

機関番号：34311
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590073
 研究課題名（和文） 病原細菌が作る修飾型エンドトキシンの宿主認識と応答に関する研究
 研究課題名（英文） Research for host-recognition and responses against endotoxin modified by pathogenic bacteria.
 研究代表者
 川崎 清史（KAWASAKI KIYOSHI）
 同志社女子大学・薬学部・教授
 研究者番号：60270641

研究成果の概要（和文）：修飾型エンドトキシンが病原細菌内で造られる際に重要な修飾酵素の活性調節機構を解析した。外膜修飾酵素 PagL は通常潜伏化しているがこの性質にリポ多糖と会合できることが重要であると示唆された。また、PagL の潜伏性の生理的意義について解析した。その結果、PagL が潜伏化していることは細菌の膜のバリアー機能の維持に重要であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Regulatory machineries of lipid A modification enzymes were analyzed in this study. Lipid A modification enzyme PagL is usually latent, and the property of PagL to associate with lipopolysaccharide was shown to be important for the latency. Furthermore, the biological significance of the PagL latency was examined. PagL latency was shown to be beneficial for bacteria to produce effective membrane permeation barrier.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：エンドトキシン、Toll-like receptor、細菌、外膜、潜伏化

1. 研究開始当初の背景

自然免疫系で働くマクロファージなどの細胞はエンドトキシン、すなわちグラム陰性

菌の外膜成分であるリポポリサッカライド (LPS) により活性化される。LPS による免疫担当細胞活性化は宿主の自然免疫活性化と

適応免疫誘導に重要である。さて、LPS 受容体は LPS と結合する CD14、LPS 刺激を細胞内に伝達する Toll-like receptor (TLR) 4、及び TLR4 の細胞外領域に会合する MD-2 など構成される高次複合体である。そして LPS のエンドトキシン活性を担う lipid A 部位が受容体複合体に認識される。これまでに、申請者はエンドトキシン様の活性を有する薬剤であるタキソールを利用して TLR4 だけではなく MD-2 がリガンド認識に機能することを示し、MD-2 のリガンド認識に関わるアミノ酸を同定した。そして申請者の研究も含めた国内外の研究によって、エンドトキシン認識に TLR4 と MD-2 は必須であることが示されている。

私はエンドトキシン認識に関わる未知の宿主因子があることを示唆する予備データを得ていた。その概要を以下に述べる。サルモネラ菌などの病原細菌は生育環境に応答して LPS の lipid A 部位を修飾する。この LPS 修飾は病原細菌の宿主環境への適応に関わると考えられている。これまでに lipid A 修飾が細菌の病原性に関わることを示す証拠として、lipid A 修飾による細菌の抗菌ペプチド抵抗性の上昇、および lipid A 修飾によるエンドトキシン活性の低下（宿主免疫監視からの回避）、が示されている。サルモネラ菌の場合、lipid A の脂肪酸に行なわれる修飾には、①外膜酵素 PagP の働きによる 2-N-ヒドロキシミリスチル基のパルミチル化、②外膜酵素 PagL の働きによる 3-O-ヒドロキシミリスチル基の脱アシル化、③このパルミチル化と脱アシル化の両方、が知られている。サルモネラ菌の非修飾型 lipid A はヒト TLR4・MD-2 複合体の強制発現により LPS 応答性を獲得した細胞株、およびヒト由来マクロファージ様細胞株を活性化する。一方、パルミチル化あるいは脱アシル化された修飾型

lipid A は TLR4・MD-2 強制発現細胞株に対しても、マクロファージに対しても、活性が著しく低下する。従って、lipid A のパルミチル化と脱アシル化は共に TLR4・MD-2 複合体による認識を回避させる修飾であると考えられた。ところが、パルミチル化と脱アシル化両方の修飾を受けた lipid A は TLR4・MD-2 強制発現細胞株の活性化能は非修飾型 lipid A と比べて著しく低下するのに対して、マクロファージ様細胞の活性化能は非修飾型 lipid A と比べて全く低下しなかった。この結果からマクロファージにはパルミチル化と脱アシル化両方の修飾を受けた lipid A の認識に必要な因子が発現しているのに対して TLR4・MD-2 強制発現細胞株にはこの修飾型 lipid A の認識に必要な因子が発現していないと考察された。逆に考えると、TLR4・MD-2 強制発現細胞株に不足因子を強制発現させて、この修飾型 lipid A が認識されるようになるか調べることにより、修飾型エンドトキシン認識に関わる新規因子を同定することができる。また、この修飾型 lipid A だけではなく、病原細菌により作り出される様々な修飾型 lipid A の認識にこの因子に関わる可能性や、様々な修飾型 lipid A 認識に関わる未同定の宿主因子がさらに存在する可能性も考えられる。本研究ではこのような修飾型エンドトキシン認識に関与する新規因子を同定すると同時に修飾型エンドトキシンの感染での役割を明らかにすることを目指して計画した。

2. 研究の目的

(1) 修飾型 lipid A の認識に関わる新規因子をマクロファージ細胞株から同定する。そして細菌感染における同定因子の機能を細胞レベルで明らかにする

(2) Lipid A 修飾の制御機構について外膜

酵素に的を絞って検討する。特にこれまでの研究の積み重ねがある PagL について検討する。

(3) エンドトキシン修飾の生理的意義について明らかにする。特に感染と宿主応答における役割の解明に焦点を絞る。

3. 研究の方法

(1) Lipid A 修飾酵素を強制発現させた大腸菌株より修飾型 lipid A を精製する。発現させる修飾酵素の組み合わせを変えることにより多様な修飾型 lipid A を調製する。これら修飾型 lipid A の生物活性をマクロファージ様細胞株および TLR4-MD2 強制発現細胞株を利用して測定して細胞による活性の違いを明らかにする。そして、マクロファージ様細胞株および TLR4-MD2 強制発現細胞株から、TLR4-MD2 受容体複合体を免疫沈降させる。TLR4-MD2 と共沈殿された因子を二次元電気泳動により分析して細胞株間の違いを調べる。マクロファージ様細胞株からは共沈殿されるが、TLR4-MD2 強制発現細胞株からは共沈殿されない因子が修飾型 lipid A 認識に関わる候補因子である。そして、候補因子の解析を行う。

(2) PagL の 4 つの細胞外ループのアミノ酸一つ一つをアラニンに置換した変異体をサルモネラに導入してリポド A の脱アシル化が見られるようになる潜伏性が失われた変異体 PagL はこれまでの研究で同定している。これら変異体 PagL と潜伏性のある野生型 PagL が外膜中で相互作用する分子の違いがあるか検討する。そのために PagL を免疫沈降させて共沈する分子、特にタンパク質と脂質、の解析を行う。

(3) PagL の潜伏化がサルモネラ外膜障壁の強化に重要であるか検討するために以下の方法で解析した。潜伏性である野生型 PagL

あるいは潜伏性を失った変異型 PagL^{R43A} を PagL 欠損のサルモネラ株に導入した。次にそのサルモネラ株を PhoP-PhoQ を活性化させる低マグネシウム培地で培養することにより PagL を誘導する。そして菌体外液に外膜通過が菌体内流入の律速段階となる脂溶性薬剤エチジウムブロマイドを添加して、エチジウムブロマイドが核酸と複合体を形成することにより発する蛍光を測定することにより外膜の透過性を分析する。

4. 研究成果

(1) マクロファージ様細胞株からは共沈殿されるが、TLR4-MD2 強制発現細胞株からは共沈殿されない因子はこれまでのところ得られておらず、さらなる検討が必要である。

(2) 可溶化した膜画分から PagL と共沈する分子を解析した。潜伏性のある PagL は LPS と共沈したのに対して、潜伏性を失った変異型 PagL は LPS と共沈しなかった。このことから PagL の LPS と会合する能力が潜伏性に関わることが示唆された。また、共沈するタンパク質の分析もおこなったが、潜伏性の有無により共沈するタンパクに違いは認められなかった。

