

研究種目： 基盤研究 (B)

研究期間： 2006~2009

課題番号： 18390032

研究課題名 (和文) エキソソーム形成機構と機能に関する研究

研究課題名 (英文) Study on the formation and function of exosomes

研究代表者

西島 正弘 (NISHIJIMA MASAHIRO)

国立医薬品食品衛生研究所・所長

研究者番号： 60072956

研究成果の概要 (和文) : エキソソームは細胞から分泌される多層膜の小胞で、その成分は細胞の生育状態、生育環境、そして細胞が貪食する物質により変化する。細胞内寄生細菌が感染している細胞から分泌されるエキソソームの成分を調べるための技術の開発、および細胞内寄生細菌が細胞感染を行った場合の宿主応答、特にエキソソームの分析を行うことを研究目的として研究を行った。細菌に感染した細胞が分泌するエキソソームに存在しうる修飾型 LPS の分析技術を開発した結果、アミノアラビノース修飾型の検出に優れたマトリクスを見つけることができた。また、リポド A 脱アシル化酵素 LpxR がサルモネラの細胞内増殖に重要な影響を与えていることを見出した。

研究成果の概要 (英文) : Exosomes are composed of proteins and lipids, which are secreted from cells including those infected with bacteria. In order to examine the structure of lipid A portion of LPS, which is potentially involved in the exosomes, we developed a method for mass spectrometry analysis of lipid A. We found that 2, 5-dihydroxybenzoic acid matrix was preferable for the detection of aminoarabinose modification. *Salmonella* Typhimurium LpxR potentially detoxifies lipid A by 3'-O-deacylation; however, the involvement of deacylation in its adaptation to host cells remains unclear. Intracellular replication assay demonstrated that growth of the *lpxR*-null strain was lower than that of the wild-type strain, indicating that lipid A 3'-O-deacylation is beneficial for intracellular growth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,000,000	0	4,000,000
2007年度	3,700,000	0	3,700,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
総計	15,100,000	2,220,000	17,320,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：脂質、細菌、エンドトキシン、質量分析、細胞内増殖

1. 研究開始当初の背景

エクソソームは細胞から分泌される多層膜の小胞で、その成分は細胞の生育状態、生育環境、そして細胞が貪食する物質により変化すると考えられていた。エクソソームの構成成分、及びその機能については不明な点が多くあった。エクソソームはその存在の普遍性、及び応用の可能性から研究の対象とするべき脂質小胞であると考えられた。一方、哺乳動物の生体防御ではさまざまな感染病原体に由来する脂質成分を Toll-like receptor をはじめとする受容体によって認識して免疫応答を惹起することが重要であることが明らかとなってきた。本研究では細胞内寄生細菌が感染時に引き起こす宿主細胞の変化、すなわち免疫応答にエクソソームの視点を加えて研究を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究では（１）細胞内寄生細菌が感染している細胞から分泌されるエクソソームの成分を調べるための技術の開発、（２）細胞内寄生細菌が細胞感染を行った場合の宿主応答、特にエクソソームの分析を行うことを研究目的としている。

3. 研究の方法

（１）細胞内寄生細菌が感染している細胞から分泌されるエクソソームの成分を調べるための技術の開発では、エクソソーム中の LPS 修飾を解析する目的で、多数のマトリクスを質量分析計 MALDI-TOF MS で試して

LPS 修飾ごとに適切なマトリクスが存在するか解析を行った。

（２）細胞内寄生細菌が細胞感染を行った場合の宿主応答解析ではサルモネラ菌を利用してマクロファージ様培養細胞に感染させる実験系を確立して、そこで見られる応答の生化学的解析を行った。

4. 研究成果

（１）エクソソーム成分の分析に必要な解析技術に関する研究ではリポ多糖修飾の検出技術の開発を行った。細胞内寄生細菌であるサルモネラ菌の外膜表面はリポ多糖と呼ばれる糖脂質で覆われている。リポ多糖は哺乳動物細胞にしか存在しないこと、リポ多糖は免疫系活性化作用があることなどから、サルモネラ菌に感染した細胞が分泌するエクソソームにはリポ多糖成分が存在し、宿主の生体防御に影響を与えている可能性が考えられる。これまで、リポ多糖の活性本体であるリポド A 部位の構造は質量分析計 MALDI-TOF MS により容易に構造分析されたが、アミノアラビノース修飾型のリポド A 検出は容易でなかった。リポド A の調整法と分析に使うマトリクスを変更したところアミノアラビノース修飾型のリポド A 検出できるようになった。一方、新しい方法ではホスホエタノールアミン修飾型のリポド A は検出できなくなった。このことから、いくつかの分析法を併用して解析することによりエクソソーム中のリポ多糖分析が可能になることがわかった。

（２）細胞内寄生細菌であるサルモネラ

菌はマクロファージなどの貪食細胞や非貪食細胞で細胞内増殖を行う。この際に外膜に由来するリポ多糖やペリプラズムに存在するペプチドグリカンなどの免疫系を賦活する働きのある物質が細胞内で部分的に消化されて、そのあとでエキソソームに輸送される可能性がある。そこで、まずサルモネラ菌の細胞内寄生・増殖系の確立をおこなった。細胞内増殖系はマウスマクロファージ由来のRAW細胞と非貪食細胞であるヒトHEK293細胞で確立できた。そこで様々なLPSリポドA部位修飾変異株を感染・増殖させて増殖に対するリポドA修飾の効果を検討した。このうち、リポドA脱アシル化酵素LpxRが細胞内増殖で果たす役割について特に解析を行った。解析の結果、まずサルモネラのリポドA 3'-O-脱アシル化を行う修飾酵素であるLpxRは細菌増殖の定常期(Stationary Phase)に細菌の膜に蓄積して脱アシル化を行うことを見出した。さらに、この増殖定常期のサルモネラ野生株とLpxR欠損株をマウスマクロファージ由来のRAW細胞株に感染させるとLpxR欠損株は野生株よりも細胞内増殖のレベルが低かった。この結果から3'-O-脱アシル化はサルモネラの細胞内増殖に有利に働くことがわかった。

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) Miyuki Kawano, Takayuki Manabe, and Kiyoshi Kawasaki: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lipopolysaccharide deacylation enhances its intracellular growth within macrophages. *FEBS lett.*

(2010) vol. 584, 207-212 査読あり

2) 川崎清史、自然免疫の鍵を握る Toll-like receptor ファルマシア (2010) vol. 46, 2-7 査読あり

3) 川崎清史、サルモネラのリポ多糖脱アシル化と抗菌ペプチド抵抗性 エンドトキシン研究 (2009) vol. 11, 26-28

4) K. Okemoto, K. Hanada, M. Nishijima and K. Kawasaki The preparation of a lipidic endotoxin affects its biological activities. *Biol. Pharm. Bull.* (2008) vol.31 1952-1954 査読あり

5) K. Kawasaki, K. China, and M. Nishijima. Release of lipopolysaccharide deacylase PagL from latency compensates for a lack of lipopolysaccharide aminoarabinose modification-dependent resistance to antimicrobial peptide polymyxin B in *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* (2007) vol. 189, 4911-4919 査読あり

6) M. Kobayashi, S. Saitoh, N. Tanimura, K. Takahashi, K. Kawasaki, M. Nishijima, Y. Fujimato, K. Fukase, S. Akashi-Takamura, and K. Miyake. Regulatory roles for MD-2 and TLR4 in ligand-induced receptor clustering. *J. Immunol.* (2006) vol. 176, 6211-6218 査読あり

7) 川崎清史、サルモネラ菌の外膜リモデリングと宿主応答 薬学雑誌 Vol. 126 1227-1234 (2006) 査読あり

[学会発表] (計4件)

1) 川崎清史、西島正弘 サルモネラ菌の抗菌ペプチド感受性のLPS脱アシル化による調節 日本エンドトキシン研究会 2007年10月 鹿児島

2) 眞鍋貴行、西島正弘、川崎清史 LPS脱アシル化酵素の活性調節に関与するアミノ

酸残基の同定第

日本生化学会大会 2007年 12月 横浜

3) 眞鍋貴行、河野美幸、川崎清史 サルモネラ LPS 脱アシル化酵素 PagL の活性調節に関与するアミノ酸残基は他の外膜タンパク質との相互作用に重要である

日本生化学会大会 2009年 10月 神戸

4) 河野美幸、眞鍋貴行、川崎清史 LpxR によるリピドA脱アシル化はサルモネラの効率的な細胞増殖に必要である

日本生化学会大会 2009年 10月 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西島正弘 (国立医薬品食品衛生研究所・所長)

研究者番号 : 60072956

(2) 研究分担者

川崎清史 (同志社女子大学・薬学部・准教授)

研究者番号 : 60270641