

# 論文審査の結果の要旨

氏名 柴田 佑里

本研究は新規 IKK 複合体結合タンパク質として p47 (NSFL1C) を同定し、p47 の NF- $\kappa$ B 活性化経路における機能を解析したものであり、以下の結果を得ている。

1. HEK 293T 細胞強制発現系を用いた共免疫沈降実験により、p47 は IKK 複合体構成分子 NEMO に結合することを明らかにした。一方、他の構成分子 IKK $\alpha$ 、IKK $\beta$ との結合は認められなかった。また、TNF- $\alpha$ および IL-1 刺激依存的に内在性 p47 と IKK 複合体が結合することを明らかにした。以上の結果から、p47 はサイトカイン刺激依存的に NEMO を介して IKK 複合体に結合することが示された。

2. p47 が IKK 複合体活性化制御に関与しているか検討するために、I $\kappa$ B $\alpha$ を基質とした *in vitro* キナーゼアッセイを行った。その結果、p47 を強制発現させると TNF- $\alpha$  により誘導される IKK キナーゼ活性が減弱すること、siRNA を用いて内在性 p47 の発現を抑制すると IKK キナーゼ活性が増強することを明らかにした。さらに、p47 の発現を抑制した際に、TNF- $\alpha$ および IL-1 刺激により誘導される I $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化、分解が亢進していることもウェスタンブロッティングにより確認した。以上の結果から、p47 は IKK 複合体を負に制御していることが示された。

3. p47 が NF- $\kappa$ B 活性化を抑制するかどうか検討するために、NF- $\kappa$ B レポーターを用いたルシフェラーゼアッセイを行った。p47 を強制発現させた際に TNF- $\alpha$  により誘導される NF- $\kappa$ B 転写活性が減弱すること、内在性 p47 の発現を抑制させた際に NF- $\kappa$ B 転写活性が増強することを明らかにした。また、サイトカイン刺激後に核内に存在する NF- $\kappa$ B を EMSA により検出したところ、内在性 p47 の発現を抑制した場合において TNF- $\alpha$ および IL-1 刺激後における核内の活性化した NF- $\kappa$ B の量が増加することも確認した。さらに、サイトカイン刺激後の NF- $\kappa$ B 標的遺伝子 *I $\kappa$ B*、*Tnfa* の転写産物量をリアルタイム PCR により測定したところ、内在性 p47 の発現を抑制した際にこれらの転写産物量が上昇することも明らかにした。以上の結果から、p47 は IKK 複合体の活性化を抑制することによって NF- $\kappa$ B 活性化を負に制御することが示された。

4. p47 のユビキチン結合ドメインを欠損させた変異体では NF- $\kappa$ B 抑制能が顕著に減弱することから、p47 のユビキチン結合能が NF- $\kappa$ B 活性化制御に重要であることが明らかとなった。また、p47 はポリユビキチン化された NEMO に結合することを *in vitro* の結合実

験を行って確認した。さらに、p47 が優先的に結合するポリユビキチン鎖の型を *in vitro* ユビキチン結合実験により解析したところ、p47 は 48 型ポリユビキチン鎖と比較して 63 型、直鎖状のポリユビキチン鎖に優先的に結合することを明らかにした。以上の結果から、p47 のポリユビキチン化 NEMO への結合が NF- $\kappa$ B 活性化を抑制するために重要であることが示唆された。

5. p47 がポリユビキチン化 NEMO の量を制御するかどうか検討するために、HEK 293T 細胞に p47、NEMO を共発現させて、ポリユビキチン化 NEMO をウェスタンブロッティングにより検出した。その結果、ポリユビキチン化 NEMO の量は p47 発現量依存的に減少することを明らかにした。また、リソソーム阻害剤 pepstatin A/E64D 処理によって p47 により減少する NEMO の発現量が回復することも明らかにした。さらに、pepstatin A/E64D 処理および内在性 p47 の発現抑制を行った際に、TNF- $\alpha$ によって誘導されるポリユビキチン化 NEMO が蓄積することも明らかにした。以上の結果から、p47 はリソソームを介したポリユビキチン化 NEMO の分解を誘導することによって、NF- $\kappa$ B 活性化を抑制することが示唆された。

なお、本論文は合田仁、尾山大明、秦裕子との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

以上、本論文は新規 IKK 複合体結合分子 p47 を同定し、p47 が IKK 複合体活性化を負に制御する機構を新たに見出しており、NF- $\kappa$ B 活性化制御機構の解明に重要な貢献を成すと考えられる。従って、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。