

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

T細胞の活性化およびヘルパーT細胞サブセットの分化を特異的に制御する手法の樹立

所属 東京都医学研究機構・東京都臨床医学
総合研究所・免疫研究部門

研究者 宮武 昌一郎

分担研究者

- | | |
|--------------------------------------|------|
| (1) 東京大学・医科学研究所・染色体制御研究分野 | 新井賢一 |
| (2) 東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・細胞生物学研究部門 | 正井久雄 |
| (3) (株) 医学生物学研究所・研究開発部 | 玉井克之 |

要旨

サイトカイン産生の制御を通じて免疫応答において重要な役割を持つ、ふたつの転写因子 GATA3 と NFAT ファミリーをモデルとして、相互作用する分子の同定および相互作用を阻害するペプチドおよび低分子化合物の探索をおこなうシステムを樹立する。GATA3 については、そのドメイン構造と機能の関係を詳細に明らかにし、相互作用する分子を分離するための有用な情報を得た。NFAT ファミリーについては、活性化分子であるカルシニューリンとの相互作用を、短時間に定量的に測定できるアルファスクリーン技法で解析する実験系を樹立した。また NFAT4 の機能を解析する目的で、活性化型変異体を作成し、培養細胞系への導入とトランスジェニックマウス作成をおこなった。これらの実験系同定されたペプチドおよび低分子化合物を細胞あるいは個体へ投与する方法を開発し、サイトカイン産生の制御法の開発をめざす。

1. 研究目的

数多くの疾患の治療において、免疫応答を制御することが非常に重要になっている。感染症はもちろんのこと、癌の治療において、免疫系を活性化することが最近注目され、自己免疫疾患やアレルギー疾患に対しては、免疫応答を抑制することが治療につながる。移植医療においても、拒絶反応をおさえるために、免疫抑制剤が必須となる。さらに酵素補充療法や遺伝子治療においても、導入した遺伝子由来のタンパク質やウイルスベクターに対する免疫応答が大

きな問題であり、免疫応答の抑制方法とともに開発する必要がある。現在の免疫抑制剤は、細胞の活性化や増殖を非特異的に阻害するものが中心で、特異性に乏しく、副作用が重大な問題となる。免疫細胞に特異性が高く、副作用の少ない薬剤の開発が待ち望まれている。免疫応答は、異なる機能を持つ様々な細胞群がネットワークを形成し、その共同作業により司られる。免疫細胞のネットワークの形成には、多種類のサイトカインと呼ばれるホルモン様タンパク質群が重要な役割を担っている。特定のサイトカインの機能を抑制することにより、免疫応答を制御し、疾患の治療に結びつけることが可能である。シクロスポリンは、主にリンパ球に作用し、多くのサイトカインの産生を抑制することにより、移植臓器に対する拒絶反応や自己免疫疾患などの強力な免疫応答を抑制できる。また TNF に対する抗体や IL-4、IL-5 に対する抗体は、各々リウマチ性関節炎における関節の炎症や気管支喘息の治療に効果があることが明らかになっている。我々は、T 細胞における転写因子によるサイトカイン産生の分子機構を解明してきたが、その知見から、特定のサイトカインの産生を抑制、あるいは促進する手法を樹立できるのではないかと発想にいたった。転写因子 GATA3 は、ヘルパー T 細胞サブセットのひとつである Th2 免疫細胞の分化を誘導するマスターレギュレーターとして、染色体構造改変作用により機能していることが明らかとなった。その機能を抑制すれば、アレルギー性疾患を引き起こす原因のひとつと考えられる Th2 の増大を抑制できる可能性がある。また転写因子 NFAT ファミリーのいくつかの遺伝子は T 細胞で発現し、多種類のサイトカインの転写誘導に関与していると考えられているが、より詳細な解析から、各 NFAT ファミリー遺伝子には機能的特異性があり、標的とするサイトカイン遺伝子にも特異性があることが明らかになってきた。また NFAT ファミリー分子は、フォスファターゼ、カルシニューリンにより活性化されるが、各 NFAT ファミリー分子とカルシニューリンとの相互作用部位にも特異性があることが明らかとなった。このようなサイトカイン産生を制御する転写因子群に特異性が存在することを利用して、特定の種類のサイトカイン産生のみを制御し、様々な疾患において関与する免疫応答を、特異的に制御でき、しかも副作用の少ない薬剤の開発を最終的な目的とする。

