

## 論文の内容の要旨

論文題目 IgM 五量体の真の構造の発見と疾患抑制タンパク質 AIM との相互作用解析

氏名 平本 絵美莉

免疫グロブリン M (Immunoglobulin M; IgM) は、血中で五量体を形成して存在している。その構造は、1960 年代の電子顕微鏡観察結果から正五角形型をしているとされ、今日まで正五角形をベースとして構造解析が行われてきた。また、IgM 五量体には J 鎖という小さな分子が結合しており、これによって五量体構造が安定化されている。IgM は免疫反応において初期段階で産生される抗体で、補体を活性化するなど感染防御において重要な機能を担う一方で、Apoptosis Inhibitor of Macrophage (AIM) のキャリアーとしての機能を持つ。

AIM は肝臓のクッパー細胞などの組織マクロファージが産生する約 40 kDa の分泌型タンパクであり、通常血中で IgM 五量体と結合することで糸球体濾過を回避し、安定的に体内を循環している。Scavenger receptor cysteine-rich スーパーファミリー (SRCR-SF) に属する AIM は、3 つの SRCR ドメインから構成され、分子内ジスルフィド結合を形成する Cys 残基を多数有する。近年の研究から、AIM は自己の死細胞などをはじめとしたさまざまな分子に結合してそれらの除去を促進する機能を有しており、これによって肥満やがん、急性腎障害などさまざまな疾患に対して治療的効果を持つことが明らかになっている。特に急性腎障害発症時には、血中の AIM が IgM から解離して尿中に移行し、尿細管を閉塞している死細胞の除去を促進することで病態が改善する。AIM が機能するためには、IgM から解離した遊離型 AIM であることが必要で、すなわち、IgM 五量体結合型 AIM が“不活性型”、IgM 五量体から解離した遊離型 AIM が“活性型”である。死細胞やがん細胞などの生体内で生じる異物はさまざまな疾患を発症する原因となるが、AIM の異物除去促進機能によって、さまざまな疾患に対する治療効果、あるいは予防効果が望める。そして、AIM による疾患予防・治療法開発の上では、AIM と IgM の解離や結合を制御して AIM の活性をコントロールすることが非常に重要であると言える。しかしこれまでに、疾患発症時における AIM 解離メカニズムや AIM と IgM の結合様式は不明であった。そこで本研究では、活性型 AIM の治療応用に向けて、AIM-IgM 間の相互作用を明らかにすることを目的とした。

まず初めに、AIM - IgM 複合体を可視化することによる構造学的アプローチで両者の結合を解析した。構造解析には構造的に揺らぎのない安定な分子が望ましいため、主に IgM の Fc 領域のみ (IgM-Fc) を用いた。まず、AIM の結合していない IgM-Fc 五量体 (J 鎖存在下) のネガティブ染色を行い、電子顕微鏡観察像から多数の単粒子像をピックアップして平均化することで二次元構造の解析を行った。すると非常に興味深いことに、J 鎖存在下の IgM-Fc 五量体は正五角形型ではなく、六量体から 1 つの単量体が抜けたような大きな空

間を1つ有する五量体で、これまで考えられていた構造とは大きく異なっていることが明らかになった。IgMのネガティブ染色法による二次元構造解析においても、IgM-Fcと同様の各単量体が正六角形型に配置された五量体構造が確認された。したがって、IgMのFc領域はFab領域の有無に関わらず、六量体から1つ単量体を抜いたような構造をしていることが明らかになった。これは、従来信じられていたIgM五量体構造を覆す非常に大きな発見である。

さらに、ネガティブ染色によるAIM-IgM-Fc (J鎖存在下) 複合体の二次元構造解析を行ったところ、IgM-Fc五量体の空間にはまり込むようにAIMが1分子存在していることが明らかになった。これまでの研究で、AIMはJ鎖の存在しないIgM多量体とは結合しないことがわかっている。そこで、J鎖の有無がどのようにAIMとの結合に影響しているかを検討した。J鎖非存在下ではIgMは六量体を形成することが報告されているが、ネガティブ染色による二次元構造解析により、IgM-FcはJ鎖非存在下では正六角形型の六量体を形成することが視覚化された。また、わずかに五量体も存在していたが、その空間はJ鎖存在下のIgM-Fc五量体よりも狭いものであった。以上より、J鎖非存在下のIgMにAIMが結合しないのは、AIMが結合できる空間がないからであると判明した。

続いて、AIMとIgMの結合様式を生化学的実験によって解析した。これまでの研究で、AIMはSDS変性ではIgMから解離せず、還元処理によって解離することがわかっていた。このことから、AIMとIgMの結合にはジスルフィド結合が関与しているのではないかと予想された。そこで、IgMおよびAIMのCys残基に着目した。まず、IgM-Fcの二次元構造より、IgMにはC414が分子内結合に寄与していない遊離Cys残基として存在していることが予想された。また、マウスAIMでは、SRCR2ドメインのみ奇数個のシステイン残基を有しており、このうちCys194が遊離システイン残基であることがデータベース上で示されている。これらの遊離Cys残基がAIM-IgM複合体形成に寄与しているかを確かめるために、AIMおよびIgMの遊離Cys残基をSer残基に置換したAIM変異体(C194S)およびIgM-Fc変異体(C414S)を調製し、複合体形成を*in vivo*および*in vitro*で調査した。その結果、それぞれの変異体ではAIM-IgM複合体形成能が完全に失われており、AIMとIgMの複合体形成には分子間ジスルフィド結合形成が必須であることが判明した。

さらに、AIM-IgM-Fc複合体のネガティブ染色像から、IgMのC $\mu$ 4ドメインとAIMが空間的に近い距離で面しており、何らかの相互作用が存在することが予想された。そこで、SRCR1ドメイン欠損型AIM (AIM  $\Delta$ SRCR1) およびSRCR3ドメイン欠損型AIM (AIM  $\Delta$ SRCR3) を作製し、それぞれのIgM-Fc五量体との結合能を*in vitro*で評価することで、AIMのSRCR1ドメイン、SRCR3ドメインのどちらがC $\mu$ 4ドメインに接しているのかを検討した。その結果、AIM  $\Delta$ SRCR1はIgM-Fcへの結合能を有したのに対して、AIM  $\Delta$ SRCR3は結合しなかった。以上より、AIM-IgM複合体形成には、AIMのSRCR3ドメインとIgMのC $\mu$ 4ドメインとの相互作用も関与していると示唆された。そこで、AIM C194とIgM-Fc C414の結合をベースとしてこれらのドッキングモデルを組むと、AIM SRCR3

ドメインの正電荷アミノ酸クラスターと IgM C $\mu$ 4 ドメインの負電荷アミノ酸クラスターがちょうど接するような構造をしていた。ネコの AIM と IgM の結合親和性はマウスより 1000 倍強いが、これはネコ AIM では SRCR3 ドメインに多く正電荷アミノ酸が存在することに起因するものであるということが明らかになっている。これらより、SRCR3 ドメインの正電荷を持つアミノ酸のクラスターと IgM の C $\mu$ 4 ドメインの負電荷をもつクラスターの電荷相互作用が、AIM - IgM 間の結合に重要であると推測された。以上の知見から、AIM - IgM 複合体形成には、遊離 Cys 残基での分子間ジスルフィド結合形成と、AIM SRCR3 ドメインと IgM C $\mu$ 4 ドメインの電荷相互作用の 2 段階のメカニズムが寄与していることが明らかとなった。

本研究では、IgM 五量体は実は正五角形ではなく正六角形型に各単量体が配置された五量体であることを明らかにした。これは、これまで 50 年以上誰もが信じて疑わなかった IgM 五量体の構造を覆すもので、非常に大きな発見である。また、AIM はジスルフィド結合と電荷相互作用の 2 つによって IgM に結合することを明らかにした。本研究の結果は、IgM とさまざまな分子の相互作用やそれに関わる機能解析などに有用な知見をもたらすだろう。さらに、さまざまな疾患に対する治療効果が望める AIM とその活性を制御していると言える IgM との結合様式を明らかにしたことは、AIM の機能部位の特定や、活性を制御することによる治療法の開発に大きく貢献することが期待できる。今後は AIM-IgM 複合体の三次元的な構造解析によって両者の結合部位のより詳細な解析を行うことで AIM の活性をコントロールすることによる新規創薬開発を目指す。