

るということであろう。Kuが最終的なDNAの切断修復の過程でのみCSに関係しているかどうかは今後の課題であるが、少なくともKuがCSに関係していることがシグナル伝達の面からも明らかになったと考えている。以上のまとめを図4に示した。

KuはDNA切断端に結合するのみならず、他のDNA結合タンパクと会合したり、DNA上のある部位にとどまったりしてDNAの立体構造を変化させ、遺伝子発現調節に関与している可能性がある。今後IL-4R/CD40シグナルを一つのモデルとしてKuの修飾、局在、機能変化を細かく見ていくことにより、Kuのもつ多彩な機能を説明できる基礎的データを収集できるものと期待される。さらに、免疫不全症におけるKu分子の病態への関与も検討する予定である。

【文献】

- 1) Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., et al.: The CD40 antigen and its ligand. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 881, 1994.
- 2) Clark, E.A. and Ledbetter, J.A.: How B and T cells talk to each other. *Nature* 367: 425, 1994.
- 3) Casellas, R., Nussenzweig, A., Wuerffel, R., et al.: Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching. *EMBO J.* 17: 2404, 1998.
- 4) Manis, J.P., Gu, Y., Lansford, R., et al.: Ku70 is required for late B cell development and immunoglobulin heavy chain class switching. *J. Exp. Med.* 187: 2081, 1998.
- 5) Rolink, A., Melchers, F. and Andersson, J.: The SCID but not the RAG-2 gene product is required for Sm-Se heavy chain class switching. *Immunity* 5: 319, 1996.
- 6) Messier, H., Fuller, T., Mangal, S., et al.: p70 lupus autoantigen binds the enhancer of the T-cell receptor beta-chain gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 2685, 1993.
- 7) Shore, D.: Telomeres-unsticky ends. *Science* 281: 1818 (1998)
- 8) Kehry, M.R.: CD40-mediated signaling in B cells. Balancing cell survival, growth, and death. *J. Immunol.* 156, 2345, 1996.
- 9) Morio, T., Hanissian, S.H., Bacharier, L.B., et al.: Ku in the cytoplasm associates with CD40 in human B cells and translocates into the nucleus following incubation with IL-4 and anti-CD40 mAb. *Immunity.* 11:339, 1999.
- 10) Muller, C., Dusseau, C., Calsou, P., et al.: Human normal peripheral blood B-lymphocytes are deficient in DNA-dependent protein kinase activity due to the expression of a variant form of the Ku86 protein. *Oncogene* 16: 1553, 1998.

Ku in the cytoplasm associates with CD40 in human B cells and translocates into the nucleus following incubation with IL-4 and anti-CD40 mAb

Tomohiro Morio, Masako Imai, Kohsuke Imai, Sukeyuki Itoh, Masayuki Nagasawa, Shigeaki Nonoyama, Hiroji Ohkawa, Jun-ichi Yata

Department of Pediatrics, Tokyo Medical and Dental University

CD40 plays a critical role in survival, growth, differentiation, and class switching of B lymphocytes. Although Ku is required for immunoglobulin class switching, how CD40 signal transduction is coupled to Ku is still unknown. Here, we show that CD40 directly interacts with Ku through the membrane-proximal region of cytoplasmic CD40. Ku was confined to the cytoplasm in human primary B cells, and the engagement of CD40 on the B cells cultured in the presence of IL-4 resulted in the dissociation of Ku from CD40, translocation of Ku into the nucleus, and increase in

the activity of DNA-dependent protein kinase. These findings indicate that Ku is involved in the CD40 signal transduction pathway and may play an important role in the CD40-mediated events.

ZAP-70欠損T細胞におけるCD2を介したシグナル伝達の解析

上野英 授 (京都大学発達小児科)
片村憲 司 (京都大学発達小児科)
小安重 夫 (慶応大学微生物)
眞弓光 文 (福井医科大学小児科)

T細胞はT細胞レセプターを介した刺激のみならず、特定のペアの抗CD2抗体を用いた刺激によっても活性化されサイトカインを産生する。我々はCD2の刺激伝達系におけるZAP-70の役割を明らかにするために、CD8欠損症の患児より得たZAP-70欠損T細胞のCD2刺激による反応を検討した。ZAP-70欠損T細胞ではCD2刺激によるDNA合成、サイトカイン産生が欠如しており、CD2刺激系においてもZAP-70が必須であることが判明した。サイトカイン産生にはMAPKスーパーファミリーが重要な役割を果たしているが、ZAP-70欠損T細胞においてもCD2刺激によるMAPKスーパーファミリーの活性化が観察され、CD2の刺激伝達経路にはZAP-70非依存性にこれらの分子を活性化する系が存在することが示された。その一方で、ZAP-70欠損T細胞ではCD2刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇、及びNFATの活性化が見られなかった。Caイオノフォアの存在下でCD2刺激を加えた場合にのみZAP-70欠損T細胞のサイトカイン産生が見られたことより、CD2刺激伝達経路においてZAP-70は主にカルシウム濃度上昇に重要な役割を果たしていると考えられる。

【はじめに】

T細胞はその表面に存在するT細胞レセプターからの刺激により活性化する。CD2は抗原提示細胞から抗原提示を受ける際の二接着分子として機能するのみならず、特定の抗CD2抗体のペアの刺激のみでT細胞を活性化されることよりT細胞レセプター非依存性にT細胞を活性化しうると考えられる。CD2を介した刺激伝達経路は未だ明らかではなく、その多くはT細胞レセプターを介した刺激伝達経路を共有していると推測されている。しかしCD2の刺激伝達においてチロシンキナーゼの一つであるZAP-70の役割は未だ明らかではなく、CD2を介して刺激したT細胞ではZAP-70のT細胞レセプターとの鎖への結合が見られないこと、およびZAP-70がほとんどチロシンリン酸化されないことが示されている (Fig. 1)。今回我々はCD8欠損症の患児より得たZAP-70欠損T細胞を用いてCD2の刺激伝達系におけるZAP-70の役割について考察

した。

【方法】

1. CD8欠損症の患児、および正常コントロールより得た末梢血単核球を2種類の抗CD2抗体 (anti-T11-2, anti-T11-3, Dr. E. L. Reinherzより御供与) にて刺激し、 $[^3\text{H}]$ -thymidineを用いてDNA合成を測定した。
2. CD8欠損症の患児、および正常コントロールより得た末梢血単核球を抗CD2抗体とともに24時間培養した際の培養上清中のサイトカインをELISAを用いて測定した。
3. CD8欠損症の患児、および正常コントロールの末梢血単核球をHTLV-Iでtransformし、T細胞株を授立した (それぞれSN株, KO株)。正常コントロールより作成したT細胞株はCD4陽性T細胞のみを抗CD8抗体を用いて磁気ビーズ法でnegative selectionしコントロールT細胞株とした。

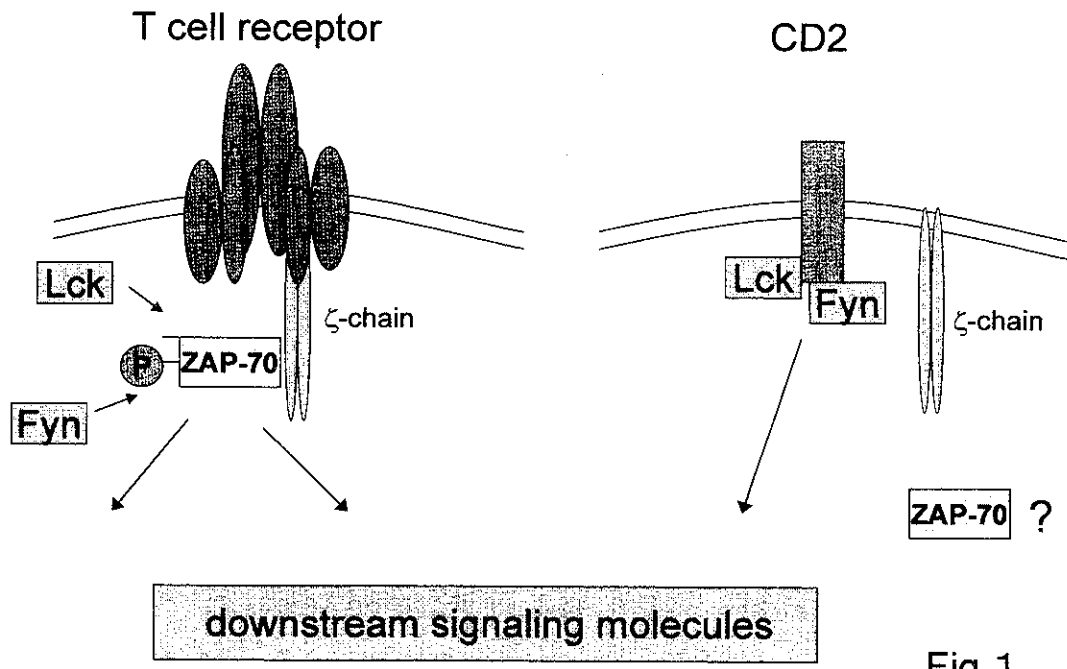


Fig. 1

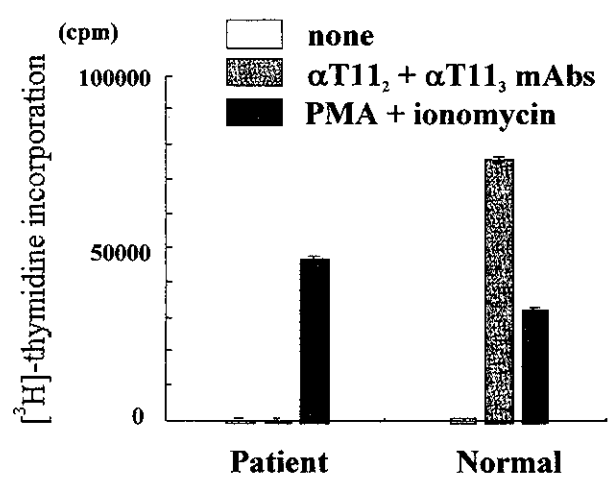


Fig. 2 Lack of T cell proliferation by CD2 stimulation in ZAP-70 deficient T cells. PBMCs from a CD8 deficiency patient and a normal adult (2×10^5) were cultured at 37°C with no addition (none), mitogenic pairs of anti-CD2 mAbs (α -T112 + α -T113 mAbs used 1:100 dilutions of ascites) or PMA (10 ng/ml) plus ionomycin (1 μ g/ml) in a 96-well plate (200 μ l/well) for 72 h, and pulsed with 0.5 μ Ci/well of methyl- 3 H-thymidine for the last 8 h of culture. The 3 H-thymidine uptake was measured on a liquid scintillation counter.

- SN, KOを抗CD2抗体で刺激し, 5×10^6 由来の cell lysateを抗ERK, JNK, p38抗体を用いて免疫沈降し, それぞれMBP, c-jun, ATF-2を基質として *in vitro* kinase assayを行った.
- Indo-1でloadしたSN, KOを抗CD2抗体で刺激した際の細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$)をspectro-

fluorophotometerを用いて検討した.

- SN, KOを抗CD2抗体で刺激し, cell lysateを作成後, リン酸化NFAT-1を認識する抗体 (Transduction Laboratories) を用いてwestern blotを行い, NFAT-1の脱リン酸化, すなわち活性化を検討した.
- 種々の濃度のionomycinの存在下で抗CD2抗体を用いてSNを刺激した際のNFAT-1の脱リン酸化, およびサイトカイン産生をそれぞれwestern blot, ELISAを用いて測定した.

【結果】

- ZAP-70を欠損するCD8欠損症の患児のT細胞はCD2刺激ではDNA合成が全く見られなかった. ZAP-70をbypassしてT細胞を活性化するPMAとionomycinの刺激では正常と同等のDNA合成が見られた (Fig. 2).
- ZAP-70欠損T細胞はCD2刺激ではIL-2, IL-4, IFN- γ のいずれのサイトカインも産生しなかった (TABLE 1).
- ZAP-70欠損T細胞において, MAPKスーパーファミリーを構成する3つのシグナル伝達分子, すなわちERK, JNK, p38のいずれもがCD2刺激により活性化された (Fig. 3). この活性化のパターンは正常T細胞におけるこれら3分子の活性化のパターンと同様であった.

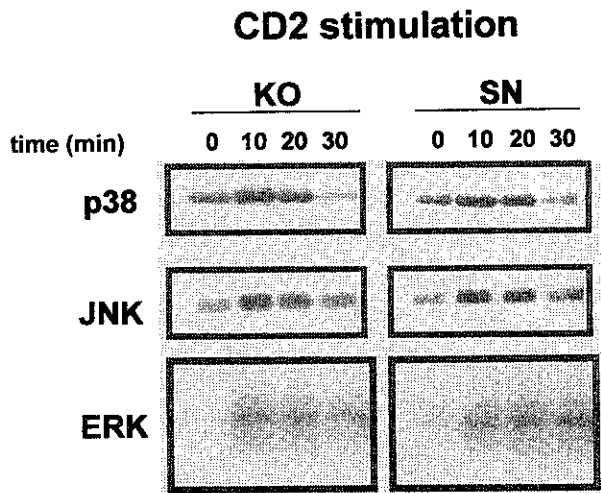


Fig. 3 Activation of MAPK superfamily by CD2 stimulation in ZAP-70 deficient T cells. SN and KO cells (5×10^6) were incubated at 37°C for the indicated periods of time with 1:100 dilutions of anti-T11₂ plus anti-T11₂ mAbs (CD2). p38, ERK2 and JNK1 were immunoprecipitated from the cell lysates (400 μl) and subjected to in vitro kinase assays. These experiments are representatives of six.

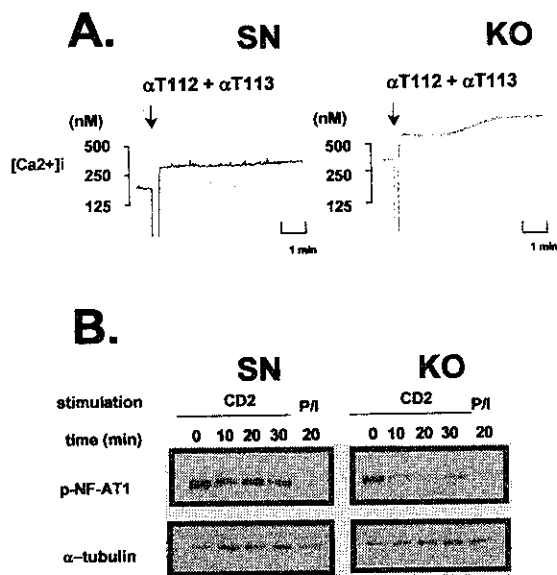


Fig. 4 Analysis of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mobilization after CD2 stimulation. A. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mobilizations in ZAP-70 deficient SN and control KO cells following CD2 stimulation. SN and KO cells ($1.5 \times 10^6/\text{ml}$) were loaded with Indo-1, suspended in a buffer solution containing 1 mM CaCl_2 , and stimulated with 1:100 dilutions of anti-T11₂ plus anti-T11₂ mAbs at 37°C . $[\text{Ca}^{2+}]_i$ flux was analyzed with a spectrofluorophotometer. Calibration was performed with ionomycin and MnCl_2 . This experiment is a representative of three. B. SN and KO cells (5×10^6) were incubated at 37°C for the indicated periods of time with anti-T11₂ plus anti-T11₂ mAbs (CD2), or PMA (10 ng/ml) plus ionomycin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (P/I). Cell lysates were separated by 12% SDS-PAGE gel, and subjected to immunoblot with a specific mAb against phosphorylated NFAT1 (upper panel). The same membrane was stripped and reprobed with anti- α -tubulin mAb (lower panel). This experiment is a representative of three.

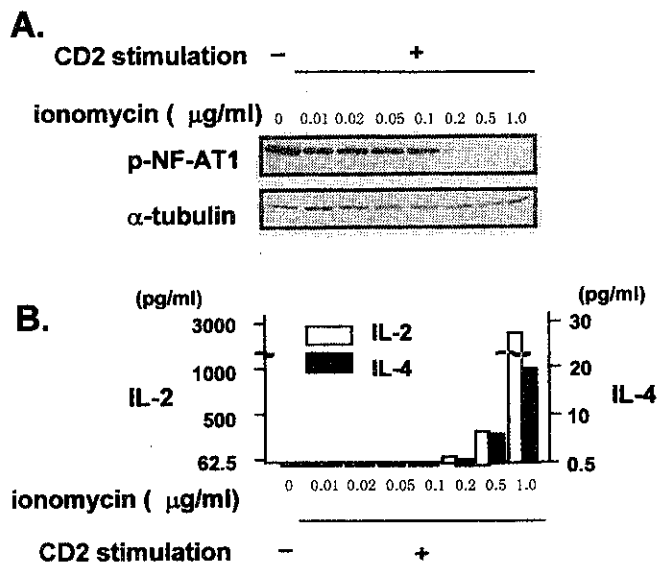


Fig. 5 Cytokine production by the stimulation with anti-CD2 mAbs and ionomycin. A. ZAP-70 deficient SN cells (5×10^6) were untreated or incubated for 15 min at 37°C with anti-T11₂ plus anti-T11₂ mAbs in combined with ionomycin at the indicated concentrations. Cell lysates were separated by SDS-PAGE, and subjected to immunoblot with a specific mAb against phosphorylated NFAT1 (upper panel), or anti- α -tubulin mAb (lower panel). B. SN cells ($1 \times 10^6/\text{ml}$) were cultured for 24 h with the same stimulation as above and IL-2 and IL-4 in the culture supernatants were measured by ELISA.

- ZAP-70欠損T細胞においてはCD2刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が欠如していた (Fig. 4A). またCD2刺激後のNFAT-1の脱リン酸化はほとんど見られず, NFAT-1が活性化していないことが判明した (Fig. 4B).
- 0.2mg/ml以上の濃度のionomycinの存在下ではZAP-70欠損T細胞でもCD2刺激によるIL-2, IL-4産生が認められた. また, このサイトカイン産生はNFAT-1の脱リン酸化に必要なionomycinの濃度と一致していた (Fig. 5).

【考察】

我々はT細胞のCD2シグナル伝達におけるZAP-70の重要性を検討するために, ZAP-70欠損T細胞を用いて主にサイトカイン産生の面から種々の解析を行った. ZAP-70欠損T細胞ではCD2刺激によるDNA合成, およびサイトカイン産生が欠如しており (Fig. 1, TABLE 1), ZAP-70がCD2のシグナル伝達においても必須であることを示した. CD2のシグナル伝達におけるZAP-70の役割は明らかで

TABLE I

The cytokine production profiles of PBMC
PBMC (1×10^6 /ml) of a CD8 deficiency-patient or a normal donor were cultured in 37 C for 24 h with no addition (none), with anti-CD2 mAbs(anti-T11₂ plus anti-T11₃ mAbs), or with PMA plus ionomycin. Cytokines in the culture supernatant were measured by ELISA.

	CD8 deficiency-patient			Normal control		
	IL-2	IL-4	IFN- γ	IL-2	IL-4	IFN- γ
None	<32	<0.5	<16	<32	<0.5	<16
anti-T11 ₂ + anti-T11 ₃ mAbs	<32	<0.5	<16	141	50.1	270
PMA (10ng/ml) + ionomycin (1 μ g/ml)	30844	198.5	504	14683	249.6	7281

はないが、CD2の刺激後にZAP-70がほとんどチロシンリン酸化されないこと、およびZAP-70はリン酸化されることで初めてキナーゼ活性を持つことを考慮すると、CD2刺激系においてZAP-70が下流のシグナル伝達分子に対するキナーゼ活性を持つとは考えにくい。一つの可能性として、CD2刺激系においてはZAP-70が他のシグナル伝達分子に対する重要なアダプター分子として機能することが考えられる。

ZAP-70欠損T細胞におけるCD2シグナル伝達の障害部位を明らかにするために、我々はまずサイトカイン産生に必須であるMAPKスーパーファミリーの活性化の有無を検討した。MAPKスーパーファミリーは異なる3つのサブグループ、すなわちERK, JNK, p38から構成されているが、そのいずれもがCD2刺激後のZAP-70欠損T細胞においても活性化されていた (Fig. 3)。この結果より、CD2のシグナル伝達にはZAP-70非依存性のMAPKスーパーファミリー活性化経路が存在し、MAPKスーパーファミリーの活性化にZAP-70は必須ではないことが示唆される。しかし、ZAP-70欠損T細胞においては正常T細胞と比較してCD2刺激後のこれら3分子の活性は弱く、ZAP-70がMAPKスーパーファミリーの活性に不必要であるとは断言できない。

一方、ZAP-70欠損T細胞ではCD2刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が欠如していた (Fig. 4A)。NFAT-1は $[Ca^{2+}]_i$ 、およびカルシニューリン依存性に脱リン酸化を受け活性化されるnuclear factorの一つで

あるが、IL-2, IL-4の産生に重要な役割を果たすことが明らかにされている。ZAP-70欠損T細胞ではCD2刺激によるNFAT-1の脱リン酸化が見られず、活性化されていなかった (Fig. 4B)。また、Caイオノフォアを用いて強制的に $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させた状態でZAP-70欠損T細胞をCD2を介して刺激するとサイトカイン産生が認められた (Fig. 5)。以上より、CD2刺激系においてZAP-70は主に $[Ca^{2+}]_i$ 上昇、NFATの活性化に重要な役割を果たしていると推察される。

尚、ZAP-70欠損T細胞におけるMAPKスーパーファミリーの活性化に関わる分子の一候補として、Sykが挙げられる。SykはZAP-70とともにSykファミリーを形成し、構造的に類似するだけでなく、機能的にもredundancyを持つことが知られている。Sykは末梢T細胞においてはZAP-70と比較して発現量のはるかに少なく、ZAP-70欠損T細胞においてCD2刺激後のMAPKスーパーファミリーの活性化が正常T細胞より弱い一因である可能性がある。また、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に関しても末梢T細胞における発現量の少ないSykでは十分な機能を果たせないのかもしれない。CD2のシグナル伝達におけるSykの役割も今後検討する必要があると思われる。

【おわりに】

CD2を介するT細胞刺激系路のin vivoにおける役割は未だ明らかではない。しかしT細胞レセプタ

一非依存性にT細胞を活性化しうることより様々な病態に関与している可能性も否定できず、非常に興味深い分子であると思われる。

CD2 signal transduction in ZAP-70 deficient T cells

Hideki Ueno ¹⁾, Kenji Katamura ¹⁾, Shigeo Koyasu ²⁾, Mitsufumi Mayumi ³⁾

Department of Pediatrics, Kyoto University Graduate School of Medicine ¹⁾, Department of Immunology, Keio University School of Medicine ²⁾, Department of Pediatrics, Fukui Medical University School of Medicine ³⁾

Stimulation with specific pairs of anti-CD2 antibodies can induce T cell activation and proliferation. In this study, we investigate the significance of ZAP-70 in CD2 signaling using ZAP-70 deficient T cells derived from a CD8 deficient patient and show that ZAP-70 is necessary for cellular proliferation and cytokine production in T cells stimulated via CD2. Biochemical analyses show that CD2 stimulation induces activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) superfamily in ZAP-70 deficient T cells, indicating that a ZAP-70 independent pathway(s) exists for MAPK superfamily activation via CD2. In contrast, intracellular Ca²⁺ mobilization and activation of nuclear factor of activated T cells (NFAT) upon CD2 triggering were impaired in T cells lacking ZAP-70. Furthermore, we found that pharmacological Ca²⁺ elevation combined with CD2 stimulation restored NFAT activation and subsequent cytokine production in ZAP-70 deficient T cells. These results indicate that in CD2 signaling, ZAP-70 plays an essential role in Ca²⁺ mobilization and NFAT activation.

CD8欠損症における温度感受性変異ZAP70 タンパク質の分解機構の解析

松田 達志 (慶應義塾大学医学部微生物学教室)
鈴木-藤本智子 (慶應義塾大学医学部微生物学教室)
箕輪 明子 (慶應義塾大学医学部微生物学教室)
上野 英樹 (京都大学医学部小児科)
片村 憲司 (京都大学医学部小児科)
小安 重夫 (慶應義塾大学医学部微生物学教室)

京都大学小児科、片村博士らによって見いだされた、本邦初症例のCD8欠損症の患児の解析を行い、この患児がCD8欠損症の原因遺伝子として報告されているチロシンキナーゼZAP70の温度感受性変異を持つことを見いだした。患児の2つのZAP70遺伝子座は異なるミスセンス変異を持ち、どちらの場合もZAP70タンパク質がきわめて不安定となり、33°Cまでは安定に存在し得るが、それ以上の温度では合成直後に速やかに分解されることが明らかになった。さらに、我々はこれらの変異タンパク質が従来いわれているようなプロテアソームを介した経路で分解されるのではないこと、さらにZAP70タンパク質の発現にはタンパク質キナーゼ特異的な分子シャペロンであるCdc37の機能が重要であることを示す知見を得た。本患児の皮下には多くのCD4陽性の活性化T細胞の浸潤が見られるが、血中では高温のために機能できない変異ZAP70が、比較的低温である皮膚においてCdc37の補助によって機能的なタンパク質として発現したためである可能性が考えられた。

【はじめに】

CD8欠損症の責任遺伝子はタンパク質キナーゼをコードするZAP70遺伝子であることが確立されている(1-5)。ZAP70はT細胞受容体下流のシグナル伝達に必須であり、患児の末梢血中にはCD4陽性細胞はみられるものの、それらの細胞はT細胞受容体刺激に反応しないことが特徴である。本邦においては、京都大学病院小児科において初の症例が見いだされた。これまでに報告された他のCD8欠損症の場合とは異なり、本患者の皮下には多くのCD4陽性の活性化T細胞の浸潤が見られた(6)。そこで本研究において、本患者ならびに家族のZAP70遺伝子の変異解析ならびに変異タンパク質の性状解析を行った。

【対象と方法】

本症例は京都大学病院小児科において見いださ

れたCD8欠損症の患児ならびにその家族である(6)。全ての遺伝子解析は患者の両親の同意を得て行われた。患者末梢血由来のCD4陽性細胞をHTLV-IIによってトランスフォームした細胞株SNは上野らによって樹立された(7)。遺伝子解析、細胞株における発現、試験管内でのタンパク質相互作用の解析などは常法にしたがって行った。詳細は本研究を公表した論文を参照されたい(8)。

【結果と考察】

患児の末梢血由来CD4陽性細胞においてはZAP70タンパク質の発現が認められなかった(6)。ZAP70タンパク質の消失がmRNAの発現異常によるものか、あるいはナンセンス変異などによるものかを明らかにするため、患者末梢血由来のCD4陽性細胞をHTLV-IIによってトランスフォームした細胞株SNを用いて解析した。ノーザンブロット解

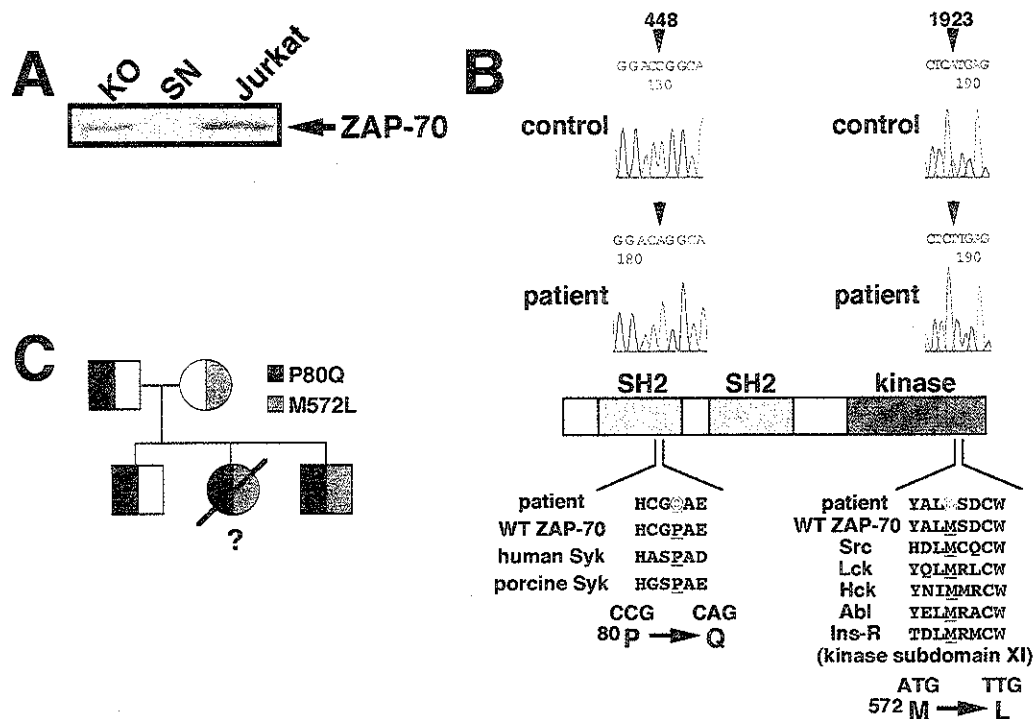


図1 患児のZAP70遺伝子解析

(A) 健常人 (KO) と患児 (SN) から樹立したHTLV-Iとトランスフォーム細胞, あるいはヒトT細胞株Jurkatの細胞抽出液をSDS-PAGEによって分画し, PVDF膜にトランスファーした後に抗ZAP70抗体によるウエスタンブロットを行った. (B) cDNAの塩基配列解析によって明らかになった変異部位を示した. 2種類のcDNAが得られ, 1つでは塩基配列の448番目のCがAに置換されたことにより, アミノ酸配列の80番目のプロリンがグルタミンに変化した. もう1つのcDNAでは塩基配列の1923番目のAがTに置換されたことにより, アミノ酸配列の572番目のメチオニンがロイシンに変化した. 下の図はこれらの変異を模式的にあらわしたものである. (C) 患児の家族の遺伝子型をあらわした.

析から, SN細胞にZAP70のmRNAが正常に発現することが明らかになった. 従って, ZAP70タンパクの消失は, 遺伝子発現の異常によるものではなく, 患者のZAP70遺伝子がコードする遺伝子産物の異常によるものと推測された.

そこで, SN細胞株からmRNA分画を抽出し, 常法にしたがってcDNAライブラリーを作製し, Jurkat細胞より得られたZAP70のcDNAをプローブとして変異ZAP70cDNAクローンを複数得た. 得られたcDNAクローンの遺伝子配列と野生型ZAP70の遺伝子配列との比較検討を行った結果, ZAP70のキナーゼドメイン内に位置する572番目のメチオニンがロイシンへと変異するミスセンス変異 (M572L) ならびにZAP70のN端側のSH2ドメインにあるプロリンがグルタミンに置換された変異 (P80Q) を同

定した. さらに染色体遺伝子の同領域を含む遺伝子断片をPCRによって増幅し, その塩基配列を決定することにより, これらの変異が確かに染色体DNA上に起こったものであることが確認された. 同時にM572L変異が母親由来であり, P80Q変異が父親由来であることが明らかになった (図1).

我々の見いだした変異がZAP70タンパク質の消失の原因であることを確認するため, M572L変異やP80Q変異を人為的に導入した組み換え型ZAP70の発現実験を行った. CMVプロモーターを用いた発現ベクターに, Myc-tagを付加した野生型ZAP70及び変異導入ZAP70 (M572L-ZAP70, P80Q-ZAP70) をそれぞれ組み込み, Jurkat細胞に一過性に発現させた. 遺伝子導入後48時間を経てから細胞抽出液を調製し, 発現している外来性のZAP70を抗

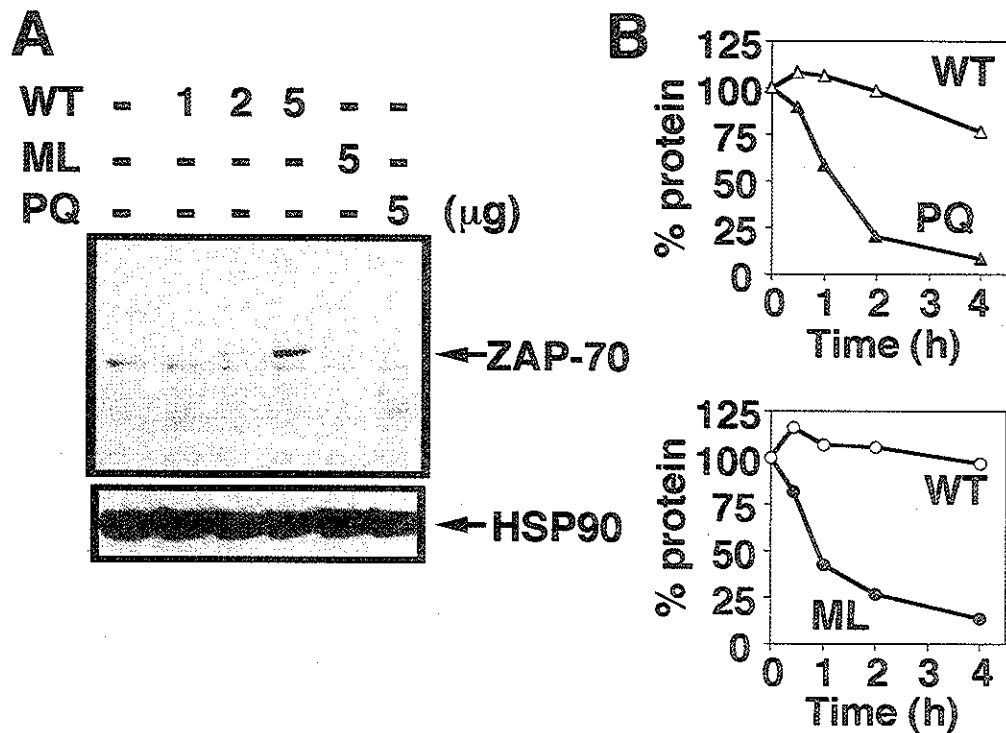


図2 変異ZAP70タンパク質の発現

(A) Mycタグをつけた野生型-ZAP70 (WT), M572L-ZAP70 (ML), P80Q-ZAP70 (PQ) をコードするcDNAを発現ベクターに組み込み、Jurkat細胞で発現させた後、抗Myc抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。上段の数字はトランスフェクションに用いたDNA量を示す。下段ではコントロールとして抗HSP90抗体を用いたウエスタンブロットを行った。(B) 同様に野生型-ZAP70 (WT), M572L-ZAP70 (ML), P80Q-ZAP70 (PQ) をコードするcDNAをJurkat細胞で発現させた後、放射性メチオニンで細胞を10分間パルスラベルし、その後大過剰の非放射性メチオニンの存在下でチェイスした。各時間においてタンパク質を抗Myc抗体を用いて免疫沈降し、SDS-PAGEとオートラジオグラフィを用いて各タンパク質の分解速度を検討した

Myc-tag抗体によるイムノブロットで検出した。野生型ZAP70を遺伝子導入した細胞においては野生型ZAPタンパク質の高い発現が認められたのに対し、M572L-ZAP70やP80Q-ZAP70を遺伝子導入した細胞においては、変異ZAP70タンパク質はほとんど検出されなかった(図2)。In vitroでの転写・翻訳系を用いた実験からは、野生型ZAP70タンパク質と変異ZAP70タンパク質の発現量に違いは見られなかった。従って、発現が見られないのは、これらの変異によりZAP70タンパク質の細胞内での安定性が低下したことによるものと考えられた。そこでさらに、パルスチェイス解析を行ったところ、野生型ZAP70が極めて安定で4時間後にもほとんど分解されないのに対し、変異型は共に半減期が1時間以内で分解された(図2)。すなわ

ち、本変異がCD8欠損症におけるZAP70タンパク質の消失の原因の一つであることが強く示唆された。変異タンパク質の分解にはプロテアソームが関係するといわれるが(9,10)、プロテアソームの阻害剤であるラクタシスチンやMG132を用いても上記の変異タンパク質の分解を阻止することは出来なかった。さらに、細胞抽出液を超速心機を用いて分画したところ、変異タンパク質の分解活性はプロテアソームとは異なる分画に回収された。これらに事実から、変異ZAP70タンパク質の分解はプロテアソーム以外のタンパク質分解酵素によると結論された。

試験管内での転写・翻訳系ではタンパク質を低温(30°C)で合成することから変異タンパク質の安定性が温度に依存している可能性が考えられた。

事実、変異タンパク質を様々な温度でJurkat細胞内に発現させる実験をしたところ、変異タンパク質が30°Cでは分解されないことが明らかになった。詳細な検討からこれらの変異体は33°Cまでであれば安定なタンパク質として合成されることが示された。

温度感受性を決定する要因には大きくわけて2通りの場合が考えられる。第1にはタンパク質本来の安定性が温度感受性である場合である。この場合には低温で合成されたタンパク質であっても高温ではその構造が不安定になる。そこで*in vitro*合成系を用いてタンパク質を合成した後にさまざまな温度でその安定性を検討した。M572L-ZAP70で変異が見られたメチオニン残基はsrcファミリーキナーゼを始めとする多くのチロシンキナーゼにおいて保存されている。従って、この変異によって酵素活性に影響がある可能性も考えられたため、M572L-ZAP70の場合にはそのキナーゼ活性も測定した。すると、M572L-ZAP70は30°Cにおいても有意にその活性が低いことが明らかになった。そこでさらに、ZAP-70のM572に相当するIckのメチオニンをロイシンに変異したところ、キナーゼ活性がほとんど失われてしまった。従って、このメチオニンはZAP70の構造を保つとともに、酵素活性にも重要であると考えられる。

一方P80Q変異体の場合はこの変異がN端側のSH2ドメインにあることから、温度の違いによって、リン酸化ITAMへの結合活性に差が見られる可能性が考えられた。そこで、T細胞受容体サブユニットの1つ、CD3 ζ の最も膜近傍のITAM由来のアミノ酸配列を持つ合成リン酸化ペプチドを用い、さまざまな温度における結合活性を測定した。具体的にはGGNQLY (PO4) NELNLGRREEY (PO4) DVLというリン酸化ペプチドを合成し、そのN端をビオチン化した。アビジン結合ビーズと混合したビオチン化ペプチドと、放射性標識メチオニン存在下に*in vitro*で合成した変異タンパク質とを、さまざまな温度でインキュベートした。その後、ビーズとともに回収される変異タンパク質の量を、電気泳動とそれに続くオートラジオグラフィによって解析した。その結果、P80Q-ZAP70は

一旦30°Cで合成された後は37°Cに温度を上昇しても結合能を失わないことが明らかになった。従って、P80Q-ZAP70の場合には、タンパク合成の過程、特に折り畳み過程が温度感受性であると考えられた。

タンパク質の折畳みには分子シャペロンが重要な役割を果たす(11,12)。これまでに多くの分子シャペロンが同定されているが、タンパク質キナーゼの折畳みにかかわる分子シャペロンとしてCdc37が知られる(13,14)。Cdc37は別のシャペロンタンパク質であるHSP90とともに機能する(13,14)。そこで、野生型や変異ZAP70タンパク質をCdc37とともに発現させた。すると、Cdc37の共発現によって野生型のZAP70の発現が大幅に増強された。興味深いことにキナーゼドメインを除去した場合にはCdc37の共発現による発現増強は見られなくなり、Cdc37がZAP70のキナーゼドメインと相互作用するシャペロンであることが考えられた。さらに変異タンパク質を用いた実験を行ったところ、キナーゼドメインの変異を持つM572L-ZAP70の発現はCdc37の共発現によって増強され、さらに非許容温度である37°Cにおいても発現が見られるようになった。一方、P80Q-ZAP70の場合にはCdc37の共発現の効果はほとんど見られなかった。さらに試験管内での結合実験から、P80Q-ZAP70がCdc37とほとんど結合できないことが示された。従って、P80Q-ZAP70の場合にCdc37の共発現の効果が見られないのはCdc37が結合できないからであると理解された。さらに、HSP90の阻害剤であるゲルダナマイシンの効果を検討したところ、野生型、変異体を問わず、ゲルダナマイシンによってZAP70の発現は完全に抑制され、Cdc37の共発現も効果はなかった。

これらの結果から、ZAP70の発現には翻訳後のCdc37とHSP90による折畳み過程が重要であることが考えられ、本研究で同定された変異体の場合にはこの折畳み過程が37°Cでうまくいかず、分解されると結論された。既に片村らによって報告されているように、本患者の皮下には多くのCD4陽性の活性化T細胞の浸潤が見られ、このような所見は他のCD8欠損症に共通するものではない。こ

の理由として、血中では高温のために機能できない変異ZAP70が、比較的低温である皮膚においてCdc37とHSP90の補助によって機能的なタンパク質として発現したためである可能性が考えられた。今後、我々が見いだした変異タンパク質分解系やCdc37/HSP90系による折畳み過程がBtkやJAK3など他のタンパク質キナーゼや、免疫不全の原因となるこれらのキナーゼの変異体などにもかかわるか否かを検討してゆく予定である。

【引用文献】

- 1) Gelfand, E. W., and Dosch, H.-M. (1983) Birth Defects: *Original Article Series*, Alan R. Liss, Inc., NY.
- 2) Roifman, C. M., Hummel, D., Martinez-Valdez, H., Thorner, P., Doherty, P. J., Pan, S., Cohen, F., and Cohen, A. (1989) *J. Exp. Med.* **170**, 2177-2182
- 3) Monafó, W. J., Polmar, S. H., Neudorf, S., Mather, A., and Filipovich, A. H. (1992) *Clin. Exp. Immunol.* **90**, 390-393
- 4) Arpaia, E., Shahar, M., Dadi, H., Cohen, A., and Roifman, C. M. (1994) *Cell* **76**, 947-958
- 5) Elder, M. E., Lin, D., Clever, J., Chan, A. C., Hope, T. J., Weiss, A., and Parslow, T. G. (1994) *Science* **264**, 1596-1598
- 6) Katamura, K., Tai, G., Tachibana, T., Yamabe, H., Ohmori, K., Mayumi, M., Matsuda, S., Koyasu, S., and Furusho, K. (1999) *Clin. Exp. Immunol.* **115**, 124-130
- 7) Ueno, H., Matsuda, S., Katamura, K., Mayumi, M., and Koyasu, S. (2000) *Eur. J. Immunol.* **38**, 71-76.
- 8) Matsuda, S., Suzuki-Fujimoto, T., Minowa, A., Ueno, H., Katamura, K., and Koyasu, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 34515-34518
- 9) Coux, O., Tanaka, K., and Goldberg, A. L. (1996) *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 801-847
- 10) Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425-479
- 11) Morimoto, R. I., Kline, M. P., Bimston, D. N., and Cotto, J. J. (1997) *Essays Biochem.* **32**, 17-29
- 12) Parsell, D. A., and Lindquist, S. (1993) *Annu. Rev. Genet.* **27**, 437-496
- 13) Kimura, Y., Rutherford, S. L., Miyata, Y., Yahara, I., Freeman, B. B., Yue, L., Morimoto, R. I., and Lindquist, S. (1997) *Genes Dev.* **11**, 1775-1785
- 14) Grammatikakis, N., Lin, J.-H., Grammatikakis, A., Tsihchlis, P. N., and Cochran, B. H. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1661-1672

Temperature-sensitive ZAP70 mutants degrading through a proteasome-independent pathway: restoration of a kinase domain mutant by Cdc37

Satoshi Matsuda¹⁾, Tomoko Suzuki-Fujimoto¹⁾, Akiko Minowa¹⁾, Hideki Ueno²⁾, Kenji Katamura²⁾, Shigeo Koyasu¹⁾

