主論文

IL-1 シグナル伝達経路における アダプター／スカフォールドタンパク質 TAB2 の作用機構

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻

岸田聡

名古屋大学図書

11512896

目次

1、	要旨	3
2、	序論	4
3、	結果	7
4、	考察	14
5、	実験材料と実験方法	16
6、	謝辞	19
7、	参考文献	20
8、	Figure の説明	25
9、	Figure	28

＜要旨＞

哺乳動物の MAPKKK ファミリーに属する TAK1 は、自然免疫を制御する Interleukin-1 (IL-1)によって活性化される細胞内シグナル伝達経路において機能している。IL-1 シグナルは TAK1 を介して、MAPK である JNK/p38 と、転写因子である NF-κB を活性化する。TAK1 と結合するタンパク質として単離、同定された TAK1-binding protein 2 (TAB2)は、これまでの研究から、IL-1 シグナルに応じて TAK1 とその上流因子である tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6)とを結びつけるアダプターとして働くことが示されている。一方、最近の報告から、IL-1 シグナルによって TRAF6 の ubiquitination が誘導されること、そしてこのステップが TAK1 の活性化に不可欠であることが明らかになった。しかし、IL-1 シグナルが TRAF6 の ubiquitination を引き起こす分子機構は明らかになっていない。本研究では、TAB2 が TRAF6 の ubiquitination を誘導する能力を有し、この作用によって IL-1 シグナルによる TAK1 の活性化を媒介していることを示した。TAB2 には CUE ドメインと呼ばれる ubiquitin 分子を認識するモチーフが含まれており、この CUE ドメインが TAB2 の機能に重要であることが示唆された。

一方、IL-1 シグナル伝達経路における TAB2 のもう一つの機能として、TAK1 の下流で NF-κB を活性化するキナーゼである IKK を TRAF6 へとリクルートし、TRAF6-TAK1 複合体による NF-κB 活性化を促進することを明らかにした。以上の結果から、TAB2 が IL-1 シグナル伝達経路において、TRAF6 の ubiquitination の誘導、そして TRAF6、TAK1 と IKK から成るシグナル伝達複合体形成の促進という複数の機能を担っていることが示された。

<序論>

サイトカインであるIL-1は、微生物による感染や物理的な傷害に応じて自然免疫系を活性化することで、炎症反応を引き起こす。IL-1 は水溶性のタンパク性リガンドであり、リンパ球など、標的の免疫細胞の表面にある受容体に結合し、細胞内シグナル伝達系を活性化する。その概要をFigure 1.にまとめた。IL-1によって動員される細胞内シグナル伝達系は、最終的に二種類の転写因子、NF-κB と AP-1 を活性化し、これらの転写因子が炎症反応に必要な標的遺伝子群の発現を誘導する(5)。

NF-κBの活性化は、inhibitor of NF-κB (IκB)と呼ばれる阻害因子の分解を介して行われる(6, 15)。非刺激時には、NF-κBはIκBと結合して細胞質に留め置かれている。IL-1 シグナルは、複数のサブユニットから構成されるIκB kinase (IKK)複合体を活性化し、IKKはIκBの特定のセリン残基をリン酸化する。リン酸化されたIκBはプロテアソームの標的となり、速やかに分解される。その結果解放されたNF-κBは核へと移行して、標的遺伝子の発現を誘導する。IKK複合体は、NF-κB活性化の制御を担う重要な分子であり、二つのキナーゼサブユニット（IKKαとIKKβ）と必須な制御サブユニット（IKKγ）が含まれている。もう一つの転写因子AP-1は、Jun、Fos、ATFといったファミリーのタンパク質から成るホモ、あるいはヘテロ二量体である。AP-1 は、mitogen-activated protein kinase (MAPK)カスケードを介して活性化される。MAPKカスケードは三種類のキナーゼ、MAPK kinase kinase (MAPKKK)、MAPK kinase (MAPKK)、MAPKから構成されている(19)。まずMAPKKKがMAPKKを、次にMAPKKがMAPKを、それぞれリン酸化して活性化し、MAPKはAP-1をリン酸化して活性化する。MAPKは成長因子に応答するもの（ERK: extracellular signal-regulated kinase）と、ストレスに応答するもの（JNK: c-Jun N-terminal kinase、及びp38）に分類されているが、IL-1 のシグナルは後者の MAPK を活性化する。JNK/p38 を活性化するMAPKKとしては、MKK3、4、6、7が報告されている。MAPKKKファミリーに属する

キナーゼは現在までに多数同定されているが、IL-1 シグナル伝達経路においては主に TAK1 が働くと考えられている(18)。TAK1 は MAPK カスケードだけではなく、もう一方の経路である IKK 複合体も活性化し、NF-κB へもシグナルを伝達する。IL-1 シグナル伝達経路で TAK1 が MAPKKK としての主たる機能を担っていることを示唆する結果として、以下のような報告がある。1）HeLa 細胞に small interfering RNA (siRNA)を導入して TAK1 の発現を阻害したところ、IL-1 に対する応答が損なわれた(25)。2）TRAF6 が *in vitro* で IKK 複合体を活性化する際に必要な生化学的分画の一部として、TAK1 が単離された(27)。3）TAK1 の活性を特異的に阻害する薬剤 5Z-7-oxozeaenol で 293 細胞を処理したところ、IL-1 に対する応答が損なわれた(17)。

最近の研究から、IL-1 シグナルによる TAK1 活性化の分子機構が明らかになりつつある。現在のところ、IL-1 による TAK1 の活性化には、二つの重要なステップがあると考えられている (Figure 2.)。一つは、IL-1 シグナル依存的な TAK1 と TRAF6 の複合体形成である(18)。293 細胞を IL-1 で刺激すると、数分以内に細胞内在性の TAK1 が活性化するが、この TAK1 活性化と同じ時間経過で TAK1 と TRAF6 の複合体も形成される。この TAK1 と TRAF6 の複合体形成は、TAB2 というアダプタータンパク質によって仲介される(23)。TAB2 は IL-1 シグナル非依存的に TAK1 と結合しており、TAB2 が TRAF6 と直接結合することによって TAK1 を TRAF6 へとリクルートし、TRAF6-TAB2-TAK1 という複合体を形成する。この複合体形成が TAK1 活性化の引き金になっていると考えられる。二つ目は、IL-1 シグナルによって誘導される TRAF6 の ubiquitination である(27)。TRAF6 はその Ring finger ドメインに E3 ubiquitin ligase 活性を有しており、IL-1 シグナル依存的に autoubiquitination を引き起こす。*in vitro* の実験系から、この ubiquitination が TRAF6 による IKK の活性化に必須であることが示されている(4, 27)。また、この TRAF6 の ubiquitination の際に働く E2 ubiquitin conjugating enzyme である Ubc13 が IL-1 シグナル伝達経路に必須であることが、

siRNA による実験などにより示唆されている(4, 31)。これらのことから、TRAF6 の ubiquitination は IL-1 シグナルの伝達、ひいては TAK1 の活性化に重要な役割を果たしていると考えられる。ところで、この TRAF6 の ubiquitination は、ubiquitin の K48 残基を介した古典的な polyubiquitin とは異なり、K63 残基を介した polyubiquitin であることが明らかになっている。K48 を介した ubiquitination は通常、プロテアソーム系による分解へのターゲットとなる(28)。一方 K63 を介した ubiquitination を受けたタンパク質は分解されるのではなく、何らかの機能的な修飾を受けるものと考えられる。IL-1 シグナルによる TRAF6 の ubiquitination については、この polyubiquitin を TAB2 が認識することによって、TRAF6-TAB2-TAK1 複合体形成が誘導されている可能性が示されている(11)。一方、IL-1 シグナルが TRAF6 の ubiquitination を誘導する機構については全くわかっていない。

本研究では、まず TAB2 ノックアウトマウスの mouse embryonic fibroblast (MEF)を用いて、IL-1 シグナル伝達経路における TAB2 の役割を検討した。その結果、TAB2 が IL-1 シグナルによる TRAF6 の ubiquitination に必要であることが明らかとなった。また、大量発現した TAB2 が TRAF6 の ubiquitination を誘導したことも考え合わせ、IL-1 シグナルによって TRAF6 の ubiquitination が引き起こされる際には、TAB2 が重要な役割を果たしている可能性を見出した。また、TAB2 が TRAF6 と IKK とを結びつけるという結果を得て、TRAF6 から IKK の活性化へと流れる経路を促進するスカフォールドとして機能している可能性も示した。以上の結果から、TAB2 は IL-1 シグナル伝達経路において TRAF6 の ubiquitination を誘導し、更に IKK を TRAF6 複合体へリクルートするスカフォールドとしても働くという、複数の機能を担うタンパク質であることが示唆された。

＜結果＞

TAB2 は IL-1 刺激による TRAF6 の ubiquitination に必要である

まず、IL-1 シグナル伝達経路における TAB2 の役割、そして作用機構を検討する為に、TAB2 のノックアウトマウスから得られる mouse embryonic fibroblast (MEF)を解析に用いた。ノックアウトマウスによる解析から、TAB2 は胚発生の段階で不可欠であることが示されている(21)。すなわち、TAB2 ノックアウトマウスでは、胚の段階から深刻な肝臓の変性が認められ、embryonic day 12.5 の時点で死亡する。そこで、複数のラインの MEF を単離、株化して TAB2 の解析に用いることとした。野生型（$TAB2^{+/+}$）と、二つの独立した TAB2 欠損型（$TAB2^{-/-}$ #1 と#2）の MEF を IL-1 で処理し、各細胞の応答を検討した（Figure 3.）。まず、ウェスタンブロッティングによって、TAK1 を検出した。これまでの研究から TAK1 は、IL-1 シグナル依存的な自己リン酸化を伴って活性化することが示されている(12)。その自己リン酸化の結果として与えられた正の電荷は、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)上での移動度を減少させるため、自己リン酸化した TAK1 は、通常の TAK1 と比較して少し上方へ「シフト」したバンドとして検出される。すなわち、SDS-PAGE 上での「バンドシフト」を指標にすることによって、TAK1 の活性化をモニターできる。Figure 3. の一番上のパネルに示す通り、野生型の MEF では IL-1 処理後 5 分からバンドシフトした TAK1 が検出され、10 分でピークを迎えている。このように IL-1 は速やかな TAK1 の活性化を誘導するが、TAB2 を欠損した MEF ではどちらのラインにおいても、バンドシフトした TAK1 はほとんど検出されなかった。つまり、TAB2 を欠損した MEF では TAK1 が活性化されておらず、IL-1 による TAK1 の活性化には TAB2 が必要であることを示している。この結果は、初代培養の MEF を用いた以前の報告とも一致している(21)。

これまでの報告で、IL-1 シグナルは TRAF6 の ubiquitination を引き起こし、

このubiquitinationがTAK1の活性化を含めたIL-1シグナル伝達経路におけるTRAF6の役割に必須であることが示唆されている(4, 27)。そこで次に、TAB2を欠損したMEFにおいて、IL-1シグナルによるTRAF6のubiquitinationが誘導されるかどうかを検討した（Figure 3.下半分のパネル)。IL-1で処理した各MEF（$TAB2^{+/+}$、$TAB2^{-/-}$ #1と#2）の細胞抽出液から、抗TRAF6抗体を用いてTRAF6を免疫沈降し、その免疫沈降したサンプルを抵ubiquitin抗体でブロッティングすることによって、ubiquitinationされたTRAF6を検出した。その結果、野生型のMEFではIL-1処理後5分から、本来のTRAF6の位置から始まって上方に伸びたバンドが検出された。これは、ubiquitinationを受けて分子量が増加したTRAF6だと考えられる。つまり野生型のMEFでは、従来のHeLa細胞を使った報告と同様に(27)、IL-1シグナルがTRAF6のubiquitinationを誘導している。一方TAB2を欠損したMEFでは、IL-1シグナルによるTRAF6のubiquitinationが著しく損なわれていた。どちらのラインの$TAB2^{-/-}$ MEFでも同じ結果が得られたことから、この表現型はTAB2が欠損していることに起因している可能性が高いと考えられる。以上の結果から、TAB2はIL-1シグナルによるTAK1の活性化、及びTRAF6のubiquitinationに必要であることが示された。

TAB2はTRAF6のubiquitinationを誘導する

これまでの報告では、TAB2はTAK1をTRAF6へとリクルートするアダプター分子であると認識されている(23)。ubiquitinationされたTRAF6のpolyubiquitin chainをTAB2が直接認識するという最近の報告も(11)、TAB2がTRAF6の下流で働き、ubiquitinationされたTRAF6を目標にしてTAK1をリクルートしていくというモデルに合致する。ところがFigure 3.の結果はTAB2がTRAF6のubiquitination自体に必要であることを示しており、TAB2がTRAF6の上流においてTRAF6のubiquitinationを促すような働きもしている可能性を想起させる。そこでこの可能性を調べるため、TAB2の大量発現がTRAF6のubiquitinationを

誘導するかどうかを検討した。293 細胞に Myc-ubiquitin と共に HA-TAB2 を発現させ、細胞内在性 TRAF6 を、抗 TRAF6 抗体を用いて免疫沈降した。この免疫沈降物を抗 Myc 抗体でブロッティングすることで ubiquitination された TRAF6 を検出したところ、HA-TAB2 の発現によって TRAF6 の ubiquitination が顕著に誘導された (Figure 4.)。この結果から、TAB2 には TRAF6 の ubiquitination を誘導する能力があることが明らかになった。先の、TRAF6 の ubiquitination に TAB2 が必要であることを示す結果も考え合わせると、IL-1 シグナルが TRAF6 の ubiquitination を誘導する際に、TAB2 が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

TAB2 に含まれる CUE ドメインは ubiquitin を認識する

タンパク質の ubiquitination は、プロテアソームによる分解のターゲットとして働く古典的な役割を始めとして、リン酸化のように標的タンパク質の性質に修飾を加えるなど、様々な生理学的な活性を発揮する。ubiquitination が行われるステップそのもの、あるいは ubiquitination を受けたタンパク質のその後の制御の過程においては、ubiquitin を特異的に認識するドメインを持つ多くのタンパク質が関与することが知られている。現在までに、UEV、UBA、UIM といった複数のドメインが構造的に解析され、それぞれ ubiquitin 分子を特異的に認識することが示されている(7)。coupling of ubiquitin conjugation to ER degradation (CUE) ドメインも、その中のひとつである(20, 22)。40 余りのアミノ酸から構成される CUE ドメインは 3 本のαヘリックスから成り、二量体を形成することによって ubiquitin 一分子を認識する。CUE という名前の元になった酵母の Cue1 タンパク質は、Ubc7 という E2 ubiquitin conjugating enzyme を ubiquitination が行われる ER へとリクルートすることが報告されている(2)。つまり Cue1 は、E2 enzyme のスカフォールドとして働くことで、ubiquitination に対して positive な制御を行っている。一方、TAB2 も、その N 末端に保存され

たCUEドメインを持っている（Figure 5.A)。ここまでの結果は、TAB2がTRAF6のubiquitinationに対してpositiveな働きをしていることを示唆しており、その働きにCUEドメインが寄与している可能性が考えられる。CUEドメインでは、直接ubiquitin分子の認識に関わっているフェニルアラニン・プロリン（FP）というモチーフが保存されており(20, 22)、TAB2のCUEドメインにもこのFPモチーフが含まれている（Figure 5.A)。酵母のCUEタンパク質の一つであるVps9の解析から、FPモチーフのフェニルアラニンに変異を導入すると、CUEドメインのubiquitin分子を認識する能力が損なわれることが示されている(20, 22)。TAB2のCUEドメインが、ubiquitinを認識することによってIL-1シグナルの伝達に寄与しているかどうかを検討するために、このFPモチーフに変異を導入したTAB2を作成した。一つはフェニルアラニンをアラニンに、もう一つはアスパラギン酸に置換し、それぞれTAB2(F20A)、TAB2(F20D)と名付けた(Figure 5.A)。まず、TAB2のCUEドメインが実際にubiquitinを認識するかどうか、そしてFPモチーフに導入した変異によってその認識能力が損なわれるかどうかを検討した。TAB2自身もubiquitinationされることが明らかになっているため、培養細胞を用いた系では、TAB2とubiquitinとの間で起こる相互作用が、TAB2のCUEドメインがubiquitin分子を認識した結果なのか、あるいはTAB2自身がubiquitinationされた結果なのかを判別することができない。そこでTAB2のCUEドメインとubiquitin分子との結合を検定する系として、酵母のtwo-hybrid systemを採用した。この系は以前の酵母のCUEタンパク質の解析にも用いられており、確実にCUEドメインとubiquitin分子との結合を検出できると考えられる(22)。DNA結合ドメインと融合させたTAB2と、転写活性化ドメインと融合させたubiquitin、及びTRAF6（この系でTAB2と結合することがわかっているpositive control(24)）を酵母内に発現させ、二者の結合を、選択プレート上での増殖能を指標にして検出した。Figure 5.Bの左の写真に示す通り、野生型のTAB2とubiquitinの融合タンパク質を発現させた酵母は、選択プレート上で

