

京都大学	博士（医学）	氏名	曳地京
論文題目	Guanylate-Binding Protein 1 Regulates Infection-Induced Autophagy through TBK1 Phosphorylation Guanylate-Binding Protein 1 はTBK1 のリン酸化を介して感染誘導性のオートファジーを制御する		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>選択的オートファジーの一種であるゼノファジーは、上皮細胞内に侵入した病原細菌を分解する。A群レンサ球菌（GAS）は分解対象の代表的菌種であり、侵入時に菌の溶血毒素SLOによる膜損傷、および宿主の糖鎖結合タンパク質galactin-3による損傷膜認識がトリガーとなってゼノファジーが誘導される。その後何らかの機構でリン酸化されたTBK1がp62などのアダプタータンパク質を菌体へ局在化させることでオートファゴソームが菌体を捕捉し分解する。しかし損傷膜の認識からTBK1リン酸化に至る経路は不明であり、ゼノファジー誘導機構の包括的な理解には至っていない。</p> <p>本研究ではこの不明経路の候補分子としてGuanylate-binding Protein (GBP) ファミリーに着目した。GBPファミリーは病原細菌排除への寄与、及びマウスマクロファージでのgalactin-3との相互作用やp62の局在促進作用が報告されている。しかしTBK1リン酸化への関与およびGASに対するゼノファジーへの関与は不明であった。</p> <p>そこでまず、GASに対するゼノファジーへの関与を検証した。HeLa細胞にオートファゴソームマーカーLC3BとGBPファミリーを発現させGASを感染させたところ、GASを取り囲むオートファゴソームへGBP1・2・4が局在した。中でもGBP1の局在率が高かったことからより詳細な検証を行なった。</p> <p>GBP1はGTPase活性を有し、かつC末端に脂質修飾されるCAAXモチーフを有する。本研究での検証により、これらの機能がGASへの局在に必要であることが示された。さらに、SLOを欠損したGASにGBP1は局在せず、galactin-3ノックアウト (KO) 細胞でもGASへの局在が減少した。この結果から、GASによる膜損傷および宿主による認識が、GBP1をGASへ局在させることが示された。</p> <p>次に、GASに対するゼノファジーへのGBP1の関与を検証した。GBP1KO細胞ではオートファゴソーム形成率が有意に減少し、GBP1の強制発現により回復した。しかし、菌体へ局在しないGTPase活性不全変異体やCAAX欠損変異体では回復しなかったことから、GBP1がGASへの局在依存的にゼノファジーを制御することが示された。</p> <p>次にGBP1のゼノファジー制御機構を検証した。GBP1KO細胞におけるゼノファジー誘導分子の動態を観察したところp62のGAS局在が減少し、GBP1の強制発現で回復した。一方、先述した菌体へ局在しない変異体ではp62の局在は回復しなかった。この結果より、GBP1がGASへの局在と同様にGTPase活性およびC末脂質修飾依存的にp62をリクルートすることが示された。</p> <p>次にリン酸化されたTBK1がp62の局在を促進することに着目して、GAS感染によるp62局在の制御経路を検証した。GAS感染時のリン酸化TBK1を定量したところ、GBP1KO細胞では野生型細胞と比較して有意に減少した。菌体周囲へのリン酸化TBK1局在も有意に減少し、GBP1強制発現によって回復した。これらの結果からGBP1がTBK1のリン酸化促進を介してp62の局在を制御し、ゼノファジーを促進することが示唆された。</p> <p>このリン酸化促進機構としてGBP1-TBK1相互作用の可能性を考え検証したところ、免疫沈降法で相互作用が検出された。またGBP1の各種欠損変異体を用いた検証により、GBP1はTBK1と幅広い領域で相互作用することが示唆された。</p> <p>これらの結果から、GBP1によるゼノファジー制御機構が明らかとなった。</p>			

（論文審査の結果の要旨）

ゼノファジーは上皮細胞に侵入した病原細菌を分解し、免疫応答として機能する。A群レンサ球菌（GAS）は分解対象の代表的菌種であり、GASによる膜損傷を宿主が認識することに起因するゼノファジー誘導経路が報告されている。また、菌体とオートファゴソームを架橋するアダプタータンパク質の局在誘導にTBK1リン酸化が重要であることが明らかになっている。しかし、膜損傷認識からTBK1リン酸化、アダプタータンパク質の局在誘導に至る経路は不明な点が多い。

本研究ではIFN発現誘導性の抗病原細菌分子GBP1に着目し、GBP1がGASに対するゼノファジーを制御すること、かつ膜損傷認識からTBK1リン酸化に至る経路で機能することを明らかにした。GBP1はgalactin-3依存的にGAS周囲へ局在し、ゼノファジーを促進することを示した。また、GBP1はTBK1と相互作用しており、そのリン酸化を促進することでアダプタータンパク質p62をGAS周囲へと局在化させ菌体の分解を誘導することを示した。

以上の研究は、ゼノファジー誘導経路において未解明であった、膜損傷からTBK1リン酸化をつなぐことでゼノファジーの包括的な理解に貢献し、細菌感染時における免疫機構の解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和4年11月25日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降