

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590524

研究課題名(和文) リステリア主要病原因子によるキナーゼを介したインフラマソーム制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the kinase-mediated regulatory mechanism of the inflammasome by a listerial virulence factor

研究代表者

原 英樹 (Hara, Hideki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30456892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内で異物や危険分子を検知するとタンパク複合体インフラマソームを形成する。インフラマソームはタンパク分解酵素カスパーゼ1を活性化することでIL-1やIL-18などのサイトカイン産生や細胞死を誘導する。いくつかのインフラマソームはアダプター分子ASCを必要とし、我々はASCのリン酸化がインフラマソーム形成を亢進することを見出した。このリン酸化シグナルを介したインフラマソーム制御機構は細菌感染(リステリア菌や結核菌など)においても確認できた。興味深いことに、リステリア感染においてインフラマソームを介した炎症応答は宿主免疫に不利に働き、さらに病原因子がこの応答を促進していることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Inflammasome, an intracellular protein complex, is activated after sensing of foreign compounds from pathogens or host danger molecules. Inflammasome activates caspase-1, a cysteine protease, to induce IL-1 and IL-18 secretion, and cell death. Some inflammasomes require adaptor molecule ASC to form the inflammasome, and we revealed that the phosphorylation of ASC acts as a molecular switch to activate inflammasome. This regulation was observed in the inflammasome activation induced by pathogenic infection including *Listeria monocytogenes* or *Mycobacterium tuberculosis*. Interestingly, the inflammasome response was detrimental to the host under *Listeria* infection and *Listeria* facilitated the response by a virulence factor.

研究分野：感染免疫

キーワード：リステリア インフラマソーム

1. 研究開始当初の背景

マクロファージや樹状細胞は細胞内受容体を発現しており、病原体由来の異物や自己危険因子などを検知することでインフラマソームと呼ばれるタンパク複合体を形成する。インフラマソームはタンパク分解酵素であるカスパーゼ1を活性化することでIL-1やIL-18などのサイトカイン産生や細胞死の1種であるピロトーシスを誘導する。インフラマソームを形成する細胞内受容体のうち、CARDドメインを有するNLRP3は直接カスパーゼ1と会合可能であるが、NLRP3やAIM2など多くの受容体はカスパーゼ1と会合するのにアダプター分子であるASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) を必要とする。

細菌やウイルスを含む様々な微生物が感染宿主においてインフラマソーム応答を誘導することがこれまで報告されている。研究代表者のグループもこれまでに *Listeria monocytogenes* (リステリア) は主にAIM2インフラマソーム、*Mycobacterium tuberculosis* (結核菌) は主にNLRP3インフラマソームを活性化することを報告してきた。しかしながら、インフラマソーム活性化に関わる病原因子やその活性化機構については不明であった。

2. 研究の目的

本研究は細菌感染で誘導されるインフラマソーム形成がどのような機序で活性化されているのかリン酸化シグナルに着目して解析を行った。またマウス感染モデルを用いてインフラマソームの生体への影響を調べた。

3. 研究の方法

(1) インフラマソームの活性化

各インフラマソームに特異的なリガンドもしくは細菌でマウス腹腔から回収したマクロファージを刺激しインフラマソームの活性化を観察した。NLRP3 インフラマソームを活性化させる場合は nigericin、AIM2 の場合は poly(dA:dT)、NLRP4 の場合は flagellin をそれぞれリガンドとして用いた。活性化の指標としてはカスパーゼ1の活性化サブユニット(p10)をウエスタンブロット法で検出、もしくはカスパーゼ1 依存的に切断されて成熟型となる IL-18 の分泌量を ELISA 法で測定した。

(2) リン酸化酵素のスクリーニング

リン酸化シグナルがインフラマソーム応答に関与しているのか検討するため、各酵素を特異的に抑制する阻害剤を用いてスクリーニングを行った。Syk 阻害剤: R406, Syk inhibitor I (SI), BAY 61-3606 (BAY); Jnk 阻害剤: SP600125 (SP), TAT-TI-JIP₁₅₃₋₁₆₃ (TAT); Src 阻害剤: PP2; p38 阻害剤: SB203580 (SB); Erk 阻害剤: FR180204 (FR); PI(3)K 阻害剤: wortmannin (WO)。さらに検討が必要な分子については siRNA を用

いてノックダウンを行う、もしくはノックアウト細胞を入手して解析を行った。

(3) リン酸化タンパクの検出

リン酸化タンパク特異的な抗体が入手可能な場合はウエスタンブロット法でリン酸化タンパクを検出した。抗体がない場合は Phos-tag を含んだポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、目的のタンパク質を特異的な抗体で検出し泳動距離の違いでリン酸化の有無を判断した。

(4) マクロファージの形質導入

pFLAG-NLRP3(R258W) および各種点変異を導入した ASC を発現するプラスミドを作製し、電気穿孔法で RAW264.7 細胞に形質導入した。

(5) マウス感染

7~9 週齢の C57BL/6 マウスに PBS で希釈した菌液を 0.2 ml 静脈注射した。

4. 研究成果

(1) 細菌感染では複数のインフラマソームが活性化する可能性があるため、リン酸化酵素のスクリーニングを行う際には既知のリガンドを用いた。その結果、nigericin および poly(dA:dT) でマクロファージを刺激したときに Syk および Jnk 阻害剤で細胞を処理すると IL-18 の分泌が顕著に低下した(図1, 2)。さらにリステリアや結核菌でマクロファージを刺激した場合にもこれらの阻害剤処理で IL-18 産生が低下した(図3, 4)。一方で、flagellin で刺激した場合の IL-18 産生はこれらの阻害剤の影響をほとんど受けなかった(図5)。また Syk もしくは Jnk (Mapk8, Mapk9) を欠損したマクロファージを用いてカスパーゼ1の活性化を検討したところ、野生型細胞と比較してこれらの欠損細胞では nigericin および poly(dA:dT) 刺激で誘導される活性化型カスパーゼ1が著明に低下していた(図6, 7, 8, 9)。これらの結果から、NLRP3 および AIM2 はインフラマソームを活性化するのに Syk や Jnk を必要とすることが示唆された。

図1

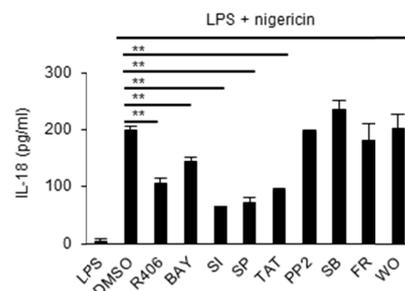


図 2

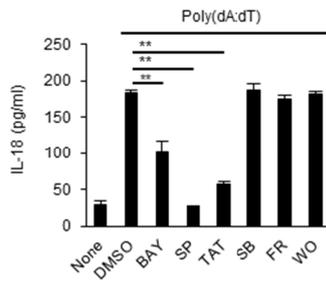


図 3

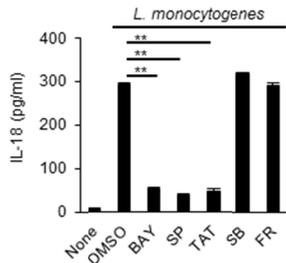


図 4

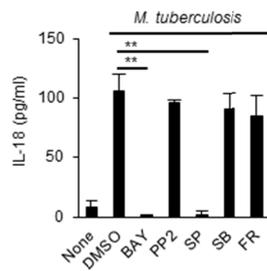


図 5

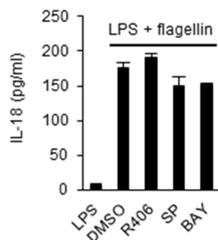


図 6

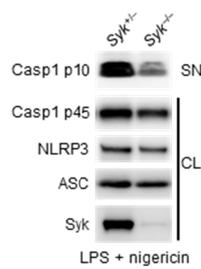


図 7

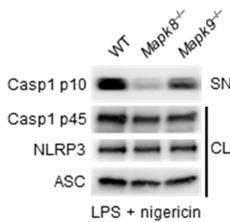


図 8

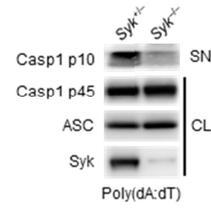
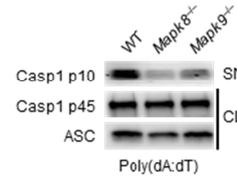


図 9



(2) NLRP3 と AIM2 どちらのインフラマソームにも Syk と Jnk は必要であることから、両者に共通して必要なアダプター分子が修飾を受けているのではないかと推察した。インフラマソームを形成すると ASC は Triton X-100 不溶性分画に移動することから、細胞を各リガンドで刺激した後に Triton X-100 可溶性分画と不溶性分画に分けて電気泳動を行い ASC のリン酸化について検討を行った。その結果、インフラマソーム活性化時に ASC がリン酸化を受けていることが示唆された。さらにこのリン酸化は Syk と Jnk に依存していた (図 10, 11, 12, 13)。これらの結果から、Syk と Jnk は ASC をリン酸化することでインフラマソーム応答に関与していると考えられた。

図 10

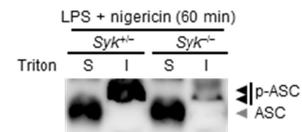


図 11

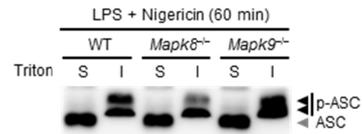


図 12

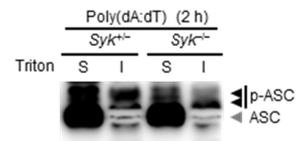
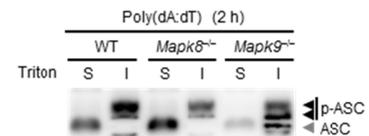
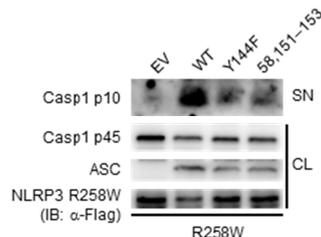


図 13



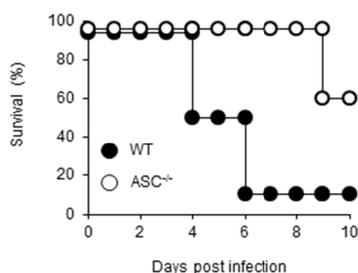
(3) ASC のリン酸化部位を特定するために複数箇所のセリン、スレオニン、チロシンに変異を加えた ASC 遺伝子をコードするプラスミドを構築し、活性型 NLRP3 である R258W を発現するプラスミドと一緒にマクロファージに形質導入し活性型カスパーゼ1を検出した。その結果、144番目のチロシン、58番目と153番目のセリン、151番目と152番目のスレオニンがリン酸化を受け、インフラマソームの活性化に影響を与えている可能性が示唆された(図14)。

図 14



(4) 次にリステリア感染におけるインフラマソーム応答の影響を調べた。10⁵ cfu を静注し、マウスの生存を観察した。その結果、ASC 欠損マウスは野生型マウスより感染抵抗性を示した(図15)。この結果から、リステリア感染においてインフラマソーム応答は宿主に不利に働いていることが判明した。

図 15



(5) 研究代表者等は以前にリステリアの病原因子である listeriolysin O (LLO) が IL-18 産生に関与していることを報告している。さらに LLO 変異株を作製することで、ある特定のアミノ酸がインフラマソーム応答に関わることを突き止めた。そこで LLO 野生型株と LLO 点変異株で Syk や Jnk のリン酸化に違いがあるのか検討を行った。その結果、LLO に点変異を加えた株ではどちらのリン酸化も減弱もしくは遅延することがわかった(図16, 17)。

図 16

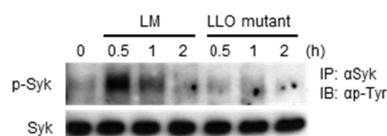
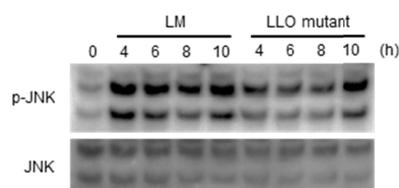


図 17



以上の結果から、リステリアは病原因子 LLO を介して Syk および Jnk のリン酸化を促すことでインフラマソームを活性化させていること、またリステリア感染においてはインフラマソーム応答が菌の増殖を亢進していることが示された。これらのリン酸化酵素を標的とした副作用の少ない特異的阻害剤を合成できれば、細菌感染のみならずインフラマソームが関わる自己炎症性疾患や自己免疫疾患(痛風や糖尿病、リウマチ関節炎など)の治療薬として期待される。

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9件)

1. Hashino M, Tachibana M, Nishida T, Hara H, Tsuchiya K, Mitsuyama M, Watanabe K, Shimizu T, Watarai M. Inactivation of the MAPK signaling pathway by *Listeria monocytogenes* infection promotes trophoblast giant cell death. *Front Microbiol.* 6. 1145. 2015. 査読有. doi: 10.3389/fmicb.2015.01145.
2. Tsuchiya K, Hara H, Fang R, Hernandez-Cuellar E, Sakai S, Daim S, Chen X, Dewamitta SR, Qu H, Mitsuyama M, Kawamura I. The adaptor ASC exacerbates lethal *Listeria monocytogenes* infection by mediating IL-18 production in an inflammasome-dependent and -independent manner. *Eur. J. Immunol.* 44. 3696-3707. 2014. 査読有. doi: 10.1002/eji.201444673.
3. Fang R, Hara H, Sakai S, Hernandez-Cuellar E, Mitsuyama M, Kawamura I, Tsuchiya K. Type I interferon signaling regulates activation of the absent in melanoma 2 inflammasome during *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect. Immun.* 82. 2310-2317. 2014. 査読有. doi: 10.1128/IAI.01572-14.
4. Tsuchiya K, Hara H. The inflammasome and its regulation. *Crit. Rev. Immunol.*

34. 41-80. 2014. 査読有 .
doi: 10.1615/CritRevImmunol.2013008
686.
5. Hara H, Tsuchiya K, Kawamura I, Fang R, Hernandez-Cuellar E, Shen Y, Mizuguchi J, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Mitsuyama M. Phosphorylation of the adaptor ASC acts as a molecular switch that controls the formation of speck-like aggregates and inflammasome activity. *Nat. Immunol.* 14. 1247-1255. 2013. 査読有. doi: 10.1038/ni.2749.
6. Yang R, Xi C, Sita DR, Sakai S, Tsuchiya K, Hara H, Shen Y, Qu H, Fang R, Mitsuyama M, Kawamura I. The RD1 locus in the *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to the maturation and secretion of IL-1 from infected macrophages through the elevation of cytoplasmic calcium levels and calpain activation. *Pathog. Dis.* 70. 51-60. 2014. 査読有. doi: 10.1111/2049-632X.12075.
7. Hernandez-Cuellar E, Tsuchiya K, Hara H, Fang R, Sakai S, Kawamura I, Akira S, Mitsuyama M. Nitric oxide inhibits the NLRP3 inflammasome. *J. Immunol.* 189. 5113-5117. 2012. 査読有. doi: 10.4049/jimmunol.1202479.
8. Tanaka T, Takahashi K, Yamane M, Tomida S, Nakamura S, Oshima K, Niwa A, Nishikomori R, Kambe N, Hara H, Mitsuyama M, Morone N, Heuser JE, Yamamoto T, Watanabe A, Sato-Otsubo A, Ogawa S, Asaka I, Heike T, Yamanaka S, Nakahata T, Saito MK. Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *Blood.* 120. 1299-1308. 2012. 査読有 . doi: 10.1182/blood-2012-03-417881.
9. Yamamoto T, Hara H, Tsuchiya K, Sakai S, Fang R, Matsuura M, Nomura T, Sato F, Mitsuyama M, Kawamura I. *Listeria monocytogenes* strain-specific impairment of the TetR regulator underlies the drastic increase in cyclic di-AMP secretion and beta interferon-inducing ability. *Infect. Immun.* 80. 2323-2332. 2012. 査読有. doi: 10.1128/IAI.06162-11.

〔学会発表〕(計5件)

1. Hara H. The Thr223 in listeriolysin O is essential for the ability to induce the inflammasome activation. 第86回日本細菌学会総会. 2013年3月18日. 幕張.
2. Hara H. Involvement of the domain 3 of listeriolysin O in the inflammasome activation induced by *Listeria monocytogenes* infection. 第41回日本免疫学会学術集会. 2012年12月5日. 神戸.
3. 原 英樹. リステリア感染で誘導されるインフラマソーム応答における主要病原因子 listeriolysin O の関与とその責任領域の検討. 第59回毒素シンポジウム. 2012年8月30日. 帯広.
4. 原 英樹. リステリア感染で誘導されるインフラマソーム応答における主要病原因子 listeriolysin O の関与とその責任領域の検討. 第6回細菌学若手コロッセウム. 2012年8月8日. 八王子.
5. 原 英樹. リステリア感染における主要病原因子 listeriolysin O 依存的なインフラマソーム応答の役割. 第23回日本生体防御学会学術総会. 2012年7月9日. 品川.

〔図書〕(計1件)

1. 原 英樹, 土屋 晃介, 医薬の門社出版, リステリア感染におけるインフラマソーム形成機構とその役割. 感染 炎症 免疫 Vol.44. 2014.

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 英樹 (HARA, Hideki)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号： 30456892

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし