

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461577

研究課題名(和文) 高親和性IgE受容体 鎖D234に会合する分子の同定と治療・創薬開発への応用

研究課題名(英文) Identification of molecules associated with high affinity IgE Fc receptor beta chain D234 and its application to therapy and drug discovery

研究代表者

寺田 知新 (TERADA, TOMOYOSHI)

岐阜大学・医学部・准教授

研究者番号：30345780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：高親和性IgE受容体 鎖はマスト細胞のシグナル伝達に重要な分子である。マスト細胞のシグナル伝達に関する可能性が示唆される 鎖C末端の234番目のアミノ酸をアラニンに置換した 鎖変異体(D234A)タンパク質の二次、三次構造および熱安定性を明らかにした。また 鎖遺伝子多型(E228G)タンパク質は野生型と比べ、二次、三次構造に差異はないが熱安定性に影響を与えることを明らかにした。本研究で明らかとなった 鎖の構造や熱力学的な特性は、鎖をターゲットとした創薬開発の一助になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The high affinity IgE Fc receptor (Fc RI) chain is an important molecule for signal transduction of mast cells. We confirmed the secondary, tertiary structure and thermal stability of chain mutant (D234A) protein in which the 234th amino acid of C-terminal chain was substituted with alanine, which is suggested to be involved in mast cell signal transduction. In addition, it was revealed that the chain polymorphism (E228G) protein affects thermal stability, although there is no difference in the secondary and tertiary structure as compared with the wild type. The structure and thermodynamic properties of the chain clarified in this study are expected to be useful for drug discovery targeting the chain.

研究分野：アレルギー学，構造生物学，小児科学

キーワード：高親和性IgE受容体 鎖 生物物理 シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

高親和性 IgE 受容体(FcεRI)はマスト細胞、好塩基球などの細胞膜に発現する IgE レセプターである。FcεRI は IgE と結合する α 鎖、シグナル伝達に關与する β 鎖、二量体の γ 鎖によって構成される。β 鎖は Fc レセプターを介したマスト細胞の活性化を促進することにより、アレルギー反応の開始に重要な役割を果たすことが知られている。C 末端にはシグナル伝達モチーフ (immunoreceptor tyrosine-based activation motif:ITAM) を有し、β 鎖の ITAM の特徴として 2 つの規定のチロシンの間にもうひとつチロシンが存在する。

申請者らは β 鎖の 3 つのチロシンを含む ITAM の機能を明らかにしてきた。このうちすべてのチロシンをフェニルアラニンに置換した変異型 β 鎖(FFF)では脱顆粒は著明に障害されるものの、サイトカイン産生には影響を与えなかった。このため、ITAM 以外に β 鎖の機能に關与する重要な領域があることが推測され、これが C 末端の 234 番目のアミノ酸 (D234)であることを明らかにした。アスパラギン酸をアラニンに置換した変異体 (D234A)では脱顆粒には影響を与えなかったものの、IL-6 の産生は著明に障害されていた。このため β 鎖を介する新たなシグナル伝達経路が存在する可能性が示唆された。また D234A は β 鎖自身のリン酸化やマスト細胞の細胞膜上への β 鎖の発現についても野生型 β 鎖と比較して差異がないことを明らかにしている。これらの知見は D234 に何らかのタンパク質が会合し、マスト細胞の機能が発揮される可能性があることを示唆している。また、β 鎖と他の分子との会合や相互作用の検討および創薬開発の視点から検討を加えようとする、構造学的知見はもちろん熱力学的な物性も重要な手がかりとなる。これらはタンパク質の安定性やフォールディングの検討に重要であると同時にタンパク質/タンパク質の会合を予測する際の重要な基礎

的データにもなる。

## 2. 研究の目的

野生型高親和性 IgE 受容体 β 鎖および鎖変異体 (D234A) タンパク質の二次、三次構造および熱安定性を比較検討する。また高親和性 IgE 受容体β鎖に会合するタンパク質を光散乱法で同定する。質量分析法でβ鎖と標的タンパク質との会合部位を検討し、D234 に会合するかどうかを明らかにする。その解明はマスト細胞を介するアレルギー反応を効果的に制御できる可能性を秘めており、それを解明してアレルギー疾患の治療や創薬開発などに資することを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) マウス β 鎖の野生型および変異体 (D234A)のタンパク質(aa:143-235)を作製しタンパク質の精製を行った。またこれらを用いて二次構造、三次構造および熱安定性を比較検討した。また熱変性曲線を用いて、ギブスの自由エネルギーを計算した。

(2) 既存のデータベースやソフト等を用いて、β 鎖に会合する可能性のあるタンパク質を検討し、予測した。

候補となったタンパク質を精製し、野生型 β 鎖、変異体 (D234A) との会合の有無等を比較検討した。

## 4. 研究成果

(1)遠紫外円二色分光(far-UV CD)による二次構造の検討では、両者とも典型的な α-ヘリックス構造をとり、D234A は構造の崩壊やヘリックス含量の低下は認められなかった(図 1)。

次に野生型および D234A の温度変化によるタンパク質の構造の変化を検討したが、いずれも二状態転移を示し有意差はないと考えられた(図 2-1)。ギブスの自由エネルギーも計算したが、有意差は認められなかった(図 2-2)。

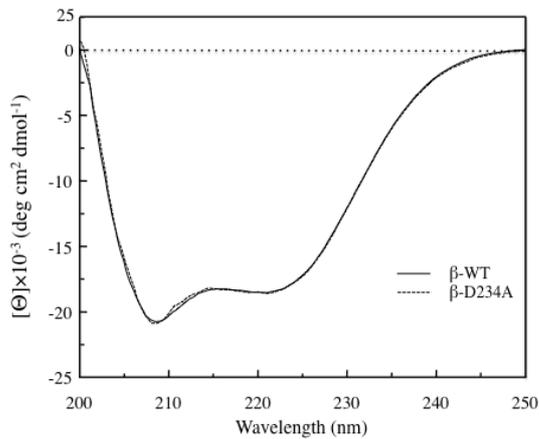


図1:遠紫外円二色分光による構造解析

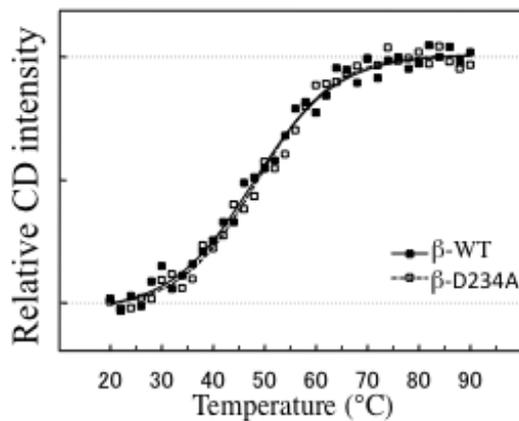


図2-1:熱変性曲線

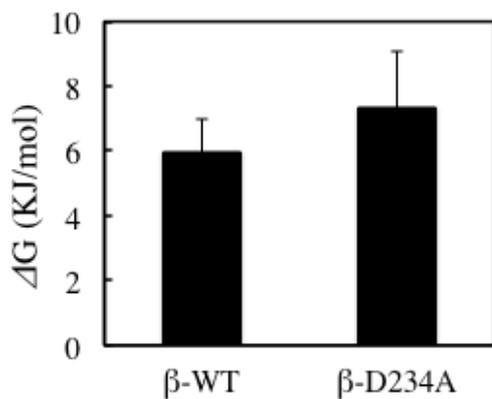


図2-2:ギブスの自由エネルギー

また近紫外円二色分光(near-UV CD)による三次構造の検討ではチロシン、フェニルアラニンやトリプトファンのアミノ酸側鎖の発色に起因した CD スペクトルが得られるが、これらに有意差は認められなかった(図3)。

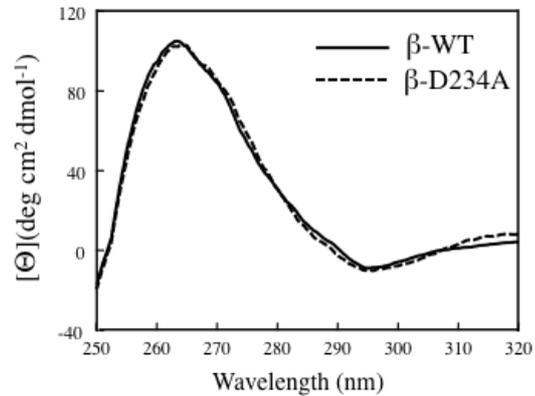


図3:近紫外円二色分光による構造解析

これらのことから D234A は 鎖タンパク質の構造や熱安定性に影響は与えず、鎖の同部位に何らかの分子が会合するかあるいは鎖に結合する分子に影響を及ぼすことにより、マスト細胞の機能を調節すると予想された。

(2) 鎖に会合すると考えられる分子について検討をおこなったが、残念ながら野生型と D234A で 鎖との会合に有意差がある分子は認められなかった。

一方で 鎖の遺伝子多型のひとつである E228Gにおいて 鎖の二次構造および三次構造に影響は与えないが、熱安定性には影響を与えることを明らかにした (Terada T et al. Biosci Biotechnol Biochem. 80 (7):1356-61, 2016.)。

## 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 7 件)

1 Maeda K, Yoshizaki S, Iida T, Terada T, Era S, Sakashita K, Arikawa H. Improvement of the fraction of human mercaptalbumin on hemodialysis treatment using hydrogen-dissolved hemodialysis fluid: a prospective observational study. Renal Replacement Therapy. 査読有. 2:42, 2016. DOI: 10.1186/s41100-016-0054-y

2 Terada T, Takahashi T, Arikawa H, Era S. Analysis of the conformation and thermal

- stability of the high-affinity IgE Fc receptor  $\beta$  chain polymorphic proteins. *Biosci Biotechnol Biochem.* 査読有. 80 (7):1356-1361, 2016. DOI: 10.1080/09168451
- 3 Takahashi T, Terada T, Arikawa H, Kizaki K, Terawaki H, Imai H, Itoh Y, Era S. Quantitation of Oxidative Modification of Commercial Human Albumin for Clinical Use: Thiol Oxidation and Carbonylation. *Biol Pharm Bull.* 査読有. 39(3):401-408, 2016. DOI: 10.1248/bpb.b15-00843
- 4 Kizaki K, Terada T, Arikawa H, Tajima T, Imai H, Takahashi T, Era S. Effect of reduced coenzyme Q10 (ubiquinol) supplementation on blood pressure and muscle damage during kendo training camp: a double-blind, randomized controlled study. *J Sports Med Phys Fitness.* 査読有. 55: 797-804, 2015.
- 5 Arikawa H, Terada T, Takahashi T, Kizaki K, Imai H, Era S. Continuous Vocalization during Kendo Exercises Suppresses Expiration Of CO<sub>2</sub>. *Int J Sports Med.* 査読有. 36(7):519-25, 2015. DOI: 10.1055/s-0034-1398679
- 6 Terawaki H, Zhu WJ, Matsuyama Y, Terada T, Takahashi Y, Sakurai K, Kabayama S, Miyazaki M, Itami N, Nakazawa R, Ito S, Era S, Nakayama M. Effect of a hydrogen(H<sub>2</sub>)-enriched solution on the albumin redox of hemodialysis patients. *Hemodial Int.* 査読有. 18(2):459-466, 2014. DOI: 10.1111/hdi
- 7 Minami T, Terada T, Takahashi T, Arikawa H, Matsuyama Y, Kizaki K, Era S. Comparative studies on the heterogeneity of plasma-derived and recombinant human albumins in laboratory use. *Int J Biol Macromol.* 査読有. 69:79-87, 2014. DOI: 10.1016/j.ijbiomac
- 〔学会発表〕(計 18 件)
- 1 坂下恵一郎, 前田憲志, 飯田俊郎, 吉崎重仁, 寺田知新, 恵良聖一. 長期の水素溶存透析液による血液透析はアルブミンレドックスを改善する. 第7回腎不全研究会. 2016年12月10日. 東京.
- 2 吉崎重仁, 近藤弥生, 加藤博愛, 平林雪江, 白川智栄, 中嶋俊介, 玉井泉, 安藤律子, 稲田清美, 飯田俊郎, 前田憲志, 坂下恵一郎, 寺田知新, 恵良聖一. 電解水透析による Albumin redox の改善~より長期の検討. 第93回東海透析研究会. 2016年9月25日. 名古屋.
- 3 Sakashita K, Maeda K, Yosizaki S, Toshiro Iida T, Terada T, Era S, Arikawa H. Improvement of the albumin redox state on hemodialysis treatment using hydrogen-dissolved hemodialysis fluid. ISBP2016 34<sup>th</sup> Congress of International Society of Blood Purification. September 8-10, 2016, Hiroshima.
- 4 坂下恵一郎, 前田憲志, 吉崎重仁, 飯田俊郎, 寺田知新, 恵良聖一, 有川 一. 水素溶存透析液を用いた血液透析治療におけるアルブミン酸化還元状態の改善. 一般社団法人日本分子状水素医学生物学会設立記念大会(第六回年会). 2016年5月27日~29日. 横浜.
- 5 Terada T, Takahashi T, Arikawa H, Era S. Human cell lines of leukocytic, erythrocytic and megakaryocytic lineages affect redox state of human serum albumin. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. March 22-24, 2016, Sapporo.
- 6 Takahashi T, Terada T, Arikawa H, Era S. Comparative study on the oxidative modification of recombinant and plasma-derived human serum albumin: thiol oxidation and carbonylation. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. March 22-24, 2016, Sapporo.

- 7 Arikawa H, Terada T, Takahashi T, Imai H, Era S. Effects of vocalization to physical activities and circulatory states during kendo exercises. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. March 22-24, 2016, Sapporo.
- 8 Terada T, Takahashi T, Arikawa H, Era S. Analysis of biological functions and protein structure in mutated FcεRI β chain (D234A). 8th Congress Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies. November 22-25, 2015, Bangkok, Thailand.
- 9 Takahashi, T, Terada T, Arikawa H, Imai H, Era S. Comparative study on the redox state of HSA products for laboratory use and healthy young subjects. 8th Congress Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies. November 22-25, 2015, Bangkok, Thailand.
- 10 Arikawa H, Terada T, Takahashi T, Imai H, Era S. Sustained vocalizations during kendo exercises suppress expiration of carbon dioxide. 8th Congress Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies. November 22-25, 2015, Bangkok, Thailand.
- 11 高橋哲平, 寺田知新, 有川一, 恵良聖一. 輸液用アルブミン製剤のチオール酸化とカルボニル化の解析. 第62回中部日本生理学会. 2015年11月13日~14日. 富山.
- 12 Terada T, Takahashi T, Arikawa H, Era S. Mutated FcεRI β chain (D234A) affects signal transduction of mast cell but does not affect protein structure and thermal stability of FcεRI β chain protein. The 92th Annual Meeting of the PSJ/The 120<sup>th</sup> Annual Meeting of the JAA. March 21-23, 2015, Kobe.
- 13 Arikawa H, Terada T, Takahashi T, Kizaki K, Imai H, Era S. Sustained vocalizations suppress expiration of carbon dioxide during kendo exercise. The 92th Annual Meeting of the PSJ/The 120<sup>th</sup> Annual Meeting of the JAA. March 21-23, 2015, Kobe.
- 14 南武志, 寺田知新, 高橋哲平, 有川一, 松山幸枝, 恵良聖一. 市販ヒト血清アルブミン製品の分子不均一性に関する研究. 第61回中部日本生理学会. 2014年11月7日~8日. 名古屋.
- 15 有川一, 寺田知新, 高橋哲平, 木崎一葉, 今井一, 恵良聖一. 継続的な発声を伴う剣道実施は, 実施者の呼気二酸化炭素排出を抑制する. 第61回中部日本生理学会. 2014年11月7日~8日. 名古屋.
- 16 鈴木祥史, 須田健二, 二宮亜具里, 寺田知新, 高橋哲平, 恵良聖一, 副島昭典. 血漿アルブミンの還元化率を改善する N-acetylcysteine(NAC)の保存・投与方法および NAC の還元力に影響を及ぼす因子の検討. 第26回腎とフリーラジカル研究会. 2014年9月20日. 名古屋.
- 17 鈴木祥史, 須田健二, 松山幸枝, 寺田知新, 恵良聖一, 副島昭典. 透析液への還元薬剤 (N-acetylcysteine:NAC) の0.03%添加により血漿アルブミン(HSA)の還元化率は著しく改善する. 第59回日本透析医学会学術集会. 2014年6月12日~15日. 神戸.
- 18 Terawaki H, Nakayama M, Zhu WJ, Kabayama S, Terada T, Takahashi T, Matsuyama Y, Sakurai K, Hayashi Y, Watanabe T, Era S. The Effect of Hydrogen-Enriched Dialysate on Redox State of Human Serum Albumin. ISN NEXUS SYMPOSIUM. April 3-6, 2014, Bergamo, Italy.
- 〔図書〕(計 1 件)
- 1 鈴木祥史, 須田健二, 松山幸枝, 寺田知新, 恵良聖一, 副島昭典. 血漿アルブミンの還元化率を改善する還元薬剤の透析液への添加とその有効濃度. 腎とフリーラジカル 第12集 66-70, 2014.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.souyaku.gifu-u.ac.jp/outline/6898b99957a7566629caf148871732f16b9cea98.pdf>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

寺田 知新 (TERADA, Tomoyoshi)

岐阜大学・医学部・准教授

研究者番号：30345780

### (2) 研究分担者

恵良 聖一 (ERA, Seiichi)

岐阜大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：30152002

### (3) 連携研究者

富田 美穂子 (TOMIDA, Mihoko)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：00366329

### (4) 研究協力者

有川 一 (ARIKAWA, Hajime)

高橋 哲平 (TAKAHASHI, Teppei)