



TITLE:

Guanylate-Binding Protein 1 Regulates
Infection-Induced Autophagy through TBK1
Phosphorylation(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Hikichi, Miyako

CITATION:

Hikichi, Miyako. Guanylate-Binding Protein 1 Regulates Infection-Induced Autophagy through TBK1 Phosphorylation. 京都大学, 2023, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2023-01-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k24315>

RIGHT:

Authors retain the copyright of their manuscripts, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited. The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations. The submitting author is responsible for securing any permissions needed for the reuse of copyrighted materials included in the manuscript.

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>			

<p>（論文審査の結果の要旨）</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>

要旨公開可能日： 年 月 日以降