

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15131

研究課題名(和文)細菌プロテアーゼを介した新たな宿主病原体相互作用の解明

研究課題名(英文)Studies on new host-pathogen interaction via bacterial protease

研究代表者

荒瀬 尚(Arase, Hisashi)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：10261900

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)：細菌の中にはプロテアーゼを産生することによって、抗体の可変領域を切断し破壊するものが存在することが判明した。さらに、我々は、細菌の産生するプロテアーゼで切断された抗体を特異的に認識する活性化レセプターとしてLILRA2を同定した。切断された抗体はLILRA2を発現している好中球を特異的に活性化した。また、切断型抗体による単球の刺激でレジオネラ菌の増殖が顕著に阻害された。さらに、感染患者の膿汁を調べると、切断された抗体が存在し、それらはLILRA2発現細胞を活性化することが判明した。以上より、LILRA2は切断された抗体を認識することで感染防御に関与していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Certain bacteria inactivate antibody by cutting variable region of antibody. Furthermore, we found that such truncated antibodies are recognized by immune activating receptor, LILRA2. Truncated antibodies specifically activated neutrophils expressing LILRA2. In addition, growth of Legionella in monocytes were suppressed by stimulation with truncated antibodies. These results suggested that LILRA2 plays an important role in host defense by recognizing truncated antibodies.

研究分野：免疫学

キーワード：プロテアーゼ LILRA2 免疫逃避 生体防御 レジオネラ マイコプラズマ

## 1. 研究開始当初の背景

細菌の中には一過性の急性感染を引き起こすものもあるが、持続感染し続ける病原細菌も存在する。持続感染する病原細菌には、宿主免疫応答から逃れるための様々な免疫逃避機構が存在すると考えられる。一方、抗体は細菌感染に対する生体防御において非常に重要な機能を担っている。細菌に対する抗体は、細菌に直接傷害を加える他、Fc レセプターを発現している好中球等を介して細菌を攻撃するのに重要な機能を担っている。ところが、細菌の中にはプロテアーゼを産生することによって、抗体を破壊するものが存在する。一方、我々は、免疫レセプターと病原体の相互作用の解析から(Satoh et al. *Cell* 2008; Suenaga et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; Wang et al. *Nat. Immunol.* 2013)、細菌の産生するプロテアーゼで切断された抗体を特異的に認識する免疫活性化レセプター-LILRA2を同定した。

## 2. 研究の目的

抗体は細菌感染に対する免疫応答に対して重要な機能を担っているが、細菌の中には、プロテアーゼを産生することによって、細菌に対する抗体を切断する免疫逃避機構を持っているものがある。我々は、好中球の発現する機能未知の活性化レセプターの中に、細菌の産生する特定のプロテアーゼによって切断された抗体を特異的に認識するレセプター(LILRA2)を同定した。つまりLILRA2は、抗体が破壊されるという免疫システムにとって危機的状況を検出するためのレセプターである可能性がある。一方、細菌の産生するプロテアーゼは宿主病原体相互作用に非常に重要である。しかし、抗体を切断する細菌プロテアーゼの正体はほとんど解明されていない。そこで、本研究では LILRA2 の認識に関わる細菌プロテアーゼを同定し、新たな宿主病原体相互作用を解明する。

## 3. 研究の方法

本研究では、まず LILRA2 のリガンドとなるように抗体を切断するプロテアーゼの同定を行う。特に、プロテアーゼ活性を持つ分画を細菌の培養上清から精製し、質量分析で同定する。また、LILRA2 による切断された抗体の認識が、感染防御にどのように機能するかを解析する。患者サンプルを用いて、切断された抗体の機能を解析する。

### ①細菌プロテアーゼの同定

IR を介した生体防御機構を解明するために、LILRA2 に認識されるように抗体を切断する細菌プロテアーゼの同定が欠かせない。そこで、LILRA2 によって認識されるように抗体を切断するプロテアーゼの産生が強いレジオネラ菌、マイコプラズマ、肺炎球菌等からプロテアーゼの同定を行う。

レジオネラ菌や肺炎球菌の培養上清には LILRA2 によって認識されるように抗体を切断するプロテアーゼの活性化が認められた。そこで、培養上清から HPLC を用いて精製し、プロテアーゼ活性の強い分画を LILRA2-Fc キメラ分子(Suenaga et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; Shiratori et al. *J. Exp. Med.* 2004)や LILRA2 レポーター細胞(下図)を用いて濃縮する。最終的には、(Satoh et al. *Cell* 2008)で用いた質量分析により、プロテアーゼの同定を行う。

### ②細菌プロテアーゼの機能解析

上記で同定するプロテアーゼの機能を、プロテアーゼの強制発現系および欠損株を作成することによって解析する。LILRA2 によって認識されるように抗体を切断するプロテアーゼを持つ細菌から、プロテアーゼの欠損株を作成し、プロテアーゼの病原性に与える影響を明らかにする。プロテアーゼを産生するレジオネラ菌はマウスに感受性で実際に抗体を切断する。そこで、プロテアーゼ欠損レジオネラをマウスに感染させることによって抗体の切断に影響を受けるかを解析する。

## 4. 研究成果

LILRA2 がどのように切断された抗体を認識するかを詳細に解析した。その結果、LILRA2 は、重鎖が切断された抗体を認識することが判明した。一方、LILRA2 の認識には、抗体の軽鎖の配列に依存していることが判明した。つまり、重鎖が切断されることによって露出した軽鎖の可変領域を LILRA2 は認識することが判明した。一方、IgM だけでなく、IgG1、IgG2、IgG2、IgG4 も切断されることによって LILRA2 に認識されたが、IgA は認識されなかった。正確な原因は不明だが、抗体の定常領域の配列も LILRA2 の認識に関与していると考えられた。

次に、レジオネラの培養上清に、抗体を可変領域を切断する酵素活性が認められたことから、培養上清に含まれるプロテアーゼの同定を試みた。培養上清のプロテアーゼ活性が認められる分画を HPLC を用いて、ゲル濾過、イオン交換カラムを用いて精製し、プロテアーゼ活性の認められる分画の質量分析による解析を行った。その結果、レジオネラ菌の分泌タンパク質である Msp が同定された。そこで、リコンビナントの Msp を作成して解析したところ、レジオネラ菌の培養上清と同様な酵素活性が認められ、切断された抗体は LILRA2 によって認識された。さらに、Msp 欠損レジオネラを解析したところ、培養上清には抗体切断活性は認められなかった。以上より、Msp が抗体の切断に関与しているレジオネラのプロテアーゼであることが明らかになった。

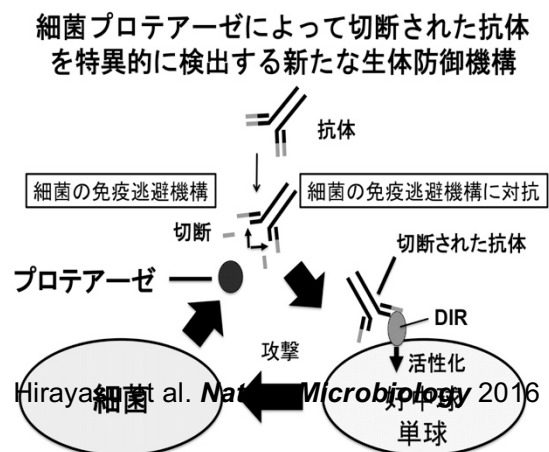
次に、切断された抗体の機能についての解析を行った。その結果、固相化した切断型抗体は LILRA2-NFAT-GFP レポーター細胞を活性

化することが判明した。また、切断型抗体は LILRA2 を発現している HL60 細胞を活性化したが、CRISPR-Cas9 で LILRA2 を欠落させた HL60 は活性化しなかった。また、切断された抗体は、好中球においても LILRA2 依存性に活性化することが判明した。これらのことから、切断型抗体は LILRA2 を発現している自然免疫細胞を活性化することが判明した。

次に、LILRA2 による活性化が、感染防御に関与しているかどうかを解析した。レジオネラ菌は単球に感染することが知られている。そこで、レジオネラ菌を単球に感染させたのち、単球を LILRA2 で活性化すると、レジオネラ菌の菌数が著明に減少することが判明した。このように、LILRA2 は分解された抗体を認識することによって、プロテアーゼを産生する細菌に対する感染防御に関与していると考えられた。

分解された抗体が実際の感染患者において産生されているかどうかを解析した。中耳炎や皮膚膿瘍の患者さんの膿汁における抗体を解析したところ、重鎖が切断された抗体が確認された。さらに、切断された重鎖が含まれた膿汁は、LILRA2 レポーター細胞を活性化することが判明した。このように、LILRA2 は、感染局所でプロテアーゼによって分解された抗体を検出することによって、感染防御を担っている免疫レセプターであることが判明した。

本研究により、LILRA2 は細菌のプロテアーゼによって切断された抗体を特異的に認識することによって、自然免疫細胞を活性化し、生体防御応答において重要な機能になっている新たなレセプターであることが判明した。つまり、病原細菌は、免疫から逃避するためにプロテアーゼを産生し抗体を切断し不活性化化する。しかし、抗体の不活性化は生体において危険状態である。そこで、免疫システムは、このような抗体異常を検出するために LILRA2 を獲得したのではないかと考えられる。LILRA2 はマウスには存在しなが、同様な活性化レセプターが存在する可能性がある。そこで、LILRA2 に相当するマウスの分子の検索や LILRA2 のトランスジェニックマウスを用いた



解析が、LILRA2 の生体内での機能を解析する上で重要であると思われる。また、レジオネラ以外の細菌のプロテアーゼを同定することで、細菌の病原性を調べる新たな指標になる可能性が考えられる (Hirayasu et al. *Nature Microbiology* 2016)。

## 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 4 件)

- ① Hirayasu K, Saito F, Suenaga T, Shida K, Arase N, Oikawa K, Yamaoka T, Murota H, Chibana H, Nakagawa I, Kubori T, Nagai H, Nakamaru Y, Katayama I, Colonna M, Arase H. Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2. *Nat. Microbiol.* 2016. 1(6):16054. 査読有  
DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.54.
- ② Kohyama M, Matsuoka S, Shida K, Sugihara F, Aoshi T, Kishida K, Ishii KJ, Arase H. Monocyte infiltration into obese and fibrilized tissues is regulated by PILR $\alpha$ . *Eur. J. Immunol.* 2016. 46(5):1214-1223. 査読有  
DOI: 10.1002/eji.201545897.
- ③ Suenaga T, Matsumoto M, Arisawa F, Kohyama M, Hirayasu K, Mori Y, Arase H. Sialic Acids on Varicella-Zoster Virus Glycoprotein B Are Required for Cell-Cell Fusion. *J. Biol. Chem.* 2015. 290(32):19833-19843. 査読有  
DOI: 10.1074/jbc.M114.635508.
- ④ Hirayasu K, Arase H. Functional and genetic diversity of leukocyte immunoglobulin-like receptor and implication for disease associations. *J. Hum. Genet.* 2015. 60(11):703-708. 査読有  
DOI: 10.1038/jhg.2015.64.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Kouyuki Hirayasu, Fumiji Saito, Tadahiro Suenaga, Kyoko Shida, Noriko Arase, Keita Oikawa, Toshifumi Yamaoka, Hiroyuki Murota, Hiroji Chibana, Ichiro Nakagawa, Tomoko Kubori, Hiroki Nagai, Yuji Nakamaru, Ichiro Katayama, Marco Colonna, Hisashi Arase, Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2, 第 45 日本免疫学会学術集会, 沖縄コンベンションセンター(沖縄), 2016 年 12 月 7 日
- ② 平安 恒幸, 齋藤 史路, 末永 忠広, 信田 京子, 荒瀬 規子, 及川 敬太, 山

岡 俊文, 室田 浩之, 知花 博治, 中川 一路, 久堀 智子, 永井 宏樹, 中丸 裕爾, 片山 一朗, Marco Colonna, 荒瀬 尚, HLA クラス I 認識受容体群 LILR の新展開 - 病原微生物によって壊された抗体を認識する生体防御機構 -, 第 25 回日本組織適合性学会大会, 北海道大学(北海道), 2016 年 10 月 24 日

- ③ Hirayasu K, Saito F, Suenaga T, Shida K, Arase N, Oikawa K, Yamaoka T, Murota H, Chibana H, Nakagawa I, Kubori T, Nagai H, Nakamaru Y, Katayama I, Colonna M, Arase H, Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2, 16th Annual Meeting of the Society for Natural Immunity, Taormina, Italy, Oct. 3<sup>th</sup>, 2016.
- ④ Hirayasu K, Saito F, Suenaga T, Shida K, Arase N, Oikawa K, Yamaoka T, Murota H, Chibana H, Nakagawa I, Kubori T, Nagai H, Nakamaru Y, Katayama I, Colonna M, Arase H, Microbially cleaved immunoglobulins are sensed by the innate immune receptor LILRA2, 15th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji island, Japan, Sep. 24<sup>th</sup>, 2016.
- ⑤ Hirayasu Kouyuki, Saito Fumiji, Suenaga Tadahiro, Shida Kyoko, Arase Noriko, Oikawa Keita, Yamaoka Toshifumi, Murota Hiroyuki, Chibana Hiroji, Nagai Hiroki, Nakamaru Yuji, Katayama Ichiro, Arase Hisashi, LILRA2 is an innate immune sensor for microbially cleaved immunoglobulins, 第 44 日本免疫学会学術集会, 札幌コンベンションセンター(北海道), 2015 年 11 月 20 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

特に無し

○取得状況 (計 0 件)

特に無し

[その他]

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒瀬 尚 (ARASE, Hisashi)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号:10261900

(3) 連携研究者

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:3058170

片山 一朗 (KATAYAMA, Ichiro)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号:80191980