

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860710

研究課題名(和文)インフラマソーム結合分子の解析による新規シグナル経路の探索

研究課題名(英文)Identification of inflammasome binding protein and novel signal pathway

## 研究代表者

川島 晃(Kawashima, Akira)

自治医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60624913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：炎症機構の一つインフラマソームの活性化機構を明らかにする為に、タンパク複合体インフラマソームを構成する分子群をTOF-MSを用いて網羅的な解析を行なった。候補分子の一つであるE3ユビキチンリガーゼは、インフラマソーム構成分子のひとつと特異的に結合し、ユビキチン化を誘導し、分解を促進することを明らかにした。また、この分子は、インフラマソーム構成分子の分解を介して、インフラマソームの活性化に抑制的に働くことを明らかにした。以上の結果よりユビキチン化を介したインフラマソーム構成分子の分解調節機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to identify the inflammasome activation system. Firstly we performed comprehensive analysis of inflammasome components by TOF-MS. In result we found that certain type of E3 ubiquitin ligase binds one of the inflammasome components and ubiquitination. And this molecule inhibits inflammasome activation through degradation of inflammasome components. These results reveal the pathway that regulates the inflammasome through the ubiquitination and degradation.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫 インフラマソーム ユビキチン

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病やメタボリック症候群などの内分泌代謝疾患において、炎症の重要性が明らかになってきている。これらの疾患において見られる炎症は、病原体の関与が無い。そのことから無菌性炎症と呼ばれている。その惹起経路の一つとして「インフラマソーム」と呼ばれる炎症活性化経路が注目されてきた。インフラマソームは、Nod 様受容体とインターロイキン-1 (IL1) を切断する caspase-1、これらの分子と結合するアダプター分子 ASC から構成されるタンパク複合体である。Nod 様受容体は、刺激を認識する受容体として働く。Nod 受容体は、NLRP1, NLRP3, NLRC4 など複数存在しており、それぞれが、様々な病原体成分や細胞内ストレスの認識に働き、NLRP3 インフラマソームの活性化を行う。Nod 様受容体のひとつ NLRP3 は、無菌性炎症において重要な働きをしていることが明らかになってきた。

NLRP3 インフラマソームの活性化は、ATP、尿酸結晶、コレステロール結晶、活性酸素などの生体に由来する内在性因子によって誘導される。それにより、これらの因子によるインフラマソームを介した炎症惹起が、様々な内分泌代謝疾患の発症と進展へ関与していることが想定されている。

インフラマソームを標的とした薬剤開発の為に NLRP3 インフラマソームの活性化機構に関する研究が行われているが、未だ詳細な分子機構は不明な点が多い。NLRP3 インフラマソームを構成する最低限の分子として、NLRP3, ASC, caspase-1 が必要である。それに加えて、リン酸化やユビキチン化などの修飾を介する様々な分子の関与を示す結果が得られており、インフラマソームタンパク複合体に含まれる分子の解明によって活性化経路の詳細が明らかになると考えた。

### 2. 研究の目的

申請者は、タンパク複合体「インフラマソーム」の構成分子の解析を行うことによって、インフラマソームの活性化経路を明らかにすることを目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) インフラマソーム構成分子の同定

我々は、活性化後に形成されるタンパク複合体「インフラマソーム」を精製する実験系を作成した。まず、ヒト単球由来の細胞株 THP-1 に、蛍光タンパク GFP を標識した (ASC インフラマソーム構成分子の一つ) を強制発現させた。強制発現は、レンチウイルスを用いた遺伝子組換え法により行った。遺伝子組換の結果、インフラマソームの形成や精製が視覚的に確認できるようになった (図

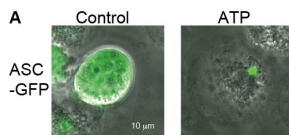


図 1 A: ASC-GFP 融合タンパクを強制発現させた THP-1。ATP 刺激 5mM 30 min 後に撮影。

1)。ATP を用いたインフラマソームの刺激後、高張液で細胞を破碎し、その後超遠心機によるショ糖濃度勾配遠心法により、タンパク複合体「インフラマソーム」を精製した (図 1 B)。

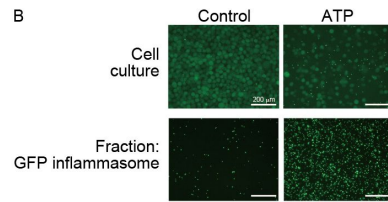


図 1 B: ショ糖濃度勾配法により GFP インフラマソームを精製した。

精製したインフラマソームを 8M urea と sonication によって破碎し、1 x sample buffer 中に溶解して、1 次元電気泳動を行った。泳動に用いたゲルを分子量毎に切り分け、ゲルからタンパクを精製し、質量分析機を用いて解析を行った。

質量分析の結果、インフラマソームに含まれる E3 ユビキチンリガーゼ分子 X を同定した。未発表データの為、分子 X と表記する。

#### (2) E3 ユビキチンリガーゼ分子 X の解析

(1) の実験で得られた分子 X の解析を行った。まず、分子 X が実際インフラマソーム中に含まれるか確認した。THP-1 細胞を用いて、内在性の分子 X の局在を蛍光免疫染色により解析した結果、インフラマソーム中に分子 X は共局在した (図 2)。(緑は ASC, 赤は分子 X, 緑の点は活性化後のインフラマソームタンパク複合体である。)

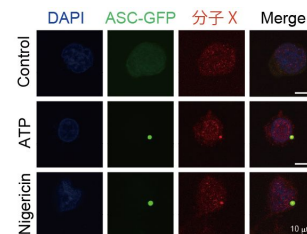


図 2: THP-1 細胞の GFP-ASC と分子 X はインフラマソーム刺激によって共局在する (蛍光免疫染色)

さらに Western blot 法により分子 X のタンパクがインフラマソーム中に含まれるか確認すると、ヒト血球由来の THP-1 マクロファージ (図 3 A) と、マウスマクロファージ (図 3 B) のインフラマソーム中に含まれることを確認した。

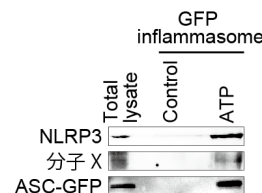


図 3 A: THP-1 細胞の精製した GFP-インフラマソーム中に分子 X は存在する

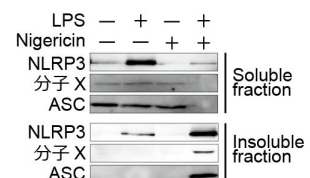


図 3 B: Mice マクロファージのインフラマソーム中にも分子 X は含まれる。LPS と Nigericin 刺激によってインフラマソーム複合体が形成され、複合体は TritonX 不溶分画に移行する。

次に、分子 X はインフラマソーム構成分子に結合するか、HEK293T 細胞を使った強制発現

系を用いて、解析を行った。3xFlag tag を繋げたそれぞれのインフラマソーム構成分子と Myc tag を繋げた分子 X を強制発現させて、抗 Flag M2 抗体を用いた免疫沈降を行った結果、分子 X は NLRP3 に特異的に結合することを明らかにした (図 4)。

加えて、His tag を付けた ubiquitin を強制発現させ Ni-ビーズを用いたプルダウンアッセイをすることによって、ユビキチンタンパクのみの精製を行った。分子 X と NLRP3 を共発現させた時のみ、ユビキチン化が増強した (図 5: ユビキチン化したタンパクは分子量が増加してスミア状の泳動像になる)。

これらの結果より分子 X は NLRP3 に特異的に結合して、NLRP3 のユビキチン化を誘導することを明らかにした。

(3) THP-1 細胞における分子 X の NLRP3 ユビキチン化に関する解析

分子 X がインフラマソーム中に含まれ、構成分子の一つ NLRP3 に特異的に結合し、ユビキチン化を誘導することを明らかにした。次に、分子 X のインフラマソーム活性化に対する影響を明らかにするため実験を行った。まず、ヒト血球由来の THP-1 細胞株を CRISPR/CAS9 システムを用いて分子 X の欠損株を作成した (図 6)。

ユビキチン化による機修飾のひとつに分解誘導があるが、分子 X の欠損株では NLRP3 の量は変わらなかった。これより分子 X による NLRP3 のユビキチン化は、非分解性の働きを持つ可能性を示した。そして、内在性の分子 X は内在性の NLRP3 と結合していた (図 7)。また、分子 X の欠損株では、ユビキチン化 NLRP3 は減少していた (図 8)。

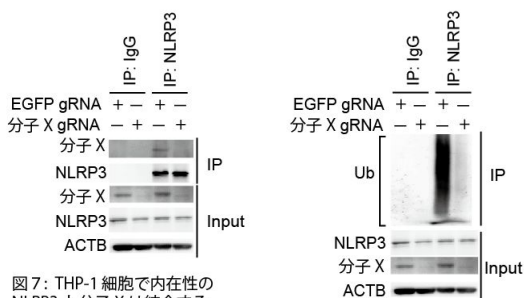


図 7: THP-1 細胞で内在性の NLRP3 と分子 X は結合する。anti NLRP3 抗体で免疫沈降を行い結合タンパクの解析を行った。

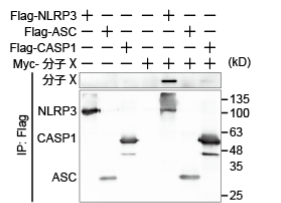


図 4: 分子 X は NLRP3 と特異的に結合する。HEK293T 細胞に Flag tag をつけたインフラマソーム構成分子 NLRP3, ASC, Caspase-1 と Myc tag をつけた分子 X を強制発現させ、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った。

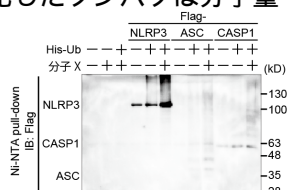


図 5: 分子 X は NLRP3 に特異的にユビキチン化を誘導する。His tag 付のユビキチン化を強制発現させて、ユビキチンタンパクのみを精製して、インフラマソーム構成分子それぞれのユビキチン化について解析した。

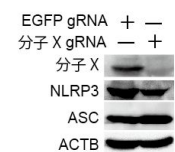


図 6: THP-1 細胞株で分子 X の欠損株を作成した

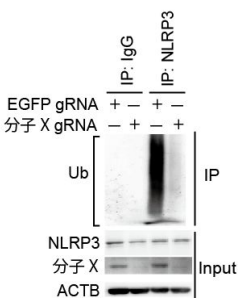


図 8: 分子 X は NLRP3 のユビキチン化に関与する

ユビキチン鎖は、ユビキチン分子同士の結合の仕方によって標的分子の機能を制御する。そこで、ユビキチン鎖の結合を見る為、代表的なユビキチン鎖である K48 と K63 に特異的な抗体を用いて、解析した結果、分子 X は K48, K63 両方の修飾を NLRP3 に行うことを明らかにした (図 9)。

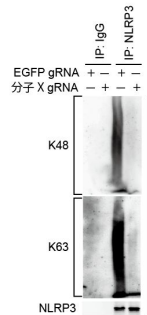


図 9: 分子 X 欠損株では NLRP3 の K48, K63 のユビキチン化が減少する

(4) 分子 X のインフラマソーム活性化に対する働きについての解析

分子 X のインフラマソーム活性化に対する働きを明らかにする為、我々はまず THP-1 の分子 X 欠損株を用いて解析を行った。インフラマソームの活性化刺激である ATP や Nigericin を投与するとインフラマソーム複合体が形成され、サイトカイン IL-1 が分泌される。分子 X の欠損株では、IL-1 の分泌が増強した (図 10)。

また、westernblot 法で解析すると、欠損株の培養液中に活性化型の IL-1 (p17) が増えることを明らかにした (図 11)。これらの結果は、分子 X の欠損によりインフラマソームがより強く活性化していることを示している。

次に THP-1 に分子 X の強制発現株を作成した。また、分子 X の機能に關与するドメイン構造をアミノ酸置換により変異させたものを強制発現する株を同時に作成した (図 12)。分子 X の強制発現株にインフラマソームの活性化刺激を行った結果、分子 X の野生型 (WT) の強制発現株では IL-1 の分泌は抑制された。一方で変異型ではその抑制効果は失われた (図 13)。それは、Westernblot 法で解析すると活性化型の IL-1 (p17) は減少していた。これらの結果より、分子 X はインフラマソームの活性化に対して抑制的に働くことを明らかにした。

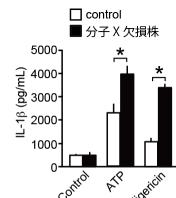


図 10: 分子 X の欠損株はインフラマソームがより活性化し、IL-1β の分泌が増強する。

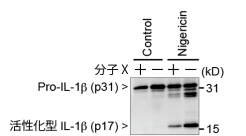


図 11: 分子 X の欠損株はインフラマソームがより活性化し、活性化型 IL-1β (p17) の量が増える

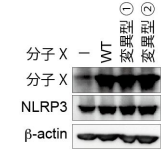


図 12: THP-1 に分子 X の WT, 変異型①、変異型②を強制発現させた。

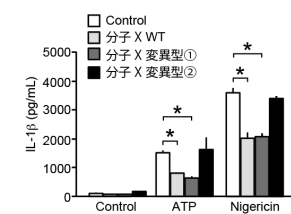


図 13: 分子 X の強制発現によって、インフラマソーム活性化誘導による IL-1β の分泌は抑制された。

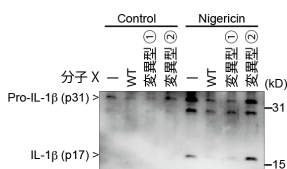


図 14: 分子 X の強制発現によって、インフラマソーム活性化誘導による活性化型 IL-1β (p17) の分泌は抑制された。

#### 4. 研究成果

我々は、インフラマソーム中に E3 ユビキチンリガーゼ分子 X が含まれることを初めて明らかにした。その分子 X は NLRP3 特異的に結合し、K48, K63 を介したユビキチン鎖を修飾することを明らかにした。また、分子 X は NLRP3 インフラマソームに抑制的に働くことを明らかにした。本研究は、炎症機構の一つインフラマソームのユビキチン化を介した抑制機構の一部を明らかにした。インフラマソームの関与する、内分泌代謝疾患を含む様々な疾患に対するユビキチン修飾機構を標的とした薬剤開発に貢献できると考えている。また、遺伝病として NLRP3 インフラマソームが恒常的に活性化する疾患が存在する。我々は、分子 X の変異や欠損がインフラマソームのより強い活性化を誘導することを明らかにしており、NLRP3 インフラマソームの関連する遺伝病への関わりも今後検討していく必要がある。

現在、分子 X に関する研究をまとめて投稿準備中である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

川島 晃 (KAWASHIMA AKIRA)