

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 21日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390153

研究課題名（和文） CARMA1 シグナルの制御機構と免疫恒常性維持における役割

研究課題名（英文） Regulation of CARMA1 signaling and its role in immune homeostasis

研究代表者

原 博満 (HARA HIROMITSU)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：20392079

研究成果の概要（和文）：CARMA1のSH3-GUKドメイン間の会合は、CARMA1の重合化を介して、免疫シナプスにおけるNF-κBシグナロソームの形成とシグナル活性化に必須の役割を演じることが明らかとなった。一方で、SH3-GUK相互作用の不全は、Th2の異常活性化を生じ、高IgE血症を特徴する自己免疫様の皮膚疾患を発症させることが判った。従って、SH3-GUK相互作用は抗原受容体を介した末梢T細胞の恒常性維持にも重要であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that SH3-GUK interactions in CARMA1 is essential for NF-κB activation through antigen receptors by regulating multimerization CARMA1 that controls formation of NF-κB signalosome at immunological synapse. However, lack of this interaction in aged mice developed autoimmune-like skin lesions with hyper-IgE due to an aberrant Th2 response. Thus, SH3-GUK interactions of CARMA1 play an important role in peripheral T cell homeostasis through antigen receptors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2011年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	9,000,000	2,700,000	11,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：抗原認識、リンパ球、獲得免疫、免疫寛容・自己免疫

1. 研究開始当初の背景

我々は、CARMA1-Bcl10-MALT1複合体（以下、CBM複合体）が、リンパ球抗原受容体（TCR、BCR）や活性化型NK細胞受容体を介したNF-κBやJNKの活性化に必須の因子であることを明らかにしてきた。

ABC DLBCLにおけるCARMA1変異の報告などから、CARMA1-Bcl10-MALT1複合体の機能は重合化により制御されていることが示唆される

が、生理的な状態でそのON/OFFを制御しているメカニズムは明らかでない。我々は、CARMA1が自身のSH3ドメインとGUKドメインとで相互作用することを見だし、この相互作用はTCRを介したNF-κB活性化に必須であり、さらに種々の生化学的解析の結果、このSH3-GUK相互作用はCARMA1の重合化によりNF-κBの活性化をコントロールしているという仮説に至った。また我々は、SH3-GUK

領域内で進化的に保存された相互作用に重要なアミノ酸残基を同定し、その部位に点変異を導入したノックインマウス(L815P)を作製した。驚いたことに、L815P マウスは20週齢を超える頃から皮膚炎症状を呈し(発症率100%),血中のIgE値が異常に上昇することを見いだした。

## 2. 研究の目的

- (1) CARMA1のSH3-GUKドメインの相互作用の生理的意義および制御機構を解明する。
- (2) KI-Aマウスが発症する皮膚炎および高IgE血症の病理学的、免疫学的に解析することでその原因を解明し、免疫恒常性維持における役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) 定常状態では、分子内SH3-GUK結合が優位であるため、分子間SH3-GUK相互作用を介したCARMA1分子間の結合は抑制され、一方で、抗原刺激時には分子間相互作用が可能となり、CARMA1は重合化されてNF- $\kappa$ B活性化に至る、という仮説を我々は立て、種々のCARMA1変異体の作製により、その遷移が可能であるかを検討した。
- (2) MAGUKファミリーの一つPSD-95の立体構造解析により、そのSH3とGUKを連結するヒンジ領域の柔軟性が予測され、これに基づくSH3-GUKを介した単体-重合体遷移仮説が提唱されている。そこで、PSD-95の立体構造情報を元にCARMA1のホモロジーモデリングを行い、CARMA1のSH3-GUKドメイン間の結合様式の予測と解析を行った。この計算は、連携研究者の平川氏が実施した。
- (3) KI-AおよびKI-Bマウスのリンパ球の分化、およびex vivoで抗原受容体刺激した際の細胞内シグナリングおよび活性化応答(細胞増殖、サイトカイン産生)を解析し、WTやCARMA1-nullマウス(CARMA1<sup>-/-</sup>)のそれと比較した。
- (4) L815Pマウスで自然発症する皮膚炎の詳細な皮膚科学的病理学的解析を連携研究者である古江に依頼した。また、脾臓、リンパ節でのTh1, Th2, Th17の分化状態や、胸腺、骨髄におけるリンパ球の分化成熟の解析を行った。
- (5) SH3-GUK相互作用の制御機構を探索する竹、領域周辺に存在する種々のキナーゼの標的部位の点変異体を作製し、NF- $\kappa$ B活性化に及ぼす影響を解析した。
- (6) CARMA1をはじめ、NF- $\kappa$ B活性化シグナルに関与する分子は免疫シナプスにマイクロクラスターを形成し、これがNF- $\kappa$ B活性化のシグナロソームとして働く事が示唆されている。SH3-GUK相互作用の免疫シナプスにおけるCARMA1クラスター形成に与える影響を調べた。

## 4. 研究成果

- (1) CARMA1のSH3-GUKドメイン相互作用はPSD-95のそれと類似する  
SH3とGUKドメインの相互作用は、これまで他のMAGUKファミリーにおいても報告されており、シナプスで働くMAGUKであるPSD95ではすでにその結晶構造も報告されている。このSH3-GUKドメイン会合はユニークであり、通常のSH3ドメインが連続した5つの $\beta$ シート( $\beta$ A- $\beta$ D)が折り畳まって形成されているのに対し、PSD95のSH3ドメインはそれより一つ多い6つの $\beta$ シートから構成されている。 $\beta$ Dと $\beta$ Eの間にHinge領域とよばれる長い領域が介在し、これによりSH3のproline-rich配列との結合面がマスクされている。さらに $\beta$ Eと $\beta$ Fの間にGUKドメインが介在し、 $\beta$ A- $\beta$ DからなるSH3サブドメインに、 $\beta$ E-GUK- $\beta$ FサブドメインがSH3の $\beta$ シートを相補するように会合することで、結果的にGUKドメインとSH3ドメインが会合した形になる。生化学的解析の結果から、 $\beta$ A- $\beta$ DからなるSH3サブドメインと、 $\beta$ E-GUK- $\beta$ Fサブドメインは不連続な別々の分子間でもtransに相互作用でることが示されているが、このサブドメイン間の結合は分子間会合より分子内会合が優位であることも報告されている。データベースにあるPSD95立体構造データを元に、CARMA1のSH3およびGUKドメインのホモロジーモデリングを行った所、CARMA1のSH3-GUKドメインは、PSD-95のそれと同様に6つの $\beta$ シートを持ち、PSD95と良く似た立体構造トポロジーを有していることが予想された(図1)。そこで、CARMA1のSH3-GUKドメイン相互作用の性質を生化学的に解析した結果、野生型(WT)CARMA1は $\beta$ E-GUK- $\beta$ Fサブドメインとは会合できないが、GUKドメインを削ることで会合できるようになることが判った。すなわちことは、CARMA1のSH3-GUK相互作用は分子内と分子間の両方が可能であること、分子内相互作用の方が分子間相互作用より優位であることを示していた。また、この分子間SH3-GUK相互作用は $\beta$ Fを削ることによって失われた。以上のことから、CARMA1のSH3とGUKドメインはPSD-95のそれと同様の様式で会合していることが考えられた。

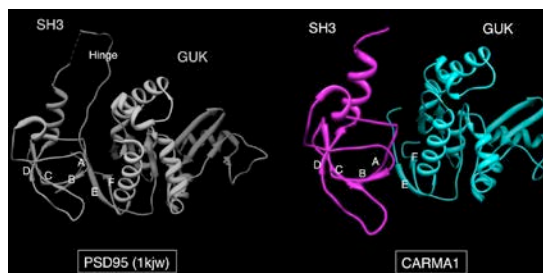


図1: CARMA1のSH3-GUKドメインの分子モデリング

(2) CARMA1 の機能不全変異 L815P は SH3-GUK 相互作用を失わせる

次に、我々は PSD95 や CARMA1 の SH3 ドメインにおいて過去に報告されている2つの point mutation に着目した。一つは、PSD95 の 460 番目の leucine が proline に変化したもの (L460P) で、この leucine は CARMA1 の 801 番目の Valine に相当する。この変異は PSD95 の SH3-GUK 相互作用を失わせると報告されている。2つ目は、CARMA1 で報告されている 815 番目の Leucine が proline へ変化した変異 (L815P) で、これは CARMA1 の NF- $\kappa$ B 活性化能を失わせると報告されている。これらの point mutation の SH3-GUK 相互作用への影響を調べた所、V801P 変異は予想通り、PSD95 で報告されているように相互作用を失わせたが、驚いたことに、L815P 変異も SH3-GUK 相互作用を失わせることを見いだした。

