

令和 2 年 4 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08267

研究課題名(和文)新規コピキチンリガーゼSherpaによる自然免疫シグナル制御

研究課題名(英文)Drosophila Toll signaling regulated by novel E3 ligase Sherpa

研究代表者

倉石 貴透 (Kuraishi, Takayuki)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：90613167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエToll経路は、病原体や組織傷害に対する自然免疫応答をはじめ、胚発生、細胞間相互作用等重要な生理的プロセスに関与している。しかしながら、主に病原体を認識する哺乳動物のToll様受容体の自然免疫経路と比較して、多様な応答性を有するショウジョウバエToll受容体のシグナル伝達因子とその制御機構は完全には解明されていない。本研究では、包括的なゲノムワイドRNAiスクリーニングとシグナル伝達因子複合体プロテーム解析により、Tollシグナル伝達経路に関与するプロテインキナーゼ等の候補分子を同定し、Toll経路の制御機構に関して新たな仮説を提唱するに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自然免疫系は微生物感染に対する生体防御反応として重要であるが、その活性化を導くシグナル伝達機構はまだ充分明らかになっていない。本研究では、一連のゲノムワイドRNAiスクリーニングとバイオインフォマティクス解析により、ショウジョウバエ自然免疫経路であるTollシグナル伝達経路に関与するプロテインキナーゼ等の候補分子、さらにはTollシグナル伝達制御に関与すると考えられる翻訳後修飾を同定することに成功した。本研究により、自然免疫シグナリングの制御機構に関して新たな仮説を提唱するに至り、その成果は哺乳類自然免疫系の新規制御機構をも示唆する成果である。

研究成果の概要(英文)：The Drosophila Toll pathway is involved in embryonic development, innate immunity, and cell-cell interactions. However, compared to the mammalian Toll-like receptor innate immune pathway, its intracellular signaling mechanisms are not fully understood. We have previously performed a series of ex vivo genome-wide RNAi screenings to identify genes required for the activation of the Toll pathway. In this study, we have conducted an additional genome-wide RNAi screening using the overexpression of Tube, an adapter molecule in the Toll pathway, and have performed a co-immunoprecipitation assay to identify components present in the dMyd88-Tube complex. Based on the results of these assays, we have performed a bioinformatic analysis, and describe candidate molecules and post-translational modifications that could be involved in Drosophila Toll signaling.

研究分野：自然免疫

キーワード：Toll経路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

自然免疫は感染防御の最前線で機能する免疫系であり、感染初期の病原体排除に重要な役割を果たすだけでなく、獲得免疫の誘導においても必須である。しかし、どのようにして自然免疫が活性化されるか、まだ完全には明らかになっていない。2011年度のノーベル医学生理学賞の対象となった、ショウジョウバエの自然免疫を制御する Toll 受容体の研究を契機に、哺乳類の Toll 様受容体 (TLR) が同定された。これが自然免疫研究におけるブレイクスルーとなり、その後の研究に大きな広がりを見せていることから、当該分野におけるショウジョウバエの有用性が強く示唆されている。

我々は、新たな自然免疫制御因子の同定を行うため、進化的に保存されている Toll 経路を対象として、Toll 経路の活性化が強く見られるショウジョウバエ培養細胞株を独自に見だし、その細胞を用いて *in vitro* のゲノムワイド RNAi スクリーニングを行った。

そして新規 HECT 型 E3 ユビキチンリガーゼを発見し、Sherpa と命名した。Sherpa は、ショウジョウバエ NF- $\kappa$ B 経路である Toll 経路の活性化に必須であり、Toll 受容体のアダプター分子 dMyd88 をユビキチン化し、dMyd88 の細胞膜近傍への局在を制御していることを明らかにした。本研究では、Sherpa を介した Toll 経路活性化の分子機構解析を推し進めると同時に、哺乳類での保存性を検証することを目指した。

## 2. 研究の目的

本研究では、以下の3点を明らかにすることを目的として研究を行った。

### ・ Sherpa-dMyd88 複合体の活性制御メカニズム

Toll 受容体の活性化は、dMyd88 や Tube, Pelle などのタンパク質から構成される巨大複合体の形成を促進する。我々は、Sherpa も dMyd88 複合体の構成成分であることを示している。さらに、Sherpa は、dMyd88 複合体の構成成分をユビキチン化することも示している。しかし、本ユビキチン化反応の詳細な分子機構と、ユビキチン化と複合体形成の連関はまだわかっていない。本項目では、ユビキチン化された dMyd88 複合体の構成成分を網羅的に明らかにすることで、Sherpa-dMyd88 複合体の活性制御メカニズムに迫ろうと考えた。また、内在性の Sherpa と dMyd88 について、Toll 受容体刺激前後での局在を明らかにしようと考えた。加えて、dMyd88 のユビキチン化部位を特定して本ユビキチン化の機能的意義を明らかにしたいと考えた。