Department of Immunology, Keio University School of Medicine¹⁾, Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Kyoto University²⁾

CD8 deficiency is an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency diseases (SCIDs) characterized by the absence of CD8⁺ T lymphocytes and impaired T cell functions. We identified two novel missense mutations in the *zap70* genes of a CD8-deficiency patient. One mutation (P80Q) affects a residue in an SH2 domain, and another (M572L) in the kinase subdomain XI. Both mutations cause degradation of ZAP70 protein in a temperature-sensitive (*ts*) manner through an ATP-dependent and proteasome-independent pathway. We further demonstrated that Cdc37, a protein kinase specific chaperone, bound to M572L but not P80Q mutant, and restored the expression of the M572L

mutant when overexpressed. The restoration of M572L mutant by Cdc37 required the function of HSP90. These results indicate that Cdc37 in conjunction with HSP90 functions as a molecular chaperone for a temperature-sensitive kinase domain mutant of ZAP70. (*J. Biol. Chem.* **274**, 34515-34518, 1999)

Bloom症候群の迅速診断法の確立とBLMの機能

近藤 直実, 金子 英雄 (岐阜大学医学部小児科)
深尾 敏幸, 森本 航 (岐阜大学医学部小児科)
寺田 知親, 笠原貴美子 (岐阜大学医学部小児科)

(1) Bloom症候群 (BS) は小柄な体型, 日光過敏性紅斑, 免疫不全, 高率な発癌を特徴とするが非典型例も存在し診断に苦慮する場合も少なくない. BSを迅速にスクリーニングするために抗体を用いてImmunoblotting, 免疫染色をおこなった. BLMタンパクは無刺激の末梢リンパ球ではほとんど発現が認められなかったが, PHAで刺激すると発現が誘導された. また, EB-virus transformed lymphoblastoid cell line (EB-LCL)でもタンパクの発現が認められたがBS由来のPHA刺激末梢単核球, EB-LCLではBLMの発現が認められなかった. 免疫染色では正常EB-LCLでは核内にdot状にBLMタンパクが染色されたが, BS EB-LCLではこのdotが認められなかった. 以上よりBSの抗体を用いたスクリーニング法として検体ではPHA刺激末梢単核球, EB-LCLが用いることができ, Immunoblottingと免疫染色をくみあわせることが有用であることが示唆された.

(2) 病因遺伝子産物BLMタンパクの機能ドメインとしてDNAヘリカーゼドメイン, C-末の核移行シグナルなどが明らかになっている. 核内でDNAの複製・修復に関与する多くのタンパクは他のタンパクと会合して機能することが想定される. そこでyeast two-hybrid systemを用いてBLMタンパクと会合するタンパクの検索をおこなった. 得られた陽性クローンのうち一つはAtaxia-telangiectasia (A-T) の病因遺伝子産物ATMだった. BLMは主としてヘリカーゼ領域を中心にATMと結合した. BS患者由来の細胞株ではATMのkinase活性が低下しており, 二つの高発癌症候群の病因遺伝子産物の機能的相互作用が示唆された. 二つの病因遺伝子産物の相互作用はそれぞれの疾患における高発癌の機序に重要な役割を果たしていると考えられる.

【はじめに】

(1) Bloom症候群(BS)は小柄な体型, 日光過敏性紅斑, 免疫不全, 高率な癌腫の合併を特徴とする先天性の疾患である. BS細胞は染色体異常が高頻度で観察され, なかでもsister chromatid exchangeの頻度の増加が特徴的である. しかし, BSは非典型例もみられ診断に苦慮する場合も少なくない. BSの病因遺伝子BLMは全長が4.3kbと比較的長いため全遺伝子配列を決定するのは労力を要する. そこで抗体を用いてBLMタンパクの発現の有無でBSのスクリーニングをおこなうための基礎的検討をおこなった.

(2) BS病因遺伝子産物BLMはRecQ helicase familyに属し, DNAの複製・修復に関与していると想定される. 今までに, BLMはC-末に存在する核移行シグナルを用いて核で機能することを報告してきた. DNAの複製・修復に関与するタンパクの多くは他のタンパクと会合もしくは複合体を形成し機能することがしばしば認められる. 今回, yeast two hybrid systemを用いてBLMと相互作用するタンパクの同定を行い, 興味深いことにATM (Ataxia-telangiectasia病因遺伝子産物) がBLMと結合することを明らかにした. Ataxia-telangiectasia (A-T) は進行性の小脳失調, 眼球結膜の毛細血管拡張, 免

疫不全を特徴とする、BSと同様に悪性腫瘍の合併、特に高率にリンパ腫の発症が観察される。BLMとATMの会合は二つの疾患に共通してみられる高発癌、免疫不全の病態を明かにする上で重要な知見である。

【方法】

(1)

1) 末梢単核球 (PBMCs) をFicoll比重遠心法で分離しPhytohemagglutinin (PHA) で刺激後タイムコースをとって細胞を回収し、タンパクを抽出した。タンパクをSDS化し5%SDS-PAGEに泳動した。Hybond ECLメンブレンにトランスファーし、ECL Western blottingキットを用いて検出した。

2) PHA刺激PBMCsまたはEB-LCLをサイトスピンでスライドグラスにはりつけアセトン固定後、抗BLM抗体を4℃で反応させ、Rhodamine抗ウサギIg抗体を作用させた後蛍光顕微鏡で鏡検した。抗BLM抗体はBLMのC-末に対する抗体を用いた。

(2)

1) Yeast two hybrid system: pGBT9 (GAL4 binding domain) にBLM遺伝子の断片を組み込んだベクターとヒト心臓cDNAをpGAD10 (GAL4 activating domain) に組み込んだベクターをY190にco-transfectionし、 β -galactosidase陽性細胞をスクリーニングした。

2) BLMを4つの断片にわけ、pGEXに組み込み発現させin vitro transcription/translationにより35SでラベルしたATMとin vitroのbinding assayをおこなった。また、逆にATMを12の断片にわけpGEXに

組み込みラベルしたBLMとのbinding assayをおこなった。

3) JHP, JP (control EB virus transformed cell line), L3 (Ataxia-telangiectasia患者より樹立したEB細胞株), 3403F (BS患者より樹立したE細胞株) に10Gyの γ 線照射し一時間後にタンパクを抽出しWestern blottingをおこなった。

4) γ 線照射し一時間後にタンパクを抽出し抗ATM抗体とprotein AとGを加えATMを免疫沈降した。免疫沈降したATMにGSTとの融合タンパクとして発現させたp53 1-40を基質として加え γ -32P-ATPをp53タンパクにラベルしたのち10% SDS-PAGEに泳動後オートラジオグラフィーによりATMのkinase活性を測定した。

【結果】

(1) BLMタンパクはB, T, Myelomonocyte由来の腫瘍細胞株には強い発現が認められた¹⁾。また、正常EB-LCLにも強い発現が認められたが、BS患者由来のEB-LCL (3403F, H9152) にはBLMタンパクが検出できなかった (図1)。無刺激のPBMCsではBLMタンパクはほとんど発現していなかったがPHAで刺激するとBLMタンパクが誘導された。BLMタンパクの誘導は刺激後2日目よりみられたが、BS患者 (631delCAA) PBMCsをPHAで刺激してもBLMタンパクは検出されなかった (図2)。正常EB-LCLではBLMタンパクは核内にdotを形成していた。このdotはPHA刺激PBMCsにも認められた。しかし、BS由来のEB-LCLおよびPHA刺激PBMCs

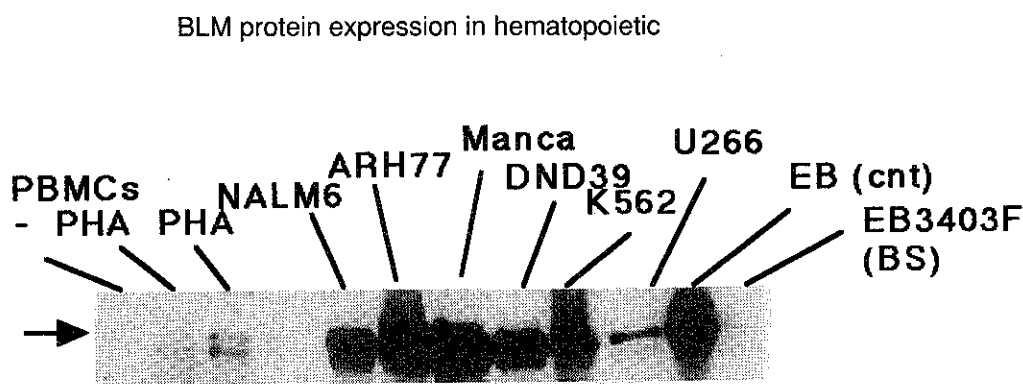


図1 血球細胞株におけるBLMタンパクの発現。

Induction of BLM protein in PHA-stimulated PBMCs

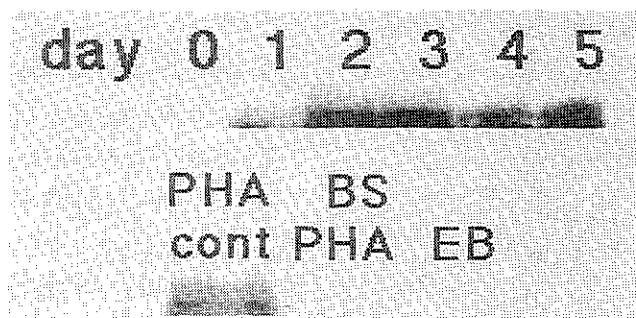
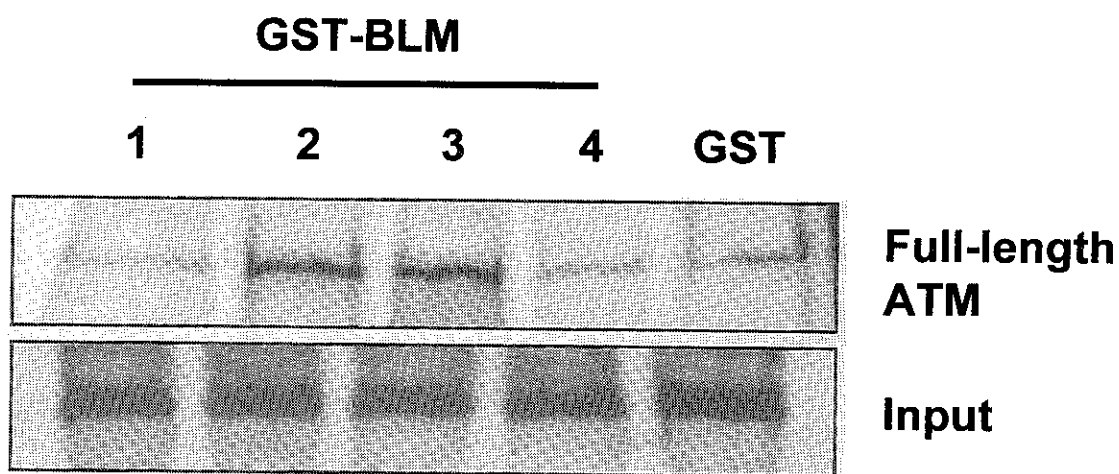


図2 PBMCsをPHAで刺激するとBLMタンパクは2日目より誘導されたが、BS (631delCAA) ではBLMタンパクの発現が認められなかった。

a In vitro binding between full length ATM and BLM



b In vitro binding between ATM5.7 and BLM

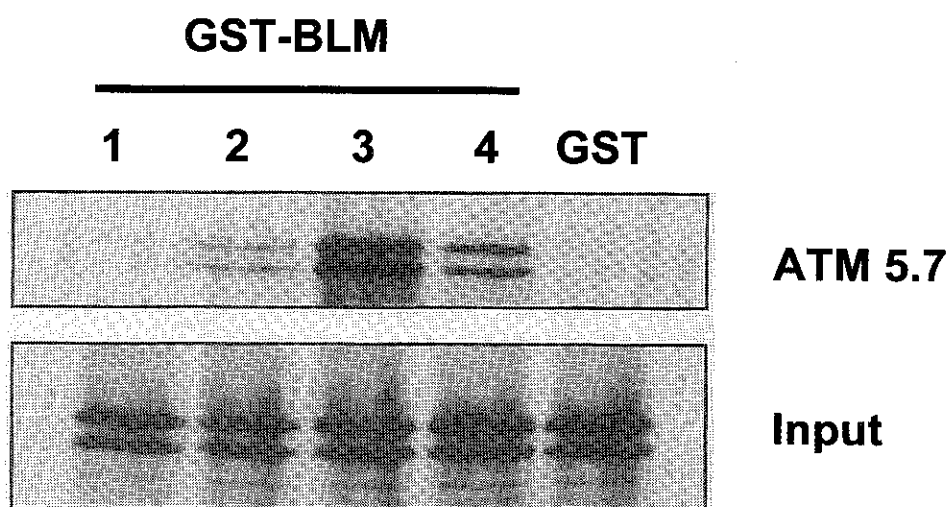


図3 a) b) in vitro binding assay: Full-length (a) and 5.7 kb (b) gene was labelled with ³⁵S-Methionine using in vitro translation and transcription method. Labelled ATM protein was incubated with GST-BLM fusion protein and then applied to 10% SDS-PAGE. GST-BLM fragment 3 showed the strong binding.

では核内のdotは認められなかった。

(2) Yeast two hybrid systemを用いてBLMと会合するタンパクのスクリーニングをおこなった。BLMの全長または前半をpGAD10に組み込んだ場合すべてのクローンが β -galactosidase陽性になってしまった。後半部を組み込んでスクリーニングをしたところ2つの陽性クローンが得られ、一つはATMと100%の相同性を示した。binding assayではfull length ATMと5.7kbのATMのいずれもBLMのfragment 3 (1909-3297)と強く結合した(図3 a, b)。HeLa細胞の核抽出液をMonoSカラムでfractionationした分画をWestern blottingしたところ、BLMとATMがほぼ同じ分画に認められた。Western blottingでBLMの発現量をしらべたところ γ 線照射により変化することなく、リン酸化等による移動度のシフトも認められなかった。 γ 線照射によるATMのkinase活性の誘導をp53を基質として検討したところBS由来の細胞株では低下しており機能的相互作用が示唆された。

【考察】

(1) BSの確定診断はBLM遺伝子の変異の同定であるが全長の決定には時間と労力を要する。そこで、抗体を用いて患者細胞でのBLMタンパクの発現の有無でスクリーニングをおこなった。BLMタンパクの発現条件を検討したところ、BLMは腫瘍由来の血球細胞株で強い発現がみられた。EB-LCLでも強く発現していたが無刺激のPBMCsではほとんど発現が認められなかった。BLMタンパクは細胞周期にはいつている分裂のさかんな細胞に強く発現している傾向が認められたので、PBMCsをPHAで刺激し細胞周期にいれてやると²⁾BLMタンパクの発現が誘導された。しかし、患者由来PBMCsではタンパクが認められなかった。免疫染色では核がdot状に染色されたが、BS患者ではこのdotが存在しなかった。今までに報告されたBLM遺伝子変異はナンセンス変異が多いことからBSのスクリーニングとしてimmunoblottingと免疫染色をくみあわせた方法は有用と考えられた。BLMタンパクの集積するdotで実際DNAの複製、修復がおこっ

ているのか今後明らかにする必要があるが、BSの表現型から考えるとsister chromatid exchangeがおこっている部位の可能性もあり、さらに解析をつづける予定である。

(2) A-Tでみられる癌腫はリンパ腫が多く、BSでは若年ではリンパ腫、年齢があがるにつれ腺癌、扁平上皮癌の合併がみられるようになる。ATMとBLMが会合するという結果は2つの症候群にみられる高発癌化のstepを明かにしていくうえで重要であり、またBS、A-Tの病態のみでなく一般の発癌機構を解明する上でも重要な知見である。BS、A-Tに共通にみられる表現型として、早老、高発癌、免疫不全がある。しかし、A-Tでみられる毛細血管拡張や小脳失調はBSでは必ずしも認められない。今後、両疾患で共通する表現型とそうでない表現型が病因遺伝子の相互作用の面から解析されることで、新たな知見が得られると考えられる。BSにおいて免疫不全がみられる理由は明らかでない。BS患者末梢B細胞のイムノグロブリン遺伝子を調べたところV-D-J組み換えは正常におこなわれており、BLM helicaseはイムノグロブリン遺伝子の組み換えに直接関与はしていない¹⁾。BLM遺伝子の発現は胸腺、精巣で強く発現されていることからT細胞の分化に関与している可能性が考えられるが、BLMの免疫細胞における機能について明かにするために、さらに解析をおこなっている。

【参考文献】

- 1) Kaneko, H., Matsui, E., Fukao, T., Kasahara, K., Morimoto, W and Kondo, N. Expression of BLM gene in human hematopoietic cells. Clin. Exp. Immunol. 118: 285-289, 1999.
- 2) Fukao, T., Kaneko, H., Birrell, G., Gatei, M., Tashita, H., Kasahara K., Cross, S., Kedar, P., Watters, D., Khanna, K.K., Misko, I., Kondo, N. and Lavin, M.F. ATM is upregulated during the mitogenic response in peripheral bloomonuclear cells. Blood 94: 1998-2006, 1999.

The establishment of screening method for Bloom syndrome and the function BLM protein

Naomi Kondo, Hideo Kaneko, Toshiyuki Fukao, Wataru Morimoto, Tomoyoshi Terada, Kimiko Kasahara
Department of Pediatrics, Gifu University School of Medicine

Bloom syndrome (BS) is a rare autosomal genetic disorder characterised by lupus-like erythematous telangiectasia of the face, sun sensitivity, infertility and stunted growth. The syndrome is associated with immunodeficiency of a generalised type, ranging from mild and essentially asymptomatic to severe. The gene mutated in this syndrome which causes the disease was cloned and identified and designated BLM.

We revealed that BLM protein was induced by PHA stimulation for 3 days in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Immunohistochemistry showed that BLM was localized in dotted structures in the nucleus. In PBMCs from BS patient the dotted structure was not detected. We propose that the combination of immunoblot and immunohistochemistry analysis may be useful for screening of BS.

The product of the BLM gene is homologous to the RecQ helicase with several lines of evidence suggesting that BLM may be involved in the complex processes of DNA replication and/or repair as part of a complex with other proteins. We have recently shown that ATM, which is the causative gene for ataxia-telangiectasia and possesses phosphatidylinositol 3-kinase activity, interacts with BLM as determined by the yeast two-hybrid assay. A fragment of pGBT -BLM (1998-4328) showed two positive colonies. A homology search of the sequence revealed that one clone was identical to be ATM cDNA. In vitro translated ATM protein was incubated with GST-BLM 1 (75-1154), BLM 2 (1070-2177), BLM 3 (1909-3297) and BLM 4 (3246-4328). BLM3 bound to both full-length and a 5.7 kb partial ATM cDNA. In vitro kinase assay in the cells from BS patients reduced ATM kinase activity was observed.

好中球二次顆粒欠損症における myeloid transcription factor, C/EBPε 遺伝子の変異同定

塩原 正明 (信州大学小児科)

伯耆原 祥 (信州大学小児科)

上松 一永 (信州大学小児科)

小宮山 淳 (信州大学小児科)

H. Phillip Koeffler (Cedars-Sinai medical center/UCLA)

好中球二次顆粒欠損症は、細菌感染を反復するまれな先天性免疫不全症である。好中球二次顆粒欠損症の原因として、デフェンシンなどの一連の顆粒蛋白の遺伝子発現を制御する分子の異常が示唆されてきた。ノックアウトマウスの解析から、myeloid transcription factor, C/EBPε 遺伝子の異常が本疾患の責任遺伝子と考えて、本例の1女性について検討した。遺伝子解析の結果、C/EBPε 遺伝子の1,113番目にアデニンの1塩基挿入がホモ接合体として見出された。このためフレームシフトを起こしtruncated proteinを生じた。両親の解析をしたところ、患者と同じmutated alleleとnormal alleleをヘテロ接合体として持つことが確認された。以上から、本症の責任遺伝子がC/EBPε 遺伝子であることが判明した。

【はじめに】

好中球二次顆粒欠損症は、好中球に形態異常、二次顆粒欠損、機能低下などがあり、化膿性感染を反復する稀な先天性疾患である^{1,2)}。二次顆粒の関連物質としてはラクトフェリン、トランスコバラミン-I、コラゲナーゼ、シトクローム b が著減または欠損し、さらに一次顆粒関連の殺菌性タンパクであるデフェンシンの著減または欠損を認めることがある³⁾。これら顆粒タンパクの産生障害はいずれもそれぞれのmRNA合成障害によることから、好中球二次顆粒欠損症の原因として、一連の顆粒タンパクの遺伝子発現を制御する分子の異常が示唆されてきた。CCAAT/enhancer binding protein ε (C/EBPε) は、DNA binding regionとleucine zipper dimerization domainをもつ転写因子であるC/EBPファミリーのひとつで、血液細胞中の特に骨髓球系とT細胞系に発現がみられる⁴⁾。Alternative promoter usage, alternative mRNA splicing, そしてalternative translation start siteにより4つのアイソフォームが存在する (p32, p30, p27, p14)。最近の knockout

mouseの実験などからC/EBPε は、骨髓球系、特に好中球の分化成熟に重要な分子であることが明らかとなった⁵⁾。今回、好中球二次顆粒欠損症例にC/EBPε のframeshift mutationを見いだしたので報告する。

【症例】

30歳、女性。両親は血族結婚ではない。乳児のころから黄色ブドウ球菌や緑膿菌による化膿性感染を繰り返していた。著明なリンパ節腫脹や肝脾腫は認めなかった。7歳の時の検査所見では、血液生化学検査では免疫グロブリン値の高値を認めた。患者末梢血好中球は2核でベルガー様異常を呈し、細胞質では二次顆粒の消失が認められた。また殺菌能の著しい低下がみられた。以上の所見から好中球二次顆粒欠損症と診断した。さらに一次顆粒関連の殺菌物質であるデフェンシン欠損も認められた³⁾。これらのことは、本疾患の原因として顆粒タンパク生成における遺伝子発現調節機構の異常を示唆するものと考えられた。

【方法と結果】

患者末梢血単核細胞からgenomic DNAを抽出し、C/EBPεのexon 1, 2, および3をカバーするプライマーセットを用いてPCRによる増幅およびシーケンスを行なった。その結果、C/EBPεの1,113番目(EMBL/GenBank/DBJ accession no. U80982)のヌクレオチドの間にA-塩基の挿入が、ホモ接合体として見いだされた。この変異は以下の塩基のフレームシフトとC/EBPεのmajor isoformであるp32のDNA binding region および leucine zipper dimerization domainを欠いたtruncated proteinを生じることが予想された。両親のC/EBPεにつき同様に解析したところ、両親とも、患者と同じmutated alleleとnormal alleleをヘテロ接合体として持つことが確認された。

【考察】

C/EBPεは、DNA binding regionとleucine zipper dimerization domainをもつ転写因子であるC/EBPファミリーに属し、その遺伝子はヒトでは14q11.2にマップされている。発現は骨髄球系およびT細胞系に限局しており、またin vitroの実験から、mim-1, neutrophil elastase, G-CSF receptor, lactoferrinなどのmyeloid specificなgene promoter活性を増強することが報告されている⁶⁾。さらに最近のC/EBPε knockout mouseの検討では、末梢血、骨髄における好中球の形態異常、好酸球の減少、in vitro colony assayでpromyelocyte, myelocyteでの成熟障害、またPseudomonasによる日和見感染で生後3-5カ月で死亡することなどが報告されている⁹⁾。これらの表現型は好中球二次顆粒欠損症に類似しており、in vitroの解析結果とあわせて、この疾患の原因としてのC/EBPεの異常が強く示唆された。今回見いだされた変異を持つC/EBPεは、WilliamsonらによるC/EBPεのdeletion mutantを用いたreporter assay⁷⁾の結果などからそのtranscriptional activityは強く障害されていると考えられ、この疾患の病態に深く関わっていることが示唆された。また両親の解析の結果から好中球二次顆粒欠損症は常染色体劣性遺伝形式をとることが確認された。

以上、好中球二次顆粒欠損症の原因遺伝子およびその遺伝形式が明らかになったことから、さらに詳しい病態解明、保因者診断などが可能となり、また新しい治療方法の開発についても示唆を与えてくれるものと考えられる。

【参考文献】

- 1) Komiyama A, Morosawa H, Nakahata T, Miyagawa Y, Akabane T. Abnormal neutrophil maturation in a neutrophil defect with morphologic abnormality and impaired function. *J. Pediatr.* 94, 19-25, 1979.
- 2) Ambruso DR, Sasada M, Nishikawa H, Kubo A, Komiyama A, Allen RH. Defective bactericidal activity and absence of specific granules in neutrophils from a patient with recurrent bacterial infections. *J. Clin. Immunol.* 4, 23-30, 1984.
- 3) Tamura A, Agematsu K, Mori T, Kawai H, Kuratsuji T, Shimane M, Tani K, Asano S, Komiyama A. A marked decrease in defensin mRNA in the only case of congenital neutrophil-specific granule deficiency reported in Japan. *Int. J. Hematol.* 59, 137-142, 1994.
- 4) Chumakov AM, Grillier I, Chumakova E, Chih D, Slater J, Koeffler HP. Cloning of the novel human myeloid-cell-specific C/EBP-ε transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1375-1386, 1997.
- 5) Yamanaka R, Barlow C, Lekstrom-Himes J, Castilla LH, Liu PP, Eckhaus M, Decker T, Wynshaw-Boris A, Xanthopoulos KG. Impaired granulopoiesis, myelodysplasia, and early lethality in CCAAT/enhancer binding protein ε-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13187-13192, 1997.
- 6) Verbeek W, Lekstrom-Himes J, Park DJ, Dang PM, Vuong PT, Kawano S, Babior BM, Xanthopoulos K, Koeffler HP. Myeloid transcriptional factor C/EBPε is involved in the positive regulation of lactoferrin gene expression in neutrophils. *Blood.* 94, 3141-3150, 1999.
- 7) Williamson EA, Xu HN, Gombart AF, Verbeek W, Chumakov AM, Friedman AD, Koeffler HP. Identification of transcriptional activation and repression domains in human CCAAT/Enhancer-