

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590415
 研究課題名(和文) 新規 E3 ユビキチンリガーゼ、c-MIR2 欠損マウスにおける免疫機能異常の解析
 研究課題名(英文) Immunological disorder in a novel E3 ubiquitin ligase, c-MIR2 deficient mice
 研究代表者 星野 真理(大村 真理)
 (OHMURA-HOSHINO MARI)
 独立行政法人理化学研究所・感染免疫応答研究チーム・研究員
 研究者番号：10313511

研究成果の概要：

新規 E3 ユビキチンリガーゼ、MIR ファミリーは、免疫反応における抗原提示に関連する分子群、MHC クラス II、B7-2 等の膜分子をユビキチン化する事により、免疫機能を抑制することができる。このファミリーの中で c-MIR2/MARCH I の欠損マウスでは抗原提示細胞である樹状細胞に分化異常があり、その異常は MARCH I の標的分子であり、高発現している MHC クラス II の発現亢進に起因していることが明らかになった。この成果は、現在までに予想されていなかった樹状細胞の分化制御機構を明らかにできるものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2,600,000	0	2,600,000
20 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	36,000,000	300,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：E3 ユビキチンリガーゼ、MHC クラス II、樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

2000年にカポジ肉腫関連ヘルペスウイルスのもつ E3 ユビキチンリガーゼである K3/MIR1, K5/MIR2 を見出し、現在の基礎となる研究を開始した。MIR1,2 は、MHC クラス I をユビキチン化しその細胞表面における発現を顕著に抑制する事から、ヘルペスウイルスの宿主細胞傷害性 T 細胞からの回避に関与すると考えている。さらに、多くのヘルペスウイルスが哺乳類分子のホモログを持っている事から、K3/MIR1, K5/MIR2 の哺乳類ホモログを探索し、哺乳類機能相同分子として c-MIR1,2 およびその同族分子群を見出し

た。我々が2003年にc-MIRを発表した後、2004年に米国 Oregon Health and Science University の Klaus Fruh らが c-MIR を含めた分子群を MARCH と名付け報告した。さらに、2005年に東工大の広瀬茂久らは、HSPC240/MARCH II を RNAi による knock down 法により解析し、膜輸送に関与している事を明らかにしている。しかしながら、彼らは、現在、これらの分子の関与する高次機能を見出す事は出来ていない。c-MIR は異型 RING domain を活性部位とする E3 ユビキチンリガーゼ(E3)であり、その過剰発現により MHC クラス II, B7-2 の細胞表面における発現が

抑制され、抗原提示が顕著に抑制される事を明らかにした。さらに、前述の c-MIR には B 細胞に強く発現しているホモログが存在する事を見出し、その knockout(KO) mouse における B 細胞の MHC クラス II, B7-2 の発現が顕著に亢進している事を見出した。

2. 研究の目的

c-MIR2 は抗原提示細胞の分化に重要な分子であり、また、MHC class II に対してのみではなく、MHC class I, B7-2 の発現制御分子でもある事が明らかとなった。これらの事実から、次の点を明らかにする事を目的とした。(A) B7-2, MHC class II の発現亢進が抗原提示細胞の分化異常に関与するのか？(B) B7-2 も MHC class II と同様にユビキチン化による発現制御を生体内にて受けているのか？(C) c-MIR2 KO マウスにおける MHC class I の発現抑制の病理学的インパクトとその機構は？(D) c-MIR2 における標的分子(ユビキチン化される分子)は MHC class II, B7-2 の他に存在するのか？上記に挙げた A-D の疑問に答えることにより、新規 E3 ユビキチンリガーゼ c-MIR2 の異常による病理像を明らかにし、その機序を解明する事を最終目標とした。

3. 研究の方法

(1) c-MIR2 KO マウスの解析

目的の項にて述べたように、現在、c-MIR2 KO マウスにおいて樹状細胞(DC)、B 細胞における分化異常を見出している。従って、その異常の個体レベルにおけるインパクトを検討するため、以下の具体的な点を明らかにする。

