

氏名	まるやま たつや <b>丸山 達哉</b>
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第739号
学位授与の日付	平成27年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学位論文題目	<b>Tec family チロシンキナーゼである Txk を介する 1 型ヘルパーT (Th1) 細胞特異的な細胞内シグナル伝達機構の解析</b>
審査委員	(主査)教授 遠藤泰久 教授 中島敏博 教授 伊藤雅信

### 論文内容の要旨

本論文は生体防御反応の主要な構成要素であるヘルパーT 細胞の分化とインターフェロン (IFN)- $\gamma$  の発現に関わる酵素 Txk の細胞内での情報伝達系を明らかにしたものである。

論文は6章からなり、第1章では研究の背景と目的を記述している。Txk は Tec ファミリーに属する非受容体型チロシンキナーゼであり、1 型のヘルパーT (Th1) 細胞とナイーブヘルパーT (Th0) 細胞に特異的に発現し、2 型ヘルパーT (Th2) 細胞には発現しない。Txk は、T 細胞の活性化に伴って核内に移行し、IFN- $\gamma$  プロモーター領域の Txk 応答配列 (Txk responsive element: Txk-RE) DNA に結合して、その転写活性化を特異的に調節することが報告されている。しかしながら、Txk を介する IFN- $\gamma$  特異的な発現調節機構については、十分に解明されていない。そこで、本研究では Txk を介する Th1 細胞特異的な細胞内シグナル伝達機構の解明を目的に検討を行った。

第2章では、IFN- $\gamma$  プロモーター領域の Txk-RE DNA に結合するタンパク質の同定を試みた。PHA-L で刺激した Jurkat 細胞の核タンパク質から、ビオチン標識 Txk-RE 二本鎖 DNA (-53/-39) に結合するタンパク質を回収し、アミノ酸解析を行ったところ、Txk と結合する分子として、poly (ADPribose) polymerase 1 (PARP-1) 及び elongation factor 1 alpha (EF1alpha)を同定した。

第3章では、遺伝子組換えタンパク質を用いたインビトロ試験において、Txk が自己リン酸化及び EF1alpha 及び PARP-1 のリン酸化を誘導し、複合体を形成すること、また、3 分子複合体が Txk-RE DNA に結合することを証明した。特に、3 分子複合体の形成には、DNA 結合ドメインを含む PARP-1 の N 末端領域が重要であることを示した。また、キナーゼ活性を欠失する Txk 変異体タンパク質を用いて同様の検討を行ったところ、複合体の形成は認められなかったことから、3 分子複合体の形成には Txk のキナーゼ活性が重要であると考えられた。一方で、PARP-1 により Txk がポリ ADP リボシル化されることを確認した。また、ヒト末梢血リンパ球の活性化に伴う IFN- $\gamma$  産生が PARP-1 酵素阻害剤により顕著に抑制されること、一方で、Interleukin (IL)-4 産生にはほとんど影響が認められないことを示した。これらの結果から、PARP-1 は、Txk を介する Th1 細胞特異的なシグナル伝達を促進的に調節していると考えられた。さらに、共焦点レーザー顕微鏡を用いた COS7 細胞におけるマルチカラー解析において、Txk の活性化に依存した Txk、

EF1alpha 及び PARP-1 の核における共局在が観察された。以上の結果から、Txk は活性化に伴って EF1alpha および PARP-1 と複合体を形成し、IFN- $\gamma$  プロモーター領域の Txk-RE に結合することによって、IFN- $\gamma$  特異的に転写活性化を誘導すると考えられた。

一方で、Jurkat 細胞においては、Txk 複合体の Txk RE DNA への結合が、T 細胞受容体 (TCR) 刺激の 1 時間後以降、減少した。核内に発現する何らかの分子が、Txk 複合体を介した IFN- $\gamma$  転写活性化を抑制的に調節している可能性が示唆される。細胞内におけるタンパク質のチロシンリン酸化は、キナーゼとフォスファターゼ (protein tyrosine phosphatase : PTP) によって調節されており、内因性の PTP により Txk の脱リン酸化が誘導されている可能性が示唆された。T 細胞に発現する PTP は、60 種類以上確認されている。核内で発現する PTP は限られるが、非受容体型 PTP のひとつである T-cell PTP (TCPTP) は、核移行シグナル配列を有し、核内で働く PTP のひとつと考えられている。

そこで第 4 章では、TCPTP が Txk の脱リン酸化を誘導するか検討した。TCPTP は、核型 (TC45) と細胞質型 (TC48) の 2 つのスプライスバリエーションが存在する。TC45 を COS7 細胞に発現させたところ、TC45 は核と細胞質の両方に認められた。一方、TC48 を発現させた COS7 細胞では、TC48 は主に細胞質において認められた。また、TC45 を発現させた COS7 細胞では、核における Txk の脱リン酸化が観察された。一方で、TC48 を発現させた COS7 細胞では、Txk の脱リン酸化は認められず、むしろ Txk のリン酸化は促進、持続化した。これらの結果から、細胞質ではなく、核に発現する TCPTP (TC45) が Txk の脱リン酸化に関与していると考えられた。

さらに第 5 章では、Jurkat 細胞における内因性の TCPTP が Txk のリン酸化にどのような影響を及ぼすか検討した。Jurkat 細胞における内因性の TCPTP を特異的な siRNA を用いてノックダウンしたところ、PHA-L/PMA 刺激後 60 分の Txk のリン酸化が顕著に亢進した。以上の結果から、核に存在する TCPTP は、Txk のリン酸化の調節に重要な役割を担っていると考えられた。

総合考察の第 6 章では、本研究で得られた Txk の細胞内情報伝達系の知見を総括し、その特異的阻害剤による炎症反応の抑制や自己免疫疾患治療剤としての可能性について論じている。さらに本研究で得られた成果をもとに、Txk 複合体の形成を指標とした自己免疫疾患やアレルギー性疾患の診断や、Th1/Th2 バランスの異常に基づく疾患の治療薬開発のための薬剤スクリーニング系などに応用できる可能性について論じている。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、アレルギー疾患や自己免疫疾患の新規の治療剤および診断薬の開発を目指したもので、免疫系のヘルパー T 細胞 Th1 におけるインターフェロン (IFN)- $\gamma$  の発現調節に関与する酵素 Txk に着目し、その細胞内情報伝達系を明らかにしたものである。

Txk は Tec ファミリーに属する非受容体型チロシンキナーゼで、T 細胞受容体からの情報により自己リン酸化し細胞核内に移動し IFN- $\gamma$  遺伝子の転写を促進するが、Txk には DNA 結合配列がない。本研究によりヒトの T 細胞のモデルである Jurkat 細胞の核タンパク質から、2 種のタンパク質 PARP-1 及び EF-1 $\alpha$  が Txk と複合体を形成する因子であることが示された。さらに複合体形成に Txk のキナーゼ活性が必要であること、DNA 結合に PARP-1 のアミノ末端領域が重要であること、また PARP-1 が Txk を ADP リボシル化することなどの新しい知見を得た。Txk 複合体の構成因子の蛍光融合タンパク質発現ベクターを作製し、COS7 細胞にトランスフェクトして、共焦点

レーザー顕微鏡を用いたマルチカラー解析を実施し、活性化により細胞核に移動することを明らかにした。また Jurkat 細胞において Txk 複合体の IFN- $\gamma$  遺伝子の転写促進が約 1 時間で停止する現象は、核内に存在する T 細胞 protein-tyrosine phosphatase アイソフォーム TC45 が Txk を脱リン酸化することによって制御されていることなどを明らかにした。

Txk 複合体形成は Th1 細胞に特異的であり、インターロイキン 4 を産生する Th2 細胞ではみられないことから、Th1/Th2 のバランス異常が原因とされる自己免疫疾患の治療薬、診断薬の開発において、個々の因子の選択的阻害剤ではなく、複合体形成をターゲットとした創薬の可能性が示唆された。

本論文は、申請者を筆頭著者とする下記の 2 報を基礎としており、査読制度のある学術雑誌に既に掲載されている。

1) Tatsuya Maruyama, Kazuhiko Nara, Hideshi Yoshikawa and Noboru Suzuki

Txk, a member of the non-receptor tyrosine kinase of the Tec family, forms a complex with poly (ADP-ribose) polymerase 1 and elongation factor 1 $\alpha$  and regulates interferon- $\gamma$  gene transcription in Th1 cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 147 (1): 164–175 (2007)

2) Tatsuya Maruyama, Jun Shimizu and Noboru Suzuki

T-cell protein tyrosine phosphatase (TCPTP) regulates phosphorylation of Txk, a tyrosine kinase of the Tec family. *Inflammation and Regeneration*, 34 (5): 240-246 (2014)