

細胞内寄生細菌に対する自然免疫応答としてのオートファジーの空間制御における microRNA の同定と機能解析

東北大学大学院 薬学研究科 生命機能解析学分野
矢野 環

1. 背景・目的

本研究は、細胞内寄生細菌に対する自然免疫応答としてのオートファジーの空間的制御における microRNA の同定と機能解析を目的とした (図 1)。

自然免疫は、ほとんどすべての多細胞生物が有する免疫系である。我々はこれまでに、細菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンの特異的に認識して自然免疫応答を活性化する因子 Peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LE を同定し、これが細菌に対する宿主の抵抗性に必須であり、体液性の自然免疫において認識分子として機能していることを示してきた。リステリア菌、赤痢菌、結核菌のような細胞内寄生細菌は、細胞内で増殖することにより抗菌ペプチド等の体液性の自然免疫応答から逃れる。近年、オートファジーが宿主の自然免疫応答として機能し、細胞内への病原体の侵入によって誘導され、病原体を取り囲みこれらの排除に働いていることが明らかにされた。オートファジーは、酵母からショウジョウバエ、ほ乳類にまで保存されているタンパク質分解系であり、基底状態においては蛋白質や細胞内小器官をオートファゴソームにより取り囲み、ライソソームと融合することにより内容物の分解を行う。オートファジーは基底状態に加え、病原体の侵入によって誘導されるが、このとき、病原体の周囲に空間的に限定されたオートファゴソーム膜の形成がみられる。我々は、PGRP-LE が体液中のみならず細胞内でも認識分子として機能し、自然免疫応答を活性化すること、さらに、リステリア菌の細胞内増殖の抑制にオートファジーが重要であり、細胞質へのリステリア菌の侵入によってオートファジーが誘導されること、この誘導が PGRP-LE によるリステリア菌の認識に依存していることをこれまでに明らかにした。自然免疫応答としてのオートファジーの過剰な亢進は自己成分の不必要な分解につながるため、菌周辺での空間的に制御された誘導が重要であるが、その制御機構はショウジョウバエ、ほ乳類に限らずいまだ全く不明である。また、オートファジーの制御の乱れは炎症反応をおこすことが知られている。

近年、遺伝子発現の RNA レベルでの制御が発生・分化等の高次生命現象に重要な働きをしていることが明らかになっている。なかでも、microRNA などの non-coding small RNA による遺伝子発現制御は生命にとって重要な機構であり、転写制御のみでは実現できない遺伝子発現調節を担っていると考えられる。これまでに自然免疫に機能する microRNA として、サイトカイン産生細胞に LPS 刺激に応じて発現する microRNA が見いだされている。これら microRNA の標的分子はコンピューター予測に基づいたレポーターアッセイで示唆されたのみで、自然免疫における機能は不明である。我々は、リステリア菌の侵入を認識して誘導されるオートファジーが、microRNA 産生に必須な因子である *dcr-1* の発現抑制により過剰に亢進し、侵入した菌の周辺以外にもオートファゴソームが拡大することを見いだしている (図 2)。これは菌感染に応じて誘導されるオートファジーの空間的制御に関するきわめて新規な知見である。そこで本研究では、リステリア菌感染によって誘導されるオートファジーの空間的制御に関与する microRNA の同定と機能解析を細胞レベル・個体レベルの双方で行うことにより、自然免疫応答としてのオートファジーの空間的制御の分子機構解明と miRNA の関与の解明が本研究の目的である。同時に、リステリア菌感染時に誘導されるオートファジーの空間制御に重要である細胞内病原体センサー PGRP-LE と共に機能し、オートファゴソーム形成に関与する因子の同定と機能解析を行い、自然免疫応答としてのオートファジーの空間的制御の分子基盤をあきらかにすることを目的とする。

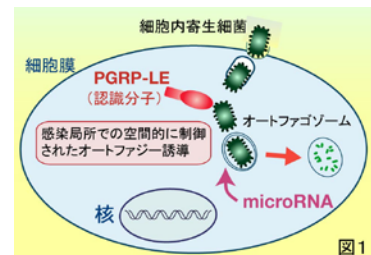
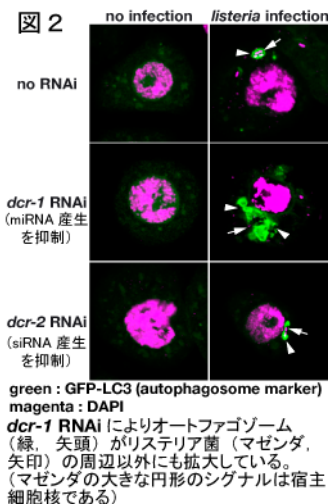


