

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860333

研究課題名(和文)免疫制御による多臓器恒常性維持機構解明

研究課題名(英文) Transglutaminase-catalyzed protein-protein crosslinking maintains the innate immunity in *Drosophila*

研究代表者

柴田 俊生 (Shibata, Toshio)

九州大学・高等研究院・助教

研究者番号：00614257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腸管は、食べ物などと一緒に侵入してきた細菌などに常にさらされているため、優れた免疫のシステムを有している。昆虫では、殺菌性の抗菌ペプチドや活性酸素に加えて、「囲食膜」と呼ばれる構造体が感染細菌からの防御を担っている。本研究では、タンパク質同士の糊付け反応に関わる酵素である「トランスグルタミナーゼ」が囲食膜の安定化を行い、高病原性細菌からの防御に携わっていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Intestinal homeostasis is ensured by a subtle balance between bacteria and host immunity. Gut epithelial barriers, such as the mucus layer in mammals and the peritrophic matrix in invertebrates, have a protective function for hosts, as they are impermeable to the invading intestinal microbes. In this study, we discovered, in the fly *Drosophila melanogaster*, that transglutaminase, known to be molecular glue involved in protein-protein covalent bond formation, is essential for peritrophic matrix formation to convert a peritrophic protein Drosocrystallin into a stable fiber-like structure and to inhibit the pathogenesis against pathogenic bacteria. Knockdown of transglutaminase gene, the permeability of the peritrophic matrix was increased and the fly exhibited highly susceptibility against a bacterial toxic protease. Transglutaminase contributes to form the stable mesh-like barrier on the peritrophic matrix and tolerant for pathogenic microorganisms.

研究分野：免疫学、生化学

キーワード：腸管免疫 囲食膜 トランスグルタミナーゼ ショウジョウバエ 外毒素プロテアーゼ 経口感染 タンパク質架橋

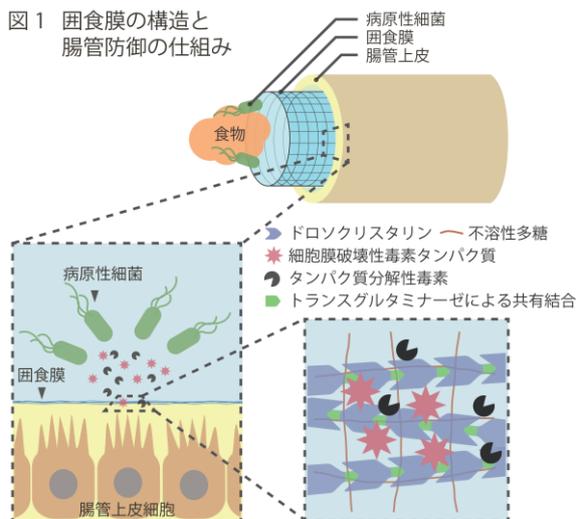
1. 研究開始当初の背景

腸管には、侵入してきた異物から自己を守るための特有の防御壁が備わっている。例えば哺乳類では、腸管の内側をムチン層と呼ばれる粘液層が覆っており、外界からの刺激物や病原性細菌によって直接生体にダメージを与えないように、バリアとしての機能を果たしている。我々の研究グループはこれまでに、ショウジョウバエの遺伝子ノックダウン技術を用いて、宿主の腸管免疫と常在細菌の相互作用や、常在細菌叢の維持機構について研究を推進してきた。本研究では、宿主と経口感染細菌との相互作用を、腸管バリアをキーワードとして解析した。

2. 研究の目的

昆虫の腸管では、不溶性の多糖およびタンパク質から構成される囲食膜と呼ばれる構造体が腸管の内側を覆っており、哺乳類の腸管ムチン層と同様に生体を守るバリアとしての役割を担っている(図1)。しかしながら、詳しい囲食膜の生体防御機構は不明のままであり、とりわけ、モデル生物として広く用いられているショウジョウバエにおいては、囲食膜を構成するタンパク質として「ドロソクリスタリン」が1種類報告されているのみだった。我々は、タンパク質同士の共有結合形成(化学架橋)、言わば糊付け反応に関わる酵素「トランスグルタミナーゼ」がショウジョウバエ腸管の囲食膜の安定性に寄与していることを見出ししていた。本研究では、トランスグルタミナーゼと囲食膜タンパク質の関係について、分子レベル・個体レベルで明らかとすることを目的とした。特に、囲食膜安定化による病原性細菌からの防御機構に焦点を当てて研究を行った。

図1 囲食膜の構造と腸管防御の仕組み



3. 研究の方法

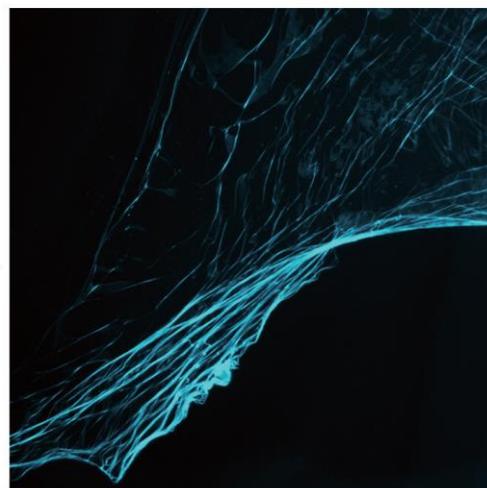
囲食膜の生体防御タンパク質であるドロソクリスタリンはそのアミノ酸配列の特徴か

ら、トランスグルタミナーゼの基質になることが強く示唆された。まず、ドロソクリスタリンを組換え体として調製した。ドロソクリスタリンにトランスグルタミナーゼを作用させた後、ウエスタンブロットにより、基質になるかどうか確認を行った。また、トランスグルタミナーゼ発現抑制ハエに高病原性細菌や、毒性をなくした細菌を経口的に感染させ、野生型ハエとの生存率や腸管上皮細胞の細胞死率を解析した。また、高病原性細菌が分泌する外毒素プロテアーゼがトランスグルタミナーゼ発現抑制ハエの生存率を低下させたため、タンパク質分解毒素(プロテアーゼ)を細菌培養液から精製し、ドロソクリスタリンに作用させて、分解の有無をウエスタンブロットや蛍光顕微鏡下で確認した。

4. 研究成果

トランスグルタミナーゼは、試験管内の実験により囲食膜タンパク質のドロソクリスタリン同士を架橋結合し、超高分子のポリマーを形成させることが判明した。また、顕微鏡を用いてドロソクリスタリンの様子を観察してみると、繊維状の構造をとることがわかった(図2)。

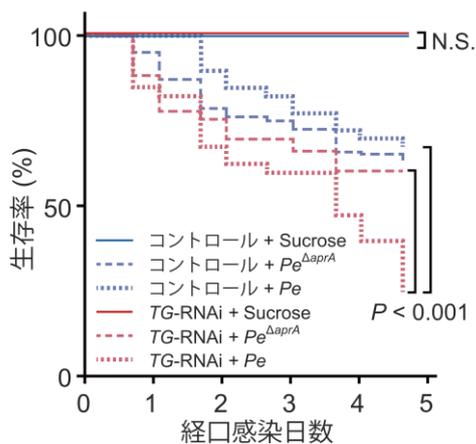
図2 ドロソクリスタリンが生み出す繊維構造



この繊維状構造の形成は、トランスグルタミナーゼの存在に関わらず、自発的に起こっていた。しかし、トランスグルタミナーゼによる架橋を受けていないドロソクリスタリンにおいては、病原性細菌が分泌するタンパク質分解性の毒素によって分解され、繊維状の構造は無くなった。一方で、トランスグルタミナーゼにより架橋されポリマーとなった繊維状ドロソクリスタリンは、タンパク質分解毒素からの攻撃を免れていた。さらに、個体レベルでの解析を行うため、腸管特異的にトランスグルタミナーゼの発現を抑制する

ことで、囲食膜におけるドロソクリスタリン同士の架橋結合を弱くしたハエを用いた。このハエに病原性細菌を経口感染させた結果、細菌が分泌する毒素プロテアーゼにより腸管上皮細胞が高頻度で死滅し、ハエ自体も非常に短命になることが判明した(図3)。以上のことより、トランスグルタミナーゼによるドロソクリスタリン繊維の安定化は、タンパク質分解性の毒素による囲食膜の破壊を防ぎ、細菌や毒素の腸管上皮細胞への侵入を遮断していると考えられる(図1)。

図3 トランスグルタミナーゼ発現抑制系統(TG-RNAi)の細菌感染時の生存率



TG-RNAi: トランスグルタミナーゼ発現抑制系統
Pe: 高病原性細菌, Pe^{Δapra}: プロテアーゼ非産生細菌

本研究において、トランスグルタミナーゼは、腸管のバリアとして存在する囲食膜の構成タンパク質を糊付けすることで、囲食膜を安定化させ、病原性細菌からの攻撃を防いでいることがわかった。一方で、哺乳類の腸管ムチン層は、病原性細菌からの防御のみならず腸内細菌の恒常性維持、ひいてはアレルギーなどの免疫疾患にも大きな影響を与えていることが解明されつつある。しかしながら、500種、100兆を超える腸内細菌の複雑さから、解析は非常に困難となっており、ムチン層が引き起こす各種生理機能の全貌は明らかにされていない。そのような中、キョウジョウバエを使った腸管免疫の研究は、哺乳類と比べて細菌種が少ないこと、実験動物として取り扱いやすいことから、2008年頃より世界中の研究室で行われるようになってきた。今回発見したトランスグルタミナーゼによる囲食膜の安定化は、腸内細菌のバランスを保つひとつの要因である可能性があり、囲食膜と腸内細菌の相互作用解析を進めることで、ヒトの腸管免疫研究にも応用できると期待される。現在は他の囲食膜構成ムチン様タンパク質の機能解析や、囲食膜による腸内細菌叢維持機構について研究を行っている。

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) Toshio Shibata, Kouki Maki, Jinki Hadano, Takumi Fujikawa, Kazuki Kitazaki, Takumi Koshiba, Shun-ichiro Kawabata.: Crosslinking of a peritrophic matrix protein protects gut epithelia from bacterial exotoxins. *PLOS Pathogens*, 11, e1005244 (2015). (査読有り)
DOI: 10.1371/journal.ppat.1005244

[学会発表] (計7件)

(1) 柴田俊生, 関原早苗, 藤川匠, 槇光輝, 宮地隆太, 石原健, 小柴琢己, 川畑俊一郎.: ショウジョウバエの腸内細菌に対する免疫応答と寛容の分子機構. 第36回日本炎症・再生医学会(シンポジウム招待講演), 2015年7月21日、東京都

(2) 柴田俊生, 関原早苗, 藤川匠, 槇光輝, 宮地隆太, 石原健, 小柴琢己, 川畑俊一郎.: 腸内細菌に対する免疫寛容による腸管恒常性維持. 第87回日本生化学会大会(口頭発表), 2014年10月17日、京都府

(3) 柴田俊生, 関原早苗, 藤川匠, 槇光輝, 宮地隆太, 石原健, 小柴琢己, 川畑俊一郎.: 腸内細菌に対する免疫寛容による腸管恒常性維持. 第17回トランスグルタミナーゼ研究会学術集会(口頭発表), 2014年10月14日、京都府

(4) 柴田俊生.: タンパク質架橋による自然免疫の応答制御と腸内細菌共生成の分子機構. 第38回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム(ポスター発表), 2014年9月11日、福岡県

(5) 柴田俊生, 関原早苗, 藤川匠, 槇光輝, 宮地隆太, 石原健, 小柴琢己, 川畑俊一郎.: ショウジョウバエの腸内細菌に対する免疫応答と寛容の分子機構. 第25回日本生体防御学会学術総会・日本比較免疫学会第26回学術集合同学会(奨励賞受賞講演), 2014年7月11日、宮城県

(6) Toshio Shibata, Sanae Sekihara, Takumi Fujikawa, Ryuta Miyaji, Kouki Maki, Takeshi Ishihara, Takumi Koshiba, Shun-ichiro Kawabata.: Transglutaminase-Catalyzed Protein-Protein Crosslinking Maintains the Gut Epithelial Immunity. Gordon Research Conference, Transglutaminases in Human Disease Processes (ポスター発表), 2014年7月1日、Lucca, Italy

(7) 柴田俊生、関原早苗、楨光輝、藤川匠、宮地隆太、石原健、小柴琢己、川畑俊一郎.: ショウジョウバエ自然免疫の応答制御と腸内細菌の共生成立の分子機構. 平成 26 年度日本生化学会九州支部例会 (シンポジウム招待講演)、2014 年 5 月 17 日、福岡県

〔図書〕 (計 1 件)

(1) Toshio Shibata, Shun-ichiro Kawabata.: Transglutaminase in Invertebrates (in "Transglutaminases: Multiple Functional Modifiers and Targets for New Drug Discovery"). pp 117-128. Springer Japan (2015)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~biopoly/research/tg-pm.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田俊生 (Toshio Shibata)
九州大学・高等研究院・助教
研究者番号: 00614257