

平成 22 年 6 月 24 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790083

研究課題名（和文）熱ショックタンパク質 Hsp72 の C 末端配列が初期免疫系に果たす役割

研究課題名（英文）Studies on Role of the C-terminal region of Heat Shock Protein 72 in Innate immunity

研究代表者 太野 路子 (Michiko Ohno)

安田女子大学 薬学部 助手

研究者番号：80454875

## 研究成果の概要（和文）：

通常HSPは細胞内に存在し、分子シャペロンとして機能している。一方近年では、細胞の傷害時における細胞外でのHSPの免疫学的な機能が注目されている。申請者はこれまでにマウス誘導型Hsp72およびそのC末端欠失変異体とlymphoid neoplasm P388D1細胞が特異的に結合し、この結合にはC末端の構造が関与していることを明らかにしている。本研究では、Hsp72C末端領域の構造の免疫系での働きについて明らかにすることを目的とした。P388D1細胞と各種Hsp72C末端欠失変異体での種々の炎症性サイトカイン発現をRT-PCRにより検討したが、特異的なサイトカインの発現はみられなかった。次に、マウス腹腔マクロファージについて検討したところ、C末端が欠失するにつれ結合が強くなる傾向がみられ、IL-1βの発現がみられた。しかし、IL-1βの発現に対するC末端領域の関与については認められなかった。次に、マウス腹腔マクロファージを用い、貪食能についてフローサイトメーターを用いて検討した。いずれのHsp変異体においても貪食能の亢進が観察されたが、変異体による差異はみられなかった。

HSP70の一時配列は異種生物間においてもよく保存されているが、C末端領域の配列は多様性に富む。そこで、この違いが異種生物の侵入などの自己非自己の見極めに関与するという仮説のもとに、現在ヒトおよび大腸菌のHSP70組換えタンパク質の発現を試みており、さらにはマウスHSP70およびこれらの異種生物HSP70とのキメラタンパク発現を試みている。

一方、腸管は生体における最大の免疫器官であり、食物や腸内細菌等の多くの外来異物と直接接触する器官である。腸管免疫系における細胞外の HSP70 の機能について検討するため、ヒト小腸上皮細胞 Caco-2 細胞を用いたモデル系の構築も試みている。またこの際、ヒト単球細胞 THP-1 と Caco-2 の共培養モデル系を構築する為に現在研究を進めている。

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,700,000	510,000	2,210,000
21年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

近年、HSPの免疫学的な機能が注目されている。本来HSPは細胞内に存在し、分子シャペロンとしての機能が主である。しかし、HSPに結合した抗原ペプチド特異的な細胞傷害性T細胞を誘導する機構(Cross-

Presentation)が明らかされ、HSPの免疫学的な機能が注目され始めた。さらにこのほかにもHSPが直接抗原提示細胞に認識され炎症性サイトカインやケモカイン等の分泌を誘導する作用が報告されている。また、これらの作用に対するHSP受容体候補(CD91,

LOX-1, SR-A, CD36, SREC-1, TLR2/4, CD94, CD40, SR-A, CCR5)が多数報告されているが、詳細な機構については未だ不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

HSP は原核生物から真核生物に至るまで多種多様な生物に保存されたタンパク質である。細菌やウイルス等の侵入やネクローシス等がおこると、細胞外の HSP が非自己あるいは危険シグナルとして生体に認識され、炎症性サイトカインやケモカインを誘導する (danger hypothesis)。この際、生体がいかにして自己と非自己あるいは生体における危険シグナルを見極めているのかは未だ明らかではない。興味深いことに、多種多様な生物に共通の分子である HSP のうち分子量が約 70000 付近の HSP70 ファミリーに属するタンパク質である HSP70 の一次配列に着目してみると、N 末端 ATPase ドメインでは異種生物間でも相同性が高いのに比べ、C 末端側の配列では生物種間の相同性が低く、なかでも C 末端 26 残基は種特異性の高い配列であった。我々はこれまでに、この C 末端部位が免疫細胞との相互作用に重要であることを明らかにしている (Ohno et al., *Mol. Immunol.* 44,2344-2354(2007))。そこで、本研究では HSP70 の C 末端部位に着目し、この部位が生体における自己や非自己、あるいは危険シグナルの見極めに寄与しているのではないかという仮説の下に、細胞外 HSP の生理学的な意義と、その認識機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

①マウス誘導型 Hsp72 とその C 末端欠失変異体およびキメラ変異体の大腸菌による発現と精製

HSP70 ファミリーに属するタンパク質は、N 末端側よりヌクレオチド結合ドメインと、それに続く基質結合ドメイン、C 末端の機能に不明な点が多く、特定の構造をとらないフレキシブルな Tail 部位から成る。我々は現在までにマウス誘導型 Hsp72 とその C 末端および N 末端欠失変異体を組み込んだプラスミドを導入した大腸菌を得ている。発現させる組換えタンパクは、N 末端より C 末端 641 残基までの Hsp72 の全長の配列をもつ Hsp72-Full と、C 末端側より Tail 部位を欠失した d(1-615)、さらに C 末端 $\alpha$ ヘリックス C をも欠失した d(1-562)、N 末端側より基質結合ドメインまでを含む d(1-543)と N 末端 ATPase ドメインのみから成る d(1-384)の 5 種類に加え、さらに N 末端の ATPase ドメインを欠失させた d(385-641)と d(385-615)である (図 1)。

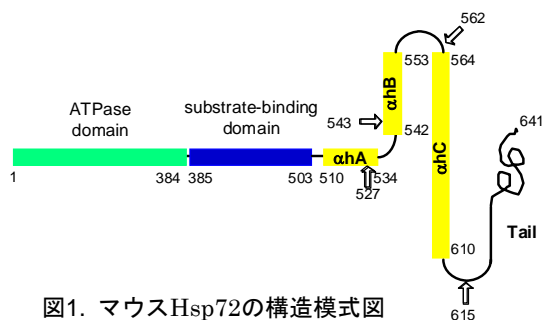


図1. マウス Hsp72 の構造模式図

また、基質結合ドメイン以降、あるいは C 末端 26 残基のみを異種生物 HSP70 の配列と置き換えたキメラタンパクの発現を目的とし、大腸菌、ヒト誘導型 Hsp70 遺伝子のクローニングを試みた。これらはそれぞれ大腸菌およびヒト培養細胞から抽出した RNA より cDNA を得て、HSP70 遺伝子のクローニングを試みている。これらを用いてマウス Hsp72 とのキメラタンパク発現プラスミドを PCR 法により構築し、マウス Hsp72 組換え体と同様に大腸菌 BL21(DE3)に導入する。各種変異タンパク質の発現は、大腸菌を用い、申請者らの方法に従って行った (Ohno et al., *FEBS Lett.* 576,381-386(2004))。得られた各タンパク質は陰イオンカラムクロマトグラフィーおよび Detoxi gel アフィニティークロマトグラフィーを用い、混入した大腸菌外膜由来リポポリサッカライド (LPS) を除去した。タンパクサンプル中に含まれる LPS 量は *Limulus ameobocyte lysate* アッセイにより測定した。

②P388D1 細胞およびマウス生細胞と各種 Hsp72 との結合

得られた各種マウス誘導型 Hsp72C 末端欠失変異体をビオチン化したものをプローブとして、streptavidin を介して細胞を蛍光ラベルし、各種細胞との結合をフローサイトメーターにより検討した。細胞は lymphoid neoplasm P388D1 細胞に加え、BALB/c マウス腹腔マクロファージおよび脾細胞中に含まれるマクロファージや樹状細胞、NK 細胞等の初期免疫担当細胞について検討した。

③炎症性サイトカイン等のケミカルメディエーターの同定と定量

各種細胞と各種マウス誘導型 Hsp72C 末端欠失変異体との結合の結果産生される炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, GM-CSF) についてリアルタイム RT-PCR により検討した。

④腹腔マクロファージ貪食能の検討

BALB/c マウスより採取した腹腔マクロファージを各種 Hsp72 変異体タンパクで刺激し、蛍光ラテックスビーズの貪食をフローサイトメーターにより検討した。

#### ⑤腸管免疫モデル系の構築

Caco-2 細胞の熱ストレス応答については、シャーレに単層培養した Caco-2 細胞を 42°C 1 時間熱ストレス条件下で培養後、37°C で 24 時間培養した後細胞を回収し、Hsp70 をはじめとしたストレスタンパクに対するウェスタンブロッティングを行った。タイトジャンクション (TJ) 機能については、Caco-2 細胞をトランスウェルにて 21 日間培養した後、TER (transepithelial electric resistance) および basal 側に加えた FITC-イヌリンの apical 側への漏出 (Ex485 nm, Em515nm) を測定した。

### 4. 研究成果

#### ①各種免疫細胞とマウス Hsp72C 末端欠失変異体との結合

P388D1 細胞およびマウス Hsp72C 末端欠失変異体との結合について検討した結果、C 末端を欠失するにつれその結合が弱くなる傾向がみられ、d384 および d543 では結合が見られなかったことから、544 残基以降の C 末端部位がこの P388D1 細胞との結合に重要であることを明らかにした (図 2)。

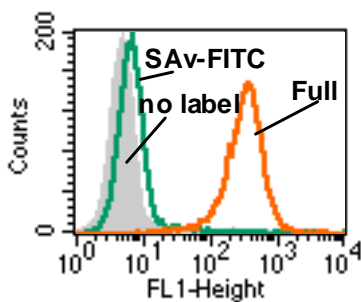


図 2 マウス Hsp72 と P388D1 細胞との結合

さらにマウス脾細胞との結合を検討したところ、ATPase ドメインのみから成る d384 以外の変異体とで結合がみられ、C 末端を欠失するごとに結合が強くなる傾向がみられた。また、脾細胞について HSP72 変異体と結合した細胞のポピュレーションについて検討したところ、マクロファージや樹状細胞、NK 細胞といった抗原提示能を持つ細胞群との結合が観察された (図 3)。

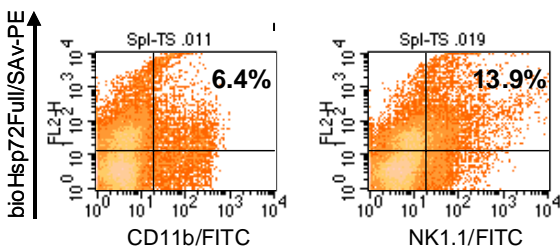


図 3 脾細胞とマウス Hsp72 との結合

そこで、次にマウス腹腔マクロファージとの結合について検討したところ、脾細胞と同様に d384 以外の Hsp72 変異体と結合し、また C 末端を欠失するにつれ結合が強くなる傾向がみられた。

#### ②P388D1 およびマウス腹腔マクロファージとの結合における炎症性サイトカインの誘導

P388D1 との結合がみられたマウス Hsp72C 末端欠失変異体について、この結合における炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, GM-CSF) の発現について、リアルタイム RT-PCR を用いて検討を行ったが、特異的な炎症性サイトカインの発現はみられなかった。次にマウス腹腔マクロファージについても検討したところ、IL-1 $\beta$  の発現がみられたが、C 末端領域との関連は見出せなかった。

#### ③腹腔マクロファージ食能に及ぼす影響

マウス Hsp72 変異体と腹腔マクロファージとの結合がマクロファージの食能に及ぼす影響について、蛍光ラテックスビーズの取り込みについて検討した結果、d384 を除くいずれの Hsp72 変異体存在下においても蛍光ビーズの取り込みの亢進がみられたが、C 末端との関連は見出せなかった。

#### ④マウス Hsp72 と異種生物 HSP70 とのキメラタンパク質の発現

当初の計画である、マウス Hsp72 と異種生物 HSP70 キメラタンパク質の発現に先立ち、現在真核生物であり同じ哺乳動物であるヒト HSP70、あるいは原核生物である大腸菌 HSP70 についてそれぞれ cDNA をクローニングし、タンパク質発現ベクター pET-22b へ組み込みタンパク質の発現を試みている。さらに今後は他の生物種 (真核生物として植物由来の HSP70 や、真核生物として乳酸菌 HSP70 など) の HSP70 の発現も試み、これらよりさらにキメラタンパク質の発現を試みる予定である。

