

# TRAF5 と ZDHHC15 による T 細胞制御機構

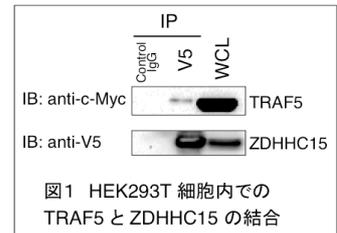
東北大学大学院医学系研究科免疫学分野

宗 孝紀

## 1. 目的

申請者らは、TRAF5 (TNF receptor-associated factor 5) がサイトカイン受容体シグナル伝達分子 gp130 に会合することで IL-6 受容体シグナルを阻害し、これにより Th17 細胞の分化を抑制するという T 細胞免疫制御の新たな分子機構を発見した (文献 1)。そして、TRAF5 に関する T 細胞シグナル機構に関する研究を継続する過程で、TRAF5 が未知のシグナル分子と会合し、新しい機序で T 細胞の機能制御に関わるという着想を得た。

申請者は、gp130 の細胞内領域に同定した TRAF5 との結合に関与する約 20 アミノ酸からなる配列 (<sup>776</sup>SRSESTQPLLDSEERPED<sup>793</sup>) がどのような機構でシグナル制御に関わるかを明らかにしたいと考え本研究を企図した。TRAF ファミリー分子の C 末端に位置する TRAF-C ドメインは、2~6 アミノ酸で構成される TRAF 結合モチーフに結合する。gp130 に存在する TRAF5 結合配列には 3 カ所の TRAF 結合モチーフ (上記下線部) が含まれる。gp130 細胞内のほぼ中央部に存在するこの配列が TRAF5 と結合することにより、どのように STAT3 のリン酸化反応に対し抑制的にはたらくかを明らかにしたいと考えた。具体的には、上記のように 1 次構造上のアミノ酸配列で単純に説明できるものなのか、それとも、この領域を含む gp130 の細胞内領域が特定の高次構造を形成することが TRAF5 との結合に重要なのである。もし、前者が正しければ、他のタンパク質中に存在する相同アミノ酸配列に TRAF5 が結合するはずである。ホモロジー検索の結果、<sup>299</sup>SMNESQNPLLANEEEPWED<sup>316</sup> という gp130 と高い相同性を示す配列を S-パルミトイルアシル転移酵素 ZDHHC15 の C 末端付近に見出した。免疫沈降実験により TRAF5 が ZDHHC15 と結合することがわかった (図 1)。しかし、ZDHHC15 のこの領域を欠失させた変異体および結合に重要と考えられるアミノ酸のアラニン変異体を用いた解析結果から、TRAF5 はこの約 20 アミノ酸の配列に結合しないことがわかった。したがって、後者の可能性が支持され、gp130 に同定したアミノ酸配列は未知の高次構造を形成することで TRAF5 と結合し、STAT3 の活性化に対し抑制的にはたらくことがわかった。



しかし、TRAF5 と ZDHHC15 との間の結合 (図 1) の意義が良くわからない。ZDHHC15 の別の領域を介してこれら分子間の結合が起こり、未知の機構により、TRAF5 によるシグナル制御が行われることが推察された。すなわち、TRAF5 が ZDHHC15 の基質となることで S-アシル化され、これにより TRAF5 に新たな生理機能が付与され、T 細胞の機能制御に関わる可能性である。本研究は、TRAF5 が脂質修飾を受け T 細胞の機能制御に関わるという仮説を検証することを目的とする。

## 2. 方法

HEK293T 細胞 (一過性発現) および T 細胞ハイブリドーマ細胞 (安定発現) 内にタグ (c-Myc あるいは FLAG) 付き TRAF5 を遺伝子導入により発現させ、それぞれの細胞に内在性に発現する S-パルミトイルアシル転移酵素群により TRAF5 が S-アシル化される可能性について ABE (acyl-biotin exchange) 法を用いて検証した。すなわち、細胞ライゼートに NEM (N-ethylmaleimide) を加え、タンパク質中に存在するシステイン残基のチオール基の反応性を不可逆的に阻害した後、ヒドロキシルアミン (NH<sub>2</sub>OH) を用いて S-アシル化されているチオール基を遊離させ、この新たに生成したチオール基に Biotin-PE-maleimide を導入した。TRAF5 に付加されたタグに対する抗体を用いて TRAF5 を免疫沈降した後、イムノブロットを行い、抗ビオチン抗体によりビオチン化タンパク質を検出することで TRAF5 における S-アシル化の有無を評価した。また、TRAF5 の欠失変異体を用いた ABE 法による解析により、TRAF5 のどの部位に脂質修飾が起こるかについて解析した。

