

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461586

研究課題名(和文) アレルギー疾患におけるサイトカイン受容体小胞輸送と受容体遺伝子多型

研究課題名(英文) Endosomal sorting signal of cytokine receptors and its single nucleotide polymorphism in allergy disease

研究代表者

竹下 敏一 (TAKESHITA, Toshikazu)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：60212023

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)：リンパ球の高度に分化した細胞内区画を小胞輸送が支えている。本研究ではインターロイキン2受容体鎖(IL-2R)並びにインターロイキン4受容体鎖(IL-4R)の小胞輸送に関わる分子機序を明らかにすると共に、受容体の遺伝子多型とアレルギーとの関連を探索した。アトピー患者においてIL-4Rの新たな遺伝子多型を見出した。一方、小胞輸送に影響を与える多型は今回見出されなかった。

研究成果の概要(英文)：In lymphoid cell, intracellular compartments, which keep the specific substances of the system and exchanges the substances between the compartments, is supported by endosomal sorting. Here, we elucidated endosomal sorting mechanism of interleukin-2 receptor (IL-2R) and interleukin-4 receptor (IL-4R), and explored single nucleotide polymorphism (SNP) of the receptors in allergy patients. We identified novel SNPs in IL-4R gene locus of the patients. On the other hand, the SNP involved in endosomal sorting was not detected in the patients.

研究分野：免疫学

キーワード：サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

小胞輸送は、従来知られていたユビキチンを目印としたユビキチン“依存性”小胞輸送が主なルートと考えられてきた。一方、ユビキチン“非依存性”の小胞輸送ルートの存在も報告されていたが、その分子レベルでの詳細が未確認であることから、その存在意義は重要視されていなかった。我々はサイトカイン受容体を例に取り、未だ不明な点の多い小胞輸送機構を明らかにすることによって、免疫機構解析の基盤とすることを試みた。我々はこれまで IL-2 受容体鎖 (IL-2R β)、IL-4 受容体鎖 (IL-4R α) がユビキチン“非依存性”小胞輸送されること、またその輸送を分子レベルで初めて明らかにした (Journal of Biological Chemistry, 286, 15458-15472, 2011)。この解析からユビキチン“依存性”小胞輸送を担う分子、「Hrs」が、ユビキチン“非依存”の小胞輸送にも機能していることが見えてきた。

「Hrs」の従来知られている機能について、先ず述べる。サイトカイン受容体の中でも最も良く解析されている Epidermal growth factor (EGF) 受容体は、EGF を受け取ってそのチロシンキナーゼが活性化され、さらに internalization されると共に、その細胞内領域に単体のユビキチン (モノユビキチン) が結合する。このモノユビキチンは、ユビキチン依存性の小胞輸送装置である ESCRT 複合体に捕らえられるが、始めに ESCRT-0 に捕らえられた EGF 受容体は次に ESCRT-I、-II、-III そしてリソソームへとバケツリレーの如く手渡され、最終的に分解される。「Hrs」は ESCRT-0 の構成因子の 1 つであり、その分子内にモノユビキチンと会合するための UIM (Ubiquitin interacting motif) モチーフを含むことから、モノユビキチン化された種々のサイトカイン受容体を最初に認識する分子である。IL-2R β も当初、ユビキチン依存性に小胞輸送されると考えられていたが、

我々は IL-2R β の小胞輸送にユビキチンが関与しないこと、一方、「Hrs」は関与することを見出した (Journal of Cell Science, 121, 1727-1738, 2008)。そしてさらに解析を進め、「Hrs」は関与するが、ユビキチンには依存しない小胞輸送の分子機序を IL-2R β と IL-4R α を用いて明らかにした (Journal of Biological Chemistry, 286, 15458-15472, 2011)。しかしながらこの輸送ルートが、サイトカイン受容体のシグナル伝達や免疫機構をどのように制御しているかは不明であり、解析すべき領域である。

2. 研究の目的

(1) 我々は IL-2R β と IL-4R α において、ユビキチン非依存性小胞輸送ルートを明らかにし、サイトカイン受容体の小胞輸送経路が、従来のユビキチン依存的ルートと本研究のユビキチン非依存的ルートに大きく分かれることを示唆した。IL-2R β 、IL-4R α の細胞内領域の Hrs 結合部位に変異を導入すると、各受容体のユビキチン非依存小胞輸送は阻害される。我々はさらにこの小胞輸送阻害に伴い IL-2 や IL-4 シグナルが増強されることを見出した。IL-2R β 、IL-4R α の細胞内領域中の Hrs 結合部位は、わずかの変異でその Hrs 結合能を失うことから、ヒトにおいてこのわずかの変異が生じた場合、免疫系に与える影響は少なくないと思われる。従って、このシグナル増強の分子メカニズムを解析すると共に、アトピー等アレルギー疾患を有する患者において、IL-2R β 、IL-4R α の細胞内領域の Hrs 結合部位変異の有無を調べることを目的とする。

IL-2R β および IL-4R α の細胞内領域の Hrs 結合部位は 4 ~ 5 個の疎水性アミノ酸クラスター (IL-2R β : FFFHL ; IL-4R α : LFLDLL) であり、この 4 ~ 5 個の疎水性アミノ酸を他のアミノ酸に置換すると、Hrs は結合できず、小胞輸送

が妨げられる。従って、上記のシグナルの増強と合わせて考えると、この部位のわずかのアミノ酸変異も、ヒトの免疫系に少なくない影響を与える可能性がある。そこでアトピー等アレルギー疾患について、この疎水性クラスター変異の有無を、患者末梢血を用いて探索する。本研究は信州大学医学部遺伝子解析倫理委員会承認済みである。

受容体細胞内領域の小胞輸送に関わるアミノ酸の1次配列は「小胞輸送シグナル」と呼ばれ、この輸送シグナルをトランスフェリン受容体などのC末端に連結すると、このキメラ受容体は recycle endosome に輸送されず、リソソームへと輸送される。そこで我々は IL-2R β の疎水性アミノ酸クラスター (365-369 : FFFHL) を通常 recycle endosome に輸送される IL-2R α の細胞内領域 C 末端に連結して、その細胞内輸送を観察した。しかしこの IL-2R α のキメラ受容体はリソソームに輸送されず、野生型の IL-2R α と同様に recycle endosome へ輸送された。さらに、IL-2R β の細胞内領域全てを IL-2R α の C 末端に連結すると、このキメラ受容体はリソソームへと輸送された。この結果とこれまでの解析結果より、疎水性アミノ酸クラスターは小胞輸送に必須の領域であるが、完全な「小胞輸送シグナル」として働くためには未だ未同定の領域があることを示唆している。この輸送シグナルの未同定アミノ酸が、前述の新たなアレルギー疾患関連の遺伝子多型並び変異に含まれるかどうかを IL-4R α 並びに IL-2R β の双方で検討する。

3. 研究の方法

(1) IL-2R β および IL-4R α の細胞内領域の Hrs 結合部位は 4 ~ 5 個の疎水性アミノ酸クラスター (IL-2R β : FFFHL ; IL-4R α : LFLDLL) であり、この 4 ~ 5 個の疎水性アミノ酸を他のアミノ酸に置換すると、Hrs は結合できず、小胞輸送が妨げられた。また、上述の様にシグナルの増強が観察された。こ

の部位のわずかのアミノ酸変異も、ヒトの免疫系に少なくない影響を与える可能性がある。そこでアトピー等アレルギー疾患について、この疎水性クラスター変異の有無を、患者末梢血を用いて探索する。

IL-4R α からのシグナルがアレルギー反応に関わっていることは、ノックアウトマウスをはじめ種々の研究より明らかであるが、受容体の変異とアレルギー増悪との関連は判っていない。従来の疾患と遺伝子座間の網羅的解析は単一アミノ酸変異に依存するものには有効であるが、本研究のような、1つの機能に複数のアミノ酸が関わる条件下では絞り込みが困難である。IL-4R α では 576 番目のグルタミンがアルギニンに置換している例で、喘息と有意な関連が認められている。ただし、これは変異ではなく、遺伝子多型である。他の部位の遺伝子多型で、アトピーとの関連が示唆されているのは C431R があり、また喘息とアトピーに関連する E400A などが報告されている。一方、今回の疎水性アミノ酸クラスター (410 - 415) についての報告はない。この部位の変異が 5 つの疎水性アミノ酸全てに入ることはほとんど無いと考えられることから、ヒトの変異が存在するとすれば、それは 1 つか、もしくは 2 つが妥当と思われる。このようなバックグラウンドを踏まえつつ、アトピー等アレルギー疾患の末梢血を用いて、IL-4R α 疎水性アミノ酸クラスターの変異をスクリーニングする。アレルギー疾患としてはアトピーと喘息を取り上げる。

(2) IL-2R β 及び IL-4R α の疎水性アミノ酸クラスターについて、クラスターを含む種々の変異体を作製して IL-2R α の細胞内領域につなぎ、「小胞輸送シグナル」として機能するための条件を探る。即ち、疎水性アミノ酸クラスターの機能を補完する領域とその特性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) アミノ酸クラスターは小胞輸送シグナルとして働く

小胞輸送に関わるアミノ酸の1次配列は「小胞輸送シグナル」と呼ばれる。一方、IL-2R β 及びIL-4R α の細胞内領域のアミノ酸クラスター領域を recycle endosome に輸送されるIL-2R α の細胞内領域C末端に連結して、その細胞内輸送を観察すると、IL-2R α のキメラ受容体はリソソームに輸送されず、野生型のIL-2R α と同様に recycle endosome へ輸送された。このことはアミノ酸クラスターのみでは「小胞輸送シグナル」として不足であり、さらにアミノ酸クラスターを捕捉する領域か、もしくはアミノ酸クラスターを補完する特性がまだ同定されていないことを示唆する。そこで図1に示すように、IL-2R β の細胞内領域の種々の変異体を作製してIL-2R α C末端に連結した。アミノ酸クラスター単独ではリソソームに輸送されないが、IL-2R β のどの領域を用いてもリソソーム輸送が観察された。無論、アミノ酸クラスター領域の欠失した変異体は全くリソソーム輸送されない。以上のことは、アミノ酸クラスター領域の下流にある程度の長さのアミノ酸鎖があれば必要十分であることを示唆する。

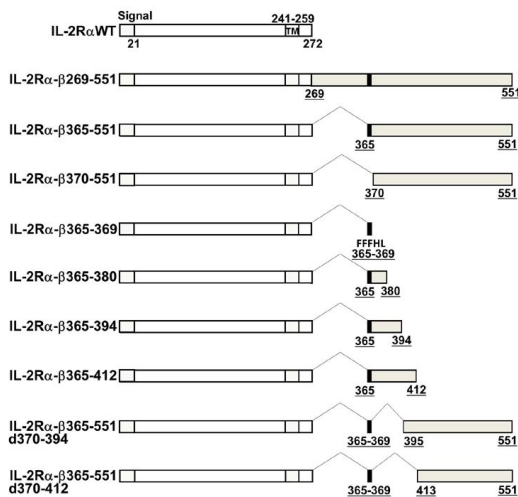
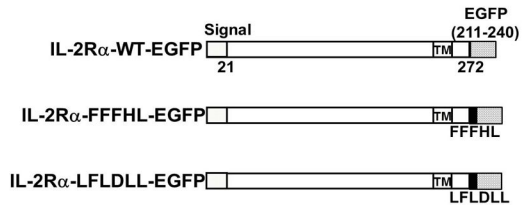


図1 IL-2受容体 β 鎖細胞内領域とIL-2受容体 α 鎖キメラ

そこでIL-2R β 及びIL-4R α の疎水性アミノ酸クラスター領域に受容体とは全く異なる green fluorescence protein であるEGFP中のアミノ酸を30残基連結した(図2)。

図2 小胞輸送シグナルとしてのアミノ酸クラスター領域



無論、EGFPの30アミノ酸のみを連結したIL-2R α はリソソーム輸送されなかったが、IL-2R β 及びIL-4R α の疎水性アミノ酸クラスター領域にEGFPの30アミノ酸連結したIL-2R α キメラ受容体はリソソーム輸送された。このことは疎水性アミノ酸クラスターが有効に働くためには、C末端に30アミノ酸程度の長さがあれば十分であることを示している。即ち、疎水性アミノ酸クラスターの立体構造の安定化に寄与していると考えられる。以上より、疎水性アミノ酸クラスターは小胞輸送シグナルであると結論づけられる。

(2) アレルギー患者におけるIL-4受容体 α 鎖の遺伝子多型

55人のアトピーおよび喘息のある小児の末血よりDNAを抽出し、IL-4Rの細胞内領域の解析を行った。5人において疎水性アミノ酸クラスター、IL-4R(LFLDLL)のN末方向から5番目のロイシン(L)にG/T変異を見出したが、残念ながらこれはCTG/CTT(Leu/Leu)でアミノ酸の変わらないサイレンス変異であった。これまでIL-4R遺伝子座の網羅的な解析から、喘息と576番目のグルタミンがアルギニンに置換する遺伝子多型(Q576R)との関連が報告されている。我々の解析では55人中11名の同遺伝子多型を見出した。その他の報告のある遺伝子座としては喘息とアトピーに関わると考えられているE400A並びにアトピーとの関連が報告されているC431Rがあり、前者は7名、後者は6名を見出した。一方、これまで報告のない遺伝子座を2つ同定した。1つはGからAの変異でTCG/TCA(Ser/Ser)となりサイレン

ス変異であった。もう1つはAからGの変異でAGC/GGC (Ser/Gly)となるが1名のみで、その意義付けはこれからの課題である。

本研究では、先ずIL-2受容体鎖ならびにIL-4受容体鎖の疎水性アミノ酸クラスター「FFFHL」ならびに「LFLDLL」が「小胞輸送シグナル」として機能していることを明らかにした。当初、このアミノ酸クラスターはリソソーム輸送に必須であるが、そのみでは機能しないことから、その補完機能に関する新たな領域があると仮定した。しかしながら補完に働く特異的な領域はなく、疎水性アミノ酸クラスターがその立体構造を安定的に保つために、C末端に余分なアミノ酸残基が存在すれば十分であることが示された。本解析は、次の課題である遺伝子多型を評価するための基礎を為すものである。これまで明らかにされているアレルギー等疾患に関わるとされている遺伝子多型はオッズ比にすると2前後となる。即ち、コントロール群である健常人と比較して2倍アレルギーになり易いことを意味する。これはいわゆる人口の数十%が保有するcommon SNPの遺伝子多型の解析結果であるから、当然と言える。この2倍程度の差は環境要因に大きく影響を受け、ある環境状態では差がないとする結果も容易に出てくるわけである。従って、遺伝子多型が本質的であるかどうかは、機能との結びつきが最も有効な評価であると考えられる。そのような視点から本研究は解析が為されている。

アレルギーとIL-4受容体鎖の遺伝子多型については、Q576RならびにI50Vがしばしば議論されている。それはこの2つの多型に関して、人種や地域でアレルギーとの関連に有為差が出たり、出なかったりするケースが背景にある。一方、I50Vについては分子メカニズムの次のような解析がなされている。IL-4受容体鎖の下流に転写因子、STAT6があり、細胞へのIL-4刺激により細胞内のSTAT6がチロシンリン酸化を受ける。そこでI50を持

つIL-4受容体鎖とV50を持つIL-4受容体鎖をそれぞれ細胞に発現させて、STAT6のリン酸化の比較を行ったところ、V50の多型を持つ受容体を発現した細胞では、STAT6のリン酸化の持続が見られた。従って、V50の多型がIL-4のシグナル増強に関わると考えられるが、患者のアレルギー症状の発現にはV50に加えて、さらなる要因が影響することを示唆している。いわゆる人口の数十%を占めるcommon SNPは無論、その多型のみで疾患を引き起こすのではなく、いくつかの関連する遺伝子の多型が積み重なって、罹患リスクを上昇していると考えられているので、関連する多型のリストが揃わないと疾患メカニズムに迫ることが困難と理解されている。本研究では、2つの新たな多型を見出したが、この多型の受容体機能に与える分子メカニズム等の解析が今後の課題である。

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)

[雑誌論文](計 2 件)

Kojima K., Amano Y., Yoshino K., Tanaka N., Sugamura K., Takeshita T.: ESCRT-0 Protein Hepatocyte Growth Factor-regulated Tyrosine Kinase Substrate (Hrs) Is Targeted to Endosomes Independently of Signal-transducing Adaptor Molecule (STAM) and the Complex Formation with STAM Promotes Its Endosomal Dissociation. **J Biol Chem** 289, 33296-33310, 2014. DOI 10.1074/jbc.M114.578245 (査読有り)

Amano Y., Yoshino K., Kojima K., Takeshita T.: hydrophobic amino acid cluster inserted into the C-terminus of a recycling cell surface receptor functions as an endosomal sorting signal **Biochem Biophys Res Commun**, 441, 164-168, 2013. DOI 10.1016/j.bbrc.2013.10.019 (査読有り)

[学会発表](計 2 件)

十亀 陽一郎、小嶋克彦、竹下敏一、木下英司、松岡 達臣：織毛虫 *Colpoda cucullus* の休眠シスト形成のシグナル

伝達系およびタンパク質発現解析 日本
原生動物学会、東広島、2013年11月8
日

天野勇治、小嶋克彦、吉野和寿、竹下敏
二: Hrs recognizes a hydrophobic amino
acid cluster in cytokine receptors
during ubiquitin-independent
endosomal sorting. 国際免疫学会、ミラ
ノ、2013年8月23日

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/immunobiology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹下 敏一 (TAKESHITA, Toshikazu)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号: 60212023

(2) 研究分担者

()

(3) 連携研究者

小嶋 克彦 (KOJIMA, Katsuhiko)
信州大学・学術研究院医学系・講師
研究者番号: 80345743

吉野 和寿 (YOSHINO, Kazuhisa)
信州大学・学術研究院医学系・助教
研究者番号: 40551859

天野 勇治 (AMANO, Yuji)
信州大学・学術研究院医学系・助教
研究者番号: 50624681