

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860161

研究課題名(和文) サイトカイン受容体のユビキチン非依存性小胞輸送

研究課題名(英文) Ubiquitin-independent endosomal sorting of cytokine receptors

研究代表者

天野 勇治 (AMANO, Yuji)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：50624681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：IL-2受容体 鎖、IL-4受容体 鎖がユビキチン非依存性に小胞輸送され、またその輸送の分子機序としてユビキチン依存性小胞輸送に関わるHrsが受容体の細胞内領域の疎水性アミノ酸クラスターに結合して小胞輸送を司っていることを報告してきた。本研究では疎水性アミノ酸クラスターが小胞輸送シグナルとして機能することを明らかにすると共に、Hrsによる小胞輸送の新たな制御機構を提案した。

研究成果の概要(英文)：We had reported that ubiquitin-independent endosomal sorting mechanism of interleukin-2 receptor (IL-2R) and interleukin-4 receptor (IL-4R). Hrs, which is also involved in an ubiquitin-dependent endosomal sorting, binds the hydrophobic amino acids clusters of the receptors and sorts the receptors into endosomes. Here, we elucidated that the hydrophobic amino acids clusters act as endosomal sorting signal and suggest Hrs controls endosomal sorting by novel manner.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞輸送

1. 研究開始当初の背景

免疫系や神経系では、細胞内の高度に分化した区画を維持しながら、かつ綿密にその区画間の連絡を行っている。この困難な機能が破綻無く働いている背景に、この機能を支えている小胞輸送の存在がある。細胞膜タンパク質のリソソームへの小胞輸送は、従来知られていたユビキチンを目印としたユビキチン依存性小胞輸送が主なルートと考えられてきた。一方、ユビキチン非依存性の小胞輸送ルートの存在も報告されていたが、その存在意義は重要視されていなかった。我々はサイトカイン受容体を例に取り、未だ不明な点の多い小胞輸送機構を分子レベルで解明することを試みた。我々はこれまで IL-2 受容体β鎖 (IL-2Rβ)、IL-4 受容体α鎖 (IL-4Rα) がユビキチン非依存性小胞輸送されること、またその輸送の分子機序を初めて明らかにした (Journal of Biological Chemistry, 286, 15458-15472, 2011)。この解析からユビキチン“依存性”小胞輸送を担う分子、「Hrs」が、ユビキチン“非依存”の小胞輸送にも機能していることが、新たに見出された。

サイトカイン受容体の中でも最も良く解析されている Epidermal growth factor(EGF)受容体は、EGF を受け取ってそのチロシンキナーゼが活性化され、さらに internalization されると共に、その細胞内領域に単体のユビキチン (モノユビキチン) が結合する。このモノユビキチンは、ユビキチン依存性の小胞輸送装置である ESCRT 複合体に捕らえられるが、始めに ESCRT-0 に捕らえられた EGF 受容体は次に ESCRT-I、-II、-III そしてリソソームへとバケツリレーの如く手渡され、最終的に分解される。「Hrs」は ESCRT-0 の構成因子の 1 つであり、その分子内にモノユビキチンと会合するための UIM (Ubiquitin interacting motif) モチーフを含むことから、モノユビキチン化された種々のサイトカイン受容体を最初に認識す

る分子である。IL-2Rβも当初、ユビキチン依存性に小胞輸送されると考えられていたが、我々は IL-2Rβの小胞輸送にユビキチンが関与しないこと、一方、「Hrs」は関与することを見出した (Journal of Cell Science, 121,1727-1738,2008)。そしてさらに解析を進め、「Hrs」は関与するが、ユビキチンには依存しない小胞輸送の分子機序を IL-2Rβと IL-4Rαを用いて明らかにした (Journal of Biological Chemistry, 286, 15458-15472, 2011)。

2. 研究の目的

細胞膜受容体のリソソームへの小胞輸送は、従来知られていたユビキチンを目印としたユビキチン依存性小胞輸送と、我々が見出したユビキチン非依存性の小胞輸送の 2 つのルートがある。我々は IL-2 受容体β鎖 (IL-2Rβ)、IL-4 受容体α鎖 (IL-4Rα) がユビキチン非依存性に小胞輸送されること、またその輸送の分子的基盤を明らかにした。本研究では、このユニークな小胞輸送ルートを辿るサイトカイン受容体の小胞輸送の分子機構を明らかにすると共に、小胞輸送がアトピー等免疫疾患へ関与するかどうかを検討する。

Hrs は IL-2Rβおよび IL-4Rαの細胞内領域の疎水性アミノ酸クラスターに会合して、受容体を小胞輸送へと導く一方、Hrs は STAM と通常会合してヘテロ 2 量体として存在している。この場合、STAM は Hrs の機能を補助するとこれまで報告されてきた。即ち、STAM は Hrs の補助分子という位置づけである。しかし、この補助分子という位置づけは、Hrs がユビキチン依存性に小胞輸送に関わるときの評価であり、本研究で明らかにしたユビキチン非依存性の小胞輸送に関わるかは明らかでない。そこでユビキチン非依存性の小胞輸送における Hrs の機能を STAM との 2 量体で再度評価することを

試みる。

受容体細胞内領域の小胞輸送に関わるアミノ酸の1次配列は「小胞輸送シグナル」と呼ばれ、この輸送シグナルをトランスフェリン受容体などのC末端に連結すると、このキメラ受容体は recycle endosome に輸送されず、リソソームへと輸送される。そこで我々は IL-2R β の疎水性アミノ酸クラスター (365-369 : FFFHL) を通常 recycle endosome に輸送される IL-2R α の細胞内領域 C 末端に連結して、その細胞内輸送を観察した。しかしこの IL-2R α のキメラ受容体はリソソームに輸送されず、野生型の IL-2R α と同様に recycle endosome へ輸送された。さらに、IL-2R β の細胞内領域全てを IL-2R α の C 末端に連結すると、このキメラ受容体はリソソームへと輸送された。この結果とこれまでの解析結果より、疎水性アミノ酸クラスターは小胞輸送に必須の領域であるが、完全な「小胞輸送シグナル」として働くためには未だ未同定の領域があることを示唆している。この輸送シグナルの未同定アミノ酸が、前述の新たなアレルギー疾患関連の遺伝子多型並びに変異に含まれるかどうかを IL-4R α 並びに IL-2R β の双方で検討する。疎水性アミノ酸クラスター (IL-2R β : FFFHL ; IL-4R α : LFLDLL) はこれまで述べてきたように、小胞輸送に必須の領域である。従って、この領域のアミノ酸のわずかな変異も免疫系に少なくない影響を与えると予想される。そこで疎水性クラスター領域を中心に、アトピー疾患患者末血リンパ球を用いて遺伝子多型を探索する。上記で述べたように、疎水性クラスター領域以外の領域も小胞輸送に影響を与えることが分かっているので、受容体の細胞内領域全体の遺伝子多型を探索する。

3. 研究の方法

(1) Hrs を欠失した細胞は細胞内に空胞が形成される。同様に Hrs を細胞に過剰に発現

させても空胞形成が認められる。しかし、このメカニズムは分かっていない。このような空胞形成時に Hrs/STAM 2 量体がどのような状態かは分かっていない。一方、Hrs は細胞質存在下では Hrs/STAM 2 量体を形成していることは既に分かっているが、細胞膜上ではオリゴマーを形成しているとの報告もある。Hrs/STAM 2 量体の細胞膜上の動態は小胞輸送の要と考えられるが、その詳細はほとんど解析されていない。従って、Hrs と STAM の量比が小胞輸送に深く関与すると考えられ、その検討を行う。

(2) IL-2R β 及び IL-4R α の疎水性アミノ酸クラスターについて、クラスターを含む種々の変異体を作製して IL-2R α の細胞内領域につなぎ、「小胞輸送シグナル」として機能するための条件を探る。即ち、疎水性アミノ酸クラスターの機能を補完する領域とその特性を明らかにする。

(3) IL-2R β および IL-4R α の細胞内領域の Hrs 結合部位は 4 ~ 5 個の疎水性アミノ酸クラスター (IL-2R β : FFFHL ; IL-4R α : LFLDLL) であり、この 4 ~ 5 個の疎水性アミノ酸を他のアミノ酸に置換すると、Hrs は結合できず、小胞輸送が妨げられた。また、上述のようにシグナルの増強が観察された。この部位のわずかなアミノ酸変異も、ヒトの免疫系に少なくない影響を与える可能性がある。そこでアトピー等アレルギー疾患について、この疎水性クラスター変異の有無を、患者末梢血を用いて探索する。

IL-4R α からのシグナルがアレルギー反応に関わっていることは、ノックアウトマウスをはじめ種々の研究より明らかであるが、受容体の変異とアレルギー増悪との関連は判っていない。従来の疾患と遺伝子座間の網羅的解析は単一アミノ酸変異に依存するものには有効であるが、本研究のような、1つの機能に複数のアミノ酸が関わる条件下では絞り込みが困難である。IL-4R α では 576 番目のグルタミンがアルギニンに置換してい

る例で、喘息と有意な関連が認められている。ただし、これは変異ではなく、遺伝子多型である。他の部位の遺伝子多型で、アトピーとの関連が示唆されているのは C431R があり、また喘息とアトピーに関連する E400A などが報告されている。一方、今回の疎水性アミノ酸クラスター(410-415)についての報告はない。この部位の変異が5つの疎水性アミノ酸全てに入ることはほとんど無いと考えられることから、ヒトの変異が存在するとすれば、それは1つか、もしくは2つが妥当と思われる。このようなバックグラウンドを踏まえつつ、アトピー等アレルギー疾患の末梢血を用いて、IL-4R α 疎水性アミノ酸クラスターの変異をスクリーニングする。アレルギー疾患としてはアトピーと喘息を取り上げる。

4. 研究成果

(1) STAM は Hrs を小胞膜上より乖離させる

Hrs の過剰発現は細胞内に空胞を形成する。この空胞は Hrs の単体で形成されていると推論されるが、ここに STAM を過剰発現させると空胞が消失した。また、この時 Hrs と STAM は細胞質に拡散していた。このことは STAM により細胞膜上の Hrs が乖離して、異常空胞が解消された可能性を示唆する。次に Hrs 欠失細胞を用いて実験を行った。Hrs 欠失細胞もまた、細胞内に空胞が形成される。Hrs 欠失細胞を固定して、細胞膜をジキトニン処理すると小孔が形成される。ここに大腸菌で作製し、蛍光色素で標識したリコンビナント Hrs を添加すると、空胞膜上に Hrs が集積する様子が見られた。さらにリコンビナント STAM を加えて経時変化を見た。すると STAM 添加後時間経過と共に蛍光 Hrs が空胞より消失した。この結果は STAM が細胞膜より Hrs を遊離させたことを強く示唆する。即ち、STAM が Hrs を小胞膜から遊離させることにより小胞輸送が正常に行われ、Hrs が小胞膜上

に留まると、小胞輸送が障害されて空胞が形成されることを示唆している。そして Hrs 欠失細胞の空胞形成は小胞輸送に重要な Hrs が欠失しているために小胞輸送が妨げられて、生じていると考えられる。

(2) 小胞輸送シグナルとしての疎水性アミノ酸クラスター

サイトカイン受容体が初期エンドソームから後期エンドソームへと小胞輸送される過程において、受容体中の短いアミノ酸配列が小胞輸送のためのドメインとなっている。この小胞輸送に関わるアミノ酸の1次配列は「小胞輸送シグナル」と呼ばれる。一方、IL-2R β 及び IL-4R α の細胞内領域のアミノ酸クラスター領域を recycle endosome に輸送される IL-2R α の細胞内領域 C 末端に連結して、その細胞内輸送を観察すると、IL-2R α のキメラ受容体はリソソームに輸送されず、野生型の IL-2R α と同様に recycle endosome へ輸送された。このことはアミノ酸クラスターのみでは「小胞輸送シグナル」として不足であり、さらにアミノ酸クラスターを捕捉する領域か、もしくはアミノ酸クラスターを補完する特性がまだ同定されていないことを示唆する。そこで IL-2R β の細胞内領域の種々の変異体を作製して IL-2R α C 末端に連結した。アミノ酸クラスター単独ではリソソームに輸送されないが、IL-2R β のどの領域を用いてもリソソーム輸送が観察された。無論、アミノ酸クラスター領域の欠失した変異体は全くリソソーム輸送されない。以上のことは、アミノ酸クラスター領域の下流にある程度の長さのアミノ酸鎖があれば必要十分であることを示唆する。

そこで IL-2R β 及び IL-4R α の疎水性アミノ酸クラスター領域に受容体とは全く異なる green fluorescence protein である EGFP 中のアミノ酸を30残基連結した。無論、EGFP の30アミノ酸のみを連結した IL-2R α はリソソーム輸送されなかったが、IL-2R β 及び

IL-4R α の疎水性アミノ酸クラスター領域にEGFPの30アミノ酸連結したIL-2R α キメラ受容体はリソソーム輸送された。このことは疎水性アミノ酸クラスターが有効に働くためには、C末端に30アミノ酸程度の長さがあれば十分であることを示している。即ち、疎水性アミノ酸クラスターの立体構造の安定化に寄与していると考えられる。以上より、疎水性アミノ酸クラスターは小胞輸送シグナルであると結論づけられる。

(2) IL-4受容体 α 鎖とアレルギー

IL-4とIL-13はアトピー発症に深く関連するIgE産生を促進する。両サイトカインは同じ受容体に結合する。即ち、IL-4受容体鎖(IL-4R)とIL-13受容体鎖は2つ一組で同一の受容体を構成している。このようなバックグラウンドから、IL-4Rのアトピー発症への関与がこれまで解析されてきた。IL-4Rの遺伝子多型は16個同定されており、その内8個がアミノ酸置換を伴う。喘息と関連が指摘されている遺伝子多型としてI50V、I75V、E375A、S411L、R511QおよびQ576などがあり、アトピー性皮膚炎と関連が指摘されているものとしてI50Vなどが報告されている。我々は喘息のある小児の末血よりDNAを抽出し、IL-4Rの細胞内領域の解析を行ったところ、疎水性アミノ酸クラスター(LFLDLL)のN末方向から5番目のロイシン(L)にG/T置換を見出し、その結果CTG/CTT(Leu/Leu)となり、アミノ酸の変わらないサイレンス変異であることが分かった。前述の喘息に関わると示唆されている576番目のグルタミンがアルギニンに置換するQ576Rは、55人中11名に見出された。一方、これまで報告のない遺伝子多型として、TCG/TCAがあるが、Ser/Serとなるサイレンス変異であった。もう1つはAGC/GGCでSer/Glyとなるが1名のみで、機能に及ぼす影響はこれからの課題である。

5. 考察

1)本研究ではIL-2受容体鎖とIL-4受容体鎖について、ユビキチン非依存性の小胞輸送の機序を解析する過程で「小胞輸送シグナル」として疎水性アミノ酸クラスター「FFFHL」ならびに「LFLDLL」を見出し、「小胞輸送シグナル」として機能することを証明した。当初、このアミノ酸クラスターをリサイクルされるタイプの受容体に挿入して、その機能を検討したが、リソソームへの小胞輸送が起こらないことから、疎水性アミノ酸クラスターを補助する新たな領域があると仮定した。しかしその後の解析により、補助に働く特異的な領域はなく、疎水性アミノ酸クラスター「FFFHL」ならびに「LFLDLL」に引き続いて十数アミノ酸残基があれば、「小胞輸送シグナル」として働くことが分かった。このことは疎水性アミノ酸クラスターがその立体構造を安定的に保つために、C末端に余分なアミノ酸残基が存在すれば十分機能することを意味している。これらの解析は、サイトカイン受容体とアレルギー等疾患との関わりを解析するための基盤研究となり、引き続きアレルギーとサイトカイン受容体の遺伝子多型との関連解析を行った。アレルギーの遺伝的素因を解析するために行われたゲノムワイド解析は、複数の遺伝子座において遺伝子多型(SNP)を抽出した。ただし、これらの遺伝子多型は人口の数十%を占める、いわゆるcommon SNPである。これらcommon SNPはどのゲノムワイド解析でも同様にオッズ比にすると2前後である。分かりやすく言えば、コントロール群である健常人と比較して2倍アレルギーになりやすいという値である。2倍程度のオッズ比ではその他の要因、即ち、人種や環境要因に大きく影響を受け、ある環境状態では差がないとする結果も容易に出てくる事態が生じる。従って、疾患との関連が見出された遺伝子多型が本質的であるかどうかは、機能との結びつきが最

も有効な情報であると考えられ、そのような視点から本研究は解析が行われている。

2) IL-4 はイムノグロブリンのクラススイッチに働き、特に IgG1 から IgE へのクラススイッチが良く知られている。IgE は即時型アレルギーに深く関連すると考えられており、喘息、アトピー性皮膚炎の重要なマーカーである。マウスに IL-4 を過剰に発現させると、IgE の上昇と喘息様症状が現れる。IL-4 の受容体は IL-4 受容体 鎖と IL-2 受容体 鎖、もしくは IL-4 受容体 鎖と IL-13 受容体 鎖で構成されている。従って、IL-4 受容体 鎖もアレルギーとの関連が示唆され、ヒト喘息における抗 IL-4 受容体 鎖抗体の投与が試みられている。一方、アレルギーと IL-4 受容体 鎖の遺伝子多型については、一定した結果が得られていない。これまで述べてきたように、大規模なゲノムワイド解析におけるオッズ比は 2 程度であり、人種や地域環境の影響が無視できないところに原因があるように思われる。人口の数十%を占める common SNP は、1 つの多型のみで疾患を引き起こすのではなく、複数の関連する遺伝子の多型が積み重なって、罹患リスクを上昇していると考えられ、関連する多型のリストが揃わないと疾患メカニズムに迫ることが困難と思われる。本研究では、2 つの新たな多型を見出した。今後、この多型と受容体機能との関連解析が必要だろう。

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)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kojima K., Amano Y., Yoshino K., Tanaka N., Sugamura K., Takeshita T.: ESCRT-0 Protein Hepatocyte Growth Factor-regulated Tyrosine Kinase Substrate (Hrs) Is Targeted to Endosomes Independently of Signal-transducing Adaptor Molecule (STAM) and the Complex Formation with STAM Promotes Its Endosomal Dissociation. **J Biol Chem** 289, 33296-33310, 2014. DOI

10.1074/jbc.M114.578245

(査読有り)

Amano Y., Yoshino K., Kojima K., Takeshita T.: hydrophobic amino acid cluster inserted into the C-terminus of a recycling cell surface receptor functions as an endosomal sorting signal **Biochem Biophys Res Commun**, 441, 164-168, 2013. DOI

10.1016/j.bbrc.2013.10.019

(査読有り)

〔学会発表〕(計 1 件)

天野勇治、小嶋克彦、吉野和寿、竹下敏一: Hrs recognizes a hydrophobic amino acid cluster in cytokine receptors during ubiquitin-independent endosomal sorting. 国際免疫学会、ミラノ、2013年8月23日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/immunobiology/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

天野 勇治 (AMANO, Yuji)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号: 50624681

(2) 研究分担者

()

(3) 連携研究者

()

(4) 研究協力者

竹下 敏一 (TAKESHITA, Toshikazu)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号: 60212023

小嶋 克彦 (KOJIMA, Katsuhiko)

信州大学・学術研究院医学系・講師

研究者番号: 80345743

吉野 和寿 (YOSHINO, Kazuhisa)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号: 40551859