

**NF- κ B 活性化シグナルの新しい機構と
生理活性物質による制御**

平成 1 6 年度

高網 大士

本論文では、次の略語を用いた

AP-1: activator protein-1

BMM: bone marrow-derived macrophage

bp: base pair(s)

BSA: bovine serum albumin

DHMEQ: dehydroxymethylepoxyquinomicin

DN: dominant negative

EGFP: enhanced green fluorescent protein

EMSA: electrophoretic mobility shift assay

ERK: extracellular-related kinase

FBS: fetal bovine serum

FHA domain: fork-head associated domain

GST: glutathione S-transferase

h : hour(s)

I κ B: inhibitor of NF- κ B

IKK: I κ B kinase

IL: interleukin

IL-1R: IL-1 receptor

IL-1RAcP: IL-1R accessory protein

IRAK: IL-1R-associated kinase

ITAM: immunoreceptor tyrosine-based activation motif

JDP2: jun dimerization protein 2

JNK: c-Jun N-terminal kinase

LPS: lipopolysaccharide

LT: lymphotoxin

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MAPKK: MAPK kinase

MAPKKK: MAPKK kinase

MBP: maltose-binding protein

M-CSF: macrophage-colony stimulating factor

min: minute(s)

MKK: MAPK kinase

MM: multiple myeloma
MNC: multi-nucleated cell
MyD88: myeloid differentiation factor 88
MEF: mouse embryonic fibroblast
NEMO: NF- κ B essential modulator
NFAT: nuclear factor-activated T-cell
NF- κ B: nuclear factor- κ B
NGF: nerve growth factor
NIK: NF- κ B-induced kinase
OC: osteoclast
PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis
PBS: phosphate-buffered saline
PCR: polymerase chain reaction
Pellino: Pelle-interacting protein
RA: rheumatoid arthritis
RANK: receptor activator of NF- κ B
RANKL: RANK ligand
RHD: Rel homology domain
SDS: sodium dodecyl sulfate
sec: second(s)
T2BP: TRAF2-binding protein
TAB: TAK1 binding protein
TAK: TGF- β activated kinase
TIFA: TRAF-interacting protein with an FHA domain
TIR: Toll/IL-1R homologous region
TLR: Toll-like receptor
TNF: tumor necrosis factor
TPA: 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate
TRAF: TNF receptor-associated factor
TRAP: tartrate-resistant acid phosphatase
Ub: ubiquitin
XEDAR: X-linked ectodysplatin-A2 receptor

目次

第1章	序論	1
第2章	新規 NF- κ B 活性化因子 TIFA の同定と機能解析	11
第1節	概論	11
第2節	実験方法	13
第3節	実験結果	27
2-3-1	TRAF6 結合タンパク質 TIFA の同定	27
2-3-2	TIFA による NF- κ B と JNK の活性化	33
2-3-3	TIFA の自己凝集と TRAF6 の活性化	36
2-3-4	TIFA による TRAF6 と IRAK-1 の結合の増強	41
2-3-5	内在性 TIFA と TRAF6 および IRAK-1 との相互作用	44
2-3-6	TIFA による IRAK-1 と TRAF6 経路の IL-1 による NF- κ B 活性化	49
第4節	考察	53
第3章	破骨細胞分化における NF- κ B の役割	56
第1節	概論	56
第2節	実験方法	60
第3節	実験結果	70
3-3-1	マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 における(-)-DHMEQ による RANKL 誘導 NF- κ B 活性化の阻害	70
3-3-2	RAW264.7 細胞における(-)-DHMEQ による RANKL 誘導破骨細胞分化の阻害	76
3-3-3	マウス骨髄由来マクロファージ(BMMs)を用いた(-)-DHMEQ による RANKL 誘導 NF- κ B 活性化および JNK 活性化への影響	80
3-3-4	マウス骨髄細胞由来マクロファージにおける(-)-DHMEQ による RANKL 誘導破骨細胞分化の阻害	83
3-3-5	RANKL によって誘導される p52 の活性化と p100 の再誘導に与える (-)-DHMEQ の効果	89
3-3-6	RANKL 刺激による NFATc1 発現誘導に対する(-)-DHMEQ の影響	93
3-3-7	Jarkat 細胞における(-)-DHMEQ の NFATc1 活性化に与える影響	100

3-3-8 (-)-DHMEQ による成熟破骨細胞の骨吸収能の抑制 102

3-3-9 (-)-DHMEQ による LPS 誘導骨破壊モデルの抑制 105

第4節 考察 110

第4章 総括 114

第5章 参考文献 116

第6章 謝辞 133

第1章 序論

NF- κ B は、1986 年に Baltimore らによって B 細胞の免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子のエンハンサー領域に結合する核タンパク質として同定され、エンハンサー領域の B 断片に結合することから、nuclear factor κ B (NF- κ B)と名づけられた (1)。はじめは、NF- κ B は、B 細胞のみに特異的に発現していると考えられていたが、NF- κ B 同定後間もなく B 細胞以外の細胞の細胞質に NF- κ B が局在していることが明らかになった (2)。さらに、lipopolysaccharide (LPS)刺激によって、NF- κ B が活性化されることが示され (3)、現在では線維芽細胞や T 細胞を始めとしたさまざまな細胞で幅広く発現していることが知られている。NF- κ B は、DNA アフィニティカラムによって精製され、NF- κ B が 65 kDa のタンパク質 (p65/RelA)と 50 kDa のタンパク質 (p50)のヘテロ二量体であることが分かった (3)。また、B 細胞以外では、I κ B と呼ばれる阻害タンパク質と結合し、不活性な状態で細胞質に局在していることが知られている。

1990 年に、Baltimore と Israel の2つのグループによって p50 の cDNA クローニングがなされ (4, 5)、さらに、1991 年に p65 の DNA クローニングも Baltimore のグループによってなされ、その構造が明らかになった (6, 7, Fig. 1)。これらのタンパク質が、N 末端の約 300 アミノ酸がプロトオンコジーンである、*c-rel* やトリのレトロウイルスである *v-rel* の特定の領域で、約 60%程度の相同性を有していて、この領域を Rel homology domain (RHD)と呼んでいる。この RHD を有するタンパク質が同定され、これらのタンパク質がファミリーを構成していることが示された。今までに同定されている哺乳類の Rel family は、p50/p105、p52/p100 (8-10)、p65 (RelA)、RelB (11)、c-Rel (12)が知られている。これらの Rel ファミリーは、その N 末端に RHD を持っており、この領域で、DNA 結合やサブユニットの間での 2 量体形成や、I κ B との結合を行っていると考えられている (13)。

Rel ファミリーは、クラス I とクラス II の2つのサブクラスに分類される (14, Fig. 1)。クラス I は、p100、p105 でこれらの N 末端側は、それぞれ p52 あるいは p50 をコードしており、それぞれ p52 と p50 の前駆体であると考えられている。P100 および p105 は、C 末端側にアンキリンリピート (ARD)と呼ばれる 30 アミノ酸程度の繰返し配列があり、さらに、RHD と ARD の間にグリシンに富む領域 (glycin-rich hinge; GRH)を持っている。p100 および p105 は、ATP 依存性タンパク質分解酵素によって切断を受け、GRH 付近で切断され、p52 およ

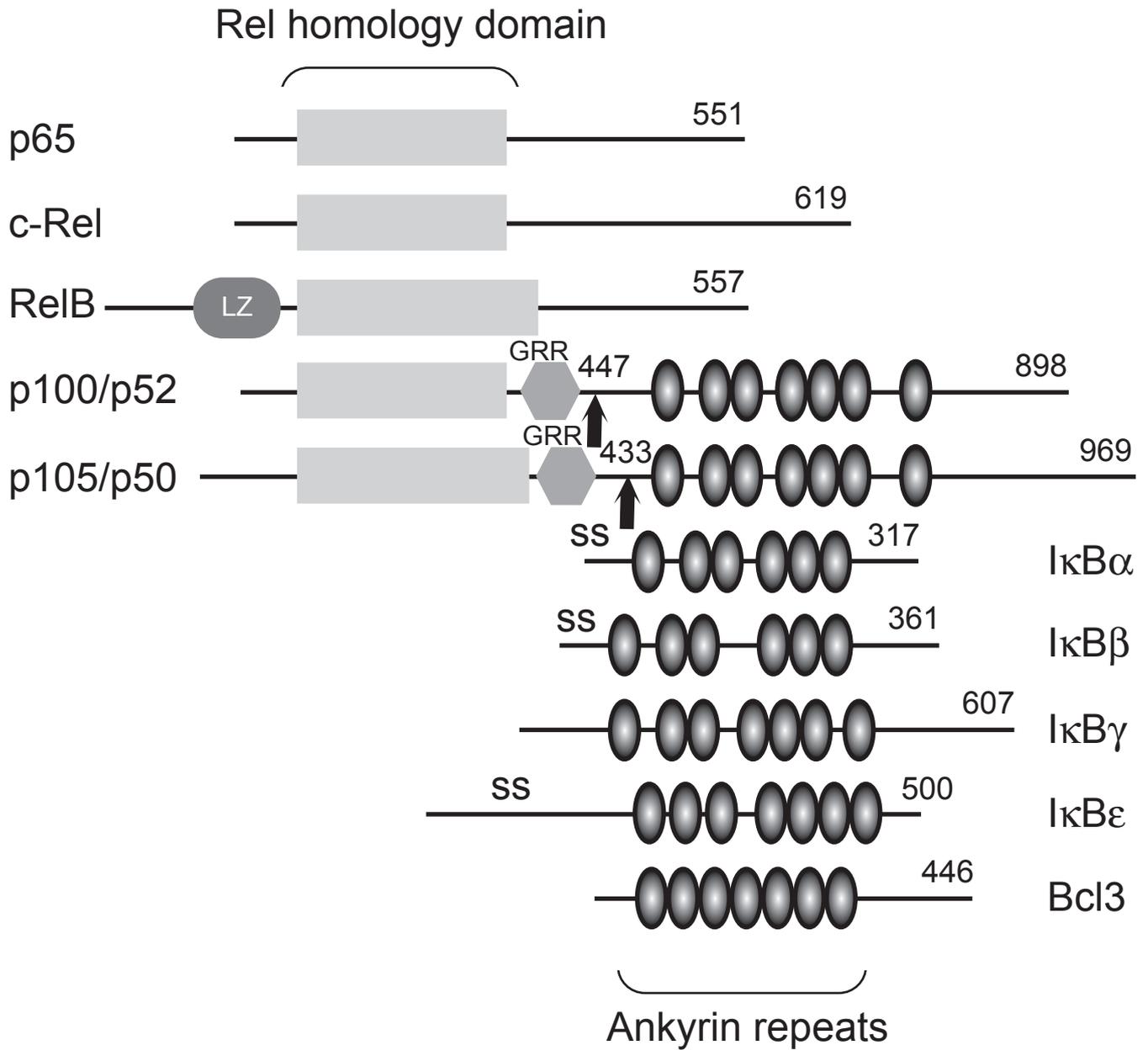


Fig. 1 Members of Rel and I κ B families. The number of amino acids in each protein is shown on the right. The arrows point to the endoproteolytic sites of p100/p52 or p105/p50: GRR, glycine-rich region; LZ, leucine zipper domain of RelB.

び p50 になる (15, 16)。p100 および p105 の C 末端部位の ARD は、I κ B ファミリーにみられる構造であり、I κ B 様の機能を有していることが報告されている (17-19)。また、p105 の N 末端部位は、alternative splicing また differential promoter usage によって I κ B- γ となる (20)。また、クラス II に含まれる p65、RelB、c-Rel は、N 末端側に RHD を有しているが、クラス I のように切断を受けない。C 末端側には、ARD が存在せず、transactivation domain として機能していて、Rel/NF- κ B の転写活性化をにんっていると考えられている。そこで、transactivation domain をもたない p50 や p52 のホモダイマーは、転写に抑制的に働いている (21-23)。

Rel ファミリーは、2つのサブユニットが結合し、ホモダイマーもしくはヘテロダイマーを形成して DNA に結合する。Rel ファミリーで、最も主要な組み合わせは、p65/p50 のヘテロダイマーであり、狭義において、NF- κ B は、p65/p50 のヘテロダイマーとされている。Rel ファミリーとしている知られている複合体は、その他に、c-Rel/p50 (24)、p50/RelB (11)、p52/RelB、p50/p52、p52/p65 (9) が報告されている。これらのさまざまな Rel 二量体は、それぞれ認識する κ B 配列が異なっており、そのため、数種類の κ B 配列が存在する (Table 1)。

Table 1 variation and sequence of κ B sites (25)

	Target gene	κ B site
Cytokine	interferon β (INF β)	GGGAAATTCC
	interleukin 1 (IL-1)	GGGAAATTCC
	interleukin 2 (IL-2)	GGGATTTCCAC
	GM-CSF	GGGAACTACC
	G-CSF	GGGGAATCTC
	TNF- α	GGGGCTTTCC
		GGGAATTCAC
Receptor	Lymphotoxin (LT)	GGGGCTTCCC
	immunoglobulin κ light chain	GGGACTTTCC
	IL-2 receptor α chain	GGGAATCTCC
	MHC class II (H-2K ^b)	GGGGATTCCCC
	T cell receptor β	GGGAGATTCC
	β 2 microglobulin	GGGACTTTCC
Viruse	HIV-1	GGGACTTTCC
	SV40	GGGACTTTCC
	CMV	GGGACTTTCC
	GGGGATTTCC	
	Adenovirus	GGGACTTTCC
		GGGAAGTACC
	common site	GGGRNNYYCC

κ B 配列は、半分に分けたうち 5' 側を A 配列、3' 側を B 配列と呼ばれていて (26)、p65/p50 ヘテロダイマーは、A 配列を p50 が、B 配列を p65 が認識することが知られている (27)。

NF- κ B の阻害タンパク質である I κ B も、Rel ファミリーと同様にファミリーを形成している (Fig. 1)。1988 年に Baeuerle のグループによって、preB 細胞株 70Z/3 細胞において、NF- κ B がなんらかのタンパク質と複合体を形成していて、不活化されていることが報告され、このタンパク質を I κ B と名づけられた (28)。この I κ B は、1990 年になって、Zabel らによってタンパク質精製され、I κ B に 37 kDa と 42 kDa の 2 種類あることが分かり、それぞれ I κ B- α と I κ B- β と名づけられた (29)。さらに、さまざまな I κ B が単離され、現在哺乳動物の I κ B として、I κ B- α 、I κ B- β 、I κ B- ϵ (14)、I κ B- γ (20)、I κ B- ζ (30)、Bcl-3 (31) が同定されている。I κ B ファミリーは、ARD を有しており、この ARD が Rel ファミリーの RHD と結合する。これらの I κ B は、それぞれ結合する Rel 二量体が決まっており、I κ B- γ や Bcl-3 は、p50 もしくは p52 のホモダイマーとしか結合できない (19, 32-36)。I κ B は、普通 Rel/NF- κ B を阻害する働きがあるが、Bcl-3 だけが、核内に存在し、p50 や p52 のホモダイマーと結合して、転写の促進を行うことが知られている (37, 38)。I κ B ファミリーの中でも、I κ B- α が主要な働きをしていると考えられており、p65/p50 ヘテロダイマーに結合することが知られている。中央に 5 回繰り返しの ARD を有し、ARD より C 末端側はプロリンやグルタミン酸、セリン、スレオニンに富む PEST 配列を持っている (39)。I κ B- α は、刺激を受けると 32 番目と 36 番目のセリン残基がリン酸化され (40)、さらに 21 番目と 22 番目のリジン残基がユビキチン化され (41)、26S プロテアソーム系によって急速に分解されることが分かっている (42-44)。I κ B- α は、プロモーター領域に κ B 配列を持ち、NF- κ B によって発現が誘導されることから、負のフィードバック機構として働き、NF- κ B の活性化を一過的なものとしている (45, 46)。I κ B- β は、構造的、機能的にも I κ B- α と類似であるが、刺激に対する応答が I κ B- α と違っている。まず、I κ B- β は、TNF- α や TPA の刺激で分解されない (47)。ただし、IL-1 や LPS 刺激では、I κ B- α に続いて、19 番目と 23 番目のセリンがリン酸化され、さらに、9 番目のリジンがユビキチン化され、分解される。I κ B- β は、I κ B- α のように NF- κ B により再合成されないため、持続的な NF- κ B の活性をもたらすことが分かっている。

NF- κ B の活性化の機構を Fig. 2 に示した。通常、NF- κ B は、I κ B と結合し、

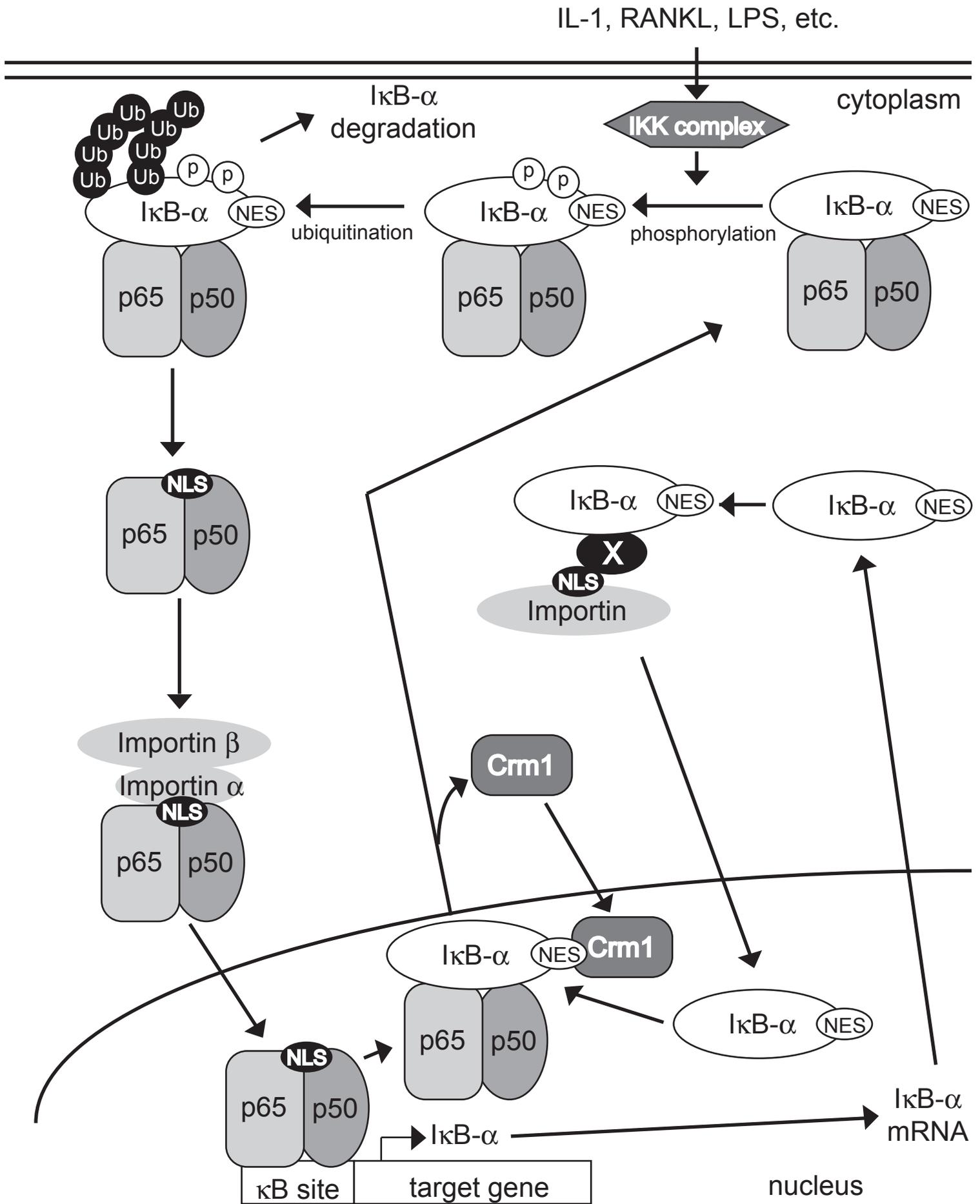


Fig. 2 Mechanism of NF- κ B activation. NLS, nuclear localization signal; NES, nuclear export signal; IKK, I κ B kinase; X, unknown protein.

不活性な状態で細胞質に局在している。このため、NF- κ B の核移行シグナル (NLS) が I κ B にマスクされているため、核移行できなくなっている (48, 49)。NF- κ B は、外的な刺激を受けると、I κ B リン酸化キナーゼである I κ B kinase (IKK) が活性化される。IKK は、タンパク質精製の手法により、700 kDa 以上の複合体として単離された (50)。さらに、その複合体の構成因子として、キナーゼ活性をになう IKK α および IKK β が 1997 年にクローニングされた (51-55)。また、IKK 複合体の調整因子と考えられる IKK γ (56) が、さらに同一のタンパク質として、NF- κ B essential modulator (NEMO, 57) が同定された。また、IKK-complex-associated protein (IKAP) など、IKK 複合体に含まれることが分かった (58)。IKK α 、IKK β は、アミノ酸配列で 52% の相同性があり、それぞれ単独で I κ B をリン酸化することができるが、細胞内ではヘテロ 2 量体で存在している。IKK は、リン酸化されることで活性化され、そのキナーゼとして NF- κ B inducing kinase (NIK, 59) や MEKK1 (60)、MEKK3 (61)、Akt (62, 63)、aPKC (64) などが報告されており、NIK は IKK α や IKK β をリン酸化し、MEKK1 は IKK β をリン酸化する。活性化 IKK は、I κ B のセリン残基をリン酸化する。すると I κ B に SCF (Skp/Cdc53/F-box protein) 複合体が I κ B に結合して E2 が I κ B をポリユビキチン化し、これを認識した 26S プロテアソームが I κ B を分解する (65)。I κ B が分解されることにより、NF- κ B の NLS が露出し、核移行し、標的遺伝子の κ B 配列に結合し、遺伝子の転写を誘導する。NF- κ B による転写は、転写の coactivator の CRE binding protein (CBP)/p300 依存性で、protein kinase A (PKA) によって p65 がリン酸化されることで、p65 と CRE/p300 複合体のコンフォメーションが変化し、転写が開始されることが分かっている (66, 67)。

NF- κ B と免疫、炎症反応は深い関連がある (Table 2, 3)。NF- κ B (68-73)、I κ B (74)、IKK (75-78) のノックアウトマウスは、免疫系に異常を示していることから、NF- κ B の重要性がしめされている。しかしながら、NF- κ B の恒常的な活性化は、慢性関節リウマチ、敗血性ショック、全身性エリテマトーデス (SLE) の原因となっていることが報告されている。また、抗炎症剤として使用されているアスピリンやサリチル酸が IKK に結合し、NF- κ B の活性化を阻害していること (79-81) や、免疫抑制剤である glucocorticoid が I κ B の高発現を誘導 (82)、もしくは、NF- κ B に結合して NF- κ B の活性化を阻害していることが報告されている (83)。したがって、NF- κ B 抑制剤は、抗炎症剤や免疫抑制剤として期待される。

また、NF- κ B は、癌においても重要であることが知られている。NF- κ B には、

cIAP-1、cIAP-2 や IXP といった inhibitor of apoptosis (IAP)を誘導して細胞死を阻害すること (84)や、抗癌剤によって NF-κB が活性化することが報告されており (85)、癌の抗癌耐性に NF-κB が関与していることが示唆される。また、膀胱癌や前立腺癌で、NF-κB が恒常的に活性化していることが報告されている (86, 87)。したがって、NF-κB 阻害剤は、抗癌剤としても有効に働くと考えられている。

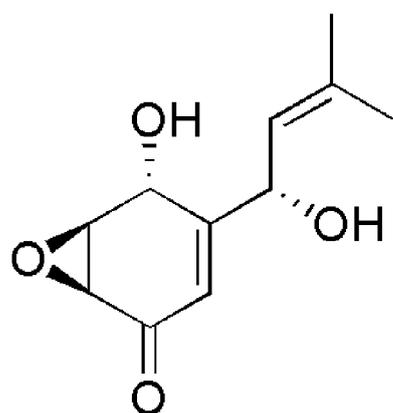
Table 2 Inducers of NF-κB (88)

Inducers
Cytokines
IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, LIF, THANK, TNF-α, TNF-β
Receptor ligand
CD40-ligand, CD2-ligand, Trail-receptor-1-ligand, Trail-receptor-2-ligand, Trail-receptor-4-ligand, RANK-ligand
Viruses
Adenovirus, Cytomegalovirus (CMV), Epatein-Barr Virus (EBV), HIV-1, Influenza virus
Viral products
Adenovirus 5: E1A, Adenovirus: E3/19K, CMV: iel, EBV: HBx, EBV: LMP, HIV-1: Tat, HTLV-I: Tax1, HTLV-II: Tax2, Influenza virus: Hemagglutinin, Parvovirus B19: NSI
Chemical agents
Anisomycin, Brefeldin, LPS, Calcium ionophores, Phorbol ester, PHA, Monensin, Okadaic acid, Vinblastine
Therapeutically used drugs
1-β-D-Arabinofuranosyl-cytosine, Anthralin, Camptothecin, Cisplatin, Daunomycin, Doxorubicin, Etoposide
Stress
UV, Hydrogen peroxide

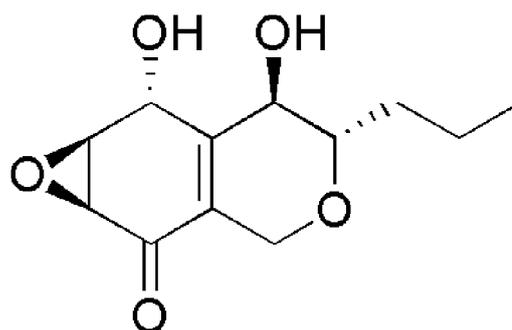
Table 3 Target gene of NF- κ B (88)

Gene
Cytokines
IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α , TNF- β
Immunoreceptors
Immunoglobulin ϵ heavy chain, Immunoglobulin κ light chain, MHC class I (H-2K ^b), MHC class I HLA-B7, β 2 Microglobulin, T-cell receptor β chain
Cell adhesion molecules
ELAM-1 (E-selectin), ICAM-1, MadCAM-1, P-selectin, VCAM-1
Acute phase proteins
Angiotensinogen, Serum amyloid A precursor, Complement factor B, Complement factor C4, LPS binding protein, Tissue factor-1
Stress response gene
Angiotensin II, COX-2, iNOS, phospholipase A2
Regulators of apoptosis
Bfl1/A1, Bcl-xL, cCD95 (Fas), Fas-ligand, IAPs, <i>IEX-1L</i>
Growth factors
G-CSF, GM-CSF, IGFBP-1, IGFBP-2
Transcription factors
<i>c-myc</i> , <i>c-rel</i> , IRF-1, IRF-2, I κ b α , <i>nfkb1</i> , <i>nfkb2</i> , p53
Viruses
HIV-1, SV40

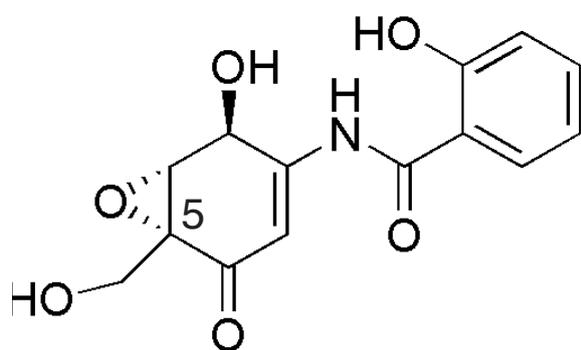
DHMEQ (Fig. 3)は、弱い抗菌活性を持つ物質 epoxyquinomicin C の骨格をもとに機能を持たせるように分子デザインし、合成された新規 epoxydone 化合物である。epoxyquinomicin A および B は、1996 年に *Amycolatopsis* に属する菌体の培養液から、弱い抗菌活性を示す物質として単離された (89)。その後、epoxyquinomicin C および D が、epoxyquinomicin A および B の類縁体として単離されたが、抗菌活性は見いだされなかった (90)。これら 4 つの化合物は、サリチル酸残基を持っていることから、タイプ II コラーゲンによって誘発される関節炎誘導モデルマウスを用いて、抗炎症活性を調べたところ、どの化合物も



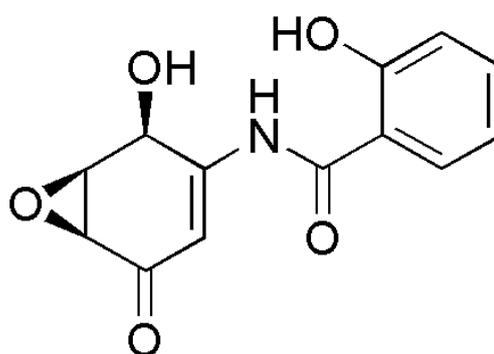
panepoxydone



cycloepoxydone



epoxyquinomicin C



(-)-DHMEQ

Fig. 3 Structures of panepoxydone, cycloepoxydone, epoxyquinomicin C, and (-)-DHMEQ.

抗炎症活性を示した (91)。なお、この際、マウスの体重に変化がみられないことから、生体内で毒性を示していないことも分かった。

Panepoxydone (92)や cycloepoxydon (93)といった、epoxydone 骨格を有する化合物が I κ B のリン酸化を阻害することで、NF- κ B の活性化を阻害することが報告されている。これらの化合物は、epoxyquinomicin C の構造に類似しているため、epoxyquinomicin 類に NF- κ B 阻害効果が期待されたが、NF- κ B を阻害する作用は見い出されなかった。そこで、当研究室において、panepoxydone や cycloepoxydon と、epoxyquinomicin C の構造的相関を高めるために、5 位のヒドロキシメチル基を除去した化合物 DHMEQ を分子デザインし、全合成を行った (94)。合成された DHMEQ は、マウスコラーゲン誘発関節炎モデルに対して、2-4 mg/kg の用量で抗炎症作用を示し、epoxyquinomicin 類よりもその作用は強かった (94)。さらに、DHMEQ は、ヌードマウスに移植した前立腺癌の増殖を抑制した (95)。また、ラットの腎炎モデルに対しても効果があることが示されている (96)。なお、これらのモデル動物において、毒性は示されていないことから、DHMEQ は、抗炎症剤、抗癌剤として有用である。さらに、従来 of NF- κ B 阻害剤が IKK をターゲットにしているのに対して、DHMEQ は、NF- κ B の核移行を阻害していることが分かった (97)。DHMEQ は、ラセミ体を主に用いていたが、キラルカラムクロマトグラフィ - をもちいて光学分割することに成功し、(-)-DHMEQ の方が、(+)-DHMEQ に比べ、活性が高く、以後は、(-)-DHMEQ を用いて研究が行われている (98)。

第2章 新規 NF- κ B 活性化因子 TIFA の同定と機能解析

第1節 概論

インターロイキン-1 (IL-1)は、転写因子 NF- κ B や AP-1 を活性化することによって、免疫、炎症反応を引き起こす主要なサイトカインの一つである (99)。また、Toll-like receptors (TLRs)も、さまざまな病原体を認識し、免疫、炎症反応を引き起こすのに必須なタンパク質として、注目されている (100)。したがって、Toll/IL-1 レセプターファミリーは、初期免疫応答から獲得免疫へ移行させるために、重要な働きをしている。Toll/IL-1 ファミリーによるシグナル伝達では、一般的には、MyD88 というアダプタータンパク質、IL-1 receptor-associated kinase (IRAK)ファミリー、さらには、tumor necrosis factor-associated factor 6 (TRAF6)を介して行われるが、TLR3 や TLR4 では、MyD88 非依存的な経路が存在する (101)。さらには、この TLR によるシグナル伝達は、*Drosophila* Toll レセプターから、広範にわたりさまざまな生物種で保存されている (100)。したがって、MyD88/IRAK/TRAF6 のシグナル伝達経路は、免疫、炎症反応において、必須なタンパク質系列と言える。

IL-シグナル (Fig. 4)は、まず、そのリガンドがレセプターに結合し、IL-1 レセプターとそのアクセサリタンパク質 (IL-1RAcP)が複合体を形成することによって、開始する。さらに、細胞質タンパク質 MyD88 (102, 103)および Tollip (104)が、レセプター複合体に、引き寄せられる。続いて、MyD88 が IRAK ファミリーである、IRAK-1、IRAK-2、IRAK-M (102, 105, 106)、および IRAK-4 (107)を引き寄せる。この MyD88 と IRAK ファミリーの結合は、death domain を介した相互作用による。さらに、IRAK-1 は、IRAK-4 によってリン酸化されることで活性化し、レセプター複合体と離れ、TRAF6 と結合する。引き続いて、TRAF6 は、transforming growth factor β -activated kinase (TAK1)を活性化し、活性化された TAK1 は、IKK、p38、c-Jun N-terminal kinase (JNK)の活性化を誘導することにより、NF- κ B や AP-1 といった転写因子を活性化する (108)。IRAK ファミリーの全てのタンパク質が、細胞内で過剰発現させると NF- κ B の活性化を引き起こす。しかしながら、IRAK-4 のキナーゼ活性のみが、NF- κ B の活性化に必要で、また、IRAK-4 は、IRAK-1 のリン酸化を引き起こすことが *in vitro* で確かめられている (107)。さらに、IRAK-1 ノックアウト細胞に、IRAK-1、IRAK-2、IRAK-M を導入すると、IL-1 によって誘導される NF- κ B 活性化が戻るが、IRAK-4

を導入してもその活性化は戻らない。したがって、IRAK-4 は、IRAK-1 の上流に位置し、刺激依存的に IRAK-1 をリン酸化することによって、シグナルを伝達すると考えられる。TRAF-6 ノックアウトマウスは、IL-1 シグナル伝達が誘導できない (109, 110)。さらに、TRAF6 は、人為的に多量体形成を行った場合には、IL-1 刺激に関係なく TAK1 の活性化を行う (111, 112)。IRAK-1 と TRAF6 は、Toll/IL-1 シグナルでなくてはならない因子であるが、その分子機構、つまり、どうやって TRAF6 と IRAK-1 が結合し、受容体複合体から離れるのか、また、どのようにして IRAK-1/TRAF6 複合体が下流のシグナルの活性化を行うのか、はよく分かっていない。

そこで、本研究において IL-1 シグナルで NF- κ B の活性化を誘導する因子の同定を、TRAF6 と IRAK-1 の結合、および活性化機構に焦点を絞って、試みた。

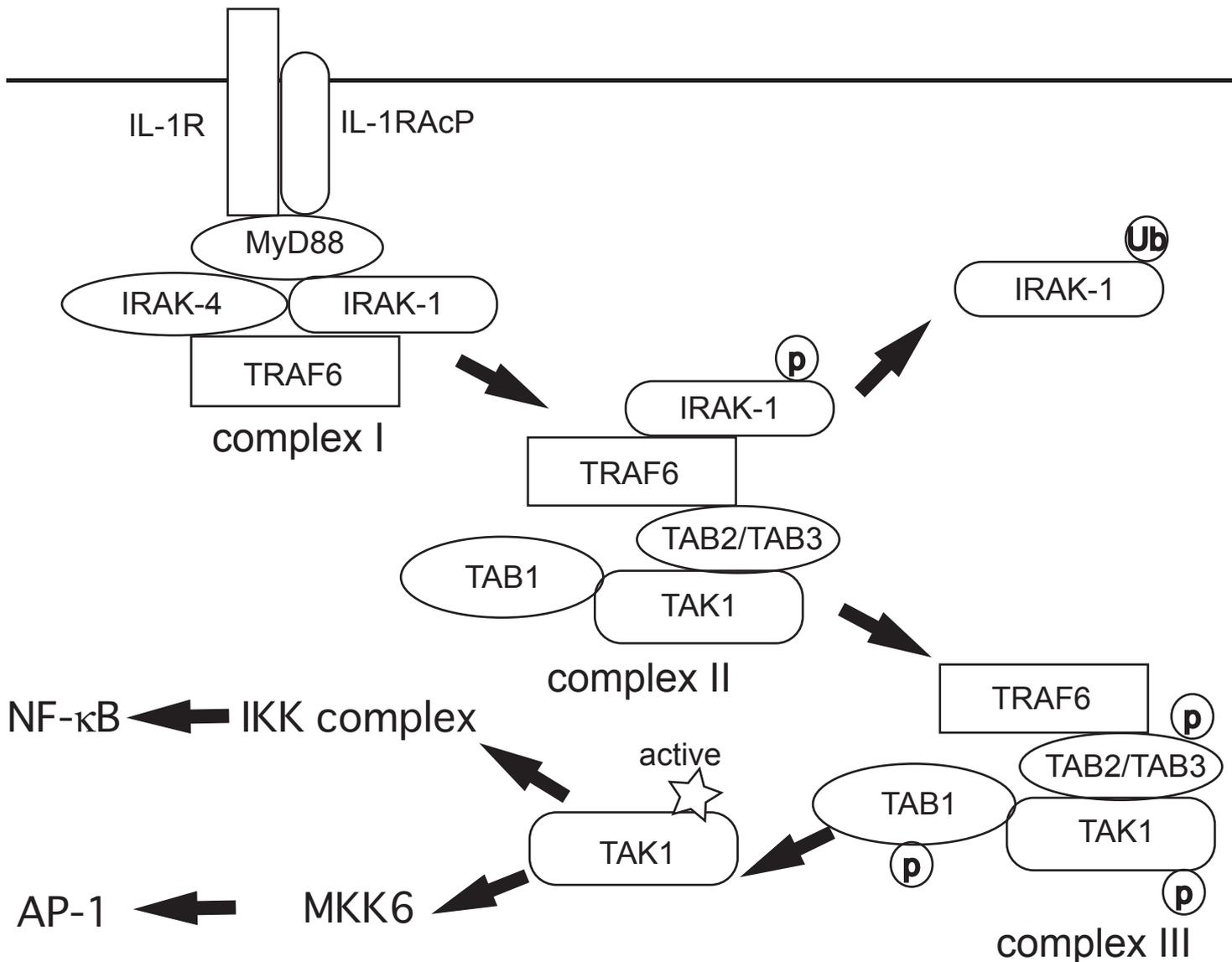


Fig. 4 Schematic model of IL-1 signal pathway

第2節 実験方法

2-2-1 細胞株

ヒト腎由来 293T 細胞	American Type Culture Collection (ATCC)より購入
ヒト肝由来 HepG2 細胞	ATCC より購入
マウス pre B 細胞由来 70Z 細胞	ATCC より購入
マウス胎児線維芽細胞 MEF 細胞	実験動物より分離

2-2-2 細胞培養

70Z 細胞の培養は次の通りに行った。培養液としては、55 ℃、30 分間加温することによって、補体成分を非働化した 10 % ウシ胎仔血清 (FBS; JRH Biosciences, Lenexa, KS) を含む Roswell Park Memorial Institute 1640 培地 (RPMI1640; 日水製薬株式会社: Tokyo, Japan) を用いた。さらに、濾過滅菌した 30 mg/l L-glutamine (Sigma: St. Louis, MO)、および抗生剤として 100 mg/l kanamycin (Sigma)、100 units/ml penicillin G (Sigma) を加えた。また、高温蒸気滅菌した炭酸水素ナトリウム (2.25 g/l) を加え、適切な pH に調整した。この培養液を用いて、37 ℃、5 % CO₂ 条件下のインキュベータ内で培養し、2~3 日に一回培地を交換することで、継代を行った。

293T 細胞、HepG2 細胞、および MEF 細胞は、10 % 非働化ウシ胎仔血清を含むダルベッコ変法イーグル培地「ニッスイ」(DMEM、日水製薬株式会社) に、濾過滅菌した 30 mg/l L-glutamine (Sigma)、100 mg/l kanamycin (Sigma)、100 units/ml penicillin G (Sigma) と、高温蒸気滅菌した炭酸水素ナトリウム (2.25 g/l) を加えたものを培養液とし、37 ℃、5 % CO₂ 条件下のインキュベータ内で培養した。2~3 日に一回培養液を除去したのち、PBS⁻ (8.0 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 0.916 g/l Na₂HPO₄, 0.2 g/l KH₂PO₄) で 2 回細胞を洗浄し、trypsin-EDTA 溶液 (8.0 g/l NaCl, 0.4 g/l KCl, 0.0475 g/l Na₂HPO₄, 0.06 g/l KH₂PO₄, 1.0 g/l glucose, 0.02 g/l phenol red, 0.35 g/l NaHCO₃, 0.2 g/l EDTA: pH 8.0, 0.75 g/ml trypsin) で細胞をはがし、継代を行った。

2-2-3 実験動物

ICR マウス (雌性、8 週齢) をチャールス・リバー (Yokohama, Japan) より購入した。

2-2-4 試薬

recombinant human interleukin-1 α (hIL-1 α) 大日本製薬(株)より購入
recombinant human tumor necrosis factor- α (hTNF- α ; #T0157) Sigmaより購入

2-2-5 試薬の調製および保存

試薬はすべて 0.5 %分を培地に添加した時に、目的濃度になるように調製した。

IL-1 α および TNF α は、0.05% BSA/PBS を用いて溶解し、1 mg/ml のストック溶液を作成し、-80 で保存した。また、RANKL は、同様にして、100 μ g/ml の濃度にて、M-CSF は、10 μ g/ml の濃度のストック溶液を作製し、-80 で保存した。

2-2-6 抗体

マウス由来抗 FLAG 抗体 (M2) Sigmaより購入
ウサギ由来抗 Myc 抗体 (C-19) Sigma Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)より購入
ウサギ由来抗 GST 抗体 免疫動物から作製、精製
ウサギ由来抗 MBP 抗体 免疫動物から作製、精製
マウス由来抗 T7 抗体 Novagen (Madison, WI)より購入
ウサギ由来抗 TRAF6 抗体 (H-274) Santa Cruz Biotechnology より購入
ウサギ由来抗 IRAK-1 抗体 (H-273) Santa Cruz Biotechnology より購入
ヒツジ由来 HRP 標識抗マウス抗体 (#NA931) Cell Signaling Technology (Beverly, MA)より購入
ヒツジ由来 HRP 標識抗ウサギ抗体 (#NA934) Cell Signaling Technology より購入

2-2-7 発現ベクター

TIFA は、N 末端に Flag、Myc および GST 融合タンパク質として、pME ベクターを用いて発現させた (113)。TIFA の欠損変異体は、PCR を用いて作製し、TIFA の点変異体は、Kunkel 法を用いて作製した。pME-FLAG-TRAF6 および

pME-FLAG-TRAF6-(275-530)は、前述した論文のものを用いた (114)。pME-IRAK1-(1-221)は、PCR 法を用いて、クローニングし、pME18S ベクターに組み込んだ。

pEF-MyD88 および pEF-MyD88-(152-296)は、大阪大学審良静男教授より、pEF-TLR4 および pEF-MD2 は、東京大学医科学研究所三宅健介教授より、pEF-TAK1、pEF-TAK1-(K63W)および pEF-TAB1 は、名古屋大学松本邦明教授より、pEF-IRAK1 は、大阪大学仲哲二博士より、3 x κ B-luc および 3 x M κ B-luc は、Wisconsin 大学宮本重規教授より、pEF-T7-JNK は、横浜市立大学大野茂男教授より、pEF-Ubc13 は、Texas 大学 Z. J. Chen 教授よりそれぞれ供与していただいた。

2-2-8 yeast-two-hybrid スクリーニング

2-2-8-1 フローチャート

マウス骨髄細胞からの mRNA の抽出 (2-2-8-2)

cDNA ライブラリーの合成 (2-2-8-3)

cDNA のベクターへの挿入とライブラリーの増幅 (2-2-8-4)

酵母への cDNA ライブラリーの導入 (2-2-8-5)

ポジティブクローンの選択 (2-2-8-6)

ポジティブクローンからのプラスミドの抽出と塩基配列の決定 (2-2-8-7)

2-2-8-2 マウス骨髄細胞 mRNA の精製

TRAF6 全長をコードする DNA 断片を、pGBT9 ベクターに組み込んだものを bait とした。また、15 匹の ICR マウス (8 週齢) の大腿骨から調製した骨髄細胞より total RNA を抽出し、Oligo dT-latex (第一化学薬品, Tokyo, Japan) により poly A RNA とした。

マウス骨髄細胞を PBS により、洗浄し、1,700 rpm, 4 , 7 分間遠心をし、上清を取り除いた。そこに、denaturing solution (4 M guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate: pH 7.0, 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol)を 5 ml 加え、2.5 ml

シリンジと 18 G 注射針を用いて十分に混合した。さらに、2 M NaOAc 0.5 ml、水飽和フェノール 5 ml、chloroform : isoamyl alcohol (49 : 1, by vol.) 1 ml を加え、転倒混和した後、氷中で、15 分間静置した。その後、3,000 rpm、4℃、20 分間遠心し、水層とフェノール層を分離し、水層のみを新しい 15 ml チューブに移した。そこに、100% ethanol を 10 ml 加え、-20℃ で、1 時間静置し、3,000 rpm、4℃ で、20 分間遠心した。上清を吸引除去し、denaturing solution を 0.3 ml 加え、沈殿物を溶かした後に、1.5 ml チューブに移し、さらに、100% ethanol を加えた。-20℃ で 5 分間静置した後に、15,000 rpm、4℃、10 分間遠心し、上清を吸引除去した。さらに、80% ethanol で wash した後、50 µl の蒸留水で沈殿物を溶かし、total RNA 溶液とした。

得られた、total RNA 210 µg / 100 µl に蒸留水 57.5 µl および 4 x elution buffer (40 mM Tris-HCl: pH 7.5, 4 mM EDTA, 0.2% SDS) 52.5 µl を加えた。さらに、Oligo-dT latex 210 µl を注加し、5 秒間ボルテックスし、65℃ で 5 分間反応させた。反応終了後、氷中で、3 分間急冷し、5 M NaCl 溶液を 42 µl 加え、5 秒間ボルテックスをした。37℃ で、10 分間反応させた後、15,000 rpm で 3 分間遠心し、上清を吸引除去した。沈殿物を washing buffer (10 mM Tris-HCl: pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.1 M NaCl) 500 µl で 2 回洗浄した。洗浄後の沈殿物に、蒸留水 210 µl 加え、65℃ で 5 分間静置し、氷上で、3 分間静置した。15,000 rpm で 3 分間遠心した後、その上清を 1.5 ml チューブに移した。そこに、2 M NaOAc 70 µl と、100% ethanol 800 µl を加え、ディープフリーザに 30 分間放置した。15,000 rpm 4℃ で、15 分間遠心し、残渣を 80% ethanol で洗浄した後、風乾し、蒸留水 30 µl で溶解し、poly A RNA 溶液とした。

2-2-8-3 cDNA ライブラリーの合成

このポリ A-RNA、HybriZAP-2.1XR Library Construction Kit (Stratagene, La Jolla, CA)、および HybriZAP-2.1XR cDNA Synthesis Kit (Stratagene)を用いて添付のプロトコルに従ってマウス骨髄細胞 cDNA ライブラリーを合成した。

Kit 添付 Buffer の組成については、Kit 添付のプロトコルに記載されているもののみ記す。1.5 ml チューブに 10 x first-strand buffer 5 µl, first-strand 5-methyl dNTP mix 3 µl, linker-primer 2 µl, DEPC-treatment water 20.8 µl, RNase blocker 1 µl を加え、前述した骨髄細胞由来 poly A RNA を 5 µg 添加し、室温で、10 分間放置した。さらに、kit に添付されている MMLV-RT 1.5 µl を添加し、37℃ で 1

時間加温した。氷上下、さらに、10 x second-strand buffer 20 μ l, second-strand dNTP mix 8 μ l, MQ 114 μ l, RNase 2 μ l, DNA polymerase I 11 μ l を加え、16 で 2.5 時間反応を行った。反応終了後、反応系を氷上に移し、blunting dNTP mix 23 μ l, cPfu DNA polymerase 2 μ l を添加し、72 で、30 分間反応させた。その後、室温まで冷却し、PhOH/CHCl₃ 200 μ l を加え、5 秒間ボルテックスをして、15,000 rpm, 2 分間遠心した。水層を新しい 1.5 ml チューブに移し、CHCl₃ 200 μ l 加え、ボルテックスをかけて、さらに遠心分離し、その水相をさらに新しいチューブに移した。3M NaOAc 20 μ l, 100% EtOH 400 μ l を加え、-20 で一晩静置した。15,000 rpm, 4 , 1 時間遠心分離し、その上清を吸引除去した。さらに、70% EtOH 500 μ l 加え、ボルテックスをしたのち遠心を行い、その上清を吸引除去した。沈殿を風乾したのち、EcoRI adaptors 9 μ l を加え、4 で 30 分間かけて、沈殿を完全に溶解させた。10 x ligase buffer (500 mM Tris-HCl [pH 7.5], 70 mM MgCl₂, 10 mM DTT) 1 μ l, 10 mM rATP (ligase や kinase の補酵素) 1 μ l, T4 DNA ligase 1 μ l を添加し、8 で一晩反応させた。その後、10 x ligase buffer 1 μ l, 10 mM rATP 2 μ l, MQ 6 μ l, T4 polynucleotide kinase 1 μ l を加え、37 で 30 分間反応させた。さらに、70 で、30 分間処理することで、酵素を失活させた。室温で、5 分間静置した後、XhoI buffer 28 μ l, XhoI 3 μ l 添加し、37 で 1.5 時間酵素反応を行った。この反応液に、10 x STE (1 M NaCl, 200 mM Tris-HCl[pH 7.5], 100 mM EDTA) 5 μ l, 100% EtOH 125 μ l を加え、-20 で一晩放置し、15,000 rpm, 4 , 1 時間遠心分離を行った。上清を吸引除去した後、沈殿物を 1 x STE 14 μ l と column loading dye (50% [v/v] glycerol, 10% [v/v] 10 x STE buffer, 40% [v/v] saturated BPB) 3.5 μ l を加え、完全に溶解した。

カラムによる分離は次のように行った。1 ml のディスプレイブルピペットの頭についている綿を引き出し、3 mm 残すように切り取り、この綿をピンセットで 3 mm ほど中に押しこんだ。このピペットと 10 ml シリンジ (テルモ) を Kit についているプラスチックチューブを使ってつないだ。シリンジのピストンを強く押し、綿を先端まで押し込んで、綿栓とした。これのように作製したカラムをスタンドに固定した。1 x STE をピペット中にみだし、さらにシリンジ中にも 3 ml ほど残るように注加した。HybriZAP-2.1XR Library Construction Kit 添付の Sepharose CL-2B gel をパストールピペットを用いて徐々に充填した。このとき、ピペットの頭から 0.8 cm のところまでつめるようにした。つめ終わった後、カラムの残りの部分にたまったゲルを取り除いた後に 1 x STE をシリンジ

の目盛で、10 ml ほど加えた。全ての buffer が滴下するまで、カラムを洗浄した。1 x STE がゲルベットの上 50 μ l ほどになったら、sample をシーケンサ用チップを用いて注加した。dye がゲルベッドまで沈んだことを確認後、パストゥールピペットを用いて 1 x STE を静かに注加し、シリンジの 3 ml の目盛のところまで満した。dye の先端が、-0.4 ml の目盛のところまで来たときから、初留をとり終え、フラクションをチューブにそれぞれ 3 滴ずつ集め、Fraction 12 までとった。その後、後留をさらに分取した。Fraction 1-12 にそれぞれ PhOH/CHCl₃ 100 μ l 加え、5 秒間ボルテックスをかけた後、15,000 rpm, 4 分間遠心分離を行った。水層を新しいチューブに移し、CHCl₃ を 100 μ l 加え、ボルテックス後に、遠心し、水層をさらに新しいチューブに移した。100 % EtOH を 200 μ l 加えた後、-20 で一晩静置した。15,000 rpm, 4 , 1 時間遠心し、上清を吸引除去後、70% EtOH で洗浄し、沈殿を風乾した。この沈殿をそれぞれ 50 μ l の MQ で溶解し、そのうち、1 μ l をアガロースゲル電気泳動を行った。サイズが 0.4 kb ~ 4.3 kb であった Fraction 3-7 を一つのチューブにまとめて、これを骨髄細胞由来 cDNA とした。

2-2-8-4 cDNA のベクターへの挿入とライブラリーの増幅

つぎに、合成した cDNA を HybriZAP-2.1 Vector に挿入した。合成した cDNA 2.5 μ l, HybriZAP-2.1 Vector 1 μ l, 10 x ligase buffer 0.5 μ l, 10 mM rATP 0.5 μ l, T4 DNA ligase 0.5 μ l を 1.5 ml チューブで混和し、12 で一晩反応した。Kit に添付されている packaging extract を溶かし、そこに前述の反応液 4 μ l を加え、よく混和し、室温で、2 時間静置した。その後、SM buffer (5.8 g/l NaCl, 2.0 g/l MgSO₄ · 7H₂O, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.01% [w/v] gelatin) 500 μ l と CHCl₃ 20 μ l をくわえ、ゆっくり混ぜ、遠心した後、上清を 1.5 ml チューブに移し、4 で保存した。このファージの増幅を行った。*E. coli* (XL1-Blue, OD₆₀₀ = 0.5) 600 μ l に cDNA library phage 5 μ l を添加し、37 で 15 分間加温した。そこに、NZY top agar (5 g/l NaCl, 2g/l MgSO₄ · 7H₂O, 5 g/l yeast extract, 10 g/l NZ amine, 0.7% [w/v] agarose) 6.5 ml を加え、NZY プレート (5 g/l NaCl, 2 g/l MgSO₄ · 7H₂O, 5 g/l yeast extract, 10 g/l NZ amine, 15 g/l agarose; 直径 15 cm) に播種し、室温で 10 分間静置した。静置後、37 で 5 時間さらに静置し、SM buffer 8 ml を加え、4 で一晩静置した。SM buffer を 50 ml チューブに回収し、さらに、プレートに 2 ml の SM buffer を注加し、さらに回収した。CHCl₃ を 10 ml 加え、室温で 15 分間

おいた後、500 g, 4℃, 10 分間遠心し、水層を新しい 50 ml チューブに移し、CHCl₃ を 90 μl と DMSO を 2 ml 添加し、-80℃ で保存した。

Phage の excision は、次のように行った。前述した骨髄細胞由来 cDNA library phage のストック 10 μl, *E-coli* (XL1-Blue-MRF', OD₆₀₀ = 0.3) 400 μl, helper phage 10 μl を混和し、室温で、15 分間静置した後、LB broth 20 ml 中に注加し、37℃ で 3 時間培養し、その後、70℃ で 20 分間処理し、500 g, 4℃, 10 分間遠心した後、上清を新しい 50 ml チューブに移した。これを、phagemid 溶液として、4℃ で保存した。

cDNA library の増幅は、次の通りに行った。*E-coli* (OD₆₀₀ = 1.0) 23 ml に、前述した骨髄細胞由来 cDNA library phagemid 100 μl を添加し、37℃ の水浴で、15 分間加温した。この、大腸菌培養液を 200 μl ずつ、LB plate (10 g/l NaCl, 10 g/l tryptone, 5 g/l yeast extract, 20 g/l agar; 直径 150 mm) 100 枚に播種し、30℃ 恒温室で、24 時間培養した。大腸菌コロニーを確認後、TE buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM EDTA [pH 8.0]) 10 ml をプレートに注加し、大腸菌コロニーを集め、50 ml チューブに回収した。3,000 rpm, 4℃, 30 分間遠心し、上清を除去し、solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA) 5 ml, solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) 10 ml, solution III (5 M KOAc) 7.5 ml を加え、よく混和し、3,000 rpm, 4℃, 30 分間遠心分離し、その上清を新しいチューブに移した。i-PrOH 12 ml を加え、室温にて一晩静置し、3,000 rpm, 4℃, 30 分間遠心し、その沈殿物を 70% EtOH 20 ml で洗浄した後、沈殿物を風乾した。TE buffer を 8 ml 加え、沈殿物を完全に溶解し、そこに、PhOH/CHCl₃ (1:1, by vol.) 10 ml 加え、よく混和し、さらに、3,000 rpm, 15 分間遠心し、その水層を新しいチューブに移した。さらに、CHCl₃ 7.5 ml を添加しよく混和した後遠心し、さらにその水層を新しいチューブに移した。そこに、100% EtOH 15 ml を加え、よく混和し、-20℃ で 10 分間静置した後に、3,000 rpm, 4℃, 1 時間遠心分離し、上清を除去し、さらに、80% EtOH で沈殿を洗浄し、沈殿物を風乾した。風乾した沈殿物に TE buffer 8 ml を添加し、室温にて一晩静置し、完全に溶解した。この溶解した DNA 溶液 2 ml に対して、CsCl 2.1 g, EtBr (50 mg/ml) 10 μl を溶解させ、超遠心チューブにつめた、チューブを超遠心機で、99 krpm, 25℃, 4 時間かけて遠心を行った。EtBr のバンドを 1 ml シリンジを用いて回収し、NaCl 飽和イソプロパノールを用いて、EtBr の除去を行った後、エタノール沈殿を行い、沈殿を 500 μl の TE で溶解し、cDNA library とした。

2-2-8-5 酵母への cDNA ライブラリーの導入

酵母 *PJ 69-4A* 株は、*lacZ*, *His3*, および *Ade2* 遺伝子がゲノムに組み込まれており、細胞内で GAL4DNA 結合ドメイン / TRAF6 融合タンパク質と GAL4 活性ドメイン / cDNA 発現産物融合タンパク質が結合すると、ヒスチジン及びアデニンが欠損する培地で生育できるようになり、かつ -ガラクトシダーゼ活性が陽性になる性質を持つ。bait である PGBT9-TRAF6 を酵母 *PJ 69-4A* 株に導入してある酵母株を SC/-Trp (1.7 g/l yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate, 5 g/l ammonium sulfate, 1.35 g/l dropout [adenine sulfate, alanine, arginine, aspartic acid, asparagine, cysteine, glutamic acid, glutamine, glycine, isoleucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tyrosine, valin を等量ずつ混合したもの], 0.16 mM uracil, 0.8 mM histidine-HCl, 0.8 mM leucine, 2% [v/v] glucose) 100 ml で 30 °C で一晩培養した。この培養液を 6 倍希釈し、吸光度 OD₆₀₀ が 0.5 になった時点で、YPAD 培地 (20 g/l Difco peptone, 10 g/l yeast extract, 40 mg/l adenine sulfate, 2% [v/v] glucose) 1000 ml 中に移し、吸光度 OD₆₀₀ が 0.45 になったところで、3,000 rpm, 5 分間遠心し、菌体を落とした。落とした菌体に、MQ 850 µl, 50 % PEG 3 ml, 1 M LiOAc solution 450 µl, ssDNA 63 µl, 骨髄由来 cDNA ライブラリー 50 µl を加え、1.5 分間ボルテックスをかけた。これを、30 °C で 30 分間、さらに、42 °C で 25 分間加温し、ヒートショックによって酵母に cDNA を取り込ませた。この酵母溶液を 1 ml の SC/-Trp/-Leu/-His/-Ade 培地 (1.7 g/l yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate, 5 g/l ammonium sulfate, 1.35 g/l dropout, 2% [v/v] glucose) に分散させ、SC/-Trp/-Leu/-His/-Ade プレート (1.7 g/l yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate, 5 g/l ammonium sulfate, 1.35 g/l dropout, 2% [v/v] glucose, 15 g/l agar; 直径 150 mm) 10 枚に播種し、30 °C で 5 日間培養した。培養後、直径が約 1.5 cm 以上のコロニーを選択し、楊子でつついて、SC/-Leu (1.7 g/l yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate, 5 g/l ammonium sulfate, 1.35 g/l dropout, 0.16 mM uracil, 0.8 mM histidine-HCl, 0.32 mM tryptophan, 2% [v/v] glucose, 15 g/l agar) のマスタープレートに移した後に、2 ml の SC/-Trp/-Leu 培地 (1.7 g/l yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate, 5 g/l ammonium sulfate, 1.35 g/l dropout, 0.16 mM uracil, 0.8 mM histidine-HCl, 2% [v/v] glucose) で 30 °C で一晩培養した。この培養液 700 µl をストック用にし、500 µl

を β -gal assay 用にした。

2-2-8-6 ポジティブクロンの選択

ポジティブクロンの判定のための β -gal assay は、次の通りに行った。500 μ l の酵母培養液を 1.5 ml チューブに移し、遠心で菌体を沈殿させた。この菌体に対して、Z buffer (10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM 2-mercaptoethanol, 100 mM PiO₄: pH 7.5 [1 M KH₂PO₄ と 1 M K₂HPO₄ を混合し、pH 7.5 に調整した buffer]) 200 μ l とガラスビーズ(Wako) 150 μ l を加え、1 分間ボルテックスをかけ、菌体を粉砕した。この反応液のうち、100 μ l を新しいチューブに移し、Z buffer 700 μ l と 2 mg/ml *O*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) 160 μ l を添加し、30 °C で 1 時間加温した。このうち、明らかに黄色を呈したものをポジティブクロンとして選択した。

2-2-8-7 ポジティブクロンからの DNA 抽出と塩基配列の決定

ポジティブクロンとして選択したコロニーからの cDNA 抽出は、次の通りに行った。マスタープレート上のコロニーを楊子でつついて、2 ml の SC/-Trp/-Leu 培地で、30 °C 一晩培養し、その培養液のうち 1 ml を新しい 1.5 ml チューブに移し、遠心により菌体を落とした。落とした菌体に、yeast breaking buffer (2% [v/v] Triton X-100, 1% [w/v] SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA) 200 μ l, ガラスビーズ 200 μ l, PhOH/CHCl₃ 200 μ l を加え、2 分間ボルテックスをかけた。15,000 rpm, 10 分間遠心し、水層を新しいチューブに移した。100 % EtOH 300 μ l を加え、-20 °C にて 5 分間静置し、15,000 rpm, 4 °C, 10 分間遠心し、70 % EtOH で洗浄し、風乾し、20 μ l の TE buffer で溶解した。

抽出したプラスミドの増幅は、次の通りに行った。エレクトロポレーション用のコンピテントセル 50 μ l に抽出したプラスミド 1 μ l を加え、エレクトロポレーション (BIORAD, [25 mF, 2.5 kV, 200 μ s])を行った。処理後の、*E-coli* を 2 x YT 培地 (16 g/l tryptone, 10 g/l yeast extract, 5 g/l NaCl) 1 ml 中に注加し、37 °C で 1 時間培養した。菌体を遠心で沈殿させた後、TE を 100 μ l 加え、LB プレートに播種した。37 °C で一晩培養し、1 プレートあたり、6 コロニーを選択し、2 x YT 培地 2 ml でさらに 37 °C で一晩培養した。培養後の菌体を 1.5 ml チューブに移し、遠心により菌体を落とし、上清を除去した。Solution I 75 μ l, solution II 150

μl , solution III 90 μl を加え、よく混和し、15,000 rpm, 10 分間遠心し、上清を新しいチューブに移した。さらに、100% EtOH を 800 μl 加え、よく混和し、15,000 rpm, 4 , 5 分間遠心し、さらに、70% EtOH で沈殿を洗浄した。沈殿を風乾し、TE 50 μl で完全に溶解した。

回収後、このプラスミドをあらかじめ pGBT9-TRAF6 でトランスフォーメーションされている酵母 *PJ 69-4A* 株に導入し、陽性クローンであることを確認した。このプラスミドより cDNA を回収し、pBluescript SK⁻ (Stratagene)のクローニングサイト BamHI / XhoI に導入し、ジデオキシ法により塩基配列を確認した。

2-2-9 ノーザンブロッティング

マウス TIFA の cDNA 配列のコード領域に相当する部分を用いてプローブを作製した。開始コドンを含むプライマー A (配列: 5-GCCTCGAGATGTCCACCTTTGAAGACGCTG-3) 及び終止コドンを含むプライマー B (配列: 5-GCGCGGCCGCTCACAGTTCGTTTTTCATCCATTTC-3) を用い、テンプレートとしてマウス TIFAcDNA の挿入されたプラスミド (pBluescript-mTIFA) を用いて以下の温度及び時間で PCR 反応を行った。95 , 2 分を 1 サイクル、95 , 1 分、52 , 1.5 分、72 , 2.5 分を 25 サイクル、72 , 10 分を 1 サイクル行い、増幅産物を回収した。別に、哺乳動物細胞用プラスミド pME18S の EcoRI サイトに、Flag-tag をコードするヌクレオチド配列およびその 3' 側に EcoRI-XhoI-NotI 認識配列を挿入されたプラスミド pME-Flag を作製した。得られた増幅断片を抽出し制限酵素 XhoI / NotI で処理しプラスミド pME-Flag に導入し発現プラスミド pME-Flag-mTIFA を作製した。このプラスミドを大量調製し、再度制限酵素 XhoI / NotI で処理し TIFA をコードする DNA 断片を得て、これを標識した。標識はメガプライム DNA ラベリングシステム (Amersham) を用いて行った。上で得た DNA とランダムプライマーを混合し 100 3 分処理後、氷水中に移し急冷した後、バッファー、[α -³²P] dCTP、及び Klenow DNA 合成酵素を加え、穏やかに混合した。混合物を 37 で 15 分間反応させた後、未反応の標識ヌクレオチドは Nick カラム (Amersham) を用いて除去し、標識 DNA プローブを作製した。マウスの心臓、脳、脾臓、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、精巣の各組織由来の mRNA が各々 2 μg ずつブロッティングされたメンブレン (MTN Blots Mouse; Clontech) を 5 ml のハイブリダイゼーション液 (Express Hyb; Clontech) 中で 68 , 30 分間処理をした。上で得た

プローブを 100 ℃、3 分間処理後、氷水中に移した後、5 ml のハイブリダイゼーション液中に添加し、メンブレンに加えた。メンブレンを 68 ℃、1 時間インキュベートし、プローブを RNA にハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ後のメンブレンを 2 x SSC (1 x SSC = 0.15M NaCl and 0.015 M sodium citrate)、0.05% SDS の組成の洗浄液で、室温にて 40 分間洗浄した。引き続き 0.1 x SSC、0.1% SDS の組成の洗浄液で、50 ℃にて 40 分洗浄した。洗浄後のメンブレンをラップにつつまみ、X 線フィルムに密着させ-80 ℃のディープフリーザーに 1 週間置き露光し現像した。

2-2-10 遺伝子の導入

リン酸カルシウム法による導入は、次の通りに行った。440 μl の DNA 溶液 (total 10 μg) と 510 μl の 2 x HBS (42 mM N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulfonic acid (HEPES): pH 7.1, 290 mM NaCl, 140 mM Na₂HPO₄) を 5 ml のプラスチックチューブ(Falcon)に加え、よく混合した。このチューブをボルテックスにかけながら、50 μl の CaCl₂ 溶液をゆっくり加えた。この溶液を培養系にゆっくりと滴下し、4 時間培養した後、沈殿物が沈降していることを確認した後、メディウムの交換を行った。

レトロウイルスによる導入は、次の通りに行った。パッケージング細胞である、plateN 細胞を 10 cm ディッシュに 2 x 10⁶ 細胞播種し、一晩培養した。pMX-Flag-TIFA ベクター 5 μg および Gene Port reagent (Invitrogen) 50 μl を抗生剤不含の DMEM 培地 1 ml に溶解させ、30 分間室温で放置した。その間に、plateN 細胞の medium を吸引除去し、新しい無血清 DMEM 培地を 4 ml 加えた。この、培養系に DNA-リポソーム複合体を滴下し、37 ℃で 4 時間培養した。その後、5 ml の 20% FBS / DMEM 溶液を 5 ml 加え、さらに 24 時間培養した。その後、メディウムを交換し、さらに 24 時間培養を行った。培養液を 15 ml チューブに移し、1,500 rpm, 4 ℃, 5 分間遠心し、その上清を新しい 15 ml チューブに移した。さらに、3,000 rpm, 4 ℃, 5 分間遠心し、その上清を新しい 15 ml チューブに移した。この上清 5 ml に対して、10 mg/ml polybrene (Sigma) 5 μl を添加し、マウス胎児線維芽細胞(MEF)の培養系に、添加した。6 時間培養後、さらに、5 ml のメディウムを足し、培養することで、Flag-mTIFA の導入を行った。

2-2-11 免疫沈降実験およびウエスタンブロットティング

HEK293T 細胞の培養系 (60mm) に、前述した発現ベクターを前述したリン酸カルシウム法を用いて導入した。36 時間後、細胞を PBS⁻ で一回洗浄後、TNE buffer (10 mM Tris-HCl: pH 8.0, 1 % (w/v) Nonidet P-40, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 µg/ml aprotinin) で可溶化し、15,000 x g で 5 分間遠心分離操作を行い、上清を回収した。この細胞抽出液に 10 µl のプロテイン G - セファロース懸濁液 (Amersham)を加え、4 にて 30 分間、転倒攪拌した。ついで、5000 x g、3 分間の遠心を行ったのち、上清を回収した。ここに、1 µg の抗 Flag 抗体を加え、4 にて 30 分間、転倒攪拌したのち、10 µl のプロテイン G - セファロース懸濁液を加え、4 にて 1 時間、転倒攪拌した。処理後、TNE buffer で免疫複合体 / 樹脂を洗浄し、回収した。この回収物に、10 µl の 3 x Sample buffer (30% グリセロール, 15% 2-メルカプトエタノール, 9% SDS, 195 mM Tris-HCl: pH 6.8) を加え、100 にて、3 分間処理した。調製したサンプルは、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって分離し、PVDF 膜にトランスファーした。トランスファー後、メンブレンを TBS (20 mM Tris-HCl: pH 7.5, 150 mM NaCl) スキムミルク (5 % (w/v)) 中でブロッキング処理を行い、続いて以下のようにそれぞれの抗体で処理した。抗 Flag 抗体、抗 Myc 抗体および抗 GST 抗体をそれぞれ 1000 倍希釈し、1 次抗体反応、さらに HRP 標識 IgG 抗体による 2 次抗体反応を行った。メンブレンを TBST (20 mM Tris-HCl: pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05 % (w/v) tween) で十分に洗浄したのち、ECL 発光キット (Amersham) を用いて検出を行った。

2-2-12 *in vivo* GST pulldown アッセイ

HEK293T 細胞の培養系 (60mm) に、前述した発現ベクターをリン酸カルシウム法を用いて導入した。36 時間後、細胞を PBS⁻ で一回洗浄後、TNE buffer (10 mM Tris-HCl: pH 8.0, 1 % (w/v) Nonidet P-40, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 µg/ml aprotinin) で可溶化し、15,000 x g で 5 分間遠心分離操作を行い、上清を回収した。この細胞抽出液に 10 µl のグルタチオンセファロース懸濁液 (Amersham)を加え、4 にて 1 時間、転倒攪拌した。処理後、TNE buffer で GST 融合タンパク質複合体 / 樹脂を洗浄し、回収した。この回収物に、10 µl の 3 x Sample buffer を加え、100 にて、3 分間処理した。調製したサンプルは、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって分離したのち、上記の方法でウエスタンブロッティングを行った。

2-2-13 ルシフェラーゼレポーターアッセイ

HEK293T 細胞および HepG2 細胞 (5×10^5 cells)の培養系に、レポータープラスミド 3xκB-Luc 1 ng、 β -actin- β -galactosidase 10 ng、図中に表示した量の種々の発現ベクターをリン酸カルシウム法によって導入した。また、トランスフェクションした DNA の総量が 10 μ g になるように、コントロールベクターを用いて調製した。36 時間後、培養系を PBS で洗浄し、ピッカジーン培養細胞溶解液 LC (東洋インキ, Tokyo, Japan) 300 μ l をくわえ、30 分間室温にて放置した。この細胞抽出液を回収したのち、15,000 rpm で 5 分間遠心処理し、上清を採取した。この酵素液 10 μ l にピッカジーン発光基質(東洋インキ)を各 100 μ l 添加し、Lumat LB9501 (Bad Wildbad, Germany)で発光量を測定した。また、 β -galactosidase 活性は、次のように測定した。20 μ l の細胞抽出液を 230 μ l の Z buffer (10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM 2-mercaptoethanol, 100 mM PiO₄; pH 7.5)を加え、さらに、50 μ l ONPG 溶液 (2 mg/ml *O*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG), 100 mM PiO₄; pH 7.5) を加え、30 分でインキュベートした。溶液が黄色に呈したところで、1 M Na₂CO₃ を 250 μ l 加えて反応を停止させた。この反応液を 420 nm の吸光波長を分光光度計 (日立製作所, Tokyo, Japan)にて測定した。ルシフェラーゼの発光量を β -galactosidase 活性により規格化し、ルシフェラーゼ活性とした。

2-2-14 JNK キナーゼアッセイ

HEK293T 細胞 (5×10^5 cells)の培養系に、pEF-His-JNK を 0.01 μ g、および図中に表示した量の種々の発現ベクターをリン酸カルシウム法によって導入した。また、細胞に導入した DNA の総量が 10 μ g となるように、コントロールベクターを用いて調整した。36 時間後、培養系を PBS にて洗浄したのち、TNE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 % (w/v) Nonidet P-40, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM NaF, 1mM Na₂VO₃, 20 mM glycerophosphate, 10 μ g/ml aprotinin) で可溶化し、15,000 x g で 5 分間遠心分離操作を行い、上清を回収した。抽出液に 1 μ g の抗 T7 抗体および 20 μ l のプロテイン G セファロース懸濁液を加え、1 時間、転倒攪拌した。処理後、TNE buffer で 3 回、kinase reaction buffer (20 mM HEPES-KOH: pH 7.9, 20 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 0.5 mM NaF, 0.1 mM Na₂VO₃, 20 mM glycerophosphate, 2 mM DTT) で 1 回洗浄した。洗浄した免疫沈降複合体 / 樹脂の 1 / 4 量をウエスタンブロットし、JNK の定量を行った。残りの沈降物には、

基質として 2 μ g の GST-c-jun 融合タンパク質 (Cell Signaling) および 2.5 μ Ci [γ -³²P]ATP を加え、30 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。反応物中の GST-c-jun 融合タンパク質は 10% SDS-PAGE により分離した。GST-c-jun に取り込まれた放射活性は、イメージアナライザ (フジフィルム) を用いて解析した。

2-2-15 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを用いた TIFA タンパク質の分離

MBP 融合 TIFA タンパク質は、常法に従って、*BL21* 株大腸菌に発現させた。MBP 融合 TIFA を発現した、*BL21* 株をプレートから滅菌した楊子を用いて突き、5 ml の 2 x YT 培地で、37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。その後、大腸菌懸濁液を 100 ml の 2 x YT 培地に移し、さらに、3 時間、37 $^{\circ}$ C で培養を行った。その時点で、培養液の OD 値を 600 nm の波長で測定し、0.9 を超えていることを確認した後、1 M IPTG (Wako) 100 μ l を添加し、インダクションをかけた。さらに、37 $^{\circ}$ C で 3 時間培養した後、50 ml チューブに大腸菌懸濁液を移し、3,500 rpm, 4 $^{\circ}$ C、15 分間遠心した。上清を除去後、3 ml の MT-PBS (1 % Triton X100, PBS) を加え、懸濁させた。超音波破砕機を用いて、output 1.5, duty 50, time 10 min の設定で大腸菌を破砕した。破砕後、15,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C で、10 分間遠心し、その上清を新しい 15 ml チューブに移した。アミロースレジン (New England BioLabs, Beverly, MA) をもちいて、精製した。MBP-TIFA タンパク質 (24 μ g) は、2.4 unit の PreScission Protease (Amersham) を用いて、4 $^{\circ}$ C、4 時間反応させることで、MBP の切断を行った。50 μ l の反応系を Superdex 75 カラム (0.32 x 30 cm; Amersham) にチャージし、溶出物を 20 μ l ずつ回収した。このフラクションを前述した 10 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、クマシーブルー染色により解析した。分子量マーカは、同様のカラム条件で流した。

第3節 実験結果

2-3-1 TRAF6 結合タンパク質 TIFA の同定

TRAF6 と IRAK-1 の結合を制御するタンパク質を同定するため、マウス骨髄細胞 cDNA ライブラリから、TRAF6 を bait とした、yeast two hybrid スクリーニングを行った。その結果、184 アミノ酸をコードする cDNA を同定した。この cDNA は、理化学研究所のグループが、TRAF2 結合タンパク質 (T2BP) として、同定していたタンパク質と相同であり、NF- κ B と JNK を活性化することが、一過性過剰発現系において確かめられている (115)。しかしながら、T2BP が TRAF6 と結合すること、また、T2BP の forkhead-associated (FHA) ドメインについての機能について、言及されていなかった。そこで、T2BP を TRAF-interacting protein with an FHA domain (TIFA, Fig. 5A) とし、その機能について調べることにした。

TIFA の mRNA の発現をノザンプロット法によって調べたところ、脾臓に強く発現が認められ、その他の臓器でも、発現が認められるものの、脾臓ほどではなかった。さらに、骨格筋における発現は認められなかった (Fig. 5B)。

FHA ドメインは、60-100 アミノ酸ほどが保存されており、その保存は、真核生物の間で、よく認められている (116)。FHA ドメインを持つタンパク質の多くは、細胞周期の調製、DNA 修復、転写の調整などを行っている (117)。特に重要なことは、FHA ドメインを持つタンパク質が、リン酸化された、セリン・スレオニン残基と直接結合することであり (118-121)、この結合は、リン酸化チロシンと直接結合できる SH2 ドメインと似ている (117, 122)。

TIFA と TRAF6 の結合が NF- κ B と JNK の活性化に必要であることを調べるために、TIFA の TRAF6 結合サイトを同定した。野生型 TIFA およびさまざまな変異体 (Fig. 5C) を GST 融合タンパク質として作製し、293T 細胞に発現させ、FLAG-TRAF6 との結合を調べた。GST pull-down アッセイを行ったところ、TIFA のカルボキシ末端側のドメイン (C-domain) が、TRAF6 との結合に十分であり、アミノ末端側のドメイン (N-domain) および、FHA ドメインは、必要でないことが分かった (Fig. 5D)。TRAF6 の C 末端側のドメイン (TRAF-C domain) が、TRAF6 とその結合タンパク質との結合に、重要であると考えられている。また、TRAF6 の TRAF-C ドメインと CD40 および RANK のペプチドとの共結晶の X 線結晶構造解析により、TRAF6 結合配列が N 末端側から、XXPXEXX-(芳香性もしくは酸性アミノ酸) ということが示された (123, Fig. 5C)。さらに、この配列の、5 番目のグルタミンをアラニンに置換した CD40 変異体が、TRAF6 と結

合できないことが示されている (124, 125)。

この TRAF6 結合共通配列が、ヒト TIFA およびマウス TIFA の C 末端ドメインに保存されている (Fig. 5C)。そこで、配列の中で重要と考えられる、178 番目のグルタミンをアラニンに置換した変異体を作成し、TRAF6 との結合を調べたところ、TRAF6 との結合が認められなくなった。したがって、TIFA は、TRAF6 結合配列を持ち、その結合配列のうち 178 番目が重要であることが示された。

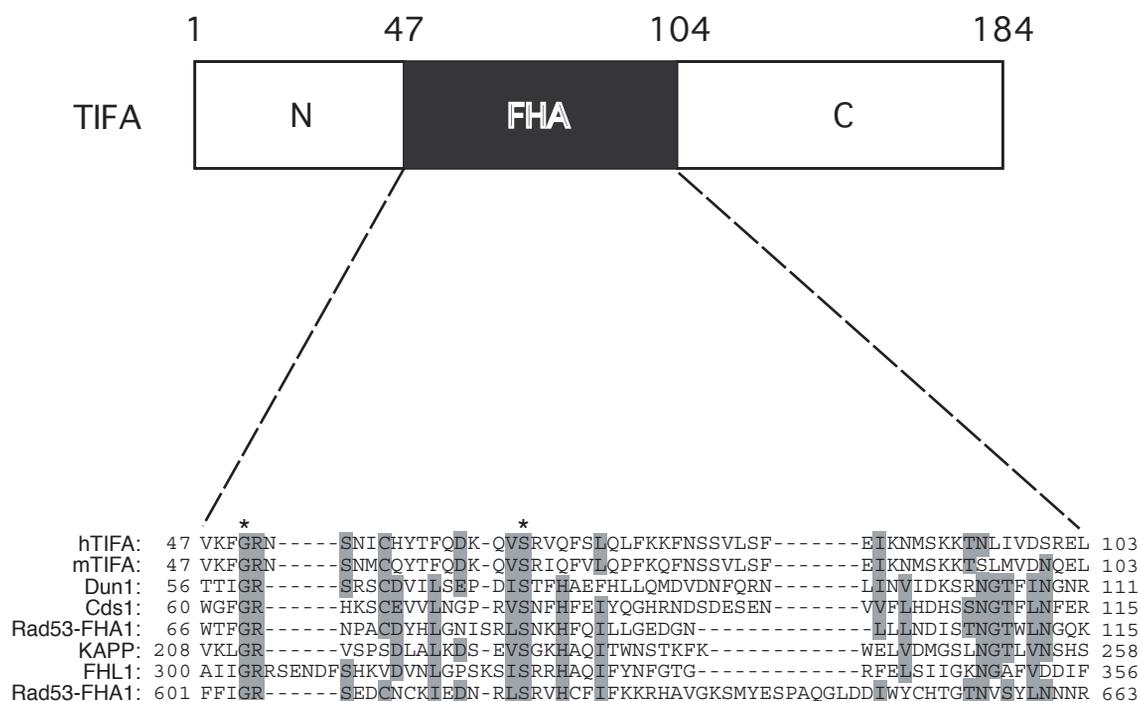


Fig. 5A Diagram of the overall structure of TIFA and alignment of FHA domain of TIFA with that of other proteins. Amino acids identical or similar in least six proteins are indicated by *gray boxes*. *Asterisks* indicate amino acids selected for site-directed mutagenesis. *h*, human; *m*, murine.

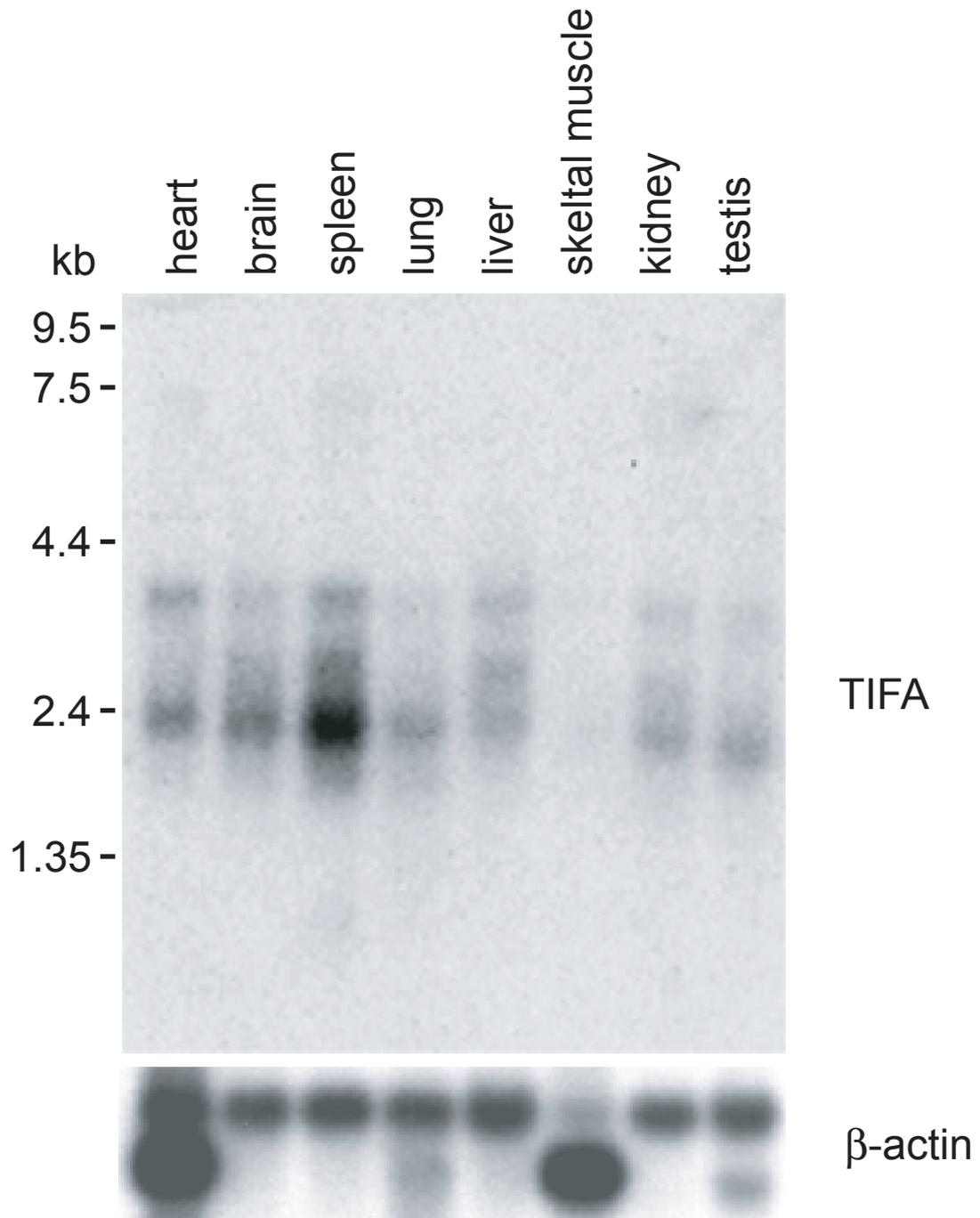


Fig. 5B Multiple-tissue northern blot analysis of TIFA. Northern blot (Clontech) was probed with a cDNA fragment of mouse TIFA (*upper*) or β -actin (*lower*).

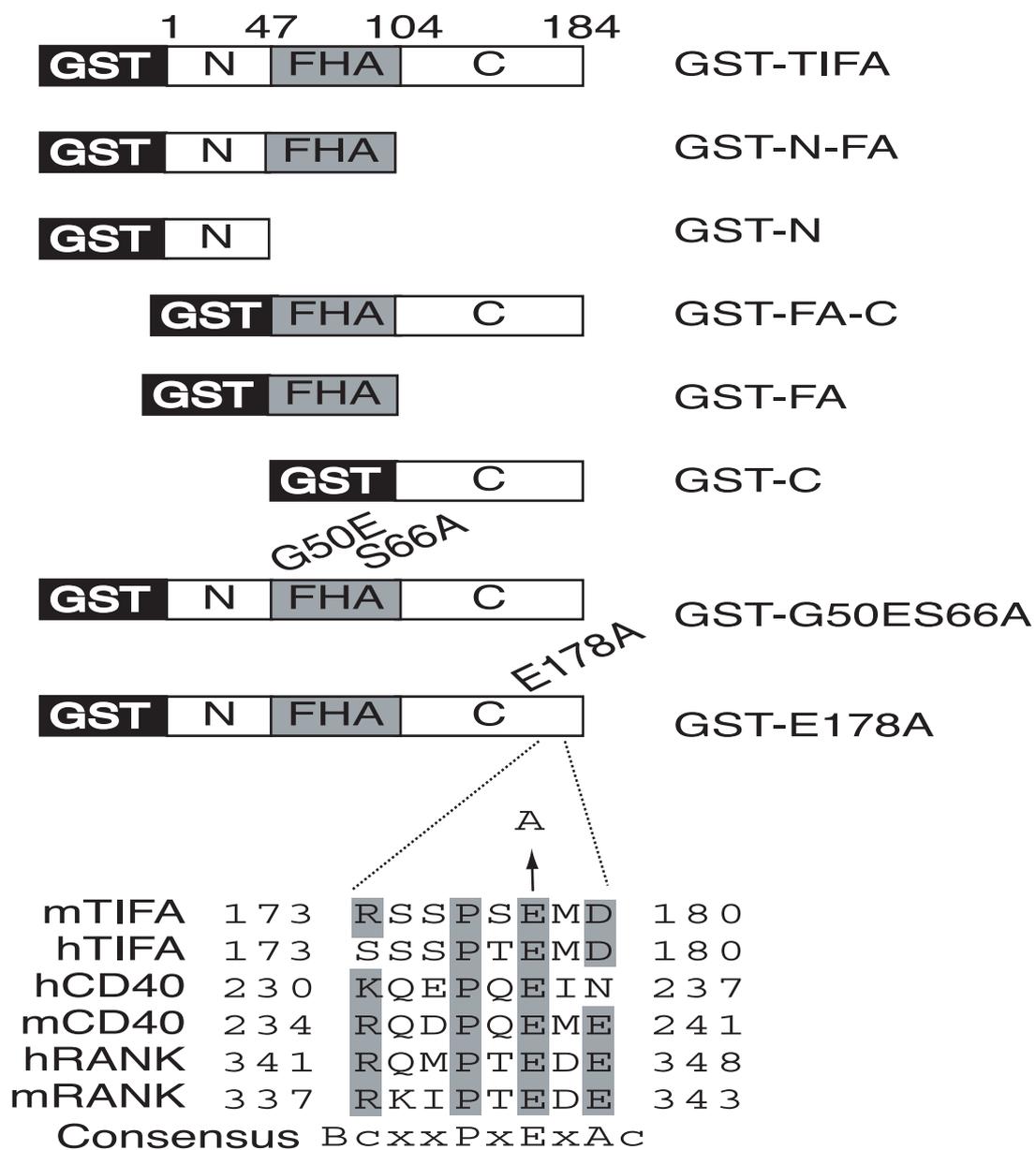


Fig. 5C Structure of TIFA and its mutants and alignment of TRAF6 binding sites.