#### ⑤腸管モデル系の構築

腸管は生体における最大の免疫器官であり、食物や腸内細菌等の多くの外来異物と直接接触する器官である。腸管免疫系における細胞外の HSP の機能について検討するため、ヒト小腸上皮細胞 Caco-2 細胞とヒト単球細胞 THP-1 と Caco-2 の共培養モデル系の構築を目指す。一方、Caco-2 細胞のストレス応答についてはこれまでにあまり調べられていない。そこでモデル系の構築に先立ち、Caco-2 細胞の基本的なストレス応答について検討した。シャーレに単層培養した Caco-2 細胞のストレス応答についてもっとも良く研究がなされている熱ストレス応答について検討した。この結果他の細胞でもみられるように、42°C 1 時間の熱ストレスにより HSP70 をはじめとしたストレスタンパク質の誘導が起こることを明らかにした。また、THP-1 細胞との共培養系ではトランスウェルを

用いて Caco-2 細胞を培養し、24 ウェルプレート上に培養した THP-1 細胞との共培養を想定している。この際、apical 側・basal 側より各種 Hsp70 変異体を暴露することによる Caco-2 細胞の免疫応答をはじめとしたストレス応答について検討する。具体的には炎症性サイトカインの発現や、ストレスタンパクの発現、さらにはそれらについておこるであろう上皮細胞のバリア機能の崩壊について検討する。そこで、この中でも特にバリア機能の評価として TJ 機能の評価系の構築を試みた。TJ の崩壊は FIT-イヌリンの透過性および TER (transepithelial electric resistance)により評価した。トランスウェルに単層培養した Caco-2 細胞の basal 側に FITC-イヌリンを加え、TJ の崩壊を引き起こすとの報告のあるエタノールを apical および basal 側より添加し、FITC-イヌリンの透過性を検討した。この結果 basal 側よりエタノールを暴露した場合に、エタノールの濃度依存的に FITC-イヌリンの透過性が亢進し、TJ 機能の崩壊が示唆された。これは TJ タンパクの 1 種である claudin-1 および Zo-1 の免疫染色によっても確認している。そこで、今後は炎症性サイトカインの発現やストレスタンパクの発現、バリア機能の変化について THP-1 との共培養系をもちいて検討していく予定である。

#### 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 1 件)

Tani F, Ohno M, Furukawa Y, Sakamoto M, Masuda S, Kitabatake N. Surface expression of a C-terminal alpha-helix region in heat shock protein 72 on murine LL/2 lung carcinoma can be recognized by innate immune sentinels. *Molecular Immunology*, 46,1326-1339 (2009) 査読有

[学会発表] (計 5 件)

①赤木玲子, 太野路子, 桂昌司, 中井彰, 井上幸江、グルタミンによる消化管保護効果発現のメカニズム、第 51 回日本生化学会 中国・四国支部例会、2010 年 5 月 15 日、山口大学 大学会館

②赤木玲子, 太野路子, 桂昌司, 中井彰, 井上幸江、ストレス負荷による消化管障害に対するグルタミンの保護効果、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28 日、就実大学

③太野路子, 井上幸江, 赤木玲子、消化管上皮細胞の障害メカニズムの解析、第 82 回 日本生化学会大会、2009 年 10 月 23 日、神戸ポートアイランド

④太野路子, 井上幸江, 赤木玲子、消化管上皮細胞におけるストレス応答とグルタミンによる保護効果、第 50 回 生化学会中国・四国支部例会、2009 年 5 月 16 日、とりぎん文化会

館

⑤太野路子、井上幸江、赤木玲子、大内和雄、瀬山敏雄、消化管上皮細胞におけるストレス応答とグルタミンによる保護効果、BMB2008 第 31 回分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 11 日、神戸ポートアイランド

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

太野 路子 (安田女子大学薬学部 助手)

研究者番号 :

80454875

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

研究者番号 :