

## 論文の内容の要旨

論文題目 ヒト高親和性 IgE レセプター $\alpha$ 鎖発現制御機構の解析

氏名 高橋 恭子

近年、アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーなどのアレルギー性疾患が大きな社会問題となっている。高親和性 IgE レセプター(Fc $\epsilon$ RI)は、IgE を介したアレルギー反応において鍵を握る受容体である。このレセプターが抗原と IgE によって架橋されることにより、細胞内にシグナルが伝達され、ヒスタミンの放出等のアレルギー反応が引き起こされる。Fc $\epsilon$ RI は、肥満細胞、好塩基球等の限られた細胞表面上に発現し、インターロイキン 4(IL-4)や IgE がその発現を誘導する可能性が示唆されている。

Fc $\epsilon$ RI は、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖、 $\gamma$ 鎖の3種類のサブユニットから構成され、ヒトにおいては $\alpha\beta\gamma_2$ の四量体及び $\alpha\gamma_2$ の三量体の形で、齧歯類においては $\alpha\beta\gamma_2$ の四量体の形で肥満細胞や好塩基球の細胞表面上に発現している。3種類のサブユニットのうち、 $\alpha$ 鎖は IgE と直接結合するサブユニットであり、 $\alpha$ 鎖ノックアウトマウスの解析から IgE を介したアレルギー反応において必須の分子であることが確認されている。一方、 $\beta$ 鎖、 $\gamma$ 鎖は細胞内へのシグナル伝達に関わるサブユニットである。 $\beta$ 鎖はシグナルを増幅する重要な役目をしていると言われており、細胞内領域に ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) モチーフが存在する。このモチーフ

に結合するチロシンキナーゼ Lyn やホスファターゼ SHIP、SHP-1、SHP-2 がシグナル伝達に関わっていることが示されている。また、 $\gamma$ 鎖はシグナル伝達に必須のサブユニットであり、同様に ITAM モチーフを有し、Syk を介して細胞内へのシグナルを伝達する。

上述した3種類のサブユニットのうち $\gamma$ 鎖は、他の免疫グロブリンの Fc レセプターやT細胞レセプター複合体の構成因子でもあり、Fc $\epsilon$ RI 発現細胞以外にも T 細胞や B 細胞など多くの細胞で発現していることから、Fc $\epsilon$ RI の細胞特異的発現を制御する分子ではないと考えられる。また、ヒトにおいては $\alpha$ 鎖と $\gamma$ 鎖のみから成る機能的なレセプターが発現することから、ヒト Fc $\epsilon$ RI の発現において $\beta$ 鎖は必須ではないと言える。したがって、Fc $\epsilon$ RI に特有のサブユニットでありかつ必須の構成因子である $\alpha$ 鎖の発現により Fc $\epsilon$ RI の細胞特異的発現が制御されている可能性が高く、 $\alpha$ 鎖の発現調節機構の解明はアレルギー反応の制御につながる重要な研究であると考えられる。しかしながら、ヒト Fc $\epsilon$ RI  $\alpha$ 鎖遺伝子の構造はすでに Pang らにより明らかにされているものの、 $\alpha$ 鎖遺伝子の発現制御領域に関しては未だ報告がなされていない。そこで、Fc $\epsilon$ RI の細胞特異的発現、刺激による発現誘導の機構の解明を目指してヒト Fc $\epsilon$ RI  $\alpha$ 鎖遺伝子の発現制御領域及び制御因子に関する解析を行った。