(3) 細胞の活性化により分子間 SH3-GUK ドメイン相互作用が増加する

我々は、細胞の活性化により、分子間 SH3-GUK 相互作用を介した CARMA1 の重合化が生じるのではないかと考え、それを検証するため、GUK ドメインを削った CARMA1 mutant をそれぞれ Jurkat T 細胞株に安定発現させた細胞を作製した。Jurkat 細胞は内在性の CARMA1 を発現するので、もし分子間会合が起きなければトランスフェクトした CARMA1 によって免疫沈降されないが、細胞の活性化により内在性の CARMA1 に何らかの変化が起こって分子間相互作用が可能になれば、トランスフェクトした CARMA1 と共沈される。実験の結果、PKC の活性化剤である PMA+カルシウムイオノフォア (P/I) による活性化刺激により、トランスフェクトした CARMA1 分子と内在性 CARMA1 分子との分子間会合が増加することが見いだされた。この会合は、V801P および L815P 変異で消失することから、SH3-GUK ドメイン相互作用を介したものであると考えられた。

(4) SH3-GUK ドメイン相互作用は免疫シナプスにおける CARMA1 マイクロクラスターの形成に必須である

T 細胞が抗原提示細胞上に提示された抗原を認識する際、T 細胞と抗原提示細胞の接着面に免疫シナプスと呼ばれる超分子構造が形成される。免疫シナプスは、それを構成する分子の局在から、内側から cSAMC, pSMAC、dSMAC の3つのパートに分けられ、TCR や PKC  $\theta$  は cSMAC 領域に集積することが判っている。さらに、SMAC には、特定の受容体やシグナル分子が集まったマイクログラスターとよばれる小構造体が形成されることが明らかに

されている。連携研究者である理研 RCAI の横須賀らは、planner membrane システムを用いた顕微鏡観察により、CD28 共刺激依存的に、cSAMC 中の TCR1 $\alpha$  領域に、TCR $\alpha$  領域を丸く囲む様にして、PKC  $\theta$  や CARMA1 のマイクログラスターが形成されることを報告している。しかし、この CARMA1 マイクログラスターの形成と NF- $\kappa$ B シグナリングとの関係性は明らかでない。我々は、SH3-GUK 相互作用の CARMA1 マイクログラスター形成への影響を調べた所、SH3-GUK 相互作用が不全な CARMA1 変異分子 (V801P、L815P) は、CARMA1 マイクログラスターの形成能が完全に消失することを見いだした (図2)。この結果は、CARMA1 マイクログラスターが NF- $\kappa$ B 活性化の signalosome として働いている可能性を示唆しているといえる。

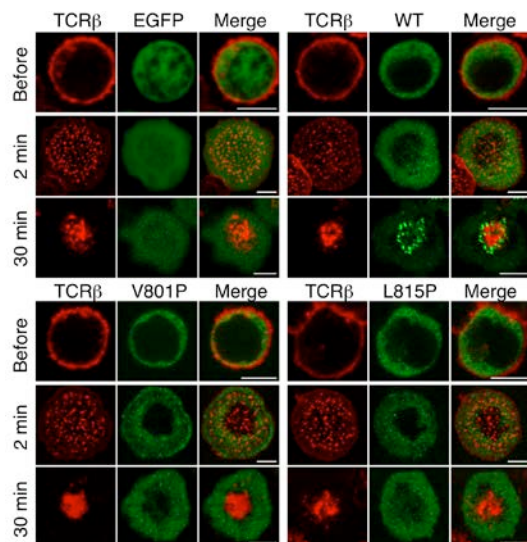


図2: SH3-GUK ドメイン相互作用は CARMA1 マイクログラスター形成に必須である

(5) SH3-GUK ドメイン相互作用は T および B リンパ球の生理機能に必須である

次に、CARMA1 の SH3-GUK regulation の生理的役割を検討するため、L815P ノックインマウスを作製し、そのリンパ球の解析を行った。末梢 T 細胞のシグナリング解析の結果、L815P マウス由来の T 細胞は、CARMA1-null (CARMA1 $^{-/-}$ ) マウスのそれと同様に、TCR-crosslink および PMA/IM 刺激後の NF- $\kappa$ B の活性化および JNK の活性化が著しく不全となった。この結果を反映して、L815P マウスの T 細胞は TCR 刺激や、PMA/IM 刺激によって誘導される増殖応答および IL-2 産生が CARMA1 $^{-/-}$  マウスと同様に著しく不全となることが判った。また、CARMA1 $^{-/-}$  マウスと同様に、胸腺での naturally occurring regulatory T 細胞の分化不全が観察された。末梢 B 細胞の BCR を介したシグナリング経路を解析した結果、T 細胞の場合と同じく、NF-

$\kappa$ B と JNK の活性化不全が、CARMA1-/-マウスのそれと同程度に認められた。これと一致して、BCR 刺激で誘導される増殖反応が、CARMA1-/-マウスと同様、ほぼ消失し、血中の自然抗体価の低下も観察された。また、腹腔の IgM+CD5+ B-1B 細胞の消失や、脾臓の濾胞 B-2 細胞や辺縁帯 B 細胞の減少など、CARMA1-/-マウスと同様の B 細胞の分化不全が観察された。以上の結果から、SH3-GUK ドメイン相互作用は CARMA1 によって媒介される T、B リンパ球の生理機能に必須であることが明らかとなった。

(6)上記の様に、L815P マウスのリンパ球は明らかな活性化不全を示すにもかかわらず、我々はこのマウスが 10 週齢前後から耳介と尾に湿疹様の皮膚病変を生じることを見いだした。20 週齢前後から耳介、尾部皮膚症状は癬痕化し、前腕の届く範囲にびらんを形成した。発症マウスでは、脾腫、リンパ節腫大が認められ、表皮肥厚、表皮真皮へのリンパ球や好酸球の浸潤を伴う皮膚炎や肺炎、尾骨の骨髓のリンパ球とマクロファージの浸潤、巨細胞形成が認められた。また、血清中の IgG2a/2b、IgM と IgA が低値である一方、皮膚病変の出現時期と一致して IgE の著しい上昇が認められた。30 週齢では血小板、赤血球の減少も認められた。また、血清中には真皮に対する自己抗体の存在が確認された。なお、L815P ヘテロマウスや CARMA1-/-マウスではこれらの異常は認められなかった。発症マウスから単離した T 細胞を抗 CD3 抗体で刺激してサイトカイン産生を調べた所、IFN $\gamma$ 、Th17 産生はヘテロマウスと同等である一方、IL-4 の著しく高い産生を認めた。すなわち、L815P マウスの病態が Th2 分化の異常な亢進に起因している可能性が考えられた。

#### 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. Hara H, Iizasa E, Nakaya M, Yoshida H: L-CBM signaling in lymphocyte development and function. Journal of Blood Medicine. 2010, 1:93-104.
2. 原博満: CARMA1, BCL10, CARD9 と NF- $\kappa$ B の活性化。臨床免疫・アレルギー科 54(3):378-383 (2010) .
3. Hara H and Saito T: CARD9 vs. CARMA1 in innate and adaptive immunity. Trends in immunol. 2009, 30(5): 234-242.

[学会発表] (計 1 件)

1. Hiromitsu Hara, Tadashi Yokosuka, Chitose Ishihara, Sinsuke Yasukawa,

Hideki Hirakawa, Eiichi Iizasa, Hiroki Yoshida and Takashi Saito: SH3-Guk domain interaction regulating Carmal micro-cluster formation is essential for antigen receptor-induced NF- $\kappa$ B activation. 第 34 回 日本分子生物学会年会 (横浜) 2011/12/13-16.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.mcis.med.saga-u.ac.jp>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

原 博満 (HARA HIROMITU)  
佐賀大学・医学部・准教授  
研究者番号: 20392079

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

平川 英樹 (HIRAKAWA HIDEKI)  
かずさ DNA 研究所・主任研究員  
研究者番号: 80372746

古江 増隆 (FURUE MASUTAKA)  
九州大学・医学研究院・教授  
研究者番号: 70134583