

平成 22 年 1 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590284
 研究課題名 (和文) IL-6 と TGF β による NLK 活性化機序の解明と分子標的療法開発の基礎的検討
 研究課題名 (英文) Molecular mechanism for the regulation of NLK
 研究代表者
 小島 裕正 (KOJIMA HIROTADA)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：40336772

研究成果の概要：本課題では、様々なサイトカインによって活性化されるキナーゼである NLK 活性化機序の解明のためプロテオミクス的手法により、NLK 複合体構成蛋白の同定を試みた。いくつかの分子が見いだされ、そのうちの一つのキナーゼについては実際に NLK や基質との結合が確認され、NLK による基質のリン酸化にも影響を与えることも明らかとなり、NLK の活性を制御する分子である可能性が示唆された。また、複合体構成蛋白が分子標的となりうるかを評価する系として、ヒト正常繊維芽細胞が使用可能であることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
平成 20 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：細胞医科学

1. 研究開始当初の背景

(1) 様々な生命現象において重要な働きを担うサイトカインのうち Interleukin-6 ファミリー (IL-6, gp130 利用型サイトカイン) と Transforming growth factor (TGF) ファミリーのサイトカインはいずれも発生段階から成熟個体まで多様な機能を発揮するサイトカインであり、共通の標的細胞に作用して、拮抗もしくは協調することも多い。両者の関わるがん化や自己免疫疾患の病態の理解のためには、両者のシグナル伝達機序が

ら見た作用機序の理解がいっそう重要になっている。それぞれシグナル伝達系においては代表的な Signal Transducers and Activator of Transcription (Stat)3 や Smad 転写因子群を用いたシグナルと蛋白質リン酸化酵素群 (TAK1/NLK や ERK キナーゼなど) の複数シグナル経路が様々なレベルで協調・拮抗しながら巧妙に作用していることがわかってきた。個々のシグナルの役割研究から、全体像の理解へと向かう研究、制御系に関する知見から新規治療標的の発見と治療法開発が重要となっている。

(2) IL-6 シグナル伝達系の中で主要な分子である Stat3 は、IL-6 刺激によりチロシン残基のリン酸化とともにセリン 727 残基のリン酸化を受ける。我々は、低濃度の IL-6 刺激時に Stat3 セリン 727 残基のリン酸化をもたらすキナーゼ経路が IL-6 受容体のシグナル伝達性分子 gp130 のチロシンリン酸化モチーフ YxxQ に由来し、阻害剤 H7 に感受性のあるキナーゼ伝達系である事を示した(Abe K *et al*, *Oncogene*, 2001;20(27):3464-3474)。次に、このキナーゼ系の本体を明らかにするため、Stat3 と複合体を形成するキナーゼ系の中からプロテオミクス的手法により TGF β -activated kinase 1 (TAK1)を見いだした。またその過程で、IL-6 が TGF β と同じく、TAK をよく活性化すること、下流で NLK を活性化することを見いだした。gp130 の YxxQ モチーフ由来シグナルで活性化された TAK1 は、核内で Stat3 や NLK と複合体を形成し、Stat3 を足場として NLK を活性化すること、このように活性化された NLK が、Stat3 セリン 727 残基をリン酸化をもたらすことを報告した(Kojima *et al*, *PNAS*, 2005;102(12):4524-4529)。

2. 研究の目的

(1) IL-6/gp130 型サイトカインや TGF β 刺激で活性化される NLK 活性化に至る経路をプロテオミクスの手法によって明らかにしていく。

(2) 活性化された NLK の作用の詳細を解明する。

(3) NLK 活性化経路の制御の評価系を作成し、将来的な分子標的療法応用への礎とする。

3. 研究の方法

(1) NLK 複合体構成成分の同定

① NLK 蛋白に 2 種類のアフィニティー タグ (TAP タグ) を付加した蛋白質を細胞内で発現させた細胞株を樹立した。タグに対する 2 種類のアフィニティークロマトグラフィーを用いて細胞溶解液より複合体の回収を行った。

② 精製した蛋白複合体を SDS-PAGE 電気泳動で分離後、リガンドに特異的に結合してくる電気泳動バンドを切り出し、蛋白分解酵素で処理した。消化しペプチドを脱塩し、MALDI-TOF 型の質量分析機で分析しペプチドマスフィンガープリンティング法により蛋白の同定を行った。

③ 精製した蛋白複合体を蛋白分解酵素で消化しペプチドを調製した。ナノスケールでの送液の可能な極微量液体クロマトグラフィーに接続した逆相クロマトグラフィーで分離後、溶出液を質量分析機により解析し、ペプチドシーケンスタグ法を用いて蛋白の同定を行った。

(2) NLK 複合体の機能と位置づけの解析

見いだされた NLK 複合体構成分子のそれぞれについて、

① cDNA を調製しタグを付加した形で発現できるベクターを構築した。抗タグ抗体あるいは、抗体が入手可能なものは抗体を用いて、蛋白-蛋白相互作用や免疫細胞染色法により細胞内の局在の変化を調べた。
② siRNA や miRNA を用いた RNA 干渉法をレンチウイルスベクターの系を用いて行い遺伝子をノックダウンした細胞株を準備した。また、発現ベクター (活性化型、劣勢抑制変異体) をレンチウイルスベクターの系を用いて導入した細胞株を準備した。それぞれの分子が NLK や基質の一つである Stat3 の活性に与える影響を調べた。

(3) NLK 活性化経路の制御の評価系の作成

見いだされた分子群の制御が、将来的ながん化抑制などの疾患治療への応用へとつながるかを検討するため、まず基準となる正常細胞における位置づけを把握する必要がある。ヒト正常繊維芽細胞である TIG 細胞を用いて、IL-6/gp130 活性化経路の位置づけを再検討した。

