

研究成果報告書

事業名（補助金名）： 基盤的研究開発育成事業（若手研究補助金）
研究開発テーマ名： 自然免疫と獲得免疫をリンクする新規アダプター分子 STAP-2 の機能解析
研究代表者名： 関根 勇一【北海道大学大学院薬学研究院／助手】
共同研究者名： 松田 正【北海道大学大学院薬学研究院／助手】

はじめに

細胞内外の種々のシグナル伝達系により個々の細胞の増殖、分化、細胞死は厳密に制御され、異なる細胞群がサイトカインやホルモンのバランスのもとに調和を保っている。これにより、生体の神経、免疫、内分泌系にみられるような高次機能を形成し維持することが可能となる。細胞外からの情報は主に種々のレセプターを介し伝えられ、次いでキナーゼ等の酵素によるシグナル伝達分子のリン酸化がおり、必要な遺伝子発現の誘導などによって細胞は様々な機能を発揮する。そのため、これら蛋白の変異や、欠損は種々の疾患として発症することも明らかになっている。シグナル伝達を司る酵素群のほかにシグナル調節を担うアダプタータンパク群も存在している。アダプター分子はシグナル伝達経路において、自身は酵素活性を持たないものの、細胞の増殖、分化、癌化に深く関与するチロシンキナーゼなどの酵素群と、タンパク質-タンパク質相互作用を行うドメイン構造を介して、非常に緻密にその活性制御を遂行している。このような各シグナル伝達分子のクロストークを解析することは細胞レベル、組織レベルでの機能の実証のみならず、生命現象の解明から疾患の病因解明にも発展すると考えられる。

アダプター分子 STAP-2 の構造と免疫系における制御機能

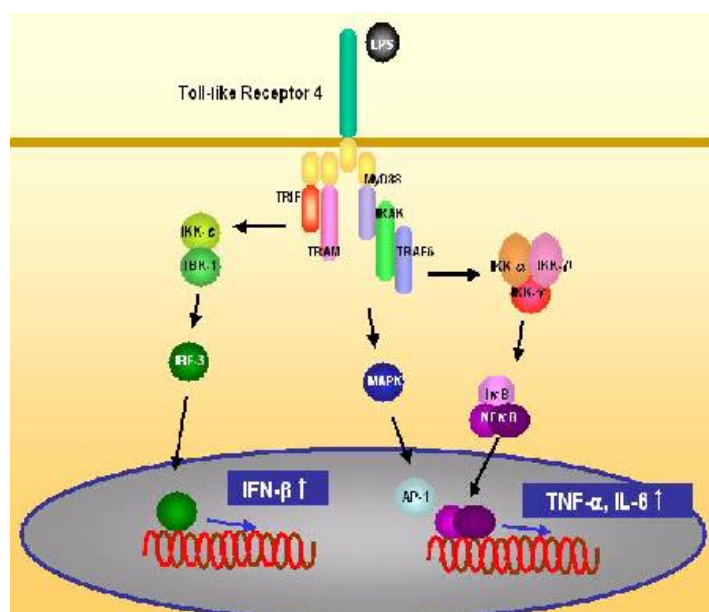
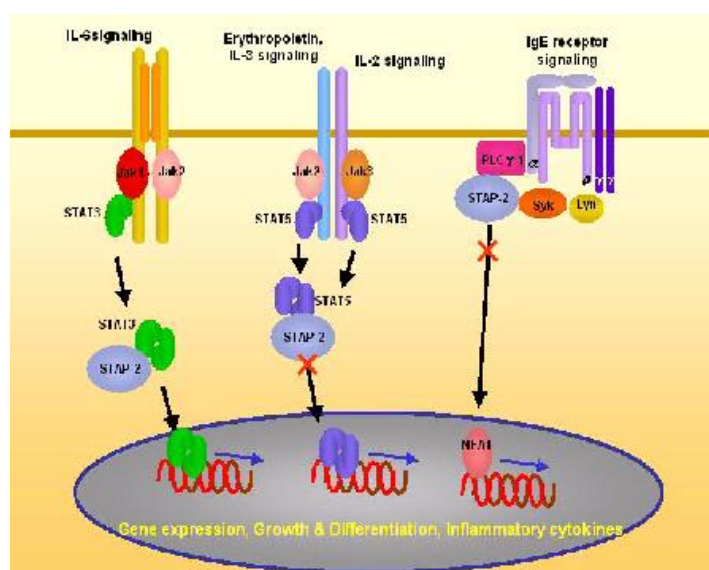
最近我々は、c-fms 結合分子として新規アダプタータンパク STAP-2 (Signal-transducing adaptor protein-2) を同定した。STAP-2 は乳癌特異的チロシンキナーゼ Brk (Breast tumor kinase) の基質である BKS (Substrate of Brk) のマウスホモログである。マウス STAP-2 は 411 アミノ酸、ヒト STAP-2 では 403 アミノ酸により構成されており、N 末端側から PH ドメイン(リン脂質結合性を示して分子に細胞膜への指向性を与える)、SH2 様ドメイン(リン酸化チロシンに結合性を示す)、C 末端側にプロリンに富むドメイン(SH3 ドメインと結合性を示す)を有し、さらに、C 末端側に STAT3 結合部位と考えられる YXXQ モチーフを有している。STAP アダプターファミリー蛋白である STAP-1 と 33% のホモロジーを有する。ノックアウト (KO) マウスなどを用いた解析から、STAP-2 が炎症性サイトカインである IL-6 刺激により、転写因子 STAT3 のリン酸化・活性化を増強することが明らかとなった。また、STAT5 を介する種々のサイトカインシグナル伝達系においては、STAP-2 が STAT5 のチロシンリン酸化および転写活性化を低下させる負の制御因子として働き、STAP-2KO マウスから分離した胸腺細胞では IL-2 依存性の細胞増殖が増強することが明らかとなっている。このように STAP-2 は、免疫応答時にサイトカインを介したシグナル伝達(獲得免疫系)を制御する分子であることが最近明らかになってきている。

