

# 論文審査の結果の要旨

氏名 茂木 秀彦

TRAF6はTNFRスーパーファミリーやToll/IL-1Rファミリーからのシグナルを転写因子NF- $\kappa$ BやAP-1の活性化へと導くタンパク質として知られている。またTRAF6欠損マウスの解析によりTRAF6が、骨代謝、免疫寛容、自然免疫や皮膚付属器形成等様々な生命現象に関わることも報告されており、その重要性が注目されている。近年、これまでとは異なるTRAF6の機能が報告された。従来、TRAF6は転写因子NF- $\kappa$ BやAP-1の活性化を正に制御する因子と考えられてきたが、T細胞のTRAF6はCD28補助シグナルにおいて負の制御因子として機能することが報告された。しかしT細胞におけるTRAF6の機能については明確な結論に至っておらず更なる解析が必要である。本研究では、TRAF6欠損マウスの胸腺細胞を用いてTRAF6の新たな機能を明らかにした。

野生型マウス(WT)及びTRAF6欠損マウス(*Traf6*<sup>-/-</sup>)のCD4<sup>+</sup>T細胞にTCR刺激を加えると、WTに比べて*Traf6*<sup>-/-</sup>で細胞増殖の亢進が認められた。またT細胞の増殖に重要なサイトカインIL-2もタンパク産生、mRNA発現共に*Traf6*<sup>-/-</sup>で亢進が認められた。次にIL-2産生に関する転写因子(NF- $\kappa$ B、AP-1、NFAT)の解析を行った結果、TCR刺激によるNF- $\kappa$ Bの活性化、NFATc1の発現はWT、*Traf6*<sup>-/-</sup>で差は認められなかったが、AP-1の活性化が*Traf6*<sup>-/-</sup>で亢進していることが認められた。またAP-1の構成因子であるc-Fosの発現亢進も認められた。以上の結果より、TRAF6はc-Fos及びAP-1の活性化を負に制御することで、IL-2産生、細胞増殖を負に制御していることが示唆された。

次にTRAF6によるc-Fos及びAP-1の活性化制御メカニズムを検討した。T細胞はTCR刺激によりIL-2を産生し、そのIL-2が自身のIL-2受容体(IL-2R)に作用することで増殖が誘導される。またこのIL-2刺激がc-Fosの発現やIL-2産生を誘導する。そこで、IL-2中和抗体存在下でTCR刺激を行うことで、TCR刺激により誘導されたIL-2 mRNA量を検討した。その結果IL-2中和抗体存在下でのIL-2 mRNAはWTと*Traf6*<sup>-/-</sup>で同程度までに減少した。この結果はTRAF6がIL-2シグナルを負に制御している可能性を

強く示唆している。

そこで IL-2 シグナルにおける TRAF6 の機能を検討した。T 細胞を活性化し IL-2 受容体の発現を誘導後、IL-2 中和抗体で細胞を休止させ、再び IL-2 で刺激した。その結果、*Traf6*<sup>-/-</sup>において c-Fos の発現を誘導すると考えられている JAK1、Erk の活性化亢進が認められた。即ち TRAF6 は IL-2 シグナルを負に制御することで c-Fos の発現を制御していることが示唆された。

次に TRAF6 による IL-2 シグナルの制御機構について検討した。IL-2R は  $\alpha, \beta, \gamma$  の三量体で構成されている。アライメント解析により IL-2R $\beta$ 上に様々な種で高度に保存されている TRAF6 結合配列が存在することが判明した。さらにその配列を介して IL-2R $\beta$ と TRAF6 が結合することも確認した。そこで、マウス胎仔線維芽細胞(MEF)を用いた IL-2 シグナル再構成系により以下の実験を行った。IL-2R $\beta$ の TRAF6 結合配列に部分変異を入れ、TRAF6 と結合できない IL-2R $\beta$ (E300A)を発現させた MEF(IL-2R $\alpha$ + $\beta$ E300A+ $\gamma$ )と、正常な IL-2R $\beta$ を発現させた MEF(IL-2R $\alpha$ + $\beta$ + $\gamma$ )の IL-2 シグナルを比較した。その結果 MEF(IL-2R $\alpha$ + $\beta$ E300A+ $\gamma$ )において、JAK1・Erk の活性化亢進、*c-fos*・mRNA の発現亢進が認められた。これらの結果から、TRAF6 は IL-2 シグナルを IL-2R $\beta$ 結合依存的に負に制御することで、c-Fos の発現を制御するという TRAF6 の新たな機能を明らかにした。

なお、本論文は、秋山泰身、井上純一郎との共同研究であるが、論文提出者が主体となって検証したもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。