

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20877

研究課題名（和文）新規免疫異常症原因遺伝子SBN02の活性制御分子メカニズムの解析

研究課題名（英文）Investigation about the molecular mechanism of SBN02-mediated immunodysregulation

研究代表者

目黒 和行（Kazuyuki, Meguro）

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40769626

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：SBN02はATPaseと思われる構造を有しRNAと結合することから、SBN02はRNAヘリケースとして標的と結合し、その代謝を制御することにより免疫系の遺伝子発現を制御して免疫の恒常性維持に関与している可能性が示唆された。そこで我々はSBN02のin vitro ATPase assayを行った。その結果、野生型SBN02のATPase活性が証明された。K284Aタンパク、および患者由来変異体については解析途中である。本結果より、SBN02はATPase活性を有し、その機能に必須である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は本研究者らのグループらによって同定された新規遺伝性免疫異常症の原因遺伝子であるSBN02の活性制御に関して新たな知見を与えるものであり、その学術的意義は大きい。本遺伝子が原因で起こる免疫異常症はその存在がまだ知られおらず、原因不明の遺伝性免疫異常症患者にも本遺伝子欠損患者が含まれている可能性があり、それらの患者の適切な診断、治療に結びつく可能性が高く、社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：SBN02 has a structure that appears to be an ATPase and binds to RNA, suggesting that SBN02 may bind to targets and regulate their metabolism as an RNA helicase. Therefore, we first performed an in vitro ATPase assay to determine whether SBN02 has an ATPase activity. We transfected FLAG-tagged SBN02 to HEK293T cells including wild type, a patient-derived mutant, and a known helicase dead mutant (K284A). We purified SBN02 protein and subjected the proteins to in vitro ATPase assay. We found that wild-type SBN02 has ATPase activity. We are comparing the ATPase activity between wild type and mutants. These results suggest that SBN02 has ATPase activity and may be essential for its function.

研究分野：遺伝性免疫異常症

キーワード：免疫異常症 免疫不全症 RNAヘリケース 免疫学 遺伝学

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

単一遺伝子の変異によって引き起こされる先天性免疫異常症患者を同定・研究することは、“Experiments of nature”とも称され、ヒトにおける免疫制御の分子メカニズムに新しい発見をもたらす。これまで、免疫系の研究はノックアウトマウスを用いた reverse genetics が主流であった。このアプローチは宿主防御機構および免疫制御機構に関わる重要な分子群を特定し、自然免疫系/獲得免疫系の分子メカニズムの解明において大成功をおさめた。しかし、齧歯類を用いた免疫研究から得られた知見を臨床医学に還元する際に、ヒトと齧歯類の免疫系の違いという本質的な問題に直面することも多い。この問題点に対して、10年ほど前から発達してきた Whole-exome/genome sequencing などの DNA シーケンス技術を背景に、米国、フランスを中心に、先天性免疫異常症（免疫不全、自己免疫/自己炎症、アレルギー）患者のゲノムを網羅的に解析し、原因遺伝子を同定することによって、遺伝子異常とヒト免疫疾患の関連を直接的に示すクリニカルゲノミクスが発展してきている。本手法は、ヒト免疫系の根本的な制御メカニズムに関してノックアウトマウスを用いた研究では明らかにならなかった新たな知見をもたらさう。

本申請研究者は、ヒト免疫疾患の発症に重要な未知の遺伝子の同定を目的に 2017 年から 2022 年 3 月まで米国 National Institutes of Health にて先天性免疫異常症コホートのクリニカルゲノミクス研究に従事してきた。そして(1)免疫異常症(免疫不全症、自己炎症)、(2)骨代謝異常、(3)血液学的異常を特徴とする新規免疫異常症患者を 5 家系 9 人同定し、Whole-exome sequencing によりこの症候群が

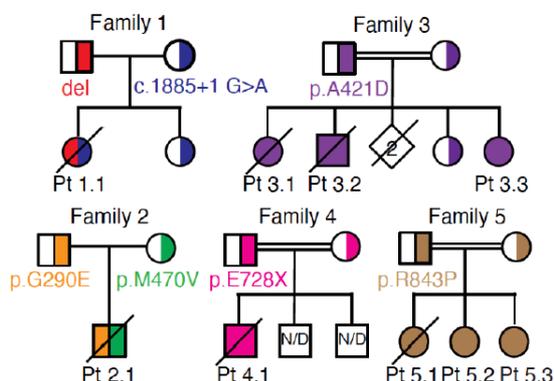


図1 新規免疫異常症SBNO2欠損症患者の家系図

Strawberry Notch Homologue 2 (SBNO 2) の機能喪失変異によって発症することを見出した(図1)。SBNO2 欠損細胞では自己炎症疾患で中心的な役割を担う Nuclear Factor-kappa B (NF-κB)、Janus kinase (JAK)/Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) 経路の活性化、及び免疫不全症を説明する Type I interferon (IFN) 経路、IFN $\gamma$  経路の不活性化が観察された。Photo-activatable ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation (PAR-CLIP)を用いた分子生物学的解析から、SBNO2 は核内で新生 RNA と結合し、その結合部位は転写開始点に近く、標的遺伝子の転写活性を促進することを示した。さらに、SBNO2 の標的遺伝子群は、骨髄系細胞の活性化を担う遺伝子を多く含んでおり、SBNO2 欠損症患者由来の骨髄系細胞は殺菌能が低下していることを示し、SBNO2 機能喪失変異による新規免疫異常症を同定するとともに、その発症機序を明らかにした(論文投稿中)。

## 2. 研究の目的

上記先行研究は、SBNO2 の機能喪失がヒト免疫異常症の発症原因となることを示す直接的な証拠であり、SBNO2 はヒト免疫系のホメオスタシス制御に必須な分子であると考えられるが、その活性制御メカニズムは不明である。本申請研究者らが行なった構造解析から、SBNO2 は ATP-ase ドメインを含む helicase であると推定されるため、その活性制御機構を解明することは免疫調節機構の理解に加え、低分子化合物による創薬戦略において非常に重要な情報となる。興味深いことに、患者由来の変異は helicase 活性に重要な ATP-ase ドメインに集中しており（図 2）、SBNO2 の機能に ATP-ase 活性が必須である可能性が高い。しかし（1）SBNO2 が ATP-ase 活性を有するか否か、（2）SBNO2

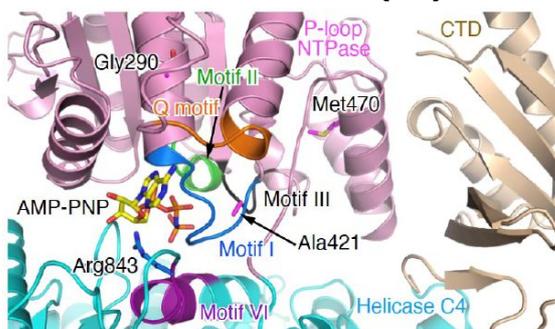


図 2 患者変異のATP-ase付近への高度な集積

の ATP-ase 活性は SBNO2 標的遺伝子の転写促進に必須か否か、は依然不明である。また、（3）SBNO2 の機能を制御する相互作用分子は知られていない。

従って本申請研究では（1）SBNO2 は ATP-ase 活性を有するか？、（2）ATP-ase 活性を有する場合、その活性は骨髄系細胞の殺菌能及び活性化遺伝子群の転写促進

に必須か？、（3）SBNO2 の機能を制御する相互作用因子は何か？、を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### （1）SBNO2 の ATP 結合能、及び ATP-ase 活性の検討

SBNO2 が ATP-ase 活性を示すかどうかを検討するために、in vitro ATP-ase assay を行う。酵素学的に活性のあるヒト SBNO2 を精製するため、HEK293T 細胞に FLAG-HA タグを付加したヒト SBNO2 (FLAG-HA hSBNO2)を過剰発現させ、細胞溶解後、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行う。沈降物に FLAG ペプチドを加えて FLAG-HA-hSBNO2 を溶出後、ゲル濾過クロマトグラフィーにて精製する。

精製した SBNO2 タンパクに fluorescent ATP analogue である TNP-ATP を結合させ、野生型及び患者由来 SBNO2 変異体（G290E, A421D, M470V, R843P）の ATP 結合能を評価する。ATP-ase 活性を持たないコントロールとして、ATP-ase Walker A NTP-binding ドメイン内のリジン（NTP のリン酸基に結合）に相当する 284 番目のリジンをアラニンに置換した人為的な変異体（K284A）及び Walker B NTP-binding ドメイン内のアスパラギン酸（Mg<sup>2+</sup>を介して NTP の 1 位、2 位のリン酸基に結合）をアラニンへ置換した変異体（D387A）を使用する。ATP-ase 活性を示す陽性コントロールとして、すでに ATP-ase 活性が証明されている野生型 Moloney Leukemia Virus 10（MOV10）タンパクを用いる。

次に精製した野生型 SBNO2 及び患者由来 SBNO2 変異体と ATP、Mg を混和し、ヒト細胞から精製した Total RNA で SBNO2 を刺激後 ATP-ase 活性を測定し、野生型 SBNO2 及び患者由来 SBNO2 変異体の ATP-ase 活性を比較する。

#### 4. 研究成果

SBNO2 は ATPase と思われる構造を有し RNA と結合することから、SBNO2 は RNA ヘリケースとして標的と結合し、その代謝を制御することにより免疫系の遺伝子発現を制御して免疫の恒常性維持に関与している可能性が示唆された。そこで我々はまず SBNO2 が ATPase 活性を持つかどうかを調べるために in vitro ATPase assay を行った。HEK293T 細胞に FLAG タグを付加した野生型 SBNO2 と患者由来の変異体、及び ATP-ase 活性に重要なモチーフとして知られている Walker A ドメインの活性を弱める変異体

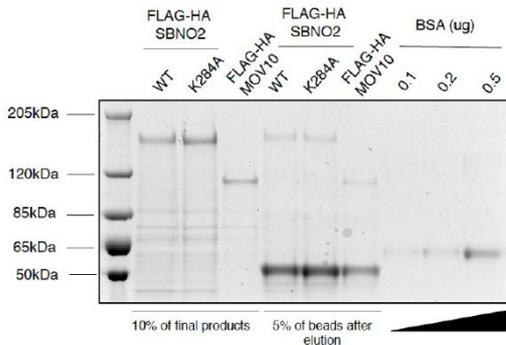


図3 哺乳類細胞から精製したSBNO2タンパク

(SBNO2K284A)を過剰発現させ、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降及び限外濾過フィルターを用いて SBNO2 タンパクを精製した(図3)。陽性コントロールとして ATP-ase 活性を持つことが示されている RNA helicase MOV10 の野生型タンパクも精製した。これらのリコンビナント蛋白に基質 RNA(HEK293T 由来核 RNA)、Mg イオン、ATP を加え反応させ、ATP が加水分解された時に生じる無機リン酸を定

量した。その結果、野生型 SBNO2 及び MOV10 で無機リン酸の産生を認め、SBNO2 の ATPase 活性が証明された。SBNO2K284A 変異体については野生型 SBNO2 と比較して ATPase 活性の低下を認めた。本結果より、SBNO2 は ATPase 活性を有し、その機能に必須である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kurihara Shunjiro, Suzuki Kotaro, Yokota Masaya, Ito Takashi, Hayashi Yuki, Kikuchi Ryo, Kageyama Takahiro, Meguro Kazuyuki, Tanaka Shigeru, Iwata Arifumi, Goto Yoshiyuki, Suto Akira, Nakajima Hiroshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Eosinophils Contribute to Oral Tolerance via Induction of ROR t-Positive Antigen-Presenting Cells and ROR t-Positive Regulatory T Cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 89 ~ 89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom14010089	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iida Kazuma, Suga Kensuke, Suzuki Kotaro, Kurihara Shunjiro, Yabe Yoko, Kageyama Takahiro, Meguro Kazuyuki, Tanaka Shigeru, Iwata Arifumi, Suto Akira, Nakajima Hiroshi	4. 巻 664
2. 論文標題 A role of Achaete-scute complex homolog 2 in T follicular regulatory cell development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 9 ~ 19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.04.065	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kazuyuki Meguro, Dimitrios G. Anastasakis, Huie Jing, Jacinta Bustamante, Yesim Aydinok, Yu Zhang, Mark D. Fleming, Jean-Laurent Casanova, David Genevieve, Michael J. Lenardo, Markus Hafner, Helen C. Su
2. 発表標題 Unwinding the molecular pathogenesis of a novel inherited immunodysregulatory disorder caused by loss-of-function mutations in DExD/H box helicase SBN02
3. 学会等名 日本免疫学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------