

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292061

研究課題名(和文) 炎症反応を制御する情報伝達の分子メカニズムとバイオプローブによる解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of signaling pathways regulating inflammatory responses and their elucidation by bioprobes

研究代表者

片岡 孝夫 (KATAOKA, Takao)

京都工芸繊維大学・その他部局等・教授

研究者番号：20242307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：炎症反応を調節しているサイトカインレセプターは、様々なアダプタータンパク質やプロテインキナーゼ等を介して、転写因子nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)等の情報伝達経路を活性化する。NF- $\kappa$ B経路は、サイトカイン、ケモカイン、細胞接着因子等をコードしている多くの遺伝子の転写を誘導し、それらの遺伝子発現を介して炎症反応を調節している。本研究では、おもに小分子化合物をバイオプローブとして用いて、炎症性サイトカインによる情報伝達や遺伝子発現を制御している分子メカニズムを解明した。

研究成果の概要(英文)：Cytokine receptors regulating inflammatory responses activate the transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway by various adaptor proteins and protein kinases. The NF- $\kappa$ B pathway induces the transcription of many genes, such as those encoding cytokines, chemokines, and adhesion molecules, and regulates inflammatory responses by their gene expression. In this study, the molecular mechanisms of the signaling pathways and gene expression induced by inflammatory cytokines were elucidated largely by using small molecules as bioprobes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：炎症性サイトカイン バイオプローブ 情報伝達 NF- $\kappa$ B イルシニアスタチンA アラントピロンA トリテルペノイド カルデノリドアグリコン

1. 研究開始当初の背景

デス受容体に属する tumor necrosis factor (TNF) レセプター-1 と Fas は、細胞内にデスドメインを有し、様々なアダプタータンパク質等を介して、転写因子 nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) の情報伝達経路やカスパーゼ 8 を介した細胞死の情報伝達経路を誘導する。一方、interleukin-1 (IL-1) レセプターは、細胞内に Toll/IL-1 receptor (TIR) ドメインを有し、別のアダプタータンパク質等を介して、おもに NF- $\kappa$ B 経路を活性化する。これらのレセプターの細胞内ドメインには、異なるアダプタータンパク質が結合し、初期の情報伝達経路が異なっている。NF- $\kappa$ B 経路は、サイトカイン、ケモカイン、細胞接着因子等の多くの遺伝子の転写を誘導し、その遺伝子発現を介して炎症反応を制御している。

2. 研究の目的

TNF- $\alpha$  や IL-1 $\alpha$  等の炎症性サイトカインは、NF- $\kappa$ B の情報伝達経路の活性化を介して、細胞接着因子 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) 等の様々な遺伝子の発現を誘導する。これまでに、我々は、微生物や植物由来の天然物や合成化合物をスクリーニングし、炎症性サイトカインによって誘導される ICAM-1 の発現に作用する小分子化合物を同定してきた。本研究では、これらの小分子化合物をバイオプローブとして活用することによって、炎症反応を制御している情報伝達や遺伝子発現の新しい分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト肺がん腫 A549 細胞等の培養細胞株、及びヒト臍帯静脈内皮細胞 human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) を小分子化合物や炎症性サイトカインで処理した後、Cell ELISA 法、定量 PCR、レポーターアッセイ、ウェスタンブロッティング、蛍光免疫染色法等を行い、小分子化合物の影響を検討した。ヒト胚性腎細胞 HEK293 細胞とそのカスパーゼ 8 低発現細胞にカスパーゼ 8、cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP)、receptor-interacting protein (RIP1) 等を遺伝子導入した後、レポーターアッセイ、免疫沈降法、ウェスタンブロッティング等を行い、NF- $\kappa$ B 活性化やタンパク質の分子間相互作用を検討した。

4. 研究成果

(1) イルシニアスタチン A は TNF レセプター-1 のエクストドメインシエディングを誘導する

イルシニアスタチン A (irciniastatin A) は、ペデリンファミリに属する翻訳阻害剤である(図 1) [1]。A549 細胞において、イルシニアスタチン A が TNF- $\alpha$  による NF- $\kappa$ B サブユニット p65 と p50 の核移行を阻

害するが、IL-1 $\alpha$  による p65 と p50 の核移行を阻害しないことを見出した。イルシニアスタチン A は、IL-1 $\alpha$  によって誘導される ICAM-1 mRNA の発現を阻害しなかったが、ICAM-1 タンパク質の発現を阻害したことから、この作用は翻訳阻害によるものであると考えられた。一方、イルシニアスタチン A が TNF レセプター-1 のエクストドメインシエディングを誘導することを見出した。

A549 細胞において、イルシニアスタチン A は、extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化を強力に誘導したが、p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase と c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化をほとんど誘導しなかった。さらに、イルシニアスタチン A で誘導される TNF レセプター-1 のエクストドメインシエディングは、MAP キナーゼ/ERK キナーゼ阻害剤 U0126 で阻害されたが、p38 MAP キナーゼ阻害剤 SB203580 や JNK 阻害剤 SP600125 では阻害されなかった。以上の結果から、イルシニアスタチン A は、リボトキシックストレス応答を誘導する他のタンパク質合成阻害剤とは異なる分子メカニズムによって、強力かつ持続的な ERK の活性化を介して、TNF レセプター-1 のエクストドメインシエディングを誘導することを明らかにした。

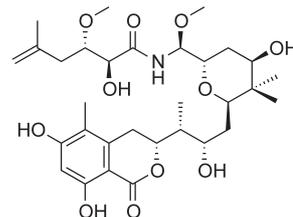


図 1 イルシニアスタチン A の構造

(2) アラントピロン A は TNF- $\alpha$  誘導性の NF- $\kappa$ B の情報伝達を阻害する

アラントピロン A (allantopyrone A) は、植物内生糸状菌が産生する  $\alpha$ -ピロン系代謝産物である(図 2)。A549 細胞において、アラントピロン A が TNF- $\alpha$  によって誘導される ICAM-1 発現を阻害することを見出した。アラントピロン A は、TNF- $\alpha$  によって誘導される NF- $\kappa$ B 応答性ルシフェラーゼレポーター活性を阻害した。さらに、アラントピロン A は TNF- $\alpha$  で誘導される NF- $\kappa$ B サブユニットの核移行と I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化と分解を阻害した。一方、アラントピロン A は I $\kappa$ B キナーゼ  $\beta$  の酵素活性を直接的に阻害しなかった。これらの結果から、アラントピロン A が I $\kappa$ B キナーゼの活性化より上流の情報伝達経路に作用していることを明らかにした。

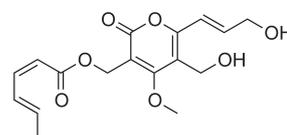


図 2 アラントピロン A の構造

(3) ウルソール酸はタンパク質の細胞内輸送を阻害する

ウルソール酸 (ursolic acid) は、多くの植物に含まれる五環性トリテルペノイドである (図3)。これまでに、我々は、ウルソール酸がアミノ酸輸送やタンパク合成に作用することによって、TNF- $\alpha$ によって誘導される遺伝子発現を抑制することを報告した[2]。一方、ウルソール酸は、HUVEC や A549 細胞において、IL-1 $\alpha$ で誘導される ICAM-1 の発現をタンパク質レベルで阻害しなかったが、細胞表面の ICAM-1 の発現を顕著に抑制し、ICAM-1 の分子量を低下させた。ウルソール酸で処理した細胞では、小胞体内に ICAM-1 が蓄積し、ICAM-1 には高マンノース型糖鎖が結合していた。さらに、ウルソール酸は、ゴルジ体の断片化を誘導した。以上の結果から、ウルソール酸はタンパク質の細胞内輸送に作用し、小胞体内に高マンノース型糖鎖が結合した ICAM-1 の蓄積を誘導することをはじめて明らかにした。

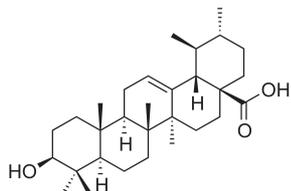


図3 ウルソール酸の構造

(4) ベツリン酸とオレアノール酸は N 結合型糖鎖修飾に作用する

ベツリン酸 (betulinic acid) とオレアノール酸 (oleanolic acid) は、五環性トリテルペノイドであり、ウルソール酸と分子量が同じ構造異性体である (図4)。ベツリン酸とオレアノール酸は、A549 細胞において、ウルソール酸と異なり、IL-1 $\alpha$ によって誘導される ICAM-1 の細胞表面の発現を阻害しなかった。一方、ベツリン酸とオレアノール酸は、ICAM-1 の N 結合型糖鎖修飾に作用すること、並びにその作用が小胞体  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤であるカスパーゼ 8 (castanospermine) の作用と類似していることを見出した。さらに、ベツリン酸とオレアノール酸は酵母由来  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性を阻害するが、タチナタマメ由来  $\alpha$ -マンノシダーゼ活性を阻害しなかった。これらの結果から、ベツリン酸とオレアノール酸が ICAM-1 の N 結合型糖鎖修飾に作用するが、細胞表面への細胞内輸送を阻害しないことを明らかにした。

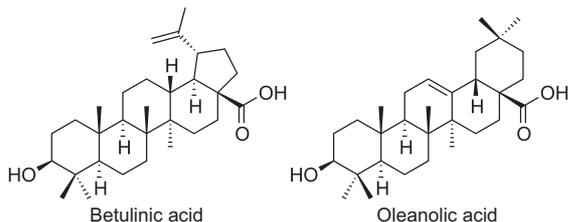


図4 ベツリン酸とオレアノール酸の構造

(5) カルデノリドアグリコンは TNF- $\alpha$ によって誘導される ICAM-1 の発現を翻訳レベルで阻害する

強心配糖体は、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase に対する阻害活性があり、カルデノリド (cardenolide) とブファノリド (bufanolide) に分類される。これまでに、我々は、カルデノリド配糖体であるウアバイン (ouabain) とオドロシド A (odoroside A) が Na<sup>+</sup>依存性アミノ酸輸送を阻害することによって、NF- $\kappa$ B 依存性のタンパク質発現を抑制することを報告した[3]。カルデノリド配糖体のアグリコン (aglycone) であるウアバゲニン (ouabagenin)、ジギトキシゲニン (digitoxigenin)、ジゴキシゲニン (digoxigenin) (図5) が Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 活性を阻害すること、並びに A549 細胞において TNF- $\alpha$  で誘導される ICAM-1 の発現を抑制することを見出した。一方、これらのカルデノリドアグリコンは TNF- $\alpha$  で誘導される ICAM-1 mRNA の発現を阻害しなかった。TNF- $\alpha$  誘導性の ICAM-1 発現に対するウアバゲニン、ジギトキシゲニン、ジゴキシゲニンの阻害作用は、ウアバイン耐性のラッ

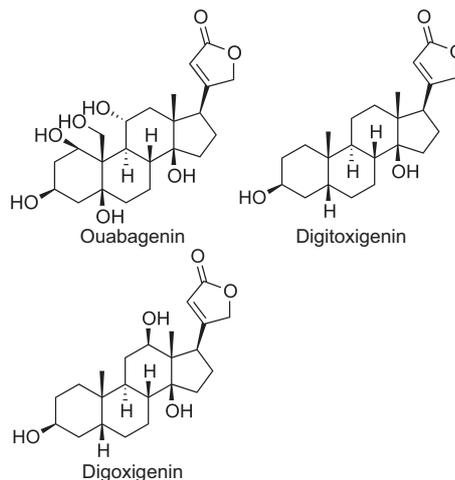


図5 カルデノリドアグリコンの構造

ト Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 1 の過剰発現によって抑制された。Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 1 のノックダウンによって、TNF- $\alpha$  誘導性 ICAM-1 に対するウアバインとウアバゲニンの阻害作用が充進した。以上の結果から、カルデノリドアグリコンは、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase に作用し、TNF- $\alpha$  で誘導される ICAM-1 の発現を翻訳レベルで阻害することを明らかにした。

(6) カスパーゼ 8 モデュレーター c-FLIP<sub>L</sub> は Fas リガンドによる NF- $\kappa$ B 活性化を調節する

カスパーゼ 8 はシステインプロテアーゼであり、アポトーシスと非アポトーシスのシグナル伝達経路の制御に重要である。カスパーゼ 8 モデュレーターである the long form of c-FLIP (c-FLIP<sub>L</sub>) は、RIP1 や TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) によるカスパーゼ 8 依存的な NF- $\kappa$ B の活性化

を制御している[4, 5]。c-FLIP<sub>L</sub>は、カスパーゼ8によってC末端ドメインが切断され、c-FLIP(p43)へと変換される。c-FLIP<sub>L</sub>の存在下では、FasリガンドによるNF-κB活性化がカスパーゼ阻害剤 zVAD-fmk で阻害されたが、c-FLIP(p43)の存在下では、FasリガンドによるNF-κB活性化が zVAD-fmk で阻害されなかった。カスパーゼ8のプロドメインが RIP1 のデスドメインと相互作用すること、並びに Fas リガンドによるNF-κBの活性化にカスパーゼ8のプロドメインが必要であることを見出した。さらに、RIP1 とカスパーゼ8の相互作用は、c-FLIP<sub>L</sub>によって阻害されたが、c-FLIP(p43)では阻害されなかった。これらの結果から、c-FLIP<sub>L</sub>のC末端ドメインがカスパーゼ8のプロドメインと RIP1 のデスドメインの相互作用を阻害し、カスパーゼ8依存的なNF-κB活性化を制御していることを明らかにした。

〈引用文献〉

- ① Takumi Chinen, Yoko Nagumo, Tsubasa Watanabe, Takamichi Imaizumi, Masatoshi Shibuya, Takao Kataoka, Naoki Kanoh, Yoshiharu Iwabuchi, Takeo Usui. Irciniastatin A induces JNK activation that is involved in caspase-8-dependent apoptosis via the mitochondrial pathway. *Toxicology Letters*, 199, 341-346, 2010.
- ② Tomonobu Yokomichi, Kyoko Morimoto, Nana Oshima, Yuriko Yamada, Liwei Fu, Shigeru Taketani, Masayoshi Ando, Takao Kataoka. Ursolic acid inhibits Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity and prevents TNF-α-induced gene expression by blocking amino acid transport and cellular protein synthesis. *Biomolecules*, 1, 32-47, 2011.
- ③ Yohei Takada, Kentaro Matsuo, Hirotsugu Ogura, Liming Bai, Asami Toki, Liyan Wang, Masayoshi Ando, Takao Kataoka. Odoroside A and ouabain inhibit Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and prevent NF-κB-inducible protein expression by blocking Na<sup>+</sup>-dependent amino acid transport. *Biochemical Pharmacology*, 78, 1157-1166, 2009.
- ④ Takao Kataoka, Jürg Tschopp. N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-κB signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 24, 2627-2636, 2004.
- ⑤ Austin Dohrman, Takao Kataoka, Solange Cuenin, Jennifer Q. Russell, Jürg Tschopp, Ralph C. Budd. Cellular

FLIP (long form) regulates CD8<sup>+</sup> T cell activation through caspase-8-dependent NF-κB activation. *The Journal of Immunology*, 174, 5270-5278, 2005.

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7件)

- ① Reiko Hiramatsu, Sayuri Fukuhara, Satoshi Mitsuda, Tomonobu Yokomichi, Takao Kataoka. Betulinic acid and oleanolic acid, natural pentacyclic triterpenoids, interfere with N-linked glycan modifications to intercellular adhesion molecule-1, but not its intracellular transport to the cell surface. *European Journal of Pharmacology*, 767, 126-134, 2015. 査読有  
DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.10.017
- ② Hue Tu Quach, Seiya Hirano, Sayuri Fukuhara, Tsubasa Watanabe, Naoki Kanoh, Yoshiharu Iwabuchi, Takeo Usui, Takao Kataoka. Irciniastatin A induces potent and sustained activation of extracellular signal-regulated kinase and thereby promotes ectodomain shedding of tumor necrosis factor receptor 1 in human lung carcinoma A549 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38, 941-946, 2015. 査読有  
DOI: 10.1248/bpb.b15-00078
- ③ Seiya Hirano, Hue Tu Quach, Tsubasa Watanabe, Naoki Kanoh, Yoshiharu Iwabuchi, Takeo Usui, Takao Kataoka. Irciniastatin A, a pederin-type translation inhibitor, promotes ectodomain shedding of cell-surface tumor necrosis factor receptor 1. *The Journal of Antibiotics*, 68, 417-420, 2015. 査読有  
DOI: 10.1038/ja.2015.3
- ④ Yuji Okina, Fumihiko Takeuchi, Tomonobu Yokomichi, Yohei Takada, Takao Kataoka. Cardenolide aglycones inhibit tumor necrosis factor α-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 at the translation step by blocking Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 38, 39-47, 2015. 査読有  
DOI: 10.1248/bpb.b14-00532

- ⑤ Junpei Yokoigawa, Kyoko Morimoto, Yoshihito Shiono, Shota Uesugi, Ken-ichi Kimura, Takao Kataoka. Allantopyrone A, an  $\alpha$ -pyrone metabolite from an endophytic fungus, inhibits the tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced nuclear factor  $\kappa$ B signaling pathway. *The Journal of Antibiotics*, 68, 71-75, 2015. 査読有 DOI: 10.1038/ja.2014.103
- ⑥ Satoshi Mitsuda, Tomonobu Yokomichi, Junpei Yokoigawa, Takao Kataoka. Ursolic acid, a natural pentacyclic triterpenoid, inhibits intracellular trafficking of proteins and induces accumulation of intercellular adhesion molecule-1 linked to high-mannose-type glycans in the endoplasmic reticulum. *FEBS Open Bio*, 4, 229-239, 2014. 査読有 DOI: 10.1016/j.fob.2014.02.009
- ⑦ Iyo Matsuda, Kentaro Matsuo, Yuka Matsushita, Yasushi Haruna, Masamitsu Niwa, Takao Kataoka. The C-terminal domain of the long form of cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP<sub>L</sub>) inhibits the interaction of the caspase 8 prodomain with the receptor-interacting protein 1 (RIP1) death domain and regulates caspase 8-dependent nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 289, 3876-3887, 2014. 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M113.506485

[学会発表] (計 10 件)

- ① 平松令子 (片岡孝夫) ベツリン酸とオレアノール酸は細胞接着因子 ICAM-1 の N 結合型糖鎖修飾に作用する、日本農芸化学会 2016 年度 (平成 28 年度) 大会、2016 年 3 月 30 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- ② Hue Tu Quach (Takao Kataoka) Santonin-related compound 2 inhibits non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway induced by lymphotoxin- $\beta$ 、日本農芸化学会 2015 年度 (平成 27 年度) 大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学津島キャンパス (岡山県岡山市)
- ③ 横井川純平 (片岡孝夫)、Thapsigargin は細胞接着因子 ICAM-1 の糖鎖修飾に作用する、日本農芸化学会 2015 年度 (平成 27 年度) 大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学津島キャンパス (岡山県岡山市)

市)

- ④ 竹内文彦 (片岡孝夫)、RelB スプライシングバリエーションの NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路における生理機能の解析、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ⑤ 松田伊世 (片岡孝夫) c-FLIP<sub>L</sub> は、caspase-8 と RIP1 に依存した NF- $\kappa$ B 活性化を制御する、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 16 日、国立京都国際会館 (京都府京都市)
- ⑥ 翁侑史 (片岡孝夫) 強心配糖体アグリコンは TNF- $\alpha$  による ICAM-1 発現を翻訳段階で阻害する、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 17 日、国立京都国際会館 (京都府京都市)
- ⑦ 横井川純平 (片岡孝夫) 転写因子 NF- $\kappa$ B の情報伝達経路に対する allantopyrone A の作用機序の解析、日本農芸化学会 2014 年度 (平成 26 年度) 大会、2014 年 3 月 28 日、明治大学生田キャンパス (神奈川県川崎市)
- ⑧ 三津田智嗣 (片岡孝夫) 細胞内タンパク質輸送に対する五環性トリテルペノイドの作用機序の解析、日本農芸化学会 2014 年度 (平成 26 年度) 大会、2014 年 3 月 28 日、明治大学生田キャンパス (神奈川県川崎市)
- ⑨ 平野誠也 (片岡孝夫) 炎症性サイトカインによるシグナル伝達と遺伝子発現に対する irciniastatin A の作用の解析、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 4 日、神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)
- ⑩ 三津田智嗣 (片岡孝夫) 五環性トリテルペノイドであるウルソール酸はタンパク質の細胞内輸送を阻害する、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 4 日、神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片岡 孝夫 (KATAOKA, Takao)  
京都工芸繊維大学・応用生物学系・教授  
研究者番号：20242307

### (3) 連携研究者

臼井 健郎 (USUI, Takeo)  
筑波大学・生命環境系・准教授  
研究者番号：60281648