

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007~2008

課題番号：19790565

研究課題名（和文）肺サーファクタント蛋白質受容体と感染防御へ向けた分子基盤の解明

研究課題名（英文）The mechanisms of protection against infection by pulmonary surfactant proteins.

研究代表者

西谷 千明（NISHITANI CHIAKI）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：30381255

研究成果の概要：本研究により、1) SP-D がトル様受容体 (TLR) 介在炎症応答を制御すること、2) 肺サーファクタント蛋白質がレジオネラなどの細胞内寄生菌と直接結合すること、さらに、肺サーファクタント蛋白質が、レジオネラの有するマクロファージへの膜障害作用を抑制すると共に、レジオネラの細胞内増殖を抑制することが明らかとなった。このことから、肺サーファクタント蛋白質が TLR を介する炎症制御ならびに細胞内寄生菌感染過程において重要な生体防御機能を担っていることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺サーファクタント蛋白質、トル様受容体 (TLR)、非定型抗酸菌、レジオネラ、自然免疫、細胞内寄生菌、呼吸器感染症、リポ多糖 (LPS)

## 1. 研究開始当初の背景

近年、コンプロマイズドホストの増加に伴い、非定型抗酸菌及びレジオネラなどの細胞内寄生菌を起炎菌とする呼吸器感染症の増加が認められている。これら感染症は、多剤耐性により治療が困難な場合も多数報告されていることから、本来生体が有している自然免疫を有効に作動させることが

重要であると考えられる。一方、肺サーファクタント蛋白質 A 及び D (SP-A 及び SP-D) は、生体防御レクチンとして、呼吸器における自然免疫において重要な役割を果たしている。申請者らは、病原微生物の構成成分を特異的に認識し、自然免疫における細胞応答の中心的な役割を担っている、Toll

様受容体 (TLR) のリガンド認識機構を明らかにし、(J Biol Chem 281:28322 2006, BBRC 328:586, 2005)、SP-A が TLR との相互作用を介し、TLR が介在する炎症反応を制御すること (J. Biol Chem 281: 21771, 2006, J. Biol Chem. 277:6830 2002)、および、肺サーファクタント蛋白質が貪食受容体である、スカベンジャー受容体 A (SR-A) やマンノース受容体 (MR) の細胞表面への発現を増強することにより、肺胞マクロファージの肺炎球菌 (*S. pneumoniae*) や非定型抗酸菌 (*M. avium*) の貪食を促進すること (J. Biol Chem. 279:21421, 2004, J. Immunol. 172:7592, 2004) を明らかにした。しかし、肺サーファクタント蛋白質が制御する TLR 介在炎症応答及び細胞内寄生菌の貪食促進機構は不明な点が多く残されていた。

## 2. 研究の目的

本研究は、SP-D による TLR 介在炎症応答制御機構、及び、肺サーファクタント蛋白質を介するマクロファージによる細胞内寄生菌貪食の分子機構を解明し、自然免疫における肺サーファクタント蛋白質の機能を明らかにすることで、呼吸器感染症防御へ向けた分子基盤を確立することを目的として遂行された。

## 3. 研究の方法

(1) SP-D による LPS 惹起炎症性細胞応答制御機構の解明と SP-D 多量体構造の重要性

### ① 組換え蛋白質の調整

wtSP-D, wtSP-A, および、SP-A/SP-Dキメラは、グルタミン合成酵素増幅系を用いて、CHO-K1細胞で発現させ、マンノースカラムを用いて調整した。SP-Dのコラゲナーゼレジスタントフラグメント (CRF) は、SP-A/SP-Dキメラをコラゲナーゼで処理し、分離精製を行っ

た。MD-2及びsTLR4蛋白質は、バキュロウイルス-昆虫細胞系を用いて発現させ、ニッケルカラムを用いて精製した。精製された組換え蛋白質は、ウェスタンブロット法並びにSDS-PAGE後のCBB染色により精製度合いを確認した。さらに、SP-D, CRF, および、SP-A/SP-Dキメラは、ゲル濾過クロマトグラフィーで分子量を測定し、Rotary Shadow法にて電子顕微鏡観察を行い、構造の確認を行った。

### ② SP-DとMD-2及びMD-2/sTLR4複合体との結合解析

マイクロタイターウェルを用いた固相化実験系、及び、免疫沈降法並びにビオチン化SP-Dとストレプトアビジンアガロースを用いたプルダウンアッセイ法を用いて結合解析を行った。

### ③ LPSとSP-DおよびMD-2との結合

LPS (Re595, Rc, 026:B6) をマイクロタイターウェルに固相化し、ビオチン化SP-Dもしくは、MD-2-Hisを反応させた後、LPSに結合したSP-DとsMD-2を、HRP標識ストレプトアビジンと抗His tag抗体で検出した。

### ④ TLR4/MD-2発現HEK293細胞へのLPS結合におけるSP-Dの影響

Alexa488標識smooth LPS (*E. coli*. 由来055:B5), あるいはrough LPS (*S. minnesota*由来) をSP-Dと反応後、TLR4/MD-2発現HEK293細胞に添加し、細胞に結合したLPSをFACSCaliburを用いて測定した。

### ⑤ TNF- $\alpha$ 分泌測定

SD ラットの気管支肺胞洗浄液から分離した肺胞マクロファージをSP-D, SP-A/SP-Dキメラ, あるいはCRFと反応させ、LPS刺激後、培養液中に分泌されたTNF- $\alpha$ をELISA法により解析した。

### ⑥ NF- $\kappa$ B活性化測定

HEK293細胞にNF- $\kappa$ Bリポーター遺伝子 (pNF- $\kappa$ B), 内部コントロール遺伝子 (pRL-TK), wt

TLR4, およびMD-2遺伝子をトランスフェクションし、SP-D, SP-A/SP-Dキメラ, あるいはCRFと反応させ、LPS刺激後、dual luciferase reporter assay systemを用いてNF- $\kappa$ B活性化を測定した。

(2) マクロファージへのレジオネラ及びM. Avium 感染に及ぼす肺サーファクタント蛋白質の影響

① 肺サーファクタント蛋白質とレジオネラ及びM. Aviumとの相互作用の解析

レジオネラもしくはM. Aviumを肺サーファクタント蛋白質と反応させ、遠心分離により菌体と共沈する肺サーファクタント蛋白質を回収し、ウェスタンブロット法を用いて解析した。その際、カルシウム、EDTAあるいは抗SP-Aモノクローナル抗体存在下で肺サーファクタント蛋白質と菌体との結合性についても調べた。

② 肺サーファクタント蛋白質によるレジオネラのマクロファージ細胞膜障害活性への影響

マクロファージ系細胞株THP-1細胞にコレクチンとレジオネラを反応させ、THP-1細胞の膜障害度をエチジウムブロマイド及びアクリジンオレンジを用いて調べた。

③ マクロファージによるレジオネラ貪食後の肺サーファクタント蛋白質の影響

肺サーファクタント蛋白質とPH-Rodo標識レジオネラを反応させ、THP-1細胞に貪食させた後、細胞内の酸性化レジオネラを測定すると共に、肺サーファクタント蛋白質とレジオネラおよびリソソームマーカーであるLAPM-1の局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

#### 4. 研究成果

(1) SP-D による LPS 惹起炎症性細胞応答制御機構の解明と SP-D 多量体構造の重要性

SP-D は、変異型 LPS と結合するが、完全型 LPS とは結合しないこと、さらに、SP-D は糖鎖認識領域(CRD)を介して RcLPS と結合し、ネック領域を介して Re595LPS と結合することが分かった。また、SP-D は MD-2 のペプチド領域に結合することが明らかとなった。さらに、SP-D は、MD-2/TLR4 複合体にも結合性を示し、完全型および変異型 LPS 惹起炎症性細胞応答を抑制した。この抑制効果は、SP-D が TLR4/MD-2 細胞発現に対する LPS の結合を減弱させるためであることが分かった。さらに、SP-A/SP-D キメラやCRFでは、wtSP-D と比較して LPS 惹起シグナルと炎症応答に対する抑制効果が減弱することが明らかとなった。

(2) マクロファージへのレジオネラ及びM. Avium 感染に及ぼす肺サーファクタント蛋白質の影響

肺サーファクタント蛋白質は、非定型抗酸菌の1つである *Mycobacteria avium* (*M. avium*)とカルシウム依存性に直接結合することが明らかとなった。さらに、*M. avium*の細胞壁構成成分の1つである、Lipoarabinomannann(LAM)は濃度依存性に*M. avium*とSP-Dとの結合を抑制した。しかし、SP-Aと*M. avium*との結合にLAMは全く影響を及ぼさなかった。また、肺サーファクタント蛋白質とレジオネラ菌体が直接結合することを見いだした。肺サーファクタント蛋白質は、糖鎖認識ドメイン(CRD)を介し、レジオネラ菌体とカルシウム依存性に直接結合することが明らかとなった。また、肺サーファクタント蛋白質がレジオネラのマクロファージ膜障害活性を抑制することを明らかにした。さらに、レジオネラは、マクロファージに被貪食後、ファゴソームとリソソームの融合を阻害し、消化を逃れることで細胞内に寄生する。しかし、肺サ

一ファクタント蛋白質存在下におけるレジオネラの貪食では、貪食されたレジオネラが細胞内で肺サーファクタント蛋白質と共局在しており、肺サーファクタント蛋白質が、リソソームのマーカー蛋白質である LAMP-1 とレジオネラとの共局在を増加することを明らかにした。

本研究課題の遂行により(1) SP-D は、LPS とその受容体との相互作用を変化させることにより、LPS 惹起炎症応答を抑制し、SP-D の十字架様構造がその抑制効果に重要であること、(2) 肺サーファクタント蛋白質はレジオネラと直接結合し、マクロファージへの膜障害作用を抑制すると共に、貪食後のファゴソームとリソソームの融合を促進することにより、細胞内増殖を抑制していること、が明らかとなった。このことから、肺サーファクタント蛋白質が TLR を介する炎症制御ならびに、レジオネラ菌体感染過程において重要な生体防御機能を担っていることが解明された。

本研究結果は、生体防御の最前線である呼吸器の自然免疫機構の分子基盤を明らかにするだけではなく、呼吸器感染症の予防や治療への応用に発展することが期待される。

#### 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 5 件)

(1) Pulmonary surfactant protein D inhibits lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory cell responses by altering LPS binding to its receptors. Yamazoe M\*, Nishitani C\*, Takahashi M, Katoh T, Ariki S, Shimizu T, Mitsuzawa H, Sawada K, Voelker DR, Takahashi H, Kuroki Y. J Biol Chem. 283(51): 35878-35888. 2008 (\*These authors contributed equally to this work).

(査読有)

(2) Pulmonary surfactant protein D binds MD-2 through the carbohydrate recognition domain. Nie X\*, Nishitani C\*, Yamazoe M, Ariki S, Takahashi M, Shimizu T, Mitsuzawa H, Sawada K, Smith K, Crouch E, Nagae H, Takahashi H, Kuroki Y. Biochemistry. 47(48):12878-12885. 2008 (\*These authors contributed equally to this work). (査読有)

(3) A single base mutation in the PRAT4A gene reveals differential interaction of PRAT4A with Toll-like receptors. Kiyokawa T, Akashi-Takamura S, Shibata T, Matsumoto F, Nishitani C, Kuroki Y, Seto Y, Miyake K. Int Immunol. 20(11) 1407-15. 2008 (査読有)

(4) The microtubule-binding protein Hook3 interacts with a cytoplasmic domain of scavenger receptor A. Sano H, Ishino M, Kramer H, Shimizu T, Mitsuzawa H, Nishitani C, Kuroki Y. J Biol Chem. 282(11):7973-7981. 2007 (査読有)

(5) Pulmonary collectins in innate immunity of the lung. Kuroki Y, Takahashi M, Nishitani C. Cell Microbiol. 9(8):1871-1879. 2007. Review. (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

(1) 澤田格 Pulmonary collectins exhibit anti-microbial activity against *Legionella pneumophila*. BMB2008 第 8 1 回日本生化学会大会 2008 年 12 月 12 日 神戸国際展示場

(2) Chiaki Nishitani Mutational analysis of Cys<sup>88</sup> of Toll-Like receptor 4 highlights the critical role of MD-2 in cell surface receptor expression BMB2008 第 8 1 回日本生化学会大会 2008 年 12 月 11 日 神戸

国際展示場

(3) 松嶋範男 TOLL 様受容体の溶液構造  
PF 研究会「ナノ構造解析・センシングにお  
ける小角散乱の利用高度化の将来展望」2008  
年 9 月 18 日 高エネルギー加速器研究機  
構・国際交流センター

(4) 有木茂 Pulmonary collectins  
interact with and aggregate *Mycobacterium*  
*avium*. The 8th Awaji International Forum  
on Infection and Immunity. 2008 年 9 月 10  
日兵庫県立淡路夢舞台国際会議場

(5) 西谷千明 TLR4 の細胞表面発現における  
MD-2 の重要性 JCS2008-Joint Conference in  
Sapporo 2008- 2008 年 7 月 11 日北海道大学  
学術交流会館

(6) 有木茂 肺サーファクタント蛋白質は非  
定型抗酸菌に結合し菌体凝集を惹起する。  
JCS2008-Joint Conference in Sapporo 2008-  
2008 年 7 月 11 日北海道大学学術交流会館

(7) 澤田格レジオネラ菌に対する肺サー  
ファクタント蛋白質の増殖抑制作用  
JCS2008-Joint Conference in Sapporo 2008-  
2008 年 7 月 11 日北海道大学学術交流会館

(8) 西谷千明 Toll-like receptor 4 region  
Glu24-Lys47 is a site for MD-2 binding  
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日  
本生化学会大会 合同大会 2007 年 12 月 13  
日 パシフィコ

(9) 西谷千明 MD-2 認識とリポ多糖シグナ  
ル伝達における Toll 様受容体 4 N 末端側  
Cys<sup>29</sup> 及び Cys<sup>40</sup> の重要性 第 20 回内藤コン  
ファレンス 自然免疫の医学・生物学[III]  
2007 年 10 月 10 日湘南国際村センター

(10) Chiaki Nishitani Surfactant protein  
A directly interacts with TLR4 and MD-2 and  
regulates inflammatory cellular response.  
第 7 回あわじしま感染症・免疫フォーラム  
2007 年 9 月 3 日 兵庫県立淡路夢舞台国際

会議場

〔図書〕(計 1 件)

西谷千明, 光澤博昭, 清水健之、佐野仁美、  
松嶋範男、黒木由夫 医学図書出版株式会  
社 エンドトキシン研究 10 基礎と臨床の最  
新知見 2007 94-100

6. 研究組織

(1)研究代表者

西谷 千明 (NISHITANI CHIAKI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：30381255

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：