

博士論文

転写因子 NF- $\kappa$ B の時空間的制御  
メカニズムの解析

関 崇生

## 目次

第一章	緒言.....	1
第二章	材料と実験方法.....	4
第三章	結果.....	11
第四章	考察.....	21
第五章	総括.....	26
第六章	図表.....	27
第七章	謝辞.....	61
第八章	引用文献.....	62

# 第一章 緒言

## 1-1 Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) について

転写因子 Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) はファミリーを形成し免疫反応、炎症、細胞増殖、細胞生存、細胞分化などの様々な生体内プロセスに関与している (1)。哺乳類の NF- $\kappa$ B ファミリーは 5 つのメンバー (C-Rel, RelB, p65/RelA, p105/p50, p100/p52) から構成され、ホモまたはヘテロ二量体を形成する (1)。これらの分子は、 $\kappa$ B サイトへの結合を介して様々な標的遺伝子の転写を促進する。NF- $\kappa$ B は通常 Inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) ファミリーに属する抑制分子と結合することによって不活性化状態に保たれている。古典的経路における NF- $\kappa$ B の活性化は、I $\kappa$ B kinase (IKK) 複合体 (IKK $\alpha$ / $\beta$ / $\gamma$ ) を介した I $\kappa$ B $\alpha$ 分子の分解に依存する。I $\kappa$ B $\alpha$ の分解は IKK 複合体によるリン酸化反応を介して行われ、様々な NF- $\kappa$ B 複合体 (特に RelA/p50 ヘテロ二量体) の核移行を導くことが知られている。古典的経路は、素早く活性化し、アポトーシス抑制、細胞分裂、炎症等に関与する標的遺伝子を発現する。一方、I $\kappa$ B $\alpha$ の分解の代わりに p100 のプロセッシングを介し RelB/p52 を活性化する非古典的経路が知られている。非古典的経路は、活性化が遅く、リンパ組織形成、B 細胞生存、成熟、樹状細胞活性化、そして骨代謝などを制御している (2)。このように NF- $\kappa$ B は機能的に異なる 2 つの活性化経路を持つ転写因子である。

## 1-2 NF- $\kappa$ B の振動について

TNF $\alpha$ 刺激は、古典的 NF- $\kappa$ B 経路を強く活性化し、IKK 複合体の活性化を引き起こす。この時、IKK 複合体は I $\kappa$ B $\alpha$ をリン酸化し、分解を導く。RelA/p50 は細胞質で I $\kappa$ B $\alpha$ から解放され、核内へ移行し、I $\kappa$ B $\alpha$ を含む標的遺伝子の発現を誘導する。新たに合成された I $\kappa$ B $\alpha$ 分子は核内の RelA/p50 と結合し、核外移行を引き起こす。それゆえ、NF- $\kappa$ B の転写活性が減弱する (図 2-A)。持続的な TNF $\alpha$ 刺激の下では、NF- $\kappa$ B の活性化と不活性化が繰り返され、そして NF- $\kappa$ B は周期的に細胞質と核の間で転移する (NF- $\kappa$ B の振動)。野生型細胞では、徐々にこの NF- $\kappa$ B の振動が弱まるが、I $\kappa$ B $\beta$  と I $\kappa$ B $\epsilon$ 欠損細胞では維持される (3)。2004 年に D. E. Nelson 博士らは、TNF $\alpha$ 刺激後の NF- $\kappa$ B の振動を可視化させた (4)。この報告によると、持続的な TNF $\alpha$ 刺激の下、NF- $\kappa$ B の振動は 10 時間以上持続し、個々の細胞で周期の異なる振動を起こす。この理由は、I $\kappa$ B $\beta$  と I $\kappa$ B $\epsilon$ が TNF $\alpha$ 刺激後に I $\kappa$ B $\alpha$ よりも遅れて誘導されるため、振動の不均一性を生み出していると考えられている (5)。短時間の TNF $\alpha$ パルス刺激は、NF- $\kappa$ B の振動を誘導せず、一度だけの活性化を誘導する (図 2-B)。一方で、LPS 刺激による NF- $\kappa$ B の活性化は、標的遺伝子の TNF $\alpha$ がオートクラインで作用するため、振動があまり見られない(6-8)。これらの報告から、TNF $\alpha$ 刺激と LPS 刺激では NF- $\kappa$ B の挙動が異なることが明らかとなった。

Ashall 博士らの報告によると、NF- $\kappa$ B の振動は標的遺伝子群の発現制御をしている。筆者らは、TNF $\alpha$ パルス刺激を繰り返すことで、NF- $\kappa$ B の振動の周期を人為的に制御し、200 分間隔で刺激をすると振動の振幅が減弱せず、かつ細胞間で周期が同調することを発見し

た。細胞を 60 分または 100 分間隔で刺激すると、徐々に減衰していく同調した振動が見られた。また、短時間刺激で誘導される遺伝子群 (TNF $\alpha$ 、IL-6、IkB $\alpha$ 、A20 等) は 1 度のパルス刺激でも誘導されることが明らかとなった。しかし、長時間刺激によって始めて誘導される遺伝子群 (RANTES、CCL2、TRAIL 等) は、200 分間隔刺激では誘導されない。長時間刺激によって誘導される遺伝子群は、持続的な刺激と同じ挙動を示す 60 分または 100 分間隔での刺激のみ誘導されることが明らかとなった。また、Tay 博士らは、TNF $\alpha$  の濃度を変えて振動の周期を制御することに成功した (9)。1 ng/ml ~ 0.01 ng/ml の濃度の刺激では、振動する細胞はほぼ存在しないが、短時間に誘導される遺伝子群が誘導される。しかし、10 ng/ml 以上の高濃度の刺激では、ほぼ全ての細胞が振動を引き起こし、長時間刺激によって誘導される遺伝子群が誘導される。この様に、刺激の強さまたは頻度によって NF- $\kappa$ B の挙動が変化し、誘導される遺伝子を決定していると考えられている。

### 1-3 非古典的 NF- $\kappa$ B 活性化経路の抑制機構について

通常、無刺激状態では NIK タンパク質の発現レベルは非常に低い状態で維持されている。これは、ユビキチン依存的な機構によって恒常的に分解されているためである (10)。この抑制的メカニズムの中心的な役割をしているのは TRAF3 である。TRAF3 は NIK の N 末端領域と結合することで、NIK を恒常的に K48 型のユビキチン化とプロテアソーム分解へと導く。この負の制御メカニズムは、NIK タンパク質の発現レベルを非常に低い状態で維持し、シグナル非依存的な p100 のプロセッシングを抑制している。TRAF3 は K48 結合型ユビキチン鎖形成を触媒する機能を有していないが、TRAF3 は NIK ユビキチンリガーゼの構成分子としての重要な機能があると考えられている。事実、NIK のユビキチン化に TRAF2、TRAF3、cIAP1/2 で構成されるユビキチンリガーゼ複合体が関与することが報告されている (11-13)。この NIK ユビキチンリガーゼ複合体は、TRAF3 ではなく TRAF2 が cIAP1/2 と直接結合している。TRAF2 と二量体化を介して cIAP1/2 と結合した TRAF3 は、NIK にこのマルチサブユニット E3 複合体をリクルートするためのアダプター分子として機能している (図 3)。この様に NIK の機能を負に制御するためには、TRAF3-TRAF2-cIAP1/2 全ての分子が必要と考えられている。

古典的経路とは異なり、非古典的経路は、持続的な活性化が特徴である。非古典的経路の活性化において、ユビキチンリガーゼ複合体の断続的な分解が起きていると考えられているが、NIK の蓄積は早い段階で停止し、一定のレベルで維持される (10, 14)。これは、NIK によって活性化された IKK $\alpha$  が NIK をリン酸化し、分解へと導く負のフィードバックメカニズムが存在するためである (14)。IKK $\alpha$  欠損細胞では抗リンホトキシン $\beta$ レセプター (LT $\beta$ R) 抗体刺激によって、NIK は断続的に蓄積する。このように、非古典的経路の抑制機構は、主に 2 つの制御機構が存在することが知られている。

#### 1-4 リンホトキンβレセプターシグナル伝達経路について

生理学的条件下において、リンホトキシン (LT) はT細胞、B細胞、NKT細胞等に発現している (15)。LTαの発現はB細胞で誘導されるが、一方でLTβの発現は恒常的である (16, 17)。LTβは2型膜貫通型のタンパク質としてLTαとヘテロ3量体を形成し、細胞膜に存在する (LTα1β2, LTα2β1; (16, 18))。LTαβヘテロ3量体は、末端細胞においてMMP (matrix metalloprotease) によって細胞膜上から切り離される (19)。LTβとは対照的に、LTαは可溶性LTα3ホモ3量体として分泌される。LTαとTNFホモ3量体は、TNFR1とTNFR2に結合し、下流のシグナルを走らせる。LTα1β2はLTβRと結合し、一方でLTα2β1はTNFR1とTNFR2に結合することが報告されている。しかし、LTα2β1の発現しているT細胞が全体の2%以下であり、生物学的な役割が明らかとなっていない (20)。LIGHT (TNFSF14) はLTβRのもう一つのリガンドであるが、herpesvirus entry mediator (HVEM) とも結合する (21)。LTβRはTNFR superfamilyに属する受容体であり、主にリンパ器官の間質細胞、上皮細胞に発現しており、末梢リンパ組織の発達と維持に重要である (22)。NIK 遺伝子に変異がある *aly* マウスでは、パイエル板とリンパ節の欠損が認められる (23)。NIKの活性化におけるLTβRの関与は、LTβR過剰発現系実験で、NIKを介したp100のプロセッシングが強く誘導されたことに基づいている (24)。さらに、抗LTβR抗体刺激をMEFに加えると、NIK、IKKα依存的なp100のプロセッシングが誘導されることが示されている (25)。LTβRの細胞質領域は、TRAFと結合するモチーフを含んでいるため、TRAF2、3、5と結合し、古典的経路と非古典的経路の両方を活性化することが明らかとなっている (22, 26)。興味深いことに、LTβRを介したRelA/p50の活性化は、NIK/IKKαに依存している。大部分のRelA/p50 IκBαと結合しているが、一部はp100と結合しており、この少量のRelA/p50がLTβRの下流で働くと考えられている。NF-κBの非古典的経路は、CCL19、CXCL13、CCL21、CXCL12等の様々なケモカインの発現を誘導し、リンパ器官の形成、リンパ球の末梢リンパ組織への遊走に関与している (25)。

#### 1-5 本研究の目的

非古典的経路の生物学的な重要性は明らかとなっているにもかかわらず、詳細な解析は古典的経路に比べて遅れている。そこで、本研究は、RelBを可視化することで、非古典的経路の挙動と標的遺伝子の発現制御メカニズムを詳細に解明することを目的として研究を遂行した。

## 第二章 材料と実験方法

### 2-1 マウス

*Relb<sup>Venus/Venus</sup>* マウスは、フェニックスバイオに委託し、3-1-2 で述べた手順で作製した。*Relb<sup>+</sup>* マウスは Jackson Laboratory から購入した。すべてのマウスは特定病原微生物の非存在下で飼育し、マウスを用いた動物実験は、東京大学医科学研究所動物実験委員会による動物実験規定を遵守して遂行した。

### 2-2 PCR

*Relb<sup>Venus/Venus</sup>* マウスの遺伝子型の決定は、マウスの尾に Lysis Buffer [50 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 5 mM Tris, 0.45% NP40, 0.45% Tween20, 20 µg/ml ProK] を加え、55°C で 60 分インキュベートした後に、95°C で 15 分間インキュベートし、ProK を失活させた。この溶液の上清をテンプレートとして PCR 法を行った。PCR 産物を 2% アガロースゲル電気泳動し、目的産物の確認を行った。

primer	Sequence (5'→3')
Primer set 1 Forward	AAGCCACGTAGCCTCTGAGG
Primer set 1 Reverse	GAGCCATCAGGCCAACCTCTC
Primer set 2 Forward	CGAGAAGCGCGATCACATGG
Primer set 2 Reverse	GAGCCATCAGGCCAACCTCTC
Primer set 3 Forward	CTGAGACCGGCTCTTAGTTCA
Primer set 3 Reverse	GGCTGGCCTCAAATATGCTA

### 2-3 細胞培養

マウス胎児線維芽細胞 Murine Embryonic Fibroblast (MEF) 細胞は、10% ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum; FBS)、0.1% L-グルタミン (和光純薬工業)、50 unit/ml ペニシリン G カリウム (明治製菓)、50 unit/ml 硫酸ストレプトマイシン (明治製菓) を含む Dalbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養を行った。

### 2-4 発現用 plasmid の構築

pMXs-IRES-HygR レトロウイルスベクターは pMXs-IRES-BsdR (東京大学 北村俊雄博士より提供) から BsdR を NcoI/SaI で切り出し、PCR で増幅した HygR をサブクローニングして構築した。

mCherry-Nuc の発現ベクターは、PCR 法を用いて構築した。早稲田大学 仙波 憲太郎博士より提供していただいた pTRE-Tight-mCherry から mCherry がコードされた領域を増幅し、pMXs-puro-EYFP-Nuc から Nuc がコードされた領域を Xho1 と EcoR1 で切り出し、pMXs-puro ベクターにサブクローニングすることで構築した。TagBFP (515-62141, Evrogen) 発現ベクターは、PCR で TagBFP 配列を増幅した後に、pMXs-IRES-Hyg に Nuc と同時にサブクローニングした。

p100 の発現ベクターは、マウスの cDNA プールから PCR 法を用いて p100 を増幅し、pMXs-puro にサブクローニングした。siRNA 耐性は、Inverse PCR 法で *Nfkb2* stealth-1 の配列に対してアミノ酸配列が変わらないように変異を導入した。核移行シグナル (NLS)、核外移行シグナル (NES) 変異体は Inverse PCR 法で変異を導入した。また、全ての p100 変異体は N 末端に Myc、C 末端領域に HA タグを Inverse PCR 法で付加した。

SV40 LargeT antigen 発現ベクターは山口 憲孝博士から提供していただいた。

3×κB-HSV-tk-Eluc-PEST 発現ベクターは、まず pELuc-PEST (TOYOBO) に NF-κB 結合配列を 3 つ並列に並べたオリゴ DNA をサブクローニングした。その下流に 3×κB-HSVtk-Luc (ウィスコンシン大学 宮本博士より提供) から PCR で増幅した HSV-tk の配列を挿入した。作製した配列を Xho1 と BamH1 で切り出し、pSuper.retro.puro (東京大学 秋山 徹博士から提供) にサブクローニングした。

3×κB-HSV-tk-mCherry-PEST 発現ベクターは、上記の pSuper.retro.puro にサブクローニングした配列から Eluc を EcoR1 と Hind3 で切り出し、PCR で増幅した mCherry を挿入して構築した。

primer	Sequence (5'→3')
HygR Forward	GACCATGGCCAAGAAGCCCGAACTCACCGCT
HygR Reverse	CATGTCGACTTAAACTCGACCTACCTCCT
mCherry Forward	GCGGATCCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGAT
mCherry Reverse	CCGGCTCGAGGCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
TagBFP Forward	GAGGATCCGCCACCATGAGCGAGCTGAT
TagBFP Reverse	AACTCGGAGTATTAAGCTTGTGCCCCAGTT
p100 Forward	GATCGCGGCCGCGCCACCATGGACAATTGCTACGATCCA
p100 Reverse	GCGCTCGAGTGGGCCTCCTCCTTATTCT
p100 siRNA mut Forward	CGCGCAGTTCAATCTGGGTGTCCTGCATGTA
p100 siRNA mut Reverse	GTCATATCTTTAGGTCCTACAGACACAGCGCACAC
Myc p100 Forward	TCAGAAGAGGATCTGGACAATTGCTACGATCCAGGC
Myc p100 Reverse	GATGAGTTTTTGTTCATGGTGGCGCGGCCGCGATC
p100 HA Forward	CCAGATTACGCTTGAATGGCCCCGGTCAACTTCCAC
p100 HA Reverse	AACATCGTATGGGTAGTGCACCTGAGGCTGGGGGTG

p100 NLS mut Forward	GCGGCTGCCTTGCCACCTTCTCCCAGCCC
p100 NLS mut Reverse	GGCTGCCCTCTGCACTTCCTCCTTGTCTTCCAC
p100 NES mut Forward	TCTGACATGGGTGCTCATGAGGGAGTCAGGCTGCTGAAA
p100 NES mut Reverse	CGCGGCCTCGGCTGCACCCACCAAGTCCCCACCAGCCAG
RelA Forward	TTCTAGAGACGATCTGTTTCCCCTCAT
RelA Reverse	AACTCGAGTTAGGAGCTGATCTGACTCAAAA
mRFP1 Forward	TTGAATTCGCCACCATGGCCTCCTCCGAGGACGTCAT
mRFP1 Reverse	AATCTAGAGGCGCCGGTGGAGTGGCGGC
HSVtk Forward	TTTCAATTGCCCCGCCAGCGTCTTGTC
HSVtk Reverse	TTTCAATTGGCGGCACGCTGTTGACGCTG
mCherry Forward-2	TGAATTCGCCACCATGGTGAGCAAGGG
mCherry Reverse-2	TTTAAGCTTCTTGACAGCTCGTCCATGC
NF-kB binding motif Fwd	TCGAGGGGGATTTCCTTTGGGGATTTCCTTTGGGGATTTCG
NF-kB binding motif Rev	AATTCGGAAATCCCCAAAGGAAATCCCCAAAGGAAATCCCC

## 2-5 レトロウイルスを用いた遺伝子導入

*Relb<sup>Venus/Venus</sup>* マウスから採取した MEF への遺伝子導入は、レトロウイルスベクターを用いて行った。パッケージング細胞である Plat-E 細胞 ( $1.35 \times 10^6$  cells) にリン酸カルシウム法で目的のレトロウイルスベクターを導入し 48 時間培養後の培養上清をウイルス上清として回収した。0.45  $\mu$ m 径のフィルターで濾過後、10% FBS、5  $\mu$ g/ml ポリブレン (SIGMA) を加えた液で MEF を 4 時間培養した。上清を捨てた後、ウイルス上清を加えさらに 24 時間培養した。翌日、培地交換しさらに 24 時間培養後、薬剤耐性選択を行い、目的の遺伝子が導入された細胞を作製した。

## 2-6 MEF のクローン化

*Relb<sup>Venus/Venus</sup>* マウスから採取した初代培養 MEF にレトロウイルスベクターを用いて SV40 LargeT 抗原を導入し、細胞をトランスフォームさせた。トランスフォームした MEF を 96 ウェルディッシュに 0.5 cells/ウェルずつ播種し、シングルクローン化細胞を 21 種得た。実験にはこの中の一つの細胞を使用した。

## 2-7 細胞への small interfering RNA (siRNA) の導入

各種 siRNA はインビトロジェン社から購入した。siRNA の各配列を以下に示した。

*Nfkb1* stealth-1; 5'-GAG AAU GGA CAG AAC AGC AGG AUG U-3'

*Nfkb1* stealth-2; 5'-GAG CAG GAC AUG GGA UUU CAG GAU A-3'



*Nfkb2* stealth-1; 5'-CCA AGG ACA UGA CUG CUC AAU UUA A-3'  
*Nfkb2* stealth-2; 5'-UUA AAU UGA GCA GUC AUG UCC UUG G-3'  
*Nfkb1a* stealth-1; 5'-GAC CUG GUU UCG CUCUUGUUGAAA U-3'  
*Nfkb1a* stealth-3; 5'-CAC GUG UCU GCA CCU AGC CUC UAC U-3'  
*Nfkb1b* stealth-1; 5'-GCA CUU GGC UGU GAU UCA UCA GCA U-3'  
*Nfkb1b* stealth-2; 5'-GGG AGG CAU CUA CAG UAG AGA AGU U-3'  
*Rela* stealth-1; 5'-GCA GUA UCC AUA GCU UCC AGA ACC U-3'  
*Rela* stealth-2; 5'-GCA GAA AGA AGA CAU UGA GGU GUA U-3'  
*Relb* stealth-2; 5'-UCU GAG CCU GUC UAC GAC AAG AAG U-3'  
*Relb* stealth-3; 5'-CCC UAC AAU GCU GGC UCC CUG AAG A-3'

ネガティブコントロールとして medium GC% negative control Stealth siRNA #2 (Invitrogen) を用いた。siRNA の導入は、Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いて行った。

## 2-8 ウェスタンブロッティング

タンパク質試料を SDS-PAGE により分離した後、タンパク質をゲルから PVDF 膜 (MILLIPORE) に転写した。転写後、PVDF 膜を 5% スキムミルクを含む TBS バッファーに浸し、室温で 1 時間ブロッキングを行った。その後目的のタンパク質に対する一時抗体と反応させた。0.1% Tween20 を含む TBS バッファーを用いて、一次抗体反応終了後の PVDF 膜を洗浄した。その後、一次抗体に対応する 2 次抗体を室温で 1 時間反応させた。洗浄後、化学発光剤を 1 分間反応させて、Chemidoc (BioRad) で撮影した。ウェスタンブロッティングに用いた抗体、詳しい反応条件は以下に示した。

抗体名	購入元	希釈倍率	反応時間
抗 Flag 抗体	SIGMA F3165	1/2000	16 時間
抗 Myc 抗体	Santa Cruz sc-789	1/1000	16 時間
抗 HA 抗体	Santa Cruz sc-805	1/1000	16 時間
抗 RelB 抗体	Cell Signaling #4922	1/2000	16 時間
抗 p100/p52 抗体	Cell Signaling #4882	1/1000	16 時間
抗 p105/p50 抗体	Cell Signaling #13586	1/2000	16 時間
抗 I $\kappa$ B $\alpha$ 抗体	Cell Signaling #9242	1/2000	16 時間
抗 I $\kappa$ B $\beta$ 抗体	Cell Signaling #9248	1/1000	16 時間
抗 RelA 抗体	Cell Signaling #4764	1/2000	16 時間
抗 Tubulin 抗体	Calbiochem #CP06	1/3000	1 時間
抗 PARP1 抗体	Santa Cruz sc-25780	1/1000	16 時間
抗 mouse IgG 抗体	GE Healthcare NA931V	1/2000	1 時間
抗 Rabbit IgG 抗体	GE Healthcare NA934V	1/2000	1 時間

## 2-9 細胞分画

MEF を 6 ウェルプレートに  $4.0 \times 10^5$  個ずつ播種し 24 時間培養した。0.3  $\mu\text{g/ml}$  抗 LT $\beta$ R 抗体 (4H8 WH2 ; Adipogen #AG-20B-0008-C100 及び、3C8 ; eBioscience #16-5671-82 を 4H8 : 3C8 = 10 : 1 で混合して使用) または 10 ng/ml TNF $\alpha$  (PEPROTECH #315-01) 刺激後に細胞を回収し、PBS を用いて洗浄した。遠心後、hypotonic Buffer [10 mM HEPES (pH7.9), 1.5 mM DTT, 25% glycerol, protease inhibitor cocktail] を用いて細胞を懸濁し、20 分間氷上でインキュベートした。終濃度 0.5% で NP40 を加え、ボルテックスした後に 2000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離をし、上清を細胞質画分とした。上清に 2×Sample Buffer [20 mM Tris-HCl (pH6.8), 10% SDS, 30% glycerol, 15% 2-mercaptoethanol, 0.002% bromophenol blue] を添加してウエスタンブロッティングの試料とした。沈殿物を hypotonic Buffer を用いて 1 回洗浄し、1×Sample Buffer を添加してウエスタンブロッティングの核画分試料とした。

## 2-10 免疫組織染色

マウスから各臓器を摘出し、PBS で洗浄後、ティッシュ・テッククリオモルド 2 号または 3 号 (SAKURA) に臓器を入れ、O.C.T. Compound (SAKURA) で包埋し、アルミホイルを敷いた液体窒素上で凍結した。クリオスタットで凍結組織切片を作製後、4 % paraformaldehyde (PFA) を切片上に添加し、室温で 15 分間固定した。PBS で 3 回洗浄後、10 % ヤギ血清 (Invitrogen) を添加し、20 分間室温でブロッッキングを行った。その後、目的のタンパク質に対応する一次抗体と 4°C で反応させた。PBS で 3 回洗浄後、一次抗体に対応する 2 次抗体を遮光、室温で 40 分間反応させた。PBS で 3 回洗浄後、包埋バッファー (80% Glycerol、20% Milli-Q、1% N-propyl-Gallate) で包埋し、共焦点顕微鏡で蛍光観察した。

抗体名	購入元	希釈倍率	反応時間
抗 RelB 抗体	Cell Signaling #4922	1/100	16 時間
Alexa647 抗 rabbit IgG 抗体	Invitrogen A21244	1/100	40 分
Alexa546 抗 rabbit IgG 抗体	Invitrogen A11035	1/100	40 分
抗 keratin-5 抗体		1/300	1 時間

## 2-11 蛍光顕微鏡観察

共焦点顕微鏡観察は、35 mm ガラスボトムディッシュ 4 分画 (グライナー ジャパン) に MEF を  $0.5 \times 10^5$  cells / chamber ずつまき、37°C、5% CO $_2$  条件下で培養しつつ行った。撮影を行う前に予め CO $_2$  チャンバー内にガラスボトムディッシュを設置し、CO $_2$  チャンバーと細胞を 2 時間以上暖めた。FV-1000D IX81 (Olympus)、倍率 20 倍で撮

影した。Venus の撮影には 515 nm 波長のマルチアルゴンレーザーを使用した。mCherry には 559 nm 波長の半導体レーザーを使用した。ダイクロイックミラーは、458 / 515 / 559 nm 波長を反射するものを使用した。Venus の蛍光の検出には、560 nm 以下の波長を反射する発光ダイクロイックミラーを使用し、535 – 565 nm のバンドパスフィルターで検出した。mCherry の検出には、560 nm 以上の波長をすべて反射する発光ダイクロイックミラーを使用し、575 – 675 nm のバンドパスフィルターで検出した。画像取得は、FV10-ASW (Olympus) で行った。Venus は、レーザーパワー8%、オフセット 0%、ゲイン×3、HV 600 の条件で撮影した。mCherry は、レーザーパワー3%、オフセット 0%、ゲイン×1、HV 600 の条件で撮影した。RelB の振動の観察はタイムラプス機能を使用し、撮影間隔 10~13 分間、撮影時間約 15 時間の条件で行った。

## 2-12 画像解析

RelB-Venus の蛍光強度は、NIS-Elements Advanced Research (Nikon) で解析した。MEF に発現させた mCherry-Nuc を核領域として認識させ、トラッキング機能で細胞を追跡し、Time-Measurement 機能で核内の蛍光強度を測定した。細胞質領域は手動で解析した。MEF の細胞周期が約 20 時間であるため、撮影開始から 10 時間以上細胞分裂しなかった細胞について核内の蛍光強度を測定した。また、この期間の細胞内 RelB の総量は Western blotting と蛍光解析からほぼ変化しないことがわかった。そこで、 $t=0$  における細胞の RelB 量を測定し、この値 RelB の総量とした。縦軸に核内 RelB と総 RelB の割合 (Nuclear / total ratio)、横軸に時間 (hr) をとり、経時的な核内 RelB の割合をグラフ化した。mCherry レポーター解析については、核内平均輝度値を手動で解析した。曲線下面積については、撮影時間毎の核内平均輝度値  $\times 10$  (min) / 60 (min) の総和で近似値を求めた。

