

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790482

研究課題名（和文） リソソーム蛋白LAPTM5によるBCRの分解機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of BCR degradation by a lysosomal protein LAPTM5

研究代表者

大内田 理佳 (OUCHIDA RIKA)

独立行政法人理化学研究所・免疫多様性研究チーム・研究員

研究者番号：80391887

研究成果の概要(和文):細胞表面の抗原受容体は、リンパ球の活性化制御に重要な役割を果たす。なかでも、活性化の終結は、抗原受容体の細胞内での分解という積極的なプロセスを経て制御されている。本研究では、リソソーム蛋白 LAPTM5 が、B 細胞抗原受容体(BCR)のリソソームでの分解システムを介した BCR 発現制御により、①B 細胞の活性化や免疫応答を調節すること、②自己応答性の B 細胞の出現を抑制的に制御している可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文):Modulation of antigen receptor expression is an important mechanism for the regulation of immune responses. We demonstrate that LAPTM5 regulates BCR levels and immune response by BCR degradation in lysosomes and LAPTM5-mediated BCR downmodulation is an important mechanism to prevent B cell hyperactivation and autoantibody production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：リソソーム、B細胞抗原受容体、B細胞活性化、自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

B細胞表面の抗原受容体(BCR)は、抗原刺激を受けると活性化シグナルを伝達するととも

に、急速に細胞内へと取り込まれ、リソソームで分解されることにより細胞表面上のBCR発現量が一過性に減少する。これは、BCR

から入るシグナルを調節し、過剰な免疫応答を抑制するための極めて重要なシステムである。これまでに、BCRの細胞内への取り込みに関わる分子群およびそのメカニズムは明らかにされつつあるが、一方で取り込まれたBCRがどのような機構で蛋白分解の場であるリソソームに認識および輸送され、分解されるかはまったく不明のままである。

我々はこれまでに、LAPTM5がT細胞において、抗原刺激に伴って細胞内に取り込まれたT細胞抗原受容体(TCR)のCD3と鎖の分解を促進することにより、T細胞表面のTCRレベルを低下させ、T細胞の過剰活性化を抑制することを明らかにした(*Immunity* 29:33-43, 2008)。

本研究では、リソソーム蛋白LAPTM5によるBCR発現制御機構の解析およびその生理的意義について検討を行った。

2. 研究の目的

本研究では、LAPTM5によるBCR発現制御の詳細な分子機構を明らかにするために、(1)BCRの分解促進に必要なLAPTM5の機能ドメインの同定、(2)Ig α /Ig β のITAM変異体を用いたLAPTM5の標的分子および標的領域の同定、(3)BCR発現量を制御する既知のメカニズムとの機能的相互関係の解明、および(4)LAPTM5と相互作用する蛋白の同定を行う。また、(5)LAPTM5欠損マウスにおける自己免疫疾患の発症亢進の有無を解析し、BCR分解制御の生理的な重要性を明確にする。

3. 研究の方法

平成22年度

(1)BCRの分解促進に必要なLAPTM5の機能ドメインを同定する。LAPTM5全長蛋白ならびに種々の欠失変異蛋白をB細胞株WEHI231で強制発現させ、内在性BCR複合体の蛋白レベルを調べる。

(2)Ig α /Ig β のそれぞれのITAM変異体発

現ベクターを構築し、HEK293T細胞などの強制発現系を用いて、LAPTM5との物理的相互作用の有無を抗LAPTM5抗体を用いた免疫沈降により検討する。このとき、ITAMの領域欠失変異体および点変異体などを用いて、LAPTM5との相互作用におけるITAM修飾の依存性の有無を解析する。

(3)既知のBCR発現制御に関わる分子群との機能的相互関係を明らかにするため、Cb1やSLAP欠損マウスとLAPTM5欠損マウスを掛け合わせたマウスを作出し、BCR発現量、B細胞応答ならびに自己抗体の出現に、それぞれの単独マウスとの違いがあるか否かを比較する。

平成23年度

(4)LAPTM5と物理的および機能的に相互作用する蛋白を同定する。すでに作製したLAPTM5を認識する3種類のモノクローナル抗体およびウサギポリクローナル抗体を用いて、LAPTM5を免疫沈降したあと、共沈蛋白について、ウェスタンブロットさらにマスペクトルを用いて同定する。同定したLAPTM5結合分子の既知の報告を参考にして、特にその細胞内局在に注目し、BCRがリソソームへと移行するスキームにおいて、LAPTM5がどのような機構で関与しているかを示唆する。

(5)Ig α /Ig β のそれぞれのITAM変異体ノックインマウスとLAPTM5欠損マウスの掛け合わせマウスを樹立し、抗原刺激後のBCR発現および分解における異常の有無を検討する。

(6)LAPTM5欠損マウスと自己免疫疾患を自然発症する*lpr*あるいはNODマウスとのかけ合わせマウスを樹立し、自己免疫疾患の発症促進に果たすLAPTM5の役割を明らかにする。

4. 研究成果

平成22年度

LAPTM5 欠損 B 細胞における抗原刺激後の BCR の発現レベルが、野生型に比して有意に亢進していることが *in vitro* の解析で判明した。この時、CD19 や CD40 の発現は野生型と比べて違いが認められなかったことから、LAPTM5 が BCR の発現を特異的に制御している可能性が示唆された。さらに、LAPTM5 欠損マウスを T 細胞依存性抗原 NP-CGG で免疫した際、野生型と比較して B 細胞上の BCR 発現量の上昇および抗原特異的な B 細胞集団の増加が認められ、抗体産生量が顕著に増加していた。LAPTM5 による BCR の発現制御を明確にするために、B 細胞株で野生型 LAPTM5 を強制発現させると、細胞表面の BCR 発現量が LAPTM5 の発現量に依存して低下し、リソソーム阻害剤によってこの BCR 低下が回復した。即ち、LAPTM5 による BCR 発現制御がリソソームに依存していることが示唆された。また、LAPTM5 の過剰発現により BCR 複合体の蛋白量が減少すること、さらに細胞内で LAPTM5 と BCR 複合体が共局在し、物理的に相互作用していることを、免疫染色および免疫沈降法により明らかにした。細胞表面の BCR は、抗原刺激に曝されると活性化シグナルを伝達するのみならず、抗原を細胞内に取り込み、MHC class II 分子を多く含むレイトエンドソーム様コンパートメント (MIIC) での分解を介した抗原提示においても重要な役割を果たす。しかしながら、LAPTM5 欠損マウスと NP に特異的に結合する V_H186. 2DFL16. 1J_H2 ノックインマウス (B1-8^{hi}) との掛け合わせマウスを用いて、*in vivo* における抗原提示能を調べたところ異常が認められなかったことから、LAPTM5 は BCR を介した抗原提示機能には関わらないことが示唆された (*J. Immunol.* 185 294-301, 2010)。

平成 23 年度

BCR 分解に果たす LAPTM5 の機能ドメインの探索を行った。種々の LAPTM5 変異体を B 細胞株 WEHI231 に導入したところ、ユビキチン結

合ドメイン変異体のみならず、3 か所の PY ドメインに点変異を導入した変異体でさえも、BCR の downmodulation を促進する機能を保持していた。この結果から、LAPTM5 による分解機構が、T 細胞受容体と B 細胞受容体では異なる可能性が示唆された。

SPF 環境下で長期飼育した LAPTM5 欠損マウスにおける自己免疫疾患の自然発症の有無を評価した。野生型に比して LAPTM5 欠損マウスでは、血中の IgM レベルが有意に上昇し、IgM および IgG 型抗 dsDNA 抗体の蓄積が観察された。さらに、Hep2 細胞を用いた核染色の結果から、IgG 型抗核抗体が LAPTM5 欠損マウスで観察された。また、組織化学的な解析において、LAPTM5 欠損マウスの腎糸球体における自己抗体沈着を認めた。すなわち、LAPTM5 による B 細胞抗原受容体の発現制御が、生理的に極めて重要なシステムであることを提示した。

BCR 分解制御のカスケードにおいて、これまでに知られている Cb1-b との機能的な相互作用を、Cb1-b と LAPTM5 の二重欠損マウスを樹立し解析した。その結果、抗原刺激後の細胞表面 BCR の発現量が二重欠損マウスで相加的に上昇していたことから、LAPTM5 が Cb1-b とは異なる経路で BCR の分解を制御している可能性が示唆された。一方、長期飼育マウスでの IgM 上昇ならびに抗 dsDNA 抗体の蓄積が、単独欠損マウスでそれぞれ上昇していたが、二重欠損マウスでの相加的な増加は観察されなかった。従って、2 つの BCR 分解経路の破綻が、劇的な自己免疫疾患誘発には繋がらないものの、自己応答性の B 細胞の抑制に重要であることが判明した。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 狩野智恵、大内田理佳、古久保哲朗、王繼揚、Rapid cell division contributes to efficient induction of A/T mutations during Ig gene hypermutation. Molecular Immunology、査読有、48巻、2011、1993-1999
- ② 大内田理佳、黒崎知博、王繼揚、A role for lysosomal-associated protein transmembrane 5 in the negative regulation of surface B cell receptor levels and B cell activation. The Journal of Immunology、査読有、185巻、2010、294-301

[学会発表] (計 1 件)

- ① 大内田理佳、The lysosomal protein LAPTM5 negatively regulates B cell activation and antibody production by downmodulating cell surface BCR expression. 2010年8月22-27日、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大内田 理佳 (OUCHIDA RIKA)

独立行政法人理化学研究所・免疫多様性研究チーム・研究員

研究者番号：80391887

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし