

遺伝子群)の発現制御にエピジェネティックスの関与が強く推測されている。一般に非メチル化 H3 (H3K4me0) の近傍遺伝子是不活性状態にあることが多く, Aire はそのプロモーター領域が H3K4me0 状態 (低発現状態) にある自己抗原遺伝子を選択的に発現誘導するというモデルが提唱されている^{2,3,12)}。また, Aire のパートナータンパク質の網羅的な解析からは, 1) DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) や TOP2a (topoisomerase II α) などと協調した DNA 損傷反応 (DNA-damage response), 2) RNA プロセシング, 3) 核輸送といったプロセスに Aire がはたらくことで, 膨大な数の自己抗原遺伝子発現を制御する可能性も報告されている¹³⁾。さらに, Aire が P-TEFb (positive transcription elongation factor b) をプロモーター領域にリクルートすることによって自己抗原遺伝子の転写伸長反応 (transcriptional elongation) を促進するという報告もある¹⁴⁾。このように転写モデルを中心に, Aire の多彩な遺伝子発現調節作用が提唱されている。ただし, こうした一連の実験は Aire 遺伝子導入細胞株を用いて行われているため, 生体における mTEC での Aire 機能を真に反映しているか否かについては疑問が残る。

5. お わ り に

T 細胞分化は T 細胞に組み込まれた内的プログラムのみに従って進行するのではなく, mTEC などの間質から供給される細胞外シグナルによって, そのプロセスが制御されている。mTEC は胸腺内 T 細胞分化を支えるという重要な役割を担うにもかかわらず, 純化した細胞を大量に単離することが困難であることからその生化学的解析は立ち遅れている。Aire 遺伝子改変マウスを切り口として mTEC の生化学的研究を推進できれば, 自己免疫疾患の病態解明に大きな進展がもたらされるものと期待される。Aire の標的遺伝子が何であるかという本質的な問いかけに答えるためには, 新たな視点や解析技術を取り入れた生化学的アプローチも必要である。

- 1) Kyewski, B. & Klein, L. (2006) *Annu. Rev. Immunol.*, 24, 571–606.
- 2) Peterson, P., Org, T., & Rebane, A. (2008) *Nat. Rev. Immunol.*, 8, 948–957.
- 3) Mathis, D. & Benoist, C. (2009) *Annu. Rev. Immunol.*, 27, 287–312.
- 4) Nagamine, K., Peterson, P., Scott, H.S., Kudoh, J., Minoshima, S., Heino, M., Krohn, K.J., Lalioti, M.D., Mullis, P.E., Antonarakis, S.E., Kawasaki, K., Asakawa, S., Ito, F., & Shimizu, N. (1997) *Nat. Genet.*, 17, 393–398.

- 5) Anderson, M.S., Venzani, E.S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., Turley, S.J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., & Mathis, D. (2002) *Science*, 298, 1395–1401.
- 6) Kuroda, N., Mitani, T., Takeda, N., Ishimaru, N., Arakaki, R., Hayashi, Y., Bando, Y., Izumi, K., Takahashi, T., Nomura, T., Sakaguchi, S., Ueno, T., Takahama, Y., Uchida, D., Sun, S., Kajiura, F., Mouri, Y., Han, H., Matsushima, A., Yamada, G., & Matsumoto, M. (2005) *J. Immunol.*, 174, 1862–1870.
- 7) Niki, S., Oshikawa, K., Mouri, Y., Hirota, F., Matsushima, A., Yano, M., Han, H., Bando, Y., Izumi, K., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kuroda, N., & Matsumoto, M. (2006) *J. Clin. Invest.*, 116, 1292–1301.
- 8) Matsumoto, M. (2011) *Eur. J. Immunol.*, 41, 12–17.
- 9) Yano, M., Kuroda, N., Han, H., Meguro-Horike, M., Nishikawa, Y., Kiyonari, H., Maemura, K., Yanagawa, Y., Obata, K., Takahashi, S., Ikawa, T., Satoh, R., Kawamoto, H., Mouri, Y., & Matsumoto, M. (2008) *J. Exp. Med.*, 205, 2827–2838.
- 10) Nishikawa, Y., Hirota, F., Yano, M., Kitajima, H., Miyazaki, J., Kawamoto, H., Mouri, Y., & Matsumoto, M. (2010) *J. Exp. Med.*, 207, 963–971.
- 11) Gray, D., Abramson, J., Benoist, C., & Mathis, D. (2007) *J. Exp. Med.*, 204, 2521–2528.
- 12) Org, T., Rebane, A., Kisand, K., Laan, M., Haljasorg, U., Andreson, R., & Peterson, P. (2009) *Hum. Mol. Genet.*, 18, 4699–4710.
- 13) Abramson, J., Giraud, M., Benoist, C., & Mathis, D. (2010) *Cell*, 140, 123–135.
- 14) Oven, I., Brdickova, N., Kohoutek, J., Vaupotic, T., Narat, M., & Peterlin, B.M. (2007) *Mol. Cell. Biol.*, 27, 8815–8823.

