

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

丸 山 達 哉

京 都 工 芸 繊 維 大 学

第1章 目次

第1章 緒言	1
第2章 IFN- γ プロモーターの Txk 応答領域 (-53/-39) に結合するタンパク質の同定	5
1. 研究の目的	5
2. 実験材料	5
3. 実験方法	6
4. 結果	8
5. 考察	11
第3章 Txk 複合体の形成と IFN- γ 遺伝子転写活性化のメカニズム	13
1. 研究の目的	13
2. 実験材料	13
3. 実験方法	16
4. 結果	21
5. 考察	33
第4章 Txk による IFN- γ 遺伝子転写活性化を終息させるメカニズム～核内に存在するタンパク質 チロシン脱リン酸化酵素の関与～	38
1. 研究の目的	38
2. 実験材料	39
3. 実験方法	40
4. 結果	41
5. 考察	44
第5章 T リンパ球における Txk の脱リン酸化に及ぼす TCPTP の寄与	46
1. 研究の目的	46
2. 実験材料	46
3. 実験方法	47
4. 結果	48
5. 考察	49
第6章 総論	51
謝辞	54
参考文献	55

第1章 緒言

ヘルパーT細胞は、多種多様な外来抗原の侵入や腫瘍に対する生体防御反応である獲得免疫系を担う主要な細胞である。また、ヘルパーT細胞の過剰な分化、活性化は、種々アレルギー性疾患や自己免疫疾患に深く関与していると考えられている[1]。1986年に、Robert Coffman、Timothy Mosmannらによって、マウスにおいて、産生するサイトカインのパターンが異なるヘルパーT細胞サブセットが存在することが示された[2]。この発見から、彼らは、ヘルパーT細胞はインターロイキン(IL)-2 やインターフェロン(IFN)- γ を産生し、主として細胞性免疫に関わる1型ヘルパーT (Th1) 細胞と、IL-4やIL-5などを産生し、抗体産生を誘導する液性免疫に関与する2型ヘルパーT (Th2) 細胞に分化し、それらが異なる役割を担っているとする、Th1-Th2理論を提唱した[3-4]。現在、ヘルパーT細胞サブセットは、Th1細胞、Th2細胞に加えて、主にIL-17を産生するTh17細胞や、IL-10やTGF- β を産生する調節性T細胞 (regulatory T cell : Treg) などが明らかにされており[1]、それらの分化誘導メカニズムや機能、疾患との関連などについても研究が進められている。

Th1細胞は、細菌や細胞内寄生生物、ウイルス感染、腫瘍などに対する免疫反応を担っている。Th1細胞は、IFN- γ やIL-2を産生し、マクロファージの活性化や遅延型過敏反応など細胞性免疫を活性化する。一方、Th2細胞は、線虫など寄生虫の感染などにより誘導される。Th2細胞は、IL-4やIL5を産生し、好酸球の分化・活性化や、Immunoglobulin E (IgE) タイプの抗体を産生するB細胞を誘導する[5-6]。

また、Th1とTh2細胞は、それぞれが産生するサイトカインによりお互いの活性を制御しあいながら生体防御機構を担っている。すなわち、Th1細胞を誘導するIL-12やTh1が産生するIFN- γ は、Th2細胞の分化・活性化を抑制し、Th2細胞を誘導するIL-4は、Th1細胞の分化・活性化を抑制する[7-9]。Th1及びTh2細胞の分化には、サイトカイン受容体を介した細胞内シグナルの重要性が示されている。IL-12及びIFN- γ は、Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 4 及びSTAT1の活性化を介し、Th1細胞のマスター調節因子であるT-bet [10-11]の発現をコントロールすることによってTh1細胞の分化を誘導している。一方、IL-4はSTAT6の活性化を介し、Th2細胞のマスター調節因子であるGATA-3の発現をコントロールすることによってTh2細胞の分化を誘導している[12-13] (図1-1)。また、T-betとGATA-3は、お互いの機能を抑制的に調節しており[14-15]、Th1/Th2バランスの調節に寄与していると考えられている。

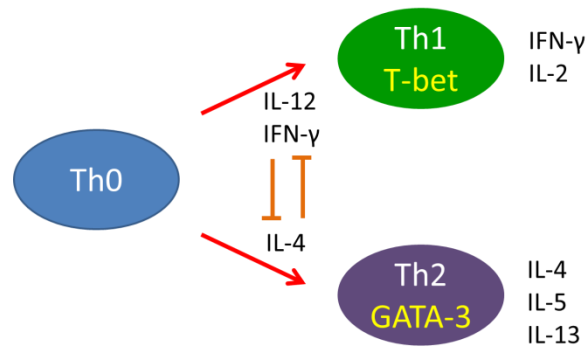


図1-1. Th1/Th2細胞とその分化調節機構の模式図

このようにして、Th1細胞とTh2細胞は相互にバランスを取りながら、様々な外来抗原に対する適切な免疫反応が効率的に誘導されている。このTh1細胞とTh2細胞のバランスの崩れによる、ヘルパーT細胞応答の慢性的な偏向は、さまざまな自己免疫疾患やアレルギー性疾患の発症や病態形成に関与していると考えられている。関節リウマチなどの自己免疫疾患では、Th1細胞の過剰な活性化が認められている[16]。一方で、気管支喘息やアトピー性皮膚炎のようなアレルギー性疾患では、Th2細胞の機能過剰とTh1細胞の減少が認められている。また、これらのアレルギー性疾患の患者の多くでは、血中IgEレベルの上昇が認められ、Th2型の免疫反応への偏向が病態に深くかかわっていると考えられている[17-20]。実際に、喘息やアトピー性皮膚炎の治療のため、抗IL-4受容体抗体やSTAT6シグナルの阻害など、Th2サイトカインやその受容体シグナルを標的とした治療法が試されている[21-23]。

Th1及びTh2細胞の分化に関わる因子については、他にも様々な因子の関与が報告されている。ナイーブヘルパーT細胞 (Th0) に発現する転写因子であるRunx1は、GATA-3の発現を抑制し、Th2細胞分化を抑制的に調節している[24]。また、T細胞受容体 (T-cell receptor: TCR) 下流の様々なシグナル分子のTh1/Th2細胞分化への関与も報告されている。例えば、TCRシグナルに関わるアダプター分子であるCARMA-1の機能を欠損する変異マウスでは、転写因子である nuclear factor-kappa B (NFkB) 及び c-jun N-terminal kinase (JNK) の活性化が抑制され、血中IgEレベルの上昇やアトピー性皮膚炎様の症状が認められるなど、Th2型免疫反応への偏向がみられ、CARMA-1を介するシグナルは、Th1細胞応答に重要であることが示唆されている[25]。また、calcineurinは一部の免疫抑制剤の標的として知られているが、内因性のcalcineurin 阻害因子と考えられる calcipressin-1 をノックアウトしたマウスのT細胞では、TCR刺激に伴うT-betの発現が抑制され、IFN-γの産生低下が認められている[26]。

しかし、Th1及びTh2細胞の分化・機能、またはそれらのバランスを調節する因子については、十分に解明されておらず、これらのメカニズムの理解は、新たな治療法の開発にもつながると考えられる。本研究では、Th1細胞に特異的に発現するチロシンキナーゼであるTxkに着目し、そのTh1細胞特異的な調節機構の解明のため、種々検討を行った。

Txkは、Tec family kinase に属する非受容体型のチロシンキナーゼで、T細胞がTCRを介して抗原提示を受けた際に活性化されるチロシンリン酸化シグナルカスケードに関わる分子のひとつである。Txkは、Th1及びTh0細胞に特異的に発現し、Th2細胞には発現しない。Kashiwakuraらは、Txkが核移行シグナル配列(Nuclear localization signal sequence : NLS)を有し、ヒト末梢血T細胞やTxkをトランスフェクトしたヒトリンフォーマ由来Jurkat細胞において、TCR刺激に伴って細胞質から核内に移行することを示した[27]。また、Txkを発現させたJurkat細胞をPhytohemagglutinin-L (PHA-L)で刺激した場合、IFN- γ の転写活性化が増強されるのに対して、IL-2やIL-4の転写活性化は増強されないことから、Txkの作用はIFN- γ に特異的であると考えられている[27]。また、Takebaらは、PHA-L刺激したTxk発現Jurkat細胞の核タンパク質中に、IFN- γ プロモーター領域DNA(遺伝子翻訳開始点の上流-538塩基)に結合するタンパク質が存在することを示した。さらに、そのタンパク質が結合する領域は、IFN- γ プロモーターの-53~-39の領域であること、またこの領域のDNAにTxkが結合していることをゲルシフトアッセイにより証明した[28]。これらの報告[27、28]から、TxkはIFN- γ 遺伝子の転写を直接的かつ特異的に調節する転写因子として機能していると示唆された。また、IFN- γ プロモーターの-53~-39の領域は、IFN- γ の転写活性化に働くTxk応答領域(Txk Responsive Element : Txk RE)であると考えられた。

一方で、Txkは典型的なDNA結合配列を有しておらず、他の分子と複合体を形成し、DNAに結合している可能性が推察された。そこで本研究では、第二章において、既報[28]でTxk REとして同定されたIFN- γ プロモーター領域(-53/-39)を含む二本鎖オリゴDNAを用いて、結合タンパク質を回収し、Txkに結合しているタンパク質の同定を試みた。また、第三章では、Txkを含むタンパク質複合体の形成のメカニズム及びその機能について解析した。さらに、Txk複合体を介したIFN- γ 転写活性化を終息させる機構として、核内のチロシンフォスファターゼが機能しているとの仮説を立て、核型及び細胞質型のT-cell PTP (TCPTP)のTxkの脱リン酸化能について検討する(第4章)とともに、Jurkat細胞におけるTxkのチロシンリン酸化に及ぼす内因性のTCPTPの機能について、short interference RNA (siRNA)を用

いた遺伝子ノックダウンの手法で検討した (第5章)。

第2章 IFN- γ プロモーターの Txk 応答領域 (-53/-39) に結合するタンパク質の同定

1. 研究の目的

Txk は、CD4 陽性のヘルパーT 細胞の中でも IFN- γ を産生する能力を有する 1 型ヘルパーT (Th1) 細胞及びナイーブヘルパーT (Th0) 細胞に限局して発現することが知られている[27]。また、Txk は核移行シグナル配列 (Nuclear localization signal sequence : 以下、NLS) を有しており、T 細胞受容体 (以下、TCR) を介した Th1 細胞の活性化に伴って核内に移行し、IFN- γ のプロモーター領域に結合することが既に示されている[28]。また、Txk が結合する応答領域 (Txk responsive element : 以下、Txk RE) についても、既に IFN- γ プロモーター領域の-53~-39 の領域にあることが同定されており、Txk はその領域に結合して、IFN- γ 遺伝子の転写活性化の促進に働くことが示されている[28]。一方で、Txk は典型的な DNA 結合配列を有しておらず、Txk が他の分子と複合体を形成し、DNA に結合している可能性が推察された。そこで、本研究では、化学合成した Txk RE 二本鎖 DNA (IFN- γ プロモーター領域 -56/-36) に結合するタンパク質を解析し、Txk 結合タンパク質の同定を試みた。

2. 実験材料

(1) Jurkat 細胞 (ヒトリンフォーマ由来の T 細胞株 (American Type Culture Collection : ATCC))

10% ウシ胎児血清 (fetal calf serum : FCS)、ペニシリン (100 units/mL)、ストレプトマイシン (100 μ g/mL) (いずれも、Gibco) を添加した RPMI1640 培地 (Gibco) を用いて維持培養した。

(2) プラスミドベクター

pME18S は、東京医科歯科大学 丸山和夫博士より譲渡された[29]。また、全長の Txk をコードする発現ベクターとして、pME18S-Txk を使用した。pME18S-Txk は、柏倉淳一博士 (理化学研究所 免疫アレルギー科学総合研究センター) が聖マリアンナ医科大学にて作製したものを[27]を使用した。

(3) ビオチン標識 Txk RE オリゴ DNA 及びコントロール二本鎖 DNA

ビオチン標識した IFN- γ プロモーター領域 (-56/-36) オリゴ DNA (以下、ビオチン標識 Txk RE オリゴ DNA) は、シグマジェノシスにて委託合成した (配列 : ACGTAATCCTCAGGAGACTTC)。また、コントロール 二本鎖 DNA は、ウシ胸腺 DNA を超音波処理し、およそ 50 bp に切断された DNA 断片を回

収して使用した。

(4) 抗体

抗ヒト poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) -1 モノクローナル抗体 (以下、抗 PARP-1 抗体 : シグマ)、
抗ヒト elongation factor (EF) -1alpha モノクローナル抗体 (以下、抗 EF-1 α 抗体 : Upstate)

(5) その他の試薬

Phytohemagglutinin-L (以下、PHA-L : ロシュ)、Biotin 3' End DNA Labeling Kit (タカラバイオ)、銀染色キット (和光純薬)、poly-L-lysine、poly (dI-dC)₂ (以上、ベーリンガーマンハイム)、マグネチックビーズ結合ストレプトアビジン (Dynabeads- streptavidin : DYNAL)

(6) 機器

SDS-polyacrylamide gel (4~20% のグラジエントゲル : イワキ)、ニトロセルロース膜 (Amersham)

3. 実験方法

(1) ビオチン標識 Txk RE 二本鎖 DNA 及びビオチン標識コントロール二本鎖 DNA の調製

ビオチン標識 Txk RE オリゴ DNA を熱変性させた後、ゆっくりと室温まで冷却してアニーリングさせて、ビオチン標識 Txk RE 二本鎖 DNA を作製した。また、コントロール二本鎖 DNA については、Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) (Biotin 3' End DNA Labeling Kit : タカラバイオ) を用い、3'末端をビオチン化した。

(2) Jurkat 細胞への Txk 発現ベクターのトランスフェクションと PHA-L 刺激

pME18S-Txk[27]を、エレクトロポレーション法により Jurkat 細胞にトランスフェクトした。以下にその方法を示す。Jurkat 細胞を、10% FCS を含有する RPMI1640 培地で培養後、遠心分離により細胞を回収して、エレクトロポレーションバッファー (30 mM NaCl, 120 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 10 mM MgCl₂) に懸濁した。この細胞をジーンパルサー (Bio-Rad) 専用のキュベット (Bio-Rad) に移し、ジーンパルサーを用いてエレクトロポレーション法 (電圧 : 300 mV、キャパシタンス : 960 μ FD) にて pME18S-Txk をトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を 43、45 または 48 時間培養した後、PHA-L を終濃度が 1 μ g/mL になるように加えて、それぞれさらに 5、3 または 0 時間培養、すなわち、トランスフェクト 48 時間後まで培養した。

(3) 核タンパク質抽出液の作製

Txk 発現ベクターをトランスフェクトした Jurkat 細胞を回収し、Phosphate Buffered Saline (PBS:pH 7.4) で洗浄した後、Tris Buffered Saline (TBS : pH 7.4) で再浮遊した。遠心分離により上清を除去後、氷冷した Buffer 1 (10 mM HEPES (pH 7.9)、10 mM KCl、0.1 mM EDTA、0.1 mM EGTA、1 mM dithiothreitol (以下、DTT)、0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (以下、PMSF)) を、 5×10^6 cells あたり 100 μ L 加えてゆっくりとピペティングした。氷上で 15 分間静置後、10 % NP-40 水溶液を 5×10^6 cells あたり 6.25 μ L 加えて攪拌した。遠心分離後、上清を細胞質タンパク質として回収した。また、ペレット (核) に氷冷した Buffer 3 (20 mM HEPES (pH 7.9)、0.4 M NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1 mM DTT、1 mM PMSF) を 5×10^6 cells あたり 50 μ L 加え、Micropestle (ependorf) でペレットを圧迫し、ホモジナイズすることで、核タンパク質を抽出した。その後、遠心分離により上清の核タンパク質抽出液を回収した。

(4) 核タンパク質と Txk RE 二本鎖 DNA との反応及び DNA 結合タンパク質の回収

核タンパク質 48 μ L あたりに、5 \times 結合バッファー (100 mM HEPES (pH 7.6), 5 mM EDTA, 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 mM DTT, 1 % Tween 20, 150 mM KCl) を 16 μ L、100 μ g/mL poly-L-lysine を 2 μ L、1 mg/mL poly (dI-dC)₂ を 2 μ L、DDW を 4 μ L、ビオチン標識 Txk-RE 二本鎖 DNA あるいはビオチン標識コントロール二本鎖 DNA (30 fM)を 8 μ L 加えて、室温で 15~30 分間インキュベートした。1 \times 結合バッファーで洗浄したマグネチックビーズ結合ストレプトアビジンを、混合液 80 μ L あたり 20 μ L 加えて、室温でさらに 15~30 分インキュベートした。ビーズを 1 \times 結合バッファーで洗浄し、回収したビーズに 1 \times サンプルバッファー (25 mM Tris-HCl (pH 6.8)、5% グリセロール、1 % SDS、0.05 % ブロモフェノールブルー、1 % 2-メルカプトエタノール) を加えて、95 $^{\circ}$ C、5 分間ボイルした後、遠心分離し、上清を SDS-polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE) (4~20 % のグラジエントゲル) に供した。SDS-PAGE 後のゲルに銀染色を施し、タンパク質のバンドを確認した。この結果、Txk と考えられる 66 kDa 付近のバンドに加えて、110 kDa と 50 kDa 付近のバンドが確認された (結果の項を参照)。

(5) Txk-RE 二本鎖 DNA 結合タンパク質の解析及び同定

SDS-PAGE 後の polyacrylamide gel より 110 kd 及び 50 kd 付近のタンパク質バンドを切り出して、ゲル内消化を行い、エドマン分解法及び高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてアミノ酸解析を行った。なお、ゲル内消化からアミノ酸解析まではアプロサイエンス社に委託して実施した。

(6) PARP-1 及び EF-1 α の Txk-RE 二本鎖 DNA への結合の確認 (イムノブロッティング)

回収した Txk RE 二本鎖 DNA 結合タンパク質に 1x サンプルバッファーを加えて、95°C、5 分間ボイルした後、遠心分離し、上清を回収した。回収した上清を SDS-PAGE (4~20 % グラジエントゲル) にて展開し、ニトロセルロース膜に転写して、抗 PARP-1 抗体及び抗 EF-1 α 抗体を用いてイムノブロッティングを実施した。

4. 結果

SDS-PAGE 後のゲルに銀染色を施し、Txk RE 二本鎖 DNA 結合タンパク質のバンドを確認したところ、Txk と考えられる 66 kDa 付近のバンド (図 2-1、矢頭) に加えて、110 kDa と 50 kDa 付近のバンド (図 2-1、矢印及び二重矢印) が確認された。

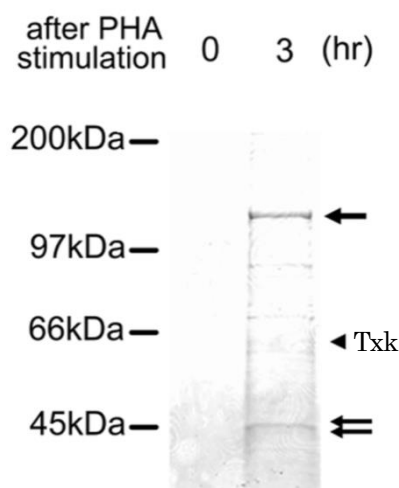


図2-1. Txk RE 二本鎖 DNA 結合タンパク質の電気泳動

Txk RE 二本鎖 DNA 結合タンパク質を SDS-PAGE (4~20% ポリアクリルアミドゲル) で展開し、銀染色を施してタンパク質のバンドを確認した。その結果、Txk と考えられる 66 kDa 付近のタンパク質 (矢頭) に加えて、110 kDa (矢印) 及び 50 kDa 付近 (二重矢印) のタンパク質のバンドが確認された。

そこで、約 110 kDa 及び約 50 kDa の Txk RE 二本鎖 DNA 結合タンパク質を同定するため、この付近のゲルを切り出し、ゲル内消化後、エドマン分解法にてアミノ酸解析を行った。その結果、110 kDa のタンパク質から 2 つ、50 kDa のタンパク質から 2 つのペプチドが得られ、その配列が同定された (表 2-1)。これらの配列について、Blast を用いてホモロジー解析を実施したところ、約 110 kDa のタンパク質が poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) -1 (GenBank Accession No. NM_001618、図 2-2 にアミノ酸配列を示す) であること、約 50 kDa のタンパク質が elongation factor (EF) -1alpha (GenBank Accession No. NM_001402、図 2-3 にアミノ酸配列を示す) であることが同定された。

表 2-1. アミノ酸解析により同定された Txk RE 二本鎖 DNA 結合タンパク質由来ペプチドの配列

110 kDa タンパク質由来	NREELGFRPEYS	PARP-1
110 kDa タンパク質由来	IFPPETSASVAA	PARP-1
50 kDa タンパク質由来	YYVTIIDAPGHR	EF-1 α
50 kDa タンパク質由来	HINIVVIGHVD.	EF-1 α

MAESSDKLYRVEYAKSGRASCKKCSSESIPKDSLRLMAIMVQSPMFDG
 KVPWHYHFSCFWKVGHSIRHPDVEVDGFSSELRWDDQQKVKKTAE
 GGVTGKGDGIGSKAEKTLGDFAAEYAKSNRSTCKGCMKIEKGGV
 RLSKMMVDPEKPLGMIDRWYHPGCFVK**NREELGFRPEYS**ASQLKG
 FSLLATEDKEALKKQLPGVKSEGKRKGDEVDGVDEVAKKKSKEKD
 KDSKLEKALKAQNDLIWNIKDELKKVCSTNDLKELLIFNKQQVPSGES
 AILDRVADGMVFGALLPCEECGQLVFKSDAYYCTGDVTAWTKCMV
 KTQTPNRKEWVTPKEFREISYLKKLKVKKQDR**IFPPETSASVAA**TPPP
 STASAPAAVNSSASADKPLSNMKILTLGKLSRNKDEVKAMIEKLGKGL
 TGTANKASLCISTKKEVEKMNKKMEEVKEANIRVVSEDFLQDVSAST
 KSLQELFLAHILSPWGAEVKAEPVEVVAPRGKSGAALSKKSKGQVKE
 EGINKSEKRMKLTLLKGGAAVDPDSSGLEHSAHVLEKGGKVFSATLGLV
 DIVKGTNSYYKLQLEDDKENRYWIFRSWGRVGTVIGSNKLEQMPSK
 EDAIEHFMKLYEEKTGNAWHKNFTKYPKKFYPLEIDYGQDEEAVKK
 LTVNPGTKSKLPKPVQDLIKMIFDVESMKKAMVEYEIDLQKMPGKLS
 KRQIQAAAYSILSEVQQAQVSGSSDSQILDLSNRFYTLIPHDFGMKKPP
 LLNNAQSVQAKVEMLDNLLDIEVAYSLLRGGSDSSKDPIDVNYEKLK
 TDIKVVDRDSEAEIIRKYVKNTTHATTHNAYDLEVIDIFKIEREGECQR
 YKPFKQLHNRLLWHGSRRTTNFAGILSQGLRIAPPEAPVTGYMFGKG
 IYFADMVSKSANYCHTSQGDPIGLILLGEVALGNMYELKHASHISKLP
 KGKHSVKGLGKTTDPDSANISLDGVDVPLGTGISSGVNDTSLLYNEYI
 VYDIAQVNLKYLLKLFNFKTSW

図2-2. ヒトPARP-1のアミノ酸配列。ハイライト部分は、Txk RE二本鎖DNA結合タンパク質の解析で同定された配列部分

MGKEKT**HINIVVIGHVD**SGKSTTTGHLYKCGGIDKRTIEKFEKEAAEM
 GKGSFKYAWVLDKLAERERGITIDISLWKFETSK**YYVTIIDAPGHR**DF
 IKNMITGTSQADCAVLIVAAGVGEFEAGISKNGQTRHALLAYTLGVK
 QLIVGVNKMMDSTEPYPYSQKRYEEIVKEVSTYIKKIGYNPDTVAFVPISG
 WNGDNMLEPSANMPWFKGWKVTTRKDGNASGTTLLEALDCILPPTR
 PTDKPLRPLQDVYKIGGIGTVPVGRVETGVLKPGMVVTFAPVNVTT
 EVKSVEMHHEALSEALPGDNVGFNVKNVSVKDVRRGNVAGDSKND
 PPMEAAGFTAQVIILNHPGQISAGYAPVLDCHTAHIACKFAELKEKIDR
 RSGKKLEDGPKFLKSGDAAIVDMVPGKPMCVESFSDYPPLGRFAVR
 DMRQTVAVGVKAVDKKAAGAGKVTKSAQKAQKAK

図2-3. ヒトEF-1 α のアミノ酸配列。ハイライト部分は、Txk RE二本鎖DNA結合タンパク質の解析で同定された配列部分

さらに、PARP-1 及びEF-1 α の T_{xk}-RE 二本鎖 DNA への結合を、特異抗体を用いたイムノブロッティングで証明した。pME18S-T_{xk} をトランスフェクトし、PHA-L で0~5 時間刺激した Jurkat 細胞から、T_{xk}-RE 二本鎖 DNA に結合する核タンパク質を回収し、抗 PARP-1 抗体を用いたイムノブロッティングを実施した。その結果、PHA-L 刺激3 時間後の T_{xk}-RE 二本鎖 DNA 結合タンパク質において、PARP-1 に相当する約 110 kDa のバンドが確認された (図 2-4a、レーン 2)。コントロールとして、PARP-1 を含むと考えられる非刺激の Jurkat 細胞の核タンパク質を泳動したところ、同様の位置に特異的なバンドが確認された (図 2-4a、レーン 1)。また、同じサンプルについて、抗 EF-1 α 抗体でイムノブロッティングを実施したところ、EF-1 α と考えられる約 50 kDa のタンパク質が確認された (図 2-4b)。PHA-L 刺激前 (0 時間後) の Jurkat 細胞の核タンパク質では、EF-1 α の結合は認められなかった (図 2-4b、レーン 1) が、PHA-L の刺激時間に依存して EF-1 α の T_{xk}-RE 二本鎖 DNA への結合が増加した (図 2-4b、レーン 2、3)。

以上の結果から、T_{xk} は活性化に伴い、PARP-1 及びEF-1 α と複合体を形成し、IFN- γ プロモーター領域の T_{xk}-RE DNA に結合すると考えられた。

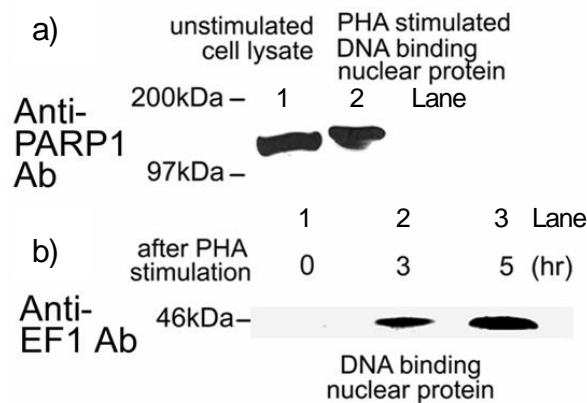


図2-4. PARP-1及びEF-1 α のT_{xk} RE二本鎖DNAへの結合の確認

- a) PHA-L刺激3時間後のT_{xk} RE二本鎖DNA結合タンパク質をSDS-PAGEで展開し、ニトロセルロース膜に転写後、抗PARP-1抗体でウエスタンブロッティングを実施した。その結果、110kDa付近にPARP-1と考えられるバンドが確認された(レーン2)。レーン1には、コントロールとして非刺激のJurkat細胞の核タンパク質を泳動した。
- b) 同じサンプルについて、抗EF-1 α 抗体でウエスタンブロッティングを実施した。その結果、50kDa付近にEF-1 α と考えられるバンドが確認された。EF-1 α のT_{xk}-RE二本鎖DNAへの結合は、PHA-L刺激前には認められず、刺激後の時間に依存して増加した。

5. 考察

本試験において、Txk が活性化に伴いタンパク質複合体を形成し、IFN- γ プロモーター領域の Txk RE DNA に結合することを証明した。また、Txk が Txk RE DNA に結合する際に複合体を形成するタンパク質のコンポーネントとして、PARP-1 及び EF-1 α を同定した。

PARP-1は、N末端側のDNA結合ドメインと、中央の自己調節ドメイン及びC末端側の触媒ドメインからなる分子量が約116 kDaの核内に豊富に存在する酵素で（ドメイン構造を図2-5中段に示す）、DNA修復などに関わることが知られている[30]。PARP-1は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺) をニコチンアミドとADPリボースに分解し、ヒストンなどの標的核タンパク質にADPリボースユニットを鎖状に付加重合（ポリADPリボシル化）する反応を触媒する。ポリADPリボースユニットは、高い負電荷を有しており、基質のひとつであるヒストンのポリADPリボシル化は、静電反発力を生み、この機構がクロマチンリモデリング、DNA修復、転写調節などに関与していると考えられている。PARP-1は、一本鎖及び二本鎖のDNA損傷に応答して活性化することが報告されているが、DNA修復だけでなく、アポトーシスや転写調節など様々な細胞機能の調節に関わることが報告されている[30]。実際、PARP-1はヒストンのみならず、DNA-dependent protein kinase [31]、NF κ B [32,33]、B-MYB [34]、AP-2a [35]、Oct-1 [36]、retinoid X receptors [37]など、様々なDNA修復因子、転写因子、シグナル分子をポリADPリボシル化し、それらの活性を調節していることが報告されており、ポリADPリボシル化は重要な翻訳後調節機構と考えられる。

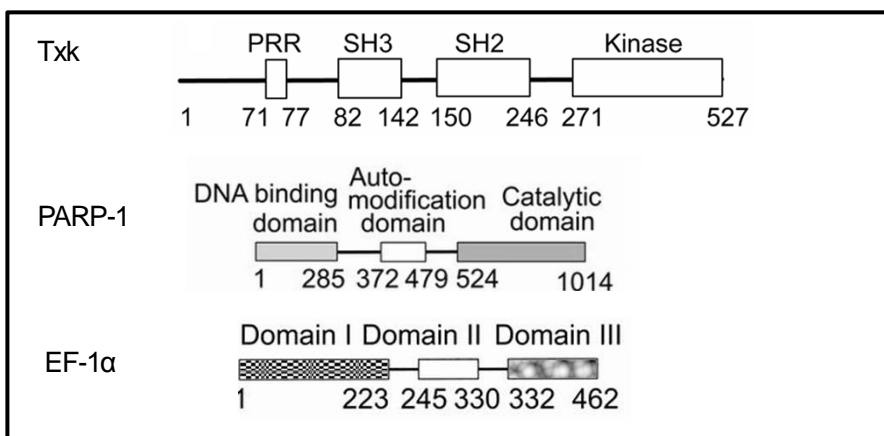


図2-5. Txk、PARP-1及びEF-1 α のドメイン構造 (PRR : proline rich region)

PARP-1を欠損する細胞でNFkBを介する転写活性化が減少することから[33]、NFkB依存的な遺伝子発現にPARP-1は必要と考えられる。一方で、PARP-1欠損細胞においても、活性化シグナルに伴う Inhibitor-kappa B (IkB) の分解や、NFkB p65の核内への移行及びNFkB responsive element DNAへの結合は正常に起こることが報告されている[32]。これらの報告から、PARP-1はNFkB依存的遺伝子発現機構において、コアクチベーターとして働いていることが示唆される。PARP-1は、NFkB以外にもB-MYB [34]、AP-2a [35]、Oct-1 [36]など、様々な転写因子のコアクチベーターとして働くことが報告されていることから、本研究で検討したTxk依存的なIFN- γ 遺伝子の転写活性化機構においても同様に、コアクチベーターとしての役割を担っている可能性が示唆された。

EF-1 α は、アミノアシル-tRNAのリボゾームへの転移を触媒し、ペプチド伸長に関わる分子として良く知られている[38]。そのため、EF-1 α は主に細胞質に局在している[39]。その一方で、オリゴデンドロサイトでは、EF-1 α が核内部においても散在することが観察されており、核において、細胞質とは異なる機能を有している可能性が示唆されている[40]。ヒト上皮様細胞癌由来細胞株A431細胞においては、EF-1 α が Epidermal growth factor (EGF) 刺激に伴って zinc finger proteinであるZPR1と結合し、核に移行すること、これらの結合及び核移行が細胞の増殖に必要であることが報告されている[41]。さらに細胞質において、EF-1 α はそのC末端領域（ドメイン構造を図2-5下段に示す）を介してPhospholipase C- γ 1 (PLC γ 1) のSH2-SH3ドメインと相互作用することが、yeast-two-hybrid systemによって示されている[42]。COS7細胞において、EGFの添加によって、これらの相互作用が促進されたことから、EF-1 α がPLC γ 1シグナル伝達系において重要な役割を担っている可能性が示されている。

これらの報告から、EF-1 α は増殖に関わるシグナル伝達分子の活性の調節、あるいはそれら分子の細胞内動態に関与していることが示唆される。TxkについてもSH2及びSH3ドメインを有することから（ドメイン構造を図2-5上段に示す）、EF-1 α のC末端領域と相互作用することによって、Txkシグナルの調節、IFN- γ 転写活性化にも関与している可能性が考えられた。

そこで、次章において、Txk/PARP-1/EF-1 α の3分子複合体の形成とIFN- γ 遺伝子転写活性化のメカニズムについて検討することとした。

第3章 Txk 複合体の形成と IFN- γ 遺伝子転写活性化のメカニズム

1. 研究の目的

Txk は、Th1 タイプ及び Th0 タイプの細胞に限局して発現し、IFN- γ の転写を特異的に活性化する転写因子として働いていることが知られている[27-28]。第2章で、Txk が PARP-1 及び EF-1 α と複合体を形成し、IFN- γ プロモーター領域 DNA (Txk RE) に結合することを示した。この結果から、この複合体の形成が、Txk の IFN- γ 特異的な転写活性化調節に深く関与していることが強く示唆される。そこで、本章では、Txk/PARP-1/EF-1 α の3分子複合体の形成と、IFN- γ 転写活性化のメカニズムについて解析するために、タンパク質レベル及び細胞レベルでの検討を行った。

Txk、PARP-1 及び EF-1 α の組換えタンパク質を大腸菌で作製し、分子間相互作用についてインビトロで解析した。上記の3分子の相互作用が Txk のキナーゼ活性に依存して誘導されているとの仮説を立て、Txk のキナーゼ活性に依存して3分子間の相互作用が誘導されるか、インビトロキナーゼアッセイやプルダウンアッセイで検討するとともに、インビトロで誘導した3分子複合体の IFN- γ プロモーター領域 DNA (Txk RE) への結合能について、ゲルシフトアッセイで検討した。また、細胞レベルにおける3分子間の相互作用について検討する目的で、Txk、PARP-1 及び EF-1 α の蛍光融合タンパク質を COS7 細胞内に発現させ、それらの分子の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

一方で、PARP-1 は基質のポリ ADP リボシル化を触媒する酵素であることから[46]、PARP-1 の酵素活性が Txk や Th1 細胞の機能調節に関与している可能性も考えられる。そこで、PARP-1 酵素活性による Txk の修飾及び Th1 細胞の機能に及ぼす影響についても検討した。

2. 実験材料

(1) プラスミドベクター

1) ヒスチジン (His) 標識全長ヒト Txk 及びヒト Txk 変異体発現ベクター

野生型全長ヒト Txk (Txk-wt)、Txk キナーゼドメイン欠損変異体 (Txk-kd) 及び種々Txk 点変異体 (Txk-Y91A、Txk-Y420A、Txk-K299E) 発現ベクターは、柏倉淳一博士 (理化学研究所 免疫アレルギー科学総合研究センター) が作製したもの[43]を使用した。Txk-wt 及び Txk 変異体タンパク質の構造の

模式図を図 3-1 に示す。

Txk-wt 発現ベクターは、全長のヒト Txk 遺伝子 (1~527 番目のアミノ酸をコード) を原核細胞発現ベクターである pQE31 (QIAGEN) に導入して作製された (pQE31-Txk-wt)。pQE31-Txk-wt は、N 末端に His 標識が付いた全長のヒト Txk をコードする。Txk のキナーゼドメイン欠損変異体 (Txk-kd) 発現ベクターについても、同様に pQE31 に導入して作製された (pQE31-Txk-kd)。Txk-kd タンパク質は、1~387 番目のアミノ酸からなり、キナーゼドメインを含む 388~527 番目のアミノ酸を欠失する。また、Txk の自己リン酸化部位である 91 番目のチロシン残基をアラニンに置換した点変異体発現ベクター (pQE31-Txk-Y91A) は、site-directed mutagenesis 法を用いて作製された[43]。さらに、Txk の ATP 結合部位にある 299 番目のリジン残基をグルタミン酸に置換した変異体についても、同様に site-directed mutagenesis 法で作製された (pQE31-Txk-K299E)。



図 3-1. 全長ヒト Txk のドメイン構造及び Txk 変異体タンパク質の構造 (PRR : proline rich region)

2) 全長 PARP-1 及び GST 標識 PARP-1 部分タンパク質発現ベクター

全長のヒト PARP-1 タンパク質をコードする pTP プラスミドは、国立がんセンター研究所の益谷美都子博士より供与された[44]。

また、PARP-1 部分タンパク質をコードする遺伝子を、pTP を鋳型にして PCR で増幅し、原核細胞発現ベクターである pGEX-5X-1 (以下、pGEX と表記する : Amersham) にサブクローニングした。これにより、PARP-1 の DNA 結合ドメインを含む N 末端側の 1~339 番目までのアミノ酸をコードする pGEX-PARP1N と、PARP-1 の自己調節ドメイン及び触媒ドメインを含む C 末端側の 338~1014 番目までのアミノ酸をコードする pGEX-PARP1C の 2 つの PARP-1 部分タンパク質発現ベクターを作製した (図 3-2)。なお、pGEX-PARP1N 及び pGEX-PARP1C は、いずれも N 末端にグルタチオン-S-トランスフェ

ラーゼ (GST) が付いたタンパク質をコードする。

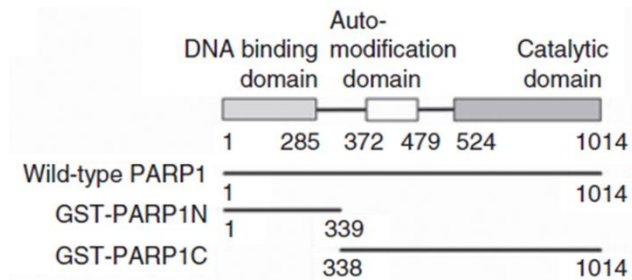


図3-2. 全長 PARP-1 のドメイン構造及び PARP-1 部分タンパク質の構造

3) His 標識及び GST 標識全長ヒト EF-1 α 発現ベクター

全長の EF-1 α cDNA は、American Type Culture Collection (ATCC) より入手した (cDNA clone No. MGC16449)。この cDNA を鋳型にして、全長の EF-1 α 遺伝子を PCR により増幅し、原核細胞発現ベクターである pQE30 (QIAGEN) にサブクローニングした (pQE30-EF-1 α)。pQE30-EF-1 α は、N 末端に His が付いた全長ヒト EF-1 α タンパク質をコードする。また、同様の方法で、全長の EF-1 α 遺伝子を pGEX プラスミドに組み込んだベクターも作製した (pGEX-EF-1 α)。pGEX-EF-1 α は、N 末端に GST が付いた全長ヒト EF-1 α タンパク質をコードする。

4) DsRed-Txk、GFP-PARP-1 及び CFP-EF-1 α 発現ベクター

細胞内における Txk、PARP-1 及び EF-1 α の局在を確認するため、それぞれのタンパク質と蛍光タンパク質 (DsRed monomer、green fluorescent protein (GFP) 及び cyan fluorescent protein (CFP)) の融合タンパク質を発現するベクターを作製した。それぞれの遺伝子は、pQE31-Txk-wt、pTP 及び pQE30-EF-1 α を鋳型にして PCR にて増幅し、全長の Txk を pDsRed monomer (Clontech) に、全長の PARP-1 を pEGFP (Clontech) に、全長の EF-1 α を pECFP (Clontech) プラスミドに導入した。なお、いずれのベクターも、それぞれの蛍光タンパク質の N 末端側に目的のタンパク質が融合するタンパク質を発現するようにデザインした。

5) 恒常的活性化型 Fyn、及び不活性化型 Fyn 発現ベクター

恒常的活性化型 Fyn (Fyn Y531F: 以下、active Fyn)、及び不活性化型 (Fyn K299M: 以下、inactive Fyn) 発現ベクターは、東京大学の豊島久真男博士より供与された[45]。

(2) 大腸菌株

JM109 株及び HB101 株 (タカラバイオ)

(3) 健常ヒト末梢血リンパ球

著者本人から、末梢血を 30 mL 採取した。なお、採血は聖マリアンナ医科大学の医師により行われた。得られた末梢血から、リンパ球分離溶液 (Lympholyte : コスモバイオ) を用いた比重分離により、リンパ球画分 (以下、PBL) を回収した。

(4) COS7 細胞 (アフリカミドリザル腎臓由来の細胞 (ATCC))

10% FCS、ペニシリン (100 units/mL)、ストレプトマイシン (100 µg/mL) (いずれも、Gibco) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地 (Gibco) を用いて維持培養した。

(5) 抗体

抗リン酸化チロシン抗体 (PY20, Santa Cruz Biotechnology)、ウサギ抗ヒト Txk 抗体 (柏倉淳一博士 (理化学研究所 免疫アレルギー科学総合研究センター) が作製したものを使用) [43]、抗 6xHistidine 抗体 (以下、抗 His 抗体 : QIAGEN)、抗ヒト PARP-1 抗体 (シグマ)、抗ヒト EF-1α 抗体 (Upstate)、抗 GST 抗体 (Amersham)、抗 poly(ADP-ribose) 抗体 (以下、抗 PAR 抗体 : Trevigen)

(6) その他の試薬

isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (以下、IPTG : タカラバイオ)、3β-indoleacrylic acid (以下、IAA : シグマ)、Ni-NTA アガロースレジン (QIAGEN)、Glutathione-sepharose HP レジン (Amersham)、10mM ATP (invitrogen)、digoxigenin (以下、DIG) 標識 Txk RE (-56/-36) オリゴ DNA (配列 : ACGTAATCCTCAGGAGACTTC、シグマジェノシスにて合成)、DIG gel shift kit (バーリンガーマンハイム)、ヒト PARP-1 enzyme (R&D Systems)、activated DNA (R&D systems)、β-NAD (シグマ)、PARP-1 阻害剤 (PJ34 : Merck)、PHA-L (ロシュ)、ヒト IFN-γ 及び IL-4 ultrasensitive ELISA キット (Biosource International)、リポフェクタミン 2000 (invitrogen)

(7) 機器

透析膜 (透析膜 8/32、分画分子量 14,000 : 三光純薬)、ニトロセルロース膜 (Amersham)、ナイロン膜 (Nytran Super charge : Whatman)、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510META : Carl Zeiss) .

3. 実験方法

(1) 組換えタンパク質の発現及び調製

1) His 標識 Txk、Txk 変異体タンパク質の調製

Txk-wt 及び Txk 変異体タンパク質 (His-Txk-kd、His-Txk-K299E 及び His-Txk-Y91A) は、前記の pQE31-Txk-wt 及び各 Txk 変異体発現プラスミドで形質転換した大腸菌 JM109 株を培養し、2 mM IPTG で刺激してタンパク質発現を誘導することにより作製した (Lac プロモーターによるタンパク質発現制御)。培養後、回収した細菌ペレットに溶解用緩衝液① (40 mM HEPES、100 mM NaCl、20 mM イミダゾール、10 mM MgCl₂、3 mM MnCl₂、20 %グリセロール、10 mM 2-メルカプトエタノール pH 8.0) を添加して懸濁し、氷温下で超音波破碎した。破碎後、4°Cで遠心分離を繰り返すことにより、細胞デブリを除いた。上清を回収し、Ni-NTA アガロースレジンを加えて、4°Cで 30 分間ローテートさせることにより、His 標識タンパクを Ni-NTA アガロースレジンに結合させた。His 標識タンパク質の結合した Ni-NTA アガロースレジン、洗浄用緩衝液① (40 mM HEPES、100 mM NaCl、50 mM イミダゾール、10 mM MgCl₂、3 mM MnCl₂、20 %グリセロール、10 mM 2-メルカプトエタノール pH 8.0) で洗浄し、さらに HEPES 緩衝液 (40mM HEPES、100mM NaCl、pH 7.4) で洗浄した後、レジンに溶出用緩衝液 (40 mM HEPES、250 mM イミダゾール、100 mM NaCl、pH 7.4) を加えて、His 標識 Txk タンパク質を溶出した。得られた溶出液から、イミダゾールを除去するために、キナーゼ緩衝液 (40 mM HEPES、10 mM MgCl₂、3 mM MnCl₂、pH 7.4) に対して透析を行い、精製 His 標識 Txk タンパク質 (以下、それぞれ His-Txk-wt、His-Txk-kd、His-Txk-K299E 及び His-Txk-Y91A と記載) を得た。

2) 全長 PARP-1 及び GST 標識ヒト PARP-1 部分タンパク質の調製

全長の PARP-1 タンパク質は、全長 PARP-1 をコードする pTP プラスミドで形質転換した大腸菌 HB101 株を IAA で刺激することにより作製した (トリプトファンプロモーターによるタンパク質発現制御)。刺激培養後、細菌ペレットを回収し、キナーゼ緩衝液に懸濁し、氷温下で超音波破碎した。破碎後、4°Cで遠心分離を実施し、上清を回収した。この上清を全長の PARP-1 タンパク質を含有するホールセルライゼートとして使用した。

GST 標識ヒト PARP1N 及び PARP1C タンパク質 (以下、GST-PARP1N 及び GST-PARP1C) の発現は、前記の pGEX-PARP1N 及び pGEX-PARP1C で形質転換した大腸菌 JM109 を、前記の方法と同様に、IPTG 刺激することによって作製した (Lac プロモーターによるタンパク質発現制御)。大腸菌ペレットを溶解

用緩衝液② (40 mM HEPES、100 mM NaCl、1 mM DTT、pH 7.4) に懸濁し、氷温下で超音波破碎した後、4°Cで遠心分離を実施し、上清を回収した。上清に溶解緩衝液②で平衡化した Glutathione-sepharose HP レジン (Amersham) を加えて、4°Cで30分間ローテートした。レジンを溶解用緩衝液②で洗浄後、溶出用緩衝液② (40 mM HEPES、1 mM DTT、10 mM 還元型グルタチオン、pH 8.0) を加えて GST 標識タンパク質を溶出した。得られた溶出液からグルタチオンを除去するため、キナーゼ緩衝液に対して透析を行い、精製 GST-PARP1N 及び GST-PARP1C タンパク質を得た。

3) His 標識及び GST 標識全長ヒト EF-1 α タンパク質の調製

His 標識ヒト EF-1 α タンパク質 (以下、His-EF-1 α) は、前項と同様にして、pQE30-EF-1 α プラスミドで形質転換した JM109 を IPTG で刺激することにより作製した。細菌ペレットを溶解用緩衝液②に懸濁し、氷温下で超音波破碎した後、4°Cで遠心分離を実施し上清を回収した。上清に Ni-NTA アガロースレジンを加え、His 標識 EF-1 α タンパク質を結合させた後、洗浄用緩衝液② (40 mM HEPES、50 mM イミダゾール、100 mM NaCl、pH 8.0) で洗浄した。洗浄後の Ni-NTA アガロースレジンに溶出用緩衝液を加えて His 標識全長ヒト EF-1 α タンパク質を溶出した。得られた溶出液から、イミダゾールを除去するために、キナーゼ緩衝液に対して透析を行い、精製 His-EF-1 α タンパク質を得た。GST 標識ヒト EF-1 α タンパク質 (以下、GST-EF-1 α) は、前述の GST-PARP1N 及び GST-PARP1C と同様の方法で調製した。

(2) Txk による基質のリン酸化の評価 (インビトロキナーゼアッセイ)

1) Txk の自己リン酸化の評価

3. 3. (1). 1)項で調製した His-Txk-wt 及び His-Txk-kd に最終濃度が 1mM になるよう DTT を添加した後、最終濃度が 250 μ M になるように ATP を加えて、25°Cで30分間インキュベートした。インキュベート後、5 \times サンプルバッファーを加えて、95°C、5分間ボイルし、遠心分離後の上清をサンプルとして回収した。サンプルを SDS-PAGE により展開し、ニトロセルロース膜に転写後、抗リン酸化チロシン抗体 (PY20) を用いたイムノブロッティングを実施した。また、His-Txk-wt 及び His-Txk-kd タンパク質の確認のため、抗 His 抗体を用いてリプロービングを行った。

2) Txk による PARP-1 及び EF-1 α のリン酸化の評価

同様にして調製した His-Txk-wt に、GST-PARP1N、GST-PARP1C あるいは GST-EF-1 α と DTT (最終濃

度 1 mM) を添加した後、ATP (最終濃度が 250 μ M) を加えて、25°C で記載した時間インキュベートした。インキュベート後、Glutathione-sepharose HP レジンを加えて、GST 標識タンパク質を回収した。レジンを洗浄後、サンプルバッファーを加えて 95°C、5 分間ボイルし、遠心分離後の上清をサンプルとして回収した。その後は、上記と同じ方法で、抗リン酸化チロシン抗体 (PY20) を用いたイムノブロッティングを実施した。また、GST-PARP1N、GST-PARP1C 及び GST-EF-1 α タンパク質の総量を確認するため、抗 GST 抗体を用いてリプロービングを行った。

(3) タンパク質間相互作用の解析 (プルダウンアッセイ)

1) His プルダウンアッセイ

His-Txk-wt 及び His-Txk-kd と非標識の全長 PARP-1 との相互作用を検討するため、His プルダウンアッセイを行った。全長 PARP-1 と His-Txk-wt あるいは His-Txk-kd を混合し、ATP 存在下 (前述の Txk 活性化条件) で 60 分間インキュベートした。インキュベート後、Ni-NTA アガロースレジンを添加し、His-Txk-wt、His-Txk-kd 及び結合タンパク質を沈降させた。レジンを洗浄後、サンプルバッファーを加えて 95°C、5 分間処理し、遠心分離後の上清をサンプルとして回収した。Txk と PARP-1 タンパク質の共沈降については、抗 PARP-1 抗体及び抗 Txk 抗体を用いたイムノブロッティングにて解析した。

2) GST プルダウンアッセイ

Txk を含む 3 分子複合体の形成について検討するため、GST プルダウンアッセイを行った。His-Txk (His-Txk-wt、His-Txk-kd、His-Txk-K299E あるいは His-Txk-Y91A) と His-EF-1 α を GST-PARP1N、GST-PARP1C あるいは GST (empty) と混合し、ATP の存在下、あるいは非存在下で 60 分間インキュベートした。インキュベート後、Glutathione-sepharose HP レジンを添加し、結合タンパク質を回収した。レジンを洗浄後、サンプルバッファーを加えて 95°C、5 分間処理し、遠心分離後の上清をサンプルとして回収した。3 分子複合体の形成 (それぞれの GST 標識タンパク質と His-Txk 及び His-EF-1 α の共沈降) については、抗 Txk 抗体、抗 EF-1 α 抗体及び抗 GST 抗体を用いたイムノブロッティングにて解析した。

(4) ゲルシフトアッセイ

PHA-L 刺激後の Jurkat 細胞の核タンパク質 (調製法は第 2 章 (2. 3. (3)) に記載) 及びインビトロで

誘導したTxkを含む3分子複合体(調製法は前項に記載)のIFN- γ プロモーター領域 Txk-RE DNA (-53/-39)への結合を確認するために、ゲルシフトアッセイを実施した。ゲルシフトアッセイは、ベーリンガーマンハイム社のDIG gel shift kitを用い、添付のプロトコールに従って実施した。その概要について以下に示す。

DIG 標識 Txk RE (-56/-36) オリゴ DNA を熱変性させた後、ゆっくりと室温まで冷却してアニーリングさせてDIG 標識 Txk RE 二本鎖 DNA を調製した。この DNA 断片と上記のタンパク質を混合し、15 分間インキュベートした。得られたタンパク質 DNA 複合体を 4 % native polyacrylamide gel 電気泳動にて展開した後、ナイロン膜に転写した。その後、ナイロン膜に転写した DIG 標識 Txk RE 二本鎖 DNA を、アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体を用いて染色した。

(5) PARP-1 によるポリ ADP リボシル化の評価

PARP-1 による Txk のポリ ADP リボシル化について、抗 PAR 抗体を用いたイムノブロッティングにより検討した。His-EF-1 α 存在下あるいは非存在下で、His-Txk-wt 結合レジンに酵素活性を有する全長の PARP-1 enzyme を 5 μ g 加え、ポリ ADP リボシル化反応緩衝液 (25 mM Tris-HCl、10 mM MgCl₂、50 mM ZnCl₂、250 mM β -NAD、20 ng activated DNA、pH 8.0) の条件で、25°C、30 分間インキュベートした。その後、Ni-NTA アガロースレジンを用いて His 融合タンパク質を回収した。得られたタンパク質を SDS-PAGE で展開し、ニトロセルロース膜に転写した後、ポリ ADP リボシル化タンパク質を検出するため、抗 PAR 抗体を用いたイムノブロッティングを実施した。さらに、ポリ ADP リボシル化修飾を受けているタンパク質が Txk であるか確認するため、同じ膜を抗 Txk 抗体でリプローブした。

(6) 健常ヒト PBL からのサイトカイン産生評価

健常ヒト末梢血から比重分離により精製した PBL を RPMI1640 培地 (Gibco) に懸濁し、96 ウェルプレート (ファルコン) に播種した。細胞に PARP-1 阻害剤である PJ34 を最終濃度が 4000 nM になるように添加し、1 時間プレインキュベートした。その後、PHA-L を最終濃度が 1 μ g/mL になるように加え、更に 24 時間培養した。培養後、上清を回収し、市販の ELISA キットを用いて、培養上清中のヒト IFN- γ 及びヒト IL-4 濃度を測定した。

(7) 共焦点レーザー顕微鏡による Txk、EF-1 α 、PARP-1 の局在の解析

COS7 細胞をガラスボトムのディッシュに播種し、培養した。その翌日、DsRed-Txk、GFP-PARP-1 及び CFP-EF-1 α 発現ベクターを、リポフェクタミン 2000 を用いて COS7 細胞にトランスフェクトした。Txk を活性化するために active Fyn 発現ベクターを、あるいはネガティブコントロールとして inactive Fyn 発現ベクターを同時にトランスフェクトした。トランスフェクト後、24 時間培養し、それぞれの蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

4. 結果

(1) Txk による PARP-1 及び EF-1 α のリン酸化

Txk は、Txk 自身の 91 番目のチロシン残基を自己リン酸化することが知られている[43]。そこで最初に、大腸菌に発現させて調製した His-Txk-wt 及び His-Txk-kd のキナーゼ活性を確認する目的で、Txk の自己リン酸化について検討した。

キナーゼ緩衝液で調製した His-Txk-wt 及び His-Txk-kd を、ATP (250 μ M) 添加あるいは非添加条件下で 30 分間インキュベートした後、抗リン酸化チロシン抗体 (PY20) を用いたイムノブロッティングを実施した。その結果、His-Txk-wt では、ATP の添加によりリン酸化 His-Txk-wt と考えられる約 63 kDa のシグナルの増加が認められた (図 3-3 上段、矢印)。一方、His-Txk-kd では、ATP 添加条件下においても、リン酸化 His-Txk-kd (約 46 kDa) のシグナルは検出されなかった (図 3-3 上段、矢頭)。また、抗 His 抗体でリプローブした結果、各レーンの Txk-wt 及び Txk-kd の総量に大きな差がないことを確認した (図 3-3 下段)。これらの結果から、His-Txk-wt はキナーゼ活性を有しているが、キナーゼドメインの大部分を欠失する His-Txk-kd は、キナーゼ活性を有していないことが確認できた。

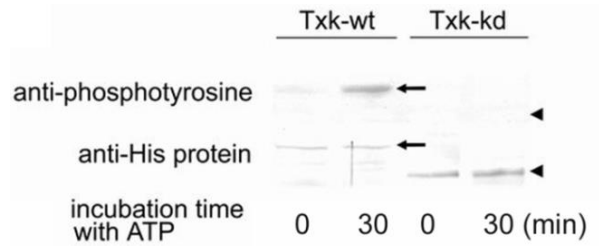


図3-3. Txkの自己リン酸化

ATP存在下あるいは非存在下におけるリン酸化His-Txk-wt及びリン酸化His-Txk-kdを抗リン酸化チロシン抗体 (PY20)を用いて検出した(上段)。また、各レーンのHis-Txk-wt及びHis-Txk-kdの総量を確認するため、抗His抗体でリプローブした(下段)。矢印は、His-Txk-wt(約63kDa)、矢頭はHis-Txk-kd(約46kDa)と考えられるバンドの位置を示す。His-Txk-wtの自己リン酸化が確認できた。一方で、His-Txk-kdの自己リン酸化は検出されなかった。

第2章で示したTxkとPARP-1、EF-1 α の複合体の形成が、Txkのキナーゼ活性により調節されている可能性が推察される。そこで次に、Txk-wtによりPARP-1及びEF-1 α のチロシンリン酸化が誘導されるか検討した。

His-Txk-wtとDNA結合ドメインを含む1-339番目のアミノ酸からなるGST-PARP1Nあるいは自己調節ドメインと触媒ドメインを含む338-1014番目のアミノ酸からなるGST-PARP1Cを混合し、ATPを添加して1及び2時間後のGST-PARP1N及びGST-PARP1Cのチロシンリン酸化を、前記と同様の方法で検討した。その結果、Txk非存在下(図3-4、no Txk)では、GST-PARP1N、GST-PARP1Cのいずれのタンパク質のチロシンリン酸化も認められなかったが、His-Txk-wtとの混合により、ATPの添加に依存したGST-PARP1N(図3-4上段、レーン5及び6、矢頭)及びGST-PARP1C(図3-4下段、レーン5、矢頭)のチロシンリン酸化が認められた。また、抗GST抗体でリプローブした結果、各レーンのGST-PARP1N及びGST-PARP1Cの総量に大きな差がないことを確認した(図3-4、Anti-GST protein)。

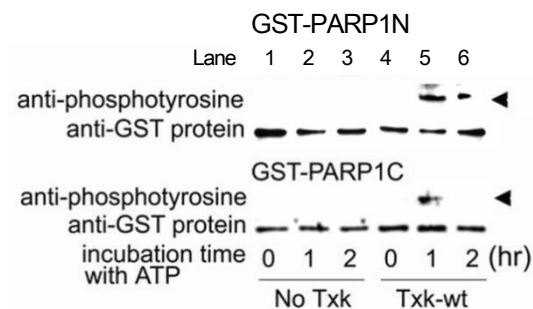


図3-4. TxxによるPARP-1のリン酸化

His-Txx-wtによるATPに依存したGST-PARP1N(上段)及びGST-PARP1C(下段)のチロシンリン酸化を、抗リン酸化チロシン抗体(PY20)を用いて検出した。また、各レーンのGST-PARP1N及びGST-PARP1Cの総量を確認するため、抗GST抗体でリプローブした(Anti-GST protein)。矢頭は、チロシンリン酸化されたGST-PARP1N(約64kDa)及びGST-PARP1C(約101kDa)と考えられるバンドを示す。

同様の方法で、His-Txx-wtがGST-EF-1 α のチロシンリン酸化を誘導するか検討した。その結果、His-Txx-wtによると考えられるATP添加に依存したGST-EF-1 α のチロシンリン酸化が確認された(図3-5 上段、レーン2~4、矢頭)。また、抗GST抗体でリプローブした結果、各レーンのGST-EF-1 α の総量に大きな差がないことを確認した(図3-5 下段)。

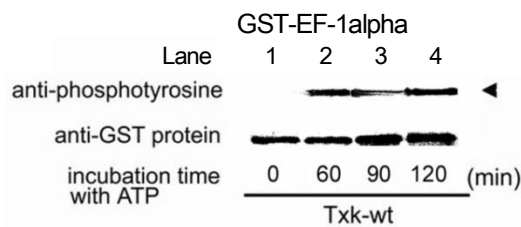


図3-5. TxxによるEF-1 α のリン酸化

His-Txx-wtによるATPに依存したGST-EF-1 α のチロシンリン酸化を抗リン酸化チロシン抗体(PY20)を用いて検出した(上段)。また、各レーンのGST-EF-1 α の総量を確認するため、抗GST抗体でリプローブした(下段)。矢頭は、チロシンリン酸化されたGST-EF-1 α と考えられるバンドを示す。

これらの結果から、Txxは結合タンパク質として同定されたPARP-1とEF-1 α の両方をチロシンリン酸化しうると考えられた。

(2) Txxのキナーゼ活性に依存した2、3分子複合体の形成

TxxによるPARP-1及びEF-1 α をチロシンリン酸化が認められたことから、これら3分子の複合体の形成が、Txxによるチロシンリン酸化に依存して誘導されている可能性が示唆された。そこで、Txx複合体の形成と、複合体形成におけるTxxのキナーゼ活性の役割について検討するため、インビトロプルダウンアッセイを実施した。

最初に、全長のPARP-1とTxxの結合について検討した。非標識の全長PARP-1をHis-Txx-wtあるいは

は His-Txk-kd と ATP 存在下で 25°C、60 分間インキュベートした。インキュベート後、Ni-NTA アガロースレジンを加え、His-Txk-wt 及び His-Txk-kd を沈降させ、PARP-1 の共沈降が認められるか、抗 PARP-1 抗体を用いたイムノブロットニングにて解析した。

抗 Txk 抗体によるイムノブロットニングの結果から、Ni-NTA アガロースレジンによる His 融合タンパク質 (His-Txk-wt 及び His-Txk-kd) の沈降 (His プルダウン) が確認された (図 3-6 下段)。全長の PARP-1 は、ATP の存在下で His-Txk-wt とともに共沈降した (図 3-6 上段、レーン 1) が、His-Txk-kd との共沈降は認められなかった (図 3-6 上段、レーン 2)。全長の PARP-1 は、キナーゼ活性を有する Txk-wt と 2 分子間で結合するが、キナーゼドメインを欠損し、キナーゼ活性を有していない Txk-kd とは相互作用しないことが示された。この結果から、PARP-1 のチロシンリン酸化が、PARP-1 と Txk の相互作用に重要であることが示唆された。

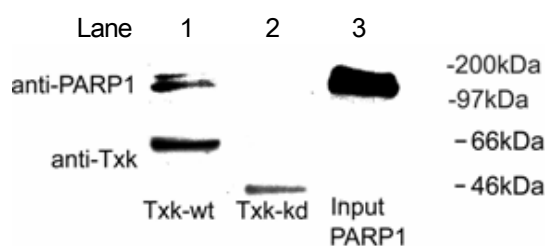


図3-6. Txkと全長PARP-1との2分子間相互作用 (Hisプルダウンアッセイ)

His-Txk-wtあるいはHis-Txk-kdをATP存在下で全長PARP-1とインキュベートした。その後、Ni-NTAアガロースレジンでHis標識タンパク質を回収し、全長PARP-1の共沈降を抗PARP-1抗体を用いたウエスタンブロットニングで解析した(上段)。また、His-Txk-wt及びHis-Txk-kdの沈降を確認するため抗Txk抗体を用いたウエスタンブロットニングを実施した(下段)。全長のPARP-1は、His-Txk-wtと共沈降した(上段、レーン1)。その一方で、キナーゼ活性を欠失したTxk-kdと全長PARP-1の共沈降は認められなかった(上段、レーン2)。

次に、同様のインビトロプルダウンアッセイにて、Txk、PARP-1 及び EF-1 α の 3 分子複合体の形成について検討した。His-Txk-wt と His-EF-1 α を、GST-PARP1N、GST-PARP1C あるいは GST と混合し、ATP 存在下で 25°C、60 分間インキュベートした。インキュベート後、Glutathione-sepharose HP レジンを加えて、GST 標識タンパク質を沈降させ、His-Txk-wt 及び His-EF-1 α の共沈降が認められるか、イムノブロットニングにて解析した。

抗 GST 抗体によるイムノブロットニングの結果から、Glutathione-sepharose HP レジンによる GST 融合タンパク質 (GST-PARP1N (図 3-7A、下段)、GST-PARP1C (図 3-7B、下段) 及び GST (図 3-7C、下段))

の沈降 (GST プルダウン) が確認された。His-Txk-wt と His-EF-1 α の共沈降について、抗 Txk 抗体及び抗 EF-1 α 抗体にて解析した。His-Txk-wt と GST-PARP1N の2分子を混合し、ATP 存在下でインキュベートしたところ、GST-PARP1N のプルダウンにより His-Txk-wt の共沈降が観察された (Fig3-7A 中段、レーン3)。さらに、GST-PARP1N と His-Txk-wt 及び His-EF-1 α の3分子を混合し、ATP 存在下でインキュベートしたところ、GST-PARP1N のプルダウンにより His-Txk-wt と His-EF-1 α の共沈降が観察された (Fig3-7A 上段及び中段、レーン4)。同様の方法で GST-PARP1C を用いた場合の His-Txk-wt 及び His-EF-1 α の共沈降についても解析した。その結果、GST-PARP1C と His-Txk-wt を2分子でインキュベートした場合には、これら2分子の共沈降が認められたが (図3-7B 中段、レーン3)、3分子でインキュベートした場合には、いずれのタンパク質の共沈降も認められなかった (図3-7B 上段及び中段、レーン4)。一方で、GST (empty) タンパク質を用いた場合には、いずれの条件においても、His-Txk-wt 及び His-EF-1 α の共沈降は認められなかった (図3-7C 上段及び中段)。これらの結果、Txk が、EF-1 α 及び PARP-1 と3分子複合体を形成すること、これら3分子の複合体の形成には、PARP-1 のDNA結合ドメインを含むN末端側 (1-338番目アミノ酸) が関与していることが示唆された。

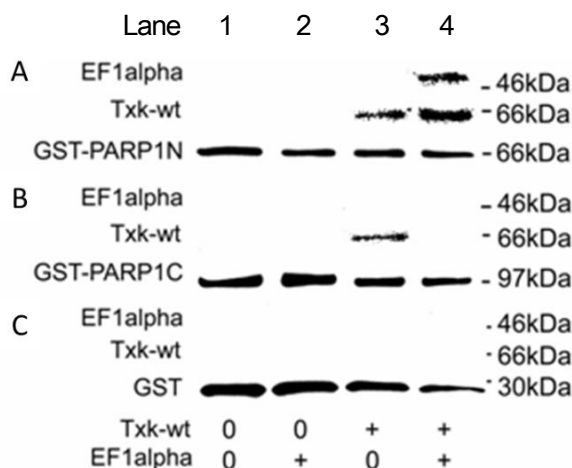


図3-7. Txk-wt/EF-1 α /PARP-1の3分子間相互作用 (GSTプルダウンアッセイ)

GST-PARP1N (A)、GST-PARP1C (B) 及び GST (C) を、ATP 存在下で His-Txk-wt 及び His-EF-1 α とインキュベートした。その後、Glutathione-sepharose HP レジンで GST 標識タンパク質を回収し、His-Txk-wt 及び His-EF-1 α の共沈降をそれぞれの抗体を用いたウエスタンブロットティングで解析した (A、B、C の中段及び上段)。また、GST タンパク質の沈降を確認するため、抗 GST 抗体を用いたウエスタンブロットティングを行った (A、B、C の下段)。その結果、Txk-wt、EF-1 α 及び PARP1N の3分子間において相互作用が認められた (A、レーン4)。

次に、His-Txk-wt、His-EF-1 α 及び GST-PARP1N の3分子複合体の形成が、Txk のキナーゼ活性 (自

己リン酸化を含む基質のリン酸化) に依存していることを確認する目的で、以下の2試験を実施した。

まず、3分子複合体の形成がATPの添加に依存しているか、同様のGSTプルダウンアッセイにて検討した(図3-8)。その結果、ATP存在下では、3分子複合体の形成が確認され、上記の結果(図3-7)が再現された(図3-8 上段及び中段、レーン3)。一方で、ATP非存在下においては、His-Txk-wtとGST-PARP1Nの二分子間の相互作用は認められたものの、3分子の相互作用は観察されなかった(図3-8 上段及び中段、レーン2)。なお、GST(empty)タンパク質を用いた場合は、ATPの存在下、非存在下に関わらず、His-Txk-wt及びHis-EF-1 α の結合は観察されなかった(図3-8、レーン4-6)。

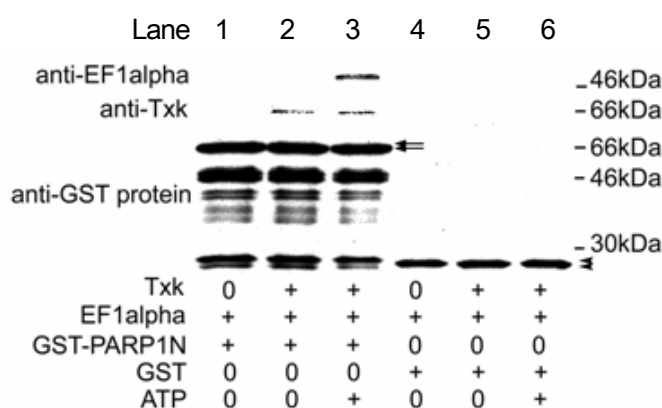


図3-8. Txk-wt/EF-1 α /PARP1Nの3分子複合体の形成に及ぼすATPの影響(GSTプルダウンアッセイ)

GST-PARP1N及びGSTを、ATP存在下あるいは非存在下でHis-Txk-wt及びHis-EF-1 α とインキュベートし、その後、前記と同様の方法でGSTプルダウンアッセイを実施した。その結果、ATP存在下ではHis-Txk-wtとGST-PARP1N及びHis-EF-1 α の3分子複合体の形成が確認された(レーン3)。一方、ATP非存在下では、3分子複合体の形成は認められなかった(レーン2)。なお、二重矢印(下段、レーン1~3)はGST-PARP1Nのバンドを、二重矢頭(下段、レーン4~6)はGSTのバンドを示す。

さらに、キナーゼドメインを欠失するTxk変異体(Txk-kd)、TxkのATP結合部位のリジン残基をグルタミン酸に置換することによりキナーゼ活性を欠失した変異体(Txk-K299E)及びTxkの自己リン酸化部位であるチロシン残基(Y91)をアラニンに置換した変異体(Txk-Y91A)を用いた場合の3分子複合体の形成について検討した。これらのTxk変異体は、いずれも自己リン酸化できない[43]。これらの変異体を用いた場合の3分子複合体の形成について、同様のGSTプルダウンアッセイにて検討した。その結果、His-Txk-wtを用いた場合、上記の結果と同様にATP存在下でHis-EF-1 α 及びGST-PARP1Nとの相互作用が観察された(図3-9A、レーン3)。一方、キナーゼ活性を欠損するTxk-kd、His-Txk-K299Eを用いた場合には、3分子複合体の形成は認められなかった(図3-9A、レーン4,5)。同様に、His-Txk-Y91A

を用いた場合においても、3分子複合体の形成は確認できなかった（図3-9A、レーン6）。なお、GSTを用いた場合は、His-Txk-wtを用いた場合においても、3分子複合体の形成は認められなかった（図3-9B）。これらの結果から、3分子複合体の形成には、Txkのキナーゼ活性及びTxkの自己リン酸化が重要であることが示唆された。

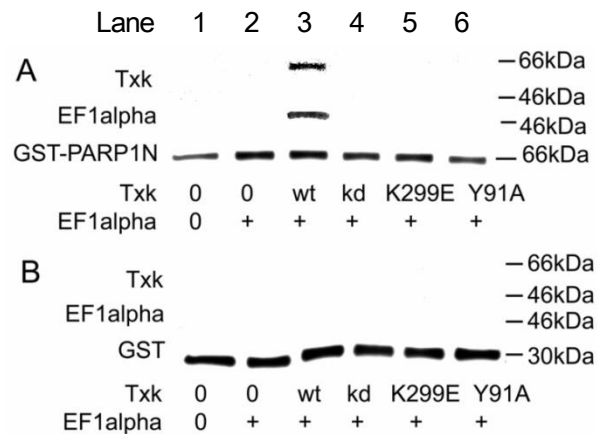


図3-9. Txkのキナーゼ活性及び自己リン酸化と3分子複合体の形成(GSTプルダウンアッセイ)

His-Txk-wt及びHis-Txk変異体(Txk-kd, Txk-K299E及びTxk-Y91A)を、His-EF-1 α とともにATP存在下でGST-PARP1N(A)あるいはGST(B)とインキュベートし、前記と同様の方法でGSTプルダウンアッセイを実施した。その結果、His-Txk-wtを用いた場合、His-Txk-wtとGST-PARP1N及びHis-EF-1 α の3分子複合体の形成が確認された(レーン3)。一方で、キナーゼ活性、自己リン酸化能を欠失したTxk変異体を用いた場合には、3分子複合体の形成は認められなかった(レーン4-6)。

(3) IFN- γ プロモーター領域 (Txk-RE) への3分子複合体の結合

前項において、Txk-wtがPARP1N(DNA結合ドメインを含むN末端側(1~338アミノ酸)の領域)及びEF-1 α と、Txkのキナーゼ活性に依存して複合体を形成することを示した。そこで、組換えタンパク質を用いてインビトロで誘導した3分子複合体のIFN- γ プロモーター領域Txk-RE DNA(-53/-39)への結合を確認するために、ゲルシフトアッセイを実施した。

第2章で、PHA-L刺激Jurkat細胞においてIFN- γ プロモーター領域のTxk-RE DNAに結合するタンパク質複合体が存在すること、またこのタンパク質複合体が、Txk、PARP-1及びEF-1 α で構成されていることを示した。そこで、最初にPHA-L刺激Jurkat細胞において形成された3分子複合体のTxk-RE DNAへの結合をゲルシフトアッセイで確認した。第2章に記載した方法で、PHA-L刺激後、経時的にJurkat細胞の核タンパク質を抽出した。抽出した核タンパク質をpoly(dI-dC)₂存在下で、DIG標識Txk-RE DNA

とインキュベートし、タンパク質と DNA の結合をゲルシフトアッセイで確認した。その結果、PHA-L 刺激後、30~60分をピークとした一過性のDIG 標識Txk-RE DNA の mobility shift が検出された (図 3-10A)。この mobility shift は、PHA-L 刺激した Jurkat 細胞において形成された Txk/PARP-1/EF-1 α からなる複合体の結合によるものと考えられた。

そこで次に、His-Txk-wt、His-EF-1 α 及び GST-PARP1N を用いてインビトロで誘導した 3 分子複合体が、Txk-RE DNA に結合するか検討するために、ゲルシフトアッセイを実施した。His-Txk-wt、His-EF-1 α 及び GST-PARP1N を ATP 存在下で 60 分間インキュベートし、得られたタンパク質複合体サンプルをゲルシフトアッセイに供した。Txk-wt、GST-PARP1N 及び EF-1 α からなる反応において、DIG 標識 Txk-RE DNA の mobility shift が観察された (図 3-10B、レーン 4、矢印)。この mobility shift は、10 倍量の非標識 Txk-RE 二本鎖 DNA を加えた場合に消失し (図 3-10B、レーン 5、矢印)、Txk-RE DNA とは異なる無関係の非標識 DNA (Oct2A、配列: GGAGTATCCAGCTCCGTAGCATGCAAATCCTCTGG) [28] を 10 倍量加えた場合には消失しなかった (図 3-10B、レーン 6、矢印) ことから、Txk-RE DNA に特異的なタンパク質の結合によるものと考えられた。また、この mobility shift は PARP1N のみ (レーン 2)、Txk-wt のみ (レーン 7)、EF-1 α のみ (レーン 8)、また PARP1N/Txk-wt (レーン 3) からなる反応においては認められず、Txk/PARP-1/EF-1 α の 3 分子複合体によるものである可能性が示唆された。

PARP-1 は、DNA 修復等のために配列非特異的に DNA に結合する[46]。GST-PARP1N も DNA 結合ドメインを有しており、同様に DNA に結合する能力があると推察される。そのため、GST-PARP1N を含む反応の全てに認められたバンド (レーン 2~6、二重矢印) は、GST-PARP1N のプローブである DIG 標識 Txk-RE DNA への非特異的結合によるものと推察された。

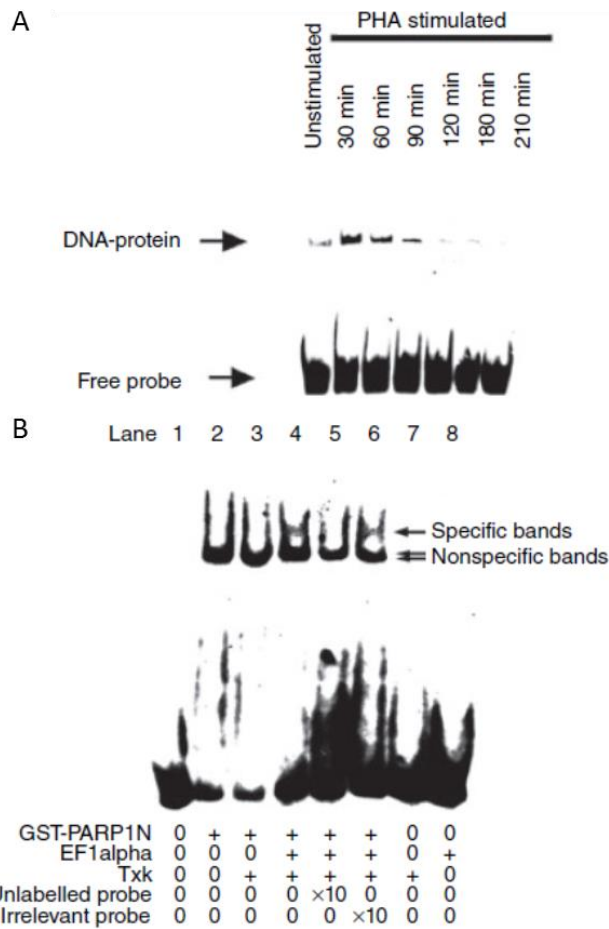


図3-10. IFN- γ プロモーター領域(Txk-RE)への3分子複合体の結合

3分子複合体のIFN- γ プロモーター領域(Txk-RE DNA)への結合能を確認するため、ゲルシフトアッセイを実施した。

(A) PHA刺激Jurkat細胞の核タンパク質を用い、DIG標識Txk-RE DNAへのタンパク質複合体の結合をゲルシフトアッセイで確認した。その結果、PHA刺激後、30~60分をピークとして一過性に、Txk/PAPR-1/EF-1 α からなるタンパク質複合体の結合によるものと考えられるDIG標識Txk-RE DNAの mobility shift が観察された。

(B) His-Txk-wt, His-EF-1 α 及びGST-PARP1Nを用いてインビトロで誘導した3分子複合体が、Txk-RE DNAに結合するか検討するために、ゲルシフトアッセイを実施した。その結果、Txk-wt, GST-PARP1N及びEF-1 α からなる反応において、特異的なDIG標識Txk-RE DNAの mobility shift が観察された(レーン4、矢印)。GST-PARP1Nを含む反応の全てに認められたバンド(レーン2~6、二重矢印)については、GST-PARP1NのDIG標識Txk-RE DNAへの非特異的結合によるものと推察された。

(4) PARP-1 酵素活性の Txk 及び Th1 細胞機能に及ぼす影響

これまでに、Txk が PARP-1 及び EF-1 α と 3 分子複合体を形成すること、また複合体形成が、Txk によるチロシンリン酸化によって調節されていることを示してきた。一方で、前述のように PARP-1 は基質のポリ ADP リボシル化を触媒する酵素であり、Txk の機能が PARP-1 の酵素活性によって調節されている可能性も考えられる。

そこで、PARP-1 が Txk をポリ ADP リボシル化するか、ポリ ADP リボシル化アッセイにて検討した。

His-EF-1 α の存在下あるいは非存在下において、His-Txk-wt と酵素活性を有することが示されている市販の全長 PARP-1 (PARP1-wt) を、ポリ ADP リボシル化反応緩衝液の条件で反応させた。反応後、His-Txk-wt を Ni-NTA アガロースレジンで回収し、抗 PAR 抗体でイムノブロッティングを行った (図 3-11A)。また、その後、同じ膜を抗 Txk 抗体でリプロービングした (図 3-11B)。その結果、EF-1 α の存在下で Txk と PARP1-wt を反応させた場合、200 kDa 付近に抗 PAR 抗体が反応する強いシグナルがみられた (図 3-11A、矢印)。抗 Txk 抗体でリプローブしたところ、同じ位置に抗 Txk 抗体の反応がみられた (図 3-11B、矢印)。このことから、このシグナルは高度にポリ ADP リボシル化された Txk のシグナルであると考えられた。抗 Txk 抗体で検出されたものの、抗 PAR 抗体でほとんど反応が認められない、97 kDa 付近のタンパク質 (図 3-11B、矢頭) については、ポリ ADP リボシル化を受けていない、あるいはわずかにポリ ADP リボシル化修飾を受けた Txk と推察された。

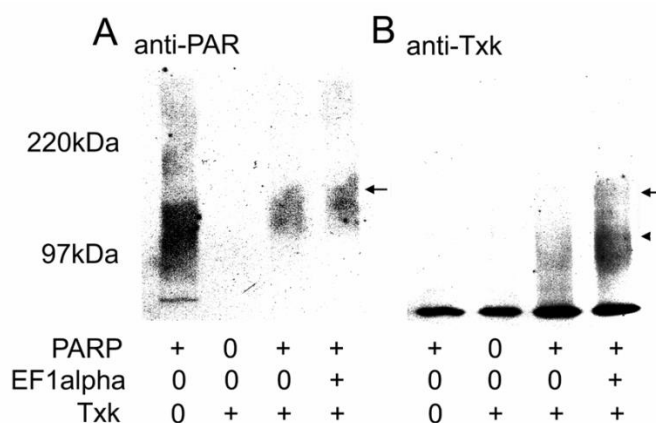


図3-11. PARP-1によりT_{xk}のポリADPリボシル化

PARP-1によりT_{xk}がポリADPリボシル化される可能性について検討するため、ポリADPリボシル化アッセイを実施した。His-EF-1 α の存在下あるいは非存在下において、His-T_{xk}-wtと酵素活性を有する市販の全長PARP-1を反応させた。反応後、His-T_{xk}-wtをNi-NTAアガロースレジンで回収し、抗PAR抗体(A)及び抗T_{xk}抗体(B)でウエスタンブロッティングを行った。その結果、200kDa付近に、高度にポリADPリボシル化されたT_{xk}と考えられるシグナルが検出された(A及びB、矢印)。抗T_{xk}抗体で検出されたが、抗PAR抗体でほとんど反応が認められない97kDa付近のタンパク質(B、矢頭)については、ポリADPリボシル化を受けていない、あるいはわずかにポリADPリボシル化修飾を受けたT_{xk}と推察された。

