

論文の内容の要旨

論文題目 DNA損傷性NF- κ B活性化経路における
アセチル基転移酵素ARD1の機能解析

氏 名 朴鍾圭

NF- κ B は、B 細胞の免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子のエンハンサー領域に結合する転写因子として、1986 年 Sen と Baltimore によって発見された。当初、B 細胞に特異的に存在していると思われたが、現在では非常に幅広い細胞で存在していることが分かっている。ハエからクラゲまでほぼ全ての動物細胞の細胞質に存在し、200 以上の遺伝子の発現をコントロールする。炎症や免疫反応、細胞増殖やアポトーシスに深くかかわる遺伝子群を制御する。

NF- κ B は、構造の中に Rel ホモロジドメインをもつヘテロ、またはホモ二量体の総称である。NF- κ B のサブユニットは 5 種類知られており (RelA, RelB, c-Rel, p105/p50, p100/p52)、それぞれの組み合わせは、活性化される経路によりある程度決まっている。

NF- κ B の活性化経路は、主に、古典的経路、非古典的経路、及び、DNA 損傷性経路の 3 種類に分類できる。古典的 NF- κ B 活性化経路は、炎症性サイトカイン (TNF α , IL-1, LPS) により始まり、対応する各受容体を介して活性化シグナルが伝達される。受容体から入った刺激は RIP1 のポリユビキチン鎖修飾を介して、下流の NEMO を含む IKK 複合体を活性化することが知られている。非古典的 NF- κ B 活性化経路もまた、免疫や炎症に関連するサイトカイン (LT β , BAFF, CD40) により受容体を経て活性化され、NF- κ B inducing kinase (NIK) の活性化とそれに続く IKK α の活性化を経て NF- κ B が活性化される。

一方、DNA 損傷性経路は、紫外線や酸化ストレス、抗がん剤などにより、DNA 二重鎖が切断されることによって活性化される。受容体を介さず、DNA 二重鎖断裂という核内のシグナルを細

胞質に伝達するという点で、古典的経路や非古典的経路とはシグナルの出発点と方向性が大きく異なる。古典的経路において細胞質内で機能する RIP1 が、DNA 損傷性経路では核内で NEMO と複合体を形成する必要がある。しかし、DNA 損傷性 NF- κ B 活性化経路上流域において、RIP1 がどのように DNA 損傷シグナルを感知し、核内にどのタイミングで移行するかなどほとんど明らかにされていない。近年、細胞増殖、アポトーシスといった現象にアセチル基転移酵素 ARD1 の関与が示唆されている。本研究の過程で、NF- κ B 活性化経路における鍵となる分子 RIP1 が ARD1 と結合することを見つけた。このことを手掛かりに、抗がん剤ドキシソルビシンによって誘導される DNA 損傷性 NF- κ B 活性化経路に ARD1 がどのように関与するかを詳細に調べることにした。

NF- κ B 活性化における ARD1 の役割を調べるために、RIP1 が関与する DNA 損傷性 NF- κ B 活性化経路と古典的 NF- κ B 活性化経路について、ARD1 ノックダウンの影響を検討した。DNA 損傷性経路には、DNA 二重鎖を切断することによって NF- κ B を活性化するドキシソルビシンを用い、古典的経路では代表的な TNF α を用いた。ARD1 を標的とする siRNA と共に、NF- κ B 活性化に伴ってルシフェラーゼを発現するレポータープラスミドを HEK293 細胞に導入し、レポーターアッセイにて NF- κ B の活性化を評価した。ARD1 のノックダウンには異なる配列の 3 種類の siRNA をそれぞれ用い、ウェスタンブロットングにて解析した結果、どの種類も効果的に ARD1 の発現を抑制した。ドキシソルビシン処理した細胞では未処理の細胞と比較して約 8 倍 NF- κ B が活性化されたが、ドキシソルビシン処理に加え ARD1 をノックダウンした細胞ではこの活性化が抑制された。対照的に、TNF α で NF- κ B を活性化させた場合は、コントロールと比較して ARD1 をノックダウンした細胞においても、有意な差は認められなかった。

次に、ARD1 を過剰発現させた条件でドキシソルビシン処理すると、ARD1 発現量依存的に NF- κ B の活性が促進される傾向が見られた。これらの結果は、ARD1 が TNF α 刺激による古典的 NF- κ B 活性化ではなく、DNA 損傷性 NF- κ B 活性化経路において、ポジティブメディエーターとして働くことを示唆する。

DNA 損傷性 NF- κ B 活性化経路では、PIDD によって感知されたシグナルを RIP1 が NEMO に伝達することが報告されている。そこで、RIP1 誘導性 NF- κ B 活性化における ARD1 の影響をレポーターアッセイで調べた。HEK293 細胞に RIP1 を過剰発現させた条件で、さらに ARD1 を過剰発現させると、ARD1 発現量依存的に NF- κ B の活性化が促進された。

HEK293 細胞に ARD1 と RIP1 を共発現させ、得られた細胞質画分のライセートを用いて免疫沈降を行った結果、ARD1 の共沈物として RIP1 が確認できた。さらに、ARD1 の RIP1 との結合ドメインを決定するために、ARD1 について 3 種類の欠損変異体を作製した。ARD1 は、主に N 末ドメイン (1-44 アミノ酸)、アセチル基転移ドメイン (45-130 アミノ酸)、及び C 末ドメイン (179-235 アミノ酸) からなる。HA タグ付きの各欠損変異体 (ARD1 Δ N, ARD1 Δ AT, ARD1 Δ C) を Myc タグ付きの RIP1 と共発現させて、抗 Myc 抗体を用いて免疫沈降を行った。ARD1 Δ N と ARD1 Δ C は RIP1 と共沈降したが、ARD1 Δ AT は共沈降しなかった。この結果から、ARD1 のアセチル基転移酵素ドメインが RIP1 との結合に必要であることが示唆された。

次にドキシソルビシン誘導性 NF- κ B 活性化経路における ARD1 の N 末とアセチル基転移酵素ドメインの寄与をレポーターアッセイで調べた。HEK293 細胞に、ARD1 の各欠損変異体を過剰発現させ、ドキシソルビシン処理を行った結果、ARD1 野生型と異なり、ARD1 Δ N と ARD1 Δ AT では、NF- κ B の活性化が上昇しなかった。しかし、ARD1 Δ N は RIP1 と結合し ARD1 Δ AT は結合しないことから、両変異体の機能欠損が NF- κ B 活性化に与える影響は異なるメカニズムである可能性が

考えられる。

DNA 損傷性 NF- κ B 活性化経路では、RIP1 は PIDD や NEMO と核内で複合体を形成し、NEMO の SUMO 化、リン酸化に引き続き、ユビキチン化が起こる。ドキシソルビン誘導性 NF- κ B 活性化経路上流で生じる NEMO ユビキチン化への ARD1 の影響を、HEK293 細胞を用いて調べた。ARD1 を強制発現させた場合、ドキシソルビン処理 2~4 時間で NEMO のユビキチン化が促進され、6 時間経過するとユビキチン化が消失した。この結果は、HEK293T 細胞を用いた過去の報告において、ドキシソルビン処理後 4 時間で NEMO が SUMO 化及びユビキチン化された傾向と一致した。

ARD1 のアセチル基転移酵素活性が NF- κ B 活性化経路の初期段階で関与している可能性があることから、ARD1 アセチル基転移酵素活性をなくした変異体 ARD1(R82A/G85A)を作製し、NF- κ B 活性化への影響を調べた。ARD1 は 82 番目から 87 番目までアミノ酸残基の間アセチル-CoA 結合部位 (RRLGLA) を持ち、この変異体は酵素活性を示さないことが知られている。そこで、82 番目のアルギニンと 85 番目のグリシンをアラニンに置換した。脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチン A (TSA) 存在下、ドキシソルビン処理した細胞では、コントロールに対して約 5 倍活性化し、ARD1 を過剰発現させた細胞ではさらに 12 倍まで活性化が促進された。一方、ARD1(R82A/G85A) を過剰発現させた細胞では、ドキシソルビン処理による NF- κ B の活性化を促進しなかった。この結果から、ARD1 のアセチル基転移酵素活性がドキシソルビン誘導性 NF- κ B 活性化に必要であることが強く示唆される。

ARD1 Δ N は RIP1 と結合するが、ドキシソルビン誘導性 NF- κ B 活性化を促進しなかった。この原因を調べるために、HA タグをつけた ARD1 野生型、ARD1 Δ N、及び ARD1(R82A/G85A)の発現ベクターを用いて、細胞内局在を調べた。ARD1 野生型と ARD1 (R82A/G85A)では、細胞質に加え核内での局在が確認できたが、ARD1 Δ N はそれらに比べて核内の局在が減少していた。この結果は、ARD1 の核移行シグナルが N 末側に存在する可能性を示し、ARD1 の核移行がドキシソルビン誘導性 NF- κ B 活性化に必要であることを示唆している。

本実験では、1. ARD1 がアセチル基転移酵素ドメインを介して RIP1 と結合してこと、2. ドキシソルビン誘導性 NF- κ B 活性化に ARD1 のアセチル基転移酵素活性が必要であること、3. ARD1 は N 末端を利用して核内へ移行していること、が分かった。ドキシソルビン誘導性 NF- κ B 活性化経路における ARD1 アセチル基転移酵素活性の標的分子は明らかではないが、RIP1 は ARD1 と結合することから、その酵素活性の基質となる有望な候補であることが予想される。今後、ARD1 が DNA 損傷性 NF- κ B 活性化経路に関与することの生理的意義を含め、ARD1 のアセチル基転移酵素活性のターゲット分子の探索、ARD1、RIP1、PIDD、及び NEMO 間の相互作用をより詳細に調査することが望まれる。