

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790376

研究課題名（和文）自然免疫系とオートファジーの相互制御機構

研究課題名（英文）Cross-regulatory mechanisms of innate immunity and autophagy

研究代表者

高江洲 義一（TAKAESU GIICHI）

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60403995

研究成果の概要（和文）：

オートファジーは、真核生物がもつ細胞内分解系の一つであり、ほ乳動物においては、飢餓適応・細胞内品質管理・生体防御などさまざまな生理的役割を果たしていることが近年明らかとなった。しかしながらその制御機構については未だ不明な点が多い。本研究課題では、自然免疫系とオートファジーの相互制御機構について研究を行った。その結果、これまで自然免疫系で働くアダプター分子と考えられてきたタンパク質TAB2, TAB3が基底レベルのオートファジーを負に制御することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Autophagy is an intracellular bulk degradation system conserved among eukaryotes. In mammals, autophagy plays many physiological roles such as starvation response, protein quality control, host defense and so on. However, the molecular mechanisms of autophagy regulation are not well understood. Here, I focused my study on cross-regulatory mechanisms of innate immunity and autophagy. I found that TAB2 and TAB3, previously characterized as adapter proteins involved in innate immunity, negatively regulate basal autophagy in mammalian cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：自然免疫、オートファジー

1. 研究開始当初の背景

近年、ほ乳動物においてオートファジーが飢餓適応以外にも細胞内品質管理・発生・自然免疫・獲得免疫・プログラム細胞死・がん抑制など様々な高次生命現象にも関わっていることが急速に明らかとなってきた。このような多様な場面でオートファジーが適切に機能するためには、それぞれに特異的な制御機構が存在すると考えられるが、それに直接関わる分子やそれらの作用機序については未だ不明な点が多く、今後解明されるべき重要課題となっている。研究代表者は、LPS/TLR4 シグナル伝達経路で必須の役割を果たすプロテインキナーゼ TAK1 のアダプター分子 TAB2, TAB3 を同定し、その機能解析を行ってきた。TAB2, TAB3 の未知の分子機能を探る目的で yeast two hybrid screening を用いて TAB3 結合タンパク質を探索した結果、オートファジー制御タンパク質の一つ Beclin-1 が TAB2 および TAB3 と結合することを独自に見いだした。そこで、TAB2, TAB3 が、自然免疫系とオートファジーの間をつなぐ制御因子として機能する可能性を考え、本研究課題を立ち上げた。

2. 研究の目的

本研究課題においては、まず TAB2 および TAB3 がオートファジー制御に関与するのかわ、もしそうなら TAB2, TAB3 は全てのオートファジーに共通の制御因子として働くのかそれともある特定の刺激に反応してオートファジーを制御する刺激特異的な制御因子として働くのか、TAB2, TAB3 がどのようなメカニズムでオートファジーを制御するのか、TAB2, TAB3 によるオートファジー制御の生理的意義は何か、あるいは Beclin-1 が TAB2, TAB3 を介して TLR シグナルの調節に関わる可能性があるのか、また、TAK1 はオートファジーに関与するのかわ、を明らかにすることを目的として、以下の研究を行った。

3. 研究の方法

(1) TAB2, TAB3 がオートファジー制御因子として機能するかどうかの検討

まず、TAB2 および TAB3 がオートファジーの制御に関与するかどうかを調べるため、RNAi 法を用いてこれらの遺伝子のノックダウンを行い、基底レベルのオートファジー、飢餓・低酸素・TRAIL 刺激などによって誘導されるオートファジーに対する影響を調べる。逆に、TAB2 または TAB3 の過剰発現がオートファジー活性にどのような影響を及ぼ

すかを検討する。オートファジー活性の検出は、特異的基質の一つとして知られる内在性 p62/SQSTM1 のタンパク量および、オートファゴソームマーカーとして知られる LC3-II の増減によって行う。

(2) TAB2, TAB3 によるオートファジー制御の分子機構の解明

次に、TAB2, TAB3 によるオートファジー制御の分子機構を明らかにするため、過剰発現系および内在性レベルにおいて、TAB2 および TAB3 と Beclin1 の相互作用、細胞内局在の変化を検討する。相互作用の検出は、免疫沈降法またはショ糖密度勾配遠心法を用いて行い、細胞内局在は蛍光タンパク質を融合させた GFP-TAB2, RFP-Beclin1 を細胞に発現させて、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察する。

(3) TAK1 がオートファジーに関与する可能性の検討

TAK1 ノックアウトマウス由来の胎児繊維芽細胞(MEF)を使って、TAK1 がオートファジーに必須かどうかを検討する。また、TAB2 によるオートファジー制御が TAK1 に依存するかどうかを調べるため、TAB2 の過剰発現との組み合わせで、野生型、ドミナントネガティブ変異型 TAK1 の効果も検討する。

(4) Beclin-1 が TLR シグナルの制御因子として働く可能性の検討

RNAi 法を用いて Beclin-1 をノックダウンし、LPS 刺激による IL-6 の産生に変化が生じるかどうかを ELISA 法で測定する。

4. 研究成果

(1) TAB2 および TAB3 がオートファジー制御因子として機能するかどうかを明らかにするために、HeLa, MCF-7, MEF の各細胞を用いて RNAi ノックダウンを行った。ウェスタンブロットまたは RT-PCR 法でそれぞれのタンパク質発現量、mRNA 発現量を検出し、遺伝子ノックダウンができていることを確認した。また、この実験から、TAB2, TAB3 のどちらかをノックダウンすると、それだけで細胞死が誘導されることを発見した。一方、TAK1 をノックダウンしても細胞死は全く起こらなかったことから、TAB2, TAB3 は TAK1 非依存的に細胞の生存に必須の役割を果たしていると考えられる。TAB2 または TAB3 のいずれかをノックダウンしただけでは、内在性 p62/SQSTM1 の発現量に変化は認められなかったが (data not shown) TAB2, TAB3 を同時にノックダウンした細胞における p62/SQSTM1 の発現量には、コントロールと比べて著明な低下が認められた (図 1)。この

時、細胞は常に通常の条件で培養していたことから、これらの細胞では基底レベルのオートファジー活性が亢進している可能性が示唆された。そこで、この p62/SQSTM1 の発現低下がオートファジーの亢進によるものかどうかを明らかにするために、ATG5 ノックアウト MEF (東京医科歯科大学水島昇教授より分与) を用いて、TAB2, TAB3 ノックダウンの効果を検討した結果、ATG5 ノックアウト MEF においては、TAB2, TAB3 ノックダウンによる p62/SQSTM1 の発現減少がほとんどおこらないことがわかった (図 1)。

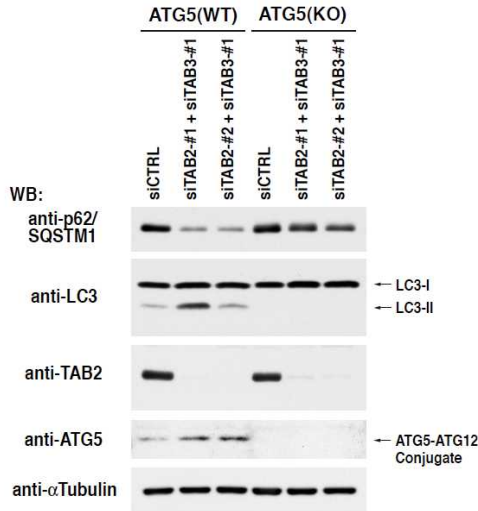


図 1 : TAB2, TAB3 のノックダウンによる基底レベルオートファジーの亢進

一方、全長の TAB2 を過剰発現させた場合は、逆に内在性 p62/SQSTM1 の発現量が上昇し、TAB2 の C 末約 300 アミノ酸のみや N 末 400 アミノ酸のみを含む欠失変異体ではそのような効果がなかった。また、野生型またはキナーゼネガティブ型 TAK1 を共発現させた場合、全長 TAB2 の過剰発現による p62/SQSTM1 の蓄積を促進することも阻害することもなかった (図 2)。以上のことから、TAB2, TAB3 が TAK1 非依存的に基底レベルのオートファジーを負に制御すると考えられる。

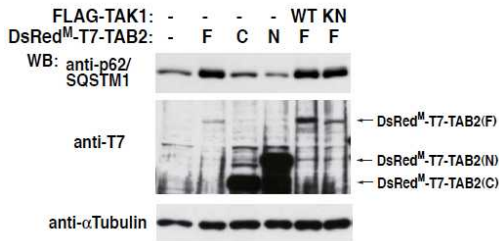


図 2 : TAB2 の過剰発現による基底レベルオートファジーの阻害

(2) TAB2, TAB3 によるオートファジー制御の分子機構を明らかにするため、Beclin-1 との結合、他のオートファジー制御因子 ATG13, ULK1, FIP200 との結合、ULK1 によるリン酸化修飾を検討した。その結果、TAB2, TAB3 は coiled-coil モチーフを含む C 末の領域で Beclin-1 と結合することが明らかとなった (図 3)。また、TAB2 と Beclin-1 の細胞内局在が一致することも見いだした (data not shown)。

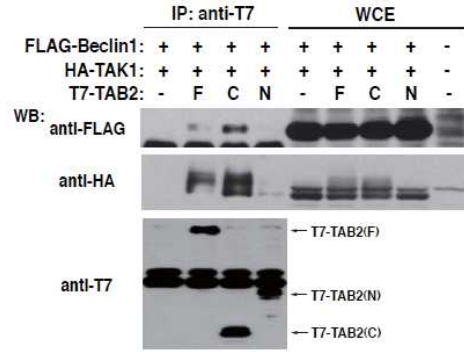


図 3 : 293T 細胞における TAB2 と TAK1 または Beclin-1 との相互作用

さらに、TAB2 は ATG13 とも結合できること、また、TAB2 は ULK1 依存的に細胞内においてリン酸化されることが明らかとなった (図 4)。

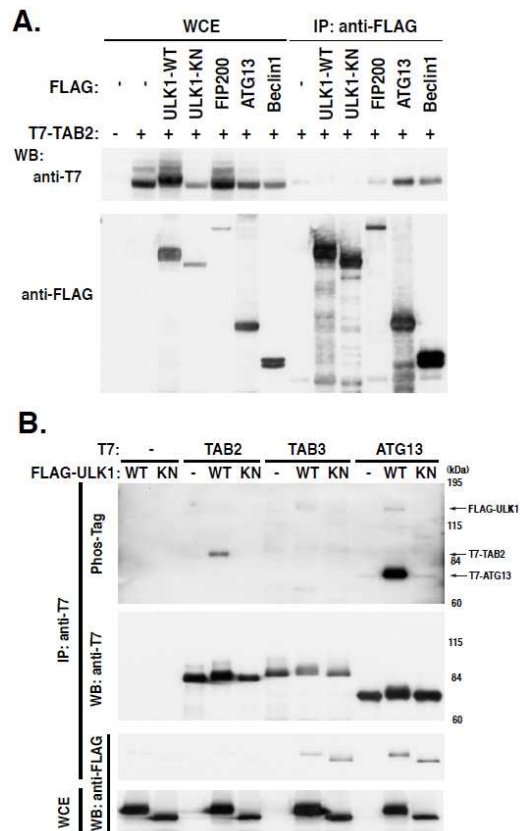


図 4 : A. 293T 細胞における TAB2 と ATG13 との相互作用, B. 293T 細胞における ULK1 による TAB2 のリン酸化

これらの結果から TAB2, TAB3 が Beclin-1 との結合を介してオートファジーの制御を行っていることが示唆され、また、TAB2, TAB3 複合体自体が ULK1 による制御を受ける可能性も考えられる。しかしながら、細胞内在性レベルでの相互作用については、飢餓・低酸素・TRAIL など様々なオートファジー誘導刺激について、免疫沈降法およびシヨ糖密度勾配遠心法を用いて詳しく検討したが、相互作用を示すデータは得られなかった。今後、検出方法や刺激の種類を変えて引き続き検討する予定である。

(3) TAK1 ノックアウト(KO)MEF を用いて TAK1 がオートファジー制御に必須かどうかを検討した。その結果、少なくとも、基底レベルのオートファジーおよび、飢餓誘導性のオートファジーに関しては野生型と TAK1KO MEF において差は認められなかった(図5)。したがって、この系において TAK1 はオートファジー制御に必須ではないと考えられる。

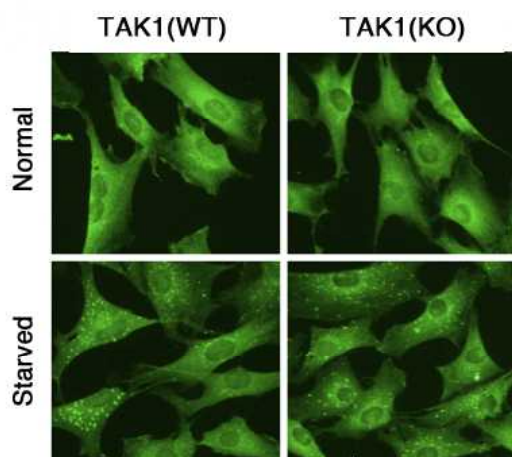


図5：通常培養条件および飢餓状態の野生型(WT)または TAK1 ノックアウト(KO)MEF におけるオートファゴソーム形成。

(4) Beclin-1 が TLR シグナルの制御因子として働くかどうかを明らかにするために、MEF において内在性 Beclin-1 をノックダウンし(タンパクレベルで 90%以上のノックダウンを確認) LPS 刺激 3 時間後および 6 時間後の培養上清に含まれる IL-6 の量を ELISA 法にて測定した。その結果、コントロールと Beclin-1 ノックダウンの間に全く差は認められなかった(data not shown)。ノックダウンの効率が十分でない可能性が残っているものの、Beclin-1 が TLR シグナルの制御因子として必須の働きをする可能性は低いことが示唆された。

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8件、全て査読有り)

Koga K, Takaesu G, Yoshida R, Nakaya M, Kobayashi T, Kinjyo I, Yoshimura A. Cyclic adenosine monophosphate suppresses the transcription of proinflammatory cytokines via the phosphorylated c-Fos protein. *Immunity*. 2009 Mar 20;30(3):372-383.

Minoda Y, Sakurai H, Kobayashi T, Yoshimura A, Takaesu G. An F-box protein, FBXW5, negatively regulates TAK1 MAP3K in the IL-1beta signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Apr 10;381(3):412-417.

Ayada T, Taniguchi K, Okamoto F, Kato R, Komune S, Takaesu G, Yoshimura A. Sprouty4 negatively regulates protein kinase C activation by inhibiting phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis. *Oncogene*. 2009 Feb 26;28(8):1076-1088.

Saeki K, Fukuyama S, Ayada T, Nakaya M, Aki D, Takaesu G, Hanada T, Matsumura Y, Kobayashi T, Nakagawa R, Yoshimura A. A major lipid raft protein raftlin modulates T cell receptor signaling and enhances th17-mediated autoimmune responses. *J Immunol*. 2009 May 15;182(10):5929-5937.

Yoshida R, Takaesu G, Yoshida H, Okamoto F, Yoshioka T, Choi Y, Akira S, Kawai T, Yoshimura A, Kobayashi T. TRAF6 and MEK1 play a pivotal role in the RIG-I-like helicase antiviral pathway. *J Biol Chem*. 2008 Dec 26;283(52):36211-36220.

Sanada T, Takaesu G, Mashima R, Yoshida R, Kobayashi T, Yoshimura A. FLN29 deficiency reveals its negative regulatory role in the Toll-like receptor (TLR) and retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like helicase signaling pathway. *J Biol Chem*. 2008 Dec 5;283(49):33858-33864.

Takaki H, Ichiyama K, Koga K, Chinen T, Takaesu G, Sugiyama Y, Kato S, Yoshimura A, Kobayashi T. STAT6 Inhibits TGF-beta1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor. *J Biol Chem*. 2008 May 30;283(22):14955-14962.

Ichiyama K, Yoshida H, Wakabayashi Y, Chinen T, Saeki K, Nakaya M, Takaesu G, Hori S, Yoshimura A, Kobayashi T. Foxp3 inhibits RORgamma-mediated IL-17A mRNA transcription through direct

interaction with RORgammat. *J Biol Chem.*
2008 Jun 20;283(25):17003-17008.

〔学会発表〕(計2件、ポスター発表)

高江洲義一、吉村昭彦 “TAK1-binding protein 2 (TAB2) may negatively regulate basal autophagy.” 第61回日本細胞生物学会大会 2009年6月2日、名古屋国際会議場

高江洲義一、吉村昭彦 “TAK1-binding protein 2 (TAB2) is essential for cell division.” 第60回日本細胞生物学会大会 2008年6月29日、パシフィコ横浜

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.careerpath-prj.keio.ac.jp/kanrinmaru/scholar/takaesu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高江洲 義一 (TAKAESU GIICHI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：60403995

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし