第 34 回総会ポスター受賞記念論文

総 説 (推薦論文)

推薦者: 日本臨床免疫学会理事, 第 34 回総会長 尾崎承一

強皮症に見出される tRNA 関連抗 Wa 抗体とその抗原蛋白 NEFA/Nucleobindin-2

井村 嘉孝, 三森 経世

Transfer RNA-associated anti-Wa antibody in patients with scleroderma and the target antigen NEFA/Nucleobindin-2

Yoshitaka IMURA, Tsuneyo MIMORI

Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Kyoto University Graduate School of Medicine

(Received May 22, 2007)

summary

Many autoantibodies associated with nucleic acids are found in autoimmune diseases, and are important for analyzing pathophysiologic mechanisms. Toll-like receptors (TLRs) are receptor molecules for innate immunity and some of them recognize nucleic acids. Nucleic acids in autoantigens may stimulate TLR and activate antigen presenting cells as adjuvants. The Wa antigen was found as a transfer RNA (tRNA)-binding protein by RNA immunoprecipitation and identified as NEFA/Nucleobindin-2. Although the function of NEFA/Nucleobindin-2 is still not clear, it may be involved in secretion of proteins along with calcium metabolism and in protein translation by tRNA-binding ability.

Key words——anti-Wa antibody; NEFA; Nucleobindin-2; TLR; tRNA

抄 録

膠原病・自己免疫疾患では多くの核酸関連自己抗体が見出されており, 病態解明の手掛かりとして重要である。自然免疫における受容体分子である Toll-like receptor (TLR) には核酸を認識するものがあり, 核酸関連自己抗原中の核酸は TLR を刺激することにより, アジュバントとして抗原提示細胞を活性化させている可能性がある。RNA 免疫沈降法により transfer RNA (tRNA) 結合蛋白として見出された Wa 抗原は NEFA/Nucleobindin-2 として報告されている分子と一致しており, その機能は未だ明らかではないが, Ca 代謝を介して分泌に関わっていると考えられ, tRNA 結合能を示すことから蛋白翻訳系にも影響を持つ可能性がある。

はじめに

膠原病・自己免疫疾患では抗核抗体をはじめとする自己抗体の測定が診断・病態解明の手掛かりとして重要である。細胞核は DNA・RNA といった核酸およびその代謝・維持に関わる蛋白成分で構成されており, 抗核抗体における特異自己抗体は核酸そのもの (DNA, RNA) や多くの核酸結合蛋白 (ヒストン, RNP, Sm, トポイソメラーゼ 1, セントロメア, RNA ポリメラーゼ, SS-B/La など) を対応抗原としている。また, 細胞質成分でもアミノアシル tRNA 合成酵素や SS-A/Ro などの RNA 結合蛋白が膠原病特異自己抗体の対応抗原となりうる。このように, 自己抗体の対応抗原に核酸と結合する

蛋白が多いことは, 自己抗体の産生機序や膠原病の病態を探索する上で示唆に富むと考えられる。

核酸関連自己抗原と TLR

B 細胞による抗体産生には T リンパ球の刺激が必要であり, T リンパ球は T 細胞レセプター (TCR) へのペプチド抗原提示により活性化される。この経路における核酸の役割は長らく不明であったが, Toll-like receptor (TLR) を介した自然免疫系が獲得免疫である抗体産生を活性化している可能性が近年示唆されている。

TLR は自然免疫系において病原微生物の構成成分を認識する受容体であり, 現在ヒトでは 10 種類 (TLR1~TLR10) が同定されている。この内 TLR9 は二本鎖 DNA, TLR3 は二本鎖 RNA, TLR7 と TLR8 は一本鎖 DNA を認識し, ウイルスなどの核

酸を認識して樹状細胞や B 細胞などの抗原提示細胞を成熟させることで防御機構として働いている。自己の核酸により刺激されないために、これらの TLR はエンドソーム内に存在し、修飾を受けていない DNA (非メチル化 CpG DNA¹⁾) や RNA²⁾ を認識するようになっている。しかしながら SLE 患者における DNA/抗 DNA 抗体免疫複合体の DNA では CpG モチーフをゲノムの 5-6 倍含んでいることから³⁾、Fc レセプターや抗 IgG 抗体 (リウマトイド因子) 型の B 細胞レセプター (BCR) を介して細胞内に貪食され、TLR9 を介して B 細胞や樹状細胞を刺激すると考えられる^{4,5)}。また、U1RNP/抗 U1RNP 抗体免疫複合体も、TLR7 を介した同様の機序で B 細胞・樹状細胞を刺激する可能性がある^{6,7)}。TLR9 をノックアウトした SLE モデルマウスでは抗 DNA 抗体の産生が低下し、TLR7 ノックアウトでは抗 RNP 抗体産生が低下する^{8,9)}ことは、この仮説を裏付けている。SLE モデルマウスの雄で SLE 症状を増強させる Yaa (Y-linked autoimmune accelerator) 変異では、通常は X 染色体にのみ存在する *tlr7* 遺伝子が Y 染色体末端にも重複しており、B 細胞での TLR7 発現が増強している¹⁰⁾。

すなわち、自己抗原における核酸はアジュバントとして抗原提示細胞を活性化させることにより病態にダイレクトに関わっている可能性があり、核酸関連自己抗原の研究は病態解明の一助となると考えられる。

RNA 免疫沈降法による RNA 関連自己抗体の同定

Lerner と Steitz が開発した³²P 標識ヒト培養細胞抽出物を用いた免疫沈降法は、種々の RNA 結合蛋白に対する自己抗体の検出を可能とし、これまでに従来で検出されなかった多くの自己抗体が発見された。本法では³²P-リン酸で核酸成分を標識した HeLa 細胞抽出物を抗原として、被検血清中の IgG を結合したプロテイン A セファロース粒子と反応させ、形成された免疫複合物より核酸成分をフェノール抽出して尿素ポリアクリルアミド電気泳動 (urea-PAGE) で分画後、オートラジオグラフィーで分析するものである。さらに、未標識細胞抽出物を用いて同様の方法で電気泳動後、銀染色で RNA を検出することも可能であり、我々はこの方法で自己抗体のスクリーニングを行っている¹¹⁾。本法は、感度・特異度ともに優れ、対応抗原の分析が可能なこと、未知の自己抗体の検出が可能なことなどの利

点がある。RNA 免疫沈降法では、抗 U1RNP 抗体・抗 Sm 抗体・抗 SS-A/Ro 抗体・抗 SS-B/La 抗体など膠原病の診断に重要な多くの自己抗体が検出可能であり、tRNA 関連自己抗体としては抗アミノアシル tRNA 合成酵素 (Aminoacyl-tRNA Synthetase : ARS) 抗体が検出できる。抗 ARS 抗体はこれまでに抗 Jo-1 抗体 (HisRS)・抗 PL-7 抗体 (AlaRS)・抗 PL-12 抗体 (ThrRS)・抗 OJ 抗体 (IleRS)・抗 EJ 抗体 (GlyRS)・抗 KS 抗体 (AsnRS) の 6 種類が報告されており、多発性筋炎・皮膚筋炎の疾患特異的マーカーであるが、その中でも慢性間質性肺炎・Raynaud 現象・多発関節炎・発熱・「機械工の手」(手指の皮膚裂溝・角質化・色素沈着)を共通する臨床症状として示しており、「抗合成酵素症候群 (anti-synthetase syndrome)」と呼ばれる一群を形成する。

抗 Wa 抗体と NEFA/Nucleobindin-2

抗 Wa 抗体は RNA 免疫沈降法において抗 ARS 抗体とは異なる tRNA を沈降する自己抗体として報告された¹²⁾。名前は最初に報告された強皮症患者に由来しており、Ouchterlony 法 (二重免疫核酸法) でも沈降抗体として検出することができ、強皮症患者 130 例の検討で 4 例 (3%) に陽性を示した。RNA 免疫沈降法では少なくとも 3~4 種類の tRNA バンドを示しており、これまで報告されている 6 種類の抗 ARS 抗体が示すバンドパターンとは異なっている (図 1)。脾臓抽出物の免疫プロット法により対応抗原は 48 kDa 蛋白と同定されたが、実体は

図1 RNA 免疫沈降法による Wa-tRNA band

長らく不明であった。しかし、その後の遺伝子クローニングにより、抗原蛋白は NEFA および Nucleobindin-2 として報告されている分子と一致することが確認された¹³⁾。

NEFA は Barnikol-Watanabe らが 1994 年に報告した、420 アミノ酸残基で構成される分子で¹⁴⁾、その構造的特徴である“DNA-Binding, EF-hand, Acidic amino acid rich region”より命名され、DNA 結合ドメイン、二つの EF-hand および EF-hand に挟まれた酸性アミノ酸が豊富なドメインで構成されている (図 2A)。ゲノム上では第 11 染色体の p14-15.1 に、Usher 症候群 (感音性難聴と網膜色素変性症を特徴とする遺伝性疾患) タイプ 1c の異常部位に同定されている¹⁵⁾。我々は HeLa 細胞 mRNA からのクローニングにより、C 末端側の EF-hand 部位 90 bp (exon 11) を欠損したスプライスバリエントの存在を発見した (図 2B)。NEFA は、MRL/*lpr* マウスにおいて抗 dsDNA 抗体の産生を亢進させる蛋白として同定された Nucleobindin¹⁶⁾ とアミノ酸レベルで 61.56% の相同性を示しており、Nucleobindin-2 とも呼ばれる。N 末端側にシグナル配列を有しており、MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) で測定される分子量は 47,713 Da、25 アミノ酸残基のシグナル配列を除いた推定分子量は 47,255 Da であり、シグナル配列の分割と共にリン酸化などの修飾を受けていると考えられる¹⁷⁾。DNA 結合ドメインの中にある二極性の核移行シグナルや C 末端側のロイシンジッパー

構造から DNA 結合蛋白と考えられるが、これまでのところ DNA あるいは RNA との具体的な結合の報告はない。我々は抗 Wa 抗体が沈降する tRNA を精製し、既知の 22 種類の tRNA 配列をもとにプライマーを作成して RNA-PCR を行った。その結果、少なくとも 5 種類 (His-, Met-, Lys-, Pro-, Val-tRNA) が Wa 抗原 (NEFA/Nucleobindin-2) に結合する tRNA であると考えられた。

NEFA/Nucleobindin-2 の細胞内局在は検討された細胞によって異なっており、細胞膜/細胞質内¹⁴⁾、ゴルジ体¹⁸⁾、小胞体/核膜¹⁹⁾で報告されている。組織分布では、組織特異性が無いとする報告もある¹⁹⁾が、我々の (半) 定量 PCR による検討では、膵臓、唾液腺、睾丸、胎盤で高発現を示し、大腸ではほとんど検出されなかった。

NEFA/Nucleobindin-2/Wa の機能： Ca 代謝と細胞外分泌との関わり

NEFA/Nucleobindin-2 は 2 つある EF-hand の各々で 1 分子ずつの Ca と結合する^{19,20)}が、そのためには EF-hand は二つとも必要であり、N 末端側の EF-hand を欠いた人工変異体では Ca 結合能を認めなくなった²⁰⁾。我々の発見したスプライスバリエントは C 末端側の EF-hand を欠いており、この点でも興味深い。NEFA/Nucleobindin-2 は、Ca と結合した状態ではトリプシンによる分解に対して安定となる²⁰⁾。無脊椎動物での NEFA/Nucleobindin-2 相同分子にはロイシンジッパーはないが、二つの

図 2 NEFA/Nucleobindin-2 の構造

EF-hand とその間の酸性アミノ酸ドメインを認めており, Ca 結合能が進化の過程で保存されていることが示唆される¹⁹⁾.

NEFA/Nucleobindin-2 の機能は未だ明らかではないが, NEFA/Nucleobindin-2 結合蛋白として Necdin (neurally differentiated embryonal carcinoma-derived protein)¹⁹⁾や ARTS-1 (aminopeptidase regulator of TNFR1 shedding), TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1)²¹⁾が報告されている.

Necdin はマウス embryonal carcinoma P19 細胞をレチノイン酸で分化させることにより発現する蛋白であり, 正常な分化神経細胞にも認めるが未分化前駆細胞には存在しない. E2F1 や p53 をターゲットとする成長抑制因子として神経細胞の形態維持に関わっていると考えられている. NEFA/Nucleobindin-2 は Necdin と EF-hand 部位を介して結合しており, 神経細胞では分化により発現が増大していた. NEFA/Nucleobindin-2 の細胞外分泌は Necdin との共発現により減少して細胞内の量が増大する. NEFA/Nucleobindin-2 の強制発現細胞ではカフェイン刺激による小胞体から細胞質内への Ca 放出が増大しており, Necdin を共発現させるとさらに増加した¹⁹⁾. このことより, NEFA/Nucleobindin-2 は細胞内での Ca 代謝に関わっていると考えられる.

TNFR1 の分泌経路としては, 細胞膜 TNFR1 の TACE (TNF- α -converting enzyme) による細胞外部分の切断と exosome-like vesicle による分泌の 2 種類があるが, NEFA/Nucleobindin-2 はこの双方に関わっている. NEFA/Nucleobindin-2 は ARTS-1 と共に TNFR1 に結合する. 三者の結合は Ca 依存性であり, 細胞内 Ca のキレートや NEFA/Nucleobindin-2 もしくは ARTS-1 のノックダウンで TNFR1 の細胞外分泌が低下した²¹⁾. すなわち, NEFA/Nucleobindin-2 は Ca 依存性に TNFR1 の分泌をコントロールしていると考えられる.

おわりに

核酸関連自己抗体である抗 Wa 抗体とその対応抗原と考えられる NEFA/Nucleobindin-2 について概説した. NEFA/Nucleobindin-2 は未だその機能は明らかではないが Ca 代謝を介して分泌に関わっていると考えられ, tRNA 結合能を示すことから蛋白翻訳系にも影響を持つ可能性が示唆される. 我々は NEFA/Nucleobindin-2 と tRNA 結合について現在

研究を進めており, 核酸関連自己抗原の研究を通して自己免疫疾患の病態解明を期待している.

文 献

- 1) Hemmi H, et al. : A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408** : 740–745, 2000.
- 2) Kariko K, et al. : Suppression of RNA Recognition by Toll-like Receptors : The Impact of Nucleoside Modification and the Evolutionary Origin of RNA. *Immunity* **23** : 165–175, 2005.
- 3) Sano H, et al. : Binding properties of human anti-DNA antibodies to cloned human DNA fragments. *Scand. J Immunol* **30** : 51–63, 1989.
- 4) Leadbetter EA, et al. : Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* **416** : 603–607, 2002.
- 5) Means TK, et al. : Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest* **115** : 407–417, 2005.
- 6) Lau CM, et al. : RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J Exp Med* **202** : 1171–1177, 2005.
- 7) Vollmer J, et al. : Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J Exp Med* **202** : 1575–1585, 2005.
- 8) Christensen SR, et al. : Toll-like receptor 9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus. *J Exp Med* **202** : 321–331, 2005.
- 9) Christensen SR, et al. : Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity* **25** : 417–428, 2006.
- 10) Pisitkun P, et al. : Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science* **312** : 1669–1672, 2006.
- 11) Froman MS, et al. : Detection of antibodies to small nuclear ribonucleoproteins and small cytoplasmic ribonucleoproteins using unlabeled cell extracts. *Arthritis Rheum* **28** : 1356–1361, 1985.
- 12) Miyachi K, et al. : A novel autoantibody reactive with a 48 kDa tRNA associated protein in patients with scleroderma. *J Rheumatol* **18** : 373–378, 1991.

- 13) Shirai Y, et al. : Molecular cloning and characterization of autoantigen recognized by anti-Wa antibodies in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* **60** (Suppl. 1) : 53, 2001 (abstract).
- 14) Barnikol-Watanabe S, et al. : Human protein NEFA, a novel DNA binding/EF-hand/leucine zipper protein. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA, isolation and characterization of the protein. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **375** : 497–512, 1994.
- 15) Higgins MJ, et al. : Contig maps and genomic sequencing identify candidate genes in the usher 1C locus. *Genome Res* **8** : 57–68, 1998.
- 16) Kubota T, et al. : Activation of autoreactive T cells that help nucleobindin-injected mice produce anti-DNA antibodies. *Immunol* **75** : 111–115, 2001.
- 17) Karabinos A, et al. : Origin of the NEFA and Nuc signal sequences. *J Mol Evol* **46** : 327–333, 1998.
- 18) Morel-Huax VM, et al. : The calcium-binding protein p54/NEFA is novel luminal resident of medial Golgi cisternae that traffics independently mannosidase II. *Eur J Cell Biol* **81** : 87–100, 2002.
- 19) Taniguchi N, et al. : The postmitotic growth suppressor necdin interacts with a calcium-binding protein (NEFA) in neuronal cytoplasm. *J Biol Chem* **275** : 31674–31681, 2000.
- 20) Kroll KA, et al. : Heterologous Overexpression of human NEFA and studies on the two EF-hand calcium-binding sites. *Biochem Biophys Res Commun* **260** : 1–8, 1999.
- 21) Islam A, et al. : Extracellular TNFR1 release requires the calcium-dependent formation of a nucleobindin 2–ARTS–1 complex. *J Biol Chem* **281** : 6860–6873, 2006.