科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２６　年　　６　月　１０　日現在

機関番号：　１４６０３
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2011～2013
課題番号：　２３７９０２９６

研究課題名（和文）ＴＢＫ１の活性化メカニズムの解明

研究課題名（英文）Investigation of TBK1 activation mechanism

研究代表者
川崎　拓実（Kawasaki, Takumi）

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：６０５８４４１４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円、（間接経費）　　990,000円

研究成果の概要（和文）：TBK1(TANK Binding kinase 1)は、病原体感染におけるサイトカインの産生において必須な役割を果たすキナーゼで、その活性化制御メカニズムは全く不明である。本研究では活性化因子のスクリーニングを通じて、TBK1の活性化メカニズムを明らかにした。スクリーニングの結果、ホスファチジルイノシトール５リン酸がシグナル制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、ホスファチジルイノシトール５リン酸を抗原と共に免疫すると、ＴＢＫ１シグナルを直接活性化することでアジュバンド効果を発揮し、抗原特異的抗体を誘導することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：TBK1 (TANK Binding Kinase 1) is important gene for host defence against virus or microbes infection. Activation mechanism for TBK1 is still unclear. Here we investigated activation mechanism by screening cellular component, and found that Ptdins5P works as signaling mediator for innate immune response during virus infection. Furthermore, synthetic Ptdins5P immunization with antigen induced antigen specific antibody production by TBK1 signaling activation.

研究分野：　基礎医学

科研費の分科・細目：　7905

キーワード：　ホスファチジルイノシトール　自然免疫　シグナル伝達　リン酸化　ウイルス

１．研究開始当初の背景

はじめに病原体が細胞に感染すると、細胞はインターフェロンをはじめとする炎症性サイトカインを産生し、細胞から放出されたサイトカインは引き続きＴ細胞など獲得性免疫による生体防御の誘導などに重要な役割を果たす。病原体の認識には、まず、病原体の特徴的な部位を細胞内のそれぞれのレセプターが認識し、その後、様々なシグナルたんぱく質をへて、シグナルが転写因子にまで伝わることでサイトカインの産生が開始される。各々の病原体由来のリガンドに対する細胞内のレセプターとレセプターからサイトカイン産生までに至るシグナリングの全容は明らかになりつつあるが、依然として不明な点も数多く残されている。TANK Binding kinase 1(TBK1)は、活性化し、転写因子 Interferon Regulatory Factor(IRF)3 を直接リン酸化する。リン酸化された IRF3 は核内に移行し、IP10 をはじめとするサイトカインや１型インターフェロンの発現を誘導する。TBK1 による IRF のリン酸化が、外来 DNA の応答に必須であることは、in vitro、 in vivo の研究により明らかになったものの、どのように TBK1 の活性化が制御されているか？は依然不明であった。

本研究では、TBK1 の活性化のメカニズムを明らかにするため、その活性化を制御する因子の探索と制御ドメインの構造を解明することを目的にしている。本研究は単に TBK1 の活性化メカニズム理解だけでなく、将来の臨床応用に役立つ情報を提供すると期待できる。TBK1 はある種の細胞のがん化に必須であると報告されており、TBK1 の活性化を抑制するような化合物の開発は、新しいがん治療薬につながる可能性を秘めている。また、現在、効果的なアジュバンドの作成は非常に重要な課題である。TBK1 を特異的に活性化することができれば、サイトカインの産生が得られるので、TBK1 の活性化剤にはアジュバンド効果を期待できる。これらのことから本研究で得られる TBK1 の活性化メカニズムの理解が、将来の薬剤開発などの応用研究に役立つと考えられる。

２．研究の目的

TBK1(TANK Binding kinase 1)は、病原体感染におけるサイトカインの産生において必須な役割を果たすキナーゼで、その活性化制御メカニズムは全く不明である。本研究では活性化因子のスクリーニングおよび、構造解析を通じて、TBK1 の活性化メカニズムを明らかにすることとした。活性化メカニズムの理解はシグナリングへの理解を深めるだけでなく、今後、癌研究やアジュバンドの作成などにも応用可能な知見を与えると期待できる。

３．研究の方法

TBK1 の活性化メカニズムを明らかにするため、本研究ではその制御因子の同定をおこなった。制御因子がどのようなものか不明であることから、主に２つ独立した方向からスクリーニングを行い同定を試みた。１つ目はハイスループットに in vitro で TBK1 の活性化を直接測定する系を立ち上げ、スクリーニングを行った。細胞から抽出した破砕液は分画し、TBK1 の活性化を指標に活性化因子が含む細胞分画を回収し、精製と濃縮段階を経て、最終的には活性化因子を同定することを試みた。また、分画と濃縮による同定とは別に生理活性化合物ライブラリーを用いて活性化因子の同定を試みた。２つ目は、TBK1 の C 末端領域側の制御ドメインの構造解析を行い in silico で結合候補分子を探索し、候補分子が in vitro 系を用いて実際に活性化に寄与するか検討することを試みた。最終的には活性化因子と制御ドメインとの高次構造を解析し、分子レベルで活性化メカニズムを明らかにすることが目的である。

