



TITLE:

FBXO2/SCF ubiquitin ligase complex directs xenophagy through recognizing bacterial surface glycan( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Yamada, Akihiro

---

CITATION:

Yamada, Akihiro. FBXO2/SCF ubiquitin ligase complex directs xenophagy through recognizing bacterial surface glycan. 京都大学, 2022, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2022-01-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k23605>

RIGHT:

京都大学	博士（医学）	氏名	山田 朗 寛
論文題目	<b>FBXO2/SCF ubiquitin ligase complex directs xenophagy through recognizing bacterial surface glycan</b> (SCF <sup>FBXO2</sup> ユビキチンリガーゼ複合体は細菌の表層糖鎖を認識することでゼノファジーを誘導する)		
(論文内容の要旨)			
<b>【諸言】</b> 細胞内へ侵入した病原性細菌に対して、宿主は細菌をユビキチンで標識することで選択的にゼノファジー（微生物に対するオートファジー）により排除する。このユビキチン化を担うリガーゼは複数報告されているが、ユビキチンリガーゼがどのように細菌を認識するかは明らかになっていない。今回の研究では、ヒトの病原性細菌である A 群レンサ球菌に対するユビキチン化機構に着目し、菌体表層の糖鎖がユビキチン標識とゼノファジー誘導に関与すること、そしてこの糖鎖を認識するユビキチンリガーゼを同定し、ゼノファジー誘導に必須であることを明らかにした。			
<b>【結果】</b> <b>1. GAC 側鎖 GlcNAc は A 群レンサ球菌のユビキチン化とゼノファジー誘導に関与する</b> A 群レンサ球菌は菌体表層に種特異的な糖鎖構造を有することから、この表層糖鎖 (Group A Carbohydrate, GAC) の生合成に関わる遺伝子 ( <i>gacA-gacL</i> ) の欠失変異体を作製し、感染時のゼノファジー誘導率を解析した。その結果、糖鎖側鎖 (GlcNAc) の生合成に関わる <i>gacI, J, K, L</i> の欠損変異株の感染では、ゼノファジーの誘導率が低かった。さらに、GlcNAc 側鎖の生合成に必須な <i>gad</i> の遺伝子欠損変異株は、細胞内においてユビキチンで標識される割合が野生株に比べて半減していた。これらの結果から、GlcNAc が A 群レンサ球菌に対するユビキチン化標識とゼノファジー誘導に関与していることが示唆された。			
<b>2. FBXO2 は GAS の GlcNAc を認識する</b> A 群レンサ球菌に対するユビキチンリガーゼを明らかにするため、SCF ユビキチンリガーゼ複合体の構成要素である糖鎖結合型 F-box タンパク質 (FBXO2, FBXO6, FBXO27) に着目し、局在を解析した結果、FBXO2 が最も高頻度で A 群レンサ球菌周囲にリクルートしていた。さらに、FBXO2 の糖鎖認識に関わるアミノ酸残基の変異により、細胞内の菌へのリクルートと <i>in vitro</i> での菌への結合が消失した。これらの結果から、FBXO2 は GlcNAc を介して A 群レンサ球菌を認識していることが示唆された。			
<b>3. FBXO2 はゼノファジーに関与する</b> ゼノファジーにおける FBXO2 機能を明らかにするために、 <i>FBXO2</i> ノックアウト (KO) 細胞を作成した。 <i>FBXO2</i> KO 細胞では、ユビキチンの菌へのリクルート率とオートファゴソームの形成率が減少し、殺菌効率も低下した。さらに、ノックアウト細胞に <i>FBXO2</i> の発現を相補することでユビキチンの菌へのリクルート率とオートファゴソームの形成率は回復し、この回復は糖鎖認識できない <i>FBXO2</i> 変異体では認められなかった。この結果から、 <i>FBXO2</i> は糖鎖認識を介して A 群レンサ球菌のユビキチン標識とゼノファジー誘導に関与することが示された。			
<b>4. SCF<sup>FBXO2</sup> はゼノファジーに関与する</b> <i>FBXO2</i> は SKP1, CUL1, ROC1 と共に複合体 (SCF 複合体) を形成して基質認識に機能することから、他の SCF 構成要素の機能についても siRNA ノックダウン試験で検証したところ、これらのノックダウ			

ンによりゼノファジー誘導が有意に阻害された。さらに、FBXO2 依存的な SKP1, CUL1, ROC1 の菌への局在化が認められた。以上の結果から、FBXO2 を基質認識因子とする SCF ユビキチンリガーゼ複合体 (SCF<sup>FBXO2</sup>) は A 群レンサ球菌のユビキチン標識とゼノファジー誘導に関与することが明らかになった。

**【結論】**  
 A 群レンサ球菌感染に対して、菌種特異的な GAC 側鎖構造を宿主の SCF<sup>FBXO2</sup> が直接認識し、ユビキチン化を制御することで、ゼノファジーを誘導することが示された。今回の知見は、ユビキチンを介した炎症応答や細胞死誘導等の生体防御反応においても、ユビキチン化酵素による直接的な菌体認識により活性化する可能性と、その仕組みを解明するための重要な手掛かりになると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)  
 選択的オートファジー (ゼノファジー) は、自然免疫機構の一つとして、宿主細胞において細胞内侵入細菌に対して働く。ゼノファジーにおける細菌認識機構を解明することは、ゼノファジーの制御機構や病原体の有する病原因子の特性を理解するために重要であるが、A 群レンサ球菌 (GAS) については未だ不明な点が多い。

本研究では、GAS が感染した際に宿主細胞のゼノファジーがどのように認識するかを、細菌、宿主双方からアプローチし解明した。GAS に対するゼノファジーがユビキチン依存的であることを示した上で、GAS 表層糖鎖 (GAC) が標的となって GAS へユビキチン化やゼノファジーが誘導されていること、GAC を認識する宿主因子は糖鎖結合型タンパク FBXO2 であることを解明した。また、GAC と FBXO2 が GAS の細胞内生存性を決定しているを示した。これらの結果から、FBXO2 が自身の糖鎖認識ドメインを介して GAC を認識し、これをトリガーに FBXO2 と共に形成される SCF ユビキチンリガーゼ複合体がゼノファジーを誘導することで GAS を殺菌していることを解明した。

以上の研究は A 群溶血性レンサ球菌感染症の発症機構および病原細菌に対する選択的ゼノファジー機構の解明に貢献し、ゼノファジーを利用した新規感染症治療法の開発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 3 年 11 月 26 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