この結果から、T_{xk} は PARP-1 によりポリ ADP リボシル化修飾を受けることが示唆された。そこで次に、PARP-1 の酵素活性の阻害により、Th1 及び Th2 細胞の機能にどのような影響を及ぼすか検討した。健康人より採取した末梢血リンパ球 (PBL) からの PHA-L 刺激による IFN- γ 及び IL-4 産生に及ぼす

PARP-1 阻害剤、PJ34 (Merck) の影響について検討した。ヒト PBL に最終濃度が 4000 nM になるように PJ34 を添加し、その 1 時間後から PHA-L 刺激を開始した。PHA-L 刺激 24 時間後に培養上清を回収し、上清中の IFN- γ 及び IL-4 濃度を ELISA で測定した。その結果、PJ34 は IFN- γ の産生を強く抑制した。その一方で、IL-4 の産生にはほとんど影響を及ぼさなかった (図 3-12)。

これらの結果から、PARP-1 は Th1 サイトカインの産生に強く関与し、Th2 サイトカインの産生にはほとんど関与していない可能性が示唆された。また、PARP-1 による Th1 サイトカインの産生の促進に、Txk のポリ ADP リボシル化が関与している可能性が推察された。

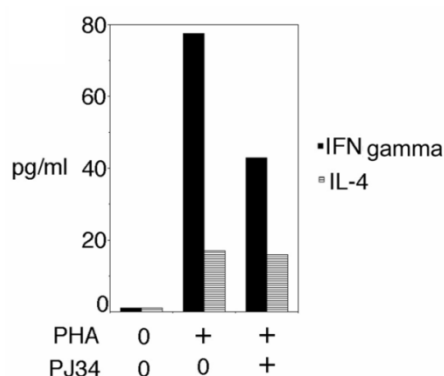


図3-12. PARP-1の酵素活性によるTh1細胞機能調節

PARP-1の酵素活性の阻害によるTh1及びTh2細胞の機能への影響について検討した。健康人より採取した末梢血リンパ球(PBL)に、最終濃度が4000nMになるようにPARP-1阻害剤であるPJ34を添加し、その1時間後にPHA-L刺激を開始した。PHA-L刺激24時間後に培養上清を回収し、上清中のIFN- γ 及びIL-4濃度をELISAにより測定した。その結果、PJ34はIFN- γ の産生を強く抑制した。その一方で、IL-4の産生にはほとんど影響を及ぼさなかった。

(5) Txk の活性化に伴う複合体形成の共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析

細胞内における Txk、PARP-1 及び EF-1 α の分子間相互作用を検討するため、共焦点レーザー顕微鏡を用いた検討を実施した。共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析を実施するため、最初に GFP-PARP-1、DsRed monomer-Txk (DsRed-Txk) 及び CFP-EF-1 α 融合タンパク質発現ベクターを作製した (実験材料の項を参照)。これらのベクターを組み合わせて、COS7 細胞にトランスフェクトした。また、Txk のリン酸化・活性化を促進するため、恒常的活性化型変異体 Fyn (FynY531F、active Fyn) を、あるいは陰性対照として不活性化型変異体 Fyn (FynK299M、inactive Fyn) を同時にトランスフェクトした。

DsRed-Txk は、inactive Fyn とコトランスフェクトした場合（不活性化条件）、主に細胞質に分布していた。一方で、active Fyn をコトランスフェクトした場合（活性化条件）は、核における集積が観察された（図 3-13A）。GFP-PARP-1 は恒常的に核に分布しており、活性化条件において、PARP-1 と Txk の核における共局在が観察された（図 3-13B）。反対に、EF-1 α は不活性化条件において、大部分が細胞質に分布しており、活性化に伴って Txk と EF-1 α の核における共局在が観察された（図 3-13C）。CFP-EF-1 α 、GFP-PARP-1 及び DsRed-Txk を active Fyn とともにトランスフェクトしたところ、核における 3 分子の共局在が観察された（図 3-13D）。

第 2 章で、Jurkat 細胞の活性化に伴い Txk/EF-1 α /PARP-1 複合体が IFN- γ プロモーター領域 DNA に結合することを示した。COS7 細胞に発現させた Txk/EF-1 α /PARP-1 の細胞内局在の観察結果は、核における 3 分子複合体の形成を支持していると考えられた。

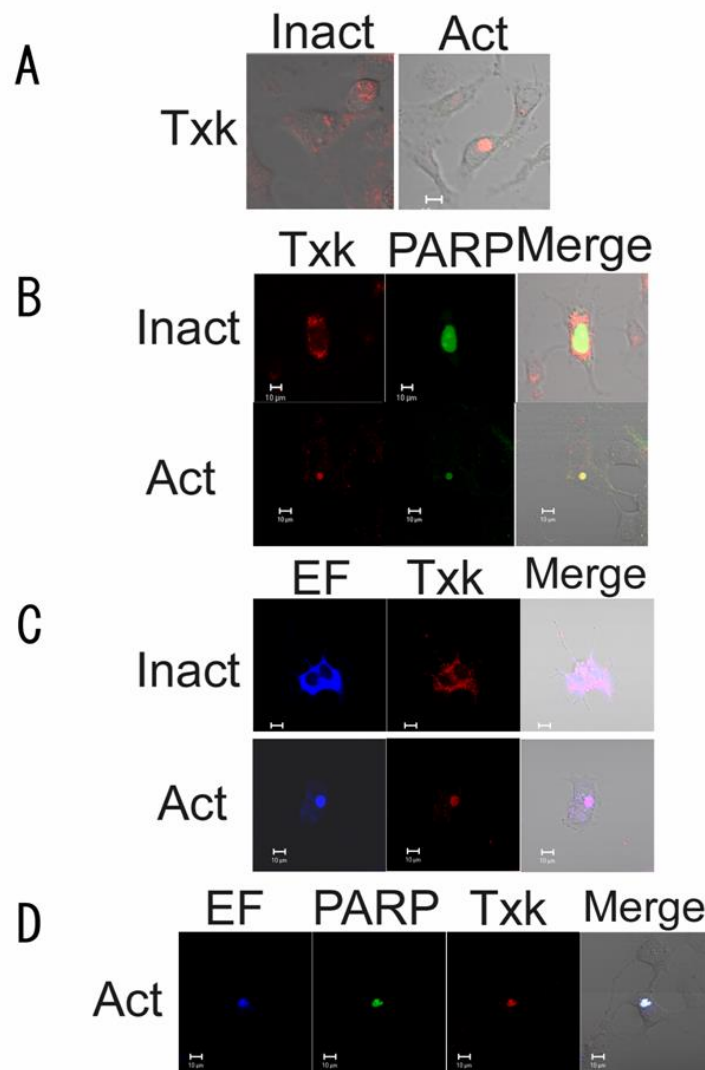


図3-13. Txkの活性化に伴う複合体形成の共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析

細胞内におけるTxk、PARP-1及びEF-1 α の局在を観察するため、共焦点レーザー顕微鏡を用いた検討を実施した。GFP-PARP-1、DsRed-Txk及びCFP-EF-1 α 融合タンパク質発現ベクターを種々組み合わせで、COS7細胞にトランスフェクトした。また、Txkのリン酸化・活性化を促進するため、active Fyn (FynY531F)を、あるいは陰性対照としてinactive Fyn (FynK299M)を同時にトランスフェクトした。

(A)DsRed-Txkは、inactive Fynとともにトランスフェクトした場合(不活性化条件)、主に細胞質に分布していた。一方で、active Fynとともにトランスフェクトした場合(活性化条件)は、核における集積が観察された。

(B)GFP-PARP-1は恒常的に核に分布しており、活性化条件において、PARP-1とTxkの核における共局在が観察された。

(C)EF-1 α は不活性化条件において、大部分が細胞質に分布しており、活性化に伴ってTxkとEF-1 α の核における共局在が観察された。

(D)CFP-EF-1 α 、GFP-PARP-1及びDsRed-Txkをactive Fynとともにトランスフェクトしたところ、核における3分子の共局在が観察された。

5. 考察

Txkは、T細胞受容体 (TCR) 刺激に伴って核内に移行し、IFN- γ プロモーター領域 (Txk-RE) DNAに結合して、IFN- γ の転写活性化を調節していることはすでに報告されている[27-28]。また、第2章において、TxkがPARP-1及びEF-1 α と複合体を形成し、Txk-RE DNAに結合していることを示した(図2-1)。本章において、この3分子複合体がTxkのキナーゼ活性に依存して形成されることを示した。Txkは、IFN- γ の転写活性化を特異的に誘導する[27]ことから、Txk、PARP-1及びEF-1 α との複合体の形成は、Th1特異的な免疫反応を調節するシグナル伝達経路の中で重要な役割を担っていることが示唆された。

1) 複合体形成におけるTxkのキナーゼ活性及びTxkの自己リン酸化の役割

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る。同じTecファミリーキナーゼであるinterleukin-2-inducible T-cell kinase (Itk) は、TCR刺激に伴い、SrcファミリーキナーゼであるLckによって511番目のチロシン残基 (Y511) がリン酸化される (transphosphorylation) [47]。また、Y511がリン酸化されることによって180番目のチロシン残基 (Y180) の自己リン酸化 (autophosphorylation) が誘導され、自己リン酸化されたItkは、Phospholipase C (PLC) γ 1のリン酸化・活性化に働く[47]。同じTecファミリーのキナーゼであるTecの活性も、Lckによるtransphosphorylation及びautophosphorylationによって調節されている[48]。Txkは、ItkやTecと同様にTCR刺激に伴ってSrcファミリーキナーゼのFynによって420番目のチロシン残基 (Y420) がリン酸化される (transphosphorylation) [49]。また、Txkは、91番目のチロシン残基 (Y91) を自己リン酸化し、この自己リン酸化がIFN- γ の発現の誘導に重要であることが示さ

れている[43]。

本章におけるインビトロキナーゼアッセイにおいて、Txk-wtが自己リン酸化すること、キナーゼドメインを欠失したTxk-kdでは自己リン酸化が認められないことを確認した(図3-3)。また、Txk-wtはPARP-1及びEF-1 α をリン酸化することを示した(図3-4、3-5)。さらにプルダウンアッセイでは、Txk/PARP-1/EF-1 α の3分子の相互作用が確認された(図3-7)。PARP-1及びEF-1 α のチロシンリン酸化についてはこれまでに報告されていないが、3分子複合体の形成がATPの存在に依存していた(図3-8)ことから、複合体の形成がTxkのキナーゼ活性を引き金に起こっていることが示唆された。さらに、Txkのキナーゼドメインを欠失した変異体(Txk-kd)及びTxkのATP結合部位のリジンをグルタミン酸に置換したTxk-K299Eでも全く複合体の形成は認められず(図3-9)、複合体形成がTxkのキナーゼ活性に依存していることが確認された。また、Txkの自己リン酸化部位であるY91をアラニンに置換した変異体(Txk-Y91A)を用いた場合でも複合体の形成は全く認められず、TxkのY91の自己リン酸化が複合体の形成に重要な役割を担っていると考えられた。Jurkat細胞にTxk Y91A変異体を発現させた場合、Txk-wtを発現させた場合と比べて、IFN- γ の転写活性化が特異的に抑制されることが示されており[43]、Y91A変異によるIFN- γ 発現の低下が、3分子複合体の形成の障害に起因する可能性が示唆された。

2) 複合体形成におけるPARP-1及びPARP-1酵素活性の役割

PARP-1は、NF κ Bに依存する遺伝子発現に関与する[50、51]が、PARP-1欠損細胞においても、刺激に応じたIkBの分解、NF κ B p65の核への移行は起こる。しかしながら、NF κ Bの応答配列DNAへの結合[50]や、NF κ Bに依存した転写活性化[51]は低下することが示されている。これらの報告は、PARP-1がコアクチベーターとしてNF κ B依存的遺伝子発現に関わることを示唆していると考えられる。NF κ Bの転写調節において、PARP-1の酵素活性が重要な働きを示すことが報告されている。Chiarugiらは、PARP-1阻害剤である6(5H)-phenanthridinoneが、PMA/ionomycin刺激によるラットリンパ球のIFN- γ 、IL-2及びTNF- α mRNA発現を抑制すること、また、LPS刺激によるグリア細胞のTNF- α mRNA発現を抑制することを報告している[52-53]。その一方で、PARP-1の酵素活性はNF κ Bによる転写調節に必要ではないとする報告もある[50]。NF κ Bは、PARP-1によりポリADPリボシル化されることが示されており[54]、何らかの修飾を受けると考えられるが、転写調節機構におけるPARP-1酵素活性の寄与については、個々の遺伝子や細

胞のタイプ、実験条件等によって異なる可能性が考えられる。

本章における検討で、PARP-1によるTxkのポリADPリボシル化が観察された。PARP-1の触媒機能によるキナーゼ活性の調節に関しては、いくつか報告がある。DNA修復に関わるキナーゼである DNA dependent kinase (DNA-PK) は、PARP-1をリン酸化し、リン酸化された PARP-1 は DNA-PK をポリADPリボシル化することが報告されている[55]。DNA-PK の活性は、PARP-1によるポリADPリボシル化修飾によって活性化される。また、LPS刺激によって誘導される p38 mitogen activated protein (MAP) kinase の活性化と p38 MAP kinaseの基質であるATF-2のリン酸化が、PARP-1欠損細胞では低下していることが示されている[56]。これらのキナーゼと同様に、Txkのキナーゼ活性あるいはTxk-RE DNAへの結合活性も、PARP-1の酵素活性によって調節されている可能性が考えられる。本研究では、PARP-1酵素阻害剤であるPJ34がヒトPBLからのIFN- γ 産生を抑制すること（図3-12）、その一方で、IL-4産生にはほとんど影響しないことを示した。この結果から、PARP-1の酵素活性は、特にTh1細胞の機能調節に重要であると考えられ、この調節機構に、少なくとも一部、Txk複合体の形成を介するメカニズムが関与していると考えられた。また、PARP-1の酵素活性は、Txkを介するIFN- γ の転写活性化を促進する方向に働いていると考えられた。

3) 複合体形成におけるEF-1 α の役割

EF-1 α は、アミノアシル-tRNAのリボゾームへの転移を触媒し、ペプチド伸長に関わる分子であり、主に細胞質に局在している[57-58]が、ヒト上皮様細胞癌由来細胞株A431細胞において、EGF受容体シグナルの活性化により、一部のEF-1 α 分子が核に移行することが報告されている[59]。そのため、T細胞においても、TCR刺激により、少なくとも一部のEF-1 α がTxkとともに核内に移行し、Txkを介したIFN- γ の転写活性化に関与している可能性が示唆された。また、インビトロキナーゼアッセイにより、TxkによるEF-1 α のチロシンリン酸化が証明されたことから（図3-5）、EF-1 α の細胞質から核への移動が、EF-1 α のチロシンリン酸化によって調節されている可能性が考えられた。ただ、細胞内シグナル分子としてのEF-1 α の機能に関する報告は少なく、そのメカニズムの解明には更なる検討が必要と考えられる。

リンパ球分化・機能に対するEF-1 α の関与については、EF-1 α に変異を有するマウスの研究から示唆されている。Wasted マウス (wst/wst) は、常染色体性のEF-1 α 2 の劣性変異を有する自然発症マウスで、

EF-1 α 1及びEF-1 α 2の両方のmRNA発現の低下により、EF-1 α が欠乏している[60]。Wasted マウス (wst/wst) は、出生後、野生型マウスと比較して体重が減少し、出生後30日前後で死に至る[60]。Wasted マウス (wst/wst) では、胸腺、脾臓の委縮及び胸腺細胞数、末梢リンパ球数の低下、胸腺細胞のアポトーシス亢進が認められているおり、免疫不全を呈する[61-62]。また、Wasted マウス (wst/wst) の胸腺細胞及び脾臓細胞のマイトジェン (Concanavalin A) に対する応答にも変化が認められており、T細胞の機能変化も示唆される[61]。これらの異常は、リンパ球の分化・機能におけるEF-1 α の重要性を示していると考えられる。本研究では、EF-1 α がT α kを介する免疫調節機構に関与している可能性を示したが、EF-1 α がT α kを介するIFN- γ 遺伝子の転写調節機構に深く関与していることを明らかにするためには、Wasted マウス (wst/wst) のT細胞を用いた検討が必要と考えられた。

4) 細胞内における3分子複合体の局在

細胞内における3分子間の相互作用を確認するため、それぞれの分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た。PARP-1は恒常的に核内に局在していた。T α kは、非活性化条件においては、主に細胞質に存在していたが、active Fynの存在下で、核に局在する像が観察された。EF-1 α については、主に細胞質に認められたが、核内において明らかな量のEF-1 α が存在する細胞も認められた。マルチカラー解析の結果、活性化に伴ったT α k、PARP-1及び EF-1 α の核における集積を確認した (図3-13D)。これら3分子がオーバーラップする領域は、核よりも少し小さい領域であった (図3-13D) ことから、これら3分子は活性化に伴い、核内の限られた領域に集積している可能性が示唆された。

本章の結果から、T α k複合体を介するシグナルが複数のステップを経て伝達されることが考えられた。最初に、TCRを介した刺激によりT α kの自己リン酸化が起こり (1stステップ)、これを引き金にT α k/PARP/EF-1 α の複合体形成 (2ndステップ)、3分子複合体のIFN- γ プロモーター領域の T α k-RE DNA への結合 (3rdステップ) が誘導され、最終的にIFN- γ の転写が活性化されると考えられた (図3-14)。

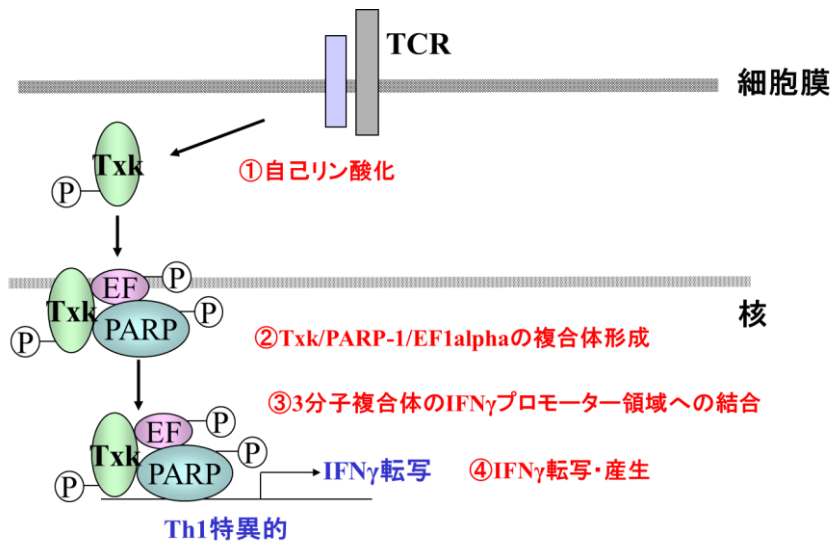


図3-14. Tsk複合体を介するシグナル伝達系の模式図

第4章 TskによるIFN- γ 遺伝子転写活性化を終息させるメカニズム

～核内に存在するタンパク質チロシン脱リン酸化酵素の関与～

1. 研究の目的

第2及び3章において、TskがPARP-1及びEF-1 α と複合体を形成し、IFN- γ プロモーター領域のTsk responsive element (Tsk-RE)と結合してIFN- γ の転写活性化を促進している可能性を示した(図2-1)。また、このTsk複合体を介した機構には、Tskのキナーゼ活性及びTskの91番目のチロシン残基(Y91)のリン酸化が必要であることを示した(図3-8、図3-9)。その一方で、Jurkat細胞において、Tsk複合体のTsk-RE DNAへの結合は、T細胞受容体(TCR)刺激後1時間以降、徐々に低下することを示した(図3-10)。このため、核において、Tsk複合体によるIFN- γ 転写活性化を終息させるために、何らかのProtein-tyrosine phosphatase (PTP)がTskの脱リン酸化に働いている可能性が示唆された。

ヒトゲノムには、100以上のPTPがコードされている。PTPは4つのクラスからなり、T細胞は少なくとも60種のPTPを発現していることが示されている[63]。そのうちのclass Iに属するclassical PTPは、さらに受容体型PTPと非受容体型PTPからなる[63、64]。非受容体型PTPの多くは細胞質に発現しており、核内に局在するPTPは少ないが、主要な非受容体型PTPのひとつであるT-cell PTP(以下、TCPTP)は、核移行シグナル(nuclear localization signal sequences : NLS)を有し、核内で働くPTPとして知られている[63]。

TCPTPは、主要な非受容体型PTPのひとつであり、その構造はN末端側の触媒ドメインとC末端側の非触媒領域からなる[65]。また、TCPTPにはC末端領域の構造が異なる2つの選択的スプライシングバリエント(TC45及びTC48)が存在する(図4-1)。両アイソフォームは、いずれもC末端側の非触媒ドメインにNLSを有し、TC45は主に核内に分布する。一方、TC48はC末端に19アミノ酸からなる小胞体標的配列(endoplasmic reticulum targeting segment)と考えられる疎水性領域を有し、細胞質に局在することが報告されている[65]。

最近のgenome-wide association study(以下、GWAS)において、TCPTPをコードする遺伝子(PTPN2)が、クローン病[66]、一型糖尿病[67]、関節リウマチ[68]など、自己免疫疾患に関連していることが示唆

されている。また、一型糖尿病との関連が報告されている PTPN2 allele と IL-2 受容体シグナルの低下の関係が報告されている[69]。さらに、TCPTP 欠損マウスでは、進行性の全身性炎症が発症すること[70、71]、T 細胞特異的 TCPTP 欠損マウスの T 細胞において、TCR シグナルが亢進することが示されている[72]。

これらのことから、本章では、TCPTP が核内における Txk の脱リン酸化に働き、IFN- γ 転写活性化をネガティブに調節しているとの仮説をたて、検討を行った。

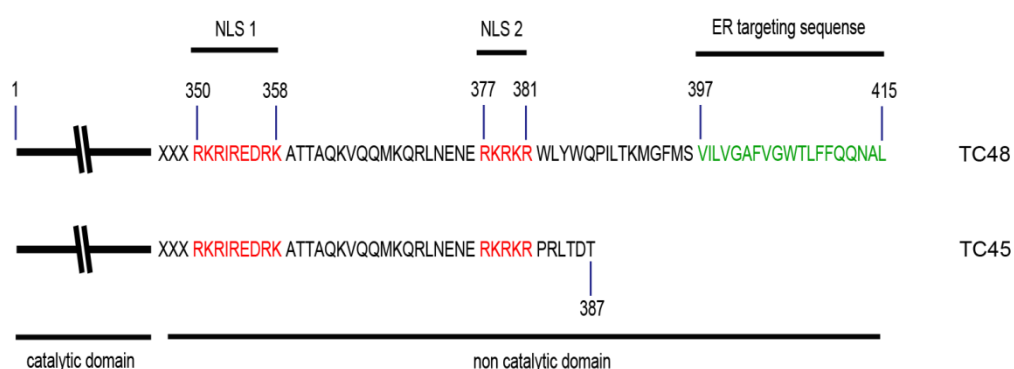


図 4-1. 核型 TCPTP (TC45) と細胞質型 TCPTP (TC48) のドメイン構造

2. 実験材料

(1) プラスミドベクター

1) GFP-Txk、DsRed-TC45 及び DsRed-TC48 発現ベクター

pQE31-Txk-wt を鋳型にして PCR にて全長 Txk 遺伝子を増幅し、pAcGFP (Clontech) に導入した (GFP-Txk 発現ベクター)。また、Jurkat 細胞の cDNA を鋳型にして PCR にて TC45 及び TC48 遺伝子を増幅し、pDsRed monomer (Clontech) に導入した (DsRed-TC45 及び DsRed-TC48 発現ベクター)。なお、いずれのベクターも、それぞれの蛍光タンパク質の N 末端側に目的のタンパク質が融合するタンパク質を発現するようにデザインした。

2) 恒常的活性化型 Fyn 発現ベクター

恒常的活性化型 Fyn (Fyn Y531F : active Fyn) 発現ベクターは、東京大学の豊島久真男博士より供与された[45]。

(2) COS7 細胞 (アフリカミドリザル腎臓由来の細胞 (ATCC))

10% FCS、ペニシリン (100 units/mL)、ストレプトマイシン (100 µg/mL) (いずれも、Gibco) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地 (Gibco) を用いて維持培養した。

(3) 抗体

ウサギ抗 GFP ポリクローナル抗体 (Clontech)、マウス抗 GFP モノクローナル抗体 (JL-8 : Clontech)、抗リン酸化チロシン抗体 (4G10 : Upstate)、ヤギ抗ヒト/マウス/ラット TCPTP ポリクローナル抗体 (以下、抗 TCPTP 抗体、R&D systems)。

(4) その他の試薬

リポフェクタミン 2000、リポフェクタミン LTX (いずれも、ライフテクノロジーズジャパン)、プロテアーゼインヒビターカクテル、ホスファターゼインヒビターカクテル (いずれも、ロシュ)、BCA プロテインアッセイキット (Thermo Fisher Scientific)、正常ウサギ IgG、protein G アガロースビーズ (いずれも、Santa Cruz Biotechnology)

3. 実験方法

(1) COS7 細胞における TC45 あるいは TC48 による Txk の脱リン酸化の評価

1) COS7 細胞への遺伝子導入

COS7 細胞を 60 mm ディッシュ (ファルコン) に播種し、ペニシリン・ストレプトマイシン非添加の DMEM 10% FCS 培地で培養した。翌日、細胞がサブコンフルントになった時点で、リポフェクタミン 2000 あるいは LTX を用いて、GFP-Txk 発現ベクター単独、あるいは GFP-Txk 発現ベクターを DsRed-TC45 あるいは DsRed-TC48 発現ベクターとともに COS7 細胞にトランスフェクトした。また、Txk の活性化のために、active Fyn 発現ベクターを同時にトランスフェクトした細胞を作製した。

2) Whole cell lysate 及び細胞質タンパク質、核タンパク質の回収

トランスフェクト 24 時間後に、細胞に lysis buffer (50 mM Tris-HCl, (pH 7.4), 0.25% Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, プロテアーゼインヒビターカクテル、ホスファターゼインヒビターカクテル) を加えて、細胞を溶解し、遠心分離により上清 (Whole cell lysate) を回収した。

また、同様にして遺伝子導入した細胞から、細胞質タンパク質と核タンパク質を別々に回収した。こ

これらのタンパク質の回収は、第2章 (2. 3. (3)) に記載の方法と同様にして行った。

3) 免疫沈降

前項で採取した各タンパク質サンプルの濃度を BCA プロテインアッセイキットにて測定した。Whole cell lysate 及び核タンパク質サンプル中の Txk タンパク質を回収するため、標識である GFP に対するポリクローナル抗体を用いた免疫沈降を実施した。タンパク質量を調整したタンパク質サンプルに、正常ウサギ IgG と protein G アガロースビーズを加えて、4°C で 1 時間反応させ、非特異的に結合するタンパク質を除去した (プレクリア)。プレクリア後、遠心分離にて上清を回収し、その上清に抗 GFP ポリクローナル抗体を添加して、4°C で一晩反応させた後、protein G アガロースビーズを添加して、さらに 4°C で 3 時間反応させた。遠心分離により、ビーズを回収し、lysis buffer にて 3 回洗浄した。回収したビーズに、サンプルバッファー (Life Technologies) を添加し、70°C、10 分間処理して免疫沈降されたタンパク質を回収した。

4) イムノブロットティング

上記操作にて得られた種々タンパク質サンプルを SDS-PAGE で展開し、PVDF 膜 (Life Technologies) に転写して、抗リン酸化チロシン抗体 (4G10)、抗 GFP モノクローナル抗体 (JL-8)、抗 TCPTP 抗体にてイムノブロットティングを行った。

5) リン酸化 Txk シグナル/総 Txk のシグナル比 (pTxk/Txk 比) の解析

イムノブロットティングの結果をスキャナー (エプソン) で取り込み、抗リン酸化チロシン抗体 (4G10) で検出されたリン酸化 Txk のシグナルと、抗 GFP モノクローナル抗体 (JL-8) で検出されたシグナル (総 Txk) の強度を Adobe Photoshop (CS5 version 12.0.4.) で測定し、それぞれの値から、pTxk/Txk 比を算出してヒストグラム化した。

4. 結果

(1) TC45 及び TC48 の COS7 細胞内における分布

最初に、トランスフェクト後の COS7 細胞における TC45 及び TC48 の分布について検討した。GFP-Txk と DsRed-TC45 あるいは DsRed-TC48 発現ベクターをトランスフェクトした COS7 細胞の細胞質タンパク質及び核タンパク質画分を別々に抽出し、SDS-PAGE で展開して抗 TCPTP 抗体でイムノブロットティ

ングを実施した。その結果、TC45 は細胞質及び核の両方に存在していた (図 4-2、レーン 3)。一方で、TC48 については、主に細胞質で認められ、核タンパク質ではほとんど検出されなかった (図 4-2、レーン 4~6)。このことから、TC45 のみが核内に分布することが確認できた。

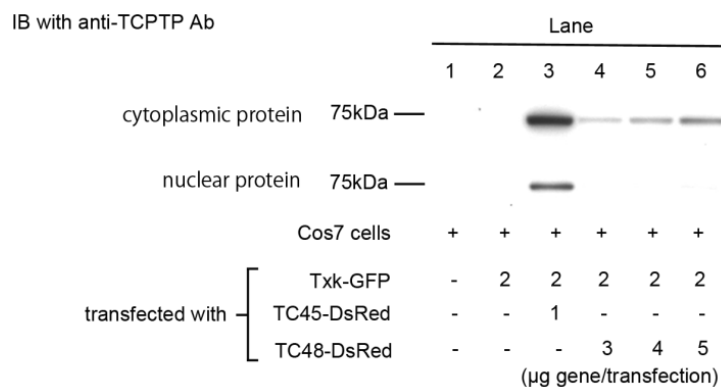


図4-2. TC45及びTC48のCOS7細胞内における分布

トランスフェクトしたDsRed-TC45及びDsRed-TC48のCOS7細胞内における分布を確認するために、細胞質タンパク及び核タンパク質画分を回収し、抗TCPTP抗体を用いたイムノブロットング (IB) を行った。DsRed-TC45 (分子量: 28+45kDa) は、細胞質 (上段) と核 (下段) の両方で認められた。一方、DsRed-TC48 (分子量: 28+48kDa) は、細胞質 (上段) でのみ認められた。

(2) TC45 あるいは TC48 による Txk の脱リン酸化

TC45 及び TC48 の共発現による Txk のリン酸化に及ぼす影響を検討するため、免疫沈降法により、リン酸化 Txk レベルについて検討した。GFP-Txk 発現ベクターを単独で、あるいは DsRed-TC45、DsRed-TC48 発現ベクターとともに COS7 細胞にトランスフェクトした。また、Txk の活性化のため active Fyn を同時に共発現させた場合についても検討した。Whole cell lysate を回収して、抗 GFP ポリクローナル抗体を用いて免疫沈降し、リン酸化 Txk を抗チロシンリン酸化抗体 (4G10) で検出した。その結果、Txk のリン酸化は、active Fyn 非存在下においてもある程度認められた (図 4-3A、レーン 2) が、active Fyn の共発現により、さらに Txk のリン酸化が増加した (図 4-3A、レーン 4)。active Fyn 非存在下における Txk のリン酸化は、COS7 細胞の内因性のキナーゼによる影響である可能性が推察される。これらの Txk のリン酸化は、いずれも TC45 の共発現により顕著に抑制された (図 4-3A、レーン 3 及び 5)。これに対して、TC48 と共発現させた場合は、Txk のリン酸化レベルにほとんど変化が認められなかった (図 4-3B)。

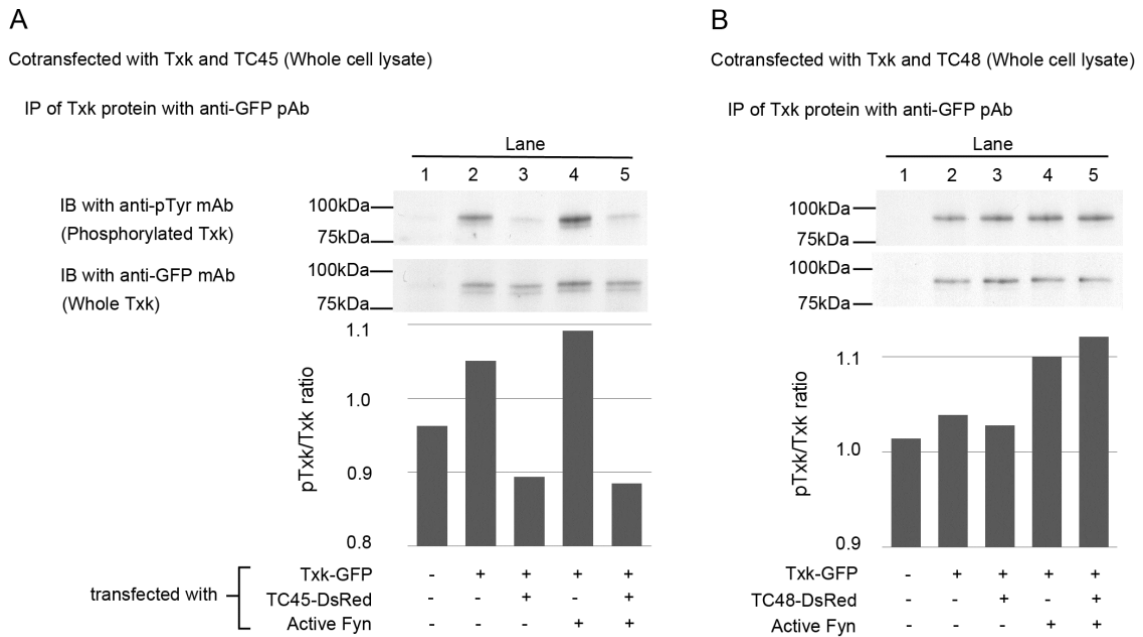


図4-3. TC45あるいはTC48によるTxkの脱リン酸化 (whole cell lysateを用いた検討)

COS7細胞におけるTxkのリン酸化に及ぼすTC45(A)及びTC48(B)の共発現の影響について免疫沈降法 (IP)で検討した。上段は抗リン酸化チロシン抗体 (4G10)、中段は抗GFP抗体 (JL-8)を用いたイムブロットティング (IB)の結果を示す。下段のヒストグラムは、リン酸化Txk/総Txk (pTxk/Txk)比を表す。TC45は、active Fynの存在、非存在に関わらず、Txkを脱リン酸化した(A)。一方、TC48はTxkの脱リン酸化を誘導しなかった。

Txk は活性化・リン酸化に伴い核内に移行することが示されていることから[27、43]、核タンパク質中のリン酸化Txkのレベルについて同様の方法で検討した。前記と同様にして、COS7細胞に、GFP-Txk、DsRed-TC45、DsRed-TC48及びactive Fyn発現ベクターをトランスフェクトし、核タンパク質画分を抽出して、免疫沈降を実施し、イムブロットティングで解析した。その結果、GFP-Txkをトランスフェクトした細胞の核タンパク質画分において、Fyn存在下、非存在下のいずれにおいてもリン酸化Txkが検出された (図4-4: レーン2及び8)。これらの、Txkのリン酸化は、TC45の共発現によって顕著に抑制された (図4-4: レーン3及び9)。しかしながら、TC48を共発現させた場合、active Fynの非存在下では、Txkの脱リン酸化が全く認められず、むしろ、リン酸化が増強された。また、このTC48によるTxkのリン酸化の増強は、TC48の発現量に依存していた (図4-4: レーン4~6)。一方、active Fyn存在下では、TC48は発現量に依存してTxkの脱リン酸化を誘導した (図4-4: レーン10~12)。ただし、active Fyn存在下における、TC48によるTxkの脱リン酸化は、TC45による脱リン酸化に比べて部分的であった。

Cotransfected with Txk and TC45 or TC48 (Nuclear protein)

IP of Txk protein with anti-GFP pAb

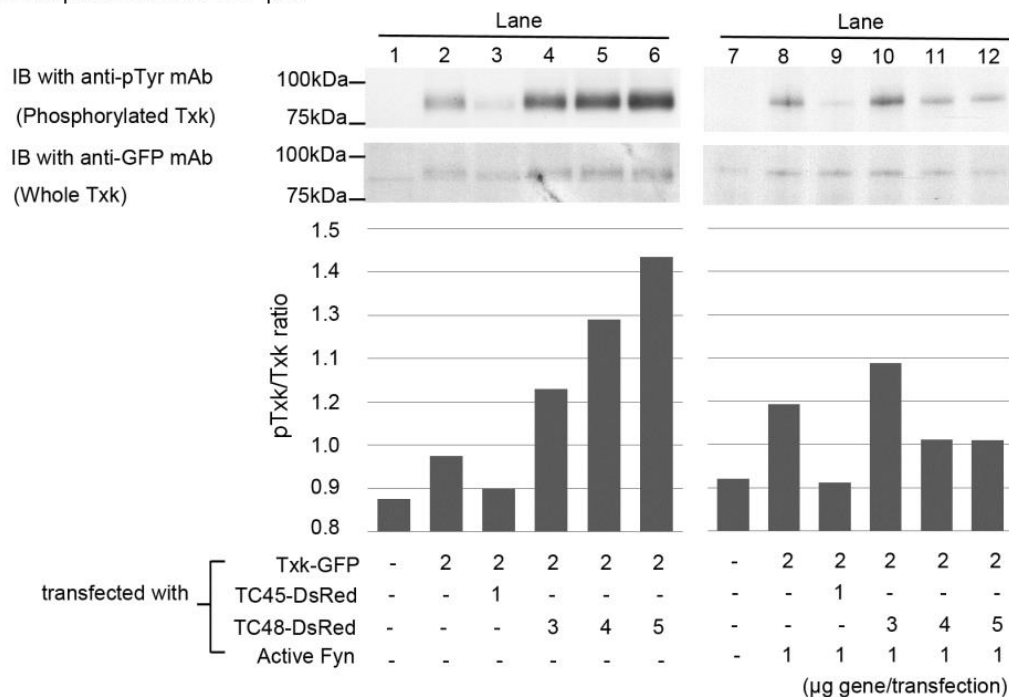


図4-4. TC45あるいはTC48によるTxkの脱リン酸化(核タンパク質を用いた検討)

COS7細胞におけるTxkのリン酸化に及ぼすTC45及びTC48の共発現の影響について免疫沈降法(IP)で検討した。上段は抗リン酸化チロシン抗体(4G10)、中段は抗GFP抗体(JL-8)を用いたイムノブロットィング(IB)の結果を示す。下段のヒストグラムは、リン酸化Txk/総Txk(pTxk/Txk)比を表す。TC45は、active Fynの存在、非存在に関わらず、Txkを脱リン酸化した(レーン3及び9)。TC48は、active Fyn非存在条件では、Txkを脱リン酸化せず、むしろ亢進した(レーン4-6)が、active Fyn存在条件では、Txkの部分的な脱リン酸化を誘導した(レーン10-12)。

5. 考察

ヒト Tec ファミリーチロシンキナーゼである、Bruton's tyrosine kinase (Btk) [73, 74]、interleukin-2-inducible T-cell kinase (Itk) [75]及びTxk[27, 76]は、刺激により核内に移行することが報告されている。前章までにTxkがPARP-1及びEF-1αと核において複合体を形成し、IFN-γプロモーター領域DNA(Txk-RE)に結合すること、またこの機構がTxkのキナーゼ活性に依存して働くことを示した。一方で、チロシンキナーゼのカウンターパートとしては、チロシン脱リン酸化酵素 (protein tyrosine phosphatase : PTP) が考えられるが、T細胞において約60種類のPTPが認められているにもかかわらず、核内に存在するPTPは、TCPTPを含めて数種類しか知られておらず[63, 64]、その機能は十分解明されていない。

近年、核に分布するTCPTPアイソフォームであるTC45が核コンパートメントで、signal transducer and activator of transcription (STAT) 1, 3及び6を脱リン酸化することが報告された[77-80]。STATは、リン

パ球的分化やサイトカイン受容体を介するシグナル伝達に必須の分子であり、TC45 が免疫機能に重要や役割を担っていると考えられる。本研究では、STAT と同様に、TCPTP が核において Txk の脱リン酸化に働き、Txk 複合体による IFN- γ 転写活性化をネガティブに調節しているとの仮説をたて、検討を行った。

その結果、COS7 細胞において、TC45 が Txk を脱リン酸化すること、細胞質に局在するアイソフォームである TC48 は Txk を脱リン酸化しないことを示した。

active Fyn を共発現しない条件では、TC48 はむしろ、Txk のリン酸化を発現量依存的に促進した (図 4-4 : レーン 4~6)。この分子メカニズムについては、まだ解明できていない。ただ、active Fyn を共発現しない条件においても、COS7 における Txk のリン酸化はある程度認められており (図 4-3A 及び B : レーン 2、図 4-4 : レーン 2)、COS7 の細胞内に Txk のリン酸化調節に関与する内因性の分子が存在すると推察される。TC48 は、細胞質において、これらの分子を基質として認識し、その活性を調節することによって、結果として Txk のリン酸化を亢進した可能性が推察された。

一方で、active Fyn を共発現する条件では、TC48 の共発現により、部分的ではあるが Txk の脱リン酸化が認められた。Fyn は不活性化状態において、C 末端の 531 番目のチロシン残基 (Y531) がリン酸化されており、不活性化状態に維持されているが、Y531 の脱リン酸化により、構造変化を起こし、キナーゼドメインの活性化ループにある Y417 が自己リン酸化され、活性化すると考えられている[81]。active Fyn は Y531 がフェニルアラニンに置換されており (Y531F)、恒常的に Y417 の自己リン酸が誘導される。一方で、TCPTP は、Fyn の Y417 の脱リン酸化に働くことが示されている[72]。このため、active Fyn を共発現させた条件では、TC48 によって、細胞質にある active Fyn (Y531F) の Y417 の脱リン酸化が誘導され、active Fyn の活性が低下し、結果として Txk のリン酸化が相対的に減少した (図 4-4 : レーン 8 と レーン 11 及び 12 の比較) 可能性が推察された。この仮説の検証には、TC48 による active Fyn Y417 の脱リン酸化の検討など、Fyn に焦点を当てた検討を実施する必要がある。

本章の検討から、TCPTP は核における Txk の脱リン酸化を誘導することによって、T 細胞の活性化の調節に重要な役割を担っていることが示唆された。

第5章 Tリンパ球における Txk の脱リン酸化に及ぼす TCPTP の寄与

1. 研究の目的

第4章における検討で、Txk のリン酸化が、TCPTP によって調節されている可能性を示した。そこで、T細胞における内因性の TCPTP によって、Txk のリン酸化が調節されているかどうか検討するために、Jurkat 細胞を用いて検討を行った。Jurkat 細胞における Txk の発現は低いことから[27]、まず GFP-Txk を安定的に発現する Jurkat 細胞を作製した。その後、GFP-Txk 安定発現 Jurkat 細胞の内因性 TCPTP を、TCPTP 特異的な short interference RNA (以下、siRNA) によりノックダウンすることによって、TCPTP の Txk のリン酸化に及ぼす影響について検討した。

2. 実験材料

(1) プラスミドベクター及び siRNA

1) GFP-Txk 発現ベクター及び GFP (empty) 発現ベクター

第4章で記載した GFP-Txk 発現ベクターを使用した。また、GFP (empty) 発現ベクター (空の pAcGFP プラスミド) を対照として使用した。

2) TCPTP 特異的 siRNA 及び scrambled siRNA

TCPTP 特異的 siRNA と、その陰性対照となる scrambled siRNA を Origene 社より購入した。

(2) Jurkat 細胞 (ヒトリンフォーマ由来の T 細胞株 (ATCC))

10% FCS、ペニシリン (100 units/mL)、ストレプトマイシン (100 µg/mL) (いずれも、Gibco) を添加した RPMI1640 培地 (Gibco) を用いて維持培養した。

(3) 抗体

ウサギ抗 GFP ポリクローナル抗体 (Clontech)、マウス抗 GFP モノクローナル抗体 (JL-8 : Clontech)、抗リン酸化チロシン抗体 (4G10 : Upstate)、ヤギ抗ヒト/マウス/ラット TCPTP ポリクローナル抗体 (以下、抗 TCPTP 抗体、R&D systems)、抗 β -actin モノクローナル抗体 (以下、抗 β -actin 抗体 : シグマ)。

(4) その他の試薬

Nucleofector® kit V (Lonza)、G418 (Gibco)、PHA-L (ロシュ)、phorbol 12-myristate 13-acetate (以下、

PMA : シグマ)、プロテアーゼインヒビターカクテル、ホスファターゼインヒビターカクテル (いずれも、ロシュ)、BCA プロテインアッセイキット (Thermo Fisher Scientific)、正常ウサギ IgG、protein A アガロースビーズ (いずれも、Santa Cruz Biotechnology)

(5) 使用機器

Nucleofector™ II system (Lonza)

3. 実験方法

(1) GFP-Txk 及び GFP (empty) 安定発現 Jurkat 細胞の作製

GFP-Txk 及び GFP (empty) 発現ベクターを、Nucleofector™ II system を用いたエレクトロポレーション法によりトランスフェクトした。なお、トランスフェクションは、Nucleofector® kit V キットを使用し、Jurkat 細胞用に最適化された推奨プロトコール (Lonza) に従って実施した。トランスフェクト後、10% FCS 含有、ペニシリン・ストレプトマイシン不含の RPMI1640 培地で2日間培養し、その後、選択培地 (RPMI1640、100 units/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、10% FCS、0.5~1.3 mg/ml G418) に置換し、約4週間培養後、GFP-Txk 及び GFP (empty) 恒常発現細胞クローンを取得した。

(2) GFP-Txk 安定発現 Jurkat 細胞の TCPTP のノックダウン

TCPTP 特異的 siRNA 及び scrambled siRNA を GFP-Txk 安定発現 Jurkat 細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトは、前項と同様に Nucleofector™ II system を用い、同様の方法で実施した。

(3) Jurkat 細胞の活性化に伴う Txk のリン酸化に及ぼす TCPTP ノックダウンの影響

1) Jurkat 細胞の PHA-L/PMA 刺激

6 ウェルプレート (ファルコン) に、 1×10^6 個の GFP-Txk 及び GFP (empty) 安定発現 Jurkat 細胞を播種し、5 µg/ml PHA-L 及び 10 ng/ml PMA (いずれも最終濃度) を添加して、0~150 分間培養した。siRNA をトランスフェクトした GFP-Txk 安定発現 Jurkat 細胞については、siRNA をトランスフェクトした 48 時間後に同様の方法で PHA-L/PMA 刺激した。

2) Whole cell lysate の回収

各時点において細胞を遠心分離により回収し、lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.25 % Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Nonidet P-40, プロテアーゼインヒビターカクテル、ホス

ファクターゼインヒビターカクテル) を加えて、細胞を溶解し、遠心分離により上清 (Whole cell lysate) を回収した。

3) 免疫沈降、イムノブロットィング及びリン酸化 Txk シグナル/総 Txk のシグナル比 (pTxk/Txk 比) の解析

第4章 (4. 3. (1)) に記載した方法と同様にして実施した。ただし、免疫沈降には、protein A アガロースビーズを用いた。

4. 結果

(1) Jurkat 細胞の活性化に伴う Txk のリン酸化

GFP-Txk 安定発現 Jurkat 細胞を PHA-L/PMA 刺激し、0、30、60、90 及び 150 分後の Whole cell lysates を回収して、Txk のリン酸化レベルを解析した。その結果、GFP-Txk 安定発現 Jurkat 細胞における Txk のリン酸化が検出された (図 5-1、レーン 1~5)。Txk のリン酸化は、刺激前にも認められ、刺激後 150 分まで持続的に認められた。なお、GFP (empty) 安定発現 Jurkat 細胞では、刺激後のいずれの時点においても、同様の位置にバンドは見られなかった (図 5-1、レーン 6~10)。

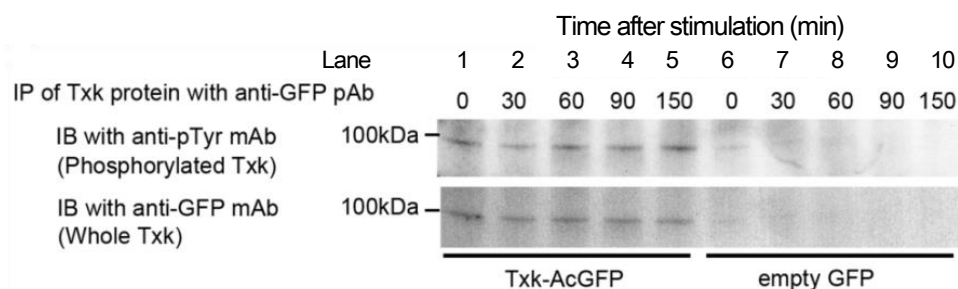


図5-1. Jurkat細胞の活性化に伴うTxkのリン酸化

GFP-Txk 安定発現 Jurkat 細胞を PHA-L/PMA で刺激し、刺激後の Txk のリン酸化について免疫沈降法 (IP) で検討した。上段は抗リン酸化チロシン抗体 (4G10)、下段は抗 GFP 抗体 (JL-8) を用いたイムノブロットィング (IB) の結果を示す。Txk のリン酸化は、刺激後 0~150 分までの間、持続的に認められた (レーン 1~5)。GFP (empty) 安定発現 Jurkat 細胞では、刺激後のいずれの時点においても、同様の位置にバンドは見られなかった (レーン 6~10)。

(2) Jurkat 細胞の活性化に伴う Txk のリン酸化に及ぼす TCPTP ノックダウンの影響

内因性 TCPTP による Txk の脱リン酸化に対する影響を検討するため、siRNA を用いて TCPTP のノックダウンを行った。図 5-2 には、独立して行った 2 試験の結果を Experiment 1 及び Experiment 2 として

記載した。TCPTP のノックダウンにより、Jurkat 細胞の TCPTP タンパク質発現が顕著に減少した (図 5-2 : 上段、Experiment 1 及び 2)。Txk のリン酸化レベルについて検討するため、抗 GFP ポリクローナル抗体を用いた免疫沈降を行った後、抗リン酸化チロシン抗体 (4G10) 及び抗 GFP モノクローナル抗体 (JL-8) でイムノブロッティングを行った。その結果、TCPTP をノックダウンした Jurkat 細胞において、PHA-L/PMA 刺激 60 分後のリン酸化 Txk レベルの上昇が認められた (図 5-2 中段 : Experiment 1 及び 2 のレーン 6)。pTxk/Txk 比を解析 (図 5-2 下から二段目) し、さらに TCPTP siRNA、scrambled siRNA 間の pTxk/Txk 比の変化率 (TCPTP siRNA/scrambled siRNA) を算出して、プロットしたところ、Experiment 1 及び 2 のいずれにおいても、PHA-L/PMA 刺激後 60 分をピークとした TCPTP のノックダウンによるリン酸化 Txk の増加が認められた (図 5-2 下段)。

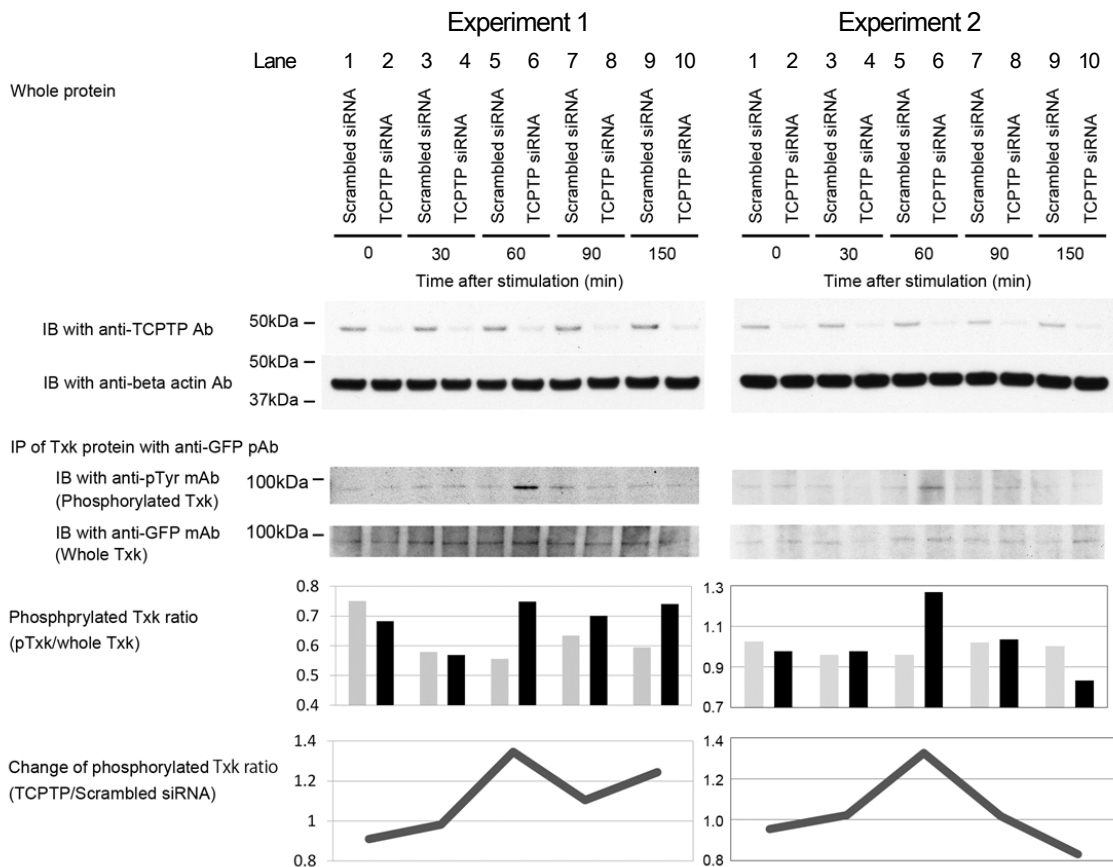


図5-2. Jurkat細胞の活性化に伴うTxkのリン酸化に及ぼすTCPTPノックダウンの影響

GFP-Txk安定発現Jurkat細胞をPHA-L/PMAで刺激した際のTxkのリン酸化に及ぼすTCPTPノックダウンの影響について検討した。

上段及び2段目は、抗TCPTP抗体及び β -actin抗体によるイムノブロットイング (IB) の結果を示す。TCPTP特異的 siRNAによるTCPTPタンパク質の顕著な低下が確認された。

3段目及び4段目は、免疫沈降 (IP) 後のサンプルを抗リン酸化チロシン抗体 (4G10) 及び抗GFP抗体 (JL-8) でIBした結果を示す。また、その下のヒストグラムはリン酸化Txk/総Txkシグナル比 (pTxk/Txk比) を、また最下段のグラフは、pTxk/Txk比のTCPTP特異的 siRNA、scrambled siRNA間の変化率をプロットした。TCPTPのノックダウンにより、PHA-L/PMA 刺激後60分をピークとしたリン酸化Txkの増加が認められた。

独立した2試験の結果をExperiment 1及び2として示す。

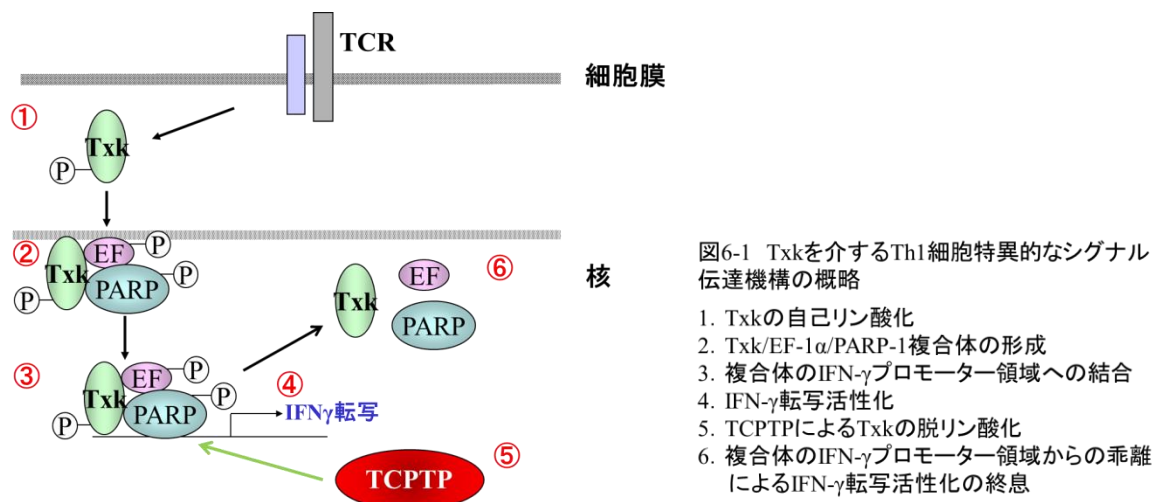
5. 考察

Jurkat 細胞の内因性の TCPTP のノックダウンにより、Txk のリン酸化の一次的な増加が認められた。このことから、T 細胞における Txk のリン酸化が、TCPTP により調節されている可能性が示唆された。ただ、Txk のリン酸化の亢進が一過性であった (図 5-2) ことから、Txk の核内における脱リン酸化が TCPTP にのみ依存しているとは言い切れない。Txk の脱リン酸化が、刺激後の段階により、異なる PTP によって調節されている可能性も考えられることから、他の PTP の関与についても検討する必要がある。

本章の検討により、T 細胞の活性化に伴う Txk を介したシグナル伝達系に、TCPTP が関与していることが示された。Txk による IFN- γ 転写活性化に及ぼす TCPTP の影響については、さらなる検討が必要であるが、TCPTP の調節により、Th1 の分化及び機能を調節できる可能性が示唆された。

第6章 総論

本論文において、TxkによるIFN- γ 転写活性化調節機構を新たに解明した(図6-1)。すなわち、Txkが自己リン酸化を起点として活性化し、EF-1 α 及びPARP-1と複合体の形成してIFN- γ プロモーター領域DNAに結合することにより、IFN- γ の転写活性化を誘導する機構を明らかにした。また、Txkのリン酸化は、核内で発現するTCPTP (TC45) によって調節を受けていることを明らかにした。



Txkは、Th1細胞に特異的に発現する[27]。また、既報[28]及び第3章の結果から、Txkを含む3分子複合体の形成は、T細胞の活性化に依存して形成されと考えられることから、活性化したTh1細胞に特異的な現象と考えられる。そのため、TxkのY91の自己リン酸化や3分子複合体の形成の検出が、Th1/Th2バランスの異常に起因すると考えられている自己免疫疾患やアレルギー性疾患の鑑別や疾患活動性の評価等に応用できる可能性がある。今後、自己免疫疾患やアレルギー性疾患患者由来の活性化T細胞における3分子複合体の形成等について検討を進めていきたい。

また、Txkの機能調節は、Th1/Th2のバランスの異常が関与する自己免疫疾患やアレルギー性疾患など、様々な疾患の治療に役立つ可能性が考えられる。Takenoらは、マウスにマウスTxk/Rlk発現ベクター(以下、Txk発現ベクター)を投与し、その後、卵白アルブミン(ovalbumin: 以下、OVA)で感作することによってOVA特異的なアレルギーを誘導した。アレルギー誘導後、脾臓細胞のOVA特異的な免疫応答について解析したところ、Txk発現ベクター投与群で顕著なTh2型免疫反応の抑制が認められ、感作マウス

の血清中総IgE、OVA特異的IgEレベルともに、Txk発現ベクター投与群で顕著に低下した[82]。これらの結果は、人為的なTxkの発現誘導により、Txk依存的なTh1細胞の分化・活性化が促進され、Th2細胞優位な免疫反応が是正されたことを示していると考えられる。このため、Txk機能の調節が、アレルギー性疾患の治療に有用である可能性が示唆された。

TxkによるIFN- γ 転写活性化を特異的に調節する薬剤の創製を考えた場合、まずTxkのキナーゼ活性を阻害する薬剤が考えられる。ただ、Txk、Tec、Itk、BtkなどのTecファミリーキナーゼは構造が類似しており、ファミリー間でTxk選択的が高い阻害剤を創出することは容易ではない。一方で、PARP-1及びEF-1 α との3分子複合体の形成については、Txk以外に報告がなく、特異的なタンパク質間相互作用と考えられることから、Txk特異的な阻害剤が創出できる可能性がある。今後は、タンパク質間相互作用阻害剤の創製のための情報収集のため、3分子それぞれについて様々な変異体を作製し、相互作用部位を絞り込んでいく必要がある。

また、今回の検討において、Txkの機能が、PARP-1や核に存在するTCPTP (TC45) によって調節されている可能性を示した。そのため、Txkに加えて、これらの分子の活性を調節することにより、Th1/Th2バランスを調節できる可能性がある。PARP-1に関しては、第3章の検討において、PARP-1阻害剤であるPJ34が、末梢血リンパ球からのIFN- γ の産生をIL-4産生にほとんど影響することなく抑制することを示した。また、PARP-1阻害剤である6 (5H) -phenanthridinone (PHE) やbenzamide、PJ34が、自己免疫疾患のひとつである多発性硬化症の動物モデルであるマウス及びラット実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルの症状を改善することが示されており[52、83]、自己免疫疾患治療剤として期待できる。

ただ、近年、自己免疫疾患において、炎症性サイトカインのひとつであるIL-17の重要性が明らかになってきている。また、2005年にIL-17を主に産生するTh17細胞の存在が示され[84]、それ以降、自己免疫疾患がTh1型免疫反応への偏向に起因して起こるとされていたTh1/Th2理論から、パラダイムシフトが起こった。さらに最近の検討では、Th1細胞が産生するIFN- γ は、Th17細胞の分化・活性化に対して抑制的に働いていることが示され、自己免疫疾患におけるTh1細胞の役割は、細胞性免疫の活性化による炎症性作用に加えて、Th17細胞の分化・機能抑制による抗炎症性作用も仲介する2面的なものであると考えられるようになってきた[85-86]。そのため、Th1細胞の分化・機能の抑制では、Th17細胞が関与する自

