

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570164

研究課題名(和文) 腸管における架橋酵素を介したシグナル伝達制御と腸内細菌との共生成立の分子機構

研究課題名(英文) Transglutaminase-Catalyzed Protein-Protein Crosslinking Maintains the Gut Epithelial Immunity in *Drosophila*.

研究代表者

川畑 俊一郎 (Kawabata, Shun-ichiro)

九州大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90183037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：トランスグルタミナーゼ(TG)は、タンパク質間の架橋反応を触媒する。哺乳動物には8種類の相同酵素が存在するが、ハエには1個の遺伝子のみが存在し、TGの研究には格好のモデル生物である。TGはハエ腸管の囲食膜形成に関与し、腸管の抗菌ペプチド産生を担うIMD経路を抑制していた。IMD経路は細菌表層のペプチドグリカン認識して抗菌ペプチドを産生するが、TGはNF- κ B様の転写因子を阻害し、常在細菌に対する過剰免疫を抑制していることが判明した。さらに、ハエ腸内細菌を解析してTGのノックダウン系統の腸内細菌叢を明らかにし、囲食膜形成に関与するタンパク質を同定して、囲食膜形成に関わるTGの機能解明を行った。

研究成果の概要(英文)：RNA interference directed against transglutaminase (TG) caused a short life span in flies reared under conventional non-sterile conditions, but not under germ-free conditions. TG RNAi enhanced the expression of genes encoding antimicrobial peptides in the immune deficiency (IMD) pathway. Wild-type flies that ingested gut lysates prepared from conventionally reared TG RNAi-treated flies had shorter life spans. In conventionally reared flies, TG RNAi triggered apoptosis in the gut and induced the nuclear translocation of Relish, the NF- κ B-like transcription factor of the IMD pathway. Wild-type flies that ingested synthetic amine donors, which inhibit the TG-catalyzed protein-protein crosslinking reaction, showed nuclear translocation of Relish and enhanced expression of genes encoding IMD-controlled antimicrobial peptide genes in the gut. We also found that TG enhances the structural strength of the peritrophic matrix by crosslinking chitin-binding proteins.

研究分野：生化学

キーワード：トランスグルタミナーゼ ショウジョウバエ 腸管 腸内細菌 ペプチドグリカン タンパク質架橋反応

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、自然免疫に関わる無脊椎動物の TG の機能解析を行ってきた。TG は、グルタミン残基とリジン残基の側鎖をイソペプチド結合で架橋する酵素である。ヒトでは 8 種類の TG が同定されており、例えば、TG2 はアポトーシス、細胞外基質の形成などに関与する。ハエには 1 種類の dTG 遺伝子が存在し、TG の機能解析には最適のモデル動物である。申請者らは、dTG を全身性にノックダウンすると、羽化率や羽化後の生存率が著しく低下すること、成虫では翅の水疱形成や腹部の模様様の消失を引き起こすことなどを明らかにした。最近、dTG を腸管特異的にノックダウンすると、成虫の著しい生存率低下を引き起こすが、無菌ハエを用いた dTG-RNAi では、生存率は低下しないことを見出した。ハエの自然免疫のシグナル伝達系には、Toll と Imd の 2 つの経路が存在するが、腸管においては Imd 経路が主要な経路である。Imd 経路の主要な病原体センサーは、グラム陰性菌の PGN を認識する PGRP-LC や PGRP-LE であり、病原細菌だけでなく、常在細菌の PGN にも応答する。そのため、常在細菌の PGN からのシグナルを負に制御し、宿主と常在細菌との共生成立に働く機構が存在するはずである。これまで、PGN の分解酵素 (PGRP-SC, PGRP-LB など) や Imd 経路の阻害タンパク質 (Rudra/Pirk/PIMS) が報告されている。自然免疫は、微生物細胞壁由来のリポ多糖、ペプチドグリカン、1,3-β-D-グルカンなどの PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) に応答するが、感染細菌にのみ存在する PAMPs は同定されていない。海外においても、ハエの腸管の常在細菌叢が自然免疫の発現制御に重要な働きをすることを示唆するデータが報告されている。

