

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07179

研究課題名(和文)結核菌感染におけるTAB3の役割

研究課題名(英文)A role of TAB3 in host defense against mycobacterial infection

研究代表者

高江洲 義一 (Takaesu, Giichi)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授

研究者番号：60403995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージが産生する炎症性サイトカインの一つであるインターロイキン(IL)-1は、貪食した結核菌の殺菌に重要な役割を果たす。一方、結核菌は病原因子zinc metalloprotease 1 (Zmp1)を分泌してIL-1の産生を阻害することで殺菌を回避する。しかしながら、これまでZmp1の詳細な作用機序は不明であった。本研究では、Zmp1が宿主のGRIM-19と会合することを見出し、さらに、GRIM-19がIL-1の産生に必須の役割を果たすことを明らかにした。本研究により、Zmp1はGRIM-19を標的としてIL-1の産生を阻害することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、結核菌が産生する炎症抑制因子の作用機序の解明に取り組んだ。その結果、炎症誘導に必須の役割を果たす新規制御因子を同定し、さらに結核菌の炎症抑制因子はこの新規制御因子を標的とすることを見出した。本研究の成果は、宿主免疫応答を増強するタイプの新たな抗結核薬や新しい結核ワクチン、さらには近年注目されている「訓練免疫」を増強することによる感染症予防法や治療法の創出に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：A mycobacterial virulence factor, Zn²⁺ metalloprotease 1 (Zmp1), is known to suppress IL-1 production by inhibiting caspase-1 resulting in phagosome maturation arrest. However, the molecular mechanism of caspase-1 inhibition by Zmp1 remains obscure. In this study, we identified GRIM-19 (also known as NDUFA13), an essential subunit of mitochondrial respiratory chain complex I, as a novel Zmp1-binding protein. Using CRISPR/Cas9-mediated gene knockout cells, we found a previously unrecognized role of GRIM-19 as an essential regulator of NLRP3 inflammasome and a molecular mechanism underlying Zmp1-mediated suppression of IL-1 production during mycobacterial infection.

研究分野：免疫学

キーワード：結核菌 自然免疫 マクロファージ 炎症 インターロイキン(IL)-1 インフラマソーム ミトコンドリア 自

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

結核の病原体である結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)は、自然界では主にヒトだけを宿主として存在してきた。現在でも世界人口の約4分の1が結核菌を保菌していると推定され、その9割以上は無症候感染である。「最も巧妙なヒト病原体の一つ」とも言われる結核菌がどのようにして宿主の免疫を回避し、長期にわたる持続感染を成立させるのか、その分子メカニズムの全体像はまだ解明されていない。結核菌による免疫回避の重要な戦略の一つがマクロファージ(M ϕ)への細胞内寄生である。その実現のために、結核菌は様々な分泌タンパク質をM ϕ 内に放出し、免疫応答に関わる細胞内シグナル伝達の阻害や殺菌回避をする。感染M ϕ 内での結核菌の生存に必須の役割を果たす結核菌の分泌タンパク質として、protein tyrosine phosphatase A (PtpA)とzinc metalloprotease 1 (Zmp1)がある。前者は宿主のTAB3, TRIM27, GADD45A, GSK3 α , VPS33Bを標的として様々な細胞応答に干渉し、後者はM ϕ 炎症性サイトカインのインターロイキン(IL)-1 β の産生を阻害することが報告されているが、いずれも作用機序は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、結核菌による殺菌回避の分子機序を明らかにするため、結核菌の分泌タンパク質PtpAとZmp1に着目してその作用機序の解明に取り組んだ。

3. 研究の方法

酵母ツーハイブリッドスクリーニング: ClontechのMatchmaker Gold Yeast Two-hybrid SystemおよびMate & Plate Libraryを用い、全長のZmp1をbaitとしてスクリーニングを行った。約4 x 10⁵個の形質転換体から55個の陽性クローンを分離し、ライブラリー由来cDNAの塩基配列を決定した。その結果、一つのクローンはミトコンドリア電子伝達系複合体IのサブユニットであるGRIM-19の86-144アミノ酸をコードすることが判明した。

細胞および培地: マウスマクロファージ細胞株J774.1およびヒト胎児腎臓上皮細胞株HEK293Tを10%非働化FBSと1%ペニシリン/ストレプトマイシンを添加したDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SIGMA, Cat# D5796)で培養した。

CRISPR/Cas9: マウス*Grim-19*遺伝子を標的とするガイドRNA(Invitrogen, ID: CRISPR249728_SGM, 5' -GGTCCGCTGTAGTCGATG-3')と組換えCas9タンパク質(Invitrogen, Cat #B25641)をNeonエレクトロポレーターを用いてJ774.1細胞に導入後、限界希釈法により2つのノックアウトクローンを取得した。

サイトカイン濃度の測定: ELISAキットを用いて、培養上清中およびマウス血清中のIL-1 β (eBioscience)、TNF- α 、IL-6(BioLegend)の濃度を測定した。

Lactate dehydrogenase (LDH) リリースアッセイ: Cytotoxicity LDH Assayキット(Dojindo社)を用いて、培養上清中のLDH量を測定した。

各種試薬および抗体: Ultrapure LPS from *E. coli* 0111:B4 strain (Cat #tlrl-3pelps), ATP (Cat #tlrl-atp)とMCC950 (Cat #inh-mcc)はInvivogenより、Nigericin (Cat #AG-CN2-0020)とPoly(dA:dT) (Cat #P0883)はAdipoGenとSigma-Aldrichよりそれぞれ購入した。ウエスタンブロットまたは免疫染色に用いた一次抗体は次の通りである: IL-1 β (Cat #12507), NLRP3 (Cat #15101), ASC (Cat #67824) (Cell Signaling Technology), Caspase-1 (Cat #ab179515), GRIM-19 (Cat #ab110240) (Abcam), β -Actin (Sigma-Aldrich, Cat #A1978)。Anti-FLAG tag (Thermo Fisher Scientific, Cat # PA1-984B), anti-T7 tag (Novagen, Cat #69522)。二次抗体: HRP-conjugated antibodies against mouse IgG (Cat #7076) and rabbit IgG (Cat #7074) (Cell Signaling Technology), and Alexa Fluor 488-conjugated cross-absorbed secondary antibodies against mouse IgG (H+L) (Invitrogen, Cat #A11001) and rabbit IgG (H+L) (Invitrogen, Cat #A11010)。Hoechst 33342 (Cat #B2261)はSigma-Aldrichより購入。

呼吸鎖複合体Iの活性測定: Complex I Enzyme Activity Assay Kit (Abcam, Cat #ab109721)を用いて、J774.1細胞破砕液に含まれるComplex Iの活性を測定した。

JC-1染色、MitoSOX染色: ミトコンドリア膜電位とmtROS産生を測定するため、それぞれ蛍光プローブのJC-1 (Abcam)とMitoSOX (Invitrogen)を用いてJ774.1細胞を染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いた蛍光観察(JC-1)とフローサイトメトリー解析(MitoSOX)を行った。

4. 研究成果

まず、Zmp1 の宿主側標的分子を同定するため、酵母 two-hybrid スクリーニングを行い、ミトコンドリア電子伝達系複合体 I のサブユニットである GRIM-19 の C 末領域 (GRIM-19-C, 86-144aa) を分離した (図 1a)。次に、動物細胞内における Zmp1 と GRIM-19 の相互作用を調べるため、HEK293T 細胞にタグ付きの GRIM-19 と Zmp1 をそれぞれトランスフェクションし、免疫沈降実験を行った結果、両者の共沈降が認められた (図 1b)。さらに、結核菌に感染したマクロファージ内での細胞内在性 GRIM-19 と Zmp1 の細胞内局在を調べるため、J774.1 細胞に、*zmp1* 遺伝子欠損 BCG に FLAG タグ付き Zmp1 を導入した相補株 $\Delta zmp1$ -BCG [Zmp1-FLAG] を感染させ、抗 GRIM-19 抗体および抗 FLAG 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。その結果、細胞内在性 GRIM-19 はミトコンドリアに局在しており、さらに Zmp1-FLAG の一部と GRIM-19 との共局在が観察された。これらの結果から、Zmp1 は GRIM-19 と動物細胞内で会合することが明らかとなった。

