

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07188

研究課題名(和文) Study for nuclear functions of Themis in the thymus and periphery.

研究課題名(英文) Study for nuclear functions of Themis in the thymus and periphery.

研究代表者

角川 清和 (kakugawa, kiyokazu)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：80391910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々が同定した遺伝子、ThemisはT細胞特異的に発現しT細胞受容体(TCR)からのシグナル伝達をアダプター分子であるGRB2、チロシン脱リン酸化酵素であるSHP1とともに担っている。またヒトのTHEMISの遺伝子座はセリアック病、アトピー性皮膚炎、糖尿病、多発性硬化症、炎症性大腸炎などの、T細胞が関与する自己免疫疾患との相関が強く示唆されている。我々はThemisタンパクが細胞質から核へ移行することがその働きに必須であることを突き止めた。さらにThemisの核内での機能を明らかにすることによりこれらの自己免疫疾患の予防・治療に道が開けると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近同定された遺伝子Themisの作用機序はまだほとんどわかっていない。これまでは主にTCR近傍でのすなわち細胞質での働きに重点が置かれていたが我々は細胞質のThemisだけではその機能に十分ではなく、Themisタンパクの細胞質から核への移行がその機能に必要なことを突き止めた。T細胞分化は胸腺でおこりこれを試験管で再現するのは困難である。遺伝子改変マウスを作成することで発現レベルやタイミングが本来の生理的条件下に近い状態で行っていることは非常に意義がある。

研究成果の概要(英文)：We identified Themis as an important gene for T cell development. Themis is also involved in occurrence of autoimmune diseases such as Celiac disease, Atopic dermatitis, diabetes, Multiple sclerosis and inflammatory bowel disease. It is already reported that Themis function as an adapter molecule together with GRB2 and tyrosine phosphatase, SHP1. We established modified Themis knock-in mouse and found that importation of Themis protein into the nucleus is critical for its function. By elucidating nuclear Themis function, we could find the ways to prevent and treat autoimmune diseases mentioned above.

研究分野：免疫学

キーワード：自己免疫疾患 T細胞 胸腺 T細胞分化 Themis

1. 研究開始当初の背景

Themis は最近同定された T 細胞分化・活性に重要な遺伝子で我々を含む 5 つの研究室がほぼ同時に報告した。その後、細胞質でアダプタータンパクである GRB2、チロシン脱リン酸化酵素である SHP1 と会合することが報告され、T 細胞受容体 (TCR) シグナルに重要な役割を果たすことが分かった。また、セリアック病、アトピー性皮膚炎、糖尿病、多発性硬化症、炎症性大腸炎などの、T 細胞が関与する自己免疫疾患との相関も強く示唆されている。しかしながら *Themis* が TCR シグナルを正に制御するのか負に制御するのかすら不明な点が多く、その作用機序の解明が急務であった。

2. 研究の目的

Themis はその分子内に二つの相同的な CABIT と名付けられたドメインを持つが既知の酵素活性をもつ部位は存在しない。従って構造からその機能を推測するのは不可能である。また、プロリン残基に富む部分と核移行シグナル (NLS) を有し、かなりの量の *Themis* タンパクが細胞核にも存在する。にもかかわらずこれまでの研究は TCR 近辺、すなわち細胞質での機能解析に集中している。本研究は *Themis* の核での働きに焦点を当て、その作用機序の解明を目指す。

3. 研究の方法

T 細胞分化の研究を試験管内で再現するのは困難であるため *Themis* の変異体のノックインマウスを作成し T 細胞分化を観察する。まず、核移行シグナルを欠失させたもの (THc) 逆に SV40 由来の核移行シグナルを付加したもの (THn) を作成し、細胞質 *Themis* または核 *Themis* だけの状態で T 細胞が分化するかどうか調べる。これには主にフローサイトメーターを用いる。

また、*Themis* の細胞内局在を操作できるよう、ヒトのエストロゲン受容体の一部である ERT2 を *Themis* に付加したノックインマウスを作成する。このマウスではタモキシフェン非投与下では *Themis* が細胞質に拘束され投与後細胞核に移行するため、それによる *Themis* の機能を知ることができる。

4. 研究成果

まず、*Themis* タンパクが細胞核にあることが必要なかどうか、*Themis* 遺伝子内の核移行シグナルを除いたノックインマウス (TH NLS) を作成した (図 1)。このマウスでは胸腺での細胞分化が著しく阻害され、成熟 T 細胞である CD4 陽性 CD8 陰性細胞あるいは CD4 陰性 CD8 陽性細胞が激減していた。これは *Themis* ノックアウトマウスとほぼ同様の表現型である。しかしながらこの TH NLS マウスでは *Themis* タンパクそのものが減少しており、このことが成熟 T 細胞の減少の理由であると推測された。この NLS は *Themis* の 2 つ目の相同的なドメインに存在するため 1 つ目の同じ位置にあるアミノ酸で NLS を補うことで *Themis* タンパクの安定と細胞質にのみと

どまることを期待した (THc、図2)。その結果、タンパク質は細胞質にとどまりタンパク量も野生型と同等であった。それでも、THc マウスではT細胞分化は阻害されていたことより細胞質の Themis タンパクだけでは十分でないことが示された。では、逆に Themis タンパクが核にしかなかったらどうであろうか？Themis にウイルス由来の NLS を付加し強制的に核にとどませたノックインマウスを作成した (THn) ところこれも T細胞分化に異常をきたしていた (図2)。

次に THn と THc を交配することにより得られたマウス (THc/n) を解析した。このマウスでは細胞質と細胞核とも Themis を有するが他方の分画には移行できない。

驚くべきことにこのような条件下でも T細胞は正常に分化しなかった (図2)。このことは Themis が細胞質と細胞核の間を相互に移動することがその機能に必要であることを強く示唆した。

そこで、Themis の細胞内局在を操作すべくヒトのエストロゲン受容体の一部である ERT2 を付加した Themis ノックインマウスを作成した (TH_{ERT2}、図2)。このマウスでは理論上、ERT2-Themis 融合タンパクは細胞質にとどまり、タモキシフェンの投与により核へ移行するはずである。このマウスの FACS 解析によりタモキシフェン投与前は融合タンパクは細胞質にとどまりさらに成熟 T細胞の数は激減していた。また、3日おきにタモキシフェンを投与したところ末梢血中の T細胞数は徐々に回復した。また、Themis タンパクも核へと移行していることも観察で

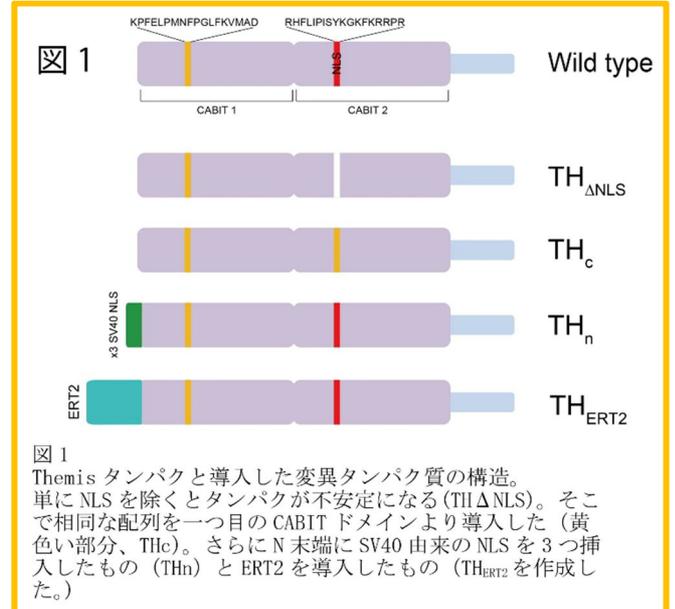


図1 Themis タンパクと導入した変異タンパク質の構造。単に NLS を除くとタンパクが不安定になる (TH_{ΔNLS})。そこで相同な配列を一つの CABIT ドメインより導入した (黄色い部分、TH_c)。さらに N 末端に SV40 由来の NLS を 3 つ挿入したもの (TH_n) と ERT2 を導入したもの (TH_{ERT2} を作成した。)

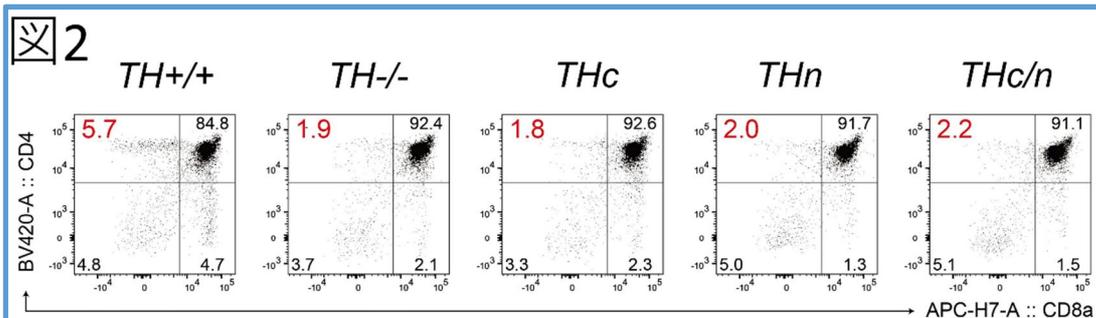
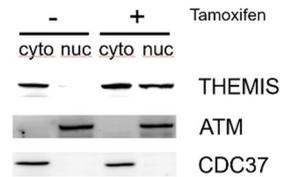


図2 各Themis変異体導入マウスの胸腺でのT細胞分化。胸腺でのT細胞分化段階は細胞表面のCD4とCD8の発現パターンにより次の順に進む。CD4⁺CD8⁻、CD4⁻CD8⁺、その後 CD4⁺CD8⁺ (ヘルパーT細胞) またはCD4⁻CD8⁻ (キラーT細胞)。したがってCD4⁺CD8⁺あるいはCD4⁻CD8⁺が最も成熟したT細胞になる。Themisの変異体はそのノックアウトマウスを含めこの成熟T細胞の数が激減している。

きた。以上の結果から Themis タンパクが細胞質と細胞核の両方にあることはその機能に十分ではなく、何らかのシグナルにより細胞質から細胞核への移動が Themis の機能、しいては T細胞分化に必要であることが分かった。Themis とともに核へ移動する分子があるのかどうか、また Themis が核でどういう働きをするのかどうか、が次の課題である。

図3



Western blot. Whole thymocyte
Cyt: Cytoplasm, Nuc: Nuclear fraction

Peripheral Blood

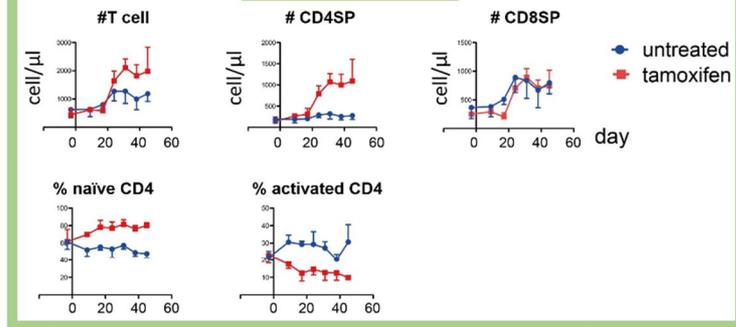


図3

ERT2-Themisマウスの解析。
ウエスタングロットによりタモキシフェン未処理の時はERT2-Themis融合タンパクは細胞質にのみ検出されるが処理後は核へ移行する。3日おきにタモキシフェンを経口投与しつつ週に一回末梢血を採取しT細胞の数を計測した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 角川清和
2. 発表標題 THEMIS functions as a cytoplasmic adaptor and nuclear transcription factor in developing thymocyte and mature T cells.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019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
---------	---------