

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

動物細胞におけるラフト等の脂質膜ドメインを介した 生体機能調節機構の解析と疾病関連因子探索への応用

所 属 国立感染症研究所 細胞化学部

研究者 北川 隆之

分担研究者

- | | |
|-------------------|------|
| (1) 国立感染症研究所細胞化学部 | 西島正弘 |
| (2) 北里大学薬学部 | 熊沢義雄 |
| (3) 生化学工業(株)中央研究所 | 田中重則 |
| (4) 第一製薬(株)創薬一研 | 難波憲司 |

要旨

動物細胞のラフトなどの脂質膜ドメインはコレステロールとスフィンゴ脂質に富み、シグナル伝達やウイルス、細菌感染に関与する特徴的なタンパク質成分を多く含む。本研究では、新たに脂質膜ドメインの構成分子として糖輸送タンパク質の存在を明らかにした。またマクロファージ細胞表面のTLR4-MD-2複合体は構造的に異なる細菌由来のLPSなど多様な分子を認識する受容体であることが判明した。LPS不応答性のTLR4欠損マウスではIL-12R β 2鎖のSTAT4結合領域が欠損しIL-12に低応答性をしめした。今後は膜機能調節機構やシグナル伝達機構の解析により感染症治療薬や診断薬探索への応用を試みる。

1. 研究目的

動物細胞の細胞膜は細胞内外のシグナルに応答する特異的なシグナル伝達分子複合体を介して細胞内の恒常性を維持している。細菌やウイルスなどの感染症においては細胞膜の特異的な生体防御系が関与し、シグナル伝達や生体機能調節機構の解析は、感染症や生体防御系に関連した新規因子の探索や新規治療薬開発への応用が期待される。

近年、動物細胞の細胞膜はラフトなどの不均一な脂質膜ドメインを含むことが明らかにされている。ラフト膜はコレステロールとスフィンゴ脂質に富み、シグナル伝達やウイルス感染などに関与するタンパク質成分も多く含んでいる。本研究では、ラフトなどの脂質膜ドメインに含まれる膜タンパク質の局在性や機能調節機構、ならびに先天性免疫を制御するLPSシグナル伝達機構や肺炎起因菌の*C.pneumoniae*感染機構について、分子細胞生化学、分子生物学的な手法を用いて解析する。また、これらを基盤として新規疾病関連因子や感染症治療薬の探索に応用する。

2. 研究方法

1) HeLa融合細胞株よりTritonX-100可溶性、難溶性画分を調整し、糖輸送タンパク質の発現を特異抗体を用いたウエスタンブロット法で解析した。また、TritonX-100可溶化後の密度勾配遠心法によるラフト膜の分離も試みた。

2) マウスpro-B細胞株Ba/F3にTLR4-MD-2複合体を強制発現させた細胞株を作成し、*Flavobacterium meningosepticum*の膜脂質成分から分離精製したFlavolipinで刺激をした。細胞内の刺激伝達は転写因子NF- κ Bの活性化をゲルシフト法及び細胞内に導入したNF- κ B活性化依存レポーター遺伝子(ルシフェラーゼ)の発現測定により解析した。Flavolipin刺激におけるLPS受容体のCD14の関与について、CD14発現細胞を用いて解析した。またFlavolipinの2カ所の光学活性中心について、それぞれ光学異性体を合成して刺激効果を比較検討した。

3) B10CrマウスおよびB10Snマウスより調整した脾細胞懸濁液 4×10^6 cells/mlを96穴プレートに分注し、rIL-12 (BD Pharmingen)を各濃度に添加し、37℃、24時間培養後、上清中のIFN- γ 量はELISA法で測定した。IL-12シグナル伝達分子(IL-12R β 1鎖、IL-12R β 2鎖、TYK2、JAK2およびSTAT4)のmRNA量はRT-PCR法で、タンパク質発現とリン酸化は特異抗体を用いた免疫沈降、ウエスタンブロット法で解析した。またIL-12R β 2鎖のクローニング及びシークエンスはPCR法で解析した。

4) 血漿中のエンドトキシンレベルの推移を比較検討するために、雌性ICRマウスの腹腔内にE.coli O111:B4生菌108cfu を接種し、感染1時間後に10,000 U/kgの抗生物質PLBを腹腔内に投与した。感染対照群とPLB投与群(各々5匹)の各時点の血漿中エンドトキシン値をエンドスベックESテストMKを用いてウェルリダー法で測定した。生菌感染による致死性のショックが誘導される条件と抗生物質投与の効果について、1群10匹の雌性8週齢のICRマウスの腹腔内にE.coli O111:B4生菌を1匹当たり107cfuおよび108cfu接種し、感染後の肝臓内での菌数の推移と生存率を観察した。