さらに、LPS (Lipopolysaccharide) 腹腔投与により肝臓において STAP-2 mRNA が誘導されること、また、STAP-2KO マウスにおいては、LPS 腹腔投与により肝臓での急性期蛋白の遺伝子発現が顕著に減少していることが明らかとなっている。これらのことから、生体内での LPS による炎症反応シグナル伝達において STAP-2 が重要な役割を果たしていることが考えられる。

感染などにより病原体が体内に侵入するとまず自然免疫反応と呼ばれる応答が起こる。この自然免疫では細菌など病原体由来物質、例えば LPS などを認識する TLR (Toll-like receptor) を介してシグナルが伝達される。その後、獲得免疫として知られる抗原抗体反応により IL-2、IL-6 等の様々なサイトカインが産生され、免疫細胞が活性化される。

Toll-like receptor (TLR) は細胞外領域にロイシンリピート配列を持ち、細胞内領域に Toll/IL-1 レセプターホモロジー領域をもつ膜型蛋白質である。主に、マクロファージや樹状細胞に多く発現

しており、免疫応答における自然免疫と獲得免疫とをつなぐ重要な役割を担う。TLR は哺乳動物で 11 種(ヒトでは 10 種)存在し、それぞれ異なった微生物構成成分を認識し炎症反応を引き起こす。リガンドの結合により TLR は NF- κ B や MAPK の活性化を介してシグナルを伝達し、炎症性サイトカインやケモカインの産生を誘導



し免疫系細胞の活性化を引き起こすことが知られている。LPS によるシグナルは TLR 4 を介し、MyD88 依存のまたは非依存的な経路を経て伝えられる。

本研究では、マクロファージでの LPS/TLR 4 シグナル経路における、新規アダプター分子 STAP-2 の役割について解析を行った。

STAP-2 ノックアウトマウス (KO) における LPS によるサイトカイン産生量の減少

図 1

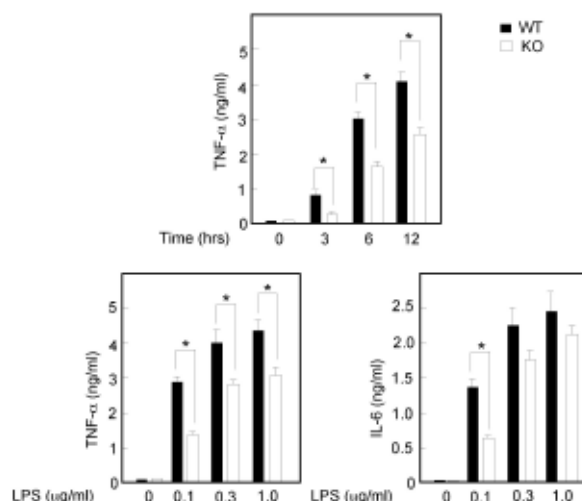
先述したとおり、STAP-2 は LPS 腹腔投与による急性期応答に関与していることが明らかとなっている。そこで、LPS/TLR4 シグナルにより誘導される炎症性サイトカインの産生に STAP-2 が関与しているのではないかと検討した。野生型 (WT) 及び KO マウスから分離した腹腔マクロファージを、LPS で刺激し、経時的に TNF- α の産生量を ELISA 法により測定した。図 1A 上段に示すように LPS 刺激による用量依存的な TNF- α の産生が確認されるが、STAP-2KO 腹腔マクロファージではその産生量が顕著に減少していた (* : $P < 0.05$)。また、LPS の用量依存的に産生される TNF- α 、IL-6 の産生も減弱していることが分かった (図 1A 下段)。

