公開

（事後評価・研究者用）

研　究　報　告　書

「内因性リガンドによる進化的に保存された自然免疫活性化機構の解明」

研究タイプ：通常型
研究期間：　平成２４年１０月～平成２８年３月
研　究　者：　倉石　貴透

１．　研究のねらい

炎症反応は、感染症や自己免疫疾患だけでなく、がん・肥満・動脈硬化などの生活習慣病においても病態に深く関与していることがわかってきている。炎症は、自然免疫経路の活性化により産生される炎症性サイトカインによって惹起されるが、どのようにして自然免疫経路が活性化されるか、充分に理解されているとはいえない。特に、微生物由来因子に依存せず、内因子のリガンドによる自然免疫経路の活性化（無菌炎症）のしくみについては、まだ明らかでない点が多い。そこで本研究では、哺乳類と類似する自然免疫経路を有するショウジョウバエを用いて、以下の４点について解析を行うことで、内因性リガンドによる自然免疫活性化のメカニズム解明を目指した。

①ショウジョウバエ Toll 経路の細胞内シグナル伝達経路解明

ショウジョウバエの Toll 経路は、内因性リガンドである spz によって活性化される。活性化された Toll 受容体には、未知の機構によりアダプター分子である dMyd88, Tube が集積し、未知のメカニズムにより IκB が不活化され、NF−κB が活性化して抗菌ペプチド発現を誘導する。これら未知の分子メカニズムを明らかにするため、ゲノムワイド RNAi スクリーニングにより Toll 経路の細胞内シグナル伝達経路に関わる新規因子を同定する。

②ショウジョウバエ幼虫の抽出液中に存在する抗菌ペプチド発現誘導活性の解析

私たちは、培養細胞とショウジョウバエ幼虫より調製した抽出液を共培養することで、培養細胞において抗菌ペプチド遺伝子の発現が誘導されることを見出している。抽出液中に含まれる″内因性リガンド″の実体を明らかにする。

③ショウジョウバエ Toll 細胞内シグナル伝達を活性化する cGMP 依存経路の解析

私たちは、受容体型グアニル酸シクラーゼ Gyc76C が、cGMP 依存性キナーゼ DG2 を介して、dMyd88 を介して NF−κB を活性化させることを見出している。しかし、DG2 がどのように dMyd88 を活性化するのか、まだよくわかっていないため、その分子機構を明らかにする。

④野生型ショウジョウバエを用いて無菌炎症を誘導できる新規実験系の確立

野生型ショウジョウバエを用いて、無菌的に自然免疫を活性化する方法はまだ見出されていないため、本研究では、″無菌炎症″をショウジョウバエで誘導する方法を確立する。

２．　研究成果

（１）概要

本研究では、ショウジョウバエを用いて内因性リガンドによる自然免疫活性化のメカニズムを解析し、以下の成果を得た。

１）ショウジョウバエ Toll 経路の細胞内シグナル伝達経路解明

ショウジョウバエの Toll 受容体は、感染依存的に体液中に生じる内因性リガンド spz によって活性化される。私たちは、Toll 経路の活性化を起こしやすい培養細胞を探索し、DL1 細胞と呼ばれる培養細胞がこの経路のシグナル伝達の解析に適していることを見いだした。この DL1 細胞を用いることで、ショウジョウバエが持つ約 15,000 遺伝子から Toll 経路活性化に関わる遺伝子を網羅的に探索し、新規シグナル伝達因子 Sherpa を同定した。

Sherpa を失ったショウジョウバエは、カビなどの微生物に対抗するための物質である抗菌ペプチドを充分に作ることができず、微生物の感染に対して脆弱性を示した。どのようにして Sherpa が Toll 経路を活性化しているのか調べた結果、Sherpa を欠損した細胞では、シグナル伝達時に細胞膜近傍に局在すべき dMyd88 が細胞膜に局在できなかった。

