

平成 23 年 4 月 10 日現在

機関番号 : 11301

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21780088

研究課題名 (和文) 自家発光型リステリア菌を用いた宿主感染防御因子の RNA i スクリーニング探索

研究課題名 (英文) Identification of novel defense factors using Luciferase expressing *Listeria* by RNAi screening.

研究代表者

後藤 彰 (GOTO AKIRA)

東北大学・大学院生命科学研究所・助教

研究者番号 : 70419000

研究成果の概要 (和文) : 自然免疫は、植物、昆虫から動物に至るまで普遍的に保存された感染の第一線で働く免疫系のひとつである。当研究室で同定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-LE は、細胞内および細胞外の両方に局在し、自然免疫シグナル伝達経路のひとつである Imd 経路およびメラニン合成経路の活性化に寄与する。さらに近年、細胞内に存在する PGRP-LE は、Toll 経路および Imd 経路とは独立的に機能して、タンパク質分解系のひとつであるオートファジーを介して細胞内寄生細菌を排除することが示された。多機能型 PGRP-LE を介した新規宿主防御因子群を同定するため、ルシフェラーゼ恒常発現リステリア菌を作製して、PGRP-LE 依存的な菌感染の条件検討を行った。さらに、もう一つの研究計画として提案したマイクロアレイ解析によって、同定した新規抗菌ペプチド Listericin のさらなる機能解析を行い Listericin が、PGRP-LE および JAK-STAT 経路の両方によって協調的に発現制御されること、分泌型 Listericin を含む培養上清が、グラム陰性菌およびリステリア菌に対して抗菌様活性があることを示した。さらに、*In vivo*における Listericin 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た。以上の結果から、Listericin は、自然免疫経路を制御する新規抗菌ペプチド様活性を有する遺伝子である可能性が示された。

研究成果の概要 (英文) : Innate immune system is one of the first-line defense system that is highly conserved from plants, insects and mammals. Peptidoglycan recognition protein (PGRP) – LE firstly identified in our laboratory is functioning on both intracellular and extracellular space and responsible for the activation of one of the innate immune signaling pathway, Imd pathway, and melanin synthesis pathway. Furthermore, PGRP-LE plays a crucial role to eliminate intracellular pathogens using one of the general protein degradation system called “Autophagy”, which is independent on the Toll and Imd pathway. Therefore, to identify further novel host defense factors involved in this multi-functional PGRP-LE, I set up the system where the growth of *Listeria* can be monitored by constitutive Luciferase expressing *Listeria* strains. Using this *Listeria* strain, the infection condition where we can see the effect of PGRP-LE was scrutinized. As an alternative strategy, I also conducted DNA microarray and identified a novel antimicrobial-like peptide named Listericin. Further analysis of Listericin using protein purification, RNAi and overexpression studies demonstrated that the expression of Listericin is cooperatively regulated by both PGRP-LE and the JAK-STAT pathway, as a secreted form, it exhibits bacteriocidal activities against gram-negative bacteria and *Listeria* strain. Furthermore, *in vivo* approach using Listericin overexpressing transgenic flies showed that they exhibit resistance against *Listeria* infection in the survival test. Taken together with these results, we can show that Listericin is a novel antimicrobial peptide on *Drosophila* innate immune response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
平成 22 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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、抗菌ペプチド

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初は、ショウジョウバエの自然免疫シグナル伝達経路に関しては、真菌および多くのグラム陽性菌の感染防御に寄与する Toll 経路と多くのグラム陰性菌の感染防御に寄与する Imd 経路が知られていた。また JAK-STAT 経路の存在も発生過程の研究においてはそのシグナル因子群の解析もなされていた。またこの JAK-STAT 経路がウイルス感染の抵抗性に寄与することも示されていた。しかし、自然免疫に関する JAK-STAT 経路の詳細な分子基盤については不明な点が多いのが現状である。また解析が進みつつある Toll 経路および Imd 経路のいずれの場合においても、研究対象のほとんどが細胞外で感染する病原体を利用しており、細胞外免疫防御系を回避して感染を成立させる細胞内寄生細菌の宿主防御戦略については、依然として不明な点が多かった。このような状況の中、当研究室で同定されたペプチドグリカン認識タンパク質である PGRP-LE が、細胞外および細胞内の両方で自然免疫の活性化に寄与し、細胞内では Toll 経路および Imd 経路とは独立的に働くタンパク質分解系であるオートファジーの機構を使って、細胞内寄生菌の排除を行っていることが示された。近年、哺乳類において、細胞内センサーである NOD 受容体も細胞内病原体の認識に寄与し、さらにオートファジーの機構を使って、感染防御を行っているという報告がなされている。またこれらの分子群はクローン病との関連も指摘されている。PGRP-LE (細胞内センサー)を介した細胞内寄生病原体に関する宿主防御機構の解明に注目が集まっている。

