

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20890028
 研究課題名（和文） 新規活性化受容体 MAIR-IV の FcR γ 鎖非依存性シグナル伝達機構の解明
 研究課題名（英文） The analysis of FcR γ -independent signaling
 of a novel activating receptor MAIR-IV
 研究代表者
 中埜 貴子（NAKANO TAKAKO）
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・研究員
 研究者番号：60510089

研究成果の概要(和文) 申請者のグループが新たに同定した活性化受容体 MAIR-IV 分子は、ITAM を持つアダプター分子 FcR γ 鎖と会合し、活性化シグナルを伝達する。本研究では FcR γ 鎖非依存性の MAIR-IV のシグナル経路の解析を行い、この経路が ITAM のリン酸化を担うチロシンリン酸化酵素 Syk 非依存性であり、TLR/IL-1R ファミリーのアダプター分子 MyD88 依存性である事を明らかにした。MAIR-IV と MyD88 は直接会合しない事から、その他の MAIR-IV の会合分子の探索を行ったが、同定には未だ至っていない。

研究成果の概要(英文) A novel activating receptor MAIR-IV associates with ITAM-bearing adopter molecule FcR γ chain and regulates cell activation. We detected that MAIR-IV could also transduce activating signal in absent of FcR γ chain. Here we shows that syk is dispensable but MyD88 is indispensable in this FcR γ -independent pathway.

交付決定額

(金額単位 円)

	直接経費	間接経費	合計
200 年度	1,080,000	324,000	1,404,000
200 年度	960,000	288,000	1,248,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野 免疫学

科研費の分科・細目 基礎医学・免疫学

キーワード 免疫、ペア型受容体、MAIR-IV

1. 研究開始当初の背景

(1)本研究に関する国内外の研究動向

自然免疫系は外来異物侵入時に迅速に機

能する最初の防衛機構である。近年、自然免疫応答で主要な役割を果たしている骨髄球系細胞で、種々の受容体分子群が同定さ

れ、免疫細胞の活性化制御機構の全貌が明らかにされつつある。活性化シグナルを伝達する受容体は、そのシグナル伝達様式から二つのグループに大別される。一つ目のグループとして、自身の細胞内領域に ITAM を持つ、免疫グロブリンの受容体である FcγRIIA/C、細菌の膜構成成分を認識する Dectin-1 らが知られている。二つ目のグループは、ITAM 等の活性化シグナルモチーフを持つアダプター分子（現在までに DAP12、DAP10、FcRγ鎖、CD3ζ鎖の4つが同定されている）と会合する NKG2D、PIR-A、TREM-1/2 らがあり、これらの受容体はアダプター分子の活性化シグナルモチーフのみに依存してシグナルを伝達することが報告されている。(Underhill, D. M. and Goodridge, H. S. Trends Immunol. 2006)

(2)本研究の着想に至った経緯

①骨髄球系の活性化を制御する MAIR ファミリーの同定

申請者のグループでは近年、樹状細胞やマクロファージ、肥満細胞などの骨髄球系細胞上に主に発現する、新規活性化および抑制性受容体 MAIR-I、MAIR-II を同定した (Yotsumoto et al. J. Exp. Med. 2003)。MAIR-I は自身の持つ抑制性シグナルモチーフ Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIM) を介して肥満細胞の脱顆粒を抑制し、MAIR-II は ITAM を持つアダプター分子 DAP12 および FcRγ鎖と会合し、その ITAM を介してマクロファージの炎症性サイトカイン産生増強に機能している事を明らかにした (Yotsumoto et al. J. Exp. Med. 2003, Okoshi et al. Int. Immuno. 2005, Nakahashi et al. J. Immunol. 2007)。申請者らはデータベースサーチの結果、MAIR-I、MAIR-II の遺伝子座近傍にさらに一つの遺伝子が存在し、

同染色体上にクラスターを形成している事を見出した (Nakano et al. Mol. Immunol. 2008) (図1)。RT-PCR の結果から、他の MAIR 分子も骨髄球系の細胞に主に発現している事が示唆され、MAIR はファミリーで骨髄球系細胞の活性化制御に機能していると考えられた。

