

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成25年5月15日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究B

研究期間：2011～2012

課題番号：23790073

研究課題名(和文) 自然免疫系におけるエピジェネティック制御機構の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of epigenetic regulation in *Drosophila* intestinal homeostasis

研究代表者

古橋 寛史 (FURUHASHI HIROFUMI)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：60545432

研究成果の概要(和文)：

本研究では、優れた利点を併せ持つショウジョウバエモデルを用いて、腸管自然免疫・恒常性維持における新規エピジェネティック制御機構に迫ることを目的とした。腸管上皮幹細胞において、特異的な染色体修飾を人為的に減弱することで、ストレス応答遺伝子群の発現亢進が観られることを明らかにした。また、この特異的な染色体修飾の減弱により、短期的には細菌感染・ストレスに対する抵抗性の上昇が観られるものの、長期的には寿命短縮に繋がる現象が引き起こされることが示唆された。本研究結果から、腸管上皮幹細胞における特異的なエピジェネティック修飾が、ストレス応答・恒常性維持機構の適切な制御に寄与している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：

To identify novel, evolutionally conserved epigenetic mechanisms that regulate gut immunity or homeostasis, we explored chromatin modifiers involved in intestinal pathology using the *Drosophila* model system. We found that forced removal of histone H3 lysine 36 methylation (H3K36me) in intestinal stem cell (ISC)/enteroblast (EB) increases the resistance to *Pseudomonas aeruginosa* infection. However, further analyses indicated that the forced H3K36me demethylation in ISC/EB causes over-activation of oxidative stress response genes and shortens lifespan. These results suggest that H3K36me might contribute to appropriate regulation of stress responses and/or the maintenance of homeostasis in *Drosophila* intestine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：自然免疫、遺伝子発現制御、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

「内なる外」と呼ばれる腸管は、生体防御上

極めて重要な免疫器官である。例えば正常な腸管免疫は、「免疫寛容」により有用な腸内

細菌を排除せず、健全維持に必須な常在細菌叢を定着・維持する。これは獲得（適応）免疫を持つ哺乳動物に限った現象ではなく、自然免疫系のみを持つショウジョウバエなどの生物でも同様に観られる (Ryu et al., *Science*, 2007 等)。事実、常在細菌叢の定着・維持、あるいは病原菌に対する感染防御における腸管自然免疫系の関与はこれまでの様々な研究で既に明らかにされつつある。しかし、そのメカニズムには未だ謎が多い。

哺乳類とショウジョウバエの腸管には細胞学的、生理学的に高い類似性がみられる (Apidianakis and Rahme, *Disease model & Mechanisms*, 2011)。腸管上皮は幹細胞を有し、その分裂・分化によって細胞のターンオーバーが盛んに行われている組織であり、一週間ほどで新しい細胞に入れ替わる。これは哺乳類もショウジョウバエも同様であり、このイベントに関わるシグナル伝達系、自然免疫関連経路 (Jak-Stat 経路など) も非常によく保存されていることが明らかにされつつある。(Jiang et al., *Cell*, 2009 など)。最近の研究により、ショウジョウバエ組織において、エピジェネティック制御因子である Polycomb Group (PcG) タンパク質が Upd サイトカインの発現を抑制し、Jak-Stat シグナリングを制御することが示されている (Classen et al., *Nature Genet.*, 2009)。また、マウスの腸管上皮幹細胞において、PcG タンパク質の一つであるショウジョウバエ PSC のホモログが特異的に発現していることが報告されている (Sangiorgi and Capocchi, *Nature Genet.*, 2008)。このことは腸管上皮幹細胞の分裂・分化、さらにはこれらのイベントを基盤にした腸管免疫系において、「細胞記憶」の一端を担うとされるエピジェネティック制御が重要な役割を持つ可能性を示している。また、最近の研究により、獲得免疫系を持たない昆虫などの生物においても、感染刺激に対する適応反応、すなわち免疫「記憶」機構の存在が示唆されており (Rodrigues et al., *Science*, 2010 など)、「細胞記憶」に関わるエピジェネティック制御因子群が、このような免疫「記憶」にも関与することが考えられる。例えば腸管免疫系においても、細胞の入れ替わりが早い腸管組織において常在菌に対する免疫寛容システムを維持したり、あるいは病原性細菌に対する感染防御機構の維持や感染ダメージを補う正常な組織の修復に関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、上述した可能性を念頭に置き、シンプルかつ高等生物種間で非常によく保存された自然免疫系を持つショウジョウバエをモデルシステムとして解析を進めるこ

