

学位論文題名

新規アポトーシス誘導受容体、Death receptor 6 (DR6)
を介した細胞内情報伝達機構の解析

学位論文内容の要旨

アポトーシスは個体の発生、細胞の癌化、免疫応答など様々な生命現象の制御に重要な役割を担う。特に免疫反応におけるアポトーシスの誘導制御にはアポトーシス誘導受容体ファミリー (Death-receptor-family, DR family) 分子が重要な役割を持つ事が知られている。DR family 分子の中で最も新しく同定された分子である DR6 遺伝子の欠損マウスでは、末梢 T 細胞や B 細胞の活性化期におけるアポトーシスの減少及び過増殖を来す事が報告された。これらの報告は、DR6 がアポトーシスの制御を介して、末梢 B 或いは T 細胞の活性化の制御に重要な役割を担う事を示すが、DR6 を介した細胞内情報伝達機構の詳細は明らかにされていない。我々は DR6 を介したアポトーシス制御機構の詳細を明らかにする事を目的として、DR6 細胞内領域に会合するタンパク質を酵母 two hybrid 法により探索し、これまでにアポトーシスとの関与が報告されていないタンパク質、cytoplasmic linker protein-170 (CLIP-170) related protein 59kDa (CLIPR-59) と DR6 細胞内領域との会合を見出した。哺乳類細胞を用いた免疫共沈降法による解析から、CLIPR-59 は哺乳類細胞においても DR6 と会合し、その会合には DR6 においては、第 373 アミノ酸から 428 アミノ酸領域が、CLIPR-59 においては第 364 アミノ酸から第 547 アミノ酸領域が必要である事が明らかとなった。これまでの報告から、DR6 の過剰発現はアポトーシス、及び転写因子・nuclear factor kappa B (NF- κ B) の活性化を誘導する事が報告されている。そこで、CLIPR-59 の DR6 を介したアポトーシス、及び NF- κ B 活性化への関与を検討した。その結果、CLIPR-59 発現は DR6 を介したアポトーシスに対しては促進し、NF- κ B の活性化に対しては抑制する事が判明した。更に、NF- κ B の活性化抑制を指標に CLIPR-59 の他のシグナルへの関与を検討した所、CLIPR-59 発現は DR6 と同じ DR ファミリーに属する TNF-R を介した NF- κ B の活性化に対して同様の効果を示したが、他のレセプターファミリーである IL-1R を介した NF- κ B 活性化に対しては影響を与えなかった。これまでの TNF-R を介した解析から、DR はリガンド刺激時に Caspase を介したアポトーシス促進経路、及び NF- κ B を介したアポトーシス抑制経路の二つの経路を同時に活性化させ、そのシグナルバランスによりアポトーシスの誘導を制御すると考えられている。これらの知見及び我々の結果を考慮すると、DR6 シグナルにおいて、CLIPR-59 は NF- κ B 経路の活性化を抑制することにより、シグナルバランスをアポトーシスへと傾かせると考えられる。一方、CLIPR-59 発現が DR6 及び TNF-R を介した NF- κ B 活性化に対して選択的に作用した事から、CLIPR-59 は DR6 及び TNF-R が共有する NF- κ B 活性化経路に対して作用する事が考えられた。これまでの報告から、TNF-R を介した NF- κ B の活性化には TRAF2/5 及びその下流に位置

する inhibitor of NF- κ B kinase (IKK)が重要な機能を有する事が報告されている。そこで次に内因性 TRAF2, TRAF5 及び IKK2 の DR6 を介した NF- κ B 活性化経路への関与を、それぞれのドミナントネガティブ (DN) 変異体発現を用いたレポータージーンアッセイにより検討を行った所、TRAF5 及び IKK2 の DN 発現は DR6 による NF- κ B 活性化を抑制したのに対し、TRAF2 の DN 発現は影響を与えなかった。この結果から DR6 を介した NF- κ B の活性化には TNF-R と同様 TRAF5 及び IKK2 が関与する事が示され、CLIPR-59 がこれらいずれかの因子に作用することが示唆された。また、CLIPR-59 はそのアミノ酸配列上、Ankyrin-like repeat や cytoskeleton-associated protein glycine-rich (CAP-Gly) ドメインなど様々な予測タンパク質会合領域を持つ一方で、酵素活性を予測させる領域を持たないことから、CLIPR-59 が他の酵素活性を有するタンパク質を介して DR6-TRAF5-IKK2-NF- κ B シグナルに働きかける事が考えられた。近年、皮膚の腫瘍の一つである cylindromatosis の原因遺伝子である CYLD は、TRAF タンパク質に対する脱ユビキチン修飾抑制能により、TNF-R を介した NF- κ B 活性化経路を抑制し、アポトーシスを促進することが報告された。そこで、内因性 CYLD が DR6 を介した NF- κ B 活性化に関与するか否かを、CYLD 特異的ノックダウンを用いたレポータージーンアッセイにより検討したところ、コントロール群と比較して、CYLD 特異的ノックダウン処理群では DR6 を介した NF- κ B 活性化が顕著に促進された。このことは内因性 CYLD が、CLIPR-59 と同様、DR6 を介した NF- κ B 活性化に対して抑制的に働く事を示し、CYLD が CLIPR-59 の機能に関与する可能性を示唆する。そこで、CYLD が CLIPR-59 の機能に関与する可能性を検討した所、免疫沈降法により CLIPR-59 と CYLD の会合が見出された。また、CLIPR-59 発現による DR6 依存性 NF- κ B 活性化に対する抑制効果が、CYLD 特異的ノックダウンにより回避されたことから、CYLD が CLIPR-59 の NF- κ B 活性化抑制能に重要な役割を担う事が示唆された。加えて、CLIPR-59 による NF- κ B 活性化抑制機構の詳細を明らかにする為に、TRAF5 のユビキチン修飾に対する CYLD 及び CLIPR-59 発現の影響を検討した所、CYLD と同様 CLIPR-59 発現もまた TRAF5 のユビキチン修飾を顕著に抑制したことから、DR6 シグナルにおいて、CLIPR-59 及び CYLD は TRAF5 レベルで NF- κ B 活性化経路に作用する事が示唆された。これまでの検討から、CLIPR-59 は DR6 刺激により誘導されるアポトーシスに対して促進的に働く事が示唆された。そこで、内因性 CYLD の、CLIPR-59 を介したアポトーシス促進効果への関与を検討したところ、CLIPR-59 発現群で認められた DR6 依存性アポトーシスに対する促進効果は CYLD 特異的ノックダウンにより回避された。このことから CYLD は DR6 シグナルにおいて、CLIPR-59 のアポトーシス促進効果に重要な役割を担う事が明らかとなった。

本研究の成果から、DR6 細胞内領域会合因子である CLIPR-59 は、TRAF5 のユビキチン修飾を、CYLD を介して抑制する事により NF- κ B 活性化経路を抑制し、シグナルバランスをアポトーシスに傾けると考えられ、CLIPR-59 は DR6 を介した細胞内情報伝達機構を理解する上で、重要なターゲット分子であると結論付けた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 藤 田 博 美
副 査 教 授 畠 山 鎮 次

学位論文題名

新規アポトーシス誘導受容体、Death receptor 6 (DR6) を介した細胞内情報伝達機構の解析

アポトーシスは個体発生、癌の形成、免疫応答等様々な生体制御に重要な役割を担う。特に、免疫応答におけるアポトーシスの制御にはアポトーシス誘導受容体群 (Death Receptor family, DR-family) が重要な役割を担う。DR-family の一つである DR6 は、末梢免疫細胞の活性化制御に重要な役割を担う事が明らかにされたが、DR6 を介した細胞内情報伝達系路の詳細は明らかにされていない。本研究は、DR6 を介した細胞内情報伝達系路の詳細を明らかにすることを目的として、DR6 の細胞内領域に会合するタンパク質を酵母 two hybrid 法により検索した。その結果、これまでにアポトーシスや DR シグナルとの関与が報告されていないタンパク質である CLIPR-59 と DR6 の会合を見出した。哺乳類細胞を用いた共免疫沈降の結果から、哺乳類細胞においても DR6 は CLIPR-59 に対して、会合性を有する事が明らかとなった。更に、CLIPR-59 遺伝子発現は DR6 を介したアポトーシスを促進し、NF- κ B 活性化を抑制する事が明らかとなった。DR シグナルにおいて、NF- κ B の活性化はアポトーシスに対して抑制的に働く事が知られており、CLIPR-59 は少なくとも NF- κ B の活性化を抑える事により、アポトーシスを促進する事が考えられる。更に、CLIPR-59 の機能の詳細を明らかにするために、CLIPR-59 会合因子の探索を行ったところ、新たに DR シグナル関与因子である CYLD 及び ASK1 と CLIPR-59 の会合が見出された。CYLD は自身の TRAF タンパク質に対する脱ユビキチン修飾活性により、NF- κ B 活性化を抑制することが報告されている。CYLD 遺伝子特異的ノックダウンは DR6 を介した NF- κ B 活性化を促進し CYLD もまた、CLIPR-59 と同様、DR6 を介した NF- κ B 活性化を負に制御することが示唆された。また、

CYLD 遺伝子特異的ノックダウンは、DR6 シグナルにおいて、CLIPR-59 発現による NF- κ B 活性化抑制及び細胞死促進効果を抑制したことから、CYLD は CLIPR-59 の機能に重要な役割を担うと考えられる。一方、ASK1 の種々の変異体の CLIPR-59 への会合性を共免疫沈降法により検討したところ、CLIPR-59 は ASK1 の C 末端領域に会合し、興味深い事にこの会合は ASK1 の活性化により制御を受ける事が見出された。また、内因性 ASK1 が DR6 刺激により活性化されること、更に野生型 ASK1 の発現は CLIPR-59 と CYLD の会合を促進するが、不活性型 ASK1 の発現は効果を示さない事から、ASK1 は DR6 シグナルにおいて、CLIPR-59 と CYLD との会合の調節因子である可能性が示唆された。本研究の成果から、DR6 シグナルにおいて、ASK1-CLIPR-59-CYLD 複合体が NF- κ B 活性化を抑制し、アポトーシスを促進する可能性が示唆され、CLIPR-59 は DR6 シグナルの詳細を解明する上で、重要なターゲット分子であると結論づけた。発表にあたり、副査の藤田教授より CLIPR-59 の DR6 と TNF-R シグナルにおける機能の違いの可能性や疾患治療を目指した将来的な発展性について等の質問があった。次いで、副査の畠山鎮次教授より細胞膜蛋白可溶化の手技、CLIPR-59 の他のユビキチン修飾制御への関与、ASK1 活性化制御への CLIPR-59 の関与、CLIPR-59 の疾患に対する遺伝学的な考察等についての質問があった。最後に主査の上出教授より、正常細胞における DR6 と DR6 会合因子の結合証明、DR6 を介する NF- κ B 経路とカスパー経路のバランス制御における会合分子の役割についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自己のデータや、これまでの DR6 や CLIPR-59 に関する論文報告を引用し、適切な回答を行った。この論文は、TNF-R ファミリーの最も新しい構成分子である DR6 を介する細胞死の分子機序を明らかにした点で高く評価され、今後免疫疾患や癌の新規治療法の開発への応用が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。