

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：平成 20 年度～平成 21 年度

課題番号：20790713

研究課題名（和文） マクロファージによる感染初期応答を制御する新規チロシンリン酸化蛋白質の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of novel tyrosine-phosphorylated protein in LPS-stimulated macrophages

研究代表者

松村 隆之 (MATSUMURA TAKAYUKI)

国立感染症研究所・免疫部・研究員

研究者番号：50434379

研究成果の概要（和文）：マクロファージにおける Toll-like receptor (TLR)シグナルはサイトカイン産生などの宿主感染応答に必須である。これまでマクロファージの LPS (TLR4 リガンド) 応答において、チロシンキナーゼがサイトカイン産生に関与することが数多く報告されてきたが、チロシンキナーゼを介した TLR シグナル伝達機構には不明な点が多い。そこで我々は最先端のプロテオミクス技術 Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) を用いて、TLR4 の下流で感染初期に誘導されるチロシンリン酸化シグナルを網羅的に解析し、リン酸化変動の定量化を行った。その中で、マクロファージの TLR シグナルにおいて機能未知な B-cell adaptor for phosphatidylinositol 3-kinase (BCAP) のチロシンリン酸化に着目した。BCAP には BCAP_L および BCAP_S の二種類のバリエーションが存在するが、RNAi を用いた BCAP_L の単独ノックダウンにより、様々な TLR リガンドで刺激したマクロファージにおける炎症性サイトカイン IL-6 および抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生が増強されることが明らかとなった。さらに BCAP_L は Syk-PI3K-PLC γ 2 経路を介した転写因子 NF- κ B の持続的活性化を抑制する分子であることが示唆された。BCAP_L は宿主に不利に働くような望ましくない持続性の刺激を妨げるために TLR シグナルを厳密にコントロールしていると考えられる。本研究により、マクロファージにおいて IL-6 および IL-10 の産生を負に制御する新規因子 BCAP_L が同定され、サイトカイン産生における新たな調節機構が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Toll-like receptor (TLR) signaling in macrophages is essential for anti-pathogen responses such as cytokine production and antigen presentation. Although numerous reports suggest that protein tyrosine kinases (PTKs) are involved in cytokine induction in response to lipopolysaccharides (LPS; TLR4 ligand) in macrophages, the PTK-mediated signal transduction pathway has yet to be analyzed in detail. Here, we carried out a comprehensive and quantitative dynamic tyrosine phosphoproteomic analysis on the TLR4-mediated host defense system in RAW264.7 macrophages using stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). We determined the temporal profiles of 25 proteins based on SILAC-encoded peptide(s). Of these, we focused on the tyrosine phosphorylation of B-cell adaptor for phosphatidylinositol 3-kinase (BCAP) because the function of BCAP remains unknown in TLR signaling in macrophages. Furthermore, *Bcap* has two distinct transcripts, a full-length (*Bcap-L*) and an alternatively initiated or spliced (*Bcap-S*) mRNA, and little is known about the differential functions of the BCAP_L and BCAP_S proteins. Our study showed, for the first time, that RNAi-mediated selective depletion of BCAP_L enhanced IL-6 and IL-10 production but not TNF- α production in TLR ligand-stimulated macrophages. We propose that BCAP_L (but not BCAP_S) negatively regulates the TLR4 signaling-mediated production of IL-6 and IL-10, most likely via the Syk-BCAP_L-PI3K-PLC γ 2-NF- κ B pathway. BCAP_L is likely to tightly control TLR signaling to prevent undesired or persistent stimulation that might be harmful to the host. Our study will provide new insights into the molecular mechanisms of the regulatory system with regard to cytokine production in innate immune responses, which may help us to design novel strategies for the prevention of infectious diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,700,000	124,837	1,824,837
平成 21 年度	1,600,000	0	1,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	124,837	3,424,837

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：感染症防御学、自然免疫、プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

生体は様々な細菌やウイルスなどの病原体感染の危険に曝されている。生体は、自然免疫と呼ばれる進化的に高度に保存された生体防御システムを用いて、これに対抗する。すなわち、病原体の感染を受けると、樹状細胞やマクロファージなどの食細胞に発現する 11 種類の Toll-like receptor (TLR) により多様な病原体成分 (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) を認識し、炎症性サイトカインの産生などの宿主応答を行う。しかしながら、この防御システムは完璧ではなく、過剰反応は生体に敗血症性ショックや死をもたらす。一方で、免疫能が低下した高齢者や病人では、院内感染により命を落とすことが社会問題となっている。抗生物質の濫用による多剤耐性菌の出現はさらに問題を深刻にしている。

我々は近年、TRAF6 欠損マクロファージにおける I κ B α の分解、JNK、p38、ERK のリン酸化といった TLR4 シグナルは、正常マクロファージに比べ活性化に 10 分程の遅れが生じるだけでその程度はほとんど変わらないにも関わらず、サイトカイン産生が誘導されないことを見出した (Gohda, J., Matsumura, T., and Inoue, J.: *J. Immunol.*, 173 (5), 2913-2917, 2004)。これは、刺激初期の JNK、p38、ERK といった MAPK の活性化および I κ B α の分解を介した NF- κ B の活性化以外にサイトカイン産生に必須な未知のシグナル伝達系が存在する可能性を示唆している。我々は、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を TLR4 リガンドである LPS で処理した際のサイトカイン産生が、チロシンキナーゼ阻害剤 Genistein 前処理により、顕著に阻害されることを明らかにしている。TLR4 シグナルにおいて Btk、Csk、Pyk2 などのチロシンキナーゼや、vav1、

SHIP、paxillin などのチロシンリン酸化タンパク質の関与が報告されていることから、チロシンリン酸化が TLR4 による宿主応答反応の制御に関与することは確実である。そこで、我々は TLR4 シグナルにおけるチロシンリン酸化タンパク質に着目した。

2. 研究の目的

感染応答システムの解明とそれに基づく制御法の開発は重要な課題である。本研究では TLR4 シグナルにおけるチロシンリン酸化ネットワークの全体像を解明し、宿主応答の分子機構の理解を深め、その知見を応用した感染応答の制御を目指す。

3. 研究の方法

最先端のプロテオミクス技術 Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) を用いて TLR4 の下流で感染初期に誘導されるチロシンリン酸化シグナルを網羅的かつ定量的に解析し、チロシンリン酸化ネットワークの全体像を明らかにする。次に、同定されたタンパク質について RNAi を用いた解析により、TLR シグナルによるサイトカイン産生に寄与するタンパク質を同定する。さらに分子生物学的アプローチから新規タンパク質が関与するシグナル伝達因子および転写因子を探索し、サイトカイン産生に関わるシグナル伝達の分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

我々はまず、プロテオミクス技術 SILAC を用いて、RAW264.7 マクロファージ細胞株の TLR4 シグナルにおけるチロシンリン酸化タ

ンパク質の経時的かつ網羅的な同定を行った。その結果、p38, ERK, SHIP, Fes, Pyk2, PLC γ 2 といった既知のタンパク質や、38 個の新規タンパク質候補を含む合計 61 個のタンパク質が同定された。安定同位体標識アミノ酸に基づいて同定された 25 個のタンパク質についてリン酸化変動の定量化を行った結果、20 個のタンパク質において 2 倍以上の変動が認められ、そのうち 19 個はシグナル伝達因子であった。さらに、変動の認められたタンパク質について RNAi を用いた機能解析を行った結果、炎症性サイトカイン TNF- α の産生には影響しないが、炎症性サイトカイン IL-6 および抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生を負に制御する新規因子 B-cell adaptor for phosphatidylinositol 3-kinase (BCAP) $_{-L}$ が見出された (図 1)。

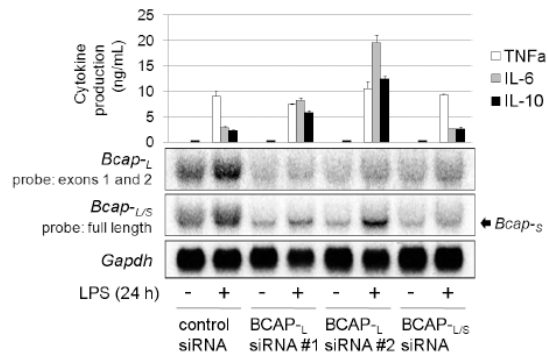


図 1 LPS 刺激誘導性のサイトカイン産生における BCAP $_{-L}$ および BCAP $_{-L/S}$ 発現抑制の影響

BCAP には BCAP $_{-L}$ および BCAP $_{-S}$ の二種類のバリエーションが存在するが、両者共にノックダウンするとサイトカイン産生に影響がないこと (図 1)、さらに両者共に 3 カ所の YXXM モチーフがチロシンキナーゼ Syk 依存的にチロシンリン酸化され PI3K p85 サブユニットと結合することが明らかとなった。このことから、BCAP $_{-L}$ はサイトカイン産生のブレーキ役、BCAP $_{-S}$ はサイトカイン産生のアクセル役である可能性が示唆された。また LPS 刺激により両者共に 6 時間以降からタンパク質発現増強が認められることが明らかとなった (図 2)。さらに BCAP $_{-L}$ 単独ノックダウンにより LPS 刺激による転写因子 NF- κ B の活性化が 12 時間後まで持続したこと、また LPS 刺激 1.5 時間後からみられる TNF- α 産生には影響せず、6 時間以降からみられる IL-6 および IL-10 の産生が増強されたこと (図 3)、さらに BCAP $_{-L}$ 単独ノックダウンにより増強した IL-6 プロモーター活性が NF- κ B 依存的であったことから、BCAP $_{-L}$ は LPS 刺激 6 時間後からの NF- κ B 持続的活性化

を抑制する因子であることが示唆された。さらに各種阻害剤を用いて、いずれのシグナル経路を介した NF- κ B 活性化において BCAP $_{-L}$ が抑制的に機能しているかを探索した結果、BCAP $_{-L}$ は Syk-PI3K-PLC γ 2 経路を介した転写因子 NF- κ B の持続的活性化を抑制する分子であることが示唆された。さらに BCAP $_{-L}$ は、TLR4 リガンドだけでなく、TLR2 リガンド MALP-2、TLR3 リガンド poly(I:C)、TLR7 リガンド R837 の刺激においても、TNF- α 産生には影響せず、IL-6 および IL-10 の産生を負に制御することが明らかとなった (図 4)。

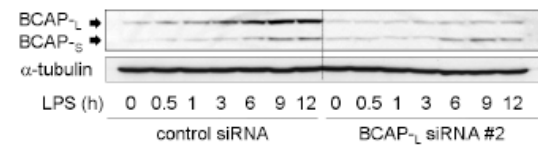


図 2 LPS 刺激による BCAP $_{-L}$ および BCAP $_{-S}$ の発現増強

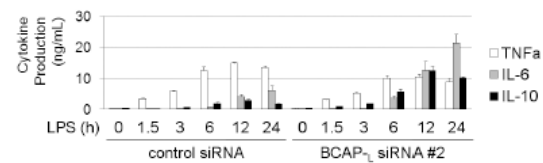


図 3 LPS 刺激誘導性のサイトカイン産生における BCAP $_{-L}$ 発現抑制の影響

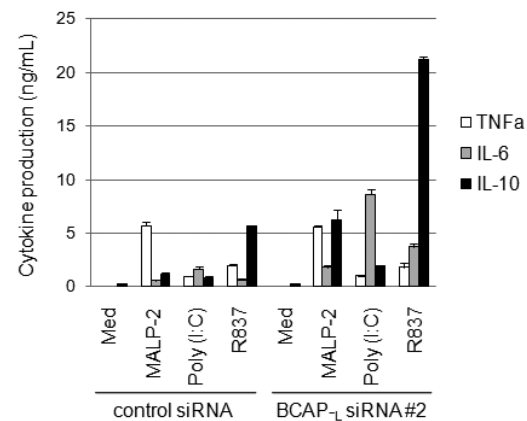


図 4 TLR リガンド刺激誘導性のサイトカイン産生における BCAP $_{-L}$ 発現抑制の影響

BCAP $_{-L}$ は宿主に不利に働くような望ましくない持続性の刺激を妨げるために TLR シグナルを厳密にコントロールしていると考えられる。本研究により、マクロファージにおいて IL-6 および IL-10 の産生を負に制御す

る新たな因子 BCAP-L が同定され、サイトカイン産生調節における新たな分子機構が明らかとなった。

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 1 件)

① Takayuki Matsumura, Junko Kawamura-Tsuzuku, Tadashi Yamamoto, Kentaro Semba, Jun-ichiro Inoue, TRAF-interacting protein with a forkhead-associated domain B (TIFAB) is a negative regulator of the TRAF6-induced cellular functions, *J. Biochem.*, 査読有, 146 (3), 2009, 375-381

[学会発表] (計 5 件)

① 松村 隆之、池辺 忠義、渡邊 治雄、小林 和夫、阿戸 学、劇症型溶血性レンサ球菌感染症におけるインターフェロン γ 産生細胞の解析、第 8 回 感染症沖縄フォーラム、2010 年 2 月 13 日、宜野湾市

② 松村 隆之、小林 和夫、阿戸 学、Monocytes are the major producers of IFN- γ in severe invasive group A streptococcal infections、第 39 回 日本免疫学会総会・学術集会、2009 年 12 月 4 日、大阪市

③ Takayuki Matsumura, Tadayoshi Ikebe, Haruo Watanabe, Kazuo Kobayashi, Manabu Ato, Involvement of IFN- γ and IL-6 in severe invasive group A *Streptococcus* infection, 17th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophage 2009、2009 年 7 月 3 日、金沢市

④ 松村 隆之、池辺 忠義、渡邊 治雄、小林 和夫、阿戸 学、劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株によるヒト好中球ネクロシス誘導機構の解析、第 7 回感染症沖縄フォーラム、2009 年 2 月 12 日、那覇市

⑤ Takayuki Matsumura, Masaaki Oyama, Hiroko Kozuka-Hata, Kentaro Semba, and Jun-ichiro Inoue, Proteomic Analysis of Host Defense System Against Infection Using SILAC-LC-MS/MS, 1st China-Japan Joint Workshop on New-Generation Vaccines for Infectious Diseases, Molecular Biology of Host-Pathogen Interaction、2008 年 5 月 22 日、Beijing、China

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 隆之 (MATSUMURA TAKAYUKI)
国立感染症研究所・免疫部・研究員
研究者番号：50434379

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：