

合には全く増強されなかった (図 1)。西ナイルウイルス E 蛋白質の 154 番目アミノ酸の糖鎖付加が C 型レクチンによる感染増強に関わることが示された。

2. 組換えインフルエンザウイルスの作製

インフルエンザウイルス (感染昆虫細胞が蛍光蛋白質を発現するようになるもの) の低温馴化にあたり、まず低温馴化株 FluMist のウイルス各遺伝子を用いた方が後の低温馴化が行いやすいと考えた。そこで VSVG(HA) (インフルエンザウイルス WSN 株の HA 分節に VSVG 遺伝子を入れたもの) と Venus(NA) (WSN 株 NA 分節に Venus) 以外の 6 分節をすべて FluMist 由来のものにしてリバーシジェネティクスを行ったが、増殖性のあるウイルスは得られなかった。そこで 5 分節を WSN 株由来、1 つのみ FluMist 由来としてウイルス回収を試みたところ、PB1, NP, PA, NS 分節を FluMist 由来にした場合に増殖性のウイルスを得ることができた (図 2)。M, PB2 分節を FluMist にした場合には増殖性ウイルスは得られなかった。その他いくつかの組み合わせで検討を行なったところ、図 3 に示す 8 種の分節組み合わせ (#3-#21) で増殖性のあるウイルスが得られた。

3. 組換えインフルエンザウイルスの低温馴化

得られたウイルスは 33°C で作製したものであるが、この温度では蚊は生存できない。そこで、図 3 に示した 8 種のウイルスのうち、PA 分節が WSN 株ではなく FluMist 由来の方が高い増殖性がみられた (データ示さず) #18, #19, #20, #21 と、8 分節すべてが WSN 株由来の #1 の 5 種のウイルスについて、低温馴化を行った。ハムスター由来 BHK 細胞に $\text{moi} = 0.0005$ で接種し、まず 33°C で増殖させてウイルスを回収した (CO_2 は無し)。Titer を測定し、再度同 moi で接種して 31°C で増殖させた。更に同様に繰り返して 29°C でウイルスを回収したところ、6 種のウイルスの中で増殖できなくなるものが 2 つあり、また他のウイルスも増殖性はかなり悪くなった (図 4)。29°C は高めの温度ではあるが蚊は生存可能であるので、この温度でのウイルス増殖を繰り返したところ、図 4 に示すように #1, #5, #18 のウイルスの増殖性は向上した。

D. 考察

1999 年にアメリカの東海岸に上陸した西ナ

イルウイルスは、それまでアフリカやヨーロッパで流行していた西ナイルウイルスと比べ病原性が高い。この病原性の差の原因は現在も解明されていないが、本実験でも用いたニューヨーク分離株 (New York 99, NY99) など北アメリカ分離株の E 蛋白質に N 型糖鎖付加部位が出来ているという違いがあり、病原性との関連が示唆される。C 型レクチンの 1 つ DC-SIGNR がこの糖鎖修飾により西ナイルウイルスの増殖を高めることが報告されていた (Davis et al., 2006, J. Virol.) が、他の C 型レクチンについては不明であった。今回の研究により、西ナイルウイルス NY99 株が DC-SIGNR 以外にも複数の C 型レクチンの発現細胞に効率よく感染すること、またその感染増強には E 蛋白質の 154N の糖鎖が関わっていることが考えられた。C 型レクチンは様々な分化ステージのマクロファージや樹状細胞、肝細胞に発現しており、今後はこれらの細胞への感染効率もしくは感染能力と病原性の関連を調べる必要がある。

これまでの年度で、蚊などからの当温遺伝子増幅法の確立に有効と考えられるウイルス系のテンプレート、つまり蛍光蛋白質を発現する水疱性口炎ウイルスと西ナイルウイルス様感染性粒子を作製した。今回新たに作製したテンプレートは、哺乳類細胞に 29°C で感染・増殖し蛍光蛋白質を発現するインフルエンザウイルスベースのものである。昆虫由来の細胞への感染性や増殖性は検討していないが、感染するのであれば、当温遺伝子増幅法の確立において、特に有用なコントロールとしてのテンプレートになると考えられる。

E. 結論

西ナイルウイルスについては高い病原性の一端が解かれたと言える。インフルエンザウイルスについては実験系確立のテンプレートの 1 つとなる寸前の段階である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

村上晋、堀本泰介、桂廣亮、下島昌幸、河岡義裕 「Vero 細胞における高増殖性インフルエンザワクチンシードウイルス開発のための基礎研究」 第 57 回日本ウイルス学会 2009 年 10 月 26 日 千代田区

小澤真、下島昌幸、五藤秀男、渡邊真治、八田寧子、堀本泰介、河岡義裕 「A 型イン

フルエンザウイルス vRNP の安定発現細胞株を用いた vRNA 転写・複製阻害物質の探索」第 57 回日本ウイルス学会 2009 年 10 月 27 日 千代田区

Matsuno K, Kishida N, Usami K, Igarashi M, Yoshida R, Nakayama E, Shimojima M, Feldmann H, Irimura T, Kawaoka Y, Takada A. Different potential of C-type lectin-mediated entry between Marburg virus strains. *J Virol* 84:5140-7, 2010.

Nishimura Y, Shimojima M, Tano Y, Miyamura T, Wakita T, Shimizu H. Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat Med* 15:794-7, 2009.

Itoh Y, Itoh Y, Shinya K, Kiso M, Watanabe T, Sakoda Y, Hatta M, Muramoto Y, Tamura D, Sakai-Tagawa Y, Noda T, Sakabe S, Imai M, Hatta Y, Watanabe S, Li C, Yamada S, Fujii K, Murakami S, Imai H, Kakugawa S, Ito M, Takano R, Iwatsuki-Horimoto K, Shimojima M, Horimoto T, Goto H, Takahashi K, Makino A, Ishigaki H, Nakayama M, Okamatsu M, Takahashi K, Warshauer D, Shult PA, Saito R, Suzuki H, Furuta Y, Yamashita M, Mitamura K, Nakano K, Nakamura M, Brockman-Schneider R, Mitamura H, Yamazaki M, Sugaya N, Suresh M, Ozawa M, Neumann G, Gern J, Kida H, Ogasawara K, Kawaoka Y. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 460:1021-5, 2009.

Kakugawa S, Shimojima M, Neumann G, Goto H, Kawaoka Y. RuvB-like protein 2 is a suppressor of influenza A virus polymerases. *J Virol* 83:6429-34, 2009.

Kobayashi K, Kato K, Sugi T, Yamane D, Shimojima M, Tohya Y, Akashi H. Application of retrovirus-mediated expression cloning for receptor screening of a parasite. *Anal Biochem* 389:80-2, 2009.

Li Z, Watanabe T, Hatta M, Watanabe S, Nanbo A, Ozawa M, Kakugawa S, Shimojima M, Yamada S, Neumann G, Kawaoka Y. Mutational analysis of conserved amino acids in the influenza A virus nucleoprotein. *J Virol* 83:4153-62, 2009.

Kakugawa S, Shimojima M, Goto H, Horimoto T, Oshimori N, Neumann G, Yamamoto T, Kawaoka Y. Mitogen-activated protein

kinase-activated kinase RSK2 plays a role in innate immune responses to influenza virus infection. *J Virol* 83:2510-7, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録情報なし。

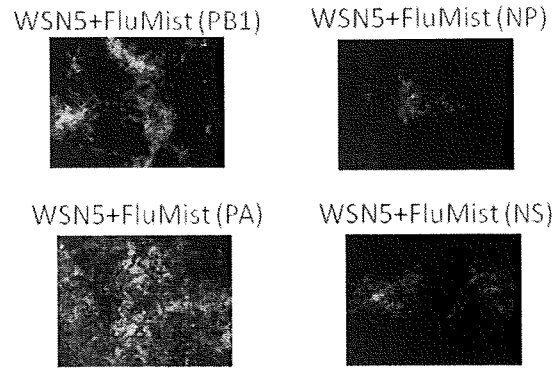


図 1 : 感染性西ナイルウイルス様粒子の C 型レクチンによる感染増強と E 蛋白質の糖鎖の有無

コントロール (Normal) Jurkat 細胞、およびその DC-SIGN, DC-SIGNR, ASGPR, MGL 発現細胞における感染性西ナイルウイルス様粒子の感染性。

(濃) 野生型 E 蛋白質の場合

(薄) E 蛋白質の N154A 変異体の場合

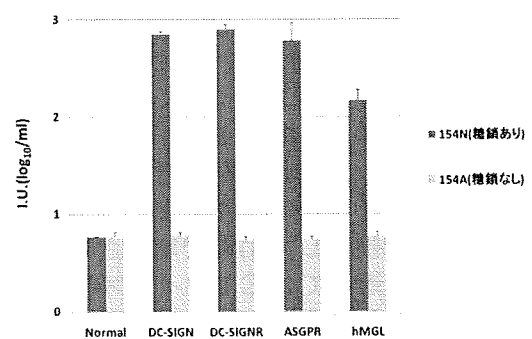


図 2 : インフルエンザウイルスの低温馴化株 FluMist の分節を 1 つ含んだ WSN 株の感染性 (HA, NA 遺伝子はそれぞれ VSV-G, Venus と入れ替えてある)

FluMist 由来の PB1, NP, PA, NS 分節を用いた場合にはウイルスの増殖が認められたが、M, PB2 分節を用いた場合には認められなかった。BHK 細胞、33°C 培養。

| HA | NA | M | PB2 | PB1 | PA | NS | NP | |
|-----------|------------|-----|-----|---------|---------|---------|---------|-----|
| WSN(VSVG) | WSN(Venus) | WSN | WSN | WSN | WSN | WSN | WSN | #1 |
| WSN(VSVG) | WSN(Venus) | WSN | WSN | FluMist | WSN | WSN | WSN | #3 |
| WSN(VSVG) | WSN(Venus) | WSN | WSN | WSN | FluMist | WSN | WSN | #5 |
| WSN(VSVG) | WSN(Venus) | WSN | WSN | WSN | WSN | FluMist | WSN | #6 |
| WSN(VSVG) | WSN(Venus) | WSN | WSN | WSN | WSN | WSN | FluMist | #7 |
| WSN(VSVG) | WSN(Venus) | WSN | WSN | FluMist | FluMist | WSN | WSN | #18 |
| WSN(VSVG) | WSN(Venus) | WSN | WSN | WSN | FluMist | FluMist | WSN | #19 |
| WSN(VSVG) | WSN(Venus) | WSN | WSN | WSN | FluMist | WSN | FluMist | #20 |
| WSN(VSVG) | WSN(Venus) | WSN | WSN | WSN | FluMist | FluMist | FluMist | #21 |

図3：増殖性が認められた組換えインフルエンザウイルス

図2に示した結果に基づき、様々な組み合わせを行いFluMist由来の分節数を増やした。そのうち増殖が認められたものをまとめて示した。BHK細胞、33℃培養。

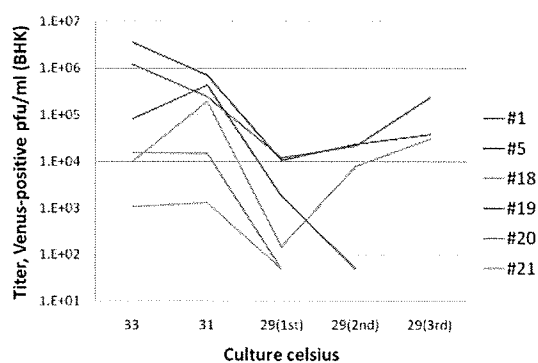


図4：低温馴化

図3に示したウイルスのうち、#1、#5、#18-#21について、BHK細胞、moi = 0.0005 (CO₂無し)の条件で少しずつ培養温度を下げてウイルスの継代を行った。29℃以降は同じ温度で継代を続けた。

等温遺伝子増幅産物の検出に向けたイムクロマト・ストリップ作成法の確立

研究分担者 平田 晴之 酪農学園大学獣医学部 獣医学科 実験動物学教室 准教授

研究要旨 マラリア、西ナイル熱、デング熱などの蚊媒介性の感染症の本邦への侵入防除に寄与するため、LAMPなどの等温遺伝子増幅法による迅速・簡便病原体検出法の確立を目的とした。分担研究者は等温遺伝子増幅法により増幅された増幅産物を目視により判定が可能であるイムクロマト法開発のため、既存の病原体の遺伝子増幅産物を用いてイムクロマト・ストリップの作製、目視による判定などの検討を行った。本研究により、病原体遺伝子増幅産物を抗原としたストリップを作製することに成功し、増幅遺伝子を用いた病原体検出法の応用への基礎データを得ることができた。

A. 研究目的

現在、PCRを代表とする遺伝子診断法の多くは野外での利用は特殊な設備の必要性など容易なことではない。病原体流行地においては大量のサンプル、及び広大なエリアを診断するために、迅速かつ簡便な病原体検出法が必要である。最近の研究において、迅速・簡便な診断法として、イムクロマト・ストリップを用いてマラリア原虫、クリプトスポリジウム、あるいはリーシュマニアの診断法の開発が報告されている。これらの報告は病原体を予め固相化したストリップに感染血清を用いて病原体を検出する免疫血清学的手法であるがサンプルの量、反応条件、感染血清中の抗体価によって判定が非常困難となることが短所である。従って、LAMP法などの等温遺伝子増幅法により増幅された増幅産物を目視により判定可能であるイムクロマト法開発をすることは、病原体を直接的に検出することが可能であり、さらに増幅産物のコピー数が少なくても検出可能である。また、増幅遺伝子は長期保存可能であり本イムクロマト・ストリップの開発は感染症の早期発見、本邦への侵入防除に寄与するものと考えられる。そこで、研究分担者は準備基盤の確立を目的としてイムクロマト・ストリップ開発に向けた抗原である遺伝子候補の選定と作製、さらにそれらを用いたイムクロマト・ストリップの作成、目視による判定および検討を行った。

B. 研究方法

1. *Babesia gibsoni* p50 遺伝子の PCR 法による増幅

既に報告されているイヌバベシア症の病原体である *Babesia gibsoni* (*B. gibsoni*) の p50 遺伝子 (S. Fukumoto et. al., Journal of Clinical Microbiology, 2001) を用いて、*B. gibsoni* に特異的なプライマー配列を設計した。プライマーの設計は 5'末端をそれぞれ FITC-と Biotin-ラベルした特異的プライマーで PCR 反応を行い増幅した。

2. FITC-Biotin 標識 *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物を検出のための最適なイムクロマト・ストリップの作製

前年度の結果を踏まえて、より最適なイムクロマト・ストリップを作製した【図1】。FITC-Biotin 標識 *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物を検出するためのイムクロマト・ストリップを用いて検出する最適な HF180MC100 のメンブレン (ミリポア)、No. 8984 (ミリポア) のコンジュゲートパット、及びストレプトアビジン標識金コロイド粒子と抗 FITC 抗体の最適 pH を pH7.2 の緩衝液として作製した。

ストリップは以下の図に示したように作成した。

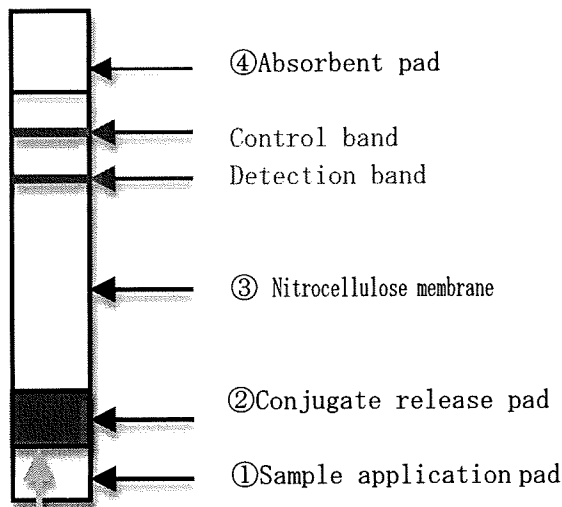


図1 [上図の説明]

- ① サンプルを入れるフィルターでサンプル中に含まれる大きい分子を取り除く役割がある、
- ② 上記方法2の最適 pH で作製したストレプトアビジン標識金コロイド粒子をグラスファイバーパッド (Schleicher & Schuell) に染みこませて乾燥させ作製した。
- ③ ニトロセルロースメンブレン (Schleicher & Schuell) に抗 FITC 抗体 (BETHYL) 500 μ l(1mg/ml) を BioDot's BioJet 3050 quanti dispenser (BioDot Inc.) を用いて検出バンド (Detection band) として、また、ビオチン (BETHYL) をコントロール検出バンドライン (Control band) とし、それぞれ最適 pH に調整し 1mm 固相化を行った。これら、検出バンドとコントロールバンドを固相化させたニトロセルロースメンブレンは 0.5 %カゼイン含 50 mM ホウ酸緩衝液により 30 分 50 $^{\circ}$ C でブロッキングを行い、さらに洗浄液 (0.5% sucrose、50 mM Tris-HCl (pH7.4)、0.05% cholanic acids) で3回洗浄を行った。
- ④ ①でアプライしたサンプルの残液を吸収するパッド (Schleicher & Schuell)

以上、①から④のパッドをプラスチックプレートにそれぞれテープで貼り付け 5 mm 幅にカットした。作製したイムノクロマト・ストリップは使用するまで乾燥剤をいれて室温にて保存した。

(倫理面への配慮)

本研究は病原体検出法の確立を目指すものであり、特段の倫理上の配慮事項を含まない。

C. 研究結果

1. *B. gibsoni* P50 遺伝子の PCR による増幅の確認

5'末端をそれぞれFITC-と Biotin-ラベルした特異的プライマーで PCR 反応を行い増幅し、増幅バンドを確認した。

2. FITC-Biotin 標識 *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物を検出のための最適なイムノクロマト・ストリップの作製

ニトロセルロースメンブレン HF180MC100, ストレプトアビジン標識金コロイド粒子をコンジュゲートパッドに浸漬させ乾燥させたコンジュゲートパッド (No. 8964: ミリポア) を用いて、イムノクロマト・ストリップを作製した。

作製したイムノクロマト・ストリップの Sample application pad に1で増幅させた FITC-と Biotin-でラベルした *B. gibsoni* P50 遺伝子の PCR 増幅産物を用いて評価した (図2)。

その結果、原虫感染の明瞭な検出バンドが認められた (Detection band)、しかしながら、コントロールバンドには認められなかった (図2)。

3. イムノクロマト・ストリップの保存性についての検討

イムノクロマト・ストリップを半年間室温に保存し、PCR により得られた *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物を用いて検討を行った。その結果、半年前と同様の検出バンドが確認された。

以上の結果より、本イムノクロマト・ストリップにおける *B. gibsoni* の検出は少なくとも半年は使用可能であることを確認した。

D. 考察

研究分担者は準備基盤の確立を目的として既存の病原体遺伝子を用いたイムノクロマト・ストリップの作製、目視による判定および検討を行った。本研究において作製したイムノクロマト・ストリップはイヌバベシア感染症において高感度に検出することが可能であり、遺伝子診断に有用であることが示唆された。しかしながら、今回検討したコントロ

ールラインは検出できなかった。この原因としてストリップに何らかの理由で biotin が固相化できなかったため、ストレプトアビジン標識金コロイド粒子がトラップされずに流れていったことが考えられる。これからの検討課題として、コントロールラインに固相化するタンパク質の選定と条件検討、さらに複数の病原体遺伝子を用いたイムノクロマト・ストリップの作製及びその検出感度の検討が必要である。その際、複数の病原体遺伝子に対して、それぞれの特異性、感度を上げるために抗原及び抗体の選定が重要な鍵になると考えられ、今後の検討事項である。

E. 結論

本研究により、イムノクロマト・ストリップ法を利用した増幅遺伝子を用いた病原体検出法の応用への基礎データを得ることができた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

陳内理生、倉田貴子、辻正義、中嶋瑠衣、平田晴之、藤澤幸平、白木裕美、浅川満彦、那須野豊彦、石原智明 野生ヒグマから検出された新型ピロプラズマ原虫 第 148 回日本獣医学会学術集会 2009.09.25

H. 知的財産権の出願・登録情報

なし

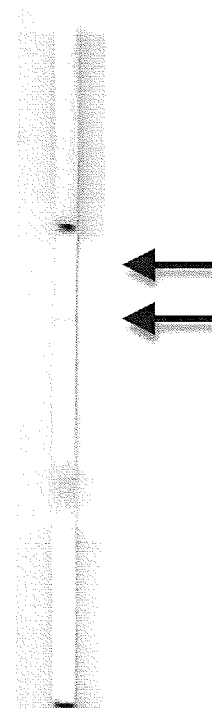


図2 *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物を用いたイムノクロマト・ストリップの評価(最適条件の検討)

ニトロセルロースメンブレン HF180MC100、コンジュゲートパット No. 8964 を用いて、イムノクロマト・ストリップを作製した。さらに、ストレプトアビジン標識金コロイド粒子及び抗FITC抗体を pH7.2 に調整し作製したイムノクロマト・ストリップに、FITC-Biotin 標識 *B. gibsoni* P50 遺伝子増幅産物を用いて評価した。上の矢印はコントロールライン、下の矢印は検出バンドラインを示す。

ネズミマラリア原虫を用いたヒトマラリア原虫感染モデルの構築

研究分担者 油田 正夫 三重大学大学院医学系研究科病態解明医学講座 教授

本研究はネズミマラリア原虫を用いてヒトマラリア原虫感染モデルの開発を行い、LAMP などの等温遺伝子増幅法を用いたヒトマラリア原虫の検出法開発に寄与することを目的とする。前年度我々は環状ネズミマラリア人工染色体を用い、蛍光タンパク質を外来遺伝子として導入したネズミマラリア原虫を作成した。本年度は環状ネズミマラリア人工染色体を改良し、テロメアを有する直鎖状人工染色体を開発した。また、直鎖状人工染色体を用い外来遺伝子をネズミマラリア原虫に導入することを試みた。直鎖型人工染色体は環状人工染色体に比して、約100倍の遺伝に導入効率を有し、蚊のステージであるオオキネート、オオシスト、スポロゾイトを含むマラリア原虫のライフサイクル全体に亘り安定的に保持された。以上の結果よりネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* にヒトマラリア原虫の遺伝子を直鎖状の疑似染色体に外来遺伝子として導入し、ヒトマラリア原虫と全く同一の条件下で等温遺伝子増幅法が遂行できる完全なモデル系を確立することが出来た。

A. 研究の背景と目的

研究は LAMP などの等温遺伝子増幅法を用いた、ヒトマラリア原虫の蚊媒介性病原体検出法の有効性を検証するため、ネズミマラリア原虫を用いた感染モデルを開発することを目的とする。

熱帯熱マラリア原虫などのヒトマラリア原虫に感染した蚊を実験に用いることは、研究者の安全、維持管理する設備等を考慮すると障害があまりにも大きく、国内では事実上不可能である。これに対しネズミマラリア原虫は人には絶対に感染せず、感染モデルとしても古くから用いられ、そのモデルとしての有用性は確認されている。しかしながら増幅に用いられるプライマー等の条件をヒトマラリア原虫に用いるものと完全に一致させることはネズミマラリア原虫では不可能であり、最終的に等温遺伝子増幅法の有効性を確認するためには、実際にヒトマラリア原虫に感染した蚊を用いることが是非とも必要である。

分担研究者はこの目的を実現するために、ネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* にヒトマラリア原虫の遺伝子を外来遺伝子として導入し、ヒトマラリア原虫と全く同一の条件下で等温遺伝子増幅法が遂行できるモデル系を確立することを着想した。

マラリア原虫 (*Plasmodium spp.*) の遺伝子操作は 1993 年の鳥マラリア原虫 (*P. gallineceum*) のザイゴートとガメートへの遺伝子導入の成功によって始まり、1995 年の熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*) 及びネズミマラリア原虫 (*P. berghei*) の赤血球ステージの原虫への遺伝子導入の成功によって、その応用性が示された。更に翌年、熱帯熱マラリア原虫とネズミマラリア原虫において、外来遺伝子と原虫染色体間での相同組換えによる遺伝子導入法が報告され、安定的に外来遺伝子を発現する遺伝子組換え原虫が作出できる技術として確立した。現在、熱帯熱マラリア原虫を初めとし、複数の原虫ゲノムプロジェクトが終了しており、それに伴い、遺伝

子操作技術の重要性は高まり、この技術を基に感染・寄生に関わる分子基盤の解明、新規ワクチン開発等が精力的に進められている。

一方で、この技術には未だ複数の技術的な問題点がある。第一に遺伝子導入効率の低さが挙げられる。通常の細胞と異なり、赤血球ステージの原虫の核まで遺伝子を導入するためには赤血球膜、寄生胞膜、原虫細胞膜、核膜の四重膜を通過する必要があり、遺伝子導入の最大の障害となっている。第二として操作の煩雑さが挙げられる。相同組換えによって外来遺伝子を導入する場合、最終的に確実に遺伝子が挿入された原虫を選択する必要がある。この作業には通常、数週間から数ヶ月程度かかることから、多大な労力と時間を要する。第三に環状プラスミドを用いて、染色体外 DNA として遺伝子を導入する場合、導入遺伝子の安定性が薬剤に依存する点が挙げられる。このため、薬剤処理可能な赤血球ステージの原虫には適しているが、薬剤処理が不可能な蚊・肝臓ステージの原虫では安定的に遺伝子が維持されず、この方法は利用できない。また細胞内で複数コピーとして維持され、モデル系として利用する際には定量性が問題となる。以上のことより、マラリア原虫の遺伝子操作は未だ改良する必要があると考えられる。

我々はマラリア原虫人工染色体を用いた遺伝子導入によって、この問題を解決することができるのではないかと考えた。すなわちマラリア人工染色体を用いてヒトマラリア遺伝子を *Plasmodium berghei* に導入し、ヒトマラリア遺伝子を染色体中と同じ条件で保持するネズミマラリア原虫を作成し、等温遺伝子増幅法の条件検討を行う。人工染色体とは細胞内で人工的に構築した極小の染色体で宿主の細胞染色体とは独立に存在できる染色体であり、①染色体 DNA の複製を開始させる「複製起点」、②細胞分裂期における染色体の均等分配に重要である「セントロメア」、③染色体の末端構造の維持に必要な「テロメア」の三領域で構成される。これまでに、細菌人工染色体 (BAC)、酵母人工染色体 (YAC: Yeast artificial Chromosome) が開発され広く利用

されている。人工染色体は宿主毎に、必要とされる三領域配列が異なるため、生物種単位で開発を行う必要があるが、マラリア原虫を宿主とする人工染色体はこれまで確立されていない。

これまでの研究で分担者はネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*) の染色体からセントロメア領域を同定し、このセントロメア領域のヌクレオチド配列をプラスミドに組み込んで、マラリア原虫に適用可能な環状人工染色体を作製した。作製した人工染色体を用いて遺伝子組み換えを行うと、娘細胞への分配効率の上昇により、遺伝子導入後の人工染色体の保持率が向上した。また、相同組換えを抑制する効果により、宿主であるマラリア原虫の染色体に影響を与えずに外来遺伝子を組み入れることが可能となった。さらに、通常のプラスミドで見られる異常な複製が起こらないことも確認できた。

以上の結果より使用したセントロメア領域が *in vivo* で正常に機能することが確認された。一方、上記したように実際の人工染色体は直鎖状であり、その両末端にはそれを保護するためのテロメア配列を有している。そこで本年度は環状ネズミマラリア人工染色体を改良し、テロメアを有する直鎖状人工染色体 (linear *Plasmodium* Artificial Chromosome, L-PAC) の開発を試みた。また、直鎖状人工染色体を用い外来遺伝子をネズミマラリア原虫に導入しその機能を評価した。

B. 本年度の計画

以上の目的を達成するため、平成 21 年度において分担研究者は以下に記す 4 つの課題を設定し研究を遂行した。

研究課題 1. ネズミマラリア原虫テロメア配列のクローニング

前年度に作製した環状人工染色体を直鎖化することを目的として、ネズミマラリアゲノムよりそのテロメア配列をクローニングする。

研究課題 2. 直鎖型人工染色体コンストラクトの構築

人工染色体を環状より本来の染色体に近い直鎖状に改良するために、クローニングしたテロメアと直鎖化のための制限酵素部位を環状染色体内部に挿入する。

研究課題 3. 血液感染ステージへの導入と安定性の評価

作成した人工染色体を実際にネズミマラリア原虫に導入し、その導入効率及び血液ステージでの安定性を評価する。このステップにおいて、血液感染ステージにおける分配効率を計算し実用的な人工染色体として機能することを評価する。

研究課題 4 ベクター感染ステージでの導入染色体の安定性の評価

直鎖状人工染色体を導入したネズミマラリア原虫を実際にハマダラ蚊に感染させて、導入した人工染色体が蚊の中のステージでも安定的にマラリア原虫に保持されるかを、GFP をマーカーとして用いて評価する。蚊の内部でマラリア原虫はオオキネート、オオシストとなり、さらに無性生殖で増殖しスポロゾイトとなる。これらのステージでも導入した人工染色体が安定的に各原虫に分配されることを確認する必要がある。

C. 研究方法

1. ネズミマラリア原虫テロメア配列のクローニング

マラリア原虫のテロメアに関しては 1985 年、Ponzi M. らによってネズミマラリア原虫 (*P. berghei*) において報告された。この報告によると、ネズミマラリア原虫のテロメアは 5' -TT(T/C)AGGG-3' という 7 塩基の配列モチーフが高度に反復したものであるとされている。ゲノムプロジェクトの成果により、熱帯熱マラリア原虫 (*P. falciparum*)、サルマラリア原虫 (*P. knowlesi*) においても同様の配列がテロメア配列モチーフとして示され、マラリア原虫で高度に保存されていることが明らかとなった。更にこの配列モチーフをその他の生物 (ヒト (5' -TTAGGG-3'), テトラヒメナ (5' -TTGGG-3')) と比較した結果、類似

していることが示された。以上の報告を参考に primer を作製し PCR にてネズミマラリア原虫ゲノムよりテロメアのクローニングを試みた。PCR で増幅されたセントロメア候補領域を pCR2.1-TOPO (Invitrogen 社製) にクローニングし、配列を決定した。

2. 直鎖状人工染色体コンストラクトの構築
クローニングしたセントロメアおよびテロメアを用いてマラリア原虫人工染色体の構築を行った。人工染色体にはセントロメアおよびテロメアに加え、環状人工染色体状人工染色体と同様に薬剤耐性遺伝子、GFP 遺伝子を組み込み、まず、環状のプラスミドを構築した。プラスミド上ではテロメアは向かい合うようにクローニングし、二つのテロメアの間には約 500bp のスペーサー配列を挿入して、制限酵素 (*PmeI*) で切断することにより直鎖化できるようにした (図 2 参照)。

3. ネズミマラリア原虫血液感染ステージへの人工染色体の導入と安定性の評価

構築した人工染色体をネズミマラリア原虫に導入し、GFP を指標にして分配効率を評価した (図 1)。人工染色体のネズミマラリア原虫への導入にはエレクトロポレーション法を使用した。まず、各 DNA を 5 μ g 調製し、ネズミマラリア原虫へエレクトロポレーションにより導入した。遺伝子導入後の原虫は直ちにラット (Wister 3 週齢) へ接種した。遺伝子導入後、20 時間経過した段階で薬剤をラットへ投与した。24 時間ごとにラット尾静脈を採取して塗末標本を作製し、原虫寄生率を計測した。コントロールプラスミド (p b GFP con)、環状人工染色体 (C-PAC)、直鎖状人工染色体 (L-PAC) をそれぞれ有する組換え原虫をマウス (Balb/c 8 週齢) に接種し、薬剤を投与した。その後、寄生率が 5~10% になるまで維持した。次に、組換え原虫を感染させたマウスから赤血球 (感染赤血球) を採取し、マウス (Balb/c 8 週齢) へ接種した。これより薬剤非存在下で原虫を維持し、原虫寄生率をモニターした。原虫寄生率が 5~10% になった時点で尾静脈より血液 (約 10

ml) を採取し、1 ml の RPMI 1640 (10% FCS) へ入れ、Hoechst 33258 (1 μ M) で原虫核を染色した。その後、Hoechst 染色された原虫中の GFP 発現原虫の割合を蛍光顕微鏡で測定、分配効率を算出した。

4. ベクター感染ステージでの導入染色体の安定性の評価

コントロールプラスミド (pbGFPcon)、環状人工染色体 (C-PAC)、直鎖状人工染色体 (L-PAC) をそれぞれ有する組換え原虫をマウス (Balb/c 8週齢) に接種し、薬剤を投与した。マウスを蚊の吸血に供した。その後、吸血した蚊を約 20 ~ 25 日間維持した。なお、この期間中に原虫は受精、生育し、最終的に蚊唾液腺内スポロゾイトとなっている。蚊より唾液腺を摘出し、それに含まれるスポロゾイトを、medium 199 を用いて調製した。全スポロゾイトに対する GFP 発現スポロゾイトの占める割合を、蛍光顕微鏡を用いて測定、分配効率を算出した。

D. 研究結果

1. ネズミマラリア原虫テロメア配列のクローニング

PCR にてネズミマラリア原虫ゲノムよりテロメアのクローニングを試みたところ 200 ~ 300 bp の DNA 断片が増幅された。増幅した断片をプラスミドにクローニングし配列を確認した。その結果、Ponzi M. らと同様の 5' -TT(T/C)AGGG-3' 配列が反復した約 200bp のテロメア配列をクローニングすることに成功した。これを用いて人工染色体構築を試みた。

2. 構成的 GFP 発現コンストラクトを含む人工染色体の構築

構築した人工染色体の概略図 (図 1) を示す。最終的に得られる直鎖状の人工染色体は (Linear Plasmodium Artificial chromosome : L-PAC) と名づけた。

2. ネズミマラリア原虫血液感染ステージへの人工染色体の導入と安定性の評価

構築した PAC をネズミマラリア原虫へと導入した。その結果、導入後の寄生率 (全赤血球に対する感染赤血球の割合 (%)) の上昇は明らかに L-PAC の方が環状人工染色体やコントロールプラスミドより速いことが示された (図 3)。寄生率の差から導入効率を予測し、比較すると、L-PAC は環状人工染色体と比べ、約 100 倍、コントロールプラスミドとは約 1000 倍以上、遺伝子導入効率が上昇した結果となった。

3. ベクター感染ステージでの導入染色体の安定性の評価

続いて PAC の原虫内での安定性を評価した。その結果、PAC は環状人工染色体と同程度の安定性を持つことが明らかとなり (図 4A)、テロメアの付加と直鎖化が人工染色体の分配に影響を与えないことが示された。蚊ステージについても検討した結果、唾液腺スポロゾイトの約 90% が L-PAC を安定的に維持していることが明らかとなった (図 4B)。更に肝臓ステージを通過した原虫での安定性を評価した結果、約 65% の原虫が L-PAC を維持しており、環状人工染色体と比較して、約 2.5 倍程度、安定性が向上することが示された (図 4C)。この結果よりセントロメアに加え、テロメアが肝臓ステージでの染色体分配において役割を果たすことが推定された。また、L-PAC は原虫の生活環を通じ、常に直鎖状を維持していることも明らかとなり、加えて原虫染色体とは相同組換えを起こさないことも示された (図 5)。

E. 考察

今年度の研究では人工染色体を用いることによって蚊感染ステージを通じて外来遺伝子が安定に保持されることが確認された。今回の人工染色体は直鎖状タイプのもので、両末端にテロメア配列を持つ。この人工染色体はほとんど 100% に近い原虫で唾液腺内のスポロゾイトに至るまで安定に遺伝子は維持された。また導入された人工染色体の原虫内でのコピー数は原虫 1 匹あたり約 1 ~ 1.5 コピーと推定された。この数は人工染色体を用

いず環状 DNA(プラスミド)を導入した場合に予想されるコピー数(数十コピー)に比べ明らかに少なく、等温遺伝子増幅法の検討に適していると考えられる。また通常、遺伝子導入の際には環状の DNA のほうが直鎖状 DNA よりも立体障害等の理由により、効率が良いことが知られている。しかし、今回得られた結果は、L-PAC は環状人工染色体と比べ、約100倍導入効率が高いという全く正反対の結果であり、非常に興味深い。現在のところ、この遺伝子導入の改善が如何なる原因によるものか不明ではあるが、少なくとも直鎖化し、実際の染色体様の構造としたことが原因のひとつであると考えられる。

人工染色体を用いた遺伝子導入法は、相同組換えにより外来遺伝子をネズミマラリア原虫のゲノムに組み込む方法に比べ手技も簡便である。またゲノムに組み込まないため原虫自身の表現型に影響を及ぼす可能性が低く、さらにクローン化する必要もないため、原虫自身の株の多様性を維持しながら、フィールドに近い状態で等温遺伝子増幅法の条件検討を行うことができるだろう。

F. 結論

本年度の研究によって、感染モデルの樹立のための基本技術を確立することができた。

G. 健康危険情報

特になし。

H. 研究発表

I. 論文

1. Functional Identification of the *Plasmodium* Centromere and Generation of a *Plasmodium* Artificial Chromosome. Iwanaga S, Khan SM, Kaneko I, Christodoulou Z, Newbold C, Yuda M, Janse CJ, Waters AP. Cell, Host & Microbe. 7, 3, 245 (2010)

2. Yuda M, Iwanaga S, Shigenobu S, Kato T, Kaneko I.: Transcription Factor AP2-Sp and its Target Genes in Malarial Sporozoites. Mol Microbiol. 2009, 75, 4, 854 - 863

3. Yuda M, Iwanaga S, Shigenobu S, Mair GR, Janse CJ, Waters AP, Kato T, Kaneko I.: Identification of a transcription factor in the mosquito-invasive stage of malaria parasites. Mol Microbiol. 2009, 71, 6, 1402 - 1414

4. Miyazaki K, Yamaguchi M, Imai H, Kobayashi T, Tamaru S, Nishii K, Yuda M, Shiku H, Katayama N. Gene expression profiling of peripheral T-cell lymphoma including gammadelta T-cell lymphoma. Blood 113(5) 1071-1074, 2009

II. 学会発表

Functional Characterization of the plasmodium centromere and generation of a plasmodium artificial chromosome. S. Iwanaga, M. Yuda, I. Kaneko, C.J. Janse, and A.P. Waters Washington, D.C. USA (2009, Nov 18-22) American Society of Tropical Medicine and Hygiene 58th Annual Meeting

Generation of a Plasmodium Artificial Chromosome S. Iwanaga Awaji, Japan (2009, Sep 8th-11th) The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity

第7回感染症沖縄フォーラム

2009.2 ChIP-seq 法を用いたマラリア原虫転写因子結合部位の genome wide な解析

第79回日本寄生虫学会大会 2009 3月 ChIP-seq 法を用いたマラリア原虫転写因子結合部位の genome wide な解析

第16回分子寄生虫学ワークショップ 2009 8月 ChIP-seq 法により同定したマラリア原虫転写因子 AP2-0 の新規標的遺伝子の解析

I. 知的財産権の出願・登録情報

1. マラリア原虫人工染色体(特願 2009-051454) 05/03/09

特許出願人: 国立大学三重大学 (90%)・国立

大学鳥取大学 (10%)、発明者：岩永史朗・油田正夫

耐性遺伝子の迅速同定法 特許出願人：国立大学三重大学、発明者：岩永史朗・油田正夫(特願 2010-071688) 26/03/10

2. マラリア原虫人工染色体を用いた薬剤

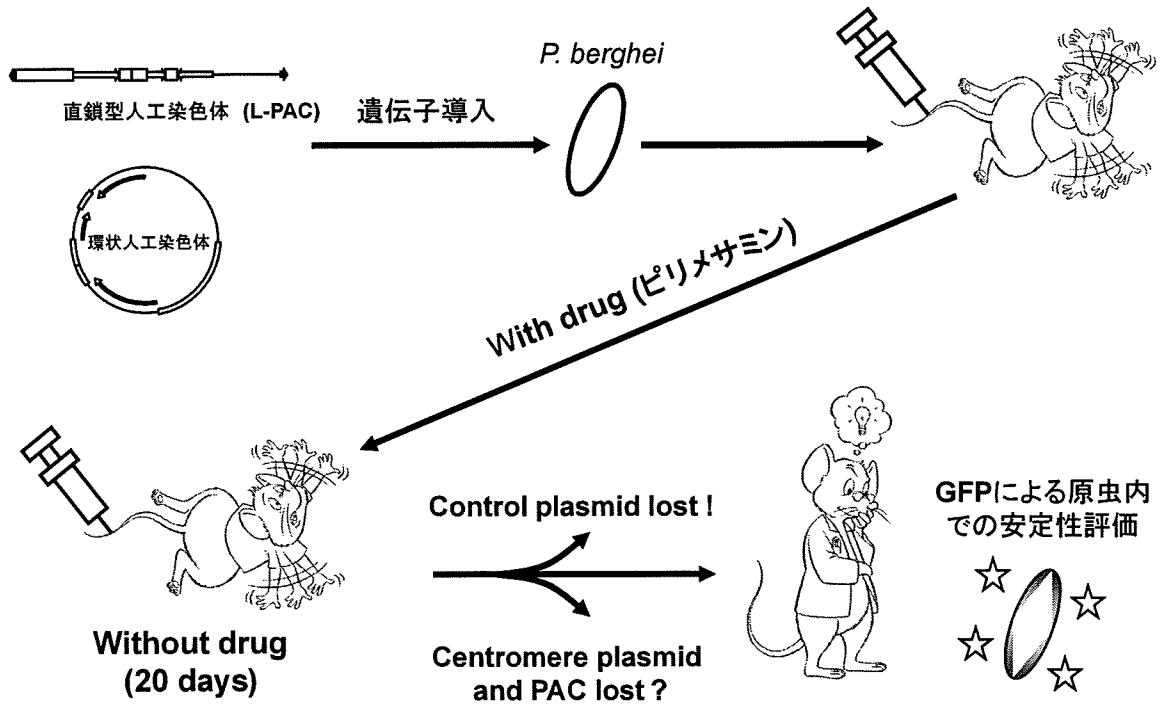
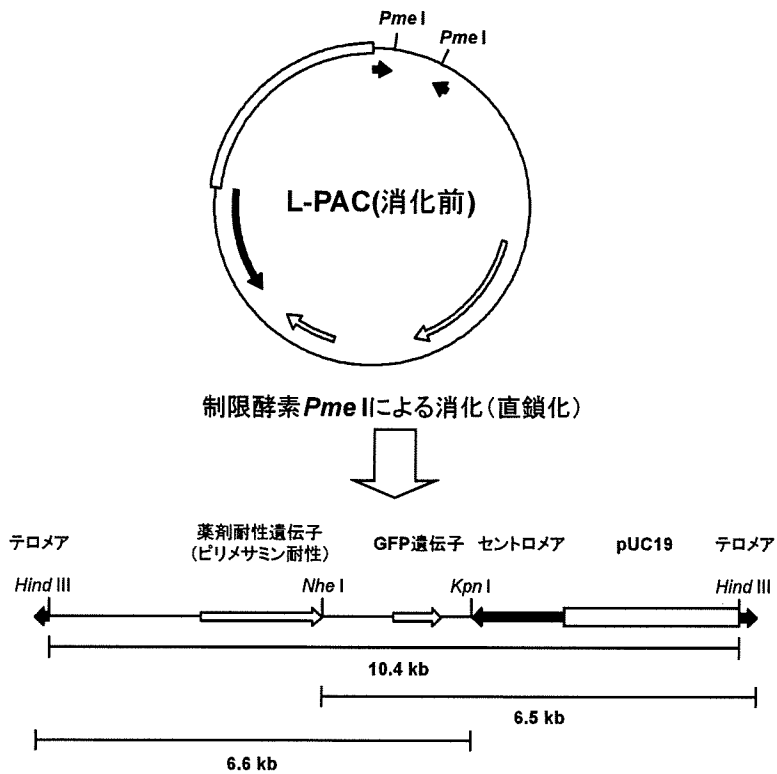


図1 PAC及びセントロメアプラスミドの原虫内(赤血球ステージ)での安定性評価実験
構築したL-PAC及び環状人工染色体をネズミマラリア原虫へ導入し、ラットに接種する。その後、薬剤を投与し、原虫に確実にL-PAC及び環状人工染色体を保持させる。続いて、原虫を新たなラットへ感染させ、薬剤非存在下で維持する。通常のプラスミド(コントロールプラスミド)は非均等に娘細胞に分配されるため、同条件下では、原虫から消失する。一方、L-PAC及び環状人工染色体は均等に分配され、原虫内で安定的に保持されると考えられる。原虫内でのプラスミドの保持はGFPの蛍光を指標に評価する。



Linear Plasmodium Artificial Chromosome (L-PAC) (10888bp)

図2 直鎖型PACの遺伝子マップ

図中の下線は図5において検出した各DNA断片とそのサイズを示す。

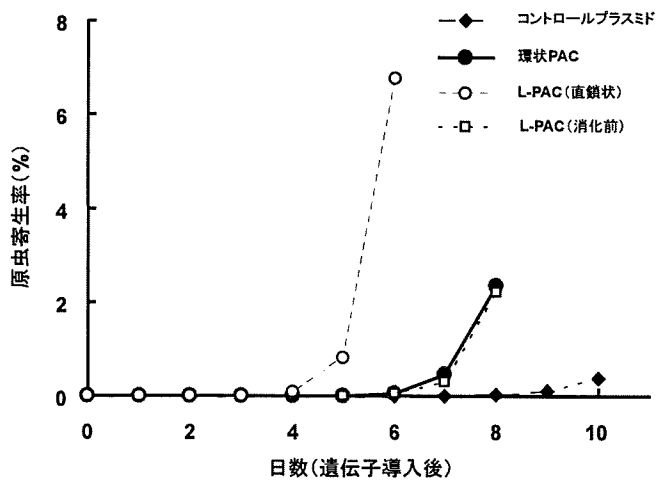


図3 PAC導入後の原虫寄生率の変化

各DNAサンプルを5μg使用し、エレクトロポレーション法により、ネズミマラリア原虫へ導入した。原虫寄生率は感染赤血球をギムザ染色し、計測した。全てのサンプルについて3回、実験を繰り返した結果、いずれの場合においても同様の結果が得られた。

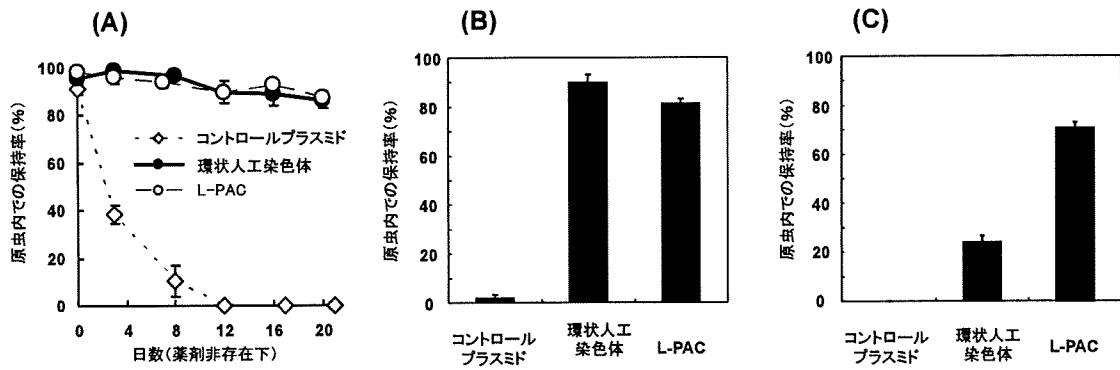


図4 PAC及びセントロメアプラスミドの原虫内での安定性

(A) 赤血球ステージの原虫、(B) 唾液腺スポロゾイト、(C) 肝臓ステージ通過後の赤血球ステージの原虫：原虫内での保持率は全原虫に対するGFP発現原虫の割合(%)より算出した。コントロールプラスミドとしてセントロメア及びテロメアが組み込まれていない環状のプラスミドを使用した。

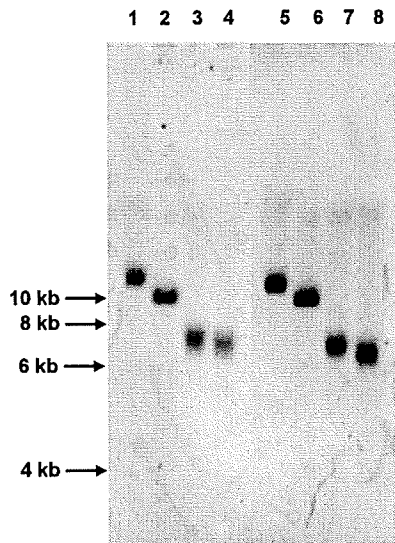


図5 サザンハイブリダイゼーションによるL-PACの制限酵素マッピング

レーン1-4は肝臓ステージ通過後の赤血球ステージの原虫より抽出したゲノムDNA、レーン5-8は薬剤非存在下で20日間維持した赤血球ステージの原虫より抽出したゲノムDNAを使用した。L-PACは原虫ゲノムDNAを抽出した際、同時に回収される。各レーンのゲノムDNAは以下の様に制限酵素処理した。レーン1, 5: 未消化、レーン2, 6: *Hind* III消化、レーン3, 7: *Kpn* I消化、レーン4, 8: *Nhe* I消化。サザンハイブリダイゼーション時にはGFP遺伝子の一部をプローブDNAとして使用した。検出されるDNA断片のサイズは図3に示した。これらの結果を合わせると、PACは直鎖状のまま、原虫内で維持されていることが示される。

p38 MAPK-Dependent Phagocytic Encapsulation Confers Infection Tolerance in *Drosophila*

Naoaki Shinzawa,^{1,2} Bryce Nelson,¹ Hiroka Aonuma,¹ Kiyoshi Okado,¹ Shinya Fukumoto,¹ Masayuki Miura,² and Hirotaka Kanuka^{1,*}

¹National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan

²Department of Genetics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

*Correspondence: kanuka@obihiro.ac.jp

DOI 10.1016/j.chom.2009.07.010

SUMMARY

Hosts employ a combination of two distinct yet compatible strategies to defend themselves against parasites: resistance, the ability to limit parasite burden, and tolerance, the ability to limit damage caused by a given parasite burden. Animals typically exhibit considerable genetic variation in resistance to a variety of pathogens; however, little is known about whether animals can evolve tolerance. Using a bacterial infection model in *Drosophila*, we uncovered a p38 MAP kinase-mediated mechanism of tolerance to intracellular bacterial infection as measured by the extent to which the host's survival rate increased or was maintained despite increasing bacterial burden. This increased survival was conferred primarily by a tolerance strategy whereby p38-dependent phagocytic encapsulation of bacteria resulted in enlarged phagocytes that trap bacteria. These results suggest that phagocytic responses are not restricted to resistance mechanisms but can also be applied to tolerance strategies for intracellular encapsulation of pathogens during the invertebrate immune response.

INTRODUCTION

Defense against pathogenic microorganisms and other parasites can be divided into two conceptually distinct components: resistance, a character that reduces the pathogen's opportunity of successful infection through an impact on pathogen fitness potentially via pathogen clearance; and tolerance, the host's ability to cope with the impact of a pathogenic encounter without a consequent reduction in fitness to the host (Raberg et al., 2007; Schneider and Ayres, 2008; Corby-Harris et al., 2007; Feroni et al., 2004). A distinguishing feature between these two strategies for dealing with infection is that resistance has a negative effect on pathogens, whereas tolerance does not, and as a result their relative importance may have substantial consequences for the ecology and evolution of host-pathogen interactions (Rausher, 2001; Roy and Kirchner, 2000). The distinction between resistance and tolerance has attracted considerable attention in studies of the evolution of host defense against

pathogens, especially in plants (Feroni et al., 2004; Rausher, 2001; Roy and Kirchner, 2000), including the idea that hosts generally exhibit genetic variation for both resistance and tolerance (Kover and Schaal, 2002). Despite the many examples that indicate the presence of genetic variation in host fitness postinfection, it is still unclear just how these immune parameters actually relate to host fitness postinfection (Corby-Harris et al., 2007). In fact, many studies have shown that there is not always a positive relationship between immunocompetence parameters and disease resistance, suggesting that host fitness postinfection may also be maintained by a second strategy, namely, infection tolerance. In plants, where tolerance has long been studied, genes conferring disease tolerance have yet to be identified at the molecular level (Raberg et al., 2007; Rausher, 2001). There have been recent reports suggesting a range of tolerance mechanisms in the fruit fly *Drosophila melanogaster* (Ayres et al., 2008; Ayres and Schneider, 2008). *Drosophila* Eiger, an endogenous TNF- α -related ligand, induces a septic shock-like response that damages the fruit fly and subsequently reduces survival rate during *Salmonella* infection (Schneider et al., 2007; Brandt et al., 2004). A recent study using a *foxo* mutant indicates a reduction of insulin signaling and consequent wasting as a primary cause of host lethality in *Mycobacterium*-infected flies (Dionne et al., 2006). In both cases, these intrinsic responses appear to affect tolerance, but not resistance, because changes in these signaling pathways do not alter bacterial burden but do alter survival.

Here we described a function for phagocytic cells in promoting tolerance, but not resistance, in the host defense system. A screen designed to uncover tolerance mechanisms revealed that *Drosophila* p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase (Dmp38b), a homolog of the p38 MAP kinase family, mediates host defense response to *S. typhimurium* through phagocytosis-based "packing" of intracellular bacteria into hemocytes without altering bacterial burden. Our results suggest that phagocytic encapsulation contributes to infection tolerance, leading to the sequestration of bacteria and thereby protecting critical host tissues from facing the pathogen.

RESULTS

Dmp38b Mediates Tolerance to *Salmonella* Infection in *Drosophila*

To reveal infection tolerance systems in host defense, we carried out a genetic screen using *Drosophila melanogaster* as an

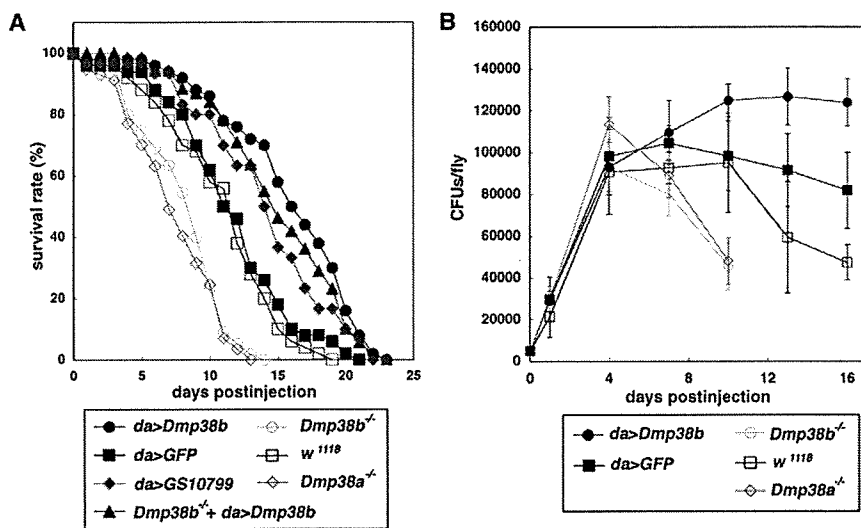


Figure 1. Dmp38b Mediates Infection Tolerance against *Salmonella* Infection in *Drosophila*

The genotypes of flies are as follows: *da > Dmp38b* (*UAS-Dmp38b/Y; da-GAL4/+*); *da > GFP* (*UAS-GFP/+; da-GAL4/+*); *da > GS10799* (*GS10799/+; da-GAL4/+*); *Dmp38b^{-/-} da > GAL4* (*UAS-Dmp38b/Y; Dmp38b^{-/-}; da-GAL4/+*). (A) Survival rates of *Dmp38b*-overexpression flies and null mutant flies were assessed after *Salmonella* (SL1344) infection. $p < 0.05$, comparing *da > GS10799* to *da > GFP*; $p < 0.001$, comparing *da > Dmp38b* and *Dmp38b^{-/-} da > GAL4* to *da > GFP*; $p < 0.001$, comparing *Dmp38b^{-/-}* and *Dmp38a^{-/-}* to wild-type (*w¹¹¹⁸*) (log-rank analysis). This experiment has been performed at least three times.

(B) Bacterial persistence in whole body of *Dmp38b*-overexpression flies and null mutant flies. Bacterial persistence was measured using streptomycin-resistant *Salmonella*. All error bars show standard deviation.

infection model. We focused on the relationship between host survival, thought to be a measure of immunocompetence more directly related to overall host fitness in the presence of infection, and pathogen load within the host, believed to be related to resistance. To identify host factors mediating tolerance, we infected lines of flies expressing a gain-of-function library (Gene Search [GS] System) with the pathogenic bacterium *Salmonella typhimurium* (Toba et al., 1999) and measured host survival rates postinfection before assessing pathogen load in prolonged survival strains (see the Experimental Procedures). No observable decrease in pathogen load in strains with prolonged survival after bacterial infection was taken as an indication of a shift in host defense from resistance to tolerance, a state of coexistence with the invading pathogens. We screened approximately 2869 *Drosophila* GS lines in combination with a ubiquitously expressing GAL4 fly strain (*da-GAL4*), resulting in overexpression of one or two genes from the *Drosophila* genome (Toba et al., 1999). As a result, *Dmp38b*, one of the *Drosophila* p38 MAP kinases, was identified as a suppressor of *Salmonella*-induced lethality without a subsequent reduction in bacterial load (Figures 1A and 1B and see Figure S1 and Table S1 available online). Conversely, the null mutant for *Dmp38b* showed consistently increased mortality (Figure 1A and Figure S1). No significant difference in bacterial load of *Dmp38b* mutants versus wild-type was observed until day 10, when flies were dying, and therefore we believe it reflects a *Dmp38b*-derived tolerance mechanism rather than resistance mechanisms (Figure 1B). Similar results were obtained from infection with other intracellular bacteria (*Listeria monocytogenes* and *Legionella pneumophila*), but not extracellular bacteria (*Staphylococcus aureus*) (Figure S2), indicating a role within phagocytes for *Dmp38b* with regards to tolerance during bacterial infection. Furthermore, loss-of-function mutants of *Dmp38a*, another member of the *Drosophila* p38 MAP kinase family (Craig et al., 2004), exhibited similar phenotypes in the presence of *Salmonella* (Figures 1A and 1B). We attempted to generate a mutant fly deficient for both *Dmp38a* and *Dmp38b*; however, these flies were embryonic lethal (data not shown), suggesting overlapping

essential functions for the two p38 MAP kinases during development. Consistent with our observations, *C. elegans* p38 PMK-1 has also been shown to be required for pathogen defense to infection (Kim et al., 2002); therefore the fruit fly might have evolved tolerance-like responses mediated by an evolutionarily conserved function of p38 MAP kinases.

Salmonella Infection Induces Activation of the Dmp38b MAP Kinase Pathway

Drosophila innate immunity can be broadly divided into two categories: humoral and cellular immunity. In order to check whether *Dmp38b* was affecting NF- κ B-dependent resistance of flies, aspects of both the humoral and cellular responses were assessed. *Dmp38b* overexpression did not appear to significantly affect induction of antimicrobial peptides (AMPs) (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Hoffmann, 2003) or hemocyte-mediated phagocytosis (Elrod-Erickson et al., 2000) (Figures S3A and S3B), consistent with a lack of significant bacterial elimination in adult flies (Figure 1B). This is in contrast to *Dmp38a* activity in larvae that suppresses AMP expression (Han et al., 1998). Another aspect of resistance involves melanization, a process whose activity can be monitored by measurement of phenoloxidase activity (Soderhall and Cerenius, 1998). Mutation to a melanization-related serine protease (CG3066) affects both resistance and tolerance in a manner highly dependent on the invading pathogen, with resistance to *Salmonella* infection being lowered (Ayres and Schneider, 2008). Interestingly, melanization appeared to be negatively regulated by *Dmp38b* (Figure S3C). Taken together, it appears that known resistance mechanisms are not responsible for the improved defense against *Salmonella* infection in *Dmp38b*-expressing flies, and therefore the increased survival was likely derived from mechanisms not typically associated with humoral or cellular defenses.

DAP-type peptidoglycan, a cell wall component of Gram-negative bacteria, has been reported to induce *Drosophila* p38-related protein phosphorylation, an activation step required for signal transduction preceding various biological events in vitro (Zhuang et al., 2006). With this in mind, we tested whether

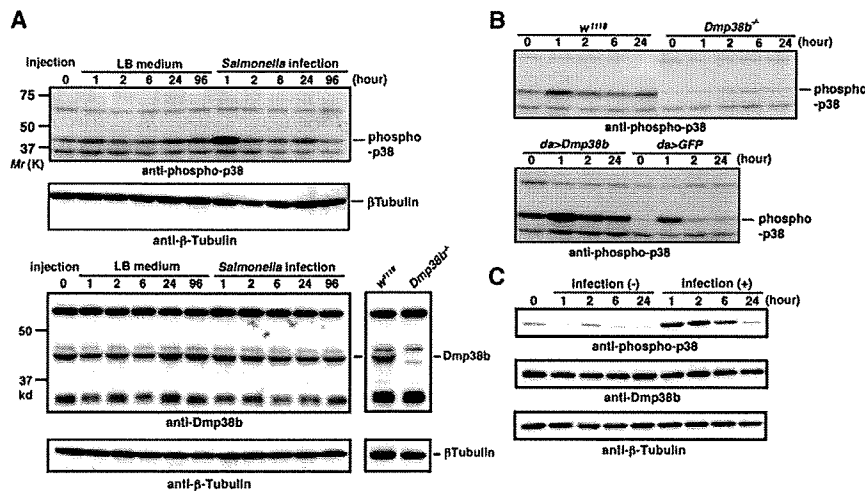


Figure 2. *Salmonella* Infection Induces the Activation of Dmp38b MAP Kinase Pathway
(A) Identification of phosphorylated Dmp38b in *Salmonella*-infected flies. Wild-type flies were injected with bacteria (*Salmonella*) or culture medium (control). The injected flies were collected at indicated time points (hour) and subjected to immunoblotting using anti-phospho-p38 antibody, anti-Dmp38b antibody, and anti- β -tubulin antibody.
(B) Identification of phosphorylated Dmp38b in *Dmp38b*-overexpression and null mutant flies infected with *Salmonella*. The represented strains were collected and subjected to immunoblotting at each indicated time point (hour) after *Salmonella* injection.
(C) Identification of phosphorylated Dmp38b in *Salmonella*-infected S2 cell as a surrogate for adult hemocytes. S2 cells were incubated for 1 hr after *Salmonella* infection, and the lysates were collected and subjected to immunoblotting at each indicated time point (hour).

p38 activation occurred following bacterial challenge in vivo. Rapid induction of p38 phosphorylation was observed within 1 hr post *Salmonella* infection but severely reduced in flies lacking *Dmp38b* (Figures 2A and 2B). In addition, increased amounts of phosphorylated p38 were also observed in response to bacterial invasion in *Dmp38b*-expressing flies. Furthermore, this increase in Dmp38 activity was seen to persist longer than that observed during infection of control flies (Figure 2B, lower panel). Next, p38b activation was examined in *Salmonella*-infected *Drosophila* S2 cells used as a surrogate for adult hemocytes. The phosphorylation of p38b was also detected in the early stages of infection (Figure 2C). It is important to note that this activation of p38b, both in vivo and in vitro, was not an artifact stemming from increased p38b expression (Figures 2A and 2C). Given that phagocytosis occurs within 1 hr postinjection (Figure S3B), it is likely that early encounters between invading bacteria and hemocytes induce the p38 MAPK pathway and contribute to the regulation of tolerance at the earliest stages of infection. Supporting the idea that activation of Dmp38 is required for tolerance to *Salmonella*, null mutants for a MAP kinase kinase dMEKK1, known to be required for peptidoglycan-induced *Drosophila* p38 phosphorylation in vitro (Zhuang et al., 2006), also showed high susceptibility to *Salmonella* infection (data not shown). Taken together, these observations suggest that the *Drosophila* p38 MAP kinase-mediated signaling cascade plays a major role in host tolerance during intracellular bacterial infection in a manner fundamentally different from resistance mechanisms of survival.

Hemocytes Are Responsible Tissue for Dmp38b-Regulated Infection Tolerance

To investigate whether Dmp38b contributes to the in vivo kinetics of *Salmonella* infection tolerance, we observed intracellular proliferation of *Salmonella* using a reporter plasmid (pMIG1), contained within *Salmonella*, that expresses a green fluorescent protein (GFP) only when residing within phagocytic cells (Valdivia and Falkow, 1997). Notably, bacteria were observed persisting and proliferating within phagocytic cells of flies expressing

DsRed to mark hemocytes (Brandt et al., 2004) (Figure 3A). Consistent with microscopic observation, bacterial loads in hemolymph from infected flies were found to be approximately 100-fold lower than that seen from whole bodies, suggesting that the majority of *Salmonella* was located inside the hemocytes (the majority of hemocytes in adult flies are attached to structures rather than floating freely within the hemolymph) (Figures 3B and 3C). Inhibition of phagocytic function of hemocytes through introduction of nondigestible latex beads to *Salmonella* infection (Figure 3D), thereby providing further evidence of a role for hemocytes in p38-mediated tolerance. Reciprocally, genetic activation of hemocytes through ectopic expression of *Dmp38b* in hemocytes using a tissue-specific GAL4 driver (*pxn-GAL4*) (Stramer et al., 2005) was sufficient to confer tolerance to levels seen through systemic expression of *Dmp38b* by *da-GAL4* (Figure 3E). Interestingly, despite prolonged survival of flies expressing *Dmp38b* in hemocytes, these hemocytes contained masses of bacteria that outnumbered that seen in control flies (Figures 3B, 3C, 4A, and 4B). It has been observed previously that the general phagocytic capacity (e.g., ability of phagocytosis and/or number of phagocytic cells) of individual wild-type animals was significantly reduced in flies infected with wild-type *Salmonella* (Brandt et al., 2004; Figures S4A and S4B). We therefore tested the phagocytic capacity of *Dmp38b*-expressing flies via hemocyte engulfment of FITC-labeled dead *E. coli* with or without *Salmonella* infection. In stark contrast to control flies infected with *Salmonella*, no significant decrease of phagocytic capacity could be detected in *Dmp38b*-expressing flies (Figures S4A and S4B). However, it is not clear whether the declined phagocytic capacity seen in wild-type *Salmonella*-infected flies is due to hemocyte disruption or phagocytosis impairment and which of these events p38b regulates to maintain phagocytic capacity. Taken together, these results imply that intracellular events in hemocytes are responsible for p38-induced infection tolerance with a resulting persistence of phagocytosis-related capacity in the face of infection.

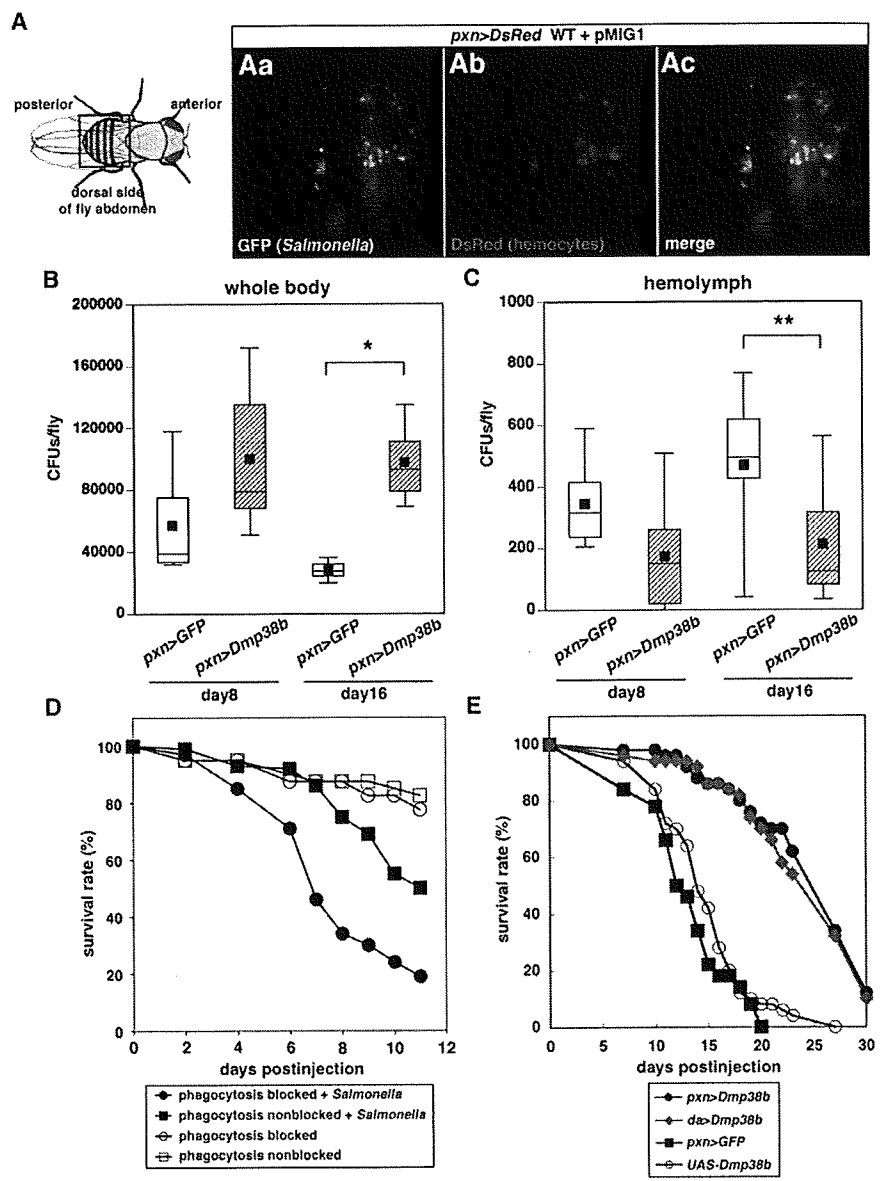


Figure 3. Hemocytes Are Responsible Tissues for Dmp38b-Regulated Infection Tolerance

The genotypes of the flies are as follows: *pxn > DsRed* (*pxn-GAL4; UAS-DsRed/MKRS, Sb*); *da > Dmp38b* (*UAS-Dmp38b/Y; da-GAL4/+*); *pxn > GFP* (*pxn-GAL4/UAS-GFP*); *pxn > Dmp38b* (*UAS-Dmp38b/Y; pxn-GAL4/+*); *UAS-Dmp38b* (*UAS-Dmp38b/Y*).

(A) Localization of invading *Salmonella* in plasmatocytes, *Drosophila* macrophage-like phagocytic cells. *pxn > DsRed* flies, expressing DsRed in hemocytes, were infected with *Salmonella* containing the phagocytic-inducible GFP reporter (pMIG1). Ectopic fluorescence reveals the colocalization of *Salmonella* (green) with hemocytes (red). Representative images of dorsal area of fly abdomens (shown as black square in schematic image [left panel]) obtained 1 day postinjection of bacteria are shown.

(B and C) Bacterial persistence in whole body (B) and hemolymph (C) in flies with hemocyte-specific overexpression of *Dmp38b* (*pxn > Dmp38b*) after *Salmonella* infection. Bacterial persistence was measured using streptomycin-resistant *Salmonella*. Filled square is the median reading, the box extends to the first and third quartiles of the data, and the whiskers indicate the most distant data point that is no more than 2.5 times the interquartile distance from the median. **p* < 0.01; ***p* < 0.05 (Student's *t* test).

(D) Survival rates of *Salmonella*-infected flies pre-injected with fluorescent latex beads to inhibit phagocytic function of hemocytes. *p* < 0.001, comparing blocked + *Salmonella* to nonblocked + *Salmonella* (log-rank analysis). This experiment has been performed three times.

(E) Survival rate of flies with hemocyte-specific overexpression of *Dmp38b* (*pxn > Dmp38b*) after *Salmonella* infection. *p* < 0.001, comparing *da > Dmp38b* and *pxn > Dmp38b* to *UAS-Dmp38b*; *p* < 0.001, comparing *pxn > Dmp38b* to *pxn > GFP* (log-rank analysis). This experiment has been performed at least three times.

Persistence of Invaded *Salmonella* in Hemocytes of *Dmp38b*-Overexpression Flies

In order to determine the fate of intracellular bacteria engulfed by p38-overexpressing hemocytes, we carefully observed *Dmp38b*-modified fruit flies infected with GFP-marked *Salmonella*. The total number of intracellular *Salmonella* within control flies, whose hemocytes had not been incapacitated by infection, clearly decreased during infection (Figures 4Ab and 4Ae), consistent with observations that *Salmonella* invasion into *Drosophila* hemocytes depends upon intact phagocytic cellular processes (data not shown). This is in contrast to hemocyte expression of *Dmp38b* that led to an increase in intracellular persistence of *Salmonella* (Figures 4Aa, 4Ad, and 4B), while reciprocally, loss of *Dmp38b* exacerbated the loss of sustainable phagocytic capacity (Figure 4C). Consistent results were obtained with CFU assays (Figures 3B and 3C). Quantification of fluorescent area derived from GFP-positive intracellular *Salmonella* as an

indication of bacterial load indicated that activation of the p38 MAP kinase pathway increased the number of bacteria (Figures 4D–4F), suggesting that bacteria were “packed” into hemocytes. These observations suggest that *Dmp38b* is involved in the enlargement of hemocytes, thereby enabling large amounts of bacteria to be trapped inside the cell.

Phagocytic Encapsulation Is Required for *Dmp38b*-Induced Tolerance through Bacterial Sequestration in Hemocytes

To obtain precise mechanistic insights into phagocytosis-linked infection tolerance, we carefully analyzed a confined cluster of *Salmonella* contained within fly phagocytes using a plasmatocyte-specific marker (anti-P1 antibody) (Kurucz et al., 2007). Surprisingly, *Salmonella*-invaded hemocytes had enlarged to an extraordinary size compared to uninfected hemocytes in *Dmp38b*-expressing flies (Figures 5A–5D; Movie S1). Seven

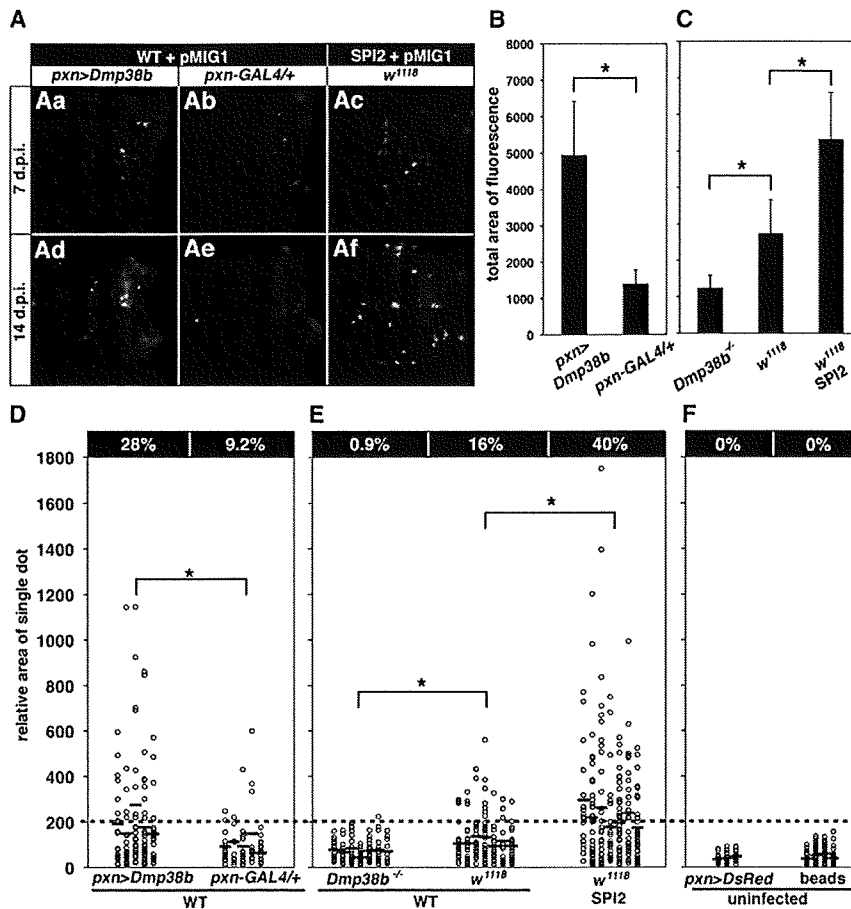


Figure 4. Persistence of Invaded *Salmonella* in Hemocytes of *Dmp38b*-Overexpression Flies

Wild-type *Salmonella* (WT+pMIG1) and SPI-2 mutant *Salmonella* (SPI-2+pMIG1) were used for infection into each line. The genotypes of the flies are as follows: *pxn-GAL4/+ (+/Y; pxn-GAL4/+)*; *pxn > Dmp38b (UAS-Dmp38b/Y; pxn-GAL4/+)*; *pxn > DsRed (pxn-GAL4; UAS-DsRed/MKRS, Sb)*. (A) Ectopic fluorescence image of fly abdomen (at dorsal part, as shown in Figure 3A) represents *Salmonella* persistence in hemocytes. (B and C) Quantification of total area of GFP fluorescence, indicating extent of cellular-invaded *Salmonella* in hemocytes. Each experiment was performed with appropriate genetic background strains. All error bars show standard deviation. **p* < 0.01 (Student's *t* test).

(D–F) Quantification of amount of persistent *Salmonella* in each enlarged hemocyte. Wild-type *Salmonella* (WT+pMIG1) and SPI-2 mutant *Salmonella* (SPI-2+pMIG1) were used for infection into each fly strain. The relative fluorescent area in each single GFP dot as shown in (Ad) and (Af) was measured 14 days postinjection. The size of uninfected hemocytes was measured using fluorescent dots in *pxn > DsRed* fly and fluorescent latex bead-injected fly (F). Single marker (open circle) indicates the relative area of one individual fluorescent dot. Each longitudinal plot represents the result obtained from one fly. Blue bar indicates the average. The number in each upper column indicates the percent of enlarged hemocytes (over 200). **p* < 0.0001 (Student's *t* test).

days postinfection, invasion of bacteria seemed to induce massive enlargement of hemocytes in both control and *Dmp38b* gain-of-function flies (Figures 5Ea and 5Eb). At the late stages of infection (14 days postinfection), the expansion rate of infected cells appeared to be 3- to 4-fold larger than that of uninfected cells (Figure 5D). Furthermore, it is remarkable that these expanded hemocytes contained huge numbers of *Salmonella*, filling nearly the entire hemocyte (Figure 5Ed). In connection with these observations and considering that the membrane of hemocytes is retained during phagocytic encapsulation, we observed that *Drosophila* p38 MAP kinase expression led to an increase in lamellipodia formation in *Salmonella* infection (Figure S5). We propose that *Drosophila* p38 signaling modulates the remodeling of the actin cytoskeleton in hemocytes that would enable the persistence of enlarged hemocytes and suggest that intracellular packing of pathogens exerts a tolerance mechanism during infection. Supporting the idea that cytoskeleton remodeling modulates phagocytosis-based tolerance, the small GTPase *Drosophila* Rac2 contributes phagocytic defense during *Pseudomonas aeruginosa* infection without affecting AMP expression (Avet-Rochex et al., 2007). We propose the term “phagocytic encapsulation” to describe this phenomenon.

To investigate whether phagocytic encapsulation contributes to fly survival after bacterial infection, we used a nonpathogenic *Salmonella* mutant strain containing a mutation to SPI-2. *Salmo-*

nella contains a *Salmonella* pathogenicity island (SPI) gene cluster encoding a type III secretion system (TTSS); infection of macrophages by *Salmonella* activates the SPI-2 virulence locus that subsequently promotes SPI-2 effectors to act within phagocytic cells to promote intracellular replication and systemic spread (Galan, 2001). SPI-2 mutants can colonize in specific immune tissue (gastrointestinal-associated lymphoid tissue like Payer's patches) but cannot progress to other areas such as mesenteric lymph nodes, suggesting that SPI-2 mutants are unable to proceed past initially invaded cells (Cirillo et al., 1998). As observed previously (Brandt et al., 2004), an SPI-2 mutant deficient for the *ssrA* gene (TM232) and carrying pMIG1 showed little pathogenicity to *Drosophila* and was retained within hemocytes after infection (Figures 4Ac and 4Af and Figure S6). Interestingly, the total number of intracellular *Salmonella* SPI-2 mutants in wild-type flies was comparable to *Dmp38b*-expressing flies (Figures 4A–4C). Furthermore, phagocytic encapsulation of SPI-2 mutants by wild-type hemocytes led to engorgement of hemocytes containing clumps of SPI-2-mutated bacteria (Figures 5Ec and 5Ee; Movie S2) in a manner similar to that seen in *Salmonella*-infected flies expressing *Dmp38b* in hemocytes (Figures 4E–4G). This phagocytic encapsulation was not observed in SPI-2 mutant-infected *Dmp38b* null flies that were found to be sensitive to the SPI-2 pathogenicity (Figure S7). Finally, the p38b-induced tolerant phenotype was abolished when the engulfing function of hemocytes was blocked

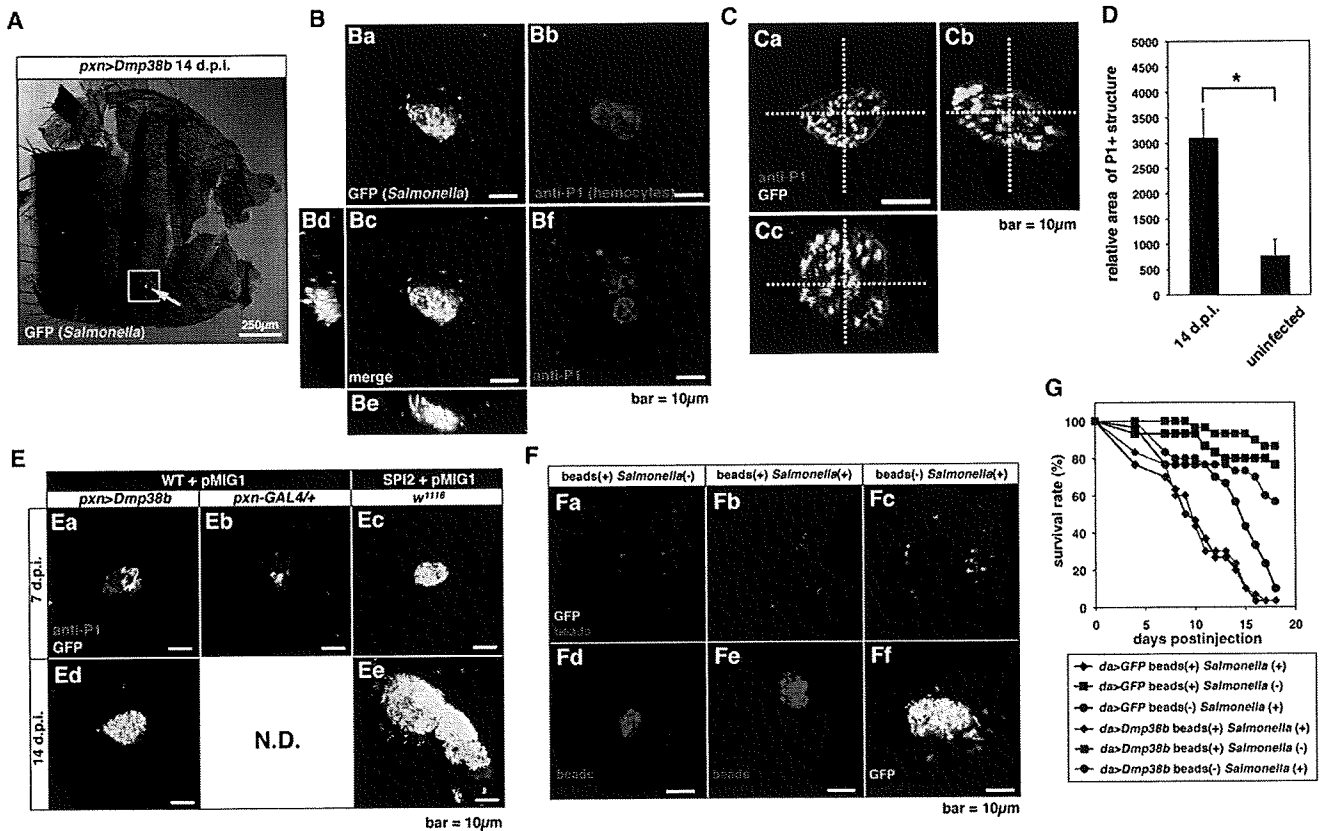


Figure 5. Phagocytic Encapsulation Is Required for p38-Induced Infection Tolerance through Sequestration in Hemocytes

The genotypes of flies used are as follows: *pxn>Dmp38b* (*UAS-Dmp38b/Y; pxn-GAL4/+*); *pxn-GAL4/+* (*+Y; pxn-GAL4/+*); *da>Dmp38b* (*UAS-Dmp38b/Y; da-GAL4/+*); *da>GFP* (*UAS-GFP/+; da-GAL4/+*).

(A) GFP ectopic fluorescence image of fly abdomen (dorsal part) infected with *Salmonella* (green).

(B) Confined cluster of *Salmonella* encapsulated by plasmatocyte-specific structure shown in high-magnification image of white square region in (A) (Ba–Bc). Note that P1-positive enlarged plasmatocyte (magenta) contains a large number of *Salmonella* (green) (X–Y plain [Bc], Y–Z plain [Bd], and X–Z plain [Be]). Plasmatocytes in uninfected flies are shown in (Bf). Scale bar, 10 μ m.

(C) Confocal microscopic image of a confined cluster of *Salmonella* within plasmatocyte specific structure 14 days postinjection. (X–Y plain [Ca], Y–Z plain [Cb], and X–Z plain [Cc]). The three-dimensional image is available as Movie S1. Scale bar, 10 μ m.

(D) Relative area of P1-positive plasmatocytes in uninfected and infected (at 14 days postinjection) *Dmp38b*-overexpression flies (*pxn > Dmp38b*). All error bars show standard deviation. * $p < 0.001$ (Student's *t* test).

(E) Confined cluster of *Salmonella* (green) in plasmatocytes (magenta) in *Dmp38b* gain-of-function flies (*pxn > Dmp38b*) infected with wild-type *Salmonella* (Ea and Ed), wild-type flies (*pxn-GAL4/+*) infected with wild-type *Salmonella* (Eb), and wild-type flies (*w¹¹¹⁸*) infected with SPI-2 mutant *Salmonella* (Ec and Ee). Scale bar, 10 μ m.

(F) Blocking of phagocytosis by injection of latex beads inhibits *Salmonella* persistent in hemocytes. Shown are ectopic fluorescence images of fly abdomen (at dorsal part, as shown in Figure 3A) (Fa–Fc) and hemocytes (Fd–Ff). Fluorescent beads (red), P1-stained hemocytes (blue), and *Salmonella* are shown.

(G) Survival rate for *Dmp38b*-overexpressing flies were assessed after *Salmonella* infection with phagocytosis blocking by latex beads injection. $p < 0.01$, comparing *da > Dmp38b* beads (+) *Salmonella* (+) to *da > GFP* beads (+) *Salmonella* (+) (log-rank analysis). This experiment has been performed three times.

in *p38b*-overexpressing flies through introduction of nondigestible latex beads as well as performed in Figure 3D before infection, suggesting a crucial link between *p38b* and phagocytic processes (Figures 5F and 5G). This use of phagocyte-blocked flies revealed the remarkable contribution of hemocytes in defense of adult *Drosophila* against systemic infection with *Salmonella* (Defaye et al., 2009). Taken together, these data suggest that *p38* MAP kinase-regulated phagocytic encapsulation sequesters and prevents proliferating bacteria from escaping to extracellular areas, thereby providing a mechanism of infection tolerance and enabling the host to suppress the increasing fitness cost resulting from infection.

DISCUSSION

Evolutionary Advantages of an Encapsulation Defense System

Infection tolerance mechanisms confer the ability to limit disease severity induced by a given parasite burden (Raberg et al., 2007; Schneider and Ayres, 2008; Corby-Harris et al., 2007; Feroni et al., 2004). The work reported here demonstrates an *in vivo* role for *Drosophila* *p38* MAP kinase during bacterial infection through tolerance strategies in the form of phagocytic encapsulation and sequestration in order to defend the host from bacterial virulence. Our present study broadens the concept of