

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659088

研究課題名（和文） RNA 干渉スクリーニングを用いたインターフェロン誘導性タンパク質の網羅的解析

研究課題名（英文） A comprehensive analysis of interferon-inducible proteins by RNA interference screening

研究代表者

松澤 健志（MATSUZAWA TAKESHI）

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号：80370154

研究成果の概要（和文）：病原細菌の感染防御に重要なインターフェロン誘導性タンパク質の同定を本研究の目的としたが、当初予定していた以上に RNAi スクリーニングの条件検討に時間がかかり、インターフェロン- γ 誘導性タンパク質を同定するまでに至らなかった。しかしその過程で、本研究によりインターフェロン- γ 刺激マクロファージ内で p38 MAPK を介してオートファジーと呼ばれる細胞の自己消化機構が活性化されること（Journal of Immunology, in press）、このインターフェロン- γ が活性化するオートファジーが細胞内寄生菌の殺菌に関わること（論文投稿中）が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to identify the interferon-inducible proteins, which is involved in the immunity to bacterial pathogens. This study reveals that autophagy is activated by interferon-gamma via p38 MAPK (Journal of Immunology, in press). Moreover, p38 MAPK-mediated autophagy contributes to macrophage bactericidal activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	0	1,500,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	360,000	3,060,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：自然免疫、インターフェロン、マクロファージ、細胞内寄生菌、RNAi スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

自然免疫は病原体認識ならびに炎症反応の惹起や獲得免疫の誘導に重要な役割を果たしている生体防御メカニズムである。Toll-like receptor (TLR) ファミリー分子

による病原体構成成分の認識、炎症性サイトカインやインターフェロン (IFN) の発現誘導 (図 1：病原体の認識) 機構の解析が免疫学の主流をなしているが、各種 IFN によりマクロファージなどの貪食細胞の活性化 (図

1 : IFN 誘導性免疫) も自然免疫機構の重要なステップである。IFN- γ 刺激により $\sim 1,300$ の IFN 誘導性タンパク質が新たに発現し、マクロファージの免疫殺菌作用が増強され、細菌、ウイルス、原虫、といった侵襲様式の異なる病原体に対応している。しかし IFN 誘導性タンパク質の網羅的解析はなされておらず、IFN 誘導性タンパク質のうちどの因子が各感染に重要であるかは明らかにされていない。

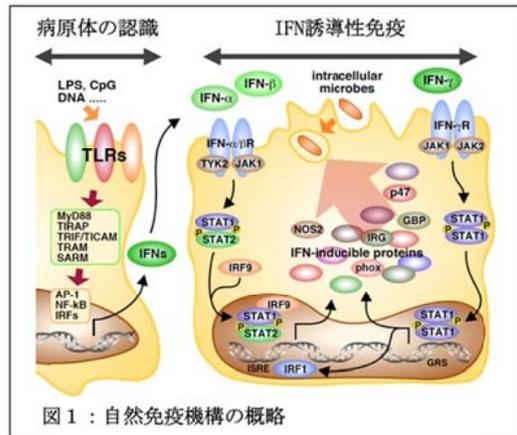


図 1 : 自然免疫機構の概略

2. 研究の目的

IFN- γ が活性化する免疫機構の全貌解明のため、網羅的 RNA 干渉 (RNAi) スクリーニングを行ない、病原細菌の感染防御に重要な IFN- γ の下流エフェクターの同定を本研究の目的とした。従来の RNAi ライブラリーとは異なり未知遺伝子を含み、全 IFN 誘導性タンパク質 ($\sim 1,300$ 種類) を網羅する RNAi ライブラリー (enzymatic production of RNAi library from subtracted cDNA : RILS) を新規作成方法により構築した後、RNAi スクリーニングにより感染防御に重要な IFN- γ 誘導性タンパク質を同定することで、IFN- γ 誘導性免疫の全貌解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究では cDNA サブトラクション法と cDNA を酵素的に siRNA 発現コンストラクトへと変換する EPRIL/REGS 法を組み合わせる事で、ある特定領域を標的にした新規ランダム RNAi ライブラリー (RILS) を構築し、全 IFN 誘導性タンパク質を対象にハイスループット RNAi スクリーニングを行い、病原細菌の感染防御に重要な IFN- γ 誘導性タンパク質の同定を試みた。