### ・ Sherpa 下流のシグナル伝達機構

ユビキチン化された dMyd88 複合体が下流のシグナル伝達にどのような意味を持つか不明である。本項目では、dMyd88 複合体下流のシグナル伝達に必要な因子をゲノムワイドにスクリーニングした。それにより、Sherpa 下流の Toll 経路シグナル伝達制御に関与する分子を同定しようと考えた。

### ・ Sherpa による自然免疫シグナル制御の哺乳類における保存性

Sherpa とアミノ酸配列の相同性が高い哺乳類タンパク質が存在している (mSherpa とする)。本項目では、mSherpa のノックアウトマウスを解析することにより、Sherpa ホモログが哺乳類自然免疫シグナル伝達に関与しているか明らかにしようと考えた。

## 3. 研究の方法

本研究では、我々が報告した一連の *ex vivo* での包括的なゲノムワイド RNAi スクリーニングをさらに進めて、Toll 経路に関わる新規の遺伝子の同定を行い、その全貌を解明することを目的とした。我々は、ショウジョウバエの Toll 経路に関わるこれまでに明らかにされていない因

子を同定するために、ex vivoでのゲノムワイドRNAiスクリーニングを実施し、その結果を報告している。これは、Tollアダプタータンパク質ショウジョウバエMyd88 (*Drosophila Myd88*; dMyd88)、下流のプロテインキナーゼPelle, NF- $\kappa$ BホモログDifのいずれかを過剰発現させるか、あるいは哺乳類NF- $\kappa$ B阻害因子I $\kappa$ BのショウジョウバエホモログであるCactusをノックダウンさせたDL1細胞(ショウジョウバエの後期胚由来の血球系接着細胞)を用いて、ex vivoでRNAiスクリーニングにより、網羅的に各遺伝子発現の抑制がToll経路のシグナル伝達に与える影響を解析するものである。本研究においては、この網羅的RNAiスクリーニングを完結させるために、残るIRAKホモログであるTubeの過剰発現によりToll経路を活性化させたDL1細胞を用いてRNAiスクリーニングを実施することとした。Tube遺伝子を単独で過剰発現させただけではToll経路は十分に活性化しないが、dMyd88とTubeを共発現することによって、Tubeを起点としたシグナル伝達因子複合体Myddosome下流のシグナル伝達経路を活性化できることがわかってきた。そこで本研究においては、TubeとdMyd88を共過剰発現させたDL1細胞を用いてRNAiスクリーニングを実施した。

加えて、複合体中に存在する構成要素を同定するために共免疫沈降-ショットガン質量分析を行った。これらの分子生物学的スクリーニングおよび複合体プロテーム解析の結果に基づいてバイオインフォマティクス分析を行った。また、Sherpaの哺乳類ホモログについてノックアウトマウスを作成し、ウイルス感染抵抗性への影響を解析した。

#### 4. 研究成果

RNAiスクリーニングの結果、計454の候補遺伝子が同定された。これらを機能分類したところ、プロテインキナーゼあるいはキナーゼ様ドメインを含むタンパクの遺伝子が21、Toll経路に関わる既知の遺伝子が7つ、ユビキチンリガーゼ関連の遺伝子が6つ同定された。この結果は、Toll経路におけるこれら機能因子の重要性を示しているものと考えられた。

次に、MyddosomeからCactusに至るまでの未知シグナル伝達分子が、dMyd88-Tubeと一過性の複合体を形成するとの仮説のもと、Myddosomeの共免疫沈降-ショットガン質量分析を実施し、シグナル伝達に関わるタンパク質を網羅的に同定した。その結果、計708のタンパクが同定された。多くのタンパクはいわゆるハウスキープング関連のタンパクあるいは細胞内存在量が多いタンパクと思われたが、そのような中、19のタンパクキナーゼ関連タンパク、15のユビキチン化/SUMO化関連のタンパクリガーゼ、10のフォスファターゼが同定された。

さらに、複合体に含まれる因子の翻訳後修飾(リン酸化, ユビキチン化, SUMO [small ubiquitin-like modifier] 化)についても検討した。その結果、Myddosomeと共免疫沈降するタンパク中に68のリン酸化ペプチドが確認されたが、その中に、Tubeの226番目のセリンと229番目のトレオニンがリン酸化されたペプチド断片が同定された。

