

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

関根 勇一 [北海道大学大学院薬学研究院／助手]

背景・目的

新規アダプター分子STAP-2はそのPH、SH2-like、プロリンリッチドメインを有するユニークな分子構造をしており、細胞内局在も細胞質から核へと広く分布している。STAP-2がサイトカインシグナル(獲得免疫系)と、病原体などを認識する(自然免疫系)抗原レセプターシグナルを制御することから、免疫系シグナル間クロストークの中核を担う新たな分子であることが示唆されている。本申請研究においてはSTAP-2の免疫機能への関与を、STAP-2KOマウスを用いることにより更なる解析を行うことを目的とする。

内容・方法

病原体等の感染による免疫応答として炎症性サイトカインが產生されることが知られている。そこでマウス腹腔マクロファージを採取し、グラム陰性菌細胞外膜の構成成分であるリポポリサッカライド(LPS)で刺激した。野生型(WT)およびSTAP-2ノックアウト(KO)マウスから分離した腹腔マクロファージの炎症性サイトカイン產生量をELISA法により、炎症性サイトカインmRNA量をRT-PCR法により比較した。また、LPS腹腔投与による血中サイトカイン量をELISA法により解析した。

LPSによる刺激はToll様受容体(TLR4)を介して細胞内に伝えられることが知られている。そこで細胞内シグナルにおけるSTAP-2の機能的作用の解析を、免疫沈降法、ウェスタンプロット法、レポーター遺伝子アッセイ、キナーゼアッセイなどにより詳細に解析しそのメカニズムを明らかにした。

結果・成果

LPS/TLR4シグナルにより誘導される炎症性サイトカインの产生にSTAP-2が関与しているか検討した。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で刺激すると時間依存的にTNF- α の产生が確認されるが、STAP-2KO腹腔マクロファージではその产生量が顕著に減少していた。また、LPSの用量依存的に产生されるTNF- α 、IL-6の产生も減弱していることが分かった。さらにLPS刺激によるTNF- α 及びIL-6のmRNA誘導もSTAP-2KOマクロファージでは減少していた。続いて、LPS腹腔投与により誘導产生される血清中のTNF- α 量もSTAP-2KOマウスでは顕著に減弱していた。これらのことからLPS/TLR4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。

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I κ Bのリン酸化を指標に検討した。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キナーゼ経路のp38、JNKのリン酸化は両者で差が見られなかった。

次にSTAP-2を恒常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产生量を比較した。すると、予想通りTNF- α 、IL-6ともに产生量がSTAP-2発現株で増強した。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うと、STAP-2発現細胞株LPS刺激によるNF- κ BのDNA結合量の増強が観察された。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。

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を発現させ、免疫沈降法にてそれら相互作用の有無を解析した。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。さらに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IKK- β を免疫沈降するとMyD88が共沈することが観察できた。また、ヒト単球系細胞株THP-1において内因性STAP-2とIKK- β との会合が確認できた。これらの結果よりSTAP-2は、TLR4下流のMyD88とIKK- β との間のシグナル伝達を仲介する分子であることが考えられる。

また、ルシフェラーゼアッセイにより、MyD88、IKK α/β の発現により上昇するNF- κ Bの活性化がSTAP-2を共発現をさせることで、NF- κ Bの活性化はさらに増強することが確認できた。さらに、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することが確認できた。

今後の展望

本研究で、マクロファージにおけるSTAP-2がLPS/TLR4シグナルの調節因子であることが明らかとなった。これまでの研究成果から、STAP-2は様々なサイトカインシグナルの調節因子であることが分かっている。今後はT細胞、B細胞、肥満細胞など他の免疫担当細胞でのSTAP-2の機能的役割を詳細に解析することで、免疫疾患の病因解明につながると考えられる。