

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790385

研究課題名(和文) 自然選択の影響を受けた遺伝子に着目した病原体と宿主との相互作用の解明

研究課題名(英文) Interaction between pathogens and host genes undergoing natural selection

研究代表者

平安 恒幸(Hirayasu, Kouyuki)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教(常勤)

研究者番号：30585170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：未だに感染症は人類にとって脅威でありながら、病原体の感染メカニズムや感染症の重症化要因についてはほとんどわかっていない。病原体と相互作用を示す分子の遺伝子は、遺伝子欠損などの特徴的な遺伝子配列を示す場合がある。そこで本研究では、機能未知かつ特徴的な遺伝子配列を示す分子は病原体と相互作用する可能性は高いと考え、様々な病原体と宿主分子との相互作用を網羅的に調べた。その過程において、特定の活性化レセプターが細菌感染によって分解された宿主タンパク質を認識する事が明らかとなった。この結果は、活性化レセプターによって細菌の侵入を感知する宿主の新たな生体防御機構が存在することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Infectious diseases are still threats to humans, and the mechanism by which pathogens infect their hosts is not fully understood yet. The present study tested the hypothesis that molecules carrying mutations with unknown function interact with pathogens. In the process of comprehensive search for interaction between pathogens and host molecules, it was found that an orphan activating receptor specifically recognized some host molecule degraded by bacteria. These results suggest that host immune system has a novel strategy to sense bacterial invasion via an activating receptor.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：自然選択 感染症 活性化型レセプター

### 1. 研究開始当初の背景

人類が感染症と闘って進化してきた痕跡がヒトゲノム中に残っている。例えば、ダフィー抗原は三日熱マラリア原虫の細胞侵入レセプターであるため、ダフィー抗原を遺伝的に発現していない個体は、三日熱マラリアに抵抗性を示す。興味深い事に、ダフィー抗原非発現型の遺伝子頻度はサハラ砂漠以南のアフリカで有意に高く、遺伝子配列解析からダフィー抗原欠損はアフリカの環境下では生存に有利だった(自然選択が働いた)可能性が示唆されている (Miller et al., *N Engl J Med*, 1976)。また、CCR5 は HIV の細胞侵入レセプターであるため、CCR5 の欠損者は HIV 感染抵抗性を示す。この場合においても CCR5 欠損の遺伝子変異はヨーロッパに多く存在し遺伝子配列解析から CCR5 遺伝子に選択圧が働いた可能性が示唆されている (Carrington et al., *Am J Hum Genet*, 1997)。このように、病原体と相互作用を示す分子の遺伝子は特徴的な遺伝子配列情報(集団間の遺伝子頻度の顕著な違いや欠損型の存在などの特徴的な遺伝子配列情報)を示す場合がある。逆の発想をすれば、特徴的な遺伝子配列情報を示す遺伝子産物は病原体と相互作用する可能性は高い。

一方で、研究代表者は、LILRA3 欠損型(非機能型)および LILRB2 低発現型が有意にアジア人集団に多く、両遺伝子に選択圧が働いた痕跡を見出した (Hirayasu et al., *Hum Genet* 119: 436, 2006, Hirayasu et al., *Am J Hum Genet* 82: 1075, 2008)。また、KIR2DL3 と HLA-C1 の遺伝子頻度が熱帯熱マラリア流行地域で有意に低いことを明らかにし、KIR2DL3 と HLA-C1 の両遺伝子を保有する個体では熱帯熱マラリアの重篤な合併症である脳性マラリアに感受性を示す事を明らかにした (Hirayasu et al., *PLoS Pathogen*, 2012)。近年、様々な分子進化学的解析手法(集団間の遺伝子頻度の比較などの遺伝子配列情報に基づいた解析手法)によって、選択圧が働いた遺伝子がゲノムワイドに探索された (Kimura et al., *PLoS one* 2: e286)。このように自然選択を受けた痕跡を示す遺伝子データが蓄積される中で、それらの進化的な意義についてはほとんど不明である。感染症との関わりも指摘されているが、実証されているものは少ない。

### 2. 研究の目的

本研究では、病原体分子と相互作用する宿主分子が特徴的な遺伝子配列情報を示す点に着目して、逆に特徴的な遺伝子配列を示す遺伝子から宿主分子と相互作用する病原体分子を同定するアプローチにより、病原体の感染メカニズムや感染症の重症化要因の解明へつなげることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 候補遺伝子の絞り込み

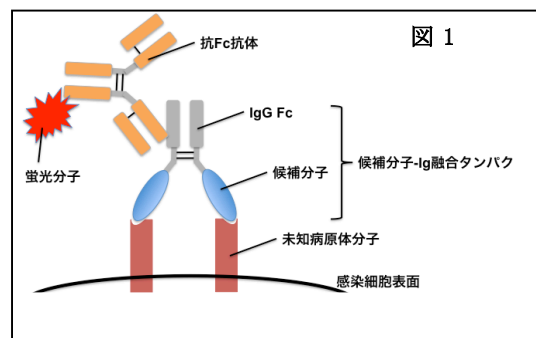
病原体と相互作用する宿主分子の候補となりうる遺伝子(自然選択の影響を受けた遺伝子)を文献および Human Evolution Database (<http://124.16.129.22/db/table.php>)により調べる。その際に、病原体の認識や細胞侵入部位として重要な細胞表面分子の遺伝子を中心に調べる。これまでに遺伝子解析を行ってきた KIR 遺伝子群および LILR 遺伝子群も候補遺伝子に含める。

#### (2) 候補分子の組換えタンパク質を作製する。

宿主分子と相互作用する病原体分子を探索するためには、未知の病原体分子と結合することのできる可溶性の宿主分子の組換えタンパク質が必要である。組換えタンパク質を安定化して産生効率を高め、組換えタンパク質の検出を容易にするために、イムグロブリンの Fc 部分と融合させた組換えタンパク質(Ig-fusion タンパク質)を作製する(図 1)。

#### (3) 宿主分子と相互作用する病原体分子を同定する。

研究代表者らの研究室で扱っているヘルペスウイルスやマラリア原虫などに加えて様々な細菌・ウイルス感染細胞に関して、Ig 融合タンパクの結合性をフローサイトメトリーにより網羅的に解析する(図 1)。Ig 融合タンパクが結合する細胞が見出されたら、免疫沈降法および質量分析により病原体分子の同定を行う。



#### (4) 同定した病原体分子と宿主分子の相互作用を細胞レベルで機能解析する。

同定された病原体分子が実際に宿主分子との相互作用により細胞内へシグナルを伝達するのかどうかを調べるために、NFAT-GFP を用いたレポーター細胞を用いた解析を行う。すなわち、NFAT-GFP レポーター細胞は細胞表面分子(宿主分子)が病原体分子と結合すると活性化し GFP を発現するので、発現した GFP

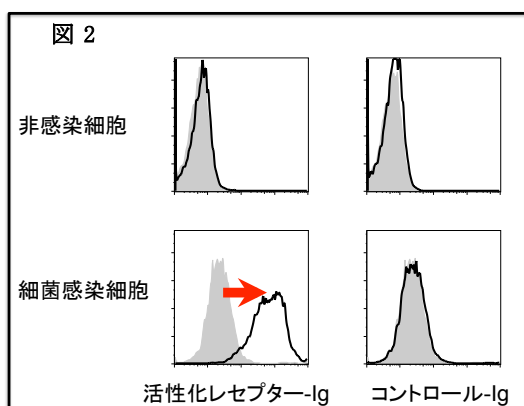
を検出することで間接的に細胞表面上での相互作用によるシグナル伝達を確認することができる。

#### (4) 同定した病原体分子と宿主分子の相互作用を個体レベルで機能解析する。

病原体をマウスの腹腔に感染させた後の腹腔洗浄液中にリガンドが存在しているか否かをウェスタンブロッティングで調べる。また、リガンドと宿主分子との相互作用を免疫沈降法により解析する。

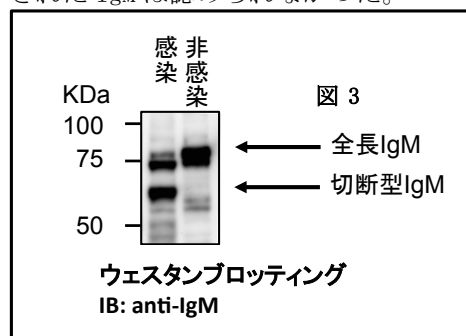
#### 4. 研究成果

ヘルペスウイルスやマラリア原虫などに加えて様々な細菌・ウイルス感染細胞に関して、Ig 融合タンパクの結合性をフローサイトメトリーにより網羅的に解析したところ、特定の活性化型レセプターが細菌感染細胞に結合することが見出された(図 2)。

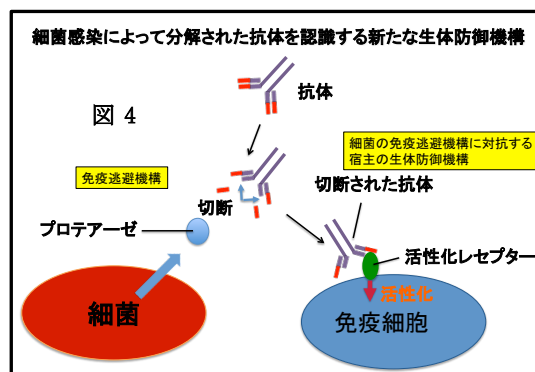


免疫沈降法および質量分析により細菌感染細胞上に発現するリガンドを同定したところ、予想に反して宿主由来の分子、すなわち IgM であった。ところが、活性化レセプターは細菌が感染していない細胞上の IgM には結合しなかった。細菌感染によって IgM がなぜ活性化レセプターによって認識されるようになるのかを調べるためにウェスタンブロッティングにより細菌感染細胞の IgM を解析したところ、細菌感染細胞では IgM が分解されて切断されていた(図 3)。N 末端を短くした切断型 IgM を作製し細菌を感染させていない 293T 細胞にトランスフェクションしたところ、活性化レセプターは全長の IgM には結合しなかったが、切断型 IgM には結合した。このことから、活性化レセプターは細菌プロテアーゼで分解された IgM を認識する可能性が考えられる。また、細胞レベルで活性化型レセプターがリガンドを認識できるかどうかを調べるために、活性化型レセプターが発現する NFAT-GFP レポーター細胞を作製して、

IgM および細菌と共培養すると、レポーター細胞が活性化され GFP を発現することが明らかになった。一方で、細菌非感染ではレポーター細胞の活性化は認められなかった。さらに、実際に細菌をマウスに感染させると、感染したマウスの腹腔洗浄液中の IgM は分解されていた。一方で、非感染マウスでは分解された IgM は認められなかった。



ある種の細菌は宿主の免疫から逃れるためにプロテアーゼによって宿主分子を切断するような免疫逃避機構を保有していることが知られている。本研究の結果は、IgM を分解するという細菌の免疫逃避機構に対抗して、宿主側が分解された IgM を認識する活性化型レセプターを進化させて、細菌に対する生体防御機構として働いている可能性を示唆している(図 4)。



#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ①. Deng, M., Lu, Z., Zheng, J., Wan, X., Chen, X., Hirayasu, K., Sun, H., Lam, Y., Chen, L., Wang, Q., Song, C., Huang, N., Gao, F. G., Jiang, Y., Arase, H., and Zhang, C. A motif in LILRB2 critical for Angptl2 binding and activation. *Blood*. 2014. in press 査読有

- ②. Jin, H., Arase, N., Hirayasu, K., Kohyama, M., Suenaga, T., Saito, F., Tanimura, K., Matsuoka, S., Ebina, K., Shi, K., Toyama-Sorimachi, N., Yasuda, S., Horita, T., Hiwa, R., Takasugi, K., Ohmura, K., Yoshikawa, H., Saito, T., Atsumi, T., Sasazuki, T., Katayama, I., L. Lanier, L., and Arase, H. Autoantibodies to IgG/HLA-DR complexes are associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111:3787-3792, 2014, 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1401105111.
- ③. Jiang, Y., Arase, N., Kohyama, M., Hirayasu, K., Suenaga, T., Jin, H., Matsumoto, M., Shida, K., L. Lanier, L., Saito, T. and Arase, H. Transport of misfolded endoplasmic reticulum proteins to the cell surface by MHC class II molecules. *Int. Immunol.* 25:235-246, 2013, 査読有 DOI: 10.1093/intimm/dxs155.
- ④. Hirayasu, K., Ohashi, J., Kashiwase, K., Hananantachai, H., Naka, I., Ogawa, A., Takanashi, M., Satake, M., Nakajima, K., Parham, P., Arase, H., Tokunaga, K., Patarapotikul, J., Yabe, T. Significant Association of KIR2DL3-HLA-C1 Combination with Cerebral Malaria and Implications for Co-evolution of KIR and HLA. *PLoS Pathog.* 8:e1002565. 2012, 査読有 DOI: 10.1371/journal.ppat.1002565.

[学会発表] (計 5 件)

- ①. Jin Hui, Arase Noriko, Kohayama Masako, Saito Fumiji, Hirayasu Kouyuki, Matsumoto Maki, Shida Kyoko, Suenaga Tadahiro, Saito Takashi, Katayama Ichiro, Lanier Lewis L., Arase Hisashi, Rheumatoid factor binding to IgG heavy chain presented on HLA-DR is associated with Rheumatoid Arthritis susceptibility. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 2013 年 12 月 13 日, 幕張メッセ (千葉市)
- ②. Tanimura Kenji, Suenaga Tadahiro, Jin Hui, Hirayasu Kouyuki, Arase Noriko, Kohayama Masako, Ebina Yasuhiko, Yasuda Shinsuke, Horita Tetsuya, Katayama Ichiro, Atsumi Tatsuya, Yamada Hideo, Arase Hisashi,  $\beta$  2-glycoprotein I presented on MHC class II molecules are recognized by

autoantibodies in antiphospholipid syndrome. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 2013 年 12 月 13 日, 幕張メッセ (千葉市)

- ③. Hirayasu Kouyuki, Saito Fumiji, Horiguchi Yasuhiko, Nagai Hiroki, Arase Hisashi, Immune sensing system for immunoglobulin degradation by bacteria. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 2013 年 12 月 11 日, 幕張メッセ (千葉市)
- ④. Yan Jiang, Hui Jin, Masako Kohyama, Noriko Arase, Kouyuki Hirayasu, Tadahiro Suenaga, Maki Matsumoto, Kyoko Shida, Lewis L. Lanier, Takashi Saito, Ichiro Katayama and Hisashi Arase, Transport of misfolded ER proteins to the cell surface by MHC class II molecules, 第 41 回日本免疫学会学術集会, 神戸国際会議場 (神戸), 2012 年 12 月 6 日
- ⑤. Kouyuki Hirayasu, Significant association of KIR2DL3-HLA-C1 combination with cerebral malaria and implications for co-evolution of KIR and HLA, France-Japan International Exchange Symposium, 大阪大学(大阪), 2012 年 2 月 10 日

[図書] (計 1 件)

- ①. 平安恒幸、医歯薬出版株式会社、週刊医学のあゆみ「免疫グロブリン様受容体による免疫制御と疾患」、2013、2 (259-260)

[その他]

ホームページ等

<http://immchem.biken.osaka-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平安 恒幸 (HIRAYASU, Kouyuki)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教 (常勤)

研究者番号 : 3 0 5 8 5 1 7 0