

自己免疫疾患の分子病態解明に向けた  
新規 TNFR2 アダプター分子アミノペプチダーゼ P3 の機能解析

2013 年

井上 雅己



# 目次

略語一覧	3
緒論	5
本論	9
第一章 TNFR2 シグナル関連タンパク質の探索	9
第一節 TNFR2 シグナル複合体の精製	10
第二節 TNFR2 シグナル関連タンパク質の同定	21
第三節 小括	26
第二章 アミノペプチダーゼ P3 の機能解析	27
第一節 TNFR2 シグナル複合体への APP3 の結合	29
第二節 APP3 の細胞内局在の変化	36
第三節 APP3 の細胞内シグナル伝達への影響	43
第四節 APP3 の潰瘍性大腸炎への関与	47
第五節 小括	53
総括	55
結論	57
謝辞	59
参考文献	60



## 略語一覽

Abz	: Orthoaminobenzoic acid
ACE	: Angiotensin converting enzyme
APP	: Aminopeptidase P
APP3m	: Mitochondrial APP3
APP3c	: Cytosolic APP3
AP-1	: Activator protein 1
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2
BH3	: Bcl-2 homology 3
CHAPS	: 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate
cDNA	: Complementary DNA
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride
D-MEM	: Dulbecco's modified eagle medium
DSS	: Dextran sulfate sodium salt
ERK	: Extracellular signal-regulated kinase
E-MEM	: Eagle's minimal essential medium
FADD	: FAS-associated death domain protein
FBS	: Fetal bovine serum
GM-CSF	: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GPI	: Glycosylphosphatidylinositol
HA	: Hemagglutinin
HE	: Hematoxylin and eosin
HEK293T	: Human embryonic kidney 293T
HPLC	: High performance liquid chromatography
HRP	: Horseradish peroxidase
IB	: Immunoblot
IL-1	: Interleukin 1
IL-6	: Interleukin 6
IP	: Immunoprecipitation
JAK	: Janus kinase
JNK	: c-Jun N-terminal kinase
MAPK	: Mitogen-activated protein kinase
MTS	: Mitochondrial targeting sequence
NaF	: Sodium fluoride
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	: Sodium pyrophosphate
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	: Sodium orthovanadate

ORF	: Open reading frame
PA	: Preadipocyte
PBS	: Phosphate buffered saline
PCR	: Polymerase chain reaction
PE	: R-phycoerythrin
PFA	: Paraformaldehyde
PI3K	: Phosphatidylinositol-3 kinase
pNA	: Para-nitroaniline
PVDF	: Polyvinylidene fluoride
RIP	: Receptor-interacting protein
PRMI-1640	: Roswell park memorial institute 1640 medium
RU	: Resonance unit
SAPK	: Stress-activated protein kinase
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
shRNA	: Small hairpin RNA
SPR	: Surface plasmon resonance
STAT	: Signal transducer and activator of transcription
TBS	Tris buffered saline
TCEP	: Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TFA	: Trifluoroacetic acid
TNF	: Tumor necrosis factor- $\alpha$
TNFR1	: TNF receptor type I
TNFR2	: TNF receptor type II
TRADD	: TNFR1-associated death domain protein
TRAF2	: TNF receptor-associated factor 2
Tris	: Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UC	: Ulcerative colitis
wtTNF	: wild-type TNF

## 緒論

我々の生体を構成する細胞は、外部から情報を受けとり、その情報をもとに自らの状態を変化させることで、刻一刻と変化する環境中における個体全体の生命活動を制御している。このような細胞外部からの情報を内部に取り込む伝達手段のひとつとして、サイトカインや増殖因子、ホルモンなどの生理活性物質に対する応答システムが存在する。このシステムは、内分泌・神経系などの臓器レベルでの機能制御だけでなく、個体外部からの刺激によっても制御されており、生理活性物質の種類や細胞応答機構は極めて多岐に渡る。このような、分子レベルにおいて細胞外からの情報を受容し細胞内へと伝える機構は、シグナル伝達と呼ばれ、多くの場合、細胞膜上のレセプターを介して行われる。生理活性物質（リガンド）が、レセプターに結合することで、細胞内に刺激が伝わり、一連の連鎖反応（シグナルカスケード）が引き起こされる結果、細胞の増殖・分化や細胞死、サイトカイン産生などの生物反応が生じる。

細胞内へのシグナルは、Gタンパク質共役レセプター、チロシンキナーゼ活性型レセプター、転写因子活性化レセプターなど、様々なタイプのレセプターを介して伝達される<sup>1-3</sup>。また、空間的・時間的に厳密な制御を受けながら、横断的な制御機構（クロストーク）でバランスを保ちつつ、生理機能を制御している。さらに、これら細胞膜上のレセプターから細胞内へシグナルを伝達・受容するタンパク質の種類や機能は多種多様であり、それらの発現異常や機能不全が起こることで、シグナル全体に影響が生じ、その結果として様々な疾患を発症させることが知られている。そのため、細胞のシグナル伝達機構を分子レベルで解析し、疾患の分子病態とシグナル伝達機構との連関を解明、さらにこのシグナルを標的とした分子を創製することは、日々進化する医療の中で、次世代の創薬について考えるうえで最重要事項であると考えられる。

このような背景のもと、近年、シグナル伝達を標的とした様々な低分子化合物が、がんや自己免疫疾患等の難治性疾患の画期的な治療薬として台頭してきた。例えば、がん細胞内で過剰に起こるタンパク質のリン酸化を是正する目的で、イマチニブやエルロチニブなどの各種キナーゼ阻害剤が開発され、血液がん・固形がんに対して目覚ましい

臨床成績をあげている<sup>4,5</sup>。また、炎症性サイトカインによって活性化される JAK-STAT シグナルを抑制することが、自己免疫疾患の一つである関節リウマチに対して治療効果をもつことが明らかになり、最近になって、JAK シグナル阻害剤（トファシチニブ）が経口関節リウマチ治療薬として承認されている<sup>6,7</sup>。このように、疾患の発症に関連するシグナル伝達を解析し、そのシグナルを制御する医薬品は、自己免疫疾患をはじめとする難治性疾患の治療に今後大きく貢献するものと期待されている。

現在、自己免疫疾患の発症や悪化に関連していることが明らかになっており、創薬ターゲットの一つとして研究が進んでいるものに、炎症性サイトカインの一種である腫瘍壊死因子（Tumor necrosis factor : TNF）がある。TNF は、生体の免疫機能の調節に重要な役割をもつタンパク質であり、関節リウマチや炎症性腸疾患（クローン病・潰瘍性大腸炎）、多発性硬化症などの自己免疫疾患の病態に深く関わっている<sup>8,9</sup>。ホモ三量体として存在・機能する TNF は、同じく三量体である 2 つのレセプター、TNF receptor type I（TNFR1）及び TNF receptor type II（TNFR2）を介して細胞内へシグナルを伝える<sup>10</sup>。これまでの研究で、両者は異なる生理作用を示すことがわかっており、TNFR1 シグナルがアポトーシス誘導や炎症の惹起に、TNFR2 シグナルが細胞の生存や増殖に関わるとされている<sup>11,12</sup>。また、これらの役割は、レセプターの発現（局在）状態によっても制御されており、TNFR1 が様々な細胞に広く発現する一方、TNFR2 の発現は限局的である<sup>12</sup>。とりわけ TNFR2 は、T 細胞など免疫細胞の一部のポピュレーションや神経細胞、血管内皮細胞などにおいてのみ確認されており<sup>13-16</sup>、各種の細胞刺激によって発現が誘導されることも知られている<sup>17</sup>。

これまで、自己免疫疾患の病態と TNF シグナルとの関連解明を目的に、レセプターノックアウトマウスを用いた数多くの研究が行われ、病態の発症・悪化だけでなく、その改善や治癒に両レセプターのシグナルが関与することが報告されてきた。特に TNFR2 に関しては、疾患モデルマウスにおいて、TNFR2 欠損が、関節破壊や大腸の炎症、脱髄など病態を悪化させることから<sup>18,19</sup>、TNFR2 シグナルが生体にとって病態抑制の役割を担うことが明らかになっている<sup>17</sup>。さらに、TNFR2 シグナルは、心筋保護作用<sup>20,21</sup> や神経保護作用<sup>22,23</sup>、過剰な免疫応答を抑制する役割を持つ制御性 T 細胞



(Treg) の活性化<sup>24-27</sup> などにも関わることが明らかとなり、TNFR2 からのシグナルを制御することで、様々な疾患の治療につながることを期待されている。しかしながら、これらの事実は、実験動物モデルや臨床結果から類推された現象であり、TNFR2 のシグナル伝達の詳細から明らかになったことではない。また現在、TNF が関連する自己免疫疾患の治療を目的として、TNF 阻害薬である TNF 中和抗体（インフリキシマブ・アダリムマブ・ゴリムマブ）や可溶性 TNF レセプター（エタネルセプト）が使用され、優れた治療効果を発揮しているものの、これらの TNF 阻害薬は、TNF シグナルをすべて阻害することが原因と考えられる免疫力低下や感染症などの有害事象を惹起してしまうという面も持ち合わせている<sup>28</sup>。このような観点のもと、TNFR2 のもつ免疫活性化シグナルや生体保護シグナルの効果を期待して、自己免疫疾患における TNFR2 シグナルの制御による新たな治療薬の確立が期待されている<sup>17</sup>。

しかしながら、このように、TNF 関連疾患の分子病態の解明や新たな治療薬の開発に向けて、TNFR2 シグナル伝達機構の解明が期待されている一方、現状、その研究は TNFR1 と比較して大きく遅れており、TNFR1 と共通のシグナル伝達分子である TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) がシグナル伝達に関わることなどの報告があるものの<sup>12,29</sup>、不明な点が多く存在する。TNFR2 シグナルの解析が遅れている原因として、① TNF が TNFR1/R2 の両方に結合すること、② 多くの細胞では TNFR2 の発現量が低く、TNFR1 シグナルが優位であること、③ 抗 TNFR2 アゴニスト抗体を用いた解析では、シグナル様式が異なる可能性があることなど<sup>30,31</sup>、TNFR2 を選択的かつ十分に活性化できる実験系の確立が困難であった点が挙げられる。その点、著者らは、ファージ表面提示法を駆使した独自の技術を応用し、サイトカインに新しい機能を付与する研究を進めてきており、レセプター特異的に結合し、アゴニスト活性またはアンタゴニスト活性を発揮するサイトカイン変異体の作製に成功している<sup>32-37</sup>。その研究過程で著者は、TNFR2 を選択的に活性化できる TNF 変異体を用いれば、TNFR2 シグナル伝達機構を解析できるのではないかと考えた。

以上の背景のもと、本研究では、TNFR2 シグナル伝達機構の解明を目的に、独自に作製した TNFR2 指向性 TNF 変異体を利用し、TNFR2 に結合するアダプター分子の

探索を試みた。その結果、TNFR2 との関連が知られていない新規な分子の同定に成功し、さらに、この分子と TNFR2 シグナルとの関連性についての解析から、新たな TNFR2 シグナル伝達制御機構に関する興味深い知見を得たので、本博士論文としてまとめた次第である。

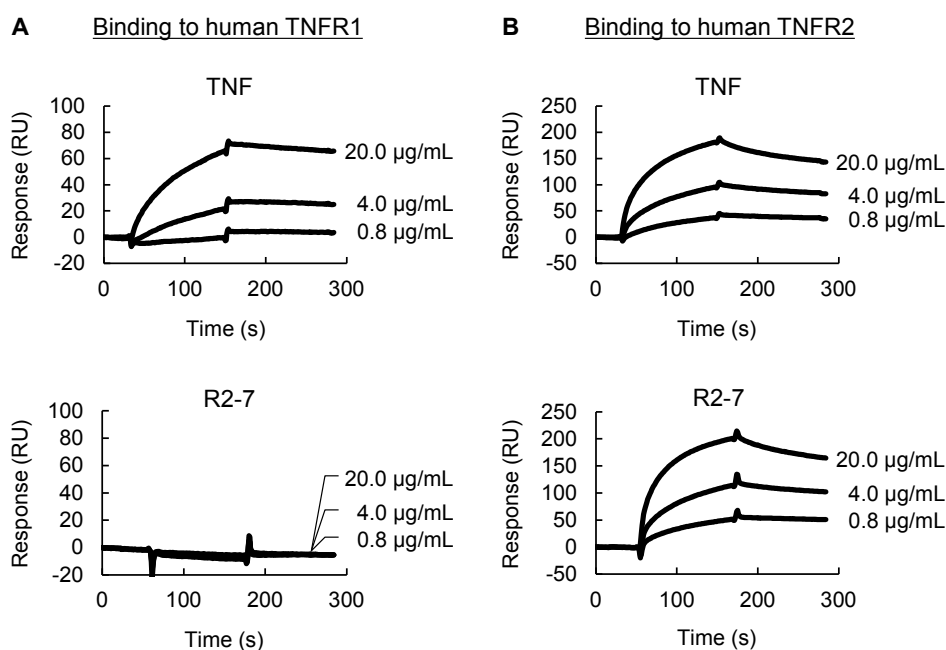
# 本論

## 第一章 TNFR2 シグナル関連タンパク質の探索

本研究では、TNFR2 を介した細胞内シグナルを効率よく解析するために、TNFR2 指向性 TNF 変異体を用いた。この変異体は、ファージ表面提示法を駆使し著者らが独自に作製したアミノ酸改変 TNF である<sup>32</sup>。ファージ表面提示法とは、組み換えタンパク質をファージコートタンパク質との融合体として発現させることで、繊維状バクテリオファージ M13 の表面に提示できる方法である。例えば、遺伝子ライブラリー産物を発現させれば、膨大なタンパク質ライブラリーを得ることができるため、ライブラリーの中から目的タンパク質を迅速に単離・同定するための基盤技術として活用されている。

この技術を駆使し、TNF のレセプター結合領域に位置する 6 カ所のアミノ酸残基 “Leu29, Arg31, Arg32, Ala145, Glu146, Ser147” を網羅的に置換した TNF 変異体を提示したファージライブラリーを作製した。このライブラリーの中から、TNFR2 に対してパンニングと呼ばれる親和性に基づくセレクションにより、TNFR2 に強く結合する複数種類の変異体を取得した。得られた変異体のレセプター結合選択性について、表面プラズモン共鳴法 (Surface plasmon resonance : SPR) による解析を行った結果、野生型 TNF が TNFR1、TNFR2 の両方に結合するのに対し、変異体の一つである R2-7 は TNFR1 へはほとんど結合性を示さず、TNFR2 だけに選択的に結合することが明らかになった (Fig. 1)。また、細胞傷害性を指標としたバイオアッセイを行い、TNFR2 を介した R2-7 の生物活性を解析した結果から、野生型 TNF と同等の活性を有することも判明し、R2-7 が優れた TNFR2 指向性をもつ TNF 変異体であることが分かった。R2-7 は、“Val29, Arg31, Arg32, Asp145, Asp146, Asp147” へとアミノ酸が変異しており、その結果、TNFR2 への結合選択性が付与されたと考えられた。

そこで、本章では、この TNFR2 指向性 TNF 変異体である R2-7 を用いて、TNFR2 シグナルに関連するタンパク質の探索を行った。



**Fig. 1 Affinity evaluation for TNFR1 and TNFR2 using surface plasmon resonance (SPR)**  
 TNF or TNF mutant R2-7 (0.8, 4, 20 µg/mL) were serially injected to the TNFR1- (A) or TNFR2- (B) immobilized sensor chip at a flow rate of 20 µL/min. The bigger response of TNF indicates higher affinity to each receptor. These sensorgrams were normalized by subtracting the response of receptor unimmobilized sensor chip.

## 第一節 TNFR2 シグナル複合体の精製

アダプター分子と呼ばれる、細胞内シグナル伝達を担うタンパク質群は、リガンドの刺激に伴うレセプターの立体構造の変化に応じて、レセプターの細胞内領域への結合を始め、それ自身がシグナル伝達の活性化に関わるほか、下流に存在するシグナル伝達分子の結合を仲介することでシグナルを増幅する役割をもつ。例えば、サイトカインが細胞膜上のレセプターに結合すると、細胞内で様々なアダプター分子が会合し、でシグナルが伝達されることが報告されている<sup>38</sup>。

本研究で対象とする TNF においても同様の機構が存在し、三量体のリガンドである TNF は、同じく三量体である TNF レセプターの高次構造変化を促し、種々のアダプター分子を介してシグナルを伝達することが知られている<sup>39</sup>。特に、TNFR1 に関しては、アダプター分子の同定や機能解析が進んでおり、これまでに詳細なシグナル伝達機

構が報告されている。TNF により TNFR1 が活性化すると、デスドメインと呼ばれる約 70 アミノ酸残基からなる TNFR1 の細胞内領域を介して、TNFR1-associated death domain protein (TRADD) が結合し、さらに TRAF2 や Receptor-interacting protein (RIP) が集合することで、シグナル伝達複合体である TNFR1 complex I が形成される。続いて、TNFR1 complex I から TRADD/TRAF2/RIP 複合体が解離し、TNFR1 と結合していた TRADD のデスドメインに新たに FAS-associated death domain protein (FADD) を介して Caspase-8/10 が会合することで、TNFR2 complex II が形成され、アポトーシスが誘導される。つまり、TNFR1 シグナルは、これら複数のアダプター分子によって空間的・時間的に制御されていることになる<sup>40,41</sup>。

一方、TNFR2 は、デスドメインを有しておらず、活性化に伴い細胞内領域に TRAF2 が直接結合することで、TNFR2 シグナル複合体が形成されと考えられている。TRAF2 は、NF- $\kappa$ B inhibitor としての役割をもつ I $\kappa$ B の分解を誘導し、転写因子である NF- $\kappa$ B を活性化させることで、細胞の増殖や生存に関与すると考えられている<sup>12,17</sup>。しかし、TNFR2 の詳細なシグナル伝達機構については解析が遅れており、アダプター分子としては TRAF2 以外知られていない。

そこで本節では、TNFR2 シグナル伝達に関与する、新たなアダプター分子の探索に向け、細胞に R2-7 をリガンドとして作用させた後、レセプターに結合した R2-7 に対する免疫沈降を行うことで、TNFR2 シグナル複合体の精製を試みた。

## 【実験材料と方法】

### 細胞培養

ヒト胎児腎細胞株である HEK293T 細胞は、10% FBS 及び抗生物質を含む D-MEM (Wako) で、ヒト白血病 T 細胞株である Jurkat 細胞は、10% FBS 及び抗生物質を含む RPMI-1640 (Wako) で、ヒト子宮頸がん細胞株である HeLa 細胞は、10% FBS 及び抗生物質を含む E-MEM (Wako) でそれぞれ継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。また、human TNFR2/Fas-preadipocyte (PA) 細胞 (細胞外及び膜貫通領域が human TNFR2、細胞内領域が mouse Fas からなるキメラレセプ

ターを安定発現する脂肪前駆細胞)<sup>42</sup>は、10% FBS及び抗生物質、5 µg/mL Blasticidin S (Invitrogen) を含む D-MEM で継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。

#### 免疫沈降による TNF/TNFR2 複合体の精製

150φ培養ディッシュにサブコンフルエント状態の HEK293T 細胞、Jurkat 細胞、HeLa 細胞、また、それぞれの human TNFR2 安定発現細胞である HEK293T-TNFR2 細胞、Jurkat-TNFR2 細胞に対して、wtTNF-FLAG 及び R2-7-FLAG (各 100 ng/mL) を 37°C、30 分作用させた。細胞を回収した後、150φ培養ディッシュ 1 枚あたり Lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 30 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 50 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1×Protease inhibitor cocktail (Roche) ] 1mL を加え、4°C で 15 分間振とうし、細胞を溶解した。14,000 rpm にて 30 分間遠心した後、細胞溶解液として上清を回収した。次に、細胞溶解液に未修飾のアガロース担体である Sepharose CL-4B (Sigma-Aldrich) を加えて、4°C で 1 時間振とうし、非特異的な結合を除くためのプレクリーニング操作を行った。続いて、この細胞溶解液に anti-FLAG M2 agarose affinity gel (Sigma-Aldrich) を加えて、4°C で 1 時間振とうした。Agarose gel を回収した後、150 µg/mL に調製した 3×FLAG peptide (Sigma-Aldrich) を添加することで、免疫沈降産物を競合的に溶出した。さらに、溶出液を Microcon YM-10 (Millipore) を用いて 3,000 rpm にて遠心限外ろ過し、3×FLAG peptide を除去した。

#### TNFR2 を介した生物活性の測定

96 穴培養プレートに、 $1.5 \times 10^4$  個/50 µL/well の human TNFR2/Fas-PA 細胞を播種し、1 µg/mL Cycloheximide 含有 D-MEM にて段階希釈した wtTNF、R2-7 及び R2-7-FLAG 50 µL を加えた。37°C で 48 時間培養した後、Cell Count Reagent SF (Nacalai tesque) を用いた WST-8 assay を行い、細胞の生存率をもとに、細胞傷害活性を算出した。

### TNFR1 及び TNFR2 の発現量の測定

細胞数  $5 \times 10^5$  個の HEK293T 細胞、Jurkat 細胞、HeLa 細胞、及び human TNFR2 安定発現細胞である HEK293T-TNFR2 細胞、Jurkat-TNFR2 細胞を 2% FBS 含有 PBS にて懸濁し、Biotinylated anti-human TNFR1 抗体 (BD Biosciences)、または Biotinylated anti-human TNFR2 抗体 (BD Biosciences) を反応させた後、PE-labeled streptavidin (BD Biosciences) を用いて染色した。対照として、アイソタイプコントロール抗体である Biotin Mouse IgG2a,  $\kappa$  (BD Biosciences)、または Biotin Rat IgG2b,  $\kappa$  (BD Biosciences) を同様に反応させた細胞及び未染色細胞を用いた。染色後、細胞を洗浄し、再度 2% FBS 含有 PBS にて懸濁した後、FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences) を用いて、TNFR1 及び TNFR2 陽性細胞を検出した。得られた測定データから、FlowJo (Tree Star) を用いて、レセプターの発現量を解析した。

### Western Blotting

細胞溶解液もしくは免疫沈降産物を、終濃度 5% (v/v) 2-メルカプトエタノール (Nacalai tesque) を含む Laemmli sample buffer (Bio-Rad) と等量混合し、95°C で 5 分間加熱した。この反応液を 10-20% ポリアクリルアミドゲル (e-PAGEL; ATTO) に添加し、トリス-グリシン/SDS 泳動バッファー [25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS), pH 8.3] を用いて、ミニゲル 1 枚当たり 40 mA 定電流で SDS-PAGE を行った。分子量マーカーは、Kaleidoscope prestained standard (Bio-Rad) 及び MagicMark Western Standard (Invitrogen) を用いた。泳動後、セミドライ式ブロッティング装置を用いて、タンパク質を PVDF 膜 (GE Healthcare) へ転写し、4% Block Ace (DS Pharma Biomedical) にて 4°C で一晩ブロッティングした。続いて、0.05% Tween20 を含む PBS (0.05% PBS-T) で洗浄した後、抗体による染色を行った。TNFR2 の検出には、1 次抗体として、0.4% Block Ace で希釈した 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Biotinylated anti-human TNFR2 抗体 (R&D Systems) を反応させた。0.05% PBS-T で洗浄した後、2 次抗体として 0.4% Block Ace で 5000 倍希釈した HRP-Streptavidin conjugate (ZYMED Laboratories) を反応させた。再度

0.05% PBS-T で洗浄した後、PVDF 膜に ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) を添加し、LAS-3000 (GE Healthcare) にて化学発光を検出した。TRAF2 の検出には、1 次抗体として anti-TRAF2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、2 次抗体として anti-rabbit IgG HRP conjugate (Cell Signaling Technology) を用いて、同様の操作を行った。

#### human TNFR2 発現ベクターの構築

human TNFR2 全長 [amino acid : 1-461] の遺伝子は、ヒト末梢血リンパ球由来 cDNA を鋳型として、*Sal* I site を含む forward primer (5'-GAT TAC GCC AAG CTT GTC GAC CAC CAT GGC GCC CGT CGC CGT CTG GGC CGC GCT GGC CGT CGG ACT GGA G-3') と *Not* I site を含む reverse primer (5'-GTC ATC CTT GTA GTC TGC GGC CGC TTA ACT GGG CTT CAT CCC AGC ATC AGG CAC TCC AAG-3') を用いて、PCR により増幅した。制限酵素処理した後、遺伝子断片を Gateway エントリーベクターである pENTR1A vector (Invitrogen) にライゲーションし、pENTR1A-human TNFR2 ベクターを作製した。続いて、Gateway LR recombination reaction (Invitrogen) により、哺乳類発現ベクターである pcDNA6.2/V5-DEST Gateway vector (Invitrogen) にサブクローニングし、human TNFR2 発現ベクターとして pcDNA6.2-human TNFR2 を作製した。

#### human TNFR2 安定発現 HEK293T 細胞の作製

遺伝子導入時に 60-70%の細胞密度になるように播種した HEK293T 細胞に、Lipofectamine LTX (Invitrogen) を用いて、定法に従い、pcDNA6.2-human TNFR2 をトランスフェクションした。遺伝子導入 48 時間後より、8  $\mu$ g/mL Blasticidin S 含有 D-MEM に培地交換し、3 週間継代培養を続けることで、Blasticidin S 耐性細胞を薬剤選択した。続いて「TNFR1 及び TNFR2 の発現量の解析」の項に従い、Blasticidin S 耐性細胞を Biotinylated anti-human TNFR2 antibody で染色した後、FACSAria II cell sorter (BD Biosciences) を用いて human TNFR2 陽性細胞を分取することで、



human TNFR2 安定発現 HEK293T (HEK293T-TNFR2) 細胞を樹立した。HEK293T-TNFR2 細胞の継代培養は、5 µg/mL Blasticidin S 含有 D-MEM (10% FBS 及び抗生物質を含む) で行った。

#### human TNFR2 安定発現 Jurkat 細胞の作製

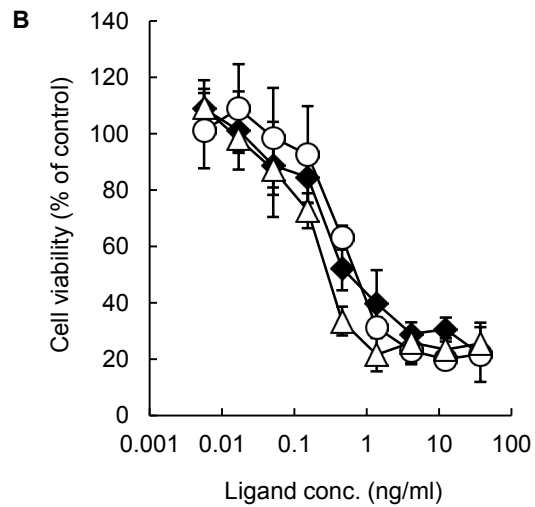
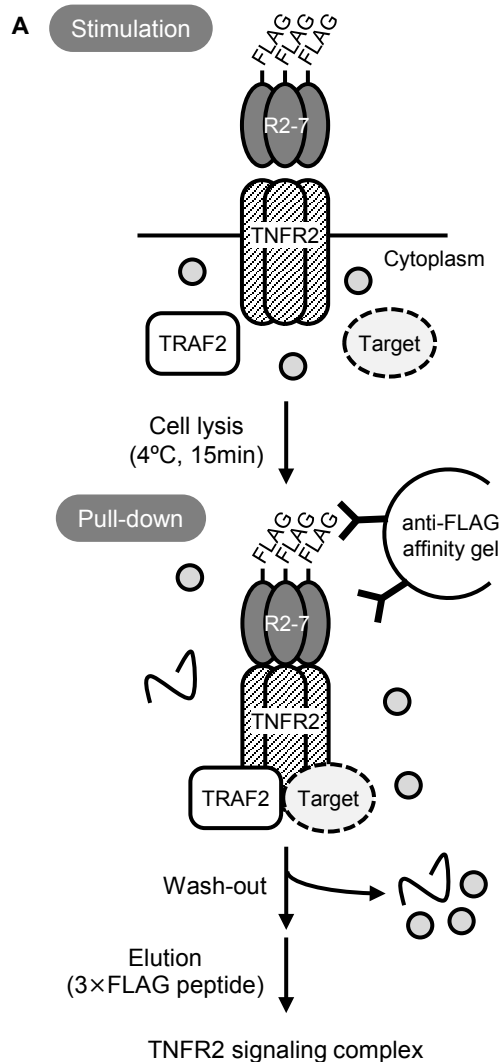
「human TNFR2 安定発現 HEK293T 細胞の作製」の項に従い、作製した。Jurkat 細胞に human TNFR2 発現ベクターとして pcDNA6.2-human TNFR2 を導入した後、8 µg/mL Blasticidin S 含有 RPMI-1640 で薬剤選択を行い、TNFR2 陽性細胞を分取することで、human TNFR2 安定発現 Jurkat (Jurkat-TNFR2) 細胞を樹立した。Jurkat-TNFR2 細胞の継代培養は、5 µg/mL Blasticidin S 含有 RPMI-1640 (10% FBS 及び抗生物質を含む) で行った。

### **【結果と考察】**

#### TNFR2 シグナル複合体の精製

TNFR2 の細胞内領域に結合するアダプター分子の同定を目的に、FLAG-tag (アミノ酸配列: DYKDDDDK) を融合させた R2-7 (R2-7-FLAG) と anti-FLAG agarose affinity gel を用いて、免疫沈降による TNFR2 シグナル複合体の精製を行った (Fig. 2A)。TNFR2 を介した R2-7-FLAG の生物活性は、野生型 TNF や R2-7 と同等であり、R2-7 の C 末端への FLAG-tag の融合は、R2-7 の機能には影響しないことを確認した (Fig. 2B)。

まず、ヒト胎児腎細胞株である HEK293T 細胞、ヒト白血病 T 細胞株である Jurkat 細胞、ヒト子宮頸がん細胞株である HeLa 細胞の 3 種類の細胞に対して、R2-7-FLAG 及び wtTNF-FLAG をそれぞれ 37°C で 30 分作用させた細胞を用いて、免疫沈降を行った。免疫沈降により、R2-7/TNFR2 複合体や TNF/TNFR2 複合体が回収されているかを検証するため、TNFR2 及び TNFR2 の既知の細胞内アダプター分子である TRAF2 に対する Western Blotting を行った。その結果、R2-7-FLAG 刺激群、wtTNF-FLAG 刺激群のいずれも、免疫沈降産物から TNFR2 及び TRAF2 は検出されず、シグナル複合



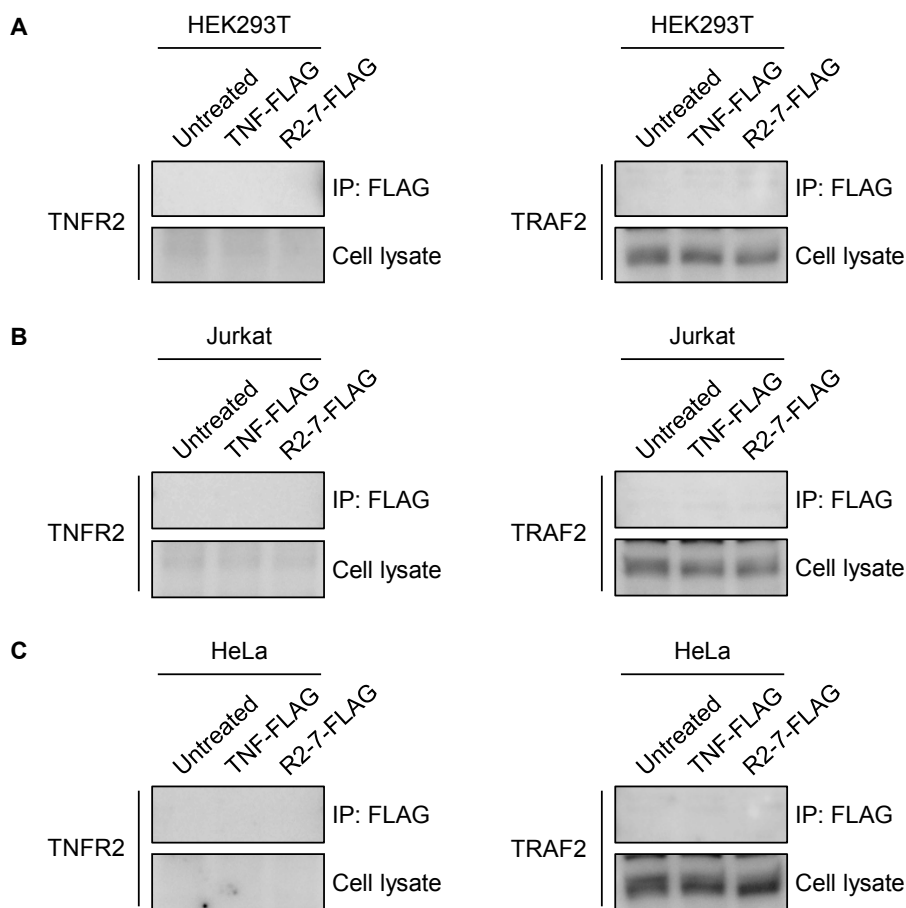
**Fig. 2 Purification of the TNFR2 signaling complex by immunoprecipitation**

(A) Scheme of TNFR2 signaling complex purification by FLAG-tag. R2-7-FLAG or wtTNF-FLAG binding to TNFR2 recruits target protein (dotted circle) that forms part of the TNFR2 signaling complex. After cell lysis, the TNFR2 signaling complex is pulled down using an anti-FLAG affinity gel. Finally, impurities such as cell membranes and nonspecifically bound proteins are removed by washing and the complex is eluted by competition with a 3×FLAG peptide. (B) *In vitro* bioactivity of wtTNF (filled diamond) and TNF mutants, R2-7 (open circle) or R2-7-FLAG (open triangle), via TNFR2 was evaluated by using human TNFR2/Fas-PA assay. Results shown are represented as mean  $\pm$  SD.

体が回収できていないことがわかった (Fig. 3)。細胞溶解液中に TNFR2 のバンドが殆ど検出されなかったことから、原因の一つとして、TNFR2 の発現量が低いことが考えられた。そこで、これら 3 種類の細胞における TNFR1 及び TNFR2 の発現量をフローサイトメトリーにて解析した結果、HEK293T 細胞では若干の発現が認められるものの、Jurkat 細胞ならびに HeLa 細胞では、TNFR2 の発現が殆ど認められなかった (Fig. 4)。

これまで、TNFR2 のシグナル解析が進展しなかった一因として、多くの細胞で TNFR2 の発現量が低いこと、さらに相対的に TNFR1 シグナルが優位であることが挙げられる<sup>12,30</sup>。本研究では TNFR2 指向性 TNF 変異体である R2-7 を用いたことから、

TNFR1 シグナルの影響は排除できたものの、細胞における TNFR2 の発現量自体が低い  
ため、Western blotting で検出できるだけの十分な TNFR2 シグナル複合体が得られ  
なかったと考えられた。

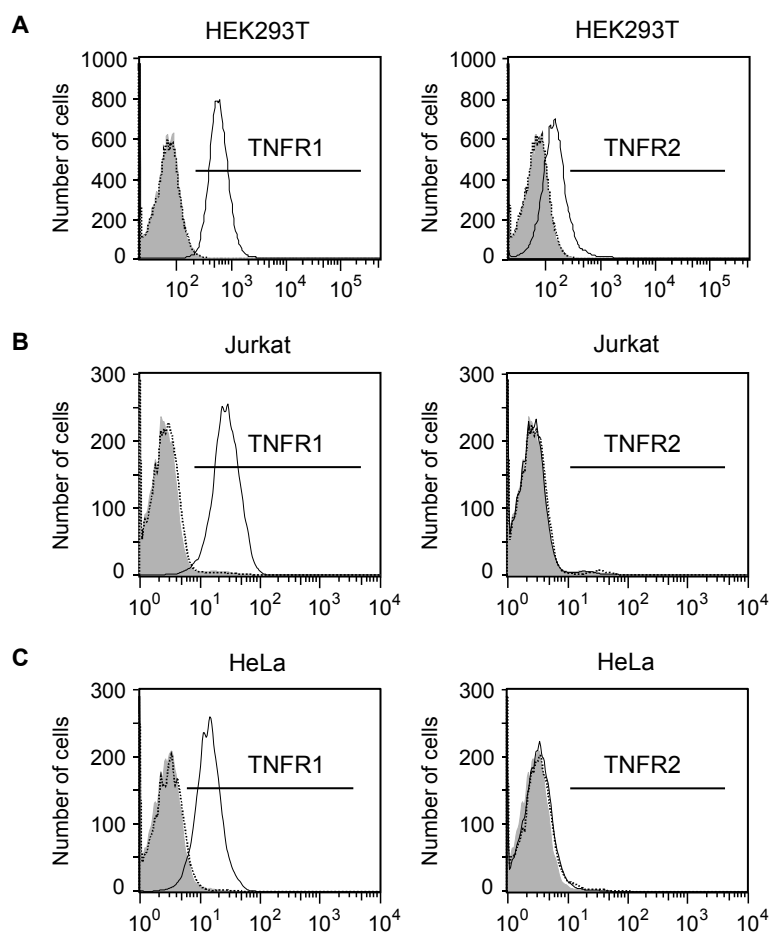


**Fig. 3 Formation of a TNFR2 signaling complex in native cells**

HEK293T (A), Jurkat (B) and HeLa (C) cells were stimulated with or without TNF-FLAG (100 ng/mL) or R2-7-FLAG (100 ng/mL) for 30 min. After cell lysis, the TNFR2 signaling complex was recovered by anti-FLAG immunoprecipitation. TNFR2 and TRAF2 in the cell lysate and immunoprecipitates were assessed by western blotting.

### TNFR2 安定発現細胞の構築

これまでの報告から、TNFR2 は T 細胞など免疫系細胞において比較的発現量が高いとされているが<sup>43</sup>、前述したとおり、ヒト白血病 T 細胞株である Jurkat 細胞においても、TNFR2 の高い発現量は認められなかった (Fig. 4B)。そこで、TNFR2 シグナル

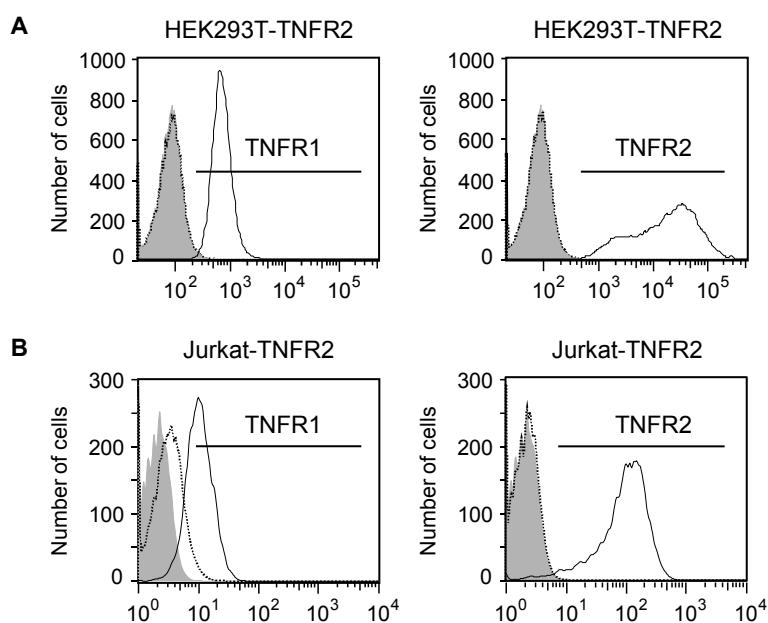


**Fig. 4 Expression of human TNFR1 and TNFR2 in native cells**

Expression of human TNFR1 and TNFR2 in HEK293T (A), Jurkat (B) and HeLa (C) cells was analyzed by flow cytometry. Cells stained by a biotinylated anti-TNFR1 or anti-TNFR2 antibody are indicated by the black line histogram. Cells stained with an isotype control antibody and unstained cells are shown by the dotted line and gray-filled histograms, respectively.

複合体を精製・同定するためには、TNFR2 が十分に発現している必要があると考え、TNFR2 を高発現する安定発現細胞の構築を試みた。ヒト TNFR2 全長の遺伝子配列をコードする発現ベクター (pcDNA6.2-human TNFR2) を作製し、リポフェクション法により HEK293T 細胞、Jurkat 細胞、及び HeLa 細胞に遺伝子導入した。続いて、Blasticidin S による薬剤選択を行った後、セルソーターを用いて、TNFR2 発現細胞を分取した。その結果、HEK293T 細胞及び Jurkat 細胞については、TNFR2 を高発現する細胞を得ることができた。一方、HeLa 細胞は、薬剤選択が不十分であったと考えら

れ、TNFR2 発現細胞は得られなかった。HEK293T 細胞及び Jurkat 細胞については、継代培養を続けた結果、最終的に、強制発現前と比較して TNFR2 を高発現する細胞を維持することができ、TNFR2 安定発現細胞株である HEK293T-TNFR2 細胞及び Jurkat-TNFR2 細胞の構築に成功した (Fig. 5)。



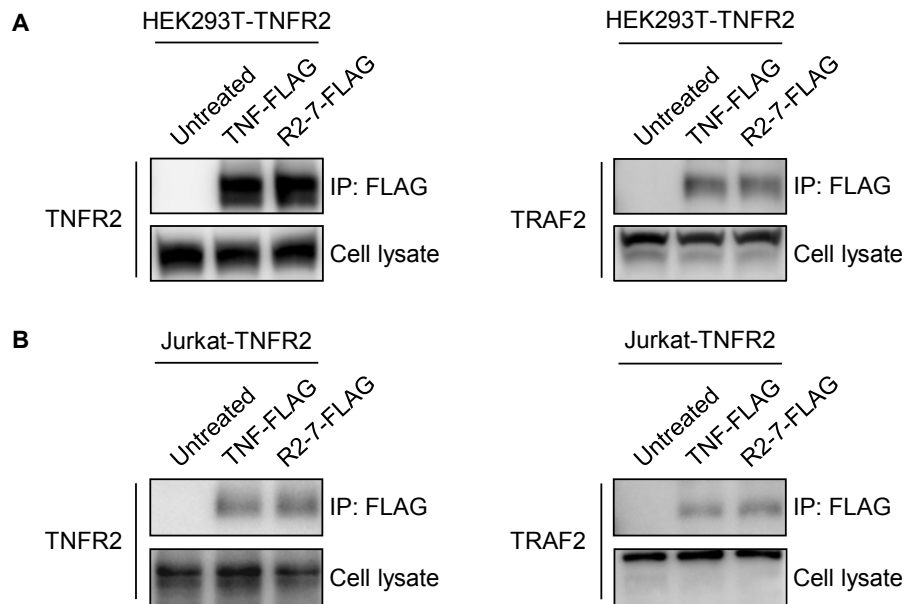
**Fig. 5 Expression of human TNFR1 and TNFR2 in cells overexpressing TNFR2**

Expression of human TNFR1 and TNFR2 in HEK293T-TNFR2 (A) and Jurkat-TNFR2 (B) cells was analyzed by flow cytometry. Cells stained by a biotinylated anti-TNFR1 or anti-TNFR2 antibody are indicated by the black line histogram. Cells stained with an isotype control antibody and unstained cells are shown by the dotted line and gray-filled histograms, respectively.

#### TNFR2 安定発現細胞における TNFR2 複合体の精製

HEK293T-TNFR2 細胞及び Jurkat-TNFR2 細胞に対して、R2-7-FLAG 及び wtTNF-FLAG をそれぞれ 37°C で 30 分作用させた後、細胞を溶解し、リガンドに対する免疫沈降を行った。免疫沈降後にレセプター複合体が回収されているか検証するために、Western Blotting にて TNFR2 と TRAF2 を検出した。その結果、いずれの細胞においても、前項で示した TNFR2 を強制発現させる前の結果とは異なり、wtTNF-FLAG 刺激群、R2-7-FLAG 刺激群の両者において、TNFR2 (約 75 kDa) 及び TRAF2 (約

50 kDa) が検出された (Fig. 6)。従って、これら TNFR2 安定発現細胞においては、免疫沈降により TNFR2 複合体が得られたことが確認できた。



**Fig. 6 Formation of a TNFR2 signaling complex in a cells stably overexpressing TNFR2**  
HEK293T-TNFR2 (A) and Jurkat-TNFR2 (B) cells were stimulated with or without TNF-FLAG (100 ng/mL) or R2-7-FLAG (100 ng/mL) for 30 min. After cell lysis, the TNFR2 signaling complex was recovered by anti-FLAG immunoprecipitation. TNFR2 and TRAF2 in the cell lysate and immunoprecipitates were assessed by western blotting.

## 第二節 TNFR2 シグナル関連タンパク質の同定

試料中に含まれる多数のタンパク質を、分画・精製することなく、LC-MS/MS を用いた質量分析により一挙に同定する手法は、一般的にショットガンプロテオミクスと呼ばれている<sup>44</sup>。近年、質量分析装置や液体クロマトグラフ (HPLC) の性能、またデータベースの同定精度が格段に向上しており、タンパク質を電気泳動などであらかじめ分離せずとも、ペプチド消化した後に、全タンパク質を直接プロテオミクス解析することで、数百~数千種類のタンパク質を同定することが可能になってきている。しかし一方で、広いダイナミックレンジを有する質量分析装置を用いて細胞内に含まれるタンパク質を網羅的に解析する場合、シャペロンタンパク質やリボソームタンパク質などの高発現タンパク質が含まれた状態では、発現量の少ないシグナル関連分子や転写因子を検出することは困難であるとされる。従って、シグナル関連タンパク質を探索するためには、これらを効果的に濃縮・精製する手法が必要である<sup>45,46</sup>。その点、前節において、TNFR2 安定発現細胞から TNFR2 シグナル複合体として得られた免疫沈降産物には、TNFR2 シグナルに関与するタンパク質群が濃縮精製されていると考えられた。

そこで、本節では、この複合体を形成しているタンパク質群を、ショットガンプロテオミクスにより網羅的に解析することで、新たな TNFR2 シグナル関連タンパク質の探索と同定を試みた。

### 【実験材料と方法】

#### 質量分析によるタンパク質の同定

第一章第一節「免疫沈降による TNF/TNFR2 複合体の精製」にて得られた試料の還元アルキル化を行った。まず、終濃度 5 mM の Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP-HCl; Sigma-Aldrich) を加えて、室温で 15 分間反応させた後、95℃で 15 分間反応させることでタンパク質を還元した。さらに、終濃度 10 mM の Iodoacetamide (Sigma-Aldrich) 加え、遮光した状態で、室温で 15 分間反応させてアルキル化を行い、等量の 100 mM L-Cystein (Sigma-Aldrich) を加えて反応を停止

した。続いて、1 M Tris-HCl (pH 8.0) を添加して、還元アルキル化したタンパク質溶液を pH 8.0 に調製した後、10  $\mu$ L のトリプシン溶液 [Trypsin Gold, Mass Spec Grade (Promega) ; 100  $\mu$ g/mL in 50 mM Ammonium bicarbonate] を加え、37°C で 16 時間、加水分解反応を行った。反応液に 10% (v/v) トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液を加えて酸性 (pH<2.0) に調製し、逆相カラムチップ (OMIX Pipette Tips C18 ; Varian) を用いて消化ペプチドを精製・溶出した。溶出液を減圧遠心にて乾燥させた後、0.1% (v/v) ギ酸水溶液 10  $\mu$ L に溶かし、測定試料とした。この試料 1  $\mu$ L を用いて、逆相液体クロマトグラフィーを搭載したフーリエ変換ーリニアイオントラップハイブリッド質量分析計 (LTQ Orbitrap XL ; Thermo Fisher Scientific) による LC-MS/MS 解析を行い、各ペプチド断片の質量電荷比 (m/z 値) を測定した。逆相カラムによる分離条件は、1  $\mu$ L/min にて 水/アセトニトリル/ギ酸による 3 時間のグラジエント溶出とした。得られた測定データからのタンパク質の同定は、Mascot search (Matrix Science) を用いて、タンパク質データベースである Swiss-Prot を参照することで行った。なお、データベース検索の際には、メチオニン残基の酸化、Iodoacetamide によるシステイン残基のカルバミドメチル化を考慮した。

#### TNFR2 シグナル関連タンパク質の選定

R2-7-FLAG で刺激した細胞及び非刺激の細胞を用いて、第一章第一節「免疫沈降による TNF/TNFR2 複合体の精製」に従い、免疫沈降を行った。続いて、前項の「質量分析によるタンパク質の同定」に従い、質量分析を行うことで、免疫沈降産物に含まれるタンパク質を同定した。刺激及び非刺激の細胞から同定されたタンパク質の比較を行い、R2-7-FLAG で刺激した細胞において特異的に検出されたタンパク質を選定した。

#### Western Blotting

第一章第一節「Western Blotting」に従った。Aminopeptidase P3 (APP3) の検出には、1 次抗体として anti-human XPNPEP3 抗体 (Abcam)、2 次抗体として anti-rabbit IgG HRP conjugate (Cell Signaling Technology) を用いた。

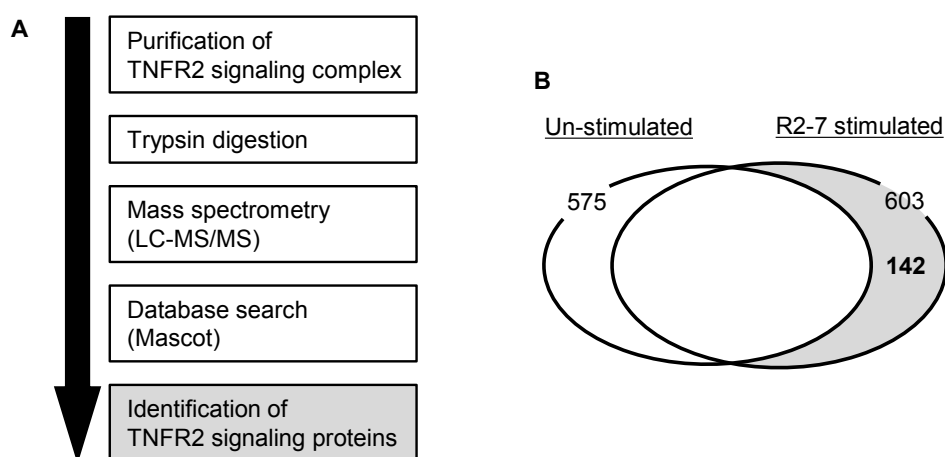


## 【結果と考察】

### 質量分析による TNFR2 複合体タンパク質の同定

TNFR2 に結合するアダプター分子を探索するため、HEK293T-TNFR2 細胞及び Jurkat-TNFR2 細胞から得られた TNFR2 複合体に含まれるタンパク質群をショットガンプロテオミクスにより網羅的に解析した (Fig. 7A)。まず、R2-7-FLAG 刺激並びに非刺激した細胞を用いて、FLAG-tag に対する免疫沈降を行った後、免疫沈降産物の LC-MS/MS 解析を行った。得られた結果について Mascot search によるデータベース検索を行い、刺激群及び非刺激群において、それぞれ同定されたタンパク質を比較することで、TNFR2 複合体を形成するタンパク質を調べた。

HEK293T-TNFR2 細胞においては、R2-7-FLAG 刺激群と非刺激群でそれぞれ約 600 種類のタンパク質が同定された。これらの比較解析を行った結果、142 個のタンパク質が刺激群で特異的に検出され、TNFR2 関連タンパク質として選定できた (Fig. 7B)。この中から、独自の選択基準とした同定スコア (Protein score) が 100 以上のタンパク質を、スコアの高いものから順に並べたリストを Table 1A に示した。その結果、TNFR2 (Accession # : P20333) や既知の TNFR2 アダプター分子として知られ



**Fig. 7 Identification of adapter proteins included in the TNFR2 signaling complex**

(A) Flow chart of the identification of TNFR2 signaling proteins. To discover adaptor molecules related to TNFR2 signaling, proteins included in R2-7/TNFR2 complex were identified by shut-gun proteomics approach. (B) Mascot database search indicated that 603 or 575 proteins were identified with or without R2-7 stimulation, respectively. Comparative analysis of results obtained for stimulated versus unstimulated cells indicated that 142 proteins (gray filled) were specifically detected in the stimulated cells. These proteins were considered to be potential TNFR2 signaling-related proteins.

る TRAF2 (Q12933) のほか、R2-7 が TNF (P01375) として同定されており、TNFR2 複合体を形成するタンパク質群が同定されていることが確かめられた。

**Table 1. List of proteins identified in the R2-7/TNFR2 complex**

**A** HEK293T-TNFR2 cells

Accession	Protein name	Protein score	Coverage (%)	Mw (kDa)
P20333	<b>Tumor necrosis factor receptor type II (TNFR2)</b>	1324.76	34.06	48.3
Q12933	<b>TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2)</b>	916.79	36.93	55.8
Q9NQH7	Aminopeptidase P3 (APP3)	868.20	31.95	57.0
Q6S8J3	POTE ankyrin domain family member E	491.72	6.88	121.3
O43464	Serine protease HTRA2, mitochondrial	312.19	13.97	48.8
P01764	Ig heavy chain V-III region VH26	261.56	16.24	12.6
O75190	DnaJ homolog subfamily B member 6	202.75	11.35	36.1
P33778	Histone H2B type 1-B	199.04	18.25	13.9
O00232	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	154.54	2.85	52.9
P01375	<b>Tumor necrosis factor (TNF)</b>	142.65	5.15	25.6
Q969P6	DNA topoisomerase I, mitochondrial	141.54	4.99	69.8
Q9UGV6	High mobility group protein 1-like 10	137.28	16.11	24.2
P61257	60S ribosomal protein L26	133.64	22.76	17.2
P49458	Signal recognition particle 9 kDa protein	132.52	12.79	10.1
Q8NFB4	Nucleoporin Nup37	129.94	4.91	36.7
Q13490	Inhibitor of apoptosis protein 2 (IAP1)	129.19	9.06	69.9
Q71UM5	40S ribosomal protein S27-like protein	127.66	15.48	9.5
Q9UMS4	Pre-mRNA-processing factor 19	126.62	11.31	55.1
Q9NR28	Diablo homolog, mitochondrial (DIABLO)	125.61	11.3	27.1
P32119	Peroxiredoxin-2	121.88	14.65	21.9
P40429	60S ribosomal protein L13a	117.41	18.23	23.6
Q6P5R6	60S ribosomal protein L22-like 1	102.65	19.67	14.6

**B** Jurkat-TNFR2 cells

Accession	Protein name	Protein score	Coverage (%)	Mw (kDa)
Q562R1	Beta-actin-like protein 2	494.55	14.10	42.0
P34931	Heat shock 70 kDa protein 1-like	374.37	9.20	70.3
P20333	<b>Tumor necrosis factor receptor type II (TNFR2)</b>	202.74	13.23	48.3
P01375	<b>Tumor necrosis factor (TNF)</b>	116.85	5.15	25.6

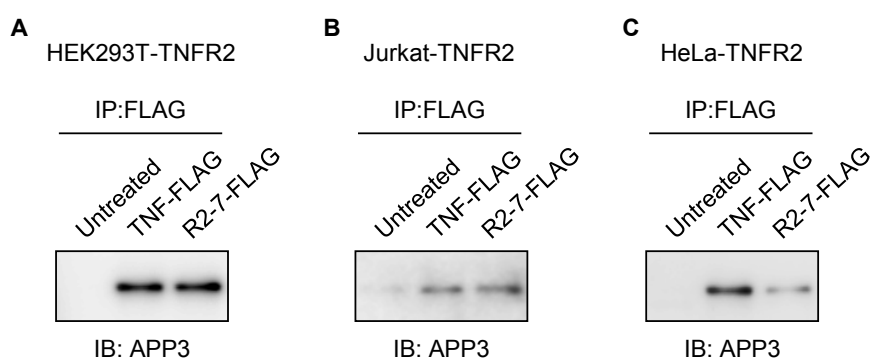
'Accession' is the identifier used for UniProt; 'Protein score' is the identification score obtained with Mascot software; 'Coverage' is the percentage of sequence coverage obtained with identified peptides; 'Mr' is the theoretical molecular masses of the proteins. Proteins indicated in bold are known to be included in the TNFR2 signaling complex.

一方、Jurkat-TNFR2 細胞では、タンパク質の総同定数が少なかった。また、同様の比較解析を行った結果、同定スコアが 100 以上のタンパク質は、TNFR2 及び TRAF2 を含めた 4 個のみが検出された (Table 1B)。

### TNFR2 アダプター分子の探索

質量分析により同定されたタンパク質が、実際に TNFR2 複合体に結合していることを確認するため、TNF-FLAG 及び R2-7-FLAG 刺激した細胞からの免疫沈降産物を Western blotting にて解析した。その結果、HEK293T-TNFR2 細胞において、TNFR2 及び TRAF2 に続き同定スコアの高かった Aminopeptidase P3 (APP3; Q9NQH7) は、リガンド刺激群においてバンドが認められ、TNFR2 に結合することが判明した (Fig. 8A)。また、Jurkat-TNFR2 細胞及び TNFR2 を一過性発現させた HeLa 細胞 (HeLa-TNFR2 細胞) においても、同様に結合が確認されたことから (Fig. 8B,C)、APP3 は、質量分析で同定された HEK293T-TNFR2 細胞以外の細胞においても TNFR2 複合体に結合していると考えられた。

Jurkat-TNFR2 細胞において、質量分析では APP3 が同定されなかった原因として、細胞内の APP3 発現量の差や質量分析装置の感度の変動などの理由が考えられた。



**Fig. 8 Recruitment of APP3 to TNFR2 signaling complex**

HEK293T-TNFR2 (A), Jurkat-TNFR2 (B) and transiently TNFR2-expressing HeLa (HeLa-TNFR2) (C) cells were stimulated with or without TNF-FLAG (100 ng/mL) or R2-7-FLAG (100 ng/mL) for 30 min. After cell lysis, the TNFR2 signaling complex was recovered by anti-FLAG immunoprecipitation. Recruitment of APP3 in TNFR2 signaling complex was confirmed by western blotting using anti-APP3 antibody.

### 第三節 小活

本章では、TNFR2 シグナル伝達機構の解明に向けて、TNFR2 シグナルに関わるタンパク質の探索を試みた。まず初めに、TNFR2 に結合するタンパク質を TNFR2 シグナル複合体として得るために、リガンドとして TNF 変異体 “R2-7” を用いて、R2-7 に対する免疫沈降を行い、複合体の濃縮・精製を試みた。その結果、通常の HEK293T 細胞などからは複合体を回収することができず、一因として、これらの細胞における TNFR2 の発現量が低いことが考えられた。そこで新たに、TNFR2 安定発現細胞の作製を試みた。HEK293T 細胞及び Jurkat 細胞に対してヒト TNFR2 遺伝子の導入を行った後、TNFR2 発現細胞だけを選別することで、TNFR2 を安定発現する細胞として HEK293T-TNFR2 細胞及び Jurkat-TNFR2 細胞の構築に成功した。これらの細胞は、親細胞に比べて TNFR2 を恒常的に高発現しており、その結果として、免疫沈降により TNFR2 シグナル複合体を濃縮・精製することが可能になったと考えられた。

次に、TNFR2 シグナルに関わるタンパク質を探索するために、免疫沈降にて得られた複合体に含まれるタンパク質群を、LC-MS/MS を用いたショットガンプロテオミクスにて網羅的に解析した。その結果、TNFR2 複合体に結合すると考えられる数十種類の候補タンパク質を同定することができた。これら候補タンパク質について、シグナル伝達時における TNFR2 への結合を精査した結果、TNFR2 の新たなアダプター分子として、アミノペプチダーゼ P3 (APP3) を見出すことに成功した。

現在までに、APP3 と TNFR2 との関連について報告はなく、TNFR2 シグナルにおける APP3 の機能については不明である。しかし、サイトカインのレセプターに関して、APP3 のようなプロテアーゼ活性をもつアダプター分子はほとんど例がなく、APP3 が TNFR2 シグナルにおいて、新たな伝達機構を仲介する重要な役割をもつことが推定された。

## 第二章 アミノペプチダーゼ P3 の機能解析

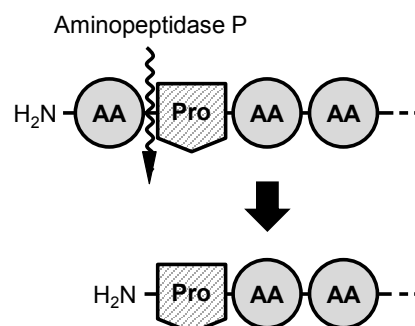
第一章にて、TNFR2 シグナルに関与するアダプター分子として同定されたアミノペプチダーゼ P3 (APP3) は、Table 2 に示すように、アイソザイムであるアミノペプチダーゼ P1 (APP1 ; Q9NQW7) 及びアミノペプチダーゼ P2 (APP2 ; O43895) とともに、Peptidase M24B (Aminopeptidase P) ファミリーに属する<sup>47</sup>。

**Table 2. Aminopeptidase P family**

Family	Protein name (Accession number)	Molecular weight	Localization
	Aminopeptidase P1, APP1 (Q9NQW7)	70 kDa	Cytoplasm
Peptidase M24B (Aminopeptidase P)	Aminopeptidase P2, APP2 (O43895)	76 kDa	Cellular membrane (GPI anchor)
	Aminopeptidase P3, APP3 (Q9NQH7)	57 kDa (→ 51 kDa) <sup>a)</sup> 48 kDa <sup>b)</sup>	Mitochondria Cytoplasm

a) Mitochondrial APP3 (APP3m). APP3m has a mitochondrial targeting sequence (MTS) domain in N-terminal; thereby APP3m is imported to mitochondria and processed to 51 kDa matured protein  
b) Cytosolic APP3 (APP3c)

これらのアミノペプチダーゼ P (APP) は、分子量も細胞内局在も様々であるが、いずれも活性中心に  $Mn^{2+}$  をもつ金属酵素であり、N 末端から 2 番目にプロリンを配するタンパク質の Xaa-Pro 配列に特異的に作用し、N 末端のアミノ酸 Xaa を切断する (Fig. 9)。生体内には、ホルモン (例 : プロラクチン) やサイトカイン (例 : IL-1 $\beta$ , IL-6, GM-CSF)、神経伝達物質 (例 : サブスタンス P)、血液凝固因子、生理活性ペプチドなど、N 末端に



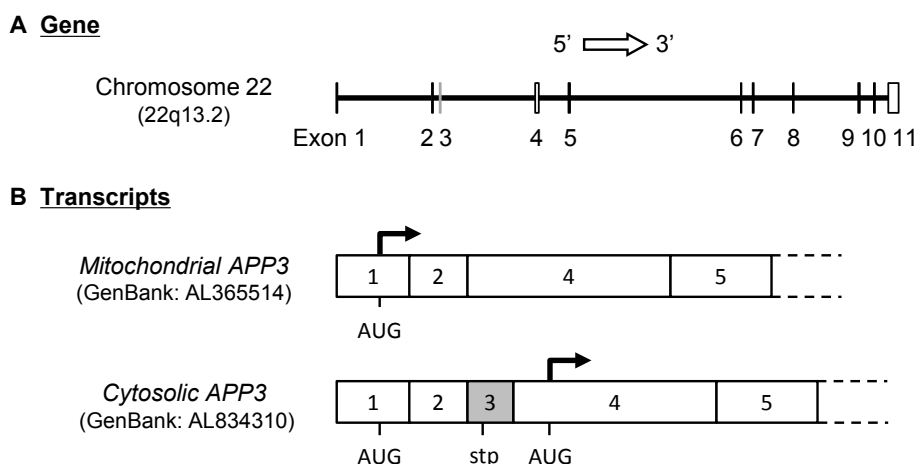
**Fig. 9 Aminopeptidase P activity**  
Aminopeptidase P (APP) is proline-specific exopeptidase. APP specifically removes the N-terminal amino acid (AA) from proteins or peptides having a proline residue located in the second position.

Xaa-Pro 配列をもつポリペプチドが数多く存在する。しかし、APP が、*in vitro* において IL-6 を分解するという報告などをもとに、タンパク質やペプチドの活性を制御する役割をもつのではないかと推定されているものの<sup>48,49</sup>、これらのタンパク質に対する APP の関与について具体的な報告はほとんどない。

APP1 は、細胞質に発現する分子量 70 kDa のホモ二量体タンパク質であり、様々な臓器に発現している。APP2 は、GPI アンカーによって細胞膜に繋ぎ止められている分子量 71 kDa の膜結合タンパク質であり、ホモ多量体を形成することで血管内皮や腎近位尿細管において機能する。血圧降下作用を持つ生理活性物質であるブラジキニン (Bradykinin; Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) が基質として知られており、血圧調節に関わる酵素として報告されている<sup>50-52</sup>。一方、APP3 は、大腸菌由来アミノペプチダーゼ P (E.coli APP) との配列の相同性から見いだされた酵素タンパク質であり<sup>53</sup>、APP1 や APP2 と比較して分子量がやや小さく、57 kDa のタンパク質である。APP3 には、選択的スプライシングに起因する、細胞質とミトコンドリアに局在する 2 つのアイソフォームが存在する (Fig. 10)。APP3 遺伝子は、ヒト 22 番染色体 [22q13.2] にコードされており、11 個の Exon から構成されるが、スプライシングの過程で、Exon 3 (92 bp) の有無により、*Mitochondrial APP3* (GenBank : AL365514) 及び *Cytosolic APP3* (GenBank : AL834310) の 2 つの mRNA へと転写されるためである<sup>47</sup>。ヒト組織由来の cDNA を用いた遺伝子発現解析の結果、生体の様々な組織において両 APP3 は確認されており、特に、心臓で最も発現が高く、続いて、膵臓、腎臓、精巣、末梢血単核球などでも高い発現が認められている<sup>47</sup>。

また、これまで APP3 と生理作用との関連については報告がなかったが、近年、家族性劣性遺伝性の腎疾患である嚢胞性腎疾患を呈する家系の大規模ゲノム解析の結果、APP3 をコードする遺伝子に、ホモ接合フレームシフト変異及びスプライス部位の変異が確認された<sup>54,55</sup>。この大規模調査の結果から、APP3 が単なる機能分子の一つではなく、重篤な疾患を引き起こす原因タンパク質であることが判明し、生体にとって重要な酵素タンパク質である可能性が示された。しかし、APP3 の生体内における基質は未だ不明であり、機能に関してもほとんど分かっていない。また、細胞内シグナルにおける

報告もなく、TNFR2 シグナルへの関わりは全く不明である。そこで、本章では、TNFR2 シグナルにおける APP3 の機能解明を目的に、以降の解析を行った。



**Fig. 10 Alternative splicing variants of APP3 gene**

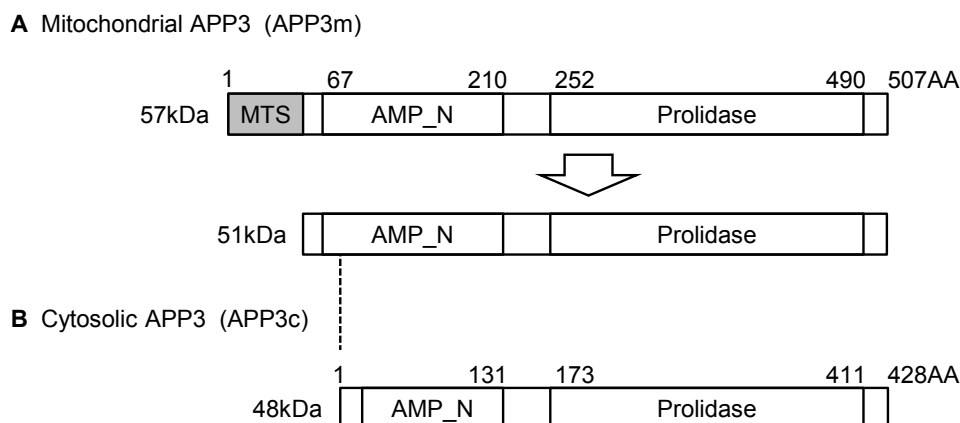
(A) APP3 gene codes two proteins, mitochondrial APP3 (APP3m) and cytosolic APP3 (APP3c), depending on the presence of exon 3 (gray-bar) in the spliced transcript. APP3 gene locates in chromosome 22 (22q13.2). Exon 1-11 coded for APP3m and APP3c are shown. (B) The 5'-end of transcripts of APP3m and APP3c are shown. The numbers indicate in each exon. AUG and stp indicates start codon and stop codon, respectively. Each protein is translated from the bent arrow.

## 第一節 TNFR2 シグナル複合体への APP3 の結合

APP3 には 2 つのアイソフォームである Mitochondrial APP3 (APP3m) 及び Cytosolic APP3 (APP3c) が存在する<sup>55</sup>。APP3m は、N 末端にミトコンドリア移行シグナル (Mitochondrial targeting sequence : MTS) を有し、57 kDa のタンパク質として発現した後、51 kDa の機能タンパク質としてミトコンドリアに局在する (Fig. 11A)。一方、APP3c は、MTS を欠いており、48 kDa のタンパク質として細胞質に発現する (Fig. 11B)。APP3m と APP3c は、それぞれ 507 個及び 428 個のアミノ酸から構成され、同様の細胞内ドメイン構造を有しており、N 末端の 79 アミノ酸以外は共通のアミノ酸配列をもつ。

第一章第二節において APP3 の同定に至ったプロテオミクス解析の結果からは、共通部分のフラグメントペプチドしか検出されておらず、APP3m と APP3c のどちらが

同定されたのかが不明であるため、TNFR2 に結合するアイソフォームを判別できなかった (Fig. 12)。そこで、本節では、リガンド側並びにアダプター分子側から免疫沈降を行い、TNFR2 と結合し得る APP3 のアイソフォームの同定を行った。



**Fig. 11 Two differentially localized isoforms of APP3**

APP3 has two differentially localized isoforms. APP3m (57 kDa, 507 amino acids) has an N-terminal mitochondrial-targeting sequence (MTS) domain, and is imported into mitochondria where it localizes as a 51-kDa mature enzyme. APP3c (48 kDa, 428 amino acids), lacking MTS, is expressed in the cytosol. An NCBI Conserved Domain Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) predicts N-terminal aminopeptidase P domain (AMP\_N; amino acid 67–210) and prolidase domain (amino acid 252–490) in APP3m. In contrast, AMP\_N and prolidase domain in APP3c are predicted as amino acid 17-131 and 173-411, respectively.

```

      ┌───┐ APP3m
1  MPWLLSAPKL VPAVANVRGL SGCM LCSORR YSLQPVPERR IPNRYLGOPS
      └───┘
      ┌───┐ APP3c
51  PFTHPHLLRP GEVTPGLSQV EYALRRHKLM SLIQKEAQQG SGTDQTVVVL
101 SNPTYYSND IPYTFHQDNN FLYLCGFQEP DSILVLQSLP GKQLPSHKAI
151 LFVPRRDPSR ELWDGPRSGT DGAIALTGVD EAYTLEEFQH LLPKMKAETN
201 MVWYDWMRPS HAQLHSDYMQ PLTEAKAKSK NKVRGVQQLI QRLRLIKSPA
251 EIERMQIAGK LTSQAFIETM FTSKAPVEEA FLYAKFEFEC RARGADILAY
301 PPVVAGNRS NTLHYVKNNQ LIKDGMVLL DGGCESSCYV SDITRTWPVN
351 GRFTAPQAEL YEAVLEIQRD CLALCFPGTS LENIYSMLT LIGQKLKDLG
401 IMKNIKENNA FKAARKYCPH HVGHYLGMDV HDPDMPRSL PLQPGMVITI
451 EPGIYIPEDD KDAPEKFRGL GVRIEDDVVV TQDSPLILSA DCPKEMNDIE
501 QICSQAS

```

**Fig. 12 APP3 fragment peptides obtained from LC-MS/MS analysis**

APP3m and APP3c have exactly the same amino acid sequences except for a 79-residue domain (underlined section) at the N-terminus of APP3m. All fragment peptides (gray shaded bar) detected by proteomics analysis were located in the homologous sequences.



## 【実験材料と方法】

### HEK293T-TNFR2 細胞溶解液の作製

100Φ培養ディッシュにサブコンフルエント状態の HEK293T-TNFR2 細胞に対して、R2-7（終濃度 100 ng/mL）を 37℃で 0、3、10、30、120 分作用させた。第一章第一節「免疫沈降による TNF/TNFR2 複合体の精製」に従い、細胞溶解液を作製した。

### HA-tag 融合 APP3 発現ベクターの構築

APP3m 全長 [amino acid : 1-507] 及び APP3c 全長 [amino acid : 1-428] をコードする遺伝子配列を得るため、human APP3m 遺伝子を含む Flexi ORF クローン pFN21A-XPNPEP3 (Promega) を大腸菌にて増幅し、また、本プラスミドを鋳型として、*Sgf I* site を含む forward primer (5'-GC CGA GCG ATC GCC ATG TCT CTG ATC CAG AAG GAA GCT CAA GGG CAG-3') と *Pme I* site を含む reverse primer (5'-A ATT CGT TTA AAC AGA AGC CTG GCT GCA TAT CTG-3') を用いた PCR により human APP3c 遺伝子を増幅した。これらの増幅遺伝子を制限酵素処理した後、それぞれ pFC14A CMV Flexi Vector (Promega) に挿入することで、pFC14A-APP3m 及び pFC14A-APP3c ベクターを作製した。続いて、C 末端に HA-tag を融合した APP3 の発現ベクターを構築するために、作製したコンストラクトを鋳型に、それぞれ *Sfi I* site を含む forward primer (5'- TT ACG GCC ATT ACG GCC AGA GTA TTA ATA CGA CT -3') と *Sfi I* site を含む reverse primer (5'- GT GGC CGA GGC GGC CTT AGA AGC CTG GCT GCA -3') を用いて、PCR により再度 APPm 及び APP3c 遺伝子を増幅した。制限酵素処理した後、各増幅断片を pMEX-HA mammalian expression vector (Dualsystems) にライゲーションすることで、HA-tag 融合 APP3 発現ベクターとして、pMEX-APP3m-HA 及び pMEX-APP3c-HA を作製した。

### HA-tag 融合 APP3 遺伝子の導入（一過性発現）

HEK293T-TNFR2 細胞は、10% FBS、抗生物質及び 5 µg/mL Blasticidin S を含む D-MEM 中で継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。遺伝子

導入時に 60-70%の細胞密度になるように 100Φ培養ディッシュに播種した HEK293T-TNFR2 細胞に、Lipofectamine LTX (Invitrogen) を用いて、定法に従い、pMEX-APP3m-HA もしくは pMEX-APP3c-HA をトランスフェクションした。37℃で培養し、遺伝子導入 24 時間後の細胞を実験に用いた。

#### HA-tag に対する免疫沈降による TNFR2 複合体の精製

100Φ培養ディッシュにサブコンフルエント状態の前述の HA-tag 融合 APP3 発現 HEK293T-TNFR2 細胞に対して、R2-7 (終濃度 100 ng/mL) を 37℃で 0、3、10、30、120 分作用させた。また、APP3 を強制発現させていない HEK293T-TNFR2 細胞を対照として用いた。細胞を回収した後、第一章第一節「免疫沈降による TNF/TNFR2 複合体の精製」に従い、細胞溶解液を作製し、EZview Red Anti-HA Affinity Gel (Sigma-Aldrich) と 4℃で 1 時間反応させた。その後、150 μg/mL に調製した HA peptide (Sigma-Aldrich) を添加することで、免疫沈降産物を競合的に溶出した。

#### FLAG-tag に対する免疫沈降による TNFR2 複合体の精製

100Φ培養ディッシュにサブコンフルエント状態の HEK293T-TNFR2 細胞に対して、R2-7-FLAG (終濃度 100 ng/mL) を 37℃で 0、3、10、30、120 分作用させた。また、100Φ培養ディッシュにサブコンフルエント状態の HA-tag 融合 APP3 発現 HEK293T-TNFR2 細胞に対して、R2-7-FLAG (終濃度 100 ng/mL) を 37℃で 30 分作用させた。第一章第一節「免疫沈降による TNF/TNFR2 複合体の精製」に従い、細胞溶解液を作製し、anti-FLAG M2 agarose affinity gel による免疫沈降を行った。

#### Western Blotting

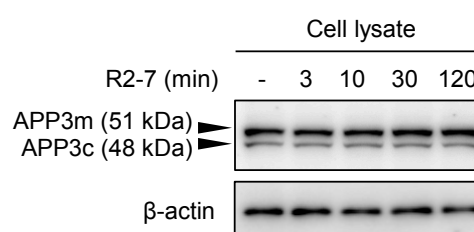
第一章第一節「Western Blotting」に従った。APP3 の検出には、1 次抗体として anti-human XPNPEP3 抗体、2 次抗体として anti-rabbit IgG HRP conjugate を用いた。TNFR2 の検出には、1 次抗体として Biotinylated anti-human TNFR2 抗体、2 次抗体として HRP-Streptavidin conjugate を用いた。TRAF2 の検出には、1 次抗体と

して anti-TRAF2 抗体、2 次抗体として anti-rabbit IgG HRP conjugate を用いた。β-actin の検出には、1 次抗体として monoclonal anti-β-actin 抗体 (Sigma-Aldrich)、2 次抗体として anti-mouse IgG-peroxidase 抗体 (Sigma-Aldrich) を用いた。

## 【結果と考察】

### HEK293T-TNFR2 細胞における APP3 の発現

HEK293T-TNFR2 細胞における APP3m もしくは APP3c の発現量及びその変化を調べるために、細胞を R2-7 で各時間刺激し、その細胞溶解液に含まれる APP3 量を Western blotting にて解析した。その結果、各アイソフォームを示す 2 つのバンドが検出され、これまでの報告と同様に、APP3m の発現量が、APP3c の発現量よりも高かった (Fig. 13)<sup>47</sup>。また、R2-7 刺激に伴う細胞内の APP3 の発現量に、時間依存的な変化は認められなかった。

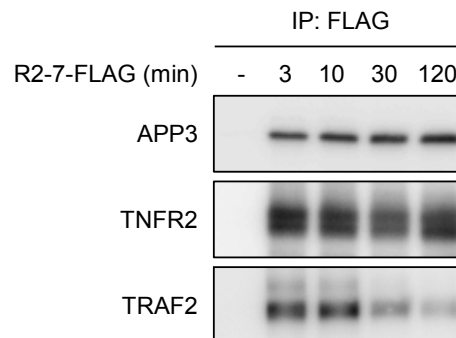


**Fig. 13 APP3 expression in HEK293T-TNFR2 cells**  
HEK293T-TNFR2 cells were stimulated with R2-7 (100 ng/mL) at the indicated time. After cell lysis, APP3 was detected by western blotting. β-actin served as a loading control.

### TNFR2 シグナル複合体と APP3 の結合

TNFR2 シグナル複合体に結合する APP3 量の時間依存的な変化を調べるために、R2-7-FLAG を作用させた HEK293T-TNFR2 細胞から回収した FLAG に対する免疫沈降産物に含まれる APP3、TNFR2 及び TRAF2 を Western blotting にて解析した。その結果、刺激 3 分後から各分子が検出され、APP3 が TNFR2 複合体に結合することが確認できた (Fig. 14)。APP3 の結合量は時間依存的に僅かながら増加する傾向にあるのに対し、TRAF2 の結合量は時間依存的に減少した。これまでの報告から、TNF の刺激に伴い、細胞質内の TRAF2 は経時的に分解されることがわかっており<sup>56</sup>、この現象により TRAF2 の結合量が低下したものと考えられた。また、TRAF2 は、自身に存在する TRAF-C ドメインと呼ばれる細胞内領域を介して、TNFR2 と直接結合することが知られている<sup>57</sup>。従って、APP3 が TRAF2 を介して TNFR2 に結合している場合、TRAF2

の分解とともに APP3 の結合量も時間依存的に減少すると考えられる。しかし、本結果から APP3 の結合量の低下は認められなかったことから、APP3 は直接 TNFR2 に結合している可能性が考えられた。さらに、検出された APP3 のバンドは 1 つであったことから、APP3m もしくは APP3c のどちらか一方のアイソフォームのみが TNFR2 に結合していると考えられたが、このバンドは、細胞溶解液から検出された APP3m のバンド位置と一致しており (data not shown)、APP3m であることが示唆された。



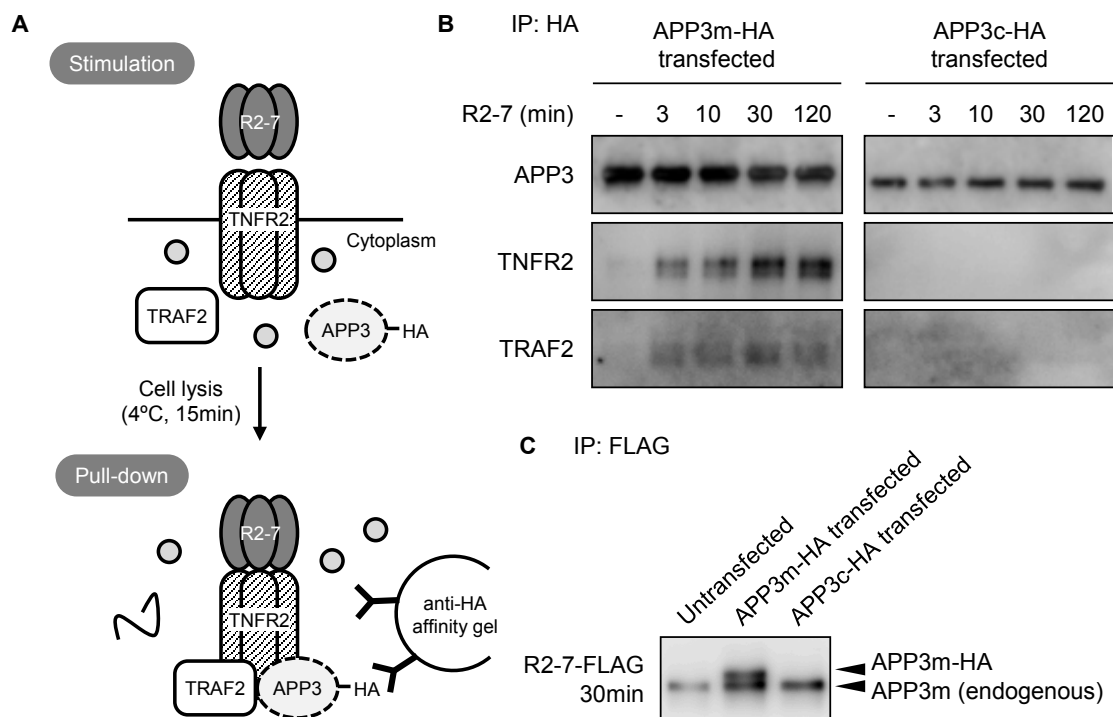
**Fig. 14 Recruitment of APP3 to the TNFR2 in signal transduction**

HEK293T-TNFR2 cells were stimulated with R2-7-FLAG (100 ng/mL) at the indicated time. After cell lysis, anti-FLAG immunoprecipitation followed by western blotting revealed that APP3 bound to TNFR2 and TRAF2

続いて、この複合体形成に関してさらに詳細に確認を行った。リガンド側からの免疫沈降産物の解析から、TNFR2 のシグナル伝達に関連して APP3m がレセプターと複合体を形成することが示唆されたが、TNFR2 に結合し得るアイソフォームが APP3m もしくは APP3c のどちらであるかを確定するために、APP3 に対する免疫沈降を行い、アダプター分子側から TNFR2 並びに TRAF2 の結合を調べた。まず、C 末端に HA-tag (アミノ酸配列 : YPYDVDPYA) を融合した APP3m もしくは APP3c を HEK293T-TNFR2 細胞に一過性に発現させた。R2-7 で各時間刺激したこれらの細胞について、非遺伝子導入細胞とともに、HA-tag に対する免疫沈降を行い、TNFR2 複合体を精製した (Fig. 15A)。この複合体に含まれるタンパク質を Western blotting にて解析した結果、APP3m を強制発現した細胞では、R2-7 刺激 3 分後から、APP3m に加えて TNFR2 や TRAF2 のバンドが認められ、APP3m が TNFR2 複合体に結合することが確認できた (Fig. 15B)。一方、APP3c を強制発現した細胞では、APP3c のバンドは確認できたものの、TNFR2 や TRAF2 は検出されなかった。非遺伝子導入細胞では、APP3、TNFR2、TRAF2 のいずれも検出されず (data not shown)、非特異的な結合などの影響はないものと考えられた。さらに、R2-7-FLAG で刺激した APP3m-HA 及

び APP3c-HA 強制発現細胞から得られた FLAG に対する免疫沈降産物を Western blotting にて解析した。その結果、いずれの細胞でも内因性の APP3m が検出されたのに対し、APP3m-HA 強制発現細胞では APP3m-HA のバンドも認められた(Fig. 15C)。

以上の検討から、TNFR2 シグナルの活性化に伴い、APP3m だけが TNFR2 に結合することが判明した。リガンド側並びにアダプター分子側のいずれの免疫沈降でも、刺激 3 分後から APP3m 及び TNFR2、TRAF2 の結合が認められたことから、APP3m は、シグナル伝達の初期段階から TNFR2 シグナル複合体に結合するものと考えられた。



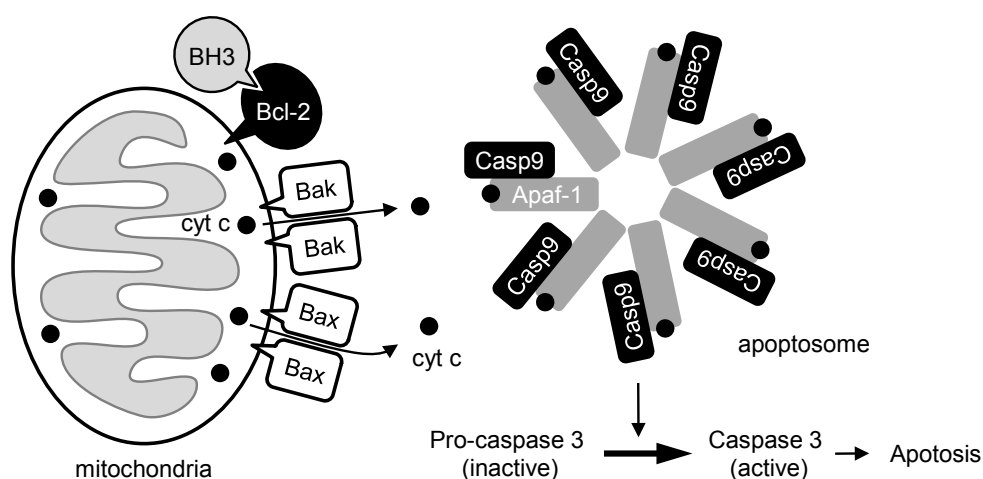
**Fig. 15 APP3m, but not APP3c binds to TNFR2**

(A) Scheme of TNFR2 signaling complex purification by HA-tag. In APP3m-HA transfected cells, APP3m-HA is recruited to intracellular domain of TNFR2 by R2-7 stimulation. After cell lysis, the TNFR2 signaling complex is pulled down using an anti-HA affinity gel. The complex is eluted by competition with an HA peptide. (B) HA-tagged APP3m (APP3m-HA) or APP3c-HA was transiently expressed in HEK293T-TNFR2 cells. R2-7 (100 ng/ml) stimulation followed by anti-HA immunoprecipitation was performed to determine the time-dependent manner of APP3m or APP3c recruitment to the TNFR2 signaling complex. (C) Anti-FLAG immunoprecipitation was performed using APP3-transfected HEK293T-TNFR2 after R2-7-FLAG (100 ng/ml) stimulation. Western blotting confirmed that endogenous APP3m was detected in cells transfected with both APP3m-HA and APP3c-HA. However, transfected APP3 was detected only in the APP3m-HA transfectant.

## 第二節 APP3 の細胞内局在の変化

APP3 はアイソフォームにより細胞内局在が異なり、通常状態では APP3m はミトコンドリアに、APP3c は細胞質に存在している。第二章第一節において、APP3m が TNFR2 へ結合することが判明したが、APP3m が細胞膜貫通型受容体である TNFR2 の細胞内領域と相互作用するためには、TNFR2 シグナルの活性化に伴い、APP3m が何らかの形でミトコンドリアから細胞質へと局在を変化させる必要があると考えられた。

ミトコンドリアに発現するタンパク質が TNFR2 シグナルに関与している知見は、これまでないが、TNFR1 シグナルにおいては、ミトコンドリアから放出されるタンパク質がアポトーシス誘導に重要な役割をもつことが知られている。この一例として、pro-survival protein である Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) の抑制を介したカスパーゼ活性化シグナルが挙げられる (Fig. 16)。TNFR1 の活性化に伴い、ミトコンドリア膜上に局在する Bcl-2 に BH3 (Bcl-2 homology 3) が結合すると、Bcl-2 が不活性化され、そこに引き寄せられた pro-apoptotic protein である Bax や Bak は細孔様の複合体を形成する。これによりミトコンドリア外膜の透過性が亢進すると、膜間腔に存在す



**Fig. 16 Activation of caspase cascade by mitochondrial apoptosome in TNFR1 signaling**

In TNFR1 signaling activation, suppression of Bcl-2 activity by BH3 proteins induce recruitment of Bax and Bak on mitochondrial outer membrane. The Bax and Bak form the pore complex and increase the permeability of mitochondrial outer membrane. Consequently cytochrome c (cyt c) which is located in intermembrane space is released to cytoplasm. An apoptosome formed with cyt c, Apaf-1 and caspase 9 (Casp9) in the cytoplasm activates a caspase cascade and induces apoptosis.

チトクローム c が細胞質に放出される。チトクローム c は、細胞質において Apaf-1 や Caspase 9 とともにアポトソーム (apoptosome) を形成し、不活性型として存在する Caspase 3 などのエフェクターカスパーゼを活性型へと変換する。その結果、細胞内のタンパク質が分解され、アポトーシスが誘導される<sup>41,58,59</sup>。そこで、TNFR2 シグナルの伝達機構においても、APP3 が類似の局在変化を示すのではないかと推察した。

本節では、TNFR2 シグナル伝達時の細胞内における APP3 の挙動を調べるために、蛍光染色により細胞内局在を観察した。さらに、細胞質及びミトコンドリアにおける APP3 の存在量と活性の変化を定量的に解析した。

### **【実験材料と方法】**

#### Venus 融合 APP3 発現ベクターの構築

第二章第一節「HA-tag 融合 APP3 発現ベクターの構築」にて作製した pMEX-APP3m-HA を鋳型に、*Nco* I site を含む forward primer (5'- CG ATC GCC ATG GCG CCT TGG CTG CTC TCA GCC CCC AAG CTG -3') と *Not* I site を含む reverse primer (5'- GT TGA AGC GGC CGC AGA AGC CTG GCT GCA TAT C -3') を用いた PCR により APP3m 遺伝子を増幅した。また、pMEX-APP3c-HA を鋳型に、*Nco* I site を含む forward primer (5'- CG ATC GCC ATG GCG TCT CTG ATC CAG AAG GAA GCT CAA GGG CAG AGT GG -3') と *Not* I site を含む reverse primer (5'- GT TGA AGC GGC CGC AGA AGC CTG GCT GCA TAT C -3') を用いた PCR により APP3c 遺伝子を増幅した。それぞれの遺伝子断片を制限酵素処理した後、クローニングサイトの 3'末端側に GFP 改変型蛍光タンパク質である Venus をコードする遺伝子を導入した pTriEx-3 vector (Merck) にライゲーションすることで、Venus 融合 APP3 発現ベクターとして、pTriEx-3-APP3m-Venus 及び pTriEx-3-APP3c-Venus を作製した。

#### 共焦点レーザー顕微鏡観察

HEK293T-TNFR2 細胞は、10% FBS、抗生物質及び 5 µg/mL Blasticidin S を含む D-MEM 中で継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。

Collagen Type I-Coated Chamber slide, 2 Chamber (IWAKI) に  $1 \times 10^5$  個/chamber の細胞を播種し、24 時間培養した。続いて、Lipofectamine LTX を用いて、定法に従い、pTriEx-3-APP3m-Venus 及び pTriEx-3-APP3c-Venus をトランスフェクションした。遺伝子導入 24 時間後に、終濃度 200 nM のミトコンドリア染色用蛍光プローブ MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen) を加えて、37°C で 30 分培養した後、R2-7 (終濃度 100 ng/mL) を 0 分、10 分、または 30 分作用させた。培養上清を除き、PBS で軽く洗浄した後、4% パラホルムアルデヒド (PFA) 含有 PBS にて室温で 20 分固定化を行った。PBS で洗浄した後、最後に DAPI 含有封入剤 (VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories) を用いて、細胞核の染色及びカバーガラスでの封入を行った。細胞の観察は、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica TCS SP2, Leica) を用いて行い、DAPI、Venus 及び MitoTracker Red の蛍光を検出した。なお、各蛍光の励起/測定波長は、DAPI 358/461 nm、Venus 515/528 nm、MitoTracker Red CMXRos 579/599 nm を用いた。

#### 細胞質/ミトコンドリアの分画

HEK293T-TNFR2 細胞は、10% FBS、抗生物質及び 5  $\mu$ g/mL Blasticidin S を含む D-MEM 中で継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。100 $\Phi$  培養ディッシュに約  $2 \times 10^7$  個の細胞を用意し、R2-7 (終濃度 100 ng/mL) を 10 分、または 30 分作用させた。細胞を回収した後、続いて、Mitochondrial isolation kit for cultured cells (PIERCE) を用いた分画遠心法により、細胞質とミトコンドリアの分画を行った。細胞質画分を回収した後、2% CHAPS/TBS 溶液にてミトコンドリアを溶解し、12,000  $\times g$  で遠心を行うことで、上清をミトコンドリア画分として回収した。対照 (0 分) として、R2-7 非刺激細胞も同様の操作を行った。

#### 細胞内 APP3 発現量の定量

第一章第一節「Western Blotting」に従い、前項「細胞質/ミトコンドリアの分画」で得られた分画試料中の APP3m 及び APP3c を検出した後、Image J を用いて、各



APP3 のバンド強度を定量した。3 回の Western Blotting の結果から得られた強度の平均値±標準偏差を算出し、非刺激時に対する各 APP3 の発現変動率を求めた。

#### 細胞内 APP3 の酵素活性の測定

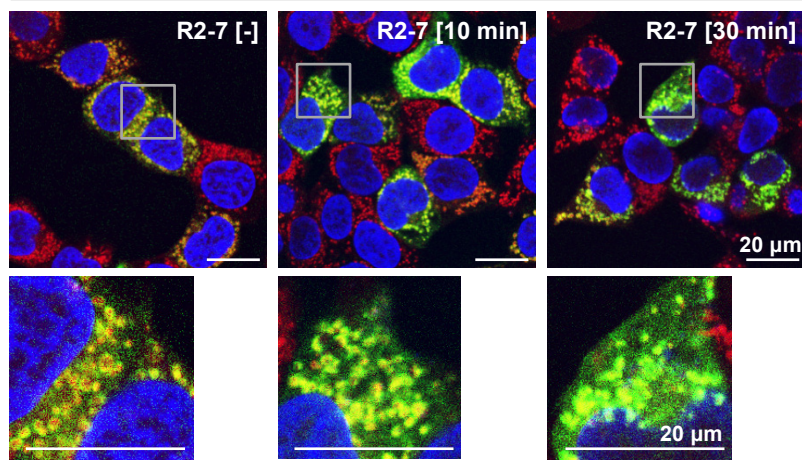
前項の「細胞質/ミトコンドリアの分画」にて得られた分画試料、または第二章第一節「FLAG-tag に対する免疫沈降による TNFR2 複合体の精製」で得られた免疫沈降産物を、96 穴ブラックプレート (Nunc) に 50  $\mu$ L/well にて添加した後、APP の蛍光基質である 100  $\mu$ M H-Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA (Bachem) 50  $\mu$ L を加えた。37°C で 15 分反応させた後、アミノベンゾイル (Abz) 基が発する蛍光を、蛍光マイクロプレートリーダー (SpectraMax ; Molecular Devices) を用いて、励起波長 320 nm 及び蛍光波長 410 nm にて測定した。

### **【結果と考察】**

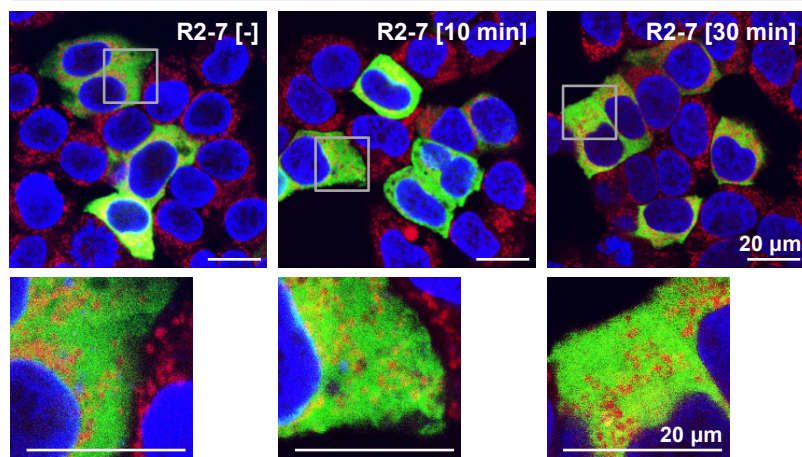
#### APP3 の細胞内局在の変化

細胞内における APP3 の挙動を調べるために、蛍光染色にて APP3 の細胞内局在を観察した。C 末端に蛍光タンパク質である Venus を融合した APP3m (APP3m-Venus) 及び APP3c (APP3c-Venus) を一過性に発現させた HEK293T-TNFR2 細胞を用いて、MitoTracker Red によるミトコンドリア染色を行った後、R2-7 刺激に伴う APP3 の細胞内局在の変化を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。APP3 (緑色)、ミトコンドリア (赤色)、細胞核 (青色) の蛍光をそれぞれ検出した画像を重ねた合わせたものを Fig. 17 に示した。その結果、APP3m-Venus を強制発現した細胞 (HEK293T-TNFR2-APP3m 細胞) では、R2-7 非刺激時においては、APP3m はミトコンドリアに局在しており、共局在を示す黄色を呈したが、刺激後 10 分、30 分と細胞質の緑色が増加しており、APP3m のミトコンドリアから細胞質への移行が観察された (Fig. 17A)。一方、APP3c-Venus を強制発現した細胞 (HEK293T-TNFR2-APP3c 細胞) では、APP3c は細胞質に広く分布して発現しており、R2-7 刺激による APP3c の局在変化は観察されなかった (Fig. 17B)。

**A** HEK293T-TNFR2-APP3m



**B** HEK293T-TNFR2-APP3c



**Fig. 17 Alteration of APP3 localization by TNF stimulation**

HEK293T-TNFR2 cells transiently expressing APP3m-Venus (A) or APP3c-Venus (B) were stained with 200 nM MitoTracker Red CMXRos for 30 min. The cells were then cultured with or without R2-7 (100 ng/mL) for 10 or 30 minutes, and fixed with 4% PFA. Cellular nuclei were stained with DAPI. Localization of APP3m and APP3c (green), mitochondria (red) and nuclei (blue) were visualized using a confocal laser scanning microscope (bar = 20 μm).

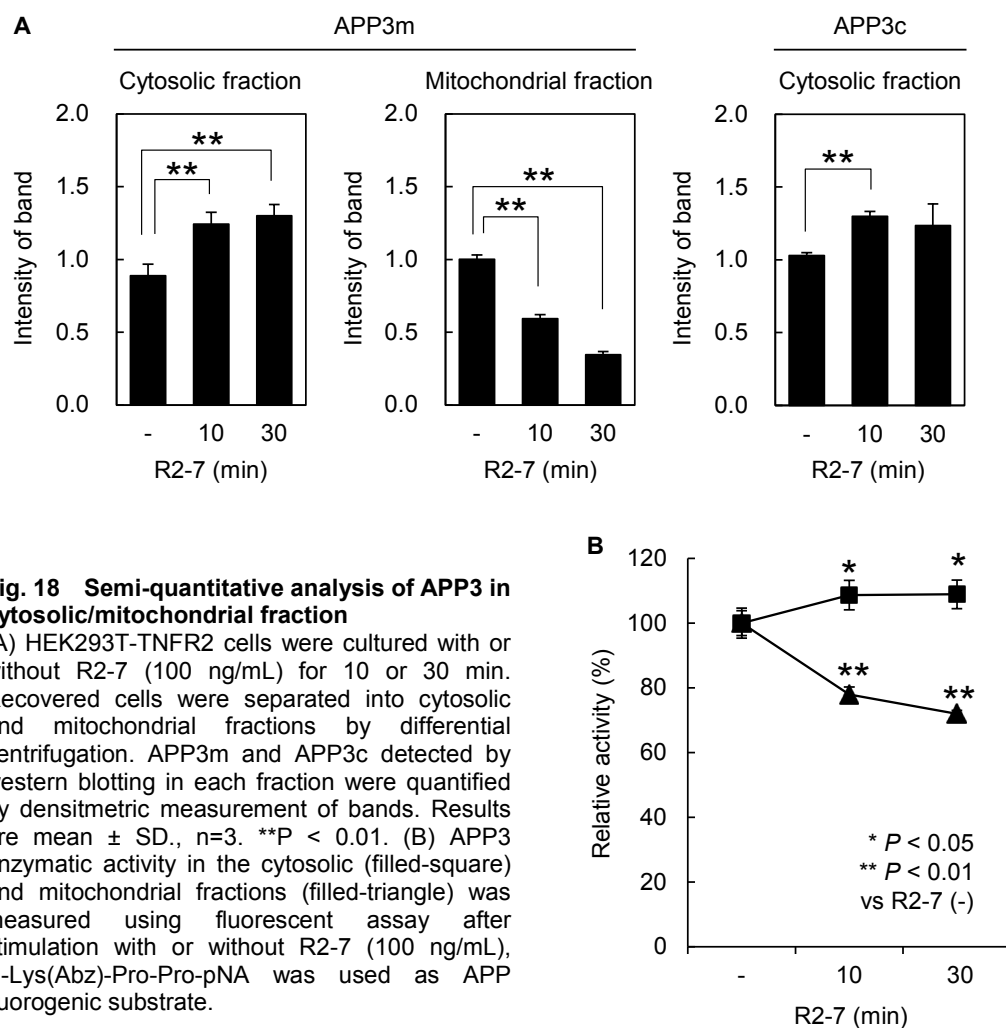
細胞質とミトコンドリアにおける APP3 発現量の変化

ミトコンドリアから細胞質への移行する APP3m を定量的に解析するために、細胞質及びミトコンドリアにおける APP3 の発現量を調べた。R2-7 非刺激及び刺激 10、30 分後の HEK293T-TNFR2 細胞から、分画遠心法により、細胞質とミトコンドリアを分画した。続いて Western blotting により APP3 を検出し、そのバンド強度を測定した。その結果、R2-7 刺激に伴い、細胞質画分の APP3m 量が増加したのに対し、ミ

トコンドリア画分の APP3m 量は大きく減少しており、いずれも刺激前に比べて発現量に有意な差が認められた (Fig. 18A)。一方、細胞質画分の APP3c 量は、刺激 10 分後に僅かに増加したものの、ミトコンドリア分画からは APP3c は検出されなかった。

### 細胞質とミトコンドリアにおける APP3 活性の変化

前項と同じ分画試料を用いて、細胞質とミトコンドリアにおける APP3 の酵素活性を解析した。アミノペプチダーゼ P の蛍光基質である H-Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA の切断に伴い発せられる蛍光量を測定した結果、細胞質画分では、R2-7 刺激 10 分、30 分と蛍光量の増大が認められ、APP3 活性が上昇したのに対し、ミトコンドリア画分の活性は低下した (Fig. 18B)。酵素活性を指標とした場合においても、発現量と同様の変

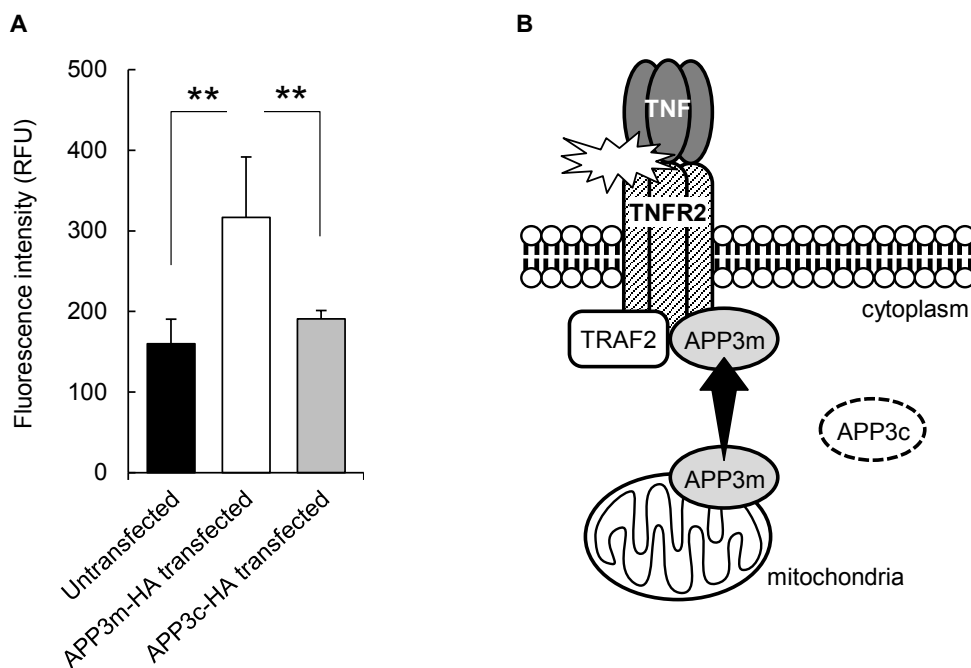


**Fig. 18 Semi-quantitative analysis of APP3 in cytosolic/mitochondrial fraction**

(A) HEK293T-TNFR2 cells were cultured with or without R2-7 (100 ng/mL) for 10 or 30 min. Recovered cells were separated into cytosolic and mitochondrial fractions by differential centrifugation. APP3m and APP3c detected by western blotting in each fraction were quantified by densitometric measurement of bands. Results are mean  $\pm$  SD., n=3. \*\*P < 0.01. (B) APP3 enzymatic activity in the cytosolic (filled-square) and mitochondrial fractions (filled-triangle) was measured using fluorescent assay after stimulation with or without R2-7 (100 ng/mL). H-Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA was used as APP fluorogenic substrate.

化が認められた。さらに、各 APP3 を一過性に強制発現させた HEK293T-TNFR2 細胞において、リガンドに対する免疫沈降産物の APP3 活性を解析した結果、APP3m 強制発現細胞だけで活性が上昇しており、APP3c 強制発現細胞では、非強制発現細胞と同程度の活性しか認められなかった (Fig. 19A)。従って、シグナル伝達時に、酵素活性を有する APP3m が TNFR2 に結合していることが示された。

Fig. 13 に示したように、R2-7 刺激による細胞内の APP3 発現量自体に大きな変化が認められないことを考慮すると、以上の結果から、リガンドの結合により TNFR2 が活性化すると、ミトコンドリアに局在する APP3m が細胞質へと移行し、TNFR2 に結合していると考えられた (Fig. 19B)。一方で、細胞質に局在する APP3c は関与していないと考えられ、アイソフォームによる機能の違いが判明した。



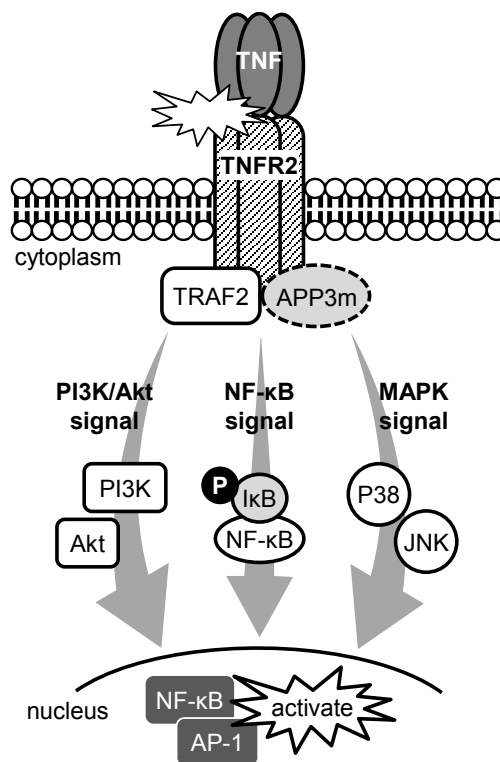
**Fig. 19 APP3m released from mitochondria to cytosol is recruited to TNFR2 complex**  
 (A) HEK293T-TNFR2 cells transiently expressing APP3m-HA or APP3c-HA were cultured with R2-7-FLAG (100 ng/mL). Anti-FLAG immunoprecipitation was performed after cell lysis. immunoprecipitation eluates from APP3m-HA overexpressing cells showed specifically higher enzymatic activity. \*\*P < 0.01. (B) Proposed model of TNFR2 signal transduction through APP3. APP3m is transferred from mitochondria to cytoplasm depending on TNFR2 activation, and recruited to TNFR2 intracellular domain. On the other hand, APP3c is not involved in TNFR2 signal transduction.

### 第三節 APP3 の細胞内シグナル伝達への影響

TNFR2 シグナルの活性化において、APP3m がミトコンドリアから細胞質へと移行していることが判明したことで、ミトコンドリアに何らかの APP3m の放出機構が存在することが示唆された。そこで、今後、この APP3m 放出機構について詳細な解析が進み、メカニズムが明確になれば、TNFR2 シグナルの制御につながる可能性が考えられた。従って、このシグナル制御を実現するためには、APP3m が TNF/TNFR2 を介したどのような細胞内シグナル伝達経路に参与しているのかを知ることが重要になる。これまでに、TNFR2 は、シグナル伝達の結果として転写因子である NF- $\kappa$ B や AP-1 を活性化し、様々な遺伝子の発現

を調節することが知られており<sup>11,31,60</sup>、レセプター下流のいくつかのシグナル伝達経路として MAPK (p38 MAPK, ERK, JNK) シグナル経路、NF- $\kappa$ B シグナル経路、及び PI3K/Akt シグナル経路などが関与していると考えられている (Fig. 20)。しかし、細胞内において、これらのシグナルは TNFR1 の下流にも存在しており、TNFR1/R2 両レセプターに相互作用する TRAF2 を介して、複雑に連携しながら機能すること (クロストーク) が知られている<sup>11</sup>。

本節では、APP3 の発現量が TNFR2 シグナルに与える影響について調べるため、TNFR2 指向性 TNF 変異体を用いて、TNFR1 シグナルを排除した状態で、TNFR2 選択的な活性化を行い、TNFR2 下流のシグナル伝達分子の発現変動を解析した。



**Fig. 20 TNFR2 signaling pathway**  
TNFR2 induces the activation of the transcription factor such as NF- $\kappa$ B and AP-1 through various intracellular signaling pathways (e.g. MAP kinase pathway, NF- $\kappa$ B pathway and PI3k/Akt pathway).

## **【実験材料と方法】**

### APP3m の一過性の強制発現

6 穴培養プレートに 60-70%の密度になるように播いた HEK293T-TNFR 2 細胞に対して、第二章第一節「HA-tag 融合 APP3 遺伝子の導入（一過性発現）」に従い、Lipofectamine LTX (Invitrogen) を用いて、pMEX-APP3m-HA をトランスフェクションした。37℃で培養し、遺伝子導入 24 時間後の細胞を実験に用いた。

### APP3 shRNA プラスミドを用いた一過性のノックダウン

6 穴培養プレートに 60-70%の密度になるように播いた HEK293T-TNFR2 細胞に対して、第二章第一節「HA-tag 融合 APP3 遺伝子の導入（一過性発現）」に従い、Lipofectamine LTX を用いて、1.5 µg human aminopeptidase P3 shRNA plasmid (Santa Cruz Biotechnology) をトランスフェクションした。37℃で培養し、遺伝子導入 48 時間後の細胞を実験に用いた。

### TNFR2 シグナル伝達におけるリン酸化シグナル分子の検出

6 穴培養プレートにサブコンフルエント状態の HEK293T-TNFR2 細胞及び前項「APP3m の一過性の強制発現」、「APP3 shRNA プラスミドを用いた一過性のノックダウン」にて作製した細胞に対して、R2-7 (終濃度 100 ng/mL) を 37℃で 3、10、30、120 分作用させた。また、非刺激の各細胞を 0 分として用いた。続いて、第二章第一節「HEK293T-TNFR2 細胞溶解液の作製」に従い、1 mL の細胞溶解液を調製した後、第一章第一節「Western Blotting」に従い、細胞溶解液中の MAPK (p38 MAPK, ERK, JNK)、NF-κB、PI3K/Akt 及び各リン酸化体を検出した。各 MAPK 及びリン酸化体の検出には、1 次抗体として、それぞれ anti-p38 MAPK 抗体及び anti-phospho-p38 MAPK 抗体 (Cell Signaling Technology)、anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) 抗体及び anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) 抗体 (Cell Signaling Technology)、anti-SAPK/JNK 抗体及び anti-phospho-SAPK/JNK 抗体 (Cell Signaling Technology)、2 次抗体として、すべて anti-rabbit IgG HRP conjugate (Cell Signaling Technology)

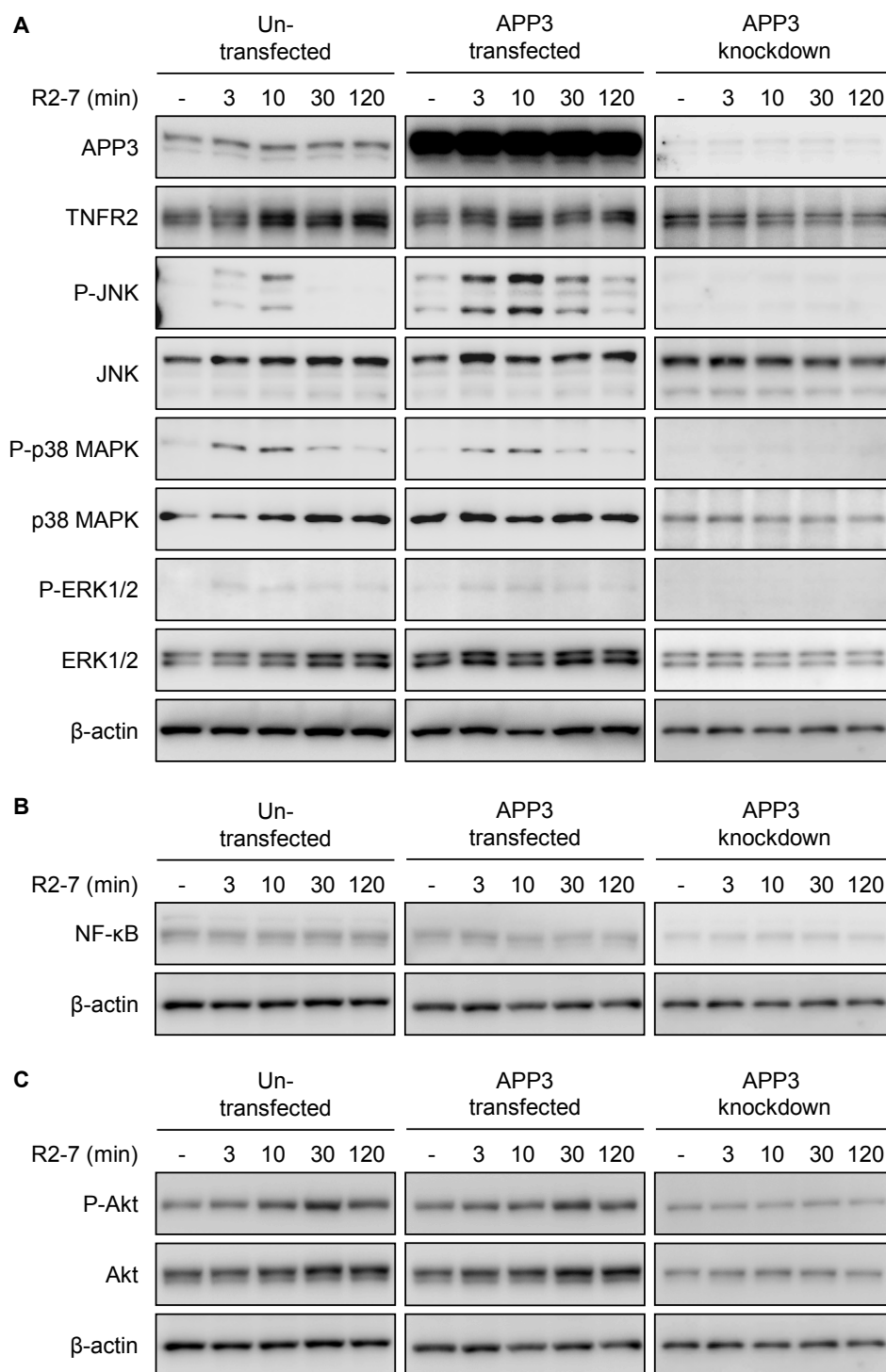
を用いた。NF- $\kappa$ B の検出には、1 次抗体として anti-NF- $\kappa$ B p65 抗体 (abcam)、2 次抗体として anti-rabbit IgG HRP conjugate (Cell Signaling Technology) を用いた。さらに、Akt 及び Phospho-Akt の検出には、1 次抗体として anti-Akt 抗体及び anti-phospho-Akt 抗体 (Cell Signaling Technology)、2 次抗体として anti-rabbit IgG HRP conjugate (Cell Signaling Technology) を用いた。また、APP3、TNFR2 及びローディングコントロールである $\beta$ -actin の検出は、第二章第一節「Western Blotting」に従った。

## 【結果と考察】

### APP3 の TNFR2 下流シグナルへの影響

APP3m を一過性に発現させた HEK293T-TNFR2 細胞、APP3 を一過性にノックダウンした HEK293T-TNFR2 細胞、及び遺伝子導入していない HEK293T-TNFR2 細胞を R2-7 (100 ng/mL) で 3、10、30、120 分刺激した後、R2-7 非刺激状態の各細胞を対照として、細胞内シグナル伝達分子である MAPK、NF- $\kappa$ B、Akt のリン酸化状態の変化を Western blotting にて解析した。

その結果、MAPK シグナルにおいて、JNK のリン酸化に影響が認められた (Fig. 21A)。遺伝子導入していない HEK293T-TNFR2 細胞では、R2-7 刺激 10 分後に、JNK のリン酸化が最大になったが、APP3m 強制発現細胞では JNK のリン酸化が全体的に亢進した。また、APP3 ノックダウン細胞では JNK のリン酸化はほとんど抑制された。一方、p38 MAPK については、APP3m の発現上昇による変化は認められなかったものの、APP3 の発現低下によるリン酸化の抑制が認められた。ERK については、APP3 によるリン酸化への影響はほとんど認められなかった。従って、APP3m の発現量の違いが、JNK のリン酸化に影響することが判明した。また、NF- $\kappa$ B シグナル (Fig. 21B) 及び PI3K/Akt シグナル (Fig. 21C) に関しては、APP3m の発現変化によるシグナルへの影響は認められなかった。以上の結果から、APP3m は、TNFR2 シグナルにおいて、JNK を介した AP-1 の活性化の制御に関与していると考えられた。



**Fig. 21 Influence of APP3 on MAPK, NF- $\kappa$ B or PI3K/Akt signals**

APP3m-HA over-expression plasmid and APP3 shRNA plasmid were transfected to HEK293T-TNFR2 cells and incubated for 24hours and 48hours, respectively. Then, cells were stimulated with or without R2-7 (100 ng/mL) at the indicated time. After cell lysis, phosphorylation of JNK, p38 MAPK, ERK1/2 were detected by western blotting (A). Expression of APP3 and TNFR2 were confirmed in the same manner.  $\beta$ -actin served as a loading control. NF- $\kappa$ B signal (B) and PI3K/Akt signal (C) were also confirmed under the same condition.



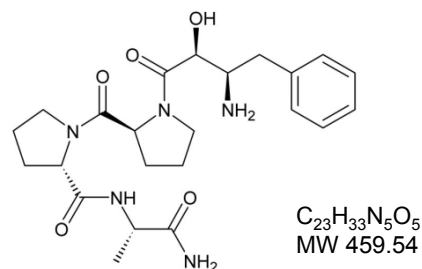
#### 第四節 APP3 の潰瘍性大腸炎への関与

第三節までの結果から、APP3 が TNFR2 シグナルに関わりをもつことが示された。しかし、自己免疫疾患の分子病態解明のためには、実際に生体において、APP3 がどのような機能を担っているのかを解析する必要があると考えられた。自己免疫疾患の一つである潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis : UC) は、大

腸粘膜が傷害され、びらんや潰瘍を形成する炎症性の疾患であり、特定疾患に指定されている。30 歳以下の成人で発症が多く、下痢や血便などの症状を呈し、再燃と寛解をくり返す。病因は不明であるが、腸管局所における過剰な免疫応答が関与していると考えられており<sup>65,66</sup>、中等症から重症の患者に対しては、TNF 中和抗体であるインフリキシマブやアダリムマブが治療に用いられている。そこで、TNF 関連疾患の炎症病態における APP3 の機能を解析するため、一例として、発症・悪化に TNF シグナルが関与する潰瘍性大腸炎<sup>62-64</sup>を対象とした APP3 の阻害実験を試みた。

現在、アミノペプチダーゼ P 選択的阻害剤として、分子量約 460 の低分子化合物である Apstatin が知られている (Fig. 22)。これまでに、Apstatin による APP2 の阻害効果を期待して、心血管イベントリスクの抑制を目指した基礎研究が精力的に行われてきた。その結果、ラットを用いた実験において、ブラジキニンの血圧抑制効果の増強<sup>61</sup>や心臓における虚血再灌流障害の減少<sup>50</sup>、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害剤との併用による大動脈縮窄高血圧モデルの血圧の正常化<sup>51,52</sup>などの効果が報告され、Apstatin の低分子医薬品としての可能性が示唆されている。

本節では、まず *in vitro* における Apstatin の APP3 阻害効果及び TNFR2 シグナルへの影響について調べた。さらに、*in vivo* において APP3 阻害による病態変化を解析するために、潰瘍性大腸炎モデルであるデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発大腸炎モデルマウスへの Apstatin の投与実験を行った。



**Fig. 22 Chemical structure of apstatin**  
Apstatin is a low molecular weight (LMW) inhibitor of aminopeptidase P.

## **【実験材料と方法】**

### Apstatin

アミノペプチダーゼ P 阻害剤として、分子量 459.54 の低分子化合物である Apstatin (N-[(2S,3R)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl]-Pro-Pro-Ala-NH<sub>2</sub>) (Santa Cruz Biotechnology) を用いた。

### Apstatin の APP3 阻害活性の測定

第二章第一節「HA-tag 融合 APP3 遺伝子の導入（一過性発現）」に従い、HEK293T-TNFR2 細胞に pMEX-APP3m-HA をトランスフェクションし、24 時間後の細胞を実験に用いた。細胞を回収した後、第二章第一節「HA-tag に対する免疫沈降による TNFR2 複合体の精製」に従い、HA-tag に対する免疫沈降を行うことで、APP3m を精製した。続いて、第二章第二節「細胞内 APP3 の酵素活性の測定」に従い、APP3m 溶液 50  $\mu$ L に、終濃度 1、10 及び 100  $\mu$ M の Apstatin を添加した後、100  $\mu$ M H-Lys(Abz)-Pro-Pro-pNA 50  $\mu$ L を加えた。37°C で 15 分反応させた後、蛍光マイクロプレートリーダーにて、励起波長 320 nm 及び蛍光波長 410 nm の測定を行った。

### TNFR2 シグナル伝達分子のリン酸化に対する Apstatin の影響の解析

6 穴培養プレートにサブコンフルエント状態の HEK293T-TNFR2 細胞に、終濃度 100  $\mu$ M の Apstatin を添加した後、37°C で 30 分培養した。続いて、第二章三節「TNFR2 シグナル伝達におけるリン酸化シグナル分子の検出」に従い、R2-7（終濃度 100 ng/mL）を 37°C で 3、10、30、120 分作用させた細胞及び R2-7 非刺激細胞を用いて、MAPK (p38 MAPK, ERK, JNK)、NF- $\kappa$ B、Akt 並びに各リン酸化体の検出を行った。

### 実験動物

C57BL/6N マウス（雌性、8 週齢）を日本 SLC 株式会社より購入した。なお、全ての動物実験は、独立行政法人医薬基盤研究所における動物実験規程に則り行った。

## デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発大腸炎モデルマウスの作製

マウスは、一般的な飼育ケージを用いて、12 時間照明にて、自由に水と餌を摂取できる状態で飼育した。2.5% (w/v) デキストラン硫酸ナトリウム (Dextran sulfate sodium salt : DSS, MW 36,000-50,000) (MP Biomedicals) 水溶液を 1 週間自然給水させたマウス (1st サイクルマウス) に、1 週間通常の水を与えた後、さらに 1 週間 2.5% DSS 水溶液を自然給水させたマウスを大腸炎モデルマウス (2nd サイクルマウス) として用いた。

## Apstatin の投与

2nd サイクルマウスに対して、生理食塩水 (Saline) にて溶解した Apstatin を 2  $\mu$ g/mouse (0.1 mg/kg) で、Day 1-7 の 1 週間連日腹腔内投与 (1 日 1 回) した。対照群には、Apstatin 溶液と等量の Saline を腹腔内投与した。

## 体重及び大腸の長さの測定

DSS 非投与 (Normal) マウス群は 5 匹、1st サイクルマウス及び 2nd サイクルマウス群は各 6 匹を用いた。Day 1、4、6、8 に各マウスの体重 (g) を測定し、各群の平均値 $\pm$ 標準偏差を算出した。また、Day 8 経過後のマウスを麻酔下で腹部切開し、盲腸下部の腸管組織を摘出した後、大腸部位の長さ (cm) を測定した。

## 病理組織解析

Day 8 に摘出したマウス大腸組織を、10%中性緩衝ホルマリン固定液を用いて固定化した後、パラフィン包埋した。マイクロトームにて 3  $\mu$ m 切片を作製し、スライドに貼り付けた後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った組織を観察した。炎症所見から、①びらん (Epithelial erosion)、②潰瘍 (Ulceration)、③炎症性細胞浸潤 (Inflammatory cell infiltration)、④繊維芽細胞増生 (Fibroblastic Hyperplasia)、⑤浮腫 (Edema) の 5 項目について、重症度を示す 5 段階の病理スコア「0 : 炎症なし 1 : 極軽度 2 : 軽度 3 : 中等度 4 : 重度」で評価し、各項目の平均値を算出した。

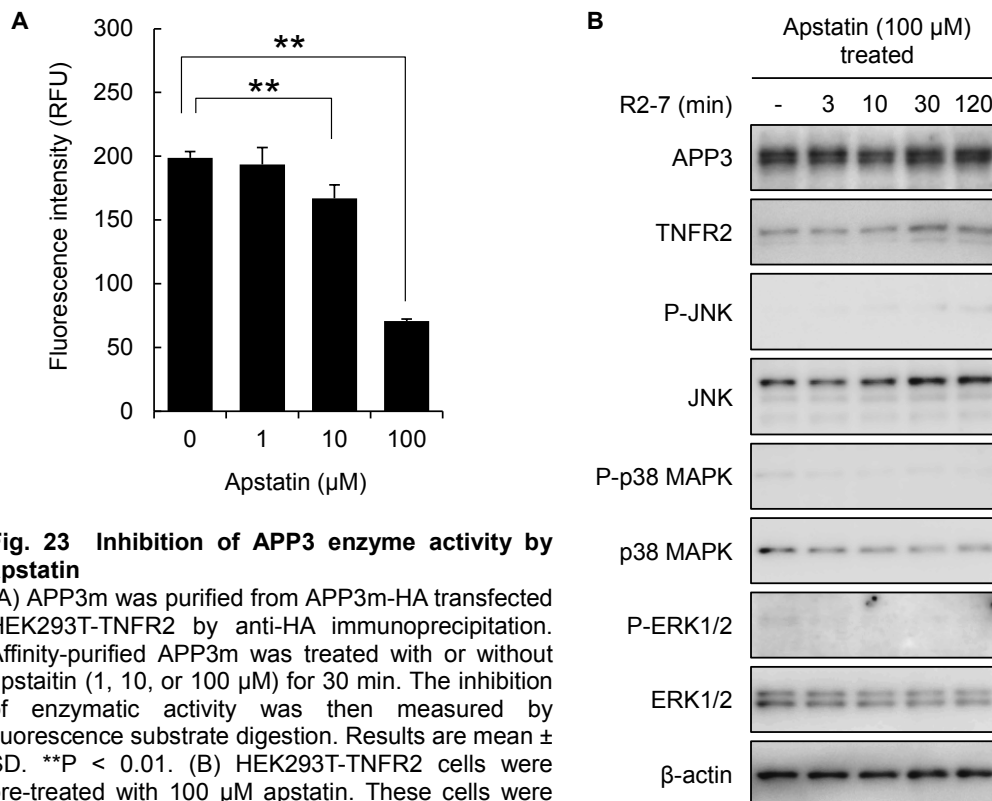
## 【結果と考察】

### Apstatin の APP3 阻害活性

APP3 に対する Apstatin の阻害活性を調べるため、HEK293T-TNFR2 細胞から、一過性に発現させた APP3 を精製し、終濃度 1、10、100  $\mu\text{M}$  の Apstatin を加えた時の APP3 の蛍光基質の切断活性を評価した。その結果、Apstatin の濃度依存的に蛍光強度が低下しており、Apstatin が APP3 阻害活性をもつことがわかった (Fig. 23A)。

### TNFR2 シグナルに対する Apstatin の影響

第二章第三節「APP3 の TNFR2 下流シグナルへの影響」の結果から、APP3 が関与すると考えられる TNFR2 下流の MAPK シグナルに対する Apstatin の影響を調べるため、Apstatin を作用させた HEK293T-TNFR2 細胞における各 MAPK 及びリン酸化



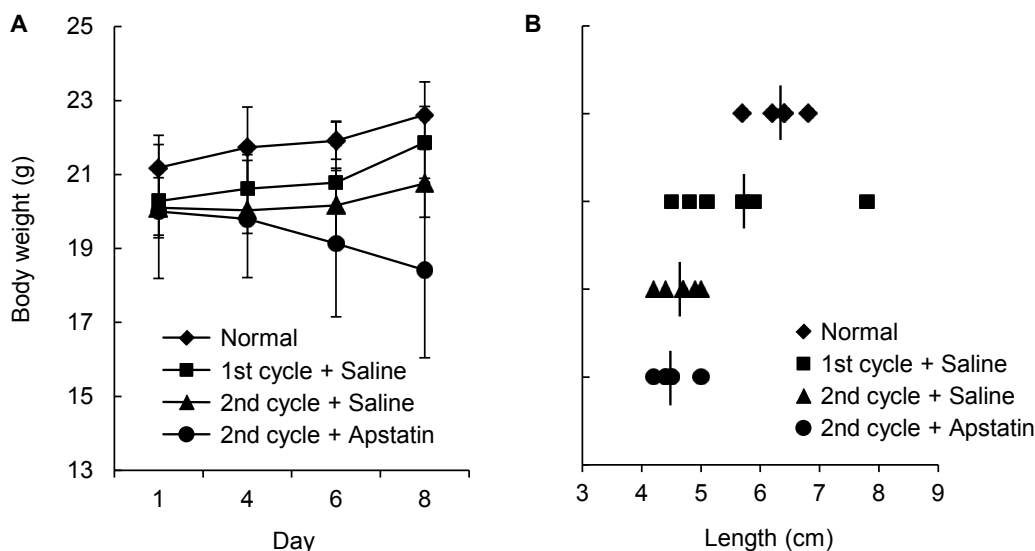
**Fig. 23 Inhibition of APP3 enzyme activity by apstatin**

(A) APP3m was purified from APP3m-HA transfected HEK293T-TNFR2 by anti-HA immunoprecipitation. Affinity-purified APP3m was treated with or without apstatin (1, 10, or 100  $\mu\text{M}$ ) for 30 min. The inhibition of enzymatic activity was then measured by fluorescence substrate digestion. Results are mean  $\pm$  SD. \*\* $P < 0.01$ . (B) HEK293T-TNFR2 cells were pre-treated with 100  $\mu\text{M}$  apstatin. These cells were stimulated with R2-7 (100 ng/mL). After cell lysis, phosphorylation of JNK, p38 MAPK or ERK were detected by western blotting, as well as expression of APP3 and TNFR2.

体を Western blotting にて解析した。その結果、Fig. 21 において APP3 をノックダウンした場合と同様に、JNK のリン酸化の抑制が認められた (Fig. 23B)。さらに、p38 MAPK と ERK のリン酸化も抑制された。また、NF- $\kappa$ B 及び PI3K/Akt については、APP3 をノックダウンした場合と同様に、シグナルに大きな変化は認められなかった (data not shown)。従って、Apstatin による APP3 の阻害は、TNFR2 シグナルにおいて、APP3 ノックダウンと同様の影響を及ぼすものと考えられた。

### 大腸炎モデルマウスの体重変化及び大腸の長さ

潰瘍性大腸炎の病態と APP3 の関連を明らかにするため、Apstatin を連日投与した DSS モデルマウスの経日的な体重変化を測定するとともに、投与終了後の大腸の長さを観察した。Day 1、4、6、8 のマウスの体重を測定した結果から、2nd サイクルマウスは、Normal マウスや 1st サイクルマウスに比べて体重の増加が抑えられる傾向にあり、大腸炎の悪化が示唆された。さらに、2nd サイクルマウスに Apstatin を投与した場合には、体重が減少する傾向が認められた (Fig. 24A)。また、Day 8 において摘



**Fig. 24 Body weight and colon length of mouse in DSS model**

Apstatin (2  $\mu$ g/mouse) or saline was i.p. injection to DSS model mouse ( $n=6$ ) every day. Normal mouse ( $n=5$ ) was used as control. (A) Body weight was measured on day 1, 4, 6, 8. All values represent the mean  $\pm$  SD. (B) After isolation of colon, the length was measured on day 8. All mice have *ad libitum* access to drinking water (filled diamond and filled square) or 2.5% DSS water (filled triangle and filled circle).

出した大腸の長さを測定した結果、Apstatin を投与した 2nd サイクルマウスでは、他群のマウスに比べて、大腸が短い傾向が認められた (Fig. 24B)。従って、Apstatin の投与による APP3 の阻害が、大腸炎の悪化を誘発している可能性が考えられた。

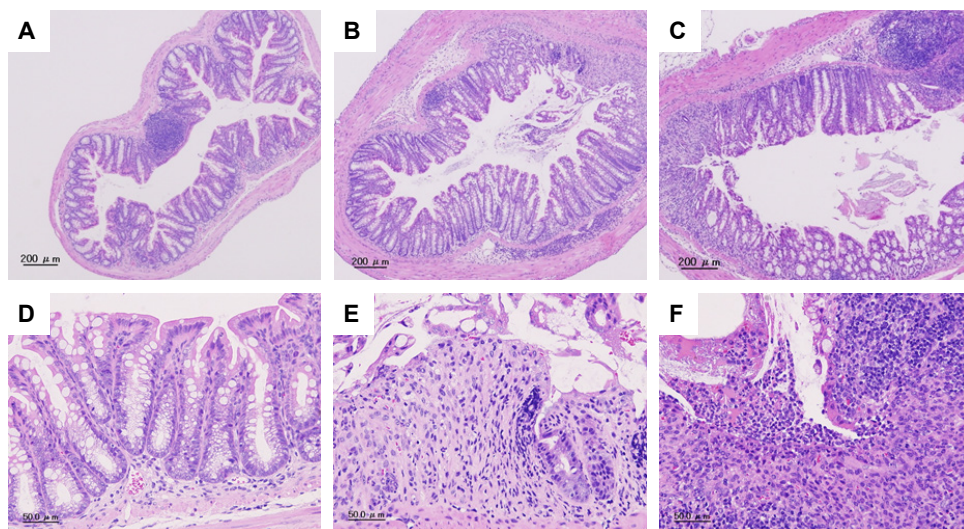
### 大腸の病理組織解析

大腸組織の炎症に対する Apstatin の影響について調べるため、Day 8 に摘出した Normal マウス (#1-5)、2nd サイクルマウス (#1-6) 及び Apstatin を投与した 2nd サイクルマウス (#1-6) の大腸の病理組織の観察を行い、炎症所見から、重症度を “0 : 炎症なし” から “4 : 重度” までの 5 段階の病理スコアで評価した (Table 3)。その結果、Normal マウスに比べて、2nd サイクルマウスでは病理スコアが高値を示し、大腸炎の症状を呈した。さらに、Apstatin を投与した 2nd サイクルマウスでは、びまんや炎症性細胞の浸潤、浮腫の病理スコアが、より高い値を示しており、大腸炎の重症化が認められた。実際に、Apstatin を投与したマウスの大腸組織の HE 染色像では、炎症性細胞の浸潤が顕著に認められた (Fig. 25)。以上のことから、APP3 の阻害により潰瘍性大腸炎の病態悪化が引き起こされると考えられ、炎症部位において TNF-TNFR2 シグナルの破綻が影響を及ぼしている可能性が示唆された。

**Table 3. Symptom severity in DSS-induced colitis mouse model**

	Normal					2nd cycle						2nd cycle + apstatin (0.1 mg/kg)								
	Score average	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	Score average	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6	Score average	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 6
Epithelial erosion	0.0	0	0	0	0	0	0.8	1	0	0	2	2	0	1.3	3	2	1	0	1	1
Ulceration	0.0	0	0	0	0	0	0.0	0	0	0	0	0	0	0.2	0	1	0	0	0	0
Inflammatory cell infiltration	0.0	0	0	0	0	0	3.0	3	2	3	3	4	3	3.2	4	3	3	3	3	3
Fibroblastic hyperplasia	0.0	0	0	0	0	0	2.7	3	1	3	3	3	3	2.7	3	3	3	3	1	3
Edema	0.0	0	0	0	0	0	1.3	0	2	1	2	0	3	1.8	2	0	3	3	0	3

Symptom severity was scored on a scale of 0 to 4; 0 = normal, 1 = very mild, 2 = mild, 3 = moderate, 4 = severe. Average scores of each group (#1-5 or #1-6) were shown.



**Fig. 25 Histological analysis of colon tissue in DSS induced colitis mouse model**  
 Representative hematoxylin and eosin (HE)-stained colon tissues from Normal mouse (A, D), 2.5% DSS *ad libitum* mouse (B, E), or 2.5% DSS *ad libitum* mouse treated with apstatin (2  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ) *i.p.* once a day (C, F). Each colon tissue was prepared at day 8. Bar = 200  $\mu\text{m}$  (A-C) and 50  $\mu\text{m}$  (D-F).

## 第五節 小活

本章では、TNFR2 シグナル伝達における APP3 の機能解析を行った。まず、*in vitro* における APP3 と TNFR2 の結合について解析した。その結果、ミトコンドリアに局在する APP3m だけが TNFR2 へ結合することが判明し、細胞質に発現する APP3c は TNFR2 シグナルへは関与していないと考えられた。APP3m と APP3c は、N 末端の 79 アミノ酸を除いて全く同じ配列である。従って、この領域に TNFR2 と相互作用する配列が含まれており、両 APP3 の結合様式に違いが生じていると考えられた。また、両 APP3 の細胞内局在を検討した結果、TNFR2 シグナルの活性化に伴い、APP3m がミトコンドリアから細胞質へ移行することが明らかになり、さらに、APP3m の発現量の変化により、JNK のリン酸化が影響を受けることが判明した。JNK のリン酸化を誘導する具体的なシグナル経路については不明であるため、さらに詳細な解析が必要ではあるが、TNFR2 がリガンドの刺激を受けると、ミトコンドリアに局在する APP3m が細胞質へと移行し、アダプター分子として TNFR2 に結合することで、TNFR2 下流の JNK

シグナルを活性化させるという、新たな TNFR2 シグナル伝達制御機構の存在が示された。現在のところ、APP3 がミトコンドリアに局在している生理的な意義については分かっていないが、理由の一つとして、APP3 がプロテアーゼ活性をもつことから、定常時は他のタンパク質に及ぼす影響を低減し、シグナル伝達時のみ APP3m を細胞質へと放出するため、ミトコンドリアが貯蔵庫の役割を担っているのではないかと推測している。また、ミトコンドリアからの APP3m の放出機構については、どのようにして TNFR2 からの情報が伝わっているのか、どのようにしてミトコンドリア外膜の透過性が向上しているのかなど不明な点が多く残っており、これらの解明が課題である。

次に、APP3 が生理機能にどのような影響を及ぼすのか、*in vivo* におけるフェノタイプについて潰瘍性大腸炎モデルマウスを用いた解析を行った。その結果、アミノペプチダーゼ P 阻害剤である Apstatin の投与により、大腸炎の病態が悪化することが判明し、APP3 の阻害による TNFR2 シグナルの抑制が関与しているという仮説のもと、APP3 の機能を保持することで、大腸炎の悪化を防ぐことができる可能性が示された。Apstatin は、アミノペプチダーゼ P ファミリーである APP1、APP2 及び APP3 をすべて阻害することから、APP3 ノックアウトマウスを用いた研究等を行い、APP3 特異的な関与について明らかとしていく必要がある。しかしながら、今回の疾患モデルマウスにおいて観察された病態の悪化は、TNFR2 ノックアウトによって起こる病態の悪化と類似しており<sup>62-64</sup>、APP3 が TNFR2 シグナルを介した生体保護作用に関わることが示唆された。今後は、自己免疫疾患の病態発生機序において重要な役割を示す IL-1 $\beta$ や IL-6 等の炎症性サイトカイン産生や制御性 T 細胞 (Treg) の機能に対して、APP3 がどのように影響するかなどを調べ、TNFR2 シグナルとの関連についてさらに詳しく解析を行う予定である。

本研究において、TNFR2シグナル伝達機構における APP3 の新たな機能が判明し、疾患との関連も示唆された。今後さらに APP3 の役割が明らかとなることで、自己免疫疾患の分子病態解明が進展すれば、将来的に、細胞内分子を標的とした TNFR2 選択的なシグナルの制御が実現するかもしれない。



## 総括

シグナル伝達は、細胞の増殖や分化、細胞死など、生命活動に重要となる生理機能を幅広く制御する生体メカニズムであり、この伝達機構の異常が、自己免疫疾患やがんなど重篤な疾患の発症・悪化に関連することが明らかとなってきた。近年、これらの疾患の発症や悪化に関与する細胞内シグナル伝達機構をターゲットとした分子標的薬が続々と開発され、臨床において高い治療効果を発揮している。しかし、生体内では様々なシグナルが複雑に絡み合っており、未だ機能の不明なシグナルも数多く存在する。

その一つとして、古くから認知されてきたものの、未だに詳細が明らかになっていない TNFR2 シグナルが挙げられる。自己免疫疾患の発症・悪化に関わる TNF シグナルのうち、特に TNFR2 は、生体の保護的な役割を担うことが動物モデル実験や臨床結果から示唆されており、そのシグナル伝達機構の解明は重要事項であると考えられてきた<sup>17</sup>。しかし、リガンドである可溶性 TNF の TNFR2 への結合親和性の低さに加え、TNFR2 自体の発現量が低いこと、さらに、発現する細胞のポピュレーションが限局されている等の理由により、解析が進捗してこなかったのが現状であった。そこで、本研究では、シグナル伝達機構の解析を目的に、ファージ表面提示法を駆使して独自に開発した TNFR2 指向性 TNF 構造変異体を用いて、TNFR2 の新たなアダプター分子の探索を試み、APP3 を見出すことに成功した。

