

氏 名 山口 ひとみ

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1065 号

学位授与の日付 平成 19 年 3 月 23 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Membrane dynamics and molecular mechanism of
autophagic elimination of Group A *Streptococcus*

論文審査委員	主 査 教授	荒木 弘之
	助教授	平田 たつみ
	助教授	鈴木 えみ子
	助教授	深川 竜郎
	教授	大隅 良典

論文内容の要旨

Autophagy is an intracellular bulk degradation system, participating in protein turnover and in the biogenetic management in starvation conditions. The process involves dynamic membrane rearrangement. Initially, a cup-shaped isolation membrane surrounds a portion of the cytoplasm and organelles. The isolation membrane is sealed by fusion between the tips, forming a double membrane bound organelle, autophagosome, which is then fused with lysosomes. After the fusion, the inner membrane of autophagosomes and the sequestered cytoplasmic components are degraded in the lysosome lumen. Recently, it was reported that *Streptococcus pyogenes* (also known as Group A streptococci, GAS) that invades the cytoplasm of host cells were effectively eliminated by autophagic machinery. GAS is a serious gram-positive human pathogen that causes a variety of infections including pharyngitis, impetigo, acute rheumatic fever and post streptococcal glomerular nephritis. These infections, as well as the manifestations of invasive disease include streptococcal toxic shock syndrome and necrotizing fasciitis. GAS has ability to efficiently invade various types of non-phagocytic cells by exploiting the cellular endocytic machinery. By secreting a cytolysin SLO (Streptolysin O), which binds cholesterol and permeabilize the membrane, GAS escapes from endosomal lumen to the cytoplasm. However, it is captured by membrane-bound compartments bearing LC3, which is a specific marker protein for autophagosomes, and killed after fusion of the compartments with lysosomes. Formation of the membrane-bound compartments containing GAS is dependent on autophagy-related protein Atg5, a core component of autophagy. Together with the presence of LC3, GAS is considered to be captured by autophagosome-related structures. Thus, the structure was named GAS-containing autophagosome-like vacuoles (GcAVs) and the specialized autophagy process was designated GAS autophagy. These results provide new insights into the mechanisms and roles of autophagy in higher eukaryotes. Although the starvation-induced canonical autophagy has been considered as non-selective, GcAVs induced by GAS invasion selectively engulf the bacteria. Furthermore, the GcAVs have diameters of about 10 μm , which are about ten times as large as canonical autophagosomes. This study focused on how such a large autophagosome is formed.

Careful observation of membrane dynamics in GcAVs formation at an ultrastructural level revealed that multiple isolation membranes emerge close by the cytoplasmic GAS. Electron microscopy of serial sections suggested that fusion between the individual isolation membranes accounts for formation of large GcAVs. After successful completion of the GcAVs, these structures underwent homotypic fusion, resulting in larger GcAVs. First GcAVs arose as chain-like structures, which reflect the original morphology of the streptococcal chain. Then, they fused with each other to form a bunch of grape-like structures, and then progressively formed into a single semi-spherical structure containing several streptococcal chains. The process may

contribute to the effective sequestration and killing of the pathogen.

Expression of GDP-bound constitutive-inactive form Rab7, Rab7T22N, blocked GcAVs formation. Rab7 is required for fusion between canonical autophagosomes and lysosomes but not for canonical autophagosome formation *per se*. In the cells expressing Rab7T22N the isolation membranes were successfully formed near GAS, although they failed to form GcAVs. Thus, it is possible that Rab7 is involved in these fusion events required for GcAV formation. Since Rab7 is unnecessary for canonical autophagosome formation, the finding demonstrates the existence of a distinct molecular basis for an autophagy system specialized for bacterial elimination.

Finally, the membrane supplier for the large GcAVs was searched. In response to GAS infection and/or GcAVs formation, Golgi stuck disappeared, implying that the massive membrane efflux happened. At this time, microtubules were intact in GAS-infected and GcAVs bearing cells. Furthermore autophagy-related protein Atg9L1, a sole trans membrane protein transferred to GcAVs from the Golgi apparatus. Finally, the traffic of Golgi lipid marker, C6-NBD-ceramide to GcAVs occurred. Thus, it is proposed that the Golgi apparatus supplies membrane for GcAVs.

In summary, distinct membrane dynamics and molecular mechanisms in the specialized autophagy used for killing intracellular GAS were revealed in this study. Pathogens have been developing the means and ways to evade the host defense mechanism, while the host cells have also evolved to counter the strategies of pathogens, employing distinct molecular mechanism from canonical autophagy. This study is the first example of a specialized or variant autophagy that involves additional molecular mechanisms to establish a microbicidal process.

オートファジーは、真核生物において非特異的に細胞質成分の分解を行なう過程として見つかった。さらに最近の研究から、細菌感染の防御にも関与していることが分かった。通常のオートファジーでは、直径 0.5~1 μm のオートファゴソームを形成するが、細菌が感染した際には 10 μm にもおよぶ大きなコンパートメントが菌を包み込む。この2つのオートファジーが同じ機構で行なわれているかは疑問であった。

山口ひとみさんは、Group A *Streptococcus* (GAS) が細胞内に侵入した際にできる大きな膜で囲まれた構造である GAS-containing LC3 positive Autophagosome-like Vacuoles (GcAVs) 形成の過程を通常のオートファジーと比較しながら調べた。蛍光標識したオートファゴソームのマーカータンパク質の蛍光顕微鏡観察と免疫電子顕微鏡観察により、細胞内に侵入した GAS の近傍に複数の隔離膜が形成され、それらが融合し GAS を包み込み、GcAVs が出来ることを明らかにした。また、ライブセルイメージング法を用いて GcAVs 形成過程を経時的に観察したところ、隔離膜が融合し GcAVs が形成した後も、GcAVs が融合を繰り返しながらさらに大きな GcAVs となることが分かった。

GcAVs 形成では膜の融合が起こることから、山口さんは膜の融合に関与する Rab7 について調べた。通常のオートファジーでは、閉じたオートファゴソームがリソゾームに融合する成熟過程に Rab7 が必要である。GAS 感染の際に Rab7 のドミナントネガティブ変異 (Rab7T22N) を発現させると、隔離膜の形成は阻害されないが、GcAVs の形成が阻害されることが分かった。また、Rab7 は GcAVs 及び GcAVs 形成前の隔離膜にも局在していた。これらのことから、GcAVs の形成には通常のオートファゴソーム形成とは異なり、Rab7 が必要であると結論している。

次に山口さんは、GcAVs の膜の由来について調べた。GAS を感染させた後、オルガネラの変化を調べたところ、GcAVs の形成した細胞ではゴルジ体の層構造が壊れ、断片化したゴルジ体構造の残骸が分散していることが分かった。また、通常のオートファゴソーム、ゴルジ体、late endosome に局在する Atg9L1 も GcAVs に局在した。一方、ゴルジ体の形態維持には微小管が重要であるが、感染前と微小管の形態は変らなかった。蛍光標識したセラミドを細胞と混ぜると代謝され、代謝された蛍光標識脂質はまずゴルジ体に蓄積し、その後細胞表層へと運ばれる。そこで、蛍光標識脂質をゴルジ体に蓄積させ GAS を感染させたところ、ゴルジ体の脂質は GcAVs に観察されるようになった。これらのことは、GcAVs の膜脂質が、ゴルジ体から供給されていることを示唆している。

本研究は、GAS 感染により生ずる GcAVs の生成過程を詳細に調べた初めての報告であり、Rab7 ドミナントネガティブ変異を用いることにより GcAVs が通常のオートファジーとは異なることを明確に示している。また、ゴルジ体が GcAVs の脂質供給源であるということを初めて強く示唆したものである。以上のことは、オートファジー研究に新たな道筋をつけるものであり、また関連分野への寄与も大きく、本論文が学位授与の要件を十分満たすものと審査員一同判断した。