

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670020

研究課題名(和文)細胞内侵襲性病原体に対する自然免疫のmicroRNAによる制御

研究課題名(英文)Role of microRNA on innate immune responses against intracellular microbe

研究代表者

矢野 環 (Yano, Tamaki)

東北大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50396446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞内に侵入性病原体に対する自然免疫制御におけるmicroRNAの同定と機能解析を行った。次世代シーケンスによる網羅的解析の結果、リステリア菌感染に応じて発現上昇するmicroRNAを5種、Vesicular stomatitis virus感染に応じて発現上昇するmicroRNAを2種同定した。そのうち共通したmiR-14はオーとファジー依存的な細胞死を制御する因子であった。さらに、ショウジョウバエ個体を用いたウイルス経口感染系を構築し、ウイルス感染により選択的オーとファジーのアダプター因子であるRef(2)Pが凝集体を形成すること、抗ウイルス応答に重要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：For analyzing the function of microRNA in the regulation of innate immune responses against intracellular microbes, such as intracellular bacteria or viruses, we performed next generation sequencing of miRNA in *Drosophila*. As a result, we identified 5 miRNA and 2 miRNA, expression of which is increased to *Listeria* or *Vesicular stomatitis virus* infection, respectively. miR-14, present in common of the both above, functions in autophagic cell death. We further analyzed the function of Ref(2)P, an adaptor of the selective autophagy, to show that it is essential against virus infection, and when viruses are orally infected to *Drosophila* adults, Ref(2)P makes an aggregate in intestinal epithelial cells. These results suggest the importance of Ref(2)P aggregate formation in the innate immune responses against viruses, and its regulation could be a novel target of virus regulation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：自然免疫 細胞内感染 miRNA ウイルス感染

1. 研究開始当初の背景

自然免疫はほとんどすべての多細胞生物が有する免疫系であり、感染防御の最前線で機能する。我々はこれまでに、ショウジョウバエをモデル生物として用い、体液中で細菌を特異的に認識して自然免疫応答を活性化する因子 PGRP-LE を同定し (*PNAS* 2002)、これが体液性の自然免疫において認識分子として病原体からの防御に機能し (*EMBO J.* 2004)、多量体化により自然免疫シグナルを活性化することを明らかにしてきた (*JBC* 2006)。しかし、病原体のなかには体液性の免疫系を逃れて細胞内に侵入して増殖を行うものがあり、細菌ではリステリア菌のような細胞内寄生細菌、各種ウイルス、トリパノゾーマのような原虫がこれに相当する。これらはヒトや家畜に重篤な疾患をもたらすものが多く、これら病原体と宿主免疫応答の攻防を明らかにすることは、病原体による感染疾患の治療や予防にきわめて有効である。我々はさらに、細胞内寄生細菌に対する自然免疫応答としてオートファジーが認識分子 PGRP-LE による病原体認識依存的に誘導され、その除去に機能していることを明らかにしてきた (*Nature Immunol.* 2006、*Nature Immunol.* 2008)。オートファジーは細胞の恒常性維持に機能する細胞内分解系だが、自然免疫応答として細胞内寄生細菌のみならず vesicular stomatitis virus (VSV) の除去に働くことが示されている。自然免疫の活性化は病原体に対する抵抗性に必要であるが、過剰な活性化は炎症を引き起こす。特に自然免疫応答としてのオートファジーの過剰亢進は自己成分の不必要な分解につながるため、病原体周辺部分で空間的に制御されることが細胞内器官やそれらの機能維持に重要である。

遺伝子発現の RNA レベルでの制御は、近年、発生・分化等の高次生命現象に重要な働きをしていることが明らかになってきている (*Dev. Cell* 2004)。なかでも、microRNA による遺伝子発現制御は多くの生物種に見られる生命にとって重要な機構であり、転写制御のみでは実現できない遺伝子発現調節を担っている。本研究代表者は研究開始までに microRNA 産生酵素である Dicer-1 の発現抑制がリステリア菌に対するオートファゴゾーム形成の空間制御に異常をもたらすことを見だし、リステリア菌、さらには VSV 感染に応じて発現上昇する microRNA を次世代シーケンスによる網羅的解析を行ってきた。

近年、自然免疫制御のなかでも、Toll-like receptor シグナル経路に關与する microRNA がいくつか報告され、その重要性が提唱されてきている。これはすなわち、自然免疫応答は感染応答として重要であるが、過剰な炎症をおこす応答は制御が必要であることを意味している。

細胞内に侵入して増殖する病原体に対する

自然免疫応答は細胞内の病原体センサーにより開始するが、この経路の制御、特に感染依存的に誘導されるオートファゴソームを介した応答の制御は多くの点が不明である。

2. 研究の目的

本研究は、細胞内に侵入する病原体である細胞内寄生細菌やウイルスに対する自然免疫応答制御における microRNA の同定と機能解析を行うことにより、未だ不明な点の多い、細胞内侵入性の病原体に対する自然免疫制御を明らかにする。特に、細胞内に侵入した病原体の排除に重要であるオートファジーの microRNA による形成制御という、本研究代表者が独自に発見した現象に注目し、その分子機構と生物学的意義を明らかにすることにより、細胞内侵入性病原体に対する自然免疫応答制御の宿主細胞生存における重要性を明らかにし、さらに、細胞内侵入性病原体に対する創薬のシーズを得ることを目的とした。

さらに、具体的には以下の点を目的とした。

(1) 細胞内寄生細菌であるリステリア菌の細胞内感染と VSV 感染に対して発現量の変化する microRNA の網羅的解析を比較し、病原体の種類に応じて機能する microRNA、さらに、幅広い病原体の細胞内感染に対する応答を制御する microRNA を同定する。

(2) オートファジーによるウイルス感染応答の制御について特に microRNA を中心に検討する。

3. 研究の方法

1年目には、網羅的解析により得ていた次世代シーケンスによる microRNA 発現データのより詳細な検討を行った。

(1) 細胞内寄生細菌であるリステリア菌 (Lm) の細胞内への感染に応じて発現量の変化する microRNA を以下の培養細胞、Lm 感染を用いて解析することにより絞り込んだ。

1. Lm の細胞内感染に対する細胞内センサーである PGRP-LE を発現させた S2 細胞と発現していない S2 細胞

2. 細胞質に侵入することのできる Lm (野生型, wt) と細胞質への侵入のための pore forming factor の遺伝子を欠損している系統 (Δ hly) の感染

以上の組み合わせ 6 通りを比較した。

(2) S2 細胞に感染するウイルスである VSV 感染に応じて S2 細胞で発現変化する microRNA を解析し、上記 (1) で抽出したリステリア菌感染に応じて発現変動する microRNA と比較した。

(3) 上記の (1), (2) に共通して発現が上昇した microRNA について、その変異体を用いて病原体感染に対する応答を検討した。

2年目には1年目の検討結果を基に、VSV 感染抵抗性における重要性が考えられた選択的オートファジーのアダプターである Ref(2)P について詳細な検討を行った。

(4) Ref(2)P の VSV 感染における重要性を検討した。具体的には、Ref(2)のショウジョウバエ個体における感染抵抗性、S2 細胞を用いた VSV 感染依存的なオートファゴソーム形成誘導における Ref(2)P の重要性、そのドメインの必要性解析、さらには、自然な感染経路を反映する系である経口感染系の構築とそれを用いた感染抵抗性の検討、腸管上皮細胞における VSV 感染に対する応答の検討を行った。

4. 研究成果

(1) リステリア菌感染に対して発現量が変動する microRNA の検討

研究の方法に記した6通りの発現検討を2回行い、各回、各サンプルにつき500,000~1,000,000リード数の結果を得た。従来の研究ではショウジョウバエ細胞を用いた microRNA の次世代シーケンスによる解析は、そのサイズの類似により80%ほどの rRNA の混在の元で解析している。本研究ではアクリルアミドゲルによるサイズ分画を初めに行うことで、その混在を30%以下に抑えることを得た。さらに、2回の独立した検討を行い、再現性のよりよい結果を得ることを得た。S2細胞における非感染時の microRNA 発現比率を表1に示した。

| 表1 | % of total miRNA |
|-----------------|------------------|
| dme-bantam-3p | 55.7 |
| dme-miR-184-3p | 10.9 |
| dme-miR-8-3p | 12.6 |
| dme-miR-11-3p | 3.0 |
| dme-miR-14-3p | 2.3 |
| dme-miR-2b-3p | 2.2 |
| dme-miR-995-3p | 1.9 |
| dme-miR-277-3p | 1.7 |
| dme-miR-276a-3p | 1.7 |
| dme-miR-33-5p | 1.3 |
| dme-miR-305-3p | 1.1 |
| dme-bantam-5p | 0.9 |

次に、野生型 Lm 感染に依存するが、 Δ hlyLm 株感染には依存しないので発現が変動する microRNA を抽出した。その結果、miR-14 を初めとする5種類の microRNA がリステリア菌の細胞内侵入に応じて発現量が上昇し、1種類の microRNA が発現量減少を起こすことを明らかにした。また、感染には依存しないが、病原体センサーである PGRP-LE の発現に

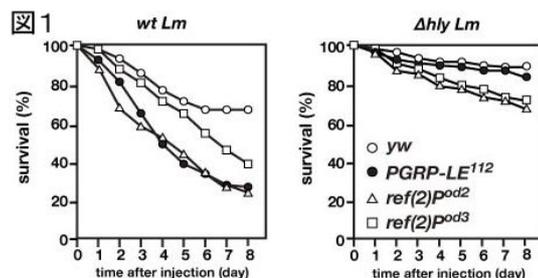
より2種類の microRNA の発現が上昇、1種類の microRNA の発現が減少することを明らかにした。

(2) VSV 感染による microRNA 発現変動 ウイルス感染における microRNA の発現変動を、S2細胞を用いて同様に解析した。ウイルスは人畜共通に感染するウイルスであり、昆虫の感染に対する耐性がウイルスキャリアとして問題となっている RNA ウイルスである VSV を用いた。解析の結果、miR-14 を初めとした2種類の microRNA の発現が上昇することを明らかにした。

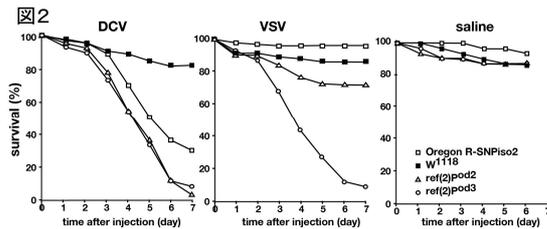
(3) (1) (2) の解析からリステリア菌、VSV どちらの感染時にも発現が共通して上昇する miR-14 に注目して、その感染応答に対する機能の検討を試みた。しかしながら、miR-14 欠損変異体のホモ接合成虫はほとんどが致死であり、モザイク動物を作製することは可能であるものの、感染組織が全身に及ぶ感染系による解析は不可能であることが判明した。さらに、研究開始後に、ショウジョウバエ変態期における細胞死に必要なオートファジー誘導に miR-14 が必要十分であるという報告が成された (*Molecular Cell* (2015) 56, 376-388)。したがって、オートファジーを介した感染防御においても miR-14 が関与している可能性が高いものの、感染組織を限定し、変態期における miR-14 の機能に影響を与えずに、感染における miR-14 の機能を解析する系が必要であることが判明した。

(4) 選択的オートファジーのアダプターである Ref(2)P の Lm, VSV 感染における重要性

リステリア菌、あるいは VSV 感染において重要な miRNA の機能を解析するためには、組織特異的な miRNA 機能操作と、その組織における病原体感染応答の解析をする必要があることが、それまでの解析で明らかとなった。そこで、細胞内で増殖する病原体感染に応じたオートファジー依存的な自然免疫応答の指標として、選択的アダプターである Ref(2)P (哺乳類 p62 ホモログ) が使用できるかを検討した。まず初めに、Ref(2)P のリステリア菌、VSV 感染における重要性を検討した。ショウジョウバエ個体を用い、野生型、および Ref(2)P 変異体のリステリア菌、VSV、Drosophila C virus (DCV) の体腔への注入に

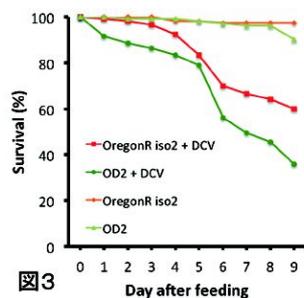


に対する感受性を検討した。その結果、リステリア菌感染、VSV 感染どちらに対しても Ref(2)P 変異体は感受性となることを示した(図1、図2)。



さらに、S2 細胞を用いてオートファゴソームのマーカとして汎用される EGFP-LC3 の puncta 形成を指標に、リステリア菌、および VSV 感染時のオートファジー誘導における Ref(2)P の必要性を検討したところ、いずれの感染においても Ref(2)P が重要であった。また、Ref(2)P に対する特異的抗体を作成し、免疫染色を行ったところ、Ref(2)P はリステリア菌、VSV どちらの感染においても細胞質においてドット状の凝集体と思われる大きなシグナルを形成した。これらの結果は Ref(2)P が感染組織において機能し、その凝集体形成をモニターすることによって感染応答を検出できることを意味している。

VSV 感染防御においては、これまでにショウジョウバエ個体におけるオートファジーが重要であることが示されている。しかしながら、培養細胞を用いた検討では、VSV 増殖抑制に対するオートファジーの寄与はきわめて低く、個体と培養細胞での違いを説明するオートファジーの抗ウイルス機構は全く明らかになっていない。本研究者は、その理由は、従来予想されているオートファジーの抗ウイルス機構である、オートファゴソームによるウイルスの直接的な



除去が抗ウイルスの分子機構なのではなく、別の機構に依っている可能性を考えた。そこで、より自然な感染を反映する感染系として経口感染系を構築し、DCV 経口感染に対する Ref(2)P 変異体の感受性を検討した。その結果、経口感染系においても Ref(2)P 変異体系統の DCV 感受性が観察され、ウイルス経口感染系が構築できた(図3)。

そこで、この経口感染系を用いて、腸管上皮細胞におけるウイルス感染応答を検討した。我々はこれまでに、腸管上皮組織における分化した細胞である Enterocyte において Ref(2)P が細菌の腸管感染に応じて凝集体を形成すること、また、これを一部介して腸管

幹細胞分裂を促進して、損傷した上皮細胞の修復が行われることを明らかにしている。DCV 経口感染による自然免疫応答を抗 Ref(2)P 抗体を用いた免疫染色により検討したところ、DCV 感染に依存して後部中腸にウイルス感染に応じて腸管上皮細胞で Ref(2)P の巨大凝集体と考えられるドット状シグナルが増加すること(図4)また、Ref(2)P 凝集体は腸管への細菌感染に応じて形成されるときとは異なり、幹細胞分裂の促進を起こさないことを明らかにした。これらの結果は、腸管感染性ウイルス感染に対する疾患防御に新たな知見を提供するものである。

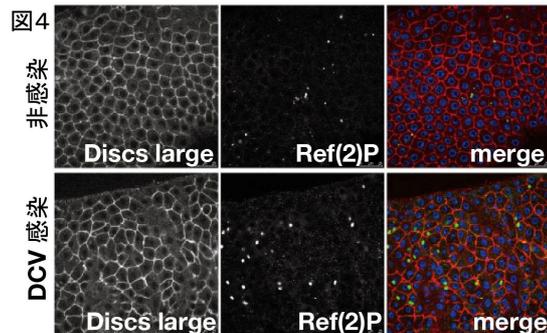


図4 DCV 経口感染により Ref(2)P タンパク質が大きなドット状のシグナルを与える。

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 3件)

Hiroki Nagai, Tamaki Yano, and Shoichiro Kurata
Role of Autophagy in Drosophila Immunity.
Invertebrate Survival Journal (2015) 12,
155-157 査読有り

矢野環、長井広樹
腸管上皮組織恒常性維持のための自然免疫とオートファジー
細胞工学 (2015) 34, 580-583 査読無し

矢野環
炎症におけるオートファジー
化学と生物 (2015) 53, 468-472 査読無し

[学会発表](計 6件)

第9回オートファジー研究会 (2015)
11月15日~17日 矢野環
「ショウジョウバエクロン病モデルによる腸管上皮細胞におけるオートファジーの機能解析」 淡路

第9回オートファジー研究会若手の会 (2015) 11月15日~17日
長井広樹、倉田祥一郎、矢野環
「オートファジー不全による腸管恒常性破綻メカニズムの解析」 淡路

EMBO Conference (cfs1503) (2015)9月9日～12日

Tamaki Yano, Hiroki Nagai and Shoichiro Kurata

“Molecular mechanism of intestinal homeostasis maintained by autophagy in *Drosophila*” (国際学会) Chia (Italy)

EMBO Global Lecture Course - Frontiers in innate immunity and drug discovery (2015)7月6日～10日

Tamaki Yano

Autophagy as an innate immune response against intracellular microbes”

(国際学会)(招待講演) Johannesburg (South Africa)

第87回日本生化学会 (2014)10月15日～18日

矢野環

「腸管恒常性におけるオートファジーの機能」(シンポジウム) 京都

日本細胞性粘菌学会 (2014) 10月11日

矢野環 「細胞社会のオートファジーによる制御」(招待講演) 仙台

〔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:

取得年月日:

国内外の別:

〔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

矢野 環 (YANO, Tamaki)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号: 50396446

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし