

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07613

研究課題名(和文) シグナル伝達分子の細胞質でのアセチル化がもたらすT細胞の新規運命決定機構の探索

研究課題名(英文) Analysis of the protein acetylation that regulates intracellular signal transduction in T cells

研究代表者

近藤 元就 (Motonari, Kondo)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：20594344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞は他の免疫細胞の機能を制御したりウイルス感染細胞を殺傷するなどの機能を発揮し生体の恒常性に寄与している。T細胞のこの多様な働きは厳密に制御されているが、その制御は細胞内情報伝達系と密接である。情報伝達の制御にはリン酸化の関与が中心的であるが、我々はアセチル化や酸化といった別の翻訳後修飾による情報伝達制御がT細胞の機能を制御している事を部分的に明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アセチル化はタンパク質の翻訳後修飾の1つで核内のヒストンを修飾するものとして古くから知られている。本研究ではアセチル化の新しい側面として、核内ではなく細胞質での意義について解析した。T細胞をモデルにして、細胞増殖やサイトカイン産生等のT細胞活性が情報伝達分子のアセチル化によって制御されている事を示した。しかしながらアセチル化の制御機構については未解のまま残されている。分子機構などの解析に関わる新しい研究分野の発展が期待される。また、T細胞は自己免疫疾患やガンなどの多岐の疾患に関与している。この分野に関するの知見を基にした医療面の開拓も期待でき、学術性と社会性の両面への貢献が予想される。

研究成果の概要(英文)：T cells play critical role in immune system. Their role is closely related to the intracellular signal transduction. Protein phosphorylation is critical for the regulation of signal transduction activity. In this study, We demonstrated other post-translational modification such as protein acetylation regulate T cell function. Acetyltransferase CBP acetylates MAP kinase-kinase MKK4 after T cell receptor (TCR) stimulation. Activation JNK and AP-1, downstream molecules of MKK4, were prevented under the acetylated MKK4 condition. Cytokine production from T cell after TCR cross-link was also attenuated in the presence of acetylated MKK4. These results provide new insight in the role of acetylation in T cell function.

研究分野：分子免疫学

キーワード：翻訳後修飾 アセチル化 T細胞機能

1. 研究開始当初の背景

細胞外の刺激は受容体を介して、細胞内シグナル伝達分子を活性化あるいは不活性化する。この活性化と不活性化の切り替えに重要な事象の1つが翻訳後修飾であり、例えばリン酸化、ユビキチン化およびアセチル化などがある。特にリン酸化はガン細胞の異常増殖をチロシンキナーゼの恒常的活性化で説明できた事、³²Pを用いて高感度で特異的に検出できた事から、シグナル伝達において中心的な立場を占めるようになった。リン酸化と脱リン酸化は受容体近傍をはじめ細胞の至るところで生じ、タンパク質機能のオンとオフとを切り換えている。別の翻訳後修飾であるアセチル化はヒストンで生じ転写の調節に関わる事から核内特有の翻訳後修飾ととらえられる事が多い。核外でアセチル化されるタンパク質の一例としてチュープリンが知られているが、シグナル伝達への直接的関与を指示する知見は乏しい。しかしながら、近年では細胞質でのアセチル化がシグナル分子の活性調節に直接に関与する事を示す報告が増えてきている。我々の研究グループは、T細胞を用いた解析でインターロイキン(IL)2受容体(IL-2R)の情報伝達系で活性化するシグナル伝達分子が細胞質でアセチル化されている事を見出した。そしてアセチル化された分子と関連する経路について解析し、アセチル化が細胞質でのシグナル伝達を調節するという一連の成果を発表してきた。

我々は細胞質で生じるアセチル化修飾の分子機構とその意義を明らかにしてきたが、そこには多くの事象が未解のまま残されている。

2. 研究の目的

抗原を認識して活性化したT細胞はクローン増殖して異物排除態勢となる(増殖期)。異物を排除後、T細胞の多くは細胞死をおこし、拡大したクローンの細胞数を減らす(退縮期)。この一連の過程には抗原とIL-2の刺激が必須である。この2つの刺激が細胞のステージの違いにより細胞増殖と細胞死という反対の応答を導いている。さらに細胞死期におけるこの2つの刺激は細胞の死と生存(記憶細胞)との選別も指揮している。この例のように、同じ細胞集団が同じような刺激を受けても異なるアウトプットを示すことは多々ある。その理由として、周囲の微小環境の影響を中心にして、エピゲノムや他のシグナル経路とのクロストークなどが挙げられているが、いずれも決定的な根拠となっていない。同じ刺激が異なる現象を導く過程にどのような制御機構が存在するのか、これが本課題の大きな問いであり、この問いへの足掛かりとして細胞質でのシグナル伝達分子のアセチル化を想定し、そのアセチル化がT細胞の運命決定に関与しているとの仮説を検証する事がこの課題の目的である。

