

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21570141

研究課題名(和文) 細胞内ストレスに応答したNF- κ B活性化機構と炎症と発癌との関連研究課題名(英文) Involvement of cellular stress-mediated NF- κ B activation in inflammation and cancer

研究代表者

鎌田 英明 (KAMATA HIDEAKI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：10233925

研究成果の概要(和文)：

TNF α は細胞内で I κ B α kinase (IKK)による I κ B のリン酸化と分解を介して転写因子 NF- κ B の活性化を誘導する。また紫外線(UV)も NF- κ B の活性化を誘導するがこの機構は不明であった。本研究で我々は UV 照射は IKK の活性化や I κ B α のリン酸化は誘導しないが、アダプタータンパク質として機能することにより NF- κ B を活性化することを見いだした。UV は I κ B α の核内移行を誘導して hnRNP-U を介して β -TrCP に結合している IKK に会合させ、I κ B α のユビキチン化と分解を誘導する。このようにして活性化された NF- κ B は抗アポトーシス遺伝子の発現を抑制して細胞死を亢進する。重要なことに、UV 照射だけでなく酸化ストレスなども核内移行と IKK の会合を介して I κ B α の分解を誘導する。

研究成果の概要(英文)：

Tumor necrosis factor α (TNF α) activates NF- κ B using the I κ B kinase (IKK) complex that phosphorylates inhibitory proteins (I κ Bs) at N-terminal sites resulting in their ubiquitination and degradation in the cytoplasm. Ultraviolet (UV) irradiation also activates NF- κ B by I κ B α degradation, but its mechanism was unknown. In this study, we have revealed that, although UV does not lead to IKK activity and N-terminal phosphorylation of I κ B α , IKK acts as an adaptor protein and activates NF- κ B. UV irradiation induces the nuclear translocation of I κ B α and association with IKK β , which constitutively interacts with β -TrCP through heterogeneous ribonucleoprotein-U (hnRNP-U) leading to I κ B α ubiquitination and degradation. NF- κ B activated by the nuclear IKK β adaptor protein suppresses anti-apoptotic gene expression and promotes UV-induced cell death. Importantly, I κ B α translocates into the nucleus and associates with IKK β and then is degraded when cells are subjected not only to UV stress but also to other types of oxidative stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞情報伝達機構・NF- κ B・ストレス応答・UV・ユビキチン・プロテアソーム
細胞死

1. 研究開始当初の背景

腫瘍壊死因子 (TNF α) や IL-1 などの炎症性サイトカインは IKK β を活性化し、NF- κ B 阻害タンパク質 I κ B α をリン酸化する。リン酸化された I κ B α はユビキチンリガーゼ β -TrCP によりユビキチン化・分解され、NF- κ B は核内に移行して遺伝子発現を誘導する。この古典的経路では NF- κ B は一過性に活性化された後にすみやかに不活性化される。これに対して慢性炎症や多くの癌細胞では NF- κ B は持続的に活性化されるが、この分子機構は不明である。一方、我々は NF- κ B の生理的意義を解明するために遺伝的改変マウスを用いた解析を行ってきた。まず、IKK β のノックアウトマウス由来の細胞に TNF α を作用させると、細胞内で活性酸素が産生されて酸化ストレスを生じ、MAP キナーゼホスファターゼのシステイン残基の酸化修飾を介して JNK の持続的活性化と細胞死が誘導されることを明らかにしてきた。また IKK β /NF- κ B 系はサイトカインの産生や酸化ストレスを介して炎症や癌に関与している。その一方で紫外線 (UV) の照射や酸化ストレスが NF- κ B の活性化を誘導する事が知られている。すなわち IKK β /NF- κ B 系と細胞内で生じたストレス応答系は密接に関連する事が明らかにされてきた。しかしながら、UV などのストレスによる NF- κ B の活性化機構は不明のままであり、解明すべき研究課題として残されていた。

2. 研究の目的

本研究は UV などにより生じる細胞内ストレスが NF- κ B を活性化する機構の解明を目的とした。さらにこの応答が炎症や発癌にどのように関連するのかを解析した。

3. 研究の方法

野生型マウスや IKK β 5 のノックアウトマウスに由来する野生型細胞や IKK β 欠損細胞を用いて I κ B α の分解と NF- κ B の活性化をウエスタンブロット法や EMSA 法を用いて解析した。さらに NF- κ B のシグナル系タンパク質の細胞内局在について免疫抗体法による細胞染色や、GFP との融合タンパク質の細胞内発現法などにより解析した。

