

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16690

研究課題名（和文）新たなGPCRシグナル伝達制御因子の機能阻害剤の探索

研究課題名（英文）Identification of compound Y as an inhibitor of GPCR signaling regulator X

研究代表者

中井 晶子（Akiko, Nakai）

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・助教

研究者番号：80768862

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）：GPCRシグナル伝達の新規制御因子Xは、Bリンパ球のケモカイン受容体の反応性を高め、液性免疫応答を促進する。本研究において、申請者らは制御因子Xの機能を阻害する化合物Yを同定し、化合物Yを投与した野生型マウスでは液性免疫応答が抑制され、炎症性疾患の病態が改善することを明らかにした。また、制御因子X上に化合物Yと結合するアミノ酸を特定し、このアミノ酸残基を別のアミノ酸に置換した制御因子X変異体を発現するマウスでは化合物Yの効果が減弱することから、化合物Yが制御因子Xを標的にすることで免疫応答を抑制することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化合物YはGPCRのシグナル伝達の新規制御因子Xの機能を阻害することで液性免疫応答を抑制し、炎症性疾患の病態を改善することが明らかになった。本研究によって、化合物Yの抗炎症作用の新たな作用機序と共に、制御因子Xが過剰な免疫応答によって引き起こされる炎症性疾患治療の新たな創薬のターゲットになり得ることが示された。

研究成果の概要（英文）：Recently, we showed that GPCR signaling regulator X positively control B lymphocyte migration mediated by chemokine receptors and promotes humoral immune responses. Here, we identified compound Y as a compound that inhibits the functions of regulator X and reduces immune responses. Treatment with compound Y suppressed humoral immune responses and blocked arthritis progression in a mouse model of rheumatoid arthritis. These immunosuppressive effects of compound Y were abolished in mice expressing mutated regulator X that has an amino acid substitution at the binding position of compound Y. These findings suggest that compound Y inhibits immune responses by targeting regulator X.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫学 GPCR ケモカイン受容体 炎症性疾患 細胞遊走

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでに申請者らは、GPCR のシグナル伝達の新規制御因子として制御因子 X を同定し、これがケモカイン受容体の反応性を高めることで B リンパ球の細胞遊走を亢進し、液性免疫応答の成立に重要な役割を果たすことを明らかにした。制御因子 X は液性免疫応答を促進することから、その機能阻害剤は過剰な免疫応答によって引き起こされる炎症性疾患の病態を抑制し得ることが考えられた。

2. 研究の目的

制御因子 X の機能を阻害する化合物を探索し、この阻害剤の炎症性疾患の病態への影響をモデルマウスを用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) 制御因子 X の機能阻害剤の探索

制御因子 X はタンパク A およびタンパク B から成る複合体で、その機能は両タンパク間の会合に依存している。そこで、タンパク A とタンパク B 間の会合を阻害し、制御因子 X の機能を喪失させ得る化合物を探索するために、生細胞内でタンパク A とタンパク B の会合を生物発光共鳴エネルギー移動 (bioluminescence resonance energy transfer; BRET) を利用して 384 ウェルプレート中で検出する実験系を構築した。この実験系を用いて、制御因子 X を解離させることで BRET を消失させうる化合物を化合物ライブラリーから選び出した。また、同定した化合物が制御因子 X の精製タンパクを解離させ得るか免疫沈降法により確認した。

制御因子 X を欠損する B リンパ球では、走化性因子に対する B リンパ球の反応性が減少する。そこで、同定した化合物を作用させた野生型 B リンパ球で、制御因子 X を欠損する B リンパ球と同等の表現型が認められるか、トランスウェルを用いた走化性試験によって確認した。

