

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、その分子認識機構の一端を解明した。また、肺炎起因菌の*C.pneumoniae*感染と動脈硬化症の関連についてマウス実験モデルを用いて検討した。今後は膜機能調節機構やシグナル伝達機構の解析を基盤とした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を多く含んでいるが、構成成分や機能については不明な点が多い。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動脈硬化症との関連が疑われる肺炎起因菌の*C.pneumoniae*感染機構について細胞生物学、分子生物学的な手法を用いて解析し、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。糖輸送タンパク質の細胞膜分布は共焦点レーザー顕微鏡により解析した。

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、LPS及びタキソールに対する刺激伝達の指標として、転写因子NF- κ Bの活性化についてゲルシフト法及び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。またTLR4と細胞表面上での複合体形成と異物認識に重要なマウスMD-2中のアミノ酸残基をアラニンスキャン法により解析した。

3) 細菌由来成分のTLRを介したシグナル伝達と膜脂質ラフトの関与について、マウスマクロファージ様株RAW267.4細胞をLPSで刺激後、抗TLR4抗体および抗CD14抗体を用いて共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

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ペックESテストMKを

用いて測定した。生菌感染による致死性ショックと抗生物質の効果について、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、*C.pneumoniae* Kajaani 7株を接種(104 IFU/穴)し、細胞内感染させた。培養後、カバーグラスを風乾させ、エタノールにて固定処理を実施し、*C.pneumoniae* を特異的に染色するChlamydia pneumoniae FITC Research Reagent 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)にて封入体形成を観察した。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成した。

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た。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(図2)。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結論した。生細胞における細胞膜分布について共焦点顕微鏡による解析の結果、GLUT1は細胞膜全域に存在し、GLUT3とは異なる分布を示し、細胞外縁部において細胞骨格タンパク質のβ-actinと共局在していることが示唆された。今後、GLUT1のラフト膜分布や糖輸送調節についてさらに検討する予定である

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、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。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の関与が示されている。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、TLR4-MD-2複合体のリガンドとなる分子の検索を行い、抗癌剤の一つである西洋イチイ由来のタキソールや、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)が、LPSと同様に細胞表面のTLR4-MD-2複合体介してNF-κBの活性化やTNFα発現誘導活性をもつことを見いだした。

ついで、TLR4と細胞表面上での複合体形成と異物認識に重要なマウスMD-2中のアミノ酸残基をアラニンスクリーン法により解析した。各種アミノ酸残基をアラニンに変えた多数の変異体を導入した細胞では細胞表面上でTLR4との複合体形成、LPS及びタキソールに対する刺激にいずれも応答しなかった。一方、いくつかのアラニン変異体では、細胞表面上での複合体形成は認められたが、LPSあるいはタキソールに対する刺激に応答しなかった(図3)。これらの結果から、細胞表面上のTLR4-MD2複合体の形成はLPS及びタキソールに対する刺激伝達に必須であるが、十分ではないこと、LPS応答性獲得とタキソール応答性を獲得するマウスMD-2のアミノ酸残基は部分的に異なることが判明した。

3) LPSの応答性と脂質ラフト形成

次に細菌由来成分のTLRを介したシグナル伝達と膜脂質ラフトの関与について検討した。マウスマクロファージ様株RAW267.4細胞をLPSで刺激後、抗TLR4抗体および抗CD14抗体を用いて共焦点レーザー顕微

鏡で観察したところ、TLR4およびCD14が共にラフト様に集合していた（図4）。コレステロール除去剤で処理したRAW267.4細胞ではLPSによるラフト膜形成やTNF産生が有意に減少していた。以上の結果から、TLR4にリガンドが結合すると脂質ラフトを形成することによりTLRシグナルを細胞内へ伝達することが示唆された。

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、致死ショックの回避との相関が認められた。また細菌感染に伴い、血中に可溶性のCD14 (sCD14) が遊離した（図5）。しかし、sCD14抗体の単独処理では致死ショックは回避されなかった。

5) *C. pneumoniae* の *in vitro* 培養法と肺炎・動脈硬化症動物モデルの作出

市中肺炎の主要起因菌である *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*)は動脈硬化症のリスクファクターとして注目されており、その細胞内感染・増殖にコレステロールを含む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、本研究では*C. pneumoniae* の *in vitro* 感染系の確立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昨年報告した。

健常BALB/Cマウスに*C. pneumoniae* Kajaani 7株を経気道接種したときの肺内菌数の経日的推移を検討した結果、感染2-11日目にかけて肺内封入体数は、105から107 IFU/g Lungの範囲で持続的に増加した後、緩やかな減少に転じ、同21日目には全個体が検出限界以下となった。病理組織学的には、間質性肺炎像を呈しており、この炎症病態を構成する浸潤細胞は好中球・マクロファージからリンパ球へと移行する細胞性の免疫応答が主体であることが明らかとなった（図6）。

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した。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、脂肪肝が認められたが、動脈硬化を示唆する病変は検出できなかった。一方、非感染ApoE欠損マウスに高脂肪食を与えると大動脈における泡沫細胞の集簇に動脈硬化を示唆する病態が観察された。実験28日目におけるApoE欠損マウスの血清総コレステロール値は対照マウスと比較して約8倍高かったことから、病態変化の発症要因の一つに高コレステロール/ラフト膜形成の関与が示唆された。ついでC57BL/6マウスに*C. pneumoniae*を感染すると泡沫細胞による軽度の集簇が観察され、微弱ながら*C. pneumoniae*による炎症誘導の影響が考えられた。これに対し、*C. pneumoniae*感染ApoE欠損マウスの大動脈では泡沫細胞の重度な沈着が認められ、動脈硬化症の増悪進展を示唆する結果であったが、非感染ApoE欠損マウスのそれと比較して明瞭な差異は確認できなかった。

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、新規癌抑制遺伝子が関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の生理的意義の解析を目的として、グルコース輸送タンパク質 (GLUT1、GLUT3)の細胞膜分布を検討した結果、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。またGLUT1は細

胞膜外縁部において細胞骨格と相互作用すること示唆された。ヒトがん細胞に発現する糖輸送タンパク質のラフト膜分布の調節機構、および糖輸送調節や増殖、転移への関与など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)やタキソールがCD14/TLR4-MD-2複合体に認識されるリガンドであることを証明した。LPSとタキソールのCD14/TLR4-MD-2複合体を介した刺激伝達作用は類似していたが、受容体の分子認識機構は異なることを変異体導入法により証明した。またLPS刺激に伴い、マウスマクロファージ細胞表面にラフト様構造が観察された。

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、致命的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処理群では致命的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。LPSにより遊離されるsCD14に着目し、中和抗体の効果を検討したが、致命的ショックは回避できなかった。血中エンドトキシンの測定に加え、ショックに至る他の因子の解析が必要である。

動脈硬化症のリスクファクターと考えられる肺炎起因菌の*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。高コレステロール食を給餌させることによって、マウスは明らかに脂肪肝を主徴とする高脂血症状態になっており、*C.pneumoniae*の感染によって動脈硬化病変は増悪進展したが、発症頻度と*C.pneumoniae*感染との因果関係について明確に証明できなかった。本病原体による動脈硬化発症の重要な前段階は感染による肺炎であると考え、BALB/Cマウスに*C.pneumoniae*を経気道的に感染し、持続型のマウス肺炎モデルを作出した。近年、*C.pneumoniae*感染が外的刺激によって生活環が変化し、本病原体感染による動脈硬化症進展などの慢性炎症に関与している可能性も示唆されている。これらの情報を基に、*C.pneumoniae*の細胞内感染・増殖とラフト膜の関与を解析し、クラミジア感染治療薬の新規スクリーニングと評価系の構築に応用する予定である。

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、糖輸送調節に寄与することが初めて示された。GLUT1はその特性からラフトなどの脂質膜ドメインに分布し、細胞骨格系と相互作用することが示唆された。

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の解明をめざしている。細菌感染による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、ならびに*C.pneumoniae*感染によるマウス肺炎および動脈硬化症モデルを確立し、治療薬の新規スクリーニングと評価系へ応用する予定である。

6. 研究発表

- 1) Sakyō, T., Kitagawa, T. Differential localization of glucose transporter isoforms in non-polarized mammalian cells: Distribution of GLUT1 but not GLUT3 to detergent-resistant membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1567: 165-175 (2002)
- 2) Kawasaki, K., Gomi, K. and Nishijima, M. Gln22 of mouse MD-2 is essential for species-specific lipopolysaccharide-mimetic action of Taxol. *J. Immunol.* 166, 11-14 (2001)
- 3) K. Kawasaki and M Nishijima. Review: Molecular basis for innate immune recognition of microbial components. *Jpn. J. Infect. Dis.* 54, 220-224(2001)
- 4) 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.* 168, 2939-2943 (2002)
- 5) K. Kawasaki, H. Nogawa, M. Nishijima. Identification of mouse MD-2 residues important for forming the cell surface TLR4-MD-2 complex recognized by anti-TLR4-MD-2 antibodies, and for conferring LPS and Taxol responsiveness on mouse TLR4 by alanine-scanning mutagenesis. *J. Immunol.* 170, 413-420 (2003)
- 6) Mita, M., Imura, N., Kumazawa, Y. and Himeno, S. 2002. Suppressed proliferative response of spleen T cells from metallothionein null mice. *Microbiol. Immunol.* 46: 101-107 (2002).
- 7) Hasunuma R., H. Maruyama H. Takimoto R. Ryll S. Tanaka and Y. Kumazawa : Does High

Mobility Group 1 Protein function as a late mediator for LPS- or TNF-induced shock in galactosamine- sensitized mice? *J. Endotoxin Res.* 8 (5) 391-398 (2002).

8) Kawaguchi K., Y.Kumazawa, et al. (2002) Time and dose-dependent effect of fosfomycin on suppression of infection-induced endotoxin shock in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 25(12):1653-1656.

7. 知的所有権の取得状況 該当なし

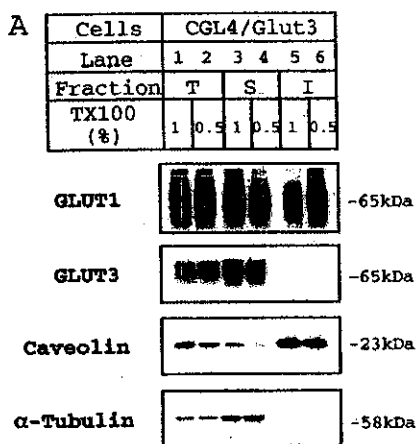
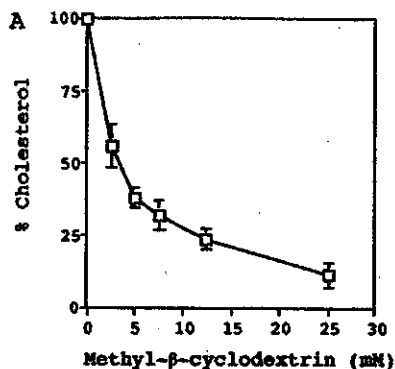


Fig. 1. Differential solubility of Glut1 and Glut3 in Triton X-100.



B

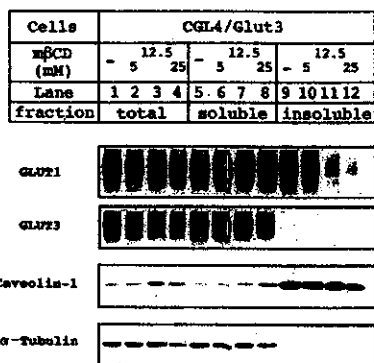


Fig. 2. Effect of cholesterol depletion on solubilization by Triton X-100.

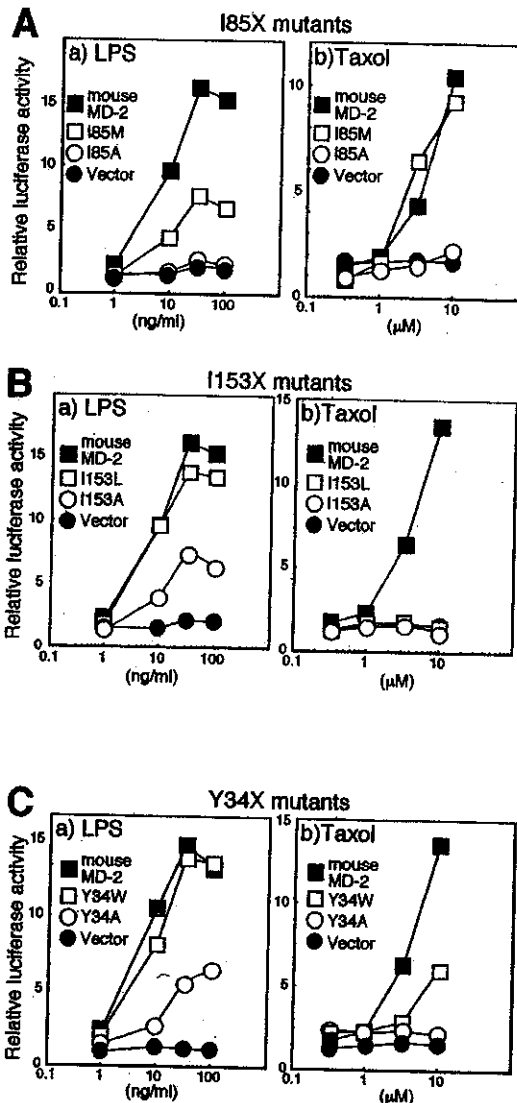


Fig. 3. Substitution of the Ile⁸⁵, Ile¹⁵³, and Tyr³⁴ residues of mouse MD-2 selectively reduces its ability to confer LPS or Taxol responsiveness on mouse TLR4. 293/mTLR4/luc cells cultivated in 24-well dishes were transfected with pEFBOS⁻ (Vector), mouse MD-2fh (mouse MD-2), or mutant mouse MD-2 expression constructs. Three days after transfection, the cells were cultivated in culture medium containing the indicated amounts of LPS (a) or Taxol (b) for 6 h, and then luciferase activity was measured. The luciferase activities are the averages for duplicate wells. The results shown are representative of two independent experiments.

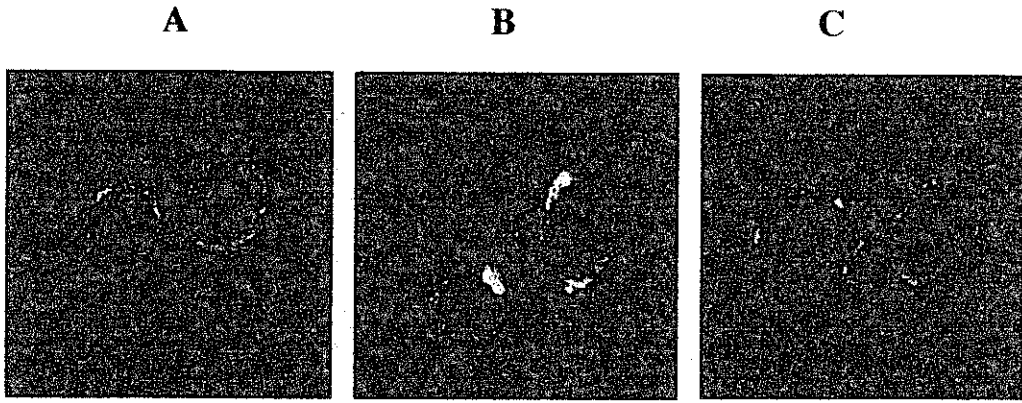


Fig. 4. LPS 刺激後の CD14 と TLR4 の脂質ラフトの形成
 MCD 処理 RAW267.4 細胞を LPS (100 ng/ml) と共に 20 分培養し、抗 TLR4 抗体 (Santa Cruz) および FITC 標識抗ヤギ IgG 抗体、TRITC 標識抗 CD14 抗体で染色後、共焦点レーザー顕微鏡 (Bio-Rad) で観察した。A: コントロール、B: LPS 刺激のみ、C: MCD 処理後 LPS 刺激

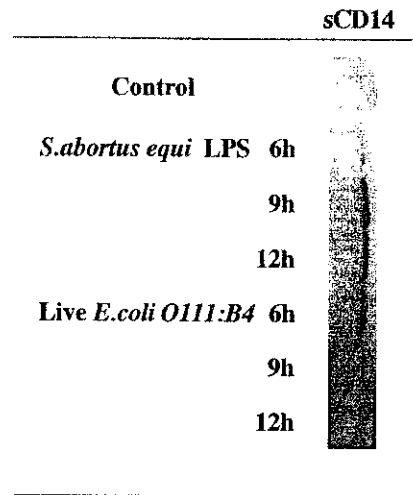


Fig. 5. Comparison of sCD14 expression in plasma of ICR mice administered 10 µg of *S. abortus equi* LPS and infected with 10⁹ cfu of *E. coli* O111:B4.

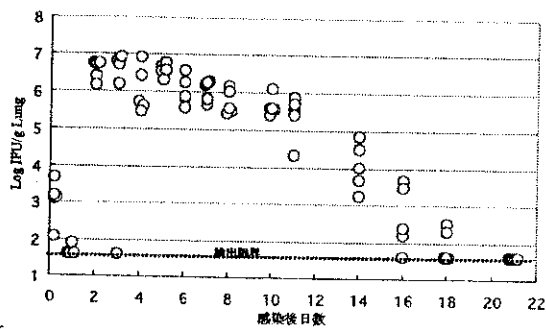


Fig. 6. BALB/Cマウスへの *C.pneumoniae* Kajaani 7 株の経気道接種と肺内菌数の経日的推移。