## 2-13 振動の周期の解析

Sung 博士らの解析方法を参考にした(27)。画像解析によって得られた核内平均輝度値に (平均輝度値-最小値)/(最大値-最小値) の操作をすることで、最小値を 0 に最大値を 1 にした。得られた値にハミング窓関数  $w(x) = 0.54 - 0.46\cos 2\pi x$  ( $0 < x < 1$ ) を掛け合わせた。ハミング窓関数は位相をずらし、 $x=0$  の時  $w=1$  の値を取るようにした関数を使用した。このデータを高速フーリエ変換した。フーリエ変換の結果は、虚数で表わされるため絶対値に直した値を振幅の大きさとして用いた。縦軸に振幅、横軸に周波数 (mHz)を示しヒストグラムで表した。振動の周期は、核内平均輝度値の推移から 5 時間以下であるため、5 時間以上の周波数は考慮しなかった。2-10 で作製したグラフの周期と一致する最も大きな振幅の周波数を振動の周期と定めた。決定した周期は逆フーリエ変換によって、元のグラフが再現されることを確認した。FFT はデータ数が 2 の階乗でなければならないため、128 個のデータを使用した。10 分毎に 128 回撮影をすると約 21 時間となり、ほぼ全ての細胞が分裂する。そのため、データの足りな

い細胞に関しては分裂する直前の値が無限に続くと仮定してデータの不足を補った。

#### 2-14 LeptomycinB、Cycloheximide 処理

MEF に 0.3  $\mu\text{g/ml}$  抗 LT $\beta$ R 抗体刺激を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、CO $_2$  チャンバーで培養の下 4 時間タイムラプスで RelB の挙動を撮影した。その後、速やかに 1 ng/ml LeptomycinB (Sigma) または 2.5  $\mu\text{g/ml}$  Cycloheximide (nacalai tesque) を処理し、15 分間チャンバー内の温度を安定させた後に、再びタイムラプスで撮影した。4 時間の抗 LT $\beta$ R 抗体刺激で RelB が核移行した細胞について核内平均輝度値を測定した。

#### 2-15 ルシフェラーゼアッセイ

HEK293 細胞に野生型 RelB、p52、RelB-Venus、NF- $\kappa$ B ルシフェラーゼレポーター、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現ベクターを導入した。48 時間後、細胞を PBS で洗浄して回収した後、Luciferase Assay System (東洋インキ) を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。内部コントロールとして $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性の値を用いて補正を行った。

#### 2-16 倫理面への配慮と法令遵守等への対応

本研究における組み換え DNA 実験は、平成 16 年度文部科学省・環境省令第一号「研究開発に関わる遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」を遵守して遂行し、東京大学医科学研究所の遺伝子組換え生物等安全委員会より機関承認を得て遂行した。

## 第三章 結果

### 3-1-1 RelB-Venus の構築

RelB は N 末端領域に転写活性化に關与するロイシンジッパー (LZ) と DNA 結合と二量体形成に關与する Rel Homology Domain (RHD) が存在する (図 4-A)。そのため、N 末端領域に蛍光タンパク質を結合すると、これらの機能が阻害されることが予想された。そこで、C 末端領域に黄色蛍光タンパク質 EYFP の変異体である Venus を結合することにした (図 4-A)。NF- $\kappa$ B ルシフェラーゼレポーターと RelB、RelB-Venus、p52 発現ベクターを HEK293 細胞に導入し、RelB-Venus の転写活性をルシフェラーゼアッセイで測定した (図 4-B)。RelB-Venus は野生型の RelB と比べやや活性は弱いものの、転写活性に問題は無いことが確認された。

### 3-1-2 *Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスの作製

より生理的条件下に近い状態の RelB の挙動を觀察するために、内在性のプロモーター制御下で発現するノックインマウスを作製することを試みた (図 5-A)。Red/ET 相同組換テクノロジー (28) を用いて、大腸菌内で RelB-Venus が挿入されたノックインターゲットベクターを作製した。ポジティブセレクション用に Neomycin 耐性遺伝子 (*PGK-Neo*)、ネガティブセレクション用にジフテリアトキシン遺伝子 (*DT-A*) を用いた。相同組み換えが起こった ES 細胞をサザンブロッティングで確認した (図 5-B)。遺伝子ターゲティングにより *Relb* が *Relb-Venus* に置換された ES 細胞株を樹立した。その ES 細胞株をマウス初期胚に注入してキメラマウスを作出し、さらにキメラマウスと野生型マウスを交配させて産子を得た。注入した ES 細胞株から分化した精子に由来する *Relb*<sup>Targeted/+</sup>マウス を PCR 法で判定した (図 5-A, 図 6-A)。しかし、*Relb*<sup>Targeted/+</sup>マウスは RelB-Venus を発現していないことが明らかとなった。最終エクソンの上流に存在する loxP 配列で挟まれた *PGK-Neo* カセットが RelB-Venus の発現を阻害していることが考えられたため、CAG-Cre マウスと掛け合わせた。これまでに、雌の CAG-Cre マウスと交配させることで、Cre を発現していないマウスでも loxP に挟まれた配列が除去されることが報告されている (29)。そこで、雌の CAG-Cre マウスと交配させて、*Relb*<sup>Venus/+</sup>マウスを得た。loxP 配列の外側に遺伝子型を決定するためのプライマーを設計し、PCR 法で遺伝子型を決定した。*Relb*<sup>Venus/+</sup>マウス同士を交配させ *Relb-Venus* 遺伝子をホモ接合体で持つ *Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスを得た (図 5-A, 図 6-B)。野生型と *Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスから肝臓、腎臓、パイエル板、腸間膜リンパ節、脾臓、胸腺を摘出し、ウエスタンブロッティング法で RelB-Venus の発現を確認した (図 6-C)。*Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスは野生型マウスと比較して、ほぼ同じ量の RelB-Venus を発現していた。

### 3-1-3 *Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスの表現型の解析

作製した *Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスはメンデルの法則に従って誕生し、見かけ上は正常に生育する (図 7)。*Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスの各臓器の重量は野生型と比較して差は見られず、臓器の欠損も見られなかった (図 8)。また、*Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスの雄、雌共に生殖能力の異常は見られなかった。

*Relb* 遺伝子欠損マウスでは、胸腺髄質領域の構築異常、脾臓の白脾髄構築異常、脾腫、胸腺萎縮、リンパ節欠損、体重減少等の表現型が観察される (30, 31)。そこで、*Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスの表現型と *Relb* 遺伝子欠損マウスの表現型を比べることで *RelB*-Venus が野生型の *RelB* と同等の機能を有しているのか検討した。野生型、*Relb*<sup>Venus/Venus</sup>、*Relb* 遺伝子欠損マウスから胸腺、脾臓、肝臓、腎臓を摘出し各臓器の重量を比較したが、*Relb* 遺伝子欠損マウスで見られる胸腺萎縮、脾腫は見られなかった (図 8、図 9-A)。

さらに、胸腺、脾臓から切片を作成し、H&E (Hematoxylin & Eosin) 染色して解析した (図 9-B)。胸腺は皮質 (Cortex) と髄質 (Medulla) で構成されており、T 細胞の分化や自己免疫寛容が成立するのに必須な臓器である。*Relb* 遺伝子欠損マウスにおいては皮質と髄質の境界が不明瞭で、構造上の異常が見られる。しかし、野生型、*Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスともに皮質と髄質は明瞭に分かれており、異常は認められなかった (図 9-B 左図)。

脾臓はリンパ球が集合している白脾髄 (White pulp) と、古くなった赤血球が破壊される赤脾髄 (Red pulp) で構築されている。野生型、*Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスともに白脾髄と赤脾髄は明瞭に分かれており、異常は認められなかった (図 9-B 右図)。以上の結果から、*RelB*-Venus は、野生型の *RelB* と同等の機能を有することが示唆された。

上記の実験に続いて、より詳細な *RelB*-Venus の解析を行った。*RelB* は、古典的経路の標的遺伝子であり TNF $\alpha$ 等の刺激で誘導される。また、*RelB* は TNF $\alpha$ 、IL-1 等の刺激では核移行しないことが知られている。そこで、*RelB*-Venus が TNF $\alpha$ 刺激依存的に核移行するかどうか検討した。野生型、*Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスから胎児線維芽細胞 (MEF) を採取した。それぞれの MEF に TNF $\alpha$ を処理し、ウエスタンブロッティング法にて *RelB*-Venus の核移行を確認した。*RelA* は、TNF $\alpha$ 刺激後約 15 分で核移行が確認されたが、核内 *RelB* 量の増加は見られなかった (図 10-A)。NF- $\kappa$ B の非古典的経路は、LT $\beta$ R、RANK、Fn14、CD40 を介して活性化される (2)。野生型、*Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスから MEF を採取し、抗 LT $\beta$ R 抗体を処理しウエスタンブロッティング法にて p100 プロセシングの誘導と *RelB* の核移行を確認した (図 10-B)。抗 LT $\beta$ R 抗体刺激によって p100 は p52 にプロセシングされ、野生型 *RelB* と同様の速度で *RelB*-Venus の核移行が認められた。また、*RelA* の核移行は認められなかった。これらの結果をまとめると、TNF $\alpha$ 、抗 LT $\beta$ R 抗体刺激時の NF- $\kappa$ B 分子の動態は、野生型と比較して差が見られなかった。

### 3-2 *Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウス由来の細胞、組織の蛍光観察の検討

共焦点顕微鏡で RelB-Venus の蛍光が観察可能か解析した。RelB は古典的経路によって誘導されるため、TNF $\alpha$ 刺激後 24 時間における RelB-Venus の誘導を共焦点顕微鏡で確認した。TNF $\alpha$ 刺激後の細胞は、TNF $\alpha$ 刺激前と比べ明らかに蛍光強度が増加していた (図 11-A)。続いて共焦点顕微鏡で RelB-Venus の核移行を観察した。抗 LT $\beta$ R 抗体刺激によって RelB-Venus の核移行が明瞭に観察された (図 11-B)。

次に組織レベルでの蛍光観察に応用できるか検討した。RelB は胸腺髄質に発現が高い細胞が存在している (32)。そこで、野生型、*Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスの胸腺から凍結切片を作製し、免疫染色することで検討した。胸腺の髄質上皮細胞は Keratin-5 を発現している (33)。*Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスの胸腺は、抗 Keratin-5 抗体で染まった領域に Venus の蛍光が集まっていることが観察された (図 12-A)。さらに、Venus の蛍光は、抗 RelB 抗体で染まった領域とほぼ一致した (図 12-B)。以上の結果から、*Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスは細胞レベルと組織レベルでの RelB の挙動を解析できることが明らかとなった。

#### 3-3-1 抗 LT $\beta$ R 抗体刺激による RelB の局在の振動

古典的経路では、刺激の頻度、強さによって引き起こされる NF- $\kappa$ B 挙動の違いが異なる標的遺伝子群の発現を決定すると考えられている (9, 34)。このように古典的経路では詳細なメカニズムの解析が行われているが、非古典的経路では解析が遅れている。そこで、*Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスから得られた初代培養 MEF を用いて RelB の挙動をリアルタイムで観察し、新たな制御メカニズムの発見を試みた。MEF に抗 LT $\beta$ R 抗体を処理し、タイムラプスで RelB の挙動を追跡した。共焦点顕微鏡に付属している CO<sub>2</sub> チャンバーで細胞を培養しつつ、10 分間隔で撮影し約 15 時間撮影した。その結果驚くべきことに、RelB が核局在と細胞質局在を繰り返す (Oscillating) 細胞や、一度だけ核移行する (Single event) 細胞が混在していることが明らかとなった (図 13-A)。

#### 3-3-2 核内蛍光量測定法の確立

3-3-1 の結果より、RelB の挙動にいくつかのパターンが存在することが明らかとなった。RelB の挙動を詳細に解析するためには核内の蛍光量を測定する系が必要である (35-37)。Tay 博士らは、核内に H2B-DsRed を安定発現させた細胞で核内の蛍光量を正確に測定する系を確立した (9)。そこで、核内に蛍光タンパク質を安定発現させた細胞の作製を試みた。まず *Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスから得られた初代培養 MEF にレトロウイルスベクターを用いて SV40 LargeT 抗原を導入し、細胞を不死化した。蛍光タンパク質は、Venus の蛍光極大波長が 528 nm であるため、この領域に蛍光が漏れこまな

い 610 nm に蛍光極大波長を持つ mCherry または、457 nm に蛍光波長を持つ TagBFP を使用した。核局在蛍光タンパク質 EYFP-Nuc から核局在シグナル (NLS) を制限酵素で切り出し、mCherry の 3' 末端領域に結合させたレトロウイルスベクターを用いて細胞に安定発現させた (図 14-A)。この細胞をクローン化し実験に用いた。

MEF は細胞周期が約 20 時間であるため、撮影開始から 10 時間以上細胞分裂しなかった細胞について核内の蛍光量を測定した。また、細胞同士が重なった細胞、撮影画面外へ移動した細胞も除いた。

顕微鏡撮影の条件として RelB-Venus の蛍光が退色しているかどうか検討するため、細胞の総蛍光量を経時的に測定した。手動で細胞の輪郭をマークし、ROI (関心領域) とした。ROI 内の蛍光量を NIS-Elements Advanced Research (Nikon) ソフトウェアで解析した (図 14-B)。4 つの細胞全て撮影開始から 15 時間までで、総蛍光量の減衰は確認されなかった。従って、撮影条件は問題ないと判断した。また、総蛍光量についてはほとんど変化が無いことから、初期値 ( $t=0$ ) を測定することで十分であると判定した。これらの条件で正確な RelB の動態を解析できると判断し、今後の実験を行った。

検討した条件で核内蛍光量に対する総蛍光量の割合 (Nuc / total ratio) を縦軸に横軸に時間 (hr) を表示した (図13-A)。その結果、0.3  $\mu\text{g/ml}$  抗LT $\beta$ R抗体を細胞に処理すると撮影画面内の91%の細胞がRelBの核移行を示すことが明らかとなった。核移行した細胞群は、振動する細胞群 (Oscillating) が全体の34%、核移行したRelBが維持される細胞群 (Nuclear retention) が45%、1回核移行する細胞群 (Single event) が12%存在することが明らかとなった (図13-A)。また、抗LT $\beta$ R抗体の濃度を0.003  $\mu\text{g/ml}$  ~ 3  $\mu\text{g/ml}$  まで振ったところ、0.3  $\mu\text{g/ml}$  が最もRelBが振動する細胞の割合が高く、3  $\mu\text{g/ml}$  では逆にRelBが振動する細胞の割合が減ってしまった (図13-B)。この結果は、他のクローン株でも同様の傾向であった (図13-B)。従って、以降は0.3  $\mu\text{g/ml}$ の濃度で抗LT $\beta$ R抗体刺激することに決定した。

### 3-3-3 RANKL、CD40L、TWEAK 刺激による RelB の振動

LT $\beta$ R 経路以外の非古典的経路を活性化させる刺激で RelB が振動するのか解析した。*Relb<sup>Venus/Venus</sup>* MEF に TWEAK 刺激を加え、タイムラプスで細胞を観察した。結果として、TWEAK 刺激でも RelB が振動した (図 15-B)。一般的に用いられる 100 ng/ml 濃度の TWEAK 刺激では RelB が非常に強く核移行するが、振動はほとんど見られない。しかし、低濃度 (10 ng/ml 以下) においては 30%~40%の細胞で振動が観察された。

次に、*Relb<sup>Venus/Venus</sup>* マウスから骨髄細胞を採取し、3 日間 M-CSF 含有培地で培養した後、GST-RANKL、250 ng/ml CD40L 刺激を加え、細胞をタイムラプスで観察した。RANKL、CD40L 刺激ともに RelB の振動が観察された (図 15-A)。

### 3-3-4 RelB の振動の周期の解析系の確立



振動の周期にはいくつかのパターンがあることが明らかとなったため、振動の周期を数学的に決定し、周期がどのような分布を示すのか解析した。これまでにSung博士らは、NF- $\kappa$ Bの振動の周期をフーリエ変換で決定する解析方法を確立している (27)。周期的な波動をさまざまな (基本周波数の整数倍の) 周波数の正弦波の重ね合わせとして表す方法はフーリエ級数またはフーリエ級数展開と呼ばれ、信号処理におけるもっとも基礎的な手法の一つである。また、単一のパルス波や人の声による不規則な音波といった周期的でない波形も、連続的に変化する異なった周波数の波を重ね合わせて表すことができる。このような一般的で複雑な波を様々な周波数の正弦波に分解して解析する手法はフーリエ変換と呼ばれている (Wikipediaより抜粋)。また、脳波の信号解析にもフーリエ変換が用いられており、工学分野だけではなく、分子生物学の分野でも幅広くフーリエ変換は用いられている解析方法である。例えば、 $\gamma$ -irradiationによってp53は振動することが知られており、周期解析にフーリエ変換が用いられている (38-40)。全ての解析は、エクセルの解析ツールの高速フーリエ変換 (FFT) で行った。撮影開始後15時間以降のデータは、細胞分裂やサイトカイン産生等の影響によって生物学的なノイズが混じっていると考えられる。そこで、フーリエ変換でこの区間の影響を少なくするためにハミング窓関数  $w(x)=0.54-0.46\cos 2\pi x, 0<x<1$  をデータに掛け合わせた。窓関数とは、ある有限区間以外で0となる関数である。ある関数や信号 (データ) に窓関数が掛け合わせられると、区間外は0になり、有限区間内だけが残るので、数値解析が容易になる (Wikipediaより抜粋)。ハミング窓関数は、周波数分解性能が良く、最もよく使われる窓関数の一つである。RelBの振動は刺激後約2~10時間で観察されるため、この区間の振幅が減弱しないように位相をシフトさせて $t=0$ で $w=1$ の値をとるハミング窓関数を乗じた。このデータをフーリエ変換した。フーリエ変換の結果は、縦軸に振幅、横軸に周波数 (mHz) を示し、5時間以下の最も振幅の大きい周波数を振動の主な周期と決定した (図16)。さらに、決定した周波数が振動の周期を示すものであるのかどうか確認するために、その周波数を中心とする周波数の山以外を除いて逆フーリエ変換した。図16では、91.4分を中心とした周波数以外を除くと、ほぼ同じ振動の周期が再現される。従って、この細胞の振動の周期は91.4分であることが分かる。この一連の作業を振動した細胞全てに行った。細胞の中には、複雑な周期を持つため、周期の同定が困難な細胞が存在したが、これらの細胞は解析から除いた。最終的に96個の細胞の振動の周期を決定し、周期の分布を示した (図17)。RelBの振動を示す細胞は、83%の細胞が1.0~2.5時間の周期を持つことが明らかとなった。

#### 3-4-1 転写活性のリアルタイム解析方法の確立

私はRelBの振動が転写活性をどのように制御しているのか解析することを試みた。2014年にMyong-Hee Sung博士らがRAW264.7細胞でTNF $\alpha$ プロモーター依存的にmCherryが発現誘導し、RelAの局在とNF- $\kappa$ B転写活性を同時に解析できる系を確立した (41)。私はこの実験系を用いてRelBとNF- $\kappa$ B転写活性を同時に解析することにした。

NF- $\kappa$ B結合配列+HSV-tkプロモーターの下流でmCherryが発現誘導されるレトロウイルスベクターを構築した (図18-A)。NF- $\kappa$ B結合配列はRelB/p52が結合しやすいと報告されているGGGGATTTCを3つタンデムに並べた配列を用いた (42)。さらに、NF- $\kappa$ B転写活性の変化を解析しやすくするために、mCherryのC末端にPEST配列を連結させた。これによりmCherryは細胞内において速やかに分解されることを期待した (図18-A 左図)。このウイルスベクターをRelB-Venus MEFsに導入し、クローン化した細胞を実験に用いた。まず、作製したレポーター細胞がNF- $\kappa$ Bに反応してmCherryを発現誘導するか確認した。抗LT $\beta$ R抗体刺激によってRelBが振動し、mCherryが誘導された (図18-A 右図)。用いたNF- $\kappa$ B 結合配列はRelA/p50とも強く結合するため、TNF $\alpha$ 刺激によって非常に強く早くmCherryが発現誘導された。以上の結果から、3 $\times$   $\kappa$ B-HSV-tk-mCherry-PESTレポーター細胞はNF- $\kappa$ Bの活性に応じてmCherryを発現誘導し、mCherryの発現誘導を転写活性として扱うことが出来る細胞であることが証明された。

### 3-4-2 RelBの振動による転写活性の増幅

3-4-1で確立した系を用いて、RelBの振動とNF- $\kappa$ Bの転写活性を解析した。抗LT $\beta$ R抗体でレポーター細胞を刺激し、RelBとmCherryの挙動をタイムラプスで追跡した。細胞をSingel event、Nuclear retention、Oscillatingの3種類にRelBの挙動で分類し、それぞれの細胞でmCherryの蛍光量を測定した。細胞分裂時は非特異的にmCherryの誘導が観察され、また、mCherryの初期値 (t=0) が25より大きい細胞は定常状態でのNF- $\kappa$ B活性が高いと考えられるためこれらの細胞を除いて解析を行った (図18-B 上図)。3種類の細胞のmCherryの曲線下面積を算出して比較を行ったところ、RelBの振動を示す細胞は他の細胞に比べ転写活性が強いことが明らかとなった (図18-B 下図)。

続いて、これまでに観察された転写活性がRelAまたはRelBに依存しているのかどうか確認した。細胞にRelAを標的とした配列の異なる2種のsiRNAを導入し、RelAの発現量をウエスタンブロット法で検出した。RelAの発現量はControl siRNAを導入した細胞と比べて、いずれの配列も約9割の発現抑制効率だった (図19-A)。RelA発現抑制細胞ではRelB、I $\kappa$ B $\alpha$ の発現量が低下しており、抗LT $\beta$ R抗体刺激によるRelBの挙動は観察されなかった。このことから、RelAは定常状態におけるRelB、I $\kappa$ B $\alpha$ の発現量を維持していることが明らかとなった。一方で、RelBを標的としたsiRNAは約8割の発現抑制効率だった (図19-B)。RelB発現抑制細胞では、ほとんどRelB-Venusの蛍光が観察されず、刺激依存的なmCherryの発現誘導も観察されなかった (図19-C)。以上の結果から、LT $\beta$ Rシグナル伝達経路の転写活性はRelBに大部分依存していることが明らかとなった。

### 3-5 Leptomycin B処理によるRelBの振動の抑制

次に、RelBの振動の機構を解明することを試みた。古典的経路の振動では、誘導されたI $\kappa$ B $\alpha$ が核内のRelA/p50ヘテロダイマーと結合し、I $\kappa$ B $\alpha$ のN末端領域のNESにCRM1が結合することによってI $\kappa$ B $\alpha$ /RelA/p50ヘテロダイマーが核外へ移行することが知られている。そこで、CRM1の阻害剤であるLeptomycin B (LMB) を処理することでRelBの振動が抑制されるのかどうか検討した。1 ng/ml LMBをMEFに処理し、RelBの挙動を観察したところ、抗LT $\beta$ R抗体刺激無しの状態でもRelBが核内に蓄積した。この結果から、RelBは無刺激状態でも核移行と核外移行を繰り返している(シャトリング)ことが明らかとなった(図20)。

LMBと抗LT $\beta$ R抗体を同時に処理してしまうと、LMB処理の効果でRelBが核内に蓄積してしまうため、抗LT $\beta$ R抗体刺激依存的にRelBが核移行した細胞の判定が困難になると考えた。そこで、あらかじめ4時間抗LT $\beta$ R抗体刺激をして、その後LMBを処理することにした。4時間の抗LT $\beta$ R抗体刺激でRelBが核移行した細胞についてRelBの挙動を解析した(図21-A)。抗LT $\beta$ R抗体刺激によって、核移行した細胞の内、約65%が振動をしていた(図21-B)。LMB処理によって核内の蛍光量は減衰すること無く維持され、振動する細胞はほぼ存在しなくなった(図19-B)。この結果から、RelBの振動は、RelBがCRM1/NESを介した核外移行を繰り返す現象であることが明らかとなった。

### 3-6 Cycloheximide処理によるRelBの振動の抑制

古典的経路の振動ではI $\kappa$ B $\alpha$ の新規合成が必須であることが明らかとなっている(3, 43, 44)。そこで、真核細胞のリボソームに作用してタンパク質合成を選択的に阻害する物質であるCycloheximide (CHX) を処理して実験を行った。細胞の調子が著しく低下することを避けるために、2.5  $\mu$ g/mlの低用量で実験を行った。定常状態の細胞にCHXを処理しても、RelBが核内に蓄積することはなかった(図22)。このことから、無刺激状態のRelBのシャトリングにはタンパク質合成が関与していないことが明らかとなった。

NF- $\kappa$ Bの非古典的経路では、NIKの恒常的な合成が起こっているため、タンパク質合成が抑制されることで刺激依存的なNIKの蓄積が抑制され、RelBの核移行が抑制されたと考えられる。そこで、LMB処理実験と同様に、あらかじめ抗LT $\beta$ R抗体刺激で4時間処理し、RelBが核移行した状態の細胞にCHXを処理した(図23-A)。抗LT $\beta$ R抗体刺激によって、核移行した細胞の内、約60%が振動をしていた(図23-B)。CHX処理によってRelBの核外移行が抑制され、RelBが核内に留められた(図23-A, B)。以上の結果から、RelBの振動の機構には、タンパク質合成とCRM1/NESを介した経路が関与していることが明らかとなった。

#### 3-7-1 p100発現抑制によるRelBの自律振動

次にRelBの振動はI $\kappa$ B分子が関わっているのか解析した。古典的経路の振動は、刺

激依存的に誘導されたIkB $\alpha$ によってCRM1依存的に核内のRelA/p50ヘテロダイマーが核外へ排出される。p100は抗LT $\beta$ R抗体刺激で活性化された古典的経路または非古典的経路から誘導される (25, 26, 45)。さらに、p100はC末端領域のアンキリンリピート内のアミノ酸配列744番~900番の間にNESが存在することが示唆されてきたが (46)、2012年にLuca Businoらによってアミノ酸配列831番~840番に存在する4つのロイシンと1つのメチオニンがNESの機能を示すことが明らかとなった (45)。このことから、RelBの振動は刺激依存的に誘導されたp100が核内のRelB/p52をCRM1依存的に核外へ排出させることで起こる現象なのではないかと考えた。細胞にp100を標的とした配列の異なる2種のsiRNAを導入し、48時間後にp100の発現量をウエスタンブロット法で検出した。p100の発現量はControl siRNAを導入した細胞と比べて、いずれの配列も約9割の発現抑制効率だった (図24-A)。この時のRelBの局在を共焦点顕微鏡で観察すると、p100 siRNAを導入した細胞では、RelBが核内に局在している細胞が多数観察された。この結果から、無刺激状態においてRelBはp100によって細胞質に留められていることが確認された (図24-B)。

p100発現抑制細胞のRelBの挙動をタイムラプスで追跡すると、驚くべきことに、RelBの自律振動を示した (図25-A)。

次にRelBの自律振動の周期をフーリエ変換によって決定した。RelBの自律振動の周期は、1.0時間~2.5時間周期であり抗LT $\beta$ R抗体刺激依存的なRelBの振動の周期とほぼ同じであった (図25-B)。視野内で自律振動を示した細胞の割合は約70%であった (図25-C)。この結果から、p100発現抑制細胞内ではp100以外のNESを持つ分子がRelBの自律振動に関与していることが示唆された。さらに、このRelBの自律振動はLMB処理、CHX処理によって抑制された (図26)。以上の結果をまとめると、RelBの自律振動は刺激依存的な振動と同様のメカニズムで動いていることが推察される。また、この自律振動はp100以外の分子によってRelBが核外移行していることを示唆している。

### 3-7-2 siRNA耐性p100過剰発現細胞の作製

p100発現抑制細胞で観察されるRelBの自律振動が非特異的な効果でないことを確かめるために、siRNA耐性の野生型p100を発現するレトロウイルスベクターを構築した (図27-A)。このレトロウイルスベクターをRelB-Venus MEFに発現させ (図27-B lane 1, 2)、p100の発現量とsiRNA耐性を確認した (図27-B lane 5, 6)。野生型p100過剰発現細胞は、p100発現を抑制してもRelBが核移行せず、自律振動も見られなかった (図27-C WT unstimulated)。さらに、この細胞は自律振動がマスクされ抗LT $\beta$ R抗体刺激依存的なRelBの振動を示した (図28-A p100 WT lane, 図28-B)。この結果は、RelBは本来無刺激状態で振動する性質があるが、p100と結合することでRelBの振動は抑制され、細胞質に留められていることを示唆している。

次にp100のNLSとNESがRelBの振動に関わっているか、siRNA耐性のp100変異体を作製し細胞に過剰発現することで確認した (図27-A, 図27-B lane 1, 3, 4, 5, 7, 8)。作製

したp100変異体の機能を解析するために、NLS変異体過剰発現細胞にp100 siRNAを導入し内在性のp100を発現抑制した。その後、NLS変異体過剰発現細胞を免疫染色しRelBとp100の局在を解析した。NLS変異体過剰発現細胞は無刺激時、RelB、p100が細胞質に局在していた (図27-C NLS<sup>AA</sup> mutant unstimulated)。これまでの報告でRelB/p52ヘテロダイマーは核移行において、RelBのNLSを必要とすることが明らかとなっている (47)。従って、p100がRelBと結合している場合、RelBのNLSによって核移行することが予想される。この推測と (図27-C NLS<sup>AA</sup> mutant 6hr LMB) の結果は一致し、さらに抗LT $\beta$ R抗体刺激を加えるとRelBの振動を示した (図28-A p100 NLS<sup>AA</sup> lane, 図28-B)。以上の結果をまとめると、RelBの振動にp100のNLSは必要ないことが示唆された。続いて、NES変異体の解析を行った。NLS変異体過剰発現細胞と同様に内在性p100をsiRNAによって発現抑制し、その後免疫染色によって局在を解析した。NES変異体過剰発現細胞は、無刺激状態でRelB、p100が核に局在していた (図27-C NES<sup>AA</sup> mutant unstimulated)。この核局在はLMB処理によってさらに強まった (図27-C NES<sup>AA</sup> mutant 6hr LMB)。これらの結果をまとめると、RelBはp100によって核外へ排出されていることを示唆し、さらにp100以外の分子もRelBの核外輸送に関与していることを示している。その上、p100NES<sup>AA</sup> mutant過剰発現細胞はp52への恒常的なプロセシングが起るため、刺激依存的なRelBの核移行が見られなかった (図28-A p100 NES<sup>AA</sup> lane)。この現象はp100の部分欠損変異体を用いた実験で2003年にGongxian Liaoらによって報告されている (48)。

### 3-8 I $\kappa$ B $\alpha$ 発現抑制によるRelBの振動の抑制

p100をsiRNA導入によって発現抑制すると、RelBが自律振動することが明らかとなった。そこで、次にRelBを核外へ排出している分子を特定することを試みた。RelBはp100以外にもI $\kappa$ B $\alpha$ と結合し、TLR4の下流でRelB-p50-I $\kappa$ B $\alpha$ の複合体を形成し、DCの成熟を制御していることが2012年にAlexander Hoffmannらのグループによって報告された (49)。従って、RelBの振動は、I $\kappa$ B $\alpha$ が関与している可能性が高いと考えた。I $\kappa$ B $\alpha$ を標的としたsiRNAを細胞に導入し発現抑制することで、RelBの振動が抑制されるのかどうか試みた。siRNAは24時間毎に2回導入し、I $\kappa$ B $\alpha$ の発現量をウエスタンブロット法で検出した (図29-A)。p100とI $\kappa$ B $\alpha$ の発現量はControl siRNAを導入した細胞と比べて、どちらも8割の抑制効果だった (図29-A)。

I $\kappa$ B $\alpha$ 発現抑制細胞に0.3  $\mu$ g/ml 抗LT $\beta$ R抗体刺激を加え、RelBの挙動をタイムラプスで追跡した。Control siRNAを導入した細胞と比較して、I $\kappa$ B $\alpha$ 発現抑制細胞では明らかにRelBの振動を示す細胞の割合が少なかった (図29-B)。RelBが核移行した細胞について観察してみると、ほとんどの細胞がSingle eventであった。さらに、p100、I $\kappa$ B $\alpha$ を同時に発現抑制するとRelBの自律振動は抑制され、RelBが核に留められた (図30)。この結果から、RelBの振動におけるRelBの核外移行はI $\kappa$ B $\alpha$ によることが示唆された。

他のI $\kappa$ Bsについても発現抑制実験を試みた。p105、I $\kappa$ B $\beta$ に対する配列の異なる2種類のsiRNAを24時間毎に2回導入し、ウエスタンブロット法でp105、I $\kappa$ B $\beta$ の発現量を

確認した。p105、I $\kappa$ B $\beta$ の発現量はControl siRNAを導入した細胞と比べて、どちらも8割の抑制効果だった (図31-A、図32-A)。それぞれの発現抑制細胞に抗LT $\beta$ R抗体刺激を加え、RelBの挙動をタイムラプスで追跡した。Control siRNAを導入した細胞と比較して、p105、I $\kappa$ B $\beta$ 発現抑制細胞ではRelBの振動を示す細胞の割合に有意差は見られなかった (図31-B、図32-B)。以上の結果から、p105、I $\kappa$ B $\beta$ はRelBの振動において関与は少ないと考えられる。

## 第四章 考察

### 3-1の考察

本研究で、RelB-Venusを内在のプロモーター制御下で発現するRelB-Venusノックインマウスを作製した。RelB-Venusノックインマウス (*Relb<sup>Venus/Venus</sup>*マウス) は、メンデルの法則に従って生まれ、RelB遺伝子欠損マウスで見られる表現型も観察されなかった (図7-9)。従って、RelB-Venusは、野生型のRelBと同等の機能を有していることが示された。さらに、*Relb<sup>Venus/Venus</sup>*マウス由来の細胞、組織切片でRelB-Venusの局在を観察することが出来た (図11、12)。RelBは樹状細胞、B細胞、胸腺髄質上皮細胞 (Medullary Thymic Epithelial Cells, mTEC) で発現が高いことが知られており、このマウス由来の細胞を用いることでRelBの発現が1細胞レベルで解析可能となった (50)。今後は*Relb<sup>Venus/Venus</sup>*マウスを用いることで免疫系の細胞で、RelBのより詳細な解析が行われることを期待している。

データを示していないが、私はこれまでにRelA-mRFP1ノックインマウス (*Rela<sup>mRFP1/mRFP1</sup>*マウス) も作製した。このマウスは、RelAのC末端領域に蛍光タンパク質mRFP1が結合したRelA-mRFP1を発現するノックインマウスである。*Rela<sup>mRFP1/mRFP1</sup>*マウスは耐性致死であることが明らかとなっている。RelA遺伝子欠損マウスは、胎児期13-15日前後でTNFレセプターを介した肝臓のアポトーシスが原因となり胎生致死となることが報告されている (51, 52)。このことから、ノックインマウス体内でRelA-mRFP1が機能せず胎生致死になっていることが予想される。また、RelAのN末端領域にEGFPを結合したノックインマウスが作製されており、このマウスは耐性致死にならない (53)。私は、RelA-mRFP1またはmRFP1-RelA発現ベクターを作製し、MEFに発現させた。興味深いことにmRFP1-RelAが発現した細胞にTNF $\alpha$ で刺激を加えると、RelAが振動したが、RelA-mRFP1は、振動しなかった。以上の結果をまとめると、RelAにはC末端領域に振動のために重要な部位があり、さらにRelAの振動はマウス胎児期において肝臓のアポトーシスを抑制するために必要であると考えられる。

### 3-2の考察

*Relb<sup>Venus/Venus</sup>*マウス由来の胸腺凍結切片の髄質領域で、RelB-Venus由来の蛍光を検出した、細胞レベルだけでなく組織レベルでの解析にも応用できることが分かった (図12)。しかし、アセトン等で固定をすると著しく蛍光強度が低下し、PFA固定でも蛍光強度が低下するため、多重染色を行う際は抗GFP抗体、抗Flag抗体等で染色するか、より感度の良い装置で解析することが必要である。今後は、S/N比の改善が課題と考えられる。

### 3-3の考察

*Relb<sup>Venus/Venus</sup>*マウスから得られたMEFに抗LT $\beta$ R抗体またはTWEAKで刺激を加え、共焦点顕微鏡で観察するとRelB-Venusの核移行が観察され、細胞質と核の間で振動することが明らかになった (図11、13、15)。Fn14シグナル伝達経路はLT $\beta$ Rよりも古典的経路を強く活性化するため、古典的経路と非古典的経路のクロストークを解析するには優れている。これまでに古典的経路と非古典的経路のクロストークのダイナミクスは解析がほとんどされていない。そこで、これらのツールが古典的経路と非古典的経路の詳細なクロストークの解析の発展に貢献できることを期待している。

これまでに、非古典的経路は破骨細胞への分化に必要であることが明らかとなっている (54-57)。本研究で、RANKL、CD40L刺激を加えた*Relb<sup>Venus/Venus</sup>* BMDM (Bone Marrow Derived Macrophage) のRelBの挙動をリアルタイムで追跡することに成功し、これらの細胞、刺激でもRelBの振動が見られることが明らかとなった (図15)。そこで、今後はRelBの振動が破骨細胞への分化に関与しているかどうか解析したいと考えている。また、mTECにはCD40、RANK、LT $\beta$ Rが発現し、これらのシグナルはmTECの成熟に必要である (58, 59)。そこで、mTECを単離し、ガラスボトムディッシュ上でこれらの刺激を加えた時にRelBの振動が起こるのか、MEFとは標的遺伝子の発現が異なるのかどうか検討を行いたいと考えている。

本研究によって個々の細胞のRelBの挙動を追跡する系を確立した (図13-15)。この系を用いることで、抗LT $\beta$ R抗体刺激に対する個々の細胞の反応が非常にヘテロであることが明らかとなった。初代培養MEFがヘテロな細胞集団のため、反応性の違いが表れていると考えていたが、クローン化細胞でも細胞毎の反応性は様々であった (図13)。抗LT $\beta$ R抗体刺激の濃度を振ることによってRelBの振動をする細胞の割合が変化することが明らかとなった。0.3  $\mu$ g/ml 抗LT $\beta$ R抗体刺激が最もRelBの核移行とRelBの振動を示す細胞の割合が高かった。逆に3  $\mu$ g/ml 抗LT $\beta$ R抗体刺激では、RelBの核移行とRelBの振動を示す細胞の割合が低くなった。この現象は、抗LT $\beta$ R抗体刺激がLT $\beta$ Rとクロスリンクして下流のシグナルを活性化させるが、抗体濃度が高いと抗体と受容体がクロスリンクせずに抗体同士が結合してしまうため刺激が入らなくなったと考えられる。

本研究で、RelBの振動の周期をフーリエ変換によって決定する系を確立した (図16)。フーリエ変換の結果から、RelBの振動は大部分の細胞が1.0~2.5時間の周期であることが明らかとなった (図17)。RelAの振動の周期は、約2.2時間であるため、RelBの振動の周期はほぼ変わらない。以上の結果から、RelBの振動は古典的経路と同様のメカニズムで起こることが予想される。LT $\beta$ R経路の下流では、RelBはp50とも二量体を形成していることが報告されている (60)。この報告を踏まえると、RelBの振動は、RelB/p50とRelB/p52によって作り出されていることが考えられる。今後は、RelB/p50とRelB/p52で振動に変化が現れるのか、また、標的遺伝子の発現に違いはあるのか検討したいと考えている。



### 3-4の考察

本研究によって、RelBの振動と転写活性をリアルタイムで追跡できるシステムを構築した(図18)。また、LTβR経路の転写活性がRelBに大部分依存し、RelAはRelB、p100、IκBαの発現量の維持に寄与していることを明らかにした(図19)。この結果を踏まえて、RelBが振動する細胞としない細胞で転写活性の増強に差があることを見出した。RelAの振動は転写を維持するために必要だと考えられている(44)が、このメカニズムと同じくRelBの振動も転写活性を誘導し、維持することが示唆された。従って、RelAと同じくRelBにも上流からのシグナルを受け取ってリン酸化され、その維持のために振動していることが考えられる。これまでにRelBのリン酸化部位は4箇所報告されており、T84, S552はRelBがGSK3βによってリン酸化されプロテアソーム分解を受けると考えられている(61, 62)。さらに、S368は二量体化に(63)、S472はIKKα/βによってリン酸化され、転写活性に必要であることが報告されている(64)。これらの報告を踏まえて、今後は、分解に関与するT84, S552を除いたS368, S472の変異体を細胞に発現させ、RelBの振動と転写活性に影響があるのかどうか解析したいと考えている。また、LTβR経路でRelBがリン酸化される報告は無いため、Phos-tag SDS-PAGEでRelBのリン酸化を検出し、将来的には質量分析することを計画している。LTβR経路は、刺激後約6時間から非古典的経路依存的にCXCL12、CXCL13、CCL19、CCL21等の標的遺伝子の発現が誘導されることが明らかとなっている(25, 65)。そこで、本研究で構築したレポーターシステムを使って、標的遺伝子のプロモーターの依存的に各種蛍光タンパク質が発現誘導される系の構築を計画している。この系を用いることで、RelBの振動をしている細胞の標的遺伝子の発現が、振動していない細胞と異なるのか明らかに出来ると期待している。

### 3-5の考察

CRM1の阻害剤であるLMBを細胞に処理することによってRelBの振動が抑制されたことから、RelBの振動にはCRM1依存的な核外移行が必要であることが明らかとなった(図21)。さらに、3-7、3-8で定常状態のRelBの局在はp100が関与し、振動時の核外移行にはIκBαが主に働いていることが示唆された(図24-32)。今後はCrispr/Cas9システムを用いて、IκBα欠損細胞を作製し、その細胞にIκBαのNLSまたはNES変異体を戻すことで、IκBαのNLS、NESがRelBの振動に必要なかどうか解析することを計画している。

無刺激状態の細胞にLMBを処理すると核内にRelBが蓄積される現象を見出した(図20)。さらに、p100標的としたsiRNAを細胞に導入すると、p100が発現抑制された細胞は、RelBが核内に局在していた(図22)。以上の結果をまとめると、定常状態においてRelBは核移行と核外移行を繰り返しているが、p100によって局在の平衡が細胞質に偏っていることが明らかとなった。同様の現象は、RelA/p50/IκBα複合体でも報告されている(66-68)。IκBαのN末端領域は構造的にしなやかであると考えられ、p50の核局在シグナル(NLS)のマスクが一時的に弱くなる場合に速やかにRelA/p50/IκBα複合体が核移行する。しかし、核内で再びNLSがマスクされるとIκBαのN末端領域のNES依存的に核外移行する。このように古典的経

路では、RelA/p50/I $\kappa$ B $\alpha$ が常にシャットリングしている。この状態のRelA/p50はDNA結合能が抑制されている (67)。この報告を考慮すると、RelB/p100もDNA結合能が抑制された状態で細胞質と核の間を転移していると考えられる。

### 3-6の考察

タンパク質合成を抑制するCHXを処理するとRelBが核移行した後に核外排出されなかった (図23)。従って、刺激依存的に核移行したRelBの核外排出には新たに合成されたタンパク質が必要である。この予想を確認するために、Crispr/Cas9で作製したI $\kappa$ B $\alpha$ 欠損細胞にLTR誘導性のI $\kappa$ B $\alpha$ 、またはNF- $\kappa$ B誘導性のI $\kappa$ B $\alpha$ を発現させ、RelBの振動が戻るかどうか解析する事を計画している。また、無刺激状態の細胞にCHXを処理してもRelBが核内に蓄積しなかった (図22)。以上の結果をまとめると、無刺激状態のRelBのシャットリングにはタンパク質合成は関与していないことが明らかとなった。

### 3-7の考察

本研究では、siRNAを用いてp100の発現を抑制し、RelBの振動におけるp100の役割を解析した。p100発現抑制細胞ではRelBが1.0~2.5時間周期で自律振動し、この振動は抗LT $\beta$ R抗体刺激によるRelBの振動と同様にCRM1とタンパク質合成を必要とすることが明らかとなった。(図24、25、26)。p100遺伝子欠損マウス由来のMEFにおいて、p50と二量体を形成することが明らかとなっている (60, 69, 70)。従って、p100発現抑制細胞のRelBはp50と二量体を形成している可能性が高い。RelBの自律振動は野生型のp100を戻すと完全に消失し、抗LT $\beta$ R抗体刺激依存的に振動するようになることから (図27、28)、RelBは従来振動する性質があり、その機能がp100によって抑制されていると考えられる。さらに、RelBが振動する細胞としない細胞があるのは、約3割~4割の細胞でp100の大部分がp52へとプロセシングされるためと考えられる。p100の発現誘導は抗LT $\beta$ R抗体刺激後約3時間から見られ12時間でピークに達する (45)。刺激後約10時間でRelBの振動も終息することから、RelBの振動の終息にp100の発現誘導が関与していると考えられる。

### 3-8の考察

本研究でRelBの自律振動、刺激依存的な振動両方にI $\kappa$ B $\alpha$ による核外移行が必要であることが示唆された (図29、30)。この時、標的遺伝子であるI $\kappa$ B $\alpha$ が誘導され、核内のRelB/p50を核外へCRM1依存的に放出する。以上のサイクルによって、刺激非依存的なRelBの振動が引き起こされ、非古典的経路が恒常的に活性化されていると考えられる。自律振動については今後、 $\kappa$ B-mCherryレポーターシステムを用いた転写の恒常的な活性化が起こっているか解析予定である。

刺激依存的なRelBの振動については3-5の考察でも述べたがI $\kappa$ B $\alpha$ 欠損細胞を作製し、

野生型、各種変異体を発現させることでより詳細な解析を行う予定である。また、RelBの振動にI $\kappa$ B $\alpha$ の分解が関与しているかどうかについては、IKKによるリン酸化部位をAlaに置換した変異体 (Super repressor, SR) をI $\kappa$ B $\alpha$ 欠損細胞に発現させて解析予定である。

RelBの振動の際、核外移行したRelB/p52またはRelB/p50がヘテロダイマーのまま上流から再びシグナルを受け取り、核移行するのかどうかは現在不明である。この点についてはRelBとp50、p52のライブイメージング技術が必要なため、現時点では解析が非常に困難である。今後、これらの分子の追跡方法が確立されることを期待している。

最後に、本研究でRelBがRANKL、CD40L、TWEAK、抗LT $\beta$ R抗体刺激によって細胞質、核を振動することが明らかとなった。しかし、この現象が生体内で実際見られるのかどうかは不明である。2011年の宮本博士の報告 (71) によると、彼等はI $\kappa$ B $\alpha$ のNESの変異体が発現するノックインマウス (*Nfkb1*<sup>NES/NES</sup>マウス) を作製した。このマウスは、そけい部リンパ節、パイエル板の数の減少、さらにこれらの大きさが非常に小さくなる。また、脾臓の白脾髄の構築にも異常が認められる。これらの表現型は、LT $\beta$ R欠損マウス、RelB欠損マウスでも見られ、主に非古典的経路の異常によって見られる。*Nfkb1*<sup>NES/NES</sup>マウスでは、おそらくRelBが核移行した後に、振動せずにp100によってのみ核外排出されていると考えられる。従って、*Nfkb1*<sup>NES/NES</sup>マウスで異常が観察されるそけい部リンパ節、パイエル板、脾臓の白脾髄の構築にはRelBの振動が重要な役割をしていることが考えられる。これまで、生体内でNF- $\kappa$ Bの振動の役割を証明した報告は無く、また抹消リンパ組織の構築の詳細なメカニズムは明らかとなっていない。RelB-Venusノックインマウスを用いることでこの謎の一端を解明できることを期待している。

## 第五章 総括

本研究は、RelB を可視化することで RelB のダイナミクスと転写活性を解析した。本研究により非古典的 NF- $\kappa$ B 活性化経路に関する新たな知見が得られたので、以下に要約するとともに図にまとめた (図 33)。

- 1) 本研究によって、個々の細胞の RelB のダイナミクスを解析する系を確立した。
- 2) RelB の振動は様々な刺激によって引き起こされ、大部分の細胞が 1.5-2.5 時間の周期を示す。
- 3) RelA は無刺激状態の RelB、p100、I $\kappa$ B $\alpha$ の発現量の維持に必要であり、また RelB の振動は非古典的経路の転写活性を強く維持している。
- 4) RelB の振動にはタンパク質合成と CRM1 依存的な核外排出が必要である。
- 5) RelB は本来振動する性質を持っているが、p100 によって細胞質に係留されているためにその性質が抑制されている。しかし、RelB の振動で見られる核外排出に p100 は関与していない。
- 6) I $\kappa$ B $\alpha$ も p100 と同様に RelB の局在を細胞質に偏らせているが、RelB の振動では主に I $\kappa$ B $\alpha$ によって RelB が核外排出されている。

本研究において、非古典的経路においても NF- $\kappa$ B が振動し、転写活性を制御していることが明らかとなった。今後、RelB の振動が免疫器官の発達、維持に関与しているかどうか明らかにできることを期待している。

## 第六章 図表

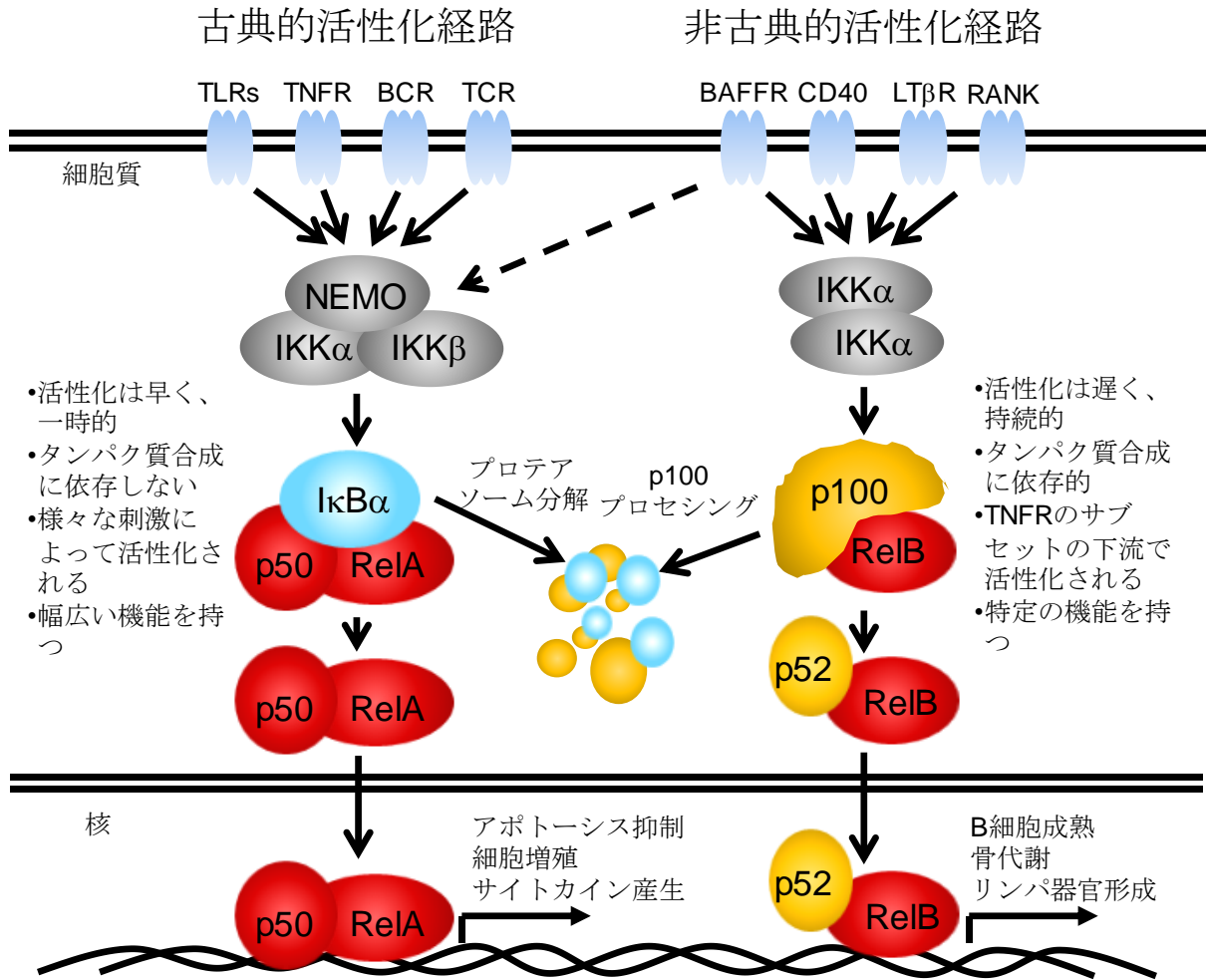
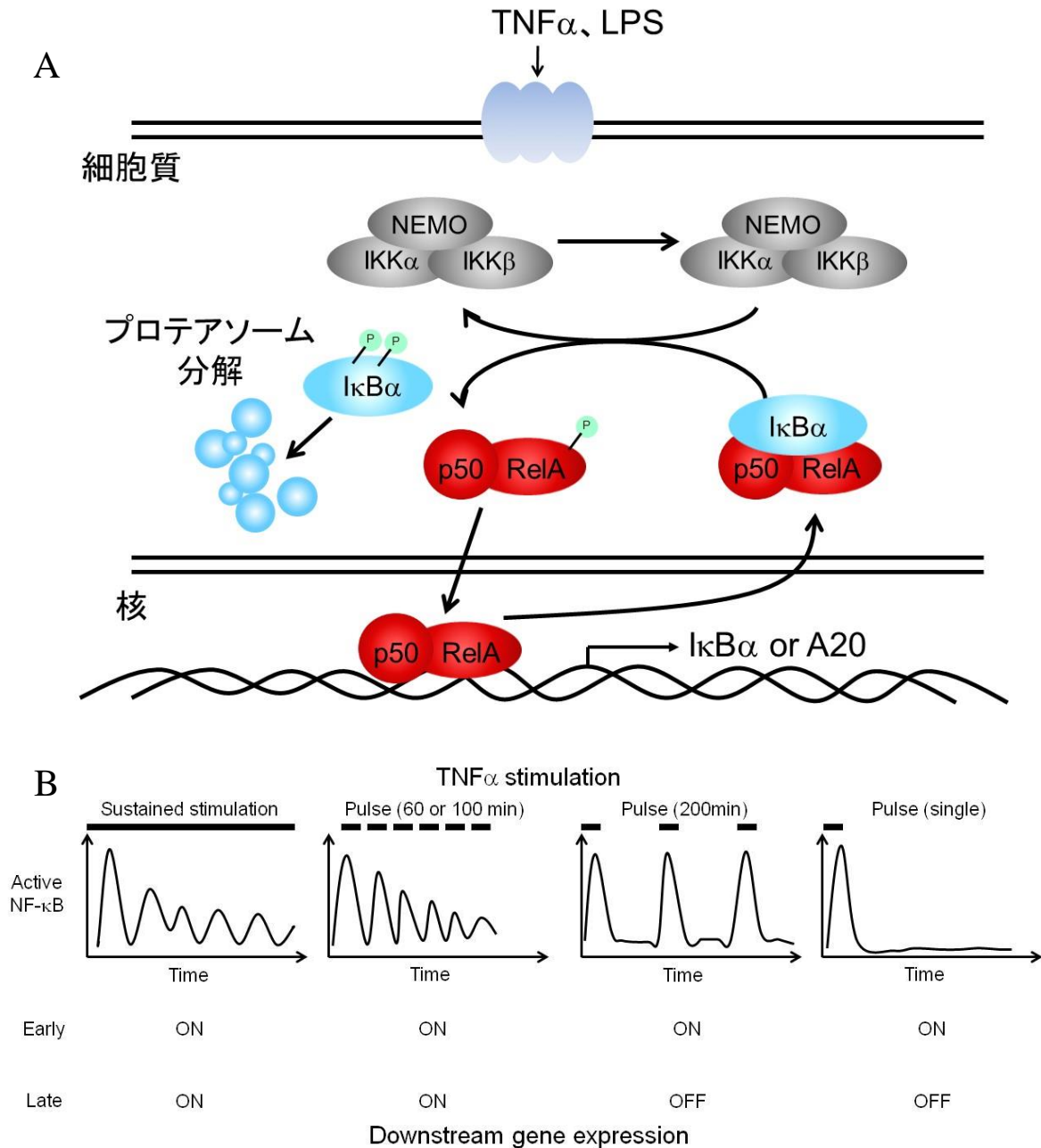


図 1 NF-κB 活性化経路



## 図 2 NF- $\kappa$ B の振動

- A) 細胞外刺激は IKK を活性化し、I $\kappa$ B $\alpha$  をリン酸化、続いて分解へ導く。NF- $\kappa$ B は核へ移行し、I $\kappa$ B $\alpha$  や A20 などのシグナル伝達経路の抑制分子の発現を誘導する。
- B) 持続的な TNF $\alpha$  刺激と 60 分または 100 分間隔のパルス刺激によって徐々に減衰する振動は、初期と後期に誘導される標的遺伝子を誘導する。200 分間隔のパルス刺激と 1 回のパルス刺激は初期に誘導される標的遺伝子を誘導する。

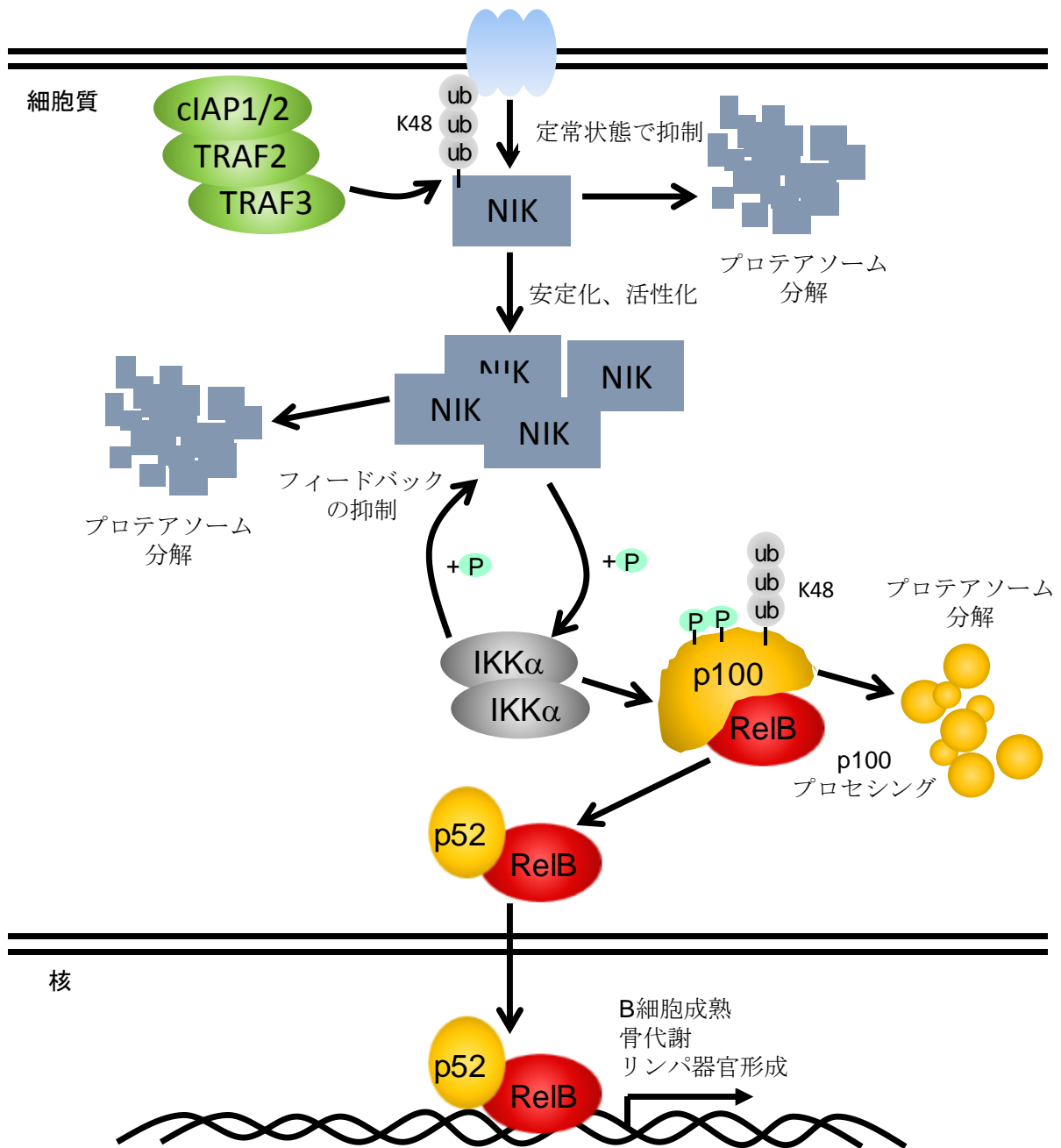
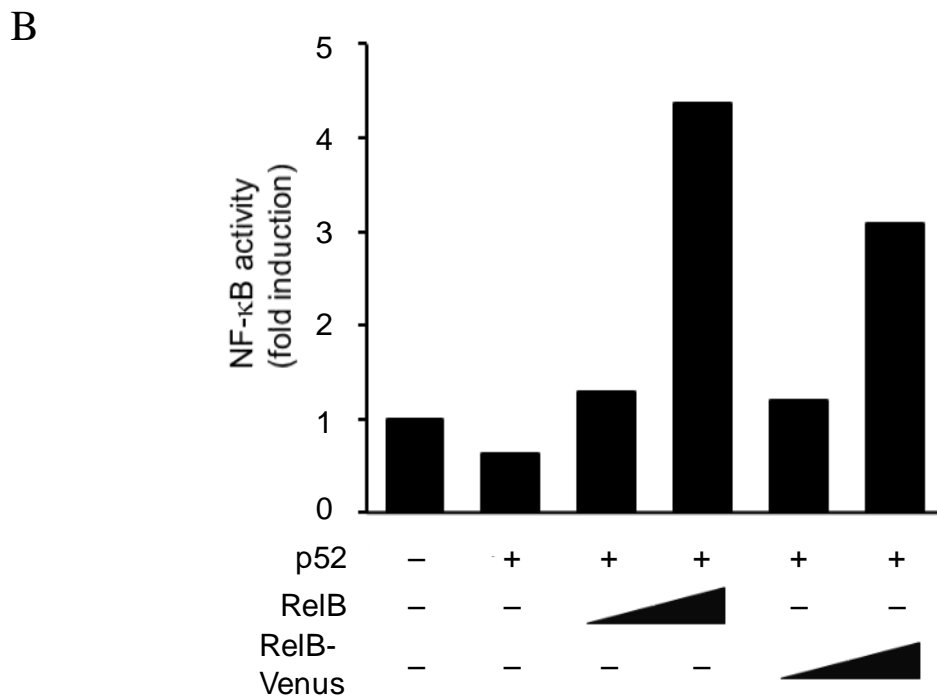
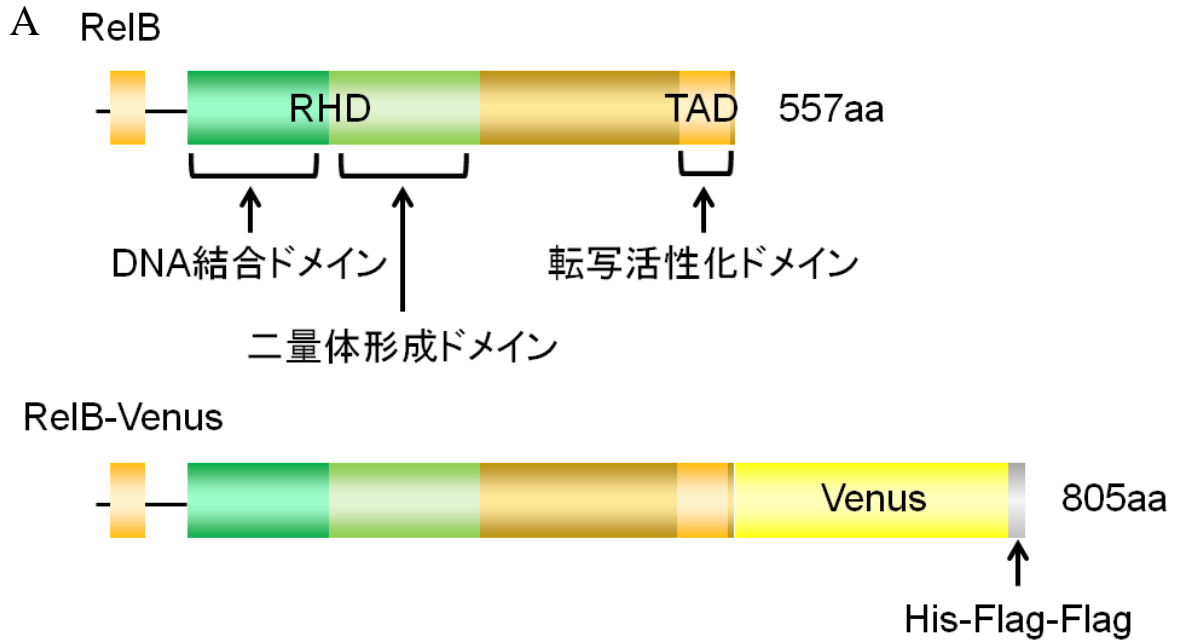


図 3 非古典的 NF- $\kappa$ B 活性化経路の抑制機構

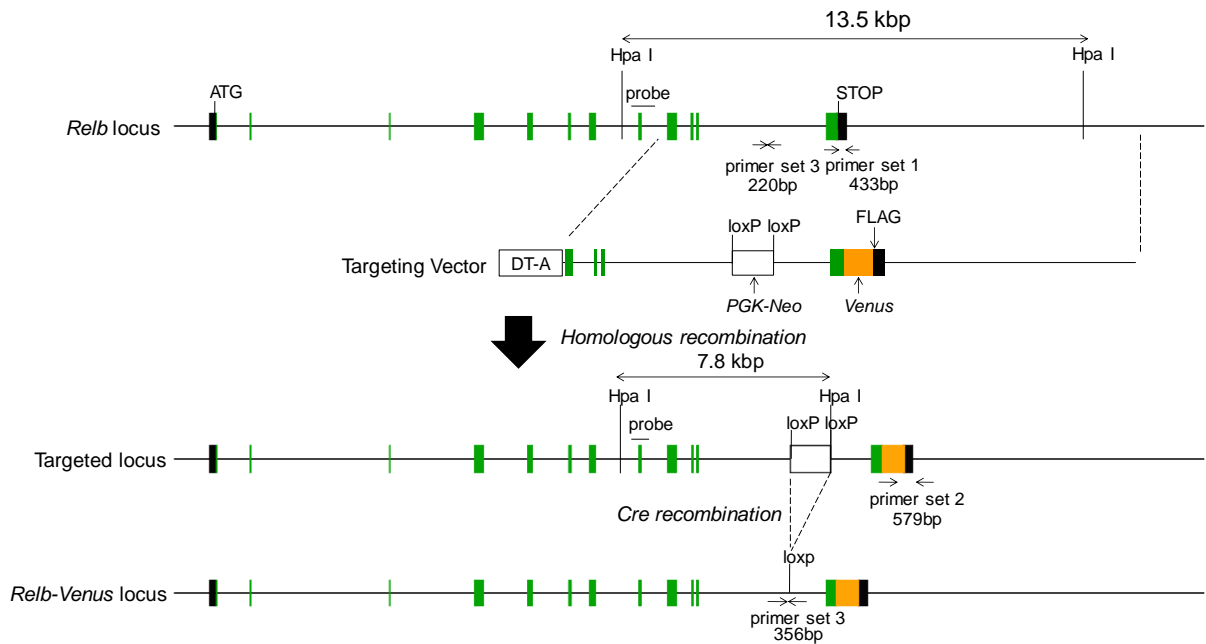


#### 図4 RelB-Venus の構築

- A) RelB-Venus の構造。RelB タンパク質の N 末端領域には DNA 結合領域が存在する。そのため、蛍光タンパク質を結合した際にこの領域の機能が阻害されることが懸念し、C 末端領域に蛍光タンパク質 Venus を結合した。Venus の C 末端領域にはタグタンパク質 His-Flag-Flag が 3 つ並列に結合している。
- B) RelB-Venus の転写活性をルシフェラーゼアッセイで検出した。内部コントロールとして  $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性の値を用いて補正を行った。



A



B

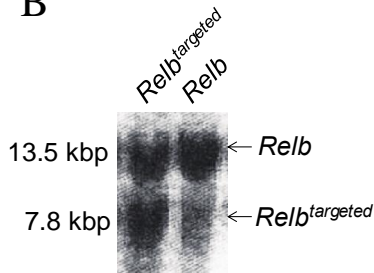
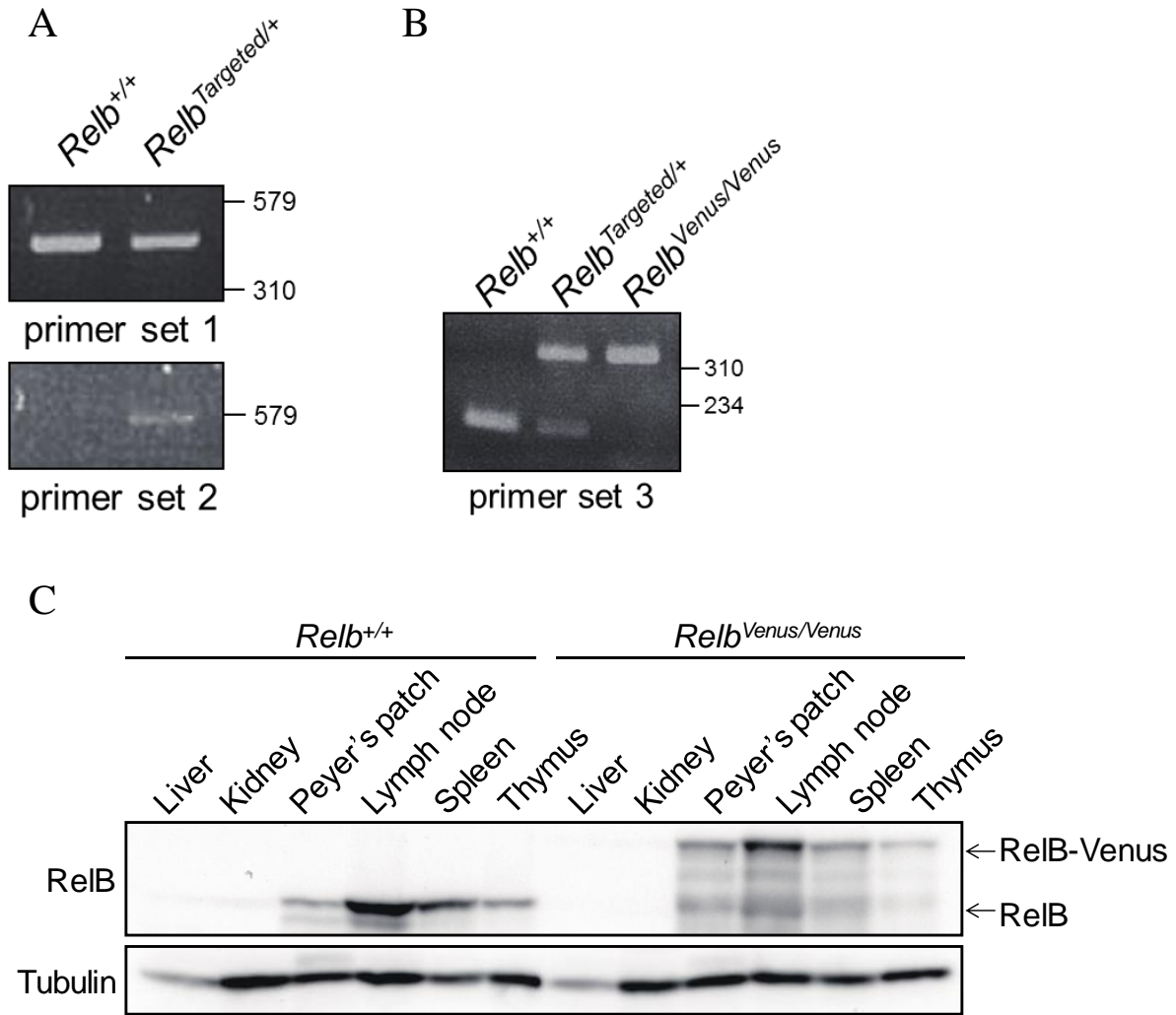


図5 *Relb<sup>Venus/Venus</sup>* ノックインマウスの作製

- A) 黒の Box は非翻訳領域、緑の Box はエクソン、オレンジの Box が蛍光タンパク質 Venus を表す。サザンブロットで使用する特異的 Hpa I で切断することによるフラグメントのサイズとプローブの位置を示した。Primer set 1, 2, 3 はそれぞれ *Relb<sup>+/+</sup>*, *Relb<sup>Targeted/+</sup>*, *Relb<sup>Venus/Venus</sup>* を判定するための Primer set である。DT-A はターゲッティングベクターをトランスフェクションした細胞をネガティブセレクションするための diphtheria toxin A サブユニット遺伝子を示す。
- B) 野生型とターゲッティングベクターが挿入された ES 細胞由来のゲノム DNA を Hpa I で切断した。制限酵素で処理した DNA をサザンブロット法で確認した。



### 図6 RelB-Venusの発現解析

- A) 図5-aに示したPrimer set 1、2を用いてPCR法でRelb<sup>+/+</sup>、Relb<sup>Targeted/+</sup>マウスの遺伝子型を決定した。
- B) Relb<sup>Targeted/+</sup>マウスとCAG-Creマウスを交配させ、生まれてきた仔マウスの尾から抽出したDNAを鋳型に図5-aで設計したPrimer set 3を用いてPCR法で遺伝子型を決定した。
- C) Relb<sup>+/+</sup>とRelb<sup>Venus/Venus</sup>マウスの胸腺、脾臓、肝臓、腎臓から細胞を採取し、ウエスタンブロッティング法にてRelB-Venusの発現を確認した。

図7 *Relb*<sup>Venus/+</sup>マウス間の交配により得られたマウスの遺伝子型

	<i>Relb</i> <sup>+/+</sup>	<i>Relb</i> <sup>Venus/+</sup>	<i>Relb</i> <sup>Venus/Venus</sup>	Total
仔数	10	27	14	51
	19.6%	52.9%	27.5%	100%
♂	4	17	6	27
	14.8%	63.0%	22.2%	100%
♀	6	10	8	24
	25.0%	41.7%	33.3%	100%

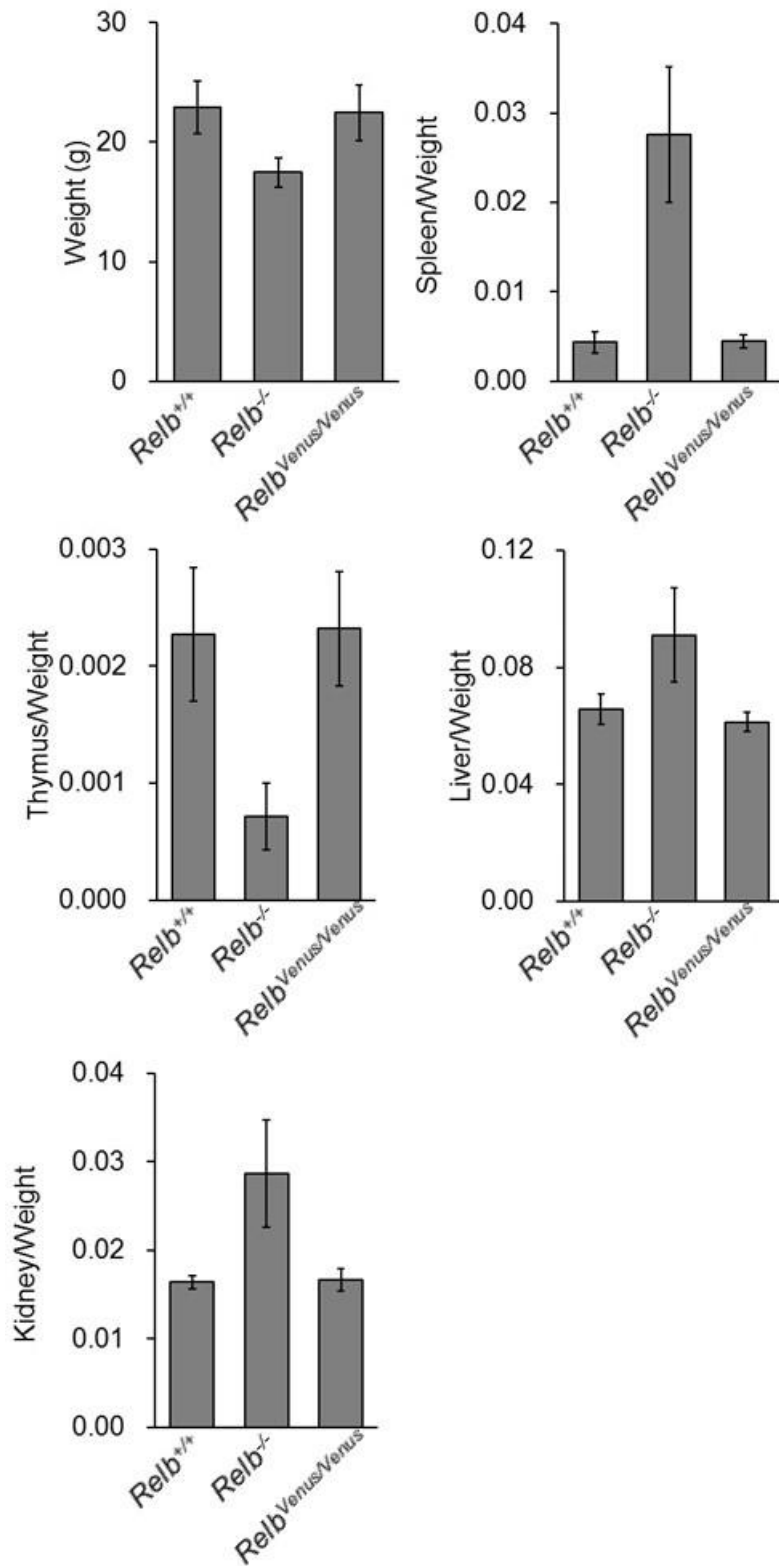


図 8 *Relb*<sup>+/+</sup>、*Relb*<sup>-/-</sup>、*Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスの体重、脾臓、胸腺、肝臓、腎臓の重量の比較 (9~11 週齢、n=3)

臓器の重量は体重当たりの重量で示した。

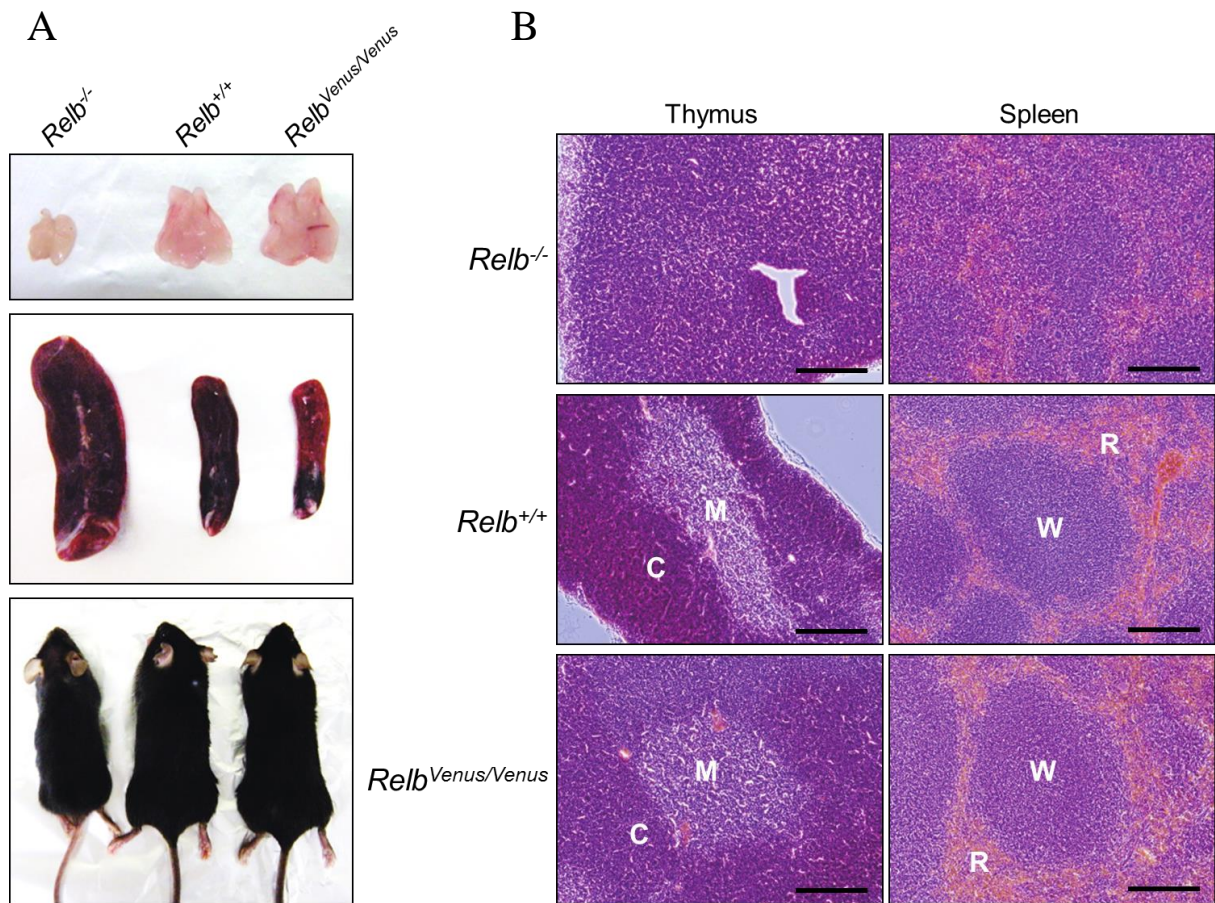


図9 *Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスの組織学的解析

- A) *Relb*<sup>+/+</sup>、*Relb*<sup>-/-</sup>、*Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスの胸腺 (上図)、脾臓 (中図)、全身 (下図) の写真を撮影した。
- B) *Relb*<sup>+/+</sup>、*Relb*<sup>-/-</sup>、*Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスの胸腺、脾臓からパラフィン切片を作製し、H&E 染色した。対物レンズ 10 倍で撮影した。Scale bar は 200  $\mu$ m。M; Medulla, C; Cortex, R; Red pulp, W; White pulp

