

学位研究紹介

FcγIIIb 多型に関連するヒト好中球プロテオミックプロファイリング Proteomic profiling of human neutrophils in relation to immunoglobulin G Fc receptor IIIb polymorphism

新潟大学大学院医歯学総合研究科歯周診断・再建学分野
横山智子

Division of Periodontology, Department of Oral Biological Science, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
Tomoko Yokoyama

【目 的】

好中球は、歯周病原細菌に対する宿主防御機構において重要な役割を担っている。ヒト好中球上には、構成的に FcγRIIA と IIIb があり、IIA は細胞内に活性化シグナルを伝達する ITAM を持ち、IIIb は GPI アンカーで結合し、活性化サブユニットとは直接会合していない。しかし、FcγRIIIb は好中球上に最も発現が多く、好中球の免疫複合体への結合は主に FcγRIIIb を介して行われ、その後 IIIb と IIA の協調作用により、効果的な貪食がすすむと考えられている。FcγRIIIb は、好中球特異的な免疫グロブリン G (IgG) レセプターであるが、機能的に違いのある NA1-NA2 多型を有する。これまで、NA1-NA2 遺伝子型と歯周炎には関連性があることが示唆されてきた。日本人歯周炎患者を対象に行った研究では、健常者に比べ侵襲性歯周炎で FcγRIIIb-NA2/NA2 の割合が有意に高い結果となっている。NA1-NA2 多型はエクソン 3 内の 5 つの塩基置換によって、第一細胞外 Ig 様ドメイン内の 4 つのアミノ酸が変化しており、また、2 か所のアミノ酸変化の結果、2 つの N 結合糖鎖付加部位がつくられる。この違いにより IgG との結合親和性が NA1/NA1 で高いこと、そして貪食能・活性酸素能が NA1/NA1 で高いことが報告されているが、その間にある FcγRIIIb と IgG との相互作用によって生じる、細胞内タンパク質にどのような影響を与えるか、また、貪食能だけでなく他のリスクファクターになりうる要因についてはまだ検証されていない。そこで、本研究では、FcγRIIIb-IgG の相互作用により、NA1-NA2 遺伝子型間

で好中球タンパク発現が異なることを仮説とし、プロテオーム解析を用いて網羅的に検証することを目的とした。

【材料および方法】

対象者の抽出のため、インフォームドコンセントが得られた健常者 40 名における FcγRIIA, IIIb 多型を PCR 法にて同定した。FcγRIIIb は IIA を介して好中球機能が発揮されるため、IIa-R/H131 に多型を統一し、その中から、FcγRIIIb-NA1/NA1 5 名、-NA2/NA2 5 名を対象者とした。各対象者から、末梢血採取後、比重遠心法好中球を分離した。FcγRIIIb の IgG1 作用による発現タンパクを観測するため、human monoclonal IgG1 antibodies to *P. gingivalis* 381 recombinant 40kDa outer membrane protein (hMAb) を用いて刺激し、FcγRIIIb 誘導性タンパク質を抽出、タンパク質抽出可溶化溶液にて溶解した。FcγRIIIb の多型間での発現の違いの検証のため、フローサイトメトリーにより、FcγRIIIb 陽性率と平均蛍光強度を比較し、多型間での陽性率、平均蛍光強度とも変化はないことを確認した。抽出されたタンパク質についてブラッドホード法にてタンパク質量を測定し、各 100 μg を pI レンジ 3-10 で等電点電気泳動し、次いで SDS-PAGE を行い、10-225kDa までの分離を行った。泳動像はシプロルビー染色を行い、泳動像をスキヤニングし、ImageMaster2D プラチウムでそれぞれのスポットを検出した。検出された総計 757 個のスポットからのスポットボリューム値を Student's unpaired t-test で多型間の比較を行い、p 値 0.05 未満で有意性の得られた 5 つのスポットを同定スポットとして採択した。採択した 5 スポットを切り出し、トリプシン消化後、質量分析、タンパク質同定を行った。

【結 果】

FcγRIIIb 誘導性タンパク質の 2 次元電気泳動により、757 タンパク質スポットが得られた (図 1)。Student's unpaired t-test により、NA1-NA2 遺伝子型で 5 つのタンパ