このことから、Sherpa は dMyd88 などのシグナル伝達因子をユビキチン化することで Toll 受容体周辺の細胞膜へと局在させ、Toll 経路のシグナル伝達を活性化していると考えられた。ヒトやマウスにも Sherpa と類似した遺伝子が存在しているが、自然免疫の誘導における生理学的意義は明確になっていない。本研究成果をもとに、ヒトやマウスの Sherpa 遺伝子による、自然免疫系の新たな活性化メカニズムが明らかになることが期待できる。

2）ショウジョウバエ幼虫の抽出液中に存在する抗菌ペプチド発現誘導活性の解析

ショウジョウバエの幼虫を酸性条件下でホモジナイズして作成した抽出液には、DL1 細胞での抗菌ペプチド発現を誘導する活性が存在する。分子実体を解明するため、性状解析を行った。その結果、活性成分は水溶性で、有機溶媒と熱処理に耐性であり、C18 逆相カラムに吸着し、プロテーゼ処理により失活することから、タンパク質であることが推測された。活性画分を用いて DL1 細胞を用いたゲノムワイド RNAi スクリーニングを行ったところ、Toll 受容体の新規内因性リガンドであることが推測された。

（2）詳細

1）ショウジョウバエ Toll 経路の細胞内シグナル伝達経路解明

Toll 細胞内シグナル伝達経路を明らかにするため、私たちはまず Toll 経路の活性化測定に適した in vitro 実験系の構築を試みた。ショウジョウバエの培養細胞株として良く用いられている S2 細胞は、Toll 経路活性化の刺激に対する応答性が低い。そこで、さまざまな培養細胞株について Toll 経路の応答性を調べ、後期胚由来の培養細胞株 DL1 が非常に高い Toll 経路応答性を示すことを見出した。dMyd88 の過剰発現によって誘導した Toll 経路活性化は、上流にある Toll 受容体のノックダウンでは抑制されず下流の Pelle のノックダウンでは抑制されるなど、これまで知られている Toll シグナル伝達経路の因子とその作用順序が DL1 細胞では維持されていることを確認した。

次に、Toll 細胞内シグナル伝達経路に関与する新規因子を同定するため、”包括的ゲノムワイド RNAi スクリーニング”を行った。このスクリーニングでは、4つの方法で Toll 経路を活性化し、そのそれぞれについて in vitro ゲノムワイド RNAi スクリーニングを行った。Toll 経路の活性化は、dMyd88 の過剰発現、Pelle の過剰発現、Cactus の RNAi によるノックダウン、Dif の過剰発現の4つにより誘導した。4つのゲノムワイド RNAi スクリーニングのデータを解析したところ、既知 Toll 経路因子の RNAi による活性抑制効果が確認され、一方で IMD 経路因子の RNAi

は抑制効果を示さなかったため、スクリーニングは良好に行われたと判断した。

スクリーニングデータのバイオインフォマティクス解析の結果、キナーゼ関連因子・E3 リガーゼ関連因子・転写制御関連因子など、およそ 100 個程度の新規 Toll 経路制御因子の候補が得られた。特に、dMyd88 の過剰発現による Toll 経路活性化を抑制し、Pelle 過剰発現による活性化は抑制しない因子として、HECT 型 E3 リガーゼの CG9153/Sherpa (SUMO-related HECT-domain and RCC-repeat Protein for Toll pathway Activation)に注目して解析を進めた。

まず始めに、Sherpa のショウジョウバエ個体での Toll 経路への関与を検証した。Sherpa 発現量が野生型の 20%程度である loss-of-function 変異体成虫を用い、グラム陽性菌を感染させて生存率を評価し、Drosomycin 発現量を定量的 PCR 法により測定した。その結果、感染後の生存率は spz 変異体と同様に増悪し、Drosomycin 発現量も顕著に低下したことから、Sherpa がショウジョウバエ成虫での細菌感染時の Toll 経路活性化に必要であることが考えられた。

培養細胞を用いた分子機構解析のため、まず始めに、RNAi スクリーニングの結果を別の dsRNA によるノックダウンによっても再現した。次に、ノックダウンによる Toll 経路活性化抑制は Sherpa の過剰発現でレスキューされることを示し、Sherpa は Pelle の上流で働く Toll 経路因子であることを確認した。次に、この in vitro レスキュー実験系を用いて Sherpa の機能に必要なドメイン解析を行った。Sherpa は、N 末端側に RCC repeat と呼ばれる β -プロペラ構造ドメインと、C 末端側に E3 リガーゼ活性をもつとされる HECT ドメインをもつ。RCC repeat と、分子間相互作用や脂質結合を担いユビキチン E3 リガーゼに散見される WD40 repeat は、立体構造的に相同なドメインである。ドメイン欠損体を用いたレスキュー実験の結果、HECT ドメインと RCC repeat の双方が、共に Toll 経路活性化に必要であることが示された。

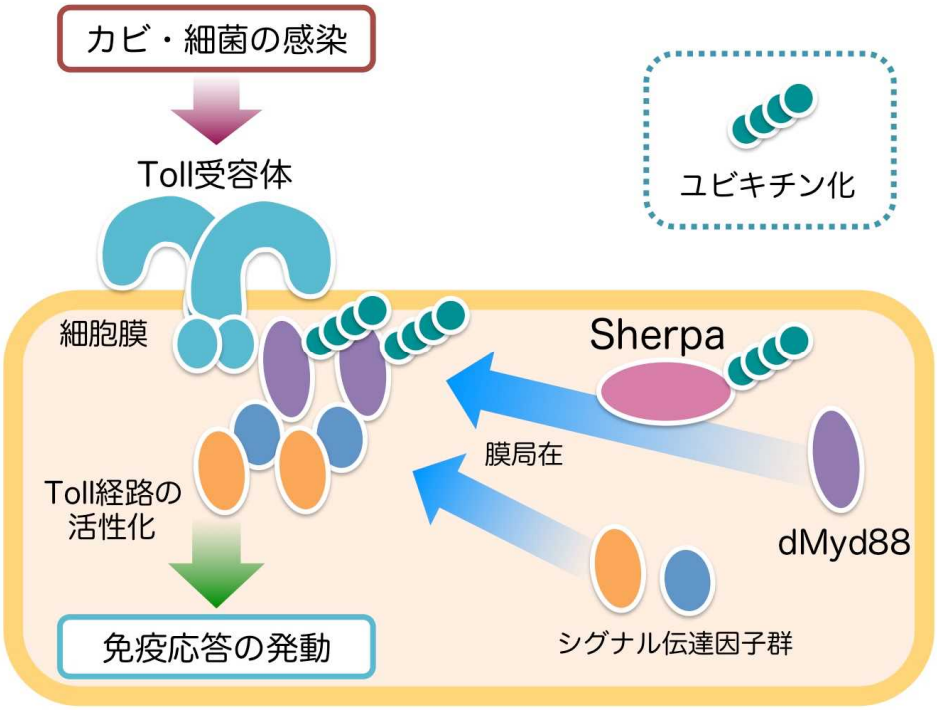
dMyd88 過剰発現によるスクリーニングでは、Sherpa と同様に dMyd88 の過剰発現による Toll 経路活性化に関わる因子として、ユビキチン様修飾分子である SUMO のショウジョウバエホモログがヒットしていた。タンパク質の SUMO 化修飾は、修飾を受けたタンパク質の細胞内局在や安定性を変化させることが知られており、シグナル伝達の制御に関わる可能性が考えられる。SUMO は、ユビキチンと同様に、活性化酵素(E1)、結合酵素(E2)、転移酵素(E3)を介して標的タンパク質に共有結合する。Sherpa と同様に、SUMO-E1 である Aos1、Uba2、SUMO-E2 である Ubc9、そして SUMO のノックダウンにより、dMyd88 過剰発現によって誘導される Toll 経路活性化は抑制され、一方、Pelle 過剰発現による活性化は抑制されなかった。すなわち、SUMO 関連因子も Pelle の上流で働くことが示唆された。

次に、Pelle の上流因子である dMyd88 が Sherpa のターゲットであると予想し、タグを付加した dMyd88 と Sherpa を過剰発現した DL1 細胞から dMyd88 の免疫沈降を行い、Sherpa と dMyd88 の分子間相互作用とユビキチン化などの翻訳後修飾を調べた。その結果、Sherpa と dMyd88 は複合体を形成しており、Sherpa 共発現時の dMyd88 にはユビキチン化が認められた。また、Sherpa 自身にも同様にユビキチン化が認められた。これらの結果から、Sherpa は自己ユビキチン化などを介して活性化し、dMyd88 にユビキチンを転移させていることが示唆された。

これまでに、dMyd88 からのシグナル伝達を制御する重要なメカニズムとして、dMyd88 の細

胞膜局在が知られており、下流因子を介した NF-κB 活性化に必須であることが分かっている。そこで、dMyd88 の細胞内局在を免疫染色により検討することで、Sherpa の作用機序について調べた。過剰発現した dMyd88 は細胞膜近傍へと局在したが、Sherpa または SUMO のノックダウンによって dMyd88 は細胞質へ移行した。また、過剰発現した Sherpa は主に細胞膜に局在し、dMyd88 と共局在した。このことから、Sherpa は SUMO 化を介して dMyd88 の細胞膜局在を誘導することで、Toll 受容体からのシグナル伝達に寄与していることが示唆された。

研究成果を簡潔に示した図



以上の研究成果は、Science Signaling 誌に発表した。

Kanoh H†, Tong L-L†, Kuraishi T†*, Suda Y, Momiuchi Y, Shishido F, Kurata S*.
"Genome-wide RNAi screening implicates the E3 ubiquitin ligase Sherpa in mediating innate immune signaling by Toll in Drosophila adults." Sci. Signal. 400, ra107 (2015)
*co-corresponding authors
†These authors contributed equally to this work

2)ショウジョウバエ幼虫の抽出液中に存在する抗菌ペプチド発現誘導活性の解析

ショウジョウバエ幼虫の抽出液中に存在する抗菌ペプチド発現誘導活性はタンパク質であると推測された。この活性は、spz を欠損するショウジョウバエ幼虫を用いて抽出液を作成しても失われないことから、spz とは異なる新規内因性リガンドであることが示唆された。

この抽出液を C18 逆相カラムにより部分精製し、Toll 経路を活性化する内因性リガンドとして用いたゲノムワイド RNAi スクリーニングを行った。その結果、Toll 受容体のノックダウンによ

り抗菌ペプチド発現が強く抑制され、Gyc76C 受容体のノックダウンでは抑制されなかったことから、新規内因性リガンドは Toll 受容体の新規リガンドであることが示唆された。さらに、スクリーニングデータを項目1のスクリーニング結果と合わせて解析し、Jumonji-like transcription factor である Jarid2 に注目して解析を進めた。

RNAi あるいは変異体により Jarid2 の発現が低下したショウジョウバエを作成し、グラム陽性菌の感染実験を行った。Jarid2 の発現低下により、グラム陽性菌感染後の抗菌ペプチド発現が低下し、生存率が野生型より増悪したことから、Jarid2 は Toll 経路に関与する新規核内因子であることが示唆された。

以上の成果は、Biochemical and Biophysical Research Communications 誌に発表した。
Kanoh H†, Kuraishi T†*, Tong L-L, Watanabe, Nagata S, Kurata S*
"Ex vivo genome-wide RNAi screening of the Drosophila Toll signaling pathway elicited by a larva-derived tissue extract" BBRC 467, 400-406 (2015)
*co-corresponding authors
†These authors contributed equally to this work