2. 研究の目的

本研究は、様々な遺伝学的手法 (UAS-GAL4 システムを用いた異所的発現系、P 因子を用いた変異体作製) や培養細胞における簡便な RNAi 法および過剰発現系が確率されているモデル生物であるショウジョウバエを用いて、ペプチドグリカン認識タンパク質 PGRP-LE を介した新しい宿主防御因子群の同定を目的とした。また様々な疾病を引き起こす原因菌である細胞内寄生細菌に対する新規宿主防御因子群の同定は、哺乳類の相同因子群の単離に繋がる可能性も非常に高い。ゆえにこの研究計画は、将来の感染症治療の礎、あるいはまだ上市がほとんどなされていない自然免疫制御薬の開発をも視野 (=研究目的) に入れた研究である。

3. 研究の方法

ペプチドグリカン認識タンパク質 PGRP-LE を介した新しい細胞内寄生病原体に対する新規宿主防御因子群を同定することを目的として、大きく分けて2つのアプローチで研究を計画した。すなわち、研究計画 1) 恒常的ルシフェラーゼ発現リステリア菌を用いた宿主 RNAi スクリーニング、および 研究計画 2) DNA マイクロアレイ法を用いた PGRP-LE 依存的宿主発現変動遺伝子群からの防御因子群のスクリーニングである。

研究計画 1) に関しては、細胞内寄生細菌である *Listeria monocytogenes* および *Listeria ivanovii* のゲノム上の tRNA^{ARG} 部位に *luxABCDE* オペロン (発光に必要な全ての基質、酵素などの遺伝子群を含むため、ルシフェリンなどの基質を添加することなく自家発光が可能) が挿入された組み替え体を作

製した。*L. monocytogenes* に関しては、4 種類の組み替え体、すなわち、プロモーター無し（コントロール）、Listeriolysin O (LLO) プロモーター、SecA プロモーターおよび Help プロモーターの下流に *luxABCDE* オペロンが挿入された相同組換え体を全て単離して、それらのルシフェラーゼ活性を測定した。Help プロモーターが最も強力なルシフェラーゼ活性を有していたため、*L. ivanovii* の場合には、Help プロモーターのみの組み替え体を作製した。その後、これらの自家発光リステリア菌をショウジョウバエ胚血球細胞由来培養細胞である S2 細胞および PGRP-LE を発現させた S2 細胞へと感染させることによって、ルシフェラーゼ発現を指標とした菌増殖および S2 および PGRP-LE-S2 での増殖率の変化について検討を行った。

研究計画 2) では、*L. 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利用した解析を行った。すなわち、前述したショウジョウバエ胚血球細胞由来培養細胞である S2 細胞が、PGRP-LE をほとんど発現してい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、野生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、この遺伝子の自然免疫シグナル伝達経路における関与、および生化学的な解析を行うことによって、詳細な遺伝子機能を解析した。さらに、ショウジョウバエの遺伝学を利用することによって、*in vivo* における機能解析も遂行した。

4. 研究成果

宿主細胞内でのリステリア菌の増殖を簡便にモニタリングすることが可能な検出系を構築するために、*luxABCDE* オペロンがリステリア菌のゲノム上に挿入された組み替え体を作製した。特異的プライマーを用いて正しい位置にベクターが挿入されていることおよびルシフェラーゼの恒常的な発現を確認した。*L. monocytogenes* を用いた組み替え体の解析から、Help (highly expressed listeria promoter) プロモーターが、最も高いルシフェラーゼ活性を示したため、同様の

ベクターを *L. ivanovii* 株にも導入した。*L. monocytogenes*-help-luciferase 株および *L. ivanovii*-help-luciferase 株を用いて、ショウジョウバエ培養細胞への感染実験およびそのルシフェラーゼ活性をモニタリングしたところ、PGRP-LE 発現 S2 細胞では、S2 細胞よりもそのルシフェラーゼ活性の減弱が観察された。RNAi スクリーニングを開始するための系が確立した。

戦略的 DNA マイクロアレイ解析により、PGRP-LE 依存、野生型リステリア菌感染依存的に発現上昇する 68 個の遺伝子群を抽出した。この中でも発現変動率が大きく新規性の高い Listericin と命名した遺伝子について、さらなる機能解析を行った。Listericin は、PGRP-LE 存在下で、しかも野生型リステリア菌が感染した時のみ発現すること、細胞内に侵入することができない LLO 因子を欠損させたリステリア菌感染では、その発現は誘導されないことが確認された (図 1)。

次に、Listericin の発現誘導が、ショウジョウバエのどの自然免疫シグナル伝達経路によって制御されているのか検討を行った。Toll 経路、Imd 経路、JAK-STAT 経路それぞれに決定的な寄与をする因子群を RNAi 法によってノックダウンさせ、リステリア菌感染による Listericin の発現を検討した。その結果、JAK-STAT 経路の転写因子である Stat92E を RNAi で遮断した場合にのみ、Listericin のリステリア菌感染に対する発現誘導が顕著に抑制された。一方、Toll 経路および Imd 経路を遮断してもその発現抑制は観察されなかった (図 2)。さらに過剰発現系を利用して、Toll 経路、Imd 経路および JAK-STAT 経路を活性化させたところ、図 2 と一致して、PGRP-LE 存在かか JAK-STAT 経路を活性化させた場合にのみ、Listericin の顕著な発現誘導が観察された (図 3)。

Listericin のさらなる生化学的分子機能を解析するために、Listericin 安定過剰発現 S2 細胞株を作製した。Western 解析の結果から、Listericin は細胞外へプロセスされた形で分泌されること、またその分泌型 Listericin はグラム陰性菌である *E. coli* K12 および DAP 型ペプチドグリカン有する *L. monocytogenes* に対して菌増殖抑制効果を有することが観察された。この効果は、グラム陽性菌である *S. saprophyticus* に対しては観察されなかった (図 4)。またこの培養上性 400 ml から Ni-NTA カラムを用いたタンパク精製およびその N 末端配列をエドマン分解法によって決定した。その結果、Listericin は 49 番目のアルギニン残基部位で限定分解された型で細胞外へ分泌されることが明らかとなった。

さらに *In vivo* における Listericin の分子機能を解析した。異所的発現系である

UAS-GAL4 システムを用いて、まず *Listericin* の発現を免疫担当器官である脂肪体および血球細胞で抑制した RNAi 個体を作製した。定量 PCR 法により *Listericin* の発現量は約 70% 程度低下していることを観察した。そこでこの *Listericin*-RNAi 個体にリステリア菌を感染させ生存率の検討を行ったところ、このトロールとして用いた野生型と比べて、生存率の有意な減少は観察されなかった。この結果は、*Listericin* の RNAi の効果が十分でなかった可能性、あるいは複数種類ある抗菌ペプチドの機能重複性によるものと考えられる。そこで、次に *Listericin* 過剰発現個体を作製して、リステリア菌の感染実験を行った。その結果、*Listericin* 過剰発現個体は、リステリア菌感染に対して、有意な抵抗性を付与した (図 5)。さらにコロニー形成法を用いた解析から、*Listericin* 過剰発現個体は、注入したリステリア菌およびグラム陰性菌の体内での菌増殖を顕著に抑制した (図 6)。感染抵抗性の付与が、体内での菌数の減少による可能性が示唆された。

これまで同定されているショウジョウバエの抗菌ペプチドのほとんどは、Toll 経路あるいは Imd 経路によって発現が制御されることが知られている。今回、私が同定した *Listericin* は、JAK-STAT 経路によって制御される抗菌活性を有するペプチドとしては初めての報告である。抗菌ペプチドは、抗生物質に比べて、その作用点が広範囲であるため耐性菌が出来にくいとされている。また元来、これらの抗菌ペプチドは生体内に存在するペプチドであるため、環境汚染をする可能性は少ない。今後の感染症治療への応用に期待が持てる。

図 1 :

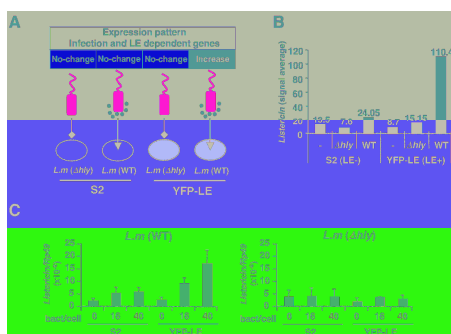


図 2 :

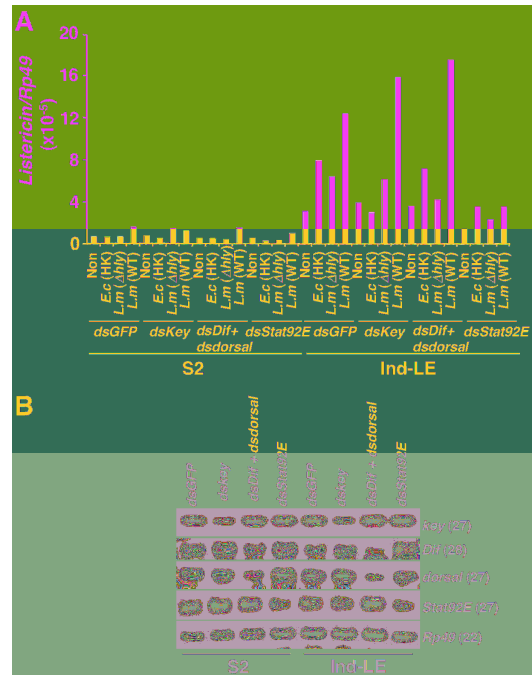


図 3 :

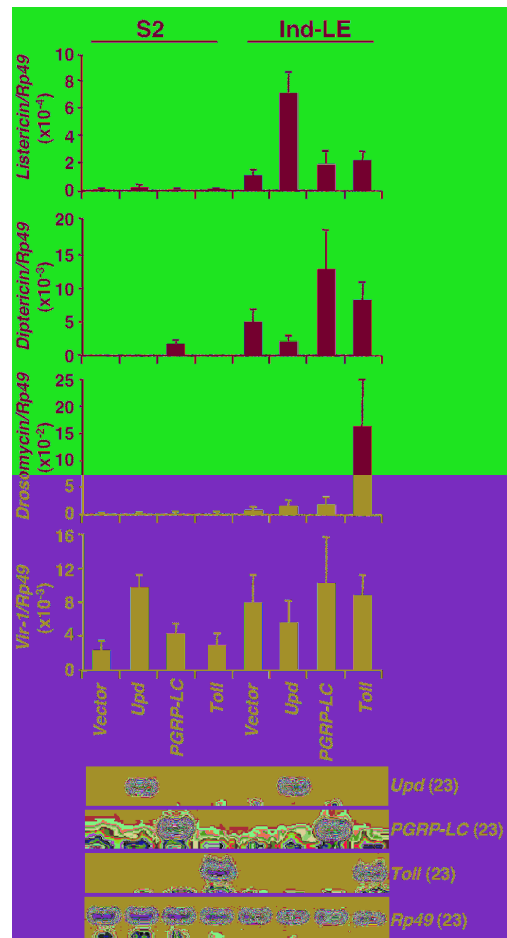


図 4 :

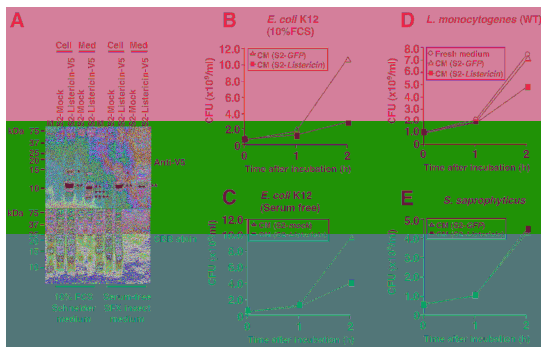


図 5 :

