

Identification of the Escherichia coli gene nlpI whose expression is enhanced by a host immune receptor

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/42237

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



氏名	孔 慶権
学位の種類	博士 (学術)
学位記番号	甲第7号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 23 日
学位授与の要件	課程博士 (学位規則第 4 条第 1 項)
学位授与の題目	Identification of the <i>Escherichia coli</i> gene <i>nlpI</i> whose expression is enhanced by a host immune receptor (宿主の免疫受容体によって発現亢進を受ける大腸菌遺伝子 <i>nlpI</i> の同定)
論文審査委員	主査 中西 義信 副査 松永 司 副査 山下 克美 副査 猪部 学 副査 平山(白土) 明子

学位論文要旨

【要約】

Interaction between the host and pathogen determines the fate of both organisms during the infectious state. The host is equipped with a battery of immune reactions, while the pathogen displays a variety of mechanisms to compromise host immunity. Although bacteria alter their pattern of gene expression in host organisms, studies to elucidate the mechanism behind this are only in their infancy. I examined the possibility that host immune proteins directly participate in the change of gene expression in bacteria. *Escherichia coli* was treated with a mixture of the extracellular region of peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LC and the antimicrobial peptide attacin of *Drosophila melanogaster*, and subjected to a DNA microarray analysis for mRNA repertoire. I identified 133 annotated *E. coli* genes whose mRNA increased after the treatment. One such gene, lipoprotein-encoding *nlpI*, showed a transient increase of mRNA in adult flies depending on PGRP-LC. NlpI-lacking *E. coli* had a lowered growth rate and/or viability in flies than the parental strain. These results suggest that a host immune receptor triggers a change of gene expression in bacteria simultaneously with their recognition and induction of immune responses.

【背景】

宿主に侵入した細菌は、その細胞壁成分が感知されて宿主免疫系に認識される。これにより免疫関連遺伝子の発現が誘導され、細菌排除のための免疫反応が起こる。一方、細菌はさまざまな方策を使って免疫による感知や攻撃を逃げようとする。この細菌の振る舞いの多くは遺伝子発現の変化を伴うことが知られるが、詳しい仕組みはわかっていない。私は、宿主の免疫細胞によって細胞壁成分が認識される際に、同時に細菌側に刺激が伝わって遺伝子の発現が変動するのではないかと考えた。つまり、“宿主細胞と細菌とが互いに遺伝子発現を変動させ合う”という考えである (Fig. 1)。私はこの仮説を検証するために、宿主にキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)、細菌には大腸菌をそれぞれ用いた感染実験を行った。ショウジョウバエと大腸菌を利用した理由は、ともに遺伝学が適用できるモデル生物であること、及び多数の個体を使った感染実験が可能なことである。まず、細胞壁成分を認識する宿主の免疫受容体を添加した大腸菌の mRNA を調べ、発現変動を起こす遺伝子を見いだした。次に、発現増加を示した遺伝子についてショウ

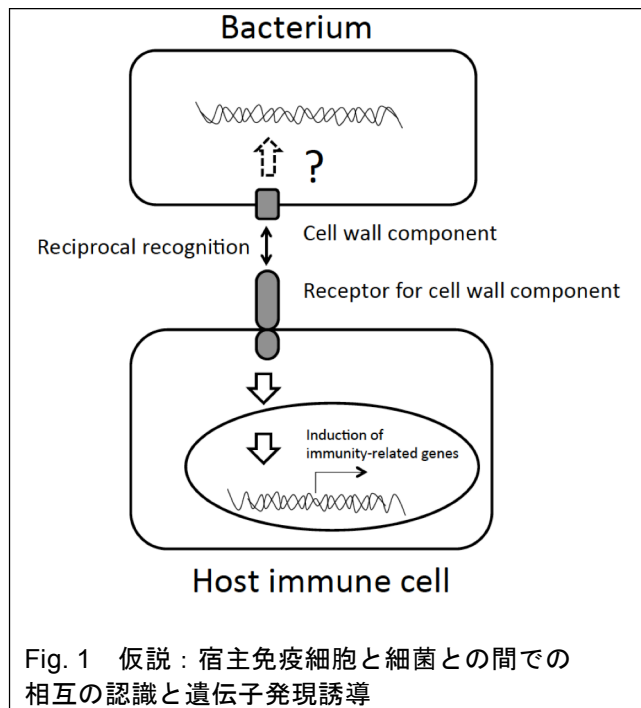


Fig. 1 仮説：宿主免疫細胞と細菌との間での相互の認識と遺伝子発現誘導

ジョウバエの mRNA を調べ、発現変動を起こす遺伝子を見いだした。次に、発現増加を示した遺伝子についてショウ

ショウジョウバエに感染させた大腸菌における発現を調べ、免疫受容体への依存性を遺伝学的に示した。この一連の実験の結果は、当初の仮説を支持するものであった。

【材料と方法】

ショウジョウバエライン、大腸菌株、及びショウジョウバエへの大腸菌の感染

ショウジョウバエラインは各種の研究機関または研究者個人より分与された。正常ラインとして *w¹¹¹⁸*、ペプチドグリカン認識蛋白質 LC (PGRP-LC) 欠損ラインとして *PGRP-LC⁷⁴⁵⁴*、ペプチドグリカン認識蛋白質 LE (PGRP-LE) 欠損ラインとして *PGRP-LE¹¹²*、そして PGRP-LC と PGRP-LE の両方を欠損するラインとして *PGRP-LE¹¹² ; PGRP-LC⁷⁴⁵⁴* をそれぞれ用いた。大腸菌には *nplI* 欠損株である JW3132 とその親菌株にあたる BW25113 を使い、どちらも National BioResource Project (国立遺伝学研究所) から分与された。LB 培地で静止期まで培養した大腸菌を Insect Saline にけんだくし、炭酸ガスで麻酔したショウジョウバエ成虫の腹部に注入した。これは、ヒト敗血症のモデルとして使われる感染法である。

DNA マイクロアレイ法による大腸菌 mRNA の解析

ショウジョウバエでは、細菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンが宿主の免疫受容体が結合するリガンドとなる。ペプチドグリカン受容体のひとつの PGRP-LC は、免疫細胞の表層に存在し、グラム陰性細菌のペプチドグリカンに結合して免疫関連遺伝子の発現を導く情報伝達経路を活性化させる。PGRP-LC には、アミノ酸配列が少しずつ異なる 3 つのサブタイプである LCx、LCa、及び LCy が存在する。私は、これらすべての細胞外領域をグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として調製した (GST-PGRP-LC)。また、グラム陰性細菌の感染したショウジョウバエで作られる抗菌ペプチドのひとつである attacin も、同様に GST 融合タンパク質として調製した (GST-attacin)。大腸菌に GST-PGRP-LC と GST-attacin の混合物、あるいは陰性コントロールとして GST のみを添加し、mRNA の種類と量をジーンチップを利用する DNA マイクロアレイ法で調べた。

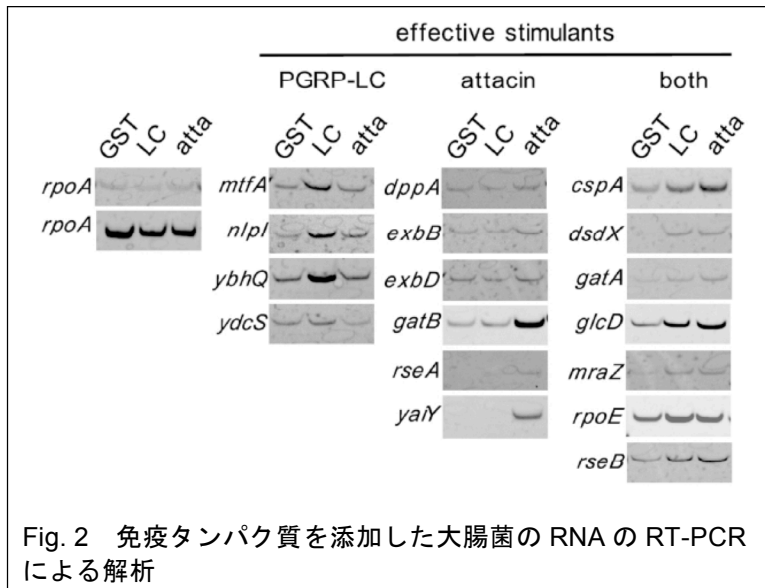
逆転写 PCR (RT-PCR) による大腸菌 mRNA の解析

免疫タンパク質の添加前後での大腸菌、あるいは大腸菌を感染させたショウジョウバエから RNA を抽出し、ランダムプライマーを使った逆転写反応を行い、得られた cDNA を鋳型として個々の遺伝子の配列に対応するプライマーを使って PCR を行った。PCR 産物はポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、エジチウムブロミドによる染色で検出した。

【結果】

免疫タンパク質の添加で変動する大腸菌遺伝子の同定

GST-PGRP-LC と GST-attacin の混合物あるいは GST を添加した大腸菌の RNA について、DNA マイクロアレイ法により mRNA の種類と量を調べた。その結果、GST 添加の大腸菌と免疫タンパク質添加の大腸菌とでは存在する mRNA のパターンが大きく異なることが示され、免疫タンパク質の刺激が大腸菌遺伝子の発現変動を起こすことがわかった。すなわち、免疫タンパク質添加によって 133 種類の遺伝子で発現が増加し、また 204 種類の遺伝子の発現が

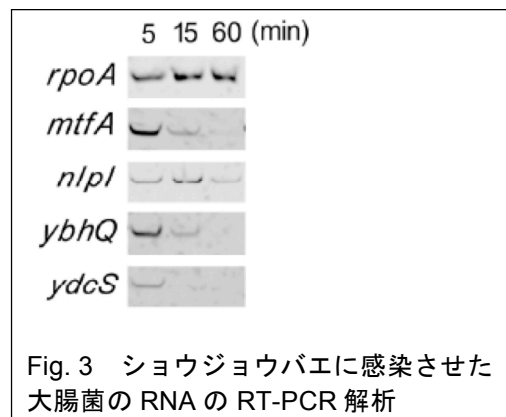


減少した。次に、発現の増加した遺伝子の中から大腸菌の宿主免疫への抵抗に関係しそうなものを 31 種類選び、GST-PGRP-LCと GST-attacinのどちらで誘導されるかを RT-PCR で調べた。すると、4 つの遺伝子が GST-PGRP-LC 依存的に、6 種類が GST-attacin に依存して、そして 7 種類が GST-PGRP-LC と GST-attacin のどちらでも誘導されることがわかった (Fig. 2)。残りの 14 種類の遺伝子については、用い

た実験条件のもとでは発現増加が認められなかった。

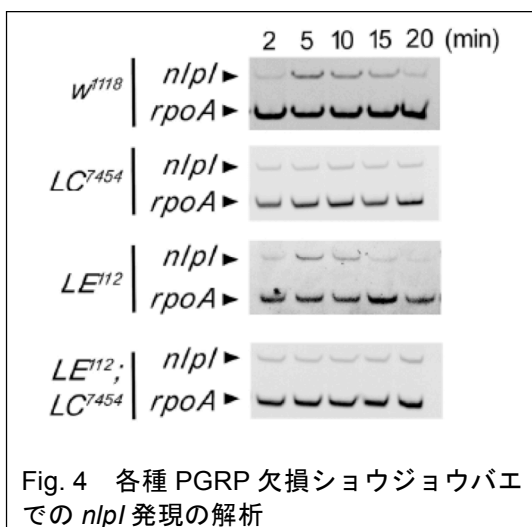
ショウジョウバエに感染した大腸菌において発現亢進する *nlpI* の同定

GST-PGRP-LC を添加した大腸菌で発現増加を示した 4 種類の遺伝子について、ショウジョウバエに感染させた大腸菌でも発現が増大するかどうかを調べた。そのために、ショウジョウバエ成虫の腹部に大腸菌を注入し、時間経過を追って抽出した RNA について RT-PCR による解析を行った。その結果、4 つの遺伝子のうち、リポ蛋白質をコードする *nlpI* の mRNA だけが一過性の増加を示した (Fig. 3)。



ショウジョウバエに感染した大腸菌における *nlpI* 発現増大の PGRP-LC 依存性

次に、ショウジョウバエ内での *nlpI* 発現亢進の詳細な時間経過を調べた。すると、*nlpI* の



mRNA は感染後 5 分以内に増え始め、20 分後までに元のレベルに戻ることがわかった (Fig. 4)。そこで、この発現パターンが PGRP-LC を欠損するショウジョウバエでも見られるかどうかを調べた。その結果、PGRP-LC 欠損ショウジョウバエ (*LC⁷⁴⁵⁴*) では、解析したどの時点でも *nlpI* の mRNA 量は変動しなかった (Fig. 4)。さらに、PGRP-LC と同じくグラム陰性細菌のペプチドグリカンに結合する可溶性タンパク質である PGRP-LE の欠損ショウジョウバエ (*LE¹¹²*) で調べると、正常型ラインと同じく *nlpI* mRNA の一過性の増加が観察された。また、PGRP-LC と PGRP-LE の両方を欠くショウジョウバエにおいては、

PGRP-LC 単独欠損の場合と同じく *nlpI* 発現の増加は認められなかった。

ショウジョウバエに感染した大腸菌における *nlpI* の役割

最後に、ショウジョウバエに感染した大腸菌にとって *nlpI* の発現増加がどのような意味を持つのかを調べた。そのために、*nlpI* 欠損大腸菌とその親菌株について、ショウジョウバエに感染してからの時間を追って生育する菌の量を調べた。その結果、*nlpI* を欠損した大腸菌は親菌株よりも早く消失することがわかった。よって、*nlpI* はショウジョウバエ内での大腸菌の保持に必要だと考えられた。さらに、この *nlpI* の効果は PGRP-LC を持たないショウジョウバエでは見られず、PGRP-LC に依存した *nlpI* の発現亢進に意味のあることが示された。

【考察】

得られたすべての結果は当初の仮説を支持するものであり、宿主の免疫細胞が膜受容体を使って細菌を認識する際に、同時に細菌を刺激して遺伝子発現を変化させることが示された。

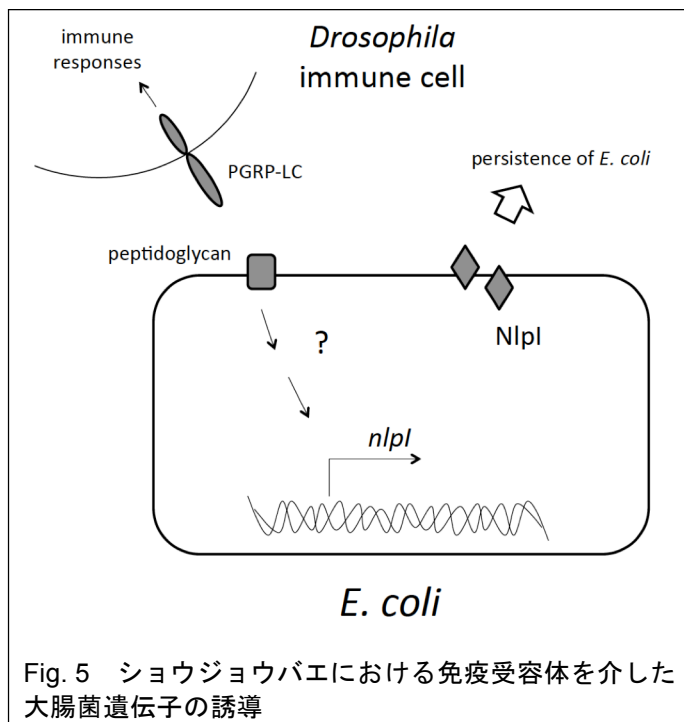


Fig. 5 ショウジョウバエにおける免疫受容体を介した大腸菌遺伝子の誘導

これは、受容体とそのリガンドが互いに役割を入れ替えて働き得ることを示唆している (Fig. 5)。このような概念はこれまで存在しておらず、本研究により初めて提唱されるものである。免疫受容体の PGRP-LC によって発現亢進を受ける大腸菌遺伝子 *nlpI* は、膜に介在するリポ蛋白質をコードしており、ショウジョウバエ内での大腸菌の保持を助ける役割を有していた。このタンパク質の働き方は不明であるが、大腸菌の増殖性または免疫への抵抗性を高める機能を持つと予想される。宿主に侵入した細菌が感知されて細菌除去のための免疫反応が誘導される時に、細菌側にもそれに抵抗するための変化が起こることは理にかなっていると考えられる。

審査結果の要旨

細菌感染症は依然として人類の生存を危ぶませる疾患のひとつである。細菌は宿主中で遺伝子発現を変化させて自己の存続をはかることが知られるが、その仕組みは不明である。学位申請者である孔氏は、宿主に侵入した細菌が感知されて遺伝子発現誘導を伴って免疫反応が誘導される際に、細菌側にも刺激が伝わって細菌遺伝子の発現も同時に変動すると仮定した。まず、細菌の細胞壁成分を認識して免疫応答を導くショウジョウバエの膜結合型免疫受容体の細胞外領域を添加した大腸菌について、mRNAの種類と量の変化が網羅的に調べられた。その結果、100種類を越える大腸菌遺伝子のmRNAが増減両方向に変動し、免疫受容体が細菌の遺伝子発現を変化させることが示された。次に、発現が増大する大腸菌遺伝子についてショウジョウバエへの感染時の変化を調べると、リポタンパク質をコードする *nlpI* 遺伝子のmRNAが一過性に増加することが見いだされた。この変化は免疫受容体の存在に依存しており、*in vitro* での結果が感染実験でも再現された。また、*nlpI* はショウジョウバエ内での大腸菌の存続を助ける働きを持つことがわかった。

実験結果は当初の仮説を支持し、“宿主と病原体とが相互に遺伝子発現を変動させる”という新たな生命現象の存在が示唆された。本審査委員会は、研究成果の新奇性および口頭発表会における学位申請者の発表と討論の能力を考慮して、当該学位論文は博士（学術）に値すると判定した。