

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03487

研究課題名(和文) 結核菌によるミトコンドリア障害と免疫抑制の分子基盤と治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism of mitochondrial damage and immune suppression induced by Mycobacterium tuberculosis

研究代表者

松崎 吾朗 (Matsuzaki, Goro)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授

研究者番号：30229455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：結核菌の病原因子Zmp1は、インターロイキン(IL)-1産生を抑制してファゴソーム成熟を停止させる。その分子機構解明のため、私達はZmp1の標的分子を検索しミトコンドリア呼吸鎖複合体Iの構成分子GRIM-19を同定した。GRIM-19欠損マクロファージでは、NLRP3インフラマソーム活性化刺激に対するIL-1産生が低下し、NLRP3インフラマソーム活性化を誘導するミトコンドリア活性酸素種(mROS)の生成も消失していた。これらの結果は、Zmp1がGRIM-19への結合を介してmROS生成を抑制し、NLRP3インフラマソーム活性化を阻害することを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

結核は、いまだに人類の健康に対する大きな障害であり、新たな免疫療法とワクチンの開発が待たれている。しかし、これまで行われてきた免疫療法の試みは大きな成果を上げておらず、これは結核菌が産生する病原因子が積極的に免疫系による感染マクロファージの活性化を抑制しているのがその一因であると私達は考えている。この点を解決するためには、結核菌が免疫を抑制する分子機構を解明し、それに対して阻害作用を有する分子標的薬を開発することが重要と考えている。今回の研究で結核菌Zmp1の宿主標的分子を同定したことは、Zmp1分子標的薬の設計とスクリーニングへの第1歩として、社会的意義があるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mycobacterium tuberculosis (Mtb) infects macrophages and establishes intracellular parasitism. A mycobacterial virulence factor Zmp1 is known to suppress interleukin (IL)-1 production resulting in phagosome maturation arrest. To clarify the molecular mechanism of Zmp1-mediated IL-1b suppression, we screened the host target molecule of Zmp1 and identified GRIM-19, a subunit of the mitochondrial respiratory chain complex. GRIM-19 knockout macrophages failed to produce IL-1 by mycobacterial infection as well as in response to NLRP3 inflammasome-activating stimuli such as extracellular ATP. We also found that GRIM-19 is required for the generation of mitochondrial reactive oxygen species (mROS) that was known to induce NLRP3 inflammasome activation. All the results suggest that Zmp1 suppresses NLRP3 inflammasome activation via binding to GRIM-19 and suppressing mROS generation.

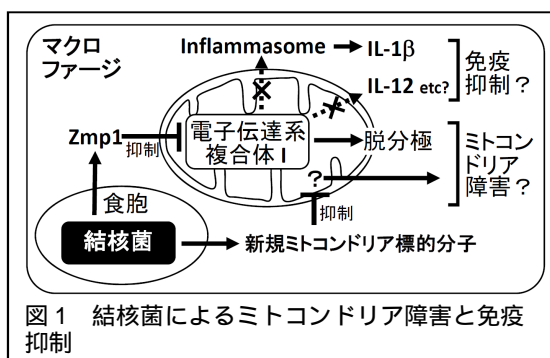
研究分野：細菌学

キーワード：結核 病原因子 マクロファージ インフラマソーム

1. 研究開始当初の背景

結核は、世界中で蔓延する重大な感染症であり、薬剤耐性菌が増加する現在、新規抗結核薬の開発とともに、耐性菌にも有効な免疫療法の開発が重要な課題である。一方、結核菌は免疫による排除を巧妙に回避する病原性を有し、免疫応答のみでは菌の完全な排除は困難であることを申請者らは結核モデルの解析で体験してきた。これらの知見から、結核に対して有効な免疫療法の開発には結核菌の病原因子の阻害が必須であると考えに至った。

上記の観点から、感染防御に重要なサイトカインIL-1 β の産生を抑制する結核菌の病原因子、Zmp1 (Master, Cell Host Microbe 2008) を対象に選び、その作用機序の解明を目指して研究を開始した。その結果、Yeast Two-hybrid 法により Zmp1 の標的分子としてミトコンドリア電子伝達系 (ETC) 複合体 I の構成分子、GRIM19 を同定するとともに、電子伝達系により形成されるミトコンドリア膜電位が Zmp1 の発現により消失 (脱分極) したことから、Zmp1 が宿主ミトコンドリア障害を起こすと考えられた (図1)。また、IL-1 β 産生制御へのミトコンドリアの関与が報告されているため、Zmp1 によるミトコンドリア障害が IL-1 β 産生抑制の原因と推定された。さらに、GRIM19 発現が低下したマウスでは、炎症性サイトカイン IL-1 β と IL-12 の発現低下が報告されており (Chen, J Biol Chem 2012)、Zmp1 と GRIM19 の結合が IL-1 β 以外の免疫応答にも影響すると推定された。



2. 研究の目的

本研究は、結核菌による免疫抑制の作用機序を明らかにし、その阻害による新規抗結核免疫療法の開発の可能性を検討することを目的とした。特に、結核菌の産生する病原因子 Zmp1 と研究代表者が見出した Zmp1 の標的分子である GRIM19 の NLRP3 インフラマソーム活性化と IL-1 β 産生における役割の解明に焦点を当てて本研究は計画された。

3. 研究の方法

- (1) *Mycobacterium tuberculosis* var. BCG: 本研究では、結核菌の弱毒ワクチン株である BCG 株を用いて研究を行った。野生型 BCG に対して Recombineering 法により Zmp1 遺伝子を欠損させた Δ Zmp1 株、また Δ Zmp1 株に FLAG 標識 Zmp1 を結核菌で発現させるシャトルベクターを導入した相補株 comp Δ Zmp1 を作製した。
- (2) In vitro 感染: マウス骨髄細胞から M-CSF で誘導した骨髄由来マクロファージ (BMDM)、あるいは J774.1 マウスマクロファージ細胞株に、MOI5 ~ 10 で BCG を感染させ、16 時間培養後の IL-1 β 産生を ELISA 法で検討した。
- (3) 細胞内 NLRP3 インフラマソーム活性化: J774.1 細胞の LPS 刺激で Pro-IL-1 β 産生を誘導し、さらに細胞外 ATP あるいは Nigericin で刺激することにより NLRP3 インフラマソームを形成させ、Pro-IL-1 β から成熟 IL-1 β への転換を誘導した。その過程で認められる Pro-IL-1 β と caspase-1 の切断を Western blotting で、また成熟 IL-1 β の産生を ELISA で検討した。
- (4) GRIM-19 欠損 J774.1 細胞の作成: CRISPR/Cas9 を用いて GRIM-19 欠損 J774.1 細胞を作製した。
- (5) ミトコンドリア機能の解析: J774.1 細胞のミトコンドリア機能について、ミトコンドリア活性酸素種 (mitROS) の産生を MitoSOX 染色とフローサイトメトリーにて、ETC 複合体 I の活性を Complex I Enzyme Activity Assay Kit にて解析した。また、ミトコンドリア膜電位を JC-1 染色

とフローサイトメトリー (J774.1 細胞) あるいは蛍光顕微鏡観察 (HEK293T 細胞) で検討した。

4. 研究成果

(1) BCG 感染マクロファージの IL-1 β 産生: 野生型 BCG 感染した BMDM では IL-1 β 産生はほとんど検出されなかったが、 Δ Zmp1 BCG 感染 BMDM では産生が認められた。一方、comp Δ Zmp1 BCG の感染では、IL-1 β 産生が消失した。以上の結果から、先行研究で示された Zmp1 による IL-1 β 産生抑制が確認された。さらに、 Δ Zmp1 BCG 感染で誘導される IL-1 β は、NLRP3 インフラマソーム阻害剤 MCC950 で抑制されたことから、BCG は NLRP3 インフラマソームを活性化するポテンシャルを有しているが、それが Zmp1 により抑制されていることが示唆された (図 2)。

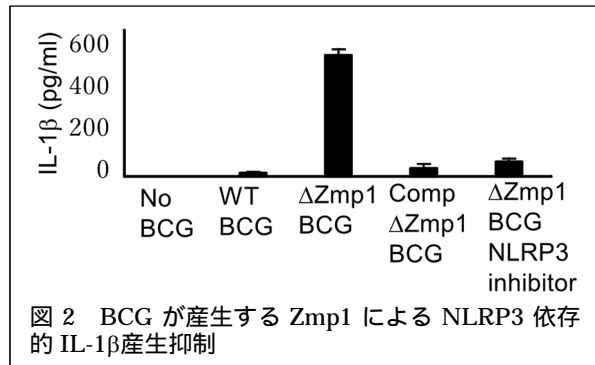


図 2 BCG が産生する Zmp1 による NLRP3 依存の IL-1 β 産生抑制

(2) Zmp1 の標的分子、GRIM19 の IL-1 β 産生における役割: 私達は、yeast-two-hybrid screening 法により Zmp1 に結合する宿主分子として GRIM-19 を同定した。この GRIM19 の IL-1 β 産生誘導における重要性を検討するため、CRISPR/Cas9 法により GRIM19 を欠損する J774.1 細胞を作製した。この細胞に NLRP3 インフラマソーム活性化刺激を与えても IL-1 β 産生がほとんど認められないことから、GRIM19 が NLRP3 インフラマソーム活性化に必須であることが判明した。

(3) GRIM19 が関与する NLRP3 活性化経路の同定: J774.1 細胞を LPS+ATP 又は Nigericin で刺激する NLRP3 インフラマソーム活性化系する実験系で解析したところ、野生型 J774.1 細胞では NLRP3 インフラマソームが活性化された結果、Caspase-1 の切断による活性化が起こったことが、培養上清中の Caspase-1 P10 断片の存在で示された。これに一致して、活性化 Caspase-1 による Pro-IL-1 β の切断で生じる成熟 IL-1 β も培養上清中に認められた (図 3)。これに対して、GRIM19 欠損 J774.1 では、Caspase-1 と Pro-IL-1 β の切断が認められず (図 3)、またインフラマソームの指標となる ASC spec 形成も認められなかった。従って、NLRP3 インフラマソームの活性化には GRIM19 が必須と考えられた。

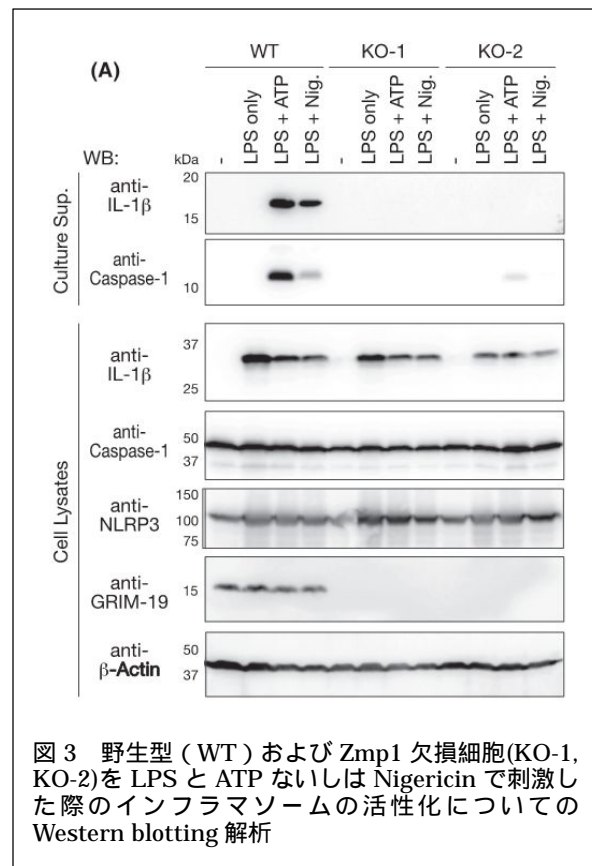


図 3 野生型 (WT) および Zmp1 欠損細胞 (KO-1, KO-2) を LPS と ATP ないしは Nigericin で刺激した際のインフラマソームの活性化についての Western blotting 解析

(4) ミトコンドリア機能に対する GRIM19 の欠損の影響: GRIM19 が ETC 複合体 I の構成要素であることから、GRIM19 欠損 J774.1 細胞ではミトコンドリア機能の低下が推定された。その点を確認するための実験を行った。その結果、GRIM19 欠損 J774.1 細胞で複合体 I の酵素活性が低下していたことは当然として、NLRP3 インフラマソームの活性化への関与が報告されている mitROS 産生も低下していた。また、ミトコンドリア膜電位の低下も認められ、同様の低下が Zmp1 遺伝子を導入した HEK293 細胞でも認められた。

以上の結果より、結核菌 Zmp1 が標的とする宿主分子 GRIM19 は、mitROS 産生を介して NLRP3 インフラマソームと Caspase-1 の活性化を誘導し、その結果、Pro-IL-1 β の切断と成熟 IL-1 β の細胞外放出に関与することが明らかとなった。また、Zmp1 の GRIM19 への結合が、NLRP3 インフラマソームの活性化における GRIM19 の機能を抑制するものと推定された。この Zmp1 の機能を抑制することにより結核菌感染マクロファージの IL-1 β 産生を誘導し、それにより感染マクロファージの抗結核菌活性を増強する可能性が考えられた。今後は、この視点からも研究を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kurane Tomomi, Matsunaga Tetsuro, Ida Tomoaki, Sawada Kazuko, Nishimura Akira, Fukui Masayuki, Umemura Masayuki, Nakayama Masaaki, Ohara Naoya, Matsumoto Sohkiichi, Akaike Takaaki, Matsuzaki Goro, Takaesu Giichi	4. 巻 36
2. 論文標題 GRIM 19 is a target of mycobacterial Zn ²⁺ metalloprotease 1 and indispensable for NLRP3 inflammasome activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22096
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202101074RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藏根友美、高江洲義一、松永哲郎、井田智章、澤田和子、梅村正幸、赤池孝章、松崎吾朗
2. 発表標題 結核菌エフェクター蛋白質によるIL-1 産生阻害の分子機序
3. 学会等名 第32回日本生体防御学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高江洲義一、Nguen Huong Minh、梅村正幸、松崎吾朗
2. 発表標題 結核菌のエフェクター蛋白質Zmp1と会合する宿主E3ユビキチンリガーゼの機能解析
3. 学会等名 第32回日本生体防御学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅村正幸、松本宗吉、藏根友美、高江洲義一、松崎吾朗
2. 発表標題 結核菌由来病原因子Zmp1欠損の感染防御への影響
3. 学会等名 第32回日本生体防御学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藏根友美、松永哲郎、井田智章、澤田和子、梅村正幸、赤池孝章、松崎吾朗、高江洲義一
2. 発表標題 結核菌エフェクター蛋白質によるIL-1 産生阻害の分子機序
3. 学会等名 九州微生物研究フォーラム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomomi Kurane, Masayuki Umemura, Masaaki Nakayama, Naoya Ohara, Goro Matsuzaki, Giichi Takaesu
2. 発表標題 GRIM-19 is a target of mycobacterial Zn ²⁺ metalloprotease 1 and indispensable for NLRP3 inflammasome activation
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masayuki Umemura, Sohkiichi Matsumoto, Tomomi Kurane, Giichi Takaesu, Goro Matsuzaki
2. 発表標題 The effect of the deletion of the mycobacterial virulence factor Zmp1 on protective immunity
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高江洲義一、藏根友美、澤田和子、西村明、松永哲郎、井田智章、梅村正幸、赤池孝章、松崎吾朗。
2. 発表標題 結核菌由来のエフェクタータンパク質によるIL-1 産生阻害の分子機序
3. 学会等名 第31回日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松崎吾朗、藏根友美、梅村正幸、大原直也、高江洲義一
2. 発表標題 マイコバクテリアの産生する病原因子Zinc Metalloprotease 1 (Zmp1) による炎症性サイトカインIL-1 産生抑制の分子機構
3. 学会等名 第33回日本比較免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高江洲義一、Nguen Huong Minh、梅村正幸、松崎吾朗
2. 発表標題 結核菌のエフェクタータンパク質Zmp1と会合する宿主E3ユビキチンリガーゼの機能解析
3. 学会等名 第33回日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Giichi Takaesu, Tomomi Kurane, Masayuki Umemura, Goro Matsuzaki.
2. 発表標題 A novel role of GRIM-19 in cytokine production in macrophages upon mycobacterial infection
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masayuki Umemura, Masayori Yoshisato, Ryusei Shimotada, Julia Toguchi, Giichi Takaesu, Goro Matsuzaki.
2. 発表標題 Effect of Zmp1-deficient BCG vaccination in protective immunity to pulmonary tuberculosis
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松崎吾朗、高江洲義一.
2. 発表標題 シンポジウム 1 生体防御研究の現状と展望：S1-2 結核菌Zmp1によるIL-1 産生抑制の分子機構
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梅村正幸、渡久地ジュリア、吉里真誼、下忠義継、高江洲義一、松崎吾朗.
2. 発表標題 Zinc metalloprotease (Zmp) 1欠損BCGの追加接種による肺炎誘導のメカニズム
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高江洲義一、梅村正幸、松崎吾朗.
2. 発表標題 マイコバクテリア感染によって誘導されるサイトカイン産生におけるGrim19の新規役割
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>熱帯生物圏研究センターのホームページでの分子感染防御学分野へのリンク https://tbc.skr.u-ryukyu.ac.jp/%e5%88%86%e5%ad%90%e6%84%9f%e6%9f%93%e9%98%b2%e5%be%a1%e5%ad%a6%e5%88%86%e9%87%8e/ 琉球大学熱帯生物圏研究センター分子感染防御学分野の独自ウェブサイト https://hostdefense.skr.u-ryukyu.ac.jp/about/ 熱帯生物圏研究センターのホームページでの分子感染防御学分野へのリンク https://tbc.skr.u-ryukyu.ac.jp/%e5%88%86%e5%ad%90%e6%84%9f%e6%9f%93%e9%98%b2%e5%be%a1%e5%ad%a6%e5%88%86%e9%87%8e/ 琉球大学熱帯生物圏研究センター分子感染防御学分野の独自ウェブサイト https://hostdefense.skr.u-ryukyu.ac.jp/about/</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松永 哲郎 (Matsunaga Tetsuro) (00723206)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	
研究分担者	松本 壮吉 (Matsumoto Sokichi) (30244073)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	高江洲 義一 (Takaesu Giichi) (60403995)	琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授 (18001)	
研究分担者	梅村 正幸 (Umemura Masayuki) (90359985)	琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授 (18001)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
インド	University of Hyderabad		