

平成21年4月13日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790093  
 研究課題名（和文）感染症治療に向けた新しいLPS認識分子アディポネクチンの機能の解明

研究課題名（英文）Recognition of lipopolysaccharide by adiponectin

## 研究代表者

塚本 宏樹（TSUKAMOTO HIROKI）  
 佐賀大学・医学部・助教  
 研究者番号：70423605

研究成果の概要：病原体に共通の分子構造(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)は、Toll-like receptor (TLR)等のPAMPs受容体によって認識される。本研究では、脂肪細胞から特異的に分泌されるアディポネクチンが、PAMPsの一つ、グラム陰性細菌の細胞壁成分である lipopolysaccharide (LPS)に結合することを、大腸菌リコンビナント蛋白質を作製し明らかにした。生化学的な解析により、その結合様式はこれまでに知られるTLR4を介したlipid A構造の認識ではなく、病原性に関わるO抗原糖鎖構造に依存することが示唆され、新しいPAMPsあるいは病原菌認識機構であることが示唆された。さらに、哺乳類細胞を用いてもリコンビナントアディポネクチンを作製し、LPSとの結合様式と翻訳後修飾との関連性及びその生物学的意義について検討を進めた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	0	2,200,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	330,000	3,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：感染症，免疫学，薬学，生体分子，抗体

## 1. 研究開始当初の背景

グラム陰性細菌の外膜に存在するLPSは、エンドトキシンとして強力かつ多彩な生物活性を有する。本分子がその活性を発現するにはTLR4の活性化が必要であるが、それにはLPS-binding protein (LBP)、CD14、MD-2の機能を必要とする。LBPがグラム陰性菌の外膜からLPSを引き抜き、分泌型あるいは膜型CD14に単体の形でトランスフ

アーする。細胞膜上でTLR4と会合したMD-2はCD14からLPSを受け取る。結果、TLR4に立体構造変化が起こり、活性化シグナルが細胞内に伝達する。これが現在考えられているLPSの認識機構である。LPSは、lipid Aと呼ばれる糖脂質部分とO抗原と呼ばれる糖鎖、その間をつなぐオリゴ糖から成る。脂肪酸側鎖や糖鎖は多様性に富むが、TLR4/MD-2複合体により認識され、そ

の活性を担うのは **lipid A** 構造である。**TLR** が **PAMPs** を認識して感染防御反応を誘導することは間違いないが、どのようにして病原菌と常在菌を識別しているかは謎である。 **LPS** の病原性は **O** 抗原の糖鎖構造によって規定され、その認識に **TLR4/MD-2** は関わらない。では、**O** 抗原はどうやって認識されているのか？ 未知の **LPS** 認識機構が存在するはずである。 **Soluble defense collagen** ファミリー分子は病原体の糖鎖構造を認識するようである。アディポネクチンは本ファミリーに含まれるが、これまでその **PAMPs** 認識を解析した報告は殆どない。本研究の成果により、**LPS** の病原性を識別する分子機構の発見が期待され、従来とは全く異なる新しい感染症治療の概念を提供できることが期待できる。

## 2. 研究の目的

アディポネクチンによる新しい **LPS** 認識機構とその機能を明らかにする。

- (1) 大腸菌リコンビナントを用い、アディポネクチンが認識する **LPS** の分子構造とその結合の生化学的特性を明らかにする。
- (2) アディポネクチンの **LPS** 結合様式が既知の **LPS** 認識分子 (**LBP**, **CD14**, **MD-2**) とどのように違うのか明らかにする。
- (3) 血中のアディポネクチンは多量体を形成し、それぞれが異なる糖鎖修飾を受けるとされる。哺乳類細胞発現系を用いてアディポネクチンを調製し、多量体形成と **LPS** 結合能の構造活性相関を明らかにする。
- (4) 「**LBP**→**CD14**→**TLR4/MD-2**」の **LPS** 認識系にアディポネクチンが機能的にどのように関わるのかを、細胞膜への **LPS** 結合、**LPS** により誘導される **NF-κB** の活性化を指標に *in vitro* 再構成系で検討する。
- (5) 抗アディポネクチン抗体により、**LPS** 応答がどのような影響を受けるのか *in vivo* で明らかにする。
- (6) 抗体が認識する多量体構造を解析し、各多量体の **LPS** 認識分子としての機能の違いを明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) 大腸菌リコンビナントアディポネクチンの発現は **pET32** ベクターと **OrigamiB(DE3)** 株による発現系を基本とした。
- (2) アディポネクチンの **LPS** 結合様式は本研究室で確立したニッケルクロマトグラフィーを利用した **LPS** 結合試験で評価した。
- (3) 哺乳類細胞発現系によるアディポネクチンの大量発現系は **pCAGGS1** ベクターを

基本とし、目的蛋白の **C** 末端を **FLAG** と **His** タグで標識して検出と精製に利用した。宿主細胞には、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子欠損株の **CHO-DG44** 細胞を用い、メトトレキセートによる遺伝子発現増幅を行った。高発現細胞株をスクリーニングし、クロマトグラフィーによるリコンビナント精製の材料とした。

- (4) **TLR4/MD-2/CD14/NFκB reporter gene** 等の安定発現する **Ba/F3** 細胞と、**LBP**、分泌型 **CD14** の順化培地から成る *in vitro* 再構成系を用いた。蛍光標識 **LPS** の細胞膜への結合と **TLR4/MD-2** シグナルの誘導に与えるアディポネクチンの影響をフローサイトメトリーとルシフェラーゼアッセイで検討した。
- (5) 抗アディポネクチン抗体の作製には、大腸菌リコンビナントを用いてウサギポリクローナル抗体を作製した。

## 4. 研究成果

- (1) チオレドキシシンと **His** タグを付加したリコンビナントアディポネクチンを大腸菌に大量発現させた。フレンチプレスによる菌体破砕で、目的蛋白を効率的に可溶化し、ニッケルカラムによるクロマトグラフィーで精製することに成功した。
- (2) 調製した大腸菌リコンビナントを用いて野生型 **rough LPS** との結合を検討すると、既知の **LPS** 認識分子 **LBP**, **CD14**, **MD-2** と同様に **LPS** に対する結合が認められた。また、その結合は **LBP** と **CD14** と同様に **Triton X100** に対して感受性であった。
- (3) **LpxM**-変異株から調整した不完全な 5 本鎖 **LPS** に対しても野生型 6 本鎖 **LPS** の場合と同等の結合能を検出することができ、アディポネクチンによる **LPS** 結合は **lipid A** 構造以外を介していることが示唆された。
- (4) 一方、**O** 抗原を持つ病原性 **smooth LPS** に対して検討すると **LPS** 結合能は減弱したことから、**O** 抗原の分子構造が本分子の **LPS** 結合能に影響を与えることが示唆された。
- (5) 加熱処理及び還元処理に対するアディポネクチンの感受性の検討から、大腸菌発現系で調整したアディポネクチンは主に単量体で存在していることが示唆された。
- (6) アディポネクチンの **LPS** 認識モチーフについて検討を加えたところ、**C** 末端の球状ドメインのみを発現させた場合においても **LPS** 結合が認められ、本構造中に **LPS** 認識モチーフが存在することが示唆された。
- (7) **CHO-DG44** 細胞にアディポネクチン遺

伝子をクローニングした pCAGGS1 ベクターを導入し、本分子を安定高発現する細胞株を樹立した。本細胞より分泌されるアディポネクチンは生体内での存在様式をよく反映し、3 量体、6 量体、それ以上の高次構造多量体を形成した。現在、免疫原、および機能解析を行うための材料を確保するために精製を試みている。

- (8) CHO-DG44 細胞の順化培地を用いた予備実験では、病原性 smooth LPS の TLR4/MD-2/CD14 発現細胞への結合と LPS による NF $\kappa$ B の活性化には顕著な影響は見られなかった。
- (9) 大腸菌リコンビナントを免疫原としてウサギポリクローナル抗体を作製し、本抗体による抑制機能について検討中である。

#### 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 4 件)

1. Hiroshi Yoshitake, Hiroki Tsukamoto, Mayuko Maruyama-Fukushima, Kenji Takamori, Hideoki Ogawa, Yoshihiko Araki : TEX101, a Germ Cell-Marker Glycoprotein, is Associated with Lymphocyte Antigen 6 Complex Locus k within the Mouse Testis Biochem. Biophys. Res. Commun. 372(2):277-282,2008. 査読あり
2. Bahrun U, Kimoto M, Tsukamoto H, Tsuneyoshi N, Kohara J, Fukudome K: Preparation and Characterization of Agonistic Monoclonal Antibodies Against Toll-Like Receptor 4-MD-2 Complex. Hybridoma 26:393-399, 2007 査読あり
3. Tsukamoto H, Takizawa T, Takamori K, Ogawa H, Araki Y: Genomic organization and structure of the 5'-flanking region of the TEX101 gene: Alternative promoter usage and splicing generate transcript variants with distinct 5'-untranslated region. Mol Reprod Dev.74(2):154-162, 2007. 査読あり
4. Tsukamoto H, Fukudome K, Kohara J, Nakatake H, Kimoto M: Preparation of recombinant murine tumor necrosis factor-alpha in Escherichia coli: a rapid method to remove tags from fusion proteins by thrombin-cleavage and ion-exchange chromatography. Protein Expr Purif. 56(1):138-44, 2007. 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

1. Tsukamoto H, Kimoto M, Tsuneyoshi N, Fukudome K.: 機能抑制型ヒト TLR4 抗体 Anti-human TLR4 monoclonal antibody which specifically prevents the LPS responses independently of Fc receptors. 第 38 回日本免疫学会総会 2008,12,2. 日本免疫学会総会誌. 38:169.
2. Fukudome K, Kohara J, Tsukamoto H, Tsuneyoshi N, Kimoto M: Adjuvant effects of agonistic anti-TLR4 monoclonal antibody in antibody induction 第 37 回日本免疫学会総会 2007,11,22. 日本免疫学会総会誌 37:227.
3. Tsukamoto H, Kohara J, Tsuneyoshi N, Kimoto M, Fukudome K: Oligomerization-independent TLR4-signaling in CD14-negative cells. 第 37 回日本免疫学会総会 2007,11,21. 日本免疫学会総会誌 37:163.

[図書] (計 0 件)

[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

塚本 宏樹 (TSUKAMOTO HIROKI)  
佐賀大学・医学部・助教  
研究者番号 : 7 0 4 2 3 6 0 5

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：