このリン酸化部位の配列を基にモチーフ解析を行ったところ、この2つのリン酸化部位はともにpoloキナーゼによりリン酸化される可能性があること示された。poloキナーゼはRNAiスクリーニングならびに共免疫沈降-質量分析の両方で同定されたことより、poloキナーゼがTubeのリン酸化をもたらしており、このリン酸化がToll経路のシグナル伝達において重要な役割を担っているものと考えられた。さらに、ユビキチン化/SUMO化を受けたペプチドの解析により104のユビキチン化/SUMO化ペプチドが同定されたが、その中にpoloキナーゼの455番目のリジンがSUMO化されたペプチドが同定された。この455番目のリジンはリン酸化ペプチド結合ドメインに存在することより、本SUMO化がN末端側にあるセリン/トレオニンプロテインキナーゼ活性に深く関わっていることが推測された。

これまでに我々は、Sherpa が dMyd88 をユビキチン化することにより Tube を細胞膜上にリクルート、これにより polo によりリン酸化を受ける可能性を示唆する結果を得ていた。一方、Sherpa は dMyd88 をユビキチン化するとともに未知のターゲットを SUMO 化することが分かっていた。今回 polo キナーゼが SUMO 化されていることが確認されたことから、これが Sherpa により成されている可能性があると考えられる。すなわち、Sherpa は dMyd88 をユビキチン化することにより Tube をリクルートし、Myddosome 複合体の形成を促進するとともに polo キナーゼを SUMO 化することにより、polo を活性化、活性化された polo が Tube をリン酸化することにより Toll シグナルを強力に活性化し、下流にそのシグナルを伝達するという仮説を提唱したい。さらに、hyd, eff, lig 等のタンパクリガーゼ関連因子が Toll 経路に関与していることが示唆されたことより、Sherpa 以外にもユビキチン化、SUMO 化が関与しており、それが Toll 経路のシグナル伝達に重要な役割を果たしていることが示唆された。

最後に、これらの実験結果を併せたバイオインフォマティック解析を行った。ゲノムワイド RNAi スクリーニングの結果は、Toll 経路のシグナル伝達における関与の度を反映しているものと仮定し、一方、Myddosome との共免疫沈降-質量分析において得られたシグナルが強い場合には Myddosome の近位で、シグナルが弱い場合には Myddosome から比較的遠位で Toll 経路のシグナル伝達に関与しているものと仮定した。特にキナーゼ関連遺伝子に注目して Toll 経路への関与、その役割について検討を行った。その結果、Cdk1, 14-3-3, Polo は Myddosome 近傍で Toll 経路に関与しており、Cdk12, MAPK-Ak2 は Myddosome より下流で Toll 経路に関与し、Sgg, Akt は Myddosome 近傍で、異なる経路に関与しているものと推定された。

以上、包括的ゲノムワイド RNAi スクリーニング解析の結果と、Myddosome 複合体の共免疫沈降-質量分析の結果を併せてバイオインフォマティクス解析を行い、Toll 経路、特に dMyd88 と Tube の下流に関与する可能性のある遺伝子を同定した。加えて、Toll 経路に関与すると考えられるキナーゼ関連遺伝子、さらには翻訳後修飾を同定し Toll 経路に関わる因子とその制御機構に関して新たな仮説を提唱するに至った。

本研究で提示した仮説について、今後生化学的解析、遺伝学的な解析を含めた in vivo 解析等により、さらなる検討が実施されることが望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kano H, Kato H, Suda Y, Hori A, Kurata S, Kuraishi T.	4. 巻 508
2. 論文標題 Dual comprehensive approach to decipher the Drosophila Toll pathway, ex vivo RNAi screenings and immunoprecipitation-mass spectrometry.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 332-337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.11.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hori A, Kurata S, Kuraishi T	4. 巻 495
2. 論文標題 Unexpected role of the IMD pathway in Drosophila gut defense against Staphylococcus aureus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 395-400
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nonaka S, Hori A, Nakanishi Y, Kuraishi T	4. 巻 126
2. 論文標題 Phagocytosis assay for apoptotic cells in Drosophila embryos	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Vis. Exp	6. 最初と最後の頁 e56352
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Aki Hori, Emil Salim, Natsumi Yamada, Rangga Asri, Takayuki Kuraishi
2. 発表標題 Sterile induction of innate immunity in Drosophila
3. 学会等名 Keystone Symposia（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayuki Kuraishi
2. 発表標題 Infection-dependent versus -independent activation of Drosophila innate immune signaling
3. 学会等名 The 3rd Makassar International Symposium on Pharmaceutical Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kazuki Fukushima, Saori Nonaka, Aki Hori, Koichiro Kawamura, Takayuki Kuraishi
2. 発表標題 Sterile induction of humoral innate immune response in Drosophila larvae
3. 学会等名 25th European Drosophila Research Conference, London (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takayuki Kuraishi
2. 発表標題 Drosophila intestinal tract as a model to decipher symbiotic and pathogenic interactions between host and microorganisms
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia conferences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考