

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07142

研究課題名(和文)黄色ブドウ球菌由来物質によるマスト細胞制御法の開発

研究課題名(英文) Mast cell function is altered by Staphylococcal superantigen-like protein 11

研究代表者

奥 輝明 (Oku, Teruaki)

星薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20409361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) が産生する宿主免疫回避関連タンパク質の一つである Staphylococcal superantigen-like protein 11 (SSL11) の組換えタンパク質を大腸菌より精製し、マスト細胞(マウス骨髄由来)に与える影響について解析したところ、マスト細胞の脱顆粒を抑制することが明らかになった。また、マスト細胞表面に存在する SSL11 標的分子を明らかにした。一方で、マスト細胞に発現する Coronin-1 が脱顆粒に関与すること、脱顆粒反応の際に 412 番目のセリン残基が PKC $\alpha$  によってリン酸化されることなどを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本国民の3人に1人が何かしらアレルギーを有しているといわれ“国民病”であるといえる。本研究成果は、外来物質(黄色ブドウ球菌産生物、Staphylococcal superantigen-like protein 11)および宿主因子(Coronin-1)の両者からマスト細胞の機能発現機構に注目し、アレルギー発症の分子機構を解明することで、新たなアレルギー制御法の開発に繋げるものである。また、黄色ブドウ球菌産生物質を利用しており、黄色ブドウ球菌のバイオリソースとしての可能性を探るものである。

研究成果の概要(英文)：First, we analyzed the degranulation of BMMC (mouse bone marrow derived mast cells) treated with recombinant SSL11. As a result, the mast cell treated with SSL11 reduced the release of beta-hexosaminidase. Next, we attempted to isolate SSL11 binding proteins from BMMC by pull down assay. When the proteins bound by GST-SSL11 were analyzed by SDS-PAGE and silver staining, a major protein band of ~85 kDa was detected. This protein was analyzed by peptide mass fingerprinting with nanoLC-MS/MS. Furthermore, we have shown that coronin-1 is required for degranulation of mast cells (RBL-2H3) and phosphorylated at Ser412 by PKC $\alpha$ . These results will be useful for the development of de novo allergy treatments.

研究分野：免疫学、生化学、分子生物学

キーワード：マスト細胞 黄色ブドウ球菌 SSL11 Coronin-1 アレルギー リン酸化 PKC スーパー抗原様タンパク質

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。

## 1. 研究開始当初の背景

即時型 (I 型) アレルギーは、免疫グロブリン E (IgE) に感作されたマスト細胞が抗原に曝された際に起こる免疫応答であり、マスト細胞の放出する生理活性物質により様々な症状が現れる。日本国民の 3 人に 1 人が何かしらのアレルギー疾患を有しているともいわれ、新たなアレルギー制御法の開発は必要である。

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) はアトピー性皮膚炎などのアレルギー症状を悪化させる一因として考えられており、実際に分泌された  $\delta$ -hemolysin はマスト細胞の脱顆粒反応を増強させていることが報告されている。一方で、宿主免疫回避関連タンパク質を産生することが知られており、この一つに Staphylococcal superantigen-like proteins (SSLs) が含まれている。SSLs は、14 種類の類似タンパク質の存在が示され、個々に標的分子や機能は異なると考えられているが、マスト細胞機能への影響については不明である。

Coronin-1 は免疫細胞特異的に発現するアクチン結合タンパク質であるが、マスト細胞の機能発現における役割については相反する研究成果が報告され、未だ不明のままである。

## 2. 研究の目的

本研究では、黄色ブドウ球菌産生物質 (SSLs) がマスト細胞に与える影響およびマスト細胞に発現する Coronin-1 に注目し、アレルギーの発症・制御機構の解明を行う。黄色ブドウ球菌はマスト細胞の刺激応答を増悪化させると考えられているが、本研究グループは、SSL11 がマスト細胞の脱顆粒反応を抑制する可能性を見出した。そこで SSL11 がマスト細胞の機能に与える影響について詳細に解析を行うことにした。また、マスト細胞に発現する Coronin-1 は、脱顆粒やサイトカイン産生に関与する可能性が示された。本研究グループは、食細胞における Coronin-1 の制御機構の解析を行っており、本分子のリン酸化による制御機構の詳細を明らかにしている。そこで、マスト細胞における Coronin-1 の役割および制御機構の解明を行うことにした。本研究は、微生物産生物質の有用性の可能性を模索しながら、複数の視点よりマスト細胞の機能制御機構を明らかにし、アレルギーの新規制御法の考案を目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 組換えタンパク質の作製