図 2



green : GFP-LC3 (autophagosome marker)
magenta : DAPI
dcr-1 RNAi によりオートファゴソーム (緑、矢頭) がリステリア菌 (マゼンダ、矢印) の周辺以外にも拡大している。(マゼンダの大きな円形のシグナルは宿主細胞核である)

2. 方法

本研究では、以下の2点を行った。

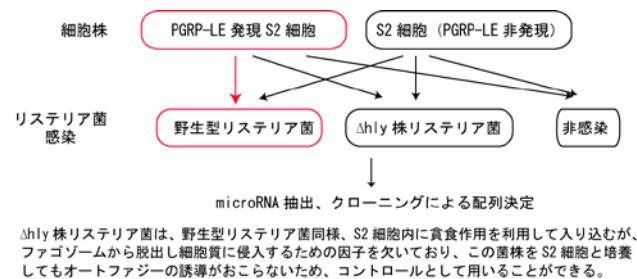
1. リステリア菌感染時に宿主細胞に発現する microRNA の同定
 2. 菌感染時のオートファジー誘導の空間的制御に重要である病原体センサー複合体の解析
- 以下、各項目について述べる。

1. リステリア菌感染時に宿主細胞に発現する microRNA の同定

A. microRNA のクローニング

我々は、リステリア菌感染により異物認識分子 PGRP-LE によるリステリア菌認識依存的に誘導されるオートファジーの空間的制御に microRNA が関与していることを見いだしている。また、リステリア菌が PGRP-LE 発現 S2 細胞に感染すると、30分から2時間くらいにかけて菌の周囲にオートファジーが誘導されることを明らかにしている。そこで、PGRP-LE 発現 S2 細胞を用いて右図のようなサンプルから microRNA を調整し、クローニングによる配列決定を行い、リステリア菌感染時に発現している microRNA の同定を試みた。

同定には、まず、microRNA を含む複合体の因子である dAgoI を過剰発現させることのできる S2 細胞株を樹立した。このとき、dAgoI にはタグを付加し、タグに対する抗体で pull down して RISC 複合体から RNA を抽出することにより、microRNA の純度を高めた。



B. 同定した microRNA のリステリア菌感染個体における発現解析

上記項目 A で同定した microRNA が、リステリア菌感染個体において発現しているかを調べることで、生体内でオートファジー制御に機能している microRNA を絞り込む。また、ショウジョウバエ培養細胞やショウジョウバエ個体を用いて、そのオートファゴゾームの空間制御に関する機能を解析する。

2. 菌感染時のオートファジー誘導の空間的制御に重要である病原体センサー複合体の解析

リステリア菌感染時には、オートファゴゾームが菌の周囲に空間的にきわめてタイトに形成されるが、そのトリガーとなるのが、ショウジョウバエ細胞においては病原体センサーである PGRP-LE である。そこで、リステリア菌感染細胞、あるいは PGRP-LE 過剰発現細胞の溶解液から PGRP-LE を免疫沈降し、その複合体に含まれるタンパク質群の同定を試みた。

3. 研究成果

1. リステリア菌感染時に宿主細胞に発現する microRNA の同定

ショウジョウバエ S2 細胞からの microRNA の単離系の構築を行った。S2 細胞に metallothionein promoter により HA-tag を付加した drosophila AgoI (dAgoI) を発現させることのできる細胞株を樹立し、この細胞を用いて dAgoI を抗 HA 抗体で免疫沈降し、そのタンパク質-RNA 複合体から microRNA を単離した。このとき、dAgoI の発現依存的に、microRNA と相補していることが知られている reaper mRNA の濃縮もみられ、microRNA-target mRNA-RISC タンパク質の複合体を濃縮できていることが確認された。さらに、十分な量がクローニングできるための系のスケールアップを検討した。現在、方法の項に記した各種の感染・非感染サンプルから microRNA を網羅的に単離し、その配列をクローニングにより決定している。

2. 菌感染時のオートファジー誘導の空間的制御に重要である病原体センサー複合体の解析

本研究を始めるに当たり、我々は細胞内に侵入したリステリア菌の周囲に病原体センサーである PGRP-LE が集積し、PGRP-LE 依存的にオートファゴゾームが形成され、リステリア菌は PGRP-LE が周囲に集積したままオートファゴゾームに取り込まれることを示していた。すなわち、オートファジーを選択的に誘導する因子群が PGRP-LE と複合体を形成し、空間的に限局したオートファジー誘導を菌周辺におこすと考えられる。そこで、PGRP-LE を発現していないショウジョウバエ培養細胞 S2 細胞に V5-tag を付加した PGRP-LE を発現させ、抗 V5 抗体で免疫沈降したタンパク質複合体を解析した。その結果、PGRP-LE を含む複合体にオートファジー誘導に機能する ref(2)P タンパク質が含まれていることが明らかとなった。また、我々が新たに作製した抗 ref(2)P 抗体を用いて免疫沈降を行い、沈降したタンパク質複合体に PGRP-LE が含まれていることを確認した。これにより、細胞

内病原体 PGRP-LE センサーは、オートファジー誘導に機能し、オートファゴゾーム上に局在する Atg8 (LC3) と相互作用する因子である ref(2)P と複合体を形成していることが明らかとなった。

さらに我々は、PGRP-LE と複合体を形成する因子の単離を、同様の免疫沈降の系を用いて試みた。その結果、PGRP-LE を共沈するが、オートファジーを誘導できない変異 PGRP-LE とは共沈しないタンパク質を検出した。現在、それらの同定を試みている。

4. 考察

オートファゴゾーム形成の空間制御に機能する microRNA の単離と同定が当初の目的であったが、感染時間、感染後時間を変化させて microRNA 発現を網羅的に解析することで、リステリア菌感染依存的な発現を解析することが可能となった。こうして同定される microRNA には、宿主細胞の菌感染抵抗性に関与するものが含まれると予想され、その解析は、microRNA を利用した治療薬への基盤となり、波及効果が期待される。また、オートファジーの制御は、オートファゴゾーム内で増殖する結核菌のような細胞内寄生細菌の制御に重要である。また、ウイルスの中には、その感染にオートファジーを利用するものが知られている。したがって、本研究で単離している、病原体センサーと複合体を形成するタンパク質の機能解析は、病原体感染依存的なオートファジー誘導の分子機構の解明に大きく寄与するのみならず、抗生物質で根治が難しい細胞内寄生細菌や、新たな抗ウイルス薬に対する知的基盤となる可能性がある。

本研究により病原体センサー PGRP-LE とリステリア菌感染依存的に複合体を形成することが明らかになった ref(2)P はヒト p62 のショウジョウバエホモログであり、ほ乳類細胞においてリステリア菌、あるいはサルモネラ菌の細胞質への侵入によって菌の周囲に蓄積し、オートファジー誘導に機能することが示されている。我々はこれまでに、ショウジョウバエ ref(2)P がリステリア菌感染依存的なオートファジー誘導に必須であること、またその感染防御にオートファジーが必要である Vesicular Stomatitis Virus に対する感染抵抗性に必要であることを示している。また、p62 タンパク質はオートファゴゾーム上に局在する因子である Atg8 (LC3) と相互作用すると考えられている。したがって、病原体を最上流で認識するセンサーと、オートファゴゾームと相互作用するであろう ref(2)P が同一のタンパク質複合体に含まれるという結果は、病原体感染に対して選択的に誘導されるオートファジーは、病原体の周辺に必要な因子のほとんどがリクルートされることにより起こることを示唆している。これが、数分から数 10 分の間にきわめて素早く形成されるオートファゴゾーム膜形成を支える分子メカニズムであり、その全容の解明が重要であると思われる。

5. 発表論文、参考文献

1. Cooperative regulation of the induction of the novel antibacterial listericin by PGRP-LE and the JAK/STAT pathway. *J. Biol. Chem.* (2010) **285**, 15731-15738
Akira Goto, Tamaki Yano, Jun Terashima, Shinzo Iwashita, Yoshiteru Oshima, and Shoichiro Kurata
2. Intracellular recognition of pathogens and autophagy as an innate immune host defense. *J. Biochem.* (2011) **150**, 143-149
Tamaki Yano and Shoichiro Kurata
3. ショウジョウバエを用いたオートファジーと感染・免疫の解析
矢野 環 炎症と免疫 Vol. 20 No. 2 (2012 年 3 月号)