

【文献】

- 1) Cunningham-Rundle C and Bodian C. Common variable Immunodeficiency: clinical and Immunological features of 248 patients. Clin. Immunol. 92:34-48, 1999.
- 2) Spickett GP., Farrant J., North ME. et al. Common variable immunodeficiency: how many disease? Immunol. Today 18:325-328, 1997
- 3) Agematsu K., Hokibara S., Nagumo H., Komiyama A. CD27: a memory B-cell marker. Immunology Today 21:204-206, 2000
- 4) Agematsu K., Nagumo H., Shinozaki K., Hokibara S., Yasui K., Terada K. et al. Absence of IgD⁺ CD27⁺ memory B cell population in X-linked hyper-IgM syndrome. J Clin Invest 102:853-860, 1998.

Absence of memory B cells in patients with common variable immunodeficiency

Kazunaga Agematsu^{1,2}, Takeshi Futatani³, Sho Hokibara², Satoshi Tsukada⁴, Atsushi Komiyama² and Hans D Ochs³

Department of Infectious Immunology¹ and Pediatrics², Graduate School of Medicine, Shinshu University. Department of Infectious Immunology³, University of Washington. Department of Medical Medicine⁴, Osaka University Medical School.

The fundamental causes of common variable immunodeficiency (CVID) remain unclear. To assess humoral immunity, we characterized early or late onset 25 CVID patients. B-cell numbers were within normal range in all patients. X-linked agammaglobulinemia (XLA), X-linked hyper-IgM syndrome (XHIM) and non-XHIM were excluded by the laboratory data and by demonstrating normal expression of Bruton's tyrosine kinase (Btk) and CD40 ligand. IgD⁺ CD27⁺ memory B-cell number was markedly reduced in the all 25 patients and in addition IgD⁺ CD27⁺ memory B-cell number was diminished in 14 patients. B cells in the patients having low to high levels of IgD⁺ CD27⁺ B cells did not carry somatic hypermutation in immunoglobulin variable (V) -region genes. B cells from every patient studied, as well as cord blood B cells, produced IgM and IgG, but not IgA upon the engagement of Ig receptor and CD40 in the presence of cytokines, and B cells from all but 6 patients secreted IgE when cells were stimulated by CD40 crosslinking in the presence of IL-4. The observation of defective memory B cells in CVID demonstrates that these naive B cells with or without IgD⁺ CD27⁺ in analogous to cord blood and hyper IgM syndrome B cells may be responsible for the failure of the differentiation into plasma cells and producing high affinity antibodies.

フローサイトメトリーを用いたWiskott-Aldrich syndrome保因者の解析

山田 雅文 (北海道大学医学部小児科)
川村 信明 (北海道大学医学部小児科)
小林 邦彦 (北海道大学医学部小児科)
有賀 正 (北海道大学遺伝子治療)
崎山 幸雄 (北海道大学遺伝子治療)
近藤 達郎 (長崎大学医学部小児科)

我々はこれまで、フローサイトメトリーを用いたリンパ球細胞内WASPの解析が、WASの診断に有用であることを報告してきた。今回は保因者診断への応用の可能性について検討した。リンパ球を用いた解析では、3例の保因者と正常人との間で差を認めなかった。そこで、遺伝子診断されたWAS保因者9例と保因者から骨髄移植を受けたWAS患者1例を対象とし、単球におけるWASPの発現を検討した。全例でWASP陽性、陰性の両細胞分画を認め、保因者診断に有用であることが判明した。WASP陰性細胞分画の割合は3.5~50.7%であった。一方、リンパ球での検討では2例を除きWASP陰性細胞分画を認めなかった。保因者にみられた単球とリンパ球でのWASP陰性細胞分画の割合の相違は、WASP分子の細胞増殖に対する重要性が血液細胞の種類によって異なることを示唆している。WAS保因者では血液幹細胞レベルで既にX染色体の不活化に偏りを認めるとの報告もある。今回の研究は、この偏りが幹細胞レベルで決定するのではなく、各血球系に分化するにつれ進行する可能性を示している。

【はじめに】

Wiskott-Aldrich症候群 (WAS) は、X染色体連鎖性の原発性免疫不全症であり、その臨床的特徴は血小板減少による出血傾向、難治性の湿疹、免疫不全による易感染性である。その原因遺伝子としてWASP遺伝子が近年同定され、その産物であるWASPがさまざまな血液細胞に発現していることが報告されている。我々は以前フローサイトメトリーを用いたリンパ球細胞内WASPの検出を行い、WAS患者の診断に有用であることを明らかにした。しかし、保因者の解析では正常者との間で差を認めず、保因者診断に有用でないことがわかった。そこで、本研究では単球について解析を行い、この方法が保因者診断に応用可能かどうかを検討した。

【対象と方法】

遺伝子診断された保因者9例と保因者より骨髄

移植を受けたWAS患者1例を対象とした。それぞれのWAS家系の遺伝子変異、WAS患者の臨床スコア (Zhuらによるスコア化による) はTable 1の通りであった。解析は以前報告した方法に準じて行った。まずヘパリン血を採取し、比重遠心法で末梢血単核球を分離した。次にPharMingen社のCytofix / Cytoperm solutionを用い、細胞のfixとpermeabilizationを1ステップで行った。一次抗体にはWASPに対するマウスモノクローナル抗体 (3F3-A5) を用い、マウスIgG1を陰性コントロールに用いた。二次抗体にはFITC標識抗マウスIgG1抗体を用い、FSC, SSCのドットプロットで認められる単球集団20,000個について解析を行った。大部分の例ではPE標識抗CD14抗体との2重染色も行った。

【結果】

まず、exon 1 でmissense mutationを認めたWAS

Table 1 Summary of WAS families

Family No.	WASP 遺伝子変異	患者の臨床スコア	WASP 陰性細胞集団の割合		保因者の年齢 (歳)
			単球 (%)	リンパ球 (%)	
1	Arg-211 → stop (exon 7)	3 (BMT at 1 year)	5.4	-¶	38
2	Deletion (exon 3-exon 7)	4 (died at 3 years)	3.5	-	32
3	Glu-31 → Lys (exon 1)	2 (BMT at 1 year)	14.6	-	34
4	Glu-31 → Lys (exon 1)	3 (BMT at 1 year)	25.1	-	28
5	G deletion after Gly-12 (exon 1)	4 (BMT at 4 years)	17.3 (18.5) ‡	- (-) ‡	27
6	Tyr-107 → Cys (exon 3)	2 → 5 (25 years)	11.7	-	55
7	C deletion after Asp-296 (exon 9)	3	11.9	-	34
8	Pro-459 → Ser (exon 11)	3	30.1	5.2	41
9	Ile-85 → Thr (exon 2)	3	50.7	31.9	39
NC	G deletion at exon 11/ intron 11	3	-	-	30

¶: WASP 陰性細胞集団を認めず。

‡(): 内は保因者より骨髄移植を受けた WAS 患者での解析結果

NC: non-carrier

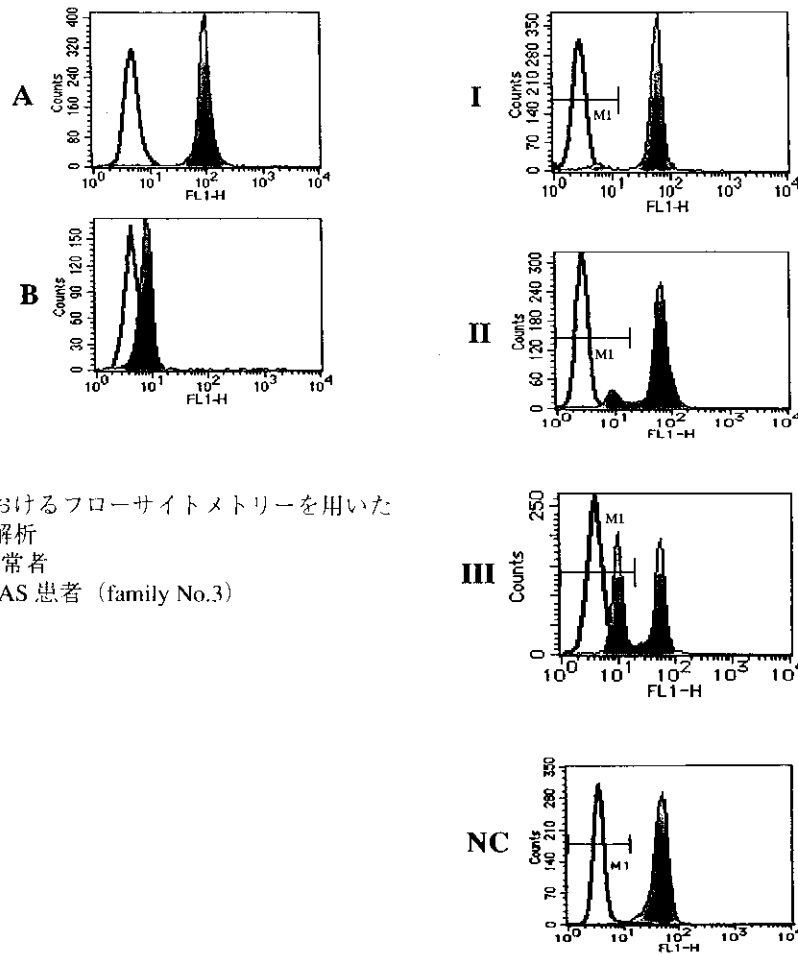


Figure 1

単球におけるフローサイトメトリーを用いた WASP 解析

A: 正常者

B: WAS 患者 (family No.3)

Figure 2

WASP 保因者単球におけるフローサイトメトリーを用いた WASP 解析

WASP 陰性細胞分画の割合より 3 群に分類した。

I 群: <10%, II 群: 10~30%, III 群: >30%, NC: 非保因者

患者のフローサイトメトリー解析結果を示す (Fig. 1)。正常者と明らかなWASP発現の差を認め、単球においてもWASPの検出が可能であることが示された。次に保因者9例と保因者から骨髓移植を受けたWAS患者1例で解析を行ったところ、全例でWASP陽性、陰性の両細胞分画を認めた (Fig. 2 I, II, III)。一方WAS患者の母で非保因者の1例ではこの分画を認めなかった (Fig. 2 NC)。保因者におけるWASP陰性細胞分画の割合は3.5~50.7%であり、3.5%の例においても明らかなWASP陰性細胞分画を認めた。これにより、本方法が保因者診断に有用であることが判明した。この結果から保因者の単球でのWASP発現パターンをI, II, IIIと大きく3つの群に分類した (Fig. 2)。

I群はWASP陰性細胞分画の割合が10%未満のものとした。この群にはexon 7におけるstop codonの1例とexon 3~exon 7に及ぶ欠損の1例が含まれる。III群はこの分画の割合が30%以上のものとした。ここにはmissense mutationの2例が含まれる。II群はこの割合が10%以上30%未満のものとした。exon 1及びexon 3におけるmissense mutationの計3例とexon 1及びexon 9における1 base deletionの各1例が含まれる。一方リンパ球を用いた解析では、2例の保因者を除き全例でWASP陰性分画を認めなかった。また、この分画を認めた2例においても、単球における割合より有意に少なかった (Table 1)。

【考案・結果】

フローサイトメトリーを用いた単球でのWASPの解析では、全例でWASP陰性細胞分画を認め、保因者診断に有用であることが明らかになった。しかし、WAS保因者のなかには単球においてもこの分画を認めない例も存在する可能性があり、保因者の否定に関しては慎重であるべきと考えられた。

単球におけるWASP陰性細胞分画の割合は、遺伝子変異から予測されるWASP障害とある程度の相関が認められた。つまり、WASP障害が大きいと考えられる症例ほどWASP陰性の分画が少ない傾向にあった。WASPは細胞の活性化、増殖に重

要なシグナル伝達に参与していると推測されており、単球の増殖においても重要と考えられる。そのため、遺伝子変異をもつX染色体が不活化している細胞と正常のX染色体が不活化している細胞との増殖能の差によって二次的にX染色体不活化パターンに偏りをきたした可能性が考えられた。しかし、exon 1における1塩基欠損によりWASPがほぼ完全に欠損していると考えられるFamily No. 5の例でもこの分画を17.3%認めた。さらに、この保因者より骨髓移植を受けたWAS患者でも18.5%と再現性が得られている。このことより、単球においてはWASP障害の程度だけでなく他の因子もWASP陰性細胞分画の割合に影響しうると考えられた。一方、リンパ球での検討ではmissense mutationの2名を除いてWASP陰性細胞分画を認めなかった。また、この細胞分画を認めた2例においても単球での割合よりも有意に少なかった。従って、リンパ球においてはWASPはその増殖に極めて重要な役割を担っており、WASP障害の程度が厳密にX染色体不活化パターンの偏りを規定していると考えられた。保因者に認められた単球とリンパ球でのWASP陰性細胞分画の相違は、WASP分子の細胞増殖に対する重要性が、血液細胞の種類によって異なることを示唆している。WASの保因者では血液幹細胞レベルで既にX-染色体不活化に偏りを認めるとの報告もあるが、今回の研究結果は、この偏りが幹細胞レベルで完成するのではなく、各系統に分化するにつれ進行する可能性を示している。

【参考文献】

- 1) Yamada M, Ariga T, Kawamura N, Yamaguchi K, Ohtsu M, Nelson DL, Kondoh T, Kobayashi I, Okano M, Kobayashi K, Sakiyama Y, Determination of carrier status for the Wiskott-Aldrich syndrome by flow cytometric analysis of Wiskott-Aldrich syndrome protein expression in peripheral blood mononuclear cells., *J Immunol.* 165: 1119-22, 2000
- 2) Yamada M, Ohtsu M, Kobayashi I, Kawamura N, Kobayashi K, Ariga T, Sakiyama Y, Nelson DL,

- Tsuruta S, Anakura M, Ishikawa N, Flow cytometric analysis of Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) protein in lymphocytes from WAS patients and their familial carriers., *Blood* 93: 756-7, 1999
- 3) Stewart DM, Treiber-Held S, Kurman CC, Facchetti F, Notarangelo LD, Nelson DL, Studies of the expression of the Wiskott-Aldrich syndrome protein., *J Clin Invest* 97: 2627-34, 1996
- 4) Wengler G, Gorlin JB, Williamson JM, Rosen FS, Bing DH, Nonrandom inactivation of the X chromosome in early lineage hematopoietic cells in carriers of Wiskott-Aldrich syndrome., *Blood* 85: 2471-7, 1995
- 5) Ariga T, Yamada M, Wada T, Saitoh S, Sakiyama Y, Detection of lymphocytes and granulocytes expressing the mutant WASP message in carriers of Wiskott-Aldrich syndrome., *Br J Haematol* 104: 893-900, 1999

Determination of carrier status for the Wiskott-Aldrich syndrome by flowcytometric analysis of Wiskott-Aldrich syndrome protein expression in peripheral blood mononuclear cells.

Masafumi Yamada¹⁾, Nobuaki Kawamura¹⁾, Kunihiro Kobayashi¹⁾, Tadashi Ariga²⁾, Yukio Sakiyama²⁾, Tatsuro Kondoh³⁾

Department of Pediatrics, Hokkaido University School of Medicine ¹⁾, Department of Human Gene Therapy, Hokkaido University School of Medicine ²⁾, Department of Pediatrics, Nagasaki University School of Medicine ³⁾

The Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) is caused by defects in the WAS protein (WASP) gene on the X chromosome. Previous study disclosed that flow cytometric analysis of intracellular WASP expression (FCM-WASP analysis) in lymphocytes was useful for the diagnosis of WAS patients. Lymphocytes from all WAS patients showed WASPdim instead of WASPbright. Here we report that FCM-WASP analysis in monocytes could be a useful tool for the WAS carrier diagnosis. Monocytes from all nine WAS carriers showed varied population of WASPdim together with WASPbright. None of control individuals possessed the WASPdim population. In contrast, lymphocytes from all the carriers except two lacked the WASPdim population. The difference of the WASPdim population in monocytes and lymphocytes observed in WAS carriers suggests that WASP plays a more critical role in the development of lymphocytes than in that of monocytes. The present studies suggest that a skewed X-chromosomal inactivation pattern observed in peripheral blood cells from WAS carriers is not fixed at the hemopoietic stem cell level but progresses after the lineage commitment.

Chediak-Higashi症候群患者白血球におけるProtein kinase C 活性の異常低下とカルパイン阻害剤E-64-dによるCon A cap形成の回復について

田 辺 文 憲 (山梨県立看護大学短期大学部)
S-H. Cui (山梨医科大学微生物学)
照 沼 裕 (山梨医科大学微生物学)
岩 谷 靖 雅 (山梨医科大学微生物学)
布 井 博 幸 (熊本大学小児科)
上 松 永 (信州大学小児科)
小宮山 淳 (信州大学小児科)
野 村 明 彦 (九州大学成長発達医学)
原 寿 郎 (九州大学成長発達医学)
小野寺 隆 (吹田市民病院)
岩 田 力 (東京大学分院小児科)
伊 藤 正 彦 (山梨医科大学微生物学)

原発性免疫不全症であるChediak-Higashi症候群 (CHS) 患者のEB virus-transformed cell lineを用い、われわれがすでに報告したCHSモデルマウスにおけるprotein kinase C (PKC) の異常低下がCHS患者でもみられるかどうかを検討した。Normal cell line をCon Aで刺激すると、translocationにより細胞膜のPKCは高まるのに対し、CHS cell lineでは膜のPKCに著明な低下がみられた。PKC分解酵素のカルパインを阻害剤するE-64-dは、このPKCの異常低下を阻止することがわかった。また、E-64-dは増加しているCon A cap形成もほぼ正常レベルまで回復させた。CHS患者の末梢血単核球においても、PKCの異常低下とE-64-dによる回復を確認した。CHSでは、Con A 刺激後に細胞内のセラミドが異常に増加することがわかり、これがPKC分解をひきおこしCHSの細胞機能不全に関与することが示唆された。

【はじめに】

CHSは常染色体劣性遺伝の先天性免疫不全症の1つであり、好中球など多くの細胞に巨大顆粒が存在し、エラスターゼなどのライソゾーム酵素活性の低下やリンパ球のナチュラルキラー (NK) 活性の低下が特徴である¹⁾。患者は黄色ブドウ球菌などの細菌感染を繰り返し、多くは小児期に死亡する。CHSの責任遺伝子は1996年に同定され、CHS1またはLystと名付けられたが、その機能はまだ明らかではない^{2, 3)}。われわれは、CHSの動物モデルであるベージュマウスにおいて、好中球やNK細胞でPMA刺激後のPKC活性に異常低下がみられ、

これがNK活性やCon A cap形成などの細胞機能に深く関与することを明らかにした^{4, 5, 6, 7)}。今回は、本研究に同意の得られたCHS患者のcell lineおよび末梢血単核球を用い、PKC活性の異常低下がCHSの異常な細胞機能に関与するかどうかを検討した。

【方法】

細胞は、同意の得られたCHS患者3例と健常者コントロール3例からEB virusでtransformしたcell lineを用いた。一部の実験では、末梢血単核球を用いた。

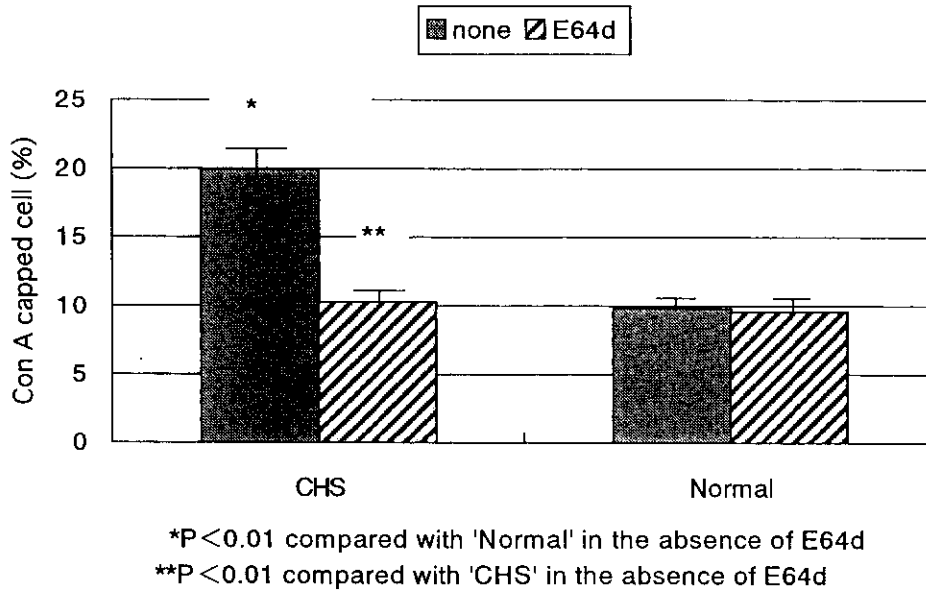


図1 E64dによるcap形成の回復

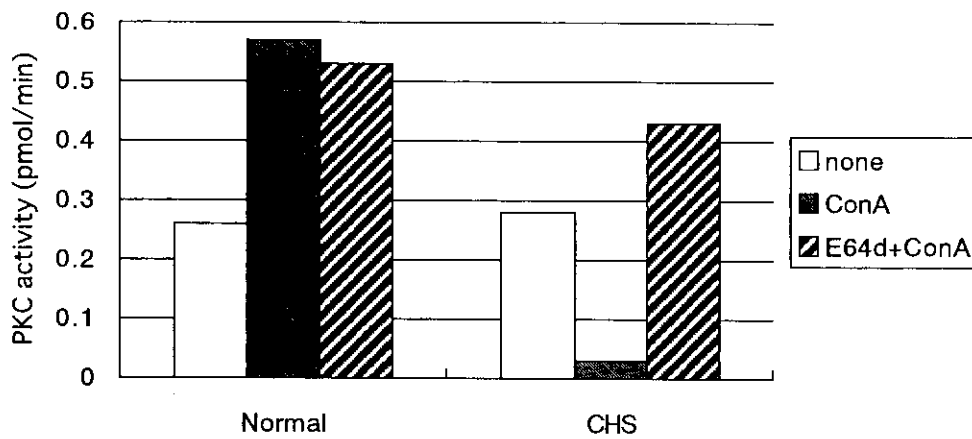


図2 細胞膜のPKC活性

表1 CHSにおけるセラミドの増加

Cell line	Stimulation	Ceramide(cpm)	Sphingomyelin(cpm)
Normal	none	450.4 ± 34	828.8 ± 79
	Con A	545.7 ± 76	835.4 ± 75
CHS	none	457.8 ± 21	656.1 ± 48
	Con A	810.5 ± 44*	420.6 ± 32*

*P < 0.01, compared with unstimulated CHS

PKCは、Con Aで刺激をした後にキレート剤およびプロテアーゼ阻害剤を含むトリスバッファー (pH7.5) に浮遊させ、4℃で10秒、3回超音波破碎を行った。さらに、4℃で、100,000g、1時間超遠

心した後、その上清を細胞質分画、TritonX-100で可溶化した沈査を膜分画とした。PKC活性は、PKC enzyme assay system (Amersham社) を用い、基質ペプチドへの³²Pのとりこみを液体シンチレー

ションで測定した。

Con A cap形成は、細胞にFITC-Con A (20 μ g/ml)を加えてインキュベートさせた後、パラホルムアルデヒドで固定し、蛍光顕微鏡でcap形成細胞の割合を測定した。

細胞内セラミドおよびスフィンゴリエリンの測定は、細胞に³H-palmitic acidを一晩取り込ませた後、脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーで展開した。セラミドとスフィンゴリエリンのスポットを削りその放射活性を測定した。

【結果】

CHS cell lineのCon A cap形成を調べたところ、図1に示すようにNormal cell lineに比べ有意に増加していた。この異常は、PKCを分解する酵素であるカルパインを阻害するE-64-d (1 μ g/ml)を加えて24時間培養すると、ほぼ正常レベルに回復することがわかった。一方、E-64-dはNormal cell lineには影響を与えなかった。

次に、細胞の膜分画のPKC活性を測定した。図2に示すように、Normal cell lineではCon A刺激(20分)によりtranslocationがおこりPKC活性が高まるのに対し、CHS cell lineではtranslocationの後、急激に膜のPKC活性が低下することがわかった。このとき、E-64-dで前処理するとCHSのPKC活性が回復することもわかった。また、図には示さないが、CHSにおけるcap形成とPKC活性の異常とE-64-dによる回復は、患者末梢血単核球においてもみられることを確認した。

われわれは、セラミドがPKCのカルパインによる分解を促進することをすでに報告している⁸⁾。CHS cell lineのセラミドが増加しているかどうかを検討したところ、表1に示すようにCHS cell lineではCon A刺激後にセラミドが有意に増加することがわかった。セラミドは主にスフィンゴリエリンの分解で産生されるが、CHSではセラミドの増加に並行してスフィンゴリエリンが減少していた。

【考察】

すでにわれわれが報告しているページマウス

におけるPKC活性の異常は、CHS患者細胞においても見られることがわかった。さらに、PKC分解阻害剤であるE-64-dは、CHSの異常なcap形成増加などの細胞機能も回復させることがわかった。今回の実験により、CHSにおけるPKC分解亢進は、刺激後の細胞内セラミドの増加が原因となっていると考えられる。CHSではスフィンゴリエリンが減少することから、スフィンゴリエリナーゼ活性の異常な活性化が考えられるが、詳細なメカニズムは現在のところ不明である。Barbosaらの論文で³⁾、ページマウスのPKC活性の異常低下とCHSの責任遺伝子であるCHS1 geneの関連性が述べられているが詳細は不明である。このメカニズムを探ることが、CHSの責任遺伝子の機能解明や遺伝子治療につながると思われる。

【文献】

- 1) 田辺文憲, 伊藤正彦. Chediak-Higashi症候群の病因・病態と治療, 小児内科, 32, 2036-2039, 2000.
- 2) Perou CM, Moore KJ, Nagle DL, et al. Identification of the murine beige gene by YAC complementation and positional cloning. Nature genetics 13, 303-308 1996.
- 3) Barbosa MDFS, Nguyen QA, Tchernev VT, et al. Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes. Nature 382, 262-265, 1996.
- 4) Ito M, Tanabe F, Takami Y, et al. Rapid down-regulation of protein kinase C in (Chediak-Higashi syndrome) beige mouse by phorbol ester. Biochem.Biophys.Res.Commun. 153, 348-356, 1988.
- 5) Ito M, Sato A, Tanabe F, et al. The thiol proteinase inhibitors improve the abnormal rapid down-regulation of protein kinase C and the impaired natural killer activity in Chediak-Higashi syndrome (beige) mouse. Biochem.Biophys, Res, Commun. 160, 433-440, 1989.
- 6) Sato A, Tanabe F, Ito M, et al. Thiol proteinase inhibitors reverse the increased protein kinase C

- down-regulation and concanavalin A cap formation in polymorphonuclear leukocytes from Chediak-Higashi syndrome (beige) mice. *J.Leukoc. Biol.* 48, 377-381, 1990.
- 7) Tanabe F, Cui S-H, Ito M. Abnormal down-regulation of PKC is responsible for giant granule formation in fibroblasts from CHS (beige) mice—a thiol proteinase inhibitor, E-64-d, prevents giant granule formation in beige fibroblasts. *J.Leukoc. Biol.* 67, 749-755, 2000.
- 8) Tanabe F, Cui S-H, Ito M. Ceramide promotes calpain-mediated proteolysis of protein kinase C β in murine polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Biophys.Res.Commun.* 242, 129-133, 1998.

Abnormal down-regulation of protein kinase C activity and the correction of Con A cap formation by E-64-d in leukocytes from Chediak-Higashi syndrome

F. Tanabe¹, S-H. Cui², H. Terunuma², Y. Iwatani², H. Nunoi³, K. Agematsu⁴, A. Komiyama⁴, A. Nomura⁵, T. Hara⁵, T. Onodera⁶, T. Iwata⁷ and M. Ito²

¹Division of Human Health Sciences, Yamanashi College of Nursing, Kofu, Yamanashi, ²Department of Microbiology, Yamanashi Medical University, Tamaho-cho, Yamanashi, ³Department of Pediatrics, Kumamoto University Medical School, Kumamoto, ⁴Department of Pediatrics, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, ⁵Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, ⁶Suita Municipal Hospital, Suita, ⁷Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Mejirodai Campus, University of Tokyo, Tokyo, Japan

We examined whether the abnormal down-regulation of PKC activity occurs in Epstein-Barr (EB) virus-transformed cell lines from Chediak-Higashi syndrome (CHS) patients. When CHS cell lines were stimulated with concanavalin A (Con A), the membrane-bound PKC activity markedly declined, whereas that in control cell lines increased. We found that E-64-d, which protects PKC from calpain-mediated proteolysis, reversed the declined PKC activity and corrected the increased Con A cap formation to almost normal levels in CHS cell lines. We confirmed that the dysregulation of PKC activity also occurred in peripheral blood mononuclear leukocytes (PBMC) from CHS patients and that E-64-d corrected both the declined PKC activity and increased Con A cap formation. Moreover, we found that ceramide production in CHS cell lines significantly increased after Con A stimulation. These results suggest that the ceramide-induced PKC down-regulation is responsible for the cellular dysfunctions in CHS.

Dyskeratosis congenita 患者の解析

布井博幸 (宮熊本大学小児科)

Dyskeratosis congenita (先天性異角化症) は皮膚の網状色素沈着, 爪の萎縮, 粘膜白板症を 3 主徴とする稀な遺伝性疾患で, 約 9 割の症例が伴性劣勢遺伝の形式を呈する。10歳までに約半数の症例で汎血球減少が認められ, 死亡原因の多くを占めている。我々は, 3 主徴と進行する汎血球減少, 及び小脳萎縮を有する 11才男児を経験した。抹消血リンパ球培養により mRNA を得て遺伝子解析を行い, これまで X-linked の DKC 症例で最も多く認められる, この疾患でホットスポットになっている異変であることを確認した。典型的な本症例の臨床経過と同時に, 汎血球減少について欠損蛋白である dyskerin 抗体を作製し Telomerase やリボソーム機能異常との関係についても検討を加えている。

【研究目的】

Dyskeratosis congenita (DKC) は, 粘膜白板症, 網状色素沈着, 爪萎縮の 3 主徴と発汗過多, 流涙症, 発育発達障害, 食道狭窄, 歯牙異常, 肺疾患などを認める稀な疾患である。現在までに 17ヶ国 70家系, 118名の DKC 患者¹⁾, また我が国では 60名以上の報告がある²⁾。更に, 10歳までに半数以上の症例が汎血球減少を呈し, この進行が死亡原因の多くを占めている。Fanconi 症候群との相違は, 一般に染色体の脆弱性を認めない点である。根治療法はなく, 汎血球減少に対して幹細胞移植が行われているが, 移植後に原因不明の間質性肺炎で死亡する症例が多く満足する成績が得られていないのが現状である³⁾。更に, 加齢と共に胃癌や舌癌などの悪性腫瘍の発生頻度が増加する^{4), 5)}, これは粘膜白板の癌化が原因と考えられている。

1998年, Heiss らは 5名の X-linked の DKC 患者から 5 つの変異を同定し, 514個のアミノ酸からなる dyskerin という蛋白の変異が X-linked の DKC の原因であることを明らかにした⁶⁾。dyskerin は 15のエクソンで構成され, 15Kb の大きさを有する。その機能は明らかではないが, rRNA 合成に関与する蛋白 (NAP57, Cbf5p) との相同性より, rRNA 合成に重要ではないかと予想されていた⁷⁾。しかし最近では, テロメラーゼ複合体の構成成分であ

る H/ACA に dyskerin が含まれ, しかも DKC 患者細胞ではテロメラーゼ活性が低下していると報告されている⁸⁾。

今回, 我々は 3 主徴及び進行する汎血球減少, 小脳萎縮を認める DKC と思われる 11歳男児を経験した。遺伝子解析の結果, 諸外国でも 11例報告されている⁹⁾ ホットスポットであるエクソン 11 のミスセンス変異を有する DKC の典型例であることが明らかになった。典型的な DKC 症例の臨床経過と同時に, 汎血球減少について欠損蛋白である抗 dyskerin 抗体を作製し, Telomerase やリボソーム機能異常との関係についても検討を加えている。

【研究方法】

1) 症 例; 11才, 男児

主 訴; 汎血球減少

家族歴; 特記すべきことなし。

現病歴; 在胎 36週, 胎児仮死にて帝王切開を受け, 出生体重 1380g (IUGR) で昭和 63年 11月出生している。アプガースコアは 1 分は 3 点, 5 分後 6 点であったため数日間呼吸管理を受けた。また, 高ビリルビン血症に対して光線療法を 6 クール施行されている。低出生体重児のため, 予定は 5カ月で, お座りは 12カ月とやや遅れ気味であっ

た。また、この頃より顔色は白く、皮下出血も起こしやすかったが、特に採血などの検査は受けていない。平成2年12月(2歳時)、麻疹罹患時に汎血球減少が認められ、国立熊本病院小児科に精査目的にて紹介入院となった。

入院時身体所見：身長81.2cm (-1.5SD)、体重8.85kg (-2.0SD以上)と小さく、歩行は出来ずつかまり立ちのみで、発語も有意単語が1~2個程度で精神運動発達に遅れが認められた。また、口腔粘膜には白斑とびらんが認められたが、皮膚の色素沈着や爪の萎縮は認められなかった。

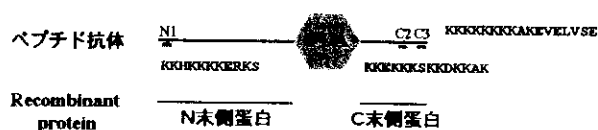
入院時検査所見：汎血球減少、骨髓低形成以外の異常所見は認められなかった。免疫グロブリン、CD4/CD8比率、リンパ球芽球化反応など免疫学的異常も認めなかった。

入院後経過：入院時、外表奇形は認められず骨髓所見から再生不良性貧血と診断した。そこでステロイドパルスをはじめ様々な治療を行ったが、どれも著明な効果なく以後外来にて経過観察となった。その後、3歳頃より爪の萎縮、皮膚の網状色素沈着が認められるようになり臨床的にはDKCが最も疑われた。また、5歳頃からは嚥下困難も認められ、内視鏡検査の結果食道狭窄の存在が明らかになった。更に、7歳頃からは汎血球減少が徐々に進行し、現在は頻回輸血の状態となっている。同時に、成長発達の遅れ、流涙症、歯牙異常などDKCに特異的な症状も認める。繰り返す感染に対しては、G-CSF製剤や抗生剤の投与などの対症療法を行っている。なお、染色体の脆弱性検査を行ったが不安定素因はなく、Fanconi症候群は否定されている。更に、Th1/Th2も正常で免疫学的異常は現在も見られていない。

2) 遺伝子解析：患者末梢血由来のEBウイルスによるB細胞株の樹立を4度試みたが出来なかった。そこで、患者単核球をPHA-P (5 g/ml, 生化学工業) + rhIL-2 (200U, genzyme) /10%FCS加RPMI1640培地にて7日間培養しT細胞を増殖させ、AGPC法にてRNAを抽出した。プライマーにRandom 9mersを用いて逆転写反応を行い、cDNAを作成しPCR法にて増幅した。PCRに用いたプライマー1F~4RはHeissら

の報告に従った⁶⁾。塩基配列決定はダイターミネーター法(ABI PRISM 310 Genetic analyzer, PERKIN ELMER)にて塩基配列を決定した。

- 3) Telomerase 活性測定：テロメラーゼ活性検出キット(TRAP-ezeTM Telomerase Detection Kit: 協和メテックス)にて、患者T細胞の活性を検出した。
- 4) 抗dyskerin モノクローナル抗体作製：以下の様に、dyskerin 蛋白質のNおよびC末端に対するペプチドとレコンビナント蛋白を各々作製し、マウスに免疫後モノクローナル抗体を作製した。



【結果】

- 1) 遺伝子解析結果(図1)：DKC1 遺伝子のエクソン11にある1150番目のCがTに置換したミスセンス変異を認めた。以下にこれまで報告されている変異と我々の症例の変異部位を示した。

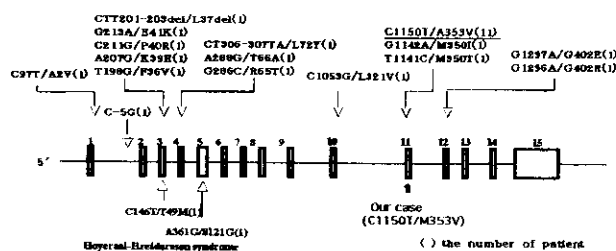


図1

- 2) Telomerase 活性(図2)：患者1ではTelomerase活性が認められなかったが、患者2とコントロール細胞では活性が認められた。なお、dyskerin抗体によるdyskerin蛋白質量はWestern blotting法による半定量法ではあるが、患者およびコントロール細胞間に差は認められなかった。
- 3) FACS 解析：作製したモノクローナル抗体はいずれもWestern blottingにて、dyskerin蛋白質を認識する5クローンが確認された。さらに、

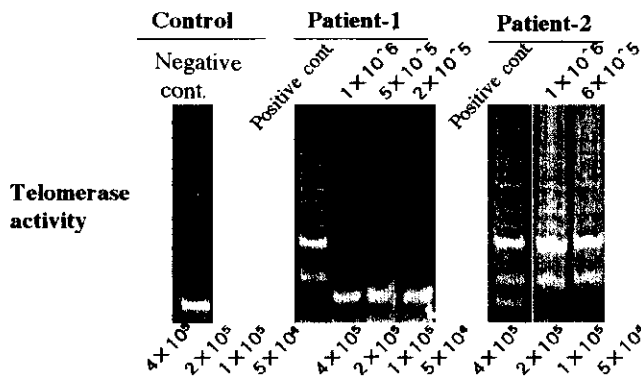


図 2

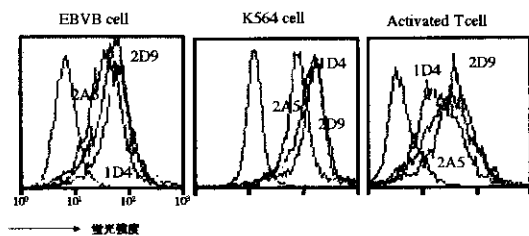


図 3

以下のように各種細胞株を Cytofix/Cytoperm Kit (Pharminngen) で固定後、FACS 解析を行った結果、3 クローンで陽性となったが C 末端に対するペプチド抗体である 2D9 が最も安定した蛍光強度が得られた (図 3)。

【考察】

Knight らは、37人の DKC 患者の遺伝子検索を行い変異が確認された21症例は、1 例を除きいずれもミスセンス変異であり、そのうち11症例が今回の患者と同じエクソン11にある1150番目のCがTに置換したミスセンス変異であることを明らかにした⁹⁾。本症例も同じ変異を有することにより臨床症状と併せて DKC と診断した。本症例を含めた12症例は、血縁関係はなく数カ国からの症例であり、エクソン11での変異部位は DKC におけるホットスポットであると考えられた。塩基配列上くり返し配列が変異の近位に見られることが変異の集中する原因かもしれない。同時に①ナンセンス変異②蛋白合成を伴わない挿入③大きな欠失などの遺伝子変異を伴う患者が存在しないことから、変異 dyskerin 蛋白質がある程度の機能を保持しているため、生物学的に選択が起きた可能性も考えられる。

実際 Mitchell らは、1名の DKC 患者で dyskerin は存在するが、テロメラーゼ活性が低下していることを明らかにしており、生物学的に dyskerin は rRNA 合成よりむしろテロメアの維持に重要な役割を果たしていると予想している⁷⁾。また、DKC には高頻度で再生不良性貧血が合併することから、血球系における dyskerin とテロメアの間接的な関係を探ることで将来この蛋白の造血における役割が明らかになることが期待される。

更に本症例では、小脳萎縮、淡蒼球部の石灰化や失調歩行を認めるが、最近 DKC と似た症状 (再生不良性貧血、男児のみ発症) を呈し小頭症、小脳低形成、発育遅延を有する Hoyeraal-Hreidarsson 症候群の 2 例で DKC1 遺伝子の変異 (146C→T, 361A→G; Fig. 3-A 下線部) が報告された¹⁰⁾。これらの症例の変異部位が、今回の症例とは異なるミスセンス変異であることから、変異の違いによる臨床症状の表現形の違いに興味もたれる^{11, 12)}。現在、汎血球減少を来した再生不良性貧血と診断されている症例の中には、初期に DKC の確定診断に至っていない症例も含まれている可能性もある。我々は、このような症例に対して、塩基配列決定と抗体を用いた検索による診断法を検討している。

【結論】

典型的な DKC 症例の臨床経過と同時に、汎血球減少について欠損蛋白である dyskerin 抗体を作製し、Telomerase やリボソーム機能異常との関係についても検討している。今後、dyskerin 蛋白質の生物学的な意味と造血系細胞の増殖との関係や免疫系の異常の可能性についても検討したいと考えている。

【参考文献】

- 1) Dokal I. : Dyskeratosis congenita. Br J Haematol 105 (suppl. 1) : 11~15, 1999
- 2) 絹巻 宏, ほか : Dyskeratosis congenita にみられる汎血球減少の臨床的考察—自験例3例および本邦報告例についての検討—, 日本小児科学会雑誌91 : 2863~2870, 1985

- 3) Langston AA, et al : Allogeneic marrow transplantation for aplastic anemia associated with dyskeratosis congenita. *Br J Haematol* 92 : 758-765, 1996
- 4) Knight, et al : Dyskeratosis Congenita (DC) Registry : identification of new features of DC. *Br J Haematol* 103 : 990~996, 1998
- 5) 貞本品子, ほか : 舌癌を合併した先天性角化異常症例. *耳鼻臨床* 92 : 253~257, 1999
- 6) Heiss NS, et al : X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat Genet* 19 : 32~38, 1998
- 7) Giordano E, et al : minifly, a drosophila gene required for ribosome biogenesis. *J Cell Biol* 144 : 1123~1133, 1999
- 8) Mitchell JR, et al : A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 402 : 551~555, 1999
- 9) Knight SW, et al : X-linked dyskeratosis congenita is predominantly caused by missense mutation in the DKC1 gene. *Am J Hum Genet* 65 : 50~58, 1999
- 10) Knight SW, et al : Unexplained aplastic anaemia, immunodeficiency, and cerebellar hypoplasia (Hoyeraal-Hreidararsson syndrome) due to mutations in the dyskeratosis congenita gene, DKC1. *Br J Haematol* 107 : 335~339, 1999
- 11) Drachtman RA, et al : Dyskeratosis congenita : Clinical and genetic heterogeneity Report of a new case and review of the literature. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 14 : 297~304, 1992
- 12) Dokal I, : Dyskeratosis congenita : an inherited bone marrow failure syndrome. *Br J Haematol* 92 : 775~779, 1996

【謝辞】

この仕事を行うにあたり、吉本寿美*1, 柳邊安秀*2, 水上 智之*1, 石橋 史成*1, 足立 尚登☆1, 高木一孝*2, (*1熊本大学医学部附属病院小児科, *2国立熊本病院小児科)に臨床的観察および研究に大変お世話になりました。ここに深謝致します。

細胞死におけるBloom 症候群病因タンパク (BLM) の関与

近藤 直実 (岐阜大学医学部小児科)

金子 英雄 (岐阜大学医学部小児科)

Bloom症候群 (BS) は成長障害, 日光過敏性紅斑, 免疫不全を特徴とする。病因遺伝子BLMはhelicase機能を有することが明らかになったが, BSに成長障害, 免疫不全がおきる原因は不明な点が多い。BLMの欠損がin vivo, in vitroの細胞の増殖におよぼす影響を検討した。BSおよび健常人由来のEBV-transformed細胞株または末梢単核球 (PBMCs) を用いた。BS由来の細胞株はコントロールに比較し増殖がゆるやかであった。さらに, 放射線照射後の生存率も低下していた。BS由来PBMCではp53タンパクの誘導が放射線照射前から亢進しており, 細胞周期の調節異常が考えられた。BLMを欠損させたマウスでは胎生12日の時点でcontrolに比較し身長は約2/3 体重は1/3と明らかに小柄であった。胎児肝細胞は約1/100に減少していた。神経管周囲には細胞死を示す細胞の増加がみられた。以上より, BLMの欠損ではDNAの複製が障害され細胞の増殖障害がおこり, またDNAのbreakに対して修復できず細胞死がおこりやすいことがBSの成長障害, 免疫不全の病態を形成していると考えられた。

【はじめに】

Bloom症候群 (BS) は生下時よりみられる小柄な体型, 日光過敏性紅斑, 免疫不全, 高率な癌腫の合併を伴う常染色体劣性の遺伝性疾患である。BSの病因遺伝子BLMはWerner症候群の病因遺伝子WRN, 酵母Sgs1などと共にDNAヘリカーゼと相同性を有しており, DNAの複製・修復に関与している。小柄な体型は他のRecQ遺伝子の異常により発症するWerner症候群, Rothmund-Thomson症候群にも共通してみられる¹⁾。しかし, BLMの異常とBSにみられる小柄な体型, 免疫不全の関係については, 不明な点が多い。今回, BLMの欠損によりin vivo, in vitroの細胞増殖, 細胞死についてどのような影響があるかを検討した。

【対象と方法】

1) BLM knock out マウス: Leder P.らが作製したマウスをもちいた²⁾。BLMマウス (+/-) を交配しday 12.5で胎児をとりだし, 臓器の重量を測定した。また, その一部をprimary cultureし, embryonic fibroblastを樹立した。

2) BSおよび健常人由来のEBV-transformed (EB) 細胞株または末梢単核球 (PBMCs) を用いた。PBMCsをPHAで3日間刺激後, 6Gy照射し1時間後細胞を回収し, ATM kinase assay, p53のWestern blottingをおこなった。

3) 細胞増殖の解析はMTT assay またはトリパンブルーを用いた。methyl methanesulfonate (MMS) を 5×10^{-6} から 20×10^{-6} に濃度をふり, 1×10^5 のembryonic fibroblastと培養し24時間後に細胞数を数えた。

【結果】

BS由来のEB細胞株, BLM^{-/-}マウス由来のembryonic fibroblastはともにコントロールに比較し増殖がゆるやかであった。EB細胞株, BLM^{-/-}のfibroblast共に放射線照射後の細胞増殖は健常人由来の細胞株に比較し低下していた。さらに, BLM^{-/-}由来のfibroblastはMMSに対する感受性も亢進していた (図1)。健常人由来の末梢単核球をPHAで3日間刺激し, 放射線照射するとp53タンパクが誘導されるが, BS患者由来の末梢単核球

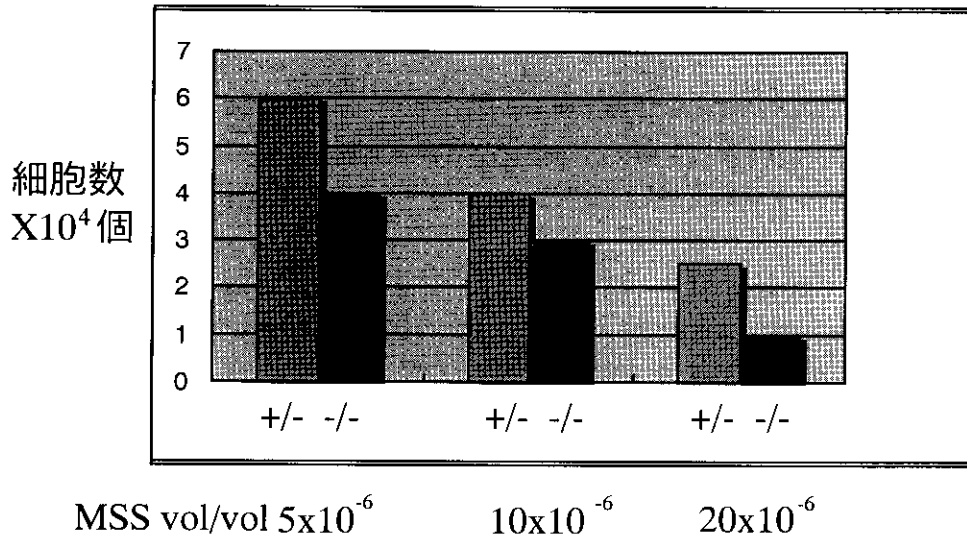


図 1 High sensitivity to MMS in BLM ^{-/-} embryonic fibroblast
 BLM欠損マウスより樹立したembryonic fibroblastのMMSに対する感受性の亢進。胎生12.5日のhomoまたはheteroマウスよりembryonic fibroblastを樹立し各濃度のMMSの存在下で生細胞数をカウントした。

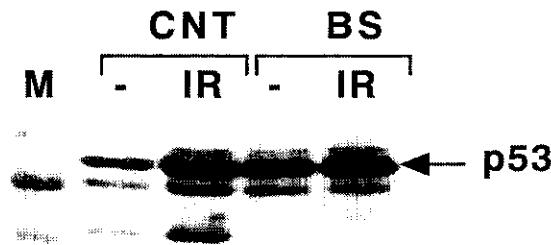


図 2 Effect of ionizing radiation (6 Gy) on p53 protein in human PBMCs from BS patient
 PBMCsにおけるp53の誘導。control (CNT) およびBS患者のPBMCsをPHAで3日間刺激後radiation照射 (IR) するとcontrolでは無照射 (-) に比較し照射後 (IR) p53が誘導されたが、BSのPBMCsでは無照射でもp53の高発現がみられ、IRにより誘導されなかった。

放射線照射前よりp53タンパクの発現が亢進していた(図2)。BLMを欠損させたマウスでは胎生12日の時点でcontrolに比較し身長は約2/3、体重は約1/3と明らかに小柄であった。正常の胎児とBLM^{-/-}の胎児は肉眼的にも大きさにより区別可能であった。また、以前報告されたようにBLM^{-/-}マウスは胎生致死であり、13日をこえて生存はできなかった。BLM^{-/-}マウスの胎児肝細胞は約1/100に減少していた。BLM^{-/-}マウスの神経管周囲にはapoptosisを示す細胞の増加がみられた。

【考察】

BSでは生下時より小柄な体型が認められる。このことは、胎児期にすでに健常人と各臓器においてその大きさに差があると考えられる。BLM欠損マウスも胎生12日で明らかに胎児の大きさに差がみられた。BS由来の細胞では、さまざまな染色体の異常がおこることが知られており、とくに、sister chromatid exchangeが特徴的である。BLMはsister chromatid exchangeに抑制的にはたらくと報告されている³⁾。生じたDNAの異常が修復可能ならば、細胞周期を停止させ修復がおこなわれるが、

修復できないときは細胞死がおこると考えられている。BLM欠損細胞株でみられた、細胞増殖の低下、放射線感受性の亢進、DNA障害を誘導する薬剤に対する感受性の亢進は、BLMの欠損ではDNAのdamageに対して修復ができないため、細胞死が誘導されやすくなっていると考えられた。さらに、BLMの欠損細胞で観察される、p53タンパクの発現異常はBLMが細胞周期の調節にも関与していることを示唆している。DNAがdamageをうけた時、ATMが活性化し細胞周期の調節をすることが知られているが、昨年度報告したATMとBLMの相互作用の点から、BLMの欠損状態ではATMの機能異常がおこることより、BLMの欠損でみられる細胞周期の調節異常はATMを介しておこっているのかもしれない。BS、BLM欠損マウスでの小柄な体型は各臓器の細胞数の低下により生じており、これは、細胞増殖の低下、細胞死の亢進によりもたらされたものと考えられる。BLM欠損のリンパ球でも同

様に細胞死の亢進がおこっており、これにより免疫不全がおこると考えられる。

【参考文献】

- 1) Lindor NM, Furuichi Y, Kitao S, Shimamoto A, Arndt C, Jalal S. Rothmund-Thomson syndrome due to RECQ4 helicase mutations. *Am. J. Med. Genet.* 90, 223-228, 2000
- 2) Chester N, Kuo F, Kozak C, O' Hara CD, Leder P. Stage-specific apoptosis, developmental delay, and embryonic lethality in mice homozygous for a targeted disruption in the murine Bloom's syndrome gene. *Genes & Dev.* 12: 3382-3393, 1998.
- 3) Wang W, Seki M, Narita Y, Sonoda E, Takeda S, Yamada K, Masuko T, Katada T, Enomoto T. Possible association of BLM in decreasing DNA double strand breaks during DNA replication. *EMBO J.* 19: 3428-3435, 2000.

Involvement of BLM protein in DNA repair and cell death

Naomi Kondo, Hideo Kaneko

Department of Pediatrics, Gifu University School of Medicine

Bloom syndrome (BS) is a rare autosomal genetic disorder characterized by lupus-like erythematous telangiectasias of the face, sun sensitivity, infertility and stunted growth, and upper respiratory infection and gastrointestinal infections commonly associated with decreased immunoglobulin levels. The syndrome is associated with immunodeficiency of a generalized type, ranging from mild and essentially asymptomatic to severe. Chromosomal abnormalities are hallmarks of the disorder, and high frequencies of sister chromatid exchanges and quadriradial configurations in lymphocytes and fibroblasts are virtually diagnostic.

To investigate why BLM deficiency causes the stunted growth and immunodeficiency, we studied the cell growth and cell death in BLM deficient cells and mice. BLM deficient EB-cell lines from BS patients and embryonic fibroblast from BLM^{-/-} mice showed slow growth compared with control cells. BLM deficient cells showed abnormal expression of p53 protein after irradiation. In BLM^{-/-} mice, small body size, reduced number of fetal liver cells and increased cell death were observed. Collecting these results, BLM deficiency causes slow cell growth and increased cell death resulting in the small body size.

原発性免疫不全症における変異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免疫学教室）
片村憲司（京都大学医学部小児科）
金兼弘和（富山医科薬科大学小児科）
宮脇利男（富山医科薬科大学小児科）
小安重夫（慶應義塾大学医学部微生物学免疫学教室）

昨年までに、片村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通じ、変異ZAP70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、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とHSP90の機能が重要であることを示す知見を得た。同様な変異タンパク質分解系が他の原発性免疫不全症における変異タンパク質の場合にも機能している可能性を検討し、伴性無 γ グロブリン血症において見いだされたBtkの変異体を用いた解析を行い、変異Btkタンパク質が変異ZAP70タンパク質と同様にプロテアソームとは異なる経路で分解されることを見いだした。

【はじめに】

昨年、京都大学病院小児科において見いだされたCD8欠損症の患児の解析を行い¹⁾、その変異の同定ならびに変異タンパク質の性状を解析した²⁾。その結果、これまでに報告された他のCD8欠損症の場合とは異なり、患児の2つのZAP70遺伝子座に見られる異なるミスセンス変異がともに温度感受性変異であることを見いだした。どちらのミスセンス変異を導入した場合も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。そこで変異ZAP70タンパク質の発現機構の解析を進めるとともに、変異Btkタンパク質の分解がやはり新たな経路によるものかを検討した。

【対象と方法】

昨年報告した、京都大学病院小児科において見いだされたCD8欠損症の患児において見いだされた変異（M572L変異ならびにP80Q変異）を導入したZAP70のcDNAを用いた。また、変異Btkの

cDNAは、C末端側にMyc-tagを付加した野生型ヒトBtk遺伝子を鋳型としてR28P変異（金兼ら、未発表）ならびにR28C変異³⁾をPCR法により導入することで作製した。

【結果と考察】

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ところ、野生型ZAP70を遺伝子導入した細胞においては野生型ZAP70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。また、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。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、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

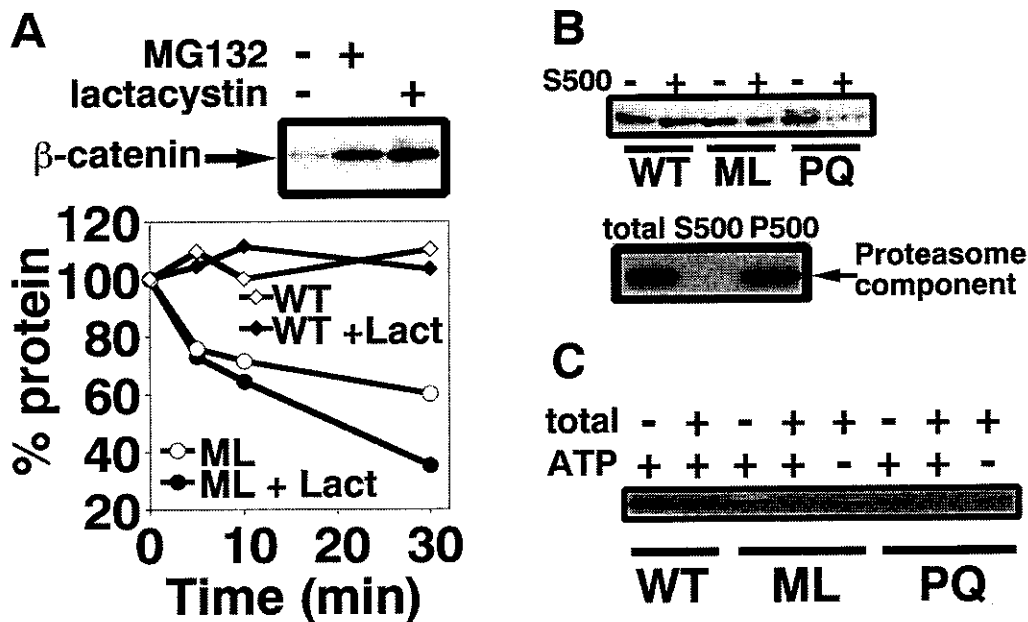


図1 変異ZAP70タンパク質の分解

(A) ³⁵S-メチオニン存在下に *in vitro* で合成した野生型ZAP70タンパク質 (WT) とM572L変異ZAP70タンパク質 (ML) を、それぞれラクタシチンで前処理した細胞抽出液 (+Lact) もしくは未処理の細胞抽出液とともにATP存在下に37℃で加温した。各時間ごとにサンプルを調製し、反応液中に存在するZAP70タンパク質の量を定量した。対照実験として、プロテアソーム系によって分解を受けることの知られるベータカテニンの分解がプロテアソームの阻害剤で阻止される様子を示す (上段)。(B) *In vitro* で合成した野生型 (WT)、M572L変異体 (ML) ならびにP80Q変異体 (PQ) をそれぞれ、超遠心処理したJurkat細胞抽出液存在下 (S500 +)、非存在下 (S500 -) にATPと共に37℃で30分間加温した。各サンプル中のZAP70タンパク質の存在量をオートラジオグラフィーで検出した (上段)。その際のJurkat細胞抽出液 (total)、超遠心後の上清 (S500) ならびに沈殿 (P500) を、それぞれプロテアソームの構成要素であるC2に対する抗体でblotした (下段)。(C) (B) と同様に *in vitro* で合成したZAP70タンパク質を、Jurkat細胞抽出液 (total) ならびにATPの存在下・非存在下に37℃で60分間加温した。各サンプル中に残存するZAP70タンパク質の量をオートラジオグラフィーで検出した。

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 (図 1A)。さらに、細胞抽出液を超遠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 (図 1B)。これらの事実から、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。さらに興味深いことに、このタンパク質分解活性はATPを要求することが明らかになった (図 1C)。これらの結果から、変異ZAP70タンパク質の分解にかかわる酵素はATP依存性であるが、プロテアソーム以外のタンパク質分解酵素であると結論された。

さらに、M572L変異やP80Q変異を人為的に導入した組み換え型ZAP70の安定発現細胞を作製した。組み換え型ZAP70の発現ベクターをZAP70欠損細胞株であるP116細胞に遺伝子導入した後G418を用

いて遺伝子導入細胞の選択を行い、30℃においてZAP70タンパク質の発現が認められる細胞株を樹立した。P80Q変異体に関しては30℃において野生型ZAP70の遺伝子導入株とほぼ同じ程度の発現を認める細胞株 (PQ#4) の樹立に成功したが、M572L変異体に関しては高発現株を樹立できず、今回はPQ#4の解析のみを行った。PQ#4細胞株を30℃で24時間培養することで変異ZAP70タンパク質を安定に発現させた後37℃に温度をシフトさせたところ、蓄積した変異ZAP70タンパク質が4時間以内に分解されることが明らかとなった。その際プロテアソームを含む種々のプロテアーゼ阻害剤を加えたが、いずれの場合にも変異ZAP70タンパク質の分解は阻害されなかった (松田ら、未発表)。以上の結果は一過性遺伝子発現系における解析結果と一致しており、樹立された細胞株を用

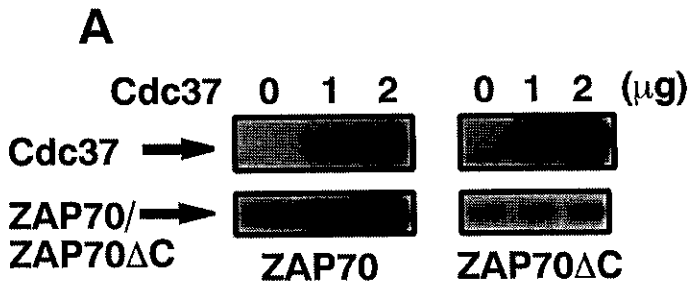


図2 ZAP70タンパク質の発現に対するCdc37の効果

(A) 野生型ZAP70もしくはキナーゼ領域を欠失させたZAP70 (ZAP70ΔC) の発現ベクターを、HA-Cdc37の発現ベクターとともにJurkat細胞に遺伝子導入した。細胞抽出液を、Myc-tagに対する抗体 (ZAP70/ZAP70ΔC)、ならびにHAに対する抗体 (Cdc37) でウエスタンブロットして、各タンパク質の発現量を検討した。

(B) (A) と同様に、Cdc37と変異ZAP70の発現ベクターをJurkat細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入後、24時間経過した段階で細胞の一部を30℃に移して、さらに24時間cultureを続けた。細胞抽出液を抗Myc抗体、抗HA抗体でウエスタンブロットしてZAP70タンパク質ならびにCdc37タンパク質の発現を検討した。

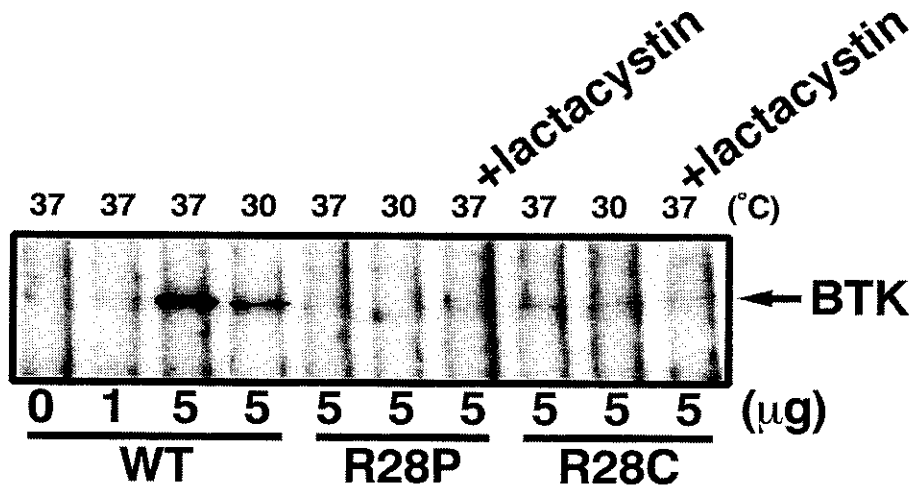


図3 変異Btkタンパク質の発現

Myc-tagを付加した野生型Btk (WT), R28P-Btk (R28P), R28C-Btk (R28C) の発現ベクターをそれぞれ表記された量Jurkat細胞に遺伝子導入し、24時間後に一部を30℃に移してさらに24時間培養を続けた。37℃で培養を続けたものの一部は30μMラクタシチン (+ lactacystin) の効果を合わせて検討した。細胞抽出液を調製後、抗Myc抗体によりBtkタンパク質の発現量を検討した。

いることで変異ZAP70タンパク質の分解機構の解析が進むものと期待される。

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とHSP90が知られる。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 (図 2A)。この際に、ZAP70のキナーゼドメインを除去するとCdc37の共発現による発現増強は見られなくなることから、Cdc37がZAP70のキナーゼドメインと相互作用することが考えられた。変異タンパク質を用いて同様な実験を行ったところ、キナーゼドメインの変異を持つM572L変異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 (図 2B)。興味深いことに、P80Q変異ZAP70の場合にはCdc37の共発現の効果はほとんど見られず、また試験管内での結合実験においても野生型やM572L変異ZAP70はCdc37と結合するのに対し、P80Q変異ZAP70がCdc37はほとんど結合できなかった。従って、P80Q変異ZAP70において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。

さらに、この一連の実験で明らかになった変異タンパク質の分解機構が一般的にいろいろな変異タンパク質に分解に当てはまるか否かを検討する目的で、Btkの変異タンパク質を用いた実験を行った。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Btk及び変異導入Btk (R28P-Btk, R28C-Btk) をそれぞれ組み込み、Jurkat細胞に一過性に発現させたところ、野生型Btkを遺伝子導入した細胞においてはBtkタンパク

質の高い発現が認められたのに対し、R28P-Btkを遺伝子導入した細胞においては、変異Btkタンパク質はほとんど検出されなかった。一方、R28C-Btk遺伝子導入細胞においては、程度は低いながらも明らかなタンパク質の発現が認められた (図 3)。これら変異タンパク質の発現レベルは30°Cで細胞を培養した場合にも回復することはなかった。さらに、プロテアソームの阻害剤であるラクタシスチンで細胞を処理した際にも、変異Btkタンパク質の発現の回復は見られず、我々の見出した変異ZAP70タンパク質と同様、プロテアソームとは異なる経路によって分解されていることが示唆された。以上の結果は、細胞内における変異タンパク質の分解が、プロテアソーム以外のタンパク質分解経路によって一律に担われている可能性をも示唆していると言う点で非常に興味深い。今後、変異ZAP70タンパク質の分解機構のさらなる解明を通して、細胞内における変異タンパク質の分解機構の普遍性についても検討を進めたい。

【文献】

- 1) 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
- 2) Matsuda, S., Suzuki-Fujimoto, T., Minowa, A., Ueno, H., Katamura, K., and Koyasu S. (1999) J. Biol. Chem. 274, 34515-34518
- 3) Hashimoto, S., Tsukada, S., Matsushita, M., Miyawaki, T., Niida, Y., Yachie, A., Kobayashi, S., Iwata, T., Hayakawa, H., Matsuoka, H., Tsuge, I., Yamadori, T., Kunikata, T., Arai, S., Yoshizaki, K., Taniguchi, N., and Kishimoto, T. (1996) Blood. 88, 561-573