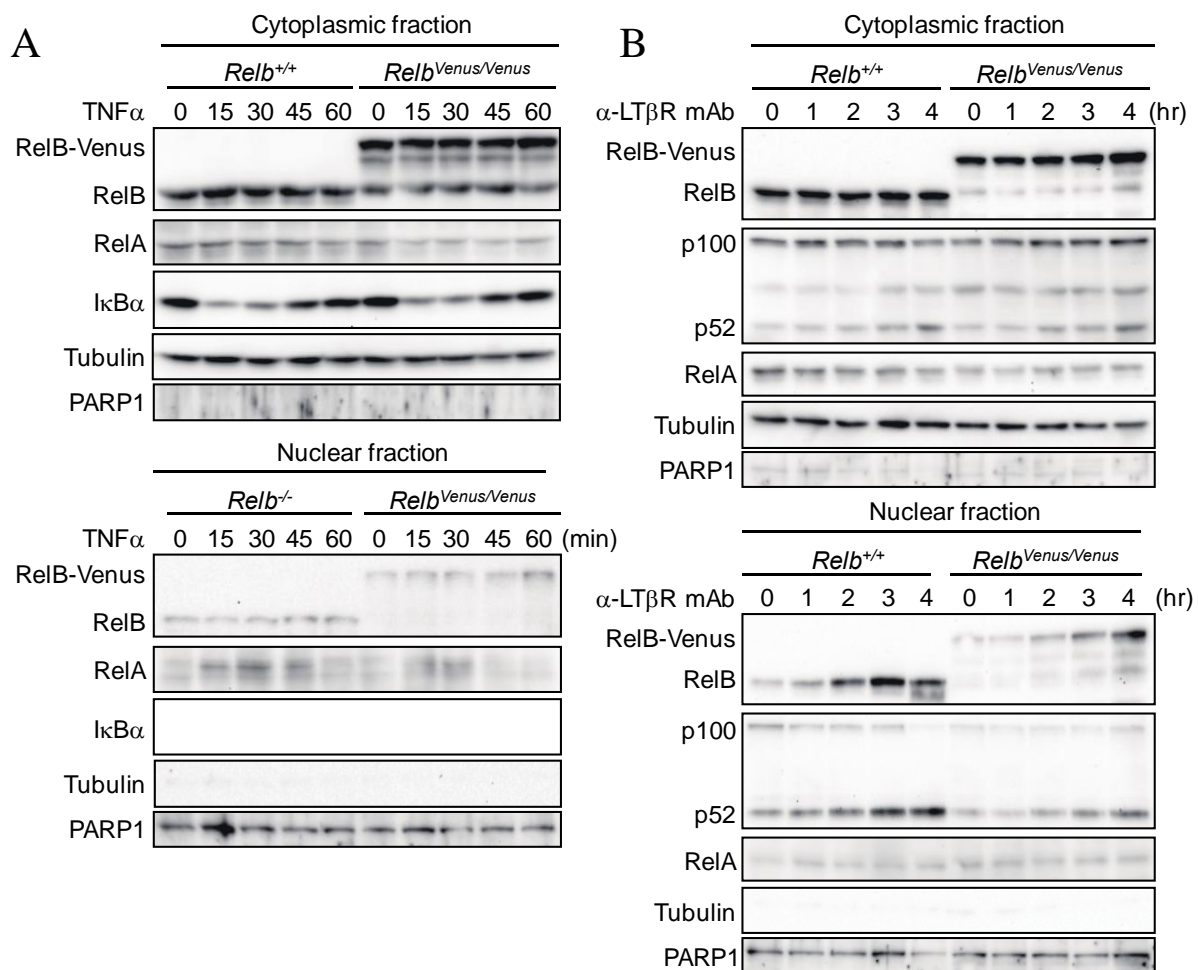


図 10 TNFα、抗 LTβR 抗体刺激による NF-κB 分子の動態解析

A) *Relb*<sup>+/+</sup>、*Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスから胎児線維芽細胞 (MEF) を採取し、表示した時間 10 ng/ml TNFα を処理しウエスタンブロッティング法にて RelA と RelB の核移行を確認した。

B) *Relb*<sup>+/+</sup>、*Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウスから MEF を採取し、表示した時間 0.3 μg/ml 抗 LTβR 抗体を処理しウエスタンブロッティング法にて p100 プロセッシングと RelB、p52 の核移行を確認した。

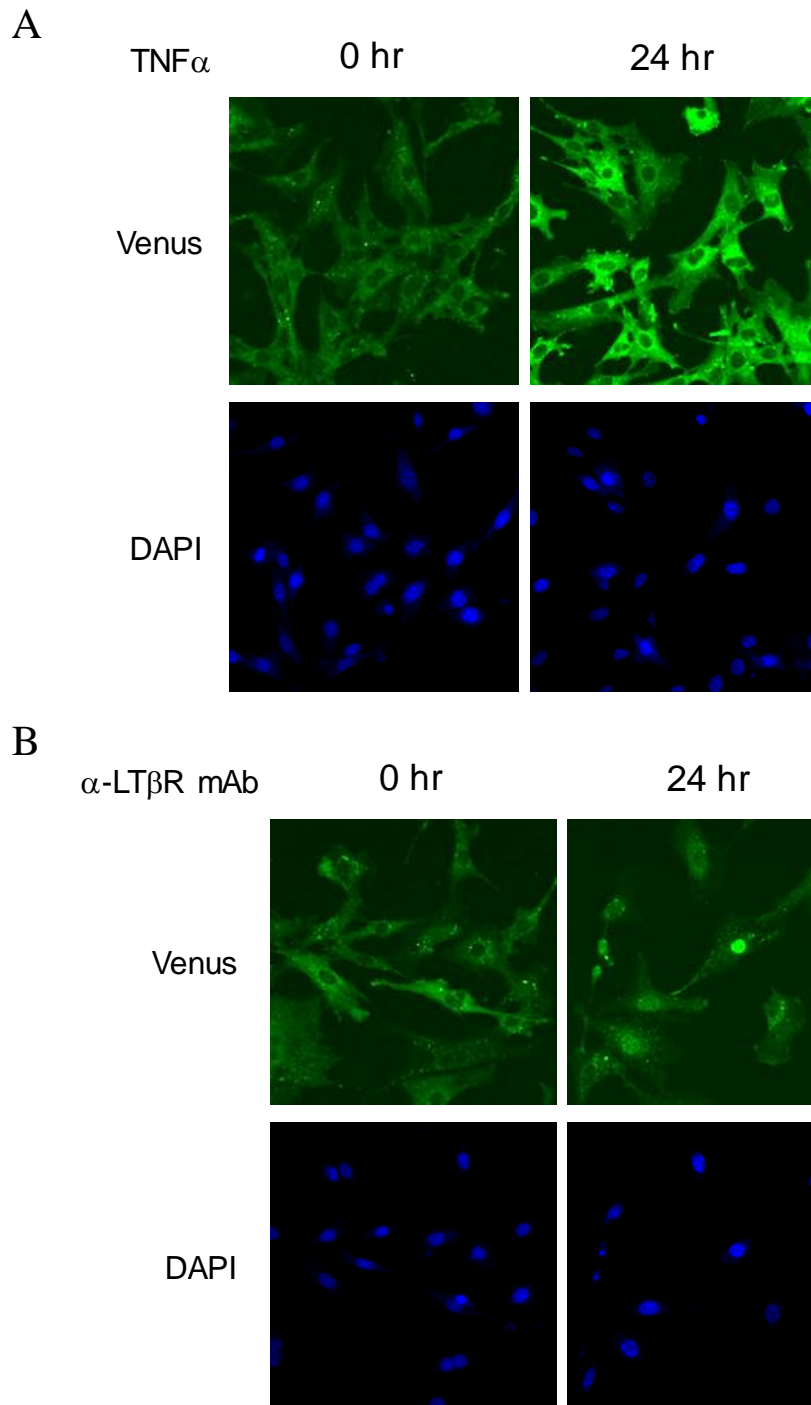


図 11 TNF $\alpha$ 、抗 LT $\beta$ R 抗体刺激による RelB-Venus の蛍光観察

- A) *Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウス由来の MEF に 24 時間 10 ng/ml TNF $\alpha$  を処理し、共焦点顕微鏡で RelB-Venus の蛍光を観察した。対物レンズ 20 倍で撮影した。
- B) *Relb*<sup>Venus/Venus</sup> マウス由来の MEF に 24 時間 0.3  $\mu$ g/ml 抗 LT $\beta$ R 抗体を処理し、共焦点顕微鏡で RelB-Venus の核移行を観察した。対物レンズ 20 倍で撮影した。



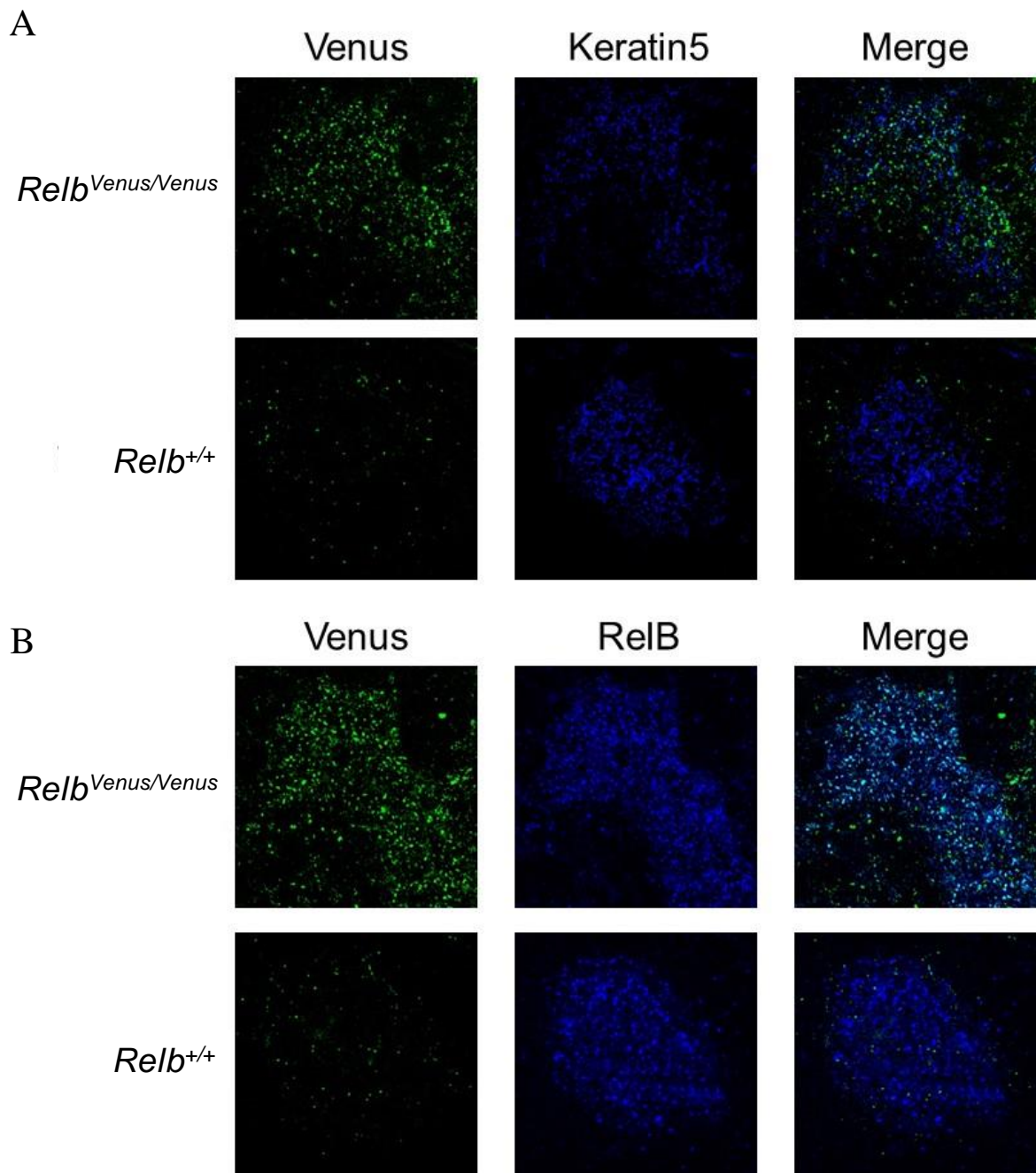


図 12 胸腺凍結切片における RelB-Venus の蛍光観察

*Relb<sup>+/+</sup>*、*Relb<sup>Venus/Venus</sup>* マウスの胸腺から凍結切片を作製し、免疫染色した。抗 Keratin-5 抗体 (A) と抗 RelB 抗体 (B)。対物レンズ 10 倍で撮影した。



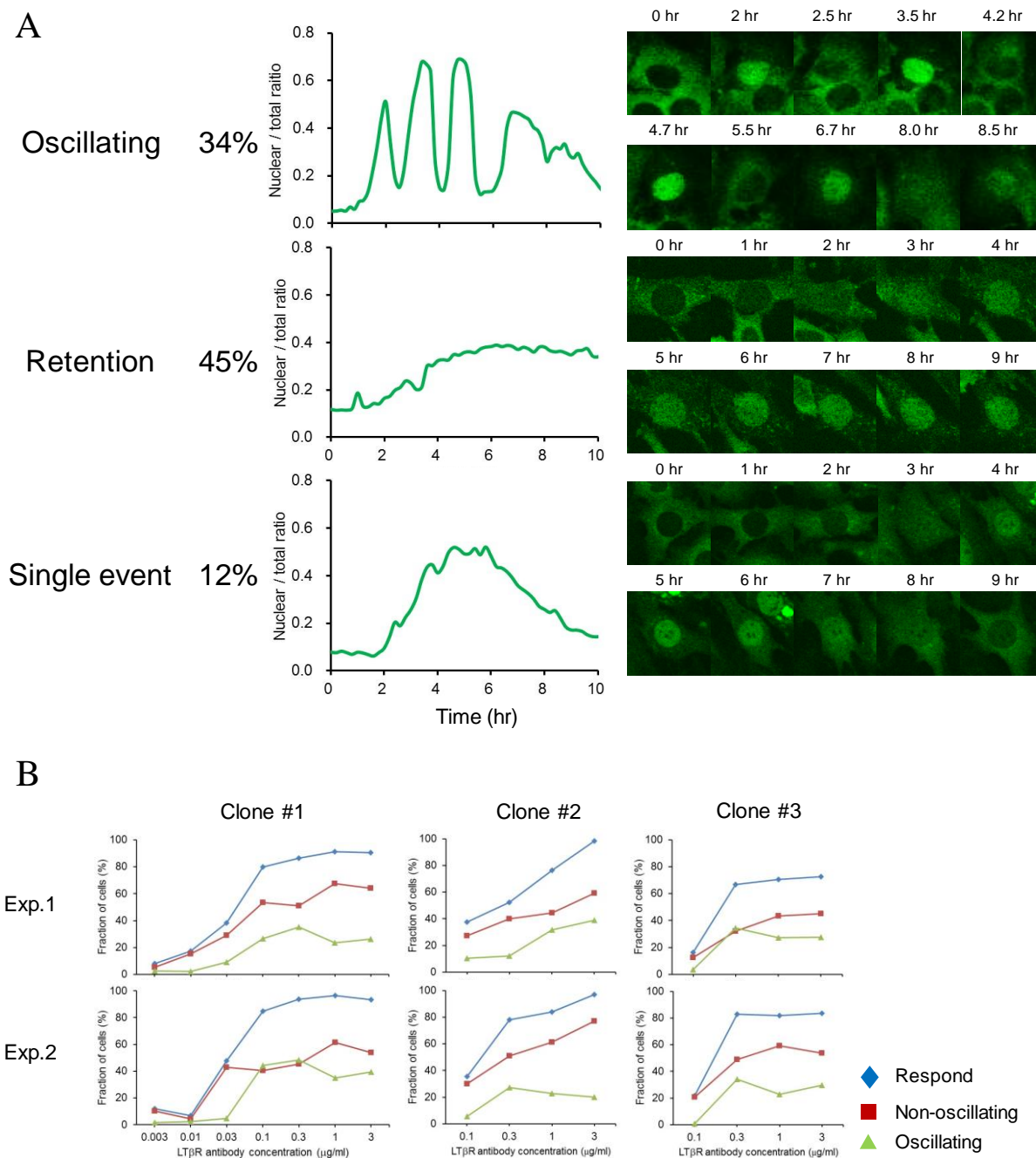
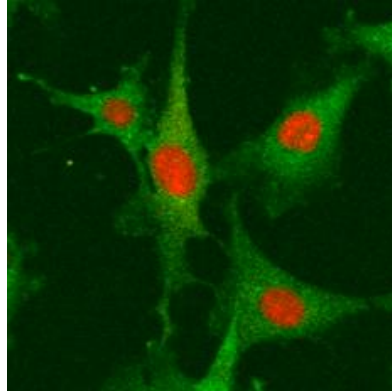


図 13 抗 LT $\beta$ R 抗体刺激が引き起こす RelB-Venus の挙動の解析

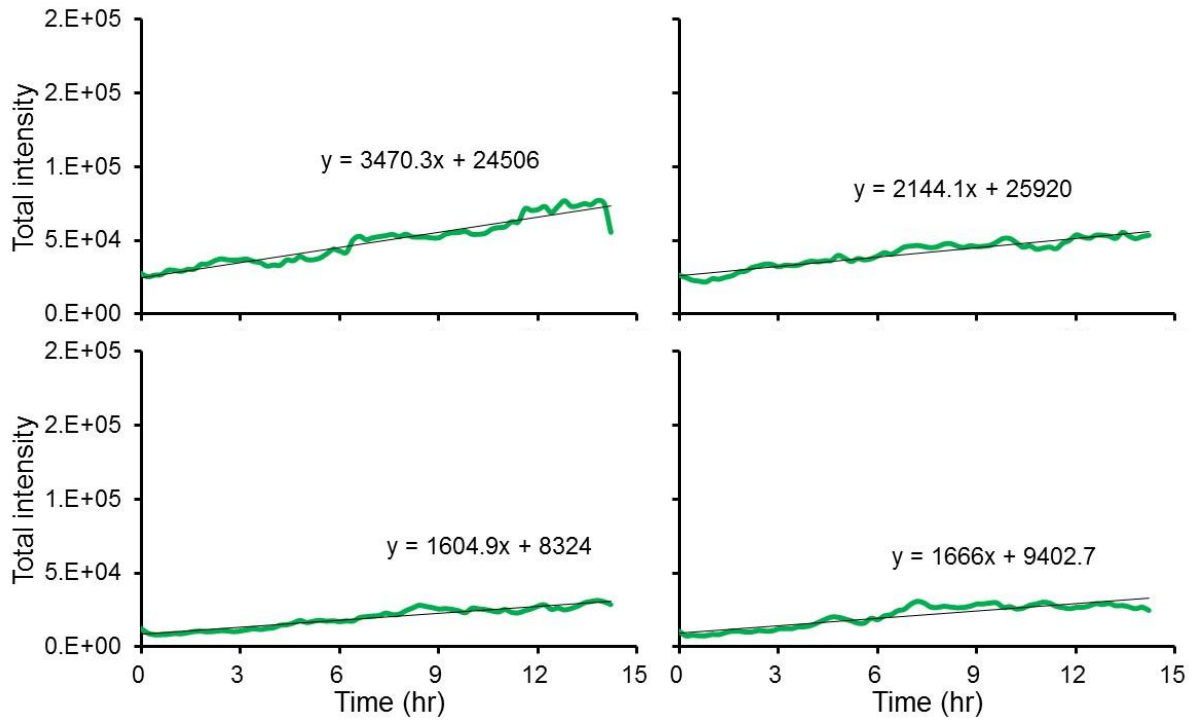
- A) RelB-Venus の挙動とそれぞれの割合を示した。右の写真の核内蛍光量と総蛍光量の割合 (Nuc / total ratio) を縦軸に示し、横軸に時間 (hr) を示すと左図が得られる。
- B) 3 種類のクローン株で抗 LT $\beta$ R 抗体刺激の濃度を振り、RelB の挙動のパターンを解析した。三角は振動した細胞 (Oscillationg) の割合を示した。四角は RelB が核移行したが振動しなかった細胞 (Non-oscillationg) の割合を示した。菱形は RelB が核移行した細胞 (Respond) の割合を示した。

A

Green: RelB-Venus  
Red: mCherry-Nuc

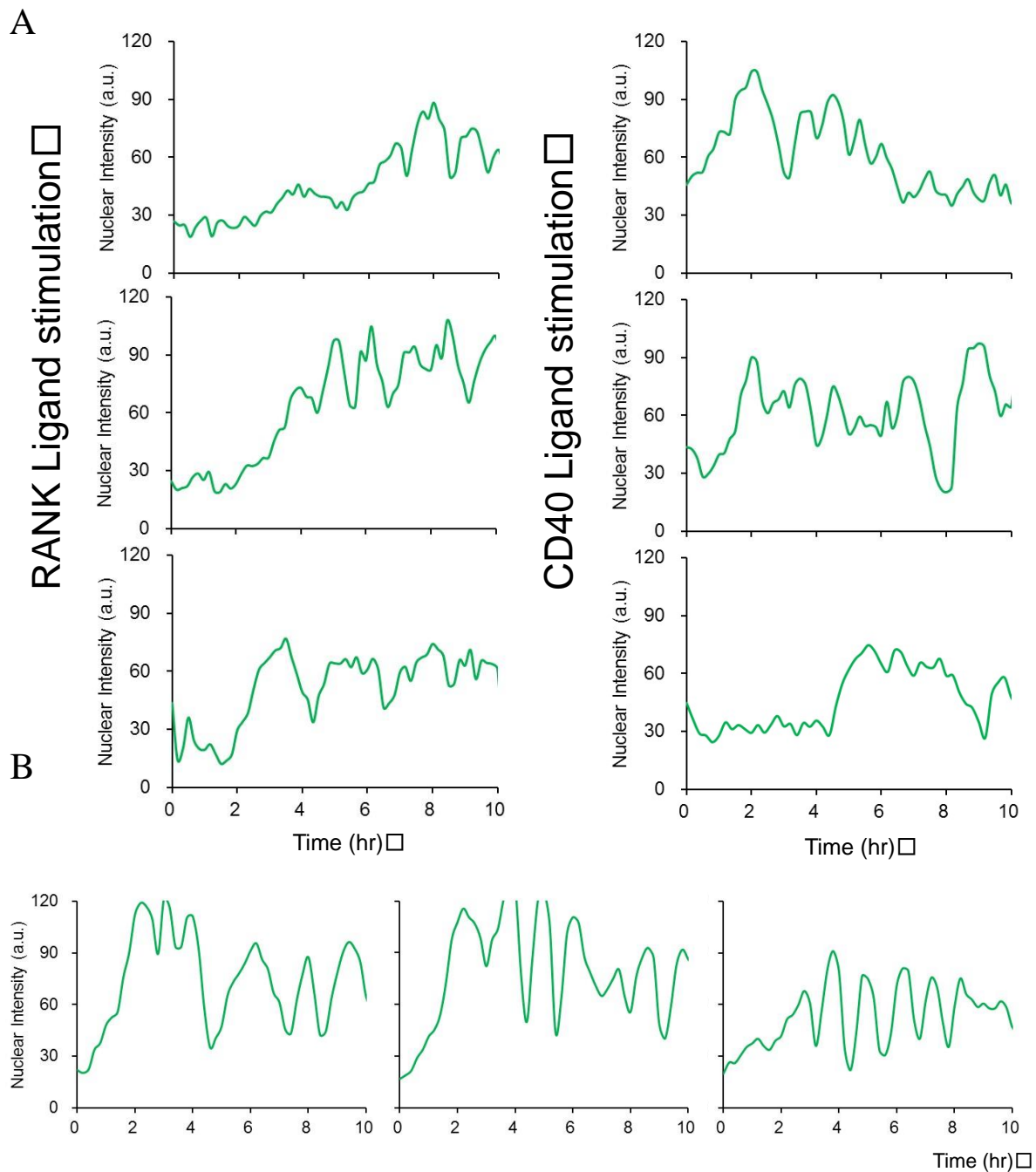


B



#### 図 14 核内蛍光量測定法の確立

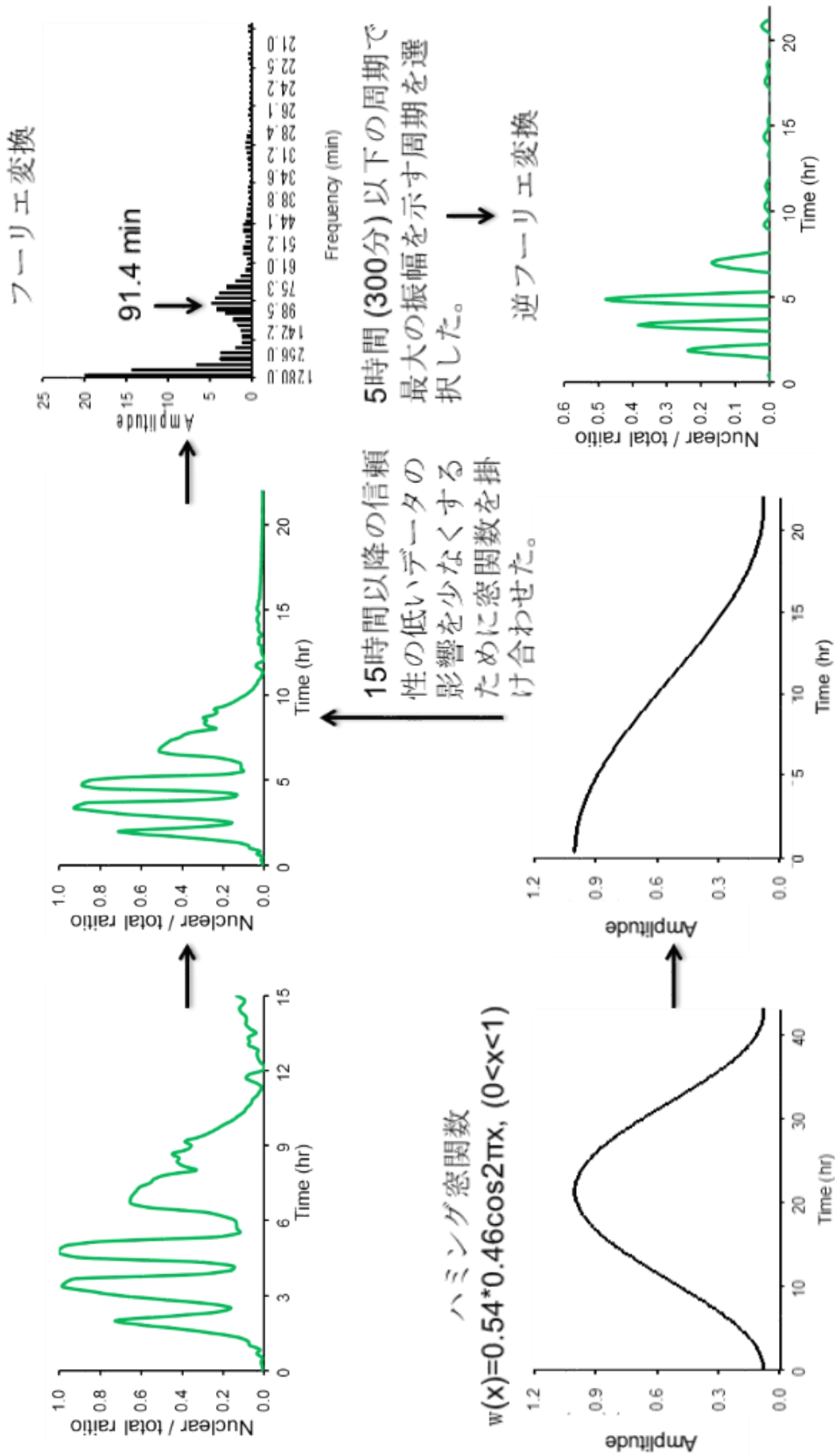
- A) 核領域、そして細胞追跡のための標識として核内に蛍光タンパク質 mCherry を安定発現させ、クローン化した細胞を樹立した。
- B) 細胞の総蛍光量を 15 時間撮影した動画から解析した。縦軸に総蛍光量 (Total intensity)、横軸に時間 (hr) を示した。また、線形近似曲線とその数式をそれぞれのグラフ内に示した。



**図 15 RANKL, CD40L, TWEAK 刺激での RelB-Venus の挙動の解析**

- A) 3 日間 M-CSF で培養した *Relb<sup>Venus/Venus</sup>* 骨髄細胞に 1/4000 GST-RANKL または、250 ng/ml CD40L で刺激を加え、タイムラプスで細胞を観察した。左図は GST-RANKL 刺激、右図は CD40L 刺激の細胞で振動した細胞のプロファイルを示した。
- B) *Relb<sup>Venus/Venus</sup>* MEF に 6 ng/ml TWEAK で刺激を加え、タイムラプスで細胞を観察した。刺激後の細胞で RelB が振動した細胞のプロファイルを示した。

図 16 振動の周期の解析法の確立



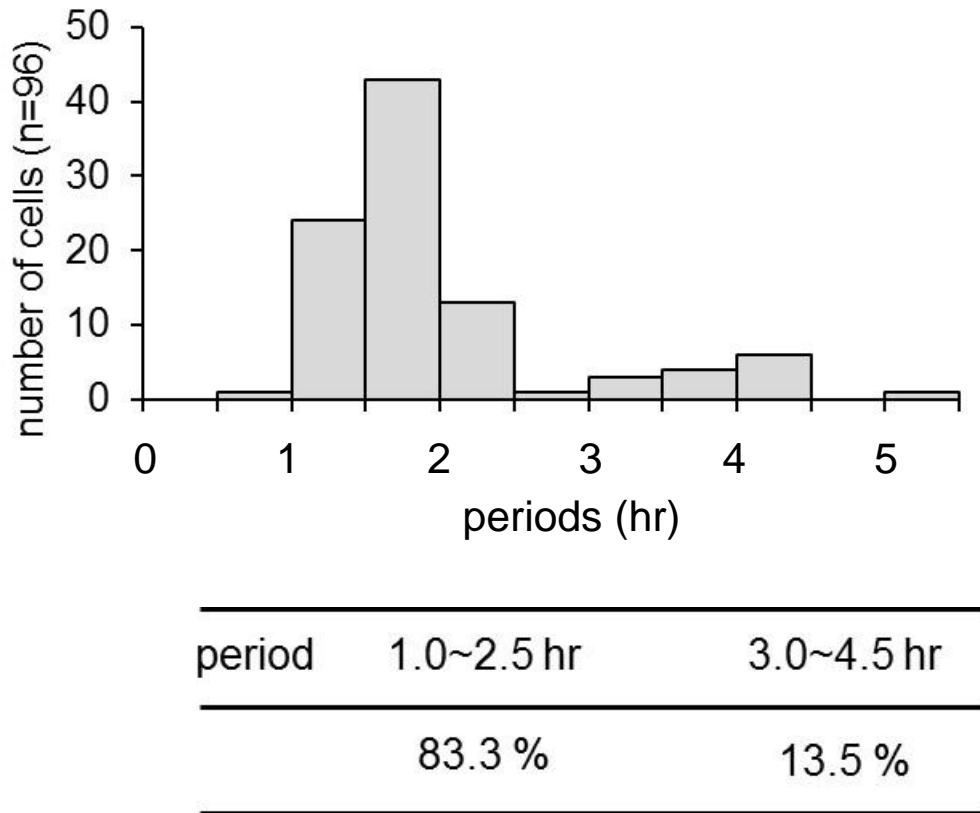
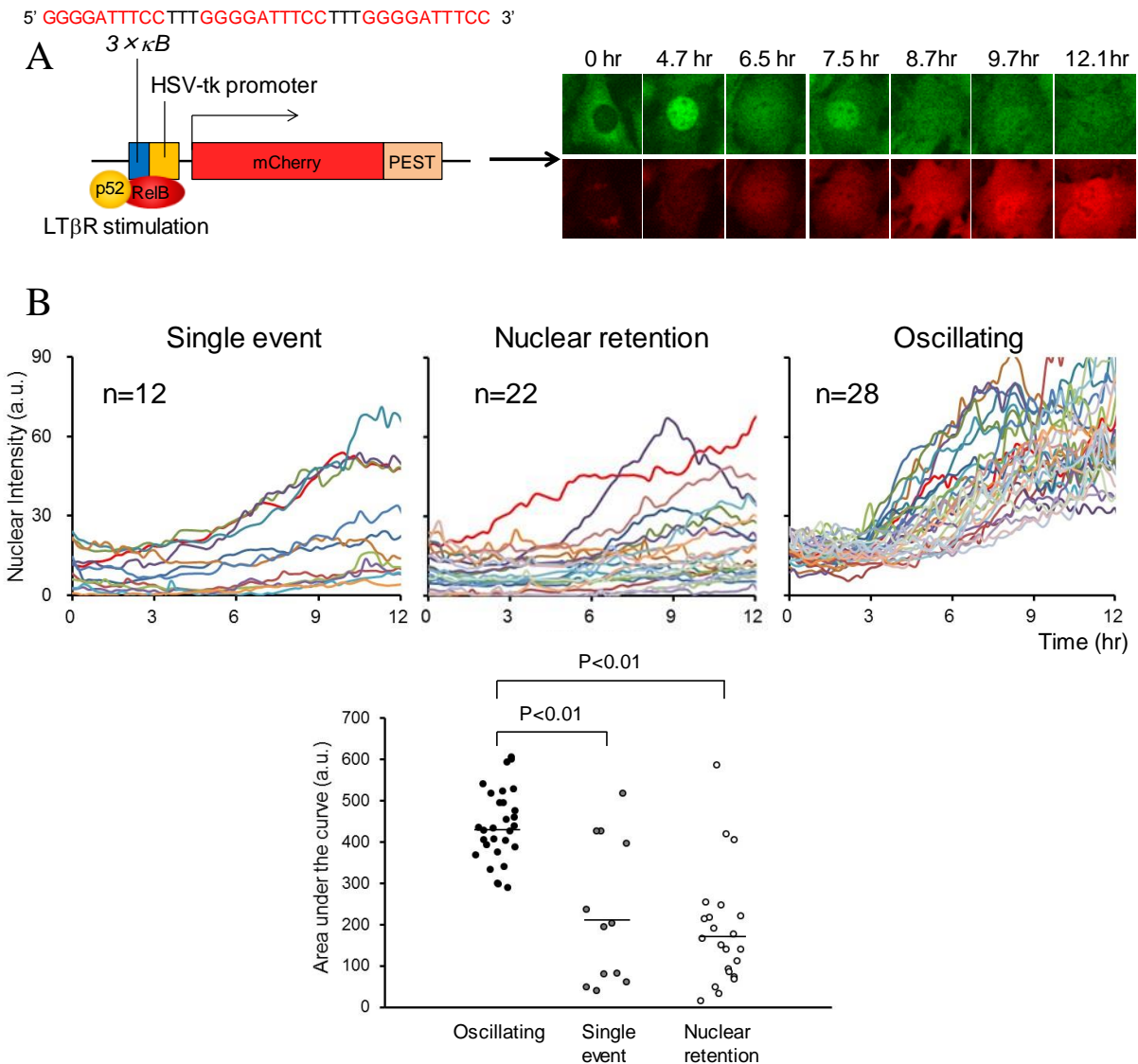


図 17 振動の周期の分布

96 個の典型的な振動を示す細胞についてフーリエ変換で周期を同定し、周期の分布を表した。



**図 18 RelB の振動と転写活性の解析**

A) NF- $\kappa$ B 結合配列 (3 $\times$  $\kappa$ B) と HSV-tk プロモーターを結合させ、その下流で蛍光タンパク質 mCherry が発現するレトロウイルスベクターを構築した。このレトロウイルスベクターを MEFs に発現させることで、RelB の挙動と NF- $\kappa$ B の転写活性を同時に解析できるレポーター細胞を作製した。また、転写活性の変化を観察しやすくするために、mCherry の C 末端に PEST 配列を連結させた。右図には 0.3  $\mu$ g/ml 抗 LT $\beta$ R 抗体刺激によって RelB が振動つつ、mCherry を発現誘導する細胞を示した。

B) レポーター細胞に 0.3  $\mu$ g/ml 抗 LT $\beta$ R 抗体刺激を加え、RelB と mCherry の挙動をタイムラプスで追跡した。上図に RelB が振動した細胞 (Oscillating) と RelB が 1 度だけ核移行した細胞 (Single event) と RelB が核移行し、核内に維持された細胞 (Nuclear retention) の mCherry の経時的な発現量を示した。下図は、mCherry の曲線下面積をそれぞれの細胞について計算し、図に示した。

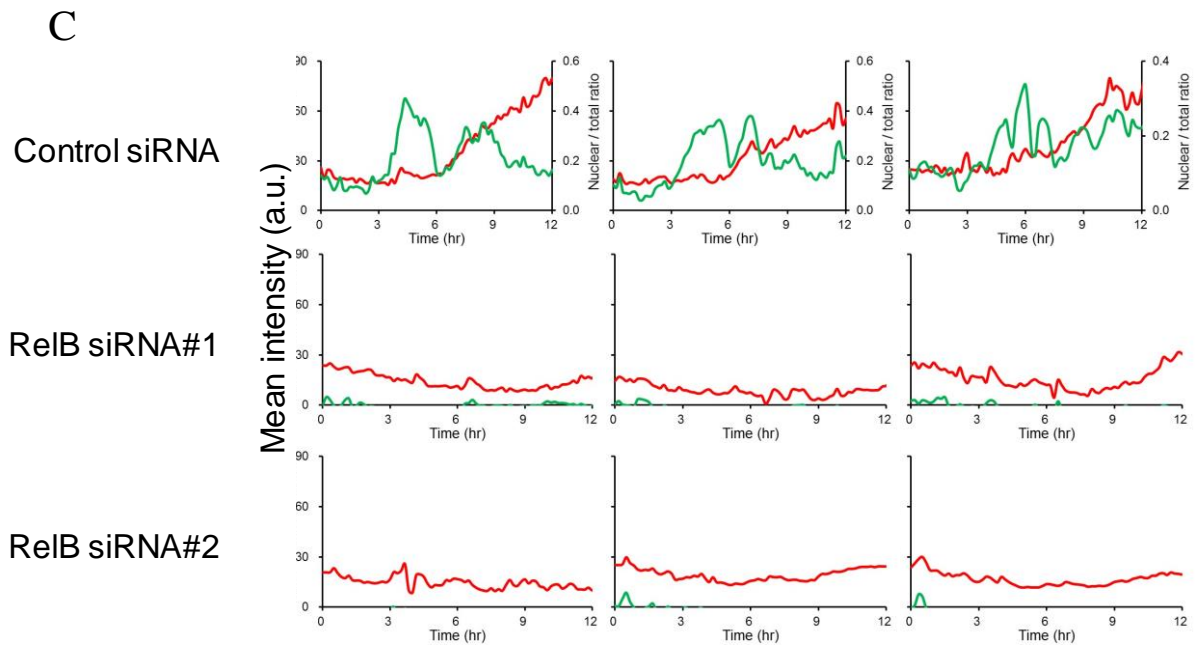
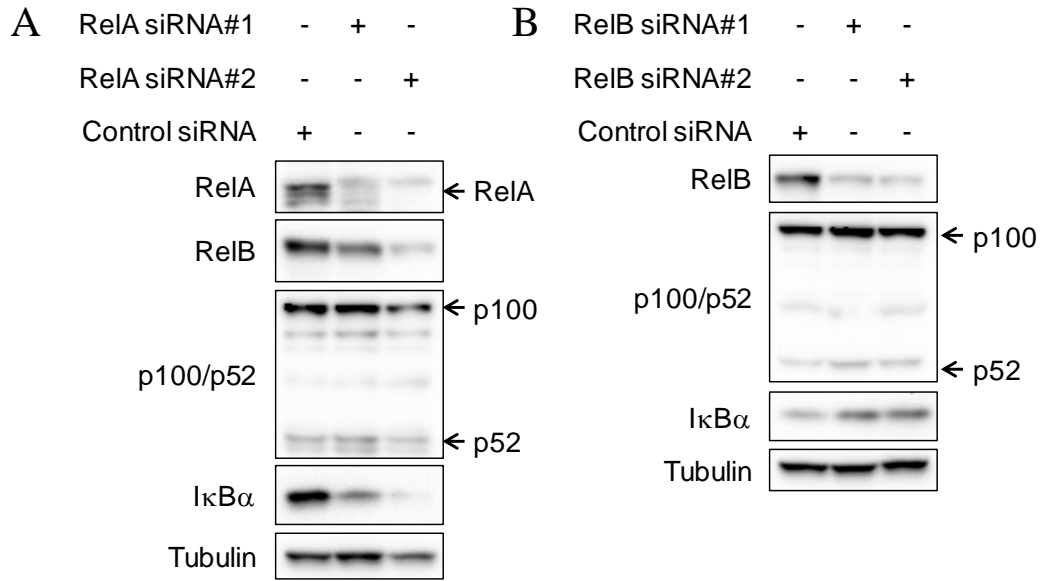
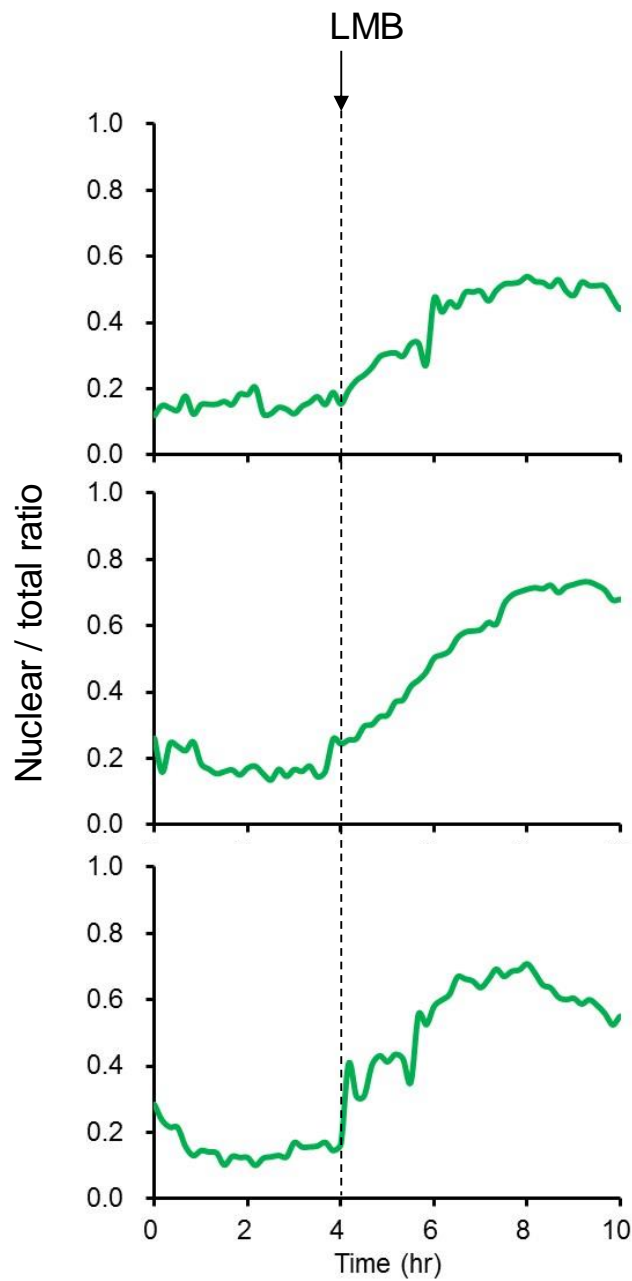
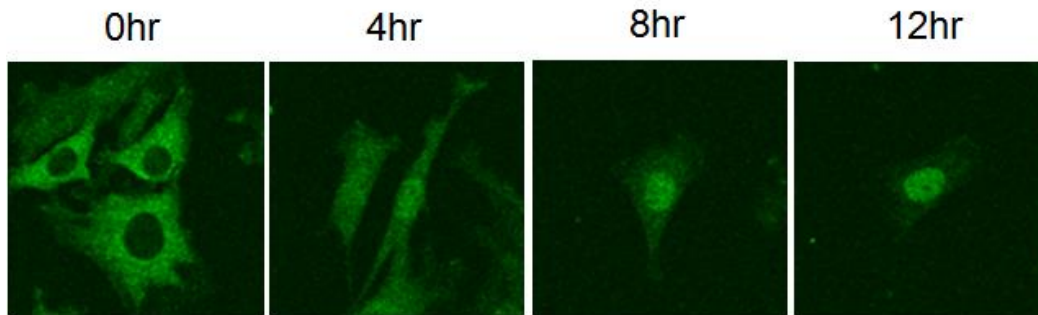


図 19 LT $\beta$ R 経路の NF- $\kappa$ B 転写活性における RelA, RelB の役割の解析

- A) RelA を標的とした 2 種類の siRNA を 24 時間毎に 2 回 MEF に導入し、ウエスタンブロット法で RelA、RelB、p100、I $\kappa$ B $\alpha$  の発現を確認した。
- B) RelB を標的とした 2 種類の siRNA を 24 時間毎に 2 回 MEF に導入し、ウエスタンブロット法で RelB、p100、I $\kappa$ B $\alpha$  の発現を確認した。
- C) RelB を発現抑制したレポーター細胞に 0.3  $\mu$ g/ml 抗 LT $\beta$ R 抗体刺激を加え、RelB と mCherry の挙動をタイムラプスで追跡した。Control siRNA 導入細胞は、典型的な RelB 振動細胞の mCherry の誘導と RelB の挙動を図に示した。

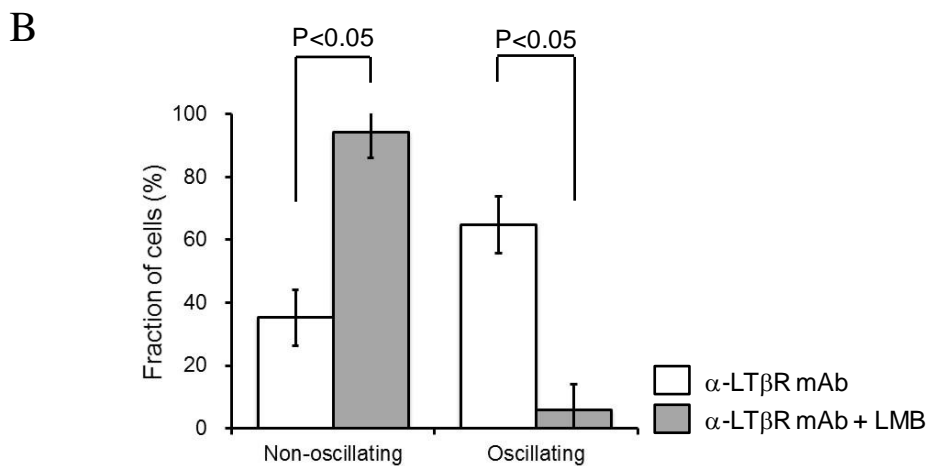
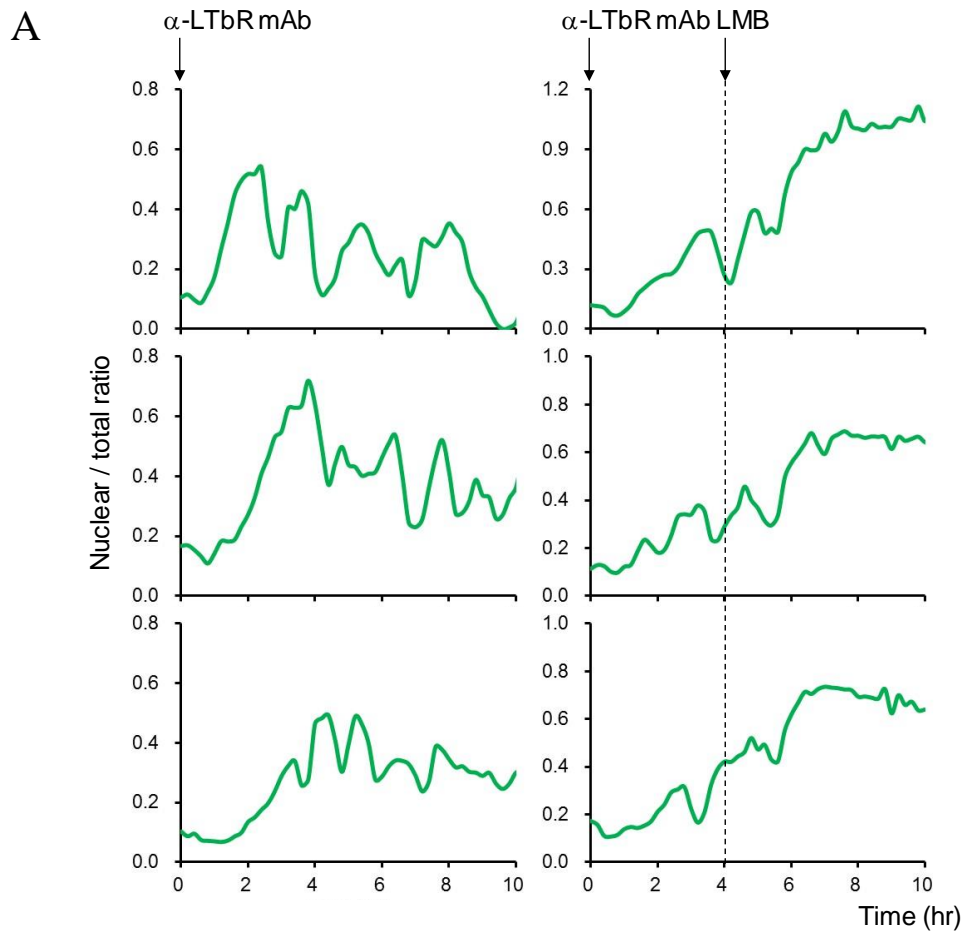




**図 20 Leptomycin B 処理による定常状態での RelB の蓄積**

撮影開始後 4 時間で 1 ng/ml Leptomycin B (LMB) を MEF に処理した。下図に典型的な細胞のプロファイルを 3 例示した。





**図 21 Leptomycin B 処理による RelB 振動の抑制**

- A) MEF に 0.3  $\mu$ g/ml 抗 LT $\beta$ R 抗体刺激を加え、4 時間タイムラプスで RelB の挙動を撮影した。その後、速やかに 1 ng/ml LMB を処理し、再びタイムラプスで撮影した。4 時間の抗 LT $\beta$ R 抗体刺激で RelB が核移行した細胞について解析を行った。左図は振動をした細胞の典型例を示した。右図は LMB を処理した細胞の典型例を示した。
- B) 刺激後 4 時間で核移行した細胞の中での振動をした細胞 (Oscillating) と振動しなかった細胞 (Non-oscillating) の割合を示した。

