

令和元年5月31日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18518

研究課題名(和文) 生体金属イオンシグナルによる新規サイトカイン産生制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation mechanisms of novel cytokine production by metal trace elements

研究代表者

和田 俊樹(矢部俊樹)(YABE-WADA, Toshiki)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：10451634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：様々な免疫細胞から産生される炎症性サイトカインの分泌制御は、適切な炎症応答のバランスを保つうえで極めて重要である。今回我々は、抗ウイルス免疫に関与する形質細胞様樹状細胞(pDC)のIFN- γ 分泌に関わる分子としてSortilinを同定した。また、SortilinがTLRシグナル依存的にmRNAレベルで発現制御を受け、ポリC結合蛋白質がその制御に関与している事を見いだした。細胞内亜鉛濃度に依存してSortilin mRNAが分解されることから、ポリC結合蛋白質は細胞内亜鉛濃度に応答してSortilinの発現制御を行っていることが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫細胞から産生される炎症性サイトカインの分泌制御は、適切な炎症応答を保つうえで極めて重要である。本研究では、抗ウイルス免疫に関与する形質細胞様樹状細胞(pDC)において、IFN- γ 分泌に関わる分子としてSortilinを同定し、その重要性を明らかにした。また、SortilinがTLRシグナル依存的にmRNAレベルで発現制御を受けており、その制御にRNA結合蛋白質であるポリC結合蛋白質が関与している事、更に細胞内の亜鉛がSortilinの制御に関わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The regulation of the proinflammatory cytokine production by immune cells is important for the appropriate inflammatory responses. In this study, we focused on the regulation of cytokine secretion in immune cells. We identified Sortilin which is involved in IFN- γ secretion in plasmacytoid dendritic cells (pDC), and Sortilin transcripts degraded posttranscriptionally upon stimulation with various TLR ligands. The nucleotide-binding ability of poly-rC-binding proteins, which can act as a trans-acting factor to stabilize Sortilin mRNA, was impaired by zinc ions and alterations of intracellular zinc affect sortilin expression. Poly-rC-binding proteins may posttranscriptionally regulate Sortilin transcripts by sensing intracellular zinc levels.

研究分野：免疫生化学

キーワード：サイトカイン 自然免疫 RNA結合蛋白質 蛋白質輸送 転写後制御

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

哺乳類での免疫機構は、マクロファージや樹状細胞などにより担われる自然免疫と、T細胞やB細胞といったリンパ球を主体とする抗原特異的な応答を行う獲得免疫の2つに大別される。TLRは、自然免疫においてPAMPsを認識することで細胞内シグナル伝達系を介して各種炎症性サイトカインの遺伝子発現を活性化する。近年、サイトカイン産生の正や負の制御は、適切な炎症応答のバランスを保つうえで極めて重要であることが示され、この制御が破綻すると自己免疫疾患などの病態を引き起こされると考えられている。例えば、本研究でとりあげる形質細胞様樹状細胞（pDC）は、病原体由来の非メチル化 CpG-DNA を認識する TLR9 を高発現し、ウイルス感染時に大量の I 型 IFN を産生する特異な DC 分画である。一方で、慢性的な活性化や自己由来の核酸への応答などを原因とする pDC の IFN 過剰産生は、全身性エリテマトーデスや尋常性乾癬といった炎症性疾患の発症・進展に重要な役割を果たすことも知られている。

サイトカイン産生機構は、この制御の破綻によって自己免疫疾患などの病態を引き起こすことから、転写、転写後、翻訳後から分泌に至る各段階において厳格に制御されることが重要である。これまで TLR シグナルにおけるサイトカイン産生機構は、転写の活性化に至る細胞内シグナル伝達系を中心に詳細な研究が進んでいる。最近では、サイトカインをコードする mRNA を RNA 結合蛋白質を介して積極的に分解制御する転写後制御機構の存在が明らかとなり、その機構の研究も進んできている。一方、サイトカインの翻訳後から分泌に至る段階での制御に関しては全く不明である。小胞輸送系においては、特定の可溶性蛋白質と結合し、細胞内外への輸送を担う膜受容体が多数同定されているが、特定のサイトカインを輸送する分子は同定されておらず、サイトカインの分泌段階における制御機構に関しても全く不明のままである。

我々は、これまであまり報告のなかった免疫細胞におけるサイトカインの分泌制御機構に着目し、研究を進めた。特に抗ウイルス免疫に関与する形質細胞様樹状細胞（pDC）の IFN- α 分泌に着目し、解析を行った結果、IFN- α に関わる分子として Sortilin を同定した。pDC における Sortilin のノックダウンによって CpG-DNA 刺激に依存した IFN- α の分泌量が減少し、細胞内において Sortilin と IFN- α が共局在することから、IFN- α の細胞外への分泌を担うキャリア分子として機能することが示唆された。更に、組換え蛋白質を用いた共鳴プラズモン解析の結果、IFN- α と直接結合する予備的結果を得た。本研究遂行中に、T細胞及びマクロファージにおける IFN- γ や IL-6 の分泌への Sortilin の関与が報告されたことから、Sortilin は免疫細胞における様々なサイトカイン分泌に関与する事が推察された。

2. 研究の目的

Toll-like receptor (TLR) は、病原体由来の共通パターン分子 (PAMPs) を認識するパターン認識受容体として自然免疫系において重要な役割を担う。これまで、TLR が PAMPs を認識し炎症性サイトカイン遺伝子の転写活性化に至るまでの細胞内シグナル伝達系の研究は精力的に行われてきたが、サイトカイン遺伝子が翻訳された後、細胞外へ分泌されるに至るまでの制御に関しては不明な点が多く残されている。本研究では、これまで殆ど報告がなかった、免疫細胞におけるサイトカインの細胞外への輸送機構、特に抗ウイルス免疫に関与する形質細胞様樹状細胞（pDC）から産生される IFN- α の細胞外への分泌を担う分子として同定した Sortilin によるサイトカイン分泌機構、及びその発現制御を明らかにすることによって、翻訳後レベルでのサイトカイン分泌制御機構の一端を明らかにすることを目的とした。更に、X線結晶構造解析による Sortilin の構造解析を行うことで、Sortilin によるサイトカイン認識の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究計画では、Sortilin がサイトカインの分泌を担うキャリア分子であることを明らかにするとともに、Sortilin の免疫細胞における発現制御機構を明らかにする。Sortilin と様々なサイトカインとの相互作用の解析を共鳴プラズモン解析による物理的な相互作用解析にて行うことで、他のサイトカインの輸送に関与する可能性を検討した。また、Sortilin の免疫細胞における発現制御のメカニズムの解明を、マウス骨髄から誘導した初代培養細胞を用いて試みた。更に、Sortilin と IFN- α の相互作用を分子レベルで明らかにするため、組換え蛋白質を用いた X 線結晶構造解析を行った。

4. 研究成果

Sortilin に結合するサイトカインの同定

Sortilin が IFN- α 以外のサイトカインと結合するか、共鳴プラズモン解析を行った。各種サイトカインの組換え蛋白質を用いて解析したところ、IFN- γ 、IL-6、IL-10、IL-12、IL-17A と結合する一方、IL-18 とは結合しないことを見いだした。IL-18 は古典的な蛋白質分泌経路を経ず、

細胞外へ分泌することが知られている。このことから、Sortilin は古典的な蛋白質分泌経路を経るサイトカインの輸送を担っていること、多様なリガンドを結合する構造柔軟性ととも、特定のリガンドを結合する特異性も持ち合わせていることが示唆された。更に、免疫細胞の制御に関わる分子との結合を調べた結果、強い結合を示す分子をいくつか同定することが出来た。

Sortilin の発現制御機構の解析

Sortilin の免疫細胞における機能解析を進めた結果、細胞を TLR リガンドで刺激することによる Sortilin をコードする mRNA の減少が観察された。そこで、細胞をアクチノマイシン D で処理することによる転写活性が阻害された条件下において TLR リガンドの刺激を行うと、TLR リガンド非処理と比較して Sortilin mRNA の半減期が減少した。このことから、TLR リガンド刺激による Sortilin mRNA の減少は、TLR シグナル依存的な転写後レベルでの mRNA 分解によるものと考えられた。そこで、RNA 結合蛋白質による TLR シグナル依存的な mRNA レベルの制御を検討するため、Sortilin mRNA の非翻訳領域 (UTR) の配列解析を行い、RNA 結合蛋白質の結合モチーフの探索を行った。結果、ポリ C 結合蛋白質 (PCBP) が結合する C リッチ配列 (CRE) が Sortilin mRNA の 3'UTR に存在することを見いだした。そこでゲルシフト解析、RNA 免疫沈降解析などを行ったところ、見いだした C リッチ配列に PCBP1 が結合することを確認した。この PCBP1 は、 α グロビン mRNA の安定化や鉄代謝に関与する多機能蛋白質として知られている。我々はこれまで、PCBP1 の遷移金属との結合やシャペロン機能と RNA 結合蛋白質としての機能の相関に関する研究において、PCBP1 が亜鉛と結合することによって CRE との結合活性が低下する予備的結果を得ていた。そこで亜鉛の役割について検討したところ、Sortilin mRNA が細胞内亜鉛濃度依存的に分解されることを見出した。亜鉛は TLR シグナルにおけるセカンドメッセンジャーとして知られていることから、TLR シグナルによる Sortilin mRNA の分解は、細胞内への亜鉛の流入によって PCBP1 が亜鉛と結合した結果、PCBP1 と Sortilin mRNA が解離することが引き金となっていることが推察される。TLR-亜鉛シグナル依存的な Sortilin mRNA の負の制御は、PCBP1 を介した転写後制御での Sortilin の制御を行うことで、これまで知られていた転写後レベルに加えて翻訳後レベルでも過剰なサイトカイン産生を制御するシステムが免疫細胞には備わっていることが推察される。

Sortilin によるサイトカイン認識機構の解明

Sortilin によるサイトカイン認識の分子メカニズムを明らかにするため、X 線結晶構造解析を試みた。CHO 細胞を用いて Sortilin 細胞外ドメインを発現する細胞株を構築後、Sortilin 細胞外ドメインの組換え蛋白質を大量精製し、精製蛋白質の結晶化スクリーニングを行った。バッファーが酸性条件下で単結晶が得られたので、放射光施設にて回折実験を行い、データ収集を行った。分子置換法による位相決定を行い、リガンド非結合型の結晶構造を 2.45-Å 分解能で決定した。興味深い事に、Sortilin は結晶中で 2 量体化していたため、ゲル濾過解析を行ったところ、バッファー pH に依存して 2 量体化することを見いだした。そこで、得られた構造情報から表面電荷を計算したところ、2 量体化に伴って大きな構造変化がみられた進化的に保存されている疎水性ループと相互作用する領域において pH の低下に伴う負電荷の消失がみられたことから、この疎水性ループを介した疎水性相互作用が低 pH での 2 量体化に重要と推察された。そこでこの疎水性ループ上のアミノ酸残基に変異を導入した変異体を HEK293 細胞で過剰発現させ、IFN- α 輸送活性をフローサイトメーターにて測定する実験系を構築し、解析を行った。結果、作製した全ての変異体において IFN- α 輸送活性が低下した。更に、2 量体を形成する界面近傍に存在する糖鎖が付加するアスパラギン残基への変異導入を行ったところ、疎水性ループ上の変異体同様の活性低下が観察された。以上から、Sortilin の pH に依存した 2 量体化は、Sortilin による IFN- α 輸送活性に重要であることが推察される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① [Yabe-Wada T*](#), Matsuba S, Unno M & Onai N*
Crystal structure of the ligand-free form of the Vps10 ectodomain of dimerized Sortilin at acidic pH.
FEBS Lett 592, 2647–2657 (2018) (*責任著者) 査読有
- ② Matsuba S, [Yabe-Wada T](#), Takeda K, Sato T, Suyama M, Takai T, Kikuchi T, Nukiwa T & Nakamura A
Identification of Secretory Leukoprotease Inhibitor As an Endogenous Negative Regulator in Allergic Effector Cells
Front Immunol 8, 1538 (2017) 査読有
- ③ Saijo S, Nagai A, Kinjo S, Mashimo R, Akimoto M, Kizawa K, [Yabe-Wada T](#), Shimizu N, Takahara H & Unno M
Monomeric Form of Peptidylarginine Deiminase Type I Revealed by X-ray Crystallography and Small-Angle X-ray Scattering.
J Mol Biol 428: 3058–3073 (2016) 査読有
- ④ [Yabe-Wada T*](#), Matsuba S, Takeda K, Sato T, Suyama M, Ohkawa Y, Takai T, Shi H, Philpott CC & Nakamura A*

TLR signals posttranscriptionally regulate the cytokine trafficking mediator sortilin
Sci Rep 6, 26566 (2016) (*責任著者) 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① 和田俊樹, 松葉慎太郎, 海野昌喜, 小内伸幸
酸性条件下で 2 量体化する Sortilin の結晶構造
第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2018 年 12 月
- ② 和田俊樹, 松葉慎太郎, 小内伸幸
サイトカイン輸送に關与する Sortilin の転写後発現制御機構
第 28 回日本樹状細胞研究会, 名古屋, 2018 年 6 月
- ③ 松葉慎太郎, 和田俊樹, 武田和也, 小内伸幸, 高井俊行, 中村晃
SLPI negatively regulates LPS-induced eosinophil activation via inhibition of Elk-1 phosphorylation
第 46 回日本免疫学会学術集会, 仙台, 2018 年 12 月
- ④ 和田俊樹, 松葉慎太郎, Caroline C. Philpott, 小内伸幸
Involvement of poly-rC binding proteins in posttranscriptional regulation of Sortilin, the cytokine trafficking mediator
ConBio2017, 神戸, 2017 年 12 月
- ⑤ 和田俊樹, 松葉慎太郎, Caroline C. Philpott, 小内伸幸
Involvement of poly-rC binding proteins in posttranscriptional regulation of Sortilin, the cytokine trafficking mediator
RNA フロンティアミーティング 2017, 比叡山, 2017 年 10 月
- ⑥ Yabe-Wada T*, Matsuba S, Takeda K, Nakamura A, Shi H, Philpott CC, Onai N
Involvement of poly-rC binding proteins in posttranscriptional regulation of Sortilin, the cytokine trafficking mediator
Cytokines 2017, Kanazawa Ishikawa, Japan, October 2017
- ⑦ Fray A, Palenchar D, Zumbrennen KB, Yabe T, Vashisht A, Wildemann J, Wohlschlegel J, Philpott CC
A Glutaredoxin-BolA complex serves as an iron-sulfur cluster chaperone for the cytosolic cluster assembly machinery
2017 International BioIron Society Meeting, Luskin Conference Center UCLA, Los Angeles, CA, USA, May 2017
- ⑧ 和田俊樹, 松葉慎太郎, Caroline C. Philpott
Involvement of poly-rC binding proteins in posttranscriptional regulation of sortilin
第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016 年 12 月
- ⑨ Yabe-Wada T, Matsuba S, Takeda K, Sato T, Suyama M, Ohkawa Y, Takai T, Shi H, Philpott CC, Nakamura A
TLR signals posttranscriptionally regulate the cytokine trafficking mediator sortilin
Gordon Research Conferences on Protein Processing, Trafficking & Secretion, Colby-Sawyer College, New London, NH, USA, July 2016
- ⑩ 松葉慎太郎, 和田俊樹, 武田和也, 佐藤哲也, 須山幹太, 高井俊行, 中村晃
好塩基球・好酸球における SLPI の制御機構の解明
第 65 回日本アレルギー学会, 東京, 2016 年 6 月

[その他]

報道関連情報

「免疫細胞の新機能解明—炎症性疾患治療に期待」
2016/5/26 (木) 北國新聞朝刊

「新たなサイトカイン分泌制御機構の発見—自己免疫疾患などに対する新たな治療法の開発への貢献に期待」
プレスリリース URL: <http://www.kanazawa-med.ac.jp/blog/2016/05/post-425.html?fi=1>

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。