

リン酸化クラスリンが作る細菌のアクチンエレベーター

千葉大学大学院医学薬学府修士課程 2 年 阿部 紘平

Clathrin phosphorylation is required for actin recruitment at sites of bacterial adhesion and internalization

Matteo Bonazzi, Lavanya Vasudevan, Adeline Mallet et al.

The Journal of Cell Biology, **195**, 525-536 (2011)

受容体は自身の活性による clathrin-coated pit の形成後くびり切られた clathrin-coated vesicle に乗ってエンドサイトーシスされる。この時、受容体により活性化された Src 型チロシンキナーゼ (SFKs) によって clathrin heavy chain (CHC) のチロシン残基がリン酸化される。また細菌が細胞に侵入する際に宿主細胞の clathrin を必要とすることが知られているが、clathrin-coated vesicle は細菌ほど大きな小胞を形成することはできない。細胞非侵入性の腸管病原性大腸菌 (EPEC) は感染時にアクチン台座を形成することで細胞に強固に付着するが、このアクチン台座形成に clathrin を必要とする。細菌の細胞への感染における clathrin とそのチロシンリン酸化の役割について解析するために、著者らは3つの異なる感染モデルを用いた以下 1-6 の実験を行った。

1. まず細菌の宿主細胞への感染時に CHC のチロシンリン酸化を伴うことを確認した。細胞非侵入性菌株の *Listeria innocua* に侵入因子 Internalin A (InlA、E-cadherin を介する経路) または InlB (Met を介する経路) を発現させた *L. innocua* (InlA)、*L. innocua* (InlB) を上皮細胞に感染させると、特に *L. innocua* (InlA) を感染させたときに CHC のチロシンリン酸化は強く検出され、それは InlA の処理によっても観察された。非侵入性の EPEC の感染においても CHC のチロシンリン酸化は強く検出された。

2. 以前、著者らは CHC のチロシン 1477 が SFKs によるリン酸化サイトであることを同定したが、精製した Src と clathrin のペプチド断片を *in vitro* で反応させることで、チロシン 1487 も SFKs によってリン酸化され得ることが質量分析法によってわかった。チロシン 1477、1487 リン酸化ペプチドに対する抗体を作製し、感染細胞におけるチロシンリン酸化 clathrin の局在を観察したところ、宿主細胞の細菌との接着面でチロシンリン酸化 CHC と F-actin のリクルートメントが観察された。

3. そこで CHC のチロシンリン酸化が細菌の侵入やアクチン台座の形成に重要なのではと考え、内在性の CHC を siRNA によりノックダウンし、そこへ CHC WT または CHC Y1477, 1487F 変異体を戻すレスキュー実験を行った。細菌の侵入やアクチン台座形成には CHC のチロシンリン酸化が必要であることが示唆された。

4. Clathrin-coated vesicle では細菌ほど大きなもののエンドサイトーシスはできない。細菌の細胞内部への移行に clathrin がどのように関わるか調べるために、電子顕微鏡を用いて感染部位の超微細構造を観察した。細胞に侵入した細菌の周囲の細胞膜では clathrin-coated pit が観察された。このことから細菌は宿主細胞内で clathrin-coated pit 形成を引き起こすと考えられる。また EPEC の感染において、アクチン台座の周囲に clathrin-coated pit が多く存在することを電子顕微鏡写真で示した。著者らはこれらの

ことから、安定な構造物である clathrin-coated pit が actin 骨格再編成の基盤を担っているのではないかと推察している。

5. 次に、細菌の感染において clathrin-coat による actin 骨格再編成に関与しそうなタンパク質の候補を挙げて解析した。巨大な clathrin 格子を形成するのに関与する clathrin のアダプタータンパク質 Dab2 と、clathrin-coat での actin 動態に重要な Hip1R は、*L. innocua* (InlA)と *L. innocua* (InlB)の細胞への侵入部位で actin と共局在し、また EPEC の感染においては EPEC とアクチン台座との間に存在した。Dab2 はモータータンパク質である Myosin VI と結合することで clathrin を介したエンドサイトーシスを制御することが知られているため、Myosin VI の局在を観察したところ、Dab2 と同様に細胞への侵入部位で actin と共局在したが、EPEC の感染では Myosin VI の集積は観察されなかった。

6. Clathrin-coat 形成から actin 骨格再編成に至るまでの分子機構を調べるために、Dab2、CHC、clathrin light chain (CLC)、Myosin VI、Hip1R それぞれのノックダウンによる他のタンパク質のリクルートメントへの影響を観察した。この結果から、Dab2 によって CHC と Myosin VI がリクルートされ、CHC に CLC が結合し、CLC により Hip1R が、Hip1R により actin がリクルートされることが示唆された。Myosin VI ノックダウンは関連するタンパク質のリクルートメントに影響を示さなかったが、細菌の侵入を障害した。また CHC のチロシンリン酸化は CHC より下流のタンパク質のリクルートメントに必要であった。

以上のことから、次のモデルが提唱された。宿主細胞では細菌の接着部位に Dab2、そして CHC がリクルートされる。SFKs による CHC チロシンリン酸化によって clathrin-coat が蓄積し、そこへ Hip1R を介して actin がリクルートされる。このことにより、EPEC などの細胞非侵入性細菌の場合にはアクチン台座が形成され、また InlA や InlB を介した細胞侵入性細菌の感染においては、Dab2 に結合した Myosin VI が actin 上を移動することで細菌を細胞内へ移行する。

この論文では clathrin のチロシンリン酸化が細菌の細胞内侵入に重要な役割を果たすことが示された。そしてその細菌の侵入は clathrin-coated vesicle を介したエンドサイトーシスによるものではないことが示唆された。非侵入性細菌でも同様のプロセスを経て actin 骨格再編成を起こすことも示されたため、細菌が宿主細胞に感染するために広く用いられている経路なのかもしれない。

