

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 1 月 25 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790951

研究課題名(和文) 内分泌・代謝疾患モデルにおけるインフラマソーム作用機序の解明

研究課題名(英文) The study of inflammasome activation system in endocrine and metabolic disorder models.

研究代表者

川島 晃 (Kawashima, Akira)

自治医科大学・医学部・ポストドクター

研究者番号：60624913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：炎症機構の一つインフラマソームの活性化機構を明らかにする為に、タンパク複合体インフラマソームを構成する分子群をTOF-MSを用いて網羅的な解析を行なった。候補分子の一つであるE3ユビキチンリガーゼは、インフラマソーム構成分子のひとつと特異的に結合し、ユビキチン化を誘導し、分解を促進することを明らかにした。また、この分子は、インフラマソーム構成分子の分解を介して、インフラマソームの活性化に抑制的に働くことを明らかにした。以上の結果よりユビキチン化を介したインフラマソーム構成分子の分解調節機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to identify the inflammasome activation system. Firstly we performed comprehensive analysis of inflammasome components by TOF-MS. In result we found that certain type of E3 ubiquitin ligase binds one of the inflammasome components and ubiquitination. And this molecule inhibits inflammasome activation through degradation of inflammasome components. These results reveal the pathway that regulates the inflammasome through the ubiquitination and degradation.

研究分野：免疫学

キーワード：分解 ユビキチン インフラマソーム

1. 研究開始当初の背景

糖尿病やメタボリック症候群などの内分泌代謝疾患における炎症の重要性が示されている。これらの疾患で炎症は、病原体の関与が無いことから無菌性炎症と呼ばれており、その惹起経路として「インフラマソーム」と呼ばれる炎症活性化経路が注目されてきた。無菌性炎症に關与する NLRP3 インフラマソームは、Nod 様受容体である NLRP3、アダプター分子である ASC、インターロイキン-1 を切断するカスパーゼ-1 から構成されるタンパク複合体である。炎症活性化刺激によってこのタンパク複合体が形成されると炎症性サイトカインである IL-1 が活性化され、炎症を惹起する。

NLRP3 インフラマソームの活性化刺激として、生体に由来する内在性因子である ATP、尿酸結晶、コレステロール結晶、活性酸素などが挙げられる。これらの因子によるインフラマソーム活性化が、痛風や動脈硬化などの疾患の発症と進展に關与していることが明らかになってきた。

これらの疾患に対し、インフラマソームを標的とした薬剤の開発は、痛風治療薬コルヒチンや IL-1 に対する阻害薬アナキナラ等がある。コルヒチンは副作用が強いことや、IL-1 阻害薬は生物学的製剤で非常に高価であることから、適用は限定されている。多様なインフラマソーム関連疾患に適用できる特異性の高い効果的な治療法は現在でも強く待たれている。

インフラマソームを標的とした薬剤開発のために NLRP3 インフラマソームの活性化機構に關しての研究が行われているが、未解明な点が多く存在している。結晶や ATP、活性酸素などの複数の活性化因子がに共通する NLRP3 インフラマソームの活性化経路は不明なままであった。また、インフラマソームに対する抑制機構に關しても、オートファジーによる分解などの関与が想定されていたが、詳細な機構は不明なままであった。

2. 研究の目的

申請者は、インフラマソームの構成分子の解析をすることによって、活性化に対する調節機構の解明を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1)インフラマソーム構成分子の同定

ヒト単球由来の細胞株 THP-1 からインフラマソームの単離を行なった。具体的には、インフラマソーム構成分子の一つである ASC と蛍光タンパク GFP を融合させたタンパクをレンチウイルスによる遺伝子組換えによって細胞株に強制発現させた。その細胞にインフラマソーム活性化刺激を入れると、インフラマソームのタンパク複合体が蛍光によって認識することが出来るようになった。(図 1 A)

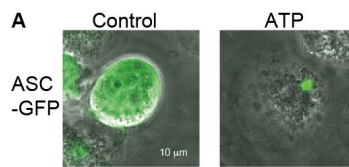


図 1 A: ASC-GFP 融合タンパクを強制発現させた THP-1。ATP 刺激 5mM 30 min 後に撮影。

蛍光タンパクで標識したインフラマソームタンパク複合体を超速心機によるシヨ糖濃度勾配遠心法によりインフラマソームタンパクを精製し(図 1 B,C)、質量分析機を用いて構成タンパクの解析を行なった。

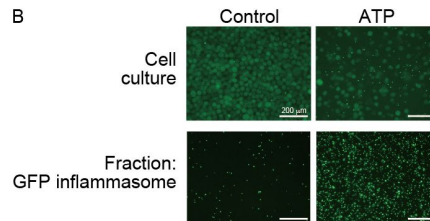


図 1 B: シヨ糖濃度勾配法により GFP インフラマソームを精製した。

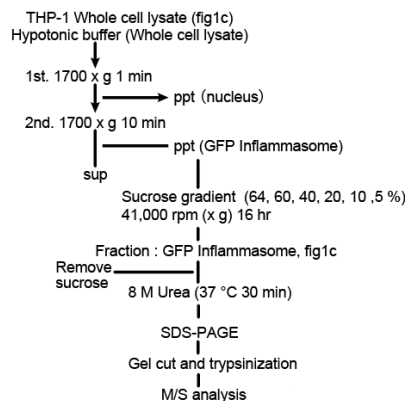


図 1 C: 質量分析 (M/S analysis) の為のスクロース濃度勾配遠心法を用いた GFP-インフラマソーム精製法

質量分析機の解析によりインフラマソーム中に新規分子を同定した。未発表データの為、それを分子 X とする。

(2)新規のインフラマソーム結合分子候補群の結合に關する解析

(1)の実験で得られたインフラマソームの中の新規分子と既知のインフラマソーム構成分子が結合するかを、ヒト腎臓由来の HEK293T に対して強制発現系と免疫沈降法を用い、既知のインフラマソーム構成分子に結合するか確かめた。その結果、分子 X は既知のインフラマソーム構成分子の中で NLRP3 に特異的に結合することを明らかにした(図 2)

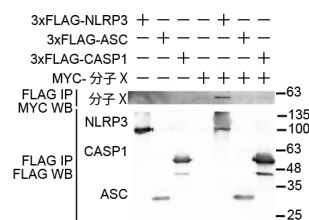


図 2: 分子 X は NLRP3 に特異的に結合する。293T 細胞にインフラマソームの構成分子に 3XFLAG Tag を繋げ強制発現を行なった。MYC tag を分子 X に付けたものを共発現させて、Anti FLAG 抗体で免疫沈降を行なった。

(3) E3 ユビキチンリガーゼ分子 X によるユビキチン誘導能の解析

分子 X は、タンパクの持つドメイン構造より E3 ユビキチンリガーゼの一つであることがわかった。E3 ユビキチンリガーゼは、タンパクのユビキチン修飾に関与する。そこで、HEK293T 細胞に、His タグを付けたユビキチンと分子 X、既知のインフラマソーム構成分子をそれぞれ共発現させることによって、分子 X による NLRP3 のユビキチン化を評価した。分子 X は、インフラマソーム構成分子の中で NLRP3 特異的にユビキチン化を誘導することを明らかにした (図 3)。

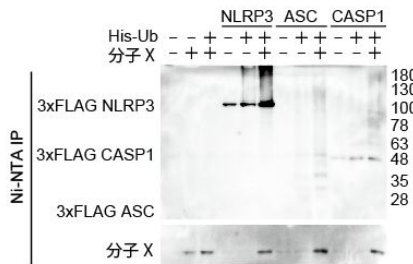


図 3: 分子 X は NLRP3 を特異的にユビキチン化する。NLRP3 と分子 X とヒスチジンタグを付けたユビキチンを共発現させた。ニッケルアガロースによってユビキチン化タンパクを精製した。

(4) 分子 X によるインフラマソームに対する機能解析

NLRP3 に結合し、ユビキチン化を誘導する新規結合分子 X がインフラマソーム活性化に関与するか明らかにすることを目的として実験を行なった。ヒト単球由来の THP-1 細胞に対し、分子 X をレンチウイルスを使った強制発現株と CRISPR/CAS9 システムによる構成分子欠損株を作成し、インフラマソームの活性化に関して検討を行った。

4. 研究成果

申請者は、インフラマソームの構成分子の質量分析機を用いた網羅的な解析によって、未知の結合分子を同定した。未発表データの為、それを分子 X とする。分子 X は、質量分析を行った由来の細胞である THP-1 細胞 (図 4) mice 由来の腹腔マクロファージ (図 5、6) においても ATP や Nigericin の刺激に応じて活性化するインフラマソーム中に共局在していた。

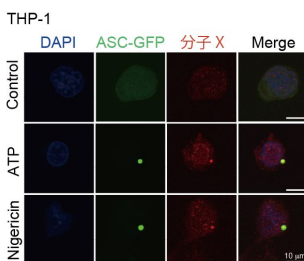


図 4: THP-1 細胞の GFP ASC と分子 X はインフラマソーム刺激によって共局在する (蛍光免疫染色)

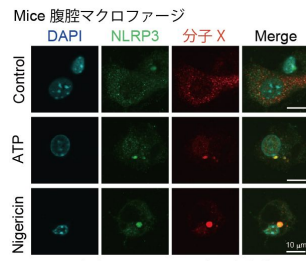


図 5: mice 腹腔マクロファージの内在性の ASC と分子 X はインフラマソーム刺激によって共局在する (蛍光免疫染色)

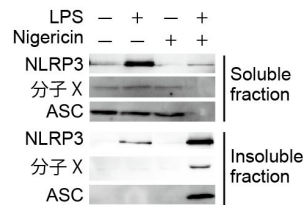


図 6: mice 腹腔マクロファージにインフラマソーム刺激である Nigericin 刺激を行うとインフラマソーム中 (不溶分画) に NLRP3 と共に分子 X も移行する

候補分子のうちの一つ分子 X は、E3 ユビキチンリガーゼであり、インフラマソーム構成分子の一つ NOD 様受容体 NLRP3 に特異的に結合し (図 2)、ユビキチン化を行なうこと (図 3) を明らかにした。

次に分子 X の結合する NLRP3 の機能として炎症機構インフラマソームの活性化がある。そこで、分子 X のインフラマソーム活性化に対する働きを調べる為に、ヒト血球細胞株 THP-1 に CRISPR/CAS9 システムによって分子 X 欠損株を作成した (図 7)。

その欠損株では、NLRP3 のタンパク量に変化はなかった。一方で分子 X の欠損によって、NLRP3 のユビキチン化は減少した (図 8)。またユビキチン修飾には、ユビキチン分子の結合の仕方によって 8 種類のポリユビキチン鎖が、知られている。その中で、分解や構造変化に関与する代表的なポリユビキチン鎖である K48, K63 に関して解析すると、分子 X の欠損株では、K48, K63 のポリユビキチン鎖が減少していた (図 9)。

次に、分子 X の欠損株では、インフラマソーム活性化刺激を行なうと、結果として分泌される培養液中の IL-1β が増加した (図 10)。さらに、インフラマソームの活性化の結果起こる ASC の凝集体の形成が分子 X の欠損株では増強することを明らかにした (図 11)。

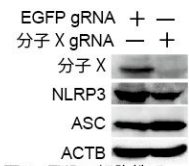


図 7: THP-1 細胞株で分子 X の欠損株を作成した

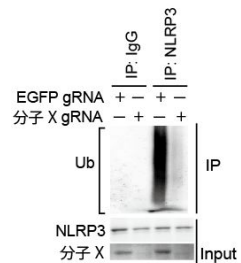


図 8: 分子 X は NLRP3 のユビキチン化に関与する

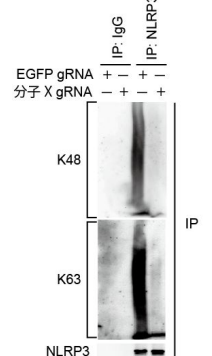


図 9: 分子 X 欠損株では NLRP3 の K48, K63 のユビキチン化が減少する

以上の結果よりインフラマソーム構成分子の網羅的解析によって得られた新規の結合分子 E3 ユビキチンリガーゼ分子 X は、NLRP3 をユビキチン化し、インフラマソームの活性化に抑制的に働くことを

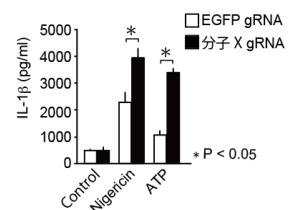


図 10: 分子 X の欠損株ではインフラマソームの活性化が增強される。THP-1 細胞にそれぞれ NLRP3 インフラマソーム刺激を行い、上清中の IL-1β を測定した。

示した。ユビキチン化によるインフラマソームに対する働きは、分解に関しては分子X欠損細胞との間に差は見られなかった。一方で、NLRP3の主な機能であるインフラマソームの活性化に対して、欠損細胞ではより強く活性化する結果を得られた。つまり、分子XによるNLRP3のユビキチン化はインフラマソーム活性化に抑制的に働いていることが想定される。

現在、上記のデータをまとめて論文に投稿準備中である。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川島 晃 (KAWASHIMA AKIRA)

自治医科大学・医学部・ポストドクター

研究者番号：60624913

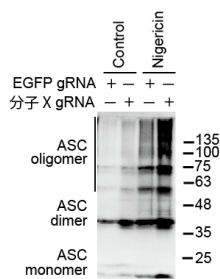


図1 1: 分子Xの欠損株ではインフラマソームの活性化が増強する。インフラマソームを構成するASC分子の重合化を評価することによってインフラマソーム活性化を比較した。