

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590107

研究課題名(和文) NFATファミリーの特異的制御メカニズムの解析にもとづく新規免疫制御法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel treatment for immunoregulation by analyzing specific regulatory mechanisms of the NFAT family.

研究代表者

北村 紀子(KITAMURA, Noriko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員

研究者番号：80415603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：NFATファミリーの多様性は免疫抑制薬における副作用の一因となるため、ファミリー間での特異的制御は重要である。NFATと制御分子CNとの結合親和性測定から、選択性を有する新規結合領域を見だし、結合に関わるコアペプチドおよび必須のアミノ酸を同定した。また、NFATc4特異的siRNA発現細胞の遺伝子発現変化および転写因子siRNAライブラリー導入細胞のNFATプロモーター活性を測定することで、NFATの選択性に関わる会合分子候補を複数同定した。これらの結果から、各NFAT分子の特異的制御を可能にし得るメカニズムの一端が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Since numerous side effects of CN inhibitors are mostly caused by the diversity of the NFAT family, control of a part, not all, of the function of NFAT family members is desirable. By comparing the binding activity of CN with each NFAT, we identified a new CN-binding region into NFATc1. The CN-binding affinity of this region was much different among the NFAT family. By means of competition assay using sequential partial peptides, we determined the core peptide and essential amino acids in it. By analyzing the gene expression in NFATc4-siRNA expressing cells, and the NFATc4 promoter activity in siRNA library-transfected cells, several candidate molecules related with the selectivity among NFAT family members were identified. The molecular mechanisms useful for the regulation of a part of NFAT family members were clarified.

研究分野：免疫学

キーワード：NFAT CN 免疫抑制薬

## 1. 研究開始当初の背景

NFAT(Nuclear factor of activated T cells)はIL-2の転写調節因子として発見された、免疫制御分子発現をはじめ、さまざまな臓器の発生・分化に重要な転写因子であり、その機能はセリン/スレオニンホスファターゼであるカルシニューリン(calcineurin; CN)によって制御されている。免疫抑制薬として使用されるCN阻害剤、サイクロスポリンやタクロリムスが、NFATの機能制御を主なターゲットとしていることから、NFATの制御は免疫反応をコントロールする上で非常に重要である。NFATはNFATc1-c4およびNFAT5の5つの遺伝子から成るファミリーを形成している。これらの分子は共通のホモロジドメインを複数有しているものの、その機能や発現組織は各NFATで異なっており、その多様性が一因となって、免疫抑制薬の重篤な副作用が生じると考えられている。現在までにNFATとCNとの結合領域は2カ所報告されており、そのうち、N末側に位置する結合配列を基にした改変ペプチドVIVITは、CNとの結合配列を競合的に阻害することでNFAT機能不全をもたらす。マウスの喘息モデルや心疾患モデルにおいて、VIVIT投与によって症状の改善効果が報告されているものの、VIVITはすべてのNFATの機能を抑制することから、既存の免疫抑制薬と同様の副作用が問題となる可能性が高い。したがって、より低毒性の免疫抑制薬の開発には単一または少数のNFATに特異的な制御が必要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

NFATの選択的制御法開発のため、NFAT-CN結合における結合親和性や各NFATの会合分子との結合様式の相違に着目して、NFATファミリーにおける選択性を規定するメカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) NFATとCN結合領域の親和性についての検討

各NFAT分子におけるCN結合領域全体もしくはその一部を、N末にGST、C末にFLAGタグを付与した融合タンパクとして大腸菌に発現させ、抗FLAG抗体ビーズにて精製して、高純度のリコンビナントタンパクを得た。さまざまな濃度のGST-NFATとCNをグルタチオンビーズと混合してプルダウンを行い、SDSゲル電気泳動後ウェスタンブロッティングで検出した。フィルム上のバンドの濃淡

を定量して描画した結合曲線から各NFATとCNの結合親和性を算出し、各NFATおよび各領域間の親和性の相違を比較した。

### (2) 新たな結合領域におけるコアペプチドの同定

結合に関わるコアペプチドを同定するため、NFATの部分配列ペプチドを作製して上記プルダウン時に共存させることで競合実験を行った。これにより同定されたNFATの配列ペプチドに光標識およびビオチン標識を施してCNと反応させた後、UVを照射して複合体を形成させた。この複合体をV8またはトリプシンによる酵素処理を行った後、マスマスペクトロメトリーにて解析し、結合に関わるCN側アミノ酸の同定を行った。

### (3) 核内移行におけるCN結合領域タンパクの作用

NFATc1およびNFATc2におけるCN結合領域全体および新たなCN結合領域を蛍光タンパクとのfusionタンパクとして発現するほ乳細胞発現ベクターを構築した。BHK細胞に恒常的にNFATc1およびNFATc2のCN結合領域の蛍光fusionタンパクを発現する細胞株を樹立し、この細胞に新たな結合領域の蛍光fusionタンパクを一過性に導入して、NFATの核内移行における影響について調べた。

### (4) NFATおよびCNタンパクの発現・精製条件の検討

結晶構造解析に使用するための、高純度リコンビナントタンパクを多量に得るため、NFATおよびCNの大腸菌での発現・精製過程の条件検討を行った。より安定的なCNタンパクを得るため、CNの機能ドメインであるAサブユニットに加え、制御ドメインであるBサブユニットを共発現する発現ベクターを新たに構築した。これら大腸菌に導入し、IPTG誘導温度や時間および配列などについて検討した。

### (5) NFATc4の転写制御機構についての解析

転写調節分子 WW Domain-containing transcription regulator 1 (WWTR1)によるNFATc4の発現制御機構を解析するため、WWTR1が結合することで標的遺伝子の遺伝子発現増強が報告されている転写因子T-box5(TBX5)の各組織中での発現をリアルタイムPCRによって調べた。また、NFATc4のプロモーター活性に対するWWTR1とTBX5の協調作用を見るため、両分子を強制発現させて検討を行った。さらに、WWTR1強制発現ベクターおよびWWTR1 siRNA発現ベクターを構築し、これらをT細胞および血管平滑筋細胞にそれぞれ導入してNFATc4発現に対する作用を検討した。

#### (6) NFATc4による発現調節遺伝子の探索

NFATc4特異的siRNAを発現するレンチウイルスベクターを構築し、そのウイルスを血管平滑筋細胞に感染させて遺伝子導入した。導入細胞における遺伝子発現の変化を、マイクロアレイを用いて解析した。

#### (7) NFATc4 発現制御に関わる転写因子の探索

NFATプロモーター領域を蛍光タンパクGFPに結合させたレポーターベクターを構築した。これを293FT細胞に恒常的に遺伝子導入することで、蛍光レベルを指標としてNFATプロモーター活性を測定できる細胞株を樹立した。この細胞株に転写因子siRNAライブラリーを導入して、NFATc4発現に関わる転写因子を検索した。

### 4. 研究成果

#### (1) NFAT-CN 結合における新規結合領域の解析

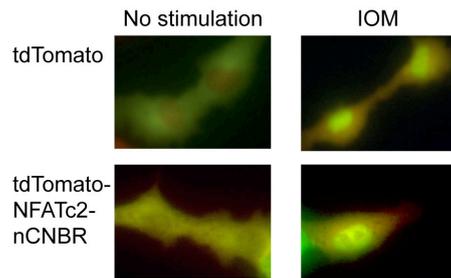
NFAT-CN 結合において、NFAT 間での親和性の違いを確かめるため、CN や各 NFAT の部分タンパクを大腸菌で発現・精製して、各種リコンビナントタンパクを得た。これらをプルダウンアッセイ法にて比較した結果、既に報告されている2カ所のNFAT-CN結合領域の間に新たな結合領域を見いだした。この領域における結合親和性には、NFATc1で最も強く、NFATc2では他のNFATに比べて非常に弱いといった、ファミリー間での選択性が認められた。この結合に関わるコアペプチドを同定するため、結合領域配列を細分化したNFAT部分ペプチドをNFAT-CNの結合に対して競合させて検討したところ、NFAT配列上の18アミノ酸が結合に関与していることが明らかになった。そこで、この18アミノ酸に光標識およびビオチン標識を施してCNと反応させた後、UV照射した反応液をウェスタンブロッティングで検出したところ、NFAT-CNの複合体形成が確認でき、この複合体をプロテオーム解析したところ、結合に関わるCN配列上の13アミノ酸を同定できた。このコアペプチドにおける結合は、NFATc1とNFATc2で選択性を認めた(図1)。



図1. 新規NFAT-CN結合領域におけるペプチドレベルでのサブタイプ選択性

さらに、細胞における新規CN結合領域の作用について調べるため、NFATc1およびNFATc2のCN結合領域全体を蛍光タンパクとのfusionタンパクとして恒常的に発現する細胞株を樹立し、NFATの核移行を蛍光レベルで確認できる実験系を確立した。この系にNFATc1およびNFATc2における新規CN結合領域タンパクを一過性に導入したところ、これらのタンパクはNFATc1の核内移行を選択的に阻害し、細胞レベルでもファミリー間の選択性が明らかとなった(図2)。

#### BHK-Np1/2EG.8S4



#### BHK-Nc1/2EG.10S4

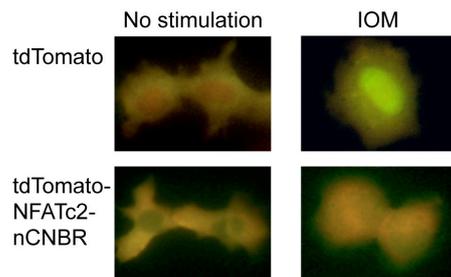


図2. NFATの核内移行に対する新規CN結合領域の作用。

#### (2) NFATおよびCNリコンビナントタンパクの発現・精製条件の検討

新たに見いだしたNFAT-CN結合領域において、結合に関わることが明らかになったペプチド間で結合シミュレーションを行い、得られた結合様式から変異ペプチドを作製してNFAT-CN結合を調べたところ、NFATc1側およびCN側における結合に必須のアミノ酸を見いだした。このCN側のアミノ酸に変異を加えたところ、ペプチドレベルだけでなくCN部分タンパクにおいてもNFAT-CN結合に影響を与えたが、全長のCNに対しては影響が見られなかった。そのため、立体構造における分子間相互作用について、さらに詳細に調べる必要があると考えられた。そこで、結晶構造解析を行うための高純度タンパクを多量に得るため、CNのAサブユニットとBサブユニットを共発現するベクターを大腸菌に導入し、IPTG誘導温度や時間について

検討したところ、低温度での培養で発現量が増加することが分かった。また、キレートアフィニティーカラムにて精製を行った CN タンパクにプロタミンを添加して DNA 結合タンパクを除き、ゲルろ過カラムによる分子量分画にかけることで、単体のタンパクのみを分取した。一方、NFATc1 タンパクはさまざまな条件下で発現・精製を行ったが、タンパクの凝集や透析時の析出により、収量が極めて悪かった。そのアミノ酸配列を調べたところ、新たな NFAT-CN 結合に関わる領域の NFATc1 は塩基性アミノ酸がとても多く、電荷の偏りによって水溶性に乏しいことが分かった。そこで、新規 CN 結合配列ペプチドを含む 50 アミノ酸から成る配列ペプチドの C 末に、酸性アミノ酸を多く有する FLAG ペプチドを付加し、電荷および水溶性を改善したペプチドを作製した。このペプチドにおいてもわずかな凝集が認められたためゲルろ過クロマトグラフィーによって単体ペプチドのみを分取した後、CN と反応させた。反応液はゲルろ過カラムによって分子量を確認し、プルダウンアッセイによっても単体タンパクでの結合が確認できた (図 3)。

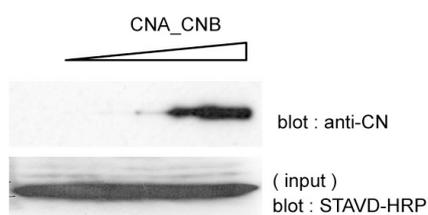


図 3. 単体 NFAT および CN を用いたプルダウンアッセイでの結合確認

(3) NFATc4 発現制御に関わる転写因子および NFATc4 による発現調節遺伝子の探索  
WWTR1 による NFATc4 転写制御機構について解析するため、WWTR1 の会合候補転写因子 TBX5 の組織発現を調べたところ、T 細胞に比べて血管平滑筋細胞で高発現であることが分かった。しかしながら、NFATc4 のプロモーター活性に対する WWTR1 と TBX5 の協調作用は認められず、NFATc4 遺伝子プロモーターにおいては、WWTR1 は TBX5 と異なる転写因子と協調して NFATc4 転写を制御する可能性が示唆された。さらに、NFATc4 特異的 siRNA 発現レンチウィルスに感染させた血管平滑筋細胞の遺伝子発現変化をマイクロアレイで解析したところ、NFATc4 が発現調節する数十の候補遺伝子を抽出できた。また、NFAT プロモーター領域のレポーターベクターを導入して樹立した細胞株に転写因子 siRNA ライブラリーを導入してプロモーター活性を測定することで、NFAT 阻害分子の発現調節を制御する転写因子候補

を複数同定することができた。今後、これらの候補分子における NFATc4 発現調節因子としての機能検証および病態生理学的役割について検討してゆく計画である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Kaminuma O, Kitamura N, Mori A, Tatsumi H, Nemoto S, Hiroi T. NFAT1 and NFAT2 differentially regulate IL-17A expression in human T cells. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2012. 158: S30-34. 査読有. doi: 10.1159/000337757

[学会発表] (計 3 件)

- ① Kaminuma O, Kitamura N, Hiroi T. 第 87 回日本生化学会大会、2014.10.17、国立京都国際会館 (京都).
- ② Kaminuma O, Kitamura N, Mori A, Hiroi T. *Experimental Biology* 2014. 2014.4.30、San Diego, USA.
- ③ Kaminuma O, Kitamura N, Nemoto S, Tatsumi H, Mori A, Hiroi T. 第 86 回日本生化学会大会、2013.9.12、パシフィコ横浜 (横浜).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北村 紀子 (KITAMURA Noriko)  
公益財団法人東京都医学総合研究所  
ゲノム医科学研究分野・研究員  
研究者番号：80415603

### (2) 研究分担者

神沼 修 (KAMINUMA Osamu)  
公益財団法人東京都医学総合研究所  
ゲノム医科学研究分野・主任研究員  
研究者番号：80342921