

博士論文

水産無脊椎動物へモリンフによる
炎症誘発機構に関する研究

安田 恭子

目次

| | |
|---|----|
| 略語一覧 | 3 |
| 序論 | 4 |
| 第 1 章 水産無脊椎動物ヘモリンフに対するヒト単球の炎症応答 | 21 |
| 第 1 節 水産無脊椎動物ヘモリンフが NF- κ B/AP-1 レポーター細胞に及ぼす影響 | 22 |
| 第 2 節 水産無脊椎動物ヘモリンフに対する NF- κ B/AP-1 レポーター細胞の反応に及ぼす NF- κ B 阻害剤の影響 | 26 |
| 第 3 節 5,000 MW で分画したウバガイヘモリンフが NF- κ B/AP-1 レポーター細胞に及ぼす影響 | 29 |
| 第 4 節 考察 | 32 |
| 第 2 章 KLH に対するヒト単球の炎症応答 | 33 |
| 第 1 節 KLH 刺激 NF- κ B/AP-1 レポーター細胞に及ぼす NF- κ B 阻害剤の影響 | 35 |
| 第 2 節 KLH による NF- κ B 転写活性の活性化におけるエンドサイトーシスの関与 | 38 |
| 第 3 節 KLH による NF- κ B 転写活性の活性化における Syk 阻害剤および Erk 阻害剤の影響 | 41 |
| 第 4 節 考察 | 45 |
| 第 3 章 KLH に対するヒト単球細胞における細胞内情報伝達機構 | 47 |
| 第 1 節 KLH 刺激に対する Syk のチロシン残基リン酸化動態 | 48 |
| 第 2 節 KLH 刺激に対する Syk のセリン残基リン酸化動態における PKC の関与 | 52 |
| 第 3 節 KLH による NF- κ B 転写活性の活性化における PKC 阻害剤の影響 | 56 |
| 第 4 節 KLH 刺激に対する Erk のリン酸化動態における Syk の関与 | 59 |
| 第 5 節 考察 | 62 |
| 第 4 章 ヒト単球細胞における KLH 相互作用タンパク質の探索 | 64 |

| | |
|---|-----|
| 第1節 光反応性架橋試薬を用いたヒト単球細胞における KLH 相互作用タンパク質の探索 | 65 |
| 第2節 質量分析による KLH 相互作用タンパク質の同定 | 70 |
| 第3節 KLH 刺激に対する NLRC4 の動態 | 90 |
| 第4節 考察 | 94 |
| 統括的考察 | 104 |

謝辞

| | |
|----|-----|
| 引用 | 113 |
|----|-----|

略語一覽

| | |
|----------------|---|
| AP-1 | activator protein-1 |
| CD | cluster differentiation |
| CLR | C type lectin receptor |
| CR3 | complement receptor 3 |
| Erk | extracellular signal-regulated kinase |
| Fc γ R | Fc gamma receptor |
| GPCR | guanine nucleotide-binding protein coupled receptor |
| IgE | immunoglobulin E |
| ITAM | immunoreceptor tyrosine-based activation motif |
| IFN γ | interferon gamma |
| IL-1 β | interleukin 1 beta |
| KLH | keyhole limpet hemocyanin |
| MAPK | mitogen-activated protein kinases |
| MHC | major histocompatibility complex |
| MR | mannose receptor |
| NLR | nucleotide-binding domain like receptors |
| NLRC4 | NLR family CARD domain containing protein 4 |
| NLRP3 | NLR family PYD domain containing protein 3 |
| NF- κ B | nuclear factor-kappa B |
| PAMP | pathogen-associated molecular pattern |
| PRR | pattern recognition receptor |
| PKC | protein kinase C |
| PGE2 | prostaglandin E2 |
| RLR | retinoic acid inducible gene-1 like receptor |
| Syk | spleen tyrosine kinase |
| Tc | cytotoxic T cell |
| TCR | T cell receptor |
| TGF- β | transforming growth factor beta |
| Th | helper T cell |
| TLR | toll like receptor |
| TNF α | tumor necrosis factor alpha |
| Treg | regulatory T cell |
| TSLP | thymic stromal lymphopoietin |

序論

日本や欧米をはじめとする先進国だけでなく、現在経済発展が目覚ましいアジア諸国においても、自然環境、化学物質への暴露、衛生状態、個人の栄養摂取状態など、取り巻く環境が大きく変化しつつある。これに伴い、癌、糖尿病、高血圧、精神疾患およびアレルギーなど、複数の環境因子と遺伝因子が複雑に影響しあう多因子疾患を罹患する患者数が増加傾向にある[1]。このうちアレルギーは、特に先進国において罹患率の増加が著しく、遺伝因子よりも環境因子の関わりが大きいことが予想されている[2]。2005年には我が国全人口の約30%が何らかのアレルギー性疾患に罹患していると報告されたが、それからわずか6年後の2011年には約50%へと急速に増加している[3, 4]。アレルギー罹患の中で、食物に対するアレルギー（食物アレルギー）を起こす食物アレルギー罹患患者は、日本においては約300万人と推定されており[5, 6]、花粉症やダニアレルギーと比べると罹患患者数は少ない。しかし、アレルギーを起こす特定の食物を摂取できないことは、単に栄養バランス・健康維持の面で問題があるだけでなく、食事によって得られる幸福感がもたらす心身の健康への寄与が損なわれる。また、アナフィラキシーショックによって死亡する事例も多く、他のアレルギー以上に深刻である。アナフィラキシーショックの機序については後述する。

自然免疫システム

自然免疫システムは侵入してきた病原性微生物や、他の潜在的な脅威に対して、初期防御として働く進化的に保存された機構で、単球、マクロファージ、樹状細胞などによって担われている。これらの細胞は、ウイルス、細菌、寄生虫や菌類のような病原体が特異的に保有している特定の病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) をパターン認識受容体 (pattern recognition receptors, PRRs) が認識することで炎症反応が惹起され、サイトカイン、ケモカインおよび脂質メディエーターの分泌、非特異的な貪食による病原体の排除、T 細胞に対する抗原提示などを行う。自然免疫システムの主な PRRs ファミリーは、Toll 様受容体 (Toll-like receptors, TLRs)、NOD 様受容体 (nucleotide-binding domain like receptors, NLRs)、RIG-I 様受容体 (retinoic acid inducible gene-1 like receptor, RLRs)、C 型レクチン受容体 (C-type lectin receptor, CLR) である。

獲得免疫システム

自然免疫システムが潜在的な脅威に対して非特異的に初期防御として働く機構であるのに対し、獲得免疫システムは抗体や補体を産生するなど脅威に対して特異的な攻撃をする。病原体など多種多様な脅威を特異的に認識する受容体を遺伝子再構成によって多様に準備し、脅威に備えている。その脅威に対峙し、脅威が去った際は、これを記憶し、次に同じ脅威が体内に侵入した場合に素早く対処するという役割を担う。

樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞によって取り込まれ、分解された病原体などの断片 (抗原) は、主要組織適合性複合体 (major histocompatibility complex, MHC) クラス II 分子と共に MHC II 複合体を形成し、細胞表面上に T 細胞へ提示される。この抗原提示の他に cluster differentiation 40 (CD40) などの補助刺激分子や種々のサイトカインの作用によって、ナイーブ T 細胞がエフェクター T 細胞に分化する。T 細胞は各々 1 種類の T 細胞受容体 (T cell receptor, TCR)

を発現しており、大きく分けて CD4 分子をもつ CD4+ T 細胞と CD8 分子をもつ CD8+ T 細胞がある。CD4 は MHC II に、CD8 は MHC I に高い親和性をもつ。初めて抗原提示を受ける CD4+ ナイーブ T 細胞のうち抗原特異的な TCR をもつ CD4+ ナイーブ T 細胞のみが、提示された MHC II 複合体を認識して CD4+ ナイーブ T 細胞からエフェクター T 細胞へと分化し、かつ増殖できるようになる。また提示された MHC I 複合体を認識した CD8+ ナイーブ T 細胞は全て細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T cell, Tc) へと分化する。CD4+ ナイーブ T 細胞から分化したエフェクター T 細胞は、分化誘導因子の違いによってヘルパー T 細胞 (helper T cell, Th) または制御性 T 細胞 (regulatory T cell, Treg) に分化する。Th は、分化誘導因子が interferon γ (IFN γ) や interleukin 12 (IL-12) などのサイトカイン優位存在下では Th1 に、IL-4 や脂質メディエーターの prostaglandin E2 (PGE2) 優位存在下では Th2 に、transforming growth factor β (TGF- β)、IL-6 および IL-23 優位存在下では Th17 に、TGF- β のみ優位存在下では Treg に分化する。Th1 は、IL-2 や IFN γ を産生する他、Tc、ナチュラルキラー細胞 (natural killer cell, NK cell) およびマクロファージなどを活性化させることによってウイルスなどに感染した細胞の排除を行う。Th2 は、IL-4、IL-5 および IL-13 などのサイトカインを産生する。Th2 サイトカインは B 細胞が形質細胞に分化・成熟して抗体を産生するために必要な因子で、B 細胞は自らの抗原認識と CD40 の補助刺激および Th1/Th2 サイトカインによって活性化され、免疫グロブリン M (immunoglobulin M, IgM) からクラススイッチを行う。Th1 からのサイトカイン IFN γ 存在下であれば免疫グロブリン G (immunoglobulin G, IgG) 産生が促進され、Th2 サイトカインのみの場合または IL-4 優位存在下であれば、抗原特異的な免疫グロブリン E (immunoglobulin E, IgE) 産生が促進される。抗原上にはアミノ酸 5-8 個のエピトープが複数存在し、これに対応した IgE が複数産生される。マスト細胞や好塩基球の細胞表面には IgE の Fc 部分に高親和性を示す受容体 (Fc ϵ RI) が存在し、IgE がこれに結合して感作が成立する。この受容体に結合した IgE と対応する箇所が 1 つのみの物質が結合した場合は、Fc ϵ RI の架橋が起こらず、マスト細胞や好塩基球細胞の反応は生じな

いが (Fig. ii)、異なる FcεRI 間に対応するエピトープを持つ特異抗原が結合した場合は、マスト細胞や好塩基球細胞の複数の FcεRI を架橋し、シグナル伝達経路が活性化され、Ca²⁺の細胞内流入が起こる。次いで、ヒスタミンなどの顆粒内メディエーター、トリプターゼなどの顆粒内タンパク質を放出し、ロイコトリエンや PGE2 などの脂質メディエーターを合成・遊離する (Fig. iii)。これらの生理活性物質により血管拡張や血管透過性亢進、気道過敏性亢進などが起こり、膨疹、掻痒などの症状を誘発する。Th17 は IL-17 を産生し貪食細胞の遊走、活性化を促し、好中球の炎症を促進する。Treg は TGF-β や IL-10 を産生して Th1、Th2 および Th17 の働きを抑制し、過剰な免疫反応を収束させる役割を果たす。

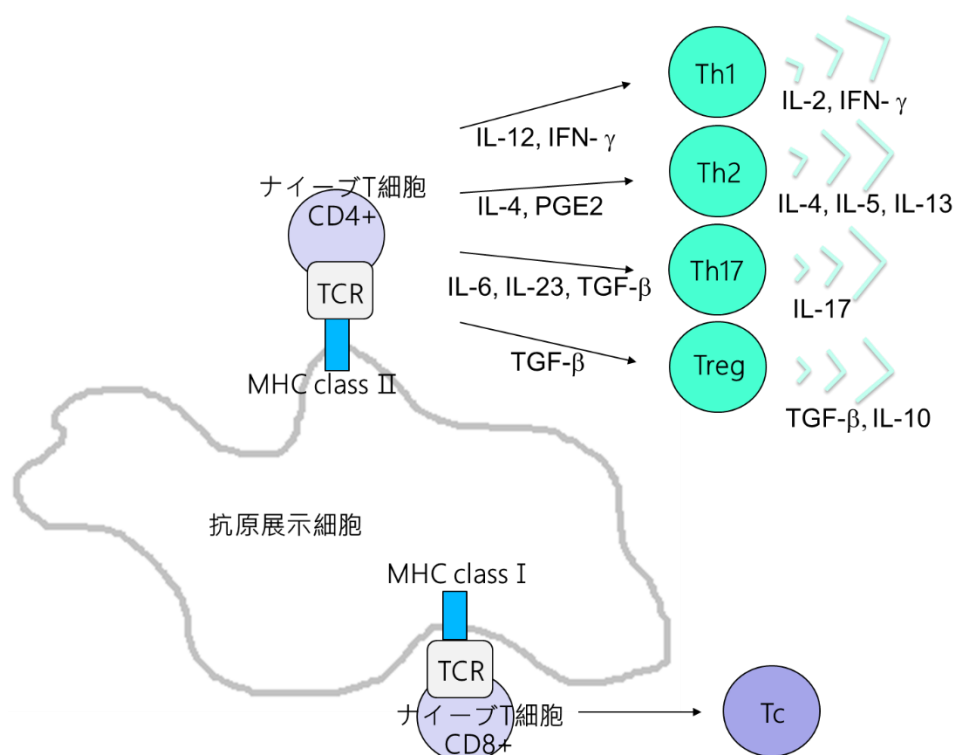


Fig. i ナイーブ T 細胞の分化

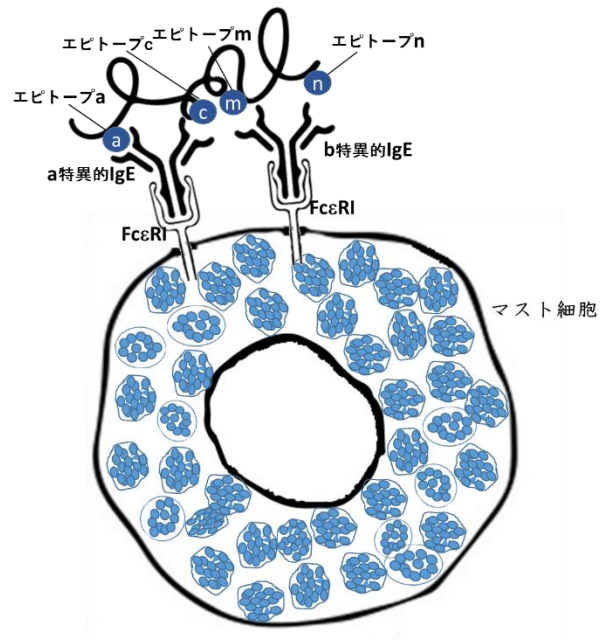


Fig. ii FcεRI 架橋不成立.

顆粒内タンパク質は放出されない。

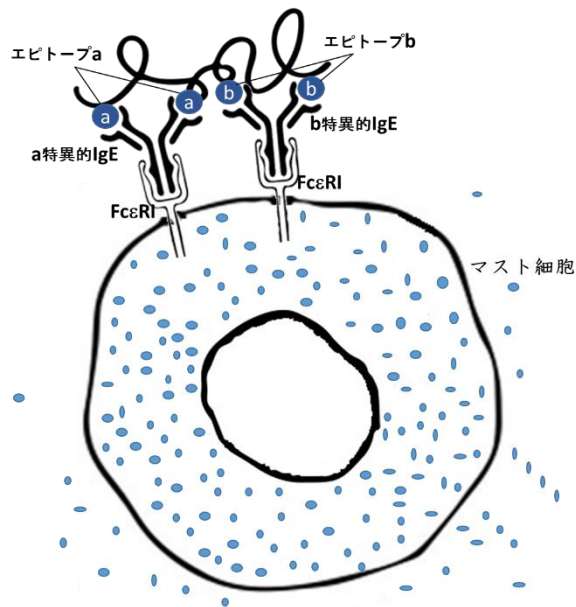


Fig. iii FcεRI 架橋成立.

顆粒内タンパク質が放出される。

アレルギーの発症

アレルギーとは免疫学的機序で開始する過敏性反応に基づく全身的または局所的な障害であり、アレルギーの免疫学的機序は二つに大別される。

一つ目は、IgE 介在性の即時型アレルギーで、食物アレルギーの多くはこのタイプとされる。IgE は B 細胞が産生する免疫グロブリンの 1 つで[7]、抗体が関わる免疫システムは上述した獲得免疫システムに含まれる。食物アレルギーではアレルギーのほとんどがタンパク質である。経口摂取されたタンパク質が、消化機能不全などによって十分に消化されずに長鎖ペプチドのまま腸管で吸収された場合にアレルギーとなることがある。乳幼児のアレルギー疾患の増加原因の一つとして、近年の離乳の早期化によって消化機能が未発達な状態でアレルギータンパク質に暴露されることが原因であるとも言われている。吸収されたアレルギータンパク質は腸管免疫系によって異物として認識され、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞に取り込まれて分解され、アレルギー断片となる。このアレルギー断片は T 細胞に提示され、T 細胞と B 細胞の協調作用によって B 細胞からアレルギー特異的な IgE が産生される。産生された IgE がマスト細胞や好塩基球などのエフェクター細胞表面 FcεRI に結合して感作が成立する。この受容体に結合した IgE にアレルギーが結合して IgE が架橋されると、マスト細胞や好塩基球細胞からヒスタミン、ロイコトリエンなどの放出が促進され、膨疹、掻痒などの症状を誘発する。また、皮膚を通じて感作（経皮感作）されやすい性質があるラテックスゴムによる皮膚接触炎が契機となって、ラテックスゴム接触による接触蕁麻疹、喘息、アナフィラキシーを起こす疾患もある[8]。植物由来の物質であるラテックスの抗原は植物が持つ抗菌ペプチドで、この抗菌ペプチドを含有するバナナなどのフルーツを食べると、口腔内の接触蕁麻疹症状（口腔アレルギー症候群）、喘息、アナフィラキシーを起こす[9]。ピーナッツアレルギーは、ピーナッツオイル塗布またはピーナッツ抗原が多量に存在する環境で過ごした場合、経皮感作が成立し、ピーナッツを食したときにアレルギー症状を起こすというものである[10, 11]。乾燥や損傷など、バリア機能が低

下した皮膚から抗原や微生物が侵入すると、皮膚の樹状細胞に取り込まれる他、上皮細胞由来のサイトカイン TSLP の発現が増加する。TSLP は樹状細胞や肥満細胞などを刺激し、Th2 反応を誘導する[12, 13]。Th2 細胞が産生する IL-4 は B 細胞に IgE 産生を促し、IL-5 と IL-13 は好酸球の産生と組織への湿潤を促し、肥満細胞が活性化されてヒスタミンなどの炎症関連物質を放出する。

二つ目は、即時型に対して IgE に依存しない非即時型アレルギー（非 IgE 抗体介在性）である。即時型ではほとんどの場合、アレルゲンを摂取してから数十分後に症状が現れるのに対し、非即時型では数時間後に主に膨疹、湿疹、掻痒などの皮膚症状が認められる。即時型に対して遅延型と称されるが、この中でも機構が異なるものがある。Tc やマクロファージによる過剰な細胞障害性の反応による機構や、即時型アレルギーに続いて起こる好酸球の活性化によって放出される炎症性物質によるアレルギー反応機構の他に、上皮細胞や内皮細胞などの細胞核内に恒常的に発現する IL-33 が細胞破壊によって遊離し、獲得免疫系を介さずにマスト細胞に作用して IL-13 などのサイトカインを放出させ、好酸球性炎症を惹起させる反応機構がある[14]。

1966 年に IgE が発見されてから[15]、IgE 介在性の即時型アレルギーに関する知見の蓄積は多いが、非 IgE 介在性アレルギーの発症メカニズムは不明な点が多い。非 IgE 介在性アレルギーでは獲得免疫系の他に自然免疫系の活性化が大きく関わると予想されているが、その詳細は明らかにされていない[16-18]。IgE に依存しない非 IgE 介在性の食物アレルギーとして、Niggemann らは、小麦アレルギーを起こしたアレルギー患者血清中に小麦アレルゲンの IgE を見出せなかったと報告している[19]。また抗原抗体反応によらない自然免疫系の活性が大きく関わっていると思われる反応として、Koller らは、甲殻類の外骨格の主要な成分であるキチン質が自然免疫系の TLR2 を介して炎症を誘発すると報告している[20]。さらに NLRs が関与するインフラマソームの一部は、直接的あるいは間接的に NF- κ B を活性化し、各種炎症応答を引き起こす。炎症性サイトカインの IL-1 β や IL-18 は、主に Th1 型の炎症反応や感染局所への好中球の遊走を誘導する[21, 22]。

アナフィラキシー (anaphylaxis)

即時型 (IgE 介在性) アレルギーによって引き起こされる全身性の疾患で、時に生命を脅かすようなショック状態 (アナフィラキシーショック) に陥る場合がある。アナフィラキシーの主な症状としては、血管性浮腫[23]、呼吸循環障害[24]などがある。また、食物を摂取した後に運動することでアナフィラキシーを発症する食物依存性運動誘発アナフィラキシー (food-dependent exercise-induced anaphylaxis, FDEIA) と呼ばれる症例もある[25, 26]。アナフィラキシーは IgE が関与する免疫学的機序によって発症するとされているが、薬剤など皮膚や粘膜を介した非侵襲的暴露によるもの[27]、ハチ毒など侵襲的暴露によるもの[28]は、IgE が関与しない免疫学的機序の場合があり、その発症機序については不明な点が多い[29]。

甲殻類アレルギー

我が国の食物アレルギー有症率の割合は、乳児が約 10%、3 歳児が約 5% [30]、保育所児が 5.1% [31]、学童期が約 4.5% [32, 33]、成人は推定で 1-2% 程度の有症率であると考えられている[34]。アレルギーの原因食物のうち、罹患者数が多いものは鶏卵、牛乳、小麦である。これらの食品の有症者は乳幼児が多く、寛解 (症状が治まって穏やかになる状態) が比較的起きやすい食品であるため、徐々にアレルギーが起きにくくなるケースがある。一方、罹患者の年齢が上がるにつれて甲殻類、魚類、果物類のアレルギー罹患者が増加する[34]。特に成人では甲殻類がアレルギーの原因である比率が高い[35] (Fig. iv, Table I)。甲殻類アレルギーについて諸外国のケースをみると、シンガポールでは食物アレルギーをもつ子供のうち 39% [36]、スペインでは甲殻類アレルギー患者数の増加が著しく、1995 年の時点で全年齢の食物アレルギー患者の 85% [37]、オーストラリアでは 2005 年の時点で 87% [38] に上ったと報告されている。

甲殻類アレルギーの主なアレルゲンとして、筋原線維タンパク質のトロポミオシンが同定されている[39-41]。その他にミオシン軽鎖[42]、筋形質カルシウム

結合タンパク質[43]、アルギニンキナーゼ[44]などが報告されており、近年ではエビのヘモリンフ（血リンパ）中に含まれるヘモシアニンについても甲殻類アレルギー患者血清との反応性が報告された[45-47]。

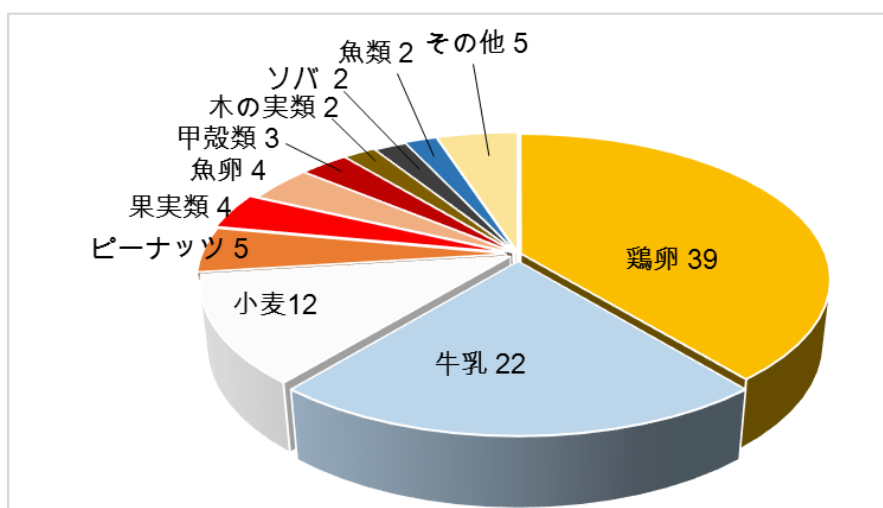


Fig. iv 全年齢におけるアレルギー原因食物
(食物アレルギーの診療の手引き 2014 改変)

Table i 年齢別アレルギー原因食物 (食物アレルギーの診療の手引き 2014 改変)

| | 0歳 | 1歳 | 2-3歳 | 4-6歳 | 7-19歳 | 20歳以上 |
|---|----------|------------|------------|-------------|------------------|------------------|
| 1 | 鶏卵 56.5% | 鶏卵 43.7% | 鶏卵 29.0% | 鶏卵 33.0% | 鶏卵 15.8% | 小麦 36.4% |
| 2 | 牛 25.6% | 牛乳 21.3% | 牛乳 25.6% | 牛乳 22.9% | 牛乳 12.8% | 甲殻類 13.9% |
| 3 | 小麦 13.1% | 小麦 7.8% | 小麦 10.0% | ピーナッツ 11.4% | 甲殻類 12.2% | 魚類 11.3% |
| 4 | | 魚卵 7.3% | 魚卵 7.6% | 小麦 7.7% | ピーナッツ 11.9% | 果物類 7.9% |
| 5 | | ピーナッツ 4.5% | ピーナッツ 7.0% | 果物類 5.6% | 小麦 10.6% | ソバ 6.0% |

ヘモシアニン (hemocyanin)

ヘモシアニンは、タコ、イカ、貝などの軟体動物、エビ、カニなどの甲殻類や数種の昆虫などの生体内で酸素運搬を行う銅含有の色素タンパク質で血青素とも呼ばれる。ヘモシアニンは、分子量 330,000 - 450,000 のサブユニットが多量

体を形成し、それらが自己集合して円筒形を形成する。各サブユニットには、配列が類似した複数種の機能ドメイン（約 50 kDa）が繰り返し存在する。各サブユニットは 2 個の銅イオンを配位し、その銅原子間に酸素 1 分子が可逆的に結合する。それ自身は無色であるが、酸素が結合した状態では銅イオンが二価となるため、ヘモシアニンを有する生物の血液は青い。

スカシ貝ヘモシアニン（keyhole limpet hemocyanin, KLH）

スカシ貝（*Macroschisma sinense*）のヘモシアニンは一般的にキーホールリンペットヘモシアニン（keyhole limpet hemocyanin, KLH）と呼ばれ、約 400 kDa のサブユニットが 10 から 20 個で構成される[48]。KLH は高い免疫原性を持つことから抗体作製時のキャリアタンパク質として頻繁に用いられる[49-51]。マンノース残基やフコース残基に富むことから、C 型レクチン受容体を介して KLH がエンドサイトーシスを引き起こし、抗原提示細胞がハプテン残基の提示をなしている可能性があると考えられる[52-55]。

NF- κ B（nuclear factor-kappa B）

NF- κ B は p50/p105（NF- κ B1）、p52/p100（NF- κ B2）、p65（RelA）、RelB、cRel のファミリーからなる二量体により構成され、炎症性サイトカイン、ケモカイン、抗アポトーシス分子、増殖因子などの発現を制御する転写因子として、自然免疫、獲得免疫、炎症反応、細胞分化や増殖といった幅広い生命現象の制御に関わる遺伝子を調節する[56]。不活性時の NF- κ B は inhibitor of NF- κ B（I κ B）と結合することで核移行シグナルが遮断され、NF- κ B は細胞質内に留まっている。リポポリサッカライド（lipopolysaccharide, LPS）などの細胞由来分子、腫瘍壊死因子 α （tumor necrosis factor alpha, TNF- α ）、インターロイキン 1（IL-1）などのサイトカインによる刺激が伝達されると、I κ B キナーゼ（I κ B kinase, IKK）が活性化し I κ B がリン酸化されて、I κ B のユビキチン化とプロテアソームによる分解が誘導され

る一方で、NF- κ B は阻害タンパク質から遊離し、核に移行して標的遺伝子の発現を引き起こす[57]。

AP-1 (activator protein-1)

AP-1 は Jun ファミリー、Fos ファミリーまたは ATF ファミリーから構成され、二量体を形成して常に DNA に結合している[58]。MAP キナーゼの 1 種である c-Jun N-terminal kinase (JNK) と p38 によってリン酸化されて活性化し、サイトカインなどが発現される。AP-1 遺伝子群は細胞の分化・増殖・アポトーシスに深く関わりとされる[59]。

エンドサイトーシス

細胞が細胞膜を内側に陥入させて小胞を形成し、細胞内へと物資を取り込む現象の総称をエンドサイトーシスと呼び、取り込む物質の種類、大きさ、取り込みの機構の違いから、ファゴサイトーシス (phagocytosis) とピノサイトーシス (pinocytosis) に大別される。エンドサイトーシスは外来物質の取り込みだけでなく、細胞膜の構成要素の分解やリサイクリングなど、様々な生理現象の役割を果たしている。エンドサイトーシスのうち特にファゴサイトーシスは、ウイルスや細菌などの病原微生物を排除するため、生体防御機構としても重要な役割を担う。通常、ファゴサイトーシスは炎症応答を伴うが、組織の再構築の際に見られるアポトーシス細胞の取り込みでは、炎症は誘発されない。

脾臓チロシンキナーゼ (spleen tyrosine kinase, Syk)

Syk はマクロファージのファゴサイトーシス、B 細胞の分化や活性化において重要な役割を果たす[60, 61]。Syk は 2 つの SH2 ドメイン (Src homology 2 domain) とキナーゼドメインがインタードメイン A と B によって区切られる構造を持つ。細胞が刺激を受けると、2 つの SH2 ドメインは免疫系の受容体サブユニットに共通する免疫受容体活性化チロシンモチーフ (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) に会合する[62]。Syk では、複数のリン酸化部位が同定され

ており、Syk のキナーゼドメインにある活性化ループ上の 2 箇所のチロシン残基 (Tyr525、Tyr526) が Syk のキナーゼ活性に特に重要とされる[63]。SH2 とキナーゼドメインをつなぐリンカー領域 (インタードメイン B) にある Tyr323 は Cbl (Casitas b-lineage lymphoma) 型ユビキチンリガーゼとの会合により、Syk のキナーゼ活性の負の調節に関与する[64, 65]。インタードメイン B にある Ser297 はプロテインキナーゼ C (protein kinase C, PKC) によってリン酸化される [66]。

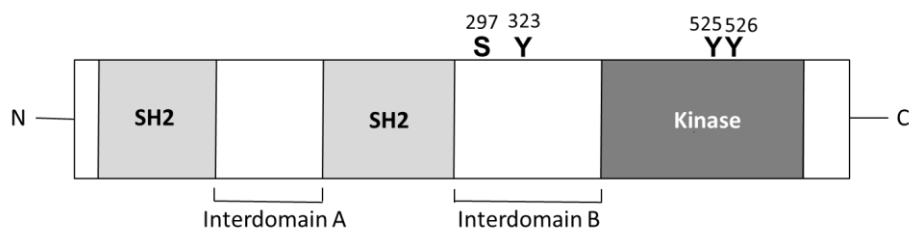


Fig. v Syk の構造

細胞外シグナル制御キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase, Erk)

Erk は酵母からヒトまで高度に保存された分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (mitogen activated protein kinase, MAPK) ファミリーの 1 つで、MAPK は受容体型チロシンキナーゼ (receptor tyrosine kinases, RTKs)、インテグリン、イオンチャンネルをはじめとした様々な種類の受容体を通じ、細胞外からの刺激に応じて情報を核へと伝達し、細胞増殖や細胞分化、アポトーシスなどのストレス応答反応を引き起こす。Erk は主に上皮増殖促進因子 (epidermal growth factor, EGF) や酸化ストレスなどにより活性化する[67]。上皮増殖促進因子受容体 (epidermal growth factor Receptor, EGFR) などの RTKs にリガンドが結合すると、アダプタータンパク質、グアニンヌクレオチド交換因子との結合を経て、低分子グアノシン三リン酸 (GTP) 結合タンパク質の Ras にシグナルを伝達する。さらに Ras は MAPK カスケードへシグナルを伝達し、順に MAPKKK (Raf)、MAPKK (MEK)、MAPK (Erk) からなるカスケードを活性化する。活性化されて二量体となった Erk は、

NF- κ B などの転写因子、プロテインキナーゼやフォスファターゼ、細胞骨格因子、アポトーシス調節因子など、多くの分子をリン酸化することにより、シグナル伝達機構を制御する[68]。

医療分野における人工知能技術の活用

アレルギーと同様に多種多様な因子が複雑にかかわる癌治療の分野においては、これまで蓄積した治験・研究データなどの情報がアレルギー疾患に比べて多く、これらの情報を人工知能による解析に用いて、治療に役立つ取り組みがなされている[69]。例えば、これまで蓄積した膨大な量の研究データや変異の多様な原因遺伝子のゲノムを解読したエクサ (10^{18}) バイトを超えるデータを基に人工知能が解析し、これに患者の癌組織のゲノムデータを照合して原因となる遺伝子変異の候補を検出する。さらに、癌進み方や治療に関する論文、臨床試験結果などのデータと照合し、最適な治療方法や薬品などを提案するというもの[70]、CTなどの画像データと遺伝子検査や血液検査データを照合し、癌を発見するなどの手法が挙げられる。膨大なデータを検索・照合などの処理作業を短い時間で行い、画像認識して変異を検出する場合、コンピューターの方がヒトよりも長けている[71]。これまで見過ごされてきた早期の病変、因果関係の発掘、病気の進行予測、治療方法の診断が可能となる。

本研究の目的と概要

本研究では、食物アレルギーの中でも、日本国民にとって古より身近な食材であり、主に成人の罹患者が多い魚介類のアレルギーを対象とした。成人になってから発症し、寛解の起きにくい食物アレルギーの発症機構については、これまでのTh2とIgEが中心的な獲得免疫システムの図式では説明ができない部分が多い。一方、自然免疫の分野はTLRsやCLRsなどの受容体やそのリガンド、シグナル伝達経路をはじめ、分子レベルでの解明が近年飛躍的に進んだ分野の一つといえる。近年アレルゲンとして同定されたヘモシアニン[45]、免疫原性が

高く抗体作製時のキャリアとして使用実績が多いタンパク質であるが、ヘモシアニンと自然免疫系との関わりについての知見は乏しい。またエビのヘモリンフ中のヘモシアニンがアナフィラキシーショックを誘発したという報告もあり[45-47]、アナフィラキシーと自然免疫系との関わりについての知見を得るためにも、ヘモシアニンの自然免疫システムにおける直接的な効果を明らかにする意義は大きい。そこで、ヘモシアニンのうち抗体作製用キャリアとして一般的なスカシ貝ヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin, KLH) を本研究の検討対象とした。

第 1 章では、特にアレルギーを起こしやすい食品や重篤な症状を引き起こしやすい食品として、表示義務あるいは表示努力が推奨されるもののうち、エビ、カニ、アワビ、サケ[72]を含む魚介類 (クルマエビ、ケガニ、ウバガイ、クロアワビおよびギンザケ) のヘモリンフあるいは血清と自然免疫システムとの関わりを調べるため、NF- κ B/AP-1 の遺伝子転写活性に応答するレポーター遺伝子を組み込んだヒト単球由来細胞 (THP1-XBlue™-MD2-CD14, InvivoGen, San diego, CA、以下 NF- κ B/AP-1 レポーター細胞) を用いて炎症関連転写因子の活性化を確認した。その結果、無脊椎動物であるクルマエビ、ケガニ、ウバガイ、クロアワビのヘモリンフは NF- κ B の転写活性を活性化することが明らかとなった。一方、ギンザケの血清は NF- κ B の転写活性を活性化させなかった。さらにスルメイカヘモリンフを SDS-PAGE によって分離した先行研究では、極めて高濃度にスルメイカヘモシアニンが含まれているという報告があったことから[73]、ヘモリンフ中の金属やペプチドなどの低分子量成分の影響を除去するために、分画分子量 5,000 の限外ろ過によってウバガイのヘモリンフを分画し、NF- κ B/AP-1 活性を評価したところ、分子量 5,000 以下の成分は NF- κ B の活性化を誘導しなかったが、分子量 5,000 以上の成分は NF- κ B の活性化を誘導した。この結果、およびヘモリンフの主成分であるヘモシアニンの分子量は 5,000 よりも大きいことから、NF- κ B の転写活性を活性化したのはヘモシアニンであると推察した。

第2章では、第1章において、水産無脊椎動物ヘモリンフ成分のうち、NF- κ Bの転写活性を活性化したものはヘモシアニンであると推察したことから、ヘモシアニンの一種であるKLHを用いてNF- κ Bの転写活性の活性化を評価したところ、KLH刺激がNF- κ Bを活性化した。KLHによる単球由来樹状細胞の分化についての先行研究においては、KLHの分子構造にはレクチン受容体のCLRsのリガンドであるマンノースやフコースが豊富に存在することから、CLRsの1つであるマンノースレセプター(mannose receptor, MR)を部分的に経由したとされる[55]。また、レクチン受容体にはCLRsの他に complement receptor 3 (CR3)、toll like receptor 2 (TLR2)、およびFc γ receptors (Fc γ Rs)などがあり [74-78]、これらの受容体が病原菌を認識する際のシグナル伝達に必須の分子として脾臓チロシンキナーゼ(spleen tyrosine kinase, Syk)がある。Sykは、細胞がグラム陰性菌の*Francisella tularensis*を認識してファゴサイトーシスを行う際のシグナル伝達に関与し[79]、ファゴサイトーシスにはSykの他に細胞外シグナル調節キナーゼ(extracellular signal-regulated kinase, Erk)が関与する[80, 81]。分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(mitogen-activated protein kinases, MAPK)の一種であるErkは、NF- κ Bの活性化に関与する分子の一つとして知られる[82, 83]。こうしたことから、KLH刺激によるNF- κ Bの活性化は、KLH刺激がエンドサイトーシスを引き起こし、次いで種々の経路を介してNF- κ Bの活性化が誘導されたもので、このKLH刺激によるNF- κ Bの活性化経路にSykやErkが関与するものと推察した。そこで、エンドサイトーシス阻害剤、Syk阻害剤、Erk阻害剤存在下においてNF- κ B/AP-1レポーター細胞に対し、KLH刺激を行ったところ、NF- κ Bの活性化が抑制された。これらの結果から、KLHはエンドサイトーシスを引き起こし、SykやErkが関わる経路を介してNF- κ Bの活性化が誘導されたと推察した。

第3章では、KLH誘導性NF- κ Bの活性化経路に関わると予想されたSykの活性化について明らかにするために、Sykのキナーゼ活性で特に重要とされるチロシ

ン残基 (Tyr525/Tyr526) [63] と、Syk のキナーゼ活性の負の調節に関与するチロシン残基 (Tyr323) [64, 65] およびセリン残基 (Ser297) におけるリン酸化について、ウェスタンブロッティングによって評価した。その結果、KLH 刺激によって Syk のチロシン残基 (Tyr525/526) およびセリン残基 (Ser297) についてはリン酸化が亢進し、チロシン残基 (Tyr323) についてはリン酸化が確認できなかったことから、Syk のキナーゼ活性はチロシン残基 (Tyr525/526) およびセリン残基 (Ser297) のリン酸化によって亢進したと推察された。さらに、Syk のセリン残基 (Ser297) のリン酸化についてはプロテインキナーゼ C (protein kinase C, PKC) の関わりがあるとされることから [66]、PKC 阻害剤が Syk (Ser297) のリン酸化に与える影響を確認したところ、PKC 阻害剤存在下では Syk (Ser297) のリン酸化が抑制された。そこで、PKC 阻害剤存在下で NF- κ B/AP-1 レポーター細胞に KLH を投与し、NF- κ B の転写活性を測定したところ、NF- κ B の転写活性の活性化は抑制されなかった。このことから、KLH によって誘導される NF- κ B の活性化に Syk は影響を与えるが、PKC によるリン酸化の影響はほとんどないものと推察された。次いで、Syk と Erk の関与を確認するため、Syk 阻害剤存在下においてヒト単球細胞 (THP-1) に対して KLH 刺激を行い、Erk の活性化についてウェスタンブロッティングにて評価した。その結果、Syk 阻害剤存在下では Erk の活性化が Syk 阻害剤非存在下に比べて抑制された。このことから、KLH によって誘導される NF- κ B の活性化には Erk の活性化が関与し、Syk は KLH による NF- κ B の活性化経路に関わる Erk の上流に位置すると推察された。

第 4 章では、ヒト単球細胞 (THP-1) において KLH と相互作用し、NF- κ B の活性化を誘導するタンパク質を探索するために、光架橋法を用いたリガンド・受容体相互作用解析法と高分解質量分析法を組み合わせ、KLH と相互作用するタンパク質の同定を試みた。その結果、自然免疫系の受容体 NLRs の 1 つである NLRC4 が KLH と相互作用している可能性が示唆されたため、ウェスタンブロッティングによって KLH 受容に伴う NLRC4 の発現量変化について評価した。また、その

他に同定された integrin $\alpha 4\beta 1$ 複合体、integrin $\alpha 5\beta 1$ 複合体、plexin-A2、guanine nucleotide-binding protein coupled receptor 98 (GPR98) などの膜タンパク質や、これらの近傍に存在する AC5、14-3-3 sigma などのタンパク質と KLH によるシグナル伝達機構について考察した。

最後に以上の結果を総括し、今後の研究課題について考察するとともに、著者が希望する将来の展望についても記述した。

なお、本研究で得られた成果の一部は既に下記の通り公表済である。

Kyoko Yasuda, Hideki Ushio. (2016) Keyhole limpet hemocyanin induces innate immunity via Syk and Erk phosphorylation. EXCLI Journal; 15: 474-481.

第1章 水産無脊椎動物ヘモリンフに対するヒト単球の炎症応答

海に囲まれた島国に暮らす日本人にとって魚介類は身近な食材であるが、エビ、カニなどが含まれる容器包装された加工食品は2001年からアレルギー反応を起こす食品として表示義務などが定められている[72]。魚介類アレルギーは、主に成人になってから発症し、寛解の起きにくい食物アレルギーである。その発症メカニズムについては、これまでの獲得免疫システムを中心に据えた図式では説明ができない部分が多く、未だ不明な点が多い。近年エビのヘモリンフ中のヘモシアニンが強度の炎症応答を伴うアナフィラキシーショックを誘発すると報告されたことから[45-47]、エビを含む魚介類のヘモリンフおよび血清と炎症関連因子との関わりを調べるため、NF- κ B/AP-1 レポーター細胞 (THP1-XBlue™-MD2-CD14, InvivoGen, San diego, CA) を用いて炎症関連転写因子 (NF- κ B/AP-1) の活性を評価した。また、スルメイカヘモリンフを7% SDS-PAGEゲルによって分離すると、約380 kDaのシングルバンドのみが検出され、スルメイカヘモリンフにおいては極めて高濃度にヘモシアニンが存在しているという報告があったことから [73]、水産無脊椎動物のヘモリンフ中の金属やペプチドなどの低分子量成分の影響を除去するために、水産無脊椎動物のヘモリンフを分画分子量5,000の限外ろ過によって分画し、各々の画分のヘモリンフについて炎症関連転写因子の遺伝子転写活性を評価した。

本研究で用いたNF- κ B/AP-1 レポーター細胞は、急性白血病患者由来ヒト単球細胞株のTHP-1細胞から作製されたもので、アルカリホスファターゼの遺伝子の前に炎症性転写因子のNF- κ Bおよびアクチベータータンパク質のAP-1のコンセンサス配列を導入し、NF- κ BおよびAP-1の発現に伴って分泌性胎盤アルカリホスファターゼ (secreted embryonic alkaline phosphatase, SEAP) を分泌するように設計された細胞である。

第1節 水産無脊椎動物ヘモリンフが NF- κ B/AP-1 レポーター細胞に及ぼす影響

水産無脊椎動物（クルマエビ、ケガニ、ウバガイ、クロアワビ）のヘモリンフおよび水産脊椎動物（ギンザケ）の血清がヒトの炎症応答に及ぼす影響を調べるため NF- κ B/AP-1 レポーター細胞を用いて炎症関連転写因子（NF- κ B/AP-1）の遺伝子転写活性を評価した。

試料および方法

細胞培養

非働化処理（56 °C、30 分）を行った 10 % (vol/vol) 牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)、1 % (vol/vol) GlutaMAX™ Supplement (Thermo Fisher Scientific)、100 μ g/ml Normocin™ (InvivoGen, San diego, CA)、200 μ g/ml Zeocin™ (InvivoGen) および 250 μ g/ml G418 (InvivoGen) を含む Roswell Park Memorial Institute medium1640 (RPMI; Thermo Fisher Scientific) を使用して、NF- κ B/AP-1 レポーター細胞 (THP1- XBlue™-MD 2-CD14, InvivoGen, San diego, CA) を維持培養し、以下の操作に用いた。第 1 章および第 2 章においては、以降これを「維持培地」と呼ぶ。カルチャーボトル (Corning, NY) を使用し、37 °C、5 % CO₂ パージ下において継代培養した。

試料動物

[節足動物門甲殻綱十脚目長尾亜目]クルマエビ科クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*)、[短尾下目十脚目短尾下目]クリガニ科ケガニ (*Erimacrus isenbeckii*)、[軟体動物門二枚貝綱異歯亜綱]バカガイ上科バカガイ科ウバガイ (*Pseudocardium sachalinense*)、[腹足綱前鰓亜綱古腹足目]ミミガイ科ミミガイ属アワビ (*Haliotis discus discus*) を、東京都台東区の鮮魚店から購入した。[顎

口上綱硬骨魚綱条鰭亜綱新鰭区真骨亜区正真骨下区原棘鰭上目]サケ亜目サケ科サケ属ギンザケ (*Oncorhynchus kisutch*) については、宮城県牡鹿郡女川町において養殖された個体を使用した。

ヘモリンフおよび血清の採取

クルマエビについては心域背甲間から、ケガニについては基節部からヘモリンフを採取した。ウバガイにおよびクロアワビについては脱殻後、心房に1 mL シリンジ (23 G) を刺し、ヘモリンフを採取した。30 分間室温に放置後、330,000 x g、4 °C で1 時間遠心し、上清を回収した。得られたヘモリンフを以下に述べる操作に用いるまで- 80 °C に保存した。

ギンザケについては、尾部血管から血液を採取後、4 °C で一昼夜保存した後、1,000 x g、4 °C で15 分間遠心し、上清を回収した。得られた血清を以下に述べる操作に用いるまで- 20 °C に保存した。

アルカリフォスファターゼレポーターアッセイを用いた NF-κB/AP-1 転写活性の評価

NF-κB/AP-1 レポーター細胞に種々の刺激を与えた後、37 °C、5 % CO₂ パージ下において24 時間培養した培養上清 20 μl にSEAP の放出量の検出試薬である QUANTI-Blue™ (InvivoGen, San diego, CA) を50 μl 添加し、この混合液を37 °C に保温して更に24 時間後に、分光光度計 SPECTRA max M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を用いて650 nm の吸光度を測定した。また結果や考察においては、650 nm における吸光度がSEAP 放出量を反映していることから、650nm をNF-κB/AP-1 の転写活性として扱った。

水産無脊椎動物ヘモリンフ刺激による NF-κB/AP-1 転写活性の評価

NF-κB/AP-1 レポーター細胞を培地中で37 °C、5 % CO₂ パージ下において培養した。このNF-κB/AP-1 レポーター細胞 (6.0 x 10⁵ 個) にフィルター滅菌した各種水産無脊椎動物ヘモリンフあるいはギンザケ血清を10 % (vol/vol) となるように

投与した。また、ネガティブコントロールとして RPMI、ポジティブコントロールとして炎症関連物質誘導メディエーターとして知られる微生物由来リポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を 0.1 µg/ml 投与し、NF-κB/AP-1 転写活性を評価した。

統計解析

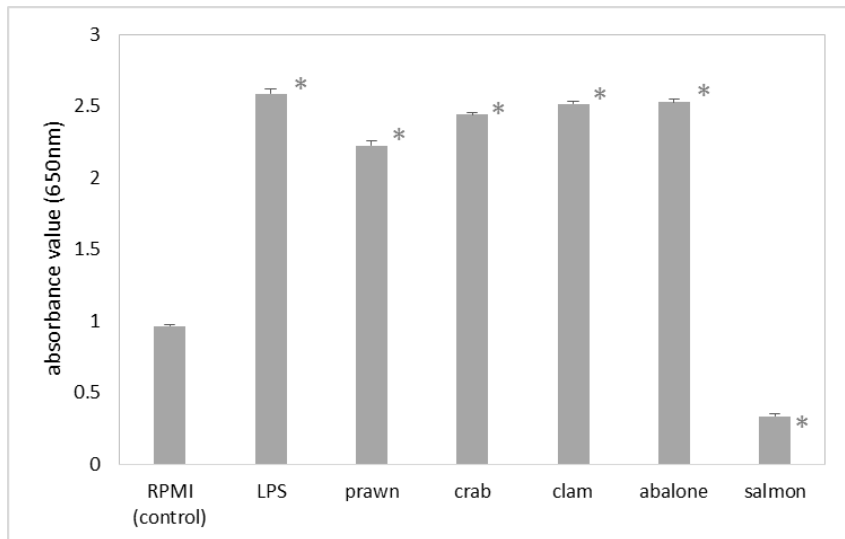
NF-κB/AP-1 の転写活性の活性化の結果について、分散性を one way ANOVA によって確認し、Dunnett's 法を用いて多群間の比較解析を行った。

結果

水産無脊椎動物へモリンフ刺激による NF-κB/AP-1 転写活性の活性化

NF-κB/AP-1 レポーター細胞にクルマエビ (prawn)、ケガニ (crab)、ウバガイ (clam)、クロアワビ (abalone) のへモリンフあるいはギンザケ (salmon) 血清を 10 % (vol/vol) となるように投与した。また、ネガティブコントロールとして RPMI、ポジティブコントロールとして 0.1 µg/ml LPS を投与して 24 時間後の NF-κB/AP-1 転写活性を測定した (Fig. 1-1)。

LPS あるいは水産無脊椎動物 (クルマエビ、ケガニ、ウバガイ、クロアワビ) のへモリンフを投与した際の NF-κB/AP-1 転写活性は、RPMI を投与した際の NF-κB/AP-1 転写活性と比較して有意に高かった。一方、ギンザケ血清を投与した際の NF-κB/AP-1 転写活性は、RPMI の NF-κB/AP-1 転写活性と比較して有意に低かった (one way ANOVA and Dunnett's 法、 $P < 0.05$)。



<Fig. 1-1> Effects of aquatic invertebrate hemolymph stimulation and aquatic vertebrate serum stimulation on THP1 reporter cell responses. THP1 reporter cell was stimulated with 0.1 $\mu\text{g/ml}$ LPS, several kinds of aquatic invertebrate hemolymphs or salmon serum. Values represent mean \pm SD in six assays. Significantly different from RPMI (control) value, *P <0.05 (one way ANOVA and Dunnett's test).

第 2 節 水産無脊椎動物ヘモリンフに対する NF- κ B/AP-1 レポーター細胞の反応に及ぼす NF- κ B 阻害剤の影響

本章第 1 節において、水産無脊椎動物のクルマエビ、ケガニ、ウバガイ、クロアワビのヘモリンフあるいは水産脊椎動物のギンザケ血清を、NF- κ B/AP-1 レポーター細胞に投与し、NF- κ B/AP-1 の転写活性の活性化を評価した。これら水産無脊椎動物のヘモリンフは NF- κ B/AP-1 の転写活性を活性化したが、ギンザケの血清は NF- κ B/AP-1 転写活性を活性化しなかった。水産無脊椎動物のヘモリンフが示した NF- κ B/AP-1 転写活性の活性化が NF- κ B と AP-1 のどちらの活性化であるのかを明らかにするために、NF- κ B 阻害剤である PDTC 存在下において、第 1 節同様に NF- κ B/AP-1 レポーター細胞に対してヘモリンフあるいは血清を投与し、NF- κ B/AP-1 の転写活性の活性化を評価した。

試料および方法

試薬

Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC, SIGMA-ALDRICH, Tokyo) を NF- κ B 阻害剤として使用した。

PDTC が水産無脊椎動物ヘモリンフ誘導性 NF- κ B/AP-1 転写活性に及ぼす影響

100 μ M PDTC を含む培地中の NF- κ B/AP-1 レポーター細胞 (6.0×10^5 個) に、フィルター滅菌処理したクルマエビ (prawn)、ケガニ (crab)、ウバガイ (clam)、クロアワビ (abalone) のヘモリンフあるいはギンザケ (salmon) 血清を 10 % (vol/vol) となるように投与した。また、ネガティブコントロールとして RPMI、ポジティブコントロールとして 0.1 μ g/ml LPS を投与し、各々の SEAP 量の検出を行った。

統計解析

第1節と同様に、NF- κ B/AP-1 転写活性の活性化の結果について、分散性を one way ANOVA によって確認した。その後2群間の比較に対しては Student's t-test 法を用いて解析した。

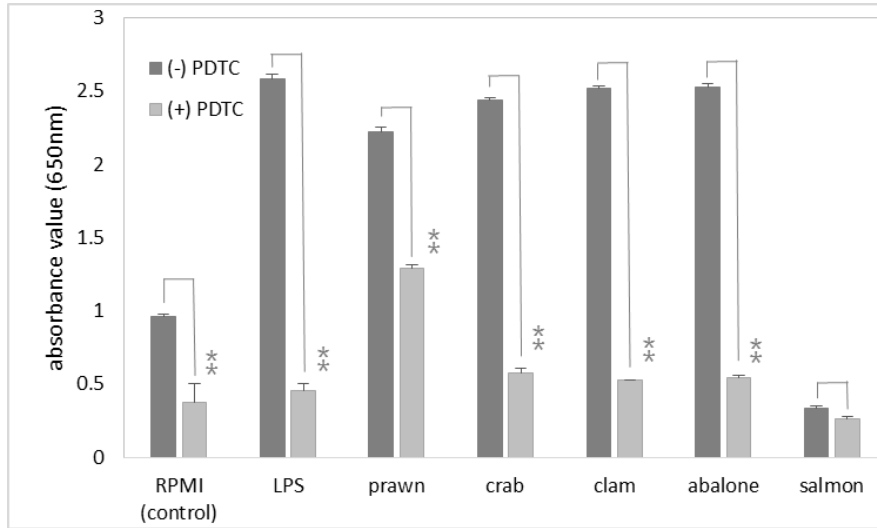
結果

PDTC が水産無脊椎動物へモリンフ誘導性 NF- κ B/AP-1 転写活性に及ぼす影響

PDTC 存在下において NF- κ B/AP-1 レポーター細胞に各種水産無脊椎動物へモリンフあるいはギンザケ血清を各々10 % (vol/vol) となるように投与してから 24 時間後の NF- κ B/AP-1 転写活性を測定した (Fig. 1-2)。

PDTC 存在下において、LPS、水産無脊椎動物のへモリンフあるいは RPMI を投与した際の NF- κ B/AP-1 転写活性は、PDTC 非存在下の NF- κ B/AP-1 転写活性と比較して有意に低かった。一方、ギンザケ血清を投与したときの NF- κ B/AP-1 転写活性は、PDTC 存在の有無で有意な差は見られなかった (one way ANOVA and Student's t-test 法、 $P < 0.0001$)。

以上の結果から PDTC が水産無脊椎動物のへモリンフによる NF- κ B/AP-1 転写活性の活性化を抑制したことから、水産無脊椎動物のへモリンフは NF- κ B の転写活性を活性化するものと推察された。



<Fig. 1-2> Effects of PDTC on the invertebrate hemolymph induced NF- κ B/AP-1 activation. THP1 reporter cell was stimulated with LPS, several kinds of aquatic invertebrate hemolymphs or salmon serum in the presence or absence of PDTC. Values represent mean \pm SD of six assays. Significantly different from RPMI (control) value, ***P < 0.0001 (one way ANOVA and Student's t-test).

第3節 5,000で分画したウバガイヘモリンフがNF-κB/AP-1レポーター細胞に及ぼす影響

本章第1節および第2節において、NF-κB阻害剤であるPDTCが水産無脊椎動物のヘモリンフによるNF-κB/AP-1転写活性の活性化を抑制したことから、水産無脊椎動物のヘモリンフはAP-1の転写活性ではなく、NF-κBの転写活性を活性化するものと推察された。また先行研究において、スルメイカヘモリンフを7% SDS-PAGEゲルによって分離すると、約380 kDaのシングルバンドのみが検出され、スルメイカヘモリンフにおいては極めて高濃度にヘモシアニンが存在しているという報告があったことから [73]、本節では、水産無脊椎動物のヘモリンフ中の金属やペプチドの影響を確認するため、分画分子量5,000の限外ろ過によって水産無脊椎動物のヘモリンフを分画し、NF-κB転写活性を活性化する成分の分子サイズに関する情報を得ることとした。

試料および方法

試料動物および5,000MW分画処理

第1節で用いたウバガイから抽出したヘモリンフをVivaspin 5 kDa (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いて排除サイズ5,000 MWで分画を行った。5,000 MW以上の画分をについて超純水を加えて限外ろ過に付す前と同じ体積とした後、各々をフィルター滅菌した。

5,000 MWで分画したウバガイヘモリンフがNF-κB/AP-1レポーター細胞に及ぼす影響

培地中で37℃、5% CO₂ パージ下において継代培養したNF-κB/AP-1レポーター細胞(6.0 × 10⁵個)に5,000 MWで分画したウバガイのヘモリンフを各々10%

(vol/vol) となるように投与した。また、ネガティブコントロールとして RPMI、ポジティブコントロールとして 0.1 µg/ml LPS を投与し、各々の SEAP 量の検出を行った。

統計解析

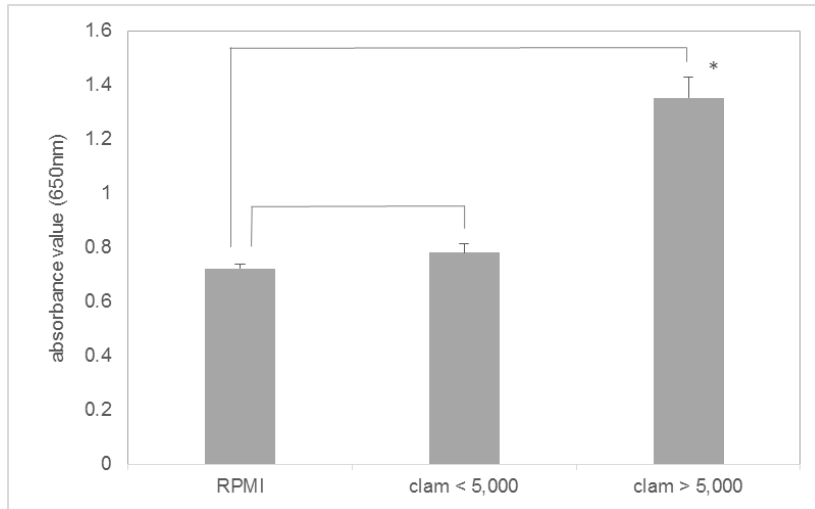
第 1 章第 1 節同様に、NF-κB/AP-1 転写活性の結果について、分散性を one way ANOVA によって確認した。その後、2 群間の比較として Student's t-test 法を用いて解析した。

結果

5,000 MW で分画したウバガイヘモリンフの NF-κB 活性化力の評価

NF-κB/AP-1 レポーター細胞に 5,000 MW で分画したウバガイ (clam) のヘモリンフを各々 10 % (vol/vol) となるように投与した。またネガティブコントロールとして RPMI、ポジティブコントロールとして 0.1 µg/ml LPS を投与し、24 時間後の NF-κB 転写活性を評価した (Fig. 1-3)。

ウバガイのヘモリンフのうち、5,000 MW 以上の画分を投与した際の NF-κB 転写活性の活性化は、RPMI を投与した際の NF-κB 転写活性と比較して有意に高かった。一方、5,000 MW 未満の画分を投与した際の NF-κB 転写活性は、RPMI の際の NF-κB 転写活性との間で有意差は確認されなかった (one way ANOVA and Dunnet's 法、 $P < 0.05$)。



<Fig. 1-3> Effects of the 5,000 fractionalized clam hemolymph stimulation on THP1 reporter cell. THP1 reporter cell was stimulated with LPS or 5,000 fractionalized clam hemolymph. Values represent mean \pm SD of six assays. Significantly different from RPMI (control) value, *P <0.05 (one way ANOVA and Dunnett's test).

第 4 節 考察

本章では、NF- κ B/AP-1 レポーター細胞に水産無脊椎動物のクルマエビ、ケガニ、ウバガイ、クロアワビのヘモリンフあるいは水産脊椎動物のギンザケの血清を刺激として投与し、NF- κ B/AP-1 の転写活性を評価した。水産無脊椎動物のヘモリンフおよび LPS は、RPMI と比較して有意に大きな NF- κ B/AP-1 転写活性の増強活性を示したが、ギンザケの血清は NF- κ B/AP-1 転写活性を増強しなかった。当該 NF- κ B/AP-1 転写活性の活性化は PDTC 存在下において抑制されたことから、水産無脊椎動物のヘモリンフは NF- κ B の転写を活性化するものと推察される。なお、ネガティブコントロールの RPMI についても PDTC の存否によって NF- κ B/AP-1 転写活性の測定値に有意差が確認された。これは細胞の継代数を重ねたことおよび RPMI 刺激によって NF- κ B/AP-1 レポーター細胞がわずかに活性化したと考えられ、これを NF- κ B の基底活性と考えた。

また先行研究において、スルメイカヘモリンフにおいては極めて高濃度にヘモシアニンが存在しているという報告があったことから [73]、水産無脊椎動物のヘモリンフ中の金属やペプチドの影響を確認するため、ウバガイヘモリンフを 5,000 MW で分画し、各々のヘモリンフの画分について NF- κ B の転写活性の活性化を測定した。ウバガイヘモリンフの 5,000 MW より小さい画分に含まれる物質はネガティブコントロール (RPMI) に比べて有意な活性増強を示さなかったが、5,000 MW 以上の画分に含まれる物質は有意に増強した。

以上の結果から、水産無脊椎動物のヘモリンフ中の 5,000 MW 以上の画分は、NF- κ B の遺伝子転写活性を活性化するものと推察された。この画分はヘモシアニンが主成分であることから、第 2 章ではヘモシアニンについて検討を加えることとした。

第 2 章 KLH 刺激に対するヒト単球細胞の炎症応答

第 1 章において、水産無脊椎動物のヘモリンフが NF- κ B の転写活性を活性化すると推察された。スルメイカヘモリンフにおいては、ヘモシアニンが極めて高濃度に存在していると報告されていることから [73]、ヘモリンフ中に含まれる金属やペプチドなどの影響を確認するためにウバガイヘモリンフを 5,000 MW 排除の限外ろ過によって分画し、NF- κ B の転写活性を評価したところ、5,000 MW 未満の画分は NF- κ B の転写活性を活性化させず、5,000 MW 以上の画分は活性化させたことから、ウバガイヘモリンフにおいて NF- κ B の転写活性を活性化させたものは、分画分子量 5,000 MW 以上の主な成分であるヘモシアニンと推察した。

ヘモシアニンは約 300,000 から 700,000 の分子量をもつ巨大な糖タンパク質で、強い免疫原性を持つことから抗体作製時のキャリアタンパク質として利用される [84]。ヘモシアニンの 1 種であるスカシ貝のヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin, KLH) は、キャリアタンパク質として頻繁に用いられ [49, 85-87]、精製度の高い製品の入手が容易であることから、本章では KLH が NF- κ B の転写活性に及ぼす影響を確認することとした。KLH はマンノース残基やフコース残基に富む分子構造を持つことから [53, 54]、単球由来樹状細胞においては C 型レクチン受容体 (C-type lectin receptor, CLR) の一つであるマンノースレセプター (mannose receptor, MR) によって認識されたとされる [55]。レクチン受容体には MR の他に complement receptor 3 (CR3)、toll like receptor 2 (TLR2) や Fc γ receptors (Fc γ R) などの受容体があり、これらはグラム陰性菌の *F. tularensis* を認識してファゴサイトーシスや炎症などの細胞応答を引き起こす [74, 76-78, 88]。また、マクロファージが *F. tularensis* に対してファゴサイトーシスを行う際に脾臓チロシンキナーゼ (spleen tyrosine kinase, Syk) や細胞外シグナル調節キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase, Erk) が関わりとされる [60, 80, 81]。Syk や Erk が関わるシグナル伝達経路は NF- κ B を活性化させる [61, 82, 89, 90]。そこで、

KLH による NF- κ B 活性化に対するエンドサイトーシスの関与および Syk や Erk の関与について明らかにすることとした。

第 1 節 KLH 刺激に対する NF- κ B/AP-1 レポーター細胞の反応に及ぼす NF- κ B 阻害剤の影響

第 1 章において、水産無脊椎動物のヘモリンフの分子量 5,000 以上の画分に NF- κ B の転写活性を活性化する性質があることが確認された。この画分にはヘモリンフ中の主成分であるヘモシアニンが含まれており、免疫原性も非常に高いことから、ヘモリンフ中の NF- κ B 活性化因子をヘモシアニンとする仮説を立て、さらに、抗体作製時のキャリアとして実績が多く、精製度の高いヘモシアニンの入手が容易な KLH を用いて、NF- κ B の活性化に及ぼす影響を評価した。

試料および方法

試薬

Mariculture keyhole limpet hemocyanin (KLH) を Thermo Fisher Scientific 社 (Rockford, IL) から購入した。Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC, SIGMA-ALDRICH, Tokyo) を NF- κ B 阻害剤として使用した。

方法

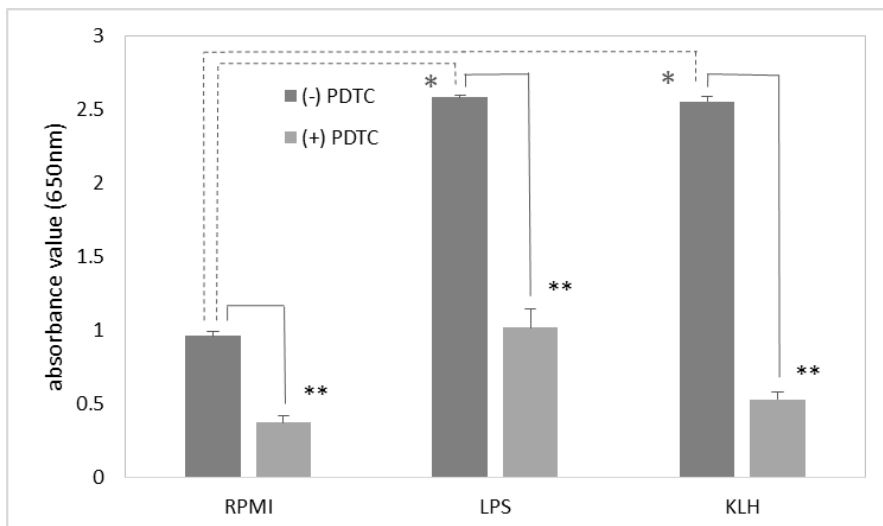
NF- κ B/AP-1 レポーター細胞を維持培地中、37 °C、5 % CO₂ パージ下において培養した。100 μ M PDTC を含む培地中の NF- κ B/AP-1 レポーター細胞 (6.0 x 10⁵ 個) あるいは PDTC を含まない培地中の NF- κ B/AP-1 レポーター細胞 (6.0 x 10⁵ 個) に 50 μ g/ml KLH を投与した。また、ネガティブコントロールとして RPMI、ポジティブコントロールとして 0.1 μ g/ml LPS を投与し、各々の SEAP 活性を測定した。

結果

KLH による NF- κ B/AP-1 活性化に対する NF- κ B 阻害剤の影響

PDTC 存在下、非存在下において NF- κ B/AP-1 レポーター細胞に RPMI、0.1 μ g/ml LPS あるいは 50 μ g/ml KLH を投与し、24 時間後の NF- κ B/AP-1 の転写活性の活性化を評価した (Fig. 2-1)。

PDTC 非存在下における LPS あるいは KLH を投与した際の NF- κ B/AP-1 の転写活性の活性化は、RPMI を投与した際の NF- κ B/AP-1 の転写活性の活性化と比較して有意に高かった (one way ANOVA and Dunnett's 法、*P < 0.05)。PDTC 存在下における LPS、KLH あるいは RPMI を投与した際の NF- κ B/AP-1 の転写活性の活性化の程度は、PDTC 非存在下における各々の NF- κ B/AP-1 の転写活性の活性化と比較して有意に弱かった (Student's t-test 法、**P < 0.0001)。



<Fig. 2-1> Effects of PDTC on the KLH-induced NF- κ B activation. THP-1 NF- κ B/AP-1 reporter cell (THP1-XBlue™-MD2-CD14 Cells) was stimulated with 0.1 μ g/ml LPS or 50 μ g/ml KLH in the presence or the absence of 10 μ M PDTC. Values represent mean \pm SD in six assays. Significant differences from RPMI (negative control) values were defined as *P < 0.05 (one-way ANOVA and Dunnett's test), **P < 0.0001 (one-way ANOVA and Student's t-test).

第2節 KLHによるNF- κ B転写活性の活性化におけるエンドサイトーシスの関与

本章第1節では、KLHがNF- κ B/AP-1レポーター細胞においてNF- κ B転写活性の活性化を示すことが明らかとなった。そこで、KLHによって誘導されるNF- κ Bの活性化に関わる因子を探索することとした。樹状細胞においては、KLHがMRによって認識され、分化誘導に関わるという報告がある[55]。また、レクチン受容体には、MRの他にCR3、TLR2、Fc γ Rsなどの受容体があり、これらはグラム陰性菌の*F. tularensis*を認識してファゴサイトーシスや炎症などの細胞応答を引き起こすとされる。[74, 76-78, 88]。

そこで、KLHのNF- κ B活性化に対するエンドサイトーシスの関与を確認するために、エンドサイトーシス阻害剤による影響を確認した。

試料および方法

試薬

Dynole[®]34-2 (Abcam, Tokyo) をエンドサイトーシス阻害剤として使用した。Dynole[®]31-2 (Abcam, Tokyo) を Dynole[®]34-2 のネガティブコントロールとして使用した。

方法

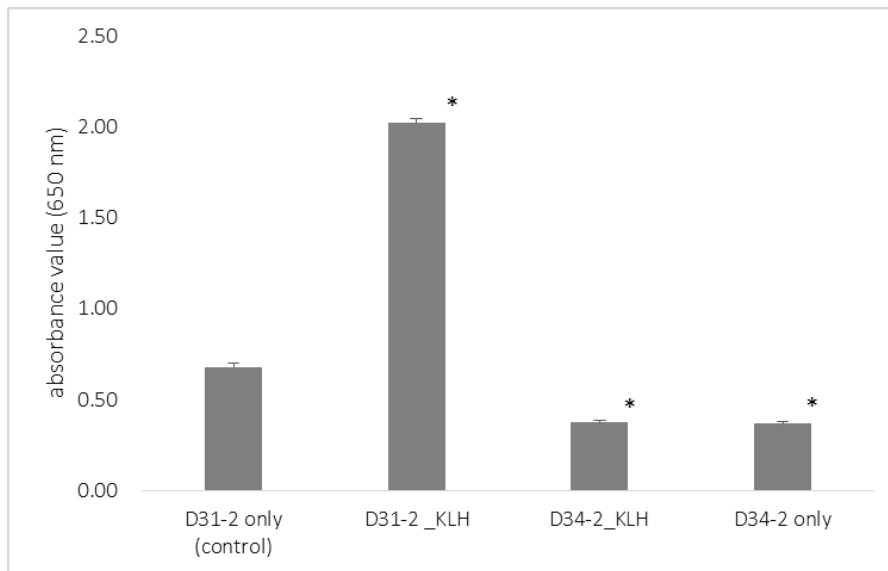
KLHによるNF- κ B転写活性の活性化に及ぼすエンドサイトーシス阻害剤の影響

50 μ M Dynole[®]34-2、50 μ M Dynole[®]31-2を含む培地中のNF- κ B/AP-1レポーター細胞(6.0 \times 10⁵個)を37 $^{\circ}$ C、5% CO₂パージ下において30分間培養後、50 μ g/ml KLHを投与し、各々のSEAP活性を測定した。

結果

KLH による NF- κ B 転写活性の活性化に及ぼすエンドサイトーシス阻害剤の影響の評価

Dynole[®]34-2 存在下あるいはネガティブコントロールの Dynole[®]31-2 存在下において NF- κ B/AP-1 レポーター細胞に 50 μ g/ml KLH を投与して 24 時間後の NF- κ B 転写活性を評価した (Fig. 2-2)。ネガティブコントロールの Dynole[®]31-2 存在下で KLH を投与したときの NF- κ B 転写活性は、KLH を投与しなかったときの NF- κ B 転写活性と比較して有意に高かった。また、Dynole[®]34-2 存在下では、KLH の投与に関わらず、ネガティブコントロールと比較して有意に低かった。(one way ANOVA and Dunnett's 法、* $P < 0.05$)。



<Fig. 2-2 > Effects of endocytosis inhibitor on the KLH-induced NF- κ B activation. THP1 reporter cell was stimulated with 50 μ g/ml KLH in 50 μ M Syk inhibitor, Dynole[®]34-2 or 50 μ M Dynole[®]31-2 (control). Values represent mean \pm SD in six assays.

*Significantly different from Dynole[®]31-2 (control) value, *P < 0.05 (one way ANOVA and Dunnett's test).

第3節 KLHによるNF- κ B転写活性の活性化におけるSyk阻害剤およびErk阻害剤の影響

本章第2節では、NF- κ B/AP-1レポーター細胞においてKLHによるNF- κ Bの転写活性の活性化がエンドサイトーシス阻害剤によって抑制されることが明らかとなった。細胞が細胞外物質を細胞内に取り込む現象のエンドサイトーシスには、細胞が異物を貪食する「ファゴサイトーシス」も含まれる。マクロファージではファゴサイトーシスの実行にSykやErkが関わることから [60, 80, 81]、本節ではKLHによるNF- κ Bの活性化とSykおよびErkとの関連について検討を加えた。

試料および方法

試薬

Bay 61-3606 hydrochloride (Abcam, Tokyo) を Syk 阻害剤として、Nimble (Abcam, Tokyo) を Erk 阻害剤として使用した。

方法

KLHによるNF- κ B転写活性の活性化に及ぼすSyk阻害剤の影響

1 μ M Syk 阻害剤 (Bay 61-3606 hydrochloride, Abcam, Tokyo) を含む培地中のNF- κ B/AP-1レポーター細胞 (6.0×10^5 個) を 37 °C、5 % CO₂ パージ下において30分間培養後、50 μ g/ml KLH を投与した。また、ネガティブコントロールとしてRPMI、ポジティブコントロールとして0.1 μ g/ml LPS を投与し、各々のSEAP活性を測定した。

KLHによるNF-κB転写活性の活性化に及ぼすErk阻害剤の影響

5 μM Erk阻害剤 (Nimble, Abcam, Tokyo) を含む培地中のNF-κB/AP-1レポーター細胞 (6.0×10^5 個) を 37 °C、5 % CO₂ パージ下において 30 分間培養後、50 μg/ml KLH を投与した。またネガティブコントロールとして RPMI、ポジティブコントロールとして 0.1 μg/ml LPS を投与し、各々のSEAP活性を測定した。

結果

KLHによるNF-κB転写活性の活性化に及ぼすSyk阻害剤の影響

Syk阻害剤存在下および非存在下においてNF-κB/AP-1レポーター細胞に50 μg/ml KLH、RPMIあるいは0.1 μg/ml LPSを投与して、24時間後のNF-κB転写活性を評価した (Fig. 2-3)。

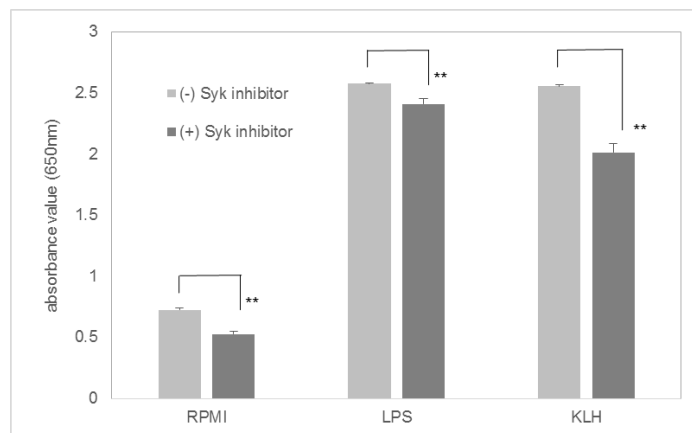
Syk阻害剤非存在下において、LPSあるいはKLHを投与した際のNF-κB転写活性の活性化は、RPMIを投与した際のNF-κB転写活性の活性化と比較して有意に高かった (one way ANOVA and Dunnett's 法、 $P < 0.05$)。Syk阻害剤存在下においては、LPS、KLHあるいはRPMIを投与した際のNF-κB転写活性は、Syk阻害剤非存在下での各々のNF-κB転写活性と比較して有意に低かった (Student's t-test 法、 $P < 0.0001$)。

KLHによるNF-κB活性の活性化に及ぼすErk阻害剤の影響

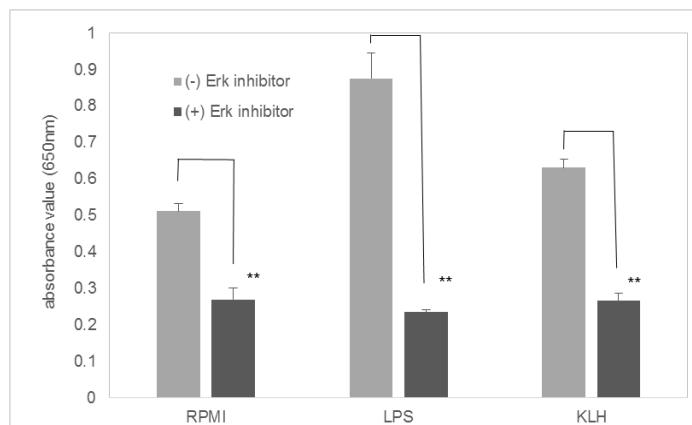
Erk阻害剤存在下、および非存在下においてNF-κB/AP-1レポーター細胞に50 μg/ml KLH、RPMIあるいは0.1 μg/ml LPSを投与して24時間後のNF-κB転写活性を測定した (Fig. 2-4)。

Erk阻害剤非存在下において、LPSあるいはKLHを投与した際のNF-κB転写活性の活性化は、RPMIを投与した際のNF-κB転写活性の活性化と比較して有意に高かった (one way ANOVA and Dunnett's 法、 $P < 0.05$)。Erk阻害剤存在下に

おける、LPS、KLH あるいは RPMI を投与した際の NF- κ B 転写活性の活性化は、Erk 阻害剤非存在下での各々の NF- κ B 転写活性の活性化と比較して有意に低かった (Student's t-test 法、 $P < 0.0001$)。



<Fig. 2-3> Effects of Syk inhibitor on the KLH-induced NF- κ B activation. THP-1 reporter cell was stimulated with 0.1 μ g/ml LPS or 50 μ g/ml KLH in the presence or the absence of 1 μ M Syk inhibitor (Bay 61-3606). Values represent mean \pm SD in six assays. **Significantly different from values in the absence of the inhibitor, P < 0.0001 (one-way ANOVA and Student's t-test).



<Fig. 2-4> Effects of Erk inhibitor on the KLH-induced NF- κ B activation. THP-1 reporter cell was stimulated with 0.1 μ g/ml LPS or 50 μ g/ml KLH in the presence or the absence of 5 μ M Erk inhibitor (Nimbolide). Values represent mean \pm SD in six assays. **Significantly different from values in the absence of the inhibitor, P < 0.0001 (one-way ANOVA and Student's t-test).

第 4 節 考察

第 1 章において、水産無脊椎動物ヘモリンフは NF- κ B の転写活性を活性化させることが明らかとなった。ヘモリンフ中の 5,000 未満の分子量をもつ成分は、NF- κ B の転写活性を活性化させず、5,000 以上の分子量をもつ成分は、NF- κ B の転写活性を活性化させることが確認された。ヘモリンフ中の主成分であり、分子量が約 300,000 から 700,000 のヘモシアニンが、NF- κ B の転写活性の活性化を示した可能性について検討を重ねた。ヘモシアニンとして、キャリアタンパク質の実績が多く、精製品の入手が容易な KLH を用いた。KLH を PDTC 存在下および非存在下で NF- κ B/AP-1 レポーター細胞に投与し、KLH が NF- κ B の転写活性の活性化を示したことから、KLH による NF- κ B の転写活性の活性化を誘導したものを探索した。

先行研究で示されたように、KLH が単球由来樹状細胞において分化などの細胞応答を誘導した際に、この誘導のシグナル伝達の一部にレクチン受容体の MR による KLH の認識が関わり[55]、KLH がマンノース残基やフコース残基に富む構造をもつことから[51]、その他のレクチン受容体にも認識される可能性もあると予想された。さらにレクチン受容体の CR3、TLR2 や Fc γ Rs はグラム陰性菌の *F. tularensis* を認識し、ファゴサイトーシスや炎症などの細胞応答を引き起こすという先行研究があることから[74, 76-78, 88]、KLH がエンドサイトーシスを引き起こし、種々の経路を介して NF- κ B を活性化させる可能性を探ることとした。

エンドサイトーシス阻害剤存在下で、NF- κ B/AP-1 レポーター細胞において KLH による NF- κ B の転写活性の活性化が抑制された。この結果と細胞がグラム陰性菌に対してファゴサイトーシスを行う際に Syk や Erk が関わりと先行研究で示されたことから[60, 80, 81]、KLH 誘導性の NF- κ B の活性化に Syk や Erk が関与する可能性を探ることとした。そこで、Syk 阻害剤存在下で NF- κ B/AP-1 レポーター細胞に KLH を投与したところ、有意に NF- κ B の転写活性の活性化が抑制された。

しかし、ネガティブコントロールと比較すると NF- κ B の転写活性の活性化が顕著に抑制されているとは言い難く、部分的な抑制を受けたと推察した。この結果は Presicce らの、単球由来樹状細胞において KLH による細胞分化のシグナル伝達の一部に MR による KLH の認識が関わるという報告と類似する [55]。

また、Erk 阻害剤存在下で NF- κ B/AP-1 レポーター細胞において KLH を投与したところ、有意に NF- κ B の転写活性の活性化が抑制された。このことから、Erk は KLH による NF- κ B の活性化に大きな影響を与えていると推察される。

以上の結果から、KLH はエンドサイトーシスを引き起こし、種々の経路を介して NF- κ B の活性化を誘導すると考えられ、KLH 誘導性 NF- κ B の活性化には Syk 以外の分子も関わる複数の経路の存在が予想されるが、その経路のほとんどは Erk を経由して NF- κ B の活性化を誘導するものと推察された。

第 3 章 KLH 刺激に対するヒト単球細胞における細胞内情報伝達機構

第 1 章において、水産無脊椎動物ヘモリンフ中の 5,000 以上の分画に NF- κ B の転写活性を活性化する性質があることが確認された。次いで第 2 章では、水産無脊椎動物ヘモリンフの主成分であり、5,000 以上の分子量をもつヘモシアニンの 1 種であるスカシ貝ヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin, KLH) に NF- κ B の転写活性を活性化する作用があることが明らかとなった。この活性化はエンドサイトーシス阻害剤存在下において抑制されたことから、KLH がエンドサイトーシス、次いで種々の経路を介して NF- κ B の転写活性を活性化すると考えられた。さらに、阻害剤の影響を調べることによってこの活性化には Syk や Erk の関与が示唆された。Syk は C 型レクチン受容体 (C-type lectin receptors, CLR)、complement receptor 3 (CR3)、mannose receptor (MR)、toll like receptor 2 (TLR2) および Fc γ receptors (Fc γ Rs) などのレクチン受容体と相互作用する分子であり、エンドサイトーシスや炎症などの細胞応答には Syk や Erk が関与することが知られる [55, 81]。そこで本章においては、急性白血病患者由来ヒト単球細胞株の THP-1 に KLH を投与した際の Syk や Erk などのリン酸化を介する細胞内情報伝達機構について、定量性に優れた近赤外光ウェスタンブロッティングによって明らかにすることとした。

第 1 節 KLH 刺激に対する Syk のチロシン残基リン酸化動態

第 1 章および第 2 章において、KLH による NF- κ B の転写活性の活性化がエンドサイトーシス阻害剤によって抑制されたことから、KLH はエンドサイトーシスを引き起こし、次いで種々の経路を介して NF- κ B の転写活性の活性化を誘導すると考えられた。さらに KLH による NF- κ B の転写活性の活性化が Syk 阻害剤あるいは Erk 阻害剤によって抑制されたことから、KLH による NF- κ B の転写活性の活性化に Syk および Erk が関わるものと推察された。そこで本節では、KLH による Syk の活性化について明らかにするために、Syk のキナーゼ活性の正の調節に特に重要とされるチロシン残基 (Tyr525、Tyr526) [63] と、Syk のキナーゼ活性の負の調節に関与するチロシン残基部位 (Tyr323) [64, 65] におけるリン酸化について、近赤外光ウェスタンブロッティングによって評価した。

試料および方法

培養細胞

本章では、非働化处理 (56 °C、30 分) を行った 10 % (vol/vol) FBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)、1 % (vol/vol) GlutaMAX™ Supplement (Thermo Fisher Scientific)、100 μ g/ml Normocin™ (InvivoGen, San Diego, CA)、を含む RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific) を使用し、急性単球性白血病患者由来ヒト単球細胞株の THP-1 細胞 (JCRB0112、医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンク、大阪) を維持培養し、以下の操作に用いた。カルチャーボトル (Corning, NY) を使用し、37 °C、5 % CO₂ パージ下において継代培養した。

試薬

Syk のリン酸化レベルを評価するために Phospho-Syk (Tyr525/526)Antibody (C87C1, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) と、Phospho-Syk (Tyr323)Antibody (2715, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) を使用した。RIPA Buffer (10 X) (9806, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) を細胞溶解液として使用した。

THP-1 細胞への KLH 投与と細胞溶解液の回収

THP-1 (1.0×10^7 個) に 500 $\mu\text{g/ml}$ KLH、ネガティブコントロールとして RPMI を投与し、0.5、1、2、5、10 あるいは 60 分後に 1 mM Na_3VO_4 、1 mM NaF、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、Protease Inhibitor Cocktail (Nakarai Tesque, Tokyo) を含む RIPA Buffer (10 X) を細胞培養液の 10 分の 1 量添加し、転倒混和後、氷上に 30 分間静置した。得られた溶液を 4 °C、20,000 $\times g$ で 10 分間の遠心分離に付し、得られた上清を以下のドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびウェスタンブロッティングに供した。

Syk およびリン酸化 Syk の検出

KLH 投与後に得られた THP-1 細胞溶解液を 12 % Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels (Bio-Rad, Hercules, CA) にて電気泳動し、タンパク質を分離した。その後、セミドライブロッティング装置 (Trans Blot Turbo, Bio-Rad) を用いて (25 V 定電圧、20 分) ゲルから polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (pore size: 0.20 μm 、Bio-Rad) にタンパク質を転写した。転写後の PVDF 膜をブロッキング溶液 (Odyssey Blocking Buffer, LI-COR, Cambridge, UK) 中で室温、1 時間振とうしてブロッキングを行った。ブロッキング後の PVDF 膜を 0.1 % Tween20 を含む PBS (PBS-T) で軽く洗浄後、さらに PBS-T 中で 5 分間 $\times 4$ 回洗浄し、一次抗体として抗リン酸化 Syk 抗体 (Tyr525/526) (Rabbit monoclonal antibody, 1.7 : 1000) あるいは抗リン酸化 Syk 抗体 (Tyr323) (Rabbit polyclonal antibody, 1.7 : 1000) を、0.2 % Tween20 を含む Odyssey Blocking Buffer 溶液中、4 °C で二晩振とう・平衡化した。次いで、PBS-T で軽く洗

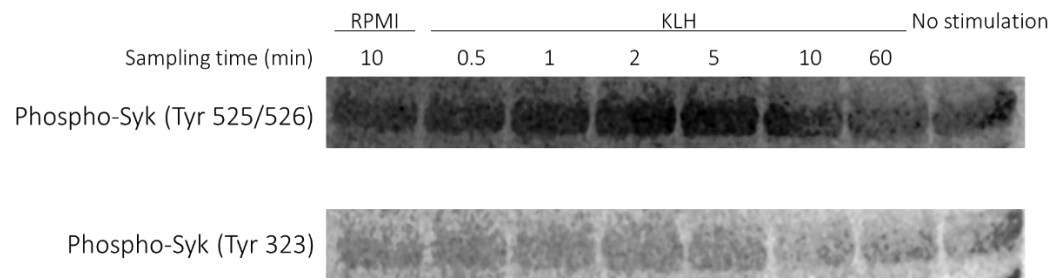
浄後、PBS-T 中で 5 分間 × 4 回洗浄し、二次抗体として Alexa Fluor 680 (Goat anti-rabbit IgG (H+L), 1 : 20000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) と 0.2 % Tween20 および 0.001 % SDS を含む Odyssey Blocking Buffer 溶液中で、遮光状態で 50 分間振とうした。さらに PBS-T で軽く洗浄後、遮光状態で PBS-T 中で 5 分間 × 4 回洗浄した後、PVDF 膜上の蛍光を近赤外イメージングシステム (Odyssey Fc Dual-Mode Imaging System, IL-COR, Lincoln, NE) にて励起波長 680 nm、蛍光波長 700 nm で蛍光画像を取得して Syk およびリン酸化 Syk の検出を行った。

結果

KLH 刺激に対する THP-1 の Syk リン酸化動態

THP-1 細胞に RPMI を投与してから 10 分後、KLH を投与してから 0.5、1、2、5、10 あるいは 60 分後の Syk のリン酸化動態を近赤外光ウェスタンブロッティングにて評価した (Fig. 3-1)。

THP-1 細胞に RPMI を投与してから 10 分後、KLH を投与してから 0.5、1、2、5、10 あるいは 60 分後の Syk のシグナル強度を比較すると、リン酸化によって Syk が活性化するチロシン残基 Try525/526 に関しては、KLH 投与後 2 分後および 5 分後にシグナル量が増加した。一方、リン酸化によって Syk が不活性化するチロシン残基 Tyr323 に関しては、KLH 投与 60 分後までのシグナルには大きな変動が認められなかった。これらのことから、KLH 刺激によって Tyr323 のリン酸化は進行せず、Try525/526 がリン酸化されることによって Syk が活性化されるものと推察される。



<Fig. 3-1> Effects of the KLH stimulation on the Syk phosphorylation at Y525/526 or Y323. THP-1 cells were stimulated with KLH. Syk phosphorylation of the cell lysate was estimated through the Western blotting with Phospho-Syk (Tyr525/526) antibody or Phospho-Syk (Tyr323) antibody.

第 2 節 KLH 刺激に対する Syk のセリン残基リン酸化動態における PKC の関与

本章第 1 節で、THP-1 細胞に対する KLH の投与による Syk の活性化について Syk のチロシン残基 (Tyr525/526) については KLH 投与 2 分後から 5 分後にリン酸化レベルの変動が確認され、チロシン残基 (Tyr323) においては、リン酸化の変動は確認されなかった。Syk は細胞が刺激を受けると主にチロシン残基において自己リン酸化が進行するとされているが、近年、セリン残基 (Ser297) におけるリン酸化が Syk の活性化と下流へのシグナル伝達に重要な役割を果たすとされ[63]、マウス Syk のセリン残基 (Ser291) のリン酸化では、プロテインキナーゼ C (protein kinase C, PKC) の関与があるとされる[66]。そこで本節では、KLH 刺激による Syk 活性化におけるヒト Syk のセリン残基 (Ser293、マウス Ser291 に相当) のリン酸化と PKC の影響について明らかにするために、PKC 阻害剤存在下で KLH を投与した THP-1 細胞の Syk (Ser297) のリン酸化を近赤外光ウェスタンブロッティングによって評価した。

試料および方法

試薬

全 Syk 量を評価するために Syk (D3Z1E) XP Rabbit mAb (13198, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) を、Syk のリン酸化レベルを評価するために Phospho-Syk (Ser 297) Antibody (14140, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) を使用した。RIPA Buffer (10 X) (9806, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) を細胞溶解液として使用した。PKC 阻害剤として bisindolyl maleimide I (EMD Millipore, Billerica, MA) を使用した。

THP-1 細胞への KLH 投与と細胞溶解液の回収

THP-1 (1.0×10^7 個) を $1 \mu\text{M}$ bisindolyl maleimide I (PKC 阻害剤) 存在下で、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ パージ下において 30 分間培養後、 $500 \mu\text{g/ml}$ KLH を投与し、 $500 \mu\text{g/ml}$ KLH、ネガティブコントロールとして RPMI を投与し、0.5、2 あるいは 10 分後に 1mM Na_3VO_4 、 1mM NaF、 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、Protease Inhibitor Cocktail (Nakarai Tesque, Tokyo) を含む RIPA Buffer (10 X) を細胞培養液の 10 分の 1 量添加し、転倒混和後、氷上に 30 分間静置した。得られた溶液を 4°C 、 $20,000 \times g$ で 10 分間の遠心分離に付し、得られた上清を以下の SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングに供した。

Syk およびリン酸化 Syk の検出

KLH 投与後に得られた THP-1 細胞溶解液を第 3 章第 1 節と同じ方法で分離したタンパク質を PVDF 膜 (pore size: $0.20 \mu\text{m}$ 、Bio-Rad) に転写し、ブロッキングを行った。ブロッキング後の PVDF 膜は、 0.1% Tween20 を含む PBS (PBS-T) で軽く洗浄後、さらに PBS-T 中で 5 分間 $\times 4$ 回洗浄し、一次抗体として抗 Syk 抗体 (Rabbit monoclonal antibody, 1.7 : 1000) あるいは抗リン酸化 Syk 抗体 (Ser 297) (Rabbit polyclonal antibody, 1.5 : 1000) を、 0.2% Tween20 を含む Odyssey Blocking Buffer 溶液中、 4°C で二晩振とう・平衡化した。次いで、PBS-T で軽く洗浄後、PBS-T 中で 5 分間 $\times 4$ 回洗浄し、二次抗体として Alexa Fluor 680 (Goat anti-rabbit IgG (H+L), 1 : 20000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) と 0.2% Tween20 および 0.001% SDS を含む Odyssey Blocking Buffer 溶液中で、遮光状態で 50 分間振とうした。さらに PBS-T で軽く洗浄後、遮光状態で PBS-T 中で 5 分間 $\times 4$ 回洗浄した後、PVDF 膜上の蛍光を近赤外イメージングシステム (Odyssey Fc Dual-Mode Imaging System, IL-COR, Lincoln, NE) にて励起波長 680nm 、蛍光波長 700nm で蛍光画像を取得して Syk およびリン酸化 Syk の検出を行った。

結果

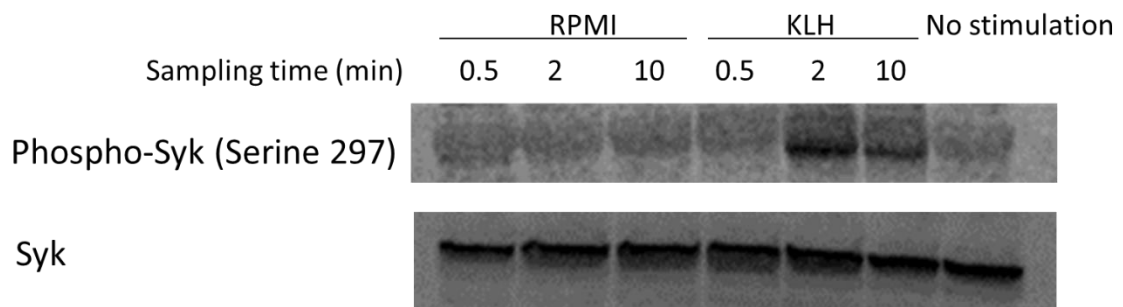
KLH 刺激に対する THP-1 の Syk リン酸化動態

THP-1 細胞にネガティブコントロールとして RPMI あるいは KLH を投与してから経時的に Syk のリン酸化動態を近赤外光ウェスタンブロッティングにて評価した (Fig. 3-2-1)。THP-1 細胞に KLH を投与してからいずれの時間帯でも、Syk 量はほぼ一定であった。THP-1 細胞に RPMI を投与してから 0.5、2 あるいは 10 分後の Syk のシグナル強度には、大きな差異は確認されなかった。一方、THP-1 細胞に KLH を投与してから 0.5、2 あるいは 10 分後のリン酸化 Syk のシグナル強度を比較すると、KLH 投与後 2 分後および 10 分後で Syk のリン酸化が亢進した。

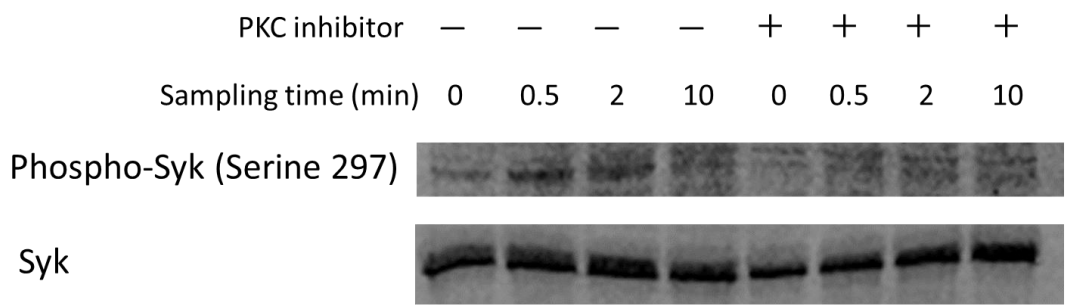
KLH による THP-1 の Syk リン酸化に対する PKC 阻害剤の影響

PKC 阻害剤存在下において、THP-1 細胞に KLH を投与してから 0.5、2 あるいは 10 分後の Syk のリン酸化動態を近赤外光ウェスタンブロッティングにて評価した (Fig. 3-2-2)。

PKC 阻害剤の存在に関わらず、THP-1 細胞に KLH を投与してからいずれの時間帯でも、Syk 量はほぼ一定であった。PKC 非存在下において、THP-1 細胞に KLH を投与してから 2 および 10 分後の Syk (Ser297) のリン酸化が亢進した。一方、PKC 阻害剤存在下においては、THP-1 細胞に KLH を投与してからいずれの時間帯においてもリン酸化が抑制された。



<Fig. 3-2-1> Effects of the KLH stimulation on the Syk phosphorylation at Ser 297. THP-1 cells were stimulated with KLH. Syk phosphorylation of the cell lysate was estimated through the Western blotting with Phospho-Syk (Ser297) antibody.



<Fig. 3-2-2> Effects of PKC inhibitor (bisindolylmaleimide I) on Syk phosphorylation of KLH stimulated THP1 cells. KLH stimulated THP-1 cells were estimated through the Western blotting with Phospho-Syk (Ser297) antibody.

