

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590054

研究課題名 (和文) 細胞内寄生細菌に対する異物認識分子 PGRP-LE の機能解析

研究課題名 (英文) Analysis of peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LE in the resistance to intracellular bacteria

研究代表者

矢野 環 (YANO TAMAKI)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：50396446

研究成果の概要：本研究は、リステリア菌等の細胞内に寄生・増殖する細菌である細胞内寄生細菌に対する宿主の側の生体防御機構における、細胞内異物認識分子である PGRP-LE の機能解析が目的である。本研究により、PGRP-LE が宿主細胞内においてリステリア菌の侵入を認識し、宿主の抵抗性に働くこと、また、PGRP-LE による認識によって、新規の自然免疫経路によりオートファジーが誘導され、リステリア菌が排除されることを明らかにした。これらの成果を Nature Immunology 誌に発表した。

交付額

	直接経費	間接経費	合計	(金額単位：円)
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000	
2008年度	900,000	270,000	1,170,000	
年度				
年度				
年度				
総計	1,900,000	570,000	2,470,000	

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：細胞生物学、自然免疫、オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物は環境に存在する細菌の感染から身を守るために免疫系を発達させてきた。自然免疫は、ほとんどすべての多細胞生物が有する免疫系であり、ヒトにおいても感染のごく初期に免疫の最前線として働くことが明らかとなっている。ショウジョウバエと哺乳類では、自然免疫シグナル経路に働く因子は、相同な分子が非常に類似した経路を形成しており、ショウジョウバエのモデル生物としての普遍性が示されている。ショウジョウバエにおける細菌感染では、細菌はまず体表を破って体内に侵入し、体液中で増殖する。これらの細菌に対し、ショウジョウバエはまず体液中で細菌を非自己として認識し、自然免疫経路の活性化を起こして抗菌ペプチドを体液中に分泌する。これまでに、このような菌を認識し、自然免疫経路を活性化する分子として peptidoglycan recognition protein (PGRP) ファミリーが同定されている。しかしながら、細胞内寄生細菌は細胞の中に侵入することにより、このような体液性の自然免疫による生体防御から逃れようとする。これらの細菌に対する自然免疫応答は、ショウジョウバエにおいてのみならず、ヒトをはじめとする哺乳類においても、生体内で機能する認識分子、防御反応共に不明な点が多く残されている。

我々はこれまでに、ショウジョウバエ体液中で DAP-type のペプチドグリカンの特異的に認識して自然免疫応答を活性化する因子 PGRP-LE を同定し、これが大腸菌などの DAP-type のペプチドグリカンを有する細菌に対する抵抗性に必須であり、体液性の自然免疫において認識分子として機能していることを示してきた。一方で我々は、PGRP-LE は上皮性組織などの一部の組織では細胞の中で機能しうることを、ショウジョウバエ培養細胞である S2 細胞内に人為的に取り込ませたペプチドグリカンの部分構造体を細胞内で認識して自然免疫応答を活性化することを示してきた (Kaneko, T *et al.* (2006) *Nature Immunol.* **7**, 715-723)。これは、PGRP-LE が細胞内において、侵入した細胞内寄生細菌に対する認識分子としても機能している可能性を示唆している。

*Listeria monocytogenes* (*Lm*) は DAP-type のペプチドグリカンを有するグラム陽性菌であり、人畜感染症であるリステリア症を引き起こすことから、その宿主細胞への感染機序に関する多くの研究がなされてきている。細胞に取り込まれた *Lm* は、Lysteriolysin 0 (LLO) と呼ばれる因子によって食胞膜を溶解

し、細胞質へと感染する。我々はこれまでに、PGRP-LE 変異体が *Lm* 感染に対して野生型と比べ感受性が高いこと、*Lm* に対する抵抗性には、*Lm* が *in vivo* で感染する細胞である体液細胞における PGRP-LE の発現が重要であることを示していた。以上の事実は PGRP-LE が細胞内寄生細菌 *Lm* を認識して自然免疫応答を誘導しているという仮説を支持している。

さて、自然免疫においては、異物の認識とともに、感染してきた細菌とどのように戦うかが重要である。*Lm* が感染に必要な宿主細胞が産生する因子は、これまでに S2 細胞への *Lm* 感染系を用いた RNAi スクリーニングによりゲノムワイドに検索されている。しかしながら、こういったアプローチでは、培養細胞である S2 細胞に発現していない因子の機能を解析できないために、個体の組織において感染抵抗性に必要な因子が同定できていない。さらに、S2 細胞では認識分子 PGRP-LE が発現していないために、*Lm* に対する防御反応が全く起きていない可能性がある。

