

感染が誘起する

I型インターフェロン産生の分子機構

笹井 美和

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科

細胞増殖学講座（大阪府立成人病センター）

（北海道大学医学部医学研究科 感染症制御学分野）

（竹家 達夫 教授）

（瀬谷 司 教授）

2007年3月23日

所属 (主指導教員)	細胞増殖学講座 (竹家 達夫 教授)		
氏名	笹井 美和	提出	平成 18年 12月 25日
題目	感染が誘起する I 型インターフェロン産生の分子機構		

要旨

(研究背景) 感染症に対する生体防御反応の解明は、SARS や鳥型インフルエンザ等の新興性ウイルス蔓延の危機に曝されている人類にとって、急務である。生体においてウイルス感染が起こると、生体は炎症性サイトカインの産生など多くの免疫機構の活性化を促すと共に、I 型インターフェロンを産生しウイルスの増殖を抑制する。I 型インターフェロン産生を誘導する経路は、Toll 様受容体(Toll-like receptor; TLR)を介した膜レセプターからのシグナル伝達経路と、細胞質内受容体からのシグナル伝達経路に大別される。TLR は細菌や微生物に特異的に存在する構成成分を認識し、中でも核酸を認識する TLR3,TLR7,TLR8,TLR9 が I 型インターフェロン産生に関与する TLR であり、そのシグナル伝達機構は、TLR3 では当研究室で単離・同定された TIR-containing Adaptor Molecule (TICAM)-1 を、TLR7,TLR8,TLR9 では Myeloid differentiation (MyD)88 をそれぞれアダプター分子とし、異なるキナーゼ及び転写因子の活性化を促して、I 型インターフェロン産生を誘導する事が報告されている。しかし、これらのアダプター分子から転写因子までを繋ぐ分子機構に関しては未知であり、感染症に対する創薬開発の点においても、その詳細な分子機構の解明は非常に重要である。

(研究成果) TLR4 は核酸ではなくグラム陰性桿菌の細胞壁主成分であるリポ多糖を認識し、I 型インターフェロンである IFN-beta の産生を誘導する TLR である。新規アダプター分子、TIR-containing Adaptor Molecule (TICAM)-2、が当研究室で単離され、予備的実験から TICAM-2 が TLR4 を介した IFN-beta 産生経路のアダプター分子であると考え、詳細な解析を行った。その結果、TICAM-2 が TLR4 の細胞内領域に結合し、TLR3 のアダプター分子である TICAM-1 と TLR4 の橋渡しを行う事が明らかとなった。TLR4 を介した IFN-beta 産生は TICAM-2 を介して TICAM-1 へとシグナルが伝えられ、IFN-beta の転写に重要な役割を果たす転写因子、Interferon regulatory factor-3 (IRF-3)、の活性化を引き起こす事により誘導されている事を明確にし、TLR4 を介した IFN-beta 産生のシグナル伝達の根幹となる分子機構を解明した。

また、I kappa B kinase-epsilon (IKK-epsilon) / IKK-i と TANK-binding kinase-1 (TBK1) / NAK / T2K が、TICAM-1 の下流で IRF-3 をリン酸化し、IFN-beta の転写を誘導するキナーゼである事が近年報告され、TRAF family member-associated NF-kappa B activator (TANK)は TBK1 と IKK-epsilon の双方に相互作用を示す報告があった事から、TANK が TICAM-1 と TBK1 とを繋ぐ中間分子ではないかと世界的にも注目されていた。しかし、TANK は TICAM-1 とは相互作用を示さなかった事から別の分子を探索し、NAK-associated protein (NAP) 1 がその中間分子であると考え、解析を行った。免疫沈降法、レポータージーンアッセイ、RNAi 法等を用いた解析の結果、NAP1 は TICAM-1 と複合体を形成し、NAP1 ノックダウン細胞では TICAM-1 からの IFN-beta 産生が低下することから、NAP1 は TLR3/TLR4-TICAM-1 を介した IFN-beta 産生に寄与している事を明確にした。

ウイルスは宿主細胞内で複製を行う事から、ウイルス核酸の認知は細胞質で検知するのが最も迅速である。細胞質内に存在する二重鎖 RNA を認識し Type-I IFN を産生する分子として、RIG-I および MDA5 が報告された。Respiratory syncytial virus (RSV)感染による IFN-beta 産生経路を探索した結果、TLR3/4 を介したシグナル伝達機構に関与する分子として先に報告した NAP1 が細胞質内二重鎖 RNA 認識による IFN-beta 産生経路にも関与している事が示唆され、詳細な解析を行った。その結果、NAP1 は RIG-I 及び MDA5 とも相互作用を示し、RIG-I、MDA5、およびこれらの下流分子である IPS-1 を介した IFN-beta 産生に関与している事を明らかにした。また、RIG-I 依存的に IFN-beta 産生を誘導すると報告のある Vesicular stomatitis virus (VSV)感染においても、IFN-beta 産生における NAP1 の関与が示された。これらの結果から、NAP1 は TLR3 および TLR4 を介した IFN-beta 産生経路のみならず、RIG-I や MDA5 を介したウイルス感染時の IFN-beta 産生経路も仲介する、IFN-beta 産生のシグナル経路の集約に寄与する重要な分子である事が示唆された。

TICAM-1 は TLR を介したアダプター分子としては他のアダプター分子と比較すると 712 アミノ酸と非常に大きく、また、TICAM-1 とこれまで明らかとなっている IFN-beta 産生に関与する分子群との直接の結合は確認されていない事から、TICAM-1 と直接結合し、そのシグナル伝達機構に関与する未知の分子群が存在すると考えられた。TICAM-1 に結合する分子の単離・同定を目的とした酵母 Two-hybrid 法によるスクリーニングを行った結果、TICAM-1 の N 末端領域に結合する分子の中に Tumor necrosis factor-associated factor (TRAF)2 が含まれていた。TRAF2 はユビキチン連結酵素として 63 番目のリジンを介したポリユビキチン鎖を基質分子に付加し、シグナル伝達に関与する事が報告されている。TRAF2 による TICAM-1 のユビキチン化を検討した所、TRAF2 は TICAM-1 をユビキチン化する事が明らかとなり、TRAF2 による TICAM-1 のユビキチン化は、TLR3 を介した MAP キナーゼの活性化に重要な役割を果たしている可能性が示された。

## 略語表

AP-1	; activator protein 1
ATF-2	; activating transcription factor-2
CARD	; Caspase recruitment domain
EBV	; Epstein-Barr Virus
FADD	; Fas-associated death domain
I-TRAF	; TRAF-interacting protein
IFN	; Interferon
IKK- $\epsilon$	; I $\kappa$ B kinase
IKK- $\iota$	; Inducible I $\kappa$ B kinase
IPS-1	; Interferon- $\beta$ promoter stimulator 1
IRAK	; IL-1 receptor-associated kinase
IRF-3	; Interferon regulatory factor -3
LPS	; Lipopolysaccharide
MAPK	; Mitogen-associated protein kinase
Mal	; MyD88-adaptor-like
MAVS	; mitochondria antiviral signaling
MDA5	; melanoma differentiation associated gene 5
MyD88	; myeloid differentiation 88
NAK	; NF- $\kappa$ B-activating kinase
NAP1	; NAK-associated protein 1
NDV	; Newcastle disease virus
NF- $\kappa$ B	; Nuclear factor $\kappa$ B
PAMP	; Pathogen-associated molecular pattern
RIG-I	; Retinoic acid inducible gene I
RIP1	; Receptor interacting protein 1
RSV	; Respiratory syncytial virus
SV	; Sendai virus
T2K	; TRAF2-associated kinase
TANK	; TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator

TBK1 ; TANK-binding kinase-1  
TICAM ; TIR domain containing adaptor molecule  
TIR ; Toll/IL-1 receptor homology  
TIRAP ; Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein  
TLR ; Toll-like receptor  
TNF ; Tumor necrosis factor  
TRADD ; TNF receptor-associated death domain protein  
TRAF ; Tumor necrosis factor-associated factor  
TRAM ; TRIF-related adaptor molecule  
TRIF ; TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$   
polyI:C ; polyriboinosinic : polyribocytidylic acid  
VSV ; Vesicular stomatitis virus

## 目次

序章	1
材料と方法	9
実験材料	9
実験方法	11
第一章 TLR4 を介した IFN- $\beta$ 産生の分子機構	20
1-1 TICAM-2 と TLR4 との結合	
1-2 TICAM-1 による IFN- $\beta$ promoter 活性化への TICAM-2 の影響	
1-3 TICAM-2 を介した IRF-3 の活性化	
1-4 TICAM-1/TICAM-2 ノックダウン細胞での IRF-3 の活性化	
考察	25
第二章 TICAM-1 の下流での IFN- $\beta$ 転写誘導の分子機構	36
2-1 TICAM-1 と TBK1、TANK の結合	
2-2 TICAM-1 と TANK との哺乳類細胞内での結合	
2-3 NAP1 と TICAM-1 との結合	
2-4 TICAM-1 による IFN- $\beta$ promoter 活性化への NAP1 の関与	
2-5 TICAM-1 による AP-1、NF- $\kappa$ B 活性化への NAP1 の関与	
2-6 TICAM-1 による IRF-3 活性化への NAP1 の関与	
2-7 リガンド刺激による IRF-3 活性化への NAP1 の関与	
2-8 リガンド刺激による NF- $\kappa$ B 活性化への NAP1 の関与	
2-9 NAP1 ノックダウン細胞での TLR3 を介した IFN- $\beta$ 産生について	
2-10 TBK1 および IKK $\epsilon$ による NAP1 のリン酸化	
考察	44
第三章 ウイルス感染による IFN- $\beta$ 産生における NAP1 の関与	60
3-1 RSV 感染による IFN- $\beta$ 産生経路の同定	
3-2 RIG-I 及び MDA5 と NAP1 との相互作用	
3-3 RIG-I 及び MDA5 を介したシグナル伝達経路への NAP1 の関与	
3-4 IPS-1 を介したシグナル伝達経路への NAP1 の関与と相互作用	
3-5 IPS-1 と NAP1 の局在	
3-6 細胞質内二重鎖 RNA 認識による IFN- $\beta$ 産生経路への NAP1 DN の影響	

3-7 NAP1 ノックダウン細胞における VSV 感染による IFN- $\beta$ 誘導	
3-8 RIG-I、MDA5、IPS-1 による NF- $\kappa$ B 活性化への TBK1、IKK $\epsilon$ の関与	
考察	68
第四章 TICAM-1 に結合する分子の単離・同定	83
4-1 TICAM-1 全長を Bait としたスクリーニング条件の検討	
4-2 TICAM-1 の断片化とスクリーニング条件の検討	
4-3 N 末端領域コンストラクト S1 を用いたスクリーニング	
4-4 N 末端領域に結合する分子 TRAF1/TRAF2 の特徴	
4-5 TICAM-1 にある BS69 結合 motif	
考察	87
第五章 TICAM-1 に結合する TRAF family 分子の機能解析	95
5-1 TICAM-1 と TRAF1、TRAF2、TRAF6 の哺乳類細胞内での相互作用	
5-2 TRAF2 及び TRAF6 と TICAM-1 の結合領域の同定	
5-3 TRAF2 による TICAM-1 のユビキチン化	
5-4 TICAM-1 における TRAF2 結合部位の同定	
5-5 TICAM-1 変異体と TRAF2 との哺乳細胞内での結合	
5-6 TRAF 結合変異体による TICAM-1 のシグナル伝達への影響	
5-7 TICAM-1 を介したシグナル伝達経路への TRAF2/TRAF6 の影響	
5-8 TICAM-1N 末端領域と TRAF3 の結合	
考察	104
第六章 TICAM-1 活性化機構の解明とリン酸化の意義	122
6-1 TBK1 及び IKK $\epsilon$ による TICAM-1 のリン酸化	
6-2 TICAM-1 リン酸化と IFN- $\beta$ promoter 活性化との相関	
6-3 TICAM-1 同士の結合による TICAM-1 のリン酸化	
6-4 TICAM-1 同士の結合部位の同定	
6-5 TIR domain を介した TICAM-1 同士の結合部位の同定	
6-6 C 末端領域を介した TICAM-1 同士の結合部位	
考察	128
終章	141
謝辞	143

## 〈 序章 〉

異物を認識する事は生体防御の第一の要であり、免疫系がその大半を担っている。免疫系は全ての生物に存在する自然免疫と、魚類以上の高等生物に存在する獲得免疫に大別される。獲得免疫は、リンパ球や抗体を中心とした免疫系であり、抗原レセプターは、後天的に遺伝子の再構成を行う事によって、多様な異物ペプチドを認識する。これに対し、自然免疫は遺伝子の再構成を行わず、微生物に共通する構造を認識するパターン認識受容体などによって異物を認識する。興味深い事に、この自然免疫系は、ショウジョウバエからヒトまで存在する事から、生物に普遍的に存在する生体防御機構と考えられている。

ショウジョウバエがカビなどの真菌感染に応答し、抗真菌ペプチドを産生するのに必須の受容体として、Toll、が報告され(1)、Toll のヒトホモログとして Toll like receptor (TLR)が単離された。ヒトでは現在までに 10 種類が報告されており、TLR family と総称される(2-4)。TLR は I 型の膜タンパク質であり、細胞外領域にロイシンに富んだ領域を、細胞内領域に Toll/IL-1 receptor (TIR) homology domain を共通で有しており、細菌やウイルスに特異的に存在する構成成分、pathogen-associated molecular pattern (PAMP)、を認識する。TLR family はその細胞外領域でそれぞれの PAMP を認識する事により様々な転写因子を活性化し、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12p40 などの炎症性サイトカインの産生を誘導する。また、TLR は獲得免疫の活性化に必須である補助刺激分子およびサイトカインの発現も誘導するため(5, 6)、獲得免疫の活性化にも必須の分子であると考えられる(7, 8)。そのため、TLR による PAMP の認識と獲得免疫の関係が近年非常に注目されている。

TLR とリガンドは非常に高い特異性があり、各 TLR が認識するリガンドは徐々に解明されつつある。代表的なものとして、TLR2 はグラム陽性菌の peptidoglycan (PGN)を(9-14)、TLR3 はウイルス二重鎖 RNA (dsRNA)を(15, 16)、TLR4 はグラム陰性菌の細胞壁構成成分の Lipopolysaccharide (LPS)を(17)、TLR5 は細菌の鞭毛構成成分である flagellin を(18)、TLR7、TLR8 は抗ウイルス剤であるイミダゾキノリン誘導体(19, 20)とウイルス由来の一本鎖 RNA を(21, 22)、TLR9 は細菌由来の CpG モチーフを含む非メチル化 DNA を(20)、それぞれ認識する。また、TLR1 と TLR2 はヘテロダイマーを形成する事により細菌のリポタンパク質を(10, 23, 24)、TLR2 と TLR6 はヘテロダイマーを形成する事によりマイコプラズマ由来リポペプチドを(23, 25)、それぞれ認識する。各 TLR はリガンドの種類により、ウイルス認識に関与する TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9、細菌認識に関与する TLR1, TLR2,



TLR4, TLR5, TLR6, TLR9 に大別することができる。ウイルス認識に関与する TLR は、それぞれのリガンドを認識すると、炎症性サイトカイン産生などを誘導するのに加え、抗ウイルス作用を示すサイトカインである Type-I interferon (IFN) (IFN- $\alpha/\beta$ )の産生も誘導する(20, 26, 27)。

TLR family を介したシグナル伝達の多くは、TIR domain を持つアダプター分子である Myeloid differentiation 88 (MyD88)を介して引き起こされる事が明らかとなっている。MyD88 は TIR domain と Death domain を有しており、これらの domain を介して他の分子と相互作用を示す。TLR の細胞外領域によって各リガンドが認識されると、細胞内領域の TIR domain に MyD88 がリクルートされ TIR domain 同士で結合する。MyD88 の Death Domain から IL-1 receptor-associated kinase (IRAK)-1 と IRAK-4 を介し、Tumor necrosis factor-associated factor (TRAF) 6 が活性化され、最終的に NF- $\kappa$ B、MAP キナーゼ等が活性化される(28)。しかし、培養細胞を用いた MyD88 ドミナントネガティブ体の解析及び MyD88 ノックアウトマウスを用いた解析により、TLR3,TLR4 を介した IFN- $\beta$ の産生、IFN 誘導性遺伝子群の発現、樹状細胞における CD40,CD80,CD86 といった共刺激分子などの発現増強は、MyD88 非依存的に引き起こされる事が明らかとなり(15, 25, 29)、第二のアダプター分子、MyD88-adaptor-like (Mal) / TIR domain-containing adaptor protein (TIRAP)が報告された(30, 31)。Mal/TIRAP は MyD88 と同様、TIR domain を有しており、TLR4 の TIR domain と結合する事、細胞レベルでの解析の結果より、Mal/TIRAP は TLR4 を介した MyD88 非依存的経路に関与する分子だと思われた。しかし、Mal/TIRAP ノックアウトマウスを用いた生体レベルでの解析の結果、TLR4 を介した IFN 誘導性遺伝子群の発現、樹状細胞における共刺激分子の発現増強等はノックアウトマウスでは変化は見られなかった(32, 33)。この事から、Mal は TLR4 を介した MyD88 非依存的経路を担うアダプター分子ではない事が示された。つまり、さらに別のアダプター分子の存在が示唆され、第三のアダプター分子、TIR domain containing adaptor molecule (TICAM)-1 / TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$  (TRIF)が報告された(34, 35)。TICAM-1 は MyD88 と同様、TIR domain を有しており、TLR3 の TIR domain と結合する分子として Yeast two-hybrid 法を用いて当研究室で単離・同定された。細胞レベルでの解析の結果、TICAM-1 は TLR3 を介した MyD88 非依存、特に Type-I IFN 産生経路を担うアダプター分子である事が示され、この事は生体レベルの解析の結果からも証明されている(36, 37)。しかし TLR4 を介した IFN- $\beta$ 産生は TICAM-1 依存的である事が示されていたにも関わらず(36)、TLR4 と TICAM-1 とは結合せず、さらなる分子の存在が浮上した。そして第四のアダプター分子 TICAM-2 / TRIF-related adaptor molecule (TRAM)が報告された(38, 39)。TICAM-2 の詳細な作用機序については第一章で述べる。

TLR3/TLR4 以外の type-I IFN 産生する TLR7/TLR8/TLR9 は、type-I IFN 産生を含むシグナル伝達の全ては MyD88 依存的である事が報告されていたが、詳細な分子機構については不明であった(20, 26)。その後の解析の結果、TLR7/TLR8/TLR9 を介した Type-I IFN 産生は MyD88 から IRAK1、TRAF6 へとシグナルが伝達され IRF-7 が活性化される事によって誘導される事が報告されるなど(40, 41)、TLR を介したシグナル伝達は世界的にも非常に活発に研究がなされ、TLR の発見から 10 年に満たない期間で非常に多くの事が明らかとなっている(3, 4, 42)。TLR を介した防御機構の解明が進むにつれ、TLR 非依存的な Type-I IFN 産生経路の存在が示唆された。ウイルス感染によって作られる細胞質内二重鎖 RNA を認識し、type-I IFN 産生を行う分子として Retinoic acid inducible gene I (RIG-I) と Melanoma differentiation associated gene 5 (MDA5)が報告された(43-46)。

TLR3 の細胞内領域に結合する分子として当研究室で単離・同定された TICAM-1 は IFN- $\beta$ の転写を顕著に誘導するが、IFN- $\beta$ の転写誘導には三種の転写因子、NF- $\kappa$ B、ATF-2/c-Jun (AP-1)、IRF-3 が関与している事が報告されている(47)。NF- $\kappa$ B、AP-1 は MyD88、Mal / TIRAP によっても TICAM-1 と同様に活性化されるのに対し IFN- $\beta$ の転写誘導は引き起こさない事(30, 35)、TLR4 を介した IFN- $\beta$ 産生は IRF-3 ノックアウトマウスでは誘導されない事を考慮すると(48)、TICAM-1 を介した IFN- $\beta$ 産生に IRF-3 が必須である事がわかる。

本研究では、TICAM-1 を介した IFN- $\beta$ 産生の分子機構において、IRF-3 活性化の分子機構を中心に解析を行い幾つかの新しい知見を示す事ができた。第一章では TLR4 を介した IFN- $\beta$ 産生に関与する分子-TICAM-2-の IRF-3 活性化機構の同定、第二章では TICAM-1 を介した IRF-3 活性化に関与する分子の同定、第三章ではウイルス感染による IRF-3 活性化機構について、第四章では TICAM-1 に結合する分子の同定、第五章では TICAM-1 に結合する分子 TRAF family の機能的意義、第六章では TICAM-1 活性化の機構とリン酸化について、それぞれ得られた知見を報告する。

< 文献 >

1. Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
2. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
3. Takeda, K., and S. Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17:1-14.
4. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335-376.
5. Hertz, C. J., S. M. Kiertscher, P. J. Godowski, D. A. Bouis, M. V. Norgard, M. D. Roth, and R. L. Modlin. 2001. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 166:2444-2450.
6. Re, F., and J. L. Strominger. 2001. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem* 276:37692-37699.
7. Schnare, M., G. M. Barton, A. C. Holt, K. Takeda, S. Akira, and R. Medzhitov. 2001. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2:947-950.
8. Hashimoto, C., K. L. Hudson, and K. V. Anderson. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52:269-279.
9. Schwandner, R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe, and C. J. Kirschning. 1999. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 274:17406-17409.
10. Takeuchi, O., A. Kaufmann, K. Grote, T. Kawai, K. Hoshino, M. Morr, P. F. Muhlradt, and S. Akira. 2000. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 164:554-557.
11. Nishiguchi, M., M. Matsumoto, T. Takao, M. Hoshino, Y. Shimonishi, S. Tsuji, N. A. Begum, O. Takeuchi, S. Akira, K. Toyoshima, and T. Seya. 2001. *Mycoplasma fermentans* lipoprotein M161Ag-induced cell activation is mediated by Toll-like receptor 2: role of N-terminal hydrophobic portion in its multiple functions. *J*

*Immunol 166:2610-2616.*

12. Underhill, D. M., A. Ozinsky, A. M. Hajjar, A. Stevens, C. B. Wilson, M. Bassetti, and A. Aderem. 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature 401:811-815.*
13. Hirschfeld, M., C. J. Kirschning, R. Schwandner, H. Wesche, J. H. Weis, R. M. Wooten, and J. J. Weis. 1999. Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J Immunol 163:2382-2386.*
14. Lien, E., T. J. Sellati, A. Yoshimura, T. H. Flo, G. Rawadi, R. W. Finberg, J. D. Carroll, T. Espevik, R. R. Ingalls, J. D. Radolf, and D. T. Golenbock. 1999. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem 274:33419-33425.*
15. Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature 413:732-738.*
16. Matsumoto, M., S. Kikkawa, M. Kohase, K. Miyake, and T. Seya. 2002. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun 293:1364-1369.*
17. Chow, J. C., D. W. Young, D. T. Golenbock, W. J. Christ, and F. Gusovsky. 1999. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem 274:10689-10692.*
18. Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, and A. Aderem. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature 410:1099-1103.*
19. Heil, F., P. Ahmad-Nejad, H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, T. Gellert, H. Dietrich, G. Lipford, K. Takeda, S. Akira, H. Wagner, and S. Bauer. 2003. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol 33:2987-2997.*
20. Hemmi, H., T. Kaisho, K. Takeda, and S. Akira. 2003. The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J Immunol 170:3059-3064.*
21. Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner, and S. Bauer. 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science 303:1526-1529.*

22. Diebold, S. S., T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira, and C. Reis e Sousa. 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303:1529-1531.
23. Hajjar, A. M., D. S. O'Mahony, A. Ozinsky, D. M. Underhill, A. Aderem, S. J. Klebanoff, and C. B. Wilson. 2001. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol* 166:15-19.
24. Alexopoulou, L., V. Thomas, M. Schnare, Y. Lobet, J. Anguita, R. T. Schoen, R. Medzhitov, E. Fikrig, and R. A. Flavell. 2002. Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nat Med* 8:878-884.
25. Kaisho, T., O. Takeuchi, T. Kawai, K. Hoshino, and S. Akira. 2001. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol* 166:5688-5694.
26. Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3:196-200.
27. Doyle, S., S. Vaidya, R. O'Connell, H. Dadgostar, P. Dempsey, T. Wu, G. Rao, R. Sun, M. Haberland, R. Modlin, and G. Cheng. 2002. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity* 17:251-263.
28. Janssens, S., and R. Beyaert. 2002. A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends Biochem Sci* 27:474-482.
29. Kawai, T., O. Takeuchi, T. Fujita, J. Inoue, P. F. Muhlradt, S. Sato, K. Hoshino, S. Akira, and T. Kaisho. 2001. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 167:5887-5894.
30. Fitzgerald, K. A., E. M. Palsson-McDermott, A. G. Bowie, C. A. Jefferies, A. S. Mansell, G. Brady, E. Brint, A. Dunne, P. Gray, M. T. Harte, D. McMurray, D. E. Smith, J. E. Sims, T. A. Bird, and L. A. O'Neill. 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413:78-83.
31. Horng, T., G. M. Barton, and R. Medzhitov. 2001. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2:835-841.
32. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, H. Sanjo, S. Uematsu, T. Kaisho, K. Hoshino, O. Takeuchi, M. Kobayashi, T. Fujita, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*

- 420:324-329.
33. Horng, T., G. M. Barton, R. A. Flavell, and R. Medzhitov. 2002. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 420:329-333.
  34. Yamamoto, M., S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 169:6668-6672.
  35. Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, and T. Seya. 2003. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 4:161-167.
  36. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640-643.
  37. Hoebe, K., X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabet, S. O. Kim, J. Goode, P. Lin, N. Mann, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, J. Han, and B. Beutler. 2003. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424:743-748.
  38. Fitzgerald, K. A., D. C. Rowe, B. J. Barnes, D. R. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, B. Monks, P. M. Pitha, and D. T. Golenbock. 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 198:1043-1055.
  39. Oshiumi, H., M. Sasai, K. Shida, T. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya. 2003. TIR-containing Adapter Molecule (TICAM)-2, a Bridging Adapter Recruiting to Toll-like Receptor 4 TICAM-1 That Induces Interferon- $\beta$ . *J Biol Chem* 278:49751-49762.
  40. Kawai, T., S. Sato, K. J. Ishii, C. Coban, H. Hemmi, M. Yamamoto, K. Terai, M. Matsuda, J. Inoue, S. Uematsu, O. Takeuchi, and S. Akira. 2004. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* 5:1061-1068.
  41. Uematsu, S., S. Sato, M. Yamamoto, T. Hirotani, H. Kato, F. Takeshita, M. Matsuda, C. Coban, K. J. Ishii, T. Kawai, O. Takeuchi, and S. Akira. 2005. Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- $\alpha$  induction. *J Exp Med* 201:915-923.
  42. O'Neill, L. A. 2006. How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Curr Opin Immunol* 18:3-9.

43. Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, and T. Fujita. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5:730-737.
44. Yoneyama, M., M. Kikuchi, K. Matsumoto, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, E. Foy, Y. M. Loo, M. Gale, Jr., S. Akira, S. Yonehara, A. Kato, and T. Fujita. 2005. Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. *J Immunol* 175:2851-2858.
45. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.
46. Hornung, V., J. Ellegast, S. Kim, K. Brzozka, A. Jung, H. Kato, H. Poeck, S. Akira, K. K. Conzelmann, M. Schlee, S. Endres, and G. Hartmann. 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314:994-997.
47. Maniatis, T., J. V. Falvo, T. H. Kim, T. K. Kim, C. H. Lin, B. S. Parekh, and M. G. Wathel. 1998. Structure and function of the interferon-beta enhanceosome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63:609-620.
48. Honda, K., S. Sakaguchi, C. Nakajima, A. Watanabe, H. Yanai, M. Matsumoto, T. Ohteki, T. Kaisho, A. Takaoka, S. Akira, T. Seya, and T. Taniguchi. 2003. Selective contribution of IFN- $\alpha$ / $\beta$  signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10872-10877.

## 〈 材料と方法 〉

### 1. 実験材料

#### 1-1 細胞

##### 溶液及び緩衝液の組成

PBS	137 mM NaCl, 8.10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Trypsin 液	0.25% (w/v) trypsin, 10 mM EDTA, solved by PBS

##### HEK293 細胞／293FT 細胞／Vero 細胞／Hep2 細胞

ヒト腎由来 293 細胞株は住友製薬より供与された。サル腎由来 Vero 細胞株およびヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞株の亜種である Hep2 細胞株は RIKEN BRC Cell Bank (RIKEN, Japan)より購入した。293 細胞および Vero 細胞は 10%(v/v)非働化ウシ胎児血清 ; FCS (Bio-WHITAKER, Walkersville, MD 及び JRH Biosciences)、100 U/ml penicillin G (GIBCO-Invitrogen, Rockville, MD)、100 µg/ml streptomycin (GIBCO-Invitrogen)を含む Dulbecco's modified Eagle's Medium (1 g/L, glucose. DMEM, GIBCO-Invitrogen)を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。細胞の回収には Trypsin 液を用いた。細胞の継代は、細胞が confluent になり次第行った。293FT 細胞は Invitrogen 社のレンチウイルス発現システムに付属されていたもので、10 %(v/v)非働化ウシ胎児血清、293 細胞と等量の Penicillin G / Streptomycin を含む DMEM (4.5 g/L, glucose. DMEM) を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。

##### RAW264.7 細胞

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 は、Japanese Cancer Research Resources Bank より購入した。培養は、10 % FCS、100 U/ml penicillin G、100 µg/ml streptomycin (GIBCO-Invitrogen)を含む RPMI 1640(GIBCO-Invitrogen)を



用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。細胞の回収は 0.02% EDTA を含む PBS を用いた。細胞の継代は、細胞がコンフルエントになり次第行った。

### HeLa 細胞と L929 細胞

ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞は、京都大学ウイルス研究所の藤田尚志教授より供与された。マウス繊維芽細胞株 L929 細胞は RIKEN BRC Cell Bank (RIKEN, Japan)より購入した。培養は 10% FCS、L-glutamine 2 mM(GIBCO)を含む Eagle's MEM (Nissui, Japan)を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。細胞の回収には Trypsin 液を用いた。細胞の継代は、細胞が confluent になり次第行った。

## 1-2 各遺伝子の Accession Number と発現ベクター

### ベクター

Yeast ; pGBKT7 (Clontech)、pGBD-C1(1)、  
pGADT7 (Clontech )

哺乳細胞用 ; pEF-BOS(2)  
pCDNA3.1 (名古屋市立大学中西真教授より供与)

### Accession Number

TICAM-1	; AB086380	NAP1	; AY151386
TICAM-2	; NM_021649	TRAF1	; BC021138
TLR4	; NM_138554	TRAF2	; NM_021138
TIRAP/Mal	; AF378129	TRAF6	; NM_145803
MyD88	; NM_002468	RIG-I	; AL161783
TBK1	; AF174536	MDA5	; NM_022168
IKKe	; AB016590	IPS-1	; BC044952
TANK	; NM_004180		

### 1-3 リガンドの調製

LPS は DIFCO 社より購入し、PBS で 1 mg/ml に調製して、フィルター滅菌して用いた。Poly(I:C)は、Amersham Biosciences Biotech 社より購入し、10 µg/ml となるよう調製して用いた。また、RAW264.7 細胞を poly(I:C)刺激する際は、polymyxin B (Sigma-Aldrich) 処理してから用いた。polymyxin B 処理は、付属のプロトコールに従って行った。

### 1-4 トランスフェクション試薬

HEK293 細胞および HEK293FT 細胞にトランスフェクションを行う際は Lipofect AMINE 2000 reagent (Invitrogen Life Technology) を、HeLa 細胞にトランスフェクションを行う際は Lipofect AMINE Plus reagent (Invitrogen Life Technology) を、RAW264.7 細胞にトランスフェクションを行う際は FuGENE6 (Roche) を、それぞれ付属のプロトコールに従って使用した。

### 1-5 ウイルスの調製

Respiratory syncytial virus (臨床分離株 RSV2177 subgroup B)は和歌山県環境衛生研究センターの今井博士より供与された(3)。RSV は Hep-2 細胞を用いて培養し、そのウイルス titer は Hep-2 細胞を用いた TCID<sub>50</sub> で決定した。RSV は非常に titer の低いウイルスであるため、実験に用いる際には超遠心機を用いてウイルス液を濃縮する必要があった。そのため RSV を増やす際にウイルスを感染させていない Hep-2 細胞も作製し、上清を濃縮して Mock として各実験のコントロールとして使用した。

Vesicular stomatitis virus (VSV)は Indiana 株を使用し、L929 細胞を用いて培養し、ウイルス titer は Vero 細胞を用いた plaque assay で決定した。

## 2. 実験方法

### 2-1 Yeast two-hybrid 法

酵母は AH109 株を使用し、Prey Vector としては pGADT7 (Clontech, USA) を使用し、Bait Vector としては、pGBKT7(Clontech)と pGBD-C1 (1)を、Bait として用いる断片に応じて使用した。酵母へのトランスフォーメーションは、MATCHMAKER Gal4 Two-hybrid System3 (Clontech)の付属プロトコールを一部改変して行った。cDNA library はヒト肺由来のものを、Carrier DNA はサケ精子由来のものを使用した(Clontech)。SD-WLHA は Yeast synthetic dextrose medium から Trp, Leu, His, Ade のアミノ酸と塩基を抜いたものを表し、SD-WLH は同培地から Trp, Leu, His のアミノ酸を抜いたものを表している。また、3-amino-1,2,4-triazole (3-AT ; Sigma)は実験により各選択条件の培地中に添加して使用した。

## 2-2 ルシフェラーゼレポータージーンアッセイ

HEK293 細胞 (24 well plate)に、LipofectAMINE 2000 reagent (Invitrogen)を用いてトランスフェクションを行った。発現プラスミド量は各実験条件に従い、最終 DNA 量が 0.8  $\mu$ g となる様に empty / pEF-BOS を加えた。使用したレポータージーンは IFN- $\beta$  promoter (東京大学 谷口維紹先生より供与)、NF- $\kappa$ B (Stratagene)、AP-1 (Stratagene)、IRF-3 activation (京都大学 藤田尚志先生より供与)のそれぞれを実験に応じて使用した。トランスフェクションの条件は付属のプロトコールに従った。内部コントロールとしては、第一章では  $\beta$ -Galactosidase を、第二章以降では Renilla luciferase を用いた。トランスフェクションの 24 時間後に細胞を回収した。リガンド刺激を行った際は、トランスフェクションの 24 時間後に各リガンドを含む培地と交換し、6 時間刺激した。第一章では、PicaGene (東洋インキ社) と  $\beta$ -Galactosidase Enzyme Assay System (Promega)を、第二章以降では Dual-Luciferase reporter gene assay system (Promega)をそれぞれ用い、各プロトコールに従って解析を行った。各実験は一条件 3well で行い、その平均値を標準偏差を付けて示した。

## 2-3 免疫沈降法

### 溶液及び緩衝液の組成

Lysis buffer	50 mM HEPES (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 7.4), 10% (v/v) glycerol, 0.5% (v/v) NP-
--------------	---

40, 30 mM NaF, 5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 20 mM IAA, 2 mM PMSF.

## 抗体

### 一次抗体

- anti – HA ; rabbit pAb (Sigma)
- anti – c-Myc ; (Westren blot) rabbit pAb (Santa Cruz)  
(Immunofluoresce) mouse IgG mAb (BabCO, CA)  
(IP) mouse IgG mAb (NeoMarkers,CA)
- anti- Flag ; M2, mouse IgG mAb (Sigma), rabbit pAb (Sigma)
- anti-IRF-3 ; anti-IRF3 rabbit IgG (Amersham Biosciences and IBL)
- anti-TRAF2 ; anti TRAR2(H-249) rabbit pAb (Santa Cruz)
- anti-TRAF6 ; anti-TRAF6(D-10) mouse mAb (Santa Cruz)
- anti-β-actin ; anti-b-actin mouse mAb (Sigma)
- anti-p-JNK ; Phospho-pJNK rabbit pAb #9251S (Cell Signaling)
- anti-p-P38 ; Phospho-p38 rabbit pAb #9211S (Cell Signaling)
- anti-P38 ; p38 rabbit pAb #9212 (Cell Signaling)
- anit-NAP1 ; anti-NAP1 mouse mAb (名古屋市立大学 中西真先生より分与)
- anti-RIG-I ; anti-RIG-I rabbit pAb (京都大学 藤田尚志先生より分与)
- anti-TICAM-1 ; anit-TICAM-1 rabbit pAb (当研究室で作製)

### 二次抗体

- HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (PharMingen, San Diego ,CA)
- HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (PharMingen)

## サンプルの調製

HEK293 細胞 (60 mm dish / confluent 又は 6 well plate / confluent)に、LipofectAMINE 2000 reagent (Invitrogen)を用いて、トランスフェクションを行った。発現プラスミド量は各実験条件に従い、最終 DNA 量が 7 μg または 4 μg となるよう empty / pEF-BOS を加えた。トランスフェクションの条件は付属のプロトコールに従った。トランスフェクトの 24 時間後、回収した細胞を 300 μl または 150 μl の lysis buffer で懸濁し、氷上で 30 分間放置した。4℃、15,000

rpm、20 分の遠心の後、得られた上清を 50  $\mu$ l または 15  $\mu$ l 取り出し、残りを Lysis Buffer で洗浄しておいた Protein G Sepharose (Amersham Pharmacia) 10  $\mu$ l に加えた。4°C、1 時間の転倒混和後、4°C、5,000 rpm で 30 秒遠心した。上清を別の tube に移し、各実験で用いた抗体を加え、4°C で 2 時間転倒混和した。全量を新しい洗浄済みの Protein G Sepharose 20  $\mu$ l に加え、一晩転倒混和した。Lysis Buffer で 3 回洗浄後、20  $\mu$ l の 2 x Sample Buffer を加え、5 分間煮沸して免疫吸着物を溶出した。4°C、10,000 rpm、30 秒の遠心後、得られたサンプルを SDS-PAGE で分離し、各条件の抗体を用いて、Western blot により解析した。

## 2-4 Western blot

### 溶液及び緩衝液の組成

#### < SDS-PAGE >

Running buffer	25 mM Tris, 0.19 M glycine, 0.1% SDS
Sample buffer (4X)	0.2 M Tris-HCl (pH 6.8), 40% (v/v) glycerol, 8% (w/v) SDS, BPB

#### < Western Blot >

Anode 1 buffer	0.3 M Tris-HCl, 20% methanol, pH 10.4
Anode 2 buffer	25 mM Tris-HCl, 20% methanol, pH 10.4
Cathode buffer	25 mM Tris-HCl, 40 mM glycine, 20% methanol, pH 9.4
Washing buffer	0.1% (v/v) Tween20, 0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)
Blocking buffer	10% skimmed milk (雪印乳業) solved by washing buffer

### Western blot 解析

SDS-PAGE 後、ゲルから PVDF 膜 (MILLIPORE, Bedford, MA) へのタンパク質の転写は以下の方法で行った。まず始めに、ゲル (6.5×5cm) を cathode buffer 中で 10 分間振とうした。また同時に PVDF 膜をメタノールによる励起後、anode buffer 2 中で 5 分間振とうした。振とう終了後、転写装置の陽極側から順に、anode buffer 1 を浸した 3 mm 紙 2 枚、anode buffer 2 を浸した 3MM

紙1枚、同 buffer で平衡化した PVDF 膜1枚、cathode buffer に浸したゲル、最後に同 buffer を浸した 3MM 紙4枚を重ね、90 mA で90分間通電した。転写後、膜を blocking buffer で90分反応させた。washing buffer で wash した後、任意の一次抗体および HRP 標識された二次抗体により反応を行い、ECL 試薬 (Amersham Pharmacia) により検出を行った。

## 2-5 タンパク質の精製

*In vitro* ubiquitination assay を行うのに必要なタンパク質を pET system (Novagen)を用いて作製した。TRAF2 および TICAM-1 はサブクローニングを行い pET20a に組み込んだ。E1 と二種類の E2 の組み込まれた pET 発現ベクターは北海道大学畠山鎮次先生より供与された。全て His タグ付加の状態が発現するようにした。各タンパク質の pET ベクターを大腸菌 BL21 (DE3) pLysS Rosetta 株に発現させ、Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG)でタンパク質の発現を誘導した後、ソニケーションにより大腸菌を破碎して Ni-NTA カラムを用いてタンパク質を精製した。すべてのタンパク質は3クローンずつタンパク質発現量を確認し、最も発現量の多いクローンを用いた。また、タンパク質の種類によって培養温度および IPTG 誘導時間を調節した。ユビキチンタンパク質は北海道大学畠山鎮次先生より供与された。各タンパク質は20%グリセロールを加えて-80°Cで保存した。

## 2-6 *In vitro* ubiquitination assay

精製した各タンパク質に反応 Buffer (30 mM HEPES (pH 7.5), 2 mM ATP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM Dithiothreitol, 1 mM creatine phosphate, 10 U/20  $\mu$ l Phosphocreatine kinase, 10 mM Phosphocreatine)を加え、30 °Cで12時間反応させた。まず E1、E2、ユビキチンタンパク質と反応 Buffer のみで効率よくユビキチン鎖が形成される各タンパク質濃度を探り、その条件下に E3 および基質である TICAM-1 を添加した。ユビキチン化が起こる際に必要なタンパク質から一種ずつ欠損させたもの、および 30°Cの反応を行わなかったものを

コントロールとした。*In vitro* でユビキチン化反応をさせた後、ウエスタンブロットティングを行った。

## 2-7 Native PAGE

HeLa 細胞 または 293 細胞を 6 well plate に翌日コンフルエントになるように播種した。HeLa 細胞では、poly (I:C) 10  $\mu\text{g/ml}$  で一時間刺激または VSV(MOI 10)感染を 8 時間行った後、細胞をセルスクレーパーで回収した。細胞は Native PAGE 用の Lysis Buffer (50 mM Tris (pH8.0), 1% NP-40, 150 mM NaCl, 100  $\mu\text{g/ml}$  Leupeotin, 1mM PMSF, 5 mM orthovanadate) で可溶化した。Native PAGE 用のゲルは第一化学より購入した。Native PAGE の手法は下の二報に従った(4, 5)。ウエスタンブロットティングを行った後、IRF-3 の単量体と二量体を両方検出できる抗体 (anti-IRF3 rabbit IgG (Amersham Biosciences and IBL)) を用いて検出した。

## 2-8 共焦点レーザー顕微鏡

Washing buffer	3 % BSA in PBS
0.5% Saponin	solved by washing buffer

HeLa 細胞 ( $1.5 \times 10^5$  cells / well)を poly-L-lysine コートしたカバーガラスの入った 24 well plate に播種し、細胞がカバーガラスに付着したら各条件のプラスミドを導入した。導入の 24 時間後に PBS で二回洗い、3 %パラホルムアルデヒドで 30 分間固定した。0.5 % Saponin 液で室温 30 分間反応させ細胞膜透過性を上げた後、強制発現させた分子に合わせて一次抗体を室温 1 時間反応させた。Washing buffer で三回洗った後、反応させた一次抗体に適した二次抗体 (Alexa Fluor 488 monoclonal または polyclonal か、Alexa Fluor 594 polyclonal Abs (Molecular Probes)) で室温 30 分間反応させた。3% BSA で 3 回洗った後、スライドガラス上にマウントし、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析を行った。MitoTracker (Molecular Probes, Netherlands)を反応させた場

合は、プラスミド導入の 24 時間後に 250 nM Mito Tracker Red を 37°C で 1 時間反応させた。検鏡には OLYMPUS Fluoview 共焦点レーザー顕微鏡および Zeiss LSM510 共焦点レーザー顕微鏡を用いた。

## 2-9 siRNA を用いた knock down

### (第一章)

RAW264.7 細胞に、oligofectAMINE reagent (Invitrogen) を用いてトランスフェクションを行った。使用した siRNA は(6)に従い、TICAM-2 の siRNA については site B を用いた。トランスフェクションの条件は付属のプロトコールに従った。1 回目のトランスフェクションの後、一日目に細胞をまき直し、2 日目に再度 siRNA をトランスフェクションし、3 日目に FuGENE 6 (Roche) を用いてレポーター遺伝子をトランスフェクションした。その 24 時間後にリガンドを調整した培地と交換し、6 時間刺激後の細胞を回収した。レポーター遺伝子を用いた解析は、2-2 と同様に行った。

### (第三章)

第三章で使用した siRNA の配列

siTICAM-1S	; 5'-GACCAGACGCCACUCCAACCTT-3'
siTICAM-1AS	; 5'- GUUGGAGUGGCGUCUGGUUCTT-3'
siTBK1-S	; 5'- GACAGAAGUUGUGAUCACATT - 3'
siTBK1-AS	; 5'- UGUGAUCACAACUUCUGUUCTT - 3'
siIKK $\epsilon$ -S	; 5'- GAGCUAUCUCACCAGCUCCTT - 3'
siIKK $\epsilon$ -AS	; 5'- GGAGCUGGUGAGAUAGCUUCTT - 3'
siGFP-S	; 5'- GCAGCACGACUUCUUCAAGTT - 3'
siGFP-AS	; 5'- CUUGAAGAAGUCGUGCUGCTT - 3'
siRIG-I-S	; 5'- AAUUCAUCAGAGAUAGUCATT - 3'
siRIG-I-AS	; 5'- UGACUAUCUCUGAUGAAUUTT - 3'
siMDA5-S	; 5'- AAAUACCAUAAUGGAGCAAUA - 3'
siMDA5-AS	; 5'- UUGCUCCAUUAUGGUAUUUCU - 3'
siIPS-1-S	; 5'- CAGAGGAGAAUGAGUAUAATT - 3'
siIPS-1-AS	; 5'- UUAUACUCAUUCUCCUCUGTT - 3'



HeLa 細胞を  $1.8 \times 10^5$ /well で 12 well plate に播種し、翌日に各 siRNA を OligofectAMINE reagent (Invitrogen)を用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクションは付属のプロトコールに準じた。強制発現の 24 時間後 RSV を各実験時の MOI となるように感染させた。感染 48 時間後に細胞を回収し、RNeasy (QIAGEN)で RNA を抽出して RT-PCR を行った。ウイルス液濃縮のため、ウイルス感染を行っていない細胞上清も回収して濃縮し、Mock とした。各実験回で RSV ウイルス加えた液量と同量の Mock を添加したものをコントロールとした。

## 2-10 RNAi vector を用いた遺伝子 Knock down 細胞の樹立

ベクターに組み込んだターゲットサイトの配列

NAP1 site-A ; 5'-AAGCTAATAGCTCGATTTGAAGA -3'

NAP1 site-B ; 5'-AAGTGATAATATGCAGCATGCAT -3'

GFP ; 5'-AACCACTACCTGAGCACCCAG -3'

上記ターゲットサイトを、ヘアピンループ構造を取る様にオリゴで作製し、pH1-Vector (7)に組み込んだ。ヘアピン構造の配列は(8)に従った。

酵素サイト→ターゲットサイト (センス) →ループ配列→ターゲットサイトにアニールする形の配列→酵素サイトの並びと成るようにオリゴを設計した。このオリゴのアンチセンスとなるようなオリゴも作製して *in vitro* でオリゴをアニールさせ、制限酵素で切断した pH1-Vector に組み込んだ。オリゴが組み込まれた事を確認したら、HeLa 細胞に強制発現させ、発現の 24 時間後に Puromycine 1  $\mu$ g/ml で選択培養し、単一クローン株を樹立した。コントロールとしてターゲットサイトの入っていない pH1-Vector と GFP に対するターゲットサイトの組み込まれた pH1-GFP を用いた。NAP1-siteA をターゲットサイトとしたものを pH1-NAP1-A、NAP1-siteB をターゲットサイトとしたものを pH1-NAP1-B とした。各ベクターに対して 4 から 5 クローンを樹立し、NAP1 ノックダウンを RT-PCR で確認した。

< 文献 >

1. James, P., J. Halladay, and E. A. Craig. 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144:1425-1436.
2. Mizushima, S., and S. Nagata. 1990. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res* 18:5322.
3. Murabayashi, N., M. Kurita-Taniguchi, M. Ayata, M. Matsumoto, H. Ogura, and T. Seya. 2002. Susceptibility of human dendritic cells (DCs) to measles virus (MV) depends on their activation stages in conjunction with the level of CDw150: role of Toll stimulators in DC maturation and MV amplification. *Microbes Infect* 4:785-794.
4. Iwamura, T., M. Yoneyama, K. Yamaguchi, W. Suhara, W. Mori, K. Shiota, Y. Okabe, H. Namiki, and T. Fujita. 2001. Induction of IRF-3/-7 kinase and NF-kappaB in response to double-stranded RNA and virus infection: common and unique pathways. *Genes Cells* 6:375-388.
5. Yoneyama, M., W. Suhara, Y. Fukuhara, M. Fukuda, E. Nishida, and T. Fujita. 1998. Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *Embo J* 17:1087-1095.
6. Oshiumi, H., M. Sasai, K. Shida, T. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya. 2003. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* 278:49751-49762.
7. Hasuwa, H., K. Kaseda, T. Einarsdottir, and M. Okabe. 2002. Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett* 532:227-230.
8. Brummelkamp, T. R., R. Bernards, and R. Agami. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296:550-553.

## 第一章 TLR4 を介した IFN- $\beta$ 産生の分子機構

Toll-like receptor (TLR) family の中でも、TLR4 はグラム陰性桿菌細胞壁主成分であるリポ多糖 (lipopolysaccharide : LPS) を認識する。LPS からの過剰な刺激が入ると、ヒトは発熱、敗血症及びショックを引き起こし、最悪の場合は死に至る。TLR4 は LPS を認識すると、IL-12, IL-6 や TNF- $\alpha$  といった炎症性サイトカインと抗ウイルス作用を示すサイトカインである IFN- $\beta$  の産生を誘導し、T 細胞の活性化を促進してその後の獲得免疫の活性化に重要な役割を果たしている事が示唆されており、TLR4 を介したサイトカイン産生の分子機構が非常に注目されていた(1, 2)。この章では TLR4 を介したサイトカイン産生の中でも、IFN- $\beta$  産生の分子機構について得られた知見を報告する。

TLR family は、序章でも述べたが、その分子的特徴として細胞外領域にロイシンリッチリピートを、細胞内領域に TIR ドメインを含んでいる I 型の膜タンパク質である。TLR family の中でも TLR4 はその発現が、免疫担当細胞表面と限局しており、その発現パターンから獲得免疫の活性化に特に重要な TLR として注目されてきた(3-5)。TLR4 を介したシグナル伝達経路に関与する分子として MyD88 が最初に報告された(6)。MyD88 は N 末端領域に FADD や TRADD にも存在する Death domain を、C 末端領域には TLR の細胞内領域にもある TIR domain を有しており、MyD88 欠損マウスを用いた解析の結果から LPS 刺激によって誘導される初期の NF- $\kappa$ B 活性化に必須である事が明らかとなった。一方、TLR4 を介した IFN- $\beta$  産生は MyD88 非依存である事が示され、別の Adaptor 分子の存在が示唆された (7)。TLR4 と MyD88 は双方の TIR domain を介して相互作用を示していた事から、新規アダプター分子も TIR domain を持っている事が予想された。TIR domain を持つ分子のゲノムデータサーチの結果、TLR4 を介したシグナル伝達機構に関与するアダプター分子として TIRAP / Mal が新たに同定されたが(8, 9)、TLR4 を介した IFN- $\beta$  産生には関与していない事がノックアウトマウスの解析により示された(10)。

TLR family の中でも TLR3 は、唯一 MyD88 との相互作用の確認されていない TLR であり、TIRAP も TLR3 を介したシグナル伝達経路に関与していなかった事から、TLR3 を介したシグナル伝達機構に関与する第三のアダプター分子の存在が示唆された。Yeast two-hybrid 法を用いたスクリーニングの結果、TLR3

の TIR domain に結合するアダプター分子として TICAM-1 が当研究室で単離・同定された(11, 12)。TICAM-1 は 712 アミノ酸からなる分子であり、その分子のほぼ中央に TIR domain を持っている。分子生物学的手法とノックアウトマウスを用いた解析の結果、TICAM-1 は IFN- $\beta$  産生に必須の転写因子である IRF-3 の活性化を誘導する、TLR3 を介した IFN- $\beta$  産生に必須の分子である事が証明された(11, 13)。さらに、TICAM-1 ノックアウトマウス由来の細胞を LPS で刺激すると、LPS 刺激によって誘導される後期の NF- $\kappa$ B 活性化と IFN- $\beta$  の誘導も起こらない事が確認されたが(13)、TICAM-1 と TLR4 の相互作用は確認されていなかった。

TICAM-1 の全長を元にしたデータベースサーチにより、TICAM-1 の TIR domain と 33.78 %の相同性の TIR domain を持つ第四のアダプター分子、TIR-domain containing adaptor molecule (TICAM) -2 が当研究室で単離・同定された(14)。

本研究では、TLR4 を介した IFN- $\beta$  産生は TICAM-2 が TLR4 の細胞内領域に結合して、TICAM-1 と TLR4 を架橋する事により TICAM-1 へとシグナルが伝えられ、TICAM-1 から IRF-3 が活性化されている事について述べる。

## < 結果 >

### 1-1. TICAM-2 と TLR4 との結合

TICAM-2 は TICAM-1 の全長を用いたデータベースサーチにより単離・同定され、10 種類ある TLR family の中でも、TLR4 の TIR domain に特異的に結合する分子である(14)。TIR domain には高度に保存されている領域、BOX I, BOX II, BOX III が存在し (Fig. 1-1 a)、中でも TLR4 の BOXII に含まれるプロリンがヒスチジンに置換された変異マウスは、LPS 刺激によるエンドトキシンショックに対して抵抗性を示す事から(1, 15)、TLR4 の BOX II に存在するプロリンは LPS 刺激によるシグナル伝達に重要な役割を果たしていると考えられている。TICAM-2 が TLR4 を介したシグナル伝達に重要な働きをするのであれば、TIR domain のプロリンに変異を持った TLR4 は、TICAM-2 と結合できない事が予測される。TLR4 の細胞内領域である 664 から 840 アミノ酸までの TLR4 (TLR4) と、同領域で BOXII のプロリンをヒスチジンに置換した TLR4 (TLR4 PH)を用い、TICAM-2 との結合を、Yeast two-hybrid 法を用いて解析した。その結果、野生型 TLR4 と TICAM-2 の結合は確認できたのに対し、TLR4 PH と TICAM-2 との結合は検出できなかった (Fig. 1-1 b)。この結果から、TICAM-2 と TLR4 の細胞内領域との結合は、TLR4 BOX II のプロリンが非常に重要である事が明らかとなった。

### 1-2. TICAM-1 による IFN- $\beta$ promoter 活性化への TICAM-2 の影響

TICAM-2 強制発現によるレポータージーン解析の結果、TICAM-2 は IFN- $\beta$  promoter と NF- $\kappa$ B を活性化しうる事が明らかとなっていた(14)。しかし、TICAM-1 強制発現による IFN- $\beta$  promoter の活性化は劇的であるのに対し(11)、TICAM-2 強制発現によるその活性化程度は低かった(14)。TICAM-1 と TICAM-2 は直接結合した事、TICAM-2 強制発現による IFN- $\beta$  promoter の活性化は TICAM-1 ドミナントネガティブ体により阻害される事から(14)、TICAM-2 強制発現による IFN- $\beta$  promoter の活性化は内在性の TICAM-1 を介して引き起こされており、TICAM-1 量が制限となるため顕著に検出できないのではないかと考

えた。この事を立証するため、低濃度の TICAM-1 を発現させ TICAM-2 の有無による IFN- $\beta$  promoter の活性化をレポーター遺伝子で調べた。TICAM-2 が TICAM-1 を介して IFN- $\beta$  promoter を活性化するのであれば、TICAM-1 と TICAM-2 の両方を発現させる事により相乗効果が現れ、それぞれの単独発現よりも、より強く IFN- $\beta$  promoter の活性化が検出されるはずである。解析の結果、予想通り、TICAM-1 単独に比べ TICAM-2 を共発現した方が顕著に TICAM-1 による IFN- $\beta$  promoter の活性化が見られた (Fig. 1-2)。これらの結果から、TICAM-2 は TICAM-1 のダイマーまたはオリゴマー形成を促進させる事により、IFN- $\beta$  promoter の活性化に寄与している事が示唆された。

### **1-3. TICAM-2 を介した IRF-3 の活性化**

IFN- $\beta$  の転写誘導に関与する三種の転写因子、AP-1 (ATF-2 / c-Jun)、NF- $\kappa$ B、IRF-3、の中でも IRF-3 は IFN- $\beta$  の転写誘導に必須な転写因子である(16, 17)。IRF-3 はリン酸化され活性化すると二量体を形成し、核へと移行して転写因子として機能する。TICAM-2 による IRF-3 活性化について、レポーター遺伝子を用いて解析を行った。TICAM-2 を強制発現すると、TICAM-2 の濃度依存的に IRF-3 の活性化が検出された (Fig. 1-3 a)。また、TICAM-2 存在下での TICAM-1 による IRF-3 の活性化について同様の解析を行った結果、TICAM-1 単独の強制発現に比べ、TICAM-2 を共発現させた方が TICAM-1 による IRF-3 の活性化はより増加する傾向が得られた (Fig. 1-3 b)。これらの結果から、TICAM-2 は TICAM-1 を介した IRF-3 の活性化を行っている可能性が考えられた。

### **1-4 TICAM-1/TICAM-2 ノックダウン細胞での IRF-3 活性化**

TLR4 を介した IFN- $\beta$  産生における TICAM-2 の機能をさらに明確にするため、マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞で、RNAi 法を用いた遺伝子ノックダウンを行った。TICAM-1 および TICAM-2 ノックダウン細胞で LPS 刺激を行った際の IRF-3 活性化について、レポーター遺伝子を用いて解析をした結果、LPS 刺激による IRF-3 の活性化はコントロール細胞に比べ TICAM-2

ノックダウン細胞では活性化の減少が見られ、TICAM-1 ノックダウン細胞でも活性化の減少が確認された (Fig. 1-4 a)。その一方、同様の細胞群に TLR3 のリガンドである poly(I:C)刺激を行い IRF-3 活性化について検討した所、TICAM-1 ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べ IRF-3 の活性化は減少したが、TICAM-2 ノックダウン細胞ではコントロール細胞と同等であった(Fig. 1-4 b)。これらの結果から、LPS 刺激による IFN- $\beta$ の転写誘導に TICAM-1, TICAM-2 は重要な役割を果たしているが、poly(I:C)を介した IFN- $\beta$ 転写誘導に TICAM-1 のみであり TICAM-2 は関与していない事が示唆された。

## < 考察 >

本章では、TLR4 を介した IFN- $\beta$  産生の分子機構について解析を行った。TICAM-2 は TLR family の中でも TLR4 の TIR domain と特異的に結合し(14)、その結合には TLR4 TIR domain の BOX II のプロリン残基が重要である事が明らかとなった (Fig. 1-1)。この TLR 4 の変異体は哺乳類細胞内でも TICAM-2 との相互作用はみられなくなったが(14)、TICAM-2 と同じく TLR4 のアダプター分子である TIRAP との相互作用は維持されていた(8)。TIRAP は TICAM-2 と同様、TLR4 の細胞内領域に直接結合する事が報告されており(9)、これらの結果は、TLR4 の TIR domain は TIRAP と TICAM-2 で結合サイトが異なり、TLR4 の BOX II のプロリンが TICAM-2 の結合には重要である事を示している。この TLR4 の変異は、エンドトキシンショックに対して耐性となっている C3H/HeJ マウスに見られた変異であり、本研究の解析結果から、C3H/HeJ マウスは LPS による TLR4 刺激に対し、下流アダプター分子である TICAM-2 が結合できなくなる事によって引き起こされていると予期させる。この仮説をより明確にするためには、TLR4 PH と TIRAP との結合を、Yeast two-hybrid 法により確認し、TLR4PH は TIRAP との結合には影響がない事を示す必要がある。

また、IFN- $\beta$  転写誘導への TICAM-2 の関与について解析を行った結果、TICAM-2 は IFN- $\beta$  promoter を活性化しうる事、また TICAM-1 による IFN- $\beta$  promoter の活性化を促進しうる事が明らかとなった (Fig. 1-2)。これらの結果に加え、TICAM-1 と TICAM-2 の結合、TICAM-1 ドミナントネガティブ体による TICAM-2 強制発現による IFN- $\beta$  promoter 活性化の阻害などから(14)、TICAM-2 は TICAM-1 を介して IFN- $\beta$  promoter の活性化を誘導している事が示唆された。IFN- $\beta$  promoter の活性化に重要な転写因子である IRF-3 活性化についても、TICAM-2 は TICAM-1 による IRF-3 活性化を促進するように作用しており、この結果からも TICAM-2 は TICAM-1 を介して IRF-3 の活性化を起こしていると推察される。

TLR4 刺激による IRF-3 活性化への TICAM-1 および TICAM-2 の影響を、RNAi 法を用いて解析した結果、TICAM-1 および TICAM-2 ノックダウン細胞では LPS 刺激によって誘導される IRF-3 の活性化は低下した。この結果から TLR4 を介した IRF-3 活性化は TICAM-1 と TICAM-2 の両者が重要である事がより明確となった。その一方で、TLR3 を介した IRF-3 の活性化には TICAM-2 ノック



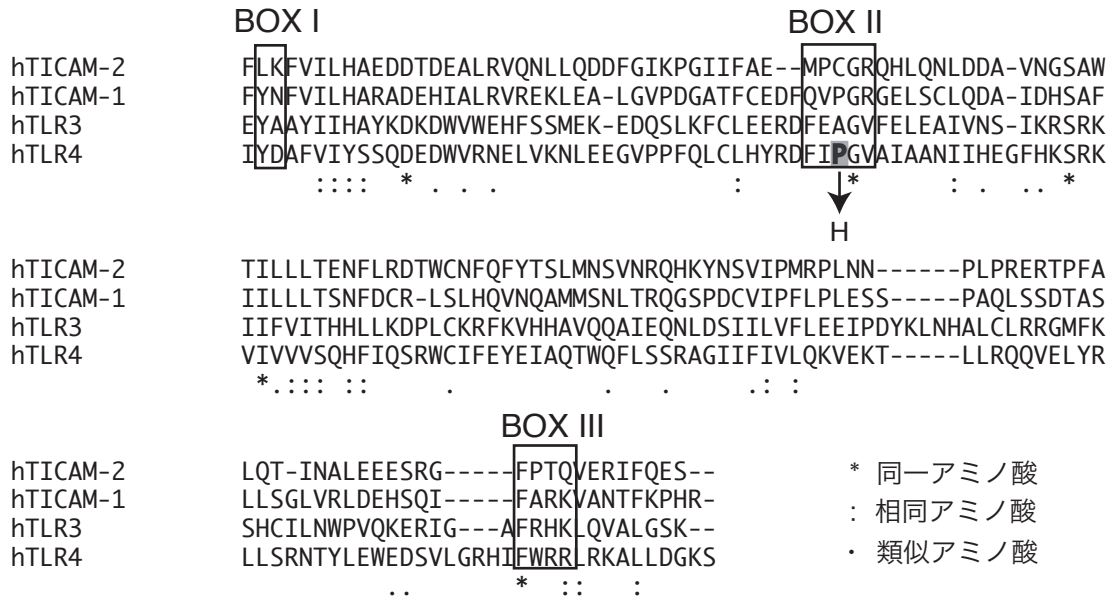
ダウンは影響を与えず、TICAM-2 は TLR4 特異的に IRF-3 の活性化に関与している事が示唆された (Fig. 1-4)(18)。その後、TICAM-2 ノックアウトマウスを用いた解析が報告され、TICAM-2 は TLR4 を介した IFN- $\beta$ 産生に必須である事が立証された(19)。

抗ウイルス作用を示す Type-I IFN の産生を誘導する TLR family は TLR3, TLR4, TLR7/TLR8, TLR9 であるが、TLR4 以外は核酸成分を認識する TLR である(20)。ウイルスなどは高頻度とその構成成分を変化させおり、遺伝的に保存されている TLR family にとって核酸成分を感知する事はより確実にウイルスを検知できる手段であり、type-I IFN の産生が核酸認識をする TLR を介して誘導されるのは道理である。しかし、TLR4 はグラム陰性桿菌の構成成分である LPS を認識するにも関わらず、なぜ IFN- $\beta$ 産生を誘導するのかは不明である。TLR4 は Respiratory syncytial virus の Fusion protein (F protein)を認識して NF- $\kappa$ B の活性化を誘導する事が報告されているが、IFN- $\beta$ 産生が誘導されるかは明らかになっていない(21)。TLR4 を介した IFN- $\beta$ 産生には抗ウイルス作用ではない、未知の機能があるのかも知れない。

TLR4 は TIR domain を含みシグナル伝達機構に関与していると報告のある四種アダプター分子、MyD88、TIRAP/Mal、TICAM-1、TICAM-2、が全て関与している事がこれまでに報告されている事から考えても(22)、TLR4 を介したシグナル伝達機構は非常に複雑に制御されている事が予想できる。四種類のアダプター分子は TLR4 を介したシグナル経路では、二つのグループに大別できる (Fig. 1-5)。各アダプターのノックアウトマウスを用いた解析の結果、LPS 刺激による NF- $\kappa$ B の活性化は、早期 (1 時間から 2 時間まで)は TIRAP - MyD88 経路、後期は TICAM-2 - TICAM-1 経路に依存しており、また IRF-3 の活性化ならびにそれに伴う IFN- $\beta$ 産生は TICAM-2 - TICAM-1 経路依存である事も立証された(10, 13)。しかし、LPS 刺激よって発現の上昇が見られる抗原提示細胞の共刺激分子 CD86 について各ノックアウトマウスを比較すると、二つの経路は相互に影響し合っている傾向が見出される。LPS 刺激によって誘導される CD86 の発現上昇は、MyD88、TIRAP それぞれ単独のノックアウトマウスでは野生型マウスと差がないがダブルノックアウトマウスでは顕著な減少が確認されたのに対し(10, 23)、TICAM-1、TICAM-2 はそれぞれ単独ノックアウトでも CD86 の発現上昇の減弱が確認された(13, 19)。これらの結果は、CD86 の発現上昇に、TIRAP-MyD88 経路よりも TICAM-1 - TICAM-2 経路の方が重要であるが、

TIRAP 及び MyD88 も必要な分子である事を暗示している。近年、TICAM-2 の N 末端がミリスチル化され、膜に局在する事が TLR4 シグナルへの TICAM-2 の機能を果たすのに重要である事が報告された(24)。また、TIRAP はフォスファチジルイノシトール, 4, 5 ビスフォスフェイト(PIP2)の結合サイトを持ち、PIP2 依存的に TIRAP が膜に局在する事が TLR4 シグナルに重要である事も報告された(25)。この二つの結果から予測すると、TLR4 を介したシグナル伝達経路は、TLR4 と直接結合する事の報告されている二つのアダプター分子、TICAM-2 と TIRAP、が脂質修飾され、TLR4 を中心に細胞膜上で脂質クラスターを形成している可能性が高い。この脂質クラスターの形成が、TLR4 のリガンド刺激による CD86 といった共刺激分子の発現と、それに伴う獲得免疫の活性化には必須である可能性が考えられる。今後の詳細な解析により、これらの謎は解明されるだろう。

(a)



(b)

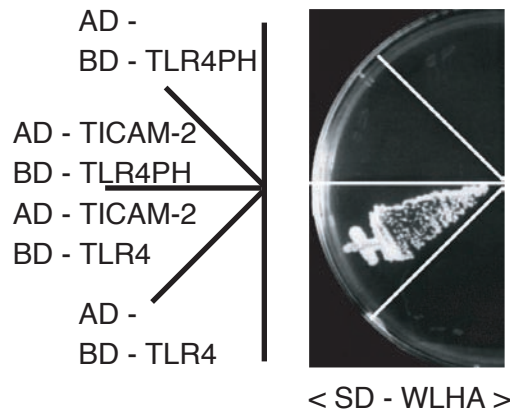


Fig. 1-1 TLR4とTICAM-2の結合

a) ヒトのTLR3, TLR4, TICAM-1, TICAM-2のTIR domainのアミノ酸配列比較

TIR domainにはシグナル伝達に重要な保存された領域、BOX I, BOX II, BOX IIIが存在する。  
TLR4のBOX IIIに存在するプロリンをヒスチジンに変換した。

b) TLR4の細胞内領域とTICAM-2との結合

TLR4の細胞内領域(664-840 a.a) (TLR4)、その領域のプロリンをヒスチジンに変換したもの (TLR4PH)、とTICAM-2との結合を、Yeast two-hybrid法を用いて解析した。

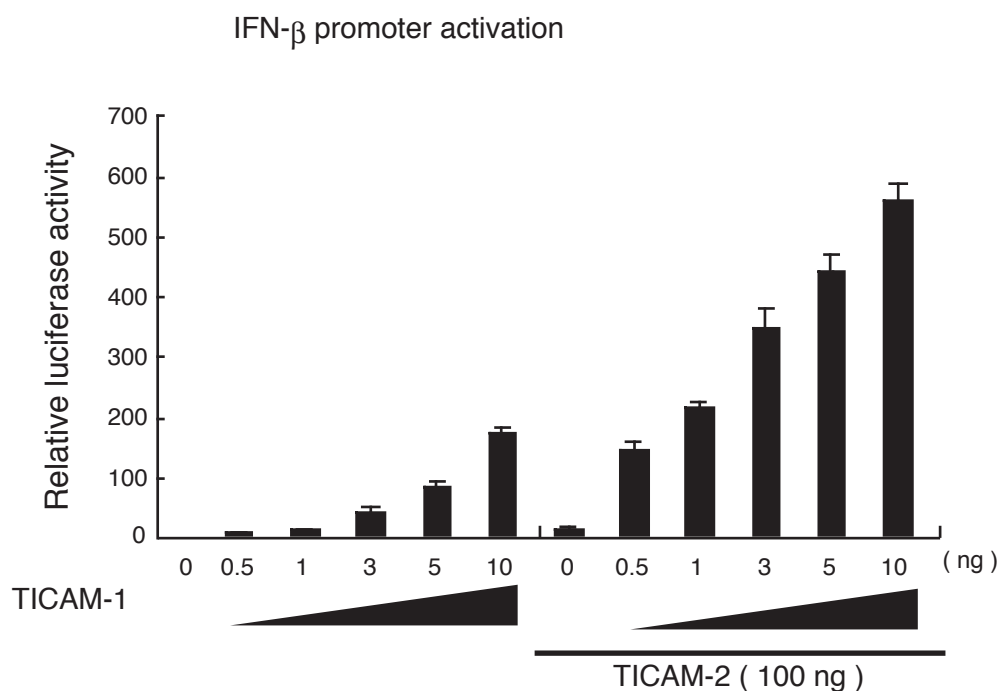
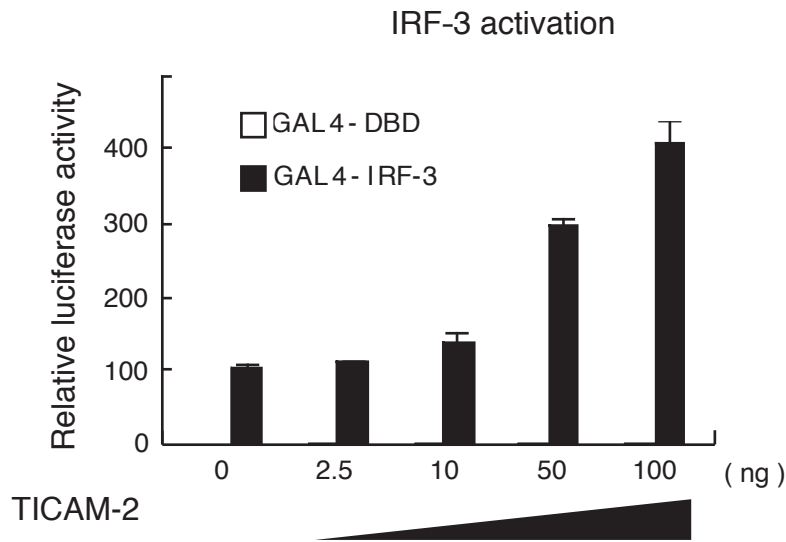


Fig. 1-2 TICAM-2 は TICAM-1 を介して IFN- $\beta$  promoter を活性化する

HEK293 細胞に TICAM-1 と TICAM-2 を、IFN- $\beta$  promoter(p125-Luc) と  $\beta$ -galactosidase を共発現させ、発現後 24 時間の細胞を回収し、解析を行った。横軸は用いた TICAM-1 及び TICAM-2 の量を示す。縦軸は空ベクターを強制発現させた細胞におけるルシフェラーゼ活性化量を 1 としたとした際の各条件の活性化量を相対値で示した。上記の結果は二回行ったうちの一回の結果で、どちらの回も同様の傾向が見られた。

(a)



(b)

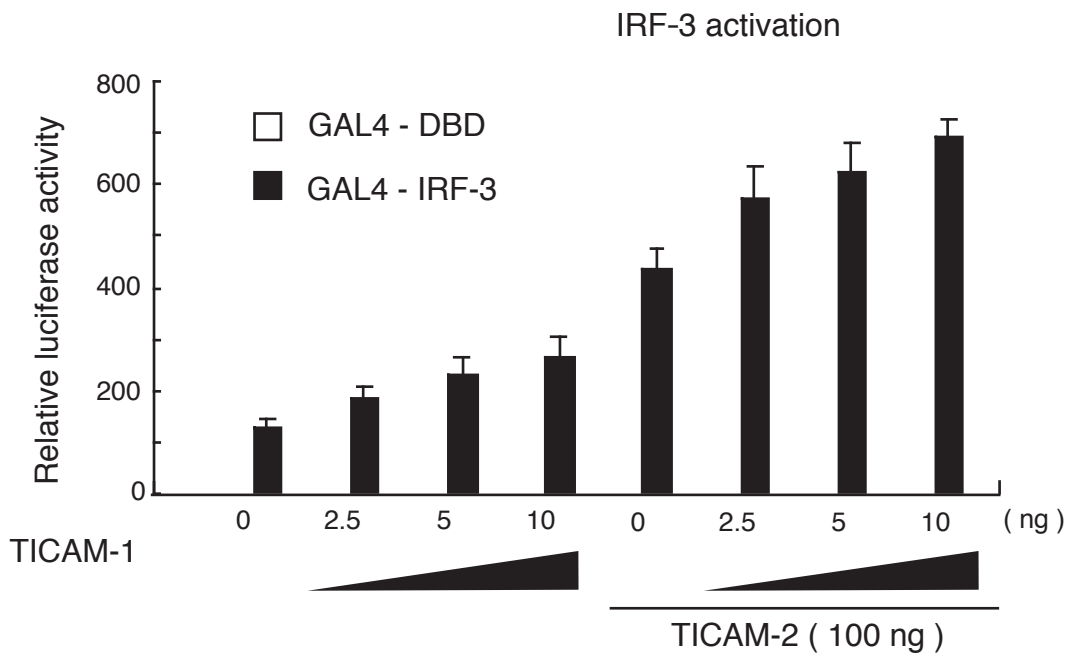


Fig. 1-3 TICAM-2 による IRF-3 の活性化

- a) TICAM-2 単独強制発現時の IRF-3 の活性化
- b) TICAM-2 存在下での TICAM-1 による IRF-3 活性化

HEK293 細胞に TICAM-1(b) 及び TICAM-2(a, b) を、IRF-3 reporter 及び GAL4 - DBD または GAL4 - IRF-3 と共発現させ、発現後 24 時間の細胞を回収して解析を行った。横軸は強制発現した cDNA の種類と量を示し、縦軸は GAL4 - DBD と空ベクターを強制発現した細胞におけるルシフェラーゼ活性化量を 1 とした時の各条件でのルシフェラーゼ活性化量を相対値で示した。上記の結果はいずれも三回行ったうちの一回の実験結果で、どの実験回においても同様の傾向が観察された。

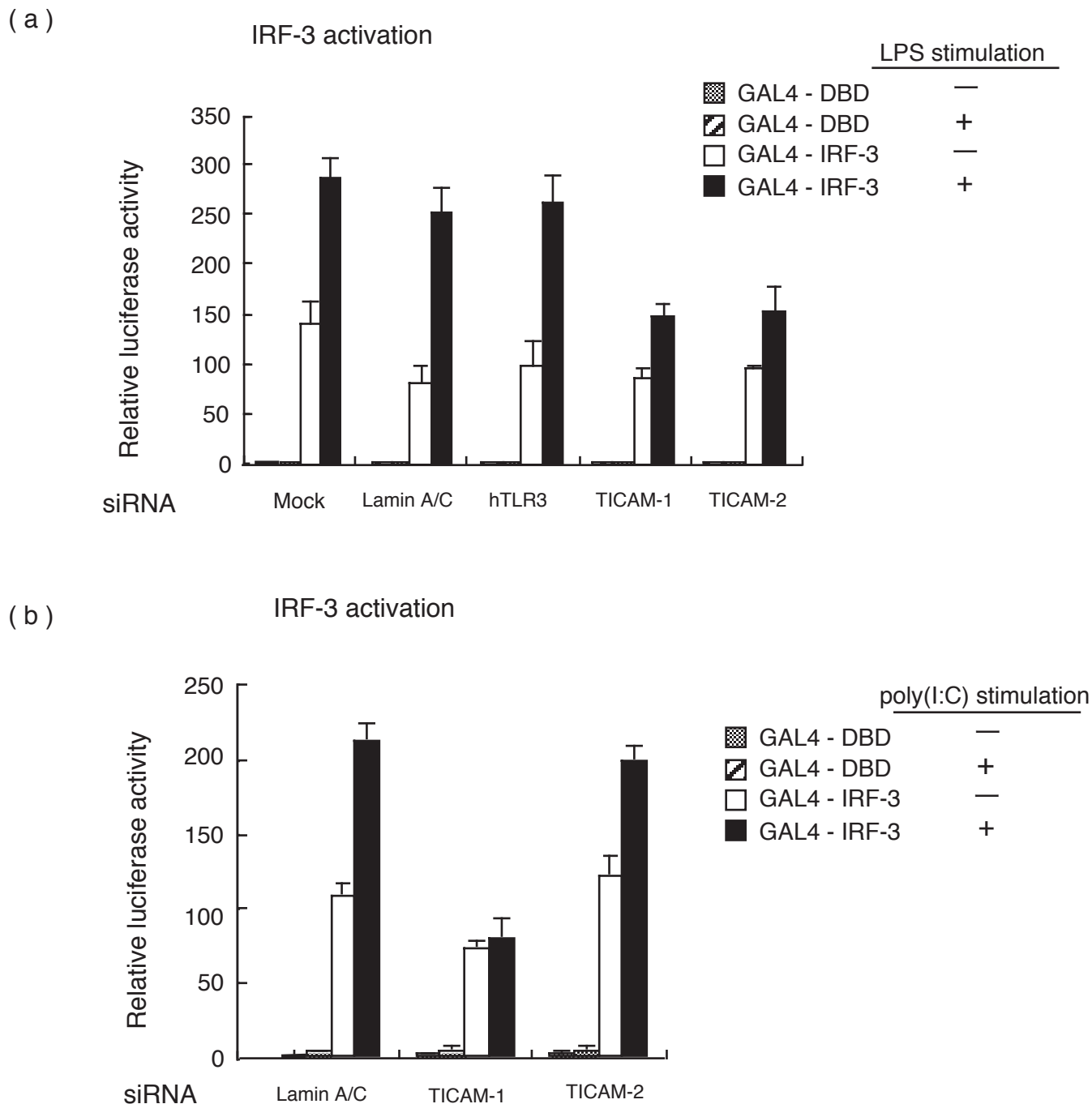


Fig. 1-4 TICAM-1 / TICAM-2 ノックダウン細胞における IRF-3 の活性化

- a) LPS (100 ng/ml) 刺激による IRF-3 活性化への TICAM-1 / TICAM-2 の影響  
 b) poly(I:C) (10 µg/ml) 刺激による IRF-3 活性化への TICAM-1 / TICAM-2 の影響

マウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞において横軸に示してある各遺伝子の siRNA を二回導入させた後、IRF-3 reporter 及び GAL4 - DBD または GAL4 - IRF-3 と共発現させ、発現後 24 時間の細胞をそれぞれのリガンドで 6 時間刺激し、細胞を回収して解析を行った。横軸は発現させた siRNA を示し、縦軸は GAL4 - DBD、siRNA mock、未刺激の細胞におけるルシフェラーゼ活性化量を 1 とした時の、各条件でのルシフェラーゼ活性化量を相対値で示した。上記の結果は、a) は 4 回、b) は二回行ったうちの一回の結果で、どの実験回も同様の傾向が見られた。

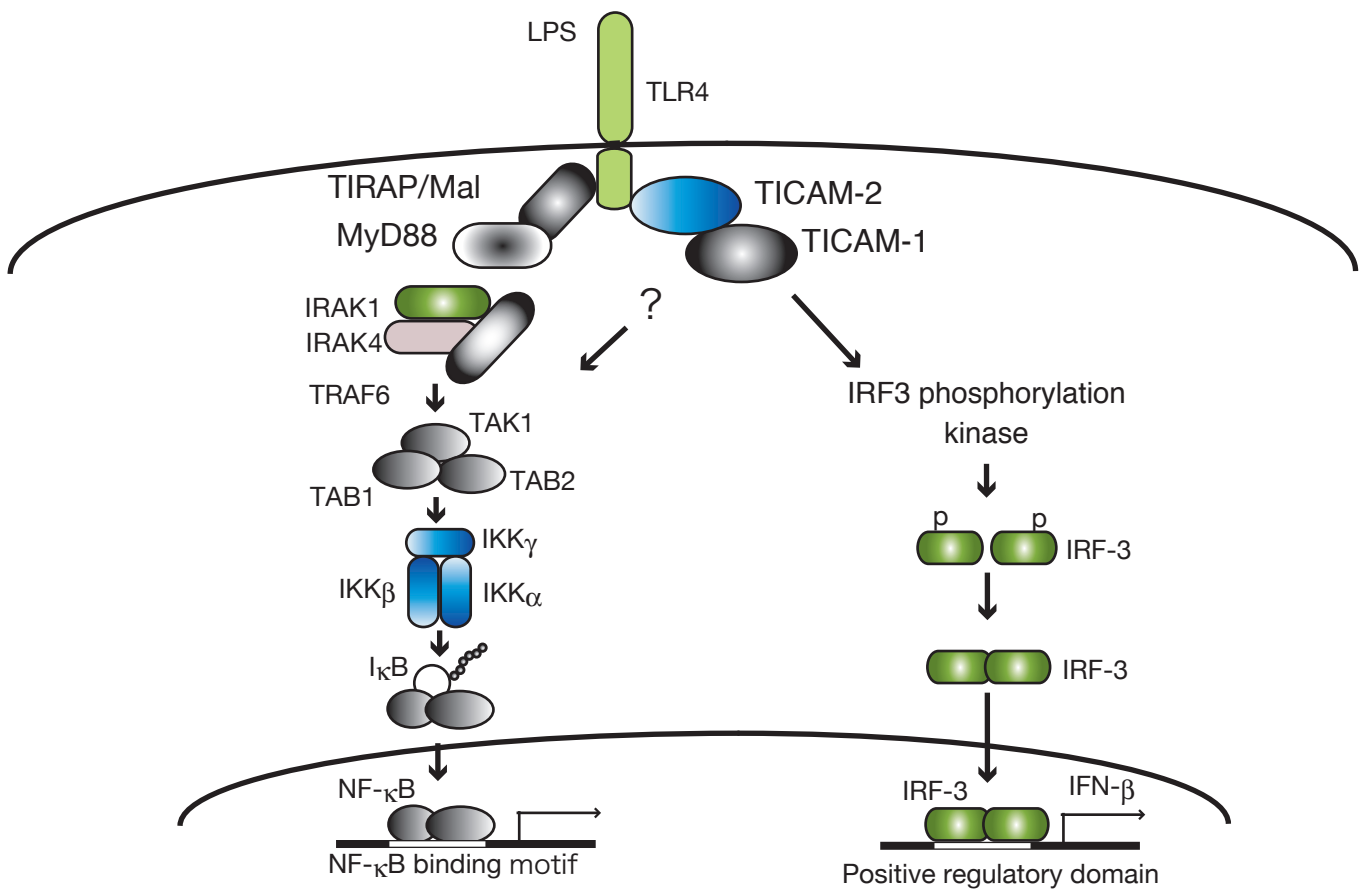


Fig. 1-5 TLR4 を介したシグナル伝達機構の概略図

< 文献 >

1. Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1:135-145.
2. Takeda, K., and S. Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17:1-14.
3. Akashi, S., S. Saitoh, Y. Wakabayashi, T. Kikuchi, N. Takamura, Y. Nagai, Y. Kusumoto, K. Fukase, S. Kusumoto, Y. Adachi, A. Kosugi, and K. Miyake. 2003. Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14. *J Exp Med* 198:1035-1042.
4. Hornef, M. W., B. H. Normark, A. Vandewalle, and S. Normark. 2003. Intracellular recognition of lipopolysaccharide by toll-like receptor 4 in intestinal epithelial cells. *J Exp Med* 198:1225-1235.
5. Latz, E., A. Visintin, E. Lien, K. A. Fitzgerald, B. G. Monks, E. A. Kurt-Jones, D. T. Golenbock, and T. Espevik. 2002. Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J Biol Chem* 277:47834-47843.
6. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, E. Kopp, A. Stadlen, C. Chen, S. Ghosh, and C. A. Janeway, Jr. 1998. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 2:253-258.
7. Kawai, T., O. Takeuchi, T. Fujita, J. Inoue, P. F. Muhlradt, S. Sato, K. Hoshino, S. Akira, and T. Kaisho. 2001. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 167:5887-5894.
8. Horng, T., G. M. Barton, and R. Medzhitov. 2001. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2:835-841.
9. Fitzgerald, K. A., E. M. Palsson-McDermott, A. G. Bowie, C. A. Jefferies, A. S. Mansell, G. Brady, E. Brint, A. Dunne, P. Gray, M. T. Harte, D. McMurray, D. E. Smith, J. E. Sims, T. A. Bird, and L. A. O'Neill. 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413:78-83.
10. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, H. Sanjo, S. Uematsu, T. Kaisho, K.



- Hoshino, O. Takeuchi, M. Kobayashi, T. Fujita, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420:324-329.
11. Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, and T. Seya. 2003. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 4:161-167.
  12. Yamamoto, M., S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 169:6668-6672.
  13. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640-643.
  14. Oshiumi, H., M. Sasai, K. Shida, T. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya. 2003. TIR-containing Adapter Molecule (TICAM)-2, a Bridging Adapter Recruiting to Toll-like Receptor 4 TICAM-1 That Induces Interferon- $\beta$ . *J Biol Chem* 278:49751-49762.
  15. Abel, B., N. Thieblemont, V. J. Quesniaux, N. Brown, J. Mpagi, K. Miyake, F. Bihl, and B. Ryffel. 2002. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *J Immunol* 169:3155-3162.
  16. Maniatis, T., J. V. Falvo, T. H. Kim, T. K. Kim, C. H. Lin, B. S. Parekh, and M. G. Wathel. 1998. Structure and function of the interferon-beta enhanceosome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63:609-620.
  17. Honda, K., H. Yanai, A. Takaoka, and T. Taniguchi. 2005. Regulation of the type I IFN induction: a current view. *Int Immunol* 17:1367-1378.
  18. Seya, T., H. Oshiumi, M. Sasai, T. Akazawa, and M. Matsumoto. 2005. TICAM-1 and TICAM-2: toll-like receptor adapters that participate in induction of type 1 interferons. *Int J Biochem Cell Biol* 37:524-529.
  19. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, K. Hoshino, T. Kaisho, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira. 2003. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat*

*Immunol* 4:1144-1150.

20. Takeda, K. 2005. Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 11:51-55.
21. Rallabhandi, P., J. Bell, M. S. Boukhvalova, A. Medvedev, E. Lorenz, M. Arditi, V. G. Hemming, J. C. Blanco, D. M. Segal, and S. N. Vogel. 2006. Analysis of TLR4 polymorphic variants: new insights into TLR4/MD-2/CD14 stoichiometry, structure, and signaling. *J Immunol* 177:322-332.
22. O'Neill, L. A., K. A. Fitzgerald, and A. G. Bowie. 2003. The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol* 24:286-290.
23. Kaisho, T., O. Takeuchi, T. Kawai, K. Hoshino, and S. Akira. 2001. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol* 166:5688-5694.
24. Rowe, D. C., A. F. McGettrick, E. Latz, B. G. Monks, N. J. Gay, M. Yamamoto, S. Akira, L. A. O'Neill, K. A. Fitzgerald, and D. T. Golenbock. 2006. The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6299-6304.
25. Kagan, J. C., and R. Medzhitov. 2006. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell* 125:943-955.

## 第二章 TICAM-1 の下流での IFN- $\beta$ 転写誘導の分子機構

第一章では TLR4 を介した IFN- $\beta$  産生の分子機構について、TICAM-2 が TICAM-1 へとシグナルを伝える事により IRF-3 の活性化が誘導されているという新たな知見を得た。本章では TICAM-1 から IRF-3 の活性化に関わる分子機構について、得られた知見を報告する。

TLR family を介したシグナル伝達機構を担うアダプター分子として、現在 5 種が報告されており、どの分子も Toll-IL-1 receptor homology (TIR) domain を有している(1)。TLR3 及び TLR4 を介した IFN- $\beta$  産生には TICAM-1 が必須である事がノックアウトマウスを用いた解析により証明されているが(2)、TICAM-1 そのものはキナーゼでは無いため、TICAM-1 の下流で IFN- $\beta$  産生に重要な転写因子である IRF-3 をリン酸化して活性化するキナーゼの存在が示唆されていた。その後の解析の結果、I $\kappa$ B kinase のホモログで NF- $\kappa$ B の活性化に関与していると報告のある TBK1 / T2K / NAK(3-5) と IKK- $\epsilon$  / IKK- $\iota$ が(6, 7)、TICAM-1 の下流で IRF-3 を直接リン酸化する事により IFN- $\beta$  の転写誘導を引き起こす事が明らかとなった(8, 9)。IKK family は IKK $\alpha$  と IKK $\beta$  が最も解明されている。これらの分子は N 末端領域に存在するセリン/スレオニンキナーゼドメイン内に、リン酸化により活性化がもたらされる活性化ループを有しており、I $\kappa$ B $\alpha$  の特定のセリン残基をリン酸化する事により NF- $\kappa$ B の活性化を誘導する事が報告されている(10)。IKK family の中でも IKK $\gamma$  はキナーゼ活性を有するドメインを持っておらず、その代わりにタンパク質との相互作用に重要と考えられるコイルドコイルドメインを持ち、IKK $\alpha$  や IKK $\beta$  と会合する事により IKK $\alpha/\beta/\gamma$  分子複合体の形成を補助して NF- $\kappa$ B の活性化に寄与していると考えられている(11)。TBK1 と IKK $\epsilon$  も IKK family 分子であるが、その NF- $\kappa$ B 活性化機構はこれまで報告されていた IKK $\alpha$  と IKK $\beta$  とは異なった機構であり、様々な論争がなされている(4, 5, 12)。TBK1 と IKK- $\epsilon$  はそれぞれ TANK / i-TRAF という分子と結合する事が報告されているが(3, 12)、TANK が TBK1 と IKK $\epsilon$  に結合する機能的意義については未解明のままであった。TICAM-1 を介した IFN- $\beta$  の転写誘導は、IKK $\alpha$  - IKK $\beta$  のキナーゼ複合体に対する IKK $\gamma$  の架橋タンパク質としての機能の様に、TANK が TBK1 - IKK- $\epsilon$  キナーゼ複合体を架橋して IRF-3 の活性化が誘導されるのではないかと世界的に予想されたが(13)、

TICAM-1 を介したシグナル伝達経路に TANK が関与するか、TANK と TICAM-1 が相互作用を示すか等、明確な根拠はなかった。

本研究では、TICAM-1 を介した IFN- $\beta$  産生には、予想されていた TANK ではなく、NAK-associated protein 1 (NAP1) が TICAM-1 と複合体を形成し、TICAM-1 を介したシグナルを IRF-3 へと伝達している事について述べる。

## < 結果 >

### 2-1 TICAM-1 と TBK1、TANK の結合

TICAM-1 と TBK1 / IKK- $\epsilon$ はそれぞれ共沈する事から(8)、これらの分子が複合体を形成している事が示唆され、その中間分子として TANK が想定されていた(13)。しかし、TICAM-1 と TBK1 が直接結合する可能性もあった事、また中間分子として想定されていた TANK が TICAM-1 と直接結合する可能性も考慮し、先ず TICAM-1 と TBK1 及び TANK が直接結合するかどうかを、Yeast two-hybrid 法を用いて解析した。TICAM-1 の全長を Yeast two-hybrid 用のベクターに組み込むと、TICAM-1 単独発現でもコロニーが形成されてしまい、Yeast two-hybrid 法には用いる事が出来なかった (第四章 参照)。そこで TICAM-1 を N 末端領域と C 末端領域の二断片に分け、それぞれを TICAM-1 S1, TICAM-1 S2 とした (Fig. 2-1 a)。TICAM-1 S1 及び TICAM-1 S2 それぞれに対して、TBK1 と TANK との結合を解析した結果、TBK1、TANK どちらの分子も TICAM-1 との結合は確認できなかった (Fig. 2-1 b, c)。TBK1 および TANK がタンパク質として形成されていない可能を排除する為、TBK1 と TANK の結合を解析した。既にある報告と同様に、これらの分子の結合は検出する事ができた (Fig. 2-1 d) (3)。この事から TBK1 と TANK は結合可能なタンパク質として形成されている事が確認できた。

### 2-2 TICAM-1 と TANK との哺乳類細胞内での結合

TICAM-1 と TANK との直接の結合は、Yeast two-hybrid 法を用いた解析では検出できなかったが、間接的に結合している可能性も考えられた。そこで 293 細胞に C 末端に HA タグを付加した TICAM-1 と C 末端に Myc タグを付加した TANK を強制発現し、TICAM-1 と TANK との相互作用を、免疫沈降法を用いて解析した。しかし、今回の実験系では TICAM-1 と TANK の共沈は確認できなかった (Fig. 2-2 lane4)。

### 2-3 NAP1 と TICAM-1 との結合

TICAM-1 と TANK との共沈が確認できなかった事から、TICAM-1 と TBK1 の間を結ぶ分子は TANK ではなく、別の分子である事も考えられた。別の分子を検索した結果、TBK1 を Bait とした Yeast two-hybrid 法により単離・同定された NAP1 が候補に上った(14)。NAP1 は TANK と 28 %の類似性を持つ分子であり、TBK1 のみならず IKK $\epsilon$ とも複合体を形成する分子である(14)。NAP1 が TICAM-1 の下流で TBK1 及び IKK $\epsilon$ と複合体を形成し、TICAM-1 を介した IFN- $\beta$ 転写誘導に関与する分子ではないかという仮説を立て、先ず TICAM-1 と NAP1 の相互作用を、免疫沈降法を用いて解析した。その結果、強制発現した NAP1 と TICAM-1 は共沈が確認された (Fig. 2-3 a)。NAP1 と TICAM-1 の相互作用が内在性タンパクでも起こる事なのかを調べる目的で、HeLa 細胞を用いて、免疫沈降を行った。その結果、内在性の NAP1 は内在性 TICAM-1 と共沈した。また、NAP1 と TICAM-1 との相互作用は poly(I:C)刺激により、より増加する傾向が得られた (Fig. 2-3 b)。これらの結果から、NAP1 は TICAM-1 と相互作用を示し、その複合体形成は poly(I:C)刺激によって増強される事が示唆された。

### 2-4 TICAM-1 による IFN- $\beta$ promoter 活性化への NAP1 の関与

TICAM-1 と NAP1 が共沈した事から、NAP1 が TICAM-1 を介した IFN- $\beta$ 産生経路に関与している事が予想された。そこで TICAM-1 を介した IFN- $\beta$ 産生経路に NAP1 が関与しているかについてレポータージーンを用いて解析した。その結果、NAP1 の全長を単独で強制発現させても IFN- $\beta$  promoter は活性化されなかったが、TICAM-1 による IFN- $\beta$  promoter の活性化は NAP1 全長の濃度依存的に増加している傾向が見られた (Fig. 2-4 a)。NAP1 は 158 - 270 アミノ酸の領域で TBK1 と結合する(14)。NAP1 158 - 270 の IFN- $\beta$  promoter 活性化への関与を解析した結果、NAP1 158 - 270 のコンストラクト単独では IFN- $\beta$  promoter の活性化に影響は見られなかったが、TICAM-1 による IFN- $\beta$  promoter 活性化は NAP1 158 - 270 の濃度依存的に抑制された (Fig. 2-4 b)。これらの結果から、NAP1 が TICAM-1 による IFN- $\beta$  promoterの活性化に関与している可能

性が考えられた。TICAM-1 による IFN- $\beta$  promoter の活性化は NAP1 158 - 270 を 100 ng、400 ng / well で強制発現した際、顕著に抑制されていたことから、以下の実験では NAP1 の濃度は 100 ng、400 ng / well で行った。

NAP1 158 - 270 が TICAM-1 による IFN- $\beta$  promoter の活性化に対して抑制的に作用したことから、NAP1 158 - 270 が TICAM-1 からのシグナルを受け取る事ができない可能性と、NAP1 158 - 270 が TBK1 からの IFN- $\beta$  promoter 活性化を阻害している可能性が考えられた。そこで、TBK1 による IFN- $\beta$  promoter 活性化への NAP1 の影響についてレポータージーン解析を行った。その結果、NAP1 全長は TBK1 による IFN- $\beta$  promoter の活性化を濃度依存的に促進し (Fig. 2-4 c)、NAP1 158 - 270 は TBK1 による IFN- $\beta$  promoter の活性化へは影響は見られなかった (Fig. 2-4 d)。これらの結果から、NAP1 は TICAM-1 と TBK1 との間に位置し、NAP1 158 - 270 は TBK1 と結合するが TICAM-1 からのシグナルを受け取る事ができないためドミナントネガティブ体として機能している事が示唆された。以降 NAP1 158 - 270 を NAP1 ドミナントネガティブ体と称した。

## **2-5 TICAM-1 による AP-1、NF- $\kappa$ B 活性化への NAP1 の関与**

IFN- $\beta$  promoter の活性化には IRF-3, NF- $\kappa$ B, ATF2 / c-Jun (AP-1)の三種類の転写因子が重要な役割を果たしており(15)、TICAM-1 強制発現時には、三種全てが活性化される事が報告されている(16)。TICAM-1 強制発現による IFN- $\beta$  promoter 活性化への NAP1 の影響が、三種類の転写因子それぞれに対してどの様に影響した結果であるかを明らかにするため、まず TICAM-1 による NF- $\kappa$ B 活性化と AP-1 活性化への NAP1 の影響について、レポータージーンを用いて解析を行った。その結果、NAP1 全長は、単独でわずかに NF- $\kappa$ B を活性化させるが、TICAM-1 による NF- $\kappa$ B の活性化には影響を与えなかったのに対し、NAP1 ドミナントネガティブ体は、単独では NF- $\kappa$ B の活性化には影響を与えないが、TICAM-1 による NF- $\kappa$ B 活性化を濃度依存的に抑制する傾向が得られた (Fig. 2-5 a)。また、TICAM-1 による AP-1 の活性化は、NAP1 全長、ドミナントネガティブ体のどちらでも影響を受けなかった (Fig. 2-5 b)。これらの結果は、NAP1 は TICAM-1 による AP-1 の活性化には影響を与えないが、NF- $\kappa$ B の活性化には関与している可能性を示している。

## **2-6 TICAM-1 による IRF-3 活性化への NAP1 の関与**

次に、IFN- $\beta$  promoter 活性化に最も重要である転写因子、IRF-3 活性化に対する NAP1 の影響について解析を行った。IRF-3 はリン酸化されると活性化し、二量体を形成して核へと移行する(17, 18)。IRF-3 活性化を検出する実験系として GAL-4 IRF-3 を用いたレポータージーン法と Native PAGE 法を用いた。GAL4-IRF-3 を用いたレポータージーン解析の結果、NAP1 ドミナントネガティブ体単独の強制発現でも恒常的に見られる IRF-3 の活性化に対して抑制的に作用し、TICAM-1 強制発現による IRF-3 の活性化に対しても NAP1 ドミナントネガティブ体の濃度依存的に抑制が見られた (Fig. 2-6 a)。また、Native PAGE 法を用いた IRF-3 の二量体形成量についての解析の結果、NAP1 ドミナントネガティブ体は TICAM-1 強制発現による IRF-3 の二量体形成を抑制した (Fig. 2-6 b)。これらの結果から、NAP1 は TICAM-1 による NF- $\kappa$ B の活性化に加えて、IRF-3 の活性化に関与することが示唆された。

## **2-7 リガンド刺激による IRF-3 活性化への NAP1 の関与**

TICAM-1 による IRF-3 の活性化に NAP1 が関与することが示唆されたことから、NAP1 が TLR3 と TLR4 を介した IRF-3 の活性化に寄与している事が推測される。そこで、TLR3 及び TLR4 それぞれのリガンドである poly(I:C)及び LPS 刺激に対する NAP1 の影響について、レポータージーンを用いて解析を行った。その結果、poly(I:C)刺激による IRF-3 の活性化は NAP1 ドミナントネガティブ体の濃度依存的に抑制された (Fig. 2-7 a)。また、LPS 刺激による IRF-3 の活性化も NAP1 ドミナントネガティブ体の濃度依存的に抑制された (Fig. 2-7 b)。さらに NAP1 の全長を強制発現させた際のリガンド刺激による IFN- $\beta$  promoter の活性化についてレポータージーンを用いて解析した所、TLR3 及び TLR4 のリガンド刺激による IFN- $\beta$  promoter の活性化は、NAP1 全長が存在する事により促進する傾向が見られた (Fig. 2-7 c, d)。



## 2-8 リガンド刺激による NF- $\kappa$ B 活性化への NAP1 の関与

NAP1 ドミナントネガティブ体は TICAM-1 強制発現による NF- $\kappa$ B の活性化を抑制した事から、TLR3 及び TLR4 それぞれのリガンド刺激による NF- $\kappa$ B 活性化へも影響している事が考えられた。レポータージーンを用いた解析の結果、TLR3 リガンドの poly(I:C)及び TLR4 リガンドの LPS それぞれの刺激による NF- $\kappa$ B の活性化は、NAP1 ドミナントネガティブ体の濃度依存的に抑制の傾向が見られた (Fig. 2-8 a, b)。これらの結果から、NAP1 は TLR3 及び TLR4 のリガンド刺激によるシグナル伝達経路に関与している事が示唆された。

## 2-9 NAP1 ノックダウン細胞での TLR3 を介した IFN- $\beta$ 産生について

TLR3 および TLR4 を介した IFN- $\beta$ 産生のシグナル伝達経路に NAP1 が関与している事をより明確にするため、RNAi 法を用いた NAP1 ノックダウンを行った。NAP1 は IKK $\gamma$ と同様、キナーゼ複合体を安定的に保持するためのスキヤフォールドタンパク質である事が予想される(14)。IFN- $\beta$ 産生に関与するキナーゼではない事、また NAP1 全長は IFN- $\beta$ 産生に影響しているが TBK1 量が律速となること(Fig. 2-4 c)等を考慮すると、遺伝子ノックダウンが高効率に行われている状況下でないと、NAP1 ノックダウンの影響は検出できない可能性があった。そこで、H1 プロモータとその下流に Puromycine 耐性遺伝子を持つ pH1-Vector を用い、Stable ノックダウン細胞を樹立して解析を行った。NAP1 ノックダウンには、N 末端領域をターゲットサイトとした pH1-NAP1-A と TBK1 との結合領域内をターゲットサイトとした pH1-NAP1-B の二種類のベクターを使用した (Fig. 2-9 a)。また、コントロールとして、ターゲットサイトを含まない pH1-Vector と、内在性に存在しない分子である GFP に対するターゲットサイトに持つ pH1-GFP を用いた。内在性 TLR3 を発現している HeLa 細胞に各種 pH1-Vector を強制発現させ、stable clone を単離した。NAP1 遺伝子ノックダウンを RT-PCR で確認した所、NAP1-A, NAP1-B どちらのサイトを用いても、NAP1 ノックダウン細胞を得る事ができ、コントロール細胞群では NAP1 の発現に影響は見られなかった(Fig. 2-9 b)。これらの Stable 細胞群を用い、poly(I:C)刺激によって誘導される IRF-3 の活性化量と IFN- $\beta$  mRNA 量について

解析を行った。その結果、NAP1 ノックダウン細胞群ではコントロール細胞群と比べ、poly(I:C)刺激による IRF-3 の活性化量の低下 (Fig. 2-9 c)と IFN- $\beta$  mRNA 誘導量の低下が顕著に認められた (Fig. 2-9 d)。これらの結果から、NAP1 は TLR3 を介した IFN- $\beta$ 産生経路に、TICAM-1 からのシグナルを IRF-3 へ伝える事により、関与している事が示唆された。

## **2-10 TBK1 および IKK $\epsilon$ による NAP1 のリン酸化**

NAP1 は TBK1 および IKK $\epsilon$ と共発現すると、これらの分子と相互作用を示すと共にリン酸化される事が報告されている(14)。TBK1 および IKK $\epsilon$ による NAP1 リン酸化の意義を模索する上で、まず TBK1 と IKK $\epsilon$ による NAP1 のリン酸化に差がないかを検討した。293 細胞に NAP1 と TBK1 および IKK $\epsilon$ を共発現させて NAP1 で免疫沈降を行った所、NAP1 と TBK1 および IKK $\epsilon$ との相互作用を確認する事ができ、NAP1 と TBK1 キナーゼ活性変異体 (TBK1 KM) も相互作用を示した(Fig. 2-10)。TBK1 KM と共発現させた際には NAP1 のリン酸化は見られなくなった事から、NAP1 のリン酸化には TBK1 のキナーゼ活性が関与している事が示唆される。TBK1 と IKK $\epsilon$ による NAP1 リン酸化の差について検討した所、TBK1 と共発現した際は whole cell lysate でも NAP1 のリン酸化が検出できているのに対して、IKK $\epsilon$ と共発現した場合は NAP1 で免疫沈降を行うと、TBK1 との共発現に比べると減少はしているものの、NAP1 のリン酸化は検出できるが、whole cell lysate ではリン酸化 NAP1 のみならず、野生型の NAP1 も検出する事はできなかった(Fig. 2-10 lane6, 8)。また TICAM-1 の N 末端領域に結合する TRAF2 (第四章・第五章参照)は NAP1 と共沈した事から、NAP1 – TBK1 / IKK $\epsilon$ の複合体に TRAF2 が含まれている事が示唆された。

## < 考察 >

TICAM-1 の下流で IRF-3 をリン酸化し、活性化するキナーゼとして報告された IKK- $\epsilon$  と TBK1 はどちらも TANK に結合する事から、TANK が TICAM-1 と IKK- $\epsilon$ 、TBK1 をつなぎ TICAM-1 の下流で IRF-3 の活性化に関与する分子であることが示唆されていた (13)。しかし Yeast-Two hybrid 法を用いた解析の結果、TBK1 と TANK はそれぞれ TICAM-1 との直接の結合は確認出来なかった (Fig. 2-1)。また TBK1 は TICAM-1 と共沈する事から(8)、その中間分子であるならば TANK も TICAM-1 と共沈すると思われたが、今回の実験条件下では TANK と TICAM-1 との共沈は確認できなかった (Fig. 2-1, 2-2)。これらの結果から、TANK ではない別の分子が間に入る事を予想した。

NAP1 は TANK と非常に高い相同性を有しており、TBK1 と直接結合し、また、IKK- $\epsilon$ とも相互作用を示す事から(14)、NAP1 が TICAM-1 と TBK1 の間をつなぐ分子ではないかと考えた。TICAM-1 と NAP1 との相互作用を解析した結果、TICAM-1 と NAP1 は共沈した事から (Fig. 2-3)、NAP1 が TICAM-1 の下流で IFN- $\beta$  産生に関与する分子である可能性が考えられた。そこでレポータージーンを用いて機能解析を行ったが、NAP1 の全長を単独で強制発現しても IFN- $\beta$  promoter の活性化は見られず、TICAM-1 強制発現による IFN- $\beta$  promoter の活性化に対しても、NAP1 全長の濃度依存的に活性化が促進している傾向は見られるものの、顕著な促進は検出されなかった。この結果はおそらく内在性の NAP1 が十分量存在している為、強制発現による NAP1 全長の効果が検出しにくくなっているのではないかと考えた。そこで NAP1 欠損体による内在性 NAP1 の機能阻害について検討した。NAP1 の TBK1 との結合領域のみのコンストラクトである NAP1 158 - 270 は、TICAM-1 による IFN- $\beta$  promoter の活性化、IRF-3 の活性化、さらに TLR3 及び TLR4 のリガンド刺激による IRF-3 の活性化に対して濃度依存的にドミナントネガティブ体として機能する事が明らかとなり (Fig. 2-6, 2-7)、NAP1 は IRF-3 の活性化に関与する事により、TLR3 及び TLR4 を介した IFN- $\beta$  産生経路に関与している事が示唆された。

TBK1 による IFN- $\beta$  promoter の活性化は NAP1 全長を添加すると促進するという結果から (Fig. 2-4 c)、NAP1 は TBK1 による IRF-3 活性化を補う様に作用している可能性が考えられる。また TBK1 と結合が可能な NAP1 ドミ

ナントネガティブ体は TBK1 による IFN- $\beta$  promoter の活性化に影響を与えなかったが (Fig. 2-4 d)、TBK1 のキナーゼ変異体は IRF-3 のリン酸化を起こせない為に IFN- $\beta$  promoter を活性化しないという報告を合わせると(8, 9)、NAP1 ドミナントネガティブ体は TICAM-1 の下流で、TBK1 のキナーゼ活性には影響を与えずに、ドミナントネガティブ体として機能しているという事を示している。これらの結果を総合すると NAP1 ドミナントネガティブ体は TICAM-1 と相互作用を示せない為にドミナントネガティブ体として機能している事が考えられる。つまり、NAP1 は TBK1 と TICAM-1 の間に入り IFN- $\beta$  産生経路に関与している事が想定される。

TLR3、TLR4 リガンドによる NF- $\kappa$ B 活性化と TICAM-1 強制発現による NF- $\kappa$ B 活性化に対しても NAP1 ドミナントネガティブ体はわずかではあるが、抑制効果を示した (Fig. 2-5 a, Fig. 2-8)。TICAM-1 を介した NF- $\kappa$ B の活性化は TICAM-1 の N 末端領域に結合する TRAF6 と、C 末端領域に結合する RIP1 が関与している事が報告されている(19, 20)。TRAF6 と RIP1 を介した NF- $\kappa$ B 活性化は IKK $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ 複合体が関与している事が知られているが(11)、NAP1 は IKK $\beta$ および IKK $\gamma$ との相互作用は現在の所、確認されていない(14)。これらの結果は、TLR3 及び TLR4 を介した NF- $\kappa$ B 活性化に、TBK1 及び IKK $\epsilon$ を介した経路も存在する可能性を秘めているが、詳細は未解決のままである。NF- $\kappa$ B 活性化への IKK family 間の連携等、さらなる解明が進む事により、TLR を介した NF- $\kappa$ B 活性化への NAP1 の関与についても明確になる事が期待される。また、NAP1 ドミナントネガティブ体は TICAM-1 による AP-1 の活性化は阻害しなかった事から(Fig. 2-5 b)、TICAM-1 を介した AP-1 活性化、つまり MAP キナーゼの活性化は、NAP1 よりも上流で分岐する事が示唆された。

本研究により NAP1 は、IKK $\gamma$ が IKK $\alpha$ ・IKK $\beta$ と複合体を形成する様に、TBK1・IKK $\epsilon$ と複合体を形成し、上流からのシグナルをより効率良く TBK1 及び IKK $\epsilon$ へと伝える事より、IRF-3 の活性化を促進して IFN- $\beta$ 産生を誘導している事が明らかとなった。IKK $\gamma$ は上流からのシグナルにより 63 番目のリジンを介したポリユビキチン化され、NF- $\kappa$ B 活性化を調節している事が知られており(21)、IKK $\gamma$ と同様、NAP1 もユビキチン化されて IRF-3 の活性化を調節している事も考えられる。また、NAP1 は TBK1 および IKK $\epsilon$ と共発現すると顕著にリン酸化される事が報告されているが(14)、TBK1 と共発現した場合は異なり、IKK $\epsilon$ と共発現した場合は顕著に NAP1 のタンパク質量が減少

する結果が得られた (Fig. 2-10)。IKK $\epsilon$ と共発現させた際の NAP1 は、whole cell lysate ではほとんど検出できないが免疫沈降を行うと検出できている。これは、少なくなった NAP1 を免疫沈降により濃縮しているため検出できていると考えられる。この結果から NAP1 は IKK $\epsilon$ と共発現する事により分解され易くなっている可能性が考えられ、IKK $\epsilon$ による NAP1 のリン酸化がタンパク質の分解に関与しているかについては IKK $\epsilon$ キナーゼ変異体を用いて同様の実験を行う必要がある。TLR3 / TLR4 を介した IFN- $\beta$ 産生には IKK $\epsilon$ よりも TBK1の方が重要であるとの報告もあり(22)、NAP1 は刺激によってその複合体の構成分子が異なり TBK1 と IKK $\epsilon$ のどちらの分子とより複合体を形成するかによって、その後のタンパク質としての運命が変わる可能性があるだけでなく、分子複合体の構成員の違いが下流シグナルを分岐する事を暗示しているのかもしれない。これらの点は今後の研究の期待される点であろう。

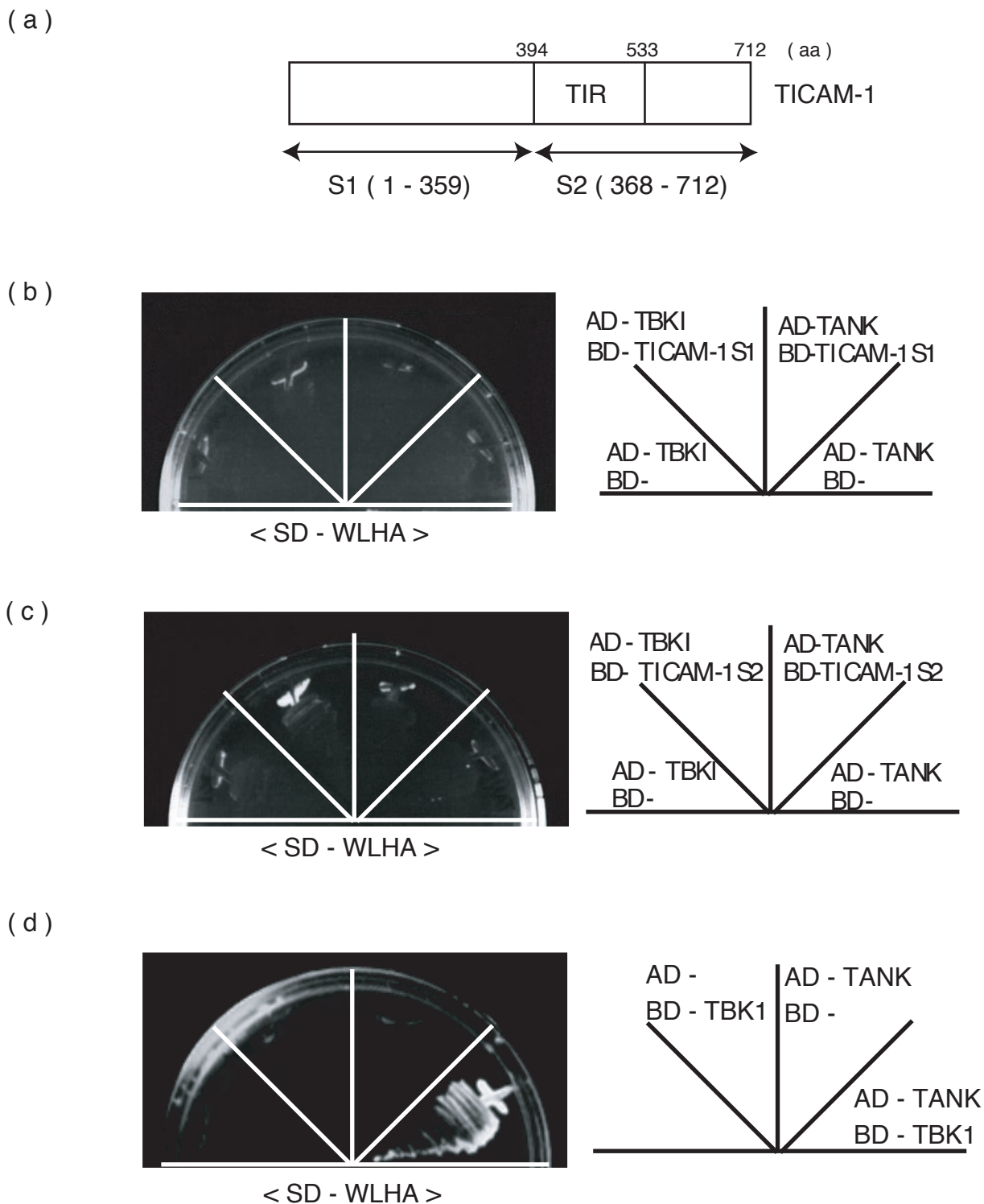


Fig. 2-1 TICAM-1 と TBK1, TANK との結合

- a) TICAM-1 の断片化模式図
- b) TICAM-1 N 末端領域と TBK1, TANK との結合
- c) TICAM-1 C 末端領域と TBK1, TANK との結合
- d) TANK と TBK1 との結合

TICAM-1 と TBK1 及び TANK との結合を、Yeast two-hybrid 法を用いて解析した。Yeast AH109 に各プラスミドを共発現させ、SD 培地から Trp, Leu を欠損させた培地で一度生育させてから、それぞれの選択培地下で生育を確認した。W ; Trp, L ; Leu, H ; His, A ; Ade

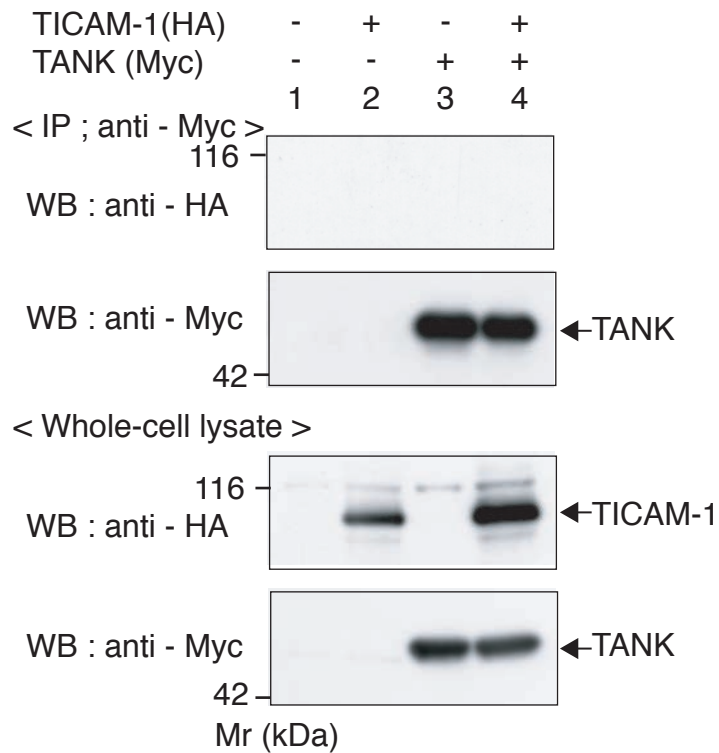
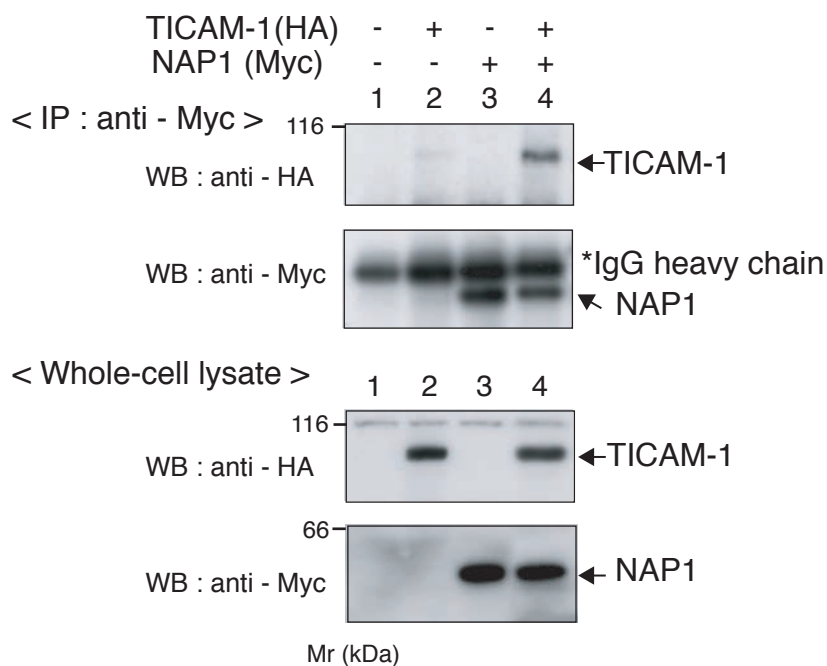


Fig. 2-2 TICAM-1 と TANK の哺乳類細胞内での相互作用

HEK293 細胞に TICAM-1 (C-terminal HA tag) と TANK (C-terminal Myc tag) を強制発現させ、24 時間後に細胞を回収し、免疫沈降を行った。上部二段が免疫沈降を行ったもの、下部二段が発現確認である。panel の左には免疫沈降及び検出に用いた一次抗体を示し、右にはバンドの予想される分子について矢印で示した。

( a )



( b )

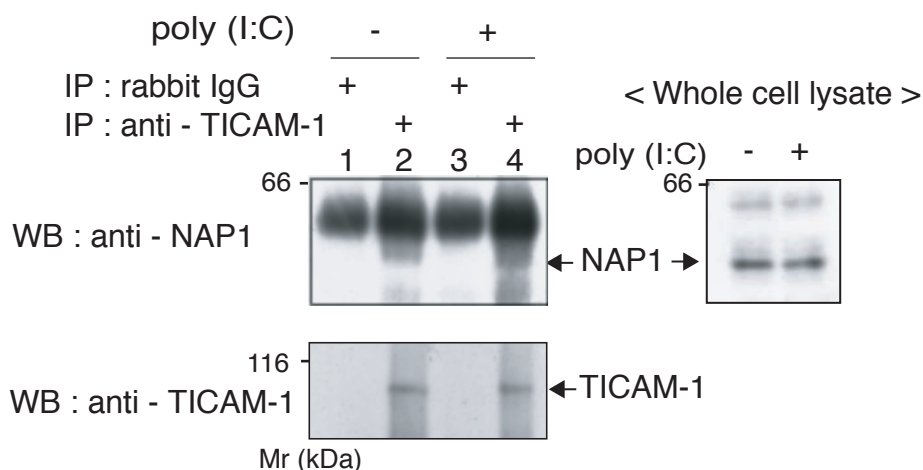


Fig. 2-3 NAP1 と TICAM-1 の哺乳類細胞内での相互作用

a) 強制発現による TICAM-1 と NAP1 の相互作用

293 細胞に TICAM-1(C-terminal HA tag) と NAP1(C-terminal Myc tag) を共発現させ、24 時間後の細胞を回収し、免疫沈降を行った。上部二段が免疫沈降を行ったもの、下部二段が発現確認である。panel の左には免疫沈降及び検出に用いた一次抗体を示し、右にはバンドの予想される分子について矢印で示した。

b) 内在性タンパク質での TICAM-1 と NAP1 の相互作用

HeLa 細胞を 10  $\mu$ g/ml の poly(I:C) (lane 3, 4)、または等量の PBS (lane 1, 2) で 20 分間刺激した後に細胞を回収し、免疫沈降を行った。記載は (a) と同じ。



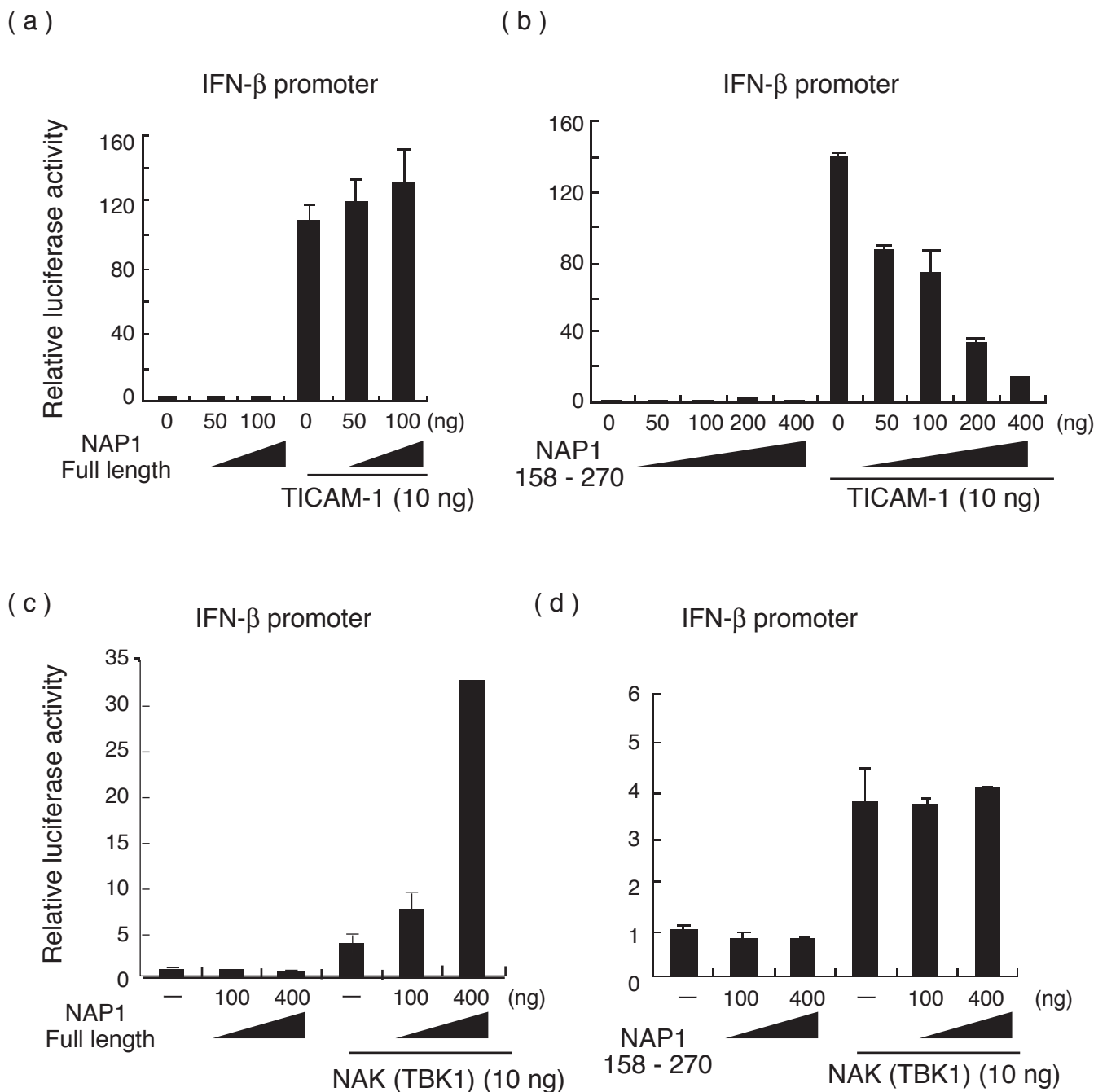
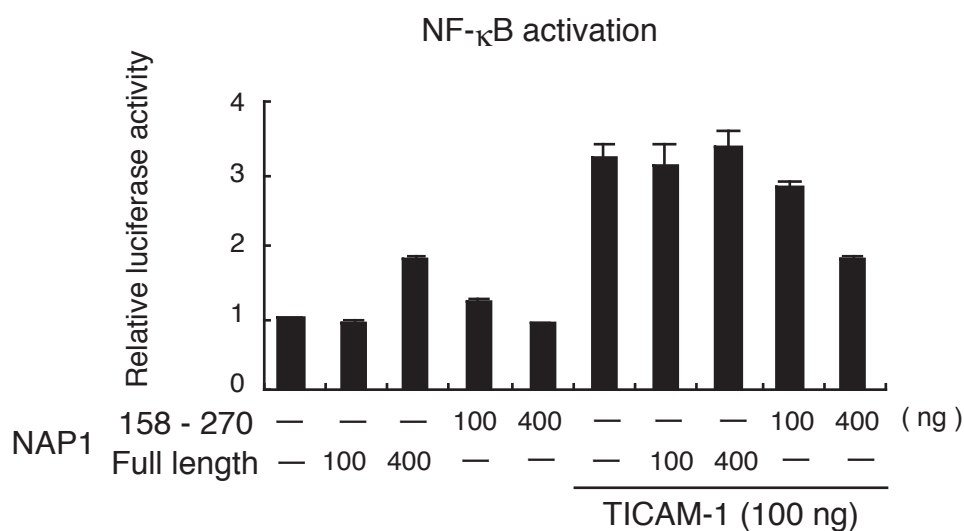


Fig. 2-4 TICAM-1 および NAK(TBK1) による IFN-β promoter 活性化への NAP1 の影響

- a) TICAM-1 による IFN-β promoter 活性化への NAP1 全長の影響
- b) TICAM-1 による IFN-β promoter 活性化への NAP1 158-270 の影響
- c) TBK1 による IFN-β promoter 活性化への NAP1 全長の影響
- d) TBK1 による IFN-β promoter 活性化への NAP1 158-270 の影響

HEK293 細胞に TICAM-1(a, b)、NAK(TBK1)(c, d) と NAP1 全長 (a, c)、NAP1 158 - 270(b, d) をそれぞれに加え、IFN-β promoter(p125-Luc)、pTK-Renilla を強制発現し、24 時間後に細胞を回収して解析を行った。横軸は添加したプラスミドの条件を示し、縦軸は空ベクターを強制発現させた際のルシフェラーゼ活性化を 1 とした際の、各条件でのルシフェラーゼ活性化量を相対的に示した。全ての結果は独立した三回の実験のうちの一回の結果であり、全ての実験で同様の傾向が見られた。

(a)



(b)

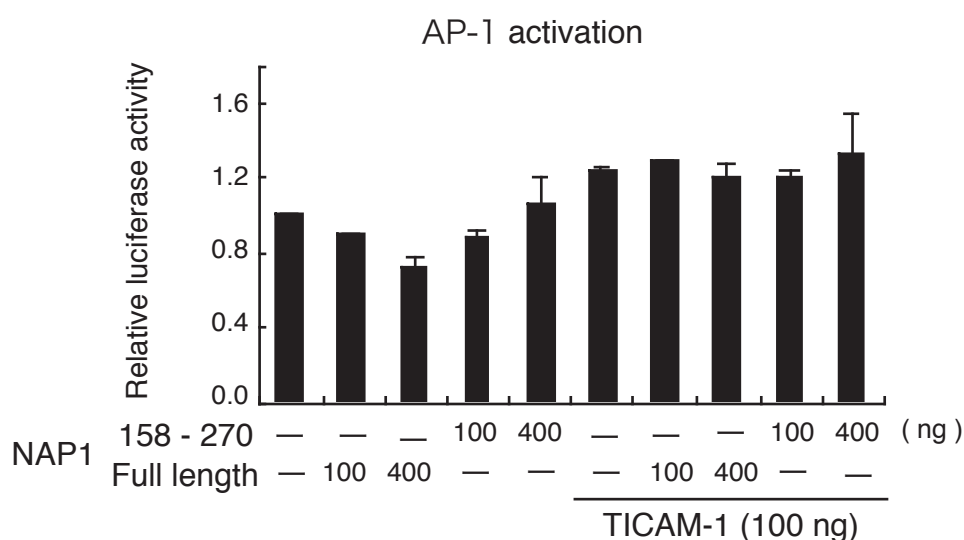


Fig. 2-5 TICAM-1 による NF- $\kappa$ B ならびに AP-1 活性化への NAP1 の影響

- a) NAP1 全長及び NAP1 ドミナントネガティブ体の TICAM-1 による NF- $\kappa$ B 活性化への影響
- b) NAP1 全長及び NAP1 ドミナントネガティブ体の TICAM-1 による AP-1 活性化への影響

HEK293 細胞に TICAM-1 と NAP1 全長または NAP1 158 - 270 を、NF- $\kappa$ B reporter (a) または AP-1 reporter (b) を共発現させ、発現後 24 時間の細胞を回収して解析を行った。横軸は添加したプラスミドの条件を示し、縦軸は空ベクターを強制発現させた際のルシフェラーゼ活性化を 1 とした際の、各条件でのルシフェラーゼ活性化量を相対的に示した。全ての結果は独立した二回の実験のうちの一回の結果であり、全ての実験で同様の傾向が見られた。

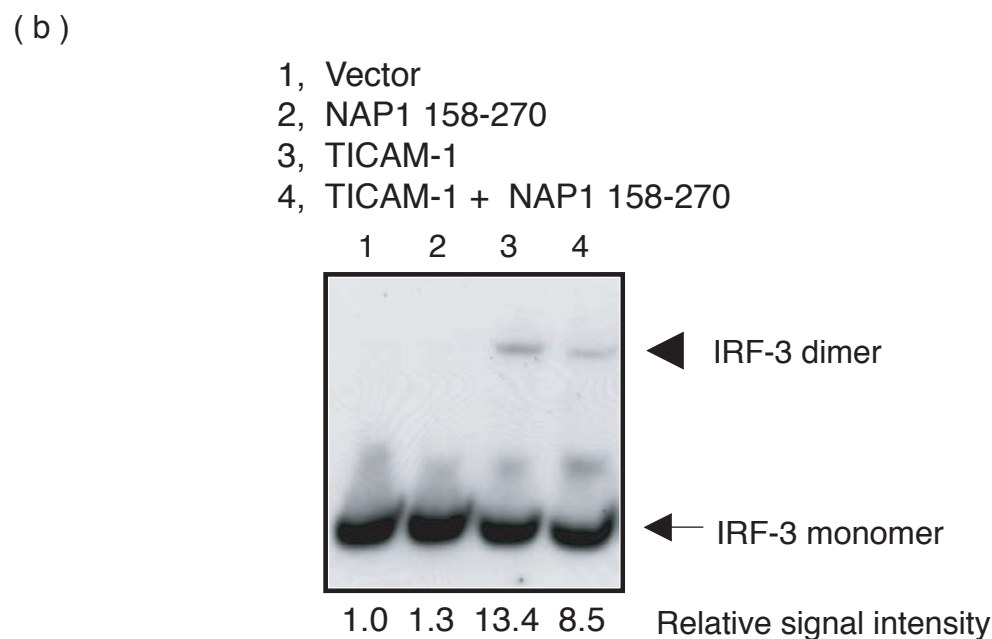
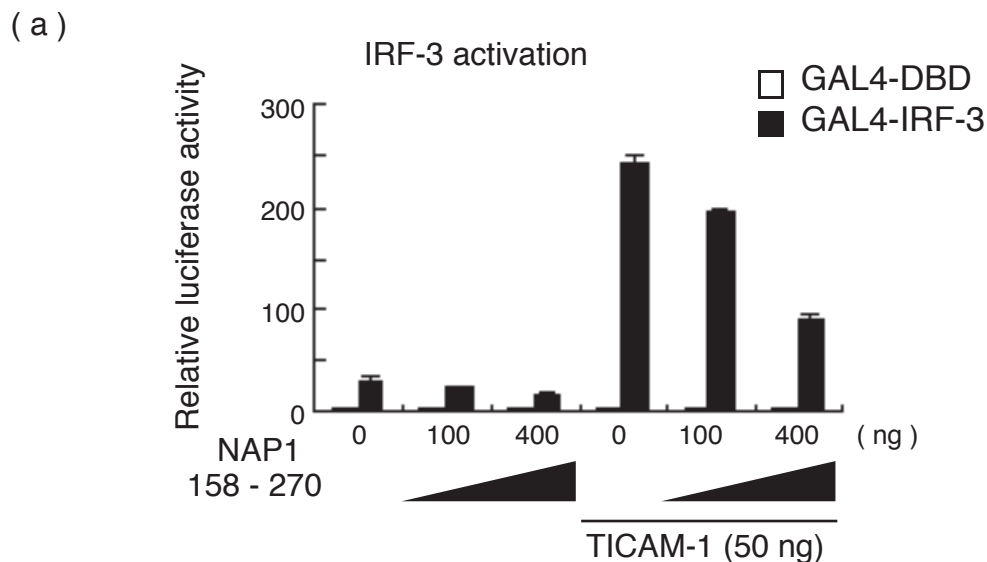


Fig. 2-6 TICAM-1 による IRF-3 活性化への NAP1 ドミナントネガティブ体の影響

a) TICAM-1 による IRF-3 活性化への NAP1 の影響 (GAL4-IRF-3 reporter を用いた解析)

HEK293 細胞に NAP1 158 - 270 と TICAM-1 を、IRF-3 reporter 及び GAL4 - DBD または GAL4 - IRF-3 と共発現させ、発現後 24 時間の細胞を回収して解析を行った。横軸は添加したプラスミドを示し、縦軸は空ベクターを強制発現させた際のルシフェラーゼ活性化を 1 とした際の、各条件でのルシフェラーゼ活性化量を相対的に示した。全ての結果は独立した三回の実験のうちの一回の結果であり、全ての実験で同様の傾向が見られた。

b) TICAM-1 による IRF-3 活性化への NAP1 の影響 (Native PAGE を用いた解析)

HEK293 細胞に TICAM-1 と NAP1 158-270 を強制発現させ、強制発現の 24 時間後に細胞を回収し、Native PAGE を用いて IRF-3 の活性化型である二量体形成量について、ウエスタンブロットリングを用いて解析した。二回の独立した実験を行い、どの回も同様の傾向が得られた。上記は二回のうちの一回の結果を示した。数値は Vector 強制発現時の IRF-3 二量体付近の泳動像を 1 とした時の他の条件のバンドの濃さを、NIH Image Scan を用いて相対的に示した。

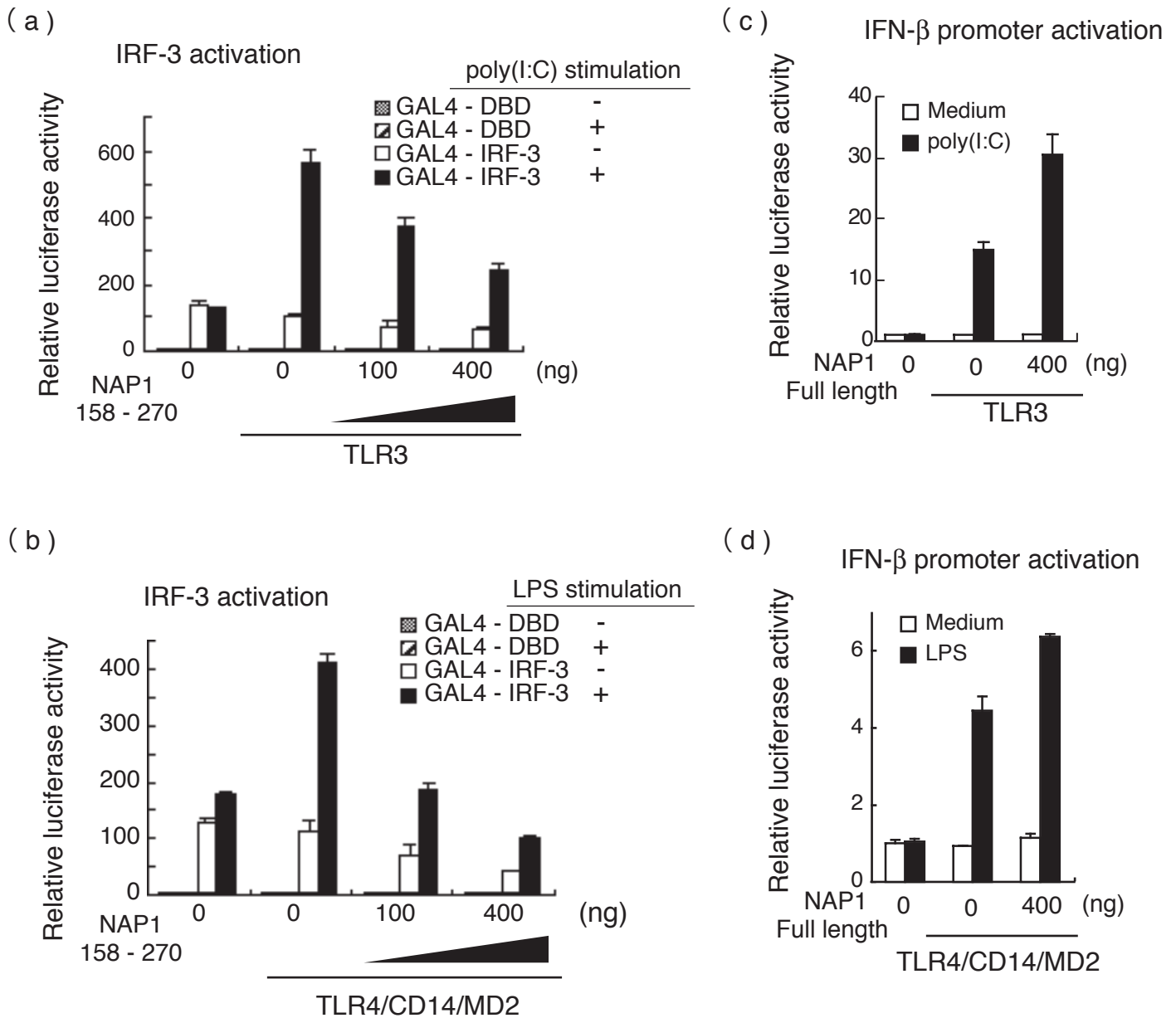
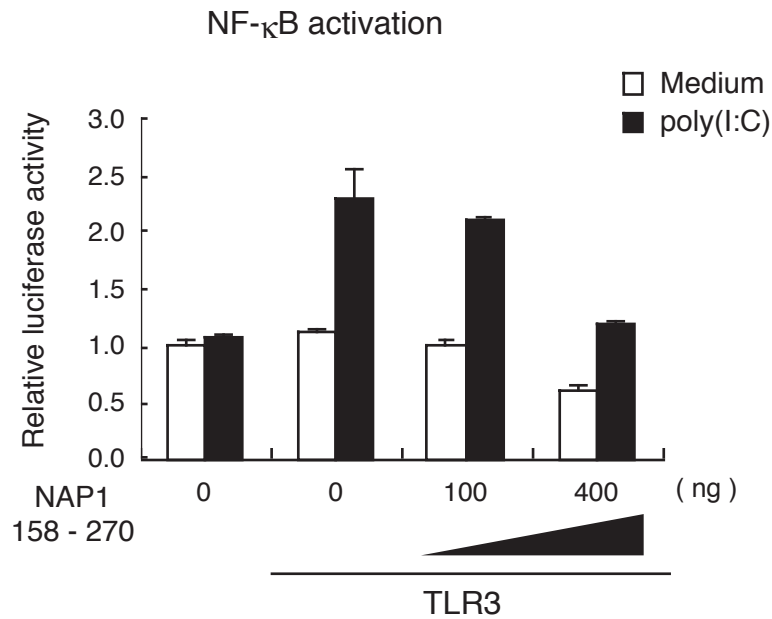


Fig. 2-7 リガンド刺激による IRF-3 活性化への NAP1 ドミナントネガティブ体の影響と  
リガンド刺激による IFN-β promoter 活性化への NAP1 全長の影響

- a) poly(I:C) 10 μg/ml 刺激による IRF-3 活性化への NAP1 ドミナントネガティブ体の影響
- b) LPS 100 ng/ml 刺激による IRF-3 活性化への NAP1 ドミナントネガティブ体の影響
- c) poly(I:C) 10 μg/ml 刺激による IFN-β promoter 活性化への NAP1 Full の影響
- d) LPS 100 ng/ml 刺激による IFN-β promoter 活性化への NAP1 Full の影響

HEK293 細胞に NAP1 158 - 270( 記載量 ) と TLR3 (50 ng) (a, c) または TLR4 / MD2 / CD14 (それぞれ 50 ng) (b, d) を、IRF-3 reporter 及び GAL4 - DBD または GAL4 - IRF-3(a, b), または IFN-β promoter(c, d) と共発現させ、発現後 24 時間の細胞に poly(I:C) (10 μg/ml) (a, c) または LPS (100 ng/ml) (b, d) を含む培地と置換し、その 6 時間に細胞を回収して解析を行った。横軸は添加したプラスミドを示し、縦軸は GAL4 - DBD または IFN-β promoter と空ベクターを強制発現させた際のルシフェラーゼ活性化を 1 とした際の、各条件でのルシフェラーゼ活性化量を相対的に示した。全ての結果は独立した四回の実験のうちの一回の結果であり、全ての実験で同様の傾向が見られた。

(a)



(b)

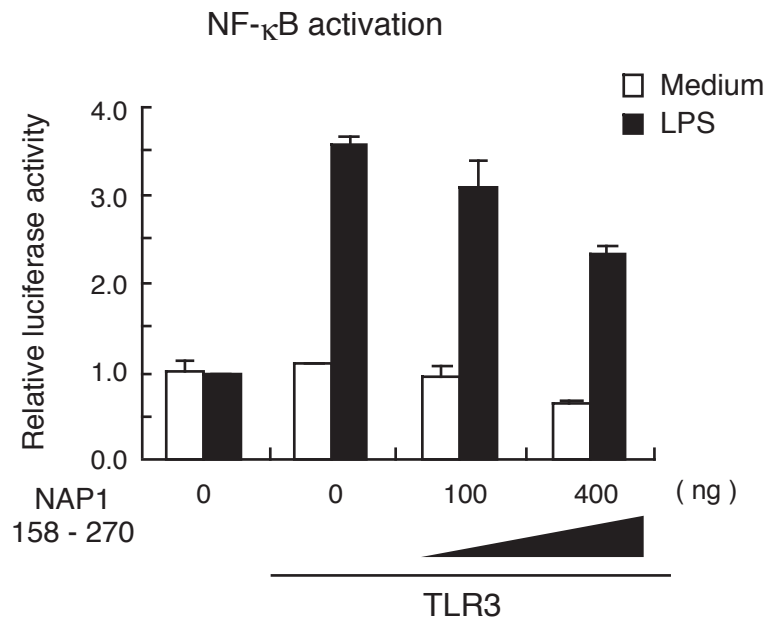


Fig. 2-8 リガンド刺激による NF- $\kappa$ B 活性化への NAP ドミナントネガティブ体の影響

- a) poly(I:C) 10  $\mu$ g/ml 刺激による NF- $\kappa$ B 活性化への NAP1 ドミナントネガティブ体の影響  
b) LPS 100 ng/ml 刺激による NF- $\kappa$ B 活性化への NAP1 ドミナントネガティブ体の影響

HEK293 細胞に NAP1 158 - 270( 記載量 ) と TLR3 ( 50 ng ) ( a ) または TLR4 / MD2 / CD14 ( それぞれ 50 ng ) ( b ) を、NF- $\kappa$ B reporter と共発現させ、発現後 24 時間の細胞に poly(I:C) ( 10  $\mu$ g/ml ) ( a ) または LPS ( 100 ng/ml ) ( b ) を含む培地と置換し、その 6 時間に細胞を回収して解析を行った。横軸は添加したプラスミドを示し、縦軸は空ベクターを強制発現させた際のルシフェラーゼ活性化を 1 とした際の、各条件でのルシフェラーゼ活性化量を相対的に示した。全ての結果は独立した二回の実験のうちの一回の結果であり、全ての実験で同様の傾向が見られた。

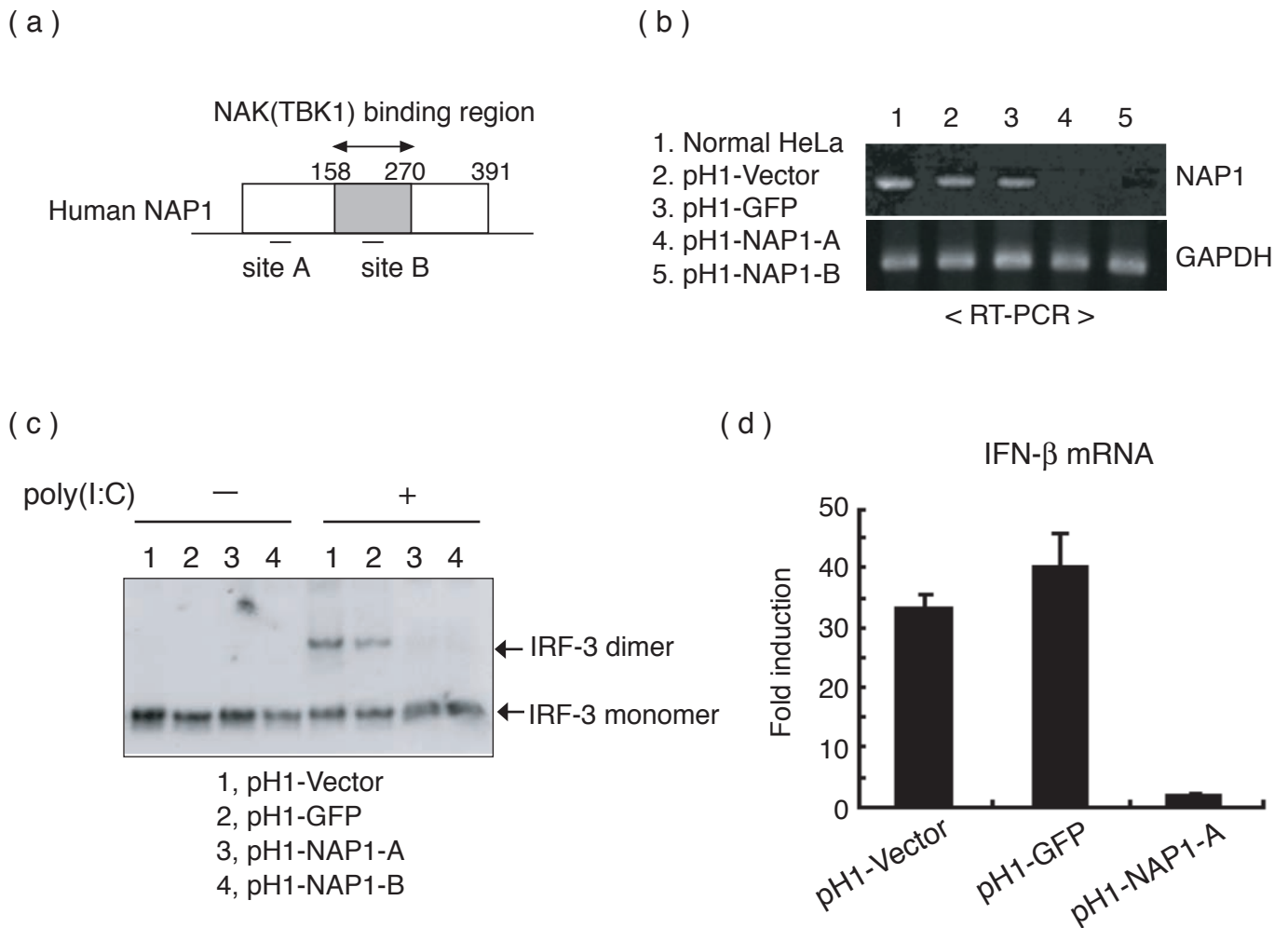


Fig. 2-9 poly(I:C) 刺激によって誘導される IRF-3 活性化及び IFN- $\beta$  mRNA への NAP1 の影響

- a) NAP1 ノックダウンによるに用いたターゲットサイトの模式図
- b) RT-PCR による NAP1 ノックダウン確認
- c) NAP1 ノックダウン細胞での poly(I:C) 刺激による IRF-3 活性化 (Native PAGE 法を用いて)
- c) NAP1 ノックダウン細胞での poly(I:C) 刺激による IFN- $\beta$  mRNA 量

HeLa 細胞に pH1-Vector, pH1-GFP (コントロール細胞群として), pH1-NAP1-A, pH1-NAP1-B のそれぞれを強制発現し、発現後 24 時間目から Puromycine (1 $\mu$ g/ml) を含む培地と置換し、それぞれ耐性となった単一細胞集団を、各条件 4 から 5 クローンずつ単離し、NAP1 ノックダウンについて RT-PCR で確認した (b)。NAP1 stable ノックダウン HeLa 細胞 (pH1-NAP1-A, pH1-NAP1-B) 及びコントロール HeLa 細胞 (pH1-Vector 又は sih-GFP) を poly(I:C) (10  $\mu$ g/ml) で 1 時間 (c) または 6 時間 (d) 刺激した際に誘導される、IRF-3 の二量体形成量 (c) および IFN- $\beta$  mRNA 量 (d) を、Native PAGE(c) および定量 PCR(d) 法を用いて解析した。Native PAGE に関しては Fig. 2-6 と同様に解析した。定量 PCR については、poly(I:C) 刺激を行った細胞群から RNA を抽出して逆転写を行い、横軸はノックダウンに用いたベクター名を、縦軸は各細胞群の poly(I:C) 刺激によって誘導される IFN- $\beta$  mRNA 量を未刺激時に含まれる IFN- $\beta$  mRNA 量で相対的に示した。各実験は c に関しては独立した三回の実験、d に関しては独立した四回の実験をそれぞれ行い、どの実験回も同様の傾向が得られた。上記はそれらのうちの一回の結果を示した。また、どの実験回においても NAP1 のノックダウンは RT-PCR にて確認した。

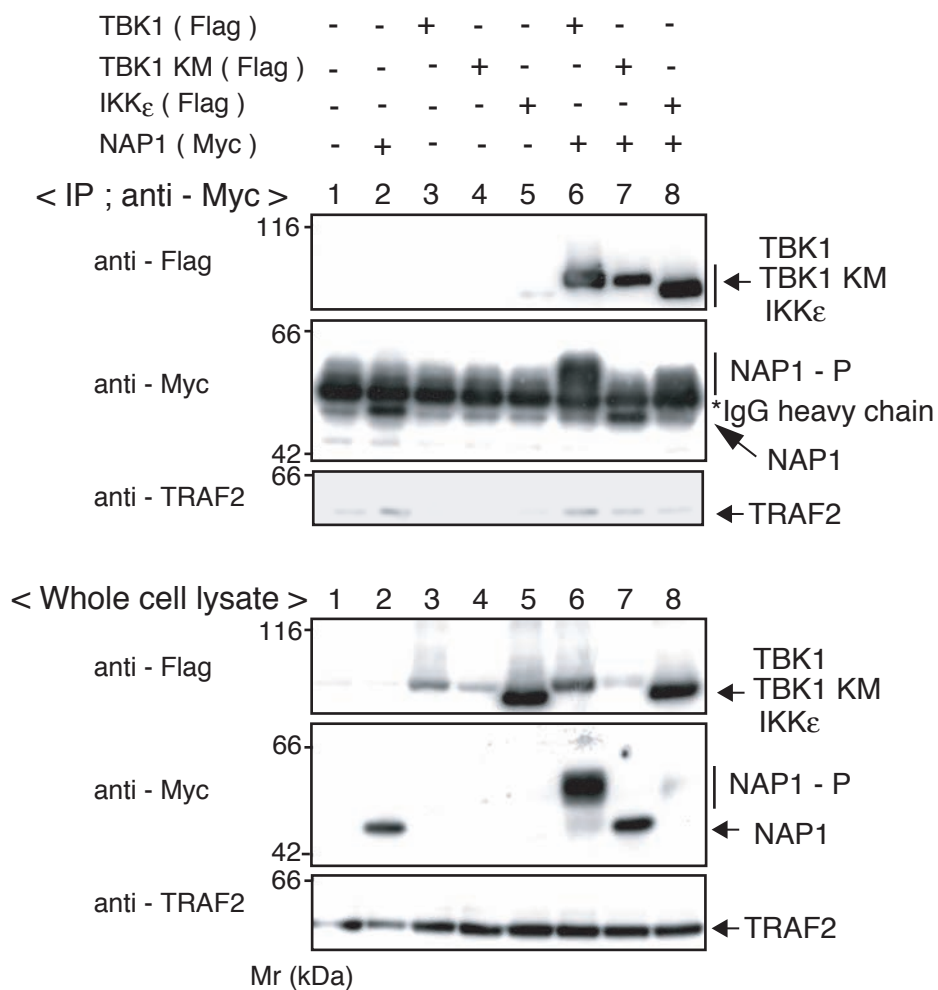


Fig. 2-10 NAP1 と TBK1 及び IKK $\epsilon$  との共発現による NAP1 のリン酸化

293 細胞に NAP1 (C-terminal Myc tag ) と TBK1, TBK1 KM (C-terminal Flag tag) 及び IKK $\epsilon$  (N-terminal Flag tag) を共発現させ、24 時間後の細胞を回収し、免疫沈降を行った。上部二段が免疫沈降を行ったもの、下部二段が発現確認である。panel の左には免疫沈降及び検出に用いた一次抗体を示し、右にはバンドの予想される分子について矢印で示した。TBK1 KM とは TBK1 のセリン・スレオニンキナーゼ活性に重要な 38 番目のリジン残基をアラニンに置換したもので、キナーゼ活性が欠損しているコンストラクトである。

## < 考察 >

1. O'Neill, L. A., K. A. Fitzgerald, and A. G. Bowie. 2003. The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol* 24:286-290.
2. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640-643.
3. Pomerantz, J. L., and D. Baltimore. 1999. NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *Embo J* 18:6694-6704.
4. Bonnard, M., C. Mirtsos, S. Suzuki, K. Graham, J. Huang, M. Ng, A. Itie, A. Wakeham, A. Shahinian, W. J. Henzel, A. J. Elia, W. Shillinglaw, T. W. Mak, Z. Cao, and W. C. Yeh. 2000. Deficiency of T2K leads to apoptotic liver degeneration and impaired NF-kappaB-dependent gene transcription. *Embo J* 19:4976-4985.
5. Tojima, Y., A. Fujimoto, M. Delhase, Y. Chen, S. Hatakeyama, K. Nakayama, Y. Kaneko, Y. Nimura, N. Motoyama, K. Ikeda, M. Karin, and M. Nakanishi. 2000. NAK is an IkappaB kinase-activating kinase. *Nature* 404:778-782.
6. Peters, R. T., S. M. Liao, and T. Maniatis. 2000. IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible IkappaB kinase complex. *Mol Cell* 5:513-522.
7. Shimada, T., T. Kawai, K. Takeda, M. Matsumoto, J. Inoue, Y. Tatsumi, A. Kanamaru, and S. Akira. 1999. IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases. *Int Immunol* 11:1357-1362.
8. Fitzgerald, K. A., S. M. McWhirter, K. L. Faia, D. C. Rowe, E. Latz, D. T. Golenbock, A. J. Coyle, S. M. Liao, and T. Maniatis. 2003. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 4:491-496.
9. Sharma, S., B. R. tenOever, N. Grandvaux, G. P. Zhou, R. Lin, and J. Hiscott. 2003. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 300:1148-1151.
10. Bonizzi, G., and M. Karin. 2004. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25:280-288.



11. Hacker, H., and M. Karin. 2006. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* 2006:re13.
12. Peters, R. T., and T. Maniatis. 2001. A new family of IKK-related kinases may function as I kappa B kinase kinases. *Biochim Biophys Acta* 1471:M57-62.
13. Barton, G. M., and R. Medzhitov. 2003. Linking Toll-like receptors to IFN-alpha/beta expression. *Nat Immunol* 4:432-433.
14. Fujita, F., Y. Taniguchi, T. Kato, Y. Narita, A. Furuya, T. Ogawa, H. Sakurai, T. Joh, M. Itoh, M. Delhase, M. Karin, and M. Nakanishi. 2003. Identification of NAP1, a regulatory subunit of IkappaB kinase-related kinases that potentiates NF-kappaB signaling. *Mol Cell Biol* 23:7780-7793.
15. Maniatis, T., J. V. Falvo, T. H. Kim, T. K. Kim, C. H. Lin, B. S. Parekh, and M. G. Wathélet. 1998. Structure and function of the interferon-beta enhanceosome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63:609-620.
16. Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, and T. Seya. 2003. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 4:161-167.
17. Honda, K., and T. Taniguchi. 2006. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 6:644-658.
18. Sato, M., H. Suemori, N. Hata, M. Asagiri, K. Ogasawara, K. Nakao, T. Nakaya, M. Katsuki, S. Noguchi, N. Tanaka, and T. Taniguchi. 2000. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 13:539-548.
19. Sato, S., M. Sugiyama, M. Yamamoto, Y. Watanabe, T. Kawai, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 171:4304-4310.
20. Meylan, E., K. Burns, K. Hofmann, V. Blancheteau, F. Martinon, M. Kelliher, and J. Tschopp. 2004. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 5:503-507.
21. Liu, Y. C., J. Penninger, and M. Karin. 2005. Immunity by ubiquitylation: a

- reversible process of modification. *Nat Rev Immunol* 5:941-952.
22. Hemmi, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yamamoto, T. Kaisho, H. Sanjo, T. Kawai, K. Hoshino, K. Takeda, and S. Akira. 2004. The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med* 199:1641-1650.

### 第三章 ウイルス感染による IFN- $\beta$ 産生における NAP1 の関与

第二章では TLR3 を介した IFN- $\beta$  産生の分子機構に NAP1 が関与しているという新たな知見を得た。この章では細胞質内二重鎖 RNA 認識による IFN- $\beta$  産生への NAP1 の関与について、得られた知見を報告する。

TLR3 は膜タンパクであり、樹状細胞やマクロファージといった抗原提示細胞ではエンドソームに、繊維芽細胞では細胞表面に局在している事が知られている(1, 2)。そのためリガンドである二重鎖 RNA 及びその合成アナログである poly(I:C)の TLR3 による認識は、ウイルス感染による壊死またはアポトーシスが誘導された感染細胞が抗原提示細胞に貪食されたりエンドサイトーシスにより取り込まれたりする際に起こる現象として捉えられている(3)。しかし、実際にウイルスが感染した際、生体はより迅速に感染を感知して抗ウイルス作用を示す type-I IFN の産生を誘導する事が不可欠である。ウイルスの中には、そのゲノム構造から複製をする際に感染細胞の細胞質内で二重鎖 RNA の合成が必須であるものが多く、このようなウイルスの感染に対しては細胞質内での二重鎖 RNA の認識が適切である。細胞質内に存在する二重鎖 RNA を認識してウイルス感染防御に関与する分子として PKR が報告されていたが(4, 5)、PKR 強制発現では type-I IFN 産生に重要な転写因子である IRF-3 及び IRF-7 の活性化は見られなかった事、また PKR 欠損マウス由来の細胞にウイルスを感染させた際の IRF-3 及び IRF-7 の活性化は野生型の細胞と同様であった事から、細胞質内二重鎖 RNA 認識による type-I IFN 産生には、別の分子の存在が示唆されていた(6)。細胞質に存在し二重鎖 RNA を認識する分子として Retinoic acid inducible gene I (RIG-I)と Melanoma differentiation associated gene 5 (MDA5)が近年報告された(7, 8)。この二つの分子は、N 末端領域に Caspase recruitment domain (CARD)を、C 末端領域には RNA helicase domain を有しており、C 末端領域の helicase domain を介して poly(I:C)と結合して ATP 依存的に二重鎖をほどこいた後、そのシグナルを N 末端領域の CARD domain に伝え、TLR3 を介した IFN- $\beta$  産生の分子機構と同様、TBK1 及び IKK $\epsilon$ を介して IRF-3 を活性化して IFN- $\beta$  の産生を誘導すると考えられている(9)。RIG-I 欠損マウスを用いた解析の結果、Sendai virus (SV)、Vesicular stomatitis virus (VSV)、Newcastle disease virus (NDV)

(全てマイナスの ssRNA をゲノムとする) といったウイルス感染に対する type-I IFN 産生の低下、ウイルス感染によるマウス致死率の上昇、個体内でのウイルス量の増加等が明らかとなった(10)。また、RIG-I 及び MDA5 のノックアウトマウスを比較する事により、RIG-I は多くの RNA ウイルス感染による type-I IFN 産生を、MDA5 はピコルナウイルス科のウイルス感染と poly(I:C) 刺激による type-I IFN 産生をそれぞれ担っており、リガンドにより認識分子が使い分けられている事が報告されている(11)。最近、RIG-I と MDA5 の下流でシグナル伝達に關与する分子として、Interferon- $\beta$  promoter stimulator -1 (IPS-1) が報告された(12)。IPS-1 は RIG-I 及び MDA5 の N 末端領域に存在する CARD domain と非常に相同性の高い CARD-like domain を N 末端領域に持つミトコンドリア膜蛋白質である。IPS-1 は N 末端領域で RIG-I 及び MDA5 と相互作用を示し、RIG-I 及び MDA5 からのシグナルを TBK1 及び IKK $\epsilon$  に伝えて type-I IFN の産生を誘導している事が報告されている(12-14)。肝炎ウイルス感染による劇症肝炎は厚生労働省による特定難治性疾患の一つであるが、C 型肝炎ウイルスの持つセリンプロテアーゼ、NS3/4A、が IPS-1 を切断し、type-I IFN 産生を抑制している事が報告されるなど(15)、RIG-I/MDA5-IPS-1 経路がウイルス感染に対する type-I IFN 産生にいかに関与しているかが伺い知れる。しかし、IPS-1 からどのように TBK1 及び IKK $\epsilon$  へと活性化が伝わり、IRF-3 が活性化されるかについては未知であった。

Respiratory syncytial virus (RSV) は、パラミクソウイルス属のマイナスの一本鎖 RNA をゲノムに持つウイルスであり、このウイルスに感染するとヒトは上気道炎を引き起こす。RSV 感染によって誘導されるサイトカインやケモカインについて多くの研究がなされているが(16-18)、type-I IFN 産生の経路に関しては、同族の SV を用いたノックアウトマウスでの解析結果から、PKR および TLR3 以外の TLR family 非依存的に誘導される事が想定されていたが、その詳細な機構については不明であった(19)。

本研究では RSV ウイルス感染による IFN- $\beta$  産生が RIG-I 依存的に誘導され、さらに TBK1 及び IKK $\epsilon$  と結合して TLR3/TLR4 を介した IFN- $\beta$  産生に關与していた NAP1 が細胞質内二重鎖 RNA 認識による IFN- $\beta$  産生にも關与している事について述べる。

## < 結果 >

### **3-1 Respiratory syncytial virus 感染による IFN- $\beta$ 産生経路の同定**

RSV 感染による IFN- $\beta$  産生の分子経路を明らかにする目的で、HeLa 細胞で RNAi 法による遺伝子ノックダウンを行い、ウイルス感染実験を行った。先ず TLR3 を介している可能性を考え TLR3 のアダプター分子である TICAM-1 を、ポジティブコントロールとして IFN- $\beta$  産生に重要なキナーゼである TBK1 と IKK $\epsilon$  をそれぞれノックダウンし、RSV を感染させた。RSV 感染 48 時間後に誘導されている IFN- $\beta$  mRNA 量は、TICAM-1 ノックダウン細胞はネガティブコントロールである siGFP を導入した細胞と比べほとんど差はみられなかった (Fig. 3-1 a)。これに対して TBK1 の siRNA を導入した細胞では RSV 感染による IFN- $\beta$  mRNA 量は減少している傾向が得られた。Poly(I:C) 刺激によって誘導される IFN- $\beta$  mRNA 量は TICAM-1, TBK1, IKK $\epsilon$  すべてのノックダウン細胞において減少が確認された事から、各ノックダウン細胞はこれらの遺伝子発現が低下する事により IFN- $\beta$  誘導能が低下している事がわかる。これらの結果から、RSV 感染による IFN- $\beta$  mRNA の誘導は TICAM-1 非依存、TBK1 依存である事が示された。

細胞質内二重鎖 RNA 認識に関与する分子経路として RIG-I / MDA5 – IPS-1 経路が、近年報告された (20)。RSV 感染による IFN- $\beta$  産生経路が RIG-I / MDA5 – IPS-1 経路を介しているかを明らかにする目的で、HeLa 細胞で siRNA を用いた遺伝子ノックダウンを行い解析した。その結果、RSV 感染によって誘導される IFN- $\beta$  mRNA 量は、コントロールである siGFP 導入細胞に比べ、RIG-I 及び IPS-1 ノックダウン細胞ではより顕著に、MDA5 ノックダウン細胞でもわずかに減少が見られた (Fig. 3-1 b)。NAP1 は TLR3 / TLR4 を介した IFN- $\beta$  産生に関与する分子として報告されている (第二章参照) (21)。驚くべき事に、NAP1 をノックダウンした細胞群においても、RSV 感染によって誘導される IFN- $\beta$  mRNA 量は減少が見られた (Fig. 3-1 c)。NAP1 の TBK1 との結合領域である 158-270 アミノ酸のみのコンストラクト (NAP1 158-270) は TLR3 を介した IFN- $\beta$  産生に対してドミナントネガティブ体として機能する事が知られている (第二章参照) (21)。NAP1 ドミナントネガティブ体を強制発現した細胞でも RSV 感染によって誘導される IFN- $\beta$  mRNA 量が減少した (Fig. 3-1 d)。これらの結果

から、RSV 感染によって誘導される IFN- $\beta$  mRNA は RIG-I / MDA5 – IPS-1 経路を介しており、NAP1 は RIG-I / MDA5 – IPS-1 経路を介した IFN- $\beta$  産生にも関与している可能性が示唆された。

### **3-2 RIG-I 及び MDA5 と NAP1 との相互作用**

NAP1 は TBK1 及び IKK $\epsilon$  と相互作用を示す事が既に報告されており(22)、RIG-I 及び MDA5 を介した IFN- $\beta$  産生は TBK1 及び IKK $\epsilon$  を介している事が報告されている事から(7)、NAP1 が RIG-I 及び MDA5 と相互作用する可能性が考えられた。そこで、NAP1 に Myc タグを、RIG-I 及び MDA5 に Flag タグをそれぞれ付加し、293 細胞に強制発現させて免疫沈降を行った。その結果、RIG-I 及び MDA5 は NAP1 と相互作用を示した(Fig. 3-2 a)。細胞内在性の RIG-I と NAP1 も強制発現による実験結果と同様に相互作用を示すかを調べるため、HeLa 細胞を用いて免疫沈降を行った。RIG-I は IFN によって誘導される遺伝子であり、IFN- $\beta$  を事前に添加していない細胞では、その RIG-I はウエスタンブロッティングでは検出できなかった(7) (Fig. 3-2 b)。事前に IFN- $\beta$  を添加して内在性 RIG-I の発現量を上昇させておくと、内在性の RIG-I はウエスタンブロッティングで検出できるようになり、内在性の RIG-I と NAP1 は共沈した(Fig. 3-2 b)。NAP1 は 391 アミノ酸からなるタンパク質であるが、158-270 アミノ酸の領域で TBK1 と直接結合する事が報告されている(Fig. 3-2 c) (22)。NAP1 と RIG-I 及び MDA5 との相互作用領域を明らかにする為、NAP1 158-270 と NAP1  $\Delta$  158-270 を用いて同様の実験を行った。その結果 NAP1  $\Delta$  158-270 のコンストラクトと RIG-I 及び MDA5 は相互作用を示した(Fig. 3-2 d)。これらの結果から、NAP1 は TBK1 とは異なる領域で、RIG-I 及び MDA5 と相互作用をしている事が示唆された。

### **3-3 RIG-I 及び MDA5 を介したシグナル伝達経路への NAP1 の関与**

NAP1 と RIG-I 及び MDA5 との相互作用が確認された事から、NAP1 が RIG-I 及び MDA5 を介したシグナル伝達機構に関与している事が考えられた。NAP1

の 158-270 の領域のみのコンストラクトは TICAM-1 を介した IFN- $\beta$ 産生に対しドミナントネガティブ体として機能する（二章参照）事から(21)、このコンストラクトを NAP1 DN とし、NAP1 全長 (NAP1 Full)と NAP1 DN の RIG-I 及び MDA5 のシグナル伝達経路への影響を、レポータージーンを用いて解析した。RIG-I 及び MDA5 は N 末端領域に CARD domain、C 末端領域に二重鎖を解くよう機能すると報告のある helicase domain を有している。RIG-I は全長では下流シグナルを活性化する力は非常に弱い、C 末端領域の helicase domain を除去する( $\Delta$  RIG-I)と非常に強く下流シグナルを活性化する事が報告されている(7)。まず RIG-I,  $\Delta$  RIG-I 及び MDA5 による IFN- $\beta$  promoter 活性化への NAP1 の影響について解析を行った。その結果、NAP1 Full は RIG-I および  $\Delta$  RIG-I を介した IFN- $\beta$  promoter の活性化に対してほとんど影響は見られなかったのに対し、MDA5 を介した IFN- $\beta$  promoter の活性化に対しては NAP1 full の濃度依存的に IFN- $\beta$  promoter の活性化が見られた(Fig. 3-3 a ; right)。また NAP1 DN は RIG-I,  $\Delta$  RIG-I 及び MDA5 による IFN- $\beta$  promoter の活性化に対し、濃度依存的に阻害を示した(Fig. 3-3 a ; left)。

IFN- $\beta$  の promoter 領域には、IRF-3, Atf-2 / c-Jun (AP-1), NF- $\kappa$ B の三種の転写因子が非常に重要な働きをしており、中でも IRF-3 活性化は IFN- $\beta$ 産生に特異的に、NF- $\kappa$ B 活性化は多くの炎症性サイトカイン産生にも重要である。RIG-I 及び MDA5 による IRF-3 活性化と NF- $\kappa$ B 活性化への NAP1 の影響について同様の解析を行った。その結果、 $\Delta$  RIG-I による IRF-3 の活性化は NAP1 Full の濃度依存的に促進する傾向が得られ、NAP1 DN は RIG-I,  $\Delta$  RIG-I 及び MDA5 による IRF-3 の活性化を濃度依存的に抑制した(Fig. 3-3 b)。また、 $\Delta$  RIG-I 及び MDA5 を介した NF- $\kappa$ B の活性化は NAP1 Full により促進する傾向がわずかに見られ、NAP1 DN はその活性化を濃度依存的に抑制した(Fig. 3-3 c)。これらの結果から、NAP1 は RIG-I 及び MDA5 を介した IRF-3 と NF- $\kappa$ B の両転写因子の活性化に影響を及ぼし、IFN- $\beta$  promoter の活性化に関与している事が示唆された。

### **3-4 IPS-1 を介したシグナル伝達機構への NAP1 の関与と相互作用**

RIG-I 及び MDA5 を介した IFN- $\beta$  産生に重要な役割を果たす分子として、

IPS-1/ MAVS / Cardif / VISA が四つの異なるグループから報告された(12-15)。IPS-1 は N 末端領域に MDA5 の CARD domain と非常に高い相同性を示す CARD-like domain を有しており、C 末端には非常に疎水性の高い膜貫通領域を持っているミトコンドリア外膜タンパク質である(13)。siRNA を導入して内在性の IPS-1 をノックダウンすると RIG-I の N 末端領域を介した IFN- $\beta$ 産生は顕著に減少するのに対して TBK1 や IKK $\epsilon$ を介した IFN- $\beta$ 産生には影響を与えないことから、IPS-1 は RIG-I よりも下流に存在して RIG-I からの IFN- $\beta$ 産生シグナルを TBK1 および IKK $\epsilon$ へと伝達しているアダプター分子であると考えられている(12)。そこで NAP1 DN が IPS-1 を介した IFN- $\beta$ 産生に関与している事を明確にするため、レポータージーンを用いた解析を行った。その結果、NAP1 DN は IPS-1 による IFN- $\beta$  promoter 及び IRF-3 の活性化を顕著に阻害した(Fig. 3-4 a)。また、NAP1 と IPS-1 との相互作用を調べるため、培養細胞を用いた免疫沈降を行った。その結果、NAP1 は IPS-1 とわずかだが共沈した (Fig. 3-4 b)。

### **3-5 IPS-1 と NAP1 の局在**

IPS-1 はミトコンドリア外膜タンパク質であり、その膜貫通領域を小胞体膜に局在が規定されている分子由来のものと置換してミトコンドリアへの局在を阻害すると IPS-1 による IFN- $\beta$ 産生が見られなくなる事から、ミトコンドリア膜に局在する事が IPS-1 による IFN- $\beta$ 産生に非常に重要であると考えられている(13)。NAP1 DN が IPS-1 による IFN- $\beta$  promoter 及び IRF-3 の活性化を顕著に阻害した事から、NAP1 がミトコンドリアに局在している可能性が考えられた。そこで NAP1 の局在を、倒立共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。HeLa 細胞に Myc-タグを付加した NAP1 を強制発現させ、ミトコンドリアマーカである MitoTracker との共局在を調べた所、NAP1 の一部が MitoTracker と共局在した。NAP1 と高い相同性を示す分子である TANK に対しても同様の実験を行ったが、TANK と MitoTracker との共局在は確認できなかった(Fig. 3-5 a)。NAP1 と IPS-1 が細胞内で共局在するかを調べるため、同様の実験系で NAP1 と IPS-1 とを共発現させた。実験に使用した IPS-1- Flag はミトコンドリアに局在している事が確認でき(Fig. 3-5 b)、この IPS-1- Flag と共発現させた NAP1-Myc は共局在を示した(Fig. 3-5 c)。これらの結果から、NAP1 は IPS-1 とミト



コンドリア膜上で相互作用を示す事が示唆された。

### **3-6 細胞質内二重鎖 RNA 認識による IFN- $\beta$ 産生経路への NAP1 DN の影響**

これまでの解析の結果、NAP1 は RIG-I / MDA5 – IPS-1 に相互作用して、これらの分子による IFN- $\beta$ 産生に影響を与えている事が示唆されてきた。そこで、ウイルス感染時に想定される細胞質内二重鎖 RNA による IFN- $\beta$ 産生においても NAP1 が関与しているかについて明らかにする為、レポーター遺伝子を用いて解析を行った。認識レセプターである RIG-I や MDA5 は IFN 誘導遺伝子であり、通常内在性のタンパク量は非常に少ないため DEAE-dextran を用いて細胞質内に poly(I:C)を移入しても IFN- $\beta$  promoter の活性化を検出する事はできなかった(Fig. 3-6 a : most left bar)(8)。そこで低いレベルでしか IFN- $\beta$  promoter の活性化を示さない程度の量の RIG-I と MDA5 を発現させ、この細胞に DEAE-Dextran を用いて poly(I:C)を移入した所、移入した poly(I:C)による IFN- $\beta$  promoter の活性化が検出され、この IFN- $\beta$  promoter の活性化は NAP1 DN の濃度依存的に阻害された(Fig. 3-6 a)。

次に実際のウイルス感染によって誘導される IFN- $\beta$ 産生に対する NAP1 の影響について解析を行った。VSV はラブドウイルス科に属する一本のマイナス鎖 RNA をゲノムに持つウイルスであり、VSV 感染によって誘導される IFN- $\beta$ 産生は RIG-I 依存的である事が示されている(11)。IFN- $\beta$ 産生に重要な転写因子である IRF-3 は活性化すると二量体を形成するが、VSV 感染によって誘導される IRF-3 の二量体は NAP1 DN の濃度依存的にその形成が阻害された(Fig. 3-6 b)。これらの結果から、NAP1 は実際のウイルス感染による IFN- $\beta$ 産生にも関与している事が示唆された。

### **3-7 NAP1 ノックダウン細胞における VSV 感染による IFN- $\beta$ 誘導について**

ウイルス感染による IFN- $\beta$ 産生経路への NAP1 の関与をより明確にする為、NAP1 stable ノックダウン細胞を用いて解析を行った。その結果、NAP1 stable ノックダウン細胞群は、コントロール細胞群に比べ、VSV 感染によって誘導

される IRF-3 の二量体の形成が顕著に減少した(Fig. 3-7 b)。また、VSV 感染によって誘導される IFN- $\beta$  mRNA 量もコントロール細胞に比べて NAP1 ノックダウン細胞では顕著に減少し、この減少は NAP1 ノックダウン細胞のクローン間及びターゲットサイトの違いに関わらず同様に確認された(Fig. 3-7 c)。これらの結果から、NAP1 は、TLR 3 / TLR4 を介した IFN- $\beta$  産生の経路のみならず、RIG-I / MDA5 を介した細胞質内二重鎖 RNA による IFN- $\beta$  産生経路にも関与している事が示唆された。

### **3-8 RIG-I, MDA5, IPS-1 による NF- $\kappa$ B 活性化への TBK1, IKK $\epsilon$ の関与**

TBK1 及び IKK $\epsilon$  は強制発現すると NF- $\kappa$ B の活性化が見られる事が報告されており(23-25)、RIG-I および MDA5 を介した NF- $\kappa$ B 活性化が NAP1 DN の濃度依存的に阻害された事から(Fig. 3-3 c)、RIG-I / MDA5 – IPS-1 経路を介した NF- $\kappa$ B 活性化に TBK1 と IKK $\epsilon$  が関与している可能性が考えられた。そこで、RIG-I, MDA5 および IPS-1 による NF- $\kappa$ B 活性化への TBK1 および IKK $\epsilon$  のキナーゼ変異体の影響について、レポータージーンを用いて解析した。その結果、TBK1 および IKK $\epsilon$  のキナーゼ変異体は RIG-I, MDA5 及び IPS-1 強制発現によって誘導される NF- $\kappa$ B の活性化を抑制した(Fig. 3-8)。

## < 考察 >

本研究により、NAP1 は CARD-helicase を介した IRF-3 の活性化に関与している事が明らかとなった。NAP1 は TBK1 及び IKK $\epsilon$ と相互作用を示す分子として単離され(22)、TLR3 及び TLR4 のアダプター分子である TICAM-1 と相互作用を示して TICAM-1 を介した IRF-3 の活性化に関与している事が明らかとなっている分子である(21)。本研究により明らかとなった事とこれまでの知見を統合すると、NAP1 は、二重鎖 RNA 認識による IFN- $\beta$ 産生経路に細胞内外からのシグナルを統括し、IRF-3 の活性化を引き起こす重要な分子である可能性が示唆された。

IKK family 分子は、TNF- $\alpha$ 刺激及び TLR を介した NF- $\kappa$ B 活性化のキナーゼとして古くから解析されており、IKK family 分子の中でも IKK $\alpha$ 及び IKK $\beta$ が最も解明が進んでいる(26)。IKK $\alpha$ 及び IKK $\beta$ は IKK $\gamma$  (NEMO)を架橋タンパク質として使用し、IKK $\gamma$ が存在する事により、より効率良く IKK $\alpha$  / IKK $\beta$ が活性化される。NAP1 は IKK $\gamma$ と似た領域を持っている事から(27)、IKK $\gamma$ と同様に架橋タンパク質として TBK1 及び IKK $\epsilon$ を含む分子複合体の形成を促し、より効率よく IRF-3 の活性化を誘導している事が想定される。TBK1 及び IKK $\epsilon$ は強制発現すると NF- $\kappa$ B の活性化が見られる事から(23-25)、IRF-3 の活性化のみならず NF- $\kappa$ B 活性化能も有したキナーゼでもあるが、細胞の種類やリガンドの種類により NF- $\kappa$ B 活性化キナーゼとしての機能を発揮するかが決められている。RIG-I および MDA5 を介した NF- $\kappa$ B 活性化が、NAP1 DN の濃度依存的に阻害されており(Fig. 3-3 c)、また RIG-I、MDA5 及び IPS-1 強制発現に見られる NF- $\kappa$ B の活性化が TBK1 及び IKK $\epsilon$ それぞれのキナーゼ変異体により抑制されている結果が得られている事から(Fig. 3-8)、RIG-I 及び MDA5 を介した NF- $\kappa$ B 活性化が TBK1 および IKK $\epsilon$ のキナーゼ活性化を介している可能性もある。RIG-I 及び MDA5 を介した NF- $\kappa$ B 活性化の分子機構に関しては、今後の詳細な解析が期待される。

RIG-I 及び MDA5 のアダプター分子として IPS-1 が報告された(20)。この分子はミトコンドリア膜タンパク質である事から、NAP1 が IPS-1 を介したシグナル伝達経路に関与しているのであれば、NAP1 もミトコンドリア膜上に導かれてくる可能性がある。Fig. 3-5 a で示した様に、強制発現させた NAP1 はごく一部であるが、ミトコンドリアマーカーである MitoTracker と共局在を示

した。これは強制発現した NAP1 のうち内在性の IPS-1 に導かれたものだけがミトコンドリアに局在したと考えられる。NAP1 と IPS-1 を共に発現させた場合、NAP1 は IPS-1 と顕著に共局在を示した点からも NAP1 は IPS-1 に導かれてミトコンドリア膜上へと移行している事が考えられる。NAP1 と IPS-1 を共発現させた際の共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析においては NAP1 と IPS-1 は顕著に共局在を示したにも関わらず(Fig. 3-5 c)、免疫沈降法による相互作用の解析では、わずかな共沈しか確認できなかった(Fig. 3-4 b)。この矛盾の説明として二つの可能性が考えられる。第一は、IPS-1 はウイルス感染が起こると、ミトコンドリア外膜上の界面活性剤不溶画分へと移行する事が報告されている事から(13)、NAP1 が結合する IPS-1 は界面活性剤不溶画分へと移行してしまっている可能性である。第二は、NAP1 と IPS-1 の直接の結合は現在確認できていない事から、NAP1 と IPS-1 との間をつなぐ分子が免疫沈降法を用いた解析ではあまり共沈していない可能性である。IPS-1 がミトコンドリア膜に存在しないと IFN- $\beta$ 産生は誘導されないという報告は(13)、IPS-1 を介したシグナル伝達経路にはミトコンドリア膜上のさらなる分子が必要である可能性を秘めており、そのミトコンドリアタンパク質が NAP1 と IPS-1 の複合体形成に重要なものかもしれない。IPS-1 を介したシグナル伝達機構はまだ未解明の部分が多いが、NAP1 がミトコンドリアに局在を示したという事は、IPS-1 を介するシグナル伝達系の分子が、ミトコンドリア膜上で大きなシグナル複合体を形成している可能性を暗示している。Type-I IFN 産生に関与する分子は NAP1 を初め、多くの分子が TLR を介した type-I IFN 産生機構と共通しており、各シグナル伝達系でシグナルソームを形成する場の違いが発現誘導される遺伝子種や発現量の差などを導いているのかもしれない。

NAP1 と同じように、TBK 及び IKK $\epsilon$ と相互作用を示す分子として TANK が報告されている(28, 29)。NAP1 と TANK はともに IKK $\gamma$ と相同性の高い領域を持っているが、TANK は TICAM-1 とは相互作用を示さず(21)、ミトコンドリアマーカーである MitoTracker との共局在も示さなかった (Fig. 3-5 a)。細胞質内二重鎖 RNA 認識による IFN- $\beta$ 産生以外に、細胞質内に存在する二重鎖 DNA によっても IFN- $\beta$ 産生が誘導され、二重鎖 RNA 認識経路と同様 TBK1 及び IKK $\epsilon$ を介して IRF-3 が活性化される事が報告されている(30-32)。RNAi 法を用いた遺伝子ノックダウンによる解析の結果、細胞質内二重鎖 DNA による IFN- $\beta$ 産生は IPS-1 依存的である事が示唆されていた(30)。しかし IPS-1 のノックアウト

トマウスを用いた解析の結果、細胞質内二重鎖 DNA による IFN- $\beta$ 産生経路は IPS-1 非依存の新規経路が存在する事が示された(33, 34)。DNA 認識による IFN- $\beta$ 産生経路にも NAPI が関与している可能性もあるが、TANK が関与している可能性もある。

本研究により、RSV 感染による IFN- $\beta$ 産生経路は RIG-I 経路である事が示唆された(Fig. 3-1 b)。RIG-I および MDA5 のノックアウトマウスを用いた解析の結果、多くのウイルス感染による IFN- $\beta$ 産生は RIG-I 依存的である事が示され RSV も RIG-I 依存的である事が示唆されたが(11)、その一方で RSV ウイルスが分類されるパラミクソウイルス属の持つ V タンパク質は MDA5 と相互作用してウイルス感染によって誘導される IFN- $\beta$ 産生を抑制する事が報告されている(35)。パラミクソウイルス属のウイルスが自己増殖に影響を与えない MDA5 を特異的に抑制しているとは考えにくい。V タンパク質は MDA5 よりも RIG-I により強い相互作用を示すか、MDA5 と RIG-I のそれぞれの経路が共通に用いる IPS-1 を含む下流分子に作用して、IFN- $\beta$ 産生を抑制している可能性もあり、今後の研究が期待される。ウイルスの持つタンパク質が IFN 産生経路に関与する分子と結合する事により IFN 産生を抑制するよう機能する報告が多数ある(36)。本研究により二重鎖 RNA 認識による IFN- $\beta$ 産生に重要である事が明らかとなった NAPI も、未知のウイルスタンパク質によって抑制されているかもしれない。

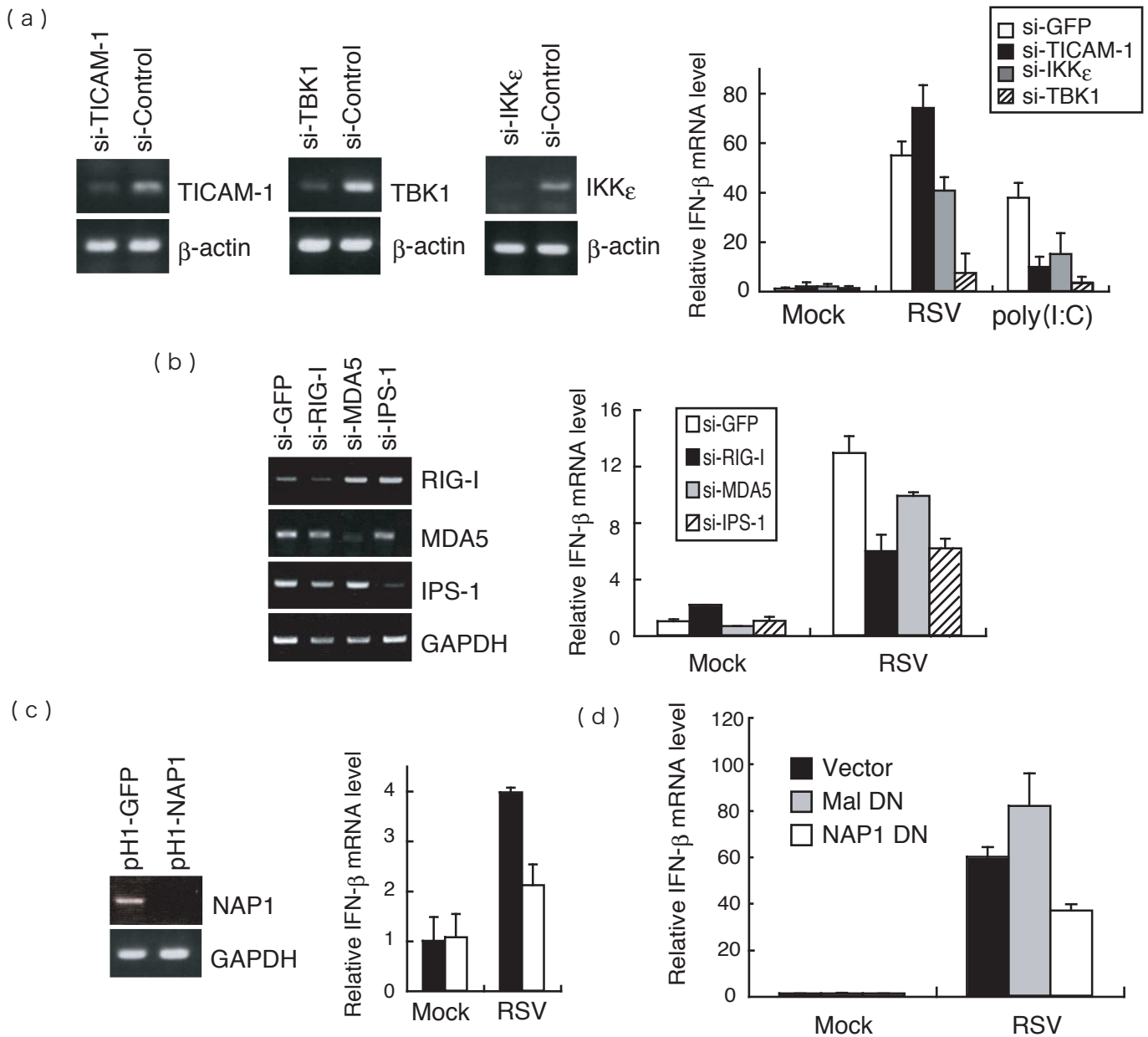


Fig.3-1 RSV ウイルス感染による IFN- $\beta$  産生は RIG-I 経路である

- a) TICAM-1, TBK1,  $IKK_{\epsilon}$  ノックダウン細胞での RSV 感染によって誘導される IFN- $\beta$  mRNA 量  
 b) RIG-I, MDA5, IPS-1 ノックダウン細胞での RSV 感染によって誘導される IFN- $\beta$  mRNA 量  
 c) NAP1 stable ノックダウン細胞での RSV 感染によって誘導される IFN- $\beta$  mRNA 量  
 d) NAP1 ドミナントネガティブ体存在下での RSV 感染によって誘導される IFN- $\beta$  mRNA 量

a, b) HeLa 細胞に GFP, TICAM-1, TBK1,  $IKK_{\epsilon}$  (a) 及び RIG-I, MDA5, IPS-1 (b) に対する siRNA を導入し、48 時間後に RSV (MOI = 1 (a) 及び 2.5 (b)) および poly(I:C) (10  $\mu$ g/ml) (a) で刺激し、48 時間後の細胞より RNA を抽出して解析を行った。左側は RT-PCR によるノックダウン確認。右側は各刺激によって誘導された IFN- $\beta$  の mRNA 量を定量 PCR にて数値化し、si-GFP 導入時の Mock で刺激した際の IFN- $\beta$  mRNA 量を 1 とした際の相対値で示した。

c) NAP1 及び GFP に対する siRNA vector を stable に発現した HeLa 細胞に、RSV (MOI = 1) を感染させ、48 時間後の細胞より RNA を抽出して解析を行った。データの示し方は a, b に同じ。

d) HEK293 細胞に NAP1 及び Mal のドミナントネガティブ体 (NAP1 158-270, Mal P125H) を強制発現し、24 時間後に RSV (MOI = 1) で刺激し、36 時間後の細胞より RNA を抽出して解析を行った。RSV 感染による IFN- $\beta$  mRNA 量は a と同じ方法で定量した。a, b, c については二回、d については 3 回の独立した実験を行い、全ての実験回において同様の傾向が得られた。上記はそれぞれ一回の独立した実験のデータである。

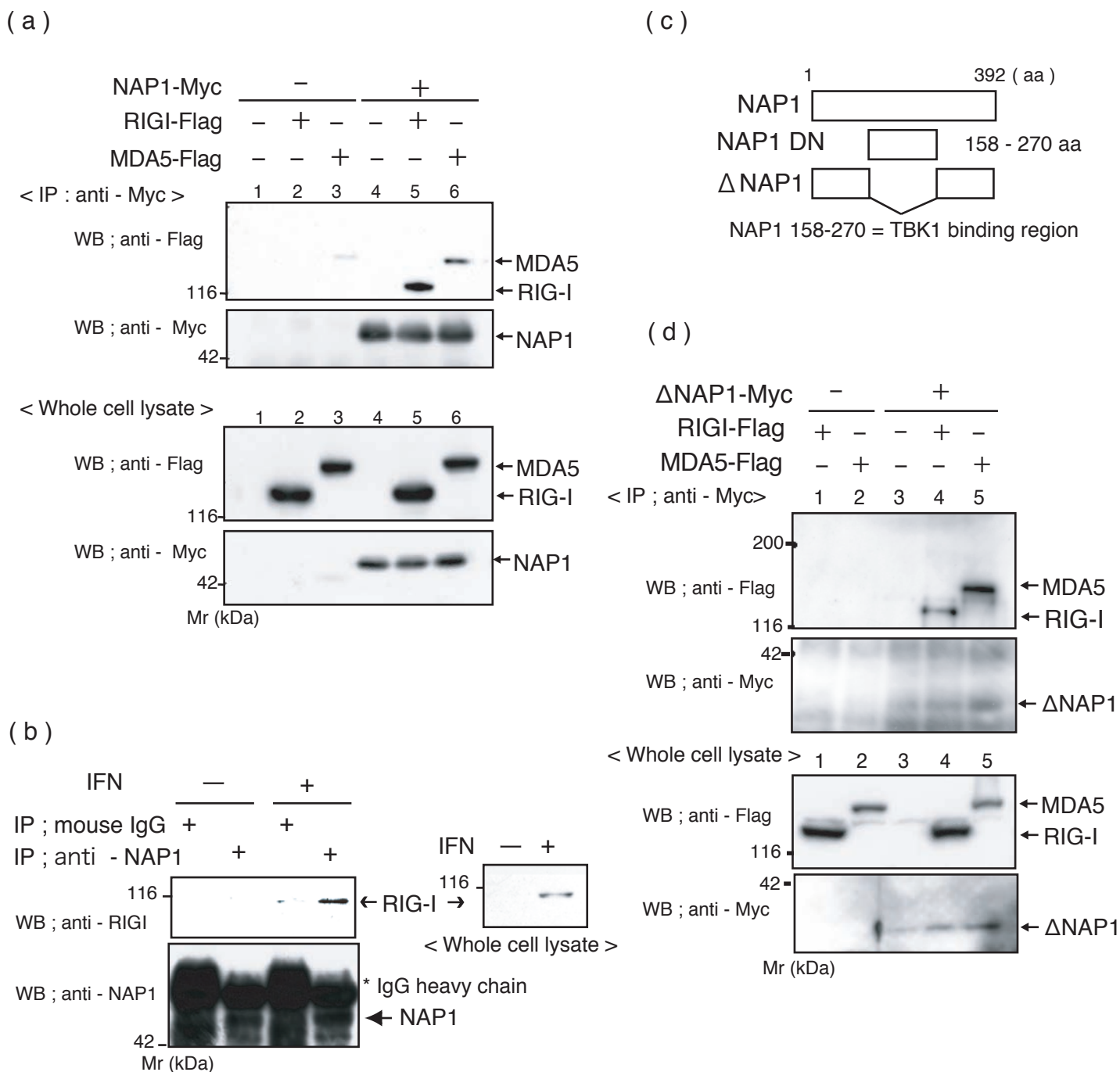


Fig. 3-2 NAP1 は RIG-I 及び MDA5 と相互作用を示す

- a) NAP1 全長と RIG-I および MDA5 との相互作用  
 b) 細胞内在性の NAP1 と RIG-I との相互作用  
 c) NAP1 deletion 体の模式図 . aa : amino acid  
 d) ΔNAP1 と RIG-I および MDA5 との相互作用

a, d) 293 細胞に記載のプラスミドを強制発現させ、24 時間後に細胞を溶解し、免疫沈降を行った。それぞれ上二段が免疫沈降を行ったもの、下二段が発現確認である。panel 左は検出に用いた一次抗体を示し、panel 右は分子量から予想されるバンドについて矢印で示した

b) HeLa 細胞を 1000 IU/ml の IFN-β で 24 時間処理した細胞群と未処理の細胞群をそれぞれ溶解し、抗 NAP1 抗体及び IgG コントロール抗体で免疫沈降を行った。表記については a) と同様である。

a, d) については三回、b) については二回の独立した実験を行い、それぞれ同様の傾向を得た。上記はそのうちの一回の結果を示した。

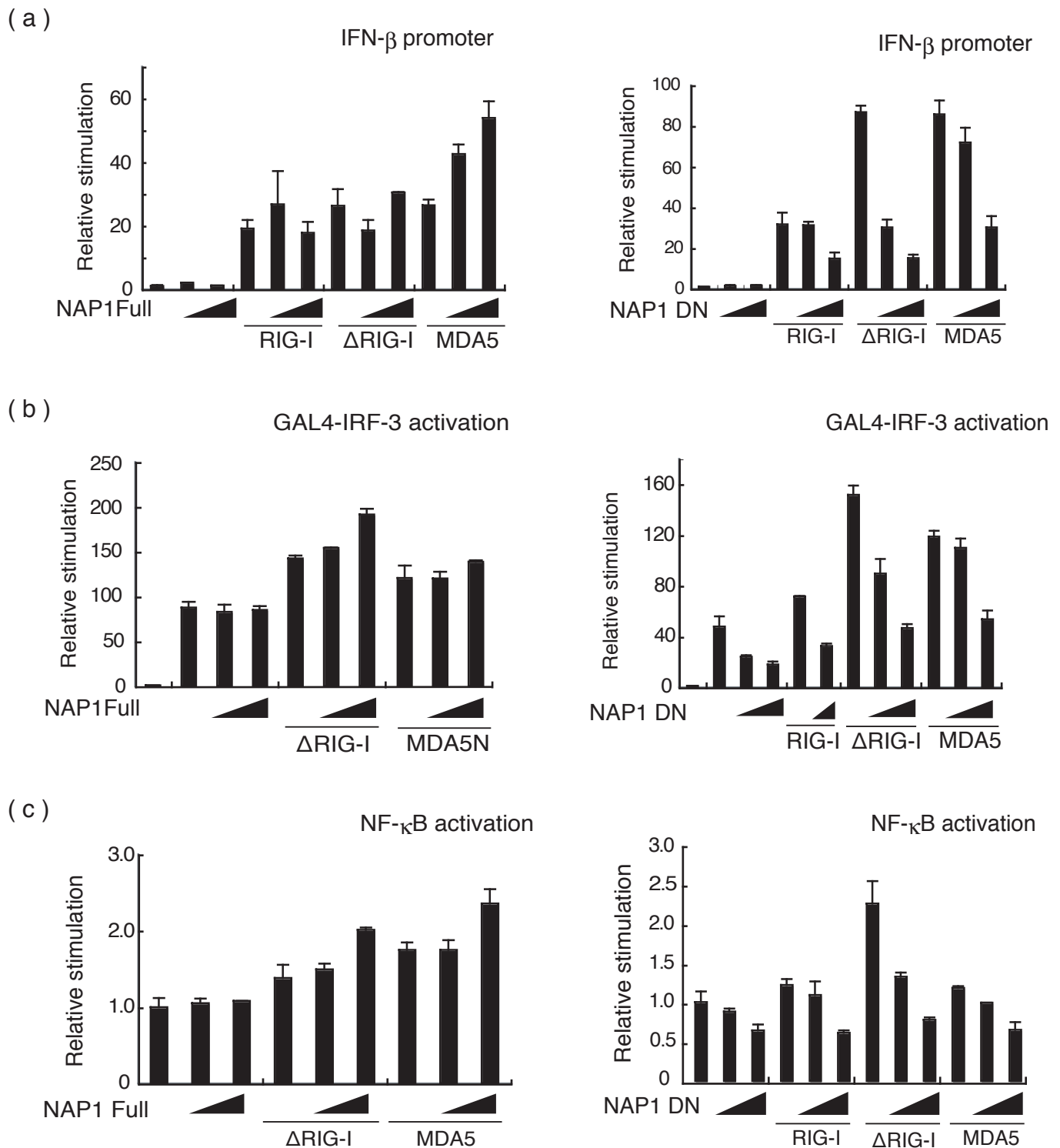


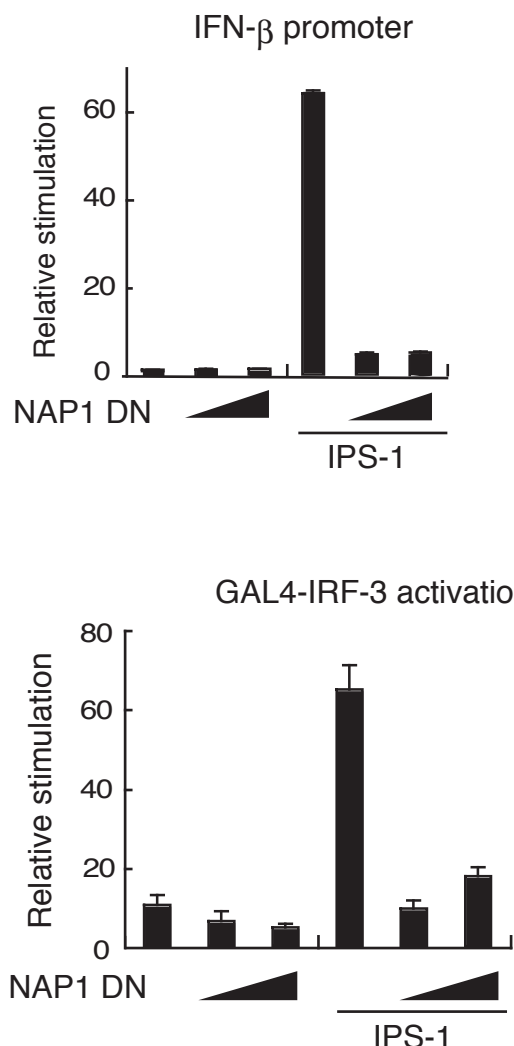
Fig. 3-3 RIG-I 及び MDA5 を介したシグナル伝達経路への NAP1 の影響

- a) RIG-I 及び MDA5 を介した IFN-β promoter 活性化への NAP1 の影響
- b) RIG-I 及び MDA5 を介した IRF-3 活性化への NAP1 の影響
- c) RIG-I 及び MDA5 を介した NF-κB 活性化への NAP1 の影響

HEK293 細胞に NAP1 Full と RIG-I 及び MDA5(100 ng) (右側) 及び NAP DN と RIG-I 及び MDA5 (300 ng)(左側) (各 NAP1 濃度 : 200 ng, 400 ng) を、IFN-β promoter (a), IRF-3 reporter (b), 及び NF-κB reporter と共発現させ、発現後 24 時間の細胞を回収して解析を行った。横軸は添加したプラスミドを示し、縦軸は空ベクターを強制発現させた際のルシフェラーゼ活性化を 1 とした際の、各条件でのルシフェラーゼ活性化量を相対的に示した。全ての結果は独立した三回の実験のうちの一回の結果であり、全ての実験で同様の傾向が見られた。



(a)



(b)

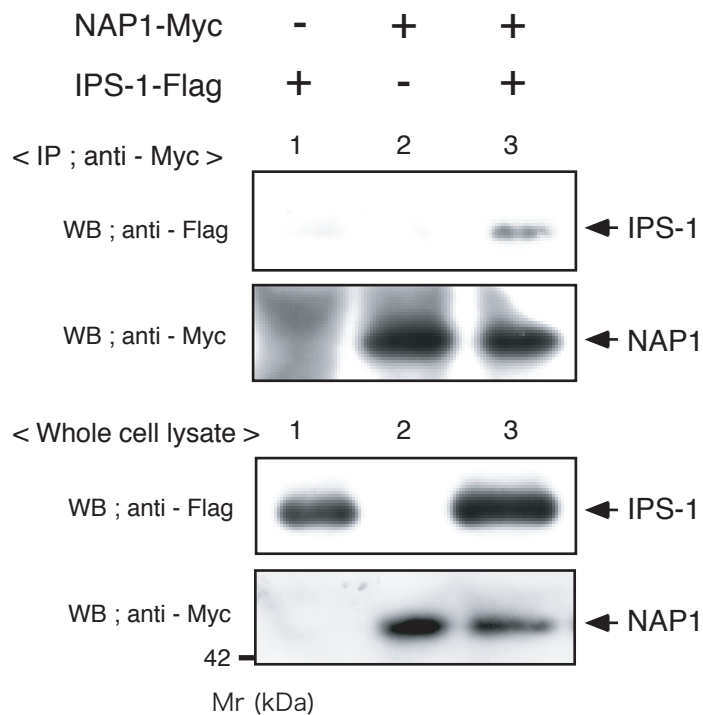


Fig. 3-4 NAP1 は IPS-1 と相互作用を示し、そのシグナル伝達経路に関与する

a) NAP1 の IPS-1 を介したシグナル伝達経路への影響

HEK293 細胞に NAP1 DN (200 ng, 400 ng) と IPS-1(300 ng) を、IFN-β promoter( 上段 ) または IRF3 reporter( 下段 ) と共発現させ、発現後 24 時間の細胞を回収して解析を行った。横軸は添加したプラスミドを示し、縦軸は空ベクターを強制発現させた際のルシフェラーゼ活性化を 1 とした際の、各条件でのルシフェラーゼ活性化量を相対的に示した。全ての結果は独立した三回の実験のうちの一回の結果であり、全ての実験で同様の傾向が見られた。

b) NAP1 と IPS-1 との相互作用

293 細胞に N 末端に Flag タグを付加した IPS-1, および C 末端に Myc タグを付加した NAP1 を強制発現させ、24 時間後に細胞を RIPA buffer で溶解し、免疫沈降を行った。それぞれ上二段が免疫沈降を行ったもの、下二段が発現確認である。panel 左は検出に用いた一次抗体を示し、panel 右は分子量から予想される分子について矢印で示した

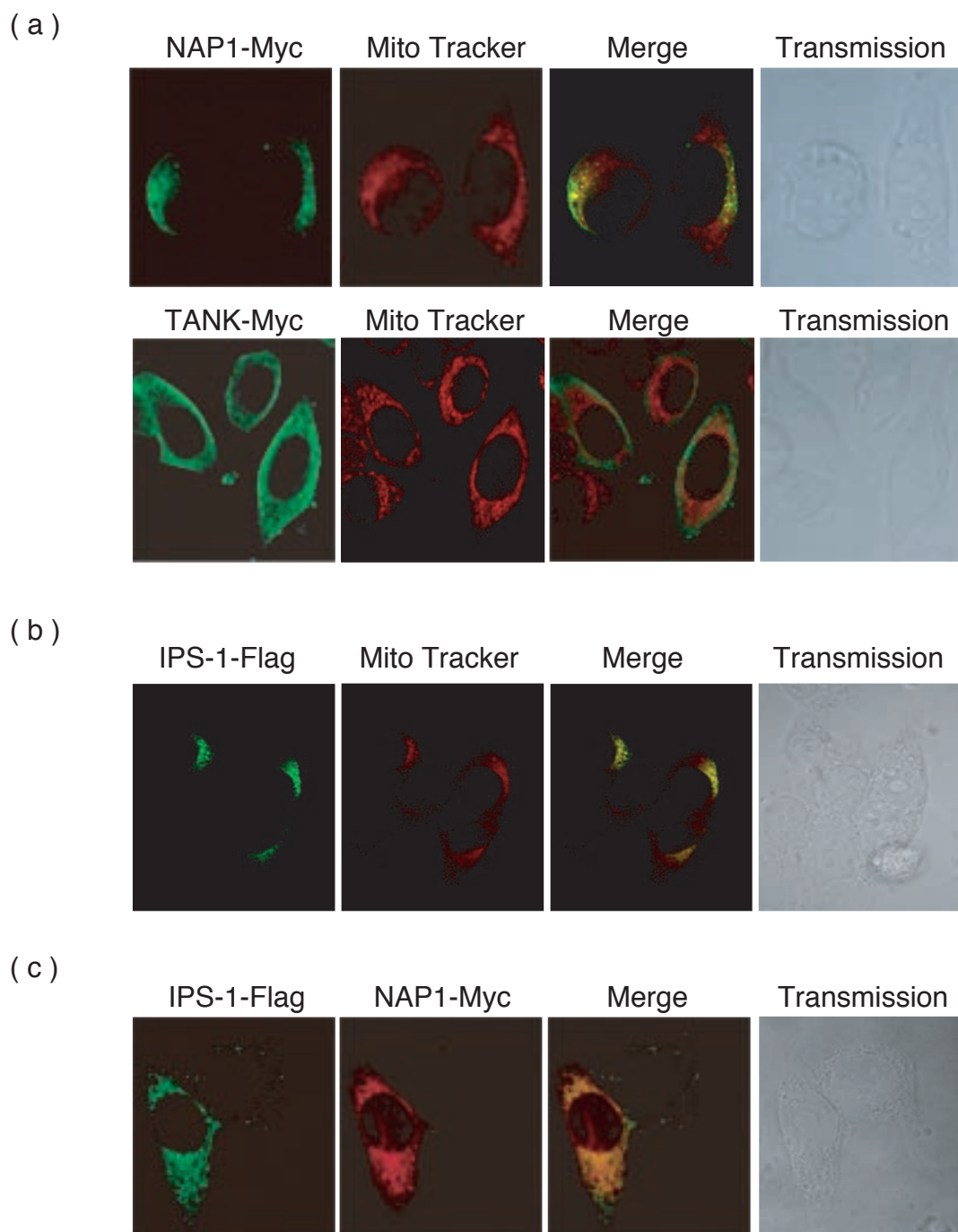
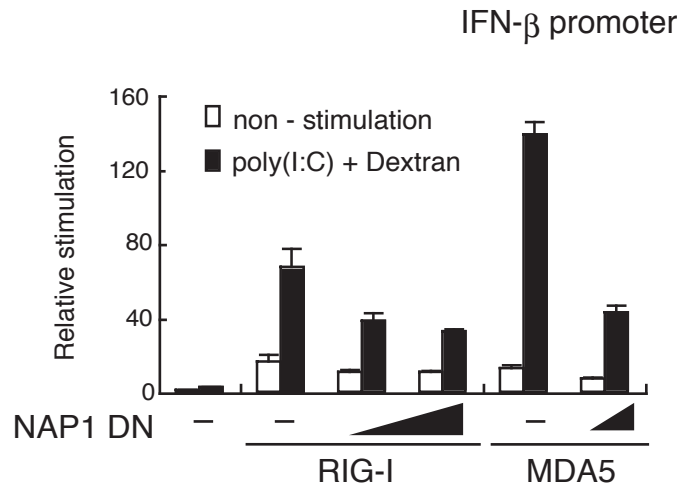


Fig. 3-5 NAP1 は IPS-1 と共局在した

HeLa 細胞を poly - L-Lysin coat したカバーガラス上に播種し付着後、各プラスミドを強制発現した。強制発現の 24 時間後に細胞を回収して抗体反応を行った。MitoTracker 染色を行った a, b に関しては、強制発現の 24 時間後に、250 nM MitoTracker を添加し、37°C で 1 時間処理をした。各実験は独立したものを 2 回行い、各実験回においても同様の傾向が得られた。上記データはその中の代表的なものの一つである。

(a)



(b)

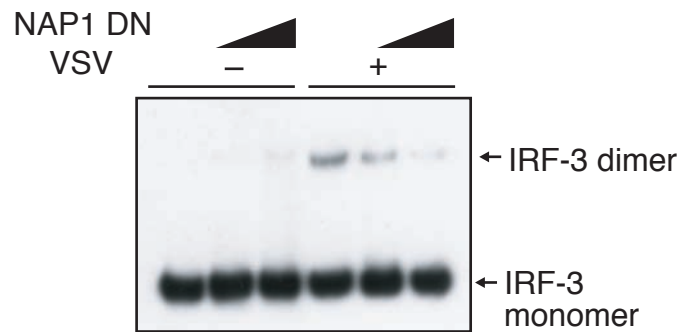


Fig. 3-6 NAP1 DN は細胞質内 poly(I:C) 及び VSV 感染による IFN- $\beta$  産生に影響を与える

a) 細胞質内二重鎖 RNA による IFN- $\beta$  promoter 活性化への NAP1 の影響

HEK293 細胞に、NAP1 DN (200 ng, 400 ng) と RIG-I 及び MDA5(100 ng) を、IFN- $\beta$  promoter と共発現させ、発現 24 時間後、poly(I:C) 10  $\mu$ g/ml を DEAE-Dextran を用いて細胞質に移入した。poly(I:C) 移入の 6 時間後に細胞を回収し、解析を行った。横軸は添加したプラスミドを示し、縦軸は空ベクター強制発現で未刺激でのルシフェラーゼ活性を 1 とした際の、各条件でのルシフェラーゼ活性化量を相対的に示した。全ての結果は独立した二回の実験のうちの一の結果であり、全ての実験回で同様の傾向が見られた

b) VSV 感染による IRF-3 活性化への NAP1 DN の影響

HEK293 細胞に NAP1 DN を強制発現させ、強制発現の 24 時間後に VSV (MOI = 10) で 8 時間感染させた。感染させた細胞を回収し、Native PAGE を用いて IRF-3 の活性化型である二量体形成量について、ウエスタンブロッティングを用いて解析した。二回の独立した実験を行い、どの回も同様の傾向が得られた。上記は二回のうちの一の結果を示した

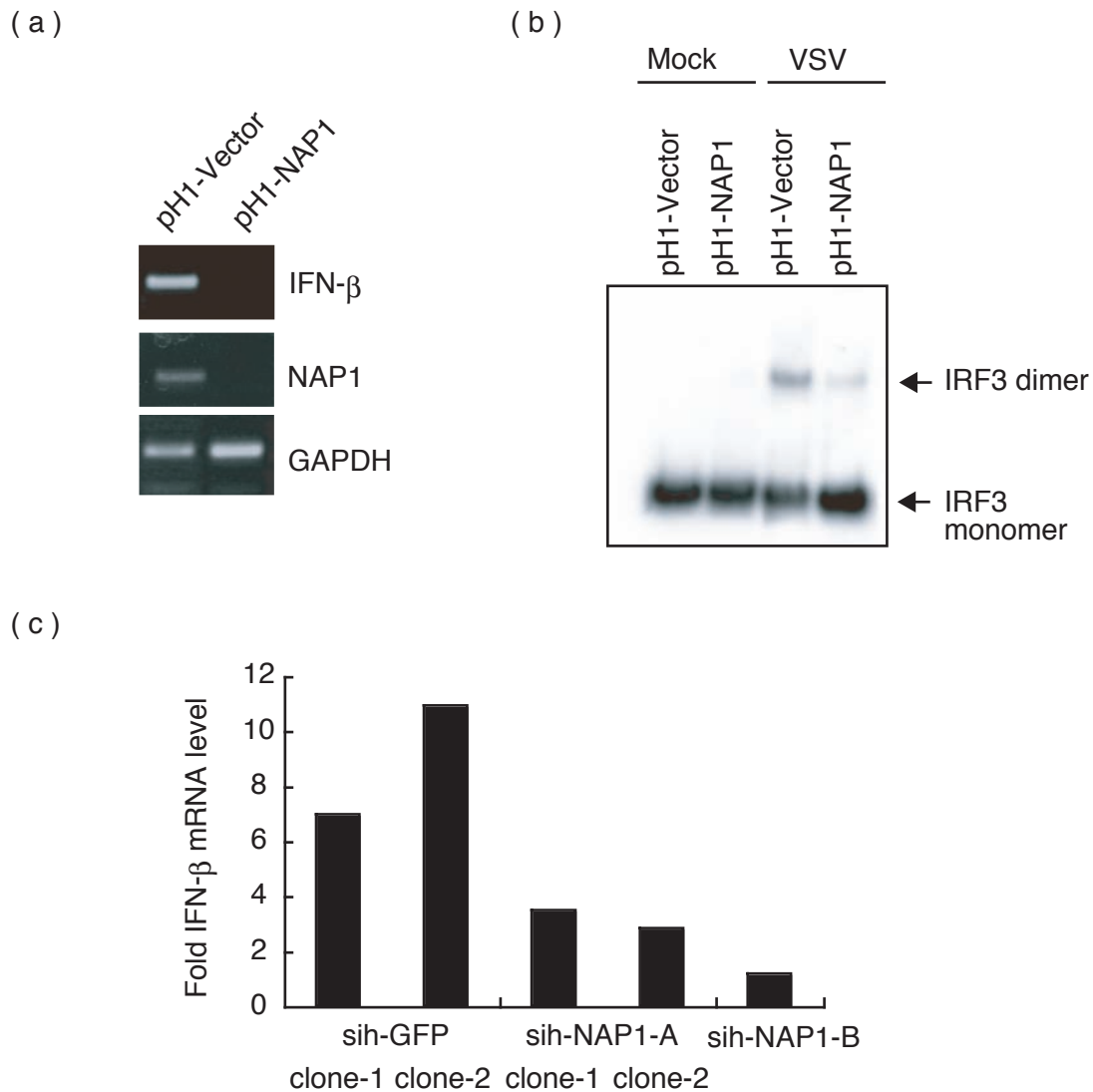


Fig. 3-7 VSV 感染によって誘導される IRF-3 活性化及び IFN- $\beta$  mRNA への NAP1 の影響

- a) RT-PCR による NAP1 ノックダウン確認および VSV 感染によって誘導される IFN- $\beta$  mRNA
- b) VSV 感染による IRF-3 二量体形成における NAP1 ノックダウンの影響
- c) NAP1 ノックダウン細胞での VSV 感染による IFN- $\beta$  mRNA 量

NAP1 stable ノックダウン HeLa 細胞 (pH1-NAP1-A, pH1-NAP1-B) 及びコントロール HeLa 細胞 (pH1-Vector 又は sih-GFP) (第二章 Fig. 2-9 参照) に VSV (MOI = 10) を 8 時間 (b) または 12 時間 (a, c) 感染させた際に誘導される、IRF-3 の二量体形成量 (b) および IFN- $\beta$  mRNA 量 (c) を Native PAGE、定量 PCR を用いて解析した。Native PAGE に関しては Fig. 3-6 に、定量 PCR は Fig. 3-1 と同様に解析し、結果は各細胞条件の Mock 感染細胞における IFN- $\beta$  mRNA 量に対する相対値で示した。各実験は b に関しては独立した三回の実験、c に関しては独立した二回の実験をそれぞれ行い、どの実験回も同様の傾向が得られた。上記はそれらのうちの一回の結果を示した。また、どの実験回においても NAP1 のノックダウンは RT-PCR にて確認した。

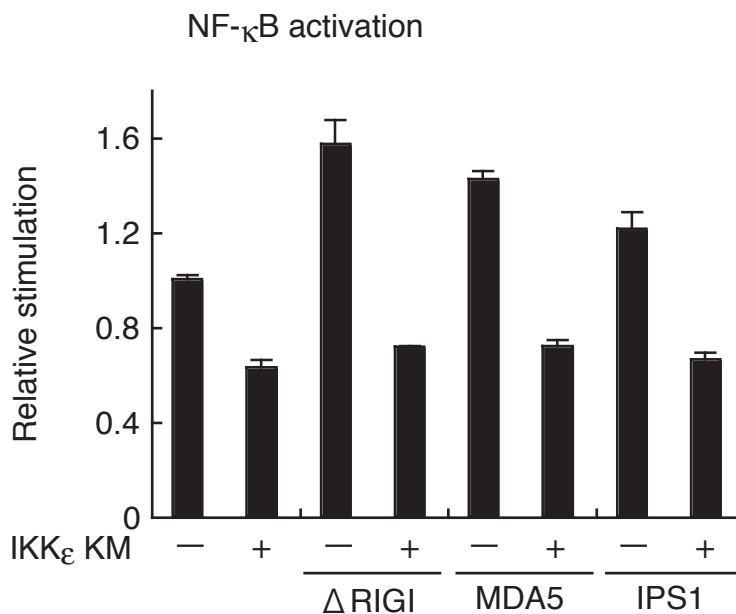
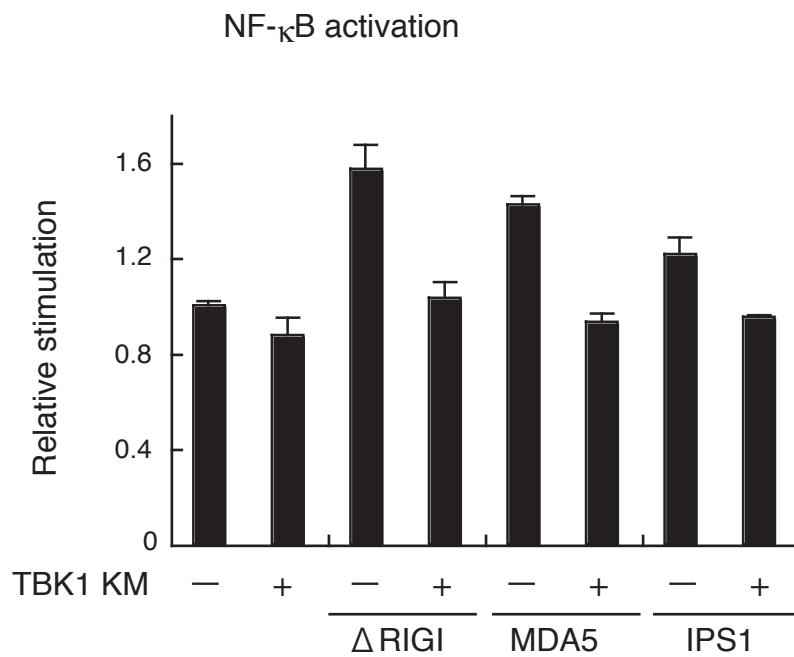


Fig. 3-8

RIG-I、MDA5 及び IPS-1 による NF- $\kappa$ B 活性化への TBK1 及び IKK $\epsilon$  のキナーゼ活性の影響

HEK293 細胞に  $\Delta$ RIGI、MDA5 及び IPS-1 (300 ng) と TBK1 KM(K38M)(上段)または IKK $\epsilon$ (K38A) (下段) (それぞれ 400 ng) を、NF- $\kappa$ B reporter と共発現させ、発現後 24 時間の細胞を回収して解析を行った。横軸は添加したプラスミドを示し、縦軸は空ベクターを強制発現させた際のルシフェラーゼ活性化を 1 とした際の、各条件でのルシフェラーゼ活性化量を相対的に示した。全ての結果は独立した二回の実験のうちの一回の結果であり、全ての実験で同様の傾向が見られた。

< 文献 >

1. Johnsen, I. B., T. T. Nguyen, M. Ringdal, A. M. Tryggestad, O. Bakke, E. Lien, T. Espevik, and M. W. Anthonsen. 2006. Toll-like receptor 3 associates with c-Src tyrosine kinase on endosomes to initiate antiviral signaling. *Embo J* 25:3335-3346.
2. Matsumoto, M., S. Kikkawa, M. Kohase, K. Miyake, and T. Seya. 2002. Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 293:1364-1369.
3. Schroder, M., and A. G. Bowie. 2005. TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander? *Trends Immunol* 26:462-468.
4. Ryter, J. M., and S. C. Schultz. 1998. Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *Embo J* 17:7505-7513.
5. Williams, B. R. 2001. Signal integration via PKR. *Sci STKE* 2001:RE2.
6. Smith, E. J., I. Marie, A. Prakash, A. Garcia-Sastre, and D. E. Levy. 2001. IRF3 and IRF7 phosphorylation in virus-infected cells does not require double-stranded RNA-dependent protein kinase R or Ikappa B kinase but is blocked by Vaccinia virus E3L protein. *J Biol Chem* 276:8951-8957.
7. Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira, and T. Fujita. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5:730-737.
8. Yoneyama, M., M. Kikuchi, K. Matsumoto, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, E. Foy, Y. M. Loo, M. Gale, Jr., S. Akira, S. Yonehara, A. Kato, and T. Fujita. 2005. Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. *J Immunol* 175:2851-2858.
9. Levy, D. E., and I. J. Marie. 2004. RIGging an antiviral defense--it's in the CARDs. *Nat Immunol* 5:699-701.
10. Kato, H., S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. Matsui, T. Tsujimura, K. Takeda, T. Fujita, O. Takeuchi, and S. Akira. 2005. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23:19-28.

11. Kato, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, S. Uematsu, A. Jung, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Yamaguchi, K. Otsu, T. Tsujimura, C. S. Koh, C. Reis e Sousa, Y. Matsuura, T. Fujita, and S. Akira. 2006. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441:101-105.
12. Kawai, T., K. Takahashi, S. Sato, C. Coban, H. Kumar, H. Kato, K. J. Ishii, O. Takeuchi, and S. Akira. 2005. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 6:981-988.
13. Seth, R. B., L. Sun, C. K. Ea, and Z. J. Chen. 2005. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 122:669-682.
14. Xu, L. G., Y. Y. Wang, K. J. Han, L. Y. Li, Z. Zhai, and H. B. Shu. 2005. VISA Is an Adapter Protein Required for Virus-Triggered IFN-beta Signaling. *Mol Cell* 19:727-740.
15. Meylan, E., J. Curran, K. Hofmann, D. Moradpour, M. Binder, R. Bartenschlager, and J. Tschopp. 2005. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 437:1167-1172.
16. Rudd, B. D., J. J. Smit, R. A. Flavell, L. Alexopoulou, M. A. Schaller, A. Gruber, A. A. Berlin, and N. W. Lukacs. 2006. Deletion of TLR3 alters the pulmonary immune environment and mucus production during respiratory syncytial virus infection. *J Immunol* 176:1937-1942.
17. Groskreutz, D. J., M. M. Monick, L. S. Powers, T. O. Yarovinsky, D. C. Look, and G. W. Hunninghake. 2006. Respiratory syncytial virus induces TLR3 protein and protein kinase R, leading to increased double-stranded RNA responsiveness in airway epithelial cells. *J Immunol* 176:1733-1740.
18. Guillot, L., R. Le Goffic, S. Bloch, N. Escriou, S. Akira, M. Chignard, and M. Si-Tahar. 2005. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J Biol Chem* 280:5571-5580.
19. Hornung, V., J. Schlender, M. Guenther-Biller, S. Rothenfusser, S. Endres, K. K. Conzelmann, and G. Hartmann. 2004. Replication-dependent potent IFN-alpha induction in human plasmacytoid dendritic cells by a single-stranded RNA virus. *J Immunol* 173:5935-5943.

20. Kawai, T., and S. Akira. 2006. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 7:131-137.
21. Sasai, M., H. Oshiumi, M. Matsumoto, N. Inoue, F. Fujita, M. Nakanishi, and T. Seya. 2005. Cutting Edge: NF-kappaB-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation. *J Immunol* 174:27-30.
22. Fujita, F., Y. Taniguchi, T. Kato, Y. Narita, A. Furuya, T. Ogawa, H. Sakurai, T. Joh, M. Itoh, M. Delhase, M. Karin, and M. Nakanishi. 2003. Identification of NAP1, a regulatory subunit of IkappaB kinase-related kinases that potentiates NF-kappaB signaling. *Mol Cell Biol* 23:7780-7793.
23. Shimada, T., T. Kawai, K. Takeda, M. Matsumoto, J. Inoue, Y. Tatsumi, A. Kanamaru, and S. Akira. 1999. IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases. *Int Immunol* 11:1357-1362.
24. Peters, R. T., S. M. Liao, and T. Maniatis. 2000. IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible IkappaB kinase complex. *Mol Cell* 5:513-522.
25. Tojima, Y., A. Fujimoto, M. Delhase, Y. Chen, S. Hatakeyama, K. Nakayama, Y. Kaneko, Y. Nimura, N. Motoyama, K. Ikeda, M. Karin, and M. Nakanishi. 2000. NAK is an IkappaB kinase-activating kinase. *Nature* 404:778-782.
26. Scheidereit, C. 2006. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* 25:6685-6705.
27. Sasai, M., M. Matsumoto, and T. Seya. 2006. The Kinase Complex Responsible for IRF-3-Mediated IFN- $\beta$  Production in Myeloid Dendritic Cells (mDC). *J Biochem (Tokyo)* 139:171-175.
28. Pomerantz, J. L., and D. Baltimore. 1999. NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *Embo J* 18:6694-6704.
29. Peters, R. T., and T. Maniatis. 2001. A new family of IKK-related kinases may function as I kappa B kinase kinases. *Biochim Biophys Acta* 1471:M57-62.
30. Ishii, K. J., C. Coban, H. Kato, K. Takahashi, Y. Torii, F. Takeshita, H. Ludwig, G. Sutter, K. Suzuki, H. Hemmi, S. Sato, M. Yamamoto, S. Uematsu, T. Kawai, O. Takeuchi, and S. Akira. 2006. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* 7:40-48.
31. Okabe, Y., K. Kawane, S. Akira, T. Taniguchi, and S. Nagata. 2005. Toll-like



- receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation. *J Exp Med* 202:1333-1339.
32. Stetson, D. B., and R. Medzhitov. 2006. Type I interferons in host defense. *Immunity* 25:373-381.
  33. Kumar, H., T. Kawai, H. Kato, S. Sato, K. Takahashi, C. Coban, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. J. Ishii, O. Takeuchi, and S. Akira. 2006. Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *J Exp Med* 203:1795-1803.
  34. Sun, Q., L. Sun, H. H. Liu, X. Chen, R. B. Seth, J. Forman, and Z. J. Chen. 2006. The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity* 24:633-642.
  35. Andrejeva, J., K. S. Childs, D. F. Young, T. S. Carlos, N. Stock, S. Goodbourn, and R. E. Randall. 2004. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17264-17269.
  36. Haller, O., G. Kochs, and F. Weber. 2006. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* 344:119-130.

## 第四章 TICAM-1 に結合する分子の単離・同定

TLR3 を介した IFN- $\beta$  産生の分子機構には、TICAM-1 が重要な役割を果たしており(1-3)、TLR4 を介した IFN- $\beta$  産生経路も TICAM-2 を介して TICAM-1 へと集約する事が第一章より明らかとなった(4)。これらの結果は TLR3 及び TLR4 を介した IFN- $\beta$  産生に TICAM-1 からのシグナル伝達経路が非常に重要であることを示している。この章では、TICAM-1 に結合する分子の単離・同定を Yeast-two hybrid 法を用いて行った。

五種類ある TLR family のアダプター分子の中でも、TICAM-1 は TLR3 及び TLR4 を介したシグナル伝達経路に特異的に関与しているアダプター分子である。TICAM-1 を介したシグナル伝達経路は、IRF-3 の活性化、NF- $\kappa$ B 活性化、MAP キナーゼの活性化の三経路に大別され(2)、これらの経路が全て活性化される事で効率よく IFN- $\beta$  産生が誘導されるが、最も影響する経路は IRF-3 活性化経路である(5)。TICAM-1 を介した IFN- $\beta$  産生は TICAM-1 の N 末端から 288 番目のアミノ酸まで欠損させるとほとんど検出されない事から、TICAM-1 を介した IRF-3 の活性化は N 末端領域が重要である事が想定されていた(2)。しかし、IRF-3 をリン酸化するキナーゼである TBK1 と TICAM-1 の N 末端領域との直接の結合は確認できなかった事(第二章参照)、TICAM-1 を介した IRF-3 活性化に重要な役割をしている分子として第二章で報告した NAPI は TICAM-1 と相互作用を示すが直接の結合は現在確認できていない事を考え合わせると、TICAM-1 の N 末端領域には TICAM-1 を介した IRF-3 活性化に関与する未同定の分子が結合する事が予想された。また TICAM-1 による MAP キナーゼ経路の活性化は NAPI ドミナントネガティブ体を発現させても、抑制されなかった(第二章、Fig. 2-5 b 参照)事から、TICAM-1 を介した MAP キナーゼ活性化に関与する分子も存在する事が想定された。

本研究では TICAM-1 に結合する分子の単離・同定を目的とし、Yeast-two hybrid 法によるスクリーニングにより得られた知見について報告する。

## < 結果 >

### 4-1 TICAM-1 全長を Bait としたスクリーニング条件の検討

TICAM-1 は全長 712 アミノ酸からなる分子であり、N 末端領域と C 末端領域の双方にプロリンに富んだ領域を有している(2)。TICAM-1 と結合する分子を Yeast two-hybrid 法を用いて単離・同定するのに際し、まず Bait として用いる TICAM-1 の配列単独では酵母が生育しない選択条件の検討を行った。TICAM-1 全長を Yeast 発現用ベクターである pGBKT7 に組み込み発現させ、最も強い選択条件である SD 培地から Trp, Leu, His, Ade を欠損させさらに 3-AT 15 mM を添加した培地を用いて選択を行ったが、TICAM-1 単独でも生育が見られ (Fig. 3-1 a)、pGBKT7 よりもプロモーター活性化能力の低い pGBD-C1 ベクターを用いて同様の実験を行ったが、やはり TICAM-1 単独でも生育が見られた (Fig. 3-1 b)。これらの結果から、TICAM-1 の全長を用いたスクリーニングは行えないと判断した。

### 4-2 TICAM-1 の断片化とスクリーニング条件の検討

TICAM-1 は、N 末端領域のプロリンに富んだ領域、TIR domain、C 末端のプロリンに富んだ領域の三断片に大別することができる。TICAM-1 を TIR domain の少し上流で二断片に分け、N 末端領域を Segment 1 (S1)、C 末端領域を Segment 2 (S2)とした (Fig. 4-2 a)。S1 および S2 についてスクリーニングの選択条件を検討した結果、S1 は pGBD-C1 に組み込んだ場合の SD 培地から Trp, Leu, His を欠損させた培地で、S2 は pGBKT7 に組み込んだ場合の SD 培地から Trp, Leu, His, Ade を欠損させて 3-AT 15 mM を添加した培地で、それぞれ 10 日間培養を行っても、生育が確認されなかった (Fig. 4-2 b, c)。よって、S1 および S2 はこれらの選択条件を用いてスクリーニングが可能であると判断した。

#### **4-3 N末端領域コンストラクト S1 を用いたスクリーニング**

スクリーニングに用いた cDNA ライブラリーは、TLR3 の発現が強く確認されているヒト肺由来 cDNA を用いた。TICAM-1 S1 に結合するタンパク質の同定を目的とし、220 万クローンに対してスクリーニングを行った。SD 培地から Trp, Leu, His, Ade を欠損させた培地を選択培地とした際、57 個のクローンを得た。これらのクローンに含まれている遺伝子をそれぞれ同定した所、13 種類の遺伝子であった (Fig. 4-3)。再度 TICAM-1 S1 との結合を確認した結果、13 種類の遺伝子のうち、5 種類に対して再結合を確認する事ができた (Fig. 4-3)。このうち TICAM-1 を介したシグナル伝達経路に関与する可能性があったのは、TRAF1、TRAF2、BS69 の三種であった。

#### **4-4 N末端領域に結合する分子 TRAF1/TRAF2 の特徴**

TICAM-1 の N 末端領域に結合する分子として、TRAF1 と TRAF2 が得られた。この二つの分子は TNF- $\alpha$ シグナル伝達経路に関与するアダプター分子として、多くの報告があり、また、同じ TRAF family 分子である TRAF6 は TLR family を介した NF- $\kappa$ B の活性化経路に関与している分子として報告されている(6)。TRAF family は現在 TRAF1 から TRAF7 までの7種類が報告されており、C 末端領域の TRAF domain と呼ばれる領域を共通に持ち、TRAF family 分子はお互いにこの domain を介して結合する事が可能である。N 末端領域には RING -finger domain と Zn-finger と呼ばれる二種類の亜鉛結合モチーフが存在するし、このモチーフを介して各々のシグナル伝達に関与していると想定されている。しかし、TRAF1 だけがこの亜鉛結合モチーフを持っていない事から、TRAF1 は他の TRAF family 分子に TRAF domain を介して結合して、その機能を抑制するように作用していると考えられている(7, 8)。TICAM-1 の N 末端領域を用いたスクリーニングによって得られた TRAF family 分子の断片を検討した結果、どの断片も TRAF domain を持っていた (Fig. 4-4)。

#### **4-5 TICAM-1にある BS69 結合 motif**

TICAM-1 の N 末端領域に結合する分子として BS69 が得られた。BS69 はアデノウイルスの E1A に結合する分子として単離・同定された分子であり(9)、転写因子である事から擬陽性の可能性も考えられる。BS69 はアデノウイルス E1A 分子に存在する PxLxP motif を介して結合する事が報告されており(10)、TICAM-1 の N 末端領域に PxLxP motif が存在した(Fig. 4-5 a)。TICAM-1 と BS69 の結合が擬陽性でない事を確認するため、TICAM-1 の PxLxP motif を PxAxP と変異させ、BS69 との結合を Yeast-two hybrid 法を用いて解析した。その結果、PxAxP に変異させた TICAM-1 は BS69 との結合が検出されなくなった(Fig. 4-5 b)。この結果から、BS69 は PxLxP motif を介して TICAM-1 と結合している事が明らかとなった。

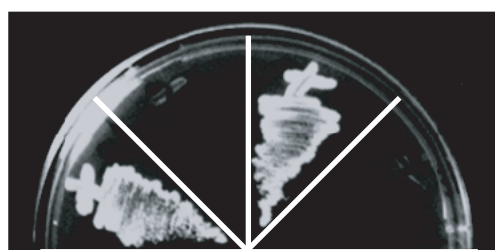
## < 考察 >

TICAM-1 の N 末端領域を用いたスクリーニングにより、5 種類のタンパク質が結合しうる事が明らかとなった。このうち Collagen type 8 と Lamin A/C は繊維状の形態を示す分子であり、これらのタンパク質の局在箇所が細胞質タンパクである TICAM-1 とは異なる事を考慮すると、この二種のタンパクは擬陽性である可能性が高い。

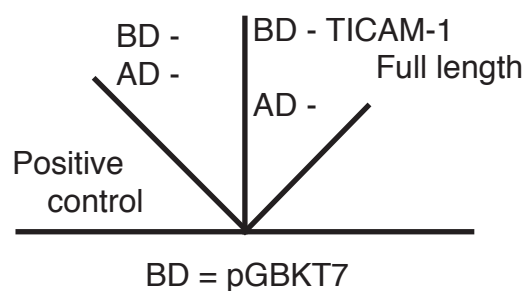
BS69 はアデノウイルスの E1A タンパク質に結合する分子として単離・同定されたタンパク質であり(9)、その splicing variant は EBV (Epstein-Barr Virus) の LMP-1 タンパク質に結合し、LMP-1 タンパク質によって引き起こされる NF- $\kappa$ B の活性化を抑制するように作用する事が報告されている(11, 12)。この splicing variant は BS69 の C 末端領域にある MYND domain を共通に有しており、スクリーニングにより得られた BS69 の断片も MYND domain を含んでいる事から、TICAM-1 の N 末端領域と BS69 の MYND domain が結合し、TICAM-1 の NF- $\kappa$ B 活性化に影響を与える可能性が考えられる。実際、TICAM-1 の N 末端領域から 386 アミノ酸を欠損させた断片は、全長に比べて NF- $\kappa$ B 活性化能が上昇する結果が得られている(2)。また、TICAM-1 の N 末端領域には BS69 が E1A タンパク質と結合する結合配列である PxLxP motif が存在し(10)、この motif を変異させた TICAM-1 S1 は BS69 との結合が見られなくなった (Fig. 4-5)。これらの結果は、BS69 が TICAM-1 の N 末端領域に結合し、TICAM-1 を介した NF- $\kappa$ B 活性化に対して負に制御している分子である事を暗示している。NF- $\kappa$ B はアポトーシスを抑制するように作用する事が知られているが、生体でウイルス感染が起こった際には感染細胞の迅速なアポトーシスの誘導が、感染拡大を防ぐ重要な要となってくる。BS69 は TICAM-1 に結合する事により、TICAM-1 からの NF- $\kappa$ B 活性化を抑制し、感染細胞でのアポトーシスを起きやすくしている可能性が考えられる。また、BS69 は LMP-1 による MAP キナーゼ活性化を伝達するアダプター分子である事が報告された(13)。この報告から BS69 は TICAM-1 を介した NF- $\kappa$ B のみならず、MAP キナーゼの活性化に関与している可能性もあり、BS69 が TICAM-1 を介したシグナル伝達経路にどのように関与しているかについては今後の解析により明確になるだろう。

TRAF family との結合については、次章に詳細な解析を行った。

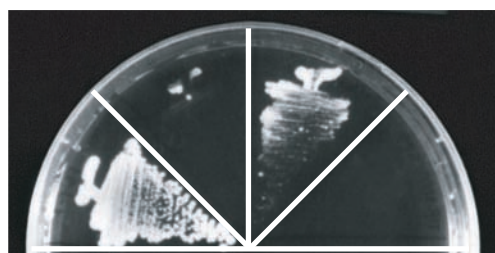
(a)



< SD - WLHA + 3-AT 15 mM >



(b)



< SD - WLHA + 3-AT 15 mM >

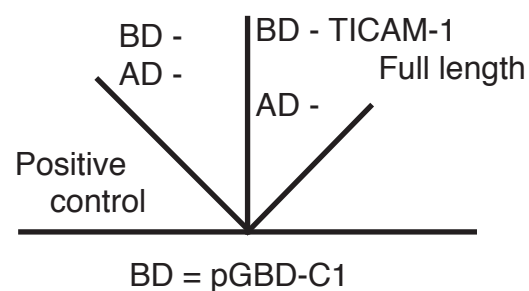


Fig. 4-1 TICAM-1 全長と選択条件検討

a) Bait vector pGBKT7 での選択条件検討

b) Bait vector pGBD-C1 での選択条件検討

Yeast AH109 に各プラスミドを共発現させ、SD 培地から Trp, Leu を欠損させた培地で一度生育させてから、選択培地下で生育を確認した。Positive control は既に相互作用の報告されているものを使用した。SD - WLHA + 3-AT 15 mM は SD 培地から Trp, Leu, His, Ade を抜いた所へ、3-AT を 15 mM 添加した培地である。

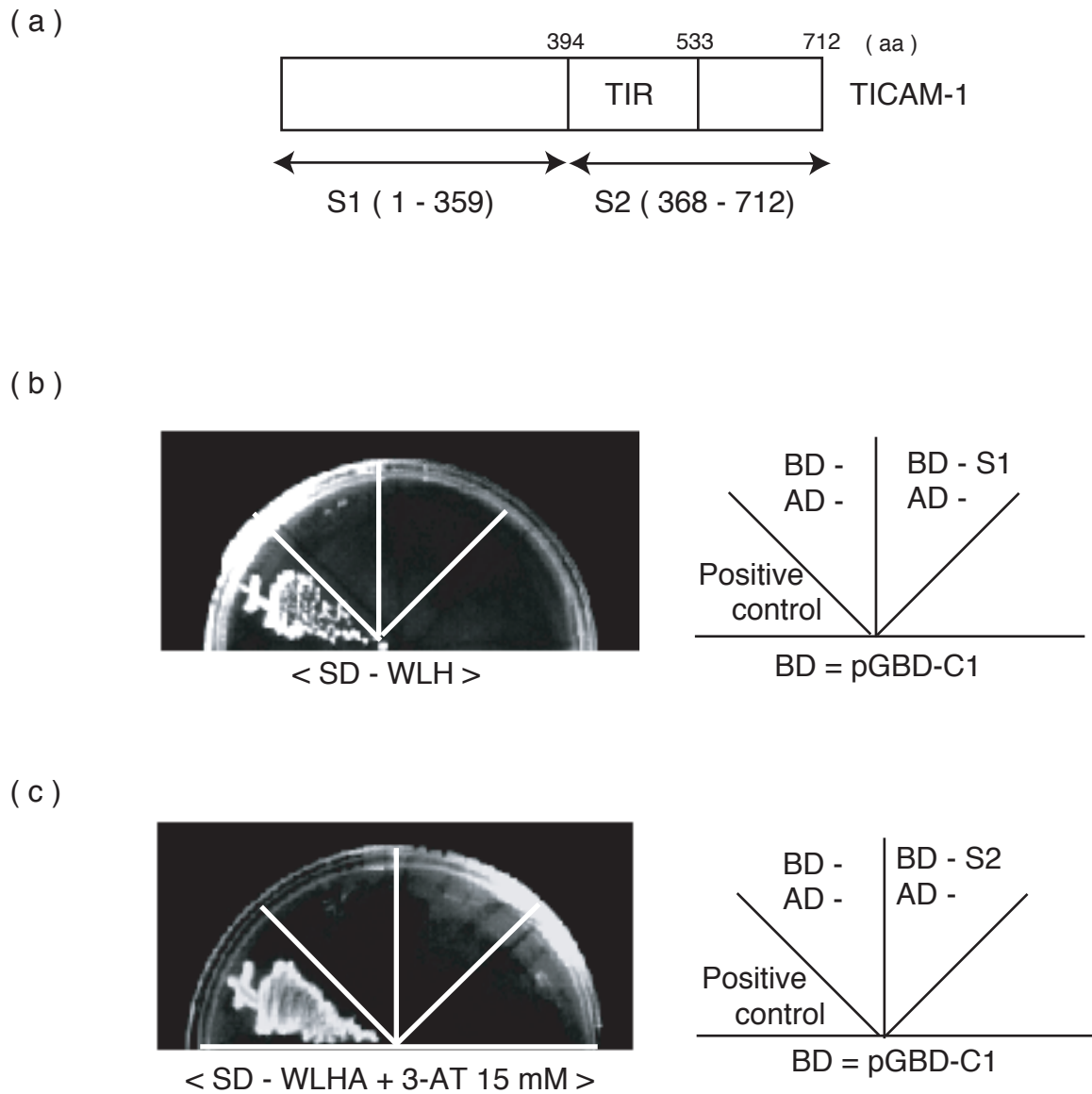


Fig. 4-2 TICAM-1 の断片化とスクリーニングの条件検討

- a) TICAM-1 の断片化模式図
- b) TICAM-1 S1 の選択条件検討
- c) TICAM-1 S2 の選択条件検討

Fig. 4-1 と同様に、条件検討を行った。



(a)

No		個数	retest
1	Homo sapiens collagen, type VIII, alpha 1 (COL8A1), mRNA.	2	+
2	Homo sapiens adenovirus 5 E1A binding protein (BS69), mRNA.	12	+
3	Homo sapiens lamin A/C (LMNA), transcript variant 3, mRNA	15	+
4	Homo sapiens solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 6 (SLC25A6), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA	2	-
5	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2), transcript variant 1, mRNA	6	+
6	Homo sapiens TNF receptor-associated factor 1 (TRAF1), mRNA	1	+
7	Homo sapiens sterol regulatory element binding transcription factor 1 (SREBF1), mRNA	1	-
8	Homo sapiens chromosome 19 clone CTD-2561J22, complete sequence	1	-
9	Homo sapiens, CDK4-binding protein p34SEI1	1	-
10	Homo sapiens ubiquitin B (UBB), mRNA	1	-
11	Homo sapiens proapoptotic caspase adaptor protein (PACAP), mRNA	1	-
12	Homo sapiens RANBPM mRNA, complete cds	2	-
13	Similar to cofilin 1, non-muscle, mRNA, complete cds	1	-

(b)



< SD- WLH >

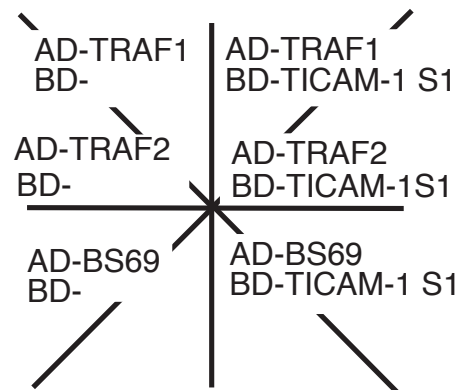
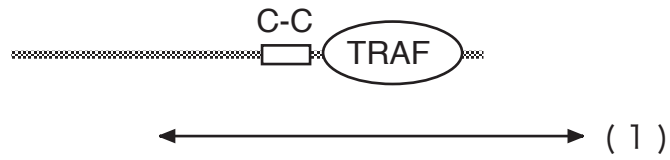


Fig.4-3 TICAM-1 S1 を用いたスクリーニングの結果

- a) 得られたクローンの遺伝子名と数
- b) TICAM-1 S1 との結合の再確認

Fig. 4-1 と同様に Yeast に各プラスミドを発現させた後、SD 培地から Trp, Leu, His を抜いた培地で生育させた。

(a)



(b)

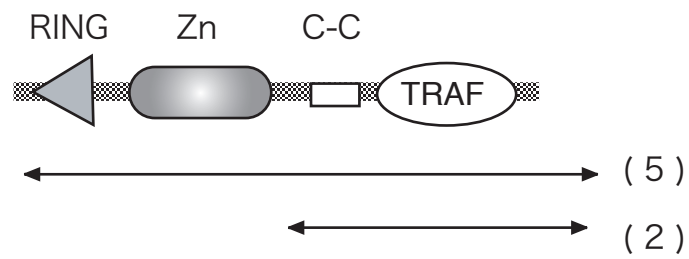


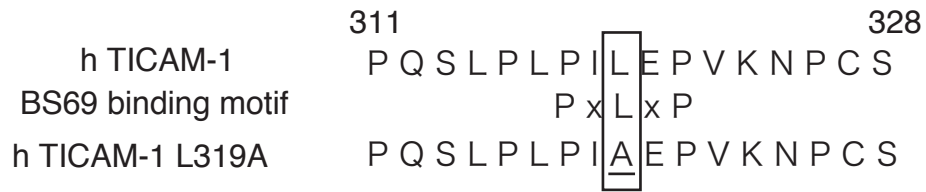
Fig. 4-4 スクリーニングにより得られた TRAF1, TRAF2 の領域

- a) TRAF1 の分子模式図
- b) TRAF2 の分子模式図

上段は各 TRAF のドメイン構造の模式図を示し、下段にスクリーニングにより得られた領域とその数を示した。

RING : Ring domain, Zn : zinc-finger domain, C-C : coiled-coil domain, TRAF : TRAF domain

(a)



(b)

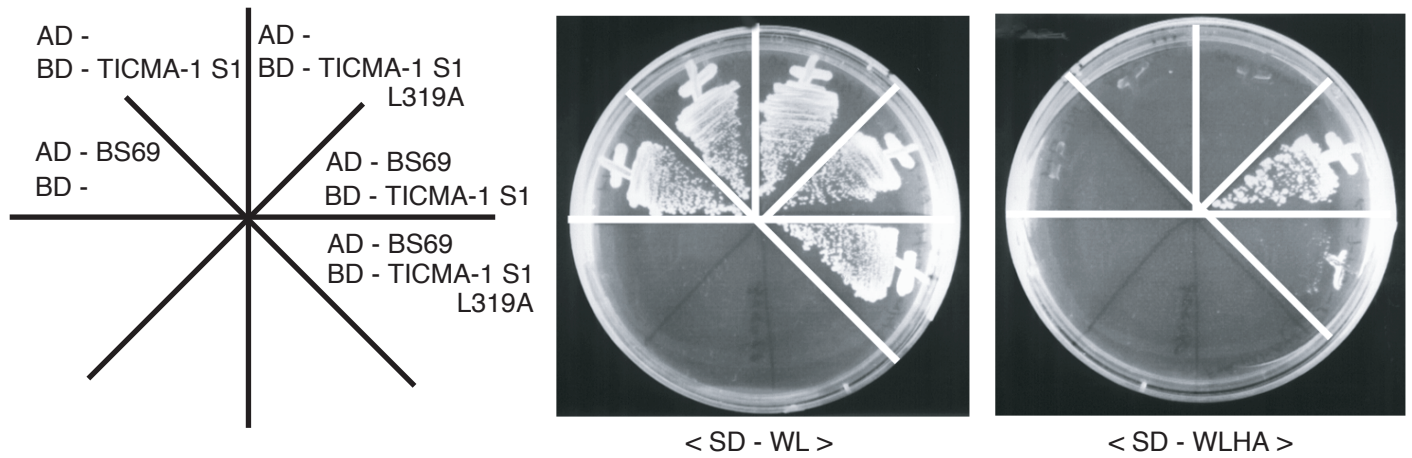


Fig. 4-5 BS69 結合 motif と結合確認

- a) TICAM-1N 末端領域にある BS69 結合モチーフ
- b) 結合モチーフ欠損 TICAM-1 と BS69 との結合

Fig. 4-1 と同様、Yeast に各プラスミドを発現させた後、SD 培地から Trp, Leu を抜いた培地 (SD - WL) と ,Trp, Leu, His, Ade (SD - WLH) を抜いた培地で生育させた。

< 文献 >

1. Yamamoto, M., S. Sato, K. Mori, K. Hoshino, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 169:6668-6672.
2. Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, and T. Seya. 2003. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 4:161-167.
3. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640-643.
4. Oshiumi, H., M. Sasai, K. Shida, T. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya. 2003. TIR-containing Adapter Molecule (TICAM)-2, a Bridging Adapter Recruiting to Toll-like Receptor 4 TICAM-1 That Induces Interferon- $\beta$ . *J Biol Chem* 278:49751-49762.
5. Honda, K., and T. Taniguchi. 2006. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 6:644-658.
6. Sasai, M., M. Matsumoto, and T. Seya. 2006. The Kinase Complex Responsible for IRF-3-Mediated IFN- $\beta$  Production in Myeloid Dendritic Cells (mDC). *J Biochem (Tokyo)* 139:171-175.
7. Chung, J. Y., Y. C. Park, H. Ye, and H. Wu. 2002. All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci* 115:679-688.
8. Fotin-Mleczek, M., F. Henkler, A. Hausser, H. Glauner, D. Samel, A. Graness, P. Scheurich, D. Mauri, and H. Wajant. 2004. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 1 regulates CD40-induced TRAF2-mediated NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 279:677-685.
9. Hateboer, G., A. Gennissen, Y. F. Ramos, R. M. Kerkhoven, V. Sonntag-Buck, H. G. Stunnenberg, and R. Bernards. 1995. BS69, a novel adenovirus E1A-associated protein that inhibits E1A transactivation. *Embo J* 14:3159-3169.

10. Ansieau, S., and A. Leutz. 2002. The conserved Mynd domain of BS69 binds cellular and oncoviral proteins through a common PXLXP motif. *J Biol Chem* 277:4906-4910.
11. Kurozumi, K., M. Nishita, K. Yamaguchi, T. Fujita, N. Ueno, and H. Shibuya. 1998. BRAM1, a BMP receptor-associated molecule involved in BMP signalling. *Genes Cells* 3:257-264.
12. Chung, P. J., Y. S. Chang, C. L. Liang, and C. L. Meng. 2002. Negative regulation of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-mediated functions by the bone morphogenetic protein receptor IA-binding protein, BRAM1. *J Biol Chem* 277:39850-39857.
13. Wan, J., W. Zhang, L. Wu, T. Bai, M. Zhang, K. W. Lo, Y. L. Chui, Y. Cui, Q. Tao, M. Yamamoto, S. Akira, and Z. Wu. 2006. BS69, a specific adaptor in the latent membrane protein 1-mediated c-Jun N-terminal kinase pathway. *Mol Cell Biol* 26:448-456.

## 第五章 TICAM-1 に結合する TRAF family 分子の機能解析

TICAM-1 の N 末端領域に結合する分子として、TRAF1 及び TRAF2 が Yeast two-hybrid 法を用いたスクリーニングにより単離された。TLR を介した NF- $\kappa$ B の活性化に重要な役割を担っている TRAF family 分子として TRAF6 が報告されているが、その他の TRAF family 分子と TLR との関与に関してはこれまで報告はなかった。近年、TLR を介したシグナル伝達経路に関する詳細な解析が進み、TRAF6 以外の TRAF family 分子が TLR を介したシグナル伝達経路に関与している事が報告されている。本章では TRAF family 分子の中でも TRAF2 の TICAM-1 を介したシグナル伝達経路への関与について、得られた知見を報告する。

TICAM-1 の N 末端領域に結合する分子として単離された TRAF1 及び TRAF2 は TNF- $\alpha$ 刺激による NF- $\kappa$ B 活性化機構に関与している分子として報告されており、詳細な解析が進んでいる(1, 2)。TNFRI に TNF- $\alpha$ が結合すると、その細胞内領域に TRADD、RIP1、TRAF2 などが誘導されてくる。TRAF2 の N 末端領域にある RING-domain はユビキチン連結酵素(E3)として機能し、TRAF2 の持つポリユビキチン鎖が RIP1 へと渡される事により TNF- $\alpha$ からのシグナルが下流分子へと伝達され、最終的に NF- $\kappa$ B が活性化される(3)。TRAF1 は TRAF2 と同様に TNFRI にリクルートされてくるが、TRAF1 の N 末端領域には RING-domain はないため、TNFRI への TRAF2 の相互作用を阻害する事により TNF- $\alpha$ 刺激による NF- $\kappa$ B 活性化に対して負に制御する分子として報告されている(4, 5)。

TLR family の多くは MyD88 をアダプター分子として用い、その後の NF- $\kappa$ B の活性化には TRAF6 が関与している事が報告されている。MyD88 は IRAK1-IRAK4 を介して TRAF6 と相互作用を示し、TRAF6 に付加されているポリユビキチン鎖が TAK1-TAB2 と複合体の形成を誘導して NF- $\kappa$ B の活性化を引き起こしている(6)。MyD88 欠損マウスを用いた解析の結果、TLR 3 を介したシグナル伝達機構はそのほとんどが MyD88 非依存的であり、その後 TICAM-1 依存的である事が明らかとなった(7, 8)。新しい経路であった事から TICAM-1 を介した NF- $\kappa$ B 活性化がどのようなようになっているか注目された。その後 TICAM-1 の N 末端領域に TRAF6 が結合して TICAM-1 を介した NF- $\kappa$ B の活性化に関与している事が報告され、TLR3 を介した NF- $\kappa$ B の活性化も TRAF6 により制御されている事が示唆された(9, 10)。しかし TRAF6 欠損マウスを用いた解析の結果、TLR3 リガンドの poly(I:C)刺激による NF- $\kappa$ B の活性化及び炎症性サイトカインの産生量は、TRAF6 欠損型と野生型それぞれのマウス由来マクロファージにおいて差は認められなかった。この結果か

ら TICAM-1 を介した NF- $\kappa$ B 活性化に TRAF6 以外の分子の存在も示唆された(11)。そして TNF- $\alpha$  を介した NF- $\kappa$ B 活性化に関与していると報告のあった RIP1 が TICAM-1 の C 末端領域に結合し、TICAM-1 を介した NF- $\kappa$ B の活性化に関与している事が報告された(12)。

TICAM-1 を介した NF- $\kappa$ B の活性化は TRAF6 と RIP1 を介して行われている事が示された。しかし、TICAM-1 を介した他のシグナル伝達経路に関しては、未解決の部分が多い。TICAM-1 を介したシグナル伝達経路は、NF- $\kappa$ B 活性化以外に、IRF-3 活性化と MAP キナーゼ活性化が主であるが、そのうち、IRF-3 の活性化に関与する分子として NAPI を第二章で報告した(13)。しかし NAPI は TICAM-1 との直接の結合は確認できなかった事から、TICAM-1 から NAPI へシグナルを伝達する分子がまだ存在している可能性を秘めていた。また、TICAM-1 を介した MAP キナーゼの活性化は、NAPI ドミナントネガティブ体では阻害されなかった事から（第二章参照）、TICAM-1 を介した MAP キナーゼ活性化に関与する分子の存在が示唆されていた。

本研究では TICAM-1 の N 末端領域に結合する分子として第四章で単離された TRAF2 が TICAM-1 をユビキチン化し、TICAM-1 を介したシグナル伝達経路に関与している事について述べる。

## < 結果 >

### 5-1 TICAM-1 と TRAF1, TRAF2, TRAF6 の哺乳類細胞内での相互作用

TICAM-1 の N 末端領域に結合する分子として TRAF1, TRAF2 が Yeast two-hybrid 法を用いて単離・同定された。TRAF1 および TRAF2 と TICAM-1 との結合が哺乳類細胞内でも起こりうる事、また TICAM-1 の全長とも相互作用を示す事を確認する為、ヒト腎由来 293 細胞に強制発現して免疫沈降を行った。その結果、TICAM-1 と TRAF1 および TRAF2 は哺乳類細胞内でもそれぞれ相互作用を示した (Fig. 5-1 a, b)。TLR を介したシグナル伝達経路に関与する TRAF family 分子としては、TRAF6 が最も解析されている。TICAM-1 の N 末端領域に TRAF6 の結合モチーフが三箇所存在し、TRAF6 が TICAM-1 と直接結合する事が報告された(9, 10)。この事から TICAM-1 と TRAF6 との結合について、Yeast two-hybrid 法を用いて確認した所、TRAF6 は TICAM-1 の N 末端領域に直接結合する事が確認された (Fig. 5-1 c)。また、哺乳類細胞を用いた免疫沈降の結果、哺乳類細胞内でも TICAM-1 と TRAF6 は相互作用を示す事が確認された (Fig. 5-1 d)。これらの結果から、TICAM-1 は TRAF family 分子のうち少なくとも TRAF1, TRAF2, TRAF6 の三種と直接結合する事が明らかとなった。

### 5-2 TRAF2 および TRAF6 と TICAM-1 の結合領域の同定

TRAF family 分子はその特徴として C 末端領域に family 間で非常によく保存されている TRAF-C domain を、N 末端領域にはユビキチン連結酵素としての機能を果たす Ring domain と複数の Zinc-finger domain、coiled-coil 領域が存在する (Fig. 5-2 a) (1)。TRAF1 のみ Ring domain を持たない事から、TRAF1 は TRAF domain を介して他の TRAF family 分子と相互作用を示す事により、他の TRAF family による作用を抑制するように機能する事が報告されている(5, 14)。TRAF1 は TRAF2 および TRAF6 による TICAM-1 への生理的作用を負に制御している可能性が考えられたため、まず TICAM-1 への TRAF2 の作用について解析を試みた。Yeast two-hybrid 法によるスクリーニングにより得られた TRAF2 の領域は全て C 末端に存在する TRAF domain を有していた事から、TRAF2 は C 末端領域の TRAF-C domain で TICAM-1 と結合する事が予想された(第四章参照)。哺乳類細胞内でも TRAF2 の C 末端領域が TICAM-1 と結合する事を明らかにするため、293 細胞を用いて免疫沈降を行った。その結果、TRAF2 は哺乳類細胞内においても、その C 末端領域を介



して、TICAM-1 と結合する事が明らかとなった (Fig. 5-2 b)。また、同様の解析を TRAF6 に対して行った所、TRAF2 と同様、C 末端領域で TICAM-1 と結合している事が明らかとなった (Fig. 5-1 d)。TICAM-1 の N 末端領域を用いたスクリーニングにより TRAF2 が得られた事から、TRAF2 は TICAM-1 の N 末端領域で結合する事が予想される。哺乳類細胞内でも TRAF2 が TICAM-1 の N 末端領域で結合する事を確認する為、TICAM-1 の N 末端領域と TIR domain を含む TICAM-1 N+TIR のコンストラクトを TRAF2 と共に 293 細胞に強制発現させ、免疫沈降を行った。その結果、TICAM-1 N+TIR は TRAF2 と相互作用を示し、また共発現させた細胞では TICAM-1 の高分子量への移行が検出された (Fig. 5-2 c)。

### 5-3 TRAF2 による TICAM-1 のユビキチン化

TRAF2 は TNF- $\alpha$  刺激を受けると RIP1 にポリユビキチン鎖を付加して RIP1 を活性化する事が報告されており(3)、TRAF2 と共発現した際に見られた TICAM-1 の高分子量への移行は TRAF2 による TICAM-1 のポリユビキチン化である可能性が考えられた。そこで 293 細胞に HA-タグを付加したユビキチンを発現させ、TICAM-1 のユビキチン化について検討した。実験に使用した TICAM-1 は CFP を融合させたもので、検出には GFP 抗体を使用した。解析の結果、HA-ユビキチンを発現させたコントロール細胞に比べ、TICAM-1 単独発現細胞では約 2.6 倍、TRAF2 を共発現させた場合は約 7.1 倍の TICAM-1 のポリユビキチン化が検出された (Fig. 5-3 a)。

ユビキチンは 76 アミノ酸からなり、7 個のリジン残基を持つ高度に保存されたタンパク質である。7 個全てのリジン残基からユビキチン鎖が形成される事が報告されているが、中でも 48 番目のリジン残基を介したポリユビキチン鎖は基質蛋白質のプロテアソームでの分解へ、63 番目のリジンを介したポリユビキチン鎖は基質タンパク質が関与しているシグナル伝達にそれぞれ関与している事が知られている(3)。TRAF family 分子の中でも、TRAF2 及び TRAF6 は 63 番目のリジン残基を介したポリユビキチン鎖を付加するユビキチン連結酵素(E3)として報告されている(15, 16)。TICAM-1 単独の強制発現でも TICAM-1 のポリユビキチン化が検出された事から、TICAM-1 のポリユビキチン化が 48 番目と 63 番目のどちらのリジン残基を介して形成されているのかを解析する為、48 番目と 63 番目のリジン残基をそれぞれアルギニンに置換した変異体(K48R-Ub, K63R-Ub)を用いて TICAM-1 のポリユビキチン化について解析を行った。それぞれのリジン残基をアルギニンに置換すると、置換したリジン残基を介したポリユビキチン鎖の形成が止まる事が

報告されている(15)。解析の結果、野生型のユビキチンを用いた場合は約 6.2 倍の TICAM-1 ポリユビキチン化を示したのに対し、K48R-Ub を用いた場合は約 4.4 倍、K63R-Ub を用いた場合は約 1.4 倍と、野生型ユビキチンに比べて TICAM-1 ユビキチン化は減少し、特に K63R-Ub を用いた場合に顕著な減少が認められた (Fig. 5-3 b)。

ユビキチン化は関与するユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチン連結酵素 (E3)、基質タンパク質と ATP が存在すれば無細胞系で再構築できる事が知られている(3, 17)。TRAF2 は K63 を介したポリユビキチン鎖を基質に結合するユビキチン連結酵素として報告されており、TICAM-1 は K63 を介したポリユビキチン化されている可能性が Fig. 5-3 より示された事から、TRAF2 による TICAM-1 のユビキチン化をより明確にするため、*in vitro* ubiquitination assay を行った。TRAF2 は Mms2(Uev1A)および Ubc13 のヘテロ二量体を E2 に用いる事が報告されている(16)。*In vitro* ubiquitination assay に必要な E1, E2 (Mms2/Ubc13), E3 (TRAF2)、基質 (TICAM-1) をそれぞれ His タグ付加の状態で大腸菌に発現させ、Ni-NTA カラムを用いて精製した (Fig. 5-3 e)。これらの精製したタンパク質を *in vitro* で再混合し、TICAM-1 のユビキチン化について解析を行った。その結果、E2、TRAF2、TICAM-1 それぞれを添加していない又は酵素反応を行っていない条件下では、TICAM-1 のユビキチン化は検出されていないのに対して、全てを満たしている条件下では TICAM-1 は高分子量へ移行した (Fig. 5-3 f)。これらの結果から TICAM-1 は TRAF2 によってポリユビキチン化されうる事が示唆された。

#### **5-4 TICAM-1 における TRAF2 結合部位の同定**

TICAM-1 への TRAF2 結合の機能的意義を明らかにするために、TICAM-1 の TRAF2 結合部位の同定を行った。TRAF2 結合 motif に関しては多数報告があり、Yeast two-hybrid 法でのスクリーニングに用いた TICAM-1 の領域には既に報告のある TRAF2 結合 motif として 100-150 アミノ酸の領域に AYQE motif, 300-386 アミノ酸の領域に PxQxT/S motif の二種が存在する (Fig. 5-4 a) (18-22)。TICAM-1 に存在する TRAF2 結合 motif は新規である可能性も考慮し、まず TICAM-1 N 末端の TRAF2 結合領域の同定を Yeast two-hybrid 法を用いて行った (Fig. 5-4 a)。その結果、TICAM-1 N300-359 のアミノ酸領域 (dN300) で TRAF2 と結合する事が明らかとなった (Fig. 5-4 b)。dN300 の領域には PxQxT/S motif が存在するが、EB ウイルスタンパク質である LMP-1 での motif 変異はプロリンとグルタミンをアラニンに置換、CD40 での motif 変異はスレオニンアラニンにそれぞれ置換した際、それぞれ TRAF2 との結合が見られなくなっていた(23, 24)。dN300 で二種類の TRAF2 結合

モチーフ変異体(AAS 体と PQA 体)を作製し (Fig. 5-4 c)、Yeast two-hybrid 法を用いて TRAF2 との結合を調べた。その結果、TICAM-1dN300 で見られていた TRAF2 との結合はどちらの変異体でも見られなくなった (Fig. 5-4 d)。この結果から、TICAM-1 は PxQxS motif を介して TRAF2 と結合する事が示唆された。

## 5-5 TICAM-1 変異体と TRAF2 との哺乳類細胞内での結合

Yeast two-hybrid 法を用いて同定した TICAM-1 の TRAF2 の結合サイトが、哺乳類細胞内でも TRAF2 結合サイトであるかを確認するため免疫沈降を行った。その結果、Yeast two-hybrid 法を用いた解析では二種類の TRAF2 結合部位変異、AAS 及び PQA、のどちらでも TRAF2 との結合は検出されなくなったが、哺乳類細胞内では PQA 変異のみが TRAF2 との共沈が欠損した (Fig. 5-5 b lane 2, 3, 4)。

次に TRAF2 結合欠損による TICAM-1 ポリユビキチン化への影響について検討した。TICAM-1 の N 末端領域には TRAF6 が直接結合する事が本研究を含む複数の研究により明らかとなっている (Fig. 5-1 c) (9, 10)。TRAF6 は TRAF2 と同じ Mms2 (Uev1A) と Ubc13 のヘテロ二量体を E2 として K63 鎖を介したポリユビキチン鎖の形成を引き起こす事が報告されている事から(15)、TICAM-1 のユビキチン化に TRAF6 も関与している可能性がある。TICAM-1 N 末端領域にある三箇所の TRAF6 結合 motif のうち、250 から 255 アミノ酸の領域に保存されている TRAF6 結合 motif が TRAF6 との結合に非常に重要である事が報告されている (Fig. 5-5 a) (10)。TICAM-1 ポリユビキチン化への TRAF6 の関与も想定し、TICAM-1 の TRAF2 結合変異体 (TICAM-1 PQA)、TRAF6 結合変異体 (TICAM-1 E252A)、TRAF2 及び TRAF6 結合変異体 (TICAM-1 PQA/E252A)のポリユビキチン化について解析した。その結果、TICAM-1 PQA または TICAM-1 E252A 変異体は野生型に比べて TICAM-1 のポリユビキチン鎖の減少が見られ、TICAM-1 PQA/E252A ではより顕著にポリユビキチン鎖の減少が確認された (Fig. 5-5 b lane 2, 4, 5, 6)。TRAF2 と TRAF6 の E3 活性によって TICAM-1 がポリユビキチン化されている事をより明確にするため、TRAF family 分子が E3 活性を示すのに重要な RING-domain を欠損している TRAF2-C 及び TRAF6-C を発現させた際の TICAM-1 のポリユビキチン化について検討した。その結果、TRAF2-C 及び TRAF6-C を共発現させると、TICAM-1 のポリユビキチン鎖は減少した (Fig. 5-5 c)。これらの結果から、TICAM-1 は TRAF2 と TRAF6 の双方の E3 活性によってポリユビキチン化されている事が示唆された。

TICAM-1 の C 末端領域には RHIM domain が下等生物まで高度に保存されておりこの domain を介して RIP1 と結合して NF- $\kappa$ B の活性化を誘導する事が報告され

ているが (Fig. 5-5 d) (12)、RIP3 と結合する事により FADD および Caspase-8 を介したアポトーシスを誘導する事も報告されている(25, 26)。TICAM-1 の全長を用いたユビキチン化の解析をするに当たり、基質となる TICAM-1 を十分量細胞内で維持するには TICAM-1 を強制発現した際に誘導されるアポトーシスを制御する必要があった。そこで、TICAM-1 の RHIM domain 内のある VQIG motif の VQLG を全てアラニンに置換 (VQLG → AAAA)して TICAM-1 のタンパク量を比較した所、RHIM domain を置換したコンストラクトはどの変異体も十分量の TICAM-1 を検出する事がきた (Fig. 5-5 d)。RHIM 変異を基として TICAM-1 全長のポリユビキチン化について解析を行った結果、TICAM-1 は RHIM domain を変異させても TICAM-1 のポリユビキチン化は検出され、TICAM-1 の RHIM domain 変異に TRAF2/TRAF6 の両結合部位も変異させた TICAM-1 Triple ではそのポリユビキチン化が減少する傾向が得られた (Fig. 5-5 e)。

## 5-6 TRAF 結合変異による TICAM-1 のシグナル伝達への影響

TICAM-1 による IFN- $\beta$  promoter 活性化への TRAF2 および TRAF6 結合欠損の影響を調べるため、各種変異体を用いたレポーター遺伝子解析を行った。TICAM-1 N+TIR は全長よりは活性化能は低下するが IFN- $\beta$  promoter を活性化する事ができた事から (Fig. 5-6 a)、まず TICAM-1 N+TIR の各 TRAF 結合変異体での IFN- $\beta$  promoter の活性化について検討した。その結果、TRAF2 結合変異体である TICAM-1 PQA は野生型と同程度の IFN- $\beta$  promoter 活性化を示したが、TRAF6 結合変異体である TICAM-1 E252A において顕著に活性化が低下し、TRAF2 と TRAF6 の両結合変異体ではより顕著にその活性化が低下した (Fig. 5-6 b upper)。各変異を入れた事により TICAM-1 タンパク質量が変化していない事を確認するため、レポーター活性を測定したサンプルの一部を用いてウエスタンブロッティングを行ったが、各サンプル間での TICAM-1 タンパク質量に大差は認められなかった (Fig. 5-6 b lower)。また IRF-3 の活性化について GAL4-IRF-3 を用いた解析を行った所、IFN- $\beta$  promoter を用いた解析と同様、TICAM-1 E252A で顕著に減少し、TICAM-1 PQA / E252A の両変異体でさらに顕著な減少が確認された (Fig. 5-6 c)。NF- $\kappa$ B および MAP キナーゼ(AP-1)活性化についても同様にレポーター解析を行った。NF- $\kappa$ B 活性化は、IFN- $\beta$  promoter の活性化の結果と同様に、TICAM-1 E252A で顕著に、TICAM-1 PQA / E252A でより顕著にその活性化の低下が見られた (Fig. 5-6 d)。AP-1 活性化は TICAM-1 E252A でほとんど活性化は見られなくなった (Fig. 5-6 e)。

TICAM-1 を介した IFN- $\beta$  promoter の活性化に TRAF2 及び TRAF6 が関与してい

る事をより明確にするためには、TICAM-1 の全長を用いた解析が必須である。TICAM-1 の全長による IFN- $\beta$  promoter 活性化を、TICAM-1 野生型 (WT)、RHIM domain 変異 TICAM-1 (RHIM)、RHIM 及び TRAF2/TRAF6 の結合変異 TICAM-1 (Triple) を用いて比較した。その結果、RHIM は WT と比較して IFN- $\beta$  promoter の活性化に差は認められなかったが、Triple では顕著に TICAM-1 による IFN- $\beta$  promoter の活性化は減少した (Fig. 5-6 f)。また RHIM 変異を基にして、PQA および E252A それぞれの変異による IFN- $\beta$  promoter の活性化について検討した所、PQA/RHIM 変異ではわずかに、E252A/RHIM 変異では顕著に IFN- $\beta$  promoter の活性化が減少した (Fig. 5-6 g)。これらの結果から TRAF2 と TRAF6 の TICAM-1 への結合は、TICAM-1 を介した IFN- $\beta$  promoter の活性化に関与している事が示唆された。

### 5-7 TICAM-1 を介したシグナル伝達経路への TRAF 2/ TRAF6 の影響

TRAF6 は多くの TLR を介した NF- $\kappa$ B 活性化に関与する分子として報告されているが、TRAF2 の TLR を介したシグナル伝達経路への関与については現在報告されていない。TRAF2 及び TRAF6 結合変異体を用いたレポーター解析の結果、TICAM-1 を介した IRF-3 の活性化に TRAF6 が非常に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。しかし TICAM-1 経路を介して IFN- $\beta$  産生を起こす LPS と poly(I:C) のそれぞれの刺激による IFN- $\beta$  産生は、TRAF6 欠損マウスでは野生型と差は認められなかった(11)。TICAM-1 経路では TRAF2 が TRAF6 と相補的に機能している可能性を考え、TRAF2 が他の TLR のアダプター分子の MyD88、TIRAP、TICAM-2 と相互作用を示すかについて解析した。その結果、TRAF2 は TICAM-1 以外のアダプター分子との相互作用はほとんど検出されなかった。また TICAM-1 以外のアダプター分子に関してもユビキチン化について解析を行った結果、驚くべき事に、MyD88 と TIRAP に関してポリユビキチン鎖の付加が検出された (Fig. 5-7 a)。

最近、TRAF2 及び TRAF6 が共通に使用する E2 である Ubc13 のコンディショナルノックアウトマウスを用いた解析がなされ、Ubc13 は LPS 刺激による MAP キナーゼの活性化 (P38 および Jnk のリン酸化) に関与している事が報告された事から(27)、TRAF2 及び TRAF6 による TICAM-1 のユビキチン化は TLR3 を介した MAP キナーゼの活性化に関与している事が予想された。そこで HeLa 細胞において poly(I:C) 刺激による MAP キナーゼの活性化への Ubc13 ドミナントネガティブ体 (Ubc13C87A) の影響について解析を行った。その結果、poly(I:C) 刺激による Jnk

のリン酸化は Ubc13 ドミナントネガティブ体との共発現により、抑制される傾向が得られた (Fig. 5-7 b)。

また、TICAM-1 による IFN- $\beta$  promoter の活性化が TRAF 結合変異 TICAM-1 により減少する結果が Fig. 5-6 で得られた。この減少が TICAM-1 による IFN- $\beta$  mRNA 誘導にも言えるかを確認するため、マウスマクロファージ由来 RAW 264.7 細胞に TICAM-1 WT、TICAM-1 RHIM 変異、TICAM-1 Triple 変異のそれぞれを強制発現し、誘導される IFN- $\beta$  mRNA 量について解析を行った。その結果、TICAM-1 強制発現によって誘導される IFN- $\beta$  mRNA 量は、TICAM-1 Triple 変異体で顕著に減少した (Fig. 6-7 c)。

## **5-8 TICAM-1 N 末端領域と TRAF3 の結合**

TRAF3 ノックアウトマウス由来の細胞を用いた解析の結果、TICAM-1 を介した IFN- $\beta$  産生に TRAF3 が関与している事が報告された(28)。TRAF2, TRAF6 がそれぞれの C 末端領域にある TRAF-C domain を介して TICAM-1 N 末端領域と結合しており TRAF3 も TRAF-C domain を持っている事から、TRAF-3 も TICAM-1 N 末端領域に直接結合している可能性が考えられた。そこで Yeast two-hybrid 法を用いて TICAM-1 の N 末端領域と TRAF3 との結合について解析を行った。しかし TICAM-1 の N 末端領域と TRAF3 との直接の結合は確認できなかった (Fig. 5-8)。

## <考察>

本章では TICAM-1 に結合する分子として単離された TRAF2 の機能的意義の解明を目指し解析を行った。

TLR family を介したシグナル伝達経路に関与する TRAF family は TRAF6 だけであると長い間考えられてきたが、近年別の TRAF family 分子の関与も報告されてきている。TRAF1 は本研究でも TICAM-1 の N 末端領域に結合する分子として単離されてきたが、TICAM-1 の TIR domain と結合して TICAM-1 を介したシグナルに対し抑制的に作用するという報告がなされた(29)。TRAF4 は TICAM-1 および TRAF6 と相互作用を示し、TLR 3 および TLR4 のリガンド刺激による IFN- $\beta$  promoter の活性化を負に制御している事が報告された(30)。また、TICAM-1 経路および RIG-I/MDA5 の経路による Type- I IFN 産生に TRAF3 が関与している事が、TRAF3 欠損マウスを用いた解析により明らかとなっている(28)。しかし、TRAF1 に関しては本研究とは TICAM-1 の結合領域が異なっており、TRAF3 および TRAF4 に関しては詳細な分子機構については不明である。TRAF1, TRAF2, TRAF6 が C 末端領域にある TRAF-C domain を介して TICAM-1N 末端領域と結合していた事と、TRAF3 も TRAF-C domain を持っている事から、TRAF-3 が TICAM-1 N 末端領域に直接結合している可能性を考えて解析を行ったが、TRAF3 と TICAM-1 N 末端領域との結合は確認されなかった (Fig. 5-8)。TRAF family 間には TRAF-C domain 同士で相互作用を示す事が報告されている事から(31)、TRAF3 は TICAM-1 と直接結合する他の TRAF family 分子を介して、TICAM-1 を介した IFN- $\beta$ 産生経路に関与している可能性が考えられる。

本研究により新たに TLR を介したシグナル伝達経路に関与が示唆された TRAF2 は、TICAM-1 の 330 から 340 アミノ酸領域に存在する PxQxS/T motif で TICAM-1 と直接結合する事が明らかとなった(Fig. 5-4, 5-5)。TICAM-1 による IFN- $\beta$  promoter 活性化への TRAF2 の関与を解明するために TRAF2 結合部位を変異させた TICAM-1 (TICAM-1 PQA)を強制発現してレポーター遺伝子解析を行ったが、その IFN- $\beta$  promoter の活性化は野生型 TICAM-1 とほとんど差は見られなかった。TICAM-1 による IFN- $\beta$  promoter の活性化は TRAF6 結合変異 TICAM-1 (TICAM-1 E252A)で顕著に低下するが、TRAF2 と TRAF6 の両結合変異 TICAM-1 (TICAM-1 PQA/E252A)で、TICAM-1 E252A よりもさらに減少した事から、TRAF2 の結合が TICAM-1 による IFN- $\beta$  promoter の活性化に関与している可能性はある (Fig. 5-6)。

TRAF6 結合部位の変異 TICAM-1 (TICAM-1 E252A)は、TICAM-1 による IFN- $\beta$  promoter 活性化を減少させる事が以前報告されていたが、その寄与は NF- $\kappa$ B 活性化が低下するためであると考えられていた(9, 10)。本研究により、NF- $\kappa$ B 活性化の低下のみならず IRF-3 活性化も顕著に低下している事が明らかとなった(Fig. 5-6)。

TICAM-1 E252A で TICAM-1 による IFN- $\beta$  promoter 活性化が劇的に減少するにも関わらず、TRAF6 欠損マウスでは TICAM-1 依存性の Type-I IFN 産生に差は見られなかった事は、TRAF6 の機能を補う分子の存在を暗示させる。TLR 刺激のうち TICAM-1 依存経路だけが TRAF6 欠損マウス由来の細胞を用いても、野生型由来の細胞と同程度の NF- $\kappa$ B 活性化、MAP キナーゼ活性化、サイトカイン産生を示すという事は、TICAM-1 経路特異的に TRAF6 の機能を補う分子が存在しているか全く異なるシグナル伝達経路を持っているかのどちらかであろう。NF- $\kappa$ B 活性化が重要な炎症性サイトカインの産生は、C 末端領域に結合する RIP1 によって担われている事が示唆されたが(12)、IRF-3 活性化には RIP1 は関与していなかった事から TRAF6 の機能を補う IRF-3 活性化に関与する分子の存在が想定される。他の TLR アダプター分子と TRAF2 との相互作用について検討した結果、TRAF2 は TICAM-1 特異的に相互作用を示した (Fig. 5-7 a)。この結果は、TICAM-1 経路において TRAF2 が TRAF6 と相補的に機能している可能性を示しているかもしれない。

TRAF2 と TRAF6 は K63 鎖を介したポリユビキチン鎖を基質に付加するユビキチン連結酵素(E3)としての機能を持っており、ユビキチンを受け渡す事により下流シグナルを活性化する事が報告されている(3)。Fig. 5-3 により TICAM-1 は TRAF2 によってユビキチン化される事が示された。TICAM-1 のユビキチン化は、TICAM-1 PQA および TICAM-1 E252A のそれぞれでも減少するが、TICAM-1 PQA/E252A ではより顕著に減少が見られた事 (Fig. 5-5 b)、TRAF2 および TRAF6 の RING-domain を欠損させた TRAF 分子を発現させると TICAM-1 のユビキチン化は減少した事から (Fig. 5-5 e)、TICAM-1 は TRAF2 と TRAF6 により K63 鎖を介したポリユビキチン化される事が示唆された。

また、TICAM-1 以外のアダプター分子のうち、MyD88 と TIRAP もユビキチン化されている可能性が示された (Fig. 5-7 a)。TIRAP はシグナルを伝達した後 Btk2 によりリン酸化され、SOCS-1 と結合できるようになりプロテアソーム依存的に分解される事が(32, 33)、MyD88 は TGF- $\beta$ 刺激によりユビキチン化されプロテアソーム依存的に分解される事が(34)、それぞれ報告されている。しかし、TLR family のアダプター分子が K63 鎖を介したポリユビキチン化されている可能性を示したのは本研究が初めてである。

TRAF2 と TRAF6 の両者と結合できない TICAM-1 は、そのユビキチン化が顕著に減少し (Fig. 5-6)、また IFN- $\beta$ 誘導能も劇的に低下した (Fig. 5-7)。しかし、この結果は TRAF2 および TRAF6 が結合できない故に TICAM-1 の下流で IRF-3 活性化に関与している TRAF3 や NAP1、TBK 1 が TICAM-1 と相互作用できなくなり IFN- $\beta$  の誘導ができていない可能性もあり、IRF-3 活性化経路に K63 鎖を介した TICAM-1 のポリユビキチン化に関与しているかについては断定できない。Ubc13 のキナーゼ



変異体により poly(I:C)を介した JNK の活性化が減少する傾向もえられており (Fig. 5-7 b)、TICAM-1 の K63 を介したポリユビキチン化は MAP キナーゼ活性化に重要である可能性もある。その一方で、TLR7 および TLR9 を介した type-I IFN 産生に必須の転写因子である IRF-7 は上流分子の活性化により K63 を介したポリユビキチン化がされて活性化するという報告もあり(35)、IRF-3 が活性化される際に K63 を介したポリユビキチン化が関与している可能性もある。

本研究により、TICAM-1 と結合する TRAF2 は TRAF6 と相補的に作用して、

- 1, TICAM-1 に K63 鎖を介したポリユビキチン鎖を付加する
- 2, TICAM-1 からの IRF-3 活性化に関与する可能性がある

という事が明らかとなった。この二点に相関があるかはまだ未解明であるが、その全容が解明される日も近いだろう。

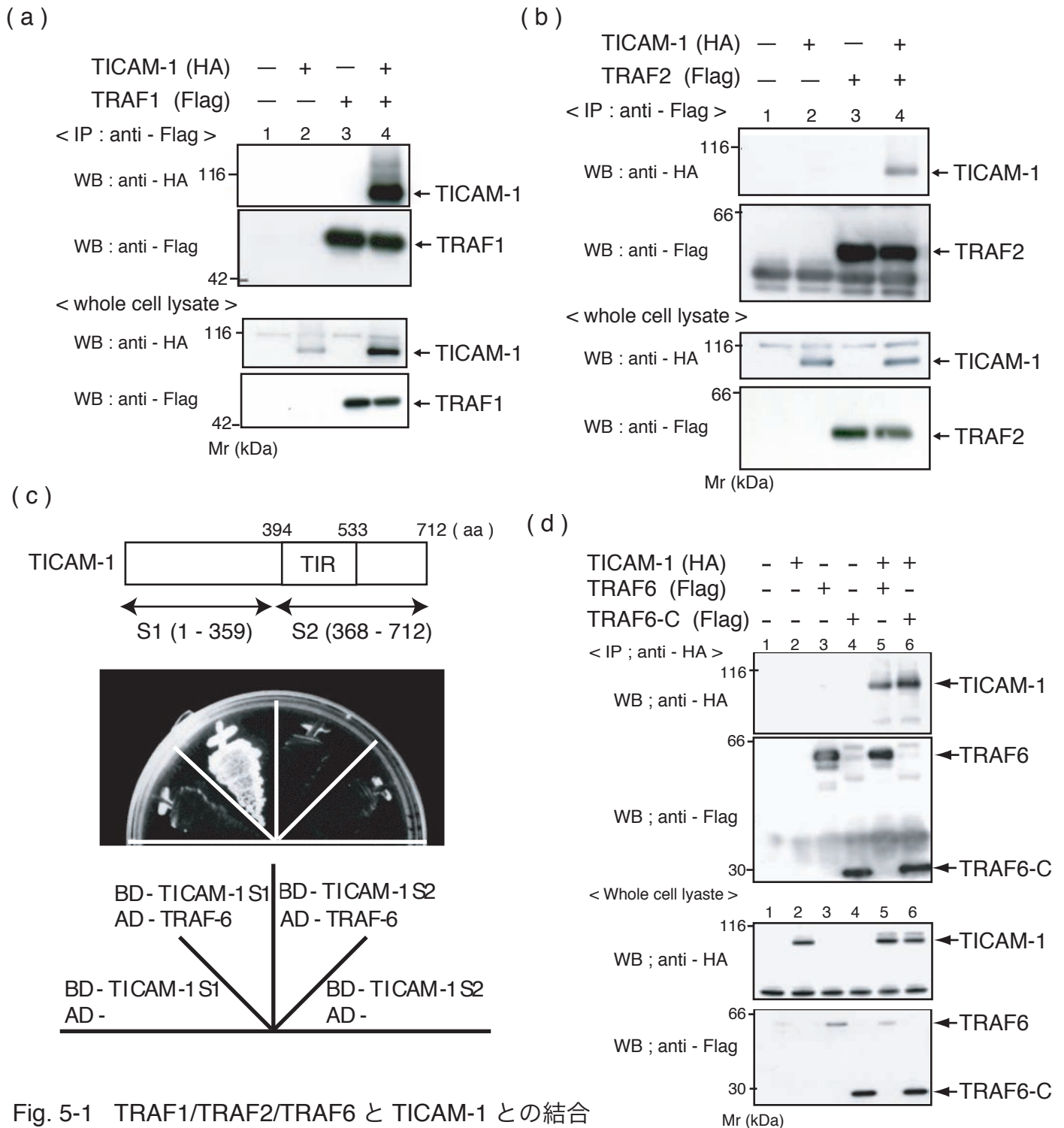


Fig. 5-1 TRAF1/TRAF2/TRAF6 と TICAM-1 との結合

- a) 哺乳類細胞内での TICAM-1 と TRAF1 の相互作用
- b) 哺乳類細胞内での TICAM-1 と TRAF2 の相互作用
- c) TRAF6 と TICAM-1 S1 との結合
- d) 哺乳類細胞内での TRAF6 と TICAM-1 との相互作用

a, b, d) 293 細胞に記載のプラスミドを強制発現させ、24 時間後に細胞を溶解し、免疫沈降を行った。それぞれ上二段が免疫沈降を行ったもの、下二段が発現確認である。panel 左は検出に用いた一次抗体を示し、panel 右は分子量から予想されるタンパクについて矢印で示した。

c) 上段 - 使用した TICAM-1 の領域。下段 - Yeast AH109 に各プラスミドを共発現させ、SD 培地から Trp, Leu を欠損させた培地で一度生育させてから、選択培地下で生育を確認した。

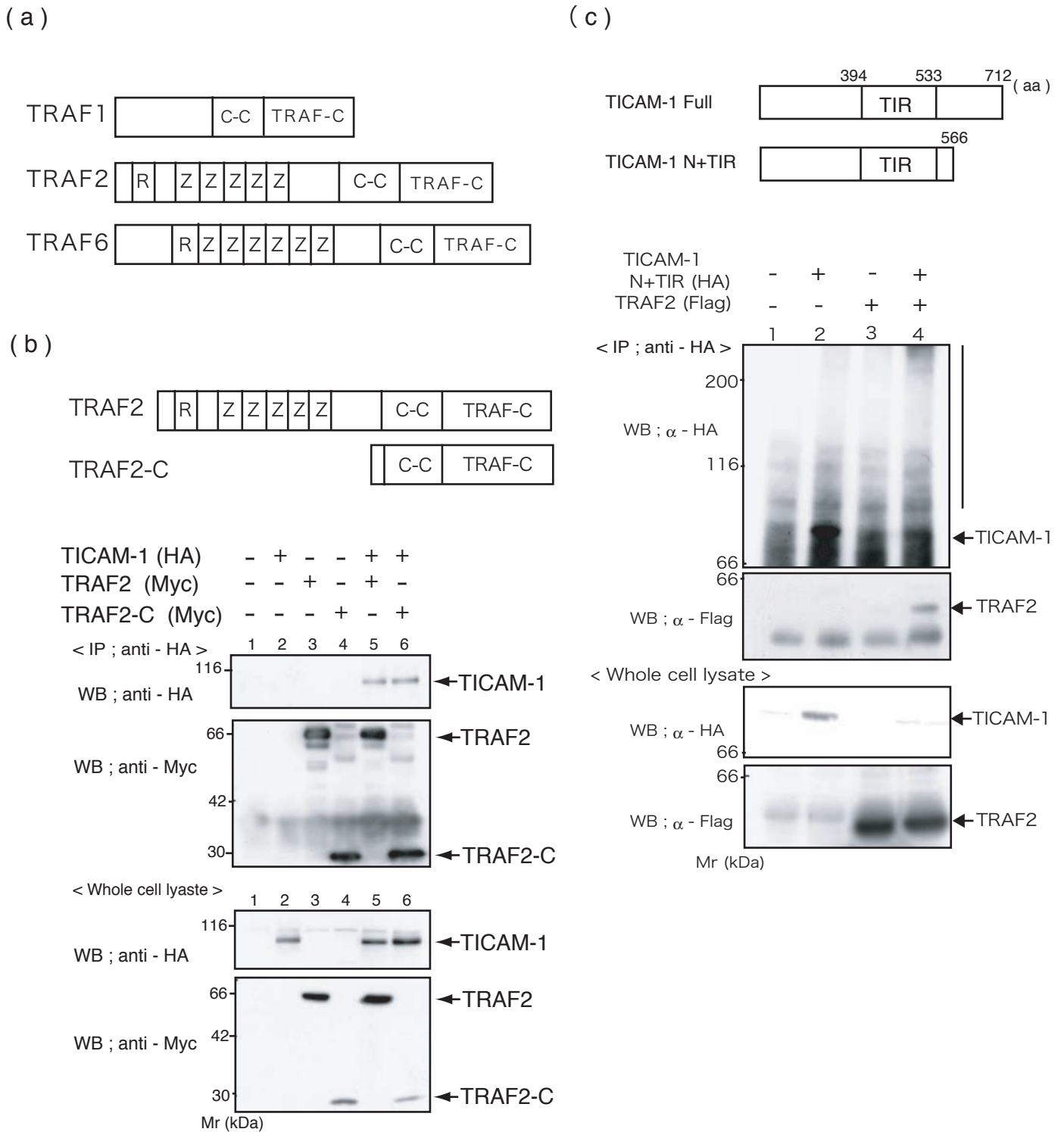


Fig. 5-2 TRAF2 と TICAM-1 との結合領域

a) TRAF family の模式図

R; Ring domain, Z; zinc-finger domain, C-C; coiled-coil domain, TRAF-C; TRAF-C domain.

b) TRAF2-C と TICAM-1 との相互作用

c) TICAM-1 N+TIR と TRAF2 との相互作用

b, c) 293 細胞に記載のプラスミドを強制発現させ、24 時間後に細胞を溶解し、免疫沈降を行った。それぞれ上二段が免疫沈降を行ったもの、下二段が発現確認である。panel 左は検出に用いた一次抗体を示し、panel 右は分子量から予想されるタンパクについて矢印で示した。

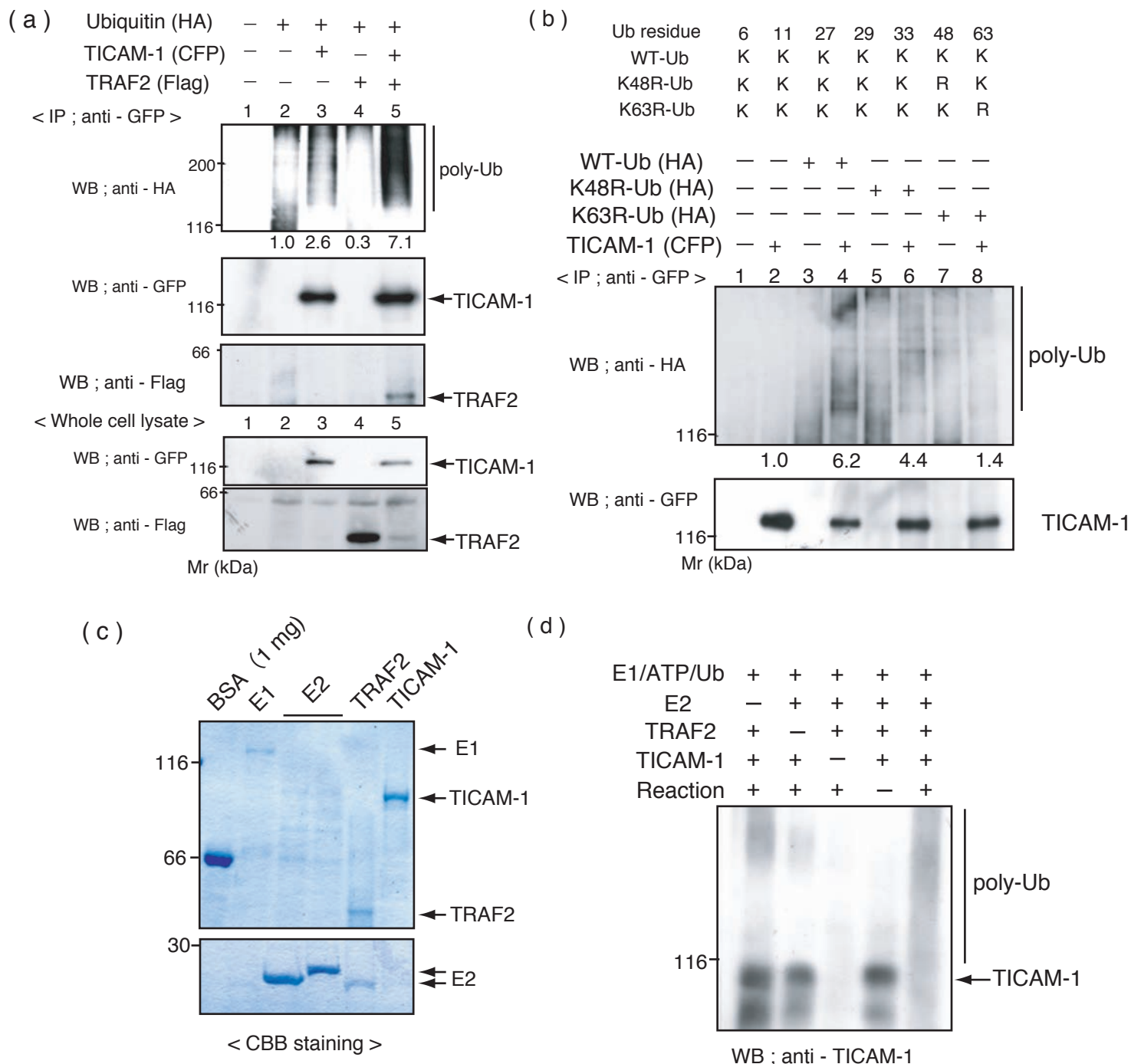


Fig. 5-3 TRAF2 による TICAM-1 のユビキチン化

a) TICAM-1 のユビキチン化

b) K48R/K63R を用いた TICAM-1 のユビキチン化

293 細胞に記載のプラスミドを強制発現させ、24 時間後に細胞を溶解し、免疫沈降を行った。それぞれ上二段が免疫沈降を行ったもの、下二段が発現確認である。panel 左は検出に用いた一次抗体を示し、panel 右は分子量から予想されるタンパクについて矢印で示した。数値は HA-Ub または TICAM-1 単独発現時のポリユビキチン化付近の泳動像を 1 として時の他の条件のバンドの濃さを、NIH Image Scan を用いて相対的に示した。

c) 精製タンパク質の CBB 染色

d) in vitro ubiquitination assay

各タンパク質に His タグを付加させたものを大腸菌に発現させ、そのタンパク質を Ni-NTA セファロースを用いて精製した。全て 20 % グリセロールを添加し、-80°C 保存のものをストックとした。(c) は各ストックを 1  $\mu$ l ずつ (TICAM-1 のみ 5  $\mu$ l) 泳動し、ゲルを CBB 染色した。精製したタンパク質を記載の組み合わせで混合し、30°C で 12 時間反応させた。Reaction (-) は混合する前から SDS を添加し、30°C 反応時間中は 4°C で保存した。12 時間後、7.5 % アクリルアミドゲルで泳動し、TICAM-1 抗体を用いて、TICAM-1 のユビキチン化について解析した。d の実験は独立した 5 回の実験を行い、どの回も同様の傾向が得られている。上記はそのうちの一回の結果を示した。

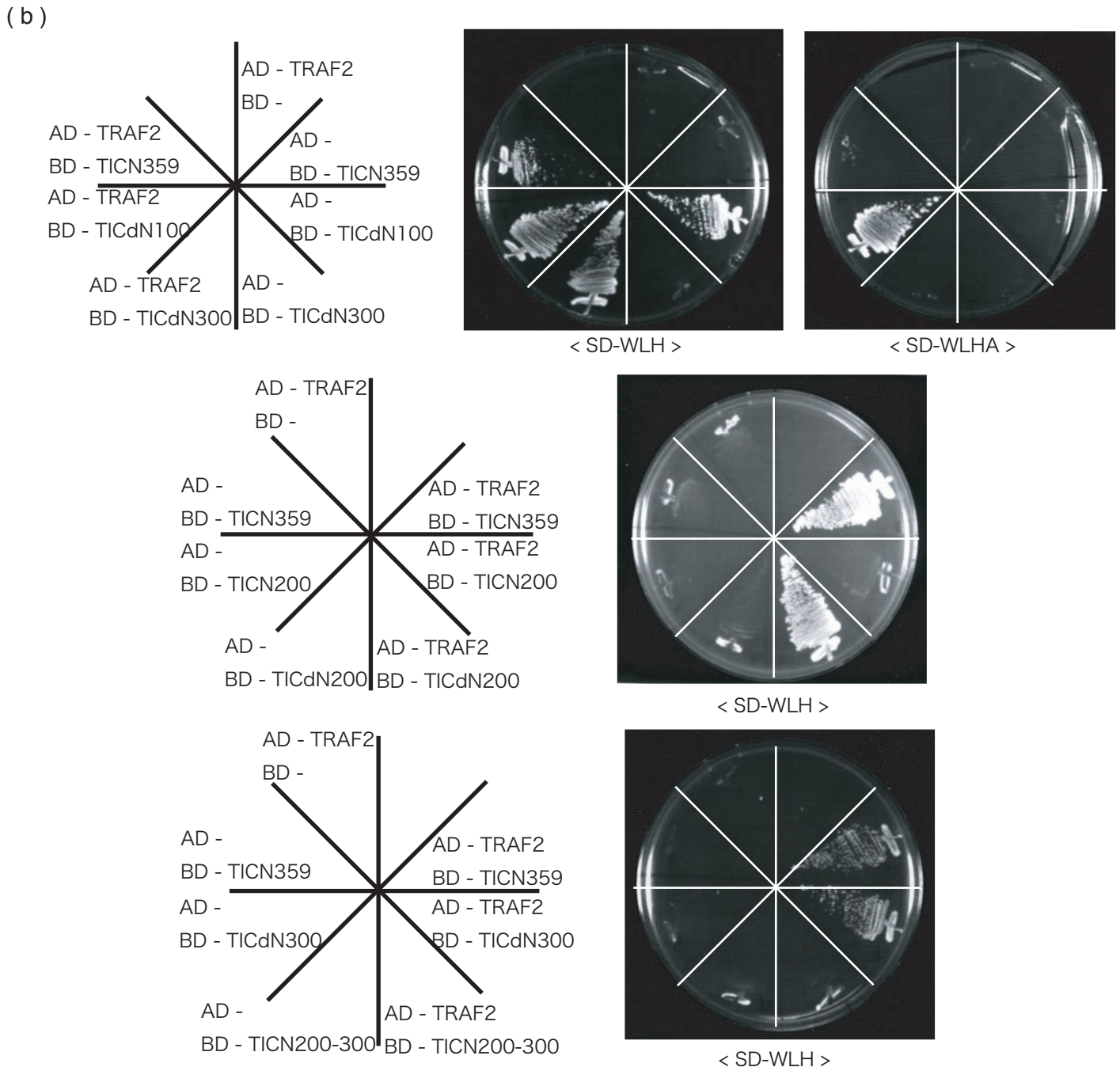
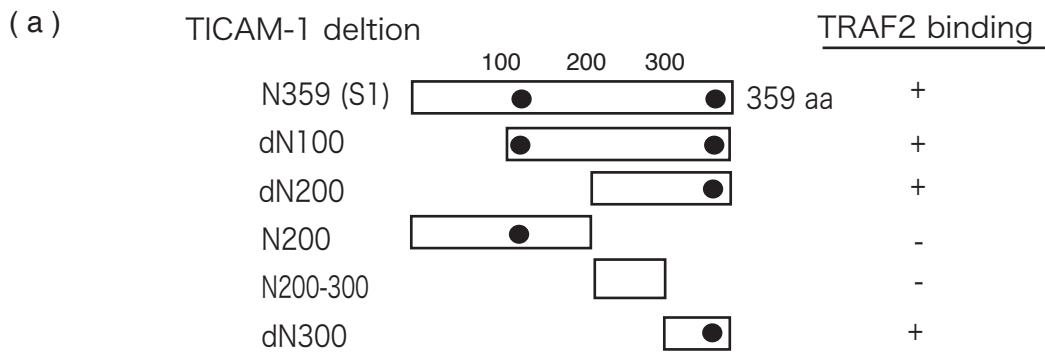


Fig. 5-4 TICAM-1 における TRAF2 結合サイトの同定

a) TICAM-1 N 末端領域欠損体の概略図 (黒丸は TRAF2 結合可能なサイトを示した)

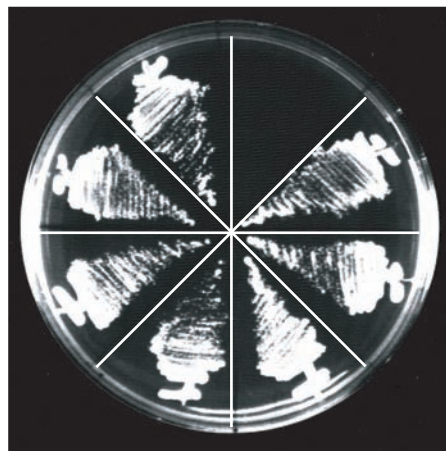
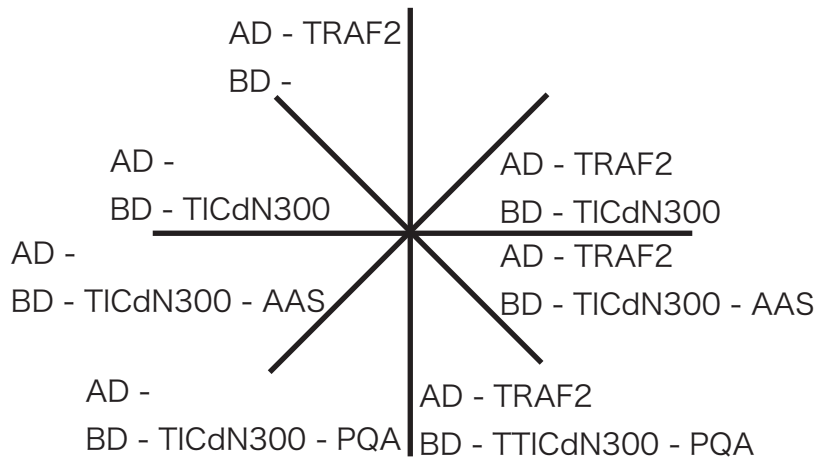
b) TRAF2 と TICAM-1 N 末端欠損体の結合

Yeast AH109 に各プラスミドを共発現させ、SD 培地から Trp, Leu を欠損させた培地で一度生育させてから、各選択培地で生育を確認した。

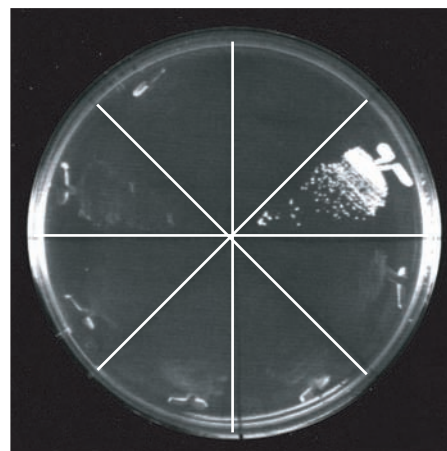
(c)

```
TICdN300 - WT      330                340
                   Q T P L Q L S V E D
                   x x P x Q x S x x x
TICdN300 - PQA    Q T P L Q L A V E D
TICdN300 - AAS    Q T A L A L S V E D
```

(d)



< SD-WL >



< SD-WLH >

Fig. 5-4 TICAM-1 における TRAF2 結合サイトの同定

c) TICAM-1 300 - 386 aa の TRAF2 結合 motif とその変異

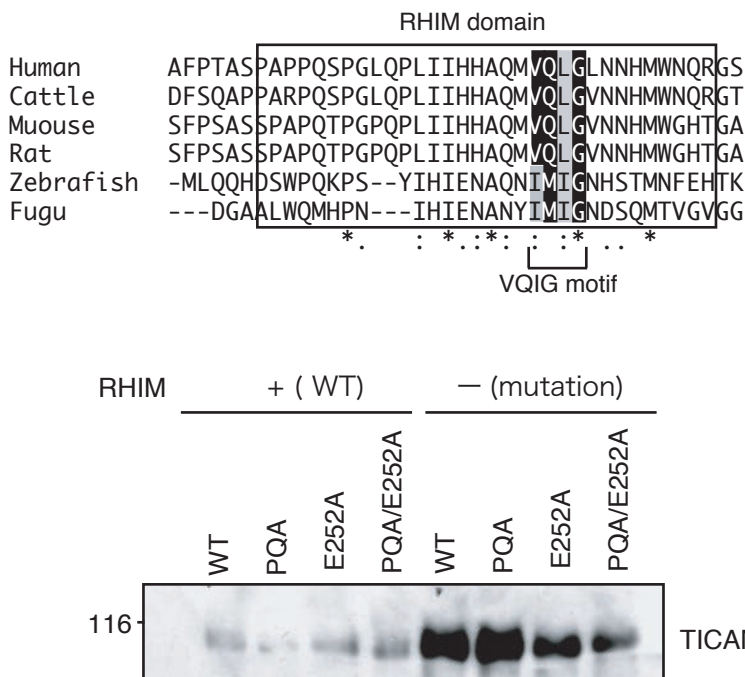
d) TICAM-1 変異体と TRAF2 との結合

Yeast AH109 に各プラスミドを強制発現させ、SD 培地から Trp, Leu を欠損させた培地で一度生育させてから、各選択培地下で生育を確認した。





(d)



(e)

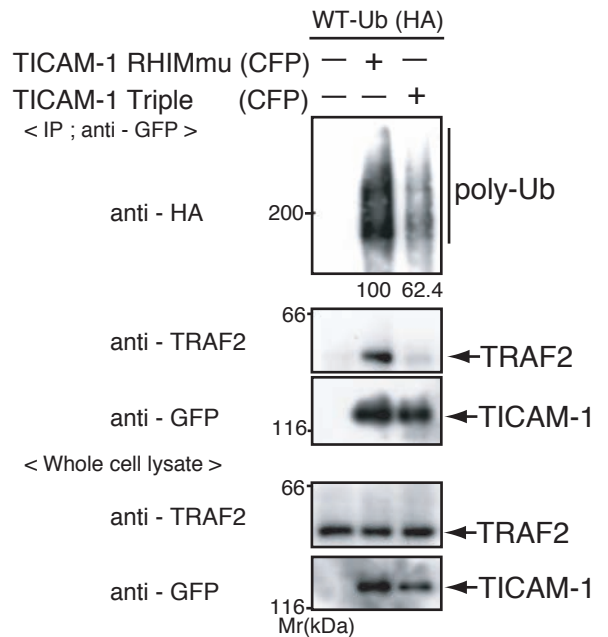


Fig. 5-5 TRAF 結合変異 TICAM-1 のユビキチン化

d) RIP 結合 domain である RHIM domain の概略 (Clustal W を用いて) と RHIM 変異による TICAM-1 蛋白量の変化

HEK293 細胞に各 TICAM-1 変異体 (200 ng) を強制発現し、発現後 24 時間の細胞を回収し、ウエスタンブロッティングを行った。

e) RHIM 変異 (VQLG→AAAA) 及び TRAF 結合変異 TICAM-1 のユビキチン化

293FT 細胞に記載のプラスミドを強制発現させ、24 時間後に細胞を溶解し、免疫沈降を行った。それぞれ上二段が免疫沈降を行ったもの、下二段が発現確認である。panel 左は検出に用いた一次抗体を示し、panel 右は分子量から予想されるタンパクについて矢印で示した。全ての実験は少なくとも独立した二回の実験を行っており、全ての実験回において同様の傾向が得られた。上記はそのうちの一回の実験結果を示した。ユビキチン化に関しては NIH image scan を用いて定量化し、各 TICAM-1 の whole cell lysate で相対化して RHIM 変異体のユビキチン化量を 100 とした時の Triple 変異体のユビキチン化量について示した。



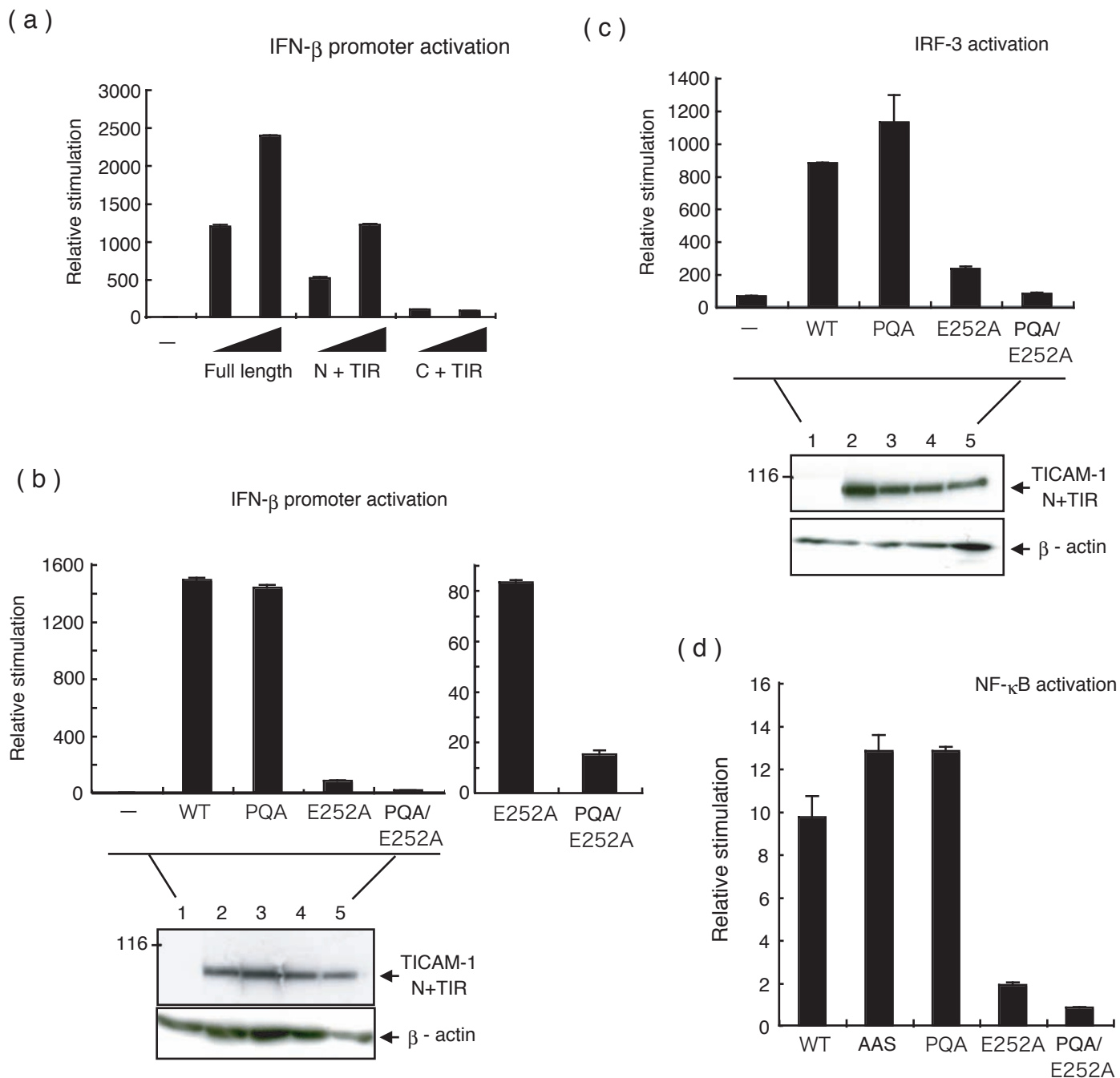


Fig. 5-6 TRAF 結合変異 TICAM-1 によるのシグナル伝達

a) TICAM-1 欠損体による IFN- $\beta$  promoter 活性化

b) TRAF 変異体による IFN- $\beta$  promoter 活性化

c) TRAF 変異体による IRF-3 の活性化      d) TRAF 結合変異体による NF- $\kappa$ B 活性化

HEK293 細胞に TICAM-1 欠損体 (a, 50 ng, 200 ng) または TICAM-1 N+TIR の TRAF 変異体 (b, c, 10 ng、d, 200 ng) を、IFN- $\beta$  promoter (a, b), IRF-3 reporter (c), NF- $\kappa$ B reporter (d) と共発現させ、発現後 24 時間の細胞を回収して解析を行った。横軸は添加したプラスミドを示し、縦軸は空ベクター (a, b, d) または GAL4-DBD に空ベクター (c) をそれぞれ強制発現させた際のルシフェラーゼ活性化を 1 とした際の、各条件でのルシフェラーゼ活性化量を相対的に示した。全ての結果は独立した二回の実験のうちの一回の結果であり、全ての実験で同様の傾向が見られた。

b, c) の下段は、ルシフェラーゼ活性を測定したサンプルの一部を取り、各コンストラクトの発現状況ウエスタンブロットティングで確認した。

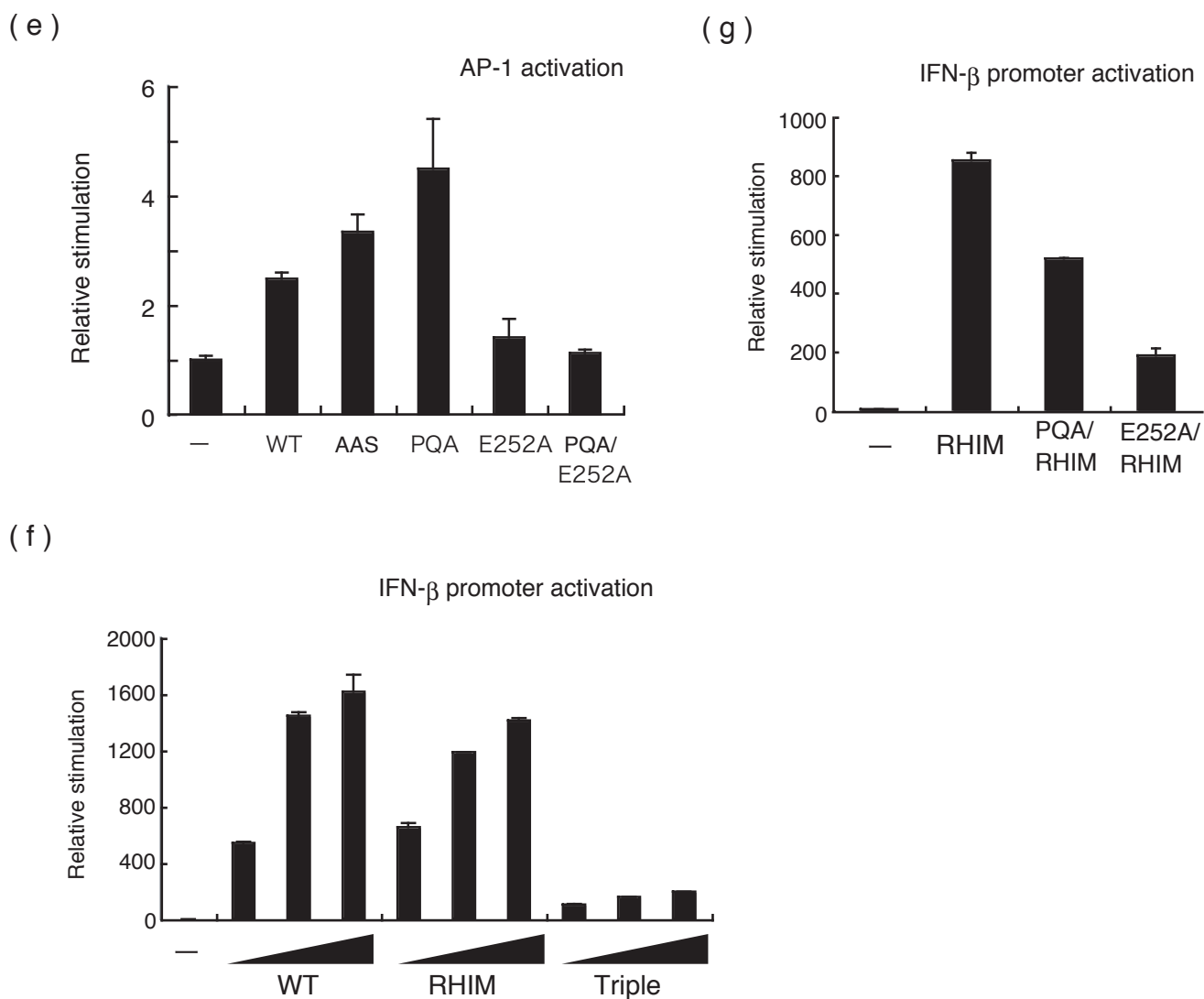


Fig. 5-6 TRAF 変異による TICAM-1 のシグナル伝達機構への影響

- e) TRAF 結合変異体による AP-1 活性化
- f) TICAM-1 全長での TRAF 変異による IFN- $\beta$  promoter の活性化
- g) RHIM 変異条件下での TRAF 変異による IFN- $\beta$  promoter 活性化

HEK293 細胞に各 TICAM-1 変異体 (e, 200 ng、f, 5 ng, 25 ng, 50 ng、g, 10 ng) を、AP-1 reporter (e) または IFN- $\beta$  promoter (f, g) と共発現させ、発現後 24 時間の細胞を回収して解析を行った。横軸は添加したプラスミドを示し、縦軸は空ベクターを強制発現させた際のルシフェラーゼ活性化を 1 とした際の、各条件でのルシフェラーゼ活性化量を相対的に示した。全ての結果は独立した二回の実験のうちの一回の結果であり、全ての実験で同様の傾向が見られた。

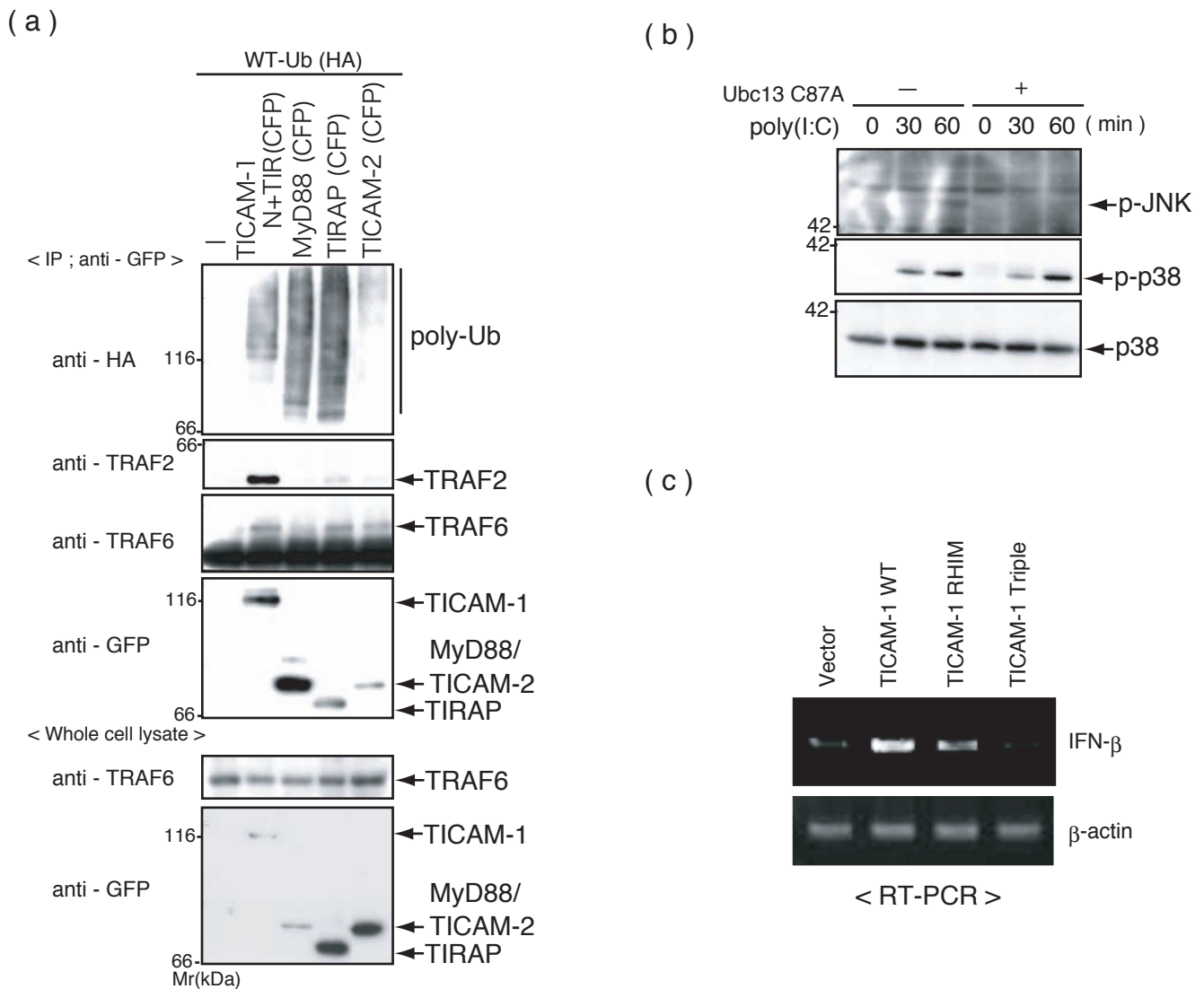


Fig. 5-7 TICAM-1 を介したシグナル伝達機構へのユビキチン化と TRAF 結合の寄与

- a) TLR のアダプター分子と TRAF2 との相互作用
- b) poly(I:C) 刺激による MAP キナーゼ活性化への Ubc13C87A の影響
- c) TICAM-1 変異体による IFN- $\beta$  mRNA 誘導

a) 293FT 細胞に記載のプラスミドを強制発現させ、24 時間後に細胞を溶解し、免疫沈降を行った。それぞれ上二段が免疫沈降を行ったもの、下二段が発現確認である。panel 左は検出に用いた一次抗体を示し、panel 右は分子量から予想されるタンパクについて矢印で示した。全ての実験は少なくとも独立した二回の実験を行っており、全ての実験回において同様の傾向が得られた。上記はそのうちの一回の実験結果を示した。

b) HeLa 細胞に Ubc13C87A または空ベクターを強制発現させ、24 時間後に細胞を溶解し、ウェスタンブロッティングを行った。panel 左は検出に用いた一次抗体を示し、panel 右は分子量から予想されるタンパクについて矢印で示した。

c) RAW264.7 細胞に上記プラスミドを等量ずつ強制発現させ、24 時間後に RNA を回収し、RT-PCR を行った。

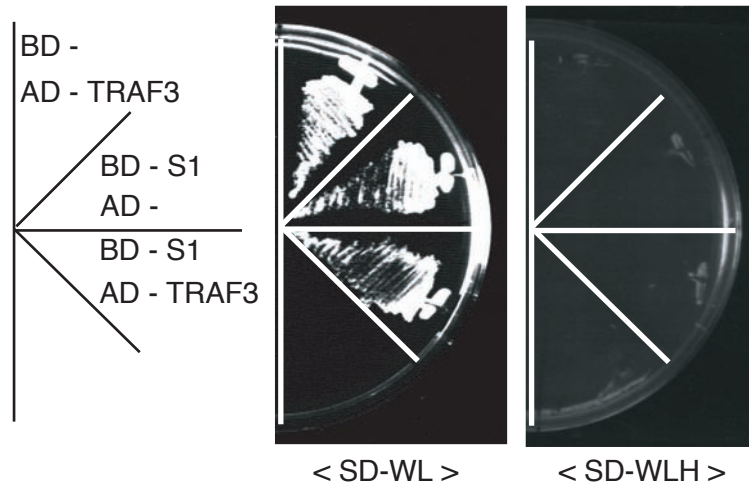


Fig. 5-8 TRAF3 と TICAM-1 の結合

TRAF3 と TICAM-1 N 末端領域 (S1) との結合を、Yeast two-hybrid 法を用いて解析した Yeast AH109 に各プラスミドを共発現させ、SD 培地から Trp, Leu を欠損させた培地で一度生育させてから、各選択培地下で生育を確認した

## < 文献 >

1. Chung, J. Y., Y. C. Park, H. Ye, and H. Wu. 2002. All TRAFs are not created equal: common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction. *J Cell Sci* 115:679-688.
2. Bradley, J. R., and J. S. Pober. 2001. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene* 20:6482-6491.
3. Chen, Z. J. 2005. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* 7:758-765.
4. Carpentier, I., and R. Beyaert. 1999. TRAF1 is a TNF inducible regulator of NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 460:246-250.
5. Zapata, J. M., and J. C. Reed. 2002. TRAF1: lord without a RING. *Sci STKE* 2002:PE27.
6. Akira, S. 2003. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 278:38105-38108.
7. Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, and T. Seya. 2003. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 4:161-167.
8. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640-643.
9. Sato, S., M. Sugiyama, M. Yamamoto, Y. Watanabe, T. Kawai, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 171:4304-4310.
10. Jiang, Z., T. W. Mak, G. Sen, and X. Li. 2004. Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3533-3538.
11. Gohda, J., T. Matsumura, and J. Inoue. 2004. Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. *J Immunol* 173:2913-2917.
12. Meylan, E., K. Burns, K. Hofmann, V. Blancheteau, F. Martinon, M. Kelliher, and J. Tschopp. 2004. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 5:503-507.

13. Sasai, M., H. Oshiumi, M. Matsumoto, N. Inoue, F. Fujita, M. Nakanishi, and T. Seya. 2005. Cutting Edge: NF-kappaB-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation. *J Immunol* 174:27-30.
14. Fotin-Mleczek, M., F. Henkler, A. Hausser, H. Glauner, D. Samel, A. Graness, P. Scheurich, D. Mauri, and H. Wajant. 2004. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 1 regulates CD40-induced TRAF2-mediated NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 279:677-685.
15. Deng, L., C. Wang, E. Spencer, L. Yang, A. Braun, J. You, C. Slaughter, C. Pickart, and Z. J. Chen. 2000. Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103:351-361.
16. Shi, C. S., and J. H. Kehrl. 2003. Tumor necrosis factor (TNF)-induced germinal center kinase-related (GCKR) and stress-activated protein kinase (SAPK) activation depends upon the E2/E3 complex Ubc13-Uev1A/TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2). *J Biol Chem* 278:15429-15434.
17. Hatakeyama, S., M. Yada, M. Matsumoto, N. Ishida, and K. I. Nakayama. 2001. U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem* 276:33111-33120.
18. Franken, M., O. Devergne, M. Rosenzweig, B. Annis, E. Kieff, and F. Wang. 1996. Comparative analysis identifies conserved tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 binding sites in the human and simian Epstein-Barr virus oncogene LMP1. *J Virol* 70:7819-7826.
19. Pullen, S. S., H. G. Miller, D. S. Everdeen, T. T. Dang, J. J. Crute, and M. R. Kehry. 1998. CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization. *Biochemistry* 37:11836-11845.
20. Boucher, L. M., L. E. Marengere, Y. Lu, S. Thukral, and T. W. Mak. 1997. Binding sites of cytoplasmic effectors TRAF1, 2, and 3 on CD30 and other members of the TNF receptor superfamily. *Biochem Biophys Res Commun* 233:592-600.
21. Lu, L. F., W. J. Cook, L. L. Lin, and R. J. Noelle. 2003. CD40 signaling through a newly identified tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2) binding site. *J Biol Chem* 278:45414-45418.
22. Ye, H., Y. C. Park, M. Kreishman, E. Kieff, and H. Wu. 1999. The structural basis for the recognition of diverse receptor sequences by TRAF2. *Mol Cell* 4:321-330.
23. Ahonen, C., E. Manning, L. D. Erickson, B. O'Connor, E. F. Lind, S. S. Pullen, M. R.

- Kehry, and R. J. Noelle. 2002. The CD40-TRAF6 axis controls affinity maturation and the generation of long-lived plasma cells. *Nat Immunol* 3:451-456.
24. Devergne, O., E. D. Cahir McFarland, G. Mosialos, K. M. Izumi, C. F. Ware, and E. Kieff. 1998. Role of the TRAF binding site and NF-kappaB activation in Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-induced cell gene expression. *J Virol* 72:7900-7908.
  25. Kaiser, W. J., and M. K. Offermann. 2005. Apoptosis Induced by the Toll-Like Receptor Adaptor TRIF Is Dependent on Its Receptor Interacting Protein Homotypic Interaction Motif. *J Immunol* 174:4942-4952.
  26. Han, K. J., X. Su, L. G. Xu, L. H. Bin, J. Zhang, and H. B. Shu. 2004. Mechanisms of the TRIF-induced interferon-stimulated response element and NF-kappaB activation and apoptosis pathways. *J Biol Chem* 279:15652-15661.
  27. Yamamoto, M., T. Okamoto, K. Takeda, S. Sato, H. Sanjo, S. Uematsu, T. Saitoh, N. Yamamoto, H. Sakurai, K. J. Ishii, S. Yamaoka, T. Kawai, Y. Matsuura, O. Takeuchi, and S. Akira. 2006. Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling. *Nat Immunol* 7:962-970.
  28. Oganessian, G., S. K. Saha, B. Guo, J. Q. He, A. Shahangian, B. Zarnegar, A. Perry, and G. Cheng. 2006. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 439:208-211.
  29. Su, X., S. Li, M. Meng, W. Qian, W. Xie, D. Chen, Z. Zhai, and H. B. Shu. 2006. TNF receptor-associated factor-1 (TRAF1) negatively regulates Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF)-mediated signaling. *Eur J Immunol* 36:199-206.
  30. Takeshita, F., K. J. Ishii, K. Kobiyama, Y. Kojima, C. Coban, S. Sasaki, N. Ishii, D. M. Klinman, K. Okuda, S. Akira, and K. Suzuki. 2005. TRAF4 acts as a silencer in TLR-mediated signaling through the association with TRAF6 and TRIF. *Eur J Immunol* 35:2477-2485.
  31. Takeuchi, M., M. Rothe, and D. V. Goeddel. 1996. Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor-kappaB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins. *J Biol Chem* 271:19935-19942.
  32. Mansell, A., R. Smith, S. L. Doyle, P. Gray, J. E. Fenner, P. J. Crack, S. E. Nicholson, D. J. Hilton, L. A. O'Neill, and P. J. Hertzog. 2006. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nat Immunol* 7:148-155.
  33. Kobayashi, T., G. Takaesu, and A. Yoshimura. 2006. Mal-function of TLRs by SOCS. *Nat Immunol* 7:123-124.

34. Naiki, Y., K. S. Michelsen, W. Zhang, S. Chen, T. M. Doherty, and M. Arditì. 2005. Transforming growth factor-beta differentially inhibits MyD88-dependent, but not TRAM- and TRIF-dependent, lipopolysaccharide-induced TLR4 signaling. *J Biol Chem* 280:5491-5495.
35. Kawai, T., S. Sato, K. J. Ishii, C. Coban, H. Hemmi, M. Yamamoto, K. Terai, M. Matsuda, J. Inoue, S. Uematsu, O. Takeuchi, and S. Akira. 2004. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* 5:1061-1068.



## 第六章 TICAM-1 活性化機構の解明とリン酸化の意義

これまでの章では、TICAM-1 を介した IFN- $\beta$  産生の分子機構について解析を行い、TICAM-1 を介した IFN- $\beta$  産生には NAP1 が関与している事を第二章で示し、第五章では NAP1 と TICAM-1 との間に TRAF2/TRAF6 が関与している可能性を示した。この章では TICAM-1 そのものに焦点を当てた TICAM-1 からのシグナル伝達について、得られた知見を報告する。

これまでの章でも述べてきたが、TICAM-1 は TLR3 および TLR4 のシグナル伝達機構に特異的に関与している事が報告されているアダプター分子であり、活性化すると IFN- $\beta$  産生を強く誘導する(1-3)。IFN- $\beta$  promoter の活性化には、AP-1 (ATF2/c-Jun)、NF- $\kappa$ B、IRF-3 の三種の転写因子の活性化が必要であるが、中でも IFN- $\beta$  promoter 特異的で重要なのが IRF-3 の活性化である(4, 5)。TICAM-1 を介した IRF-3 の活性化には NAP1 が重要な役割を果たしている事を第二章で報告し、TICAM-1 と直接結合する TRAF2 及び TRAF6 が TICAM-1 からの IRF-3 の活性化に関与している可能性を第五章で示した(6, 7)。しかし、TICAM-1 がどのように上流からのシグナルを受けて活性化し、その活性化を IRF-3 へと伝達しているかについては未解決なままであった。IRF-3 をリン酸化し活性化するキナーゼとして、セリン・スレオニンキナーゼである TBK1 と IKK $\epsilon$  が報告された(8, 9)。TBK1 と IKK $\epsilon$  は IRF-3 のみならず、TLR7 および TLR9 を介した Type-I IFN 産生に重要な IRF-7 のリン酸化とそれに伴う活性化にも関与しており、TBK1 と IKK $\epsilon$  は type-I IFN 産生に非常に重要なキナーゼである。最近、TBK1 と TICAM-1 を強制発現すると、TICAM-1 がリン酸化される事が報告された(6)。しかし、TICAM-1 が TBK1 によりリン酸化される事が TICAM-1 を介したシグナル伝達機構に重要であるかについては未解明のままである。

また、TICAM-1 は TLR3 の TIR domain に結合するが、TICAM-1 の TIR domain にある BOX II のプロリンをヒスチジンに置換すると、TLR3 を介した IFN- $\beta$  promoter の活性化が抑制される結果が得られていたが(1)、この TICAM-1 変異体が、どのように作用して TLR3 を介した IFN- $\beta$  promoter の活性化を抑制しているかは不明であった。

本研究では、TBK1 による TICAM-1 のリン酸化が TICAM-1 の TIR domain

付近で起こっている事と、TIR domain に保存されている 434 番目のプロリンを介して TICAM-1 同士の複合体を形成する事により IFN- $\beta$  promoter を活性化している事について、得られた知見を報告する。

## < 結果 >

### 6-1 TBK1 および IKK $\epsilon$ による TICAM-1 のリン酸化

TICAM-1 の下流で IRF-3 を活性化するキナーゼとして TBK1 と IKK $\epsilon$ が存在する事が報告された(8, 9)。TBK1 および IKK $\epsilon$ が TICAM-1 もリン酸化するかを調べる為、HEK293 細胞に TBK1, IKK $\epsilon$ および TICAM-1 をそれぞれ強制発現して免疫沈降を行った。その結果、TICAM-1 は TBK1 と共発現した際にはリン酸化されていると見られる高分子量へのバンドのシフトが確認されたのに対し、IKK $\epsilon$ と共発現した場合には TICAM-1 の高分子量への移行は確認できなかった (Fig. 6-1 a)。その頃、TICAM-1 が TBK1 によりリン酸化されているという報告がなされ(6)、TBK1 と共発現する事による TICAM-1 の高分子量への移行は TICAM-1 のリン酸化である事が証明された。しかし、TICAM-1 のリン酸化の意義については未解明のままであった。

TBK1 による TICAM-1 のリン酸化の意義について解明するためには、TICAM-1 のリン酸化サイトの同定が必須である。TICAM-1 を N+TIR と C+TIR の二断片に分け、TBK1 によるリン酸化領域の同定を試みた (Fig. 6-1 b)。293 細胞に TICAM-1 の全長 (Full)と TICAM-1 欠損体 (N+TIR 及び C+TIR) のそれぞれを TBK1 と共発現させ、各 TICAM-1 のリン酸化について検討した結果、TICAM-1 N+TIR ではリン酸化が検出されたが、TICAM-1 C+TIR ではリン酸化は検出されなかった (Fig. 6-1 c)。これらの結果から、TICAM-1 は TBK1 特異的に N 末端領域がリン酸化される事が想定された。

### 6-2 TICAM-1 リン酸化と IFN- $\beta$ promoter 活性化との相関

TBK1 は TICAM-1 のみならず IRF-3 や IRF-7 をリン酸化する事により、これらの転写因子を活性化して核への移行を可能にし、IFN- $\beta$ の転写を誘導する(5)。TICAM-1 も TBK1 によりリン酸化されるという事は、TICAM-1 のリン酸化が TICAM-1 による IFN- $\beta$ 転写誘導に関与している可能性もある。TICAM-1 のリン酸化領域が N 末端領域である事が考えられたので、N 末端領域を欠損させた TICAM-1 欠損体 ( $\Delta$ N50、 $\Delta$ N100、 $\Delta$ N150、 $\Delta$ N230) を作製し (Fig. 6-

2 a)、これら N 末欠損 TICAM-1 の IFN- $\beta$  promoter 活性化能と TBK1 によるリン酸化について検討した。その結果、TICAM-1  $\Delta$ N150 までの欠損体では IFN- $\beta$  promoter の活性化は野生型と同等であったが、TICAM-1  $\Delta$ N230 においてその活性化は顕著に減少し、また TBK1 によるリン酸化も検出できなくなった (Fig. 6-2 b)。これらの結果から、TICAM-1 の 150 から 230 アミノ酸の領域で、TICAM-1 は TBK1 によりリン酸化され、TBK1 による TICAM-1 のリン酸化は TICAM-1 による IFN- $\beta$  promoter 活性化に重要である可能性が想定された。

### **6-3. TICAM-1 同士の結合による TICAM-1 のリン酸化**

TBK1 は TICAM-1 との直接の結合は現在の所確認されていない事と、TICAM-1 の N 末端領域に結合する TRAF6 が多量に存在すると TICAM-1 と TBK1 との相互作用が阻害されるという報告を考え合わせると(6)、TBK1 が TRAF6 以外の TICAM-1 N 末端領域に結合する分子を介して、TICAM-1 と相互作用している事が考えられる。つまり TICAM-1  $\Delta$ N230 によるリン酸化と IFN- $\beta$  promoter 活性化能の消失は、TBK1 の相互作用に関わる分子が結合出来なくなっている事に起因しており、TBK1 の相互作用部位と TICAM-1 のリン酸化部位は異なる領域である可能性も考えられる (Fig. 6-3 a left)。TLR family と TLR family に結合する 5 種類のアダプター分子は、全て細胞内領域に TIR domain を持っている事が特徴であり、これらの分子は TIR domain 同士を介した結合を示す事が報告されている(10, 11)。TICAM-1 も TIR domain を介して TICAM-1 が関与しているシグナル伝達経路の TLR3 と TICAM-2 に結合し、また TICAM-1 同士が結合する事も報告されている(1, 2)。そこで、TICAM-1 同士が結合する事を利用し、欠損体とは異なるタグを付加した TICAM-1 の全長を欠損体と共発現した際の欠損体のリン酸化について検討を行った。TBK1 との相互作用が出来ない故にリン酸化されていないのであれば、TBK1 と結合が可能な TICAM-1 と多量体を形成した欠損体は TBK1 によるリン酸化が検出されると予想した (Fig. 6-3 a right)。この仮説に基づいて解析を行った結果、以前はリン酸化が検出されなかった TICAM-1  $\Delta$ N230 でも TICAM-1 のリン酸化が検出され、TIR domain のみの TICAM-1 でもリン酸化が検出された (Fig. 6-3 b)。これらの結果から、TICAM-1 は、N 末端領域ではなく、TIR domain 付近が TBK1

によりリン酸化されている事、また TBK1 は TICAM-1 の 150 から 230 のアミノ酸領域で相互作用している事が示唆された。しかし TICAM-1 リン酸化と IFN- $\beta$  promoter 活性化との相関については、不明のままであった。

#### **6-4. TICAM-1 同士の結合部位の同定**

TICAM-1 は TIR domain を介してホモ二量体を形成しうる事が報告されているが(1)、TICAM-1 が多量体を形成する事の重要性に関しては未知である。TICAM-1 をリン酸化する TBK1 は自己リン酸化能を有している事から、TICAM-1 が多量体を形成する事により、TICAM-1 に結合した TBK1 が相互に活性化し合っ、IRF-3 のリン酸化を誘導している可能性がある。TICAM-1 の多量体形成の機能的意義を探る目的で、まず TICAM-1 同士の結合部位の同定を行った。TICAM-1 同士の結合部位として TIR domain 同士の結合が想定されるが、その他の領域でも二量体を形成する可能性がある。TICAM-1 を二断片に分け、Yeast two-hybrid 法を用いて解析を行った。その結果、TICAM-1 の N 末端同士の結合は検出されなかったが、TIR domain を含む C 末端領域では、予想通り結合が確認された (Fig. 6-4 a)。結合の確認された C 末端領域をさらに TIR domain と C 末端領域とに分け同様の解析を行った結果、TIR domain 同士のみならず、C 末端領域同士も結合が確認された (Fig. 6-4 b)。これらの結果から、TICAM-1 は TIR domain と C 末端領域のそれぞれに TICAM-1 同士の結合に関与する部位が存在する事が示唆された。

#### **6-5. TIR domain を介した TICAM-1 同士の結合部位の同定**

TLR family およびそのアダプター分子が共通で有している TIR domain は内部に高度に保存されている BOX I, BOX II, BOX III が存在している事が特徴であり、中でも BOX II のプロリンは TLR を介したシグナル伝達経路に非常に重要なアミノ酸である事が知られている(12, 13) (第一章参照)。TICAM-1 の TIR domain にも BOX II が存在し(1)、BOX II に含まれる 434 番目のプロリンは下等生物まで高度に保存されていた (Fig. 6-5 a)。TICAM-1 TIR 体 (387 – 566 aa)

の 434 番目のプロリンをヒスチジンに置換した TICAM-1 TIR P434H は、TLR3 を介した IFN- $\beta$  promoter の活性化に対し、ドミナントネガティブ体として作用する事が報告されていたが(1)、どのように作用してドミナントネガティブ体となっているかについては未解明であった。TICAM-1 TIR P434H の作用機序を明らかにするため、TICAM-1 の TIR domain に結合する事が報告されている TICAM-1, TICAM-2, TLR3 の TIR domain と TICAM-1 TIR P434H との結合を Yeast two-hybrid 法を用いて解析した。その結果、TICAM-1 TIR P434H は TICAM-1 TIR domain 同士の結合のみ、検出されなくなった (Fig. 6-5 b)。この結果から、TICAM-1 TIR P434H は TLR3 の TIR domain に結合し、内在性 TICAM-1 の TLR3 との結合を阻害する事により TLR3 を介したシグナル伝達機構に対してドミナントネガティブ体として機能している事が示唆された。

#### **6-6. C 末端領域を介した TICAM-1 同士の結合部位**

TICAM-1 同士は TIR domain のみならず、C 末端領域でも結合する事から、C 末端領域にも TICAM-1 同士の結合に関与するドメインが存在する事が示唆された。TICAM-1 の C 末端領域には、RIP1 の結合ドメインである RHIM domain が存在し、RIP1 と RHIM domain 同士で結合して NF- $\kappa$ B を活性化する事が報告されている(第五章参照) (14, 15)。RHIM domain が、TICAM-1 の C 末端領域同士を介した結合に関与しているかを明らかにするため、TICAM-1 の RHIM domain を変異させて C 末端領域同士の結合を Yeast two-hybrid 法を用いて解析した。その結果、RHIM domain に変異を加えても、C 末端領域同士の結合に影響は見られなかった (Fig. 6-6)。この結果から、TICAM-1 の C 末端同士の結合は、RHIM domain ではない領域を介している事が示唆された。

## < 考察 >

本章では TICAM-1 の活性化機構の解明を目指し、TICAM-1 のリン酸化と二量体形成について解析を行った。TICAM-1 は、IKK $\epsilon$ は関係なく、TBK1 特異的にリン酸化される事が本研究を含む複数の研究により明らかにされた (Fig. 6-1) (6)。TBK1 と IKK $\epsilon$ は共に IRF-3 及び IRF-7 をリン酸化して活性化するキナーゼであるが、TBK1 は恒常的に発現しているにも関わらず IKK $\epsilon$ は Type-I IFN によって発現が誘導される遺伝子である事(16)、骨髄細胞由来マクロファージでは TBK1 と IKK $\epsilon$ の両遺伝子の発現が確認されるのに対してマウス胎児由来繊維芽細胞では TBK1 しか確認されない事など(17)、分子的に異なる性質を示す可能性が示されている。TBK1 および IKK $\epsilon$ それぞれのノックアウトマウスを用いた解析の結果、TLR4 のリガンドである LPS 刺激による IFN- $\beta$ 産生は IKK $\epsilon$ ではなく TBK1 依存性である事が報告されているが(18)、その一方でウイルス感染による Type-I IFN の産生は TBK1 と IKK $\epsilon$ が相補的に作用して誘導している事が TBK1 および IKK $\epsilon$ のダブルノックアウトマウスを用いた解析から明らかとなった(19)。これらの報告から TBK1 単独依存性を示した Type-I IFN 産生経路は TICAM-1 経路のみである事が伺える。内在性 TICAM-1 は LPS 刺激依存的にリン酸化される事も報告されている事からも(6)、TBK1 によってのみ起こる TICAM-1 のリン酸化は、TICAM-1 によるシグナル伝達経路に深い関わりがある事を想定させる。

TICAM-1 が TBK1 によってリン酸化される事は明確となったが、そのリン酸化の意義については依然不明である。TBK1 は IRF-3 をリン酸化するキナーゼでもあるため、TBK1 のキナーゼ変異体を用いると IRF-3 のリン酸化及びリン酸化に伴う IFN- $\beta$ 産生も全く見られなくなってしまい(8)、TICAM-1 がリン酸化されない事による IFN- $\beta$ 産生への影響は判断できない。TICAM-1 リン酸化の IFN- $\beta$ 産生への寄与を明確にするためには、TICAM-1 リン酸化サイトを同定する事が必須である。TICAM-1 を断片化し TBK1 によるリン酸化について解析を行った所、N 末端から 230 アミノ酸を欠損させた TICAM-1  $\Delta$ N230 において、TICAM-1 のリン酸化が検出されなくなり、IFN- $\beta$  promoter の活性化も顕著に減少した。この結果から TICAM-1 の 150 から 230 アミノ酸の領域に TICAM-1 のリン酸化サイトがあり、リン酸が TICAM-1 による IFN- $\beta$  promoter の活性化に必須ではないかと考えた (Fig. 6-2)。しかし TICAM-1  $\Delta$ N230 が TBK1 と相互

作用を示す事ができない故に IFN- $\beta$  promoter の活性化と TICAM-1 のリン酸化が起こっていない可能性があった。そこで TBK1 の結合を TICAM-1 の全長で補いリン酸化について検討した結果、TICAM-1 のリン酸化部位は TIR domain 付近である事が示唆された (Fig. 6-3)。この結果は、TBK1 は TICAM-1 の 150 から 230 アミノ酸の領域を介して TICAM-1 と相互作用している事を暗示しており、この 150 から 230 アミノ酸の領域は下等生物まで高度に保存されている事からも、TICAM-1 の機能に非常に重要な分子の結合が予想される。TBK1 との相互作用が TICAM-1 の 150 から 230 アミノ酸の領域である事を免疫沈降により立証する必要がある。

TBK1 による TICAM-1 のリン酸化が、TICAM-1 の TIR domain 付近である事が予想されたため、データベース検索を用いてリン酸化部位を検討した。その結果、384 から 389 アミノ酸の領域に、非常に高度にリン酸化されうると予想されるセリン残基が存在した (Fig. 6-7 a)。TICAM-1 と同じく TBK1 によりリン酸化される事が報告されている IRF-3 および IRF-7 は、既にリン酸化サイトが同定されており、中でも IRF-3 はより詳細なリン酸化機構について解析がなされている(20, 21)。IRF-3 の C 末端領域には 7 個のセリン・スレオニンリン酸化サイトが存在するが、中でも 385 番目と 386 番目のセリン残基のリン酸化が、IRF-3 を活性化し IFN- $\beta$  産生に重要である事が報告されている(20)。IRF-3 および IRF-7 についても、同じデータベースを用いて解析を行った。その結果、IFN- $\beta$  産生に重要なリン酸化部位として報告されているセリン残基のみが高度にリン酸化される予想残基として示された (Fig. 6-7 b)。IRF-3 及び IRF-7 の TBK1 によるリン酸化サイトと予想された TICAM-1 のリン酸化サイトの配列を比較すると、三種の分子全て SSLD/E の配列を持っていた (Fig. 6-7 a, b)。この解析から TICAM-1 の TBK1 によるリン酸化サイトは 384 番目と 385 番目のセリン残基である可能性が想定された。これらのセリン残基をアラニンに置換して TBK1 によるリン酸化の有無を解析すると共に、TICAM-1 を介したシグナル伝達経路への影響についても解析を行う必要が有る。このサイトが TBK1 によるリン酸化サイトであれば、TICAM-1 リン酸化の意義について全容が説明されるだろう。TICAM-1 リン酸化の意義に関しては、三つの可能性が考えられる。第一は、リン酸化による構造変化が下流分子との結合を可能とし、IFN- $\beta$  産生を誘導する事である。第二は、リン酸化により TICAM-1 の分解に関与する分子の結合が促進され、IFN- $\beta$  産生が収束する事である。第三は、リン酸化



された TICAM-1 と特異的に結合する分子が存在し、下流分子との結合を阻害して TICAM-1 からのシグナルを抑制する事である。TICAM-1 と TBK1 を共発現させると、TICAM-1 のリン酸化は検出されるがそのタンパク量に関しては、TICAM-1 単独と大差は見られなかった事から (Fig. 6-1)、第二の可能性は低いと思われる。ごく最近、TBK1 のキナーゼドメイン付近に直接結合して TBK1 と TICAM-1 の相互作用を阻害する事により TICAM-1 からのシグナルを抑制する分子として SHP-2 が報告された(22)。リン酸化された TICAM-1 と特異的に結合し、TICAM-1 と下流分子との相互作用を阻害する分子が存在するかもしれない。

TICAM-1 の TIR domain 同士は 434 番目のプロリン (P434) が重要な役割を果たしている事が本研究により明らかとなり、TLR3 を介した IFN- $\beta$  promoter の活性化に対してドミナントネガティブ体として機能していた TICAM-1 TIR P434H は(1)、TLR3 の細胞内領域に結合できるが内在性 TICAM-1 とは結合できないために TLR3 からのシグナルが内在性 TICAM-1 へと伝えられず、ドミナントネガティブ体として機能している事が示唆された (Fig. 6-5)。TICAM-1 TIR domain のみのコンストラクトは、その TIR domain を介して内在性 TICAM-1 と TLR3 とを繋ぐ事ができたため TLR3 を介した IFN- $\beta$  promoter の活性化に対してドミナントネガティブ体としては機能しなかった事を考えると(1)、TICAM-1 多量体形成が IFN- $\beta$  promoter の活性化に重要である事が想定される。TICAM-1 の多量体形成が IFN- $\beta$  promoter の活性化にどのように重要であるかについて、今後の解析の焦点となるであろう。

TICAM-1 リン酸化と多量体形成の意義については未解明な部分が多いが、本研究により、その解明の足がかりとなるような結果が得られている。これらの結果を基に、今後の研究が期待される。

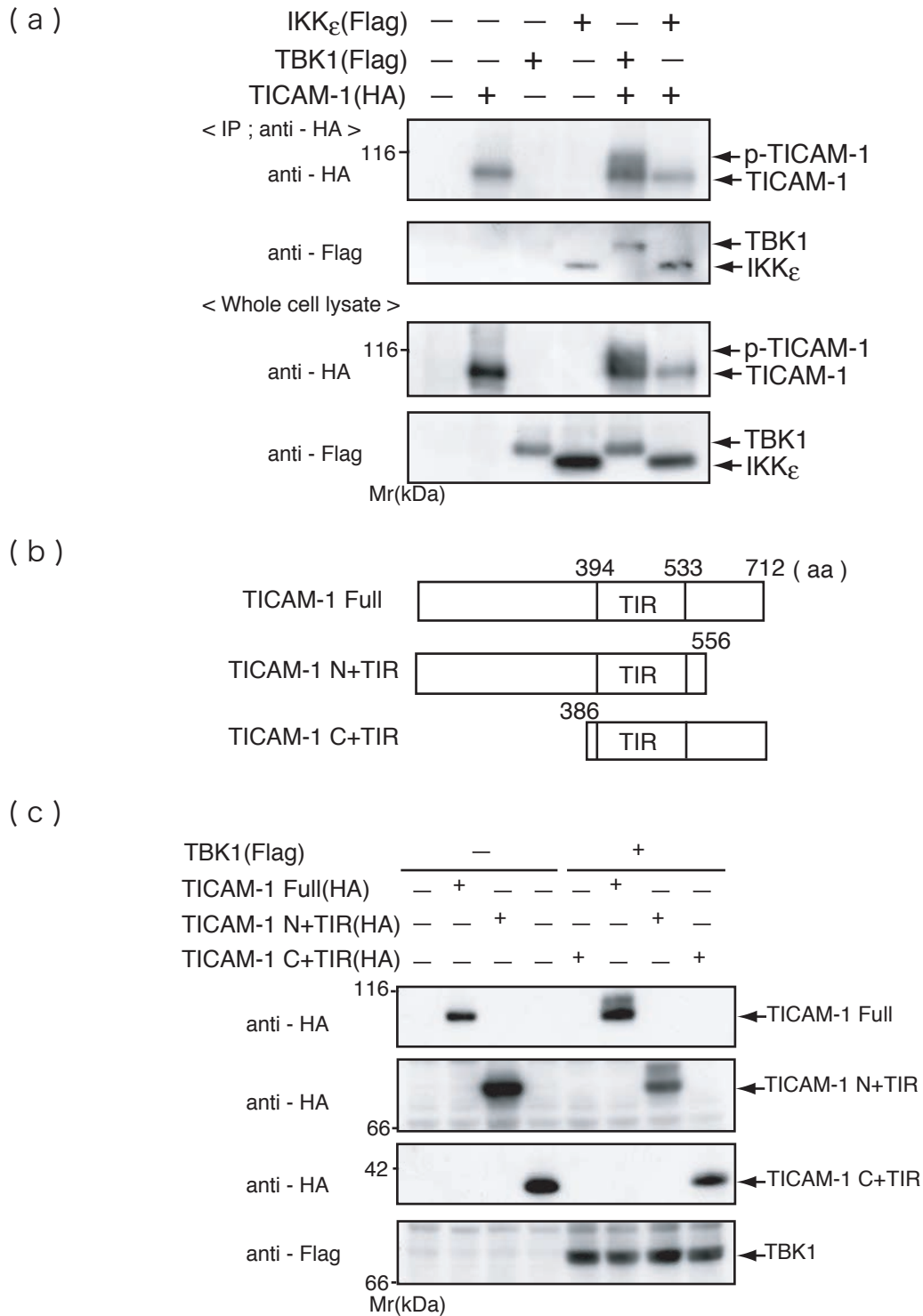


Fig. 6-1 TBK1 による TICAM-1 のリン酸化

- a) TBK1 による TICAM-1 のリン酸化  
 b) TICAM-1 欠損体の模式図  
 c) TICAM-1 欠損体の TBK1 によるリン酸化

HEK293 細胞に TICAM-1 (C-terminal HA tag) と TBK1(a, c) および IKK $\epsilon$ (a) (N-terminal Flag tag) を共発現させ、24 時間後に細胞を回収し、免疫沈降 (a) 及びウエスタンブロッティング (c) を行った。(a) は上部二段が免疫沈降を行ったもの、下部二段が発現確認である。panel の左には免疫沈降及び検出に用いた一次抗体を示し、右にはバンドの予想される分子について矢印で示した。

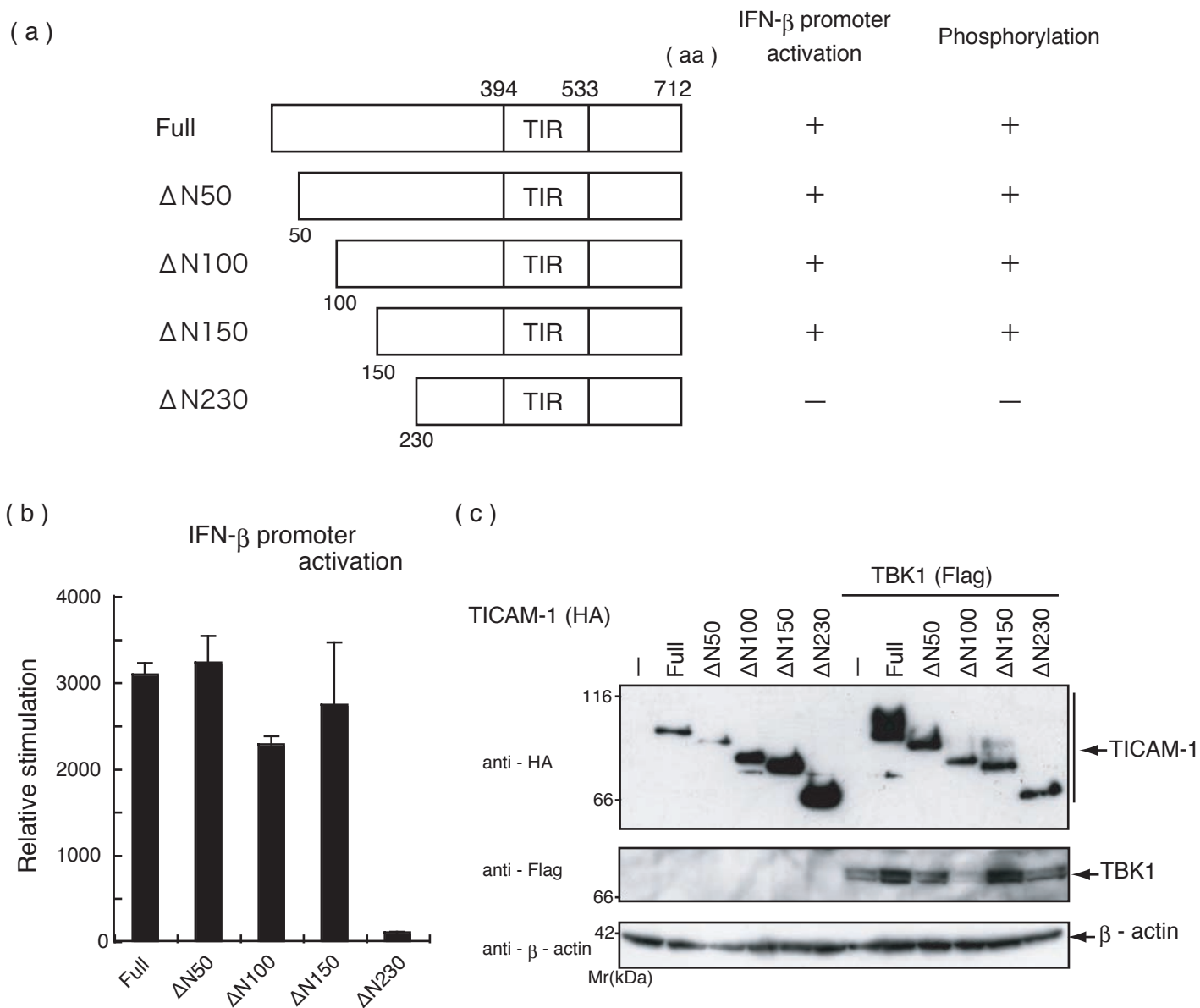


Fig. 6-2 TICAM-1 による IFN- $\beta$  promoter 活性化と TICAM-1 リン酸化領域との相関

- a) TICAM-1N 末欠損体の模式図  
 b) TICAM-1N 末欠損体による IFN- $\beta$  promoter 活性化  
 c) TICAM-1N 末欠損体のリン酸化

b) HEK293 細胞に各 TICAM-1 N 末欠損体 (100 ng) を、IFN- $\beta$  promoter と共発現させ、発現後 24 時間の細胞を回収して解析を行った。横軸は添加したプラスミドを示し、縦軸は空ベクターを強制発現させた際のルシフェラーゼ活性化を 1 とした際の、各条件でのルシフェラーゼ活性化量を相対的に示した。結果は独立した二回の実験のうちの一回の結果であり、全ての実験で同様の傾向が見られた。

c) 293FT 細胞に各 TICAM-1N 末欠損体 (C-terminal HA タグ) を TBK1(C-terminal Flag タグ) と共発現させ、24 時間後に細胞を溶解し、ウエスタンブロッティングを行った。panel 左は検出に用いた一次抗体を示し、panel 右は分子量から予想される分子について矢印で示した。また、TICAM-1 発現時に、アポトーシス阻害剤である Z-VAD FMK (20  $\mu$ M) を添加した。

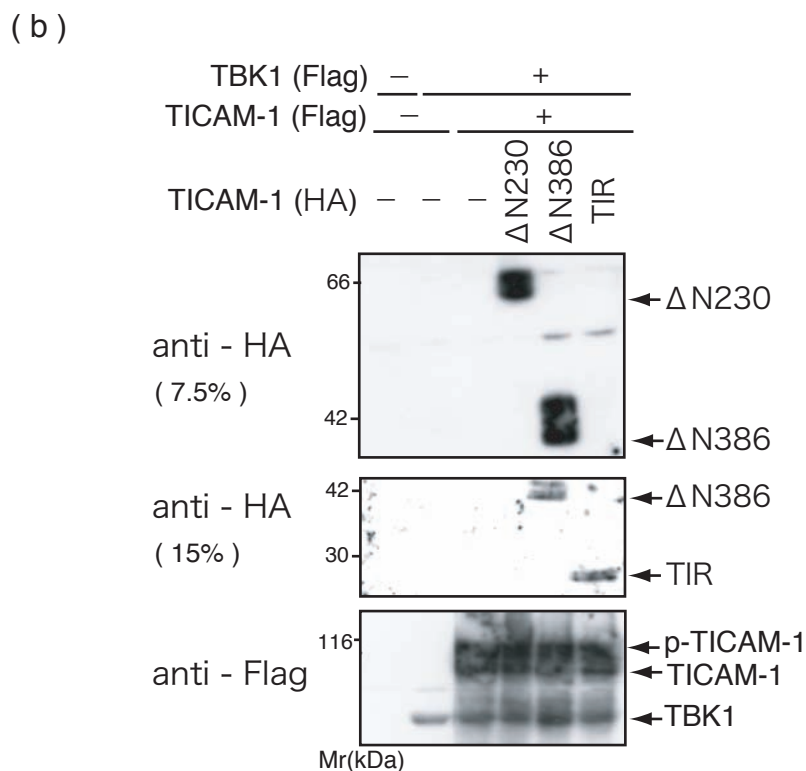
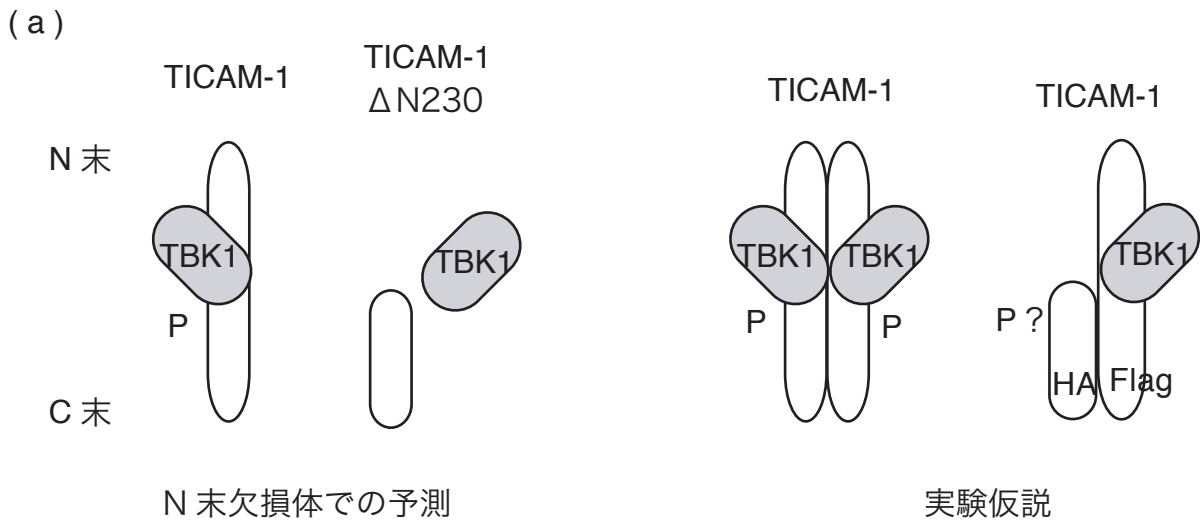


Fig. 6-3 TICAM-1 多量体形成による TICAM-1 リン酸化

- a) TBK1 による TICAM-1 リン酸化の予測図  
 b) TICAM-1 全長補足時における TICAM-1 N 末欠損体のリン酸化

b) 293FT 細胞に各 TICAM-1 N 末欠損体 (ΔN230, ΔN386, TIR(387-566 aa). C-terminal HA タグ) を TICAM-1 Full (C-terminal Flag タグ) と TBK1 (C-terminal Flag タグ) と共発現させ、24 時間後に細胞を溶解し、ウエスタンブロッティングを行った。panel 左は検出に用いた一次抗体と SDS-PAGE のゲル濃度を示し、panel 右は分子量から予想されるタンパクについて矢印で示した。また、TICAM-1 発現時に、アポトーシス阻害剤である Z-VAD FMK (20 μM) を添加した。

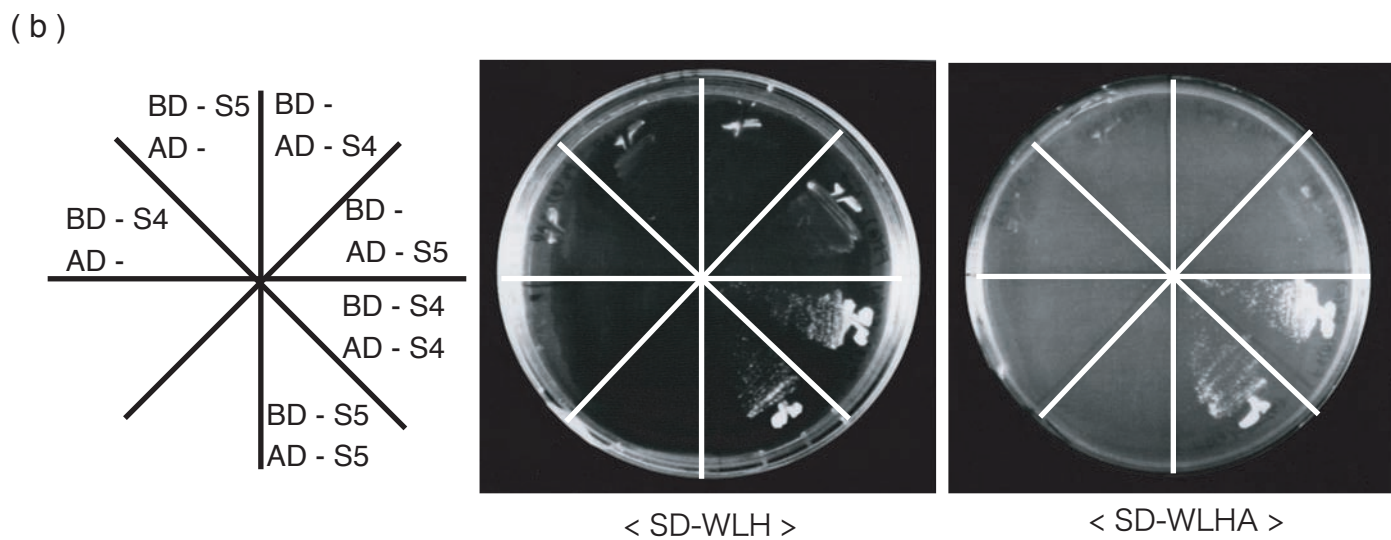
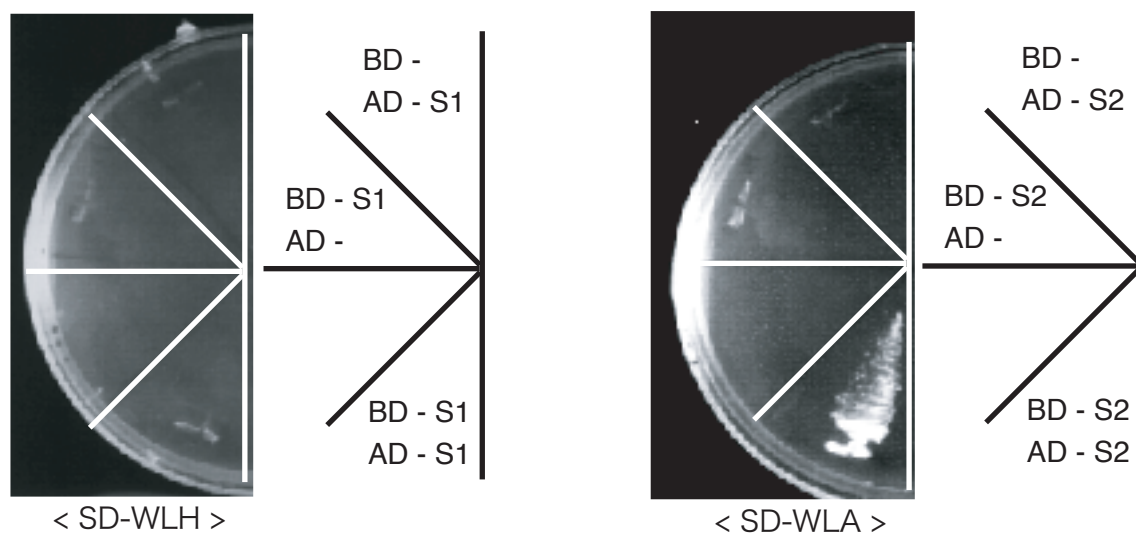
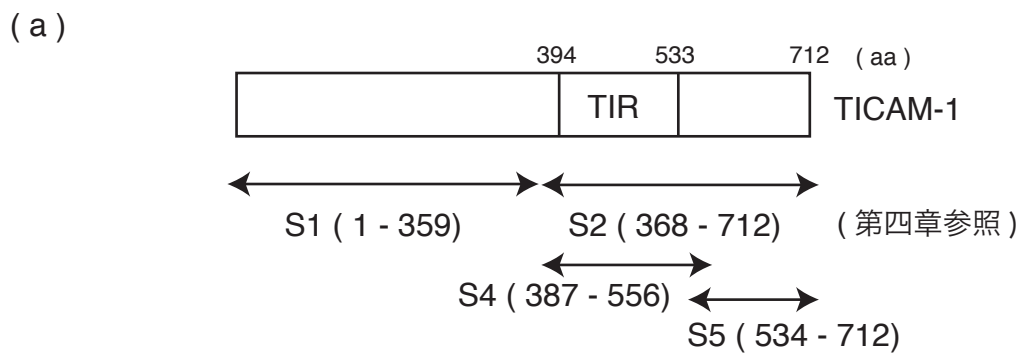
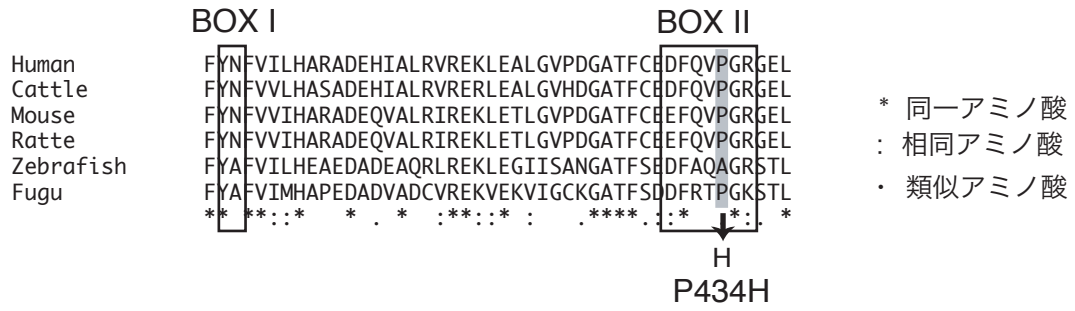


Fig. 6-4 TICAM-1 同士 の 結合 部位 の 同定

- a) TICAM-1N 末端領域同士と C 末端領域同士の結合  
 b) TICAM-1 TIR domain 同士と C 末端同士の結合

Yeast AH109 に各プラスミドを共発現させ、SD 培地から Trp, Leu を欠損させた培地で一度生育させてから、それぞれの選択培地下で生育を確認した。W ; Trp, L ; Leu, H ; His, A ; Ade

(a)



(b)

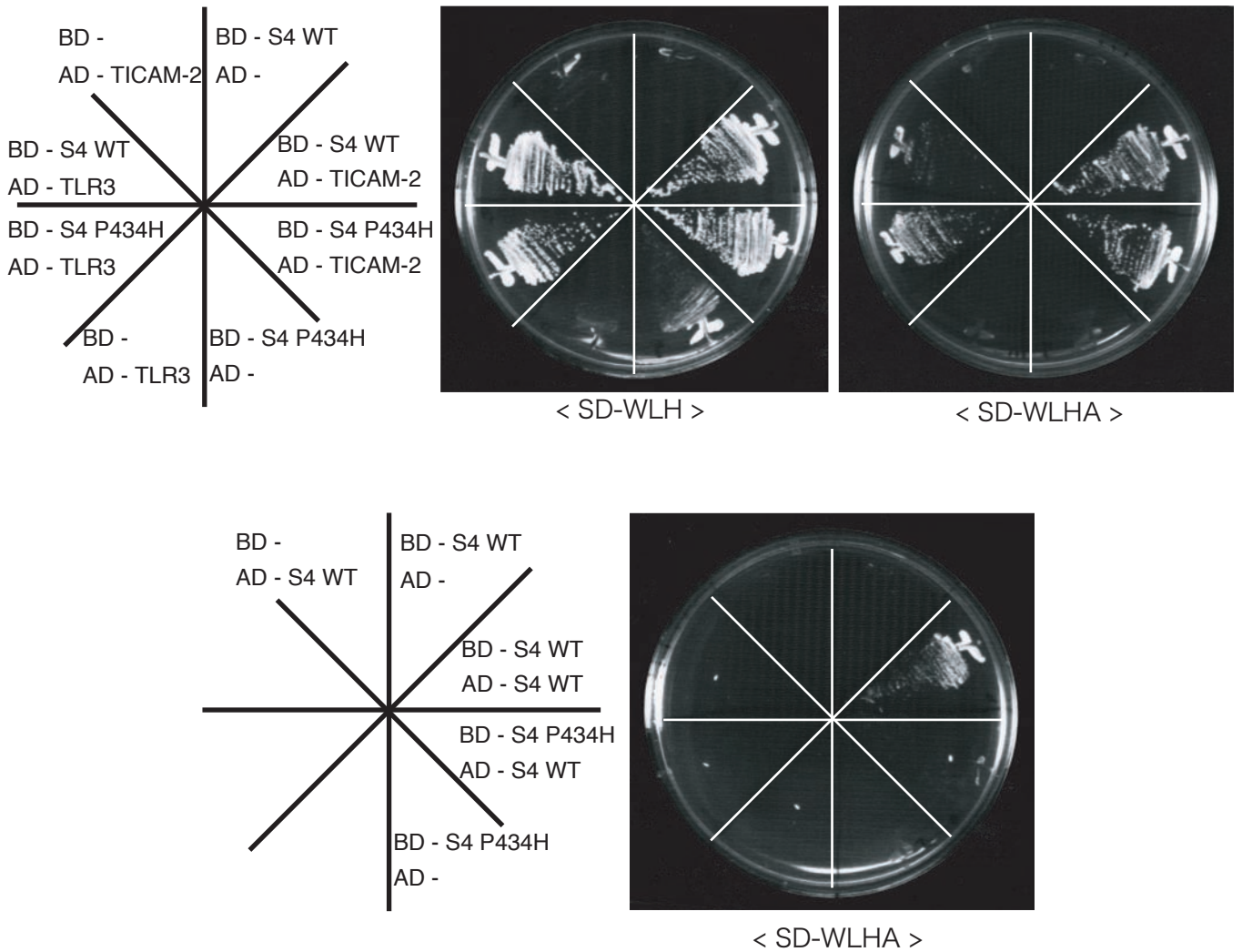


Fig. 6-5 TICAM-1 P434 変異体による TLR family 間の結合

- a) 下等生物 TICAM とのアミノ酸配列比較 (Clustal W を用いた相同性比較)
- b) TICAM-1 結合分子との結合に対する P434H 変異の影響

Yeast AH109 に各プラスミドを共発現させ、SD 培地から Trp, Leu を欠損させた培地で一度生育させてから、それぞれの選択培地下で生育を確認した。W ; Trp, L ; Leu, H ; His, A ; Ade

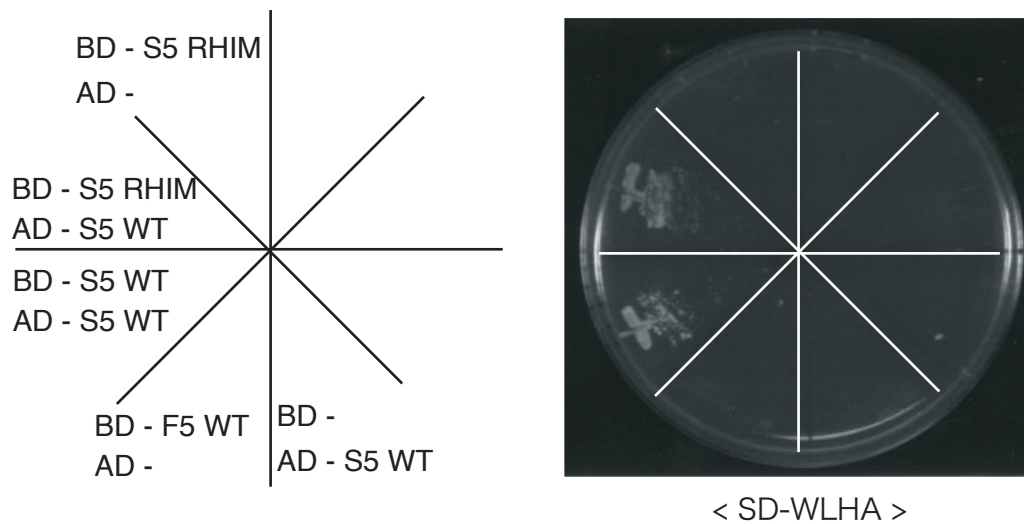


Fig. 6-6 TICAM-1C 末端領域同士の間相互作用

TICAM-1 の C 末端領域にある RHIM domain に変異を入れ (VQLG →AAAA)、TICAM-1 の C 末端同士の間結合について解析を行った

Yeast AH109 に各 cDNA を共発現させ、SD 培地から Trp, Leu を欠損させた培地で一度生育させてから、それぞれの選択培地下で生育を確認した。W ; Trp, L ; Leu, H ; His, A ; Ade



( a ) human TICAM-1 (320 - 640 aa)

```

PVKNPCSVKDQTPQLQSVEDTTSPTNKPCPPTPTTTPETSPPPPPPPSSTPCSAHLTPSSLFPSSLESSEQKFYNFVIL 400
HARADEHIALRVREKLEALGVPDGFCEDFQVPGRGELSCQLQDAIDHSAFIIILLTSNFDCLSLHQVNQAMMSNLTRQ 480
GSPDCVIPFLPLESSPAQLSSDTASLLSGLVRLDEHSQIFARKVANTFKPHRLQARKAMWRKEQDTRALREQSQHL DGER 560
MQAAALNAAYSAYLQSYLSYQAQMEQLQVAFGSHMSFGTGAPYGARMPFGGQVPLGAPPPFTWPGPCQPPLHAWQAGT 640

.....S.....T.....S...TT.....TT...S.....ST.....T.....SS..SS..... 400
.....T.....S..... 480
.S.....S.....T..... 560
.....T 640

```

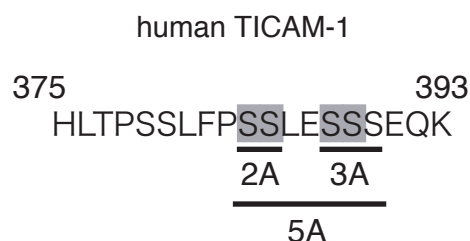
human TICAM-1 (320 - 640 aa)

Serine Prediction

379	H LTPSSLFP	0.015	.
380	LTPSSLFPS	0.019	.
384	S LFPSSLES	0.720	*S*
385	LFPSSLESS	0.979	*S*
388	SSLESSEQ	0.996	*S*
389	SLESSEQK	0.949	*S*
390	LESSEQKF	0.276	.
440	RGELSCLQD	0.025	.
449	AIDHSAFII	0.011	.
458	LLLTSNFDC	0.503	*S*
465	DCRLSLHQV	0.104	.
475	QAMMSNLTR	0.002	.
482	TRQGSPDCV	0.869	*S*
494	LPLESSPAQ	0.032	.
495	PLESSPAQL	0.043	.
500	PAQLSSDTA	0.119	.
501	AQLSSDTAS	0.095	.
505	SDTASLLSG	0.156	.
508	ASLLSGLVR	0.023	.
517	LDEHSQIFA	0.970	*S*
553	LREQSQHLD	0.282	.

Threonine Prediction

377	SAHLTPSSL	0.874	*T*
426	PDGATFCED	0.584	*T*
457	ILLLTSNFD	0.015	.
478	MSNLTRQGS	0.020	.
503	LSSDTASLL	0.042	.
527	KVANTFKPH	0.581	*T*
546	KEQDTRALR	0.141	.



( b )

human IRF-3 C-terminal

Serine Prediction

351	CVGESWPOD	0.072	.
385	VGASSLEN	0.939	*S*
386	GGASSLENT	0.969	*S*
396	DLHISNSHP	0.007	.
398	HISNSHPLS	0.009	.
402	SHPLSLTSD	0.352	.
405	LSLTSDQYK	0.013	.
427	GPGES----	0.007	.

Threonine Prediction

391	ASPSTPACL	0.210	.
402	RNCDTPIFD	0.223	.
429	SPRYTIYLG	0.735	*T*
465	HLEGTQREG	0.982	*T*

IRF-3 及び IRF-7 を活性化し、二量体形成に必須のリン酸化部位として報告されている

human IRF-7 C-terminal

Serine Prediction

471	REGVSSLDS	0.948	*S*
472	EGVSSLDSS	0.857	*S*
475	SSLDSSSLS	0.275	.
476	SLDSSSLSL	0.407	.
477	LDSSSLSLC	0.025	.
479	SSLSLCLCS	0.675	*S*
483	SLCLSSANS	0.013	.
484	LCLSSANS	0.011	.
487	SSANSLYDD	0.992	*S*

Threonine Prediction

359	DQPWTKRLV	0.808	*T*
370	KVVPTCLRA	0.039	.
390	SLENTVDLH	0.167	.
404	PLSLTSDQY	0.168	.

Fig. 6-7 TICAM-1 リン酸化サイトの予測

Human TICAM-1、Human IRF-3、 Human IRF-7 のリン酸化予測を NetPhos 2.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) を用いて行った。



< 文献 >

1. Oshiumi, H., M. Matsumoto, K. Funami, T. Akazawa, and T. Seya. 2003. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 4:161-167.
2. Oshiumi, H., M. Sasai, K. Shida, T. Fujita, M. Matsumoto, and T. Seya. 2003. TIR-containing Adapter Molecule (TICAM)-2, a Bridging Adapter Recruiting to Toll-like Receptor 4 TICAM-1 That Induces Interferon- $\beta$ . *J Biol Chem* 278:49751-49762.
3. Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640-643.
4. Maniatis, T., J. V. Falvo, T. H. Kim, T. K. Kim, C. H. Lin, B. S. Parekh, and M. G. Wathélet. 1998. Structure and function of the interferon-beta enhanceosome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 63:609-620.
5. Honda, K., and T. Taniguchi. 2006. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 6:644-658.
6. Sato, S., M. Sugiyama, M. Yamamoto, Y. Watanabe, T. Kawai, K. Takeda, and S. Akira. 2003. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 171:4304-4310.
7. Sasai, M., H. Oshiumi, M. Matsumoto, N. Inoue, F. Fujita, M. Nakanishi, and T. Seya. 2005. Cutting Edge: NF-kappaB-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation. *J Immunol* 174:27-30.
8. Fitzgerald, K. A., S. M. McWhirter, K. L. Faia, D. C. Rowe, E. Latz, D. T. Golenbock, A. J. Coyle, S. M. Liao, and T. Maniatis. 2003. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 4:491-496.

9. Sharma, S., B. R. tenOever, N. Grandvaux, G. P. Zhou, R. Lin, and J. Hiscott. 2003. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 300:1148-1151.
10. Akira, S., and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499-511.
11. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335-376.
12. Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.
13. Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1:135-145.
14. Meylan, E., K. Burns, K. Hofmann, V. Blancheteau, F. Martinon, M. Kelliher, and J. Tschopp. 2004. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol* 5:503-507.
15. Kaiser, W. J., and M. K. Offermann. 2005. Apoptosis Induced by the Toll-Like Receptor Adaptor TRIF Is Dependent on Its Receptor Interacting Protein Homotypic Interaction Motif. *J Immunol* 174:4942-4952.
16. Kishore, N., Q. K. Huynh, S. Mathialagan, T. Hall, S. Rouw, D. Creely, G. Lange, J. Carroll, B. Reitz, A. Donnelly, H. Boddupalli, R. G. Combs, K. Kretzmer, and C. S. Tripp. 2002. IKK-i and TBK-1 are enzymatically distinct from the homologous enzyme IKK-2: comparative analysis of recombinant human IKK-i, TBK-1, and IKK-2. *J Biol Chem* 277:13840-13847.
17. Perry, A. K., E. K. Chow, J. B. Goodnough, W. C. Yeh, and G. Cheng. 2004. Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to toll-like receptor activation and viral infection. *J Exp Med* 199:1651-1658.
18. Hemmi, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yamamoto, T. Kaisho, H. Sanjo, T. Kawai, K. Hoshino, K. Takeda, and S. Akira. 2004. The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med* 199:1641-1650.
19. Matsui, K., Y. Kumagai, H. Kato, S. Sato, T. Kawagoe, S. Uematsu, O. Takeuchi,

- and S. Akira. 2006. Cutting edge: Role of TANK-binding kinase 1 and inducible I $\kappa$ B kinase in IFN responses against viruses in innate immune cells. *J Immunol* 177:5785-5789.
20. Mori, M., M. Yoneyama, T. Ito, K. Takahashi, F. Inagaki, and T. Fujita. 2004. Identification of Ser-386 of interferon regulatory factor 3 as critical target for inducible phosphorylation that determines activation. *J Biol Chem* 279:9698-9702.
  21. Caillaud, A., A. G. Hovanessian, D. E. Levy, and I. J. Marie. 2005. Regulatory serine residues mediate phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent activation of interferon regulatory factor 7. *J Biol Chem* 280:17671-17677.
  22. An, H., W. Zhao, J. Hou, Y. Zhang, Y. Xie, Y. Zheng, H. Xu, C. Qian, J. Zhou, Y. Yu, S. Liu, G. Feng, and X. Cao. 2006. SHP-2 phosphatase negatively regulates the TRIF adaptor protein-dependent type I interferon and proinflammatory cytokine production. *Immunity* 25:919-928.

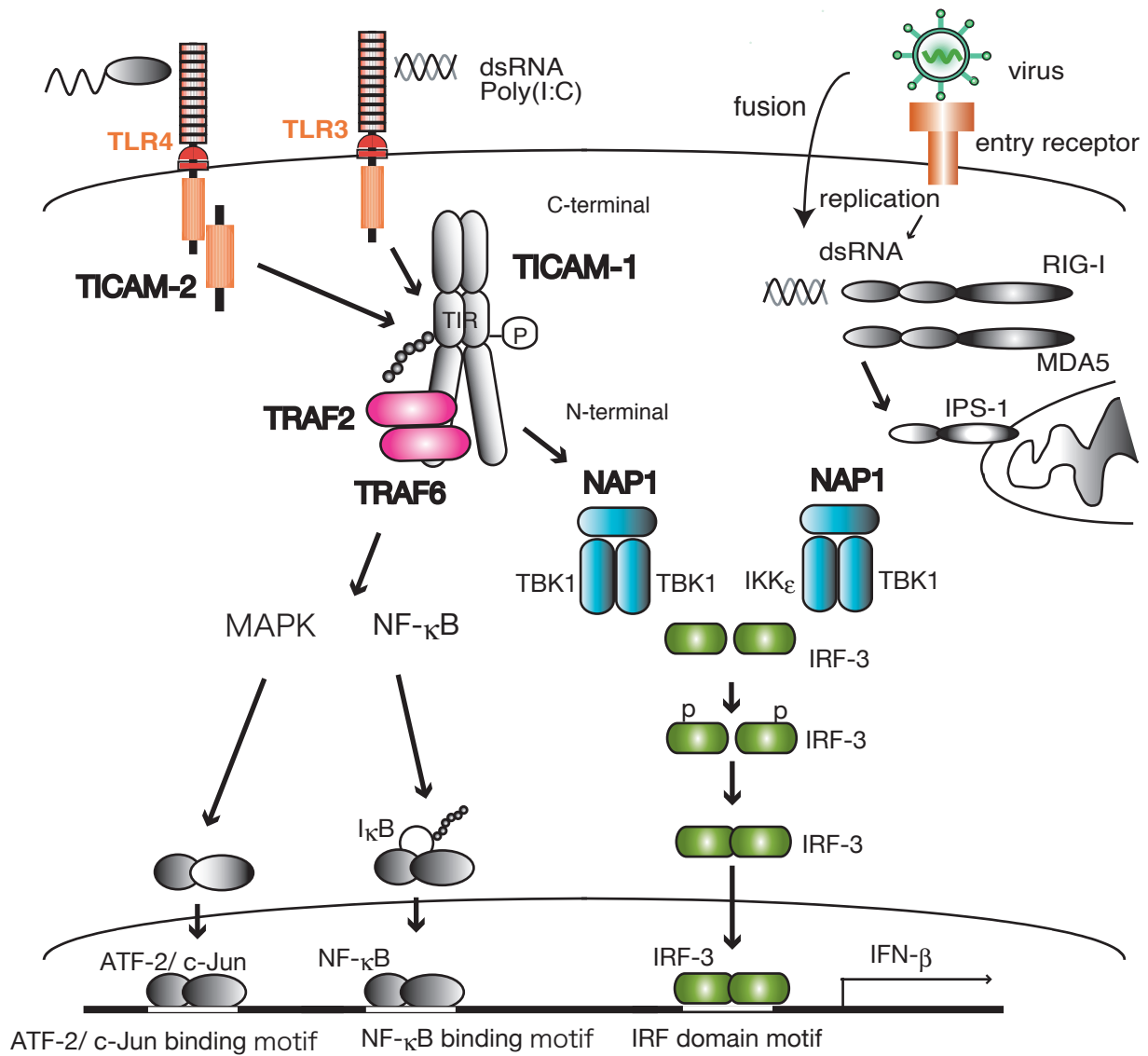


## 〈 終章 〉

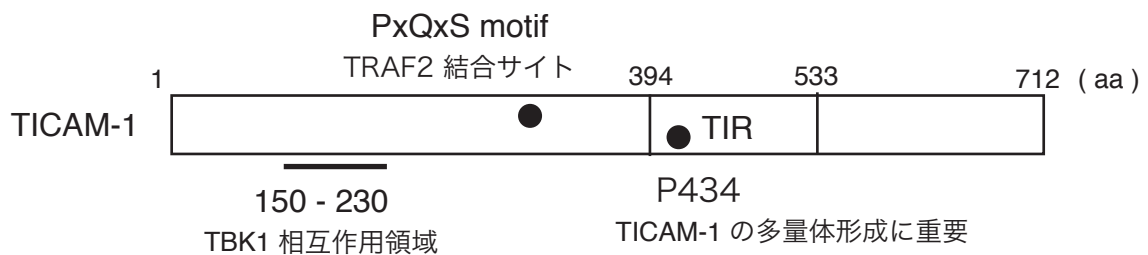
本研究により、

1. TLR4 を介した IFN- $\beta$ 産生は TICAM-2 が TICAM-1 へとシグナルを伝達する事により誘導されている事を明らかにした。
2. NAP1 は TICAM-1 の下流で TBK1 と TICAM-1 とをつなぎ、TICAM-1 を介した IRF-3 の活性化を誘導する分子である事を明らかにした。
3. NAP1 がウイルス感染による RIG-I/MDA5 経路を介した IRF-3 活性化にも関与している事を明らかにした。
4. TICAM-1 の N 末端領域に結合する分子として TRAF1, TRAF2, BS69 を同定した。
5. TICAM-1 は N 末端領域に結合する TRAF2 と TRAF6 によってポリユビキチン化される事を明らかにした。また、TRAF2 と TRAF6 の結合が欠損している TICAM-1 は顕著にその IRF-3 活性化能が低下する事を明らかにした。
6. TICAM-1 は TIR domain と C 末端領域の二箇所でも二量体を形成し、TIR domain 同士の結合は 434 番目のプロリンが重要であることを明らかにした。また、TICAM-1 は TBK1 によって特異的にリン酸化され、そのリン酸化部位は TIR domain 付近であることを明らかにした。

< IFN-β 産生経路 >



< TICAM-1 機能 domain >



## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始適切な御指導、御討論を賜りました北海道大学医学部医学研究科 病態解析学講座 感染症制御学分野 瀬谷 司 教授ならびに松本 美佐子 助教授に深く感謝致します。また、様々な面でご援助下さいました奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 細胞増殖学講座 竹家 達夫 教授に深く感謝致します。

終始熱心な御指導を賜り、また研究のすばらしさを教えて下さいました北海道大学医学部感染症制御学分野 押海 裕之 助手に心から感謝致します。

本論文を審査して下さいました、奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 動物遺伝子機能学講座 川市 正史 教授、細胞内情報学講座 伊東 広 教授、動物遺伝子機能学講座 石田 靖雅 助教授に深く感謝致します。

全くの素人であった私に、ユビキチン化を基礎から教えて下さり、研究に関する多くの事をご指導下さいました北海道大学医学部医学研究科 分子生化学講座 畠山 鎮次 教授に心から御礼申し上げます。

研究および様々な面で大変お世話になりました、大阪府立成人病センター研究所 免疫学部門の皆様、北海道大学医学部感染症制御学分野の皆様、共に刺激を与えながら終始支えてくれた同期生や友人に心から感謝致します。

最後に、研究ばかりしている私を終始精神的に支え下さいました両親に心から感謝致します。

2007年 3月 23日