自己免疫疾患に対しては、十分な治療効果が得られない可能性も考えられる。

一方で、気管支喘息やアトピー性皮膚炎のようなアレルギー性疾患では、Th2細胞の機能過剰とTh1細胞の減少が認められており、血中IgEレベルの上昇など、Th2型の免疫反応への偏向が病態に深くかかわっていると考えられている[17-20]。実際に、喘息やアトピー性皮膚炎の治療のため、抗IL-4受容体抗体やSTAT6シグナルの阻害剤など、Th2サイトカインやその受容体シグナルを標的とした治療法が試されている[21-23]。第4章の検討において、核に存在するTCPTP (TC45) がTxkを脱リン酸化すること、また第5章の検討において、ヒトリンフォーマ由来のT細胞株であるJurkat細胞におけるTCPTPのノックダウンにより、Txkのリン酸化が持続することを示した。これらの結果から、TCPTPの阻害により、Txkシグナルが持続し、Th1型の免疫反応の活性化が誘導できる可能性が示唆された。前述のマウスOVA感作モデル[82]で認められたように、Txk機能の亢進によって、Th2型の免疫反応への偏向が是正される可能性があり、TCPTP阻害によるアレルギー性疾患の治療の可能性が期待される。ただ、TCPTPは、STAT1 (IFNなどの受容体シグナルに関与) 、3 (IL-6などの受容体シグナルに関与) 、6 (IL-4などの受容体シグナルに関与) などの調節にも関与していることが報告されており[77-80]、Th1細胞とTh2細胞の両方への関与が示唆される。そのため、TCPTPの阻害によってTh1/Th2バランスを調節し、アレルギー病態を改善するためには、基質選択的な作用メカニズムの探索など、更なる検討が必要と考えられた。

以上、本研究において、Txkを介したTh1細胞特異的シグナル伝達機構を明らかにした。本研究で得られた知見は、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があると考えられる。そのため、Txk複合体の形成とその利用法について、聖マリアンナ医科大学と共同で特許化した[87]。今後、本研究の産業利用を目指して研究を進めていきたい。

謝 辞

本研究をまとめるにあたり、休学期間を含め、長期間、終始暖かいご指導、ご助言、激励をいただきました指導教官、遠藤泰久教授に心より感謝の意を表します。また、実験、論文の作成にあたり、様々なご指導、ご助言をいただきました吉村亮一助教に心より感謝の意を表します。本実験の多くは、聖マリアンナ医科大学 免疫病害動物学、鈴木 登教授らとの共同研究であり、ご指導をいただきました鈴木 登教授、清水 潤准教授、また、実験のご指導、サポートをいただきました先生、スタッフの皆様方に感謝の意を表します。また、本研究を進めるにあたり、一部試験材料をご提供いただくとともに、実験施設の使用を許可していただきました科研製薬株式会社、島野正直博士、原田達広博士をはじめ皆様方に感謝致します。

参考文献

- 1) Sun B, Zhang Y. Overview of Orchestration of CD4⁺ T Cell Subsets in Immune Responses. *Adv Exp Med Biol.* 2014; 841: 1-13.
- 2) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone: I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986; 136: 2348-57
- 3) Mosmann TR, Coffman RL. Two types of mouse helper T cell clone: Implications for immune regulation. *Immunol Today* 8: 223-27.
- 4) Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145-73.
- 5) Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* 1996; 383(6603):787-93.
- 6) Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2000; 85(1): 9-18.
- 7) Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. TH2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by TH1 clones. *J Exp Med.* 1989; 170(6):2081-95.
- 8) Paludan SR. Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship. *Scand J Immunol.* 1998; 48(5): 459-68.
- 9) Nakamura T, Kamogawa Y, Nottomly K, Flavell RA. Polarization of IL-4- and IFN-gamma- producing CD4⁺ T cells following activation of naïve CD4⁺ T cells. *J Immunol.* 1997; 158: 1085-94.
- 10) Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell.* 2000; 100: 655-69.
- 11) Mullen AC, Hutchins AS, High FA et al. Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction. *Nat Immunol* 2002; 3:652-8.
- 12) Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 1997; 89:587-96.

- 13) Messi M, Giacchetto I, Nagata K, Lanzavecchia A, Natoli G, Sallusto F. Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. *Nat Immunol* 2003; 4:78–86.
- 14) Usui T, Nishikomori R, Kitani A, Strober W. GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity*. 2003; 18(3): 415-28.
- 15) Usui T, Preiss JC, Kanno Y, Yao ZJ, Bream JH, O'Shea JJ, Strober W. T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J Exp Med*. 2006; 203(3):755-66.
- 16) Dolhain RJ, van der Heiden AN, ter Haar NT, Breedveld FC, Miltenburg AM. Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1996; 39(12):1961-9.
- 17) Kon OM, Kay AB. T cells and chronic asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999;118(2-4):133-5.
- 18) Wegmann M. Th2 cells as targets for therapeutic intervention in allergic bronchial asthma. *Expert Rev Mol Diagn*. 2009; 9(1): 85-100.
- 19) Brandt EB, Sivaprasad U. Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis. *J Clin Cell Immunol*. 2011; 2(3): pii: 110.
- 20) Romeo MJ, Agrawal R, Pomés A, Woodfolk JA. A molecular perspective on TH2-promoting cytokine receptors in patients with allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 133(4):952-60.
- 21) Vatrella A, Fabozzi I, Calabrese C, Maselli R, Pelaia G. Dupilumab: a novel treatment for asthma. *J Asthma Allergy*. 2014; 4;7:123-30.
- 22) Beck LA, Thaçi D, Hamilton JD, Graham NM, Bieber T, Rocklin R, Ming JE, Ren H, Kao R, Simpson E, Ardeleanu M, Weinstein SP, Pirozzi G, Guttman-Yassky E, Suárez-Fariñas M, Hager MD, Stahl N, Yancopoulos GD, Radin AR. Dupilumab treatment in adults with moderate-to-severe atopic dermatitis. *N Engl J Med*. 2014; 371(2):130-9.
- 23) Igawa K, Satoh T, Yokozeki H. A therapeutic effect of STAT6 decoy oligodeoxynucleotide ointment in atopic dermatitis: a pilot study in adults. *Br J Dermatol*; 2009; 160(5): 1124-6.
- 24) Komine O, Hayashi K, Natsume W et al. The Runx1 transcription factor inhibits the differentiation of naive CD4+ T cells into the Th2 lineage by repressing GATA3 expression. *J Exp Med* 2003; 198:51–61.

- 25) June JE, Wilson LE, Vinuesa CG et al. Identifying the MAGUK protein Carma-1 as a central regulator of humoral immune responses and atopy by genome-wide mouse mutagenesis. *Immunity* 2003; 18:751–62.
- 26) Ryeom S, Greenwald RJ, Sharpe AH, McKeon F. The threshold pattern of calcineurin-dependent gene expression is altered by loss of the endogenous inhibitor calcipressin. *Nat Immunol* 2003; 4:874–81.
- 27) Kashiwakura J, Suzuki N, Nagafuchi H et al. Txk, a nonreceptor tyrosine kinase of the Tec family, is expressed in T helper type 1 cells and regulates interferon gamma production in human T lymphocytes. *J Exp Med* 1999; 190:1147–54.
- 28) Takeba Y, Nagafuchi H, Takeno M, Kashiwakura J, Suzuki N. Txk, a member of nonreceptor tyrosine kinase of Tec family, acts as a Th1 cell-specific transcription factor and regulates IFN-gamma gene transcription. *J Immunol* 2002; 168:2365–70.
- 29) Maruyama K, Sugano, S. Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene* 1994; 138: 171-174.
- 30) Virag L, Szabo C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002; 54:375–429.
- 31) Ariumi Y, Masutani M, Copeland TD, Mimori T, Sugimura T, Shimotohno K, Ueda K, Hatanaka M, Noda M. Suppression of the poly(ADP-ribose) polymerase activity by DNA-dependent protein kinase in vitro. *Oncogene* 1999; 18: 4616-25.
- 32) Oliver FJ, Menissier-deMurcia J, Nacci C et al. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly(ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J* 1999; 18:4446–54.
- 33) Hassa PO, Covic M, Hasan S, Imhof R, Hottiger MO. The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-kappa B coactivator function. *J Biol Chem* 2001; 276:45588–97.
- 34) Cervellera MN, Sala A. Poly(ADP-ribose) polymerase is a B-MYB coactivator. *J Biol Chem* 2000; 275:10692–6.
- 35) Li M, Naidu P, Yu Y, Berger NA, Kannan P. Dual regulation of AP-2alpha transcriptional activation by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochem J* 2004; 382:323–9.

- 36) Nie J, Sakamoto S, Song D, Qu Z, Ota K, Taniguchi T. Interaction of Oct-1 and automodification domain of poly(ADP-ribose) synthetase. *FEBS Lett* 1998; 424:27–32.
- 37) Miyamoto T, Kakizawa T, Hashizume K. Inhibition of nuclear receptor signalling by poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biol* 1999; 19:2644–9.
- 38) Ejiri S. Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; 66: 1–21.
- 39) Edmonds BT, Wyckoff J, Yeung YG et al. Elongation factor-1 alpha is an overexpressed actin binding protein in metastatic rat mammary adenocarcinoma. *J Cell Sci* 1996; 109: 2705–14.
- 40) Barbarese E, Koppel DE, Deutscher MP et al. Protein translation components are colocalized in granules in oligodendrocytes. *J Cell Sci* 1995; 108:2781–90.
- 41) Gangwani L, Mikrut M, Galcheva-Gargova Z, Davis RJ. Interaction of ZPR1 with translation elongation factor-1alpha in proliferating cells. *J Cell Biol* 1998; 143:1471–84.
- 42) Kim MJ, Si F, Kim SJ et al. The SH2-SH2-SH3 domain of phospholipase C-gamma1 directly binds to translational elongation factor-1alpha. *Mol Cells* 1999; 9: 631–7.
- 43) Kashiwakura J, Suzuki N, Takeno M, Itoh S, Oku T, Sakane T, Nakajin S, Toyoshima S. Evidence of autophosphorylation in Txk:Y91 is an autophosphorylation site. *Biol Pharm Bull* 2002; 25:718–21.
- 44) Ikejima M, Noguchi S, Yamashita R, Suzuki H, Sugimura T, Miwa M. Expression of human poly(ADP-ribose) polymerase with DNA-dependent enzymatic activity in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989; 163(2): 739-745.
- 45) Takeuchi M, Kuramochi S, Fusaki N, Nada S, Kawamura-Tsuzuku J, Matsuda S, Semba K, Toyoshima K, Okada M, Yamamoto T. Functional and physical interaction of protein-tyrosine kinases Fyn and Csk in the T-cell signaling system. *J Biol Chem*. 1993, 268(36): 27413-9.
- 46) Virag L, Szabo C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002; 54:375–429.
- 47) Wilcox HM, Berg LJ. Itk phosphorylation sites are required for functional activity in primary T cells. *J Biol Chem* 2003; 278:37112–21.

- 48) Tomlinson MG, Kane LP, Su J, Kadlecck TA, Mollnauer MN, Weiss A. Expression and function of Tec, Itk, and Btk in lymphocytes: evidence for a unique role for Tec. *Mol Cell Biol* 2004; 24:2455–66.
- 49) Chamorro M, Czar MJ, Debnath J et al. Requirements for activation and RAFT localization of the T-lymphocyte kinase Rlk/Txk. *BMC Immunol* 2001; 2:3.
- 50) Oliver FJ, Menissier-deMurcia J, Nacci C et al. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly(ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J* 1999; 18:4446–54.
- 51) Hassa PO, Covic M, Hasan S, Imhof R, Hottiger MO. The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-kappa B coactivator function. *J Biol Chem* 2001; 276:45588–97.
- 52) Chiarugi A. Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1 suppress transcriptional activation in lymphocytes and ameliorate autoimmune encephalomyelitis in rats. *Br J Pharmacol* 2002; 137:761–70.
- 53) Chiarugi A, Moskowitz MA. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity promotes NF-kappaB-driven transcription and microglial activation: implication for neurodegenerative disorders. *J Neurochem* 2003; 85:306–17.
- 54) Kameoka M, Ota K, Tetsuka T et al. Evidence for regulation of NF-kappaB by poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem J* 2000; 346:641–9.
- 55) Ruscetti T, Lehnert BE, Halbrook J et al. Stimulation of the DNA dependent protein kinase by poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem* 1998; 273:14461–7.
- 56) Ha HC. Defective transcription factor activation for proinflammatory gene expression in poly(ADP-ribose) polymerase 1-deficient glia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:5087–92.
- 57) Ejiri S. Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; 66:1–21.
- 58) Edmonds BT, Wyckoff J, Yeung YG et al. Elongation factor-1 alpha is an overexpressed actin binding protein in metastatic rat mammary adenocarcinoma. *J Cell Sci* 1996; 109:2705–14.
- 59) Gangwani L, Mikrut M, Galcheva-Gargova Z, Davis RJ. Interaction of ZPR1 with translation elongation factor-1 alpha in proliferating cells. *J Cell Biol* 1998; 143:1471–84.

- 60) Shultz LD, Sweet HO, Davisson MT, Coman DR. 'Wasted', a new mutant of the mouse with abnormalities characteristic to ataxia telangiectasia. *Nature* 1982; 297:402-4.
- 61) Goldowitz D, Shipman PM, Porter JF, Schmidt RR. Longitudinal assessment of immunologic abnormalities of mice with the autosomal recessive mutation, 'wasted'. *J Immunol* 1985; 135:1806-12.
- 62) Potter M, Bernstein A, Lee JM. The *wst* gene regulates multiple forms of thymocyte apoptosis. *Cell Immunol* 1998; 188:111-7.
- 63) Stanford SM, Rapini N, Bottini N: Regulation of TCR signalling by tyrosine phosphatases: from immune homeostasis to autoimmunity. *Immunology*. 2012; 137: 1-19.
- 64) Ruela-de-Sousa RR, Queiroz KC, Peppelenbosch MP, Fuhler GM: Reversible phosphorylation in haematological malignancies: potential role for protein tyrosine phosphatases in treatment? *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1806: 287-303.
- 65) Lorenzen JA, Dadabay CY, Fischer EH: COOH-terminal sequence motifs target the T cell protein tyrosine phosphatase to the ER and nucleus. *J Cell Biol*. 1995; 131: 631-643.
- 66) Wellcome Trust Case Control Consortium: Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007; 447: 661-678.
- 67) Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, Bailey R, Nejentsev S, Field SF, Payne F, Lowe CE, Szeszek JS, Hafler JP, Zeitels L, Yang JH, Vella A, Nutland S, Stevens HE, Schuilenburg H, Coleman G, Maisuria M, Meadows W, Smink LJ, Healy B, Burren OS, Lam AA, Ovington NR, Allen J, Adlem E, Leung HT, Wallace C, Howson JM, Guja C, Ionescu-Tîrgoviște C; Genetics of Type 1 Diabetes in Finland, Simmonds MJ, Heward JM, Gough SC; Wellcome Trust Case Control Consortium, Dunger DB, Wicker LS, Clayton DG: Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet*. 2007; 39: 857-864.
- 68) Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Kawaguchi T, Stahl EA, Kurreeman FA, Nishida N, Ohmiya H, Myouzen K, Takahashi M, Sawada T, Nishioka Y, Yukioka M, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Tohma S, Takasugi K, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Matsuo K, Tanaka H, Tajima K, Suzuki T, Iwamoto T, Kawamura Y, Tani H, Okazaki Y, Sasaki T, Gregersen PK, Padyukov L, Worthington J, Siminovitch KA,

- Lathrop M, Taniguchi A, Takahashi A, Tokunaga K, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Mimori T, Plenge RM, Yamanaka H, Momohara S, Yamada R, Matsuda F, Yamamoto K: Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat Genet.* 2012; 44: 511-516.
- 69) Long SA, Cerosaletti K, Wan JY, Ho JC, Tatum M, Wei S, Shilling HG, Buckner JH. An autoimmune-associated variant in *PTPN2* reveals an impairment of IL-2R signaling in CD4(+) T cells. *Genes Immun.* 2011 Mar;12(2):116-25.
- 70) You-Ten KE, Muise ES, Itié A, Michaliszyn E, Wagner J, Jothy S, Lapp WS, Tremblay ML. Impaired bone marrow microenvironment and immune function in T cell protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *J Exp Med.* 1997; 186(5):683-93.
- 71) Heinonen KM, Nestel FP, Newell EW, Charette G, Seemayer TA, Tremblay ML, Lapp WS. T-cell protein tyrosine phosphatase deletion results in progressive systemic inflammatory disease. *Blood.* 2004; 103(9):3457-64.
- 72) Wiede F, Shields BJ, Chew SH, Kyparissoudis K, van Vliet C, Galic S, Tremblay ML, Russell SM, Godfrey DI, Tiganis T. T cell protein tyrosine phosphatase attenuates T cell signaling to maintain tolerance in mice. *J Clin Invest.* 2011; 121(12): 4758-74.
- 73) Mohamed AJ, Vargas L, Nore BF, Backesjo CM, Christensson B, Smith CI: Nucleocytoplasmic shuttling of Bruton's tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 2000; 275: 40614-40619.
- 74) Gustafsson MO, Hussain A, Mohammad DK, Mohamed AJ, Nguyen V, Metalnikov P, Colwill K, Pawson T, Smith CI, Nore BF. Regulation of nucleocytoplasmic shuttling of Bruton's tyrosine kinase (Btk) through a novel SH3-dependent interaction with ankyrin repeat domain 54 (ANKRD54). *Mol Cell Biol.* 2012; 32(13): 2440-53.
- 75) Perez-Villar JJ, O'Day K, Hewgill DH, Nadler SG, Kanner SB: Nuclear localization of the tyrosine kinase Itk and interaction of its SH3 domain with karyopherin alpha (Rch1alpha). *Int Immunol.* 2001; 13: 1265-1274.
- 76) Debnath J, Chamorro M, Czar MJ, Schaeffer EM, Lenardo MJ, Varmus HE, Schwartzberg PL: *rlk/TXK* encodes two forms of a novel cysteine string tyrosine kinase activated by Src family kinases. *Mol Cell Biol.* 1999; 19: 1498-1507.

- 77) ten Hoeve J, de Jesus Ibarra-Sanchez M, Fu Y, Zhu W, Tremblay M, David M, Shuai K: Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol.* 2002; 22: 5662-5668.
- 78) Wang Y, Ning H, Ren F, Zhang Y, Rong Y, Wang Y, Su F, Cai C, Jin Z, Li Z, Gong X, Zhai Y, Wang D, Jia B, Qiu Y, Tomita Y, Sung JJ, Yu J, Irwin DM, Yang X, Fu X, Chin YE, Chang Z: GdX/UBL4A specifically stabilizes the TC45/STAT3 association and promotes dephosphorylation of STAT3 to repress tumorigenesis. *Mol Cell.* 2014; 53: 752-765.
- 79) Yamamoto T, Sekine Y, Kashima K, Kubota A, Sato N, Aoki N, Matsuda T: The nuclear isoform of protein-tyrosine phosphatase TC-PTP regulates interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3 dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 297: 811-817.
- 80) Lu X, Chen J, Sasmono RT, Hsi ED, Sarosiek KA, Tiganis T, Lossos IS: T-cell protein tyrosine phosphatase, distinctively expressed in activated-B-cell-like diffuse large B-cell lymphomas, is the nuclear phosphatase of STAT6. *Mol Cell Biol.* 2007; 27: 2166-2179.
- 81) Okada M. Regulation of the SRC family kinases by Csk. 2012. *Int J Biol Sci.* 8: 1385-97.
- 82) Takeno M, Yoshikawa H, Kurokawa M, Takeba Y, Kashiwakura JI, Sakaguchi M, Yasueda H, Suzuki N. Th1-dominant shift of T cell cytokine production, and subsequent reduction of serum immunoglobulin E response by administration in vivo of plasmid expressing Txk/Rlk, a member of Tec family tyrosine kinases, in a mouse model. *Clin Exp Allergy.* 2004; 34(6):965-70.
- 83) Scott GS, Kean RB, Mikheeva T, Fabis MJ, Mabley JG, Szabó C, Hooper DC. The therapeutic effects of PJ34[N-(6-oxo-5,6-dihydrophenanthridin-2-yl)-N,N-dimethylacetamide HCl], a selective inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase, in experimental allergic encephalomyelitis are associated with immunomodulation. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310:1053–61.
- 84) Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005; 6(11): 1123-32.
- 85) Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1183: 211-21.

- 86) Kelchtermans H, Billiau A, Matthys P. How interferon-gamma keeps autoimmune diseases in check. Trends Immunol. 2008; 29(10): 479-86.
- 87) 鈴木 登、丸山達哉 ;Txk複合体及びその利用. JP 4674332 (2004年出願、2011年登録)