

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580400

研究課題名(和文) 旋毛虫分泌タンパク質による免疫抑制作用の免疫学的および構造生物学的解析

研究課題名(英文) Immunological and structural analysis of immunosuppressive effect of excretory-secretory protein from *Trichinella pseudospiralis*

研究代表者

長野 功 (NAGANO, Isao)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40283296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)： 旋毛虫感染は自己免疫性疾患の発症を強力に抑制する。今回は旋毛虫が特異的に分泌する分子量53kDaのタンパク質の免疫抑制機構の解析と53kDaタンパク質の立体構造解析を行った。その結果、53kDaタンパク質はマクロファージに作用して炎症の活性化をおさえ、IL-6とIL-17の増幅ループを制御して免疫抑制に関与していることが明らかとなった。

また、53kDaタンパク質の構造解析においては、高純度の精製法を確立し、また正確な高次構造を有する可能性が高い組換えタンパク質を得る発現系を構築した。しかし、X線結晶構造解析のために結晶化に最適な条件の検討を試みたが、結晶化は認められなかった。

研究成果の概要(英文)： Our previous study indicated that *Trichinella pseudospiralis* infection can ameliorate autoimmune encephalomyelitis through suppressing Th17 and Th1 responses. In the present study, we investigated the immunomodulatory function of the recombinant *T. pseudospiralis* 53kDa excretory-secretory protein (Tp53), including the effect on the production of IL-6 of macrophage and IL-17, IFN-gamma and IL-4 of splenocyte *in vitro* and *in vivo*. Results suggested the recombinant Tp53 has immune regulatory function of inhibiting IL-6 production of macrophage, and suppressing Th17 and Th1 responses of splenocyte, suggesting Tp53 possesses immunomodulation function to suppress Th17 response via inhibiting IL-6 and IL-17 positive feedback loop.

For structural studies, we have established expression and purification system using *E. coli* and pCold-GST vector. We have started the crystallization of Tp53. However, we have not obtain any crystal yet.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード： 旋毛虫 免疫抑制 分泌タンパク質 組換えタンパク質 サイトカイン マクロファージ 高次構造解析 X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

寄生性線虫である旋毛虫は、宿主筋肉細胞に感染した後、筋肉細胞を自己の生存に適した細胞(ナース細胞)に変異させて寄生を続ける。この筋肉細胞変異には旋毛虫が分泌するタンパク質が重要な役割を担っている可能性がすでに10年以上前から示唆されている。我々は、この筋肉細胞変異を解明するために、国内外研究者に先駆け、旋毛虫から種々の分泌タンパク質を同定し、その詳細を報告してきた。

一方、寄生虫感染では宿主の免疫能が抑制されることが多く報告されている。我々は旋毛虫を感染させたマウスを用いて、感染が実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)発症におよぼす影響について検討を行った。その結果、旋毛虫感染はEAE発症を強力に抑制することが明らかとなった。旋毛虫は、成虫が宿主の腸管上皮内寄生、新生幼虫は血液内寄生、筋肉幼虫は細胞内寄生であり、すべてのステージで組織内寄生を行うという極めて特異的な寄生虫であり、その分泌物質が宿主に何らかの作用をおよぼしていることは容易に推測される。宿主の免疫機能への影響に関しても、我々は旋毛虫の分泌物質に関連があるものと考えた。前述のように、我々は旋毛虫から多くの分泌タンパク質を同定しているが、その中で旋毛虫だけが特異的に分泌する分子量53kDaタンパク質(Tp53)に注目した。このTp53については、我々はすでにその基礎的な特徴について検討し、報告を行っている。このTp53はホモログ検索では他に相同性のあるタンパク質は存在せず、またその発現は成虫およびナース細胞完成後の筋肉幼虫に限られており、かつその発現量は他の分泌タンパク質に比べて極めて多かった。以上の結果より、このTp53は旋毛虫の宿主体内での寄生の維持に重要な役割を担っているものと推定される。そこで今回の研究では、Tp53の免疫抑制剤としての医薬品化を最終目標とし、その医薬品化の前段階として、詳細な免疫抑制機構の解析とTp53の立体構造解析などの基礎的研究を行う。また、将来的には薬効、薬物動態、安全性、物性等に基づいて生理活性タンパク質の低分子化等の最適化を行うことが必須となるが、それらについては今後の課題である。