3. 研究の方法

IL-2で刺激されたT細胞は核に局在するアセチル化酵素CBPを細胞質へ輸送する。CBPはIL-2Rに結合し近傍のシグナル伝達分子をアセチル化する。細胞質でのCBPによるアセチル化過程を顕在化する目的で、細胞質局在をとるエストロゲン受容体(ER)とCBPとを融合タンパク質(ER-CBP)として発現するベクターを作成し、これを細胞へ遺伝子導入する系を確立した。予備検討としてER-CBP発現ベクターをT細胞株Jurkat細胞へ導入した。ER-CBP存在下ではT細胞受容体(TCR)を架橋する事で誘導される転写因子AP-1の活性が減弱し、細胞増殖能の低下も認められた。この結果を元に次の3つの主題を設定した。

1. TCRからAP-1に至る経路に対するCBPの関与

Jurkat細胞へER-CBPを導入し抗CD3抗体と抗CD28抗体とで細胞を刺激した。所定時間毎に細胞を回収してSDS-PAGEとイムノブロット法で解析した。AP-1に関連するシグナル分子のうち、活性化状態がER-CBPにより干渉されるものが存在するかを検討した。

2. CBPによりアセチル化される基質の探索

TCRを架橋して刺激したJurkat細胞、ER-CBP発現Jurkat細胞、対照Jurkat細胞のそれぞれから細胞抽出液を調製した。これらにアセチル化タンパク質濃縮カラムによりアセチル化されたタンパク質を調製した。質量分析によりアセチル化タンパク質、アセチル化リジン残基の同定を試みた。

3. ER-CBP発現トランスジェニックマウスの作成と解析

ER-CBP発現カセットを作成し、トランスジェニックマウスの樹立を試みた。このマウスにおけるT細胞機能を解析した。

これらを中心に解析した。

4. 研究成果

1. TCR から AP-1 に至る経路に対する CBP の関与

ER-CBP 発現 Jurkat 細胞の解析から、MAP キナーゼ経路の 1 つである MKK4/MKK7 JNK AP-1 の経路が、アセチル化の作用点である事がわかってきた。対照 Jurkat 細胞を TCR 架橋で刺激した場合に比べて、ER-CBP 発現 Jurkat 細胞では MKK4 の活性化を示すリン酸化の程度が減弱していた。MKK7 は対照 Jurkat 細胞でもほとんどリン酸化が検出されなかった。MKK7 の軽度のリン酸化レベルは ER-CBP 発現条件下でも同程度であった。以上から、MKK4 が CBP の標的である可能性が示唆された。

MMK4 と MKK7 の一次構造に着目し、アセチル化の選択性(特異性)について検討した。これらの分子は類似の構造を持ち、アミノ末端側から D ドメイン、触媒ドメイン、DVD ドメインで構成されている。下流の JNK と相互作用するのは D ドメインである。MKK4 の D ドメインはリジン残基が多く認められる。活性が変化しなかった MKK7 ではアルギニン残基が認められる。アセチル化はリジン残基を修飾するので、D ドメインの特徴が MKK4 と MKK7 の ER-CBP に対する影響度の差異につながったと推測した。MKK4 と MKK7 のそれぞれから D ドメインをクローニングした。D ドメインを相互に入れ替えてドメインシャッフリングした MKK を作成し、この仮説の検証を進めている。同時に、MKK4 の D ドメインに部位特異的変異を導入してリジン残基をアラニンに置換した変異体を作成した。アミノ酸置換での MKK4 活性とアセチル化の変化を解析中である。

2. CBP によりアセチル化される基質の探索

細胞質に CBP を局在させた細胞から細胞抽出液を調製した。アセチル化タンパク質の濃縮条件の検討を進めている。今後アセチル化修飾タンパク質を質量分析により同定していく。そして、同定分子が TCR 経路へどのように関与するのか、アセチル化部位の同定などに取り組む。

3. ER-CBP 発現トランスジェニックマウスの作成と解析

マウスから CBP の cDNA をクローニングし、そのアミノ末端側に ER を付加した。カルボキシル末端側には internal ribosome entry site (IRES) 配列と緑色蛍光タンパク質 (GFP) 構造遺伝子を連結した。GFP の付加により ER-CBP 発現 T 細胞を特定できるようにした。このカセットでトランスジェニックマウスを作製したが、このマウスからは目的の ER-CBP を発現する T 細胞を認める事ができなかった。遺伝子導入用のカセットを作り直して、再度マウスの樹立を目指している。

4. その他の翻訳後修飾による T 細胞機能の制御

アセチル CoA のアセチル基が標的タンパク質のリジン残基に付加されてアセチル化修飾となる。アセチル CoA の生合成の場としてミトコンドリアが知られている。このことから、ミトコンドリアの作用が T 細胞の機能調節に関与する可能性を想定した。ミトコンドリアの維持に寄与する mitochondrial transcription factor A (TFAM) 遺伝子に着目し、この遺伝子の T 細胞特異的ノックアウト (TFAMcKO) マウスを用いて解析を進めた。このマウスから調製した TFAMcKO T 細胞は対照の野生型 T 細胞と比べて、ミトコンドリア量の減少と酸化的リン酸化能の低下を示した。これらの結果はピルビン酸からアセチル CoA への代謝に影響がある事を示唆するが、現在詳細を検討中である。次に TFAMcKO T 細胞を抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体で TCR 架橋することで活性化する細胞内情報伝達系を解析した。チロシンリン酸化酵素 Lck や MAP kinase の 1 つである ERK の活性が野生型 T 細胞の反応に比べて TFAM cKO T 細胞で減弱している事が判明した。TCR 下流での情報伝達不全について解析した結果、TCR カスケードで生じるリン酸化を負に調節しているフォスファターゼ SHP-1 の活性が TFAM cKO T 細胞で亢進している事が判った。SHP-1 の活性とミトコンドリア不全の関連性を探索した結果、野生型 T 細胞ではミトコンドリア由来の活性酸素により SHP-1 が酸化修飾されている事、この酸化により脱リン酸化活性が抑制されている事がそれぞれ判明した。そして、ミトコンドリアの作用が減弱している TFAM cKO T 細胞では SHP-1 の酸化修飾度の程度が低下している事も見出した。以上から、T 細胞機能を支えるミトコンドリアの作用の 1 つとして、酸化修飾を介した SHP-1 制御系が見えてきた。現在ミトコンドリアが T 細胞機能に及ぼす作用についてさらなる検討を続けている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuriko Tanaka, Mayu Onozato, Tetuo Mikami, Terumi Kohwi-Shigematsu, Takeshi Fukushima, Motonari Kondo	4. 巻 22
2. 論文標題 Increased Indoleamine 2,3-Dioxygenase Levels at the Onset of Sjogren's Syndrome in SATB1-Conditional Knockout Mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10125-10125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms221810125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Taku Kuwabara, Fumio Ishikawa, Masataka Ikeda, Tomomi Ide, Terumi Kohwi-Shigematsu, Yuriko Tanaka, Motonari Kondo	4. 巻 4
2. 論文標題 SATB1-dependent mitochondrial ROS production controls TCR signaling in CD4 T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202101093
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202101093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akiko Inoue, Yuriko Tanaka, Shinya Ohira, Kentaro Matsuura, Motonari Kondo, Kota Wada	4. 巻 24
2. 論文標題 High CD4 T cell/B cell ratio in the rapanasal sinus mucosa of patients with eosinophilic chronic rhinosinusitis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International archives of Otorhinolaryngology	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中ゆり子、井上彰子、近藤元就
2. 発表標題 自己免疫疾患モデルマウス病源性T細胞による組織障害メカニズムの解析
3. 学会等名 Kyoto T cell conference 第30回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中ゆり子、井上彰子、近藤元就
2. 発表標題 シェーグレン症候群疾患モデルマウス病原性T細胞による唾液腺組織障害機構の解析
3. 学会等名 第29回 日本シェーグレン症候群学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuriko Tanaka, Akiko Inoue, Taku Kuwabara, Taku Naito, Marii Ise, Motonari Kondo
2. 発表標題 An early serum marker for Sjogren's syndrome in SATB1 deficient mice.
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taku Naito, Yuriko Tanaka, Taku Kuwabara, Marii Ise, Motonari Kondo
2. 発表標題 Satb1 regulates thymocyte trafficking after positive selection.
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑原卓、近藤元就
2. 発表標題 アセチル化によるIL-2受容体シグナルの制御
3. 学会等名 日本サイトカイン・インターフェロン学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akiko Inoue, Yuriko Tanaka, Motonari Kondo, Hidehito Matsui, Takara Nakazawa, Shinya Ohira, Hiroshi Osafune, Kota Wada
2. 発表標題 More sever ECRS patients produce more TSLP in the paranasal sinus
3. 学会等名 JSA/WAO Joint COngress 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中ゆり子、小野里磨優、福島健、近藤元就
2. 発表標題 シェーグレンシンドローム疾患モデルマウス血清中代謝産物の解析
3. 学会等名 日本トリプトファン研究会 第39回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上彰子、田中ゆり子、長船大士、近藤元就、和田弘太
2. 発表標題 慢性副鼻腔炎患者の副鼻腔粘膜浸潤細胞の免疫学的検討
3. 学会等名 第二回日本アレルギー学会関東地方会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中ゆり子、井上彰子、小野里磨優、福島健、近藤元就
2. 発表標題 シェーグレン症候群疾患モデルマウスの病態解析と発症初期新規マーカーの探索
3. 学会等名 第28回日本シェーグレン症候群学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野里磨優、田中ゆり子、井上彰子、近藤元就、福島健
2. 発表標題 LC-MS/MSによるシェーグレン症候群疾患モデルマウス血清中L-トリプトファンおよびL-キヌレニンの定量
3. 学会等名 第32回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤元就、葛西宏威、松井幸英、中島耕一、桑原卓
2. 発表標題 IL-7受容体 鎖新規subdomainの同定
3. 学会等名 Kyoto T cell Conference 第29回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiko Inoue、Yuriko Tanaka、Motonari Kondo
2. 発表標題 New findings of eosinophilic chronic rhinosinusitis tissue- significantly higher CD4 positive T cells / B cells ratio in the mucosa-.
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuriko Tanaka、Akiko Inoue、Taku Kuwabara、Taku Naito、Motonari Kondo
2. 発表標題 Lack of SATB1 leads to Sjogren's syndrome like autoimmune manifestations in mice.
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Taku Naito, Yuriko Tanaka, Taku Kuwabara, Motonari Kondo
2 . 発表標題 Effect of Satb1 deficiency on differentiation of CD4+ vs CD8+ SP thymocytes.
3 . 学会等名 The 48th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Taku Kuwabara, Marii Ise, Taku Naito, Yuriko Tanaka, Motonari Kondo
2 . 発表標題 Mitochondrial respiration is critical for TCR signaling via an oxidative inactivation of phosphatase.
3 . 学会等名 The 42nd annual meeting of the molecular biology society of Japan
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Akiko Inoue, Yuriko Tanaka, Hanae Furuya, Riko Kajiwara, Akira Fukuo, Kota Wada, Motonari Kondo
2 . 発表標題 High CD4+ T Cell/ B Cell Ratios in the Paranasal Sinus Mucosae with Eosinophilic Chronic Rhinosinusitis.
3 . 学会等名 52nd Annual Meeting Of The Society For Leukocyte Biology
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Yuriko Tanaka, Akiko Inoue, Taku Naito, Taku Kuwabara, Motonari Kondo
2 . 発表標題 Lack of SATB1 leads to Sjogren's syndrome like autoimmune manifestations in mice
3 . 学会等名 52nd Annual Meeting Of The Society For Leukocyte Biology
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Motonari Kondo
2. 発表標題 SATB1, A Nuclear Protein Necessary for Establishment of Immune Tolerance.
3. 学会等名 52nd Annual Meeting Of The Society For Leukocyte Biology
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 T細胞に関連する疾病の治療及び診断のための薬剤を同定するための方法	発明者 桑原卓、松井幸英、 近藤元就	権利者 学校法人東邦大 学
産業財産権の種類、番号 特許、6984858	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔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