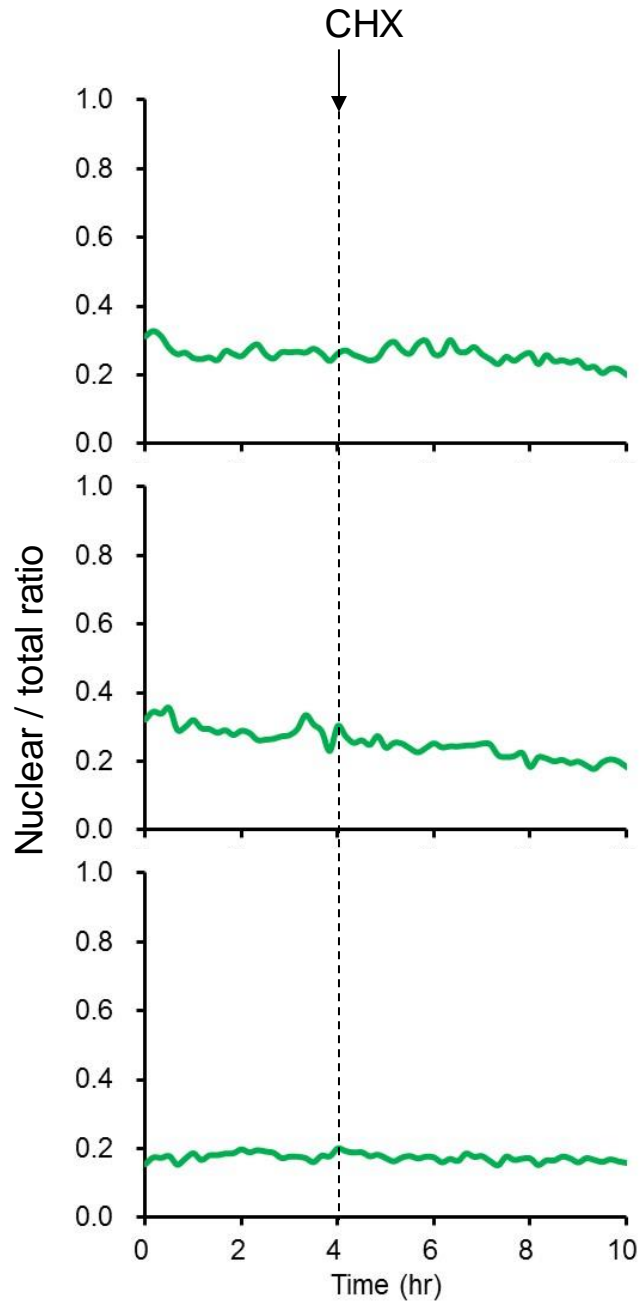


図 22 無刺激状態の RelB への Cycloheximide 処理の影響

撮影開始後 4 時間で 1 ng/ml Cycloheximide (CHX) を MEF に処理した。下図に典型的な細胞のプロファイルを 3 例示した。

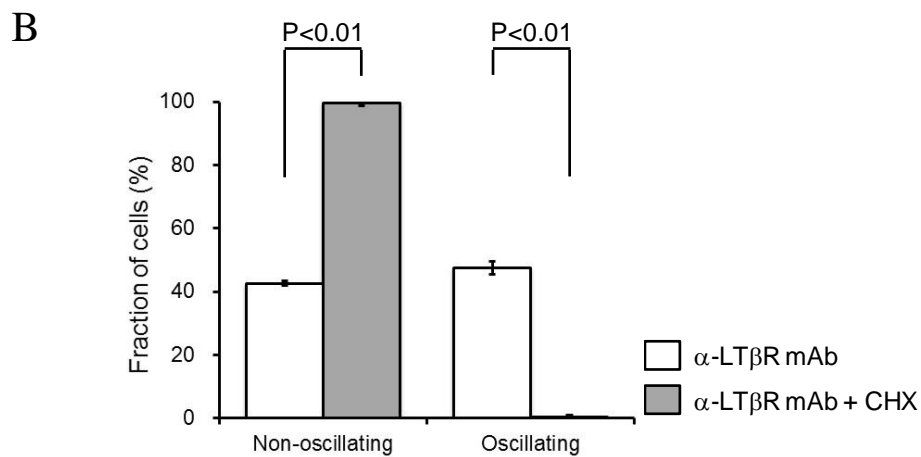
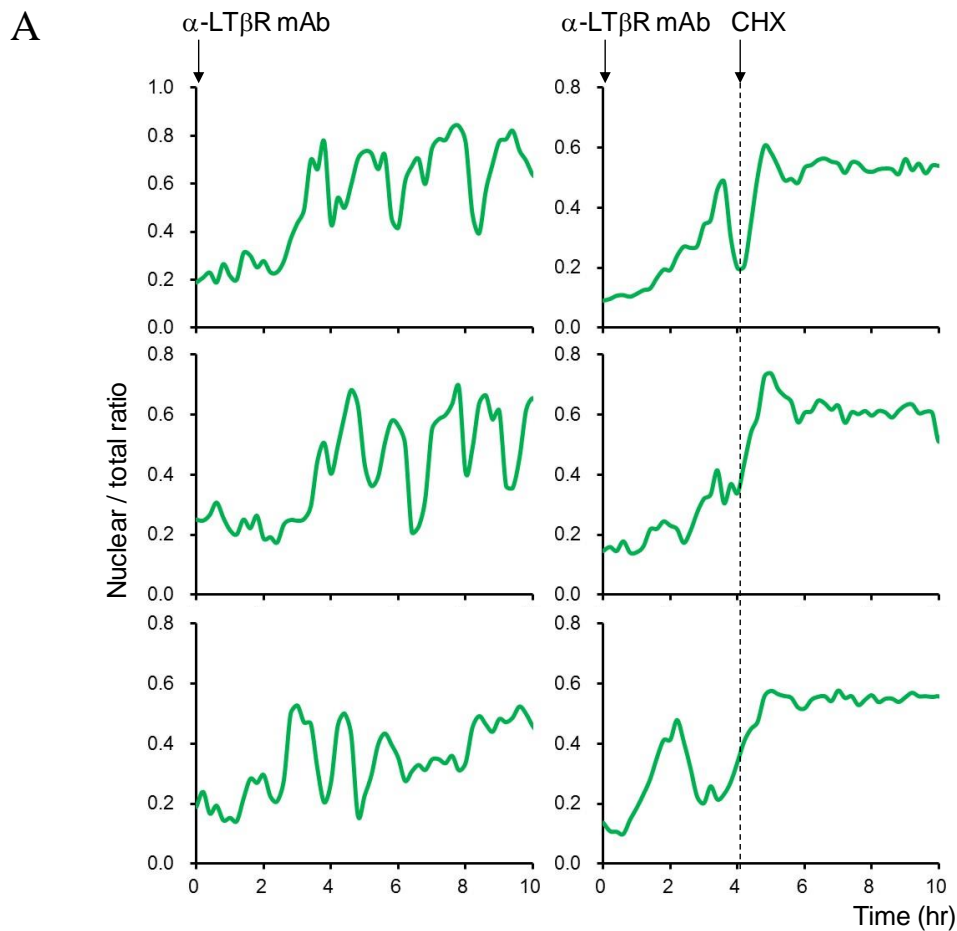
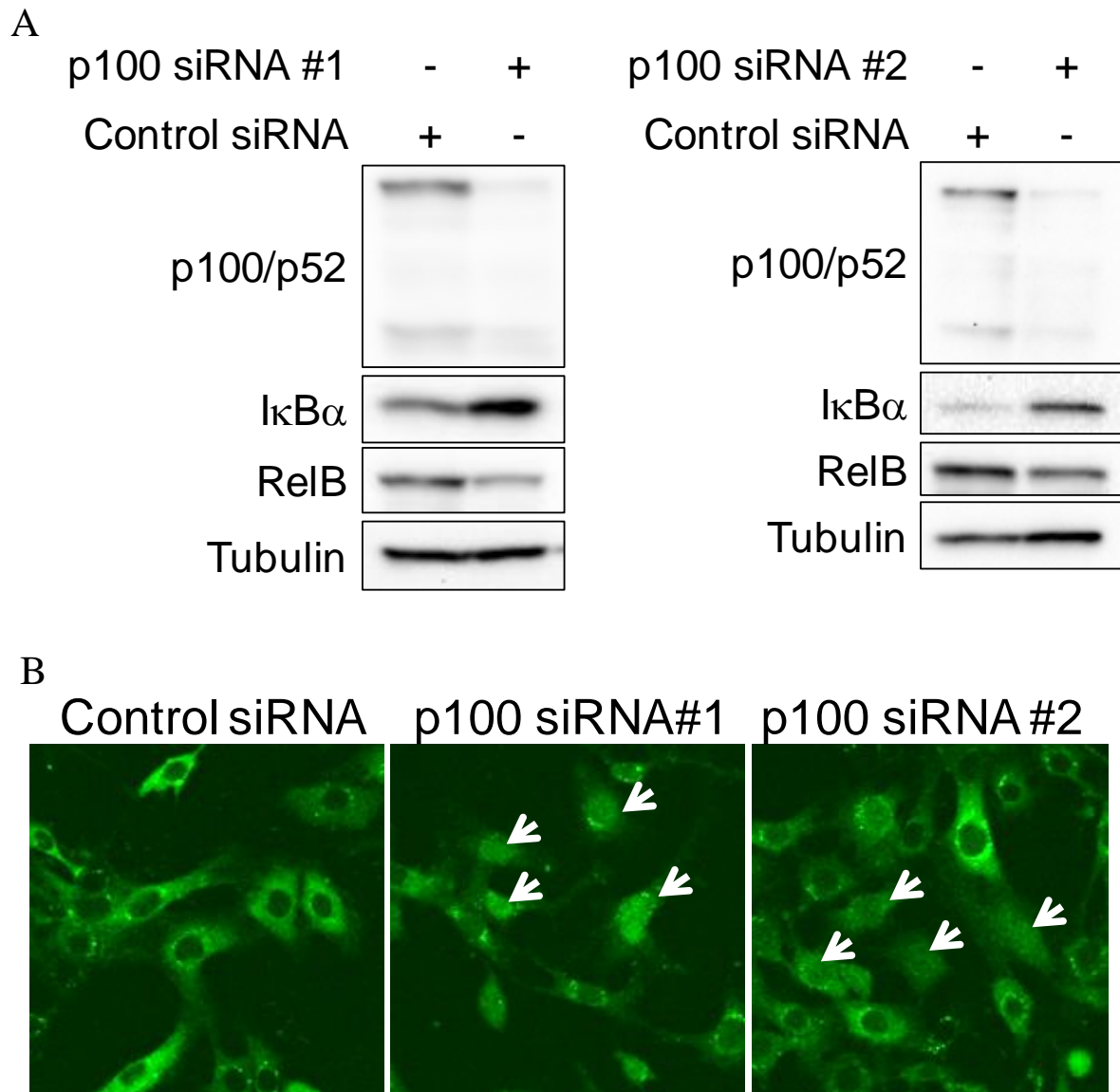


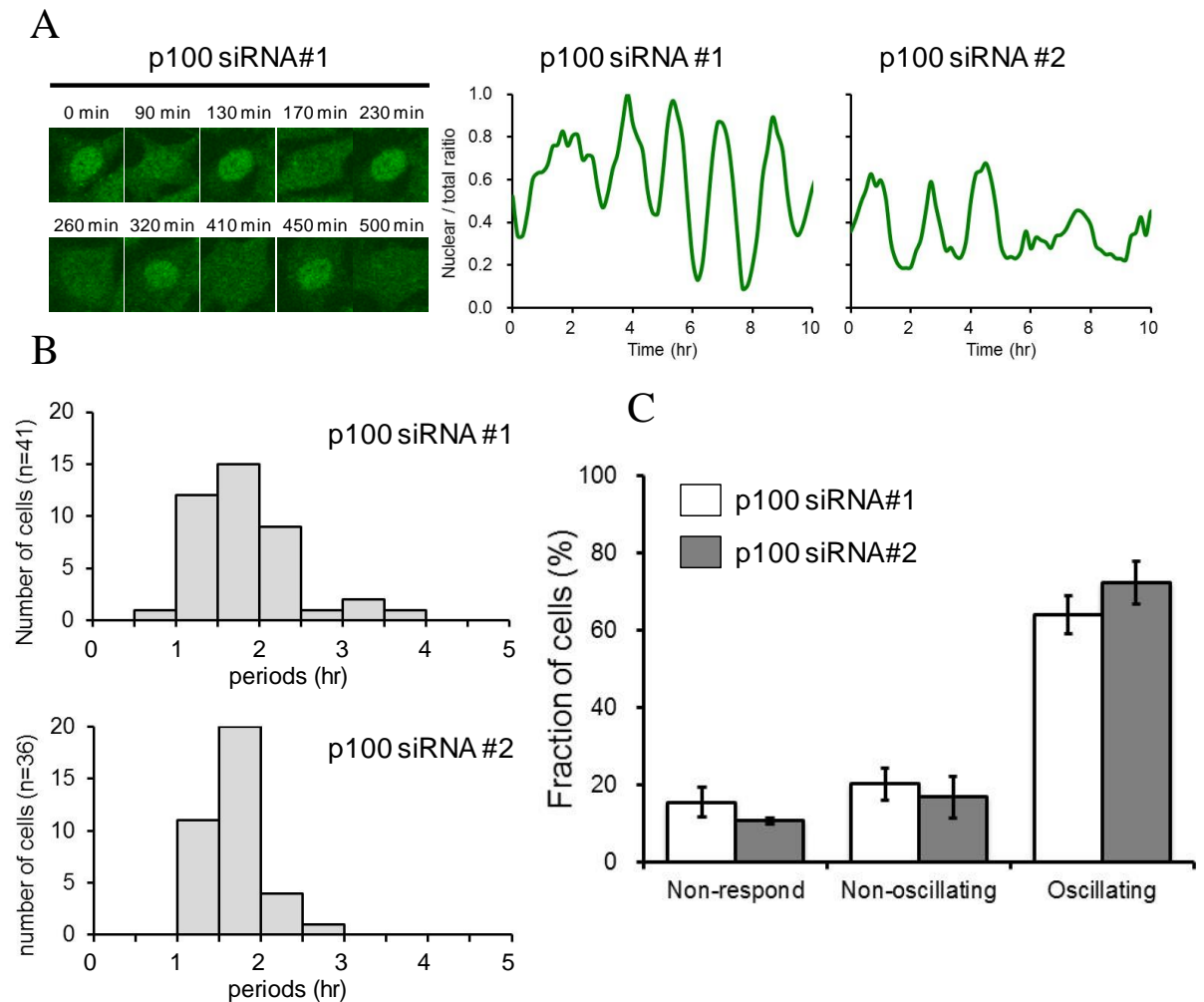
図 23 Cycloheximide 処理による RelB 振動の抑制

- A) MEF に 0.3  $\mu\text{g/ml}$  抗 LT $\beta$ R 抗体刺激を加え、4 時間タイムラプスで RelB の挙動を撮影した。その後、速やかに 2.5  $\mu\text{g/ml}$  CHX を処理し、再びタイムラプスで撮影した。4 時間の抗 LT $\beta$ R 抗体刺激で RelB が核移行した細胞について核と細胞全体の蛍光量を測定した。左図は振動をした細胞の典型例を示した。右図は CHX を処理した細胞の典型例を示した。
- B) 刺激後 4 時間で核移行した細胞の中での振動をした細胞 (Oscillating) と振動しなかった細胞 (Non-oscillating) の割合を示した。



**図 24 p100 発現抑制による RelB の核移行**

- A) p100 を標的とした 2 種類の siRNA を MEF に導入し、48 時間後にウエスタンブロット法で p100、IκBα、RelB の発現を確認した。
- B) p100 を標的とした 2 種類の siRNA を MEF に導入し、48 時間後に共焦点顕微鏡で RelB の局在を観察した。白矢印は、RelB が核内に局在している細胞を示す。20 倍の対物レンズで撮影した。



**図 25 p100 発現抑制による RelB の自律振動**

- A) 配列の異なる 2 種類の p100 siRNA を MEF に導入し、タイムラプスで RelB の挙動を追跡した。RelB が振動している細胞について。上図は p100 siRNA#1 を導入した細胞の連続写真を示した。右図には 2 種類の siRNA を導入した細胞の典型的プロファイルを示した。
- B) p100 siRNA #1 を導入した細胞について、41 個の典型的な振動を示す細胞についてフーリエ変換で周期を同定し、周期の分布を表した(上図)。p100 siRNA #2 を導入した細胞について、36 個の典型的な振動を示す細胞についてフーリエ変換で周期を同定し、周期の分布を表した(下図)。
- C) p100 siRNA #1 または、#2 を導入した細胞について画面内で振動した細胞 (Oscillating) と RelB が核移行したが振動しなかった細胞 (Non-oscillating) 、RelB が核移行しなかった細胞 (Non-respond) の割合を示した。

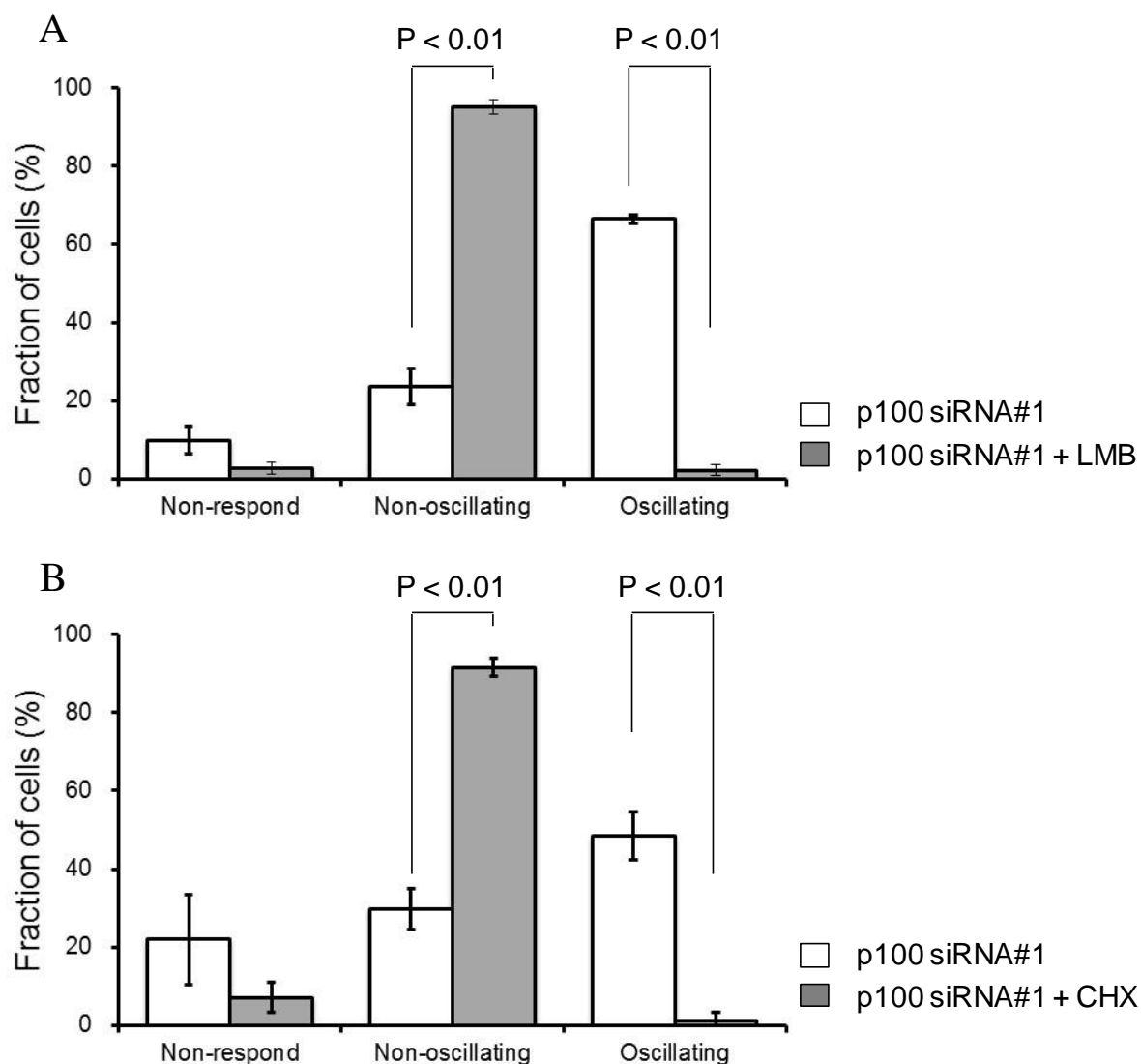


図 26 LMB 処理、CHX 処理による RelB の自律振動の抑制 (siRNA#1)

- A) p100 siRNA #1 を導入した MEF に 1 ng/ml LMB を処理し、タイムラプスで RelB の挙動を撮影した。画面内の振動した細胞について解析した。RelB が振動した細胞 (Oscillating) と RelB が核移行したが振動しなかった細胞 (Non-oscillating) と RelB が核移行しなかった細胞 (Non-respond) の割合を示した。
- B) p100 siRNA #1 を導入した MEF に 2.5  $\mu$ g/ml CHX を処理し、タイムラプスで RelB の挙動を撮影した。RelB が振動した細胞 (Oscillating) と RelB が核移行したが振動しなかった細胞 (Non-oscillating) と RelB が核移行しなかった細胞 (Non-respond) の割合を示した。

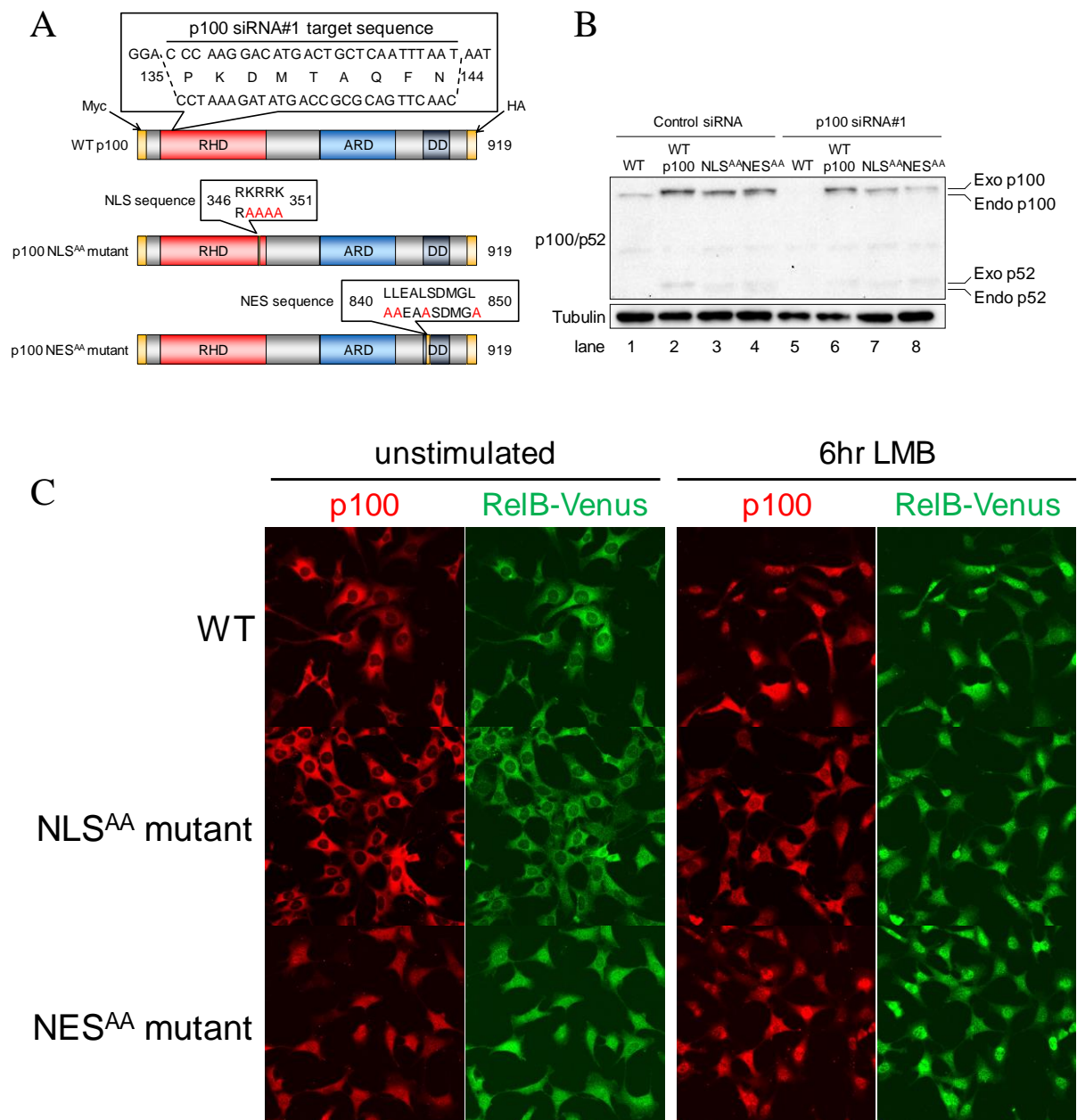
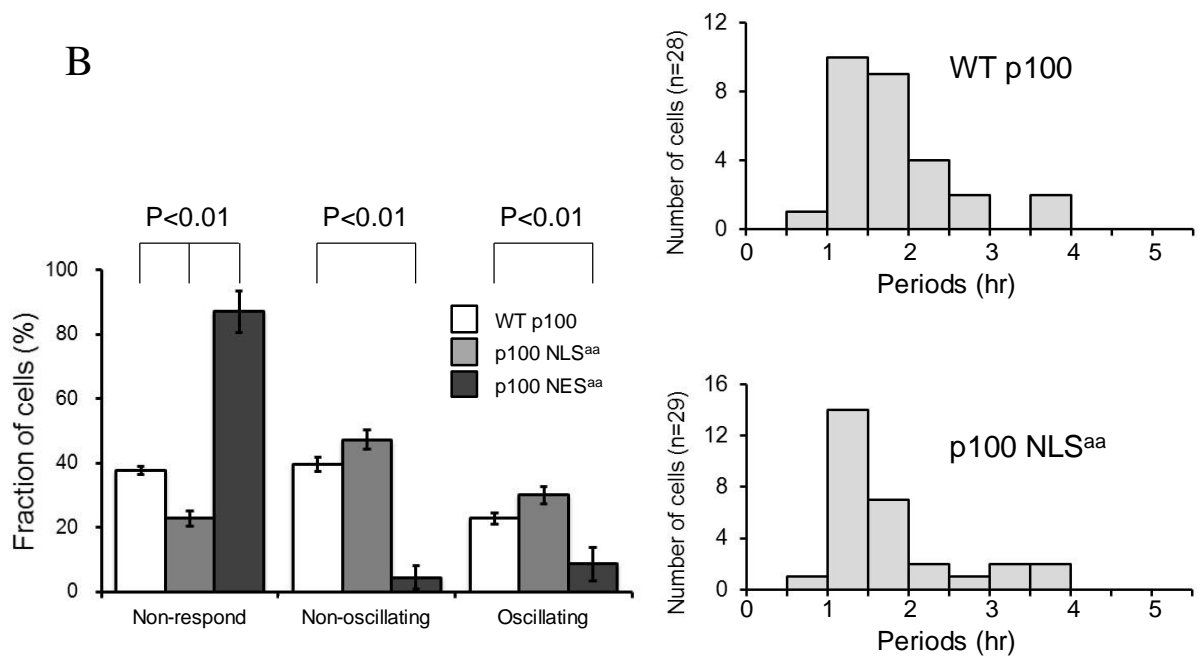
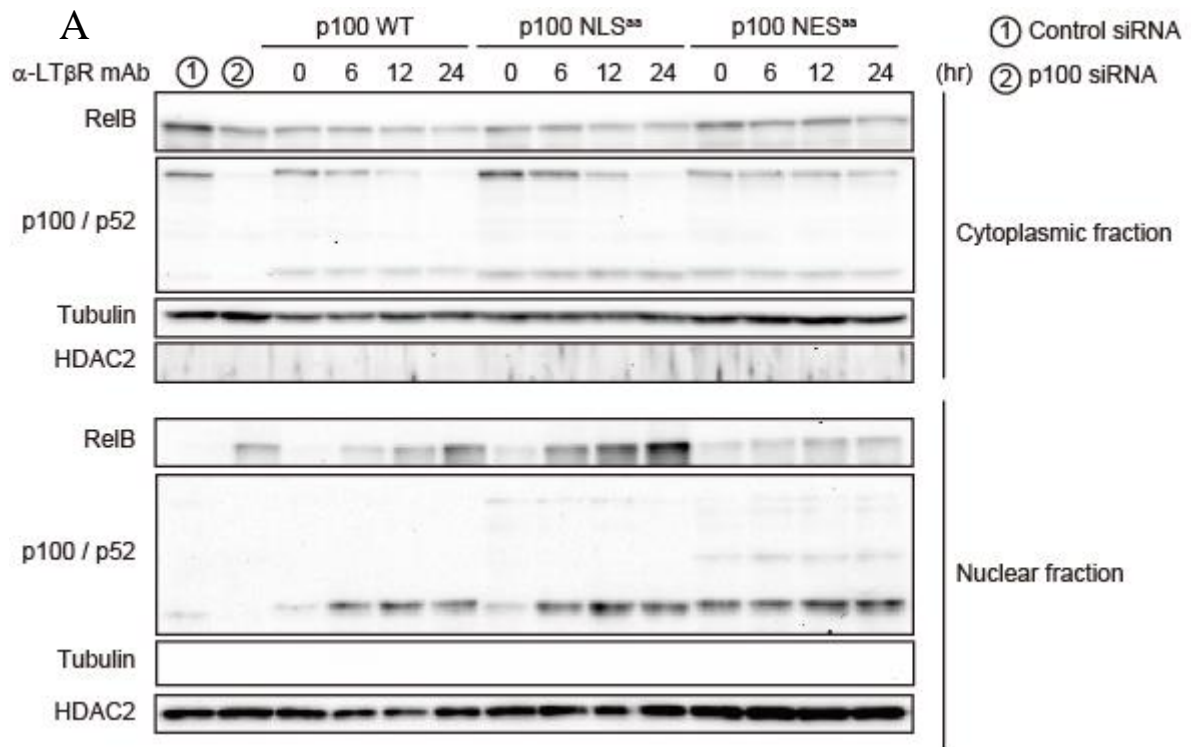


図 27 p100 変異体の作製

- A) p100 siRNA#1 耐性野生型 p100 と p100 NLS または NES の変異体の作製模式図を示した。
- B) p100 変異体を発現させた MEF に siRNA を処理することで、内在性の p100 を発現抑制させた。この細胞の p100 をウエスタンブロット法で確認した。
- C) p100 変異体を発現させた MEF に siRNA を処理し、内在性の p100 を発現抑制させた。この細胞を免疫染色し、RelB と p100 の局在を観察した。左は無刺激、右は 1 ng/ml LMB を 6 時間処理した細胞を示した。20 倍の対物レンズで観察した。

