

自然免疫系の活性化とその制御の分子機構

研究課題名：自然免疫による微生物認識の分子機構の解明

九州大学大学院医学研究院 助教授
牟田 達史

● はじめに

全ての多細胞生物に普遍的に存在する自然免疫では、それぞれ固有のゲノム内に含まれる限られた数の遺伝子を用いて多彩な感染微生物に対応するため、微生物に共通に存在する分子のパターンを認識することにより活性化する。近年の哺乳動物におけるToll-like receptor (TLR)の発見とその機能解析により、様々な微生物由来成分がそれぞれ特異的なTLRを活性化することが明らかになった。高次の生体防御機構である適応/獲得免疫をもつ脊椎動物でも、体内に侵入した病原菌を最初に認識、応答するのは単球、マクロファージ、樹状細胞などの自然免疫担当細胞であり、微生物由来成分によって活性化されたこれらの細胞は、抗菌物質、ケモカイン、細胞接着因子などを産生するとともに、サイトカインや副刺激分子の発現を介して、T細胞、B細胞による獲得免疫系の発動を制御する。

こうした炎症反応は感染防御に必須であるが、その過剰な反応は、敗血症に代表される全身性炎症反応症候群などのホストの生命の危機をもたらす病態を惹起する危険性をもつため、厳密な制御を受ける必要がある。我々は、自然免疫の活性化時に誘導される新規遺伝子産物を同定し、この分子が炎症反応制御について非常に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

● 研究結果と考察

我々は、自然免疫系の強力な活性化剤であるグラム陰性菌由来のリポ多糖(LPS)でマクロファージを刺激した際に誘導される分子を検索し、非刺激の細胞ではほとんどその発現が観察されないが、LPS刺激によって強く誘導される新規分子を見出し、IkB- ζ (zeta)と命名した。この分子はC末端側にIkBタンパク質ファミリーにみられるアンキリンリピート構造をもつが、そのN末端側は、既知のタンパク質と同一性を示さない。典型的なIkBタンパク質と異なり、核内に局在するIkB- ζ は、炎症応答において中心的な役割を果たす転写因子nuclear factor- κ B (NF- κ B)のp50サブユニットとそのC末端側を介して結合し、その転写活性を阻害することが当初の解析によって示された。

IkB- ζ は、LPS刺激のみならず、ペプチドグリカン、CpG DNAなどのTLR刺激物質、さらにはインターロイキン(IL)-1 β による刺激によっても強く発現が誘導された。一方、同様にNF- κ BやMAPキナーゼが活性化される腫瘍壊死因子(TNF)- α 刺激の場合には、その誘導はほとんど見られなかった。IkB- ζ 誘導に関わる細胞内シグナル伝達系について検討したところ、この分子の誘導には、NF- κ B自身の活性が必須であることが示されたが、この活性のみでは十分ではないことが判明し、TLR、IL-1受容体に共通して存在する細胞内ドメインであるTIRドメインの活性化に由来する特異的なシグナルの存在が示唆された。IkB- ζ のプロモーター解析、あるいはnuclear run-on assayによる転写量の測定の結果、LPS、IL-1 β 、TNF- α いずれの刺激でもIkB- ζ 転写活性の増強が認められるものの、刺激に対する特異性はみられなかった。従って、IkB- ζ の刺激特異的な誘導には転写後修飾の関与が示唆された。その後の解析により、LPSやIL-1 β 刺激特異的にIkB- ζ mRNAの分解速度が低下し、安定性が著しく上昇していることが判明した。IkB- α mRNAについては、刺激による安定性の変化は認められず、この安定化はIkB- ζ mRNAに特異的であることが明らかになった。

他のタンパク質と同一性を示さないIkB- ζ のN末端側の機能について検討した結果、まず、この領域内に核移行シグナル(NLS)が存在することが明らかになった。さらに、各種IkB- ζ 断片を、GAL4のDNA結合ドメインとの融合タンパク質としてHEK293細胞に発現させ、その転写活性化能をGAL4レポーターを用いて測定することにより、転写活性化活性について検討した結果、IkB- ζ 分子内部断片に活性が検出された。この領域の示す活性は、全長のIkB- ζ には検出されず、分子内の相互作用によりこの活性が抑制されていることが示唆された。このIkB- ζ の転写活性化活性発現機構について検討したところ、転写活性をもたないNF- κ B p50サブユニットのGAL4融合タンパク質を、全長のIkB- ζ と共発現した際に、転写活性が検出されるようになることを見出した。従って、IkB- ζ の転写活性化能は、NF- κ Bとの結合を介した構造変換によって発揮されると考えられた。

実際の遺伝子の転写に及ぼす影響を調べるため、繊維芽細胞やマクロファージにレトロウイルス発現系を用いてI κ B- ζ を過剰発現したところ、LPS刺激に伴うIL-6の産生が亢進する一方、TNF- α の産生が抑制されることを見出した。従ってこの分子は、転写を正と負の双方向に制御する二面性をもった転写制御因子であると考えられた。

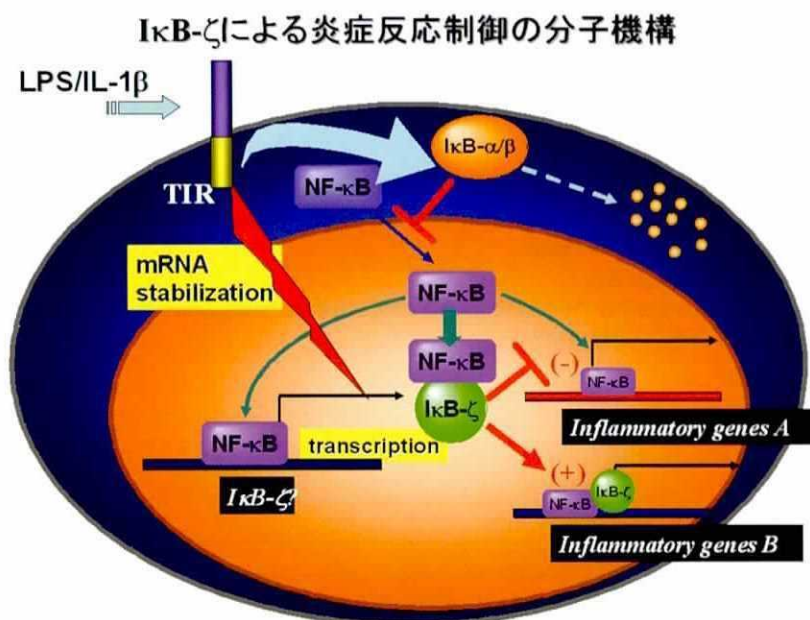
さらに、I κ B- ζ の生体内での機能を明らかにする目的で、大阪大学の審良教授のグループと共同でI κ B- ζ 遺伝子欠損マウスを作製した。このマウス由来の細胞の自然免疫応答について検討したところ、LPSや他のTLR刺激物質による刺激、あるいはIL-1 β 刺激に対するIL-6 mRNAの誘導がほとんどみられないことが判明した。一方、TNF- α 刺激に伴うIL-6産生は正常であった。さらにこの細胞では、IL-6のみならず、IL-12や、granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)などを含む一群のLPS誘導性の遺伝子の発現が著しく障害されていることが判明し、I κ B- ζ は自然免疫活性化時におけるこれらの遺伝子発現に必須の因子であることが明らかになった。

また、上述の如く、NF- κ B p50サブユニットとの相互作用によってI κ B- ζ の転写活性化能が生じることが示されていたが、実際に、p50サブユニット遺伝子欠損細胞では、LPSやIL-1 β 刺激依存的なIL-6産生が著しく低下しており、この因子がI κ B- ζ の機能発現に必須であることが判明した。

さらに、LPS投与後のマウス個体レベルでのサイトカイン産生について検討したところ、IL-12の産生は減弱しているものの、IL-6の産生は正常マウスと遜色なかった。この時、TNF- α の産生が著しく亢進しており、この過剰なTNF- α によってI κ B- ζ 非依存的なIL-6産生が亢進し、見かけ上正常なIL-6産生がみられることが明らかになった。

以上の結果より、生体内でも、I κ B- ζ はNF- κ B p50サブユニットと協調しつつ、一連の炎症応答遺伝子の誘導に必須の役割を果たす一方、転写の負の制御にも関わる二面性をもつ因子であることが明らかになった。

