

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 2 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21249004

研究課題名（和文） 自然免疫におけるオートファジー誘導機構の解明

研究課題名（英文） Study of induction mechanisms of autophagy in innate immunity

研究代表者

倉田 祥一郎 (KURATA SHOICHIRO)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：90221944

研究成果の概要（和文）：

本研究は、病原体センサーが細胞内感染を認識した後に、どのようにして恒常性維持機構であるオートファジーを誘導するのか解析した。その結果、哺乳動物 p62 (SQSTM1) のショウジョウバエホモログである Ref(2)P タンパク質が、リステリア菌の細胞内感染を認識しオートファジーを誘導する病原体センサー PGRP-LE に結合する事、そして、Ref(2)P が PGRP-LE によるオートファジー誘導に必要であることが明らかとなった。さらに、PGRP-LE のオートファジー誘導に必要な機能ドメインを同定した。

研究成果の概要（英文）：

PGRP-LE, a pathogen sensor in *Drosophila*, induces autophagy after recognition of bacteria such as *Listeria* in the cytoplasm. A *Drosophila* homologue of p62 (SQSTM1) encoding by Ref(2)P was identified as a down-stream regulator showing direct binding to PGRP-LE, that is crucial for PGRP-LE-dependent induction of autophagy and host survival after Listerial infection. Moreover, a functional domain of PGRP-LE required for autophagy induction was identified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	15,100,000	4,530,000	19,630,000
2010 年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
2011 年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
年度			
年度			
総計	35,900,000	10,770,000	46,670,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：自然免疫、オートファジー、ショウジョウバエ、抗菌ペプチド、PGRP

1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエの感染防御に働く Toll 受容体の研究をきっかけに、哺乳動物の Toll 様受容体 (TLR) (Nature 1997) が病原体センサーとして同定され、当該研究

分野の大きなブレイクスルーとなった。一方ショウジョウバエでは、Toll 受容体は自己由来内因性リガンドである Spz を認識し、直接病原体を認識するセンサーの存在は

不明であった。研究代表者は、ゲノム機能を利用した変異体スクリーニングを確立し、ショウジョウバエにおいて、病原体センサーとして機能するPGRP-LEを同定した (PNAS 2002)。PGRP-LE は、グラム陰性菌などが有するジアミノピメリン酸 (DAP) 型ペプチドグリカンの特異的に認識する。そして、グラム陰性菌の感染などによって活性化される細胞内シグナル伝達系 (imd 経路) を活性化することで Diptericin などの抗菌ペプチド産生を誘導すると共に、体液中でメラニン化を誘導する (PNAS 2002)。時をほぼ同じくして、海外の研究グループから、同じ PGRP ファミリーに属する PGRP-SA が、imd 経路と異なる細胞内シグナル伝達系である Toll 経路を介して、グラム陽性菌の感染によって誘導される抗菌ペプチドの産生に関わること (Nature 2001)、また PGRP-LC が、PGRP-LE と同様に、imd 経路の活性化に関わることを示された (Nature 2002, Science 2002)。これらにより、ショウジョウバエでは PGRP ファミリーが病原体センサーとして機能することが明らかとなった。その後、研究代表者が提唱した、病原細菌の識別におけるペプチドグリカン構造の重要性が、それらの PGRP-SA, -LC でも確認された。すなわち、PGRP-SA は、PGRP-LE が認識しないリシン型ペプチドグリカンを認識し、PGRP-LC は PGRP-LE と同様に DAP 型ペプチドグリカンの認識に関わることを示された (Immunity 2004, EMBO Rep. 2005)。また、哺乳動物の病原体センサー NOD ファミリーでも同様であることから (Nature Immunol. 2003)、自然免疫におけるペプチドグリカン多様性の認識の重要性は、現在では広く認められるようになった。さらに、研究代表者は、感染抵抗性の発現に PGRP-LE と PGRP-LC が

協調的に働くことを明らかにすると共に (EMBO J 2004)、感染シグナルの活性化における PGRP-LE あるいは PGRP-LE/PGRP-LC の多量体化の重要性を明らかにした (Biochem. J 2003, JBC 2006)。この知見が鍵となり、PGRP-LE が体液中だけでなく、免疫応答細胞の膜上、そして、免疫応答細胞の細胞内においても、病原細菌構成成分の認識に関与することが明らかとなった (Nature Immunol. 2006)。この結果に呼応して、PGRP-LE の変異体では、細胞内寄生細菌であるリステリア菌に対する感染抵抗性が著しく低下することを見いだした。抗菌ペプチド産生の imd 経路の活性化に必要な転写因子 Relish の変異体の細胞でも、リステリア菌の細胞内増殖は抑制されることから、PGRP-LE が、抗菌ペプチドの産生誘導以外の機構により、リステリア菌の細胞内増殖を抑制している事が示唆された。そこで、その機構を追求したところ、PGRP-LE がオートファジーを誘導し、細胞内寄生細菌を排除していることが明らかとなった (Nature immunol. 2008)。

2. 研究の目的

オートファジーは、飢餓時の恒常性維持のために誘導される細胞内分解系として明らかにされてきた。近年、自己由来成分凝集体や、細胞内寄生細菌などの排除に重要な役割を担うことが明らかにされ、その多様な機能に注目が集まっている。PGRP-LE は、これまでにオートファジーを誘導することが示されている唯一の病原体センサーである。そこで本研究では、PGRP-LE が細菌の感染を認識し、特異的にオートファジーを誘導する分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

病原体センサーが、細胞内寄生細菌の感染を認識して、オートファジーを誘導する分子機構を明らかにするために、本研究では次の3つの研究項目を推進した。

(1) PGRP-LE に結合し、オートファジー誘導に関わるアダプター分子の同定

(2) オートファジー誘導に必要な PGRP-LE の機能ドメインの同定

(3) PGRP-LE により誘導されるオートファジーに必要な因子のゲノムワイド RNAi スクリーニング

4. 研究成果

(1) PGRP-LE に結合し、オートファジー誘導に関わるアダプター分子の同定

哺乳動物で、変性したタンパク質の分解など、選択的なオートファジーの誘導に関わる事が示されている p62 (SQSTM1) のホモログである Ref(2)P は、酵母の two-hybrid 系で PGRP-LE と相互作用することが明らかとなっている。そこで、本研究では、ショウジョウバエ細胞内で Ref(2)P と PGRP-LE が相互作用するかどうか調べるために、両者を S2 細胞で発現させ共免疫沈降を行った。その結果、PGRP-LE と Ref(2)P は、共免疫沈降されることが明らかとなり、両者はショウジョウバエ S2 細胞内で複合体を形成することが明らかとなった。さらに、免疫染色により、S2 細胞内で、感染したリステリア菌、PGRP-LE、Ref(2)P、ユビキチン化タンパク質、そしてオートファジーのマーカーである LC3 が共局在することが明らかとなった。そこで、Ref(2)P が、PGRP-LE 依存のオートファジー誘導に必要なかどうか検討するために、Ref(2)P を標的とした RNAi を行ったところ、細胞内寄生細菌であるリステリア菌の

感染で PGRP-LE 依存に起きるオートファジーの誘導が見られず、Ref(2)P が、PGRP-LE 依存のオートファジー誘導に必要であることが示された。さらに、ref(2)P の変異体では、リステリア菌の感染抵抗性が低下しており、ref(2)P が細胞内寄生細菌に対する感染抵抗性の発現に重要であることが明らかとなった。その際、ref(2)P 変異体の体液細胞内で、リステリア菌の細胞内増殖抑制が見られなかった。これらの結果は、PGRP-LE が細胞質に感染したリステリア菌を認識し、Ref(2)P タンパク質をそこに局在させることで選択的にオートファジーを誘導していることを示唆している。

(2) オートファジー誘導に必要な PGRP-LE の機能ドメインの同定

PGRP-LE がオートファジーを誘導するために必要な機能ドメインを明らかにするために、各種変異を加えた PGRP-LE 変異体を S2 細胞で発現させ、リステリア菌の細胞内増殖抑制が起きるかどうか調べた。その結果、1 アミノ酸置換によりリステリア菌の細胞内増殖抑制が解除される領域を同定した。このドメインは、リステリア菌の感染で誘導される PGRP-LE 依存のオートファジー誘導に必要であった。また、このドメインは、哺乳動物の自然免疫シグナル伝達に関わるタンパク質間相互作用ドメイン、RHIM ドメインと相同性を有していたことから、オートファジー誘導に必要なタンパク質相互作用を担うドメインであることが考えられた。PGRP-LE はリステリア菌の細胞内感染を認識した後に、オートファジーだけでなく、細胞内シグナル伝達系である imd 経路を活性化し、抗菌ペプチドの産生をも誘導する。本研究で同定したドメインは、この抗菌ペプチドの産生誘導には関

わらないことが明らかとなった。この結果は個体においても同様であり、機能ドメイン内の 4 アミノ酸を置換した PGRP-LE を、PGRP-LE 欠損変異体に発現させ、同定したドメインがオートファジーの誘導には必要であるが、抗菌ペプチドの産生誘導には必要でないことを明らかにした。一方、抗菌ペプチド誘導に必要な機能ドメインも同定されており、こちらのドメインも RHIM ドメインと相同性を有している。したがって、PGRP-LE は、それぞれオートファジー誘導と抗菌ペプチド産生誘導に必要な二つの RHIM 様ドメインを有しており、おそらくこの領域に異なるアダプター分子が結合し、オートファジーと抗菌ペプチドの産生を個別に誘導しているものと考えられた。

(3) PGRP-LE により誘導されるオートファジーに必要な因子のゲノムワイド RNAi スクリーニング

本研究では、オートファジー誘導に必要とされる因子を同定するために、ゲノムワイド RNAi スクリーニングを行った。このスクリーニングは、21,306 の転写産物に対して網羅的なノックダウンスクリーニングが可能なショウジョウバエ S2 細胞に PGRP-LE を発現させ、それぞれの転写産物特異的に RNAi を行い、細胞内寄生細菌であるリステリア菌を感染させた。RNAi により、PGRP-LE によるオートファジー誘導に必要な因子の発現が抑制されると、リステリア菌の細胞内増殖が抑制されない。したがって、リステリア菌の細胞内増殖をモニターすることで、PGRP-LE によるオートファジー誘導に必要な因子が同定できる。そのために、ルシフェリンなどの基質を添加することなくルシフェラーゼ発現に必要な全ての因子群を含む luxABCDE オペ

ロンを、宿主への感染時に活性化する hly 遺伝子のプロモーター、宿主感染と関係なく恒常的に発現する secA 遺伝子のプロモーター、および高発現リステリアプロモーター (Help: highly expressed listeria promoter) に連結し、リステリア属菌 (病原性のある *Listeria monocytogenes* は用いず、病原性が著しく低い *Listeria ivanovii*、および非病原性の *Listeria seeligeri* を用いた) にエレクトロポレーション法を用いて導入した。これにより、リステリア菌の細胞内増殖をリアルタイムで検出できる感染レポーターが確立できた。そこで、このレポーターリステリア菌を PGRP-LE を発現させた S2 細胞へ感染させ、ゲノムワイド RNAi スクリーニングを行った。現在までに、6144 遺伝子について解析を終了し、RNAi による発現抑制により、PGRP-LE 依存のリステリア菌の細胞内増殖抑制を解除する遺伝子として 11 遺伝子を同定した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 17 件)

1. Yano, T., and Kurata, S.: Intracellular Recognition of Pathogens and Autophagy as an Innate Immune Host Defense. *J. Biochem.* 150, 143-149, 2011. 査読有
2. Goto, A., Yano, T., Terashima, J., Iwashita, S., Oshima, Y. and Kurata, S.: Cooperative regulation of the induction of the novel antibacterial listericin by PGRP-LE and the JAK-STAT pathway. *J. Biol. Chem.* 285, 15731-15738, 2010. 査読有
3. Kurata, S.: Extracellular and intracellular pathogen recognition by

Drosophila PGRP-LE and PGRP-LC. Int. Immunol. 22, 143-148, 2010. 査読有

4. Yano, T., and Kurata, S. : An unexpected twist for autophagy in Crohn's disease. Nature Immunol. 10, 134-136, 2009 査読有

[学会発表] (計 57 件)

1. Kurata, S. : A receptor guanylyl cyclase mediates humoral and cellular responses in *Drosophila* immunity. 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, June 3, 2011, Nagoya
2. Kurata, S. : Recognition of intracellular bacterial infections and induction of autophagy in *Drosophila* immunity. The 2010 Gordon Research Conference on Autophagy in Stress, Development & Disease, April 28, 2010, Lucca (Barga), Italy

[図書] (計 1 件)

1. Kurata, S. : Fly immunity; recognition of pathogens and induction of immune responses (Chapter 11). Invertebrate Immunity, Kenneth Soderhall (Ed.), 61 名による執筆, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, Adv. Exp. Med. Biol. 708, 205-217, 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : センサーの分子濃度依存シグナル増幅を利用した検出方法

発明者 : 倉田祥一朗、大島吉輝、矢野環

権利者 : 国立大学法人東北大学

種類 : 特許出願

番号 : 特願 2009-160130 号
出願年月日 : 平成 21 年 7 月 6 日
国内外の別 : 国内

[その他]

ホームページ等

http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seimei/seimei_original.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉田 祥一朗 (KURATA SHOICHIRO)
東北大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号 : 90221944

(2) 研究分担者

なし ()
研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ()
研究者番号 :