

酢酸による T 細胞活性化制御の分子機序解明

石 黒 和 博

名古屋大学大学院医学系研究科消化器疾患病態論寄講座 准教授

緒 言

酢酸は食酢の主成分であり、腸内細菌が産生する短鎖脂肪酸の大部分を占めている¹⁾。また乳酸菌の一部(ビフィズス菌など)は乳酸だけでなく酢酸も産生している²⁾。これまで食酢や乳酸菌製品が健康に寄与することが知られているが、酢酸・酢酸ナトリウムが免疫機能に与える影響、特に T 細胞活性化に与える影響については報告が全くなかった。また、酢酸・プロピオン酸・酪酸ナトリウム混合注腸が潰瘍性大腸炎の治療に有効とする報告はあったものの、これら短鎖脂肪酸のうちのどの成分がどのように抗炎症作用を発揮しているかについては不明であった^{3,4)}。そこで我々が酢酸・酢酸ナトリウムによる T 細胞活性化への影響を検討したところ、酢酸・酢酸ナトリウムは T 細胞活性化に極めて重要な転写因子である NFAT の核内移行を特異的に抑制すること、その NFAT 核内移行抑制により T 細胞のサイトカイン産生が抑えられること、更に酢酸ナトリウムの投与が腸炎や皮膚炎の改善に有効であることがわかった⁵⁾。

NFAT は 5 つのメンバーから構成される転写因子ファミリーであり、T 細胞には NFAT1 (NFATc2)、NFAT2 (NFATc1)、NFAT4 (NFATc3) が存在し、IL-2 などのサイトカイン発現に関与している⁶⁾。NFAT はリン酸化された状態で細胞質に存在するが、T 細胞に刺激が与えられると活性化したカルシニューリンにより脱リン酸化され核内輸送体 importin beta と結合し核内へと輸送されていく。臨床で既に使用されているサイクロスポリンなどの免疫調節剤はカルシニューリンの活性を阻害し NFAT の脱リン酸化を妨げることで NFAT の核内移行を抑制する⁷⁾。一方、酢酸・酢酸ナトリウムは NFAT の脱リン酸化には全く影響を与えず脱リン酸化された NFAT と importin beta との結合を阻害することで NFAT の核内移行を抑制することを我々は既に明らかにしている⁵⁾。しかし、酢酸・酢酸ナトリウムが NFAT-importin beta 結合を阻害する分子機序については不明である。ま

た NF-kappaB などの転写因子が特定の importin alpha members を介して importin beta と結合することが知られているにもかかわらず、NFAT と importin beta の結合様式についてはこれまで全く報告がない。本研究は酢酸・酢酸ナトリウムによる NFAT-importin beta 結合阻害の作用機序を分子レベルで解析し、NFAT-importin beta 結合様式の解明につなげることを目的として行った。

これまで酪酸は染色体の構造を調節するヒストンのアセチル化を介して遺伝子の発現に影響を与えることが知られている。そこで我々は、酢酸は NFAT-importin beta 結合を調節するアダプター分子のアセチル化を介して作用を発揮していると考え、酢酸によりアセチル化が誘導されるタンパクを検索し、酢酸によりアセチル化が誘導されるタンパクの NFAT-importin beta 結合への関与を検討した。

実 験 方 法

酢酸・酢酸ナトリウムともに NFAT に特異的な活性抑制作用がある一方で酢酸ナトリウムは酢酸と比べ pH に対してほとんど影響を与えない。そのため、本研究の実験には酢酸ナトリウムを使用した。実験材料・方法の詳細は既報の論文に記載した⁸⁾。

結 果

1. 酢酸ナトリウムは tubulin alpha のアセチル化を誘導する

T 細胞由来 Jurkat 細胞を酢酸ナトリウムと培養したところ、分子量約 55 kDa のタンパクが著明にアセチル化された(図 1)。これは内部コントロールに利用した tubulin alpha と全く同じ大きさであり、tubulin alpha は 40 番目のリシン残基がアセチル化されることが知られている。そこでアセチル化 tubulin alpha に対する抗体を用いて検討したところ、酢酸は濃度依存的に tubulin alpha をアセチル化することを確認できた(図

