

寄生戦略分子の構造解析に基づく新規免疫制御機構の解明

所属： 岐阜大学 大学院医学系研究科 寄生虫学・感染学分野

助成対象者：前川洋一

共同研究者：

長野 功（岐阜大学大学院医学系研究科・准教授）

呉 志良（岐阜大学大学院医学系研究科・助教）

鎌足 雄司（岐阜大学岐阜大学生命科学総合支援センター・助教）

概要

寄生虫は種々の生理活性物質を分泌し宿主生体防御機構を修飾することで長期に渡る寄生を可能にしている。私たちは宿主免疫系を制御する新たな旋毛虫分泌タンパク質(Tpp53)を同定した。本研究では組換えタンパク質(rTpp53)を作製し Tpp53 の立体構造と作用機序の解明を試みた。

マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 (RAW 細胞) を rTpp53 にて処置後に LPS で刺激すると、非処置群で認められる IL-6 産生が抑制された。rTpp53 処置 RAW 細胞では LPS 刺激による NF- κ B p65 の核移行が認められなかったためその上流について解析したところ、IKK のリン酸化不全による I κ B α のリン酸化及び分解の抑制が観察された。rTpp53 による作用は LPS 刺激と同時処置の場合には認められないことから、rTpp53 前処置により RAW 細胞の特性が変化したものと考えている。今後、更なる解析を行い Tpp53 作用機序の全容解明を進める。

Abstract

Parasites can survive in the host environment by modifying the host immune system via secreted physiologically active substances. We identified a novel secretory protein (Tpp53) of *Trichinella pseudospiralis* that modifies the host immune system. In this study, we tried to elucidate the molecular structure and functions of Tpp53 by preparing recombinant protein (rTpp53).

When mouse macrophage cell line, RAW 264.7 (RAW cells), was treated with rTpp53 before stimulation with LPS, IL-6 production was suppressed compared to the control group. Nuclear translocation of NF- κ B p65 was not observed in rTpp53-treated RAW cells after LPS stimulation. We found that the phosphorylation and degradation of I κ B α was suppressed in rTpp53-treated RAW cells. These suppressions were due to the decreased phosphorylation of IKK. rTpp53 did not suppress the NF- κ B activation when treated with LPS and rTpp53 simultaneously, indicating that the alteration of gene expression in RAW cells may be induced by rTpp53 pretreatment and this alteration may contribute to the effect of rTpp53. Further studies are needed to clarify the precise mechanism underlying the modification of host immune system by Tpp53.

研究内容

背景

寄生性線虫である旋毛虫(*Trichinella* 属)は宿主細胞内に寄生する極めて稀な多細胞性病原体である。そのため旋毛虫には生物学的に非常に特異的かつ興味深い特徴がある。旋毛虫は宿主筋細胞に感染した後、筋細胞を自己の生存に適した細胞(ナース細胞)に変異させて寄生を続ける。筋細胞変異には旋毛虫が分泌するタンパク質が重要な役割を担っている。私たちは筋細胞変異を解明するために、国内外研究者に先駆け旋毛虫から種々の分泌タンパク質を同定し、その詳細を報告してきた(1-4)。一方、寄生虫感染では宿主免疫系が抑制されることが多く報告されている。私たちはマウスを用いた旋毛虫感染研究において感染が実験的自己免疫病の発症に及ぼす影響について検討を行い、旋毛虫感染は自己免疫病の発病を強力に抑制することを明らかにした(5)。そこで私たちは、宿主免疫系への影響に関しても旋毛虫の分泌物質と関連があるものと考えた。前述のように私たちは旋毛虫から多くの分泌タンパク質を同定しており、その中で旋毛虫だけが特異的に分泌する分子量53kDaのタンパク質(*Trichinella pseudospiralis* 53: Tpp53)に着目した。Tpp53について、私たちはすでにその基礎的な特徴について検討し報告をしている(6)。ホモログ検索ではTpp53と相同性のある他のタンパク質は存在しない。また、発現は成虫およびナース細胞完成後の筋肉内幼虫に限られており、発現量は他の分泌タンパク質に比べて極めて多い。これらのことから、Tpp53は旋毛虫が宿主体内での寄生を維持していくうえで重要な役割を担っているものと推定される。そこで、実験的炎症性腸炎発症に対するTpp53の影響を解析したところ、組換えTpp53(rTpp53)前処理により腸の炎症反応は際立って弱まった(未

発表データ)。この結果は、Tpp53 が宿主免疫系の修飾や抑制に関与する分子であることを示唆している。

目的

私たちは、Tpp53 が持つ免疫修飾・抑制機構の全容を解明し炎症性疾患に対する新たな創薬の糸口の発見を目指している。本研究では、Tpp53 の立体構造解析に基づく生理活性機構の解明および作用機序の詳細について明らかにし、Tpp53 が持つ免疫修飾・抑制機構についての基礎的知見の獲得を目的とする。

結果

マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 (RAW 細胞) を r Tpp53 にて処置後に LPS で刺激すると、非処置群で認められる IL-6 産生が抑制された。同様の抑制はマウス由来のマクロファージ細胞でも観察された。LPS は Toll-like 受容体(TLR)4 のリガンドであり、TLR4 に LPS が結合すると細胞質に存在していた NF- κ B p65 が核内へと移行する。そこで rTpp53 処置により NF- κ B p65 の核移行に影響が認められるか否かについて検討した。その結果、rTpp53 処置した RAW 細胞では LPS 刺激による NF- κ B p65 の核移行が認められなかった。

そこで NF- κ B の上流について解析した。無刺激時には NF- κ B は I κ B α と結合し細胞質にとどまっている。LPS 刺激によりリン酸化された I κ B α はプロテアソームによって分解を受け、I κ B α との結合が解かれた NF- κ B p65 は核内へと移行する。I κ B α の分解について検討したところ rTpp53 処置により LPS 刺激による I κ B α の分解が抑制されていた。また、I κ B α の分解に必要なリン酸化修飾も減弱していた。さらに、I κ B α のリン酸化酵素である IKK の活性化も Tpp53 処置により消失しており、Tpp53 は IKK より上流に作用することが示唆された。しかし LPS 刺激による MAPK シグナル経路の活性化に対しては rTpp53 処置では顕著な影響を認めなかったことから、TLR4 からのシグナル全般を抑制しているわけではなく、NF- κ B 経路を選択的に抑制していると考えられた。

次に rTpp53 の作用が TLR4 に限定的か否かについて検討した。その結果、rTpp53 は TLR4 以外にも TLR1/2 を介した NF- κ B 経路の活性化を抑制した。一方、Hela 細胞を TNF- α にて刺激した際の NF- κ B 経路の活性化には影響が認められなかったことから、rTpp53 の作用はマクロファージに特異的である可能性が示唆された。また、rTpp53 による作用は LPS 刺激

と同時処置の場合には認められないことから、rTpp53 前処置により RAW 細胞の特性が変化したものと考えている。

今後

本研究では、未だ構造解析を行い得るに十分な結晶化条件を見出すことができていない。結晶化条件の最適化は今後の課題である。一方、Tpp53 分子の作用機序についてはある程度絞り込みができてきた。今後は、rTpp53 前処置によってどのような変化が生じ NF- κ B 経路を抑制しているのかについてその詳細を解明することを目指す。Tpp53 による宿主免疫制御の分子基盤の解明は炎症抑制を志向する創薬につながると考えているため、研究の継続と更なる展開に注力していく。

引用文献

1. Nagano I., et al. J. Helminthol. 2001
2. Nagano I., et al. J. Helminthol. 2002
3. Nagano I., et al. Parasitology 2006
4. Nagano I., et al. Vet. Parasitol. 2011
5. Wu Z., et al. Parasite. Res. 2010
6. Nagano I., et al. Int.J.Parasitol. 2004

本助成に関わる成果

[論文発表]

1. Asano T, Wu Z, Srinontong P, Ikeda I, Nagano I, Morita H, Maekawa Y. Non-encapsulated *Trichinella pseudospiralis* infection impairs follicular helper T cell differentiation with subclass-selective decreases in antibody responses. ***Infect. Immun.*** 2016;84(12):3550-3556. (謝辞に住友電工グループ社会貢献基金による助成を受けた旨を記載)

[口頭発表]

1. 呉 志良、長野 功、Srinontong Piyatat、浅野一信、前川洋一 宿主免疫機構を抑制する旋毛虫分泌分子 Tpp53 の機能解析 第 85 回日本寄生虫学会大会 宮崎市 2016.3.19-20.

2. 呉 志良、長野 功、Srinontong Piyarat、前川洋一 *Trichinella pseudospiralis* 由来 53kDa 分泌蛋白 Tpp53 はマクロファージの NF- κ B シグナル経路を抑制する 第 72 回日本寄生虫学会西日本支部大会 岐阜市 2016.10.15-16.
3. 住吉孝允、高橋 翔、呉 志良、Srinontong Piyarat、長野 功、前川洋一 旋毛虫感染によるスギ花粉アレルギー反応の抑制 第 72 回日本寄生虫学会西日本支部大会 岐阜市 2016.10.15-16.

[ポスター発表]

1. Zhiliang Wu, Isao Nagano, Piyarat Srinontong, Yoichi Maekawa. *Trichinella pseudospiralis*-derived 53kDa excretory-secretory protein inhibits NF- κ B signal pathway of macrophage. The 14th Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonoses Sagamihara, Kanagawa Nov. 26-27. 2016.

[その他]

なし