

## 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 25 年 4 月 11 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590396

研究課題名（和文） コレラ菌による NLRP3 活性化新規経路の解析

研究課題名（英文） Analysis of new NLRP3 activation passway by *Vibrio cholerae*

研究代表者

仲宗根 昇 (NAKASONE NOBORU)

琉球大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80175497

研究成果の概要（和文）：本研究は、アダプター蛋白である MyD88/Trif 非依存性に NLRP3 を活性化するコレラ菌の因子を同定し、活性化経路を明らかにすることを目的とした。2010 年度～2012 年度までの間に、コレラ菌のいくつかの因子を候補としてあげ、その中で溶血毒素である HlyA が有力な候補であることを明らかにし、またこの活性化機構は他の菌の膜穴形成毒素・溶血毒素では代用できない特異性のあるものであることを明らかにした。しかしながら、これをさらに裏付ける十分な証拠を得ることができなかった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to isolate a MyD88/Trif independent NLRP3 activator from *Vibrio cholerae* O1 and clarified the signaling passway. We used several factors of *V.cholerae* for the purpose, and we found that the hemolysin (HlyA) is most possible factor in *V. cholerae*. We also found that other bacterial hemolysins did not show same phenomenon. However, we could not obtain the certificate evidences.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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、炎症反応

## 1. 研究開始当初の背景

生体は外部から病原体や異物が体内に侵入すると、細胞表面にある受容体（Toll Like Receptor, TLR）を介してその侵入を感知し、その情報をさらに細胞内に伝達して伝達シグナル特有の応答複合体を形成し、最終的に炎症性サイトカインを産生し外部刺激に対し応答する。NLR(NOD-like receptor)蛋白の

1 つである NLRP3 の応答複合体の 1 つであり、通常 MyD88 や Trif といったアダプターを介してカスパーゼ 1 を活性化し、炎症性サイトカインを産生することが知られている。ヒトに下痢を起こすコレラ菌の培養上清も同様に作用し、NLRP3 欠損マウス由来のマクロファージではカスパーゼ 1 の活性は認められない。ところが同じシグナル伝達因子

の仲間である MyD88 と Trif の両方を欠損したマクロファージではカスパーゼ 1 の活性化及び IL-1 $\beta$  の産生がみられた。これは TLR $\rightarrow$ MyD88/Trif 非依存性に NLRP3 が活性化されたことを意味し、同じピブリオ属であるピブリオ・バルニフィカスでは認められなかった。このことはコレラ菌培養上清にはこれまでに報告されていない NLRP3 活性化物質および活性化経路があることを示唆しており、コレラ菌特有の活性であると考えられた。

これとあわせて世界におけるコレラ流行の状況を見ると新しいなぞが浮かび上がる。2010 年 ハイチにおける大地震で生活環境の破壊とともにコレラの大流行がおり、3 万人以上のコレラ患者が発生し 3000 人以上の死者を出した。このときの致死率はこれまで知られていたコレラの致死率よりかなり高く、コレラ毒素以外の別の因子が炎症に関わっていることが推測された。また、ワクチンに関し、コレラワクチンにおいて生菌がより強力に効果的であることが知られていたが、下痢の主原因であるコレラ毒素を遺伝学的に除いても、下痢や発熱がみられ、コレラ毒素以外の因子の存在が疑われていた。

## 2. 研究の目的

上記のようなこれまで知られていないコレラ菌のもつ性状が報告されている。我々が偶然に見つけた MyD88/Trif 非依存性に NLRP3 を活性化する現象はこれまで報告されておらず、この現象の解明が上記の疑問に答えを出す可能性を秘めている。そこで、MyD88/Trif 非依存性 NLRP3 活性化因子の存在を証明しかつ同定すること、さらにその因子が作用する宿主側の標的を明らかにし、NLRP3 活性化機構を解明することでコレラ菌による病態変化の機構を明らかにすることを目的とした。

さらに余力があれば、その因子がコレラの症状とどの様な関係にあるのかを推定し臨床症状との関係も検討する。

## 3. 研究の方法

方法として以下の手法を用いた。MyD88/Trif 非依存性 NLRP3 活性化因子の同定法として、C57BL/6 マウス及びその MyD88/Trif ダブルノックアウトマウス骨髄細胞由来マクロファージ(BDM)と反応させ、NF- $\kappa$  B やカスパーゼ 1 および IL-1 $\beta$  の活性化をウエスタンブロット法で定性的に、ELISA 法で定量的に調べる。

(1) マクロファージと反応させるものとして、コレラ菌の既存の病原因子である血球凝集素プロテアーゼ (Hap)、コレラ毒素、溶血毒(HlyA)、多機能巨大分子 (MART) が活性化因子かを検討する。

(2) (1) の因子が不定されたら新たに培養上清からカラムクロマト、クロマトフォカシング、ショ糖密度勾配法、電気泳動法など種々の分離法を用い因子の同定を試みる。

(3) (2) により因子が判明したらその因子に対する抗体を作成し、免疫沈降法などで宿主側の応答因子 (群) を探求する。

(4) 因子に類似したものを他の菌がもっていないかを文献的に調べ、持っている場合はそれを調整し、マクロファージと反応させて同じように活性があるか確認する。

## 4. 研究成果

### (1) hlyA 遺伝子欠損株では NLRP3 活性化は起こらない。

NLRP3 は外部刺激によりアダプター蛋白 ASC とカスパーゼ 1 などを集合しインフラマゾームという複合体を形成し、その後やカスパーゼ 1 の活性化に引き続き NF- $\kappa$  B の活性化とともに IL-1 $\beta$ 、IL-18 の分泌と続く一連の流れを伴っている。コレラ菌の持つ因子として、コレラ毒、RtxA 毒、HlyA 毒の欠損株を作成し BDM と反応させ、IL-1 $\beta$ 、カスパーゼ 1 の活性化を調べた。コレラ毒素、および MART (RTX) 欠損株には NLRP3 活性化能がみとめられ、活性因子は別のものであることが判明した。コレラ菌の溶血毒 hlyA の欠損株を用いると IL-1 $\beta$ 、カスパーゼ 1 の活性化が著しく低下することがわかり hlyA が目的の因子である可能性が示唆された。次に hlyA 欠損株の反応系に、コレラ菌の hlyA 遺伝子を大腸菌に組み込み発現させた組換え HlyA を反応系に加えると、NLRP3 活性化反応 (IL-1 $\beta$ 、IL-18、Casp1 活性化) が回復した (表 1)。これらの結果から hlyA が MyD88、Trif 非依存性に NLRP3 を活性化していることが推測された。

表 1 MyD88, Trif 単独ノックアウトマウス BDM との反応

WT/M $\Phi$	WT	$\Delta$ rtxA	$\Delta$ hlyA	$\Delta$ R/H*	+HlyA	
					$\Delta$ hlyA	$\Delta$ R/H
IL-1 $\beta$	+	+	-	-	+	+
IL-18	+	+	-	-	+	+
Casp1	+	+	-	-	+	+

\* $\Delta$ rtxA と  $\Delta$ hlyA のダブル欠損変異株。

Casp1:カスパーゼ 1 の活性化を示す。

### (2) MyD88/Trip ダブルノックアウトマウスの骨髄由来マクロファージにおいても同様な現象がみられる。

表 2 MyD88(-/-)/Trif(-/-) ダブルノックアウトマウス BDM に対する反応

WT	$\Delta$ rtxA	$\Delta$ hlyA	$\Delta$ R/H
----	---------------	---------------	--------------

IL-1 $\beta$	+	+	-	-
IL-18	+	+	-	-
Casp 1	+	+	-	-

次に MyD88(-/-)Trif(-/-)のダブルノックアウトマウスのマクロファージを使って同様な実験を行った(表2)。MyD88, Trif 単独ノックアウトマウスBDMの結果と同じ結果を得た。

### (3) hlyA 欠損株に ATP を加えてもサイトカインの活性化は見られない。

コレラ菌の溶血毒 HlyA は赤血球膜に穴をあける pore forming toxin ファミリーの一員であるので、hlyA 欠損株のサンプルに P2X7 を刺激し K<sup>+</sup>の排泄を促進し NLRP3 の活性化を起こす ATP を添加してみたが、MyD88(-/-)Trif(-)ノックアウトマウスのマクロファージは反応しなかった。このことは K<sup>+</sup>イオンの排出に伴う現象ではないことを示唆している。

### (4) 他の細菌が産生する溶血毒を加えてもサイトカインの活性化は見られない。

コレラ菌の HlyA の MyD88/Trif 非依存性 NLRP3 活性化が他の菌の溶血毒でも生じるか検討した。リステリア菌のリステリオリジン、肺炎球菌の $\alpha$ 毒素、黄色ブドウ球菌の $\beta$ 毒素は、membrane pore forming toxin の仲間であり同様な現象が見られることが期待された。毒素は遺伝子技術を使い組換え蛋白として大腸菌に発現させ、Ni タグの蛋白として精製した(図1)。溶血活性があることを確認後、MyD88(-/-)/Trif(-/-)ダブルノックアウトマウス由来マクロファージと反応させたが、コレラ菌と同様な所見は得られなかった(図2)。このことはこの現象はコレラ菌独自のものであることを示唆している。

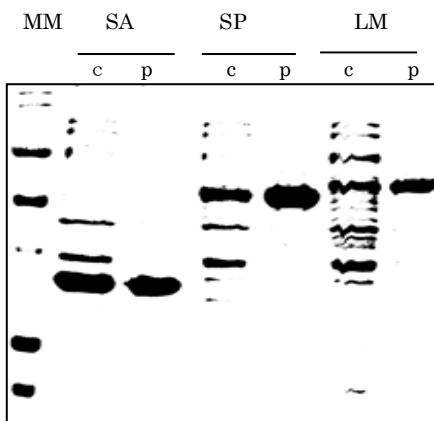


図1. 組換え溶血毒の SDS - 電気泳動のタンパク染色。各溶血毒素遺伝子を組込んだプラスミドを大腸菌に入れ培養後、IPTG で誘導をかけ(c)、菌体内にある溶血毒を溶解して集め、Ni によるアフィニティーカラムで精製

した(p)。SA:ブドウ球菌 $\alpha$ 溶血毒(36kDa)、SP:肺炎球菌ストレプトリジン O(60kDa)、LM:リステリア菌リステリオリジン O(60kDa)。各サンプルの溶血活性を確認後、マクロファージとの実験に使用した。

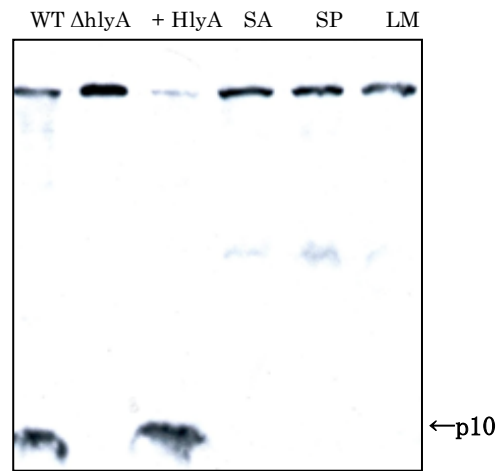


図2. 各菌の溶血毒によるカスパーゼ1活性化。各菌の溶血毒を MyD88/Trif ダブルノックアウト BDM を使用し、カスパーゼ1の活性化を p10 の産生でみたもの。+HlyA は  $\Delta$ hlyA の培養上清に組換え HlyA を加えたもの。WT:野生株コレラ菌、 $\Delta$ hlyA:HlyA 欠損コレラ菌、SA~LM:図1と同じ。

### (5) HlyA が因子であることの証明が不足している。

以上の結果はコレラ菌 HlyA が MyD88/Trif 非依存性の NLRP3 活性化因子である可能性を示しているが、精製 HlyA の純度が検定されておらず、HlyA 欠損株で失活した活性が復元する補足試験の裏付けが十分になされていない。現在この実験を急いでいる。また HlyA と随伴して産生されている分子で NLRP3 を活性化する因子についての検討がまだなされていない。これらの因子、例えば CpG, flagellin, acf、Hap、ペプチドグリカンなども検討する必要がある。

### 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3件、全て査読あり)

(1) Higa N, Toma C, Koizumi Y, Nakasone N, Nohara T, Masumoto J, Kodama T, Iida T, Suzuki T. *Vibrio parahaemolyticus* effector proteins suppress inflammasome activation by interfering with host autophagy signaling. *PLOS Pathogen*. 9, 2013, e1003142.

(2) Koizumi Y, Toma C, Higa N, Nohara T,

Nakasone N, Suzuki T. Inflammasome activation via intracellular NLRs triggered by bacterial infection. Cell Microbiol. 14, 2012 149-154

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

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① Nakasone N, Higa N, Nohara, Takaesu G, Nohara T, Toma C, Suzuki T. The plant extracts which inhibit typeIII secretion in enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. 第86回細菌学会総会、2013年3月18日、千葉
- ② Toma C, Higa N, Nakasone N, Nohara T, Koizumi N, Suzuki T. Analysis of the virulence factors involved in *Leptospira interrogans*-macrophage interactions. 86回細菌学会総会、2013年3月18日、千葉

〔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

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

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲宗根 昇 (NAKASONE NOBORU)

琉球大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：80175497

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

鈴木 敏彦 (SUZUKI TOSHIHIKO)  
琉球大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：10292848