

機関番号：12601
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2011
 課題番号：23659497
 研究課題名（和文） IL-17 受容体の細胞内情報伝達経路の解明
 研究課題名（英文） The molecular mechanism of signal transduction of IL-17 receptors
 研究代表者
 中江 進 (NAKAE SUSUMU)
 東京大学・医科学研究所・特任准教授
 研究者番号：60450409

研究成果の概要（和文）：
 IL-17 受容体ファミリーは5つの遺伝子（IL-17RA-RE）が知られているが、その細胞内情報伝達経路に関しては不明な部分が多い。本研究では、IL-17 受容体ファミリーの細胞内領域に直接結合する分子を同定し、それぞれの分子の細胞内情報伝達機構を明確にすることを試みた。

研究成果の概要（英文）：
 Five molecules, IL-17RA through IL-17RE, have been identified as members the IL-17 receptor family. However, the molecular mechanism(s) of signal transduction via these molecules is poorly understood. In the study, we attempted to identify adopter molecules that bind directly to the intracellular domains of IL-17 receptors and clarify their pathways of signal transduction downstream of each receptor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：アレルギー学

1. 研究開始当初の背景

獲得性免疫応答に主要な役割を持つヘルパーT細胞において、IFN- γ ⁺ Th1 細胞とIL-4⁺ Th2 細胞に加えて、最近、IL-17A や IL-17F を産生する Th17 細胞が新しく同定された。それに伴い、免疫系における Th17 細胞および IL-17 の重要性が近年、注目を集めている。申請者らは IL-17 ファミリーサイトカインの欠損マウスを作製し、これらを用いて、感染症、アレルギーや自己免疫疾患の発症及び病態形成における IL-17 ファミリーサイトカインの役割の解明に世界に先駆けて取り組み、当該分野では世界をリードしてきた (Immunity, 17, 375, 2002; Immunity, 30, 108, 2009; Allergol Int, 59, 399, 2010)。

IL-17 および IL-17 受容体ファミリーは、図1のようなリガンド-受容体の対をなす。しかしながら、

IL-17B、IL-17C および IL-17E の受容体、また、IL-17RD および IL-17RE に結合するリガンドは不明である(注:現在では、IL-17C は IL-17RA と IL-17RE のヘテロダイマーを受容体とすることが明らかになっている)。さらに、IL-17 ファミリーサイトカインによる細胞内情報伝達経路について

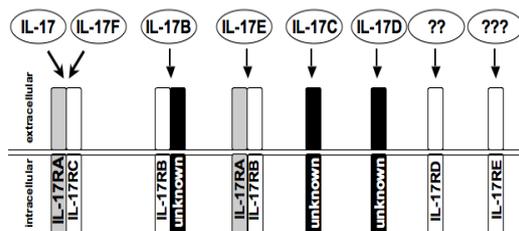


図 IL-17-IL-17Rファミリー

も多くが未解である。

2. 研究の目的

IL-17 受容体ファミリーは、細胞内領域に共通の構造「SEFIR ドメイン」をもつ。IL-17 の作用は、IL-17RA の SEFIR ドメインに Act1 が結合し、TRAF6 を介して伝達される。一方で、IL-17 の作用は、Act1 欠損マウスの細胞でも見られるため、Act1 以外の分子の関与が示唆されている。そこで、本研究ではよく分かっていない IL-17 受容体ファミリーの細胞内情報伝達経路を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) IL-17 受容体ファミリーの細胞内領域に結合する分子の探索

酵母ツーハイブリッドスクリーニングシステムにより、IL-17RA、IL-17RB、IL-17RC、IL-17RD、IL-17RE に直接結合する因子を同定する。それぞれの細胞内領域部分を bait とし、prey にはそれぞれのレセプターの発現が強く確認される細胞由来の cDNA ライブラリーを用いてスクリーニングを行う。具体的には、出芽酵母(*S.cerevisiae*)で発現させることのできる ADH1 プロモーターの下流に GAL4-DNA binding domain とレセプターの細胞内領域を融合させるように構築したベクターを用いて bait を発現させる。Prey として、GAL4-activation domain と、目的の細胞由来の cDNA を融合させるように構築したライブラリーを酵母内にて作製したものを用いる。

同定した因子が、レセプターに刺激が入力した後に、実際にその細胞内領域に結合するのか否かを確認する。まずレセプターに既知のリガンド、もしくは架橋抗体を使用しシグナルが入力した状態の細胞を、非還元・非変性条件下で処理し、レセプターに対する抗体を用いてレセプター複合体を免疫沈降させる。この複合体を native-PAGE した後、同定した因子に対する抗体を使用し、western-blotting にてレセプター複合体に目的の因子が含まれているかを確認する。

異なるリガンドに対して異なる細胞内反応がみられるレセプターに関しては、これらの違いに注目し、レセプターやその細胞内領域に結合する因子のリン酸化を含めた修飾等を解析する。

(2) リガンドが不明な IL-17 受容体ファミリーに結合するアゴニスト抗体の作成

IL-17RD、RE はリガンドが同定されていない。そのため、これらのレセプターにリガンドが結合した後に起こる一連のシグナル伝達機構を解析できない。そこで、IL-17RD、RE の細胞外領域を認識する抗体を用いてレセプターを架橋させ、擬似的にシグナルを細胞内へ伝達させることにより、シグナル伝達

因子の解析を可能にしたい。現在、両レセプターを特異的に認識する良い抗体が存在しないので、これらレセプターの細胞外領域について、大腸菌発現ベクターを利用してタンパク質を得た後、ウサギまたはラットに免疫し、ポリクローナル抗体を得る。

4. 研究成果

(1) IL-17 受容体ファミリーの細胞内領域に結合する分子の探索

IL-17受容体ファミリー (IL-17RA-RE) の細胞内情報伝達に関わる因子を同定することを目的とする。IL-17RAの細胞内領域に結合するとされる因子群Act1、TRAF6、およびTAK1の3因子が、他のIL-17受容体ファミリーの細胞内領域に直接、結合しうるかどうか評価を行った。IL-17RBの細胞内領域には、3因子のうちTAK-1は結合したが、Act1とTRAF6は結合しなかった。IL-17RC、IL-17RDおよびIL-17REの細胞内領域には、3因子のいずれも結合しないことが明らかになった。マウスの脾臓と肝臓のライブラリーをもとに、酵母ツーハイブリッドにより、IL-17RBの細胞内領域に直接結合する新規分子の探索を行った。その結果、脾臓では5クローン、肝臓では40クロンの候補を同定した。

(2) リガンドが不明な IL-17 受容体ファミリーに結合するアゴニスト抗体の作成
リガンドが不明であった IL-17RD および IL-17RE の生理的役割を評価するためのツールとして、それらの分子に対する刺激抗体の作製を目的とした。そこで、抗体作製に用いる抗原として、IL-17RD および IL-17RE の細胞外領域のリコンビナントタンパク質を大腸菌にて発現させるシステムの構築とその精製を試みた。それらリコンビナントタンパク質を大腸菌で発現させることは可能であったが、発現した IL-17RD および IL-17RE の細胞外領域のリコンビナントタンパク質はともに疎水性タンパク質であったため、PBS に可溶化できず精製できなかった。そのため、発現ベクターとして pCold vector とシャペロンを利用する系に変更し、それらリコンビナントタンパク質の可溶化に成功した。今後、このリコンビナントタンパク質の精製を行い、これを抗原として抗体の作製を行う。

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)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中江 進 (NAKAE SUSUMU)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：60450409

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

南部 あや (NAMBU AYA)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：10456197