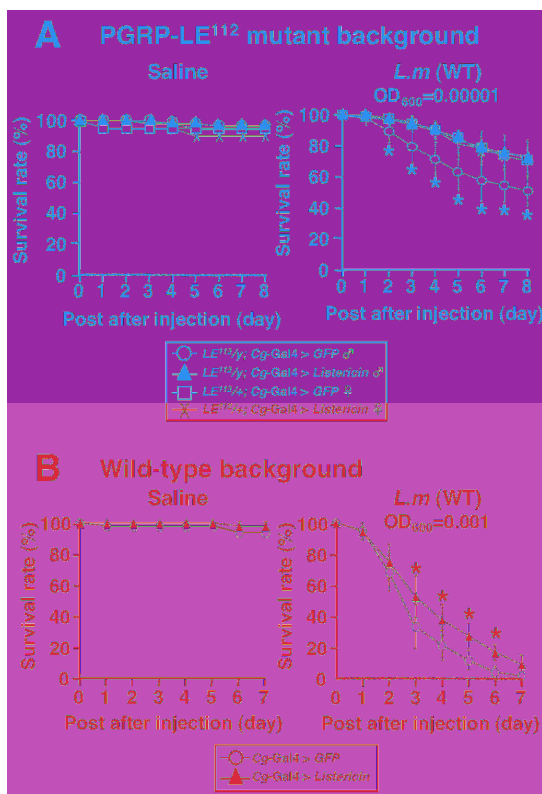
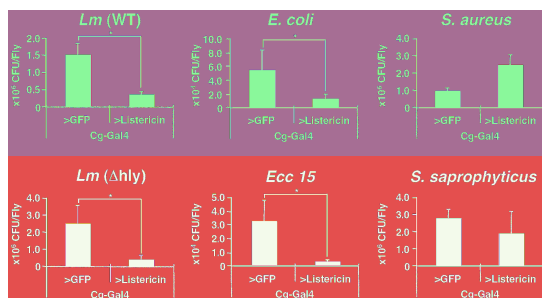


図 6 :



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 2 件)

1、 Akira Goto, Tamaki Yano, Jun Terashima, Shinzo Iwashita, Yoshiteru Oshima and Shoichiro Kurata. Cooperative regulation of the induction of the novel antibacterial Listericin by PGRP-LE and the JAK-STAT pathway. Journal of Biological Chemistry. Vol. 285, p 15731 - 15738 (2010) (査読あり) .

2、 Akira Goto and Shoichiro Kurata. Immune response of insects and crustaceans. Bentham Science eBook (Review article) Accepted (2010) (査読あり) .

[学会発表] (計 4 件)

1、 Goto, A., Iwashita, S., Nabe, K., Fukuzaki, M., Oshima, Y. and Kurata, S.: Novel roles of receptor-type Guanylyl Cyclase Gyc76C on Drosophila innate immune responses. BMB2010 (第 33 回分子生物学会年会、第 8 3 回日本生化学会大会 合同大会)、2010 年、1 2 月 9 日、神戸 (口答発表&ポスター発表)

2、 Goto, A. and Kurata, S.: Cooperative regulation of the induction of the novel antibacterial Listericin by PGRP-LE and JAK-STAT pathway. 14th International Congress of Immunology (第 14 回国際免疫学会議)、2010 年、8 月 23 日。神戸

3、 Goto, A., Yano, T., Terashima, J., Iwashita, S., Oshima, Y., and Kurata, S.: Cooperative regulation of the induction of the novel antibacterial Listericin by PGRP-LE and JAK-STAT pathway. 日本比較免疫学会第 22 回学術集会、2010 年、8 月 2 日、福岡 (古田奨励賞受賞)

4、 後藤彰 (G-COE 助教)、矢野環 (准教授)、寺島潤 (助教)、倉田祥一郎 (教授) : 新規抗菌ペプチド Drosophila Listericin の同定。第 76 回日本生化学会東北支部会例会、2010 年、5 月 8

日、福島

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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・助教
研究者番号：70419000

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし