

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08892

研究課題名(和文) シグナル伝達分子の細胞質内アセチル化によるB細胞分化機構の解明

研究課題名(英文) Cytoplasmic acetylation regulates signal transduction and B cell development

研究代表者

桑原 卓 (KUWABARA, Taku)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：40385563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：インターロイキン-7(IL-7)はB細胞分化に必須のサイトカインである。IL-7刺激は主にリン酸化酵素Jakと転写因子Stat5の活性により伝達される。今回の検討で、IL-7受容体の新しい機能ドメインを見出すことが出来た。本検討と我々の以前の検討を総合して考えると、Stat5のリン酸化による制御だけでなく、アセチル化による調節機構の存在が示唆された。新規機能ドメインにアセチル化や脱アセチル化に関する複合体の関与が想定され、これを明らかにする検討を続けている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果は、インターロイキン-7受容体に新しい機能ドメインが存在することを示した。本検討の結果から、このドメインがアセチル化修飾を介した情報伝達系分子の機能調節に関わる可能性が示唆された。免疫系細胞の情報伝達異常は免疫不全や白血病等の疾病に至ることがある。こうした疾患の治療開発へつながる可能性が本研究の成果の意義と考えている。本検討で見出したアセチル化の分子機構の全貌を明らかにすること、免疫系を含めた細胞のライフサイクルにおいて、アセチル化がどの過程にどのように関与しているかを明らかにすることも重要となる。基礎分野にこうした気付きを残せた点でも学問的意義があったと考えている。

研究成果の概要(英文)：Interleukin-7 (IL-7) is essential for lymphocyte development. To identify functional subdomains in the cytoplasmic tail of IL-7 receptor alpha (IL-7Ra) chain, here, we constructed a series of IL-7Ra deletion mutants. We found that IL-7Ra-deficient hematopoietic progenitor cells (HSCs) gave rise to B cells both in vitro and in vivo when a wild-type (WT) IL-7Ra chain was introduced; however, no B cells were observed under the same conditions from IL-7Ra-deficient HSCs with introduction of exogenous IL-7Ra subunit, which lacked the amino acid region at position 414-441 (d414-441 mutant). Signal transducer and activator of transcription 5 (Stat5) was phosphorylated in cells with d414-441 mutant, similar to that in WT cells, in response to IL-7 stimulation. In contrast, more truncated Stat5 was generated in cells with d414-441 mutant in WT cells. These results suggested that amino acid 414-441 in IL-7R chain formed a critical subdomain necessary for role of IL-7 in B cell development.

研究分野：免疫学

キーワード：翻訳後修飾 リンパ球機能

1. 研究開始当初の背景

翻訳後修飾はタンパク質の活性調節を通じてそれを発現する細胞の機能を制御する。キナーゼや転写因子のリン酸化は情報伝達や遺伝子発現に不可欠である。グルコーストランスポーターは細胞質膜で機能するが、糖鎖修飾により局在と活性が制御されている。これらの修飾以外にもユビキチン化やアセチル化などがタンパク質の機能調節に関与している。基質タンパク質が修飾される場所は修飾酵素の局在による。リン酸化に関与するキナーゼやフォスファターゼは細胞内に広範にあるため、様々のところでおこる。糖鎖付加は糖鎖転移酵素の局在するゴルジ体で生じる。ヒストンをアセチル化するCBP (CREB-binding protein) やp300は核に局在する。このように修飾酵素の局在は基質タンパク質の機能とそれに続く生体反応との間で不可分な関係にある。

インターロイキン2 (IL-2) はT細胞増殖因子として見いだされ、今日ではT細胞の機能に不可欠なサイトカインである。IL-2受容体 (IL-2R) はIL-2R α 鎖、IL-2R β 鎖、およびIL-2R γ 鎖の三量体で構成され、シグナル伝達には主にIL-2R β 鎖が重要な役割を担っている。IL-2R β 鎖とIL-2R γ 鎖の細胞質領域にはチロシンキナーゼJak1とJak3がそれぞれ結合している。これらの酵素はIL-2刺激により相互にリン酸化して活性化し、IL-2R β 鎖のチロシン残基 (Y) をリン酸化する。IL-2R β 鎖のY338はリン酸化されるとアダプタータンパク質Shcの、リン酸化Y392およびリン酸化Y510は転写因子Stat5 (signal transducers and activators for transcription) の結合部となる。IL-2Rに結合した後のStat5は、分子内のY696をJaksにリン酸化されると2量体を形成し受容体を離れ、核へ移行した後に標的遺伝子の発現を誘導する。

多くの解析により明らかにされつつあるIL-2Rのシグナル伝達系であるが、不明のまま残されている部分もある。そのうちのひとつは、約90kDaの完全長Stat5が、IL-2刺激により約75kDaの断片 (tStat5; truncated Stat5) として見出されることである。実際にT細胞株CTLL-2細胞をIL-2で刺激すると、tStat5が刺激後5分程度で検出できた。検出されるまでの時間が5分程度と短いことから、転写と翻訳過程を経たというよりは、タンパク質レベルでの限定消化により生成したと考えた。tStat5はチロシンのリン酸化が検出されるためY696を保存した状態で切断されていると判断した。tStat5の生成に関して幾つか知られており、セリンプロテアーゼファミリーのタンパク質分解酵素あるいはカテプシンGが消化すると報告されている。これらの報告によれば、タンパク質分解酵素はStat5のY719とM720の間で切断する。CTLL-2細胞を用いた我々の検討は、全てのStat5がtStat5として検出されるのでは無く、切断される分子とされない分子が混在することを示していた。我々は先行研究で、IL-2Rから発した刺激はShcを介したMEK/ERKを経て核へ伝わり核内からCBPを細胞質へ輸送すること、細胞質でCBPはIL-2R β 鎖に直接結合し近傍のStat5をアセチル化すること、そしてアセチル化依存性にStat5は切断されることを見出した。また、tStat5は完全長Stat5のドミナントネガティブ型として抑制作用を発揮することも判った。これまで脱リン酸化酵素やSOCS (suppressor of cytokine signaling) 等による抑制が知られていた。CBPが局在を細胞質へ変えてまで実行する細胞質でのアセチル化は、注目されてこなかったが、情報伝達系や細胞機能の制御に重要な役割を果たす可能性がある。

IL-2R β 鎖はIL-7Rなどの他のサイトカイン受容体に共有されていることから、共通 (c) 鎖とも呼ばれている。c鎖はIL-7R β 鎖とヘテロ二量体を形成し、IL-7刺激を伝達する。B細胞の成熟過程では、IL-7は転写因子EBFとPax5の誘導に必須である。Jak1/3-Stat5経路はEBFとPax5の発現を直接に制御する経路である。獲得免疫の主役であるB細胞の成熟を調節するIL-7シグナルのオンとオフは厳格に制御されている。IL-2RではIL-2R β 鎖が、IL-7Rの場合はIL-7R β 鎖がそれぞれの情報伝達に中心的に機能する。両者は類似の伝達系を用いることから推測出来るように、我々はIL-2Rで明らかにしたアセチル化による制御がIL-7Rを介したB細胞成熟でも作動していると考えた。

2. 研究の目的

この研究の長期的な目標は、情報伝達系の調節に細胞質内で生じるアセチル化が普遍的に制御系している事の証明である。そのうえでこの計画では、B細胞の成熟過程に焦点をあて、Stat5活性と細胞質内アセチル化制御の意義を明らかにする事である。

3. 研究の方法

IL-7R β 鎖の情報伝達における未知機能を調べるため、IL-7R β 鎖の細胞質内領域の部分欠失変異体を作製した。IL-7R β 鎖は459アミノ酸残基で構成される。265残基から459残基の細胞質

内領域を9つのサブ領域に分け、それぞれの欠損変異 IL-7R 鎖を遺伝子組換え法で作製した。各変異受容体をレトロウイルスベクターにより細胞へ導入した。各変異 IL-7R 鎖発現 CTLL-2 細胞を作製した。CTLL-2 細胞は IL-2R を発現する T 細胞株で、IL-7R 鎖を導入すると内在性の c 鎖とで IL-7R を再構成できる。この系を用いて IL-7 刺激による細胞増殖アッセイを行った。一連の変異 IL-7R 鎖を IL-7R 鎖欠損前駆細胞へ遺伝子導入し、B 細胞への成熟能を調べた。フローサイトメーターを用いて、CD19、B220、IgM、および Mac-1 の発現を指標にして細胞の成熟度アッセイを行った。IL-7 による Stat5 の活性化はリン酸化状態をイムノプロット法で解析した。

4. 研究成果

未熟な細胞の増殖や B 細胞への分化は IL-7 刺激による Stat5 の活性で支持されている。作製した IL-7R 鎖部分欠失変異体の多くは、細胞増殖と分化の両方にほとんど変化を示さずに野生型 IL-7R 鎖と同レベルであるが、細胞増殖と分化が同時に不全となるものであった。しかし、414-441 アミノ酸残基領域を欠く変異体 (d414-441) を発現する細胞では、IL-7 依存性の細胞増殖は認められたが、B 細胞への分化は著明に障害されていた。IL-7R 鎖の Y449 は IL-7 刺激によりリン酸化され Stat5 の結合部となる。Y449 をフェニルアラニン (F) に置換した Y449F 変異体は Stat5 活性化を示さず、また B 細胞分化を支持しなかった。d414-441 変異体は Y449 が保存されているため、IL-7 刺激後に Stat5 の活性化を示した。Stat5 は IL-7 刺激後に速やかにリン酸化されるが、刺激後 20 分程度後から全長分子に加え、低分子の Stat5 が検出されることがある。d414-441 変異体ではこの低分子 Stat5 が野生型 IL-7R 鎖の場合に比べて明瞭に検出された。低分子 Stat5 は IL-2R 系での tStat5 と同様のものと考えている。この仮定に則せば、tStat5 はドミナントネガティブ型として作用する。そこで、野生型マウスから未熟前駆細胞を調製し、tStat5 を遺伝子導入した。この前駆細胞を RAG 欠損マウスへ養子移入した。このマウスを所定期間飼育した後、脾臓中の成熟 B 細胞をフローサイトメーターで解析した。tStat5 を発現させた場合は、対照に比べて有意に成熟 B 細胞が減少した。Mac-1 陽性のミエロイド系細胞は変化無かった。tStat5 は Stat5 活性を調節していることが示唆された。

以上のことから、今回見出した IL-7R 鎖の 414-441 領域は tStat5 の生成を調節する因子の結合部である事が示唆された。すなわち、この領域は Stat5 の活性制御を通して、B 細胞成熟をコントロールしていることが考えられる。IL-7R 鎖の新しい機能領域を同定できたことと、それを通じて Stat5 活性が調節され B 細胞成熟過程が制御されていることを見出した点で、申請当初の目的が部分的に達成できたと言える。Stat5 の調節にアセチル化が具体的に関与する事の実証が今後の検討課題として残された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hirotake Kasai, Taku Kuwabara, Yukihide Matsui, Koichi Nakajima, Motonari Kondo	4. 巻 19
2. 論文標題 Identification of an essential cytoplasmic region of interleukin-7 receptor alpha subunit in B-cell development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 2522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19092522	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 Yasushi Akiba, Taku Kuwabara, Takanori Mukozu, Tetuo Mikami, Motonari Kondo	4. 巻 62
2. 論文標題 Special AT-rich sequene binding protein 1 is required for maintenace of T cell receptor responsiveness and development of experimental autoimmune encephalomyelitis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 255-268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12579	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 Matsui Yukihide, Kuwabara Taku, Eguchi Toyonobu, Nakajima Koichi, Kondo Motonari	4. 巻 194
2. 論文標題 Acetylation regulates the MKK4-JNK pathway in T cell receptor signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Immunology Letters	6. 最初と最後の頁 21 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.imlet.2017.12.002	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 -
1. 著者名 Taku Kuwabara, Yukihide Matsui, Fumio Ishikawa, Motonari Kondo	4. 巻 19
2. 論文標題 Regulation of T-Cell Signaling by Post-Translational Modifications in Autoimmune Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 819 ~ 819
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19030819	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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 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 松井幸英、桑原卓、近藤元就
2. 発表標題 TCR-stimulation recruits CBP from nucleus to the cytoplasm and affects the protein phosphorylation.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桑原卓、石川文雄、田中ゆり子、内藤拓、近藤元就
2. 発表標題 Mitochondrial transcription factor A rescues defect in T cell receptor responsiveness in SATB1 deficient mice.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桑原卓、安井優太郎、石川文雄、秋葉靖、内藤拓、田中ゆり子、近藤元就
2. 発表標題 自己免疫マウスにおける実験的自己免疫性脳脊髄炎耐性機構の解析
3. 学会等名 第40回日本分子生物学学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松井幸英、桑原卓、近藤元就
2. 発表標題 T細胞受容体刺激によるCBPの核外移行と遺伝子発現への影響
3. 学会等名 第28回日本生体防御学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔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
---------	---------