4. 研究成果

(1) NLK 複合体構成成分の同定

IL-6/gp130 シグナルにおける NLK の活性化に至る経路並びに基質となる分子群をプロテオミクスの手法により検索を試みた。まず NLK に 2 種類のタグ (TAP タグ) を付加した形で発現可能な細胞株を作製した。検討の結果、標識タグとして、

① 抗 HA 抗体と抗 Flag 抗体認識部位を順に配列したタグと

② 抗 Flag 抗体認識部位とカルモジュリン結合タンパク質認識部位を順に配列したタグが有効であることを確認した。

IL-6/gp130 シグナルを活性化させた細胞の溶解液より①のタグを付加したものについては抗 FlagM2 抗体と抗 HA 抗体により、②のタグを付加したものについて抗 FlagM2 抗体とカルモジュリンセファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより蛋白複合体を精製した。精製蛋白複合体中の構成蛋白を種々の質量分析機を用いてプロテオミクス解析を行

った。その結果、種々のキナーゼや調節機能に関わると予想される蛋白分子の存在が明らかになった。

(2) NLK 複合体の機能と位置づけの解析

① 前項(1)で見いだされた NLK 複合体構成分子のうちの一つのキナーゼ NLK 結合性キナーゼ (NLKBK) は、免疫沈降実験により内在性の NLK や Stat3 とともに確実に結合することが明らかとなった。また、免疫細胞染色の結果、主に核に存在するが、細胞質画分にも存在することが明らかになった。

Stat3 の機能に与える影響を検討するために shRNA によりノックダウン細胞の作製を試みた。しかしながら十分に発現レベルを低下させた細胞株を得ることができなかった。そこでキナーゼ活性を消失させた変異分子をドミナントネガティブ体として発現させた細胞を作製し検討したところ、Stat3 の機能を部分的に抑制することが確認された。

② 一方で gp130、TGF β シグナルにおける NLK の下流で基質となりうる転写因子の存在を明らかにした。これらの転写因子の活性化の差異に対する NLK 複合体構成蛋白の位置づけを検証中である。

(3) NLK 活性化経路の制御の評価系の作成

見いだされた分子群の制御が、がん化抑制に有用かを検討するため、正常繊維芽細胞における gp130-Stat3 経路の位置づけを再検討した。

正常 2 倍体繊維芽細胞である TIG3 細胞を IL-6 と可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6R) で刺激し情報伝達機能を担う受容体である gp130 を活性化させると、刺激 8 日目以降で、増殖の低下、細胞の扁平化、老化特異的 β -ガラクトシダーゼ活性の上昇、活性酸素種、p53 蛋白発現の上昇等の老化マーカーの誘導が認められた。gp130 を miRNA による RNA 干渉法で発現低下させたり、gp130 に由来する主要な伝達分子である Stat3 の劣勢抑制変異体を導入した TIG3 細胞においては、IL-6+sIL-6R 刺激における老化誘導の低下が確認された。gp130 シグナルによる老化誘導は抗酸化剤 N-アセチル-L-システイン (NAC) の前処理で低減されることから活性酸素種の産生が老化誘導に重要であることが示唆された。

また、p53 を shRNA を用いた RNA 干渉法によりノックダウンさせると老化誘導が認められなくなることがわかった。更には gp130 刺激により γ H2A.X 抗体陽性細胞の出現も認められたことから DNA 障害経路の関与も示唆された。

以上の結果より、持続的な gp130 シグナルの活性化が増殖抑制を導くこと、Stat3 がその際に重要であることを明らかとした (第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会合同年会、第 32 回日本分子生物学会年会にて報告)。

この細胞においては p53 の活性化経路に異常がおこれば、老化は誘導されず、むしろ細胞増殖のほうへ細胞の運命が決定されるため、NLK 複合体構成成分の機能解析においても使用可能であると考えられた。現在、この系における Stat3 の機能に影響を与える NLK や結合分子群の位置づけを検討中である。これらの分子の中でサイトカイン特異性を決定する分子を明らかにできれば、サイトカインシグナルの新たな分子標的の候補となる可能性が考えられる。

(4) まとめ

本課題では、IL-6/gp130 型サイトカインや TGF ファミリーなど様々なサイトカインによって活性化されるキナーゼである NLK の活性化機序の解明のためプロテオミクス的手法により、NLK 複合体構成蛋白の同定を試みた。いくつかの興味深い分子が見いだされ、そのうちの一つのキナーゼについては実際に NLK や基質との結合が *in vitro* でも確認され、NLK による基質のリン酸化にも影響を与えることも明らかになり、NLK の活性を制御する分子であると考えられた。

また、複合体構成蛋白が将来的に分子標的治療の候補となりうるかを評価する系として、ヒト正常繊維芽細胞が使用可能であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Igarashi H, Kuwahara K, Yoshida M, Xing Y, Maeda K, Nakajima K, Sakaguchi N., GANP suppresses the arginine methyltransferase PRMT5 regulating IL-4-mediated STAT6-signaling to IgE production in B cells. *Molecular Immunology*, 2009, 46(6), 1031-1041 (査読あり)

〔学会発表〕（計 2 件）

- (1) Kojima H, Nozawa T, Kunimoto H, Nakajima K, gp130 を介した細胞老化誘導機構の解析, 第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会合同年会, 神戸ポートアイランド(兵庫県), 2008 年 12 月 12 日
- (2) Kojima H, Kunimoto H, Nakajima K, Prolonged stimulation of gp130 leads to premature senescence of human diploid fibroblasts, 第 32 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (神奈川県), 2009 年 12 月 17 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 裕正 (KOJIMA HIROTADA)
大阪市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：40336772

(2) 研究分担者

中嶋 弘一 (NAKAJIMA KOICHI)
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00227787