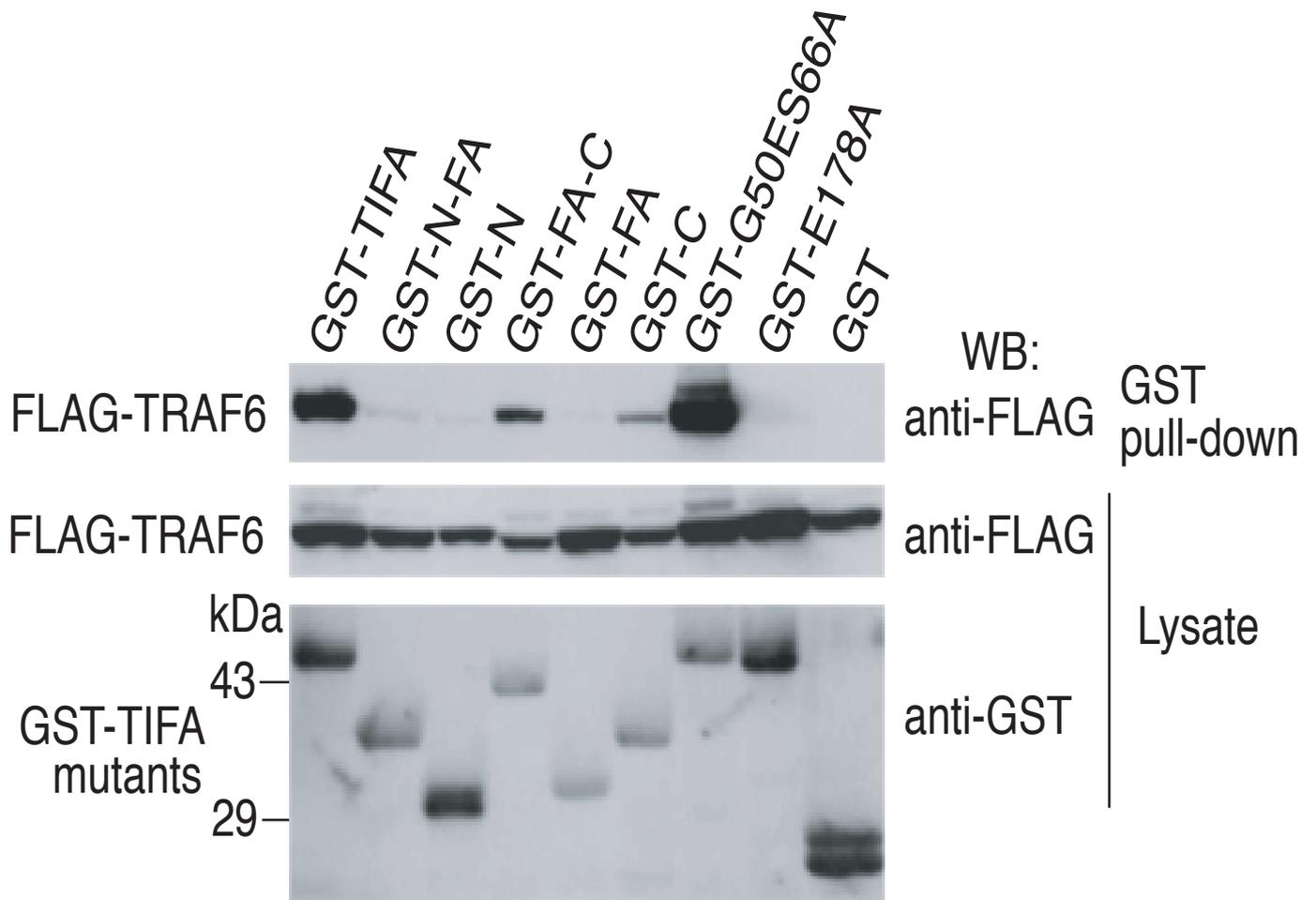


Fig. 5D Identification of the TRAF6 binding site in TIFA. HEK293T cells were cotransfected with pME-GST-TIFA or pME-GST-TIFA mutant and pME-FLAG-TRAF6. Thirty-six hours after transfection, cell lysates were subjected to GST pull-down assay. WB, Western blot.

2-3-2 TIFA による NF- κ B と JNK の活性化

TIFA および TIFA の変異体が、NF- κ B および JNK を活性化するかを調べた。ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、TIFA の FHA ドメインと、C ドメインが、NF- κ B の活性化に必須であり、N ドメインは、必要ではないことが分かった (Fig. 6A)。また、レポーターアッセイと JNK キナーゼアッセイにより、GST-E178A 変異体は、NF- κ B と JNK の活性化を引き起こさなかった (Fig. 6A, Fig. 6B)。この結果は、TIFA と TRAF6 の結合が、TIFA による NF- κ B と JNK の活性化に、必須であることを示唆している。

さらに、TIFA の NF- κ B および JNK 活性化に対する FHA ドメインの役割を調べるために、TIFA の 50 番目のグリシンと、66 番目のセリンをそれぞれ、グルタミンとアラニンに置換した変異体 (G50ES66A, Fig. 5, A and C) を作成した。この、グリシンとセリンは、FHA ドメインを持つタンパク質で、特に保存されており、*Arabidopsis* キナーゼ結合タンパク質に同様の変異を導入したところ、リン酸化セリン / スレオニンを持つ結合タンパク質との結合が認められなくなることが、分かっている (119)。

GST-G50ES66A 変異体は、TRAF6 との結合を示すものの (Fig. 5D)、NF- κ B および JNK の活性化を示さなかった (Fig. 6, A and B)。これらの結果は、TIFA と TRAF6 との結合は、NF- κ B と JNK の活性化には、必須であるが、十分でないことを示唆している。したがって、TIFA の FHA ドメインが NF- κ B および JNK の活性化に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

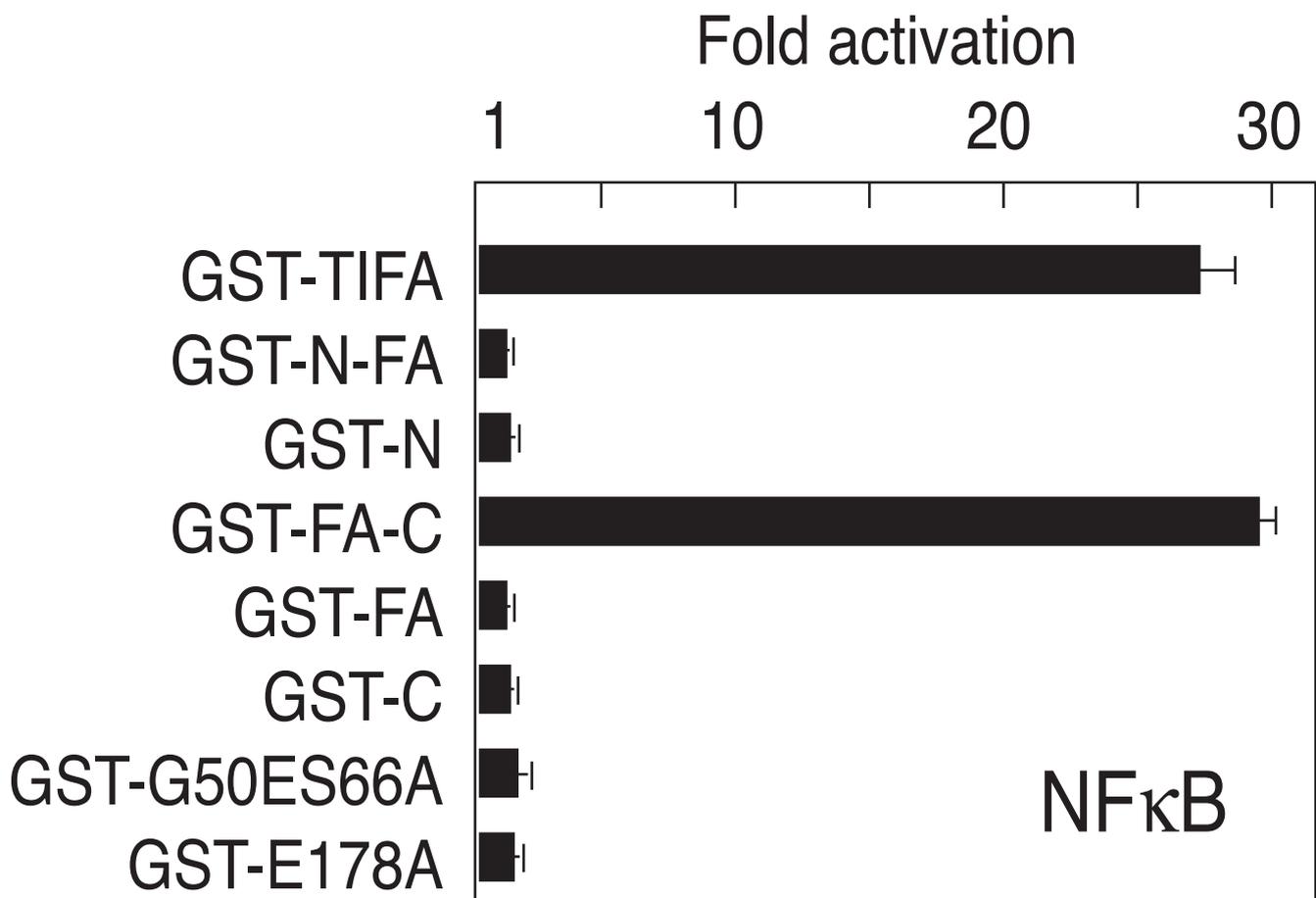


Fig. 6A Activation of NF- κ B by TIFA mutants. HEK293T cells were transfected with 1 ng of 3 x κ B-luc or 3 x M κ B-luc (mutant κ B sites), 10 ng of β -actin- β -galactosidase, and 5 μ g of expression plasmid for TIFA or its mutants. Thirty-six hours after transfection, luciferase assays were performed. Results shown are mean \pm S.D. of triplicate experiments and are representative of two independent experiments.

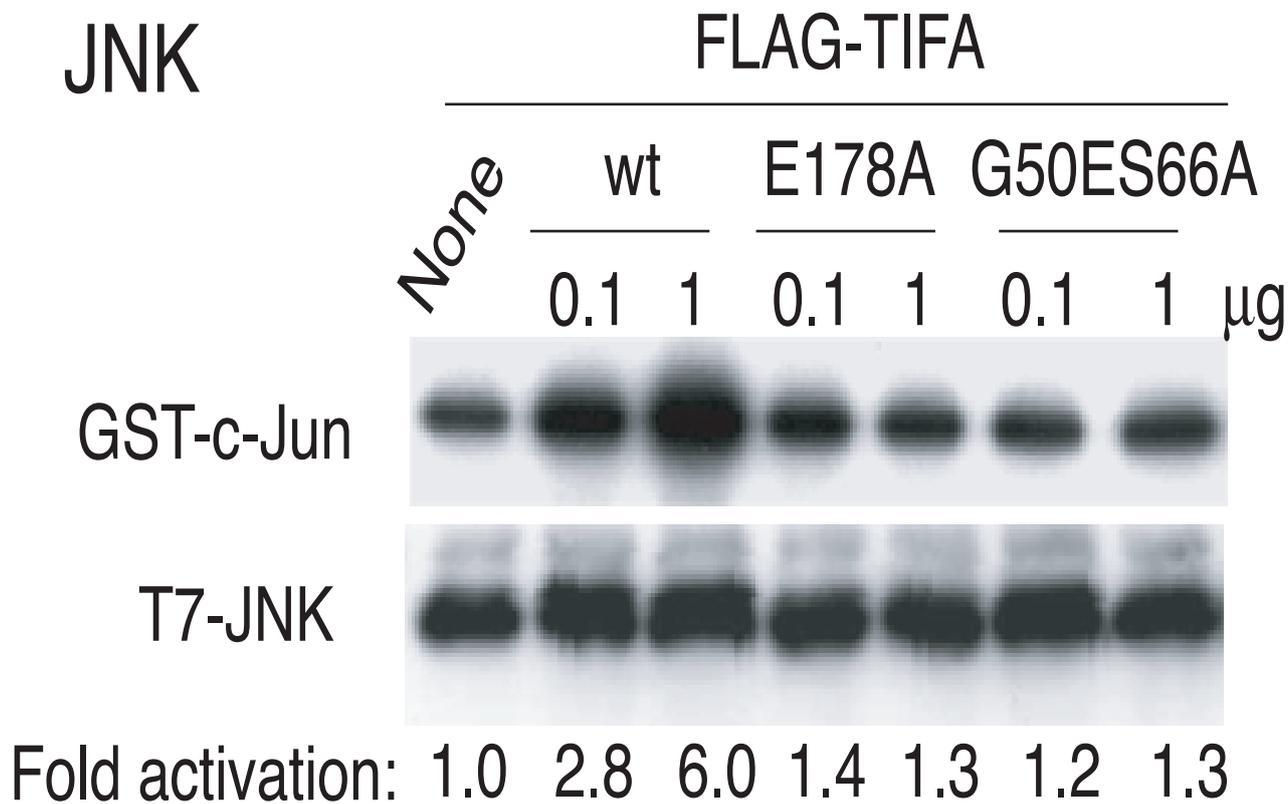


Fig. 6B Activation of JNK by TIFA mutants. Thirty-six hours after transfected with 10 ng of pEF-T7-JNK and the indicated amounts of expression plasmid for TIFA mutants. Thirty-six hours after transfection, His-JNK was immunoprecipitated with anti-T7 antibody. Immunoprecipitates were subjected to *in vitro* kinase assay using GST-Jun as a substrate. The results shown are representative of duplicate experiments. *wt*, wild type.

2-3-3 TIFA の自己凝集と TRAF6 の活性化

TRAF6 は、自己凝集したときに、シグナルを下流に伝えることが分かっている (111, 112)。TIFA を過剰発現させたときに、一部がリン酸化フォームをとる (Fig. 7A)。

そこで、リン酸化 TIFA が FHA ドメインとリン酸化ペプチドとの結合により自己凝集し、さらに、TRAF6 と結合することで、TRAF6 の凝集を助けている可能性が考えられる。そこで、TIFA が自己凝集するかを調べるために、FLAG-TIFA とさまざまな GST-TIFA 変異体が結合するかを、GST pull-down アッセイによって確かめた (Fig. 7B)。FLAG-TIFA は、GST とは結合せず、GST-TIFA と結合することから、TIFA は、自己凝集することが確かめられた。また、GST-FA-C 変異体と FLAG-TIFA の結合が認められることから、TIFA の自己凝集には、N 末端ドメインは必要ではない。また、自己凝集できる変異体が、NF- κ B と JNK の活性化を引き起こすことから、TIFA の自己凝集が、NF- κ B および JNK の活性化に必要であることが示唆された。しかしながら、GST-G50ES66A と FLAG-G50ES66A が結合することから、TIFA の自己凝集は、FHA ドメインによるもの、すなわち TIFA の FHA ドメインとリン酸化 TIFA によるものではないことが分かった。

野生型 TIFA も FHA ドメイン変異型の TIFA も、自己凝集を引き起こし、TRAF6 と結合できるにもかかわらず、野生型 TIFA のみが、下流にシグナルを伝達することができる。この差異が、野生型と FHA ドメイン変異型の構造に起因するものと考え、リコンビナントタンパク質を作製し、その多量体形成について、ゲル濾過カラムクロマトグラフィを用いて調べることにした。リコンビナントタンパク質は、野生型および FHA ドメイン変異型について、Maltose Binding Protein (MBP) タグを付加したものを大腸菌から調製し、アミロースレジンにより精製後、3C プロテアーゼにより TIFA と MBP を切断できるように作製した。精製した MBP-TIFA タンパク質を、3C プロテアーゼで GST-3C と TIFA に完全に切断し、その反応液を Superdex 75 ゲル濾過カラムクロマトグラフィで分離、解析を行った (Fig. 7C, *upper*)。マーカータンパク質の溶出パターンと比較したところ、MBP (43 kDa) は、1 量体を形成しており、GST-3C (46 kDa) は、二量体を形成することが分かった。野生型 TIFA (24 kDa) は、フラクション 14 に溶出しており、TIFA は、三量体を形成している。しかしながら、TIFA-G50ES66A タンパク質について、同様の実験を行ったところ、TIFA 変異体は、フラクシ

ヨシ 7 に溶出しており、六量体もしくは、七量体を形成していることが分かった (Fig. 7C, *lower*)。したがって、TIFA による NF- κ B および JNK の活性化には、TIFA による自己凝集と、三量体の形成が重要であることが示唆された。

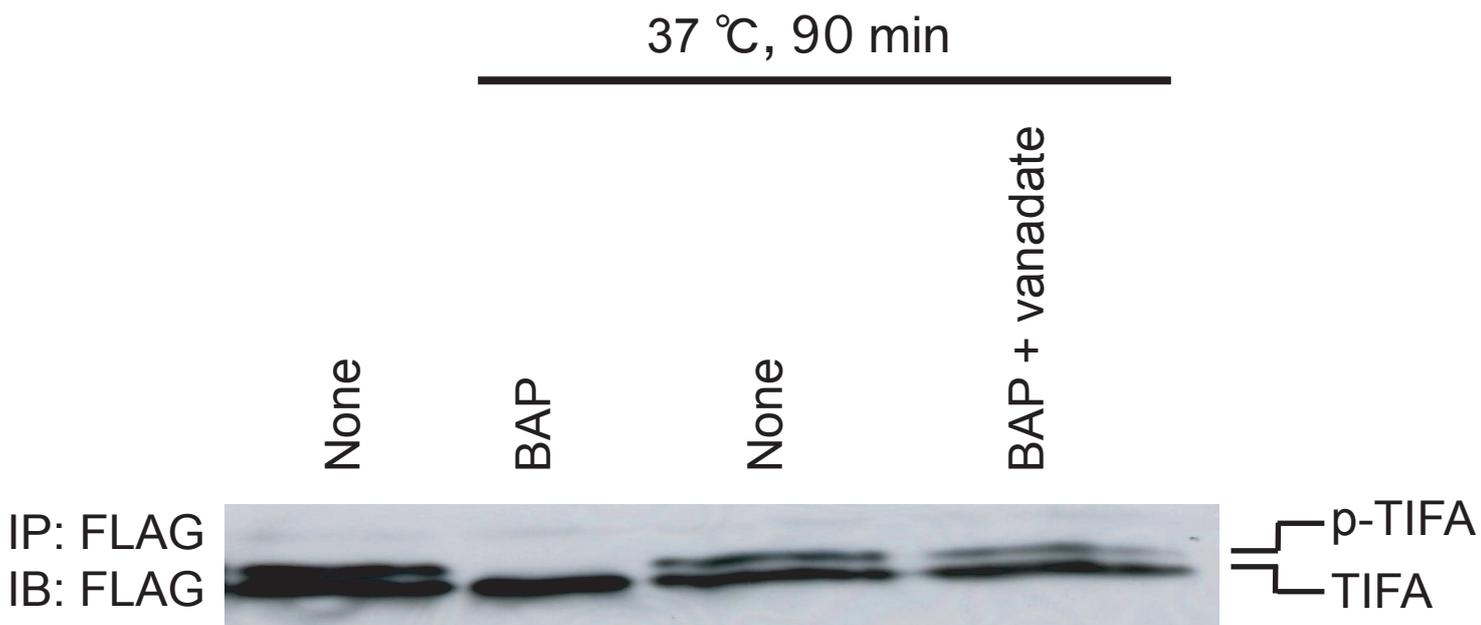


Fig. 7A Phosphorylated form of TIFA. HEK293T cells were transiently cotransfected with 5 μ g of pME-FLAG-TIFA. Cell lysate were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody and incubated with alkaline phosphatase (BAP), or added with 1 mM sodium vanadate at 37 °C for 90 min.

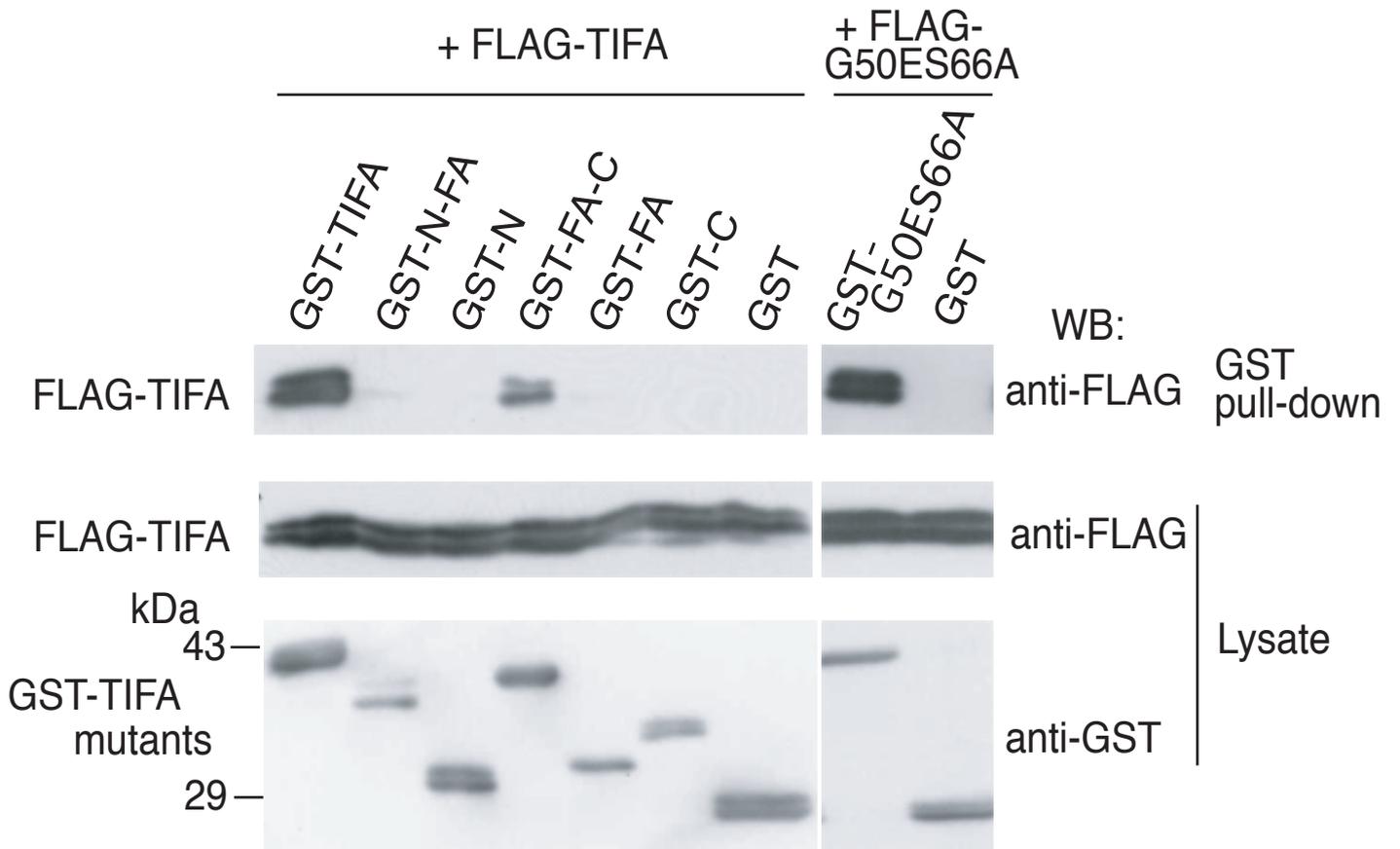


Fig. 7B Identification of the domain required for TIFA self-association. GST-TIFA or its mutants were coexpressed with FLAG-TIFA or FLAG-G50ES66A in HEK293T cells. GST pull-down assay were performed, and coprecipitated FLAG-TIFA was analyzed by Western blotting (WB) with anti-FLAG antibody.

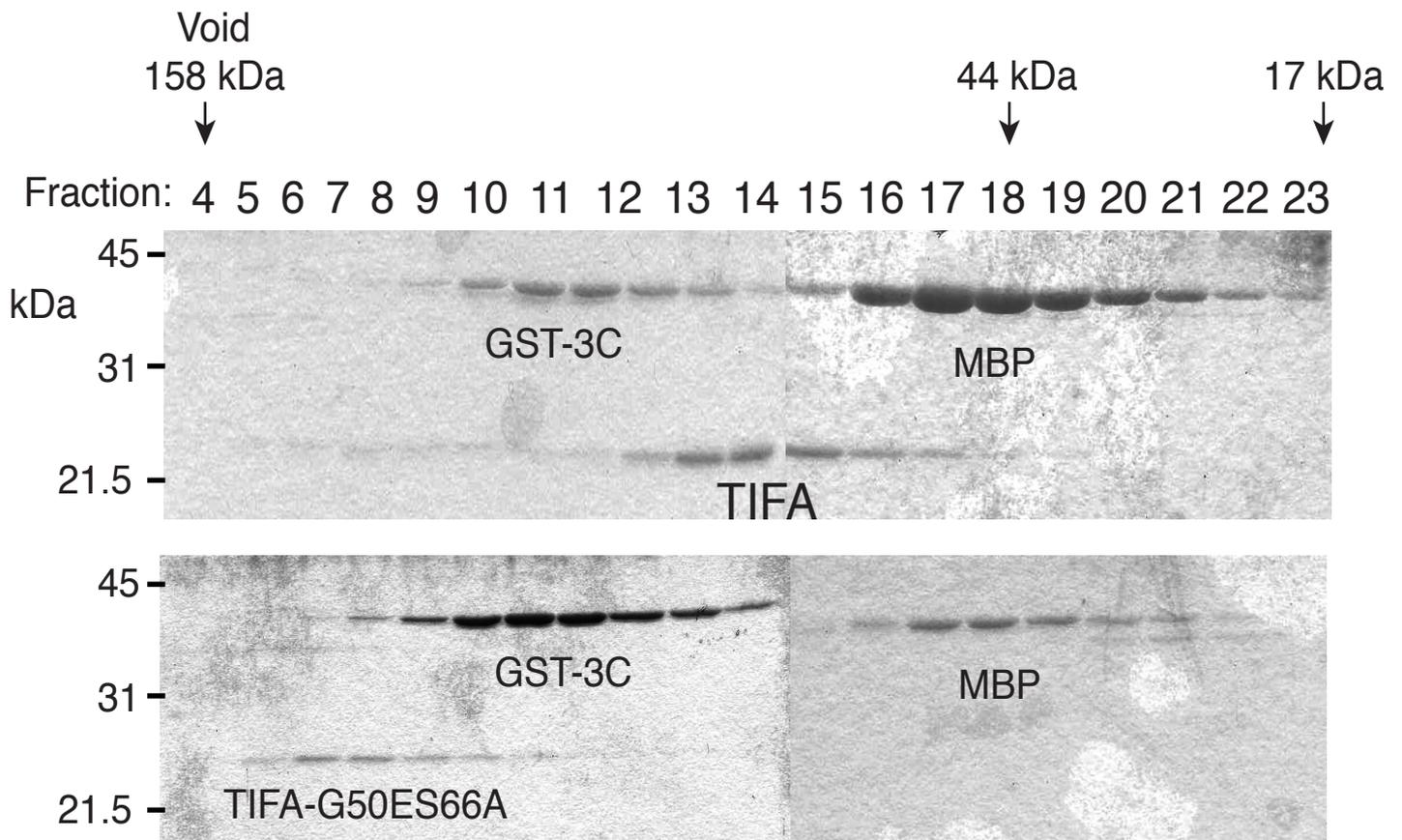


Fig. 7C Oligomer formation of recombinant TIFA protein and that of mutant TIFA protein. MBP-TIFA (24 μ g, *upper*) or MBP-TIFA-G50ES66A (*lower*) was cleaved with 2.4 units of PreScission Protease (GST-3C) at 4 $^{\circ}$ C for 4 h. The reaction mixture was applied to Superdex 75 column, and fraction (20 μ l) were collected. Fractions were analyzed on 10 % polyacrylamide-SDS gel and proteins were visualized by Coomassie Brilliant Blue staining. Arrows indicate the elution profile of the molecular mass marker proteins (158 kDa, γ -globulin; 44 kDa, ovalbumin; 17 kDa, myoglobin) and the position of the void volume.

2-3-4 TIFA による TRAF6 と IRAK-1 の結合の増強

TRAF6 の上流の因子である、IRAK-1 と TIFA の結合を調べることにした。GST-TIFA と IRAK-1 を共発現し、GST pull-down アッセイを行ったところ、TIFA と IRAK-1 が結合することが明らかになった (Fig. 8A)。また、GST-G50ES66A および、GST-E178A も野生型 TIFA と同様の強さで、IRAK-1 と結合することが示された。したがって、TIFA と IRAK-1 との結合には、TRAF6 との結合および、FHA ドメインによるリン酸化セリン/スレオニンの認識は、必要がなかった。

TIFA が、TRAF6 および IRAK-1 と結合することから、TIFA が TRAF6 と IRAK-1 の結合を増強すると仮定した。これを確かめるために、TRAF6 と IRAK-1 の結合を TIFA がいない状態および発現を上昇させた状態について解析した。0.2 μg の TRAF6 と IRAK-1 発現ベクターを導入したとき、TRAF6 と IRAK-1 の結合はかろうじて認められた。そこに、TIFA の発現ベクターの量を増やしていくに従い、TRAF6 と共沈される IRAK-1 の量が増えてゆき、TIFA を 0.1 μg 導入したときに、TRAF6 と IRAK-1 の結合がピークを迎えた (Fig. 8B)。これは、TRAF6 と IRAK-1 の発現量と TIFA の発現量の比が 0.1 μg の TIFA を発現させたときに最適になるからであると考えられる。したがって、TIFA を過剰発現した場合、TRAF6 と IRAK-1 の結合を増強することが分かった。

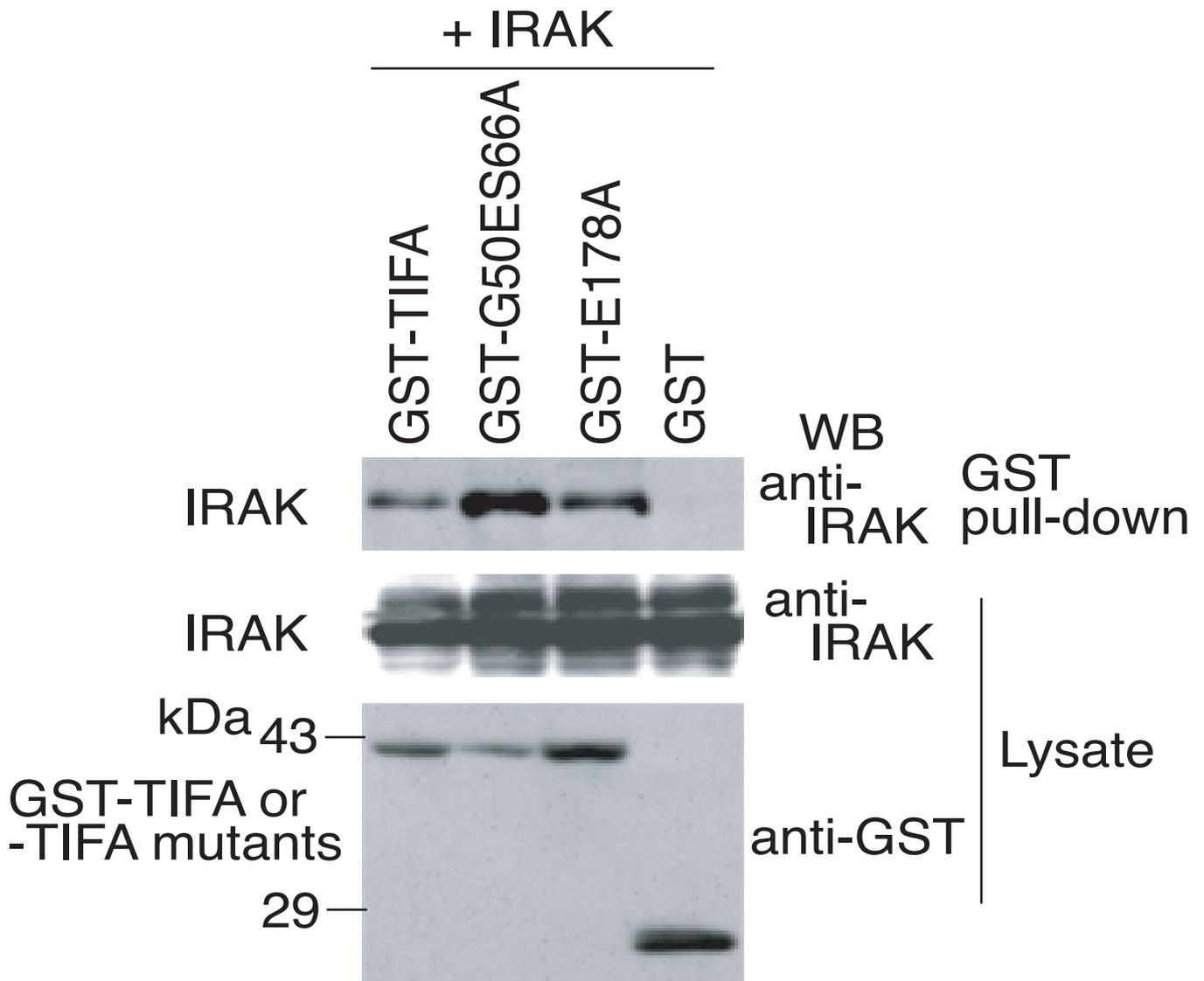


Fig. 8A Interaction of TIFA with IRAK-1. HEK293T cells were cotransfected with pME-GST-TIFA, pME-GST-TIFA mutants, or pME-GST and pEF-IRAK-1. Thirty-six hours after transfection, cell lysates were subjected to GST pull-down assay. WB, Western blot.

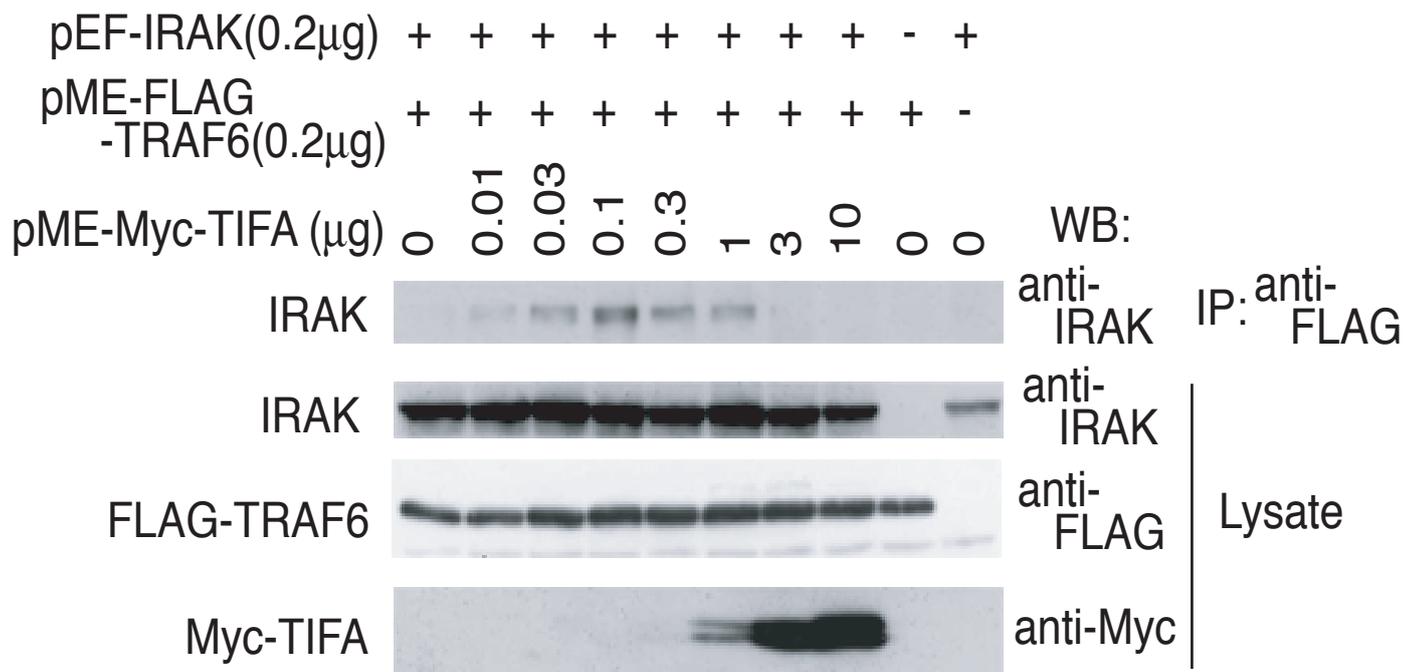


Fig. 8B TIFA links TRAF6 to IRAK-1. HEK293T cells were cotransfected with 0.2 μg of pME-FLAG-TRAF6 and/or pEF-IRAK-1 and increasing amounts of pME-Myc-TIFA. FLAG-TRAF6 was immunoprecipitated with anti-FLAG antibody.

2-3-5 内在性 TIFA と TRAF6 および IRAK-1 との相互作用

IRAK-1/TIFA/TRAF6 複合体の生理条件下での役割を調べるため、内在性タンパク質の相互作用について解析した。内在性 TIFA タンパク質を同定するために、ウサギ由来抗 TIFA 抗体を作製した。マウス preB 細胞株 70Z の細胞抽出液から、抗 TIFA 抗体を用いて免疫沈降後、抗 TIFA 抗体によるウェスタンブロットを行ったところ、24 kDa 付近に 2 つのバンドが検出され、これは、HEK293T 細胞に TIFA を強制発現したときにあらわれるバンドと一致する (Fig. 9A, *left four lanes*)。この 2 つのバンドは、コントロール IgG 抗体で、免疫沈降したときには、あらわれないので、内在性 TIFA 依存的なバンドと考えられる。

つぎに、内在性 TIFA が TRAF6 と結合するかを調べた。内在性 TRAF6 は、IL-1 で 5 分間刺激したときも、また、刺激をしていないときにでも、内在性 TIFA と結合していることが、抗 TIFA 抗体を用いたウェスタンブロット法により示された (Fig. 9A, *right two lanes*)。この結果は、70Z 細胞において、TIFA と TRAF6 は、定常的に結合していることを示している。その他の細胞株においても、TIFA と TRAF6 が結合しているか調べるために、野生型マウス胎児線維芽細胞株 (MEF) および、TRAF6 欠損型 MEF を用いて解析することにした。なお、抗 TIFA 抗体の活性が、比較的弱いため、レトロウイルスを用いて、野生型および TRAF6 欠損型 MEF に FLAG-TIFA を少量発現させた細胞株を用いることにした。FLAG-TIFA の過剰発現を押さえるために、FLAG-TIFA とピューロマイシン耐性遺伝子をレトロウイルスにより導入し、ピューロマイシンセレクションにより、FLAG-TIFA の発現が抑えられた株を得た。この発現細胞株において、FLAG-TIFA は、内在性 TIFA の約 3 倍の発現量に抑えており、NF- κ B および JNK の活性化には、影響を与えないと考えた。そこで、少量発現した FLAG-TIFA を内在性 TIFA と同じ働きをすると考え、以下の実験を行った。

FLAG-TIFA 発現株の野生型および TRAF6 欠損型 MEF の細胞抽出液を抗 TRAF6 抗体で免疫沈降した後、抗 FLAG 抗体で、ウェスタンブロットしたところ、TIFA は、TRAF6 が存在している場合のみ、共沈することが分かった (Fig. 9B)。この結果から、抗 TRAF6 抗体は、TIFA を認識してしまう交差性によって TIFA を直接的に免疫沈降していないことが確かめられた。したがって、これらのデータから、TIFA と TRAF6 の定常的な相互作用を 70Z pre-B 細胞および MEF の両細胞株により確かめられたことになる。

さらに、TIFA と IRAK-1 の生理的条件下における相互作用を調べることにし

た。FLAG-TIFA を少量発現させた野生型 MEF を用いて、IL-1 で 5 分間刺激した細胞抽出液と、刺激していない細胞抽出液を調製し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降実験を行った。免疫沈降後、抗 IRAK-1 抗体を用いて、ウエスタンブロットを行ったところ、IL-1 刺激を行った場合にのみ、リン酸化 IRAK-1 が共沈していることが分かった (Fig. 9C)。活性型リン酸化 IRAK-1 は、受容体 / MyD88 複合体と離れていることが報告されていることから (103)、IRAK-1 は、受容体複合体から離れた後に、TIFA と結合している可能性が高く、活性型リン酸化 IRAK-1 のみが、IL-1 刺激依存的に TRAF6 と結合するという報告(126)に、合致する。IRAK-1 は、コントロールウイルスを導入した MEF では、共沈されないため、抗 FLAG 抗体の交差性によって IRAK-1 が沈降したものではない。これらの結果は、TIFA が、*in vivo* において IL-1 シグナル依存的に IRAK-1 と相互作用することを明確に示しており、TIFA が IL-1 刺激依存的に TRAF6 と IRAK-1 の結合を助けていることが示唆される。

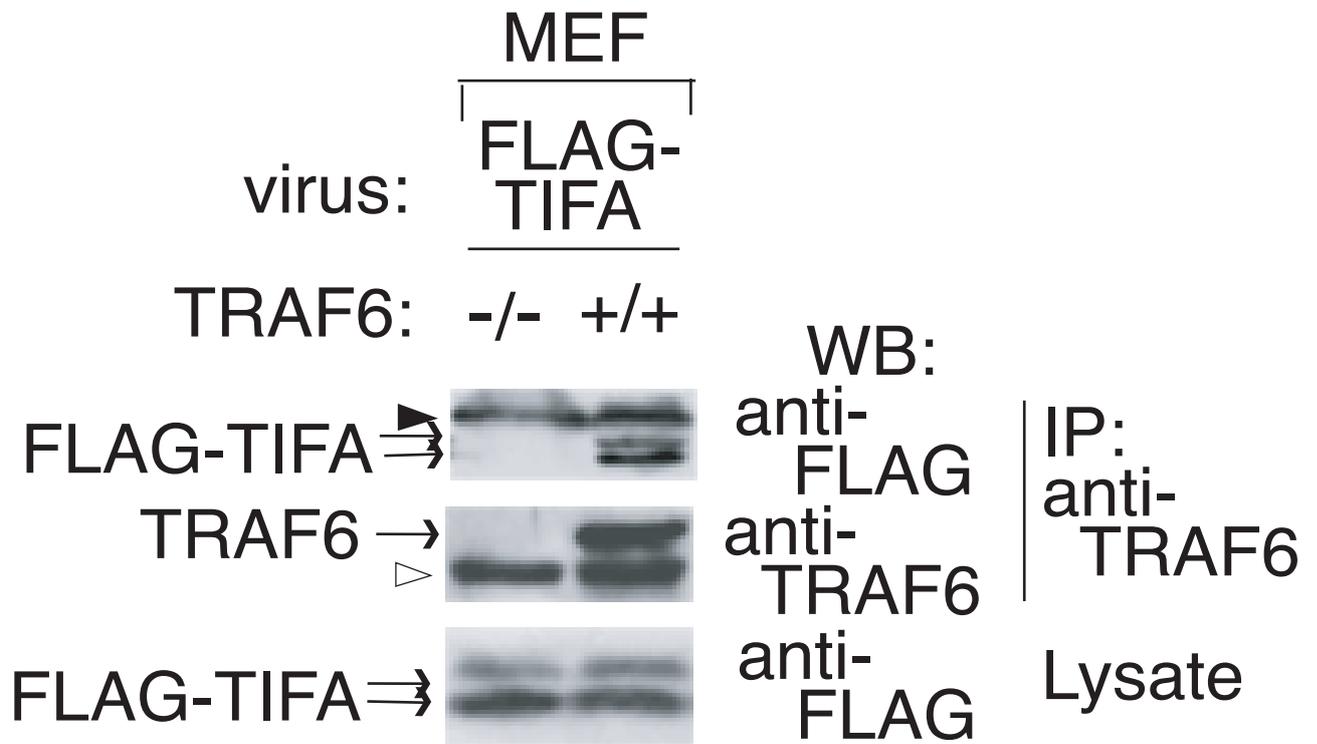


Fig. 9B Interaction of TRAF6 with TIFA in MEF cells. Both wild-type MEF (+/+) and TRAF6-deficient MEF (-/-) were infected with retrovirus expressing FLAG-TIFA. Anti-TRAF6 antibody immunoprecipitates were analyzed by Western blotting with anti-FLAG antibody. *Open* and *solid arrowheads* indicate the Ig heavy chain and Ig light chain, respectively. Lysates were also subjected to immunoblotting directly analyze FLAG-TIFA expression.

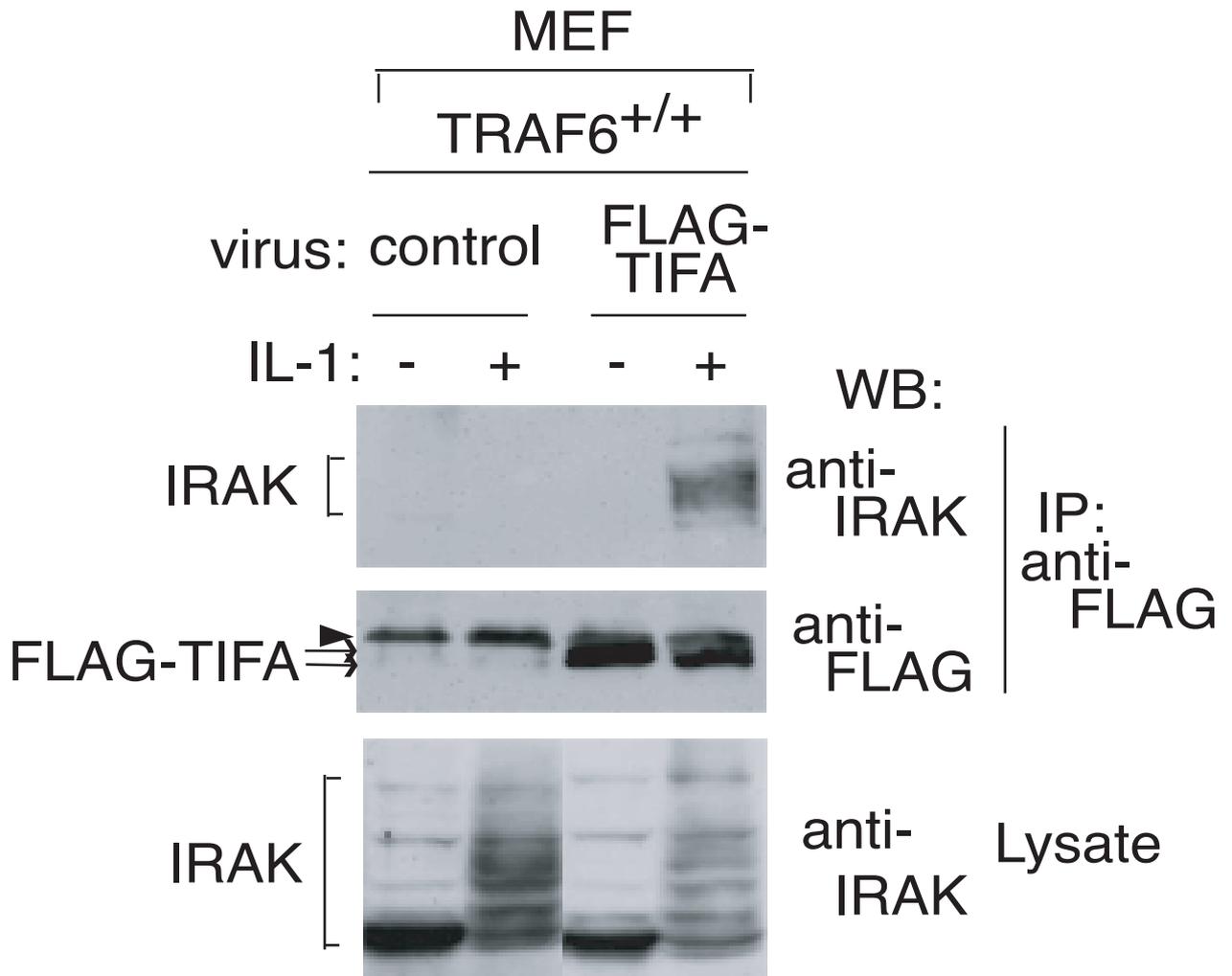


Fig. 9C IL-1 stimulation-dependent interaction of TIFA and IRAK-1 in MEF cells. Wild-type MEFs were infected with retrovirus expressing FLAG-TIFA or control virus. Both types of MEFs were unstimulated (-) or stimulated (+) with IL-1 (20 ng/ml, 5 min). Anti-FLAG antibody immunoprecipitates were analyzed by Western blotting with anti-IRAK-1 antibody. The *solid arrowhead* indicates Ig light chain. Lysates were also subjected to immunoblotting directly to analyze IRAK-1 expression.

