

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25年 5月 9日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890147

研究課題名（和文） タンパク質架橋反応による腸管免疫の情報伝達制御

研究課題名（英文） Transglutaminase-catalyzed Crosslinking Suppresses Innate Immune Signaling in the Drosophila Gut

研究代表者

柴田 俊生 (SHIBATA TOSHIO)

九州大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：00614257

研究成果の概要（和文）：

トランスグルタミナーゼ (TGase) は、タンパク質の架橋反応を触媒する酵素である。最近、キイロショウジョウバエ TGase の RNAi 実験により、TGase は腸管免疫の制御に関与していることが示唆された。腸管免疫制御の分子機構は未解決の問題である。そこで、本研究では腸管免疫における TGase の機能を調べた。本研究の結果、TGase は、腸管の免疫経路を負に制御し、過剰な免疫反応を抑え、腸内細菌の恒常性に寄与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Mammalian transglutaminases (TGases) play important roles in numerous physiological phenomena such as blood coagulation and skin formation via protein-protein crosslinking. We revealed that TGase-catalyzed protein-protein crosslinking suppresses the immune signaling pathway to maintain a buffered threshold required for immune tolerance against commensal microbes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：自然免疫

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の架橋は、皮膚の角質化や血液凝固、またアポトーシスを引き起こす生体において必須の反応である。このタンパク質架橋反応は、トランスグルタミナーゼ (TGase) と呼ばれる酵素が触媒している。私たちの研究グループはこれまでに、キイロシ

ョウジョウバエの遺伝子ノックダウン技術を用いて、TGase による架橋反応が、外皮形成や生存に必須であることを個体レベルで示してきた。ごく最近、私たちは、TGase が腸管の感染微生物に対する認識の情報伝達系を制御していることを見いだした。これまでに、タンパク質の架橋反応が腸管免疫の制

御に関わるという報告はなく、まったく新しい研究分野を切り開く可能性が高い。

2. 研究の目的

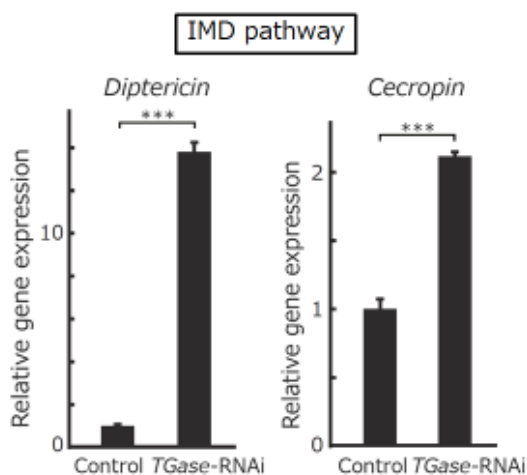
トランスグルタミナーゼ (TGase) は、タンパク質のリジン残基とグルタミン残基間の架橋反応を触媒する酵素である。最近、キイロショウジョウバエ TGase の遺伝子ノックダウン (RNAi) 実験により、TGase は腸管免疫の制御に関与していることが示唆された。腸管免疫制御の分子機構は未解決の問題である。そこで、本研究では腸管免疫における TGase の機能を調べた。

3. 研究の方法

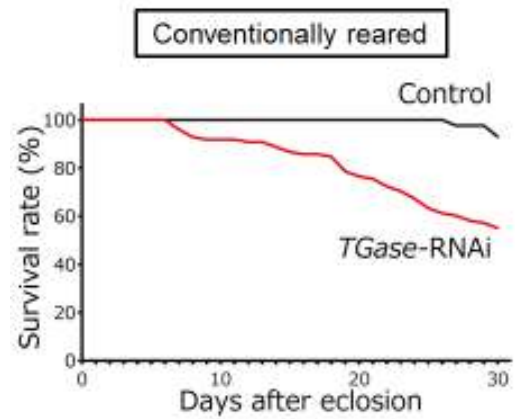
GAL4/UAS システムにより、TGase を腸管特異的に遺伝子ノックダウン (RNAi) した。この個体を用いて、生存率の測定や、リアルタイム PCR 法による各種免疫関連因子の定量化を行った。さらに、細菌特有の 16S rRNA に基づいた腸内細菌種の同定を行った。

4. 研究成果

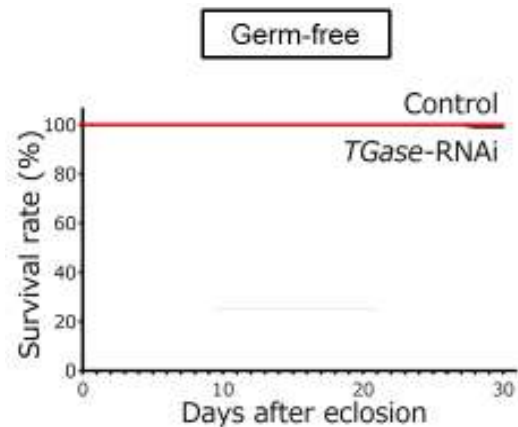
TGase を RNAi した系統と、コントロール系統の、腸管における各種免疫関連因子の産生量をリアルタイム PCR 法により定量化した。その結果、主要な免疫経路である IMD 経路の抗菌ペプチドであるジプテリシンやセクロピンが、RNAi 系統において著しく亢進していることが判明した (下図)。



また、腸管特異的に TGase を RNAi した系統では、コントロール系統と比較して生存率が有意に減少し (次段・上図)、腸管上皮細胞のアポトーシスが高頻度で誘発されていた。

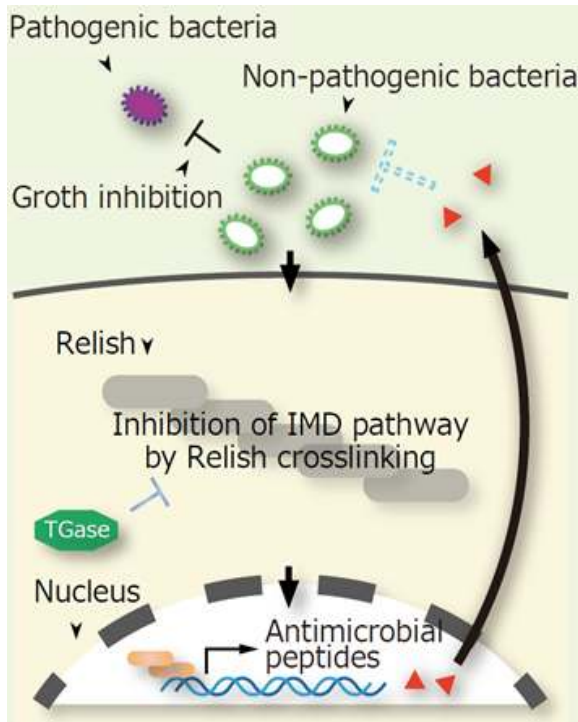


興味深いことに、RNAi 系統を無菌状態で飼育すると、生存率は大幅に回復し (下図)、アポトーシスも認められなかった。



さらに、TGase の RNAi 系統の腸管抽出物を、無菌化した野生型系統に経口投与すると、TGase を RNAi したときと同様に生存率が低下した。以上より、TGase は腸管免疫を負に制御し、腸内細菌叢の維持を行っている可能性が示唆された。そこで、16S rRNA に基づく腸内細菌叢の解析を行った。コントロールの系統では抗菌ペプチド感受性の高い *Acetobacter* 属の細菌が大部分を占めていたのに対し、RNAi 系統では抗菌ペプチド抵抗性を有する *Pseudomonas* 属の細菌が主要であることが明らかとなった。続いて、TGase による IMD 経路制御の分子機構を明らかにする目的で、TGase の合成基質を用い、IMD 経路の基質タンパク質を同定した。組換え体を用いた実験から、基質タンパク質は TGase により高度に架橋されることが明らかとなった。以上のことから、TGase は IMD 経路の因子を架橋して不活性化させ、常在細菌による IMD 経路の異常な活性化を抑制することで、腸管恒

常性維持に寄与していることが判明した（下図）。



TGase の機能解析は、これまで哺乳類を中心に研究され、TGase ファミリーの生理機能は、血液凝固、創傷治癒、角質化、アポトーシスなど多岐におよぶ。最近になって、肝細胞やがん細胞に発現する TGase-2 が、刺激に応じて特異的な転写因子やカスパーゼ 3 を架橋することで、特定の受容体の発現や炎症に関わる NF- κ B 経路を制御することが報告されている。細菌の表層成分を認識する PGRP-LC や PGRP-LE というキイロショウジョウバエの病原体センサーを介したシグナル伝達制御と腸管の恒常性維持の分子機構の解明は、キイロショウジョウバエとヒトの自然免疫系のシグナル伝達の類似性から、ヒト腸管の病原体センサーのシグナル伝達制御や自然炎症の研究に対して大きな波及効果が見込まれる。また、申請者らと本領域周辺の研究者との有機的な連携が、TGase の架橋反応によるシグナル伝達制御の分子機構という新たな研究分野の創造につながると確信している。