マウスでは、ZDHHC15 を含む ZDHHC ファミリー酵素群が 24 種類存在する。脾臓 CD4<sup>+</sup> T 細胞に発現する 24 種類の ZDHHC の mRNA 絶対発現量に関して real-time RT-PCR により定量した。また、7 種類の ZDHHC 遺伝子をクローニングし、HEK293T 細胞にそれぞれの ZDHHC ファミリー分子と TRAF5 とを共発現させたときに TRAF5 における S-アシル化修飾がどう影響を受けるかについて ABE 法により測定した。

## 3. 結果

HEK293T 細胞および T 細胞ハイブリドーマ細胞に発現させた TRAF5 が、強く S-アシル化修飾を受けていることが明らかになった (図 2)。ヒドロキシルアミンを作用させない条件で同様の実験を行った場合、抗ビオチン抗体によるシグナルがほとんど検出されなかったことから、確かに、細胞内に発現する TRAF5 が S-アシル化され

ていることを確認できた (図 2)。

TRAF5は、N 末端から C 末端側へ RING (really interesting new gene)、ジンクフィンガー、Coiled-coil、TRAF-C ドメインから構成される。TRAF5 に関するこれらの様々なドメイン欠失変異体の S-アシル化修飾度に関して測定した結果、C 末端側の Coiled-coil や TRAF-C ドメインはほとんど S-アシル化されず、RING やジンクフィンガーに存在する複数のシステイン残基が多重に脂質修飾を受けることがわかった。

マウスで 24 種類の存在が確認されている ZDHHC 酵素群のうち、CD4<sup>+</sup> T細胞ではほとんど発現が確認されないもの (4 種類) から著しく発現量が高いもの (約 5 種類) まで、ファミリー分子のあいだで発現量に大きな差が認められた。

HEK293T 細胞内では、内在性の S-パルミトイルアシル転移酵素群により TRAF5 がある一定レベルで S-アシル化されるが、特定の ZDHHC (4 種類) と共発現させることでその S-アシル化修飾度の増強が認められた。すなわち、これらの ZDHHC が TRAF5 を S-アシル化する責任酵素であることが示唆された。

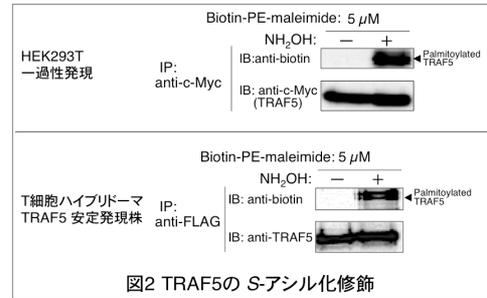


図2 TRAF5の S-アシル化修飾

#### 4. 考察

本研究から、TRAF5 が細胞内で S-アシル化修飾されることが初めて明らかになり、その修飾部位が N 末端側に同定できた。S-アシル化された TRAF5 が具体的にどのような T細胞の機能制御に関与するかについては、今後さらに研究を進める必要があるが、その可能性に関して以下に考察する。

TNF 受容体ファミリー分子は、リガンド刺激依存的に 3 量体化し、細胞内に TRAF ファミリー分子が結合する。TRAF-C ドメインが受容体に結合するが、TRAF5 に関しては、この部分は S-アシル化を受けない。S-アシル化を受ける RING やジンクフィンガードメインは、ユビキチンリガーゼ活性に関与する部位であり、TRAF5 の E3 リガーゼ活性がこの脂質修飾により変化する可能性がある。また T細胞では、Fyn、LAT、Lck などが S-アシル化されることで脂質ラフトへ集積し、T細胞のシグナル伝達に重要な役割をはたす。S-アシル化により TRAF5 の膜への親和性が増強し、これにより TRAF5 のシグナル伝達分子としての機能が変化する可能性も存在する。T細胞における CD27 や GITR による補助刺激シグナルが、TRAF5 の欠損により減弱することが報告されている (文献 2-4)。S-アシル化されない TRAF5 を *Traf5*<sup>-/-</sup> T細胞内に発現させ、TNF 受容体シグナルを評価することで S-アシル化修飾の意義を明らかにできると考えられ、今後検討したい。

