

学内グラント 終了時報告書

平成21年度 学内グラント報告書

リンパ球運命決定におけるアダプタータンパク SIT の役割の解析

研究代表者 塚越 由香 (埼玉医科大学 保健医療学部 健康医療科学科)

研究分担者 加門 正義*

緒言

T細胞やB細胞の表面には、抗原分子を認識して細胞内にシグナルを伝えるT細胞レセプター (T cell receptor: TCR) が存在する¹⁾。シグナルは、細胞膜から細胞質を経て核へと伝達され、増殖、分化、アポトーシスなど実に様々な細胞応答を誘導し、その結果様々な細胞の運命が決定される^{2,5)}。この違いはシグナルの強度、持続時間、補助シグナルの有無により決定されると考えられている^{6,10)}。

例えば、胸腺では、未熟なT細胞がTCRと自己ペプチドの親和性の違いにより、分化成熟していく^{4,6,9)}。骨髄から胸腺に遊走してきた未熟T細胞は、最初はCD4, CD8いずれも発現していないDN (ダブルネガティブ) 細胞であるが、その後CD4, CD8どちらも発現しているDP (ダブルポジティブ) 細胞へと分化し、正の選択、負の選択の対象になる。これらの選択はTCRと、胸腺上皮上に提示された自己major histocompatibility complex (MHC) 及び自己ペプチド断片の複合体との親和性を指標に行われる。つまり、TCRが親和性の強いリガンド (MHC + 自己ペプチド) と出会った場合は負の選択によりアポトーシスを引き起こし細胞は死滅する。また、親和性が弱い場合は正の選択によりデフォルト死を回避して生き残る⁹⁾。このような選択機構を通り抜けて生き残った細胞のみCD4, CD8SP (シングルポジティブ) 細胞へと分化し、末梢へ遊走する事ができるようになる。したがって、TCRからのシグナルをpositive もしくは、negativeに制御しているしくみを明らかにする事は、T細胞の運命を理解する上で非常に重要である。

近年、レセプターからのシグナル伝達は、非常に複雑なネットワークを形成し、調節されていることが明らかになってきた。そこには、シグナルを受け取るレセプターと、シグナルを伝えるリン酸化酵素、司令塔の役割を担う膜型アダプター分子の3つが中心とな

り、核内の遺伝子発現を制御する転写因子を動かしていると考えられている。レセプターからのシグナルにおいてアダプター分子は、様々なシグナル伝達分子群と結合し、シグナル伝達の顕著な効率化、及び経路の分岐等に重要な役割を果たす分子である¹⁰⁾。そこで我々は、シグナルネットワークを形成するメンバーの一つであるSHP-2 interacting transmembrane adaptor protein (SIT) が胸腺細胞に強く発現されていることに着目して研究を進めた。SITは膜型のアダプター分子であり、シグナルの負の制御への関与が推測されているが、機能はまだほとんどわかっていない¹¹⁻¹⁴⁾。SITは短い(22アミノ酸残基)細胞外部と長い細胞質部を持ち、ホモダイマーを形成するタンパク分子で¹⁵⁾、C-terminal src kinase (Csk), growth factor receptor binding protein 2 (Grb2), SH2-containing protein tyrosine phosphatase 2 (SHP2) 等を結合し、nuclear factor of activated T cells (NF-AT) 活性を抑制することが明らかにされている。SHP2結合部位に変異を入れても、抑制機能は損なわれないのでどのような機構で抑制作用が発現するかは明らかでないが、SITノックアウトマウスにおいてT細胞の正の選択が弱まり、負の選択へシフトすることからTCRを介したシグナルを何らかの形で抑制していることが報告されている。一方で、TCRからのシグナル伝達を正に制御することが知られているLAT (linker of activation in T cells) は、SIT同様膜型アダプター分子の一つで構造的にもSITとよく似ている。TCRの抗原刺激で活性化されたZAP-70によりリン酸化されるとphospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1), grb2-related adaptor downstream of src (Gads), Grb2等と会合し、MAPK経路、Ca²⁺動員のシグナル伝達に必須であることが示されており、解析が進んでいる分子である^{16,21)}。そこで、LATはSITの鏡面分子としての役割を持ち、LATは正、SITは負にTCRシグナル伝達を制御しているのではないかと仮説を立て、SITがTCRを介したシグナル伝達における役割をLAT機能と比較しながら解析を行った。

*埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター 発生、分化、再生部門

材料と方法

1) 動物

C57BL/6 (B6) マウスは日本CLEAより購入した。

2) 抗体

FITC 標識抗 TCR β 抗体 (H57-597), FITC 標識抗 CD25 抗体 (7D4), PE 標識抗 B220 抗体, PE 標識抗 CD44 抗体 (IM-7), PE-Cy5 標識 streptavidin, PE-Cy7 標識 streptavidin は BD Biosciences より購入した。FITC 標識抗 CD8 抗体, FITC 標識抗 B220 抗体は BioLegend より購入した。PE 標識抗 CD4 抗体, PE 標識抗 TCR β 抗体 (H57-597) は Beckman Coulter (Miami, FL, USA) より購入した。FITC 標識抗 CD4 抗体は eBioscience より購入した。Biotin 標識 BSIT-1 ~ 5, 同標識抗 CD4 抗体 (MT4), 同標識抗 CD8 抗体, Alexa Flour 647 標識 BSIT-1 は我々の研究室で調整した。

HRP 標識抗マウス IgG 抗体, 抗 CD3 抗体 (2C11), 抗リン酸化チロシン抗体 (4G10) は同研究室で調整した。

3) フローサイトメーター

胸腺細胞, 脾臓細胞をそれぞれ $1 \sim 10 \times 10^5$ 個の細胞に抗体を加えて水中で30分反応させ, 氷冷した staining buffer (0.5% BSA, 0.02% sodium azide 含有 HBSS) で二回洗浄した。染色の際, 抗体と Fc γ receptor との非特異的結合を防ぐために, ラット抗マウス Fc γ receptor (2.4G2) を加えた。染色した細胞は, FACSCalibur また FACSaria (Becton Dickinson) を用いて解析を行った。

4) リン酸化の検出

24穴培養プレートに $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 抗 CD3 抗体 (2C11) を一晚, 4°C でコートさせ, 5×10^6 個/well に調製した細胞を加えた。1200 rpm で3分遠心し, 細胞を抗体に密着させた。その後 37°C で5分間反応させ, $5 \times \text{TNE}$ buffer を加え, 反応を止めると同時に細胞を溶解した。その後, 遠心分離にて可溶性の上清を分取し, 免疫沈降用の抗体を加え, protein G ビーズを用いて免疫沈降させた。SDS-PAGE と Western blotting は定法によって行った。

結果

1) 脾細胞におけるSIT発現

BSIT-1を用いてB6マウス脾細胞におけるSIT発現をフローサイトメーターにて解析した。成獣B6マウスより脾臓を摘出しT細胞(TCR β +), B細胞(B220+)についてSIT発現を解析した所, T細胞では高発現していることがわかった(図1)。B細胞においても認められたがかすかだった。

2) T細胞の各分化段階におけるSIT発現

末梢のT細胞でSITが発現していることがわ

かったため, 次にT細胞の各分化段階におけるSITの発現を調べた。T細胞が分化・成熟する場所として知られている胸腺より細胞を摘出し, CD4, CD8に対する抗体でDN細胞, DP細胞, CD4SP細胞, CD8SP細胞に染め分け, 各分画におけるSITの発現をフローサイトメーターで解析した(図2)。その結果全ての分画でSITの発現は見られたが, DN細胞では低く, DP細胞で最大となり, SP細胞になると低下するということがわかった。特にSP細胞ではCD4SP細胞でのSIT発現はSD8SPのSIT発現より高かった。

さらに, TCR遺伝子の再構成のシグナルはDN細胞の時期に入るのでDN細胞について, CD25とCD44に対する抗体でDN1~4に染め分け詳しく解析した²⁾(図3)。その結果, DN1ではほとんど発現は見られないが, DN2になると, かすかに発現し始めた。TCR β 鎖の遺伝子再構成が行われ, T細胞分化のチェックポイントとなる β 選択のシグナルが入るDN3で高くなり, TCR α 鎖の遺伝子再構成が行われるDN4でさらに高くなった。さらに, DN4の次のステージであるDP細胞と比較すると, T細胞のクローン選択に非常に重要な正の選択, 負の選択のシグナルが入るDPでSIT発現は最大となるということが明らかになった。

