

論文内容の要旨

論文題目 新規 NF- κ B 活性化抑制因子 p47 の同定と 機能解析

氏名 柴田 佑里

【緒言】

NF- κ B は炎症、免疫応答、細胞分化や増殖など広範な生命現象に必要な転写因子である。無刺激時、NF- κ B は inhibitor of NF- κ B (I κ B) と結合し、核移行シグナルが遮蔽された不活性型の状態で細胞質に繫留されている。NF- κ B の活性化は刺激依存的な I κ B の分解により誘導されるが、I κ B の分解はリン酸化触媒サブユニットの IKK α と IKK β 、調節サブユニットの NEMO で構成される I κ B kinase (IKK) 複合体によって厳密に制御されている。細胞がサイトカイン (IL-1、TNF- α) などの刺激を受けると、レセプター下流の分子 receptor-interacting protein 1 (RIP1) や NEMO のユビキチン化が誘導される。すると、これらのポリユビキチン鎖を足場として下流分子が複合体を形成し、その結果 IKK 複合体が活性化する。活性化した IKK 複合体は I κ B α のリン酸化を誘導し、このリン酸化を指標として I κ B α はプロテアソームによって分解される。その後、NF- κ B は核内に移行して標的遺伝子の転写を促進する。このように、NF- κ B 活性化経路においてポリユビキチン鎖を介した IKK 複合体の活性化は非常に重要なステップである。

通常、NF- κ B の活性化は一過性となるように厳密に制御されている。そのため、NF- κ B の制御機構の破綻は様々な疾患の原因となる。恒常的な NF- κ B 活性化は細胞腫瘍化、腫瘍悪性化に関与することが示されており、ヒトレトロウイルス Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) の感染によって発症する成人 T 細胞性白血病 (Adult T-cell leukemia: ATL) は恒常的に NF- κ B が活性化している腫瘍のひとつとして知られている。HTLV-1 のプロウイルスゲノムには Tax タンパク質がコードされており、Tax は恒常的な NF- κ B の活性化を誘導して T 細胞を腫瘍化すると考えられている。これまでの研究により、Tax は NEMO に結合して IKK 複合体活性化を誘導

すること、それと同時に Tax は NF- κ B 活性化抑制分子 A20 の機能を阻害して IKK 複合体活性化を持続させることが示されている (図 1)。しかしながら、Tax による恒常的な IKK 複合体活性化機構の全容は明らかとなっていない。そこで、1) IKK 複合体活性化に関与し、2) Tax によりその機能が制御される分子を新たに同定するために本研究を行った。

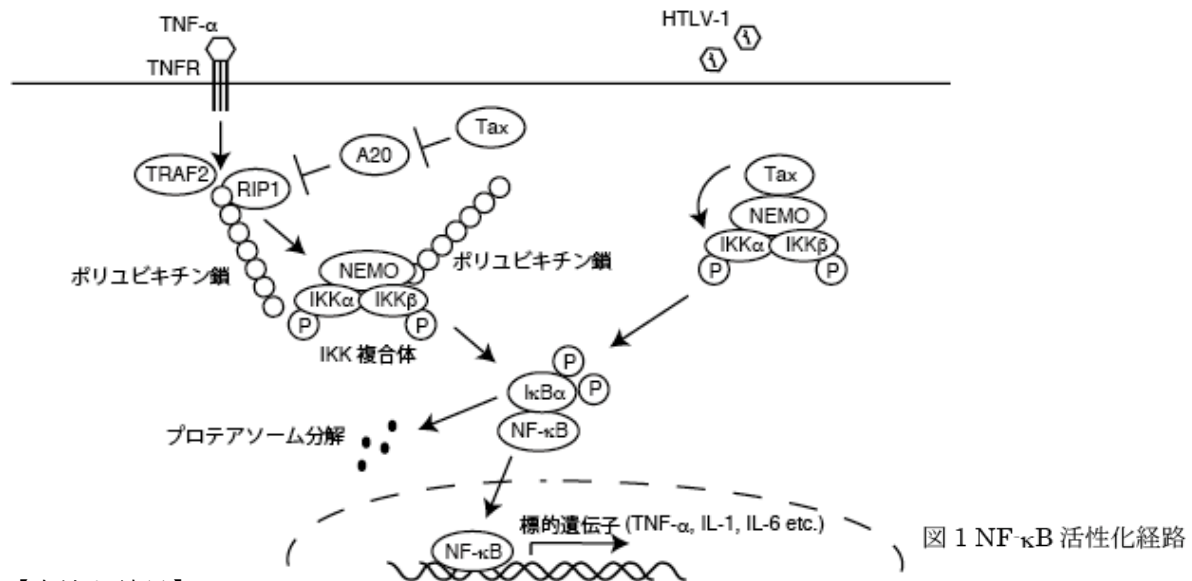


図 1 NF- κ B 活性化経路

【方法と結果】

マス解析により新規 IKK 複合体結合タンパク質として p47 (NSFL1C) を同定し、p47 は Tax 依存的に IKK 複合体から解離することを見出した (図 2)。p47 は IKK 複合体のどの構成分子に結合するのか検討したところ、p47 と IKK α 、IKK β の結合は確認できなかったのに対して、NEMO と p47 の結合は検出することができた (図 3)。

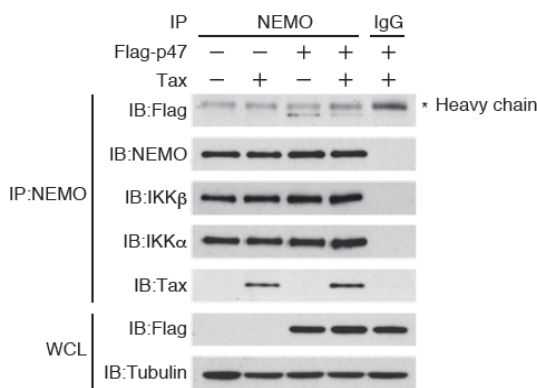


図 2 p47 と IKK 複合体の結合

HEK 293T 細胞に Flag タグ付加 p47 を発現させた後、抗 NEMO 抗体を用いて共免疫沈降を行った。IKK 複合体に結合している p47 をウェスタンブロットングによって検出した。

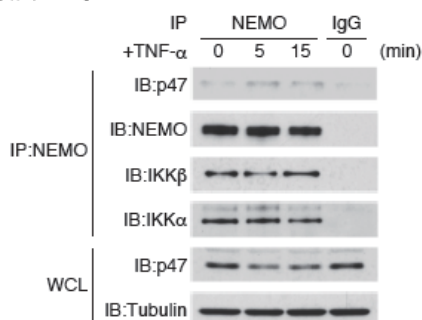


図 4 内在性 p47 と IKK 複合体の結合

HeLa 細胞を表記した時間で TNF- α (10 ng/ml) 処理した後、抗 NEMO 抗体を用いて共免疫沈降を行った。その後、IKK 複合体に結合している p47 をウェスタンブロットングによって検出した。

さらに、内在性の p47 が IKK 複合体と結合するかどうか検討したところ、TNF- α 刺激依存的に p47 と IKK 複合体の結合が増強することが明らかとなった (図 4)。以上の結果から、サイトカイン刺激後に p47 は NEMO を介して IKK 複合体に結合することが示唆された。

p47 は ATP アーゼ p97 の補助因子として同定されたタンパク質で、ゴルジ体の膜形成に関与することが報告されている。しかし、p47 の IKK 複合体活性化経路における機能は解析されていない。p47 と IKK 複合体の結合は Tax によって阻害されることから、A20 と同様に p47 は IKK 複合体活性化の負の制御分子であるのではないかと仮説を立てた。そこで p47 を標的とした small interfering RNA (siRNA) を用いて p47 の発現を抑制した後、TNF- α によって誘導される I κ B α のリン酸化をウェスタンブロットティングにより検出した。その結果、p47 発現抑制によって I κ B α のリン酸化は亢進し、それに伴い I κ B α の分解も促進していることが明らかとなった (図 5)。次に、NF- κ B レポーターアッセイを行って p47 の過剰発現および発現抑制が NF- κ B 転写活性化に影響を与えるかどうか検討した。p47 を過剰発現させると TNF- α により誘導される NF- κ B 転写活性は減弱した。一方、p47 の発現を抑制すると NF- κ B 転写活性は上昇した (図 6)。さらに、p47 が NF- κ B 標的遺伝子の発現に影響を与えるかどうか検討するために、リアルタイム PCR を行って標的遺伝子の転写産物量を測定した。その結果、p47 発現抑制によって NF- κ B 標的遺伝子 *I κ B* および *Tnfa* の発現が上昇することが明らかとなった (図 7)。以上の結果から、p47 は新規 NF- κ B 活性化抑制因子であることが示唆された。

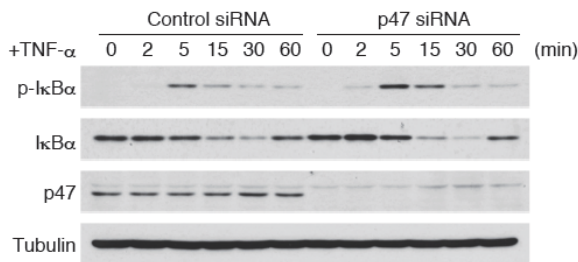


図 5 p47 発現抑制の IKK 活性化への影響

HeLa 細胞に p47 siRNA または control siRNA を導入し、TNF- α (1.0 ng/ml) 処理を行った。その後細胞を回収し、ウェスタンブロットティングによって I κ B α のリン酸化を検出した。

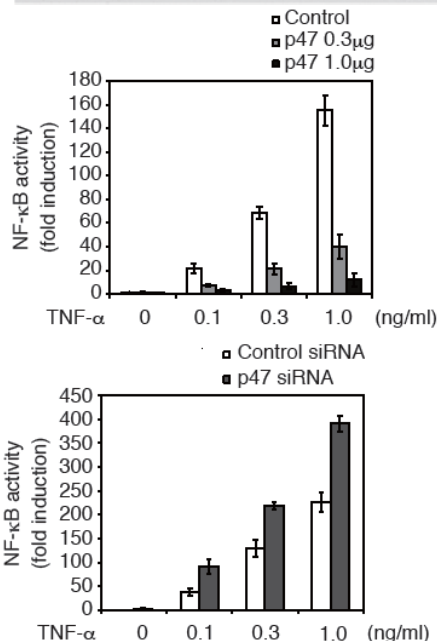


図 6 p47 過剰発現および発現抑制の NF- κ B 活性化への影響
HEK 293T 細胞に Flag タグ付加 p47 と NF- κ B レポーターを導入した後、表記の濃度で TNF- α 処理を行った。24 時間後、ルシフェラーゼアッセイを行ってレポーター活性を測定した。p47 発現抑制効果は、HEK 293T 細胞に p47 siRNA と NF- κ B レポーターを導入し、以後上記と同様の実験を行って検討した。

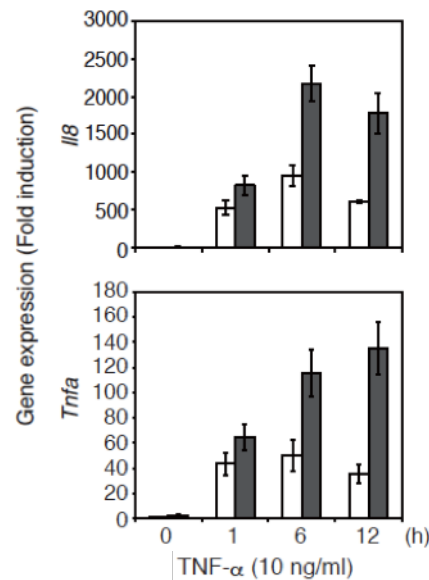


図 7 p47 発現抑制の NF- κ B 標的遺伝子発現への影響
HeLa 細胞に p47 siRNA または control siRNA を導入し、表記の時間 TNF- α (10 ng/ml) 処理を行った。回収した RNA を鋳型として cDNA を調製し、リアルタイム PCR によって *I κ B* および *Tnfa* の mRNA 量を測定した。

次に、我々は p47 による IKK 複合体抑制メカニズムの解明を試みた。はじめに、IKK 複合体活性化を抑制するために必要な p47 のドメインの決定を行った。p47 は N 末端側に UBA ドメイン、中央に SEP ドメイン、C 末端側に UBX ドメインを有している。各ドメインを欠損させた p47 変異体を作成し、これら変異体が NF-κB 活性化を抑制するかどうか検討した。p47-WT 同様に p47-ΔUBX は TNF-α により誘導される NF-κB 活性化を抑制したが、p47-ΔUBA、p47-ΔUBA/SEP は NF-κB 抑制能が低下していた (図 8)。この結果から、p47 の UBA ドメインは IKK 複合体活性化を抑制するために必要であることが示唆された。UBA ドメインはポリユビキチン鎖に結合することが知られている。また、p47 が結合する NEMO は刺激依存的にユビキチン化修飾を受けること、NEMO のポリユビキチン化は IKK 活性化に必要であることから、p47 はポリユビキチン化 NEMO を制御しているのではないかと仮説を立てた。そこで、p47 の発現を抑制し、サイトカイン刺激により誘導されるユビキチン化 NEMO を検出した。その結果、p47 の発現を抑制した場合に、サイトカイン刺激後 5、15 分におけるユビキチン化 NEMO が蓄積していた (図 9)。以上の結果から、p47 は UBA ドメインを介してポリユビキチン化 NEMO に結合して、ポリユビキチン化した NEMO の量を減少させることが示唆された。

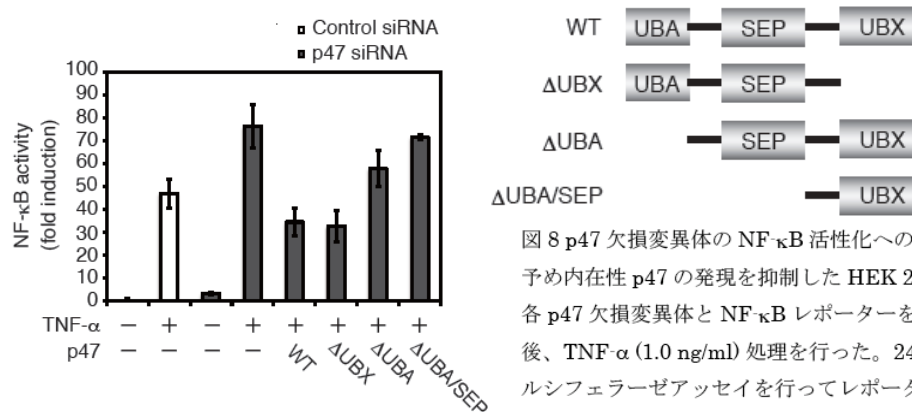


図 8 p47 欠損変異体の NF-κB 活性化への影響
 予め内源性 p47 の発現を抑制した HEK 293T 細胞に各 p47 欠損変異体と NF-κB レポーターを発現させた後、TNF-α (1.0 ng/ml) 処理を行った。24 時間後、ルシフェラーゼアッセイを行ってレポーター活性を測定した。

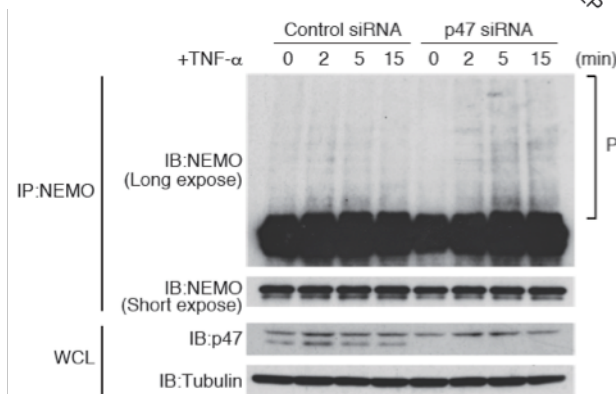


図 9 p47 発現抑制のポリユビキチン化 NEMO への影響
 HeLa 細胞に p47 siRNA を導入し、表記の時間 TNF-α (10 ng/ml) 処理を行った。抗 NEMO 抗体を用いて免疫沈降を行った後、ウェスタンブロッティングによってポリユビキチン化 NEMO を検出した。

【結語】

以上の結果から、p47 は新規 NF-κB 活性化抑制因子であること、p47 はポリユビキチン化 NEMO の量を減少させることによって NF-κB 活性化を負に制御することが示唆された。Tax は p47 と IKK 複合体の結合を阻害することによって、IKK 複合体活性化を持続させるのではないかと考えている (図 10)。

図 10 p47 による NF-κB 抑制機構

