

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460582

研究課題名(和文) DNAワクチンの効果を決定するキナーゼ分子TBK1の活性制御機構の解明

研究課題名(英文) Study on regulatory mechanism of TBK1

研究代表者

久保田 耐 (Toru, Kubota)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：10274929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、DNAワクチンの効果を決定する細胞内リン酸化酵素TBK1の活性制御、及び新規標的基質の検索とそのリン酸化の生物学的意義を明らかにすることを目標として研究を行った。

本研究により、これまで知られていないTBK1とIKKの異なる制御領域が明らかになり、これらのキナーゼ分子はそれぞれ特異的な制御を受けることが示唆された。またTBK1の新規標的基質として、RGSファミリーに属する複数のタンパク質を同定し、これらのRGSタンパク質が自然免疫受容体刺激によりリン酸化修飾を受けることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We studied on regulatory mechanisms of TBK1, which is activated by innate immune receptors and is known to play a critical role in DNA vaccines. We found different regulatory domains in C-terminal regions of TBK1 and IKK, suggesting these kinases are potentially involved in distinct activation signals.

We also investigated novel TBK1 substrates and found out RGS (regulator of G protein signaling) proteins as novel TBK1 substrates. RGS proteins are phosphorylated along with activation of innate immune signaling, suggesting novel crosstalk between GPCRs (G protein coupled receptors) and innate immune receptors and signals activated by innate immune receptors may directly affected to GPCR pathways, such as chemokine receptor signaling..

研究分野：ウイルス学

キーワード：TBK1 RGS GPCR

1. 研究開始当初の背景

自然免疫受容体下流のキナーゼである TBK1 の遺伝子欠損マウスでは、DNA ワクチンの効果が大きく減弱していたことから TBK1 は直接この効果に影響を及ぼすと考えられている。一方 TBK1 の基質としては主にインターフェロンの産生に関わる転写因子である IRF3 及び IRF7 がよく知られており、これらに関する研究は精力的に行われてきたが、その活性制御機構は明らかではなく、また IRF 以外の基質についての研究も進んでいない。

2. 研究の目的

本研究では TBK1 及び、TBK1 と高い相同性を有し IRF3 や IRF7 をリン酸化基質として持つ IKKε について、その活性制御機構の解明を目指すとともに、これらの新規基質タンパク質の検索を行い、その生物学的意義について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) TBK1 の活性制御機構の解析: TBK1 の C 末端領域には TANK、NAP1 などのアダプター分子との結合領域があることが知られている。この領域に変異を導入しても TBK1 のキナーゼ活性には影響がないことから、アダプター分子との結合は TBK1 の活性に必須ではないと考えられている。IKKε の対応する領域について、欠損および変異を導入し、その効果を調べた。

2) TBK1 の新規リン酸化基質の検索: TBK1 及び IKKε の新規リン酸化基質を探しだすために、酵母 two-hybrid 系を用いてこれらのキナーゼ分子と相互作用する細胞内タンパク質のスクリーニングを行う。また本研究開始前に行った同様のスクリーニングの結果 TBK1 結合タンパク質として単離された G タンパク質共有型受容体 (GPCR) の制御因子 RGS1 が TBK1 のリン酸化基質であるか否かについて、主に強発現系を用いて解析を行った。

4. 研究成果

1) TBK1 の活性制御機構の解析: TBK1 と IKKε の C 末端領域について欠損型及び点変異型の変異体を作成し、IRF3 のリン酸化に与える影響と、I 型 IFN 産生に及ぼす影響について検討した。その結果、TBK1 では C 末端領域の変異は IRF3 のリン酸化能に影響を与えずまた IFN プロモータの活性化もみられた。一方 IKKε の対応する変異は IRF3 のリン酸化能を消失させ、IFN プロモータの活性化も見られなくなった。TBK1 と IKKε の C 末端領域は 2 量体化に必須であり、またこの領域には TANK、NAP1、SINTBAD などのアダプター分子が結合することが知られている。TBK1 の点変異体ではアダプター分子との結合能が消失してにもかかわらず、IRF3 のリン酸化能や IFN プロモータの活性化能を保持していたことから、TBK1 の 2 量体化を介した活性化にはアダプタ

ー分子との結合は必須ではないことが明らかとなった。一方 IKKε ではアダプター分子との結合能の消失した変異体ではキナーゼの活性化が起こらなかったため、アダプター分子との結合が 2 量体化を介した活性化に必要である可能性が示唆された。これらのことから TBK1 と IKKε は、これまで知られているように発現誘導が異なるだけでなく、別々の活性化制御機構により機能が発動する可能性が考えられた。

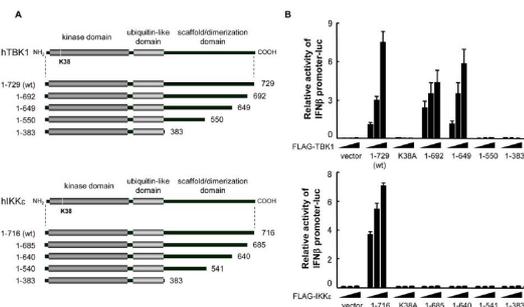


図1 IKKε の C 末端領域は IFN プロモータの活性化に必要なが、TBK1 の対応する領域は必要ない。

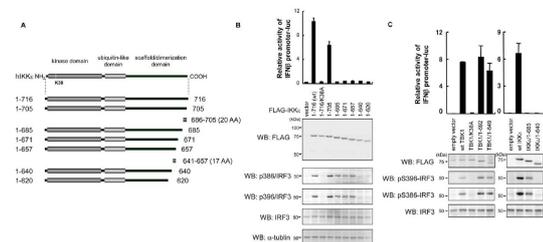


図2 IKKε の C 末端領域には IRF3 のリン酸化及び IFN プロモータの活性化に必要な 2 つの機能ドメインが存在する。

2) TBK1 の新規リン酸化基質の検索: TBK1 と IKKε の C 末端領域を bait に用いて酵母の two hybrid 系でこの領域に結合する因子の検索を行ったところ、両方のキナーゼ分子に結合するタンパク質を幾つか単離することが出来た。どちらか C 末端領域の変異体解析により、この領域には 2 つのキナーゼ分子のうち一方にのみ結合する因子が存在することが予想されるが、これまでのところそのようなタンパク質は単離することができていない。そこで同様のスクリーニングの結果得られていた RGS タンパク質について解析を進めた。RGS タンパク質は RHD と呼ばれる共通領域に特徴づけられる 20 種類以上のタンパク質からなるファミリーであり、スクリーニングではこのうち RGS1 が単離されていた。RGS1 と、TBK1 または IKKε の共発現細胞抽出物を用いた免疫沈降で、これらの相互作用が検出されたが、RGS2、RGS3、RGS13、RGS16、RGS18 などの RGS1 と特に構造上類似性の高い R4 サブファミリーだけでなく、RGS10、GRK1 など他のサブファミリーに属する RGS タンパク質についても相互作用が確認された。

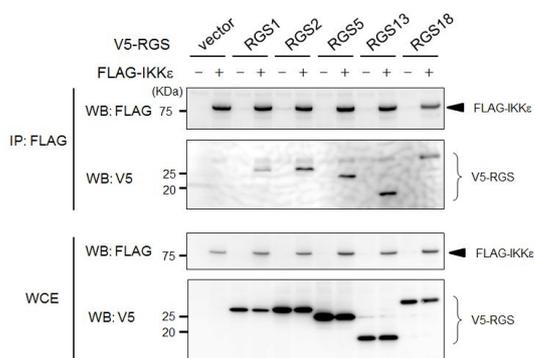


図3 免疫沈降による IKKε と RGS1 及び R4 サブグループに属する RGS タンパク質との結合解析

RGS1 と、TBK1 または IKKε の共発現細胞の抽出物を、phos-tag PAGE で分離したところ、RGS1 単独発現細胞では見られないリン酸化 RGS1 のバンドが複数検出されたことから、RGS1 は TBK1 及び IKKε のリン酸化標的基質であることが確認された。同様にこれらキナーゼと結合することが確認された RGS タンパク質についても phos-tag PAGE による解析を行い、いずれも TBK1 及び IKKε 共発現細胞ではリン酸化を受けることが確認された。これらのリン酸化修飾は、TBK1 及び IKKε との共発現だけではなく、VISA、TRIF などの自然免疫受容体シグナル下流の活性化因子を発現させた場合も検出された。

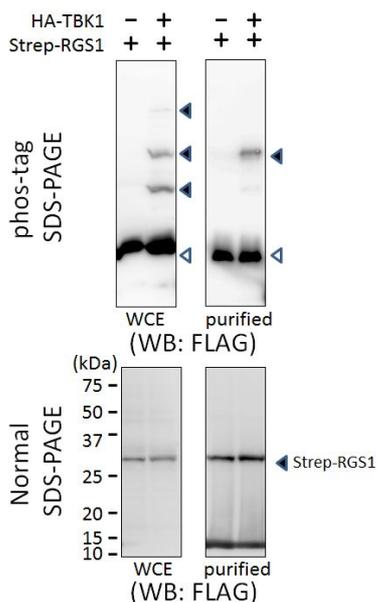


図4 phos-tag PAGE によるリン酸化 RGS1 の検出。TBK1 と RGS1 の共発現細胞抽出物には RGS1 単独発現では見られないリン酸化修飾された RGS1 が検出される。

また VISA、TRIF 発現細胞を TBK1 阻害剤で処理した場合は検出されなかった。このことから、自然免疫受容体の活性化に伴い、多くの RGS タンパク質が TBK1 及び IKKε 依存的リン酸化修飾を受けることが示唆された。

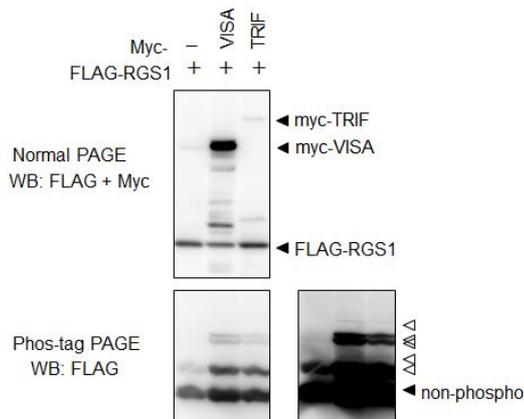


図5 RGS1 は、VISA 及び TRIF との共発現によりリン酸化される。

RGS1 及び RGS18 について、TBK1 及び IKKε 依存的リン酸化修飾部位を特定するために、TBK1 または IKKε との共発現細胞から RGS タンパク質を精製し、質量分析を行った。この結果、RGS1 では S143 と S180 に、また RGS18 では S34 と S92 にキナーゼ発現依存的にリン酸化修飾の上昇がみられた。質量分析の結果得られたリン酸化部位についてアラニン置換変異体を作成し、TBK1 及び IKKε 依存的リン酸化が起こるか否かを phos-tag PAGE を用いて検討したところ、いずれのリン酸化バンドもキナーゼ発現の有無で変化がみられなかったため、これらが本当に TBK1 及び IKKε 依存的リン酸化部位であるかは更に検討が必要である。RGS1 に関しては更にリン酸化修飾部位を検討するために、全てのセリン及びスレオニン残基を個別に置換した変異体を作成し、phos-tag PAGE を用いて TBK1 及び IKKε 依存的リン酸化バンドが消失するか否かを検討した。この結果、S85 をアラニンに置換した変異体では、TBK1 及び IKKε 依存的リン酸化バンドの一つが消失することが確認された。

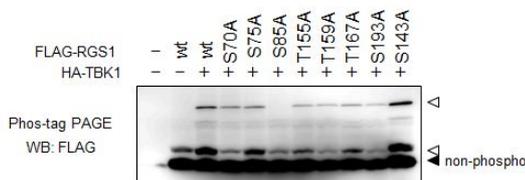


図6 TBK1 との共発現による RGS1 アラニン置換変異体の解析

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)

Nakatsu Y, Matsuoka M, Chang TH, Otsuki N, Noda M, Kimura H, Sakai K, Kato H, Takeda M, Kubota T. Functionally distinct effects of the C-terminal regions of IKKε and TBK1 on type I IFN production. PLoS One. 査読有 2014, 9(4):e94999.

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 耐 (Toru Kubota)
国立感染症研究所・ウイルス第三部・主任
研究官
研究者番号：10274929

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：