

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590450  
 研究課題名（和文）白血球細胞骨格系のダイナミクスに基づく感染防御機構の解明  
 研究課題名（英文）Analysis of the leukocyte cytoskeletal dynamics that are essential for the host defense mechanisms against infections.

研究代表者  
 四宮 博人 (SHINOMIYA HIROTO)  
 愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授  
 研究者番号：80162618

研究成果の概要：申請者が同定した p65/L-plastin は、白血球に特異的に発現され、アクチン細胞骨格の再構築 (p65-actin-scaffold) に関与している。p65-actin-scaffold は菌体刺激によって随時形成され、これを中心に形成される高次タンパク質集合体が、感染防御的細胞応答の基盤として機能すると想定している。p65/L-plastin とともに細胞骨格のダイナミクスに関するタンパク質、および p65-actin-scaffold と高次タンパク質集合するタンパク質として NADPH オキシダーゼ p47<sup>phox</sup> などについて、特異抗体を用いて p65-actin-scaffold との共存関係を調べた。また、マクロファージ内でのそれらの局在変化と貪食・細胞接着や殺菌活性の増強との関連を評価した。ルミノール結合ビーズを用いて、貪食依存性の活性酸素酸性定量法を確立し、細胞骨格の再構成が活性酸素産生において重要であることを明らかにした。p65/L-plastin, WASP, VAV に関して、それぞれの欠損は貪食・細胞接着依存性の活性酸素産生の障害をきたすことを考え合わせ、p65-actin-scaffold を中心とする細胞骨格系のダイナミクスが、白血球の感染防御活性の発現において重要な役割を担うと考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：感染防御，マクロファージ，細胞接着，アクチン細胞骨格，p65/L-plastin, WASP, VAV, NADPH オキシダーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 細菌リポ多糖 (LPS) 刺激や貪食反応によって、マクロファージ中でリン酸化されるタンパク質として、申請者が同定した

p65/L-plastin は、calcium(Ca), calmodulin,  $\beta$ -actin 結合部位を有する多機能タンパク質で、白血球に特異的に発現され、リン酸化と細胞内 Ca によって、アクチン細胞骨格の再

構築 (p65-actin-scaffold) に関与している。最近, p65/L-plastin の遺伝子欠損マウスでは, 細胞接着依存的な活性酸素の産生がおこらず, 細菌に対し易感染性であることが明らかにされ, 本タンパクの感染防御における重要性を示している。

(2) 防御系細胞である白血球の特徴は, フリーセルとして移動し要時活性化される点である。この重要性は, LAD (leukocyte adhesion deficiency; 白血球接着異常症) という病気の存在からも明らかで, その白血球の細胞接着・活性は障害され, 反復感染し致死的である。白血球の移動・細胞接着・食食等には, アクチン細胞骨格のダイナミックな再構築が必須であり, 固形組織の細胞種とは異なる制御系が想定される。

(3) これらのことから, p65-actin-scaffold は菌体刺激によって随時形成され, これを中心に形成される高次タンパク質集合体が, 細胞接着・活性化や殺菌活性の増強などの感染防御的細胞応答の基盤として機能するのではないかと考えるに至った。

## 2. 研究の目的

(1) 本申請では, これまでの成果を基礎とし, 研究を進展させる。p65-actin-scaffold のダイナミクスに関与する候補タンパク質として, 既に保有しているものに加えて, アクチン骨格の再構築に関与すると考えられる WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) や VAV などのタンパク質を作製する。愛媛大学に独自の無細胞タンパク質合成システムを用いる。WASP は, 易感染性を示す免疫不全症候群 (WAS) の原因タンパク質であり, 白血球特異的に発現される。WAS 由来のマクロファージは運動性・食食能に障害がある。我々は, 最近, WASP が *in vitro* で p65-actin 複合体と結合し, p65-actin-scaffold の形成を促進することを見出している。

(2) 形成された p65-actin-scaffold と細胞接着部位やファゴソームなどの膜系を連結すると想定される moesin や, 殺菌に関与し p65-actin-scaffold との結合が想定される NADPH オキシダーゼ構成タンパク質 (p47<sup>phox</sup> など) を作製し, 細胞接着, 食食, 殺菌との関連を明らかにする。この際, TLR, MyD88 ノックアウトマウスも用いる。

(3) これらによって, 菌体認識-細胞骨格系ダイナミクス-細胞エフェクター機能を軸とする感染防御機構の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 白血球細胞骨格のダイナミクスに関する候補タンパク質の調製: リコンビナント p65/L-plastin, T-plastin, grancalcin およびこれらに対する特異抗体 (モノクロを含む) は既に調整されている。β-actin もマクロファージ細胞株より精製されている。今回, 細胞骨格のダイナミクスに関与する候補タンパク質として, WASP などのタンパク質を作製する。形成された p65-actin-scaffold と高次タンパク質集合する候補として, moesin, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> タンパク質を作製する。マクロファージ cDNA library から PCR 法で, 全長の cDNA を調製し, 各タンパク質を合成・精製する。これらを抗原として特異抗体を得る。

(2) 細胞骨格ダイナミクスの細胞内免疫染色による検出: マウスマクロファージや樹状細胞を菌体で刺激し, 細胞内 p65 の変化を免疫組織学的に観察する。p65 が actin ファイバーと共存的に, 特徴ある構造体 (p65-actin-scaffold) を形成することは既に観察・報告した。この実験系で, 上記の各種タンパク質に対する抗体を用いて, p65-actin-scaffold との共存関係を観察する。また, 細胞接着や細菌殺菌活性の増強との関連を評価する。結核菌を用いた同様の実験を, 実績のある国際医療センター研究所 (P3 レベル実験室) で実施する。

(3) 高次タンパク質集合のウエスタンブロットによる検出: マクロファージや樹状細胞を菌体で刺激後, マイルドに可溶化し, 細胞骨格系分子集合を抗 p65 抗体を用いて免疫沈降させる。沈降物を可溶化し, SDS-PAGE 後, 上記の各種タンパク質に対する抗体を用いてウエスタンブロットを実施し, p65-actin-scaffold に含まれるタンパク種を同定する。結核菌を用いて同様の実験を実施する。

(4) NADPH オキシダーゼ活性化と細胞骨格との関連について: NADPH オキシダーゼの構成要素である p47<sup>phox</sup> や p67<sup>phox</sup> は, 食細胞活性化時に細胞質から細胞膜に移行するが, その過程に細胞骨格が関与することが示唆されているが, 詳細は不明である。p65/L-plastin 遺伝子欠損マウスの白血球は, 細胞接着依存的な活性酸素生成が認められないことから, NADPH オキシダーゼと p65-scaffold との関連が強く示唆される。この点についてルミノール結合ビーズを用いた *in vitro* 活性酸素定量系で調べる。

(5) TLR ノックアウトマウスでの実験: TLR4 に変異のある C3H/HeJ マクロファージでは

LPS 刺激によって p65-actin-scaffold の再構築が起らない。このマウスは易感染性として知られている。そこで、実験をさらに他の TLR に拡大するため、TLR4, TLR2, MyD88 ノックマウスを使用し、上記の実験を実施する。

#### 4. 研究成果

(1) 申請者が同定した p65/L-plastin は、白血球に特異的に発現され、アクチン細胞骨格の再構築 (p65-actin-scaffold) に関与している。p65-actin-scaffold は菌体刺激によって随時形成され、これを中心に形成される高次タンパク質集合体が、細胞接着・活性化や殺菌活性の増強などの感染防御的細胞応答の基盤として機能すると想定している。p65/L-plastin とともに細胞骨格のダイナミクスに関与するタンパク質として WASP, VAV, および、形成された p65-actin-scaffold と高次タンパク質集合するタンパク質として NADPH oxidase p47phox について、マクロファージ cDNA library から PCR 法で全長の cDNA を調製し、タンパク質合成・精製をすすめた。

(2) 特異抗体を用いて、これらのタンパクと p65-actin-scaffold の共存関係について蛍光顕微鏡を用いて観察した。また、食食・細胞接着や細菌殺菌活性の増強との関連を評価した。ルミノール結合ビーズを用いて、食食依存性の活性酸素酸性定量法を確立し、アクチン骨格系の阻害剤の効果を調べ、細胞骨格の再構成が活性酸素産生において重要であることを明らかにした。

(3) 上記の細胞内複合体 (高次タンパク質集合) をさらに生化学的手法で解析した。マクロファージや樹状細胞を菌体で刺激後、マイルドに可溶化し、細胞骨格系分子集合を抗 p65 抗体を用いて免疫沈降させた。沈降物を SDS で可溶化し、SDS-PAGE 後、上記の各種タンパク質に対する抗体を用いて、ウエスタンブロットを実施して、p65-actin-scaffold に含まれるタンパク種を検出した。

(4) p65/L-plastin, WASP, VAV に関して、それぞれ欠損は食食・細胞接着依存性の活性酸素産生の障害をきたすことを考え合わせ、p65-actin-scaffold を中心とする細胞骨格系のダイナミクスが、白血球の感染防御活性の発現において重要な役割を担うと考えられる。

#### 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 7 件)

1) Le Guyader D, Redd MJ, Colucci-Guyon E, Murayama, Shinomiya H, and Herbomel P: Origins and unconventional behavior of neutrophils in developing zebrafish. *Blood* 査読有 111: 132-141, 2008

2) Shen H, Kanoh M, Maruyama S, Matsumoto A, Zhang W and Asano Y: Attenuated *Listeria* infection activates natural killer cell cytotoxicity to regress melanoma growth in vivo. *Microbiol Immunol* 査読有 52: 107-117, 2008

3) Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T, Kanamori M, Kirikae T: KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 査読有 52: 4194-4197, 2008

4) Shinomiya H, Shinjo M, Fengzhi L, Asano Y, Kihara H: Conformational analysis of the leukocyte-specific EF-hand protein p65/L-plastin by X-ray scattering in solution. *Biophys Chem* 査読有 131: 36-42, 2007

5) Shinomiya H: Dual role of the actin cytoskeleton in host defenses and in the establishment of bacterial infections. *Nippon Saikingaku Zasshi* 査読有 62: 279-293, 2007

6) Sekiguchi J, Nakamura T, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae F, Kobayashi I, Augustynowicz-Kopec E, Kirikae T: Development and evaluation of a line probe assay for rapid identification of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J Clin Microbiol* 査読有 45: 2802-2807, 2007

7) Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Kirikae F, Toyota E, Kirikae T: Detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 査読有 45: 179-192, 2007

[学会発表] (計 7 件)

1) 四宮博人, 野中里佐, 犬伏 歩, Nurul Huda Khan, 木暮一啓, 村瀬光春, 鈴木 聡, 浅野喜博: *Pseudomonas aeruginosa* の環境適応戦略と病原性との関連についての解析. 第 81

回日本細菌学会総会, 2009年3月12日, 名古屋

2) Shinomiya H, Yumoto F, Kirikae T, Matsumoto A, Asano Y: Structure-function analysis of p65/L-plastin that regulates macrophage activities through cytoskeletal remodeling. 第38回日本免疫学会総会, 2008年12月3日, 京都

3) 四宮博人, 野中里佐, 木暮一啓, Nurul Huda Khan, 石井良和, 鈴木聡, 浅野喜博: 臨床分離緑膿菌と海洋分離緑膿菌の遺伝子型・性状・病原性の比較について. 第81回日本細菌学会総会, 2008年3月26日, 京都

4) 四宮博人: 自然免疫の基礎免疫学. 第21回肝類洞壁細胞研究会, 2007年12月22日, 愛媛

5) Shinomiya H, Yumoto F, Shinjo M, Kihara H, Matsumoto A, Asano Y: Structural and functional analyses of the leukocyte-specific EF-hand protein, p65/L-plastin. 第37回日本細菌学会総会, 2007年11月21日, 東京

6) 松本哲, 丸山砂穂, 加納誠, 四宮博人, 浅野喜博: リステリア感染マクロファージの細胞死誘導機構の解析. 第37回日本細菌学会総会, 2007年11月21日, 東京

7) 四宮博人: 細菌刺激による白血球細胞骨格再構成とその感染防御における意義. 第6回四国免疫フォーラム, 2007年7月14日, 愛媛

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

四宮 博人 (SHINOMIYA HIROTO)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 80162618

### (2) 研究分担者

切替 照雄 (KIRIKAE TERUO)  
国立国際医療センター・感染制御研究部・部長  
研究者番号: 50192563  
浅野 喜博 (ASANO YOSHIHIRO)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 70114353