4. 研究成果

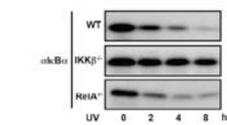
本研究において以下の事実を明らかにした。

(1) UV による IKK β 依存性の I κ B α の分解

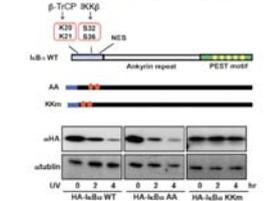
UV による NF- κ B 活性化における IKK β の役割を明らかにするために、野生型細胞と IKK β 欠損細胞の比較を行った。野生型細胞では UV 照射により I κ B α が分解されるのに対して IKK β 欠損細胞では分解されないことから、I κ B α の分解には IKK β が必要であることが確認された。そこで IKK β 欠損細胞に野生型 IKK β とキナーゼ活性を欠損した IKK β 変異体 (IKK β KN) を導入したところ、驚くべきことに IKK β KN でも I κ B α の分解が誘導されることが判明した (図 1)。さらに IKK β によるリン酸化を受けない I κ B α 変異体を細胞に発現させて UV 照射を行ったところ、この I κ B α 変異体は分解された。一方、 β -TrCP によるユビキチン化を受けない I κ B α 変異体は分解されなかった。すなわち、UV 照射による I κ B α の分解には、IKK β によるリン酸化は必要ではないが、

β -TrCP によるユビキチン化が必要であることが示唆された。実際に野生型細胞では UV 照射により I κ B α のユビキチン化が誘導されるのに対して、IKK β 欠損細胞ではユビキチン化は誘導されないことが確認できた。これらのことから、UV による I κ B α の分解において、IKK β はキナーゼ活性非依存的に β -TrCP による I κ B α のユビキチン化を誘導することが判明した。

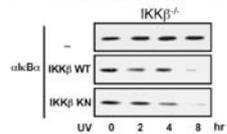
① I κ B α の分解には IKK β が必要である。



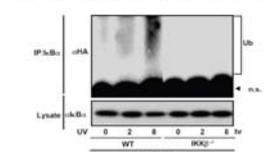
③ I κ B α の分解にはリン酸化は不要である。



② I κ B α 分解は IKK β キナーゼ活性非依存性である。



④ I κ B α のユビキチン化は IKK β 依存性である。



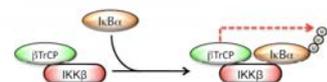
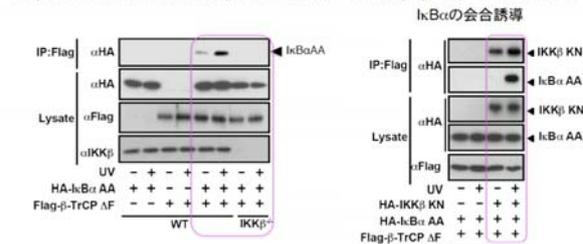
(図 1)

(2) IKK β のアダプター機能

β -TrCP による I κ B α のユビキチン化反応における IKK β の役割を解明するために、 β -TrCP と I κ B α の会合への関与を検討した。野生型細胞と IKK β 欠損細胞に β -TrCP と I κ B α を導入し、両者の会合を免疫沈降法により解析した。野生型細胞では UV 照射に反応して β -TrCP と I κ B α の会合が誘導されるが、IKK β 欠損細胞では会合が誘導されなかった (図 2)。そこで私たちは、IKK β が β -TrCP と I κ B α の会合を介するアダプターとして機能しているということ想定し、IKK β 欠損細胞に IKK β KN を導入した解析を行った。この結果、IKK β は β -TrCP と恒常的に会合しており、UV に反応して I κ B α は IKK β を介して β -TrCP に会合してユビキチン化を受けると考えられた。

① β -TrCP と I κ B α の会合には IKK β が必要である。

② IKK β と β -TrCP の恒常的会合と、I κ B α の会合誘導



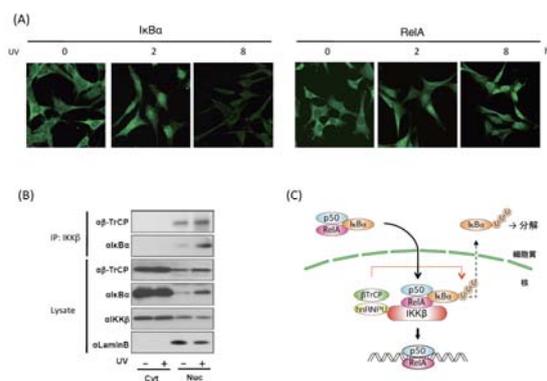
(図 2)

(3) 核内 I κ B α /IKK β / β -TrCP 複合体形成

UV 照射後の I κ B α および RelA の細胞内局在の変化を解析したところ、UV 照射後 2 時間で I κ B α は核内に移行して、8 時間後には分解されることが判明した (図 3)。さらに、レプトマイシン B (LMB) でタンパク質の核外移行を阻

害すると UV 照射による I κ B α の分解が抑制されることから、I κ B α の核内外のシャトリングが分解に関与すると考えられた。このことを確認するために核局在型 I κ B α 変異体 (NLS-I κ B α) および細胞質局在型 I κ B α 変異体 (NES-I κ B α) を用いて UV 照射による分解およびユビキチン化の誘導を解析した。核局在型 I κ B α 変異体では UV によるユビキチン化は誘導されるものの分解が遅滞し、細胞質局在型 I κ B α 変異体ではユビキチン化は誘導されずに分解が遅滞することが観察された。これらの結果から、UV 照射に反応して I κ B α は核内に移行してユビキチン化を受け、最終的に細胞質でプロテアソーム依存的に分解されると考えられた。また Ca²⁺キレーターである BAPTA-AM が UV 照射により誘導される I κ B α の核内移行と分解を抑制することから、I κ B α の核内外のシャトリングには Ca²⁺シグナルが関与していると考えられた。

UV 照射に反応して I κ B α が核内に移行してユビキチン化を受けることから、核内で I κ B α は IKK β を介して β -TrCP と会合すると考えられた。そこで IKK β 欠損細胞に NES を付加した細胞質局在型 IKK β 変異体と NES を付加した核局在型 IKK β 変異体を導入して解析したところ、TNF α は細胞質の IKK β を介して I κ B α の分解を誘導するのに対して、UV は核内の IKK β を介して I κ B α の分解を引き起こすことが判明した。実際に細胞質分画と核分画で I κ B α の会合を解析したところ、UV 照射に反応して核内に移行した I κ B α は IKK β と β -TrCP との複合体を形成することが確認された。また核タンパク質 hnRNP-U は β -TrCP と会合することが報告されている。そこで UV 反応における hnRNP-U の関与を解析したところ、IKK β は hnRNP-U と恒常的に会合しており、IKK β /hnRNP-U/ β -TrCP の三者は核内で恒常的な複合体を形成していることが判明した。UV 照射に反応して核内移行した I κ B α は IKK β /hnRNP-U/ β -TrCP 複合体に会合し、この複合体上で β -TrCP によるユビキチン化をうけると考えられた。



(図 3)

(4) p38・CK2 の IKK β 会合と I κ B α 分解促進
UV に反応した I κ B α の分解に、p38MAP キナーゼと CK2 による I κ B α の C 末端領域のリン酸化が関与することが報告されていた。この点について解析を行ったところ、UV に反応した I κ B α の分解に本質的に寄与するのは β -TrCP を介したユビキチン化であるが、これに加えて p38 と CK2 によるリン酸化も分解を促進する効果を有する事が確認された。それでは p38 と CK2 は IKK β のアダプター分子機能とど

のような関係にあるのであろうか？興味深いことに UV 照射に反応して p38 と CK2 は IKK β は会合して、I κ B α /IKK β /p38/CK2 複合体が形成されることが判明した。すなわち IKK β は β -TrCP のみならず、p38 と CK2 に対してもアダプター分子として機能すると考えられた。

