

## 琉球大学学術リポジトリ

GRIM-19は結核菌のZn<sup>2+</sup>メタロプロテアーゼの標的であり、NLRP3インフラマソームの活性化に必須である

|       |                                                                                                                                                                                                          |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| メタデータ | 言語: en<br>出版者: 琉球大学<br>公開日: 2022-06-10<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En): inflammasome, interleukin-1 $\beta$ ,<br>macrophages, mitochondria, Mycobacterium<br>tuberculosis<br>作成者: 藏根, 友美<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002018035">http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002018035</a>                                                                                                |

(別紙様式第3号)

## 論 文 要 旨

### 論 文 題 目

GRIM-19 is a target of mycobacterial  $Zn^{2+}$  metalloprotease 1 and indispensable for NLRP3 inflammasome activation

(GRIM-19は結核菌の $Zn^{2+}$ メタロプロテアーゼの標的であり、NLRP3インフラマソームの活性化に必須である)

氏 名 藏根 友美

【背景】結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) は、マクロファージ (Mφ) に感染する細胞内寄生性細菌であり、その排除には炎症性サイトカインの Interleukin (IL)-1β が重要である。一方で、結核菌はエフェクタータンパク質である Zn<sup>2+</sup> metalloprotease 1 (Zmp1) を分泌して IL-1β の産生を阻害することで、Mφ 内での殺菌を回避することが報告されている (Master et al., *Cell host & microbe*, 2008)。しかしながら、Zmp1 による IL-1β 産生阻害の具体的な分子機序は不明であった。

【目的】本研究では、Zmp1 による IL-1β 産生阻害の分子機序を解明することを目的とした。

【方法】Zmp1 と会合する宿主タンパク質を同定するため、全長の Zmp1 を bait とする酵母 two-hybrid スクリーニングを行った。分離した会合分子の IL-1β 産生における役割を解明するために、CRISPR/Cas9 法を用いてその遺伝子を破壊した J774.1 マウス Mφ 株を作製し、以下の実験を行っ

た。まず、結核菌ワクチン株 BCG の Zmp1 欠損株 (BCG- $\Delta$ zmp1) の感染で誘導される IL-1 $\beta$  の産生を ELISA 法で解析した。続いて、結核菌に対する感染防御に重要な NLRP3 インフラマソームを選択的に活性化させた際の IL-1 $\beta$  産生、Caspase-1 の活性化、ASC speck の形成、ミトコンドリア由来活性酸素種 (mtROS) の産生についてそれぞれ ELISA、ウエスタンブロット、蛍光免疫染色、フローサイトメトリーによって調べた。さらに、電子伝達系 Complex I の活性とミトコンドリア膜電位 ( $\Delta\Psi_m$ ) について J774.1 とヒト胎児腎細胞の HEK293T を用いて検証した。

【結果】酵母 two-hybrid スクリーニングの結果、ミトコンドリア電子伝達系 Complex I の必須サブユニットの一つである GRIM-19 が Zmp1 の会合分子として同定された。BCG 感染実験の結果、J774.1 野生株 (WT) では BCG- $\Delta$ zmp1 感染後に IL-1 $\beta$  の産生が誘導されたのに対して、GRIM-19-KO では誘導されなかった。また、J774.1 WT では活性化刺激

依存的な IL-1 $\beta$  産生、Caspase-1 の活性化、ASC speck の形成、mtROS 産生の亢進が起こるのに対し、GRIM-19-KO ではそれらが認められなかった。さらに、GRIM-19-KO では J774.1 WT と比べて定常状態の Complex I 活性および  $\Delta\Psi_m$  が低下しており、一方、HEK293T 細胞で Zmp1 を強制発現させると  $\Delta\Psi_m$  が低下することが明らかとなった。

【考察】本研究により、Zmp1 は新規 NLRP3 インフラマソーム制御因子 GRIM-19 に結合し、ミトコンドリア電子伝達系 Complex I の機能を阻害して mtROS 産生を抑制し、その結果 NLRP3 インフラマソームの活性化を阻害して IL-1 $\beta$  の産生を抑制することが示唆された。

【結語】本研究の成果は、結核菌感染時の NLRP3 インフラマソーム活性化の制御機構について新たな知見を提供するとともに、Zmp1 と GRIM-19 の相互作用を阻害する新たな抗結核薬の開発に寄与し得るものである。