

平成15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

目 次

課題番号

20030895A KH21009	リン脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	西島正弘 …… 1
896A KH21010	低酸素センサーを介する虚血性および変性性神経疾患の機序解明と新規治療薬開発	芝崎 太 …… 6
897A KH21011	細胞内情報伝達分子を標的とした抗ウイルス剤および抗癌剤の開発	松田道行 …… 19
898A KH21012	抗動脈硬化性リポ蛋白質HDLの代謝制御機構	新井洋由 …… 25
899A KH21013	ゲノム修復と細胞分裂に関連する因子の構造機能解析と応用に関する研究	葛西正孝 …… 33
900A KH21014	難治性疼痛に関与するATP受容体の機能解析と医療への応用	井上和秀 …… 39
901A KH21015	動脈硬化症進展阻止のための血管内皮細胞特異的発現EDG受容体作働薬・拮抗薬の開発	望月直樹 …… 47
902A KH21016	天然物由来シグナル伝達制御物質の探索と創薬への応用に関する研究	上原至雅 …… 51
903A KH21017	肥満／糖尿病発症予防のためのターゲット遺伝子の同定と制御法の開発	江崎 治 …… 55
904A KH21018	ゲノム情報にもとづいた移植免疫抑制にかかわる遺伝子の検索と創薬への応用に関する研究	絵野沢 伸 …… 59
905A KH21019	神経・免疫・内分泌相関による生体防御機構の解明と創薬	田平 武 …… 62
906A KH21020	レクチン機能を利用した血管における生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 67
907A KH21021	感染症に関連した免疫異常の解析と新規制御物質の開発	鈴木和男 …… 74
908A KH21022	自己免疫性膵炎発症に関連するIgG 4型抗体の認識する自己抗原の検索、ならびに特異的診断システムの開発	川 茂幸 …… 84
909A KH21024	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	北川隆之 …… 89
910A KH21025	新規サイトカインの炎症性疾患における役割の解析と創薬への応用	山越 智 …… 95
911A KH21026	マイクロアレイDNAチップを用いた各種病態関連発現遺伝子の解析	辻本豪三 …… 104
912A KH21027	細胞死をもたらすストレスシグナル伝達機構の解析および生体防御機構の解明	桃井 隆 …… 111
913A KH22071	ウイルスの侵入および発芽過程を標的とした次世代抗インフルエンザ薬の開発	鈴木康夫 …… 118
914A KH22072	サイトカインシグナル制御分子による慢性関節リウマチの治療薬の開発	吉村昭彦 …… 121
915A KH22073	T細胞の活性化およびヘルパーT細胞サブセットの分化を特異的に制御する手法の樹立	宮武昌一郎 …… 125
916A KH22082	変異型HB-EGFノックインマウスによる循環器疾患の解析	目加田英輔 …… 133

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

研究要旨 動物細胞のラフトなどの脂質膜ドメインはシグナル伝達やウイルス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、ラフトドメインの新たな構成分子として糖輸送タンパク質を見出し、その分布様式を検討した。ラフト膜の関与が予想される肺炎クラミジア感染について、新規 *in vitro* 阻害剤スクリーニング系を確立した。またマクロファージ細胞表面の TLR4-MD2 受容体を介した LPS シグナル伝達機構や LPS ショックについても解析し、感染症の予防・治療薬への応用を検討した。

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所細胞化学部 西島正弘
- (2) 第一製薬(株)創薬一研 難波憲司
- (3) 生化学工業(株)中央研究所 田中重則

A. 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し、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細胞内感染において細胞膜の特異な生体防御系が関与していることから、細胞膜を介した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これら分子を標的とした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等の不均一な脂質膜ドメインを含む分子集合体から構成されることが明らかにされているが、ラフト膜を介した機能調節機構や構成成分については不明な点が多い。本研究では、ラフト膜ドメインに分布する糖輸送タンパク質の局在性や機能調節機構、ならびにラフト膜の関与が示唆されるクラミジア感染や LPS シグナル伝達について解析し、新規な疾病関連因

子や感染症治療薬の探索に応用する。

B. 研究方法

1) 培養動物細胞 (Hela, CHO) より TritonX-100 可溶性、難溶性画分を調整し、糖輸送タンパク (GLUT1, GLUT3) の発現をウエスタンブロット法で解析した。また、GLUT1, GLUT3 の N 末端に FLAG-cDNA を挿入した発現ウイルスベクターを構築し、CHO 細胞へ遺伝子導入した後の膜分布を検討した。2) ヒト肺由来 HEp-2 細胞、及びヒト Hela 由来融合細胞 (CGL1, CGL4) をカバーグラス入り 24 穴プレートで約 24 時間培養し、肺炎クラミジア (*C.pneumoniae* Kajaani 7 株) を接種 (104 IFU/ウエル) し、細胞内感染させた。培養後、エタノールにて固定処理し、*C.pneumoniae* を特異的に染色する *Chlamydia pneumoniae* FITC 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 (感染・増殖性) を評価した。3) LPS 由来の Lipid A 及び Monophosphoryl-lipid A (MPL) でマウス腹腔マクロファージ (mpMph) を刺激した後、IL-1 β の mRNA 量、細胞内 proIL-1 β 量、細胞外の mature IL-1 β 量、及び caspase-1 の活性、細胞内 pro

caspase-1量を測定した。4) LPSによるエンドトキシシオックはBALB/c及びLPSに不応答性を示すBALB/lps^dマウスを用いて検討した。感染3時間前にナリンジン (NAR、東京化成) 1mg/匹または生理食塩水を腹腔内に投与後、aroA変異株を 1×10^8 CFU / 匹で腹腔接種し生死の時間経過を調べた。マウス心臓から採取した血液より血漿を調製し、LPS濃度と可溶性CD14を測定した。

(倫理面への配慮) 実験動物の取り扱いには各事業所の動物倫理規定を遵守して実施した。

C. 研究結果

1) ヒトがん細胞における糖輸送タンパク質の発現とラフト膜分布

動物細胞の表面には 10 数種の糖輸送タンパク質 (GLUT) が存在する。これらは 12 回膜貫通型の糖タンパク質であるが、輸送特性や組織発現に特異性があり、生理的な役割や機能調節機構はそれぞれ異なると考えられる。我々は、腫瘍性の Hela 細胞株に発現する GLUT1 と GLUT3 がそれぞれ異なる細胞膜ドメインに分布することを、非イオン性界面活性剤 (Triton X-100, Lubrol WX) の可溶化分画法、共焦点コンフォーカル顕微鏡観察により明らかにした。GLUT1 は界面活性剤に難溶性のラフト膜ドメインに分布し、細胞骨格系との相互作用が確認された。これらの機能性ドメインの解析を目的に、GLUT1 と GLUT3 の N-末端に FLAG ペプチドを含む発現ベクターを構築し、CHO 細胞に強制的に発現した結果、FLAG/GLUT1 と FLAG/GLUT3 はそれぞれ難溶性画分、可溶性画分に分布していた (Fig. 1)。さらに、これらの膜分布を制御する細胞因子・薬剤について検討中である。今後、これら膜分布を制御する因子等の解析により、新規な糖代謝改善薬の開発が可能と思われる。

2) 肺炎クラミジアの in vitro 感染評価系の確立と阻害薬検索への応用

肺炎起因菌である肺炎クラミジア (C.p) は動脈硬化発症の危険因子として注目され、感染・増殖とラフト膜の関連が示唆されている。我々は C.p の in vitro 培養法：標準株 HEp-2 細胞に感染した C.p の封入体を FITC 試薬によって特異的に蛍光染色する方法を確立し、抗クラミジア化合物の評価系を構築した。ついで本評価系を適用した新規 in vitro スクリーニング系の確立を目的として、カベオリン含量の異なるヒト HeLa 融合細胞系において C.p の感染・増殖性を検討した結果、カベオリン含量の高い CGL1 細胞では C.p の封入体量が標準株 HEp-2 細胞の約 2 倍多く、カベオリン含量の低い CGL4 細胞では約 1 / 4 に低下していた (Fig. 2)。両細胞の C.p の増殖様式に着目しながら、評価系と化合物のスクリーニングを開始した。

3) LPS 受容体：TLR4-MD-2 複合体を介した異物認識と活性化の分子機構

マクロファージは様々な感染微生物により活性化され、炎症性サイトカインを分泌誘導して感染を防御する。近年、グラム陰性菌由来の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 複合体が報告されている。我々は TLR4-MD-2 複合体を介した新規リガンドを検索し、西洋イチイ由来の抗癌剤タキソールやグラム陰性菌由来のアミノ酸含有膜脂質類が、LPS と同様に TLR4-MD-2 複合体を介して NF- κ B を活性化することを見いだした。また LPS および Lipid A で活性化される Caspase-1 は Lipid A の部分加水分解産物 Monophosphoryl-lipid A (MPL) では活性化されず、活性型 IL-1 β の細胞外分泌が誘導されないことを見いだした (Fig. 3)。一方、Caspase-

1の活性化に必須とされるCaspase-11遺伝子はNF- κ Bにより活性化されるが、Lipid AとMPLいずれの場合も誘導された。Caspase-1は細胞膜の特定領域で複合体を形成し細胞外に分泌されることから、特異的なラフト膜の関与が示唆される。

4) 細菌感染に伴う血中エンドトキシン解析

エンドトキシン（リポ多糖、LPS）の血中動態を、動物モデルで把握するため、*Escherichia coli* O111、または *Salmonella typhimurium* aroA 変異株を感染したマウス血漿中のエンドトキシン濃度について診断用医薬品を用いて測定した。これらの細菌感染において、感染初期に抗生物質を使用した場合はエンドトキシンショックが抑制されて治療効果を認めたが、感染後では無効であった。従って、ショック誘導には感染早期の一時的な血漿 LPS レベルの亢進よりも高い LPS レベルの維持が関与することが示唆された。aroA 変異株を感染する前に柑橘系フラボノイドのナリンジン（NAR）を投与すると、ショック誘導が劇的に抑制された (Fig. 4)。NAR 前投与により、肝臓、脾臓中での菌数の減少とともに、血漿中の LPS 濃度、可溶性 CD14 の遊離も減少した。NAR には *in vitro* の抗菌活性がないので、この作用は宿主を介した防御応答であることが示唆され、新規な免疫調節剤の創生に寄与することが期待される。

D. 考察

ヒトがん細胞株に発現するグルコース輸送タンパク質の 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明らかとなった。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。これ

らの膜分布を制御する細胞因子・薬剤について検討中である。最近、GLUT1 はヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) の新規受容体であることが判明し (Cell, 2003)、感染症治療薬の新たな分子標的として注目される。また肺炎クラミジア (*C.pneumoniae*) の細胞内感染とラフト膜の関連性に着目し、*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適用したクラミジアの *in vitro* 感染評価系を確立し、新規治療薬のスクリーニングが可能となった。グラム陰性菌由来のリポポリサッカライド (LPS) はマクロファージの活性化を介して免疫反応を賦活化するが、致死的なエンドトキシンショックも引き起こす。本研究では柑橘系フラボノイドのナリンジン (NAR) の前投与により細菌感染に伴うショック誘導が劇的に抑制されることを見いだした。宿主免疫反応を制御する新規調節剤の創生が期待される。また LPS の活性部位である lipid A の部分加水分解産物 monophosphoryl lipid A (MPL) は細胞毒性が低く、LPS のエンドトキシンショックを抑制する作用が知られているが、MPL 作用における Caspase-1 の重要性が示唆された。Caspase-1 は様々な炎症性疾患に関与することから、炎症性疾患の発症機構や治療薬の探索に寄与することが期待される。

E. 結論

動物細胞のラフトなどの脂質膜ドメインに関与する膜輸送タンパク質の分布様式やマクロファージ細胞表面の TLR4-MD-2 受容体を介したシグナル伝達の分子機構について新しい知見を得た。また細菌エンドトキシンショックや肺炎クラミジア感染について感染評価系を確立した。今後はこれらの研究成果を活用した新規感染症の予防・治療薬開発への発展が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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)
- 2) Y. Watanabe, K. Miura, M. Shiozaki, S. Kurakata and M. Nishijima. Synthesis of lipid A type carboxymethyl derivatives with ether chains instead of ester chains and their LPS-antagonistic activities. *Carbohydr. Res.* 338, 47-54 (2003)
- 3) K. Kawasaki, K. Gomi, Y. Kanai, M. Shiozaki, M. Nishijima. Molecular basis for lipopolysaccharide mimetic action of Taxol and flavolipin. *J. Endotoxin Res.* 9, 301-307 (2003)

2. 学会発表

- 1) 佐京智子、北川 隆之 : Hela 融合細胞における糖輸送タンパク質の発現と細胞膜分布。
第 123 年回がん分子標的治療研究会総会、2003

年 6 月、東京

- 2) 佐京智子、石館光三、北川 隆之 : Studies on distribution of mammalian glucose transporter GLUT1 to a raft-like detergent resistant membrane in human epithelial carcinoma cells.
第 76 回日本生化学大会、2003 年 10 月、横浜
- 3) 桶本和男、川崎清史、西島正弘 : Distinctive cytokine induction pattern via TLR-4 between macrophages stimulated by ornithine-containing lipid and LPS. 第 76 回日本生化学会大会、2003 年 10 月、横浜
- 4) 桶本和男、西島正弘 : Monophosphoryl lipid A によるマクロファージからの IL-1 b 産生誘導機構の解析。第 33 回日本免疫学会総会、2003 年 12 月、福岡

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

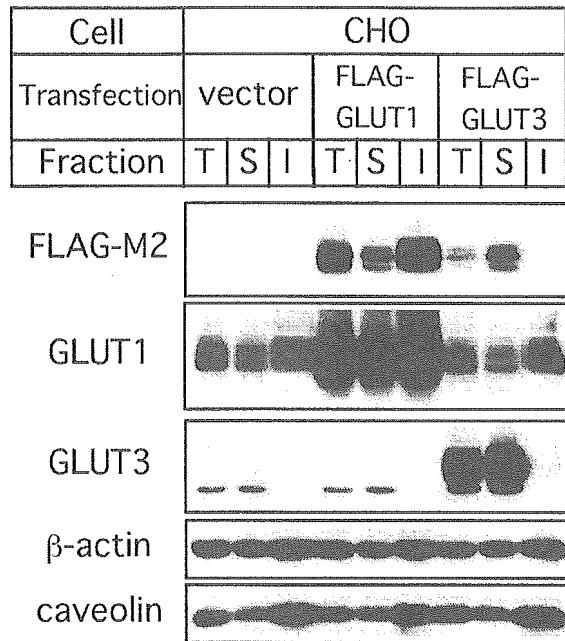


Fig.1 Raft-association of FLAG-tagged GLUT1

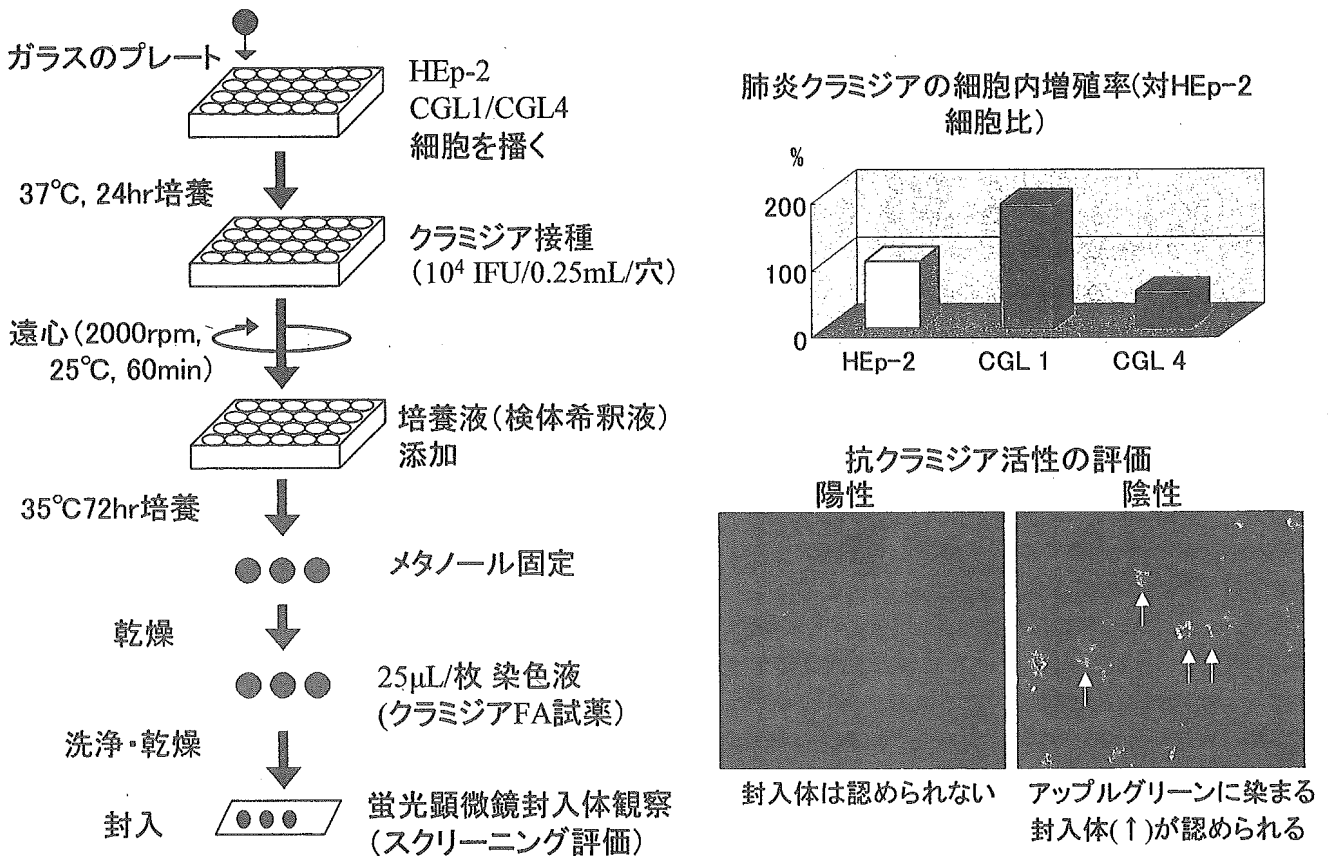


Fig. 2 肺炎クラミジアを用いた新規活性物質スクリーニング法

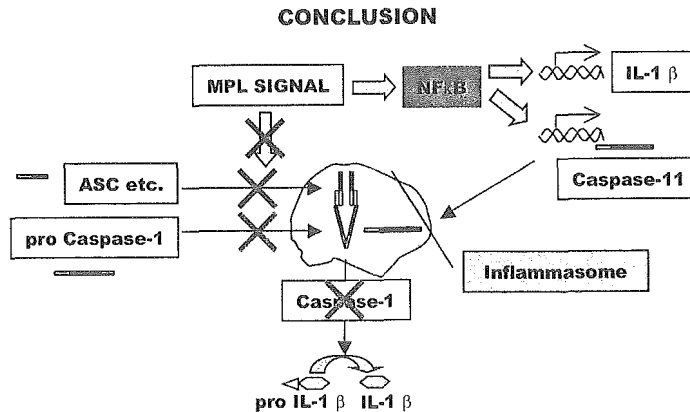
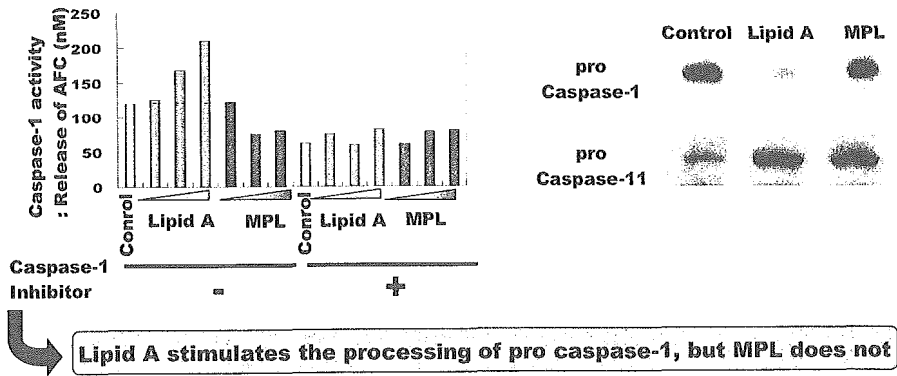


Fig. 3 Effects of Lipid A and monophosphoryl lipid A (MPL) on activation of IL1-β and caspase-1 in macrophages

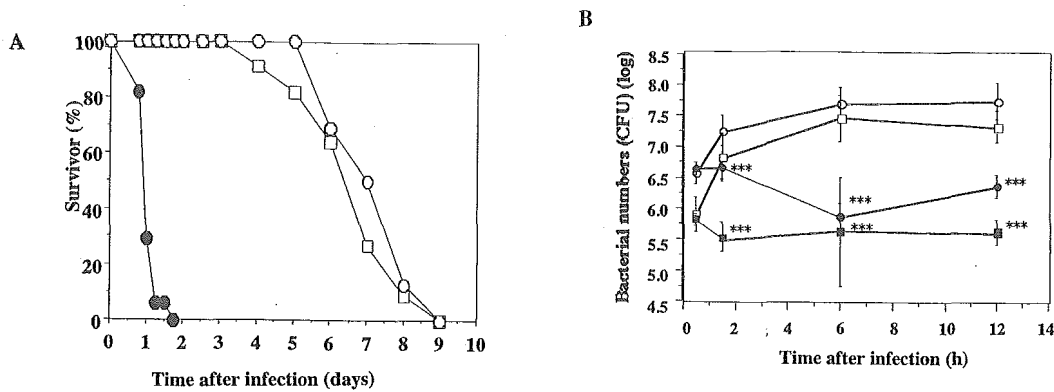


Fig. 4

Preretreatment with naringin (NAR) decreased the lethal shock and bacterial numbers. A) Mice were infected with *S. typhimurium* aroA: infection alone of BALB/c (14 mice/group, ●), infection and NAR-treated BALB/c (11 mice/group, □) and infection alone of BALB/lps^d (16 mice/group, ○). B Treatment with NAR decreased bacterial numbers in livers and spleens. The number of BALB/c mice at the indicated time point (0.5 h, 1.5 h, 6 h, 12 h) was 4 to 9 per group. Infection alone: liver (○) and spleen (□). Infection + naringin-treated mice: liver (●) and spleen (■). *** P<0.001 (vs. 0.5h after injection: by the Scheffe of post hoc test).

平成15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16年9月30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