

平成30年6月16日現在

機関番号：14303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14920

研究課題名(和文)細胞傷害顆粒に対する新規膜結合型分子プローブの創製と機能解析法の開発

研究課題名(英文) Construction of novel membrane-bound molecular probes for lytic granules and their functional analysis

研究代表者

片岡 孝夫 (Kataoka, Takao)

京都工芸繊維大学・応用生物学系・教授

研究者番号：20242307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： ヒト肺がん腫A549細胞において、HM13、TMED10、SLC3A2がLysoTracker Red DND-99と部分的に共局在し、LAMP1のC末端領域と連結したパーフォリンもしくはグランザイムBがLysoTracker Red DND-99と共局在することを明らかにした。シリアンハムスター腎臓由来BHK-21細胞において、LAMP1がおもにtrans-Golgiネットワークに局在することを見出した。マウス胸腺腫BW5147細胞において、T-box転写因子eomesoderminがIFN- γ 遺伝子座のプロモーター領域とCNSへのRelAとNFATc2の結合を促進することを見出した。

研究成果の概要(英文)： HM13, TMED10, and SLC3A2 co-localized partly to LysoTracker Red DND-99, and perforin and granzyme B, which were fused to the C-terminal region of LAMP1, co-localized to LysoTracker Red DND-99 in human lung adenocarcinoma A549 cells. LAMP1 has been shown to localize mainly to the trans-Golgi network in Syrian hamster kidney BHK-21 cells. The T-box transcription factor eomesodermin has been shown to promote the binding of RelA and NFATc2 to the promoter region and multiple conserved noncoding sequences across the Ifng locus in mouse thymoma BW5147 cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：perforin granzyme B LAMP1 細胞傷害顆粒 eomesodermin IFN-

1. 研究開始当初の背景

細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) やナチュラルキラー (natural killer: NK) 細胞は、生体防御に重要な細胞であり、ウイルスに感染した細胞やがん細胞を排除する。CTL や NK 細胞は、細胞内に特殊な細胞小器官である細胞傷害顆粒を有している。細胞傷害顆粒は、分泌型リソソームとして機能し、その構成成分として、ポア形成タンパク質であるパーフォリン (perforin)、セリンプロテアーゼであるグランザイム B (granzyme B)、リソソーム膜タンパク質である lysosomal associated membrane protein 1 (LAMP1) 等が報告されている。CTL や NK 細胞は、標的細胞を認識すると、細胞傷害顆粒をエキソサイトーシスする。このとき放出された perforin によって、granzyme B が細胞内に侵入し、標的細胞に細胞死が誘導される。

2. 研究の目的

細胞傷害顆粒には、perforin や granzyme B 等の可溶性タンパク質の他に、LAMP1 等の膜タンパク質が含まれている。これまでに細胞傷害顆粒に関するプロテオミクスが報告されているが、細胞傷害顆粒に局在している膜タンパク質については十分に理解されていない。本研究では、細胞傷害顆粒に特異的な膜タンパク質を探索し、細胞傷害顆粒に対する膜結合型分子プローブの構築を行なうことによって、細胞傷害顆粒の分子構造、生合成、細胞内輸送の分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ラット腎臓由来 NRK 細胞 (RCB0043) とシリアンハムスター腎臓由来 BHK-21 細胞 (RCB1423) を理化学研究所バイオリソース研究センターより入手した。ヒト肺がん腫 A549 細胞 (JCRB0076) を国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクより入手した。A549 細胞、NRK 細胞、BHK-21 細胞等にリポフェクション法によって発現ベクターを一過的にトランスフェクションし、共焦点顕微鏡による細胞内局在の観察等を行なった。

(2) マウス胸腺腫 BW5147 細胞 (JCRB9002) を国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンクより入手した。マウス Eomes をコードする発現ベクターを導入した BW5147 細胞トランスフェクタントとコントロール発現ベクターを導入した BW5147 細胞トランスフェクタントを樹立した。これらの BW5147 細胞トランスフェクタントを、T 細胞受容体の刺激の代替として、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) と ionomycin (IM) で刺激し、リアルタイム PCR による mRNA 定量、ELISA 法によるサイトカイン量の定量、クロマチン免疫沈降 (ChIP) による DNA 結合

量の定量等を行なった。

4. 研究成果

(1) ヒト NK 細胞株 YTS 細胞から精製された細胞傷害顆粒のプロテオーム解析によって、細胞傷害顆粒に含まれるタンパク質の網羅的な解析結果が報告されている [1]。一方、ヒト末梢血由来 NK 細胞においてインターロイキン 2 刺激によって発現が亢進する遺伝子のゲノムワイドな解析結果が報告されている [2]。これらの論文で共通する膜タンパク質の遺伝子として、histocompatibility minor 13 (HM13)、transmembrane p24 trafficking protein 10 (TMED10)、solute carrier family 3 membrane 2 (SLC3A2) を見出した。本研究では、ヒト NK 細胞株 YTN10 細胞から cDNA ライブラリーを作製し、PCR を用いて HM13、TMED10、SLC3A2 の 3 種類の遺伝子をクローニングした。さらに EGFP タグを C 末端に連結した HM13-EGFP、TMED10-EGFP、SLC3A2-EGFP をコードする発現ベクターを構築し、A549 細胞に一過的に発現させた。共焦点顕微鏡による観察を行なったところ、HM13-EGFP、TMED10-EGFP、SLC3A2-EGFP の 3 種類の膜タンパク質はいずれも LysoTracker Red DND-99 と部分的に共局在することが観察された。

YTN10 細胞において、限界希釈法を用いて、単一の細胞から増殖可能な複数のクローンを単離した。これらの YTN10 細胞クローンの中から、野生型 YTN10 細胞と比較して、perforin の発現量が同程度であるが、エレクトロポレーションによる遺伝子導入効率が高いクローンが得られた。今後、これらの 3 種類の膜タンパク質について、YTN10 細胞等の NK 細胞における細胞内局在を調べる必要がある。

(2) LAMP1 は、C 末端に膜貫通ドメイン及びリソソームの局在に必要なチロシンモチーフを含む短いサイトゾル領域を持っている。可溶性タンパク質である perforin と granzyme B に LAMP1 の C 末端領域である LAMP1 (325-417) を連結させた遺伝子を作製した。Perforin、granzyme B、LAMP1、perforin-LAMP1 (325-417) もしくは granzyme B-LAMP1 (325-417) の C 末端に EGFP タグを連結した遺伝子を A549 細胞に一過的に発現させ、共焦点顕微鏡で観察した。その結果、perforin-EGFP、granzyme B-EGFP、LAMP1-EGFP、perforin-LAMP1 (325-417)-EGFP、granzyme B-LAMP1 (325-417)-EGFP はいずれも LysoTracker Red DND-99 と共局在することが観察された。今後、これらのタンパク質を CTL や NK 細胞において発現させ、細胞傷害顆粒に対する膜結合型分子プローブとしての可能性を検討する必要がある。

(3) これまでの先行研究から、NRK 細胞では、LAMP1-EGFP が細胞内に散在し、LysoTracker

Red DND-99 と共局在しているのに対し、BHK-21 細胞では LAMP1-EGFP が比較的一箇所に集積し、LysoTracker Red DND-99 と共局在しないことを見出した。本研究では、BHK-21 細胞に LAMP1-EGFP を一過的に導入し、LysoTracker Red DND-99 で染色した後、超解像顕微鏡で観察し、LAMP1-EGFP が LysoTracker Red DND-99 と共局在しないことを確認した。さらに、本研究では、NRK 細胞と BHK-21 細胞における内在性 LAMP1 の局在を検討した。抗 LAMP1 ポリクロナール抗体を用いて内在性 LAMP1 を検出したところ、NRK 細胞では LAMP1 が細胞内に散在していたが、BHK-21 細胞では LAMP1 が核周辺部に集積していることが観察された。以上の結果から、内在性 LAMP1 は、NRK 細胞と BHK-21 細胞において、LAMP1-EGFP と類似した局在を示すことが明らかになった。さらに、BHK-21 細胞では、LAMP1-DsRed-Monomer が *cis*-Golgi マーカー GM130-EGFP と共局在しないが、*trans*-Golgi network protein 2-EGFP と共局在していることが観察された。以上の結果から、BHK-21 細胞では、NRK 細胞と異なり、LAMP1 がおもに *trans*-Golgi network に局在していることが明らかになった。現時点では、BHK-21 細胞において、LAMP1 がリソソームに局在しないメカニズムは不明であり、さらなる研究が必要である。

(4) T-box ファミリーは、組織の発生や分化を制御している転写因子であり、DNA に結合する T-box ドメインと転写活性化ドメインを有している。T-box 転写因子の一つである eomesodermin (Eomes) と T-bet は、免疫系の制御に重要な役割を担い、CD4⁺ T ヘルパー 1 (Th1) 細胞、CD8⁺ CTL、NK 細胞の分化に重要である。T-bet は、エフェクター CD8⁺ T 細胞で多く発現しているが、メモリー CD8⁺ T 細胞でその発現が減少する。一方、Eomes はメモリー CD8⁺ T 細胞で強く発現している。Interferon- γ (IFN- γ) はウイルス感染細胞やがん細胞に対する免疫応答を調節する重要なサイトカインである。IFN- γ は、おもに Th1 細胞、CTL、NK 細胞によって産生される。ナイーブ CD8⁺ T 細胞では IFN- γ の発現がほとんど見られないが、エフェクター CD8⁺ T 細胞やメモリー CD8⁺ T 細胞では、IFN- γ の発現が高い。Eomes は、IFN- γ の産生に重要であるだけでなく、perforin や granzyme B の発現及び細胞傷害活性に重要であることが報告されている。以上の点から、Eomes は細胞傷害顆粒の生合成にも関与している可能性が示唆される。

T-bet や Eomes は、IFN- γ の発現に重要な役割を担っている。T-bet は、IFN- γ 遺伝子座のプロモーター領域や複数の conserved noncoding sequences (CNS) に結合し、ヒストン修飾を調節していることが明らかになっている。しかしながら、T-bet に比べて、Eomes による IFN- γ の転写調節に対する役割

は十分に理解されていない。研究代表者らは、マウス胸腺腫 BW5147 細胞に Eomes や T-bet を発現させると、IFN- γ の産生が誘導されることを見出した[3]。さらに、Eomes や T-bet が IFN- γ 遺伝子座のプロモーター領域や複数の CNS に結合することを見出した[3]。本研究では、IFN- γ 遺伝子に対する Eomes の転写調節の分子メカニズムの解明を目的とした。

Eomes を発現させた BW5147 細胞トランスフェクタントを PMA と IM で刺激すると、IFN- γ mRNA の発現や IFN- γ の培地中への産生が誘導された。PMA と IM による IFN- γ mRNA の発現や IFN- γ の産生は、carcineurin 阻害剤 FK506 でほぼ完全に阻害され、nuclear factor B (NF- κ B) 阻害剤 TPCA-1 で部分的に阻害された。以上の結果から、Eomes による IFN- γ の発現には、carcineurin 依存性の NFAT 経路が必須であるが、NF- κ B 経路も関与していることが示唆された。さらに、Eomes を発現させた BW5147 細胞トランスフェクタントを PMA と IM で刺激すると、コントロール BW5147 細胞トランスフェクタントと比較して、IFN- γ 遺伝子座にあるプロモーター領域及び複数の CNS への NF- κ B サブユニット RelA 及び NFAT ファミリー NFATc2 の結合が顕著に増加することを見出した。以上の結果から、Eomes が IFN- γ 遺伝子座にあるプロモーター領域や CNS への RelA と NFATc2 の結合を促進することが明らかになった。Eomes を発現させた BW5147 細胞は、IFN- γ の転写調節の分子メカニズムを解明するための有用な研究材料であると考えられる。

【参考文献】

1. Casey, T.M., Meade, J.L., and Hewitt, E.W. Organelle Proteomics. Identification of the exocytic machinery associated with the natural killer cell secretory lysosome. *Molecular & Cellular Proteomics*. 6, 767-780, 2007
2. Dybkaer, K., Iqbal, J., Zhou, G., Geng, H., Xiao, L., Schmitz, A., d'Amore, F., and Chan, W.C. Genome wide transcriptional analysis of resting and IL2 activated human natural killer cells: gene expression, signatures indicative of novel molecular signaling pathway. *BMC Genomics*, 8, 230, 2007
3. Fukuoka, N., Harada, M., Nishida, A., Ito, Y., Shiota, H., and Kataoka, T. Eomesodermin promotes interferon- γ expression and binds to multiple conserved noncoding sequences across the *Ifng* locus in mouse thymoma cell lines. *Genes to Cells*, 21, 146-162. 2016

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計3件)

原田 美鈴(片岡 孝夫) T-box ファミリー転写因子 eomesodermin はマウス胸腺腫 BW5147 細胞においてT細胞の活性化に应答し IFN- の発現を制御する、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)

家治 葉子(片岡 孝夫) リソソーム関連タンパク質の細胞内局在性の解析、日本農芸化学会 2017 年度(平成 29 年度)大会、2017 年

桑田 沙羅(片岡 孝夫) The lysosomal membrane protein LAMP1 localizes mainly to trans-Golgi network in baby hamster kidney (BHK-21) cells、BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会)、2015 年

6. 研究組織

(1)研究代表者

片岡 孝夫 (KATAOKA, Takao)

京都工芸繊維大学・応用生物学系・教授

研究者番号：20242307