

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：たんぱく質と膜が造る細胞内物流システム

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

吉森 保 (大阪大学微生物病研究所 教授)

主たる共同研究者

天野 敦雄 (大阪大学大学院歯学研究科 教授)(平成16年4月～)

3. 研究内容及び成果

真核細胞の内部に存在する膜オルガネラの多くは、物流のネットワークを形成している。ネットワークは、栄養摂取などの細胞のハウスキーピング機能に加え、免疫系や神経系などの生体高次機能をも担う。ネットワークにおける輸送は、たんぱく質に制御されたメンブレントラフィックと呼ばれる複雑でダイナミックな膜の動きを介して行われる。本研究では、未だ謎の多い2つのメンブレントラフィック経路、I.オートファジー経路とII.エンドサイトーシス経路に焦点を絞り、その分子機構と生理的意義の解明を目指し以下の成果を得ている。プロジェクト開始後感染症を中心とした疾患との関わりに研究が展開し予想外の結果が得られているが、それについては平成16年度から細菌学を専門とする天野グループの参加を得たことが大きな助けとなっている。

I. オートファジー経路

オートファジーは、細胞質からリソソームへの物質輸送経路である。細胞質やオルガネラをオートファゴソームという膜構造が包み込み、リソソームと融合、内容物は消化される。我々は、オートファジーの膜ダイナミクスの実態と分子メカニズムの一部を明らかにし、ここ数年の本分野の劇的な発展に寄与してきた。本研究では、その実績を活かしさらに分子機構解明を進めると同時に、オートファジーの新たな役割を発見するに至った。

1) 対病原体オートファジーの発見

オートファジーの本来の役割は、細胞の自己成分の代謝回転などの異化作用である。我々は、細胞内侵入細菌の排除というオートファジーの新たな機能を見いだした。病原性細菌のA群レンサ球菌は非貪食系細胞の細胞質に侵入するが、通常の10倍以上の巨大なオートファゴソームが菌を包むように形成され、菌は殺される。オートファジーが代謝のみならず、一種の自然免疫としての役割を持つことが明らかになった。従来選択性は無いと考えられてきたオートファジーが、菌を特異的に感知し隔離する点でも注目される。この発見以降、様々な病原体についてオートファジーとの関係が相次いで報告され、ひとつの分野となっている。本研究代表者らはその後引き続きA群レンサ球菌の解析を行い、巨大オートファゴソーム形成機構や通常のオートファジーには不必要な制御たんぱく質の関与を突き止めた。進化の過程において生体防御に特化したオートファジーが現れたものと思われる。

2) オートファジーによる変性疾患原因たんぱく質分解の解析

遺伝子の変異などにより正しい立体構造がとれなくなったたんぱく質は、しばしば細胞内で凝集・蓄積し細胞死をもたらす。アルツハイマー病や狂牛病などの変性疾患が引き起こされる。本研究において、肝変性疾患の原因となる1-アンチトリプシンZ変異体(ATZ)がオートファジーによって特異的に分解されることが見いだされた。さらに、ハンチントン舞踏病などの神経変性疾患の

原因となる長いポリグルタミン鎖を含むたんぱく質 (polyQ) の凝集塊形成や毒性をオートファジーが抑制することも示された。PolyQがプロテアソーム活性を阻害するという報告もあり、オートファジーが神経変性疾患の抑制に果たす役割は予想以上に大きいかもしれない。以上オートファジーは、病原微生物や異常たんぱく質という細胞にとっての「招かれざる客」を排除する生体防御システムとして働いていることが本研究により判明した。

3) オートファジーの分子機構の解析

オートファジーの分子機構の理解に複数の重要な進展があった。まず、オートファゴソームが完成後微小管に沿ってダイニンモーターを使って移動すること、細胞の辺縁部で形成されたオートファゴソームが、核近傍に分布するリソソームと融合するために移動が必要であることを証明した。次に新規のオートファジーたんぱく質を2種同定し、それらがPI3キナーゼなどを共通成分とする2種類の複合体を形成し、それぞれがオートファジーを促進および抑制することを示した。さらにAtg16L複合体が、オートファゴソーム形成に必要なLC3の翻訳後修飾(ユビキチン化に類似した脂質化)の最終段階を触媒することを明らかにした。また、GFPとmRFPのふたつの蛍光たんぱく質をLC3に繋ぐことで、オートファゴソームがリソソームと融合しているかどうかを識別できるプローブを開発した。オートファジーの進行をモニターするアッセイ系として有用と考えられる。

II. エンドサイトーシス経路

エンドサイトーシス経路は、細胞外の物質を取り込みリソソームに輸送するメンブレントラフィックであるが、病原体の侵入経路でもある。

1) 歯周病菌の細胞内侵入機構の解明

人類史上最も患者数の多い慢性疾患である歯周病の原因菌 *P. gingivalis* の細胞内侵入機構の詳細を明らかにした。本菌が細胞膜の特異微小領域Lipid Raf、微小管、アクチン系系の重合・脱重合を利用し細胞内侵入を果たすことを発見した。これまで微小管はオルガネラなどの移動の「レール」として機能することは知られていたが、微小管の重合・脱重合というダイナミクスが細菌の細胞内侵入に関わるという知見は無かった。また、本菌の細胞侵入効率を決定する要因として繊毛遺伝子多型が重要であることを示した。

2) エンドソームにおける受容体ユビキチン化の解析

エンドサイトーシス経路では、ユビキチン化がリソソームへの輸送の信号でその識別はエンドソームで行われる。上皮成長因子受容体(EGFR)は細胞膜でユビキチン化され、それによりエンドソームで選別されると考えられていたが、我々はエンドソームへの輸送過程におけるユビキチン化が重要であることを見いだした。EGFRユビキチン化のE2酵素も新たに発見した。

(天野グループは、A群レンサ球菌及び歯周病菌を用いた実験を担当・支援した。)

4. 事後評価結果

4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文発表: 国内誌0件、国際誌70件。総説及び著作: 国内20件、国際12件。招待講演: 国内69件、国外14件。口頭及びポスター発表: 国内48件、海外19件。特許出願: 国内2件、海外3件。論文は内容もレベルの高いものが多く高く評価できる。CREST開始年次から次第に発表が多くなり、H18で最大になっている。研究の進展から考えると、最もリーズナブルな論文の出方である。総説、著書や国際会議、国内会議での口頭発表も多い。

特筆すべき発表論文

Nakagawa I, et al. Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science* 306, 1037-1040

(2004) 本来代謝に働くオートファジーが、細胞内に侵入した病原細菌の排除を行い生体防御システムとしても機能しているという予想外の発見を行なった。その後多数の論文が発表され活発化している「免疫オートファジー」分野創成の端緒となったエポックメイキングな研究であり、多くの総説で取り上げられまた論文に引用されている。

Ogawa M, et al. Escape of Intracellular *Shigella* from Autophagy. *Science* 307, 727-731 (2005) 赤痢菌はオートファジーによる捕獲・分解を回避する分子機構を持つことを明らかにした。オートファジー対病原体の進化上の攻防戦が明るみに出て、感染症におけるオートファジー研究の重要性がさらに明白となった。東大医科研・笹川千尋教授グループが本研究代表者との共同研究により得た成果である。

Tsuda K, et al. Molecular dissection of internalization of *Porphyromonas gingivalis* by cells using fluorescent beads coated with bacterial membrane vesicle. *Cell Struct. Funct.* 30, 81-91 (2005) 歯周病菌表面成分をコートした蛍光ビーズを用いたアッセイ系を開発し、それによって歯周病菌のエンドサイトーシス経路を介した宿主細胞内侵入の分子機構を世界に先駆け解明した。

Kamimoto T, et al. Intracellular inclusions containing mutant α_1 -antitrypsin Z are propagated in the absence of autophagic activity. *J. Biol. Chem.* 281, 4467-4476 (2006) 肝変性疾患の原因となる α_1 アンチトリプシンのZ変異体をオートファジーが特異的に分解していること、分解は変異たんぱく質が凝集塊を形成する以前に起こっていることを示した。病原体排除とこのような毒性たんぱく質排除がオートファジーの重要な機能であることが判明し、生体防御システムとしてオートファジーという概念が確立された。

4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

ここ数年の間にオートファジーの生体における重要性が次々と明らかになっている。今最もホットな分野であるオートファジー研究は我が国が世界をリードしており、本研究による病原性細菌除去機能の発見はその一翼を担う画期的なものである。機能の理解に必須である分子機構の解明も着実に進めており、今後も本分野における日本の主導的立場の維持に貢献するであろう。本研究の成果は、感染症及び変性疾患などの社会的に極めて重要な疾患群の予防・治療戦略に結びつく可能性がある。基礎科学たる細胞生物学の医学における重要性が確認される事例として意義深い。

4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

オートファジーによる病原菌排除の発見は、新たな免疫の発見として主要新聞各紙で取り上げられ反響を呼んだ。

歯周病菌の細胞内侵入機構の解明は、日本細胞生物学会が発行するCell Structure and Function誌の年間最優秀論文賞を獲得した。また歯周病菌の解析で、天野グループの加藤が第47回歯科基礎医学会学術大会で最優秀ポスター発表賞を受賞した。