

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K15713

研究課題名（和文）T細胞におけるTRAF5のS-パルミトイル化機序とその生理的意義の解明

研究課題名（英文）Mechanism of S-palmitoylation of TRAF5 in T cells and its physiological significance

研究代表者

林 隆也（HAYASHI, TAKAYA）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任講師

研究者番号：10624851

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質は細胞内で合成された後、様々な修飾を受けその性質が制御される。免疫細胞であるT細胞は微生物等の感染に反応し、また種々の炎症環境下で影響を受けて性質を変化させるが、その際にも関連する様々なタンパク質が修飾を受けている。我々は炎症性タンパク質IL-6応答に関わる分子TRAF5に着目し、S-パルミトイル化という修飾を担う酵素Zdhhc15と結合する事を見出した。また、正常マウスT細胞にはZdhhc15の他にもZdhhc18, 5, 6, 7, 20の発現レベルが高い事がわかってきており、TRAF5のS-パルミトイル化修飾やT細胞におけるZdhhc分子群が特定のT細胞機能を担っている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

T細胞は微生物感染から我々の体を守る役割を担っている一方、本来反応すべきではない物質へ過剰応答するアレルギー反応にも関与しているため、その反応制御を理解する事は非常に重要である。本研究ではT細胞の機能制御に関わる分子であるTRAF5が今まで知られていなかったS-パルミトイル化という修飾を受ける事を示し、また、マウスT細胞におけるS-パルミトイル化修飾を担う酵素のバリエーションを明らかにした事は学術的に意義深いと考える。今後のさらなる研究によりT細胞が関係する炎症性疾患にこの修飾酵素による分子制御が関与する事が分かれば、新規な治療法の確立へ貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：After proteins are synthesised in cells, their properties are regulated by various modifications. T cells, which are major immune cells, respond to microbial infection and are influenced by various inflammatory conditions, and change their properties. We focused on TRAF5, a molecule involved in response to pro-inflammatory cytokine IL-6, and found that it binds to the enzyme Zdhhc15, which is related to S-palmitoylation modification. In addition to Zdhhc15, expression levels of Zdhhc18, 5, 6, 7, 20 are also found to be high in normal mouse T cells, suggesting that the S-palmitoylation of TRAF5 and the group of Zdhhc molecules in T cells may be responsible for specific T cell functions.

研究分野：免疫学

キーワード：S-パルミトイル化 TRAF5

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は細胞内で合成された後、様々な修飾を受けその性質が制御される。T細胞は微生物等の感染に应答し、また種々の炎症環境下で影響を受けて分化するが、その際にも関連するタンパク質が多様な修飾を受けて特定のシグナル伝達を行い機能性発現へと繋がる。TNF receptor-associated factor (TRAF)ファミリー分子は6種類 (TRAF1-6) から構成され、T細胞抗原受容体、補助刺激受容体、IL-17受容体やToll様受容体の直下でシグナル伝達に関与し、免疫担当細胞の機能制御に重要な役割をはたす。申請者らは、TRAF5がIL-6受容体ヘテロ二量体のうちgp130に結合することでIL-6シグナルを負に制御し、Th17細胞分化を抑制するという新たな機能を発見した (Nagashima H. et al., *Nat. Immunol.*, 2014)。さらに、この結合に関与するgp130内のモチーフをデータベース解析した結果、このモチーフを含む分子の一つとしてZdhhc15を見出した。

Zdhhc15はDHHCファミリーパルミトイルアシル転移酵素群 (PATs) の一つで、炭素数16の飽和脂肪酸であるパルミチン酸を基質タンパク質のシステイン残基に可逆的に付加する (S-パルミトイル化)。S-パルミトイル化は、N-ミリスチル化と並ぶ主要な脂質修飾であり、この修飾を受けたタンパク質は疎水性が上昇し、脂質膜への親和性、安定性、生理活性が大きく変化する。

TRAFは機能発現する上で受容体が存在する形質膜近傍への局在が重要となるが、TRAF5はN-ミリスチル化配列や脂質結合ドメインを有しておらず、膜局在制御の詳細は不明な点が多い。本研究は、TRAF5がS-パルミトイル化制御を受けていると仮説をたて、T細胞におけるその機序や生理的意義の検討を行った。

2. 研究の目的

タンパク質の機能は、様々な翻訳後修飾により質的・量的に制御を受ける。TRAFは補助刺激受容体、Toll様受容体やサイトカイン受容体などの下流で多様なシグナル伝達制御に関わるが、S-パルミトイル化を介した機能制御に関する研究は皆無である。本研究では、T細胞におけるTRAF5のS-パルミトイル化機構及びパルミトイルアシル転移酵素群との関連性を評価することを計画している。これにより、TRAFの新規な機能制御の可能性を検討し、これらの研究を通じてT細胞依存的な炎症性疾患の新規な制御機構の解明に向けた分子基盤の構築を目指す。

3. 研究の方法

DHHCファミリーパルミトイルアシル転移酵素群が担うS-パルミトイル化は、パルミチン酸が基質タンパク質のシステイン残基に可逆的に付加される修飾である。S-パルミトイル化TRAF5の検出には、acyl-biotinyl exchange (ABE)法を用いた。この手法の応用法 (IP-ABE法)は既にHEK293T細胞等を用いたS-パルミトイル化検出系で確立している。まず、TRAF5を発現させたHEK293T細胞の細胞溶解液にN-エチルマレイミド (NEM)、ヒドロキシルアミン (NH₂OH)、ビオチン-マレイミドを反応させる事でS-パルミトイル化システインをビオチン化に置換する (ABE法)。次に、ストレプトアビジンビーズを用いてビオチン化タンパク質をプルダウン法により回収し、抗TRAF5抗体を用いてウェスタンブロット (W.B.)を行う事でS-パルミトイル化TRAF5が検出される。TRAF5は種々のN末端およびC末端短縮型変異体をプラスミドベクターにて発現させた。TRAF5とZdhhc15との結合は、共免疫沈降法とそれに続くW.B.法により解析を行った。Zdhhc15は野生型他、C末端側のTRAF5結合モチーフを欠損させた末端短縮変異体やTRAF5結合モチーフのアミノ酸置換変異体を用いて結合能の変化を検討した。

正常マウスT細胞におけるZdhhc分子群の発現レベルは、トータルRNAを抽出しオリゴdTプライマーによる逆転写反応に続く特異的なプライマーセットを用いたRT-PCR法にて解析を行った。また、それぞれの発現レベルは内部標準を用いて標準化した。

Zdhhc15以外にもmRNA発現レベルを参考にZdhhc18を含む幾つかの分子 (Zdhhc5, 6, 7, 20) の発現ベクターを作製し、これらをTRAF5発現ベクターと共にHEK293T細胞に共発現させ、IP-ABE法にてTRAF5のS-パルミトイル化レベルの変化を検討した。

正常マウスT細胞におけるZdhhc分子群のmRNA発現レベルの解析により最も発現レベルが高かったZdhhc18に着目し、MCC (moth cytochrom c) 特異的T細胞ハイブリドームを用いてノックダウンの影響を検討した。Zdhhc18を標的とする3種類のショートヘアピンRNA発現ベクターを作製しそれぞれ安定発現させてMCCペプチド刺激に対するIL-2産生能の変化をCTLL-2細胞増殖アッセイにて測定した。

4. 研究成果

TRAF5とZdhhc15の結合に関して、TRAF5-gp130結合により見出されたTRAF5結合モチーフ (SXXE-X8-EEXED) の関与を検討した。Zdhhc15内のTRAF5結合モチーフはヒトとマウスで保存されており、どちらも299番目のセリンから始まり316番目のアスパラギン酸で終わるSRSESTQPLLDSEERPEDである。そこで、Zdhhc15のC末端側のTRAF5結合モチーフを欠く末端短縮

型変異体(1-298番目アミノ酸)発現プラスミドを作製し TRAF5 との結合に与える影響を共免疫沈降により検討した結果、野生型 Zdhhc15 と末端短縮型変異体 Zdhhc15 では同等の TRAF5 結合を示した。さらに、TRAF5 結合モチーフ後半 EEXED のグルタミン酸及びアスパラギン酸を全てアラニンに置換したアミノ酸置換変異体 Zdhhc15 を用いて TRAF5 結合能を検討した結果、アミノ酸置換変異体も野生型 Zdhhc15 と同等の TRAF5 結合を示した。以上のことから、TRAF5-Zdhhc15 結合は Zdhhc15 内の TRAF5 結合モチーフを介さないことが明らかになった。

TRAF5 の N 末端側が S-パルミトイル化される事を HEK293T 細胞への末端短縮型変異体 TRAF5 の遺伝子導入および ABE 法により見出した。これを担う PATs を検討する目的で正常マウス T 細胞における Zdhhc 分子群の mRNA 発現レベルの解析を行った結果、Zdhhc18 を筆頭に Zdhhc5, 6, 7, 20 の発現レベルが高い事が分かった。それぞれの Zdhhc 分子と TRAF5 との共発現下における S-パルミトイル化レベルの変化を免疫沈降 ABE 法により検討した結果、再現性をもって TRAF5 の S-パルミトイル化レベルを増減させるものは認められなかった。

次に、正常マウス T 細胞における Zdhhc 分子群の mRNA 発現レベルの解析により最も発現レベルが高いことが示された Zdhhc18 に着目し、T 細胞ハイブリドーマを用いてノックダウンの影響を検討した。Zdhhc18 を標的とする3種類のショートヘアピン RNA 発現ベクターのうち、2種類で Zdhhc18 mRNA レベルを半減させることが出来たので、MCC 特異的 T 細胞ハイブリドーマの Zdhhc18 をノックダウンし T 細胞抗原受容体に対する特異的抗原ペプチド刺激としての MCC ペプチド刺激に対する IL-2 産生能の変化を CTLL-2 細胞増殖アッセイにて測定したところ、コントロール shRNA 処理群と比較して IL-2 産生の有意な変化は認められなかった。

免疫担当細胞の主要な細胞種である T 細胞は、微生物などの感染から身を守る宿主防御の役割を担っている一方、本来反応すべきではない物質へ過剰応答するアレルギー反応にも深く関与している事が知られており、T 細胞によるそれらの反応制御機構を理解する事は生体防御の増強やアレルギー疾患や各種炎症性疾患の理解や治療法の確立に際して非常に重要である。本研究課題では T 細胞の機能制御に関わる分子である TRAF5 が今まで知られていなかった S-パルミトイル化という可逆的な脂質修飾を受ける事を示し、また、マウス T 細胞における S-パルミトイル化修飾を担う酵素のバリエーションを明らかにした。今後のさらなる研究により T 細胞が関係する炎症性疾患にこの修飾酵素による分子制御が関与する事が分かれば、新規な治療法の確立へ貢献する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------