

機関番号： 8 2 4 0 1
 研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2008～2010
 課題番号： 20590496
 研究課題名(和文)
 MAP3Kにより制御される免疫細胞の分化と機能の解析
 研究課題名(英文)
 MAP3K regulation of immune cell development and function
 研究代表者
 篠原 久明 (SHINOHARA HISAKI)
 独立行政法人理化学研究所・分化制御研究グループ・研究員
 研究者番号： 10391971

研究成果の概要(和文)：

本研究では、自然免疫シグナルおよび獲得免疫の双方に寄与している MAP3K、TAK1 を mb1-Cre を用いた B 細胞特異的遺伝子欠損マウスの解析を行った。末梢では抗原刺激依存的な NF- κ B の活性化、抗体産生、細胞増殖、細胞生存、細胞分化とこれに関わる遺伝子発現の全てが TAK1 を必要とすることが明らかになった。骨髄においても B 細胞の一部の集団の分化が優位に阻害されていることから TAK1 が B 細胞分化に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

MAP3K, TAK1 is shared in adaptive and innate immune signaling. We generated and analyzed B cell conditional deletion of TAK1 using mb1-cre. In periphery, TAK1-deficient B cells showed impaired activation of NF- κ B, proliferation, survival, and differentiation induced by anti-IgM. TAK-deficient bone marrow B cell also showed significant decreased differentiation in some subsets. Thus these analysis suggest TAK1 is essential for B cell differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：NF- κ B, MAP3K, シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

B 細胞抗原受容体 (BCR) が抗原を受け取ると細胞内には B 細胞の機能、増殖、分化を決定するシグナルが誘導され転写因子を活性化する。活性化された転写因子は B 細胞の活性化や、免疫応答に必要な遺伝子を発現させる。転写因子である NF- κ B はこの過程の中心的役割を担っている。NF- κ B 活

性化に関わる分子の欠損は免疫不全になり、逆に過活性は自己免疫疾患、癌を誘導する。故に、特異的に NF- κ B の活性化を誘導するシグナルの制御は重要な課題である。

BCR シグナルではプロテインキナーゼ C (PKC) β 、アダプター分子 CARMA1、及び Bcl10 等が NF- κ B の活性化に必要なことが知られているが、これらの分子がどのようにして NF- κ B の活性化をもたらすのか、

分子機構の解明が待望されていた。申請者は、BCR 刺激により活性化した PKC β が CARMA1 をリン酸化すること、またこのリン酸化を受けた CARMA1 が Bcl10 やセリンスレオニンキナーゼである TAK1 と会合し NF- κ B の活性化を誘導する新規メカニズムを、DT40 遺伝子欠損細胞を用い NF- κ B 活性評価系を樹立することにより明らかにした (Shinohara H. et al., J Exp Med. 2005)。

さらに詳細な分子機構の解析を行い、PKC β によってリン酸化されると予測される CARMA1 のセリン、スレオニンについて変異導入 DT40B 細胞を用い、NF- κ B の活性化に必須である部位、つまり CARMA1 の機能発現に必要なリン酸化部位を明らかにした。CARMA1 はその中央部のセリンを PKC β によりリン酸化され下流シグナル分子を集積、活性化を誘導するばかりでなく、下流のエフェクター分子、セリンスレオニンキナーゼ IKK β によりリン酸化修飾を受ける。NF- κ B 活性化経路における IKK β によるシグナル増幅機構という新たなコンセプトを報告している (Shinohara H. et al., J Exp Med. 2007)。

BCR シグナルにおいて NF- κ B の活性化に必須である分子はどのような Complex を形成し、何によって制御、修飾されているのか、またマウスを使った in vivo の系ではどのような機能が見られるのかといった解析は不明な点が多く残されている。CARMA1 近傍に大きな複合体が形成されていることは間違いないが、この複合体の形成を制御している機構は予想よりはるかに複雑である。例えば、最近 T 細胞受容体 (TCR) シグナルにおいて IKK β が Bcl10 をリン酸化し、Bcl10 の抑制的機能を制御していることが報告された (Mol Cell. 2006)。このリン酸化は初期の複合体形成にも機能しているということから、おそらく、申請者が報告しているように IKK β は正と負、両方のフィードバックを誘導すると考えられる。申請者は二つの MAP3K、TAK1 と MEKK3 欠損マウスを用意し、NF- κ B 活性化経路におけるシグナル増幅機構への関与、及び B 細胞分化への影響を明らかにすることを本研究の目的とする。

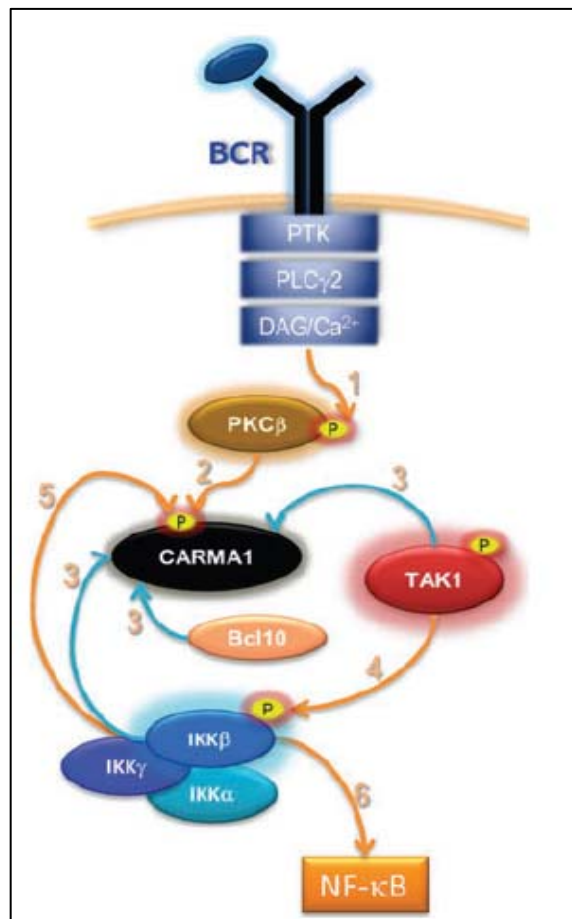
2. 研究の目的

申請者は、抗原受容体シグナルで NF- κ B を活性化することにセリンスレオニンキナーゼ、MAP3K ファミリー分子である MEKK3 が必要な分子であることを見出し、T 細胞特異的に遺伝子を欠損させたマウスを作製した。MEKK3 は T 細胞の分化及び TCR 刺激による細胞増殖、サイトカイン産生に重要な役割を担っていることを明らかにした。(Shinohara H. et al., Int. Immunol.

2009) 本研究では、自然免疫シグナルおよび獲得免疫の双方に寄与している MAP3K、TAK1 がこのシグナル機構に関わることを考え、CD19-Cre より効率よく遺伝子を欠陥させる mb1-Cre (Ig α -Cre) を用い TAK1 の B 細胞特異的遺伝子欠損マウスの解析を行う。さらに、自然免疫および獲得免疫の双方に共通で使われるシグナルのクロストークする分岐点を知ること、より詳細な分子機構を解明し、各シグナルが及ぼす細胞分化への影響を明らかにしたいと考えている。BCR シグナルにおいて NF- κ B の活性化に必須である分子はどのような Complex を形成し、何によって制御、修飾されているのか、またマウスを使った in vivo の系ではどのような機能が見られるのかといった解析は不明な点が多く残されている。これを明らかにする。

3. 研究の方法

リンパ球細胞で NF- κ B 活性化に関わる分子群は (下図)、CARMA1、及びがん細胞より単離された Bcl10、MALT1 といったアダプターが報告されている。申請者は、



BCR 刺激によりリン酸化を受けた CARMA1 が Bcl10、MALT1、TAK1 と会合し IKK の活性化を誘導することを報告している (Shinohara H. et al., J Exp Med. 2005)。

NF- κ B 活性化シグナル増幅の制御機構に TAK1 が関わっている知見を得ていることから、本研究では、CD19-Cre より効率よく遺伝子を欠落させる mb1-Cre (Ig α -Cre) を用い TAK1、の B 細胞特異的遺伝子欠損マウスの解析を行い生体内での機能を解析する。B 細胞における TAK1 遺伝子欠損の影響を細胞表面のマーカー染色により観察する。さらに抗原受容体刺激による、細胞増殖、生存を解析する。CD40、BAFF、LPS 等重複して機能していると報告のある刺激に対する反応を検討する。

4. 研究成果

分子機序に基づいた NF- κ B 活性化経路における IKK β によるシグナル増幅機構という新たなコンセプトを打ち出すことに成功したように、B 細胞の機能、増殖、分化を決定する NF- κ B 活性化シグナルの制御の機構解析へのアプローチは、申請者が樹立した DT40B 細胞での系で初めて関連分子欠損細胞の網羅的解析、分子機序解明に必須である変異遺伝子の導入によって可能になる。現時点で樹立した NF- κ B の活性化を誘導するシグナル関連分子の遺伝子欠損、および変異遺伝子導入細胞の量、質ともに他の追従を許していない。加えて遺伝子欠損マウスを用い、In Vivo における細胞分化の解析を行うことで分子機序を Biological な現象に反映することが可能である。

申請者は、セリンスレオニンキナーゼ、MAP3K ファミリー分子である MEKK3 の T 細胞特異的に遺伝子を欠損させたマウスを作製し、T 細胞の発生分化や機能が著しく障害され、獲得免疫応答が不全であることを見出し、抗原受容体シグナルで NF- κ B を活性化することに MEKK3 が必要な分子であることを見出した (Shinohara H. et al., Int. Immunol. 2009)。そこで、遺伝子を B 細胞特異的に欠落させる mb1-Cre (Ig α -Cre) マウスと交配し、MEKK3 の遺伝子欠損マウスを用意し、分化への影響、寄与を検証したが B 細胞においては顕著な機能の欠失は観察されなかった。

そこで MEKK3 と同じく自然免疫シグナルおよび獲得免疫の双方に寄与している MAP3K、TAK1 を mb1-Cre を用いた B 細胞特異的遺伝子欠損マウスの解析を行った。末梢では抗原刺激依存的な NF- κ B の活性化、抗体産生、細胞増殖、細胞生存、細胞分化とこれに関わる遺伝子発現の全てが TAK1 を必要とすることが明らかになった。骨髄においても B 細胞の一部の集団の分化が優位に阻害されていることから TAK1 が B 細胞分化に

重要であることを明らかにした。

特に本研究の課題である MAP3K、TAK1 を欠損させたマウスの細胞では、NF- κ B 活性化シグナルに関与するアダプター群の遺伝子欠損マウスでは見られなかった分化への影響が観察されており、IKK 遺伝子欠損マウスに近い表現型を示していることから、B 細胞の機能、増殖、分化を決定する NF- κ B 活性化シグナルの制御の機構の一端が明らかにすることができた。

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 6 件)

1. Eitelhuber A C., Warth S., Schimmack G., Düwel M., Hadian K., Demski K., Beisker W., Shinohara H., Kurosaki T., Heissmeyer V. and Krappmann D. Dephosphorylation of Carma1 by PP2A negatively regulates T cell activation (2011) **EMBO J** 30(3):594-605. (査読有)
2. Kurosaki T., Shinohara H., and Baba Y. B cell signaling and fate decision. (2010) **Ann Rev Immunol.** 28:21-55. (査読無)
3. Moreno-García M.E., Sommer K., Shinohara H., Bandaranayake A.D., Kurosaki T., and Rawlings D. J. MAGUK-controlled ubiquitination of CARMA1 modulates lymphocyte NF- κ B activity. (2010) **Mol Cell Biol.** 30(4), 922-934. (査読有)
4. Shinohara, H., and Kurosaki T. Comprehending the Complex Connection between PKC β , TAK1, and IKK in BCR-signaling. (2009) **Immunol Rev.** 232, 300-318. (査読無)
5. Shinohara, H., Yamasaki, S., Maeda, S.,

Saito, T., and Kurosaki T. Regulation of NF- κ B-dependent T cell activation and development by MEKK3. (2009) **Int. Immunol.** 21(4):393-401. (査読有)

6. Weber M., Treanor B, Depoil D., Shinohara H., Harwood N.E., Hikida M., Kurosaki T and Batista F.D. PLC γ 2 and Vav cooperate within 'microsignalosomes' to propagate B cell spreading in response to membrane-bound antigen. (2008) **J Exp Med.** 205, 853-68. (査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 久明 (SHINOHARA HISAAKI)

独立行政法人理化学研究所・分化制御研究グループ・研究員

研究者番号：10391971