松本 満, 新居 卓朗

(徳島大学疾患酵素学研究センター
免疫病態研究部門)

Transgenic approaches to the pathogenesis of autoimmune disease with mouse models of the human disease
Mitsuru Matsumoto and Takuro Nii (Division of Molecular Immunology, Institute for Enzyme Research, University of Tokushima, 3-18-15 Kuramoto, Tokushima 770-8503, Japan)

細胞骨格によるスカベンジャー受容体 CD36 重合体形成とシグナル制御機構

1. は じ め に

自然免疫細胞の一つマクロファージは, 感染防御以外にも, 様々な病気の原因から我々の体を守っている。食事として摂取した動物タンパク質を原料とするリポタンパク質が過剰に血液中を循環することで高脂血症となり, 結果と

して血管障害などの生活習慣病が引き起こされる。リポタンパク質の中でも特に問題となるのは、「悪玉コレステロール」と呼ばれる低比重リポタンパク質 (low density lipoprotein: LDL) である。LDL は、血管壁などを通じて組織内に入り、組織内で酸化 LDL (ox-LDL) となる。ox-LDL は有害であるので、速やかに排除する必要がある、マクロファージが ox-LDL を貪食する。マクロファージ細胞表面には、ox-LDL を取り込むための受容体が発現しており、代表としてスカベンジャー受容体 CD36 が挙げられる¹⁾。CD36 は B 型スカベンジャーファミリーに属し、血小板や血管内皮細胞などにも発現しているが、特にマクロファージに発現した CD36 が粥状硬化症などの病態進行に深く関わっている^{2,3)}。

2. CD36 のリガンド取り込み機能

CD36 はトロンボスポンジンやコラーゲン、マラリア感染赤血球など、形状の共通性のない多様なリガンドの受容体として働くことから、ユニークなリガンド認識機構を有すると考えられている。タンパク質の構造的特徴としては、N 末端と C 末端の 2 ヶ所に細胞膜貫通部位とごく短い細胞内領域を持ち、JNK や Rho ファミリー GTPase の活性化によりシグナルを伝達し、エンドサイトーシスやサイトカイン発現を引き起こす。実験的に IgM 型モノクローナル抗 CD36 抗体を用いて強制的にクロスリンクさせることでエンドサイトーシスが起きることから、受容体の多量体形成が引き金となってシグナルが伝達されると考えられる^{4,5)}。

3. CD36 の多量体形成

前述の通り、CD36 のシグナル伝達の分子メカニズムの解明は、さまざまな疾患の発症機序の理解や疾患予防に必要である。そこで筆者らのグループでは、マクロファージ細胞表面における多量体形成機構メカニズムの解明にフォーカスし、生化学的手法と一分子イメージングの技術を組み合わせることにより、マクロファージ細胞表面における CD36 のダイナミズムを調べた⁶⁾。

我々の実験系では、ヒト末梢血からマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) を用いて誘導したマクロファージをカバーガラス上で培養したものを用いた。受容体は蛍光標識した Fab 抗体を用いた。一分子イメージング手法による蛍光強度の解析により、固定した細胞表面では四量体以上の CD36 多量体が観察された (図 1a)。この時、細胞にはリガンドは加えられておらず、受容体の多量体化はリガ

ンドがなくても生じることがわかった。次に、生細胞のマクロファージ細胞表面における分子のダイナミズムを探った。すると、CD36 の形成する多量体は“メタステーブル”な状態であることがわかった。この“メタステーブル”な状態では、CD36 多量体が数ミリ秒単位の短い間隔で離合集散を繰り返していた (図 1b)。

4. 受容体の多量体化と細胞骨格の影響

さらに、CD36 は細胞表面で特徴的な軌跡を描くことがわかった。それぞれの CD36 の軌跡を詳細に解析した結果、三つに分類されることがわかった。一つは細胞中心から外側に直線状にのびる直線軌道型 (I 型)。二つ目は決まった方向を持たないブラウン運動を行う自由型等方向性軌道型 (II 型)、三つ目は狭く限局された領域内でブラウン運動を行う閉じ込め型等方向性軌道型 (III 型) であった。それぞれの割合は、I 型が 27%、II 型が 18%、III 型が 55% 程度であった。また、多量体形成の頻度は I 型で最も高かった。結論として、I 型軌道は多量体形成を促進することが明らかとなった。なお、詳細な解析手法と結果については、文献 6, 7 を参照のこと (図 1c, d)。

5. 細胞骨格による受容体ダイナミクスのコントロール

直線軌道型 (I 型) は、これまでに知られていない新しいタイプの分子の軌道であった。どのようなメカニズムによりこの軌道は作られるのであろうか。これまでに、免疫細胞を含めた多くの細胞で、細胞骨格が分子のモビリティに重要であることが知られている⁸⁾。我々は、I 型軌道が細胞骨格に依存しているのではないかと考え、細胞骨格系各種阻害剤を用いて軌道形成に与える影響を調べた。そこで、チューブリン重合阻害剤 (ノコダゾール) でマクロファージを処理し、CD36 の軌跡の変化を調べたところ、I 型の割合が大幅に減少した。また、アクチンの重合阻害剤であるラトランキュリンで処理した場合も同様に I 型の割合は大幅に減少した。加えて、I 型軌道が減少した場合、多量体形成も大きく阻害された。以上、CD36 の軌道形成は細胞骨格系により依存しており、かつ軌道の形状が多量体形成の効率に影響を与えていることがわかった (図 2a, b)。なお、Fcγ 受容体などでは、I 型の軌道は認められなかったことから、I 型軌道はすべての分子に普遍的に見られるものではなかった。

