

論文内容の要旨

論文題目 TRAF6による二相性 NF- κ B 活性化モデルの提唱

氏名 山崎 孔輔

細胞間情報伝達物質であるサイトカインのうち、IL-1は炎症反応や感染防御などの免疫反応において重要な役割を果たし、そのIL-1の過剰産生は癌の悪性化に寄与していることが知られている。そのため、IL-1のシグナル伝達機構に関する知見は免疫疾患や癌に対する治療薬の開発に大きく貢献すると考えられる。

IL-1は多様な細胞から産生され、繊維芽細胞やマクロファージなどに発現しているIL-1Rに作用し、転写因子NF- κ BやAP-1を活性化することでサイトカインを発現誘導する。IL-1シグナルにおいて、ユビキチンリガーゼ活性(E3活性)を持つRINGドメインを有するアダプター分子TRAF6が重要な役割を果たしており、活性化すると自己をK63型ポリユビキチン化する。このK63型ポリユビキチン鎖はプロテアソーム分解の標的ではなく、シグナル分子が複合体形成するための足場になると考えられており、TAK1-TAB2/3複合体がこのポリユビキチン鎖を介してTRAF6と結合することが知られている。この結合によりリン酸化酵素であるTAK1が活性化し、IKKをリン酸化することで活性化させ、続いてIKKがNF- κ Bの抑制因子であるI κ B α のリン酸化、それに続くプロテアソーム分解を誘導することで、NF- κ Bの核移行を促し、転写活性を導く。一方、TAK1と同様なリン酸化酵素であるMEKK3もIL-1シグナルに関与しており、IKKをリン酸化することでNF- κ B活性を促すことが知られている。(図1)

しかしながら、TAK1とMEKK3の両者はIL-1シグナルに深く関与するにも関わらず、これらの活性化機構や両者の関係性については未解明な点が多い。本研究では、TRAF6の下流に位置する2つのリン酸化酵素(TAK1とMEKK3)の活性化機構の解析を中心として進めた結果、TRAF6による巧妙なNF- κ B活性化の制御機構が明らかになった。

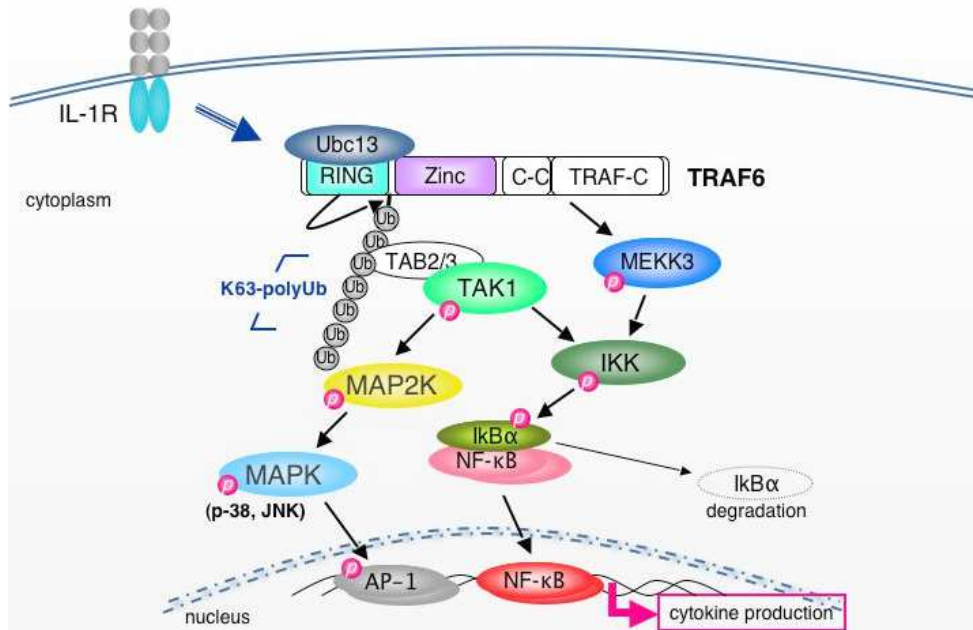


図1 IL-1シグナルのモデル図

TAK1のポリユビキチン化はIL-1シグナル依存的なTAK1の活性化に必要である

本研究では TRAF6の E3活性に着目し、新規な基質分子の探索の結果、TAK1がポリユビキチン化されることを見出した。K63型しか起こらないユビキチンを、レトロウイルスを用いてマウス胎児繊維芽細胞(MEF)に遺伝子導入し、安定発現細胞株を樹立した。そして、IL-1シグナル依存的な TAK1の K63型ポリユビキチン化の検出を試みたところ、IL-1シグナル依存的に増大する TAK1のポリユビキチン化が確認された。また、この TAK1のポリユビキチン化は TRAF6依存的であることを、TRAF6欠損 MEF を用いた実験から明らかにした。