さらに LPS 刺激による TNF- α 及び IL-6 の mRNA 誘導を RT-PCR 法により検出した。すると STAP-2KO マクロファージでは WT に比べ mRNA の誘導が減少していることが確認できた (図 1B)。

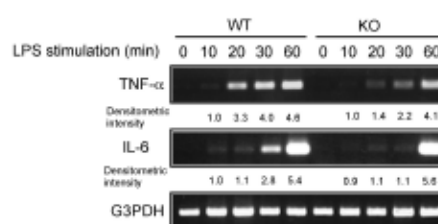
続いて、LPS 腹腔投与により誘導産生される血清中の TNF- α 量を ELISA 法により比較した。すると STAP-2KO マウスでは WT に比べ誘導産生された血清中の TNF- α 量は顕著に減弱していた (図 1C、* : $P < 0.05$)。

これらのことから LPS/TLR 4 を介した炎症応答に STAP-2 が関与していることが示唆された。

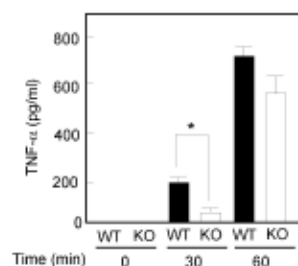
A



B



C



LPS/TLR4 による NF- κ B 活性化と STAP-2 の関与

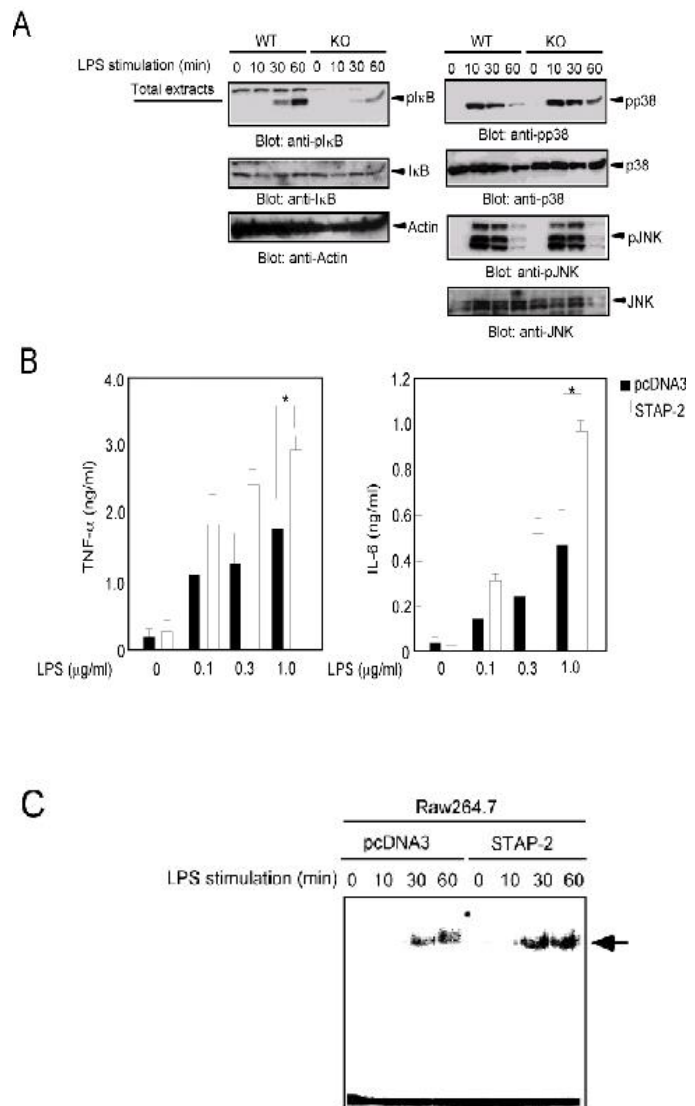
LPS/TLR4 シグナル伝達経路は、NF- κ B または MAP キナーゼの活性化によりそのシグナルが伝えられることが知られている。そこで LPS による NF- κ B の活性化を調べるため、I κ B のリン酸化を指標に検討した。WT、KO マウスそれぞれの腹腔マクロファージを LPS で経時的に刺激後、ウェスタンブロットを行い、特異的リン酸化抗体を用いて解析した。その結果、STAP-2KO マウス腹腔マクロファージでは WT に比べ I κ B のリ

ン酸化が顕著に減弱していた。しかし、MAP キナーゼである p38、JNK のリン酸化には両者に差が見られなかった (図 2A)。

図 2

次に STAP-2 またはコントロールとしてベクターを恒常的に発現させたマウスマクロファージ様細胞株 Raw264.7 を作製し、LPS 刺激によるサイトカイン産生量を比較した。すると、予想された通り TNF- α 、IL-6 ともに産生量が STAP-2 発現株で増強していた (図 2B、* : $P < 0.05$)。

さらにこの Raw264.7 細胞株を用いてゲルシフトアッセイを行った。LPS 刺激により NF- κ B の DNA 結合量の増強が観察されるが、STAP-2 発現細胞株ではさらにその結合能が増強することが観察された (図 2C)。以上の結果より、STAP-2 は LPS/TLR4 シグナル経路において、NF- κ B の活性化を増強させることが明らかとなった。

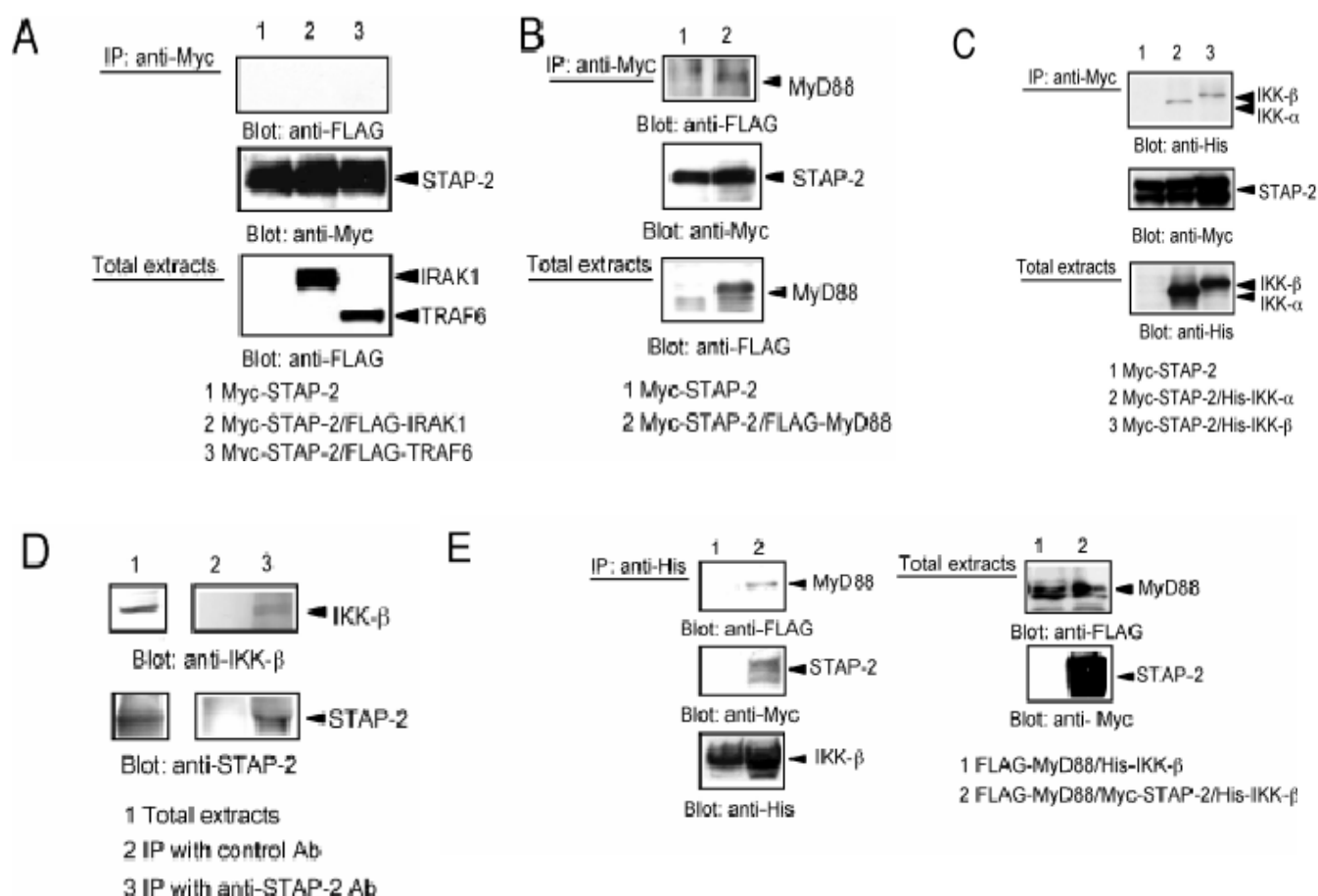


LPS/TLR4 下流シグナル伝達分子と STAP-2 の相互作用

これまでの結果から LPS/TLR4 シグナル下流の NF- κ B 活性化経路において、STAP-2 が何らかのシグナル伝達分子と相互作用している可能性が考えられた。そこで、HEK293T 細胞に STAP-2 及び TLR4 下流の様々なシグナル伝達分子 (IRAK1、TRAF6、MyD88、IKK- α 、IKK- β) を発現させ、免疫沈降法にてそれぞれ相互作用の有無を解析した (図 3)。すると STAP-2 は、MyD88、IKK- α 及び β と相互作用することが明らかとな

った。また、ヒト単球系細胞株 THP-1 を PMA 処理によりマクロファージに分化させ、内因性 STAP-2 で免疫沈降すると IKK- β との会合が確認できた (図 3B)。さらに図 3C に示すように STAP-2 非存在下では、IKK- β の免疫沈降物には MyD88 が観察されないが、STAP-2 存在下では IKK- β を免疫沈降すると MyD88 が共沈することが観察できた。これらの結果より STAP-2 は、TLR 4 下流の MyD88 と IKK- β との間のシグナル伝達の仲介を成す分子であることが考えられる。