2-3-6 TIFA による IRAK-1 と TRAF6 経由の IL-1 による NF- κ B 活性化

IRAK-1 および TRAF6 と相互作用するという TIFA の機能について、さらに詳しく調べるために、TIFA のドミナントネガティブ変異体 (DN) について、NF- κ B ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いた解析を行った。TIFA 変異体 GST-G50ES66A は、IL-1 および TLR4 依存的な NF- κ B 活性化を抑制したが、TNF- α 依存的な NF- κ B 活性化を抑制しなかった (Fig. 10A)。したがって、TIFA は、TRAF6 を介したシグナルで、働くことが示唆された。また、MyD88 および、IRAK-1 依存的な NF- κ B 活性化についても、GST-G50ES66A は、抑制したが、TAK1/TAB1 依存的な活性化 (111)には影響を与えなかった (Fig. 10B)。

予期しないことに、TRAF6 による NF- κ B の活性化について、GST-G50ES66A は、その活性化を上昇させることが分かった (Fig. 10B, *right*, luciferase activity with reporter alone was set to 1)。これは、おそらく、GST-G50ES66A 変異体が、TRAF6 と結合できることから (Fig. 5D)、ある程度の量を強制発現させた TRAF6 を凝集させてしまうことによって、TRAF6 の活性化を誘導してしまい、NF- κ B 活性化を上昇させたと考えられる。

TIFA による NF- κ B 活性化を TRAF6-DN および TAK1-DN が、その導入量依存的に抑制した (Fig. 10C)。さらに、不活性型 Ubc13 (Ubc13(C87A))も、TIFA による NF- κ B 活性化を抑制した (Fig. 10C)。したがって、TIFA によるシグナルが、Lys-63 型ポリユビキチン化 TRAF6 を誘導している可能性があり、これは、TAK1 によって誘導される、IKK や MKK6 の活性化に必要と考えられている (114, 128)。また、TIFA による活性化は、MyD88-DN には影響されなかったが、IRAK-1-DN によって阻害されていた (Fig. 10C)。TIFA が過剰発現系で、IRAK-1 と結合することから (Fig. 8A)、IRAK-1 の機能が、*in vivo* において、TIFA の上流にあるにもかかわらず、IRAK-1-DN が TIFA の活性化の過程を邪魔している可能性が考えられる。これらの結果からも、TIFA が TRAF6 と IRAK-1 を繋げていることが強く示唆される。

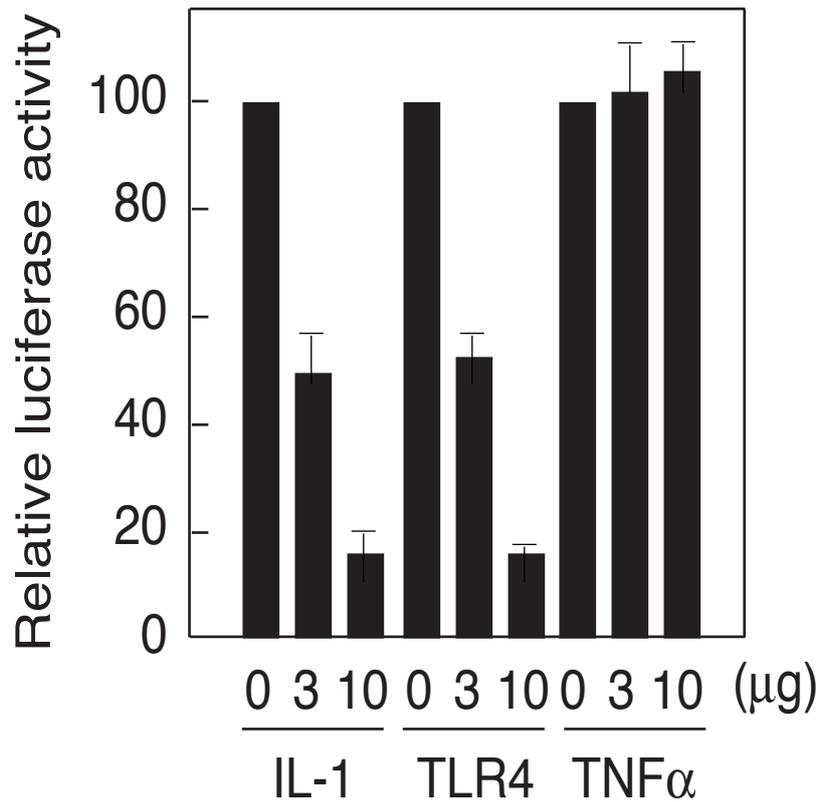


Fig. 10A HEK293T cells or HepG2 cells were transfected with 3 x κ B-luc and increasing amounts (0, 3, or 10 μ g) of pME-GST-G50ES66A. Thirty hours after transfection, cells were either stimulated with TNF α (10 ng/ml, HEK293T) or IL-1 (20 ng/ml, HepG2) for 6 h. HEK293T cells were transfected with pEF-TLR4 and pEF-MD-2 together with 3 x κ B-luc and increasing amounts of pME-GST-G50ES66A. Relative values in which the fold activation in the absence of dominant-negative mutant was set to 100 are shown. Results shown are mean \pm S.D. of triplicate experiments and are representative of two independent experiments.

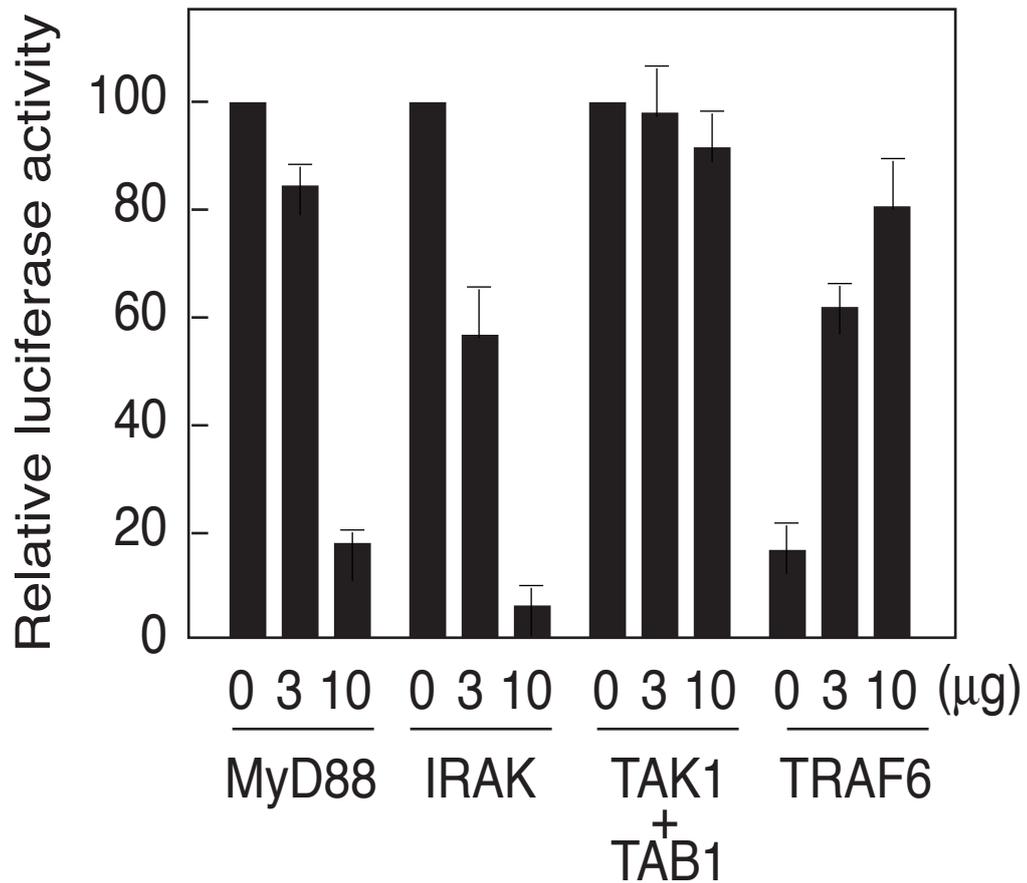


Fig. 10B HEK293T cells were transfected with an expression plasmid encoding one of the NF- κ B activators including MyD88, IRAK-1, TAK1/TAB1, or TRAF6 in the increasing amounts (0, 3, or 10 μ g) of pME-GST-G50ES66A. Relative values in which the fold activation in the absence of dominant-negative mutant was set to 100 (*expect TRAF6 columns*) or in which the luciferase activity with reporter alone was set to 1 (*TRAF6 columns*) are shown. Results shown are mean \pm S.D. of triplicate experiments and are representative of two independent experiments.

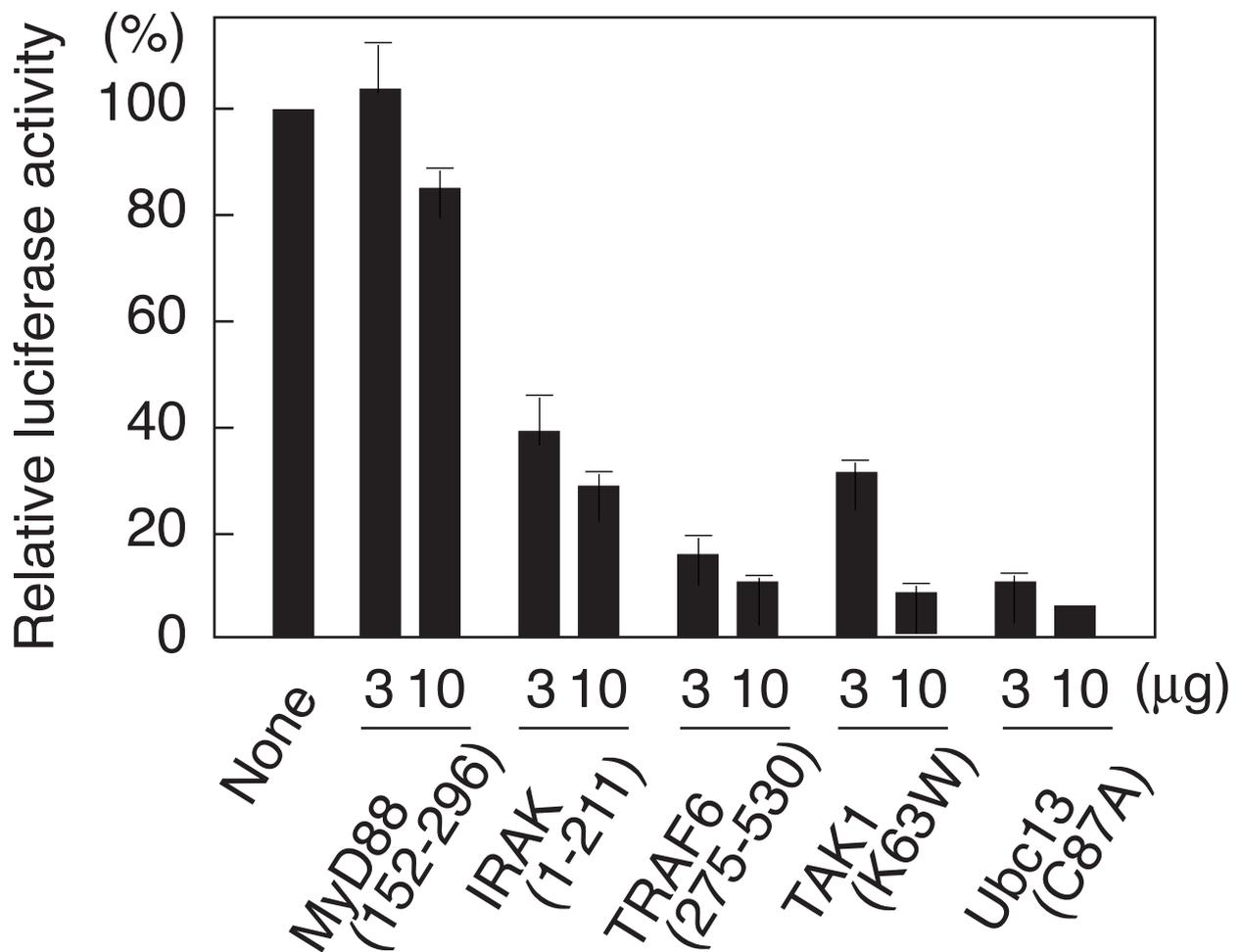


Fig. 10C HEK293T cells were transfected with 0.1 μ g of pME-TIFA in the absence or presence of increasing amounts (3 or 10 μ g) of expression vector encoding MyD88-(152-296), IRAK-1-(1-211), TRAF6-(273-530), TAK1(K63W), or Ubc13(C87A). Thirty-six hours after transfection, luciferase activity was measured. Relative values in which the fold activation in the absence of dominant-negative mutant was set to 100 are shown. Results shown are mean \pm S.D. of triplicate experiments and are representative of two independent experiments.

第4節 考察

IL-1 シグナルを伝える因子として、TRAF6 結合タンパク質 TIFA を同定した。TIFA は、TRAF6 と IRAK-1 に結合する。さらに、IRAK-1 は、TIFA がある程度発現した状態で、TRAF6 と共沈する。したがって、TIFA は、過剰発現したときに IL-1 刺激非依存的に、TRAF6 と IRAK-1 の結合を増強する。内在性の TIFA と TRAF6 の結合を2つの違う細胞株で調べたところ、TIFA は、TRAF6 と IL-1 刺激に関係なく結合することを示した。その反対に、TIFA と IRAK-1 の結合は、生理条件下において、IL-1 刺激依存的であった。これらの結果は、生理条件下において、TIFA が、IL-1 刺激依存的に TRAF6 と IRAK-1 の結合を増強することを強く示唆している。TLR シグナル伝達経路でも、IRAK-1 と TRAF6 が主要な役割を行っていることから、TIFA は、TLR シグナルにおいても同様の役割を担っている可能性が考えられる (101, 128)。実際、TLR-4 による NF- κ B の活性化は、TIFA のドミナントネガティブ変異体の強制発現によって抑制される。したがって、TIFA は、初期免疫においても機能しているかもしれない。TIFA の同一タンパク質として同定された T2BP は、過剰発現した場合に TRAF2 と結合することが報告されているが、生理条件下における T2BP と TRAF2 の相互作用は未だ報告されていない (115)。これらのことを鑑みると、TIFA は、細胞内において TRAF2 と TRAF6 の両方を制御している可能性も考えられる。

キナーゼやアダプタータンパク質を含むシグナル伝達因子の結合は、タンパク質のリン酸化を介して制御されており、また、結合の解離は、キナーゼからフォスファターゼに機能が移行することによっておこる。タンパク質のセリン残基とスレオニン残基のリン酸化は、伝統的に酵素のコンフォメーションを制御する方法と認識されてきた。最近の研究により、セリン/スレオニンのリン酸化はさまざまな分子の複合体形成に、重要な役割を果たしていることが明らかとなった。この複合体形成は、FHA ドメインや、14-3-3、WW ドメイン、WD ドメイン、leucine-rich repeat ドメインを含む、リン酸化セリン/スレオニン認識モジュールがリン酸化ペプチドと特異的に結合することによって起こる (122)。FHA ドメインを有するタンパク質のうち、特異的な FHA ドメインの標的タンパク質が見ついているものもある。ある場合において、リン酸化依存的な FHA ドメインと標的タンパク質の結合が、細胞機能の生理的に非常に重要な役割をしている (117)。酵母において DNA ダメージや細胞周期停止にかかわるキナーゼである Rad53p の FHA2 ドメインは、Rad9p と結合し、この結合

は、DNA ダメージシグナルにより、Rad9p がリン酸化したときに起こる。Rad53p の FHA2 ドメインに変異を加えると、DNA ダメージによる G2/M 期細胞周期停止が起こらなくなることから、Rad53p-Rad9p 結合の生理的な重要性が窺われる (118)。さらに、*Arabidopsis* キナーゼ結合タンパク質脱リン酸化酵素は、細胞膜上で、leucine-rich repeat 受容体様タンパク質リン酸化酵素と、受容体様キナーゼが、リガンドと結合することによる自己リン酸化が起こると結合する (119)。受容体様キナーゼは、*CLAVATA1 (CLV1)* 遺伝子産物で、変異を起こすことにより、植物の茎や花の分裂組織の肥大が起こる (129)。これらの結果と、TIFA の G50ES66A 変異体が NF- κ B と JNK の活性化をひき起こせない事実は、TIFA の FHA ドメインに対する特異的な標的が存在し、このタンパク質が TIFA により伝達されるシグナルを制御している可能性を示唆している。本研究において、TIFA に結合タンパク質として、3つのタンパク質、すなわち TRAF6、IRAK-1 と TIFA 自身の同定を行った。しかしながら、これらのタンパク質が、野生型 TIFA にも G50ES66A 変異体にも結合できることから、リン酸化依存的に FHA ドメインと結合するタンパク質の候補ではないことを示している。TRAF6 は、多量体を形成したときにシグナルを伝達すること (111, 112)、リコンビナント TIFA が3量体を形成できることから、TIFA が IRAK-1 を含んだ TRAF6 の多量体形成を引き起こすことによる NF- κ B と JNK の活性化に寄与している可能性が十分考えられる。興味深いことに、リコンビナント TIFA-G50ES66A 変異体は、6 ~ 7 量体を形成し、3 量体を形成しない。さらに、TIFA-G50ES66A 変異体は、TRAF6 をある程度強制的に発現させた場合には、NF- κ B の活性化を誘導できるが、外来性の TRAF6 がない状況下では、内在性 TRAF6 への働きかけによる NF- κ B の活性化は誘導できない。ある程度の量の TRAF6 の一過的過剰発現によって、TRAF6 の部分的な活性化が引き起こされたと仮定すると、TIFA の FHA ドメインは、TRAF6 の多量体形成特異的な TRAF6 の活性化の初期段階に必要であるかもしれない。そのうえで、TIFA の FHA ドメインの本当の役割を明らかにするための研究が必要であると考えられ、TIFA の FHA ドメインに結合するタンパク質の同定が急がれる。

TIFA が IRAK-1 と TRAF6 の結合に必須であるか、また、その結合を安定化しているかどうかは、明らかになっていない。一つの興味深い可能性としては、TIFA がシグナルの強さを決めているのではないかということである。IRAK-1 は、3つの TRAF6 結合配列を有しており (123)、また、TIFA も一つの TRAF6

結合配列を持っている。TIFA は、IL-1 刺激依存的に IRAK-1 と結合するので、シグナルに関与できる TRAF6 の量は、TIFA の発現が低い細胞にくらべて TIFA の発現が強い細胞で多くなると考えられる。さらに、IRAK-1 と TIFA が結合することによって、構造的な変化が起こって TRAF6 とのアフィニティーがより増す可能性も考えられる。また、TIFA の FHA ドメインが IRAK-1 や IRAK-4 の基質と結合することも考えられ、そのために、IRAK-1/TIFA/TRAF6 複合体が安定化されるかもしれない。IRAK-1 のキナーゼ活性が、293T 細胞においては、IL-1 シグナルに必要でないことが報告されている (130)。おそらく、IRAK-1 のキナーゼ活性は、他の特定の細胞株において影響があることを意味しているのかもしれない。そう考えると、TIFA が脾臓に多く発現していて、骨格筋にほとんど発現していないことは、非常に興味深い。Pellino 1 というタンパク質も、IL-1 刺激依存的に IRAK-1/IRAK-4/TRAF6 複合体に結合できる因子として報告された (131)。Pellino 1 も TIFA と同じ働きをしていると考えられる。しかしながら、TIFA と Pellino 1 では、発現している臓器が違っていて、Pellino 1 は、脾臓には弱くしか発現しておらず、骨格筋に非常に多く発現している。

TRAF6 は、Toll/IL-1 シグナルの他に、TNF 受容体スーパーファミリーの CD40 や、RANK、X-linked ectodysplatin-A2 receptor (XEDAR)、p75 neutrophin nerve growth factor receptor のシグナルに関与している (109, 110, 132, 133)。最近の研究より、p75 NGFR は、NGF 依存的に IRAK-1 を引き付けることが分かったが(134)、その他の受容体では、その 3 量体形成には、IRAK-1 は必要とならない (135)。限定的な実験であるが、TIFA は、CD40 や RANK の細胞質ドメインとの結合は認められていないことから、TIFA は、p75 NGFR をのぞいた TNFR スーパーファミリーにおける TRAF6 の多量体形成には、関与していないようである。したがって、TIFA は、IRAK-1 と TRAF6 の両方が関与するシグナルのみで働いている可能性が大きい。TIFA シグナルの分子機構の解明、とくに FHA ドメインの役割の解明には、TIFA タンパク質の結晶構造解析や FHA ドメインの標的タンパク質の解明が必要と思われる。さらなる TIFA の研究によって、炎症および初期免疫応答における新しい発見がなされることが期待される。

第3章 破骨細胞分化における NF- κ B の役割

第1節 概論

通常、骨代謝は、骨吸収と骨形成のバランスの上に成り立っており、骨吸収は破骨細胞、骨形成は骨芽細胞が行っている。このバランスが崩れると、リウマチや骨粗鬆症などの骨代謝異常病が引き起こされる。関節リウマチでは、骨破壊や関節での組織破壊が起こることが報告されている (136, 137, Fig. 11)。骨量の減少や、その構造的欠陥は、炎症が起こっているところに破骨細胞が多く引き寄せられるからであると考えられる (136, 138, 139)。その際、前駆細胞から破骨細胞形成に必須な因子である receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) が、関節リウマチ時に起こる骨破壊に重要な役割をしている (140)。

破骨細胞は、多核細胞で、末梢血中の単核細胞から形成される (141)。これらの前駆細胞は、骨の表面で、サイトカイン、ホルモン、骨芽細胞などの影響によって、破骨細胞に分化する。これらの細胞から産生される破骨細胞分化に必須な因子として、macrophage colony stimulated factor (M-CSF)が見出された。M-CSF の欠損は、Bcl-2 を過剰発現させることで回復することから、前駆細胞の生存因子としての役割が中心であると考えられている (142)。RANK は、細胞膜結合型の tumor necrosis factor (TNF) receptor のファミリーで、RANKL が結合することで、細胞内にシグナルを伝達し、そのシグナルは、生体内で破骨細胞の形成、活性化、生存に必須である (143)。このことは、RANKL ノックアウトマウスが、破骨細胞の形成不全で、骨大理石病の表現型を示すことから明らかである (144)。RANKL は、活性型ビタミン D₃、プロスタグランジン (PG)E₂、副甲状腺ホルモン(PTH)、IL-6 などのこれまで知られている多くの骨吸収誘導因子によって、骨芽細胞などの破骨細胞形成を促進する細胞表面に誘導されることが分かった。

したがって、RANKL-RANK によるシグナル伝達については、詳細な研究が行われてきた (145, Fig. 12)。RANK の細胞質ドメインに結合するタンパク質の探索が行われ、TRAF ファミリーがその候補とされた。TRAF ファミリーは、RANKL によるシグナルを下流に伝え、NF- κ B や AP-1 といった転写因子の活性化、および ERK や p38、Akt といった MAPK の活性化を引き起こすことが分かった (146-149)。TRAF ファミリーの中でも、TRAF6 が特に重要であることが、そのノックアウトマウスの研究から明らかとなった。TRAF6 ノックアウトマウス

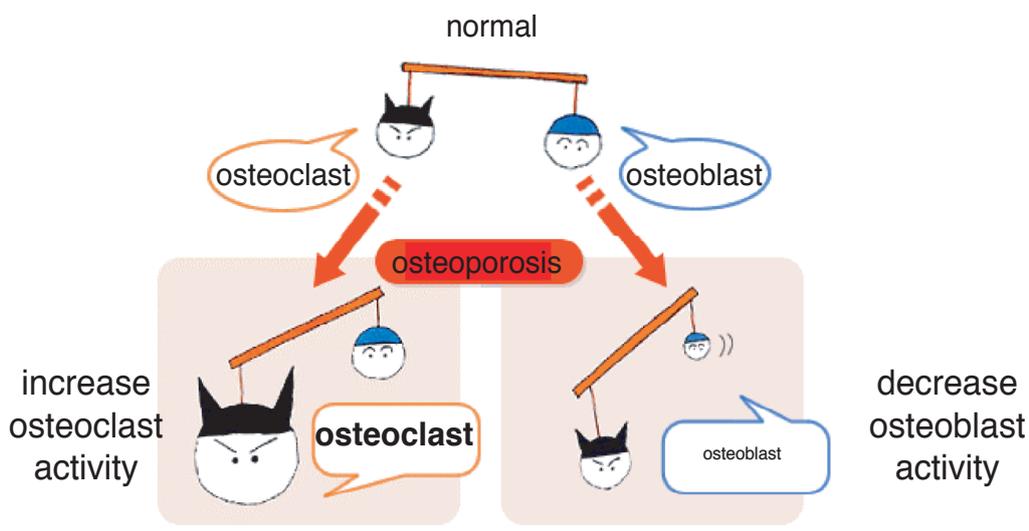


Fig. 11 Mechanism of the bone metabolism

は、2つのグループから報告されており、両グループとも大理石骨病の表現型を示すことを報告している。しかしながら、この病態の原因については、意見が食い違い、Inoue らのグループでは、破骨細胞の分化自体が誘導できないことが原因であることを主張しており (109)、Tak Mak らのグループでは、破骨細胞自体の分化誘導はできるが、活性化が起こらないことが原因であると主張した (110)。現在では、TRAF6 ノックアウト細胞にレトロウィルス発現系を用いて、TRAF6 の各ドメインを発現させ、破骨細胞の分化誘導にどのドメインが必須かどうかを調べた研究において、TRAF6 は、破骨細胞の活性化のみならず分化誘導に必須であることが確かめられている (150)。前述した通り、TRAF6 は、さまざまな因子の活性化を誘導する。その中で、遺伝学的な手法で破骨細胞分化における必要性が示されたのは、NF- κ B のみ (151)でその他のタンパク質については、阻害剤やドミナントネガティブ変異体の過剰発現によってしか、示されていない。

NF- κ B p50/p52 double knockout mouse の他にも、遺伝子欠損マウスが大理石骨病の病態を示す例がある。AP-1 の構成因子である c-Fos は、RANKL によって活性化するが、*c-fos* のノックアウトマウスが大理石骨病の表現型を示すことから、c-Fos の経路も RANK シグナルによる破骨細胞分化に必須であることが示された (152-154)。また、*PU.1* ノックアウトマウスや、*mi* マウスが大理石骨病を呈することから、PU.1 や MITF などの転写因子も破骨細胞分化に必須であることが明らかになっている (142)。

破骨細胞分化において、マスターキーと考えられる因子が、RANKL 刺激によるゲノムワイドスクリーニングによって発見された。T 細胞の増殖、活性化に重要な転写因子である、nuclear factor of activating T-cell c1 (NFATc1)は、破骨細胞前駆細胞に RANKL 刺激をしたとき、その mRNA およびタンパク質の発現が上昇し、その発現上昇は、TRAF6^{-/-}および c-Fos^{-/-}細胞ではみられない。さらに、NFATc1 ノックアウト細胞では、RANKL による破骨細胞の分化が誘導されない。また、NFATc1 は、破骨細胞分化の過程において、活性化し、核に凝集することで、転写活性化しており、生体内においても TRAP 陽性細胞においても共発現していることが分かった (155)。また、RANKL による NFATc1 の活性化には、カルシウム依存性脱リン酸化酵素であるカルシニューリンが関与しており、抑制剤である、FK506 やシクロスポリン A が RANKL による破骨細胞形成を抑制することも分かった (155)。したがって、NFATc1 は、RANKL によ

て誘導される破骨細胞分化に必要な十分な因子であり、RANK シグナルで最も重要な因子であることが示された。

しかしながら、RANKL によって活性化される重要な因子である、NF-κB の破骨細胞分化に与える役割は、その分子機構の面でよく分かっていない。そこで、NF-κB 阻害剤(-)-DHMEQ をもちいて、RANKL による破骨細胞分化における NF-κB の分子メカニズムについて解析を行った。

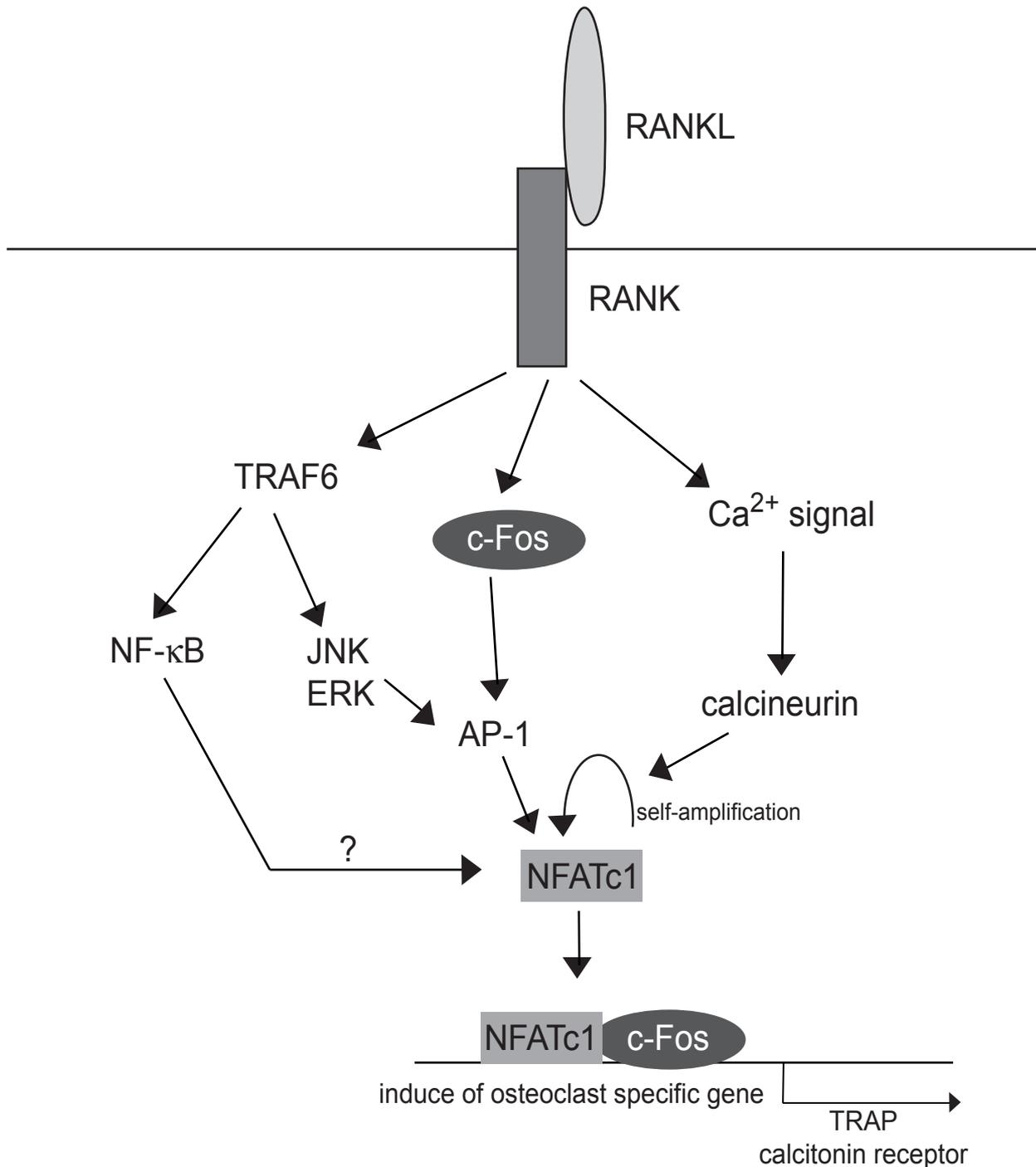


Fig.12 Schematic model of RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis.

第2節 実験方法

3-2-1 細胞株

ヒト白血病 T 細胞由来 Jurkat 細胞	ATCC より購入
マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞	ATCC より購入

3-2-2 細胞培養

Jurkat 細胞の培養は次の通りに行った。培養液としては、55℃、30 分間加温することによって、補体成分を非働化した 10 %FBS (JRH Biosciences)を含む RPMI1640 (日水製薬)を用いた。さらに、濾過滅菌した 30 mg/l L-glutamine (Sigma)、および抗生剤として 100 mg/l kanamycin (Sigma)、100 units/ml penicillin G (Sigma)を加えた。また、高温蒸気滅菌した炭酸水素ナトリウム (2.25 g/l)を加え、適切な pH に調整した。この培養液を用いて、37℃、5 % CO₂ 条件下のインキュベータ内で培養し、2~3 日に一回培地を交換することで、継代を行った。

RAW264.7 細胞は、10 % FBS を含む DMEM (日水製薬株式会社)に、濾過滅菌した 30 mg/l L-glutamine (Sigma)、100 mg/l kanamycin (Sigma)、100 units/ml penicillin G (Sigma)と、高温蒸気滅菌した炭酸水素ナトリウム (2.25 g/l)を加えたものを培養液とし、37℃、5 % CO₂ 条件下のインキュベータ内で培養した。2~3 日に、一回培養液を除去したのち、PBS⁻ (8.0 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 0.916 g/l Na₂HPO₄, 0.2 g/l KH₂PO₄)で 2 回細胞を洗浄し、trypsin-EDTA 溶液(8.0 g/l NaCl, 0.4 g/l KCl, 0.0475 g/l Na₂HPO₄, 0.06 g/l KH₂PO₄, 1.0 g/l glucose, 0.02 g/l phenol red, 0.35 g/l NaHCO₃, 0.2 g/l EDTA: pH 8.0, 0.75 g/ml trypsin)で細胞をはがし、継代を行った。

3-2-3 実験動物

C57BL マウス (雌性、7週齢)をクレア株式会社 (Tokyo, Japan)より購入し、1 週間飼育したのちに用いた。

3-2-4 試薬

(-)-DHMEQ 本研究室において、合成(98)されたものを使用
recombinant human receptor activator of NF- κ B ligand (hRANKL)

和光純薬(株)(Osaka, Japan)より購入
recombinant human macrophage colony stimulated factor (hM-CSF)

R&D Systems Inc. (San Diego, CA)より購入
Lipopolysaccharide (LPS; #L2654) Sigma より購入

12-*O*-teradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) Sigma より購入

ionomycin Biomol (Plymouth Meeting, PA)より購入

3-2-5 試薬の調製および保存

試薬はすべて 0.5 %分を培地に添加した時に、目的濃度になるように調製した。

(-)-DHMEQ は、DMSO 中に 10 mg/ml となるように溶解させ、-20 で保存した。使用の際は、メタノールで、最終濃度が、0.3 ~ 10 μ g/ml になるように希釈した。メタノール濃度は、1%にした。

RANKL は、0.05% BSA/PBS を用いて溶解し、100 μ g/ml の濃度にて、M-CSF は、10 μ g/ml の濃度のストック溶液を作成し、-80 で保存した。

TPA は、DMSO 中に 2 mg/ml となるように溶解し、-20 で保存した。

Ionomycin は、エタノール中に 2 mmol/l となるように溶解し、-20 で保存した。

3-2-6 抗体

ウサギ由来抗 I κ B- α 抗体 (C-15) Santa Cruz Biotechnology より購入

ウサギ由来抗 p65 抗体 (F-6) Santa Cruz Biotechnology より購入

ウサギ由来抗 p52 抗体 (C-5) Santa Cruz Biotechnology より購入

ウサギ由来抗 JNK1 抗体 (C-17) Santa Cruz Biotechnology より購入

ウサギ由来抗 p38 抗体 (C-20) Santa Cruz Biotechnology より購入

マウス由来抗 ERK2 抗体 (D-2) Santa Cruz Biotechnology より購入

マウス由来抗 NFATc1 抗体 (7A6) Santa Cruz Biotechnology より購入

ウサギ由来抗 TRAF6 抗体 (H-274) Santa Cruz Biotechnology より購入

ウサギ由来抗 c-Fos 抗体 (H-125) Santa Cruz Biotechnology より購入

ウサギ由来抗 phospho-JNK1/2 抗体

Cell Signaling Technology (Beverly, MA)より購入

ウサギ由来抗 phospho-p38 抗体

Cell Signaling Technology より購入

ウサギ由来抗 phospho-ERK1/2 抗体

Cell Signaling Technology より購入

ヒツジ由来 HRP 標識抗マウス抗体 (#NA931)

Amersham より購入

ヒツジ由来 HRP 標識抗ウサギ抗体 (#NA934)

Amersham より購入

ヒツジ由来 Alexa Fluor 488 標識抗マウス抗体

Molecular Probe (Eugene, Oregon)より購入

ヒツジ由来 Alexa Fluor 546 標識抗ウサギ抗体

Molecular Probe より購入

3-2-7 RAW264.7 細胞の培養と破骨細胞分化

10 %非働化 FBS、200 $\mu\text{g/ml}$ カナマイシン、100 units/ml ペニシリン G、600 mg/ml グルタミン、および 2.25 g/l NaHCO_3 を含む、DMEM 培地 0.5 ml が入った、24 ウェルプレートに RAW264.7 細胞 (4×10^4 cells/well)を播種し、100 ng/ml RANKL および、0.3、1、もしくは 3 $\mu\text{g/ml}$ の DHMEQ を添加し、5 日間培養した。培養後、細胞を 5%パラホルムアルデヒドを含む PBS により、10 分間室温で固定し、PBS ですすいた後、アセトン/エタノール (1:1 v/v)により、30 秒間室温で脱脂した。続いて、固定した細胞を TRAP 染色液 (0.01% naphthol AS-MX phosphate (ICN Biomedicals:), 0.05% fast red violet LB salt (Sigma)、50 mM 酒石酸ナトリウム、90 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0))で室温にて、5 分間染色した。染色終了後、ウェルを蒸留水ですすぎ、風乾した後、顕微鏡で観察した。その際、TRAP 染色液により、明らかに赤色に呈色し、核を 4 つ以上有する多核細胞を破骨細胞とし、その数を数えた。

3-2-8 マウス骨髄細胞由来マクロファージを用いた破骨細胞分化

8 週齢の ICR マウスより、解剖用ハサミを用い、大腿骨および尺骨をとりだした。1 ml シリンジ (テルモ, Tokyo, Japan)と 21 G 注射針 (テルモ)を用いて、髓腔から骨髄細胞を採取した。採取後に、培養液に懸濁させ、ナイロンメッシュを通過させて、不要な部位を取り除いた。このようにして調製した骨髄細胞を 10 %非働化 FBS、200 $\mu\text{g/ml}$ カナマイシン、100 units/ml ペニシリン G、600 mg/ml グルタミン、2.25 g/l NaHCO_3 、10 ng/ml M-CSF を含む、 α -minimum essential medium (invitrogen)を用いて、 1×10^6 cells/ml に調製し、24-well プレートに 0.5 ml づつ

播種した。2 日間培養後、非付着性細胞を洗浄して取り除き、付着性細胞を破骨細胞前駆細胞として用いた。この前駆細胞の培養液に 100 ng/ml の RANKL および、0.3、1、3 $\mu\text{g/ml}$ の(-)-DHMEQ を添加して、2 日間培養した。培養後、3-2-7 と同様にして、細胞を固定し、TRAP 染色を行った。染色後、TRAP 染色により、赤色に呈し、核が 4 個以上の細胞を破骨細胞として、その細胞数を測定した。

3-2-9 gel shift assay

核抽出物の調製は、Andrew, Faller の方法 (156)に従った。

RAW264.7 細胞および骨髓細胞由来マクロファージは、 1×10^6 cells/ml に調製した細胞を 100 mm ディッシュに播種し、各々の濃度の(-)-DHMEQ で、2 時間前処理後、RANKL を 100 ng/ml で処理した。処理後、細胞を氷上に移し、培地を吸引除去し、さらに、ice-cold PBS 5 ml で 2 回洗浄を行った。Buffer A (10 mM HEPES: pH 7.9, 1.5 mM DTT, 0.1 mM PMSF) 400 μl をディッシュに加え、ラバーポリスマンを用いて細胞をはがし、1.5 ml チューブに採取した。15 分間氷上で静置したのち、14,000 rpm、4 、5 分間遠心を行った。上清を吸引除去後、さらに Buffer A を 400 μl 加え、ピペティングを行った。14,000 rpm、4 、5 分間遠心操作を行った後、上清を吸引除去し、Buffer C (20 mM HEPES-KOH: pH 7.9, 25% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF) 40 μl を添加し、ピペティング後に氷上で 20 分間静置した。14,000 rpm、4 、5 分間遠心した後、その上清を核抽出物とした。

DNA プロープの作成は、以下の通りに行った。4 μl の合成オリゴヌクレオチド(Promega: Madison, U.S.A.)、2 μl の γ - ^{32}P -ATP、2 μl の 10 x T4 PNK buffer (0.5 M Tris-HCl: PH 7.6, 0.1 mM MgCl_2 , 50 mM DTT, 1 mM spermidine \cdot HCl, 1 mM EDTA) を水で全量 18 μl とした。さらに、10 units/ml の T4 polynucleotide kinase (T4 PNK; Takara: Ohtsu, Japan) 2 μl を加え、37 で 10 分間反応させた。反応後、TE buffer を 80 μl 加えて反応をとめ、全量を 100 μl とした。充填されていた保存液を除去し、3 ml の蒸留水で置換した Nick column (Amersham)に 100 μl の反応液をチャージした後、400 μl の蒸留水を加え、カラムから溶出したフラクションを 1.5 ml チューブに回収した。さらに、400 μl の蒸留水を添加し、溶出したフラクションを 1.5 ml チューブに回収し、これを標識プロープとした。このプロープを Mini poly-QTM Vial に 1 μl とり、アトムライトを 1.5 ml 加えて混合

し、液体シンチュレーションカウンタで、放射活性を測定し、使用の際に、 3×10^4 cpm/ μ l になるように蒸留水で希釈した。

5 x binding buffer (375 mM NaCl, 75 mM Tris-HCl: pH 7.0, 7.5 mM EDTA, 7.5 mM DTT, 37.5% glycerol, 1.5% NP-40, 5 mg BSA)を 4 μ l、1 mg/ml に調製した poly dI-dC (Amersham)を 1 μ l、核抽出物 5 μ g 分に、全量が 17 μ l になるように蒸留水を加えた。Supershift 用のサンプルには、抗 p65 抗体を 0.5 μ g 添加したものの、競争阻害用のサンプルには、放射ラベルしていないプローブを 1 μ l 添加したものを作成した。これに、放射ラベルされた DNA プローブを 3 μ l 加え、混和した後、室温にて 20 分間インキュベートした。その後、20 μ l の反応液を 1.5 時間 150 V の電圧で前もって電気泳動しておいた 4% polyacrylamide gel (6.7 mM acrylamide (30/2), 1.25 ml 10 X TBE buffer, 42 ml H₂O, 500 ml APS, 50 ml TEMED)のウェルに移し、0.25 X TBE buffer を用いて、150 V で 1 時間電気泳動した。泳動後、ゲルを濾紙に移し、ゲル乾燥機を用いて 80 °C で 1 時間で、ゲルを乾燥させた。このゲルを、-80 °C で 3 時間 X 線フィルム (フジフィルム : Fuji, Japan; HR-A)に感光させた。

3-2-10 ウェスタンブロット法による I κ B、MAPK、NFATc1、TRAF6、c-Fos、p52 の検出

I κ B、MAPK の検出は、次の通りに行った。RAW264.7 細胞および骨髓細胞由来マクロファージは、 1×10^6 cells/ml に調整した細胞を 60 mm ディッシュに播種し、一晚培養後に、3 μ g/ml (-)-DHMEQ を 2 時間前処理した後、100 ng/ml RANKL で刺激した。所用の時間インキュベートした後、細胞を氷上に移し、氷冷した PBS で一回洗浄した後、lysis buffer (50 mM Tris-HCl: pH 5.0, 1% NP-40, 20 mM EDTA, 100 mM Na₃VO₄, 0.1 mg/ml leupeptin, 1 mM PMSF) 100 μ l 加え、ラバーポリスマンで細胞をかき集め、1.5 ml チューブに回収した。さらに、2 x sampling buffer (84 mM Tris-HCl: pH 6.3, 4.6% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.004 % プロモフェノールブルー)を 100 μ l 加え、ピペッティングした。これを、5 分間煮沸したものをサンプルとした。

NFATc1、TRAF6、c-Fos、p52 の検出は、次の通りに行った。3-2-8 と同様の方法で調製した骨髓細胞由来マクロファージを 60 mm プレートに 5×10^6 細胞播種し、100 ng/ml RANKL および 3 μ g/ml (-)-DHMEQ で、24 時間および 48 時間処理した。その後、氷冷した PBS-で細胞を洗浄後、lysis buffer 100 μ l をくわ

え、ラバーポリスマンで細胞をかきとり、1.5 ml チューブに採取した。さらに、2 x sampling buffer を 100 μ l 添加し、5 分間煮沸し、サンプルとした。

SDS ポリアクリルアミド電気泳動は次のように行った。スぺーサ付きのスラブゲル電気泳動用ガラス板 (日本エイド - , Tokyo, Japan)をテフロンストラップで、パッキング後、切り込み型スラブ泳動ガラス板をのせ、これをクリップで固定した。ここに、12.5% ポリアクリルアミドゲル (1.5 M Tris-HCl: pH 8.9 [10 ml], 30% アクリルアミド溶液 [13.3 ml], 10% SDS [0.4 ml], 蒸留水 [15.9 ml], APS [5 mg], TEMED [0.02 ml])を流し込んだあと、蒸留水を 1 ml ゆっくりと流し入れ、気泡を取り除いた。室温で、15 分間放置し、下層ゲルが固まった後、ペーパータオルで、水分を除去した。ここにスタッキング用ポリアクリルアミドゲル (1.0 M Tris-HCl: pH 6.8 [1.3 ml], 30% アクリルアミド溶液 [1.7 ml], 10% SDS [0.1 ml], 蒸留水 [6.9 ml], APS [5 mg], TEMED [0.01 ml])を流し込み、15 分間放置した。ゲルが固まったところで、コーム、テフロンストラップ、クリップの順にはずし、あらかじめ下層にスラブゲル用 running buffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 0.1% SDS)をいれておいた泳動層にゲルをガラス板ごと固定した。上層にも、running buffer をいれ、マイクロシリンジでウェルを洗浄後、ウェルに 50 μ l のサンプルと、10 μ l の分子量マーカ (BRL, NY, USA)をアプライし、50 V の定電圧で泳動した。電気泳動終了後、transfer buffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 20% メタノール) 中で、60 V の定電圧を 3 時間かけて PVDF 膜 (Amersham)に転写した。

転写終了後、PVDF 膜を 5% non-fat skim milk を含む、TBS-0.1% Tween 中で、室温で 30 分間緩やかに振盪した。その後、目的の一次抗体 (Table 3-1 参照)と反応させた。反応終了後、PVDF 膜を TBS-Tween で、5 分ごとに 3 回洗浄し、5% skim milk を含む TBS-Tween で 1000 倍希釈した 2 次抗体 (Table 3-1 参照)と 30 分間反応させた。TBS-Tween で 5 分ごとに 30 分間洗浄後、ECL 法により発色し、フィルム(フジフィルム)に感光させ、検出を行った。

Table 3-1 一次抗体の反応条件

一次抗体	希釈倍率	方法	温度	反応時間	二次抗体種
IκB-α	x 1000	静置	室温	1 h	Rabbit
Tubulin	x 1000	振盪	室温	1 h	Mouse
JNK1	x 500	静置	室温	1 h	Rabbit
p38	x 500	静置	室温	1 h	Rabbit
ERK2	x 500	静置	室温	1 h	Rabbit
phospho-JNK1/2	x 500	振盪	4	O/N	Rabbit
phospho-p38	x 500	振盪	4	O/N	Rabbit
phospho-ERK1/2	x 500	振盪	4	O/N	Rabbit
NFATc1	x 200	静置	室温	1 h	Mouse
c-Fos	x 300	静置	室温	1 h	Rabbit
TRAF6	x 300	静置	室温	1 h	Rabbit
p52	x 1000	静置	室温	1 h	Rabbit

3-2-11 免疫蛍光染色法による p65、NFATc1、TRAF6、c-Fos、p52 の検出

p65 の検出は、次の通りに行った。カバーガラスを敷いた、12-well プレート (Corning Coster) に 1 ml づつ播種した RAW264.7 細胞 (1×10^5 cells) に (-)-DHMEQ を 3 μ g/ml の濃度で、2 時間前処理した。さらに、100 ng/ml RANKL で、45 分間刺激した後、プレートを氷上に移し、氷冷した PBS で細胞を 2 回洗浄した。洗浄後、5 % PFA/PBS を 500 μ l 加え、氷上にて 15 分間インキュベートし、細胞を固定した。PBS で、細胞を 3 回洗浄し、室温にて、1% tritonX/PBS で 5 分間処理した。PBS で 3 回洗浄し、2% BSA/PBS で室温、30 分間処理し、ブロッキング反応を行った。その後、プレート上の、カバーガラスをパラフィルムを張り付けた、シャーレ上にうつし、カバーガラス上に、2 % BSA/PBS で希釈した一次抗体(抗 p65 抗体[100 倍希釈])を 100 μ l をピペットマンを用いてのせた。そのまま、1 時間静置した後、PBS で 2 回洗浄した。1 次抗体反応と同様に、2 次抗体として、Alexa Fluor 546 標識抗ウサギ抗体を 2 % BSA/PBS で 100 倍に希釈したものを 100 μ l 用いた。遮光下、室温で、30 分間反応させた後、PBS で、3 回洗浄を行った。さらに、Hoechst 33258 で、5 分間、核を染色した。その後、PBS で洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。

NFATc1、TRAF6、c-Fos、p52 の検出は、次の通りに行った。カバーガラスを敷いた 12-well プレートに 3-2-8 で示した方法と同様にして、得られた骨髄由来マクロファージの培養液に 100 ng/ml RANKL および 3 μ g/ml の (-)-DHMEQ を添

加して、24 時間または、48 時間培養した。培養後、前述の方法にて、細胞を固定、膜の可溶化、ブロッキングを行った。次に、細胞と抗 NFATc1 抗体(100 倍希釈)、抗 TRAF6 抗体(100 倍希釈)、抗 c-Fos 抗体(100 倍希釈)、抗 p52 抗体(100 倍希釈)とを前述の方法と同様にして、室温で、1 時間反応させた。PBS で、2 回洗浄した後、2 次抗体として、Alexa Fluor 546 標識抗ウサギ抗体および、Alexa Fluor 488 標識抗マウス抗体を 2% BSA/PBS で 100 倍に希釈したもので、遮光下、室温にて、40 分間反応させた。反応後、前述と同様の方法にて、Hoechst 33258 を用いて核染色をし、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

3-2-12 カルシウム振動の測定

glass base dish (IWAKI, Tokyo, Japan)に 3-2-8 で示した方法と同様にして得られた、骨髄由来のマクロファージ(2×10^6 cells)を播種し、10 ng/ml M-CSF で、2 日間培養した。その後、浮遊性の細胞を洗浄した後、10 ng/ml M-CSF、100 ng/ml RANKL また、3 μ g/ml (-)-DHMEQ をもちいて、24 時間処理した。無血清の α -MEM に 5 μ M fluo-4 AM、5 μ M fura Red AM、0.05% puronic F127 を調製し、15 分間、超音波洗浄機で完全に溶解した後、細胞に処理し、37 °C、5 % CO₂ インキュベータで、30 分間加温した。その後、 α -MEM で 2 回洗浄した後、10% FBS、10 ng/ml M-CSF が添加された α -MEM で、20 分間 CO₂ インキュベータで加温した。さらに、Hank's balance salt solution (Sigma)で 2 回洗浄し、画像解析装置付き蛍光顕微鏡(Eclipse TE300; Nikon, Tokyo, Japan)でカルシウム流入を観測した。488 nm の波長で、細胞を励起し、flu-4 は、505-530 nm の波長で、さらに、Fura Red については、600-680 nm の波長で、その強度を 5 秒間隔で計測した。およそ 4 分間計測した後、10 μ M の ionomycin を投与し、さらに 1 分間観測を行った。

3-2-13 破骨細胞の骨吸収能の評価

象牙切片を用いた評価は、次の通りに行った。3-2-8 で示した方法と同様にして得られた、骨髄由来のマクロファージを 96-well プレート上に FBS でコーティングした象牙質切片 (6 mm [直径] x 150 μ m [圧さ]、和光純薬)のうえに、 1×10^4 細胞播種し、10 ng/ml M-CSF および 100 ng/ml RANKL で 3 日間培養することで、破骨細胞へ分化誘導した。破骨細胞を顕微鏡下で確認した後、細胞に 3 μ g/ml (-)-DHMEQ で処理し、さらに 2 日間培養を行った。培養後、象牙質切片を 1 N

NH₄OH で 5 分間超音波洗浄を行い、切片上の破骨細胞をはがした後、蒸留水で洗浄した。さらに、0.5 % トリジンブルー染色液 (Chroma, Munster, Germany) で、1 分間染色した。染色後、水洗し、風乾し、実体顕微鏡で骨吸収孔を観測した。

リン酸カルシウムの微結晶がコーティングされた OAAS™ プレート (Osteogenic Core Technology, Chunan, Korea) を用いた評価は、次の通りに行った。3-2-8 で示した方法と同様にして得られた骨髄由来マクロファージを OAAS™ プレート上に 5×10^4 細胞播種し、10 ng/ml M-CSF、100 ng/ml RANKL で 3 日間培養し、破骨細胞を分化誘導した。破骨細胞を顕微鏡で観察した後、3 µg/ml (-)-DHMEQ を添加し、さらに 2 日間培養を行った。その後、プレートを 5 % 次亜塩素酸ナトリウム溶液で、5 分間処理し、細胞をはがした。さらに、プレートを水洗し、風乾した後、位相差顕微鏡を用いて、破骨細胞による吸収孔を観察した。

3-2-14 LPS 誘導骨破壊モデルマウスを用いた(-)-DHMEQ の評価

マウス(C57BL マウス、雌性、7 週齢)を 1 週間飼育後、1 ml シリンジ、24G 注射針を用いて、(-)-DHMEQ を 8 mg/kg になるように、腹腔投与を行った。(-)-DHMEQ は、10 mg/ml の濃度で、DMSO に溶解したものを RPMI1640 培地で、270 µg/ml に希釈して、(-)-DHMEQ 投与群(n = 3)には、1 ml 投与した。また、control 群 (n = 3)には、RPMI 培地のみを 1 ml 投与した。(-)-DHMEQ を投与後、1 時間おいた後、PBS で溶解した 5 mg/ml LPS (Sigma)を 25 mg/kg の濃度になるように、マウスの頭頂部にシリンジ(Hamilton)を用いて、皮下注射した。また、control 群に対しては、PBS のみを皮下注射した。その後、24 時間おきに同様にして、(-)-DHMEQ を 8 mg/kg の濃度で、腹腔投与を連続 5 日間行った。

6 日目にマウスを頸椎脱臼により、屠殺後、断頭し、頭部のみを固定液 (10 % ホルムアルデヒド、0.5% グルタルアルデヒド、PBS⁻ base) 45 ml に浸し、2 日間、4 °C で振盪し、固定した。その後、PBS⁻ で一昼夜振盪し、洗浄した後、裁断機を用いて、頭部頭蓋冠部位のみを採取した。採取後の頭蓋冠の頭皮部位のみをピンセットを用いて、剥いだ後に、ナイロンメッシュにくるみ、脱灰液 (10 % EDTA-NaOH pH 7.0)に浸し、4 °C にて、2 週間振盪し、脱灰を行った。なお、この際、脱灰液は、5 日おきに交換を行った。脱灰終了後に、PBS⁻ で、一昼夜振盪し洗浄を行った。洗浄した頭蓋冠を、サンプル管中で、80 % エタノール

溶液で一昼夜、4 で振盪し、さらに、90 %エタノールに交換し、一昼夜振盪、ついで、100 %エタノールに交換し、一昼夜振盪し、脱水を行った。つぎに、100 %アセトンに頭蓋冠を浸し、同様にして、一昼夜振盪することで、サンプルの脱脂を行った。

つぎに、サンプルを JB-4 embedding Kit (Polysciences, Inc., Warrington, PA)の樹脂に浸し、4 日間 4 で、振盪し樹脂振盪を行った。また、この時、2 日に一回、振盪液を交換した。その後、型にサンプルを移した後、重合開始剤を加えた JB-4 樹脂を型に流し込んだ。窒素気流下、2 時間静置した後に、凝固したことを確認後、サンプルを型からはずしとった。はずしたサンプルを、クライオスタットを用いて、厚さ 2 μm の切片を作成した。切片は、切り始めから 100 μm ごとに 3 枚ずつ作成し、スライドガラスに張り付け、エアスプレーを用いてしわをのばした後、風乾した。風乾した切片を、前述した TRAP 染色液に浸し、37 で 1 時間染色し、水洗することで、TRAP 染色を行った。さらに、メチルグリーン染色液で、室温下、10 分間染色を行い、水洗、風乾した。この切片をエントラニュー封入剤 (Sigma)を用いて、封入した。この切片を位相差顕微鏡で観察し、さらに、切片上の TRAP 陽性で、核 4 つ以上の細胞を数えた。また、骨髓腔の測定は、切片の顕微鏡写真を Adobe Photoshop によりとりこみ、その画像を NIH Image をもちいて、面積の測定を行った。また、骨密度測定は、DCS-600R (Aloka)を用いて行った。なお、本実験における実験動物の取扱いについては、東京医科歯科大学朝霧成学先生ならびに青木和広先生の指導のもとで適切に行った。

第3節 実験結果

3-3-1 マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞における(-)-DHMEQ による RANKL 誘導 NF- κ B 活性化の阻害

RAW264.7 細胞を RANKL により刺激すると、NF- κ B の活性化が誘導される。そこで、NF- κ B 阻害剤(-)-DHMEQ が、その活性化を抑制するかを確かめることとした。NF- κ B は、活性化すると DNA に結合して、標的遺伝子を誘導することが知られている。まずは、NF- κ B の DNA 結合能を調べるために、Electroporesis Mobility Shift Assay (EMSA)法を用いて調べることにした。まず細胞に、(-)-DHMEQ を 1-10 μ g/ml の濃度で、2 時間前処理し、その後 RANKL で、30 分間刺激後、その核抽出物を抽出し、EMSA を行った。その結果、(-)-DHMEQ は、その濃度依存的に、NF- κ B の活性化を抑制し、とくに、3 μ g/ml 以上の濃度で、RANKL による NF- κ B の活性化を完全に抑制した (Fig. 13A)。また、時間依存的な(-)-DHMEQ による、NF- κ B の抑制効果を調べるために、RAW264.7 細胞に (-)-DHMEQ を 3 μ g/ml の濃度で、2 時間前処理後、RANKL で刺激し、0, 15, 30, 60 分後の核抽出液を抽出し、EMSA を行った。3 μ g/ml の(-)-DHMEQ を処理した場合、NF- κ B の活性化をあらわすバンドは消失し、その効果は、RANKL 刺激後、60 分後においても持続していた (Fig. 13B)。さらに、p65 抗体を用いた、super-shift が検出されていることから、このバンドが、NF- κ B 特異的であることが示されている (Fig. 13A and 13B, *right lane*)。

Jurkat 細胞を用いた研究により、(-)-DHMEQ が TNF- α 刺激依存的な NF- κ B 活性化において、I κ B の分解を阻害しないことが分かっている (97)。そこで、RANKL による、NF- κ B 活性化の阻害機構も同様であるか調べるため、I κ B の分解に与える(-)-DHMEQ の影響を調べることにした。3 μ g/ml の(-)-DHMEQ を RAW264.7 細胞に 2 時間処理後、100 ng/ml の RANKL で、細胞を刺激し、それぞれ、0, 5, 15, 30, 60 分後の細胞抽出液を調製し、抗 I κ B 抗体および抗 tubulin 抗体を用いて、ウエスタンブロットを行った。その結果、(-)-DHMEQ を投与していない細胞においては、RANKL 刺激後、5 分で I κ B が分解しはじめ、15 分でほぼ消失し、60 分後には、再誘導されていることが分かった (Fig. 13C, *upper, left 5 lanes*)。I κ B が NF- κ B の標的遺伝子の一つであることから、NF- κ B が活性化されると、I κ B の再誘導が起こることが知られている (45)。しかしながら、(-)-DHMEQ を処理した細胞において、RANKL 刺激後、5 分で I κ B の分解が始まり、それ以降、I κ B の再誘導は、起こらなかった (Fig. 13C, *upper, right 5 lanes*)。

さらに、RANKL によって誘導される、NF- κ B の核移行を(-)-DHMEQ が阻害するか、免疫染色法を用いて調べた。I κ B から分離した、NF- κ B は、NLS が露出することで、核移行することが知られており (66, 67)、TNF α 刺激による、NF- κ B の核移行を(-)-DHMEQ が抑制することが、Jurkat 細胞を用いた研究により分かっている (97)。そこで、RAW264.7 細胞に 3 μ g/ml の(-)-DHMEQ を 2 時間処理後、RANKL 刺激し、45 分後の p65 の局在を抗 p65 抗体を用いて、検出した。(-)-DHMEQ を処理していない細胞では、p65 は、細胞全体に局在しており、核に移行していることが示された (Fig. 13D, *upper, center panel*)。しかしながら、(-)-DHMEQ を処理した細胞では、p65 は、細胞質に局在しており、核移行が阻害されていることが示された (Fig. 13D, *upper, right panel*)。以上の結果より、(-)-DHMEQ は、RANKL によって誘導される NF- κ B の活性化を核移行の段階で抑制することが分かった。

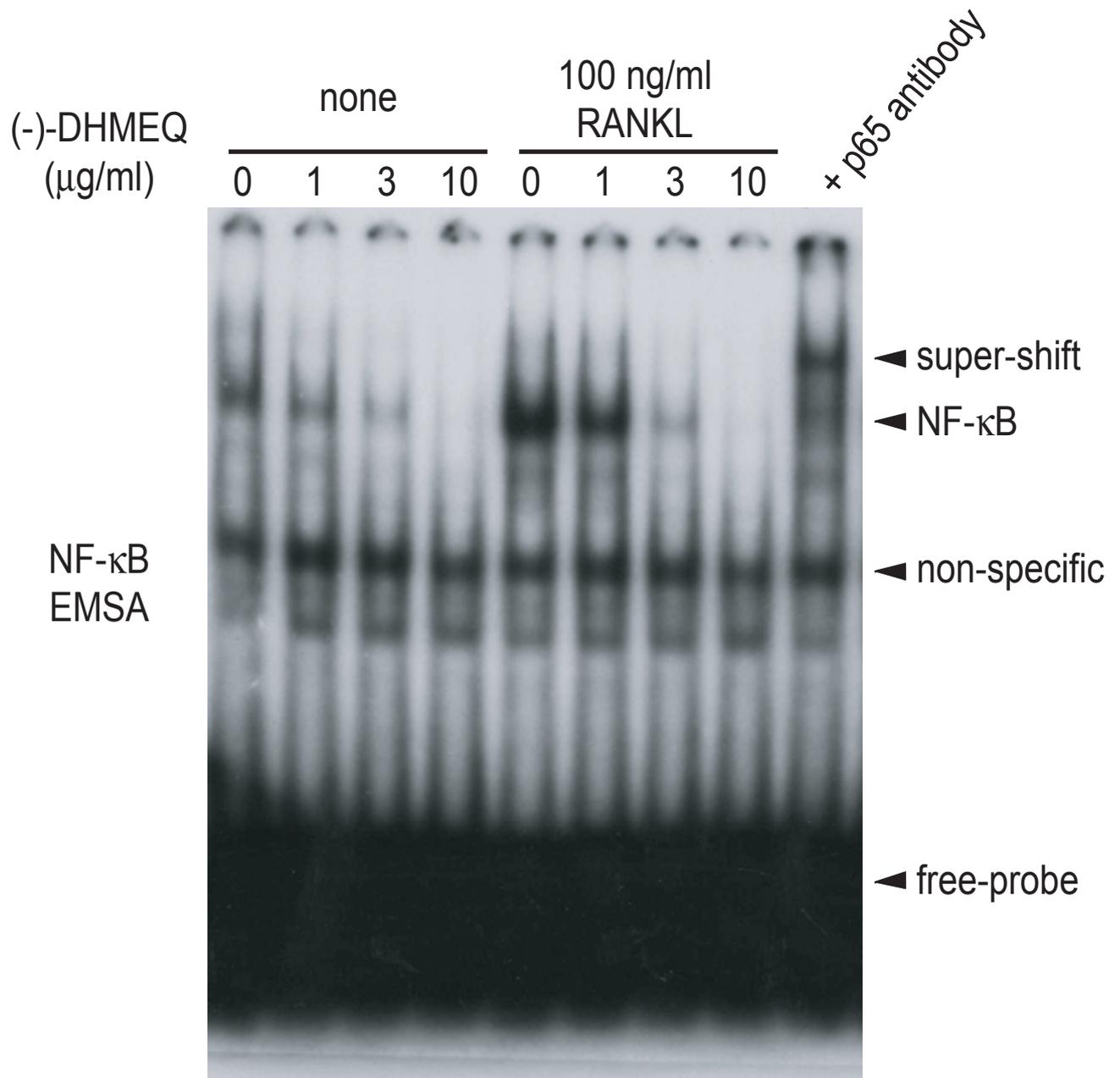


Fig. 13A Inhibition of RANKL-induced NF-κB activation by (-)-DHMEQ. RAW264.7 cells were cultured with or without (-)-DHMEQ in presence or absence of RANKL for 30 min. Then the nuclear extract was assayed by EMSA. Sample were loaded on a 4 % polyacrylamide gel and electrophoresed at 150 V. An autoradiogram of the gel was shown.

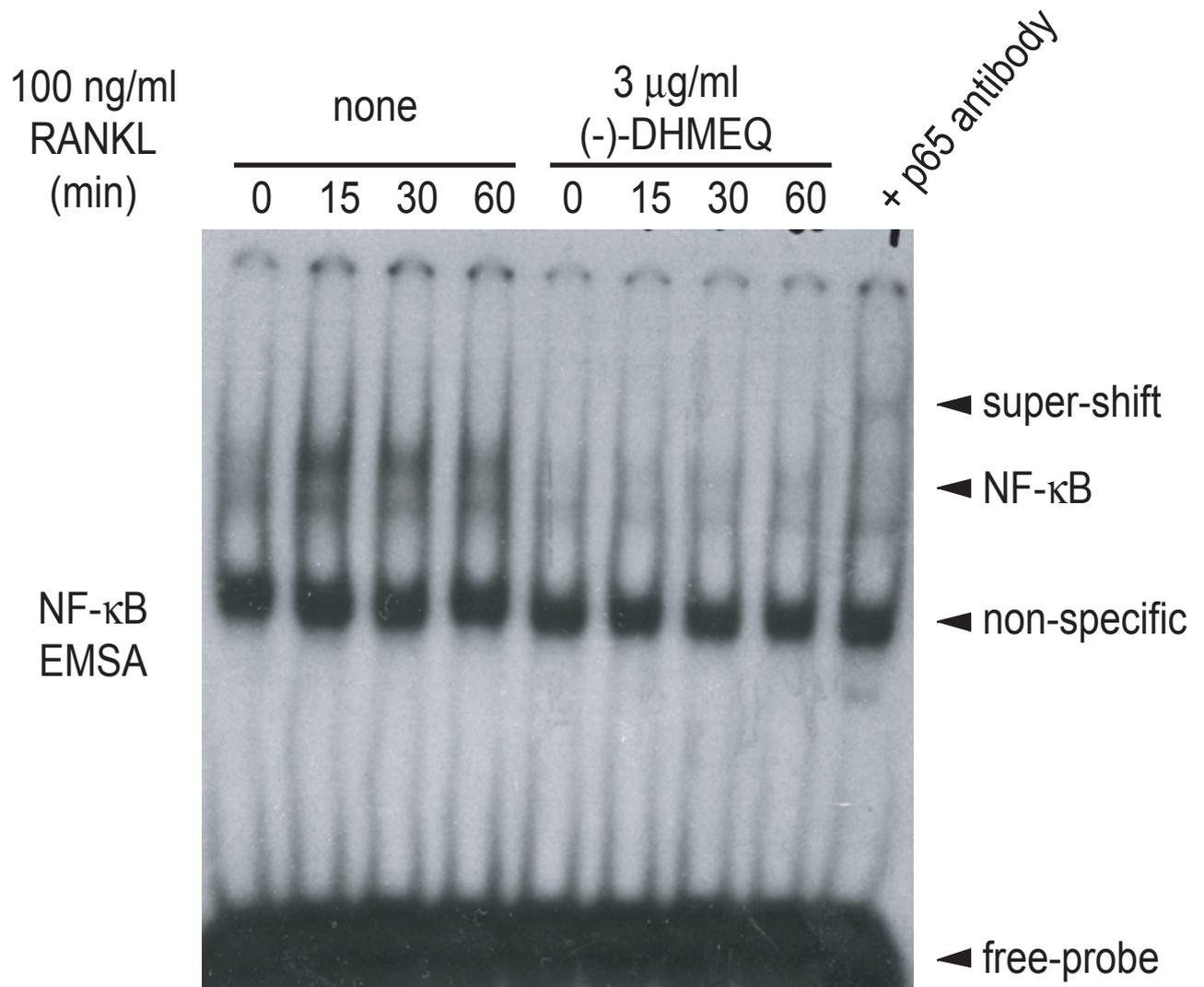


Fig. 13B Inhibition of RANKL-induced NF- κ B activation by (-)-DHMEQ in time course. RAW264.7 cells were cultured with or without 3 μ g/ml (-)-DHMEQ in presence of RANKL for indicated time. Then the nuclear extract was assayed by EMSA. Sample were loaded on a 4 % polyacrylamide gel and electrophoresed at 150 V. An autoradiogram of the gel was shown.

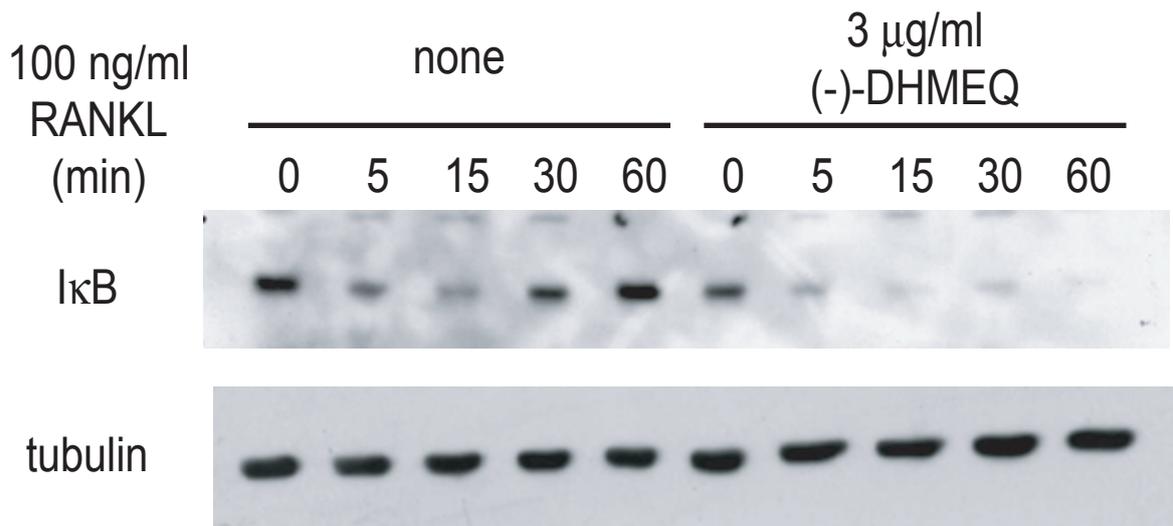


Fig. 13C Effect of (-)-DHMEQ on RANKL-induced I κ B degradation and resynthesis. RAW264.7 cells were treated with 100 ng/ml RANKL alone or together with 3 μ g/ml (-)-DHMEQ for indicated times. The lysates were fractioned on a polyacrylamide gel, and immunoblotted with anti-I κ B and anti-tubulin.

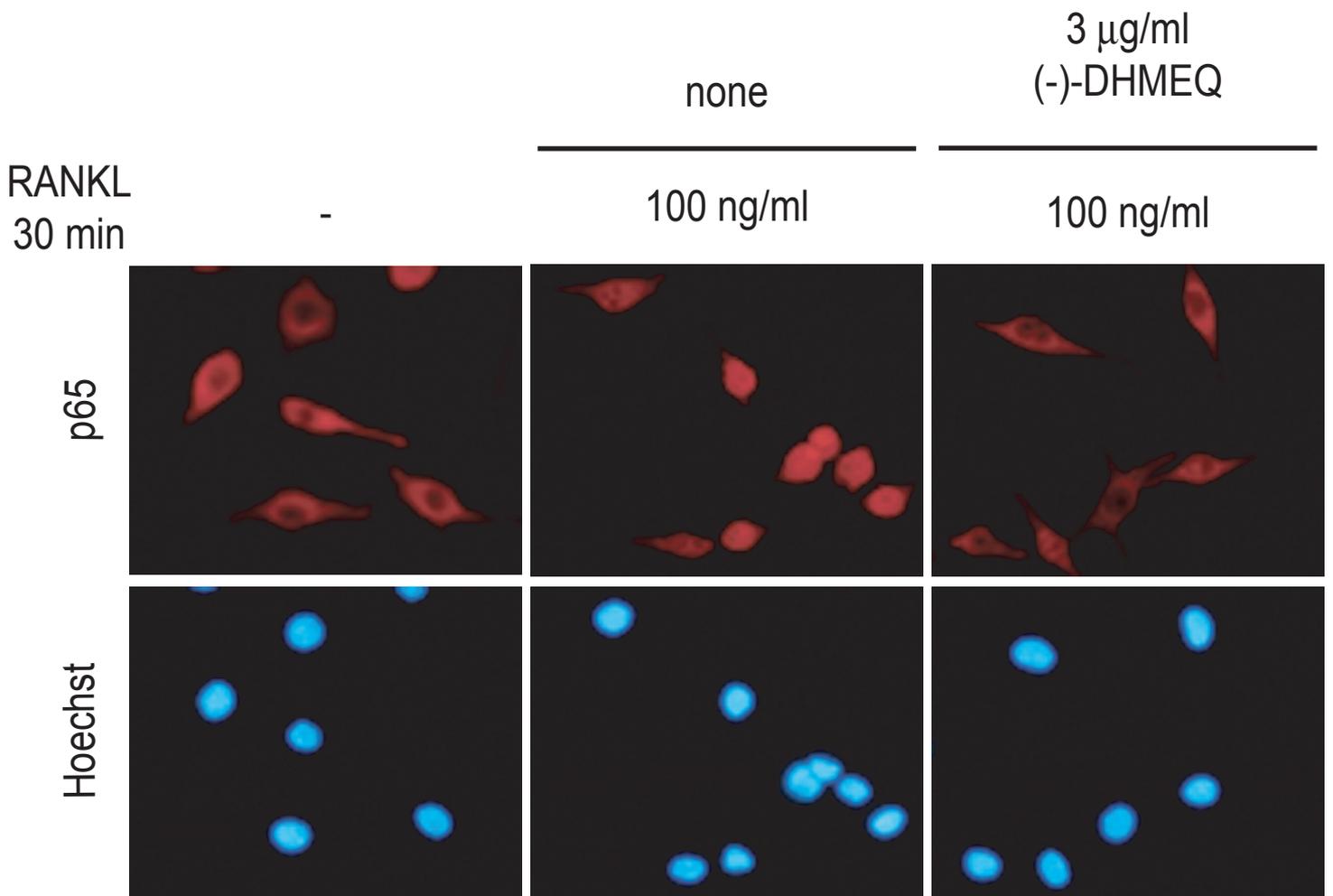


Fig. 13D Inhibition of RANKL-induced NF- κ B nuclear translocation by (-)-DHMEQ. RAW264.7 cells were treated with or without 3 $\mu\text{g/ml}$ (-)-DHMEQ and with or without 100 ng/ml RANKL for 30 min, and then cells were fixed and stain with anti-p65 antibody and Hoechst 33258. Magnification, X 40.

3-3-2 RAW264.7 細胞における(-)-DHMEQ による RANKL 誘導破骨細胞分化の阻害

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 は、RANKL 存在下 5 日間培養すると、破骨細胞に分化誘導される。そこで、(-)-DHMEQ が、RANKL によって誘導される破骨細胞分化を抑制するかを調べることにした。100 ng/ml RANKL 存在下、(-)-DHMEQ の濃度を 0, 0.3, 1, 3 $\mu\text{g/ml}$ として、RAW264.7 細胞を 5 日間培養した。培養後、固定し、TRAP 染色したところ、TRAP 陽性で、多核の細胞が、(-)-DHMEQ の濃度依存的に減ることが分かった (Fig. 14A)。さらに、TRAP 陽性で、核の数が 4 つ以上の細胞を数えたところ、(-)-DHMEQ 濃度依存的に、減少しており、(-)-DHMEQ の濃度が、3 $\mu\text{g/ml}$ の時に、完全に抑制した (Fig. 14B)。

破骨細胞が、分化、活性化すると cathepsin K の発現が誘導され、さらに、活性化することが知られており、cathepsin K は、破骨細胞分化における 1 つのマーカとされている。そこで、(-)-DHMEQ が TRAP 染色と同様に、cathepsin K の発現および活性化を抑制しているかを cathepsin K detection kit を用いて調べた。cathepsin K detection kit には、cathepsin K の基質が試薬として含まれており、cathepsin K がこの基質を切断することによって、蛍光を発する。RAW264.7 細胞に 100 ng/ml RANKL 存在下、3 $\mu\text{g/ml}$ (-)-DHMEQ を処理し、5 日間培養後、cathepsin K detection kit を用いて、活性を調べたところ、(-)-DHMEQ は、cathepsin K の発現および活性化を阻害していた (Fig. 14C)。したがって、(-)-DHMEQ は、RAW264.7 細胞における RANKL 誘導破骨細胞分化を抑制することが、TRAP および cathepsin K の 2 つのマーカから確かめられた。

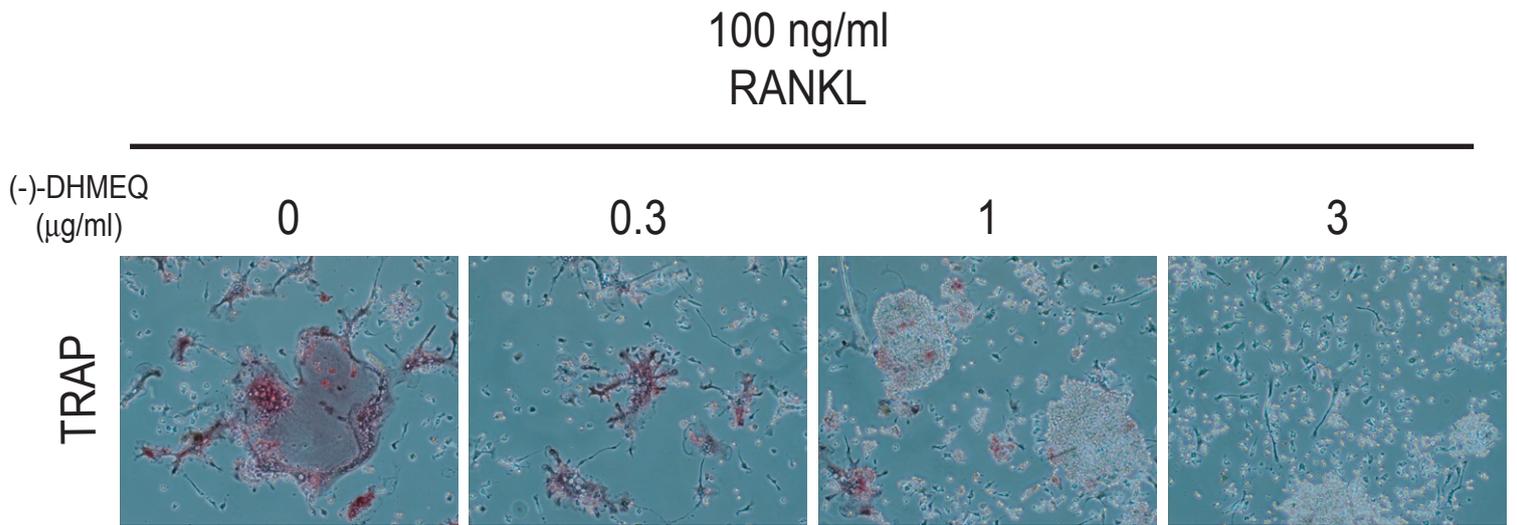


Fig. 14A Inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis in RAW264.7 cells by (-)-DHMEQ. RAW264.7 cells were cultured with the indicated concentrations of (-)-DHMEQ in the presence of 100 ng/ml RANKL for 5 days. The cells were then fixed and stained for TRAP, and photographs were taken. Magnification, X 20.

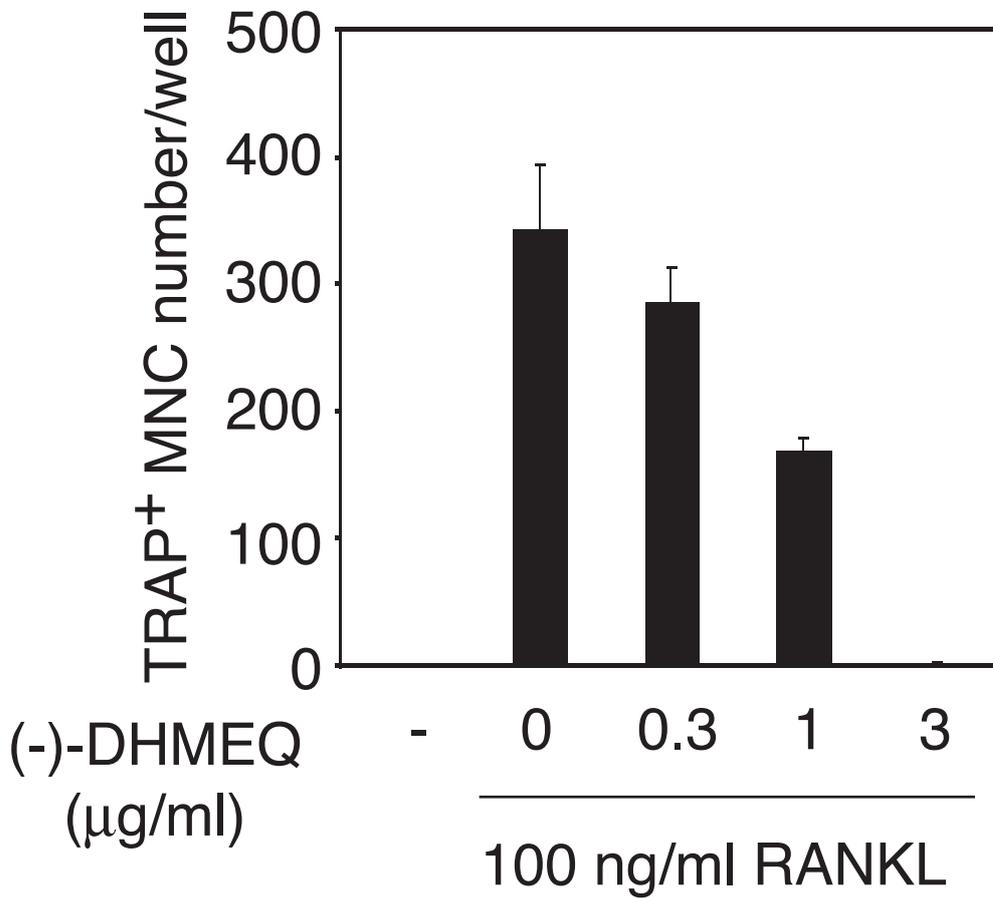


Fig. 14B Quantitative analysis of the effect of (-)-DHMEQ on RANKL-induced osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated as in "A." Multinucleate (> 3 nuclei) TRAP-positive cells per well were counted. Each value is mean \pm S.D. of triplicated determinations.

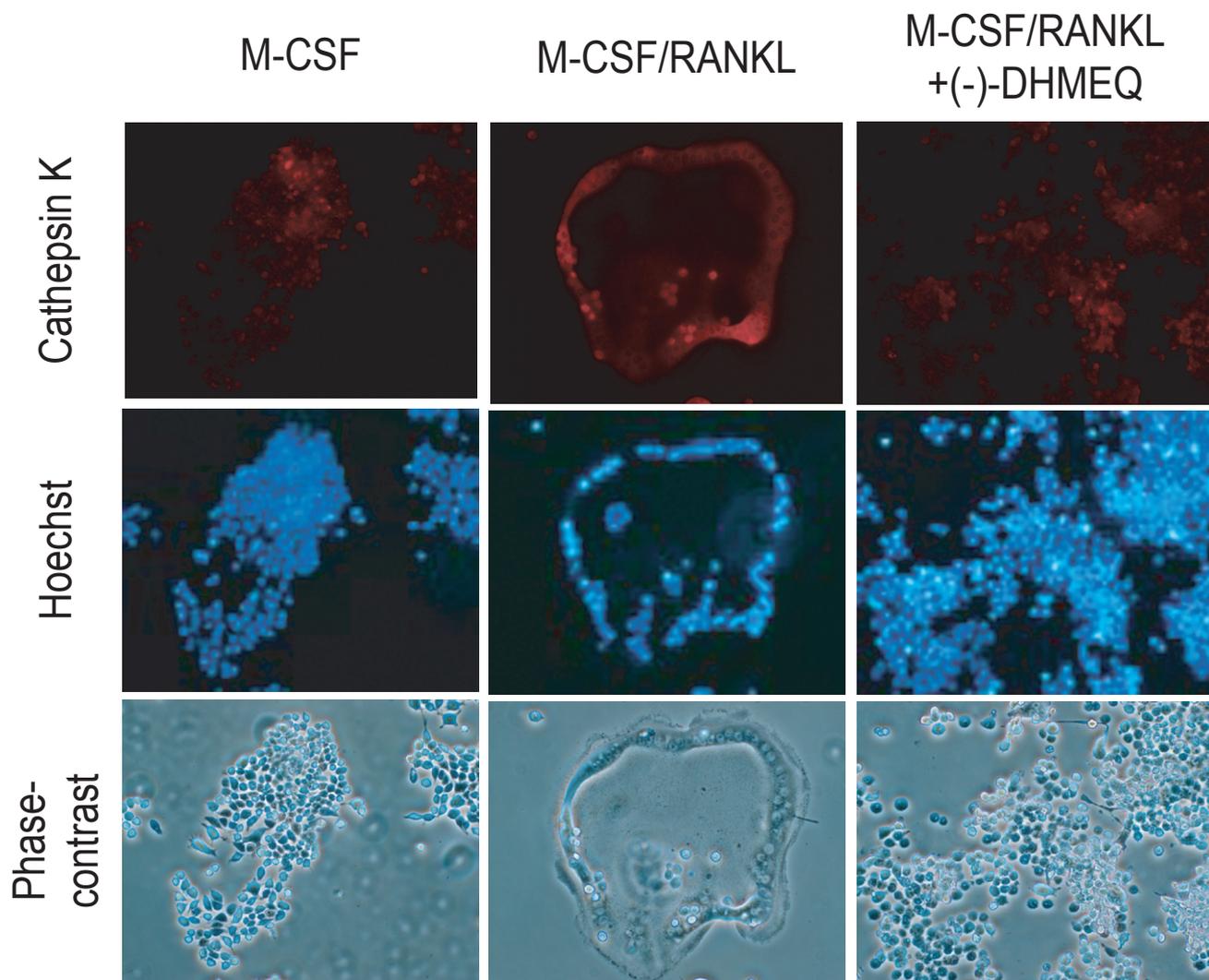


Fig. 14C Effect of (-)-DHMEQ on RANKL-induced cathepsin K activation in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were incubated with 100 ng/ml RANKL in the presence or absence of 3 μ g/ml (-)-DHMEQ for 5 days. Then the activity of cathepsin K was visualized as described in *Experimental Procedures*.

