

修士論文
Master's Thesis

T 細胞シグナル伝達系における
プロテインキナーゼ **D2** の機能に関する研究
(Studies on functions of protein kinase D2 in T-cell signal
transduction)

原田 久美子
Kumiko Harada

熊本大学大学院医学教育部医科学専攻修士課程
免疫識別学
(指導：西村 泰治 教授)

2006 年 3 月

本論文は **International Immunology** に受理された。
International Immunology 18, 1737-1747(2006).

目次

1	要旨	4
2	略語一覧	5
3	研究の背景と目的	
3-1)	T細胞レセプター (TCR) を介した T 細胞活性化に関わるシグナル伝達経路	6
図 1	TCR の下流シグナル伝達経路	7
3-2)	ZAP-70 の活性化を介さない新しい T 細胞活性化機構の存在	7
図 2	T 細胞クローン (T5-32) によるマウス L 細胞に発現させた HLA-DR4-抗原ペプチド複合体の抗原認識	8
3-3)	PKC ζ /PKD ファミリー	9
図 3	PKD ファミリー構成体の構造模式図	9
3-4)	本研究の目的	10
4	実験方法	
4-1)	材料と試薬	11
4-2)	プラスミドの構築と調製	11
4-3)	IL-2p/GFP を有する Jurkat 細胞 (2H10) の作製	12
4-4)	レンチウイルスによる細胞への PKD2 遺伝子の導入	12
4-5)	TCR を介した T 細胞の活性化	13
4-6)	IL-2 プロモーターにより制御される GFP 産生のウエスタン プロットによる確認	13
4-7)	フローサイトメトリーによる死細胞数の測定	13
4-8)	<i>In vitro</i> PKD2 キナーゼアッセイ	14
4-9)	His-タグ融合蛋白質の精製	14
4-10)	TCR 刺激した Jurkat 細胞内のリン酸化蛋白質の二次元電気泳動	15
4-11)	質量分析による二次元電気泳動ゲルスポットの蛋白質同定	15
4-12)	RT-PCR 法による Nur77 mRNA 量の比較	15
4-13)	共焦点レーザー顕微鏡による PKD2-GFP 融合蛋白質の細胞内 分布の観察	16
5	実験結果	
5-1)	PKD2 の酵素活性が IL-2 プロモーター活性化に及ぼす影響の検討	17
図 4	本実験に用いた PKD2 の構造	17
図 5	PKD2 変異体の <i>in vitro</i> キナーゼ活性	18

図 6	PKD2-GFP 強制発現プロモーターの違い (A: EF-1 α , B: CMV) による PKD2-GFP 蛋白質発現量と PKD2 による IL-2 プロモーター活性化の比較	19
図 7	PKD2-GFP の発現量と IL-2 プロモーター活性化および PKD2-GFP 分解の比較	20
図 8	TCR 刺激による Δ PH-PKD2-GFP の分解生成は FMK により抑制された	21
図 9	Δ PH-PKD2-GFP を発現する Jurkat 細胞は、TCR 刺激により誘導される細胞死が増強している	22
5-2)	PKD2 の高いキナーゼ活性は TCR 刺激による細胞死を増強する	22
図 10	PKD2 酵素活性の違いによる細胞死の経時的変化	23
図 11	PKD2 発現細胞の TCR 刺激により誘導される細胞死は FMK (pan-caspase inhibitor) により抑制された	24
図 12	TCR 刺激により誘導される細胞死に対する PKD 阻害剤の影響	25
5-3)	TCR 刺激による PKD2-GFP の細胞内分布の変化	25
図 13	TCR 刺激による PKD2-GFP の細胞内局在の変化	26
5-4)	PKD2 の活性増強は TCR 刺激による Nur77 mRNA の発現量を増加する	26
図 14	Δ PH-PKD2-GFP を発現させた細胞では Nur77 の mRNA の発量が増加する	28
5-5)	PKD2 活性化細胞において特異的に発現するリン酸化蛋白質の同定	29
図 15	常時活性型 PKD2 を強発現する Jurkat 細胞を TCR 刺激すると SET, pp32 および calreticulin のリン酸化が増強した	29
表 1	TOF-MS フラグメントとその MS/MS により同定されたペプチドのアミノ酸配列	30
5-6)	PKD2 の基質としての SET	31
図 16	His-SET 蛋白質を用いた PKD2-GFP の <i>in vitro</i> キナーゼアッセイ	32
図 17	His-SET は Jurkat 細胞の活性化した内在性 PKD2 によりリン酸化された	33
6	考察	34
7	結語	37
8	謝辞	38
9	参考文献	39
10	この修士論文に関する学会発表リスト	41

1 要旨

T 細胞は、抗原提示細胞表面の主要組織適合遺伝子複合体(major histocompatibility complex, MHC)分子に結合したペプチドを、T 細胞受容体 (TCR) を介して認識する。TCR からのシグナルは、種々の生化学的反応のカスケードにより、細胞膜から核内に伝えられて様々な遺伝子の発現を誘導し、T 細胞を活性化する。このシグナル伝達に関与するキナーゼの一つとしてプロテインキナーゼ D (PKD) ファミリー分子が知られており、これには PKD1、PKD2 および PKD3 の 3 種がある。T 細胞には主に PKD2 が発現し、TCR 刺激により活性化されて、サイトカイン産生や細胞増殖に関係していることが明かにされつつある。本研究では、T 細胞のシグナル伝達系における PKD2 の機能の解明を目的として、T 細胞の増殖因子である IL-2 産生への関与および TCR 刺激による細胞死誘導に対する関与を検討した。さらに PKD2 の基質を探索することを目的として、TCR 刺激により、野生型細胞に比較して活性化型 PKD2 発現細胞で著明にリン酸化される蛋白質の同定を試みた。

IL-2 産生への PKD2 の関与については、レポーターアッセイによる IL-2 プロモーターの活性化を調べることにより行った。IL-2 プロモーターを Jurkat 細胞に導入し、安定発現細胞株を樹立し、この細胞に PKD2 の野生型 (WT) および常時活性化型 (Δ PH) 変異体の各遺伝子を EF-1 α と CMV の 2 種類のプロモーターを用いて発現させた。細胞死については各 PKD2 変異体を Jurkat 細胞に発現させて、TCR 刺激後、死細胞をフローサイトメトリーにより観察した。

各 PKD2 蛋白質の発現に EF-1 α プロモーターを用いた場合、TCR 刺激により Δ PH 発現細胞は、WT 発現細胞より強い IL-2 プロモーターの活性化能を示した。CMV プロモーターを用いると各 PKD2-GFP 蛋白質の発現は TCR 刺激により顕著に増加し、WT 発現細胞では、IL-2 プロモーター活性化が認められたが、 Δ PH 発現細胞では IL-2 プロモーターの活性化はむしろ抑制されており、カスパーゼが関与する PKD2 の分解が観察された。これに符合して、 Δ PH-PKD2-GFP 発現細胞は、TCR 刺激により高率で細胞死を起こし、この細胞死はカスパーゼ阻害剤および PKD 阻害剤により抑制された。以上より PKD2 は IL-2 プロモーター活性化と細胞死の両経路に関与することを明らかにした。

Δ PH 発現 Jurkat 細胞と野生型 Jurkat 細胞を TCR 刺激し、リン酸化蛋白質の 2 次元電気泳動の比較から、 Δ PH 発現細胞にのみ認められたスポットを質量分析法にて分析し、SET、pp32 およびカルレティキュリン(calreticulin)を同定した。これらの His タグ融合蛋白質を調製し、PKD2 の *in vitro* キナーゼアッセイを行ったところ SET が PKD2 の基質であることがわかった。

PKD2 は IL-2 プロモーター活性化と細胞死の両経路に関与することが示唆されたが、どちらの経路に進むかは活性化型 PKD2 の量に依存すると考えられた。SET と pp32 は核内で複合体を形成しヒストンのアセチル化を制御することが知られているが、これに PKD2 が何らかの関与をしている可能性がある。

2 略語一覧

DAG :	diacylglycerol
DTT :	dithiothreitol
HAT :	histone acetyl transferase
HDAC :	histone deacetylase
IL-2 :	interleukin-2
IL-2p/GFP :	IL-2 プロモーターの後に GF を繋いだコンストラクト
IPTG :	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
INHAT :	inhibitor of acetyltransferase
MHC :	major histocompatibility complex
MS :	mass spectrometry
PH :	pleckstrin homology
PI :	propidium iodide
cPKC :	conventional protein kinase C
nPKC :	novel protein kinase C
PKD :	protein kinase D
PLC :	phospholipase C
PMA :	phorbol 12-myristate 13-acetate
PMSF :	phenylmethylsulfonyl fluoride
RIPA :	radioimmune precipitation assay
SIN :	self-inactivating
TCR :	T cell receptor
TFA :	trifluoroacetic acid
FMK :	N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-Me)fluoromethyl ketone (Z-VAD-FMK)

3 研究の背景と目的

3-1) T細胞レセプター (TCR) を介した T細胞活性化に関わるシグナル伝達経路

T細胞表面の TCR と抗原提示細胞上の主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex: MHC、ヒトでは HLA と呼ばれる) 分子に結合した抗原ペプチドとの会合は、T細胞内の様々なシグナル伝達分子の活性化を誘導する。TCR は抗原ペプチドの認識部位を含む α 鎖と β 鎖およびシグナル伝達に関与する CD3 複合体 (γ 鎖、 δ 鎖、 ϵ 鎖および ζ - ζ 鎖ホモ二量体) により構成されている。CD3 各鎖の細胞質内部分には免疫レセプターチロシン活性化モチーフ (ITAM) と呼ばれる特徴的なアミノ酸配列が存在する。図 1 に TCR の下流のシグナル伝達経路を示した (1)。Fyn および Lck により、TCR ζ 鎖などの ITAM のチロシン基がリン酸化されると、蛋白質チロシンキナーゼである ZAP-70 が TCR の ζ 鎖に結合する。次にこの ZAP-70 は Lck によりリン酸化されて活性化し、LAT と SLP-76 をリン酸化する。この両者によりホスホリパーゼ C- γ 1 (PLC- γ 1) が活性化され、ホスファチジルイノシトール二リン酸 (PIP₂) を加水分解し、ジアシルグリセロール (DAG) とイノシトール三リン酸 (IP₃) を生じる。DAG はプロテインキナーゼ C (PKC) を活性化し、下流のシグナル伝達分子にシグナルが伝達され、転写因子 NF- κ B の活性化に繋がる。また IP₃ は細胞内の Ca²⁺濃度を上昇させカルシウム経路を活性化する。また、LAT 分子のチロシン残基がリン酸化されると Grb2 が結合し、Ras および Raf を介して MAPK 経路を活性し、AP-1 の転写因子を活性化する。活性化された転写因子は標的遺伝子の転写をもたらし、サイトカインの産生や増殖などの T細胞の免疫応答を起こす。このように、図 1 に示される TCR 刺激による活性化経路の殆どが、ZAP-70 の活性化を起点にしている。実際、免疫不全を示す家系に ZAP-70 遺伝子の変異が認められている。また ZAP-70 のノックアウトマウスにおいて胸腺細胞の分化異常が認められており、ZAP-70 は T細胞のシグナル伝達において重要な役割を果たしている。

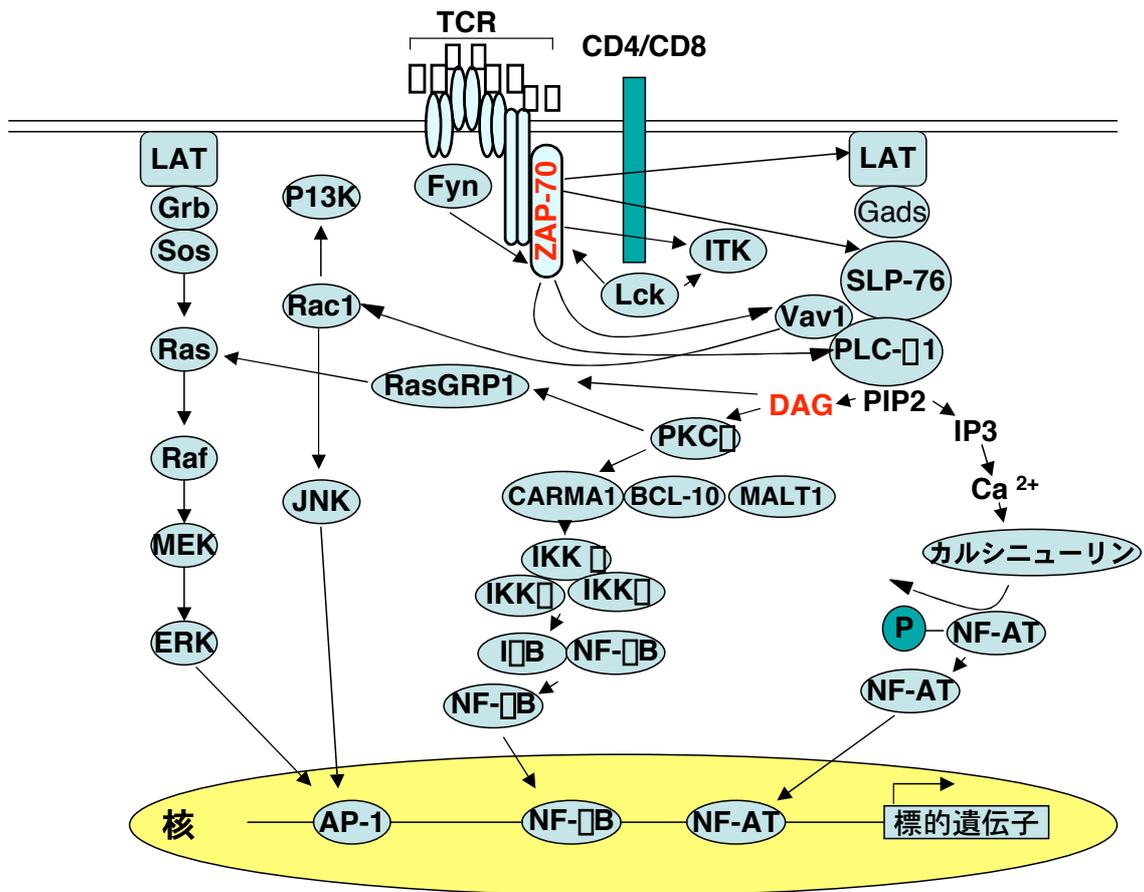


図1. TCRの下流シグナル伝達経路

3-2) ZAP-70 の活性化を介さない新しい T 細胞活性化機構の存在

ヒト CD4⁺T 細胞クローン T5-32 は、HLA-DR4 拘束性に溶連菌由来の抗原ペプチド (M12) 複合体を特異的に認識し、種々のサイトカイン産生や増殖応答を起こす (図 2A)。Irie らは (2)、M12 の 1 アミノ酸残基を置換したアナログペプチド (Q59G) と HLA-DR4 分子複合体を、マウス L 細胞表面に過剰発現させ (図 2B)、T5-32 に認識させると、強い増殖応答が誘導されるにもかかわらず、ZAP-70 のリン酸化およびキナーゼ活性化が全く認められないユニークな T 細胞応答を見出した。この現象は T 細胞増殖応答誘導に ZAP-70 の活性化をスキップする別のシグナル伝達経路の存在を示唆するものであった。種々の阻害剤を用いてこの T 細胞増殖応答に対する阻害効果を調べたところ、PKC 全般の阻害剤であるが μ アイソタイプ (PKC μ) にはほとんど効果のない Gö6983 は、M12 および Q59G の刺激による T 細胞増殖応答を強くは抑えなかった (50%阻

害濃度=2 μ M) が、カルシウム依存性の PKC (cPKC) と PKC β に特異的な阻害剤である Gö6976 は、50%阻害濃度=0.1~0.2 μ M でいずれの刺激による増殖応答も強く抑制した。この T 細胞応答に cPKC が関与するならば、Gö6983 も強い阻害効果を示すはずであることから、M12 および Q59G どちらの刺激によるシグナル伝達経路には PKC β が介在することが示唆された (図 2C)。

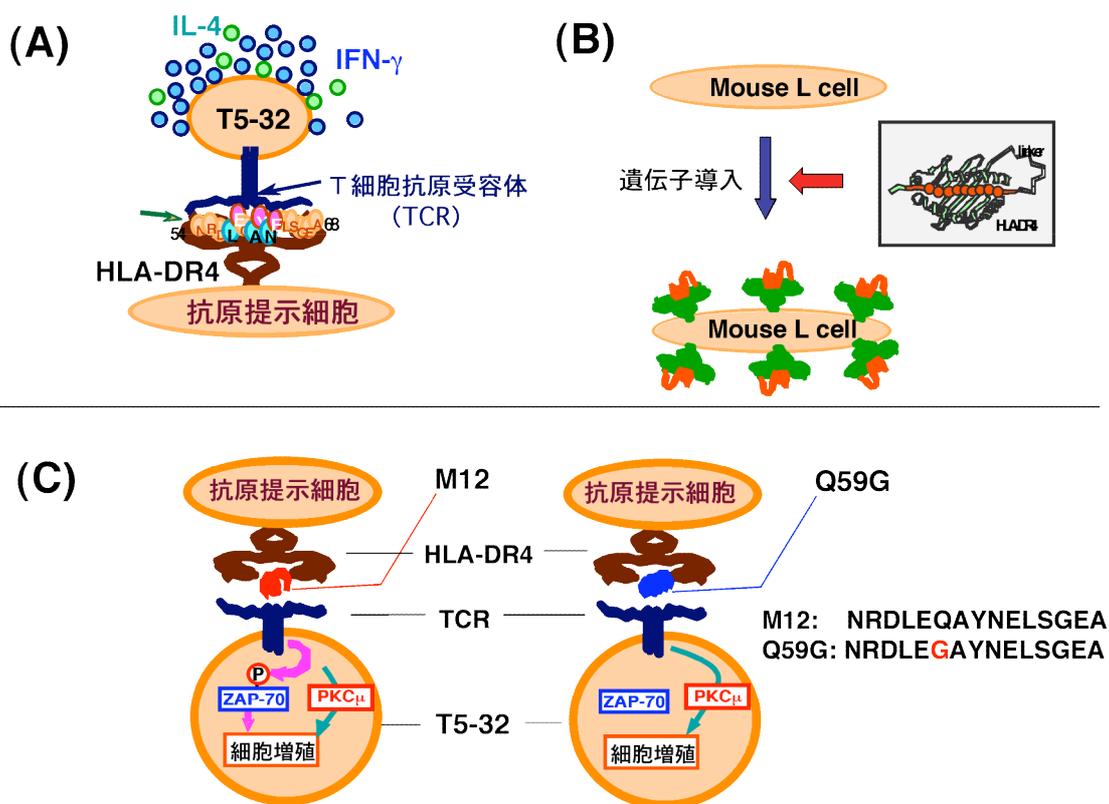


図2. T細胞クローン (T5-32) によるマウスL細胞に発現させた HLA-DR4-抗原ペプチド複合体の抗原認識

(A) T5-32クローンをM12ペプチドをパルスした末梢血単核球細胞で刺激するとIFN- γ やIL-4を産生し、増殖した。(B) マウスL細胞にHLA-DR4/peptideを発現させた。M12またはQ59Gを共有結合で繋いだHLA-DR4を細胞表面に発現している。(C) M12DR4で刺激したT5-32細胞はZAP-70のリン酸化が起こり、増殖した。しかし、Q59GDR4で刺激したT5-32細胞はZAP-70のリン酸化が起こらずに増殖した。

3-3) PKC ζ /PKD ファミリー

当初、PKC ζ はCa²⁺に依存せずに DAG 刺激に応答することから、PKC ファミリーの中でCa²⁺非依存的で DAG により活性化する novel PKC (nPKC)の1つとして分類されていた。しかしPKC ζ はPKCと比較して、キナーゼドメインのホモロジーが低いこと、またPKCには存在しないpleckstrin homology (PH)様ドメインを持つがPKCにある自己制御モチーフは持たないことから、最近では独立したプロテインキナーゼD (PKD) ファミリーの分子として分類されるようになった。PKD ファミリーの分子は、哺乳動物ではPKD1 (3, 4)、PKD2 (5)、PKD3 (6) の3種が知られている(図3)。現在ではPKC ζ はPKD1、PKC δ はPKD3と呼ばれる。本論文でも、以後この新しい命名法にしたがって表記する。

PKDの活性化機構として、現在、PKD1については、その上流に存在するPKCによるリン酸化によって活性化されると提唱されている(7, 8)。すなわち、TCR刺激によりPLC- γ 1活性化して、PIP₂を加水分解してDAGを生成させ、これによりPKCが活性化して、PKDを活性化するというものである。しかしながら、シグナル伝達系におけるPKDの役割は十分には解明されていない。

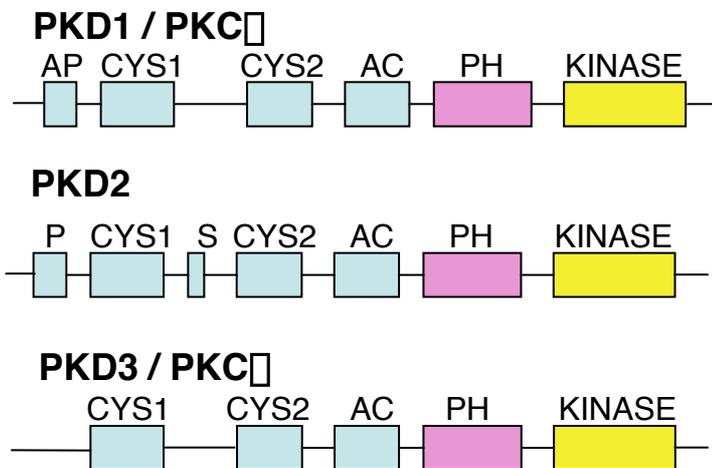


図3. PKDファミリー構成体の構造模式図 (文献7より改変)

AP, alanine- and proline-rich domain; P, proline-rich domain; S, serine-rich domain; CYS, cysteine-rich domain(DAG binding domain); AC, acidic domain; PH, pleckstrin homology domain; KINASE, kinase catalytic domain.

PKD1 ではその細胞内分布がよく調べられており、不活性な状態ではその多くは細胞質 (9-12) にあり、少量がゴルジ体やミトコンドリアに存在する(13, 14)。レセプターの刺激により PKD1 はすぐに細胞膜に移行し、ここで CYS2 ドメイ

ンに DAG が結合すると PKC によりキナーゼドメイン内の活性化ループのセリンがリン酸化されて活性化し、細胞膜から再び細胞質に分布し、さらに一部は核に移行する (9)。またゴルジ体への移行するものには、CYS1 への DAG の結合が起こっている (15)。PKD1 の活性化は、マウスケラチノサイトや NIH3T3 繊維芽細胞の増殖を促進することが観察されている (16)。

抗 PKD 抗体を用いた免疫沈降物の質量分析による解析と RT-PCR による mRNA の発現解析から T5-32、Jurkat、ヒト末梢 T 細胞およびマウス T 細胞において PKD1 は検出されず、PKD ファミリーのキナーゼとしては PKD2 が主要であることがわかった (Irie 未発表データ)。

3-4) 本研究の目的

本研究では T 細胞の活性化に関わるシグナル伝達機構における PKD2 の役割を解明を目的として、常時活性化型 PKD2 発現細胞を用いて、TCR 刺激による IL-2 プロモーター活性化および細胞死誘導に対する PKD2 の関与を調べた。さらに PKD2 の下流のシグナル伝達分子を探索することを目的として、TCR 刺激により、野生型細胞に比較して活性化型 PKD2 発現細胞で顕著にリン酸化される蛋白質の同定を試みた。

4 実験方法

4-1) 材料と試薬

4-1-1) 細胞

本実験で使用した細胞は次のものである。

Jurkat 細胞 : clone: E6-1, American Type Culture Collection catalog number (TIB-152)

293T 細胞 : ヒト腎臓上皮細胞を形質転換し、SV40 large T antigen を発現させたもの

2H10 細胞 : IL-2 プロモーター遺伝子の後にレポーターの GFP 遺伝子を繋いだものを Jurkat 細胞に導入したもの

4-1-2) 試薬

抗体は次のものを使用した。

マウス抗ヒト CD3 抗体 : BD Biosciences

ヤギ抗マウス IgG,F(ab')₂ 抗体 : Pierce Biotechnology

ウサギ抗 GFP 抗体 : BD Biosciences

ウサギ抗ヒト PKD2 抗体: Calbiochem

ウサギ抗ヒト PKC α 抗体(D-20): Santa Cruz Biotechnology

Horseradish Peroxidase (HRP) 標識ロバ抗ウサギ IgG, F(ab')₂ 抗体: Amersham Biosciences

免疫沈降は Protein A ビーズ (Pierce) を使用した。

細胞培養液は次のものを用いた。

1) RPMI 培地 (Jurkat 細胞の培養に使用)

RPMI Medium 1640 に 10%ウシ胎児血清 (FCS)、ペニシリン/ストレプトマイシン/L-グルタミン、非必須アミノ酸液を混合したもの

2) DMEM 培地 (293T 細胞の培養に使用)

Dulbecco's Modified Eagle Medium に 10%FCS、ペニシリン/ストレプトマイシン/L-グルタミン、非必須アミノ酸を混合したもの

4-2 プラスミドの構築と調製

4-2-1) リコンビナント PKD2 発現用レンチウイルスベクターの構築

ヒト PKD2 全長 cDNA は Jurkat 細胞 RNA より RT-PCR 法により調製した。この野生型ヒト PKD2 全長 cDNA に変異を導入して、キナーゼ不活性型 (PKD2-K580N/S706A/S710A) および常時活性型 (PH ドメイン (アミノ酸残基 397-509) を削除) を作製した。これらの cDNA の 3' 末端側にリンカー配列を介して GFP cDNA を繋げ (図 4)、それぞれ pENTR4 ベクターに導入した。各インサート DNA は Gateway (Invitrogen) システムの LR 組み替え反応により CSII-CMV-RfA ベクターに導入した。一部の実験では EF-1 α プロモータを持つ CSII-EF-RfA ベクターを用いた。調製したレンチウイルスベクターは全て、塩化セシウムの密度勾配法により精製した。

4-2-2) IL-2 プロモーター活性測定用レポータープラスミドの構築

レポーターアッセイには IL-2 プロモータの下流に GFP cDNA を繋いだコンストラクトを Bluscript II KS⁺ (STRATAGENE) ベクターに挿入したプラスミド (IL-2p/GFP) を使用した。

4-2-3) His タグ融合蛋白質発現用ベクターの構築

His タグを持つ融合蛋白質の作製には、pET28a ベクター (Novagen) に Jurkat 細胞 RNA より RT-PCR 法により調製したヒト SET あるいはヒト pp32 cDNA 全長を組み込んだものを用いた。

4-3) IL-2p/GFP を有する Jurkat 細胞 (2H10) の作製

TCR 刺激による IL-2 プロモーターの活性化を Jurkat 細胞で評価する目的で 20 μ g の IL-2p/GFP を 1 μ g のハイグロマイシン耐性遺伝子をもつプラスミドと共に、Jurkat 細胞にエレクトロポレーション法 (370 V, 960 μ F, 4 mm キュベット) により導入した。400 μ g/ml のハイグロマイシンにて薬剤選択した後、PMA 刺激に応答し、GFP の蛍光を発する細胞株を樹立し、2H10 と命名した。

4-4) レンチウイルスによる細胞への PKD2 遺伝子の導入

ポリ L-リジンコートした 10 cm ディッシュに 293T 細胞を 6 x 10⁶/10 ml 播き、DMEM 培地にて 24 時間培養した後、OPTI-MEM I 培地 (Invitrogen) 8 ml に交換した。10 cm ディッシュ 1 枚当たり、10 μ g のパッケージングプラスミド pCAG-HIVgp、10 μ g のエンベローププラスミド pCMV-VSV-G-RSV-Rev および

17 μ g の各 PKD2 遺伝子を持つウイルスベクタープラスミドと Lipofectamine 2000 試薬(Invitrogen) 80 μ l を混合して複合体を形成させ、これを 293T 細胞に加えて形質転換した。12 時間後に上清を、10 μ M のホルスコリンを含む DMEM 培地 7ml に交換し、さらに 48 時間培養した。培養上清を超遠心 (50000G、2h、20°C) して、ウイルス粒子をペレットにし、これを 50 μ l の RPMI 培地に懸濁した後、96 穴 U 底のプレート上で Jurkat 細胞または 2H10 細胞 (5×10^4 / well) に感染させた。37°C で培養を開始する前に、プレートを室温で 2 時間、555G で遠心することにより、細胞とウイルスの接触を高めた。

4-5) TCR を介した T 細胞の活性化

各遺伝子を導入した Jurkat または 2H10 細胞 (2×10^5 / 0.2 ml) を、48 穴プレート上でマウス抗ヒト CD3 抗体 (1 μ g/0.2 ml) と作用させ、37°C でインキュベートした。さらに 10 分後、それぞれにヤギ抗マウス IgG,F(ab')₂ 抗体 (2 μ g/ 0.2ml) を加え、TCR 刺激した。

In vitro PKD2 キナーゼアッセイでは、24 穴プレート上で各細胞 (5×10^6 / 0.5 ml) にマウス抗ヒト CD3 抗体 (5 μ g/0.5 ml) を加えて 37°C、10 分間インキュベートした後、ヤギ抗マウス IgG,F(ab')₂ 抗体 (10 μ g/0.5 ml) を加えて TCR 刺激した。

4-6) IL-2 プロモーターにより制御される GFP 産生のウエスタンブロットによる確認

24 時間 TCR 刺激した、各 PKD2 遺伝子導入 2H10 細胞を、可溶化バッファー (50 mM Tris-HCl (pH7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 1 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, Protease Inhibitor Cocktail) で溶解した後、11% SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロース膜に転写後、抗 GFP 抗体でブロッキングした。これを HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体および化学発光 (ECL; Amersham Biosciences) により検出した。

4-7) フローサイトメトリーによる死細胞数の測定

2H10 細胞に PKD2 遺伝子を発現させた細胞 (2×10^5 / 0.2 ml) を 48 穴プレート上で TCR 刺激した。細胞は、種々の時間 37°C にてインキュベートした。各細胞を PBS 0.3 ml に懸濁し、Propidium iodide (PI) (200 ng/ml) 0.3 ml を加えて

5 分間反応させた。PI で染色される死細胞の割合をフローサイトメーター (FACScan, BD Biosciences) で測定した。

Z-VAD FMK (FMK)を用いた阻害実験では、Jurkat 細胞に PKD2-GFP 遺伝子を発現させた細胞 (2×10^5 / 0.2 ml) を $25 \mu\text{M}$ の FMK と 1 時間、 37°C でインキュベート後、TCR 刺激を行った。

Gö6976 を用いた阻害実験では、細胞 (2×10^5 / 0.2 ml) を $1 \mu\text{M}$ の Gö6976 と 37°C 、30 分インキュベートしたあと、TCR 刺激した。

4-8) *In vitro* PKD2 キナーゼアッセイ

TCR 刺激した PKD2 遺伝子発現細胞を、可溶化バッファーに溶解し、抗 GFP 抗体とプロテイン A ビーズで免疫沈降した。RIPA バッファー (20 mM Tris-HCl(pH 8), 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% Sodium deoxycholate, 1 mM DTT, 5 mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 10% Glycerol) 、可溶化バッファーおよびキナーゼバッファー(30 mM Tris-HCl(pH 7.4), 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT) でビーズを洗浄した。これに、0.25 MBq の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP および基質蛋白質 (His-SET または His-pp32) を含むキナーゼバッファー $12.5 \mu\text{l}$ を加え、 30°C 、10 分間反応させた。PKD2 の自己リン酸化反応の検出には、基質蛋白質を含まない同バッファーを用いた。反応後、上清は SDS-PAGE により基質蛋白質を分離した後、ゲルを乾燥して X 線フィルムにあてた。ビーズは ^{32}P -ATP と基質を含まない氷冷キナーゼバッファーで洗浄した。ビーズに結合した蛋白質を SDS-PAGE で分離し、ニトロセルロース膜に転写して、X 線フィルムにあてた。

4-9) His-タグ融合蛋白質の精製

His-タグ融合蛋白質を調製するため、1 mm ギャップのキュベットを使用して 1.4 kV でエレクトロポレーションを行ない、大腸菌 BL21(DE3)に pET-28a/SET、または pET28a/pp32 を導入した (装置 : ELECTRO CELL MANIPULATOR 600, BTX)。カナマイシン($25 \mu\text{g/ml}$)を含む寒天プレートに大腸菌を蒔き、 37°C でインキュベートした。コロニーを拾い、500 ml のカナマイシン($25 \mu\text{g/ml}$)入り LB 培地で培養し、600 nm の吸光度が $0.6 \sim 1$ になったところで IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)を終濃度が 0.75 mM となるように加えた。さらに 37°C で 3 時間培養した後、集菌し、ペレットの湿重量 1g 当たり 5 ml の溶菌バッフ

アー (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl(pH8), 1 mM PMSF(Phenylmethylsulfonyl Fluoride), 1% Triton x100)を加え、超音波破碎機 (BRNSON 250D) にて細胞を破碎した。これを遠心し、上清を溶菌バッファで平衡化した Ni-NTA Agarose (Invitrogen)カラム (3 ml) にかけた。溶菌バッファおよび 10 mM イミダゾール液 (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl(pH8), 10 mM イミダゾール) で洗浄後、溶離液 (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl(pH8), 1 M イミダゾール) で溶出し、その 0.15 ml ずつを分画した。各フラクションの蛋白質濃度を Bradford 法により測定した。

4-10) TCR 刺激した Jurkat 細胞内のリン酸化蛋白質の二次元電気泳動

1x10⁷ 個の Jurkat 細胞および常時活性化型 PKD2 遺伝子 (Δ PH-PKD2-GFP) を導入した Jurkat 細胞を、FCS を含まない RPMI 培地で 10 時間培養した後、12 時間 TCR 刺激した。細胞を回収し、PhosphoProtein Purification Kit (QIAGEN) を用いてリン酸化蛋白質画分を得た。Nanosep カラムで濃縮、脱塩後、Immobiline DryStrip ゲル (pH 3-10, Bio-Rad) を用いて、一次元めの等電点電気泳動を行った後、11%のアクリルアミドゲルにより二次元めの電気泳動を行った。ゲルはシプロルビーで染色し、両サンプル間で量に著明な差のあるスポットをフルオロホレスター3000 (アナテック) を用いて切り出した。

4-11) 質量分析による二次元電気泳動ゲルスポットの蛋白質同定

二次元電気泳動後、切り出したゲル片を 50%アセトニトリル-25 mM 炭酸水素ナトリウム溶液にて脱色後、乾燥した。これにトリプシン液 (10 μ g トリプシンを 1 ml の 50 mM 炭酸水素ナトリウムに溶解) を加えて 37°C で 1 晩、ゲル内消化した。50%アセトニトリル-5%トリフルオロ酢酸(TFA)溶液で消化物を抽出し、乾固した。これを 0.1% TFA に溶解後、 μ C₁₈ZipTip で脱塩、濃縮した。質量スペクトルの測定は Qstar Pulser i, アプライドバイオシステムズ) により行った。

4-12) RT-PCR 法による Nur77 mRNA 量の比較

市販のキット (RNeasy Mini kit, Invitrogen) を用いて、TCR 刺激 2 時間後の Jurkat 細胞より全 RNA を調製した。これを鋳型にし、ランダムプライマー、逆転写酵素 (Superscript II, Invitrogen)、dNTP 溶液を用いて cDNA を合成した。これを鋳型にしてヒト Nur77 に特異的なプライマーセット

(CATCCTCCGCCTGGCGTACAGG および GTCCGCAGCTCGGGCAGTTTGC) およびコントロールとして β -actin プライマーセット (CCTCGCCTTTGCCGATCC および GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC) を用いて PCR 反応を行った。リアルタイム RT-PCR は Light Cycler (Roche) を用いて行った。

4-13) 共焦点レーザー顕微鏡による PKD2-GFP 融合蛋白質の細胞内分布の観察

PKD2-GFP 遺伝子を発現させた細胞をポリ L-リジンコートシャーレ (IWAKI glass base dish, 27 \square) にて培養して付着させた。これを FLUOVIEW (FV 500, オリンパス) を用いて、励起波長/蛍光波長=488/520 nm および明視野にて観察した。

