

博士（医学） 小野 晓

学位論文題名

Rapid turnover of the CD3 ζ chain independent of the TCR-CD3 complex in normal T cells.

（正常T細胞における TCR-CD3 複合体から独立した CD3 ζ 鎖の早い代謝回転）

学位論文内容の要旨

T細胞レセプター複合体(TCR)はクローン特異的なTCR $\alpha\beta$ 、インパリアントなCD3 $\gamma\delta\epsilon$ 、および ζ 鎖ファミリーダイマーの6～7種類のタンパク質からなるオクタマーであり、T細胞の抗原認識、活性化における重要な分子群である。TCRは未熟な胸腺細胞では細胞表面の発現レベルが低いが、分化に伴って成熟T細胞になると高発現になり機能的なTCR複合体になることが知られており、そのメカニズムもタンパク質レベルでの会合、分解による調節であることが示唆されている。それゆえTCR/CD3複合体はT細胞の機能面からのみならず、多分子よりなるレセプター複合体の細胞内代謝、各サブユニットの会合と分解および細胞表面の発現機構のモデルシステムとしても精力的に解析されてきた分子群である。従来、主としてNIHのグループによって行われたT細胞ハイブリドーマ2B4を使った生合成標識（主にパルスチーズラベル）の実験で、TCRの細胞内代謝については、他のコンポーネントに比してCD3 ζ 鎖は半減期が長く安定であること、複合体形成に利用されなかった ζ 鎖以外の分子は、85～90%が4時間以内に分解されることが示されていた。つまり、CD3 ζ 鎖は他の構成分子のおよそ10分の1量しか產生されず、そのほとんど全てが複合体形成に使用されていると考えられてきた。また、細胞表面にTCRが発現するために ζ 鎖が重要であることも、同様の生合成標識による実験及び ζ 鎖ノックアウトマウスの解析より明らかになってきた。しかし、このようにタンパク產生より細胞表面への表出にいたるまでの解析は精力的に行われてきたが、今まで細胞表面に表出した後のTCR分子の挙動を解析した例はない。また、従来の実験では2B4が主に使用され、正常T細胞について解析した例は存在しない。今回我々は、BALB/cマウスの脾T細胞を使用し、細胞表面をビオチンラベルした後、一定時間培養してチーズすることによって、TCRの表面発現後の挙動を解析した。この解析のなかで見出した、正常T細胞におけるCD3 ζ 鎖の興味ある性質について報告する。

成熟正常T細胞でのTCRの細胞表面発現後の挙動を解析するために、我々は、BALB/cマウスの脾臓よりT細胞をナイロンウールカラムを用いて分離し、細胞表面タンパク質をビオチン化した後、通常の培養液で0、2、4時間培養した。培養後の細胞を1%ジギトニン溶液で可溶化後、抗CD3 ζ 、抗CD3 ϵ 、抗TCR β の各抗体で免疫沈降し、SDS-PAGEで解析した。結果は驚くべきことにTCR-CD3の他のコンポーネントは変化しないにもかかわらず、ビオ

チ化した ζ 鎖のみが2～4時間の培養でほとんど消失していた。このことは、 ζ 鎖が細胞表面で複合体の他の構成分子から解離し、分解されたことを示唆している。この現象は細胞のヨウ素標識によっても確認されるので、ビオチン化によるアーチファクトではない。また、従来の細胞内代謝の実験に使用された2B4ではこの現象は起こらず、細胞表面での代謝は2B4と正常T細胞では異なっていることが示唆された。さらにこの結果で注目されるのは抗CD3 ζ 鎖抗体による免疫沈降で ζ 鎖は検出されないにもかかわらず、ビオチン化されたTCR $\alpha\beta$ 、CD3 $\gamma\delta\epsilon$ は時間による変化なく認められたことである。このことは細胞表面のTCRから解離した ζ 鎖の代わりに、新たな ζ 鎖が入れ替わっている可能性を示している。通常、 ζ 鎖がなくなれば細胞表面TCRレベルが減少することが示されてきたが、ビオチン化した細胞を培養する前後で細胞表面のCD3レベルが変化しないことがFACSによって示された。次に、4時間培養してビオチン化 ζ 鎖が検出されなくなった細胞を再度ビオチン化すると、入れ替わった ζ 鎖がビオチン化されることから細胞表面に存在することが確認された。さらに、この再ビオチン化された ζ 鎖も4時間後には消失した。また、培養前後で細胞内の ζ 鎖の総量は変化しないことが抗 ζ 鎖抗体でのイムノプロット解析で示され、 ζ 鎖の消失は細胞表面だけの出来事であることが判明した。すなわち、CD3 ζ 鎖は細胞表面に発現後、非常に早いサイクルで他のTCR複合体とは独立した運命をたどることが示されたのである。次に我々は、消失した ζ 鎖の運命について検討を加えた。同様の実験をリソソーム酵素の阻害剤であるNH₄Clの存在下で培養すると、 ζ 鎖の消失は認められなくなった。また、培養を37度ではなく、0度で行うと ζ 鎖は消失しない。これらのことから、細胞表面 ζ 鎖はインターナライズした後リソソームで分解されることが強く示唆された。このように、CD3 ζ 鎖が他の複合体分子とは挙動を異にしていることが示されたため、我々は、產生されたCD3 ζ 鎖の全てがTCR-CD3複合体の一部としてのみ細胞表面に運ばれていると考えられていた従来の常識を疑ってみることにした。このため、我々はTCR α がDNAレベルで欠損し、細胞表面にTCR-CD3複合体が発現していないことが確認されている、ヒトJurkat細胞株(J.RT-T3.1)について細胞表面の ζ 鎖を解析した。この細胞株の細胞表面をビオチン化し、抗CD3 ζ 鎖抗体で免疫沈降したところ、細胞表面に ζ 鎖のみが発現していることが判明した。さらに、この単独発現している ζ 鎖は親株におけるTCR複合体中の ζ 鎖と同じように4時間の培養で消失することも証明された。このことで、 ζ 鎖の消失には他のコンポーネントの関与はなく、 ζ 鎖分子独自の性質であることが示された。

CD3 ζ 鎖は細胞内にITAMモチーフを持ち、細胞内情報伝達に重要な分子として注目されている。一方でCD3 ζ 鎖ノックアウトマウスの解析から、 ζ 鎖が細胞表面TCR複合体のレベルの決定に関与していることが示された。今回の我々の ζ 鎖の代謝回転に関する興味ある結果から、未熟T細胞と成熟T細胞でTCRレベルの差を生じる原因など、TCRレベルの調節に関して新たな展望が開かれることが期待される。

学位論文審査の要旨

主査教授 小林邦彦
副査教授 西信三
副査教授 上出利光

学位論文題名

Rapid turnover of the CD3 ζ chain independent of the TCR-CD3 complex in normal T cells.

(正常T細胞における TCR-CD3複合体から独立した CD3 ζ 鎖の早い代謝回転)

T細胞レセプター複合体(TCR)はクローン特異的なTCR $\alpha\beta$ 、インパリアントなCD3 $\gamma\delta\epsilon$ 、および ζ 鎖ファミリーダイマーの6~7種類のタンパク質からなるオクタマーであり、T細胞の抗原認識、活性化における重要な分子群である。TCRは未熟な胸腺細胞では細胞表面の発現レベルが低いが、分化に伴って成熟T細胞になると高発現になり機能的なTCR複合体になることが知られており、そのメカニズムもタンパク質レベルでの会合、分解による調節であることが示唆されている。それゆえTCR/CD3複合体はT細胞の機能面からのみならず、多分子よりなるレセプター複合体の細胞内代謝、各サブユニットの会合と分解および細胞表面の発現機構のモデルシステムとしても精力的に解析されてきた分子群である。従来、主としてNIHのグループによって行われたT細胞ハイブリドーマ2B4を使った生合成標識（主にパルスチェースラベル）の実験で、TCRの細胞内代謝については、他のコンポーネントに比してCD3 ζ 鎖は半減期が長く安定であること、複合体形成に利用されなかつた ζ 鎖以外の分子は、85~90%が4時間以内に分解されることが示されていた。つまり、CD3 ζ 鎖は他の構成分子のおよそ10分の1量しか產生されず、そのほとんど全てが複合体形成に使用されていると考えられてきた。また、細胞表面にTCRが発現するためには ζ 鎖が重要であることも、同様の生合成標識による実験及び ζ 鎖ノックアウトマウスの解析より明らかになってきた。しかし、このようにタンパク質产生から細胞表面への表出にいたるまでの解析は精力的に行われてきたが、細胞表面に表出した後のTCR分子の挙動を解析した例はない。また、従来の実験では2B4が主に使用され、正常T細胞について解析した例は存在しない。本研究は、BALB/cマウスの脾T細胞TCRの表面発現後の挙動を解析し、正常T細胞におけるCD3 ζ 鎖の挙動は2B4等のT細胞ハイブリドーマで得られた知見と異なることを見出したものである。

BALB/cマウスの脾臓よりT細胞をナイロンウールカラムを用いて分離し、細胞表面タンパク質をビオチン化した後、通常の培養液で0、2、4時間培養した。培養後の細胞

を1%ジギトニン溶液で可溶化後、抗CD3 ζ 、抗CD3 ϵ 、抗TCR β の各抗体で免疫沈降し、SDS-PAGEで解析した。その結果、TCR-CD3の他のコンポーネントは変化しないにもかかわらず、ビオチン化した ζ 鎖のみが2~4時間の培養でほとんど消失していた。このことは、 ζ 鎖が細胞表面で複合体の他の構成分子から解離し、分解されたことを示唆する。この現象は細胞のヨウ素標識によっても確認されたので、ビオチン化によるアーチファクトではない。また、従来の細胞内代謝の実験に使用された2B4ではこの現象は起こらず、細胞表面での代謝は2B4と正常T細胞では異なっていることが示唆された。さらに注目されるのは抗CD3 ζ 鎖抗体による免疫沈降で、 ζ 鎖は検出されないにもかかわらずビオチン化されたTCR $\alpha\beta$ 、CD3 $\gamma\delta\epsilon$ が認められたことである。このことは細胞表面には ζ 鎖を持ったTCR-CD3があることを示すが、ビオチン化していない新たな ζ 鎖である可能性が高い。通常、 ζ 鎖がなくなれば細胞表面TCRレベルが減少することが示されてきたが、ビオチン化した細胞を培養する前後で細胞表面のCD3レベルが変化しないことがFACSによって示された。次に、培養後ビオチン化 ζ 鎖が検出されなくなった細胞を再度ビオチン化すると、新たなビオチン化された ζ 鎖が細胞表面に確認された。さらに、この再ビオチン化された ζ 鎖も培養後には消失した。また、培養前後で細胞内の ζ 鎖の総量は変化しないことが抗 ζ 鎖抗体でのイムノプロットで示され、 ζ 鎖の消失は細胞表面だけの出来事であることが判明した。すなわち、CD3 ζ 鎖は細胞表面に発現後、非常に早いサイクルで他のTCR複合体とは独立した代謝をすることが示された。次に、消失する ζ 鎖の消失機構について検討を加えた。リソソーム酵素の阻害剤であるNH₄Clの存在下で培養すると、 ζ 鎖の消失は認められなくなり、また、培養を37度ではなく、0度で行うと ζ 鎖は消失しないことから、細胞表面 ζ 鎖は細胞内に取り込まれた後リソソームで分解されることが強く示唆された。このように、CD3 ζ 鎖が他の複合体分子と挙動を異にしていることが示されたため、次にTCR α が欠損し、TCR-CD3複合体が発現していないヒトJurkat細胞株(J.RT-T3.1)について細胞表面の ζ 鎖を解析した。この細胞株の細胞表面をビオチン化し、抗CD3 ζ 鎖抗体で免疫沈降したところ、細胞表面には ζ 鎖のみが発現していることが判明した。さらに、この単独発現している ζ 鎖は4時間の培養で同様に消失することも証明された。このことは、 ζ 鎖の代謝は他のコンポーネントとの全く別個に行われることを示す。

公開発表に際し、副査の上出教授からリソソーム酵素阻害で ζ 鎖の細胞膜上での変換が起こらないことと ζ 鎖産生との関係、胸腺細胞での ζ 鎖代謝、 ζ 鎖ノックアウトマウスの実験と ζ 鎖の役割について、副査の西教授から細胞膜のラベリングの問題点について、SDS電気泳動上に観察される不明なバンドについて、metabolic labeling法でのデータについて、T細胞クローンでの動態、主査の小林教授から ζ 鎖に結合するZAP70と ζ 鎖の変換の関係、シグナル伝達における影響、等の質問があったが、申請者はほぼ妥当な回答をした。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるに充分な資格を有するものと判定した。