3) 胸腺におけるT細胞の最終分化に伴うSIT発現

T細胞分化において, DP細胞の時期に正の選択により自己ペプチドとMHCの複合体と弱く反応するクローンが選ばれCD4もしくはCD8SP細胞へ分化する細胞の運命が決定されると, 髄質へと遊走

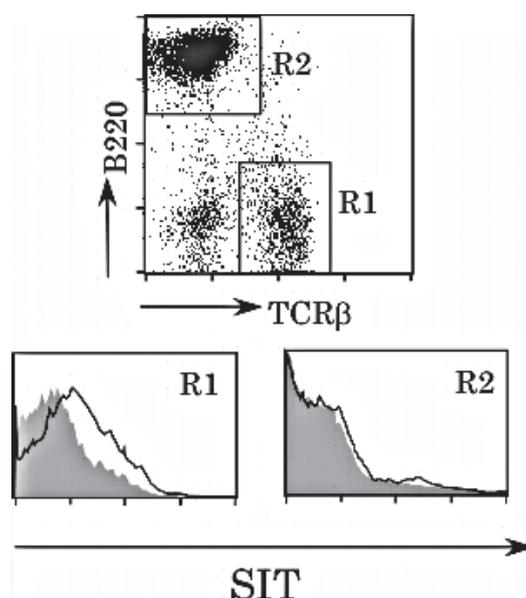


図1.

し髄質の抗原提示細胞により異所的に発現し、提示された自己ペプチドと強く反応するクローンを除く負の選択が行われる。この2つのチェックポイントを通過するとCD4/8どちらか一方の発現が抑えられ残りの一方を発現するSP細胞へと分化する。そこで、正の選択により運命決定がなされた後のT細胞の最終分化にともなうSITの発現量の変化をフローサイトメーターにて解析した(図4)。B6マウスから胸腺を摘出し、CD4とCD8に対する抗体で染め分け、正の選択が終了したばかりの細胞から、最終分化を終えた細胞まで細かくゲートをかけ、SITの発現の推移を解析した。図4より、CD4への分化が決定した細胞について、正の選択を終えたばかりのまだCD8を高く発現している細胞でSITの発現は高く、その後最終分化を受けCD8の発現がほとんどなくなるとSITの発現は低くなることがわかった。CD8への分

化が決定した細胞についても同様に、正の選択を受けた直後ではSIT発現は高く、CD4の発現が低下するとSIT発現も低下することがわかった。このことから、SIT発現はT細胞の最終分化にともなって低下することがわかった。

4) TCR刺激に伴うSITリン酸化

SIT発現がTCR刺激に伴って増加したため、TCR刺激に伴うSITのリン酸化をWestern blottingにて確認した。B6マウスより胸腺を摘出し抗CD3抗体(2C11)で刺激後、BSIT-2でSIT分子を免疫沈降しSDS-PAGEで展開しWestern blottingにて抗リン酸化チロシン抗体(4G10)を用いてSITのリン酸化を検出したところ、同様に処理したLATはリン酸化されている一方で、SITは刺激前から強くリン酸化された状態で存在し刺激に応じた新たなリン酸化は検出されなかった(図5)。

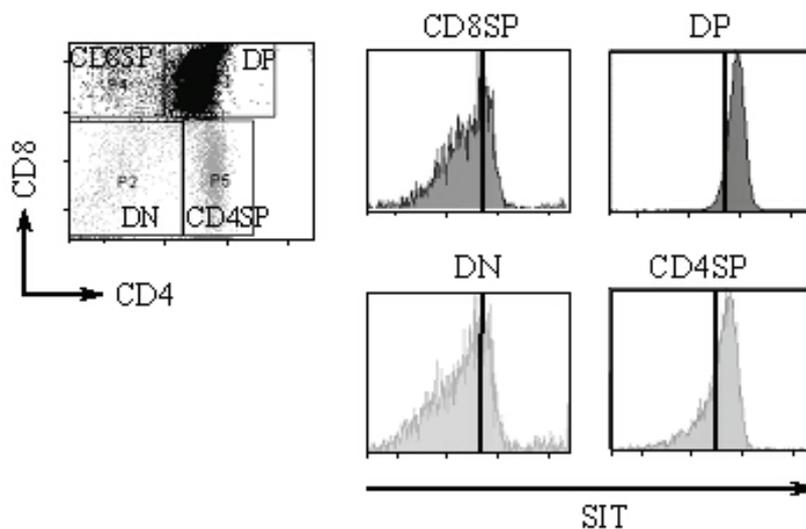


図2.