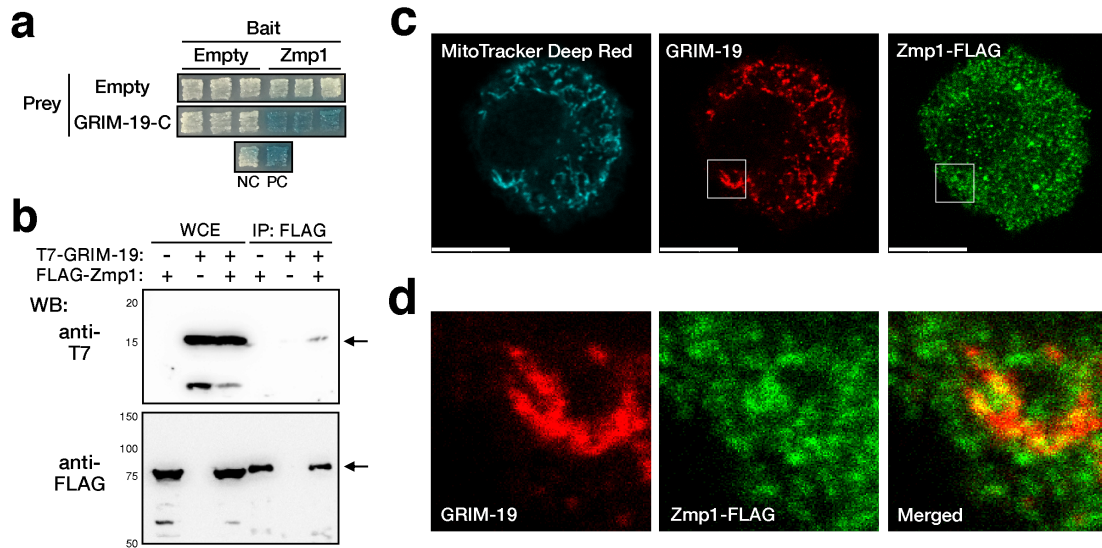


図 1 (a) 酵母 two-hybrid 法による Zmp1 と GRIM-19 の相互作用の検出。(b) 293T 細胞で発現させた Zmp1 と GRIM-19 の共沈降。(c) $\Delta zmp1$ -BCG [Zmp1-FLAG] を感染させた J774.1 細胞における内在性 GRIM-19 と Zmp1 の共局在。MitoTracker Deep Red はミトコンドリアの染色像を示す。(d) (c) の四角で囲った領域の拡大像および GRIM-19 と Zmp1-FLAG の重ね合わせ像。

これまでに GRIM-19 が IL-1 β の産生に関与するという報告はない。そこで、CRISPR/Cas9 法を用いてマウスマクロファージ細胞株 J774.1 の *Grim-19* 遺伝子欠損細胞を 2 クローン (KO-1, KO-2) 樹立し、IL-1 β 産生制御における GRIM-19 の役割を調べた。その結果、GRIM-19 は BCG 感染で誘導される IL-1 β の産生に必須の役割を果たすことが明らかとなった (図 2a)。また、NLRP3 特異的阻害剤の MCC950 を用いた検討により、BCG 感染によって誘導される IL-1 β の産生は NLRP3 依存的であることがわかった (data not shown)。そこで、リポ多糖 (LPS) で前処理した細胞を ATP または Poly dA:dT で再刺激して産生される IL-1 β の量を測定したところ、GRIM-19 欠損細胞では ATP 刺激によって誘導される IL-1 β の産生が顕著に減少することが明らかとなった (図 2b)。一方、Poly dA:dT 刺激によって誘導される IL-1 β の量は GRIM-19 欠損細胞で WT よりも僅かに減少した (図 2b)。したがって、GRIM-19 は NLRP3 依存的な IL-1 β 産生に必須の役割を果たす一方、AIM2 依存的な IL-1 β 産生には寄与していないと考えられる。

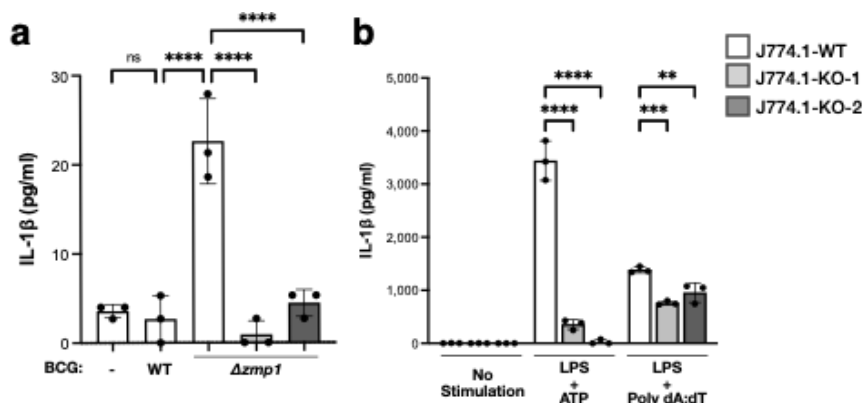


図 2 (a) BCG 野生株 (WT) または *zmp1* 欠損株 ($\Delta zmp1$) を感染させて 24 時間培養した J774.1 細胞 (WT, KO-1, KO-2) の培養上清を用いた IL-1 β の ELISA。(b) LPS で 4 時間刺激をした後、ATP または Poly dA:dT で 2 時間刺激した J774.1 細胞 (WT, KO-1, KO-2) の培養上清を用いた IL-1 β の ELISA。

次に、GRIM-19 が NLRP3 インフラマソームの活性化に関与するかをウエスタンブロットで調べた。LPS で前処理した細胞を ATP または Nigericin で再刺激すると、J774.1-WT では成熟型 IL-1 β と Caspase-1 の活性化に伴い生成される断片 (p10) が培養上清から検出されたが、GRIM-19 欠損細胞ではそれらがほとんど認められなかった (図 3a)。一方、LPS 刺激のみで誘導される pro-IL-1 β については、J774.1-WT と比べて GRIM-19 欠損細胞で僅かに減少していた (図 3a)。また、NLRP3 インフラマソームの構成因子である NLRP3、Caspase-1、ASC の発現量は WT と GRIM-19 欠損細胞との間で差は見られなかった (図 3a, data not shown)。以上のことから、GRIM-19 は NLRP3 インフラマソームの活性化に必須であると考えられる。NLRP3 インフラマソームの活性化にはミトコンドリア由来活性酸素種 (mtROS) が重要である。そこで、蛍光プローブ MitoSOX を用いて LPS+ATP 刺激後の mtROS の産生量を調べたところ、J774.1-WT では刺激によって mtROS レベルが上昇したのに対し、GRIM-19 欠損細胞では全く上昇が認められなかった (図 3b)。したがって、GRIM-19 は mtROS の産生を介して NLRP3 インフラマソームの活性化を制御することが示唆される。

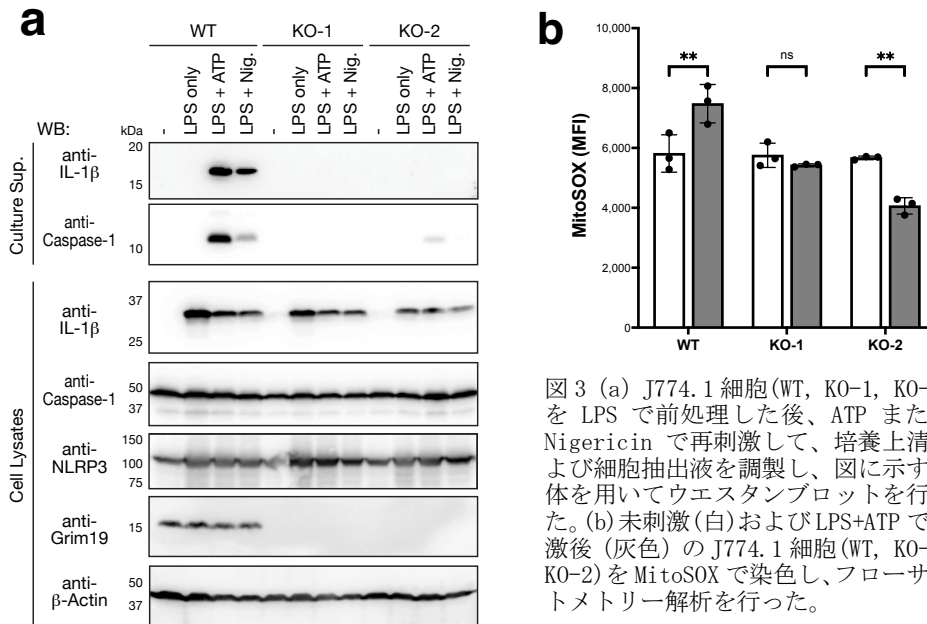


図 3 (a) J774.1 細胞 (WT, KO-1, KO-2) を LPS で前処理した後、ATP または Nigericin で再刺激して、培養上清および細胞抽出液を調製し、図に示す抗体を用いてウエスタンブロットを行った。(b) 未刺激 (白) および LPS+ATP で刺激後 (灰色) の J774.1 細胞 (WT, KO-1, KO-2) を MitoSOX で染色し、フローサイトメトリー解析を行った。

最後に、GRIM-19 はミトコンドリア電子伝達系複合体 I の必須サブユニットであることから、GRIM-19 遺伝子欠損または Zmp1 の発現がミトコンドリア膜電位の低下をもたらす可能性があると考え、蛍光プローブ JC-1 を用いた解析を行った。その結果、GRIM-19 欠損細胞では WT に比べてミトコンドリア膜電位が大幅に低下していることが明らかとなった (図 4a)。また、HEK293T 細胞で Zmp1 を一過的に発現させると、コントロールと比べてミトコンドリア膜電位が有意に低下し、その度合いは複合体 I の阻害剤である Rotenone で細胞を処理した場合と同程度であった (図 4b)。これらの結果から、Zmp1 は GRIM-19 を標的として、ミトコンドリア電子伝達系複合体 I の働きを阻害する可能性が示唆される。

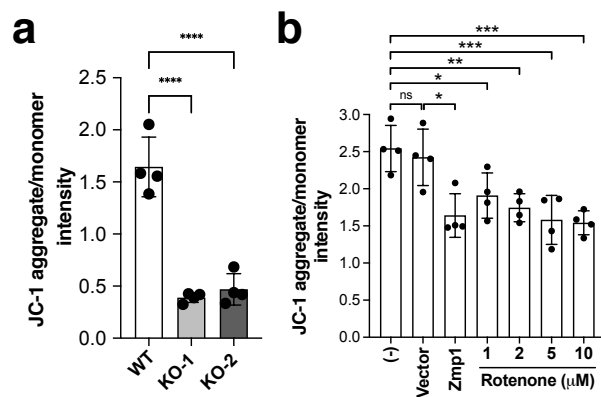


図 4 (a) J774.1 細胞 (WT, KO-1, KO-2) を JC-1 で染色して蛍光顕微鏡観察を行い、赤色蛍光 (aggregate) と緑色蛍光 (monomer) の比を測定した。(b) HEK293T 細胞に空または Zmp1 発現ベクターをトランスフェクションし、(a) と同様に JC-1 染色と解析を行った。

以上より、ミトコンドリア電子伝達系複合体 I のサブユニットである GRIM-19 が NLRP3 インフラマソームの活性化に必須の役割を果たすこと、結核菌のエフェクタータンパク質 Zmp1 は GRIM-19 を標的として NLRP3 依存的な IL-1 β の産生を阻害することが強く示唆された。本研究では、結核菌による殺菌回避の分子機序の解明を目指して、結核菌の分泌タンパク質 PtpA および Zmp1 に着目してこれらの作用機序の解明に取り組んだが、Zmp1 の研究が予想以上に進展したため、こちらの解析を優先して進めた結果、以上の知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高江洲義一、藏根友美、平安座啓、山田綾太郎、梅村正幸、松崎吾朗
2. 発表標題 結核菌の分泌タンパク質Zmp1によるIL-1 産生阻害機序
3. 学会等名 第29回日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藏根友美、高江洲義一、梅村正幸、松崎吾朗
2. 発表標題 結核菌の分泌タンパク質Zmp1によるIL-1 産生阻害の分子機序
3. 学会等名 第71回日本細菌学会九州支部総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高江洲義一、藏根友美、梅村正幸、松崎吾朗
2. 発表標題 A molecular mechanism of inflammasome suppression by mycobacterial virulence factor
3. 学会等名 第47回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高江洲義一、藏根友美、澤田和子、梅村正幸、松崎吾朗
2. 発表標題 結核菌エフェクタータンパク質によるIL-1 産生阻害の分子機序
3. 学会等名 第60回日本熱帯医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高江洲義一、藏根友美、澤田和子、梅村正幸、松崎吾朗
2. 発表標題 結核菌が賛成するエフェクター分子の作用機序の解明とそれに基づく宿主免疫増強型の結核治療法の開発
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藏根友美、澤田和子、高江洲義一、梅村正幸、松崎吾朗
2. 発表標題 結核菌エフェクタータンパク質によるIL-1 産生阻害の分子機序
3. 学会等名 第30回日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高江洲義一、藏根友美、松永哲郎、井田智章、澤田和子、梅村正幸、赤池孝章、松崎吾朗
2. 発表標題 結核菌由来のエフェクタータンパク質によるIL-1 産生阻害の分子機序
3. 学会等名 第31回日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藏根友美、澤田和子、高江洲義一、梅村正幸、松崎吾朗
2. 発表標題 結核菌エフェクタータンパク質によるIL-1 産生阻害の分子機序
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高江洲義一、梅村正幸、松崎吾朗
2. 発表標題 結核菌のエフェクタータンパク質Zmp1と相互作用する宿主側分子の同定とその機能解析
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藏根友美、高江洲義一、澤田和子、梅村正幸、松崎吾朗
2. 発表標題 結核菌エフェクタータンパク質によるIL-1 産生阻害の分子機序
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>琉球大学熱帯生物圏研究センター分子感染防御学分野ホームページ https://hostdefense.skr.u-ryukyu.ac.jp/</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松崎 吾朗 (Matsuzaki Goro) (30229455)	琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授 (18001)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	梅村 正幸 (Umemura Masayuki) (90359985)	琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授 (18001)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of Maryland			