①抗原チャレンジ、疾患の誘導による検討。

(a) T 細胞依存性抗原、非依存性抗原をマウスに投与し、より、詳細に抗体価の上昇を比較する。さらに、T 細胞の活性化の状態を比較する。

(b) ミエリンを過剰投与する事により、実験的自己免疫性脳脊髄炎を誘導し、発症程度を比較する。

②単離抗原提示細胞による検討。

(a) 現在、c-MIR2 KO の脾臓に存在する DC において CD4+ DC の population が減少しており、CD11C の発現が減少している。従って、CD11C にて脾臓 DC をソーターにて単離し、OVA ペプチド、OVA 反応性 T 細胞(OT-II T 細胞)を用いて、抗原提示機能を比較する。

(b) 単離された脾臓 DC を LPS 等により刺激し、

サイトカインの分泌を比較する。

(2) MHC II, B7-2 の発現制御異常と細胞分化異常の関連

c-MIR2 KO における抗原提示細胞の分化異常が、MHC II, B7-2 の発現制御機構の破綻によるものであるのかを、以下の手法を用いて検討する。

①変異型 I-A beta,あるいは B7-2 knock-in mouse の作成と解析

現在において、I-A beta 細胞内領域、K225 のユビキチン化が c-MIR2 による発現抑制に重要である事を見出している。このリジン残基はエクソン 4 にコードされている事から、このエクソンのリジン残基をアルギニンに置換したエクソンが、conditional に発現するマウスを作成し検討する。これと同様に、B7-2 のユビキチン化部位は、細胞内領域の 4 つのリジン残基である事を見出しているため、これらの残基をアルギニンに置換できるように作成する。これらのマウスは、CAG-cre、CD19-cre、LysM-cre と交配する事により、全身、B 細胞、マクロファージ等にて変異型 MHC II, B7-2 が発現する。これらのマウスにおいて MHC II, B7-2 の発現が上昇する事を確認した上で、c-MIR2 KO にて認められた脾臓 DC における分化異常の再現を検討する。さらに、(1)にて示した免疫応答の検討を、in vitro, in vivo にて行う。

4. 研究成果

c-MIR ノックアウトマウス、MARCH I ノックアウトマウス(KO)について免疫学的生理機能を検討した。

KO の T 細胞依存性抗原特異的抗体反応について、初期免疫後抗原特異的抗体産生、抗原特異的 T 細胞反応が低下していた。なお、アナフィラキシーは観察されず、自己免疫疾患の発症の指標である抗核抗体、抗 DNA 抗体についても変化を認めなかった。KO の樹状細胞(DC)については、細胞数には異常はなかったが、CD4DC の比率が減少し、サイトカイン産生、抗原提示能が低く、分化異常が示唆された。なお、c-MIR KO では、免疫学的性状の異常が見出されなかった。

次にこの DC の異常分化のメカニズムを明らかにするために、MARCH I により高発現している MHC II に起因するものか、B7-2 に起因するものかを調べた。MHC II, B7-2 それぞれの MARCH I によるユビキチン化を不活性化した

MHC II だけでもしくは B7-2 だけが高発現しているマウス, MHC II KI マウスと B7-2 KI マウスを作製し, その DC を調べた。すると B7-2 KI マウスでは異常は認められなかったが, MHC II KI マウスでは MARCH I KO と同様の分化異常が認められた。この結果から MHC II の高発現により DC の分化異常が生じることが明らかとなった。

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 Ishido S, Goto E, Matsuki Y, Ohmura-Hoshino M. : E3 ubiquitin ligases for MHC molecules. Curr Opin Immunol. : Feb 7, 2009 査読無
- ② Young LJ, Wilson NS, Schnorrer P, Proietto A, ten Broeke T, Matsuki Y, Mount AM, Belz GT, O'Keefe M, Ohmura-Hoshino M, Ishido S, Stoorvogel W, Heath WR, Shortman K, Villadangos JA Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. Nat Immunol, 11:1244-52, 2008 査読有
- ③ Goto E, Mito-Yoshida M, Uematsu M, Aoki M, Matsuki Y, Ohmura-Hoshino M, Hotta H, Miyagishi M, Ishido S. An excellent monitoring system for surface ubiquitination-induced internalization in mammals. PLoS ONE, 3(1):e1490, 2008 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 星野 真理, 松木 洋平, 吉田 麻理, 青木 雅美, 後藤 栄治, 石戸 聡: "MARCH-IによるMHC IIのユビキチン化を介した樹状細胞の維持", 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, (日本免疫学会), 12 月, 2008, 京都 .
- ② 後藤 栄治, 吉田 麻理, 青木 雅美, 松木 洋平, 星野 真理, 堀田 博, 石戸 聡: "KSHV MIR1 と MIR2 による抑制機構における相違点に関する検討", 第 56 回日本ウイルス学会学術集会, (日本ウイルス学会), 10 月, 2008, 岡山 .
- ③ Ishido S . Dendritic cell maintenance by MARCH-I through MHC II ubiquitination,

9th International Congress on Cell Biology and 20th Annual Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, (International Federation for Cell Biology), Oct. 2008, Seoul, Korea .

- ④ Hoshino M ., Matsuki Y ., Yoshida M ., Goto E ., Aoki M ., and Ishido S . : "Dendritic cell maintenance by MARCH-I through MHC II ubiquitination", 10th International Symposium on Dendritic Cells, Oct. 2008, Kobe .,
 - ⑤ 後藤 栄治, 星野 真理, 松木 洋平, 水戸 麻理, 青木 雅美, 植松未香, 石戸 聡, 主要組織適合抗原の新たな制御分子群, 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会合同大会 (BMB2007), 2007 年 12 月 15 日, 横浜
 - ⑥ Ishido S ., Hoshino M ., Goto E ., Aoki M ., Matsuki Y ., Yoshida M ., and Uematsu M . : "New players for regulation of MHC function", International Symposium on Membrane Traffic, Nov. 2007, Awaji .
 - ⑦ 星野 真理, 松木 洋平, 後藤 栄治, 水戸 麻理, 青木 雅美, 植松 未香, 石戸 聡: "樹状細胞の分化に重要な役割を持つ MARCH-I 分子", 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会, 11 月, 2007, 東京 .
 - ⑧ Ishido S ., Hoshino M ., Goto E ., Matsuki Y ., Aoki M ., Yoshida M ., and Uematsu M . : "A novel family of membrane-bound E3 ubiquitin ligases", 5th International Antigen Processing and Presentation Workshop, (The Walter and Eliza Hall Institute Immunology Division), Oct. 2007, Dunk Island, Australia ,
 - ⑨ 石戸 聡, 後藤 栄治, 水戸 麻理, 青木 雅美, 松木 洋平, 星野 真理, 植松 未香, カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス MIR1,2 の哺乳類相同分子の同定, 第 55 回ウイルス学会学術集会, 2007 年 10 月 22 日, 札幌
- [産業財産権]
○出願状況 (計 2 件)
名称:c-MIR を機能評価できる細胞株

発明者:石戸 聡、後藤 栄治、水戸 麻理
権利者:独立行政法人理化学研究所
種類:特許
番号:2007-128821
出願年月日:2007年5月15日
国内外の別:国内

名称:c-MIR を利用した CD40 の発現調節、及びそのスクリーニング方法
発明者:石戸 聡、上坂 等
権利者:独立行政法人理化学研究所
種類:特許
番号:2007-146706
取得年月日:2007年6月1日
国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

星野 真理(大村 真理)
(OHMURA-HOSHINO MARI)
独立行政法人理化学研究所・感染免疫応答
研究チーム・研究員
研究者番号:10313511

(2)研究分担者

石戸 聡 (ISHIDO SATOSHI)
独立行政法人理化学研究所・感染免疫応答
研究チーム・チームリーダー
研究者番号:10273781