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) よりゲノム DNA を調製した後、PCR 法にて SSL1 ~ SSL11 の遺伝子をクローニングし、Glutathione-S-transferase (GST) 融合型およびポリヒスチジン (His) 融合型タンパク質の発現プラスミドを構築した。大腸菌にて発現させた後、グルタチオンアガロースまたは His-tag 精製用レジンをを用いて精製した。

### (2) 抗 SSL11 抗体の作製

精製した GST-SSL11 とフロイントアジュバントを混合したエマルジョンを調整した後、BALB/c マウスの腹腔に反復投与した。血清抗体価の上昇を確認し、脾細胞と骨髄腫細胞 (PAI) を融合させた。HAT 培地による選択と限界希釈により、抗 SSL11 抗体 (IgG1/k) 産生ハイブリドーマを樹立した。

### (3) マウス骨髄由来マスト細胞 (BMMC) および腹腔由来マスト細胞 (PCMC) の作製

BALB/c (6~8 週齢) より大腿骨を摘出し、骨髄細胞をマウス IL-3 (30 ng/ml) を添加した培地にて約 30 日培養することにより BMMC を作製した。BALB/c (6~8 週齢) の腹腔内細胞を無血清培地にて回収し、マウス IL-3 (30 ng/ml) およびマウス SCF (70 ng/ml) を添加した培地にて約 14 日培養することにより PCMC を作製した。

### (4) 脱顆粒実験

BMMC ( $1 \times 10^6$  cells/ml) または PCMC ( $1 \times 10^6$  cells/ml) を Anti-DNP IgE (30 ng/ml) で 1 時間感作した後、DNP<sub>30</sub>-BSA (5 ng/ml) で 0~30 分間刺激した。上清を回収し、 $\beta$ -ヘキサソミニダーゼの活性を測定した。IgE 抗体による感作後に His-SSL11 を加え、マスト細胞の脱顆粒に与える影響について解析した。また、同様の刺激を行った後、細胞を SDS サンプルバッファーにて溶解し、リン酸化 Coronin-1 (pSer2, pSer412) 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。また、JNK のリン酸化についても解析を行った。

### (5) IgE 抗体への SSL11 の結合性

IgE 抗体と GST-SSL11 を混合した後、グルタチオンアガロースを用いて GST-SSL11 を精製し、IgE 抗体が共精製されるか検討した。

### (6) マスト細胞へ SSL11 の結合

BMMC および PCMC の懸濁液 (2% FCS/PBS) に、ビオチン化した His-SSL7 または His-SSL11 (His-SSL7-biotin, His-SSL11-biotin) を添加し、4、30 分間静置した。洗浄後、Streptavidin-Alexa Fluor 647 で染色し、これら組換えタンパク質のマスト細胞への結合性を FACSVerse (BD Biosciences) を用いて解析した。

#### (7) SSL11 結合タンパク質の精製および同定

グルタチオンアガロースに精製 GST-SSL11 または GST を結合させた後、BMMC の細胞溶解液を加え、SDS-PAGE および銀染色により SSL11 結合タンパク質について解析した。また、BMMC の細胞表面をビオチン化した後、同様のプルダウンアッセイを行い、SDS-PAGE およびニトロセルロース膜への転写し、Streptavidin-HRP にて検出した。Streptavidin-HRP で検出されたバンドと同一の分子量より検出された銀染色のバンドについて、ゲルより切り出し、nanoLC-MS/MS にてタンパク質の同定を行った (日本プロテオミクス)。

#### (8) Coronin-1 のリン酸化に関与する PKC アイソフォームの特定

ラットマスト様細胞 RBL-2H3 に抗原抗体複合体刺激を行い、その際の Coronin-1 のリン酸化について調べた。各種 PKC 阻害薬処理した細胞を用いて、脱顆粒およびリン酸化に関与する PKC アイソフォームを解析した。さらに、CRISPR/Cas9 システムにより PKC $\alpha$  の欠失株の作製、その細胞への PKC $\alpha$  のレスキュー株を樹立し、Coronin-1 のリン酸化について解析した。

#### (9) リン酸化部位変異体 Coronin-1 の作製

CRISPR/Cas9 システムと鋳型一本鎖 DNA (ssODN) を用いることで、Coronin-1 の 412 番目のセリン残基をアラニン残基 (S412A) に置換できること RAW264.7 細胞を用いて確認した。マウス (C57BL/6) 受精卵に対して同様に行うことで、アラニン残基 (S412A) またはアスパラギン酸残基 (S412D) に置換した変異体マウスを作製した。