(3) PagL の潜伏性が失われている変異細胞株および潜伏性を失った変異型 PagL を導入した細胞株では、野生細胞株あるいは野生型 PagL を発現する細胞株と比較して、PhoP-PhoQ を活性化する条件下でエチジウムブロマイドの外膜透過性が上昇していた。また一部の脂溶性抗菌剤に対する感受性の上昇も見られた。これらの結果から PagL の潜伏性は PhoP-PhoQ 活性化による外膜障壁機能の強化に重要であることがわかった。

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 6 件)

- ① Kiyoshi Kawasaki and Takayuki Manabe: Latency of the lipid A deacylase PagL is involved in producing a robust permeation barrier in the outer membrane of *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* 査読あり (2010) vol. 192, 5837-5840
- ② Takayuki Manabe, Miyuki Kawano, and Kiyoshi Kawasaki: Mutations in the lipid A deacylase PagL which release the enzyme from its latency affect the ability of PagL to interact with lipopolysaccharide in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読あり (2010) vol. 396, 812-816
- ③ Miyuki Kawano, Takayuki Manabe, and Kiyoshi Kawasaki: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lipopolysaccharide deacylation enhances its intracellular growth within macrophages *FEBS Lett.* 査読あり (2010) vol. 584, 207-212
- ④ Kiyoshi Kawasaki: Alternative procedures for analysis of lipid A modification with phosphoethanolamine or aminoarabinose *J. Microbiol. Methods* 査読あり (2009) vol. 76, 313-315
- ⑤ Kazuo Okemoto, Kentaro Hanada, Masahiro Nishijima and Kiyoshi Kawasaki: The preparation of a lipidic endotoxin affects its biological activities *Biol. Pharm. Bull.* 査読あり (2008) vol. 31 1952-1954
- ⑥ T. Manabe and K. Kawasaki: Extracellular loops of lipid A 3-O-deacylase PagL are involved in recognition of aminoarabinose-based membrane modifications in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 査読

あり (2008) vol. 190, 5597-5606

〔学会発表〕 (計 7 件)

- ① 眞鍋貴行、河野美幸、川崎清史: サルモネラリポ多糖脱アシル化酵素 PagL の活性抑制にはリポ多糖との結合が重要である 第 83 回日本生化学会 神戸 2010 年 12 月
- ② 川崎清史、眞鍋貴行: 二成分制御系 PhoP-PhoQ 活性化によるサルモネラ外膜透過性障壁の強化に外膜脱アシル化酵素の潜伏性が関与する 第 83 回日本生化学会 神戸 2010 年 12 月
- ③ K. Kawasaki and M. Kawano: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lipopolysaccharide deacylation enhances its intracellular growth within macrophages. Annual meetings of the Society for Leukocyte biology and The international Endotoxin and Innate Immunity Society バンクーバー (カナダ) 2010 年 10 月
- ④ 川崎清史、眞鍋貴行: サルモネラ外膜リパーゼ (PagL) の潜伏性に関わるアミノ酸残基の解析 第 52 回日本脂質生化学会 群馬県渋川市 2010 年 6 月
- ⑤ 河野美幸、眞鍋貴行、川崎清史: LpxR によるリポド 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 第 82 回日本生化学会 神戸 2009 年 10 月
- ⑥ 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 第 82 回日本生化学会 神戸 2009 年 10 月
- ⑦ K. Kawasaki and T. Manabe: Extracellular loops of lipid A 3-O-deacylase PagL are involved in recognition of aminoarabinose-based membrane

modifications in *Salmonella enterica*.
10th Biennial Meeting of the International
Endotoxin and Innate Immunity Society エ
ジンバラ (イギリス) 2008年7月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 清史 (KAWASAKI KIYOSHI)

同志社女子大学・薬学部・教授

研究者番号：60270641