3-3-3 マウス骨髄由来マクロファージ(BMMs)を用いた(-)-DHMEQ による RANKL 誘導 NF- κ B 活性化および MAPK 活性化への影響

マウス骨髄細胞由来マクロファージ(BMMs)は、マウス骨髄細胞から、M-CSF 存在下、培養することで調製できる。BMM は、破骨細胞分化についての研究で非常によく用いられる。そこで、RAW264.7 細胞で得られた(-)-DHMEQ の効果、すなわち、RANKL によって誘導される NF- κ B 活性化の抑制、および破骨細胞分化の抑制について同様の結果を得られるか、BMM を用いて検討することとした。

ICR マウス(雌性、8 週齢)の大腿骨および尺骨から、骨髄細胞を調製し、M-CSF によって、BMM を誘導した。誘導した BMM に、(-)-DHMEQ を 2 時間前処理し、RANKL で刺激し、30 分後に核抽出物を調製し、EMSA を行った。その結果、(-)-DHMEQ は、その濃度依存的に RANKL によって誘導される NF- κ B の活性化を抑制し、3 μ g/ml の濃度で完全に抑制した (Fig. 15A)。

RANKL により、MAPK も同様に活性化することが知られている (147)。そこで、(-)-DHMEQ が、RANKL による MAPK の活性化に対して影響を与えるか調べることにした。前述と同様の方法で調製した BMM を(-)-DHMEQ で 2 時間前処理し、RANKL で刺激後、0, 5, 15, 30, 60 分後に細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロットを行った。MAPK の活性化は、それぞれそのリン酸化抗体を用いて、そのリン酸化をもって活性とした。JNK、p38、ERK それぞれの MAPK について、(-)-DHMEQ は、活性化に影響を与えなかった (Fig. 15B)。したがって、(-)-DHMEQ は、RANKL による NF- κ B の活性化のみを抑制し、MAPK の活性化については影響を与えなかった。

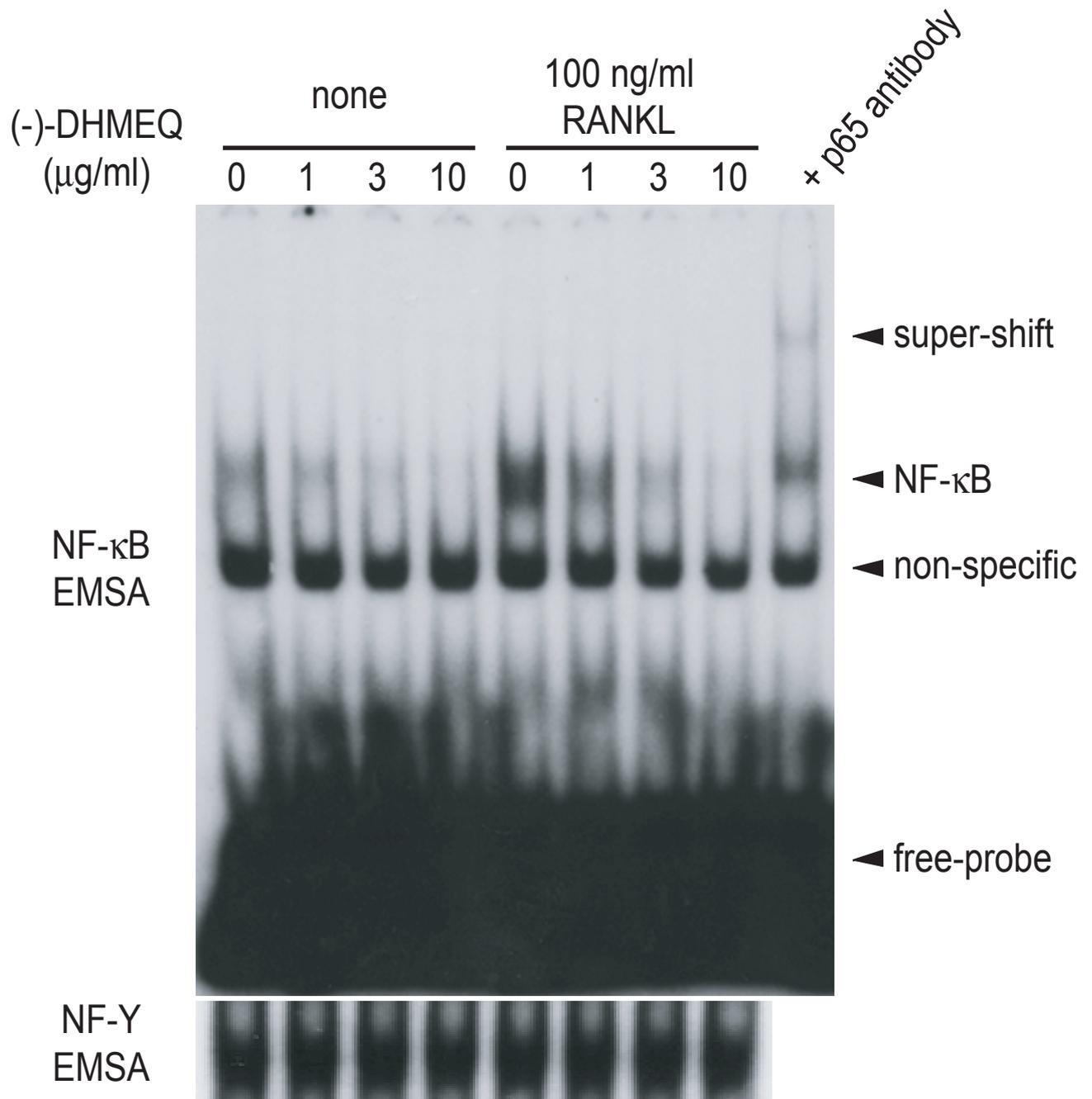


Fig. 15A Inhibition of RANKL-induced NF- κ B activation by (-)-DHMEQ in BMMs. BMMs were cultured with or without (-)-DHMEQ in the presence or absence of RANKL for 30 min. NF-Y DNA-binding activity was measured as internal control. Then the nuclear extract was assayed by EMSA. Samples were loaded on a 4 % polyacrylamide gel and electrophoresed at 150 V. An autoradiogram of the gel was shown.

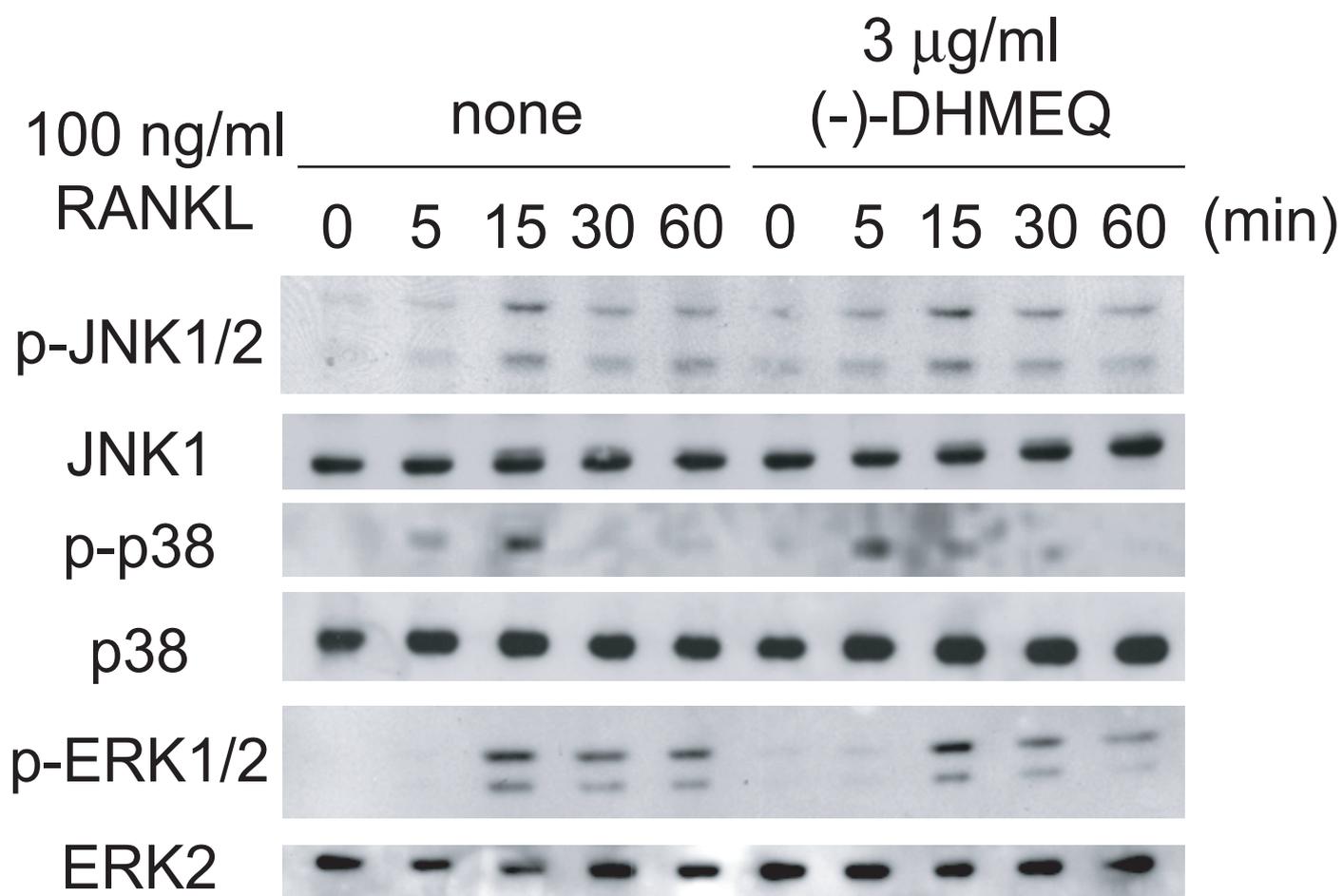


Fig. 15B Effect on RANKL-induced MAPKs activation by (-)-DHMEQ in BMMs. BMMs were stimulated 100 ng/ml RANKL in the presence or absence of 3 μ g/ml (-)-DHMEQ for indicated times. The cell lysates were fractionated by 12.5% polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotted with anti-phospho-JNK, anti-phospho-p38, or anti-phospho-ERK.

3-3-4 マウス骨髄細胞由来マクロファージにおける(-)-DHMEQ による RANKL 誘導破骨細胞分化の阻害

M-CSF によって誘導される骨髄細胞由来マクロファージは、M-CSF、RANKL 共存下 2~3 日間培養すると、破骨細胞に分化誘導できる。(-)-DHMEQ による破骨細胞分化への影響を調べるため、(-)-DHMEQ (0, 0.3, 1, 3 $\mu\text{g/ml}$)共存下、RANKL により BMM を破骨細胞に分化誘導した。RANKL 存在下、2 日間培養した後、細胞を固定し、TRAP 染色を行った。(-)-DHMEQ の濃度依存的に TRAP 陽性で多核の細胞が減少していた (Fig. 16A)。さらに、(-)-DHMEQ を処理すると破骨細胞自体の大きさも、小さくなることが分かった。実際に、TRAP 陽性で、核の数が 4 つ以上の細胞を数えたところ、(-)-DHMEQ 濃度依存的に減少しており、(-)-DHMEQ を 3 $\mu\text{g/ml}$ 投与したときには、完全に消失した (Fig. 16B)。

(-)-DHMEQ による、破骨細胞分化の抑制が、BMM 自体の増殖抑制であることを否定するため、BMM の増殖に対する(-)-DHMEQ の効果を調べることにした。3 $\mu\text{g/ml}$ の(-)-DHMEQ を投与したとき、培養 2 日後の細胞増殖は、投与していない場合と比べて、差異はみられなかった (Fig. 16C)。また、10 $\mu\text{g/ml}$ の(-)-DHMEQ を投与した場合、増殖抑制がみられるが細胞生存率に与える影響はみられなかった (Fig. 16D)。したがって、(-)-DHMEQ による、破骨細胞分化の抑制効果は、NF- κB 活性化の抑制のためであり、BMM 自体の増殖抑制によるものではないことが分かった。

さらに、NF- κB の活性化が、破骨細胞分化においてどの段階で重要かを調べるために、(-)-DHMEQ の投与を RANKL 刺激後、0-24 時間および 24-48 時間に行うこととした。RANKL 刺激時から 0-24 時間投与した場合、破骨細胞の分化は、完全に抑制されていた。しかしながら、RANKL 刺激後、24-48 時間に投与した場合は、破骨細胞数は、投与していない場合に比べ、半減するものの完全には抑制されていなかった (Fig. 16E)。これらの結果から、RANKL による NF- κB の活性化は、破骨細胞分化において初期のステージで重要な役割を果たすことが示唆された。また、後期のステージでも、ある程度の寄与を行うことも考えられる。

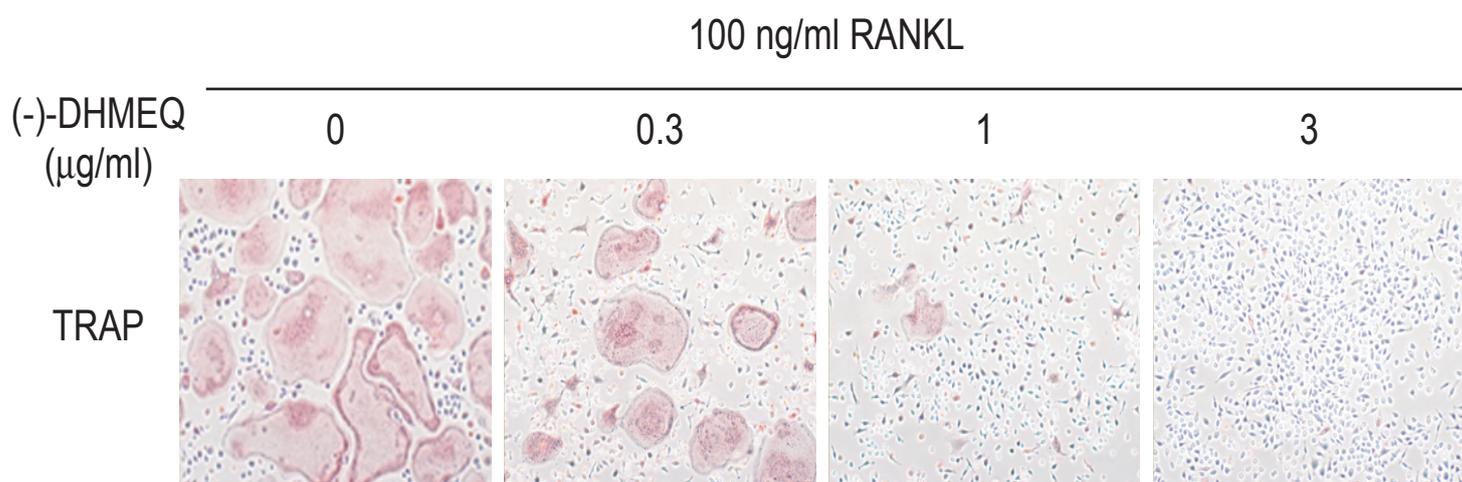


Fig. 16A Inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis by (-)-DHMEQ in BMMs. The effect of (-)-DHMEQ on the formation of TRAP-positive multinucleated cell. BMMs were cultured with 10 ng/ml M-CSF and 100 ng/ml RANKL for 48 hours with or without (-)-DHMEQ Then the cells were fixed and stained for TRAP. Magnification, X 10.

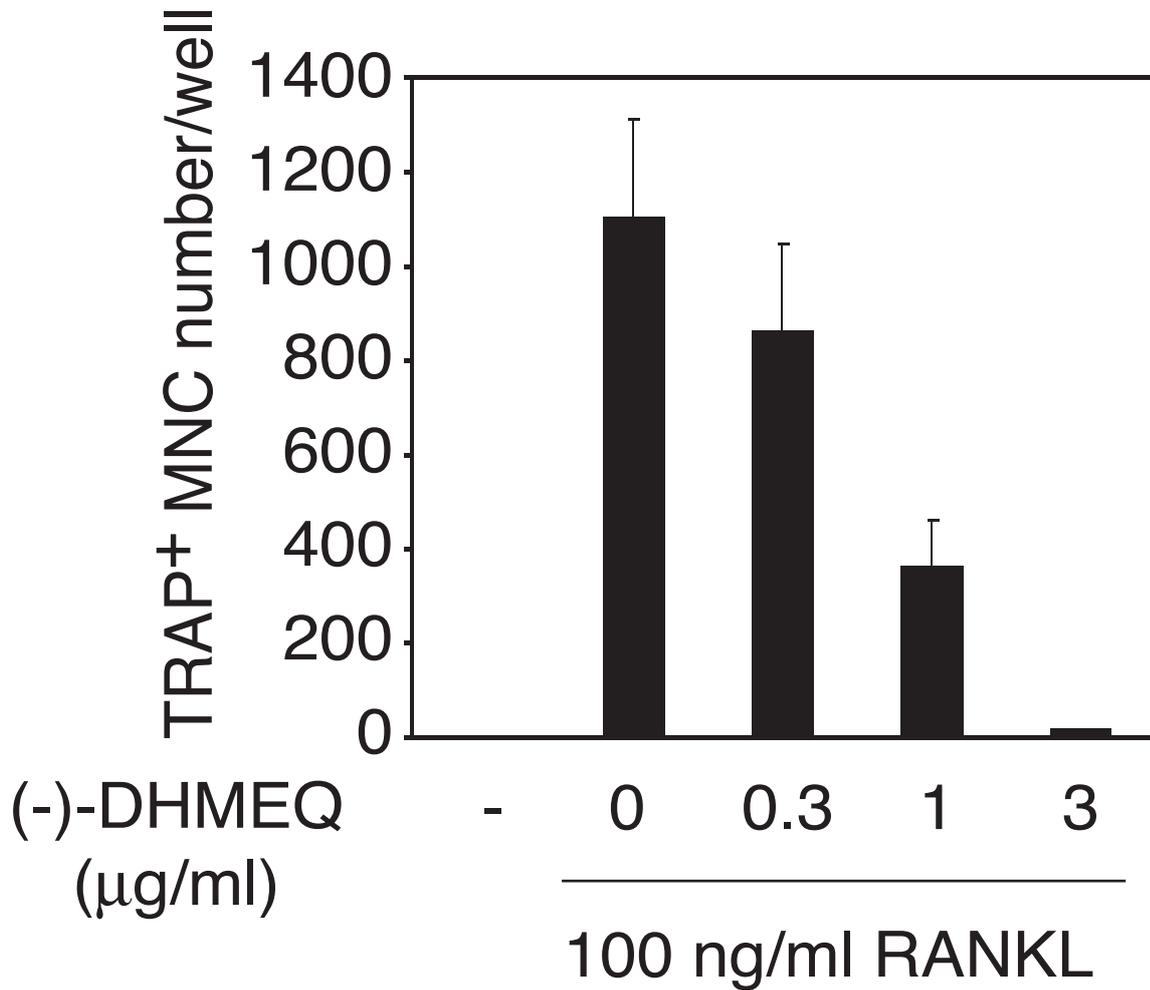


Fig. 16B Quantitative analysis of the effect of (-)-DHMEQ for RANKL-induced osteoclastogenesis in BMMs. BMMs were treated as in Fig. 16A. After the TRAP staining, multinucleated (> 3 nuclei) TRAP-positive cells per well were counted. Each value is the mean \pm S.D. of triplicate determinations.

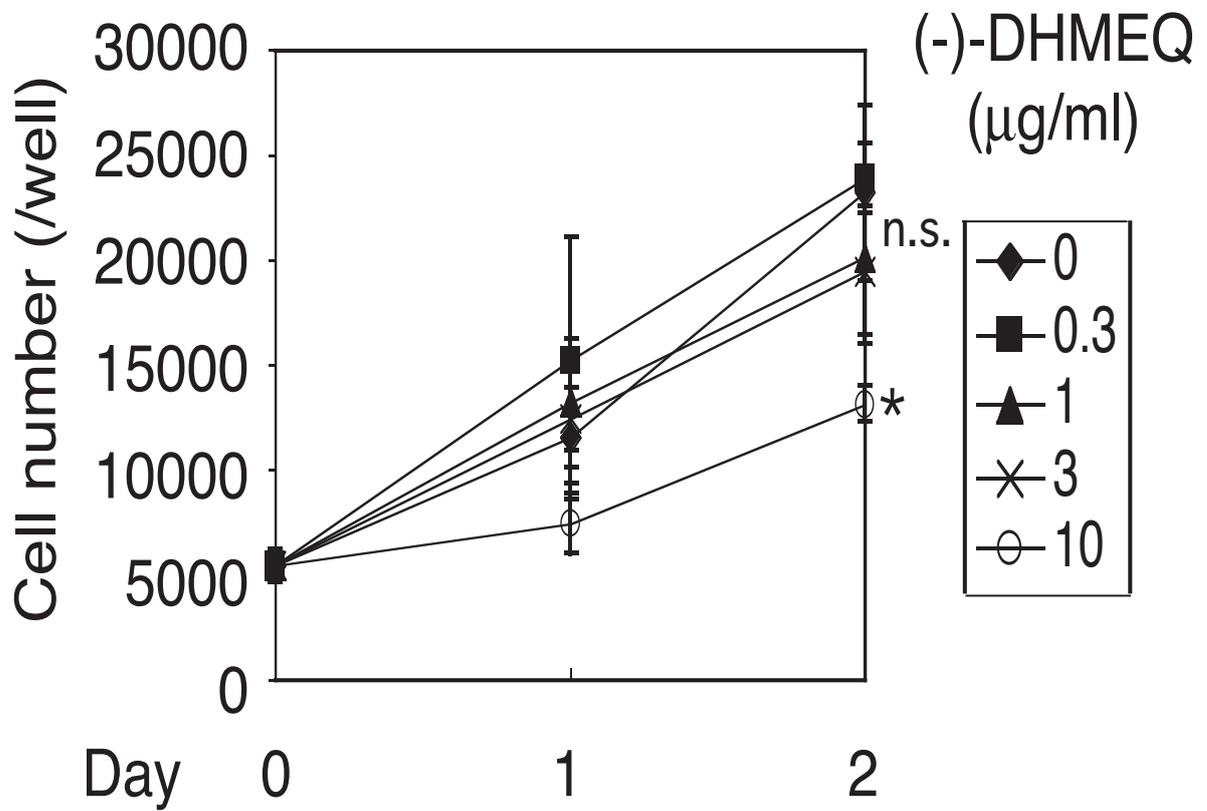


Fig. 16C Effect of (-)-DHMEQ on cell proliferation. BMMs were cultured in the presence of 10 ng/ml M-CSF for 24 hours or 48 hours with various concentration of (-)-DHMEQ. Each value is the mean \pm S.D. of triplicate determinations. *; $P < 0.05$ against the value of proliferation with no (-)-DHMEQ added. n.s.; not significant.

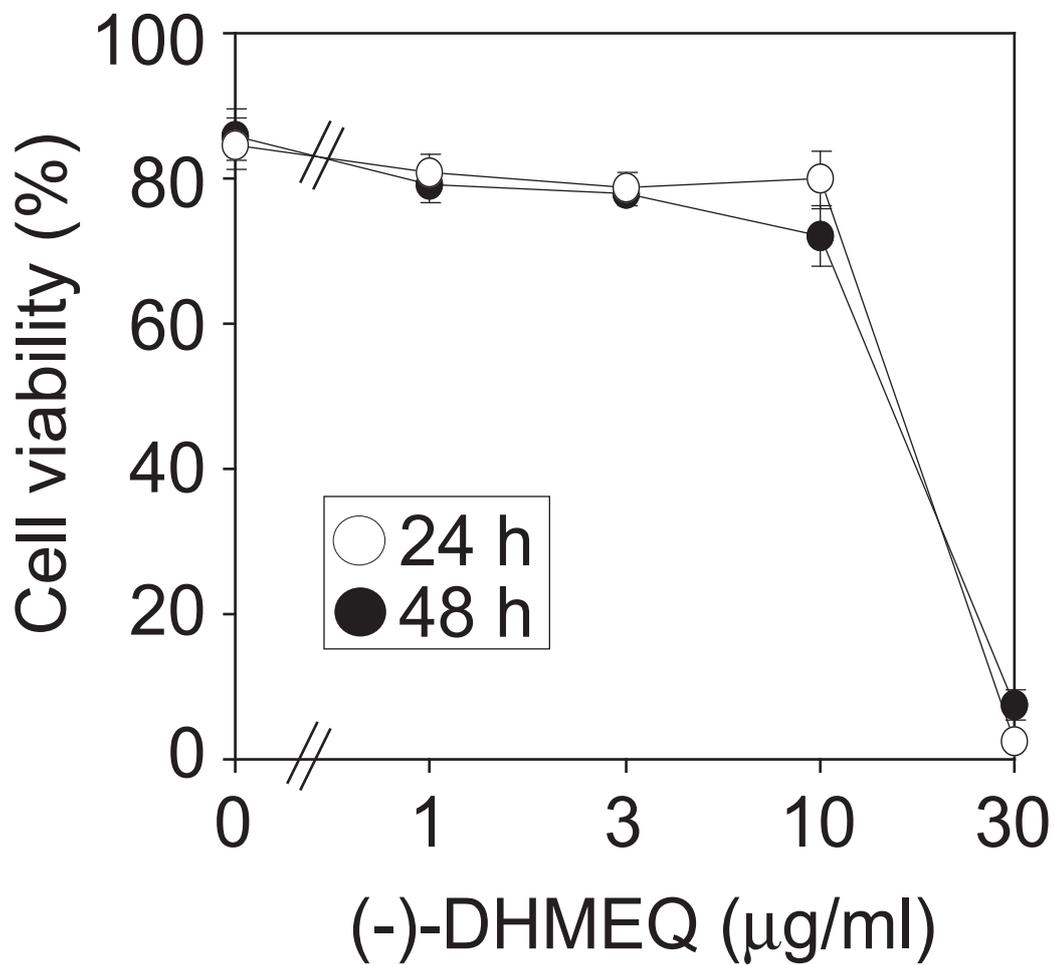


Fig. 16D Effect of (-)-DHMEQ on cell viability. BMMs were cultured in the presence of 10 ng/ml M-CSF and various concentration of (-)-DHMEQ for 24 hours or 48 hours, then the viability was measured by trypan blue dye exclusion. Each value is the mean \pm S.D. of triplicate determinations.

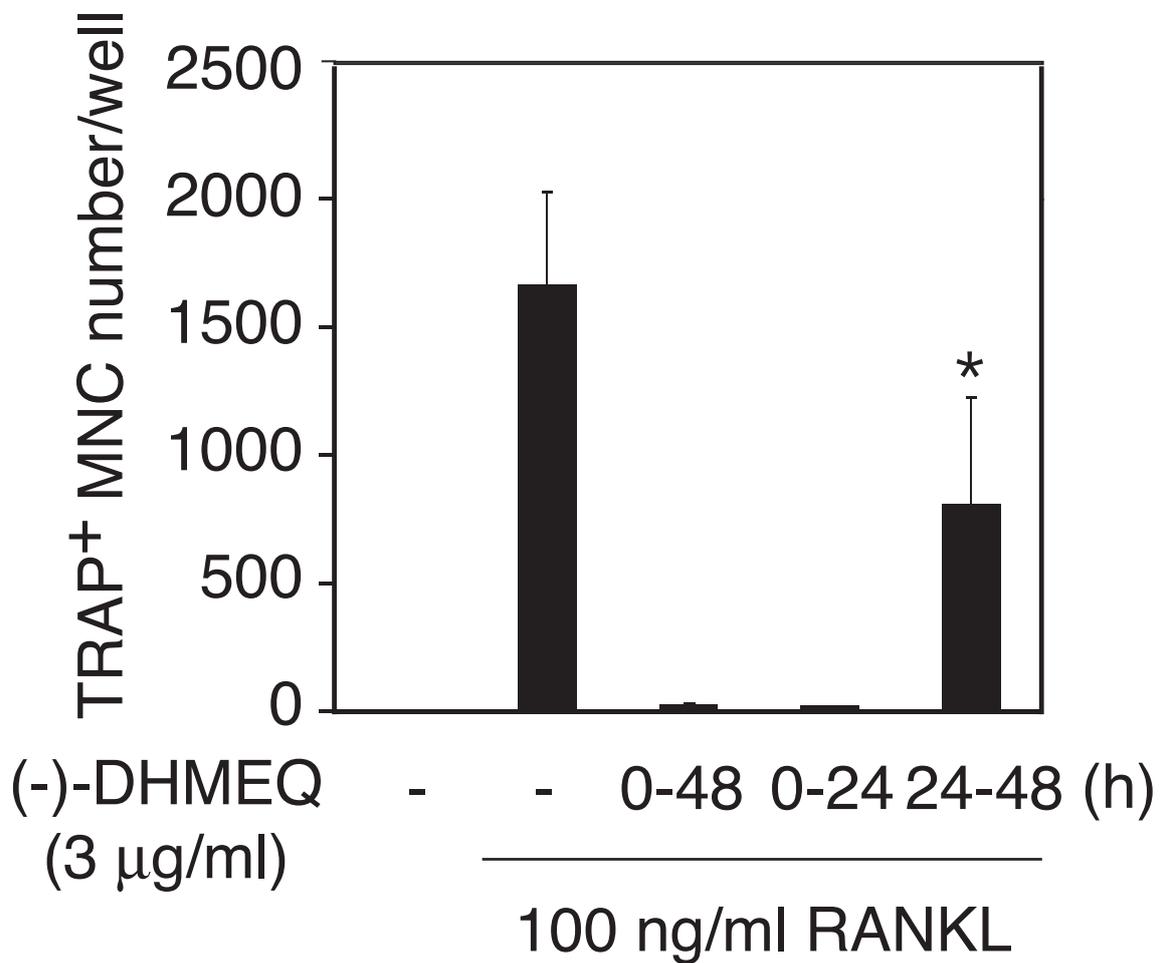


Fig. 16E Effect of early- or late-phase addition of (-)-DHMEQ on osteoclastogenesis in BMMs. BMMs were incubated with 10 ng/ml M-CSF and 100 ng/ml RANKL for 48 hours in the presence of 3 µg/ml (-)-DHMEQ for indicated periods. Then multinucleated TRAP-positive cells were counted. *; $P < 0.05$, against the value of no (-)-DHMEQ added. Each value is the mean \pm S.D. of triplicate determinations.

3-3-5 RANKL によって誘導される p52 の活性化と p100 の再誘導に与える(-)-DHMEQ の効果

RANKL 刺激による、NF- κ B の活性化には、分単位の“短期的な”活性化と、時間単位の“長期的な”活性化が起こることが分かっている。さらに、最近の報告によると、NIK ノックアウトマウス由来骨髄細胞に RANKL を作用させても、破骨細胞分化が誘導されない。また、この際、RANKL による短期的な NF- κ B の活性化は起こるにもかかわらず、長期的な NF- κ B の活性化が起こらなくなっていた (157)。さらに、この長期的な NF- κ B の活性化には、p100 のプロセッシングにより、p52 がリリースされ、RelB と複合体を形成し、核移行することで、標的因子の発現誘導が起こることが知られている (15)。この現象は、LT β によって誘導される、NF- κ B 活性化に代表され、RANKL によって誘導される破骨細胞分化にも重要であることが示唆されている (157)。

(-)-DHMEQ が、RANKL によって誘導される破骨細胞分化において、後期の段階においても抑制効果を示したことから (Fig. 16E)、RANKL によって誘導される長期的な NF- κ B の活性化にも影響を与えると考えた。BMM に(-)-DHMEQ を前処理し、RANKL で刺激後、4, 8 時間後に細胞の核抽出物を調製し、EMSA を行ったところ、(-)-DHMEQ は、NF- κ B の活性化を抑制した (Fig. 17A)。さらに、RANKL によって誘導される p100 のプロセッシングおよび再誘導に対する (-)-DHMEQ の影響をウエスタンブロットによって調べた。その結果、(-)-DHMEQ を投与した場合においても、p100 のプロセッシングは起こっており、NIK の活性化には影響を与えていないことが分かった。しかし、(-)-DHMEQ を投与していない場合には、p100 の再誘導が起こっているにもかかわらず、(-)-DHMEQ を投与したときには、p100 の再誘導は起こらず、p100 が減少していることが示された (Fig. 17B)。さらに、RANKL 刺激 24 時間後の細胞を固定し、抗 p52 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、(-)-DHMEQ 投与細胞では、p100/p52 の量が減少していることが分かった (Fig. 17C)。これらの結果から、(-)-DHMEQ は、RANKL によって誘導される p100 のプロセッシングには、影響を与えないが、p52 の核移行を阻害していることが示唆された。したがって、プロモーターに κ B のある p100 の再誘導が起こらなくなり、p100 のプロセッシングによる p52 の供給が起こらなくなっていると考えられる。

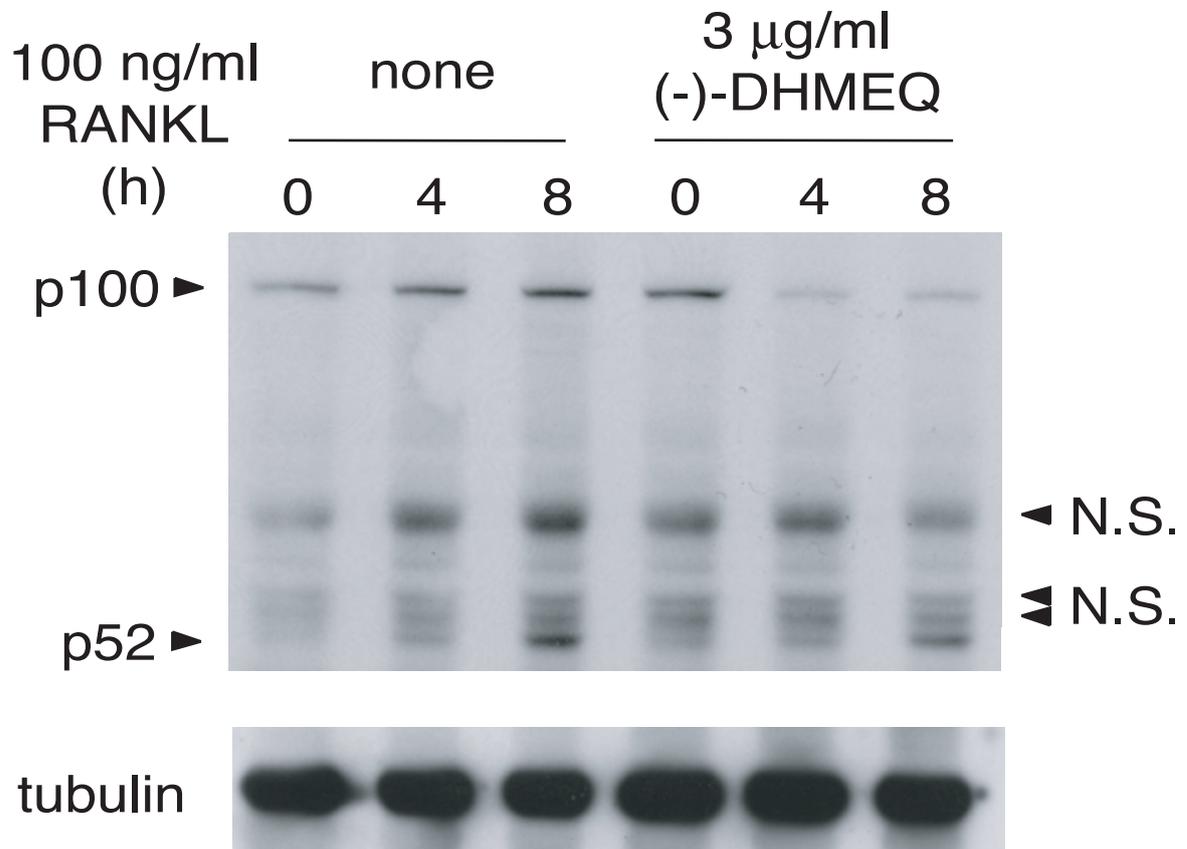


Fig. 17B Effect of (-)-DHMEQ on RANKL-induced p52 production and p100 resynthesis. BMMs were cultured with 10 ng/ml M-CSF and 100 ng/ml RANKL in the presence or absence of 3 μ g/ml (-)-DHMEQ for indicate periods. Then the cell lysates were fractioned by 10% polyacrylamide gel electropheresis and immunoblotted with anti-p52 antibody or anti-tubulin antibody. N.S., nonspecific.

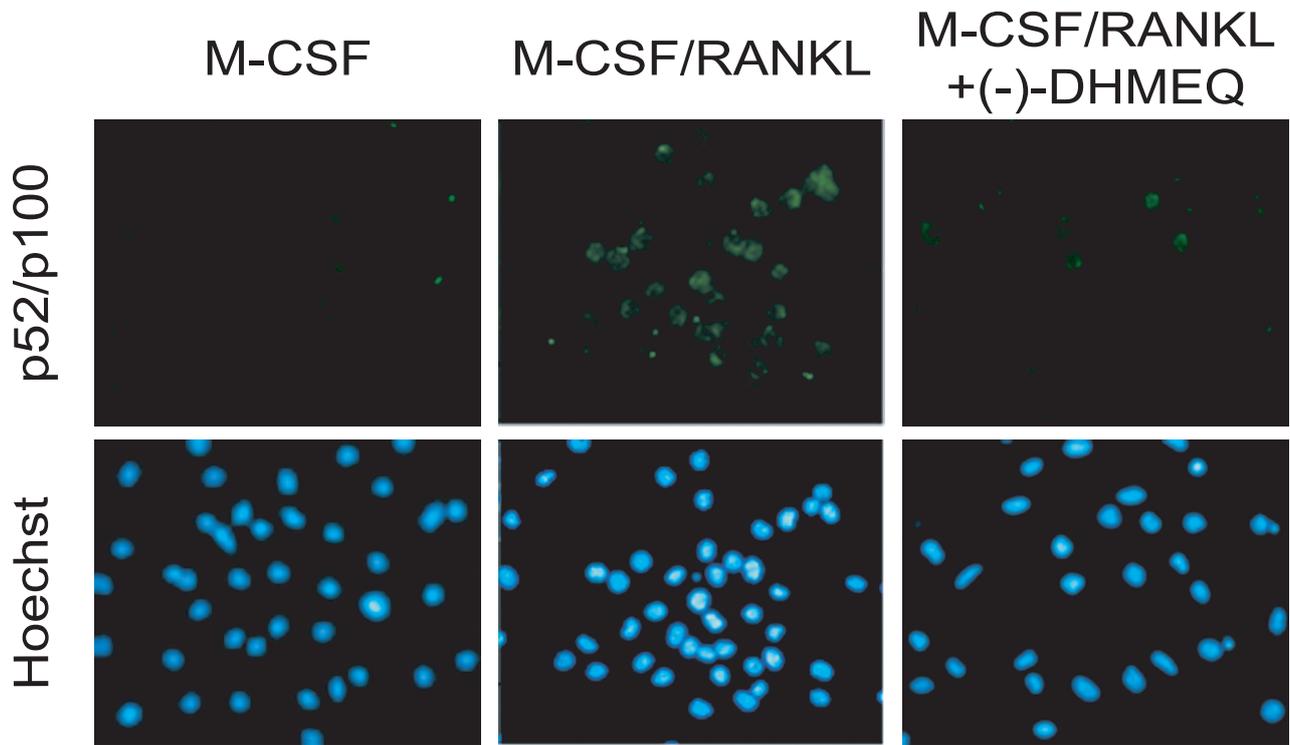


Fig. 17C Effect of (-)-DHMEQ on RANKL-induced p100 resynthesis in BMMs by immunostaining. BMMs were treated or not with 3 $\mu\text{g/ml}$ (-)-DHMEQ in the presence or absence of 100 ng/ml RANKL for 24 hours. Then the cells were fixed, permeabilized, and stained with anti-p52 antibody and Hoechst 33258.

3-3-6 RANKL 刺激による NFATc1 発現誘導に対する(-)-DHMEQ の影響

RANKL による破骨細胞分化において、さまざまなタンパク質の発現上昇が重要であると考えられている。その中でも、転写因子 NFATc1 の発現が特に重要であることが、ゲノムワイドスクリーニングおよびノックアウト細胞を用いた研究から分かっている (155)。

そこで、(-)-DHMEQ による RANKL 誘導破骨細胞分化の抑制の分子機構を調べるために、RANKL によって誘導される NFATc1 の発現を調べることにした。BMM に 3 $\mu\text{g/ml}$ の(-)-DHMEQ を処理し、RANKL 刺激、6, 12, 24, 48 時間後の細胞抽出液を調製し、抗 NFATc1 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。その結果、NFATc1 は、RANKL 刺激、24 時間後から発現し始め、破骨細胞分化が認められる 48 時間後においても発現が認められる (Fig. 18A, *left 5 lanes*)。しかしながら、破骨細胞分化を完全に抑制する濃度の(-)-DHMEQ を投与した細胞では、24 時間後、および 48 時間後においても NFATc1 の発現が顕著に抑制されていることが分かった (Fig. 18A, *right 5 lanes*)。

さらに、NFATc1 の他に RANKL によって誘導される因子である TRAF6 および c-Fos の発現上昇に与える影響を調べた。BMM を(-)-DHMEQ で処理し、RANKL 刺激、24 時間後の細胞抽出液を抗 NFATc1 抗体、抗 c-Fos 抗体、抗 TRAF6 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。その結果、NFATc1 については、(-)-DHMEQ の濃度依存的に発現を抑制するにもかかわらず、c-Fos および TRAF6 の発現には影響を与えなかった (Fig. 18B)。また、免疫染色法を用いて、RANKL 刺激後、24 時間および 48 時間経過した細胞について、NFATc1、c-Fos、TRAF6 の発現量を特異的な抗体を用いて調べたところ、同様の結果を得た (Fig. 18C)。以上の結果より、(-)-DHMEQ は、RANKL によって誘導される NF- κ B 活性化を抑制することにより、NFATc1 の発現を抑制することが示された。

RANKL による NFATc1 の発現誘導には、カルシウムシグナルも必須であると考えられている (155)。そこで、(-)-DHMEQ が NF- κ B 活性化の抑制以外に、カルシウムシグナルを抑制してしまう可能性を否定するため、BMM をもちいて(-)-DHMEQ のカルシウム振動に対する影響を調べた。その結果、(-)-DHMEQ は、RANKL によって誘導されるカルシウム振動には影響を与えなかった (Fig. 18D)。最後に、(-)-DHMEQ 存在下、NFATc1 を強制発現すると、破骨細胞分化の誘導がもどるか調べた。その結果、NFATc1 を強制発現させた場合には、破骨細胞分化がみられ、c-Fos、TRAF6 を強制発現させても破骨細胞分化は誘導さ

れなかった (Fig. 18E)。したがって、(-)-DHMEQ による破骨細胞分化の抑制は、その細胞毒性によるものではなく、RANKL によって誘導されるいくつかのシグナルの中でも NF- κ B 活性化を抑制することに伴う、NFATc1 の発現抑制によるものであることが強く示唆された。

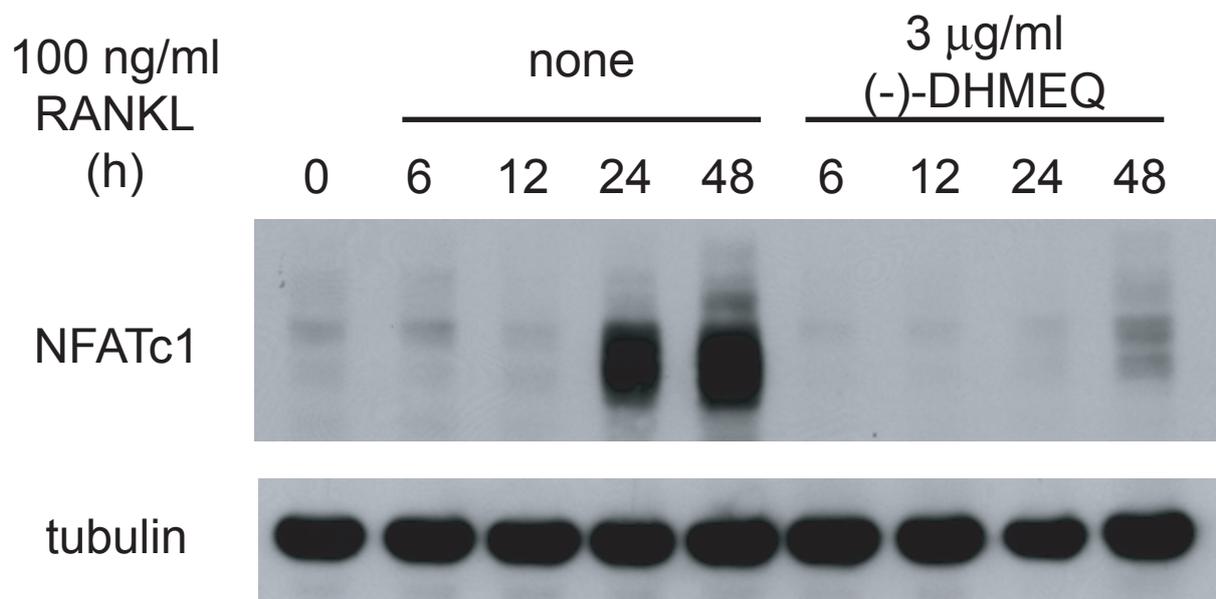


Fig. 18A Effect of (-)-DHMEQ on RANKL-induced expression of NFATc1 in time course. BMMs were incubated with or without 3 μ g/ml (-)-DHMEQ in presence of 10 ng/ml M-CSF and 100 ng/ml RANKL for indicated times. The cell lysates were fractionated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-NFATc1 antibody or anti-tubulin.

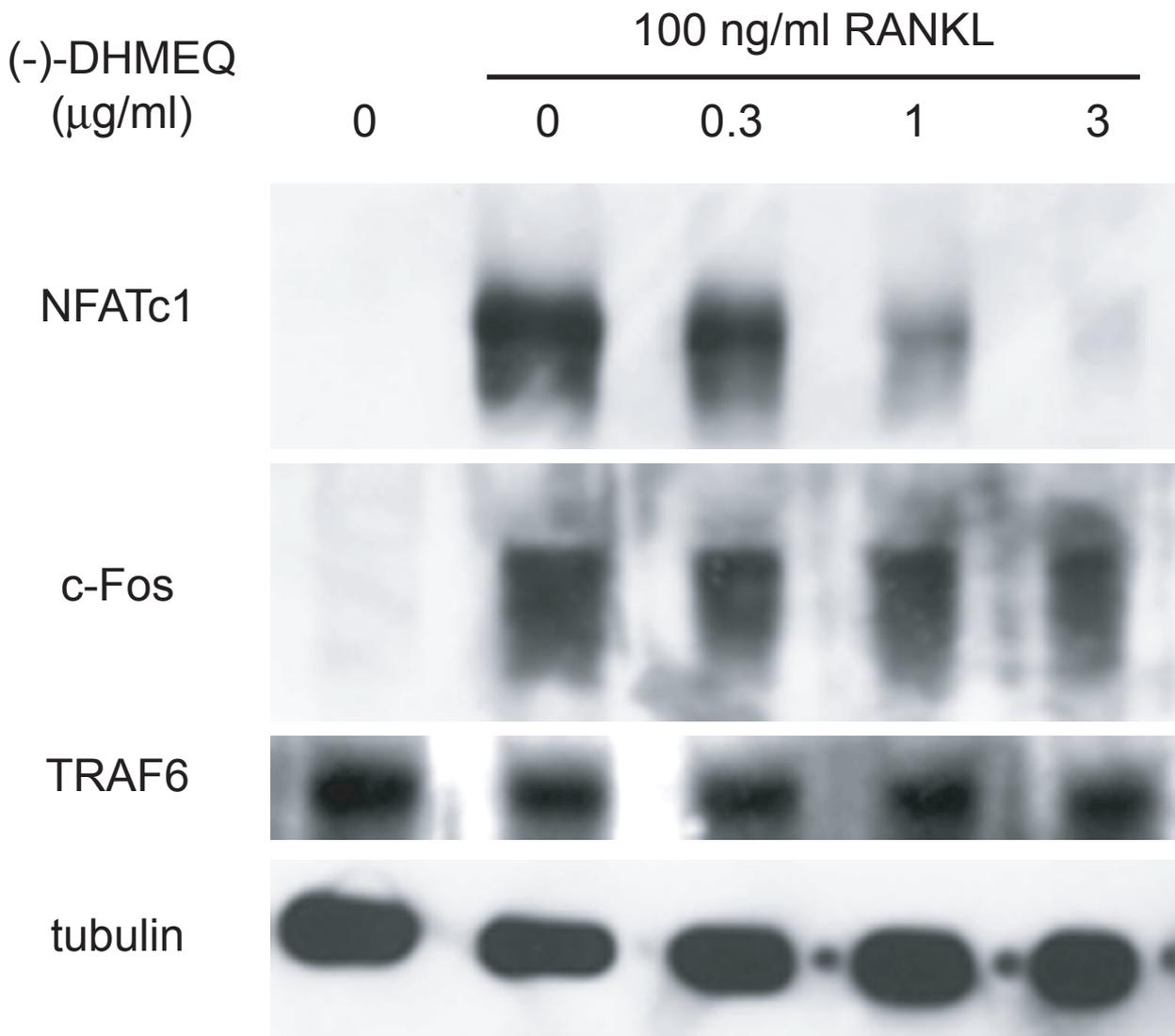


Fig. 18B Effect of (-)-DHMEQ on RANKL-induced expression of NFATc1, c-Fos, or TRAF6. BMMs were cultured with 10 ng/ml M-CSF and 100 ng/ml RANKL along with the indicated concentrations of (-)-DHMEQ for 24 hours. The cell lysates were fractionated by 10 % polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotted with anti-NFATc1, anti-c-Fos, anti-TRAF6, and anti-tubulin.

