

令和元年6月3日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08352

研究課題名(和文) TRAF6の分解を利用した感染症疾患治療薬候補物質の探索に関する研究

研究課題名(英文) Exploration of candidate compounds that overcome infectious disease by inducing TRAF6 degradation

研究代表者

室井 正志 (Muroi, Masashi)

武蔵野大学・薬学部・教授

研究者番号：70311389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Toll-like receptorのシグナル伝達に關与するIRAK-1がTRAF6を分解することを利用して、過剰な炎症性メディエーター産生を抑制する感染症疾患治療薬候補物質の探索を行った。IRAK-1の712個のアミノ酸のうち、TRAF6の分解誘導、NF- $\kappa$ Bの活性化およびTRAF6との結合にはアミノ酸領域1-102と523-618もしくは619-712のみで十分であることを見出した。さらに、523-712に存在する5アミノ酸から成る領域のペプチドを細胞内に発現させてもTRAF6の分解が誘導されることを見出した。本研究は未だに治療法のない感染症疾患の克服に光明をあてるものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌感染症疾患は、米国内だけでもこれによる死者が年間に数十万人にも達すると推定されている臨床上の重大な問題であるにもかかわらず、現在、効果的な治療法がなく、有効な治療薬の開発が切に望まれている。本研究では感染症疾患につながる炎症性メディエーター産生に關与するTRAF6を効果的に分解するペプチドを見出した。このペプチド構造を擬態する低分子化学物質が得られれば細菌感染症疾患治療薬の開発に多大に貢献するものである。また、TRAF6蛋白質の機能抑制は骨新生を促すことも報告されており、TRAF6の分解を誘導する薬物は、骨粗鬆症、関節リウマチなどの運動器疾患の治療薬の開発にもつながるものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：I previously found that IRAK-1, a kinase involved in Toll-like receptor signaling, induced degradation of TRAF6, an indispensable molecule for Toll-like receptor signaling.

This study explored a minimal structural region of IRAK-1 for the degradation, which may be applicable to the treatment of infectious diseases through inhibition of exacerbated production of inflammatory mediators.

Among 712 amino acids of IRAK-1, I found that only Death Domain (D: amino acid 1-102) and C1 (amino acid 523-618) or C2 (amino acid 619-712) were required for the degradation of TRAF6. C1 and C2 contain three potential TRAF6-binding sequences, each of which consists of five amino acids, and I also found that expression of these sequence structures in cells induced degradation of TRAF6. These results provide a possibility for obtaining a therapeutic drug, which inhibits exacerbated production of inflammatory mediators, for infectious diseases, and shed light on the treatment of unovercome infectious diseases.

研究分野：自然免疫

キーワード：感染症疾患 Toll-like receptor 炎症性疾患 エンドトキシン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エンドトキシン疾患をはじめとする細菌感染症疾患は、米国内だけでもこれによる死者が年間に数十万人にも達すると推定されている臨床上的重大な問題である。感染症疾患は TLR4 を活性化させるエンドトキシンなどの細菌構成物質がマクロファージ細胞などを刺激し、無秩序な炎症性メディエーター産生を誘導することが原因であるとされている。現在までにエンドトキシン拮抗薬や炎症性メディエーターの作用を抑制する物質などが治療薬として試されたが、期待された効果が得られていない。これは、種々の菌体成分が TLR4 以外の TLR を活性化すること、および、産生される炎症性メディエーターが多岐にわたることが起因しているものと思われる。

TLR は、現在、少なくとも 10 種類が見出されており、それぞれが異なる菌体成分を認識することが明らかになっている。TLR がこれらの菌体成分により刺激されると、それぞれの TLR が異なるアダプター分子や IRAK を介して TRAF6 へとシグナルが伝達され、NF- $\kappa$ B などの転写因子が活性化される。これにより、さまざまなサイトカインなどの放出が起き自然免疫が活性化される。一方で、過剰な TLR の刺激は NF- $\kappa$ B を介した無秩序な炎症性メディエーター産生を誘導し、感染症疾患へと発展する。TRAF6 のノックアウトマウスが作成され、TRAF6<sup>-/-</sup>マクロファージ細胞では TLR1/2, TLR2/6, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9 による炎症性応答が完全に遮断されることが見出され、TRAF6 がほぼ全ての TLR による炎症性メディエーター産生に重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。また、最近では T cell 受容体、B cell 受容体のシグナリングにも関係していることが見出され、自然免疫だけではなく免疫系に幅広い役割を果たしている。

申請者は TLR のシグナル伝達機構を解析する過程で、マクロファージ細胞を種々の TLR 刺激薬で長時間または過剰に刺激することで TRAF6 の分解が起きること、この分解には IRAK-1 が関与しており、細胞に IRAK-1 を過剰発現させることで proteasome 依存性に TRAF6 の分解が誘導されることを見出し、IRAK-1 は TRAF6 へとシグナル伝達を行うだけではなく、TLR の刺激が過剰になった際には、TRAF6 を分解に導き、TLR シグナルを負に調節していることを明らかにしている (Muroi and Tanamoto, *Biochim. Biophys. Acta*, **1823**, 255-263, 2012)。申請者は、この機構を利用することで、過剰な TLR の活性化に起因する無秩序な炎症性メディエーター産生を抑制できるのではとの着想に至った。感染症疾患の治療として IRAK-1 をヒトに過剰発現させることは非現実的であるため、TRAF6 の分解に必要な IRAK-1 の構造最小単位をペプチドレベルまで絞り込み、これに細胞膜透過性を高めるための修飾、あるいは、ペプチドのファーマコフォアを解析して、これを擬態する低分子化合物を探索することが必要となる。現在までに IRAK-1 の 712 アミノ酸のうち、TRAF6 の分解に必要な領域を百数十アミノ酸まで絞り込むのに成功している。これをさらに絞り込むことにより、現実的な細菌感染症疾患治療薬の開発につながるものと期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究は、TRAF6 の分解に必要な IRAK-1 の構造最少単位をペプチドレベルまで絞り込み、これをシード化合物として、TRAF6 を分解することにより過剰な炎症性メディエーター産生を抑制するような感染症疾患治療薬候補物質の探索を行うものである。このために本研究では以下のことを明らかにすることを目的とした。

- (1) IRAK-1 の各種欠失変異体を作成し、TRAF6 の分解に必要な IRAK-1 の構造最少単位を絞り込む。
- (2) 絞り込んだ IRAK-1 の構造最少単位に細胞膜透過性の修飾を行ったペプチドを合成し、これをマクロファージ細胞等に加えて TRAF6 の分解が誘導されるかどうかを検討する。
- (3) 絞り込んだ IRAK-1 の構造最少単位ペプチドのファーマコフォアと、そのファーマコフォアを擬態する低分子化合物をコンピュータ解析ソフトを用い探索する。
- (4) 得られた低分子化合物をマクロファージ細胞等に加えて TRAF6 の分解が誘導されるかどうかを検討する。
- (5) また、TRAF6 の分解に必要な IRAK-1 の構造領域が生理的にどのような役割を果たしているのかを解明し、IRAK-1 がいかにして TLR のシグナル伝達を正にも負にも調節しているのかを解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

ヒト胎児腎細胞由来の HEK293 細胞 (JCRB 生物資源バンク) は、Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies, Grand Island, NY) に fetal bovine serum (Life Technologies)、penicillin (Life Technologies) および streptomycin (Life Technologies) を、それぞれ 10%、100 U/mL および 100  $\mu$ g/mL となるように加えた培地 (以下、DMEM) で培養した。

FLAG タグを付加した TRAF6 を恒常的に発現する HEK293 細胞 (T6-34 細胞) の作成はすでに報告済み (Muroi and Tanamoto, 2012) である。この細胞は、DMEM に G418 (0.5 mg/mL、終濃度) を加えた培地で培養した。

## (2) プラスミドの作成

NF- $\kappa$ B 依存性のルシフェラーズレポータープラスミド pELAM-L、TRAF6 および IRAK-1 の発現プラスミドについては Muroi ら (2002) により報告済みである。IRAK-1 の各種変異体プラスミドは PCR を用いた標準的手法により作成し、変異は DNA シークエンスにより確認した。

## (3) レポーターアッセイ

NF- $\kappa$ B 依存性のルシフェラーズレポーター活性の測定は Muroi ら (2012) の方法に従って行った。T6-34 細胞を 6 ウェルプレートに播種し、16 時間後、リン酸カルシウム法を用いて、種々の IRAK-1 変異体プラスミド (0.1-0.5  $\mu$ g)、0.2  $\mu$ g の pELAM-L および 5 ng の phRL-TK (Promega) をトランスフェクションした。30 時間後、細胞を Phosphate Buffered Saline (PBS) で洗浄し、そこへプロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque) を添加した lysis buffer (10 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 10 mM KCl, 5 mM EDTA, 40 mM  $\beta$ -glycerophosphatase, 0.5% Nonidet P40, 30 mM NaF, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM dithiothreitol) を 100  $\mu$ L ずつ加えて細胞抽出液を調製した。細胞抽出液のレポーター遺伝子活性は Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) に従って測定し、ウェル間の細胞数および遺伝子導入効率の差に基づくレポーター活性の誤差を補正した。

## (4) ウェスタンブロッティング

細胞抽出液の上清を用いて Muroi ら (2002, 2012) の方法に従って SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行い、タンパクを PVDF メンブレン (Millipore, Billerica, MA) に転写後、ウェスタンブロッティングを行った。一次抗体として抗 EIAV 抗体 (Muroi and Tanamoto, 2008)、抗 FLAG 抗体 (M2; Sigma-Aldrich) および抗  $\beta$ -actin 抗体を用い、二次抗体として peroxidase を結合させた抗ウサギ、または抗マウス IgG 抗体 (Jackson Immuno Research, West Grove, PA) を用いた。化学発光試薬 (Millipore) を加えた後、発光をルミネッセンスイメージアナライザー (GE Healthcare, Piscataway, NJ) で検出した。

## 4. 研究成果

IRAK-1 は 712 個のアミノ酸から成る蛋白質であり、機能的違いにより Death Domain (D: アミノ酸 1-102)、Internal Domain (I: アミノ酸 103-197)、Kinase Domain (K: アミノ酸 198-522)、C1 (アミノ酸 523-618)、C2 (アミノ酸 619-712) の 5 領域に分けられる。そこで、これらの領域を個々に、あるいは組み合わせて欠失させた種々の IRAK-1 変異体と野生型について TRAF6 の分解誘導能、TRAF6 との相互作用および NF- $\kappa$ B の活性化を比較した。D 領域を欠失すると TRAF6 の分解、TRAF6 との相互作用および NF- $\kappa$ B の活性化が見られなくなった。また、C1 領域を欠失すると、TRAF6 との相互作用および NF- $\kappa$ B の活性化は見られたが、TRAF6 の分解はほとんど見られなくなった。一方で、他の領域は欠失しても TRAF6 の分解、TRAF6 との相互作用および NF- $\kappa$ B の活性化が誘導されたことから、D 領域または C1 領域が TRAF6 の分解誘導能、TRAF6 との相互作用および NF- $\kappa$ B の活性化に必須であり、I 領域、K 領域および C2 領域は必要ないことを明らかにした。一方で、D 領域または C1 領域単独ではいずれの活性も誘導せず、D と C1 領域の両者により全ての活性が誘導されることを見出した。

D 領域の N 末側もしくは C 末側を 10-33 アミノ酸欠失すると、NF- $\kappa$ B の活性化は見られるものの、TRAF6 の分解は見られなくなった。C1 領域には TRAF6 との結合に重要だとされる部位が 2 ヶ所 (TB1, TB2) 存在するが、TRAF6 の分解には D と TB2 のみで十分であることを見出し、D と TB2 の間に可動性を持たせるための 10 アミノ酸程度のスペーサーを挿入するだけで TRAF6 の分解、TRAF6 との相互作用および NF- $\kappa$ B の活性化のいずれもが誘導されることを明らかにした。

TB2 領域は 6 アミノ酸程度の長さであるが D 領域は 100 アミノ酸と長いため、ペプチドとして合成することは困難である。D 領域は他の Death domain を有するタンパクとの相互作用に関与しているため、TB2 領域が実質的に TRAF6 の分解に寄与するものと考え、TB2 を短鎖タンパクとの融合タンパクの型で細胞内に過剰発現させることで TRAF6 の分解が誘導されるかどうかを検討すると、GFP と TB2 の融合タンパクもしくは NanoLuc<sup>®</sup> Luciferase の large 断片と TB2 との融合タンパクを細胞内に発現させるだけで TRAF6 の分解が誘導されることを見出した。

上記の結果をまとめると、TB2 だけを細胞内に発現させるだけで TRAF6 の分解が誘導できる可能性を示し、TB2 のファームコフォアを解析して、これを擬態する低分子化合物を探索することで現実的な細菌感染症疾患治療薬の開発につながるものと期待できる。また、本研究の結果では TRAF6 との結合と NF- $\kappa$ B の活性化に必要な IRAK-1 の構造領域は完全に一致し、NF- $\kappa$ B の活性化における TRAF6 との結合の重要性が伺える。Li らは、I 領域もまた NF- $\kappa$ B の活性化に必要であり、D、I と C1 領域だけの変異体で NF- $\kappa$ B の活性化を誘導することを報告している。しかし本研究では D と C1 領域だけで野生型と同等に活性化することから、Li らとの違いは I 領域を欠失した変異体の発現量の差によるものと思われる。本研究では、C1 領域を欠失しても TRAF6 と結合し NF- $\kappa$ B も活性化するが、TRAF6 の分解を誘導しなかったことから、TRAF6 の分解誘導における C1 領域の重要性が伺えるが、NF- $\kappa$ B の活性化においても D 領域単独では活性化が起きず、C1 領域も必要としたことから、TRAF6 は D 領域と C1 領域を介して

IRAK-1 と結合し、NF- $\kappa$ B の活性化を引き起こすが、TRAF6 を分解する何らかの物質が IRAK-1 の C1 領域に結合することで TRAF6 と相互作用し、TRAF6 を分解に導くのではないかと考えている。

#### <引用文献>

- Li, X., Commane, M., Jiang, Z., Stark, G.R. IL-1-induced NF- $\kappa$ B and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation diverge at IL-1 receptor-associated kinase (IRAK), *PNAS* **98** (2001) 4461-4465.
- Muroi, M., Ohnishi, T., Tanamoto, K. Regions of the Mouse CD14 Molecule Required for Toll-like Receptor 2- and 4-mediated Activation of NF- $\kappa$ B, *J. Biol. Chem.*, **277** (2002) 42372-42379.
- Muroi, M., Tanamoto, K. TRAF6 distinctively mediates MyD88- and IRAK-1-induced activation of NF- $\kappa$ B, *J. Leuk. Biol.* **83** (2008) 702-707.
- Muroi, M., Tanamoto, K. IRAK-1-mediated negative regulation of Toll-like receptor signaling through proteasome-dependent downregulation of TRAF6, *Biochim. Biophys. Acta.* **1823** (2012) 255-263.

#### 5 . 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計4件)

- Zenke K., Muroi M., Tanamoto K.: IRF1 supports DNA binding of STAT1 by promoting its phosphorylation. *Immunol. Cell. Biol.*, **96**, 1095-1103 (2018), doi: 10.1111/imcb.12185
- Ishii T, Niikura Y, Kurata K, Muroi M., Tanamoto K, Nagase T, Sakaguchi M, Yamashita N.: Time-dependent distinct roles of Toll-like receptor 4 in a house dust mite-induced asthma mouse model. *Scand. J. Immunol.*, (2018), doi: 10.1111/sji.12641
- Zenke K., Muroi M., Tanamoto K.: AKT1 distinctively suppresses MyD88-dependent and TRIF-dependent Toll-like receptor signaling in a kinase activity-independent manner. *Cellular Signalling*, **43**, 32-39 (2018), doi: 10.1016/j.cellsig.2017.12.002
- Sugiyama K., Muroi M., Kinoshita M., Hamada O., Minai Y., Sugita-Konishi Y., Kamata Y., and Tanamoto K.: NF- $\kappa$ B activation via MyD88-dependent Toll-like receptor signaling is inhibited by trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. *J. Toxicol. Sci.*, **41**, 273-279 (2016), doi: 10.2131/jts.41.273

##### [学会発表](計9件)

- 室井 正志、善家 孝介、棚元 憲一：STAT1 の活性化には N 末側アミノ酸も必要である、平成 31 年 3 月 日本薬学会第 139 年会（千葉）
- 善家 孝介、竹居 芳恵、津田 知希、相馬 柊子、室井 正志、棚元 憲一：一酸化窒素合成酵素(iNOS)の転写と発現における NF- $\kappa$ B1 (p50/p105)の役割、平成 31 年 3 月 日本薬学会第 139 年会（千葉）
- 室井正志、善家孝介、棚元憲一：STAT1 により誘導される IRF1 は STAT1 を活性化する、平成 30 年 3 月 日本薬学会第 138 年会（金沢）
- 善家孝介、室井正志、棚元憲一：AKT1 はキナーゼ活性に依存せず TLR4 シグナリング活性化を抑制する、平成 30 年 3 月 日本薬学会第 138 年会（金沢）
- Muroi M., Zenke K., Tsuchiya K., and Tanamoto K. : Role of the C-terminal region of STAT1 on its binding to the GAS element. 平成 29 年 3 月 第 90 回日本細菌学会総会（仙台）
- Zenke K., Muroi M., Ido T., Tanobe R., Ihashi Y., and Tanamoto K. : Suppression of Toll-like receptor signaling by kinase-dead AKT1. 平成 29 年 3 月 第 90 回日本細菌学会総会（仙台）
- 室井正志、善家孝介、土屋光平、棚元憲一：STAT1 における二量体化と GAS への結合に必要なアミノ酸配列、平成 29 年 3 月 日本薬学会第 137 年会（仙台）
- 善家孝介、室井正志、井戸貴彬、田野邊竜平、井橋佑太、棚元憲一：Toll-like receptor シグナリングに対する非活性型 AKT1 の抑制作用、平成 29 年 3 月 日本薬学会第 137 年会（仙台）
- 室井正志、善家孝介、棚元憲一：AKT1 による Toll-like receptor シグナリングの調節、平成 29 年 9 月 第 100 回日本細菌学会関東支部総会（東京）

##### [図書](計0件)

##### [産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

##### [その他]

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究分担者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。