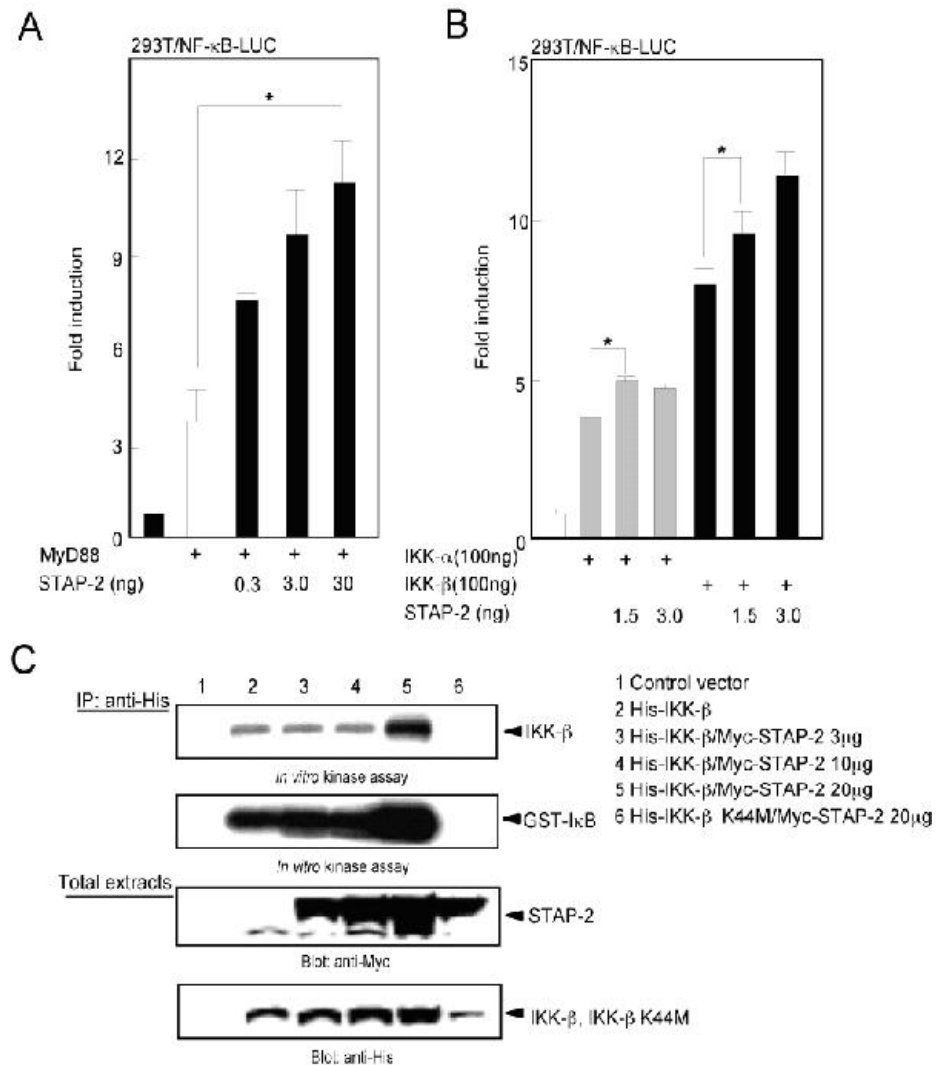
図 3



MyD88、IKK- β を介した NF- κ B 転写活性化への STAP-2 の影響

293T 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイにおいて、転写因子 NF- κ B の活性化が MyD88、IKK- α/β の発現により上昇することが観察できる。ここに STAP-2 を共発現させることで、NF- κ B の活性化はその用量依存的にさらに増強することが確認できた (図 4A、B、* : $P < 0.05$)。さらに、NF- κ B の活性化に必要な IKK- β のキナーゼ活性に対する STAP-2 の影響を検討した。in vitro キナーゼアッセイを行ったところ、STAP-2 の用量依存的に IKK- β のキナーゼ活性が増強し、基質である IKK- β のリン酸化が亢進することが確認できた (図 4C)。これより、STAP-2 は MyD88、IKK- β を介した NF- κ B の転写活性化を亢進し、それは IKK- β のキナーゼ活性を増強させることによることが示唆された。

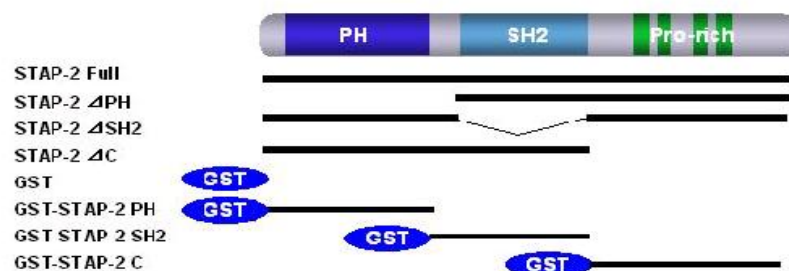
図 4

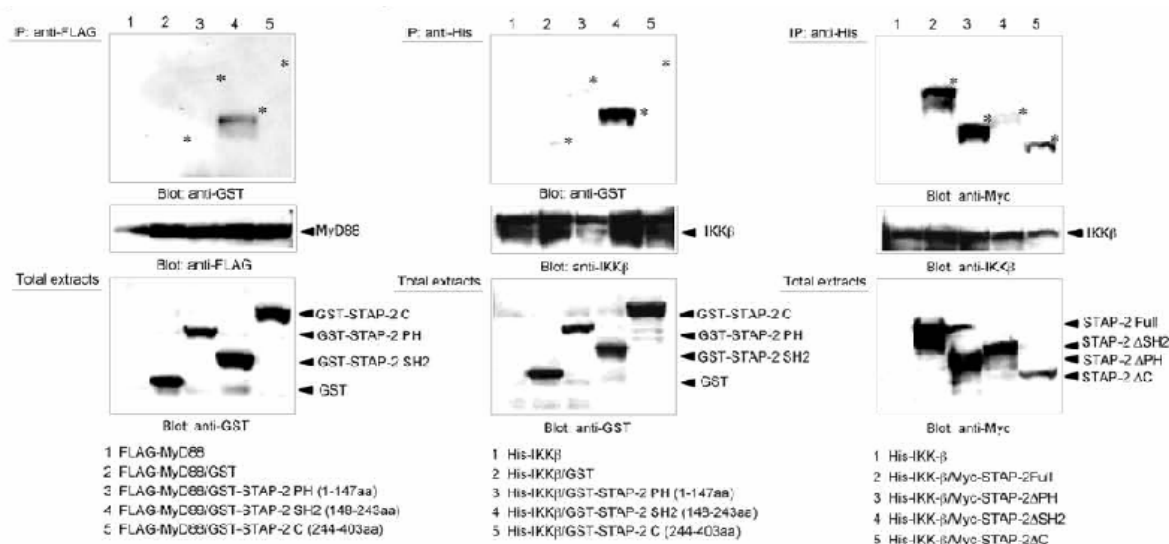


STAP-2 SH2-like ドメインを介した MyD88、IKK-β との相互作用

続いて、STAP-2 の構造の中で MyD88 や IKK-β と相互作用するのに必要なドメインを同定するため、下図のような STAP-2 変異体を用いて免疫沈降法により解析を行った。293T 細胞に各種タンパクを発現させ免疫沈降しウェスタンブロット法により解析すると、MyD88、IKK-β とともに STAP-2 の SH2 ドメインを介して結合していることが明らかとなった (図 5)。

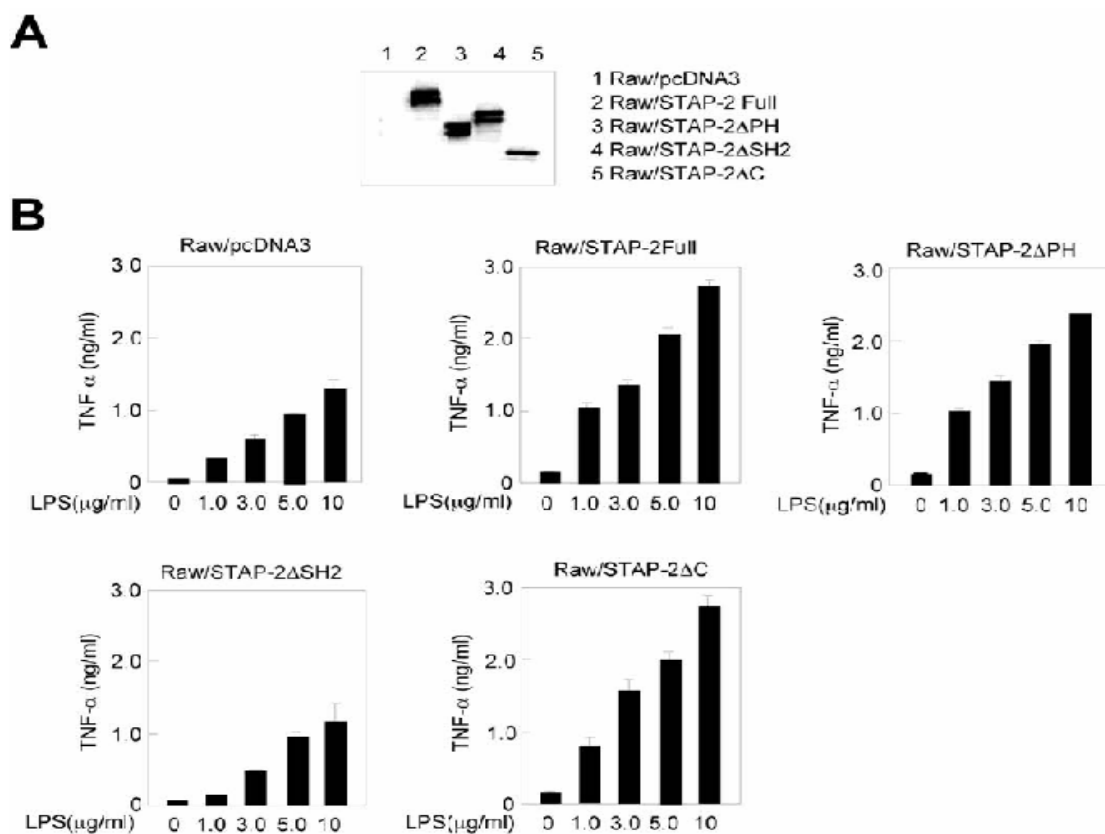
図 5





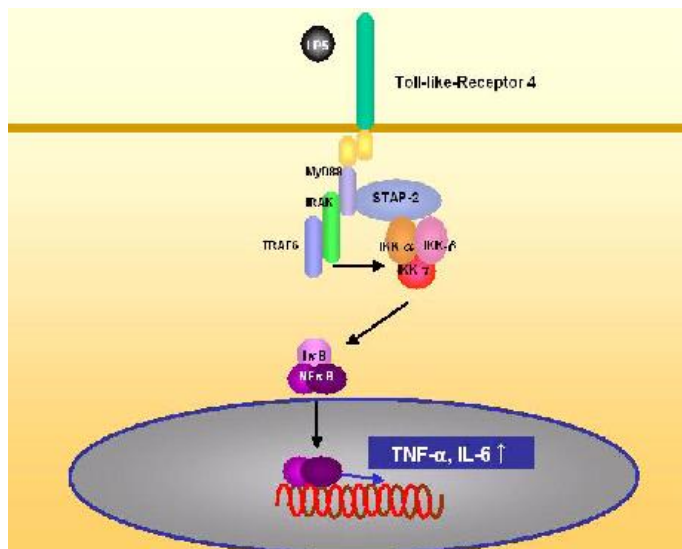
そこで、この SH2 ドメインが TLR4 シグナル経路の活性化に重要であるか、STAP-2 各種欠失変異体を恒常的に発現する Raw 細胞を樹立し(図 6 A)、LPS 刺激によるそれぞれの TNF- α 産生量を指標に比較した。すると、STAP-2 Full、 Δ PH、 Δ C を発現している Raw 細胞では TNF- α 産生量が増加することが確認できた。しかし、MyD88、IKK- β との結合に重要な SH2 ドメインを欠失した STAP-2 Δ SH2 を恒常的に発現させた Raw 細胞では、LPS による TNF- α の産生量はコントロール細胞と同程度まで低下していた (図 6 B)。これより、STAP-2 はその SH2 ドメインを介して機能的に LPS/TLR4 シグナルの活性化に寄与していることが示された。

図 6



考察

LPS/TLR4 シグナル経路において、これまでに MyD88、IRAK、TRAF6 を介した IKK の活性化経路が報告されている。本研究では LPS/TLR4 シグナルにおいて IRAK、TRAF6 を介さずに MyD88 が STAP-2 を介して直接 IKK β をリクルートして活性化させる経路が存在することが示唆された。つまり、STAP-2 は MyD88 と IKK- β のリンカーとして機能し、そのシグナルを正に制御する分子であると考えられる。そして LPS/TLR4 シグナルの活性化には STAP-2 の SH2 ドメインが重要であることが示された。



炎症反応においてマクロファージは、IL-1、IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインを産生し、外来病原体の排除機構の活性化に重要な役割を担っている。炎症反応時におけるマクロファージやその他免疫細胞の活性制御に、新規アダプター分子 STAP-2 がその活性調節分子として機能していることは明白である。つまり、STAP-2 は自然免疫系・獲得免疫系シグナル間クロストークの中核を担う、非常に多機能な新規分子であることが示唆される。今後、より詳細なメカニズムの解析により、自然免疫、獲得免疫の活性制御機構の解明につながると考えられる。