

2009年 4月 20日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19780069

研究課題名（和文） リステリア菌感染の高感度検出レポーターシステムを用いた新規防御因子の探索

研究課題名（英文） Screening of novel defense factors using highly sensitive *Listeria* infection reporter system

研究代表者 後藤 彰 (GOTO AKIRA)

東北大学・大学院生命科学研究科・COE フェロー

研究者番号：70419000

研究成果の概要：

本研究目的は、リステリア菌に対する感染防御因子探索である。遺伝子網羅的発現解析を用いて新規遺伝子 *Listericin* を同定した。過剰発現および RNAi 解析から、*Listericin* は JAK-STAT 経路により制御されること、またその過剰発現個体はリステリア菌感染に対して抵抗性を示し、体液中菌数も減少することを明らかとした。*Listericin* が新規抗菌様因子である可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	300,000	2,200,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：細胞応答、自然免疫

1. 研究開始当初の背景

自然免疫は、抗体産生などの獲得免疫とは異なり感染初期に働く病原体に対して非特異的な生体防御反応のひとつであり、哺乳類から昆虫および植物に至るほぼ全ての動物種が共通してもっているシステムである。具体的には、マクロファージによる貪食作用、上皮組織からの抗菌ペプチドの産生、あるいは凝固反応などが挙げられる。研究開始当初、ショウジョウバエの自然免疫シグナル伝達

経路には、主にグラム陽性菌または真菌に対する Toll 経路およびグラム陰性菌に対する Imd 経路が知られていた。しかしながら、これらの感染防御経路の解析にはいずれも細胞外で感染する病原菌が用いられており、細胞内に寄生するリステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) などの細菌についての宿主防御機構に関する研究は遅れていた。このような状況の中、当研究室で発見されたペプチドグリカン認識タンパク質ファミリーのひとつである PGRP (Peptidoglycan

recognition protein)-LE が細胞内寄生細菌の認識分子として機能することが初めて証明された (Kaneko, T. et al., *Nat. Immunol.*, **7**, 715-723, 2006)。「細胞内寄生細菌に対する PGRP-LE を介した感染防御機構」という新しい分野に注目が集まった。

2. 研究の目的

本研究は、様々な遺伝学および生化学的な解析手法が確立されているショウジョウバエをモデル生物として、PGRP-LE を介したリステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) に対する新規防御因子の探索を目的とした。また、過剰発現系あるいは RNAi 法による遺伝子機能抑制法によって、これらの同定した因子群がどのようにリステリア菌感染に対して機能しているか検討した。さらに、解析した遺伝子群の中から、高感度で発現上昇する遺伝子である場合には、この遺伝子を用いたレポーターシステムを構築することも同時に目的とした。

3. 研究の方法

PGRP-LE を介したリステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) に対する防御因子を探索するために DNA マイクロアレイ法を用いた。すなわち、ショウジョウバエ胚血球細胞由来培養細胞である S2 細胞は、PGRP-LE をほとんど発現しないという事象を利用して、S2 細胞と PGRP-LE を低レベルに発現させた S2 細胞 (YFP-LE) 細胞にリステリア菌をそれぞれ感染させ、その遺伝子変動を DNA マイクロアレイ法により解析した。さらに感染には、野性型リステリア菌に加えて、リステリア菌が細胞内に侵入する時に必要な Listeriolysin O を欠損させた変異型リステリア菌を用いることにより、宿主細胞内への侵入特異的な誘導遺伝子群の同定を試みた。また感染時間についても感染後 2 時間および 8 時間後のサンプルにおける遺伝子変動を解析し、早期反応および遅期反応についての差異についても検討した。このように同定した遺伝子群から、候補遺伝子を絞り込み、その後、培養細胞を用いた RNAi 法および過剰発現実験等を行うことによって、詳細な遺伝子発現解析を行った。さらに、異所的発現が可能な UAS-GAL4 システムを用いて、同定した因子群を免疫組織で過剰発現させ、さらなる詳細な遺伝子機能解析も行った。

4. 研究成果

細胞内寄生細菌リステリア菌に対する新規防御因子を探索するために、ショウジョウ

ウバエ培養細胞 (PGRP-LE 発現がない S2 細胞および PGRP-LE 発現がある YFP-LE) にリステリア菌を感染させ、DNA マイクロアレイ解析をおこなったところ、PGRP-LE 依存のかつ野性型リステリア菌感染特異的に 419 個の遺伝子群が誘導されることが明らかとなった。この候補遺伝子群について、詳細な文献検索およびデータベース解析を行い、PGRP-LE 依存的な誘導が特に顕著であった新規遺伝子 *Listericin* (仮名) について、さらなる解析を行った。*Listericin* は、S2 細胞でのリステリア菌感染には、発現誘導が観察されなかったのに対して、YFP-LE 細胞においては、野性型リステリア菌感染特異的な発現誘導が観察された (図 1)。この結果は、*Listericin* が PGRP-LE を介して、リステリア菌が細胞内に侵入してきた場合のみ誘導される遺伝子である可能性が強く示唆された。

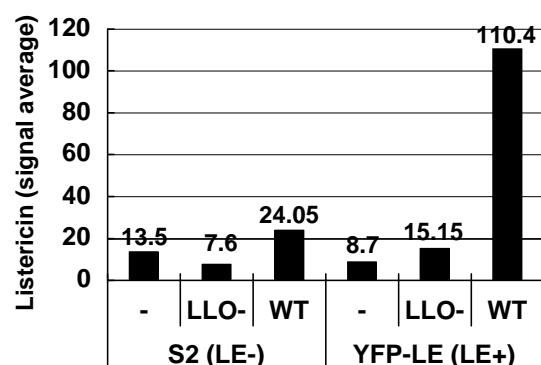


図 1

次に、この *Listericin* の発現誘導がこれまで解析が進んできているショウジョウバエの代表的な自然免疫シグナル伝達経路である Imd 経路および Toll 経路あるいは発生および近年、ウイルス感染に対する抵抗性にも必要であることが示されている JAK-STAT 経路のいずれによって制御されているのか RNAi 法を用いて検討した。それぞれの経路に対して必須の転写因子である Kenny (Imd 経路)、Dif + dorsal (Toll 経路)、STAT92E (JAK-STAT 経路) の RNAi を行い、リステリア菌 (LLO-変異型および野性型) の感染に対する *Listericin* の発現誘導を測定した。その結果、PGRP-LE 発現細胞 (Ind-LE) において、Imd 経路の転写因子 Kenny および Toll 経路の転写因子群 Dif+dorsal の RNAi に比して、JAK-STAT 経路に必須の Stat92E の RNAi のみ、*Listericin* の野性型リステリア菌に対する発現誘導が観察されなかった (図 2 : 矢印)。この結果は、*Listericin* がこれまでよく知られていた Toll 経路および Imd 経路とは異なる発生に主に必要と思われていた JAK-STAT 経路によって発現誘導制御が行われている可能性を強く示唆する結果である。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. 後藤彰、矢野環、寺島潤、倉田祥一郎 細胞内寄生リステリア菌感染によるショウジョウバエ新規遺伝子 *CG9080* の発現誘導。Novel *Drosophila* gene *CG9080* is induced upon intracellular bacteria *Listeria* infection. 日本比較免疫学会第 20 回学術集会 (2008 年 8 月 25 日—27 日) 東京医科歯科大学
2. Akira GOTO, Tamaki YANO, Jun TERASHIMA, Jean-Luc IMLER and Schoichiro KURATA. *Vir-1* is induced upon *Listeria monocytogenes* infection on *Drosophila melanogaster*. JDRC8 (The 8th Japanese Drosophila Research Conference) (July 2 – July 4, 2007) Awaji Yumebutai International Conference Center

[図書] (計 0 件)

[○出願状況 (計 0 件)]

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者
後藤 彰 (GOTO AKIRA)
東北大学・大学院生命科学研究科・COE フェロー
研究者番号 : 70419000

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし