

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390014

研究課題名(和文)自然免疫応答を制御する新規cGMP経路の解析

研究課題名(英文)Analysis of novel cGMP pathway regulating innate immune responses

研究代表者

倉田 祥一郎(KURATA, Shoichiro)

東北大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90221944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：受容体型グアニル酸シクラーゼであるGyc76Cは、自然免疫応答を制御する新規受容体である。Gyc76Cは、cGMP産生を介して液性免疫応答を、cGMP産生を介さずに細胞性免疫応答を制御する。本研究では、cGMP産生を介して液性免疫応答を制御する、Gyc76C下流で働く因子をゲノムワイドに探索し同定した。さらに、cGMP産生を介さずに細胞性免疫応答を制御する、Gyc76C下流で働く因子を同定した。

研究成果の概要(英文)：A receptor-type guanylate cyclase, Gyc76C, is a novel receptor regulating innate immune responses. Gyc76C regulates the activation of humoral responses in cGMP-dependent manner, and the activation of cellular responses in cGMP-independent manner. This study identified several Gyc76C down-stream factors involving the Gyc76C-mediated activation of humoral responses, and the Gyc76C-mediated activation of cellular responses.

研究分野：生物系薬学

キーワード：自然免疫 cGMP ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

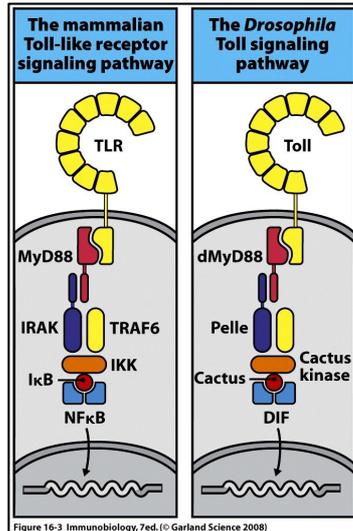
ショウジョウバエの感染防御に働く Toll 受容体の研究をきっかけに、哺乳動物の Toll 様受容体 (TLR) (Nature 1997) が病原体センサーとして同定され、当該研究分野の大きなブレイクスルーとなった。これが、2011 年度のノーベル賞受賞の対象となったように、遺伝学的解析に優れたショウジョウバエを用いた研究は、自然免疫研究に新たな展開をもたらす可能性が高い。下図に示すように (免疫生物学より転載) 哺乳動物の TLR 経路と、ショウジョウバエの Toll 経路は、それぞれ相同の因子により (例え

ば、TLR と Toll、MyD88 と dMyD88、NF- κ B と DIF/Dorsal) 同じように制御されていることが明らかとなっている。その一方で、TLR が病原体の構成成分を

認識する病原体センサーとして機能するのに対して、Toll 受容体のリガンドはサイトカイン様ペプチドである Spz であり、Toll 受容体は病原体センサーとして機能しないという両者の相違点も明らかとなっている。

研究代表者は、ゲノム機能を利用した機能獲得型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 を世界に先駆けて同定した (PNAS2002)。これまでに、PGRP-LE が、Toll 経路とは異なる自然免疫シグナル伝達系である imd 経路を活性化することを示している (Biochem.J. 2003, EMBO J. 2004, JBC 2006)。さらに、PGRP-LE は、細胞質内でも病原体センサーとして機能し (Nature Immunol. 2006, JBC 2010)、オートファジーを誘導して細胞内寄生細菌を排除することを明らかにした (Nature Immunol. 2008)。

PGRP-LE を同定した機能獲得型変異体スクリーニングは、ゲノムワイドに遺伝子を過剰発現させ、それにより、感染が無くとも、自然免疫応答が活性化される遺伝子を同定する。PGRP-LE を同定した、このスクリーニングを一万余系統以上にまで拡大し、受容体型グアニル酸シクラーゼ Gyc76C を同定した。Gyc76C は、Toll 受容体とは独立して機能しているが、Toll シグナル経路



において Toll 受容体の下流に位置している dMyD88 からのシグナルを活性化し、抗菌ペプチド産生などの液性免疫応答を誘導する。このことから、少なくともショウジョウバエでは、Gyc76C は Toll 受容体と双壁をなす自然免疫受容体であることがわかる。実際、Gyc76C の変異体は、Toll 受容体の変異体と同様に、グラム陽性菌に対する感染抵抗性を失う。研究代表者は、受容体型グアニル酸シクラーゼである Gyc76C が cGMP を産生し、その産生された cGMP により活性化される cGMP 依存性プロテインキナーゼが dMyD88 からのシグナルを活性化することを明らかにした。さらに、ヒト細胞株を用いた解析から、ショウジョウバエと同様に、cGMP キナーゼが、MyD88 依存の NF- κ B の活性化を増強することを見いだした。これらの結果は、cGMP により介在される新規自然免疫シグナル経路が存在し、さらにその cGMP 経路が、ショウジョウバエとヒトにおいて共通に存在していることを示唆している。さらに研究代表者は、Gyc76C が cGMP 経路で液性免疫応答を誘導するだけでなく、cGMP 経路非依存に細胞性免疫応答であるマクロファージの増殖誘導を引き起こすことを明らかにしていた。

2. 研究の目的

上述した知見を踏まえ、本研究では、ヒトとショウジョウバエの系で、自然免疫応答を制御する新規 cGMP 経路の分子機構を明らかにすると共に、Gyc76C が cGMP 非依存に細胞性免疫応答を引き起こす分子機構を明らかにすることを目的とした。

そのために、次の4つの項目を推進した。

- (1) cGMP 依存性プロテインキナーゼによる cGMP シグナル伝達経路の解明
- (2) ヒト細胞培養系での新規 cGMP 経路の解明
- (3) Gyc76C が活性化する cGMP 非依存経路の解明

3. 研究の方法

- (1) cGMP 依存性プロテインキナーゼによる cGMP シグナル伝達経路の解明

Gyc76C は、過剰発現により液性免疫応答である抗菌ペプチド (Drosomycin) の産生などを誘導する。この Gyc76C 依存の抗菌ペプチドの産生誘導は、Toll 受容体そのものや、Toll 受容体のリガンド Spz の変異では影響を受けない。その一方で、Toll 経路の Toll 受容体の下流に地位する dMyD88, Tube, Pelle, DIF/Dorsal の変異により著しく減弱する。このことは、Gyc76C が、Toll 受容体とは独立して機能しているものの、Toll 経路において Toll 受容体の下流に位置している dMyD88 からのシグナルを活性

化し、液性免疫応答を誘導することを示している。さらに、この dMyD88 の活性化に cGMP 依存性プロテインキナーゼが関わる事が明らかとなった。dMyD88 の C 末端側には、cGMP キナーゼによりリン酸化を受けるコンセンサス配列が存在しており、cGMP 依存性プロテインキナーゼが直接 dMyD88 をリン酸化し、dMyD88 からのシグナルを活性化する可能性が高い。そこで本研究では、cGMP 依存性プロテインキナーゼが dMyD88 を直接リン酸化しているかどうかを調べた。その結果、cGMP 依存性プロテインキナーゼによる dMyD88 依存の抗菌ペプチド産生の増強には cGMP 依存性プロテインキナーゼのリン酸化活性が必要であるが、dMyD88 は直接的な基質ではないことが示唆されたため、DL1 細胞を用いたゲノムワイド RNAi スクリーニング系を確立し、cGMP 依存性プロテインキナーゼによる dMyD88 依存の抗菌ペプチド産生の増強に必要な因子を網羅的に同定した。

(2) ヒト細胞培養系での新規 cGMP 経路の解明

ヒト細胞株を用いた解析から、ショウジョウバエと同様に、cGMP 依存性プロテインキナーゼが、MyD88 依存の NF- κ B の活性化を増強することが示唆されている。この点を確認すると共に、ショウジョウバエで同定した cGMP 依存性プロテインキナーゼによる dMyD88 依存の抗菌ペプチド産生の増強に必要な因子のホモログが、ヒト細胞株における cGMP 依存性プロテインキナーゼによる MyD88 依存の NF- κ B の活性化の増強に必要な因子かどうか調べた。

(3) Gyc76C が活性化する cGMP 非依存経路の解明

Gyc76C は、抗菌ペプチド産生などの液性免疫応答を誘導する一方で、細胞性免疫応答であるマクロファージの増殖誘導をも引き起こす。それらはそれぞれ異なった機構で制御されていることが明らかとなっている。すなわち、Gyc76C 依存の抗菌ペプチド誘導は、Gyc76C により産生される cGMP、それを介する cGMP キナーゼ、そして dMyD88 より下流の Toll 経路の因子が関わるのに対して、Gyc76C 依存のマクロファージの増殖誘導には、全くそれらの因子は関与しない。そこで、本研究では、Gyc76C が活性化する cGMP 非依存経路の分子機構を明らかにするために、マクロファージの増殖誘導に関わることが知られ

ている因子が、この経路に関わるのかがどうか調べた。そのために、Ras/MAP キナーゼシグナル経路に着目し、特に低分子量 G タンパク質を中心に解析を進めた。まず、Gyc76C 依存のマクロファージの増殖誘導に対する RNA-i による低分子量 G タンパク質の発現抑制の影響を調べた。低分子量 G タンパク質の RNA-i により、Gyc76C 依存のマクロファージの増殖誘導が抑制されたため、Gyc76C 依存の抗菌ペプチド誘導は影響を受けないことを確認した。

4. 研究成果

(1) cGMP 依存性プロテインキナーゼによる cGMP シグナル伝達経路の解明

ショウジョウバエ DL1 細胞を用いて、dMyD88 依存の抗菌ペプチド産生が、cGMP 依存性プロテインキナーゼの過剰発現により増強されることを確認した。そして、この cGMP 依存性プロテインキナーゼによる dMyD88 依存の抗菌ペプチド産生の増強に cGMP 依存性プロテインキナーゼのリン酸化活性が必要であることを、リン酸化活性に必要なアミノ酸を置換した変異体 cGMP 依存性プロテインキナーゼを用いて示した。dMyD88 の C 末端側には、cGMP キナーゼによりリン酸化を受けるコンセンサス配列が存在しており、cGMP 依存性プロテインキナーゼが直接 dMyD88 をリン酸化し、dMyD88 からのシグナルを活性化する可能性が高いと予想したが、dMyD88 のリン酸化を受けるコンセンサス配列は必要ないことが明らかとなった。そこで、Gyc76C による抗菌ペプチド産生誘導に必要な因子を同定するために、DL1 細胞を用いたゲノムワイド RNAi スクリーニングを開始した。そのゲノムワイドスクリーニングから、プロテインフォスファターゼ (PP) 複合体を同定した。そして、PP 複合体は、Gyc76C に依存した抗菌ペプチドの発現誘導と、Gyc76C や cGMP 依存性プロテインキナーゼと同様に、グラム陽性菌に対する宿主の感染抵抗性の発現に必要であった。この結果は、PP 複合体が、cGMP 依存性プロテインキナーゼと同様に、新規 cGMP 経路の制御に関わっていることを示している。

(2) ヒト細胞培養系での新規 cGMP 経路の解明

ヒト細胞株を用いて、ショウジョウバエと同様に、cGMP 依存性プロテインキナーゼが、MyD88 依存の NF- κ B の活性化を増強することを確認した。さらに、ショウジョウバエで同定した

cGMP 依存性プロテインキナーゼによる dMyD88 依存の抗菌ペプチド産生の増強に必要な因子 PP 複合体のホモログが、ヒト細胞株における cGMP 依存性プロテインキナーゼによる MyD88 依存の NF- κ B の活性化の増強に必要かどうか調べたところ、それを示唆する結果を得た。

(3) Gyc76C が活性化する cGMP 非依存経路の解明

Gyc76C 依存のマクロファージの増殖誘導に対する低分子量 G タンパク質の発現抑制の影響を調べたところ、低分子量 G タンパク質の RNA-i により、Gyc76C 依存のマクロファージの増殖誘導が抑制された。一方で、低分子量 G タンパク質の RNA-i により Gyc76C 依存の抗菌ペプチド誘導は影響を受けなかったことから、低分子量 G タンパク質は、Gyc76C が活性化する cGMP 非依存経路に関わる事が明らかとなった。

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 6 件)

Seiji Tsuzuki, Masanori Ochiai, Hitoshi Matsumoto, Shoichiro Kurata, Atsushi Ohnishi and Yoichi Hayakawa *Drosophila* growth-blocking peptide-like factor mediates acute immune reactions during infectious and non-infectious stress. *Sci. Rep.* 査読有、2, 210, 2012.

DOI: 10.1038/srep00210.

Haruhisa Kikuchi, Masato Isobe, Shoichiro Kurata, Yasuhiro Katou, and Yoshiteru Oshima

New Dimeric and Monomeric Chromanones, Gonytolides D-G, Isolated from the Fungus *Gonytrichum* sp. *Tetrahedron* 査読有、68, 6218-6223, 2012.

DOI: 10.1016/j.tet.2012.05.064

Haruhisa Kikuchi, Yuichi Sato, Shoichiro Kurata, Yasuhiro Katou, Yoshiteru Oshima.

Terresterol, a Polyoxygenated Lanostanoid, Isolated from the Oomycete *Saprolegnia terrestris*, and Its Innate Immune-Promoting Activity. *Tetrahedron* 査読有、69, 3536-3542, 2013.

DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2013.02.088>

Takayuki Kuraishi, Aki Hori, and

Shoichiro Kurata

Host-microbe interactions in the gut of *Drosophila melanogaster*. *Front. Physiol.* 査読有、4: 375, 2013.

DOI: 10.3389/fphys.2013.00375

Shoichiro Kurata

Peptidoglycan recognition proteins in *Drosophila* immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 査読有、42, 36-41, 2014.

DOI: 10.1016/j.dci.2013.06.006.

Tomita T, Ieguchi K, Coin F, Kato Y, Kikuchi H, Oshima Y, Kurata S, Maru Y. ZFC3H1, a Zinc Finger Protein, Modulates IL-8 Transcription by Binding with Celastramycin A, a Potential Immune Suppressor. *PLoS One.* 査読有、2014 Sep 30;9(9):e108957.

DOI: 10.1371/journal.pone.0108957. eCollection 2014.

[学会発表](計 13 件)

Shoichiro Kurata

"New Toll gate for humoral and cellular immune response in *Drosophila*"

The 12th Congress of the International Society of Developmental and Comparative Immunology, Plenary lecture, July 9, 2012, Fukuoka

Shoichiro Kurata

A link coordinating humoral and cellular responses in *Drosophila* immunity.

XXIV International Congress of Entomology, August 19-25, 2012. Daegu, Korea.

Shoichiro Kurata

A receptor-type guanylate cyclase mediates humoral and cellular responses in *Drosophila* immunity. EMBO-ESF Research Conference "Integrated Insect Immunology: From Basic Biology To Environmental Applications" September 23-28, 2013. Pultusk, Poland.

DOI: 10.1016/j.tet.2013.02.088

Shoichiro Kurata

Recognition of microbes and regulation of innate immunity. KVA-JSPS Seminar January 8-12, 2014. Uppsala University, Umeå University, and Stockholm University in Sweden, and Tampere University in Finland

Shoichiro Kurata

A link coordinating humoral and cellular responses in *Drosophila* immunity.

Asian invertebrate immunity

symposium 2013 February14, 2014.
Busan, Korea

Shoichiro Kurata

A link coordinating humoral and
cellular responses in *Drosophila*
immunity.

Glasgow Epitheliome meeting in 2014,
April 23, 2014, Glasgow UK.

Shoichiro Kurata

Novel Regulator, Sherpa, Regulating
Drosophila NF-kB Signaling.

The 3rd Homeostatic Inflammation
International Symposium, January 29,
2015, Tokyo, Japan

Hiroataka Kanoh, Hiroaki Suzuki, Shinzo
Iwashita, Akira Goto, Takayuki
Kuraishi, Julian A. T. Dow,
Shireen-Anne Davies & Shoichiro
Kurata

A receptor guanylyl cyclase
mediating

Toll-independent/dMyD88-dependent
humoral response and
dMyD88-independent cellular
response in *Drosophila* immunity.

EMBO/EMBL Symposia : New
Perspectives on Immunity to
Infection. May 19-22, 2012. EMBL
Heidelberg, Germany

狩野裕考、石川裕規、倉石貴透、倉田
祥一朗

ショウジョウバエ自然免疫における
cGMP依存免疫応答活性化機構の解析
第78回日本生化学会東北支部例会、
2012年5月26日、山形

鈴木弘章、倉石貴透、倉田祥一朗

ショウジョウバエ受容体型グアニル酸
シクラーゼによる血球細胞増殖を介し
た自然免疫制御機構の解明

第23回日本生体防御学会総会 2012
年7月9日~11日、東京

Hiroataka Kanoh, Hiroaki Suzuki, Shinzo
Iwashita, Akira Goto, Takayuki
Kuraishi, Julian A. T. Dow,
Shireen-Anne Davies & Shoichiro
Kurata

A receptor guanylyl cyclase
mediating

Toll-independent/dMyD88-dependent
humoral response and
dMyD88-independent cellular
response in *Drosophila* immunity.

22nd IUBMB, 37th FEBS Congress,
September 4th-9th, 2012, Sevilla,
Spain

鈴木弘章、倉石貴透、倉田祥一朗

ショウジョウバエ受容体型グアニル酸
シクラーゼによる血球細胞増殖を介し
た自然免疫制御機構の解明

第85回日本生化学会大会 2012年12

月14日~16日、福岡

狩野裕考、倉石貴透、倉田祥一朗

ゲノムワイド RNAi スクリーニングに
よるショウジョウバエ細胞内 Toll 経
路および cGMP 依存性経路における新
規シグナル伝達因子の同定

第37回日本分子生物学会年会 2014年
11月25-27日、横浜

〔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.pharm.tohoku.ac.jp/~seimei/seimei
_original.html](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: