

学 位 論 文 題 名

VHS タンパク質 Tom1の機能に関する研究

学位論文内容の要旨

【はじめに】

インターロイキン1 (IL-1) は炎症反応で中心的役割を果たすサイトカインであり、標的細胞に作用すると IL-1 受容体を介してシグナルが下流に伝わり、転写が促進される。本研究では、Toll/IL-1R 受容体を介するシグナル伝達に関与するアダプター分子の機能を明らかにするために、新規アダプター分子として同定されていた Tollip に着目し、この分子の結合タンパク質として Tom1 を同定した。Tom1 (Target of myb1) は、ガン遺伝子 v-myb の標的遺伝子として単離されたが、その機能については不明であった。そこで、機能未知の Tom1 に着目し、機能解析を行った。

【結果と考察】

1. Tom1 と Tollip の結合に関する解析

Tollip は、IL-1RacP (IL-1 receptor accessory protein) の細胞内ドメインを bait に用いた Yeast two-hybrid スクリーニングで得られ、Toll/IL-1 受容体の細胞内ドメインやアダプター分子 IRAK との結合能も有しており、受容体と IRAK を仲介する働きを行うと考えられている。そこで、Tollip を bait に用いた Yeast two-hybrid スクリーニングを行い、Tom1 が Tollip 結合タンパク質であることを明らかにした。

Tom1 と Tollip の結合に関与するそれぞれの領域を決定するために、それぞれの欠失変異体を HEK293 細胞に発現させ、免疫沈降実験を行った。その結果、Tollip は、Tom1 の中央部分に存在する GAT ドメインを含む領域と結合することが明らかとなった。

Tollip はシグナル依存的に受容体と結合するが、未刺激の状態の細胞内では IRAK と複合体を形成しているので、Tollip、Tom1 および IRAK の3者が複合体を形成している可能性が考えられる。そこで、HEK293 細胞から抽出液を調製してゲル濾過を行い、3者の複合体形成の有無を調べた。その結果、Tom1 と Tollip が同一の分画に検出され、両者の会合が示唆された。IRAK は高分子量領域に広く検出されたが、Tom1/Tollip 分画にも検出されることから、IRAK の一部が Tom1・Tollip 複合体に結合していると考えられる。なお、Tom1 は、より高分子量の領域にも検出されたが、それはユビキチン化タンパク質と結合した分子に由来すると考えられる (第2項参照)。

Tollip は IL-1 シグナル伝達に関与する分子であるので、その結合タンパク質である Tom1 も IL-1 シグナル伝達に関与する可能性が考えられる。そこで、IL-1 シグナル伝達に対する Tom1 の影響を調べるために、HEK293 細胞を用いて IL-1 receptor I (IL-1R I) を安定に発現している細胞株を樹立し、この細胞株に Tom1 やその欠失変異体を発現させ、Tom1 の過剰発現が IL-1 シグナルに及ぼす影響を、HEK293-IL-1RI を用いたレポーターアッセイによって調べた。その結果、Tom1 の過剰発現によって、Tollip の過剰発現の場合と同様に、IL-1 シグナル伝達が抑制され、TNF シグナル伝達も抑制されることが明らかになった。また、Tom1 欠失変異体を用いたレポーターアッセイの結果から、Tom1 の VHS ドメインがシグナル伝達

の抑制に重要であることが示唆された。

2. Tom1 とユビキチン鎖の結合に関する解析

Tom1 の生理的な機能をさらに解明するために、Tom1 の C 末端側 182 アミノ酸を欠いた欠失変異体 (1-310) を bait に用いてマウス NIH3T3cDNA ライブラリーの Yeast two-hybrid スクリーニングを行い、結合タンパク質の同定を試みた。その結果、ユビキチンをコードする 3 種類の遺伝子が得られた。

そこで、HEK293 細胞を用いて内在性 Tom1 の免疫沈降実験を行ったところ、ポリユビキチン化タンパク質との共沈降が観察され、*in vivo*における Tom1 とポリユビキチン鎖との結合が明らかになった。また、HEK293 細胞に Tom1 を過剰発現させて免疫沈降を行い、共沈降するポリユビキチン鎖を回収して質量分析を行ったところ、Tom1 が結合するユビキチン鎖は、タンパク質分解の分解シグナルとして機能するリジン 48 を介するポリユビキチン鎖であることが判明した。さらに、GST-Tom1 融合タンパク質と、ユビキチン分子や 2-4 個のユビキチン分子からなるユビキチン鎖との結合を GST pull down assay で解析したところ、Tom1 がユビキチン鎖と直接結合すること、より長いユビキチン鎖に対する結合の方がユビキチン分子に対してよりも強いことが明らかになった。また、現在までに報告されているユビキチン結合タンパク質は、UBA や UIM などの特徴的なドメインを有しているが、Tom1 には既知のユビキチン結合ドメインは存在していない。

以上の結果から、Tom1 が、リジン 48 を介するユビキチン鎖を認識できること、4 つ以上の長さをもつユビキチン鎖を強く結合することから、Tom1 は、ユビキチン-プロテアソームシステムを介するタンパク質分解に関与する可能性が考えられる。

3. Tom1 結合タンパク質の探索

質量分析による Tom1 結合タンパク質の探索を行った。HEK293T 細胞に Flag タグを付加した Tom1 を過剰発現させ、抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降を行い、Tom1 結合タンパク質を質量分析により同定した。その結果、Tom1 結合タンパク質として、エンドサイトーシス関連タンパク質であるクラスリンが同定された。さらに、エンドサイトーシスにおいてモータータンパクとして働くミオシン VI も同定された。また、各種 Tom1 欠失変異体を用いた免疫沈降実験から、クラスリンとミオシン VI は Tom1 の C 末端領域に結合することが明らかになった。最近、VHS ドメインや GAT ドメインを有する各種タンパク質がエンドサイトーシスや細胞内輸送において重要な働きをしていることが報告されている。これらの報告と本研究の結果から、Tom1 がエンドサイトーシスに関与する分子である可能性が考えられる。

【まとめ】

本研究の結果から、Tom1 はサイトカインシグナル、ユビキチン-プロテアソーム系を介するタンパク質分解、そしてエンドサイトーシスという少なくとも 3 つの生理作用に関わる多機能タンパク質である可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 横 沢 英 良
副 査 教 授 松 田 正
副 査 助 教 授 山 下 俊 之
副 査 助 教 授 川 原 裕 之

学 位 論 文 題 名

VHS タンパク質 Tom1の機能に関する研究

インターロイキン1 (IL-1) は炎症反応で中心的役割を果たすサイトカインであり、標的細胞に作用すると、IL-1 受容体を介してシグナルが下流に伝わり、転写が促進される。IL-1R 受容体を介するシグナル伝達には様々なアダプター分子が関与しているが、最近、新規アダプター分子として同定された Tollip は、IL-1 受容体の細胞内ドメインやアダプター分子 IRAK との結合能を有しており、受容体と IRAK を仲介する働きを行うと考えられている。

本論文提出者は、新規アダプター分子 Tollip の結合タンパク質として同定した VHS タンパク質 Tom1 (Target of myb1)を取り上げ、サイトカインのシグナル伝達、ユビキチン-プロテアソーム系を介するタンパク質分解、そしてエンドサイトーシスにおける Tom1 の機能に関する一連の研究を展開し、以下の成果をおさめた。

(1) Tollip を bait に用いた酵母 two-hybrid スクリーニングを行い、Tom1 が Tollip 結合タンパク質であることを明らかにした。また、Tom1 と Tollip の各欠失変異体を HEK293 細胞に発現させて免疫沈降実験を行い、Tollip が、Tom1 の中央部分に存在する GAT ドメインを含む領域に結合することを明らかにした。さらに、HEK293 細胞から抽出液を調製してゲル濾過を行い、Tollip、Tom1 および IRAK の3者の関係を調べ、Tom1 と Tollip が複合体を形成し、その複合体に IRAK の一部が結合していることを明らかにした。

(2) IL-1 receptor I (IL-1R I) を安定に発現している HEK293 細胞株を樹立し、この細胞株に Tom1 やその欠失変異体を発現させて、Tom1 の過剰発現が IL-1 シグナルに及ぼす影響を、HEK293-IL-1RI を用いたレポーターアッセイによって調べた。そして、Tom1 の過剰発現によって、IL-1 と TNF による両シグナル伝達が抑制されることを明らかにした。また、Tom1 欠失変異体を用いたレポーターアッセイの結果

から、Tom1 の VHS ドメインがシグナル伝達抑制に重要であることを明らかにした。

(3) Tom1 の C 末端側 182 アミノ酸を欠いた欠失変異体 (1-310) を bait に用いた酵母 two-hybrid スクリーニングを行い、Tom1 結合タンパク質として、ユビキチンをコードする 3 種類の遺伝子を同定した。次に、HEK293 細胞を用いて内在性 Tom1 の免疫沈降実験を行い、Tom1 がポリユビキチン鎖と結合することを明らかにした。また、HEK293 細胞に Tom1 を過剰発現させて免疫沈降を行い、PMF (peptide mass fingerprint) 法により、Tom1 に結合しているポリユビキチン鎖を分析し、Tom1 が結合するユビキチン鎖が、タンパク質分解の分解シグナルとして働くリジン 48 を介するポリユビキチン鎖であることを明らかにした。さらに、GST-Tom1 融合タンパク質を用いてユビキチン鎖との結合を GST pull down assay によって解析し、Tom1 がユビキチン鎖と直接結合すること、より長いユビキチン鎖に対してより強く結合すること、Tollip によって Tom1 のユビキチン鎖結合が促進されることを明らかにした。以上の結果から、Tom1 が、Tollip と共に、ユビキチン-プロテアソームシステムを介するタンパク質分解に関与すると提案した。

(4) PMF 法により、Tom1 結合タンパク質として、エンドサイトーシス関連タンパク質であるクラスリンと、エンドサイトーシスにおいてモータータンパクとして働くミオシン VI を同定した。また、各種 Tom1 欠失変異体を用いた免疫沈降実験から、クラスリンとミオシン VI が Tom1 の C 末端領域に結合することを明らかにした。以上の結果から、Tom1 がエンドサイトーシスに関与する分子であると提案した。

以上の新知見およびそれらを得るために用いた新研究方法は、VHS タンパク質 Tom1 のサイトカインシグナル伝達経路における生理的役割の理解にとどまらず、多機能性タンパク質として働く Tom1 による細胞機能の制御機構を理解する上で重要な寄与をなすものである。

審査委員一同このことを高く評価し、本論文提出者が博士 (薬学) の称号を受けるにふさわしいものと一致して判断した。