次に TAK1のポリユビキチン化サイトの同定を試みた。幅広い種間で保存されている TAK1の7つのリジンを抽出し、それぞれのリジンをアルギニンに点変異させた TAK1 K/R 変異体を構築した。それらを TAK1の欠損 MEF に安定発現させ、生理的条件下における IL-1シグナル依存的な TAK1の K63型のポリユビキチン化を検出した。すると、209番目のリジンに点変異を与えた TAK1(TAK1-K209R)のみにおいて、TAK1のポリユビキチン化が著しく減弱した。これより、TAK1の K63型ポリユビキチン化の特異的なユビキチン化部位は K209であることが示された。

TAK1のポリユビキチン化の IL-1シグナル依存的な NF-κB 活性化への関与を明らかにするため、TAK1の野生型を TAK1欠損 MEF に安定発現させた細胞(TAK1-WT MEF)と K209R を TAK1欠損 MEF に安定発現させた細胞(TAK1-K209R MEF)に対して、IL-1刺激を与えた。TAK1-WT MEFと比較して TAK1-K209R MEF では、TAK1欠損 MEF と同程度に、TAK1活性化、NF-κB 活性化、さらには、NF-κB の標的遺伝子である IL-6の mRNA 発現量も著しく減弱した。これらの結果は、TAK1のポリユビキチン化は TAK1自身の活性化とそれに続く NF-κB の十分な活性化

や IL-6産生に必要であることが示された。

TAK1のポリユビキチン化は TAK1、MEKK3、TRAF6を含む複合体の形成に必要である

TAK1のポリユビキチン化はどのような分子機構で TAK1自身の活性化を制御しているのだろうか？本研究では、TAK1の活性化に必要な分子を同定することで制御機構についての手掛かりを得ようと考えた。そこで着目した分子が上述の MEKK3である。MEKK3欠損 MEF に野生型の MEKK3、又はリン酸化活性を消失させた MEKK3を安定発現させ、IL-1シグナル依存的な TAK1の活性化を検討したところ、野生型を発現させた MEF では TAK1の活性化が確認されたのに対し、リン酸化活性が消失した MEKK3を発現させた MEF と MEKK3欠損 MEF では TAK1活性化の顕著な減少が見られた。これより MEKK3は TRAF6と同様に、TAK1の活性化に必要な分子であることが示されたため、これら3分子が複合体を形成するのではないかと考え、IL-1シグナル依存的な免疫沈降実験を試みた。MEKK3抗体、又は TAK1の抗体で免疫沈降したところ、IL-1刺激後5分で TRAF6と TAK1の結合及び MEKK3と TAK1の結合が確認され、刺激後30分にはそれらの結合は消失した。TAK1抗体で免疫沈降しても同様な結果が確認された。さらに、これら3分子の結合は3分子内1分子でもないと残りの両者は結合を維持できないことをそれぞれの欠損 MEF を用いて証明した。この結果は、別々の空間で起こっている2分子同士が結合しているのではなく、TRAF6、TAK1、MEKK3の3分子同士が複合体を形成することを示唆している。

さて、この3分子の複合体形成に TAK1のポリユビキチン化がどのように関与するかを、TAK1-WT MEF と TAK1-K209R MEF を用いて検討した。驚くべきことに、TAK1-WT MEF で確認された複合体形成が TAK1-K209R MEF では殆ど消失した。これらの結果から TAK1のポリユビキチン化は TRAF6、TAK1、MEKK3から構成される IL-1シグナル依存的な複合体形成に必要であることが示された。そして、この複合体形成により、MEKK3による TAK1の活性化が促されることが示唆された。

TRAF6は機構的、時間的に異なる2つの NF-κB 活性化経路を制御する

上述した TAK1のポリユビキチン化を介する経路は TRAF6の RING ドメインを必要とするが、我々は以前、TRAF6の欠損 MEF に TRAF6の RING ドメインを欠損した変異体でも NF-κB 活性化能力は残存するが、RING と Zinc ドメインの両方を欠損させた TRAF6変異体では NF-κB 活性化能力は完全に消失することから、TRAF6の Zinc ドメインから生じる NF-κB 活性化経路が存在することを明らかにした。RING ドメインを介す経路を RING 経路、Zinc ドメイン経路を Zinc 経路と便宜的に呼びたい。本研究においては、この Zinc 経路の分子機構と生理機能についての解析を試みた。そのためにまず、Zinc 経路のみが機能しない TRAF6変異体の構築を試みた。結果として、TRAF6は5つの Zinc ドメインを持つのだが、N 末端側から数えて5番目の Zinc ドメインの機能を潰した変異体(TRAF6-mZ5)がそのような変異体であることを示した。

そして、野生型の TRAF6と上述した2種類の TRAF6変異体を TRAF6欠損 MEF に安定発

現させた細胞(TRAFF6-WT MEF、TRAFF6- \otimes R MEF、TRAFF6-mZ5 MEF)における EMSA を用いた NF- κ B の DNA 結合能力を比較した。すると TRAFF6- \otimes R MEF では時間的に早い NF- κ B 活性化の抑制が見られ、TRAFF6-mZ5 MEF においては時間的に遅い NF- κ B 活性化の抑制が見られた。これより、両方の経路は機構的(ユビキチン化を伴うか否か)に異なるだけではなく、時間的(RING 経路が早く、Zinc 経路が遅い)にも異なった NF- κ B 活性化経路であることが示された。

最後に Zinc 経路の生理機能を理解するために NF- κ B 標的遺伝子の発現に着目した。Real-time PCR を用いて IL-1刺激後の NF- κ B 標的遺伝子の mRNA 量を比較検討したところ、TRAFF6-WT MEF と比べて TRAFF6-mZ5 MEF では IL-6, IRF1の発現量は僅かな減少に留まったが、TNF α , CCL2, CXCL10の発現量は顕著な減少が見られた。これらの結果から、Zinc 経路が一群の NF- κ B 標的遺伝子の発現誘導に重要な役割を果たしていることが明らかにされた。

まとめ

本研究において、IL-1刺激依存的に TRAFF6、TAK1、MEKK3がシグナル複合体を形成することを示し、この複合体形成には TAK1の K63型のポリユビキチン化が必要であることを見出した。この様にリン酸化酵素である TAK1自身が K63型のポリユビキチン化を受けることで、シグナル複合体形成を促し、自身を活性化させるという全く新しいシグナル制御機構を発見した。

また、TRAFF6がドメインごとに機構的、時間的に異なる2つの NF- κ B 活性化経路を使い分けていることを証明した。それぞれの経路に依存度が高い転写産物群が存在することから、『TRAFF6が下流の分子群を巧妙に操作する指揮者としての役割を果たすことで、IL-1シグナルにおける炎症反応や免疫応答を精密に制御する』という TRAFF6による二相性 NF- κ B 活性化モデルを提唱したい。

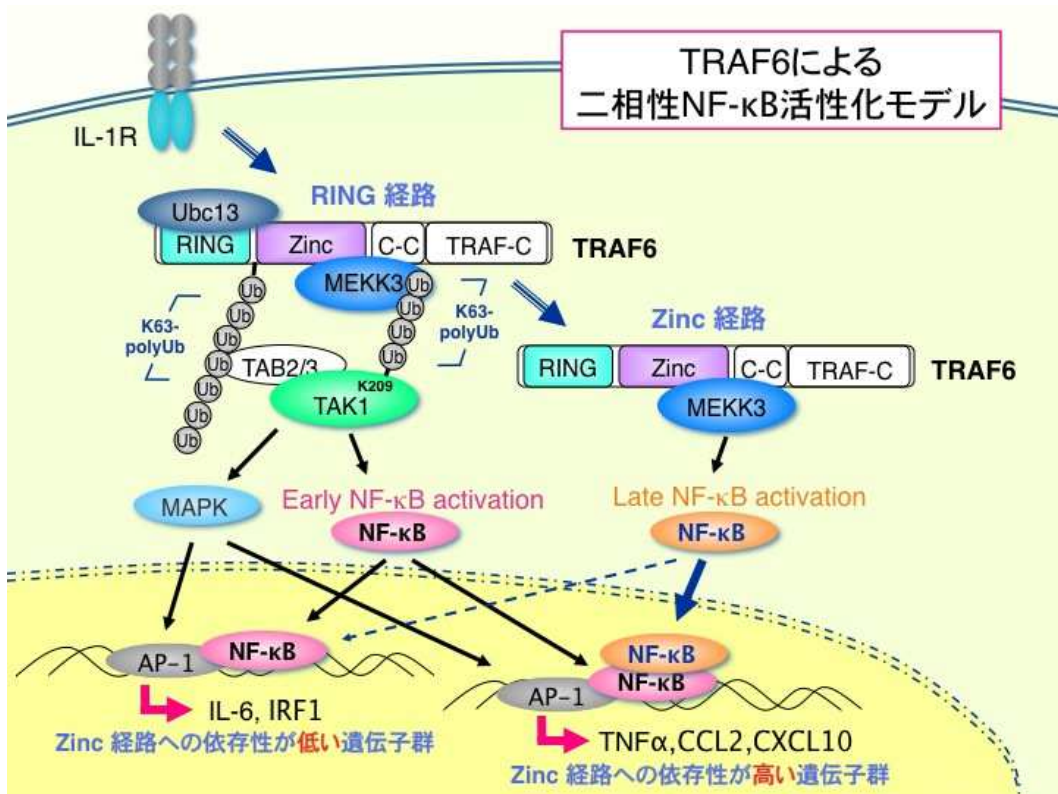


図2 IL-1シグナルにおける TRAF6による二相性 NF-κB 活性化モデル