

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 細胞膜ドメインを介したサイトカインシグナル伝達
クロストークの解析

指導教官 谷口 維紹 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

三谷 祐貴子

インターフェロン (IFN)- α/β および IFN- γ は、当初、抗ウイルス活性を示すサイトカインとして同定されたが、細胞増殖抑制作用や免疫調節作用といった細胞応答の制御にも関与していることが知られるようになった。この IFN の生理作用は、IFN- α/β あるいは IFN- γ がそれぞれの異なったレセプター複合体を形成した後、おのこの Jak-Stat 系を活性化し、IFN 誘導遺伝子の発現へとつながることで発揮される。IFN- α/β および IFN- γ がそれぞれに固有のシグナル伝達経路を持つにもかかわらず、同じ抗ウイルス作用を持つことから、第 I 章において、これらの IFN シグナル間における相互作用を検討した。さらに、IFN に対するレセプターは、通常細胞表面上に $10^2\sim 10^3$ 個と限られた数しか存在せず、しかもマルチサブユニット構造であるにもかかわらず、そのシグナル伝達は迅速かつ効率良く行われていることから、IFN レセプター分子やその下流のエフェクター分子がある特定の細胞膜上の領域に局在しているのではないかと考え検討を加えた。

IFN- α/β レセプターサブユニットの 1 つである IFNAR1 あるいは IFN- γ レセプターサ

ブユニットの 1 つである IFNGR1 欠損マウスより胎仔線維芽細胞 (MEFs; mouse embryonic fibroblasts) を調整し、EMCV (encephalomyocarditis virus) を用いて、CPE (cytopathic effect) アッセイを行った。IFNAR1 欠損 ($AR1^{-/-}$) MEFs においては、野生型 MEFs に比べ、IFN- γ による抗ウイルス活性が約 10 分の 1 に低下していることが明らかとなった。一方、IFNGR1 欠損 MEFs においては、IFN- α による抗ウイルス活性は野生型 MEFs と同程度に認められた。次に、Stat1 の DNA 結合活性を GAS (IFN- γ -activated site) プローブを用いた EMSA (electrophoretic mobility shift assay) で調べたところ、IFN- γ を処理した $AR1^{-/-}$ MEFs においては野生型の MEFs に比べ、Stat1 の DNA 結合活性が約 6 分の 1 に低下していることが明らかとなった。さらに $AR1^{-/-}$ マウス由来の脾臓細胞においても同様の Stat1 の DNA 結合活性の低下が認められた。このことから、IFN- γ による最大限の応答の発現には IFNAR1 が必要であることが示された。

IFNAR1 はレセプターであるため、IFN- γ による最大限の応答に、IFNAR1 を介した IFN- α/β のシグナルが関与しているのか、またはリガンド非依存的に IFNAR1 自体が関与しているのかが明らかではない。実際、生体内ではウイルス感染が伴わなくても自発的に極微量の IFN- α/β が産生されていることが報告されている。また、IFN- α の産生は主に IFN- β の産生に依存していることが報告されていることから IFN- β 欠損 ($IFN-\beta^{-/-}$) マウスを使用し、 $IFN-\beta^{-/-}$ MEFs において IFN- α mRNA の発現を検討したところ、IFN- α mRNA はほとんど検出されなかった。そこで、 $IFN-\beta^{-/-}$ MEFs を用いて、 $AR1^{-/-}$ MEFs と同様の実験を行ったところ、IFN- γ 刺激時の Stat1 の活性化、ISGF3 複合体形成および抗ウイルス活性が低下していることが明らかとなった。さらに、 $IFN-\beta^{-/-}$ MEFs に極微量の IFN- β (0.1 U/ml) を添加することにより、IFN- γ の反応性が野生型 MEFs 程度まで回復することも明らかにした。このことから、自発的に産生されている極微量の IFN- α/β が、IFN- γ による最大限の応答を発揮するために必要であることが示された。

次に、そのメカニズムについて検討した。グリセロール密度勾配法を用いた実験から、 $AR1^{-/-}$ MEFs においては野生型 MEFs と比較して、Stat1 の二量体形成が低下している

ことが明らかとなった。さらに、AR1^{-/-} MEFs に IFNAR1 の 455 番目のチロシン残基 (Y455) をフェニルアラニンに置換した変異体を発現させたところ、intact な IFNAR1 を発現させた場合に比べ、IFN- γ による DNA 結合活性が5分の1程度しか回復しなかった。このことから、自発的に産生されている極微量の IFN- α/β によって IFNAR1 の細胞内チロシン残基はリン酸化された状態にあり、このチロシン残基を利用して IFN- γ 刺激時に Stat1 が効率良く二量体形成を行っていると考えられることができる。実際、野生型 MEFs においては、刺激前から IFNAR1 のチロシンリン酸化を認め、IFN- γ 刺激によりそのチロシンリン酸化が増強するが、一方、IFN- β ^{-/-} MEFs では、刺激の有無に関わらず IFNAR1 のリン酸化は検出できなかった。さらに野生型 MEFs では、IFN- γ 刺激後、チロシンリン酸化された Stat1 と IFNAR1 との会合がみとめられた。IFN- γ 刺激により、IFNAR1 のリン酸化が増強することやチロシンリン酸化された Stat1 が IFNAR1 にリクルートすることから、IFN- γ レセプターの近傍に IFN- α/β レセプターが存在するのではないかと考え、免疫沈降法にて調べた結果、IFNAR1 と IFNGR2 とが IFN- γ の有無にかかわらず会合していることを明らかにした。さらに興味深いことに IFN- β ^{-/-} MEFs においてはこの会合が減弱しているという結果が得られた。また、IFNAR1 をはじめ、IFNGR1 や IFNGR2 といった IFN レセプターサブユニットが細胞膜上のカベオラ膜ドメインに存在したことから、この IFN- α/β と IFN- γ のクロストークがカベオラ膜ドメインにおいて行われていることが明らかとなった。

第I章において、IFN- α/β と IFN- γ の間には、細胞膜上のカベオラ膜ドメインにおいて、レセプターレベルでのクロストークがあることを明らかにした。このクロストークの存在は、これら二つのタイプの IFN の生理作用の重複性を説明する新たな分子メカニズムであると考えられる。IFN- γ による応答は IFN- γ レセプターを介したシグナル単独でも発揮されるが、IFN- α/β のシステムを利用することにより、さらに効率のよいシグナル伝達を可能にすると考えられる。また、IFN 系のレセプターサブユニットや Jak キナーゼがカベオラ膜ドメインに濃縮されている結果は、限られた数の、かつ複数のサブユニットから成

るサイトカインレセプターが効率良く細胞内へシグナルを伝達するための制御機構であると考えられる。さらに、自発的に産生されている極微量の IFN- α/β の IFN- γ シグナルにおける新たな役割を明らかにした。その役割とは、一つは、IFNAR1 の細胞内チロシン残基を常にリン酸化した状態にしておき、IFN- γ 刺激後、効率良く Stat1 をリクルートさせる部位を提供する役割、もう一つは、IFNAR1 と IFNGR2 との会合を増強する役割である。この点に関して、第 II 章で IL-6 を例に、他のサイトカインにおいても類似の機構が存在するのかを検討した。

第 II 章において、IL-6 刺激により、野生型、AR1^{-/-}あるいは IFN- β ^{-/-} MEFs を用いて、第 I 章と同様の実験を行った。その結果、IFN- γ に加えて、IL-6 も効率的なシグナル伝達のためには、自発的に産生されている極微量の IFN- α/β のシグナルを必要とすることを明らかにした。IL-6 と IFN- α/β のクロストークの分子メカニズムも、ほぼ IFN- γ と IFN- α/β のクロストークの場合と同様で、リン酸化された IFNAR1 の細胞内チロシン残基を、IL-6 も効率的な Stat1 および Stat3 の二量体形成に利用していること示唆する結果を得た。さらに、gp130 も IFNAR1 同様、カベオラ膜ドメインに濃縮されており、架橋剤を用いた実験において両者が共沈してくることから、細胞膜上のカベオラ膜ドメインにおいて gp130 と IFNAR1 は近傍に存在していることが明らかとなった。自発的に産生されている極微量の IFN- α/β によって細胞内のチロシン残基がリン酸化されていることから、IFNAR1 にはサイトカイン刺激後、さまざまな Stats が会合し、その二量体形成に利用されている可能性が考えられる。

本研究によって、MEFs においては、カベオラ膜ドメインに IFNAR1、IFNGR1、IFNGR2 および gp130 といったサイトカインレセプターが局在していることが明らかとなった。細胞膜上には、サイトカインレセプターが集まって存在するレセプトゾームのようなコンパートメント化されたドメインが存在する可能性があり、そこでクロストークがおこっている可能性が示唆される。