1)。なお酪酸はヒストンのアセチル化を誘導する一方で tubulin alpha のアセチル化を誘導しなかった (図 1)。マウスの脾臓から取り出した primary T cells でも酪酸による tubulin alpha のアセチル化を観察できた。

これまで tubulin alpha は histone deacetylase 6 (HDAC6) により脱アセチル化され、HDAC6 を阻害する Trichostatin A (TSA) は tubulin alpha のアセチル化を誘導することが知られている⁹⁾。Jurkat 細胞でも TSA により tubulin alpha のアセチル化が誘導された (図 2 A)。そこで酪酸ナトリウムが HDAC6 活性に与える影響を檢

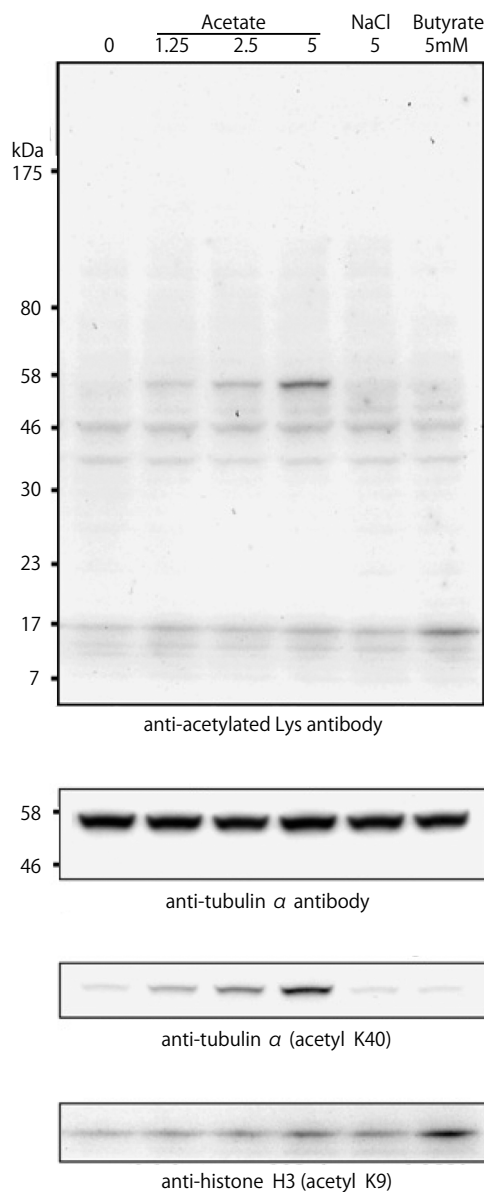


図 1 酪酸ナトリウムによる tubulin alpha のアセチル化
Jurkat 細胞を酪酸ナトリウム 0-5 mM 存在下で 30 分間培養した後、タンパクを抽出し Western blot analysis を行った。Lys or K, lysine。

討したところ、酪酸ナトリウムは HDAC6 の活性を濃度依存的に阻害することが分かった (図 2 B)。

2. Tubulin alpha アセチル化と NFAT 核内移行抑制

Jurkat 細胞において TSA 10 nM は酪酸 5mM と同様に tubulin alpha のアセチル化を誘導するが、それは培養 1 時間後までであり 2 時間後にはその作用は著しく減弱する (図 3 A)。この現象を利用して tubulin alpha アセチル化と NFAT 核内移行抑制との関連を検討した結果、NFAT 核内移行は tubulin alpha がアセチル化される条件下で抑制されることがわかった (図 3 B, C)。NFAT 依存レポーターアッセイでも検討したところ tubulin alpha がアセチル化される条件下で NFAT の活性化が抑制されることを確認できた (図 3 D)。なお、TSA も酪酸も NF-kappaB の核内移行および活性化に影響を与えなかった (図 3 B, E)。以上から tubulin alpha アセチル化と NFAT 核内移行抑制との関連が証明された。

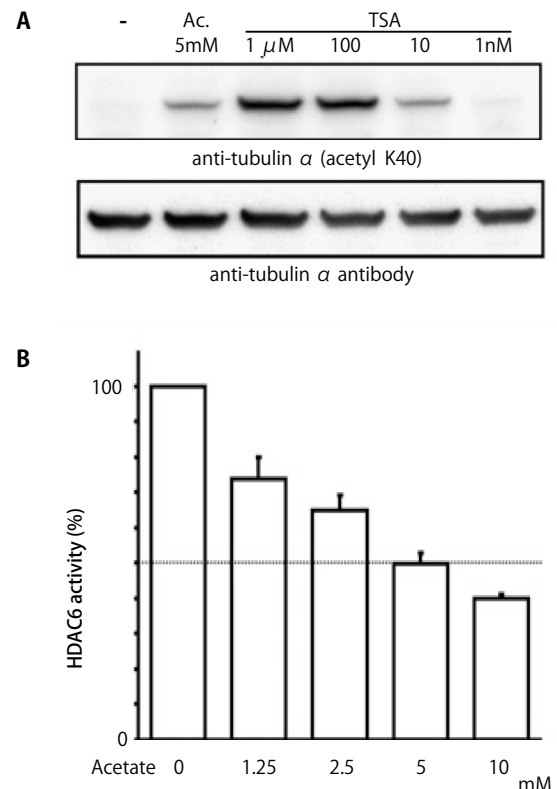


図 2 酪酸ナトリウムならびに TSA による tubulin alpha のアセチル化

(A) Jurkat 細胞を酪酸ナトリウムあるいは TSA とともに 30 分間培養した後、タンパクを抽出し Western blot analysis を行った。
(B) 酪酸ナトリウム存在下で HDAC6 の酵素活性を評価した。

3. NFAT, tubulin alpha, importin beta の相互作用

次に組換えタンパクを用いて NFAT, tubulin alpha, importin beta の相互作用を検討した。その結果、tubulin alpha は NFAT と結合する一方、importin beta は tubulin alpha 存在下に NFAT と結合することがわかった (図 4 A)。更に importin beta は NFAT 存在下に

tubulin alpha と結合することが分かった (図 4 B)。これらのことから NFAT と tubulin alpha はそれぞれ単独ではなく NFAT-tubulin alpha 複合体となり importin beta に結合することが示唆された。

更に免疫沈降試験を行い細胞内の NFAT, tubulin alpha, importin beta の相互作用を検討した。その結

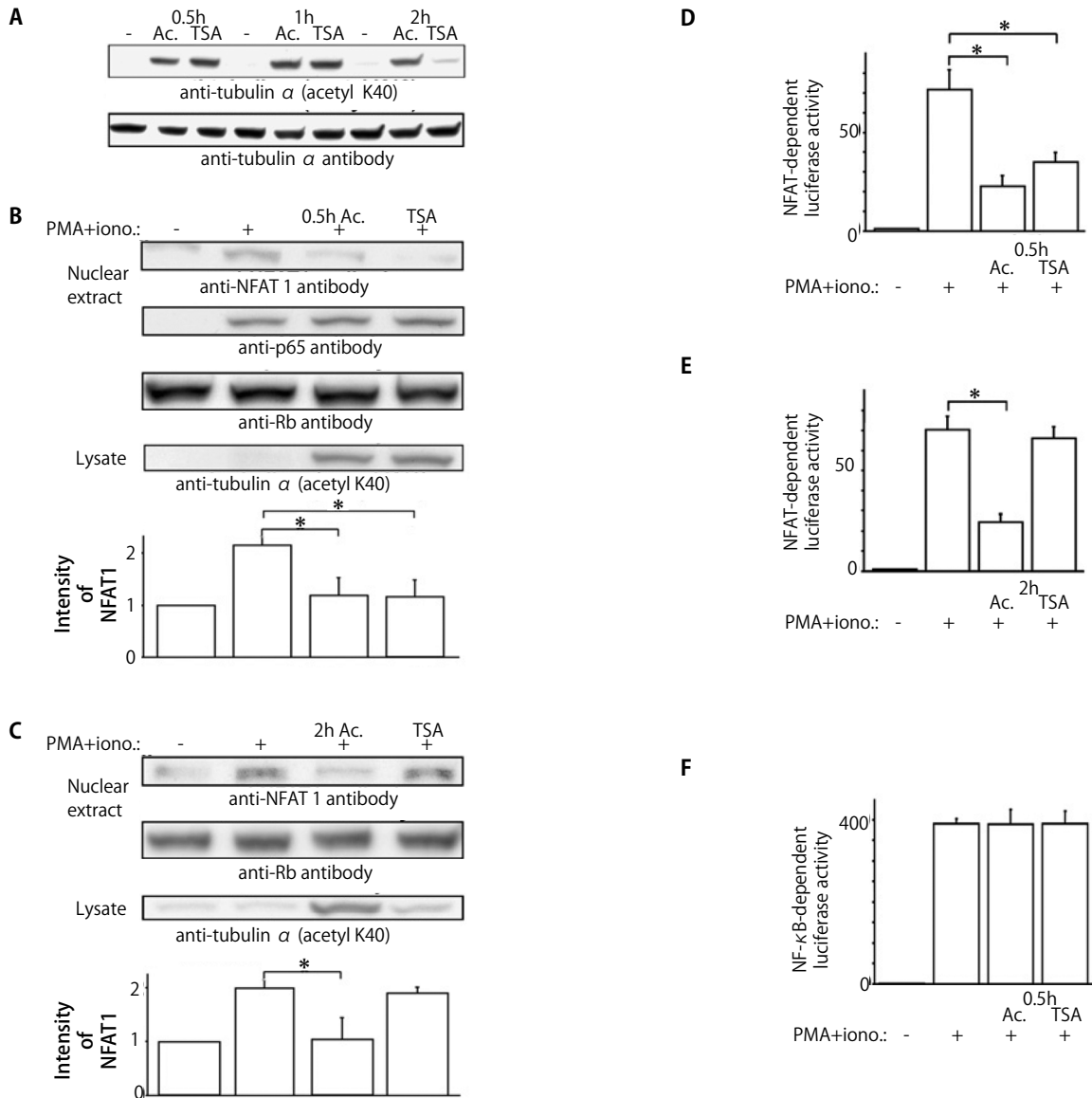


図3 Tubulin alpha アセチル化と NFAT 核内移行抑制との関連

(A) Jurkat 細胞を酢酸ナトリウム 5 mM あるいは TSA 10 nM とともに 30 分から 2 時間培養した後、タンパクを抽出し Western blot analysis を行った。

(B,C) Jurkat 細胞を酢酸ナトリウム 5 mM あるいは TSA 10 nM とともに 30 分間(B)あるいは 2 時間(C)培養した後、PMA+ionomycin 刺激を加え、核分画を抽出し Western blot analysis を行った。*、 $P < 0.05$ (Student's t-test)。

(D,E) Jurkat 細胞を酢酸ナトリウム 5 mM あるいは TSA 10 nM とともに 30 分間(D)あるいは 2 時間(E)培養した後、PMA+ionomycin 刺激を加え、NFAT 依存レポーターアッセイを行った。

(F) Jurkat 細胞を酢酸ナトリウム 5 mM あるいは TSA 10 nM とともに 30 分間培養した後、PMA+ionomycin 刺激を加え、NF-κB 依存レポーターアッセイを行った。

果、tubulin alpha は NFAT と細胞内で結合しているが tubulin beta は NFAT と結合していないことがわかった (図 4 C)。更に tubulin alpha-NFAT 結合は酢酸や PMA+ionomycin による細胞刺激により影響を受けなかった (図 4 D、第 1 列)。一方、importin beta は細胞刺激に伴い NFAT と結合し、この結合が酢酸による tubulin alpha アセチル化により阻害された (図 4 D、第

4 列)。以上から酢酸は tubulin alpha のアセチル化を誘導することで NFAT-tubulin alpha 複合体と importin beta との結合を阻害し NFAT の核内移行を抑制すると考えられた。

次に tubulin alpha が結合する NFAT の領域を同定するため図 4 E 上に示した NFAT 断片を発現するベクターを細胞に導入して調べたところ、N 末端 1-571 は

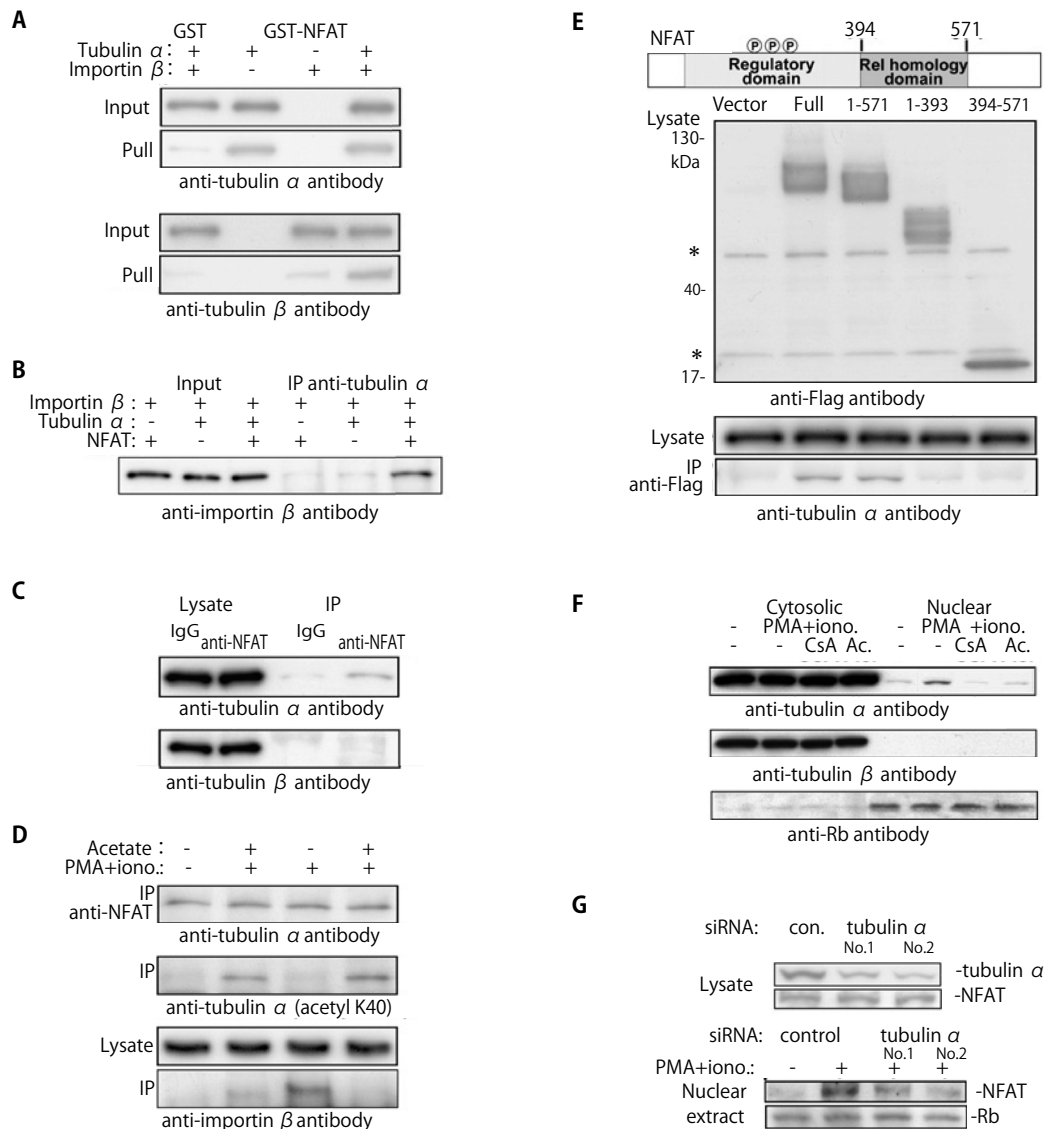


図 4 NFAT, tubulin alpha, importin beta 間の相互作用

(A) GST-NFAT, 6xHis-tubulin alpha, 6xHis-importin beta を混合し (Input)、GST-NFAT を回収した (Pull)。 (B) GST-NFAT 存在下 / 非存在下で 6xHis-Ztubulin alpha と 6xHis-importin beta を混合し (Input)、6xHis-tubulin alpha を抗 tubulin alpha 抗体による免疫沈降で回収した (IP)。 (C) Jurkat 細胞の溶解液 (Lysate) から NFAT を抗 NFAT 抗体による免疫沈降で回収した。 (D) PMA+ionomycin で刺激した Jurkat 細胞の溶解液から NFAT を抗 NFAT 抗体による免疫沈降で回収した。 (E) 293T 細胞に Flag-NFAT 発現ベクターを導入した後、Flag-NFAT を抗 Flag 抗体による免疫沈降で回収した。 (F) Jurkat 細胞をサイクロスポリン (CsA) あるいは酢酸ナトリウム (Ac) 存在下で PMA+ionomycin により刺激した後、細胞質分画・核分画を抽出した。 (G) Jurkat 細胞の tubulin alpha を siRNA で knock-down させ、PMA+ionomycin で刺激した後、核分画を抽出した。

tubulin alpha と結合するものの N 末端 1-393 は結合しない (図 4 E) ことから 394-571 断片に相当する Rel homology domain が tubulin alpha との結合に必須であることが分かった。しかし 394-571 断片のみは tubulin alpha と結合しない (図 4 E) ことから Rel homology domain だけでは十分ではなく regulatory domain を含む N 末端領域も tubulin alpha との結合に重要であることがわかった。この regulatory domain に importin beta との結合を調節するリン酸化 Ser/Thr 残基が存在することは興味深い。

4. Tubulin alpha と NFAT の核内移行

これまで tubulin alpha は細胞質に存在するとされてきたが、tubulin alpha が NFAT と結合しているのであれば tubulin alpha は T 細胞刺激に伴い NFAT とともに核内に移行するはずである。これを確認する実験を行ったところ tubulin alpha は tubulin beta とは異なり T 細胞刺激後に核分画で検出される一方、NFAT 核内移行を抑制するサイクロスポリン (CsA) や酢酸ナトリウムが存在すると検出されなくなることが観察された (図 4 F)。また siRNA により tubulin alpha の発現を低下させると、

その低下に伴い NFAT の核内移行も抑制された (図 4 G)。以上から tubulin alpha は NFAT とともに T 細胞刺激後に細胞質から核内へと移行していくことが確認できた。

考 察

酢酸の T 細胞に対する作用機序を分子レベルで検討することにより NFAT 核内移行の分子機序を明らかにすることができた。すなわち、酢酸は HDAC6 活性を阻害することで tubulin alpha のアセチル化を誘導するが、この tubulin alpha こそがこれまで謎であった importin beta との結合を補助する NFAT のアダプター分子であり、tubulin alpha のアセチル化はそのアダプター機能を阻害するため、酢酸は NFAT と importin beta との結合を阻害し NFAT の核内移行を抑制するのである (図 5)。本研究の結果は “tubulin alpha アセチル化” が T 細胞における酢酸の影響を評価するための “バイオマーカー” として有用であることを示していると同時に NFAT 核内移行抑制を介して T 細胞活性化を制御する “新しいターゲット” として有用であることも意味している。現在、我々は本研究の成果を更に発展させ新たな抗炎症療法を開発するため、tubulin alpha のアセチル化などを指標

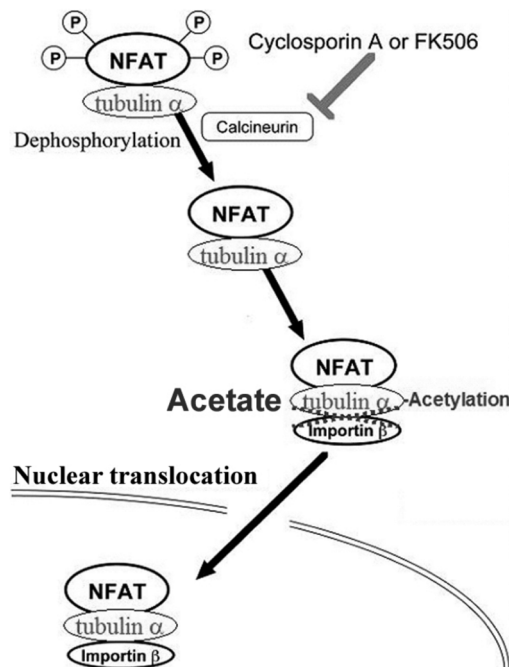


図5 酢酸の作用機序と NFAT 核内移行の分子機序

核内輸送体 importin beta はカルシニューリンより転写因子 NFAT が脱リン酸化されると NFAT-tubulin alpha complex に結合し細胞質から核内へと輸送する。酢酸・酢酸ナトリウムは tubulin alpha のアセチル化を誘導することにより importin beta と NFAT-tubulin alpha complex の結合を阻害し NFAT の核内移行を抑制する。

に T 細胞の活性化を制御しうる化合物を見つけるスクリーニングを行っている。

腸管、特に大腸には細菌が豊富に存在するが、健常では大腸に病的な炎症反応は観察されることはない。この腸内細菌は発酵により酢酸を多量に産生しているが、その酢酸に T 細胞活性化を抑制する作用があることを考えると、腸内細菌が産生する酢酸は腸管の炎症を制御する要因の一つであると推測できる。これに対して炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎とクローン病）では腸内細菌叢が変化し便中酢酸量が減少することが知られているが、腸管内で酢酸量が低下することにより T 細胞活性化制御が不十分となり過剰な炎症反応につながっている可能性がある。そのような病的状態は腸管内に酢酸ナトリウムを補充することで解消されうるが、実際に臨床試験において酢酸ナトリウムを含む注腸による潰瘍性大腸炎の改善が報告されている^{3,4)}。我々は予備的臨床試験で酢酸ナトリウム単独の注腸が難治性潰瘍性大腸炎や術後再発クローン病を改善することを認めている（未発表）。今後は腸内細菌が産生する酢酸の生理的意義を解明し、酢酸ナトリウムを用いた新たな抗炎症療法の開発に貢献していきたい。

要 約

- 1) 酢酸は tubulin alpha のアセチル化を誘導する。
- 2) Tubulin alpha は転写因子 NFAT と結合し、この複合体に核内輸送体 importin beta が結合する。
- 3) Tubulin alpha のアセチル化は NFAT-tubulin alpha 複合体と importin beta の結合を阻害する。

謝 辞

本研究に対して援助をいただいた公益財団法人三島海雲記念財団に深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) J.M. Wong et al.: *J Clin Gastroenterol*, 40, 235-243, 2006.
- 2) G.A. Preidis and J. Versalovic: *Gastroenterology*, 136, 2015-2031, 2009.
- 3) P. Vernia et al.: *Aliment Pharmacol Ther*, 9, 309-313, 1995.
- 4) J. Patz et al.: *Am J Gastroenterol*, 91, 731-734, 1996.
- 5) K. Ishiguro et al.: *Eur J Immunol*, 37, 2309-2316, 2007.
- 6) F. Macian: *Nat Rev Immunol*, 5, 472-484, 2005.
- 7) A. Kiani et al.: *Immunity*, 12, 359-372, 2000.
- 8) K. Ishiguro et al.: *J Immunol*, 186, 2710-2713, 2011.
- 9) J.W. Hammond et al.: *Curr Opin Cell Biol*, 20, 71-76, 2008.