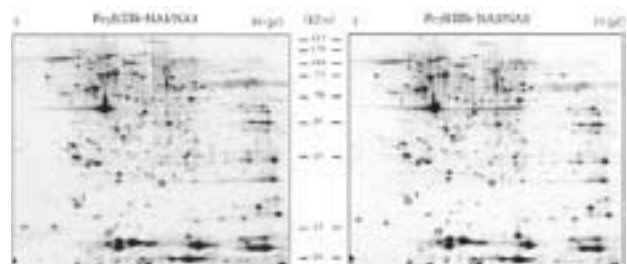


図 1 代表的な 2 次元電気泳動像

表1 有意差のある5スポットの同定結果

Spot no.	Protein name	Mean spot volume ratio (NA1/NA2)	Accession number (NCBItr)	MW (Da)	MOWSE score	Matched peptide sequences
Spot no.1	Protein-arginin deiminase type-4 (PADI4)	0.6	gi 12230488	74.079	182	TLPVVFDSPPR VMGPDFGYVTR ILFGDSCYPSNDSR GPQTGGISGLDSFGNLEVSPP VTVR
Spot no.2	Annexin VI	0.7	gi 34533483	75.873	153	ALIEILATR LVFDEYLK FMTILCTR SEIDLLNIRR ILISLATGHREEGGENLDQAR
Spot no.3	Cdc42hs-Gdp complex	1.4	gi 4389379	21.258	78	YVECSALTQK WVPEITHHCPK QKPITPETAELKAR
Spot no.4	Myosin light chain 12A	1.5	gi 5453740	19.794	124	GNFNIEFTR KGNFNIEFTR FTDEEVDLYR EAPIDKGNFNIEFTR
Spot no.5	Coactosin-like1	1.3	gi 21624607	15.944	194	KELEEDFIK DDGSVAVWTFK ELEEDFIKSELK ELEEDFIKSELKK FALITWIGENVSGLQR SKFALITWIGENVSGLQR

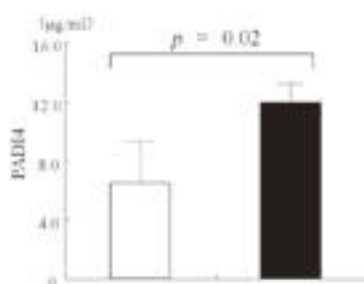


図2 FcγRIIIb-NA1/NA1, -NA2/NA2好中球 PADI4 濃度

タンパク質スポット発現レベルに有意差が認められた($p < 0.05$)。NA1/NA1好中球では2スポット(PADI4, annexin VI)が有意に発現低下しており, 3スポット(Cdc42hs-Gdp, complex, myosin light chain 12A, coactosin-like 1)が有意に高い発現を示した(表1)。このうちPADI4では, 同様のタンパク質発現傾向が, ELISA測定により確認された(図2)。

【考 察】

PADIはアルギニンのイミノ基を外す脱イミノ反応をすすめる酵素であり, タンパク質を構成するアルギニン残基の正電荷を消失させ, 中性のシトルリンに変換する。そのため, ターゲットとなるタンパク質の高次構造や他の分子との相互作用が変化し, 細胞内の様々な機能に大きな影響を及ぼすと考えられている。PADI4は5種類のPADIのアイソフォーム中で, 骨髄・末梢血など免疫・血液系臓器・細胞に発現することが知られており, 核移行シグナルを持つこと, シトルリン化酵素であり, その過剰発現は慢性炎症性疾患の病因になりえることが報告

されている。PADI4は細胞外カルシウムイオンの影響を受けるとの報告があり, FcγRIIIbはカルシウムイオンの放出トリガーとなることが報告されているため, このカルシウムイオンの制御差の多型間における違いが, PADI4発現差につながるのではと推察する。今のところ, PADI4が直接菌周炎と関連するという証拠はない。仮説として, PADI4発現が高かったNA2/NA2ドナーの方がシトルリン化されたタンパク質が増え, その結果, 補体の活性化や好中球の動員・活性化, 炎症性サイトカインの産生などの炎症反応が増加したと考える。annexin VIは, 好中球のファゴゾーム成熟期に発現上昇し, 好中球機能と関連することが示唆されている。今回の結果から, ある測定時点でのannexin VIタンパク質発現はNA1-NA2多型間で異なることから, 好中球の機能差につながるのではないかと推測される。Cdc42hs-Gdp Complexは貪食や活性酸素産生に重要なタンパク質であり, coactosin-like 1はアクチン細胞骨格に関わり, これらのタンパク質発現が高いほど, 好中球機能は亢進し, NA1/NA1で好中球機能が亢進したと考えられる。

以上の結果より, FcγRIIIb遺伝子多型は好中球におけるタンパク質発現に影響を及ぼすことが示唆された。

【文 献】

Yokoyama T, Kobayashi T, Yamamoto K, Yamagata A, Oofusa K, Yoshie H: Proteomic profiling of human neutrophils in relation to immunoglobulin G Fc receptor IIIb polymorphism.

Journal of Periodontal Research, 45(6):780-787, 2010.