

Regnase-1 の分解を介した I κ B kinase 複合体の TLR/IL-1R 誘導型サイトカイン mRNA 安定化制御機構の解明

本研究成果のポイント

- ◇ Regnase-1 の分解機構を解明
- ◇ I κ B kinase 複合体による Regnase-1 の分解を介した IL-6 mRNA 安定化を発見
- ◇ Regnase-1 の負のフィードバック機構を示唆

Toll-like receptor (TLR) は、病原体の感染を認識し、サイトカイン発現を介して、炎症応答を惹起することが知られています。TLRにより活性化された細胞内シグナルは、I κ B kinase 複合体の活性化による I κ B α リン酸化を介して NF- κ B の活性化を誘導し、IL-6 等の炎症性サイトカインの遺伝子発現を誘導します。加えて近年、私達は RNase である Regnase-1 が IL-6 など炎症性サイトカインの遺伝子 mRNA の不安定化を制御して炎症性疾患発症を抑制していることを明らかにしました。しかしながら、炎症期における転写後制御に Regnase-1 が関与しているかどうかは不明のままでした。

今回本研究グループは、I κ B kinase 複合体が炎症を調節する、新しいメカニズムを解明しました。それは、IL-1R や TLR 刺激に対し I κ B kinase 複合体が Regnase-1 をリン酸化し、ユビキチン-プロテアソーム分解経路により Regnase-1 を分解するというものです。その結果、IL-6 mRNA が安定化し、迅速な IL-6 産生につながります。また、Regnase-1 は、自身の mRNA を負に制御していることを発見し、IL-1R/TLR 刺激の負のフィードバックに Regnase-1 が関与していることが示唆されました。この新知見は、Regnase-1 をターゲットとした炎症性サイトカイン制御薬剤の開発に繋がる成果として期待されます。

この研究は最先端研究開発支援プログラム「免疫ダイナミズムの統合的理解と免疫制御法の確立」（中心研究者：審良静男教授 IFRc 拠点長）の支援を受けて行われました。

（研究の説明）

1. 背景

自然免疫は細菌、ウイルス、寄生虫といった感染病原体の初期認識ならびにその後の炎症反応の惹起や獲得免疫の誘導に重要な役割を果たしている生体防御メカニズムです。自然免疫において Toll-like receptor (TLR) は、病原体の感染を認識し、トリガーされた細胞内シグナルは、炎症性サイトカインの遺伝子を誘導します。その細胞内シグナル分子の1つである I κ B kinase 複合体 (NEMO-IKK α -IKK β 複合体) が I κ B α のリン酸化を誘導して転写因子である NF- κ B を活性化し、遺伝子発現を誘導します。この NF- κ B を介した転写制御は IL-6 等の炎症性サイトカインの遺伝子発現に必要不可欠であることが知られています。加えて近年、私達は RNase である Regnase-1 が IL-6 や IL-12 といった炎症性サイトカインの

遺伝子 mRNA の不安定化を制御して炎症性疾患発症を抑制していることを明らかにしました。しかしながら、炎症期における転写後制御に Regnase-1 が関与しているかどうかは不明のままでした。

2. 研究の成果

Regnase-1 の分解は、IL-1R や TLR 刺激後、数分で起こり、その時、Regnase-1 はリン酸化されて、ユビキチン化を受けていました (図 1A, B, C)。また、I κ B kinase 複合体の一部の IKK β によって Regnase-1 はリン酸化されていました。さらにプロテアソームによって Regnase-1 は分解されていました (図 1D)。次に I κ B kinase 複合体活性をコントロールしている複合体の一部の NEMO によって Regnase-1 の分解が制御されていることを NEMO 欠損細胞 (5R 細胞) を用いて確認しました (図 1E)。これらより IL-1R/TLR 刺激後、I κ B kinase 複合体は、Regnase-1 をリン酸化修飾した後、ユビキチン-プロテアソーム経路によって Regnase-1 を分解することが分かりました。

コントロール細胞 (RatI 細胞) では、刺激によって IL-6 mRNA は、安定化しているのに対し、NEMO 欠損細胞 (5R 細胞) では、刺激により IL-6 mRNA は不安定化しました (図 1D)。さらに、この NEMO 欠損による不安定化が Regnase-1 によるものかどうかを明らかにする目的で、I κ B kinase 複合体を介した Regnase-1 分解を抑制する変異遺伝子を Regnase-1 欠損細胞に導入した後、IL-1 β 刺激を行い、IL-6 mRNA の発現を検討しました。野生型の遺伝子を導入した細胞に比べて変異型の遺伝子を導入した細胞では IL-6 mRNA を抑制していました (図 2A)。これらより、IL-1R 刺激後の I κ B kinase 複合体は Regnase-1 の分解を介して IL-6 mRNA を安定化していることが分かりました (図 2B)。さらに、Regnase-1 の自身の mRNA を分解していることを確認しました。

3. 今後の期待

今回本研究グループは、I κ B kinase 複合体が炎症を調節する、新しいメカニズムを解明しました。それは、IL-1R や TLR 刺激に対し I κ B kinase 複合体が Regnase-1 をリン酸化し、ユビキチン-プロテアソーム分解経路により Regnase-1 を分解するというものです。その結果、IL-6 mRNA が安定化し、迅速な IL-6 産生につながります。(図 3)。また、Regnase-1 は、自身を分解し、IL-1R/TLR 刺激による負のフィードバックに関与していることを示唆しました。I κ B kinase 複合体は、様々な遺伝子発現を誘導することが知られています。今回、I κ B kinase 複合体の新しい作用である IL-6 mRNA 安定化は、他のサイトカイン mRNA でも同様の機構が存在する可能性があり、学術的新展開が予想されます。また、本研究による知見は、Regnase-1 をターゲットとした炎症性サイトカイン制御薬剤の開発に繋がる成果として期待されます。

(図)

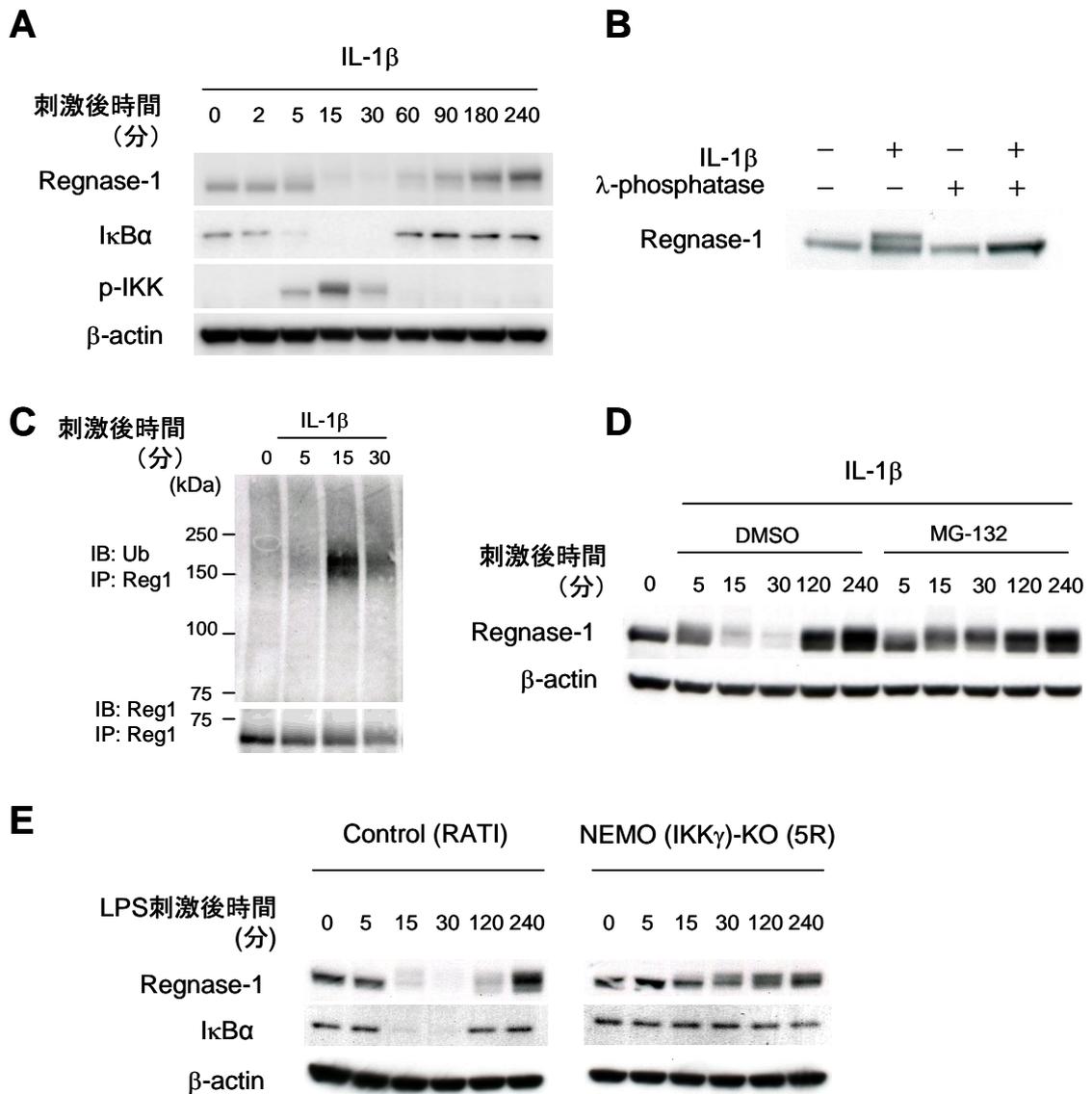


図1 IκB kinase 複合体を介したRegnase-1の分解

(A) IL-1β刺激後、Regnase-1は30分で分解される。(B) IL-1β刺激検体を脱リン酸化酵素 (λ-phosphatase) で処理した場合、上部のリン酸化バンドが消失している。(C) IL-1β刺激後、検体をRegnase-1抗体(Reg1)を使用して免疫沈降(IP)し、ユビキチン抗体(UB)を使用してRegnase-1のユビキチン化を免疫ブロット(IB)にて検出した。IL-1β刺激後、Regnase-1はユビキチン化を受けている。(D) プロテアソーム阻害剤MG-132存在下ではRegnase-1の分解が阻害されている。(E) IκB kinase 複合体の活性を制御しているNEMOを欠落した細胞 (5R 細胞) ではLPS刺激しても分解されない。

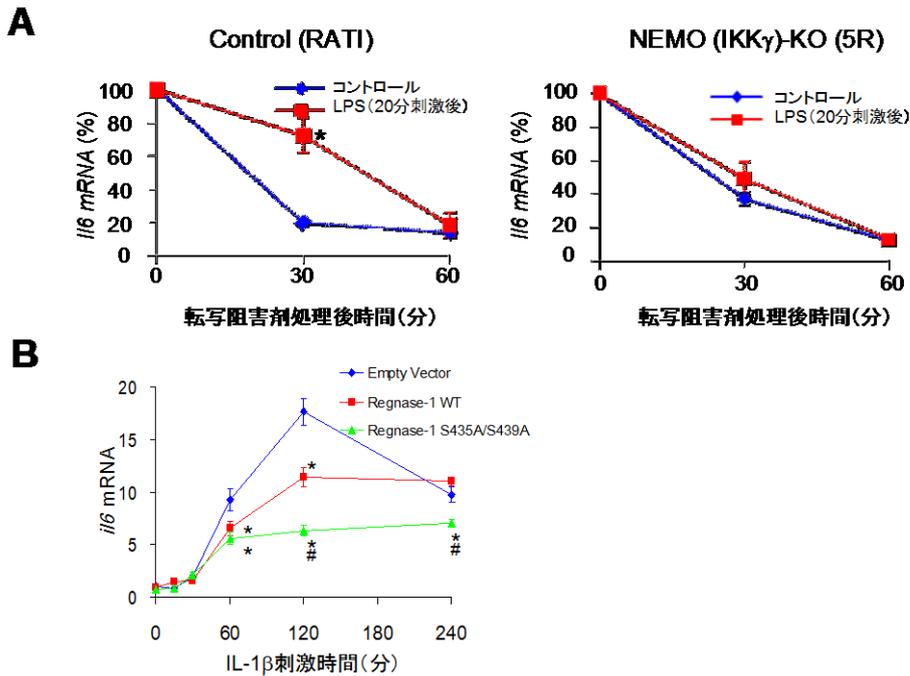


図2 I κ B kinase 複合体はIL-6 mRNAを安定化する

(A)NEMOが存在する細胞 (RATI細胞) では、LPS刺激後IL-6 mRNA は安定化する。一方、NEMOを欠落した細胞 (5R細胞) ではIL-6 mRNAは安定化しない。(B)I κ B kinase 複合体によって分解しないRegnase-1変異体(S435A/S439A)を導入した細胞では野生型(WT)を導入した細胞に比べてIL-6 mRNAの発現量が少ない。

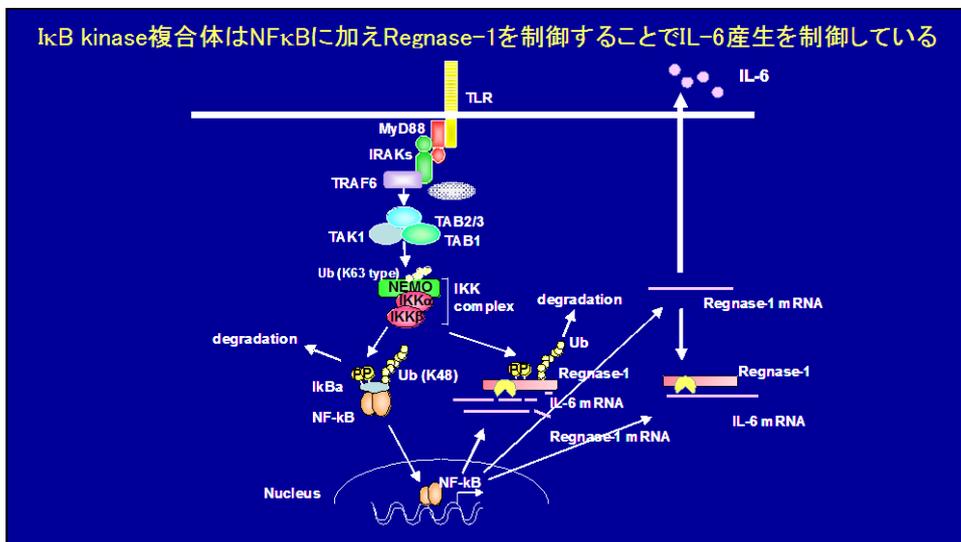


図3 I κ B kinase 複合体のIL-6 mRNA安定化メカニズム

IL-1RやTLR刺激によってI κ B kinase 複合体はRegnase-1をリン酸化し、ユビキチンプロテアソーム経路によりRegnase-1を分解する。その結果、IL-6 mRNAは安定化し、迅速なIL-6産生をおこす。