筆者らのグループでは、直線軌道の存在意義としては、二次元平面で自由に運動する受容体同士が衝突し多量体を形成する確率は通常それほど高くなくとも、分子を一次元

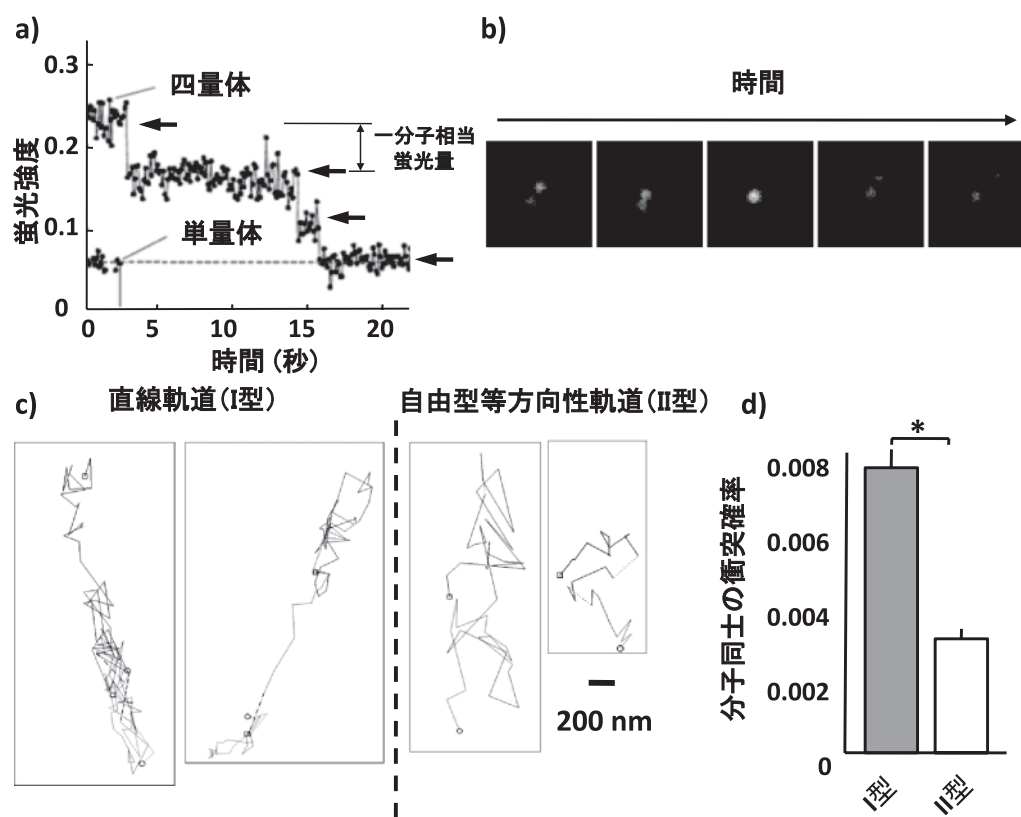


図1 マクロファージの細胞表面におけるCD36の多量体形成と分子衝突効率

- (a) 連続励起により蛍光は段階的に退色する．これより一分子相当の蛍光量を測定し，多量体の構成分子数を測定する．図中では四量体および単量体の例を示す．
 (b) マクロファージ細胞表面での一分子ライブイメージング．CD36の軌跡の連続写真を示す．ミリ秒単位で分子同士の衝突，乖離が観察される．
 (c) 2種類の軌跡；直線型軌道（I型，左）と自由型等方向性軌道（II型，右）．I型では，直線状の軌道を示し，II型では等方向性のブラウン運動を示す．
 (d) 多量体形成効率の比較．グラフの縦軸は，分子同士の衝突の確率を示している．高いほど多量体を形成しやすい．II型に所属する分子は自由に動くことができるが，多量体を形成する確率は低い．

の動き（直線軌道）に収束することで，衝突の確率を上げ，多量体形成を促進している，という仮説を考えている．特にマクロファージでは，侵入した病原細菌や有害脂質などを早急に察知し，貪食排除を迅速に行う必要がある．このように細胞骨格系により多量体形成をコントロールすることで，リガンドに対する感受性を調整しているのではないかと考えている（図3）．

6. おわりに

自然免疫におけるCD36の最近の話題を概説する．Hoebeらによって，CD36が細菌由来リポタンパク質の認識に必要であることを示された⁹⁾．それまで，細菌細胞壁

を構成するアシル化リポタンパク質は，Toll様受容体（TLR）ファミリーのTLR2を介して認識されると理解されていたが，*N*-エチル-*N*-ニトロソ尿素（ENU）突然変異により，TLR2シグナルに補助分子が存在することが，初めて知られることとなった．未知の細胞生物学のプロセスにより，CD36はTLR2のシグナルを増強すると考えられる．さらに意外なことに，別のグループからCD36がTLR4/TLR6の補助分子でもあることが報告された¹⁰⁾．古くにはCD36と結合する分子として，CD9などのテトラスペニンやCD11bなどのインテグリンファミリーが知られている．これらの分子は，TLR分子などと共役的に働くことによってCD36を中心としたヘテロ多量体を形成して

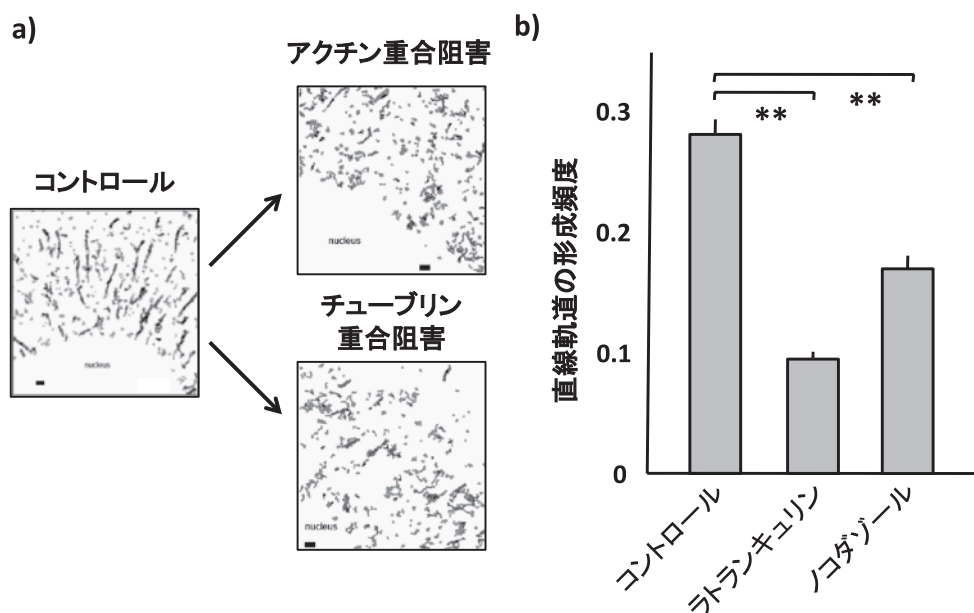


図2 細胞骨格阻害剤による軌道の変化と多量体形成効率の変化

- (a) 細胞骨格阻害剤（ラトランキュリンとノコダゾール）でマクロファージを処理すると、直線型の軌道が減少する。直線軌道が成り立つには、アクチンフィラメントとチューブリンの両方が必要であると考えられる。
- (b) 両阻害剤により直線軌道を壊すことにより、多量体の形成効率が減少することが定量的に示されている。

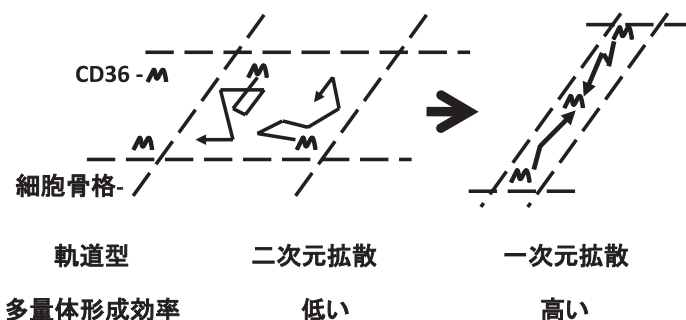


図3 細胞骨格により制限される膜タンパク質の拡散と多量体形成効率の関係

マクロファージ細胞膜で、細胞骨格により作られる二次元拡散と一次拡散。細胞骨格によりコンパートメントの形態が変わる。直線型軌道のCD36は容易に衝突し多量体を形成できる。これにより、細胞は、受容体シグナルの感度を調節することができる。

いるのではないかと想像される^{11,12)}。今後の研究成果を待ちたい。

1) Podrez, E.A., Byzova, T.V., Febbraio, M., Salomon, R.G., Ma, Y., Valiyaveetil, M., Poliakov, E., Sun, M., Finton, P.J., Cur-

tis, B.R., Chen, J., Zhang, R., Silverstein, R.L., & Hazen, S.L. (2007) *Nat. Med.*, 13, 1086-1095.

2) Febbraio, M., Hajjar, D.P., & Silverstein, R.L. (2001) *J. Clin. Invest.*, 108, 785-791.

3) Collot-Teixeira, S., Martin, J., McDermott-Roe, C., Poston, R., & McGregor, J.L. (2007) *Cardiovasc. Res.*, 75, 468-477.

- 4) Collins, R.F., Touret, N., Kuwata, H., Tandon, N.N., Grinstein, S., & Trimble, W.S. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 30288–30297.
- 5) Huang, M.M., Bolen, J.B., Barnwell, J.W., Shattil, S.J., & Brugge, J.S. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 7844–7848.
- 6) Jaqaman, K.*, Kuwata, H.*, Touret, N., Collins, R., Trimble, W.S., Danuser, G., & Grinstein, S. (*equal contribution) (2011) *Cell*, 146, 593–606.
- 7) Jaqaman, K., Loerke, D., Mettlen, M., Kuwata, H., Grinstein, S., Schmid, S.L., & Danuser, G. (2008) *Nat. Methods*, 5, 695–702.
- 8) Kaizuka, Y., Douglass, A.D., Varma, R., Dustin, M.L., & Vale, R.D. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 20296–20301.
- 9) Hoebe, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Du, X., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Shamel, L., Hartung, T., Zähringer, U., & Beutler, B. (2005) *Nature*, 433, 523–527.
- 10) Stewart, C.R., Stuart, L.M., Wilkinson, K., van Gils, J.M., Deng, J., Halle, A., Rayner, K.J., Boyer, L., Zhong, R., Frazier, W.A., Lacy-Hulbert, A., El Khoury, J., Golenbock, D.T., & Moore, K.J. (2010) *Nat. Immunol.*, 11, 155–161.
- 11) Huang, W., Febbraio, M., & Silverstein, R.L. (2011) *PLoS One*, 6, e29092.
- 12) Miao, W.M., Vasile, E., Lane, W.S., & Lawler, J. (2001) *Blood*, 97, 1689–1696.

桑田 啓貴

(昭和大学歯学部口腔微生物学教室)

Cytoskeletal control of CD36 diffusion promotes its receptor and signaling function in human primary macrophage
Hirotsuka Kuwata (Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Showa University, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8555, Japan)

異なるライフステージの脂肪細胞における アラキドン酸カスケード反応経路の調節と その役割

1. はじめに

脂肪細胞とその前駆脂肪細胞は、アラキドン酸シクロオキシゲナーゼ (COX) 経路を介して複数のタイプの内因性プロスタノイドを生合成する能力を持つ。それらは、脂肪細胞の異なるライフステージの段階において、局所ホルモンとしてオートクラインやパラクラインの様式で周囲の関連細胞に作用して脂肪細胞の分化誘導や成熟過程において多様な作用を引き起こす。脂肪細胞の分化誘導や機能変化におけるプロスタグランジン (PG) 類の役割は複雑である。なぜなら、生合成される PG 類の種類、脂肪細胞

のタイプ、脂肪細胞へ分化誘導する培養条件、さらに、PG 類のそれぞれに対する異なるタイプの複数の受容体サブタイプの存在により、PG 類の作用が違った結果となるからである。例えば、PGE₂ の細胞表面の受容体には 4 種類の受容体サブタイプが存在しており、それぞれが独特の細胞情報伝達経路を示す。また、脂肪細胞で、どの受容体サブタイプが主に発現しているかは、脂肪細胞のライフステージにより事情が異なる¹⁾。

脂肪細胞の分化誘導の中心的な役割を果たす細胞内因子として、核内ホルモン受容体スーパーファミリーに属する転写因子のペルオキシソーム増殖剤応答性因子 (PPAR) の γ サブタイプがある。この核内受容体はリガンド依存的に活性化され、ある種の脂肪酸、過酸化脂質、エイコサノイドなどが有効である。そのうち、アラキドン酸 COX 経路で生合成される PGD₂ が非酵素的に脱水反応して生成する PGJ₂ シリーズが高親和性の活性化リガンドとして有効であることが確認され、さらに、細胞系でも外因性の関連化合物が脂肪細胞の分化誘導や成熟過程の促進因子として報告されるに至った^{2,3)} (図 1)。それ以来、脂肪細胞における PG 関連物質の役割に興味が高まってきた経緯がある。以上の背景の下に、脂肪細胞の分化誘導や成熟過程におけるアラキドン酸 COX 経路の発現様式や調節機構に着目した関連研究を紹介する。

2. 成熟期の脂肪細胞による PGJ₂ シリーズの生合成と 脂肪細胞形成における役割

培養系で脂肪細胞の分化誘導や成熟過程をモニターするのに有用な実験系として、マウスの前駆脂肪細胞株の 3T3-L1 細胞株が用いられている。この培養系で脂肪細胞の形成を行うには、未分化の前駆脂肪細胞が増殖する生育期、デキサメタゾン、cAMP レベルの維持に必要な 3-イソブチル-1-メチルキサンチン、そしてインスリンを含む培養液で処理する分化誘導期、さらに、インスリンを含む培養液で脂肪蓄積が起こる成熟期の三つのステージが必要となる。まず、我々は、脂肪細胞の分化誘導の中心因子である核内受容体の PPAR γ を活性化する PGJ₂ シリーズの生成がどのように制御されているか、また、生成された内因性の代謝産物が脂肪細胞機能にどのように関与しているかについて研究した。核内受容体の PPAR γ の発現は、脂肪細胞形成の分化誘導期から成熟期にかけて促進された。また、上記の培養細胞系で各ライフステージにおける検討の結果、アラキドン酸 COX 経路の二つの COX アイソフォーム (COX-1 および COX-2) の発現が認められた。