

シヨウジヨウバエ腸管における細菌と宿主の相互作用の研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-07-02 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/2297/00051376

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



氏名	堀 亜紀
学位の種類	博士（創薬科学）
学位記番号	医薬保博甲第168
学位授与の日付	平成30年3月22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	ショウジョウバエ腸管における細菌と宿主の相互作用の研究

論文審査委員	主査	倉石 貴透
	副査	松永 司
	副査	中西 義信
	副査	伊従 光洋
	副査	嶋田 努

学位論文要旨

Abstract

All metazoan guts are subjected to conditions in which an efficient antimicrobial system operates to eliminate pathogens while tolerating symbiotic commensals. However, the molecular mechanisms controlling this process are poorly understood. In this research, we used *Drosophila melanogaster*, a powerful model organism for studying innate immune responses in the gut. By using *Staphylococcus aureus*, a Gram-positive bacteria, as an entomopathogen, we examined several immune pathway mutants and found that the IMD pathway mutants were more susceptible to the oral infection. The number of bacteria in the IMD mutant was greater than wild-type flies upon the infection. This result indicates that the bacterial clearance is reduced in the IMD mutant. However, upon the infection, quantitative RT-PCR analysis showed that the expression of antimicrobial peptides was not induced in wild-type and mutant flies. Since gut peristalsis could be such an effector mechanism, we monitored the amounts of defecated bacteria and found that excretion of ingested bacteria from the IMD mutant gut is compromised. These findings provide a new aspect of the gut defense system of *Drosophila*, and helps to elucidate the processes of gut-microbe symbiosis and pathogenesis.

本論

「内なる外」と呼ばれる腸管は、常に様々な病原体に曝されている部位である。この腸管内では、常にある種の微生物が常在菌として存在する一方、食物などと共に経口的に取り込まれる病原微生物による感染症の危険に常に曝される最前線となる。そのため、腸管にはこれらの微生物に対抗する特有な免疫系が存在す

るが、その詳細な機構は不明である。

本研究では、自然免疫研究の有用なモデル生物であり、構造的・機能的に哺乳類と非常に類似性の高い腸管を有するショウジョウバエを用いて、腸管での自然免疫機構の解析を行うこととした。ショウジョウバエ腸管での免疫応答は、これまでにグラム陰性菌を用いた解析から

- (1) 囲食膜による腸管上皮細胞の物理的な防御
- (2) 腸管上皮細胞による活性酸素種 ROS (Reactive Oxygen Species) の産生による菌の排除
- (3) IMD (Immune deficiency) 経路を介した抗菌ペプチドの産生による菌の排除
- (4) 感染により傷ついた上皮細胞の修復

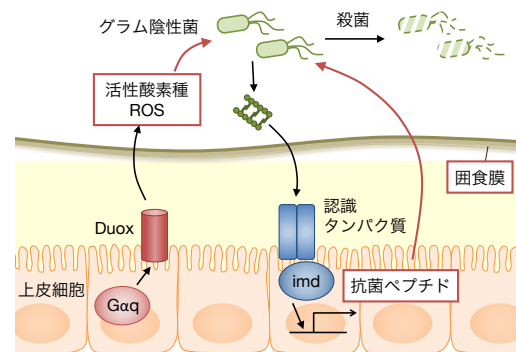


Fig. 1 ショウジョウバエ腸管での免疫応答

により行われていることが明らかになっている。

しかしながら、グラム陽性菌に対する腸管での免疫応答については全く知られていない。そこで今回、グラム陽性菌経口感染時の腸管における免疫応答機構の解明を目的として研究を行った。

まず始めに、グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) を経口感染させる条件を検討し、再現性よく感染後の生存率を測定できる実験系を確立した。そこで、これまでにショウジョウバエ腸管においてグラム陰性菌経口感染時の免疫応答に重要であると知られていた機構の関与を検討した。

囲食膜は腸管の管腔側に存在する半透膜であり、食物や細菌などの巨大分子は通さず、膜上に存在する消化酵素により分解された分解産物のみを透過させることで、腸管上皮細胞を物理的に保護している。囲食膜を構成するタンパク質 Dcy (Drosocrystallin) の変異体を用いた研究から、囲食膜がグラム陰性菌である *P. entomophila* の経口感染時に、細菌毒素から上皮細胞を保護する重要な

役割を果たしていることが遺伝学的に示されている。この囲食膜の変異体を用いて *S. aureus* 経口感染実験を行ったところ生存率が低下したことから、囲食膜による腸管上皮細胞の物理的な防御が *S. aureus* 経口感染時の防御にも重要であることが分かった。

活性酸素種 ROS は好中球やマクロファージ内での細菌の殺菌に重要であり、NADPH オキシダーゼファミリーの分子によって産生される。ショウジョウバエの Duox は NADPH オキシダーゼファミリーに属する ROS 産生酵素である。病原性細菌によって放出されるウラシルが宿主の G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor: GPCR) に受容されると、下流の G タンパク質である Gaq や PLC β が活性化し、MAPK 経路を介して Duox の酵素活性や発現量を調節することで ROS が産生され、病原性細菌の排除に働く。そこで、ROS を産生できない Gaq の変異体を用いて *S. aureus* 経口感染実験を行ったところ、生存率の低下はみられなかった。実際に *S. aureus* 経口感染時に腸管での ROS の産生量を定量したところ、感染後ほとんど ROS は検出されなかった。これらのことから、腸

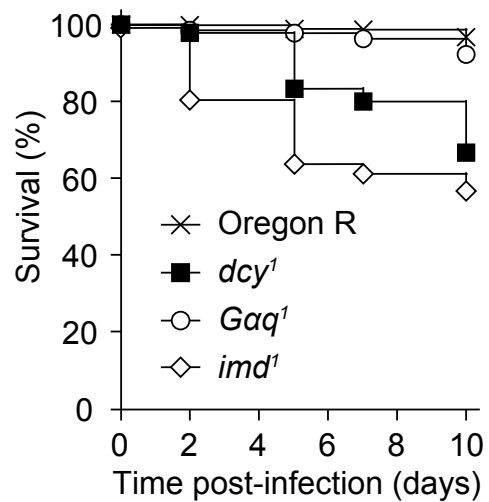


Fig. 2 *S. aureus* 経口感染後の生存率

管上皮細胞による ROS の産生による殺菌は *S. aureus* の排除には関与しないことが示唆された。

腸管上皮細胞により産生される ROS は、細菌のみならず自分自身の腸管上皮細胞も同時に傷害する。この損傷を修復するために JAK-STAT 経路や EGFR 経路を介したシグナル伝達により、腸管幹細胞が急速に分化・増殖を開始することが知られている。そこで *S. aureus* 経口感染時に本当に ROS が産生されていないのか確認するため、組織損傷時に産生されるサイトカインの変異体を用いて経口感染実験を行ったところ、生存率の低下は見られなかった。さらに、感染後幹細胞の分化・増殖の亢進もみられなかったため、*S. aureus* 経口感染により確かに ROS が産生されていないことに加え、ROS 以外の要因による腸管へのダメージも生じていないことがわかった。

グラム陰性菌である *Pseudomonas entomophila* や *Serratia marcescens* の経口感染時には、IMD 経路依存の抗菌ペプチド産生が誘導される。

そして、IMD 経路の転写因子 Relish の完全欠損体で生存率の低下がみられることから、グラム陰性菌の腸管感染時には IMD 経路によって産生される抗菌ペプチドが感染抵抗性に必要であると示唆されている。さらに、グラム陰性菌である

Erwinia carotovora carotovara 15 経口感染後の腸管でのマイクロアレイ解析により、抗菌ペプチドを含むショウジョウバエ自然免疫に関わる因子の発現が IMD 経路を介して上昇することが示されていることから、グラム陰性菌経口感染時の腸管においては、IMD 経路を介した自然免疫応答が重要であると考えられて

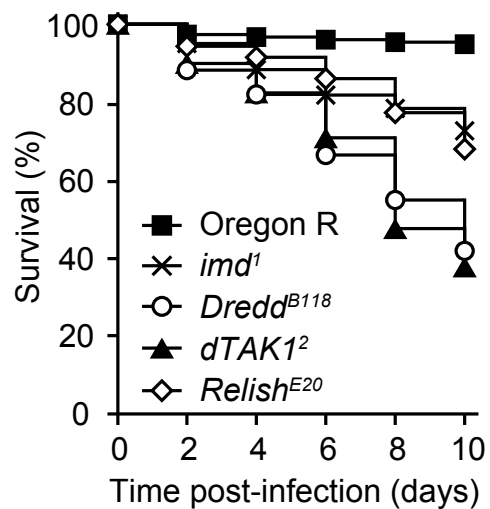
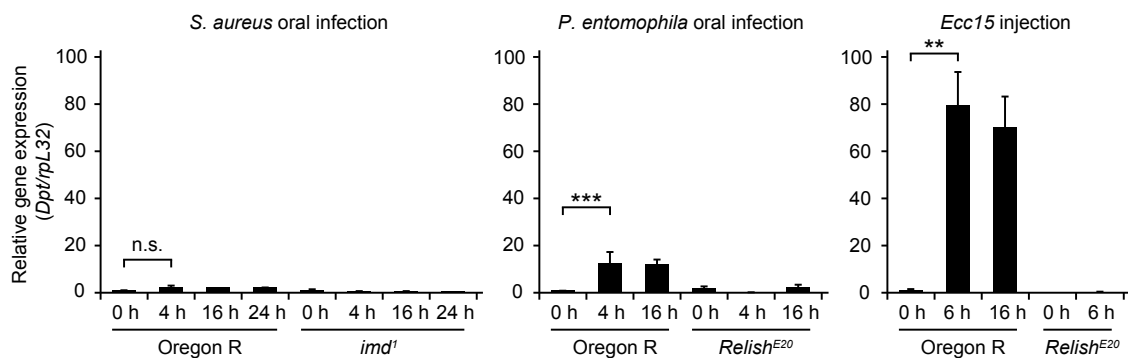


Fig. 3 IMD 経路変異体の *S. aureus* 経口感染後の生存率

いる。そこで、*S. aureus* 経口感染時に IMD 経路を介した免疫応答が関与しているか調べた。IMD 経路の構成因子であるアダプター分子の IMD, IMD の解裂に関わる Dredd, IMD 下流のシグナル伝達に必須のキナーゼである dTak1, さらに下流の転写因子である Relish の変異体を用いて *S. aureus* 経口感染実験を行った。その結果、すべての変異体で生存率の低下がみられたため、*S. aureus* 経口感染時の免疫応答に IMD 経路が関与している可能性が示唆された。

細菌の体液中への注入による全身感染では、グラム陰性菌の感染により IMD 経路が脂肪体において活性化され、主に抗菌ペプチド Diptericin を誘導し感染防御に働く。そこで、グラム陽性菌である *S. aureus* の経口感染時に腸管において抗菌ペプチドの発現が誘導され *S. aureus* の排除に働いているのか、*S. aureus* 経



口感染後の腸管での抗菌ペプチド発現量を定量 PCR により調べた。しかしながら、*S. aureus* 経口感染では腸管での抗菌ペプチドの発現誘導がみられなかった。

Fig. 4 *S. aureus* 経口感染後の腸管での抗菌ペプチド発現量

IMD の変異体においてなぜ *S. aureus* 経口感染により生存率の低下が見られるのか調べるため、*S. aureus* 経口感染後に腸管から体液中に菌が漏出していないか検討したところ、*S. aureus* の体液への漏れ出しは観察されなかった。このことから、腸管の中での何らかの応答により *S. aureus* 経口感染による生存率の低下が引き起こされていることが示唆された。

そこで、CFU (Colony Forming Unit) アッセイにより経口感染後の体内での菌数を調べたところ、野生型では *S. aureus* の数が徐々に低下し排除されているの

に対して、IMD 変異体では *S. aureus* の数が徐々に上昇していた。これらのことから、IMD 経路が *S. aureus* 経口感染時の腸管からの排除にも関わっていることが示唆されたが、その機構は抗菌ペプチドの産生や ROS の産生にはよらないものであると考えられた。

この排除機構として、腸管の蠕動運動によるフン中への細菌の排泄応答が重要なのではないかと考え、*S. aureus* 経口感染後の腸管の蠕動運動によるフン中への菌の排泄量を調べることにした。その結果、野生型と比べて IMD 変異体では菌の排泄量が有意に少なく、蠕動運動によるフン中への菌の排泄に異常が見られた。さらに、DNA マイクロアレイ解析を行った結果から、*S. aureus* 経口感染時に IMD 経路依存的に神経系の遺伝子の腸管での発現変動がみられた。このうちのいくつかの遺伝子については腸管での RNAi により *S. aureus* 経口感染後の生存率の低下が見られた。これらの結果から、神経系の遺伝子の発現量が IMD 経路によって制御され、*S. aureus* 経口感染後の蠕動運動を調節することにより腸管からの *S. aureus* の排除に働く可能性が考えられた。

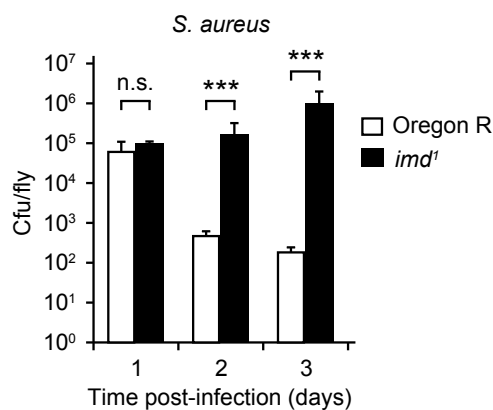


Fig. 5 *S. aureus* 経口感染後の腸管内の菌数

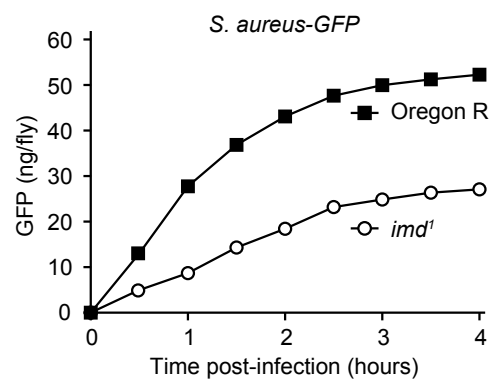


Fig. 6 *S. aureus* 経口感染後のフン中への菌の排泄量

以上の結果から、グラム陽性菌感染時には ROS や抗菌ペプチドの産生が起こらないため、蠕動運動によるフン中への菌の排泄が非常に重要な役割を果たしていることが示唆された。IMD 経路変異体は排泄機能に異常が生じているために黄色ブドウ球菌を正常に排除することができないため、感染抵抗性の低下がみられると考えられる。今回の結果から、これまでに知られていなかったグラム陽性菌に対する腸管での免疫応答機構が明らかとなり、免疫系と蠕動運動を制御する機構の相互作用が重要な役割を持つことが示唆された。

IMD 経路の変異体では野生型に比べて腸内細菌叢を構成する細菌種のバランスが変化していることがすでに報告されている。消化管に存在する腸内常在微生物・細菌叢は宿主のさまざまな生理機能を調節しており、ショウジョウバエにおいてもウイルス抵抗性や自然免疫応答、消化管の形態・機能維持に関与していることが報告されている。そこで、腸内細菌叢が *S. aureus* に対する感染抵抗性に寄与しているか調べることにした。メタ 16S シーケンス解析により、自分で維持して感染実験に使用している野生型と IMD 変異体の腸内細菌叢の間にも違いがあるか調べたところ、野生型と比べて IMD 変異体の腸内細菌叢のバランスが変化していることがわかった。この腸内細菌叢の違いにより *S. aureus* に対する感染抵抗性が低下しているのか調べるため、次亜塩素酸で滅菌して腸内細菌を減らした野生型と IMD 変異体を用いて *S. aureus* 経口感染実験を行った。その結果、無菌飼育を行っても野生型と IMD 変異体ともに *S. aureus* 経口感染後の生存率に通常飼育時との差はみられなかった。このことから、腸内細菌叢は IMD の変異体でみられる *S. aureus* 経口感染抵抗性の低下や蠕動運動による腸管からの排除応答に関与しないと考えられた。

最後に、腸内細菌叢の関与の検討をしている過程で、無菌状態のショウジョウバエを安定的に長期間・世代を超えて維持する方法を検討し、確立することに成

功した。この方法を用いることにより、これまでに解析できなかった宿主と微生物の長期的な相互作用を世界で初めて明らかにできることが期待される。

審査結果の要旨

消化管における宿主と微生物の相互作用は、宿主の恒常性維持に重要な役割を果たす。本論文は、遺伝学的手法が豊富なモデル生物であるキイロショウジョウバエを用いて以下の解析を行った。まず1点目に、これまでに報告が無かったグラム陽性菌に対する感染防御メカニズムの一端を明らかにした。具体的には、ショウジョウバエのNF- κ B経路であるIMD経路が消化管からのグラム陽性菌排除に必要であることを初めて明らかにし、その排除メカニズムは、これまでに知られている抗菌ペプチドによるものではなく、消化管の蠕動運動の制御による細菌の排泄によるものであることを示唆した。2点目に、腸内細菌と宿主の相互作用を解析する上で重要な「無菌ショウジョウバエ」を世界に先駆けて確立した。これまでの手法では、無菌ハエを抗生物質無しで長期間維持することは困難であったが、無菌マウスの維持に用いるビニルアイソレータを使い、栄養成分を変更したエサを用いる等の工夫により、数世代以上に渡って無菌状態を維持する新規手法を確立した。以上の知見は今後の当該分野の発展に大きく寄与すると考えられ、口述試験の内容を踏まえ、本論文に関して慎重かつ総合的に審査を行った結果、博士学位請求論文としての水準を十分に満たしているものと判断し、本論文が博士（創薬科学）に値すると全委員が合意した。