４．研究成果

TBK1 の活性化因子の探索のため、in vitro での TBK1 の活性化測定系を立ち上げた。測定系を用いて、様々な候補物質が TBK1 の活性化に寄与するかを検討したものの、そのいずれも影響を与えなかった。そこで細胞を分画し、どの分画に TBK1 を活性化する物質を含んでいるのかを検討した。その結果、細胞膜成分を含む分画に活性化する因子が存在することが明らかになった。さらに詳しく調べるため、TBK1 に結合する膜成分を探索したところ、結合する脂質を同定することに成功した。

それら脂質のうち、TBK1-IRF3 の活性化に寄与する脂質を、合成脂質を用いて同定した。さらに細胞内でのその脂質の役割を検討するため、脂質合成酵素を同定し、酵素の機能阻害が TBK1-IRF3 シグナルを抑制することを明らかにした。さらに細胞内でのその脂質の役割を検討するため、ホスファチジルイノシトール５リン酸の合成酵素を同定し、酵素の機能阻害が TBK1-IRF3 シグナルを抑制することを明らかにした。また、どのようなメカニズムで TBK1-IRF3 シグナルを制御しているか検討したところ、ホスファチジルイノシト

ール５リン酸はTBK1の活性化を制御しているというより、IRF３と結合することにより、IRF3の構造変化をもたらすことで、シグナル伝達を制御しているとう知見が得られた。また、IRF3 とホスファチジルイノシトール５リン酸との結合は、in silico によるシミュレーションにおいても結合を確認することができた。また、抗原を合成ホスファチジルイノシトール５リン酸とともにマウスに免疫すると抗原特異的な抗体が産生されることから、ホスファチジルイノシトール５リン酸が新規アジュバンドとして働くことを見出した。ホスファチジルイノシトール５リン酸は、TBK1-IRF3 シグナルを直接的な標的にすることにより免疫応答を誘導することから、これまですでに報告されているアジュバンドとは異なる作用機序であり、また、元来生体内由来の物質であることから、より安全性の高いアジュバンドの開発に役立つと考えている。

これらの研究成果は論文発表し、また特許の出願を行った。

一方、TBK1 の構造を解明する研究は、TBK1 の制御ドメインと考えられる部位を大腸菌に発現させたものの、発現がうまくいかなかったため、全長の TBK1 たんぱく質を昆虫細胞系を用いて精製した。精製はうまくいくものの過剰発現による細胞毒性のためか発現量が向上しないため、たんぱく質の量が確保できなかった。また、その後、TBK1 のホモログである IKKi の構造が解明され、また直後に TBK1 の構造も解明されたため、構造を解明する研究については断念した。

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）

(1) Kawasaki T, Takemura N, Standley M D, Akira S, Kawai T.

The second messenger phosohatidylinositol-5-phosphate facilitates antiviral innate immune signaling

Cell Host Microbe. (査読有) 14, 148-158, 2013

〔学会発表〕（計２　件）

(1) 川﨑拓実、武村直紀、Daron M Standley、審良静男、河合太郎

PtdIns5P works as a new type of adjuvant

第４２回日本免疫学会　2013年12月11日～2013年12月13日　幕張メッセ

(2) 川﨑拓実、武村直紀、Daron M Standley、審良静男、河合太郎

Identification and characterization of a cellular component that modulate TBK1-IRF3 signal axis

第４１回日本免疫学会　2012年12月5日～2012年12月7日 神戸国際会議場

〔図書〕（計１　件）

(1) 川﨑拓実、審良静男、河合太郎

ライフサイエンス統合データベースセンター　：ライフサイエンス新着レビュー

ホスファチジルイノシトール５リン酸による自然免疫応答の制御
http://first.lifesciencedb.jp/archives/7606
2013年9月9日

〔産業財産権〕
○出願状況（計１　件）

名称：アジュバント及びそれを含むワクチン
発明者：川﨑拓実、河合太郎、審良静男
権利者：川﨑拓実、河合太郎、審良静男
種類：
番号：特願2012-232990
出願年月日：2012年10月22日
国内外の別： 国内

○取得状況（計0　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

http://bsw3.naist.jp/courses/courses209.html

６．研究組織
(1)研究代表者

川﨑　拓実（Takumi KAWASAKI）
奈良先端大学院大学・バイオサイエンス
研究科・助教
研究者番号：60584414

(2)研究分担者
（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者
（　　）

研究者番号：