

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790466

研究課題名 (和文) 記憶 B 細胞の分化・維持における IgG 抗原受容体の細胞質領域の果たす役割の解析

研究課題名 (英文) Analysis of the role of cytoplasmictail in IgG molecule for the development and the sustention of memory B cells

研究代表者

藤堂 景史 (TODO KAGEFUMI)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：50452561

研究成果の概要(和文):記憶 B 細胞に発現する IgG 分子は進化的に保存された cytoplasmic tail を有する。しかしながら、この cytoplasmic tail の生理的役割は明らかでない。そこで本研究では、この IgG cytoplasmic tail の果たす役割を明らかにすることを目的とした。

その結果、IgG cytoplasmic tail は IgG 分子の細胞表面への安定な発現に寄与しており、さらにはそのリン酸化が、IgG のより安定な発現に寄与していることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文): The IgG molecule expressing on the memory B cells have the evolutionarily conserved cytoplasmic tail. However, the physiological role of the IgG cytoplasmic tail is not clear. Therefore, the purpose of this study was to clarify the role of the cytoplasmic tail of IgG molecule.

As a result, the cytoplasmic tail of IgG contributed to the stably expression of the IgG molecule on the cell surface, and its phosphorylation contributed to more stably expression of the IgG on the cell surface.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫記憶

## 1. 研究開始当初の背景

免疫システムは生体の持つ、外来の病原体を効率よく排除するシステムであり、このシステムが不全であれば、感染症を引き起こす

こととなる。反対にこの排除システムが過度に機能しすぎると、免疫システム自身が自己を攻撃し、自己免疫疾患やアレルギーなどの原因となる。しかし通常はこのような自己を

攻撃しうる細胞は迅速に排除される。

獲得免疫の最大の特徴の一つが、一度感作した抗原に再び感作すると迅速にその抗原を排除する応答が起こることであり、これは免疫情報が記憶細胞へと保存されるためである。この免疫情報の記憶は、仮に自己に害をもたらす応答が存在しても記憶されるため、異常な免疫情報の蓄積は、自己免疫疾患やアレルギーの原因の一つとなりうる。そこで、獲得した免疫記憶を制御しリセットすることができるならば、自己免疫疾患やアレルギーの克服につながると考えられる。

体液性免疫の中心である B 細胞は、免疫情報を記憶する細胞の一つであり、免疫情報の蓄積は記憶 B 細胞の pool として維持される。B 細胞は抗原特異的受容体 (BCR) を細胞表面に発現しており、抗原選択性を実現するために、B 細胞の分化や活性化は BCR からのシグナル依存的に進行する。しかしながら、免疫情報の蓄積を担う記憶 B 細胞への分化とその維持において BCR シグナル分子群がどのような役割を果たしているかという点については国際的にも少数の研究のみが行われてきており、不明な点が多く残されている。

BCR は膜型免疫グロブリンとシグナルコンポーネントである  $Ig\alpha/\beta$  分子から成る。primary な免疫応答を担っている naïve B 細胞は IgM クラスの BCR を細胞表面に発現しているのに対して、記憶 B 細胞は細胞表面に IgG クラスの BCR を発現している。BCR からのシグナルはシグナルコンポーネントである  $Ig\alpha/\beta$  分子依存的に細胞内へと伝わると考えられているため、どの isotype の免疫グロブリンが発現しているとしても BCR から伝わるシグナルは、 $Ig\alpha/\beta$  によって活性化される一連の分子によるものであるはずである。しかしながら記憶 B 細胞への分化は、IgM 型 BCR から伝わるシグナルとは異なったシグナルが細

胞内へと伝わり、異なるシグナル分子が活性化された結果、その最終的な output であると予想される。この違いが何に起因するかは明らかでない。

## 2. 研究の目的

獲得免疫応答においては、生体に侵入した異物に対して特異的な B 細胞集団の一部が、抗原レセプター (BCR) からの活性化シグナルを受け免疫監視システムの中心的な細胞の一つである記憶 B 細胞へと分化すると考えられている。この理論を支持する報告として、BCR シグナル伝達に欠損のある xid マウスにおいて記憶 B 細胞の形成に不全があることが示されており、記憶 B 細胞の形成に BCR シグナルが重要な役割を果たしていることが強く示唆されている。

そこで、本研究では、膜型免疫グロブリンの cytoplasmic tail の違いに着目した。IgM クラスの BCR cytoplasmic tail は Lys-Val-Lys 3 残基のみから成っており、これは動物種間で非常に保存されている。これに対して、IgG クラスの cytoplasmic tail は 28 アミノ酸残基から成る。これまでに免疫グロブリンの cytoplasmic tail が免疫応答に及ぼす役割については、いくつかの報告があり、IgG1、IgE の tailless mutant マウスではそれぞれのクラスの免疫応答と免疫記憶が著しく減少するなど、記憶 B 細胞の分化・維持に関わっている可能性を予想しているが実際にどのような分子メカニズムによって記憶 B 細胞の分化や維持に寄与しているかは明らかではない。そこで本研究では免疫グロブリンの cytoplasmic tail が実際に記憶 B 細胞の分化と維持に寄与しているかどうかを検討し、cytoplasmic tail のどの領域がその機能に関与しているかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

抗原架橋による BCR からのシグナルは免疫グロブリンの isotype に関係なく、BCR のシグナルコンポーネントである Ig $\alpha$ / $\beta$  依存的に開始されるが、抗原刺激を受けた際の振る舞いは、naïve B 細胞などの IgM ポジティブ B 細胞と記憶 B 細胞などの IgG ポジティブ B 細胞では異なる。この違いが何に起因するかを調べるために IgM と IgG の cytoplasmic tail の違いに着目した。IgM クラスの cytoplasmic tail は-Lys-Val-Lys という、3 アミノ酸残基のみであり、これは動物種間で非常に保存されている。それに対して IgG クラスの cytoplasmic tail は 28 アミノ酸残基から成り、これもまたサブクラス間や他の動物種間でも保存されている。そしてこの 28 アミノ酸残基の中には、tyrosine kinase の認識配列である、YXXM モチーフが存在し、どのサブクラスにおいても保存されている。本研究では、この tyrosine が、既知あるいは未知の kinase の基質となり、リン酸化されることで下流へとシグナルを伝達することで記憶 B 細胞への分化や維持に寄与していると予想した。そこで、代表的な IgG のサブクラスである IgG1 の cytoplasmic tail の mutant を作成することで IgG クラスの cytoplasmic tail が B 細胞のシグナルさらには記憶 B 細胞への分化・維持にどのような寄与をしているかを調べた。

様々な IgG1 cytoplasmic tail mutant をマウス B 細胞株である A20 細胞および非 B 細胞株である 293 細胞に発現させることで、IgG1 cytoplasmic tail の役割を解析しようと試みた。A20 細胞は IgG2a<sup>+</sup>細胞株であるため、性質は記憶 B 細胞に近いと考えられる。発現させる mutant は tyrosine kinase のリン酸化モチーフである YXXM の tyrosine を phenylalanine に置換したもの (Y/F mutant)、

リン酸化 tyrosine をミミックするために、tyrosine をグルタミン酸に置換したもの (Y/E mutant)、IgM 型の cytoplasmic tail を持った mutant (TL mutant) を強制発現させた。しかしながら細胞株に発現遺伝子を強制発現させるとランダムにゲノムに組み込まれるので、clonal variation が生じ、組み込まれた部位の違いによる clone 間での違いが生じる可能性がある。そこで、ゲノムに組み込まれる部位を一定にし clonal variation をなくすために、特定の遺伝子座に gene construct をノックインすることができる flip-in system (invitrogen) を利用する。これにより、同じ遺伝子座に組み込まれた mutant クローンを作成し、それぞれの mutant の比較をおこなった。

また、IgG 分子は重鎖と軽鎖からなるヘテロ四量体であり、非 B 細胞株である 293 細胞に遺伝子導入する際には、抗体重鎖/軽鎖遺伝子の両方を導入する必要があり、非常に煩雑である。そこで重鎖のみで発現できるような IgG 重鎖可変部領域/定常領域の一部を緑色蛍光タンパク GFP に置換したような IgG1 発現コンストラクトを作成し、このコンストラクトを 293 細胞へ発現させることで解析を行った。

### 4. 研究成果

IgG 分子の cytoplasmic tail の生理的意義を解明するために、研究方法にあるような、種々の IgG1 mutant を B 細胞株である A20 と非 B 細胞株である 293 細胞に発現させた。その結果、A20 に発現させたものでは、どの mutant を発現させても、IgG1 の発現レベルに違いはなかった。しかしながら、非 B 細胞株である 293 細胞に発現させたところ、野生型の IgG1 を発現させたものでは、一部の細胞でのみで細胞表面へと発現したのに対し、

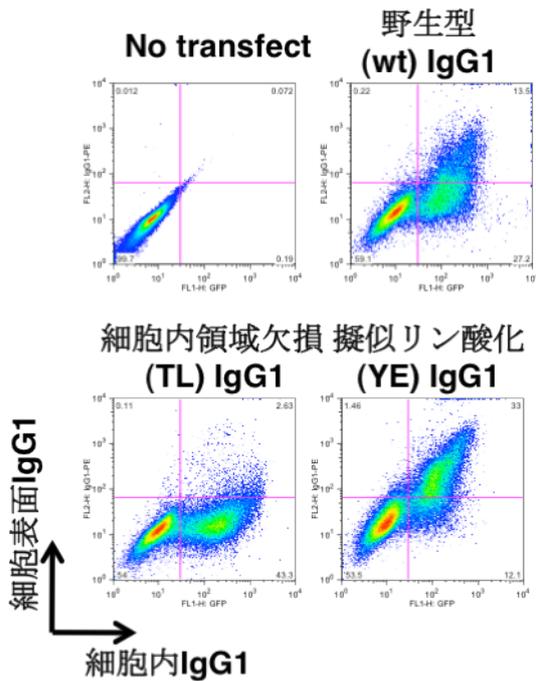


Fig. 1

Y/F mutantやTL mutantは、ほとんど細胞表面へと発現することができなかつた。また、驚くべきことに、リン酸化 tyrosine をミミックした Y/E mutant を発現させたところ、ほとんどの細胞で IgG1 分子を細胞表面へ発現することができ、その発現レベルも野生型に比べて非常に高いレベルであった (Fig. 1)。

A20 と 293 細胞におけるそれぞれの IgG1 mutant の発現パターンの違いが何に起因するかを検討するために、BCR のシグナルコンポーネントである  $Ig\beta$  のノックダウンを試みた。それぞれの mutant を発現する A20 細胞の  $Ig\beta$  の発現を siRNA を用いてノックダウンしたところ、野生型の IgG1 を発現させたものでは、 $Ig\beta$  のノックダウンにより IgG1 分子発現レベルが著しく低下した。一方、Y/E mutant を発現させたものでは、 $Ig\beta$  ノックダウンしたにもかかわらず、IgG1 の細胞表面への発現レベルの低下は認められなかつた (Fig. 2)。

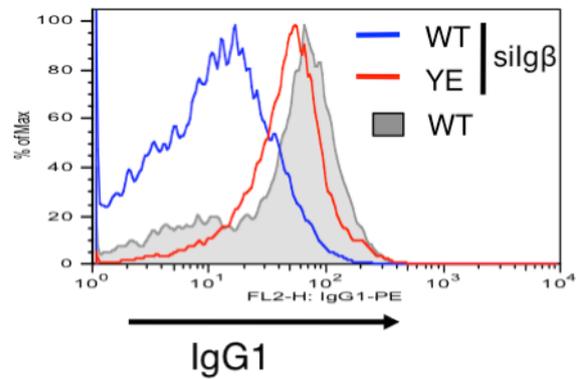


Fig. 2

これらのことより、IgG 分子の cytoplasmic tail は  $Ig\beta$  分子の発現依存的に、IgG 分子の細胞表面への安定化に寄与しており、さらには、cytoplasmic tail の tyrosine がリン酸化されることで、より IgG 分子が細胞表面に安定に発現できることがわかつた。

## 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 2 件)

① Kagefumi Todo and Masaki Hikida  
Requirement for CD79b down-regulation in germinal center B cells for normal affinity maturation  
2011 Keystone Symposia B Cells: New Insights into Normal versus Dysregulated Function, 353, April 12-17, 2011 Whistler, British Columbia, Canada

② Kagefumi Todo and Masaki Hikida  
Physiological function of tyrosine phosphorylation in IgG1 cytoplasmic tail  
14<sup>th</sup> International Congress of Immunology, PP-081-12, Aug. 22-24, 2010 Kobe, Japan

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤堂 景史 (TODO KAGEFUMI)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：50452561