第3節 KLHによるNF- κ B転写活性の活性化におけるPKCの関与

本章第2節では、THP-1細胞においてKLHによるSykのセリン残基(Ser297)のリン酸化がPKC阻害剤によって抑制されることが明らかとなった。そこで本節ではNF- κ B/AP-1レポーター細胞において、KLHによるNF- κ Bの転写活性の活性化に対するPKCの影響について、PKC阻害剤を用いて明らかにすることとした。

試料および方法

試薬

PKC阻害剤としてbisindolyl maleimide I (EMD Millipore, Billerica, MA)を使用した。

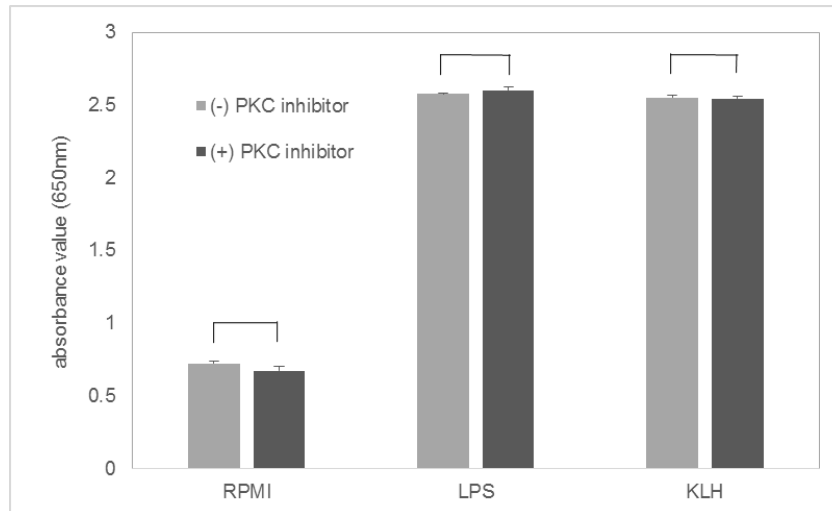
方法

KLHによるNF- κ B転写活性の活性化に及ぼすPKCの影響

1 μ M bisindolyl maleimide I (PKC阻害剤)を含む培地中のNF- κ B/AP-1レポーター細胞(6.0×10^5 個)を37°C、5%CO₂パージ下において30分間培養後、50 μ g/ml KLHを投与した。また、ネガティブコントロールとしてRPMI、ポジティブコントロールとして0.1 μ g/ml LPSを投与し、各々のSEAP活性を測定した。

結果

PKC 阻害剤存在下および非存在下において NF- κ B/AP-1 レポーター細胞に 50 μ g/ml KLH、ネガティブコントロールとして RPMI、ポジティブコントロールとして 0.1 μ g/ml LPS を投与して 24 時間後の NF- κ B 転写活性を評価した (Fig. 3-1)。PKC 阻害剤存在下において、LPS、KLH あるいは RPMI を投与した際の NF- κ B 転写活性は、PKC 阻害剤非存在下での各々の NF- κ B 転写活性と比較して有意差はなかった (Student's t-test 法、 $P < 0.0001$)。以上の結果から、KLH による NF- κ B の転写活性の活性化に対し、PKC が影響を及ぼす可能性は低いと推察された。



<Fig. 3-3> Effects of PKC inhibitor on the KLH-induced NF- κ B activation. THP-1 reporter cell was stimulated with 0.1 μ g/ml LPS or 50 μ g/ml KLH in the presence or the absence of 1 μ M PKC inhibitor (Bisindolylmaleimide I). Values represent mean \pm SD in six assays. There is no significant difference from values in the absence of the inhibitor, $P < 0.0001$ (one-way ANOVA and Student's t-test).

第4節 KLH 刺激に対する Erk のリン酸化動態における Syk の関与

第1章および第2章において、KLH はエンドサイトーシスを引き起こし、次いで種々の経路を介して NF- κ B の転写活性の活性化を誘導すると考えられた。さらに KLH による NF- κ B の転写活性の活性化が Syk 阻害剤あるいは Erk 阻害剤によって抑制されたことから、KLH による NF- κ B の転写活性の活性化に Syk および Erk が関わるものと推察された。

そこで本節では、KLH による Syk 活性化と Erk 活性化の連携について明らかにするために、Syk 阻害剤存在下で KLH を投与した THP-1 細胞の Erk とリン酸化 Erk を用いた近赤外光ウェスタンブロッティングによって評価した。

試料および方法

試薬

全 Erk 量を評価するために Anti-Erk1/2 antibody (EPR 17526, Abcam, Tokyo) を、Erk のリン酸化レベルを評価するために Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2 (Tyr 202/204), Cell Signaling Technology, Danvers, MA) を使用した。

THP-1 細胞への KLH 投与と細胞溶解液の回収

THP-1 (1.0×10^7 個) を 10 μ M Bay 61-3606 hydrochloride (Syk 阻害剤) 存在下で、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ パージ下において 2 時間培養後、500 μ g/ml KLH を投与し、0.5、2 あるいは 10 分後に 1 mM Na₃VO₄、1 mM NaF、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、Protease Inhibitor Cocktail (Nakarai Tesque, Tokyo) を含む RIPA Buffer (10 X) を細胞培養液の 10 分の 1 量添加し、転倒混和後、氷上に 30 分間静置した。得られた溶液を 4 $^{\circ}$ C、20,000 \times g で 10 分間の遠心分離に付し、得られた上清を以下の SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングに供した。

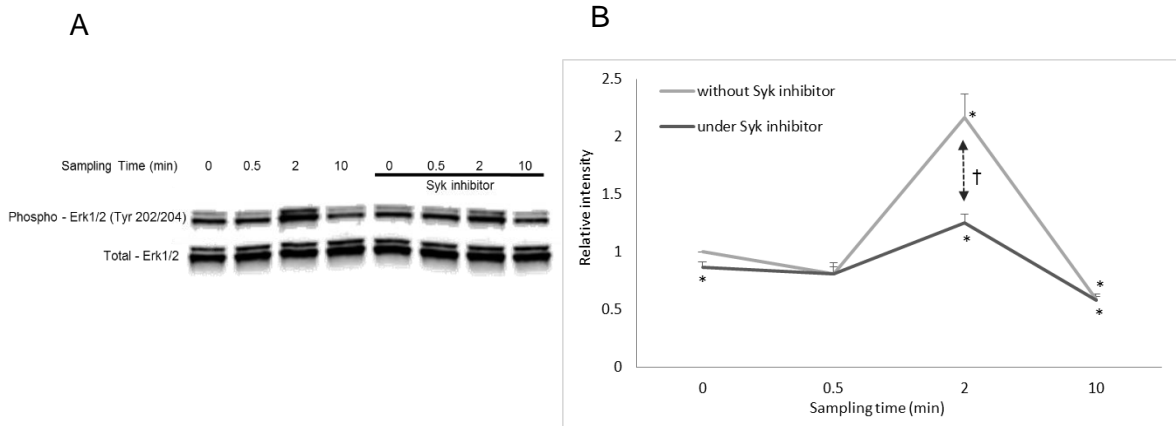
Erk およびリン酸化 Erk の検出

Syk 阻害剤存在下で THP-1 細胞へ KLH を投与して得られた細胞溶液を第 3 章第 2 節と同様な方法で SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングに供した。なおウェスタンブロッティングによる Erk 及びリン酸化 Erk の検出には、それぞれ Erk 抗体として Anti-Erk1/2 antibody (rabbit monoclonal antibody, 1 : 600, Abcam)、リン酸化 Erk 抗体として Phospho-p44/42 MAPK (rabbit polyclonal antibody, 1 : 600, Cell Signaling Technology) を使用した。

結果

KLH 刺激に対する THP-1 の Erk リン酸化動態および Syk 阻害剤の影響

Syk 阻害剤存在下において、THP-1 細胞に KLH を投与してから 0.5、2 あるいは 10 分後の Erk のリン酸化動態を近赤外光ウェスタンブロッティングにて評価した (Fig. 4-1)。THP-1 細胞に KLH を投与してからいずれの時間帯でも、Syk 阻害剤の有無に関わらず Erk 量はほぼ一定であった。一方、THP-1 細胞に KLH を投与してから 2 分後のリン酸化 Erk のシグナル強度を比較すると、KLH 投与後 2 分後および 10 分後にリン酸化が亢進した。



<Fig. 3-4> Effects of Syk inhibitor on the KLH-induced Erk phosphorylation. (A) THP-1 cells were pre-treated or non-treated 10 μ M Syk inhibitor (Bay 61 -3606) at 37 $^{\circ}$ C for two hours. THP-1 cells were then stimulated with 500 μ g/ml KLH at 37 $^{\circ}$ C for various periods of time. At the end of the incubation period, cells were lysed in a RIPA buffer with inhibitors for 30 min on ice. After centrifugation (20,000 g, 10 min, 4 $^{\circ}$ C), supernatant proteins were evaluated through the Western blot with antibodies, anti-Erk1 /2 antibody (EPR 17526) or anti-phospho-Erk1 /2 (Tyr 202/204).

(B) Phosphorylation signals were normalized to total Erk1/2 signal intensities in the panel (A). The graphs represent mean \pm SD of values obtained from three independent experiments. *Significantly different from the initial value in the absence of the inhibitor, *P < 0.05 (one-way ANOVA and Dunnett's test). †There is a significant difference between values with and without the inhibitor at 2 min, †P < 0.001 (one-way ANOVA and Student's t-test).

第5節 考察

第1章および第2章では、KLHがエンドサイトーシスを引き起こし、次いで種々の経路を介して NF- κ B の転写活性を活性化させている可能性があり、KLHによる NF- κ B の転写活性の活性化にはファゴサイトーシスや炎症などの細胞応答に関わる分子の Syk や Erk の関与が推察された。

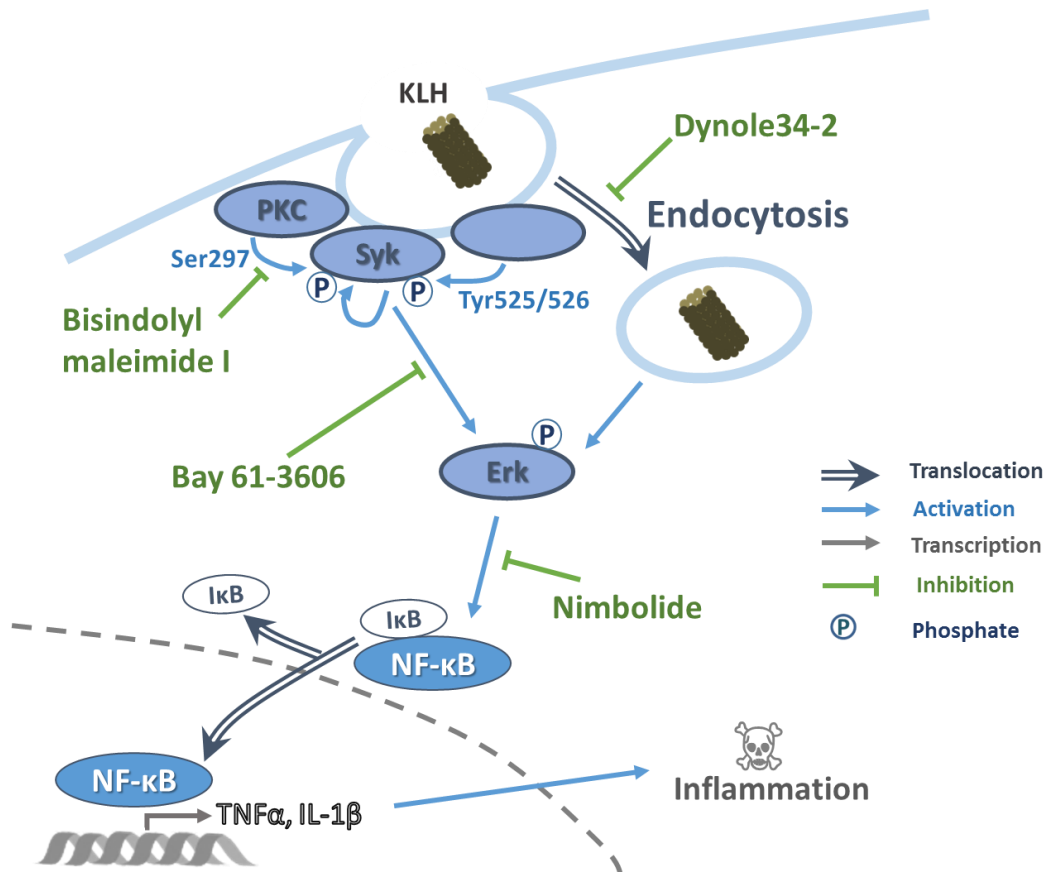
本章では、KLHによる Syk の活性化について、チロシン残基 (Tyr323) におけるリン酸化は確認されなかったが、チロシン残基 (Tyr525/526) およびセリン残基 (Ser297) におけるリン酸化の亢進が明らかとなった。この KLHによる Syk のセリンリン酸化は PKC 阻害剤存在下において抑制されたが、KLHによる NF- κ B の転写活性の活性化は PKC 阻害剤によって抑制されなかった。このことから、PKC は KLHによる Syk のセリン残基リン酸化に影響を及ぼすが、KLHによる NF- κ B の転写活性の活性化への影響は及ぼしていないと推察され、他のセリンスレオニンキナーゼあるいはチロシンキナーゼによる制御の可能性が示唆される。

また、KLHによる Erk のリン酸化が近赤外光ウェスタンブロットティングによって明らかとなった。この KLHによる Erk のリン酸化は Syk 阻害剤存在下において抑制された。このことから、Syk は KLHによる Erk のリン酸化に関与するものと推察される。

Syk および Erk は KLH を添加してから数分間でリン酸化されていた。このリン酸化比率が時間依存的に増加した後、減少する傾向は、先行研究で示された内容と一致する [63, 91]。

以上のことから、KLHによって誘導される NF- κ B の活性化のシグナル経路には、Syk および Erk のリン酸化が関与するものと推察される。Syk のリン酸化は、Ser297 については PKC の影響を受けるが、KLHによる NF- κ B の活性化に関わる Syk のリン酸化には影響を与えないものと推察された。また Syk は Erk の上流に位置する

が、KLH による NF- κ B の活性化に関わる Erk のリン酸化への影響は部分的なもの
と推察される。



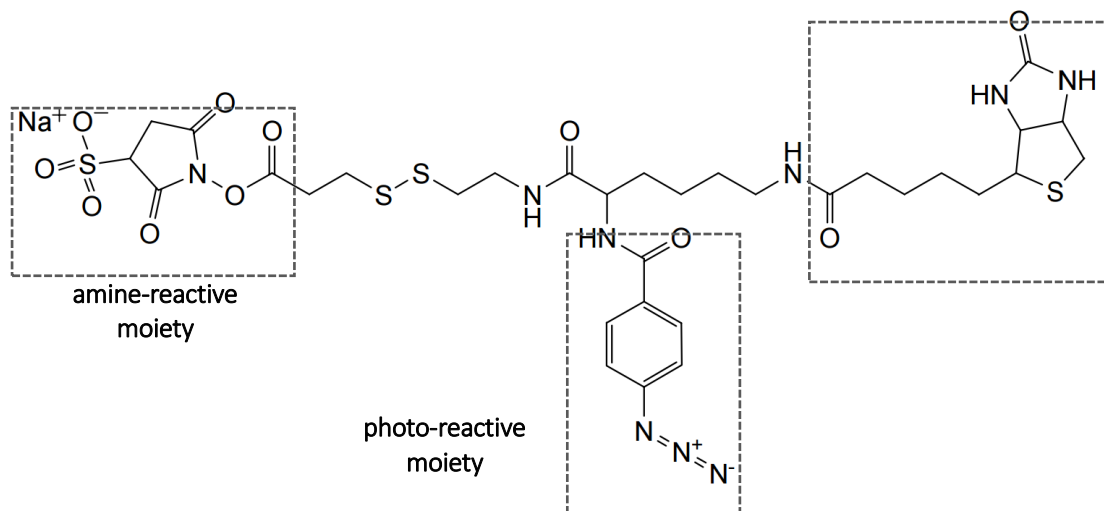
<Fig. 3-5> The signal pass way of the KLH induced NF κ B activation.

第 4 章 ヒト単球細胞における KLH 相互作用タンパク質の探索

第 1 章および第 2 章では、KLH がエンドサイトーシスを引き起こし、次いで種々の経路を介して NF- κ B を活性化させる可能性が示唆された。第 3 章において、この KLH によって誘導される NF- κ B の活性化シグナル経路には Syk および Erk が関与することが示唆された。本章では、ヒト単球細胞 (THP-1) にて光反応性架橋試薬を用いて KLH と KLH 相互作用タンパク質を架橋し、KLH と相互作用して NF- κ B の活性化を誘導するタンパク質を探索することとした。

第1節 光反応性架橋試薬を用いたヒト単球細胞における KLH 相互作用タンパク質の探索

本節では、KLHによって誘導されるNF- κ Bの活性化経路を明らかにするために、ビオチン標識転移を利用し、THP-1細胞においてKLHと相互作用するタンパク質を探索した。ビオチン標識転移とは、目的物質にビオチンとその物質に相互作用する物質を分岐的に共有結合させた後に、還元処理を行って目的物質のみを解離させることにより、ビオチン標識された相互作用物質を得る方法である。ビオチン標識転移には、光反応性架橋試薬の1種であるSulfo-SBEDを用いた。Sulfo-SBEDは末端にNHSエステルがあり、S-S結合を介した分子鎖の先にビオチンと光反応性の芳香族アジドを分岐的にもつ構造を持つ(Fig. 4-1)。



<Fig. 4-1> Chemical structure of Sulfo-SBED

試料および方法

試薬

光反応性架橋剤の1種である Sulfo-SBED (Thermo Scientific, Rockford, IL) を用いた。Sulfo-SBED は還元剤によって切断される S-S 結合部位、およびビオチン部位の2つのタンパク質結合部位からなる。還元剤として 2-mercaptoethanol (Wako) を用い、SDS-PAGE に供するサンプルバッファとして Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad) を用いた。

Sulfo-SBED 結合 KLH (KLH プローブ) の作製

1 μg の Sulfo-SBED に 25 μL の dimethyl sulfoxide (DMSO, Wako) を添加して溶解後に 100 μL の精製水を添加した。これを 20 μL の 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ KLH に添加した後、遮光下で 30 分間室温に静置した。さらにこれを遮光下で一晩、4 $^{\circ}\text{C}$ 下、2,000MW 排除の透析膜 (Slide-A-Lyzer Cassette: Thermo Scientific) を用いて PBS に対して透析したものを KLH プローブとして以下の操作に使用した。また KLH を無添加の Sulfo-SBED についても同様な操作を行い、これをコントロールプローブとした。

KLH プローブとヒト単球細胞 (THP-1) における KLH 相互作用タンパク質との光架橋

THP-1 (5.0×10^6 個) に KLH プローブとコントロールプローブを投与し、2 分後と 22 分後に ULTRAVIOLET POLYMERIZER (堂阪イーエム、京都) を使用して 18 分間 UV 照射 (波長: 345 nm、距離: 3 cm) を行った。UV 照射後、ウェル内の細胞を培地ごと回収し、遠心分離 (1,200 \times g、20 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分) した後に上清を破棄した。さらに PBS を添加して遠心分離 (1,200 \times g、20 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分) に付し、上清を破棄した。細胞ペレットに 1 mM Na_3VO_4 (Wako)、1 mM NaF (Wako)、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Roche, Basel)、Protease Inhibitor Cocktail (Nakarai Tesque, Tokyo) を含む RIPA Buffer (1 X) を添加し、転倒混和後、氷上に 30 分間静置した。得られた溶液を遠心分離 (20,000 \times g、4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分) に付し、

上清を回収した。上清の4分の1量の4 x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad)、または10% 2-mercaptoethanol (Wako) 含む4 x Laemmli Sample Bufferを加えてよく混合し、加熱処理(95 °C、5分)したものを以下のSDS-PAGEおよびリガンドブロッキングに供した。

KLH 相互作用タンパク質の検出

前項で得られた試料を2-15%のグラジエントポリアクリルアミドゲル(Multi Gel2 mini 2/15 (13W): コスモバイオ、東京)で電気泳動し、タンパク質を分子量毎に分離した。その後セミドライブロッキング装置(Trans Blot® Turbo: Bio-Rad)を用いて(1.0 A 定電流、30分)ポリアクリルアミドゲルからPVDF膜(pore size 0.20 μm, Trans Blot® Turbo Transfer Kit: Bio-Rad)にタンパク質を転写した。転写後のPVDF膜をブロッキング溶液(EZBlock Chemi: アトー、東京)中で室温にて50分間振とうしてブロッキングを行った。その後、PVDF膜を0.1% Tween 20を含むTris buffered saline (TBS-T)で軽く洗浄後、さらにTBS-T中で5分 × 4回洗浄し、streptavidin Alexa 680 conjugate (Thermo Scientific, 1 : 6000)を含むTBS-T中で室温において、50分間振とうした。PVDF膜をTBS-Tで軽く洗浄後、さらにTBS-T中で5分 × 4回洗浄し、TBSで軽く洗浄した後、PVDF膜上の蛍光を近赤外線イメージングシステム(Odyssey® imaging system: LI-COR Biotechnology, Lincoln, NE)にて励起波長680 nm、蛍光波長700 nmで蛍光画像を取得し、目的タンパク質の検出を行った。

結果

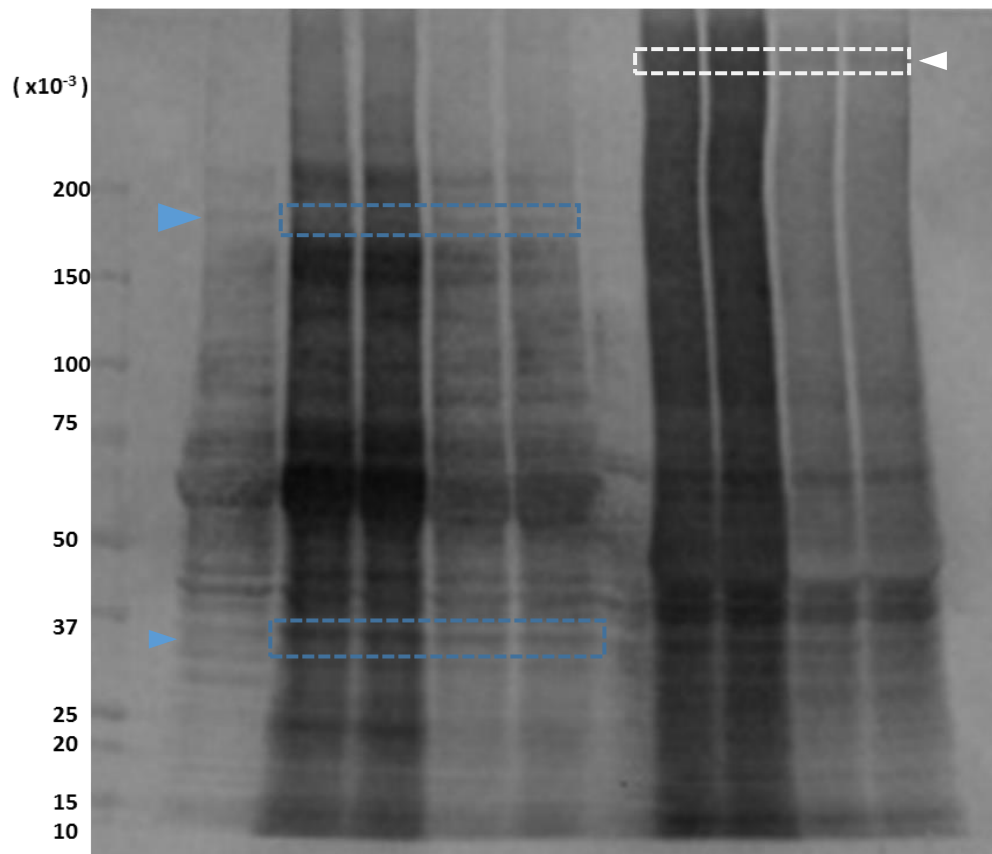
KLH 相互作用タンパク質の検出

KLH と光反応架橋試薬 Sulfo-SBED を用いて作製した KLH プローブもしくは Sulfo-SBED のみのコントロールプローブを投与し、UV 照射を行った THP-1 細胞

の細胞溶解液について、SDS-PAGE およびストレプトアビジンを用いたリガンドプロットングを行った (Fig. 4-2)。

KLH プローブを投与した THP-1 細胞のうち、還元剤を含まない Laemmli Sample Buffer で溶解した試料には 200,000 以上の分子量をもつタンパク質のバンドが明確に検出されたが (Fig. 4-2 白矢尻)、還元剤を含む Laemmli Sample Buffer で溶解した試料に同様なバンドは認められなかった。また、還元剤存在下では 180 kDa 付近 (Fig.4-2 大きい青矢尻) および微量であるが 30 kDa 付近 (Fig. 4-2 小さい青矢尻) にバンドが見られたが、還元剤非存在下では同様なバンドはほとんど認められなかった。KLH は光反応性架橋剤 Sulfo-SBED の NHS エステル部と反応して結合し、UV 照射後の還元処理によってビオチン標識転移する。したがって、KLH プローブを投与した試料のうち、還元剤存在下で認められた 180 kDa および 30 kDa 付近のバンドは、ビオチン化 KLH 相互作用タンパク質がストレプトアビジンによって検出されたと考えられる。また、還元剤非存在下で認められた > 200 kDa のバンドは、KLH の分解断片に対して KLH 相互作用タンパク質が Sulfo-SBED によって架橋結合したものが検出されたと推定される。

| | | | | | | | | | | |
|---------------------|---|----|----|----|----|---|----|----|----|----|
| 2-mercaptoethanol | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| KLH | - | - | - | + | + | - | - | - | + | + |
| Sampling time (min) | 0 | 20 | 40 | 20 | 40 | 0 | 20 | 40 | 20 | 40 |



<Fig. 4-2> Ligand blotting analysis of extracts from the KLH-probe stimulated THP-1 cells. The supernatant proteins were separated in 2-15% SDS-PAGE gel. The supernatant proteins were evaluated through the ligand blotting with streptavidin Alexa 680 conjugate.

第 2 節 質量分析による KLH 相互作用タンパク質の同定

本章第 1 節において、還元剤によって S-S 結合部が切断できる光反応性架橋試薬と KLH を結合した KLH プローブを THP-1 細胞に投与し、KLH および KLH と相互作用するタンパク質を UV 光照射によって架橋し、溶解して得た細胞溶解液を SDS-PAGE およびリガンドブロッキングに供した。その結果、還元剤存在下で溶解した試料にのみ 180 kDa 付近、微量であるが 30 kDa 付近にビオチン化タンパク質が検出された。これらは KLH 相互作用タンパク質であると推察され、質量分析計を用いてこれらのタンパク質を同定することとした。

方法

ゲルの切り出しと脱色

本章第 1 節の UV 光照射実験により得られた試料を 2-15 % グラジエントポリアクリルアミドゲル (Multi Gel2 mini 2/15: コスモバイオ) で電気泳動し、タンパク質を分子量毎に分離した。このポリアクリルアミドゲルを Bio-Safe™ Coomassie G-259 Stain (Bio-Rad) 中で室温において 4 時間振とう後に、超純水で軽く洗浄し、1 時間 × 2 回洗浄後、さらに超純水中で室温にて一晩振とうした。このポリアクリルアミドゲルから各々の刺激条件について、約 180 kDa 付近および 30 kDa 付近のゲルを 100 % メタノールで洗浄したメスを用いて切り出した。切り出したゲルを約 1 mm x 1 mm 程度に細切し、200 μ L のマイクロチューブに回収した。ゲル小片を 100 μ L 超純水で一度洗浄後、脱色液 (50 mM 炭酸水素アンモニウム/50% メタノール) をゲルが十分浸る程度加えて 40 °C で 3 分間インキュベートしてゲルの脱色を行った。

ゲル内消化

脱色後のゲル小片を 100% アセトニトリルで脱水し、減圧遠心によって乾燥させた後、ジチオトレイトール (DTT) 溶液 (10 mM DTT/ 100 mM 炭酸水素アンモニウム) を加えて 50 °C で 1 時間インキュベートした。再度ゲル小片を十分乾燥させ、アルキル化溶液 (40 mM ヨードアセトアミド/ 100 mM 炭酸水素アンモニウム) を加えてゲルを膨潤させた後、遮光して室温に 30 分間静置した。還元・アルキル化後のゲル小片を超純水で洗浄し、50 mM 炭酸水素アンモニウム/ 50 % メタノールを加えて 40 °C で 15 分インキュベートした。上清を破棄した後、再び 50 mM 炭酸水素アンモニウム/ 50 % メタノールを加えて 40 °C で 15 分インキュベートした後、ゲル小片を十分に乾燥させ、消化酵素溶液 (20 µg Trypsin Protease (MS grade, Thermo scientific) / 1.5 ml 10 mM 炭酸水素アンモニウム 10 % アセトニトリル) を加え、37 °C において一晩、酵素消化を行った。

消化ペプチドの抽出・脱塩

トリプシン消化後のゲルから、0.1 % トリフルオロ酢酸/ 50 % アセトニトリル、0.1 % トリフルオロ酢酸/ 60 % アセトニトリル、0.1 % トリフルオロ酢酸/ 70 % アセトニトリルおよび 0.1 % トリフルオロ酢酸/ 80 % アセトニトリルで消化ペプチドを抽出し、回収した。

消化ペプチドの脱塩には GL-Tip™ SDB (GL サイエンス、東京) を用いて、この製品の取扱説明書を参考に操作を行った。SDB チップに遠心アダプター (GL サイエンス) を装着し、1.5 mL チューブにセットした。溶媒 A (80% アセトニトリル/ 0.1 % トリフルオロ酢酸) を加えて 3,000 x g で 2 分遠心し、さらに溶媒 B (0.1 % トリフルオロ酢酸) を加えて 3,000 x g で 2 分遠心して平衡化を行った。平衡化した SDB チップにサンプルを加えて 3,000 x g で 5 分遠心を行い、消化ペプチドを吸着させた。その後溶媒 B を加えて 3,000 x g で 10 分遠心を行い、洗浄を行った。最後に溶媒 A を加えて 3,000 x g で 3 分遠心を行い、ペプチドを溶出した。

質量分析による KLH 相互作用タンパク質の同定

脱塩した消化ペプチドは、cHiPLC System (Eksigent ekspert™: AB SCIEX, Tokyo) 搭載した cHiPLC® System NanoLC-Ultra™ system (Eksigent ekspert™) で分離した。NanoLC においては、0.1 % ギ酸を A 溶液、0.1 % ギ酸/アセトニトリルを B 溶液とした。サンプル 2 µl を Autosampler 2 で導入し、cHiPLC trap column (200 µm × 0.5 mm ChromXP C18-CL、3 µm、120 Å) に吸着させ、10 分間 A 溶液 2 µL/min で洗浄を行った。次いで 300 nL/min の溶出グラディエントで nanoLC cHiPLC column (75 µm × 15 cm ChromXP C18-CL、3 µm、120 Å) による分離を行った (Table 4-1)。カラムからの溶出液を NanoSpray® III source (AB SCIEX) を用いて TripleTOF® 5600 system (AB SCIEX) に導入した。タンパク質同定解析用 information dependent acquisition: 100 msec の積算時間で m/z100-1600 の範囲を MS 測定し、一定の閾値を超えたピークについて 1 サイクルごとに 20 本の MS/MS を測定した。Q1 transmission window を 360 Da とし、4 段階とした。各 MS/MS の測定時間は 250 msec とし、1 サイクル 2.3 秒で測定した。各 MS/MS データにつき、以下に示すデータベースを用いた Protein Pilot TM ソフトウェア 4.5 (AB SCIEX) でデータベースサーチを行った。Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) から得たヒトのタンパク質データセット (2016 年 4 月 1 日ダウンロード) と KLH のタンパク質データセット (2016 年 4 月 25 日ダウンロード) を合わせたものをデータベースとして使用した。

同定された KLH 相互作用タンパク質に関する *in silico* 解析

Protein pilot で出力された結果のうち、タンパク質の同定結果に対する Prot Score (信頼率に換算可能) の積算値が最も高いものを Protein Pilot 解析データとした。KLH プローブを投与して 20 分後と 40 分後を合わせた解析データから、コントロールプローブを投与して 20 分後と 40 分後を合わせた解析データを減算し、KLH 相互作用タンパク質リストを得た。減算処理は R 言語 (i386 3.2.5) を用いて行った。また、R 言語 (i386 3.2.5) を用いて Uniprot (<http://www.uniprot.org/>)

から得たヒトの膜局在性タンパク質のデータセット（2016年9月2日ダウンロード）に対して解析データを参照し、膜タンパク質の選出を行った。さらに、Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>) で公開されている解析ソフトウェア basic local alignment search tool and KEGG orthology and links annotation (Blast KOALA) を用いて、アノテーションおよび KEGG マッピングを行った[92, 93]。

結果

質量分析による KLH 相互作用タンパク質の同定

本章第1節の UV 光照射実験により得られた試料に還元剤を投与後、2-15% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、タンパク質を分子量毎に分離して約 180 kDa 付近、および 30 kDa 付近のゲルを切り出し、このゲル内で消化後にゲルから抽出したタンパク質を質量分析システムで分離後に同定解析した。KLH プローブを投与した解析データから、コントロールプローブを投与した解析データの減算処理は R 言語 (i386 3.2.5) を用いたプログラミングによって行った。180 kDa 付近、および 30 kDa 付近において、コントロールプローブを投与した THP-1 細胞のみで検出されたタンパク質は、180 kDa 付近では 64 種類、30 kDa 付近では 74 種類、KLH プローブを投与した THP-1 細胞のみに検出されたタンパク質は、180 kDa 付近では 59 種類、30 kDa 付近では 51 種類であった。KLH プローブを投与した THP-1 細胞のみで検出されたタンパク質は、KLH と相互作用した可能性があると推定され (Supplemental data)、以降に示す方法で選出、または分類した。

膜局在性を示すタンパク質の選出

第3章までに KLH はファゴサイトーシスを引き起こして NF κ B を活性化させる可能性があることを示した。また KLH プローブを投与してから細胞回収までの時間が 40 分程度であったことから、細胞膜タンパク質、細胞質内の膜タンパク

質および膜物質と強く相互作用するタンパク質が KLH と相互作用し、細胞応答を誘導したものと仮説をたてた。そこで、質量分析システムで分離後に同定解析し、KLH 相互作用タンパク質として推定されたタンパク質のうち、ヒトの膜局在性タンパク質に含まれるものを選出し、解析に用いたデータベースから得た各タンパク質のアミノ酸配列を基に分子量を概算して分子量順（降順）に示した（Table 4-2, Table 4-3）。

180 kDa 付近からは、G-protein coupled receptor 98 (GPR 98)、symplekin、integrin alpha-4、integrin alpha-5、integrin beta-1、differentially expressed in FDCP 6 homolog、heat shock cognate 71 kDa protein、target of rapamycin complex 2 subunit MAPKAP1、protein kinase C および casein kinase substrate in neurons protein 1 が、30 kDa 付近からは、desmoplakin、plexin-A2、adenylate cyclase type 5、calcium-activated potassium channel subunit alpha-1、desmoglein-4、leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 2、heat shock protein HSP 90-alpha、heat shock cognate 71 kDa protein、syntenin-1、voltage-gated hydrogen channel 1、sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3 が膜局在性タンパク質として検出された。これらの KLH 相互作用膜タンパク質候補には、ファゴサイトーシスおよび Erk の活性化に関わる性質を持つものや、自然免疫に関わる性質を持つものも含まれていた。すなわち、検出された膜局在性 KLH 相互作用タンパク質の中には、第 3 章までの結果で示された KLH によるファゴサイトーシスの誘引や Erk の活性化に関して一端を担っているものが含まれる可能性が高い。ただし、検出された膜局在性 KLH 相互作用タンパク質の中には、機能が明らかになっていないものも含まれていた。各タンパク質のより詳細な機能と KLH との関連性については本章第 4 節の考察で論じる。

同定された KLH 相互作用タンパク質の KEGG Blast KOALA による分類

質量分析によって同定された KLH 相互作用タンパク質は、分子量順（降順）に示した（Supplemental data）。また、これらのタンパク質は Kyoto encyclopedia

of genes and genomes (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>) の解析ソフトウェア Blast KOALA を用いて[92, 93]、アノテーションと KEGG マッピングを行い、関連する経路を示した。

本研究において KLH による NF- κ B の活性化に影響を与える因子として注目した Syk や Erk との関与が推察されるタンパク質である 14-3-3 protein sigma が 180 kDa 付近および 30 kDa 付近の両方において検出された。14-3-3 protein sigma は、14-3-3 タンパク質ファミリーの 1 種で、14-3-3 タンパク質ファミリーは、前述した膜タンパク質の Integrin などに結合している。また、多くの標的タンパク質をリン酸化し、その活性を調節する、あるいはタンパク質複合体を形成して、細胞の増殖、分化や形態変化など多様なシグナルを調節する[94]。本節の結果においても、14-3-3 protein sigma (約 28,000) が 180 kDa 付近からも検出されたことから、複合体を形成しているものと予想される。したがって、KLH 受容の下流では 14-3-3 protein sigma の複合体形成によるシグナルの調節が行われる可能性も想定できる。

また、30 kDa 付近において検出された NLR family CARD domain containing protein 4 (NLRC4) は、細菌由来の病原因子によって活性化する受容体で [95]、Syk や Erk を介して NF- κ B を活性化させる経路とは異なる経路でインフラマソームを形成して炎症応答を誘引する自然免疫系において重要な働きを持つ Nod 様受容体の 1 種である。NLRC4 は約 116,000 であるにも関わらず 30 kDa 付近で検出されたことから、KLH 受容後に何らかの機構によって分解された NLRC4 断片が検出されたものと推察される。このことから、KLH 受容の下流では、インフラマソーム形成阻害を目的とした NLRC4 の分解や、余剰なインフラマソームの除去過程における NLRC4 の分解などが起きている可能性が考えられる。

以上の結果から、KLH によって誘導される細胞応答について、Syk や Erk を介する経路に加えて、NLRC4 が関連するインフラマソーム形成を介した経路も影響を受けている可能性が考えられた。そこで、KLH による NLRC4 の量的変化をウェスタンブロッティングによって評価することとした。

<Table 4-1> 溶出グラディエント

A 溶液 0.1% ギ酸、B 溶液 0.1% ギ酸/アセトニトリル

| 時間 (分) | A (%) | B (%) |
|--------|-------|-------|
| 0 | 98 | 2 |
| 70 | 68 | 32 |
| 71 | 20 | 80 |
| 75 | 20 | 80 |
| 76 | 98 | 2 |
| 90 | 98 | 2 |

<Table 4-2> 180 kDa 付近から検出された膜タンパク質

| protein name | MW (x10 ⁻³) |
|---|-------------------------|
| G-protein coupled receptor 98 | 693 |
| Symplekin | 141 |
| Integrin alpha-4 | 115 |
| Integrin alpha-5 | 115 |
| Integrin beta-1 | 88 |
| Differentially expressed in FDCP 6 homolog | 74 |
| Heat shock cognate 71 kDa protein | 71 |
| Target of rapamycin complex 2 subunit MAPKAP1 | 59 |
| Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1 | 51 |

<Table4-3> 30 kDa 付近から検出された膜タンパク質

| protein name | MW (x10 ⁻³) |
|--|-------------------------|
| Desmoplakin | 332 |
| Plexin-A2 | 211 |
| Adenylate cyclase type 5 | 139 |
| Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1 | 138 |
| Desmoglein-4 | 114 |
| Leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 2 | 85 |
| Heat shock protein HSP 90-alpha | 85 |
| Heat shock cognate 71 kDa protein | 71 |
| Syntenin-1 | 32 |
| Voltage-gated hydrogen channel 1 | 32 |
| Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3 | 32 |

Supplemental data

180 kDa 付近において KLH プローブ投与 THP-1 細胞にのみ検出したタンパク質

> 180,000

| MW (x10 ⁻³) | Protein name | Physical function and disease | KEGG Pathway map No. and name |
|-------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---|
| 633 | Midasin | Translation | 03008 Ribosome biogenesis in eukaryotes |
| 515 | Dynein heavy chain 10 axonemal | Neurodegenerative diseases | 05016 Huntington's disease |

~ 180,000 (150,000-180,000)

| MW (x10 ⁻³) | Protein name | Physical function and disease | KEGG Pathway map No. and name |
|----------------------------|--|-------------------------------|-------------------------------------|
| 180 | Low-density lipoprotein receptor-related protein 6 | Signal transduction | 04310 Wnt signaling pathway d |
| | | | 04150 mTOR signaling pathway |
| 168 | Slit homolog 3 protein | Development | 04360 Axon guidance |
| 156 | DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC1 | Metabolism | 01100 Metabolic pathways |
| | | Nucleotide metabolism | 00230 Purine metabolism |
| | | | 00240 Pyrimidine metabolism |
| | | Transcription | 03020 RNA polymerase |
| | | Immune system | 04623 Cytosolic DNA-sensing pathway |
| Infectious diseases: Viral | 05169 Epstein-Barr virus infection | | |

< 150,000

| MW (x10 ⁻³) | Protein name | Physical function and disease | KEGG Pathway map No. and name |
|--|---|-------------------------------|---|
| 149 | Fanconi anemia group I protein | Replication and repair | 03460 Fanconi anemia pathway |
| 148 | 1-phosphatidylinositol 4 | Metabolism | 01100 Metabolic pathways |
| | | Carbohydrate metabolism | 00562 Inositol phosphate metabolism |
| | | Signal transduction | 04014 Ras signaling pathway |
| | | | 04012 ErbB signaling pathway |
| | | | 04370 VEGF signaling pathway |
| | | | 04064 NF-kappa B signaling pathway |
| | | | 04066 HIF-1 signaling pathway |
| | | | 04020 Calcium signaling pathway |
| | | | 04070 Phosphatidylinositol signaling system |
| | | | 04072 Phospholipase D signaling pathway |
| | | Immune system | 04611 Platelet activation |
| | | | 04650 Natural killer cell mediated cytotoxicity |
| | | | 04662 B cell receptor signaling pathway |
| | | | 04664 Fc epsilon RI signaling pathway |
| 04666 Fc gamma R-mediated phagocytosis | | | |
| 04670 Leukocyte transendothelial migration | | | |
| Endocrine system | 04919 Thyroid hormone signaling pathway | | |
| Nervous system | 04722 Neurotrophin signaling pathway | | |

| | | | |
|--|--|--|--|
| | | Sensory system | 04750 Inflammatory mediator regulation of TRP channels |
| | | Development | 04360 Axon guidance |
| | | | 04380 Osteoclast differentiation |
| | | Cancers | 05200 Pathways in cancer |
| | | | 05206 MicroRNAs in cancer |
| | | | 05205 Proteoglycans in cancer |
| | | Cancers | 05214 Glioma |
| | | | 05223 Non-small cell lung cancer |
| | | Endocrine and metabolic diseases | 04933 AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications |
| | | Infectious diseases: Bacterial | 05110 Vibrio cholerae infection |
| | | | 05120 Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection |
| | | Infectious diseases: Viral | 05169 Epstein-Barr virus infection |
| | | Antineoplastic resistance | 01521 EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance |
| | | 146 | Phosphoinositide phospholipase C |
| | | Carbohydrate metabolism | 00562 Inositol phosphate metabolism |
| | | Signal transduction | 04014 Ras signaling pathway |
| | | | 04012 ErbB signaling pathway |
| | | | 04370 VEGF signaling pathway |
| | | | 04064 NF-kappa B signaling pathway |
| | | | 04066 HIF-1 signaling pathway |
| | | | 04020 Calcium signaling pathway |
| | | | 04070 Phosphatidylinositol signaling system |
| | | | 04072 Phospholipase D signaling pathway |
| | | Immune system | 04611 Platelet activation |
| | | | 04650 Natural killer cell mediated cytotoxicity |
| | | | 04662 B cell receptor signaling pathway |
| | | | 04664 Fc epsilon RI signaling pathway |
| | | | 04666 Fc gamma R-mediated phagocytosis |
| | | 04670 Leukocyte transendothelial migration | |
| | | Endocrine system | 04919 Thyroid hormone signaling pathway |
| | | Nervous system | 04722 Neurotrophin signaling pathway |
| | | Sensory system | 04750 Inflammatory mediator regulation of TRP channels |
| | | Development | 04360 Axon guidance |
| | | | 04380 Osteoclast differentiation |
| | | Cancers | 05200 Pathways in cancer |
| | | | 05206 MicroRNAs in cancer |
| | | | 05205 Proteoglycans in cancer |
| | | Cancers: Specific types | 05214 Glioma |
| | | | 05223 Non-small cell lung cancer |
| | | Endocrine and metabolic diseases | 04933 AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications |
| | | Infectious diseases: Bacterial | 05110 Vibrio cholerae infection |
| | | | 05120 Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection |
| | | Infectious diseases: Viral | 05169 Epstein-Barr virus infection |
| | | Antineoplastic resistance | 01521 EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance |

| | | | | |
|--------------------------------|--|--|--|--|
| 141 | Symplekin | Translation | 03015 mRNA surveillance pathway | |
| | | Cellular community | 04530 Tight junction | |
| 140 | Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase PRP16 | Transcription | 03040 Spliceosome | |
| 140 | Valine--tRNA ligase | Translation | 00970 Aminoacyl-tRNA biosynthesis | |
| 139 | Phosphatidylinositol 3 | Carbohydrate metabolism | 00562 Inositol phosphate metabolism | |
| | | Signal transduction | 04070 Phosphatidylinositol signaling system | |
| | | Immune system | 04662 B cell receptor signaling pathway | |
| | | | 04666 Fc gamma R-mediated phagocytosis | |
| Endocrine system | 04910 Insulin signaling pathway | | | |
| 138 | Helicase SKI2W | Folding, sorting and degradation | 03018 RNA degradation | |
| 136 | Zinc finger E-box binding homeobox 2 | Cancers | 05206 MicroRNAs in cancer | |
| 135 | Leucine--tRNA ligase cytoplasmic | Translation | 00970 Aminoacyl-tRNA biosynthesis | |
| 132 | Histone deacetylase 6 | Cancers | 05203 Viral carcinogenesis | |
| | | Substance dependence | 05034 Alcoholism | |
| 128 | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7 | Signal transduction | 04068 FoxO signaling pathway | |
| | | Cancers | 05203 Viral carcinogenesis | |
| | | Infectious diseases: Viral | 05168 Herpes simplex infection | |
| | | | 05169 Epstein-Barr virus infection | |
| 128 | Replication factor C subunit 1 | Replication and repair | 03030 DNA replication | |
| | | | 03420 Nucleotide excision repair | |
| | | | 03430 Mismatch repair | |
| 126 | Apoptosis-stimulating of p53 protein 2 | Signal transduction | 04390 Hippo signaling pathway | |
| 120 | Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 beta | Cell growth and death | 04110 Cell cycle | |
| | | Infectious diseases: Viral | 05166 HTLV-I infection | |
| 118 | U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein | Transcription | 03040 Spliceosome | |
| 116 | Alpha-mannosidase 2C1 | Glycan biosynthesis and metabolism | 00511 Other glycan degradation | |
| 115 | Integrin alpha-4 | Signal transduction | 04151 PI3K-Akt signaling pathway | |
| | | Signaling molecules and interaction | 04512 ECM-receptor interaction | |
| | | | 04514 Cell adhesion molecules (CAMs) | |
| | | Cell motility | 04810 Regulation of actin cytoskeleton | |
| | | Cellular community | 04510 Focal adhesion | |
| | | | Immune system | 04640 Hematopoietic cell lineage |
| | | | | 04670 Leukocyte transendothelial migration |
| | | 04672 Intestinal immune network for IgA production | | |
| | | Cardiovascular diseases | 05410 Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) | |
| | | | 05412 Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) | |
| 05414 Dilated cardiomyopathy | | | | |
| Infectious diseases: Parasitic | 05140 Leishmaniasis | | | |
| 115 | Integrin alpha-5 | Signal transduction | 04151 PI3K-Akt signaling pathway | |
| | | Signaling molecules and interaction | 04512 ECM-receptor interaction | |
| | | Transport and catabolism | 04145 Phagosome | |
| | | Cell motility | 04810 Regulation of actin cytoskeleton | |
| | | Cellular community | 04510 Focal adhesion | |
| | | Immune system | 04640 Hematopoietic cell lineage | |

| | | | |
|-----|--|-------------------------------------|---|
| | | Cancers | 05206 MicroRNAs in cancer 05205 Proteoglycans in cancer |
| | | Cardiovascular diseases | 05410 Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) 05412 Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) 05414 Dilated cardiomyopathy |
| | | Infectious diseases: Bacterial | 05131 Shigellosis 05133 Pertussis 05100 Bacterial invasion of epithelial cells |
| 111 | Hypoxia up-regulated protein 1 | Folding, sorting and degradation | 04141 Protein processing in endoplasmic reticulum |
| 88 | Integrin beta-1 | Signal transduction | 04015 Rap1 signaling pathway 04151 PI3K-Akt signaling pathway |
| | | Signaling molecules and interaction | 04512 ECM-receptor interaction 04514 Cell adhesion molecules (CAMs) |
| | | Transport and catabolism | 04145 Phagosome |
| | | Cell motility | 04810 Regulation of actin cytoskeleton |
| | | Cellular community | 04510 Focal adhesion |
| | | Immune system | 04611 Platelet activation 04670 Leukocyte transendothelial migration |
| | | Development | 04360 Axon guidance |
| | | Cancers | 05200 Pathways in cancer 05205 Proteoglycans in cancer |
| | | Cancers: Specific types | 05222 Small cell lung cancer |
| | | Cardiovascular diseases | 05410 Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) 05412 Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) 05414 Dilated cardiomyopathy |
| | | Infectious diseases: Bacterial | 05130 Pathogenic Escherichia coli infection 05131 Shigellosis 05133 Pertussis 05100 Bacterial invasion of epithelial cells |
| | | Infectious diseases: Parasitic | 05145 Toxoplasmosis 05140 Leishmaniasis |
| 81 | Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit STT3A | Metabolism | 01100 Metabolic pathways |
| | | Glycan biosynthesis and metabolism | 00510 N-Glycan biosynthesis 00513 Various types of N-glycan biosynthesis |
| | | Folding, sorting and degradation | 04141 Protein processing in endoplasmic reticulum |
| 77 | Nucleolin | Infectious diseases: Bacterial | 05130 Pathogenic Escherichia coli infection |
| 71 | Heat shock cognate 71 kDa protein | Transcription | 03040 Spliceosome |
| | | Folding, sorting and degradation | 04141 Protein processing in endoplasmic reticulum |
| | | Signal transduction | 04010 MAPK signaling pathway |
| | | Transport and catabolism | 04144 Endocytosis |
| | | Immune system | 04612 Antigen processing and presentation |
| | | Endocrine system | 04915 Estrogen signaling pathway |
| | | Aging | 04213 Longevity regulating pathway - multiple species |
| | | Infectious diseases: Bacterial | 05134 Legionellosis |

| | | | |
|----|---|----------------------------------|--|
| | | Infectious diseases: Viral | 05162 Measles |
| | | | 05164 Influenza A |
| | | | 05169 Epstein-Barr virus infection |
| | | Infectious diseases: Parasitic | 05145 Toxoplasmosis |
| 68 | Protein kinase N2 | Signal transduction | 04151 PI3K-Akt signaling pathway |
| | | Infectious diseases: Bacterial | 05132 Salmonella infection |
| 59 | Target of rapamycin complex 2 subunit MAPKAP1 | Signal transduction | 04150 mTOR signaling pathway |
| 52 | Protein transport protein Sec61 subunit alpha isoform 2 | Folding, sorting and degradation | 03060 Protein export |
| | | | 04141 Protein processing in endoplasmic reticulum |
| | | Transport and catabolism | 04145 Phagosome |
| | | Infectious diseases: Bacterial | 05110 Vibrio cholerae infection |
| 50 | Elongation factor 1-alpha 1 | Translation | 03013 RNA transport |
| | | Infectious diseases: Bacterial | 05134 Legionellosis |
| 50 | Tubulin beta-2B chain | Transport and catabolism | 04145 Phagosome |
| | | Cellular community | 04540 Gap junction |
| | | Infectious diseases: Bacterial | 05130 Pathogenic Escherichia coli infection |
| | | Transport and catabolism | 04145 Phagosome |
| | | Cell growth and death | 04210 Apoptosis |
| | | Cellular community | 04540 Gap junction |
| | | Infectious diseases: Bacterial | 05130 Pathogenic Escherichia coli infection |
| 50 | N-myc proto-oncogene protein | Cancers | 05202 Transcriptional misregulation in cancer |
| 49 | Wilms tumor protein | Cancers | 05202 Transcriptional misregulation in cancer |
| 47 | Beta-enolase | Metabolism | 01100 Metabolic pathways |
| | | | 01110 Biosynthesis of secondary metabolites |
| | | | 01120 Microbial metabolism in diverse environments |
| | | | 01130 Biosynthesis of antibiotics |
| | | | 01200 Carbon metabolism |
| | | | 01230 Biosynthesis of amino acids |
| | | Carbohydrate metabolism | 00010 Glycolysis / Gluconeogenesis |
| | | Energy metabolism | 00680 Methane metabolism |
| | | Folding, sorting and degradation | 03018 RNA degradation |
| | | Signal transduction | 04066 HIF-1 signaling pathway |
| 43 | Creatine kinase B-type | Metabolism | 01100 Metabolic pathways |
| | | Amino acid metabolism | 00330 Arginine and proline metabolism |
| 42 | Serpin B5 | Cell growth and death | 04115 p53 signaling pathway |
| | | Cancers | 05206 MicroRNAs in cancer |
| 39 | Fructose-bisphosphate aldolase | Metabolism | 01100 Metabolic pathways |
| | | | 01110 Biosynthesis of secondary metabolites |
| | | | 01120 Microbial metabolism in diverse environments |
| | | | 01130 Biosynthesis of antibiotics |
| | | | 01200 Carbon metabolism |
| | | | 01230 Biosynthesis of amino acids |
| | | Carbohydrate metabolism | 00010 Glycolysis / Gluconeogenesis |
| | | | 00030 Pentose phosphate pathway |
| | | | 00051 Fructose and mannose metabolism |

| | | | |
|----|---------------------------------|---------------------------------|--|
| | | Energy metabolism | 00710 Carbon fixation in photosynthetic organisms 00680 Methane metabolism |
| 37 | L-lactate dehydrogenase A chain | Metabolism | 01100 Metabolic pathways 01110 Biosynthesis of secondary metabolites 01120 Microbial metabolism in diverse environments 01130 Biosynthesis of antibiotics |
| | | Carbohydrate metabolism | 00010 Glycolysis / Gluconeogenesis 00620 Pyruvate metabolism 00640 Propanoate metabolism |
| | | Amino acid metabolism | 00270 Cysteine and methionine metabolism |
| | | Endocrine system | 04922 Glucagon signaling pathway |
| 37 | L-lactate dehydrogenase B chain | Metabolism | 01100 Metabolic pathways 01110 Biosynthesis of secondary metabolites 01120 Microbial metabolism in diverse environments 01130 Biosynthesis of antibiotics |
| | | Carbohydrate metabolism | 00010 Glycolysis / Gluconeogenesis 00620 Pyruvate metabolism 00640 Propanoate metabolism |
| | | Amino acid metabolism | 00270 Cysteine and methionine metabolism |
| | | Endocrine system | 04922 Glucagon signaling pathway |
| 33 | ADP/ATP translocase 2 | Signal transduction | 04020 Calcium signaling pathway 04022 cGMP-PKG signaling pathway |
| | | Neurodegenerative diseases | 05012 Parkinson's disease 05016 Huntington's disease |
| | | Infectious diseases: Viral | 05166 HTLV-I infection |
| 29 | Dickkopf-related protein 2 | Signal transduction | 04310 Wnt signaling pathway |
| 28 | 14-3-3 protein sigma | Cell growth and death | 04110 Cell cycle 04115 p53 signaling pathway |
| | | Excretory system | 04960 Aldosterone-regulated sodium reabsorption |
| 27 | Glutathione peroxidase | Metabolism of other amino acids | 00480 Glutathione metabolism |
| 27 | 40S ribosomal protein S3 | Translation | 03010 Ribosome |
| 26 | L-lactate dehydrogenase | Metabolism | 01100 Metabolic pathways 01110 Biosynthesis of secondary metabolites 01120 Microbial metabolism in diverse environments 01130 Biosynthesis of antibiotics |
| | | Carbohydrate metabolism | 00010 Glycolysis / Gluconeogenesis 00620 Pyruvate metabolism 00640 Propanoate metabolism |
| | | Amino acid metabolism | 00270 Cysteine and methionine metabolism |
| | | Endocrine system | 04922 Glucagon signaling pathway |
| 26 | Homeobox protein TGIF2 | Signal transduction | 04350 TGF-beta signaling pathway |
| 25 | L-lactate dehydrogenase | Metabolism | 01100 Metabolic pathways 01110 Biosynthesis of secondary |

| | | | |
|----|--|--------------------------------|--|
| | | | metabolites |
| | | | 01120 Microbial metabolism in diverse environments |
| | | | 01130 Biosynthesis of antibiotics |
| | | Carbohydrate metabolism | 00010 Glycolysis / Gluconeogenesis |
| | | | 00620 Pyruvate metabolism |
| | | | 00640 Propanoate metabolism |
| | | Amino acid metabolism | 00270 Cysteine and methionine metabolism |
| | | Endocrine system | 04922 Glucagon signaling pathway |
| 23 | Heat shock protein beta-1 | Signal transduction | 04010 MAPK signaling pathway |
| | | | 04370 VEGF signaling pathway |
| | | Infectious diseases: Viral | 05169 Epstein-Barr virus infection |
| | | Infectious diseases: Parasitic | 05146 Amoebiasis |
| 19 | Serine/arginine-rich splicing factor 3 | Transcription | 03040 Spliceosome |
| | | Infectious diseases: Viral | 05168 Herpes simplex infection |
| 19 | Histone H2B | Cancers | 05203 Viral carcinogenesis |
| | | Immune diseases | 05322 Systemic lupus erythematosus |
| | | Substance dependence | 05034 Alcoholism |
| 18 | Histone H2A | Immune diseases | 05322 Systemic lupus erythematosus |
| | | Substance dependence | 05034 Alcoholism |
| 16 | Histone H3.1t | Cancers | 05202 Transcriptional misregulation in cancer |
| | | Immune diseases | 05322 Systemic lupus erythematosus |
| | | Substance dependence | 05034 Alcoholism |
| 15 | Ubiquitin-60S ribosomal protein L40 | Translation | 03010 Ribosome |
| 14 | Histone H2B | Cancer | 05203 Viral carcinogenesis |
| | | Immune diseases | 05322 Systemic lupus erythematosus |
| | | Substance dependence | 05034 Alcoholism |
| 13 | Histone H2A | Immune diseases | 05322 Systemic lupus erythematosus |
| | | Substance dependence | 05034 Alcoholism |
| 11 | Histone H4 | Cancers | 05203 Viral carcinogenesis |
| | | Immune diseases | 05322 Systemic lupus erythematosus |
| | | Substance dependence | 05034 Alcoholism |

30 kDa 付近において KLH プローブ投与 THP-1 細胞にのみ検出したタンパク質

> 35,000

| MW ($\times 10^{-3}$) | Protein name | Physical function and disease | KEGG Pathway map No. and name |
|--|--|-------------------------------|--|
| 332 | Desmoplakin | Cardiovascular diseases | 05412 Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) |
| 286 | Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2 | Neurodegenerative diseases | 05012 Parkinson's disease |
| 211 | Plexin-A2 | Development | 04360 Axon guidance |
| 139 | Adenylate cyclase type 5 | Nucleotide metabolism | 00230 Purine metabolism |
| | | Signal transduction | 04015 Rap1 signaling pathway |
| | | | 04072 Phospholipase D signaling pathway |
| | | | 04024 cAMP signaling pathway |
| | | | 04022 cGMP-PKG signaling pathway |
| | | Cell growth and death | 04114 Oocyte meiosis |
| | | Cellular community | 04540 Gap junction |
| | | Immune system | 04611 Platelet activation |
| | | | 04062 Chemokine signaling pathway |
| | | Endocrine system | 04911 Insulin secretion |
| | | | 04923 Regulation of lipolysis in adipocytes |
| | | | 04912 GnRH signaling pathway |
| | | | 04913 Ovarian steroidogenesis |
| | | | 04915 Estrogen signaling pathway |
| | | | 04914 Progesterone-mediated oocyte maturation |
| | | | 04921 Oxytocin signaling pathway |
| | | | 04918 Thyroid hormone synthesis |
| | | | 04916 Melanogenesis |
| | | | 04924 Renin secretion |
| | | | 04925 Aldosterone synthesis and secretion |
| | | Circulatory system | 04261 Adrenergic signaling in cardiomyocytes |
| | | | 04270 Vascular smooth muscle contraction |
| | | Digestive system | 04970 Salivary secretion |
| | | | 04971 Gastric acid secretion |
| | | | 04972 Pancreatic secretion |
| | | | 04976 Bile secretion |
| | | Nervous system | 04724 Glutamatergic synapse |
| | | | 04727 GABAergic synapse |
| | | | 04725 Cholinergic synapse |
| 04728 Dopaminergic synapse | | | |
| 04726 Serotonergic synapse | | | |
| 04723 Retrograde endocannabinoid signaling | | | |
| Sensory system | 04750 Inflammatory mediator regulation of TRP channels | | |
| Aging | 04211 Longevity regulating pathway | | |
| | 04213 Longevity regulating pathway - multiple species | | |
| Environmental adaptation | 04713 Circadian entrainment | | |
| Cancers | 05200 Pathways in cancer | | |
| Neurodegenerative diseases | 05012 Parkinson's disease | | |

| | | | |
|-----|---|-------------------------------------|---|
| | | Substance dependence | 05030 Cocaine addiction |
| | | | 05031 Amphetamine addiction |
| | | | 05032 Morphine addiction |
| | | | 05034 Alcoholism |
| | | Cardiovascular diseases | 05414 Dilated cardiomyopathy |
| | | Infectious diseases: Viral | 05166 HTLV-I infection |
| | | Antineoplastic resistance | 01522 Endocrine resistance |
| 138 | Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1 | Signal transduction | 04022 cGMP-PKG signaling pathway |
| | | Endocrine system | 04911 Insulin secretion |
| | | | 04924 Renin secretion |
| | | Circulatory system | 04270 Vascular smooth muscle contraction |
| | | Digestive system | 04970 Salivary secretion |
| | | | 04972 Pancreatic secretion |
| 129 | Thrombospondin-1 | Signal transduction | 04015 Rap1 signaling pathway |
| | | Signal transduction | 04350 TGF-beta signaling pathway |
| | | Signal transduction | 04151 PI3K-Akt signaling pathway |
| | | Signaling molecules and interaction | 04512 ECM-receptor interaction |
| | | Transport and catabolism | 04145 Phagosome |
| | | Cell growth and death | 04115 p53 signaling pathway |
| | | Cellular community | 04510 Focal adhesion |
| | | Cancers | 05206 MicroRNAs in cancer |
| | | | 05205 Proteoglycans in cancer |
| | | Cancers: Specific types | 05219 Bladder cancer |
| | | Infectious diseases: Parasitic | 05144 Malaria |
| 116 | NLR family CARD domain-containing protein 4 | Immune system | 04621 NOD-like receptor signaling pathway |
| | | Infectious diseases: Bacterial | 05132 Salmonella infection |
| | | | 05134 Legionellosis |
| 100 | RNA-binding protein 25 | Transcription | 03040 Spliceosome |
| 97 | Interleukin-12 receptor subunit beta-2 | Signal transduction | 04630 Jak-STAT signaling pathway |
| | | Signaling molecules and interaction | 04060 Cytokine-cytokine receptor interaction |
| | | Immune diseases | 05321 Inflammatory bowel disease (IBD) |
| 86 | Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1 | Nucleotide metabolism | 00230 Purine metabolism |
| | | | 00240 Pyrimidine metabolism |
| | | Folding, sorting and degradation | 03018 RNA degradation |
| 85 | Heat shock protein HSP 90-alpha | Folding, sorting and degradation | 04141 Protein processing in endoplasmic reticulum |
| | | Signal transduction | 04151 PI3K-Akt signaling pathway |
| | | Immune system | 04621 NOD-like receptor signaling pathway |
| | | | 04612 Antigen processing and presentation |
| | | Endocrine system | 04915 Estrogen signaling pathway |
| | | | 04914 Progesterone-mediated oocyte maturation |
| | | Environmental adaptation | 04626 Plant-pathogen interaction |
| | | Cancers | 05200 Pathways in cancer |
| | | Cancers: Specific types | 05215 Prostate cancer |
| 82 | Junction plakoglobin | Cancers | 05200 Pathways in cancer |
| | | | 05202 Transcriptional misregulation in cancer |
| | | Cancers: Specific types | 05221 Acute myeloid leukemia |
| | | Cardiovascular diseases | 05412 Arrhythmogenic right ventricular |

| | | | |
|----|--|------------------------------------|---|
| | | | cardiomyopathy (ARVC) |
| 71 | Heat shock cognate 71 kDa protein | Transcription | 03040 Spliceosome |
| | | Folding, sorting and degradation | 04141 Protein processing in endoplasmic reticulum |
| | | Signal transduction | 04010 MAPK signaling pathway |
| | | Transport and catabolism | 04144 Endocytosis |
| | | Immune system | 04612 Antigen processing and presentation |
| | | Endocrine system | 04915 Estrogen signaling pathway |
| | | Aging | 04213 Longevity regulating pathway - multiple species |
| | | Infectious diseases: Bacterial | 05134 Legionellosis |
| | | Infectious diseases: Viral | 05162 Measles |
| | | | 05164 Influenza A |
| | | | 05169 Epstein-Barr virus infection |
| | | Infectious diseases: Parasitic | 05145 Toxoplasmosis |
| 67 | BRCA1-associated protein | Signal transduction | 04014 Ras signaling pathway |
| 50 | Putative elongation factor 1-alpha-like 3 | Translation | 03013 RNA transport |
| | | Infectious diseases: Bacterial | 05134 Legionellosis |
| 49 | Transcriptional enhancer factor TEF-5 | Signal transduction | 04011 MAPK signaling pathway - yeast |
| | | | 04390 Hippo signaling pathway |
| | | | 04391 Hippo signaling pathway - fly |
| | | | 04392 Hippo signaling pathway -multiple species |
| 45 | Phosphoglycerate kinase 1 | Metabolism | 01100 Metabolic pathways |
| | | | 01110 Biosynthesis of secondary metabolites |
| | | | 01120 Microbial metabolism in diverse environments |
| | | | 01130 Biosynthesis of antibiotics |
| | | | 01200 Carbon metabolism |
| | | | 01230 Biosynthesis of amino acids |
| | | Carbohydrate metabolism | 00010 Glycolysis / Gluconeogenesis |
| | | Energy metabolism | 00710 Carbon fixation in photosynthetic organisms |
| 43 | NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9 | Metabolism | 01100 Metabolic pathways |
| | | Energy metabolism | 00190 Oxidative phosphorylation |
| | | Neurodegenerative diseases | 05010 Alzheimer's disease |
| | | | 05012 Parkinson's disease |
| | | | 05016 Huntington's disease |
| | | Endocrine and metabolic diseases | 04932 Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) |
| 40 | Vesicular integral-membrane protein VIP36 | Folding, sorting and degradation | 04141 Protein processing in endoplasmic reticulum |
| 39 | 39S ribosomal protein L3 | Translation | 03010 Ribosome |
| 38 | Poly(rC)-binding protein 1 | Transcription | 03040 Spliceosome |
| 37 | Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase | Metabolism | 01100 Metabolic pathways |
| | | Glycan biosynthesis and metabolism | 00510 N-Glycan biosynthesis |
| 36 | Malate dehydrogenase | Metabolism | 01100 Metabolic pathways |
| | | | 01110 Biosynthesis of secondary metabolites |
| | | | 01120 Microbial metabolism in diverse environments |
| | | | 01130 Biosynthesis of antibiotics |
| | | | 01200 Carbon metabolism |

| | | | |
|----|--------------------------|--------------------------------------|---|
| | | Carbohydrate metabolism | 00020 Citrate cycle (TCA cycle) |
| | | | 00620 Pyruvate metabolism |
| | | | 00630 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism |
| | | Energy metabolism | 00710 Carbon fixation in photosynthetic organisms |
| | | Amino acid metabolism | 00270 Cysteine and methionine metabolism |
| | | Excretory system | 04964 Proximal tubule bicarbonate reclamation |
| 36 | Apolipoprotein E | Neurodegenerative diseases | 05010 Alzheimer's disease |
| 36 | Gamma-glutamyl hydrolase | Metabolism of cofactors and vitamins | 00790 Folate biosynthesis |

~ 30,000 (25,000-35,000)

| MW ($\times 10^{-3}$) | Protein name | Physical function and disease | KEGG Pathway map No. and name |
|-------------------------|---|--|---|
| 35 | E3 ubiquitin-protein ligase CHIP | Folding, sorting and degradation | 04141 Protein processing in endoplasmic reticulum |
| | | | 04120 Ubiquitin mediated proteolysis |
| 35 | Transcription initiation factor IIB | Transcription | 03022 Basal transcription factors |
| | | Cancers | 05203 Viral carcinogenesis |
| | | Infectious diseases: Viral | 05169 Epstein-Barr virus infection |
| 34 | Hydroxymethylglutaryl-CoA lyase | Metabolism | 01100 Metabolic pathways |
| | | Carbohydrate metabolism | 00650 Butanoate metabolism |
| | | Lipid metabolism | 00072 Synthesis and degradation of ketone bodies |
| | | Amino acid metabolism | 00280 Valine, leucine and isoleucine degradation |
| | | Metabolism of terpenoids and polyketides | 00281 Geraniol degradation |
| | | Transport and catabolism | 04146 Peroxisome |
| 34 | Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein | Signal transduction | 04064 NF-kappa B signaling pathway |
| | | | 04668 TNF signaling pathway |
| | | | 04071 Sphingolipid signaling pathway |
| | | Cell growth and death | 04210 Apoptosis |
| | | Immune system | 04622 RIG-I-like receptor signaling pathway |
| | | Endocrine system | 04920 Adipocytokine signaling pathway |
| | | Cancers | 05203 Viral carcinogenesis |
| | | Infectious diseases: Bacterial | 05152 Tuberculosis |
| | | Infectious diseases: Viral | 05160 Hepatitis C |
| | | | 05169 Epstein-Barr virus infection |
| 34 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2 | Transcription | 03040 Spliceosome |
| 33 | Transcription initiation factor IIE subunit beta | Transcription | 03022 Basal transcription factors |
| | | Cancers | 05203 Viral carcinogenesis |
| | | Infectious diseases: Viral | 05169 Epstein-Barr virus infection |
| 33 | 60S ribosomal protein L6 | Translation | 03010 Ribosome |
| 32 | Survival motor neuron protein | Translation | 03013 RNA transport |
| 32 | Syntaxin-12 | Transport and catabolism | 04145 Phagosome |
| 32 | Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3 | Signal transduction | 04024 cAMP signaling pathway |
| | | | 04022 cGMP-PKG signaling pathway |
| | | Endocrine system | 04911 Insulin secretion |
| | | | 04918 Thyroid hormone synthesis |

| | | | |
|----|--|---------------------------------|---|
| | | | 04919 Thyroid hormone signaling pathway |
| | | Circulatory system | 04260 Cardiac muscle contraction |
| | | | 04261 Adrenergic signaling in cardiomyocytes |
| | | Digestive system | 04970 Salivary secretion |
| | | | 04971 Gastric acid secretion |
| | | | 04972 Pancreatic secretion |
| | | | 04976 Bile secretion |
| | | | 04973 Carbohydrate digestion and absorption |
| | | | 04974 Protein digestion and absorption |
| | | | 04978 Mineral absorption |
| | | Excretory system | 04960 Aldosterone-regulated sodium reabsorption |
| | | | 04961 Endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption |
| | | | 04964 Proximal tubule bicarbonate reclamation |
| 30 | 2-aminoethanethiol dioxygenase | Metabolism | 01100 Metabolic pathways |
| | | Metabolism of other amino acids | 00430 Taurine and hypotaurine metabolism |
| 30 | Type 1 phosphatidylinositol 4 | Signal transduction | 04070 Phosphatidylinositol signaling system |
| 28 | 14-3-3 protein sigma | Cell growth and death | 04110 Cell cycle |
| | | Cell growth and death | 04115 p53 signaling pathway |
| | | Excretory system | 04960 Aldosterone-regulated sodium reabsorption |
| 28 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase | Transcription | 03040 Spliceosome |
| 28 | Sororin | Cancers | 05206 MicroRNAs in cancer |
| 26 | B-cell lymphoma/leukemia 10 | Signal transduction | 04064 NF-kappa B signaling pathway |
| | | Immune system | 04660 T cell receptor signaling pathway |
| | | | 04662 B cell receptor signaling pathway |
| | | Infectious diseases: Bacterial | 05152 Tuberculosis |
| 25 | Charged multivesicular body protein 3 | Transport and catabolism | 04144 Endocytosis |
| 25 | Charged multivesicular body protein 4b | Transport and catabolism | 04144 Endocytosis |

< 25,000

| MW (x10 ⁻³) | Protein name | Physical function and disease | KEGG Pathway map No. and name |
|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--|
| 24 | 60S ribosomal protein L13a | Translation | 03010 Ribosome |
| 23 | Ras-related protein Rab-10 | Signal transduction | 04152 AMPK signaling pathway |
| | | Transport and catabolism | 04144 Endocytosis |
| 19 | Histone H2B | Cancer | 05203 Viral carcinogenesis |
| | | Immune diseases | 05322 Systemic lupus erythematosus |
| | | Substance dependence | 05034 Alcoholism |
| 19 | Histone H2A | Immune diseases | 05322 Systemic lupus erythematosus |
| | | Substance dependence | 05034 Alcoholism |
| 15 | Histone H3.3 | Cancers | 05202 Transcriptional misregulation in cancer |
| | | Immune diseases | 05322 Systemic lupus erythematosus |
| | | Substance dependence | 05034 Alcoholism |
| 13 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase | Antimicrobial resistance | 01503 Cationic antimicrobial peptide (CAMP) resistance |

| | | | |
|----|---------------------------------|----------------------|------------------------------------|
| 12 | 60S acidic ribosomal protein P2 | Translation | 03010 Ribosome |
| 11 | Histone H4 | Cancers | 05203 Viral carcinogenesis |
| | | Immune diseases | 05322 Systemic lupus erythematosus |
| | | Substance dependence | 05034 Alcoholism |

第 3 節 KLH 刺激に対する NLRC4 の動態

本章第 1 節および第 2 節において、UV 光照射実験により得られた試料を 2-15 % SDS-PAGE によって分子量毎に分離し、KLH 相互作用タンパク質が含まれると推察された約 180 kDa 付近および約 30 kDa 付近のゲルを切り出し、ゲル内で消化後に抽出したタンパク質を質量分析システムで分離後に同定解析した。その結果、第 3 章までに示した KLH によって引き起こされるファゴサイトーシスに関与する膜タンパク質が KLH 相互作用タンパク質として同定された。さらに Syk や Erk を介した経路とは異なる経路で、インフラマソームを形成して炎症応答を誘引する Nod 様受容体の 1 種である NLRC4 [95] が 30 kDa 付近から検出された。自然免疫系で重要な働きを示す NLRC4 が KLH 受容の下流で分解されていたことから、インフラマソーム形成を介した経路を調節するための機構が機能している可能性が考えられた。そこで本節では、第 1 節の UV 光照射実験により得られた、KLH プローブを投与し、還元剤を添加した試料における NLRC4 の発現量変化について、特異的抗体を用いたウェスタンブロッティングによって評価した。

試料および方法

試薬

抗 NLRC4 抗体として NLRC4 polyclonal antibody (Abnova, Taipei) を、抗 β -actin 抗体として β -actin mouse monoclonal antibody (Wako, Tokyo) を用いた。SDS-PAGE に供するサンプルバッファーとして Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad) を用いた。

NLRC4 の検出

第 1 節で得られた試料を 10 %ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、タンパク質を分子量毎に分離した。その後セミドライブロッティング装置 (Trans Blot® Turbo: Bio-Rad) を用いて (100 mA 定電流、45 分) ポリアクリルアミドゲ

ルから PVDF 膜 (pore size 0.20 μm , Merck Millipore, Darmstadt) にタンパク質を転写した。転写後の PVDF 膜をブロッキング溶液 (Odyssey Blocking Buffer, LI-COR) 中で室温にて 50 分間振とうしてブロッキングを行った。その後 PVDF 膜を 0.1 % Tween 20 を含む PBS-T で軽く洗浄後、さらに PBS-T 中で 5 分間 \times 4 回洗浄し、一次抗体として抗 NLRC4 抗体 (rabbit polyclonal antibody, Abnova)、あるいは抗 β -actin 抗体 (mouse monoclonal antibody, Wako) を、0.2 % Tween20 を含む Odyssey Blocking Buffer (抗 NLRC4 抗体は 1 : 6000、抗 β -actin 抗体は 1 : 8000) 溶液中、4 $^{\circ}\text{C}$ で二晩振とう・平衡化した。次いで、PVDF 膜を PBS-T で軽く洗浄後、PBS-T 中で 5 分間 \times 4 回洗浄し、二次抗体として Alexa Fluor 680 (goat anti-rabbit IgG (H+L), Thermo Fisher Scientific, 1 : 20000)、あるいは Alexa Fluor 680 (goat anti-mouse IgG (H+L), Thermo Fisher Scientific, 1 : 20000) と 0.2 % Tween20 および 0.001 % SDS を含む Odyssey Blocking Buffer 溶液中で、遮光状態で 50 分間振とうした。さらに PBS-T で軽く洗浄後、遮光状態で PBS-T 中で 5 分間 \times 4 回洗浄した後、PVDF 膜上の蛍光を近赤外イメージングシステム (Odyssey[®] imaging system: LI-COR Biotechnology) にて励起波長 680 nm、蛍光波長 700 nm で蛍光画像を取得して NLRC4 の検出を行った。

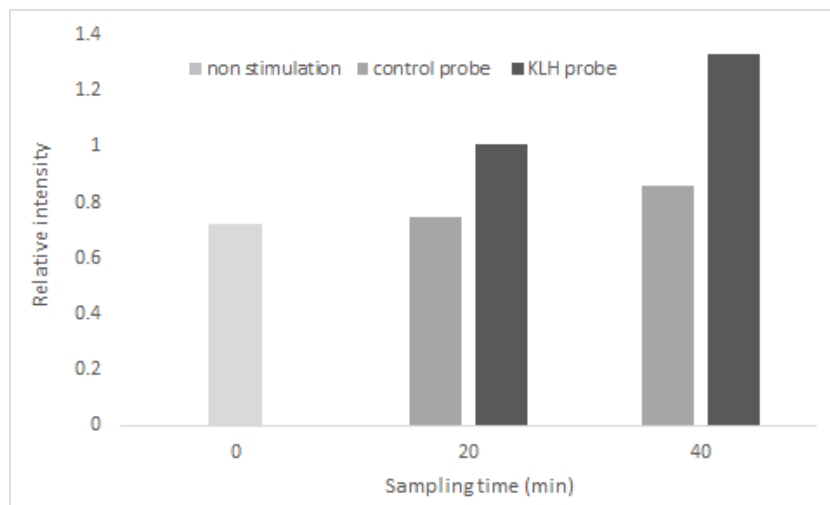
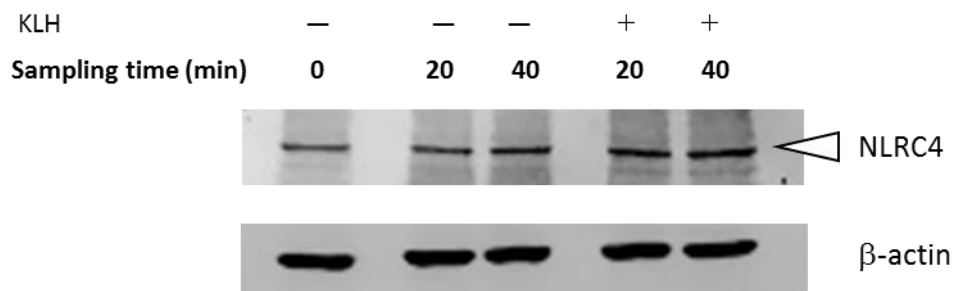
結果

KLH による NLRC4 の発現量変化の評価

KLH と光反応架橋試薬 Sulfo-SBED を用いて作製した KLH プローブもしくは Sulfo-SBED のみのコントロールプローブを投与し、UV 照射を行った THP-1 細胞の細胞溶解液に、還元剤を含む Laemmli Sample Buffer を添加した試料についてウェスタンブロッティングを行い、KLH 受容に伴う NLRC4 の発現量変化について評価した (Fig. 4-3)。

THP-1 細胞において、プローブを投与しなかった試料 (Sampling time 0)、コントロールプローブ、あるいは KLH プローブを投与した試料について、NLRC4

の分子量である 116,000 付近にバンドが確認された。コントロールプローブを投与した試料と、プローブを投与しなかった試料における NLRC4 量との差異は見られないが、KLH プローブを投与した試料については投与 40 分後までの時間経過によって NLRC4 量の増加傾向が見られた。プローブを投与しなかった試料とコントロールプローブを投与した試料では同等量の NLRC4 の発現が認められたことから、NLRC4 は恒常的に一定量発現しているといえる。また質量分析において、分子量 116,000 の NLRC4 が 30 kDa 付近で検出され、ウエスタンブロッティングにおいてバンドが確認されたのは 116 kDa 付近のみで 30 kDa 付近には明瞭なバンドは確認されなかった。原因として、分解されて生じる約 30 kDa の NLRC4 断片には使用した抗体のエピトープが含まれていなかった、もしくは分解断片が微量で且つ低分子であるために PVDF 膜への転写時に膜を透過した可能性が挙げられる。



<Fig. 4-3> Western blotting analysis of extracts from the KLH-probe stimulated THP-1 cells. The supernatant proteins were separated in 10 % SDS-PAGE gel. The supernatant proteins were evaluated through the western blotting with NLRC4 polyclonal antibody.

第 4 節 考察

本章第 1 節では、THP-1 細胞において KLH と相互作用し、NF- κ B の活性化を誘導するタンパク質を探索するために、光反応性架橋試薬を用いて KLH と KLH 相互作用タンパク質を架橋したものをリガンドブロッティングにて検出し、還元剤添加の有無によって、KLH が架橋された S-S 結合部が切断されたものと、切断されていないものとの差異が確認された。第 2 節では、第 1 節の光反応性架橋試薬実験によって得られた試料の 180 kDa 付近および 30 kDa 付近のタンパク質について質量分析システムで分離後に同定解析した。還元剤によって S-S 結合部が切断された試料の解析結果のうち、KLH プローブを添加したもののみ検出されたタンパク質の抽出には R 言語 (i386 3.2.5) を用いたプログラミングによって行った。さらに、KLH はファゴサイトーシスを引き起こす性質をもつことが第 3 章までに示されたことから、KLH と相互作用して細胞応答を誘発したものは、主に膜タンパク質と仮定し、Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) から得たヒトの細胞膜タンパク質と細胞膜相互作用タンパク質のデータセット (2016 年 9 月 2 日ダウンロード) に含まれるものを R 言語 (i386 3.2.5) を用いたプログラミングによって選出した。

膜局在性 KLH 相互作用タンパク質として同定された中で、最も分子量が大きい GPR98(分子量 693,000)は、G タンパク質共役受容体(guanine nucleotide-binding protein coupled receptor, GPCR) の 1 種である。GPCR は約 800 のファミリーメンバーを持ち、主に低分子や光などの細胞外のシグナルを受容してそれを細胞内に伝える細胞膜貫通型の受容体である [96]。GPCR のうち約 150 種類はリガンドが同定されていないオーファン受容体で、GPCR の中でも大きな分子量を持つ GPR98 もオーファン受容体であるが [97]、本研究結果により KLH と相互作用する可能性が示された。分子量が約 700,000 の GPR98 が 180 kDa 付近で検出されたのは、GPR98 は複数のスプライシングパターンをもち、エクソンの組み合わせ

も多数であることによるものか[98]、もしくは KLH 刺激に対する細胞応答による反応において分解された可能性が予想されるが、これについては未確認である。

Symplekin (分子量 141,000) は、核膜において mRNA 前駆体の 3'末端のセグメント切断およびポリアデニル化を行うタンパク質複合体の足場であるタンパク質で、RNA ポリメラーゼ II による転写にも関与し、多数の異なるタンパク質間の相互作用を仲介している。これらの分子機構については不明な点が多いが [99, 100]、KLH 刺激によって引き起こされた細胞応答に関わるタンパク質の転写が促進されたと推察される。

Integrin alpha-4 (分子量 115,000)、integrin alpha-5 (分子量 115,000)、integrin beta-1 (分子量 88,000) は、細胞内にある細胞骨格と細胞外にある細胞外基質をつなぐ細胞膜上受容体のインテグリンファミリーに属している。インテグリンは、18 種類の α 鎖 (分子量 120,000 - 180,000) と 8 種類の β 鎖 (分子量 90,000 - 110,000) が 1 : 1 で会合して 24 種類のヘテロダイマーを形成している。これらが 180 kDa 付近で検出されたのは、integrin alpha-4 と integrin beta-1 が会合して integrin $\alpha 4\beta 1$ 、integrin alpha-5 と integrin beta-1 が会合して integrin $\alpha 5\beta 1$ ヘテロダイマーを形成していた可能性が推察される。これらは共にフィブロネクチンに結合する [101]。フィブロネクチンの RGD 配列などのリガンドがインテグリンを介して細胞に接着すると、細胞は受けた刺激に応じて細胞外領域のリガンド結合能を制御すると共に、増殖や遺伝子発現など細胞の次の行動を引き起こす。インテグリンダイマーは、それぞれ固有の役割を担っているが、integrin beta-1 は、エンドサイトーシスやこれによって引き起こされる Erk の活性化に関わるとされており [102]、KLH によって引き起こされたファゴサイトーシスや Erk の活性化にも関与していると推察される。

Differentially expressed in FDCP 6 homolog は、別名でインターフェロン調節因子 4 結合タンパク質 (IRF4-binding protein, interferon regulatory factor 4 binding protein) と呼ばれ、主にリンパ球や骨髄系細胞で発現し、細胞増殖や分化に関わる interferon regulatory factor 4 (IRF4) に結合するタンパク質である [103, 104]。IRF4

は、自然免疫系の作動において NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) が IL4 プロモーターに結合するために必要であることが示されている [105]。したがって、IRF4 結合タンパク質である differentially expressed in FDCP 6 homolog が KLH と相互作用し得ることから、KLH による自然免疫系応答には IRF4 による転写調節を伴う可能性が推察される。

Heat shock cognate 71 kDa protein (HSC70) は、heat shock protein 70 (HSP70) と 90 %以上の相同性をし、哺乳類においては恒常的に発現しているタンパク質である。HSC70 は熱ショックなどのストレスによって発現誘導された HSP70 と速やかに複合体を形成し、共に作用する。HSP は分子量によって異なる構造・機能を有するが、共通して分子シャペロンとしてタンパク質のフォールディングを制御する機能を有する。またフォールディングの段階で問題が生じて機能不全となったタンパク質や、ストレスによって変性したタンパク質に結合し、修復を行う [106, 107]。HSC70 は HSP70 以外にも HSP40 や HSP110 と協調して変性タンパク質をリフォールディングするという性質をもつことから[108-110]、分子量 71,000 の HSC70 が 180 kDa 付近から検出されたのは、HSC70 のこうした性質によるものと推察される。HSC70 および HSP90 は別名でそれぞれ lipopolysaccharide (LPS)-associated protein 1、LPS-associated protein 2 と呼ばれ、グラム陰性菌の細胞膜構成成分である LPS と相互作用し、複合体となる。LPS の受容体 TLR4 と共受容体である CD14 は、この LPS-associated protein と LPS の複合体に結合し、LPS-associated protein に依存した LPS 認識を行う [111]。こうした報告から、KLH と HSC70 もしくは HSP90 の相互作用による自然免疫系を介した炎症誘発機構が関与するものと推察される。

Target of rapamycin complex 2 subunit MAPKAP1 (分子量 59,000) は、target of rapamycin (TOR)、rapamycin-insensitive companion of mTOR (Rictor) [112]、mammalian lethal with SEC13 protein 8 (mLST8) [113]、proline-rich protein 5 (PRR5) [114] および DEP domain-containing mTOR-interacting protein (Deptor) [115] を構成要素とする複合体の TOR complex 2 (TORC2) のサブユニット mitogen-activated protein kinase

associated protein 1 (MAPKAP1) である[116]。TORC2 は、アクチン骨格の制御やエンドサイトーシスに関わるとされており [117, 118]、KLH 刺激によって引き起こされるファゴサイトーシスに関わる可能性が考えられる。しかし、MAPKAP1 以外の TORC2 複合体を形成する分子のペプチドは、今回の質量分析からは検出されなかった。TORC2 複合体を形成するタンパク質のペプチドが、質量分析に用いたポリアクリルアミドゲル部分に含まれていなかった可能性もあるが、分子量 59,000 の MAPKAP1 が 180 kDa 付近から検出されたことから、TORC2 とは異なる複合体を形成していた可能性もある。MAPKAP1 は stress-activated map kinase-interacting protein 1 (SAPK-interacting protein 1, Sin1) という別名をもち、ストレス応答キナーゼ (stress-activated map kinase, SAPK) 経路とクロストークすることから [119]、SAPK 経路に関わる分子が MAPKAP1 と複合体を形成する可能性が考えられる。

Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons protein 1 (PACSIN 1) (分子量 51,000) は、ヒトにおいて神経細胞で発現しており、エンドサイトーシスを調節する性質をもつとされる [120, 121]。また樹状細胞における PACSIN 1 は、自然免疫系の TLR7 や TLR9 においてリガンドへの応答に関与し、炎症性サイトカインのインターフェロン産生を調節する[122]。これらの報告と合わせて、約 51,000 の PACSIN 1 が 180 kDa 付近から検出されたことから、KLH による炎症誘発には PACSIN 1 を含む複合体との相互作用に関わる可能性が十分に考えられる。

30 kDa 付近から検出された膜局在性 KLH 相互作用タンパク質の多くは 70,000 以上の分子量を有するものだった。これら > 30 kDa の膜局在性 KLH 相互作用タンパク質は、分解されたことによって 30 kDa 付近で検出されたものと考えられる。分解機構については、ファゴサイトーシス後のファゴリソソームにおける分解や、KLH 受容の下流で活性化する可能性がある caspase ファミリーによる分解などが考えられる。

Desmoplakin (分子量 332,000) は、細胞間の接着構造デスモソームの主要なタンパク質である。PKC α の足場にも存在し、PKC α の活性化にも関与するとされ [123]、KLH 刺激による PKC の活性化に関与する可能性がある。

Plexin-A2 (分子量 211,000) は、膜貫通型タンパク質であり、細胞間のシグナル伝達、神経回路の形成や免疫細胞の調節に関わるセマフォリンの主要な受容体のプレキシファミリーの 1 種である [124, 125]。セマフォリンは 20 種類以上のサブファミリーを有するタンパク質群で、細胞外領域にアミノ酸残基 500 以下の Sema ドメインと呼ばれる共通の領域を有し、これを特異的に認識する受容体と直接結合する [126, 127]。plexin-A2 においては Sema3A や Sema6A が受容体結合断片として同定されており [128]、Sem3A は樹状細胞のリンパ管への遊走促進に関与することが明らかとなっている [129]。セマフォリンの受容体には、180 kDa 付近で検出された KLH 相互作用タンパク質のインテグリンも同定されており [130]、セマフォリンとその受容体との相互作用が免疫系細胞の活性化の制御に関与するとされている [131]。このことから、KLH と plexin-A2 やインテグリンのようなセマフォリン受容体との相互作用についても、免疫細胞の活性化と制御に関与する可能性が推察される。

Adenylate cyclase type 5 (AC5, 分子量 139,000) は、細胞膜受容体などと複合体を形成するアデニル酸シクラーゼの 1 種である。アデニル酸シクラーゼは、ATP を基質としてセカンドメッセンジャーの cAMP を産生し、プロテインキナーゼ A (protein kinase A, PKA) やプロテインキナーゼ C (protein kinase C, PKC) を活性化させ、細胞内にシグナルを伝達して細胞応答を促す。PKA は、Erk 経路を活性化する Raf-1 キナーゼをリン酸化する [132, 133]。PKC は、第 3 章に記したように Syk のリン酸化に関わる。AC5 ノックアウトマウスから単離した心筋繊維芽細胞は、酸化ストレスや UV 光照射に対して耐性があり、コントロール群よりも Erk の活性化が亢進したことが報告されている [134]。この報告から、AC5 は、他のアデニル酸シクラーゼとは異なり、Erk 経路の活性化に関して負のフィードバック調節を行う可能性が推察される。分子量 139,000 の AC5 が 30 kDa 付近で検出

されたことから、KLH 刺激によって AC5 の分解が亢進した可能性が示唆され、これは第 3 章において、KLH 刺激によって Erk が活性化した一方で、その上流では AC5 などの PKC 活性に関わるタンパク質の分解を伴う制御機構が作動した可能性が考えられる。

Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1 (分子量 138,000) は細胞膜上で伝達物質や膜電位の調節に関与する他、エンドサイトーシスにも関与するが[135-137]、KLH によって引き起こされたファゴサイトーシスなどの細胞応答に関与したかは明らかではない。

Desmoglein-4 (分子量 114,000) は、前出の desmoplakin と同じく、細胞間の接着構造デスモソームに存在するタンパク質であるが、生理活性についての知見は少なく、KLH 刺激による細胞応答に直接的に関与するか否かについては不明である。

Leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 2 (分子量 85,000) は、シナプス細胞接着様分子 (synaptic adhesion-like molecule, SALM) の一つで、主に海馬神経細胞における神経突起伸長およびシナプス形成の調節や[138, 139]、赤血球の生成や破壊、アポトーシスにも関わりとされるが[140]、このメカニズムについては不明であり、現時点では KLH 刺激による細胞応答との関連性は低いと推察される。

Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP90) (分子量 85,000) は、前出の HSC70 と同じ熱ショックタンパク質であり、共通した性質をもつ。HSP90 は自然免疫系の NLR の NOD2 の活性化に関与し、さらに別のペプチドグリカン中の構造に反応する NOD1 や、内因性の損傷関連分子パターンに反応する NLRP3 が、インフラマソーム複合体を形成して各々の機能を発揮する際のフォールディングにも関与する [141-143]。こうした報告から、KLH と HSP90 の相互作用による自然免疫系を介した炎症誘発が推察され、KLH による炎症誘発機構として Syk や Erk を介した経路に加え、NLRs が関与するものと推察される。

Syntenin-1 (分子量 32,000) は、細胞接着、神経伝達、ユビキチン化およびエキソソームの生合成調節機能を有する。細胞内情報伝達系においては、複数の情報伝達タンパク質と結合して、シグナル伝達複合体を形成する足場タンパク質であり [144, 145]、KLH 刺激による細胞内情報伝達に関与すると推察される。

Voltage-gated hydrogen channel 1 (分子量 32,000) は、電気信号 (膜電位) を利用して細胞膜中の水素イオンの流れを制御する。水素イオン流出は膜の脱分極を伴い、ファゴサイトーシスにおける活性酸素種の生成に影響を与える [146, 147]。KLH によって引き起こされたファゴサイトーシスとの関与が推察される。

Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3 における beta-3 サブユニットの機能の詳細は不明であるが、原形質膜における Na^+ と K^+ の交換時に結合する ATP の加水分解に触媒作用を及ぼす [148]。ヒト単球由来樹状細胞のファゴサイトーシスに関与するタンパク質についてプロテオーム解析を行った先行研究においても検出の報告があり [149]、本研究で用いたヒト単球における KLH 刺激によって引きこされたファゴサイトーシスに関与する可能性がある。

非膜局在性の KLH 相互作用タンパク質として同定されたタンパク質には、本研究において KLH によって誘導される NF- κ B の活性化に影響を与える因子として注目した Syk や Erk との関与が推察される 14-3-3 protein sigma や、自然免疫系において重要な働きをする NLRC4 が含まれていた (Supplemental data)。

180 kDa 付近および 30 kDa 付近において、KLH と相互作用した可能性のあるタンパク質として検出された 14-3-3 タンパク質 σ (シグマ) は 7 種の異性体を持つ 14-3-3 タンパク質ファミリーの 1 つで、他に β (ベータ)、 γ (ガンマ)、 ϵ (イプシロン)、 ζ (ゼータ)、 η (イータ)、 τ (タウ) が存在し、それぞれ細胞内でのシグナル伝達に深く関わっている。14-3-3 タンパク質ファミリーは多くの標的タンパク質をリン酸化し、その活性を調節し、あるいはタンパク質複合体を形成して、細胞の増殖、分化や形態変化など多様なシグナルを調節していると推定される [94]。標的タンパク質には Raf-1 などが挙げられる。Raf-1 は、Erk の活性化に関与する MAPK カスケードの上流に位置するとされ [150-153]、

Ca²⁺シグナルの重要な担い手であり、Syk のセリン残基リン酸化に関わる PKC を活性化 [154]、あるいは阻害して[155]PKC が関与するシグナル伝達系を調節している。分子量約 28,000 の 14-3-3 sigma タンパク質が 30 kDa 付近だけでなく 180 kDa 付近でも検出されたのは、こうした標的タンパク質のリン酸化の際に結合、あるいは複合体を形成した可能性が推察される。14-3-3 sigma の活性化に対する KLH の直接的な影響については不明であるが、HeLa 細胞においてバナメイエビヘモシアニン刺激により 14-3-3 ζ の発現量が増加したという報告があることから [156]、ヘモシアニンの 1 種である KLH による Syk や Erk の活性化および NF-κB の活性化経路に、14-3-3 sigma あるいは 14-3-3 sigma と標的タンパク質との複合体が関与する可能性がある。

30 kDa 付近においては自然免疫系の NLRs の 1 つである NLRC4 が検出された。そこで本章第 3 節において、第 1 節の UV 光照射実験で得られ、第 2 節の質量分析にも用いた試料について、ウェスタンブロッティングを行い、KLH 受容に伴う NLRC4 の発現量変化について評価した。プローブを投与しなかった試料、コントロールプローブを投与した試料、あるいは KLH プローブを投与した試料について NLRC4 の分子量である 116,000 付近にバンドが確認された。プローブを投与しなかった試料とコントロールプローブを投与した試料では、NLRC4 の発現量に差異は見られず、また同等量の NLRC4 の発現量であったことから、NLRC4 は恒常的に一定量発現していると推察された。一方、KLH プローブを投与した試料では、投与後の時間経過に伴って発現量の増加傾向が見られ、NLRC4 の活性化が亢進したと推察される[157-159]。しかし、第 2 節の質量分析においては分子量 116,000 の NLRC4 が 30 kDa 付近において検出され、NLRC4 の分解が起きていたことから、KLH 刺激による NLRC4 の発現量増加と分解が同時に進行していたが、KLH 刺激から試料回収までの時間においては NLRC4 の発現増加量が分解量よりも多かったことが推察される。

NLRC4 は細菌由来の病原因子によって活性化し、システインタンパク質分解酵素 caspase-1 の前駆体を分断し、活性化させる。caspase はシステイン中の硫黄原

子を用いて、タンパク質中のアスパラギン酸残基の C 末端側を切断し、アポトーシスや炎症を誘導する。ヒトの細胞では 12 種類近くが発見されており、それぞれが異なる役割を担っている[Chéreau et al. 2003]。活性化した caspase-1 は、炎症性サイトカインの IL-1 β や IL-18 の前駆体のプロドメインを切断することにより、不活性型から成熟型にして細胞外への分泌を誘導する [95, 160-162]。分子量約 116,000 である NLRC4 が 30 kDa 付近において検出された理由として、NLRC4 によって分解切断されて活性化する caspase-1、もしくは他の caspase ファミリーが NLRC4 の分解に関与した可能性考えられた。そこで、プロテアーゼの切断特異性に関する情報を集積し統計的処理 [163] を行う PeptideCutter プログラムによって解析を行った。その結果、これら caspase ファミリーが NLRC4 の分解に関わる可能性は極めて低いことが示された。

また NLRC4 の別の性質として、オートファジー誘導の基軸分子である Bcl-2 interacting coiled-coil protein (Beclin-1) と結合しているが、NLR family apoptosis inhibitory protein (NAIP) とリガンドとの会合によって NLRC4 が活性化すると、Beclin-1 が遊離してオートファジーが誘導されることが近年の研究で明らかになった[164, 165]。これらの知見から、オートファジーが NLRC4 の分解機構の 1 つである可能性が推察される。A 群連鎖球菌の感染における NLRs と Beclin-1 の応答について、細菌の分解排除を担う Beclin-1 によるオートファゴソーム形成に先立って、NLRs が細菌を感知することが報告されている[166]。また、NLRC4 と Beclin-1 の解離によるオートファジーの進行は、過剰な炎症応答の防止などに寄与すると考えられている[164]。本章の結果とこれらの既往研究から、KLH 刺激による NLRC4 の急激な発現促進と並行して、オートファジーなどによる分解を介した NLRC4 の活性調節機構が機能する可能性が考えられる。

これまでの研究の多くが LPS などの刺激による NLRC4 の活性化や発現量増加を示してきたが、本章の結果からは KLH 刺激によって NLRC4 の発現量が増加すると同時に一部が分解されていることが示唆された。このように生体応答の亢進時に発現量の増加や酵素群の活性化と同時に分解系が作動し、適切に活性が

制御される例として、HSPファミリーではストレス条件下において発現量が上昇するとともに細胞保護機能達成後に速やかに分解されることや[167]、免疫応答において活性化された NF- κ B は標的遺伝子の転写を誘導し、その後にユビキチン化されて分解されることなどが認められており、本章では NLRC4 の動態について既往研究では見落とされていた部分が明らかになった。

総括的考察

アレルギーは長い間、Th2 が主要な役割を担った IgE 介在性の生体応答であるとされてきたが、多種多様なアレルゲンが同定され、アレルギーのメカニズムについても新しい解釈が求められるようになった。特に自然免疫系の受容体が次々と同定されてからは、アレルギーと自然免疫システムとの関わりについての知見が蓄積されつつある。食物アレルギーについては、国内外で関心が高く、我が国では 2001 年 4 月より特にアレルギーを起こしやすい食品や重篤な症状を引き起こしやすい食品について容器包装に入った全ての加工品に表示をすることが義務付けられ、魚介類の一部もその対象となっている。エビ、カニは表示義務、アワビ、イカ、イクラ、サケ、サバは表示努力が推奨されている [72]。これらの水産物に対するアレルギーは細胞傷害性の反応など、これまでの IgE を介するとされる食物アレルギーとは性格を異にし、その他の機構の関与が疑われる。また、エビのヘモリンフ中のヘモシアニンがアナフィラキシーショックを誘発すると報告されたことから [45-47]、本研究においては、水産無脊椎動物ヘモリンフによる炎症誘発機構に関して検討を加えた。

第 1 章では、水産無脊椎動物クルマエビ、ケガニ、ウバガイ、クロアワビのヘモリンフに炎症関連転写因子 (NF- κ B) の活性化を誘導する成分が含まれることが明らかとなった。一方、水産脊椎動物のギンザケの血清は炎症関連転写因子を活性化しなかった。さらに先行研究において、スルメイカのヘモリンフにおいては極めて高濃度にヘモシアニンが存在しているという報告があったことから [73]、本研究では水産無脊椎動物のヘモリンフ中の金属やペプチドなどの低分子量成分の影響を除去するために、分画分子量 5,000 の限外ろ過によってウバガイのヘモリンフを分画し、NF- κ B/AP-1 活性を評価したところ、分子量 5,000 以下の成分は NF- κ B の活性化を誘導しなかったが、分子量 5,000 以上の成分は

NF- κ B の活性化を誘導した。この結果から、ヘモリンフの主成分であり、5,000以上の分子量をもつヘモシアニンが NF- κ B の活性化を誘導した可能性があるかと推察した。

第 2 章および第 3 章では、第 1 章の結果からヘモシアニンが NF- κ B を活性化させたとする仮説を提唱し、ヘモシアニンのうち抗体作製時の担体として実績の多い KLH を用いて検討を加えた。そこで、KLH が NF- κ B の活性化を誘導すること、KLH がエンドサイトーシスを誘導し、細胞内情報伝達機構を介して NF- κ B を活性化させることなどが明らかとなった。さらに、KLH 誘導性の NF- κ B 活性化には Syk や Erk が関わるものと推定された。ただし、Syk 阻害剤の効果が部分的なものであったことから、KLH 誘導性 NF- κ B の活性化には Syk 以外の分子も関わる複数の経路の存在が予想された。

第 4 章では、光架橋法を用いたリガンド・受容体相互作用解析法と高分解質量分析法を組み合わせ、KLH と相互作用するタンパク質を同定した。その結果、第 3 章までに示された KLH によって引き起こされるファゴサイトーシスおよびこれに伴う Erk/MAPK などのシグナル伝達経路ならびに自然免疫系の細胞応答に関与する性質を持つタンパク質が KLH 相互作用タンパク質として同定された。同定された膜局在性 KLH 相互作用タンパク質のうち、integrin alpha-4 \cdot beta-1 複合体、integrin alpha-5 \cdot beta-1 複合体 [102]および integrin のリガンドであるセマフォリンを同じくリガンドとする plexin-A2 [130] が KLH の受容体として機能し、Erk/MAPK を介して KLH が NF- κ B を活性化するものと予想された。さらに、GPCR ファミリーメンバーでオーファン受容体である GPR98 も KLH の受容体である可能性が示唆された。

同定された非膜局在性 KLH 相互作用タンパク質の中で、14-3-3 sigma は第 2 章および第 3 章で示された Erk を介した KLH 誘導性 NF- κ B 活性化との関連が推察された [150, 151, 153, 168]。さらに、自然免疫系の受容体 NLRs の 1 つである NLRC4

の分解断片が検出された。KLH 受容に伴う NLRC4 の発現量変化についてウェスタンブロッティングによって評価したところ、NLRC4 は恒常的に一定量発現し、KLH 受容に伴って発現量が増加するものの、発現量増加と同時に分解系が作動して適切な時点で活性化を収束させるなどの情報伝達制御機構が存在するものと推察された。

以上の結果から、以下のような経路が考えられる (Fig. 5-1, Fig. 5-2)。KLH は、integrin $\alpha 4\beta 1$ 複合体、integrin $\alpha 5\beta 1$ 複合体、plexin-A2、GPR98 などの膜タンパク質に認識され、それらの近傍に存在する AC5 や 14-3-3 sigma などのタンパク質によるシグナル伝達が行われると同時に (Fig. 5-1)、Syk を介したエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる (Fig. 5-2)。細胞表面での KLH 受容および KLH のエンドサイトーシスの下流では、Erk を介して多くのシグナル伝達分子がリン酸化され、最終的に NF- κ B を活性化させる (Fig. 5-1, 5-2)。活性化した NF- κ B は、炎症性サイトカインの TNF α の発現や、後述する caspase-1 による成熟化のためのプライミングとして炎症性サイトカインの IL-1 β や IL-18 の前駆体の発現を誘導する [169]。一方、エンドサイトーシスされた KLH の分解物は NAIP と会合し複合体を形成することによって NLRC4 に認識され [164]、NLRC4 が活性化する (Fig. 5-2)。また、NLRC4 の活性化によって遊離した Beclin-1 がオートファゴソーム形成を誘導し [164, 165]、NLRC4 を分解することによって炎症応答を制御する。活性化した NLRC4 はインフラマソームを形成して caspase-1 を活性化させる。活性化型 caspase-1 は、NF- κ B の活性化に伴って産生された IL-1 β や IL-18 の前駆体を成熟型にして細胞外への分泌を誘導し [95, 160-162]、これらの分泌された炎症性サイトカインが様々な炎症反応を引き起こす (Fig. 5-2)。

分泌された炎症性サイトカインは血管内皮細胞や気道上皮細胞などを活性化するとともに、ケモカインの放出を誘導して炎症を引き起こし、すでに確立された獲得免疫系の活性化も誘導する。したがって、エビやカニなどの水産無脊

椎動物を食する際、炎症誘発物質であるヘモシアニンの摂取によって誘発された自然免疫系を介した炎症応答が起こると共に、アレルギー原因物質（トロポミオシンなど）による IgE 介在性アレルギーを増悪させる可能性が考えられる。このような機構が、魚介類アレルギーに特徴的なアナフィラキシーなどの重篤な症状の一因である可能性がある。

個体群にとって脅威となる感染などが生じた場合は、免疫細胞の局所的集合や炎症反応によって器官の機能障害につながる組織障害を引き起こし、感染した個体の活動を縮小させ、致命的に感染した個体を死に至らせることによって [170-172]、他の個体への感染拡大を抑制する。このような機構は、大きな意味での個体群免疫機構とも考えられ、こうした反応を抑制することは個体群維持の目的に相反するといえる。しかし、エビやカニなどの水産無脊椎動物を食した場合も炎症反応が抑制されず、個体群にとっての脅威と同レベルの応答が生じたり、沈静化せずに死に至ることは望ましくない。炎症応答の増悪化を抑制し、宿主組織へのダメージを最小限に抑える調整機能が有効に働く必要がある。

以上のように、本研究では甲殻類および貝類から採取したヘモリンフによって自然免疫系を介した炎症応答が誘導されることを示した。また、ヘモリンフの主成分であるヘモシアニンがその原因物質であると考え、KLH の受容から自然免疫系を介した炎症応答に至る機構の一部を明らかにした。本研究の成果は、既往研究を元に提唱されている魚介類アレルギー発症機構に一石を投じるものであり、高い学術的意義を有する。

本研究では、水産無脊椎動物のヘモシアニンの 1 種である KLH に着目し、KLH によって誘発される自然免疫応答について、その詳細を検討した。しかし、実際の食事では様々な食物を同時に摂取することが通常であるため、複数の成分によって独立に引き起こされた自然免疫系を介する炎症誘発や IgE 介在性アレルギーが相乗的に影響し合い、結果的に過剰な反応となるなどの、いわゆる「食

べ合わせ」によるアレルギーの重篤化が起こる可能性も否定できない。また、炎症誘発物質が原材料に元来含まれるとは限らず、加熱調理や保存時に発生される場合もある。例えば、酸化低比重リポ多糖（Oxidized low density lipoprotein, oxLDL）の主な成分であるオキシステロールは、食品中に含まれるコレステロールが酸化変性を受けて産生され[173, 174]、NLRC4 と同様に細胞外への炎症性サイトカイン分泌に關与する NLR family PYD domain containing protein 3（NLRP3）を活性化させる [175, 176]。このように、食事構成や調理・加工方法によっては、食事を介して炎症誘発物質と共にアレルゲンを体内に取り込む事態が発生し、その結果アナフィラキシーなどの重篤なアレルギー症状が誘発される可能性は極めて高い。したがって、食物アレルギーの完全な理解を目指すのであれば、単一アレルゲンや特定の炎症誘発物質のみに焦点を絞った解析では不十分である。

このような観点からも、これまで報告されている食物アレルギーについて、獲得免疫系の裏で見過ごされてきた自然免疫系による炎症誘発機構や、既に知られている食品由来の炎症誘発物質とアレルギーとの関連などについても、再度検証する必要があるものとする。こうした検証を知見の蓄積のみに留まらせない方法として、2020 年までの実用化をめざしている癌の診断・治療に役立つ情報を提案するシステムを参考にすることができる。癌についてこれまで蓄積した研究成果、患者の癌細胞から漏れ出た情報、患者のゲノム情報、環境情報などのビックデータを基に人工知能が解析した結果を参考に治療方法を検討するというもので、専門家の手作業による検索や照合に人工知能による提案を加えることで、これまで見過ごされてきた因果関係の発掘や病気の進行予測、治療方法の診断を可能とする。アレルギーも癌と同様に様々な要因が複雑に絡み合った多因子疾患として知られており、アレルギー治療に関してもこのような検討が可能と思われるが、解析するデータの対象が癌とアレルギーでは異なる。癌は癌化した細胞を中心に、これに付随する多様な因子との情報の解析が主要であるが、アレルギーは、現在のところ根源となる対象の特定が困難な複

合的な反応である。不特定の対象と多様な因子、および患者に関する多様な情報との関連性の抽出は複雑さを極めているが、人工知能はこうした作業を得意とすることから、この解析結果を専門家の検討に活用することで、多様な因子との因果関係や新規治療方法、食品の加工方法などが見出される可能性がある。これまで医療現場または患者個人において、原因食品の除去や、重篤な症状に際してアドレナリン自己注射のエピペンを投与するなどの経験的・末梢的な対応がなされてきたが、既得の膨大な情報について統合的に判断され、分析された結果をより詳細に検討することにより、科学的・根本的かつ能動的なアレルギー問題解決策の提案に向けた一步に寄与することが期待される。

本研究では、水産無脊椎動物由来のヘモシアニンによる自然免疫系を介した炎症応答の惹起が、アナフィラキシーショックのような重篤なアレルギー症状に関連する可能性が示唆された。ヘモシアニンは、水産無脊椎動物などの生体内において、酸素運搬以外にも抗菌作用を持つことが報告されつつある[177, 178]。例えばエビのヘモシアニンはトリの赤血球に対して溶血活性を示しており[179]、こうした機能がヒトの生体内において激しい炎症応答を誘導する可能性も推察され、食物自体の生体内の反応についても知見を蓄積することも重要と考えられる。さらに、シャーガス病の要因となる寄生虫のサシガメ (*Reduviidae*) は、ヘモシアニンを持たず、ヘモシアニンと起源が同じとされるヘキサメリン (hexamerin) を持つ[180, 181]。ヘモシアニンと相同性を持つヘキサメリンは、KLH に対する抗体と非常に強く反応することから[182]、寄生虫に対するヒトの自然免疫機構の反応が、KLH に対しても同じように反応している可能性が考えられる。したがって、既得の獲得免疫系を中心とした情報では不十分であり、本研究で提唱するような自然免疫系とアレルギーとの関わりおよびアレルギーに関連する多様な因子について、さらなる知見を集積し、統合的な解析材料として生かされることが求められる。

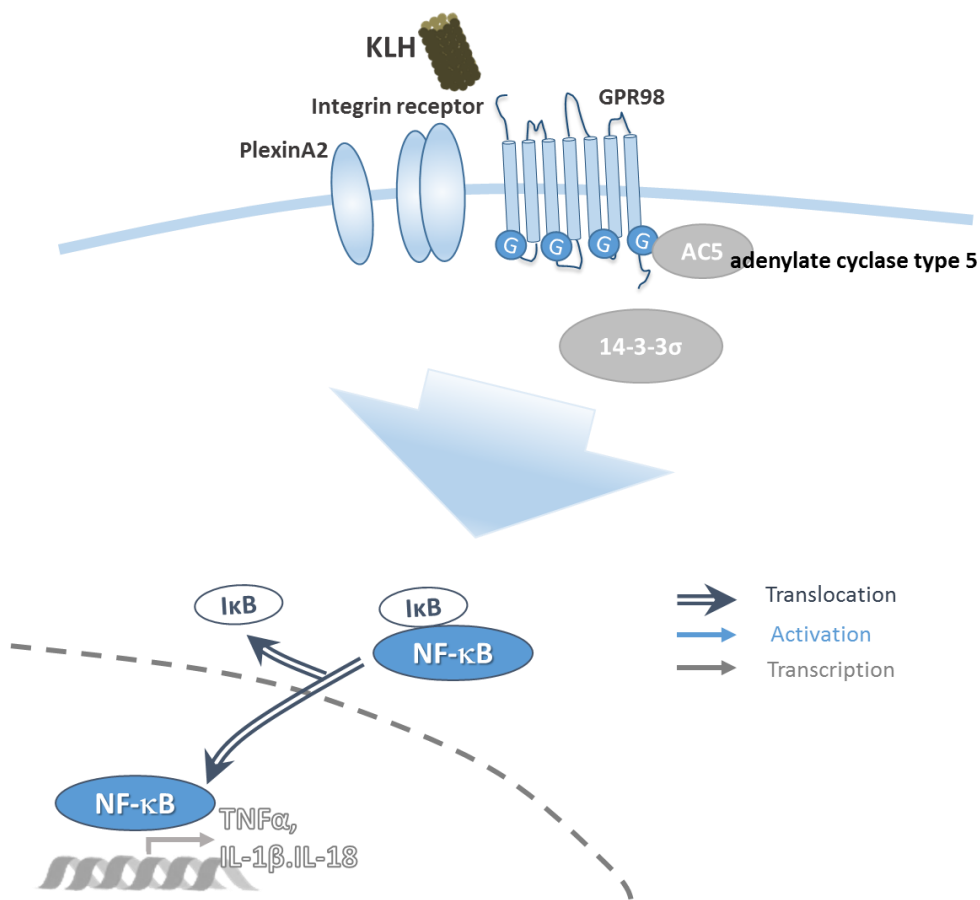


Fig. 5-1 KLH is recognized and interact with the integrin receptors, plexin-A2, GPR98, AC5 and 14-3-3. The interaction may lead the NF-κB activation.

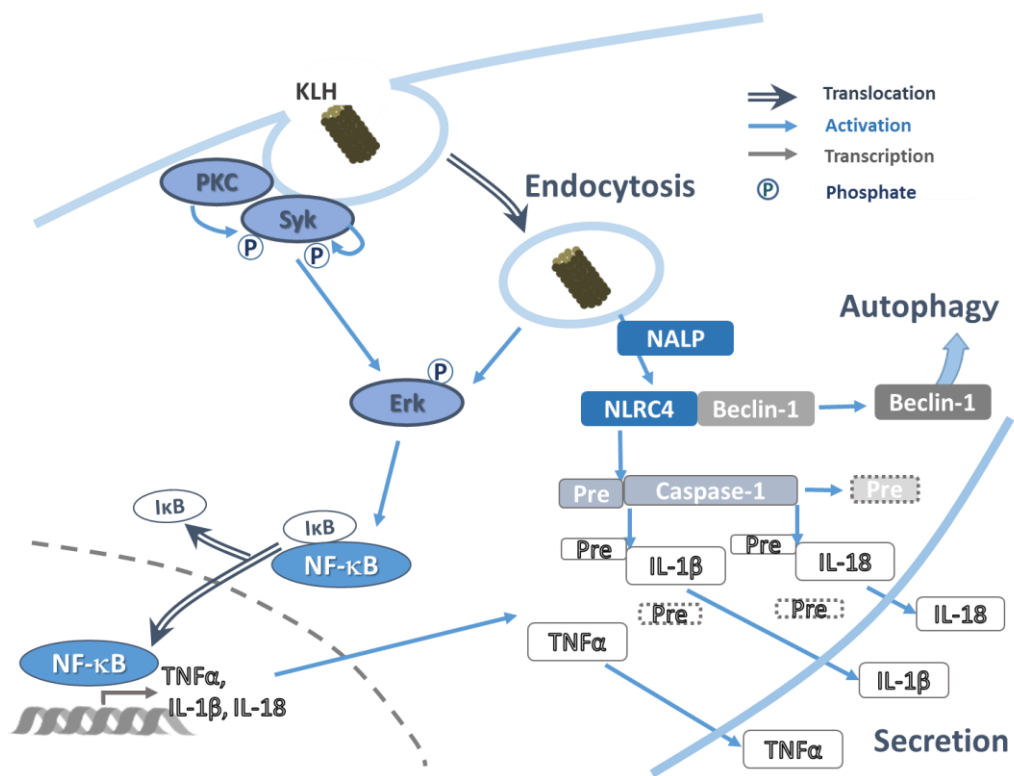


Fig. 5-2 The pass way of the KLH induced NF-κB and NLRC4 activation.

謝辞

本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科 潮秀樹教授の終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻の下に行われたものであり、ここに深甚なる謝意を表します。また、数々のご指導、ご鞭撻、ご助言を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科 浅川修一教授、松永茂樹教授、金子豊二教授、木下滋晴准教授に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始暖かく見守ってくださった東京大学大学院農学生命科学研究科 中谷操子技術職員に深く感謝申し上げます。また、本研究に至るまでの実験の基本操作や数々のご助言などを賜りました昭和学院短期大学ヘルスケア栄養学科 大原和幸助教に深く感謝申し上げます。さらに本研究を進める上で、多くの刺激や示唆のみならず、データの解析など、多大なご助力を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程後期 小南友里氏に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、多くのご協力や議論を頂きました東京大学大学院農学生命科学研究科水産化学研究室の皆様には深く御礼申し上げます。また、研究室生活におきましても、大変お世話になりました東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物工学研究室、水圏天然物化学研究室の皆様には熱く御礼申し上げます。

引用文献

- [1] J. Dunlop, E. Matsui, H.P. Sharma, Allergic Rhinitis: Environmental Determinants, *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 36 (2016) 367-377.
- [2] S. Takafuji, T. Nakagawa, Air pollution and allergy, *Journal of investigational allergology & clinical immunology*, 10 (2000) 5-10.
- [3] 厚生科学審議会疾病対策部会リウマチ・アレルギー対策委員会, リウマチ・アレルギー対策委員会報告書, in: 厚生労働省 (Ed.), 2005, pp. 47.
- [4] 厚生科学審議会疾病対策部会リウマチ・アレルギー対策委員会, リウマチ・アレルギー対策委員会報告書, in: 厚生労働省 (Ed.), 2011, pp. 40.
- [5] M. Ebisawa, Management of Food Allergy in Japan “Food Allergy Management Guideline 2008 (Revision from 2005)” and “Guidelines for the Treatment of Allergic Diseases in Schools”, *Allergology International*, 58 (2009) 475-483.
- [6] S. Sakai, R. Matsuda, R. Adachi, H. Akiyama, T. Maitani, Y. Ohno, M. Oka, A. Abe, K. Seiki, H. Oda, K. Shiomi, A. Urisu, Interlaboratory Evaluation of Two Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits for the Determination of Crustacean Protein in Processed Foods, *Journal of AOAC International*, 91 (2008) 123-129.
- [7] H.H. Bennich, K. Ishizaka, S.G. Johansson, D.S. Rowe, D.R. Stanworth, W.D. Terry, Immunoglobulin E: a new class of human immunoglobulin, *Immunology*, 15 (1968) 323-324.
- [8] R.S. Holzman, Clinical Management of Latex-Allergic Children, *Anesthesia & Analgesia*, 85 (1997).
- [9] R. Brehler, U. Theissen, C. Mohr, T. Luger, “Latex-fruit syndrome”: frequency of cross-reacting IgE antibodies, *Allergy*, 52 (1997) 404-410.
- [10] W. Li, Z. Zhang, R. Tian, K. Zhang, Skin as a Novel Route for Allergen-specific Immunotherapy, *Current Pharmaceutical Design*, 20 (2014) 886-891.
- [11] N. Izadi, M. Luu, Y.P. Ong, S.J. Tam, The Role of Skin Barrier in the Pathogenesis of Food Allergy, *Children*, 2 (2015).
- [12] I. Angelova-Fischer, I.M. Fernandez, M.H. Donnadieu, S. Bulfone-Paus, D. Zillikens, T.W. Fischer, V. Soumelis, Injury to the stratum corneum induces in vivo expression of human thymic stromal lymphopoietin in the epidermis, *J Invest Dermatol, United States*, 2010, pp. 2505-2507.
- [13] M.K. Oyoshi, R.P. Larson, S.F. Ziegler, R.S. Geha, Mechanical injury polarizes skin dendritic cells to elicit a TH2 response by inducing cutaneous thymic stromal lymphopoietin expression, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126 (2010) 976-984.e975.
- [14] K. Oboki, T. Ohno, N. Kajiwara, H. Saito, S. Nakae, IL-33 and IL-33 Receptors in Host Defense and Diseases, *Allergology International*, 59 (2010) 143-160.
- [15] K. Ishizaka, T. Ishizaka, E.H. Lee, Physicochemical properties of reaginic antibody. II. Characteristic properties of reaginic antibody different from human gamma-A-isohemagglutinin and gamma-D-globulin, *J Allergy*, 37 (1966) 336-349.
- [16] W.E. Paul, J. Zhu, How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified?, *Nat Rev Immunol*, 10 (2010) 225-235.
- [17] M. Schnare, G.M. Barton, A.C. Holt, K. Takeda, S. Akira, R. Medzhitov, Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses, *Nat Immunol*, 2 (2001) 947-950.
- [18] G.M. Halpern, J.R. Scott, Non-IgE antibody mediated mechanisms in food allergy, *Annals of allergy*, 58 (1987) 14-27.
- [19] B. Niggemann, S. Reibel, C.C. Roehr, D. Felger, M. Ziegert, C. Sommerfeld, U. Wahn, Predictors of positive food challenge outcome in non-IgE-mediated reactions to food in children with atopic dermatitis, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108 (2001) 1053-1058.
- [20] B. Koller, A.S. Muller-Wiefel, R. Rupec, H.C. Korting, T. Ruzicka, Chitin Modulates Innate Immune Responses of Keratinocytes, *Plos One*, 6 (2011) 7.
- [21] F.L. van de Veerdonk, M.G. Netea, C.A. Dinarello, L.A. Joosten, Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection, *Trends Immunol*, 32 (2011) 110-116.

- [22] T. Hoshino, M. Okamoto, Y. Sakazaki, S. Kato, H.A. Young, H. Aizawa, Role of proinflammatory cytokines IL-18 and IL-1beta in bleomycin-induced lung injury in humans and mice, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 41 (2009) 661-670.
- [23] P.A. Greenberger, Anaphylactic and anaphylactoid causes of angioedema, *Immunol Allergy Clin North Am*, 26 (2006) 753-767.
- [24] M.Y. Lee, M.H. Yang, J.H. Liu, C.C. Yen, P.C. Lin, H.W. Teng, W.S. Wang, T.J. Chiou, P.M. Chen, Severe anaphylactic reactions in patients receiving oxaliplatin therapy: a rare but potentially fatal complication, *Support Care Cancer*, 15 (2007) 89-93.
- [25] S. Porcel, A.B. Sanchez, E. Rodriguez, C. Fletes, M. Alvarado, S. Jimenez, J. Hernandez, Food-dependent exercise-induced anaphylaxis to pistachio, *J Investig Allergol Clin Immunol*, 16 (2006) 71-73.
- [26] K. Palosuo, Update on wheat hypersensitivity, *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 3 (2003) 205-209.
- [27] L.M. Webb, P. Lieberman, Anaphylaxis: a review of 601 cases, *Ann Allergy Asthma Immunol*, 97 (2006) 39-43.
- [28] R.S. Pumphrey, I.S. Roberts, Postmortem findings after fatal anaphylactic reactions, *J Clin Pathol*, 53 (2000) 273-276.
- [29] 一般社団法人日本アレルギー学会, アナフィラキシーガイドライン, 一般社団法人日本アレルギー学会, 2014.
- [30] M. Ebisawa, C. Sugizaki, Prevalence Of Allergic Diseases During First 7 Years Of Life In Japan, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125 AB215.
- [31] 野田龍哉, 保育園における食物アレルギー対応 全国調査より, 食物アレルギー研究会会誌, 食物アレルギー研究会, JAPAN, 2010, pp. 5-9.
- [32] 孝. 今井, 家. 板橋, 学校給食における食物アレルギーの実態, *日本小児科学会雑誌*, 109 (2005) 1172.
- [33] 公益財団法人日本学校保健会, 平成 25 年度学校生活における健康管理に関する調査, 公益財団法人日本学校保健会, 2014, pp. 72-141.
- [34] 厚生労働科学研究班, 食物アレルギーの診療の手引き 2014, in: 厚生労働省 (Ed.), 2014, pp. 5.
- [35] A.L. Lopata, R.E. O'Hehir, S.B. Lehrer, Shellfish allergy, *Clin Exp Allergy*, 40 (2010) 850-858.
- [36] W.C. Chiang, M.I. Kidon, W.K. Liew, A. Gohw, J.P.L. Tang, O.M. Chay, The changing face of food hypersensitivity in an Asian community, *Clinical and Experimental Allergy*, 37 (2007) 1055-1061.
- [37] J.F. Crespo, C. Pascual, A.W. Burks, R.M. Helm, M.M. Esteban, FREQUENCY OF FOOD ALLERGY IN A PEDIATRIC POPULATION FROM SPAIN, *Pediatric Allergy and Immunology*, 6 (1995) 39-43.
- [38] M. Fernandez Rivas, Food allergy in Alergologica-2005, *Journal of investigational allergology & clinical immunology*, 19 Suppl 2 (2009) 37-44.
- [39] P.V.S. Rao, K.N. Shanti, B. Martin, G. Vekatraman, S. Nagpal, D.D. Metcalfe, TROPOMYOSIN IS THE MAJOR SHRIMP ALLERGEN, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 91 (1993) 341-341.
- [40] K.N. Shanti, B.M. Martin, S. Nagpal, D.D. Metcalfe, P.V. Rao, Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes, *J Immunol*, 151 (1993) 5354-5363.
- [41] P.S.C. Leung, W.K. Chow, S. Duffey, H.S. Kwan, M.E. Gershwin, K.H. Chu, IgE reactivity against a cross-reactive allergen in crustacea and mollusca: Evidence for tropomyosin as the common allergen, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 98 (1996) 954-961.
- [42] R. Ayuso, G. Grishina, L. Bardina, T. Carrillo, C. Blanco, M.D. Ibanez, H.A. Sampson, K. Beyer, Myosin light chain is a novel shrimp allergen, *Lit v 3, Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122 (2008) 795-802.
- [43] K. Shiomi, Y. Sato, S. Hamamoto, H. Mita, K. Shimakura, Sarcoplasmic calcium-binding protein: identification as a new allergen of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*, *Int Arch Allergy Immunol*, 2008 S. Karger AG, Basel., Switzerland, 2008, pp. 91-98.
- [44] C.J. Yu, Y.F. Lin, B.L. Chiang, L.P. Chow, Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, *Pen m 2, Journal of Immunology*, 170 (2003) 445-453.

- [45] S. Piboonpocanun, O. Jirapongsananuruk, T. Tipayanon, S. Boonchoo, R.E. Goodman, Identification of hemocyanin as a novel non-cross-reactive allergen from the giant freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii*, *Mol Nutr Food Res*, 55 (2011) 1492-1498.
- [46] M.G. Giuffrida, D. Villalta, G. Mistrello, S. Amato, R. Asero, Shrimp allergy beyond Tropomyosin in Italy: clinical relevance of Arginine Kinase, Sarcoplasmic calcium binding protein and Hemocyanin, *Eur Ann Allergy Clin Immunol*, 46 (2014) 172-177.
- [47] D. Guillen, A. Fiandor, V. Del Pozo, M. Pedrosa, E. Phillips-Angles, T. Caballero, S. Quirce, Anaphylaxis caused by hemocyanin contained in shrimp cephalothorax, *Ann Allergy Asthma Immunol*, 113 (2014) 674-675 e672.
- [48] J. Schutz, P. Dolashka-Angelova, R. Abrashev, P. Nicolov, W. Voelter, Isolation and spectroscopic characterization of the structural subunits of keyhole limpet hemocyanin, *Biochim Biophys Acta*, 1546 (2001) 325-336.
- [49] H.B. Herscovitz, W.W. Harold, A.B. Stavitsky, Immunochemical and immunogenic properties of a purified keyhole limpet haemocyanin, *Immunology*, 22 (1972) 51-61.
- [50] R.D. Swerdlow, R.F. Ebert, P. Lee, C. Bonaventura, K.I. Miller, Keyhole limpet hemocyanin: Structural and functional characterization of two different subunits and multimers, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 113 (1996) 537-548.
- [51] J.R. Harris, J. Markl, Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review, *Micron*, 30 (1999) 597-623.
- [52] S.R. Kantelhardt, M. Wuhrer, R.D. Dennis, M.J. Doenhoff, Q. Bickle, R. Geyer, Fuc(alpha1-->3)GalNAc-: the major antigenic motif of *Schistosoma mansoni* glycolipids implicated in infection sera and keyhole-limpet haemocyanin cross-reactivity, *Biochemical Journal*, 366 (2002) 217-223.
- [53] T. Kurokawa, M. Wuhrer, G. Lochnit, H. Geyer, J. Markl, R. Geyer, Hemocyanin from the keyhole limpet *Megathura crenulata* (KLH) carries a novel type of N-glycans with Gal(beta1-6)Man-motifs, *Eur J Biochem*, 269 (2002) 5459-5473.
- [54] M. Wuhrer, M.L. Robijn, C.A. Koeleman, C.I. Balog, R. Geyer, A.M. Deelder, C.H. Hokke, A novel Gal(beta1-4)Gal(beta1-4)Fuc(alpha1-6)-core modification attached to the proximal N-acetylglucosamine of keyhole limpet haemocyanin (KLH) N-glycans, *Biochem J*, 378 (2004) 625-632.
- [55] P. Presicce, A. Taddeo, A. Conti, M.L. Villa, S. Della Bella, Keyhole limpet hemocyanin induces the activation and maturation of human dendritic cells through the involvement of mannose receptor, *Mol Immunol*, 45 (2008) 1136-1145.
- [56] M.S. Hayden, S. Ghosh, NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions, *Genes & Development*, 26 (2012) 203-234.
- [57] S. Liu, Z.J. Chen, Expanding Role of Ubiquitination in NF- κ B Signaling, *Cell research*, 21 (2011) 6-21.
- [58] P. Angel, M. Karin, The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1072 (1991) 129-157.
- [59] S.M. Jacobs-Helber, A. Wickrema, M.J. Birrer, S.T. Sawyer, AP1 Regulation of Proliferation and Initiation of Apoptosis in Erythropoietin-Dependent Erythroid Cells, *Molecular and Cellular Biology*, 18 (1998) 3699-3707.
- [60] S. Hadas, M. Spira, U.K. Hanisch, F. Reichert, S. Rotshenker, Complement receptor-3 negatively regulates the phagocytosis of degenerated myelin through tyrosine kinase Syk and cofilin, *J Neuroinflammation*, 9 (2012) 166.
- [61] T. Kurosaki, M. Takata, Y. Yamanashi, T. Inazu, T. Taniguchi, T. Yamamoto, H. Yamamura, Syk activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling, *J Exp Med*, 179 (1994) 1725-1729.
- [62] K. Fütterer, J. Wong, R.A. Grucza, A.C. Chan, G. Waksman, Structural basis for syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide1, *Journal of Molecular Biology*, 281 (1998) 523-537.
- [63] H. Bohnenberger, T. Oellerich, M. Engelke, H.-H. Hsiao, H. Urlaub, J. Wienands, Complex phosphorylation dynamics control the composition of the Syk interactome in B cells, *European Journal of Immunology*, 41 (2011) 1550-1562.
- [64] M. Deckert, C. Elly, A. Altman, Y.C. Liu, Coordinated regulation of the tyrosine phosphorylation of Cbl by Fyn and Syk tyrosine kinases, *J Biol Chem*, 273 (1998) 8867-8874.

- [65] N. Rao, A.K. Ghosh, S. Ota, P. Zhou, A.L. Reddi, K. Hakezi, B.K. Druker, J. Wu, H. Band, The non-receptor tyrosine kinase Syk is a target of Cbl-mediated ubiquitylation upon B-cell receptor stimulation, *Embo j*, 20 (2001) 7085-7095.
- [66] L.L. Paris, J. Hu, J. Galan, S.S. Ong, V.A. Martin, H. Ma, W.A. Tao, M.L. Harrison, R.L. Geahlen, Regulation of Syk by phosphorylation on serine in the linker insert, *J Biol Chem*, 285 (2010) 39844-39854.
- [67] W. Zhang, H.T. Liu, MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells, *Cell Res*, 12 (2002) 9-18.
- [68] S. Yoon, R. Seger, The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions, *Growth Factors*, 24 (2006) 21-44.
- [69] A. Enshaei, C.N. Robson, R.J. Edmondson, Artificial Intelligence Systems as Prognostic and Predictive Tools in Ovarian Cancer, *Annals of Surgical Oncology*, 22 (2015) 3970-3975.
- [70] C. Castaneda, K. Nalley, C. Mannion, P. Bhattacharyya, P. Blake, A. Pecora, A. Goy, K.S. Suh, Clinical decision support systems for improving diagnostic accuracy and achieving precision medicine, *Journal of Clinical Bioinformatics*, 5 (2015) 4.
- [71] S.E. Dilsizian, E.L. Siegel, Artificial Intelligence in Medicine and Cardiac Imaging: Harnessing Big Data and Advanced Computing to Provide Personalized Medical Diagnosis and Treatment, *Current Cardiology Reports*, 16 (2013) 441.
- [72] 消費者庁, アレルギー物質を含む加工食品の表示ハンドブック, in: 消費者庁食品表示課 (Ed.), 2014, pp. 33.
- [73] A. Matsuno, Z. Gai, M. Tanaka, K. Kato, S. Kato, T. Katoh, T. Shimizu, T. Yoshioka, H. Kishimura, Y. Tanaka, M. Yao, Crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of a 3.8-MDa respiratory supermolecule hemocyanin, *Journal of Structural Biology*, 190 (2015) 379-382.
- [74] A. Ben Nasr, J. Haithcoat, J.E. Masterson, J.S. Gunn, T. Eaves-Pyles, G.R. Klimpel, Critical role for serum opsonins and complement receptors CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in phagocytosis of *Francisella tularensis* by human dendritic cells (DC): uptake of *Francisella* leads to activation of immature DC and intracellular survival of the bacteria, *J Leukoc Biol*, 80 (2006) 774-786.
- [75] D.L. Clemens, B.Y. Lee, M.A. Horwitz, *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops, *Infect Immun*, 73 (2005) 5892-5902.
- [76] A. Balagopal, A.S. MacFarlane, N. Mohapatra, S. Soni, J.S. Gunn, L.S. Schlesinger, Characterization of the receptor-ligand pathways important for entry and survival of *Francisella tularensis* in human macrophages, *Infect Immun*, 74 (2006) 5114-5125.
- [77] J. Katz, P. Zhang, M. Martin, S.N. Vogel, S.M. Michalek, Toll-like receptor 2 is required for inflammatory responses to *Francisella tularensis* LVS, *Infect Immun*, 74 (2006) 2809-2816.
- [78] M. Malik, C.S. Bakshi, B. Sahay, A. Shah, S.A. Lotz, T.J. Sellati, Toll-like receptor 2 is required for control of pulmonary infection with *Francisella tularensis*, *Infect Immun*, 74 (2006) 3657-3662.
- [79] M.K. Mansour, E. Latz, S.M. Levitz, *Cryptococcus neoformans* Glycoantigens Are Captured by Multiple Lectin Receptors and Presented by Dendritic Cells, *The Journal of Immunology*, 176 (2006) 3053-3061.
- [80] X. Song, S. Tanaka, D. Cox, S.C. Lee, Fcγ receptor signaling in primary human microglia: differential roles of PI-3K and Ras/ERK MAPK pathways in phagocytosis and chemokine induction, *J Leukoc Biol*, 75 (2004) 1147-1155.
- [81] K.V. Parsa, J.P. Butchar, M.V. Rajaram, T.J. Cremer, S. Tridandapani, The tyrosine kinase Syk promotes phagocytosis of *Francisella* through the activation of Erk, *Mol Immunol*, 45 (2008) 3012-3021.
- [82] T. Miyazaki, H. Katagiri, Y. Kanegae, H. Takayanagi, Y. Sawada, A. Yamamoto, M.P. Pando, T. Asano, I.M. Verma, H. Oda, K. Nakamura, S. Tanaka, Reciprocal role of ERK and NF-κB pathways in survival and activation of osteoclasts, *J Cell Biol*, 148 (2000) 333-342.
- [83] B. Jiang, S. Xu, X. Hou, D.R. Pimentel, P. Brecher, R.A. Cohen, Temporal control of NF-κB activation by ERK differentially regulates interleukin-1β-induced gene expression, *J Biol Chem*, 279 (2004) 1323-1329.
- [84] K.E. van Holde, K.I. Miller, Hemocyanins, *Adv Protein Chem*, 47 (1995) 1-81.
- [85] J.E. Curtis, E.M. Hersh, E.J. Freireich, Antigen-specific immunity in recipients of leukocyte transfusions from immune donors, *Cancer Res*, 30 (1970) 2921-2929.

- [86] J.E. Curtis, E.M. Hersh, W.T. Butler, R.D. Rossen, Antigen dose in the human immune response. Dose-relationships in the human immune response to Keyhole limpet hemocyanin, *J Lab Clin Med*, 78 (1971) 61-69.
- [87] W.O. Weigle, Immunochemical properties of hemocyanin, *Immunochemistry*, 1 (1964) 295-302.
- [88] Z.-Y. Huang, S. Hunter, P. Chien, M.-K. Kim, T.-H. Han-Kim, Z.K. Indik, A.D. Schreiber, Interaction of Two Phagocytic Host Defense Systems: Fc γ RECEPTORS AND COMPLEMENT RECEPTOR 3, *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (2011) 160-168.
- [89] Y. Liu, G. Zhao, J. Lin, C. Li, Q. Li, C. Che, Q. Wang, L. Hu, The role of Syk signaling in antifungal innate immunity of human corneal epithelial cells, *BMC Ophthalmology*, 15 (2015) 55.
- [90] P.P. Roux, J. Blenis, ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68 (2004) 320-344.
- [91] J. Yatabe, H. Sanada, M.S. Yatabe, S. Hashimoto, M. Yoneda, R.A. Felder, P.A. Jose, T. Watanabe, Angiotensin II type 1 receptor blocker attenuates the activation of ERK and NADPH oxidase by mechanical strain in mesangial cells in the absence of angiotensin II, *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 296 (2009) F1052-F1060.
- [92] M. Kanehisa, S. Goto, Y. Sato, M. Kawashima, M. Furumichi, M. Tanabe, Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG, *Nucleic Acids Research*, 42 (2014) D199-D205.
- [93] M. Kanehisa, Y. Sato, K. Morishima, BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences, *Journal of Molecular Biology*, 428 (2016) 726-731.
- [94] H. Fu, R.R. Subramanian, S.C. Masters, 14-3-3 Proteins: Structure, Function, and Regulation, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 40 (2000) 617-647.
- [95] F.S. Sutterwala, L.A. Mijares, L. Li, Y. Ogura, B.I. Kazmierczak, R.A. Flavell, Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome, *J Exp Med*, 204 (2007) 3235-3245.
- [96] R.C. Stevens, V. Cherezov, V. Katritch, R. Abagyan, P. Kuhn, H. Rosen, K. Wuthrich, The GPCR Network: a large-scale collaboration to determine human GPCR structure and function, *Nat Rev Drug Discov*, 12 (2013) 25-34.
- [97] D.R. McMillan, P.C. White, Studies on the very large G protein-coupled receptor: from initial discovery to determining its role in sensorineural deafness in higher animals, *Adv Exp Med Biol*, 706 (2010) 76-86.
- [98] A. Sadeque, N.V.L. Serão, B.R. Southey, K.R. Delfino, S.L. Rodriguez-Zas, Identification and characterization of alternative exon usage linked glioblastoma multiforme survival, *BMC Medical Genomics*, 5 (2012) 1-16.
- [99] N.G. Kolev, J.A. Steitz, Symplekin and multiple other polyadenylation factors participate in 3'-end maturation of histone mRNAs, *Genes Dev*, 19 (2005) 2583-2592.
- [100] K. Xiang, T. Nagaike, S. Xiang, T. Kilic, M.M. Beh, J.L. Manley, L. Tong, Crystal structure of the human symplekin-Ssu72-CTD phosphopeptide complex, *Nature*, 467 (2010) 729-733.
- [101] C. Brakebusch, R. Fässler, β 1 integrin function in vivo: Adhesion, migration and more, *Cancer and Metastasis Reviews*, 24 (2005) 403-411.
- [102] K. Thelen, V. Kedar, A.K. Panicker, R.S. Schmid, B.R. Midkiff, P.F. Maness, The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins, *J Neurosci*, 22 (2002) 4918-4931.
- [103] H. Negishi, Y. Ohba, H. Yanai, A. Takaoka, K. Honma, K. Yui, T. Matsuyama, T. Taniguchi, K. Honda, Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (2005) 15989-15994.
- [104] S.L. Nutt, N. Taubenheim, J. Hasbold, L.M. Corcoran, P.D. Hodgkin, The genetic network controlling plasma cell differentiation, *Semin Immunol*, 23 (2011) 341-349.
- [105] J.P. Ting, J.A. Harton, NLRP3 moonlights in TH2 polarization, *Nat Immunol*, 16 (2015) 794-796.
- [106] C.R. Brown, L.Q. Hong-Brown, S.J. Doxsey, W.J. Welch, Molecular Chaperones and the Centrosome: A ROLE FOR HSP 73 IN CENTROSOMAL REPAIR FOLLOWING HEAT SHOCK TREATMENT, *Journal of Biological Chemistry*, 271 (1996) 833-840.
- [107] J. Yang, S.M. Roe, M.J. Cliff, M.A. Williams, J.E. Ladbury, P.T. Cohen, D. Barford, Molecular basis for TPR domain-mediated regulation of protein phosphatase 5, *Embo j*, 24 (2005) 1-10.

- [108] Y. Minami, M. Minami, Hsc70/Hsp40 chaperone system mediates the Hsp90-dependent refolding of firefly luciferase, *Genes Cells*, 4 (1999) 721-729.
- [109] J.P. Schuermann, J. Jiang, J. Cuellar, O. Llorca, L. Wang, L.E. Gimenez, S. Jin, A.B. Taylor, B. Demeler, K.A. Morano, P.J. Hart, J.M. Valpuesta, E.M. Lafer, R. Sousa, Structure of the Hsp110:Hsc70 nucleotide exchange machine, *Mol Cell*, 31 (2008) 232-243.
- [110] S.M. Doyle, O. Genest, S. Wickner, Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14 (2013) 617-629.
- [111] K. Triantafilou, M. Triantafilou, R.L. Dedrick, A CD14-independent LPS receptor cluster, *Nat Immunol*, 2 (2001) 338-345.
- [112] D.D. Sarbassov, S.M. Ali, D.H. Kim, D.A. Guertin, R.R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, D.M. Sabatini, Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton, *Curr Biol*, 14 (2004) 1296-1302.
- [113] D.H. Kim, D.D. Sarbassov, S.M. Ali, R.R. Latek, K.V. Guntur, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, D.M. Sabatini, GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR, *Mol Cell*, 11 (2003) 895-904.
- [114] S.Y. Woo, D.H. Kim, C.B. Jun, Y.M. Kim, E.V. Haar, S.I. Lee, J.W. Hegg, S. Bandhakavi, T.J. Griffin, PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling, *J Biol Chem*, 282 (2007) 25604-25612.
- [115] T.R. Peterson, M. Laplante, C.C. Thoreen, Y. Sancak, S.A. Kang, W.M. Kuehl, N.S. Gray, D.M. Sabatini, DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival, *Cell*, 137 (2009) 873-886.
- [116] D.R. Alessi, F. Barry Caudwell, M. Andjelkovic, B.A. Hemmings, P. Cohen, Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase, *FEBS Letters*, 399 (1996) 333-338.
- [117] Q. Yang, K. Inoki, T. Ikenoue, K.L. Guan, Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity, *Genes Dev*, 20 (2006) 2820-2832.
- [118] D. Rispal, S. Eltschinger, M. Stahl, S. Vaga, B. Bodenmiller, Y. Abraham, I. Filipuzzi, N.R. Movva, R. Aebersold, S.B. Helliwell, R. Loewith, Target of Rapamycin Complex 2 Regulates Actin Polarization and Endocytosis via Multiple Pathways, *J Biol Chem*, 290 (2015) 14963-14978.
- [119] M.G. Wilkinson, T.S. Pino, S. Tournier, V. Buck, H. Martin, J. Christiansen, D.G. Wilkinson, J.B. Millar, Sin1: an evolutionarily conserved component of the eukaryotic SAPK pathway, *The EMBO Journal*, 18 (1999) 4210-4221.
- [120] H. Meng, L. Tian, J. Zhou, Z. Li, X. Jiao, W.W. Li, M. Plomann, Z. Xu, M.P. Lisanti, C. Wang, R.G. Pestell, PACSIN 2 represses cellular migration through direct association with cyclin D1 but not its alternate splice form cyclin D1b, *Cell Cycle*, 10 (2011) 73-81.
- [121] A. Quan, J. Xue, J. Wielens, K.J. Smillie, V. Anggono, M.W. Parker, M.A. Cousin, M.E. Graham, P.J. Robinson, Phosphorylation of syndapin I F-BAR domain at two helix-capping motifs regulates membrane tubulation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (2012) 3760-3765.
- [122] E. Esashi, M. Bao, Y.-H. Wang, W. Cao, Y.-J. Liu, PACSIN1 regulates the TLR7/9-mediated type I interferon response in plasmacytoid dendritic cells, *European journal of immunology*, 42 (2012) 573-579.
- [123] A.E. Bass-Zubek, R.P. Hobbs, E.V. Amargo, N.J. Garcia, S.N. Hsieh, X. Chen, J.K. Wahl, 3rd, M.F. Denning, K.J. Green, Plakophilin 2: a critical scaffold for PKC alpha that regulates intercellular junction assembly, *J Cell Biol*, 181 (2008) 605-613.
- [124] F. Suto, M. Tsuboi, H. Kamiya, H. Mizuno, Y. Kiyama, S. Komai, M. Shimizu, M. Sanbo, T. Yagi, Y. Hiromi, A. Chédotal, K.J. Mitchell, T. Manabe, H. Fujisawa, Interactions between Plexin-A2, Plexin-A4, and Semaphorin 6A Control Lamina-Restricted Projection of Hippocampal Mossy Fibers, *Neuron*, 53 (2007) 535-547.
- [125] J. Renaud, G. Kerjan, I. Sumita, Y. Zagar, V. Georget, D. Kim, C. Fouquet, K. Suda, M. Sanbo, F. Suto, S.L. Ackerman, K.J. Mitchell, H. Fujisawa, A. Chédotal, Plexin-A2 and its ligand, Sema6A, control nucleus-centrosome coupling in migrating granule cells, *Nat Neurosci*, 11 (2008) 440-449.
- [126] L. Tamagnone, P.M. Comoglio, Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond, *Trends in Cell Biology*, 10 377-383.

- [127] L. Tamagnone, P.M. Comoglio, Signalling by semaphorin receptors: cell guidance and beyond, *Trends in Cell Biology*, 10 (2000) 377-383.
- [128] T. Nogi, N. Yasui, E. Mihara, Y. Matsunaga, M. Noda, N. Yamashita, T. Toyofuku, S. Uchiyama, Y. Goshima, A. Kumanogoh, J. Takagi, Structural basis for semaphorin signalling through the plexin receptor, *Nature*, 467 (2010) 1123-1127.
- [129] C. Chaudhry, M.C. Weston, P. Schuck, C. Rosenmund, M.L. Mayer, Stability of ligand-binding domain dimer assembly controls kainate receptor desensitization, *Embo j*, 28 (2009) 1518-1530.
- [130] A.P. Mould, M.A. Travis, S.J. Barton, J.A. Hamilton, J.A. Askari, S.E. Craig, P.R. MacDonald, R.A. Kammerer, P.A. Buckley, M.J. Humphries, Evidence That Monoclonal Antibodies Directed against the Integrin β Subunit Plexin/Semaphorin/Integrin Domain Stimulate Function by Inducing Receptor Extension, *Journal of Biological Chemistry*, 280 (2005) 4238-4246.
- [131] H. Takamatsu, A. Kumanogoh, Diverse roles for semaphorin-plexin signaling in the immune system, *Trends in Immunology*, 33 (2012) 127-135.
- [132] P. Kunapuli, C.S. Kasyapa, L. Hawthorn, J.K. Cowell, LGI1, a Putative Tumor Metastasis Suppressor Gene, Controls in Vitro Invasiveness and Expression of Matrix Metalloproteinases in Glioma Cells through the ERK1/2 Pathway, *Journal of Biological Chemistry*, 279 (2004) 23151-23157.
- [133] K. Yeung, T. Seitz, S. Li, P. Janosch, B. McFerran, C. Kaiser, F. Fee, K.D. Katsanakis, D.W. Rose, H. Mischak, J.M. Sedivy, W. Kolch, Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP, *Nature*, 401 (1999) 173-177.
- [134] L. Yan, D.E. Vatner, J.P. O'Connor, A. Ivessa, H. Ge, W. Chen, S. Hirotsu, Y. Ishikawa, J. Sadoshima, S.F. Vatner, Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress, *Cell*, 130 (2007) 247-258.
- [135] B. Toro, N. Cox, R.J. Wilson, E. Garrido-Sanabria, E. Stefani, L. Toro, M.M. Zarei, KCNMB1 regulates surface expression of a voltage and Ca²⁺-activated K⁺ channel via endocytic trafficking signals, *Neuroscience*, 142 (2006) 661-669.
- [136] S.-H. Kwon, W.B. Guggino, Multiple sequences in the C terminus of MaxiK channels are involved in expression, movement to the cell surface, and apical localization, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (2004) 15237-15242.
- [137] O. Strauss, N. Reichhart, N.M. Gomez, C. Muller, Contribution of Ion Channels in Calcium Signaling Regulating Phagocytosis: MaxiK, Cav1.3 and Bestrophin-1, *Adv Exp Med Biol*, 854 (2016) 739-744.
- [138] P.Y. Wang, G.K. Seabold, R.J. Wenthold, Synaptic Adhesion-Like Molecules (SALMs) Promote Neurite Outgrowth, *Molecular and cellular neurosciences*, 39 (2008) 83-94.
- [139] W. Mah, J. Ko, J. Nam, K. Han, W.S. Chung, E. Kim, Selected SALM (synaptic adhesion-like molecule) family proteins regulate synapse formation, *J Neurosci*, 30 (2010) 5559-5568.
- [140] A. Castellanos, G. Lang, J. Frampton, K. Weston, Regulation of erythropoiesis by the neuronal transmembrane protein Lrfr2, *Exp Hematol*, 35 (2007) 724-734.
- [141] Y. Kadota, K. Shirasu, R. Guerois, NLR sensors meet at the SGT1-HSP90 crossroad, *Trends in Biochemical Sciences*, 35 (2010) 199-207.
- [142] M. Zhang, Y. Kadota, C. Prodromou, K. Shirasu, L.H. Pearl, Structural Basis for Assembly of Hsp90-Sgt1-CHORD Protein Complexes: Implications for Chaperoning of NLR Innate Immunity Receptors, *Molecular Cell*, 39 (2010) 269-281.
- [143] A. Mayor, F. Martinon, T. De Smedt, V. Petrilli, J. Tschopp, A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses, *Nat Immunol*, 8 (2007) 497-503.
- [144] J. Fernández-Larrea, A. Merlos-Suárez, J.M. Ureña, J. Baselga, J. Arribas, A Role for a PDZ Protein in the Early Secretory Pathway for the Targeting of proTGF- α to the Cell Surface, *Molecular Cell*, 3 (1999) 423-433.
- [145] J. Fernandez-Larrea, A. Merlos-Suarez, J.M. Urena, J. Baselga, J. Arribas, A role for a PDZ protein in the early secretory pathway for the targeting of proTGF-alpha to the cell surface, *Mol Cell*, 3 (1999) 423-433.
- [146] M. Sasaki, M. Takagi, Y. Okamura, A Voltage Sensor-Domain Protein Is a Voltage-Gated Proton Channel, *Science*, 312 (2006) 589.

- [147] Y. Okamura, Y. Fujiwara, S. Sakata, Gating mechanisms of voltage-gated proton channels, *Annu Rev Biochem*, 84 (2015) 685-709.
- [148] G.A. Figtree, C.C. Liu, S. Bibert, E.J. Hamilton, A. Garcia, C.N. White, K.K. Chia, F. Cornelius, K. Geering, H.H. Rasmussen, Reversible oxidative modification: a key mechanism of Na⁺-K⁺ pump regulation, *Circ Res*, 105 (2009) 185-193.
- [149] S.I. Buschow, E. Lasonder, R. Szklarczyk, M.M. Oud, I.J.M. de Vries, C.G. Figdor, Unraveling the human dendritic cell phagosome proteome by organellar enrichment ranking, *Journal of Proteomics*, 75 (2012) 1547-1562.
- [150] E. Freed, M. Symons, S.G. Macdonald, F. McCormick, R. Ruggieri, Binding of 14-3-3 proteins to the protein kinase Raf and effects on its activation, *Science*, 265 (1994) 1713-1716.
- [151] K. Irie, Y. Gotoh, B.M. Yashar, B. Errede, E. Nishida, K. Matsumoto, Stimulatory effects of yeast and mammalian 14-3-3 proteins on the Raf protein kinase, *Science*, 265 (1994) 1716-1719.
- [152] K. Shimizu, S. Kuroda, B. Yamamori, S. Matsuda, K. Kaibuchi, T. Yamauchi, T. Isobe, K. Irie, K. Matsumoto, Y. Takai, Synergistic activation by Ras and 14-3-3 protein of a mitogen-activated protein kinase kinase kinase named Ras-dependent extracellular signal-regulated kinase kinase stimulator, *J Biol Chem*, 269 (1994) 22917-22920.
- [153] H. Fu, K. Xia, D.C. Pallas, C. Cui, K. Conroy, R.P. Narsimhan, H. Mamon, R.J. Collier, T.M. Roberts, Interaction of the protein kinase Raf-1 with 14-3-3 proteins, *Science*, 266 (1994) 126-129.
- [154] T. Isobe, Y. Hiyane, T. Ichimura, T. Okuyama, N. Takahashi, S. Nakajo, K. Nakaya, Activation of protein kinase C by the 14-3-3 proteins homologous with Exol protein that stimulates calcium-dependent exocytosis, *FEBS Letters*, 308 (1992) 121-124.
- [155] A. Aitken, C.A. Ellis, A. Harris, L.A. Sellers, A. Toker, Kinase and neurotransmitters, *Nature*, 344 (1990) 594.
- [156] L. Zheng, X. Zhao, P. Zhang, C. Chen, S. Liu, R. Huang, M. Zhong, C. Wei, Y. Zhang, Hemocyanin from Shrimp *Litopenaeus vannamei* Has Antiproliferative Effect against HeLa Cell In Vitro, *PLoS One*, 11 (2016) e0151801.
- [157] L. Franchi, N. Kamada, Y. Nakamura, A. Burberry, P. Kuffa, S. Suzuki, M.H. Shaw, Y.-G. Kim, G. Núñez, NLR4-driven interleukin-1 β production discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense, *Nature immunology*, 13 (2012) 449-456.
- [158] R.G. Iannitti, V. Napolioni, V. Oikonomou, A. De Luca, C. Galosi, M. Pariano, C. Massi-Benedetti, M. Borghi, M. Puccetti, V. Lucidi, C. Colombo, E. Fiscarelli, C. Lass-Flörl, F. Majo, L. Cariani, M. Russo, L. Porcaro, G. Ricciotti, H. Ellemunter, L. Ratclif, F.M. De Benedictis, V.N. Tasesa, C.A. Dinarello, F.L. van de Veerdonk, L. Romani, IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent inflammation in murine and human cystic fibrosis, *Nature Communications*, 7 (2016) 10791.
- [159] J. Rzepecka, M.A. Pineda, L. Al-Riyami, D.T. Rodgers, J.K. Huggan, F.E. Lumb, A.I. Khalaf, P.J. Meakin, M. Corbet, M.L. Ashford, C.J. Suckling, M.M. Harnett, W. Harnett, Prophylactic and therapeutic treatment with a synthetic analogue of a parasitic worm product prevents experimental arthritis and inhibits IL-1 β production via NRF2-mediated counter-regulation of the inflammasome, *Journal of Autoimmunity*, 60 (2015) 59-73.
- [160] L. Franchi, A. Amer, M. Body-Malapel, T.D. Kanneganti, N. Ozören, R. Jagirdar, N. Inohara, P. Vandenabeele, J. Bertin, A. Coyle, E.P. Grant, G. Núñez, Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages, *Nat Immunol*, 7 (2006) 576-582.
- [161] T. Suzuki, L. Franchi, C. Toma, H. Ashida, M. Ogawa, Y. Yoshikawa, H. Mimuro, N. Inohara, C. Sasakawa, G. Núñez, Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in Shigella-infected macrophages, *PLoS Pathog*, 3 (2007) e111.
- [162] L. Franchi, J. Stoolman, T.D. Kanneganti, A. Verma, R. Ramphal, G. Núñez, Critical role for Ipaf in Pseudomonas aeruginosa-induced caspase-1 activation, *Eur J Immunol*, 37 (2007) 3030-3039.
- [163] K. Borivoj, Specificity of proteolysis, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, 1992.
- [164] S.L. Lage, C. Longo, L.M. Branco, T.B. da Costa, C.d.L. Buzzo, K.R. Bortoluci, Emerging Concepts about NAIP/NLRC4 Inflammasomes, *Frontiers in Immunology*, 5 (2014) 309.

- [165] Y. Zhao, J. Yang, J. Shi, Y.N. Gong, Q. Lu, H. Xu, L. Liu, F. Shao, The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus, *Nature*, 477 (2011) 596-600.
- [166] N. Jounai, K. Kobiyama, M. Shiina, K. Ogata, K.J. Ishii, F. Takeshita, NLRP4 Negatively Regulates Autophagic Processes through an Association with Beclin1, *The Journal of Immunology*, 186 (2011) 1646-1655.
- [167] M.J. Vos, J. Hageman, S. Carra, H.H. Kampinga, Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families, *Biochemistry*, 47 (2008) 7001-7011.
- [168] H. Xing, S. Zhang, C. Weinheimer, A. Kovacs, A.J. Muslin, 14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades, *The EMBO Journal*, 19 (2000) 349-358.
- [169] C.R. Casella, T.C. Mitchell, Putting endotoxin to work for us: Monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65 (2008) 3231-3240.
- [170] C. Nathan, A. Ding, Nonresolving Inflammation, *Cell*, 140 871-882.
- [171] R.L. Goffic, V. Balloy, M. Lagranderie, L. Alexopoulou, N. Escriou, R. Flavell, M. Chignard, M. Si-Tahar, Detrimental Contribution of the Toll-Like Receptor (TLR)3 to Influenza A Virus-Induced Acute Pneumonia, *PLoS Pathog*, 2 (2006) e53.
- [172] R.L. Zemans, S.P. Colgan, G.P. Downey, Transepithelial Migration of Neutrophils, *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 40 (2009) 519-535.
- [173] J.E. Pie, K. Spahis, C. Seillan, Cholesterol oxidation in meat products during cooking and frozen storage, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39 (1991) 250-254.
- [174] E. Boselli, V. Velazco, M. Fiorenza Caboni, G. Lercker, Pressurized liquid extraction of lipids for the determination of oxysterols in egg-containing food, *Journal of Chromatography A*, 917 (2001) 239-244.
- [175] F.J. Sheedy, A. Grebe, K.J. Rayner, P. Kalantari, B. Ramkhelawon, S.B. Carpenter, C.E. Becker, H.N. Ediriweera, A.E. Mullick, D.T. Golenbock, L.M. Stuart, E. Latz, K.A. Fitzgerald, K.J. Moore, CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation, *Nat Immunol*, 14 (2013) 812-820.
- [176] A. Grebe, E. Latz, Cholesterol Crystals and Inflammation, *Current Rheumatology Reports*, 15 (2013) 1-7.
- [177] T. Nagai, T. Osaki, S.-i. Kawabata, Functional Conversion of Hemocyanin to Phenoloxidase by Horseshoe Crab Antimicrobial Peptides, *Journal of Biological Chemistry*, 276 (2001) 27166-27170.
- [178] Y. Wen, S. Zhan, H. Huang, M. Zhong, J. Chen, C. You, F. Wang, Y. Zhang, Identification and characterization of an 18.4kDa antimicrobial truncation from shrimp *Litopenaeus vannamei* hemocyanin upon *Vibrio parahaemolyticus* infection, *Fish & Shellfish Immunology*, 56 (2016) 450-458.
- [179] Y. Zhang, F. Yan, Z. Hu, X. Zhao, S. Min, Z. Du, S. Zhao, X. Ye, Y. Li, Hemocyanin from shrimp *Litopenaeus vannamei* shows hemolytic activity, *Fish & Shellfish Immunology*, 27 (2009) 330-335.
- [180] T. Burmester, Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily, *Mol Biol Evol*, 18 (2001) 184-195.
- [181] A. Rassi, Jr., A. Rassi, J.A. Marin-Neto, Chagas disease, *The Lancet*, 375 1388-1402.
- [182] H. Keller, B. Lieb, B. Altenhein, D. Gebauer, S. Richter, S. Stricker, J. Markl, Abalone (*Haliotis tuberculata*) hemocyanin type 1 (HtH1), *European Journal of Biochemistry*, 264 (1999) 27-38.