### 4. 研究成果

#### (1) SSL11 がマスト細胞の脱顆粒反応に与える影響

IgE 抗体にてマウス骨髄由来マスト細胞 (BMMC) を感作した後、His-SSL11 を添加し氷上で 30 分間静置した。その後、抗原 (DNP<sub>30</sub>-BSA) による細胞刺激を行ったところ、His-SSL11 の濃度依存的に  $\beta$ -ヘキサソミニダーゼの放出量が減少することが明らかになった。次に、His-SSL11 の作用機構を明らかにするために、ビオチン化した His-SSL11 を作製し、IgE 抗体や BMMC への結合性について解析を行った。その結果、SSL11 は IgE 抗体ではなく、BMMC に結合することが明らかになった。本結果は、BMMC のみならず、PCMC、マスト様細胞株 MC/9 (マウス)、RBL-2H3 (ラット) についても確認した。マスト細胞に発現する SSL11 に結合するタンパク質を単離するために、GST-SSL11 を用いたプルダウンアッセイを行った。その結果、SDS-PAGE および銀染色により 75 ~ 85 kDa、60 ~ 65 kDa、45 kDa 付近に特徴的なバンドが 3 本検出された。BMMC の細胞表面をビオチン化した後、同様にプルダウンアッセイを行なったところ 75 ~ 85 kDa、60 ~ 65 kDa のバンドのみ検出された。そこで、これら 2 本のバンドを銀染色したゲルより切り出し、nanoLC-MS/MS および Mascot サーチにて、SSL11 の標的タンパク質の特定を行った。2 本のバンドより特定されたタンパク質は両者ともタンパク質 X であった。抗タンパク質 X 抗体を用いて SSL11 と共精製されるタンパク質がタンパク質 X であることを確認した。タンパク質 X は、タンパク質 Y に結合することが知られており、またタンパク質 Y は抗原抗体複合体を介した細胞への刺激に関与することが報告されているため、SSL11 はこの経路を傷害することによりマスト細胞の脱顆粒を抑制していることが示唆された。タンパク質 X は糖タンパク質あるため、糖鎖修飾の違いにより SSL11 に結合したタンパク質 X が 2 種類の分子量のより検出されたと考えられた。これまでに申請者は、SSL11 が O 結合型糖鎖のシアル酸残基に結合する可能性を示しているため、詳細な解析を行う予定である。また、SSL11 をプレートに固相化し、BMMC を播種したところ、細胞が強く付着・伸展した。精製した SSL1 ~ SSL11 について同様の実験を行ったところ、SSL2、SSL3、SSL4、SSL5、SSL6 についても同様の活性が認められた。これらの SSLs がマスト細胞機能に与える影響については不明である。

#### (2) Coronin-1 のリン酸化とマスト細胞の脱顆粒反応

Coronin-1 をノックダウンした RBL-2H3 (RBLshCoro1) を用いて脱顆粒反応を解析したところ、親株と比較して  $\beta$ -ヘキサソミニダーゼの放出量が減少していた。また、RBL-2H3 による脱顆粒反応における Coronin-1 のリン酸化について解析したところ、抗原刺激 1 ~ 5 分後に 412 番目のセリン残基 (Ser412) の一過性のリン酸化が認められた。一方で、2 番目のセリン残基 (Ser2) のリン酸化は検出されなかった。これまでに、好中球やマクロファージにおいて Coronin-1 はプロテインキナーゼ C (PKC) によってリン酸化されることを明らかにしているため、PKC 阻害薬処理した RBL-2H3 を用いて、Ser412 のリン酸化と脱顆粒について解析した。その結果、PKC 阻害薬処理により、 $\beta$ -ヘキサソミニダーゼの放出や TNF- $\alpha$  産生量が低下した。Ser412 のリン酸化に関与する PKC アイソフォームを特定するために、各種 PKC 阻害薬を用いたところ、PKC $\alpha$ / $\beta$  阻害薬である Gö6976 処理で抑制することができた。次に、CRISPR/Cas9 システムにより、PKC $\alpha$  または PKC $\beta$  を欠損した RBL-2H3 細胞を作製し、Ser412 のリン酸化について解析した。その結果、PKC $\alpha$  欠損細胞では Ser412 のリン酸は抑制されたのに対し、PKC $\beta$  欠損細胞では変化がなかった。また、PKC $\alpha$  のレスキューにより、Ser412 のリン酸化は回復した。

