

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08661

研究課題名(和文) 環状ジヌクレオチドによる関節リウマチ誘発機序の解明と新たな治療戦略の創出

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms underlying cyclic di-nucleotides-induced rheumatoid arthritis to develop novel therapeutic strategies

研究代表者

茂谷 康 (MOTANI, Kou)

徳島大学・先端酵素学研究所(オープンイノベ)・講師

研究者番号：70609049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞質に漏出したDNAは、環状ジヌクレオチドcGAMPの生成およびSTING分子の活性化を介して炎症を惹起し、関節リウマチを引き起こす。しかしながら、STINGの下流で誘導される炎症シグナル伝達機構については不明な点が多い。本研究では、STINGの下流でシェディング酵素ADAM17が活性化し、炎症性液性因子として知られるSEMA4Dが細胞外に放出される機構を発見した。また、タンパク質相互作用解析を行うための改良型BioID法を構築し、STINGと相互作用するIFITM3を新たに見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの報告では、環状ジヌクレオチドによってSTINGが活性化すると、転写因子IRF3を介してI型インターフェロンが発現誘導される機構が知られていた。しかし、関節炎の発症にはIRF3やI型インターフェロンは関与しないことから、別の炎症シグナルの存在が示唆されている。本研究では、STINGの新たな下流シグナルとしてADAM17-SEMA4D経路を発見した。関節炎の患者では関節液や血液中においてSEMA4Dの量が著しく増加することが報告されていることから、STING-ADAM17-SEMA4D経路が関節炎の新たな治療標的となる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Self-DNAs leaked out of nuclei or mitochondria into cytoplasm cause cGAMP- and STING-dependent inflammation, leading to development of polyarthritis. However, molecular mechanisms of the inflammatory signaling via cGAMP-STING are largely unclear. In this study, I found that STING activates the sheddase ADAM metalloproteinase domain 17 (ADAM17) and his activation produces soluble proinflammatory SEMA4D. I also developed an improved BioID method to analyze protein-protein interactions, and identified novel STING interactors such as IFITM3 protein.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：STING cGAMP SEMA4D BioID Tamavidin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの身体では、不要となった死細胞がマクロファージに貪食され、死細胞由来の DNA が分解される。しかし、この分解機能を失った DNase II 欠損マウスでは、蓄積した死細胞由来 DNA がマクロファージの細胞質に漏出し、マクロファージから I 型インターフェロンが過剰に分泌されることによって胎生期に重篤な貧血が引き起こされる。一方、大人になるにつれて徐々にヒト関節リウマチ様の関節炎を発症するが、I 型インターフェロンには依存しないことから、他の炎症因子の関与が示唆されている。これらの結果は、細胞質 DNA によって複数の炎症誘導経路が活性化する可能性を示唆している。その後、DNaseII 欠損マウスと STING 欠損マウスを交配することにより、貧血と関節炎の両方が抑制されることが明らかにされ、STING 分子が DNA による炎症シグナルの起点となり、その下流で I 型インターフェロンや別の炎症因子が誘導されることが示された。

研究代表者はこれまでに、細胞質 DNA によって STING 分子が活性化される分子機序について解析を進め、マクロファージが細胞質内 DNA センサー cGAS を介して DNA を感知すると cGAMP という環状ジヌクレオチドを生成し、cGAMP が小胞体膜タンパク質 STING に結合して活性化する仕組みを明らかにした。しかしながら、cGAMP によって STING が活性化してからどのような下流因子を介して炎症が惹起され関節炎が発症するのか、という問題が残されている。

2. 研究の目的

上記の背景から、cGAMP-STING 経路の下流で誘導される I 型インターフェロン産生シグナル以外の炎症シグナルが関節リウマチ発症の鍵を握ると考えられた。予備的な実験から当初は CBL1 や AP3B1 といった分子に注目していたが、STING シグナルへの関与は認められなかった。そこで、対処法として計画していた、(1) STING の活性化によって細胞外に放出される炎症性液性因子の探索、(2) BioID 法を用いた STING 相互作用因子の探索を行い、STING 下流シグナル伝達機構の全貌解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) STING の活性化によって細胞外に放出される炎症性液性因子の探索

STING が活性化することにより、サイトカインの一種である I 型インターフェロンに加え、別の液性因子が細胞外へ放出されるのではないかと予想した。そこで、RAW264.7 マクロファージ細胞株を無血清培地で培養し、cGAMP と同様に STING に結合して活性化することができる細胞膜透過性化合物 DMXAA を加えて 4 時間後に培養上清を回収した。限外ろ過によってサンプルを濃縮した後、メタノール・クロロホルム沈殿によりタンパク質を精製した。トリプシン消化後に LC-MS/MS 解析を行い、培養上清中に含まれるタンパク質を同定した。

(2) BioID 法を用いた STING 相互作用因子の探索

STING は定常状態では小胞体膜に局在するが、活性化に応じてゴルジ体やエンドソーム、リソソームなどへ輸送されることが知られている。したがって、これらのオルガネラにおいて STING の下流シグナルが発信されることが予想され、その空間において STING と相互作用する因子を同定することが重要と考えた。Proximity-dependent biotin identification (BioID) 法は、目的のタンパク質とビオチン化酵素の融合タンパク質を生きた細胞内で発現させ、目的タンパク質と近接または相互作用するタンパク質をビオチン標識することによって同定することができる強力なスクリーニング技術である。本研究ではこの手法を用いて STING の相互作用因子の大規模同定を行った。

4. 研究成果

(1) STING の活性化によって細胞外に放出される炎症性液性因子の探索

LC-MS/MS 解析によって培養上清中に含まれる 1299 種類のタンパク質を同定した。そのうち、無刺激 (DMSO) に比べて STING リガンド刺激 (DMXAA) で有意かつ 4 倍以上増加したものが 23 種類あり、既知のサイトカインである I 型インターフェロン (IFN β 1) とともに、免疫セマフォリン分子 SEMA4D を見出した。SEMA4D は細胞膜に局在する膜タンパク質であるが、STING の下流でシェディング酵素 ADAM17 が活性化することにより膜から切り離されて細胞外に放出されることが明らかとなった。また、関節炎を伴う自己炎症性疾患の患者において STING 遺伝子の恒常活性化型変異が報告されている。そこで、この STING の病態関連変異体を細胞に発現させたところ、同様に ADAM17 を介した SEMA4D のシェディングが誘導されることを発見した。この仕組みは、I 型インターフェロンが STING の下流で TBK1 キナーゼおよび転写因子 IRF3 を介して発現誘導される機構と異なっており、関節炎の発症に関与しうる新規の STING 下流炎症シグナルとして今後の研究が期待される (図 1)。

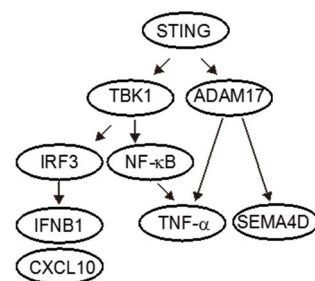
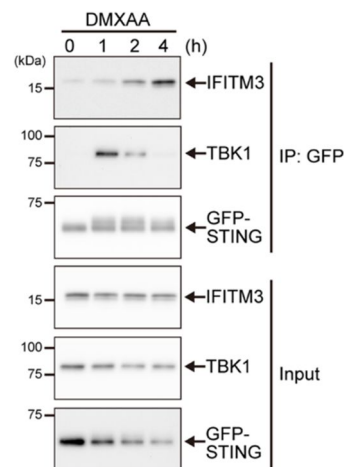
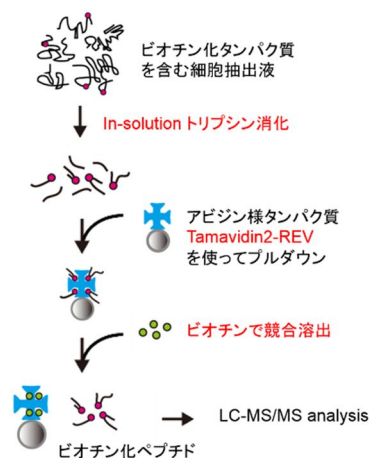


