

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20599014

研究課題名(和文) NALP3およびIPAFのリガンドの探索・同定

研究課題名(英文) Isolation and identification of the NALP3- and IPAF-ligands

研究代表者

小倉 裕範 (OGURA YASUNORI)

琉球大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60304557

研究成果の概要(和文)：NALP3タンパク質とIPAFタンパク質はそれぞれ炎症を誘導する因子である。これらの因子により炎症が開始される機構を明らかにするために、NALP3およびIPAFを直接働かせる因子＝リガンドを探索した。結果として研究期間中にリガンドに到達することはできなかったが、リガンドを探索する過程でNALP3が機能するための条件を見出すことができ、今後さらにリガンドを探索するためのヒントを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The NALP3 and IPAF proteins are known to induce inflammation. In this study, I attempted to identify the factors that directly activate NALP3 and IPAF. Although I could not isolate such factors during this period, I revealed many important features in the chemical process of the NALP3 activation. On the basis of these findings, I will continue searching the NALP3- and IPAF-ligands.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	0	1,200,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	660,000	4,060,000

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：感染免疫、Caspase-1、NALP3(NLRP3)、IPAF(NLRC4)、Danger signal

1. 研究開始当初の背景

カスパーゼ1(IL-1 β 変換酵素)は配列特異的なタンパク質分解酵素(システインプロテアーゼ)であり、定常状態の哺乳動物細胞では細胞質中に不活性型として存在するが、細胞が細菌あるいは細菌成分などで刺激されることで活性化され、2つの炎症性サイトカイン、IL-1 β およびIL-18の前駆体を切断し、活性型分子を細胞外へ放出させる。IL-1 β はTNF α と並ぶ炎症性サイトカインであり、IL-18はインターフェロンを誘導する活性を有し、Th1型の感染免疫の誘導に重要な役割を果た

すとされる。すなわちカスパーゼ-1は免疫・炎症反応の引き金を引き、同時にその反応パターン決定に関与すると考えられている。

細菌感染とカスパーゼ1活性化とを結びつける細胞内の機構は長い間不明であったが、2002年から2007年にかけてカスパーゼ1の活性化に複数のNLRタンパク質(ヒトNLRP1、マウスNlrp1b^{129S1}、NLRP3(NALP3)、NLRP6、NLRP10、NLRP12、NLRC4(IPAF)、マウスNaip5^{57BL/6}、ヒトPyrin)が関わることも、複数の研究室から報告された。NLRタンパク質群は哺乳動物の細胞内に局在し、シグナル伝達分子

として機能すると考えられている分子群である。すなわち上流因子がNLRタンパク質に結合することによってその構造を変化させ、下流因子を活性化すると考えられている。

当時の研究報告をまとめると、NLRタンパク質-カスパーゼ1経路はマクロファージが宿主細胞の破壊を試みるような細菌にさらされた場合に活性化されること、そして細菌の様々な攻撃様式に応じて異なるNLRタンパク質が機能することがわかってきた。すなわち、NLRP1b^{129S1}は炭疽菌の壊死毒素に、NLRP3はリステリア菌や黄色ブドウ球菌の細胞膜穿孔性毒素に、NLRC4およびNaip5^{57BL/6}はサルモネラ菌やレジオネラ菌などのIII/IV型分泌に応答してカスパーゼ1を活性化することが報告されている。なおNLRP3は生細菌による感染ばかりでなく、細菌由来RNA、ムラミルジペプチド、ウイルス感染、また宿主細胞の壊死により放出される物質（高濃度のATP、尿酸結晶、ピロリン酸カルシウム結晶）にも反応してカスパーゼ1を活性化させることが報告されている。

2. 研究の目的

上記のように、2008年の初めにはNALP3およびIPAFの活性化を誘導する因子が明らかにされてきていた。しかしNALP3およびIPAFタンパク質に直接結びついてこれらを活性化させる因子＝リガンドは明らかになっておらず、研究者間でも見解に矛盾があった。特にリガンドが細菌由来のものか、宿主細胞に由来するものかという議論は、これらのNLRタンパク質が非自己を認識しようとしているのか、それとも危険因子を検出しようとしているのかという議論につながった。

そこで本研究はNALP3およびIPAFのリガンドを探索する方法を開発し、実際にリガンドを同定することを目的とした。

3. 研究の方法

NALP3およびIPAFのリガンドを探索するためにふたつの戦略を考えた。

ひとつめは、リガンドがタンパク質であると想定して、活性化されたNALP3あるいはIPAFの形成するタンパク質複合体をそれぞれ精製し、その構成タンパク質成分をマスマスペクトロメトリーで同定する方法であった(計画1)。

一方もうひとつは、目的のリガンドがタンパク質ではなかった場合を想定し、溶液中でNALP3経路あるいはIPAF経路を活性化する系をそれぞれ再構成し、それらを応用してリガンドを探索する方法を考えた(計画2)。つまり、純化したカスパーゼ1、NALP3/IPAF、そして補助因子のASCを試験管内で混合し、さらにこれにリガンドを含んでいると考えられる溶液を加えることでカスパーゼ1を活性化できれば、溶液中でカスパーゼ1活性化のシグ

ナル伝達系を再構成したことになる。この系を利用すれば、NALP3/IPAF経路の活性化に必要な最小の因子を純化することが可能であろうと考えた。すなわち、NALP3/IPAFの活性化因子を含む細胞抽出液を順次分画し、NALP3あるいはIPAF経路を活性化しうる最小の分画を得るというものである。もしそのような分画を得られたならば、各種の生化学的、物理化学的方法およびマスマスペクトロメトリーなどの方法を用いて、この分子を化学的に同定できるはずである。なお、分画する細胞抽出液として細菌あるいは細菌抽出物で刺激されたマクロファージ細胞株の抽出液を用いることとし、リガンドが細菌由来であるか、宿主細胞由来であるかは最終的にリガンドが同定されて初めて判明することになると期待した。

4. 研究成果

(計画1)「NALP3およびIPAFに結合するタンパク質の探索」のために、RAW264.7細胞(マウス由来マクロファージ様細胞株)を用いることとした。それは①RAW264.7細胞がカスパーゼ1活性化に必要な補助タンパク質ASCを発現していないこと、②しかし人為的にASC遺伝子を導入することでNALP3およびIPAFによるカスパーゼ1活性化能を付与できること、③遺伝子の導入にはプラスミドのトランスフェクションの他、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入も可能なことを確認できたからである。ASCを発現せず、強制発現でシグナル伝達系が回復することは、外からシグナル伝達系を操作する上で遊離と考えられた。

エピトープタグを付加したNALP3およびIPAFタンパク質をASCタンパク質とともにRAW264.7細胞に強制発現させ、免疫沈降法によりNALP3/IPAF複合体を抽出し、共役して沈降してくるタンパク質を検出することを試みた。しかしNLRP3およびIPAFタンパク質が発現されていることは確認できたものの、NALP3/IPAFタンパク質と共役沈降するタンパク質の存在を確認することはできなかった。またNALP3/IPAFタンパク質を強制発現させた細胞がNALP3活性化刺激(LPS+ATP)/IPAF活性化刺激(サルモネラ菌感染)に対してより強く反応するなどということはなく、強制発現させたNALP3/IPAFタンパク質が機能していることも確認できなかった。今後、細胞を可溶化する方法を変更するなどの検討課題が残っているが、本計画は細胞培養への度重なるマイコプラズマの混入により進行が妨げられ、現在も中断している。

計画(2)「無細胞系によるNALP3およびIPAF経路の再構成」のためにまずNALP3、IPAF、カスパーゼ1およびASCの組換えタンパク質標品の調製を試みた。しかし大腸

菌で発現されたタンパク質は可溶化されず、ヒト胎児腎細胞HEK293Tでは十分な発現量を確保できず、純粋なタンパク質標品の調製は断念した。

次いでNALP3、IPAF、カスパーゼ1およびASCタンパク質を含む粗抽出液を用いたシグナル伝達系の再構成を考えた。野生型マウスに加えて、NLRP3欠損マウス、NLRC4欠損マウス、およびASC欠損マウス由来のマクロファージを利用できたので、これらの破碎液を単独で、あるいは混合して用い、各因子の働きを評価した。その結果、次のようなことが判明した。

①何も刺激を加えていない野生型マウス骨髄由来マクロファージを10mMカリウムおよび1.5mMマグネシウムを含む緩衝液中で機械的に破碎し、この破碎液を30℃下に置いてもカスパーゼ1は不活性のまま保たれる。一方、マクロファージをあらかじめLPS+ATPあるいはサルモネラ菌で刺激しておく、30℃下のインキュベーション中にカスパーゼ1が活性化（消化）される。

②ASC欠損マウス由来のマクロファージでは①のようなLPS+ATP依存性のカスパーゼ1活性化が起こらない。つまり、この反応にはASCが必須因子である。

③LPS+ATPで刺激したカスパーゼ1欠損マウス由来マクロファージの破碎液を、無刺激のASC欠損マウス由来マクロファージの破碎液に混合して①の条件下で反応させると、カスパーゼ1の活性化が検出される。つまり、この条件下におけるカスパーゼ1活性化ではASC>カスパーゼ1のシグナル伝達が再構成されている。

④①および③のようなカスパーゼ1活性化が進行するためには細胞破碎液中の不溶性画分（遠心により除去される画分）の存在が不可欠である。

⑤無刺激のマクロファージの破碎液中でASCは可溶性画分中に存在し、LPS+ATPで刺激されたマクロファージの破碎液中でASCは不溶性画分中に存在する。つまり④で見出されたカスパーゼ1活性化因子は不溶性のASCであることが示唆される。またこの不溶化したASCは、他の研究者らから既に報告されているSpeck/パイロトソームに相当するものと考えられた。

⑥NALP3欠損マウス由来のマクロファージを用いて①のような実験を行うと、野生型マクロファージを用いた場合と同様に、LPS+ATP依存性のカスパーゼ1活性化が検出される。この結果は、細胞をLPS+ATPで刺激した際に細胞中で起こるカスパーゼ1活性化がNALP3に依存性であることと矛盾する。

⑦NALP3欠損マクロファージでもLPS+ATP依存性にASCが不溶性画分へ移行する。

しかし一方、NALP3欠損マクロファージをLPS+ATPで刺激して細胞の形態を保持したままにしておいた場合、パイロトソームの形成は観察されず、カスパーゼ1の活性化は検出されない。したがって細胞を機械的に破碎する過程でASCの不溶化が生じたと考えられた。つまり、NALP3活性化は細胞の機械的破碎と同等の作用をもつと考えられた。

⑧細胞破碎液中のカリウム濃度を減量すると、LPS+ATP刺激の有無にかかわらず、細胞の破碎液中でのASCの不溶化が起き、カスパーゼ1の活性化が誘導される。

⑨逆に細胞破碎液中のカリウム濃度を増加させると、LPS+ATP刺激を加えてもASCの不溶化は起きず、カスパーゼ1は活性化されない。

⑩細胞破碎液にEGTA（カルシウムのキレート剤）を加えると、高カリウム濃度下でもASCの不溶化およびカスパーゼ1の活性化が進行するようになる。しかしEDTA（マグネシウムのキレート剤）ではこの作用が見られない。

⑪①と同様の実験条件で、ただし細胞を界面活性剤で破壊すると、ASCの重合体形成およびカスパーゼ1活性化が起こらない。これはASCの不溶化には細胞内の何らかの構造が保持されている必要があることを示唆した。

以上より、*in vitro*でASC>カスパーゼ1の反応を再構成できることが判明したが、NLRP3>ASCあるいはNLRC4>ASCの反応を再構成できる条件には至らなかった。細胞の破碎によりNALP3とは無関係にASCが不溶化してしまう現象を避ける条件を検討しなければならないと考えられた。また、カリウム濃度の低下およびカルシウム濃度の低下が直接ASCの活性化（不溶化）を制御していることが示唆されたため、細胞内での局所的なイオン動態とNALP3の機能の関係について検討が必要であると考えられた。

ところで、細胞の機械的破碎がNALP3の作用に相当すること、またASCの不溶化にはある種の構造が保持されていなければならないことなどが示され、細胞の膜構造とNLRタンパク質によるシグナル伝達との密接な関係が示唆された。そこで、これらのタンパク質の局在を電子顕微鏡あるいは蛍光顕微鏡を用いて検討した。その結果、ASCタンパク質の局在について次のようなことが判明した。

⑫LPS+ATPで誘導されるASC重合体を免疫電子顕微鏡法で観察すると、ASC重合体は細胞質内に存在し、特定の膜構造と関連して存在しているようには観察されない。

⑬ただし、ASC重合体はオスミウム/ウランでは染色されない何らかの繊維状の構造

物に支持されているように観察された。(図1)

⑭ ASCとGFPの融合タンパク質をRAW264.7細胞に導入し、LPS+ATP刺激後の挙動を観察すると、細胞質中に散在していたASCが何らかの繊維状構造物に沿って移動するように観察される。(図2) この繊維状構造物はアクチン繊維とは異なる局在を示す。また微小管は、細胞がLPS+ATPで刺激されると消失するように観察されるため、ASCとの共局在を明確にするのが困難である。

これらの結果よりASCタンパク質が何らかの繊維状構造物に運搬されることが想像された。NALP3およびIPAFのASCへの作用を理解する上で、この構造物が同定され、ASCタンパク質の運搬機構が明らかにされることが重要であると考えられた。

結果として、NALP3およびIPAFリガンドの探索方法の確立すら成し遂げることができなかった。しかしNALP3によるシグナル伝達経路の理解のために重要な知見を得られることができ、今後の探索のためのヒントを得ることができた。

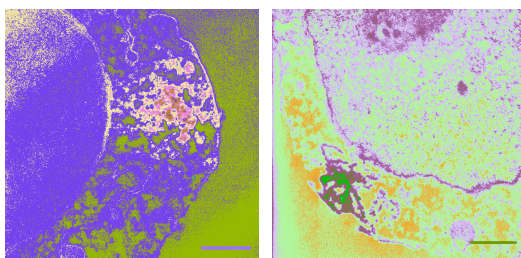


図1 両者ともASCを発現するRAW264.7細胞をLPS+ATPで刺激し、ASCタンパク質を免疫染色(DABにて発色)後、オスミウム固定して超薄切標本を作製し、電子顕微鏡にて観察した像。対照との比較から電子密度の高い粒子が集合している部位がパイロトソームと考えられた。縮尺目盛は783nm。

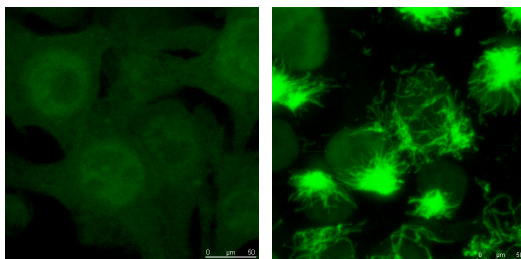


図2 両者ともASC-GFP融合タンパク質を発現したRAW264.7細胞。左はLPSのみで刺激し、右はLPS+ATPで刺激した後、細胞を固定し、蛍光顕微鏡下にASC-GFPの局在を観察した。

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3件、すべて査読あり)

① Nakasone N, Toma C, Higa N, Koizumi Y, Ogura Y., Suzuki T. Detergents enhance EspB secretion from Escherichia coli strains harboring the locus for the enterocyte effacement (LEE) gene. *FEMS Microbiology Letters* 2011 **315**:109-114

② Toma C, Higa N, Koizumi Y, Nakasone N, Ogura Y., McCoy AJ, Franchi L, Uematsu S, Sagara J, Taniguchi S, Tsutsui H, Akira S, Tschopp J, Núñez G, Suzuki T. Pathogenic Vibrio activate NLRP3 inflammasome via cytotoxins and TLR/nucleotide-binding oligomerization domain-mediated NF-kappa B signaling. *J Immunol.* 2010 **184**:5287-97

③ Ichinohe T, Lee HK, Ogura Y., Flavell R, Iwasaki A. Inflammasome recognition of influenza virus is essential for adaptive immune responses. *J Exp Med.* 2009 **206**:79-87

[学会発表] (計6件)

① 仲宗根昇、小倉裕範、鈴木敏彦
Purification of multifunctional repeat-in-toxin (RTX) of Vibrio cholerae 01 第83回日本細菌学会総会、横浜、2010年3月27-29日

② 比嘉直美、トーマクラウディア、仲宗根昇、小倉裕範、小泉由起子、鈴木敏彦
The TLRP3- and NLRP4-mediated inflammasome activation by the infection of Vibrio parahaemolyticus 第83回日本細菌学会総会、横浜、2010年3月27-29日

③ 田中脩嗣、小倉裕範、鈴木敏彦
Caspase-1 activation by environmentally isolated bacteria 第83回日本細菌学会総会、横浜、2010年3月27-29日

④ トーマクラウディア、小泉由起子、仲宗根昇、比嘉直美、小倉裕範、鈴木敏彦
Mechanism of macrophage infection by Leptospira interrogans 第83回日本細菌学会総会、横浜、2010年3月27-29日

⑤ 鈴木敏彦、トーマクラウディア、比嘉直美、小泉由起子、仲宗根昇、小倉裕範
Activation of the NLRP3 inflammasome by pathogenic Vibrios is

mediated via pore-forming toxins and differentially regulated by Toll-like receptor signaling. 第39回日本免疫学会総会、大阪、2009年12月2-4日

⑥ トーマクラウディア、比嘉直美、仲宗根昇、小泉由起子、McCoy, Andrea J、小倉裕範、筒井ひろ子、増本純也、Franchi, Luigi、Nunez, Gabriel、鈴木敏彦 Vibrio vulnificus activates Nalp3 inflammasome via the synergistic action of pore forming toxins 第38回日本免疫学会総会、京都、2008年12月1-3日

[その他]

ホームページ等

<http://w3.u-ryukyu.ac.jp/bacteriology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小倉 裕範 (OGURA YASUNORI)
琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：60304557

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：