ASC-mediated NF-κB activation leading to lL-8 production requires caspase-8 and is inhibited by CLARP

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 長谷川, 瑞穂
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9764

金沢大学十全医学会雑誌　第115巻　第2号　92－93（2006）

【総説】

第四回　高安賞優秀賞受賞論文

論文　「ASC-mediated NF-κB activation leading to IL-8 production requires caspase-8 and is inhibited by CLARP」

J.Biol.Chem
Vol.280, No.15, 15122-15130 2005年4月掲載

ASCを介したNF-κBの活性化とIL-8の産生にはCaspase-8が関与する

長谷川　瑞穂（はせがわ　みずほ）

はじめに

様々な病原に対する生体防御機構は，植物から動物まで幅広く存在している．ヒトでは，細胞質内のNodタンパク質や細胞膜上のToll様受容体などが病原成分を認識する．これらのホモログは植物にも存在し，生体防御の根幹はよく保存されているといえる[1]．Nodタンパク質は，ヌクレオチド結合性多量体化ドメイン(NOD)を持つタンパク質の総称であり，ヒトでは約20種類が知られる．典型的なNodタンパク質は，中央にNOD，N末端側にCARDなど下位因子と結合するエフェクター・ドメイン，C末端側に応答すべきリガンドを規定するセンサー・ドメインLRRをもつ[1]．

このうち，CARD12は下位タンパク質ASCと結合し，NF-κB活性化，アポトーシス，Caspase-1依存性的IL-1β産生を誘導する[2]．また，Nod1, Nod2は特異的細菌成分を認識し，細菌に対する免疫応答に重要な役割を果たす．筆者らはキメラNodタンパク質の機能を解析することにより，CARD12が介するNF-κB活性化の分子メカニズムを明らかにした．

CARD12/ASC系のシグナル依存的活性化システムの確立

CARD12はリガンド応答性ドメインLRRを持つが，その刺激上流因子は不明であった．そこで，ASCを介した刺激依存的活性化のしくみを明らかにするため，刺激上流因子が既知で，しかもよく機能の解析されているNodタンパク質であるNod2のリガンド応答領域とCARD12のエフェクター・ドメインCARDを融合させたキメラタンパク質(以後C12N2)を作製し，その機能を調べた（図1A）．まず，NF-κB依存性のレポーターとASCとともにC12N2を，元来Nod2のリガンドであるMDPに応答しないHEK293細胞へ導入し，樹立株（以後MAIL8）を単離した．この株をMDPで刺激するとNF-κBが活性化される．このとき，細胞質内に凝集体構造が形成され，C12N2とASCはこの凝集体への局在した（図1B）．この凝集体構造はC12N2とASC単独に発現させた細胞で認められないことから，ASCは刺

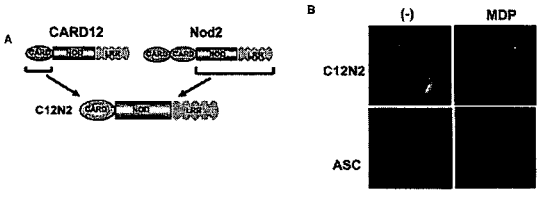

図1　CARD12/ASC系のシグナル依存的活性化システムの確立 (A) キメラタンパク質C12N2の作製 (B) C12N2とASCの局在性

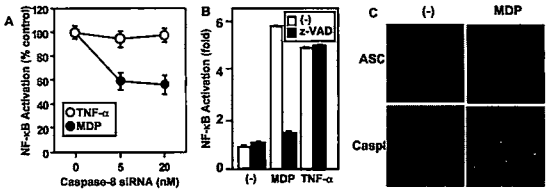

図2　C12N2/ASCを介したNF-κBの活性化におけるCaspase-8の関与　(A)Caspase-8のsiRNAの効果 (B)Caspase阻害剤の効果 (C) Caspase-8の局在性 (J.Biol.Chem. Vol.280, 15122-15130, 2005より改変)

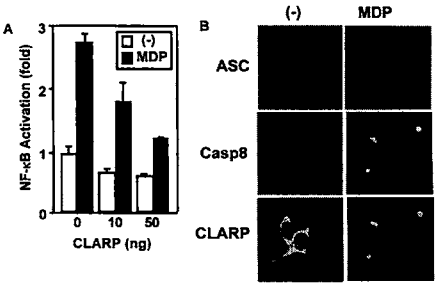

図3　C12N2/ASCを介したNF-κBの活性化におけるCLARPの関与　(A)CLARPの効果 (B) CLARPの局在性 (J.Biol.Chem. Vol.280, 15122-15130, 2005より改変)

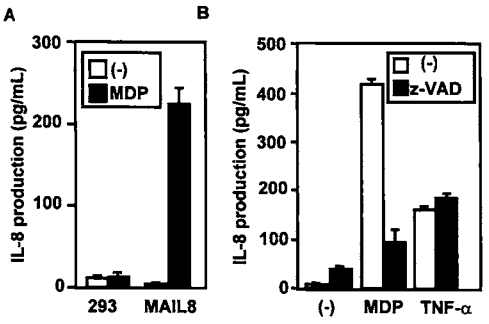

図4　C12N2/ASCによるNF-κB活性化依存的IL-8の産生 (A) IL-8の産生(B)Caspase阻害剤の効果 (J.Biol.Chem. Vol.280, 15122-15130, 2005より改変)

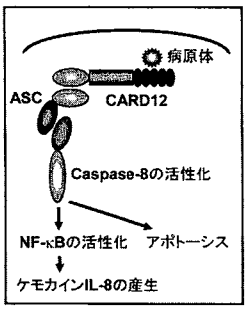

図5　ASCを介したNF-κB活性化機構のモデル図

激依存的にC12N2へ結合し，凝集体を形成することがわかった．このことは，CARD12, ASCは刺激依存的に結合し，細胞内で凝集体を形成することでNF-κB活性化を誘導することを示唆する．

CARD12/ASCを介したNF-κBの活性化にはCaspase-8の酵素活性が必要である

このCARD12とASCの集合以後の過程で，どのようにしてNF-κBが活性化されるのか，分子レベルでさらに詳しく調べた．ASC凝集によって誘導されるアポトーシスではCaspase-8が重要な役割を果たしている[2]．また，著者らが以前調べたFasを介した情報伝達系では，Caspase-8が刺激依存的なアポトーシスだけでなくNF-κB活性化に必須の役割を果たしている[3]．これらのことから，ASCの介するNF-κB活性化においてもCaspase-8の関与を考えた．そこで，MAIL8のCaspase-8の発現量をsiRNAにより抑制したところ，MDP刺激によるNF-κB活性化も抑制された (図2A)．このことから，ASCを介したNF-κB活性化にはCaspase-8が必要であることが示唆された．Caspase-8はプロテアーゼであるので，次にこの酵素活性が必要かどうかを阻害剤やドミナントネガティブ変異タンパク質の発現の影響で検討したところ，ASCを介したNF-κB活性化にもCaspase-8の酵素活性が必要であることがわかった (図2B)．そこで，Caspase-8の局在性を調べたところ，刺激依存的にCaspase-8もASC凝集体へリクルートされた (図2C)．このことは，ASCを介したNF-κB活性化は凝集体へCaspase-8をリクルートすることによって誘導されることを示唆する．

CLARPはCARD12/ASCを介したNF-κBの活性化を抑制する

Caspase-8活性はCLARPにより調節されることが知られる[4]．そこでASC情報伝達系の調節におけるCLARPの関与を検討した．MAIL8でCLARPを過剰発現させたところMDP刺激によるNF-κB活性化が抑制され，CLARPによる負の調節機構が明らかとなった (図3A)．次に，CLARPの局在性を調べたところ，Caspase-8同様に，ASC凝集体への移行が認められた (図3B)．このことから，CLARPはCARD12, ASC, Caspase-8集合体に結合することで阻害的にASC情報伝達系を調節することがわかった．

CARD12/ASCはNF-κBの活性化依存的にケモカインIL-8の産生を誘導する

こうしたASCを介したNF-κB活性化はどのような遺伝子の転写と結びつくのであろうか．MDPで刺激したMAIL8の培養上清に存在する分泌タンパク質をELISAにより検索したところ，細菌キラーである好中球の呼び寄せに重要なケモカインIL-8の分泌が認められた (図4A)．この分泌は，NF-κB活性化同様に，プロテアソームやcaspaseの阻害剤での前処理，ドミナントネガティブI-κBαやCLARPの過剰発現により抑制された (図4B)．これらのことから，ASCはNF-κB活性化を介してIL-8分泌を制御する可能性が考えられる．

まとめ

以上の結果を図5にまとめた．ASCはリガンド依存的にCARD12との結合，凝集体を形成し，caspase-8をこれにリクルートする．caspase-8酵素活性依存的に活性化されたNF-κBはケモカインIL-8の産生を誘導する．ショウジョウバエのcaspase-8ホモログも自然免疫応答に重要な役割を果たしており，今回の発見は，caspase-8の自然免疫応答における役割が進化的によく保存されていることを示すものである．最後に，本研究は金沢大学癌研究所で成されたものであり，ひとえに須田貴司教授のご指導・叱咤激励ならびに同輩諸兄との共同研究と暖かいご支援の賜物であることを特記させていただきます．

文　　献

1）須田貴司 Apaf-1様タンパク質：炎症と細胞死シグナルの新しい接点　細胞工学 24: 929-933, 1997

2）Masumoto J, Dowds TA, Schaner P, Chen FF, Ogura Y, Li M, Zhu L, Katsuyama T, Sagara J, Taniguchi S, Gumucio DL, Nunez G, Inohara N. ASC is an activating adaptor for NF-κB and caspase-8-dependent apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 303: 69-73, 2003

3）Imamura R, Konaka K, Matsumoto N, Hasegawa M, Fukui M, Mukaida N, Kinoshita T, Suda T. Fas Ligand Induces Cell-autonomous NF-κB Activation and Interleukin-8 Production by a Mechanism Distinct from That of Tumor Necrosis Factor-α J. Biol. Chem. 279, 46415-46423, 2004

4）Irmler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP Nature 388: 190-195. 1997

Profile

2002年　金沢大学自然科学研究科博士前期課程修了
2005年　金沢大学医学系研究科修了。医学博士号取得
2005年からミシガン大学医学部病理にてポスドク
現在のテーマはNodファミリータンパク質の分子機構の解明
E-mail; mizuhoh@umich.edu
URL;
http://www.geocities.jp/mizuhase/science.world.htm