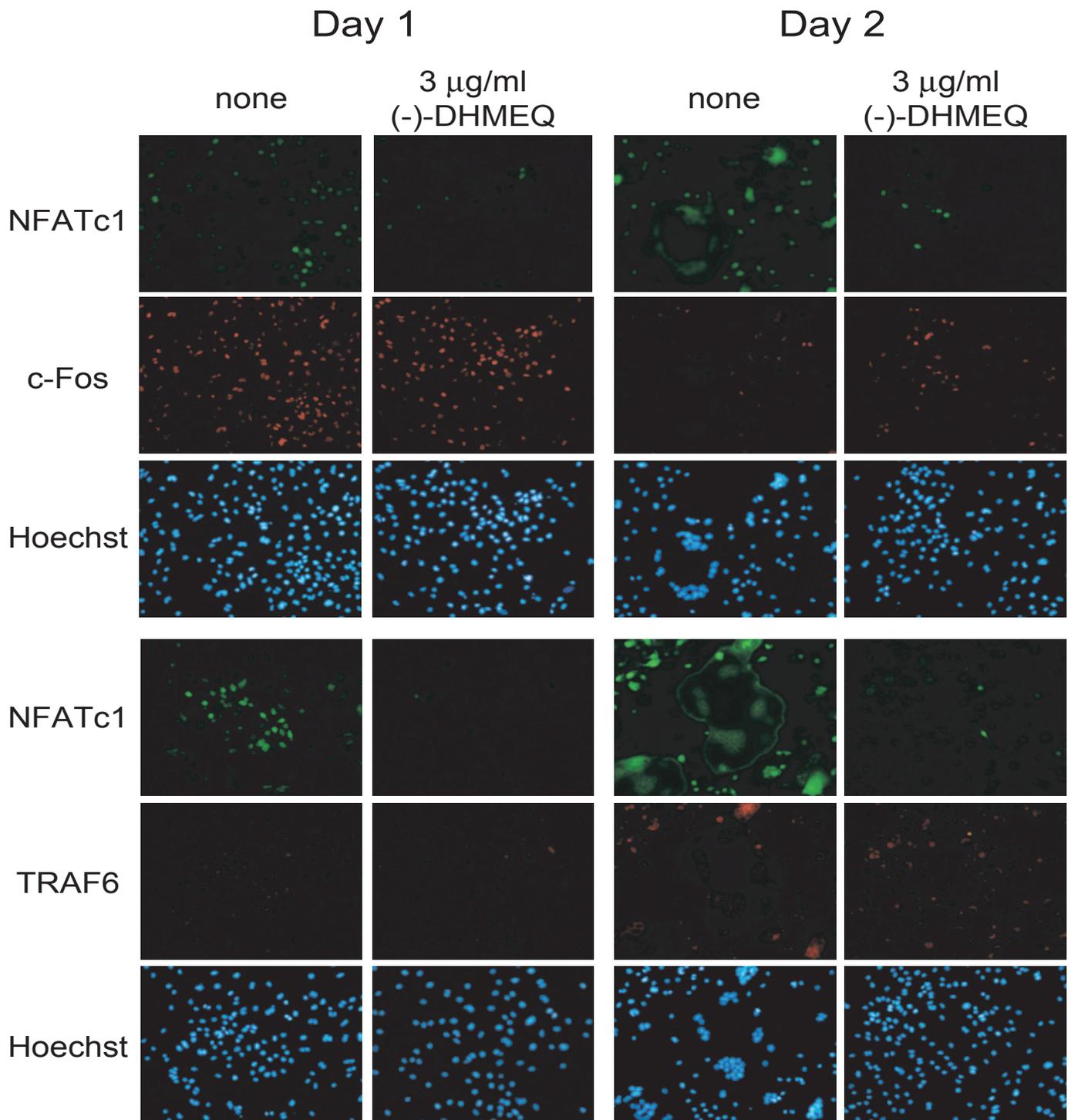


Fig. 18C Immunofluorescence analysis of effect of (-)-DHMEQ on RANKL-induced expression of NFATc1, c-Fos, or TRAF6. BMMs were treated or not with 3 $\mu\text{g/ml}$ (-)-DHMEQ in the presence of RANKL for 24 hours or 48 hours. Then the cells were fixed, permeabilized, and stained with anti-NFATc1, anti-c-Fos, anti-TRAF6, or Hoechst 33258.

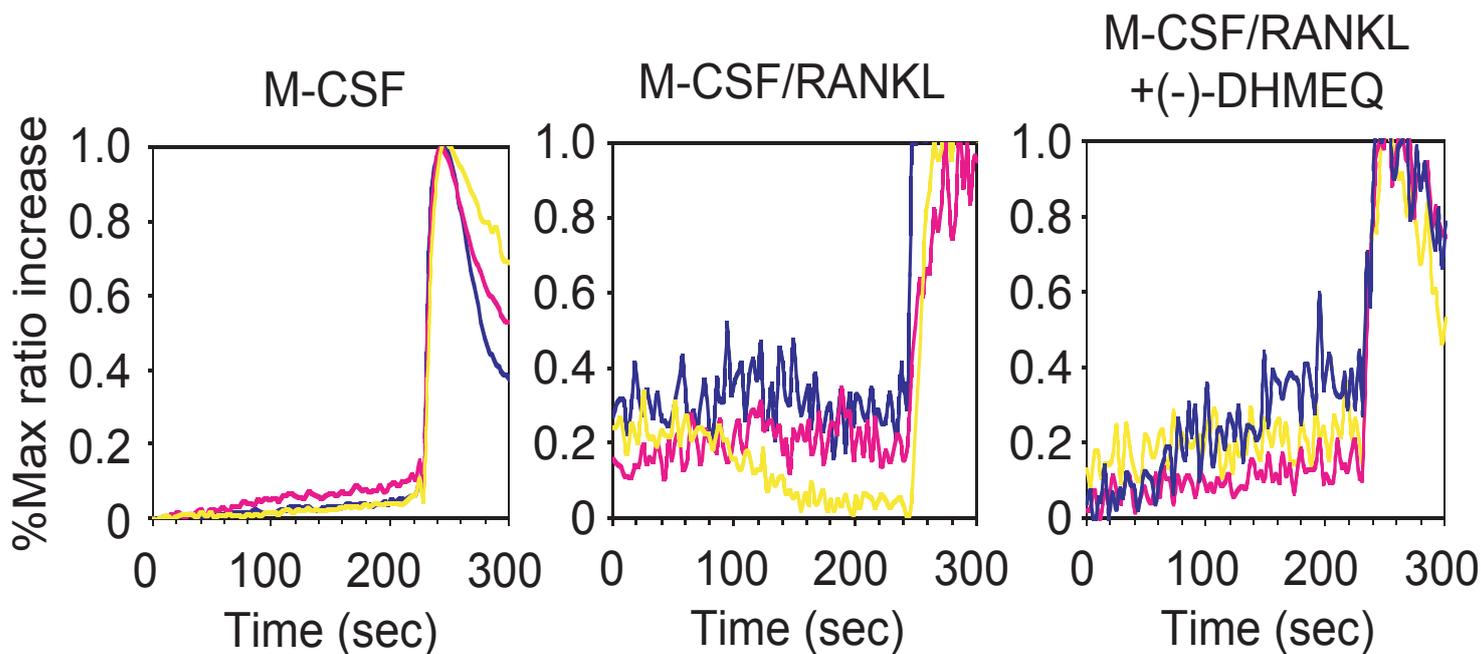


Fig. 18D Effect of (-)-DHMEQ on RANKL-induced calcium oscillation in BMMs. BMMs were incubated with or without 3 $\mu\text{g/ml}$ (-)-DHMEQ in the presence of 100 ng/ml RANKL for 48 hours. The calcium change in the cells coloaded with fluo-4 and Fura Red. The increase in percent maximum ratio from the baseline was plotted with an interval of 5 s. The increase in the maximum ratio was obtained by the addition of 10 μM ionomycine at the end of experiments. Each color indicates an individual cell in the same field.

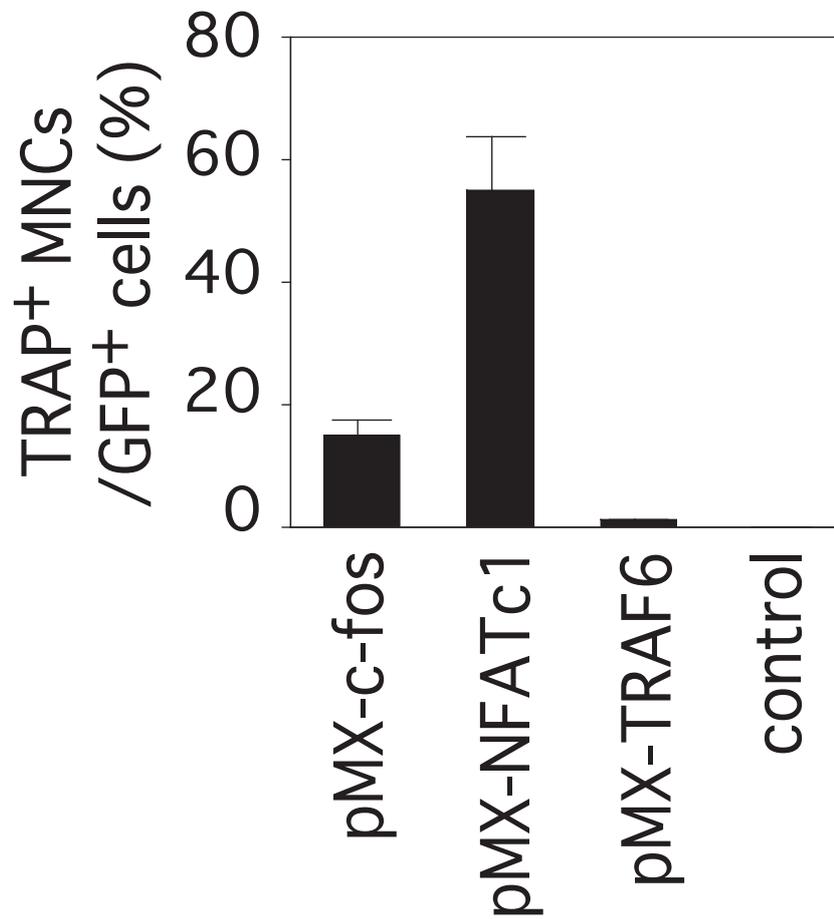


Fig. 18E Effect of NFATc1 overexpression on osteoclastogenesis in (-)-DHMEQ-treated cells. BMMs were infected with retroviruses expressing NFATc1, c-Fos, or TRAF6. After 2 days, the cells were treated with 10 ng/ml M-CSF and 100 ng/ml RANKL in presence or absence of 3 μ g/ml (-)-DHMEQ for 2 days. Then, the cells were fixed and stained for TRAP.

3-3-7 Jurkat 細胞における(-)-DHMEQ の NFATc1 活性化に与える影響

(-)-DHMEQ は、RANKL によって誘導される NFATc1 の発現を抑制した (Fig. 17)。そこで、次に、(-)-DHMEQ が NFATc1 の発現のみならず、活性化も抑制するか調べることにした。(-)-DHMEQ は、NF- κ B の核移行のみを抑え、Smad2 などのその他の転写因子の核移行は抑えないことが分かっている (97)。Jurkat 細胞は、TPA/ionomycin 刺激することで、NF- κ B および NFAT の活性化が誘導される。Jurkat 細胞に(-)-DHMEQ を前処理し、さらに、TPA/ionomycin 刺激後、30 分の核抽出物を調整し、NF- κ B および NFAT 結合特異的配列のプローブを用いて EMSA を行った。その結果、(-)-DHMEQ は、TPA/ionomycin 刺激依存的な、NF- κ B の活性化を濃度依存的に抑制するものの、NFAT の活性化を抑制しなかった (Fig. 19)。以上の結果より、(-)-DHMEQ は、RANKL によって誘導される NFAT の活性化を抑制することはなく、NFATc1 の発現のみを抑制することが示唆された。

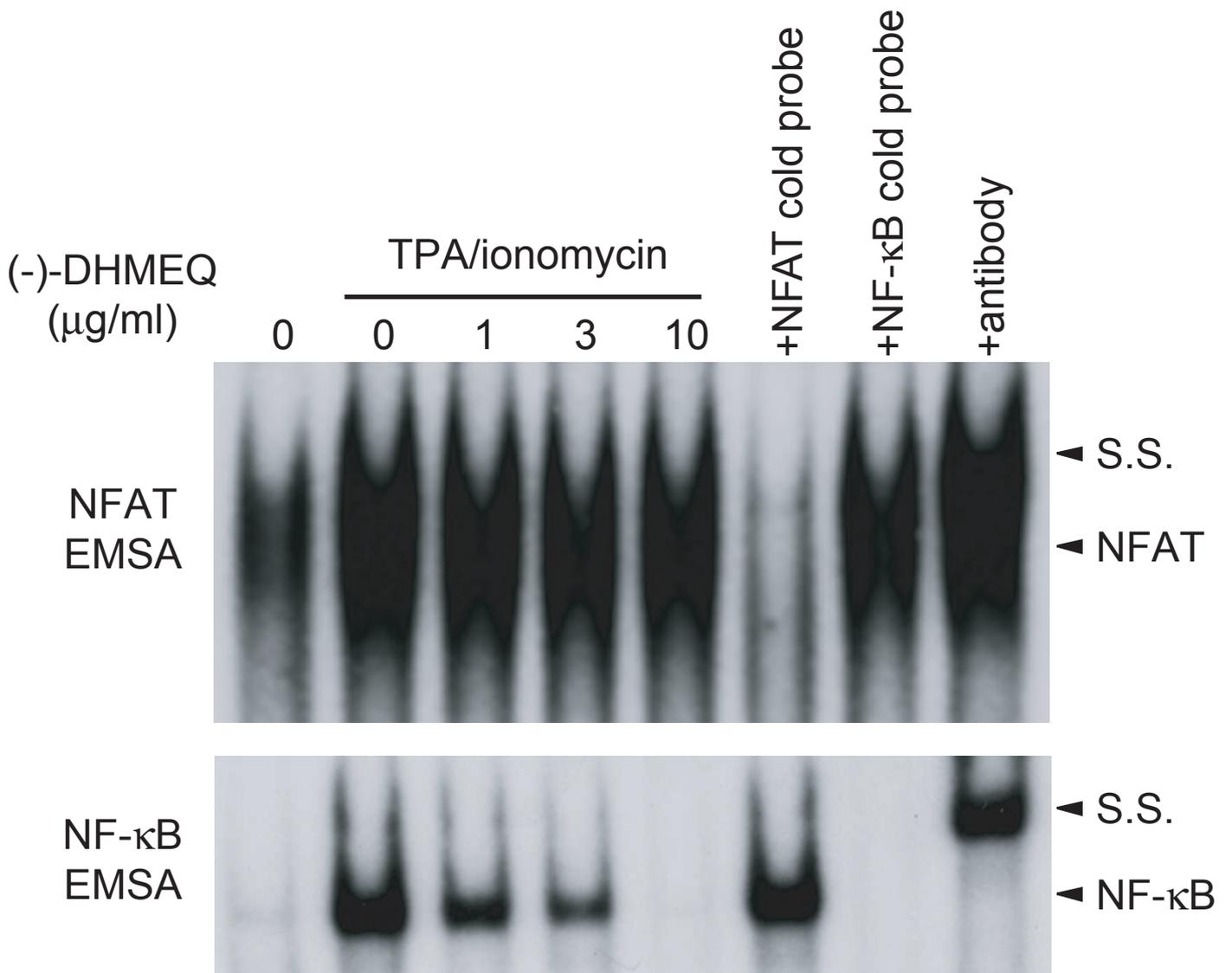


Fig. 19 Effect of (-)-DHMEQ on TPA/ionomycin-stimulated Jurkat cells. Jurkat cells were incubated with the indicated concentrations of (-)-DHMEQ in the presence of 5 nM TPA and 8 μM ionomycin for 30 min. Then the nuclear extracts were prepared and assayed by EMSA.

3-3-8 (-)-DHMEQ による成熟破骨細胞の骨吸収能の抑制

RANKL による NF- κ B の活性化は、破骨細胞の分化のみならず、骨吸収活性にも関与していることが知られている。そこで、成熟破骨細胞の骨吸収活性に与える、(-)-DHMEQ の影響を調べることにした。骨吸収活性を調べる上で、象牙質切片がよく使われており、本研究において、象牙質切片上で、破骨細胞分化を誘導した後、(-)-DHMEQ を投与することで、骨吸収活性に与える影響を調べた。すなわち、骨髓細胞から誘導した BMM をいったんトリプシンを用いて、はがした後、FBS でコーティングした象牙質切片上に播種し直した。その後、RANKL を加え、3 日間培養することで、破骨細胞を誘導した。顕微鏡で、破骨細胞に分化していることを確認した後、(-)-DHMEQ を投与し、さらに 2 日間培養した。破骨細胞をはがした後、トルイジンブルー染色を行い骨吸収孔を観察した。その結果、(-)-DHMEQ を投与した時には、成熟破骨細胞の骨吸収能が減少しており、吸収孔の面積を測定したところ、投与していないときにくらべ、約 60% ほど減少していた (Fig. 20A and B)。さらに、吸収孔の深さも浅くなっていることが観察された。(-)-DHMEQ による骨吸収活性の抑制を違う系を用いて調べた。OAAS プレートは、リン酸カルシウム微結晶がプラスチックプレートに蒸着されたもので、プレートが光を透過するため、位相差顕微鏡にて、破骨細胞の分化の様子や骨吸収孔の観察ができる。OAAS プレートをもちいて、象牙質切片を用いたときと同様にして、(-)-DHMEQ の骨吸収能に与える影響を調べた。(-)-DHMEQ を投与すると、破骨細胞による吸収孔が顕著に減少し、吸収孔の面積を測定したところ、投与していないときにくらべ、ほぼ 90% 減少していることが分かった (Fig. 20C and D)。以上の結果より、(-)-DHMEQ は、破骨細胞の分化のみならず、成熟破骨細胞の骨吸収活性をも抑制していることが示された。

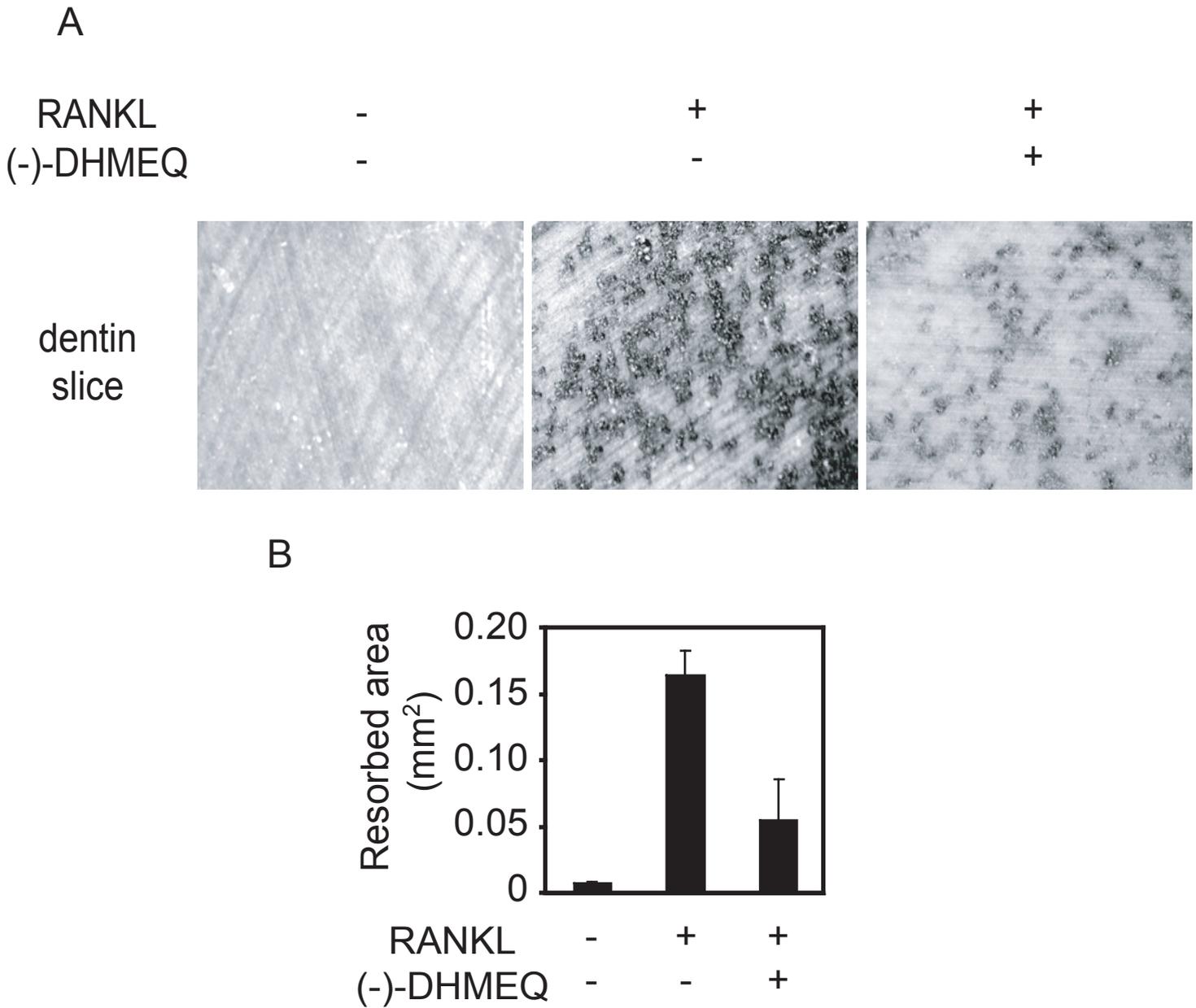


Fig. 20A, B Inhibition of bone resorption by (-)-DHMEQ. (A) Pit assay using dentin slice. BMMs were incubated with 10 ng/ml M-CSF and 100 ng/ml RANKL onto ivory dentin slices for 3 days. Osteoclast formation was observed on day 3. the cells were incubated with or without 3 μ g/ml (-)-DHMEQ for additional 2 days. Then the dentin slices were washed with 1N NH_4OH and stained with 0.5% toluidineblue. Magnification, x 40. (B) Quantitative analysis. Pit area were measured by the Adobe Photoshop and NIH Image. Each value is the mean \pm S.D. of triplicate determinations.

C

RANKL
(-)-DHMEQ

-

+

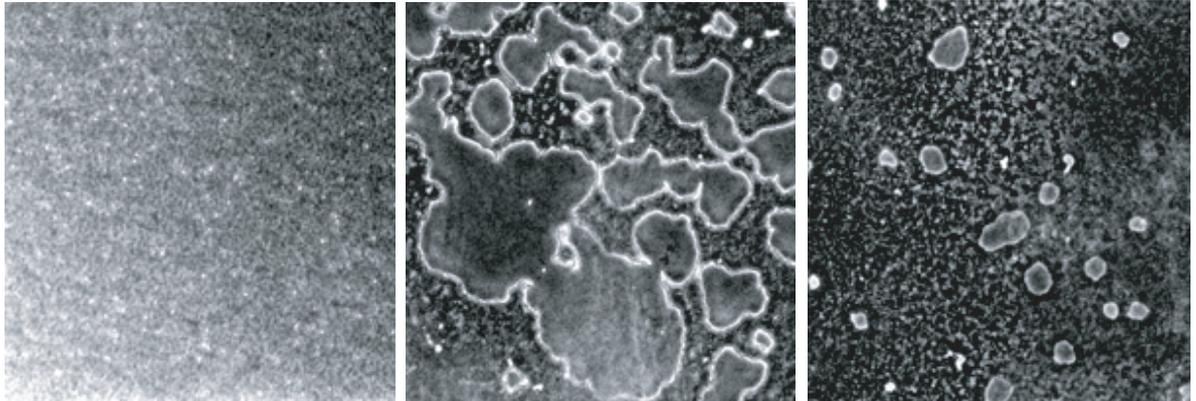
+

-

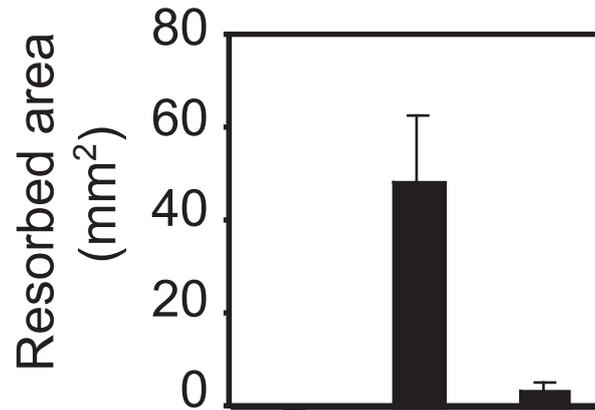
-

+

OAAS™
plate



D



RANKL - + +
(-)-DHMEQ - - +

Fig. 20C, D Inhibition of bone resorption by (-)-DHMEQ. (C) Pit assay using OAAS™ plate. BMMs were incubated with 10 ng/ml M-CSF and 100 ng/ml RANKL onto OAAS™ plate for 3 days. Osteoclast formation was observed on day 3. the cells were incubated with or without 3 μg/ml (-)-DHMEQ for additional 2 days. Then the plate were photographed after wash out the osteoclasts. Magnification, x 100. (D) Quantitative analysis. Pit area were measured by the Adobe Photoshop and NIH Image. Each value is the mean ± S.D. of triplicate determinations.

3-3-9 (-)-DHMEQ による LPS 誘導骨破壊モデルの抑制

LPS を局所的に投与することにより、強制的に炎症を引き起こし、炎症性の破骨細胞の分化誘導と骨破壊を起こさせるモデルが確立されており、薬剤による骨破壊の抑制の評価によく用いられている。そこで、このモデルを用いて、(-)-DHMEQ の骨破壊の抑制効果を *in vivo* で調べることにした。8 週齢の C57BL/6 マウスの頭蓋冠に局所的に LPS を投与し、8 mg/kg の(-)-DHMEQ を連日腹腔投与し、5 日目にマウスを屠殺し、頭蓋冠部位のみの切片を作製した。作製した切片を、TRAP 染色、およびメチルグリーン染色した。LPS 投与群では、破骨細胞が顕著に誘導されているが、(-)-DHMEQ 投与群においては、破骨細胞はほとんど誘導されていないことがわかる (Fig. 21A)。さらに、LPS 注入点から、500 μm の範囲について、TRAP 陽性で、多核の細胞を破骨細胞として数えたところ、(-)-DHMEQ 非投与群にくらべ、(-)-DHMEQ 投与群では約 30% に減少しており、これは、コントロール群と同程度の破骨細胞数であった (Fig. 21B)。さらに、骨破壊の程度を骨髓腔の増加を指標に測定したところ、(-)-DHMEQ 非投与群では、コントロール群にくらべ、80% ほど増加しているにもかかわらず、(-)-DHMEQ 投与群においては、その増加率は 20% ほどに抑えられていた (Fig. 21C)。また、コントロール群、(-)-DHMEQ 非投与群および(-)-DHMEQ 投与群の頭蓋冠について、骨密度測定を行ったところ、(-)-DHMEQ 投与群では、非投与群にくらべ有為にその骨密度の減少が回復していた (Fig. 21D)。さらに、(-)-DHMEQ の連日腹腔投与による毒性は、本実験で用いた濃度においては報告されていない (95, 96)。以上の結果より、(-)-DHMEQ は、*in vivo* の骨破壊モデルにおいて、骨破壊の抑制効果があることが示された。

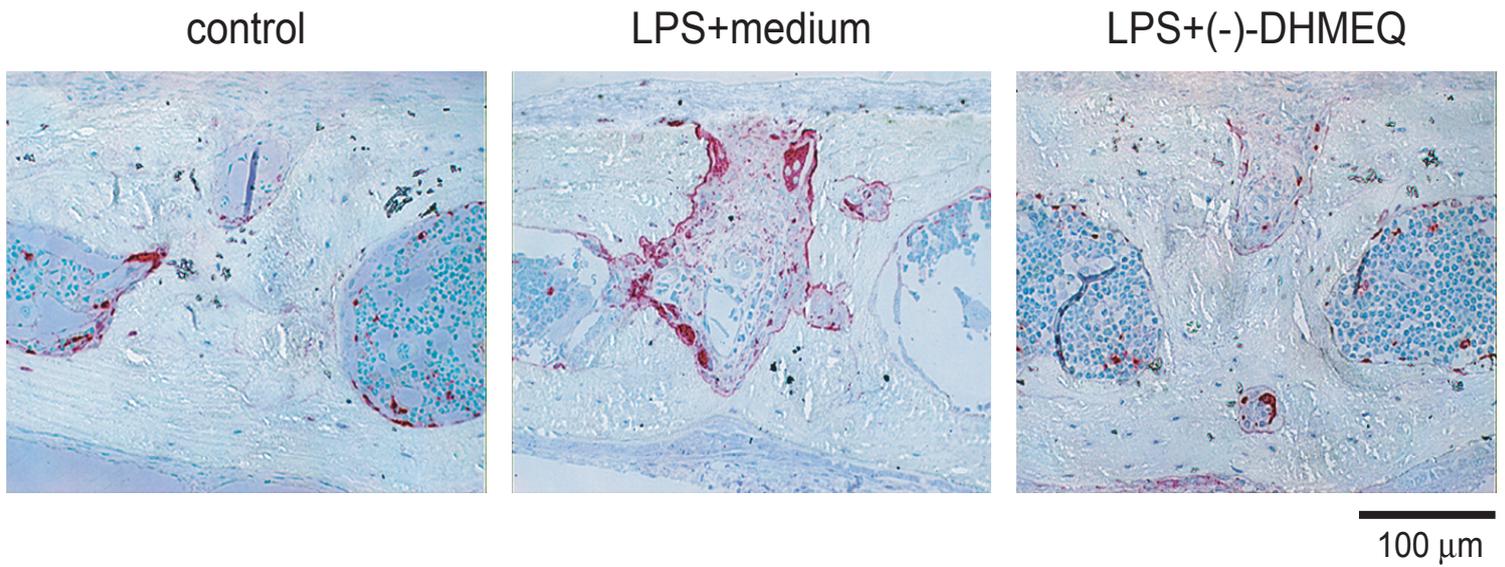


Fig. 21A Inhibition of inflammatory bone destruction *in vivo* by (-)-DHMEQ. LPS (25 mg/kg) was injected to calvarial bone of C57BL6 mice. The mice were intraperitoneally injected with (-)-DHMEQ (8 mg/kg) or solvent medium from day 0 everyday for 5 days, and sacrificed on day 6. Then, the calvarial tissues were fixed, decalcified, embedded, and the sections were stained with TRAP and methylgreen. Magnification, x 20.

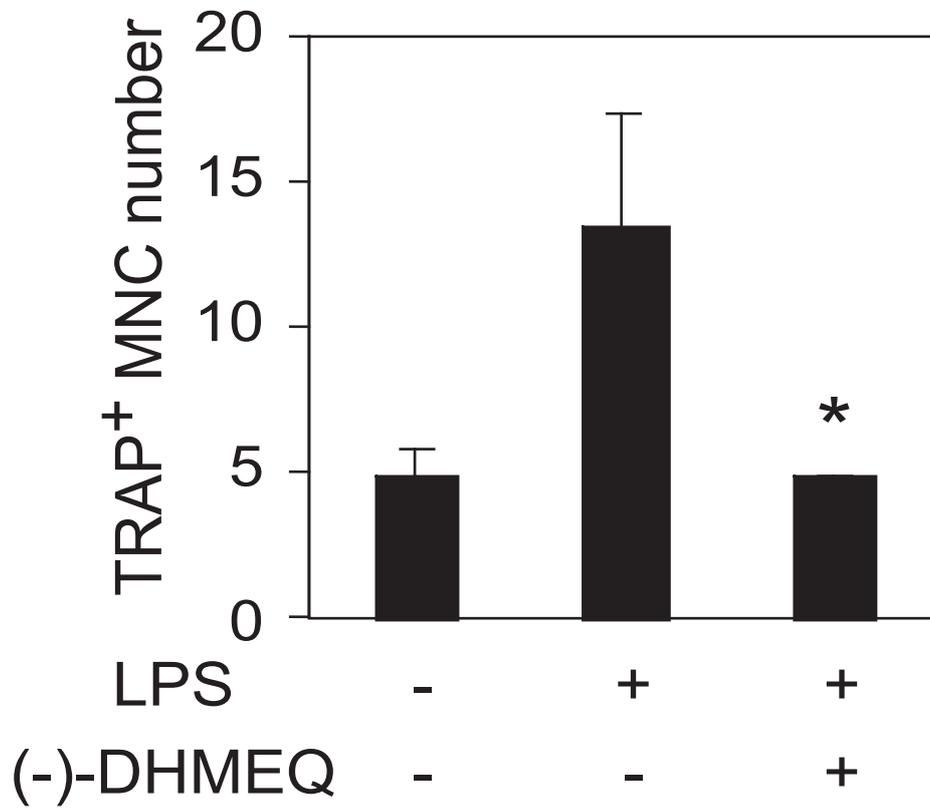


Fig. 21B Effect of (-)-DHMEQ on the increasing of osteoclast formation in LPS-induced bone destruction model mice. Multinucleated TRAP-positive cells were counted in the area with in 500 μ m from the site of LPS injection. *; $P < 0.05$, against the value of no (-)-DHMEQ treatment. Each value is the mean \pm S.D.

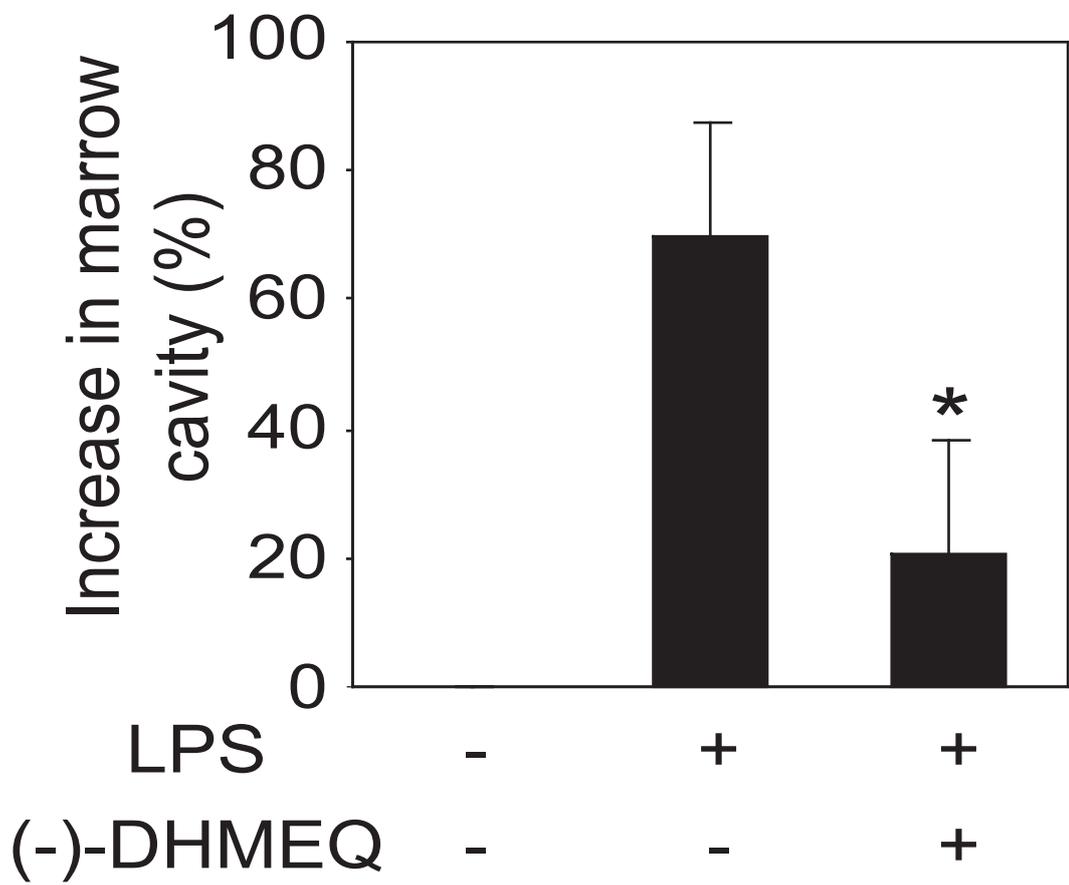


Fig. 21C Effect of (-)-DHMEQ on the increase in marrow cavity in LPS-induced bone destruction model mice. Increase in the marrow cavity were measured in the area with in 500 μm from the site of LPS injection. *; $P < 0.05$, against the value of no (-)-DHMEQ treatment. Each value is the mean \pm S.D.

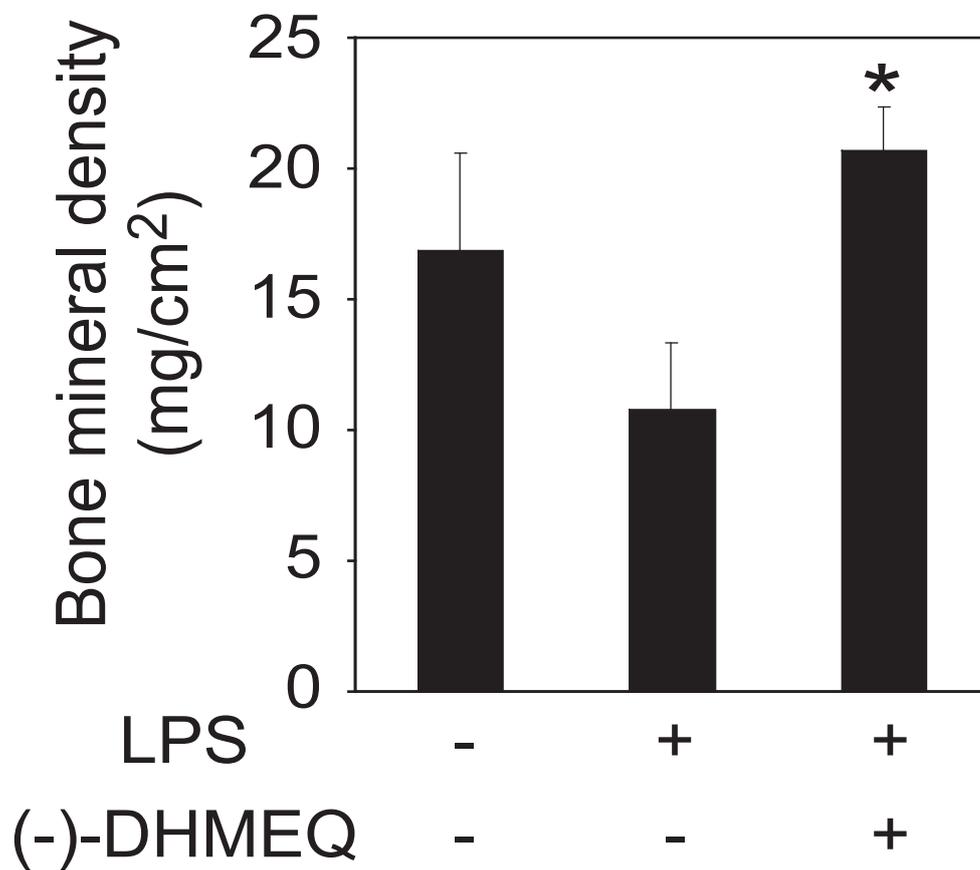


Fig. 21D Effect of (-)-DHMEQ on the bone mineral density in LPS-induced bone destruction model mice. Bone mineral density were measured in the area within 500 μ m from the site of LPS injection. *; P < 0.05, against the value of no (-)-DHMEQ treatment. Each value is the mean \pm S.D.

第4節 考察

本研究により、新規 NF- κ B 阻害剤(-)-DHMEQ がマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 およびマウス骨髄由来マクロファージ (BMM)において、RANKL によって誘導される破骨細胞分化を抑制することが分かった。さらに、RANKL によって活性化する NF- κ B 複合体のうち、p65/p50 および p52/RelB の両方の複合体の核移行を阻害することが示唆された。また、(-)-DHMEQ は、NF- κ B の活性化を阻害することで、破骨細胞分化において必須な因子と考えられている NFATc1 の発現を抑制し、c-Fos や TRAF6 の発現は抑制しなかった。興味深いことに、(-)-DHMEQ は、NFATc1 の活性化を抑制することはなく、NFATc1 を強制発現した細胞においては、RANKL 存在下、破骨細胞分化を抑制しなかった。したがって、NF- κ B が、RANKL 依存的な NFATc1 の発現を誘導していることが示唆された。NFATc1 は、Ca²⁺シグナルによる、カルシニューリンの活性化により、活性化し、標的タンパク質の転写を行う。その標的タンパク質として、破骨細胞分化に特異的なタンパク質である、TRAP やカルシトニン受容体があげられる。さらに、NFATc1 は、自らの転写も活性化しており、RANKL によって刺激を受けると、増幅し、核に凝集することが分かっている (155)。(-)-DHMEQ が、NFATc1 の活性化自体については阻害しないので、おそらく、NFATc1 のごく初期の発現誘導に、NF- κ B が関与している可能性が考えられる。さらに、(-)-DHMEQ は破骨細胞分化における初期のステージにおいて、分化抑制を行うが、後期の段階において投与した場合には、その抑制が起こりにくくなっていることから、やはり、NF- κ B の活性化が、初期の NFATc1 の発現に重要であると言える。

RANKL による破骨細胞分化における、NF- κ B の重要性についての研究は、さまざまな方法で行われている。ジーンターゲティングの手法により、NF- κ B の p50/p52 のダブルノックアウトマウスが作製され、そのマウスが、大理石骨病の表現型を呈することから NF- κ B は、破骨細胞分化において必須な因子であることが示唆された (151)。また、NF- κ B の阻害タンパク質である I κ B の分解されない変異体を細胞に導入すると、RANKL による破骨細胞分化が抑えられることが報告されている (158)。さらに、同じグループが分解されないタイプの I κ B に HIV タンパク質の持つ膜透過配列を付加したタンパク質を作成した。このタンパク質を骨破壊モデルマウスに投与したところ、破骨細胞の分化とそれに伴う骨破壊が抑制された (159)。さらに、最近の研究により、I κ B のリン

酸化酵素 IKK 複合体のうちその調節因子である IKK γ /NEMO が、その他の IKK 複合体構成因子と結合できなくなるようなペプチド作製された。このペプチドを RANKL 誘導骨破壊モデルマウスに投与したところ、その骨破壊が抑制されることが分かった。また、このペプチドは、タイプ II コラーゲン誘導関節炎モデルにも有効であることが確認されており、NF- κ B が炎症のみならず、破骨細胞の異常な形成に伴う骨破壊に関与していることが強く示唆された (160)。しかしながら、これらの研究は、タンパク質やペプチドを用いているため、臨床応用が難しい側面を持っており、低分子化合物をもちいた NF- κ B の活性化阻害による骨破壊の抑制の方が、臨床応用に向いていると思われる。

最近、NF- κ B 活性化阻害剤として知られている低分子化合物 curcumin を用いた破骨細胞分化の阻害が報告された (161)。この報告によると、curcumin による NF- κ B 活性化の阻害能は(-)-DHMEQ に比べ、約 3 倍ほど弱く、さらに、破骨細胞分化の阻害能は(-)-DHMEQ に比べ、約 2 倍程度弱かった (161)。また、RANKL による破骨細胞分化における NF- κ B の分子機構については、言及されていなかった (161)。

NFATc1 が、RANKL によって誘導される破骨細胞分化に重要であることが、ゲノムワイドスクリーニングとノックアウト細胞の研究から明らかになったのは、ごく最近のことであるが、そのシグナルにおける役割が急速に分かってきている。前述したように、RANKL 刺激によって、NFATc1 は、Ca²⁺シグナルによって自己増幅を行う。さらに、RANKL 刺激により、カルシウム振動が起こり、さらにカルシウムイオンのキレーターを投与すると、NFATc1 の発現誘導が抑制され、破骨細胞の形成が抑えられる (155)。また、興味深いことにカルシニューリンの阻害剤である FK506 (155, 162)やシクロスポリン A (156)を細胞に投与すると、NFATc1 の活性化が抑えられているのと共に、発現が顕著に抑制されていた。さらに、ピリミジン合成阻害剤である、lefunomide は、RANKL によって誘導されるカルシウムシグナルの抑制を行うことにより NFATc1 の発現抑制を行うことが分かった (163)。したがって、RANKL によって誘導される、カルシウムシグナルは、NFATc1 の活性化を行うことで、自己増幅を行わせることによって、破骨細胞分化特異的なタンパク質の発現誘導を引き起こし、分化誘導に導くと考えらる。また、最近、RANKL によるカルシウムシグナルについて重要な知見が得られた。immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)を持つ受容体結合タンパク質である、DAP12 と FcR γ サブユニットのダ

ブルノックアウトマウスを作成したところ、そのマウスは、大理石骨病の表現型を示していた。さらに、このマウスから得られた BMM を RANKL 刺激したところ、カルシウム振動がおきておらず、破骨細胞への分化誘導も起こらなかった。また、この BMM に、NFATc1 を強制発現させると、RANKL によって破骨細胞に分化誘導できることも分かった (164)。つまり、RANKL によって誘導されるカルシウムシグナルが、NFATc1 の発現誘導に必須であり、さらに、NFATc1 が発現してしまえば、破骨細胞への分化誘導ができることが示されたことになる。(-)-DHMEQ は、RANKL によって誘導されるカルシウム振動には影響を与えないことから、NF- κ B は、カルシウム振動に影響しないことおよび (-)-DHMEQ が薬剤としてカルシウムシグナルに影響を与えていないことが示唆される。MAPK もまた、RANKL-RANK シグナルを制御している (165-168)。Kawaida のグループは、RANKL によって誘導される Jun dimerization protein 2 (JDP2) が破骨細胞分化に必須であり、さらに、JNK 阻害剤 SP600125 が破骨細胞分化を抑制したと報告している (167)。また、p38 の阻害剤である SD203580 もまた、RANKL によって誘導される破骨細胞の形成を抑制している (168)。したがって、MAPK もまた、破骨細胞分化において必要な因子であることが示唆される。しかしながら、(-)-DHMEQ は、RANKL による MAPK の活性化を抑制していない。これらの結果より、(-)-DHMEQ は、RANKL によって誘導されるカルシウムシグナルや MAPK の活性化自体に影響を与えていないことから、NF- κ B 活性化を特異的に抑えることにより、NFATc1 の発現を抑制し、破骨細胞分化を抑えていることが強く示唆された。

NF- κ B は、成熟破骨細胞での骨吸収活性にも強く関与している可能性が考えられる。成熟破骨細胞に(-)-DHMEQ を投与したところ、破骨細胞による骨吸収の抑制が、象牙質切片を用いた系でも、OAAS プレートを用いた系でも観察された。また、NF- κ B の活性化を引き起こす IKK を強制発現させた破骨細胞では、その骨吸収活性が亢進しており、IKK のドミナントネガティブ変異体を強制発現させた場合には、その活性が減弱していたことが報告されており (169)、NF- κ B が骨吸収能にも関与していることを裏付けている。最後に、(-)-DHMEQ は、LPS 誘導骨破壊モデルを抑制したことから、生体においても破骨細胞の分化誘導を抑制し、骨破壊を抑えていることが示唆された。しかしながら、(-)-DHMEQ が LPS によって誘導される炎症自体を抑制し、T 細胞などの炎症に関与する細胞からの RANKL の産生が起こらなくなり破骨細胞の誘導ができなくなった可

能性も考えられる。この可能性を排除するために、成熟した B 細胞や T 細胞が存在しない RAG2 ノックアウトマウスを用いて、同様の実験を行う必要があると考えられる。いずれにしても、現象としての骨破壊を抑制した。また、(-)-DHMEQ は、コラーゲン誘導リウマチモデル (94) やラットの腎炎 (95)、さらに、前立腺癌の増殖 (96) を毒性を示すより数十倍低い用量で抑制する。したがって、(-)-DHMEQ は、リウマチ時や多発性骨髄腫に伴う骨破壊の治療薬として臨床応用が期待できる。

第4章 総括

転写因子 NF- κ B は、Baltimore らが 1986 年に発見して、20 年が経とうとしている。20 年の間に、NF- κ B の関与するシグナルの同定、シグナル伝達因子の同定、さらには、NF- κ B と疾患の関係が明かにされてきた。NF- κ B は、炎症、免疫反応において重要なメディエーターであるだけでなく、最近では、癌の増殖、転移などにかかわっているという報告も多数なされている。それらの観点から、NF- κ B 活性化の阻害剤の開発が、世界中のトップラボで行われており、今後は、NF- κ B をターゲットとした薬剤による臨床応用が主要な研究テーマになる可能性が高い。しかしながら、NF- κ B は、広範なシグナル伝達で活躍する転写因子であるため、さまざまな刺激からのシグナル伝達が複雑にからみ合っており、さらなるシグナル伝達における役割の解明が急がれる。本研究において、NF- κ B を活性化するシグナル伝達経路として、Toll/IL-1 シグナルでは、新規シグナル伝達因子の同定と機能の解析、一方、RANKL-RANK シグナルでは、破骨細胞分化における NF- κ B の役割の解明を行った。ここで、解明された点をまとめる。

- (1) TRAF6 結合タンパク質として、新規タンパク質 TIFA を同定した。
- (2) TIFA は、過剰発現系で NF- κ B と JNK の活性化を行う。
- (3) TIFA は、TRAF6 と定常的に結合し、IRAK-1 とは、IL-1 刺激依存的に結合する。
- (4) 新規 NF- κ B 阻害剤(-)-DHMEQ は、RAW264.7 細胞および BMM において、RANKL による NF- κ B の活性化を抑制した。
- (5) (-)-DHMEQ は、RAW264.7 細胞および BMM において、RANKL によって誘導される破骨細胞分化を抑制する。
- (6) (-)-DHMEQ は、RANKL によって誘導される NFATc1 の発現を抑制する。
- (7) (-)-DHMEQ は、成熟破骨細胞の骨吸収能を抑制する。

(8)(-)-DHMEQ は、*in vivo* において、LPS によって誘導される炎症性骨破壊モデルを抑制する。

以上の成果により、本研究において、新規 TRAF 結合タンパク質 TIFA を同定し、TIFA は、IL-1 シグナルにおいて主要な構成因子である TRAF6 と IRAK-1 の結合をつなげることにより、下流にシグナルを伝え、転写因子 NF- κ B および AP-1 の活性化を引き起こすことを見い出した。さらに、新規 NF- κ B 阻害剤(-)-DHMEQ が、RANKL 刺激による NF- κ B 活性化を阻害することにより、NFATc1 の発現を抑制することによって、破骨細胞分化を抑制し、さらに、*in vitro* および *in vivo* において、破骨細胞による骨吸収の抑制を行うことが示された。

第5章 参考文献

- (1) Sen, R., and Baltimore, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, **46**, 705-716 (1986)
- (2) Baeuerle, P. A., and Baltimore, D. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF- κ B transcription factor. *Cell*, **53**, 211-217 (1986)
- (3) Baeuerle, P. A., and Baltimore, D. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science*, **242**, 540-546 (1988)
- (4) Ghosh, S., Gifford, A. M., Riviere, L. R., Tempst, P., Nolan, G. P., and Baltimore, D. Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF- κ B: homology to rel and dorsal. *Cell*, **62**, 1019-1029 (1990)
- (5) Kieran, M., Blank, V., Logeat, F., Vandekerckhove, J., Lottspeich, F., Le Bail, O., Urban, M. B., Kourilsky, P., Baeuerle, P. A., and Israel, A. The DNA binding subunit of NF- κ B is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product. *Cell*, **62**, 1007-1018 (1990)
- (6) Nolan, G. P., Ghosh, S., Liou, H. C., Tempst, P., and Baltimore, D. DNA binding and I κ B inhibition of cloned p65 subunit of NF- κ B, a rel-related polypeptide. *Cell*, **64**, 961-969 (1991)
- (7) Ruben, S. M., Dillion, P. J., Schreck, R., Henkel, T., Chen, C. H., Maher, M., Baeuerle, P. A., and Rosen, C. A. Isolation of rel-related human cDNA that potentially encodes the 65-kD subunit of NF- κ B. *Science*, **251**, 1490-1493 (1991)
- (8) Schmid, R. M., Perkins, N. D., Duckett, C. S., Andrews, P. C., and Nabel, G. J. Cloning of NF- κ B subunit which stimulates HIV transcription in synergy with p65. *Nature*, **352**, 733-736 (1991)
- (9) Bours, V., Burd, P. R., Brown, K., Villalobos, J., Park, S., Ryseck, R. P., Bravo, R., Kelly, K., and Siebenlist, U. A novel mitogen-inducible gene product related to p50/p105-NF κ B participates in transactivation through a κ B site. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 685-695 (1992)
- (10) Neri, A., Chang, C. C., Lombardi, L., Salina, M., Corradini, P., Maiolo, A. T., Chaganti, R. S., and Dalla-Favera, R. B-cell lymphoma-associated chromosomal translocation involves candidate oncogene *lyt-10*, homologous to NF- κ B p50. *Cell*, **67**, 1075-1087 (1991)

- (11) Ryseck, R. P., Bull, P., Takamiya, M., Bours, V., Siebenlist, U., Dobrzanski, P., and Bravo, R. RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF- κ B. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 674-684 (1992)
- (12) Chen, I. S., Wilhelmsen, K. C., and Temin, H. M. Structure and expression of c-rel, the cellular homolog the oncogene of reticuloendotheliosis virus strain T. *J. Virol.*, **45**, 104-113 (1983)
- (13) Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, **16**, 225-260 (1998)
- (14) Whiteside, S. T., Epinat, J. C., Rice, N. R., and Israel, A. I κ B epsilon, a novel member of the I κ B family, controls RelA and c-Rel NF- κ B activity. *EMBO J.*, **16**, 1413-1426 (1997)
- (15) Palombella, V. J., Rando, O. J., Goldberg, A. L., and Maniatis, T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B1 precursor protein and activation of NF- κ B. *Cell*, **78**, 773-785 (1994)
- (16) Fan, C. M., and Maniatis, T. Generation of p50 subunit of NF- κ B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature*, **354**, 395-398 (1991)
- (17) Henkel, T., Zabel, U., van Zee, K., Muller, J. M., Fanning, E., and Baeuerle, P. A. Intramolecular masking of nuclear location signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF-kappa B subunit. *Cell*, **68**, 1121-1133 (1992)
- (18) Rice, N. R., McKichan, M. L., and Israel, A. The precursor of NF- κ B p50 has I κ B-like functions. *Cell*, **71**, 243-253 (1992)
- (19) Liou, H. C., Nolan, G. P., Ghosh, S., Fujita, T., and Baltimore, D. The NF- κ B p50 precursor, p105, contains an internal I κ B-like inhibitor that preferentially inhibits p50. *EMBO J.*, **11**, 3003-3009 (1992)
- (20) Inoue, J., Kerr, L. D., Kakizuka, A., and Varma, I. M. I κ B- γ , a 70 kD protein identical to the C-terminal half of p110 NF- κ B: a new member of the I kappa B family. *Cell*, **68**, 1109-1120 (1992)
- (21) Brown, A. M., Linhoff, M. W., Stein, B., Wright, K. L., Baldwin, A. S. Jr., Basta, P. V., and Ting, J. P. Function of NF- κ B/Rel binding sites in the major histocompatibility complex class II invariant chain promoter is dependent on cell-specific binding of different NF- κ B/Rel subunits. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 2926-2935 (1994)

- (22) Kang, S. M., Tran, A. C., Grilli, M., and Lenardo, M. J. NF- κ B subunit regulation in nontransformed CD4⁺T lymphocytes. *Science*, **256**, 1452-1456 (1992)
- (23) Plaksin, D., Barurele, P. A., and Einsenbach, L. KBF1 (p50 NF- κ B homodimer) acts as a repressor of H-2K(b) gene expression in metastatic tumor cells. *J. Exp. Med.*, **177**, 1651-1662 (1993)
- (1) Nakayama, K., Shimizu, H., Mitomo, K., Watanabe, T., Okamoto, S., and Yamamoto, K. A lymphoid cell specific nuclear factor containing c-Rel-like proteins preferentially interacts with interleukin-6 κ B-related motifs whose activities and repressed in lymphoid cells. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 1736-1746 (1992)
- (25) 井上純一郎 転写因子 Rel/NF- κ B の制御機構 - 刺激はいかにして核へ伝達されるか - 。 *蛋白質核酸酵素*, **37**, 2947-2959 (1992)
- (26) Urban, M. B., and Baeuerle, P. A. The 65-kD subunit of NF- κ B is receptor for I κ B and a modulator of DNA-binding specificity. *Genes Dev.*, **4**, 1975-1984 (1990)
- (27) Urban, M. B., Schreck, R., and Baeuerle, P. A. NF- κ B contacts DNA by a heterodimer of the p50 and p65 subunit. *EMBO J.*, **10**, 1817-1825 (1991)
- (28) Baeuerle, P. A., and Baltimore, D. I κ B: a specific inhibitor of the NF- κ B transcription factor. *Science*, **242**, 540-546 (1988)
- (29) Zabel, U., and Baeuerle, P. A. Purified human I κ B can rapidly dissociate the complex of the NF- κ B transcription factor with its cognate DNA. *Cell*, **61**, 255-265 (1990)
- (30) 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**, 27657-27662 (20019)
- (31) Ohno, H., Takimoto, G., and Mckeithan, T. W. The candidate proto-oncogene bcl-3 is related to genes implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell*, **60**, 991-997.
- (1) Franzoso, G., Bours, V., Park, S., Tomita-Yamaguchi, M., Kelly, K., and Siebenlist, U. The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF- κ B-mediated inhibition. *Nature*, **359**, 339-342 (1992)
- (33) Franzoso, G., Bours, V., Azarenko, V., Park, S., Tomita-Yamaguchi, M., Kanno, T., Brown, K., and Siebenlist, U. The oncoprotein Bcl-3 can facilitate NF- κ B-mediated transactivation by removing inhibiting p50 homodimers from select κ B sites. *EMBO J.*, **12**, 3893-3901 (1993)

- (34) Nolan, G. P., Fujita, T., Bhatia, K., Huppi, C., Liou, H. C., Scott, M. L., and Baltimore, D. The bcl-3 proto-oncogene encodes a nuclear I κ B-like molecule that preferentially interacts with NF- κ B p50 and p52 in a phosphorylation-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 3557-3566 (1993)
- (35) Wulczyn, F. G., Naumann, M., and Scheidereit, C. Candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a subunit-specific inhibitor of transcription factor NF- κ B. *Nature*, **358**, 597-599 (1992)
- (36) Zhang, Q., Didonato, J. A., Karin, M., and McKeithan, T. W. BCL3 encodes a nuclear protein which can alter the subcellular location of NF- κ B proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 3915-3926 (1994)
- (37) Bours, V., Franzoso, G., Azarenko, V., Park, S., Kanno, T., Brown, K., and Siebenlist, U. The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through κ B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. *Cell*, **72**, 729-739 (1993)
- (38) Fujita, T., Nolan, G. P., Liou, H. C., Scott, M. L., and Baltimore, D. The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF- κ B p50 homodimers. *Genes Dev.*, **7**, 1354-1363 (1993)
- (39) Verma, I. M., Stevenson, J. K., Schwarz, E. M., van Antwerp, D., and Miyamoto, S. Rel/NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.*, **9**, 2723-2735 (1995)
- (40) Traenckner, E. B., Pahl, H L., Henkel, T., Schmidt, K. N., Wilk, S., and Baeuerle, P. A. Phosphorylation of human I κ B- α on serines 32 and 36 controls I κ B- α proteolysis and NF- κ B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.*, **14**, 2876-2883 (1995)
- (41) Scherer, D. C., Brockman, J. A., Chen, Z., Maniatis, T., and Ballard, D. W. Signal-induced degradation of I κ B α requires site-specific ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11259-11263 (1995)
- (42) Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V. J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D., and Maniatis, T. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I κ B- α to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.*, **9**, 1586-1597 (1995)
- (43) Traenckner, E. B., Wilk, S., and Baeuerle, P. A. A proteasome inhibitor prevents activation of NF- κ B and stabilizes a newly phosphorylated form of I κ B- α that is still bound to NF- κ B. *EMBO J.*, **13**, 5433-5441 (1994)
- (44) Miyamoto, S., Maki, M., Schmitt, M. J., Hatanaka, M., and Verma, I. M. Tumor

- necrosis factor- α -induced phosphorylation of I κ B α is a signal for its degradation but not dissociation from NF- κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12740-12744 (1994)
- (45) De Martin, R., Vanhove, B., Cheng, Q., Hofer, E., Csizmadia, V., Winkler, H., and Bach, F. H. Cytokine-inducible expression in endothelial cells of an I κ B- α -like gene is regulated by NF- κ B. *EMBO J.*, **12**, 2773-2779 (1993)
- (46) Le Bail, O., Schmidt-Ullrich, R., and Israel, A. Promoter analysis of the gene encoding the I κ B- α /MAD3 inhibitor of NF- κ B: positive regulation by members of the rel/NF- κ B family. *EMBO J.*, **12**, 5043-5049 (1993)
- (47) Thompson, J. E., Phillips, R. J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Ghosh, S. I κ B- β regulates the persistent response in a biphasic activation of NF- κ B. *Cell*, **80**, 573-582 (1995)
- (48) Beg, A. A., Ruben, S. M., Scheinman, R. I., Haskill, S., Rosen, C. A., and Baldwin, A. S. Jr. I κ B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF- κ B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev.*, **6**, 1899-1913 (1992)
- (49) Ganchi, P. A., Sun, S. C., Greene, W. C., and Ballard, D. W. I κ B/ MAD-3 masks the nuclear localization signal of NF- κ B p65 and requires the transactivation domain to inhibit NF- κ B p65 DNA binding. *Mol. Biol. Cell.*, **3**, 1339-1352 (1992)
- (50) Chen, Z. J., Parent, L., and Maniatis, T. Site-specific phosphorylation of I κ B α by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell*, **84**, 853-862 (1996)
- (51) DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E., and Karin, M. A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature*, **388**, 548-554 (1997)
- (52) Regnier, C. H., Song, H. Y., Gao, X., Goeddel, D. V., Cao, Z., and Rothe, M. Identification and characterization of an I κ B kinase. *Cell*, **90**, 373-383 (1997)
- (53) Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Li, J., Young, D., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A., and Rao, A. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science*, **278**, 860-866 (1997)
- (54) Woronicz, J. D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M., and Goeddel, D. V. I κ B kinase- β NF- κ B activation and complex formation with I κ B kinase- α and NIK. *Science*, **278**, 866-869 (1997)
- (55) Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, m., Hayakawa, M., and Karin, M. The I κ B

- kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell*, **91**, 243-252 (1997)
- (56) Rothwarf, D. M., Zandi, E., Natoli, G., and Karin, M. IKK- γ is an essential regulatory subunit of the I κ B kinase complex. *Nature*, **395**, 297-300 (1998)
- (57) Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S. T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H. E., Kay, R. J., and Israel, A. Complementation cloning of NEMO, a component of the I κ B kinase complex essential for NF- κ B activation. *Cell*, **93**, 1231-1240 (1998)
- (58) Cohen, L., Henzel, W. J., and baeuerle, P. A. IKAP is scaffold protein of the I κ B kinase complex. *Nature*, **395**, 292-296 (1998)
- (59) Malinin, N. L., Boldin, M. P., Kovalenko, A. V., and Wallach, D. MAP3K-related kinase involved in NF- κ B induction by TNF, CD95, and IL-1. *Nature*, **385**, 540-544 (1997)
- (60) Lee, F. S., Hagler, J., Chen, Z. J., and Maniatis, T. Activation of the I κ B α kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell*, **88**, 213-222 (1997)
- (61) Yang, J., Lin, Y., Guo, Z., Cheng, J., Huang, J., Deng, L., Liao, W., Chen, Z., Liu, Z., and Su, B. The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF- κ B activation. *Nat. immunol.*, **2**, 620-624 (2001)
- (62) Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M., and Donner, D. B. NF- κ B activation by tumor necrosis factor requires the Akt serin-threonine kinase. *Nature*, **401**, 82-85 (1999)
- (63) Romashkova, J. A., and Makarov, S. S. NF- κ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signaling. *Nature*, **401**, 86-90 (1999)
- (64) Sanz, L., Sanchez, P., Lallena, M. J., Diaz-Meco, M. T., and Moscat, J. The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF- κ B activation. *EMBO J.*, **18**, 3044-3053 (1999)
- (65) Shirane, M., Hatakeyama, S., Hattori, K., Nakayama, K., and Nakayama, K. Common pathway for the ubiquitination of I κ B α , I κ B β , and I κ B ϵ mediated by the F-box protein FWD α . *J. Biol. Chem.*, **274**, 28169-28174 (1999)
- (66) Gerritsen, M. E., Williams, A. J., Neish, A. S., Moore, S., Shi, Y., and Collins, T. CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2927-2932 (1997)
- (67) Zhong, H., Su Yang, h., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Ghosh, S. The

- transcriptional activity of NF- κ B is regulated by the I κ B-associated PKAs subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell*, **89**, 413-424 (1997)
- (68) Sha, W. C., Liou, H. C., Tuomanen, E. I., and Baltimore, D. Targeted disruption of the p50 subunit of NF- κ B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell*, **80**, 321-330 (1995)
- (69) Snapper, C. M., Zelazoxski, P., Rosas, F. R., Kehry, M. R., Tian, M., Baltimore, D., and Sha, W. C. B cells from p50/NF- κ B knockout mice have selective defects in proliferation, differentiation, germ-line CH transcription, and Ig class switching. *J. Immunol.*, **156**, 183-191 (1996)
- (70) Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., Ghosh, S., and Baltimore, D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF- κ B. *Nature*, **376**, 161-170 (1995)
- (71) Burkly, L., Hession, C., Ogata, L., Reilly, C., Marconi, L. A., Olson, D., Tizard, R., Cate, R., and Lo, D. Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature*, **373**, 531-536 (1995)
- (72) Weih, F., Carrasco, D., Durham, S. K., Barton, D. S., Rizzo, C. A., Ryseck, R. P., Lira, S. A., and Bravo, R. Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF- κ B/Rel family. *Cell*, **80**, 331-340 (1995)
- (73) Kontgen, F., Grumont, R. J., Strasser, A., Metcalf, D., Li, R., Tarlinton, D., and Gerondakis, S. Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibit defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev.*, **9**, 1965-1977 (1995)
- (74) Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., and Baltimore, D. Constitutive NF- κ B activation, enhanced granulopoiesis, and neonatal lethality in I κ B α -deficient mice. *Genes Dev.*, **9**, 2736-2746 (1995)
- (75) Takeda, K., Takeuchi, O., Tsujimura, T., Itami, S., Adachi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Yoshikawa, K., Terada, N., and Akira, S. Limb and skin abnormalities in mice lacking IKK α . *Science*, **284**, 313-316 (1999)
- (76) Hu, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R., and Karin, M. Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK α subunit of I κ B kinase. *Science*, **284**, 316-320 (1999)
- (77) Li, Q., Lu, Q., Hwang, J. Y., Buscher, D., Lee, K. F., Izipisua-Belmonte, J. C., and

- Verma, I. M. IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeltone. *Genes Dev.*, **13**, 1322-1328 (1999)
- (78) Tanaka, M., Fuentes, M. E., Yamaguchi, K., Durnin, M. H., Dalrymple, S. A., Hardy, K. L., and Goeddel, D. V. Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF- κ B activation in IKK- β -deficient mice. *Immunity*, **10**, 421-429 (1999)
- (79) Frantz, B., and O'Neill, E. A. The effect of sodium salicylate and aspirin on NF- κ B. *Science*, **270**, 2017-2019 (1995)
- (80) Kopp, E., and Ghosh, S. Inhibition of NF- κ B by sodium salicylate and aspirin. *Science*, **265**, 956-959 (1994)
- (81) Yin, M. J., Yamamoto, Y., and Gaynor, R. B. The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β . *Nature*, **396**, 77-80 (1998)
- (82) Scheinman, R. I., Cogswell, P. C., Lofquist, A. K., and Baldwin, A. S. Jr. Role of transcriptional activation of I κ B α in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*, **270**, 283-286 (1995)
- (83) Auphan, N., DiDonato, J. A., Rosette, C., Helmberg, A., and Karin, M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science*, **270**, 286-290 (1995)
- (84) You, M., Ku, P. T., Hrdlickova, R., and Bose, H. R. Jr. ch-IAP1, a member of the inhibitor-of-apoptosis protein family, is a mediator of the antiapoptotic activity of the v-Rel oncoprotein. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 7328-7341 (1997)
- (85) Wang, C. Y., Mayo, M. W., and Baldwin, A. S. Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science*, **274**, 784-787 (1996)
- (86) Sumitomo, S., Tachibana, M., Ozu, C., Asakura, H., Murai, M., Hayakawa, M., Nakamura, H., Takayanagi, A., and Shimizu, N. Induction of apoptosis of cytokine-producing bladder cancer cells by adenovirus-mediated I κ B α overexpression. *Hum. Gene. Ther.*, **10**, 37-47 (1999)
- (87) Sumitomo, S., Tachibana, M., Nakashima, J., Murai, M., Miyajima, A., Kimura, F., Hayakawa, M., and Nakamura, H. An essential role for nuclear factor κ B in preventing TNF- α -induced cell death in prostate cells. *J. Urol.*, **161**, 674-679 (1999)
- (88) Pahl, H. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*, **18**, 6853-6866 (1999)

- (89) Tsuchida, T., Umekita, M., Kinoshita, N., Iinuma, H., Nakamura, H., Nakamura, K., Naganawa, H., Sawa, T., Hamada, M., and Takeuchi, T. Epoxyquinomicins A and B, new antibiotics from *Amycolatopsis*. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **49**, 326-328 (1996)
- (90) Matsumoto, N., Tsuchida, T., Umekita, M., Kinoshita, N., Iinuma, H., Sawa, T., Hamada, M., and Takeuchi, T. Epoxyquinomicins A, B, C and D, new antibiotics from *Amycolatopsis*. I. Taxonomy, fermentation, isolation and antimicrobial activities. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **50**, 900-905 (1997)
- (91) Matsumoto, N., Iinuma, H., Sawa, T., Takeuchi, T., Hirano, S., Yoshioka, T., and Ishizuka, M. Epoxyquinomicins A, B, C and D, new antibiotics from *Amycolatopsis*. II. Effect on type II collagen-induced arthritis in mice. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **50**, 906-911 (1997)
- (92) Erkel, G., Anke, T., and Sterner, O. Inhibition of NF- κ B activation by panepoxydone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **226**, 214-221 (1996)
- (93) Gehrt, A., Erkel, G., Anke, T., and Sterner, O. Cycloepoxydon, 1-hydroxy-2-hydroxymethyl-3-pent-1-enylbenzene and 1-hydroxy-2-hydroxymethyl-3-pent-1,3-dienylbenzene, new inhibitors of eukaryotic signal transduction. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **51**, 455-463 (1998)
- (94) Matsumoto, N., Ariga, A., To-e, S., Nakamura, H., Agata, N., Hirano, S., Inoue, J., and Umezawa, K. Synthesis of NF- κ B activation inhibitors derived from epoxyquinomicin C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 865-869 (2000)
- (95) Kikuchi, E., Horiguchi, Y., Nakashima, J., Kuroda, K., Oya, M., Ohigashi, T., Takahashi, N., Shima, Y., Umezawa, K., and Murai, M. Suppression of hormone-refractory prostate cancer by a novel nuclear factor κ B inhibitor in nude mice. *Cancer Res.*, **63**, 107-110 (2003)
- (96) Miyajima, A., Kosaka, T., Seya, K., Asano, T., Umezawa, K., and Hayakawa, M. Novel nuclear factor kappa B activation inhibitor prevents inflammatory injury in unilateral ureteral obstruction. *J. Urol.*, **169**, 1559-1563 (2003)
- (97) Ariga, A., Namekawa, J., Matsumoto, N., Inoue, J., and Umezawa, K. Inhibition of tumor necrosis factor- α -induced nuclear translocation and activation of NF- κ B by dehydroxymethylepoxyquinomicin. *J. Biol. Chem.*, **277**, 24625-24630 (2002)

- (98) Suzuki, Y., Sugiyama, C., Ohno, O., and Umezawa, K. Preparation and biological activities of optically active dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel NF- κ B inhibitor. *Tetrahedron*, **60**, 7061-7066 (2004)
- (99) Fitzgerald, K. A., and O'Neill, L. A. The role of the interleukin-1/Toll-like receptor superfamily in inflammation and host defence. *Microbes Infect.*, **2**, 933-943 (2000)
- (100) Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.*, **2**, 675-680 (2001)
- (101) O'Neill, L. A. Wanted: a molecular basis for specificity in toll-like receptor signal transduction. *Mol. Cell*, **10**, 969-971 (2002)
- (102) Muzio, M., Ni, J., Feng, P., and Dixit, V. M. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*, **278**, 1612-1615 (1997)
- (103) Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S., and Cao, Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*, **7**, 837-847 (1997)
- (104) Burunski, K., Clatworthy, J., Martin, L., Martinon, F., Plumpton, C., Maschera, B., Lewis, A., Ray, K., Tschopp, J., and Volpe, F. Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat. Cell Biol.* **2**, 346-351 (2000)
- (105) Cao, Z., Henzel, W. J., and Cao, X. IRAK a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science*, **271**, 1128-1131 (1996a)
- (106) Wesche, H., Gao, X., Li, X., Kirschning, C. J., Stark, G. R., and Cao Z. IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J. Biol. Chem.*, **274**, 19403-19410 (1999)
- (107) Li, S., Strelow, A., Fontana, E. J., and Wesche, H. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 5567-5572 (2002)
- (108) Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., and Matsumoto, K. The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature*, **398**, 252-256 (1999)
- (109) Naito, A., Azuma, S., Tanaka, S., Miyazaki, T., Takaki, S., Takatsu, K., Nakao, K., Nakamura, K., Katsuki, M., Yamamoto, T., and Inoue, J. Server osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6-deficient mice. *Genes Cells*, **4**, 353-362 (1999)

- (110) Lomaga, M. A., Yen, W C., Sarosi, I., Duncan, G. S., Furlonger, C., Ho, A., Morony, S., Capparelli, C., Van, G., Kaufman, S., van der Heiden, A., Itie, A., Wakeham, A., Khoo, W., Sakaki, T., Cao, Z., Penninger, J. M., Paige, C. J., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Boyle, W. J., Goeddel, D. V. and Mak, T. W. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev.*, **13**, 1015-1024 (1999)
- (111) Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J., and Chen, Z. J. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*, **412**, 346-351 (2001)
- (112) Baud, V., Liu, Z. G., Bennett, B., Suzuki, N., Xia, Y., and Karin, M. Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev.*, **13**, 1297-1308 (1999)
- (113) Shii, Y., Yamamoto, T., and Yamaguchi, N. Negative regulation of Rb expression by the p53 gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5206-5210 (1992)
- (114) Ishida, T., Mizushima, S., Azuma, S., Kobayashi, N., Tojo, T., Suzuki, K., Aizawa, S., Watanabe, T., Mosialos, G., Kieff, E., Yamamoto, T., and Inoue, J. identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J. Biol. Chem.*, **271**, 28745-28748 (1996)
- (115) Kanamori, M., Suzuki, H., Saito, R., Muramatsu, M., and Hayashizaki, Y. T2BP, a novel TRAF2 binding protein, can activate NF- κ B and AP-1 without TNF stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **290**, 1108-1113 (2002)
- (116) Hofmann, K., and Bucher, P. The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 347-349 (1995)
- (117) Li, J., Lee, G. I., Van Doren, S. R., and Walker, J. C. The FHA domain mediates phosphoprotein interactions. *J. Cell Sci.*, **113**, 4143-4149 (2000)
- (118) Sun, Z., Hsiao, J., Fay, D. S., and Stern, D. F. Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint. *Science*, **281**, 272-274 (1998)
- (119) Li, J., Smith, G. P., and Walker, J. C. Kinase interaction domain of kinase-

- associated protein phosphatase, a phosphoprotein-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7821-7826 (1999)
- (120) Durocher, D., Henkel, J., Fersht, A. R., and Jackson, S. P. The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. *Mol. Cell*, **4**, 387-394 (1999)
- (121) Durocher, D., Taylor, I. A., Sarbassova, D., Haire, L. F., Westcott, S. L., Jackson, S. P., Smerdon, S. J., and Yaffe, M. B. The molecular basis of FHA domain: phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanism. *Mol. Cell*, **6**, 1169-1182 (2000)
- (122) Yaffe, M. B., and Cantley, L. C. Signal transduction. Grabbing phosphoproteins. *Nature*, **402**, 30-31 (1999)
- (123) Ye, H., Arron, J. R., Lamothe, B., Cirilli, M., Kobayashi, T., Shevede, N. K., Segal, D., Dzivenu, O. K., Vologodskaja, M., Yim, M., Du, K., Singh, S., Pike, J. W., Darnay, B. G., Choi, Y., and Wu, H. distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature*, **418**, 443-447 (2002)
- (124) Pullen, S. S., Miller, H. G., Everdeen, D. S., Dang, T. T. A., Crute, J. J. and Kehry, M. R. CD40- tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization. *Biochemistry*, **37**, 11836- 11845 (1998)
- (125) Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Azuma, S., Yamamoto, T., and Inoue, J. Two differently regulated nuclear factor kappaB activation pathways triggered by the cytoplasmic tail of CD40. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1234-1239 (1998)
- (126) Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Janeway, C. A., Jr., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*, **110**, 191-202 (2002)
- (127) Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z. J. Activation of IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique ubiquitin chain. *Cell*, **103**, 351-361 (2000)
- (128) Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Munhrladt, P. F., Sato, S., Hoshino, K., and Akira, S. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of INF-regulatory factor 3 and the expression of subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J. Immunol.*, **167**, 5887-5894 (2001)
- (129) Clark, S. E., Williams, R. W., and Meyerowitz, E. M. The CLAVATA1 gene

- encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. *Cell*, **89**, 575-585 (1997)
- (130) Takaesu, G., Ninomiya-Tsuji, J., Kishida, S., Li, X., Stark, G. R., and Matsumoto, K. Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 2475-2484
- (131) Jiang, Z., Johnson, H. J., Nie, H., Qin, J., Bird, T. A., and Li, X. Pellino 1 is required for interleukin-1 (IL-1)-mediated signaling through its interaction with IL-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4)-IRAK-tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) complex. *J. Biol. Chem.*, **278**, 10952-10956 (2003)
- (132) Naito, A., Yoshida, H., Nishioka, E., Satoh, M., Azuma, S., Yamamoto, T., Nishikawa, S., and Inoue, J. TRAF6-deficient mice display hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8766-8771 (2002)
- (133) Khursigara, G., Orlinick, J. R., and Chao, M. V. Association of the p75 neurotrophin receptor with TRAF6. *J. Biol. Chem.*, **274**, 2597-2600 (1999)
- (134) Mamidipudi, V., Li, X., and Wooten, M. W. Identification of interleukin 1 receptor-associated kinase as a conserved component in the p75-neurotrophin receptor activation of nuclear factor-kappaB. *J. Biol. Chem.*, **277**, 28010-18018 (2002)
- (135) Inoue, J., Ishida, T., Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Naito, A., Azuma, S., and Yamamoto, T. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter protein that mediate cytokine signaling. *Exp. Cell Res.*, **254**, 14-24 (2000)
- (136) Goldring, S. R., and Gravallesse, E. M. Pathogenesis of bone erosion in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, **12**, 195-199 (2002)
- (137) Fledmann, M., Brennan, F. M., and Maini, R. N. Rheumatoid Arthritis (review). *Cell*, **85**, 307-310 (1996)
- (138) Romas, E., Backharevski, O., Hards, D. K., Kartsoginannis, V., Quinn, M. W., Martin, T. J., and Gillespie, M. T. Expression of osteoclast differentiation factor at sites of bone erosion in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, **43**, 821-825 (2000)
- (139) Takayanagi, H., Iizuka, H., Hideharu, J., Juji, T., Yamamoto, A., Oda, H., Nakamura, K., and Tanaka, S. Involvement of RANKL/ODF in osteoclastogenesis from synovial cell in RA. *Arthritis Rheum.*, **43**, 259-269 (2000)

- (140) Pettit, A. R., Ji, H., Stechow, R., Muller, R., Goldring, S., Choi, Y., Benoist, C., and Gravellese, E. TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in serum transfer model of arthritis. *Am. J. Pathol.*, **159**, 1689-1699 (2001)
- (141) Fujikawa, Y., Quinn, J. M., Sabokbar, A., McGee, J. O., and Athanasou, N. A. The human osteoclast precursor circulates in the monocyte fraction. *Endocrinology*, **137**, 4058-4060 (1996)
- (142) Boyle, W. J., Simonet, W. S., and Lacey, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, **423**, 337-342 (1999)
- (143) Li, J., Sarosi, I., Yan, X. Q., Morony, S., Capparelli, C., Tan, H. L., McCabe, S., Elliott, R., Scully, S., Van, G., Kaufman, S., Juan, S. C., Sun, Y., Tarpley, J., Martin, L., Christensen, K., McCabe, J., Kostenuik, P., Hsu, H., Fletcher, F., Dunstan, C. R., Lacy, D. L., and Boyle, W. J. RANK is intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1566-1571 (2000)
- (144) Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliot, R., Colombero, A., Elliot, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y. X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J., and Boyle, W. J. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, **93**, 165-176 (1998)
- (145) 高柳 広 RA における免疫系と骨代謝の相互作用 分子リウマチ, **1**, 74-81 (2004)
- (146) Wong, B. R., Josien, R., Lee, S. Y., Vologodakaia, M., Steinman, R. M., and Choi, Y. The TRAF family of signal transducers mediates NF- κ B activation by TRANCE receptor. *J. Biol. Chem.*, **273**, 28355-28359 (1998)
- (147) Darnay B. G., Haridas, V., Ni, J., Moore, P. A., and Aggarwal, B. B. Characterization of the intercellular domain of receptor activator of NF- κ B (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF- κ B and c-Jun N-terminal kinase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 20551-20555 (1998)
- (148) Darnay, B. G., Ni, J., Moore, P. A., and Aggarwal, B. B. Activation of NF- κ B by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF- κ B-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif. *J. Biol.*

- Chem.*, **274**, 7724-7731 (1999)
- (149) Darnay, B. G., and Aggarwal B. B. Signal transduction by tumor necrosis factor and tumor necrosis factor related ligands and their receptors. *Ann. Rheum. Dis.*, **58**, Suppl. 1, I2-I13 (1999)
- (150) Kobayashi, N., Kadono, Y., Naito, A., Matsumoto, K., Yamamoto, T., Tanaka, S., and Inoue, J. Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. *EMBO J.*, **20**, 1271-1280 (2001)
- (151) Franzoso, G., Carlson, L., Xing, L., Poijak, L., Shores, E. W., Brown, K. D., Leonardi, A., Tran, T., Boyce, B. F., and Siebenlist, U. Requirement for NF- κ B in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev.*, **11**, 3482-3496 (1997)
- (152) Wang, Z. Q., Ovitt, C., Grigoriadis, A. E., Ruther, U., and Wagner, E. F. Bone and hematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature*, **360**, 741-745 (1992)
- (153) Johnson, R. S., Spiegelman, B. M., and Papaioannou, V. Pleiotropic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene. *Cell*, **71**, 577-586 (1992)
- (154) Grigoriadis, A. E., Wang, Z. Q., Cecchini, M. G., Fleisch, H. A., and Wager, E. F. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage linkage determine and bone remodeling. *Science*, **266**, 443-448 (1994)
- (155) Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J.-I., Wagner, E. F., Mak, T. W., Kodama, T., and Taniguchi, T. Induction and activation of transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev. Cell*, **3**, 889-901 (2002)
- (156) Andrews, N. C., and Faller, D. V. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 2449-2455 (1991)
- (157) Novack, D. V., Yin, L., Hagen-Stapleton, A., Schreiber, R. D., Goeddel, D. V., Ross, F. P., and Teitelbaum, S. T. The I κ B function of NF- κ B2 p100 controls stimulated osteoclastogenesis. *J. Exp. Med.*, **198**, 771-781 (2003)
- (158) Abu-Amer, Y., Dowdy, S. F., Ross, F. P., Clohisy, J. C., and Teitelbaum, S. L. TAT fusion proteins containing tyrosine 42-deleted I κ B α arrest osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.*, **276**, 30499-30503 (2001)
- (159) Clohisy, J. C., Roy, B. C., Biondo, C., Frazier, E., Willis, D., Teitelbaum, S. L., Abu-Amer, Y. Direct inhibition of NF- κ B blockes bone erosion associated with

- inflammatory arthritis. *J. Immunol.*, **171**, 5547-5553 (2003)
- (1) Jimi, E., Aoki, K., Saito, H., D'Acquisto, F., May, M. J., Nakamura, I., Sudo, T., Kojima, T., Okamoto, F., Fukushima, H., Okabe, K., Ohya, K., and Ghosh, S. Selective inhibition of NF- κ B blocks osteoclastogenesis and prevents inflammatory bone destruction *in vivo*. *Nat. Med.*, **10**, 617-624 (2004)
- (161) Bharti, AC., Takada, Y., and Aggarwal, BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits receptor activator of NF- κ B ligand-induced NF- κ B activation in osteoclast precursors and suppresses osteoclastogenesis. *J. Immunol.*, **172**, 5940-5947 (2004)
- (162) Hirotani, H., Tuohy, N. A., Woo, J-H., Stern, P. H., and Clipstone, N. A. The calcineurin/NFAT signaling pathway regulates osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *J. Biol. Chem.*, **279**, 13984-13992 (2004)
- (163) Urushibara, M., Takayanagi, H., Koga, T., Kim, S., Isobe, M., Morishita, Y., Nakagawa, T., Loeffler, M., Kodama, T., Kurosawa, H., and Taniguchi, T. The antirheumatic drug leflunomide inhibits osteoclastogenesis by interfering with receptor activator of NF- κ B ligand-stimulated induction of nuclear factor of activated T cell c1. *Arthritis Rheum.*, **50**, 794-804 (2004)
- (164) Koga, T., Inui, M., Inoue, K., Kim, S., Suematsu, A., Kobayashi, E., Iwata, T., Ohnishi, H., Matsuzaki, T., Kodama, T., Taniguchi, T., Takayanagi, H., and Takai, T. Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature*, **423**, 758-763 (2004)
- (165) Lee, S. E., Woo, K. M., Kim, S. Y., Kim, H-M., Kwack, K., Lee, Z. H., and Kim, H-H. The phosphatidylinositol 3-kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation. *Bone*, **30**, 71-77 (2002)
- (166) Wei, S., Wang, W. M., Teitelbaum, S. L., and Ross, F. P. Interleukin-4 reversibly inhibits osteoclastogenesis via inhibition of NF- κ B and mitogen-activated protein kinase signaling. *J. Biol. Chem.*, **277**, 6622-6630 (2002)
- (167) Kawaida, R., Ohtsuka, T., Okutsu, J., Takahashi, T., Kadono, Y., Oda, H., Hikita, A., Nakamura, K., Tanaka, S., and Furukawa, H. Jun dimerization protein 2 (JDP2), a member of AP-1 family of transcription factor mediates osteoclast differentiation induced by RANKL. *J. Exp. Med.*, **197**, 1029-1035 (2003)
- (168) Hotokezaka, H., Sakai, E., Kanaoka, K., Saito, K., Matsuo, K-I., Kitaura, H., Yoshida, N., and Nakayama, K. U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK,

accelerate differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cell. *J. Biol. Chem.*, **277**, 47366-47372 (2002)

- (169) Miyazaki, T., Katagiri, H., Kanegae, Y., Takayanagi, H., Sawada, Y., Yamamoto, A., Pando, M. P., Asano, T., Verma, I. M., Oda, H., Nakamura, K., and Tanaka, S. Reciprocal role of ERK and NF- κ B pathways in survival and activation of osteoclasts. *J. Cell. Biol.*, **148**, 333-342 (2000)

第6章 謝辞

本研究の遂行に際して、終始御指導、御鞭撻を賜りました慶應義塾大学理工学部 梅澤一夫教授に深く感謝いたします。

また、本研究の遂行に際して、終始御指導を賜りました東京大学医科学研究所 井上純一郎教授に深く感謝いたします。

本研究に関して有益な御助言をいただきました慶應義塾大学理工学部 只野金一教授、柳川弘志教授、岡浩太郎助教授に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、種々の御助言をいただいた東京医科歯科大学分子細胞機能学分野 高柳広教授、朝霧成拳助手に深く感謝いたします。

酵母2 - ハイブリッド法について御教授いただいた東京大学医科学研究所 仙波憲太郎助教授、秋山泰身講師、合田仁助手に深く感謝いたします。

TIFA タンパク質精製を担当していただいた、熊本大学薬学部 岡本良成助手に深く感謝いたします。

骨破壊モデルマウスの切片の作成ならびに、染色法について御教授いただいた東京医科歯科大学硬組織薬理学分野 大谷啓一教授、青木和広助手、斉藤広章氏に深く感謝いたします。

カルシウム流入の測定を行っていただいた、慶應義塾大学理工学研究科 久保田健氏に深く感謝いたします。

本研究における共同研究者である加藤弘樹氏、守谷彩香氏、守田俊介氏、杉山千枝氏、長田年弘氏に深く感謝いたします。

本研究について討論およびアドバイスをいただいた鈴木芳和博士、松村隆之博士、大野修氏、藤井盛光氏、川瀬摂氏に深く感謝いたします。

最後に研究生活を公私ともに支えていただいた先輩、同輩、後輩の皆様に感謝いたします。