

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461576

研究課題名(和文) クライオパイリン関連周期熱症候群の発症機序の構造生物学的解明

研究課題名(英文) The structural analysis of the onset mechanism of cryopyrin-associated periodic syndrome

研究代表者

大西 秀典(Ohnishi, Hidenori)

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60381620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、クライオパイリン関連周期熱症候群(CAPS)発症機序の分子生物学的な解明のため、ヒトNLRP3リコンビナント蛋白の発現・精製を本研究の目的とした。昆虫細胞を利用した蛋白発現系(カイコ及びSF9細胞)を使用し種々の発現コンストラクトを試み、リコンビナント蛋白の発現は確認されたが、いずれも不溶性で機能実験、構造解析に使用可能な可溶性蛋白としては回収が困難であった。結論として、現状ではヒトNLRP3をリコンビナント蛋白として大量精製するのは困難であることが判明した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was the recombinant protein expression, purification and molecular analyses of human NLRP3, in order to analysis the onset mechanism of cryopyrin-associated periodic syndrome. We tried to use the insect cell protein expression systems (silkworm or SF9 cells) with the various protein expression constructs. The protein expression of NLRP3 variants was confirmed, but they were insoluble. Therefore, we could not obtain the suitable protein samples for analyzing the function and structure. In conclusion, our study revealed the quite difficulty of the large-scale protein purification of human NLRP3.

研究分野：小児科学

キーワード：自己炎症性疾患 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

自然免疫を惹起するための病原体関連分子パターン(PAMPs)認識受容体である Toll 様受容体(Toll like receptor: TLR)と炎症性サイトカイン IL-1/18 ファミリーの細胞内シグナル伝達経路は、大きくオーバーラップしており、ほぼ全ての TLR ファミリーと IL-1R ファミリーが共通の細胞内アダプター分子 MyD88 を介して、IRAK を活性化 TRAF6 をリン酸化 IKK 複合体のリン酸化 I B を分解し核内転写活性因子 NF- B を活性化した結果、種々の炎症性サイトカインを産生すると考えられている。すなわち IL-1、IL-18 の前駆体はこのシグナル経路の活性化により産生される(炎症惹起の第一段階)。このシグナル経路の単一遺伝子病として、IRAK4 欠損症、MyD88 欠損症、免疫不全を伴う無汗性外胚葉形成異常症といった原発性免疫不全症が知られている。

一方で、RIG-I 様受容体(RLR)、NOD 様受容体(NLR)は、細胞質中で PAMPs やダメージ関連分子パターン(DAMPs)を認識する受容体として知られており、特にその中で NLRP3(cryopyrin と呼ばれる)分子は、RNA や尿酸結晶、コレステロール結晶、アジュバンドであるアルムなど多彩な分子を認識する主要な細胞質自然免疫受容体である。PAMPs や DAMPs を認識した NLRP3 はインフラマソームと呼ばれる多量体構造を形成し、ASC と会合し、さらに caspase-1 と結合することで、この酵素を活性化し、IL-1、IL-18 前駆体を活性型に変換する(炎症惹起の第二段階)。さらに活性型 IL-1、IL-18 は NF- B 活性を増大させ、炎症増強のループをまわしている。当然、これらの炎症増加機構には抑制の機構が存在する(例えば IL-1 受容体アンタゴニストや IL-18 結合タンパクの存在がそれに相当する)と考えられるが、NLRP3 や MEFV の遺伝子異常により炎症が増強し続ける疾患がヒトで知られてきており、自己炎症性疾患と呼ばれている。

NLRP3 遺伝子異常により発症する疾患は CAPS と呼ばれ約 100 万人に 1 人の有病率とされており、すでに国内で 50 症例以上が報告されている。また MEFV 遺伝子異常による発症する疾患は家族性地中海熱(FMF)と呼ばれすでに 300 名以上の患者が国内でも報告されている。CAPS を発症する NLRP3 の機能獲得型変異はすでに数多く報告されており、NLRP3 遺伝子は 9 つのエクソン領域で構成されているが、そのうち疾患発症に明らかに関与する遺伝子変異は NLRP3 分子の NACHT ドメインに相当するエクソン 3 領域に集中して存在していることが判明している。しかし、これら NLRP3 分子上に発生したアミノ酸置換が、どのような機序でインフラマソームの活性化を引き起こすのか分子生物学的な知見は乏しいのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では、CAPS 発症の分子生物学的の解明を一義的な目的とする。特にヒトで同定される NLRP3 の遺伝子変異は、その遺伝子型に応じて CAPS が発症した際の重症度をおおまかに規

定しているとされる。例えば、我々の経験した症例では、Y563N 変異を有する家系は全て軽症型の家族性寒冷自己炎症性症候群を発症するが、E688K 変異を有する家系ではより重症病型である CINCA 症候群が Muckle-Wells 症候群を発症していた(Ohnishi H, J Clin Immunol 2012)。そのため、遺伝子変異ごとにこの分子の挙動の変化を観測したい。

3. 研究の方法

昆虫細胞用発現ベクター pFastBac1 (Invitrogen 社)に NLRP3 全長、PYD 欠失型、LRR 欠失型の遺伝子コンストラクトを組み込んだものを作成する。

バキュロウイルスを精製し、SF9 細胞に感染させ、培養細胞を回収する。超音波処理後の細胞破砕液を液体クロマトグラフィー(イオン交換カラム、Ni-NTA カラム、ゲルろ過カラム)で多段階精製を行う。

カイコ感染用 Bacmid DNA を精製し、カイコに注入。約 1 週間後にカイコ体液を抽出し、液体クロマトグラフィー(イオン交換カラム、Ni-NTA カラム、ゲルろ過カラム)で多段階精製を行う。

4. 研究成果

NLRP3 分子のリコンビナント蛋白の発現系を、昆虫細胞発現系を利用して構築することを試みた。pFastBac1 に NLRP3 全長及び 3 種類の LRR ドメイン欠失型の遺伝子コンストラクトを組み込んだものを作成し、それぞれ SF9 細胞で蛋白発現が確認された。しかし非常に少量の蛋白しか発現せず、かつ不溶性であった。次いで、カイコを使用した蛋白発現系を利用して上記蛋白群の発現精製を試みたが、カイコ脂肪組織中から NLRP3 蛋白を抽出することができなかった。NLRP3 と相同性の高い分子である NLRC4 の蛋白立体構造が 2014 年に報告されているが、その際に使用された NLRC4 蛋白発現コンストラクトは N 末端の Pyrin ドメインを欠失させたコンストラクト(PYD)で作成されていた。この情報を元に NLRP3 発現コンストラクトの最適化を目的とし、NLRP3 PYD のコンストラクトを 3 種類設計し、SF9 細胞に感染させ、蛋白発現を試みた。NLRP3 PYD はいずれも SF9 細胞内に発現が確認されたが、やはり不溶性で機能実験、構造解析に使用可能な可溶性蛋白としては回収が困難であった。

次の改善案として可溶性ドメイン分子(human SUMO3 tag)を融合した形のコンストラクトを作成し、蛋白発現系を再構築したが、NLRP3 は分解してしまい蛋白発現を得ることはできなかった。

結論として、現状では NLRP3 をリコンビナント蛋白として大量精製するのは困難であることが判明した。

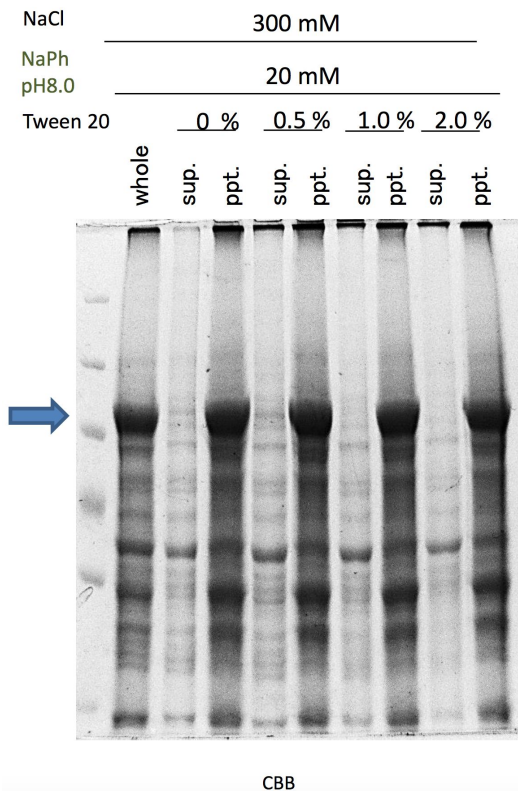


図 1. NLRP3 PYD(1-111aa)をSF9細胞で細胞内に発現させた結果(CBB染色)。目的サイズの蛋白は不溶性分画(ppt.)に存在し、可溶性分画(sup.)にはほとんど認められない。

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 2 件)

- 1: Kagawa R, Fujiki R, Tsumura M, Sakata S, Nishimura S, Itan Y, Kong XF, Kato Z, Ohnishi H, Hirata O, Saito S, Ikeda M, El Baghdadi J, Bousfiha A, Fujiwara K, Oleastro M, Yancoski J, Perez L, Danielian S, Ailal F, Takada H, Hara T, Puel A, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Casanova JL, Ohara O, Okada S, Kobayashi M. Alanine-scanning mutagenesis of human signal transducer and activator of transcription 1 to estimate loss- or gain-of-function variants. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Dec 14. pii: S0091-6749(16)31281-7. (査読あり)
- 2: Ohnishi H, Kawamoto N, Seishima M, Ohara O, Fukao T. A Japanese family case with juvenile onset Behçet's disease caused by TNFAIP3 mutation. *Allergol Int.* 2017 Jan;66(1):146-148. (査読あり)
- 3: Mizutani Y, Okano T, Takahashi T, Ohnishi H, Ohara O, Sano A, Seishima M. Pyoderma Gangrenosum, Acne and Suppurative Hidradenitis Syndrome Treated with Granulocyte and Monocyte Adsorption Apheresis. *Acta Derm Venereol.* 2017 Feb

8;97(2):275-276. (査読あり)

4: Sotoma S, Imura J, Igarashi R, Hirose KM, Ohnishi H, Mizukami S, Kikuchi K, Fujiwara TK, Shirakawa M, Tochio H. Selective Labeling of Proteins on Living Cell Membranes Using Fluorescent Nanodiamond Probes. *Nanomaterials (Basel).* 2016 Mar 25;6(4). pii: E56. (査読あり)

5: Shikano H, Ohnishi H, Fukutomi H, Ito K, Morimoto M, Teramoto T, Aoki M, Nishihori T, Akeda Y, Oishi K, Fukao T. Mondini dysplasia with recurrent bacterial meningitis caused by three different pathogens. *Pediatr Int.* 2015 Dec;57(6):1192-5. (査読あり)

6: Takahashi T, Fujisawa T, Kimura M, Ohnishi H, Seishima M. Familial Mediterranean fever variant with repeated atypical skin eruptions. *J Dermatol.* 2015 Sep;42(9):903-5. (査読あり)

7: Mizuno Y, Kato G, Shu E, Ohnishi H, Fukao T, Ohara O, Fukumoto H, Katano H, Seishima M. Merkel cell polyomavirus-positive Merkel cell carcinoma in a patient with epidermodysplasia verruciformis. *Acta Derm Venereol.* 2015 Jan;95(1):98-9. (査読あり)

8: 大西秀典, 金子英雄: IgG サブクラス欠損症および IgA 欠損症. *小児内科* 2015 年;47 巻増刊号:718-721. (査読なし)

9: Tsutsumi N, Kimura T, Arita K, Ariyoshi M, Ohnishi H, Yamamoto T, Zuo X, Maenaka K, Park EY, Kondo N, Shirakawa M, Tochio H, Kato Z. The structural basis for receptor recognition of human interleukin-18. *Nat Commun.* 2014 Dec 15;5:5340. (査読あり)

10: Kimura T, Tsutsumi N, Arita K, Ariyoshi M, Ohnishi H, Kondo N, Shirakawa M, Kato Z, Tochio H. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of human IL-18 and its extracellular complexes. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* 2014 Oct;70(Pt 10):1351-6. (査読あり)

11: Funato M, Uemura O, Ushijima K, Ohnishi H, Orii K, Kato Z, Yamakawa S, Nagai T, Ohara O, Kaneko H, Kondo N. A complement factor B mutation in a large kindred with atypical hemolytic uremic syndrome. *J Clin Immunol.* 2014 Aug;34(6):691-5. (査読あり)

12: Kubota K, Ohnishi H, Teramoto T, Kawamoto N, Kasahara K, Ohara O, Kondo N. Clinical and genetic characterization of Japanese sporadic cases of periodic Fever, aphthous stomatitis, pharyngitis and adenitis syndrome from a single medical center in Japan. *J Clin Immunol.* 2014 Jul;34(5):584-93. (査読あり)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 1件)

名称：インターロイキン-18 活性阻害剤
発明者：大西秀典、木村豪、加藤善一郎、枋
尾豪人、堤尚孝、横田歩
権利者：京都大学、岐阜大学
種類：特許
番号：2015-242091
出願年月日：2016年12月9日
国内外の別：外国

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 秀典 (OONISHI, HIDENORI)
岐阜大学・医学部附属病院・講師
研究者番号:60381620

(4) 研究協力者

枋尾 豪人 (TOCHIO, HIDEHITO)
京都大学
木村 豪 (KIMURA, TAKESHI)
岐阜大学