2. 研究の目的

免疫抑制機構の解析

旋毛虫感染により免疫病態が改善されるのはTh1細胞による反応が主体となる自己免疫性疾患である。一方、旋毛虫感染はTh2反応の増強によって抗炎症反応を引き起こす。すなわち、旋毛虫の自己免疫抑制作用はTh2反応の増強によるTh1反応の抑制の結果であると推測される。今回の研究では培養細胞を用いて以上の推測を検討する。培養細胞に旋毛虫由来の53kDaのタンパク質(Tp53)を投与した場合の、Th1関連サイトカインの発現

の減弱と、Th2関連サイトカインの増強を確認する。また、その他のサイトカイン(IL-6、IL-17等)についても発現量を検討する。一方、転写因子NF- κ BおよびAP-1は免疫反応において中心的役割を果たす転写因子であり、その活性の増強は自己免疫性疾患などの免疫異常を引き起こす。よって今回の実験ではTp53がNF- κ BおよびAP-1の転写活性に抑制的に働くことを確認する。

構造生物学的解析

タンパク質の生理活性機能はその3次元構造(立体構造)に依存している。Tp53の立体構造を解析することにより、どのようなメカニズムによりそのTp53が活性を示すのか、またどの部位で作用がおこっているのか(活性部位)を実際に目で見て解析することが可能である。また、酵素で代表されるようにTp53の活性は他の物質との相互作用による。立体構造を基とした相互作用解析により、相互作用する部位を特定することができる。活性部位、相互作用部位がわかればその部位だけを遺伝子工学的に合成し、低分子量で活性が高く、副作用が低い医薬品を提供することが可能である。構造決定法にはX線結晶構造解析とNMR法があるが、今回検討を行うTp53は分子量が53kDaと大きく、X線結晶構造解析を行う必要がある。しかし、立体構造を解析するには純度が高く、高濃度で、ある程度の量のTp53が必要である。今回の研究の目標は、まず解析できる量、質の組換えタンパク質を大腸菌で作成することであり、またそれを用いてTp53の立体構造を解明し、活性部位を特定することである。

旋毛虫は宿主細胞内に寄生し、その分泌タンパク質が直接宿主の細胞に作用するという極めてユニークな線虫であり、免疫抑制作用を有すると考えられる分子量53kDaのタンパク質は、自己免疫性疾患およびアレルギー疾患治療薬、また移植医療にも応用が可能である。

3. 研究の方法

(1) 組換え53kDaタンパク質(Tp53)の作製

組換えTp53の作製は、*T. pseudospiralis*のTp53をコードするcDNAをpCold-GST発現ベクターに組み込み、大腸菌にて発現を行った。免疫学的解析に用いた組換えTp53はアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、エンドトキシン除去カラムにて高純度に精製した。また、構造解析用の組換えTp53は、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーで精製した。

(2) 53kDaタンパク質による免疫抑制作用の免疫学的解析

転写活性に対する影響

転写因子NF- κ BおよびAP-1は免疫反応において中心的役割を果たす転写因子であり、そ

の活性の増強はアレルギーなどの免疫異常を引き起こす。寄生虫感染ではさまざまなサイトカイン、ケモカインが産生されるが、これらの中で特に重要なものは、IFN- γ で、感染後の自然免疫応答だけでなく獲得免疫の活性化にも重要な役割を果たす。IFN- γ のプロモーターは、3つの転写因子、NF- κ B、IRF3、AP-1から構成されるタンパク複合体が結合することにより活性化される。そこでTp53がNF- κ BまたはAP-1の各特有な応答配列の転写活性に与える影響をルシフェラーゼアッセイによって解析した。細胞はHEK293 (TLR4/MD-2) 細胞を用い、NF- κ B、AP-1の各特有な応答配列を組み込んだルシフェラーゼベクターを導入した。Tp53は、発現ベクターに53kDa遺伝子を組み込み、培養細胞に導入、または大腸菌で作成した組換えTp53を直接培養液中に投与し、それぞれLPS、TNF- α またはPMAで刺激し、その影響を解析した。

サイトカイン産生能に対する影響

組換えTp53を免疫細胞に投与して、その影響を細胞内の免疫関連タンパク質の発現で検討した。まず、マウスの単球系培養細胞であるRAW 264.7細胞に53kDa遺伝子を組み込んだ発現ベクターを導入し、Tp53を細胞内で強制発現させた。その後、細胞をLPSで刺激し、産生されたサイトカインであるTNF- α の量をELISAで計測した。

組換えTp53をマウス脾細胞、マウス腹腔内マクロファージ、RAW 264.7細胞または樹状細胞に直接投与し、培養後、LPS等の刺激による培養上清中のサイトカインの発現量をELISAまたは、リアルタイムPCRを用いて検討した。また、腹腔内マクロファージを採取し、組換えTp53を投与してM1およびM2マクロファージのマーカーの発現をリアルタイムPCRで測定した。一方、組換えTp53をマウス腹腔内に投与した後、マウス脾細胞およびマクロファージを採取培養して、サイトカイン量を測定した。

(3) 53kDa タンパク質の構造生物学的解析

Tp53の構造解析に必要な大腸菌による組換えタンパク質の作成法の検討を行った。

組換えタンパク質の高次構造は一次元NMR法および円二色性分光法で確認した。

安定同位体標識した大腸菌による組換えTp53を用いたNMR法を行った。

X線結晶構造解析による構造解析を行うために結晶化に最適な条件を約200種類の異なるバッファー条件下で検討を行った。また、精製度の向上させるためにアフィニティークロマトグラフィー精製の後にイオン交換クロマトグラフィーによる精製を加えた。

組換えタンパク質を一部分だけ切り出し、低分子化して大腸菌で発現させる試みを行った。すなわち、組換えタンパク質をトリプシンで部分消化し、消化に抵抗性を示す(高次構造を正しくとっている)部分をアミノ酸

シーケンスで、アミノ酸配列の決定を試みた。

4. 研究成果

53 kDa タンパク質 (Tp53) の転写活性に対する影響

発現ベクターに53kDa遺伝子を組み込み、HEK293 (TLR4/MD-2) 細胞に導入して強制発現させ、その後NF- κ BおよびAP-1の転写活性に対するTp53の影響をルシフェラーゼアッセイにより検討した。その結果、TNF- α で刺激した場合、遺伝子の細胞への導入量に比例して、NF- κ Bに対する転写活性はコントロール群と比べて大きく上昇し、AP-1もPMA刺激により上昇が認められた。

一方、HEK293 (TLR4/MD-2) 細胞にルシフェラーゼ発現ベクターを導入して組換えTp53を培養液中に直接投与した場合、上記の53kDa遺伝子を発現ベクターに組み込んで細胞に導入した結果とは異なり、組換えTp53の細胞への投与量に比例してNF- κ Bの転写活性は低下した。一方、AP-1に対しては影響を示さなかった。

以上のような結果から、Tp53は細胞内で発現させた場合と、細胞外から投与して作用させた場合ではその反応性はかなり異なるものと考えられた。下記のサイトカイン産生能に対する影響の解析でも、Tp53の細胞内発現では炎症性サイトカインの産生は増加するが、細胞外から投与すると抑制的に働いた。

サイトカイン産生能に対する影響

RAW 264.7細胞に53kDa遺伝子を組み込んだ発現ベクターを導入し、Tp53を強制発現させた。その結果、エンブティーベクターを導入したRAW 264.7細胞のTNF- α 産生量に比べて、53kDa遺伝子導入細胞では約4-6倍にTNF- α 産生量は増加していた。

一方、マウス脾細胞、マウス腹腔内マクロファージまたはRAW 264.7細胞の培養液に直接組換えTp53を投与し、細胞の培養後、LPS等の刺激による培養上清中のサイトカインの発現量を測定した。その結果、RAW 264.7細胞では、組換えTp53投与により形態に変化が見られた。また、RAW 264.7細胞はLPSの刺激によりIL-6が産生されるが、組換えTp53を同時に投与すると、IL-6の産生はdose dependentに抑制された(図1)。

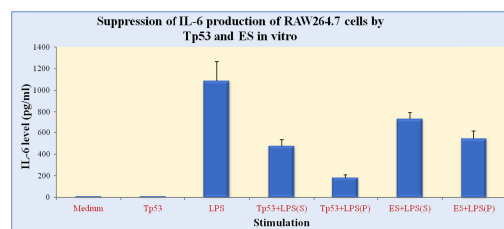


図1 Tp53 および旋毛虫分泌タンパク質 (ES) の

RAW264.7細胞投与におけるIL-6産生への影響

マクロファージは現在では機能的にM1とM2マクロファージの亜群に分類されている。

M1 は Th1 型の免疫を誘導し、また Th2 細胞に活性化された M2 マクロファージは Th1 に抑制的に働くものと考えられている。マウス腹腔内マクロファージの M1 および M2 マクロファージマーカーの発現を測定すると、M1 マーカーである IL-6 と TNF- α は組換え Tp53 投与で抑制されるが、M2 マーカーである Ym1 と Fizz1 は組換え Tp53 投与で抑制されなかった (図 2)。

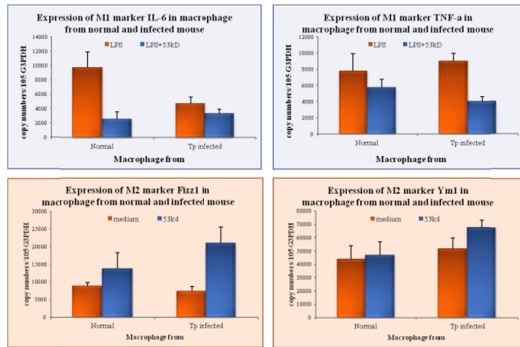


図 2 Tp53 の腹腔内マクロファージ投与における M1 および M2 マーカーの発現 への影響

Th17 細胞はヘルパー T 細胞のサブセットのひとつで、アレルギーに大きく関連する細胞群として最近発見されたものである。脾細胞では LPS で刺激すると、IFN- γ (Th1 細胞が産生) および IL-17 (Th17 細胞が産生) 産生が増加するが、組換え Tp53 の投与により抑制され、また ConA 刺激で増加する IL-4 (Th2 細胞が産生) 産生量も組換え Tp53 投与で抑制された (図 3、4、5)。

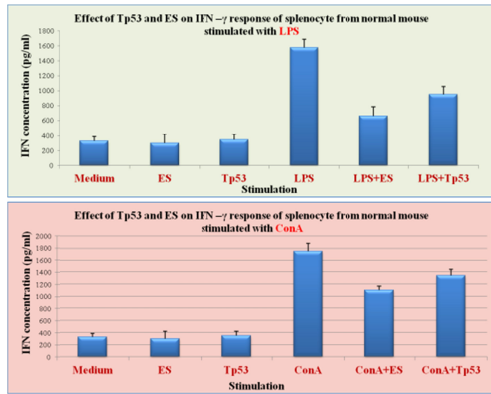


図 3 Tp53 および ES の脾細胞投与における IFN- γ 産生への影響

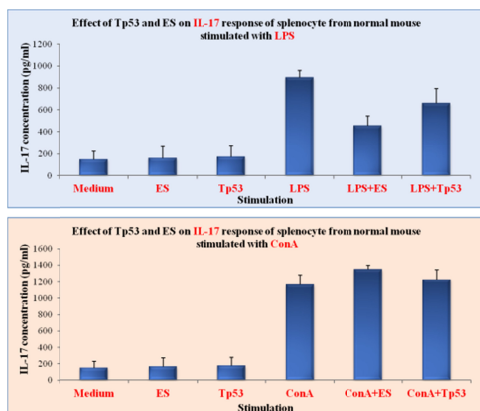


図 4 Tp53 および ES の脾細胞投与における IL-17 産生への影響

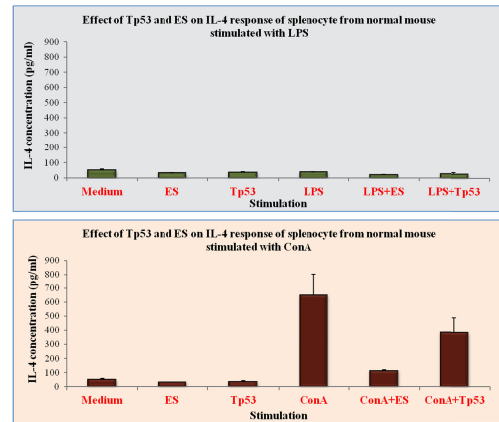


図 5 Tp53 および ES の脾細胞投与における IL-4 産生への影響

一方、組換え Tp53 を用いた in vivo の系において、マウスの腹腔内に組換え Tp53 を投与した後、脾細胞を採取して刺激すると、IL-17 産生量は組換え Tp53 投与群で低下、IL-4 も低下傾向を示した (図 6)。

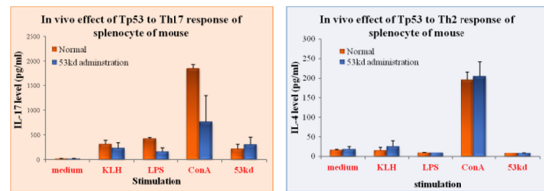


図 6 Tp53 の腹腔内投与における脾細胞の IL-17 および IL-4 の産生

以上のような結果から、Tp53 はマクロファージからの IL-6 などの炎症性サイトカインの産生を抑制して、Th17 細胞および Th1 細胞などからのサイトカイン産生を抑制する。すなわち、Tp53 はマクロファージに作用して炎症の活性化をおさえ、IL-6 と IL-17 の増幅ループを制御して免疫抑制に関与していると考えられた。

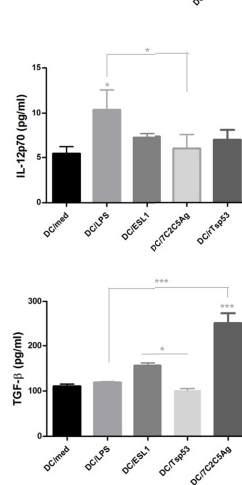


図 7 Tp53 の樹状細胞におけるサイトカインの産生への影響

また、樹状細胞に対する Tp53 の影響を解析した結果、組換え Tp53 は IL-12 の産生を抑制し、IL-10 産生を増強した (図 7)。一方、樹状細胞と T 細胞を混合培養し、T 細胞の増殖に対する影響を検討した結果、

組換え Tp53 の投与により増殖は増強され、IL-4 および IL-10 産生も増強されるが、IFN- γ 産生量は低下した (図 8)。

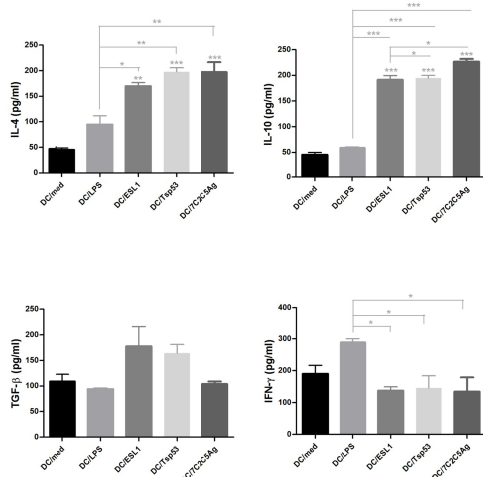


図 8 Tp53 の混合培養 (樹状細胞および T 細胞) におけるサイトカイン産生への影響

(2) 53kDa タンパク質の構造生物学的解析

Tp53 の構造解析に必要な大腸菌による組換え Tp53 の作成法について検討を行った。

ベクターとして pCold-GST ベクター、発現用の大腸菌としては SHuffle express 株 (NEB 社) を用いた発現系を構築した。その結果、この発現系では組換え Tp53 のほとんどが可溶化して発現され、構造解析に十分な量の組換え Tp53 を得ることが可能となった。また、組換え Tp53 を二次元 NMR 法および円二色性分光法で確認したところ、正確な高次構造を有している可能性が示唆された。

しかし、安定同位体標識した組換え Tp53 を用い NMR 法を行ったが、解析困難であった。これは Tp53 の分子量 が大き過ぎるためであると考えられた。よって、X 線結晶構造解析による構造解析を主として検討を行った。まず、組換え Tp53 を用いて、結晶化に最適な条件を約 200 種類の異なるバッファー条件下で検討を行った。しかし、すべての条件下で組換え Tp53 は無反応か凝集化を起し、結晶化に最適な条件は決定できなかった。これは組換え Tp53 の精製度が低いためであると考え、アフィニティークロマトグラフィー精製の後にイオン交換クロマトグラフィーによる精製を加えた。その結果、極めて高純度の組換え Tp53 が合成されたが、この Tp53 を用いても結晶化はされなかった。そこで、組換え Tp53 を一部分だけ切り出し、低分子化して大腸菌で発現させる試みを行った。すなわち、組換え Tp53 をトリプシンで部分消化し、消化に抵抗性を示す (高次構造を正しくとっている) 部分をアミノ酸シーケンスで、アミノ酸配列を決定することを試みた。現在、部分消化の検討中であるが、高次構造

を正しくとっている組換え Tp53 の一部分の DNA 配列を発現ベクターに組み込み Tp53 の発現、精製、結晶化を試みる予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. Yamaguchi K, Kamatari Y O, Fukuoka M, Miyaji R, Kuwata K. Nearly Reversible Conformational Change of Amyloid Fibrils as Revealed by pH-Jump Experiments. *Biochemistry*. in press 2013. 査読有

2. Ishikawa T, Burri R R, Kamatari Y O, Sakuraba S, Matubayasi N, Kitao A, Kuwata K. A theoretical study of the two binding modes between lysozyme and tri-NAG with an explicit solvent model based on the fragment molecular orbital method. *Phys Chem Chem Phys*. 15:3646-3654. 2013. 査読有

3. Okada H, Ikeda T, Kajita K, Mori I, Hanamoto T, Fujioka K, Yamauchi M, Usui T, Takahashi N, Kitada Y, Taguchi K, Uno Y, Morita H, Wu Z, Nagano I, Takahashi Y, Kudo T, Furuya K, Yamada T, Ishizuka T. Effect of Nematode *Trichinella* infection on glucose tolerance and status of macrophage in obese mice. *Endocr J*. 2013. 査読有

4. Wu Z, Nagano I, Takahashi Y. *Trichinella*: what is going on during nurse cell formation? *Vet Parasitol*. 194:155-9. 2013. 査読有

5. Wu Z, Nagano I, Asano K, Liu MY, Takahashi Y. Differential immunological responses induced by infection with female muscle larvae and newborn larvae of *Trichinella pseudospiralis*. *Vet Parasitol*. 194:217-21. 2013. 査読有

6. Nagano I, Wu Z, Asano K, Takahashi Y. Molecular cloning and characterization of transgelin-like proteins mainly transcribed in newborn larvae of *Trichinella* spp.: *Veterinary Parasitology*, 178:134-142. 2011. 査読有

7. Kamatari Y O, Smith L J, Dobson C M, Akasaka K. Cavity hydration as a gateway to unfolding: An NMR study of hen lysozyme

at high pressure and low temperature.
Biophys Chem. 156:24-30.2011. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 長野 功、呉志良、前川洋一、高橋優三、
旋毛虫が分泌する 53kDa タンパク質による免疫抑制作用 日本獣医学会、2013 年 9 月 20 日、岐阜市
2. Wu Z, Nagano I, Takahashi Y. What 's going on during nurse cell formation? 13th International Conference on Trichinellosis. August 2, 2011. Changchun, China.
3. Wu Z, Nagano I, Takahashi Y. Potential roles of insulin-like growth factors in different pathology of infected muscle cells between *T. spiralis* and *T. pseudospiralis*. 13th International Conference on Trichinellosis. August 2, 2011. Changchun, China.
4. Wu Z, Nagano I, Takahashi Y. Differential immunological responses induced by infection with female muscle larvae and newborn larvae of *Trichinella pseudospiralis*. 13th International Conference on Trichinellosis. August 2, 2011. Changchun, China.

〔図書〕(計 1 件)

1. 長野 功、呉志良、高橋優三、寄生虫学研究材料と方法 (寄生虫由来組換えタンパク質の大腸菌での作製) 2012 三恵社

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長野 功 (NAGANO, Isao)
岐阜大学・医学系研究科・准教授
研究者番号 : 40283296

(2)研究分担者

呉 志良 (WU, Zhiliang)
岐阜大学・医学系研究科・助教
研究者番号 : 90313874

鎌足 雄司 (KAMATARI, Yuji)
岐阜大学・生命科学総合研究
支援センター・助教
研究者番号 : 70342772