

論文の内容の要旨

論文題目 **NF- κ B** 活性化を誘導するシグナル伝達分子

NIK の新規活性化制御機構と生理機能の同定

氏 名 新澤 未穂

【緒言】

転写因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B) は、炎症反応や細胞増殖、アポトーシスなど多岐にわたる生命現象に関与している。NF- κ B の活性化は、炎症、自然免疫に関与する遺伝子の発現を促す古典的経路と、リンパ組織の構築に関わる遺伝子発現を制御する非古典的経路という 2 つの機構によって誘導される。NF- κ B inducing kinase (NIK) は、欠損マウスや変異マウスの解析から、非古典的経路の活性化に必須なシグナル伝達分子であることが明らかとなっている。一方で、過剰発現した NIK は、古典的経路の活性化にも寄与することが報告されている。

リンパ節形成不全のマウスとして C57BL/6 系統コロニーから樹立された *alymphoplasia* (*aly/aly*) マウスは、NIK 遺伝子に点変異を持ち、その解析から NIK がリンパ組織の形成や骨代謝など重要な生理機能に寄与することが示されてきた。これまでに多くの例において、マウスの遺伝的背景の違いが遺伝子欠損マウスの表現型に影響することが報告されている。そこで本研究では、初めに「NIK の新たな生理機能の同定」を目的として遺伝的背景が異なる *aly/aly* マウスの解析を行った。

さらに私は、NIK の活性化を制御する分子機構に着目した。通常、NIK は、E3 リガーゼである cIAP がポリユビキチン鎖を付加することでプロテアソーム依存的に分解されている。cIAP は、TRAF2、TRAF3 と複合体を形成し、TRAF3 にリクルートされた NIK に作用する。上流の受容体から細胞内に

NIK を活性化するシグナルが伝達されると、TRAF3-TRAF2-cIAP 複合体は受容体に結合し、ついで cIAP による複合体の分解が起こる。これにより、分解されていた NIK が安定化し細胞内に蓄積する。その後、蓄積した NIK は、自己リン酸化によって活性化し、NF- κ B の核内移行を誘導して標的遺伝子の転写を促進する。これまでの研究から、多発性骨髄腫や悪性リンパ腫において NIK が異常に蓄積することが示されており、NIK の発現量を適切に調節する分子機構の重要性が推察できる。しかしながら、NIK の活性化制御機構は不明な点が多く、全容は明らかになっていない。そこで本研究では「NIK 活性化制御機構の全貌解明」を第二の目的とし研究を遂行した。

【方法と結果】

【1】 NIK の新たな生理機能の同定

遺伝的背景が異なる *aly/aly* マウスを解析するため、C57BL/6 マウスから BALB/cA マウスへ 10 回の戻し交配を行い BALB/cA 背景の *aly/aly* マウスを得た。BALB/cA-*aly/aly* マウスは、C57BL/6-*aly/aly* マウスと同様に、リンパ節やパイエル板が欠損していた。また、これまでの報告と一致して、自己免疫応答を制御する胸腺髄質上皮細胞の分化異常が認められ、末梢組織では自己免疫様病態が観察された。これは、*aly* 変異による自己免疫がマウスの遺伝的背景に依存しないことを示唆する。しかしながら私は BALB/cA-*aly/aly* マウスは C57BL/6-*aly/aly* マウスでは見られない、脾臓の肥大化を呈することを見つけた。BALB/cA-*aly/aly* マウスの脾細胞をフローサイトメトリーにより解析したところ、活性化した T 細胞 (CD44⁺CD62^{low}) の割合に有意な差はないが、BALB/cA-*aly*⁺ マウスに比べ赤血球前駆細胞 (TER119⁺CD45⁻、及び TER119⁺CD45⁻) の割合が有意に増加していた。この結果は、BALB/cA-*aly/aly* マウスで起こる脾臓の肥大化が自己免疫反応の亢進によるものではなく、髄外造血に起因することを示唆する。また、NIK が脾臓における髄外造血の制御に関与することも示唆する。

【2】 NIK 活性化制御機構の解明

NIK 活性化を制御する分子機構を解明するため、新規 NIK 結合分子の同定を行った。

マウス胎仔胸腺の cDNA を無細胞系 *in vitro virus* (IVV) 法を用いてスクリーニングし、NIK 結合分子を探索した。その結果、セリン・スレオニンホスファターゼであるカルシニューリンの触媒サブユニット Ppp3ca を同定した。

Ppp3ca による NIK 活性化制御機構の分子メカニズムを明らかにするため、両者の結合領域を同定した。NIK は、その機能と結合分子から 3 つの領域に分けられる。各領域を欠損させた NIK 欠失変異体と Ppp3ca との結合を検討した結果、Ppp3ca は NIK の Kinase ドメインまたは C 末端領域に結合することが明らかになった。これまでの研究から Kinase ドメインや C 末端領域は、リン酸化を介して NIK の活性化を制御することが報告されている。したがって、ホスファターゼ活性を有する Ppp3ca は、NIK のリン酸化状態を変化させ、その活性を制御している可能性が推察される。

