

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：38005

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19140

研究課題名(和文) T細胞特異的CNOT3欠損マウスにおけるT細胞分化・機能異常と自己免疫疾患発症

研究課題名(英文) Functional analysis of CNOT3 in mice devoid of CNOT3 in T cell specific manner

研究代表者

呉羽 拓 (Kureha, Taku)

沖縄科学技術大学院大学・細胞シグナルユニット・研究員

研究者番号：50637684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：CCR4-NOT複合体はmRNAを脱アデニル化するmRNA分解系酵素複合体である。この複合体のサブユニットの一つCNOT3をT細胞特異的に欠損させると、胸腺中におけるT細胞の分化異常が観察された。これは正の選択異常によるもので、細胞死シグナルの亢進が認められた。Map3k5(Ask1)はこの複合体の標的遺伝子であることが分かり、ASK1タンパクの発現増加が正の選択に寄与していると明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Positive selection of double-positive (DP) thymocytes requires precise regulations of T-cell antigen receptor (TCR) signaling. We here describe that limitation of mRNA poly (A) tail length by the deadenylase CCR4-NOT complex ensures the positive selection by modulating TCR signaling. The CCR4-NOT complex is the major deadenylase that removes poly(A) tails from mRNAs. To clarify the role of CNOT3 in T cell, we generated mice devoid of CNOT3 in T cell specific manner. T cell-specific depletion of the CNOT3 subunit revealed requirements of the CCR4-NOT complex in the positive selection and inhibition of inappropriate Jnk and p38 activations induced by TCR stimulation. Furthermore, we found that the CCR4-NOT complex post-transcriptionally attenuates expression of ASK1, thereby preventing inappropriate activation of Jnk and p38 after TCR stimulation. Consequently, our data suggest a novel link between the deadenylase-mediated poly(A) tail shortening and the T cell repertoire formation.

研究分野：免疫学、分子生物学

キーワード：T細胞分化 正の選択 脱アデニル化 CCR4-NOT複合体 TCRシグナル

1. 研究開始当初の背景

mRNA の poly A 配列を分解するデアデニレーションは、適切な mRNA 発現・タンパク合成に関与し、動物の発生や分化制御に重要な役割を果たす。CCR4-NOT 複合体は酵母から哺乳類まで高度に保存された mRNA 分解系酵素複合体であり CNOT タンパク (CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT6 or CNOT6L, CNOT7 or CNOT8, CNOT9, CNOT10) により構成されている。この複合体は、mRNA の poly A 配列をデアデニル化するが、デアデニル化された RNA はエクソソームにより分解を受けると考えられている。しかし、その RNA 分解機構の詳細に関しては、未だ明らかとなっていない。近年、CCR4-NOT 複合体サブユニットの一つ CNOT3 が T 細胞白血病患者において変異し、腫瘍抑制因子として機能している可能性が報告された。また、胸腺や脾臓といった免疫システムを司る臓器において CCR4-NOT 複合体サブユニットのタンパク質が高発現していることが明らかになっている。これらより、CNOT3 は T 細胞における生存および分化に重要な因子であることが示唆された。

本研究では、T 細胞特異的に発現する Lck-Cre および Cd4-Cre マウスを用いて、CNOT3 遺伝子を T 細胞特異的に欠損するマウスを作製した (T-CNOT3 Δ マウス)。T-CNOT3 Δ マウスにおいては、成熟 T 細胞分化の異常がみられ、それはポジティブセレクション (正の選択) の異常によるものではないかと示唆された。T 細胞における分化異常を解析することで、mRNA 分解システムによる T 細胞分化制御という新しい分子機構メカニズムを解明する。

2. 研究の目的

mRNA の poly A 配列を分解する CCR4-NOT デアデニレース複合体は、心機能、代謝、精子形成など様々な生命現象の制御に重要であることが明らかにされてきているが、その免疫機能における役割は未だ明らかになっていない。CCR4-NOT 複合体サブユニットの一つである CNOT3 をマウス T 細胞特異的に遺伝子欠損させたマウスを作製し解析すると、それが自己免疫疾患の発症および T 細胞分化異常に関与することを見出した。本研究では、これをさらに発展させ、T 細胞特異的 CNOT3 遺伝子欠損マウスの病態および T 細胞分化異常を解析することにより、CCR4-NOT 複合体標的遺伝子の発現制御機構やその遺伝子産物の機能を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

T-CNOT3 Δ マウスにおいて、正負の選択に異常がある事を確認するため、主要組織適合抗原複合体(MHC) classI あるいは MHC classII 拘束性 T 細胞受容体(TCR)トランスジ

ェニックマウスを用いる。T-CNOT3 Δ マウスに TCR を過剰発現してもシグナルに異常が見られるかどうかを検討する。Transgene 由来の TCR を過剰発現することで TCR レパートリー異常の可能性を除外でき、TCR 下流のシグナル(kinase, phosphatase, etc.) に異常がある事が言える。また、負の選択の解析にはオス特的異分子由来の抗原(HY 抗原)を認識する MHC classI 拘束性 HY-TCR トランスジェニックマウスを用いる。この HY-TCR を持つオスマウスでは、HY 分子を自己抗原として発現しているため有害な自己反応性 T 細胞の負の選択が起こる。HY-TCR オスマウスの T 細胞において、CNOT3 を欠損した場合の負の選択を検討する。

Double Positive (DP)胸腺細胞の細胞死および細胞増殖の解析は、MACS を使用し DP 胸腺細胞を分離後、Annexin V および 7AAD 染色によりアポトーシスを判定する。また、細胞周期を調べることで、細胞増殖に異常があるかどうか解析する。

TCR シグナルを解析するため、FACS により DP 胸腺細胞をソーティング後 CD3 および CD4 抗体を用いて TCR を刺激する。刺激後ライゼイートを回収しウェスタンブロットにより種々のリン酸化を検出する。

4. 研究成果

今回、正の選択を解析するため Cd4-Cre マウスに焦点を当て研究を進めた。MHC classI および II トランスジェニックマウスを使用し、T-CNOT3 Δ マウスにおける正の選択異常を観察したところ、CD4 および CD8 single positive(SP) T 細胞の分化成熟が顕著に阻害された。このことより、CNOT3 が T 細胞の正の選択に必須であることが明らかとなった。次に、正の選択異常より CNOT3 が TCR 下流のシグナルに関与しているのではないかと考えられ、TCR シグナルを解析した。DP 胸腺細胞を FACS によりソーティング後、CD3 および CD4 抗体を用いて TCR を刺激した。CNOT3 存在下および非存在下における種々のキナーゼのリン酸化を比較したところ、生存シグナルに関与する ERK には変化は見られなかったが、細胞死に関与する p38 および JNK のリン酸化が CNOT3 欠損 DP 胸腺細胞において亢進している事が分かった。また、このリン酸化亢進は in vivo における胸腺細胞中でも起きていた。このことから、CNOT3 は細胞死シグナルを制御することで、DP 胸腺細胞の生の選択に関与することが明らかとなった。

さらに TCR 刺激依存的に細胞死が起きているかどうかを確認するため、MACS を使用し DP 胸腺細胞を分離後アポトーシスの有無を調べた。TCR 刺激非存在下においてはコントロール DP 胸腺細胞および CNOT3 欠損胸腺細胞の細胞死には特に違いは見られなかった。しかし、TCR 刺激存在下において細胞死を観察したところ、CNOT3 欠損 DP 胸腺

細胞の細胞死がコントロールと比較して顕著に増加していることが分かった。このことから、CNOT3 は恒常的な生存には特に関与せず、TCR 刺激依存的な細胞死を制御している可能性が示唆された。

次に CNOT3 を含む CCR4-NOT 複合体の標的遺伝子を探索した。CNOT3 は CCR4-NOT 複合体形成に重要なサブユニットであり、CNOT3 欠損 T 細胞における種々のサブユニットのタンパク発現減少が観察されている。今回、我々は p38 および JNK のタンパク発現量には違いがないことから、これらを制御するさらに上流のタンパク質に着目しスクリーニング解析を行った。スクリーニングの結果、Map3k family の一つである ASK1(Map3k5)のタンパク発現量が増加している事が明らかとなり CCR4-NOT 複合体の標的遺伝子である事を明らかとした。CNOT3 欠損 T 細胞において、Ask1 mRNA のポリ A は延長し、翻訳効率の増加が確認された。このことから CCR4-NOT 複合体は Ask1 の翻訳を制御し、適切な T 細胞分化に重要であることが示唆された。

最後に CNOT3 欠損 T 細胞における ASK1 のタンパク発現増加が T 細胞の正の選択に関与するかどうかを Ask1 ノックアウトマウスを用いて解析した。T-CNOT3 Δ マウスと Ask1 ノックアウトマウスを交配し T-CNOT3, Ask1 Δ マウスを作製し、胸腺中における T 細胞分化を観察した。T-CNOT3, Ask1 Δ マウスにおいては、正の選択異常が部分的に回復することが明らかになり、Ask1 の正の選択への関与が明らかとなった。

今回の研究より、CCR4-NOT 複合体による RNA 代謝が T 細胞における正の選択に関与するという新規メカニズムの一端を解明され、それは ASK1 を介した細胞死シグナルの抑制が関与することが明らかとなった。

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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

1. Taku Ito-Kureha, Deadenylase-mediated poly(A) tail shortening regulates the positive selection of thymocytes through post-transcriptional down-regulation of ASK1. 46th Annual Meeting German Society for Immunology, Germany, September, 2016
2. Taku Ito-Kureha, Poly(A) shortening of ASK1 mRNA contributes to positive selection of thymocytes through impairment of TCR-induced stress response. International Congress of Immunology 2016, Australia, August, 2016
3. Taku Ito-Kureha, Deadenylase-mediated poly(A) shortening regulates the maintenance of regulatory T cells. The 2nd Annual Meeting of the Japanese Society for Osteoimmunology, Okinawa, July, 2016
4. Taku Ito-Kureha, CNOT3 is important for thymocyte development through the regulation of TCR-mediated cell death signaling. The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Hokkaido, November, 2015
5. Taku Ito-Kureha, The CCR4-NOT complex subunit CNOT3, is required for T cell maturation through dampening TCR-induced stress response. The 38th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Kobe, December, 2015

[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

呉羽 拓 (KUREHA, Taku)
沖縄科学技術大学院大学・細胞シグナルユ
ニット・研究員
研究者番号：50637684

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()