まず、ヒト Fc $\epsilon$ RI  $\alpha$ 鎖遺伝子の 5'フランキング領域中の転写制御領域及び転写制御因子の同定を行った。ヒト Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ 鎖遺伝子の翻訳開始コドンの上流約 2.4kb の領域をクローニングし、この領域の様々な長さの遺伝子断片及び部位特異的変異を導入した遺伝子断片を *Photinus pyralis* 由来のルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとしてコードするプラスミドへ挿入した。これらのレポータープラスミドを $\alpha$ 鎖を恒常的に発現するラット肥満細胞株 RBL-2H3 及びマウス肥満細胞株 PT-18、 $\alpha$ 鎖非発現細胞であるヒト T 細胞株 Jurkat へ導入して一過性の発現試験を行った。その結果、nt -50 及び nt -75 を中心とするそれぞれ数塩基の領域が発現細胞特異的な $\alpha$ 鎖プロモーターの活性化に機能した。これらの領域の配列を含む標識二本鎖オリゴ DNA プロープと PT-18 細胞及び RBL-2H3 細胞より調製した核タンパク質を用いたゲルシフトアッセイの結果、特定した遺伝子領域にそれぞれ配列特異的に結合するタンパク質が存在した。さらに、抗 Elf-1 抗体、抗 GATA-1 抗体を添加した場合に、核タンパク質の結合によりシフトした標識プロープのバンドが消失あるいはスーパーシフトした。*in vitro* 転写・翻訳系により調製した Elf-1 及び GATA-1 を用いて nt -50 及び nt -75 を中心とする領域に結合する因子がそれぞれ Elf-1 及び GATA-1 であることを確認した。

遺伝子の発現調節領域が 3'側非翻訳領域やイントロンといったプロモーター領域から離れた領域にも存在する例が多いことから、次にそれらの領域中の転写調節領域の特定を行った。 $\alpha$ 鎖遺伝子の nt -11764 からおよそ nt +9kb の位置にある *Sau3AI* 認識部位までの約 20kb の領域について *cis* エレメントの探索を行った。この領域を 7つの遺伝子断片に分割し、各断片を SV40 プロモーター支配下にルシフェラーゼ遺伝子をコードするレポータープラスミドの SV40 プロモーター上流へ挿入した。作製したプラスミドを RBL-2H3 及び PT-18 細胞へ導入して一過性の発現試験を行った結果、第 1 イントロンを含む遺伝子断片にのみ強いプロモーター活性化能が認められた。 $\alpha$ 鎖遺伝子のプロモーター領域から第 2 エクソンの途中までをルシフェラーゼ遺伝子の上流にフレームが合うように挿入したレポータープラスミド、及びこのプラスミドから  $\alpha$ 鎖の第 1 エクソンのみを欠失させたプラスミドを作製し、もともと遺伝子上に存在するのと同じ位置関係において  $\alpha$ 鎖遺伝子の第 1 イントロンが  $\alpha$ 鎖遺伝子のプロモーターを活性化することを確認した。第 1 イントロン内に存在する様々な転写因子の結合モチーフに部位特異的変異を導入してさらに詳細なマッピングを行った結果、E-box モチーフ CAGCTG 配列がエンハンサーエレメントとして機能することが明らかとなった。ゲルシフトアッセイより、この配列に特異的に結合する核タンパク質が存在することが示された。抗 USF1 抗体、抗 USF2 抗体及び *in vitro* 転写・翻訳系により調製した USF1、USF2 を用い、結合因子が USF1/USF2 ヘテロダイマーであることを明らかにした。さらに、USF2 アンチセンス発現プラスミドを細胞に導入することにより  $\alpha$ 鎖の発現が抑制されたことからこの転写因子が実際に転写活性化に機能することが確認された。

同定した各転写因子の発現プラスミドを作製するにあたって、これまで報告のなかったラット Elf-1 及びラット USF2 の cDNA のクローニングを行い塩基配列を決定した。両者の cDNA には *alternative splicing* によると考えられる複数種の多型がそれぞれ存在した。これらの多型の発現パターン、DNA 結合能、転写活性化能の解析を行い、これらの多型による  $\alpha$ 鎖遺伝子の発現制御の可能性について考察を行った。

本研究は、Fc $\epsilon$ RI の発現制御機構の全貌を解明する第一歩になると考えられる。このような研究の積み重ねにより、抗原の種類に関わらず IgE を介したアレルギー反応を抑制する、アレルギーの新たな治療・予防法の開発が可能となるであろう。