次に Ppp3ca における NIK の結合領域を同定した。その結果、NIK は Ppp3ca の N 末端領域に結合することが分かった。N 末端領域には、Ppp3ca のホスファターゼ活性を制御する触媒ドメインが存在するため、脱リン酸化により NIK の活性化を制御している可能性が示唆された。Ppp3ca の N 末端領

域のアミノ酸配列は、Ppp3ca のアイソフォームである Ppp3cb、Ppp3cc と相同性が高い。Ppp3cc の発現は脳と精巣に限局しているが、Ppp3cb の発現は Ppp3ca と同様に多くの組織において確認されている。したがって、Ppp3cb もまた NIK に結合し、その活性化を制御しているのではないかと仮説を立てた。共免疫沈降実験を行った結果、Ppp3cb と NIK の結合を明らかにした。さらに Ppp3cb は、Ppp3ca と同様に NIK の Kinase ドメインまたは C 末端領域に結合すること分かった。

以上の結果は、細胞内において Ppp3ca と Ppp3cb が NIK に対し同様の機能を持つことを示唆する。そこで、NIK 活性化を誘導するシグナルにおける Ppp3ca と Ppp3cb の機能を解析した。NIK は、TNF receptor super family に属する Lymphotoxin β receptor (LT β R) からのシグナルを受容して活性化する。初めに、私は、LT β R シグナルによって誘導される標的遺伝子として、Ets ファミリーに属する転写因子 Spi-B を同定した。aly/aly マウスの胎児から作製したマウス胎児繊維芽細胞 (MEF 細胞) では、LT β R 刺激によって Spi-B の発現は誘導されなかった。このことから、Spi-B の発現は NIK 依存的に制御されていると考えられる。

そこで、MEF 細胞において、RNAi 法を用いて Ppp3ca と Ppp3cb の発現を抑制し、LT β R シグナルによって誘導される NIK 依存的な Spi-B 発現への影響を解析した。その結果、Ppp3ca と Ppp3cb の発現を抑制した細胞では、コントロール細胞に比べ、LT β R 刺激によって誘導される Spi-B の発現量が増加することが分かった。さらに、Ppp3ca と Ppp3cb の発現を同時に抑制した細胞では、単独で発現抑制した細胞に比べ、Spi-B の発現量増加が顕著だった。以上の結果から、Ppp3ca と Ppp3cb は NIK に対して同じ抑制機能を持ち、NIK 下流のシグナルを負に制御していると考えられる。

Ppp3ca と Ppp3cb の発現抑制による NIK 下流のシグナルへの影響を解析した。その結果、Ppp3ca と Ppp3cb の発現を抑制した細胞では、無刺激状態において、p100、及び RelB の発現量増加が見られた。さらに核内における p65 の発現が増加していることが明らかとなった。核内の p65 の発現量は、LT β R 刺激後において顕著に増加した。p100、RelB は古典的経路の標的遺伝子である。核内の p65 の発現量が増加していることから、Ppp3ca と Ppp3cb は NIK 活性化を負に制御することで、古典的経路の活性化を抑制していると考えられる。また、p100 の発現量増加に付随して、LT β R 刺激後における核内の p52 の発現量増加が見られた。

以上の結果から、Ppp3ca と Ppp3cb の発現抑制によって安定化した NIK が、古典的経路、もしくは古典的経路と非古典的経路の 2 つの経路を活性化することが示唆される。

【結語】

本研究では、第一の研究目的である「NIK の新たな生理機能の同定」において、NIK が脾臓における髄外造血の制御に関わることを明らかにした。

第二の研究目的である「NIK 活性化制御機構の全貌解明」では、新規 NIK 結合分子として Ppp3ca とそのアイソフォームである Ppp3cb を同定した。さらに Ppp3ca と Ppp3cb は、NIK の活性化を誘導する LT β R シグナルにおいて、NIK 依存的な標的遺伝子 Spi-B の発現を抑制する機能を持つことが示唆された。このことから、Ppp3ca と Ppp3cb は NIK と結合し、その活性化を制御することで、下流のシグナルを抑制していることが推察される。NIK は、自己リン酸化によって活性化することが知

られている。Ppp3ca と Ppp3cb は、ホスファターゼ活性によって NIK の脱リン酸化を誘導し、その活性化を抑制するのか、もしくは、NIK の分解を誘導する TRAF3-TRAF2-cIAPs との複合体形成を促すアダプター分子として働き、活性化を抑制するのか、今後詳細な解析によって明らかにする必要がある。