



Title	インターフェロナーガンマ誘導性GTPase群の細胞内動態制御機構の解明
Author(s)	大嶋, 淳
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52363
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (大 嶋 淳)	
論文題名	インターフェロン-ガンマ誘導性GTPase群の細胞内動態制御機構の解明
論文内容の要旨	
<p>【研究目的】</p> <p>細胞内に侵入した病原体に対する宿主側の感染防御には、インターフェロン-ガンマ (IFN-γ) によって誘導される免疫機構がきわめて重要である。IFN-γは、マクロファージなどの自然免疫担当細胞に作用して約2,000種類のエフェクター分子群の遺伝子発現を誘導し、これらの誘導された分子群が病原体排除機能に関わっているものと考えられている。これまでに、IFN-γ刺激で誘導されるGTP分解酵素群 (IFN-γ誘導性GTPase群) が細胞内寄生性病原体に対する宿主防御因子として機能していることが知られており、近年ではIFN-γ誘導性GTPase群によるグラム陰性細菌の寄生胞膜の破壊が非標準的インフラマソームの活性化にも重要であることが明らかにされた。そこで本研究では、IFN-γ誘導性GTPaseの一種であるGBPに対する共免疫沈降と質量分析の結果からGBPに結合する候補分子を同定し、その機能解析を足掛かりにIFN-γ誘導性GTPase群の細胞内動態の制御機構の解明を試みた。</p>	
<p>【研究方法と結果】</p> <p>1. IFN-γ誘導性GTPase群の機能を制御する分子の同定</p> <p>まず、GBPに対する大規模免疫沈降および質量分析の結果から、Gbp2に結合する候補分子としてRabGDIを同定した。哺乳類細胞におけるRabGDIには、RabGDIαとRabGDIβの2つのアイソフォームが存在することが知られている。そこで、マウス胎仔線維芽細胞 (Mouse embryonic fibroblast : MEF) にRabGDIαとRabGDIβをそれぞれ過剰発現させた細胞株を作製し、免疫沈降によるGbp2との結合性の確認とIFN-γ刺激による病原体排除機能における影響を評価した。その結果、RabGDIαとGbp2との結合が確認され、RabGDIαを過剰に発現した細胞ではIFN-γ依存性の病原体排除能が抑制されていることが明らかになった。</p> <p>さらに、RabGDIαを好中球やマクロファージといったミエロイド系細胞で特異的に欠損するマウスを作製し、細胞内寄生性病原体<i>Toxoplasma gondii</i> (<i>T. gondii</i>) を腹腔内投与によって感染させて、マウス内での<i>T. gondii</i>の感染拡大をルシフェラーゼ活性による発光を指標に生体イメージング装置を用いて検討した。その結果、RabGDIαを欠損するマウスでは野生型マウスと比べて<i>T. gondii</i>の腹腔内での拡がりがありに抑えられており、生存率の測定結果からもRabGDIαコンディショナルノックアウトマウスは<i>T. gondii</i>感染に対してより高い抵抗性を示した。</p> <p>以上の結果より、RabGDIαはIFN-γ依存性の病原体排除機構に対して抑制的に機能することが示された。</p> <p>2. RabGDIα欠損のIFN-γ誘導性GTPase群の細胞内動態への影響に対する検討</p> <p>IFN-γによる細胞内寄生性病原体の排除機構において、IRG・GBPといったIFN-γ誘導性GTPase群が病原体周囲に集積し、寄生胞膜を破壊することが重要であることが知られている。そこで、RabGDIαの欠損が、IRGあるいはGBPの病原体への集積に影響を及ぼしているかどうかを蛍光免疫染色で検討した。その結果、RabGDIα欠損によりIrga6およびGbp2の病原体周囲への集積が有意に増加していることを見出した。</p> <p>3. IFN-γ依存的な病原体排除におけるGbp2の機能解析</p> <p>RabGDIαがGbp2と相互作用することでIFN-γ依存的な細胞内寄生性病原体排除を抑制していることが示されたので、Gbp2の病原体排除における機能についてさらなる詳細な検討を加えた。</p> <p>まず、病原体感染時のGbp2とIrga6の細胞内局在について検討した。IFN-γ刺激したのち<i>T. gondii</i>を感染させたMEFにおいて、<i>in situ</i> PLAキット[®]を用いてGbp2とIrga6の細胞内での局在を評価した。その結果、Gbp2とIrga6は病原体周囲のきわめて近接した位置に局在し相互作用していることを明らかにした。</p>	

次に、CRISPR/Cas9を用いてGbp2欠損MEF細胞を作製した。野生型細胞とGbp2欠損細胞をそれぞれIFN- γ で刺激し、ルシフェラーゼ発現*T. gondii*を感染させて36時間後の*T. gondii*の存在量をルシフェラーゼアッセイにより定量化した結果、野生型と比べてGbp2欠損細胞ではIFN- γ による病原体排除能が有意に低下していることが明らかになった。さらに免疫蛍光染色を用いた解析により、Gbp2欠損細胞では野生型細胞と比較してIrga6の病原体周囲への集積が減少していた。

以上の結果より、Gbp2はIFN- γ 依存的な病原体排除に重要な役割を示し、Gbp2とIrga6は病原体周囲に集積し協調して機能していることが示された。

4. RabGDI α の脂質結合ポケットの病原体排除能における役割の検討

RabGDIは本来、不活性なGDP結合型のRabを細胞質に隔離することでRabの負の制御因子として機能することが知られている。RabGDIによる膜からのプレニル化されたRabの抜き取りには、RabGDIの脂質結合ポケット（Rabのプレニル化された脂質修飾部位が挿入される）におけるRabとの結合が関与している。しかし、IFN- γ 誘導性の細胞自律性免疫の観点からRabGDI α の脂質結合ポケットの機能を検討した報告はまだない。そこで、RabGDI α の脂質結合ポケットの変異株を作製してRabGDI α 欠損細胞に発現させ、Gbp2との結合性、Irga6の病原体への集積および病原体排除能が回復するかどうかを共免疫沈降、蛍光免疫染色およびルシフェラーゼアッセイによって検討した。その結果、脂質結合ポケット変異体RabGDI α は内在性Gbp2との共免疫沈降が低下しており、さらにRabGDI α 欠損MEFに脂質結合ポケット変異体RabGDI α を発現させても、IFN- γ 依存性の*T. gondii*殺傷能やIrga6の寄生胞膜への集積に対する抑制効果は回復しなかった。このことから、RabGDI α によるGbp2との相互作用および機能阻害には、RabGDI α の脂質結合ポケットが必須であることを明らかにした。

5. RabGDI α の非標準的インフラマソームへの関連性の検討

近年、マクロファージにおけるIFN- γ 誘導性GTPase群によるグラム陰性細菌の寄生胞の破壊が、非標準的インフラマソームを活性化している可能性が示されている。そこで次に、非標準的インフラマソームの活性化におけるGbp2の作用に対するRabGDI α の関与について検討した。野生型およびRabGDI α 欠損マクロファージに Δ SPI2 *S. Typhimurium*や*C. koseri*を感染させ、培養上清中のIL-1 α とIL-1 β の濃度についてはELISAによって、細胞死の程度については乳酸デヒドロゲナーゼの放出量によって評価した。その結果、細菌感染したRabGDI α 欠損マクロファージの培養上清におけるIL-1 α とIL-1 β の濃度は、野生型細胞におけるものより有意に高かった。さらに、RabGDI α 欠損マクロファージでの細胞死も野生型細胞に比べて有意に増大していた。対照的に、大腸菌のLPSを細胞質に直接導入した場合には、IL-1 β の産生および細胞死の程度は野生型とRabGDI α 欠損細胞との間で有意な差はなかった。これらの結果から、RabGDI α は、*T. gondii*だけでなく、*S. Typhimurium*や*C. koseri*といった寄生胞形成グラム陰性細菌に対するGbp2依存的細胞免疫応答を阻害し、非標準的インフラマソームによって引き起こされる過度の炎症を抑制するために重要である可能性が示された。

【考察および結論】

RabGDI α はIFN- γ 誘導性GTPaseの一種であるGbp2と結合して病原体周囲への集積を阻害することにより、IFN- γ 依存的な病原体排除を抑制することが明らかとなった。RabGDI α によるGbp2との相互作用および機能阻害には、RabGDI α の脂質結合ポケットが重要であり、脂質結合ポケットを標的としてRabGDI α の機能を抑制する小分子化合物の開発が可能になれば、抗*T. gondii*治療のための新規的な創薬戦略となり得るかもしれない。また、Gbp2の機能不全によって他のIFN- γ 誘導性GTPaseであるIrga6の集積も低下することから、IFN- γ 誘導性GTPase群の細胞内動態には階層性・調律性があることが明らかになった。

さらに、RabGDI α の欠損は、*T. gondii*だけでなく*S. Typhimurium*や*C. koseri*といった病原細菌へのGbp2の集積を増強させ、その結果インフラマソームの活性化につながるということがわかった。このことは、RabGDI α が多様な寄生胞形成病原体に対するGbp2依存的な細胞自律的免疫応答の負の制御因子として広く機能していることを示唆している。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (大 嶋 淳)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	林 美加子
	副 査	教授	川端 重忠
	副 査	准教授	波多 賢二
	副 査	講師	山田 聡
論文審査の結果の要旨			
<p>本研究は、低分子量 GTPase の一種である Rab ファミリーの活性を制御する因子として従来より知られていた RabGDIαが、寄生胞形成病原体に対する IFN-γ 依存的な細胞自律性免疫応答を負に制御する因子としても機能することを明らかにしたものである。RabGDIαは IFN-γ誘導性 GTPase の一種である Gbp2 と結合して病原体周囲への集積を阻害することにより、IFN-γ依存的な病原体排除を抑制することが示された。</p> <p>以上の研究成果は、細胞内に侵入した病原体に対する宿主免疫応答を理解するうえで重要な知見を提供するものであり、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。</p>			