

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23870022

研究課題名（和文）新規経路を介した持続的 NF- $\kappa$ B 活性化と炎症と発癌との連関研究課題名（英文）Stress-induced NF- $\kappa$ B mediated by the nuclear IKK $\beta$  and cell death

研究代表者

土谷 佳弘 (TSUCHIYA YOSHIHIRO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・特任助教

研究者番号：90611301

研究成果の概要（和文）：NF- $\kappa$ B は炎症と発癌に重要な役割を担う転写因子であり、細胞が炎症のシグナルを受容すると、阻害タンパク質 I $\kappa$ B のリン酸化と分解により NF- $\kappa$ B の活性化が誘導される。我々は細胞がストレスを受容すると、I $\kappa$ B がリン酸化非依存性に分解されて持続的に NF- $\kappa$ B が活性化される新規経路が誘導されることを見いだしてきた。本研究では、アセトアミノフェンによる肝障害モデルマウスの解析より、ストレス応答による新規経路を介した NF- $\kappa$ B 活性化が生体内においても関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We have found that nuclear IKK $\beta$  induces I $\kappa$ B degradation in UV- and oxidative stress-induced NF- $\kappa$ B activation. The administration of concanavalin A (ConA) and acetaminophen (APAP) to mice causes cell death and severe liver injury. Expression of IKK $\beta$  in the nucleus in IKK $\beta$  knockout mice greatly increases ALT levels and exhibited severe liver damage. These results suggested a possible involvement of nuclear IKK $\beta$  pathway in hepatitis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：分子生物学・生化学

科研費の分科・細目 機能生物化学

キーワード：NF- $\kappa$ B・細胞内シグナル伝達・ストレス応答・アダプター・炎症

## 1. 研究開始当初の背景

NF- $\kappa$ B はサイトカイン遺伝子発現を誘導して炎症や発癌に関与する転写因子である。

腫瘍壊死因子 (TNF $\alpha$ ) などの炎症性サイトカインは細胞質に存在する I $\kappa$ B キナーゼ (IKK $\beta$ ) を介して NF- $\kappa$ B 阻害タンパク質 I $\kappa$ B $\alpha$

をリン酸化する。リン酸化された I $\kappa$ B $\alpha$ は、ユビキチンリガーゼ $\beta$ -TrCPによりユビキチン化を受けて分解され、最終的に NF- $\kappa$ B は核内に移行して遺伝子発現を誘導する(図1)。このリン酸化を介した NF- $\kappa$ B 活性化機構は古典経路として知られており、詳細な分子機構の解析がなされてきた。これに対して細胞にストレスを負荷した場合でも NF- $\kappa$ B が活性化されることが知られていたが、どのような分子機構を介して NF- $\kappa$ B が活性化されるのかは不明であった。

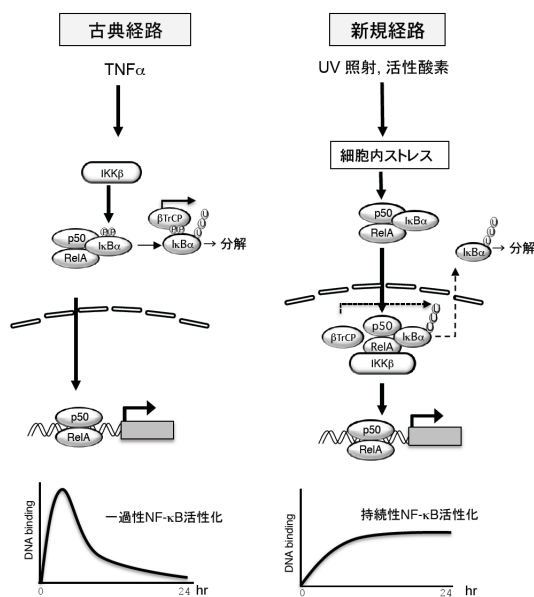


図1 古典経路と新規経路を介したNF- $\kappa$ B活性化機構

これまでに我々は紫外線(UV)照射によるNF- $\kappa$ Bの活性化機構を解析する過程で、ストレスに応答したNF- $\kappa$ Bの活性化には古典経路とは異なる新規の活性化経路が機能していることを見いだしてきた(Tsuchiya, Mol Cell, 39, 570, (2010))。本研究では新規経路の分子機構の解析を目的とする。さらに遺伝子改変マウスを用いた解析により、新規経路と炎症発症の連関について解析する。