2. 研究方法

T ヘルパーサブセット Th2 の分化のマスターレギュレーターである転写因子 GATA3 と、リンパ球でのサイトカイン産生制御を担う NFAT ファミリー分子を標的として研究をすすめる。これらの転写因子の機能を理解するためには、活性化の分子機構と作用を発揮するための分子機構の解析が必要であり、他の分子との特異的相互作用によりおこなわれる。そこで、相互作用する分子群の同定・解析、相互作用に必要なドメインの解析、相互作用の特異性の解析から、相互作用を特異的に抑制するペプチドを開発する。また分子間相互作用を簡便に、かつ短時間で測定する方法を樹立し、相互作用を阻害あるいは促進する低分子化合物のハイスループット

スクリーニングをおこなう。これらの阻害ペプチド、および低分子化合物を培養細胞系、および疾患モデル動物に種々の方法を用いて導入し、そのサイトカイン産生に対する作用、免疫応答に対する効果を評価する。

A、Th2 分化のマスターレギュレーターGATA3 についての研究計画

我々は、GATA3 が、Th2 サイトカイン遺伝子 IL-4、IL-13 および IL-5 が近接して存在する、Th2 サイトカインクラスター領域の染色体構造を、制御因子群が相互作用可能な構造に改変することにより、Th2 分化を誘導し、これらの Th2 サイトカイン遺伝子を発現させることを明らかにした。GATA3 がどのようにして、染色体構造を改変するのか、その分子機構を解明するために、GATA3 の様々な変異体を作成し、ヘルパーT 細胞サブセットの分化を解析できる、マウス CD4 陽性 T 細胞の初代培養系に導入し検討をおこなった。サイトカインの産生パターン、染色体構造改変の指標である、ヌクレアーゼ高感受性部位の解析、DNA 結合活性などを解析した。また相互作用する分子群を同定する目的で、GATA3 を含むタンパク質複合体の分離を試みた。

B、NFAT ファミリーについての研究計画

T 細胞では、NFAT ファミリー分子のうち、NFAT1、2、4 が発現している。遺伝子欠損マウスの解析などから、各 NFAT 分子がサイトカイン産生に関して、特異的作用を持っていることが明らかとなってきた。NFAT4 をモデルとして、カルシニューリンと相互作用する領域の詳細な解析から、相互作用する領域がふたつあることが示唆された。そこで、組織から精製したタンパク質や、培養細胞や大腸菌で発現させたりコンビナントタンパク質を用いて、in vitro での NFAT とカルシニューリンの結合を、免疫沈降とウェスタンブロットにより解析した。さらに 2 分子間の結合を、定量的に短時間に測定できる、アルファスクリーン技法を用いて測定する実験系の構築を試みた。各 NFAT 分子の生物活性を詳細に検討するために、NFAT4 をモデルとして用いて、活性化型の変異体を作成し、培養細胞系への導入、トランスジェニックマウス作成により、細胞レベル、および動物レベルでの機能、とくにサイトカインを含む遺伝子発現に対する作用を解析した。

3、研究成果

A、Th2 分化のマスターレギュレーターGATA3 についての研究計画

GATA3 は GATA ファミリーに属する転写因子であり、転写活性化ドメインとふたつの Zn フィンガーを持っている。Zn フィンガー領域は DNA と結合することが明らかとなっている。転写活性化ドメインの欠失では、標的配列への結合活性は影響を受けないが、染色体構造改変活性と Th2 分化誘導能は完全に消失した。ふたつある Zn フィンガーのうち、C 末に近いフィンガーの欠失では、標的配列への結合活性を完全に失い、染色体構造改変活性と Th2 分化誘導能は完全に消失した。N 末に近いフィンガーの部分欠失では、興味深いことに標的配列への結合活