とで、腸管自然免疫系による感染防御機構、感染ダメージの修復、および免疫寛容システムに関与するエピジェネティック因子群を迅速かつ効率的に探索した。そして、その作用機序を解明することで、自然免疫系におけるエピジェネティック制御の普遍原理に迫ることを目的とした。

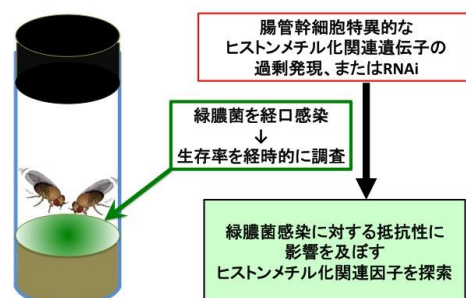
3. 研究の方法

種を超えて保存されている自然免疫系とエピジェネティック制御の両研究を迅速かつ効果的に推進するために、他では得られ難い優れた利点を併せ持ち、高度な遺伝学的解析が可能なショウジョウバエモデルを利用した。RNAi ノックダウン、あるいは過剰発現によるエピジェネティック制御関連因子群に的を絞ったスクリーニングを行い、腸管自然免疫系における普遍的なエピジェネティック制御機構の同定をねらった。

ショウジョウバエの RNAi 系統、あるいは過剰発現系統は既に網羅的に作成され、系統保存センターなどから入手できる為、これらを有効利用した。ただし、エピジェネティック制御関連因子群の多くは、胚発生・分化において必須であるため、変異体が初期発生期で致死となり、成虫器官/個体での解析が不可能な場合も多いことが予想される。そこで、飼育温度をシフトするだけで簡便かつ厳密に空間特異的な GAL4 依存発現誘導がコントロールできる温度制御型 GAL4-UAS 系を用いて、時空間特異的に RNAi/過剰発現等を誘導できるシステムを利用した。このシステムを用いることで、初期発生・器官形成過程に影響することなく、羽化後の飼育温度を 29℃ に上げるだけで、成虫の腸管幹細胞/芽細胞特異的に RNAi、あるいは過剰発現を誘導することができる。

上述した実験系によりエピジェネティック制御因子の RNAi ノックダウン、あるいは過剰発現を腸管上皮幹細胞で誘導した個体に緑膿菌を経口感染させ、病原性細菌の経口感染に対する感受性/抵抗性に有意な変化が現れる因子を探索した (Fig. 1)。

Fig.1 病原性細菌感染時の腸管免疫・恒常性維持に関するエピジェネティック因子の探索



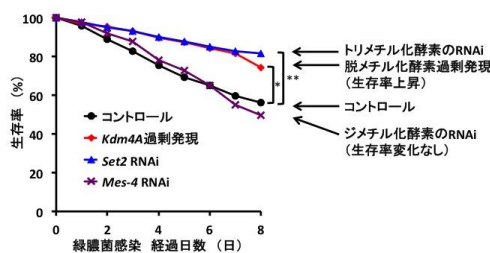
経口感染に用いる病原性細菌として、多剤耐性菌の存在などで医学・免疫学上重要な研究対象として位置づけられており、またその病原性等について、モデル生物による研究も含めて比較的良好に解析されている緑膿菌を一例として用いた。

遺伝学的スクリーニングによって見出された候補因子について、各因子のノックダウン/過剰発現を施した腸管上皮において、感染刺激にตอบสนองした自然免疫反応、感染後の体内菌数の変化、および腸管上皮細胞の増殖・状況等を各種マーカー/レポーターを用いて観察した。これは感染感受性/抵抗性を示す原因について理解する上で極めて重要な第一段階であり、その後の解析の礎となる。続いて、その作用機序を明らかにする為に、ノックダウン/過剰発現システムの感染刺激にตอบสนองした遺伝子発現をマイクロアレイ解析によりプロファイリングし、その比較解析を行った。有意な発現変動が観られた遺伝子群については、その発現変動の詳細を定量的RT-PCR法によって確認した。

4. 研究成果

まず、緑膿菌経口感染後の生存率を細菌感染に対する抵抗性の指標として、腸管免疫系に関与するヒストンメチル化関連酵素の探索を行った。その結果、腸管上皮幹細胞 (ISC) においてヒストン H3 の 36 番目のリジン残基 (H3K36) のメチル化酵素 *set2* の RNAi を誘導した系統と、H3K36 の脱メチル化酵素 *Kdm4A* の過剰発現を誘導した系統において、生存率の有意な上昇が見られた (Fig. 2)。

Fig.2 ショウジョウバエ腸管幹細胞におけるH3K36me3の減弱によって、緑膿菌感染抵抗性が上昇する



この結果から、ISC における H3K36 のメチル化の減弱が感染抵抗性を上昇させる可能性が示唆された。一方、最終分化した腸管上皮細胞において *Kdm4A* 過剰発現、あるいは *set2* RNAi を行った際には生存率に変化が見られなかったことから (Fig. 3)、ISC における H3K36 メチル化修飾の減弱が、ISC の分裂・分化を通じたエピジェネティックな遺伝子発現制御、あるいは ISC から上皮細胞へのシグナル伝達等を介して感染抵抗性の上昇に

関与するといった、腸管免疫・恒常性維持に関わる新規制御機構の存在が考えられた (Fig. 4)。

Fig.3 最終分化後の上皮細胞におけるH3K36me3の減弱では感染抵抗性への影響が観られない

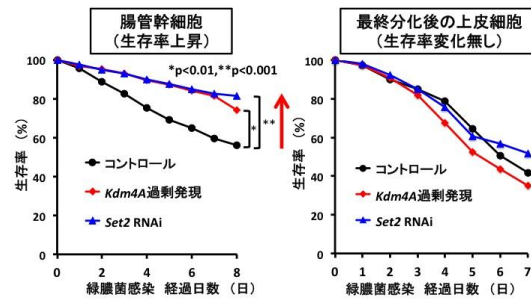
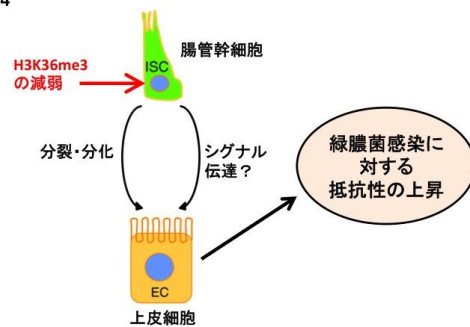


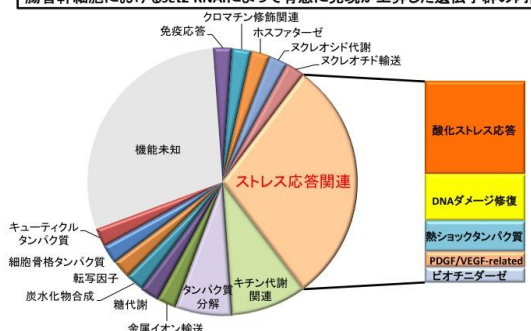
Fig.4



次に、緑膿菌経口感染に対する抵抗性が上昇するメカニズムに迫るために、緑膿菌経口感染後の体内緑膿菌数の変化や、細胞分裂の活性化について解析を行ったが、*Kdm4A* 過剰発現および *set2* RNAi による顕著な変動は見られなかった。しかし、遺伝子発現解析において、*Kdm4A* 過剰発現 および *set2* RNAi により酸化ストレス等に対するストレス応答遺伝子群の顕著な発現亢進が見られた (Fig. 5)。

Fig.5 マイクロアレイによる網羅的な解析

腸管幹細胞における *set2* RNAi によって有意に発現が上昇した遺伝子群の内訳



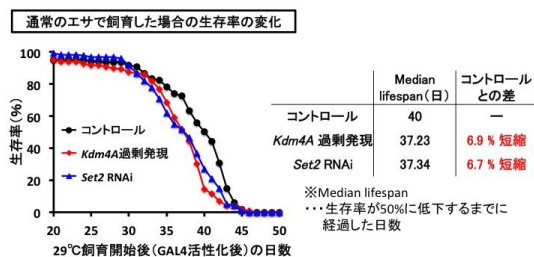
この結果から、緑膿菌経口感染によって生じる ROS 等によるストレスの軽減に ISC における H3K36 メチル化修飾状態が関与している可

能性が考えられた。そこで、強い酸化ストレスを生じさせる薬剤であるパラコートを経口摂取させた後の生存率を観察したところ、*Kdm4A* 過剰発現および *set2* RNAi によって生存率が上昇した。

この結果から、ISC における H3K36 のメチル化の減弱によって酸化ストレスに対する抵抗性が上昇すると考えられ、H3K36 メチル化の減弱による緑膿菌経口感染後の生存率の上昇は、ROS 等によるストレスに対する抵抗性が上昇することによってもたらされている可能性が示唆された。

さらに、上述した通り、ISC における H3K36 のメチル化修飾がストレス応答を介した腸管の恒常性維持に機能していることが考えられたため、H3K36 メチル化の減弱による長期的な影響について検証する目的で個体の寿命を調べたところ、*Kdm4A* 過剰発現や *set2* RNAi によって寿命が短縮される傾向が見られた (Fig. 6)。

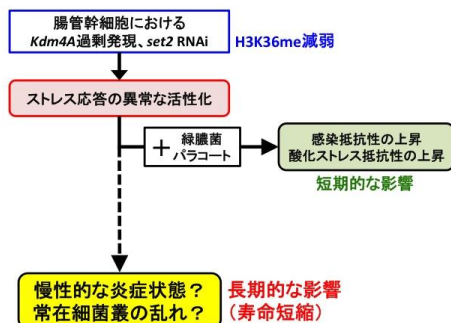
Fig.6 腸管幹細胞における*Kdm4A*過剰発現、*set2* RNAiによって寿命が短縮する傾向が見られる



また、抗生物質入りのエサで飼育した場合には寿命が短縮する傾向は見られなかったことから、常在細菌叢に対する宿主側の適切な応答・恒常性維持機構に H3K36 のメチル化修飾が重要である可能性が考えられた。

以上の結果から、ISC における H3K36 メチル化はストレス応答・恒常性維持機構の適切な制御に寄与している可能性が示唆された。H3K36 メチル化の減弱により腸管恒常性維持機構の一端が異常となることでストレス応答が亢進し、短期的には感染やストレスに対する抵抗性の上昇が見られるものの、長期的には寿命の短縮に繋がる現象を引き起こしている可能性が考えられる (Fig. 7)。

Fig.7



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)

[学会発表] (計 4 件)

① 古橋寛史、大沼史明、倉田祥一郎：
ショウジョウバエ腸管の恒常性維持に関するエピジェネティック制御因子の解析、第 32 回東北免疫研究会、2013 年 3 月 29 日、仙台

② 古橋寛史、大沼史明、倉田祥一郎：
Functional Analysis of Epigenetic Regulation in *Drosophila* Intestinal Homeostasis. The 4th EMBO meeting, 2012 年 9 月 22~25 日、ニース、フランス

③大沼史明、古橋寛史、倉田祥一郎：
ショウジョウバエ腸管免疫系におけるエピジェネティック制御因子の機能解析、第 23 回日本生体防御学会総会、2012 年 7 月 9~11 日、東京

④大沼史明、古橋寛史、倉田祥一郎：
腸管自然免疫におけるエピジェネティック制御因子の機能解析、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13-16 日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古橋 寛史 (FURUHASHI HIROFUMI)
東北大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：60545432

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

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

大沼 史明 (OHNUMA FUMIAKI)
東北大学・大学院薬学研究科・
修士課程学生