### (3) SSL11 が Coronin-1 のリン酸化に与える影響

SSL11 で処理した BMDC では、抗原刺激 1~5 分後に起こる Coronin-1 の Ser412 のリン酸化が著しく減弱した。また、その後に認められる JNK のリン酸化も減弱していた（刺激 10 分後）。現時点では、Coronin-1 のリン酸化と JNK のリン酸化の因果関係は不明である。そこで Coronin-1 (Ser412) のリン酸化を起こらなくした変異体（アラニン残基へ置換、S412A）やリン酸化模倣体（アスパラギン酸残基へ置換、S412D）を作製し、その影響を解析することにした。CRISPR/Cas9 システムと鋳型一本鎖 DNA (ssODN) を利用した塩基置換法により、RAW264.7 細胞の Ser412 をアラニン残基 (Ala) に置換した。ゲノム DNA の遺伝子配列はサングー法により確認した。また、同義突然変異により Ala412 配列が制限酵素 (*TseI*) により消化できるようにした。同様に ssODN を利用した CRISPR/Cas9 システムにて、マウス (C57BL/6) 受精卵への遺伝子改変を行った。ssODN には S412A および S412D への改変用の 2 種類を用いた。産仔の遺伝子解析を行い、S412A および S412D の遺伝子型を有する個体を確認した。今後、これらのマウスの継代を行った後、BMDC を調製し、Coronin-1 のリン酸化の意義を解析したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Higashi Nobuaki, Maeda Rino, Sesoko Nakaba, Isono Momoko, Ishikawa Sodai, Tani Yurina, Takahashi Katsuhiko, Oku Teruaki, Higashi Kyohei, Onishi Shoichi, Nakajima Motowo, Irimura Tatsuro	4. 巻 520
2. 論文標題 Chondroitin sulfate E blocks enzymatic action of heparanase and heparanase-induced cellular responses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 152 ~ 158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuiji Makoto, Shiohara Kazuyuki, Takei Yoshinori, Shinohara Yoshinori, Nemoto Shigeyoshi, Yamaguchi Satoshi, Kanto Masanori, Itoh Saotomo, Oku Teruaki, Miyashita Masahiro, Seyama Yoshiyuki, Kurihara Masaaki, Tsuji Tsutomu	4. 巻 42
2. 論文標題 Selective Cytotoxicity of Staphylococcal $\alpha$ -Hemolysin ( $\alpha$ -Toxin) against Human Leukocyte Populations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 982 ~ 988
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-01024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oku Teruaki, Kaneko Yutaka, Ishii Rie, Hitomi Yuki, Tsuiji Makoto, Toyoshima Satoshi, Tsuji Tsutomu	4. 巻 27
2. 論文標題 Coronin-1 is phosphorylated at Thr-412 by protein kinase C $\delta$ in human phagocytic cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 1 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 金子 豊, 石井理恵, 人見祐基, 築地 信, 豊島 聡, 辻 勉, 奥 輝明
2. 発表標題 免疫細胞特異的アクチン結合タンパク質Coronin-1の食作用におけるリン酸化とファゴソームからの解離
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 里 史明, 相良篤信, 稲葉健二郎, 奥 輝明, 湯本哲郎
2. 発表標題 COL8A1は、FAKの活性化を介してトリプルネガティブ乳がんの腫瘍形成を促進する
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 史 佳, 生田駿乃介, 福村修示, 大熊晴香, 鈴木聖也, 金田 碧, 福田明々人, 重田奈緒, 高橋勝彦, 奥 輝明, 安達勇光, 西村吉雄, 中島元夫, 入村達郎, 東 伸昭
2. 発表標題 ヘパラーゼ阻害物質heparastatin (SF4) による結腸癌細胞の増殖抑制効果
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥 輝明, 栗坂知里, 人見祐基, 築地 信, 辻 勉
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌SSL5およびSSL11の白血球MMP-9に与える影響
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥 輝明, 栗坂知里, 安藤祐介, 人見祐基, 築地 信, 伊藤佐生智, 辻 勉
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌Staphylococcal superantigen-like protein 5 (SSL5) の宿主免疫系に与える影響
3. 学会等名 第20回Pharmaco-Hematologyシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子 豊, 安藤祐介, 人見祐基, 築地 信, 奥 輝明, 辻 勉
2. 発表標題 マウス血小板におけるCoronin-1のリン酸化の解析
3. 学会等名 第20回Pharmaco-Hematologyシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Higashi N, Maeda R, Sesoko N, Isono M, Takahashi K, Oku T, Nakajima M, Irimura T
2. 発表標題 Chondroitin sulfate E from squid cartilage and mouse bone marrow-derived mast cells inhibits heparanase-mediated enzymatic action and heparanase-induced cellular responses
3. 学会等名 Proteoglycans 2019 (11th International Conference on Proteoglycans) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤祐介, 金子 豊, 長谷川晋也, 築地 信, 渡辺知恵, 奥 輝明
2. 発表標題 免疫細胞特異的アクチン結合タンパク質Coronin-1の発現制御機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	柏倉 淳一  (Kashiwakura Jun-ichi)		

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
研究協力者	安藤 祐介  (Ando Yusuke)		

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