

令和 2 年 4 月 9 日現在

機関番号：35408

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15181

研究課題名（和文）新規内因性リガンドによる感染非依存の免疫活性化機構の解析

研究課題名（英文）Infection-independent immunity mediated by a novel endogenous Toll ligand Spz5

研究代表者

野中 さおり（Nonaka, Saori）

安田女子大学・薬学部・助教

研究者番号：40767787

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ショウジョウバエにおいて、Tollの新規内因性リガンドSpz5は、既知のTollリガンドSpzとは異なり、プロテアーゼによる切断を受けずにTollリガンドとして働くこと、Spz5-Tollの下流ではdMyd88が情報伝達分子として働くことがわかった。しかし、当初の予想に反して、ショウジョウバエ幼虫をピンセットでつまむと抗菌ペプチドが産生されるといふ申請者のグループが独自に開発した感染非依存の免疫の異常活性化のモデル系へのSpz5の関与は示せず、感染非依存の免疫活性化機構の全容は解明はできなかった。その代わりに、Spz5はSpzと協調して、ショウジョウバエの正常な個体発生に働くことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初の予定であった感染非依存の免疫の異常活性化の仕組みは示せなかったが、本研究により、Spz5が既知のTollリガンドSpzと協調して個体発生に関わるという新たな発生に関わる経路が見つかったと言える。さらに、ショウジョウバエのTollがその哺乳類counterpartであるToll-like受容体と同じようにマルチリガンド性をもつことが初めて示された。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that Spz5 works as a Toll ligand without cleavage by protease in *Drosophila* although Spz, a famous Toll ligand, needs activation by protease. And, dMyd88 was identified as a signal transducer in the downstream of Spz5-Toll. However, we couldn't show the requirement of Spz5 in infection-independent expression of antimicrobial peptides in larvae after pinching, and the mechanism of infection-independent immunity remains unclear. Instead of that, we showed genetic interaction between Spz5 and Spz in the developmental process of *Drosophila*.

研究分野：自然免疫

キーワード：Spz5 Toll ショウジョウバエ 自然免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者の研究グループは、ショウジョウバエの幼虫をピンセットでつまむだけで感染時と同程度の抗菌ペプチドの産生が行われることを発見し、これを感染非依存の免疫の異常活性化のモデルとして、その仕組みの解明に取り組んできた。その過程で、この現象に関わる有力候補として、自然免疫の受容体 Toll の新規内因性リガンド Spz5 を特定した。しかし、*in vivo* でこの分子が感染非依存の免疫の異常活性化に関わるかどうか、及びこの時の Spz5-Toll 下流の情報伝達経路、Toll に作用する時の Spz5 の構造は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の3つを明らかにすることである。

in vivo で Spz5 が感染非依存の免疫の異常活性化に関わるかどうか、またはその他の *in vivo* における役割

Spz5-Toll 下流の情報伝達経路

Toll に作用する時の Spz5 の構造

3. 研究の方法

in vivo で Spz5 が感染非依存の免疫の異常活性化に関わるかどうかの検証または、その他の *in vivo* における役割の探索

CRISPR-Cas システムを用いて Spz5 の遺伝子変異ショウジョウバエを作製し、その幼虫をピンセットでつまんだ後、4 h 後の抗菌ペプチド Drosomycin の発現レベルを RT-qPCR で調べ、野生型に比べてそのレベルが抑制されるかを調べた。その他の *in vivo* における Spz5 の役割の探索では、Spz5 が細菌感染時の抗菌ペプチド産生及び、個体発生に必要とされるかを調べた。前者については、グラム陽性菌の *Staphylococcus saprophyticus* 及び、グラム陰性菌の *Ecc15* を野生型または *spz5* 遺伝子変異体に注入感染後、24 h または 16 h 後における抗菌ペプチド (*S. saprophyticus* 感染時: Drosomycin, *Ecc15* 感染時: Diptericin) の発現レベルを RT-qPCR で調べた。発生の解析では、*spz5* 遺伝子変異体、既知の Toll リガンド *spz* の遺伝子変異体及び、*spz5* と *spz* の二重変異体について、成虫まで成長した割合を調べた。

Spz5-Toll 下流の情報伝達経路の解明

既知の Toll リガンド Spz の作用時、Toll の下流では dMyd88 が情報伝達分子として働き、抗菌ペプチド Drosomycin の発現を誘導する。そこで、この分子を候補として、まず、*Drosomycin* プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子につなげた遺伝子をもつレポーター細胞 (以下、*Drosomycin* レポーター細胞) に dMyd88 の RNAi を誘導した。そして、RNAi 誘導で、Spz5 外来発現細胞の抽出液添加時における *Drosomycin* プロモーターの活性化が抑えられるかをルシフェラーゼアッセイで調べた。

Toll に作用する時の Spz5 の構造の解明

Spz5 は神経栄養因子として Toll-6 のリガンドとなる時は、Furin と呼ばれるプロテアーゼによる切断を必要とする。そこで、Toll リガンドとして働く時もこのような切断が必要であるかを調べるために、まず、アミノ酸置換により Furin 結合サイトを欠いた Spz5 を外来発現させた細胞を作製した。そして、その細胞抽出液を *Drosomycin* レポーター細胞に添加した際の *Drosomycin* プロモーターの活性化レベルをルシフェラーゼアッセイにより調べた。

4. 研究成果

in vivo で Spz5 が感染非依存の免疫の異常活性化に関わるかどうかの検証及び、その他の *in vivo* における役割の探索

spz5 遺伝子変異体の幼虫をピンセットでつまんだ時、野生型と比べて抗菌ペプチドの発現レベルが減少しなかった。つまり予想に反して、Spz5 はこのモデル系で見られる感染非依存の免疫の異常活性化には関与しないと考えられた。さらに、グラム陽性菌及びグラム陰性菌を感染させた時の抗菌ペプチドの発現レベルも *spz5* 遺伝子変異体は野生型と同程度であり、細菌感染時の抗菌ペプチド産生への関与も示せなかった。一方、*spz5* 単独の遺伝子変異体ではすべての個体が成虫になったのに対し、*spz* と *spz5* の二重変異体では *spz* 単独の遺伝子変異体よりもさらに成虫になる割合が減少することがわかり、Spz5 は Spz と協調して正常な個体発生の進行に働くと考えられた。

Spz5-Toll 下流の情報伝達経路の解明

dMyd88 の RNAi を誘導した *Drosomycin* レポーター細胞では、Spz5 の外来発現細胞の抽出液添加時における *Drosomycin* プロモーター活性の上昇が阻害された。よって、dMyd88 は Spz5-Toll 下流の情報伝達分子であると考えられた。

Toll に作用する時の Spz5 の構造の解明

Furin 結合サイトを欠いた Spz5 を外来発現させた細胞抽出液にも、*Drosomycin* プロモーター

ーを活性化する作用が十分に見られた。Furin 結合サイトを欠いた Spz5 をウエスタンブロッティングで検出すると野生型と同じ分子質量位置にシグナルが見られた。以上より、Spz5 が Toll リガンドとして働く時は、プロテアーゼによる切断は必要なく full-length の状態で作用すると考えられた。

以上より、Toll の新規内因性リガンド Spz5 は、full-length の状態で Toll リガンドとして働くこと、Spz5-Toll の下流では dMyd88 が情報伝達分子として働くことがわかった。さらにこの経路は既知の Toll リガンド Spz と協調して、ショウジョウバエの正常な個体発生に働くことが示唆された。当初の予定であった感染非依存の免疫の異常活性化の仕組みは示せなかったが、本研究により、新たな個体発生に関わる経路が見つかったと言える。本研究成果は、*Biochem Biophys Res Commun.* 506:510-515, 2018 に掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saori Nonaka, Koichiro Kawamura, Aki Hori, Emil Salim, Kazuki Fukushima, Yoshinobu Nakanishi, and Takayuki Kuraishi	4. 巻 506
2. 論文標題 Characterization of Spz5 as a novel ligand for Drosophila Toll-1 receptor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 510-515
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.10.096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----