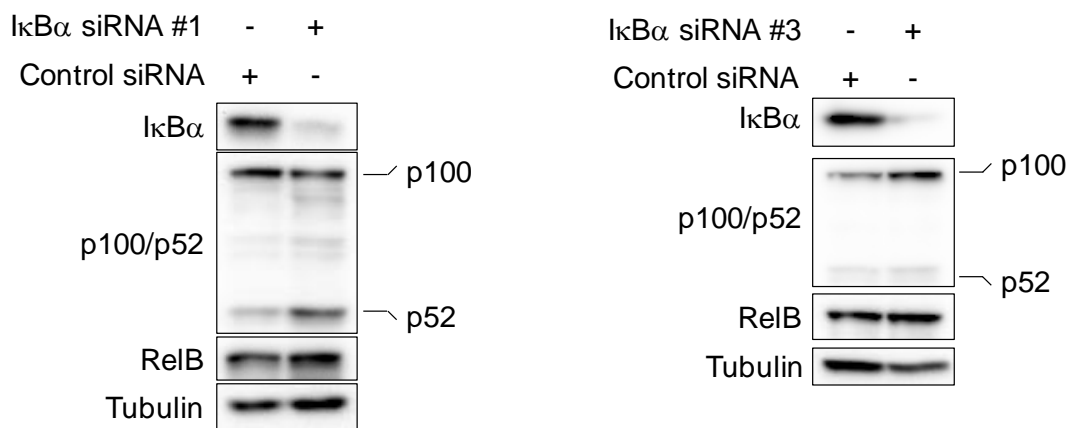




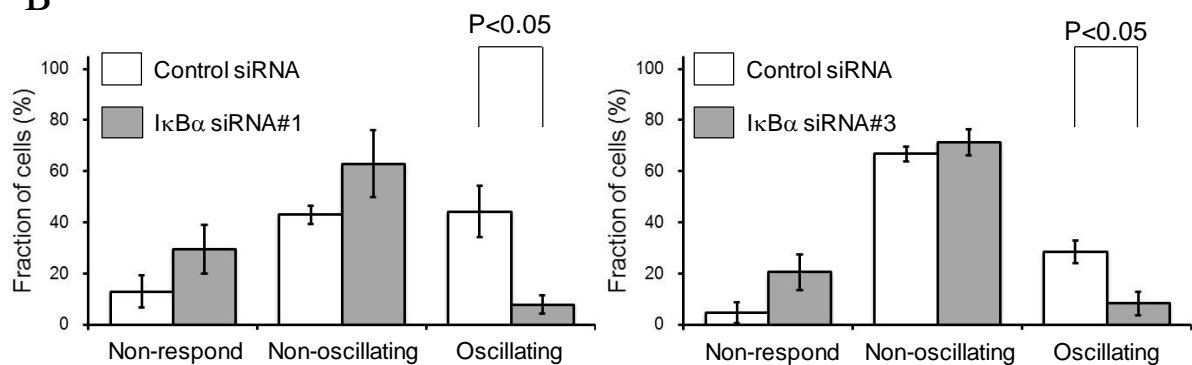
## 図 28 p100 発現による RelB の自律振動の抑制

- A) p100 変異体を発現させた MEF に siRNA を処理することで、内在性の p100 を発現抑制した。この細胞に 0.3  $\mu\text{g/ml}$  抗 LT $\beta$ R 抗体で表示の時間刺激し、その後細胞を回収した。細胞を細胞質画分と核画分に分離し、p100, RelB をウエスタンブロット法で確認した。細胞質画分のマーカーに Tubulin、核画分のマーカーに HDAC2 を使用した。
- B) p100 変異体を発現させた MEF に siRNA を処理することで、内在性の p100 を発現抑制した。この細胞に 0.3  $\mu\text{g/ml}$  抗 LT $\beta$ R 抗体で表示の時間刺激し、タイムラプスで RelB の挙動を追跡した。左図は、RelB が振動した細胞 (Oscillating) と RelB が核移行したが、振動しなかった細胞 (Non-oscillating) と RelB が核移行しなかった細胞 (Non-respond) の割合を示した。右図は、Wild-type p100 と p100 NLS<sup>aa</sup> 変異体発現細胞の RelB 振動の周期をフーリエ変換で同定し示した。

A

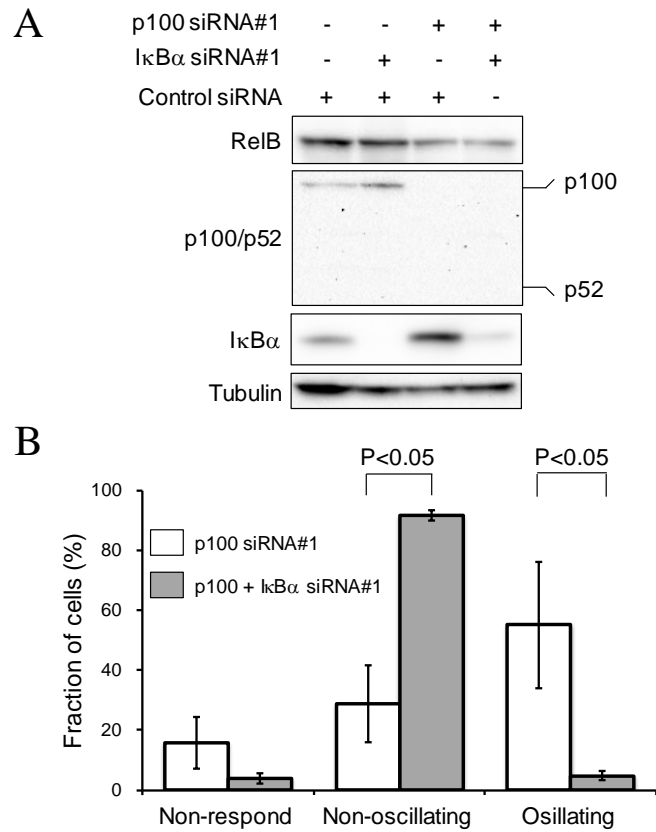


B



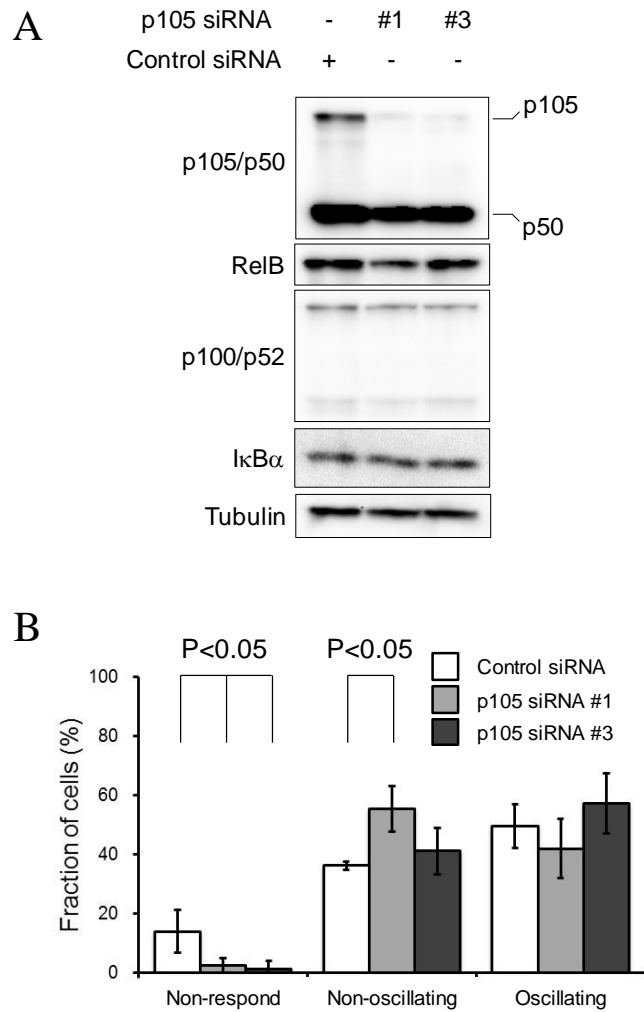
**図 29 IκBα発現抑制による RelB 振動の抑制**

- A) 配列の異なる 2 種類の IκBα siRNA を MEF に導入し、48 時間後にウエスタンブロット法で p100、IκBα、RelB の発現を確認した。
- B) IκBα発現抑制細胞に 0.3 μg/ml 抗 LTβR 抗体刺激を加え、RelB の挙動をタイムラプスで観察した。画面内で振動した細胞 (Oscillating) と RelB が核移行したが振動しなかった細胞 (Non-oscillating)、RelB が核移行しなかった細胞 (Non-respond) の割合を示した。



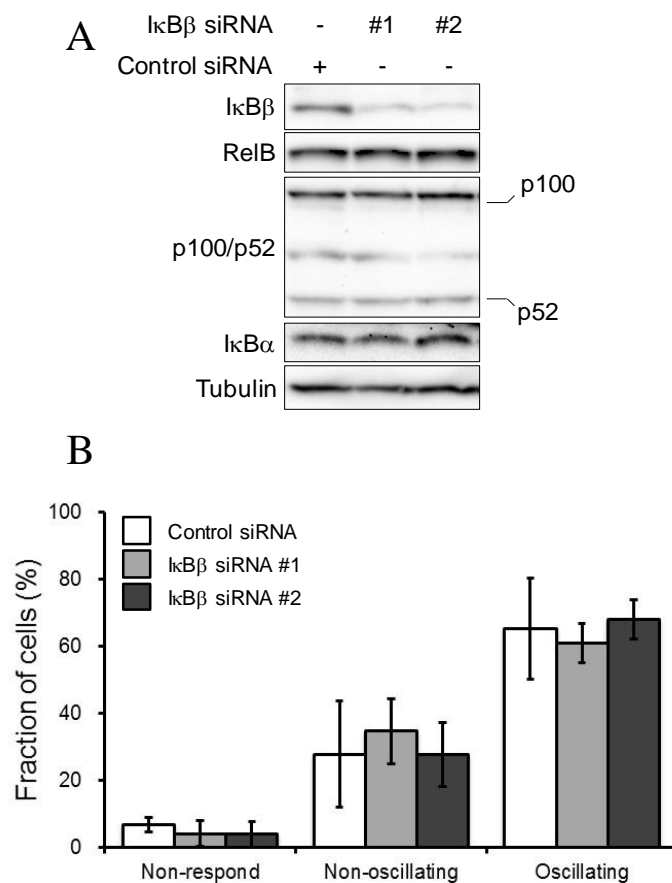
**図 30 p100 と I $\kappa$ B $\alpha$ 発現抑制細胞の RelB 自律振動の抑制 (siRNA#1)**

- A) p100 と I $\kappa$ B $\alpha$ を標的とした siRNA を MEF に 24 時間毎に 2 回導入し、48 時間後にウエスタンブロット法で RelB、p100、I $\kappa$ B $\alpha$ の発現を確認した。
- B) p100、I $\kappa$ B $\alpha$ 発現抑制細胞の RelB の挙動をタイムラプスで追跡した。RelB が振動した細胞 (Oscillating) と RelB が核移行したが、振動しなかった細胞 (Non-oscillating) と RelB が核移行しなかった細胞 (Non-respond) の割合を示した。



**図 31 p105 発現抑制細胞の RelB の振動の解析**

- A) p105 を標的とした siRNA を MEF に 24 時間毎に 2 回導入し、48 時間後にウエスタンブロット法で p105、RelB、p100、IκBα の発現を確認した。
- B) p105 発現抑制細胞に 0.3 μg/ml 抗 LTβR 抗体刺激を加え、RelB の挙動をタイムラプスで追跡した。RelB が振動した細胞 (Oscillating) と RelB が核移行したが、振動しなかった細胞 (Non-oscillating) と RelB が核移行しなかった細胞 (Non-respond) の割合を示した。



### 図 32 IkB $\beta$ 発現抑制細胞の RelB の振動の解析

- A) IkB $\beta$ を標的とした siRNA を MEF に 24 時間毎に 2 回導入し、48 時間後にウエスタンブロット法で IkB $\beta$ 、RelB、p100、IkB $\alpha$ の発現を確認した。
- B) IkB $\beta$ 発現抑制細胞に 0.3  $\mu$ g/ml 抗 LT $\beta$ R 抗体刺激を加え、RelB の挙動をタイムラプスで追跡した。RelB が振動した細胞 (Oscillating) と RelB が核移行したが、振動しなかった細胞 (Non-oscillating) と RelB が核移行しなかった細胞 (Non-respond) の割合を示した。

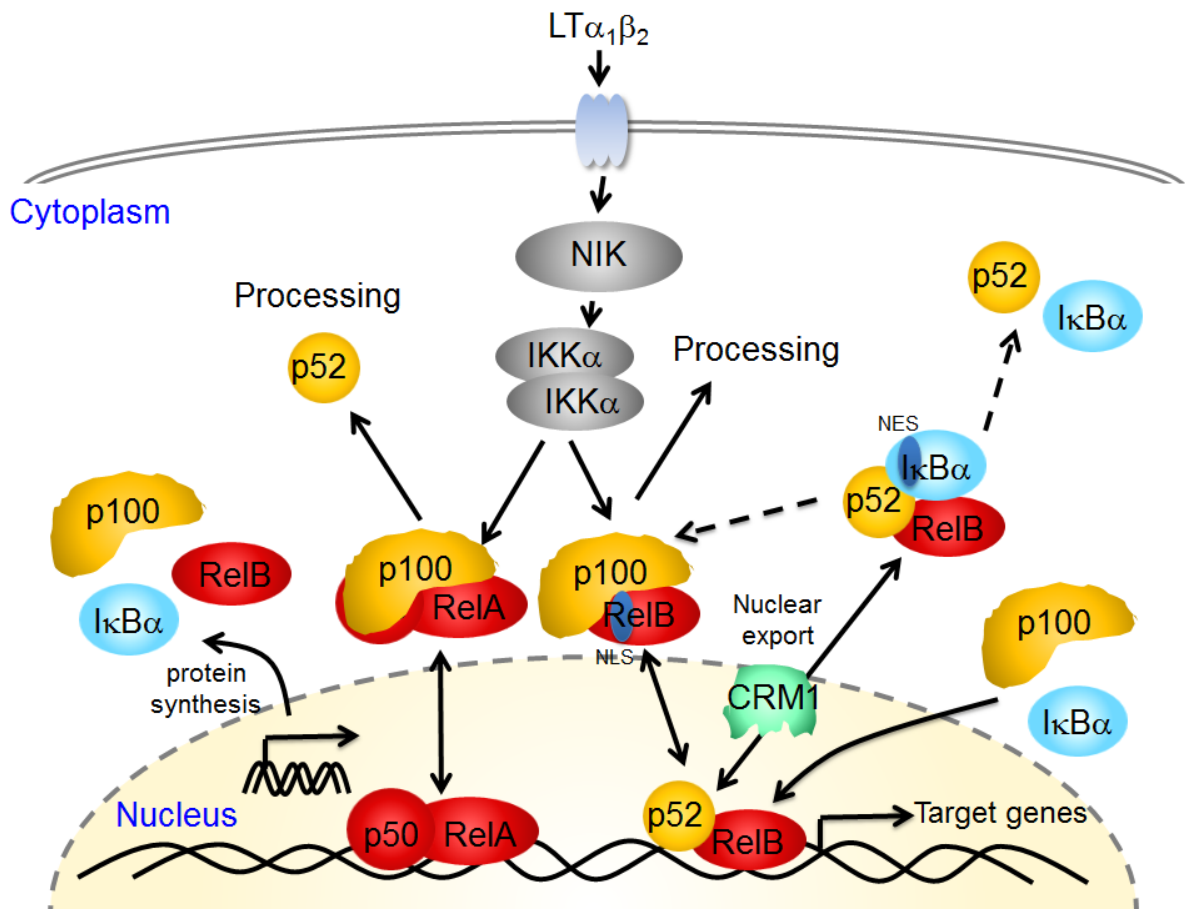


図 33  $LT\beta R$  シグナルの RelB 振動のモデル図

## 第七章 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御指導、御高配を賜りました  
東京大学医科学研究所 分子発癌分野 教授 井上純一郎博士  
に謹んで感謝の意を評します。

本研究を遂行するにあたり、貴重な御助言、御指導をして下さいました  
東京大学医科学研究所 腫瘍数理分野 教授 市川一寿博士  
に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、貴重な御助言を下さいました  
東京大学医科学研究所 分子発癌分野 准教授 秋山泰身博士  
東京大学医科学研究所 アジア感染症研究拠点 特任講師 合田仁博士  
千葉大学薬学研究院 分子細胞生物学教室 助教 山口憲孝博士  
国際医療研究センター研究所 分子炎症制御プロジェクト 反町研究室 上級研究  
員 大島大輔博士  
東京大学医科学研究所 分子発癌分野 助教 田口祐博士  
に深く感謝いたします。

また、研究への御助言や激励を頂きました分子発癌分野の先輩方、同輩、後輩  
に感謝いたします。更に、不肖な息子を常に暖かく見守ってくれた両親、祖母、祖  
父に深く感謝いたします。  
最後に、本研究のために尊い犠牲となったマウスの存在をここに明記すると共に深  
く追悼の意を表します。

## 第八章 引用文献

1. M. S. Hayden, S. Ghosh, Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**, 344-362 (2008).
2. S. C. Sun, Non-canonical NF-κB signaling pathway. *Cell Res* **21**, 71-85 (2011).
3. A. Hoffmann, A. Levchenko, M. L. Scott, D. Baltimore, The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* **298**, 1241-1245 (2002).
4. D. E. Nelson *et al.*, Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science* **306**, 704-708 (2004).
5. L. Ashall *et al.*, Pulsatile stimulation determines timing and specificity of NF-kappaB-dependent transcription. *Science* **324**, 242-246 (2009).
6. S. L. Werner, D. Barken, A. Hoffmann, Stimulus specificity of gene expression programs determined by temporal control of IKK activity. *Science* **309**, 1857-1861 (2005).
7. M. W. Covert, T. H. Leung, J. E. Gaston, D. Baltimore, Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science* **309**, 1854-1857 (2005).
8. T. K. Lee *et al.*, A noisy paracrine signal determines the cellular NF-kappaB response to lipopolysaccharide. *Sci Signal* **2**, ra65 (2009).
9. S. Tay *et al.*, Single-cell NF-kappaB dynamics reveal digital activation and analogue information processing. *Nature* **466**, 267-271 (2010).
10. G. Liao, M. Zhang, E. W. Harhaj, S. C. Sun, Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J Biol Chem* **279**, 26243-26250 (2004).
11. B. J. Zarnegar *et al.*, Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol* **9**, 1371-1378 (2008).
12. S. Vallabhapurapu *et al.*, Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling. *Nat Immunol* **9**, 1364-1370 (2008).
13. J. E. Vince *et al.*, IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* **131**, 682-693 (2007).
14. B. Razani *et al.*, Negative feedback in noncanonical NF-kappaB signaling modulates NIK stability through IKKalpha-mediated phosphorylation. *Sci Signal* **3**, ra41 (2010).



15. B. B. Aggarwal, Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **3**, 745-756 (2003).
16. J. L. Browning *et al.*, Lymphotoxin beta, a novel member of the TNF family that forms a heteromeric complex with lymphotoxin on the cell surface. *Cell* **72**, 847-856 (1993).
17. M. Worm, R. S. Geha, CD40 ligation induces lymphotoxin alpha gene expression in human B cells. *Int Immunol* **6**, 1883-1890 (1994).
18. J. L. Browning *et al.*, Characterization of surface lymphotoxin forms. Use of specific monoclonal antibodies and soluble receptors. *J Immunol* **154**, 33-46 (1995).
19. J. Young *et al.*, Lymphotoxin-alpha-beta heterotrimers are cleaved by metalloproteinases and contribute to synovitis in rheumatoid arthritis. *Cytokine* **51**, 78-86 (2010).
20. C. F. Ware, Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu Rev Immunol* **23**, 787-819 (2005).
21. K. Schneider, K. G. Potter, C. F. Ware, Lymphotoxin and LIGHT signaling pathways and target genes. *Immunol Rev* **202**, 49-66 (2004).
22. P. S. Norris, C. F. Ware, The LT beta R signaling pathway. *Adv Exp Med Biol* **597**, 160-172 (2007).
23. R. Shinkura *et al.*, Alymphoplasia is caused by a point mutation in the mouse gene encoding Nf-kappa b-inducing kinase. *Nat Genet* **22**, 74-77 (1999).
24. G. Xiao, E. W. Harhaj, S. C. Sun, NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell* **7**, 401-409 (2001).
25. E. Dejardin *et al.*, The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* **17**, 525-535 (2002).
26. S. Basak *et al.*, A fourth IkappaB protein within the NF-kappaB signaling module. *Cell* **128**, 369-381 (2007).
27. M. H. Sung *et al.*, Sustained oscillations of NF-kappaB produce distinct genome scanning and gene expression profiles. *PLoS One* **4**, e7163 (2009).
28. G. Testa *et al.*, Engineering the mouse genome with bacterial artificial chromosomes to create multipurpose alleles. *Nat Biotechnol* **21**, 443-447 (2003).
29. K. Sakai, J. Miyazaki, A transgenic mouse line that retains Cre recombinase activity in mature oocytes irrespective of the cre transgene transmission. *Biochem Biophys Res Commun* **237**, 318-324 (1997).
30. F. Weih *et al.*, Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities

- in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. *Cell* **80**, 331-340 (1995).
31. F. Weih *et al.*, Both multiorgan inflammation and myeloid hyperplasia in RelB-deficient mice are T cell dependent. *J Immunol* **157**, 3974-3979 (1996).
  32. D. Carrasco, R. P. Ryseck, R. Bravo, Expression of relB transcripts during lymphoid organ development: specific expression in dendritic antigen-presenting cells. *Development* **118**, 1221-1231 (1993).
  33. T. Akiyama *et al.*, Dependence of self-tolerance on TRAF6-directed development of thymic stroma. *Science* **308**, 248-251 (2005).
  34. L. Ashall *et al.*, Pulsatile stimulation determines timing and specificity of NF-kappaB-dependent transcription. *Science* **324**, 242-246 (2009).
  35. D. G. Spiller, C. D. Wood, D. A. Rand, M. R. White, Measurement of single-cell dynamics. *Nature* **465**, 736-745 (2010).
  36. D. Mullassery, C. A. Horton, C. D. Wood, M. R. White, Single live-cell imaging for systems biology. *Essays Biochem* **45**, 121-133 (2008).
  37. T. K. Lee, M. W. Covert, High-throughput, single-cell NF- $\kappa$ B dynamics. *Curr Opin Genet Dev* **20**, 677-683 (2010).
  38. N. Geva-Zatorsky *et al.*, Oscillations and variability in the p53 system. *Mol Syst Biol* **2**, 2006.0033 (2006).
  39. N. Geva-Zatorsky, E. Dekel, E. Batchelor, G. Lahav, U. Alon, Fourier analysis and systems identification of the p53 feedback loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13550-13555 (2010).
  40. G. Lahav *et al.*, Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells. *Nat Genet* **36**, 147-150 (2004).
  41. M. H. Sung *et al.*, Switching of the relative dominance between feedback mechanisms in lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B signaling. *Sci Signal* **7**, ra6 (2014).
  42. L. V. Britanova, V. J. Makeev, D. V. Kuprash, In vitro selection of optimal RelB/p52 DNA-binding motifs. *Biochem Biophys Res Commun* **365**, 583-588 (2008).
  43. M. H. Sung *et al.*, Sustained oscillations of NF-kappaB produce distinct genome scanning and gene expression profiles. *PLoS One* **4**, e7163 (2009).
  44. D. E. Nelson *et al.*, Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science* **306**, 704-708 (2004).
  45. L. Busino *et al.*, Fbxw7 $\alpha$ - and GSK3-mediated degradation of p100 is a pro-survival mechanism in multiple myeloma. *Nat Cell Biol* **14**, 375-385 (2012).
  46. N. J. Solan, H. Miyoshi, E. M. Carmona, G. D. Bren, C. V. Paya, RelB

- cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J Biol Chem* **277**, 1405-1418 (2002).
47. R. Fagerlund, K. Melén, X. Cao, I. Julkunen, NF-kappaB p52, RelB and c-Rel are transported into the nucleus via a subset of importin alpha molecules. *Cell Signal* **20**, 1442-1451 (2008).
  48. G. Liao, S. C. Sun, Regulation of NF-kappaB2/p100 processing by its nuclear shuttling. *Oncogene* **22**, 4868-4874 (2003).
  49. V. F. Shih *et al.*, Control of RelB during dendritic cell activation integrates canonical and noncanonical NF- $\kappa$ B pathways. *Nat Immunol* **13**, 1162-1170 (2012).
  50. T. Seki *et al.*, Visualization of RelB expression and activation at the single-cell level during dendritic cell maturation in Relb-Venus knock-in mice. *J Biochem*, (2015).
  51. A. A. Beg, W. C. Sha, R. T. Bronson, S. Ghosh, D. Baltimore, Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* **376**, 167-170 (1995).
  52. M. E. Rosenfeld, L. Prichard, N. Shiojiri, N. Fausto, Prevention of hepatic apoptosis and embryonic lethality in RelA/TNFR-1 double knockout mice. *Am J Pathol* **156**, 997-1007 (2000).
  53. R. De Lorenzi, R. Gareus, S. Fengler, M. Pasparakis, GFP-p65 knock-in mice as a tool to study NF-kappaB dynamics in vivo. *Genesis* **47**, 323-329 (2009).
  54. E. Dejardin, The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol* **72**, 1161-1179 (2006).
  55. J. Hauer *et al.*, TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2874-2879 (2005).
  56. N. S. Soysa *et al.*, The pivotal role of the alternative NF-kappaB pathway in maintenance of basal bone homeostasis and osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* **25**, 809-818 (2010).
  57. S. Vaira *et al.*, RelB is the NF-kappaB subunit downstream of NIK responsible for osteoclast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3897-3902 (2008).
  58. T. Akiyama *et al.*, The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance. *Immunity* **29**, 423-437 (2008).

59. Y. Hikosaka *et al.*, The cytokine RANKL produced by positively selected thymocytes fosters medullary thymic epithelial cells that express autoimmune regulator. *Immunity* **29**, 438-450 (2008).
60. S. Basak, V. F. Shih, A. Hoffmann, Generation and activation of multiple dimeric transcription factors within the NF-kappaB signaling system. *Mol Cell Biol* **28**, 3139-3150 (2008).
61. R. Marienfeld *et al.*, Signal-specific and phosphorylation-dependent RelB degradation: a potential mechanism of NF-kappaB control. *Oncogene* **20**, 8142-8147 (2001).
62. M. Neumann *et al.*, Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  is a crucial mediator of signal-induced RelB degradation. *Oncogene* **30**, 2485-2492 (2011).
63. H. J. Maier, R. Marienfeld, T. Wirth, B. Baumann, Critical role of RelB serine 368 for dimerization and p100 stabilization. *J Biol Chem* **278**, 39242-39250 (2003).
64. H. Authier *et al.*, IKK phosphorylates RelB to modulate its promoter specificity and promote fibroblast migration downstream of TNF receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 14794-14799 (2014).
65. G. Bonizzi *et al.*, Activation of IKK $\alpha$  target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers. *EMBO J* **23**, 4202-4210 (2004).
66. C. Johnson, D. Van Antwerp, T. J. Hope, An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of IkappaB $\alpha$ . *EMBO J* **18**, 6682-6693 (1999).
67. T. T. Huang, N. Kudo, M. Yoshida, S. Miyamoto, A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IkappaB $\alpha$  controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappaB/IkappaB $\alpha$  complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 1014-1019 (2000).
68. W. F. Tam, L. H. Lee, L. Davis, R. Sen, Cytoplasmic sequestration of rel proteins by IkappaB $\alpha$  requires CRM1-dependent nuclear export. *Mol Cell Biol* **20**, 2269-2284 (2000).
69. J. C. Lo *et al.*, Coordination between NF-kappaB family members p50 and p52 is essential for mediating LT $\beta$ R signals in the development and organization of secondary lymphoid tissues. *Blood* **107**, 1048-1055 (2006).
70. Z. B. Yilmaz, D. S. Weih, V. Sivakumar, F. Weih, RelB is required for Peyer's patch development: differential regulation of p52-RelB by lymphotoxin and TNF. *EMBO J* **22**, 121-130 (2003).
71. S. M. Wuerzberger-Davis *et al.*, Nuclear export of the NF- $\kappa$ B inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  is required for proper B cell and secondary lymphoid tissue formation.

*Immunity* 34, 188-200 (2011).