I κ B- ζ は、異なる遺伝子に対して正と負の全く逆方向の転写制御を行う。I κ B- ζ の作用を決定する遺伝子上の構造について検討したところ、I κ B- ζ によって転写が亢進するヒト β -ディフェンシン-2のプロモーターにおいて、I κ B- ζ の作用には、NF- κ B結合配列が必須であることが判明したが、この配列のみによって構成されるプロモーターに対しては、I κ B- ζ は抑制的に機能することが明らかになった。プロモーター上の他の配列の影響について調べたところ、この配列に加えて、その下流にあるC/EBP (NF-IL6) 結合配列様の配列がI κ B- ζ による転写亢進に重要であることが明らかになった。こうした配列とそこに結合する因子の有無が、I κ B- ζ による転写制御の方向性を決定しているものと思われる。



以上の結果より、I κ B- ζ は、自然免疫活性化時に、NF- κ B活性化と特異的なmRNA安定化を介して細胞内に出現する分子であり、この分子は、NF- κ Bやその他の因子との相互作用を介して、ある一群の遺伝子の転写の充進に必須な役割を果たす一方、別の遺伝子群の転写に対しては抑制的に機能する二面性をもち、炎症の方向性を左右する極めて重要な因子であることが判明した。

● 今後の展望

I κ B- ζ を介した転写制御の分子機構について解明するとともに、この因子によって制御を受ける遺伝子群の機能の同定を介して、高次の生命反応におけるI κ B- ζ の生理機能について明らかにしたい。また、こうした解析を通じ、自然免疫系の活性化とその制御の恒常性維持における重要性とその破綻による病態との関連にも迫りたい。

主要業績リスト

- Yamazaki, S., Muta, T., Matsuo, S., and Takeshige, K.:
Stimulus-Specific Induction of a Novel NF- κ B Regulator, I κ B- ζ , via Toll/Interleukin-1 Receptor Is Mediated by mRNA Stabilization.
J. Biol. Chem. Papers in Press. Published on November 2, 2004 as Manuscript M409983200
- Fujimoto, T., Yamazaki, S., Eto-Kimura, A., Takeshige, K., and Muta, T.:
The Amino-terminal Region of Toll-like Receptor 4 Is Essential for Binding to MD-2 and Receptor Translocation to the Cell Surface.
J. Biol. Chem. 279, (46), 47431-47437, (2004)
- Yamamoto, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Takeuchi, O., Takeshige, K., Saitoh, T., Yamaoka, S., Yamamoto, N., Yamamoto, S., Muta, T., Takeda, K., Akira, S.:
Regulation of Toll/IL-1 Receptor-mediated Gene Expression by the Inducible Nuclear Protein I κ B- ζ .
Nature 430, (6996), 218-222, (2004).
- Muta, T., Yamazaki, S., Eto, A., Motoyama, M., and Takeshige, K.:
I κ B- ζ , a New Anti-inflammatory Nuclear Protein Induced by Lipopolysaccharide, Is a Negative Regulator for Nuclear Factor- κ B.
J. Endotoxin Res. 9, (3), 187-191, (2003).
- Eto, A., Muta, T., Yamazaki, S., and Takeshige, K.:
Essential Roles for NF- κ B and a Toll/IL-1 Receptor Domain-Specific Signal(s) in the Induction of I κ B- ζ .
Biochem. Biophys. Res. Commun. 301, (2), 495-501, (2003).
- Kataoka, K., Muta, T., Yamazaki, S., and Takeshige, K.:
Activation of Macrophages by Linear (3R3)- β -d-Glucans: implications for the recognition of fungi by innate immunity.
J. Biol. Chem. 277, (39), 36825-36831, (2002).
- Takaki, Y., Seki, N., Kawabata, S., Iwanaga, S., and Muta, T.:
Duplicated Binding Sites for (3R3)- β -d-Glucan in the Horseshoe Crab Coagulation Factor G: implications for a molecular basis of the pattern recognition in innate immunity.
J. Biol. Chem. 277, (16), 14281-14287, (2002).
- Muta, T., and Takeshige, K.:
Essential Roles of CD14 and Lipopolysaccharide-binding Protein for Activation of Toll-like receptor (TLR) 2 as Well as TLR4. Reconstitution of TLR2- and TLR4-activation by Distinguishable Ligands in LPS Preparations.
Eur. J. Biochem. 268, (16), 4580-4589, (2001).
- Yamazaki, S., Muta, T. and Takeshige, K.:
A Novel I κ B Protein, I κ B- ζ , Induced by Proinflammatory Stimuli, Negatively Regulates Nuclear Factor- κ B in the Nuclei.
J. Biol. Chem. 276, (29), 27657-27662, (2001).