

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19141

研究課題名(和文)ケモカインTARCの新規レセプター同定とそのシグナル経路の解明

研究課題名(英文)Identification of a novel receptor and signal transduction for chemokine TARC

研究代表者

日吉 真照(Hiyoshi, Masateru)

国立感染症研究所・血液・安全性研究部・研究員

研究者番号：40448519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ケモカインTARCは、体内で過剰に産生されるとアレルギー炎症反応に関与する。現在、TARCの受容体としてCCR4が唯一同定されているが、新たなTARC受容体が明らかになれば、アレルギー炎症反応の更なる理解につながる。本研究では、独自に見出した新規TARC受容体を発現する可能性がある細胞株から、新規のTARC受容体を同定することを目的とした。

この細胞からTARC-Flagと結合したタンパク質について質量分析を行ったところ、3種類のタンパク質を同定することに成功した。これらのタンパク質はいずれも免疫細胞に発現し、細胞表面に局在することから、新たなTARC受容体である可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Chemokine TARC is involved in allergic inflammatory reactions. it is known that CCR4 is the only receptor of TARC. Therefore, identification of a novel TARC receptor and signal transduction provides a new insight into allergic inflammatory response. In this study, we aimed to identify a novel TARC receptor from a cell in which TARC binds to cell surface without the expression of CCR4. we purified proteins from the cell using the FLAG affinity chromatography and identified three proteins bound to TARC-Flag protein by mass spectrometry. Moreover, the three proteins are expressed in immune cells and localized to cell surface, suggesting that the three proteins are candidates for a novel TARC receptor.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ケモカイン レセプター

1. 研究開始当初の背景

TARCは白血球の遊走と活性化に関与するケモカインである。アトピー性皮膚炎では、病変部の表皮角化細胞などで過剰に産生されたTARCがTh2細胞を引き寄せ、それに伴って生じる免疫反応の亢進がアレルギー反応の原因と考えられている。そのため、血清中TARC濃度は臨床においてアトピー性皮膚炎の病態指標に利用されている。現在、TARCのレセプターとしては唯一、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)のひとつであるCCR4が同定されている。

一方、GPCRの中には内在性リガンドが未だに不明であるオーファンレセプターが多く存在する。ヒトにおいては約150種類がオーファンレセプターであると考えられている。仮に、既知の疾患に関連するサイトカインが結合するオーファンレセプターを同定し、その発現細胞やシグナル経路を明らかにできれば、その疾患の原因解明および創薬に直結するインパクトの強い研究となる。現在、オーファンレセプターの内在性リガンドの探索は競争が激しい研究分野である。

申請者は近年、サイトカインと緑膿菌外毒素(PE)の融合タンパク質(サイトカイン-PE)を用いたエンドサイトーシス機構の解析を行ってきた。PEはエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれてはじめて細胞死を誘導する毒素タンパク質であり、細胞外においては細胞に対して無害である。申請者はこのPEの性質に着目し、サイトカイン-PEの添加による細胞株の生死を指標にして、細胞株におけるサイトカインレセプターの発現の有無を解析する独創的な実験系を樹立した。この実験系を用いて申請者は、TARCとPEの融合タンパク質(TARC-PE)の添加によって死滅する細胞株を見出すことに成功した。さらに、見出した細胞株には以下の特徴があることを明らかにしている。

- ・ 既知のTARCのレセプターであるCCR4(mRNAおよびタンパク質)を発現していない。
- ・ CCR4を発現したJurkat細胞よりも低濃度のTARC-PEで死滅する。
- ・ 蛍光ラベルしたTARCは細胞表面に特異的に結合する。
- ・ ウシ血清アルブミン-PEでは死滅しない(非特異的なPEの細胞内取り込みは無い)。

これらの結果は、この細胞株が未知のTARCレセプターを発現する可能性が非常に高いことを示す。この細胞株を用いてTARCの新規レセプター同定とそのシグナル経路を明らかにすることができれば、TARCが関与するアレルギー炎症反応の機序解明と創薬研究に貢献できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、免疫反応およびアレルギー性炎症反応に関与しているケモカインTARCの未知のレセプターを同定することである。そのために以下に焦点を絞った研究を行っていく。

- ・ 既に、新規TARCレセプターを発現している可能性が高い細胞株を見出している。この細胞株からTARCと結合する新規レセプターを同定する。
- ・ 同定したTARCレセプターの生体内での機能解明および疾患との関連を解明するために、発現組織と発現細胞を明らかにする。
- ・ 生理機能解明とアレルギー疾患の創薬新規ターゲット探索のために、TARCレセプター下流のシグナル経路に関与する分子群を明らかにする。

これらの研究によって、免疫およびアトピー性皮膚炎などのアレルギー性炎症について新たな知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法

まず、独自に見出した細胞株について、CCR4の発現量とTARCとの結合性を詳細に解析した。既知のTARCのレセプターであるCCR4の発現について高感度な検出系で確認するために、CCR4 mRNAの発現を多数のプライマーを用いたPCRを行った。次に、抗CCR4抗体および蛍光ラベルしたTARC-Flagを用いて染色し、フローサイトメトリーによって解析を行った。比較対象としてJurkatなどのCCR4を発現していることが確認されている細胞株を用いた。

さらに、見出した細胞株においてTARC添加による細胞内のシグナル経路活性化の有無を確認するために、細胞株の培養液にTARC-HA-Flagを添加した後、細胞抽出液を調整し、ウエスタンブロットによって細胞内のシグナル分子のリン酸化などを確認した。

また、この細胞株から未知のTARCレセプターを同定するために以下の実験を順次行った。

細胞株から調整した細胞抽出液を用いて、HA-Flag タンデムアフィニティー精製を行う。具体的には、細胞抽出液にTARC-HA-Flagタンパク質を加え、TARCレセプターと結合させる。その後、抗HA-tag抗体と抗Flag抗体で順次TARC-HA-Flagタンパク質を精製し、この精製TARCに結合したタンパク質を電気泳動と銀染色で確認する。これらタンパク質をゲルから切り出し、質量分析でTARCレセプターを同定する。

TARCと目的のレセプターが低親和性に結合する可能性がある。そこで、以下の実験を行いTARCに低親和性に結合するタンパク質を同定する。

- ・ TARC-HA-Flagを共有結合させた担体を用

意し、細胞抽出液中のタンパク質において TARC-HA-Flag の存在下で担体中の移動速度が低下するタンパク質群を分離する。

・TARC-HA-Flag を細胞株に添加した後、タンパク質架橋剤を用いて、細胞表面に結合した TARC-HA-Flag を共有結合させる。その後、FLAG アフィニティー精製を行って TARC-HA-Flag に結合したタンパク質を濃縮する。

これらの方法で低親和性結合タンパク質を濃縮して電気泳動と銀染色で確認した後、タンパク質をゲルから切り出して質量分析を行い TARC レセプターを同定する。

さらに、TARC レセプターの同定以外のレセプターの同定も並行して試みる。TARC 以外のサイトカインと PE の融合タンパク質も数種類既に作製している。これらの PE 融合タンパク質を様々な細胞株に添加して細胞の生死を指標に探索する。細胞死が誘導された細胞株を見つけ次第、上記と同様の実験を行いレセプターを同定する。

4. 研究成果

独自に見出した細胞株における CCR4 mRNA の発現を多数のプライマーを用いた PCR によって確認したところ、この細胞株 (X) では、いずれのプライマーにおいても CCR4 mRNA を検出されなかった (図 1)。

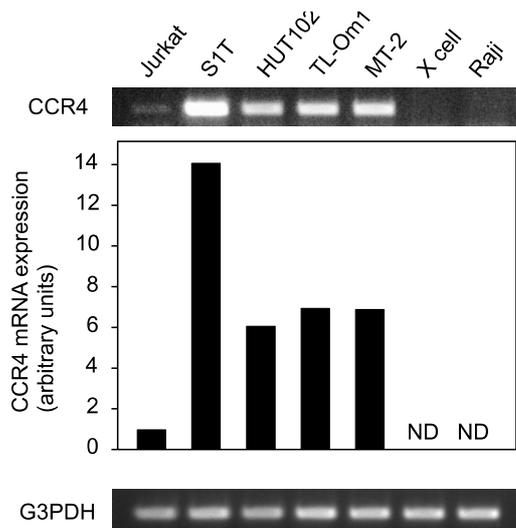


図 1

次に、TARC の CCR4 非依存性結合を詳細に解析した。CCR4 の発現量に違いがある細胞株 (Jurkat および S1T) を比較対象として、独自に見出した細胞株 (X) の CCR4 の発現と TARC-Flag の結合を解析した。その結果、この細胞株は CCR4 の発現が低い Jurkat 細胞よりも CCR4 の発現が低く検出できないが、TARC-Flag との結合性は Jurkat より高いことが確認できた (図 2)。これらの結果から、この細胞株に新規の TARC レセプターが存在

する可能性が非常に高いことが確認された。

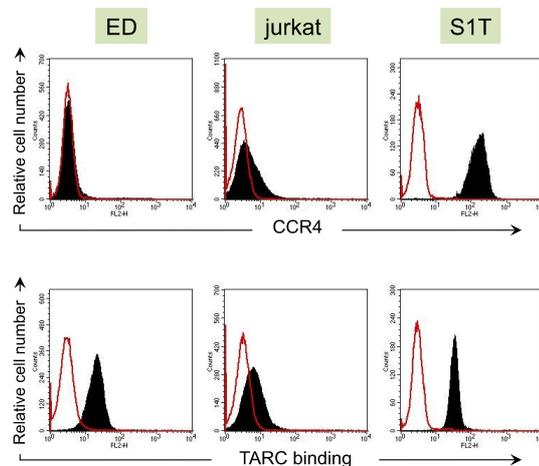


図 2

この独自に見出した細胞株について、TARC-HA-Flag 添加による細胞内のシグナル経路活性化の有無を確認したところ、TARC-HA-Flag 添加によって細胞内のチロシンがリン酸化されたタンパク質の量が有意に増加することがわかった。このことは、この細胞株の細胞表面のシグナル分子に TARC-HA-Flag が特異的に結合していることを示唆している。さらに、この細胞株は CCR4 を発現していないことから、この細胞株には、未知の TARC シグナル経路が存在することを示唆している。

新規の TARC レセプターを単離するために、細胞株より調整した細胞抽出液と TARC-HA-Flag を用いて FLAG アフィニティー精製を行ったところ、数種類のタンパク質を見出すことができた。しかし、詳細な解析をするために必要な量が得られなかったため、実験方法の改良を行った。すなわち、タンパク質架橋剤を用いて TARC-HA-Flag の結合を安定させたサンプルを用いて精製を行い、電気泳動によってタンパク質を確認した。その結果、分子量 37kDa 付近に特異的に TARC-HA-Flag に結合したと考えられるタンパク質を見出すことに成功した (図 3 赤矢頭)。このタンパク質を含む電気泳動ゲルを切り出し、質量分析を行ったところ、3種類のタンパク質を同定することができた。これらのタンパク質について解析を行ったところ、これらはいずれも免疫細胞に発現し、細胞表面に局在することがわかった。これらの結果は、同定したタンパク質の中に新規の TARC レセプターが存在することを示唆している。現在、さらに詳細な解析を行っている。

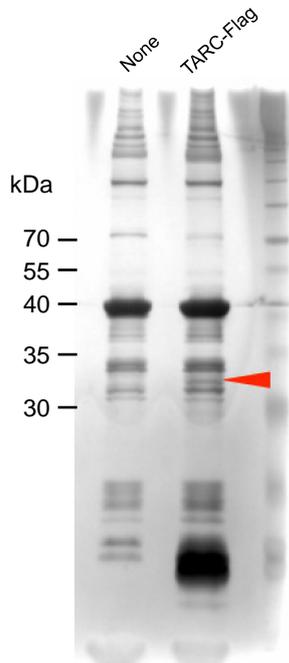


図 3

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Hashimoto M, Bhuyan F, Hiyoshi M, Nayori O, Nasser H, Miyazaki M, Saito T, Kondoh Y, Osada H, Kimura S, Hase K, Ohno H, Suzu S.
Potential role of the formation of tunneling nanotubes in HIV-1 spread in macrophages. J Immunol., 査読有 196 1832-1841, 2016.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500845>

Hashimoto M, Nasser H, Bhuyan F, Kuse N, Satou Y, Harada S, Yoshimura K, Sakuragi J, Monde K, Maeda Y, Welbourn S, Strebel K, Abd El-Wahab EW, Miyazaki M, Hattori S, Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Oka S, Takiguchi M, Suzu S.
Fibrocytes Differ from Macrophages but Can Be Infected with HIV-1. J Immunol., 査読有 195, 4341-4350, 2015.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500955>

. Hiyoshi M, Okuma K, Tateyama S, Takizawa K, Saito M, Kuramitsu M, Araki K, Morishita K, Okada S, Yamamoto N, Biragyn A, Yamaguchi K, Hamaguchi I.
Furin-dependent CCL17-fused recombinant toxin controls HTLV-1 infection by targeting and eliminating infected CCR4-expressing cells in vitro and in vivo. Retrovirology, 査読有 12: 73, 2015.
DOI: 10.1186/s12977-015-0199-8

〔学会発表〕(計 2 件)

谷生道一、日吉真照、浜口功
HTLV-1 アクセサリータンパク質の立体構造解析を目指した大量発現系構築の試み
第 3 回日本 HTLV-1 学術集会、2016 年 8 月 27 日、鹿児島

大隈和、日吉真照、滝澤和也、齋藤益満、倉光球、浜口功
TARC 結合組換えトキシンによる CCR4・Furin 依存的な HTLV-1 感染制御第 2 回日本 HTLV-1 学術集会、2015 年 8 月 22 日、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日吉 真照 (HIYOSHI, Masateru)
国立感染症研究所・血液安全性研究部・研究員
研究者番号：40448519