性は消失したが、染色体構造改変活性と Th2 分化誘導能は保持された。これは、染色体構造改変活性と Th2 分化誘導能に、標的配列への結合活性があまり重要でないことを示唆する。さらに種々の標的配列を用いて、認識できる配列は存在しないのか検討している。また N 末に近いフィンガーの部分欠失変異体は、Th2 分化誘導能は保持し、IL-4 は強く誘導されたが、IL-5 はほとんど誘導されなかった。これは、マスターレギュレーターである GATA3 の部分的機能欠損により、影響を受けるサイトカイン遺伝子に特異性があることを示唆し、GATA3 のドメイン構造にサイトカイン遺伝子特異性があることを示す。また N 末に近いフィンガーは、GATA ファミリーと特異的に相互作用する核タンパク質 FOG と相互作用することが知られており、相互作用に必要なアミノ酸の詳細な解析がなされている。この解析に基づき、FOG との相互作用を消失させる変異を GATA3 に導入したが、標的配列への結合活性、染色体構造改変活性、Th2 分化誘導能はすべて野生型と同様であり、FOG との相互作用は重要でないことが明らかとなった。これらの解析から、転写活性化ドメインと C 末のフィンガーが、GATA3 の機能に重要と考え、特異的に相互作用する分子の同定を試みている。内在性 GATA3 の発現量は低く、過剰発現する T 細胞株の樹立が必要である。非 T 細胞において、GATA3 を過剰発現させた場合でも、2Mda 以上の巨大なタンパク質複合体を形成していることが明らかとなった。標的配列のアフィニティーカラムが複合体分離に有用であることが示された。

B、NFAT ファミリーについての研究計画

NFAT4 をモデルとして、N 末に存在するカルシウム制御領域に、ふたつのカルシニューリン結合ドメインが存在し、免疫沈降法とウェスタンブロットを用いて、カルシニューリンとこれらのカルシニューリン結合ドメインが特異的に結合することを確認した。そこで 2 分子間の結合を、定量的に短時間に測定できる、アルファスクリーン技法による測定系の樹立をおこなった。ビオチン化したカルシニューリンをストレプトアビジンを持つドナービーズに結合させ、カルシニューリン結合部位と GST との融合タンパク質を、グルタチオンを持つアクセプタービーズに結合させ、カルシニューリンと NFAT4 のカルシニューリン結合領域との結合をアルファスクリーン技法により測定することに成功した。測定感度は高く、アルファスクリーン技法の特徴である、定量性、簡便性、ハイスループットスクリーニングを備えた測定系が樹立されたことになる。ヒトおよびマウスの他の NFAT ファミリー分子のアルファスクリーン技法により測定が可能となった。少なくとも 2 カ所存在すると考えられる、各 NFAT 分子のカルシニューリン結合領域とカルシニューリンとの結合親和性の測定を開始した。また、結合領域のアミノ酸配列に基づいたペプチドを多数合成し、結合阻害活性の強度や特異性の測定も開始した。

遺伝子欠損マウスの解析から、NFAT ファミリー分子の特異的機能が明らかとなってきたが、機能重複もあり、不明な点も多い。そこで活性化型 NFAT4 を作成し、培養細胞に遺伝子導入し、またトランスジェニックマウスを作成し、細胞レベル、および個体レベルでの機能解析をおこ

なった。胸腺におけるダブルポジティブ細胞からシングルポジティブ細胞への分化で重要であること、またナイーブT細胞におけるIL-2の産生、IFN γ やTNF α といったTh1サイトカインの産生には正の制御因子として機能するが、Th2サイトカインの産生には負の制御因子として機能することが明らかとなった。そこで、NFAT4とカルシニューリンとの結合を阻害すると考えられるペプチドを細胞に導入し、活性化型により誘導された生物活性が、逆に減弱されるかどうか検討している。

4, 考察

本研究課題の第一年度の成果として、T細胞においてサイトカイン遺伝子の発現を制御するふたつの転写因子群、GATA3とNFATファミリーの詳細な解析により、これらの転写因子が、種々のサイトカイン遺伝子の発現を制御する時、強いサイトカイン特異性を持つことが明らかとなった。したがって、その活性を緻密に制御できれば、特定のサイトカイン、あるいは特定のサイトカインの組み合わせを、抑制、場合によっては増大することが可能な分子基盤が、明らかになってきた。Th2分化のマスターレギュレーターGATA3についての研究計画では、染色体構造改変に重要なドメインが同定され、GATA3の機能発現に必要な相互作用する分子の同定・分離のための基礎情報が得られた。またNFATファミリーについての研究計画においては、カルシニューリンと各NFATファミリー分子の結合活性の解析を、定量性、簡便性が高く、ハイスループットスクリーニングをおこなうのに最適である、アルファースクリーン技法でおこなえるようになった。その結果、各NFAT分子の各カルシニューリン結合領域とカルシニューリンとの結合の特異性を詳細に検討すること、さらに阻害活性を持つペプチドや低分子化合物のスクリーニングが可能となった。培養細胞への遺伝子導入やトランスジェニックマウス作成によるNFAT4分子の機能特異性を明らかにしたが、このような解析を他のNFAT分子でもおこない、特異的阻害ペプチドや低分子化合物が期待される効果を持つか検討するための基礎情報とする予定である。

5, まとめ

(1) Th2分化のマスターレギュレーターGATA3の各ドメインの機能が明らかとなった。この情報は、GATA3を含む複合体の分離、重要な相互作用する分子の同定、さらに阻害分子の探索に非常に重要である。

(2) NFATファミリーとカルシニューリンとの相互作用を、アルファースクリーン技法で測定可能となった。これにより、阻害活性のあるペプチドや低分子化合物のハイスループットスクリーニングが可能となった。

(3) NFAT4について、活性化型を作成し、培養細胞への導入やトランスジェニックマウス作

成により、サイトカイン発現における機能などを明らかにした。これにより阻害活性のあるペプチドや低分子化合物の作用を評価するための情報が得られた。

6. 研究発表

- 1) Amasaki, Y., Adachi, S., Ishida, Y., Iwata, M., Arai, N., Arai, K., and Miyatake, S.: Constitutively nuclear form of NFATx shows an efficient transactivation activity and induces differentiation of CD4⁺CD8⁺ T cells (submitted)

- 2) Kim, J.M., Nakao, K., Nakamura, K., Saito, I., Katsuki, M., Arai, K. and Masai, H. Inactivation of cdc7 kinase in mouse ES cells results in S phase arrest and p53-dependent cell death. EMBO J., in press.

- 3) Masai, H., and Arai, K. Cdc7 kinase complex: A key regulator for initiation of DNA replication." J. Cell. Physiol. 190: 287-296, 2002

- 4) Ishimi, Y., Komamura-Kohno, Y., Arai, K., and Masai, H. Biochemical activities associated with mouse Mcm2 protein. J. Biol. Chem. 276: 42744-42752, 2001.

- 5) Ogino, K., Takeda, T., Matsui, E., Iiyama, H., Taniyama, C., Arai, K., and Masai, H. Bipartite binding of a kinase activator activates Cdc7-related kinase essential for S phase. J. Biol. Chem. 276: 31376-31387, 2001.

- 6) Uchiyama, M., Arai, K. and Masai, H. sna41^{snai}, a novel mutation causing G1/S arrest in fission yeast, is defective in a CDC45 homolog and interacts genetically with pol α . Mol. Gene. Genet., 265: 1039-1049, 2001.

- 7) Uchiyama, M., Griffiths, D., Arai, K. and Masai, H. Essential role of Cdc45 in the loading of DNA polymerase α into MCM in fission yeast. J. Biol. Chem. 276: 26189-26196, 2001.

- 8) Takeda, T., Ogino, K., Tatebayashi, K. Ikeda, H., Arai, K. and Masai, H. Regulation of initiation of DNA replication and maintenance of mitotic chromosome structures during S phase by Hsk1 kinase in the fission yeast. Mol. Biol. Cell 12: 1257-1274, 2001.

- 9) Watanabe, S., Zeng, R., Aoki, Y., Itoh, T. and Arai, K. Initiation of polyoma virus origin dependent DNA replication through STAT5 activation by human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Blood*, 97: 1266-1273, 2001.
- 10) Liu, J., Arai, K., Arai, N. Inhibition of NFATx Activation by an Oligopeptide: Disrupting the Interaction of NFATx with Calcineurin. *J. Immunol*, 167: 2677-2687, 2001.
- 11) Liston, P., Fong, W.G., Kelly, N.K., Toji, S., Miyazaki, T., Conte, D., Tamai, K., Craig, C.G., McBurney, M.W. and Korneluk, R.G. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nature Cell Biology*. 3: 128-133, 2001.
- 12) 宮武昌一郎 : NFATz の機能、臨床免疫 (科学評論社) 35,184-190,2001
- 13) 宮武昌一郎 : Th1/Th2 分化に関与する転写因子 医学のあゆみ (医歯薬出版) 196:844-846,2001
- 14) 宮武昌一郎、竹本直史、鴨川由美子 : サイトカインの転写調節機構、臨床検査 (医学書院) 45: 19-28, 2001
- 15) 竹本 直史、宮武 昌一郎、Th2 特異的な遺伝子発現様式の形成と維持を司るクロマチン構造制御、アレルギー科 (科学評論社) 11: 478-483, 2001
- 16) 宮武昌一郎、竹本直史、鴨川由美子 : クロマチンリモデリングと Th1/Th2 分化、*Molecular Medicine 免疫* 2001 (中山書店) 38: 122-134, 2001

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社