(2) 液性免疫応答および炎症性疾患の病態における制御因子 X の機能阻害の影響

B リンパ球特異的に制御因子 X を欠損するマウスでは、免疫後の抗体産生が野生型マウスに比べて大きく低下し、これに伴って胚中心 B リンパ球および抗体産生細胞の産生も減少することが分かっている。そこで、同定した化合物を投与した野生型マウスにおいて、制御因子 X 欠損マウスで認められた表現型を再現できるか確認した。さらに、関節リウマチのマウスモデルを用いて、同定した化合物の投与により炎症性疾患の病態が改善し得るか検討した。

(3) 制御因子 X と化合物の結合様式の決定

制御因子 X と同定した化合物の結合様式を明らかにするために、制御因子 X 上で化合物が相互作用し得るアミノ酸残基を探索し、質量分析により作用部位を特定した。また、このアミノ酸残基を別のアミノ酸に置換した制御因子 X の変異体は、化合物によって解離しないか確認した。さらに、この制御因子 X の変異体を発現するマウスを作製し、液性免疫応答および炎症性疾患の病態への化合物の効果が野生型マウスに比べてどのように変化するか検討することで、制御因子 X が化合物の真の標的分子であるか確かめた。

4. 研究成果

(1) 制御因子 X の機能阻害剤の探索

制御因子 X を解離させる物質をスクリーニングした結果、化合物 Y を同定した。化合物 Y を試験管内で制御因子 X の精製タンパクに作用させたところ、制御因子 X の解離が認められたことから、化合物 Y が直接的に制御因子 X に作用することが確認できた。

また、制御因子 X を欠損する B リンパ球と同様に、化合物 Y を作用させた野生型 B リンパ球では、複数のケモカインに対する走化性が低下した。このことから、化合物 Y は制御因子 X の機能阻害剤であることが示唆された。

(2) 液性免疫応答および炎症性疾患の病態における制御因子 X の機能阻害の影響

野生型マウスに化合物 Y を投与したところ、免疫後の抗体産生、胚中心 B リンパ球および抗体産生細胞の産生の減少を認めた。また、関節リウマチのマウスモデルにおいて化合物 Y の投与により病態の進行が阻害された。このことから、化合物 Y を投与することで液性免疫応答が抑制され、炎症性疾患の病態が改善することが分かった。

(3) 制御因子 X と化合物 Y の結合様式の決定

制御因子 X と化合物 Y の結合様式について検討したところ、タンパク A 上に化合物 Y と相互作用し得るアミノ酸残基を見出した。また、この推定した作用部位に化合物 Y が結合することを質量分析により確認した。さらに、化合物 Y と結合するアミノ酸残基を別のアミノ酸に置換したタンパク A 変異体から成る制御因子 X は化合物 Y によって解離しないことが分かった。つづいて、化合物 Y が結合しない制御因子 X 変異体を発現するマウスを作製した。野生型マウスに比べて制御因子 X 変異体マウスでは、化合物 Y による液性免疫応答の低下や炎症性疾患の病態の改善効果が減弱することが明らかになった。以上のことから、制御因子 X が化合物 Y の真の標的であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakai Akiko, Fujimoto Jun, Miyata Haruhiko, Stumm Ralf, Narazaki Masashi, Schulz Stefan, Baba Yoshihiro, Kumanogoh Atsushi, Suzuki Kazuhiro	4. 巻 216
2. 論文標題 The COMMD3/8 complex determines GRK6 specificity for chemoattractant receptors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 1630 ~ 1647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20181494	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中井 晶子
2. 発表標題 COMMD3/8複合体による走化性因子受容体シグナル伝達の制御
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Nakai
2. 発表標題 Control of chemoattractant receptor signaling by the COMMD3/8complex
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Nakai
2. 発表標題 The COMMD3/8 complex dictates the specificity of GRK6 recruitment to chemoattractant receptors
3. 学会等名 第18回あわじ感染と免疫国際フォーラム（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Nakai
2. 発表標題 The COMMD3/8 complex determines the specificity of GRK6 recruitment to chemoattractant receptors
3. 学会等名 MNCB2020+1 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------