

タイトル	Acetylation regulates the MKK4 JNK pathway in T cell receptor signaling
別タイトル	T 細胞受容体シグナル伝達におけるアセチル化修飾がMKK4 JNK カスケードを制御する
作成者（著者）	松井, 幸英
公開者	東邦大学
発行日	2021.03.25
掲載情報	東邦大学大学院医学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査：南木敏宏 / タイトル：Acetylation regulates the MKK4 JNK pathway in T cell receptor signaling / 著者：Yukihide Matsui, Taku Kuwabara, Toyonobu Eguchi, Koichi Nakajima, Motonari Kondo / 掲載誌：Immunology Letters / 巻号・発行年等：194: 21-28, 2018 / 本文ファイル：出版者版
著者版フラグ	none
報告番号	32661乙第2942号
学位記番号	乙第2781号
学位授与年月日	2021.03.25
学位授与機関	東邦大学
DOI	info:doi/10.3390/ijms19030819
その他資源識別子	https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165247817304108?via%3Dihub
メタデータのURL	https://mylibrary.toho-u.ac.jp/webopac/TD50935867

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

松井幸英より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号乙第 2781 号

学位申請者 : まつ い ゆき ひで
松 井 幸 英

学位論文 : Acetylation regulates the MKK4-JNK pathway in T cell receptor signaling

(T 細胞受容体シグナル伝達におけるアセチル化修飾が MKK4-JNK カスケードを制御する)

著 者 : Yukihide Matsui, Taku Kuwabara, Toyonobu Eguchi, Koichi Nakajima, Motonari Kondo

公表誌 : Immunology Letters 194: 21-28, 2018

論文内容の要旨 :

[目的] 細胞は受容体を介して細胞外の様々の物質を受け取っている。細胞にとって物質は刺激情報としての意味を持つ。細胞は刺激に応じた反応を示すが、刺激をシグナル分子のリン酸化に変換して伝達する。我々はサイトカイン情報伝達系を解析し、リン酸化だけでなくアセチル化も刺激を制御する修飾として重要である事を報告してきた。通常アセチル化は核内で生じるが、我々が見出した調節は細胞質で基質をアセチル化するものだった。また、核内でヒストンをアセチル化する酵素として知られているCBP (CREB-binding protein) が細胞質へ輸送されて基質をアセチル化している事も明らかにした。核から細胞質へ輸送されたCBPとこれによるアセチル化は大きな意義を持つと考えられるが詳細は不明である。細胞質でのアセチル化の意義と普遍性を見出すために、私はT細胞受容体 (TCR) の情報伝達系でアセチル化が生じるのか、生じるならばそれほどのような制御であるかについて検討した。

[方法と結果] モデル実験系にヒトT細胞株Jurkat細胞を用いた。T細胞が活性化した後CBPが核から細胞質へ輸送されるかを検討するために、細胞を抗CD3抗体と抗CD28抗体とでTCR架橋して刺激した。経時的に採取した細胞を、細胞質と核画分とに分画した後、ウエスタンブロット法でCBPを検出した。未刺激時では、CBPのほとんどは核画分で検出された。刺激後では、細胞質にCBPが検出され、時間依存性にCBP存在量が細胞質で増えた。この結果は、CBPはTCR刺激により核外へ輸送される事を示唆している。CBPは細胞質で情報伝達系を制御する事が考えられる。遺伝子工学的手法により細胞質に局在する組換えCBP (ERCBP) 発現

プラスミドを作製しJurkat細胞へ導入した。TCR刺激に応答したT細胞では幾つかの転写因子が活性化する。中でも、Nuclear factor κ B (NF κ B)、Nuclear factor of activated T cell (NFAT)、およびActivator protein-1 (AP-1) が主要な働きを担う転写因子である。ルンフェラーゼ法でこれらの転写因子活性を測定する系をJurkat細胞で構築した。ERCBP発現Jurkat細胞をTCR架橋したところ、NF κ BとNFATは正常Jurkat細胞とERCBP発現Jurkat細胞とで顕著な差を認めなかったが、AP-1活性はERCBP発現Jurkat細胞で有意に減弱している事が判明した。AP-1に至る情報伝達系にCBPが作用している可能性が示唆された。そこで、TCR刺激した後、ERCBP発現Jurkat細胞の情報伝達系を解析した。正常Jurkat細胞に比べてERCBP発現Jurkat細胞では、JNKとErkのリン酸化が減弱している事が分かった。ZAP70のリン酸化は両細胞で有意な違いを認めなかった。これらの結果から、細胞質でCBPはErk経路やJNK経路を選択的に制御している可能性が考えられる。

AP-1とJNKの上流にMKK4とMKK7が位置する。そこで、細胞質でERCBPがMKK4あるいはMKK7をアセチル化している可能性を検討した。ERCBP発現Jurkat細胞から調製した細胞抽出液を抗アセチルリジン抗体で免疫沈降し、アセチル化タンパク質を濃縮した。SDS-PAGEとウェスタンブロット法で解析したところ、アセチル化タンパク質画分にMKK4が検出された。MKK7やJNK、c-junのアセチル化は検出されなかった。MKK4のアセチル化がT細胞機能をどのように制御するかを検討するために、培養上清中のサイトカインを測定した。この結果、インターロイキン2の産生量が顕著に下がっている事が分かった。以上の事から、細胞質に局在するCBPはMKK4を介してT細胞機能を制御するという新規分子機構が明らかになった。

[考察] これまでTCR下流の情報伝達系はリン酸化制御が中心であった。今回の検討でMKK4-JNK-AP-1の経路がリン酸化だけでなくアセチル化により調節されている事が判明した。この分子機構はインターロイキン2の産生を負に制御している事から、T細胞増殖などの機能にも何らかの効果を及ぼすと考えられる。この過程に関与するCBPは通常では核に局在する。刺激に応答して細胞質へ局在を変える事から、CBPは未知の重要な役割を担うと考えられるが、これを明らかにするためには引き続き検討が必要である。

[結語] T細胞受容体の情報伝達系でのアセチル化制御が細胞質で生じている事を明らかにした。細胞質でCBPがMKK4をアセチル化する制御系の存在が示された。本検討結果は、細胞質でのアセチル化制御が広く一般に働く機構である事を強く示唆する。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号乙第 2781 号	氏 名	松 井 幸 英
学位審査担当者	主 査	南 木 敏 宏
	副 査	澁 谷 和 俊
	副 査	赤 羽 悟 美
	副 査	中 野 裕 康
	副 査	内 藤 篤 彦

学位論文の審査結果の要旨 :

T細胞は獲得免疫に重要な役割を果たしているが、T細胞の活性化の制御に細胞質でのシグナル伝達分子のアセチル化が関与していることを本論文では示している。ヒトT細胞株であるJurkat細胞においてT細胞受容体 (TCR) 及びCD28を刺激すると、アセチル化を誘導する酵素であるCBP (CREB-binding protein) が細胞質で増加した。細胞質に局在する組換えCBP (ERCBP) 発現プラスミドをJurkat細胞へ導入し、TCR刺激に応答する転写因子であるNuclear factor κ B (NF κ B) 、Nuclear factor of activated T cell (NFAT) 、Activator protein-1 (AP-1) の活性化を解析したところ、NF κ BとNFATの活性は変化しなかったが、AP-1の活性は有意に低下した。AP-1活性に関連する伝達系を解析すると、ERCBP発現Jurkat細胞では、JNKとErkのリン酸化の減弱がみられたが、p38のリン酸化には変化が見られなかった。更にその上流のZAP70のリン酸化には有意な変化を認めなかった。JNK - AP-1の上流にMKK4とMKK7が位置するが、ERCBP発現Jurkat細胞ではMKK4のアセチル化がみられた。また、ERCBP発現Jurkat細胞では培養上清中のIL-2、IL-18の濃度低下を認めた。これまでTCR下流のシグナル伝達系はリン酸化制御を中心に解析されてきたが、本研究結果より、MKK4 - JNK - AP-1、Erk - AP-1の活性化経路がリン酸化だけでなくアセチル化により調節されていることが見出された。この分子機構はIL-2、IL-18の産生を負に制御していることから、T細胞増殖などの機能にも影響があると考えられ、細胞内シグナル伝達分子のアセチル化は、T細胞活性化の制御に重要であることが示唆された。

2021年1月26日に、審査委員 (澁谷、赤羽、中野、内藤、南木) 全員が参加の下、学位審査会が開かれた。申請者による本研究のプレゼンテーションの後に、審査委員より、プライマリーT細胞でも同様の反応が見られるのか、抗原刺激でも同様の反応が見られるか、細胞質内CBPの時間的変化は解析したか、CBPのノックダウンでの解析はしたか、CBPの生理的な意義は何か、等の質問がされたが、申請者はそれらの質問すべてに的確に回答した。

本研究は、T細胞活性化制御の新たな機構を見出した研究であり、審査委員全員一致して、学位授与に値すると判断した。