(1) RNAi スクリーニングの準備のためのランダム RNAi ライブラリー (RILS) の構築 (図 : 左側)

IFN- γ 処理したマクロファージ様細胞の mRNA から cDNA (tester cDNA) を、また未処理

細胞の mRNA から cDNA (driver cDNA) を作製したのち、tester cDNA から driver cDNA をサブトラクション法により差し引くことで、IFN 誘導性遺伝子のみの cDNA を作製した。この subtracted cDNA をもとに EPRIL/REGS 法により、IFN 誘導性タンパク質に対するランダム RNAi ライブラリーを作製した。作製効率を考慮し 5,200 の独立ベクターから成るランダム RNAi ライブラリーを作製すれば、全 IFN 誘導性タンパク質 (1,300 標的遺伝子) を網羅出来ると考えられた。

(2) スクリーニングに用いるマクロファージ細胞株、遺伝子導入方法の検討

マクロファージ様細胞株遺伝子導入効率が低いため、まず、マウスマクロファージ様細胞株 RAW 264.7 細胞への遺伝子導入効率の最適化を行った。カチオンリポソームをベースとしたリポフェクション法では RAW 264.7 細胞への遺伝子導入効率は非常に低かったため (10%以下)、レンチウイルスを介した遺伝子導入法を構築し RAW 264.7 細胞への遺伝子導入効率を最適化した。

(3) 感染実験及び IFN マクロファージ活性化作用の検出

本研究には宿主細胞内での寄生様式の異なる 2 種類の細胞内寄生性細菌 (細胞質で増殖する *Listeria monocytogenes*、食胞内で増殖する *Salmonella typhimurium*、もしくは *Mycobacterium bovis* BCG 株) を用いた。IFN のマクロファージ活性化作用の検出は以下の方法で行った。マクロファージに細胞内寄生性細菌を感染させ、数時間培養した後、マクロファージ内での細胞内寄生細菌の増殖 (もしくは殺菌) を、生細菌数を蛍光光度で測定可能な AlamarBlue 試薬 (励起波長 530 \sim 560nm、蛍光波長 590 nm) を用いて測定する。マクロファージ内での細胞内寄生細菌の増減を指標にし、IFN のマクロファージ活性化作用を検出する。申請者は現在までに 3 種類の細胞内寄生性細菌の感染実験と、

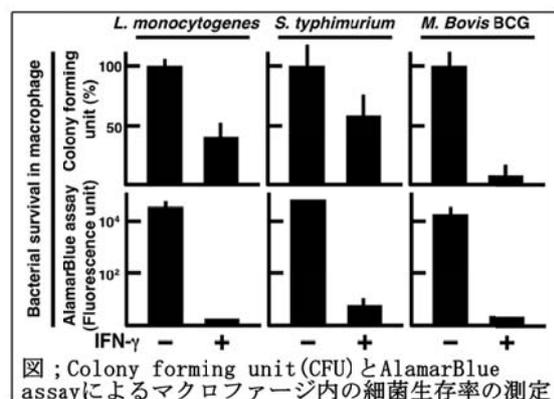
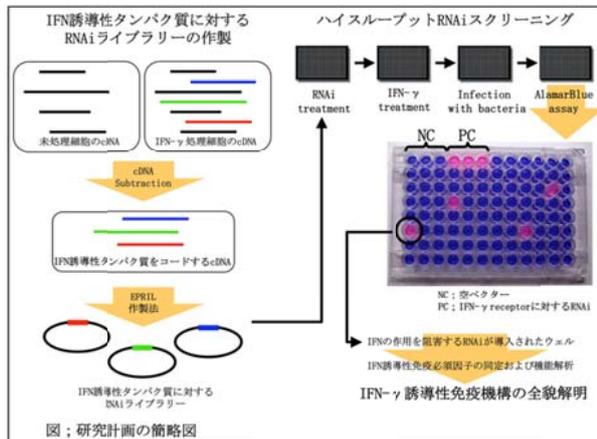


図 ; Colony forming unit (CFU) と AlamarBlue assay によるマクロファージ内の細菌生存率の測定

AlamarBlue 試薬をもちいた生細菌数測定実験の条件検討を行い、IFN のマクロファージ活性化作用が蛍光光度で測定可能である実験結果を得た。

(4) ハイスループット RNAi スクリーニング(図：右側)



96 ウェルプレート上で培養したマクロファージに RNAi ライブラリーを導入する。サイレンシング効果が得られるまで培養した後、IFN- γ を細胞培養中に添加し IFN- γ 誘導性タンパク質を発現させる。細胞内寄生細菌を細胞培養液中に添加し数時間プレートを静置することでマクロファージに細菌を食させた後、抗生剤 (*Mycobacterium* 属細菌に対しては amikacin、それ以外の菌株に対しては gentamicin) を培養液中に添加し、マクロファージに取り込まれなかった細菌の増殖を阻止する。数時間培養した後、マクロファージ細胞を 0.1% TritonX-100 溶液にて溶解し、AlamarBlue 試薬を各ウェルに加えた後に蛍光光度を測定する。対照実験として空ベクター(陰性対照、図-(NC))または、IFN の作用に必須である IFN- γ 受容体をサイレンシングする RNAi ベクター(陽性対照、図-(PC))を導入したマクロファージの感染実験も同時に行う。導入した RNAi により IFN のマクロファージ活性化作用が阻害された場合、マクロファージ内で細菌が増殖し、陽性対照同様に蛍光光度が高い(赤色)ウェルとして検出される。IFN の作用を阻害する RNAi ベクターに挿入された DNA 断片の遺伝子配列を決定し、病原細菌の感染防御に必須な因子を同定。

4. 研究成果

インターフェロン- γ が活性化する免疫機構の全貌解明のため、網羅的 RNA 干渉 (RNAi) スクリーニングを行ない、病原細菌の感染防御に重要なインターフェロン- γ の下流エフ

ェクターの同定を本研究の目的とした。従来の RNAi ライブラリーとは異なり未知遺伝子を含み、全 IFN 誘導性タンパク質 (~1,300 種類) を網羅する RNAi ライブラリーを新規作成方法により構築した後、RNAi スクリーニングにより細菌感染の防御に重要なインターフェロン- γ 誘導性タンパク質を同定することで、インターフェロン誘導性免疫の全貌解明を目指した。当初予定していた以上に RNAi スクリーニングの条件検討に時間がかかり、平成 23 年度の研究により細菌感染の防御に重要なインターフェロン- γ 誘導性タンパク質を同定するまでに至らなかったが、その過程で、本研究によりオートファジーと呼ばれる細胞の自己消化機構がインターフェロン- γ 刺激したマクロファージで活性化され、この活性化に p38 MAPK が重要であること (Journal of Immunology, in press)、さらに、この p38 MAPK を介した IFN- γ のオートファジー活性化作用が細胞内寄生菌の殺菌に関わる事 (論文投稿中) を明らかにした。インターフェロン- γ により活性化したマクロファージは病原体の排除のみならず、腫瘍細胞に対する作用も増強し、マクロファージの活性化メカニズムは広く免疫学に重要である。以上のことより本研究により免疫学上価値のある知見が得られたと考えられる。

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 1 件)

- ① Takeshi Matsuzawa, Bae-Hoon Kim, Avinash R. Shenoy, Shigeki Kamitani, Masami Miyake, and John D. MacMicking, IFN- γ elicits macrophage autophagy via the p38 MAPK signaling pathway, Journal of Immunology, 査読有、2012、in press

[学会発表] (計 4 件)

- ① 藤原絵梨、松澤健志、三宅達彦、三宅眞美、インターフェロン γ によるオートファジー調節メカニズムの解析、第 64 回日本細菌学会関西支部総会、2011 年 11 月 19 日、大阪府 (堺市)
- ② 三宅達彦、松澤健志、藤原絵梨、三宅眞美、インターフェロン γ 誘導性オートファジーの *Listeria monocytogenes* に対する感染防御における役割、第 64 回日本細菌学会関西支部総会、2011 年 11 月 19 日、大阪府 (堺市)

- ③ 藤原絵梨、松澤健志、三宅達彦、三宅眞美、インターフェロン γ によるオートファジー調節メカニズムの解析、第 152 回日本獣医学術集会、2011 年 9 月 19-21 日、大阪府（堺市）
- ④ 三宅達彦、松澤健志、藤原絵梨、三宅眞美、インターフェロン γ 誘導性オートファジーの *L. monocytogenes* 感染における作用メカニズムの解析、第 152 回日本獣医学術集会、2011 年 9 月 19-21 日、大阪府（堺市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松澤 健志 (MATSUZAWA TAKESHI)
大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教
研究者番号：80370154

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：