図1 STING-ADAM17-SEMA4D シグナルの同定

(2) BioID法を用いたSTING相互作用因子の探索

これまでの BioID 法では、ビオチン化タンパク質をストレプトアビジンで補足する方法が用いられてきたが、この従来の方法ではビオチン化ペプチドの検出効率が非常に悪いという問題点があった。そこで、ビオチンとの可逆的結合能を有する新規アビジン様タンパク質 Tamavidin2-REV を利用し、ビオチン化ペプチドを効率的に検出する方法を開発した(図2)。新規タマビジン法は、従来のストレプトアビジン法と比較して、ビオチン化ペプチドの検出能が約300倍増加することが明らかとなった。

新たに開発したタマビジン法を用いて STING 相互作用解析を行うため、まず STING とビオチン化酵素の融合タンパク質 (BioID-STING) を発現する細胞を樹立し、リガンド依存的に BioID-STING が核近傍のゴルジ体を集積するとともに STING と相互作用すると考えられるタンパク質が強くビオチン化されることを確認した。このビオチン化されたタンパク質を同定するため、タマビジン法を用いて質量分析を行った結果、4021 個のビオチン化ペプチドを同定することに成功した。無刺激の状態では主に小胞体タンパク質のビオチン化が検出された一方、リガンド刺激後にはゴルジ体、エンドソーム、リソソームに局在するタンパク質のビオチン化が多数認められ、上述の STING の動的挙動と一致する結果が得られた。この中には既知の相互作用因子である TBK1 や SQSTM1、パルミトイル化酵素 ZDHHC ファミリータンパク質などに加え、新規相互作用因子である interferon induced transmembrane protein 3 (IFITM3) が含まれていた。免疫沈降法による相互作用解析により、STING と TBK1 が活性化の初期 (刺激 1 時間後) に結合するのに対し、STING と IFITM3 は活性化の後期 (刺激 4 時間後) に強い結合が認められた (図3)。現在、STING と IFITM3 が活性化の後期に特異的に相互作用する意義について解析を進めており、炎症シグナル解明への手がかりになるものと期待している。また、本研究で開発されたタマビジン法は、非常に高感度なビオチン化ペプチド検出法として幅広いタンパク質相互作用研究への応用が期待できる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Motani K and Kosako H.	4. 巻 1867
2. 論文標題 Phosphoproteomic identification and functional characterization of protein kinase substrates by 2D-DIGE and Phos-tag PAGE	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta.	6. 最初と最後の頁 57-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbapap.2018.06.002.	査読の有無 有
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 Terabayashi T, Hanada K, Motani K, Kosako H, Yamaoka M, Kimura T and Ishizaki T.	4. 巻 23
2. 論文標題 Baicalein Disturbs the Morphological Plasticity and Motility of Breast Adenocarcinoma Cells Depending on the Tumor Microenvironment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes Cells.	6. 最初と最後の頁 466-479
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12584.	査読の有無 有
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 Motani K and Kosako H.	4. 巻 293
2. 論文標題 Activation of stimulator of interferon genes (STING) induces ADAM17-mediated shedding of the immune semaphorin SEMA4D.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 7717-7726
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.002175.	査読の有無 有
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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 茂谷 康
2. 発表標題 細胞質DNAによって活性化されるシグナル伝達機構とその役割
3. 学会等名 核酸代謝鶴岡カンファレンス（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 茂谷 康, 梶本 真弓美, 小迫 英尊
2. 発表標題 BioID法によるピオチン化部位の大規模スクリーニングで明らかとなったSTINGタンパク質の相互作用因子
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>徳島大学藤井節郎記念医科学センター細胞情報学分野ホームページ http://www.fujii.tokushima-u.ac.jp/cellsignaling/</p>
--

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
研究協力者	梶本 真弓美 (KAJIMOTO Mayumi)		
連携研究者	小迫 英尊 (KOSAKO Hidetaka) (10291171)	徳島大学・先端酵素学研究所・教授 (16101)	
連携研究者	内山 圭司 (UCHIYAMA Keiji) (60294039)	徳島大学・先端酵素学研究所・准教授 (16101)	

