

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08896

研究課題名(和文)新規コピキチン化酵素複合体Nqo1-PDLIM2による自然免疫応答制御機構

研究課題名(英文) Regulation of innate immune responses by NQO1-PDLIM2 axis

研究代表者

木村 彰宏 (Kimura, Akihiro)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・室長

研究者番号：20533318

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)：NQO1は抗酸化酵素の一つとして知られている。NQO1欠損マクロファージではLPS誘導性IL-6産生が特異的に高くなることが判明していた。このことはNQO1が自然免疫応答において誘導されるサイトカインの中でIL-6のみを選択的に制御していることを示しており、今回われわれはそのメカニズムの詳細を明らかにした。IκBzはLPS誘導性IL-6産生におけるマスターレギュレーターである。NQO1はIκBzとPDLIM2の結合の橋渡し役として機能しており、その結果、NQO1がIκBzのコピキチン依存的分解を促進し、IL-6産生を選択的に抑制していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

敗血症は細菌やウイルスなどの感染症により、全身に炎症が広がり、進行すると多臓器不全や敗血症ショックといった重篤な病態に陥る。現在、世界で年間2,000万人以上もの人が新たに発症しており、その中のかかなりの割合の人が敗血症で亡くなっているとされている。この敗血症を誘発する最初のきっかけとなるのが、TLRと呼ばれる受容体からのシグナル伝達とされている。ところが、TLRシグナルが過剰に伝達されると、IL-6などのサイトカインが多量に産生され敗血症ショックとなる。そのため、TLRシグナルからのIL-6産生制御機構の解明は、敗血症ショックの発症機序の解明やその治療法の確立において非常に重要であるといえる。

研究成果の概要(英文)： NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) protects cells against oxidative stress and toxic quinones. In this study, we found a novel role of NQO1 in suppressing Toll-like receptor (TLR)-mediated innate immune responses. NQO1-deficient macrophages selectively produced excessive amounts of IL-6 on LPS stimulation, and the deletion of NQO1 in macrophages exacerbated LPS-induced septic shock. NQO1 interacted with the nuclear IκB protein IκB-z, which is essential for the TLR-mediated induction of a subset of secondary response genes including IL-6, and promoted IκB-z degradation in a ubiquitin-dependent manner. We identified PDLIM2 as the ubiquitin E3 ligase for NQO1-dependent IκB-z degradation. NQO1 augmented the association between PDLIM2 and IκB-z, resulting in increased IκB-z degradation. Collectively, this study describes a mechanism of the NQO1-PDLIM2 complex as a novel and important ubiquitin E3 ligase.

研究分野：免疫

キーワード：NQO1 LPS IL-6 PDLIM2 自然免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

さまざまな細菌感染やウイルス感染に対する防御機構として自然免疫応答が重要な役割を担っている。近年、自然免疫応答のシグナル伝達経路や制御機構が解明されてきたが、未だ不明な点も多く残っている。また、細菌やウイルスなどの外来因子だけでなく生体に内在する物質も自然免疫応答を活性化し、自己免疫疾患に大きく関与していることも明らかとなってきた。これらのことから自然免疫応答により惹起される炎症反応の制御機構を解明することは、自己免疫疾患の発症メカニズムの解明や新規治療法の開発につながる事が期待される。

われわれはこれまでに AhR が IL-17 産生性ヘルパーT 細胞(Th17)の分化や自然免疫応答の抑制などさまざまな免疫応答を制御し、多くの自己免疫疾患にも関与していることを報告してきた(*Proc Natl Acad Sci USA* 105 : 9721-9726, 2008, *J Exp Med* 206: 2027-2035, 2009)。これまでの研究は AhR 単独における免疫応答の制御機構の解明が中心であったが、環境応答因子である AhR は本来さまざまな薬物代謝酵素を誘導し環境応答システムを構築することで生体のホメオスタシスを維持している。従って、AhR とそれにより誘導される代謝酵素により形成される環境応答システムによる免疫応答制御機構の解明が求められるが、この観点からのアプローチは殆んど成されていない。

今回、われわれはマクロファージにおいて LPS 刺激により抗酸化酵素 NAD(P)H quinone dehydrogenase 1(Nqo1)の発現誘導が AhR 依存的に増強されることを発見した。興味深いことに Nqo1 欠損(KO)マクロファージでは野生型(WT)マクロファージに比べて LPS 誘導性の IL-6 産生が顕著に高くなっている一方で、TNF- α 産生は正常であった。これらの結果は Nqo1 がマクロファージにおいて自然免疫により誘導される炎症性サイトカインの一つである IL-6 の産生を選択的に抑制していることを示している。LPS による IL-6 産生には核内転写因子である I κ B ζ の誘導が必要である(*Nature* 430 : 218-222, 2004)。われわれは Nqo1 が LPS 誘導性 IL-6 産生を抑制する際、核内ユビキチンリガーゼ PDLIM2 と結合し I κ B ζ をユビキチン依存的に分解していることを明らかにしている。

2. 研究の目的

われわれはこれまでダイオキシン受容体(Aryl hydrocarbon receptor: AhR)がさまざまな免疫応答を制御していることを明らかにしてきた。今回、マクロファージにおいて AhR が NAD(P)H quinone dehydrogenase 1(Nqo1)を誘導し、その **Nqo1 が LPS 誘導性 IL-6 産生を選択的に抑制していることを発見した**。本研究では Nqo1 による LPS 誘導性 IL-6 産生の選択的制御機構を解明するために、**われわれが新たに発見した新規ユビキチン化酵素複合体 Nqo1-PDLIM2 の作用機序に焦点を当てる**。LPS 誘導性 IL-6 産生経路における Nqo1-PDLIM2 による作用機構を明らかにすることで、自然免疫応答における新規な制御機構の解明や Nqo1 リガンドを用いた自然免疫応答により誘導されるエンドトキシンショックや自己免疫疾患に対する新たな治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

1. マクロファージにおける Nqo1 による LPS シグナル制御機構

われわれはこれまでに Nqo1 KO マクロファージにおいて LPS 誘導性の IL-6 や IL-12 の産生がコントロールに比べ著しく高くなっている一方で、TNF- α 産生に関しては正常であることを明らかにしている。LPS 誘導性の IL-6 や IL-12 は核内転写因子 I κ B ζ により制御されていることから、I κ B ζ 依存的および非依存的に誘導される他のサイトカインや誘導因子に関

して解析を進める。WT および Nqo1 KO マクロファージを LPS で刺激した後、上清中の各サイトカインを ELISA で測定するとともに、一酸化窒素の産生を比較することで Nqo1 が LPS シグナルにおいて I κ B ζ 依存的経路のみを選択的に制御していることを明らかにする。

また LPS 刺激後の WT および Nqo1 KO マクロファージにおいて LPS シグナルの下流で作用する interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4) や IRAK1、NF- κ B などの活性をウェスタンブロットティング法で確認することで、Nqo1 が I κ B ζ 非依存的経路に関与していないことを示す。さらに WT および Nqo1 KO マクロファージを LPS で刺激した後、IL-6 や TNF- α の転写活性をルシフェラーゼアッセイやクロマチン免疫沈降法を用いて解析を進める。LPS 誘導性のサイトカイン産生やシグナルカスケードだけでなく、転写レベルでの制御機構を明らかにしていくことで Nqo1 による LPS シグナル制御機構を解明していく。

2. Nqo1-PDLIM2 ユビキチン化酵素複合体による I κ B ζ の分解メカニズムの解明

われわれはこれまでに Nqo1 が I κ B ζ と結合し、I κ B ζ のユビキチン依存的分解を促進していることを明らかにしている。さらに Nqo1 が核内ユビキチンリガーゼ PDLIM2 と結合することで I κ B ζ の分解を誘導していることを発見した。実際に WT、Nqo1 KO マクロファージ、PDLIM2 KO マクロファージを LPS 刺激後、I κ B ζ タンパクの安定化を調べたところコントロール細胞と比較して Nqo1 KO および PDLIM2 KO 細胞において I κ B ζ タンパクが非常に安定化していることが判明した。PDLIM2 の作用機序を明らかにするためにまず、PDLIM2 がどのドメインを介して I κ B ζ と結合しているのかを明らかにする。PDLIM2 は LIM ドメインと PDZ ドメインを有している (*Nat Immunol* 8: 584-591, 2007)。両ドメインも標的タンパクと結合することが知られているため、PDLIM2 (LIM) および PDLIM2 (PDZ) を用いてどちらのドメインを介して PDLIM2 が I κ B ζ と結合しているのかを証明する。

Nqo1-PDLIM2 ユビキチン化酵素複合体が I κ B ζ と結合し分解を誘導する際の構成成分に関して明らかにする。WT および Nqo1 KO マクロファージを LPS で刺激した後、PDLIM2 で免疫沈降し Nqo1 依存的に結合しているタンパクを質量分析により明らかにする。本実験においては内在性のタンパクを免疫沈降する系であることから、発現量や抗体のアフィニティーの問題で計画通りに進行しない可能性がある。そのような場合には、マクロファージにタグ付きの PDLIM2 を強制発現させることで上記と同様の実験を行うことで問題を解消していく。

4. 研究成果

1. マクロファージにおける Nqo1 による LPS シグナル制御機構

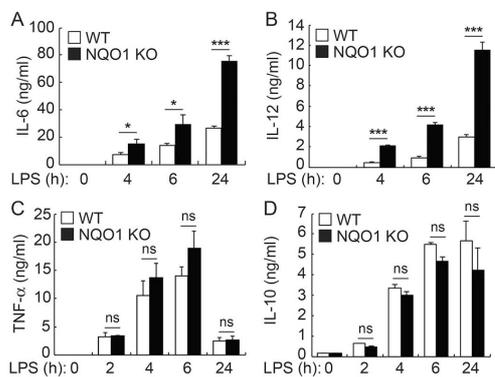
WT および Nqo1 KO マクロファージを LPS で刺激した後、上清中の各サイトカインを ELISA で測定したところ、NQO1 KO マクロファージにおいて IL-6 および IL-12 産生が WT 細胞に比べて著しく高くなっていた (図 1)。一方で、TNF- α や IL-10、NO などの産生は両群において差は認められなかった (図 1)。これらの結果から NQO1 は LPS シグナルの下流において、I κ B ζ 依存的経路を特異的に抑制していることが明らかになった。一方で、LPS シグナル下流において、I κ B α の分解は両群に差がなかったことから NQO1 は I κ B ζ 非依存的経路を抑制していないことが示され (図 2)。このことは NQO1 が TNF- α や IL-10 などの産生を抑制していない結果とも整合性がある。

2. Nqo1-PDLIM2 ユビキチン化酵素複合体による I κ B ζ の分解メカニズムの解明

今回われわれは NQO1 が LPS により誘導される I κ B ζ のユビキチン化を促進していることを

発見した。NQO1自身はユビキチンリガーゼではないことから、IkB ζ のユビキチン化を誘導するユビキチンリガーゼを探索したところ、核内ユビキチンリガーゼであるPDLIM2が同定された。NQO1欠損マクロファージと同様に、PDLIM2欠損マクロファージにおいてもLPS誘導性IL-6産生が特異的に上昇していた。われわれはPDLIM2がIkB ζ と結合しユビキチン化を誘導する際に、NQO1が両者の結合の橋渡しとしての役割を担っていることを明らかにした。さらにPDLIM2がNQO1やIkB ζ と結合するにはPDLIM2内に存在するLIMドメインを介していることもdeletion mutantを使った実験により明らかにした(図3)。またin vivoにおけるLPS投与実験においてもNQO1欠損マウスおよびPDLIM2欠損マウスにおいてコントロールマウスよりもLPS感受性が高くなっており、血中IL-6量も高値を示した(図4)。以上の結果から、NQO1はPDLIM2によるIkB ζ ユビキチン化に必要な橋渡しタンパクとしてはたらくことにより、LPS誘導性IL-6産生を特異的に抑制していることを明らかにした。

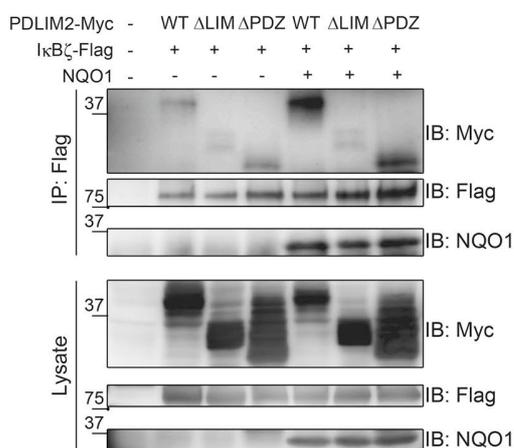
[図1]



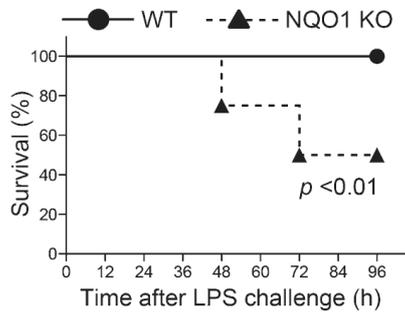
[図2]



[図3]



[図4]



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kimura A, Kitajima M, Nishida K, Serada S, Fujimoto M, Naka T, Fujii-Kuriyama Y, Sakamoto S, Ito T, Handa H, Tanaka T, Yoshimura A, Suzuki H.	4. 巻 215(8)
2. 論文標題 NQO1 inhibits the TLR-dependent production of selective cytokines by promoting I B- degradation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Exp Med.	6. 最初と最後の頁 2197-2209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20172024.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitajima M, Kimura A, Suzuki H	4. 巻 200
2. 論文標題 Nqo1 Regulates Irritant Contact Hypersensitivity against Croton Oil through Maintenance of Dendritic Epidermal T Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Immunol.	6. 最初と最後の頁 1555-1559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.1701389.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akihiro Kimura and Harumi Suzuki
2. 発表標題 The AhR-Arnt-MafK complex regulates the differentiation of regulatory B cells
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihiro Kimura, Masayuki Kitajima and Harumi Suzuki
2. 発表標題 The novel ubiquitin ligase complex, NQO1-PDLIM2 inhibits TLR-dependent production of selective cytokines by degrading IκB-z
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akihiro Kimura, Masayuki Kitajima and Harumi Suzuki
2. 発表標題 The novel ubiquitin ligase complex, NQO1-PDLIM2 inhibits TLR-dependent production of selective cytokines by degrading IκB-z
3. 学会等名 The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立国際医療研究センター 免疫病理研究部 http://plaza.umin.ac.jp/~suzukih/cgi-bin/lab/index.cgi 国立国際医療研究センター 免疫病理研究部 http://plaza.umin.ac.jp/~suzukih/cgi-bin/lab/index.cgi
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考