

自然免疫としての貪食殺菌からの抵抗を制御する 大腸菌および黄色ブドウ球菌遺伝子の網羅的解析

金沢大学 医薬保健研究域大学院
医学系研究科・薬学系 生体防御応答学
白土 明子

1 はじめに

細菌が宿主内に侵入すると、マクロファージなどの食細胞がこれを貪食し、その内部で殺菌して分解排除する。食細胞による細菌貪食は、食細胞受容体による微生物表面分子パターンの認識、食細胞内への取り込み、細菌のリソソームへの輸送とラジカルや加水分解酵素による殺菌と分解の素過程の総和で構成される。一方、細菌には貪食殺菌を回避して生き延びる機構があり、これが感染成立や病原性発揮の要因にも挙げられる。本研究は、食細胞による殺菌回避に働く、細菌側の因子を見いだすことを目的として行われた。

2 方法

細胞性自然免疫応答としての貪食機構は、モデル動物である線虫やショウジョウバエから、ヒトに至るまで保存されている。本研究では、遺伝学の使えるモデル宿主としてキロショウジョウバエを用い、三齢幼虫より取り出したヘモサイト(哺乳類のマクロファージに相当)を食細胞として用いた。細菌は黄色ブドウ球菌RN4220株とこれを親菌株とする細胞壁成分変異菌株ライブラリー、大腸菌BW25113株とこれを親菌株とする遺伝子欠損菌株ライブラリー、大腸菌全遺伝子プロモータ制御下に緑色蛍光蛋白質 (GFP) を発現するプラスミドを導入した大腸菌ライブラリーをそれぞれ共同研究者からの供与を受けて用いた。細菌の貪食程度の解析には、蛍光色素で標識した生菌を、食細胞と混ぜて一定時間放置し、貪食されずに残った細菌の蛍光を消光してから、顕微鏡下に貪食を検出した。一方、個体レベルの解析では、ショウジョウバエ成虫の腹に一定数の生菌を顕微鏡下に注入し、飼育時間に伴うハエ生存率を調べるとともに、ハエ体内の菌数をコロニー形成法により評価した。

3 結果

黄色ブドウ球菌の細胞壁成分関連遺伝子の解析

細胞壁成分に変異のある黄色ブドウ球菌の変異菌株群について、キロショウジョウバエのヘモサイトによる細菌貪食程度を、親菌株と比較した。その結果、*ItaS*, *murB*, *tagO*遺伝子のいずれかを欠く黄色ブドウ球菌変異菌株は、食細胞に貪食されにくいことがわかった。*ItaS*はリポタイコ酸の、*murB*はペプチドグリカンの、そして*tagO*はタイコ酸の合成にそれぞれ必須な遺伝子であることから、細胞壁細分のリポタイコ酸やペプチドグリカンが、貪食リガンドの候補として挙げられた。そこで、ショウジョウバエヘモサイトに発現する様々な受容体の変異体を作成または入手し、そのようなハエから調製したヘモサイトを用いて黄色ブドウ球菌の貪食程度を解析した。すると、*draper*(線虫Ced-1の

ハエホモログでEGF様構造の繰り返し配列を持つ膜一回蛋白質をコードする)と名付けられた遺伝子が、黄色ブドウ球菌の食食に必要であるとわかった。そして、Draperと黄色ブドウ球菌のリポタイコ酸との直接結合により食食が規定されることがわかった。ハエ成虫への注入感染実験を行うと、リポタイコ酸を欠く黄色ブドウ球菌はハエ体内で著しく増殖しハエは親菌株注入群よりも早く死んだ。また、ハエの食食受容体Draper欠損体は、黄色ブドウ球菌注入感染時に野生型ハエよりも体内での菌の増殖亢進と、早い死が観察された。この結果は、食食不全により細菌が感染した宿主内で増殖して高い病原性を発揮することによると解釈できる。

大腸菌二成分制御系因子の解析

細菌遺伝子発現制御機構の中心に二成分制御系があり、これはセンサーとレギュレーターの組み合わせで構成される。大腸菌は約30種類の二成分制御系を有し、環境変化を感知した二成分制御系因子により、その下流遺伝子群の発現が調節される。本研究では、宿主内での大腸菌の二成分制御系因子群61種類の遺伝子プロモータ活性を、GFPの蛍光強度を指標に評価した。その結果、19種類の遺伝子が宿主体腔内で高い活性を示すとわかった。次に、これらについて、ショウジョウバエ食細胞に大腸菌を食食させて、食細胞内での大腸菌遺伝子プロモーター活性を調べたところ、食食された時に顕著に活性が高い2つの二成分制御系を見いだした。そのひとつがkdpE-kdpD(それぞれレギュレーターとセンサーをコードする)であり、これらの遺伝子欠損菌株感染時の宿主応答を調べたところ、欠損菌株を感染させたハエは親菌株感染時と比べて生存率が高いまま保持されたことから、kdpEDは大腸菌のハエへの病原性を亢進するとわかった。

2 まとめ

本研究により、食細胞による食食に関連する大腸菌および黄色ブドウ球菌の遺伝子が見いだされた。黄色ブドウ球菌の*ItaS*は食食リガンドとなる細胞壁成分の合成に必要であり、また、大腸菌の*kdpED*は宿主の食細胞内で活性化して病原性発揮に働く可能性がある。

3 参考文献および成果発表

Tabuchi, Y., Shiratsuchi, A., Kurokawa, K., Gong, J. H., Sekimizu, K., Lee, B. L., and Nakanishi, Y. Inhibitory role for D-alanylation of wall teichoic acid in activation of insect Toll pathway by peptidoglycan of *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 185, 2424-2431 (2010)

Shiratsuchi, A., Shimizu, K., Watanabe, I., Hashimoto, Y., Kurokawa, K., Razanajatovo, I. M., Park, K. H., Park H. K., Lee, B. L., Sekimizu, K., and Nakanishi, Y. Auxiliary role for D-alanylated wall teichoic acid in Toll-like receptor 2-mediated survival of *Staphylococcus aureus* in macrophages. *Immunology* 129, 268-277 (2010)

Firdausi, A., Shiratsuchi, A., Kori, A., Ishihama, A., and Nakanishi, Y. Regulation of synthesis of *Escherichia coli* RNA polymerase sigma subunit in sepsis model infection in *Drosophila*. The Molecular Biology Society of Japan The 11th Spring Symposium / International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa, May, 2011

Shiratsuchi, A. Genetical analysis of bacterial factors interacting with host immunity in *Drosophila* model. Annual Meeting of Japanese Biochemical Society, (Kyoto, Japan) September, 2011 Symposium: Communication between microbes and host organisms under infection and symbiosis.