2. 研究の目的

腸管において、宿主は、常在細菌叢と共生

関係を維持しつつ、病原細菌に対する認識と排除を行っている。しかし、病原細菌の細胞壁成分であるペプチドグリカン (PGN) と常在細菌の PGN を識別して認識する分子機構は知られていない。したがって、常在細菌に対しては、病原細菌センサー (PGN 受容体: PGRP-LC) を介した応答を負に制御し、共生を成立させる機構が存在するはずである。トランスグルタミナーゼ (TG) は、グルタミン残基とリジン残基を架橋する細胞内酵素である。最近、申請者らは、ハエ TG (dTG) を RNAi により腸管特異的にノックダウンすると、ハエの生存率が著しく低下し、腸管において、PGRP-LC の下流にある自然免疫のシグナル伝達経路 (Imd 経路) に依存的な抗菌ペプチド産生系が増強していることを見出した。申請者らは、dTG は、常在細菌の PGN により誘導される Imd 経路に依存的なペプチド産生系を抑制して、宿主と腸内細菌との共生成立に働いていると推定している。本研究では、dTG の腸管における標的基質を同定するとともに、dTG による Imd 経路のシグナル伝達制御、および宿主と腸内細菌との共生成立の分子機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

1) GAL4/UAS システムを用い、腸管特異的に dTG を RNAi によりノックダウンする。腸管から mRNA を回収し、リアルタイム PCR 法によって、腸管における Imd 経路、および Toll 経路依存的な各種抗菌ペプチド (セクロピン、ドロソマイシン、ジプテリシンなど) の発現量を定量化する。dTG をノックダウンあるいは過剰発現した系統と野生型の抗菌ペプチドの発現量をそれぞれ比較する。

2) TG の合成基質であるペンチルアミン (ビオチン化) と腸管抽出液を混合し、dTG 活性により抽出液中のタンパク質を特異的にビオチン化し、アビジン-磁気ビーズで回収後、質量分析することで、dTG の標的基質を同定

する。

3) 同定した標的基質の組換えタンパク質を調製して、dTG による架橋反応を生化学的に解析するとともに、標的基質の架橋部位を同定する。さらに、標的基質に対する抗体を作製して、標的基質の腸管上皮における細胞内局在性を調べる。腸内細菌の有無による標的基質の細胞内局在性の変化も調べる。

4) dTG-RNAi ハエでは、野生型とは異なる腸内細菌叢を有していると推定される。dTG-RNAi ハエと野生型ハエの腸管から DNA を抽出し、細菌の 16S rRNA の保存領域に対応する PCR プライマーを用いて DNA を増幅し、その塩基配列を解析する。

5) 上記 1) の結果をもとに、dTG-RNAi ハエに特異的な腸管の細菌群を同定する。それらの細菌群が短命の原因となる可能性があるため、野生型の無菌ハエに同定した細菌を感染させて、生存日数をコントロールのハエと比較する。

4. 研究成果

腸内の共生細菌は、宿主の免疫反応から免れて増殖し、腸管の恒常性に寄与するとともに、ビタミンなどの必須栄養源の供給を行っている。これまで、腸内共生細菌に対する宿主の免疫寛容の分子機構は不明であった。本研究では、キイロショウジョウバエを用いて、タンパク質同士を糊付けする酵素トランスグルタミナーゼ (dTG) が、共生細菌の抗原に対して免疫応答する特定の情報伝達因子を糊付けして機能抑制することで、免疫寛容となっていることを明らかにした。キイロショウジョウバエにおいては、10~50 種、計 500 万個、ヒトになると ~500 種、計 100 兆個を超える共生細菌が常在している。腸内の共生細菌叢は、腸管の免疫系により管理されているが、共生細菌に対する宿主の免疫寛容の分子機構は、謎に包まれたままであった。dTG の機能を阻害したところ、1 ヶ月内では

とんどが死んでしまうことが判明しました。詳細な解析の結果、TG は共生細菌の抗原に免疫応答する情報伝達因子を糊付けして不活性化することにより、宿主の免疫寛容性を誘導していた。上述のハエの短命の原因は、免疫寛容性を失った腸管から、過剰に作られた宿主の抗菌性タンパク質により共生細菌の多くが殺菌され、正常な腸内細菌叢のバランスを崩してしまったためであると推定された。

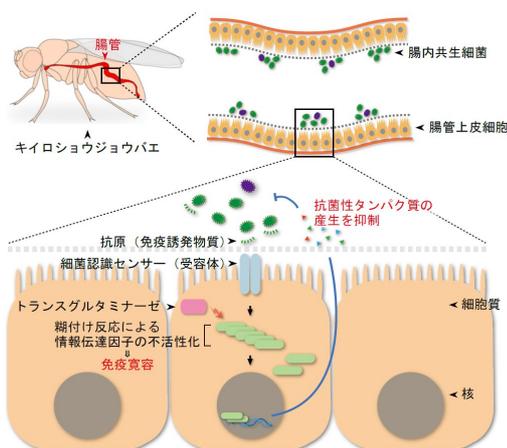


図 1 : 正常の状態では、トランスグルタミナーゼは、腸内の抗菌性タンパク質の産生量を調節することで腸内細菌叢を管理している。

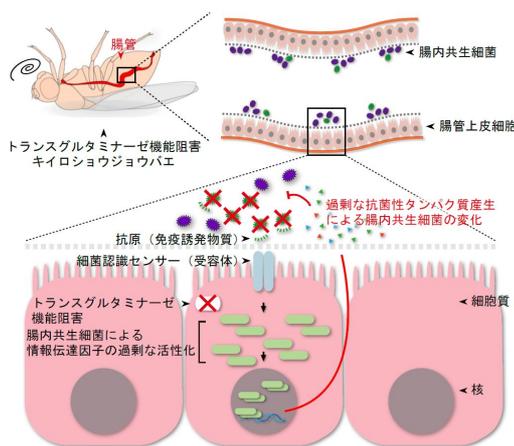


図 2 : トランスグルタミナーゼの機能阻害 (RNAi によるトランスグルタミナーゼ mRNA のノックダウン) による腸内細菌叢のバランスの破壊が宿主を短命にする。

一方、次世代シーケンサーによる腸内細菌叢解析を行ったところ、TG-RNAi 系統、およ

びコントロール系統では腸内細菌叢が異なることが分かった。また、同系統間においても加齢に伴って腸内細菌叢が変化していた。TG-RNAi 系統が短命である原因を詳しく調べるために、腸管より細菌を単離した。その結果、A 属 2 種と L 属 1 種の腸内細菌の単離に成功した。単離した A 属 2 種はいずれも 16S-rDNA 配列が完全に一致する種がデータベース上になく、新種と考えられたため、*A. sp#1*、*A. sp#2* と名付けた。次世代シーケンサーによる解析で、主要な腸内細菌として検出された P 属については、今回は八工腸管から単離出来なかった。

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 1 件)

1) Shibata, T., Sekihara, S., Fujikawa, T., Miyaji, R., Maki, K., Ishihara, T., Koshiba, T., and Kawabata, S.: Transglutaminase-catalyzed protein-protein cross-linking suppresses the activity of the NF- κ B-like transcription factor Relish. *Science Signaling*, **6**, ra61 (2013). (doi:10.1126/scisignal.2003970) (査読有)

[学会発表](計 6 件)

1) Kawabata, S.: Transglutaminase-catalyzed relish crosslinking suppresses innate immune signaling in the *Drosophila*. Gordon Research Conference on Transglutaminase in Human Disease Processes. Lucca, Italy, June 29-July 4, 2014. (招待講演)

2) Shibata, T., Sekihara, S., Fujikawa, T., Miyaji, R., Maki, K., Ishihara, T., Koshiba, T., and Kawabata, S.: Transglutaminase-Catalyzed Protein-Protein Crosslinking Maintains the Gut Epithelial Immunity in *Drosophila*. The 55th Annual *Drosophila* Research Conference. San Diego, CA, USA, March 26-30, 2014. (招待講演)

3) Shibata, T., Sekihara, S., Fujikawa, T., Miyaji, R., Maki, K., Ishihara, T., Koshiba, T., and Kawabata, S.: Transglutaminase-catalyzed crosslinking suppresses the activity of the NF- κ B-like transcription factor relish in *Drosophila*. The First Asian Invertebrate Immunology Symposium. Pusan University, Busan, Korea, February 14-15, 2014. (招待講演)

演)

4) 川畑俊一郎: ショウジョウバエの腸内細菌に対する免疫応答と寛容の分子機構. 阿蘇シンポジウム、阿蘇リゾートグランヴィリオホテル、2014年7月15~16日。(招待講演)

5) 川畑俊一郎: 腸内細菌により誘導される IMD 経路を介したシグナル伝達制御. 第 86 回日本細菌学会総会シンポジウム 幕張国際会議場、2013年3月19日。(招待講演)

6) Kawabata, S.: Transglutaminase-catalyzed protein crosslinking suppresses innate immune signaling in the *Drosophila* gut. The 12th International Endotoxin and Innate Immunity Society Meeting 2012 (IEIIS2012) and the 2nd Homeostatic Inflammation Symposium (HIS 2012). Tokyo, Japan, October 23-26, 2012. (招待講演)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~biopoly/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川畑 俊一郎 (KAWABATA Shun-ichiro)

九州大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号: 90183037

(2) 連携研究者

柴田 俊生 (SHIBATA Toshio)

九州大学・高等研究院・助教

研究者番号: 00614257