

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間： 2008～2009

課題番号：20790093

研究課題名 (和文) 自己免疫寛容における GRAIL 分子の役割の解明

研究課題名 (英文) The role of GRAIL in immune tolerance

研究代表者

市川大樹 (ICHIKAWA DAIJU)

国立精神・神経センター 神経研究所 免疫研究部 流動研究員

研究者番号：60462793

研究成果の概要 (和文)：

T細胞アナジーにおいて E3 リガーゼである GRAIL が誘導及び維持に重要であることが報告されているが、GRAIL の E3 リガーゼとしての基質はほとんどわかっていない。今回、我々はまず、2次元電気泳動法と MALDI-TOF Mass を用い、T細胞アナジーにおいて減少するタンパク質を約 30 種類同定した。その中で GRAIL の基質として RhoGDI α/β 以外に新たにアクチン骨格に関連するタンパク質を同定した。それらのタンパク質は GRAIL の E3 活性に重要である RING domain の変異体によりユビキチン化が抑制された。また GRAIL とそれらのタンパク質が共局在する事から基質である事がわかった。このことから GRAIL はアクチン骨格関連タンパク質を制御している事により、T細胞アナジーの誘導と維持していることがわかった。

研究成果の概要 (英文)：

The molecular basis of cell-intrinsic program that establishes T cell anergy is not completely understood. Recent reports demonstrated that E3 ubiquitin ligases, including gene related to anergy in lymphocytes (GRAIL), as essential components to induce and maintain T-cell anergy. The aim of this study is identification of GRAIL E3 ligase substrates to substantiate the molecular mechanisms of T cell anergy. We identified 30 proteins specifically decreased under anergic condition as we previously reported. In addition to RhoGDI α/β , we identified several actin cytoskeleton-associated proteins as the substrates of GRAIL. These proteins were ubiquitinated by GRAIL E3 ligase but not enzymatically inactive H2N2 or RING deletion GRAIL. Confocal laser microscopy analysis revealed that these proteins were colocalized with GRAIL. These data demonstrate that GRAIL might regulate actin cytoskeleton-associated proteins to maintain an anergic states of T cell.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
平成 21 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学 生物系薬学

キーワード：免疫学

1. 研究開始当初の背景

T 細胞の自己抗原への免疫寛容の破綻は、多発性硬化症などの自己免疫疾患を引き起こす。自己への免疫寛容を末梢で維持する機構の一つとして、T 細胞の抗原への無反応状態（アナジー）が知られているが、アナジーの形成に Cbl-b, GRAIL などの E3 ユビキチンリガーゼが重要であることが注目されている。しかしながら T 細胞アナジーにおいてじゅうようである E3 リガーゼのうち cbl-b, Itch については詳細な報告があるのに対し、GRAIL によりユビキチン化されるタンパク質についてはわかっておらず、また T 細胞アナジーを誘導する分子メカニズムについても詳細なことは知られていなかった。

2. 研究の目的

T 細胞の自己抗原への免疫寛容の破綻は、多発性硬化症などの自己免疫疾患を引き起こす。自己への免疫寛容を末梢で維持する機構の一つとして、T 細胞の抗原への無反応状態（アナジー）が知られているが、アナジーの形成に Cbl-b, GRAIL などの E3 ユビキチンリガーゼが重要であることが注目されている。Cbl-b は、チロシンキナーゼ経路をすることにより T 細胞の反応性を抑制している。GRAIL については、その制御する基質が明らかではなく、基質の解明はアナジーの分子機序の解明につながる。そこで本研究では、GRAIL の基質の同定及び、その生体内での役割を明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

(1) T 細胞アナジーにおいて発現が減少するタンパク質を網羅的に解析する為に、Ovalbumin (OVA) 特異的 T 細胞受容体のトランスジェニックマウス DO11.10 の脾臓細胞を用いて ionomycin 刺激によりアナジーを誘導した。アナジー細胞において非アナジー細胞と比較して発現が低下している蛋白質を、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動を用いて同定した。

(2) 上記で同定した蛋白質が T 細胞アナジーにおいて重要であるかを解析するために為に、同定したタンパク質をエンコードするレトロウイルスプラスミドを作製し OVA 特異的 T 細胞に過剰発現させ、アナジー状態が消失するかどうか FACS を用いて検討した。

(3) また上記で同定したタンパク質が実際に GRAIL の基質であるかを調べる為に、GRAIL をエンコードするプラスミドの作製を行った。その後、GRAIL、上記で同定したタンパク質、ユビキチンを発現させるプラスミドを 293T 細胞に過剰発現させ、GRAIL により

上記で同定したタンパク質がユビキチン化されるかを免疫沈降法及び Western blotting を用いて検討した。

(4) 上記の方法によりユビキチン化されたタンパク質が GRAIL と相互作用するのかを調べる為にユビキチン化されるタンパク質については蛍光タンパク質である DsRed 融合をさせ、また GRAIL については AcGFP 融合タンパク質発現プラスミドを作製した。その後、それらを 293T 細胞に過剰発現させ、共焦点レーザー顕微鏡にて共局在するかを検討した。

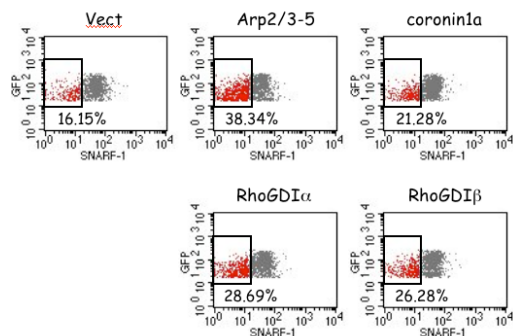
(5) GRAIL が基質をユビキチンするのどの部位が重要であるかを調べる為に各々のドメインを欠失させた変異体発現プラスミドを作製し上記と同様の方法にてユビキチン化の確認を行った。

(6) GRAIL が T 細胞と抗原提示細胞 (APC) の相互作用に重要であるかを調べる為に、GRAIL を DO11.10T 細胞に過剰発現させ、APC として A20 細胞を用い、OVA₃₂₃₋₃₃₉ をパルスさせた後、相互作用させ共焦点レーザー顕微鏡にて上記で同定した基質が T 細胞と抗原提示細胞の相互作用部位に集積するかを調べた。

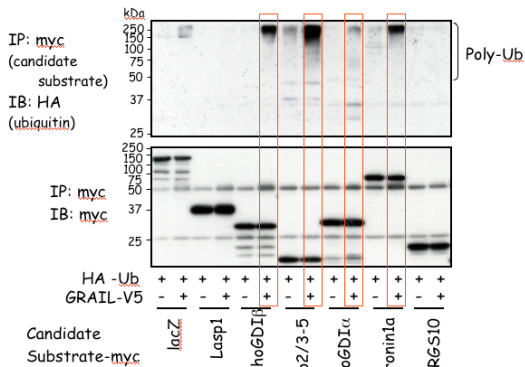
4. 研究成果

(1) CD4+T 細胞のアナジー状態で特異的に発現が低下するタンパク質を 2次元電気泳動及び MALDI-TOF Mass を用いて解析を行った結果、未知、既知を含め約 30 のタンパク質を同定した。

(2) 同定したタンパク質が細胞骨格に關与するものが多かった事より、それらのタンパク質に着目し、これらのタンパク質を発現させるレトロウイルスプラスミドを作製し、DO11.10 CD4+ T 細胞過剰発現させると、同定したタンパク質の 1 つである RhoGDIa/b、coronin1a、Arp2/3-5 が T 細胞アナジーを部分的に解除し、増殖を回復させる事がわかった。

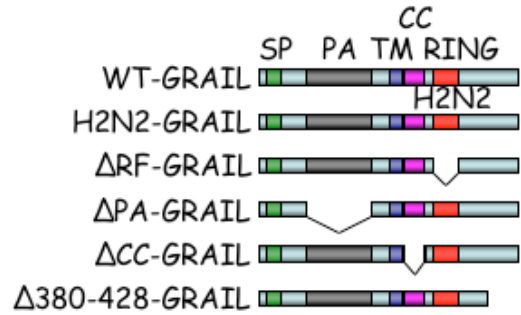
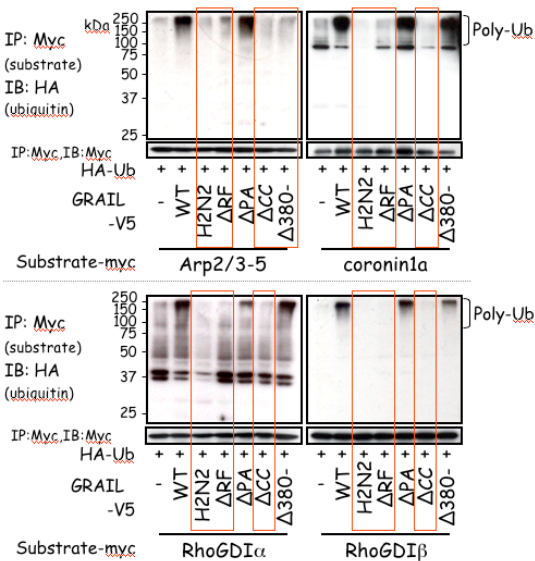


(3) これらの基質が GRAIL によりユビキチン化されるかを、これらを発現するプラスミドを作製した後、293T細胞にリン酸カルシウム法によりトランスフェクションを行い、基質を免疫沈降することにより解析を行った結果、上記のタンパク質は GRAIL によりユビキチン化される事がわかった。

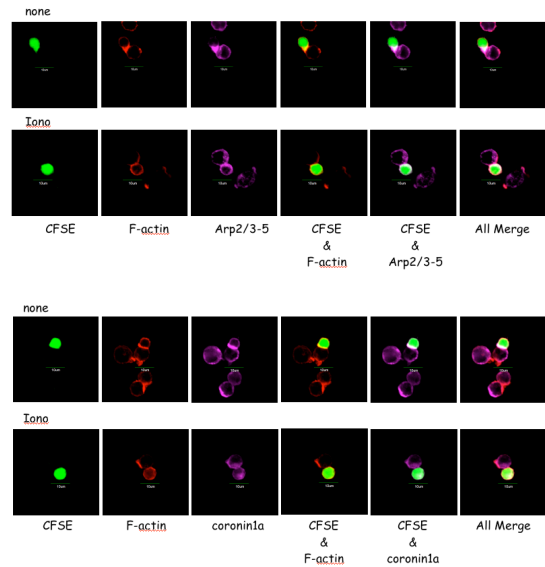


(4) 基質が共局在するかを調べるために、AcGFP 融合 GRAIL 及び DsRed 融合 GRAIL を発現するプラスミドを作製した後、293T細胞にリン酸カルシウム法によりトランスフェクションを行った結果、基質が GRAIL と共局在することが確認された。

(5) これらの基質のユビキチン化の必須なドメインとして GRAIL の RING finger ドメイン、coiled-coil ドメインを同定した。



(6) GRAIL を、レトロウイルスを用いて DO11.10 CD4⁺ T 細胞に過剰発現させることにより、アナジー状態の T 細胞と同様に OVA₃₂₃₋₃₃₉ でパルスした A20 細胞との免疫シナプスの形成が現弱し、また上記のタンパク質である coronin1a、Arp2/3-5 が免疫シナプスへの集積が抑制されることがわかった。



今回我々は、2次元電気泳動法により同定したタンパク質の中から GRAIL の基質として新たに細胞骨格系の制御に重要なタンパク質である coronin1a、Arp2/3-5 を発見した。GRAIL はこの Arp2/3-5 や coronin1a といったアクチン再構成に関与する蛋白質をユビキチン化し、分解させることにより T 細胞アナジーの誘導及び維持していることがわかった。また、抗原提示細胞との相互作用、とりわけ免疫シナプスの形成にも Arp2/3-5 と coronin1a が強く関与していることが本研究から明らかとなった。GRAIL はこのことから免疫シナプスの形成を Arp2/3-5、coronin1a のタンパク質を減少させることにより現弱させていると考えられた。このことから生体内において GRAIL が重要である事が示唆された。

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 1 件)

市川大樹, 水野美歩, 大木伸司, 山村隆, 三宅幸子 T 細胞アナジーに関連した E3 リガーゼ GRAIL の基質同定第 39 回日本免疫学会学術集会. 大阪国際会議場, 大阪, 12. 3, 2009

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市川大樹 (ICHIKAWA DAIJU)

国立精神・神経センター 神経研究所 免疫研究部 流動研究員

研究者番号 : 60462793