3）ショウジョウバエ NF-κB 経路である IMD 経路に関与する新規因子の同定

前述したように、ショウジョウバエの NF-κB 経路には、Toll 経路とは独立した IMD 経路が存在する。自然免疫活性化メカニズム解明のため、補助的なプロジェクトとして、IMD 経路に関わる新規因子の解析を進めた。

抗菌ペプチドの発現誘導を指標とした機能獲得型スクリーニングにより、ショウジョウバエ IMD 経路により制御されている抗菌ペプチド Diptericin の発現を誘導する因子として Droj2 同定した。Droj2 RNAi 個体を用いた細菌感染実験により、Droj2 は IMD 経路の活性化に必要な因子であることを明らかにした。さらに、Droj2 のほ乳類ホモログである DnaJA3 に着目し、哺乳類培養細胞系における DnaJA3 の NF-κB 経路への関与を解析した。DnaJA3 の RNAi を行った HEK293 細胞では、フラジェリン刺激による NF-κB レポーター活性が低下し、IκB のリン酸化が抑制された。また、DnaJA3 の RNAi により、IKK 過剰発現による RelA のリン酸化が抑制された。これらの結果は、DnaJA3 が NF-κB 経路の活性化において、IκB のリン酸化に必要な因子であることを示唆しており、ショウジョウバエからヒトまで進化的に保存された新規自然免疫活性化因子を同定したことを示している。

以上の結果は、Journal of Biological Chemistry 誌に発表した。
Momiuchi Y†, Kumada K†, Kuraishi T†, Takagaki T, Aigaki T, Oshima Y, Kurata S
"Role of phylogenetically conserved co-chaperone protein Droj2/DNAJA3 in NF-κB signaling." J. Biol. Chem. 290, 23816-23825 (2015)
†These authors contributed equally to this work

3. 今後の展開

1）ショウジョウバエ Toll 経路の細胞内シグナル伝達経路解明

ショウジョウバエ Toll 経路の新規シグナル伝達因子として、E3 リガーゼの Sherpa を同定した。

Sherpa は、Toll 受容体のアダプター分子である dMyd88 の細胞膜局在を制御していることが示唆された。哺乳類の MyD88 は自然免疫や炎症性サイトカインによるシグナルにおいて極めて重要な分子であり、哺乳類にも Sherpa と相同性の高い分子（以下、mSherpa と記す）が存在する。興味深いことに、mSherpa は通常はどの組織でもあまり発現していないが、LPS 処理を行った腹腔マクロファージにおいて発現が強く誘導されることがわかった（未発表データ）。mSherpa もショウジョウバエの Sherpa と同様に MyD88 の制御に関わっているのであれば、LPS などにより炎症が惹起されたあとの炎症の慢性化に関与する可能性がある。そこで現在ノックアウトマウスを作出中であり、今後の解析により mSherpa の慢性炎症への関与が解明されることが期待できる。

包括的ゲノムワイド RNAi スクリーニングにより、Sherpa 以外にも新規 Toll 経路因子の候補を複数同定している。今後、ショウジョウバエ個体を使った解析や分子機構の解析を進め、ショウジョウバエ Toll シグナル伝達経路の詳細が解明されることが期待できる。

2）ショウジョウバエ幼虫の抽出液中に存在する抗菌ペプチド発現誘導活性の解析

ショウジョウバエ幼虫の抽出液には、Toll 受容体の新規リガンドが存在していることがわかった。今後、種々のクロマトグラフィーなどにより、リガンド活性を精製して同定する。それにより、新たな自然免疫活性化機構の一端が明らかになることが期待できる。

3）ショウジョウバエ Toll 細胞内シグナル伝達を活性化する cGMP 依存経路の解析

未公開ながら、受容体型グアニル酸シクラーゼ Gyc76C の下流において、dMyd88 を活性化する分子機構が明らかになってきた。また、そのシグナル伝達経路は進化的に保存されていることも示唆された。今後は、cGMP 依存経路がどのような生理的・病理的条件下で NF−κB の制御に関わっているか明らかにする必要がある。同時に、Gyc76C のリガンドを同定することが必要である。

