

平成21年 4月 8日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770115
 研究課題名（和文）膜受容体のエンドサイトーシスに関与する新規分子ファミリーの機能解析
 研究課題名（英文）Functional analysis of CMTM3/BNAS2 in B cell receptor endocytosis
 研究代表者
 與五沢 里美（YOGOSAWA SATOMI）
 群馬大学・生体調節研究所・グローバルCOE 研究員
 研究者番号：60392437

研究成果の概要：CMTM3を欠損させたニワトリB細胞株及びCMTM3を安定発現させたマウスB細胞株を用いて、B細胞抗原受容体（BCR）の細胞内への取り込み（エンドサイトーシス）を解析した。その結果、CMTM3を欠損するとBCRのエンドサイトーシスが遅延し、また、細胞膜のCMTM3がBCRと共にエンドサイトーシスされた。以上のことより、CMTM3がBCRエンドサイトーシスに機能していることを見出し、その仕組みの一端を明らかにすることができた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：受容体、輸送、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

B細胞抗原受容体（BCR）は抗原と結合するとIg α / β と共に膜複合体を形成し、細胞の活性化・増殖・分化などを誘導する活性化シグナルを細胞内へ伝達する。その後、BCRはIg α / β と解離し、エンドサイトーシスにより抗原を細胞内へと取り込むことで抗原の分解とMHC分子への提示に機能しているが、取り込まれ

た抗原—受容体複合体のメンブレントラフィックの仕組みはよく分かっていない。

CMTM3/BNAS2はBCRアダプタータンパク質BLNKと結合する分子として当研究室で同定され、膜貫通型MARVELドメインとロイシンジッパーを有するCMTMファミリーの一つである。このCMTMファミリー（CMTM1-8）は2003年にゲノム塩基配列中に見出され、2つの遺伝子領

域にクラスターを成し、遺伝子ファミリーを形成していることから、細胞の基本的機能に重要な役割を果たしていると予想される。また、これまでの報告から、MARVEL ドメインを有するタンパク質はメンブレントラフィックに関与するものがあるため、CMTM3 も同様にメンブレントラフィックに関与する可能性が考えられる。

そこで、ニワトリ B 細胞株 DT40 の CMTM3 欠損株を作製し解析したところ、架橋による BCR のエンドサイトーシスが遅延し、それは CMTM3 導入により回復した。従って、DT40 細胞において BCR のエンドサイトーシスを CMTM3 は正に制御していることが示唆され、本研究を遂行するに至った。

2. 研究の目的

BLNK と結合する分子として CMTM3/BNAS2 を同定し、その分子ファミリー CMTM を単離した。これまでの解析から、CMTM3 及び CMTM ファミリーはメンブレントラフィックに関与する可能性が考えられる。そこで、本研究は、CMTM3 及び CMTM ファミリーがメンブレントラフィックに関与する可能性を検証すること、また、それにより BLNK の新たな機能を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) HeLa 細胞に T7-CMTM3 を安定発現させ、各オルガネラマーカ (クラスリン被覆小胞 ; 抗 clathrin 抗体、初期エンドソーム ; 抗 EEA1 抗体、リソソーム ; 抗 LAMP1 抗体、ゴルジ体 ; 抗 GM130 抗体、小胞体 ; 抗 calnexin 抗体) との二重染色によりその局在を調べた。

(2) ニワトリ B 細胞株 DT40 の CMTM3 欠損株を

作製し以下の解析を行った。

① 架橋による BCR エンドサイトーシスについてフローサイトメトリーを用いて調べた。

② 架橋による BCR のキャッピングと CMTM3 の野生型及び変異体の局在変化について共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

(3) FLAG-CMTM3 を安定発現させたマウス B 細胞株 BAL17 を用いて、抗 FLAG 抗体により細胞膜の CMTM3 を標識し、BCR 架橋による BCR エンドサイトーシスをフローサイトメトリー及び共焦点レーザー顕微鏡を用いて調べた。

(4) CMTM3 及び BLNK を過剰発現させた BAL17 細胞を用いて、BCR 架橋による CMTM3 及び BLNK の局在の変化について共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

(5) BLNK 欠損マウス及び野生型マウスから脾臓 B 細胞を単離し、架橋による BCR エンドサイトーシスについてフローサイトメトリーを用いて調べた。

4. 研究成果

研究の主な成果は以下の通りである。

(1) HeLa 細胞に CMTM3 を安定発現させ、各オルガネラマーカとの二重染色によりその局在を調べたところ、CMTM3 は主に細胞膜、初期エンドソーム、クラスリン被覆小胞に局在が見られた。

(2) ニワトリ B 細胞株 DT40 の野生株及び CMTM3 欠損株を用いて解析したところ、CMTM3 欠損株では野生株と比べ、架橋による BCR のエンドサイトーシスが遅延し、それは CMTM3 導入により回復した。さらに、BCR 架橋による BCR のキャッピングと CMTM3 の野生型及び変異体の局在変化を観察したところ、CMTM3 の変異体は BCR のキャッピングとの共局在が見られなかったが、CMTM3 の野生型では BCR のキャッピングとの共局在が見られた。

(3) FLAG-CMTM3を安定発現させたマウスB細胞株BAL17を用いて、抗FLAG抗体により細胞膜のCMTM3を標識し、BCR架橋によるBCRエンドサイトーシスを観察したところ、細胞膜のCMTM3がBCRと共にエンドサイトーシスされた。

(4) BCR 架橋による CMTM3 及び BLNK の局在変化を観察したところ、CMTM3 と BLNK は、BCR 架橋後一時的に細胞膜に局在し、その後 CMTM3 のみエンドサイトーシスした BCR との共局在が見られた。

(5) BLNK 欠損マウス及び野生型マウスから脾臓 B 細胞を単離し、架橋による BCR エンドサイトーシスを調べたところ、野生型マウスと比べ BLNK 欠損マウスの脾臓 B 細胞において BCR エンドサイトーシスの遅延が見られた。

以上のことより、CMTM3は、BLNKと共に架橋によるBCRの膜複合体で機能し、その後、BCRと共にエンドサイトーシスされることで、BCRエンドサイトーシスに機能していることが明らかとなった。

CMTMファミリーは、2003年にCKLF2と相同性を有する分子群としてデータベースより同定されたが、それらの機能や生理的意義は殆ど不明であった。唯一、昨年になってCMTM3はヒト前立腺癌由来の細胞株における解析からアンドロゲン受容体の転写活性に関与していることが報告された(Wang et al, BBRC, 2008)。それとは別に、CMTM3はアダプタータンパク質BLNKと結合する分子として当研究室で同定されており、本研究における解析の結果、BCRエンドサイトーシスに機能していることが明らかとなり、リンパ球系細胞での生理的意義を初めて見出すことができた。また、BLNKはこれまでB細胞の活性化・増殖に必要であることは知られていたが、本研究においてBCRエンドサイトーシスでの機能を明らかにすることができた。

B細胞における重要な細胞機能として効率

的な抗原提示があげられるが、この効率的な抗原提示が行われるためには、抗原が迅速に捕捉され細胞内へとエンドサイトーシスされた後プロセッシングされることが重要となる。本研究結果から、CMTM3とBLNKは迅速なBCRエンドサイトーシスに必要であり、BCRエンドサイトーシスのメカニズムの一端を明らかにすることができた。

今後、BCRエンドサイトーシスの詳細なメカニズムを明らかにするため、CMTM3とBLNKの新たな相互作用分子の探索や他のCMTMファミリーの関与について解析することが必要であると考えられる。また、本研究結果からCMTM3は初期エンドソームにも一部局在しており、このことから、BCRリサイクリング経路にも関与している可能性が示唆される。その一方で、CMTM3は樹状細胞やマクロファージにも発現しており、これら細胞でのファゴサイトーシスにも関与している可能性が考えられる。これらCMTM3の機能解析が、リンパ球系細胞での更なる研究の進展に繋がることが期待される。

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)

[学会発表] (計1件)

① 與五沢里美、B細胞抗原受容体のエンドサイトーシスに関与するCMTM3/BNAS2 の機能解析、第30回日本分子生物学会、2007. 12. 13、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

與五沢 里美 (YOGOSAWA SATOMI)

群馬大学・生体調節研究所・グローバルCO
E 研究員
研究者番号：60392437