

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790467

研究課題名 (和文) 自然免疫系における核内 I κ B タンパク質の役割の解明研究課題名 (英文) Role of a nuclear protein I κ B ζ in innate immunity

研究代表者

山本 雅裕 (YAMAMOTO MASAHIRO)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00444521

研究成果の概要 (和文)：I κ B ζ の自己免疫疾患における役割の解明

核タンパク質 I κ B ファミリーに属する I κ B ζ が、マウスで Th17 分化に必要な転写因子であることを明らかにした。ナイーブ CD4 陽性 T 細胞に、ROR γ t と共に I κ B ζ を異所性に発現させると、IL-6 と TGF- β 非存在下でも、Th17 分化が強力に誘導された。また I κ B ζ 欠損マウスは、Th17 分化に異常がみられ、実験的自己免疫性脳脊髄に抵抗性を示した。I κ B ζ は、ROR γ t と協調して、*Il17a* 遺伝子の調節領域に直接結合することによって、*Il17a* の発現を高めた。

研究成果の概要 (英文)：We clarified that an nuclear I κ B family protein I κ B ζ is a master transcriptional factor for the generation of mouse Th17 cells. Ectopic co-expression of I κ B ζ and ROR γ t strongly induced Th17 differentiation even in the absence of IL-6 and TGF- β . In addition, I κ B ζ -deficient mice showed defective Th17 differentiation in vivo and resistance to EAE induction. Moreover, I κ B ζ in collaboration with ROR γ t directly associated with the promoter of IL17a and highly induced expression of IL17a.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：免疫学

科研費の分科・細目：特定領域研究・520

キーワード：原虫、自然免疫学、遺伝学

1. 研究開始当初の背景

宿主は自然免疫と獲得免疫という2つの免疫機構をもって、病原微生物の侵入に対し防衛しており、どちらの免疫機構も基本的には自己には存在しない（非自己の）異物を直接的にまたは間接的に排除するシステムである。獲得免疫機構は主としてB細胞とT細胞が非自己の抗原に対する特異的な抗体産生やその非自己抗原を発現している細胞を特異的に傷害する機構の成立に関与し、その成立までに一定期間の時間を要する。一方、自然免疫機構は外界異物の構成成分に対しマクロファージや樹状細胞などの免疫担当細胞や神経細胞、上皮細胞や線維芽細胞などの非免疫担当細胞などが極めて敏速に反応する機構であり、その位置づけは獲得免疫が「特異的」免疫機構であるのに対し、応急処置的な「非特異的」な免疫機構であると考えられてきた。しかし、近年 Toll 様受容体（TLR）の発見を始めとする種々のパターン認識受容体群の発見により、「非特異的」と考えられてきた自然免疫機構が病原微生物にしか存在しない構成成分のパターンの差異を非常に特異的に認識し、炎症性サイトカインの産生や共刺激分子の発現誘導などを介して獲得免疫を極めて効率的に活性化する「特異的」な免疫機構であることが示唆された。中でも10数種類存在するTLRを介する免疫応答は、それぞれのTLRが発現する細胞の違いに起因する部位特異的な側面と、それぞれのTLRの下流で活性化するシグナ

ル伝達経路の違いに起因するというシグナル特異的な応答が存在することが判明した。特に、後者のTLRシグナル伝達機構の違いにより多様な免疫応答が引き起こされるメカニズムについて、本応募者らはTLRの細胞内領域に存在する特徴あるTIRドメインと呼ばれる構造に着目し、細胞内アダプター分子をバイオインフォーマティクスの手法および生化学的手法により同定し、その遺伝子欠損マウスの作製と解析を通じてTIRドメインを有するアダプター分子がTLRのシグナル特異的な免疫応答を引き起こすことを包括的に解明してきた。

TLRを介するシグナル伝達経路はTIRドメインを有するアダプター分子であるMyD88とTRIFに依存した二つの経路に大別することができる。TLR3とTLR4の下流に存在し、主としてI型インターフェロンの産生誘導に関与するTRIFに対し、MyD88はTLR3を除く全てのTLRシグナル伝達経路に存在し、腫瘍壊死因子（TNF）- α 、インターロイキン（IL）-1, IL-6, IL-12 p40などの炎症性サイトカインの産生の誘導に必須の役割を果たしている。MyD88依存経路もTRIF依存経路も炎症サイトカイン遺伝子の発現に強く関与している転写因子であるNF- κ Bの活性化やMAPキナーゼの活性化を引き起こすにもかかわらず、MyD88依存経路の活性化の方がTRIF依存経路よりもIL-6やIL-12 p40などの遺伝子発現を強く誘導する分子機構について、本応募者はまずMyD88依存

経路の活性化により誘導される遺伝子群は刺激後 30 分以内に速やかに発現されはじめる早期誘導遺伝子群と、刺激後 2 時間後より徐々に発現が認められるようになる遅期誘導遺伝子群に大別でき、さらに遅期誘導遺伝子群は刺激後の新たなタンパク質合成が必要となることを見出した。このことは同時に、早期誘導遺伝子群の中に遅期誘導遺伝子群の産生を制御する因子が存在することを示唆しており、本応募者は早期誘導遺伝子の一つである核内タンパク質である I κ B ζ が IL-6 や IL-12 p40, IL-18 といった遅期誘導遺伝子群の発現に必須の役割を果たしていることを I κ B ζ 欠損マウスの作製を通じて遺伝学的に証明した。また、本応募者らは、I κ B ζ が MyD88 依存的な遅期誘導性遺伝子群が存在する染色体のクロマチン構造を開きエピジェネティックに変化させ、NF- κ B などの主要転写因子がその場所へ動員しやすくすることが、I κ B ζ の二段階遺伝子発現制御における重要な役割の一つであることを示した。しかしながら、I κ B ζ 自身にはクロマチンの再構成を媒介する酵素活性などは存在せず、その分子機構については未だ不明な点が多い。また、I κ B ζ のファミリー分子である I κ BNS は I κ B ζ とは逆に遅期誘導性遺伝子群の発現を負に制御していることを本応募者らは示しているが、I κ B ζ と同様にエピジェネティックな制御を介して遅期遺伝子群に影響を与えているかについては未だ不明であり、獲得免疫系における役割はさらに未だ不明な点

が多く、I κ B ζ の自然免疫系と獲得免疫系の成立における役割も不明であった。

2. 研究の目的

核内 I κ B ζ ファミリー分子の機能発現のための分子基盤を明らかにする目的で、I κ B ζ 及び I κ BNS 結合する分子の同定を試みる。また、I κ B ζ が TLR 刺激後の MyD88 依存的な遅期誘導遺伝子群のエピジェネティックなクロマチン再構成に関与していることから、I κ BNS にも同様の、あるいは、逆にクロマチン構造を閉じる作用があるかどうかを明らかにすることと、I κ B ζ 及び I κ BNS の獲得免疫系における役割、とりわけ、自己免疫疾患の誘導における役割についてすることを目的とした。

3. 研究の方法

① I κ B ζ 及び I κ BNS をベイトとした酵母 two-hybrid 法を行い相互作用分子を同定する。酵母内で結合が確認された分子については、ヒト由来又はマウス由来の細胞株及び腹腔マクロファージ・胎児由来線維芽細胞において強制発現させ、内在性の I κ B ζ 及び I κ BNS と結合するかどうかを免疫沈降法で検討した。加えて、Flag タグ及び Myc タグを有する I κ B ζ と I κ BNS を作製し、腹腔内マクロファージ及びその他の免疫担当細胞の破碎体に混ぜ、免疫沈降法により内在性の会合分子を MALDI/TOFF-MS 法により同定を試

みた。

- ② I κ B ζ は TLR 刺激のみならず、TLR とシグナル伝達経路の多くを共有する IL-1 受容体ファミリー分子のシグナル伝達経路の活性化によっても誘導される。IL-1 は主として自然免疫担当細胞より産生され、その産生機構は inflammasome と呼ばれる巨大な複合体を介して起こることが近年急速に解明されつつあり、様々な炎症性自己免疫疾患における発症及び進展に深く関与していることが示されている。(文献 1) また、I κ BNS についてもその遺伝子欠損マウスで DSS 誘導性腸炎が野生型マウスに比べて悪化することから、I κ BNS の生体における炎症反応の抑制的な機能が示唆されている。従って、本研究では I κ B ζ 及び I κ BNS の獲得免疫系における機能を明らかにするために I κ B ζ 及び I κ BNS 欠損マウスより T 細胞及び B 細胞を採取し、抗原受容体刺激による増殖反応や抗体産生誘導能を検討した。また、I κ B ζ については自然免疫担当細胞及び獲得免疫担当細胞の両方で発現が強く認められその表現型がどちらの免疫系に依存しているのか不明確となることを防ぐために、I κ B ζ の部位特異的欠損マウスを作製し、自然免疫担当細胞及び獲得免疫担当細胞特異的 I κ B ζ 欠損マウスの作製を目指した。
- ③ I κ B ζ 欠損マウスに、多発性硬化症モデルである実験的脳脊髄炎 (EAE) モデルを起

こすことで I κ B ζ の役割を検討した。

4. 研究成果

核内 I κ B タンパク質の一つである I κ B ζ 欠損マウスを用いて、実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) 誘導実験を実施したところ、I κ B ζ 欠損マウスでは脊椎ミエリン鞘の脱髄が起きず、さらに炎症性リンパ球の浸潤もほとんど認められなかった。また、この結果が自然免疫担当細胞によるものなのか、獲得免疫系担当細胞によるものなのかを明らかにする目的で、I κ B ζ 欠損マウスに野生型マウス由来の T 細胞を移入したマウスと野生型マウスに I κ B ζ 欠損 T 細胞を移入したマウスを用いて、EAE 誘導実験を試みたところ、前者のマウスでは EAE が惹起できたのに対し後者のマウスでは全く EAE が起きなかったことから I κ B ζ 欠損マウスにおいては T 細胞の機能異常により EAE が惹起できていないことが示唆された。EAE の惹起に関与する T 細胞は Th17 であることが報告されている。従って、次に Th17 の分化における I κ B ζ の役割を解明するために I κ B ζ 欠損マウスよりナイーブ T 細胞を採取し、*in vitro* において Th17 誘導条件にて培養したところ Th17 細胞の分化能が I κ B ζ 欠損 T 細胞では著しく低下していたことから、I κ B ζ は Th17 細胞分化に関与する分子であることが示唆された。また、逆にナイーブ T 細胞に I κ B ζ を強制発現させ Th17 誘導条件で培養するとコントロール群に比べ IL-17 産生が亢進し、さらに IL-17 産生に

必須の転写因子である ROR γ t と I κ B ζ を共発現させると IL-17の産生が増強されたことから ROR γ t と協調して I κ B ζ は IL-17 の転写に関与していることが示唆されたものの、両者の直接的結合は認められなかった。以上のことから、Th17誘導に I κ B ζ が関与し、EAEの発症に重要な役割を果たしていることが証明された。

5. 代表的な研究成果

(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)

- 1) Okamoto K, Iwai Y, Oh-hora M, Yamamoto M, et al. I κ B ζ regulates Th17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature*. (2010) 464:1381-5. 査読・有
- 2) Talbot S, Töttemeyer S, Yamamoto M, et al. Toll-like receptor 4 signalling through MyD88 is essential to control *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection, but not for the initiation of bacterial clearance. *Immunology*. (2009) 128:472-83. 査読・有
- 3) Wu X, Yamamoto M, et al. Regulation of hematopoiesis by the K63-specific ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2009) 106:20836-41.. 査読・有
- 4) Yamamoto M, et al. A single polymorphic amino acid on *Toxoplasma gondii* kinase

ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3. *J Exp Med*. (2009) 206: 2747-2760. 査読・有

5) Yamazaki K, Gohda J, Kanayama A, Miyamoto Y, Sakurai H, Yamamoto M, et al. Two Mechanistically and Temporally Distinct NF- κ B Activation Pathways in IL-1 Signaling. *Sci Signal*. (2009) 2:ra66. 査読・有

6) Kayama H, Koga R, Atarashi K, Okuyama M, Kimura T, Mak TW, Uematsu S, Akira S, Takayanagi H, Honda K, Yamamoto M, Takeda K. NFATc1 mediates Toll-like receptor-independent innate immune responses during *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Pathog*. (2009) 5:e1000514. 査読・有

7) Kobayashi T, Kim TS, Jacob A, Walsh MC, Kadono Y, Fuentes-Pananá E, Yoshioka T, Yoshimura A, Yamamoto M, et al. TRAF6 is required for generation of the B-1a B cell compartment as well as T cell-dependent and -independent humoral immune responses. *PLoS One*. (2009) 4:e4736. 査読・有

8) Tokunaga F, Sakata S, Saeki Y, Satomi Y, Kirisako T, Kamei K, Nakagawa T, Kato M, Murata S, Yamaoka S, Yamamoto M, et al. Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF- κ B activation. *Nat Cell Biol*. (2009) 11:123-32. 査読・有

〔学会発表〕（計4件）

1. **Yamamoto M.**, Soldati-Favre D, Takeda K.
「トキソプラズマ原虫のキナーゼであるROP16上の多型的な1つのアミノ酸置換が株特異的かつ直接的なStat3のリン酸化を決定する」第32回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜、2009年12月9日～12日
2. **Yamamoto M.**, 「A single polymorphic amino substitution on Toxoplasma gondii kinase ROP16 determines the direct and strain-specific activation of Stat3.」第39回日本免疫学会総会・学術集会 大阪国際会議場、2009年12月2日～4日
3. **山本雅裕**, Dominique Soldati-Favre, 竹田 潔「トキソプラズマ原虫のリン酸化酵素であるROP16はStat3を直接活性化する」第8回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 千里ライフサイエンスセンター、2009年10月9日～10日
4. **Yamamoto M.**, Soldati-Favre D, Takeda K.
「Essential role of Toxoplasma gondii ROP16 in host Stat3 activation」The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity (Awaji Yumebutai International Conference Center on Awaji Island, Hyogo, Japan, September 8th-11th, 2009)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 雅裕 (YAMAMOTO MASAHIRO)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00444521