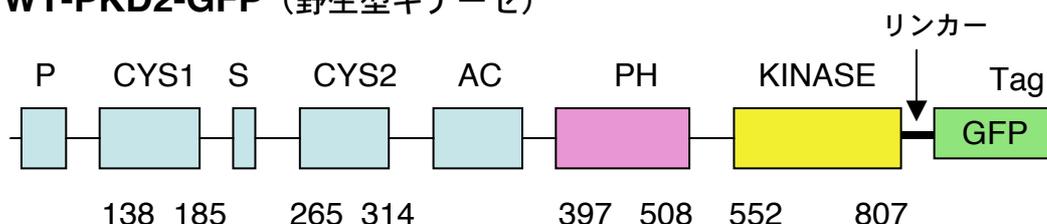
5 実験結果

5-1) PKD2 の酵素活性が IL-2 プロモーター活性化に及ぼす影響の検討

5-1-1) レンチウイルス法により導入した PKD2 のキナーゼ活性

作製したヒト PKD2 の構造の模式図を図 4 に示した。PKD2 は PKD1 と同様な構造を持ち、N 末端の制御ドメインと C 末端のキナーゼドメインからなる (4)。制御ドメインはプロリンに富むドメイン (P)、2 つのシステインに富むドメイン (CYS1, CYS2) とその間を繋ぐセリンに富むドメイン (S)、酸性ドメイン (AC) および Pleckstrin homology (PH) ドメインからなる。PH ドメイン (ヒト PKD2, 397-508) はキナーゼドメインを制御しており、この部位を欠如した PKD は常時キナーゼ活性化型となる (17)。

WT-PKD2-GFP (野生型キナーゼ)



ΔPH- PKD2- GFP (常時キナーゼ活性化型)

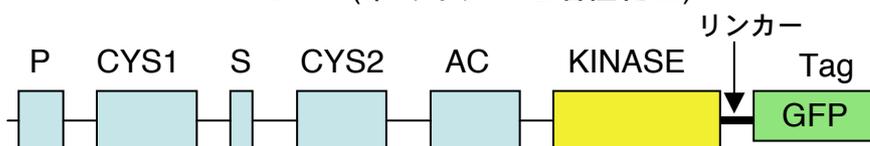


図4. 本実験に用いた PKD2 の構造 (文献7より改変)

ドメインの略号は図1に同じである。いずれのPKD2にもリンカーを介して GFP タグを結合させた。ΔPH-PKD2-GFP は野生型より PH ドメインを除いたものである。数字は各ドメインの始まりと終わりのアミノ酸残基の位置を示す。

IL-2p/GFP を導入した Jurkat 細胞株 2H10 に、各リコンビナント PKD2 遺伝子をレンチウイルス法により発現させた細胞が、キナーゼ活性を有しているかどうかを抗 GFP 抗体を用いた *in vitro* キナーゼアッセイにて調べた。各酵素の活性を PKD2 の自己リン酸化能により評価した (18)。

図 5A に示すように、WT-PKD2-GFP は 37°C、1 時間の TCR 刺激によりキナーゼ活性が増加した。ΔPH-PKD2-GFP は TCR 刺激がなくても強い活性を示し

たが、刺激によりさらに活性が上昇した。親細胞である 2H10 では、抗 GFP 抗体で沈降されるキナーゼ活性は認められなかった。各々の PKD2-GFP 遺伝子を導入した 2H10 細胞には、対応する蛋白質が発現していることがウエスタンブロットにより確認された (図 5B)。

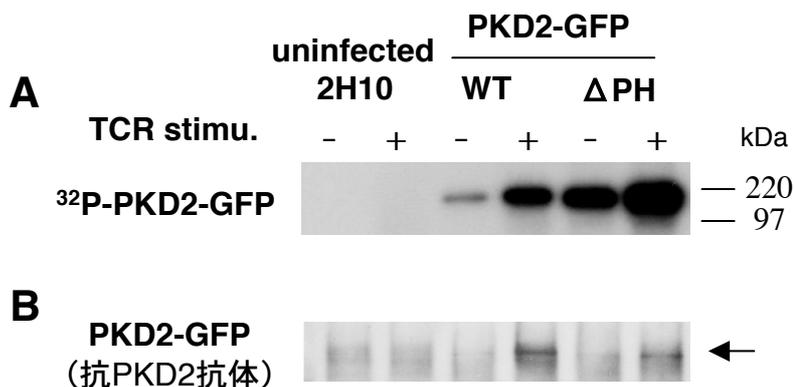


図5. PKD2変異体の*in vitro*キナーゼ活性

2H10細胞にCMVプロモーターによりWT-PKD2-GFP (WT)あるいはΔ PH-PKD2-GFP (Δ PH) を発現させた細胞をTCR刺激後、37°C、1時間培養した。細胞を可溶化後、抗GFP抗体により免疫沈降し、各PKD2-GFPのキナーゼ活性を[γ-³²P]ATPを用いた自己リン酸化能により調べた。

A: 標識された免疫沈降物をSDS-PAGEにより分離しニトロセルロース膜に転写したもののオートラジオグラム、B: Aの膜を抗PKD2抗体でウエスタンブロットしたもの

5-1-2) PKD2 キナーゼ活性の IL-2 プロモーター活性化への影響

IL-2p/GFP を持つ 2H10 細胞に、強力な発現プロモーターであるヒトの蛋白質ポリペプチド伸長因子 (EF-1α) を用い、その下流に PKD2-GFP 遺伝子が結合したコンストラクトをレンチウイルス法により導入した。TCR 刺激により IL-2 プロモーターが活性化し、産生される GFP の量を、抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロットにより調べた。この GFP (分子量約 30 kDa) と各 PKD2-GFP (分子量約 130 kDa) とは、分子量の違いにより容易に区別できる。

EF-1αプロモーターにより各 PKD2-GFP を発現させると、TCR 刺激がない場合でも各 PKD2-GFP の発現が抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロットで確認できた (図 6A、上段)。TCR 刺激を行うと、その発現量は低下する傾向がみられたが、IL-2 プロモーターの活性化により産生される GFP はどちらのタイプの PKD2 を発現させても 2H10 と比べて増加した (図 6A、中段)。この際、WT-PKD2-GFP と比較して Δ PH-PKD2-GFP はその発現量が低いにも関わらず (図 6A、

上段)、高い IL-2 プロモーター活性を示した。ΔPH-PKD2 および WT-PKD2 の結果から、PKD2 のキナーゼ活性は TCR 刺激による IL-2 プロモーター活性化に関与していることが示された。

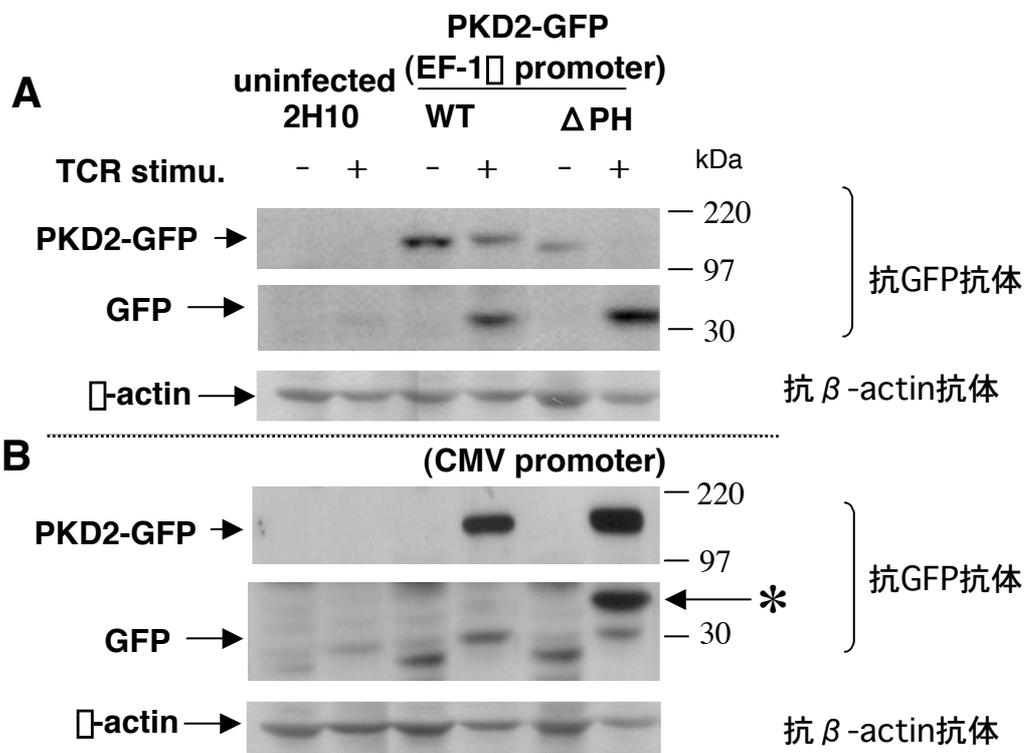


図6. PKD2-GFP強制発現プロモーターの違い (A: EF-1 α , B: CMV)によるPKD2-GFP蛋白質発現量とPKD2によるIL-2プロモーター活性化の比較

IL-2プロモーター遺伝子を導入したJurkat細胞 (2H10) にWT-PKD2-GFPおよび Δ PH-PKD2-GFPを異なるプロモーターで発現させた。TCR刺激後、24時間培養し、全細胞を可溶化して、抗GFP抗体でウエスタンブロットし、GFP発現量を調べた。また各レーンのサンプル量の確認のために、抗 β -actin抗体を用いて β -actinの量を調べた。

サイトメガウイルス (CMV) は、ヒトに感染する通常無害 (不顕性) のウイルスである。CMV プロモーターは、哺乳動物細胞内で遺伝子の恒常的な発現を行う。PKD2 の発現プロモーターとして CMV を用いた場合の IL-2 プロモーター活性を、2H10 細胞に PKD2-GFP 遺伝子を導入した系において調べた。

EF-1 α プロモーターの場合と異なり、TCR 刺激のない場合、CMV プロモーターでは各 PKD2-GFP は、抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロットではほと

んど観察できない程度の発現量であったが、TCR 刺激により各 PKD2-GFP 蛋白質の発現量は著明に増加した (図 6B、上段)。CMV プロモーターを用いた場合においても、どちらのタイプの PKD2 を発現させたものも、TCR 刺激により 30 kDa の位置に見られる GFP のバンドは 2H10 のものより増加した。しかし、EF-1 α プロモーターの場合と異なり Δ PH-PKD2 では WT-PKD2 より GFP の産生はむしろ少なく、そのすぐ上に抗 GFP 抗体と反応する別のバンド (*) が見られた (図 6B、中段)。このバンドは IL-2 プロモーター遺伝子を持たない通常の Jurkat 細胞に Δ PH-PKD2-GFP 遺伝子を導入したのもでも、TCR 刺激により出現したので、 Δ PH-PKD2-GFP の C 末端側に由来する分解物と考えられた。

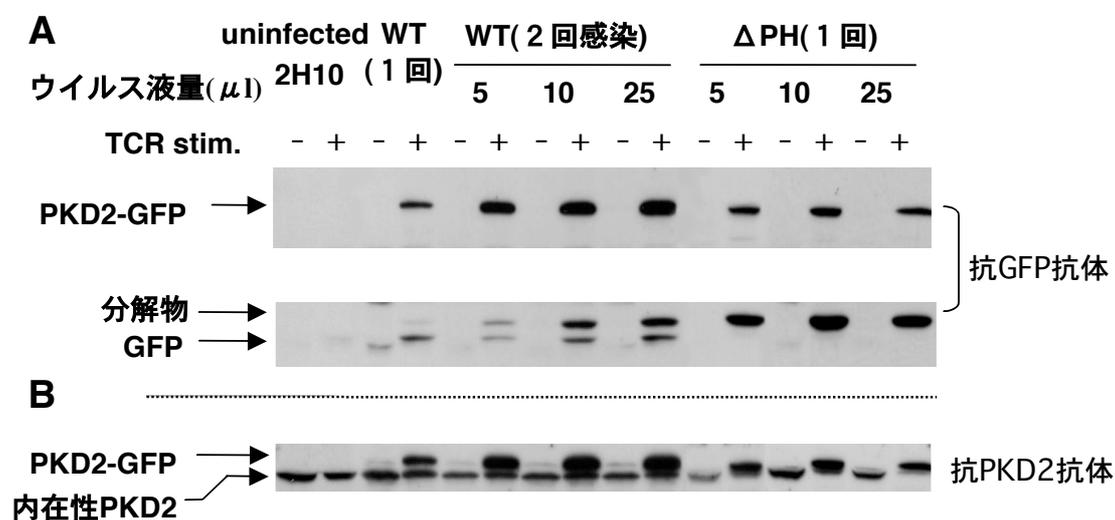


図7. PKD2-GFPの発現量とIL-2プロモーター活性化および PKD2-GFP 分解の比較

2H10細胞 (5×10^4) に感染させるウイルス液の量を5-25 μ l 変化させた。細胞を溶解し、SDS-PAGEで分離後、ウエスタンブロットにより検出した。PKD2-GFP : CMV プロモーター，ウエスタンブロット：(A) 抗GFP抗体；(B) 抗PKD2抗体

すでに WT-PKD2-GFP を発現させた 2H10 細胞に再度ウイルスを感染させて、WT-PKD2-GFP の発現量をさらに増加させた場合、その発現量の増加に伴いこの分解物のバンドが増加することが観察された (図 7A、下段)。抗 PKD2 抗体を用いたウエスタンブロットの結果 (図 7B) から、TCR 刺激したものでは、PKD2-GFP の発現量は内在性の PKD2 量と比較して、多くても同等~2、3 倍程度であった。

図 8 に示すように、この分解物の生成はカスパーゼの阻害剤である FMK により阻害されたことから、カスパーゼが作用するアポトーシスに関与している

と考えられた。

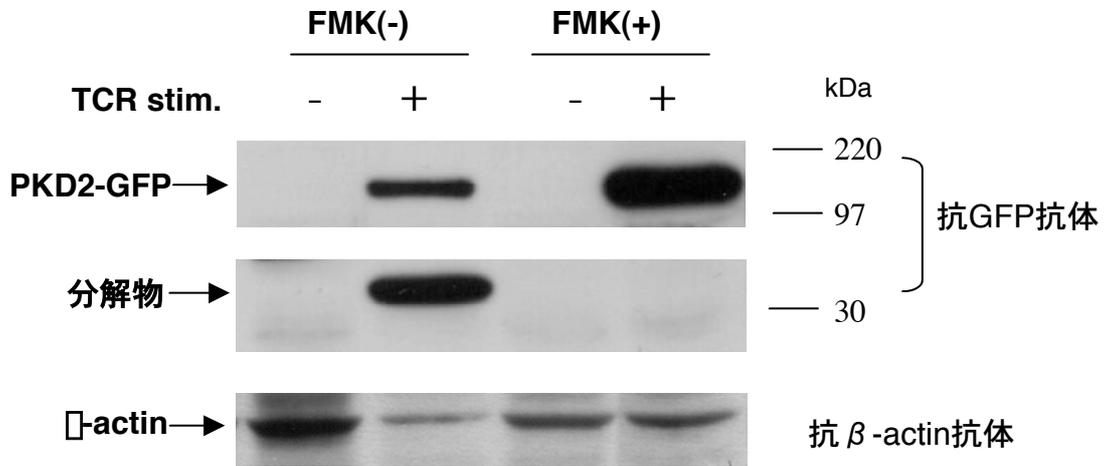


図8. TCR刺激による Δ PH-PKD2-GFPの分解物生成はFMKにより抑制された

Δ PH-PKD2-GFP (CMVプロモーター) をトランスフェクトした2H10細胞 (2×10^5) に $25 \mu\text{M}$ のFMKを作用させ、 37°C 、1時間培養後、抗-CD3抗体と2次抗体によりTCR刺激し、さらに 37°C 、24時間培養した。細胞を可溶化後、SDS-PAGEで分離し、抗GFP抗体を用いたウエスタンブロットにより検出した。また各レーンのサンプル量の確認のために、抗 β -actin抗体を用いて β -actinの量を調べた。

そこで、TCR 刺激 48 時間後の Δ PH-PKD2-GFP/Jurkat 細胞と GFP/Jurkat 細胞を PI 染色し、死細胞を FACS で調べたところ、図 9 に示すように、活性化型の Δ PH-PKD2-GFP は GFP のみを発現させたものに比べ、多くの細胞死が認められた。

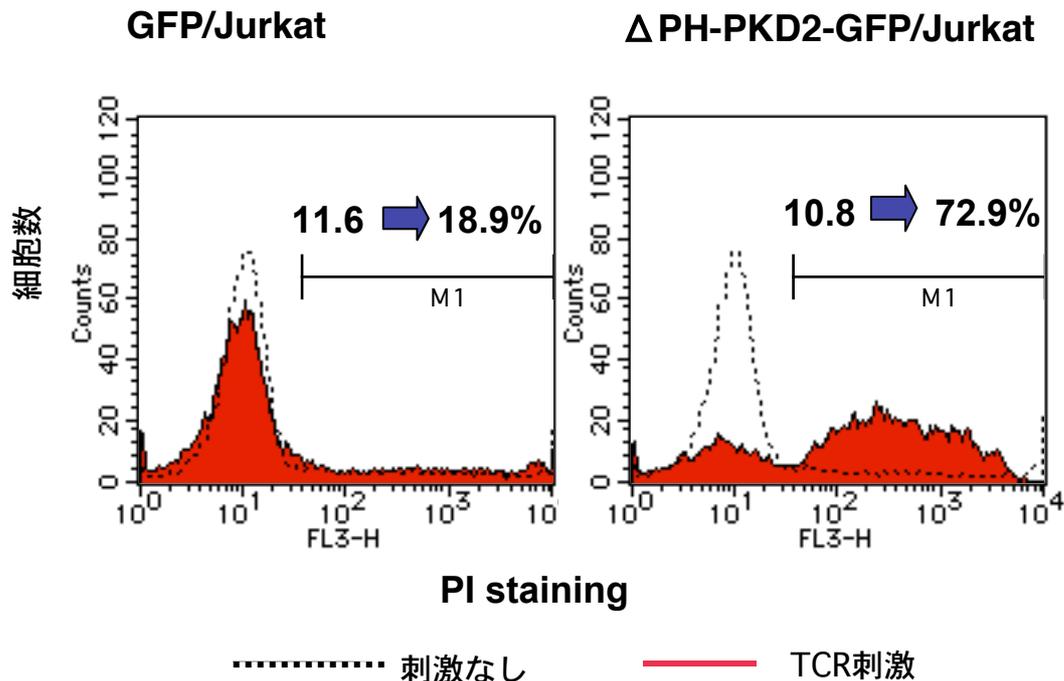


図9. Δ PH-PKD2-GFPを発現するJurkat細胞は、TCR刺激により誘導される細胞死が増強している

図中の数値はTCR刺激前後の死細胞数の割合を示す。
 Jurkat細胞 にΔ PH-PKD2-GFP又はGFPのみを発現させた細胞(CMVプロモーター)をTCR刺激し、48時間37℃にて培養後、PIにより死細胞を染色し、FACSにて死細胞の割合を求めた。

5-2) PKD2 の高いキナーゼ活性は TCR 刺激による細胞死を増強する

5-2-1) PKD2 のキナーゼ活性と細胞死の関係

PKD2 のキナーゼ活性と細胞死の関係を調べるために、各 PKD2-GFP を発現させた Jurkat 細胞を TCR 刺激し、誘導される死細胞を PI 染色して、FACS で定量した。図 10 に示すように、WT-PKD2-GFP 発現 Jurkat およびノーマルの Jurkat では、刺激後の時間経過とともに増加した細胞死は僅かであるのに対し、活性化型の Δ PH-PKD2-GFP 発現 Jurkat では著明に増加した。この結果は、活性化 PKD1 が U-937 骨髄性白血病細胞の細胞死を高めた Endo ら (19) の結果と符合するものである。

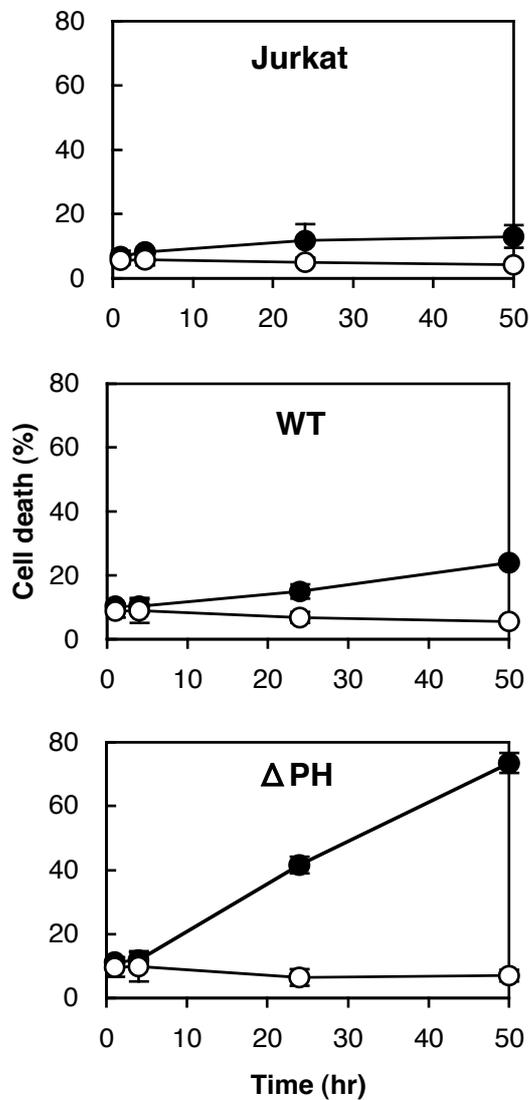


図 10. PKD2酵素活性の違いによる細胞死の経時的変化

PKD2-GFPを発現させたJurkat細胞 (CMVプロモーター)をTCR刺激し、一定時間37℃にて培養後、PIにより死細胞を染色し、FACSにて死細胞の割合を求めた。

○ : TCR刺激なし

● : TCR刺激あり

5-2-2) PKD2 活性の増加に伴い誘導される細胞死に対する FMK の効果

アポトーシスによる細胞死にはカスパーゼ依存性のものとアポトーシス誘導因子の関与するカスパーゼ非依存性のものが知られている。PKD2 による細胞死へのカスパーゼの関与を調べるため、カスパーゼ阻害剤 (FMK) 存在下で各細胞の TCR 刺激を行った(図 11)。FMK の存在下では、WT-PKD2-GFP 発現細胞および Jurkat 細胞ではバックグラウンドレベルまで細胞死が抑制された。ΔPH-PKD2-GFP 発現細胞では、FMK 非存在下では TCR 刺激により 40~50%の死細胞が生ずるが、FMK 処理により 17%程度までに抑制された (図 11)。したがって PKD2 のキナーゼ活性により誘導されるアポトーシスの大部分はカスパーゼ依存性と思われた。

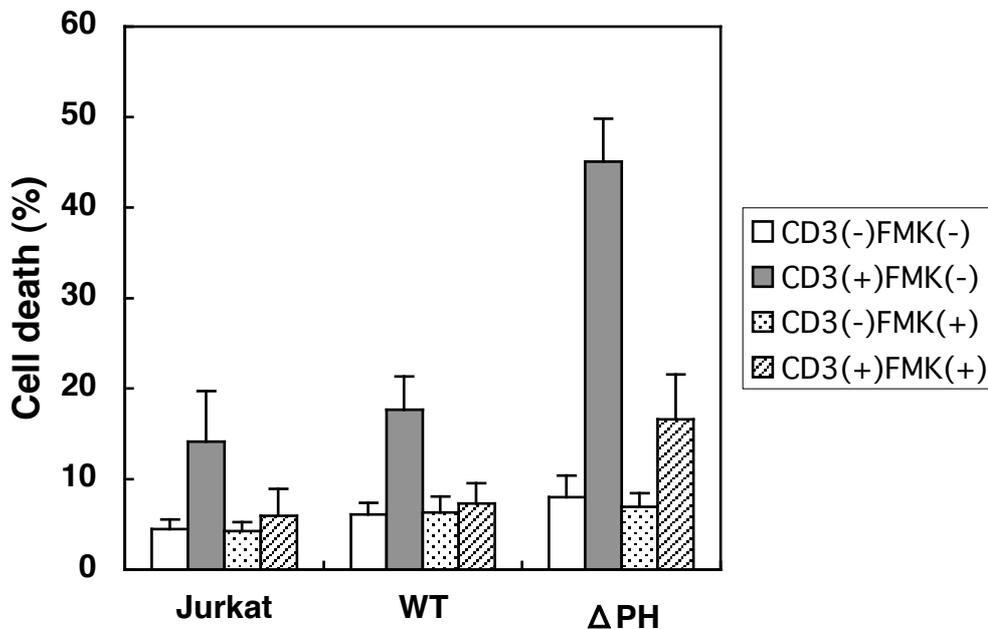


図 11. PKD2-GFP発現細胞のTCR刺激により誘導される細胞死はFMK(pan-caspase inhibitor)により抑制された

PKD2-GFP (CMVプロモーター)を発現させたJurkat細胞 (2×10^5)を $25 \mu\text{M}$ FMKで前処理し、1時間、 37°C 培養後、TCR刺激し、さらに24時間、 37°C にて培養後、PIにより死細胞を染色し、FACSにて死細胞の割合を求めた。

5-2-3) PKD2 活性の増加に伴い誘導される細胞死に対する PKD 阻害剤の効果

Gö6976 はカルシウム依存性の古典的 PKC (cPKC; α 、 β I、 β II、 γ) と PKD に特異的な阻害剤である (IC_{50} for PKC η = 6 nM, IC_{50} for PKD1 = 20 nM)。Gö6976 の 1μ M で各 PKD2-GFP 発現 Jurkat 細胞を 30 分間前処理した後、TCR 刺激を行い、細胞死に対する Gö6976 の影響を調べた。図 12 に示すように、TCR 刺激による Δ PH-PKD2-GFP 発現細胞の細胞死が、Gö6976 処理により著明に抑制されたことから、この細胞死が PKD2 のキナーゼ活性により誘導される可能性が支持された。

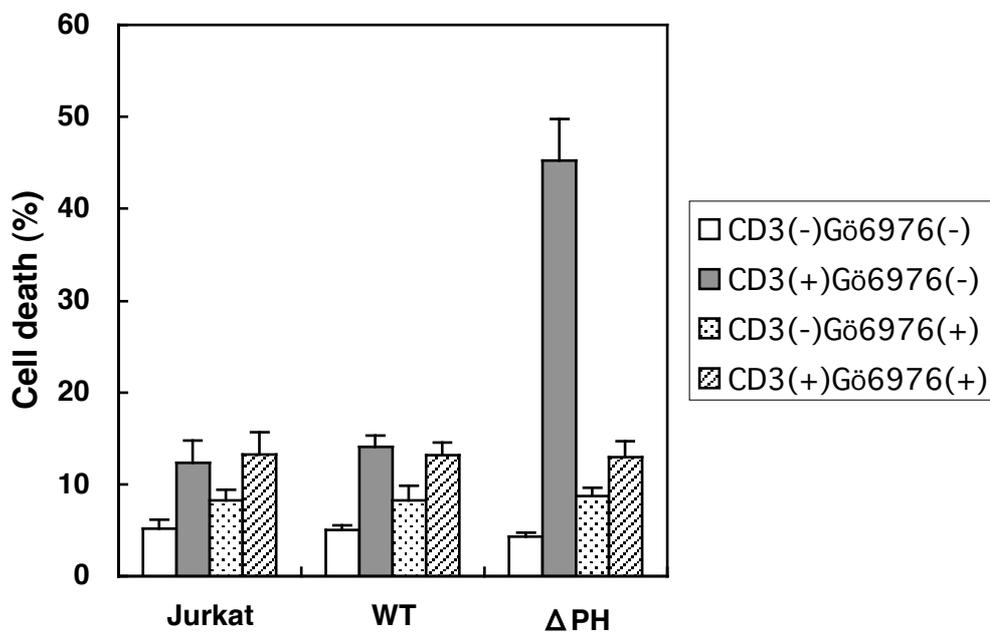


図 12. TCR刺激により誘導される細胞死に対するPKD阻害剤の影響

PKD2-GFP (CMVプロモーター)を発現させたJurkat細胞 (2×10^5)を 1μ MのGö6976で前処理し、30分、 37°C で培養後、TCR刺激し、さらに24時間、 37°C にて培養後、PIにより死細胞を染色し、FACSにて死細胞の割合を求めた。

5-3) TCR 刺激による PKD2-GFP の細胞内分布の変化

PKD2の細胞内局在を調べるため、PKD2-GFPを発現させた細胞を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。図13に示すように、WT-PKD2-GFP発現細胞では核部分が抜け、主に細胞質に存在することが示された。同じ細胞をTCR刺激すると、蛍光は細胞全体に広がり、WT-PKD2-GFPの一部は核に移行すると思わ

れた。いっぽう、 Δ PH-PKD2-GFP発現細胞においてはTCR刺激の有無に関わらず細胞全体に存在した。したがって、キナーゼ活性を持つ活性化PKD2の一部は核に移行するものと思われた。

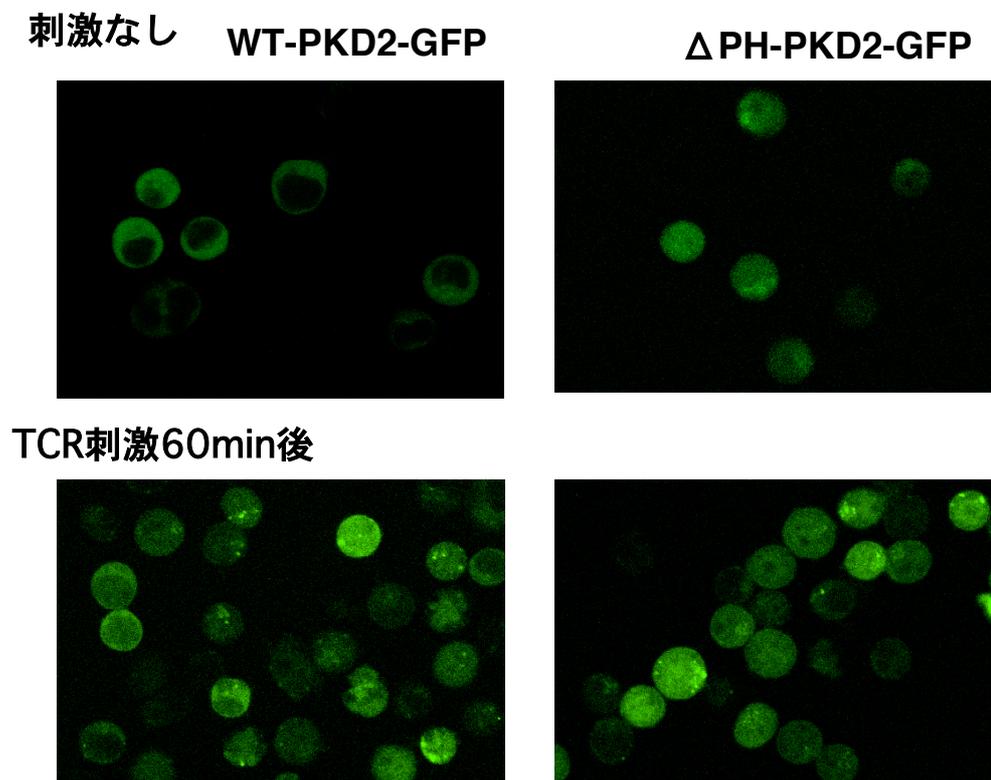


図13. TCR刺激によるPKD2-GFPの細胞内局在の変化

Jurkat細胞にPKD2-GFPを発現させた細胞（CMVプロモーター）をTCR刺激して共焦点顕微鏡にて観察した。

5-4) PKD2の活性増強は、TCR刺激によるNur77 mRNAの発現量を増加する

核内ステロイド孤児受容体である Nur77 は、胸腺細胞の負の選択時におけるアポトーシスに関与し、TCR刺激に応答してその遺伝子の発現が上昇する（20, 21）。通常、胸腺細胞では、Nur77プロモーターには転写因子MEF2Dが結合し、これにヒストン脱アセチル化酵素（HDAC7）が結合することにより、転写が抑制されている（22, 23）。HDAC7がリン酸化されMEF2Dから離れると、Nur77の転写が起これアポトーシスに進む経路が提唱されており、HDAC7をリン酸

化するものとして、PKD1 が報告されている (24)。そこで Δ PH-PKD2-GFP を発現した細胞においても Nur77 遺伝子の発現が増加しているかどうかを GFP のみを発現させた Jurkat 細胞と比較した(図 14)。TCR 刺激後の 2 時間で Nur77 mRNA 発現を RT-PCR 法により調べたところ、 Δ PH-PKD2-GFP 発現細胞では、GFP のみを発現する細胞に比べ増幅される cDNA 量が増加した。したがって、Jurkat 細胞においても、Nur77 の発現を増加させることにより、より強いアポトーシスを誘導する可能性が考えられた。実際、図 13 で示したように、PKD2 は TCR 刺激によりその一部が核に移行する。 β -アクチンの mRNA の発現は RT-PCR のコントロールとして用いたものであり、両細胞において発現量に差は見られなかった。

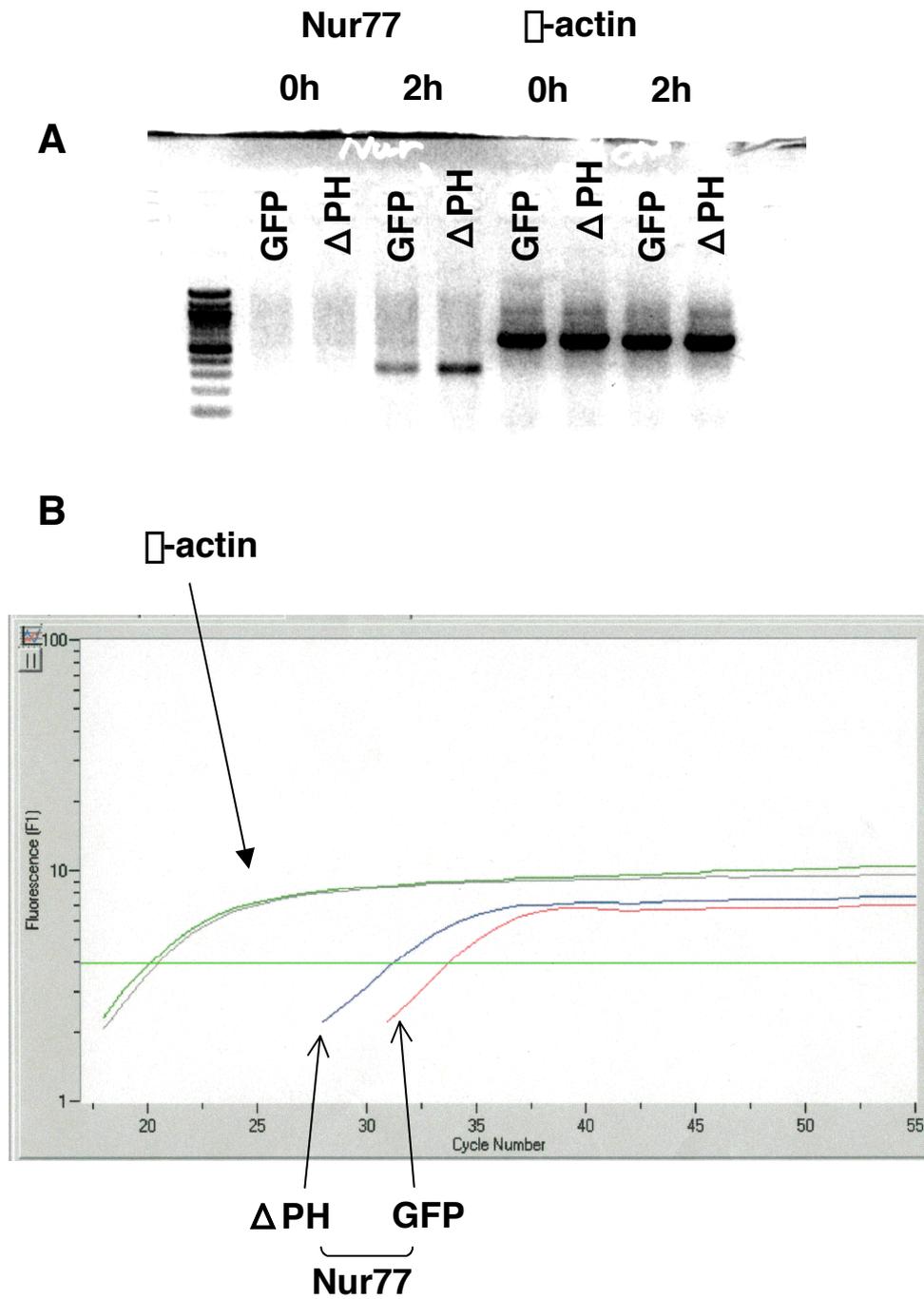


図14. ΔPH-PKD2-GFPを発現させた細胞ではNur77の mRNAの発現量が増加する

A: RT-PCR, B: Real Time-PCR

5-5) PKD2 活性化細胞において特異的に発現するリン酸化蛋白質の同定

これまでに PKD2 のキナーゼ活性は、IL-2 プロモーターの活性化やアポトーシスの誘導などに関与することを示してきた。しかし、PKD2 の基質は何か、それがどのようなシグナル伝達経路に関わるのかは不明である。そこで、まず PKD2 活性導入および TCR 刺激によりどのような分子が特異的にリン酸化されるのかを解明することを目的に、 Δ PH-PKD2-GFP 発現 Jurkat 細胞とノーマルな Jurkat 細胞をそれぞれ TCR 刺激し、両者からリン酸化蛋白質を回収し 2 次元電気泳動で比較した。図 15 に示すように、 Δ PH-PKD2-GFP 発現細胞では Jurkat よりも著明に増加するいくつかのスポットが認められた。これらのスポットをゲルより切り出し、ゲル内トリプシン消化後、エレクトロスプレー法により試

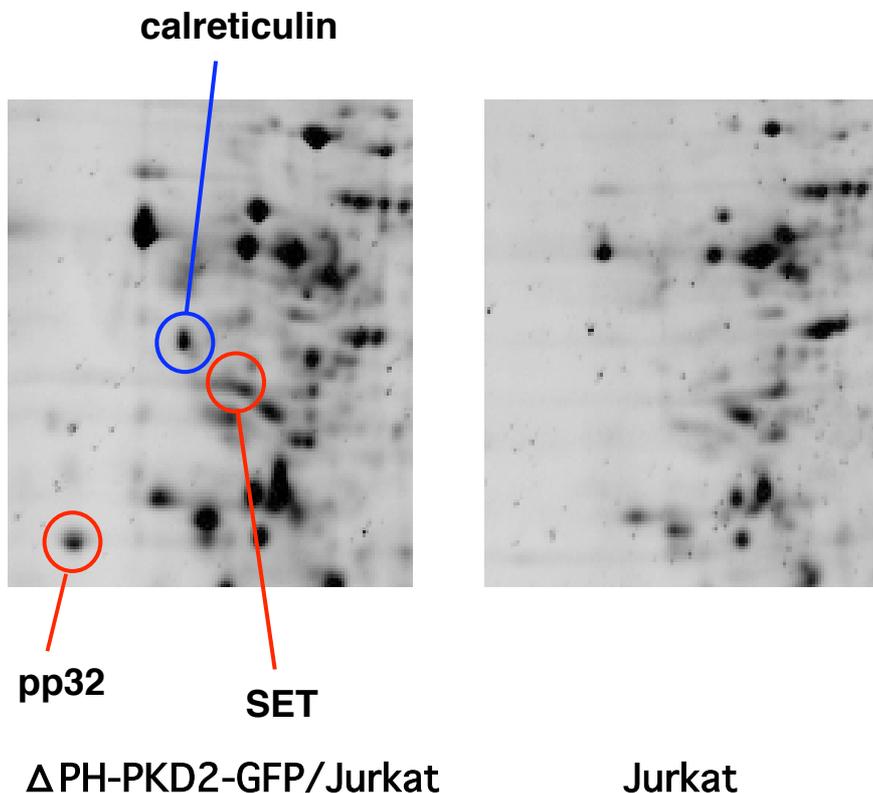


図15. 常時活性型PKD2を強発現するJurkat細胞をTCR刺激するとSET、pp32およびcalreticulinのリン酸化が増強した

Δ PH-PKD2-GFP発現細胞 (CMVプロモーター) とJurkat細胞をTCR刺激後、12時間37°Cで培養し、細胞を可溶化後、リン酸化プロテイン精製キットによりリン酸化タンパク質を回収し、2次元電気泳動を行った。染色はSYPROルビーで行った。

料をイオン化し、質量電荷比 (m/z) 値の違いでイオンの飛行時間が異なる飛行時間型質量分析法 (Time of Flight Mass Spectrometry : TOF-MS) によりフラグメントイオンを測定した。これらのうちペプチドイオンと思われる 2 価または 3 価のイオンをさらにフラグメント化して生成物イオンスペクトル (MS/MS スペクトル) を測定した。次いで、データベース検索によりそれらアミノ酸配列ならびに蛋白質の同定を行った。表 1 に各々の蛋白質を同定したペプチド配列を示した。

カルレティキュリンは Ca^{2+} 結合蛋白質であり小胞体に局在している。SET と pp32 は核内に存在し、両者で複合体を形成し、ヒストンをアセチル化する p300/CBP や PCAF などのヒストンアセチル転移酵素 (histone acetyl transferase : HAT) の活性を抑制する阻害剤 (inhibitor of acetyltransferase : INHAT) として機能している(25-27)。 Δ PH-PKD2-GFP 発現細胞においてリン酸化 SET や pp32 の量が昂進していたことは、PKD2 の基質であることが考えられた。

表 1 TOF-MS フラグメントとその MS/MS により同定されたペプチドのアミノ酸配列

蛋白質	TOF-MS フラグメントイオン (価数)	ペプチドアミノ酸配列
Calreticulin	804.30(2+)	FYALSASFEPFSNK
	610.30(2+)	GQTLVVQFTVK
pp32	1064.80 (3+)	LEGLTDEFEELEFLSTINVGLTSIA
	784.00 (2+)	LLPQLTYLDGYDR
	642.30 (3+)	LLPQLTYLDGYDRDDK
	551.20 (2+)	VSGGLEVLAEK
SET	921.00(2+)	IDFYFDENPYFENK
	637.40(2+)	LNEQASEEILK
	604.80(2+)	VEVTEFEDIK

5-6) PKD2 の基質としての SET

SET 蛋白質および pp32 蛋白質が、実際に PKD2 によりリン酸化されるかについて検討した。Δ PH-PKD2-GFP、キナーゼ活性のない KD-PKD2-GFP および GFP のみを発現する Jurkat 細胞をそれぞれ TCR 刺激し、His-SET および His-pp32 の His-タグリコンビナント蛋白質を基質に、*in vitro* キナーゼアッセイを行った。His-pp32 は、PKD2 のキナーゼ活性に関係なく、また TCR 刺激の有無に関係なく、非特異的な ³²P の標識が見られた (データ不掲載)。His-SET については、図 16A に示すように、TCR 刺激により Δ PH-PKD2-GFP についてのみ強くリン酸化されたバンドが、His-SET (分子量 33kd) の分子量に相当する位置に見られた。コントロールとしたキナーゼ活性を持たない KD-PKD2-GFP や GFP 蛋白質のみでは、殆ど放射能の取込みは見られなかった。図 16B に示すように免疫沈降物中では Δ PH-PKD2-GFP のみがキナーゼ活性を示した。また図 16C は、免疫沈降物中の PKD2-GFP の蛋白質量を示し、Δ PH-PKD2-GFP 発現細胞が KD-PKD2-GFP と比較して、特に大量の PKD2-GFP の蛋白質を発現しているのではないことを示す。

次に、図 16A で見られたバンドが大腸菌にもともと存在する蛋白質によるものではないことを、His-SET および pET-28a ベクターのみを大腸菌に導入しヒスチジンタグのみを発現させた菌より得られた画分 (Mock) を基質にして、PMA 刺激により活性化した PKD2 の *in vitro* キナーゼアッセイにより検討した (図 17)。内在性の PKD2 にはわずかに活性があるため、PMA 刺激のない場合でも多少の His-SET のリン酸化がみとめられたが、PMA 刺激により PKD2 は、さらに強力に His-SET をリン酸化した。いっぽう Mock を基質にした場合には、His-SET の分子量の位置に相当するバンドは見られなかった。したがって、観察された His-SET の分子量の位置のリン酸化バンドは、大腸菌由来の何らかの蛋白質によるものではないことが示された。

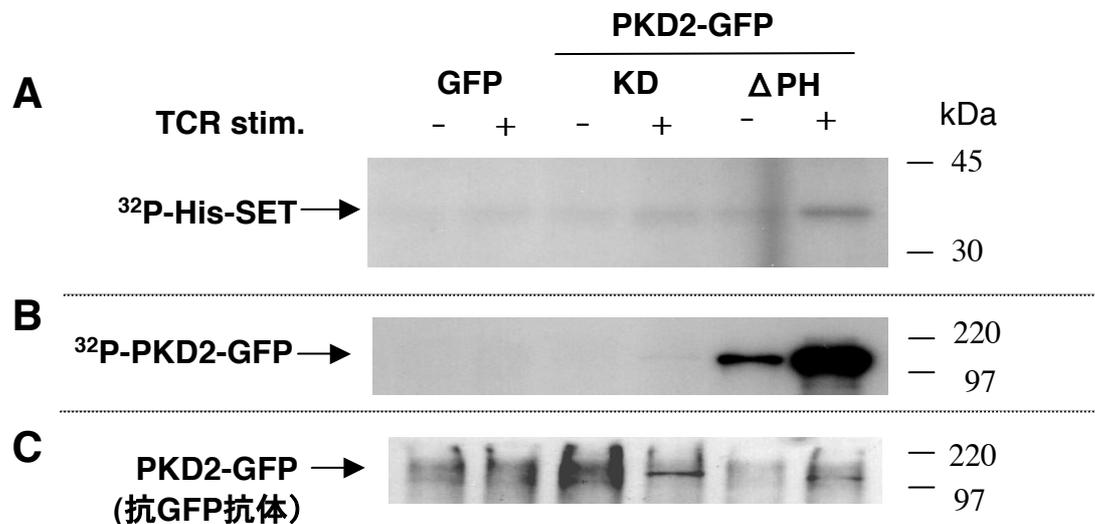


図16. His-SET蛋白質を用いたPKD2-GFPの*in vitro*キナーゼアッセイ

JurkatにΔPH-PKD2-GFP, キナーゼ活性のないKD-PKD2-GFPおよびGFPのみを発現させた細胞 (CMVプロモーター) をTCR刺激後、12時間培養した。細胞を可溶化後、抗GFP抗体で免疫沈降(プロテイン A ビーズ)したもの [γ- ^{32}P] ATPを用いてHis-SETをラベルした。

A: 反応上清のSDS-PAGEゲルのオートラジオグラム B: プロテインA ビーズに保持されたPKD2-GFPをSDS-PAGE後、ニトロセルロース膜に転写し、自己リン酸化を見たもの C: Bの膜を抗GFP抗体でウエスタンブロットしたもの

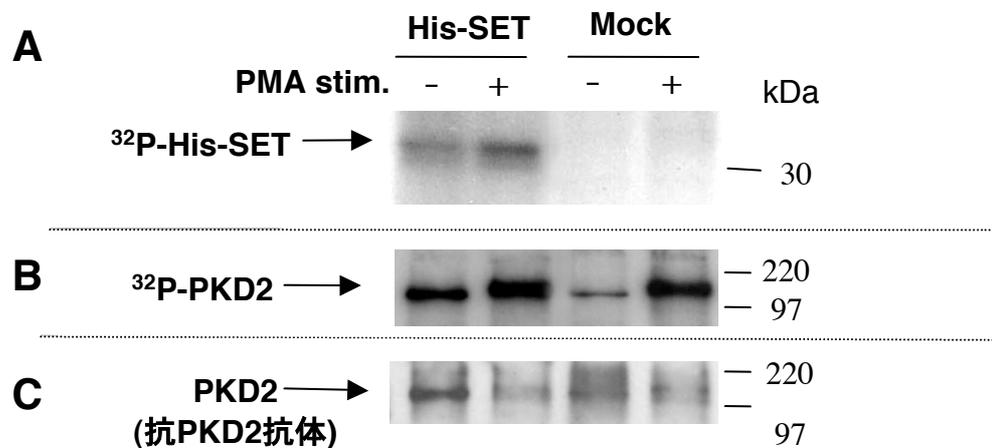


図17. His-SETはJurkat細胞の活性化した内在性PKD2によりリン酸化された

Jurkat細胞をPMA (30ng/ml) で1時間刺激後、細胞を可溶化し、抗PKD抗体でIPしたもの (プロテインAビーズ) をキナーゼとして用い、His-SETを基質とした。

A: 反応上清を泳動したオートラジオグラム B: プロテインA ビーズに保持されたPKD2を泳動してニトロセルロース膜に転写し、自己リン酸化を見たもの C: Bを抗PKD2抗体でウエスタンブロットしたもの

6 考察

本研究では、ヒト PKD2 の T 細胞における役割の解明を目的に、PKD2 蛋白質の C 末端側に GFP 標識をつけた野生型ならびに各種 PKD2 変異体をレンチウイルス法にて Jurkat 細胞に発現させ、その機能の解析を行った。同法を用いることにより、ほぼ全ての細胞に目的遺伝子を導入させることができたが、プロモーターの種類によりその発現量に違いがみとめられた。CMV プロモーターを用いた場合は、1 回のウイルス感染では TCR 刺激がない場合、蛍光顕微鏡による目視や FACS ではその発現が確認できたが、抗 GFP 抗体を用いたウエスタンブロット法ではほとんど検出できない程度の発現量であった。しかし、これらを TCR 刺激すると導入した PKD2-GFP 蛋白質の発現量は著明に増加した。いっぽう、EF-1 α プロモーターを用いた場合は、TCR 刺激がない場合でもウエスタンブロット法で PKD2-GFP 蛋白質の発現が十分観察できる程度であったが、CMV プロモーターと異なり、TCR 刺激によりその発現量が増加することはなく、むしろ減少する傾向が見られた。B 細胞に EF プロモーターを用いて GFP-PKD1 を発現させた細胞の BCR 刺激でも同様な現象が観測されている (28)。

CMV プロモーターには転写因子 AP-1, CREB および NF- κ B の結合モチーフが存在するが、これらはどれも TCR 刺激により活性化されるものである (29)。これらの転写因子が CMV プロモーター下流の遺伝子の発現を増加させることにより蛋白質の発現が上昇した可能性が考えられた。IL-2 プロモーターの活性化は PKD2 のキナーゼ活性と関係することが明らかとなったが、そのメカニズムとして IL-2 遺伝子の発現はエンハンサー領域に結合する転写因子、NF-AT, NF-IL-2-A, NF- κ B および AP-1 等により制御されているので (30)、これらの転写因子の活性化に PKD2 が関与している可能性がある。また PKD2 も PKD1 と同じように、リン酸化により活性化すると、核に移行することが観察されたことから、核内に移行した活性化 PKD1 が HDAC7 をリン酸化することにより、Nur77 遺伝子の発現を誘導するような (24)、種々の遺伝子の転写調節に関係していることも考えられる。このことは、後に述べる INHAT 機能を持つ SET のリン酸化に PKD2 が関与することとも合わせて、PKD2 の 1 つの役割として核内での遺伝子発現の調節に関わるのではないかという作業仮説が立てられる。現在、この仮説に基づき、研究を引き続き行っている。

PKD2 の適度な発現は、TCR 刺激により IL-2 プロモーターを活性化させ細胞

増殖の方に作用するシグナル経路が働くと思われるが、過剰な発現は細胞死のシグナル経路へと傾くと考えられた。ウエスタンブロットによる解析から、過剰発現した PKD2-GFP が分解することがわかり、カスパーゼの作用により PKD2 が分解されることが示唆された。分解物の分子量（約 34 kDa）から、GFP の分子量を考慮すると、PKD2 の C 末端から 60 残基程度上流で分解していることになる。PKD1 のカスパーゼによる分解については、A431 細胞に PKD1 を発現させ、doxorubicin にてアポトーシスを誘導した時、カスパーゼ 3 により 52kDa と 62kDa の 2 つの分解物を生じることが報告されている(31)。また、Endo らはヒト U-937 骨髄性白血病細胞を用いた遺伝毒性物質によるアポトーシスにおいて、カスパーゼ 3 の作用により PKD1 から 60k の分解物を生じることが報告している (19)。今回、観察された分解物はこれらのものよりも分子量の小さいものである。カスパーゼ 3 の切断モチーフは Asp-X-X-Asp であるが、同様なモチーフを PKD2 で検索したが該当するものは見出せなかった。また、Z-VAD FMK は広範囲のカスパーゼの阻害剤であり、カスパーゼ 3 の以外にもカスパーゼ 1、4、7 を阻害する。これらのカスパーゼの切断モチーフも見出せなかった。現在、分解物バンドを PVDF 膜に転写し、N 末端分析を行うことにより切断部位を同定することを試みている。

PKD2 の基質として SET 蛋白質を同定した。PKD1 のリン酸化モチーフとして、Parra らはロイシンの 5 残基下流のセリンをリン酸化すると述べている (LXXXXS) (24)。また、Doppler らは (LXRXXS) をあげている (32)。SET と pp32 のアミノ酸配列中にこれらのモチーフを探してみると SET および pp32 に Parra らのモチーフがおのおの 2 箇所あり、PKD2 によるリン酸化部位である可能性がある。SET 蛋白質には α と β のサブタイプが知られている。両者は N 末端のアミノ酸配列の一部が異なるが、それ以外は全く同じ配列を持ち、88% の同一性がある。本実験で用いた SET は α 型のアミノ酸配列をもつものである。Adachi ら (33) は、種々のヒト培養細胞株を用いて *in vivo* で ^{32}P 標識化することにより、リン酸化される β 型 SET の N 末端領域に存在する 2 つのセリン残基を同定し、このリン酸化が PKC によると予想している。しかしこの配列は α 型には存在しないので、本研究で見出した PKD2 による SET のリン酸化部位は、Adachi らが β 型について見出したセリン残基とは異なるものである。

核内の SET 蛋白質のリン酸化が、次にどのような現象を誘導するのかは不明であるが、pp32 と SET の複合体が INHAT としてヒストンのアセチル化を抑制

していることから、核内に移行した活性化 PKD2 が INHAT 複合体をリン酸化することにより、ヒストンのアセチル化を制御し、その結果として各種遺伝子の発現をコントロールするのではないかという興味深い可能性が考えられる。実際、胸腺細胞において PKD1 は TCR 刺激により核内に移行し、ヒストン脱アセチル化酵素 7 をリン酸化する (24) ことと考え合わせて、PKD のグローバルな作用の 1 つは、ヒストンアセチル化の制御であるかもしれない。

7 結語

本研究により 1) PKD2 は TCR 刺激による IL-2 プロモーターの活性化に関与することが明かとなった。しかし、2) 常時活性化型 PKD2 を過剰に発現させた場合、TCR 刺激により PKD2 の分解および細胞死が誘導された。また、3) PKD2 の基質を探索したところ、核蛋白質で、ヒストンのアセチル化の制御に関与する SET が同定され、4) TCR 刺激により PKD2 の一部が核移行することと合わせて、PKD2 が TCR 刺激による遺伝子の転写制御を行う可能性が考えられた。

8 謝辞

本研究において終始ご指導下さいました熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座西村泰治教授に深く感謝致します。

本研究の詳細な研究方法に関して直接ご指導頂きました熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座入江厚助手に深く感謝致します。研究方法などについてご指導、ご助言頂きました熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座千住覚助教授および中面哲也博士（現国立ガンセンター）に深く感謝致します。

本研究の実験方法についてご指導下さいました熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座栗井博丈氏、金正蘭氏に深く感謝致します。

本研究に際し、終始温かい御支援を戴きました熊本大学大学院医学研究科免疫識別学講座の諸氏に深謝致します。

レンチウイルスベクターシステムをご供与いただいた理化学研究所三好浩之博士に深謝致します。

9 参考文献

- 1) Germain, R.N., and Stefanova, I. (1999) *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 467-522.
- 2) Irie, A., Chen, Y. Z., Tsukamoto, H., Jotsuka, T., Masuda, M., Nishimura, Y. (2003) *Eur. J. Immunol.* **33**, 1497-1507.
- 3) Valverde, A.M., Sinnott-Smith, J., Van Lint, J. and Rozengurt, E. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8572-8576.
- 4) Johannes, F.J., Prestle, J., Eis, S., Oberhagemann, P. and Pfizenmaier, K. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 6140-6148.
- 5) Sturany, S., Van Lint, J., Muller, F., Wilda, M., Hameister, H., Hocker, M., Brey, A., Gern, U., Vandenheede, J., Gress, T., Adler, G., and Seufferlein, T. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 3310-3318.
- 6) Hayashi, A., Seki, H., Hattori, A., Kozuma, S. and Saito, T. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1450**, 99-106.
- 7) Rykx, A., De Kimpe, L., Mikhalap, S., Vantus, T., Seufferlein, T., Vandenheede, J. R., and Van Lint, J. (2003) *FEBS Letters* **546**, 81-86.
- 8) Waldron, R. T., and Rozengurt, E. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 154-163.
- 9) Rey, O., Young, S. H., Cantrell, D., and Rozengurt, E. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 32616-32626.
- 10) Matthews, S. A., Iglesias, T., Rozengurt, E., and Cantrell, D. (2000) *Embo J.* **19**, 2935-2945
- 11) Matthews, S., Iglesias, T., Cantrell, D., and Rozengurt, E. (1999) *FEBS Lett.* **457**, 515-521.
- 12) Rey, O., Sinnott-Smith, J., Zhukova, E., and Rozengurt, E. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 49228-49235.
- 13) Liljedahl, M., Maeda Y., Colanzi, A., Ayala, I., Van Lint, J., and Malhotra, V. (2001) *Cell*, **104**, 409-420.
- 14) Hausser, A., Link, G., Bamberg, L., Burzlaff, A., Lutz, S., Pfizenmaier, K., and Johannes, F. J. (2002) *J. Cell Biol.* **156**, 65-74.
- 15) Maeda, Y., Beznoussenko, G. V., Van Lint, J., Mironov, A. A., and Malhotra, V. (2001) *Embo J.* **20**, 5982-5990
- 16) Rennecke, J., Rehberger, P.A., Furstenberger, G., Johannes, F.J., Stohr, M., Marks, F. and Richter, K.H. (1999) *Int. J. Cancer* **80**, 98-103.

- 17) Iglesias, T., and Rozengurt, E. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 410-416.
- 18) Matthews, S. A., Rozengurt, E., and Cantrell, D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 26543-26549.
- 19) Endo, K., Oki, E., Biedermann, V., Kojima, H., Yoshida, K., Johannes, F. J., Kufe, D., and Datta, R. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 18476-18481.
- 20) Liu, Z. G., Smith, S. W., McLaughlin, K. A., Schwartz, L. M., and Osborne, B. A. (1994) *Nature* **367**, 281-284.
- 21) Woronicz, J. D., Calnan, B., Ngo, V., and Winoto, A. (1994) *Nature* **367**, 277-281.
- 22) Woronicz, J. D., Lina, A., Calnan, B. J., Szychowski, S., Cheng, L., and Winoto, A. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6364-6376.
- 23) Dequiedt, F., Kasler, H., Fischle, W., Kiermer, V., Weinstein, M., Herndier, B. G., and Verdin, E. (2003) *Immunity* **18**, 687-698.
- 24) Parra, M., Kasler, H., McKinsey, T. A., Olson, E. N., and Verdin, E. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 13762-13770.
- 25) Kutney, S. N., Hong, R., Macfarlan, T., and Chakravarti, D. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 30850-30855.
- 26) Santa-Coloma, T. A. (2003) *Cerebellum* **2**, 310-320.
- 27) Seo, S. B., McNamara, P., Heo, S., Turner, A., Lane, W. S., and Chakravarti, D. (2001) *Cell* **104**, 119-130.
- 28) Wood, C. D., Marklund, U., and Cantrell, D. A. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 6245-6251.
- 29) Nel, A. E., Slaughter, N. (2002) *J. Allergy Clin. Immunol.* **109**, 901-915.
- 30) Smith, J. L., Collins, I., Chandramouli, G. V. R., Butscher, W. G., Zaitseva, E., Freebern, W. J., Haggerty, C. M., Doseeva, V., and Gardner, K. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 41034-41046.
- 31) Vantus, T., Vertommen, D., Saelens, X., Rykx, A., De Kimpe, L., Vancauwenbergh, S., Mikhalap, S., Waelkens, E., Keri, G., Seufferlein, T., Vandenabeele, P., Rider, M. H., Vandenheede, J. R., and Van Lint, J. (2004) *Cell. Signal.* **16**, 703-709.
- 32) Doppler, H., Storz, P., Li, J., Comb, M. J., and Toker, A. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 15013-15019.
- 33) Adachi, Y., Pavlakis, G. N., and Copeland, T. D. (1994) *FEBS Lett.* **340**, 231-235.

10 この修士論文に関する学会発表リスト

1) 九州バイオサイエンスシンポジウム

平成 17 年 9 月 2 日～3 日（於：熊本）

T 細胞抗原受容体刺激による IL-2 プロモーター活性に及ぼす PKD2 の作用
（熊本大・医） ○原田久美子、入江 厚、栗井博丈、金 正蘭、西村泰治

2) 2005 年日本免疫学会総会・学術集会

平成 17 年 12 月 13 日～15 日（於：横浜）

プロテインキナーゼ D2 (PKD2) は、TCR 刺激による IL-2 プロモーター
活性化に関与する。

（熊本大・院医薬・免疫識別） ○入江 厚、原田久美子、塚本博丈、
金 正蘭、西村泰治