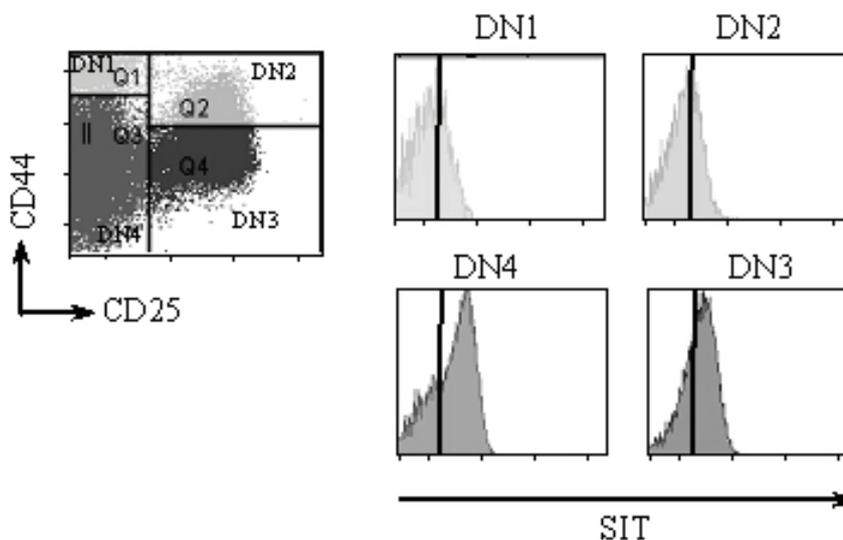


図3.

考察

T細胞は抗原提示分子であるmajor histocompatibility complex (MHC) 分子上に提示された抗原をCD4やCD8のような補助レセプターと共にTCRを介して認識する。TCRを介したシグナル伝達はそのシグナルの伝わり方により、増殖、分化、アポトーシス、サイトカイン産生等、全く異なった細胞の運命が決定される。近年、SIT同様、膜型のアダプター分子であるLATがTCRを介したシグナル伝達において中心的な役割を担う分子として注目されている。LATはT細胞の分化に必要な不可欠であることが示されており、TCRがMHC上に提示された自己ペプチドを認識する際にZAP-70によりリン酸化され、SLP-76やPLC- γ , Gads, Grb2など様々なシグナル伝達分子を結合することでシグナル伝達の効率化に寄与している^{19,20)}。

SITはTCRを介したシグナル伝達を負に制御するという点で、LATと異なっている。腫瘍細胞を用いた

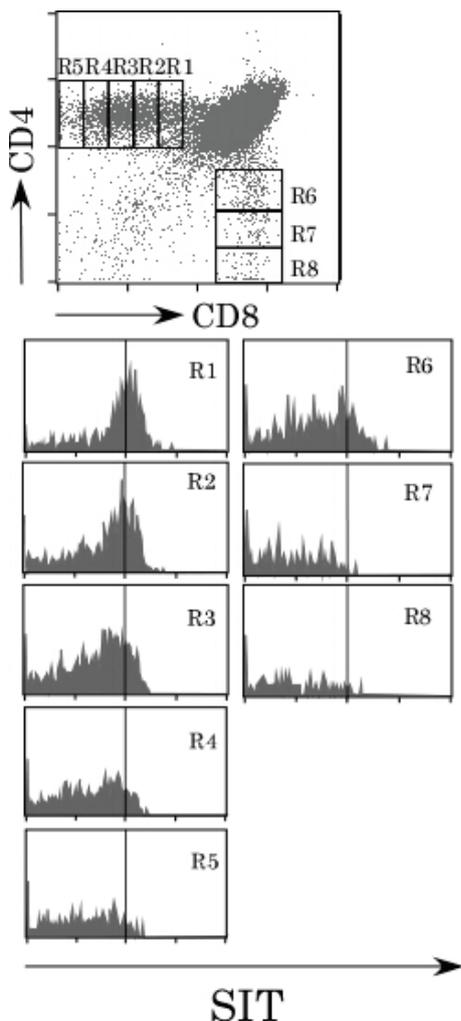


図4.

実験でSITを過剰発現させるとNF-ATの活性が低下することや、SITノックアウトマウスにおいて正の選択から負の選択にシフトする傾向が見られることからTCRを介したシグナル伝達を負に制御すること考えられるが、詳しい制御のメカニズムは明らかになっていない^{11,13)}。

そこで、本研究ではリンパ球におけるSITの発現を解析した結果、SITは主にT細胞に発現していることがわかった。T細胞の分化段階におけるSITの発現を解析した所、TCR β 鎖の遺伝子再構成が行われ β 選択のシグナルが入るDN3、TCR α 鎖の再構成が行われるDN4と分化が進むにつれて高くなり、T細胞のクローン選択に重要な正、負の選択のシグナルが入るDP細胞でSITの発現は最大になった。TCR(CD3)に刺激を入れてもSITのリン酸化に差異が見られなかったことから、SITは構成的にリン酸化を受けた状態で存在し、 β 選択や正、負のシグナルが入った時に他のシグナル伝達分子を会合することでシグナル伝達を行う場所を作出したり、TRIM (TCR-interacting molecule) と協調することでシグナルの強さや長さを調節しているのではないかと考えている^{22,23)}。SITがT細胞分化のどの段階で機能しているのかを解決するためには、ある段階で分化が止まっているような遺伝子改変マウス (RAG2 (-/-) マウスやTCR α 鎖 (-/-) マウス) や正もしくは負の選択のみ起こるようなTCRトランスジェニックマウスを用いてSITの発現やリン酸化、会合する分子について解析をしていく必要があると考えられる。

本研究より、SITがT細胞のクローン選択の時期に相関して発現していることが明らかになった。細胞の

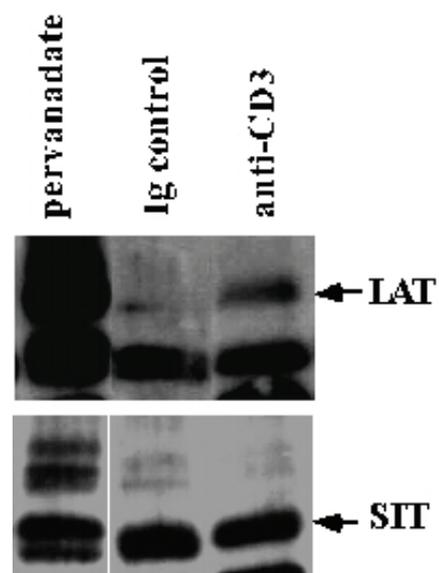


図5.

外から刺激を加えてもSITのリン酸化に優位な差は見られなかったことから、構成的にリン酸化を受けることで、遺伝子再構成に係るシグナルや抗原レセプターのシグナルを制御することに関わっているのではないかと考えている。詳しい制御のメカニズムは解明しきれなかったが、複雑なシグナルネットワークの一つを構成する分子としてのSITについて知見を増やすことができた。残された疑問を明らかにするため、今後の解析が期待される。

参考文献

- 1) Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983;302:575-81.
- 2) Kronenberg M, Gorman J, Haars R, Malissen M, Kraig E, Philips L, Delovitch T, Suci-Foca N, Hood LE. Rearrangement and transcription of the b-chain genes of the T-cell antigen receptor in different types of murine lymphocytes. *Nature* 1985;313:647-53.
- 3) Cantrell D. T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Annu Rev Immunol* 1996;14:259-74.
- 4) Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:139-76.
- 5) Yasutomo K, Doyle C, Miele L, Fuchs C, Germain RN. The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate. *Nature* 2000;404:506-10.
- 6) Brugnera E, Bhandoola A, Cibotti R, Yu Q, Guinter TI, Yamashita Y, Sharrow SO, Singer A. Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity* 2000;13:59-71.
- 7) Wilkinson B, Kaye J. Requirement for sustained MAPK signaling in both CD4 and CD8 lineage commitment: a threshold model. *Cell Immunol* 2001;211:86-95.
- 8) van der Merwe PA, Davis SJ. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol* 2003;21:659-84.
- 9) Liu X, Bosselut R. Duration of TCR signaling controls CD4-CD8 lineage differentiation in vivo. *Nat Immunol* 2004;5:280-8.
- 10) Horejsi V, Zang W, Schraven B. Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signaling. *Nat Rev Immunol* 2004;4:603-16.
- 11) Marie-Cardine A, Kirchgessner H, Bruyns E, Shevchenko A, Mann M, Autschbach F, Ratnoffsky S, Meuer S, Schraven B. SHP2-interacting transmembrane adaptor protein (SIT), a novel disulfide-linked dimer regulating human T cell activation. *J Exp Med* 1999;189:1181-94.
- 12) Pfrepper KI, Marie-Cardine A, Simeoni L, Kuramitsu Y, Leo A, Spicka J, Hilgert I, Scherer J, Schraven B. Structural and functional dissection of the cytoplasmic domain of the transmembrane adaptor protein SIT (SHP2-interacting transmembrane adaptor protein). *Eur J Immunol* 2001;31:1825-36.
- 13) Simeoni L, Posevitz V, Kölsch U, Meinert I, Bruyns E, Pfeffer K, Reinhold D, Schraven B. The transmembrane adapter protein SIT regulates thymic development and peripheral T-cell functions. *Mol Cell Biol* 2005;25:7557-68.
- 14) Posevitz V, Arndt B, Krieger T, Warnecke N, Schraven B, Simeoni L. Regulation of T cell homeostasis by the transmembrane adaptor protein SIT. *J Immunol* 2008;180:1634-42.
- 15) Hübener C, Mincheva A, Lichter P, Schraven B, Bruyns E. Complete sequence, genomic organization, and chromosomal localization of the human gene encoding the SHP2-interacting transmembrane adaptor protein (SIT). *Immunogenetics* 2001;53:337-41.
- 16) Zhang W, Sloan-Lancaster J, Kitchen J, Tribble RP, Samelson LE. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 1998;92:83-92.
- 17) Finco TS, Kadlecsek T, Zhang W, Samelson LE, Weiss A. LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* 1998;9:617-26.
- 18) Zhang W, Irvin BJ, Tribble RP, Abraham RT, Samelson LE. Functional analysis of LAT in TCR-mediated signaling pathways using a LAT-deficient Jurkat cell line. *Int Immunol* 1999;11:943-50.
- 19) Zeyda M, Staffler G, Horejsi V, Waldhausl W, Stulnig TM. LAT displacement from lipid rafts as a molecular mechanism for the inhibition of T cell signaling by polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 2002;277:28418-23.
- 20) Sommers CL, Park CS, Lee J, Feng C, Fuller CL, Grinberg A, Hildebrand JA, Lacaná E, Menon RK, Shores EW, Samelson LE, Love PE. A LAT mutation that inhibits T cell development yet induces lymphoproliferation. *Science* 2002;296:2040-3.
- 21) Aguado E, Richelme S, Nuñez-Cruz S, Miazek A, Mura AM, Richelme M, Guo XJ, Sainty D, He HT, Malissen B, Malissen M. Induction of T helper type

2 immunity by a point mutation in the LAT adaptor. Science 2002;296:2036-40.

- 22) Bruyns E, Marie-Cardine A, Kirchgessner H, Sagolla K, Shevchenko A, Mann M, Autschbach F, Bensussan A, Meuer S, Schraven B. T cell receptor (TCR) interacting molecule (TRIM), a novel disulfide-linked dimer associated with the TCR-CD3-z complex, recruits intracellular signaling proteins to the plasma membrane. J Exp Med 1998;188:561-75.
- 23) Koelsch U, Schraven B, Simeoni L. SIT and TRIM determine T cell fate in the thymus. J Immunol 2008;181:5930-9.

研究成果

論文発表

- 1) Shimizu N, Tsukagoshi Y, Eshima K,

Iizuka M, Shinohara N. Developmental change in the expression of SHP2-interacting Transmembrane Protein(SIT) on the cells of T lineage. Kitasato Med J. 2010 (in press).

- 2) Tsukagoshi Y, Shimizu N, Matsuno Y, Katagiri H, Eshima K, Ito K, Iizuka M, Shinohara N. Production of monoclonal antibodies to a short extracellular portion of SHP2-interacting transmembrane adaptor protein by DNA immunization. Kitasato Med J. 2009;39:44-51.

学会発表

- 1) Tsukagoshi Y, Iizuka M, Eshima K, Shinohara N. Requirement of SHP-2 interacting transmembrane adaptor protein(SIT) to induce T and B cell development. 第39回日本免疫学会学術集会. 平成21年12月. 大阪.