

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460600

研究課題名(和文) アセチル化によるIL-7受容体シグナル制御機構の解明

研究課題名(英文) A study of cytokine signal transduction regulated by protein acetylation

研究代表者

桑原 卓 (KUWABARA, Taku)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：40385563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：インターロイキン(IL)2やIL7の情報伝達系を解析する過程で、下流分子であるsignal transducer and activator of transcription 5 (STAT5)のアセチル化を検出した。リン酸化同様に、情報伝達系に深く関与する分子修飾だと考えられる。STAT5は細胞質でアセチル化されていた。STAT5はアセチル化に依存して限定消化され、転写因子活性を失っていた。CREB-binding protein (CBP)は核内でヒストンをアセチル化しているが、IL-2刺激依存的に細胞質へ輸送され、STAT5をアセチル化していることが判った。

研究成果の概要(英文)：Ligand binding to the cognate cytokine receptors activates intracellular signaling by recruiting protein tyrosine kinases and other protein modification enzymes. However, the roles of protein modifications other than phosphorylation remain unclear. Here, we examine a novel regulatory mechanism of Stat5 based on its acetylation. As for phosphorylation, interleukin 2 (IL-2) induces the acetylation of signaling molecules including Stat5 in the murine T cell line CTLL-2. Stat5 is acetylated in the cytoplasm by CREB-binding protein (CBP). Acetyl-Lys696 and -Lys700 on Stat5 are critical indicators for limited proteolysis, which leads to the generation of a truncated form of Stat5 (tStat5). In turn, tStat5 prevents transcription of the full-length form of Stat5. We also demonstrate that CBP physically associates with the IL-2 receptor chain. CBP, found in the nucleus in resting CTLL-2 cells, relocates to the cytoplasm after IL-2 stimulation in a MEK/ERK pathway-dependent manner.

研究分野：免疫学

キーワード：サイトカイン シグナル伝達 タンパク質修飾

1. 研究開始当初の背景

分子生物学的手法の発展によりサイトカインやその受容体の遺伝子が単離され、分子構造が明らかにされた。これに続く解析で、サイトカイン情報伝達における受容体のドメイン構造とその機能、あるいは受容体サブユニットがサイトカイン間で共有されていることが明らかにされてきた。受容体サブユニットが共有は、下流のシグナル伝達様式の共通性を示唆する。この研究で注目したインターロイキン (IL) 2 と IL7 は、共通鎖を共有する。これらのサイトカイン刺激に応じて、転写因子 signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) が活性化する。異なるサイトカインで活性化した STAT5 は、細胞周囲の微小環境や細胞種に、また細胞内で活性化する他の転写因子との総合的機能のそれぞれに依存して適切な遺伝子を発現する。

IL-7 受容体 (IL7R) は IL7R 鎖と c 鎖の 2 つのサブユニットで構成される。これらのサブユニットはリガンドとの結合により重合する。鎖と c 鎖にの細胞質領域には、それぞれチロシンキナーゼ janus kinase (Jak) 1 と Jak3 が結合している。サブユニットの重合によりこれらの Jak が活性化する。これにより鎖の細胞質領域に存在する 4 つのチロシン残基 (Y) がリン酸化される。リン酸化チロシンはシグナル伝達に関わる各種タンパク質の会合部位となる。このうちリン酸化 Y449 は STAT5 の結合部である。結合後の STAT5 は Jak によりリン酸化され転写因子として核内へ移行する。このように受容体から核へ伝わる情報伝達はリン酸化による活性調節が中心的である。

タンパク質の機能はリン酸化などの分子修飾により制御される場合がある。タンパク質のチロシン、セリン、およびスレオニンはリン酸化の標的になるアミノ酸である。リン酸化以外でもタンパク質は、ユビキチン化や SUMO 化など多くの修飾を受けて、それぞれの機能が調節されている。抑制タンパク質がユビキチン化とタンパク質分解を受けて、カスケードが進行する場合や、パルミトイル化により細胞質膜局在を規定される場合などである。しかしながら、他のタンパク質修飾はリン酸化に比較すると、情報伝達とそれに続く細胞機能への関与について深く知られるに至っていない。

2. 研究の目的

IL7R 下流のシグナル伝達は Jak1 と Jak3 および STAT5 のケースで詳細に調べられている。しかしながら一方で、他のカスケードがどのように関与し、またそれらがどのように調節されているかについてはよく分かっていなかった。

本研究の目的はサイトカイン受容体の情

報伝達系の新しい制御機構を見いだすことである。B 細胞分化をモデルに、見いだした新規伝達様式の重要性について解析を進める。ここではリン酸化以外の修飾系であるアセチル化にこだわって検討する。

3. 研究の方法

マウス T 細胞株 CTLL-2 細胞を IL-2 で刺激して IL-2R の下流カスケードを刺激した。Jak と STAT5 の系を中心にシグナル伝達について、リン酸化とアセチル化についてイムノプロット法で解析する。

IL7Ra 鎖の情報伝達への寄与を調べるため、細胞質内領域の欠失変異体を複数作製した。プロ B 細胞株である Ba/F3 細胞へ変異鎖を遺伝子導入した。これらを内在性の c 鎖との組み合わせにより IL7R の再構築 Ba/F3 細胞として IL7 刺激に対する応答の解析に用いた。フローサイトメトリー法で調製したマウス骨髄由来共通リンパ球系前駆細胞に鎖の欠失変異体を導入した。この共通リンパ球系前駆細胞の IL7 依存性 B 細胞分化を解析した。IL7R を用いた B 細胞の実験系では、IL2 で得られた結果を参考にして、アセチル化に焦点をあてた計画に取り組んだ。

4. 研究成果

1) アセチル化によるシグナル伝達系調節に関する解析

IL2 受容体 (IL-2R) は鎖、鎖、および c 鎖の 3 つのサブユニットで構成される。鎖と c 鎖の細胞質領域には、それぞれチロシンキナーゼ janus kinase (Jak) 1 と Jak3 が結合している。リガンドとの結合によるサブユニットの重合は Jak を活性化する。これにより IL2R の細胞質領域に存在するチロシン残基 (Y) がリン酸化される。このリン酸化 Y は情報伝達に関わる各種タンパク質の会合部位となる。STAT5 は鎖のリン酸化 Y392 に結合し、Jak によりリン酸化され、転写因子として核内へ移行する。リン酸化 Y338 はアダプター分子 Shc の会合部で、Ras-Raf-MEK-Erk を経てシグナルは核に伝達される。アセチル化がこれらをはじめとする IL2R シグナルをどのように調節しているかを調べた。

CTLL-2 細胞を IL2 で刺激した後、所定時間ごとに細胞抽出液を調製した。抗 Jak1 抗体、抗 Jak3 抗体、および抗 STAT5 抗体を用いてそれぞれのタンパク質を免疫沈降した。既に報告されているように、Jak1 と Jak3 および STAT5 のリン酸化が IL2 刺激の数分後から認められ 20 分でピークに達した。これら分子のリン酸化は 30 分後にやや減弱し、120 分後には未刺激のレベルに戻った。抗アセチル化リジン抗体を用いて、各免疫沈降画

分中のアセチル化タンパク質の検出を試みた。Jak1 と Jak3 および STAT5 のアセチル化は、刺激 10 分後に軽度認められた。リン酸化が減弱する 30 分後にアセチル化はピークとなった。Jak1 などの分子に注目して解析したが、リン酸化が先行しアセチル化が続くことが判った。

STAT5 だけでなく Jak1 と Jak3 でも検出されたことから、アセチル化は受容体の細胞質膜近傍で生じている可能性を考えた。抗鎖抗体を用いて IL2 刺激後の細胞抽出液の免疫沈降画分を調製した。未刺激細胞の免疫沈降画分からはアセチルトランスフェラーゼ活性を認めなかったが、刺激後の試料からは活性を検出することができた。CTLL-2 細胞を大量に培養し、IL2 刺激した後に同画分を調製した。これを質量分析計で解析したところ、アセチルトランスフェラーゼ活性を有すタンパク質として、CREB-binding protein (CBP) が候補として挙がった。抗鎖抗体による免疫沈降を改めて行い、イムノプロット法で CBP の検出を試みたところ、確かにこのアセチルトランスフェラーゼが鎖画分に含まれていることが判った。以上のことから CTLL-2 細胞において、IL2 刺激依存性に CBP が鎖に結合し Jak1 と Jak3 および STAT5 をアセチル化していることが示唆される。

アセチル化の増多と共に、全長分子に比べると分子量の小さい STAT5 も同時に検出される事に気がついた。脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチン A 存在下で IL2 刺激した場合に、STAT5 のアセチル化の増加と同時に低分子 STAT5 (STAT5s) も増加した。このことから、STAT5s はアセチル化依存性に限定的タンパク質消化により出現する可能性を考えた。アセチル化はリジン残基に入る。STAT5 のカルボキシル末端側に集中するリジン残基 (K) 群に着目しアラニン残基 (A) へのアミノ酸置換変異 STAT5 (KA) を作製した。各変異体の限定消化程度を解析したところ、K696A と K700A の変異 STAT5 は切断耐性を示した。K696A-K700A 二重変異 STAT5 はより明瞭な切断抵抗性を示した。これらの結果から、696 と 700 のリジン残基のアセチル化は限定消化の標的になる可能性が示唆された。

STAT5 はアミノ末端ドメイン、coiled-coil ドメイン、DNA 結合ドメイン、SH2 ドメイン、および転写活性化ドメイン (TAD) で構成されている。イムノプロット法で STAT5 の検出に使用している抗体の特異性から STAT5s は TAD を欠くことが判った。転写活性を持たないことから、STAT5s はドミナントネガティブとして全長 STAT5 の転写活性を抑制する可能性がある。これを確かめるため、ルシフェラーゼを指標としたレポーターアッセイを行った。IL2 刺激により著明に上昇した内在性 STAT5 の転写活性は、STAT5s 発現ベクターの導入量依存性に抑制

された。この抑制は、切断耐性の二重変異 STAT5 (K696A-K700A) の同時導入により解除された。これらの結果は、STAT5 のアセチル化は IL2R シグナル伝達の強度を調節している可能性を示唆する。

Jak1 などの分子修飾では、リン酸化がアセチル化に先行している。検出感度の差異もあるが、リン酸化依存性の刺激が核に伝達され、それに応答して CBP が細胞質へ輸送されていることが考えられる。鎖の細胞質領域は IL2R シグナル伝達に必須であることが知られている。鎖の細胞質膜に近い方から、S 領域、A 領域および P 領域と分けることができる。これらの領域は古くからの研究で、シグナル伝達経路との対応関係が詳しく明らかにされている。どのシグナルが CBP の細胞質輸送に必須であるのか、および細胞質の CBP が鎖のどの領域に結合するかを調べるために、各領域の欠損鎖を発現する BAF03 細胞を用いて検討を進めた。BAF03 細胞は B 細胞の前駆細胞で、IL2 受容体の鎖と c 鎖を発現する。これに遺伝子導入して各領域欠損 IL2R を再構築した一連の細胞を用いた。詳細は省くが次のことが明らかになった。A 領域内の Y338 がリン酸化される。リン酸化 Y338 にアダプター蛋白質 Shc が結合し、Ras-Raf-MEK-Erk 経路が核に伝達される。核内の Erk が核-細胞質輸送系を刺激し CBP が細胞質へ輸送されることが判明した。また、細胞質中に出た CBP は鎖の P 領域に結合していることも明らかになった。このような分子機構が、リン酸化が先行してアセチル化が追隨する現象の説明になると考えている。

2) B 細胞分化とシグナル伝達型のアセチル化に関する解析

B 細胞の分化は IL7 に依存すること、IL7R が c 鎖を共有することからこの検討を着想した。IL7R シグナルの特徴は IL7R 鎖に依存する。作製した一連の領域欠損変異 IL7R 鎖発現ベクターを Ba/F3 細胞へ導入した。これらの細胞を IL7 で刺激したところ、STAT5 のリン酸化が認められた変異 IL7R 鎖は細胞増殖能も示した。次に導入細胞をマウス由来の共通リンパ球系前駆細胞に置き換えて同様の実験を行った。概ね Ba/F3 細胞の場合と同じ結果であった。また、STAT5 のリン酸化と細胞増殖を示したものは、B 細胞分化能も有していた。ところが、ある領域 (X 領域) を欠損する変異 IL7R 鎖は STAT5 のリン酸化と細胞増殖を示したにもかかわらず、B 細胞の分化能を持たないことが判明した。これまで STAT5 のリン酸化と細胞分化能は同列に考えられてきた。我々の結果はこれまで知られていない細胞分化制御機構が、この欠損領域に含まれていることを強く示唆する。

X 領域欠損 IL7R 鎖発現 Ba/F3 細胞での

TAT5 のリン酸化を解析している過程で、低分子量の STAT5 が認められた。抗体との反応性から、IL2R で検出した STAT5s と同様のものと考えられる。IL7 誘導性 STAT5s について調べたところ、過剰なアセチル化が検出された。以上の結果は、IL2R の場合と同様の細胞質内アセチル化が IL7R シグナル伝達経路でもその調節に関与している可能性を示唆する。

以上の結果から、これまでリン酸化が支配的に調節していると考えられてきたシグナル伝達系だが、アセチル化も制御に参加していることが考えられる。アセチル化分子機構がどのような表現型に関与するかについての生物学的意義を追求していく。

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)

[雑誌論文](計 4 件)

M. Kondo, Y. Tanaka, T. Kuwabara, T. Naito, T. Kohwi-Shigematsu, and A. Watanabe, SATB1 plays a critical role in establishment of immune tolerance, *The Journal of Immunology*, 2016, 196, :563-572, 査読有り
DOI : 10.4049/jimmunol.1501429

H. Toyota, K. Sudo, K. Kojima, N. Yanase, T. Nagao, R. H. Takahashi, H. Iobe, T. Kuwabara, T. Kakiuchi, and J. Mizuguchi, Thy28 protects against anti-CD3-mediated thymic cell death in vivo, *Apoptosis*, 2015, 20:444-454, 査読有り
DOI : 10.1007/s10495-014-1082-0

T. Kuwabara, and S. Imajoh-Ohmi, Augmentation of LPS receptor expression by interferon gamma correlates with susceptibility to LPS-induced apoptosis in human monoblastic cell line U937, *Immunology and Immunotechniques*, 2014, 1:1-9, 査読有り
DOI : なし

A. Takashima, F. Ishikawa, T. Kuwabara, Y. Tanaka, T. Kinoshita, M. Itoh, and T. Kakiuchi, Uterine natural killer cells severely decrease in number at gestation day 6 in mice, *Biology of Reproduction*, 2013, 89:1-8, 査読有り
DOI : 10.1095/biolreprod.113.109009

[学会発表](計 3 件)

T. Kuwabara, and M. Kondo : Acetyltransferase CBP modulates interleukin-2 receptor signaling, *The 44th Annual meeting of Japanese society for Immunology*, 2015 年 11 月 18 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

T. Kuwabara, Y. Akiba, Y. Tanaka, T. Naito, M. Kondo : SATB1 is required for development of experimental autoimmune encephalomyelitis, *The 43rd Annual meeting of Japanese society for Immunology*, 2014 年 12 月 10 日、京都国際会議場 (京都府京都市)

桑原卓、近藤元就 : アセチル化によるサイトカイン情報伝達制御、第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
桑原 卓 (KUWABARA, Taku)
東邦大学・医学部・講師
研究者番号 : 40385563

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
近藤 元就 (KONDO, Motonari)
東邦大学・医学部・教授
研究者番号 : 20594344