

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年10月11日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591398

研究課題名（和文） 新規糖質ステロイド標的分子 GLCCI1 の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of glucocorticoid induced transcript 1 (GLCCI1)

研究代表者

楊 國昌 (YAN KUNIMASA)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：70255389

研究成果の概要（和文）：糖質ステロイドの薬理作用の最終下流経路を同定するために、存在意義が不明であった糖質ステロイド誘導遺伝子（GLCCI1）の蛋白機能の解明を試みた。GLCCI1は細胞内骨格チューブリン上に存在する約70kDaのリン酸化蛋白であり、糖質ステロイド受容体を介して産生されることが判明した。さらに、GLCCI1は滑車蛋白複合体構成分子であるdynein-light chain 1（LC8）とその活性化キナーゼPAK1のいずれにも結合し、PAK1のLC8リン酸化機能を阻害することで、胸腺T細胞のアポトーシスを誘導することが明らかになった。この新規アポトーシス経路は、糖質ステロイドの免疫抑制作用の新規経路である。

研究成果の概要（英文）：The aim of the present study was to identify the protein function of GLCCI1, a novel gene induced by synthetic glucocorticoid. We found that GLCCI1 was a tubulin-associated phosphoprotein migrated at ~70 kDa that was induced via glucocorticoid-glucocorticoid receptor complex. We also found that both PAK1 and dynein-light chain 8 were the ligand proteins of GLCCI1, and that GLCCI1 interfered the PAK1 kinase activity against LC8 biogenesis, which led to T cell apoptosis. Our data suggested that the functional implication of GLCCI1 in PAK1-LC8 interaction might be a novel downstream cascade resembling synthetic glucocorticoid action as an immunosuppressant.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：糖質ステロイド・T細胞・アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

1) 糖質ステロイド薬（以下ステロイド薬）は、腎・膠原病、血液悪性腫瘍、アレルギー疾患などの多種の難治性疾患に対する治療薬の第一選択として頻用されているが、薬理

作用の非特異性、重篤な依存性や諸臓器での多彩な副作用への改善は依然として未解決である。一方、臨床の場では、今もなお各疾患における同薬の作用機序は全く不明なまま、あくまで臨床経験に基づいた使用がなさ

れている。ステロイド薬の薬理作用の発現機序の理解は、ステロイド薬とその受容体 (glucocorticoid receptor) との複合体が標的細胞の核内に移行後、核内転写因子群に対して作用発現すること等を発端とするものである。その後、最終的にサイトカインなど活性化因子や増殖因子の発現を遺伝子の転写レベルで調節することが、障害諸臓器の機能を回復させるというものである。しかし、この理論からは、ステロイド薬・受容体複合体の核内移行後に発現するはずの薬理作用と、各臓器障害の原因となる細胞質内責任タンパク分子の機能回復との直接的なクロストークが成り立たない。即ち、ステロイド作用の最終的な細胞質内下流分子 (経路) が未だ全く不明である。

2) GLCCI1: glucocorticoid induced transcript1 (別称 testhymn, GIG18) は、呼称のごとくステロイド薬によりその mRNA が発現増加する遺伝子として同定された。GLCCI1 の生物学的役割については、その mRNA の発現増加が、1) 胸腺 T 細胞のアポトーシスに伴う (Mol Endocrinol 10:967,1996)、2) マウス胸腺 T 細胞においてステロイド薬投与により顕著である (Immunogenetics 54:68,2003)、と報告されたが、そのタンパク機能は全く不明である。

2. 研究の目的

1) GLCCI1 はアミノ酸配列を基にしたデータベース解析から、リン酸化酵素 (キナーゼ) の基質と推測された。従来から、ステロイド薬の諸蛋白機能への間接的な細胞内作用経路として、シグナリング系 (タンパク質リン酸化) が示唆されていたが、その直接的な証明は成されていない。本研究は、GLCCI1 が基質としてリン酸化されることにより、多くのキナーゼのリン酸化能を阻害することを証明することを目的とした。

2) 1) の機序により GLCCI1 がステロイド薬の薬理作用の直接的実行薬であることを証明する。そのために、ステロイド薬の薬理作用が最も明白である胸腺 T 細胞機能における GLCCI1 の生物学的役割について焦点をあてた。

3. 研究の方法

1) 感染ベクターの作成 :

ヒト full-length GLCCI1cDNA を単離し、ほ乳類細胞、大腸菌、酵母に対する感染用ベクターに導入した。

2) GLCCI1 永久発現細胞株の樹立 :

ほ乳類用ベクターを HEK-293 細胞に導入し、genetecin 耐性株を樹立した。

3) リコンビナント GLCCI1 の作成 :

大腸菌用ベクターを使用し、コールドシヨック発現系によりヒト完全長リコンビナント

ト GLCCI1 を精製した。

4) 抗 GLCCI1 特異抗体の作成 :

3) の完全長リコンビナント GLCCI1 を家兔に免疫後抗血清を採取し、さらに affinity column により精製回収した。

5) GLCCI1 の細胞内局在 :

GLCCI1 永久発現細胞とマウス胸腺単離 T 細胞を材料に、作成した抗 GLCCI1 抗体と細胞内骨格関連分子との 2 重免疫蛍光染色を行った。

6) Western blot 法・免疫沈降法 :

培養マウス胸腺 T 細胞株 (WEHI)、マウス胸腺 T 細胞、GLCCI1 永久発現細胞株のタンパク材料と抗 GLCCI1 抗体を用いた。また WEHI 細胞の GLCCI1 について、λ phosphatase 処理による分子量を比較し、リン酸化の有無について検討した。さらに、GLCCI1 永久発現株から tag 付き GLCCI1 (FLAG-GLCCI1) に結合するタンパクを免疫沈降し各分子の抗体を用いた Western blot を行った。

7) ステロイド薬による GLCCI1 の regulation :

WEHI 細胞に合成ステロイド・デキサメタゾン (DEX) 添加し、GLCCI1 mRNA とタンパク発現を RT-PCR と Western blot で比較した。

8) GLCCI1 の結合分子の同定 :

マウス胸腺および腎 cDNA ライブラリーを prey とする yeast two-hybrid screen を行った

9) In vitro リン酸化実験 :

GLCCI1、LC8、PAK1 のそれぞれのリコンビナントを混合し、ラジオアイソトープ標識の ATP を反応させた後 autoradiography で解析した。

10) 合成ステロイドによるマウス胸腺のアポトーシス解析 :

マウスに DEX を静注し、胸腺から採取した T 細胞の各サブセットの GLCCI1、アポトーシスマーカー (活性化カスパーゼ 3/9、Bim) について Western blot を行った。

11) リン酸化質量解析 :

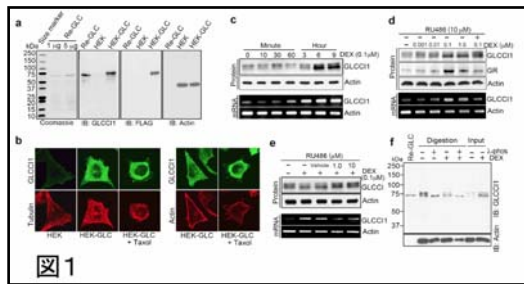
GLCCI1 永久発現株から ex vivo GLCCI1 を回収し、トリプシン処理による断片 GLCCI1 についてリン酸化部位の同定を行った。

4. 研究成果

1) GLCCI1 のタンパク特性 (図 1)

ヒトリコンビナント GLCCI1 は 70kDa の分子量として泳動された。一方、HEK-293 細胞に発現させた ex vivo GLCCI1 は 70kDa と 75kDa の 2 種の分子量として同定された。共焦点レーザー顕微鏡による ex vivo GLCCI1 の局在は、チュブリンの局在変化と同様に観察された。WEHI 細胞では、DEX

添加により濃度依存性および時間依存性に、GLCCI1 の mRNA とタンパクが増加した。この GLCCI1 の増加は、糖質ステロイド受容体拮抗剤 RU486 の先行添加により阻害されたことから、糖質ステロイド・糖質ステロイド受容体複合体を介する経路が、GLCCI1 の産生に必須であることが判明した。λ フォスファターゼによりリン酸を除去した実験により、70kDa と 75kDa の 2 種の分子量は、全て 70kDa に同定されたことから、70kDa は脱 (非) リン酸化体、75kDa はリン酸化体であることが判明した。以上のことから、GLCCI1 はチュブリン依存性のリン酸化タンパクであり、その regulation は糖質ステロイド受容体によることが判明した。



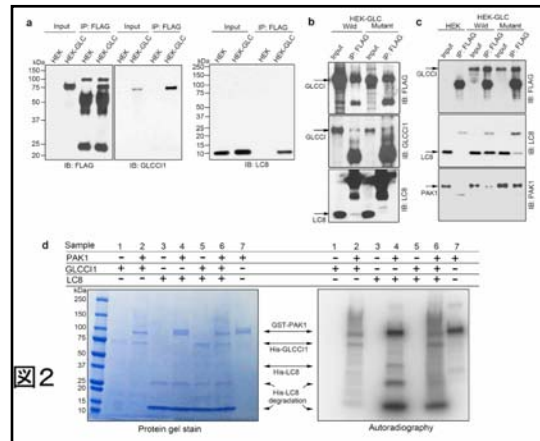
2) GLCCI1 の相互作用分子 (図 2)

Yeast two-hybrid screen による GLCCI1 の結合分子の候補として、胸腺と腎臓の cDNA ライブラリーのいずれにおいても dynein-light chain 1 (LC8) が示された。LC8 はチュブリン上の滑車蛋白複合体の一分子である。GLCCI1 永久発現株と WEHI 細胞のいずれにおいても、GLCCI1 で免疫沈降した産物に LC8 が同定されたことから、GLCCI1-LC8 相互作用の存在が実際に証明された。さらに、LC8 結合アミノ酸予想配列の変異型 GLCCI1 は、明らかな LC8 結合性の低下を示したことから、本研究により新規 LC8 結合タンパクとして GLCCI1 が登場し、加えて、お互いの結合ドメインが明らかになった。

胸腺 T 細胞において、LC8 と糖質ステロイドの key word で想起される現象はアポトーシスである。アポトーシスにおける LC8 の役割は、protein activated kinase 1 (PAK1) によるリン酸化により阻害されることが報告されている。そこで、GLCCI1 と PAK1 の相互作用の存在についてさらに検討を行った。まず免疫沈降により、GLCCI1 は LC8 のみならず PAK1 にも結合することが同定された。興味深いことに、LC8 との結合性が減弱した変異型 GLCCI1 は、本来の GLCCI1 よりも極めて強い PAK1 結合性が示された。

以上のことから、GLCCI1、LC8、PAK1 の 3 者の結合性が何らかの生物学的役割を有

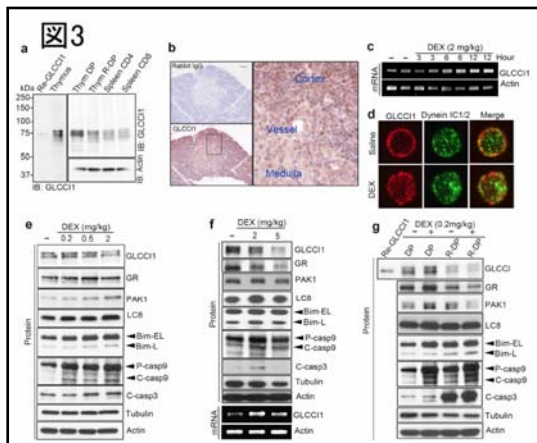
することが示唆された。そこで、3 者のリコンビナントタンパクを混合した *in vitro* リン酸化実験を行った。既に判明しているように、PAK1 は自己リン酸化も行うキナーゼであり、LC8 は PAK1 のリン酸化の基質であった。これに対し、GLCCI1 は自己リン酸化が存在せず、PAK1 により強くリン酸化された。興味深いことに、GLCCI1 は、PAK1 による LC8 のリン酸化を劇的に減弱させた。以上のことから、GLCCI1 は PAK1 の LC8 リン酸化を阻害する新規キナーゼ阻害分子であることが判明した。



3) 胸腺 T 細胞における GLCCI1 とアポトーシス (図 3)

胸腺 T 細胞の機能に関わる GLCCI1 の役割を同定する際には、T 細胞 subpopulation における GLCCI1 の発現の比較検討が必須である。抗 CD8 あるいは CD4 標識磁気ビーズにより、胸腺 CD4+CD8+T (double positive T) 細胞、残りの population、脾臓 single positive T 細胞 (CD4+, CD8+) を分離し、GLCCI1 のタンパク発現について Western blot 法で検討した。その結果、double positive T では、胸腺内 rest of double positive T や脾臓 T 細胞に比して、圧倒的に GLCCI1 の発現が多いことが判明した。胸腺内の GLCCI1 の分布は、皮質に優位に強く認められ、これは double positive T の局在部位であり、Western blot の結果と合致した。分離した胸腺 T 細胞での GLCCI1 は、永久発現細胞株と同様に細胞質に観察された。In vivo (マウス胸腺) での GLCCI1 の発現は、mRNA レベルでは 2~5mg/kg DEX 単回投与 3 時間後にはすでに upregulation が観察された。また、GLCCI1 のタンパク発現は、0.5mg/kg DEX 単回投与までは増加したが、2~5mg/kg ではむしろ減少した。この mRNA とタンパクでの GLCCI1 の発現パターンの矛盾は、GLCCI1 タンパクの分解亢進が理由と考えられた。また、DEX による GLCCI1

の増加に伴い、カスパーゼ 3/9 の活性化と Bim の発現亢進が同定された。



6. 研究組織

(1) 研究代表者

楊 國昌 (YAN KUNIMASA)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：70255389

(2) 研究分担者

秋元義弘 (AKIMOTO YOSHIHIRO)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：60184115

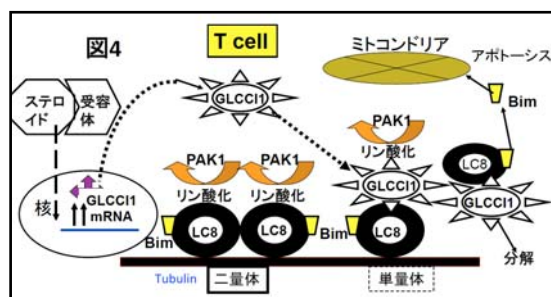
石垣靖人 (ISHIGAKI YASUHIRO)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：20232275

4) GLCCI1 機能の仮説 (図 4)

以上の結果を踏まえ、胸腺 T 細胞における GLCCI1 の生物学的役割を以下の様に考察した。ステロイド薬により高発現した T 細胞の GLCCI1 は、PAK1 のリン酸化能を阻害することで二量体 LC8 を単量体に変換させ、結果として LC8 結合タンパクであるミトコンドリア障害因子 Bim の遊離を惹起しアポトーシスを誘導すると考えられる。この結果は、T 細胞のアポトーシスにおけるステロイド薬の新規薬理作用機序として世界に先駆けた新知見である。



5) GLCCI1 のリン酸化ドメインの同定と今後の展望

Ex vivo GLCCI1 をトリプシンで断片化した試料を用いてリン酸化質量解析を行った。その結果、約 50 カ所の明らかなリン酸化部位同定され、その殆どはセリンであった。このことは、GLCCI1 は PAK1 意外にも現在同定されている 500 以上のキナーゼの多くに対して、その活性阻害をする可能性が示唆された。GLCCI1 の中のさらなる阻害キナーゼの同定は、ステロイド薬薬理作用機序の解明に多大な貢献をするものと確信するものである。