高親和性IgE受容体 (FcεRI) の発現調節と遺伝子構造

長谷川 真 成^{1,2)}西 山 千 春²⁾秋 澤 有 四 郎²⁾高 橋 恭 子³⁾古 川 漸¹⁾奥 村 康²⁾小 川 秀 興²⁾羅 智 靖^{2,3)}山口大学医学部小児科¹⁾, 順天堂大・医・アトピー疾患研究センター²⁾, 日本大・医・先進医学総合研究センター³⁾

はじめに

高親和性IgE受容体 (FcεRI) はIgEと特異的に結合しエフェクター細胞を活性化することからアレルギー反応の鍵となる分子として広く知られている。

今回、我々は“アトピー遺伝子”として注目されているβ鎖遺伝子多型と発現制御の関係について検討し、さらにアレルギー反応に不可欠であるα鎖について新規の遺伝子多型を発見したので紹介する。

FcεRIβ鎖多型

FcεRIβ鎖遺伝子は、7つのエクソンからなっており、現在まで図1¹⁾に示すような複数の多型が報告されている。アミノ酸置換を伴う多型は図1中、黒丸(●)

で示した3カ所に認められている。すなわち膜貫通部に存在している181番目のイソロイシンからロイシンへの置換、183番目のバリンからロイシンへの置換と細胞質内に存在する237番目のグルタミン酸からグリシンへの置換である。

これら3つの多型とアレルギー疾患との関連については、1994年以降様々なグループから報告がなされている(表1²⁾)。表1中しばしばN.D.となっていることから分かるように、民族によっては変異型が検出されないこともあり、多型の存在は民族によって片寄りがあるようである。また、検出された民族においても多型とアレルギー疾患との関連は報告によって結論が異なっており、FcεRIβ鎖多型とアレルギー疾患の関連については未だ議論の余地がある。

最近、このFcεRIβ鎖遺伝子多型の機能解析に関する報告が異なる2つのグループより相次いでなされ

図1. FcεRIβ鎖の構造とこれまでに報告された多型部位 (文献1) 一部改)

表1. FcεRIβ鎖 coding regionの多型の報告例 (文献2) 一部改)

*N.D.: 検出されず

** (-): 相関なし, *** (+): 相関あり, **** (?): 不明

Ile181Leu / Val183Leu

報告者	変異	国	対象	検出率 (対照)	相関	報告年
Shirakawa, T. et al	181	UK	60 families	17%	(+)	1994
Hizawa, N. et al	181	Japan	327	N.D.	(-)	1995
Hill, M.R. et al	181	Australia	1004	4.5%	(+)	1995
Shirakawa, T. et al	181	Japan	10 atopy	N.D.	(-)	1996
Martinati, L.C. et al	181	Italy	213 (148 atopy)	N.D.	(-)	1996
Kofler, H. et al	181	Austria	40 atopy	N.D.	(-)	1996
Hijazi, Z. et al	181/183	Kuwait	221 (96 asthma)	48% (31%)	(?)	1998
Rohrbach, M. et al	181	Swiss	451 (292 asthma)	N.D.	(-)	1998
Green, S.L. et al		South Africa				1998
	181	Black	92 (48 asthma)	43.8% (31.8%)	(?)	
		White	96 (45 asthma)	55.6% (5.9%)	(+)	
	183	Black	68 (41 asthma)	3.5% (N.D.)	(-)	
		White	69 (39 asthma)	N.D.	(-)	
Amelung, P.J. et al	181/183	Netherlands	126	N.D.	(-)	1998
Wilkinson, J. et al	181/183	UK	240 families	N.D.	(-)	1999
Deichmann, K.A. et al	181	Germany	109 families	N.D.	(-)	1999
Dickson, P.W. et al	181/183	Australia	757 (300 asthma)	N.D.	(-)	1999
Sariano, J.B. et al	181	Spain	196 (146 asthma)	N.D.	(-)	2000
Thomas, N.S. et al	181/183	UK	300	N.D.	(-)	2000

Glu237Gly

報告者	国	対象	検出率 (対照)	相関	報告年
Hill, M.R. et al	Australia	1004	5.3%	(+)	1996
Shirakawa, T. et al	Japan	500 (300 atopy+ 100 asthma)	16% (6%)	(+)	1996
Rohrbach, M. et al	Swiss	451 (292 asthma)	3.7% (2.6%)	(?)	1998
Green, S.L. et al	South Africa				1998
	Black	83 (41 asthma)	39.0% (40.5%)	(-)	
	White	97 (46 asthma)	23.9% (7.8%)	(+)	
Wilkinson, J. et al	UK	240 families	3.5%	(?)	1999
Deichmann, K.A. et al	Germany	109 families	N.D.	(-)	1999
Dickson, P.W. et al	Australia	757 (300 asthma)	N.D.	(-)	1999
Ishizawa, M. et al	Japan	333 (128 asthma)	22.2% (20.0%)	(-)	1999
Thomas, N.S. et al	UK	685	3.4%	(?)	2000

た. いずれの報告もFcεRIβ鎖遺伝子多型は, FcεRIのシグナル伝達能に影響を及ぼさないという結果であった. 以下にその報告例を紹介する.

古本ら³⁾は, β鎖ノックアウトマウスの骨髓由来培養マスト細胞 (BMMC) にレトロウイルスベクターを用いて, β鎖を再導入する系を構築し解析に用いた. 導入したβ鎖はマウスのものであるが, ヒトの多型に相当するアミノ酸置換を行った. すなわち, マウスの172, 174, 228番目のアミノ酸はヒトの181, 183, 237番に相当するが, 野生型あるいは相当する位置に変異を導入した変異型β鎖を再構築したFcεRIのシグナル伝達機能を解析した. その結果, 変異型と野生型との間でIL-6, TNF-α, LTC4分泌, β-hexosaminidase分泌, Ca²⁺動員, いずれについても差は認められず(図2), 少なくともマウスの系においてはこれら3種類の多型は

FcεRIを介したマスト細胞活性化に影響を与えないと結論づけている.

一方, Donnadieuら⁴⁾はヒト単球細胞株U937にα, γ鎖を恒常的に発現させ, さらにWTβ, βI181L-V183L, βE237Gを発現させ, 3つの多型β鎖導入細胞におけるFcεRIの細胞膜表面への発現およびシグナル伝達増幅能を検討した結果, α鎖の糖鎖付加・成熟・細胞表面への移行に差はなく, FcεRI刺激後のβ鎖シグナル伝達能においても差を認めなかった(図3).

このような背景から我々はβ鎖の遺伝子多型が蛋白質の機能としてではなく, 遺伝子の段階において異なる作用を持っている可能性について検討した. すなわち, 野生型と変異型で転写調節能の程度が異なっているのではないかと考えて解析した. 最初に紹介したようにβ鎖の多型は複数個報告されているが, 今回我々

は181, 183, 237番目のアミノ酸置換を伴う多型について解析を行った。

まず, 181, 183のコード領域を含むヒトFcεRIβ鎖遺伝子断片を, ルシフェラーゼ遺伝子下流に導入したプラスミドを作製し, これをヒトFcεRIβ鎖発現細胞株, Megakaryocyte cell lineであるHML/SE, に導入して転写活性を測定した。

その結果, WTがプロモーター活性を抑制しているのに対し, Mutantではその抑制がほとんど見られない, あるいはむしろ活性化を増強している傾向が見られた。

237多型でも同様の実験を行った結果, WTはβ鎖プロモーター活性を著しく抑制するが, Mutantではその効果が小さい傾向にあった。

次に, 多型部位に結合する蛋白分子を調べるため, HML/SEの核抽出物を用いてGel Shift Assayによる解析を行った。

その結果, 野生型で認められたバンドの一つが181/183いずれかの変異によって消失していた。一方, 237多型においてもWTとMutant間で泳動像に差が認められ, 変異型配列に有意に結合する蛋白質の存在が確認された。今後, これらの蛋白質の同定と, 機能について解析を進めて行く予定である。

FcεRIα鎖多型

我々はこれまでα鎖プロモーター領域を中心に遺伝子構造について解析し報告してきた⁵⁻⁷⁾が, 今回, プロモーター中に新たな多型を発見した。

図4にα鎖遺伝子構造の模式図を示す。これまでの解析から, α鎖は転写開始点直上にあるGATA, Ets-motifがプロモーター活性発現に必須であること, 第一イントロン中E-boxに結合するUSF1/2がα鎖発現を制御していることなどを明らかにしてきた。さらに, -66

A

	IL-6 (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)	LTC ₄ (ng/ml)
pMX-puro	ND	ND	ND
β-Wild-type	207 ± 26.3	34 ± 5.8	28.6 ± 1.43
β-L172I	201 ± 13.8	21 ± 8.1	28.3 ± 2.0
β-L174V	202 ± 4.7	35 ± 10.0	24.7 ± 3.77
β-E228G	215 ± 3.0	32 ± 2.3	30.5 ± 1.89

B

C

図2. FcεRI架橋刺激による野生型-変異型β鎖トランスフェクタントからのサイトカイン, LTC₄分泌 (A) およびFcεRIβ鎖トランスフェクタントからのFcεRIを介したβ-hexosaminidase放出 (B, C) (文献3) 一部改

A. 野生型-変異型間で有意差は認めなかった。B. PMA+ionoをpositive controlとし, IgE, IgE+Ag, Agで刺激した。野生型-変異型間で有意差は認めなかった。C. Agの濃度依存性についても差は認めなかった。

番目にTとCの塩基置換を発見した。

そこで、このヒトFcεRIα鎖プロモーター領域を、ルシフェラーゼ遺伝子上流に導入したプラスミドをT, C両アリルについて作製し、FcεRIα鎖発現細胞株(PT18, RBL-2H3, KU812)に導入して転写活性を測定した。

その結果、CアリルではTアリルに比べ、プロモーター活性が低下していることが確認された。

TアリルはGATA-1の結合配列直下にGATA様の配列が並んだ構造をとっており、Cアリルにおいては2つめのGATA配列が潰れGACAという配列になっている。この点に注目してin vitroで作製したGATA-1を用いてGel Shift Assayによる解析を行った。

その結果、GATA-1は主に5'側GATAに結合することが確認された。また、GATA-1はGACA配列には結合しないことも確認された。

図3. α, γ cDNAとWTβ, βI181L-V183L, βE237Gを含むコンストラクトをトランスフェクトし、FcεRIの細胞膜表面への発現をMFI (mean fluorescence intensity) で評価 (A, B). さらにNIP-BSA (A) およびanti-NIP (B) 刺激によるCa反応の測定 (C, D) (文献4) 一部改

A. αγ2型とαβγ2型間において有意差を認めるが、αβγ2野生型-変異型間では有意差は認めなかった。
B. 時間経過による発現量においても野生型-変異型間で有意差は認めなかった。*:有意差なし, **:p=2.1E-3, ***: p=3.3E-5 C, D: 野生型-変異型間で有意差は認めなかった。

図4. FcεRIα鎖の遺伝子構造

つまり、単独で比較するとGATA-1 binding affinityは5' GATA, 3' GATA, GACAの順となった。

以上のようにGATA-1の関与が示唆されたため、さらにGATA-1を用いた共発現実験を行った。

その結果、Cアリルにおいて、GATA-1を加えた場合プロモーター活性は約2倍上昇し、GATA-1によってプロモーター活性がup-regulateされることが確認された。一方、Tアリルでは約4倍と、Cアリルより強くGATA-1によってプロモーターが活性化されることが判明した。

以上の結果をまとめると、α鎖プロモーターは5'側にあるGATA motifが強くGATA-1を結合する。Tアリルの場合、近接した3'側GATA様配列にもGATA-1が結合することが可能だが、CアリルではGATA-1は5'側のみに結合する。すなわち、Tアリルでは3'側GATA様配列に結合したGATA-1と他の転写因子やRNAポリメラーゼ等の何らかの相互作用の結果3' GATAの潰れたCアリルにくらべ転写活性が上昇する可能性も考えられる。あるいは、GATA-1自身がTアリルのようにオーバーラップした2つのGATA motifを持つDNAとより強固に結合する機構も予想される。いずれにせよ引き続き詳細な解析を行って行きたいと考えている。

次に、多型部位と、その周囲の転写因子結合部位を挟むようにPCRプライマーを設計し、ボランティア22例のゲノムを用いて多型頻度を検討した。本領域約575bpについてシーケンスを行った結果、多型が確認されたのは-66の1カ所のみであった。

また、全体では22例中19例がホモのTアリル、3例がT/CのヘテロでほとんどがTアリルであった。これをアレルギーの有無でみると、非アレルギー例においてのみ10例中3例にT/Cのヘテロが検出された。この結果と先の結果より、Cアリル遺伝子を持つ人はアレルギー体質になりにくい可能性が示唆されるが、さらに症例数を増やして検討する必要がある。また、他の民族においてどのようなパターンを示すかも検討して行く必要があると考えている。

おわりに

以上、β鎖については遺伝子多型の新たな機能の可能性、α鎖についてはこれまで知られていなかった多型をプロモーターの重要領域に発見したことを報告した。

アレルギー疾患は多因子疾患であり、当然のことながらこれらの遺伝子の多型解析のみで原因を解明することは困難である。すなわち他のアレルギー候補遺伝子を組込んだ多変量解析が当然必要である。アレルギー候補遺伝子機能解析のさらなる発展を期待するとともに、我々もこれらの結果をさらに詳細に検討して行きたい。

謝 辞

HML/SEを御供与頂いた京都大学中畑龍俊先生に深謝致します。

文 献

- 1) 白川太郎, Hopkin, J., 毛 暁全, ほか: 第11染色体とアトピー遺伝子. 分子アレルギー学 (富岡玖夫・監), メディカルレビュー社, p.419.(1998)
- 2) 長谷川真成, 西山千春, 羅 智靖: FcεRIβ鎖多型, 科学評論社, 東京, 12(6), p.538.(2001)
- 3) Furumoto, Y., Hiraoka, S., Kawamoto, K., et al.: Polymorphism in FcεRIβ chain do not affect IgE-mediated mast cell activation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 273: 765.(2000)
- 4) Donnadieu, E., Cookson, W.O., Jouvin, M-H., et al.: Allergy-associated polymorphism of the FcεRIβ subunit do not impact its two amplification functions. J. Immunol., 165: 3917(2000)
- 5) Nishiyama, C., Yokota, T., Okumura, K., et al.: The transcription factors Elf-1 and GATA-1 bind to cell-specific enhancer elements of human high-affinity IgE receptor α-chain gene. J. Immunol., 163, 623. (1999)
- 6) Takahashi, K., Nishiyama, C., Nishiyama, M., et al.: A complex composed of USF1 and USF2 activates the human FcεRI α chain expression via CAGCTG element in the first intron. Eur. J. Immunol., 31, 590. (2001)
- 7) Nishiyama, C., Hasegawa, M., Nishiyama, M., et al.: Cloning of Full-Length Genomic DNA Encoding Human FcεRI α-Chain and Its Transcriptional Regulation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 284: 1056.(2001)