

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860038

研究課題名(和文)NF- $\kappa$ Bの活性化に必須な新規遺伝子mCG8863の機能解析研究課題名(英文)Role of mCG8863 for the activation of NF- $\kappa$ B

## 研究代表者

倉石 貴透(Kuraishi, Takayuki)

東北大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90613167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：NF- $\kappa$ B経路は抗菌ペプチドやサイトカインの産生を制御するシグナル伝達経路として、自然免疫における中心的な役割を担っている。これまでに、生物に普遍的な自然免疫制御機構の新たな一面を明らかにするため、ショウジョウバエ幼虫における過剰発現スクリーニングを行い、抗菌ペプチドDiptericinの発現を誘導する新規遺伝子であるCG8863を同定している。そこで本研究では、CG8863ノックダウン個体を用いた細菌感染実験により、CG8863のNF- $\kappa$ B経路への関与を示した。さらにCG8863のほ乳類ホモログがI $\kappa$ Bのリン酸化を制御することでNF- $\kappa$ B経路の活性化に寄与している可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：The NF- $\kappa$ B pathway is a phylogenetically conserved signaling pathway that has a central role for inflammatory and immune responses. We demonstrated that a co-chaperone protein CG8863 is involved in the activation of the canonical NF- $\kappa$ B signaling in flies and in human cultured cells. Overexpression of CG8863 induced an antimicrobial peptide expression in Drosophila. Conversely, knockdown of CG8863 resulted in the reduced expression of antimicrobial peptides and higher susceptibility to Gram-negative bacterial infection in flies. Similarly, Toll-like receptor-stimulated I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation was suppressed by the knockdown of human CG8863 in HEK293 cells. IKK-overexpression induced NF- $\kappa$ B phosphorylation was also compromised in the CG8863-knockdown cells. Our study reveals a novel conserved regulator of the NF- $\kappa$ B pathway acting at the level of I $\kappa$ B phosphorylation.

研究分野：自然免疫学

キーワード：NF- $\kappa$ B

### 1. 研究開始当初の背景

NF- $\kappa$ B は、炎症誘導・免疫寛容・細胞死抑制・二次リンパ組織の形成・発癌など、きわめて多くの生理的・病理的現象に深く関与する転写因子である。それゆえ、NF- $\kappa$ B の活性化を導く刺激は多岐にわたり、その細胞内シグナル伝達機構も複雑であるため、いまだ NF- $\kappa$ B 活性化機構の全貌は把握されていない。私たちは、NF- $\kappa$ B の活性化機構を明らかにするため、ショウジョウバエを用いて研究を行っている。細菌感染時における NF- $\kappa$ B の活性化機構はショウジョウバエからヒトまで進化的に保存された経路である。ショウジョウバエは、細菌感染時に NF- $\kappa$ B 依存的に抗菌ペプチドを産生することが知られており、その NF- $\kappa$ B 活性化を導く受容体として 1996 年に Toll が同定されている。この発見が哺乳類 Toll-like receptor (TLR) の発見へとつながって大きく研究が展開した。しかし、受容体活性化から NF- $\kappa$ B の活性化に至る細胞内シグナル伝達機構はまだ十分に解明されていないことから、私たちは約 10000 系統の遺伝子過剰発現ショウジョウバエ系統を用いて、抗菌ペプチド発現誘導を指標とした機能獲得型スクリーニングを行った。それにより、新規遺伝子 CG8863 を見出した。すなわち、CG8863 の過剰発現を行ったショウジョウバエ個体において、NF- $\kappa$ B 依存的な抗菌ペプチド発現が誘導される。その結果に一致して、CG8863 の機能欠損ショウジョウバエにおいては、細菌感染時に誘導される抗菌ペプチド発現が有意に減弱する。そしてその変異個体は、通常は致死性のない大腸菌などの感染に対して致死性を示す。CG8863 遺伝子は進化的に保存されたコシャペロン遺伝子であり、哺乳類にもそのホモログが存在することから、申請者らはその遺伝子を mCG8863 と命名している。興味深いことに、哺乳類培養細胞においても、TLR 刺激による NF- $\kappa$ B の活性化に mCG8863 が必要であることが私たちの実験によりわかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、mCG8863 が NF- $\kappa$ B 経路の活性化にどのように関与しているのか、その分子機構を明らかにすることを目的として研究を進めた。

### 3. 研究の方法

(1) mCG8863 RNAi 細胞における NF- $\kappa$ B 経路因子のリン酸化状態の検討

NF- $\kappa$ B 経路のシグナル伝達は、経路を構成する因子が順番にリン酸化されることでシグナル伝達が行われる。具体的には、TLR5 に刺激が入るとアダプター分子である MyD88, IRAK1 (Interleukin-1 receptor associate kinase 1), IRAK4 (Interleukin-1 receptor associate kinase 4), TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) などのリン酸化が誘導され、最終的に IKK (Inhibitor kappa B

kinase) 複合体がリン酸化され、活性化状態となる。NF- $\kappa$ B: RelA ヘテロ二量体と結合することで核移行を阻害し、細胞質にとどめている I $\kappa$ B (Inhibitor kappa B) は活性化状態の IKK 複合体によりリン酸化され、ポリユビキチン化を受けると共にプロテアソームによる分解へと誘導される。I $\kappa$ B が分解されることで抑制の外れた NF- $\kappa$ B: RelA ヘテロ二量体は核移行シグナル (NLS) が露出することで核移行が可能になり、さらに RelA がリン酸化などの翻訳後修飾を受けること転写活性が上昇し、転写が行われる。このようなシグナル伝達において、mCG8863 が NF- $\kappa$ B 経路の活性化に寄与する因子である場合、mCG8863 の RNAi によって活性化のシグナルを抑制すると mCG8863 より下流の NF- $\kappa$ B 経路を担う因子のリン酸化が抑制されると考えられる。そこで、mCG8863 の RNAi を行った HEK293 細胞においてフラジェリン刺激後の NF- $\kappa$ B 経路を担う因子のリン酸化状態をウエスタンブロットングにより検討した。本実験では、siRNA のトランスフェクションにより mCG8863 の RNAi を行い、フラジェリンで刺激した HEK293 細胞から調製した細胞溶解液を NF- $\kappa$ B 経路因子の抗体を用いたウエスタンブロットングで解析した。NF- $\kappa$ B 経路因子のリン酸化が抑制されないコントロールとして、Non-Target siRNA を導入した細胞の溶解液、NF- $\kappa$ B 経路因子のリン酸化が抑制されるコントロールとして MyD88 の RNAi を行った細胞溶解液を用いた。

(2) mCG8863 RNAi 細胞における IKK 過剰発現時の NF- $\kappa$ B 経路因子のリン酸化状態の検討

前節での解析により、mCG8863 の RNAi を行った細胞では、フラジェリン刺激を行った際の I $\kappa$ B のリン酸化および減少が抑制されること、RelA (NF- $\kappa$ B p65) のリン酸化が抑制されることが明らかとなった。しかし、I $\kappa$ B より上流の因子に関しては、フラジェリン刺激による内在性分子のリン酸化状態の変化がウエスタンブロットングで検出ができなかった (データ示さず) ため、mCG8863 が I $\kappa$ B のリン酸化を抑制出来るような NF- $\kappa$ B 経路上流のどこで作用しているかは明らかになっていない。そこで、mCG8863 が NF- $\kappa$ B 経路活性化のどの段階で作用しているのかを示すため、mCG8863 の RNAi を行った細胞で I $\kappa$ B 上流の因子の過剰発現実験を行う事とした。通常、NF- $\kappa$ B 経路の因子を過剰発現した場合、下流の因子にシグナルが伝達され、NF- $\kappa$ B が活性化される。しかし、mCG8863 の RNAi が同時に行われていた場合、過剰発現した因子が mCG8863 の下流で活性化に関与している因子であれば NF- $\kappa$ B 活性化は通常通り起こるが、mCG8863 の上流または同段階で活性化に関与している因子であれば NF- $\kappa$ B 活性化は抑制されると考えられる。本実験では、mCG8863 の RNAi と NF- $\kappa$ B 経路

の因子の過剰発現を組み合わせることで mCG8863 の NF- B 活性化への関与段階の決定を試みた。

本実験は前節同様の方法で mCG8863 の RNAi を行った後に NF- B 経路因子の過剰発現ベクターを導入した HEK293 細胞から調製した細胞溶解液を NF- B 経路因子の抗体を用いたウエスタンブロッティングで解析した。コントロールとして Non-Target siRNA を導入した細胞の溶解液、過剰発現する因子の上流の RNAi を行う（過剰発現による下流因子の活性化が抑制されない）コントロールとして MyD88 の RNAi を行った細胞溶解液を用いた。

### (3) フラジェリン刺激時の細胞における NF- B 経路因子による免疫沈降

前節までの解析で、mCG8863 の RNAi により I B のリン酸化が阻害されることや IKK 過剰発現時にも NF- B 経路の活性化が抑制されることが明らかとなった。これらの実験結果から、mCG8863 は NF- B 経路において、IKK 複合体が I B をリン酸化する段階でこれらの因子のもとにリクルートされ、何らかの寄与をしている可能性が考えられる。そこで、本実験では mCG8863 と I B などの因子が NF- B 経路活性化時に相互作用していることを示すため、NF- B 経路因子の抗体を用いた免疫沈降を行い、mCG8863 との相互作用について検討した。

本実験ではフラジェリン刺激により NF- B 経路を活性化した HEK293 細胞のタンパク抽出液において NF- B 経路因子の抗体を用いた免疫沈降を行い、NF- B 経路活性化時の mCG8863 との相互作用について検討した。コントロールとしてはフラジェリン刺激をしていない HEK293 細胞のタンパク抽出液を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) mCG8863 RNAi 細胞における NF- B 経路因子のリン酸化状態の検討

mCG8863 の RNAi を行った細胞溶解液では、コントロールの細胞溶解液と比べてフラジェリン刺激後の I B のリン酸化が顕著に抑制されており、加えて I B 自体の量の減少や RelA (NF- B p65) のリン酸化も抑制されていた。

この結果から、mCG8863 は I B のリン酸化より上流で NF- B 経路の活性化に寄与している可能性が示唆された。

### (2) mCG8863 RNAi 細胞における IKK 過剰発現時の NF- B 経路因子のリン酸化状態の検討

mCG8863 の RNAi を行った細胞溶解液では IKK 複合体のキナーゼ活性を担うサブユニットである IKK を過剰発現した際に、IKK 自体のリン酸化状態はコントロールと比べて変化しないにもかかわらず、RelA (NF- B p65) のリン酸化状態はコントロールと比べ

て顕著に抑制されていた。

この結果から、mCG8863 は IKK の下流で NF- B の活性化に寄与している可能性が示唆され、前節の結果と合わせて考えると、mCG8863 は I B のリン酸化に必要な因子である可能性が高いと考えられる。

### (3) フラジェリン刺激時の細胞における NF- B 経路因子による免疫沈降

I B の免疫沈降により、mCG8863 が共沈降され、その共沈降はフラジェリン刺激依存的に増大した。

この結果から、mCG8863 と I B の物理的相互作用は NF- B 経路活性化時に増強される可能性が示唆された。また、前節までの結果を合わせて考えると mCG8863 が NF- B 経路の活性化により I B のもとにリクルートされ、IKK 複合体によるリン酸化を補助しているという可能性が考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Kuraishi T\*, Hori A\*, Kurata S. "Host-microbe interactions in the gut of *Drosophila melanogaster*." *Frontiers in Physiology* 4: 375. 2013  
\*These authors contributed equally to this work  
doi:10.3389/fphys.2013.00375.  
査読あり

[学会発表](計 22 件)

1. Li-Li Tong, Hirotaka Kanoh, Takayuki Kuraishi, Fumi Shishido, Shoichiro Kurata  
"Drosophila Toll pathway requires an E3-ligase protein Sherpa for the activation"  
2nd Young Researchers' Conference in Sendai, 仙台, 2015 年 1 月 23 日
2. Hirotaka Kanoh, Li-Li Tong, Takayuki Kuraishi, Shoichiro Kurata  
"Genome-wide RNAi screenings for downstream components of the Toll signaling pathway"  
2nd Young Researchers' Conference in Sendai, 仙台, 2015 年 1 月 23 日
3. Hirotaka Kanoh, Takayuki Kuraishi, Shoichiro Kurata  
"In vitro genome-wide RNAi screenings for the canonical intracellular Toll pathway and cGMP-dependent pathway in *Drosophila*"

第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月 25 日

4. Li-Li Tong, Hirotaka Kanoh, Takayuki Kuraishi, Shoichiro Kurata

“ Drosophila Toll pathway requires an E3-ligase protein Sherpa for its activation ”

第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月 25 日

5. 渡辺亮, 倉石貴透, 青山俊弘, 中山浩伸, 知花博治, 倉田祥一朗

“ カンジダ酵母の病原性を規定する遺伝子の網羅的同定: ショウジョウバエ成虫への殺傷能力を指標としたカンジダ非必須遺伝子欠損株のスクリーニング ”

第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月 25 日

6. 初内義希, 熊田幸平, 倉石貴透, 倉田祥一朗

“ コシャペロン分子 hCG8863 による NF- B 経路活性化機構の解析 ”

第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月 25 日

7. 見目裕之, 堀亜紀, 倉石貴透, 倉田祥一朗

“ 機械的刺激に応答した自然免疫関連遺伝子群の発現誘導メカニズムの解明 ”

第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月 25 日

8. 石澤勇輝, 生野浩平, 石川裕規, 倉石貴透, 倉田祥一朗

“ DNA ウイルスに対する新たな抗ウイルス因子 TRIM47 の解析 ”

第 13 回次世代を担う若手ファーマバイオフォーラム, 富山, 2014 年 9 月 20 日

9. Aki Hori, Takayuki Kuraishi, Shoichiro Kurata

“ Gut immune response against Gram-positive bacteria in Drosophila ”

Cold Spring Harbor Asia conferences, Suzhou, China, September 2, 2014

10. Takayuki Kuraishi, Aki Hori, Hiroyuki Kenmoku, Shoichiro Kurata

“ Damage-induced innate immune response in Drosophila larvae: a novel model system for analyzing a mechanism that governs sterile inflammation ”

Cold Spring Harbor Asia conferences, Suzhou, China, September 2, 2014

11. 初内義希, 熊田幸平, 倉石貴透, 倉田祥一朗

“ NF- B 経路の活性化を制御する新規因子

コシャペロン CG8863/DnaJA3 ”

日本比較免疫学会第 26 回学術集会, 第 25 回日本生体防御学会学術総会, 仙台, 2014 年 7 月 9 日

12. 堀亜紀, 倉石貴透, 倉田祥一朗

“ ショウジョウバエ腸管におけるグラム陽性菌に対する防御応答機構の解析 ”

日本比較免疫学会第 26 回学術集会, 第 25 回日本生体防御学会学術総会, 仙台, 2014 年 7 月 9 日

13. Takayuki Kuraishi

“ Neuronal control of gut integrity in Drosophila adults ” (Invited)

2014 Epitheliome meeting, University of Glasgow, Scotland, UK, April 22, 2014

14. Aki Hori, Takayuki Kuraishi, Shoichiro Kurata

“ Gut immune response against Gram-positive bacteria ”

55th Annual Drosophila Research Conference, Town & Country Resort & Conference Center, San Diego, USA, 26, 2014

15. Takayuki Kuraishi, Aki Hori, Shoichiro Kurata

“ Damage induced expression of antimicrobial peptides via the Imd pathway in Drosophila larvae ”

55th Annual Drosophila Research Conference, Town & Country Resort & Conference Center, San Diego, USA, March 26, 2014

16. 初内義希, 倉石貴透, 倉田祥一朗

“ hCG8863 による NF- B 経路活性化機構の解析 ”

第 36 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2013 年 12 月 3 日

17. Aki Hori, Takayuki Kuraishi, Shoichiro Kurata

“ NF- B-independent antimicrobial peptide expression upon Gram-positive bacterial infection in Drosophila larvae ”

第 36 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2013 年 12 月 3 日

18. Hirotaka Kanoh, Aki Hori, Yoshiki Momiuchi, Takayuki Kuraishi, Hiroaki Suzuki, Shinzo Iwashita, Akira Goto, Julian Dow, Shireen-A. Davies, Shoichiro Kurata

“ A receptor guanylyl cyclase mediating Toll-independent/dMyd88-dependent humoral response and dMyd88-independent cellular response in Drosophila

immunity”

23rd European Drosophila Research Conference, Barcelona, Spain, October 16, 2013

19. 堀亜紀、倉石貴透、倉田祥一郎  
“ ショウジョウバエにおけるグラム陽性菌  
に対する新たな腸管免疫機構の解析 ”  
第 12 回次世代を担う若手ファーマ・バイオ  
フォーラム, 東京, 2013 年 9 月 14 日

20. 倉石貴透、狩野裕考、倉田祥一郎  
“ 自然免疫応答を担うショウジョウバエ受  
容体型グアニル酸シクラーゼ下流のシグナル  
伝達機構 ”  
新学術領域研究「自然炎症」「脂質マシナリ  
ー」合同若手ワークショップ, 徳島, 2013 年  
7 月 4 日

21. 堀亜紀、倉石貴透、倉田祥一郎  
“ ショウジョウバエ腸管におけるグラム陽  
性菌に対する免疫応答機構の解析 ”  
新学術領域研究「自然炎症」「脂質マシナリ  
ー」合同若手ワークショップ, 徳島, 2013 年  
7 月 2 日

22. 堀亜紀、倉石貴透、倉田祥一郎  
“ ショウジョウバエ腸管におけるグラム陽  
性菌に対する免疫応答機構の解析 ”  
第 79 回日本生化学会東北支部会例会, 仙台,  
2013 年 5 月 11 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seimei/seimei\\_original.html](http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seimei/seimei_original.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
倉石 貴透 (KURAIISHI, Takayuki)  
東北大学大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：90613167

(2) 研究分担者  
なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
なし ( )

研究者番号：