

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月20日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590501

研究課題名（和文）エンドトキシンバイオセンサーの開発に関する研究

研究課題名（英文）Trial of developing an endotoxin bio-sensor

研究代表者

室井 正志（MUROI MASASHI）

武蔵野大学・薬学研究所・准教授

研究者番号：70311389

研究成果の概要（和文）：Toll-like receptor (TLR)/MD-2 分子がエンドトキシンを認識した際に 2 量体を形成する性質を利用してエンドトキシンの検出を行うバイオセンサーの開発を試みた。TLR4 の N 末または C 末に luciferase の N 末領域 (Nluc) もしくは C 末領域 (Cluc) を結合させた蛋白を一過性に発現させたが、2 量体化による Nluc と Cluc の近接で生じる luciferase 活性の再興は観察できなかった。恒常的発現系での検討が必要と思われる。

研究成果の概要（英文）：Development of an endotoxin bio-sensor for detecting dimerization of Toll-like receptor (TLR)/MD-2 complex was attempted. N-terminal (Nluc) or C-terminal (Cluc) half of luciferase was fused to either N-terminal or C-terminal of TLR4. Restoration of luciferase activity, which occurs when Nluc and Cluc come in close proximity, was not observed in response to endotoxin in cells transiently expressing these fusion proteins. Further analysis in a stable expression system may be required.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：エンドトキシン、Toll 様受容体、マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

エンドトキシンはグラム陰性細菌の外膜成分であり、これに起因する重症敗血症の死亡率は 25-30%、敗血症ショックでは 40-70%に達し、米国内だけでもこれによる死者が年間に数十万人にも達すると推定されている。このような強力な毒性と、除去することの困難さから、医薬品分野では注射剤などへの混入は厳しく監視されているし、臨床分野に

おいては感染症における起因菌の推定、エンドトキシン血症の診断などの目的で血中のエンドトキシンレベルをモニターすることが求められている。現在、エンドトキシンの検出にはカプトガニの血液凝固反応を利用したリムルテストが用いられているが、この方法は血液製剤や血中のエンドトキシンレベルは測定できないという欠点がある。これを克服するため、最近明らかになった生体における自然免疫応答を利用し

たエンドトキシンの検出が注目されている。

ヒトのマクロファージ細胞等では TLR/MD-2 複合体蛋白がエンドトキシンを認識し、このシグナルを細胞内へ伝達して NF- κ B などの転写因子を活性化する。申請者等はこれを利用して、通常エンドトキシンに応答しない細胞に TLR/MD-2 遺伝子および転写因子 NF- κ B の活性化によりルシフェラーゼを合成する遺伝子の全てを安定的に導入し、エンドトキシンの応答により合成されてくるルシフェラーゼの活性を測定することによりエンドトキシンの検出を行う細胞株を開発し、血中のエンドトキシンレベルが測定可能であることを示してきた。同様にルシフェラーゼの代わりにアルカリフォスファターゼを用いた方法も開発されている。しかし、これらの方法は NF- κ B の活性化を指標とするためエンドトキシンに特異的なものではなく、TNF- α などのエンドトキシン以外の物質の混入により偽陽性を生じるといった本質的な欠点を持っている。さらに、活性発現にはルシフェラーゼなどの蛋白合成が必要となるため、検出までに長時間（最低でも 6 時間程度）要する点も測定法として問題となっている。

2. 研究の目的

TLR/MD-2 分子はエンドトキシン刺激により 2 量体を形成し、それが引き金となって細胞の活性化が起こることが明らかにされている。従って、この 2 量体形成を測定することでエンドトキシン活性の測定が可能となる。本研究では、その原理を利用してエンドトキシンの測定系の開発を目指すものであるが、さらに技術的には、この 2 量体形成の測定にスプリットルシフェラーゼ技術を応用する。すなわち、ルシフェラーゼ蛋白は N 末と C 末の 2 分子に分かれていても、両分子が近傍に接近することでルシフェラーゼ活性を示すことが知られている。申請者はすでに、自発的に 2 量体を形成する CD4 を用いて、それに N 末ルシフェラーゼおよび C 末ルシフェラーゼを結合したキメラ遺伝子を作成し、これを細胞で発現させることによりルシフェラーゼ活性を検出することに成功している。本研究では同様に、TLR4 分子にこの N 末と C 末のルシフェラーゼをそれぞれ結合させたキメラ遺伝子を作成し、エンドトキシンによりキメラ TLR4 が 2 量体を形成した際に生じるルシフェラーゼ活性を測定することによって、エンドトキシンを検出する系の作成を試みる。

3. 研究の方法

(1) 材料

ヒト胎児腎由来細胞株 HEK293 細胞を用

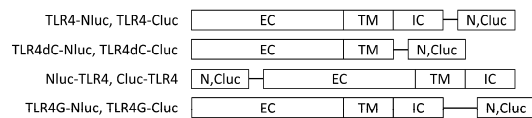
いた。

(2) plasmid の構築

全長 TLR4 の C 末端に luciferase の N 末 (TLR4-Nluc) または C 末 (TLR4-Cluc) 領域を結合させた plasmid、TLR4 の細胞内領域を欠失したものに luciferase の N 末 (TLR4dC-Nluc) または C 末 (TLR4dC-Cluc) 領域を結合させた plasmid、全長 TLR4 の N 末端に luciferase の N 末 (Nluc-TLR4) または C 末 (Cluc-TLR4) 領域を結合させた plasmid さらには TLR4 の細胞内領域を欠失したものに 22-30 アミノ酸リンカー配列を介して luciferase の N 末 (TLR4G-Nluc) または C 末 (TLR4G-Cluc) 領域を結合させた plasmid を作成した (図 1)。

(3) luciferase 活性の測定

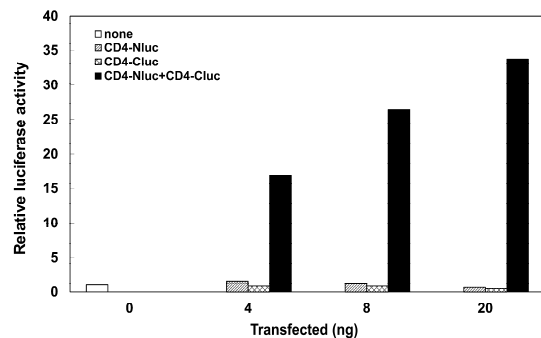
細胞透過性の luciferase 基質を加えた後、エンドトキシンで刺激し、luciferase 活性を時間を追って測定した。



4. 研究成果

(1) 分割 luciferase 法の検証

まず、N 末と C 末に分割した luciferase が近接することにより luciferase 活性が再興するかどうかを自発的に 2 量体を形成することが知られている CD4 の C 末に luciferase の N 末 (CD4-Nluc) または C 末 (CD4-Cluc) 領域を結合させたキメラ遺伝子を作成し、これらそれぞれ単独もしくは両者同時に細胞に発現させた場合の luciferase 活性を測定して、CD4-Nluc または CD4-Cluc それぞれ単独では luciferase 活性の増大は観察されなかったが、両者を同時に発現させると発現量に依存して luciferase 活性の増大が観察された (図 2) ことから、分割 luciferase 法は 2 量体形成をモニターするのに有用であることを確認した。



(2) TLR4-luciferase キメラ蛋白

TLR4 の 2 量体形成をモニターするため、まず、全長 TLR4 の C 末端にフレキシブルな 10 残基のアミノ酸を介して luciferase の N 末側領域または C 末側領域を結合させた遺伝子を作成した。これを CD14 と MD-2 とともに HEK293 細胞に一過性に発現させ、LPS で刺激したが、10 分後までに luciferase 活性の上昇は観察されなかった。

全長 TLR4 を用いた場合、TLR4 の 2 量体形成によりアダプター分子である MyD88 や TRIF といった分子が TLR4 の細胞内領域に結合するため、luciferase の N 末側領域と C 末側領域が近接できない可能性を考え、TLR4 の細胞内を欠失したものに luciferase の N 末側領域または C 末側領域を結合させた遺伝子を作成した。これを CD14 と MD-2 とともに HEK293 細胞に一過性に発現させ、LPS で刺激したが、10 分後までに luciferase 活性の上昇は観察されなかった。

次に、全長 TLR4 の N 末端にフレキシブルな 10 残基のアミノ酸を介して luciferase の N 末側領域または C 末側領域を結合させた遺伝子を作成した。これを CD14 と MD-2 とともに HEK293 細胞に一過性に発現させ、LPS で刺激したが、これでも 10 分後までに luciferase 活性の上昇は観察されなかった。

TLR4 と luciferase の間にはフレキシブルな 10 残基のアミノ酸からなるリンカー配列を挿入し、luciferase の N 末側領域と C 末側領域の可動性を高めて両分子が活性を有したコンフォメーションを取れるようにしているが、10 残基では短すぎる可能性を考え、全長 TLR4 の C 末端にフレキシブルなアミノ酸 22-30 残基を挿入して luciferase の N 末側領域または C 末側領域を結合させた遺伝子を作成した。これを CD14 と MD-2 とともに HEK293 細胞に一過性に発現させ、LPS で刺激したが、10 分後までに luciferase 活性の上昇は観察されなかった。

以上、全ての試みにおいて luciferase 活性の上昇が観察されなかったことは、TLR4 の 2 量体形成が一過性であり、luciferase の N 末側領域と C 末側領域が活性を有したコンフォメーションを取れるようになるに至らないか、もしくは、一過性発現の系では全ての細胞でこれらのキメラ蛋白を発現しているわけではないため、十分なシグナル強度が得られていない可能性が考えられる。今後は一過性発現ではなく、恒常的発現の系での検討が必要であると思われる。

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 8 件)

- ① Muroi M., Tanamoto K.: IRAK-1-mediated negative regulation of Toll-like receptor signaling through proteasome-dependent downregulation of TRAF6. *Biochim. Biophys. Acta*, 査読有、**1823**, 255-263 (2012)
- ② Muroi M., Shima K., Nakagawa Y., and Tanamoto K.: Application of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for discrimination of Escherichia strains possessing highly conserved ribosomal RNA gene sequences. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有、**34**, 430-432 (2011)
- ③ Ohnishi T., Muroi M., Tanamoto K.: Inhibitory effects of soluble MD-2 and soluble CD14 on bacterial growth. *Microbiol. Immunol.*, 査読有、**54**, 74-80 (2010)
- ④ Sugiyama K., Muroi M., Tanamoto K., Nishijima M., Sugita-Konishi Y.: Deoxynivalenol and nivalenol inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by mouse macrophage cells. *Toxicol Lett.*, 査読有、**192**, 150-4 (2010)
- ⑤ Yoshida, T., Yoshioka, Y., Fujimura, M., Kayamuro, H., Yamashita, K., Higashisaka, K., Nakanishi, R., Morishita, Y., Nabeshi, H., Yamashita, T., Muroi M., Tanamoto, K., Nagano, K., Abe, Y., Kamada, H., Kawai, Y., Mayumi, T., Itoh, N., Yoshikawa, T., Tsunoda, S., Tsutsumi, Y.: Urban aerosols induce pro-inflammatory cytokine production in macrophages and cause airway inflammation in vivo. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有、**33**, 780-783 (2010)
- ⑥ Tanamoto K., Muroi M., Igarashi M., Shima K., Nakagawa Y., Fujiwake H.: 日本薬局方指定菌株の特性と保存管理法に関する研究 III, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス、査読無、**41**, 890-894 (2010)
- ⑦ Shioiri T., Muroi M., Hatao F., Nishida M., Ogawa T., Mimura Y., Seto Y., Kaminishi M., Tanamoto K.: Caspase-3 is activated and rapidly released from human umbilical vein endothelial cells in response to lipopolysaccharide. *Biochim. Biophys. Acta*, 査読有、**1792**, 1011-1018 (2009)
- ⑧ Tanamoto K., Muroi M., Nakagawa Y., Shima K., Ichimura K.: 日本薬局方指定菌株の特性と保存管理法に関する研究、*Pharm. Regul. Sci.*, 査読無、**40**, 520-524 (2009)

[学会発表] (計 15 件)

- ① 林原 紀明、田村 直樹、渡辺 恵、室井 正志、畑尾史彦 瀬戸泰之 棚元

- 憲一：ミクログリア細胞における Toll-like receptor の発現及び炎症性応答、第 85 回日本細菌学会総会 (2012, 3 月 29 日、長崎、長崎ブリックホール)
- ② 北島孝明, 室井正志, 山下直美, 棚元憲一：ダニアレルゲンの自然免疫応答に及ぼす影響、第 85 回日本細菌学会総会 (2012, 3 月 27 日、長崎、長崎ブリックホール)
- ③ Sugiyama, K., Kinoshita, M., Minai, Y., Muroi, M., Tanamoto, K. and Sugita-Konishi, Y: Trichothecene mycotoxins inhibit MyD88-independent pathways of Toll-like receptors, 9th Joint Meeting of ICS-ISICR (2011, 10 月 10 日、イタリア、Monash University Prato Centre)
- ④ Masashi Muroi and Ken-ichi Tanamoto: IRAK-1-mediated negative regulation of Toll-like receptor signaling. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (2011, 9 月 8 日、札幌、札幌コンベンションセンター)
- ⑤ 杉浦 友香、廣野 泰亮、室井 正志、棚元 憲一：光散乱エンドトキシン測定法分析法バリデーション、日本防菌防黴学会第 38 回年次大会 (2011, 8 月 31 日、大阪、千里ライフサイエンスセンター)
- ⑥ 室井 正志、島 圭介、中川 恭好、棚元 憲一：マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法による遺伝的近縁菌株の識別解析、日本防菌防黴学会第 38 回年次大会 (2011, 8 月 31 日、大阪、千里ライフサイエンスセンター)
- ⑦ 室井 正志、島 圭介、中川 恭好、棚元 憲一：マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法による遺伝的近縁菌株の識別解析、日本薬学会第 131 年会 (2011, 3 月 30 日、静岡、ツインメッセ静岡)
- ⑧ 杉浦 友香、廣野 泰亮、室井 正志、棚元 憲一：光散乱エンドトキシン測定法における攪拌回転速度の検討、日本薬学会第 131 年会 (2011, 3 月 30 日、静岡、グランシップ)
- ⑨ 室井 正志、棚元 憲一：IRAK-1 による TRAF6 の分解を介した TLR シグナリングの抑制的調節、第 16 回日本エンドトキシン・自然免疫研究会 (2010, 11 月 13 日、奈良、かしはら万葉ホール)
- ⑩ Masashi Muroi and Ken-ichi Tanamoto: Stimulation of Toll-like receptors leads to proteasome-dependent downregulation of TRAF6 through interaction with IRAK-1. Annual Meeting of The Society for Leukocyte Biology & The International Endotoxin and Innate Immunity Society (2010, 10 月 9 日、バンクーバー、Fairmont

Hotel)

- ⑪ 室井正志、棚元憲一：IRAK-1 により誘導される TRAF6 の proteasome 依存性の分解、日本薬学会第 130 年会 (2010, 3 月 30 日、岡山、桃太郎アリーナ)
- ⑫ 室井正志、棚元憲一：TRAF6 は IRAK-1 と相互作用することにより proteasome 依存性に分解される、第 83 回日本細菌学会総会 (2010, 3 月 29 日、横浜、パシフィコ横浜)
- ⑬ 杉山圭一、室井正志、棚元憲一、小西良子：TLR シグナルに対する deoxynivalenol の抑制機構、第 82 回日本生化学会大会 (2009, 10 月 24 日、神戸、神戸国際展示場)
- ⑭ 森重智弘、吉岡靖雄、田辺綾、堤康央、室井正志、棚元憲一、河合裕一、眞弓忠範、向洋平、岡田直貴、中川晋作：非結晶性ナノシリカの自然免疫抑制作用に関する検討、第 36 回日本トキシコロジー学会 (2009, 7 月 17 日、盛岡、アイーナ)
- ⑮ 水谷紀子、室井正志、五十嵐ありさ、菅野慎二、鎌田洋一、小西良子、棚元憲一：非病原性細菌による感染症に対する内分泌かく乱候補物質の影響評価、第 16 回日本免疫毒性学会学術大会 (2009, 8 月 7 日、旭川、市民文化会館)

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 室井正志、棚元憲一、医学図書出版：IRAK-1 による TRAF6 の分解を介した TLR シグナリングの抑制的調節、エンドトキシン・自然免疫研究 14、pp7-10 (2011)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

室井 正志 (MUROI MASASHI)
武蔵野大学・薬学研究所・准教授
研究者番号：70311389

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし