

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21117005

研究課題名(和文) ショウジョウバエにおける内因性リガンド・病原体センサーによる恒常性維持機構

研究課題名(英文) HOMEOSTATIC INFLAMMATION IN DROSOPHILA

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) 122,500,000円、(間接経費) 36,750,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ショウジョウバエを用いて、3つの研究項目(1)新規受容体Gyc76Cとその内因性リガンドによる恒常性維持機構の解明(2)病原体センサーPGRP-LEにより恒常的に誘導されている自然炎症の制御機構の解明、(3)病原体センサーPGRP-LEによるオートファジー誘導に見られる動的移行機構の解明を行い、病原体センサーが病原体成分に限らず自己由来内因性リガンドにも応答し、恒常性維持機構としての自然炎症を誘導しており、その破綻が病態へつながることを示すと共に、その分子的基盤の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the molecular mechanisms of homeostatic inflammation focusing on three items (1) new receptor, Gyc76C, and its endogenous ligand, (2) pathogen sensor, PGRP-LE, dependent induction of homeostatic inflammation, and (3) PGRP-LE-dependent autophagy induction, using Drosophila as a model system.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：自然炎症 病原体センサー 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) 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 (Nature 1997)。一方ショウジョウバエでは、Toll 受容体は自己由来内因性リガンドである Spz を認識し、直接病原体を認識するセンサーの存在は不明であった。

研究代表者は、ゲノム機能を利用した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 を同定した (PNAS 2002)。PGRP-LE は、グラム陰性菌などが有するジアミノピメリン酸型ペプチドグリカンの特異的に認識し、グラム陰性菌の感染などによって活性化される細胞内シグナル伝達系 (imd 経路) を活性化することで抗菌ペプチド産生を誘導すると共に、体液中でメラニン化を誘導する (PNAS 2002)。時を同じくして、海外の研究グループから、同じ PGRP ファミリーに属する PGRP-SA が、imd 経路と異なる細胞内シグナル伝達系である Toll 経路を介して、グラム陽性菌の感染によって誘導される抗菌ペプチドの産生に関わること (Nature 2001)、また PGRP-LC が、PGRP-LE と同様に、imd 経路の活性化に関わることが示された (Nature 2002, Science 2002)。これらにより、ショウジョウバエでは PGRP ファミリーが一群の病原体センサーとして機能することが明らかとなった。

PGRP-LE が活性化するメラニン化は、ショウジョウバエにおける急性炎症反応であり、体液中のフェノール酸化酵素前駆体 (proPO) が活性化することで誘導される。この proPO の活性化は、セリンプロテアーゼ群 (MP1, Sp7, PPAE) が行うが、セリンプロテアーゼインヒビターである Spn27A により制御されている。Spn27A の変異体では、病原体の感染がなくとも持続的なメラニン化が観察されること (Dev. Cell 2002) から、この経路は、非感染時においても恒常的に活性化しているが、その反応は制御されていると考えられる。研究代表者は、この Spn27A 変異体で観察される持続的なメラニン化が、PGRP-LE の変異により抑制されることを見いだした (EMBO J. 2004)。これらの結果は、PGRP-LE は非感染時においても恒常的に活性化されているが、その反応は Spn27A により制御されている事を示している。この結果に呼応して、ショウジョウバエで PGRP-LE を過剰発現しこの制御を破綻させると、非感染時においても過度なメラニン化が誘導され、致死となる (PNAS 2002)。これらの結果は、病原体センサーである PGRP-LE が、病原体成分に限らず自己由来内因性リガンドにも応答し、

持続的に炎症反応を誘導すること、さらに、その破綻が個体死を招くことを示唆している。これはまさしく、本新学術領域研究が提唱する自然炎症と、その破綻による病的炎症の誘導の典型例であり、本研究では、その自然炎症の制御機構を分子レベルで明らかにすると共に、その破綻から病態へ移行する過程を明らかにすることにした。

2. 研究の目的

本研究では、

(1) PGRP-LE を介して恒常的に誘導されている自然炎症の制御機構の解明

(2) オートファジー誘導に見られる動的移行機構の解明

(3) 内因性リガンドに対応する新たな生体防御機構の解明

を行い、病原体センサーが病原体成分に限らず自己由来内因性リガンドにも応答し自然炎症を誘導しており、その破綻が病態へつながることを明確に示すと共に、その分子的基盤を理解し、そこに存在する自然炎症の基本原則を浮き彫りにする。

本研究で、焦点を当てる自然炎症の3つの局面は、いずれも研究代表者のオリジナルな研究成果に基づき初めて明らかとなったもので、きわめて独創的である。それと同時に、本研究では、それらの分子機構の解明という縦系の解析に、横糸を紡ぐように自然炎症の基本原則を探る。これにより初めて自然炎症という概念が、その分子基盤を伴って理解されることとなり、当該領域の新たなブレイクスルーへ発展することが期待できる。

3. 研究の方法

病原体センサー PGRP-LE は、非感染時においても恒常的に活性化しているが、その炎症反応は制御されている。ところが、その制御が破綻すると、感染がなくとも過度な炎症反応が誘導され個体死に至る。本研究では、この恒常的に誘導されている自然炎症の制御機構を明らかにするために、二つの遺伝学的スクリーニングを行った。第一のスクリーニングは、PGRP-LE の過剰発現で誘導されるメラニン化を抑制する染色体欠失変異体のスクリーニングであり、第二のスクリーニングは、第二のスクリーニングは、RNA-i により発現抑制を行った際に、感染が無くともメラニン化を誘導する遺伝子の探索である。

また本研究では、オートファジー誘導に見られる動的移行機構の解明のために、PGRP-LE. Ref(2)P タンパク質の機能ドメインの同定を行った。

さらに、新規受容体 Gyc76C の下流のシグナル伝達機構を明らかにするために、ゲノムワイドな RNA-i スクリーニングを行っ

た。

また、過剰発現により感染非依存に自然炎症を制御する NF- κ B 経路を活性化する遺伝子を同定するために、GAL4/UAS システムを用いた機能獲得型スクリーニングを行った。ショウジョウバエの NF- κ B 経路である Toll 経路と imd 経路の活性化を検出するために、それぞれの経路で制御されている抗菌ペプチド Drs と Dip の発現をモニターできるレポーター遺伝子を用いた。

4. 研究成果

平成 21 年度

ショウジョウバエを用いた機能獲得型ゲノムワイドスクリーニングにより、自然免疫を制御する新規受容体を同定している。本研究では、この新規受容体とこれまで明らかとなっている自然免疫機構、特に、哺乳動物では病原体センサーとして機能し、ショウジョウバエでも自然免疫受容体として機能する Toll 受容体が制御している機構との関係を調べた。その結果、新規受容体は、Toll 経路で働く dMyD88, Tube, Pelle, Drsal/Dif を介して抗菌ペプチドの産生を誘導しているものの、Toll 受容体そのものとは独立して機能していることが明らかとなった。また、その際、cGMP を介して作用していることも明らかとなった。さらに、DNA マイクロアレイの解析により、新規受容体は、抗菌ペプチドだけでなく、セリンプロテアーゼなど他の多くの遺伝子の発現誘導を制御していることが明らかとなった。これらの結果は、自然免疫を制御する cGMP を介した新規なシグナル伝達系が存在していることを示している。本研究で同定した新規シグナル伝達経路も Toll 経路と同様に、種を超えて存在し、自然炎症の制御を行っている可能性を指摘できた。

平成 22 年度

病原体センサー PGRP-LE は、非感染時においても恒常的に活性化しているが、その炎症反応(メラニン化)は制御されている。ところが、その制御が破綻すると、感染がなくとも過度な炎症反応が誘導され個体死に至る。本研究では、この恒常的に誘導されている自然炎症の制御機構を明らかにするために、二つの遺伝学的スクリーニングを行った。第一のスクリーニングは、PGRP-LE の過剰発現で誘導されるメラニン化を抑制する染色体欠失変異体のスクリーニングであり、第 2 染色体左腕 88%、第 2 染色体右腕 82%、第 3 染色体左腕 88%、第 3 染色体右腕 85% の領域を欠失する染色体欠失変異体ライブラリー 158 システムをスクリーニングした。これにより 11 システムを同定した。さらに、これらの系統で欠失している領域内の、より小さな欠失を有する

変異体 46 システムを解析し、同様の抑制がみられる 4 システムを同定した。これらの領域には、55 遺伝子が存在しており、原因遺伝子の同定を進めた。第二のスクリーニングは、RNA-i により発現抑制を行った際に、感染がなくともメラニン化を誘導する遺伝子の探索である。これにより、大腸菌の DnaJ (Hsp40) 様のシャペロン DroJ2 と、それと相互作用する Hsc70-4 が負の調節因子として自然炎症を制御している可能性が示唆された。さらに PGRP-LE が JAK/STAT 経路と協調的に働いていることも明らかとなった。

平成 23 年度

哺乳動物でオートファジーの誘導に関わる事が示されている p62 のホモログである Ref(2)P は、酵母の two-hybrid 系で PGRP-LE と相互作用する。本研究により、PGRP-LE と Ref(2)P がショウジョウバエ S2 細胞内で複合体を形成することが明らかとなった。さらに、免疫染色により、S2 細胞内で、感染したリステリア菌、PGRP-LE、Ref(2)P、ユビキチン化タンパク質、そしてオートファジーのマーカーである LC3 が共局在することが明らかとなった。加えて、Ref(2)P が、PGRP-LE 依存のオートファジー誘導に必要であり、さらに細胞内寄生細菌リステリア菌に対する宿主の感染抵抗性の発現に重要であることを明らかにした。これらの結果は、PGRP-LE によるオートファジー誘導において、Ref(2)P が重要な役割を果たしていることを示しており、Ref(2)P がアダプター分子として機能している可能性を示唆している。オートファジーは、ウイルスに対する感染抵抗性にも重要であることが示されている。本研究により、Ref(2)P が、細胞内寄生細菌のみならず、ウイルスに対する宿主の感染抵抗性の発現に重要であることが明らかとなった。したがって、Ref(2)P は細胞内感染によるオートファジー誘導のプラットフォームとして機能している可能性が考えられた。

平成 24 年度

Gyc76C の内因性リガンドを同定するために、Gyc76C を発現している S2 細胞を用いて、Gyc76C を活性化し cGMP の産生を誘導する活性を指標に、ショウジョウバエ個体から内因性リガンドを生化学的手法により精製することを試みた。さらに、PGRP-LE と Ref(2)P の相互作用が PGRP-LE のオートファジー誘導に必要なアミノ酸の置換により減弱することが明らかとなった。この結果は、Ref(2)P がオートファジー誘導に特異的に働くアダプター分子として機能していることを示唆している。また、細胞内で、感染したリステリア菌、PGRP-LE、Ref(2)P、そしてオートファジーのマーカーである LC3 が共局在することを明らかにしているが、

リステリア菌へのRef(2)Pの集積が、PGRP-LEに依存していることが明らかとなった。さらに、リステリア菌へのPGRP-LEの集積も、Ref(2)Pに依存していることが明らかとなった。これらの結果は、PGRP-LEとRef(2)Pが、相互依存的に感染したリステリア菌に集積することを示している。

平成25年度

Gyc76Cは、Toll受容体と同様に、グラム陽性菌に対する感染抵抗性の発現に必須である。本研究により、Gyc76CがMyD88を介して抗菌ペプチド産生などの液性免疫応答を誘導させるだけでなく、MyD88を介さずにマクロファージ(体液細胞)の増殖を誘導(細胞性免疫応答)することが明らかとなった。そして、これらの二つの応答は、Gyc76Cによりそれぞれ異なる経路で制御されていることが明らかとなった。すなわち、液性応答は、Gyc76Cが産生するcGMPが介在する新規cGMP経路により制御されており、細胞性応答は、cGMPに依存しない経路により制御されている。さらに、研究代表者は、この新規cGMP経路を制御するcGMP依存性プロテインキナーゼを同定した。Toll経路は、哺乳動物においてもTLR経路として存在している。研究代表者は、ヒト細胞培養系で、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見いだした。この結果は、ショウジョウバエで見いだした新規cGMP経路がヒトにおいても存在していることを示唆している。さらに、Gyc76CがcGMP非依存に誘導する細胞性免疫応答に必要なGyc76Cのドメインを同定した。この領域は、Gyc76CがcGMP依存に誘導する液性免疫応答に必要なドメインとは異なることが明らかとなった。また、恒常的に自然炎症を誘導するDroJ2の哺乳動物ホモログも、ショウジョウバエと同様にNF- κ B経路の活性化に関わる事が明らかとなった。

このように本研究では、ショウジョウバエを用いて、3つの研究項目(1)新規受容体Gyc76Cとその内因性リガンドによる恒常性維持機構の解明(2)病原体センサーPGRP-LEにより恒常的に誘導されている自然炎症の制御機構の解明、(3)病原体センサーPGRP-LEによるオートファジー誘導に見られる動的移行機構の解明を行い、病原体センサーが恒常性維持機構としての自然炎症を誘導しており、その破綻が病態へつながることを示すと共に、その分子的基盤の一端を明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計15件)

Kikuchi, H., Sato, Y., Kurata, S., Katou, Y., Oshima, Y.: Terrestrial, a Polyoxygenated Lanostanoid, Isolated from the Oomycete *Saprolegnia terrestris*, and Its Innate Immune-Promoting Activity. *Tetrahedron* **69**, 3536-3542, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2013.02.088> 査読有

Kuraishi, T., Hori, A., Kurata, S.: Host-microbe interactions in the gut of *Drosophila melanogaster*. *Front. Physiol.* **4**: 375, 2013. DOI: [10.3389/fphys.2013.00375](https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00375) 査読有

Kurata, S.: Peptidoglycan recognition proteins in *Drosophila* immunity. *Dev. Comp. Immunol.* **42**, 36-41, 2014. DOI: [10.1016/j.dci.2013.06.006](https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.06.006). 査読有

Tsuzuki, S., Ochiai, M., Matsumoto, H., Kurata, S., Ohnishi A., Hayakawa, Y.: *Drosophila* growth-blocking peptide-like factor mediates acute immune reactions during infectious and non-infectious stress. *Sci. Rep.* **2**, 210, 2012. DOI: [10.1038/srep00210](https://doi.org/10.1038/srep00210). 査読有

Kikuchi, H., Isobe, M., Kurata, S., Katou, Y., Oshima, Y.: New Dimeric and Monomeric Chromanones, Gonytolides D-G, Isolated from the Fungus *Gonytrichum* sp. *Tetrahedron* **68**, 6218-6223, 2012. DOI: [10.1016/j.tet.2012.05.064](https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.05.064) 査読有

Ntwasa, M., Goto, A., Kurata, S.: Coleopteran antimicrobial peptides: Prospects for clinical applications. Special Issue on "Antimicrobial Peptides as Therapeutic Agents" *International Journal of Microbiology*. 2012, Article ID 101989, 2012. DOI: [10.1155/2012/101989](https://doi.org/10.1155/2012/101989). 査読有

Kikuchi, H., Okazaki, K., Sekiya, M., Uryu, Y., Ueda, K., Katou, Y., Kurata, S., Oshima, Y.: Synthesis and Innate Immunosuppressive Effect of 1,2-Cyclopentanediol Derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 1263-1273, 2011. 査読有

Sekiya, M., Ueda, K., Okazaki, K., Terashima, J., Katou, Y., Kikuchi, H., Kurata, S., Oshima, Y.: A phytoceramide analog stimulates the production of chemokines through CREB activation in human endothelial cells. *Int. Immunopharmacol.* **11**, 1497-1503, 2011. 査読有

Kikuchi, H., Isobe, M., Sekiya, M., Abe, Y., Hoshikawa, T., Ueda, K., Kurata, S., Katou, Y., Oshima, Y.: Structures of the dimeric and monomeric chromanones, gonytolides A-C, isolated from the

fungus *Gonytrichum* sp. and their promoting activities of innate immune responses. *Org. Lett.* **13**, 4624-4627, 2011. 査読有

Yano, T., Kurata, S.: Intracellular Recognition of Pathogens and Autophagy as an Innate Immune Host Defense. *J. Biochem.* **150**, 143-149, 2011. 査読有
Goto, A., Yano, T., Terashima, J., Iwashita, S., Oshima, Y. Kurata, S.: Cooperative regulation of the induction of the novel antibacterial listericin by PGRP-LE and the JAK-STAT pathway. *J. Biol. Chem.* **285**, 15731-15738, 2010. 査読有

Kurata, S.: Extracellular and intracellular pathogen recognition by *Drosophila* PGRP-LE and PGRP-LC. *Int. Immunol.* **22**, 143-148, 2010. 査読有

Yano, T., Kurata, S.: An unexpected twist for autophagy in Crohn's disease. *Nature Immunol.*, **10**, 134-136, 2009 査読有

Kikuchi, H., Hoshi, T., Kitayama, M., Sekiya, M., Katou, Y., Ueda, K., Kubohara, Y., Sato, H., Shimazu, M., Kurata, S., Oshima, Y.: New diterpene pyrone-type compounds, metarhizins A and B, isolated from entomopathogenic fungus, *Metarhizium flavoviride* and their inhibitory effects on cellular proliferation. *Tetrahedron* **65**, 469-477, 2009. 査読有

Kikuchi, H., Sekiya, M., Katou, Y., Ueda, K., Kabeya, T., Kurata, S., Oshima, Y.: Revised Structure and Synthesis of Celastramycin A, a Potent Innate Immune Suppressor. *Organic Letters* **11**, 1693-1695, 2009. 査読有

〔学会発表〕(計 77 件)

招待講演のみ記入

発表者は、全て研究代表者：倉田祥一郎

Glasgow Epitheliome meeting in April 2014. A link coordinating humoral and cellular responses in *Drosophila* immunity. April 23, 2014. Glasgow, UK.
Asian invertebrate immunity symposium 2013. A link coordinating humoral and cellular responses in *Drosophila* immunity. February 14, 2014. Busan, Korea.

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

Poland.

XXIV International Congress of Entomology. A link coordinating humoral and cellular responses in *Drosophila* immunity. August 19, 2012. Daegu, Korea.

The 12th Congress of the International Society of Developmental and Comparative Immunology, Plenary lecture. New Toll gate for humoral and cellular immune response in *Drosophila*. July 9, 2012, Fukuoka, Japan.

8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry. A receptor guanylyl cyclase mediates humoral and cellular responses in *Drosophila* immunity. May 31, 2011, Nagoya, Japan.

International symposium on Deciphering a link between pathogen sensors and inflammatory diseases. Innate immune responses in *Drosophila*. July 28, 2010. Tokyo, Japan.

The 2010 Gordon Research Conference on Autophagy in Stress, Development & Disease. Recognition of intracellular bacterial infections and induction of autophagy in *Drosophila* immunity. April 25, 2010. Lucca (Barga), Italy. The STINT workshop. Intracellular bacterial recognition and induction of immune responses in *Drosophila*. March 15, 2010. Uppsala, Sweden.

5th International Symposium on Autophagy. Induction of autophagy via intracellular innate immune recognition in *Drosophila*. September 24, 2009. Otsu, Japan.

CNRS meeting "Insect immunity in action". Induction of autophagy via intracellular innate immune recognition in *Drosophila*. May 23, 2009. Aussois, France.

The 66th KABMB annual meeting. Induction of autophagy via intracellular innate immune recognition in *Drosophila*. May 12, 2009. COEX, Korea.

〔その他〕

ホームページ

http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seimei/seimei_original.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉田 祥一郎 (KURATA SHOICHIRO)
東北大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：90221944