5) HEp-2細胞浮遊液(2×10⁵個)をカバーグラス入りの24穴プレートで約24時間培養し、各穴に*C.pneumoniae* Kajaani 7株を接種(104 IFU/穴)し、2000 rpm, 25℃の条件下にて1時間遠心処理を行い細胞内感染させた。次いで、上清を吸引除去し、cycloheximideを含むMEM培養液を各穴に1 mLずつ分注後、35℃、5% CO₂ガス濃度の条件下にて約72時間培養した。培養終了後、カバーグラスを風乾させ、エタノールにて15分間固定処理を実施した。*C.pneumoniae* を特異的に染色するChlamydia pneumoniae FITC Research Reagent (DAKO社,Denmark)またはクラミジア属を染色するクラミジア FA 試薬を用いて染色し、万能写真顕微鏡Axiophot (Carl Zeiss社, Germany)にて封入体形成の有無を観察した。

8週齢の雄性C57BL/6マウスに高コレステロール餌(組成:1.25%コレステロール、15%脂肪、0.5%コール酸ナトリウム、83.25%CRF-1)を16週間与え、マウス動脈硬化発症モデルを作出した。対照として、CRF-1を単独で与えた。

3. 研究成果

1) ヒト子宮がん細胞における糖輸送タンパク質のラフト膜分布

ヒト子宮がん由来HeLa細胞の腫瘍性には新規癌抑制遺伝子の関与が推定されている。正常ヒト細胞との融合によりin vivo腫瘍性の抑制されたHeLa融合細胞は糖輸送タンパク質のGLUT1を発現しているのに対して、癌抑制遺伝子の欠損により腫瘍性を獲得した融合細胞ではGLUT1とGLUT3を発現している。本研究ではこれら糖輸送タンパク質ファミリーのラフト膜分布の可能性について検討した。

腫瘍性のHela融合細胞株(CGL4)を氷冷下でTritonX-100処理を行うと、GLUT3を含む80%以上のタンパク質は可溶性となったが、GLUT1は部分的に難溶性画分に分布した(図1)。対照に検討したTritonX-100難溶性のカベオリン、アルカリホスファターゼも難溶性画分に回収された。つぎに、TritonX-100可溶化後の全タンパク質を密度勾配超遠心法により分離したところ、GLUT1はカベオリン、アルカリホスファターゼ、GM1とともにラフト膜画分に相当する低密度画分に分布したのに対し、GLUT3は大部分の可溶性タンパク質とともに高密度画分に分布していた(図2)。TritonX-100溶液における難溶性のGLUT1はシクロデキストリンにより約70%の膜コレステロールを除去すると、ほぼ完全に可溶性となった。以上より、Hela融合細胞株に発現するGLUT1とGLUT3はそれぞれ異なる細胞膜ドメインに存在し、糖輸送調節に寄与することが示唆された。GLUT1はその特性からコレステロールを多く含むラフトなどの脂質膜ドメインに分布すると推定された。

2) LPS受容体:TLR4-MD-2複合体による異物認識の分子機構

マクロファージは様々な感染微生物によって活性化され、様々な炎症性サイトカインを分泌誘導することにより感染防御をしている。マクロファージの微生物感染における防御作用は細胞表面に存在する微生物成分に対する分子認識受容体を介しているとの仮説が立てられていた。最近、微生物成分のうち、リポポリサッカライド(LPS)の認識・識別にはToll-like receptor (TLR) 4-MD-2複合体が、リポペプチドやペプチドグリカンなどの認識・識別にはTLR2を中心とする複合体がそれぞれ関与することが示されている。我々はTLR4-MD-2複合体による異物認識の分子メカニズムの解明を目的として、これまでTLR4-MD-2複合体のリガンドとなる分子の検索を行い、抗癌剤の一種である西洋イチイ由来のタキソールがリガンドとなることを見いだした。本研究ではさらに百日咳菌や緑膿菌などのグラム陰性病原菌に存在するアミノ酸含有膜脂質(Flavolipin)について検証した。

Lipoaminoacidの一種であるFlavolipin(図3)は日和見感染菌*Flavobacterium meningosepticum*の膜脂質成分の20%をしめる主要成分であり、マクロファージを活性化してTNF- α 等の炎症性サイトカインを誘導する。これまでLPS低応答性変異マウスC3H/HeJ由来マクロファージではFlavolipinによる活性化が見られないことが知られているが、活性化に必要な構造や刺激伝達に関わる分子の同定はされていない。マウスpro-B細胞株Ba/F3にTLR4-MD-2複合体を強制発現させると細胞はFlavolipin刺激にตอบสนองしてNF- κ B活性化が起こるようになった。TLR4の細胞質領域を欠損させた変異TLR4では刺激が伝達されないことからTLR4の細胞質領域を介して刺激伝達が行なわれると考えられた。以上の結果、FlavolipinはLPSや

タキソールと同様にTLR4-MD-2複合体のリガンドであることが明らかになった。このNF- κ B活性化は細胞表面へのCD14の発現によってさらに増強された。CD14はLPS刺激伝達を増強したが、タキソール刺激伝達は増強しなかった。従って、TLR4-MD-2複合体のリガンドのうちでも、CD14の要求性は異なると考えられた。また、Flavolipinに存在する2カ所の光学活性中心のTLR4-MD-2複合体による刺激認識における重要性を調べるため、それぞれ光学異性体を合成し、TLR4-MD-2発現Ba/F3細胞及びマクロファージ様細胞株J774.1に対する刺激効果を比較検討した。その結果、脂肪酸部位中の光学活性中心がR型であるとTLR4-MD-2複合体を強制発現したBa/F3細胞株でのNF- κ B活性化依存レポーター遺伝子の活性化（図4）、マクロファージ様細胞株からのTNF α 発現誘導活性が見られることがわかった。以上の結果から、Flavolipinの刺激伝達にTLR4-MD-2複合体が関与すること、及びFlavolipinの脂肪酸部位のR型立体配置がマクロファージ活性化に重要であることが明らかになった。

3) 遺伝子欠損マウスを用いたサイトカインシグナルの情報伝達機構

LPSに不応答性を示すC57BL/10ScCr (B10Cr)マウスは、その受容体であるToll-like-receptor 4 (TLR4)を先天的に欠損している。さらに、このマウスはinterleukin 12 (IL-12)で刺激してもinterferon- γ (IFN- γ) 産生が低いことも知られている。本研究ではB10CrマウスのIL-12レセプターからのシグナル伝達について研究した。

正常C57BL/10ScSn (B10Sn)脾細胞をrIL-12で刺激するとIFN- γ を産生したが、B10Cr脾細胞は産生しなかった（図5）。IL-12レセプター (IL-12R) およびシグナル伝達に関わるIL-12R β 1鎖、IL-12R β 2鎖、TYK2、JAK2およびSTAT4のmRNAの発現をRT-PCRで検討したところ、B10CrマウスもB10Snマウスと同様にmRNAを発現していた。rIL-12で脾細胞を刺激した時、STAT4のチロシン残基がリン酸化されているかについてウエスタンブロット法で検討した。B10Sn脾細胞と比べB10Cr脾細胞におけるSTAT4のチロシンリン酸化の程度が著しく低いことが分かった。STAT4が結合するIL-12R β 2鎖遺伝子の塩基配列を調べた結果、2472番目のシトシンがグアニンに置換した一塩基変異により778番目のチロシンが終止コドンに変化していることが分かった（図6）。778番目以降のアミノ酸配列にはSTAT4の結合部位が存在することから、B10CrマウスのIL-12低応答性はIL-12R β 2鎖のSTAT4結合領域が欠損しているためであると結論した。

4) 細菌感染と血中エンドトキシン解析

細菌感染に伴うエンドトキシンショックの実験モデルを用い、診断薬の標準エンドトキシンの由来となっているE.coli O111:B4株をマウス腹腔内に感染した時の血中エンドトキシン値の動態とエンドトキシンショックの誘導について検討した。107cfuの感染ではマウスの致死性ショックは誘導されないが、108cfuで感染させたマウスは、すべて48時間以内には死亡した。108cfu感染1時間後に抗生物質PLBを腹腔内に投与した群ではすべて生存し、PLB処理により致死性ショックが回避できた。感染1時間後の肝臓中の菌数は、およそ107cfuであり、感染3時間後では108cfuに達し、その後も緩やかに増加した。一方、PLB投与30分後（感染1.5時間後）の時点で、PLB投与群の肝臓中の菌数は、106cfu近くまで低下し、その後も菌数の減少傾向を認めた。従って、PLBの腹腔内投与がショックの誘導の回避効果と相関することが示された。108cfuの感染後の血漿中のエンドトキシン量は、500EU/mLであったが、時間依存的に増加した。一方、PLB処理群では、血中エンドトキシンレベルは、どの時点でも、約1,000EU/mLで、感染群との間に有意な差を認め（図7）、致死性ショックの回避との相関が認められた。

5) *C.pneumoniae* の *in vitro* 培養法と染色法

市中肺炎の主要起因菌である *Chlamydomphila pneumoniae* (*C.pneumoniae*)の細胞内感染・増殖にラフト膜の関与が示唆されている。我々はこれらの関連性に着目し、本年度は、*in vitro* における *C.pneumoniae* の培養法ならびにマウス動脈硬化症モデルの作出について検討した。HEp-2細胞に感染した *C.pneumoniae* の封入体の有無について、蛍光顕微鏡下に検討した。その結果、FITC Research Reagentを用いることにより、アップルグリーンに発色する *C.pneumoniae* の封入体が特異的に染色されることを確認した。

健常C57BL/6マウスに *C.pneumoniae* を点鼻感染しても動脈硬化の発症はほとんど認められないことが報告されている。そこで、我々は高コレステロール食を与えたC57BL/6マウスに *C.pneumoniae* を経気道感染した場合の動脈硬化の発症頻度を検討する目的で、まず非感染条件での動脈硬化の発症時期とその頻度につき検討中した。解剖時の所見として、CRF-1のみを与えたマウスでは体重増加以外に各臓器での変化は認められなかったが、高コレステロール食を与えたマウスでは給餌開始後10週間目から内臓および皮下脂肪の増加、脂肪肝が認められ、血清も白濁傾向にあった。さらに感染条件下での変化を検討中である。

4. 考察

我々は、*in vivo*腫瘍性の異なるヒト子宮がん由来Hela/正常ヒト融合細胞系を用いて、新規癌抑制遺伝子機能に關与する細胞膜タンパク質の発現変化について検討し、腫瘍性に伴うグルコース輸送タンパク質 (GLUT3)の発現変化を見出した。本研究では、ヒトがん細胞におけるグルコース輸送タンパク質発現の生理的役割を解析することを目的として、グルコース輸送タンパク質ファミリー (GLUT1、GLUT3) の細胞膜分布について検討した結果、GLUT1はコレステロールを多く含む界面活性剤に難溶性のラフトなどの脂質膜ドメインに分布したのに対し、GLUT3は界面活性剤に可溶性の細胞膜に分布することが示唆された。MDCKやCaco-2などの極性細胞においては、GLUT1は側底側細胞膜

(basolateral) に分布するのに対し、GLUT3は頂端側細胞膜 (apical) に分布する事も報告されている。Hela融合細胞株に発現するグルコース高親和性のGLUT1とGLUT3の細胞膜分布がどのように調節されているのか、また糖輸送調節にどのように奇与するのか、今後の検討課題である。

マクロファージ細胞表面のLPS受容体：TLR4-MD-2複合体を介した異物認識機構の解析より、グラム陰性菌由来のアミノ酸含有膜脂質(Flavolipin)がCD14及び、TLR4-MD-2複合体に認識されるリガンドであると考えられる。以上の因子はLPS認識にも関わる因子である。FlavolipinとLPSは構造が部分的に類似しているが、この類似した部分が受容体に認識されるのに関わる部分かもしれない。またLPSに不応答性を示すTLR4欠損マウスはIL-12に対して低応答性であり、IL-12R β 2鎖のSTAT4結合領域が欠損していた。

敗血症などグラム陰性菌の感染症の診断に血中エンドトキシンレベルの測定が行われている。E.coli O111:B4株のマウス腹腔内感染において、致死性のショックに伴い血中エンドトキシンレベルが時間依存的に増加したのに対し、PLB処理群では致死性のショックは回避されたが、血中エンドトキシンは感染初期のレベルであった。血中エンドトキシンレベルの測定に加え、ショックに至る他の因子の解析が必要である。

肺炎起因菌の*C.pneumoniae* について*in vitro* の培養法と封入体の特異的な染色法を確立した。今後は細胞内感染とラフト膜との関連や動脈硬化発症との因果関係につきマウスモデルを用いて検討していく予定である。

5. まとめ

Hela融合細胞株に発現するグルコース輸送タンパク質ファミリーのGLUT1とGLUT3はそれぞれ異なる細胞膜ドメインに存在し、糖輸送調節に奇与することが示唆された。GLUT1はその特性からラフトなどの脂質膜ドメインに分布すると推定された。

マクロファージ細胞表面のTLR4-MD-2複合体は構造的に異なるLPS、タキソール、Flavolipinを認識できる受容体であることが判明した。これらのリガンドがTLRを活性化する分子機構や脂質膜ドメインの解析によりパターン認識の分子基盤を解明をめざしている。IL-12に対して低応答性をしめすまたLPS不応答性のTLR4欠損マウスではIL-12R β 2鎖のSTAT4結合領域が欠損していた。今後はエンドトキシンショックに至るシグナル伝達機構の解析等により感染症治療薬や診断薬探索への応用を試みる。

また*C.pneumoniae*の細胞内感染およびラフト膜との関連性に着目し、*In vitro* における*C.pneumoniae* の培養法と封入体の特異的な染色法を確立した。

6. 研究発表

1. Gomi, K., Kawasaki, K., Kawai, Y., Shiozaki, M. and Nishijima, M. Toll-like receptor 4-MD-2 complex mediates the signal transduction induced by flavolipin, an amino acid-containing lipid unique to *Flavobacterium meningosepticum* J. Immunol. In press
2. K. Kawasaki and M Nishijima. Minireview: Molecular basis for innate immune recognition of microbial components. Jpn. J. Infect. Dis. In press
3. S. Akashi, Y. Nagai, H. Ogata, M. Okawa, K. Fukase, S. Kusumoto, K. Kawasaki, M. Nishijima, S. Hayashi, M. Kimoto, and K. Miyake. Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition. Int. Immunol. 13 1595-1599 (2001)
4. K. Kawasaki, S. Akashi, R. Shimazu, T. Yoshida, K. Miyake, and M. Nishijima. Involvement of Toll-like receptor 4/MD-2 Complex in species-specific lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. J. Endotoxin Res. 7 232-236 (2001)
5. Ryll, R., Watanabe, K., N. Fujiwara, R. Hasunuma, Y. Kumazawa, M. Okada and I. Yano. Mycobacterial cord factor, but not sulfolipid, causes depletion of NKT cells and upregulation of CD1d1 on murine macrophages. Microbes Infect. 3: 611-619 (2001)

6. Hasunuma, R., H. Morita, S. Tanaka, M.A. Freudenberg, C. Galanos and Y. Kumazawa. Differential clearance and induction of host responses by various administered or released lipopolysaccharides. *J. Endotoxin Res.* 7: 421-429 (2001)

7. Ryll, R., Kumazawa, Y. and Yano, I. 2001. Immunological properties of trehalose dimycolate (cord factor) and other mycolic acid-containing glycolipids—review. *Microbiol. Immunol.* 45: 801-811 (2001)

8. Mita, M., Imura, N., Kumazawa, Y. and Himeno, S. Suppressed proliferative response of spleen T cells from metallothionein null mice. *Microbiol. Immunol.* 46: 101-107 (2002)

7. 知的所有権の取得状況
該当なし

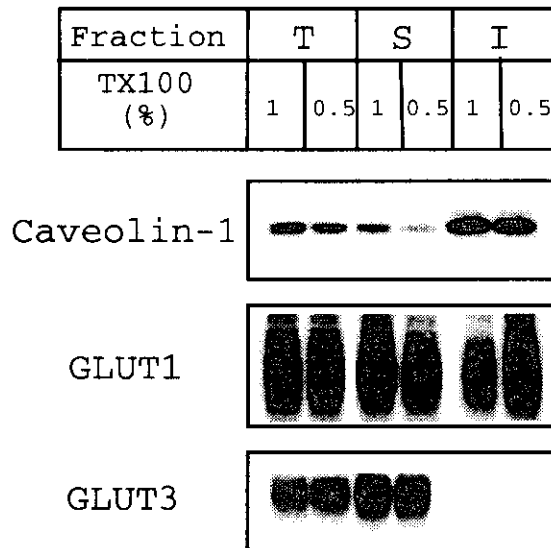


図1. HeLa融合細胞におけるTritonX-100による可溶化
T (全蛋白), S (可溶性蛋白), I (不溶性蛋白) 各10 μ g

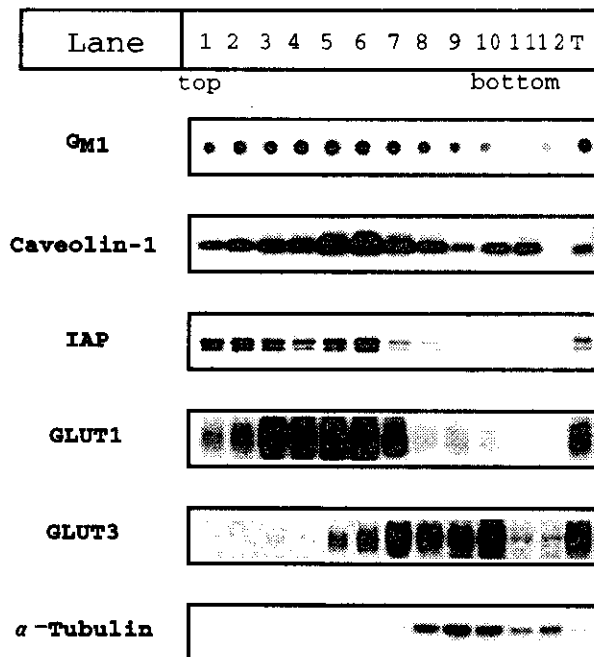


図2. 密度勾配遠心法における膜タンパク質の分布

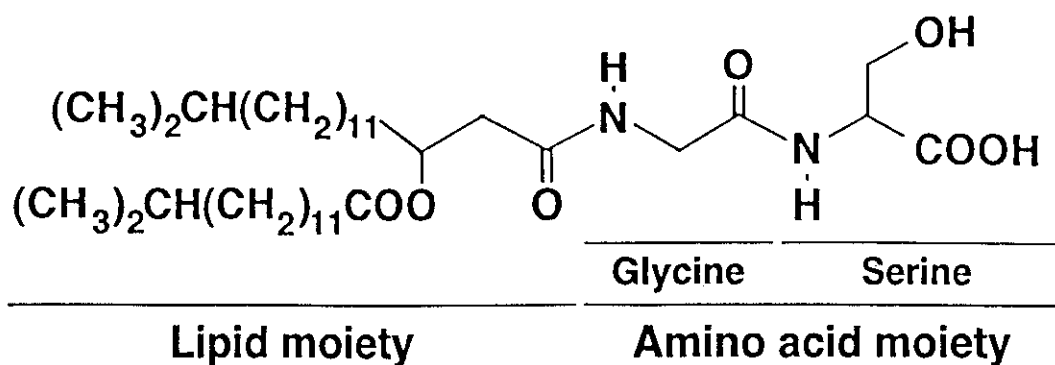


図3. Flavolipinの構造

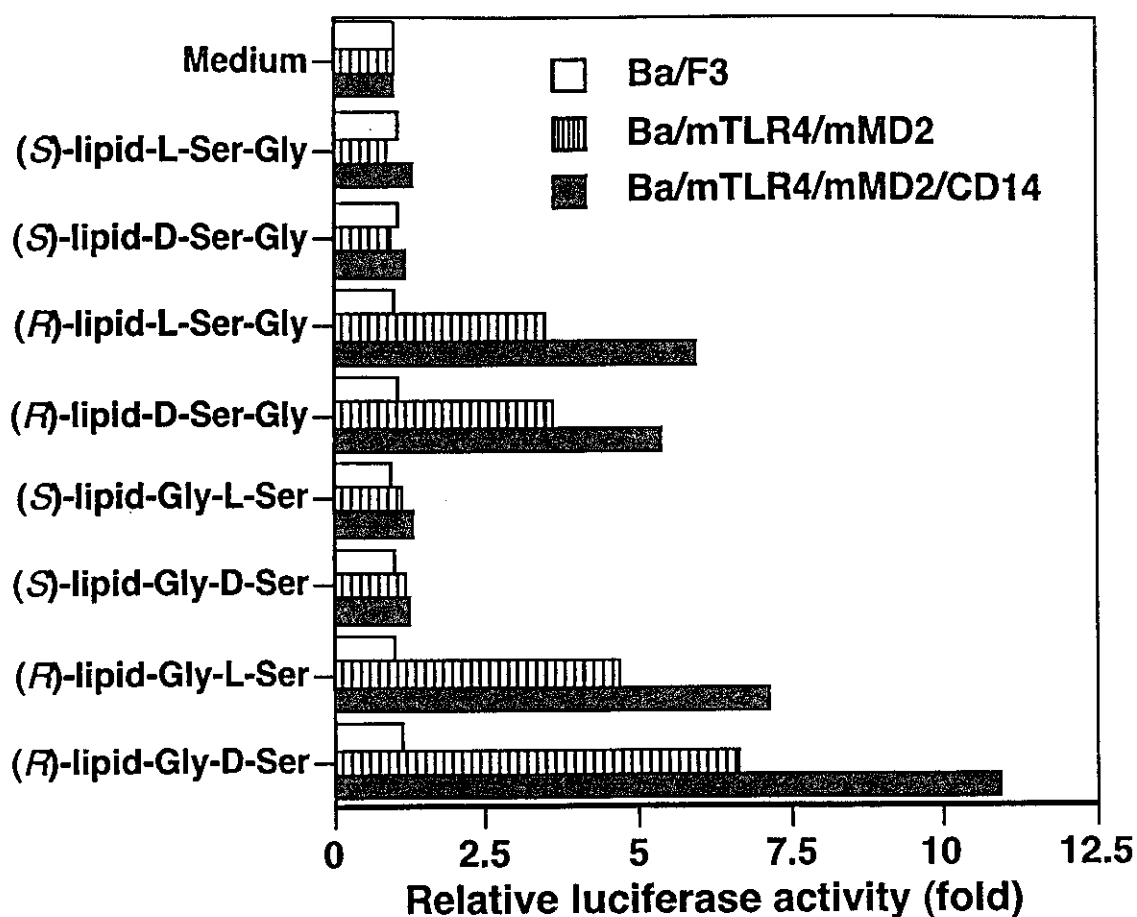


図4. Flavolipinの光学異性体とNF- κ B活性化

The (*R*)-configuration of the flavolipin lipid moiety is important for signal induction via the TLR4-MD-2 complex. Ba/F3 cells with p551gkluc introduced and Ba/mTLR4/mMD2 and Ba/mTLR4/mMD2/CD14 cells (4×10^4 cells/100 μ l of cell culture medium containing 1% DMSO in the wells of a 96-well dish (Costar)) were stimulated without (medium) or with 50 μ g/ml of the synthesized flavolipin ((*R*)-lipid-Gly-L-Ser), flavolipin stereoisomers ((*R*)-lipid-Gly-D-Ser and (*S*)-lipid-Gly-(D or L)-Ser), and flavolipin analogs ((*R* or *S*)-lipid-(D or L)-Ser-Gly). After stimulation at 37°C for 4 h, 25 μ l of 5 \times cell lysis reagent (Promega) was added to the wells, and then luciferase activity was measured. Luciferase activity was normalized as to the activity in cells incubated without a stimulant and is presented as fold induction. The data represent the averages for duplicate wells.

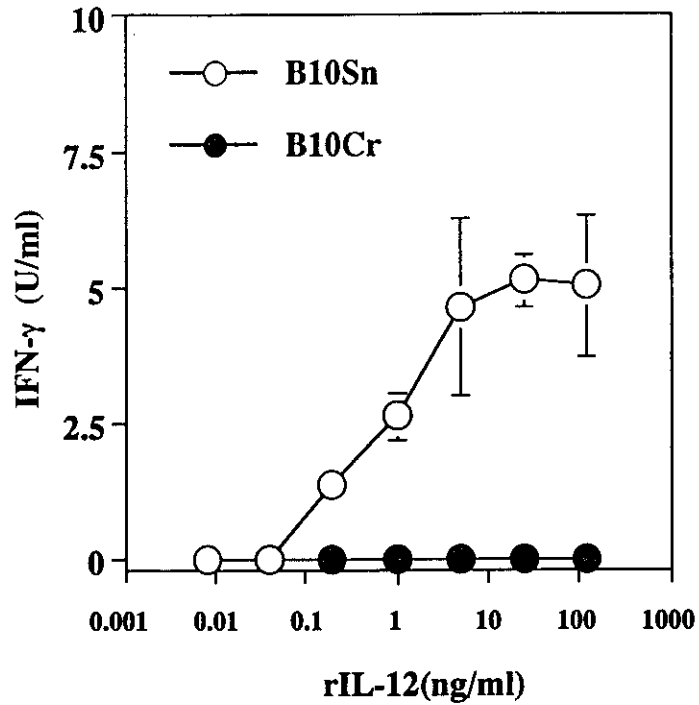


図5. 脾細胞をrIL-12で刺激した時のIFN-γ産生

B10Sn、B10Crマウスの脾細胞をrIL-12で24時間刺激した後の培養上清中のIFN-γ量を、ELISAにより測定した。

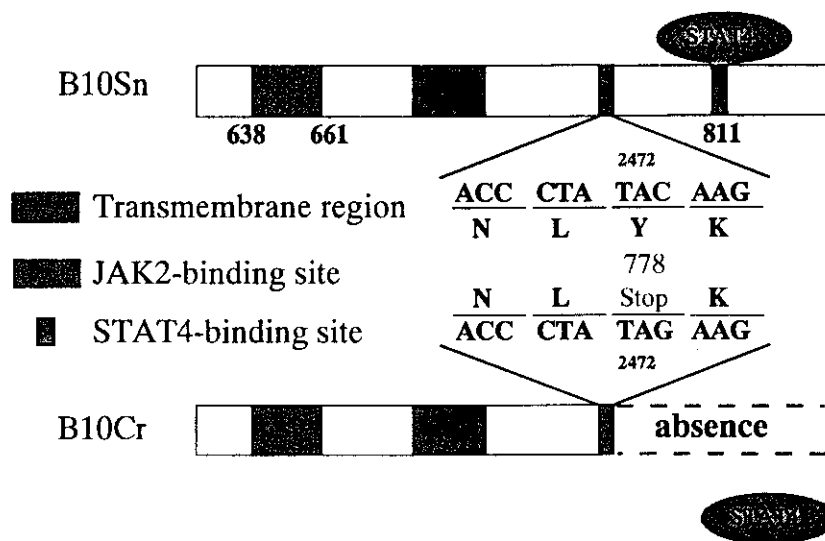
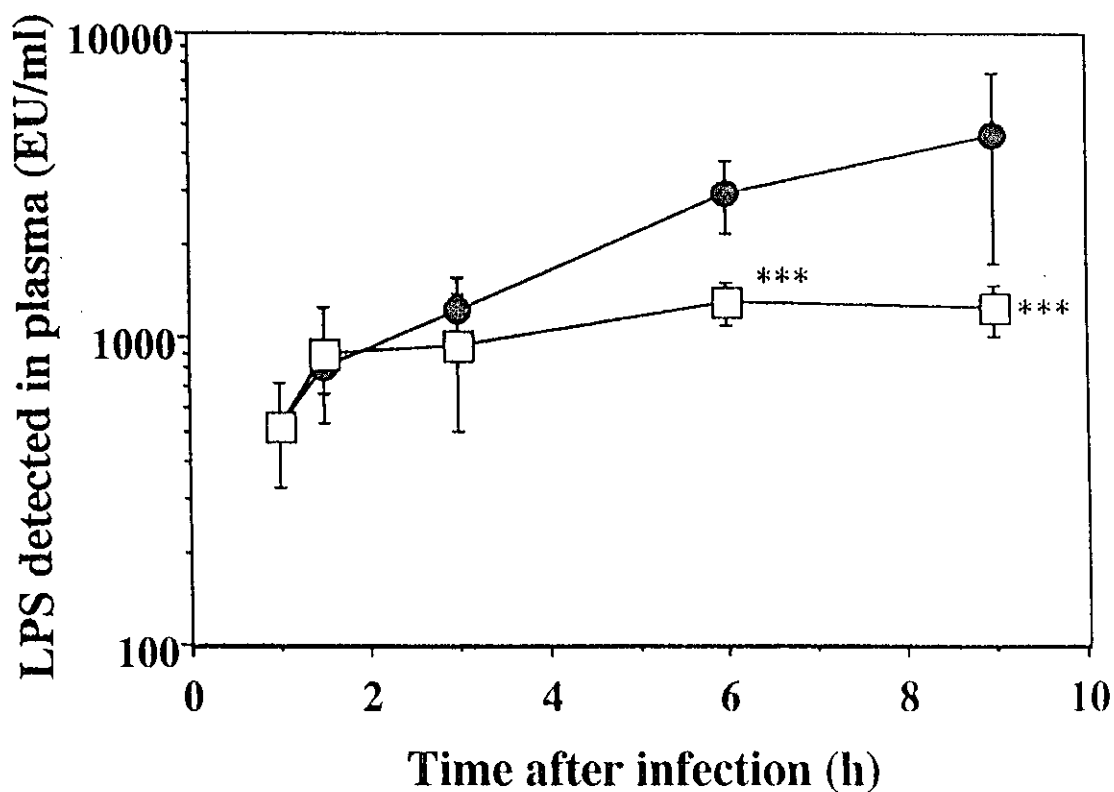


図6. B10SnマウスとB10CrマウスのIL-12Rβ2鎖

B10SnマウスとB10CrマウスのIL-12Rβ2鎖を模式的に示した。B10CrマウスのIL-12Rβ2鎖はSTAT4結合部位を欠損している。



Treatment with PLB 1 h after infection with 10^8 cfu of *E.coli* O111:B4 resulted in significant decreases in plasma LPS levels. Infection controls (●) and PLB-treated mice (□).

図7. 細菌感染と血中エンドトキシンの変動

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社