

# 自然免疫を制御する新規シグナル伝達経路の解析

東北大学大学院 薬学研究科 生命機能解析学分野

倉田 祥一郎

## 1. 背景

自然免疫系は感染防御の要をなす生体防御機構である。加えて、自然免疫系は感染症だけでなく、慢性炎症疾患や、がん転移、生活習慣病などとも深い関わりがあることが示されてきている。したがって、それらの疾患の理解と、それを標的とした創薬により疾患の克服を考える際には、自然免疫系の解明は不可欠である。

自然免疫系は、多細胞生物において高度に保存された、種間で共通性を示すシステムである。遺伝学的解析に優れたショウジョウバエは、自然免疫研究のモデル生物として、研究の発展に貢献してきた。ショウジョウバエの感染防御を制御するToll受容体の研究が契機となり、哺乳動物でのToll様受容体 (TLR) が同定され、自然免疫研究のブレイクスルーとなった。この過程には、日本人研究者の貢献が極めて高く、TLRファミリーが病原体の構成成分を特異的に認識して自然免疫応答を誘導することが明らかにされた。一方、ショウジョウバエでは、Toll受容体は病原体センサーとしては機能せずに、その上流でペプチドグリカン認識タンパク質 (PGRP) ファミリーが、病原体センサーとして機能していることが明らかとなった。研究代表者は、PGRP-LEを世界に先駆けて同定し (PNAS 2002)、PGRP-LEがToll経路とは異なる自然免疫シグナル伝達系であるimd経路の活性化に重要であることを示している (EMBO J. 2004, JBC 2006)。さらに、PGRP-LEは、細胞質内でも病原体センサーとして機能し (Nature Immunol. 2006, JBC 2010)、オートファジーを誘導して細胞内寄生細菌を排除することを明らかにした (Nature Immunol. 2008)。

研究代表者は、PGRP-LEを同定した遺伝学的アプローチにおいて、自然免疫系を制御する新たな受容体 (受容体型グアニル酸シクラーゼ) を同定している。この新規受容体は、Toll受容体とは独立しているものの、その下流のdMyD88に依存して抗菌ペプチドの産生を誘導する。さらに、この新規受容体は、この体液性免疫応答を誘導するだけでなく、dMyD88とは別経路で、細胞性免疫応答を誘導することも明らかとなっている。すなわち、この新規受容体の強制発現によりToll経路で制御されている抗菌ペプチドDrosomycinの発現が誘導されるが、このDrosomycinの誘導は、Toll受容体の変異では影響を受けないのに対して、dMyD88、あるいはその下流の因子の変異では認められなくなる。また、ショウジョウバエでは、細菌感染によりマクロファージの増殖が誘導されるが、その増殖誘導が、新規受容体の変異体では観察されないが、dMyD88などのToll経路に働く因子の変異では影響を受けない。したがって、この新規受容体は、体液性免疫応答と細胞性免疫応答を異なる様式で制御している。本研究では、研究項目 (1) として、この新規受容体が制御する二つの自然免疫新規シグナル伝達経路を明らかにすることを目的とした。それらの二つの新規シグナル伝達経路のうち、体液性免疫応答を制御する経路は、哺乳動物においても保存されている可能性が示唆されている。そこで、本研究では、研究項目 (2) として、哺乳動物における自然免疫新規シグナル伝達経路を明らかにすることとした。本報告においては、研究項目 (1) の結果についてのみ記載する。

## 2. 方法

新規受容体は、受容体型グアニル酸シクラーゼであり、セカンドメッセンジャーとしてcGMPを産生する。その一方で、グアニル酸シクラーゼドメインの他に、カイネースと相同性を示すカイネースホモロジドメインも有している。そこで、この新規受容体が制御する体液性免疫応答と細胞性免疫応答が、どちらのドメインに依存して制御されているのか、グアニル酸シクラーゼ活性を示さない1アミノ酸置換変異体と、カイネースホモロジドメインを欠いた変異体が、それぞれ体液性免疫応答と細胞性免疫応答を誘導できるのかどうか調べた。さらに、cGMPの産生が重要であるのかどうか、cGMPを不活性化型に分解するフォスホジエステラーゼ (PDE) -5/6を新規受容体と共に発現させて、体液性免疫応答と細胞性免疫応答に与える影響を調べた。これらの解析は、遺伝子導入ショウジョウバエを

用いて個体レベルで行った。

これらの解析により、体液性免疫応答のみがcGMPの産生を必要とし、細胞性免疫応答はcGMPの産生を必要としないことが明らかとなった。そこで、新規受容体の下流で体液性免疫応答を制御する因子を同定するために、cGMP依存性キナーゼに着目し、遺伝子導入ショウジョウバエで、個体レベルでRNAi法を行い解析した。そして、そのようにして同定したcGMPキナーゼのリン酸化活性が、体液性免疫応答の活性化に必要かどうか、リン酸化活性に必要なアミノ酸を置換したcGMPキナーゼをショウジョウバエS2細胞で発現させ、細胞レベルで調べた。さらにこの系で、dMyD88がリン酸化を受けることが、体液性免疫応答の活性化に必要かどうか調べた。加えて、同定したcGMPキナーゼが、dMyD88と複合体を形成するのかどうか、それぞれをS2細胞で発現させ、共免疫沈降するのかどうか調べた。

また、新規受容体が細胞性免疫応答を誘導する際に機能する下流因子を同定するために、マクロファージの増殖誘導に関わることが知られている低分子量GTPaseに着目し、遺伝子導入ショウジョウバエで、個体レベルでRNAi法を行い解析した。

### 3. 結果

新規受容体が制御する体液性免疫応答と細胞性免疫応答が、グアニル酸シクラーゼドメインとカイネースホモロジードメインの、どちらのドメインに依存して制御されているのか、グアニル酸シクラーゼ活性を示さない1アミノ酸置換変異体と、カイネースホモロジードメインを欠いた変異体をショウジョウバエ個体で発現させ、それぞれ体液性免疫応答と細胞性免疫応答が誘導できるのかどうか調べた。その結果、グアニル酸シクラーゼ活性を示さない変異体は、体液性免疫応答を誘導できないのに対して、細胞性免疫応答は誘導できることが明らかとなった。逆に、カイネースホモロジードメインを欠いた変異体は、体液性免疫応答は誘導できるものの、細胞性免疫応答は誘導できないことがわかった。この結果に呼応して、cGMPを不活性化型に分解するPDE-5/6を新規受容体と共に発現させたところ、新規受容体が誘導する体液性免疫応答は完全に阻害されたのに対して、細胞性免疫応答は全く影響を受けなかった。これらの結果は、新規受容体がcGMPの産生を介して体液性免疫応答を誘導し、その一方で、同じ新規受容体がcGMPの産生には依存せずに、カイネースホモロジードメインを介して、細胞性免疫応答を誘導していることを示している。

次に、新規受容体の下流で体液性免疫応答を制御する因子の同定を行った。そして、cGMP依存性キナーゼに着目しRNAiを行うことにより、新規受容体の下流で体液性免疫応答を制御するcGMPキナーゼを同定した。さらに、同定したcGMPキナーゼのリン酸化活性が、体液性免疫応答の活性化に必要かどうか、リン酸化活性に必要なアミノ酸を置換したcGMPキナーゼを発現し解析したところ、cGMPキナーゼのリン酸化活性が、体液性免疫応答の活性化に必要であることがわかった。さらにこのcGMPキナーゼによりdMyD88がリン酸化されることが、体液性免疫応答の活性化に必要かどうか、dMyD88のcGMPキナーゼによるリン酸化コンセンサス配列に変異を加えて調べた。その結果、dMyD88のcGMPキナーゼによるリン酸化コンセンサス配列に変異を加えても、cGMPキナーゼ依存の体液性免疫応答が誘導されることがわかった。共免疫沈降により、cGMPキナーゼがdMyD88と複合体を形成していることが示されたので、dMyD88は直接cGMPキナーゼによりリン酸化を受けないものの、cGMPキナーゼと複合体を形成して体液性免疫応答を誘導していることが示唆された。

さらに、新規受容体が細胞性免疫応答を誘導する際に機能する下流因子を同定するために、マクロファージの増殖誘導に関わることが知られている低分子量GTPaseに着目し、RNAi法を行い、新規受容体の下流で細胞性免疫応答を制御する低分子量GTPaseを同定した。

### 4. まとめ

本研究により、自然免疫を制御する新規受容体、受容体型グアニル酸シクラーゼが、体液性免疫応答と細胞性免疫応答を誘導する際に、cGMP産生を介して体液性免疫応答を誘導すること、さらに、これとは別の経路で細胞性免疫応答を誘導することが明らかとなった。細胞性免疫応答の誘導には、受容体型グアニル酸シクラーゼのカイネースホモロジードメインが必要であった。加えて本研究では、体液性免疫応答の誘導に関わる新しいcGMPキナーゼと、細胞性免疫応答の誘導に関わる低分子量GTPaseを同定した。また、本研究によりcGMPキナーゼが関わる経路は、ヒト培養細胞でも自然免疫系の活性化に関わることが示唆されたことから、種を超えて新規自然免疫シグナル伝達経路が存在する可能性が示された。