

# T 細胞受容体シグナル伝達系における WASP 蛋白分解機構とその機能的意義

笹原洋二

東北大学大学院医学系研究科小児病態学

## 研究要旨

Wiskott-Aldrich 症候群の原因遺伝子である WASP 遺伝子産物は、WASP 結合蛋白質 WIP と複合体を形成して T 細胞受容体 (TCR) シグナル伝達系下流に位置し、T 細胞活性化とアクチン重合化を制御することは知られていたが、WASP 蛋白分解機構とその機能的意義は不明であった。また、WIP が WASP 蛋白質安定化に重要であることが我々によって報告されている。今回我々は、T 細胞受容体シグナル伝達系における WASP 蛋白分解機構とその機能的意義を明らかにする目的で、ヒト T 細胞、293T 細胞、WASP 欠損および Cbl-b 欠損マウスの脾臓 T 細胞を用いて解析を行った。その結果、WASP 蛋白は TCR 刺激後、経時的に Ca 依存性蛋白分解酵素であるカルパインによる断片化と、Cbl ファミリー (Cbl-b、c-Cbl) ユビキチンリガーゼと共沈してユビキチン化を受け、その後 26S プロテアソームによる分解を受けることが明らかとなった。また、野生型 T 細胞におけるカルパイン特異的阻害剤の添加と、Cbl-b 欠損マウス T 細胞においてアクチン重合化が有意に増加した。しかしながら、WASP 欠損マウス T 細胞においてはカルパイン阻害の効果は認めなかった。このことから、T 細胞における WASP 蛋白分解機構は、WASP が活性化された後に、カルパインによる断片化と Cbl ファミリーによるユビキチン化によって蛋白分解を受け、TCR シグナル伝達系においてアクチン重合化を機能的に負に制御していることが明らかとなった。

## A. 研究の目的

Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS) は、多様な免疫不全、難治性湿疹、血小板減少を 3 主徴とした X 染色体連鎖性原発性免疫不全症であり、Xp11.22-p11.23 に存在する WASP 遺伝子が原因遺伝子である。WASP 蛋白は T 細胞活性化やアクチン重合化に重要な役割を果たす。また、恒常的活性化変異によって自身を活性化構造へ変化させて、X 染色体連鎖性好中球減少症 (X-linked severe congenital neutropenia; XLN) や骨髓異形成症候群 (myelodysplastic syndrome; MDS) を起こす。一方、T 細胞において WIP 蛋白は WASP 蛋白の安定化を制御することや、Cbl ファミリー蛋白が T 細胞受容体 (TCR) と WASP-WIP 複合体の間の分子集団に存在し、TCR シグナル経路を負に制御することが知られていた。そこで我々は、T 細胞活性化シグナル下での WASP 蛋白分解機構の詳細を体系的に明らかにし、その機能的意義解明することを本研究の目的とした。

## B. 研究方法

主に T 細胞株、293T 細胞、WASP および Cbl ファミリーノックアウトマウス T 細胞を用いて、分子生物学的手法により、WASP 蛋白質分解機構を解析した。

## C. 研究結果

1) WASP は *in vitro* において、カルパインの基質となり、ユビキチン-プロテアソーム経路で分解された (図 1、2)。

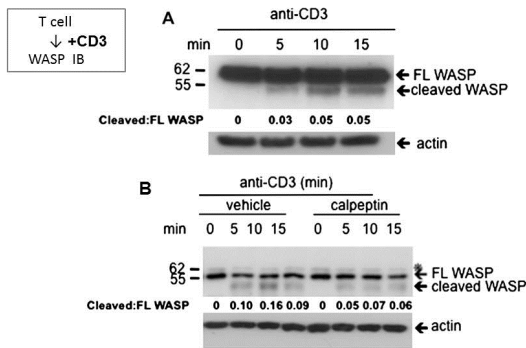


図1 TCRシグナル下で、WASP蛋白はカルパインの基質となる

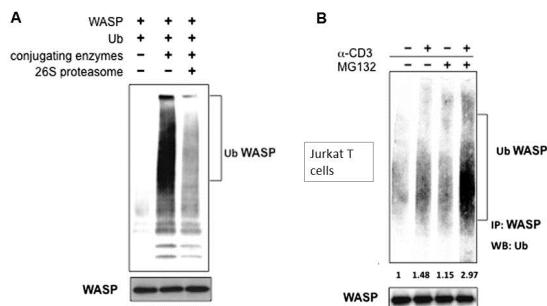


図2 In vitroおよびTCRシグナル下で、ユビキチン化を受けたWASPはプロテアゾームで分解される

- 同様に WASP は TCR シグナル伝達系においても、経時的にカルパインによって切断され、ユビキチン-プロテアゾーム経路で分解された (図 1, 2)。
- c-Cbl と Cbl-b は TCR シグナル伝達系を負に制御するユビキチン E3 リガーゼである。Cbl ファミリー蛋白質は TCR 刺激下にて WASP と複合体を形成し、E3 ユビキチンリガーゼとして働いた。同様の結果が、293T 細胞の一過性発現系においても示された (図 3)。

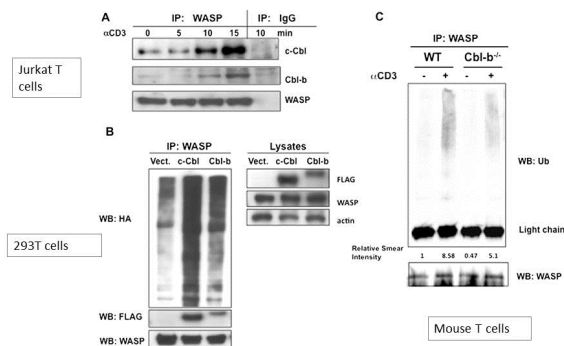


図3 Cblファミリー蛋白はWASPのE3ユビキチンリガーゼである

- WASP のチロシンリン酸化は、TCR シグナル下において WASP のユビキチン化に関わっていた。
- T 細胞においてカルパイン阻害剤はアクチン重合化の downregulation を負に制御したが、WASP ノックアウトマウスでは起こらなかった。また、c-Cbl ノックアウトマウス T 細胞ではアクチン重合化は増強した (図 4)。

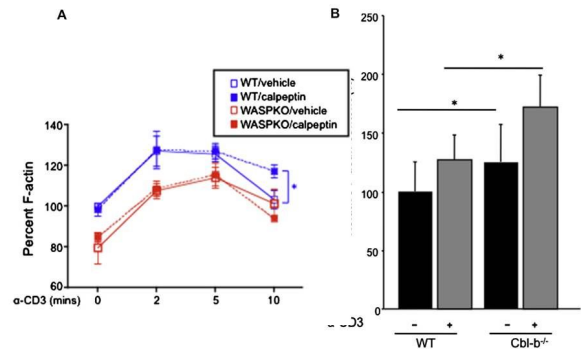


図4 WASP蛋白分解機構は、TCRシグナル伝達系においてアクチン重合化を機能的に負に制御する

#### D. 考察

TCR シグナル伝達系における WASP 活性化後に起こる WASP 蛋白分解には、カルパインと Cbl ファミリー蛋白によるユビキチン化が関与しており、これを明らかにした。また、この WASP 蛋白分解機構はアクチン重合化を機能的に負に制御している事も明らかとなった (図 5)。

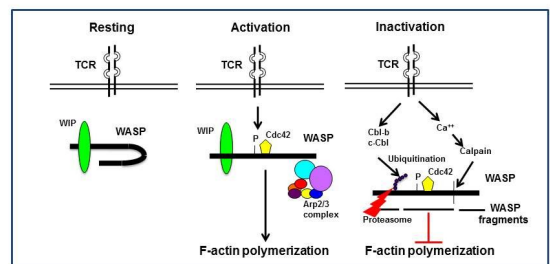


図5 Activation and Inactivation of WASP in TCR signaling

しかしながら、WASP 蛋白と Cbl ファミリー蛋白との結合が直接的か、他蛋白が介在しているかについては不明である。これは c-Cbl が多様な蛋白と関与しているためであり、更なる解明が必要である。また、X 連鎖性 WAS におけるミスセンス変異が WIP

結合領域に集中し WASP 蛋白質の不安定化が病態の根底にある点、および常染色体劣性 WAS としての WIP 欠損症でも WIP ノックアウトマウス同様、WASP 蛋白質の不安定化が報告されている。これらの分子病態の理解に、今回の WASP 蛋白分解機構は重要であると考えられた。

#### E. 結論

WASP 蛋白は TCR 刺激後、経時的に Ca 依存性蛋白分解酵素であるカルパインによる断片化と、Cbl ファミリーユビキチンリガーゼによってユビキチン化を受け、プロテアソームによる分解を受けることが明らかとなった。また、この WASP 蛋白分解機構は、TCR シグナル伝達系においてアクチン重合化を機能的に負に制御していることが明らかとなった。これらは X 連鎖性 WAS および常染色体劣性 WAS の分子病態を理解する上で重要である。

#### F. 研究危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Looi CY, Sasahara Y, Watanabe Y, Satoh M, Hakozaki I, Du W, Uchiyama T, Kumaki S, Kure S, Tsuchiya S. Open conformation of WASP regulates its nuclear localization and gene transcription in myeloid cells. *Int. Immunol.*, in press.
- 2) Horino S, Sasahara Y, Satoh M, Niizuma H, Kumaki S, Abukawa D, Satoh A, Imaizumi M, Kanegane H, Kamachi Y, Sasaki S, Terui K, Ito Y, Kobayashi I, Ariga T, Tsuchiya S, Kure S. Selective expansion of regulatory T cells in mixed chimera after allogeneic bone marrow transplantation in a patient with IPEX syndrome. *Pediatr. Transplant*, in press.
- 3) Watanabe Y, Sasahara Y, Ramesh N, Massaad MJ, Looi CY, Kumaki S, Kure S, Geha RS, Tsuchiya S. T cell receptor ligation causes Wiskott-Aldrich syndrome protein degradation and F-actin assembly

downregulation. *J Allergy Clin Immunol*, 132: 648-655, 2013.

- 4) Horino S, Uchiyama T, So T, Nagashima H, Sun S, Sato M, Asao A, Haji Y, Sasahara Y, Candotti F, Tsuchiya S, Kure S, Sugamura K, Ishii N. Gene therapy model of X-linked severe combined immunodeficiency using a modified foamy virus vector. *PLoS One*, 8(8): e71594, 2013.
- 5) Kumaki S, Sasahara Y, Kamachi Y, Muramatsu H, Morio T, Goi K, Sugita K, Urabe T, Takada H, Kojima S, Tsuchiya S, Hara T. B-cell function after unrelated umbilical cord blood transplantation using a minimal-intensity conditioning regimen in patients with X-SCID. *Int J Hematol*, 98:355-360, 2013.
- 6) 笹原洋二：知っておきたい最新の免疫不全症分類 診断から治療まで 免疫不全症を伴う特徴的な症候群-Wiskott-Aldrich 症候群、高 IgE 症候群- 小児科診療 76(3), 407-412, 2013.

##### 2. 学会発表

- 1) Sasahara Y, Watanabe Y, Looi CY, Ramesh N, Geha RS, Kure S. Functional roles of WIP in Wiskott-Aldrich syndrome. 24<sup>th</sup> Japanese Society of Hematology, International Symposium in Ehime, May 24-25<sup>th</sup>, 2013, Matsuyama, Ehime, Japan.
- 2) 大久保幸宗、笹原洋二、二瓶真人、木越隆晶、松木琢磨、渡辺祐子、堀野智史、入江正寛、力石健、菅野潤子、藤原幾磨、呉繁夫：ACTH 不応症、Fanconi 貧血様の症状と悪性リンパ腫を合併した原発性免疫不全症の一例 第 6 回日本免疫不全症研究会, 2013 年 1 月 26 日 東京.
- 3) 笹原洋二、大内芽里、鈴木信、鈴木資、片山紗乙莉、入江正寛、呉繁夫：WASP と IL-10 受容体遺伝子変異を同定した乳児期発症炎症性腸疾患 2 症例の臨床的検討 第 116 回日本小児科学会学術集会, 2013 年 4 月 19-21 日 広島
- 4) 笹原洋二：シンポジウム:小児免疫不全症の現状と展望 免疫不全症に対する造血幹細胞移植

第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013  
年 11 月 29-31 日 福岡

H.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

成果の普及、活用に関わる活動

仙台市民公開講座 難病医療相談会

原発性免疫不全症の診断と治療についての講演および  
質疑応答、個別相談

参加者：患者家族、一般市民約 20 名

2013 年 11 月 26 日

宮城県仙台市 泉区役所