(5) NF- κ B による細胞死の亢進

NF- κ B は抗アポトーシス遺伝子の発現を亢進することにより細胞死を抑制する。しかし最近の研究により、NF- κ B は遺伝子発現を亢進するだけでなく、逆に遺伝子発現を抑制する転写抑制因子としても機能する事が知られている。とくに UV により活性化された NF- κ B はいくつかの遺伝子発現を抑制してアポトーシスを亢進することが報告されていた。そこで IKK β 欠損細胞に IKK β 変異体を導入した再構成細胞での遺伝子発現と細胞死反応を解析した。キナーゼ活性を欠損した IKK β KN 変異体や核局在型 IKK β 変異体を発現させると、UV に反応した NF- κ B の活性化を引き起こすことができるが、この時に活性化された NF- κ B は Bcl-xL や x-IAP などの抗アポトーシス遺伝子の発現を特異的に抑制することが確認された。さらに NF- κ B は UV による細胞死を促進する事も観察された。

(6) ストレス応答性 NF- κ B 活性化と肝障害
これらのことから慢性炎症時や組織障害時に観察される NF- κ B の持続的活性化には IKK β のアダプター機能の関与が想定された。そこで肝細胞特異的な IKK β のノックアウトマウスにアデノウイルスを用いて、アダプター機能のみを有する IKK β 変異体と、キナーゼ活性のみを有する IKK β 変異体を導入し、さらにリポポリ多糖やコンカナバリン A による炎症反応を解析したところ、アダプター機能のみを有する IKK β 変異体を導入した場合には肝細胞死が亢進して重篤な肝障害が引き起こされることが判明した。

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 8 件)

1. Numajiria, N., Takasawa, K., Nishiy, T., Tanaka, H., Ohno, K., Hayakawa, W., Asada, M., Matsuda, H., Azumi, K., Kamata, H., Tomohiro Nakamura, Hideaki Hara, Masabumi Minami, Stuart A. Lipton, and Takashi Uehara. On-off system for PI3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation of phosphatase with sequence homology to tensin (PTEN). *Poc. Nat. Acad. Sci. USA*. in press (2011) 査読有
2. Nakatsu, Y., Sakoda, H., Kushiyama, A., Zhang, J., Ono, H., Fujishiro, M., Kikuchi, T., Fukushima, T., Yoneda, M., Ohno, H., Horike, N., Kanna, M., Tsuchiya, Y., Kamata, H., Nishimura, E., Isobe, T., Ogihara, T., Katagiri, H., Oka, Y., Takahashi, S., Kurihara, H., Uchida, T., Asano, T. Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1 associates with IRS-1 and enhances insulin actions

- and adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 286: 20812-20822 (2011) 査読有
3. Ohno, H., Nakatsu, Y., Sakoda, H., Kushiyama, A., Ono, H., Fujishiro, M., Yuichiro Otani, Hirofumi Okubo, Yoneda, M., Fukushima, T., Tsuchiya, Y., Kamata, H., Nishimura, F., Kurihara, H., Katagiri, H., Oka, Y., Asano, T. 4F2hc stabilizes GLUT1 protein and increases glucose transport activity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 300: 1047-1054 (2011) 査読有
 4. Tsuchiya, Y., Asano, T., Nakayama, K., Kato, Jr., K., Karin, M., Kamata, H. IKK β is an adaptor protein for β -TrCP mediated I κ B α ubiquitination in UV-induced NF- κ B activation. *Mol. Cell* 39: 570-582 (2010) 査読有
 5. *Kamata, H., Tsuchiya, Y., Asano, T. I κ B β is a positive and negative regulator of NF- κ B activity during inflammation. *Cell Res.*, 20: 1178-1180 (2010) 査読有
 6. Nakatsu, Y., Sakoda, H., Kushiyama, A., Ono, H., Fujishiro, M., Horike, N., Yoneda, M., Ohno, H., Tsuchiya, Y., Kamata, H., Hidetoshi Tahara, Toshiaki Isobe, Nishimura, F., Katagiri, H., Oka, Y., Fukushima, T., Takahashi, S., Kurihara, H., Uchida, T., Asano, T. Pin1 associates with and induces translocation of CRTC2 to the cytosol, thereby suppressing CRE transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 285: 33018-33027 (2010) 査読有
 7. Yoneda M., Guo Y., Ono H., Nakatsu Y., Zhang J., Cui X., Iwashita M., Kumamoto S., Tsuchiya Y., Sakoda H., Fujishiro M., Kushiyama A., Koketsu Y., Kikuchi T., Kamata H., Nishimura F., Asano T*. Decreased SIRT1 expression and LKB1 phosphorylation occurs with long-term high-fat diet feeding, in addition to AMPK phosphorylation impairment in the early phase. *Obes. Res. Clin. Pract.* 4: 201-207 (2010) 査読有
 8. Cui X., Kushiyama A., Yoneda M., Nakatsu Y., Guo Y., Zhang J., Ono H., Kanna M., Sakoda H., Ono H., Kikuchi T., Fujishiro M., Shiomi M., Kamata H., Kurihara H., Kikuchi M., Kawazu S., Nishimura F., Asano T. Macrophage foam cell formation is augmented in serum from patients with diabetic angiopathy. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 87: 57-63 (2010) 査読有

[学会発表] (計12件)

1. Yoshihiro Tsuchiya and Hideaki Kamata, IKK β act as an adaptor protein for I κ B α ubiquitination and degradation in UV-induced NF- κ B activation; possible involvement in the TNF signaling. 13th International TNF Conference, Awajishima, Japan, 2011. 5. 17
2. 鎌田英明, 土谷佳弘, 浅野知一郎「NF- κ Bと活性酸素(ROS)シグナルに関連したタンパク質のリン酸化と分解による細胞応答」第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同大会, 神戸, 2010. 12. 9
3. 土谷佳弘, 浅野知一郎, 鎌田英明「細胞内ストレスに応答した核内IKK β を介した新規NF- κ B活性化機構」第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同大会, 神戸, 2010. 12. 9
4. 中津祐介, 迫田秀之, 櫛山暁史, 張君, 福嶋俊明, 内田隆史, 鎌田英明, 浅野知一郎「エネルギー状態によるCRTC3の発現制御と脂肪分化における役割の解明」第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同大会, 神戸, 2010. 12. 10
5. 大崎慶子, 中津祐介, 迫田秀之, 櫛山暁史, 大野晴也, 渡辺俊明, 内田隆史, 福嶋俊明, 鎌田英明, 浅野知一郎「新規Pin1結合タンパク質Trk-fused geneはAktの活性化を促進する」第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会合同大会, 神戸, 2010. 12. 10
6. 鎌田英明, 土谷佳弘「Nuclear IKKb acts as an adaptor protein for I κ B α degradation in UV-induced NF- κ B activation」第69回日本癌学会学術総会, シンポジウム, 大阪, 2010. 9. 24
7. Hideaki Kamata, Nuclear IKKb acts as an adaptor protein for I κ B α degradation in UV-induced NF- κ B activation and promotes cell death. International Symposium on the Innovation for Health And Sustainable Life" Hiroshima University, Japan, 2010. 3. 9
8. 岩下未咲, 熊本園子, 迫田秀之, 櫛山暁史, 藤城 緑, 中津祐介, 大野晴也, 大谷裕一郎, 土谷佳弘, 鎌田英明, 西村英紀, 浅野知一郎「LPSによる脂肪組織インスリン抵抗性へのマクロファージの関与と, ARBによるインスリン抵抗性改善作用の機序」第21回分子糖尿病学シンポジウム, 和歌山, 2009. 12. 12
9. 土谷佳弘, 浅野知一郎, 中山啓子, 加藤友久, Michael Karin, 鎌田英明「核内IKKを介したNF- κ B活性化による細胞死亢進」第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009. 12. 9
10. 大野晴也, 中津祐介, 大久保博史, 大谷祐一郎, 崔興龍, 張君, 郭瑩, 迫田秀之, 藤城緑, 堀家なな緒, 櫛山暁史, 土谷佳弘, 鎌田英明, 浅野知一郎「GLUT1と相互作用を有する膜タンパク質4F2hcの同定と糖取り込みに与える影響」第82回日本生化学会合同大会, 神戸, 2009. 10. 24
11. 土谷佳弘, 浅野知一郎, 中山啓子, 加藤友久, Michael Karin, 鎌田英明「細胞内ストレスに応答した核内IKK β を介した新規NF- κ B活性化機構」第82回日本生化学会合同大会, 神戸, 2009. 10. 23
12. 中津祐介, 堀家なな緒, 櫛山暁史, 迫田秀之, 大野晴也, 神名真智, 鎌田英明, 栗原裕基, 内田隆史, 浅野知一郎「プロリン異性化酵素Pin1はTORC2と結合してCRE活性を抑制することで, 肝の糖新生系を制御する」第82回日本生化学会合同大会, 神戸, 2009. 10. 23

[その他]

ホームページ等

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/1010>

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌田 英明 (KAMATA HIDEAKI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授

研究者番号：10233925

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：