## 2. 研究の目的

### (1) 新規経路の分子機構の解明

細胞内ストレスにより駆動されるNF- $\kappa$ B活性化の新規経路の分子機構については解明すべき2点の課題がある。

①NF- $\kappa$ BとI $\kappa$ B $\alpha$ の核内移行の機構の解明。古典経路ではI $\kappa$ B $\alpha$ が分解された後にNF- $\kappa$ Bが

核内に移行するが、新規経路ではストレスに応答してNF- $\kappa$ BとI $\kappa$ B $\alpha$ が同時に核内に移行する。なぜ、I $\kappa$ B $\alpha$ の分解に先行してNF- $\kappa$ B・I $\kappa$ B $\alpha$ は核内に移行するのかを解明する。

②新規経路を介した持続的NF- $\kappa$ B活性化機構の解明。古典経路ではフィードバック制御によりNF- $\kappa$ B速やかに不活性化されるのに対して、なぜ新規経路ではフィードバック制御が機能せずにNF- $\kappa$ Bが持続的に活性化されるのかを明らかにする。

### (2) 炎症と発癌における新規経路の関与

炎症部位では古典経路によるNF- $\kappa$ Bの活性化が誘導されるのと同時に、酸化ストレスの発生に応答した新規経路も駆動されていると考えられる。また多くの癌細胞では新規経路で特徴的に観察される持続性のNF- $\kappa$ Bの活性化が誘導される。炎症と発癌における古典経路と新規経路の関与を解明するために、古典経路および新規経路のみが特異的に駆動される遺伝子改変マウスを作製し、このマウスを用いた炎症モデル実験を行う。最終的に炎症における古典経路と新規経路の役割を明らかにする。とくに肝細胞特異的IKK $\beta$ 遺伝子改変マウスを用いて、肝障害について重点的に解析する。

## 3. 研究の方法

(1) ①古典経路ではI $\kappa$ B $\alpha$ の分解によりNF- $\kappa$ Bは核内に移行するのに対して、新規経路ではI $\kappa$ B $\alpha$ の分解に先行してNF- $\kappa$ B・I $\kappa$ B $\alpha$ 複合体が核内に移行する。この分子機構を解明するために、UVや酸化ストレスで新規経路を駆動したときにNF- $\kappa$ B・I $\kappa$ B $\alpha$ 複合体に会合または解離するタンパク質を、阻害剤実験や免疫沈降法を用いて同定を試みた。

②古典経路によりNF- $\kappa$ Bが活性化されると、I $\kappa$ B $\alpha$ やA20などのNF- $\kappa$ B阻害タンパク質遺伝子発現が誘導され、NF- $\kappa$ Bは速やかに不活性化される。ところが新規経路ではこのフィードバック機構が機能せずにNF- $\kappa$ Bは持続的に活性化される。マイクロアレイにより古典経路と新規経路による遺伝子発現の差異を解析した。

(2) これまでに肝細胞特異的IKK $\beta$ ノックアウトマウスを用いた解析により、炎症における

NF- $\kappa$ B と組織障害の連関や(Cell, 120, 649, 2005)、肝発癌における NF- $\kappa$ B と細胞死の連関が明らかにされている(Cell, 121, 977, 2005)。本研究ではさらにこの実験系を進展させて、古典経路と新規経路を識別して解析できる肝細胞特異的 IKK $\beta$ 遺伝子改変マウスを作製した。具体的にはまず、アルブミン遺伝子プロモーターを用いて肝細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Alb-Cre トランスジェニックマウスと IKK $\beta^{F/F}$ マウスを交配して肝細胞特異的に内在性の IKK $\beta$ 遺伝子を欠損するマウス(IKK $\beta^{F/F};$ Alb-Cre)を用意した。さらに核局在シグナル(NLS)を付加した IKK $\beta$ 遺伝子(NLS-IKK $\beta$ )、および核外移行シグナル(NES)を付加した IKK $\beta$ 遺伝子(NES-IKK $\beta$ )を導入したトランスジェニックマウスを用意した。これらのトランスジェニックマウスと肝細胞特異的 IKK $\beta$ 遺伝子欠損マウスを交配して、NLS-IKK $\beta$ 、NES-IKK $\beta$ 遺伝子が肝細胞で発現するマウスを作製した。IKK $\beta$ を発現するマウスでは古典経路と新規経路、NLS-IKK $\beta$ を発現するマウスでは新規経路のみ、NES-IKK $\beta$ を発現するマウスでは古典経路のみが駆動することになる。これらのマウスにアセトアミノフェンを投与し、このときに誘発される肝組織における炎症応答や組織障害を解析した。

#### 4. 研究成果

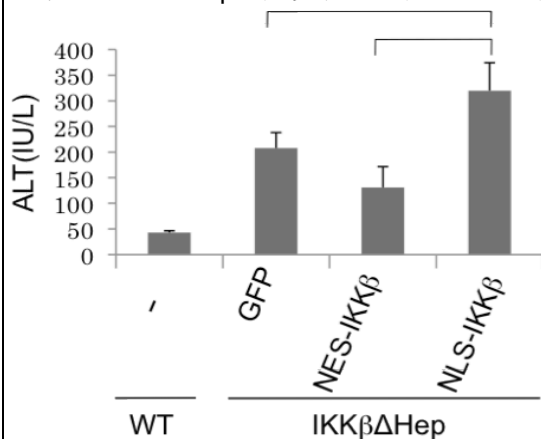
##### (1)

①NF- $\kappa$ B と I $\kappa$ B $\alpha$ の核内移行の機構の解明。阻害剤スクリーニングにより I $\kappa$ B $\alpha$ の核内移行にはカルシウムイオンが関与していることが明らかとなっている。そこでカルシウムシグナルで駆動する因子であるカルモジュリンや CAMK に着目して解析をおこなった。しかし、ノックダウンや過剰発現解析をおこなったが UV 照射による I $\kappa$ B $\alpha$ の核内移行には変化がみられなかった。今後は質量分析法を用いて UV 照射により I $\kappa$ B $\alpha$ と会合が誘導される新たな因子の探索を行う予定である。

②新規経路を介した持続的 NF- $\kappa$ B 活性化機構の解明。マイクロアレイ法の解析より UV 照射によって I $\kappa$ B $\alpha$ の発現の低下がみられた。このことから活性化した NF- $\kappa$ B は核外への移

行が誘導されず、持続的に核内に蓄積することが明らかとなった。また、免疫沈降法にの解析より UV 照射に反応して NF- $\kappa$ B は脱アセチル化タンパクである HDAC との会合することが明らかとなった。今後は質量分析法により古典経路とストレス経路による NF- $\kappa$ B の翻訳後修飾の差異を解析し、ストレス経路特異的な NF- $\kappa$ B の修飾を探索する。最終的に、NF- $\kappa$ B と HDAC の会合の生理的な意義を解析する。

(2)肝細胞特異的に IKK $\beta$ 遺伝子を欠損させたマウスにコンカナバリン(ConA)やアセトアミノフェン(APAP)を投与すると肝障害が増悪化する。そこで本研究では NLS および NES を付加した IKK $\beta$ 遺伝子をアデノウイルスを用いて肝細胞特異的 IKK $\beta$ ノックアウトマウスに導入し、細胞質局在型 IKK $\beta$ および核局在型 IKK $\beta$ のみが発現するマウスを作製した。これらのマウスに ConA や APAP を投与し、このときの ALT などを指標に肝障害を解析した(図 2)。NES-IKK $\beta$ を発現するマウスの肝障害は野生型のマウスと同程度であった。これに対して NLS-IKK $\beta$ を発現するマウスでは強度



(図 2) 肝細胞特異的IKK $\beta$ ノックアウトマウスを用いたアセトアミノフェン(APAP)による肝障害誘導

の肝障害が誘発されていることが判明した。このことから、核内の IKK $\beta$ を介したストレス応答性の経路が肝細胞死を増強していると示唆された。今後は肝細胞特異的 IKK $\beta$ ノックアウトマウスに NLS-IKK $\beta$ および NES-IKK $\beta$ 遺伝子を発現したトランスジェニックマウスを作成する。このマウスにジニトロサミンを用いて肝臓における発がん誘導実験を行い、核内の IKK $\beta$ を介したストレス応答性の経路

が肝臓における発がんに関与しているのか解析する予定である。さらに、本研究を進展させストレス経路の解明による研究成果を基盤にして、炎症疾患や癌の治療法の開発につなげたい。

#### 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)

1. Nakatsu Y, Otani Y, Sakoda H, Zhang J, Guo Y, Okubo H, Kushiyama A, Fujishiro M, Kikuch T, Fukushima T, Ohno H, Tsuchiya Y, Kamata H, Nagamachi A, Inaba T, Nishimura F, Katagiri H, Takahashi S, Kurihara H, Uchida T, Asano T. Role of Pin1 protein in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis in a rodent model. *J Biol Chem.* 2012 Dec 28;287(53):44526-35. 査読有  
DOI:10.1074/jbc.M112.397133
2. Iwashita M, Sakoda H, Kushiyama A, Fujishiro M, Ohno H, Nakatsu Y, Fukushima T, Kumamoto S, Tsuchiya Y, Kikuchi T, Kurihara H, Akazawa H, Komuro I, Kamata H, Nishimura F, Asano T. Valsartan, independently of AT1 receptor or PPAR  $\gamma$ , suppresses LPS-induced macrophage activation and improves insulin resistance in cocultured adipocytes. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2012 Feb 1;302(3):E286-96. DOI:10.1152/ajpendo.00324.2011 査読有
3. Yusuke Nakatsu, Hideyuki Sakoda, Akifumi Kushiyama, Jun Zhang, Hiraku Ono, Midori Fujishiro, Takako Kikuchi, Toshiaki Fukushima, Masayasu Yoneda, Haruya Ohno, Nanao Horike, Machi Kanna, Yoshihiro Tsuchiya, Hideaki Kamata, Fusanori Nishimura, Toshiaki Isobe, Takehide Ogihara, Hideki Katagiri, Yoshitomo Oka, Shin-ichiro Takahashi, Hiroki Kurihara, Takafumi Uchida and Tomoichiro Asano. Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1 associates with IRS-1 and enhances insulin actions and adipogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 20812-20822, 2011. 査読有  
DOI:10.1074/jbc.M110.206904

[学会発表] (計5件)

1. 土谷佳弘, 金本麻裕, 菅野雅元, 浅野知一郎, 鎌田英明, 「IKK $\beta$ の脱リン酸化反応における転写因子 RelA の関与」第85回日本生化学会合同大会ワークショップ 福岡, 2012.12.16.
2. 土谷佳弘, 金本麻裕, 菅野雅元, 浅野知一郎, 鎌田英明, Stress-induced NF- $\kappa$ B activation mediated by the nuclear IKK and cell death, 第35回日本分子生物学会, 福岡, 2012.12.13.
3. Yoshihiro Tsuchiya, Tomoichiro Asano, Keiko Nakayama, Tomohisa Kato, Jr., Michael Karin, and Hideaki Kamata. 「Nuclear IKK $\beta$  acts as an adaptor protein for I $\kappa$ B $\alpha$  ubiquitination and degradation in UV- and oxidative stress-induced NF- $\kappa$ B activation. Keystone Symposium」 “NF- $\kappa$ B Signaling and Biology: From Bench to Bedside” Whistler, British Columbia, Canada, 2012.3.25.
4. 土谷佳弘, 浅野知一郎, 菅野雅元, 鎌田英明「IKK $\beta$ の多重的活性制御機構—転写因子 p65 によるネガティブフィードバックとレドックス制御の関与」第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011.12.16
5. Yoshihiro Tsuchiya and Hideaki Kamata. 「IKK $\beta$  act as an adaptor protein for I $\kappa$ B $\alpha$  ubiquitination and degradation in UV-induced NF- $\kappa$ B activation; possible involvement in the TNF signaling」13th International TNF Conference, Awajishima, 2011.5.17.

[その他]

ホームページ

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/ikagaku/index.html>

受賞

2012年12月 第85回日本生化学会合同大会  
鈴木絃一メモリアル賞

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

土谷 佳弘 (TSUCHIYA YOSHIHIRO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・特任助教

研究者番号: 90611301

(2) 研究分担者

( )

(3) 連携研究者

( )