

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 22 日現在

機関番号：12611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591459

研究課題名(和文) ヒトSLE関連多型部位に見出された新たなFc受容体会合モチーフの解析

研究課題名(英文) Analysis of the novel FcγR transmembrane interface motif displaying a polymorphism associated with human SLE susceptibility

研究代表者

本田 善一郎 (HONDA, Zen-ichiro)

お茶の水女子大学・保健管理センター・教授

研究者番号：70238814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：FcγRIIA膜貫通部位全長にわたる28種類のCys置換体を安定発現するB細胞株を確立し、様々な条件下で架橋実験を行ったところ、FcγRIIAは予想されていなかった複雑な非刺激時受容体会合、架橋時再会合を起こすことが解った。再会合は受容体情報伝達に必須の過程である。FcγRIIB I232T多形は同定された相互作用部位の1つに存在し相互作用を変容する。受容体構造機能関連に関してさらに構造生物学的、分子動力学的な検討を始める予定である。

研究成果の概要(英文)：We have prepared 28 Cys mutants spanning the transmembrane domain of FcγRIIA, stably expressed in human B cells, and the cells were analyzed for Cys crosslinking under unligated, and ligated conditions. We identified unexpectedly complicated TMD assembly and reassembly mechanisms under resting, and activated conditions, and these structural alterations are all responsible for the signal stabilization, and the signal activation. We extrapolated the findings in FcγRIIA to FcγRIIB I232T autoimmune disease promoting polymorphism, and found that the amino acid substitution does alter the mode of the TMD association.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：膠原病・アレルギー内科学

キーワード：Fc受容体 膜貫通部位 遺伝子多型 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

IgG Fc 受容体 (FcγR) は免疫複合体の貪食処理を行うとともに細胞内活性化 (ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motif)、抑制 (ITIM: Inhibitory Motif) モチーフを介して樹状細胞、NK 細胞、多核白血球、マクロファージなど自然免疫細胞、および B 細胞の機能調節を行い、自然免疫、液性免疫の調節を介して感染防御および免疫恒常性の維持、自己免疫疾患発症の抑制に必須の役割を担っている。

FcγRIIB は唯一の抑制型 Fc 受容体であり、マスト細胞、マクロファージに加え B 細胞系に発現し、炎症、アレルギーの制御、さらに B 細胞受容体 (BCR)、Toll 様受容体経路の抑制、プラズマ細胞アポトーシスを通して液性免疫の恒常性維持に働く。FcγRIIB 欠損マウスはヒト全身性エリテマトーデス様の疾患を発症するので、FcγRIIB は免疫恒常性のマスターキー分子であることが判明している。

FcγR 遺伝子群は遺伝子重複により染色体 1q21-23 にクラスターを形成し、そこには数多くの調節多型、構造多型、コピー数多型が確認されており、これらは自己免疫疾患と強く関連する。

我々は FcγR 初期シグナルに注目し、その Src PTK 依存性および特異性 (FcγR, FcεR と Lyn, Hck の共役) を解明し、FcγR, FcεR が細胞膜画分、脂質ラフトに移行して Lyn, Hck と近接することを示した (Honda Z. et al. Mol. Cell. Biol. 2000, Kono H. et al. J. Immunol. 2002)。

さらに我々はヒト全身性エリテマトーデスに関連する FcγR IIB 膜貫通部位 (transmembrane domain、以下 TMD) 多型 (I232 T) が脂質ラフトから排除される機能欠損異常であることを見出した (Kono H. et al. Hum. Mol. Genet. 2005, Honda Z. Springer Sem. Immunopathol. 2006)。

この知見は FcγR TMD がシグナル伝達に必須のドメインであることを意味するが、TMD がシグナル伝達に関わるメカニズムは解明されていない。

2. 研究の目的

FcγR シグナルには大きな空白が残されており、受容体の細胞外多価架橋 (凝集) がいかなる機構で膜貫通部位 (TM) を通して細胞内 ITAM モチーフのリン酸化へと伝達されるかは明らかにされていない。この問題に対する一つのアプローチは、TM を含めた FcγR 多量体の構造を検討することだが、“多価架橋 (凝集)” という曖昧な表現に見られるように、定まった高次構造、会合様式があるという認識は大勢とは言い難い。

本研究では最も単純な単量体構造をとる、FcγRIIA を対象として膜貫通部位 (TMD) に想定される会合部位を詳細に検討し、TMD 多量体構造の有無を確かめる。予想通りに受容体 TMD2 量体、多量体が存在する場合は、シ

グナル伝達にどの様に関わるか、そのメカニズムを解明する。

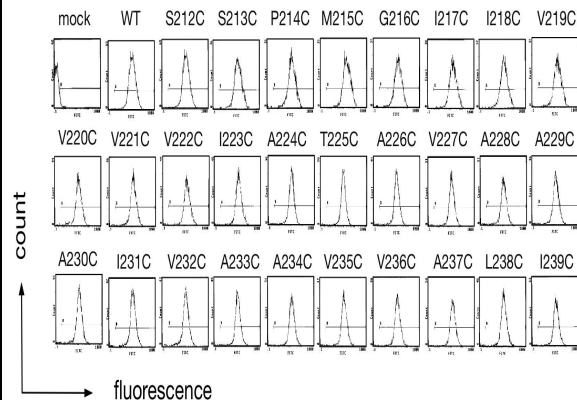
我々はヒト全身性エリテマトーデスに関連する FcγR IIB 膜貫通部位 (transmembrane domain、以下 TMD) 多型 (I232 T) が脂質ラフトから排除される機能欠損異常であることを世界に先駆けて発見し報告している。本研究に寄って得られる知見を、FcγRIIA と高い構造相同性を示す FcγR IIB に敷衍し、ヒト自己免疫疾患発症に関わる FcγR IIB I232T 多形がどの様に受容体会合に影響を与えるかを詳細に検討し、さらに全身の免疫調節に影響を与えるメカニズムを解析する。

FcγRIIA、IIB TMD の特異的化合部位が解明されれば、新たな治療薬剤の分子内標的部位となり、治療剤スクリーニング法を考案することができる。

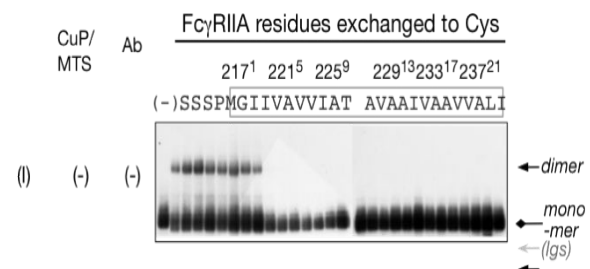
3. 研究の方法

FcγRIIA の細胞外膜近傍部分 (juxtamembrane domain, JMD) および膜貫通部位 (TMD) 全長の Cys 変異導入を行い、全ての置換体をヒト B 細胞株に安定発現した。

すべての置換体はほぼ同程度の膜発現をした。



これらを酸化刺激 (銅錯体刺激) Cys 特異的架橋試薬を用いて TMD 架橋に供し、TMD 近接部位をマッピングした。同様の架橋実験を受容体 2 価、多価凝集の後に行い、受容体刺激時に初めて近接する部位をマッピングした。



検出された相互作用部位に変異導入を行い、変異によって TMD 架橋が消失すること、細胞内シグナル伝達が減弱することを確認し、当該部位が確かに TMD 相互作用に重要であること、さらに、TMD 相互作用がシグナル伝達に必須であることを Syk,Erk 活性化、受容体チロシンリン酸化の減弱を指標に、確認した。

FcγRIIA を対象とした検討で見出された TMD 相互作用部位と相同な FcγRIIB 部分の Cys 変異体を作製、さらにヒト SLE 発症のリスクとなる I232T 変異を導入して、疾患関連多形が FcγRIIB 多量体形成にどの様に影響するかを検索した。

4. 研究成果

FcγRIIA JMD、TMD 全長にわたる 28 種類の Cys 置換体を安定発現する B 細胞株を確立し、様々な条件下で架橋実験を行った。

極めて興味深いことに、FcγRIIA は予想されていなかった複雑な非刺激時受容体会合、及び架橋時の TMD 再会合を起こすことが解った。TMD 会合、再会合は受容体の機能抑制及び情報伝達活性化に必須の過程であった。

さらに TMD に 2 ヶ所の特異的会合部位があること、その構造がグリシン・ジッパーとして知られる構造であることが解った。

さらなる情報から、TMD の非刺激時の構造、刺激時の多量体構造がシグナルの安定化、活性化の機構と密接に結びついていることが判明した。

これらの新規情報から、新たな受容体非活性化、活性化と受容体 2 量体形成、刺激時採光性による多量体形成と、受容体リン酸化、細胞内シグナル伝達を関係付ける新たなシグナル伝達スキームを描くことができる。

現在分子動力的研究、理論生物学研究の専門家との議論を行っており、原子間相互作用の階層からシグナル伝達を理解する検討を試みている。

FcγRIIB I232T 多形は TMD 相互作用部位の 1 つに存在する。さらに興味深いことに、I232T 多形はその相互作用を強めることが解った。

FcγRIIB I232T 多形は多くの研究者からすでに膜貫通部位多形のプロトタイプとして扱われ、膜貫通部位構造とシグナル伝達の間を考察する重要な材料として広い注目を集めている最近では、I232T 多形のヒトから骨髓を採取し、免疫不全マウス骨髓に再構成したヒト化マウスが作成されている。同マウスは免疫亢進状態、自己免疫状態を生じ、疾患モデルとして極めて有用な可能性がある。しかし、多形機能の分子的理解は、我々が 2005-2006 に発表した、脂質ラフトからの排除という細胞生物学的機構変化から進歩してはいない。疾患関連多形が実際に構造変化を与えるという今回の知見は、多形に寄って生じる最上流の異常を検出している。したがって疾患発症に対する深い洞察を与える可能性がある。

今回の結論から、受容体機能の変化に関して

容易に複数の仮設が想定される。現在、構造生物学的、分子動力的な検討を始める予定であり、疾患発生のメカニズムにさらに近接し、治療標的の同定へと進む予定である。これらの結果は現在投稿準備中である。

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)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Nishibe R, Watanabe W, Ueda T, Yamasaki N, Koller R, Wolff L, Honda Z-i, Ohtsubo M, Honda H.

CIZ1, a p21^{Cip1/Waf1}-interacting protein, functions as a tumor suppressor *in vivo*. **FEBS Lett.** 587: 1529-1535, 2013 DOI: 10.1016/j.febslet.2013.03.034.

査読あり

2. Ueda T, Sanada M, Matsui H, Yamasaki N, Honda Zi, Shih LY, Mori H, Inaba T, Ogawa S, Honda H.

EED mutants impair polycomb repressive complex 2 in myelodysplastic syndrome and related neoplasms. **Leukemia** 26, 2557-2560, 2012 DOI:10.1038/LEU.2012.146.

査読あり

3. Honda H, Takubo K, Oda H, Kosaki K, Tazaki T, Yamasaki N, Miyazaki K, Moore KA, Honda Zi, Suda T, Lemischka IR.

Hemp, an mbt domain-containing protein, plays essential roles in hematopoietic stem cell function and skeletal formation. **Proc Natl Acad Sci USA** 108, 2468-2473, 2011

DOI: 10.1073/pnas.1003403108.

査読あり

4.

[学会発表](計 2 件)

1. 上田 健, 真田 晶, 松井啓隆, 山崎憲政, 本田善一郎, 森 啓, LEE-YUNG SHIH 稲葉俊哉, 小川誠司, 本田浩章.

MDS で同定されたポリコローム複合体構成因子 EED の機能欠失型変異体の解析

第 74 回日本血液学会

平成 24 年 10 月 19 日 京都

2. 津久井大輔, 岡本明子, 大久保麻衣, 浅子来美, 本田善一郎, 河野肇, 滝川一

横断性脊髄炎を呈した全身性エリテマトーデスの一例

第 599 回日本内科学会 関東地方会

平成 23 年 4 月 14 日 東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

本田善一郎 (HONDA Zen-ichiro)

お茶の水女子大学・保健管理センター・教授
研究者番号: 70238814

(2)研究分担者

本田 浩章 (HONDA Hiroaki)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号：40245064

(3)連携研究者 なし