

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860207

研究課題名(和文) MARCH9によるNF- κ B制御機構の解明研究課題名(英文) Regulation of NF- κ B signalling by MARCH9

研究代表者

後藤 栄治 (GOTO, EIJI)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：40435649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：NF- κ Bはストレスや紫外線など様々な刺激により活性化し、免疫応答、炎症等、生命に必須のシグナルを伝達する分子である。NF- κ B制御機構の破綻は、癌、炎症性疾患及び自己免疫疾患など様々な疾患の原因となることが知られている。本研究では、NF- κ Bの制御に関与することが示唆される新規分子MARCH9を同定した。今後さらにMARCH9の詳細な機能を解析することにより、様々な疾患の原因解明及び、将来の治療戦略へ新たな手掛かりを示すことが出来るのではないかと期待される。

研究成果の概要(英文)：Nuclear factor- κ B (NF- κ B) is activated by various stimuli, including cellular stresses, UV irradiation and cytokines. NF- κ B is essential for immune and inflammatory responses, and abnormal NF- κ B signalling is implicated in multiple diseases. In the present study, we identified MARCH9 as a new candidate protein for regulation of NF- κ B signalling. Further detailed study of MARCH9 will provide clues as to the underlying cause of multiple NF- κ B-related diseases.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ユビキチン NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

NF- Bはストレスや紫外線、サイトカイン等様々な刺激により活性化し、免疫応答、細胞増殖及び炎症等、生命に必須のシグナルを伝達する転写因子である。NF- B 活性制御機構の破綻は、癌、炎症性疾患及び自己免疫疾患など様々な疾患の原因となり、このような疾患では多くの場合NF- Bの恒常的な活性亢進が認められることから、近年、NF- Bの活性阻害が疾患の創薬ターゲットとして注目されている。従って、NF- B活性制御機構の解明は、癌をはじめとする様々な疾患の原因解明及び創薬ターゲットに向け、極めて重要な意味を持つと考える。

申請者は、NF- Bの活性制御に関わる新規調節分子を同定するため、腫瘍壊死因子TNF によるNF- Bの活性化に伴いmRNAの発現が変動する分子をマイクロアレイ法にて網羅的に探索した。その結果、MARCHファミリータンパク質の一つであるE3 ユビキチンリガーゼMARCH9を同定した。

MARCHファミリータンパク質は、申請者らによって世界に先駆けて見出された、新たな膜結合型E3 ユビキチンリガーゼ群である(Ishido S. et al., Curr Opin Immunol. 2009、Ohmura-Hoshino, M. et al., J Biochem. 2006)、今回同定されたMARCH9は、これまでに、細胞膜あるいはリソソーム膜に局在し、免疫関連分子(ICAM-1, Mult1)のユビキチン化およびリソソーム分解に関与していることが報告されているが(Nice TJ. et al., J Immunol 2010、Hoer S. et al., FEBS Lett 2007)、MARCH9の生理機能およびNF- B制御機構におけるMARCH9の関与については現在のところ全く報告されていない。

これらのことから、本研究では、MARCH9によるNF- B抑制の分子機序の解明および、個体レベルにおけるMARCH9の生理的役割を明らかにし、様々な疾患の原因解明及び、将来の治療戦略へ向け新たな手掛かりを提示したいという着想に至った。

2. 研究の目的

MARCHファミリーは申請者らが独創的に見

いだした膜結合型E3 ユビキチンリガーゼ群で、これまでアポトーシスや免疫関連分子の分解に関与することを示したが、最近申請者は、MARCH9がNF- B活性を抑制する新規E3 ユビキチンリガーゼである可能性を見いだした。そこで本研究では、MARCH9によるNF- B抑制の分子機序の解明及び、個体レベルにおけるMARCH9の生理的役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)細胞培養およびTNF 刺激

HEK293T細胞は、10% FCS、Penicillin/Streptomycinを添加したDMEM (SIGMA社)を用い、37・5% CO₂の条件下のもとで培養した。NF- Bの活性化を誘導するため、最終濃度10ng/mlになるようにTNFを培養液中に添加し、6時間培養した。

(2)リアルタイムPCR

RNeasy mini kit (Qiagen社)を用いて細胞から全RNAを抽出し、SuperScript First-Strand Synthesis System (Life Technologies社)を使用して定法に従いcDNAを合成した。mRNA発現量の定量はPower SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems社)およびStepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems社)を用いて定法に従い解析を行った。

(3) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

HEK293T細胞にpGL4-NF- B-Luc、pGL4-Renilla-Luc/TK (Promega社)およびpcDNA3.1-MARCH9(野生型あるいは活性欠失変異体)を一過的に導入し、24時間後、TNF刺激にてNF- Bの活性化を誘導した。TNF刺激後、Bright-Glo luciferase assay system (Promega社)およびLumat luminometer (Berthold社)を用いて定法に従いルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

MARCH9はマイクロアレイ法にて、TNFによるNF- Bの活性化に伴いmRNAの発現が減

少する分子として同定されてきた分子である。したがって、まず初めに、リアルタイム PCR 法により、TNF 刺激後の MARCH9 mRNA の変動を検証した。HEK293T 細胞を TNF (10ng/ml) で 6 時間刺激後、リアルタイム PCR 法により、mRNA の発現量を測定した。その結果、NF- κ B の標的遺伝子である ICAM-1 の発現量は増加していたが(図 1 右)、MARCH9 の発現量は有意に減少していた(図 1 左)。

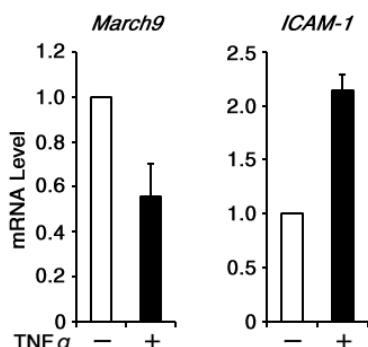


図 1. MARCH9 mRNA は TNF 刺激により減少する。

MARCH9 mRNA は TNF 刺激により減少することから、MARCH9 分子は定常状態においては、過剰なシグナルが伝達されるのを制御するため NF- κ B の活性を負に制御しており、TNF 刺激時においては、NF- κ B の活性亢進の妨げにならないように mRNA の発現が減少するのではないかと考えられた。

したがって、MARCH9 分子が TNF 刺激による NF- κ B の活性化を抑制する能力を有しているか否かを検討するため、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。HEK293T 細胞に野生型(Wt)および E3 ユビキチンリガーゼ活性欠失変異体(Ring-mt)の MARCH9 を一過的に導入し、TNF 刺激後、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、NF- κ B の活性化を測定した。その結果、野生型 MARCH9 は顕著に TNF 刺激による NF- κ B の活性化を抑制したが、活性欠失変異体 MARCH9 では、野生型 MARCH9 に比べ、NF- κ B の抑制効果が有意に減弱した(図 2)。

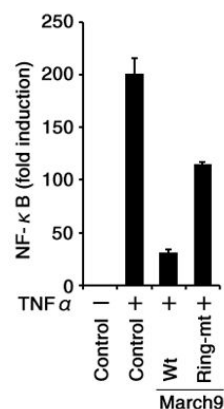


図 2. MARCH9 は E3 ユビキチンリガーゼ活性依存的に TNF 刺激による NF- κ B の活性化を抑制する。

これらの結果から、MARCH9 は NF- κ B 活性を抑制する新規 E3 ユビキチンリガーゼである可能性が示唆された。現在までに、NF- κ B の活性化を抑制する膜結合型 E3 ユビキチンリガーゼの存在は知られていない。申請者が見出しつつある “MARCH9 による NF- κ B 抑制機構” は、NF- κ B 活性化経路において、ユビキチン化による新たな負の制御が存在することを示唆しており、このことは、学術的に高い意義と独創性を有するものである。

今後は MARCH9 欠損マウスを用いた個体レベルにおける MARCH9 の生理的役割を明らかにし、様々な疾患の原因解明及び、将来の治療戦略へ新たな手掛かりを提示したいと考えている。

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 2 件)

Sato, Y., Goto, E., Shibata, Y., Kubota, Y., Yamagata, A., Goto-Ito, S., Kubota, K., , JI., Takekaw, M., Tokunaga, F., Fukai, S. Structures of CYLD USP with Met1- or Lys63-linked diubiquitin reveal mechanisms for dual specificity. Nat Struct Mol Biol., 2015, 22(3):222-229. 査読有
doi: 10.1038/nsmb.2970.

Kato, K., Ishii, R., Goto, E., Ishitani, R., Tokunaga, F., and Nureki, O. Structural and functional analyses of DNA-sensing and immune activation by human cGAS. PLoS One., 2013,

8(10):e76983. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0076983.

〔学会発表〕(計1件)

後藤 栄治

CRISPR/Cas9 法を用いた LUBAC 欠損細胞の作
製と NF- κ B 活性制御への影響
第 37 回日本分子生物学会年会
2014 年 11 月 25 日 ~ 2014 年 11 月 27 日
パシフィコ横浜 (神奈川県)

〔その他〕

ホームページ等

<http://molcellbiol.imcr.gunma-u.ac.jp/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 栄治 (GOTO, Eiji)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号: 40435649