

## タンパク質分解系による炎症応答の新たな制御機構

王 文琦 (筑波大学 生物学類)

指導教員：千葉 智樹 (筑波大学 生命環境系)

## 背景および目的

オートファジーは、ユビキチン・プロテアソーム系とともに、細胞内における異常または古くなったタンパク質を分解し、細胞の恒常性を維持している。ユビキチン・プロテアソーム系においてプロテアソームはユビキチン化されたタンパク質を認識して1分子ずつの選択的なタンパク質分解が行う。これに対して、オートファジーではリソソームがターゲットを囲い込んだオートファゴソームと膜融合し非選択的なバルク分解を行う。

オートファジーは、飢餓環境下において活性化しタンパク質を積極的に分解することでアミノ酸を供給している。また先行研究によって、中枢神経系に特異的にオートファジー機能を欠損したマウスでは異常なタンパク質の蓄積とともに小脳のプルキンエ細胞が脱落するなどの神経変性様の病理像が観察されたため、オートファジーは中枢神経系の恒常性維持にも重要であることが分かった。

近年、アルツハイマー病やパーキンソン病で見られる脳内異常タンパク質の蓄積は慢性的な炎症反応と密接な関係にある。またこの炎症反応において  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  転写因子は中心的な役割をもつと言われている。 $\text{NF-}\kappa\text{B}$  シグナル伝達を活性化する経路は主に  $\text{TNF-}\alpha$  刺激に応答する Canonical Pathway と、LPS や Lymphotoxin などの刺激に応答する Non-canonical Pathway に分けられる。Canonical Pathway では  $\text{TNF-}\alpha$  刺激によって IKK が活性化し、次に活性化した IKK が  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$  をリン酸化することで  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$  はポリユビキチン化され、これを特異的に認識するプロテアソームによって分解される。その後  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$  と結合し細胞質に留まっていた  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  は核内へ移行し炎症性サイトカインなどの転写を促進する。このプロセスによって活性化する  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  は p65 と p50 のヘテロダイマーである。Lymphotoxin や CD40L 刺激に応答する Non-canonical Pathway では刺激によって IKK $\alpha$  が活性化すると  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  の一員である p100 をリン酸化する。リン酸化された p100 はユビキチン・プロテアソーム系による限定分解を受けて p52 となり、これと RelB で構成される  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  が核内移行する。

本研究ではオートファジーが中枢神経系において炎症反応を制御している可能性を考え、まずオートファジーと転写因子  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  の関係をオートファジー機能を欠損した細胞を用いて解析した。

## 方法

- 細胞  
実験には野生型マウス胎児繊維芽細胞(WT MEF)とオートファジー機能を欠損した ATG5 KO MEF を用いた。
- $\text{NF-}\kappa\text{B}$  Reporter gene assay  
Luciferase reporter plasmid と Renilla Luciferase plasmid をトランスフェクションした WT MEF と ATG5 KO MEF それぞれに  $\text{TNF-}\alpha$  処理を加えた後、ルシフェラーゼの活性を測定した。トランスフェクション効率の補

正のため、Renilla Luciferase の活性を内部コントロールとして用いた。

- $\text{TNF-}\alpha$  刺激後の p65 の核内移行  
 $\text{TNF-}\alpha$  を処理した WT MEF と ATG5 KO MEF における  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  p65 の細胞内局在を p65 抗体を用いた細胞免疫染色し、蛍光顕微鏡で観察した。
- $\text{TNF-}\alpha$  刺激後の細胞内の p65 の発現量  
 $\text{TNF-}\alpha$  を処理した後、WT MEF と ATG5 KO MEF における p65 の発現量を Western Blotting 法を用いて解析した。
- $\text{NF-}\kappa\text{B}$  p52,  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$  の発現量  
p100/p52 抗体と  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$  抗体を用いた Western Blotting 法によって WT MEF と ATG5 KO MEF の細胞内における p52,  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$  の発現量を解析した。

## 結果・展望

$\text{NF-}\kappa\text{B}$  Reporter gene assay の結果、オートファジーは  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  の転写活性を制御している可能性が考えられた。詳しいデータは発表会にて発表する。また、今後は Cre-LoxP 系を用いた組織限定的なオートファジーのノックアウトマウスを用いて組織レベルでの解析を検討している。