4）野生型ショウジョウバエを用いて無菌炎症を誘導できる新規実験系の確立

未公開ながら、野生型幼虫を用いて、容易に無菌的な自然免疫活性化を誘導する方法を確立した。前述の forward genetic screening を進めることで、無菌炎症を誘導する新規シグナル伝達経路が解明されることが期待される。

4. 評価

（1）自己評価

（研究者）

本さきがけ研究においては、「ねらい」に示した四つのプロジェクトを提案して推進した。「1. ショウジョウバエ Toll 経路の細胞内シグナル伝達経路解明」では、新規遺伝子 Sherpa を同定し、自然免疫シグナルにおける dMyd88 の局在制御という新しいメカニズムを提唱することができた。さらに、その他多くの新規シグナル伝達因子の候補も同定できた。哺乳類の MyD88 は急性炎症および慢性炎症において重要な役割を果たす分子である。現時点ではショウジョウバエのみであるが、MyD88 の新たな制御メカニズムを見出したことは炎症研究の今後の展開において重要な成果であったと考えられる。哺乳類での解析が進めば、新たな炎症制御法の開発などにより、社会・経済への波及効果も期待できる。したがって、研究目的は充分に達

成されたと判断する。

「2. ショウジョウバエ幼虫の抽出液中に存在する抗菌ペプチド発現誘導活性の解析」では、抽出液中のリガンド活性は同定できなかったものの、リガンドの生化学的性状を明らかにし、また、Toll 受容体の新規リガンドであることもわかったため、不充分ながらもある程度研究目的は達成された。

「3. ショウジョウバエ Toll 細胞内シグナル伝達を活性化する cGMP 依存経路の解析」では、Gyc76C のリガンドを同定することはできなかったが、cGMP 依存性キナーゼ DG2 の下流でプロテインフォスファターゼ 2A（PP2A）が機能することを個体レベルで明らかにした。さらに、Gyc76C, DG2, PP2A による NF−κB の制御は、ヒトにまで保存されていることを示した。以上から、研究目的はおおむね達成されたと判断する。

「4. 野生型ショウジョウバエを用いて無菌炎症を誘導できる新規実験系の確立」では、非常に簡単な方法でショウジョウバエ幼虫に無菌的に炎症を誘導できる新たな実験系を確立し、未知のシグナル伝達経路の関与を示唆した。研究目的は充分に達成されたと判断する。

本さきがけ研究は、年度あたり1、2名の学生と、最終年度のみ研究補助者として1名を雇用して、少人数で行われた。研究費の執行という観点から効率よく進めることができ、最終年度に潤沢にあった研究費を用いて解析委託を利用してスピードアップをはかることができた。

本さきがけ研究の領域会議での交流を通じて、ショウジョウバエ研究者として注目され、東北大学助教から慶應大学医学部専任講師へと異動し、本さきがけ研究を哺乳類を用いて展開でき、さらにショウジョウバエを用いた腸内細菌研究を進める機会を得ることにより、研究者としての飛躍につながった。

（2）研究総括評価（本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った）。

（研究総括）

ショウジョウバエを用いて新規の自然免疫活性化機構の解明を目指した本研究課題において、1）Toll経路の活性化を起こしやすい培養細胞を見いだしてゲノムワイドRNAiスクリーニングを実施し、dMyd88などのシグナル伝達因子をユビキチン化してToll経路のシグナル伝達を活性化する新規シグナル伝達因子Sherpaを同定して発表した。Sherpaは主に細胞膜に局在し、dMyd88と共局在し、NF−κBの活性化に関与することを明らかにした。2）ショウジョウバエ幼虫の抽出液中に存在する抗菌ペプチド発現誘導活性がタンパク質性のToll受容体の新規内因性リガンドであると推測した。その他に未公開ながら、受容体型グアニル酸シクラーゼGyc76Cの下流においてdMyd88を活性化する分子機構の解明や、幼虫を用いて容易に無菌的な自然免疫活性化を誘導する方法を確立などの研究も進展しており、今後におけるそれらの成績の発表が期待できる。

研究期間中に複数の異動もあったが、それぞれの研究環境で十分に研究を進展させるとともに、哺乳類を用いたさらなる研究展開もしている。今後、それらの哺乳類での解析を進め、新たな炎症制御法の開発につなげて欲しい。大いに期待している。

5. 主な研究成果リスト

（1）論文（原著論文）発表

1. Momiuchi Y†, Kumada K†, **Kuraishi T†**, Takagaki T, Aigaki T, Oshima Y, Kurata S
"Role of phylogenetically conserved co-chaperone protein Droj2/DNAJA3 in NF-κB signaling."
J. Biol. Chem. (2015) 290, 23816-23825
†These authors contributed equally to this work

2. Kanoh H†, **Kuraishi T†***, Tong L-L, Watanabe, Nagata S, Kurata S*
"Ex vivo genome-wide RNAi screening of the Drosophila Toll signaling pathway elicited by a larva-derived tissue extract."
BBRC (2015) 467, 400-406
*co-corresponding authors
†These authors contributed equally to this work

3. Kanoh H†, Tong L-L†, **Kuraishi T†***, Suda Y, Momiuchi Y, Shishido F, Kurata S*.
"Genome-wide RNAi screening implicates the E3 ubiquitin ligase Sherpa in mediating innate immune signaling by Toll in Drosophila adults."
Sci. Signal. (2015) 400, ra107
*co-corresponding authors
†These authors contributed equally to this work

（2）特許出願

該当無し

（2）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

英文総説

1. **Kuraishi T†***, Kenmoku H†, Kurata S*.
"From mouth to anus: functional and structural relevance of enteric neurons in the Drosophila melanogaster gut."
Insect Biochemistry and Molecular Biology (in press)
*co-corresponding authors
†These authors contributed equally to this work

2. **Kuraishi T†**, Hori A†, Kurata S.
"Host-microbe interactions in the gut of Drosophila melanogaster."
Frontiers in Physiology 4: 375. 2013
†These authors contributed equally to this work

日本語総説

1. 見目裕之、堀亜紀、**倉石貴透**、倉田祥一朗
『神経系によるショウジョウバエ腸管の構造と機能の制御』
蚕糸昆虫バイオテック 84 巻 3 号 (2015.12) accepted

2. **倉石貴透**、狩野裕孝、倉田祥一朗
『内因性リガンドによって活性化されるショウジョウバエの Toll 経路』
別冊 BIO Clinica（バイオクリニカ）慢性炎症と疾患　第 4 巻第 2 号 16-21 (2015.5)

招待講演

1. Takayuki Kuraishi
"Neuronal control of gut integrity in Drosophila adults" (Invited)
2014 Epitheliome meeting, University of Glasgow, Scotland, April 22, 2014

国外学会

1. **Takayuki Kuraishi**, Aki Hori, Hiroyuki Kenmoku, Shoichiro Kurata
"Damage-induced innate immune response in Drosophila larvae: a novel model system for analyzing a mechanism that governs sterile inflammation"
Cold Spring Harbor Asia conferences, Suzhou, China, September 2, 2014

2. Takayuki Kuraishi, Aki Hori, Shoichiro Kurata
"Damage induced expression of antimicrobial peptides via the Imd pathway in Drosophila larvae"
55th Annual Drosophila Research Conference, Town & Country Resort & Conference Center, San Diego, March 26, 2014

プレスリリース

1. 平成27年10月28日
東北大学，科学技術振興機構（JST）
自然免疫応答を発動する新分子「Sherpa」を発見
昆虫モデルから見えた新たな免疫制御メカニズム
http://www.jst.go.jp/pr/announce/20151028/index.html