

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（薬学）	氏名	井上 雅己
学位授与の要件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 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			
論文審査担当者			
主査	教授	小澤 孝一郎	印
審査委員	教授	松尾 裕彰	
審査委員	准教授	熊谷 孝則	
〔論文審査の要旨〕			
<p>腫瘍壊死因子（TNF）は、様々な炎症・自己免疫性疾患の病態に関わることが知られるサイトカインである。TNF のレセプターには2種類のサブタイプ（TNFR1 および TNFR2）が存在している。近年の研究により、それら2つのレセプターが相反する機能を担うことが明らかになってきた。例えば、TNFR2 欠損が関節リウマチの動物モデルの病態を悪化させることや、TNFR2 シグナルが T 細胞の活性化を介して免疫系を抑制することなどが示唆されている。そのため、TNFR2 の機能を分子レベルで明らかにできれば、様々な TNF 関連疾患の病態解明や、自己免疫性疾患・炎症性疾患などの新たな治療薬開発につながるものと期待される。しかし、従来の TNFR2 の機能解析は、ノックアウトマウスを用いた現象論的な研究報告が多く、TNFR2 の細胞内シグナル伝達機構については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、ファージ表面提示法を駆使して独自に構築した TNFR2 のみを選択的に活性化可能な TNF 構造変異体を用いることで、TNFR2 を介したシグナル伝達に関わる分子群を網羅的に解析した。その結果、新たな TNFR2 アダプター分子としてアミノペプチダーゼ P3（APP3）の同定に成功した。さらに、APP3 と TNFR2 シグナルの関連性についての解析から TNFR2 の新たなシグナル伝達制御機構に関する以下に示す興味深い知見を得た。</p> <p>はじめに、TNFR2 の細胞内シグナル伝達に関わる分子を解析するため、TNFR2 に結合し複合体を形成するタンパク質を探索した。TNFR2 を強制発現させた HEK293T 細胞を TNFR2 指向性 TNF 変異体（R2-7）で刺激した後、免疫沈降法により TNFR2 シグナル複合体を回収した。この複合体に含まれるタンパク質をショットガンプロテオミクス法で網羅的に解析し</p>			

た。その結果、複数の新規のアダプター分子を同定することに成功した。それらのうち、最も同定スコアの高かった APP3 は、TNFR2 シグナルの伝達に重要な役割をもつ可能性が示唆された。APP3 は、N 末端から 2 番目にプロリンを配するタンパク質の X-Pro 結合を切断する酵素である。APP3 は嚢胞性腎疾患への関与が示唆されているが、TNFR2 との関連性については報告はない。また、APP3 のようなプロテアーゼ活性をもつサイトカインレセプターのアダプター分子もあまり知られていない。

APP3 には、細胞内局在の異なる 2 つのアイソフォーム、Mitochondrial APP3 (APP3m) と Cytosolic APP3 (APP3c) が知られている。しかし、両者は N 末端を除き共通配列をもつため、プロテオミクスの結果からはその区別が不可能であった。そこで、各アイソフォームを HEK293T-TNFR2 に一過性に強制発現させ、R2-7 で刺激した後、APP3 に対する免疫沈降を行った。その結果、APP3m を強制発現した細胞のみで TNFR2 及び TRAF2 を介した複合体が検出されたことから、TNFR2 には APP3m が結合することが判明した。APP3m は、通常ミトコンドリアに局在することから、TNFR2 シグナルの活性化に伴い、細胞質へ移行する可能性が考えられた。APP3m の局在変化を明らかにするため、細胞質及びミトコンドリアにおける APP3m 存在量の変化を解析した。HEK293T-TNFR2 を R2-7 で刺激した後、細胞質分画及びミトコンドリア分画し、ウエスタンブロットにより APP3m を定量解析した。その結果、時間依存的に細胞質画分の APP3m は増加し、ミトコンドリア画分の APP3m は減少することが明らかになった。APP3m の局在変化が確認できたことから、TNFR2 シグナルの活性化によるミトコンドリアからの APP3m 放出機構の存在が示唆された。

TNFR2 シグナルは、NF- κ B または AP-1 を活性化することが知られている。この活性化に関連する細胞内シグナル伝達経路に対する APP3 の影響を検討した。HEK293T-TNFR2, APP3m を強制発現させた HEK293T-TNFR2, 及び APP3 を shRNA でノックダウンした HEK293T-TNFR2 を R2-7 で刺激し、ウエスタンブロットにて各シグナル分子のリン酸化を調べた。その結果、APP3m の発現上昇に依存して JNK のリン酸化が亢進した。逆に、APP3 の発現低下に伴い JNK のリン酸化は抑制された。一方、その他の細胞シグナル分子への影響は認められなかった。従って、TNFR2 シグナルは、主として APP3m と JNK を介した AP-1 の活性化を制御していると考えられた。

以上の結果から、本論文は、TNFR2 のアダプター分子として同定された APP3m がミトコンドリアから細胞質に移行することで JNK のリン酸化を制御するという新たな知見の発見という点で、非常に意義が高いと考えられる。さらに、このような TNFR2 の機能解析の進展は、自己免疫疾患の病態発症メカニズムの解明に繋がる可能性を秘めており、疾患や治療目的に応じた新規自己免疫疾患治療薬の開発に貢献できることが期待される。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士(薬学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。