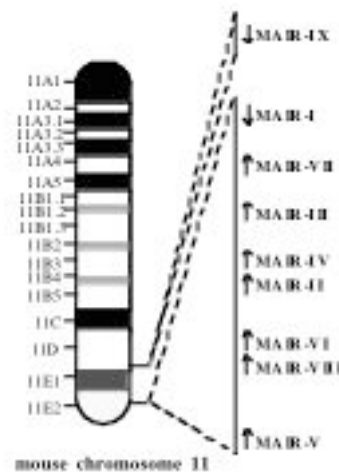


図1. MAIR-I-IXはマウス11番染色体上でクラスターを形成している

②新規活性化受容体 MAIR-IV

申請者らが新たに同定した MAIR 分子のうち、MAIR-IV は好中球、マクロファージおよび樹状細胞に発現しており、抗 MAIR-IV 抗体刺激に応じて、炎症性サイトカインである TNF-α および IL-6 の産生亢進を促す事を明らかにした。また、申請者は MAIR-IV 自身にはシグナルモチーフが存在しないが、ITAM を持つアダプター分子である FcRγ と会合する事を共免疫沈降の系で明らかにし、MAIR-IV は FcRγ の ITAM を介して活性化シグナルを伝達する受容体である事を示した (Nakano et al. Mol. Immunol. 2008) (図2)。通常の活性化受容体は会合するアダプター分子のみに依存してシグナルを伝達する。しかし、申請者は MAIR-IV が FcRγ 遺伝子欠損マウスにおいてもシグナルを伝達する事を明らかとした。MAIR-IV は FcRγ 非依存性の活性化シグナル経路も用いている事が示

唆され、従来とは異なる新規の細胞活性化経路の存在が期待された。

2. 研究の目的

免疫細胞の活性化は、細胞に発現している受容体から入る、活性と抑制シグナルの総和により制御されている。活性化シグナルを伝達する受容体は、通常、自分自身または会合しているアダプター分子の持つ Immunoreceptor tyrosine-based activating motifs (ITAM) を介してシグナルを伝達している。MAIR-IV は ITAM を持つアダプター分子 FcR γ 鎖と会合し、抗 MAIR-IV 抗体刺激によって炎症性サイトカイン産生等の活性化シグナルを伝達する受容体であるが、FcR γ 鎖遺伝子欠損マウスでも MAIR-IV シグナルが伝達される事が明らかとなった。本研究では、新たな細胞の活性化制御機構である MAIR-IV の FcR γ 鎖非依存性シグナル経路の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) シグナル経路における主要分子の同定

既存の遺伝子欠損マウスより細胞を採取し、抗 MAIR-IV 抗体を用いて刺激実験を行った。各遺伝子欠損マウスにおいて、野生型と比較して MAIR-IV 刺激の結果に差異が認められるかで主要分子の絞り込みを行った。

(2) MAIR-IV と MyD88 の会合の検討

(1)の実験により絞り込まれた分子を MAIR-IV とともにマウス細胞株に導入し、両遺伝子を過剰発現するトランスフェクタントを作製した。同細胞より細胞溶解液を作製し、共免疫沈降法により、両分子が細胞表面で複合体を形成しているか検討を行った。

(3) 免疫沈降法による介在分子の探索

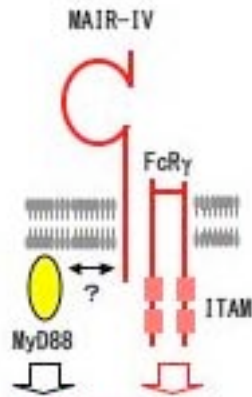
MAIR-IV と MyD88 の会合は、MAIR-IV の細胞内領域に結合ドメインが存在しない事から、何らかの介在分子により仲介されている事が予想された。マウス細胞を用いて抗 MAIR-IV 抗体による免疫沈降を行った後、銀染色法により特異バンドの検出を試みた。得られたバンドは切り出しを行い、MALDI-TOFMS 法を用いた質量分析法により分子の同定を検討した。

・ 研究成果

(1) シグナル経路における主要分子の同定

通常の活性化受容体は会合するアダプター分子のみに依存してシグナルを伝達する。しかし、申請者は MAIR-IV が FcR γ 遺伝子欠損マウスにおいてもシグナルを伝達する事を明らかとし、FcR γ 非依存性の活性化シグナル経路の存在が示唆された。この経路が ITAM に依存したものであるのかを明らかにする為に、ITAM のリン酸化を担うチロシンリン酸化酵素 Syk およびその下流で働く CARD9 遺伝子欠損マウスを用いて実験を行った。その結果、この経路には両分子とも必須ではない事が明らかとなった。続いて、近年 ITAM シグナルとのクロストークが注目されている、TLR/IL-1R シグナルに必須のアダプター分子 MyD88 遺伝子欠損マウス由来の細胞でも同様の検討を行った。その結果、同細胞では野生型に比して MAIR-IV シグナルが有意に減少する事が明らかとなり、MAIR-IV の下流で MyD88 が主要な役割を果たしている事が示唆された (図 2、3)。このデータが抗 MAIR-IV 抗体へのエンドトキシンの混入によるものではないことは、エンドトキシン検出試薬または TLR4 遺伝子欠損マウスの実験により確認済み

である。



活性化シグナル
(炎症性サイトカイン産生)

図2. 新規活性化受容体 MAIR-IV
MAIR-IVはFcRγと会合し、炎症性
サイトカイン産生を促す活性化シ
グナルを伝達する受容体である。
さらに、MAIR-IVはMyD88依存的
にも活性化シグナルを伝達するこ
とが示唆された。

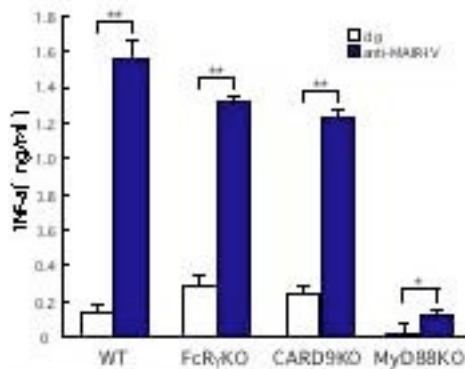


図3. MAIR-IVはFcR γ 非存在下でも活性化
シグナルを伝達でき、そのシグナルは
MyD88依存的である。

(2) MAIR-IV と MyD88 の会合の検討

(1)の実験により、FcR γ 非依存性のMAIR-IVシグナル経路にはMyD88が重要である事が示された。MyD88と受容体分子との会合にはTIR配列が必要である事が知られているが、MAIR-IVにはその配列が存在しない。MAIR-IVとMyD88が実際にマウス細胞において複合体を形成しているのか、両遺伝子を過剰発現するトランスフェクタントを作製し、解析を行う事とした。同細胞より細胞溶解液を作製し、抗MAIR-IVまたは抗MyD88抗体を用いて共免

疫沈降法を行い、その後Western blotting法により、相互のバンドが検出されるか検討を行った。結果、いずれの抗体においても相手のバンドは検出されず、両者が直接会合している可能性は低いものとする。これが介在分子の不在に依るものか、複合体形成を起こさない事を示しているのかを明らかにする為に、マウス好中球およびマクロファージを採取して同様の実験を試みようとしたが、明確な結果を得る事はできなかった。

(3) 免疫沈降法による介在分子の探索

MAIR-IVとMyD88の会合は、MAIR-IVの細胞内領域に結合ドメインが存在しない事から、何らかの介在分子により仲介されている事が予想された。FcR γ 以外のMAIR-IV会合分子を同定するために、マウス細胞を用いて抗MAIR-IV抗体による免疫沈降を行った後、銀染色法により特異バンドの検出を試みた。その結果、1 k、30 k、3 k、kDaに抗MAIR-IV抗体による特異的なバンドが得られた。それぞれのバンドを切り出し、MALDI-TOFMS法を用いた質量分析法による分子同定を試みたが、有意な結果は得られなかった。その原因として非特異的なバンドが多数存在する事が挙げられた。その後非特異的バンドの出現抑制に努めたものの、良好な条件が見つからず、現在はその代替法としてTwo-Hybrid Systemの利用を検討中である。

通常、活性化シグナルを伝達する受容体は、自分自身またはアダプター分子の持つITAMを介して活性化シグナルを伝達するが、このMAIR-IVは更にMyD88依存的な活性化シグナル伝達経路を用いている事が示唆された。MyD88はTLR/IL-1Rファミリーの主要な

アダプター分子であることから、MAIR-IV シグナルは TLR シグナルの修飾に寄与していることが予測される。TLR は細菌やウイルス感染に関与する生体防御に必須の役割を果たしており、MAIR-IV と MyD88 シグナルの機構解明は、骨髄球系細胞の新たな活性化制御機構を解き明かすことに繋がると考えられ、重要である。

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)

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中埜 貴子 (NAKANO TAKAKO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・研究員

研究者番号 0 1 0 0