続いて、APP3 の機能解析を行った結果、その発現上昇に伴い JNK のリン酸化が亢進しており、APP3m が JNK のリン酸化を介して転写因子を活性化するシグナル伝達機構の存在が明らかとなった。従って、TNF の刺激により、APP3 はシグナル伝達分子として TNFR2 と複合体を形成し、TNFR2 を起点とした MAPK リン酸化カスケードを介して、他のタンパク質の活性調節を行っていると考えられた。APP3 はプロリン特異的エキソペプチダーゼであるため、標的となる基質タンパク質は限定されると考えられるが、これまでにその基質に関する報告はなく、どのような種類のタンパク質を切断しているかは不明である。また、APP3 はリガンド刺激の時間内では、プロテアーゼ活性を持った状態で TNFR2 に結合していると考えられるため、JNK や MAPK 等の可逆的なり

ン酸化反応を制御するためには、APP3 が分解される、あるいは APP3 を不活化する内因性物質が産生されるなど、APP3 自体の活性制御機構が存在する可能性が考えられた。従って、より詳細な TNFR2 シグナル伝達機構を知るためには、今後、タンパク質ライブラリー<sup>67,68</sup> や疾患変動タンパク質データベース<sup>55</sup> などを活用した APP3 基質の探索、APP3 のプロテアーゼ活性制御機構や分解機構の解明などが期待される。

また、本研究では、ミトコンドリアに局在する APP3m が、TNFR2 シグナルの活性化に伴い細胞質へと放出されることを明らかとした。現在のところ、APP3m がミトコンドリアに局在する生理的な意義、また TNFR2 からミトコンドリアへの情報伝達や APP3m 放出過程におけるミトコンドリア外膜の透過性などの制御メカニズムについては不明な点が多い。しかし近年、ミトコンドリアが単なるエネルギー産生のみであるだけでなく、多彩な生理機能を有することが明らかとなり、遺伝的要因や疾患、加齢などによるミトコンドリア機能の低下が、糖尿病<sup>69</sup> やがん<sup>70</sup>、神経変性<sup>71</sup> などに関与することが分かってきている。このようなミトコンドリアの機能異常が、APP3 の発現低下や放出機構の破綻に関与することで、自己免疫疾患の発症や病態の悪化を引き起こすという可能性も十分に考えられる。特に、今回明らかとなった TNFR2 刺激に伴うミトコンドリアからの APP3m の放出は、TNFR2 シグナル伝達機構の鍵となる現象の一つであると考えられるため、APP3m 放出機構を含めた TNFR2 シグナルにおけるミトコンドリアの関与についても解明していく必要がある。さらに、APP3 ノックアウトマウスを作製し、疾患モデルでの解析を行うことで、潰瘍性大腸炎のみならず、関節リウマチや多発性硬化症など各種自己免疫疾患における APP3 の影響を調べ、APP3 が病態の改善または悪化にどのように関わるのかについても解明していきたいと考えている。

以上のように、本研究において解析できたシグナル伝達機構は、その一端であり、まだ不明な点も多く、TNFR2 シグナルの解明は緒に就いたばかりである。しかしながら、本研究によって TNFR2 の新たなシグナル伝達制御機構の存在を明らかにできたことは、自己免疫疾患など TNF 関連疾患の分子病態解明に向けて大きな意義をもつと考えており、本シグナル伝達機構を創薬ターゲットとした新たな分子標的治療薬の開発に大きく貢献できることを期待している。

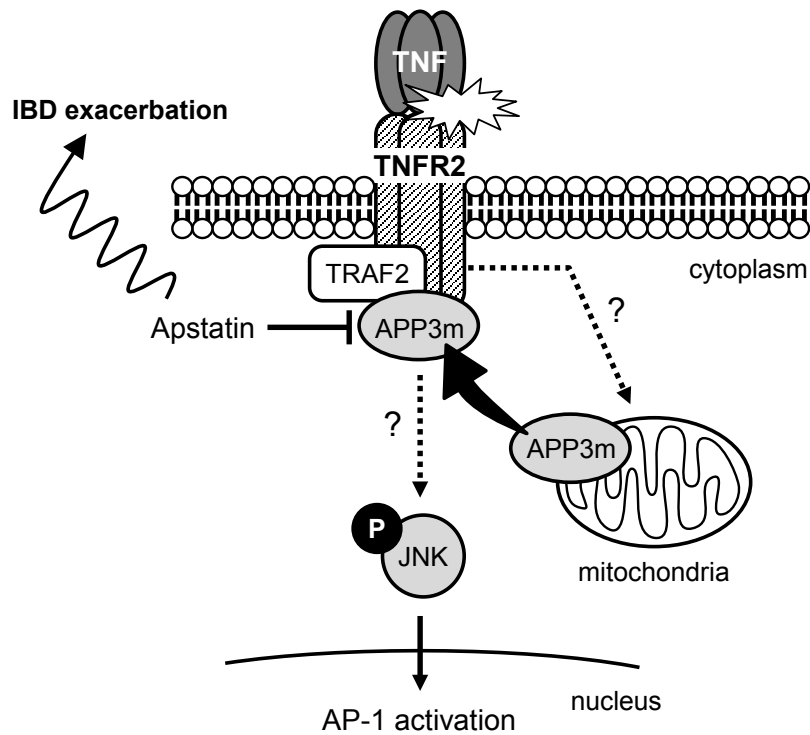
## 結論

本博士論文では、自己免疫疾患の分子病態解明に向けて、創薬標的の一つとなる得る TNFR2 シグナル伝達機構を解明する目的で、TNFR2 シグナル関連タンパク質の探索及びその機能解析を行った。その結果、以下の新しい知見を得た。

1. 新たに構築した TNFR2 安定発現細胞から、TNF 変異体 R2-7 の刺激により形成される TNFR2 シグナル複合体を精製し、プロテオミクス的手法により解析した結果、新規 TNFR2 アダプター分子としてアミノペプチダーゼ P3 (APP3) を見出した。
2. APP3 の機能解析の結果から、TNF が細胞膜上の TNFR2 に作用すると、ミトコンドリアに局在する APP3m が細胞質へと移行し、TNFR2 の細胞内領域に結合すること、さらに APP3m により JNK のリン酸化が亢進することを明らかとした。
3. DSS 誘発大腸炎モデルマウスを用いて、Apstatin による APP3 阻害の影響について解析した結果、TNFR2 シグナルの破綻が原因と考えられる大腸上皮組織傷害の亢進が認められ、大腸炎が重篤化することを示した。

これらの知見から、APP3 が関与する TNFR2 シグナル伝達の新たな制御機構が存在する可能性が示された (Fig. 26)。TNFR2 シグナルは、直接的にはアポトーシス誘導を引き起こさないと考えられるものの、実験的には TNFR1 と協調して細胞死に影響することが証明されているように、未だ明らかとなっていない様々な機能を有すると考えられる。本研究において、TNFR2 シグナルに関与する新規の分子を見出せたことで、新たな TNFR2 シグナル伝達機構の一端を解明することができた。

TNFR2 を標的とした自己免疫性疾患の治療については、近年、その可能性に注目が集まっている。今後、TNFR2 シグナルにおける、より詳細な APP3 の機能解析が進展すれば、自己免疫疾患の病態発症メカニズムが明らかになり、将来的に、疾患や治療目的に応じた新たな自己免疫疾患治療薬の開発につながるものと期待できる。



**Fig. 26 Proposed model of novel TNFR2 signaling mechanism that includes APP3m**

When the TNF binds to TNFR2, APP3m is transferred from mitochondria to cytoplasm and recruited to the intracellular domain of TNFR2, as well as TRAF2. The TNF/TNFR2 signaling complex bound APP3m triggers the phosphorylation of JNK. However, detailed mechanism that is considered to induce to the AP-1 activation is unknown. Furthermore, APP3 inhibition by apstatin exacerbates symptom of inflammatory bowel disease (IBD). This result indicates the possibility that APP3 mediates a part of protective role of TNFR2 signaling.

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、広島大学大学院医歯薬学総合研究科医薬分子機能科学研究室教授の小池 透先生に、懇切なる御指導、御鞭撻を賜ると共に、終始温かい御配慮を賜りました。ここに衷心より感謝申し上げます。

本研究を遂行する機会を与えてくださり、終始熱心な御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野教授の堤 康央先生、独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクトプロジェクトリーダーの角田慎一先生、同サブリーダーの鎌田春彦先生に心より深謝申し上げます。

また、本研究に対し、種々の貴重な御指導、御助言を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科医薬分子機能科学研究室准教授の木下英司先生、同助教の木下恵美子先生、同遺伝子制御科学研究室准教授の的場康幸先生、独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクトの向 洋平先生、長野一也先生、阿部康弘先生、野村鉄也先生、大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野准教授の吉岡靖雄先生、同助教の東阪和馬先生に心より御礼申し上げます。

本稿を纏めるにあたり、御指導、御助言を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科教授の小澤孝一郎先生、松尾裕彰先生、同准教授の熊谷孝則先生に厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究を遂行するにあたり、多大な御協力を賜りました、独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクトの皆さま、並びに大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野の皆さまに御礼申し上げます。

最後に、常に温かく見守り支えてくれた家族に心より感謝致します。

2013

井上雅己

## 参考文献

1. Stevens, R.C., *et al.* The GPCR Network: a large-scale collaboration to determine human GPCR structure and function. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 25-34 (2013).
2. Lemmon, M.A. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117-1134 (2010).
3. O'Sullivan, L.A., Liongue, C., Lewis, R.S., Stephenson, S.E. & Ward, A.C. Cytokine receptor signaling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Mol Immunol* **44**, 2497-2506 (2007).
4. Capdeville, R., Buchdunger, E., Zimmermann, J. & Matter, A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 493-502 (2002).
5. Dowell, J., Minna, J.D. & Kirkpatrick, P. Erlotinib hydrochloride. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 13-14 (2005).
6. Kremer, J.M., *et al.* The safety and efficacy of a JAK inhibitor in patients with active rheumatoid arthritis: Results of a double-blind, placebo-controlled phase IIa trial of three dosage levels of CP-690,550 versus placebo. *Arthritis Rheum* **60**, 1895-1905 (2009).
7. Ghoreschi, K., *et al.* Modulation of innate and adaptive immune responses by tofacitinib (CP-690,550). *J Immunol* **186**, 4234-4243 (2011).
8. Aggarwal, B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **3**, 745-756 (2003).
9. Feldmann, M. & Maini, R.N. Lasker Clinical Medical Research Award. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Med* **9**, 1245-1250 (2003).
10. MacEwan, D.J. TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *Br J Pharmacol* **135**, 855-875 (2002).
11. Cabal-Hierro, L. & Lazo, P.S. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal* **24**, 1297-1305 (2012).
12. Naude, P.J., den Boer, J.A., Luiten, P.G. & Eisel, U.L. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *Febs J* **278**, 888-898 (2011).
13. Ban, L., *et al.* Selective death of autoreactive T cells in human diabetes by TNF or TNF receptor 2 agonism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**,

- 13644-13649 (2008).
14. Dopp, J.M., *et al.* Expression of the p75 TNF receptor is linked to TNF-induced NFkappaB translocation and oxyradical neutralization in glial cells. *Neurochem Res* **27**, 1535-1542 (2002).
  15. Irwin, M.W., *et al.* Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation* **99**, 1492-1498 (1999).
  16. Yang, L., Lindholm, K., Konishi, Y., Li, R. & Shen, Y. Target depletion of distinct tumor necrosis factor receptor subtypes reveals hippocampal neuron death and survival through different signal transduction pathways. *J Neurosci* **22**, 3025-3032 (2002).
  17. Faustman, D. & Davis, M. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 482-493 (2010).
  18. Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T.T., Cominelli, F. & Kollias, G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* **10**, 387-398 (1999).
  19. Suvannavejh, G.C., *et al.* Divergent roles for p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in the pathogenesis of MOG(35-55)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol* **205**, 24-33 (2000).
  20. Monden, Y., *et al.* Tumor necrosis factor-alpha is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H743-753 (2007).
  21. Wang, M., Crisostomo, P.R., Markel, T.A., Wang, Y. & Meldrum, D.R. Mechanisms of sex differences in TNFR2-mediated cardioprotection. *Circulation* **118**, S38-45 (2008).
  22. Arnett, H.A., *et al.* TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* **4**, 1116-1122 (2001).
  23. Fontaine, V., *et al.* Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. *J Neurosci* **22**, RC216 (2002).
  24. Chen, X., Baumel, M., Mannel, D.N., Howard, O.M. & Oppenheim, J.J. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* **179**,

- 154-161 (2007).
25. Chen, X. & Oppenheim, J.J. The phenotypic and functional consequences of tumour necrosis factor receptor type 2 expression on CD4(+) FoxP3(+) regulatory T cells. *Immunology* **133**, 426-433 (2011).
  26. Chen, X., *et al.* Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood. *Eur J Immunol* **40**, 1099-1106 (2010).
  27. Chen, X., *et al.* TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4+Foxp3+ regulatory T. cell phenotype in the inflammatory environment. *J Immunol* **190**, 1076-1084 (2013).
  28. Lamprecht, P. TNF-alpha inhibitors in systemic vasculitides and connective tissue diseases. *Autoimmun Rev* **4**, 28-34 (2005).
  29. Mukai, Y., *et al.* Solution of the structure of the TNF-TNFR2 complex. *Sci Signal* **3**, ra83 (2010).
  30. Bluml, S., Scheinecker, C., Smolen, J.S. & Redlich, K. Targeting TNF receptors in rheumatoid arthritis. *Int Immunol* **24**, 275-281 (2012).
  31. Jupp, O.J., *et al.* Type II tumour necrosis factor-alpha receptor (TNFR2) activates c-Jun N-terminal kinase (JNK) but not mitogen-activated protein kinase (MAPK) or p38 MAPK pathways. *Biochem J* **359**, 525-535 (2001).
  32. Abe, Y., *et al.* Fine tuning of receptor-selectivity for tumor necrosis factor-alpha using a phage display system with one-step competitive panning. *Biomaterials* **32**, 5498-5504 (2011).
  33. Nomura, T., *et al.* Creation of an improved mutant TNF with TNFR1-selectivity and antagonistic activity by phage display technology. *Pharmazie* **65**, 93-96 (2010).
  34. Nomura, T., *et al.* Novel protein engineering strategy for creating highly receptor-selective mutant TNFs. *Biochem Biophys Res Commun* **388**, 667-671 (2009).
  35. Nomura, T., *et al.* Therapeutic effect of PEGylated TNFR1-selective antagonistic mutant TNF in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *J Control Release* **149**, 8-14 (2011).
  36. Shibata, H., *et al.* The treatment of established murine collagen-induced arthritis with a TNFR1-selective antagonistic mutant TNF. *Biomaterials* **30**, 6638-6647 (2009).



37. Shibata, H., *et al.* Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor receptor-1-selective mutant of a tumor necrosis factor-alpha antagonist. *J Biol Chem* **283**, 998-1007 (2008).
38. Flynn, D.C. Adaptor proteins. *Oncogene* **20**, 6270-6272 (2001).
39. Chen, G. & Goeddel, D.V. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* **296**, 1634-1635 (2002).
40. Micheau, O. & Tschopp, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**, 181-190 (2003).
41. Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* **10**, 45-65 (2003).
42. Abe, Y., *et al.* Simple and highly sensitive assay system for TNFR2-mediated soluble- and transmembrane-TNF activity. *J Immunol Methods* **335**, 71-78 (2008).
43. Chan, F.K. & Lenardo, M.J. A crucial role for p80 TNF-R2 in amplifying p60 TNF-R1 apoptosis signals in T lymphocytes. *Eur J Immunol* **30**, 652-660 (2000).
44. Schiess, R., Wollscheid, B. & Aebersold, R. Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery. *Mol Oncol* **3**, 33-44 (2009).
45. Kuai, J., *et al.* Endogenous association of TRAF2, TRAF3, cIAP1, and Smac with lymphotoxin beta receptor reveals a novel mechanism of apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 14363-14369 (2003).
46. Kuai, J., *et al.* NAK is recruited to the TNFR1 complex in a TNFalpha-dependent manner and mediates the production of RANTES: identification of endogenous TNFR-interacting proteins by a proteomic approach. *J Biol Chem* **279**, 53266-53271 (2004).
47. Ersahin, C., Szpadarska, A.M., Orawski, A.T. & Simmons, W.H. Aminopeptidase P isozyme expression in human tissues and peripheral blood mononuclear cell fractions. *Arch Biochem Biophys* **435**, 303-310 (2005).
48. Rusu, I. & Yaron, A. Aminopeptidase P from human leukocytes. *Eur J Biochem* **210**, 93-100 (1992).
49. Vanhoof, G., Goossens, F., De Meester, I., Hendriks, D. & Scharpe, S. Proline motifs in peptides and their biological processing. *Faseb J* **9**, 736-744 (1995).
50. Ersahin, C., Euler, D.E. & Simmons, W.H. Cardioprotective effects of the

- aminopeptidase P inhibitor apstatin: studies on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* **34**, 604-611 (1999).
51. Kitamura, S., Carbini, L.A., Simmons, W.H. & Scicli, A.G. Effects of aminopeptidase P inhibition on kinin-mediated vasodepressor responses. *Am J Physiol* **276**, H1664-1671 (1999).
  52. Wolfrum, S., Richardt, G., Dominiak, P., Katus, H.A. & Dendorfer, A. Apstatin, a selective inhibitor of aminopeptidase P, reduces myocardial infarct size by a kinin-dependent pathway. *Br J Pharmacol* **134**, 370-374 (2001).
  53. Graham, S.C., Maher, M.J., Simmons, W.H., Freeman, H.C. & Guss, J.M. Structure of *Escherichia coli* aminopeptidase P in complex with the inhibitor apstatin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 1770-1779 (2004).
  54. Bottinger, E.P. Lights on for aminopeptidases in cystic kidney disease. *J Clin Invest* **120**, 660-663 (2010).
  55. O'Toole, J.F., *et al.* Individuals with mutations in XPNPEP3, which encodes a mitochondrial protein, develop a nephronophthisis-like nephropathy. *J Clin Invest* **120**, 791-802 (2010).
  56. Fischer, R., *et al.* Ligand-induced internalization of TNF receptor 2 mediated by a di-leucin motif is dispensable for activation of the NFkappaB pathway. *Cell Signal* **23**, 161-170 (2011).
  57. Grech, A.P., *et al.* Tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) signaling is negatively regulated by a novel, carboxyl-terminal TNFR-associated factor 2 (TRAF2)-binding site. *J Biol Chem* **280**, 31572-31581 (2005).
  58. Schutze, S., Tchikov, V. & Schneider-Brachert, W. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 655-662 (2008).
  59. Chang, D.W., Xing, Z., Capacio, V.L., Peter, M.E. & Yang, X. Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *Embo J* **22**, 4132-4142 (2003).
  60. Assi, K., Pillai, R., Gomez-Munoz, A., Owen, D. & Salh, B. The specific JNK inhibitor SP600125 targets tumour necrosis factor-alpha production and epithelial cell apoptosis in acute murine colitis. *Immunology* **118**, 112-121 (2006).

61. Kitamura, S., Carbini, L.A., Carretero, O.A., Simmons, W.H. & Scicli, A.G. Potentiation by aminopeptidase P of blood pressure response to bradykinin. *Br J Pharmacol* **114**, 6-7 (1995).
62. Sashio, H., *et al.* Polymorphisms of the TNF gene and the TNF receptor superfamily member 1B gene are associated with susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease, respectively. *Immunogenetics* **53**, 1020-1027 (2002).
63. Pierik, M., *et al.* Tumour necrosis factor-alpha receptor 1 and 2 polymorphisms in inflammatory bowel disease and their association with response to infliximab. *Aliment Pharmacol Ther* **20**, 303-310 (2004).
64. Stillie, R. & Stadnyk, A.W. Role of TNF receptors, TNFR1 and TNFR2, in dextran sodium sulfate-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* **15**, 1515-1525 (2009).
65. Geremia, A., Biancheri, P., Allan, P., Corazza, G.R. & Di Sabatino, A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev* (2013).
66. Sartor, R.B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* **3**, 390-407 (2006).
67. Tadokoro, D., *et al.* Characterization of a caspase-3-substrate kinome using an N- and C-terminally tagged protein kinase library produced by a cell-free system. *Cell Death Dis* **1**, e89 (2010).
68. Sugimura, Y., *et al.* Screening for the preferred substrate sequence of transglutaminase using a phage-displayed peptide library: identification of peptide substrates for TGASE 2 and Factor XIIIa. *J Biol Chem* **281**, 17699-17706 (2006).
69. Patti, M.E. & Corvera, S. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* **31**, 364-395 (2010).
70. Wallace, D.C. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer* **12**, 685-698 (2012).
71. Deng, H.X., *et al.* Conversion to the amyotrophic lateral sclerosis phenotype is associated with intermolecular linked insoluble aggregates of SOD1 in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7142-7147 (2006).