

## オートファジー非依存的な Atg 遺伝子の機能

大阪大学微生物病研究所 感染病態分野

笹井 美和

### <要旨>

Atg遺伝子はオートファジーの誘導に必須の分子群であるが、この遺伝子群のオートファジー以外の機能については未解明な部分が多い。著者らはAtg遺伝子の中でもAtg8遺伝子に着目し、オートファジー以外のAtg8の機能について解析を行った。その結果、Atg8ファミリーの中でもGABARAPサブファミリーに分類されるGate-16 / GABARAPの2種の遺伝子を欠損させると細胞内LPS受容体であるCaspase-11を介したインフラマソームの活性化が亢進した。詳細な解析の結果、Gate-16/GABARAPは細胞質内に遊離しているLPSを介したインフラマソームの活性化には関与しておらず、病原体の様に膜に包まれているか膜に突き刺さっているLPSを介したインフラマソームの活性化にのみ関与していた。さらに、生体内敗血症モデルでのマウスの生存率について検討した結果、Gate-16/GABARAPは強い感受性を示した。これらの結果から、Gate-16/GABARAPは敗血症による炎症を抑制するように作用している事が示唆された。

### <背景>

オートファジーとは細胞が飢餓状態に陥った際、細胞内容を分解して栄養を得ることにより生存を維持しようとする生命現象であるが、近年、飢餓状態からの生存のためだけでなく、様々な生命現象に関与していることが報告されつつある。オートファジーが誘導される際にはAutophagy related gene (Atg) 遺伝子と総称される遺伝子群が複雑に作用し合っていることが報告されているが、著者らはこのAtg遺伝子の中でもAtg8に着目して研究を行なっている。Atg8はマウスにおいてはLC3a、LC3bからなるLC3サブファミリーと、GABARAP、GABARAPL1、Gate-16(GABARAPL2)からなるGABARAPサブファミリーの5種の分子からなっている。LC3bはオートファジーが誘導された際に隔離膜上に集積しドット状の構造体として検出されることからオートファジーが誘導された際の標識として認知されているが、GABARAPサブファミリーはオートファジーにおける機能も未だに明確ではない。著者らは細胞内寄生病原体であるトキソプラズマ原虫感染に対する感染防御機構の解析を通じて、GABARAPサブファミリーがオートファジー非依存的に病原体の排除機構に関与していることを明らかにし、Atg8のオートファジーではない多様な機能に可能性を感じた<sup>1</sup>。そこで、本研究ではAtg8の新たな機能としてインフラマソーム活性化への関与について解析を行った。

### <結果と考察>

Atg遺伝子の中でもAtg16L1の欠損マウス由来のマクロファージではLPS刺激によるIL-1 $\beta$ の産生が亢進し、DSS誘導性の炎症性腸疾患モデルでもAtg16L1欠損マウスでは高い感受性を示すことから、Atg16L1はインフラマソームを負に制御しているということが報告されており、また、細胞内寄生病原体の感染防御機構に関与しているGBPが細胞内LPSを介したインフラマソームの活性化にことが報告されたことから、細胞内LPS認識機構を介したインフラマソームの活性化におけるAtg8の機能について解析を行った<sup>2,3</sup>。Pam3で前刺激を行い細胞質内にLPSをトランスフェクションして細胞内LPS認識機構を活性化させた際に見られるIL-1 $\beta$ の産生量は、Gate-16欠損細胞で僅かに上昇し、Gate-16/GABARAP二重欠損細胞では顕著にその活性化が亢進し、その亢進度合いはAtg12欠損細胞と同等レベルであった(Fig. 1 B)。また、同様に細胞質内LPS認識機構を活性化させた際のCaspase-1とCaspase-11の活性化量についてウェスタンブロッティング(WB)法を用いて検討したところ、Gate-16/GABARAP二重欠損細胞ではこれらの分子の活性化の亢進が見られた(Fig. 1 C)。これらの結果から、Gate-16/GABARAPは細胞内LPS認識によるインフラマソームの活性化を負に制御していることが明らかとなった。以降、Gate-16/GABARAP二重欠損のことをGABARAPs DKOとする。

細胞内LPS認識による非標準インフラマソームの活性化にGABARAPsが関与していることが示唆されたことから、その作用機序を明らかにするため、様々な方法でLPSを細胞質内に入れて非標準インフラマソームを活性化させた際のGABARAPsの関与について解析を行った。その結果、電気刺激により細胞質内にLPSを移入したり(Fig. 2 B)、コレラ毒素を用いて細胞質内にLPSを移入

したり (Fig. 2C) した場合、GABARAPsは細胞質内LPSを介したIL-1 $\beta$ の産生には影響を与えなかった。感染細胞の細胞質に小胞を形成してその中で増殖することが知られているシトロバクター菌やサルモネラ菌の感染を行った際にみられる非標準インフラマソームの活性化については、GABARAPs DKO細胞で亢進していた(データ非掲載)ことから、GABARAPsは膜に包まれた状態か膜に突き刺さっている状態のLPSを介した非標準インフラマソームの活性化に関与していることが示唆された。

最後に、生体内炎症でのGABARAPsの影響を明らかにするため、敗血症モデルを行った。Poly(I:C)を先に投与した後にLPSを投与するとTLR4を介した炎症ではなく、Caspase-11を介した非標準インフラマソームを介した炎症が引き起こされることが知られている<sup>4</sup>。そこで非標準インフラマソームを介した生体内炎症にGABARAPsが影響を与えるかどうかを検討した。その結果、野生型マウスが死亡しない程度の炎症を誘導すると、GABARAPs DKOマウスは顕著に生存率が低下した (Fig. 3B)。LPS投与後3時間後の血中のサイトカイン量について検討した結果、IL-1 $\beta$ やIL-6といった炎症性サイトカインの産生はGABARAPs DKOマウスにおいて顕著に増加していた (Fig. 3C)。これらの結果から、GABARAPsは低濃度LPS刺激による敗血症を負に制御していることが明らかとなった。

これらの結果から、GABARAPsは細胞質内LPSの中でも膜に包まれた状態のLPSを介したCaspase-11依存的な非標準インフラマソームを負に制御していることが明らかとなった。著者は先の研究でIFN誘導性GTPase群の中でもGBPsの細胞内局在がGABARAPsにより制御されていることを明らかにしており<sup>1</sup>、さらにGBPsは非標準インフラマソームの活性化に関与していることが報告されている<sup>3</sup>。GBPsは細胞内LPSを含む小胞からLPSを引き離すと考えられているが<sup>5</sup>、その仮説が正しければGBPsの細胞内局在が異常であるGABARAPs DKO細胞ではGBPsは機能できず、膜に包まれたLPSを介した非標準インフラマソームの活性化は引き起こされないと想定される。しかし、今回の解析によりGABARAPsが欠損した細胞では膜に包まれたLPSを介した非標準インフラマソームはより亢進しており、GBPsは細胞内小胞膜上のLPSを小胞から引き離すようには機能していない可能性が高い。著者らはGABARAPs DKOで見られている非標準インフラマソームの活性化亢進がGBPs依存的である予備的な結果を既に得ており、今後、GABARAPsがどのように作用することによりGBPs依存的な非標準インフラマソームを負に制御しているのか解析を進めていく。

1 Sasai, M. *et al.* Essential role for GABARAP autophagy proteins in interferon-inducible GTPase-mediated host defense. *Nat Immunol* **18**, 899-910, doi:10.1038/ni.3767 (2017).

2 Saitoh, T. *et al.* Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production. *Nature* **456**, 264-268, doi:10.1038/nature07383 (2008).

3 Meunier, E. *et al.* Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. *Nature* **509**, 366-370, doi:10.1038/nature13157 (2014).

4 Kayagaki, N. *et al.* Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* **479**, 117-121, doi:10.1038/nature10558 (2011).

5 Santos, J. C. *et al.* LPS targets host guanylate-binding proteins to the bacterial outer membrane for non-canonical inflammasome activation. *EMBO J* **37**, doi:10.15252/embj.201798089 (2018).