

令和元年5月24日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05084

研究課題名(和文)新規cGMP経路によるNF- κ Bシグナル調節機構の解明研究課題名(英文)Studies of modulation mechanisms of NF- κ B signaling by novel cGMP pathway

研究代表者

倉田 祥一郎 (Kurata, Shoichiro)

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：90221944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、自然免疫系が、病原体成分だけでなく自己成分により影響を受け、慢性炎症疾患や、ガン転移、生活習慣病などとも深い関わりがあることが明らかとなってきた。したがって、それらの疾患の理解や創薬を考える際には、自然免疫系調節機構の理解が不可欠である。研究代表者は、自然免疫系の中心的なシグナル伝達であるNF- κ B経路を調節する新規cGMP経路を明らかにしている。本研究では、遺伝学的解析に優れたショウジョウバエを用いた解析と、これまでの解析結果が蓄積されているヒト培養細胞での解析を組み合わせ、cGMP経路によるNF- κ Bシグナルの調節機構の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然免疫系が、病原体成分だけでなく、自己由来のリガンド(内因性リガンド)も認識することが明らかとなってきた。その際、病原体成分では強い反応が一過的に誘導されるのに対して、内因性リガンドでは弱い反応が持続的に誘導され、慢性炎症となる。したがって、このような自然免疫応答の違いが、どのようにして生じるのかを理解することが重要である。本研究により、自然免疫系の中心的なシグナル伝達であるNF- κ B経路の調節機構が明らかとなり、自然免疫制御機構の理解に重要な進展が見られた。

研究成果の概要(英文)：Innate immunity is involved in chronic inflammatory diseases, cancer metastasis, and lifestyle diseases by recognition of self-ligands. Therefore, understanding of regulation mechanisms of innate immune system is indispensable for understanding of these diseases and drug discovery. We have identified novel cGMP signaling pathway that modulates NF- κ B pathway in innate immunity. In this study, we investigated modulation mechanisms of NF- κ B signaling by novel cGMP pathway.

研究分野：生物系薬学

キーワード：NF- κ B cGMP 自然免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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 (Cell 1996) 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してきた。自然免疫の制御に中心的な役割を果たしている NF- κ B 経路は、種を越えて保存されている。その NF- κ B 経路である哺乳動物の 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, IRAK と Pelle, 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。最近では、TLR が自己成分をも認識し、当初関連性が予想されることもなかった慢性炎症疾患や、ガン転移、生活習慣病などとも深い関わりがあることが明らかとなってきた。

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ペプチドグリカン認識タンパク質 (PGRP) -LE を世界に先駆けて同定した (PNAS 2002)。これまでに、PGRP-LE が、Toll 経路とは異なる自然免疫 NF- κ B 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 を同定したスクリーニングを一万余系統以上にまで拡大し、Toll 経路を活性化する受容体型グアニル酸シクラーゼ Gyc76C を同定した (論文投稿中)。Toll 受容体と Gyc76C をそれぞれ単独で活性化した場合に比べて、両者を同時に活性化すると、はるかに強い免疫応答が観察されることから、Gyc76C は、Toll 受容体と協調して NF- κ B シグナルを調節する受容体であることがわかる。さらに、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。これまでに、Gyc76C が産生する cGMP により活性化される cGMP 依存性プロテインキナーゼ (cGK) と、プロテインフォスファターゼ 2A (PP2A) が、Toll 受容体の下流に位置している dMyd88、Pelle を介して NF- κ B シグナルを活性化することを明らかにしている。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 (cGK) が、MyD88/IRAK1 (Pelle ホモログ) 依存の NF- κ B の活性化を増強し、その過程にショウジョウバエと同様に PP2A が関わることを明らかにした。これらの結果は、cGMP が介在する新規自然免疫シグナル経路が存在することを示すと共に、この cGMP 経路が、ショウジョウバエとヒトにおいて共通に NF- κ B シグナルを調節していることを示唆している。これらの知見を踏まえ、本研究では、ショウジョウバエとヒト・マウスの系で、自然免疫新規 cGMP 経路による NF- κ B シグナルの調節機構を明らかにすることにした。

2. 研究の目的

近年、自然免疫系が、病原体成分だけでなく自己成分により影響を受け、慢性炎症疾患や、ガン転移、生活習慣病などとも深い関わりがあることが明らかとなってきた。したがって、それらの疾患の理解と、それを標的とした創薬を考える際には、自己成分による自然免疫系調節機構の理解が不可欠である。NF- κ B 経路は自然免疫を制御する中心的なシグナル伝達系である。

研究代表者は、ショウジョウバエ個体と培養細胞、並びにヒト培養細胞の系において、NF- B 経路を調節する新規 cGMP 経路を明らかにしている。そこで本研究では、遺伝学的解析に優れたショウジョウバエを用いた解析と、抗体などの解析ツールが利用可能であり、これまでの解析結果が蓄積されている哺乳動物（ヒト）培養細胞での解析を組み合わせ、それぞれの利点を利用して、新規 cGMP 経路による NF- B シグナルの調節機構を明らかにすることを目的とした。加えて、ショウジョウバエにおいて cGMP 経路がどのような局面で活性化され、自然免疫系を調節するのかを明らかにすることにした。これにより、自己成分によりどのように自然免疫系が調節されているのか、その分子機構の理解が進むと考えられる。

3 . 研究の方法

これまでに、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、cGK が、MyD88/IRAK1 依存の NF- B の活性化を増強することを見だしている。その際、活性化型 IRAK1 であるリン酸化 IRAK1 の量が増加する。IRAK1 は、TLR 経路の活性化において IRAK4 によるリン酸化を受け活性化し、TLR 経路のシグナル伝達に関与するが、IRAK1 の自己リン酸化は TLR のシグナル伝達においては必要でないことが示されている。そこで、IRAK1 の自己リン酸化が、cGMP 経路による NF- B シグナルの調節に関わるのかどうか検討した。IRAK1 は、セリン・スレオニンキナーゼドメインを持ち、キナーゼドメインに存在する ATP 結合性アミノ酸である 239 番目のリシン (Lys239) 並びに触媒アミノ酸である 340 番目のアスパラギン酸 (Asp340) の変異によって、自己リン酸化が低下することが示されている。そこで、Lys239 と Asp340 を、それぞれセリンに置換した IRAK 変異体 (K239S および D340S) ならびにその両者をセリンに置換した IRAK 変異体 (MT) を、cGK と共に、ヒト HEK293 細胞において共発現させた。その後、NF- B の活性化を NF- B レポーター遺伝子を用いて検出した。

これまでに、ショウジョウバエでは cGMP 経路が Toll 受容体の下流に位置している dMyd88、 Pelle を介して NF- B シグナルを活性化することを明らかにしているが、この過程に PP2A が関わることを明らかにしている。一方、ヒト細胞株を用いた解析から、cGMP 経路が MyD88/IRAK1 依存の NF- B の活性化を増強し、その過程にショウジョウバエと同様に PP2A が関わることを明らかにしている。そこで、cGMP 経路による NF- B シグナルの調節に、PP2A のホスファターゼ活性が必要であるのかどうか、ヒト、並びに、ショウジョウバエの培養細胞の系で調べた。PP2A 阻害剤として、オカダ酸を用いた。MyD88、もしくは、IRAK1 を cGK と共にヒト HEK293 細胞において共発現させた。その後、NF- B の活性化を NF- B レポーター遺伝子を用いて検出し、cGK 依存の NF- B の活性化増強におけるオカダ酸の影響を調べた。同様に、ショウジョウバエ DL1 細胞を用いて、dMyD88 を cGK と共に共発現させ、NF- B の活性化を NF- B レポーター遺伝子を用いて検出し、cGK 依存の NF- B の活性化増強におけるオカダ酸の影響を調べた。

これまでに、Gyc76C の変異体が、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ことから、cGMP 経路がグラム陽性菌に対する感染抵抗性の発現に重要であることを示している。ショウジョウバエでは、PGRP-SA とグラム陰性菌認識タンパク質-1 が、グラム陽性菌のペプチドグリカンを認識し、セリンプロテアーゼのカスケードを活性化する。これにより、Toll 受容体のリガンドである Spz の前駆体が限定分解を受け、Toll 受容体を活性化し、NF- B を活性化する。そこで、ショウジョウバエにおいて cGMP 経路がどのような局面で活性化され、自然免疫系を調節するのかを検討するために、グラム陽性菌感染で活性化するセリンプロテアーゼにより、Gyc76C が活性化するのかどうか調べた。そのために、ショウジョウバエでセリンプロテアーゼを過剰発現させ、NF- B を活性化した際に、Gyc76C 依存に cGMP レベルが上

昇するのかどうか調べた。

4．研究成果

cGK が、MyD88/IRAK1 依存の NF- κ B の活性化を増強する際、活性化型 IRAK1 であるリン酸化 IRAK1 の量が増加する。そこで、IRAK1 の自己リン酸化が、cGMP 経路による NF- κ B シグナルの調節に関わるのかどうか、Lys239 と Asp340 を、それぞれセリンに置換した IRAK 変異体 (K239S および D340S) ならびにその両者をセリンに置換した IRAK 変異体 (MT) を、cGK と共に共発現させた。その結果、K239S、ならびに D340S は、野生型 IRAK1 とほぼ同程度に NF- κ B シグナルを活性化し、cGK との共発現においても、野生型 IRAK1 と同様に NF- κ B シグナルを増強した。加えて、Lys239 と Asp340 の両者をセリンに置換した IRAK 変異体 (MT) は、野生型 IRAK1 より強く NF- κ B シグナルを活性化し、cGK との共発現においても、野生型 IRAK1 より強く NF- κ B シグナルを増強した。これらの結果は、IRAK1 の自己リン酸化が、cGMP 経路による NF- κ B シグナルの調節に関わらないことを示している。

これまでに、ショウジョウバエと、ヒト培養細胞の両者において、PP2A が cGMP 経路による NF- κ B シグナルの調節に関わることを明らかにしている。そこで、cGMP 経路による NF- κ B シグナルの調節に、PP2A のホスファターゼ活性が必要であるのかどうか、ヒト、並びに、ショウジョウバエの培養細胞の系で調べた。まずヒト培養細胞で、PP2A のホスファターゼ活性を阻害するオカダ酸の影響を調べたところ、cGMP 経路による NF- κ B シグナルの増強が阻害されることが分かった。この結果は、cGMP 経路による NF- κ B シグナルの増強に PP2A のホスファターゼ活性が必要であることを示唆している。そこで、ショウジョウバエの培養細胞系で同じくオカダ酸の影響を調べたところ、ショウジョウバエ DL1 細胞においても、cGMP 経路による NF- κ B シグナルの増強に PP2A のホスファターゼ活性が必要であることを示唆され、新規 cGMP 経路による NF- κ B シグナルの調節における PP2A の役割が種を越えて保存されていることが示唆された。

ショウジョウバエにおいて cGMP 経路がどのような局面で活性化され、自然免疫系を調節するのかを検討するために、グラム陽性菌の感染により活性化するセリンプロテアーゼにより NF- κ B が活性化した際に、cGMP レベルが上昇するのかどうか調べた。その結果、セリンプロテアーゼにより cGMP の産生量が増加し、その増加は Gyc76C に依存していた。一方、Toll 受容体の変異は、セリンプロテアーゼによる cGMP の増加には影響を与えず、Toll 受容体のリガンドである活性化型 Spz の発現でも、cGMP の産生量は増加しなかった。これらの結果は、グラム陽性菌の感染により活性化するセリンプロテアーゼにより、Toll 受容体とは独立して、Gyc76C が活性化されることを示している。これらの知見は、cGMP 経路が、プロテアーゼの活性化により生ずる自己成分により活性化することを明確に示すと共に、cGMP 経路がグラム陽性菌の感染抵抗性の発現に重要であるというこれまでの結果を支持するものである。

本研究により、新たに同定した cGMP 経路による NF- κ B シグナルの調節機構の一端を明らかに出来たことは、慢性炎症疾患や、ガン転移、生活習慣病などとも深い関わりがあることが明らかとなってきた自然免疫を標的とした、それらの疾患の理解と、創薬を考える際に重要な進展と言える。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Hiroataka Kanoh, Hiroyuki Kato, Yamato Suda, Aki Hori, Shoichiro Kurata, Takayuki

- Kuraishi: Dual comprehensive approach to decipher the *Drosophila* Toll pathway, *ex vivo* RNAi screenings and immunoprecipitation-mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有り、508, 332-337, 2019. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.11.007.
2. Aki Hori, Shoichiro Kurata, Takayuki Kuraishi: Unexpected role of the IMD pathway in *Drosophila* gut defense against *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有り、495, 385-400, 2018. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.004.
 3. Hiroyuki Kenmoku, Aki Hori, Takayuki Kuraishi and Shoichiro Kurata: Novel mode of induction of the humoral innate immune response in *Drosophila* larvae. *Dis. Model. Mech.* 査読有り、10, 271-281, 2017. doi: 10.1242/dmm.027102.
 4. Hiroyuki Kenmoku, Hiroki Ishikawa, Manabu Ote, Takayuki Kuraishi, and Shoichiro Kurata: A subset of neurons controls the permeability of the peritrophic matrix and midgut structure in *Drosophila* adults. *J. Exp. Biol.* 査読有り、219, 2331-2339, 2016. doi: 10.1242/dmm.027102.
 5. Kikuchi Haruhisa, Hoshikawa Tsuyoshi, Shoichiro Kurata, Katou Yasuhiro, Oshima Yoshiteru: Design and Synthesis of Structure-Simplified Derivatives of Gonytolide for the Promotion of Innate Immune Responses. *J. Nat. Prod.* 査読有り、79, 1259-1266, 2016. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00829.

〔学会発表〕(計 11件)

招待講演

1. Shoichiro Kurata: Neural control of host resistance to ingested bacteria in *Drosophila*. International Symposium for Infectious Diseases: Vector-borne Diseases. October 14, 2018. Shenzhen, China
2. 倉田祥一朗: 食した細菌に対するハエの防御を支配する神経 .マゴットセラピー症例検討会. 2017年12月2日, 東京
3. 倉田祥一朗: ショウジョウバエ自然免疫における細菌認識と感染防御. 第70回日本細菌学会九州支部総会、第54回日本ウイルス学会九州支部総会. 2017年9月8日, 沖縄
4. Shoichiro Kurata: Neural control of gut homeostasis in *Drosophila* immunity. The Tohoku Forum for Creativity Thematic Program 2017 *New Horizons in Food Science via Agricultural Immunology*. July 23, 2017, Sendai
5. Shoichiro Kurata: Neural control of gut homeostasis in *Drosophila* immunity. The 2017 Japan-NIH Joint Symposium. February 16, 2017, Sendai
6. Shoichiro Kurata: Neural control of gut homeostasis in *Drosophila* immunity. The 2nd Asian Invertebrate Immunology Symposium. October 14-17, 2016, Hangzhou, China.
7. 倉田祥一朗: 昆虫の自然免疫を支える異物パターン認識. 日本比較免疫学会第28回学術集会シンポジウム. 2016年8月19日, 東京

一般発表

1. 上野春奈、自然免疫系を活性化する新規受容体 Gyc76C のリガンドの探索. 2017年度生命科学系学会合同年次大会. 2017年12月6日~9日, 神戸
2. Takayuki Kuraishi, E3 ubiquitin ligase Sherpa mediates Toll innate immune signaling in *Drosophila*. 57th Annual *Drosophila* Research Conference, July 13-17, 2016, Florida

3. Takayuki Kuraishi, E3 ubiquitin ligase Sherpa mediates Toll innate immune signaling in Drosophila. JDRC12 Sep. 9-11, 2016, Tokyo
4. 倉石貴透、新規 E3 リガーゼ Sherpa によるショウジョウバエ Toll 経路を介した自然免疫応答の制御. 日本生化学会北陸支部第 34 回大会、2016 年 5 月 28 日金沢市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ: http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seimei/seimei_original.html

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。