さらに、キイロショウジョウバエを用いた自然免疫研究、とりわけ腸管免疫は、哺乳類に比べて、常在細菌叢やその実験動物としての取り扱いやすさから、2008 年頃より明らかに研究推進の拍車がかかり始めた。申請者が推進してきた TGase の IMD 経路の抑制系の研究成果は、現在、国際誌に査読（改定）中であり、さらに本研究領域の発展が見込まれる。

腸管は経口的に感染してきた細菌と常に接しており、常時脅威にさらされているため、免疫反応の最重要の場と言ってもよい。しかし、腸管免疫の全貌はいまだに分かっておらず、特に常在細菌叢の維持機構についてはほとんど未解明の分野である。タンパク質の架橋反応が、腸内細菌に影響をおよぼすといった報告は、申請者の知る限りこれまでされておらず、本研究による宿主と細菌の相互作用の解明は、哺乳類の腸管免疫研究においても大きなインパクトを与えると考えられる。

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）

Keisuke Tagawa, Toyoki Yoshihara, Toshio Shibata, Kazuki Kitazaki, Yuichi Endo, Teizo Fujita, Takumi Koshiba, Shun-ichiro Kawabata.: Microbe-Specific C3b Deposition in the Horseshoe Crab Complement System in a C2/Factor B-Dependent or -Independent Manner. PLoS ONE, 7, e36783 (2012). (査読あり)

〔学会発表〕（計 7 件）

1) 柴田俊生、関原早苗、藤川匠、宮地隆太、石原健、小柴琢己、川畑俊一郎.: キイロショウジョウバエトランスグルタミナーゼの架橋反応による腸管免疫の維持機構、第 85 回日本生化学会（シンポジウム講演・口頭発表）、2012 年 12 月 14 日、福岡

2) 柴田俊生、関原早苗、藤川匠、宮地隆太、石原健、小柴琢己、川畑俊一郎.: キイロショウジョウバエトランスグルタミナーゼの架橋反応による腸管免疫の維持機構、第 15 回トランスグルタミナーゼ研究会学術集会（口頭発表）、2012 年 12 月 13 日、福岡

3) T. Shibata, S. Sekihara, T. Fujikawa, R. Miyaji, T. Ishihara, T. Koshiba, S. Kawabata.: Transglutaminase-catalyzed protein-protein crosslinking of Relish suppresses innate immune signaling in *Drosophila*, Homeostatic Inflammation Symposium (国際エンドトキシン学会・ポスター発表)、2012 年 10 月 23 日、東京

4) T. Shibata, S. Sekihara, T. Fujikawa, R. Miyaji, T. Ishihara, T. Koshiba, S. Kawabata.: Transglutaminase-catalyzed Crosslinking Suppresses Innate Immune

Signaling in the Drosophila Gut,
International Society of Developmental
and Comparative Immunology (国際比較免疫
学会・口頭発表)、2012年7月19日、福岡

5) 柴田俊生、関原早苗、藤川匠、宮地隆太、
石原健、小柴琢己、川畑俊一郎. :キイロショウ
ウジョウバエトランスグルタミナーゼの架
橋反応による腸管免疫の維持機構、平成 24
年度日本生化学会九州支部例会 (口頭発表)、
2012年5月27日、福岡

6) 柴田俊生、関原早苗、宮地隆太、藤川匠、
小柴琢己、川畑俊一郎. :キイロショウジョウ
バエトランスグルタミナーゼの架橋反応に
よる腸内細菌叢と免疫制御の分子機構解明、
第84回日本生化学会大会 (口頭発表)、2011
年9月22日、京都

7) 柴田俊生、関原早苗、宮地隆太、藤川匠、
小柴琢己、川畑俊一郎. :キイロショウジョウ
バエトランスグルタミナーゼの架橋反応に
よる腸内細菌叢と免疫制御の分子機構解明、
第4回トランスグルタミナーゼ研究会&日
本ポリアミン学会合同学術集会 (ポスター
発表)、2011年9月20日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 俊生 (SHIBATA TOSHIO)

九州大学・大学院理学研究院・助教

研究者番号：00614257