オートファジーは、ショウジョウバエからヒトにまで保存されている細胞内分解系で、細胞がその存続のために饑餓時に自らの成分を分解するためや、不要となった様々な分子を処理するために働く機構である。近年、哺乳類培養細胞において、オートファジーが細胞内に侵入してきた細菌によって菌の周辺に誘導され、これらの菌に対する抵抗性に機能していることが示されている (Nakagawa, I. *et al.* (2004) *Science* **306** 1037-1040)。しかしながら、オートファジーの、細胞内に侵入してきた菌の周囲に限定的に誘導される機構は全く不明であり、しかも、オートファジーが個体のレベルで細胞内寄生細菌に対する抵抗性に機能しているのかも不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞内寄生細菌である *Listeria monocytogenes* に対する異物認識分子 PGRP (Peptidoglycan Recognition Protein)-LE の機能と、PGRP-LE によって誘導される細胞内寄生細菌に対する生体防御反応の解析を行うことにより、いまだ不明な点の多い、細胞内寄生細菌の細胞内における認識と、細胞内寄生細菌に対する生体防御反応の全容理解のための分子的基盤を得ることであった。特に以下の2点に重点を置いた。

- (1) 細胞内寄生細菌 *Lm* の認識における PGRP-LE の機能解析
- (2) PGRP-LE によって活性化される *Lm* に対す

る自然免疫反応の網羅的解析と、*Lm* への抵抗性におけるオートファジーの解析

(1)ではPGRP-LEが*Lm*を細胞内において認識しているか、認識することにより細胞、あるいは個体が*Lm*感染に対する抵抗性をするかを検討した。

(2)では*Lm*感染によってPGRP-LE依存的に活性化される自然免疫反応を解析した。網羅的解析と共に、オートファジーに注目して解析し、*Lm*感染に対する抵抗反応としてオートファジーが重要であるのか、PGRP-LEによる*Lm*認識がオートファジー誘導に必須であるのかについて検討した。

これら2方向からの解析により、細胞内寄生細菌に対する自然免疫反応の全容理解のための分子基盤を得ることが目的であった。

### 3. 研究の方法

PGRP-LEに焦点をあてた、細胞内寄生細菌認識分子としての機能解析と、細胞内寄生細菌に対する細胞の抵抗反応に焦点をあて、これの反応誘導におけるPGRP-LEの機能について解析することで研究を推進した。これらの2方向からの解析により、細胞内寄生細菌に対する生体防御反応の理解をめざした。

#### (1)PGRP-LEの細胞内*Lm*認識と抵抗反応誘導の検討

##### ①S2細胞系

S2細胞においてはPGRP-LEの発現が見られない。そこでPGRP-LEをS2細胞において誘導的、あるいは恒常的に発現させることのできる遺伝子導入細胞株を樹立し、これらの細胞株を用いて、以下の2点について検討した。

A. 細胞内に侵入した*Lm*がPGRP-LEに認識されて自然免疫が活性化されるか

S2細胞に*Lm*を感染させ、PGRP-LEの発現依存的に自然免疫応答のひとつである抗菌ペプチド産生誘導が起きるかを検討した。

B. 細胞内に侵入した*Lm*に対して抵抗反応が起きるか

PGRP-LEが細胞内に侵入した*Lm*に対する抵抗反応を起こすかを検討するために、S2細胞に感染する*Lm*数がPGRP-LEの発現の有無により変化があるかを調べた。細胞内に侵入した菌は、コロニー形成法により算定した。さらに、既知の自然免疫経路であるToll経路、imd経路の因子の発現をRNAi法により抑制して*Lm*を感染させ、細胞内の菌数を算定することにより、*Lm*に対する抵抗反応が既知の自然免疫経路に依存しているかを検討した。

##### ②*ex vivo*系

S2細胞系は強制発現系であるので、内在性のPGRP-LEの機能を検討することができない。そこで、*ex vivo*系を確立した。幼虫の体液

細胞を取り出して培養液中で培養、*Lm*感染を行うことにより、内在性のPGRP-LEの機能解析を可能にした。

#### (2)PGRP-LEによって活性化される*Lm*に対する自然免疫反応の解析

##### ①*Lm*感染に応じたオートファジー検出系

オートファジー誘導の分子マーカーであるEGFPとLC3の融合タンパク質を恒常的に発現させ、オートファジーによるLC3タンパク質の局在化を可視化できるようなS2細胞系を樹立した。また、*ex vivo*系では、ショウジョウバエにおいて組織特異的な強制発現系として汎用されているGAL4/UASシステムを用い、ショウジョウバエ幼虫の体液細胞にEGFP-LC3を発現させ、感染実験を行った。

##### ②PGRP-LEによるオートファジー誘導とオートファジーによる*Lm*感染抵抗性の検討

S2細胞系と*ex vivo*系により、まず、*Lm*感染に応じて誘導されるオートファジーがPGRP-LEに依存しているかを検討した。S2細胞系ではPGRP-LEの強制発現、*ex vivo*系ではPGRP-LE欠損変異体を用いた。次に、*Lm*感染への抵抗性にオートファジーが重要であるかを、オートファジー関連遺伝子*Atg5*のRNAi法による発現抑制により検討した。

##### ③PGRP-LEによって誘導される*Lm*感染抵抗反応の網羅的解析

細胞内寄生細菌への抵抗性には、オートファジー以外にも未知の機構が働いている可能性がある。そこで、PGRP-LEによる*Lm*認識によって、どのような感染防御のための反応が起きるのかをDNAマイクロアレイにより網羅的に解析した。

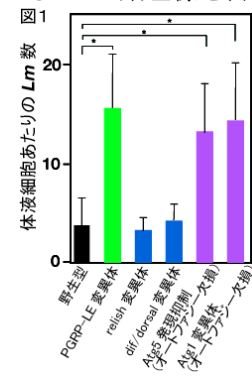
### 4. 研究成果

(1)*Lm*の細胞内増殖抑制にPGRP-LEとオートファジーが必須である

幼虫から取り出した体液細胞を培養し、*Lm*感染を行う*ex vivo*系を確立した。この系を用いて、PGRP-LEを始めとする様々な変異体体液細胞における*Lm*増殖抑制を体液細胞、および細胞内に感染している*Lm*の染色像を計測して定量化した。

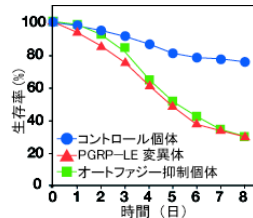
その結果、*Lm*の細胞内増殖抑制にはPGRP-LEが必須であること、IMD経路の必須因子(*relish*)、Toll経路の必須因子(*dif/dorsal*)は必要ないことを示した。また、PGRP-LE欠損による*Lm*増殖抑制欠損は、オートファジー

を強制的に誘導することで回復した(図1)。



(2) オートファジーは個体レベルでの *Lm* 感染への抵抗性に必須である

オートファジー欠損マウスは出生直後に致死となるために、細胞内寄生細菌への個体レベルにおける抵抗性におけるオートファジーの役割は不明であった。我々はショウジョウバエをモデル動物として用い、組織特異的にオートファジーを抑制することで、個体としての細胞内寄生細菌感染に対する抵抗性におけるオートファジーの役割を検討した。その結果、体液細胞におけるオートファジー欠損個体は *Lm* 感染に感受性であり、オートファジーの役割が個体としての抵抗性に必須であることが示された (図2)。



(3) PGRP-LE 依存的な *Lm* 増殖抑制にはオートファジーが必須だが、IMD 経路、Toll 経路は必要ない

(4) *Lm* 感染時には PGRP-LE 依存的にオートファジーが誘導される

## 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 3 件)

① Tamaki Yano and Shoichiro Kurata  
An unexpected twist for autophagy in Crohn's disease. *Nature Immunol.* **10**, 134-136 (2009) 査読有り

② Tamaki Yano, Shizuka Mita, Hiroko Omori, Yoshiteru Oshima, Yukari Fujimoto, Ryu Ueda, Haruhiko Takada, William E Goldman, Koichi Fukase, Neal Silverman, Tamotsu Yoshimori and Shoichiro Kurata  
Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in drosophila. *Nature Immunol.* **9**, 908-916 (2008) 査読有り

③ Tamaki Yano and Shoichiro Kurata  
Induction of autophagy via innate bacterial recognition. *Autophagy* **4**, 958-960 (2008) 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

① 矢野 環 ショウジョウバエ PGRP-LE の細胞内認識依存的なオートファジー誘導によるリステリア菌の増殖抑制

日本比較免疫学会第20回学術集会  
平成20年8月25日～27日 東京

② 矢野 環 ショウジョウバエ PGRP-LE の細胞内寄生細菌の認識によるオートファジー誘導 第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同年会 神戸

③ 矢野 環 miRNA 経路による細胞内寄生細菌に対する自然免疫応答の制御 第10回 RNA ミーティング 札幌

④ Tamaki Yano Essential role of Peptidoglycan Recognition Protein (PGRP)-LE, on the recognition of intracellular bacterial pathogens (The 8th Japanese Drosophila Research Conference 2007年7月2日～4日 淡路)

⑤ 矢野 環 ショウジョウバエ PGRP-LE による細胞内寄生細菌の認識とオートファジー誘導 第30回日本分子生物学会年会 横浜

[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]

発表論文②に関して、以下に報道があった。

① 日本経済新聞 平成20年7月7日朝刊  
および 日経プレスリリース  
<http://release.nikkei.co.jp/detail.cf?relID=193460&lindID=4>

② 読売新聞 平成20年8月3日朝刊

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 環 (YANO TAMAKI)  
東北大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号: 50396446

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし