

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

学 位 論 文

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

大阪大学大学院歯学研究科

分子病態口腔科学専攻

口腔分子感染制御学講座 歯科保存学教室

【指導教官； 林 美加子 教授】

大嶋 淳

目次

I. 緒言	4
II. 実験方法および結果	7
1. 質量分析による、GBP と結合する候補分子の同定	7
1-1 目的	
1-2 材料と方法	
1-3 結果	
2. RabGDI α およびRabGDI β と Gbp2 の結合に関する検討	9
2-1 目的	
2-2 材料と方法	
2-3 結果	
3. RabGDI α および RabGDI β の過剰発現による IFN- γ 依存的病原体排除能への影響	12
3-1 目的	
3-2 材料と方法	
3-3 結果	
4. 組織特異的 RabGDI α 欠損マウスの作製	14
4-1 目的	
4-2 材料と方法	
4-3 結果	
5. RabGDI β 欠損細胞の作製	17
5-1 目的	
5-2 材料と方法	
5-3 結果	
6. マウス胎児線維芽細胞 (MEF) における、IFN- γ 依存的病原体排除能への RabGDI α および RabGDI β 欠損の影響	19
6-1 目的	
6-2 材料と方法	
6-3 結果	

7. ミエロイド系細胞特異的 RabGDI α 欠損マウスの <i>in vivo</i> における <i>T. gondii</i> 抵抗性の評価	21
7-1 目的	
7-2 材料と方法	
7-3 結果	
8. マクロファージにおける、IFN- γ 依存的病原体排除能への RabGDI α 欠損の影響	24
8-1 目的	
8-2 材料と方法	
8-3 結果	
9. RabGDI α の欠損が IRG の細胞内動態に与える影響	27
9-1 目的	
9-2 材料と方法	
9-3 結果	
10. RabGDI α の欠損が GBP の細胞内動態に与える影響	29
10-1 目的	
10-2 材料と方法	
10-3 結果	
11. Gbp2 と Irga6 の細胞内における局在の検討	32
11-1 目的	
11-2 材料と方法	
11-3 結果	
12. Gbp2 欠損細胞の作製	35
12-1 目的	
12-2 材料と方法	
12-3 結果	
13. Gbp2 の欠損が IFN- γ 依存的病原体排除能および Irga6 の集積に与える影響	37
13-1 目的	
13-2 材料と方法	
13-3 結果	
14. Gbp2 の N 末端ヌクレオチド結合ドメインおよび C 末端プレニル化ドメインの、病原体排除能における役割の検討	39
14-1 目的	
14-2 材料と方法	
14-3 結果	

15. RabGDI α の IFN- γ 誘導性免疫応答に対する阻害作用における、 Rab 結合ドメインの役割の検討	42
15-1 目的	
15-2 材料と方法	
15-3 結果	
16. RabGDI α の IFN- γ 誘導性免疫応答に対する阻害作用における、 脂質結合ポケットの役割の検討	45
16-1 目的	
16-2 材料と方法	
16-3 結果	
17. RabGDI α 欠損が、 <i>S. Typhimurium</i> への Gbp2 の集積に及ぼす影響	48
17-1 目的	
17-2 材料と方法	
17-3 結果	
18. RabGDI α の非標準的インフラマソームへの関連性の検討	50
18-1 目的	
18-2 材料と方法	
18-3 結果	
III. 考察	54
IV. 結論	59
V. 謝辞	60
VI. 参考文献	61
VII. 図表	73

I. 緒言

インターフェロン-ガンマ (IFN- γ) は、ウイルスや細菌、寄生虫といった様々な細胞内寄生性病原体に対する細胞自律的免疫において重要な役割を果たす炎症性サイトカインである [1]。マクロファージなどの自然免疫担当細胞を IFN- γ で刺激すると、およそ 2000 種類にもおよぶ遺伝子の発現が誘導され、これらの IFN- γ 誘導性遺伝子群が細胞内寄生性病原体の増殖や生存の抑制に寄与していると考えられている [2]。感染した細胞内に独特な寄生胞 (pathogen-containing vacuoles : PCV) を形成する細胞内寄生性原虫 *Toxoplasma gondii* に対する宿主応答 [3, 4] については、誘導性一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase : iNOS) による一酸化窒素の産生やインドールアミン酸素添加酵素 (indoleamine 2,3-dioxygenase : IDO) によるトリプトファン分解によって、IFN- γ 依存的な原虫の増殖抑制が引き起こされることが知られている [5, 6]。近年ではさらに、IFN- γ で誘導されるグアノシン三リン酸 (guanosine triphosphate : GTP) 分解酵素活性をもつ分子群 (IFN- γ 誘導性 GTPase 群) が、細胞内に侵入した *T. gondii* の排除に重要な役割を果たすことが明らかになってきている [7]。IFN- γ 誘導性 GTPase 群はその分子量の違いによってサブファミリーを形成しており、これまでに約 47kDa の immunity-related GTPase (IRG) ファミリーや約 65kDa の guanylate binding protein (GBP) ファミリーに属する分子群が細胞内の *T. gondii* に関与していることが示されている [8-12]。IRG や GBP は *T. gondii* の寄生胞周囲に蓄積し、その膜構造を破壊することによってそれに続く細胞内分解を誘導し病原体を殺傷すると考えられる [9, 10, 13]。

T. gondii だけでなく、他の寄生胞形成病原体や共生細菌に対しても、IFN- γ 誘導性 GTPase 群の集積が認められることが報告されている。*Salmonella enterica*

subspecies *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*)、*Chlamydia trachomatis*、*Legionella pneumophila*、*Citrobacter koseri* などのグラム陰性細菌もまた、感染した細胞内に PCV を形成し [14-16]、GBP による PCV 膜の破壊によってこれらのグラム陰性細菌の細胞内での増殖が抑制される [17-19]。さらに最近、GBP によるグラム陰性細菌の PCV の破壊によって生じる細胞質へのリポ多糖 (LPS) の放出が、カスパーゼ 11 の活性化とピロトーシス (pyroptosis) を伴う非標準的インフラマソームを促進し [18, 20]、IL-1 α/β による炎症の誘導と細菌の排除に重要な役割を果たすことが明らかになった[21-23]。このように、IFN- γ 誘導性 GTPase 群は寄生胞形成病原体の PCV を破壊することによって、細胞自律性免疫応答だけでなく、非標準的インフラマソームを活性化するという多面的な機能を有していることが徐々に解明されつつある。

しかしながら一方で、IFN- γ 誘導性 GTPase 群の PCV への集積における細胞内動態の制御メカニズムについては、まだ不明な点が多い。これまでに、オートファジー必須タンパク質の 1 つである Atg5 を欠損した細胞において、*T. gondii* および *C. trachomatis* の PCV 膜への IRG や GBP の蓄積が顕著に抑制されていることが明らかにされている [17, 24]。さらに近年の報告では、Atg5に加えて Atg3、Atg7、Atg16L1 も IFN- γ 誘導性 GTPase 群の集積および *T. gondii* の排除に大きく関与していることが示された [17, 25, 26]。しかし、他のオートファジー関連タンパク質である Atg9a と Atg14 は、オートファジーの形成には必須であるにもかかわらず、IFN- γ 誘導性 GTPase 群の動態および細胞内自律性免疫機構には重要ではないことが明らかにされた [25, 26]。これらの報告は、Atg3/Atg5/Atg7/Atg16L1 が有する、オートファジー形成とは異なる機能によって、IFN- γ 誘導性 GTPase 群を介した細胞自律性免疫が正に制御されている可能性を示唆している。しかしながら、IFN- γ 誘導性 GTPase 群の活性を負に制御するメ

カニズムについては、完全に未知のままである。そこで本研究では、IFN- γ 誘導性 GTPase 群の細胞内動態の制御機構をより詳細に解明することを試みた。

II. 実験方法および結果

1. 質量分析による、GBP と結合する候補分子の同定

1-1 目的

まず、IFN- γ 誘導性 GTPase 群の一種である p65 GBP による細胞内寄生性病原体 *T. gondii* に対する宿主防御の分子メカニズムをより詳細に検討するために、GBP の結合パートナーとなる候補分子を質量分析によって検索した。

1-2 材料と方法

大規模免疫沈降および質量分析

Flag タグ付きの mGBP を過剰発現している RAW264.7 細胞を 200 U/ml の IFN- γ で一晩刺激したのち、*T. gondii* Pru 株を moi = 5 で 1 時間感染させた。細胞を 0.5 % NP-40 含有溶解バッファー (25 mM Tris-HCl 溶液 pH 7.4、150 mM 塩化ナトリウム、5 mM 塩化マグネシウム、cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) および 0.5 mM GTP) で 4 °C にて 30 分間溶解し、核画分は遠心分離で取り除いた [27]。上清は、Protein G ビーズを用いて 4 °C、3 時間プレクリアを行ったのち、マウスモノクローナル抗 HA 抗体 (Roche Applied Science) および Protein G ビーズを用いて 4 °C で 2 時間反応させた。さらに、Laemmli サンプルバッファー中で 95 °C でボイルすることによって結合タンパク質を洗浄したビーズから溶出し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) および銀染色を行った。全分子量の範囲を含む単一のバンドを、銀染色した SDS-PAGE ゲルの各レーンか

ら抽出しトリプシン消化したのち、逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) およびイオントラップ型質量分析計 (LTQ linear ion trap mass spectrometer ; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) にて解析を行った。ペプチド断片は、NCBI の非重複データベース (nr.fasta) から作られた種特異的データベースを検索する SEQUEST algorithms⁴⁴ を用いることで質量分析データから同定した。

1-3 結果

T. gondii に感染した IFN- γ 刺激マクロファージにおいて、Flag タグ付き Gbp2 の大規模免疫沈降実験を行って質量分析にかけた結果、得られたペプチド断片の配列から Gbp2 に結合する候補分子として RabGDI を同定した (図 1)。

2. RabGDI α および RabGDI β と Gbp2 の結合に関する検討

2-1 目的

RabGDI は低分子量 GTPase の一種である Rab タンパク質の制御因子として知られる分子であり、RabGDI α と RabGDI β の 2 つのファミリー分子からなる[28, 29]。また、RabGDI α と RabGDI β はそれぞれ、*Gdi1* および *Gdi2* 遺伝子にコードされている[30]。今回の質量分析の結果得られたペプチド断片は RabGDI α および RabGDI β に共通する配列であった (図 1) ことから、まずは Gbp2 との結合が RabGDI α と RabGDI β のいずれか、もしくはその両方で確認できるのかどうかを免疫沈降によってさらに検討した。

2-2 材料と方法

1) 細胞

マウス胎児線維芽細胞 (Mouse Embryonic Fibroblast ; MEF) は、10 %ウシ胎児血清 (FBS : Nichirei Bioscience, 東京)、100 U/ml ペニシリンおよび 0.1 mg/ml ストレプトマイシン (Nacalai Tesque, 京都) を含有する DMEM (Nacalai Tesque) にてそれぞれ培養した。

2) 発現ベクター

遺伝子組換え実験は大阪大学微生物病研究所に申請、承認ののち (承認番号 : 3345-1、3346-1)、大阪大学遺伝子組換え実験安全管理規程指導のもとで行った。発現ベクターを構築するための cDNA 断片は、以下のプライマーセットを用いて増幅した : (RabGDI α _F と RabGDI α _R ; RabGDI β _F と RabGDI β _R) (表 1)。

RabGDI の cDNA 断片は pcDNA および pMRX-Puromycin ベクターに挿入することで、C 末端に Flag タグを付与した。すべての構築の塩基配列は、ABI PRISM 遺伝子分析装置 3130xl (PE Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) を用いてシーケンシングを行い確認した。

3) 試薬

抗 Gbp2 抗体 (sc-10588 ; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) 、抗 Flag 抗体 (F3165 ; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) および抗 Actin 抗体 (A1978 ; Sigma Aldrich) を使用した。

4) レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入

まず、直径 3.5 cm の細胞培養ディッシュに 2×10^6 ずつ播種した Platinum-E 細胞 (パッケージング細胞) に Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Waltham, MA, USA) を用いて発現ベクターを導入した。発現ベクター 4 μ g を無血清 DMEM 250 μ l に希釈した DNA 希釈溶液と、Lipofectamine 2000 10 μ l を無血清 DMEM 250 μ l に希釈した Lipofectamine 希釈溶液とを混合し、室温で 20 分間反応させたあと Platinum-E 細胞培養液に添加した。24 時間後に血清入りの液体培地に交換し、さらに 48 時間培養した。Platinum-E 細胞の培養上清に含まれるウイルスのみを直径 0.45 μ m フィルターで濾過して回収し、10 μ g/ml の polybrane (Invitrogen) を添加したのち MEF 細胞に感染させた。6 時間後に培地交換を行い、24 時培養したのち試薬選択を開始して過剰発現細胞株を得た。

5) 免疫沈降

RabGDI α または RabGDI β を過剰発現させた MEF を、未処理もしくは 10 ng/ml の IFN- γ (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) で 24 時間刺激したのち、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque) と脱リン酸化酵素阻害剤カクテル (Nacalai Tesque) を含む溶解バッファー (0.5 % NP-40、150 mM 塩化ナトリウム、1 mM EDTA と 20 mM Tris-HCl、pH7.5) によって溶解した。細胞溶解産物は、プロテイン G-セファロース (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) で 1 時間プレクリアを行ったのち、記載された抗体 1 μ g とプロテイン G-セファロースとともに 12 時間、4 °C で反応させた。沈殿溶液は、溶解バッファーを用いて 3 回洗浄したのち、Laemli サンプルバッファーにて抽出、解離させた。得られたタンパク質抽出溶液を SDS-PAGE で分離しポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に転写して移行させ、記載された抗体を用いて検出した。

2-3 結果

Flag タグ付きの RabGDI α が、内因性 Gbp2 と IFN- γ 刺激依存的に結合を示すことがわかった (図 2a)。一方、Flag タグ付き RabGDI β と内因性 Gbp2 との結合はみられなかった (図 2b)。

3. RabGDI α および RabGDI β の過剰発現による、 IFN- γ 依存的病原体排除能への影響

3-1 目的

実験 2 で作製した RabGDI α および RabGDI β の恒常発現 MEF を用いて、それぞれの RabGDI の過剰な発現が IFN- γ 依存的な病原体排除能に及ぼす影響について評価を行った。

3-2 材料と方法

1) トキソプラズマ原虫

ルシフェラーゼ発現 *T. gondii* ME49 株は、2 %FBS と 100 U/ml ペニシリンおよび 0.1 mg/ml ストレプトマイシン (Nacalai Tesque, 京都) を含む RPMI 1640 培地 (Nacalai Tesque) にて培養した Vero 細胞に感染させた状態で維持し、3 日毎に継代培養した。

2) ウェスタンブロット

MEF は、1 % NP-40、150 mM 塩化ナトリウム、20 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM EDTA およびプロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque) を含む溶解バッファーにて溶解させた。細胞溶解産物を SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜に転写して移行させたのち、5 %スキムミルク (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) でブロッキングを行った。その後、記載された抗体を用いて処理し ECL (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) と反応させ、タンパク質の発現を検出した。

3) ルシフェラーゼアッセイによる *T. gondii* 数の測定

5×10^5 ずつ播種した MEF を、未処理もしくは 10 ng/ml の IFN- γ で 24 時間刺激したのち、感染後 36 時間の時点におけるルシフェラーゼ発現 *T. gondii* の感染数を評価した (moi = 1)。*T. gondii* の存在量を測定するために、感染細胞を 100 μ l の溶解バッファー (Promega, Madison, WI, USA) で回収し超音波処理を行って溶解させた。4 °C で 15000 rpm の遠心分離後、上清 5 μ l に含まれるルシフェラーゼの活性を、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) および GLOMAX 20/20 luminometer (Promega) を用いて測定した。未刺激の細胞における活性に対する、IFN- γ 刺激された細胞での活性の相対的な割合を示した。

4) 統計解析

実験結果は unpaired Student' s t-test を用いて統計処理を行い、 $P < 0.01$ で有意差検定を行った。すべてのデータはソフトウェア Prism (GraphPad, La Jolla, CA, USA) によって解析した。

3-3 結果

レトロウイルスベクターを用いて MEF に RabGDI α を過剰発現させたところ、IFN- γ 依存的な *T. gondii* の排除が顕著に抑制されていた (図 3a, b)。一方、RabGDI β の過剰発現細胞では、対照群と同様の IFN- γ 依存的な *T. gondii* の排除がみられた (図 3c, d)。

4. 組織特異的 RabGDI α 欠損マウスの作製

4-1 目的

ヒトの RabGDI α をコードする *GDI1* は、X 連鎖性精神発達遅滞の原因遺伝子として同定されており [31, 32], 過去の RabGDI α 欠損マウスにおける解析も脳波異常・行動異常・記憶障害などの脳・神経系の異常を報告するものばかりである [33, 34]。本研究では IFN- γ によって誘導される Gbp2 の結合分子として RabGDI α を同定したので、RabGDI α の IFN- γ 依存的な病原体排除における役割についてより詳細に検討するため、自然免疫担当細胞特異的に RabGDI α を欠損するマウスを作製することにした。

4-2 材料と方法

1) 全身性および組織特異的 *Gdi1* 欠損マウスの作製

すべての動物実験は大阪大学微生物病研究所に申請、承認ののち（承認番号：動微 H23-13-1）、大阪大学動物実験規程指導のもとで行った。C57BL/6 マウスは、SLC（日本エスエルシー社，静岡）のものを使用した。*Gdi1* 遺伝子は、KOD FX NEO（Toyobo, 大阪）を用いた PCR により、ES 細胞（V6.5）由来のゲノム DNA から増幅させた。ターゲティングベクターは、*Gdi1* 遺伝子の 3 kb 断片を PGK プロモーター駆動性ネオマイシン耐性遺伝子（neo）カセットを含む断片で置換できるように設計した。さらに、2~4 番目のエクソンを含む *Gdi1* ゲノム DNA の 3kb 断片は、PGK プロモーター駆動性ジフテリア毒素 A（DTA）断片を含む pKS-SApGKneo-DTA ベクターに、2 つの loxP 配列に挟み込まれるかたちで挿入された。ターゲティングベクターを電気穿孔法で ES 細胞に導入したのち、硫酸ネオ

マイシンアナログである G418 (Nacalai Tesque) に抵抗性を示すクローンを PCR とサザンブロット法により選別した。正しく相同組換えを生じた ES 細胞を C57BL/6 の胚盤胞に注入し、得られたキメラ雄マウスを C57BL/6 雌マウスと交配することによって、生殖細胞系伝達を確認するとともに *Gdil* のヘテロ接合 F1 マウスの作製を行った。今回使用した薬剤耐性カセットにはスプライシング・アクセプター (SA) 配列、終始コドン、poly A 配列が含まれており、標的とする遺伝子領域で相同組組換えによってこのベクターを挿入することにより発現を不活化することができる。全身性の RabGDI α 欠損マウスについては、薬剤耐性カセットによる遺伝子トラップ法を利用して作製した。なお、RabGDI α をコードする *Gdil* 遺伝子は X 染色体上にあるため、雄マウスにおいてはヘテロ接合体で欠損マウスとなる。組織特異的 RabGDI α 欠損マウスについては、さらに *Gdil*^{flox(+neo)/Y} ヘテロ接合雄マウスを CAG-Flpe トランスジェニック雌マウスと交配することによって、2つの FRT 配列で挟み込まれたネオマイシンカセットを取り除いた。マウスのスクリーニングは、尾から抽出した DNA を鋳型にプライマー (RabGDI α _screening_F および RabGDI α _WT_R) (表 1) を用いた PCR によって行った。さらに、ネオマイシンカセットを除去したヘテロ接合 *Gdil*^{flox/+}雌マウスを、*LysM* プロモーター依存的に Cre リコンビナーゼを発現する *LysM*-Cre トランスジェニックマウスと交配し、ミエロイド系細胞特異的に RabGDI α を欠損するマウスを作製した。

2) 定量的リアルタイム PCR

細胞からの全 RNA はセパゾール (Nacalai Tesque) を用いて抽出し、cDNA は Verso Reverse Transcriptase (Thermo scientific) を使って合成した。リアルタイム PCR は Go-Taq Real-Time PCR system (Promega) と CFX connect real-time PCR system (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) を使用して行い、タンパク質の発現量は各試料における β -アクチンの発現量をもとに正規化した。以下に使用したプライマーセットを示す: (*Gdi1* のための RabGDI α _qpF と RabGDI α _qpR、*Actb* のための Actin_qpF と Actin_qpR) (表 1)。

4-3 結果

RabGDI α の生理学的な役割をさらに評価するために、ミエロイド系細胞でのみ RabGDI α を欠損するコンディショナル・ノックアウトマウスを、古典的な ES 細胞を用いた遺伝子ターゲティング法により作製した (図 4a)。ES 細胞を用いたサザンブロットにより正しい相同組換えが生じていることを認め (図 4b)、マウスの尾から抽出したゲノム DNA を鋳型にした PCR によりネオマイシンカセット除去後の flox アリルのバンドシフト (FRT 配列および loxP 配列を含む約 150 bp 分だけ野生型アリルより上方に移動する) を確認した (図 4c)。また、RabGDI α コンディショナル・ノックアウトマウス由来の腹腔内マクロファージにおいて、RabGDI α の mRNA の発現が消失していることを確認した (図 4d)。

5. RabGDI β 欠損細胞の作製

5-1 目的

次に、RabGDI β の IFN- γ 依存的な病原体排除における役割について詳細に検討するために、RabGDI β 欠損細胞を作製した。

5-2 材料と方法

Cas9/CRISPR ゲノム編集技術を用いた *Gdi2* 欠損細胞の作製

C57BL/6 および B6C3F1 マウスは、SLC 社のものを使用した。*Gdi2* の gRNA 挿入断片は、KOD FX NEO (Toyobo) と以下のプライマーセットを用いて増幅した：(Gdi2_gRNA1_F と Gdi2_gRNA1_R, Gdi2_gRNA2_F と Gdi2_gRNA2_R) (表 1)。gRNA 発現プラスミドを作製するために、gRNA 用の断片を Gibson Assembly mix (New England Biolab, Ipswich, MA, USA) を用いて gRNA クローニング・ベクター (Plasmid #41824 ; Addgene, Cambridge, MA, USA) に挿入した。さらに、T7 プロモーターを KOD FX NEO と以下のプライマーを用いて gRNA テンプレートに追加した：(Gdi2_T7gRNA_F および gRNA_common_R)。T7-Gdi2 の gRNA 用 PCR 産物は、ゲル濾過したのち合成 gRNA として使用した。MEGAscript T7 (Life Technologies, Waltham, MA, USA) を gRNA の合成に用いた。Cas9 mRNA は、mMESSAGE mMACHINE T7 ULTRA kit (Life Technologies) と鋳型 DNA (pEF6-hCas9-Puro とプライマーT7Cas9_IVT_F および Cas9_R を用いて作製) を使用して *in vitro* 転写反応 (IVT) で合成し、ゲル濾過を行った [25]。合成された gRNA と Cas9mRNA は、MEGAclear kit (Life Technologies) を使って生成し、RNA 分解酵素を含まない精製水 (Nacalai tesque) によって溶解した。6 週齢の B6C3F1

(C57BL/6 × C3H) 雌マウスを過排卵させ、B6C3F1 雄マウスと交配させた。受精した一細胞期胚を卵管から回収し、以前の報告 [35]に従って、Cas9 mRNA (100 ng/μl) と gRNA (50 ng/μl) を前核または細胞質に導入した。遺伝子導入後も生き残った胚を、交尾後 0.5 日の偽妊娠 ICR 雌マウスの卵管に移植した。結果として生じた *Gdi2* 遺伝子の変化は、プライマーを用いたスクリーニングを行い確認した：(RabGDIβ_KO_F と RabGDIβ_KO_R)。さらに、変異を起こした遺伝子座を持つ雄マウスを C57BL/6 雌マウスと交配することによって、生殖細胞系伝達を確認した。ヘテロ接合マウスについて、ホモ型接合 RabGDIβ 欠損胚を作製するための交配を行うことで初代培養 MEF を得た。

5-3 結果

RabGDIβ欠損細胞を CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術によって作製した (図 5a)。2つの gRNA に挟まれた領域の欠失は、PCR およびシーケンシングにより確認した (図 5a, b)。

6. マウス胎児線維芽細胞 (MEF) における、IFN- γ 依存的病原体排除能への RabGDI α および RabGDI β 欠損の影響

6-1 目的

実験4、実験5で作製した RabGDI α および RabGDI β の欠損 MEF を用いて、IFN- γ 依存的な病原体排除機構におけるそれぞれの RabGDI の欠損による影響を評価した。

6-2 材料と方法

1) 試薬

抗 RabGDI β 抗体 (sc-133939 ; Santa Cruz Biotechnology) および抗 Actin 抗体 (A1978 ; Sigma Aldrich) を用いた。

2) 定量的リアルタイム PCR

前述 (実験4) と同一の方法で行った。

3) ウェスタンブロット

前述 (実験3) と同一の方法で行った。

4) ルシフェラーゼアッセイによる *T. gondii* 数の測定

5×10^5 ずつ播種した MEF を、未処理もしくは記載された濃度の IFN- γ で 24 時間刺激したのち、moi = 1 で感染した 36 時間後の時点におけるルシフェラーゼ発現 *T. gondii* の感染数を、前述 (実験3) と同一の方法で評価した。

5) 統計解析

実験結果は unpaired Student' s t-test を用いて統計処理を行い、 $P < 0.05$ で有意差検定を行った。

6-3 結果

それぞれの MEF における RabGDI の発現の消失を、RabGDI α については定量的リアルタイム PCR にて、RabGDI β についてはウエスタンブロットにて確認したのち (図 6a, c) 、IFN- γ 依存的な病原体排除能を評価した。各欠損細胞を用いた解析の結果、RabGDI α 欠損 MEF では、野生型細胞に比べて IFN- γ の用量依存的な原虫数の減少が有意に増強されていた (図 6b) 。対照的に、RabGDI β 欠損 MEF は、野生型細胞と同様の反応を示した (図 6d) 。

ここまでに得られたデータをまとめると、RabGDI β ではなく RabGDI α こそが Gbp2 と結合することが明らかとなり、おそらく MEF における IFN- γ 依存的な *T. gondii* の排除機構において抑制的に作用していることが示された。

7. ミエロイド系細胞特異的 RabGDI α 欠損マウスの *in vivo* における *T. gondii* 抵抗性の評価

7-1 目的

マクロファージなどの自然免疫担当細胞が、*in vivo* での *T. gondii* に対する IFN- γ 介在性免疫応答においてきわめて重要な役割を果たすことが知られている [36]。そこでマクロファージにおける RabGDI α の生理学的役割を分析するために、ミエロイド系細胞特異的に RabGDI α を欠損させたマウスに対して、*T. gondii* の感染実験を行った。

7-2 材料と方法

1) イメージング技術を用いた原虫の *In vivo* 解析

8 - 12 週齢の雌マウスを用いて感染実験を行った。ルシフェラーゼを恒常発現している *T. gondii* ME49 株の増殖体を 5×10^3 ずつ 100 μ l のリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline : PBS) に懸濁し、腹腔内投与にてマウスに感染させた。感染後、示された日数での生物学的発光を測定した。生物学的発光を検出するために、まずイソフルラン (大日本住友製薬, 大阪) で麻酔をかけたマウスの腹腔内に、200 μ l PBS に溶解させた 3 mg の D-ルシフェリン (Promega, Madison, WI, USA) を注入後、ルシフェリンが適度に腹腔内に分散するよう 5 分間待機した。ルシフェリン注入後 10 分が経過した時点で、腹腔内の発光強度を *in vivo* イメージング装置 (IVIS- Spectrum ; Xenogen, Grantham, LIN, UK) にて 60 秒間露光し検出した。画像解析は Living image software (Xenogen) を使用して行った。

2) ルシフェラーゼアッセイによる *in vivo* での原虫数の測定

脾臓および腸間膜リンパ節 (mesenteric lymph nodes : MLNs) における *T. gondii* 数を測定するために、感染 8 日目の臓器を回収した。脾臓は 5 ml の PBS で均質化して 4 °C、8000 rpm で遠心分離したのち、沈殿物を 200 μ l の Passive Lysis Buffer (Promega) 中で超音波処理を行い溶解した。MLNs は 500 μ l の溶解バッファー中で均質化し超音波処理を行った。溶解産物を 4 °C、15000 rpm で遠心分離したのち、上清 5 μ l 中のルシフェラーゼ活性を、前述のとおり Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて測定した。また、ルシフェラーゼ活性ユニットをもとに原虫数を算出するため、ルシフェラーゼ (および YFP) を発現している *T. gondii* ME49 株の段階希釈溶液を、原虫数 $10^4 - 10^7$ の範囲内で \log_{10} ごとに調整し、溶解させてから上記の方法でルシフェラーゼ活性の測定を行った。その結果、ほぼ直線に近い標準曲線が得られた (図 7c, d)。

3) 血清中のサイトカインの測定

T. gondii ME49 株を感染後 3、6、9 日目にマウスから回収した血清中に含まれる炎症性サイトカインの濃度は、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) によって測定した。IFN- γ については捕捉抗体 (XMG1.2 ; eBioscience, San Diego, CA, USA) および検出抗体 (R4-6A2 ; eBioscience)、IL-12 p40 については捕捉抗体 (C15.6 ; eBioscience) および検出抗体 (C17.8 ; eBioscience) を用いた。

4) 統計解析

感染マウスの生存率 (図 7f) については、log-rank test を用いて統計処理を行い $P < 0.01$ で有意差検定を行った。他の実験結果は unpaired Student' s t-test を用いて統計処理を行い、有意差を検定した ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$)。

7-3 結果

対照群とミエロイド系細胞特異的 RabGDI α 欠損マウスについて高用量の *T. gondii* を腹腔内に感染させ、原虫の腹腔内での広がり、免疫器官での増殖およびマウスの生存率を評価した。*In vivo* イメージング解析の結果、感染後 7 日目および 9 日目の原虫の腹腔内での広がりを示すシグナルは、対照群のマウスに比べてミエロイド系細胞特異的 RabGDI α 欠損マウスにおいて顕著に抑制されていた (図 7a, b)。次に、感染したマウスから回収した脾臓および腸間膜リンパ節 (MLN) に含まれる原虫数を、検量線 (図 7c, d) をもとにルシフェラーゼ活性から算出した。その結果、感染したミエロイド系細胞特異的 RabGDI α 欠損マウスから回収した脾臓および腸間膜リンパ節 (MLN) に含まれる原虫数は対照群マウスより有意に減少していた (図 7e) さらに、感染したミエロイド系細胞特異的 RabGDI α 欠損マウスの生存率についても、対照群マウスと比較して有意に延長していることが明らかになった (図 7f)。しかし、感染した対照群とミエロイド系細胞特異的 RabGDI α 欠損マウスにおける血清中の IL-12 p40、IFN- γ 濃度は同様であったことから (図 7g)、ミエロイド系細胞特異的 RabGDI α 欠損マウスが示す *T. gondii* に対する低感受性は IL-12 p40 または IFN- γ の産生欠如によるものではないことが明らかになった。

8. マクロファージにおける IFN- γ 依存的病原体排除能への RabGDI α 欠損の影響

8-1 目的

次に、RabGDI α の欠損がマクロファージにおける IFN- γ 依存的な原虫の増殖抑制や殺傷能に影響を及ぼすかどうかを評価するために、*in vitro* においてルシフェラーゼアッセイおよび蛍光免疫染色を行った。

8-2 材料と方法

1) 細胞

マウス腹腔マクロファージはチオグリコレート溶液を注入した72時間後にマウス腹腔内より回収し、10 %FBS、100 U/ml ペニシリンおよび0.1 mg/ml ストレプトマイシンを含有する RPMI 1640 培地にて培養した。

2) 試薬

抗 CD11b 抗体 (M1/70 ; eBioscience) を使用した。*T. gondii* を染色する抗 GAP45 抗体は、D. Soldati-Favre 博士 (Department of Microbiology and Molecular Medicine, University of Geneva Medical School, Geneva, Switzerland) から分与されたものを用いた。

3) ルシフェラーゼアッセイによる *T. gondii* 数の測定

1 × 10⁶ ずつ播種した腹腔内マクロファージを、未処理もしくは 10 ng/ml の IFN-γ で 24 時間刺激したのち、記載された期間におけるルシフェラーゼ発現 *T. gondii* の感染数を評価した (moi = 0.5)。さらに、1 × 10⁶ ずつ播種した腹腔内マクロファージを未処理もしくは記載された濃度の IFN-γ で 24 時間刺激したのち、感染後 36 時間の時点におけるルシフェラーゼ発現 *T. gondii* の感染数を、前述 (実験 3) と同一の方法で評価した。

4) 免疫蛍光染色

T. gondii (moi = 0.5) で感染させたマクロファージを 3.7 %ホルムアルデヒド含有 PBS で 10 分間処理して固定し、0.1 % トライトン X-100 を含む PBS で透過処理したのち、8 %ウシ胎児血清含有 PBS によってブロッキング処理を行った。その後、ウサギ抗 GAP45 抗体 (1 : 500)、マウス抗 CD11b 抗体 (1 : 500) によって 37 °C で 1 時間反応させ、その後二次抗体として Alexa Fluor 488-結合抗ウサギ IgG 抗体、Alexa Fluor 594-結合抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen) で 37 °C、暗所にて 1 時間処理した。核は DAPI (和光純薬工業, 大阪) によって共染色を行った。最後に、免疫染色した細胞を PermaFluor (Thermo Scientific) によってスライドガラス上に設置し、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1200 IX-83 ; Olympus, 東京) を用いて分析した。画像解析は Fluoview (Olympus) を使用して行った。

5) 統計解析

実験データにおける統計学的有意差は、unpaired Student' s t-test を用いて検定した (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001)。

8-3 結果

MEF の場合と同様に、RabGDI α を欠損したマクロファージでは、時間・用量依存的な IFN- γ 依存性の原虫数の減少が増強されていた (図 8a, b)。対照群あるいはミエロイド系細胞特異的 RabGDI α 欠損マウス由来のマクロファージにおける、原虫の感染率と増殖を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ (図 8c - e)、感染 3 時間後の時点では対照群と RabGDI α 欠損細胞の間に *T. gondii* 感染細胞の割合は同等であった (図 8c)。それに対して、感染 24 時間および 36 時間の時点になると RabGDI α 欠損マクロファージにおける感染率は、対照群の細胞に比べて有意に低下していることがわかった (図 8c, d)。このことは、IFN- γ 誘導性の原虫殺傷能が RabGDI α 欠損により強化されたことを示している。対照群および RabGDI α 欠損マクロファージにおける原虫の増殖を PCV 中の原虫数を計測することにより評価してみると、RabGDI α 欠損細胞では PCV における *T. gondii* の数が対照群と同様であることが明らかになった (図 8e)。このことから、RabGDI α は、IFN- γ 依存的な PCV での *T. gondii* の増殖抑制ではなく、IFN- γ 依存的な原虫殺傷能に関与することが示された。

9. RabGDI α の欠損が IRG の細胞内動態に与える影響

9-1 目的

T. gondii に対する IFN- γ 誘導性の殺傷機構は、p47 IRG に依存的であることが知られている [6, 37]。そこで、IFN- γ 刺激された野生型もしくは RabGDI α マクロファージにおける 2 つの異なる p47 IRG ファミリーメンバー、Irga6 および Irgb6 (TGTP としても知られる) の *T. gondii* への集積を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

9-2 材料と方法

1) 試薬

抗 Irgb6 (TGTP ; sc-11079 ; Santa Cruz Biotechnology) 、抗 Flag 抗体 (F3165 ; Sigma Aldrich) および抗 Actin 抗体 (A1978 ; Sigma Aldrich) を使用した。*T. gondii* を染色する抗 GAP45 抗体と抗 Irga6 (10D7) はそれぞれ、D. Soldati-Favre 博士および J. C. Howard 博士 (Institute for Genetics, University of Cologne, Cologne, Germany) から分与されたものを用いた。。

2) 免疫蛍光染色

MEF は moi = 4、マクロファージは moi = 0.5 の *T. gondii* (moi = 0.5) で感染させた。それぞれの感染細胞は前述 (実験 8) と同一の方法で処理され、一次抗体にはウサギ抗 GAP45 抗体 (1 : 500) 、マウス抗 Irga6 抗体 (1 : 100) およびヤギ抗 Irgb6 抗体 (1 : 100) 、二次抗体として Alexa Fluor 488-結合抗ウサギ IgG 抗体、Alexa Fluor 594-結合抗マウス IgG 抗体または Alexa Fluor 594-抗ヤギ IgG 抗体を用いた。

3) ウェスタンブロット

前述（実験 3）と同一の方法で行った。

4) 免疫沈降

前述（実験 2）と同一の方法で行った。

5) 統計解析

統計学的有意差は、unpaired Student's t-test を用いて検定した（* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ ）。

9-3 結果

対照群に比べて RabGDI α 欠損マクロファージでは、感染 3 時間後および 6 時間後の原虫への Irga6 の集積の割合が有意に増加していた（図 9a, b）。対照的に、Irgb6 の *T. gondii* への集積に関しては、検討したどの時点においても対照群と RabGDI α 欠損マクロファージとの間に有意差はなかった（図 9c, d）。さらに、RabGDI α 欠損 MEF でもまた、検討したほとんどの時点で野生型細胞に比べて原虫への Irga6 の集積が有意に増大した（図 9e, f）。また、Irga6 のタンパク質の発現量は野生型および RabGDI α 欠損 MEF で同等であったことから、RabGDI α による Irga6 の集積への抑制的な効果はタンパク質の発現レベルによるものではなかった（図 9g）。さらに、共沈免疫沈降実験によって RabGDI α と Irga6 の間の結合についても検討を行ったが、両分子の結合は検知されなかった（図 9h）。したがって、*T. gondii* に集積する Irga6 の割合の増加は、RabGDI α 欠損により間接的に引き起こされている可能性が示された。

10. RabGDI α の欠損が GBP の細胞内動態に与える影響

10-1 目的

もともと RabGDI α は Gbp2 に結合するタンパク質として同定した分子である (図 2a)。そこで次に、RabGDI α が Gbp2 と特異的に結合するのか、それとも他の p65 GBP ファミリーメンバーとも相互作用するのかを確認するために、免疫沈降実験を行った。また、野生型および RabGDI α 欠損 MEF における各々の p65 GBP の *T. gondii* への集積についても共焦点レーザー顕微鏡解析にて比較した。

10-2 材料と方法

1) 試薬

抗 Gbp1 抗体 (sc-10586 ; Santa Cruz Biotechnology)、抗 Gbp2 抗体 (sc-10588 ; Santa Cruz Biotechnology)、抗 Flag 抗体 (F3165 ; Sigma Aldrich) および抗 Actin 抗体 (A1978 ; Sigma Aldrich) および抗 HA 抗体 (HA.11 ; MMS-101R ; Covance, Princeton, NJ, USA) を使用した。*T. gondii* を染色する抗 GAP45 抗体は D. Soldati-Favre 博士から分与されたものを用いた。

2) 発現ベクター

発現ベクターを構築するための cDNA 断片は、以下のプライマーセットを用いて増幅した : (Gbp1_F と Gbp1_R ; Gbp2_F と Gbp2_R ; Gbp3_F と Gbp3_R ; Gbp5_F と Gbp5_R ; Gbp5_F2 と Gbp5_R2 ; Gbp7_F と Gbp7_R) (表 1)。各 Gbp の cDNA は、pMRX-Blasticidin ベクターに挿入されることで N 末端に HA タグを付与した。

すべての構築の塩基配列は、シーケンシングを行い確認した。Flag-Gbp1 発現ベクターは Dr. Eva-Maria Frickel (Division of Parasitology, MRC National Institute for Medical Research, London, UK) より分与されたものを使用した。

3) 免疫沈降

前述（実験 2）と同一の方法で行った。

4) ウェスタンブロット

前述（実験 3）と同一の方法で行った。

5) 免疫蛍光染色

MEF は、*T. gondii* (moi = 4) で感染させた。それぞれの感染細胞を前述（実験 8）と同一の方法で処理し、一次抗体にはウサギ抗 GAP45 抗体（1 : 500）、マウス抗 Flag 抗体（1 : 500）およびマウス抗 HA 抗体（1 : 500）、その後二次抗体として Alexa Fluor 488-結合抗ウサギ IgG 抗体、Alexa Fluor 594-結合抗マウス IgG 抗体で反応させた。

6) 統計解析

実験結果は unpaired Student' s t-test を用いて処理を行い、 $P < 0.001$ で有意差検定を行った。

10-3 結果

Flag タグを付けた RabGDI α は、内在性 Gbp2 と共沈澱したが、Gbp1 とは結合しなかった (図 10a)。次に、野生型および RabGDI α 欠損 MEF において各々の p65 Gbp を強制発現させた細胞株を作製し、ウエスタンブロットにて発現を確認した (図 10b, c)。さらに、野生型および RabGDI α 欠損 MEF における各 GBP の病原体への集積について共焦点レーザー顕微鏡を用いて比較したところ、*T. gondii* への Gbp1、Gbp3、Gbp5 および Gbp7 の集積の割合は同等であったが、Gbp2 の集積だけは野生型細胞と比較して RabGDI α 欠損 MEF で有意に増大していた (図 10d, e)。これらの結果から、RabGDI α は他の p65 GBP ではなく Gbp2 と特異的に結合することが明らかとなった。

11. Gbp2 と Irga6 の細胞内における局在の検討

11-1 目的

ここまでの結果から、RabGDI α 欠損細胞において p47 IRG と p65 GBP のうち、Irga6 と Gbp2 が同様の動態を示していることが示唆された。過去の報告では、p65 GBP^{chr3} が *T. gondii* に集積する Irgb6 と Irgb10 を調節していることや [10]、*T. gondii* 寄生胞への Irgb6 の集積に Gbp1 が重要であることが示されている [9]。このように、p47 IRG と p65 GBP の分子間にはつながりがある可能性が示唆されているものの、Irga6 と Gbp2 の間の具体的な相互作用については未だ明らかではない。そこで次に、IFN- γ 刺激した MEF における *T. gondii* 寄生胞上での Irga6 と Gbp2 の局在について検討を加えた。

11-2 材料と方法

1) 試薬

抗 HA 抗体 (H6908 ; Sigma Aldrich) および抗 *T. gondii* 抗体 (#0281 ; ViroStat, Portland, ME, USA) を使用した。抗 Irga6 抗体 (10D7) は J. C. Howard 博士から分与されたものを用いた。

2) 免疫蛍光染色

MEF は、*T. gondii* (moi = 4) で感染させた。それぞれの感染細胞を前述 (実験 8) と同一の方法で処理し、一次抗体にはヤギ抗 *T. gondii* 抗体 (1 : 100) 、マウス抗 Irga6 抗体 (1 : 100) およびウサギ抗 HA 抗体 (1 : 100) 、二次抗体として Alexa

Fluor 647-結合抗マウス IgG 抗体、Alexa Fluor 594-結合抗ウサギ IgG 抗体、Alexa Fluor 488-抗ヤギ IgG 抗体を用いた。

3) *In situ* proximity-ligation assay (PL アッセイ)

Duolink *In situ* PLA Kit (Olink Bioscience, Uppsala, Sweden) をメーカーの指示手順に従って用いた。まず MEF を YFP 発現 *T. gondii* (moi = 4) で感染させ、免疫蛍光染色と同一の方法で固定し、透過処理した。抗体バッファーで希釈した一次抗体 (ウサギ抗 HA (1 : 100) およびマウス抗 Irga6 抗体 (1 : 100)) で 37 °C、1 時間反応させ、洗浄バッファー A にて震盪条件下で洗浄した。その後、抗体バッファーに 1 : 5 で希釈した PLA プローブ (Duolink 抗マウス PLA MINUS および抗ウサギ PLA PLUS) を用いてスライドを 37 °C で 1 時間反応させ、洗浄バッファー A で震盪させながら洗浄した。次に、PLA プローブをライゲーション反応させるため、37 °C で 30 分間、ライゲーションバッファー[抗体バッファーにライゲーション溶液を 1 : 5、リガーゼを 1 : 40 に希釈]を用いて反応させ、洗浄バッファー A で洗浄を行った。さらに、増幅ポリメラーゼバッファー[抗体バッファーに増幅用溶液を 1 : 5、ポリメラーゼを 1 : 80 に希釈]をスライドに加え 37 °C で 100 分間反応させた後、洗浄バッファー B にて洗浄を行った。最後に、1/100 希釈した洗浄バッファー B で 1 分間最終洗浄を行い、スライドを DAPI 含有 Duolink マウンティング溶液 (Olink Bioscience) にて封入した。作製したスライドガラスを共焦点レーザー顕微鏡により分析した。

4) 統計解析

実験結果は unpaired Student' s t-test を用いて統計処理を行い、 $P < 0.001$ で有意差検定を行った。

11-3 結果

共焦点レーザー顕微鏡観察および蛍光シグナル強度分析によって、同様な位置で Irga6 と Gbp2 タンパク質が共局在していることが示された (図 11a, b) 。さらに、Irga6 と Gbp2 がきわめて近接した位置 (<16 nm) にあるかを検討するために、proximity ligation (PL) アッセイを行った[38]。その結果、PL シグナルは IFN- γ で刺激されていない細胞では全く観察されず (図 11c) 、対照的に IFN- γ 刺激した細胞においては HA タグを付けた Gbp2 と内在性 Irga6 の間に強い PL シグナルが観察された。さらに、RabGDI α 欠損 MEFs では野生型細胞に比べて Gbp2 と Irga6 の間の PL シグナルを伴う *T. gondii* の数が顕著に増加していた (図 11d, e) 。

12. Gbp2 欠損細胞の作製

12-1 目的

Irga6 と Gbp2 の間の関係を直接的に評価するために、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により Gbp2 欠損細胞を作製した。

12-2 材料と方法

1) マウス

C57BL/6 および B6C3F1 マウスは、SLC 社のものを使用した。

2) Cas9/CRISPR ゲノム編集技術を用いた *Gbp2* 欠損細胞の作製

Gbp2 の gRNA 挿入断片は、KOD FX NEO (Toyobo) と以下のプライマーセットを用いて増幅した：(Gbp2_gRNA1_F と Gbp2_gRNA1_R) (表 1)。gRNA 発現プラスミドを作製するために、gRNA 用の断片を Gibson Assembly mix (New England Biolab) を用いて gRNA クローニング・ベクター (Plasmid #41824 ; Addgene) に挿入した。さらに、T7 プロモーターを KOD FX NEO と以下のプライマーを用いて gRNA テンプレートに追加した：(Gbp2_T7gRNA_F および gRNA_common_R)。T7-Gbp2 の gRNA 用 PCR 産物は、ゲル濾過したのち合成 gRNA として使用した。MEGAscript T7 (Life Technologies) を gRNA の合成に用いた。Cas9 mRNA の合成は前述 (実験 5) と同一の方法で行った。6 週齢の C57BL/6 雌マウスを過排卵させ、C57BL/6 雄マウスと交配させた。受精した一細胞期胚を卵管から回収し、Cas9 mRNA (100 ng/μl) と gRNA (50 ng/μl) を前核または細胞質に導入した。遺伝子導入後も生き残った胚を、交尾後 0.5 日目の偽妊娠 ICR 雌マウスの卵管に移

植し、13.5 日齢の胚を初代培養 MEF 作製のために回収した。その結果生じた MEF の *Gbp2* 遺伝子の変化は、以下のプライマーを用いて確認した；(*Gbp2_indel_F* と *Gbp2_indel_R*)。さらに、*Gbp2* タンパク質の発現を、抗 *Gbp2* 抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した。

3) 試薬

抗 *Gbp2* 抗体 (sc-10588 ; Santa Cruz Biotechnology) および抗 Actin 抗体 (A1978 ; Sigma Aldrich) を使用した。抗 *Irga6* (10D7) は J. C. Howard 博士から分与されたものを用いた。

4) ウエスタンブロット

前述 (実験 3) と同一の方法で行った。

12-3 結果

Gbp2 欠損細胞は CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術によって作製した (図 12a)。導入された遺伝子変異はシーケンシングにより確認を行い、一塩基欠失および一塩基置換、あるいは 2 塩基置換によってフレームシフト変異を生じていることが確認できた (図 12a)。タンパク質レベルでの発現の消失はウエスタンブロットにより確認し、IFN- γ 刺激によって *Irga6* タンパク質は同様に誘導される一方、*Gbp2* タンパク質は *Gbp2* 欠損 MEF では検出されないことが確認された (図 12b)。

13. Gbp2 の欠損が IFN- γ 依存的病原体排除能および

Irga6 の集積に与える影響

13-1 目的

Gbp2 の IFN- γ 依存的な原虫の殺傷能における役割および Irga6 との相互作用をより直接的に評価するために、実験 12 で作製した Gbp2 欠損 MEF を用いてルシフェラーゼアッセイおよび蛍光免疫染色を行った。

13-2 材料と方法

1) 試薬

抗 Irgb6 抗体 (sc-11079 ; Santa Cruz Biotechnology) を使用した。*T. gondii* を染色する抗 GAP45 抗体と抗 Irga6 抗体 (10D7) はそれぞれ、D. Soldati-Favre 博士および J. C. Howard 博士から分与されたものを用いた。

2) ルシフェラーゼアッセイによる *T. gondii* 数の測定

5×10^5 ずつ播種した MEF を、未処理もしくは 10 ng/ml の IFN- γ で 24 時間刺激したのち、moi = 1 で感染した 36 時間後の時点におけるルシフェラーゼ発現 *T. gondii* の感染数を、前述 (実験 3) と同一の方法で評価した。

3) 免疫蛍光染色

T. gondii (moi = 4) で感染させた細胞を前述 (実験 8) と同一の方法で処理した。一次抗体にはウサギ抗 GAP45 抗体 (1 : 500) およびマウス抗 Irga6 抗体 (1 : 100)、二次抗体としては Alexa Fluor 594-結合抗マウス IgG 抗体、Alexa Fluor 488-結合抗ウサギ IgG 抗体を用いた。

4) 統計解析

実験データにおける統計学的有意差は、unpaired Student' s t-test を用いて検定した (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) 。

13-3 結果

野生型の細胞に比べて、Gbp2 欠損細胞では IFN- γ 依存的な *T. gondii* の排除能が抑制されていた (図 13a) 。さらに、Gbp2 欠損 MEF での Irgb6 の *T. gondii* への集積は野生型細胞と同様であった (図 13d, e) 一方で、Irga6 の集積は野生型細胞に比べて有意に低下していた (図 13b, c) 。この結果は RabGDI α 欠損 MEF において観察された結果 (図 9e, f) とは真逆の減少を示していた。これらの結果から、Gbp2 は Irga6 の *T. gondii* の PCV への集積を正に制御していることが明らかになった。

14. Gbp2 の N 末端ヌクレオチド結合ドメインおよび

C 末端プレニル化ドメインの、病原体排除能における 役割の検討

14-1 目的

Gbp2 を含む p65 GBP は、2 つの構造ドメイン、すなわち、N 末端の球状のヌクレオチド結合ドメイン（GTP-結合モチーフが位置している）と C 末端のプレニル化ドメインを有している [11, 27, 39]。そこで次に、*T. gondii* に対する応答における Gbp2 の GTP-結合状態およびプレニル化の役割を評価するために、各ドメインの変異体を作製し Gbp2 欠損細胞に発現させて Gbp2 の機能が回復するかを検討した。

14-2 材料と方法

1) 試薬

抗 Actin 抗体（A1978; Sigma Aldrich）および抗 HA 抗体（MMS-101R; Covance）を使用した。*T. gondii* を染色する抗 GAP45 抗体は、D. Soldati-Favre 博士から分与されたものを用いた。

2) 発現ベクター

点変異を含む一連の Gbp2 変異株用のベクターは、以下のプライマーを用いて合成した：（C586S のための Gbp2_C586S_R ; K51A のための K51A および Gbp2_F）（表 1）。Gbp2 変異株のための cDNA は pMRX-Blasticidin ベクターに挿入し、N

末端に HA タグを付与した。すべての構築の塩基配列はシーケンシングを行い確認した。

3) ウェスタンブロット

前述（実験 3）と同一の方法で行った。

4) ルシフェラーゼアッセイによる *T. gondii* 数の測定

5×10^5 ずつ播種した MEF を、未処理もしくは 10 ng/ml の IFN- γ で 24 時間刺激したのち、moi = 1 で感染した 36 時間後の時点におけるルシフェラーゼ発現 *T. gondii* の感染数を、前述（実験 3）と同一の方法で評価した。

5) 免疫蛍光染色

MEF は、*T. gondii* (moi = 4) で感染させた。それぞれの感染細胞を前述（実験 8）と同一の方法で処理し、一次抗体としてウサギ抗 GAP45 抗体（1 : 500）マウス抗 Irga6 抗体（1 : 100）およびマウス抗 HA 抗体（1 : 500）、二次抗体として Alexa Fluor 594-結合抗マウス IgG 抗体、Alexa Fluor 488-結合抗ウサギ IgG 抗体を用いた。

6) 統計解析

実験結果は ANOVA および Tukey test を用いて統計処理を行い、 $P < 0.01$ で有意差検定を行った。

14-3 結果

T. gondii に対する応答における GTP-結合状態と Gbp2 のプレニル化の役割を評価するために、Gbp2 の 51 番目のリジン残基あるいは 586 番目のシステイン残基がアラニンまたはセリンにそれぞれ置換された K51A 変異体と C586S 変異体を作製した (図 14a)。K51A は、ヒト GBP1 において GTP や GDP を含むヌクレオチドに対する結合不全をしめす変異体である [40]。C586S 変異は、ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ I による Gbp2 の脂質修飾 (プレニル化) を欠いた変異体である [41, 42]。これらの変異体を Gbp2 欠損 MEF に発現させ、*T. gondii* の IFN- γ 依存的な殺傷および Irga6 の集積について評価した (図 14b)。その結果、野生型の Gbp2 を発現した Gbp2 欠損 MEFs は IFN- γ 依存的な原虫数の減少と、Irga6 および Gbp2 の集積を回復した。一方、K51A および C586S 変異体を発現させても、IFN- γ 依存的病原体排除能における Gbp2 の機能は戻らなかった (図 14c - e)。このことは、Gbp2 のヌクレオチド結合とプレニル化が IFN- γ 依存的な細胞性免疫応答に必須であることを示している。

15. RabGDI α の IFN- γ 誘導性免疫応答に対する阻害作用における、Rab 結合ドメインの役割の検討

15-1 目的

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 [43]。RabGDI による膜からのプレニル化された Rab の抜き取りは、RabGDI と Rab の直接的な相互作用、すなわち Rab 結合ドメインおよび脂質結合ポケット (Rab のプレニル化された脂質修飾部位が挿入される [44, 45]) における結合によって生じる [28, 44, 46, 47]。これまでに知られている RabGDI α のこの 2 つのドメインの重要性は、もともと Rab との相互作用の観点からに特徴付けられたものである。しかし、IFN- γ 誘導性の細胞自律性免疫の観点から、それらのドメインがどのように機能しているのかは未だ明らかではない。そこでまず、PL アッセイを用いて RabGDI α と Gbp2 の間の相互作用の局在化について分析を行った。さらに、RabGDI α の Rab 結合ドメインの変異体を作製し RabGDI α 欠損細胞に発現させて RabGDI α の機能が回復するかを検討した。

15-2 材料と方法

1) 試薬

抗 Gbp2 抗体 (sc-10588 ; Santa Cruz Biotechnology) 、抗 Flag 抗体 (F3165 ; Sigma Aldrich) 、抗 HA 抗体 (H6908 ; Sigma Aldrich) および抗 Actin 抗体 (A1978 ; Sigma Aldrich) を使用した。

2) 発現ベクター

点変異を含む一連の RabGDI α 断片は、以下のプライマーを用いて作製した：
(Y39V のための RabGDI α _F と RabGDI α _Y39V_R ; R218A/Y219A のための RabGDI α _R218A/Y219A_F と RabGDI α _R218A/Y219A_R ; E233S/R240A のための RabGDI α _E233S/R240A_F と RabGDI α _E233S/R240A_R) (表 1)。RabGDI α の Y39V、R218A/Y219A、E233S/R240A の cDNA は、pcDNA および pMRX-Puromycin に挿入して C 末端に Flag タグを付与した。Rab10 の cDNA は、Rab10_F と Rab10_R プライマーを使って増幅し、pcDNA ベクターにクローニングすることで N 末端に HA タグを付与した。すべての構築の塩基配列は、シーケンシングを行い確認した。

3) *In situ* proximity-ligation assay (PL アッセイ)

一次抗体としてウサギ抗 HA (1 : 100) およびマウス抗 Flag 抗体 (1 : 500) を用い、前述 (実験 11) と同一の方法で行った。

4) 免疫沈降

前述 (実験 2) と同一の方法で行った。

5) ルシフェラーゼアッセイによる *T. gondii* 数の測定

5×10^5 ずつ播種した MEF を、未処理もしくは 10 ng/ml の IFN- γ で 24 時間刺激したのち、moi = 1 で感染した 36 時間後の時点におけるルシフェラーゼ発現 *T. gondii* の感染数を、前述 (実験 3) と同一の方法で評価した。

6) 統計解析

実験結果は ANOVA および Tukey test を用いて統計処理を行い、 $P < 0.05$ で有意差検定を行った。

15-3 結果

まず、PL アッセイを用いて RabGDI α と Gbp2 の間の相互作用の局在化について分析を行ったところ、原虫の周囲で強く検出された Irga6 と Gbp2 の間の相互作用 (図 11c, d) と比較すると、HA タグ付きの Gbp2 と RabGDI α の結合を示す PL シグナルは原虫周囲には検出されず、細胞質でのみ観察された (図 15a)。次に、IFN- γ 介在性免疫における RabGDI α の Rab 結合ドメインについて評価した。以前の報告と一致して [44, 48]、RabGDI α Y39V、R218A/Y219A、および E233/E240A 変異体は、HA タグ付きの Rab10 との結合が減弱していた (図 15b)。その一方、これらの Rab 結合ドメイン変異体は内在性 Gbp2 とは正常に共免疫沈降を生じ、IFN- γ 誘導性の原虫数の減少についても RabGDI α の阻害作用を回復させた (図 15c, d)。このことから、RabGDI α による Gbp2 に対する機能阻害には Rab 結合ドメインは重要ではないことが示された。

16. RabGDI α の IFN- γ 誘導性免疫応答に対する阻害作用における、脂質結合ポケットの役割の検討

16-1 目的

RabGDI α の132番目のメチオニンをイソロイシンに置換したM132I変異体は、RabGDI α の脂質結合ポケットの構造が変化し Rab との結合性が低下することが報告されている[46]。そこで次に RabGDI α の脂質結合ポケットの重要性についても検討するために、RabGDI α のM132I変異体を作製し Gbp2 との結合性および IFN- γ 依存的病原体排除能への関与を評価した。

16-2 材料と方法

1) 試薬

抗 Gbp2 抗体 (sc-10588 ; Santa Cruz Biotechnology) 、抗 Flag 抗体 (F3165 ; Sigma Aldrich) および抗 Actin 抗体 (A1978 ; Sigma Aldrich) を使用した。

2) *In silico* RabGDI α 立体構造モデル

マウス RabGDI α 配列を HHPred サーバーへ提出し、立体構造予測のための最も可能性の高いテンプレートと配置が選択された[49]。上位2つのテンプレートは脂質結合型だったので、三番目によいテンプレートであった PDB ID = 2bcg を選択した。マウス RabGDI α との配列相同性は53%であり、OSCAR-star side-chain modeling [50]と組み合わせて断片組立モデリングツールスパナを用いて正確なモデルを構築するには十分なレベルであった。タンパク質表面は ef-surf によって生成され、jV proGrams を用いて描出した[51]。

3) 発現ベクター

RabGDI α の M132I 変異体は、以下のプライマーを用いて作製した：
(RabGDI α _M132I_F と RabGDI α _M132I_R) (表 1)。作製した cDNA は、
pMRX-Puromycin に挿入して C 末端に Flag タグを付与した。すべての構築の塩基
配列は、シーケンシングを行い確認した。

4) 免疫沈降

前述 (実験 2) と同一の方法で行った。

5) ウェスタンブロット

前述 (実験 3) と同一の方法で行った。

6) ルシフェラーゼアッセイによる *T. gondii* 数の測定

5×10^5 ずつ播種した MEF を、未処理もしくは 10 ng/ml の IFN- γ で 24 時間刺激
したのち、moi = 1 で感染した 36 時間後の時点におけるルシフェラーゼ発現 *T.*
gondii の感染数を、前述 (実験 3) と同一の方法で評価した。

7) 免疫蛍光染色

T. gondii (moi = 4) で感染させた細胞を前述 (実験 8) と同一の方法で処理した。
一次抗体にはウサギ抗 GAP45 抗体 (1 : 500) およびマウス抗 Irga6 抗体 (1 : 100)、
二次抗体としては Alexa Fluor 594-結合抗マウス IgG 抗体、Alexa Fluor 488-結合抗
ウサギ IgG 抗体を用いた。

8) 統計解析

実験データにおける統計学的有意差は、ANOVA および Tukey test を用いて検定した (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

16-3 結果

RabGDI α の脂質結合ポケット (図 16a) の重要性についても確認するために、RabGDI α の M132I 変異体を作製して Gbp2 との結合性を検討した。その結果、Flag タグ付きの RabGDI α M132I 変異体は、内在性 Gbp2 との共免疫沈降が有意に低下した (図 16b)。さらに、RabGDI α 欠損 MEF に RabGDI α M132I 変異体を発現させても、IFN- γ 依存性の *T. gondii* 殺傷能や PCV 上への Irga6 の集積の抑制効果は回復しなかった (図 16c - e)。実験 15 の結果も考慮すると、Gbp2 依存的な *T. gondii* に対する細胞自律性免疫応答の抑制には、RabGDI α の Rab 結合ドメインではなく脂質結合ポケットを介した Gbp2 の認識が重要であることが明らかになった。

17. RabGDI α 欠損が、*S. Typhimurium* への Gbp2 の集積に及ぼす影響

17-1 目的

T. gondii だけでなく *S. Typhimurium* など一部のグラム陰性細菌もまた、感染した細胞内に PCV を形成し、GBP による PCV 膜の破壊によってこれらのグラム陰性細菌の細胞内での増殖が抑制されることが知られている [17-19]。そこで次に、RabGDI α の欠損が寄生胞形成グラム陰性細菌である *S. Typhimurium* の PCV への Gbp2 の集積にも影響を及ぼしているかを検討した。

17-2 材料と方法

1) 細菌

Δ SPI2 *S. Typhimurium* は、熊谷雄太郎博士（大阪大学免疫学フロンティア研究センター）より分与されたものを用い、LB 液体培地および LB 寒天培地にて培養した。

2) 試薬

抗 HA 抗体 (MMS-101R; Covance) および抗 *Salmonella* sp 抗体 (#0701; ViroStat) を使用した。

3)細菌感染

MEF は 10 ng/ml の IFN- γ であらかじめ 24 時間刺激した。 Δ SPI2 *S. Typhimurium* は 7 ml の LB 液体培地にて 37 °C、6 時間振盪培養し、0.05 ml の定常期培養溶液

を 50 ml LB 液体培地に植え継いでさらに 21 時間 37 °C で静置培養した [52]。細菌は室温で 20 分間、3000 rpm で遠心して回収し、あらかじめ室温に戻した抗生物質非含有液体培地にて再懸濁を行って moi = 10 で培養細胞に添加した。プレートは、1600 rpm (500g) で 15 分間遠心分離し、37 °C にて 1 時間培養した。その後、100 µg/ml ゲンタマイシン (Nacalai Tesque) を 1 時間添加することで細胞内に侵入しなかった細菌を除去し、残りの時間は 10 µg/ml ゲンタマイシン含有マクロファージ培地にて培養した。

4) 免疫蛍光染色

前述 (実験 8) と同一の方法で細胞を処理し、一次抗体にはマウス抗 HA 抗体 (1 : 500) およびウサギ抗 *Salmonella* 抗体 (1 : 100)、二次抗体としては Alexa Fluor 594-結合抗マウス IgG 抗体、Alexa Fluor 488-結合抗ウサギ IgG 抗体を用いた。

5) 統計解析

実験結果は unpaired Student' s t-test を用いて統計処理を行い、 $P < 0.001$ で有意差検定を行った。

17-3 結果

HA タグを付けた Gbp2 の Δ SPI2 *S. Typhimurium* への集積の割合は、野生型細胞に比べて RabGDI α 欠損 MEF で顕著に増大していた (図 17a, b)。

18. RabGDI α の非標準的インフラマソームへの関連性の 検討

18-1 目的

インフラマソームは、炎症の主要なメディエーターであるカスパーゼ 1 を活性化させる、複数のタンパク質から構成される複合体である[53-55]。また、カスパーゼ 11 はグラム陰性細菌由来の細胞質中の LPS の認識に必須の役割を果たし、非標準的なインフラマソームを介してカスパーゼ 1 を活性化させることが明らかにされている [21, 56]。さらに近年、マクロファージ内での p65 GBP^{chr3} によるグラム陰性細菌の PCV 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た[18, 20]。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 の関与を検討した。

18-2 材料と方法

1) 細菌

寄生胞形成グラム陰性細菌である Δ SPI2 *S. Typhimurium* および *Citrobacter koseri* (*C. koseri*) はそれぞれ、熊谷雄太郎博士および岐阜大学医学部病原微生物遺伝資源センターより分与されたものを用い、LB 液体培地および LB 寒天培地に培養した。

2) 試薬

抗カスパーゼ 11 抗体 (17D9; C1354; Sigma Aldrich) および抗 Actin 抗体 (A1978; Sigma Aldrich) を使用した。

3) マクロファージの培養と細菌感染

骨髄由来マクロファージ (BMDMs) は、マウスから回収した骨髄細胞を 10 % v/v FBS (Nichirei Bioscience)、10 % 929L 細胞上清液、100 U/ml ペニシリンおよび 0.1 mg/ml ストレプトマイシン (Nacalai Tesque) を含有する RPMI 1640 培地 (Nacalai Tesque) で 1 週間培養することで分化させた。マクロファージを 6 穴あるいは 24 穴平底プレートにそれぞれ 3×10^6 /well もしくは 3×10^5 /well ずつ播種し、10 ng/ml の IFN- γ で 24 時間刺激した。細菌の感染は前述 (実験 17) と同一の方法で行った。

4) サイトカインおよび LDH の測定

BMDMs を 24 穴平底プレートに 3×10^5 /well ずつ播種し、10 ng/ml の IFN- γ で刺激したのち、前記のとおり Δ SPi2 *S. Typhimurium* と *C. koseri* を感染させた。細菌感染後の細胞培養上清および、*T. gondii* ME49 株を感染後 3、6、9 日目にマウスから回収した血清中に含まれる炎症性サイトカインの濃度は、ELISA によって測定した。IL-1 α については捕捉抗体 (14-7011-85 ; eBioscience) および検出抗体 (13-7111-85 ; eBioscience)、IL-1 β については捕捉抗体 (840134 ; R&D systems, Minneapolis, MN, USA) および検出抗体 (840135 ; R&D systems) を用いた。LDH は、CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) を使用して測定した。LDH 放出量の割合は、以下の式を用いて算出した：(感染細胞からの LDH - 非感染細胞からの LDH)/(全細胞溶解産物からの LDH - 非感染細胞からの LDH) \times 100。

5) LPS の細胞内への導入

BMDMs を 100 ng/ml の Pam2CSK4 (InvivoGen, San Diego, CA, USA) であらかじめ 5 時間刺激し、2 $\mu\text{g/ml}$ の最高純度 LPS (大腸菌 O1111:B4 由来 ; InvivoGen) と 0.25 % v/v FuGeneHD (Promega) を含む無血清 RPMI 1640 液体培地で 16 時間反応させた。

6) ウェスタンブロット

未感染もしくは細菌感染させたマクロファージは、感染の 3 時間後に常温に戻した血清非含有 RPMI 1640 培地にて洗浄を行い、感染 17 時間後の時点までこの無血清培地で培養した。次に、培養上清を、10 % v/v トリクロロ酢酸 (TCA ; Nacalai Tesque) で氷上にて 1 時間処理してタンパク質を濃縮した。濃縮されたタンパク質は、4 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分、15000 rpm で遠心分離してペレットとして回収し、氷冷アセトンで洗浄、風乾ののち、RIPA バッファーとプロテアーゼ阻害剤カクテルを含む溶解バッファーで溶解させて 98 $^{\circ}\text{C}$ に加熱した。細胞溶解産物を SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜に転写して移行させたのち、5 % スキムミルク (Becton Dickinson and Company) でブロッキングを行った。その後、記載された抗体を用いて処理し ECL (Merck Millipore) と反応させ、タンパク質の発現を検出した。

7) 統計解析

統計学的有意差は、unpaired Student' s t-test を用いて検定した (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$) 。

18-3 結果

野生型および RabGDI α 欠損マクロファージにおける非標準的インフラマソームの活性化について検討した。 Δ SPI2 *S. Typhimurium* や *C. koseri* に感染した RabGDI α 欠損マクロファージにおける 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 (図 18a)。さらに、ピロトーシス細胞死の程度を、 Δ SPI2 *S. Typhimurium* と *C. koseri* に感染した野生型もしくは RabGDI α 欠損マクロファージにおける乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の放出量によって測定した。その結果、RabGDI α 欠損マクロファージでのピロトーシスも野生型細胞に比べて有意に増大していた (図 18b)。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 の産生およびピロトーシスの程度は野生型と RabGDI α 欠損細胞との間で有意差はなかった (図 18c, d)。非標準的インフラマソームではカスパーゼ 11 の活性化が、IL-1 α の分泌、ピロトーシスの誘導、カスパーゼ 1 の活性化とそれに続く IL-1 β のプロセッシングにとって最も重要な事象となる[21, 57]。そこで次に、 Δ SPI2 *S. Typhimurium* と *C. koseri* に感染した野生型もしくは RabGDI α 欠損マクロファージについて、カスパーゼ 11 の活性化についても検討を行った。細菌感染した RabGDI α 欠損マクロファージにおける培養上清は、野生型細胞に比べてカスパーゼ 11 の活性化形態 (p26) を高濃度に含んでおり (図 18e)、RabGDI α の欠損が非標準的インフラマソームの活性化を増加させることが示された。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。

III. 考察

IFN- γ 誘導性 GTPase 群は、寄生胞を形成する細胞内侵入病原体に対する宿主防御においてきわめて重要な役割を果たす。本研究では、IFN- γ 誘導性 GTPase 群が介する細胞自律性免疫の最初の抑制性制御因子として、RabGDI α を同定することができた。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。このことは、RabGDI α が多様な寄生胞形成病原体に対する Gbp2 依存的な細胞性自然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。

酵母における RabGDI と同様に、RabGDI α の機能は Rab の調節機構の観点から詳細に検討されてきた[58, 59]。その多くは、膜性小胞の細胞内トラフィックにおける機能に関するものである。Rab は、GDP 結合型の不活性状態と GTP 結合型の活性化状態の間を往復し、細胞内分子スイッチとして働く [60]。不活性型 Rab は、結合した膜上において GDP から GTP に変換されることで活性化し、輸送小胞を形成する[61]。輸送小胞上の活性型 Rab は小胞の標的膜へのドッキングと融合を容易にし、最終的には GTP の GDP への加水分解による転換によって不活性化に戻る。RabGDI は、Rab 結合ドメインを介して標的膜上の不活性型 Rab と結合し、その際には脂質結合ポケットへの Rab の脂質修飾（プレニル化）領域の挿入も伴う。これによって、Rab は標的膜から引き離され細胞質にプールされることになり、次の小胞輸送のための再利用が可能になるとされている[62]。IFN- γ によって生じる応答の観点では、RabGDI α の Rab 結合ドメインはその阻害作用に必要ではなかったため、RabGDI α は Rab とは無関係の方法で機能しているのかもしれない。対照的に、RabGDI α の脂質結合ポケットは、阻害

作用に必要不可欠であった。さらに、Gbp2 の C 末端におけるプレニル化は *T. gondii* の PCV 膜への集積および IFN- γ 依存的な原虫殺傷作用に必須であり [11]、Rab のプレニル化も同様に膜への繫留と機能にとって重要であるとされている [44]。RabGDI α と Gbp2 の細胞内局在に関して、両タンパク質間の直接的な相互作用を示唆する PL シグナルが主に細胞質中で検出されたことも考慮すると、膜小胞輸送における RabGDI α と Rab の間の関係との類似性から、RabGDI α は Gbp2 を標的 PCV から細胞質に引きはがすことができるのかもしれない。Rab は再利用のために RabGDI α によって回収される一方で、Gbp2 は細胞自律的免疫を終息あるいは減弱させるために寄生胞形成病原体の PCV 膜から引きはがされている可能性が考えられるものの、この RabGDI α と Gbp2 の相互作用における詳細なメカニズムを解明するにはさらなる検討が必要である。

哺乳類 RabGDI は 2 つのアイソフォームをもつのに対して、酵母では RabGDI をコードする GDI 遺伝子は 1 つしかなく、GDI の欠損は致死的である [60]。これまでに報告されている RabGDI α 欠損マウスは生存可能で、認知機能の障害を除いて健康である [34]。しかし、理由は分からないが、本研究では出生後も生存可能な RabGDI β 欠損マウスを得ることはできなかった (未発表データ)。この点を考慮すると、*in vivo* では RabGDI β の欠損は RabGDI α によって代償性に補完されなかったものと思われる。また、胎児の発生に限らず Rab の調節における RabGDI α と RabGDI β の機能の相違についてもまだ詳細は明らかではない。RabGDI α と RabGDI β はどちらも、*in vitro* では GDP 結合型の不活性 Rab と結合し可溶化する [63]。本研究では特に、RabGDI β ではなく RabGDI α が Gbp2 と特異的に結合し、Gbp2 依存的な細胞自律性免疫を制御することを明らかにした。現在までのところ、IFN- γ 誘導性応答における RabGDI β の具体的な機能は未知であ

る。RabGDI β は Gbp2 以外の Gbp ファミリーメンバーと結合するのかもしれないし、もしくはこの免疫応答には全く関与していないのかもしれない。

p65 GBP をコードする遺伝子は、13 のファミリーメンバー（11 の活性型メンバーと 2 つの偽遺伝子）から成り、マウスの 3 番染色体と 5 番染色体に 2 つのクラスターを形成して存在していてそれぞれが高い相同性を有している[64]。先行研究において p65 GBP^{chr3} を欠損するマウスが作製され、*T. gondii* あるいは *C. trachomatis* への p47 IRG の集積および保持に p65 GBP^{chr3} が関与していることが示された [10, 17]。さらにその後の研究から、Gbp1 が *T. gondii* への Irgb6 の集積と保持に役割を果たす一方、Irga6 の細胞内動態には影響しないことが明らかにされている[9]。本研究では、Gbp2 が原虫への Irga6 の集積を調節するものの Irgb6 の集積には機能しないことが明らかになった。Gbp1、Gbp2、p65 GBP^{chr3} 欠損細胞において、23 のメンバーからなるマウス p47 IRG ファミリーのすべてについて検討がなされたわけではないものの、これらの結果からは個々の p65 GBP メンバーが異なるかたちで p47 IRG の集積や保持を調節している可能性が強く示唆される。p65 GBP が p47 IRG と相互作用して集積や保持を正に制御する詳細な分子メカニズムはまだよくわかっておらず、さらなる分析を行う必要がある。

細胞外 ATP や細菌由来フラジェリンといった微生物あるいは危険シグナルが NLRP3/ASC や NLRC4/ASC によってそれぞれ感知されると、古典的インフラマソームが誘導されてカスパーゼ 1 の活性化を引き起こし、IL-1 β や IL-18 の成熟とピロトーシスを生じる[53, 54]。さらに、細胞質に生じたウイルスまたは寄生胞形成グラム陰性細菌由来の二重鎖 DNA は、AIM2 インフラマソームによって検知される[55]。近年、カスパーゼ 1 の活性化とは異なるもう一つのメカニズムとして、非標準的インフラマソームが報告された。非標準的インフラマソームでは LPS、タイプ I インターフェロン、IFN- γ により強く誘導されるカスパーゼ

11 がきわめて重要であることが示されている[21]。寄生胞を形成するような細胞内侵入グラム陰性細菌による感染は非標準的インフラマソームを活性化させ、カスパーゼ 11 を含む炎症性カスパーゼによって細胞内 LPS が直接的に検知されることが報告されている[56, 65]。最近、p65 GBP が寄生胞形成グラム陰性細菌 PCV の破壊を促進し、細胞質に LPS を放出することによって非標準的インフラマソームを活性化していることが示された[18, 20]。本研究ではそれに加えて、寄生胞形成グラム陰性細菌によって誘導される IL-1 α / β の産生、カスパーゼ 11 の活性化およびピロトーシスが RabGDI α によって抑制されていることが新たに示された。この結果から、カスパーゼ 11 による非標準的インフラマソームの活性化の調節における IFN- γ 誘導性 GTPase 群の重要性を強化するとともに、非標準的インフラマソームに由来する過度な炎症応答の抑制に RabGDI α が重要な役割を果たしていることが示唆された。

まとめると、本研究では、寄生胞形成病原体の感染で生じる IFN- γ 誘導性 GTPase 群依存的な細胞自律的免疫応答および非標準的インフラマソームの活性化に対して、RabGDI α が負の制御因子として機能することを明らかにした。ミエロイド系細胞特異的 RabGDI α 欠損マウスが血清中の炎症性サイトカイン産生には影響することなく *T. gondii* 感染に対する抵抗性を示すことと、IFN- γ /Gbp2 依存的免疫応答の制御に RabGDI α の脂質結合ポケットが重要であることを考慮すると、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うるかもしれない。

歯科・口腔領域においても近年、歯周病の原因菌である *Porphyromonas gingivalis*、*Tannerella forsythensis*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* など、これまでは細胞外でのみ増殖すると考えられていた多くの病原性微生物が宿主

細胞内にも侵入可能であることが明らかになってきている[66, 67]。これらの細菌は細胞内に侵入することによって宿主免疫系を回避し病態を進行、遷延化させている可能性が示唆されており[68]、細胞内に侵入した病原性微生物の動態の解明は急務となっている。これまでのところ *P. gingivalis* 感染が NLRP3 および AIM2 を介してインフラマソームを活性化させ、IL-1 β の分泌を伴う炎症誘導に関与していることなどが報告されている[69]ものの、歯周病菌の細胞内侵入に伴う炎症反応の活性化について多くは解明されていない。*P. gingivalis*、*T. forsythensis*、*A. actinomycetemcomitans* は3菌種ともにグラム陰性細菌であり、その LPS が細胞質に曝されることにより非標準的インフラマソームを活性化することから、これらの細菌に対する細胞内免疫応答の解明が口腔領域疾患のさらなる病態解明につながるかもしれない。

IV. 結論

本研究において、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 RabGDI α 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が明らかになった。RabGDI α は脂質結合ポケットを介して Gbp2 と直接的かつ特異的に結合してその機能を阻害することがわかった。Gbp2 は Irga6 の *T. gondii* PCV への集積にとって特に重要な分子であり、RabGDI α による Gbp2 の機能阻害は Irga6 の PCV への集積を抑制させ、Gbp2/Irga6 依存的な免疫応答において抑制的に作用することが示された。さらに、RabGDI α による Gbp2 の機能阻害は、*S. Typhimurium* や *C. koseri* といった寄生胞形成グラム陰性細菌による感染で生じる非標準的インフラマソームを介した過度な炎症反応を制限していることが明らかとなった。

V. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき御指導と御高配を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座の恵比須繁之教授、林 美加子教授、野杻由一郎准教授に、深甚なる感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり多大な御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学微生物病研究所感染症態分野の山本雅裕教授に厚くお礼申し上げます。

抗 *T. gondii* 抗体、抗 Irga6 抗体および Δ SPI2 *S. Typhimurium* をそれぞれ分与してくださいました D. Soldati-Favre 博士 (Department of Microbiology and Molecular Medicine, University of Geneva Medical School, Geneva, Switzerland)、J. C. Howard 博士 (Institute for Genetics, University of Cologne, Cologne, Germany)、熊谷雄太郎博士 (大阪大学免疫学フロンティア研究センター定量免疫学ユニット) に心から謝意を表します。

最後になりましたが、本研究を行うに際し、多大なる御協力をいただいた大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座および大阪大学微生物病研究所感染症態分野の皆様に、心より感謝申し上げます。

VI. 参考文献

[1] Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:749-95.

[2] MacMicking JD. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat Rev Immunol.* 2012;12:367-82.

[3] Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii*: 25 years and 25 major advances for the field. *Int J Parasitol.* 2009;39:935-46.

[4] Yarovinsky F. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat Rev Immunol.* 2014;14:109-21.

[5] Langermans JA, Van der Hulst ME, Nibbering PH, Hiemstra PS, Fransen L, Van Furth R. IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasmatatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol.* 1992;148:568-74.

[6] Zhao Y, Ferguson DJ, Wilson DC, Howard JC, Sibley LD, Yap GS. Virulent *Toxoplasma gondii* evade immunity-related GTPase-mediated parasite vacuole disruption within primed macrophages. *J Immunol.* 2009;182:3775-81.

- [7] Kim BH, Shenoy AR, Kumar P, Bradfield CJ, MacMicking JD. IFN-inducible GTPases in host cell defense. *Cell Host Microbe*. 2012;12:432-44.
- [8] Taylor GA, Feng CG, Sher A. p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:100-9.
- [9] Selleck EM, Fentress SJ, Beatty WL, Degrandi D, Pfeffer K, Virgin HW, Macmicking JD, Sibley LD. Guanylate-binding protein 1 (Gbp1) contributes to cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog*. 2013;9:e1003320.
- [10] Yamamoto M, Okuyama M, Ma JS, Kimura T, Kamiyama N, Saiga H, Ohshima J, Sasai M, Kayama H, Okamoto T, Huang DC, Soldati-Favre D, Horie K, Takeda J, Takeda K. A cluster of interferon-gamma-inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. *Immunity*. 2012;37:302-13.
- [11] Degrandi D, Kravets E, Konermann C, Beuter-Gunia C, Klumpers V, Lahme S, Wischmann E, Mausberg AK, Beer-Hammer S, Pfeffer K. Murine guanylate binding protein 2 (mGBP2) controls *Toxoplasma gondii* replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:294-9.

[12] Liesenfeld O, Parvanova I, Zerrahn J, Han SJ, Heinrich F, Munoz M, Kaiser F, Aebischer T, Buch T, Waisman A, Reichmann G, Utermöhlen O, von Stebut E, von Loewenich FD, Bogdan C, Specht S, Saefel M, Hoerauf A, Mota MM, Könen-Waisman S, Kaufmann SH, Howard JC. The IFN-gamma-inducible GTPase, Irga6, protects mice against *Toxoplasma gondii* but not against *Plasmodium berghei* and some other intracellular pathogens. PLoS One. 2011;6:e20568.

[13] Ling YM, Shaw MH, Ayala C, Coppens I, Taylor GA, Ferguson DJ, Yap GS. Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. J Exp Med. 2006;203:2063-71.

[14] Wyrick PB. Intracellular survival by *Chlamydia*. Cell Microbiol. 2000;2:275-82.

[15] Knodler LA, Steele-Mortimer O. Taking possession: biogenesis of the *Salmonella*-containing vacuole. Traffic. 2003;4:587-99.

[16] Roy CR, Tilney LG. The road less traveled: transport of *Legionella* to the endoplasmic reticulum. J Cell Biol. 2002;158:415-9.

[17] Haldar AK, Saka HA, Piro AS, Dunn JD, Henry SC, Taylor GA, Frickel EM, Valdivia RH, Coers J. IRG and GBP host resistance factors target aberrant, "non-self" vacuoles characterized by the missing of "self" IRGM proteins. PLoS Pathog. 2013;9:e1003414.

- [18] Meunier E, Dick MS, Dreier RF, Schurmann N, Kenzelmann Broz D, Warming S, Roose-Girma M, Bumann D, Kayagaki N, Takeda K, Yamamoto M, Broz P. Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. *Nature*. 2014;509:366-70.
- [19] Kim BH, Shenoy AR, Kumar P, Das R, Tiwari S, MacMicking JD. A family of IFN-gamma-inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection. *Science*. 2011;332:717-21.
- [20] Pilla DM, Hagar JA, Haldar AK, Mason AK, Degrandi D, Pfeffer K, Ernst RK, Yamamoto M, Miao EA, Coers J. Guanylate binding proteins promote caspase-11-dependent pyroptosis in response to cytoplasmic LPS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:6046-51.
- [21] Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, Newton K, Qu Y, Liu J, Heldens S, Zhang J, Lee WP, Roose-Girma M, Dixit VM. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*. 2011;479:117-21.
- [22] Akhter A, Caution K, Abu Khweek A, Tazi M, Abdulrahman BA, Abdelaziz DH, Voss OH, Doseff AI, Hassan H, Azad AK, Schlesinger LS, Wewers MD, Gavrilin MA, Amer AO. Caspase-11 promotes the fusion of phagosomes harboring pathogenic bacteria with lysosomes by modulating actin polymerization. *Immunity*. 2012;37:35-47.

- [23] Aachoui Y, Leaf IA, Hagar JA, Fontana MF, Campos CG, Zak DE, Tan MH, Cotter PA, Vance RE, Aderem A, Miao EA. Caspase-11 protects against bacteria that escape the vacuole. *Science*. 2013;339:975-8.
- [24] Zhao Z, Fux B, Goodwin M, Dunay IR, Strong D, Miller BC, Cadwell K, Delgado MA, Ponpuak M, Green KG, Schmidt RE, Mizushima N, Deretic V, Sibley LD, Virgin HW. Autophagosome-independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens. *Cell Host Microbe*. 2008;4:458-69.
- [25] Ohshima J, Lee Y, Sasai M, Saitoh T, Su Ma J, Kamiyama N, Matsuura Y, Pann-Ghill S, Hayashi M, Ebisu S, Takeda K, Akira S, Yamamoto M. Role of mouse and human autophagy proteins in IFN-gamma-induced cell-autonomous responses against *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 2014;192:3328-35.
- [26] Choi J, Park S, Biering SB, Selleck E, Liu CY, Zhang X, Fujita N, Saitoh T, Akira S, Yoshimori T, Sibley LD, Hwang S, Virgin HW. The parasitophorous vacuole membrane of *Toxoplasma gondii* is targeted for disruption by ubiquitin-like conjugation systems of autophagy. *Immunity*. 2014;40:924-35.
- [27] Virreira Winter S, Niedelman W, Jensen KD, Rosowski EE, Julien L, Spooner E, Caradonna K, Burleigh BA, Saeij JP, Ploegh HL, Frickel EM. Determinants of GBP recruitment to *Toxoplasma gondii* vacuoles and the parasitic factors that control it. *PLoS One*. 2011;6:e24434.

- [28] Cherfils J, Zeghouf M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev.* 2013;93:269-309.
- [29] Seabra MC, Wasmeier C. Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16:451-7.
- [30] Nishimura N, Nakamura H, Takai Y, Sano K. Molecular cloning and characterization of two rab GDI species from rat brain: brain-specific and ubiquitous types. *J Biol Chem.* 1994;269:14191-8.
- [31] Bienvenu T, des Portes V, Saint Martin A, McDonell N, Billuart P, Carrie A, Vinet MC, Couvert P, Toniolo D, Ropers HH, Moraine C, van Bokhoven H, Fryns JP, Kahn A, Beldjord C, Chelly J. Non-specific X-linked semidominant mental retardation by mutations in a Rab GDP-dissociation inhibitor. *Hum Mol Genet.* 1998;7:1311-5.
- [32] D'Adamo P, Menegon A, Lo Nigro C, Grasso M, Gulisano M, Tamanini F, Bienvenu T, Gedeon AK, Oostra B, Wu SK, Tandon A, Valtorta F, Balch WE, Chelly J, Toniolo D. Mutations in GDI1 are responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nat Genet.* 1998;19:134-9.
- [33] Ishizaki H, Miyoshi J, Kamiya H, Togawa A, Tanaka M, Sasaki T, Endo K, Mizoguchi A, Ozawa S, Takai Y. Role of rab GDP dissociation inhibitor alpha in regulating plasticity of hippocampal neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:11587-92.

[34] D'Adamo P, Welzl H, Papadimitriou S, Raffaele di Barletta M, Tiveron C, Tatangelo L, Pozzi L, Chapman PF, Knevett SG, Ramsay MF, Valtorta F, Leoni C, Menegon A, Wolfer DP, Lipp HP, Toniolo D. Deletion of the mental retardation gene *Gdi1* impairs associative memory and alters social behavior in mice. *Hum Mol Genet.* 2002;11:2567-80.

[35] Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell.* 2013;153:910-8.

[36] Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science.* 1988;240:516-8.

[37] Martens S, Parvanova I, Zerrahn J, Griffiths G, Schell G, Reichmann G, Howard JC. Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *PLoS Pathog.* 2005;1:e24.

[38] Weibrecht I, Leuchowius KJ, Clausson CM, Conze T, Jarvius M, Howell WM, Kamali-Moghaddam M, Söderberg O. Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox. *Expert Rev Proteomics.* 2010;7:401-9.

[39] Vestal DJ, Jeyaratnam JA. The guanylate-binding proteins: emerging insights into the biochemical properties and functions of this family of large interferon-induced guanosine triphosphatase. *J Interferon Cytokine Res.* 2011;31:89-97.

[40] Praefcke GJ, Kloep S, Benschaid U, Lilie H, Prakash B, Herrmann C. Identification of residues in the human guanylate-binding protein 1 critical for nucleotide binding and cooperative GTP hydrolysis. *J Mol Biol.* 2004;344:257-69.

[41] Sinensky M, Lutz RJ. The prenylation of proteins. *Bioessays.* 1992;14:25-31.

[42] Stickney JT, Buss JE. Murine guanylate-binding protein: incomplete geranylgeranyl isoprenoid modification of an interferon-gamma-inducible guanosine triphosphate-binding protein. *Mol Biol Cell.* 2000;11:2191-200.

[43] Alory C, Balch WE. Organization of the Rab-GDI/CHM superfamily: the functional basis for choroideremia disease. *Traffic.* 2001;2:532-43.

[44] Rak A, Pylypenko O, Durek T, Watzke A, Kushnir S, Brunsveld L, Waldmann H, Goody RS, Alexandrov K. Structure of Rab GDP-dissociation inhibitor in complex with prenylated YPT1 GTPase. *Science.* 2003;302:646-50.

[45] Ignatev A, Kravchenko S, Rak A, Goody RS, Pylypenko O. A structural model of the GDP dissociation inhibitor rab membrane extraction mechanism. *J Biol Chem.* 2008;283:18377-84.

- [46] Gilbert PM, Burd CG. GDP dissociation inhibitor domain II required for Rab GTPase recycling. *J Biol Chem.* 2001;276:8014-20.
- [47] Hutagalung AH, Novick PJ. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev.* 2011;91:119-49.
- [48] Schalk I, Zeng K, Wu SK, Stura EA, Matteson J, Huang M, Tandon A, Wilson IA, Balch WE. Structure and mutational analysis of Rab GDP-dissociation inhibitor. *Nature.* 1996;381:42-8.
- [49] Soding J, Biegert A, Lupas AN. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:W244-8.
- [50] Liang S, Zheng D, Zhang C, Standley DM. Fast and accurate prediction of protein side-chain conformations. *Bioinformatics.* 2011;27:2913-4.
- [51] Kinoshita K, Nakamura H. eF-site and PDBjViewer: database and viewer for protein functional sites. *Bioinformatics.* 2004;20:1329-30.
- [52] Wu S, Lu R, Zhang YG, Sun J. Chronic *Salmonella* infected mouse model. *J Vis Exp.* 2010; 1947..
- [53] Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2012;28:137-61.

[54] Anand PK, Malireddi RK, Kanneganti TD. Role of the nlrp3 inflammasome in microbial infection. *Front Microbiol.* 2011;2:12.

[55] Schattgen SA, Fitzgerald KA. The PYHIN protein family as mediators of host defenses. *Immunol Rev.* 2011;243:109-18.

[56] Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, Ramani SR, Gonzalez LC, Akashi-Takamura S, Miyake K, Zhang J, Lee WP, Muszyński A, Forsberg LS, Carlson RW, Dixit VM. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science.* 2013;341:1246-9.

[57] Vigano E, Mortellaro A. Caspase-11: the driving factor for noncanonical inflammasomes. *Eur J Immunol.* 2013;43:2240-5.

[58] Matsui Y, Kikuchi A, Araki S, Hata Y, Kondo J, Teranishi Y, Takai Y. Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein. *Mol Cell Biol.* 1990;10:4116-22.

[59] Sasaki T, Kikuchi A, Araki S, Hata Y, Isomura M, Kuroda S, Takai Y. Purification and characterization from bovine brain cytosol of a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein. *J Biol Chem.* 1990;265:2333-7.

[60] Garrett MD, Zahner JE, Cheney CM, Novick PJ. GDI1 encodes a GDP dissociation inhibitor that plays an essential role in the yeast secretory pathway. *EMBO J.* 1994;13:1718-28.

[61] Nuoffer C, Balch WE. GTPases: multifunctional molecular switches regulating vesicular traffic. *Annu Rev Biochem.* 1994;63:949-90.

[62] Ullrich O, Horiuchi H, Bucci C, Zerial M. Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature.* 1994;368:157-60.

[63] Shisheva A, Chinni SR, DeMarco C. General role of GDP dissociation inhibitor 2 in membrane release of Rab proteins: modulations of its functional interactions by *in vitro* and *in vivo* structural modifications. *Biochemistry.* 1999;38:11711-21.

[64] Kresse A, Konermann C, Degrandi D, Beuter-Gunia C, Wuerthner J, Pfeffer K, Beer S. Analyses of murine GBP homology clusters based on *in silico*, *in vitro* and *in vivo* studies. *BMC Genomics.* 2008;9:158.

[65] Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, Li P, Hu L, Shao F. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature.* 2014;514:187-92.

[66] Amano A, Furuta N, Tsuda K. Host membrane trafficking for conveyance of intracellular oral pathogens. *Periodontol 2000.* 2010;52:84-93.

[67] Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* are components of a polymicrobial intracellular flora within human buccal cells. *J Dent Res.* 2005;84:59-63.

[68] Takeuchi H, Furuta N, Morisaki I, Amano A. Exit of intracellular *Porphyromonas gingivalis* from gingival epithelial cells is mediated by endocytic recycling pathway. *Cell Microbiol.* 2011;13:677-91.

[69] Park E, Na HS, Song YR, Shin SY, Kim YM, Chung J. Activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes by *Porphyromonas gingivalis* infection. *Infect Immun.* 2014;82:112-23.


```

RabGDI $\alpha$  1:MDEEYDVIVLGTGLTECILSGIMSVNGKKVLHMDRNPYYGGESSITPLEELYKRFQILE 60
RabGDI $\beta$  1:MNEEYDVIVLGTGLTECILSGIMSVNGKKVLHMDQNPYYGGESASITPLEDLYKRFKLP 60
* * * * *

RabGDI $\alpha$  61:GPPESMGRGRDWNVDLIPKFLMANGQLVKMLLYTEVTRYLDFKVVVEGSFVYKGGKIYKVP 120
RabGDI $\beta$  61:QPPASMGRGRDWNVDLIPKFLMANGQLVKMLLFTEVTRYMDFKVIEGSFVYKGGKIYKVP 120
* * * * *

RabGDI $\alpha$  121:STETEALASNLGMFEKRRFRKFLVVFANFDENDPKTFEGVDPQNTSMRDVYKFDLQGD 180
RabGDI $\beta$  121:STEAEALASSLMLFEKRRFRKFLVYVANFDEKDPRTFEGVDPKKTSMRDVYKFDLQGD 180
* * * * *

RabGDI $\alpha$  181:VIDFTGHALALYRTDDYLDQPCLETINRIKLYSESLARYGKSPYLYPLYGLGELPQGFAR 240
RabGDI $\beta$  181:VIDFTGHSLALYRTDDYLDQPC CETINRIKLYSESLARYGKSPYLYPLYGLGELPQGFAR 240
* * * * *

RabGDI $\alpha$  241:LSAIYGGTYMLNKPVDIIIMENGVVGVKSEGEVARCKQLICDPSYIPDRVQKAGQVIRI 300
RabGDI $\beta$  241:LSAIYGGTYMLNKP IEEIIVQNGKVVGVKSEGEIARCKQLICDPSYVVKDRVEKVGQVIRV 300
* * * * *

RabGDI $\alpha$  301:ICILSHPIKNTNDANSCQIIIPQNQVNRKSDIYVCMISYAHNVAAQGKYIAIASTTVETA 360
RabGDI $\beta$  301:ICILSHPIKNTNDANSCQIIIPQNQVNRKSDIYVCMISFAHNVAQGKYIAIVSTTVETK 360
* * * * *

RabGDI $\alpha$  361:EPEKEVEPALELLEPIDQKFVAISDLYEPIDDGSESQVFCSCSYDATTHFETTCDNDIKDI 420
RabGDI $\beta$  361:EPEKEIRPALELLEPIEQKFVVISDLFVPKDLGTDSQIFISRAYDATTHFETTCDNDIKDI 420
* * * * *

RabGDI $\alpha$  421:YKRMAGSAFDFENMKRKQNDVFGADQ 447
RabGDI $\beta$  421:YKRMTGSEFD FEEMKRKKNDIYGED 445
* * * * *

```

図1

Gbp2の免疫沈降および質量分析の結果得られた、RabGDI α およびRabGDI β に共有されるペプチド断片配列

RabGDI α のアミノ酸配列を上段、RabGDI β の配列を下段に記載している。アスタリスクはRabGDI α およびRabGDI β に共通するアミノ酸配列を示す。赤い四角に囲まれた配列が、質量分析で得られたペプチド断片を示している。

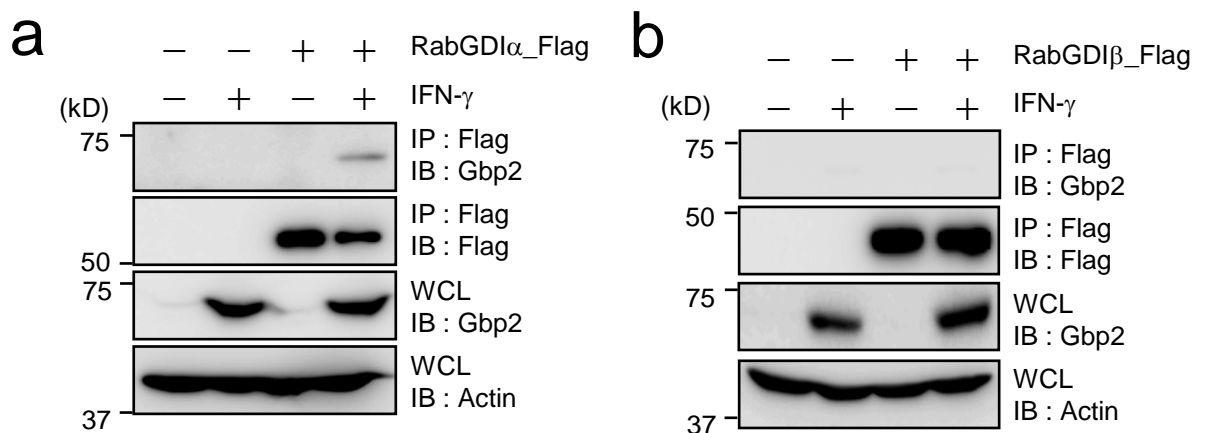


図2

RabGDI α およびRabGDI β とGbp2の結合に関する検討

- (a) 免疫沈降による、RabGDI α とGbp2の結合に関する検討
- (b) 免疫沈降による、RabGDI β とGbp2との結合に関する検討

IP ...記載した抗体で免疫沈降を行ったことを示す
 WCL ...全溶解産物を泳動したことを示す
 IB ...ウエスタンブロットによるタンパクの検出に用いた抗体を示す

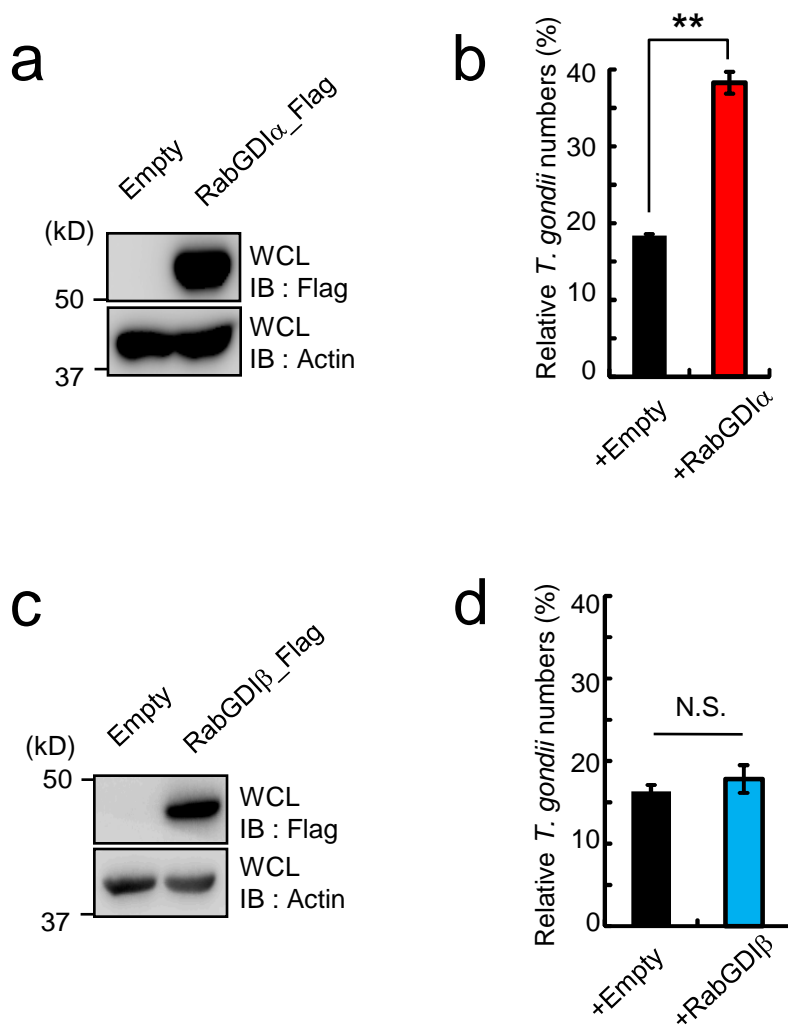


図3

RabGDI α およびRabGDI β の過剰発現による、IFN- γ 誘導性病原体排除能への影響

- (a) ウェスタンブロットによる、RabGDI α の発現の確認
- (b) RabGDI α 過剰発現MEFにおける、IFN- γ 依存的な病原体排除の評価
- (c) ウェスタンブロットによる、RabGDI β の発現の確認
- (d) RabGDI β 過剰発現MEFにおける、IFN- γ 依存的な病原体排除の評価

N.S., not significant ; ** $P < 0.01$ (unpaired Student's t-test)

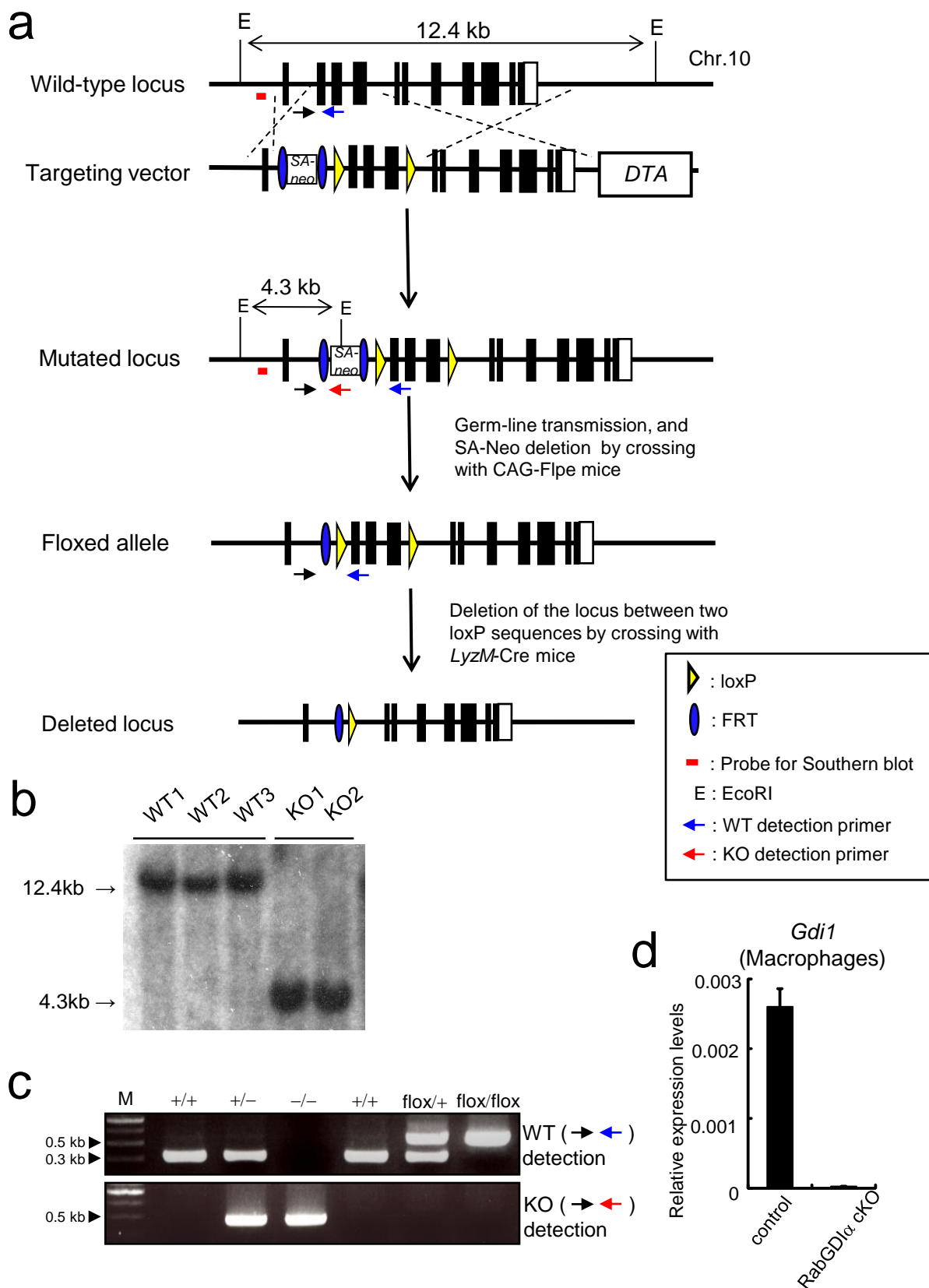


図4

組織特異的RabGDI α 欠損マウスの作製

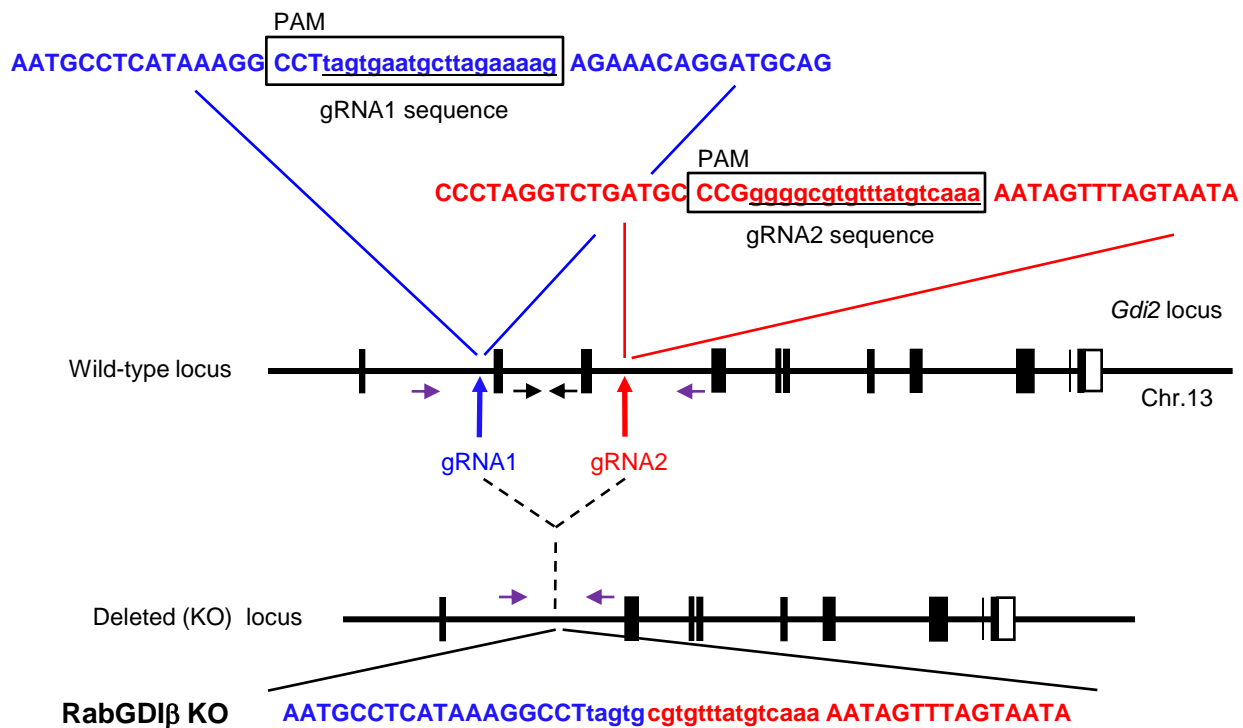
(a) ターゲティングベクターの構築

(b) ES細胞におけるサザンブロット

(c) PCRによる遺伝子型の確認

(d) 定量的リアルタイムPCRによるマクロファージでのRabGDI α の発現の消失の確認

a



→← : WT detection primers
->-< : KO detection primers

b

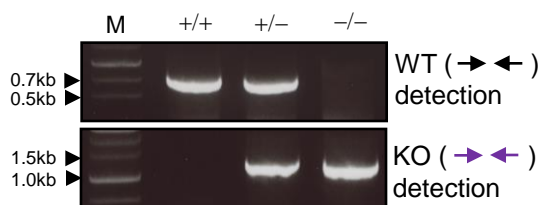


図5

RabGDI β 欠損細胞の作製

- (a) *Gdi2*遺伝子における標的配列
- (b) PCRによる遺伝子型の確認

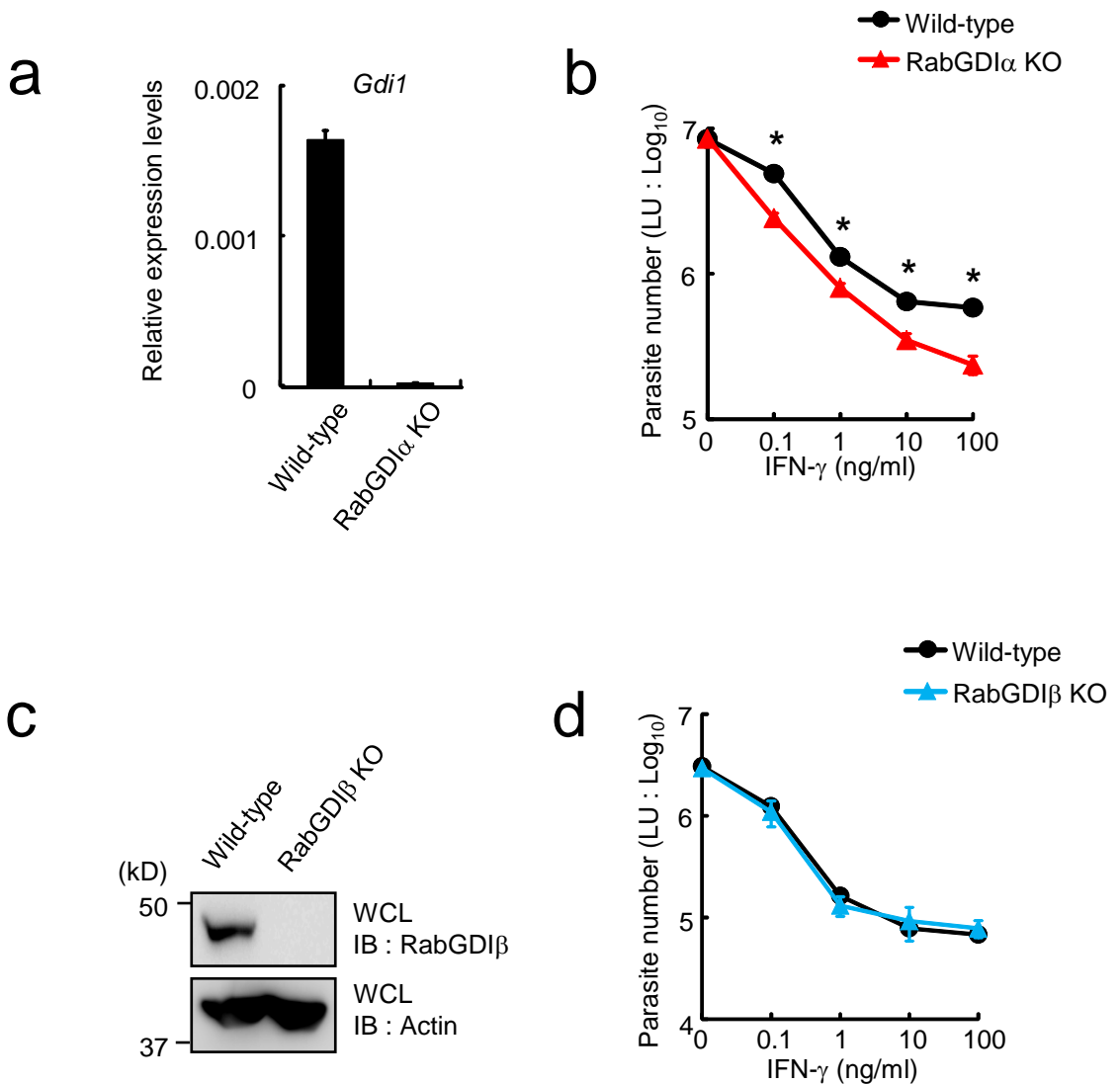


図6

MEFにおける、IFN- γ 依存的な病原体排除へのRabGDI α およびRabGDI β 欠損の影響

- (a) 定量的リアルタイムPCRによる、MEFでのRabGDI α 発現消失の確認
- (b) RabGDI α 欠損MEFにおける、IFN- γ 依存的な病原体排除の評価
- (c) ウェスタンブロットによる、RabGDI β 発現消失の確認
- (d) RabGDI β 欠損MEFにおける、IFN- γ 依存的な病原体排除の評価

* $P < 0.05$ (unpaired Student's t-test)

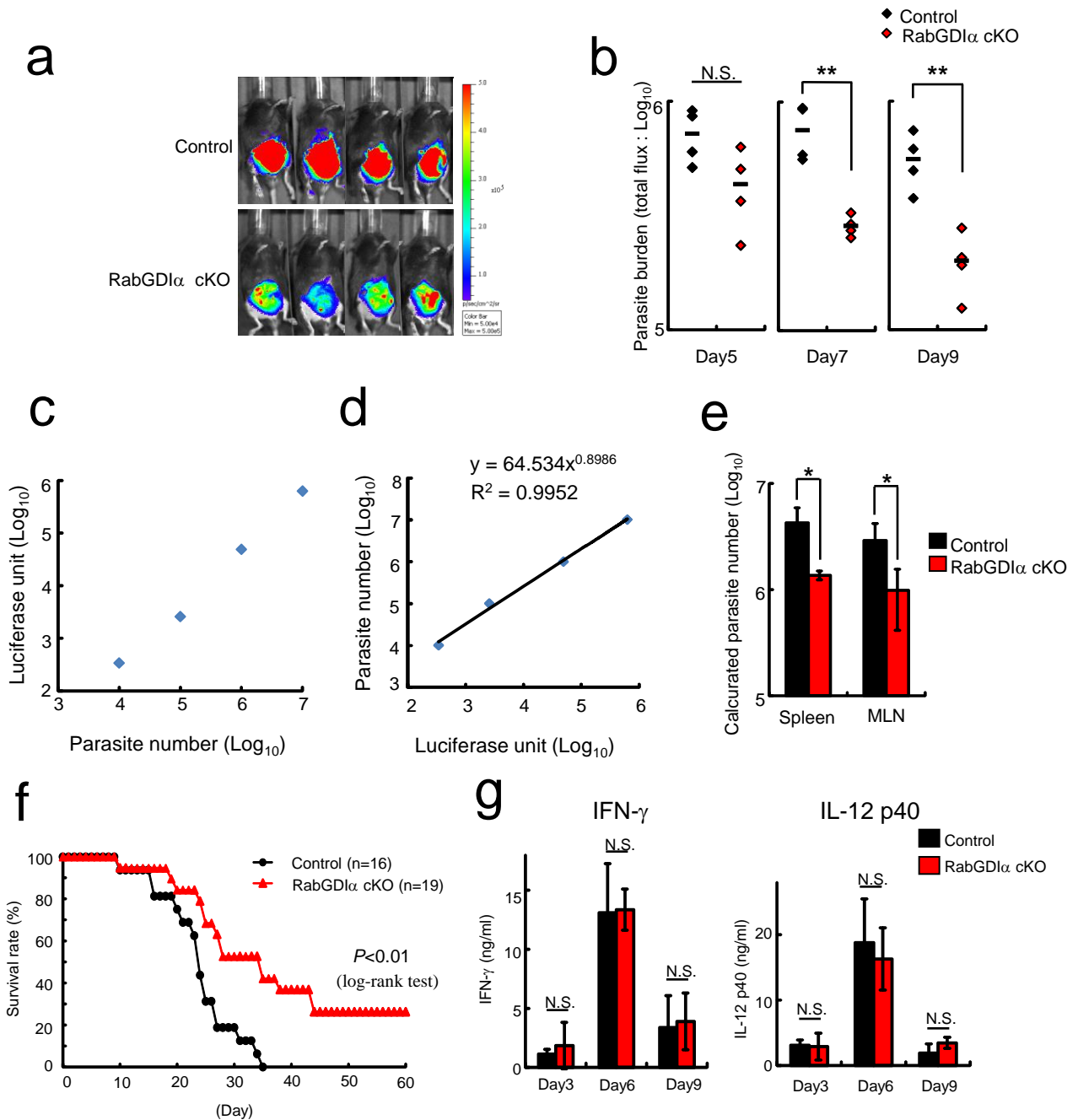


図7

ミエロイド系細胞特異的RabGDI α 欠損マウスの*in vivo*における *T. gondii* 抵抗性の評価

- (a) *In vivo*イメージング装置による、感染7日目の*T. gondii*の広がりの検出
- (b) (a)における全光子放射の定量化
- (c) ルシフェラーゼ発現*T. gondii*の段階希釈溶液($10^4 - 10^7$)に対する発光検出値
- (d) (c)をもとに作製した検量線
- (e) 感染マウスの脾臓および腸間膜リンパ節に含まれる原虫数
- (f) 感染マウスの生存率
- (g) 感染マウスの血清中サイトカイン量

N.S., not significant ; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (unpaired Student's t-test)

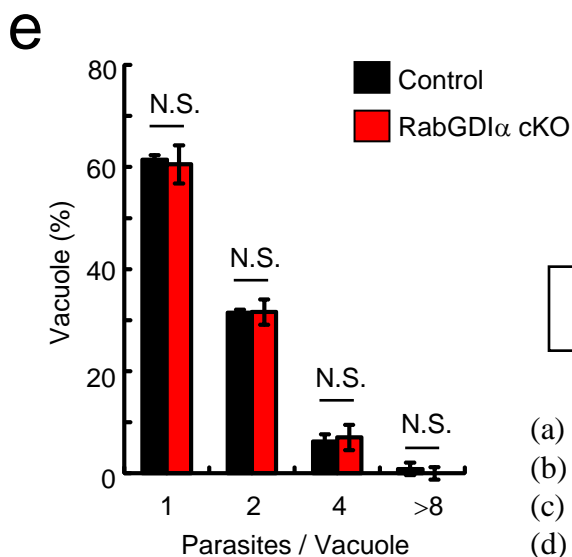
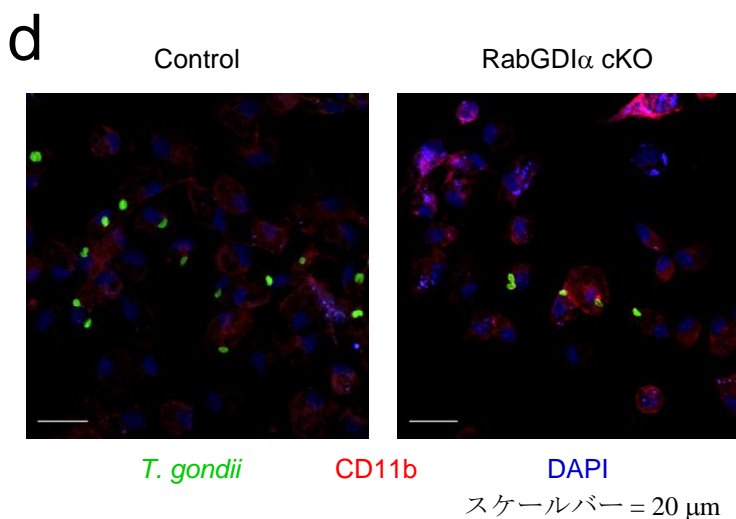
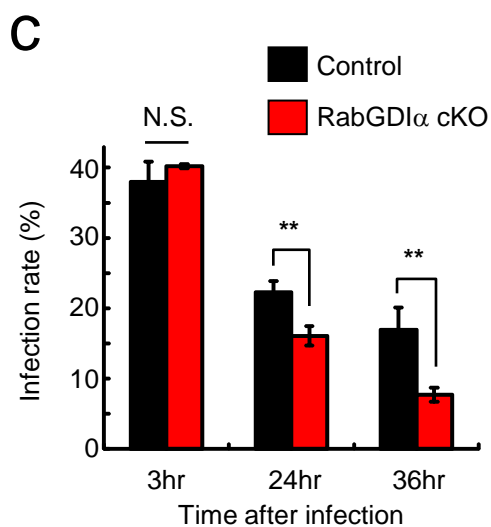
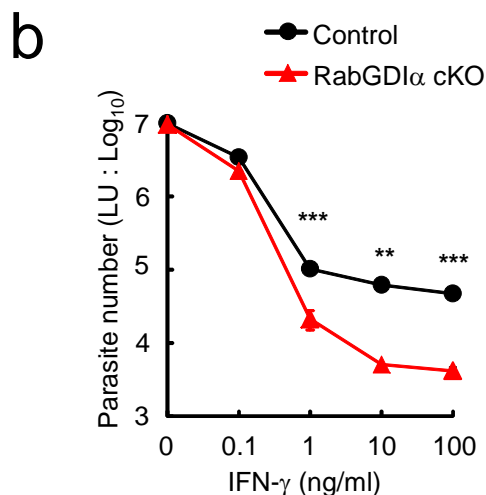
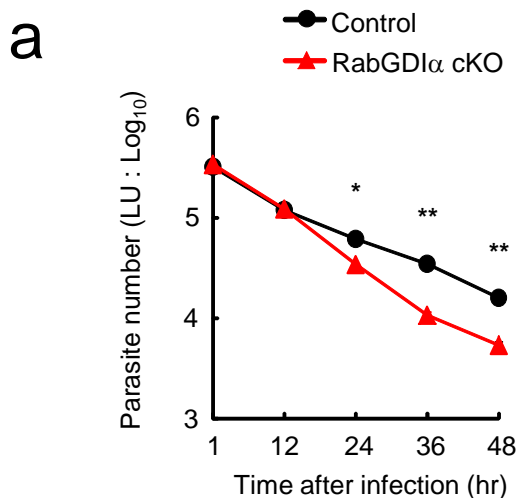


図8 マクロファージにおける、
IFN- γ 依存的な病原体排除への
RabGDI α 欠損の影響

- (a) IFN- γ 刺激時間依存的な*T.gondii*排除への影響
- (b) IFN- γ 刺激濃度依存的な*T.gondii*排除への影響
- (c) 感染マクロファージの割合の経時的変化
- (d) 感染36時間後の免疫蛍光染色
- (e) 感染36時間後の、寄生胞1つあたりに含まれる原虫数とその割合

N.S., not significant ; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (unpaired Student's t-test)

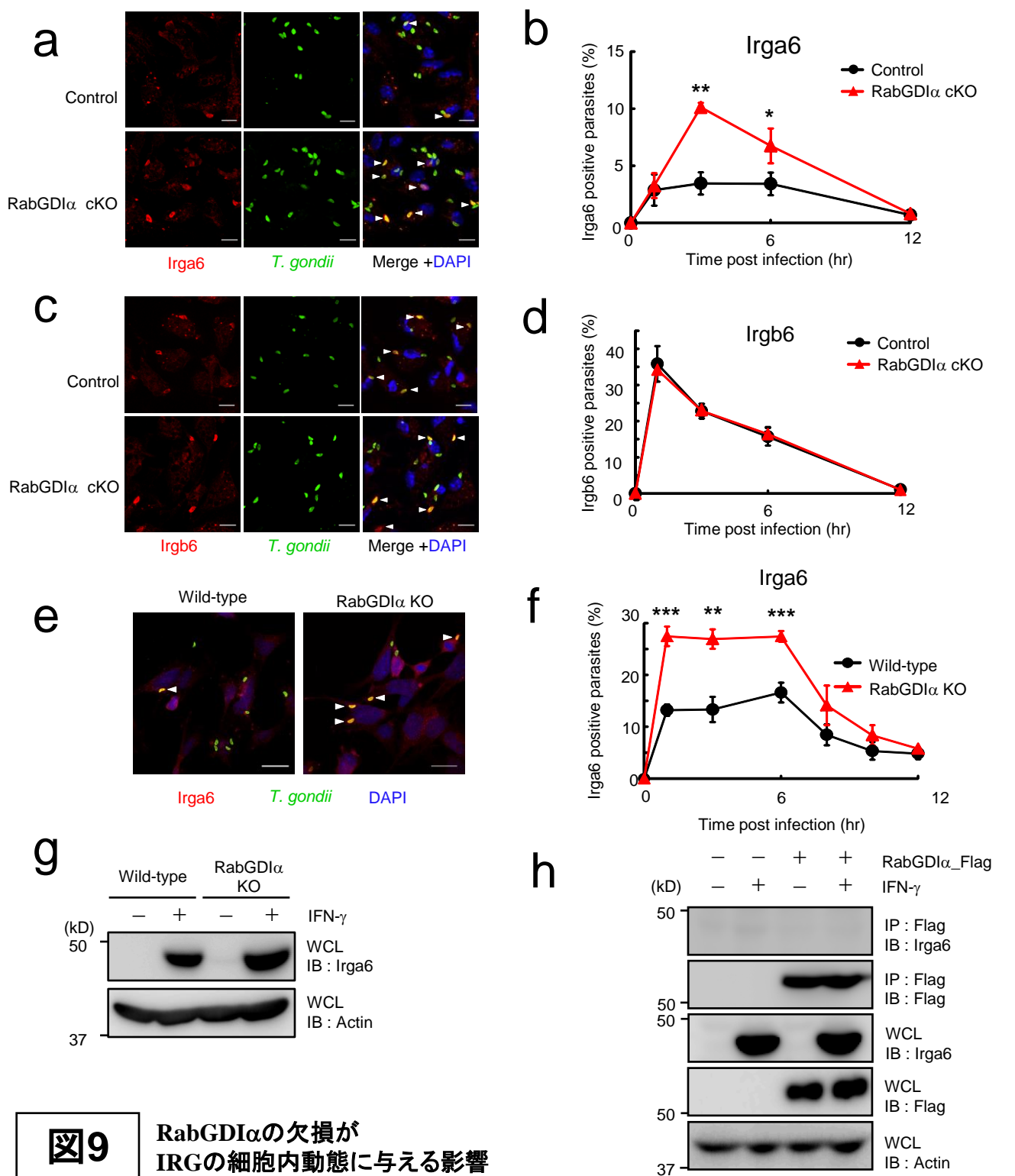


図9

RabGDI α の欠損がIRGの細胞内動態に与える影響

- (a) 感染3時間後のIrga6の免疫蛍光染色(マクロファージ) [矢頭: *T. gondii*とIrga6の共局在を示す]
 (b) Irga6の*T. gondii*への集積の定量化(マクロファージ)
 (c) 感染3時間後のIrgb6の免疫蛍光染色(マクロファージ) [矢頭: *T. gondii*とIrgb6の共局在を示す]
 (d) Irgb6の*T. gondii*への集積の定量化(マクロファージ)
 (e) 感染3時間後のIrga6の免疫蛍光染色(MEF) [矢頭: *T. gondii*とIrga6の共局在を示す]
 (f) Irga6の*T. gondii*への集積の定量化(MEF)
 (g) RabGDI α 欠損によるIrga6の発現への影響
 (h) 免疫沈降によるRabGDI α とIrga6の結合の確認

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

(unpaired Student's t-test)

スケールバー = 10 μ m

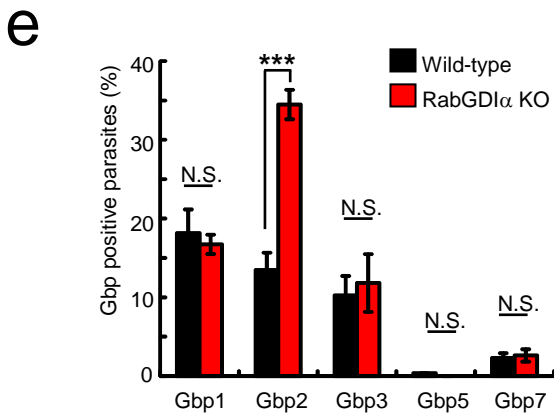
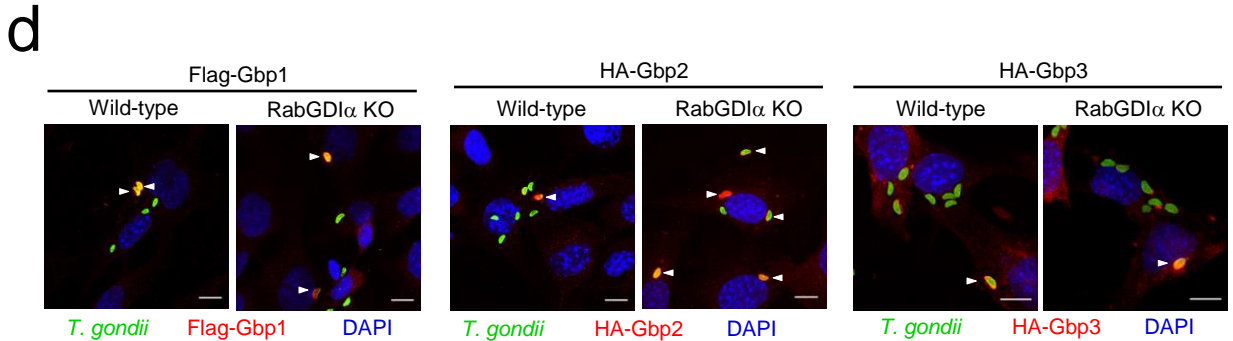
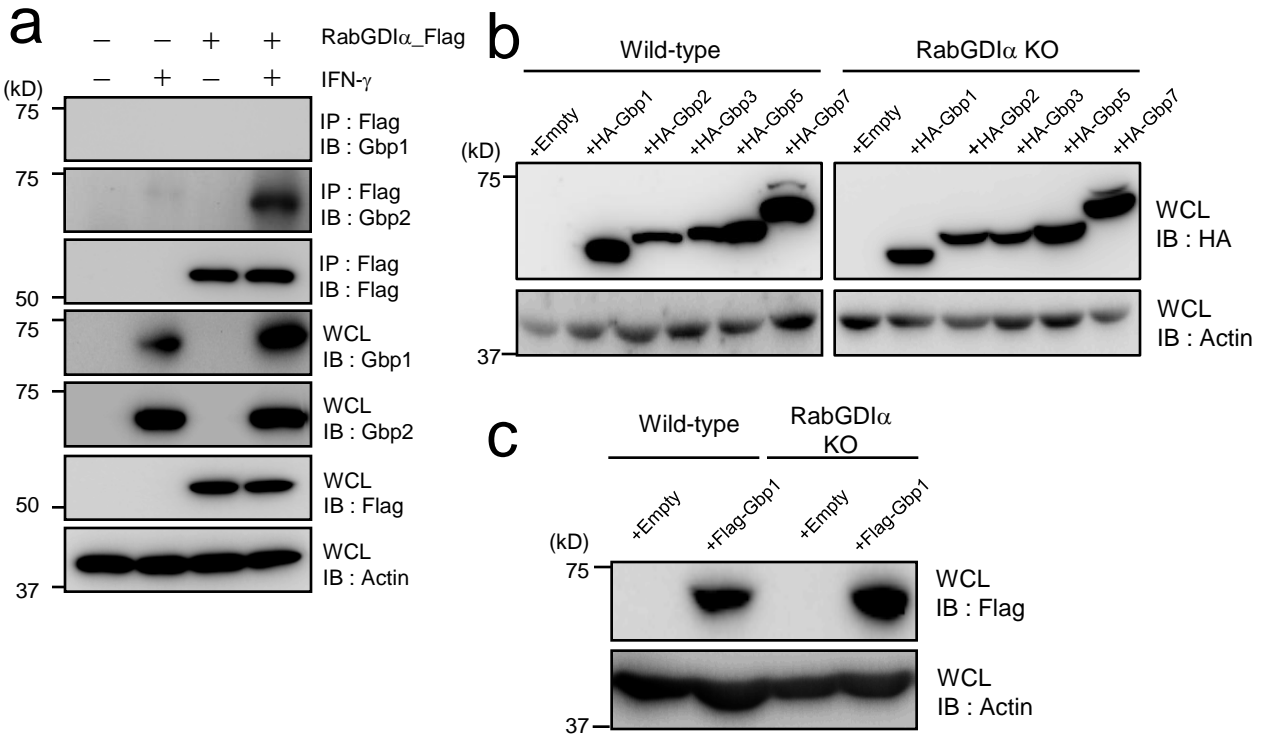


図10 RabGDI α の欠損がGBPの細胞内動態に与える影響

- (a) 免疫沈降によるRabGDI α とGbp1およびGbp2との結合の確認
- (b) ウェスタンブロットによる各Gbpsの発現の確認
- (c) ウェスタンブロットによるFlag-Gbp1の発現の確認
- (d) RabGDI α 欠損細胞における免疫蛍光染色 [矢頭: *T. gondii*と各Gbpの共局在を示す]
- (e) 各Gbpsの*T. gondii*への集積の定量化

N.S., not significant ; *** $P < 0.001$ (unpaired Student's t-test)
スケールバー = 10 μ m

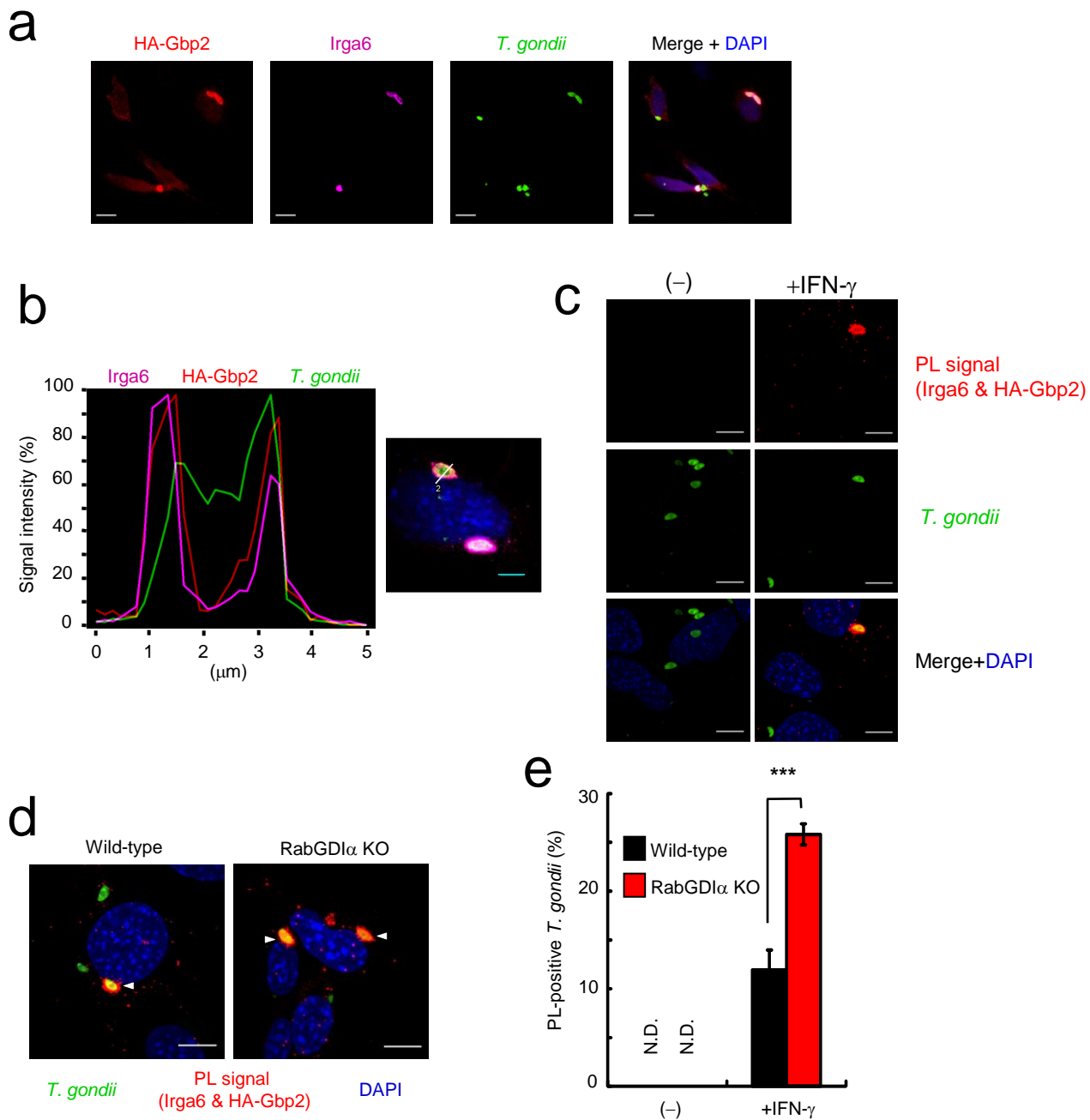


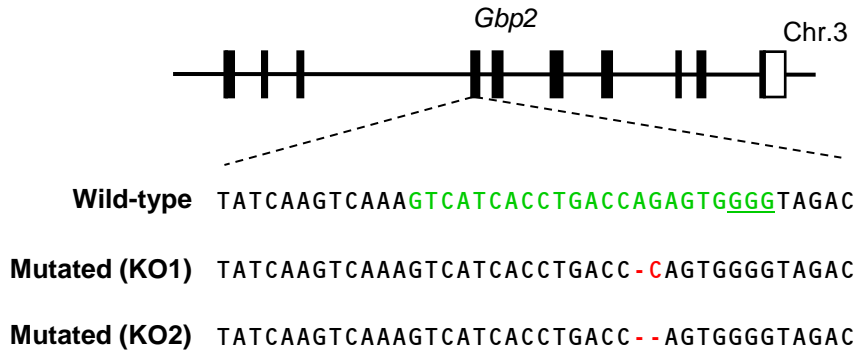
図11

Gbp2とIrga6の細胞内における局在の検討

- (a) 免疫蛍光染色によるGbp2とIrga6の局在の確認
 (b) 画像解析ソフトを用いたシグナル強度の検出
 (c) PL assayによるGbp2とIrga6の共局在の検出
 (d) RabGD1 α 欠損細胞における、Gbp2とIrga6によるPLシグナルの検出
 [矢頭:*T. gondii*とPLシグナルの共局在を示す]
 (e) RabGD1 α 欠損細胞における、PLシグナル陽性*T. gondii*の定量化

N.D., not detected ; *** $P < 0.001$ (unpaired Student's t-test),
 スケールバー = 10 μm (図11bは5 μm)

a



b

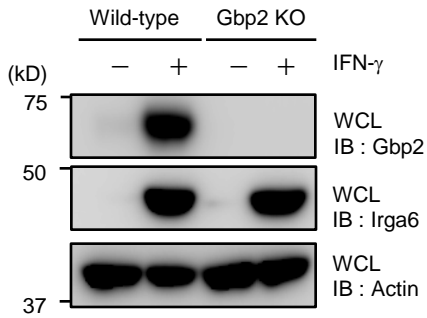


図12

Gbp2欠損細胞の作製

- (a) *Gbp2*遺伝子における標的配列
- (b) ウェスタンブロットによる発現消失の確認

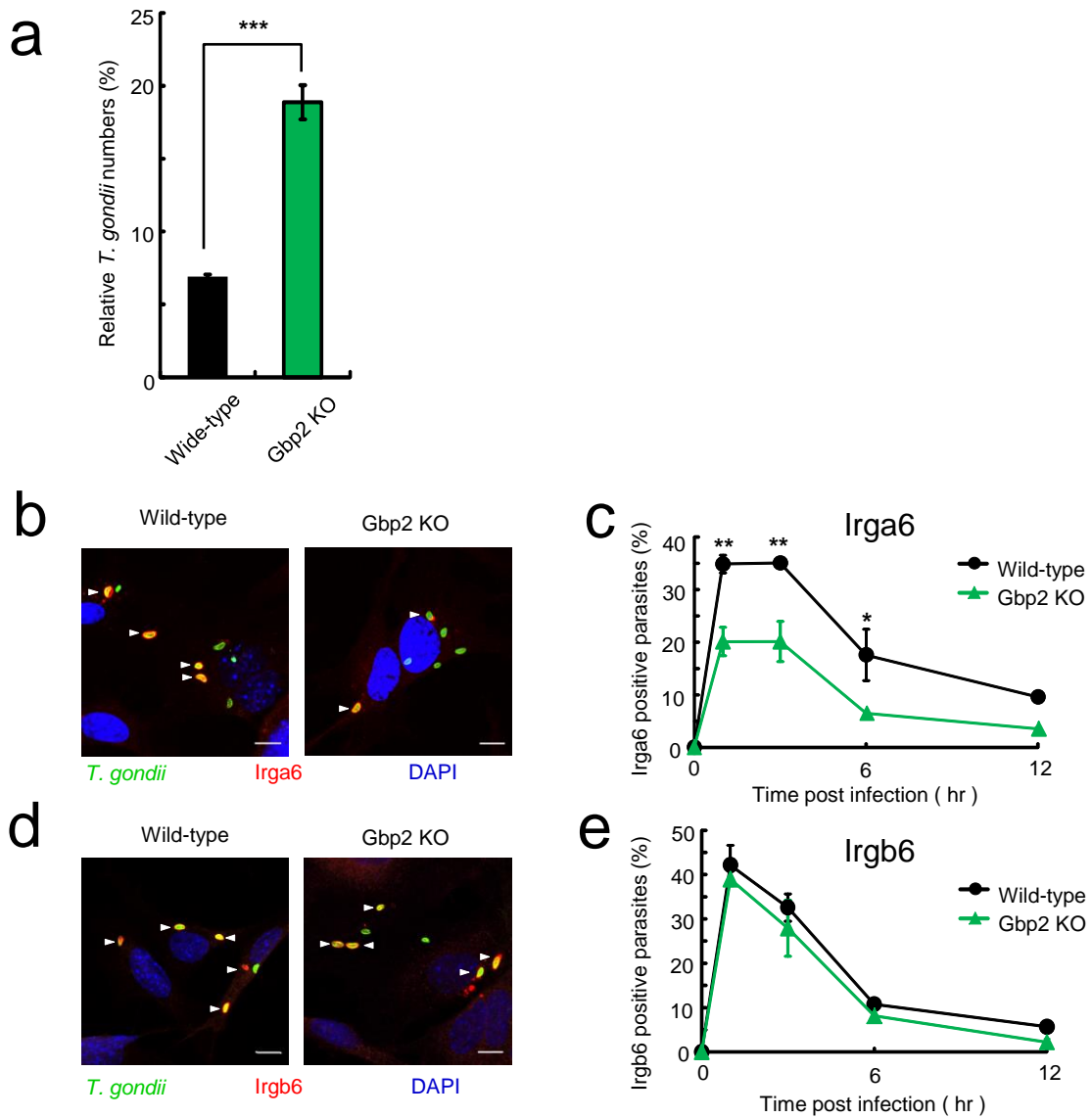


図13

Gbp2の欠損がIFN- γ 依存的病原体排除能およびIrga6の集積に与える影響

- (a) Gbp2欠損細胞におけるIFN- γ 依存的な病原体排除能の評価
 (b) 感染3時間後のIrga6の免疫蛍光染色
 [矢頭:*T. gondii*とIrga6の共局在を示す]
 (c) Irga6の*T. gondii*への集積の定量化
 (d) 感染3時間後のIrgb6の免疫蛍光染色
 [矢頭:*T. gondii*とIrgb6の共局在を示す]
 (e) Irgb6の*T. gondii*への集積の定量化

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (unpaired Student's t-test)

スケールバー = 10 μ m

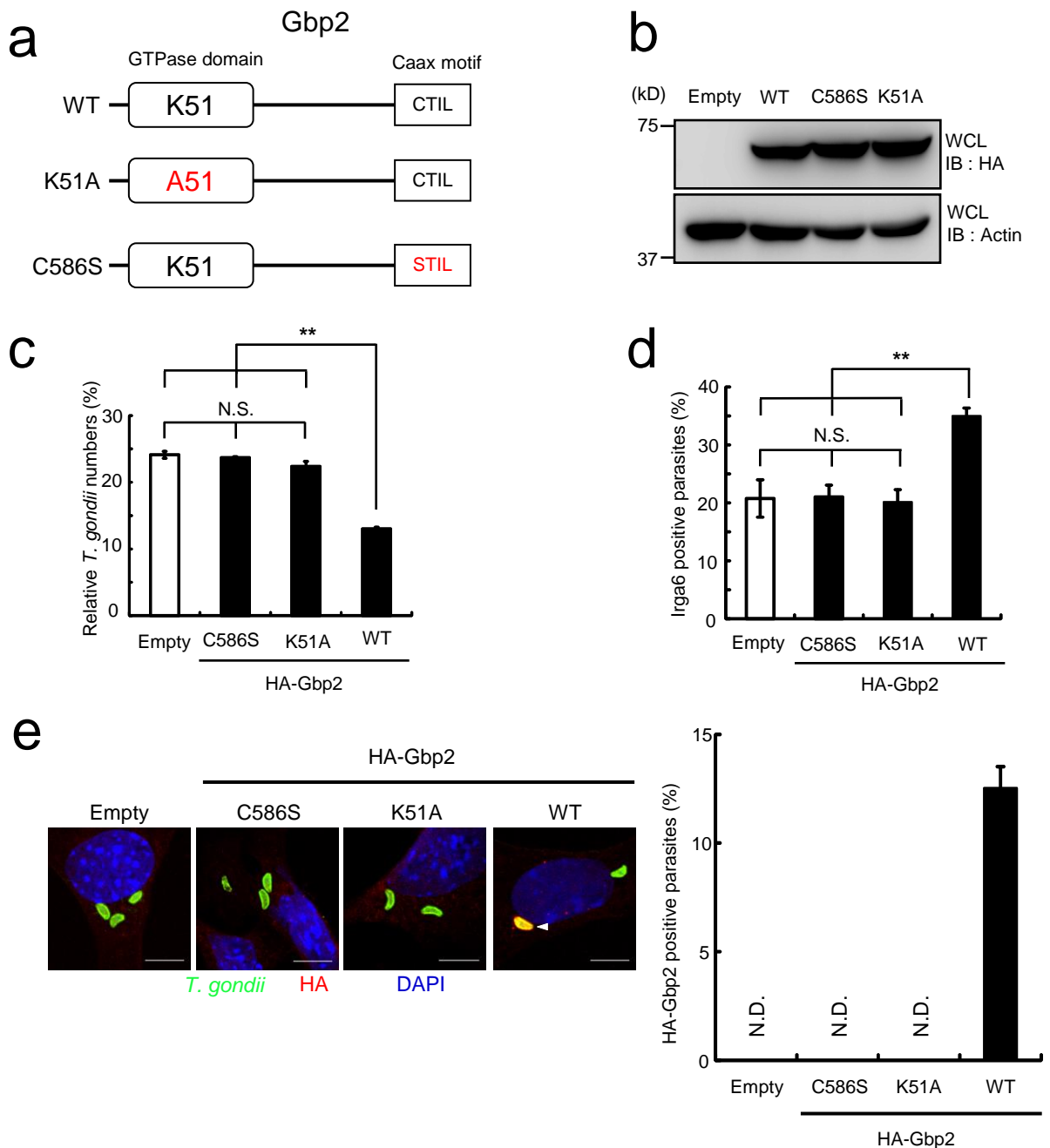


図14

Gbp2のN末端のヌクレオチド結合ドメインおよびC末端プレニル化ドメインの、病原体排除能における役割の検討

- (a) Gbp2のヌクレオチド結合ドメインおよびプレニル化ドメインの概略図
- (b) ウエスタンブロットによる野生型および変異体Gbp2の発現の確認
- (c) 野生型および変異体Gbp2の発現による、IFN- γ 依存的病原体排除能への影響
- (d) 野生型および変異体Gbp2の発現による、Irga6の*T. gondii*への集積への影響
- (e) 変異体Gbp2の*T. gondii*への集積の検討 [矢頭:*T. gondii*とGbp2の共局在を示す]

N.D., not detected ; N.S., not significant ; ** $P < 0.01$ (ANOVA および Tukey test)
 スケールバー = 10 μ m

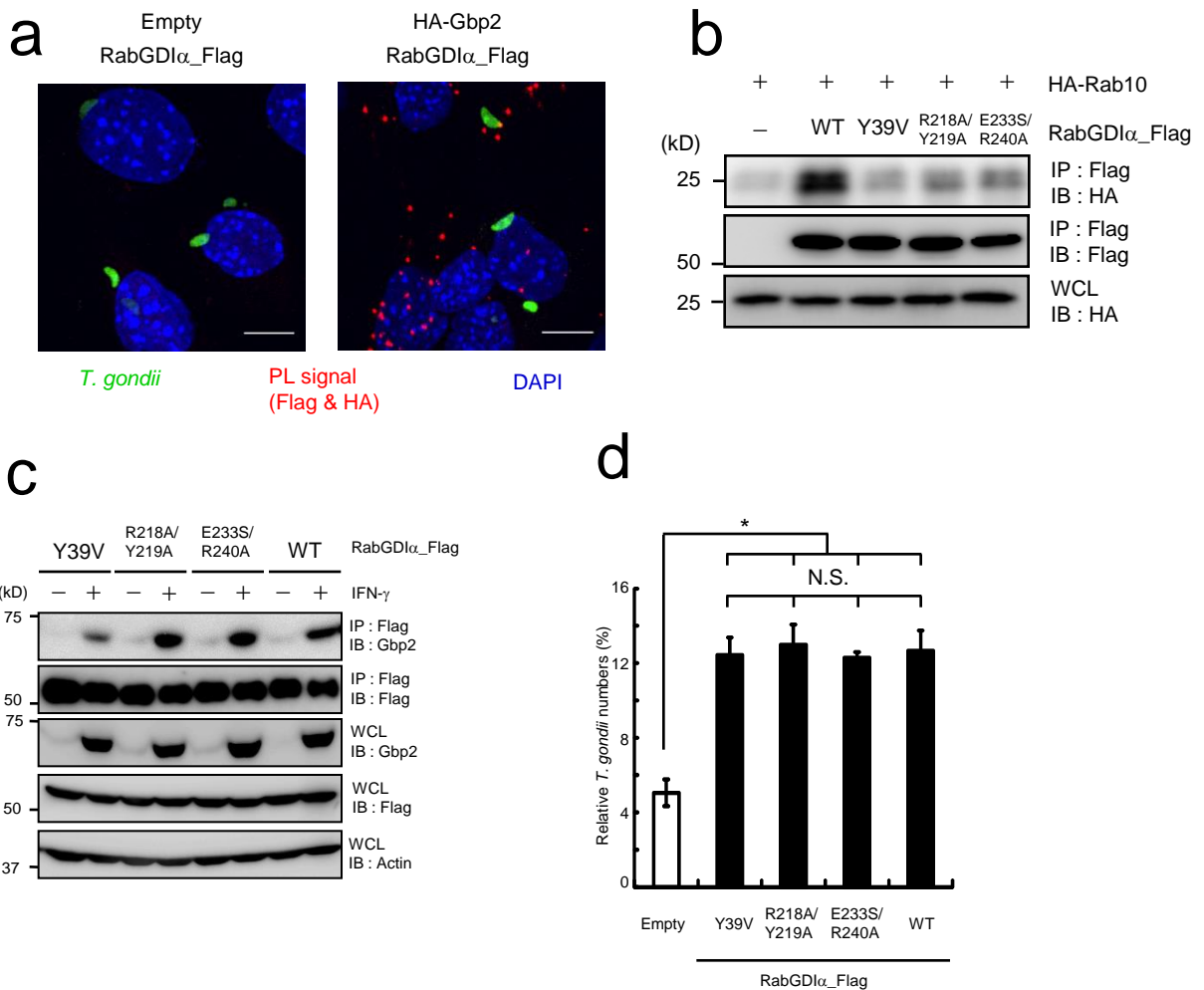


図15

RabGDI α のRab結合ドメインの、IFN- γ 誘導性免疫応答に対する阻害作用における役割

- (a) PLアッセイによるRabGDI α とGbp2の共局在の検出
- (b) 免疫沈降による、RabGDI α のRab結合ドメイン変異体とRab10との結合に関する検討
- (c) 免疫沈降による、RabGDI α のRab結合ドメイン変異体とGbp2との結合に関する検討
- (d) 野生型RabGDI α およびRab結合ドメイン変異体の発現による、IFN- γ 依存的病原体排除能への影響

N.S., not significant ; * $P < 0.05$ (ANOVA および Tukey test)

スケールバー = 10 μ m

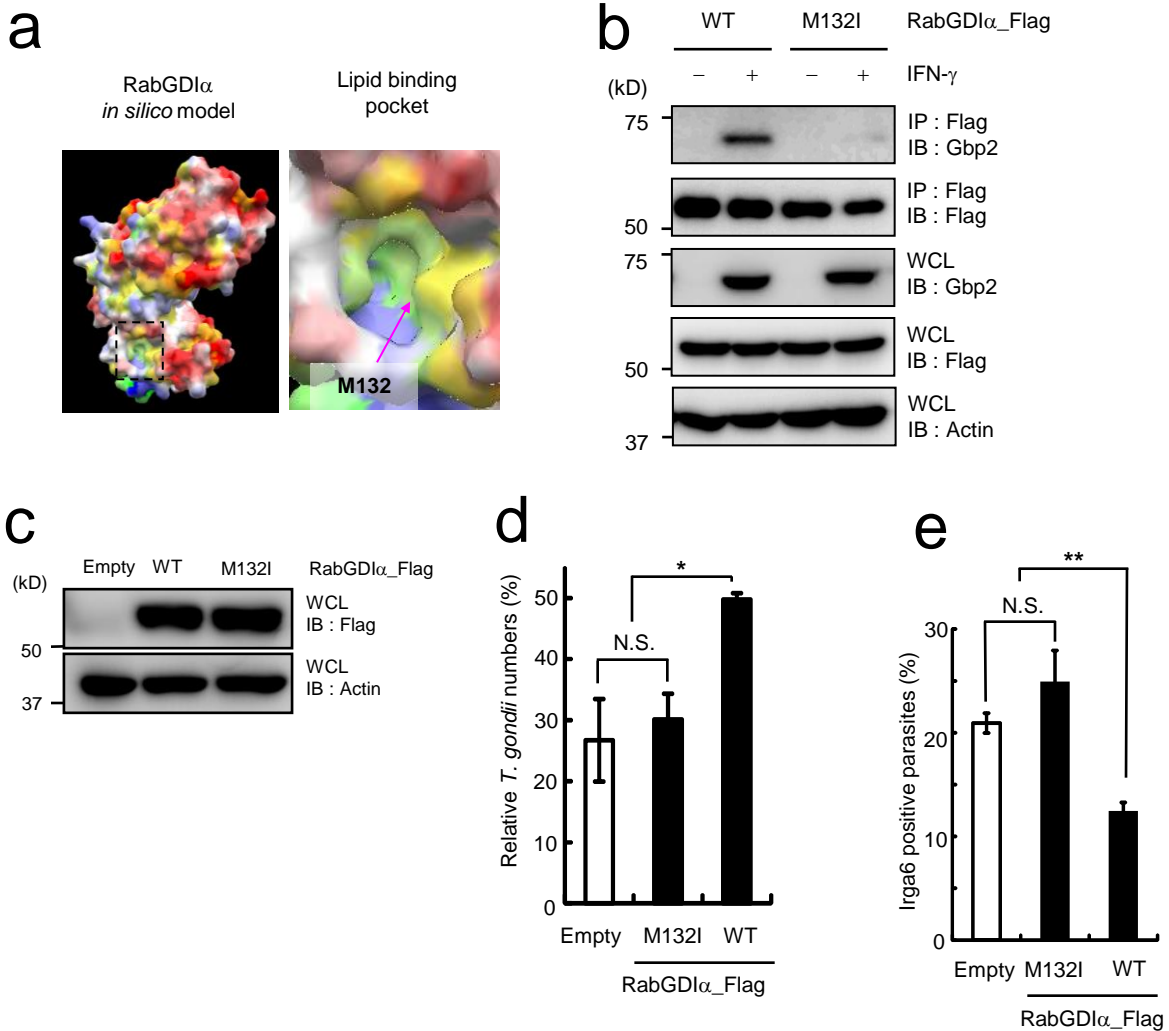


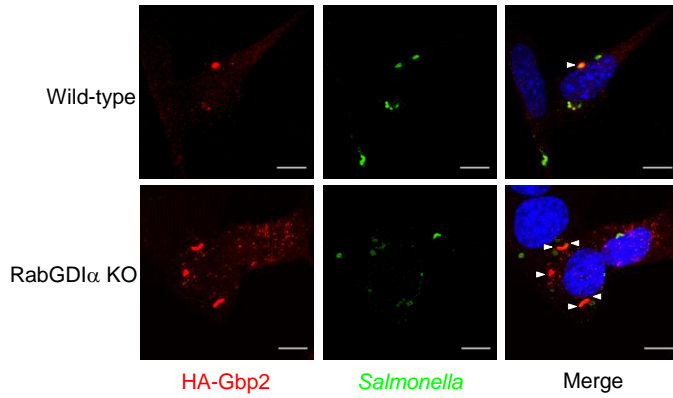
図16

RabGDI α の脂質結合ポケットの、IFN- γ 誘導性免疫応答に対する阻害作用における役割

- (a) RabGDI α の脂質結合ポケットの*in silico*立体構造モデル
- (b) 免疫沈降によるGbp2との結合の評価
- (c) ウエスタンブロットによるタンパク質発現の確認
- (d) RabGDI α の野生型および脂質結合ポケット変異体の発現による、IFN- γ 依存的病原体排除能への影響
- (e) RabGDI α の野生型および脂質結合ポケット変異体の発現による、Irga6の*T. gondii*への集積への影響

N.S., not significant ; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (ANOVA および Tukey test)

a



b

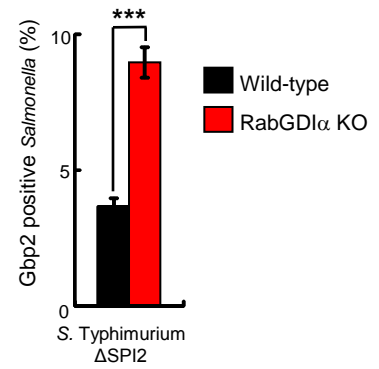


図17

RabGDI α 欠損が、*S. Typhimurium*へのGbp2の集積に及ぼす影響

- (a) 感染1時間後のRabGDI α 欠損細胞における免疫蛍光染色
[矢頭:*S. Typhimurium*とGbp2の共局在を示す]
- (b) 感染1時間後のGbp2の*S. Typhimurium*への集積の定量化

*** $P < 0.001$ (unpaired Student's t-test)

スケールバー = 10 μ m

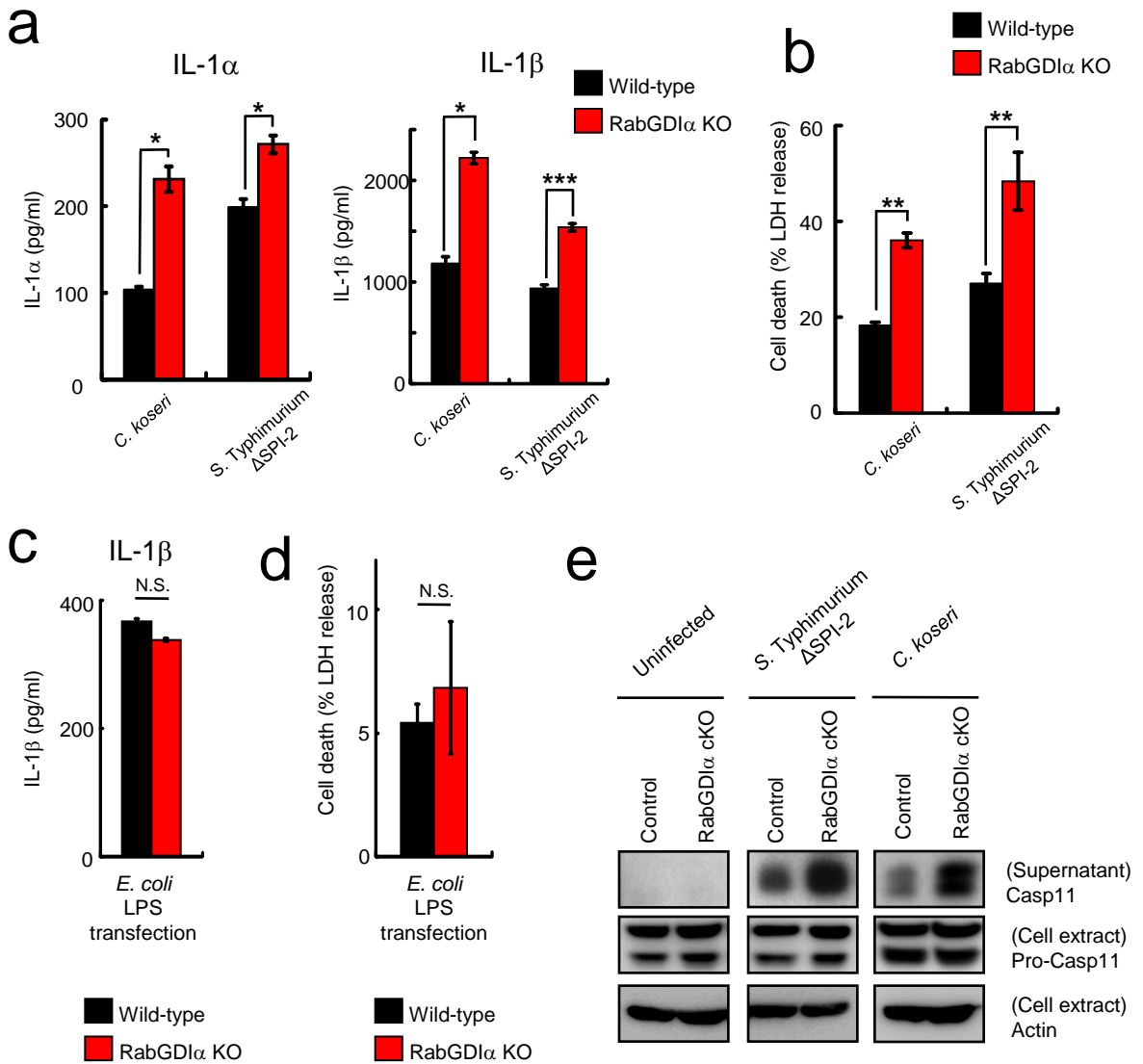


図18

RabGDIαの非標準的インフラマソームへの関連性の検討

- (a) ELISAによる、細菌感染マクロファージの培養上清に含まれるサイトカインの検出
- (b) LDHアッセイによる、細菌感染マクロファージの細胞死の評価
- (c) ELISAによる、LPSを導入したマクロファージの培養上清に含まれるサイトカインの検出
- (d) LDHアッセイによる、LPSを導入したマクロファージの細胞死の評価
- (e) ウェスタンブロットによるカスパーゼ11活性化の評価

N.S., not significant; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (unpaired Student's t-test)

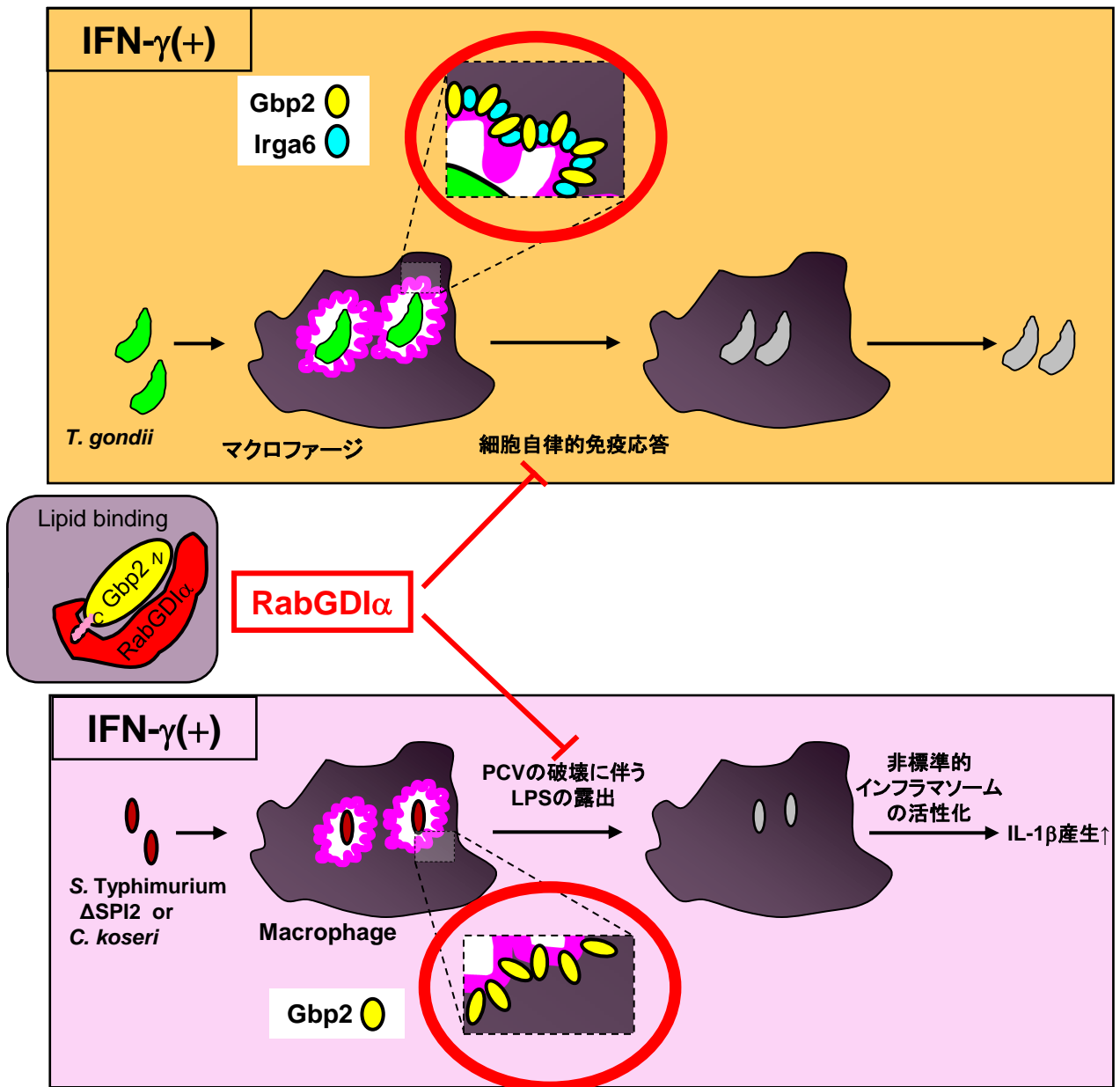


図19

RabGDI α による、IFN- γ 依存的免疫応答の阻害作用の概略図

RabGDI α は脂質結合ポケットを介してGbp2と直接的かつ特異的に結合してその機能を阻害する。Gbp2はIrga6の*T. gondii* PCVへの集積にとって特に重要な分子であり、RabGDI α によるGbp2の機能阻害はIrga6のPCVへの集積を抑制させ、Gbp2/Irga6依存的な免疫応答において抑制的に作用する(上段)。さらに、RabGDI α によるGbp2の機能阻害は、*S. Typhimurium*や*C. koseri*といった寄生胞形成グラム陰性細菌による感染で生じる非標準的インフラマソームを介した過度な炎症反応を制限する役割を果たす(下段)。