gp130 への TRAF5 の結合は、TRAF5 の TRAF-C ドメインを介して起こる。この結合により、IL-6 シグナルと、これに依存した Th17 細胞の分化が抑制される。*Traf5*<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T細胞内に TRAF5 の full-length あるいは TRAF-C ドメインを遺伝子導入により戻し、Th17 細胞の分化に及ぼす影響を調べた結果、TRAF-C ドメインは full-length の TRAF5 と同等の抑制活性をもつことがわかった (文献 1)。この結果は、RING やジンクフィンガードメインが IL-6 受容体シグナルの抑制にはあまり大きく関与しないことを意味し、また同様に、TRAF5 の S-アシル化が IL-6 受容体シグナルの制御にそれほど重要でないことを示唆する。S-アシル化された TRAF5 と未修飾の TRAF5 がそれぞれどの程度の割合で存在し、それぞれの TRAF5 が TNF 受容体および IL-6 受容体それぞれのシグナル伝達に対してどう関与するかを明らかにする必要があると考える。

TRAF5 の発現は、リンパ組織、特にリンパ球に高く検出される (文献 1)。CD4<sup>+</sup> T細胞においては、ナイーブ細胞に高発現するが、抗 CD3 抗体で細胞を刺激することでその発現量が急速に低下する。重要なことに、他の TRAF ファミリー分子における発現パターンは、刺激後増加するか変化がないというものであり、TRAF5 とは全く異なっていた (文献 1, 未発表)。大腸癌細胞に発現する FAS は、ZDHHC7 と結合することで S-パルミトイル化され、これによりリソソームを介する分解が抑制される (文献 5)。S-パルミトイル化により、脂質ラフトにおけるユビキチン依存的分解が抑制される例も報告されている (文献 6)。これらの結果は、タンパク質の S-アシル化がタンパク質の安定性に関与することを意味する。S-アシル化型 TRAF5 が安定化か不安定かは現在不明であるが、T細胞の活性化に伴い S-アシル化酵素と脱 S-アシル化酵素のバランスが変化し、これにより TRAF5 の安定性がその S-アシル化修飾度により変化する可能性がある。責任酵素の同定も含めて、今後検討を進めたい。

今後是非検討すべき課題は、より生理的な条件下において TRAF5 における S-アシル化の意義を明確にすることである。CD4<sup>+</sup> T細胞の活性化、分化、生存に S-アシル化 TRAF5 がどのように関与するかについて明らかにしていきたい。

#### 5. 参考文献

1. Nagashima H, Okuyama Y, Asao A, Kawabe T, Yamaki S, Nakano H, Croft M, Ishii N, So T. The adaptor TRAF5 limits the differentiation of inflammatory CD4<sup>+</sup> T cells by antagonizing signaling via the receptor for IL-6. *Nat Immunol* 2014;15:449-456.
2. Nakano H, Sakon S, Koseki H, Takemori T, Tada K, Matsumoto M, Munechika E, Sakai T, Shirasawa T, Akiba H, Kobata T, Santee SM, Ware CF, Rennert PD, Taniguchi M, Yagita H, Okumura K. Targeted disruption of *Traf5* gene causes defects in CD40- and CD27-mediated lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9803-9808.
3. Esparza EM, Lindsten T, Stockhausen JM, Arch RH. Tumor necrosis factor receptor (TNFR)- associated factor 5 is a critical intermediate of costimulatory signaling pathways triggered by glucocorticoid-induced TNFR

in T cells. *J Biol Chem* 2006;281:8559–8564.

4. Kraus ZJ, Haring JS, Bishop GA. TNF receptor-associated factor 5 is required for optimal T cell expansion and survival in response to infection. *J Immunol* 2008;181:7800–7809.

5. Rossin A, Durivault J, Chakhtoura-Feghali T, Lounnas N, Gagnoux-Palacios L, Hueber AO. Fas palmitoylation by the palmitoyl acyltransferase DHHC7 regulates Fas stability. *Cell Death Differ* 2015;22:643–653.

6. Abrami L, Leppla SH, van der Goot FG. Receptor palmitoylation and ubiquitination regulate anthrax toxin endocytosis. *J Cell Biol* 2006;172:309–320.