

細菌感染に対するヒト抗菌蛋白質BPIを介した自然免疫系の研究

Study on innate immunity mediated by human BPI upon bacterial infection

研究代表者 筑波大学応用生物化学系 講師 西村 仁
Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba
Assistant Professor, Hitoshi NISHIMURA

和文アブストラクト

生体には細菌などの異物に対する防御機構(自然免疫系)が存在しており, その研究が活発に行なわれている. しかし, 個々の研究は特定の分子に焦点が絞られており, 自然免疫系全体におけるその分子の位置付けは不明であることが多い. 本研究は, 自然免疫系を代表する bactericidal/permeability-increasing protein (BPI)と補体系の関わりを分子レベルから個体レベルで明らかにすることを目的としている. 最近, 毒性細菌の感染が国内外において問題となっているが, 抗生物質は細菌の生育を妨げる薬剤であり, 本研究が目指す知見は殺菌および菌体の除去に関係することで, 全く別の視点である. 従って, 抗生物質の開発に加えて生体が本来もっている自然免疫系を活用する薬剤を開発することで, 細菌感染や臓器移植における拒絶反応に対するより多角的な治療が可能になると思われる.

Abstract

This study was undertaken to elucidate how bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) acts on innate immunity. When we examined phagocytosis of several strains of bacteria by neutrophils in the presence of human serum, several substrains derived from the same parental strain were engulfed at remarkably different levels. This result suggests that the differences of genetic backgrounds among the substrains affect the phagocytosis. Since BPI promotes phagocytosis of Gram-negative bacteria by neutrophils through acceleration of complement activation, BPI may be a useful tool to identify Gram-negative bacteria to survive from a host defense system.

1. 研究目的

グラム陰性菌が生体内に感染すると炎症反応が惹起される. 重篤な場合は血圧低下や disseminated intravascular coagulation (DIC)などの敗血症の症状が見られ, 死に至ることもある. これまでの研究より, グラム陰性菌外膜の主要構成成分である lipopolysaccharide (LPS, リポ多糖)がその原因物質であることが明らかになっている.

ヒト好中球のアズール顆粒に存在する抗菌タンパク質 bactericidal/permeability-increasing protein (BPI)は, グラム陰性菌特異的な抗菌作用およびLPS中和作用をもつことが知られている. 一方, 補体系は約20種類の血清タンパク質から構成されるセリンプロテアーゼのカスケード系で, 細菌表面に膜傷害性複合体を形成して殺菌したり, 補体フラグメント(オプソニン)を細菌表面に沈着させ

て貪食細胞による細菌の貪食を惹起させる役割をもつ。最近、申請者は、BPIがグラム陰性菌(大腸菌)上での補体系活性化を促進し、好中球による大腸菌の貪食を劇的に増強することを見出した。

本研究の目的は、グラム陰性菌の感染に対するBPIを介した自然免疫系の分子基盤を理解することである。具体的には、(1)貪食亢進に必要なBPIの機能領域の同定、(2)細菌の貪食に対する効果が上昇または低下したBPI変異体の作製、(3)貪食亢進に関与するBPI結合性分子の同定、(4)BPIのノックアウト(KO)マウスおよび(2)で得られた変異体のトランスジェニック(TG)マウスの作製、および(5)ヒトに感染するグラム陰性菌の好中球による貪食の測定、を試みた。

2. 研究経過

2.1. 方法

BPIのNおよびC末端領域の産生

ヒトBPI (wtBPI)は全456アミノ酸残基からなる。Figure 1に本研究で産生させたBPIのNおよびC末端領域の組換えタンパク質を示した。BPIのN末端領域(1-193アミノ酸残基、N-BPI)を産生させるためのベクターを構築してHEK293細胞に遺伝子導入した後、該当遺伝子を恒常的に発現する細胞株(N-BPI/HEK)を選別した。組換えタンパク質はN-BPI/HEKを無血清培地中で3日間培養した後、培養上清から回収

を試みた。目的タンパク質の遺伝子の発現はノーザンブロット分析で、活性はカプトガニ血球由来factor Cを用いたLPS中和活性測定法で調べた。

BPIのC末端領域(194-456アミノ酸残基、C-BPI)はチオレドキシシン(Trx)タグとポリヒスチジン(His)タグの融合タンパク質(C-BPI/Trx & His)として大腸菌で産生させた。

BPIのKOマウスの作製

マウスBPI遺伝子に対するターゲティングベクターを構築した後、ES細胞に遺伝子導入した。相同組換えを介してBPI遺伝子に変異が導入されたESクローンを選別した後、定法に従ってKOマウスの作製を試みた。

ヒトに感染するグラム陰性菌の好中球による貪食の測定

細菌の表面タンパク質をfluorescein isothiocyanate (FITC)で標識した後、各濃度のヒト血清存在下で、ヒト末梢血由来の好中球とインキュベーションした。好中球の細胞外の蛍光をトリパンプルーで消光させ、貪食された細菌由来の蛍光強度をfluorescence-activated cell sorter (FACS)で測定した。

2.2. 結果

BPIの機能領域の同定

N-BPIのHEK293細胞による発現は転写レベルでは確認されたものの、タンパク質の活性は見出されなかった(Figure 2B)。最もmRNAの発

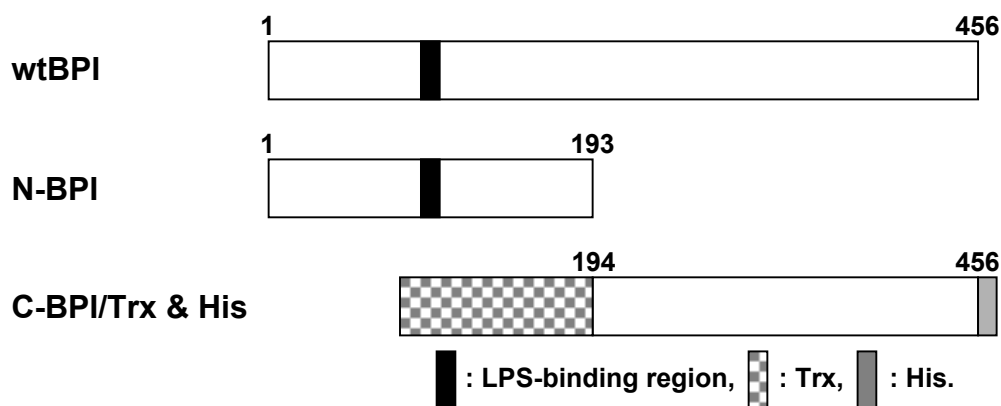


Figure 1. BPI-related recombinant proteins examined in this study.

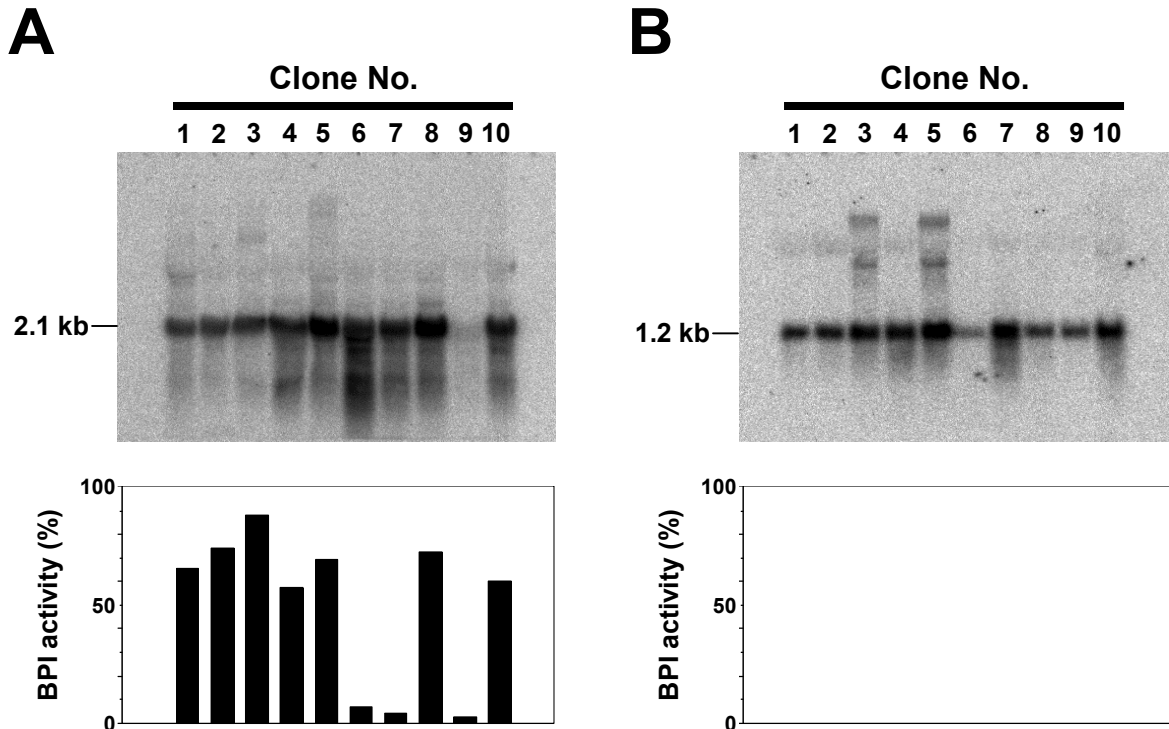


Figure 2. Production of (A) wtBPI and (B) N-BPI in HEK293 cells. Upper; Northern blot analysis, lower; BPI assay using factor C.

現量が多かったクローンNo.5 (Figure 5B)を無血清培地中で大量培養した後で培養上清から組換えタンパク質の回収を試みたが、N-BPIの活性は検出されなかった。一方、対照のwtBPIはmRNAの存在およびタンパク質の活性が確認された(Figure 2B)。

C-BPI/Trx & Hisは大腸菌の封入体画分のみ見出され、可溶性画分には存在しなかった。別のタグ(glutathione, GST)との融合タンパク質も試みたが、同じ結果であった(data not shown)。

BPIのKOマウスの作製

得られた陽性のESクローン10個のうち、5クローンについてキメラ雄マウスを作製して、野性型C57BL/6雌マウスと交配した。しかし、生殖系列の細胞に変異が伝播したヘテロマウスは得られなかった。

ヒトに感染するグラム陰性菌の好中球による食食の測定

本研究では、グラム陰性菌として大腸菌と緑濃菌について調べた。大腸菌はDH5 α 、緑濃菌はヒトに感染した親株から単離された亜種PA01-S, NH-17, およびEBRを用いて食食の測定実験を行った(Figure 3)。それぞれの細菌について、ヒト血清(補体系)の濃度依存的に細菌の食食が観察された。興味深いことに、緑濃菌の亜種は親株が同じでありながら、その亜種間で食食量の違いが観察された。

3. 研究成果

Figure 3の結果は、細菌間のわずかな遺伝的背景の違いがヒトの生体防御系から逃れることに繋がることを示唆している。補体系が細菌表層で活性化されることはよく知られており、その活性化に関与する細菌の表層分子も幾つか報告されている。BPIは細菌上で起こる補体系の活性化を増強して、好中球による細菌の食食を劇的に増強する。LPSは補体系活性化分子のひとつなので、Figure 3で観察さ

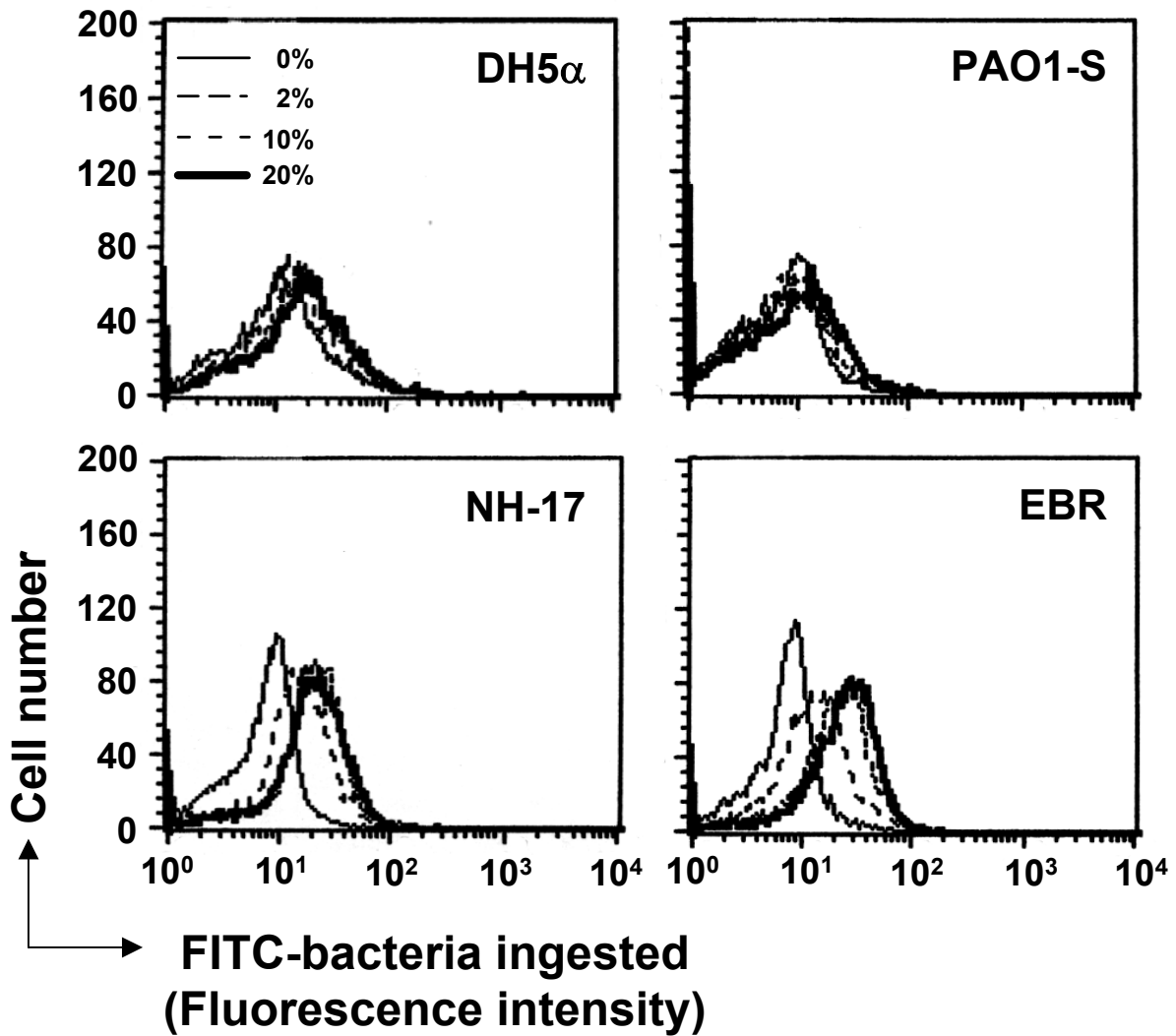


Figure 3. Phagocytosis of Gram-negative bacteria by neutrophils in the presence of various concentrations of serum.

れた細菌間の食食量の違いは、LPSの構造差に起因する可能性が考えられる。事実、LPSの糖鎖構造は細菌間でかなり異なることが知られている。BPIはLPS結合性分子なので、BPIを遺伝子的に改変した変異体は、野性型BPIでは結合できない細菌と結合して、補体系との共同作業でそれらの細菌をクリアランスできることが予想される。

4. 今後の課題と発展

まず、BPIの機能領域の同定とKOマウスの作製が急務である。それ以降は、BPIの活性が増強または低下した変異体を作製して、自然免疫系が増強されたモデルマウスの確立に繋げ

たい。

5. 発表論文リスト
なし。