増殖した。この結果は両者が結合したことを示しており、TAB2 に含まれる CUE ドメインは、その配列から予想された通り、ubiquitin を認識する能力を有していると考えられる。次に、FP モチーフに変異を導入した TAB2(F20A) と TAB2(F20D) について検討したところ、ubiquitin と一緒に発現させた酵母の選択プレート上での増殖能が著しく低下していた。一方、TRAF6 と一緒に発現させた酵母は野生型の時と同程度増殖しており、TRAF6 との結合能は変わっていないことがわかる。この結果は、FP モチーフに導入した変異によって、ubiquitin との結合能が特異的に損なわれたことを示している。つまり、先の TAB2 と ubiquitin との結合が実際に CUE ドメインを介して行われていること、及び F20A、F20D の変異体において、ubiquitin を認識する能力の欠損という期待した通りの表現型が得られたことが確認できた。

CUE ドメインは TAB2 による NF-κB 活性化に寄与している

次に、CUE ドメインが TAB2 の機能に必要かどうかを、NF-κB のレポーターアッセイを用いて検討した。293 細胞に NF-κB のレポータープラスミドと種々の HA-TAB2 発現ベクターをトランスフェクションし、NF-κB の活性化に依存したレポーターの発現を測定した (Figure 6.)。以前に報告されている通り (23)、野生型の TAB2 を発現させた場合には、NF-κB レポーターは約 10 倍まで活性化された。ところが、TAB2(F20A) や TAB2(F20D)、あるいは TAB2(ΔCUE) (CUE ドメイン全体を除いた変異体) を発現させた場合のレポーター活性化は、2 倍から 4 倍にとどまった。一方、各 TAB2 タンパク質の発現量を確認するために、レポーターアッセイに用いた細胞抽出液でウェスタンブロッティングを行ったが、差は見られなかった。この結果から、TAB2 の CUE 変異体では NF-κB を活性化する能力が損なわれていることが明らかとなり、CUE ドメインが IL-1 シグナル伝達経路における TAB2 の役割に重要であることが示唆された。

TAB2 は IKK を TRAF6 へとリクルートする

以前の報告で TAB2 は、TRAF6 と TAK1 とを結びつけるアダプター分子として働くことが示された(23)。TAB2 を大量発現すると、IL-1 刺激に関わらず TRAF6 と TAK1 との複合体形成を誘導し、TAK1、及び IKK の活性化を引き起こす。このことから、TAB2 は TRAF6 と TAK1 間の結合を仲介しているだけでなく、その TRAF6 複合体へ IKK もリクルートして、TAK1 による IKK の活性化を促進している可能性が考えられる。この点を検討するために、まず TAB2 の大量発現が TRAF6 と IKK との結合を誘導するかどうかを調べた。293 細胞に empty vector、あるいは TAB2 の発現ベクターをトランスフェクションした後、抗 IKKα抗体を用いてそれぞれの細胞抽出液から細胞内在性 IKKαを免疫沈降し、共沈してくる細胞内在性 TRAF6 を検出した (Figure 7. A)。その結果、TAB2 を大量発現した際には TRAF6 が IKKα と共沈した。つまり大量発現された TAB2 は、TRAF6 と TAK1 との複合体形成を誘導して TAK1 を活性化するだけでなく、その複合体へ IKK もリクルートしてくることが明らかとなった。

293IL-1RI 細胞を IL-1 で処理した後、細胞内在性 TRAF6 複合体形成のタイムコースを調べた以前の報告では、TAK1 と TAB2 は IL-1 処理後速やかに TRAF6 と結合し、そのピークは 2 分から 5 分であった(23, 24)。この結果と比較するため、同条件において IL-1 刺激後の TRAF6 と IKK の結合を検討した。293IL-1R1 細胞を IL-1 で処理した後、細胞抽出液から細胞内在性 IKKαを免疫沈降した。そして、共沈してくる TRAF6 を検出した結果、IL-1 処理後 3 分で共沈が認められ、10 分時にはもう共沈はほとんど消失していた (Figure 7. B)。この速やかで一過的な結合は、TRAF6 と TAK1 の結合とタイムコースがよく一致している。この結果から、TAB2 は IL-1 シグナルに応じて TAK1 と TRAF6 を結合させ TAK1 の活性化を促す一方、この複合体に IKK もリクルートする可能性が示唆された。この働きによって TAK1 による IKK の活性化を促進し、NF-κB 経路へのスカフォールドとして機能していることが考えられる。

次に、TRAF6 複合体と IKK との結合を更に検討するために、免疫染色によって各タンパク質の細胞内局在を検討した。HeLa 細胞に TRAF6、TAB2、そして IKKα の発現ベクターをトランスフェクションし、各タンパク質の細胞内局在を Cy2、及び Cy3 結合抗体で可視化した。まず、各タンパク質を単独で発現させた場合の局在を調べた (Figure 8.A)。その結果、TRAF6 と IKKαは細胞質全体に拡散したパターンを示し、TAB2 は細胞質で斑点状の局在を示した。TAB2 の斑点状の局在パターンは、ミトコンドリアとは一致しなかったため、おそらくエンドソームに存在しているものと考えられる。次に TRAF6 と TAB2 を共発現させたところ、TAB2 はやはり斑点状の分布だったのに対して、TRAF6 は単独発現時とは異なり斑点状のパターンを示した (Figure 8.B)。そして両者の斑点はよく重なり、共局在していたことから、TAB2 と TRAF6 が結合していることが示された。次に、IKKαを TRAF6、TAB2 と共に発現させた。その結果、TRAF6 は斑点状の局在パターンを示し、IKKαも大部分が細胞質に拡散しているものの、一部は斑点状になり TRAF6 と共局在していた (Figure 8.C)。つまり TRAF6、TAB2 と共発現させた場合、IKKαは両者と共局在する傾向があることがわかる。このことは、先に免疫沈降による結合実験で得られた、IKK が TRAF6-TAB2-TAK1 複合体に結合するという結果を支持しており、TAB2 がスカフォールドとして TRAF6 や IKK を含むシグナル伝達複合体を集合させている可能性が示唆される。

＜考察＞

これまでにTAB2については、TRAF6とTAK1とを結びつけてTAK1の活性化を誘導するという機能が報告されていた(23)。一方、*in vitro*の系において、TRAF6によるIKK複合体の活性化を仲介する活性がある生化学的分画にTAB2が含まれることが報告された(4, 27)。同じグループは、その*in vitro*の系においてTRAF6がTAK1を活性化する際には、TRAF6自身がubiquitinationされることが不可欠だという結果も示している(27)。本研究は、TAB2についての新規な機能を二つ報告した。一つは、TAB2が直接ubiquitin分子を認識し、IL-1シグナルによって引き起こされるTRAF6のubiquitinationを誘導するというものであり、もう一つはTRAF6-TAB2-TAK1複合体にIKKをリクルートすることによって、NF-κB経路のスカフォールドとして働くというものである。この結果は、TAB2がIL-1シグナル伝達経路において、TAK1周辺で行われる複数の制御に関わる多機能性のタンパク質であることを示している。実際に、以前報告されているTAB2のノックアウトマウスの解析において、TAB2を欠く初代培養MEFではIL-1刺激によるTAK1の活性化が起こらないことが報告されており(21)、それは株化したMEFを用いた本研究の結果とも一致している。しかしその報告では、TAB2ノックアウトMEFの表現型について、IL-1によるTAK1の活性化は損なわれているものの、下流のNF-κBやJNK/p38の活性化、そして標的遺伝子の発現については野生型のMEFと変わらず正常であるとしている。これらの結果は、少なくともMEFをモデルとした系では、IL-1シグナル応答にTAB2やTAK1が必要でないことを示している。しかし一方で、ショウジョウバエのTAK1ホモログであるdTAK1については、ショウジョウバエの自然免疫を制御しており哺乳動物のIL-1経路にあたるImdという経路に必須であることが、遺伝学的に明らかになっている(26)。従って哺乳動物の場合でも、実際に体内でリンパ球などがIL-1を受容してその細胞内シグナル伝達系を動かす場合にTAK1が必須な役割を果たしている可能性は高いと考えられる。前述の通り、TAB2のノックアウトマウスは胚致死で成体

が得られないため(21)、哺乳動物の免疫系における TAK1 の役割は未だ解析されていない。この目的の為には、T 細胞や B 細胞特異的なコンディショナル・ノックアウトマウスを作製する必要がある。TAB2 が欠損し、その結果 TAK1 の活性化が起こらない状態でも IL-1 のシグナルが正常に伝達されているという MEF の結果については、他のタンパク質が TAK1 の役割を補っている可能性が考えられる。そのようなタンパク質の候補としては、MEKK1、MEKK2、MEKK3、NIK といった、TAK1 と同じ MAPKKK ファミリーに属するキナーゼが挙げられる。これらはいずれも、培養細胞を用いた実験から IL-1 シグナルによる NF-κB や JNK/p38 の活性化に関わっている可能性を報告されている(1, 8, 13, 14, 16, 29, 30)。

最近になって、複数のグループから TAB2 に類似したタンパク質として TAB3 が報告された(3, 9, 10)。TAB3 もやはり TAK1 と結合し、HeLa 細胞に siRNA を導入して TAB3 や TAB2 の発現を阻害した実験からは、TAB3 が TAB2 と重複した機能を担う可能性が示唆されている(9)。しかし一方で、以前の TAB2 ノックアウトマウスの報告と本研究においては、TAB2 を欠損させるだけで、MEF を IL-1 で処理した時の TAK1 活性化が著しく損なわれるという表現型が観察されている。TAB2 と同様、TAB3 も N 末端に保存された CUE ドメインを持っているため、細胞の種類によっては TAB3 が TRAF6 の ubiquitination を制御している可能性が十分に考えられる。TAB2 と TAB3 の詳しい機能解析には、コンディショナルを含むノックアウトマウスの作製、解析という遺伝学的なアプローチが必要である。

＜実験材料と実験方法＞

細胞の培養と発現ベクター

293 細胞、293IL-1RI 細胞、及び mouse embryonic fibroblast (MEF)は、Dulbecco's modified Eagle's medium に 10% fetal calf serum を添加した培地を用い、37℃、5% CO_2 のインキュベイターで培養した。

HA-TAB2 の発現ベクター (pCMV-HA-TAB2) は、以前に報告されたものを用いた(23)。TAB2(ΔCUE)は、EcoRV のサイトを利用して TAB2 の N 末端 53 アミノ酸をコードする cDNA を除くことによって作製した。TAB2(F20A)と TAB2(F20D)は、PCR によって変異を導入した。PCR によって作製したフラグメントについては、シーケンシングによって意図しない変異が入っていないことを確認した。ubiquitin の発現ベクター (pCDNA3.1-Myc-Ub) は、東京都臨床医学総合研究所の田中啓二先生から分与して頂いた。

抗体と免疫沈降、トランスフェクション

TRAF6、TAK1、そして TAB2 に対するウサギのポリクローナル抗体は、以前に報告されたものを用いた(18, 23)。JNK、p38、IκBα、IKKαに対するウサギのポリクローナル抗体、及び Myc、ubiquitin に対するモノクローナル抗体は Santa Cruz から購入した。HA に対するモノクローナル抗体 (HA.11) は Covance から購入した。

免疫沈降実験では、MEF を 10 cm ディッシュに播き (一枚当たり 1.0×10^6 個)、24 時間後に serum を添加していない培地に交換した (serum stervation)。3 時間の培養の後で IL-1β (Roche より購入) による処理を開始した。次に細胞を氷冷した phosphate-buffered saline (PBS)で洗い、0.5% Triton X-100 lysis buffer (20 mM Hepes (pH 7.4), 150 mM NaCl, 12.5 mM β-glycerophosphate, 1.5 mM $MgCl_2$, 2 mM EGTA, 10 mM NaF, 2 mM DTT, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM

PMSF, 20 mM aprotinin)で細胞を溶解した。10,000 × g で5分間の遠心分離の後、上清を取り出して細胞抽出液とした。各抗体 1 μg と 15 μl の protein G-sepharose (Pharmacia より購入) を加えて4℃で一晩揺らすことで免疫沈降を行った。293細胞の場合は、10 cmディッシュに播き (一枚当たり 1.0 × 10^6 個)、24 時間後にリン酸カルシウム法によってトランスフェクションを行った。更に48時間培養した後、0.5% Triton X-100 lysis buffer にて細胞抽出液を調整し、MEF の場合と同様に免疫沈降を行った。293IL-1R1 細胞の場合は、10 cm ディッシュに播き (一枚当たり 1.0 × 10^6個)、72時間後に IL-1 処理、細胞抽出液の調整、免疫沈降を MEF と同様に行った。

NF-κB レポーターアッセイ

293 細胞を 6-well ディッシュに播き (ウェル当たり 1.6 × 10^5個)、24 時間後に Ig-κ-luciferase レポータープラスミドと pAct-β-galactosidase プラスミド、そして各 TAB2 発現ベクターをトランスフェクションした (リン酸カルシウム法)。 時間後に Reporter Lysis Buffer (Promega)を用いて細胞を溶解した。その抽出液を Luciferase の基質と混合することによって発光値を得た(Promega Luciferase Assay System)。また、抽出液を用いてβ-galactosidase アッセイを行い、トランスフェクション効率を計算することで、レポーターアッセイの各値を補正した。

酵母 two-hybrid アッセイ

出芽酵母の PJ69-4A 株に、bait と prey のプラスミドをトランスフォームした。bait は、転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメイン (GBD) と TAB2 が融合したタンパク質を酵母内に発現させるベクターで、prey は、GAL4 の転写活性化ドメイン (GAD) と ubiquitin、あるいは TRAF6 が融合したタンパク質を発現させるベクターである。GAD と ubiquitin の融合タンパク質を発現させる prey プラスミド

pACT2-wtUbi は、Northwestern University の Dr. Linda Hicke から分与して頂いた。bait と prey 間の結合は、ヒスチジンを欠く選択培地上での増殖を指標にして検出した。また、マーカー遺伝子（ヒスチジン合成酵素 HIS3）非特異的な発現によって生じるバックグラウンドを下げるため、3 mM の 3-aminotriazole（ヒスチジン合成阻害剤）を培地に添加した。

免疫染色

HeLa 細胞を chamber slide に播き、24 時間後に Transfast transfection reagent (Promega)を用いて各発現ベクターをトランスフェクションした。36 時間後に細胞を PBS で洗い、続いて 4% paraformaldehyde で固定を行った。PBS で 2 回洗った後、アセトンで 2 分間処理（室温）して浸透化した。10%の血清での 30 分のブロッキングを経た後、一次抗体（抗 HA、Flag、IKKα、TAB2、TAK1 抗体）と共にインキュベイトした。続いて二次抗体（Cy2 結合型抗マウス IgG 抗体と Cy3 結合型抗ウサギ IgG 抗体（Amersham））とインキュベイトし、蛍光顕微鏡（Olympus）で観察した。

＜謝辞＞

松本邦弘教授、そして North Carolina State University の Dr. Jun Ninomiya-Tsuji のお二方には、6 年間に渡って実験技術の指導、研究方針の議論、そして金銭面において多大な支援を頂きました。心から感謝いたします。ありがとうございました。そして、大阪大学微生物病研究所の審良静男教授、東京都臨床医学総合研究所の田中啓二教授、Northwestern University の Dr. Linda Hicke からは、貴重な実験材料を分与して頂きました。また、名古屋大学の松本研究室と North Carolina State University の Dr. Jun Ninomiya-Tsuji's Lab のメンバーの皆さんには、普段の研究室での毎日で様々なお世話になりました。ここに皆様に感謝の気持ちを表したいと思います。本当にありがとうございました。

<参考文献>

1. **Baud, V., Z. G. Liu, B. Bennett, N. Suzuki, Y. Xia, and M. Karin.** 1999. Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. Genes Dev. **13**:1297-1308.
2. **Biederer, T., C. Volkwein, and T. Sommer.** 1997. Role of Cuelp in ubiquitination and degradation at the ER surface. Science **278**:1806-1809.
3. **Cheung, P. C., A. R. Nebreda, and P. Cohen.** 2004. TAB3, a new binding partner of the protein kinase TAK1. Biochem. J. **378**:27-34.
4. **Deng, L., C. Wang, E. Spencer, L. Yang, A. Braun, J. You, C. Slaughter, C. Pickart, and Z. J. Chen.** 2000. Activation of the IkB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. Cell **103**:351-361.
5. **Dinarello, C. A.** 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood **87**:2095-2147.
6. **Ghosh, S., M. J. May, and E. B. Kopp.** 1998. NF-kB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu. Rev. Immunol. **16**:225-260.
7. **Hicke, L., and R. Dunn.** 2003. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **19**:141-172.
8. **Huang, Q., J. Yang, Y. Lin, C. Walker, J. Cheng, Z. G. Liu,**

and B. Su. 2004. Differential regulation of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEKK3. Nat. Immunol. **5**:98-103.

9. **Ishitani, T., G. Takaesu, J. Ninomiya-Tsuji, H. Shibuya, R. B. Gaynor, and K. Matsumoto.** 2003. Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling. EMBO J. **22**:6277-6288.

10. **Jin, G., A. Klika, M. Callahan, B. Faga, J. Danzig, Z. Jiang, X. Li, G. R. Stark, J. Harrington, and B. Sherf.** 2004. Identification of a human NF-kB-activating protein, TAB3. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**:2028-2033.

11. **Kanayama, A., R. B. Seth, L. Sun, C. K. Ea, M. Hong, A. Shaito, Y. H. Chiu, L. Deng, and Z. J. Chen.** 2004. TAB2 and TAB3 activate the NF-kB pathway through binding to polyubiquitin chains. Mol. Cell **15**:535-548.

12. **Kishimoto, K., K. Matsumoto, and J. Ninomiya-Tsuji.** 2000. TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is activated by autophosphorylation within its activation loop. J. Biol. Chem. **275**:7359-7364.

13. **Kopp, E., R. Medzhitov, J. Carothers, C. Xiao, I. Douglas, C. A. Janeway, and S. Ghosh.** 1999. ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. Genes Dev. **13**:2059-2071.

14. **Lee, F. S., J. Hagler, Z. J. Chen, and T. Maniatis.** 1997. Activation of the IkBa kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. Cell **88**:213-222.

15. **Li, Q., and I. M. Verma.** 2002. NF-kB regulation in the immune system. Nat. Rev. Immunol. **2**:725-734.

16. **Malinin, N. L., M. P. Boldin, A. V. Kovalenko, and D. Wallach.** 1997. MAP3K-related kinase involved in NF-kB induction by TNF, CD95 and IL-1. Nature **385**:540-4.

17. **Ninomiya-Tsuji, J., T. Kajino, K. Ono, T. Ohtomo, M. Matsumoto, M. Shiina, M. Mihara, M. Tsuchiya, and K. Matsumoto.** 2003. A resorcylic acid lactone, 5Z-7-oxozeaenol, prevents inflammation by inhibiting the catalytic activity of TAK1 MAPK kinase kinase. J. Biol. Chem. **278**:18485-18490.

18. **Ninomiya-Tsuji, J., K. Kishimoto, A. Hiyama, J. Inoue, Z. Cao, and K. Matsumoto.** 1999. The kinase TAK1 can activate the NIK-IkB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. Nature **398**:252-256.

19. **Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, and M. H. Cobb.** 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocr. Rev. **22**:153-183.

20. **Prag, G., S. Misra, E. A. Jones, R. Ghirlando, B. A. Davies, B. F. Horazdovsky, and J. H. Hurley.** 2003. Mechanism of ubiquitin recognition by the CUE domain of Vps9p. Cell **113**:609-620.

21. **Sanjo, H., K. Takeda, T. Tsujimura, J. Ninomiya-Tsuji, K. Matsumoto, and S. Akira.** 2003. TAB2 is essential for prevention of apoptosis in fetal liver but not for interleukin-1 signaling. Mol. Cell. Biol. **23**:1231-1238.

22. **Shih, S. C., G. Prag, S. A. Francis, M. A. Sutanto, J. H. Hurley, and L. Hicke.** 2003. A ubiquitin-binding motif required for intramolecular monoubiquitylation, the CUE domain. EMBO J.

22:1273-1281.

23. **Takaesu, G., S. Kishida, A. Hiyama, K. Yamaguchi, H. Shibuya, K. Irie, J. Ninomiya-Tsuji, and K. Matsumoto.** 2000. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. Mol. Cell **5**:649-658.

24. **Takaesu, G., J. Ninomiya-Tsuji, S. Kishida, X. Li, G. R. Stark, and K. Matsumoto.** 2001. Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway. Mol. Cell. Biol. **21**:2475-2484.

25. **Takaesu, G., R. M. Surabhi, K. J. Park, J. Ninomiya-Tsuji, K. Matsumoto, and R. B. Gaynor.** 2003. TAK1 is critical for IkB kinase-mediated activation of the NF-kB pathway. J. Mol. Biol. **326**:105-115.

26. **Vidal, S., R. S. Khush, F. Leulier, P. Tzou, M. Nakamura, and B. Lemaitre.** 2001. Mutations in the Drosophila dTAK1 gene reveal a conserved function for MAPKKKs in the control of rel/NF-kB-dependent innate immune responses. Genes Dev **15**:1900-12.

27. **Wang, C., L. Deng, M. Hong, G. R. Akkaraju, J. Inoue, and Z. J. Chen.** 2001. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. Nature **412**:346-351.

28. **Weissman, A. M.** 2001. Themes and variations on ubiquitylation. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. **2**:169-178.

29. **Yang, J., Y. Lin, Z. Guo, J. Cheng, J. Huang, L. Deng, W. Liao, Z. Chen, Z. Liu, and B. Su.** 2001. The essential role of

MEKK3 in TNF-induced NF-kB activation. Nat Immunol **2**:620-4.

30. **Zhao, Q., and F. S. Lee.** 1999. Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kB through IkB kinase-a and IkB kinase-b. J. Biol. Chem. **274**:8355-8358.

31. **Zhou, H., I. Wertz, K. O'Rourke, M. Ultsch, S. Seshagiri, M. Eby, W. Xiao, and V. M. Dixit.** 2004. Bcl10 activates the NF-kB pathway through ubiquitination of NEMO. Nature **427**:167-71.

＜Figure の説明＞

Figure 1. TAB2 は IL-1 による TRAF6 の ubiquitination に必要である

野生型（$TAB2^{+/+}$）、及び 2 つのラインの TAB2 ノックアウト MEF（$TAB2^{-/-}$#1 と#2）を表示されている分数だけ IL-1 で処理し、その細胞抽出液を抗 TAK1、及び TAB2 抗体でブロッティングした。また、細胞抽出液は抗 TRAF6 抗体による免疫沈降にもかけられ、沈降してきたサンプルを抗 TRAF6 抗体と抗 ubiquitin 抗体でブロッティングした。

Figure 2. TAB2 は TRAF6 の ubiquitination を誘導する

293 細胞に Myc-Ub、そして empty vector か HA-TAB2 の発現ベクターをトランスフェクションし、その細胞抽出液を使って抗 TRAF6 抗体による免疫沈降を行った。沈降された細胞内在性 TRAF6 は、抗 TRAF6 抗体と抗 Myc 抗体でブロッティングした。また、細胞抽出液を抗 HA 抗体でブロッティングし、HA-TAB2 を検出した。

Figure 3. TAB2 は ubiquitin 結合モチーフである CUE ドメインを持つ

(A) 出芽酵母（*S. cerevisiae*）Vps9 の CUE ドメインと、*human* TAB2 の CUE ドメインのアミノ酸配列比較。Ubiquitin 分子の認識に必要な FP モチーフが白抜きで示してある。この FP モチーフのフェニルアラニンをアラニン(F20A)、そしてアスパラギン酸（F20D）に置き換えた変異体を作成した。

(B) 野生型、及び F20A と F20D の変異体 TAB2 について、ubiquitin 分子を認識できるかどうかを、酵母の two-hybrid システムを用いて検討した。出芽酵母の PJ69-4A に、示した組み合わせで Gal4 DNA-binding domain (GBD)と融合させた TAB2、そして Gal4 activation domain (GAD) と融合させた ubiquitin や TRAF6 を発現させるベクターをトランスフォームした。その結

果得られた形質転換体を、ヒスチジンを欠く選択培地（3 mM 3-AT を含む）に塗り、GBD-と GAD-の各融合タンパク質の結合を選択培地上での増殖を指標にして検出した。

Figure 4. CUE ドメインは TAB2 による NF-κB の活性化に関わっている

293 細胞に Ig-κ-luciferase レポータープラスミド、pAct-β-Gal、そして量を変えた各 HA-TAB2(WT, ΔCUE, F20A, F20D)の発現ベクターをトランスフェクションした。細胞抽出液に含まれる luciferase 活性を測定し、β-galactosidase 活性によってトランスフェクション効率の影響を補正した。その結果は、empty vector をトランスフェクションした時の luciferase 活性を基準とした fold-increase で表示した。上のパネルでは細胞抽出液を抗 HA 抗体でブロッティングし、各 HA-TAB2 の発現量を確認した。

Figure 5. TAB2 は IKK を TRAF6 複合体へとリクルートする

(A) 293 細胞に TAB2 の発現ベクター、あるいは empty vector をトランスフェクションし、細胞抽出液から抗 IKKα抗体を用いて IKK を免疫沈降した。沈降したサンプルを抗 TRAF6、TAB2、IKKα抗体でそれぞれブロッティングし、また細胞抽出液を抗 TRAF6 抗体でブロッティングした。

(B) 293IL-1RI 細胞を示した分数だけ IL-1 で処理し、細胞抽出液から抗 IKKα抗体を用いて IKK を免疫沈降した。続いて沈降物を抗 TRAF6、IKKα抗体で、細胞抽出液を抗 TRAF6 抗体でそれぞれブロッティングした。

Figure 6. TAB2 の存在下で TRAF6 と IKKαは共局在する

(A) HeLa 細胞にそれぞれ HA-TRAF6、IKKα、TAB2、TAK1 の発現ベクターをトランスフェクションした。36 時間後に細胞を固定し、抗 HA、IKKα、TAB2、TAK1 抗体を加えてインキュベイションした。続いて二次抗体である Cy2 結合型

抗マウス IgG 抗体、あるいは Cy3 結合型抗ウサギ IgG 抗体とインキュベイションした後、蛍光顕微鏡で細胞を観察した。

(B) HeLa 細胞に Flag-TRAF6 と TAB2 の発現ベクターをトランスフェクションし、一次抗体として抗 Flag、TAB2 抗体を用いて、(A)と同様に各タンパク質の細胞内局在を観察した。

(C) HeLa 細胞に HA-TRAF6、IKKα、そして TAB2 の発現ベクターをトランスフェクションし、一次抗体として抗 HA、IKKα抗体を用いて、(A)と同様に各タンパク質の細胞内局在を観察した。

Figure 1.

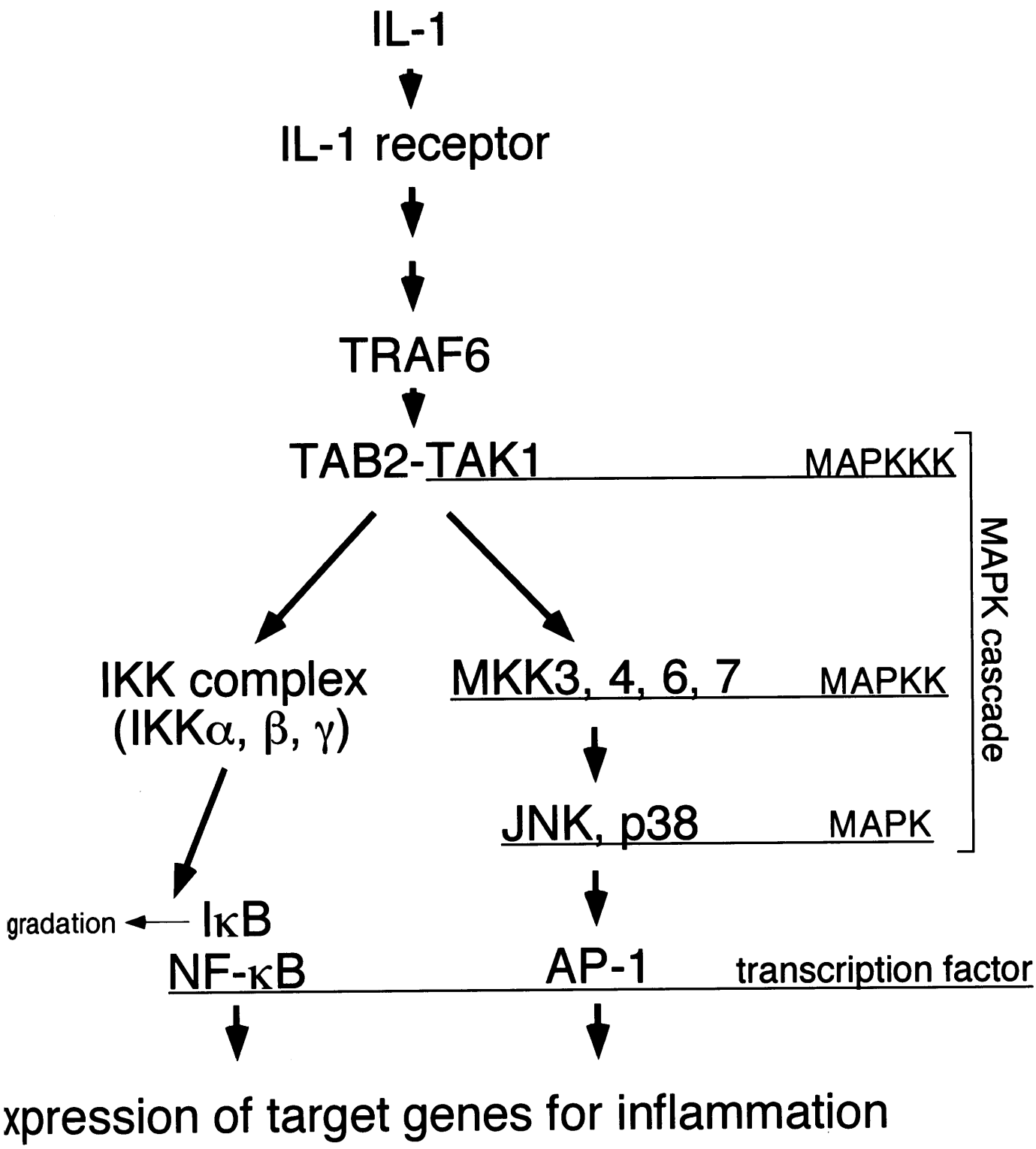

IL-1
IL-1 receptor
TRAF6
TAB2-TAK1
MAPKKK
MAPK cascade
IKK complex
(IKKα, β, γ)
MKK3, 4, 6, 7
MAPKK
JNK, p38
MAPK
gradation
IκB
NF-κB
AP-1
transcription factor
xpression of target genes for inflammation

Figure 2.

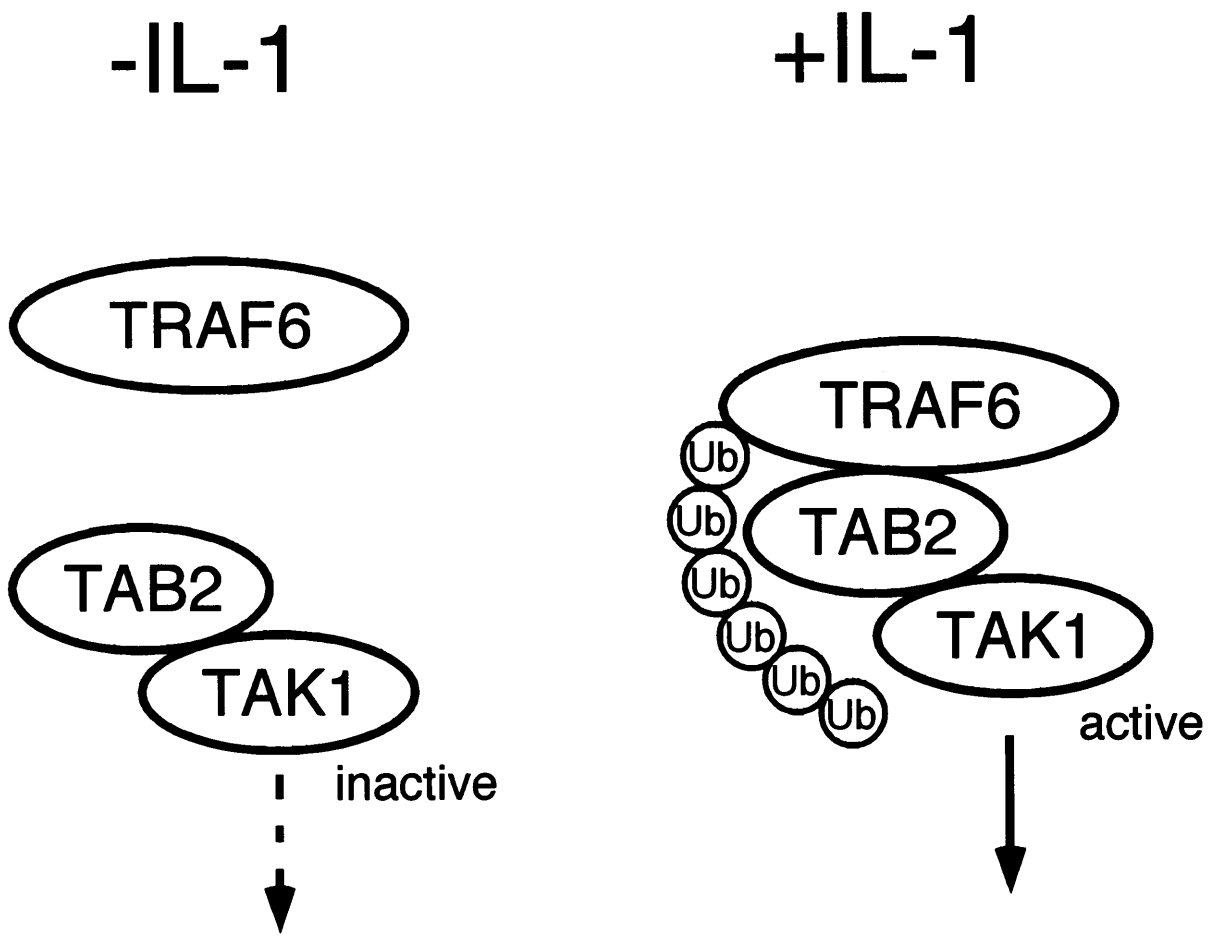

-IL-1
+IL-1
TRAF6
TAB2
TAK1
inactive
TRAF6
Ub
Ub
Ub
Ub
Ub
Ub
TAB2
TAK1
active

Figure 3.

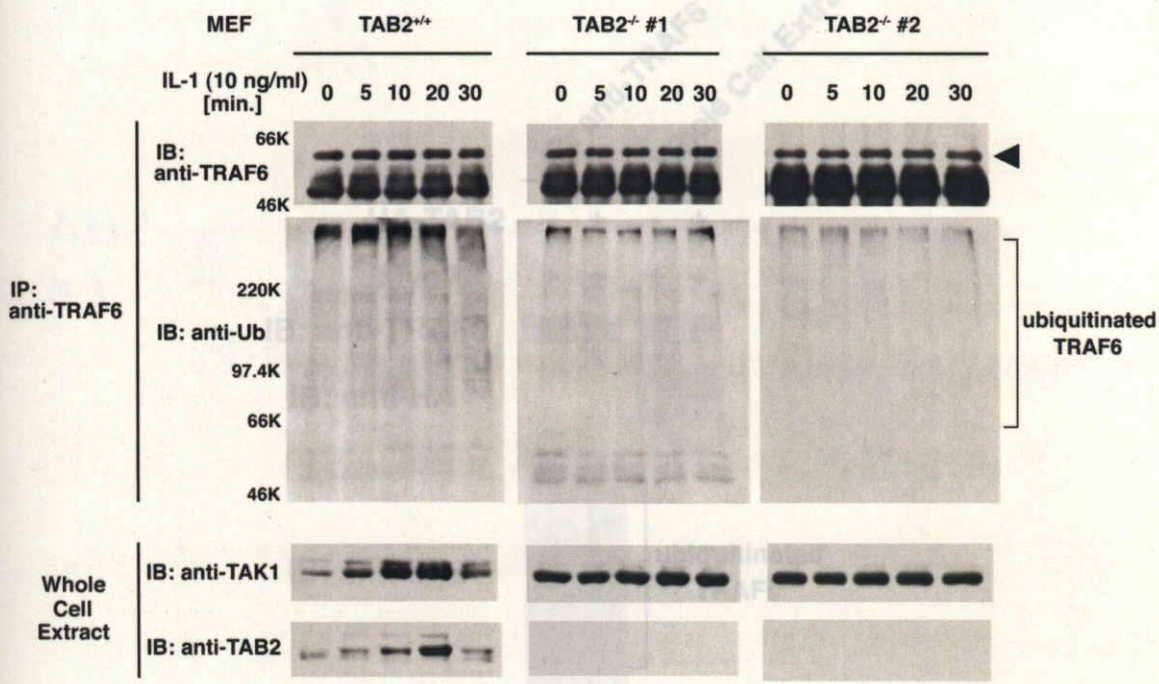

MEF
TAB2+/+
TAB2-/- #1
TAB2-/- #2
IL-1 (10 ng/ml) [min.]
0 5 10 20 30
0 5 10 20 30
0 5 10 20 30
IP: anti-TRAF6
IB: anti-TRAF6
66K
46K
IB: anti-Ub
220K
97.4K
66K
46K
ubiquitinated TRAF6
Whole Cell Extract
IB: anti-TAK1
IB: anti-TAB2

Figure 4.

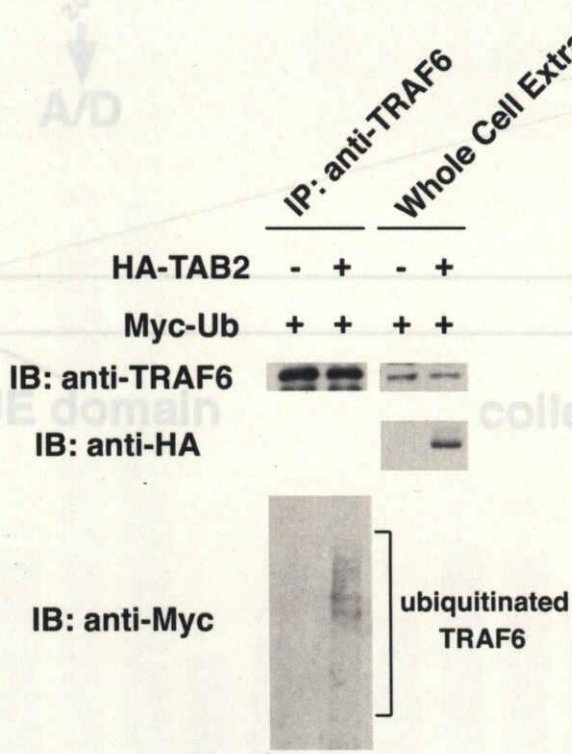

IP: anti-TRAF6
Whole Cell Extract
HA-TAB2 - + - +
Myc-Ub + + + +
IB: anti-TRAF6
IB: anti-HA
IB: anti-Myc
ubiquitinated
TRAF6

Figure 5.

A

domain of Vps9 (*S. cerevisiae*)

408 420 450

ERKDTLNTLQNMFPDMDPSLIEDVCIAKKSRIGPCVDALLSLS

IDFQVLHDLRQKFPEVPEVVVSRCMLQNNNNLDACCAVLSQES

8 20 50

A/D

***man* TAB2**
693 a. a.)

CUE domain **coiled-coil region**

B

AD | - Ub TRAF6 - Ub TRAF6 - Ub TRAF6

BD-AB2 **WT** **F20A** **F20D**

SD-Histidine plate (3 mM 3AT)

Figure 6.

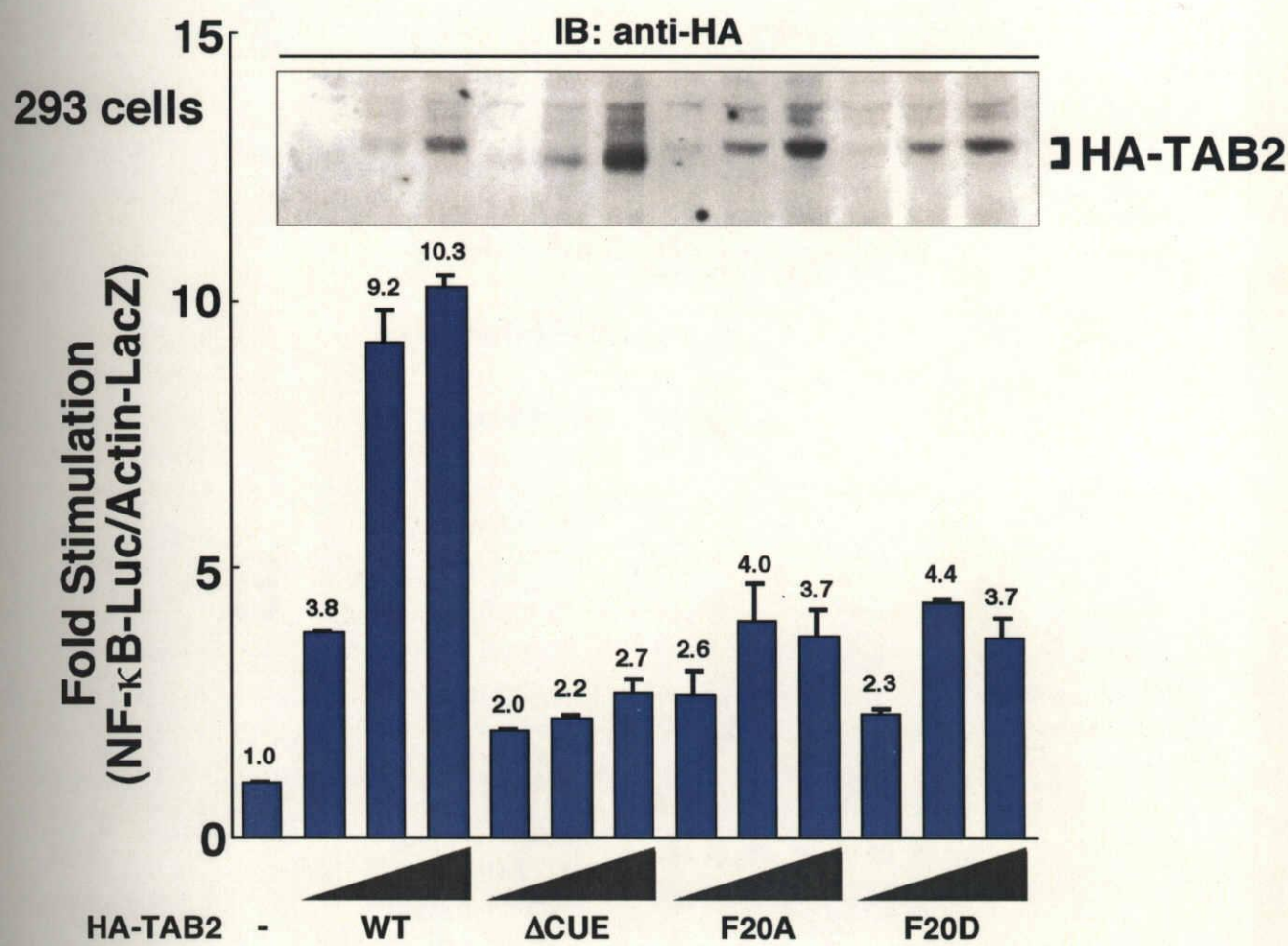
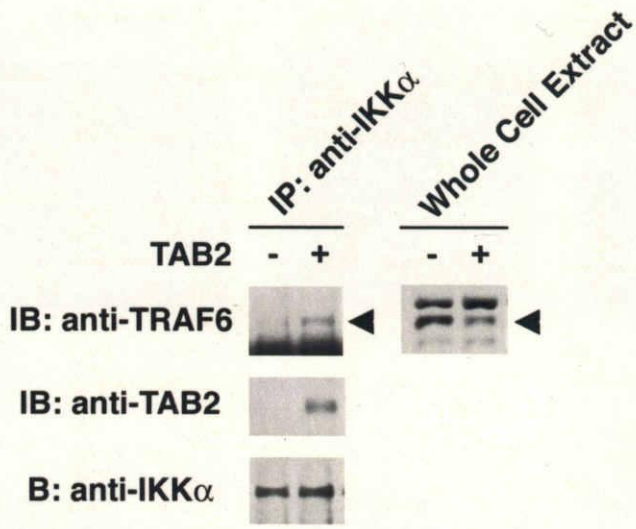
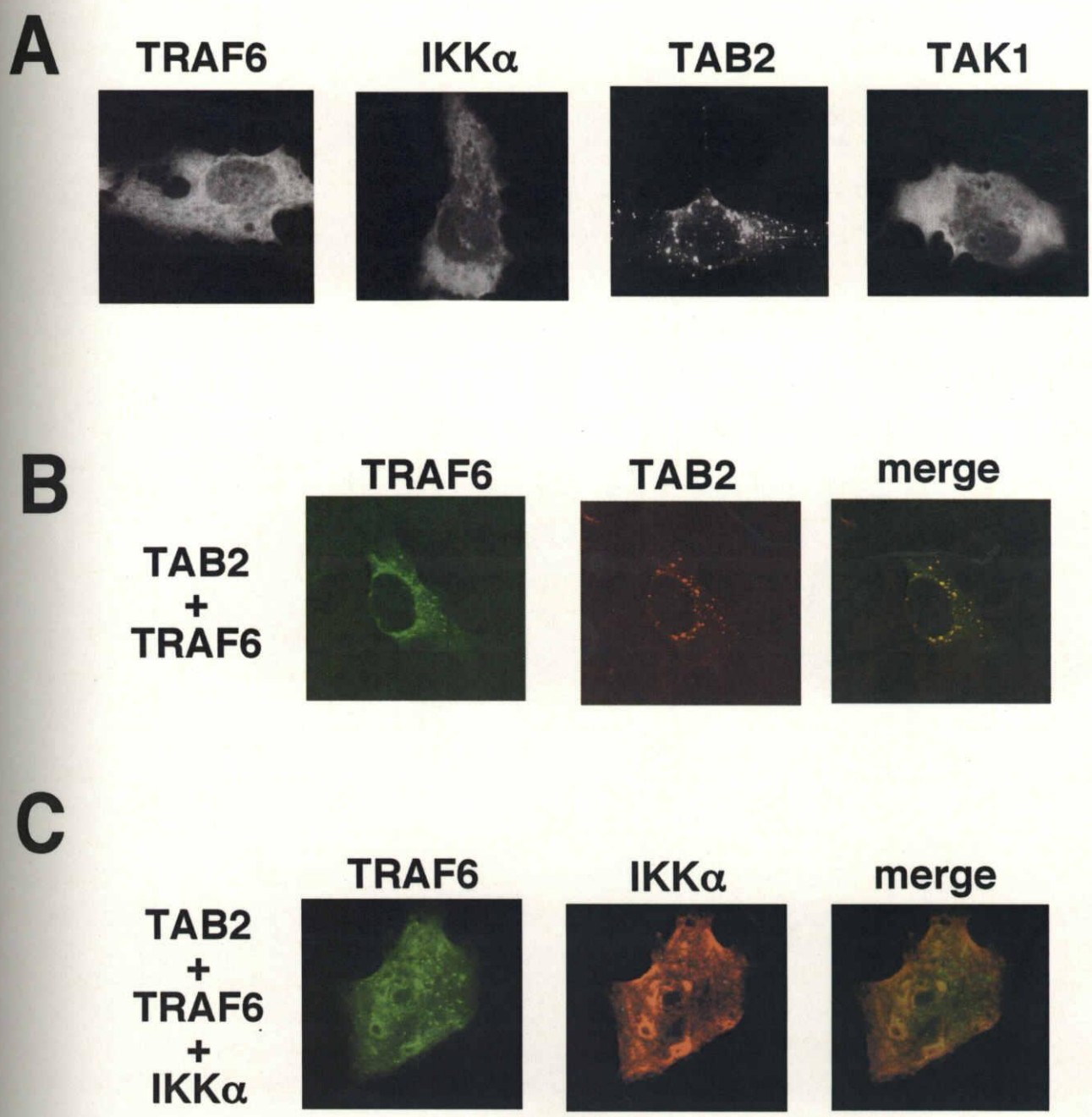

IB: anti-HA
293 cells
HA-TAB2
Fold Stimulation
(NF-κB-Luc/Actin-LacZ)
15
10
5
0
1.0
3.8
9.2
10.3
2.0
2.2
2.7
2.6
4.0
3.7
2.3
4.4
3.7
HA-TAB2
-
WT
ΔCUE
F20A
F20D

Figure 7.


A
IP: anti-IKKα
Whole Cell Extract
TAB2
-
+
-
+
IB: anti-TRAF6
IB: anti-TAB2
B: anti-IKKα

B
IP: anti-IKKα
Whole Cell Extract
IL-1 (5 ng/ml)
[min.]
0 3 10 30 0 3 10 30
IB: anti-TRAF6
IB: anti-IKKα

Figure 8.


A
TRAF6
IKKα
TAB2
TAK1
B
TAB2
+
TRAF6
TRAF6
TAB2
merge
C
TAB2
+
TRAF6
+
IKKα
TRAF6
IKKα
merge