

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月20日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590502

研究課題名（和文）エンドトキシンシグナルの強弱を調節する分子機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanisms of the strength of endotoxin signaling

研究代表者

棚元 憲一（TANAMOTO KENICHI）

武蔵野大学・薬学研究所・教授

研究者番号：60107430

研究成果の概要（和文）：エンドトキシン活性の強弱の調節機構を解明するため、その活性と受容体蛋白への結合性を比較した。ヒトおよびマウス由来 LBP に対する各種 lipid A（エンドトキシンの活性中心化合物）の結合性はどちらの LBP でも $406 > 506 > 516$ の順になった。これは、マウス細胞での活性 ($506 \geq 406 > 516$) とはほぼ平行したが、ヒト細胞での活性 ($506 \gg 516 \approx 406$) とは平行せず、エンドトキシン活性発現には LBP との結合以降の過程が重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To clarify the regulatory mechanisms of the strength of endotoxin signaling, relationship between its activity and the binding to the receptor protein was studied. The affinity of lipid A compounds (active molecule of endotoxin) to human and mouse LBP was in following order; $406 > 506 > 516$. The order was roughly paralleled with their activities in murine cells but not with those in human cells, indicating that the process following the binding to LBP plays an important role in the regulation of the strength of endotoxin signaling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：エンドトキシン、Toll 様受容体、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

細菌感染に伴って遊離するエンドトキシンは、無秩序な炎症性メディエータの産生という内分泌系のかく乱を引き起こすことによって生体の恒常性の破綻を招き、その複合反応の総和として死に至らしめると考えられており、米国内だけでもエンドトキシンに起因する死者が年間に数十万人にも

達すると推定されている医学上の大きな問題の原因物質である。エンドトキシンは化学的には lipopolysaccharide (LPS) である。しかし LPS は化合物としては単一の物質ではなく、由来する菌種によって活性本体であるリピド A 部分のグルコサミン骨格、置換脂肪酸、リン酸基置換等の構造組成が大きく異なり、さらにその修飾体としての多

糖部分の変化を含めて、実に多様な物質の総称である。概ねグラム陰性菌由来の LPS はいくつか例外を除いてこの内毒素活性を表す。しかしその活性強度は極めて多岐にわたり、大腸菌由来 LPS のように非常に強い活性を表すものから、*Rhodopseudomonas* 由来の LPS の様にほとんど活性を示さないといった活性スペクトルを示すことはよく知られている。

TLR4 発見以来の近年の膨大な研究の蓄積により、マクロファージによるエンドトキシンの認識と、それに続く細胞内シグナル伝達機構の概容は分子レベルで明らかにされつつある。すなわち、マクロファージの活性化は LPS 結合タンパク質である LBP, CD14, TLR4, MD-2 等の分子が組織的に LPS 分子を認識・結合して複合体を形成し、それらの多彩な構造体をパターン認識することによりシグナル伝達を開始されると考えられており、いずれの菌由来の LPS も基本的にこの経路により活性発現が行われるものと考えられている。

申請者はこれまでに、各種グラム陰性菌由来の LPS、及び化学合成リピド A 類縁体を用いてエンドトキシンの構造活性相関の研究を行い（棚元憲一、ファルマシア、24, 163-170, 1988）、活性の強弱を支配する構造要因を明らかにしてきた。さらに不活性型リピド A 類縁体がアンタゴニスト活性を示すことを最初に見いだす（Tanamoto et al., *Infect. Immun.* **44**, 427-433, 1984）とともに、化学処理、化学修飾により種々の不活性体の作成とそのアンタゴニスト活性の研究を行ってきた（Tanamoto, *FEBS Lett.* **351**, 325-329, 1994）。特に、化学合成リピド A 類縁体を用いた研究の中で、大腸菌型、サルモネラ型、前駆体型の 3 種の化合物を用いた詳細な構造活性相関及び、作用機作の研究を行っており、大腸菌型リピド A はヒト、マウス由来マクロファージ両方に強い活性を持ち、サルモネラリピド A は大腸菌の LPS に比べ、脂肪酸が一個多いだけの違いにも関わらず、マウスには活性を示すものの、ヒト細胞には活性を示さず（Tanamoto & Azumi, *J. Immunol.* **164**, 3149-3156, 2000）、逆にアンタゴニスト作用を示すこと、また、前駆体型は、ヒト細胞に対しては不活性であり、マウスマクロファージには強い活性を有するが、サクシニル化修飾によりマウスに対する活性も完全になくなり、強力なアンタゴニストに転ずることなどを明らかにしてきた（Tanamoto, *J. Immunol.*, **155**, 5391-5396, 1995）。このようなエンドトキシンの構造活性研究の過程で、エンドトキシン分子の極めて微細な構造変化によって活性が大きく異なってくること、さらには細胞種によっ

てその作用が逆転するというエンドトキシン分子と細胞との複雑な活性化現象を解析する中で、本研究に結びつく、エンドトキシンの化学構造の違いによる活性調節はいかにして行われるのかという問題点の着想に至った。当時は TLR 等のエンドトキシンの活性化機構に関する知見がなく、もっぱら LPS 分子の構造活性相関が中心であり、メカニズム解析は限られたものであったが、現在分子レベルでの活性化機構の大枠が明らかになってきたことで、本研究課題における解析が可能となってきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は最終的にはエンドトキシン疾患という難治疾患の治療法への発展を見据えて、エンドトキシン活性の発現に主要な役割を果たしているマクロファージに対するエンドトキシンの活性の強弱を調節している機構を解明しようとするものである。

近年の世界的な研究成果により、エンドトキシンの活性化機構に関連する種々の生体因子は明らかにされつつあるが、多様な菌由来の LPS に対する生体の多様な反応に着目した解析は行われていない。そのような独自の視点で、活性の強弱を支配している質的な要因を明らかにしようとするところが本研究の特色があり、この解析により、エンドトキシン活性発現の調節機構を明らかにすることは、単に学術的な意味にとどまらず、臨床応用への発展、敗血症に代表されるエンドトキシン疾患の対策につながるものである。

3. 研究の方法

(1) 材料

細胞としてマウスマクロファージ様細胞株 J774.1、ヒトモノサイト様細胞株 THP-1 を用いた。THP-1 細胞は PMA と vitamin D3 により分化させてから用いた。リピド A として大腸菌型 506、サルモネラ型 516 およびリピド A 前駆体 406 を用いた。His タグを付加したリコンビナント LBP は酵母の発現系を利用して、Ni-sepharose を用いて精製した。

(2) Western blott

細胞を刺激後、蛋白抽出液を作成し、SDS-PAGE により蛋白を分離し、PVDF 膜に転写後、常法に従い Western blott を行った。

(3) ELISA

各種リピド A の LBP への結合は、LBP を 96 穴プレートに固相化後、リピド A 存在下で FITC ラベルした LPS を加え、抗 FITC 抗体を用いて LPS の結合率を求めた。

(4) レポーター活性

細胞に NF- κ B 依存性のルシフェーゼレ

ポーター遺伝子を導入し、各種リポド A で刺激後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

(1) リコンビナント LBP の精製

エンドトキシンの活性本体であるリポド A がマクロファージ細胞を活性化するためには、血清中の LBP によりリポド A が血清中もしくはマクロファージ細胞表面に存在する CD14 に引き渡される必要がある。その後、リポド A は MD-2 へと受け渡され、MD-2-リポド A 複合体が TLR4 へと結合し、細胞内にシグナルが伝達される。従って、マウスおよびヒトの系で正しい活性を測定するためにはマウスまたはヒト由来の LBP、CD14、MD-2、TLR4 を用いて行う必要がある。そこで、まず、マウスおよびヒト由来のリコンビナント LBP の精製から着手した。

リコンビナント LBP はエンドトキシン混入を避けるため、酵母の発現系を利用して精製した。精製した LBP の活性を確認するため、マウスマクロファージ様細胞株 J774.1 を無血清培地を用いて異なる濃度の LBP 存在下で LPS で刺激した。LPS の活性は I κ B α の分解を Western blott により検出した。I κ B α は LBP 非存在下では LPS により分解を受けないが、ヒト (h) およびマウス (m) 由来 LBP の 2 ng/ml 程度から分解が観察された (図 1)。このことから、精製したリコンビナント LBP は活性を保持していることが明らかになった。

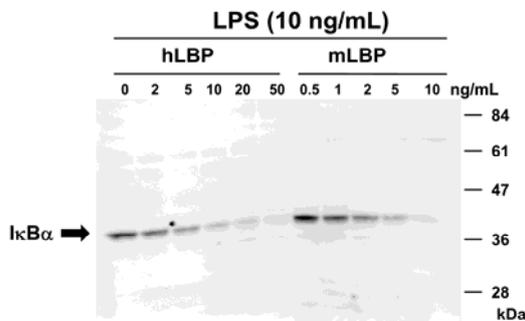


図 1 リコンビナント LBP の LPS 活性に与える効果。J774.1 細胞を無血清培地中、0-50 ng/ml の LBP 存在下で、LPS で刺激し、I κ B α 蛋白を Western blott 法により検出した。

(2) リコンビナント LBP に対する各種リポド A の結合

リポド A の活性発現のためには、まず、LBP と結合する必要があることから、LBP に対する各種リポド A の結合と活性を比較した。

hLBP および mLBP を固相化後、506、516、406 存在下で FITC-LPS の結合を ELISA の系で測定した。hLBP および mLBP どちらを

用いても、406 による阻害活性が最も強く、次いで 506、516 の順になった (図 2)。

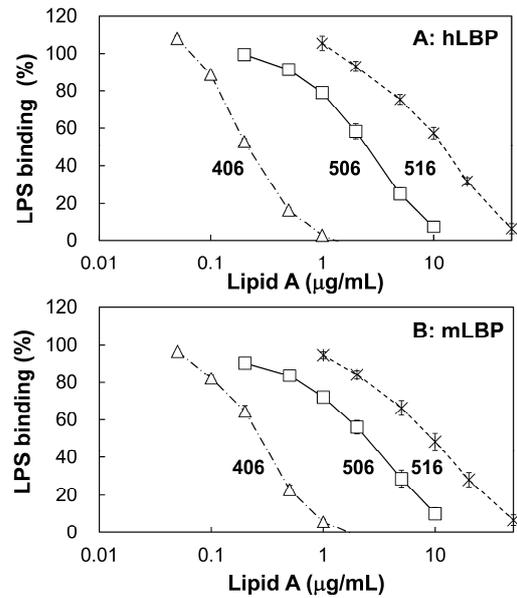


図 2 LBP に対する各種リポド A の結合。hLBP (A) または mLBP (B) を固相化後、506、516、406 存在下で FITC-LPS の結合率を測定した。

リポド A の結合と生物活性を比較するため、3 種のリポド A の NF- κ B 活性化能を検討した。ヒト細胞では 516 と 406 がほとんど活性を示さないのに対し、マウス細胞では 506 と 406 がほぼ同等の活性で、次いで 516 の順になった (図 3)。

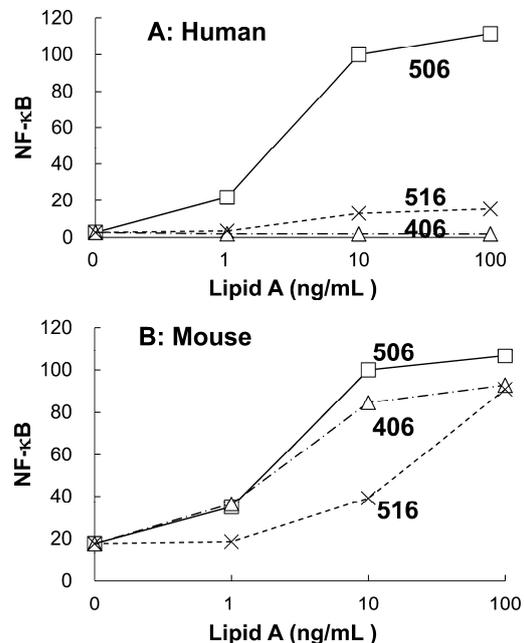


図 3 各種リポド A の生物活性。分化させた THP-1 細胞 (A) または J774.1 細胞 (B) に NF- κ B 依存性のルシフェラーゼレポーター遺伝子を導入し、506、516、406 で刺激した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

以上より、リポド A の構造の違いによる生物活性の差は LBP に対する結合性だけで

は説明できず、CD14以降のプロセスが関与することが明らかになった。

近年の世界的な研究成果により、エンドトキシンの活性化機構に関連する種々の生体因子は明らかにされつつあるが、多様な菌由来のLPSに対する生体の多様な反応に着目した解析は行われていない。そのような独自の視点で、活性の強弱を支配している質的な要因を明らかにすることは、単に学術的な意味にとどまらず、臨床応用への発展、敗血症に代表されるエンドトキシン疾患の対策につながるものである。

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20件)

- ① Muroi M., Tanamoto K.: IRAK-1-mediated negative regulation of Toll-like receptor signaling through proteasome-dependent downregulation of TRAF6. *Biochim. Biophys. Acta*, 査読有、**1823**, 255-263 (2012)
- ② Nakamura K, Ohtsuki T, Mori, Hoshino H, Hoque A, Oue A, Kano F, Sakagami H, Tanamoto K., Ushijima H, Kawasaki N, Akiyama H, Ogawa H. Novel anti-HIV-1 activity produced by conjugating unsulfated dextran with polyL-lysine. *Antiviral Res.* 査読有、**94**, 89-97 (2012)
- ③ Akiyama T, Yamazaki T, Tanamoto K. Analysis of thickening polysaccharides by the improved diethylthioacetal derivatization method. *J. Food. Hyg. Soc. Japan.* 査読有、**52**, 40-6 (2011)
- ④ Muroi M., Shima K., Nakagawa Y., and Tanamoto K.: Application of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for discrimination of *Escherichia* strains possessing highly conserved ribosomal RNA gene sequences. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有、**34**, 430-432 (2011)
- ⑤ Ohnishi T., Muroi M., Tanamoto K.: Inhibitory effects of soluble MD-2 and soluble CD14 on bacterial growth. *Microbiol. Immunol.*, 査読有、**54**, 74-80 (2010)
- ⑥ Sugiyama K., Muroi M., Tanamoto K., Nishijima M., Sugita-Konishi Y.: Deoxynivalenol and nivalenol inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by mouse macrophage cells. *Toxicol Lett.*, 査読有、**192**, 150-4 (2010)
- ⑦ Yoshida, T., Yoshioka, Y., Fujimura, M., Kayamuro, H., Yamashita, K., Higashisaka, K., Nakanishi, R., Morishita, Y., Nabeshi, H., Yamashita, T., Muroi, M., Tanamoto, K., Nagano, K., Abe, Y., Kamada, H., Kawai, Y., Mayumi, T., Itoh, N., Yoshikawa, T., Tsunoda, S., Tsutsumi, Y.: Urban aerosols induce pro-inflammatory cytokine production in macrophages and cause airway inflammation in vivo. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有、**33**, 780-783 (2010)
- ⑧ 秋山卓美、佐々木亮、山崎壯、棚元憲一、山形一雄、河村葉子 SDS-PAGEによる既存添加物酵素のたんぱく質分離パターン 日本食品化学学会誌、査読有、**17**, 88-95 (2010)
- ⑨ Akiyama T, Hayashi A, Yamazaki T, Tada A, Sugimoto N, Yun YS, Kunugi A, Tanamoto K., Kawamura Y. Identification methods of terpenoid gum bases using TLC and GC/MS, *食品衛生学雑誌*、査読有、**51**, 264-72 (2010)
- ⑩ Tanamoto K., Muroi M., Igarashi M., Shima K., Nakagawa Y., Fujiwake H.: 日本薬局方指定菌株の特性と保存管理法に関する研究 III、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、査読無、**41**, 890-894 (2010)
- ⑪ Shioiri T., Muroi M., Hatao F., Nishida M., Ogawa T., Mimura Y., Seto Y., Kaminishi M., Tanamoto K.: Caspase-3 is activated and rapidly released from human umbilical vein endothelial cells in response to lipopolysaccharide. *Biochim. Biophys. Acta*, 査読有、**1792**, 1011-1018 (2009)
- ⑫ Tanamoto K., Muroi M., Nakagawa Y., Shima K., Ichimura K.: 日本薬局方指定菌株の特性と保存管理法に関する研究、*Pharm. Regul. Sci.*, 査読無、**40**, 520-524 (2009)
- ⑬ Kawasaki H, Furusho N, Tatebe C, Kubota H, Yanagi T, Yasukouchi Y, Mori Y, Yamashita Y, Iizuka T, Takahata K, Takahashi J, Sato K, Tanamoto K. Analysis of hexachlorobenzene in Food Red Nos. 104 (phloxine) and 105 (rose Bengal) by GC-ECD. *J. Food. Hyg. Soc. Japan*, 査読有、**50**, 6-9 (2009)
- ⑭ Tada A, Sugimoto N, Sato K, Akiyama T, Asanoma M, Yun YS, Yamazaki T, Tanamoto K. Examination of original plant of Jamaica quassia extract, a natural bittering agent, based on composition of the constituents. *J. Food. Hyg. Soc. Japan*, 査読有、**50**, 16-21 (2009)
- ⑮ Kawamura Y, Mutsuga M, Yamauchi T, Ueda S, Tanamoto K. Migration tests of cadmium and lead from paint film of baby toys. *J. Food. Hyg. Soc. Japan*, 査読有、**50**, 93-96 (2009)

- ①⑥ Ito Y., Sugimoto N., Akiyama T., Yamazaki T. & Tanamoto K. Cepaic acid, a novel xanthylum pigment from the dried outer scales of the yellow onion *Allium cepa*. *Tetrahedron Lett.*, 査読有、**50**, 4084-4086 (2009)
- ①⑦ 田原麻衣子、杉本直樹、末松孝子、有福和紀、斎藤剛、井原俊英、吉田雄一、多田敦子、久保田領志、清水久美子、山崎壯、棚元憲一、中澤裕之、西村哲治 qNMR に基づく有機リン系農薬イソキサチオンオキシソンの品質管理 *日本食品化学学会誌* 査読有、**16**, 28-33 (2009)
- ①⑧ 多田敦子、杉本直樹、古庄紀子、石附京子、佐藤恭子、山崎壯、棚元憲一 既存添加物オゾケライトの成分調査 *日本食品化学学会誌* 査読有、**16**, 92-96 (2009)
- ①⑨ Tatebe C., Kawasaki H., Kubota H., Sato K., Tanamoto K. & Kawamura Y. Analysis of residual solvent in thickeners by headspace gas chromatography using a standard addition method. *Japn.J.Food Chem.Safety (JJFCS)* 査読有、**16**, 78-83 (2009)
- ②⑩ Mutsuga M., Lee YK, Kawamura Y, Tanamoto K. Analysis of primary aromatic amines in paper products *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* 査読有、**50**, 160-166 (2009)
- [学会発表] (計15件)
- ① 林原 紀明、田村 直樹、渡辺 恵、室井 正志、畑尾史彦 瀬戸泰之 棚元 憲一 : ミクログリア細胞における Toll-like receptor の発現及び炎症性応答、第 85 回日本細菌学会総会 (2012, 3 月 29 日、長崎、長崎ブリックホール)
- ② 北島孝明、室井正志、山下直美、棚元 憲一 : ダニアルレルゲンの自然免疫応答に及ぼす影響、第 85 回日本細菌学会総会 (2012, 3 月 27 日、長崎、長崎ブリックホール)
- ③ Sugiyama, K., Kinoshita, M., Minai, Y., Muroi, M., Tanamoto, K. and Sugita-Konishi, Y: Trichothecene mycotoxins inhibit MyD88-independent pathways of Toll-like receptors, 9th Joint Meeting of ICS-ISICR (2011, 10 月 10 日、イタリア、Monash University Prato Centre)
- ④ Masashi Muroi and Ken-ichi Tanamoto: IRAK-1-mediated negative regulation of Toll-like receptor signaling. *International Union of Microbiological Societies 2011 Congress* (2011, 9 月 8 日、札幌、札幌コンベンションセンター)
- ⑤ 杉浦 友香、廣野 泰亮、室井 正志、棚元 憲一 : 光散乱エンドトキシン測定法分析法バリデーション、日本防菌防黴学会第 38 回年次大会 (2011, 8 月 31 日、大阪、千里ライフサイエンスセンター)
- ⑥ 室井 正志、島 圭介、中川 恭好、棚元 憲一 : マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法による遺伝的近縁菌株の識別解析、日本防菌防黴学会第 38 回年次大会 (2011, 8 月 31 日、大阪、千里ライフサイエンスセンター)
- ⑦ 室井 正志、島 圭介、中川 恭好、棚元 憲一 : マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法による遺伝的近縁菌株の識別解析、日本薬学会第 131 年会 (2011, 3 月 30 日、静岡、ツインメッセ静岡)
- ⑧ 杉浦 友香、廣野 泰亮、室井 正志、棚元 憲一 : 光散乱エンドトキシン測定法における攪拌回転速度の検討、日本薬学会第 131 年会 (2011, 3 月 30 日、静岡、グランシップ)
- ⑨ 室井 正志、棚元 憲一 : IRAK-1 による TRAF6 の分解を介した TLR シグナリングの抑制的調節、第 16 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会 (2010, 11 月 13 日、奈良、かしはら万葉ホール)
- ⑩ Masashi Muroi and Ken-ichi Tanamoto: Stimulation of Toll-like receptors leads to proteasome-dependent downregulation of TRAF6 through interaction with IRAK-1. *Annual Meeting of The Society for Leukocyte Biology & The International Endotoxin and Innate Immunity Society* (2010, 10 月 9 日、バンクーバー、Fairmont Hotel)
- ⑪ 室井正志、棚元憲一 : IRAK-1 により誘導される TRAF6 の proteasome 依存性の分解、日本薬学会第 130 年会 (2010, 3 月 30 日、岡山、桃太郎アリーナ)
- ⑫ 室井正志、棚元憲一 : TRAF6 は IRAK-1 と相互作用することにより proteasome 依存性に分解される、第 83 回日本細菌学会総会 (2010, 3 月 29 日、横浜、パシフィコ横浜)
- ⑬ 杉山圭一、室井正志、棚元憲一、小西良子: TLR シグナルに対する deoxynivalenol の抑制機構、第 82 回日本生化学会大会 (2009, 10 月 24 日、神戸、神戸国際展示場)
- ⑭ 森重智弘、吉岡靖雄、田辺綾、堤康央、室井正志、棚元憲一、河合裕一、眞弓忠範、向洋平、岡田直貴、中川晋作: 非結晶性ナノシリカの自然免疫抑制作用に関する検討、第 36 回日本トキシコロジー学会 (2009, 7 月 17 日、盛岡、アイーナ)
- ⑮ 水谷紀子、室井正志、五十嵐ありさ、菅野慎二、鎌田洋一、小西良子、棚元憲一 :

非病原性細菌による感染症に対する内
分泌かく乱候補物質の影響評価、第 16
回日本免疫毒性学会学術大会（2009, 8
月 7 日、旭川、市民文化会館）

〔図書〕（計 1 件）

- ① 室井正志、棚元憲一、医学図書出版：
IRAK-1 による TRAF6 の分解を介した
TLR シグナリングの抑制的調節、エンド
トキシン・自然免疫研究 **14**、pp7-10
(2011)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

棚元 憲一 (TANAMOTO KENICHI)
武蔵野大学・薬学研究所・教授
研究者番号：6 0 1 0 7 4 3 0

(2) 研究分担者

室井 正志 (MUROI MASASHI)
武蔵野大学・薬学研究所・准教授
研究者番号：7 0 3 1 1 3 8 9

(3) 連携研究者

なし