

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791780

研究課題名 (和文) 微生物による宿主細胞への侵入と細胞内輸送の制御における
リポタンパク質の役割研究課題名 (英文) The roles of bacterial lipoproteins on bacterial invasion and
on intracellular trafficking in host cells

研究代表者

長谷部 晃 (HASEBE AKIRA)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：90281815

研究成果の概要 (和文)：マイコプラズマは細胞壁を欠き、細胞膜リポタンパク質が宿主細胞の Toll 様受容体 (TLR) 2 で認識される。また、一部のマイコプラズマは宿主細胞への侵入性を有することから、*Mycoplasma hominis* のリポタンパク質を精製しその性状を調べた。その結果、これまで報告のあった 50kDa のアドヘジンと N 末端アミノ酸配列が相同で、分子量が 10kDa 小さいリポタンパク質の欠損変異体を同定した。このリポタンパク質はマクロファージを活性化するだけでなく TLR2 非依存的に宿主細胞への付着に関与するという事などを明らかにした。さらにマイコプラズマがリポタンパク質を介して宿主細胞に影響を与えることから、マイコプラズマが培養細胞に混入した場合の除去方法についても検討した。以上のことは国際的な学術雑誌に投稿準備中である。

研究成果の概要 (英文)：To study the roles of bacterial lipoproteins on bacterial invasion to host cells and on the effects on intracellular trafficking in host cells, attempts were made to purify a mycoplasmal lipoprotein, since some mycoplasmas are known to be able to invade into host cells. In this study, a lipoprotein was purified from *M. hominis*. The 40 kDa-lipoprotein was purified, and its N-terminal amino acid sequence was identical to that of P50 lipoprotein, which had already been reported as an adhesin of *M. hominis*. Interestingly, this lipoprotein could adhere to THP-1 cells but anti TLR2 antibody failed to inhibit adherence of this lipoprotein to THP-1 cells. We are now under preparation for submitting these results to an international journal on immunology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔細菌学

1. 研究開始当初の背景

我々は、マクロファージによるリポペプチド FSL-1 の取り込みがクラスリン依存的で

あるが、リポペプチドの受容体である TLR2 は取り込みに無関係であり、さらに、取り込みには CD14 ならびに CD36 が重要であるこ

とを明らかにした。また、FSL-1 による刺激が細胞内トラフィックで重要な役割を果たす Rab protein ファミリーのひとつ Rab5 の発現に影響を及ぼすことがわかった (未発表データ)。そこで、本研究では、マクロファージによるリポペプチドの取り込みについての研究で得られた成果をもとに、代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis*、ならびにマイコプラズマの宿主細胞への侵入メカニズムに関わるリポタンパク質 (LP) を精製しその役割を明らかにし、さらに、細菌ならびに LP による宿主細胞内小胞の成熟の制御を中心とした細胞内トラフィックの制御について調べようと考えた。本研究により、病原細菌の宿主細胞内侵入による感染の慢性化メカニズム解明の一助としたい。

2. 研究の目的

非淋菌性尿道炎や早産などと関係があると報告されているマイコプラズマである *M. hominis* からリポタンパク質を精製し、宿主細胞への侵入に関わる役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

M. hominis ATCC33129 を馬血清 (15%)、イースト抽出液 (1.5%) L-アルギニン (0.25%) ならびにペニシリン (500 U/ml) を含む PPLO 培地で培養した。

培養された *M. hominis* から LP 画分を n-オクチル-β-D-グルコピラノシドで抽出し、その画分から SDS-PAGE で TNF-α 産生誘導活性の強いリポタンパク質を精製した。なお、TNF-α 産生誘導活性は精製した LP でヒトの単球/マクロファージ系細胞 THP-1 を刺激し、産生された TNF-α を ELISA で測定することにより調べた。

また、精製された LP による mitogen-activated protein kinase

(MAPK) の活性化はウェスタンブロッティング法で調べ、さらにこの LP の THP-1 細胞への付着能については、この LP をビオチン化し、アビジン-HRP を使って検出することで調べた。

4. 研究成果

M. hominis 由来の、THP-1 に TNF-α 産生を誘導する LP を精製するため、*M. hominis* のリポタンパク質画分の電気泳動を行い、ニトロセルソース膜に転写しそれらの活性を調べたところ、その活性が最も高いのは、分子量 40 kDa の領域に存在していることがわかった (図 1)。

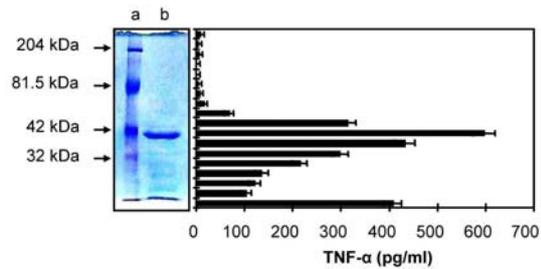


図 1. *M. hominis* 由来 LP 画分の分子量別 TNF-α 産生誘導活性 (a: 分子量マーカー、b: *M. hominis* 由来 LP 画分)

この 40 kDa の LP を精製しその N 末端アミノ酸配列を調べたところ、*M. hominis* においてすでにアドヘジンとして報告されている LP のひとつである P50 と一致した。P50 は *M. hominis* の宿主細胞への付着に関与する LP のひとつであるが、その性質としてこれまでマクロファージの活性化については報告されていない。そこで、本 LP を欠損型 (truncated) P50、P50t としてその性質を調べた。

P50t はアルカリ加水分解の時間依存的にマクロファージに対する TNF-α 産生誘導活性を減少させ (図 2A)、さらに proteinase K で処理しても活性を失わなかったことから、P50t の活性が LP によるものであることがわかった (図 2B, C)。

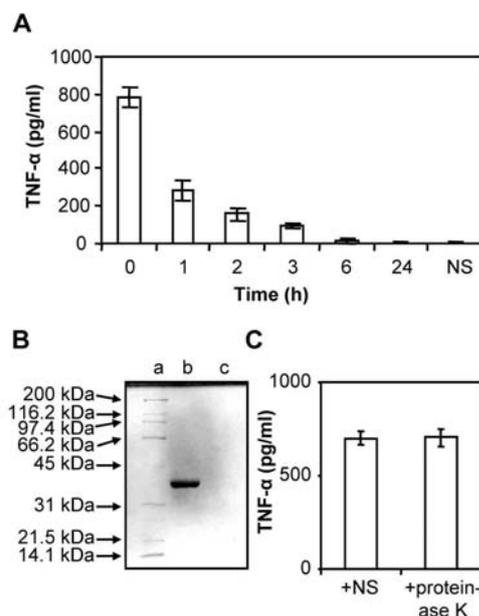


図 2. A, P50t の TNF-α 産生誘導活性に及ぼすアルカリ加水分解の影響 (NS は生理食塩水のみ). B, P50t の proteinase K 処理 (a: 分子量マーカー、b: P50t、c: proteinase K 処理された P50t). C, NS あるいは proteinase K 処理された P50t の TNF-α 産生誘導活性。

さらに、微生物由来 LP の認識に重要な役

割を果たしていることが知られている TLR2 が P50t の認識に関わっているかを調べた。TLR2 を発現している C57BL/6 マウス由来腹腔マクロファージと TLR2 を欠いている TLR2(-/-)マウス由来腹腔マクロファージを P50t で刺激したところ、C57BL/6 マウス由来マクロファージは P50t 刺激で活性化したのに対し、TLR2(-/-)マウス由来マクロファージは活性化しなかった(図 3A)。したがって、P50t の認識には TLR2 が重要であることがわかった。

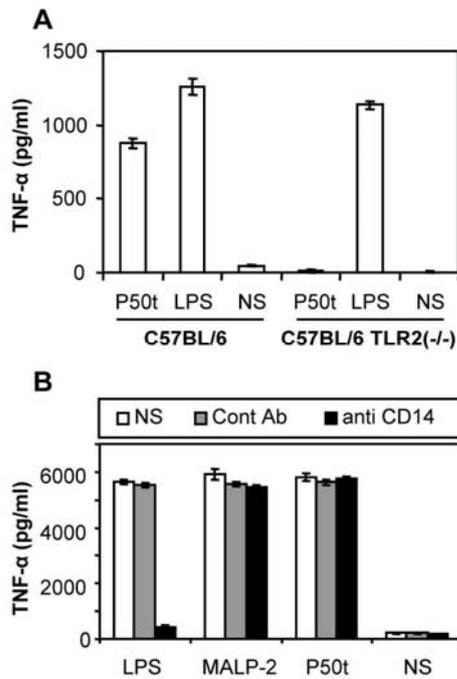


図 3. A, C57BL/6 マウスならびに C57BL/6 TLR2(-/-)マウス由来腹腔マクロファージの P50t による活性化. B, THP-1 細胞の活性化に及ぼす anti CD14 抗体の影響。

次にトリアシルリポペプチドの認識において重要な役割を果たすことが知られている CD14 の P50t の認識における役割を調べるために、anti CD14 抗体が P50t によるヒト単球・マクロファージ系細胞である THP-1 の活性化に及ぼす影響を調べた。その結果、P50t による THP-1 の活性化に CD14 は無関係であることがわかり、P50t の活性はジアシルリポペプチド MALP-2 と同様であることがわかった。これらのことと、N 末端アミノ酸配列が容易に解明されたことなどから P50t の活性はジアシルリポペプチドによることが示された (図 3B)。

TLR2 を介した微生物由来 LP 刺激におけるシグナル伝達経路において、p38、Erk1/2 ならびに SAPK/JNK など、種々の MAPK がリン酸化されることが知られている。そこで、これらの MAPK のリン酸化をそれぞれの特異抗体を用いてウェスタンブロッティング

法で調べた (図 4A)。その結果、P50t のシグナル伝達経路において、p38、Erk1/2 ならびに SAPK/JNK が重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、これらの MAPK の阻害剤が TLR2 による THP-1 の活性化に及ぼす影響を調べたところ、それぞれの阻害剤の濃度依存的に TNF-α の産生量が低下したことから、これらの MAPK が P50t のシグナル伝達に重要な役割を果たしていることがわかった。

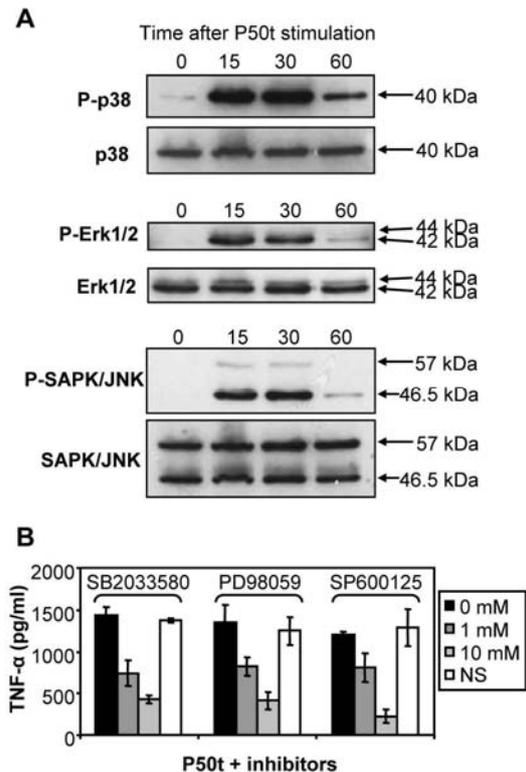


図 4. A, THP-1 細胞の P50t 刺激後 15 分、30 分ならびに 60 分における種々の MAPK とそのリン酸化. B, MAPK 阻害 (p38-SB2033580, Erk1/2-PD98059, SAPK/JNK- SP600125) が P50t の活性に及ぼす影響。

次に、P50 は *M. hominis* の付着因子 (アドヘジン) として作用していることが知られているので、欠損変異体である P50t が付着に関与しているか調べた。ビオチン化した P50t (B-P50t) と THP-1 を 4°C で 3 時間インキュベートし、THP-1 をよく洗った。THP-1 のライセートを SDS-PAGE で泳動したものをニトロセルロース膜に転写してアビジン-HRP で B-P50t を検出したところ、B-P50t の濃度依存的に THP-1 に付着していることがわかった (図 5A)。さらに P50t をあらかじめ 4°C で THP-1 とインキュベートすると B-P50t の付着を競合的に阻害したが (図 5B)、TLR2 に対する抗体を用いても B-P50t の付着を阻害しなかった (図 5C)、

P50t の THP-1 への付着には TLR2 ではない他の因子が関与していることが示唆された。

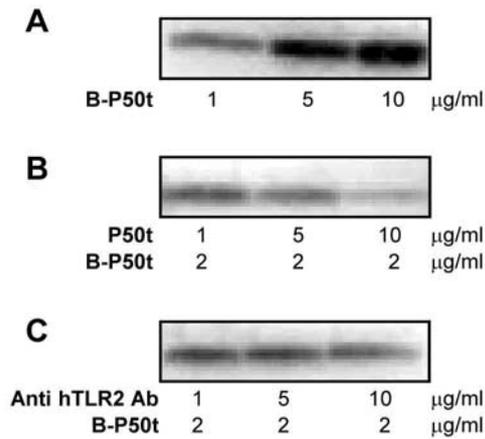


図 5. A, B-P50t による THP-1 への付着. B, P50t による B-P50t の THP-1 への付着の競合的阻害. C, anti TLR2 抗体による B-P50t の THP-1 への付着の競合的阻害.

以上のことから、*M. hominis* のアドヘジンである P50 の欠損変異体はジアシルリポタンパク質であり、これまで報告されているジアシルリポタンパク質と同様に TLR2 依存的にマクロファージを活性化した。さらにそのシグナル伝達経路は MAPK を介しており、部分的に欠損があるにも関わらずマクロファージへの付着能を失わなかった。また、この付着能には TLR2 は無関係であることがわかった。この研究成果は国際的な学術雑誌への投稿準備中である。

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)

Haque M. Shamsul, Akira Hasebe, Mitsuhiro Iyori, Makoto Ohtani, Kazuto Kiura, Diya Zhang, Yasunori Totsuka, Ken-ichiro Shibata. The Toll-like receptor 2 (TLR2) ligand FSL-1 is internalized via the clathrin-dependent endocytic pathway triggered by CD14 and CD36 but not by TLR2. Immunology. 査読有, 130, 2010, p. 262-272.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷部 晃 (HASEBE AKIRA)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：90281815

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし