

博士論文

新規ケミカルプルダウン法によるASK1結合因子の同定と解析

曾我 真弓

目次

序論	3
方法	9
結果	17
考察	24
総括	31
参考文献.....	32
謝辞	37
図表	39

序論

細胞は日々様々なストレスにさらされているため、恒常性を保つために適切なストレス応答が必要となる。Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路は細胞内シグナル伝達経路の一つであり、MAPK kinase kinase (MAP3K)、MAPK kinase (MAP2K)、MAPK を逐次リン酸化することにより活性化し、最終的に活性化された MAPK は転写因子などの基質をリン酸化することで細胞の増殖、分化、細胞死などの応答を誘導する (Fig. 1)。MAP3K はこのシグナル伝達経路の最上流に位置するため、細胞内外の様々な刺激を受容し、下流へとシグナルを伝達するセンサーのような役割を担う¹。

当研究室で同定され、詳細な解析が行われてきたストレス応答性キナーゼ ASK1 は JNK 及び p38MAPK 経路の上流に位置する MAP3K 分子の一つである。これまでに、活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) や腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor- α : TNF- α)、小胞体ストレスなどにより活性化され、適切なストレス応答を引き起こすことで、環境変化に適応するために重要な役割を担っていることが報告されている²⁻⁵。ASK1 は様々な組織、細胞に普遍的に発現していることが知られており (Fig. 2A)、組織や細胞種ごとに多種多様な機能に関与していることが報告されている (Fig. 2B)。樹状細胞においては、菌体構成成分である LPS 処置により ASK1 が活性化し、サイトカイン産生を促進することが分かっており、敗血症モデルにおいて ASK1 欠損マウスは生存率が顕著に増加するという表現型を示す⁶。また、胃における ASK1 は遺伝子発現を制御することによって細胞増殖を正に制御し胃癌を誘発する一方³、肝臓においては肝細胞のアポトーシスを誘導することでむしろ癌を抑制する機能を担っている⁴。また、ASK1 欠損マウスではアンジオテンシン II によって誘導される心肥大が抑制されることから、心臓においても何らかの細胞機能を制御しているものと考えられる⁵。このように ASK1 は組織、細胞種ごとに多種多様な生理応答を制御することで、複数の病態に関与する (Fig. 2B)。

当研究室では近年、脂肪組織における ASK1 の機能に着目した解析が精力的に行われており、脂肪組織における ASK1 の機能が徐々に解明されつつある。

脂肪組織には褐色脂肪組織と白色脂肪組織の二種類の組織が存在する。白色脂肪組織はエネルギーを脂肪として貯蔵する機能を有する一方、褐色脂肪組織は体熱産生を誘導することで積極的にエネルギーを消費する機能を有している⁷。褐色脂肪細胞は発達したクリステを有するミトコンドリアを多く持ち、Uncoupling protein 1 (UCP1) という脱共役タンパク質が特異的に発現していることにより熱産生を盛んに行うことが可能になっている⁸。

当研究室での解析から、未成熟な褐色脂肪細胞において ASK1 は β アドレナリン受容体作動薬処置により活性化し、下流 MAPK である p38 の活性化を介して UCP1 の発現を誘導することで褐色脂肪細胞成熟化の一端を担っていることが明らかにされている。UCP1 が熱産生を引き起こす分子実体であることから、ASK1 欠損褐色脂肪細胞では UCP1 の発現量低下に伴い熱産生能が低下していると予想された。実際に細胞内温度を測定することが可能なプローブを用いた実験から、ASK1 欠損初代培養褐色脂肪細胞では β アドレナリン受容体作動薬処置依存的な熱産生能が低下していることが明らかになった。また、マウス個体における褐色脂肪組織活性を評価するべく、 β アドレナリン受容体作動薬処置を行った際の酸素消費量の測定を行った結果、ASK1 欠損マウスでは β アドレナリン受容体作動薬処置依存的な酸素消費量の増加が抑制されることが明らかとなっている。脂肪組織特異的な ASK1 欠損マウスにおいても同様の結果を示すことも分かっている。これらの結果は、ASK1 が脂肪組織において β アドレナリン受容体作動薬依存的な熱産生及び代謝亢進に寄与することを示唆する⁹。

さらに、成熟した初代培養褐色脂肪細胞においても β アドレナリン受容体作動薬処置依存的な IL-6 や MCP1 といった炎症性サイトカイン等の発現誘導に ASK1 が寄与することがわかっている¹⁰。このように褐色脂肪細胞において、ASK1 は熱産生のみならず、種々の分泌タンパク質の発現制御にも関与している。しかしながら、これら褐色脂肪細胞における ASK1 機能の詳細な分子メカニズムは解明されていない。

また、個体における代謝応答において ASK1 がどのような機能を有するかについて他の検討が行われている。その一つとして ASK1 欠損マウスに高脂肪食負荷を行い、耐糖能を比較する実験が行われている。その結果、ASK1 欠損マウスでは野生型と比較して耐糖能が低下することが明らかとなっている¹⁰。耐糖能が低下するメカニズムとしては様々な要因が考えられるが、現状、どの組織における ASK1 のどのような機能が関与しているかは分かっていない。現在、組織特異的 ASK1 欠損マウスを用いた検討が行われている。ASK1 欠損マウスの耐糖能が低下する原因の一つとして、脂肪組織や炎症性細胞での炎症応答の変化が挙げられる。炎症性サイトカインとして知られる IL-6 や MCP1 は肥満下の脂肪組織から分泌され、インスリン抵抗性の獲得に働くことが知られている^{11,12}。脂肪細胞から産生された炎症性サイトカインはマクロファージの脂肪組織への浸潤や、脂肪組織に常在するマクロファージの炎症性マクロファージ (M1 マクロファージ) への分化を促進する^{13,14}。脂肪組織に集積した M1 マクロファージは脂肪細胞と共に炎症性サイトカインを産生することで炎症応答を増幅し、炎症を慢性化させる。近年では、T 細胞も脂肪組織での炎症において重要な機能を担っていることが分かっている

¹³。肥満状態の脂肪組織に多く浸潤していることが知られている細胞障害性 CD8⁺T 細胞の産生するケモカインや炎症性サイトカイン産生がマクロファージや脂肪細胞に作用することでさらなる脂肪組織炎症の亢進に繋がる^{13,15}。一方で、制御性 T 細胞 (Treg) が脂肪炎症の抑制に寄与しているとの報告がある^{13,16}。最新の知見では、脂肪組織における Treg への分化には IL-33 が重要であり、IL-33 の投与により肥満状態の脂肪組織で減少する Treg 細胞の数が増加し、血糖値の上昇が抑制されることが明らかになっている¹⁷。このように脂肪組織での炎症応答の制御はインスリン感受性の低下や耐糖能の低下に対する治療戦略になり得るという点で非常に興味深いものである。細菌感染時に炎症を惹起することが知られているいくつかのシグナル伝達経路が、脂肪における炎症応答にも関与することが報告されている¹⁸⁻²⁰。細菌の細胞壁成分である LPS により活性化されることが知られている Toll like receptor 4 (TLR4) の欠損マウスでは高脂肪食負荷依存的なインスリン抵抗性の獲得が抑制されることが報告されている^{18,19}。また細菌細胞壁成分の分解産物により活性化される NOD 経路も脂肪組織の炎症に関わることが知られている。NOD1 及び NOD2 を欠損したマウスでは高脂肪食負荷後の血中炎症性サイトカイン量が減少し、それに伴いインスリン抵抗性が改善することが知られている²⁰。これらの細菌感染応答時に機能する受容体は高脂肪食負荷時には長鎖脂肪酸に応答し、活性化することで炎症性サイトカイン発現誘導を介して脂肪組織での炎症応答を惹起するものと考えられている。過去の報告から ASK1 は樹状細胞における炎症性サイトカイン産生応答を正に制御することが明らかになっており、耐糖能悪化の表現型とは相反する結果となっている。しかしながら、脂肪細胞において ASK1 がどのように炎症応答に関与するかに関してはこれまで不明であったため、脂肪細胞における ASK1 の詳細な機能解析を行うことが、ASK1 欠損マウスの高脂肪食応答のメカニズム解明に繋がることが期待される。

当研究室ではゲル濾過クロマトグラフィーを用いた解析から ASK1 が数メガダルトンの非常に大きな複合体を形成していることを明らかにしている²¹。この複合体は ASK1 を活性化する刺激である過酸化水素刺激により、さらに大きな複合体に変化することも分かっている²¹。ASK1 の単量体の大きさは 150 kDa 程度であるため、この複合体には ASK1 以外の何らかの分子が内包されているものと考えられる。

多くのシグナル伝達分子やその制御因子はシグナル複合体 "signalosome (シグナロソーム)" を形成していることが知られている^{21,22}。シグナロソームの形成により、細胞が刺激を感知した後に素早くそのシグナル経路に特異的なシグナルを誘導することが可能になる。古くから知られるシグナロソームとして IKK 複合体が存在する。IKK α 、IKK β 、

IKK γ (NEMO)、IKB α はシグナロソームを形成することで NF κ B 経路の活性化のために重要な機能を担っていることが知られている²²。また、アポトーシス誘導に重要なシグナロソームとして "Apoptosome"²³、免疫応答において炎症性サイトカインである IL-1 β の産生において重要な "Inflammasome" などの特定の生理的応答を誘導する為に必要なシグナロソームも知られている²⁴。近年では、マクロファージにおける CD40 が環境によって異なるシグナロソームを形成することが示されている。この報告では、細胞膜のコレステロール量の減少により TRAF2、TRAF3、TRAF5 を含む IL-12 発現誘導シグナロソームの形成が阻害され、TRAF6 を含む IL-10 発現誘導シグナロソームの形成が促進されるとの主張がなされている²⁵。このように、含まれる分子の種類によってシグナロソーム特異的なシグナルが制御され、適切な生理応答を導くことに繋がるものと考えられる。

上述した通り ASK1 は組織、細胞ごとに多種多様な生理応答を誘導することが知られている。ASK1 の形成する複合体 "ASK1 シグナロソーム" に関しても他のシグナロソーム同様、含まれる分子の種類によってシグナル経路や生理応答の特異性が制御されている可能性が考えられる。このことから、ASK1 シグナロソームの中には組織、細胞種ごとに特異的な機能を制御する未知の鍵分子が内包されていることが期待される。

しかしながら、これまでに行われてきた ASK1 の結合因子解析は HEK293A 細胞などの培養細胞を用いた解析のみであり、組織、細胞種に特異的な ASK1 複合体構成因子の解析はこれまでに試みられていない²⁶。多くの細胞種において共通する普遍的な ASK1 の制御メカニズムを解析する上では優れた方法であると言えるが、特定の組織、細胞種でのみ生じる現象を捉えることは出来ない。さらに、これまでに行われてきた ASK1 の結合因子解析は過剰発現した ASK1 を用いたものであった。そのため、非特異的に ASK1 に結合する分子が多く同定されてしまうという問題点が考えられた。また、過剰発現時にはタグの結合したタンパク質を過剰発現しており、タグの存在により本来結合する因子が結合出来ない状態になる可能性も考えられた。そこで私は初代培養褐色脂肪細胞において内在性の ASK1 複合体を精製することで、ASK1 結合因子を同定し、脂肪細胞での ASK1 の詳細な機能解析に繋げようと考えた。

近年、細胞内からタンパク複合体を精製し結合因子を質量分析計にて同定する実験手法は日々改良が行われている。しかしながら、主流となるタンパク複合体精製手法はタグを結合させた過剰発現タンパクを用いるものであり、内在性のタンパク質を精製対象として取り扱った報告は多くない²⁷。内在性複合体を単離精製する技術は発展途上であり、特に内在性キナーゼを高純度で精製する手法は一般的に確立されていない。複合体

の単離精製方法として、簡便であるといった理由から、抗体を用いたプルダウン法が最も有効であると認識されているが、内在性複合体は最も困難な精製対象である。近年の総説内でも言及されているが、精製後の溶出は質量分析計解析に用いるサンプル作製において重要なステップである。溶出の際に SDS サンプルバッファーで溶出を行うとビーズ等に非特異的に結合した分子も溶出されてしまうため、例えば FLAG タグで免疫沈降した場合は大過剰の FLAG ペプチドを用いた競合的な溶出が推奨されている²⁷。しかしながら抗原抗体反応が強い場合、ペプチドでの競合による溶出が困難である。

当研究室ではこれまでに内在性のキナーゼを精製するための新規ケミカルプルダウン法の開発が行われてきた。キナーゼの ATP 結合ポケットにはゲートキーパー領域が存在することによりかさ高い ATP アナログである 1NA-PP1 侵入することが出来ない。しかしながら、Shokat 法ではゲートキーパー領域などにアミノ酸変異を加えることで 1NA-PP1 の ATP 結合ポケットへの結合が可能になることが報告されている²⁸。このようにゲートキーパー領域などに変異を加え、1NA-PP1 が結合することが可能になったキナーゼのことを Analog sensitive (as) キナーゼと呼ぶ (Fig. 3)。ASK1 に関しても V745I/M761A/S828A の三ヶ所にアミノ酸変異を加えることで as 型に改変出来ることが知られている。当研究室では既に as 型に改変された ASK1 (as-ASK1) がノックインされたマウス (Analog sensitive kinase allele ノックインマウス: ASKA マウス) が存在する。新規ケミカルプルダウン法ではこの ASKA マウス由来の初代培養細胞または組織より内在性 as-ASK1 を精製することが可能になる。ASKA マウス由来の初代培養細胞または組織の溶解液と 1NA-PP1 を結合させたビーズとをインキュベーションすると、as-ASK1 の ATP 結合部位には 1NA-PP1 が侵入することが出来るため、内在性の as-ASK1 を精製することが出来る。溶解液中に含まれるその他のキナーゼは as 型に改変されていないため、1NA-PP1 はそれらの酵素の ATP 結合ポケットに結合することが出来ない。そのため本精製法では as-ASK1 のみが精製され、その他のキナーゼは精製されないことが想定される。その後、過剰量の 1NA-PP1 を加えることでビーズより as-ASK1 を溶出することが可能である (Fig. 4)。このように競合的なペプチドを用いずにビーズより as-ASK1 を溶出可能な点に本精製の利点がある。

特異的な抗体を用いずに、細胞内より特異的なタンパク質を精製するためには、タンパク質にタグを付加する、又は新規ケミカルプルダウン法のように目的タンパク質に変異を加える等の目印をつける必要がある。ATP アナログを用いた新規ケミカルプルダウン法と比較して、タグの付加により目的タンパク質を区別する場合、本来結合するタンパク質との結合を阻害してしまう可能性が考えられる。一方で、ATP アナログを用いる実験系の場合、ATP 結合部位に変異を加えることにより目的タンパク質を区別

するが、変異による ATP との結合能の低下に伴う機能の低下が懸念される。過去の報告では、ゲートキーパー領域の 1 アミノ酸に変異を加え as 型に改変したチロシンリン酸化酵素 v-Src 及び Fyn は野生型と比較して 10 倍程度 ATP との結合能が低下するが、ATP との結合能を十分に保持していることが示されている²⁹。この報告からリン酸化酵素のゲートキーパー領域への変異は ATP との結合能を大幅に低下させる変異ではないことが推察される。また、他の報告では as 型に改変された ASK1 のリン酸化能に関しても検討が行われている。ASK1 の基質である MKK4 を用いた in vitro kinase assay の結果、as 型に改変した ASK1 も MKK4 をリン酸化することが可能なことが示されている。また、骨髓由来マクロファージに活性酸素刺激を行った際の ASK1 の活性化が野生型由来の細胞及び ASKA マウス由来の細胞で同等に生じることが示されている³⁰。これらの報告から as-ASK1 の変異は ASK1 機能を大幅に変化させるものではないことが示唆されており、ATP 結合部位への変異依存的な機能低下への懸念はある程度排除することが出来る。以上の点からも ATP アナログを用いた新規ケミカルプルダウン法は優れた精製法であると考えられる。

これまでの結果から、本精製法を用いることで ASKA マウス由来の線維芽細胞 (MEF) から内在性の as-ASK1 を精製することが可能なことが分かっている。そこで、私は本精製法を用いて初代培養褐色脂肪細胞より内在性の as-ASK1 複合体を精製することで、ASK1 複合体構成因子の解析に繋げようと考えた。

本研究は初代培養褐色脂肪細胞より内在性の ASK1 複合体を精製し、複合体構成因子を同定することで、脂肪細胞における ASK1 のより詳細な機能解析を行うことを目的としている。代謝応答に関する研究では個体での表現型解析に重きがおかれ、脂肪細胞内の詳細なシグナル伝達メカニズムに注目した研究は多くない。そこで、私は ASK1 を中心として、脂肪細胞における詳細なシグナル伝達メカニズムを明らかにすることで、脂肪細胞の機能や関与する病態メカニズムのより深い理解に繋げたいと考えている。

また、本研究では新規ケミカルプルダウン法を用いて組織、細胞種特異的な ASK1 複合体構成因子の同定を行う。本研究の成果によって、様々な組織、細胞種における ASK1 の新規機能解析や、ASK1 以外のキナーゼの組織、細胞種特異的な機能解析においても有用なツールとして提唱することが出来ると考えている。

方法

細胞系の培養

HEK293A 細胞は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose (DMEM、Sigma、D5796) に 10% Fetal Bovine Serum (FBS、biowest) を加えた培地で培養した。細胞は、37 °C、5% CO₂ 条件下で培養した。

初代培養褐色脂肪細胞の単離、培養、分化誘導

C57BL6/J マウスの生後 0 もしくは 1 日の新生児より、褐色脂肪組織を単離し、isolation buffer (0.123 M NaCl、5 mM KCl、1.3 mM CaCl₂、5 mM glucose、100 mM HEPES-NaOH (pH 7.2)、4% BSA) 内で保存した。解剖バサミでミンチしながら、コラゲナーゼ溶液 (1 mg/mL in isolation buffer、Collagenase for Dispersion、Wako、#034-10533) 中に移し、37°C で 50 分振盪した。溶液が白く濁ったことが確認されたら、セルストレイナー (100 μm、BD) で塊を除去し、1,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を取り除いた。沈殿物を isolation buffer で懸濁し、再度 1,000 rpm で 5 分間遠心した。上清を取り除き、DMEM high glucose (20% FBS、100 units/mL PG) で懸濁したものを 10 cm ディッシュに播種した。

約 80 %コンフルエントに達したら、 1.0×10^5 cell/mL にて、10 cm dish、6 穴プレートもしくは 24 穴プレートに播種した。100%コンフルエントに達した日を day -2 と規定し、培地交換を行った。day 0 に分化誘導培地 (DMEM high glucose containing 1 nM triiodo-L-thyronine (T3、Sigma、T5516)、20 nM insulin (Sigma、I1882)、5 mM dexamethasone (Sigma、D4902)、0.125 mM indomethacin (Sigma、I7378)、0.5 mM IBMX (Sigma、I5879)、1 mM rosiglitazone (Sigma、R2408)、20 mM HEPES-NaOH (pH 7.2)、20% FBS) に置換し、day 2 には分化促進培地 (DMEM high glucose containing 1 nM triiodo-L-thyronine (T3、Sigma、T5516)、20 nM insulin (Sigma、I1882)、20 mM HEPES-NaOH (pH 7.2)、20% FBS) に置換した。その後は 1 日おきに分化促進培地に置換した。実験には day 6 の細胞を用いている。

プラスミド作製

マウス RIPK2 は C57BL6/J マウス褐色脂肪組織由来の cDNA を用いてクローニングを行った。マウス NOD1 は C57BL6/J マウス傍精巣上体白色脂肪組織由来の cDNA を用いて、2 つの断片に分けクローニングを行った。以下に使用したプライマーの配列を記す (5'側より表記)。

mRIPK2-forward: gcgaattcgccaccatgaacggggacgccatc

mRIPK2-reverse: cgctcgagcaagctttattctgagga

mNOD1 (1-2298) -forward: gcgaattcgccaccatggaggaacacggccatcatga

mNOD1 (2298-2862) -forward: ccagataactgatatcggagcca

mNOD1 (1-2298) -reverse: tggtccgatatcagttatctgg

mNOD1 (2298-2862) -reverse: cgctcgaggaagcagatgattcttctcattct

また、mRIPK2 deletion mutant は上記プライマーに加えて以下のものを用いて行った。
その際、mRIPK2 全長のプラスミドをテンプレートとして作製した (5'側より表記)。

mRIPK2 (Kinase domain) -reverse: aatgcttaatagaacttgaa

mRIPK2 (Intermediated domain) -forward: gcgaattcgccaccatgccagttctgagaacattt

mRIPK2 (Intermediated domain) -reverse: cgctcgagtggcgctctgaaccttt

mRIPK2 (CARD domain) -forward: gcgaattcgcccaacagtggatccagag

また、アデノウイルス作製のベクターについては、3'FLAG-pENTR に挿入した mRIPK2 をコードする塩基配列を Gateway[®]Technology を用いて pAd/CMV ベクターに移すことで作製した。

上記以外のプラスミドは、過去当研究室において作製されたものを用いた。

アデノウイルスの作製・感染

アデノウイルスベクターは、ViraPower[™] アデノウイルス発現システム (Invitrogen) を用い、添付のプロトコールに従って作製した。作製したアデノウイルスは day 2 の初代培養褐色脂肪細胞に multiplicity of infection (MOI) が 25 となるように感染させ、4 日後の day 6 で実験に用いた。

プラスミド導入

DMEM (無添加) と PEI-Max (Polysciences, Inc.) を混合し室温で 5 分間静置した後、プラスミド溶液 (10 もしくは 100 ng/mL) を適量加え、さらに 15 分間静置した。その後、細胞を培養している各ウェルに混合液を添加した。プラスミド導入後 2 日の細胞を実験に用いた。

siRNA 導入

OPTI-MEM (無添加、GIBCO) と Lipofectamine[™] RNAiMax Reagent (invitrogen) を混合し室温で 5 分間静置した後、OPTI-MEM と siRNA (invitrogen、20 mM) の混合液を加

えた。さらに室温で 15 分間静置した後、細胞培養プレートに加え、その上から HEK293A 細胞または day 2 の初代培養褐色脂肪細胞の細胞懸濁液を添加した。実験には、siRNA 導入後 60 時間後の HEK293A 細胞または day 6 の初代培養褐色脂肪細胞細胞を用いた。

本論文において使用した siRNA の配列は以下の通りである。

control si #1: Stealth™ RNAi Negative Control Medium GC Duplex

control si #3: Stealth™ RNAi Negative Control Medium GC Duplex #3

hASK1 si #1 (#1278) : GCCAACACUACAGUCAGGAAUUAU

hASK1 si #2 (#1370) : UUAGAAAAACUGCCAACCUUUGAUU

hASK1 si #3 (#2780) : GACAAUGUGUUGAUUAAAUACCUACA

mRIPK2 si #1 : GCUCUUGGUGUAAAUAUCUGCACA

mRIPK2 si #3 : AUAUAGAUGAUUGUCCUCCUUCGG

試薬の処置

刺激は、基本的に 1000 倍濃縮された試薬を培地量に対して 1000 分の 1 倍量加えることにより行った。MilliQ に溶解した、CL316,243 (Santa Cruz, sc-203895)、DMSO に溶解した C12-iE-DAP (Invivogen, #tlrl-c12dap) を用いた。コントロールとしては、MilliQ もしくは DMSO (Sigma) を用いた。なお、過酸化水素刺激に関しては、100 mM に希釈した H₂O₂ (Wako) を培地量の 100 分の 1 量添加することによって行った。

細胞溶解、免疫沈降

24 穴プレート 1 ウェルあたり 150 mL、12 穴プレート 1 ウェルあたり 800 µl、もしくは 6 穴プレート 1 ウェルあたり 800 mL の IP lysis buffer +DOC (20 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、4 mM EDTA pH 8.0、1% sodium deoxycholate、1% Triton-X 100、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、5 µg/mL leupeptin)又は IP lysis buffer -DOC (20 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、4 mM EDTA pH 8.0、1% Triton-X 100、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、5 µg/mL leupeptin)を加え、10-20 分間 4 °C で振盪した。リン酸化シグナルを検出する際は、lysis buffer に PhosSTOP (Roche) 溶解液又は当研究室で作製した 25 x Phosphatase inhibitor cocktail 2 (200 mM NAF、300 mM beta-glycerophosphate、25 mM Na₃VO₄、30 mM Na₂MoO₄、125 µM Cantharidin、50 mM Imidazole) を加えた。細胞溶解液を回収し、13,500 rpm で 10-15 分間遠心した。lysate サンプルに関しては、上清に対し等量の 2 x Sample buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.8、10% bromophenol blue、36% glycerol、4 % sodium dodecyl sulfate (SDS)、10 mM dithiothreitol) を加え、98 °C で 3 分間インキュベーションすることによりサンプル化した。

免疫沈降実験においては、遠心後回収した細胞溶解液に対して、一次抗体を添加し、一晩 4 °C でインキュベーションを行った。その後、protein A/G sepharose を添加した上でさらに 2 時間 4 °C でインキュベーションを行い、lysis buffer を用いて 3-4 度洗浄した。最後に lysate サンプルと同様、2 x Sample buffer を用いてサンプル化した。ただし、抗 Flag 抗体で免疫沈降を行う際は、一次抗体の代わりに抗 Flag 抗体ビーズ (Wako、#016-22784) と 15 分間インキュベーションしたのちに、洗浄、サンプル化を行った。

なお、免疫沈降実験においては一次抗体として、control rabbit IgG (Santa Cruz、sc-2027)、control rat IgG (Santa Cruz、sc-2026)、抗 ASK1 抗体 (当研究室作製、TC003)、抗 RIPK2 抗体 (Santa Cruz、sc-20146/ H300) を用いた。

組織プロットサンプル調整

C57B6/J マウスより各組織を摘出後 PBS で洗った後に液体窒素によって凍結させた。その後各組織を用い、以下のようにサンプル化した。

イムノブロッティングに用いた組織は、IP Lysis buffer +DOC 中で、ポリトロンホモジナイザーによって破碎、溶解した。組織溶解液を 13,500 rpm で 5-10 分遠心し、上清を回収し、さらに 15 分遠心した上清を lysate サンプルとした。その後 DCTM Protein Assay Kit (BIO-RAD、500-0116JA)を用いてタンパク定量を行い、1 µg protein/µl に IP Lysis buffer +DOC で希釈した。Lysate サンプルは、希釈後の上清に対し等量の 2 x Sample buffer containing 5% 2-Mercaptoethanol (nacalai tesque、21438-82)を加え、98°Cで 3 分間インキュベーションすることによりサンプル化した。

イムノブロッティング

上記の方法で作製したサンプルを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分離した後、BioTraceTM PVDF Membrane (Pall) に転写した。転写後のメンブレンを 2% スkimミルク (雪印) を含む TBS-T (137 mM NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.1% Tween 20) に浸し、常温で 1-2 時間振盪した。その後、TBS-T で 2-3 回程度すすぎを行い、5% bovine serum albumin (岩井化学) と 0.1% NaN₃ を含む TBS-T を用いて希釈をした一次抗体溶液でパッキングした上で、4 °C で一晩以上振盪した。

パッキングしておいたメンブレンを取り出し、TBS-T ですすいだ後、2% skimミルクを含む TBS-T で希釈した二次抗体で再度パッキングをした上で、1-2 時間常温で反応させた。検出系としては、enhanced chemiluminescent (ECL) システムを用いた。

本論文において使用した抗体は以下の通りである。一次抗体として、抗 Flag 抗体 (Wako、# 012-22384/1E6)、抗 HA 抗体 (Roche、3F10)、抗 Myc 抗体 (Calbiochem、9E10)、

抗 phospho-ASK 抗体 (2T、当研究室作製³¹、抗 ASK1 抗体 (Abcam、ab45178/EP553Y)、抗 phospho-p38 (Thr180/Tyr182) 抗体 (Cell Signaling、#9211)、抗 p38 抗体 (Cell Signaling、#9228/L53F8)、抗 phospho-TAK (T184/187) 抗体 (Cell Signaling、#4508/90C7)、抗 TAK1 抗体 (Santa Cruz、M-579)、抗 RIPK2 抗体 (Cell Signaling、sc-22763/H300)、抗 I κ B α 抗体 (Santa Cruz、sc-371/C-21) を用いた。また二次抗体として、HRP 標識抗 mouse IgG 抗体 (Cell Signaling、# 7076)、HRP 標識抗 rabbit IgG 抗体 (Cell Signaling、# 7074)、HRP 標識抗 rat IgG 抗体 (Cell Signaling、# 7077)を用いた。場合により 2 次抗体として Protein A,HRP-conjugated (Thermo Fisher Scientific、#10-1023)、Protein G,HRP-conjugated (Southern Biotech)を用いた。

バンド定量

スキャナで取り込んだ jpeg ファイルを画像解析ソフト Image J で開き、[Invert]によって白黒反転を行い、指定した範囲内のシグナル強度を測定した。なお background として、バンドが存在しない位置の同一範囲内のシグナル強度も測定した。

RNA 抽出および cDNA 作製

細胞を培養した 24 穴プレート 1 穴に対し 1 mL の Isogen (ニッポンジーン) を加え、常温で 20 分間振盪することで細胞を溶解した。細胞溶解液をエッペンドルフチューブに取り、100 mL のクロロホルム (Wako) を加えた上で 15 秒程度激しく振った。4 °C、13,500 rpm で 15 分間遠心した上で上層である水層を 350 mL 程度分取し、イソプロパノール (Wako) を 500 mL 加えた上で、再度激しく振った。4 °C、13,500 rpm で 10 分間遠心することで RNA を沈殿させ、上清はデカンテーションによって取り除いた。沈殿したペレットに対して 70%エタノール (Wako、DEPQ 処理 Milli-Q で希釈) を加え、さらに 4 °C、13,500 rpm で 3 分間遠心した。沈殿を確認した上で上清をデカンテーションにより取り除き、小型遠心機で壁に付着した液体成分を集めつつ、ピペットマンを用いて完全に液滴を吸い取った。続いて、チューブの蓋を開けたまま自然乾燥させ、沈殿物が乾いたことを確認したのち、20 mL の RNase free water (TOYOBO) を加え、55 °C で 10 分間インキュベートすることによって溶解した。

吸光度を測定することによって濃度を計算し、ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて、0.5 μ g の RNA を逆転写することで cDNA を作製した。

定量 RT-PCR

LightCycler®480 Multiwell Plate 96、white (Roche、04729692001) 1 穴に対し、cDNA 溶液 2 µl、FastStart Essential DNA Green Master (Roche、06924204001) 10 µl、MilliQ 7 µl、プライマー (10 µM) 1 µl ずつ加え、LightCycler® 96 (Roche、05825926001) によって検出を行った。cDNA を希釈する際には 997 µL に MilliQ に 3 µl の Poly (A) (Sigma、10108626001) を加えた溶液を用いた。また本研究において、各遺伝子の発現量は全て S18 ribosomal protein の発現量で補正した値を用いている。

定量 RT-PCR 用のプライマーは Universal Probe Library Assay Design Center (Roche) を用いて作製した。本論文で使用した定量 RT-PCR 用のプライマー配列は以下の通りである (5'側より表記、f: forward、r: reverse)。

mCCL2#68-f、catccacgtgttggtca

mCCL2#68-r、gatcatcttgctggtgaatgagt

mTNF α #25-f、ctgtagcccacgtcgtagc

mTNF α #25-r、ttgagatccatgccgttg

mCXCL2#62-f、aaaatcatccaaaagataactgaacaa

mCXCL2#62-r、ctttggttcttcggttgagg

mIL-6#6-f、gctaccaaactggatataatcagga

mIL-6#6-r、ccaggtagctatggtactccagaa

mS18#70-f、tccagcacattttgcgagta

mS18#70-r、cagtgatggcgaaggctatt

初代培養褐色脂肪を採取に用いたマウス

全ての実験において SPF 環境下で繁殖、飼育をした C57B6/J マウスを用いた。ASK1 欠損マウス及び as-ASK1 ノックインマウス (ASKA マウス) の作製法は過去の文献に記載がある^{30,31}。

ゲル濾過クロマトグラフィー

・サンプル作製

初代培養褐色脂肪細胞又はケミカルプルダウン法により精製操作を行った後のサンプルを使用した。10 cm dish に播種した初代培養褐色脂肪細胞の上清を取り除き、500 µLのH buffer +150 mM NaCl (50 mM HEPES-KOH pH 7.5、10 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、1 mM EDTA、1 mM EGTA) を加えホモジナイズした後に、13,500 rpmにて15分間遠心し、上清をMillex®-HVフィルター、0.45 µl、PVDF、33mm、γ線滅菌済 (Millipore、

SLHV033RB)に通した。または、ケミカルプルダウン法により精製・溶出後のサンプル 50 μ lにH bufferを450 μ l 加えたものをサンプルとして用いた。

・ゲル濾過クロマトグラフィー

AKTA design 液体クロマトグラフィーシステムを使用した。カラムはSuperose 6 10/300 GL (GE Helthcare) を用いた。サンプル500 μ lをH bufferを用いて分離した。Void から18 フラクションを500 μ Lずつ回収し、100% Ethanol を1 mL加え、-20 $^{\circ}$ Cで一晩保存した後に、13,500 rpmにて20分遠心し、タンパクのエタノール沈殿を行った。上清を取り除き、1時間風乾後に、2 x Sample bufferを加え、98 $^{\circ}$ Cで3分間インキュベーションすることによりサンプル化した。

ケミカルプルダウン法

・1NA-PP1 結合ビーズの作製

20 mg/mL の NHS ビーズ (多摩川精機、TAS8848 N1141) 50 μ l に *N,N*-Dimethylformamide (DMF) (Sigma、227056) を200 μ l 加え、13,500 rpm にて5 分間遠心した。上清を取り除いた後に DMF を200 μ l 加え、ソニケーションを行った。この操作を3 回繰り返し、最後に上清を取り除いた後は174 μ l の DMF を加え、ソニケーションを行った。1 mM のリンカー結合型 1NA-PP1 を26 μ l 加え、1 時間常温で振盪した。その後、13,500 rpm で5 分間遠心し、上清を取り除いた。200 μ l の Ethanolamine (Sigma、398136)を加え、2 時間常温で振盪した。13,500 rpm で5 分間遠心した後に、上清を取り除き、2 M Tris-HCl (pH 8.0) を200 μ l を加え、ソニケーションを行った後に、2 時間常温で振盪した。13,500 rpm で5 分間遠心し、50% MeOH (和光純薬、137-01823) - H buffer を200 μ l 加え、ソニケーションを行った。作製した 1NA-PP1 結合ビーズは5 mg/mL の濃度になる。作製後は4 $^{\circ}$ C で保存し、使用直前に H buffer + 150 mM NaCl に置換し使用した。使用直前に1 サンプルにつき60 μ l に400 μ l の H buffer + 150 mM NaCl を加え、ソニケーションを行い、13,500 rpm で5 分間遠心し、上清を取り除いた。この作業を3 回行った後に、40 μ l の H buffer + 150 mM NaCl で懸濁した。

・精製

10 cm dish に播種した初代培養褐色脂肪細胞を1 - 8 dish 用いた。上清を取り除いた後に H buffer 10 mL を加え dish を Wash する操作を2 回行った後に100 μ l - 1 mL の H buffer + 150 mM NaCl + 10% digitonin (和光純薬、044-02121) を加え、細胞をスクレープし1.5 mL チューブに回収した。回収した細胞をペレットミキサー (Treff Lab) でホモジナイズした後に、13,500 rpm で5 分間遠心し、細胞を沈殿させた後、再度ペレットミキサー

でホモジナイズを行った。この操作を2回繰り返した後に、13,500 rpm で5分間遠心し、上清を別の1.5 mL チューブに回収した。回収した上清を13,500 rpm で20分間遠心し、上清を Millex®-HV フィルター、0.22 µl、PVDF、33 mm、γ線滅菌済 (Millipore、SLHV033RB) に2回通した。フィルター後の溶液に H buffer + 150mM NaCl に置換したビーズ 40 µl を加え、4 °C で振盪しながら16時間インキュベーションした。磁気スタンド (多摩川精機、TA4899N10) 上で10分間静置し、ビーズを集積させた。Wash 用 H buffer (H buffer + 0.02% Triton) を200 µl 加え、懸濁した後に磁気スタンド上で10分間静置し、ビーズを再度集積させた。この洗浄作業を5回繰り返した。5回目は200 µl で懸濁し、2本の1.5 mL チューブに等量ずつ分配した。磁気スタンドを用いてビーズを回収した後に、1 mM 1NA-PP1 溶液または DMSO 溶液を50 µl 加え懸濁し、氷上で2時間インキュベーションした。インキュベート中は15分おきにタッピングを行った。1NA-PP1 または DMSO 溶液は49 µl の Wash 用 H buffer に50 µM の1NA-PP1 または DMSO を1 µl 加え、13,500 rpm で遠心したものを使用した。インキュベーション後、磁気スタンド上で10分間静置し、上清を別の1.5 mL チューブに回収した。イムノブロットにサンプルを用いる場合は、回収した上清及びビーズにはそれぞれ50 µl の2 x Sample buffer を加え、98 °C で3分間インキュベーションすることによりサンプル化した。質量分析計解析には回収した上清を用いた。

計算および統計学的処理

すべての定量的なデータは、Microsoft Excel®および GraphPad Prism® 5 を用いて解析した。統計学的解析においては、対応のないスチューデント t 検定を用いた。

結果

初代培養褐色脂肪細胞における ASK1 複合体の大きさの検討

序論で述べた通り、HEK293A 細胞において ASK1 が 1,500-2,000kDa に及ぶ非常に大きな複合体を形成していることが分かっている²¹。しかしながら、その他の細胞種においても ASK1 が大きな複合体を形成しているかに関しては不明であった。そこで本研究において着目している初代培養褐色脂肪細胞においても ASK1 が巨大な複合体を形成しているか検討を行うこととした。野生型の初代培養褐色脂肪細胞の溶解液を用い、ゲル濾過クロマトグラフィー解析を行った (Fig. 5A) 結果、HEK293A 細胞を用いた場合と同様のフラクションにおいて ASK1 が検出された。このことから、初代培養褐色脂肪細胞においても ASK1 は 1,500-2,000kDa の非常に大きな複合体を形成していることが分かった。

新規ケミカルプルダウン法による ASK1 複合体の精製

褐色脂肪細胞における詳細な ASK1 機能の解明を目指し、当研究室で既に確立されていた新規ケミカルプルダウン法を利用し、初代培養褐色脂肪細胞より内在性の as-ASK1 複合体を精製し、複合体に含まれる構成因子を同定したいと考えた。これまでに、線維芽細胞 (MEF) を用いて内在性の as-ASK1 を精製することが可能なことが明らかになっていた。そこでまず、初代培養褐色脂肪細胞より内在性の as-ASK1 を精製することが可能か確認すべく、ASKA マウス由来の初代培養褐色脂肪細胞より新規ケミカルプルダウン法を用いて内在性 as-ASK1 の精製を試みた。大過剰の 1NA-PP1 を用いた溶出後のサンプルと残存したビーズをイムノブロットに供し、抗 ASK1 抗体を用いて検出した。その結果、1NA-PP1 で溶出した後のビーズサンプルではコントロールである DMSO で溶出処理を行ったビーズサンプルと比較して検出される ASK1 の量が減少した。また、1NA-PP1 で溶出処理を行ったサンプルでのみ ASK1 が検出された (Fig. 6)。このことから、新規ケミカルプルダウン法では初代培養褐色脂肪細胞を用いた場合にも、内在性の as-ASK1 を精製することが可能であることが確認された。

次に、本精製法が内在性の as-ASK1 を複合体の状態で精製することが可能な系であるかの確認を行った。これまでに行われていた MEF からの内在性 as-ASK1 精製においては、精製操作により複合体の大きさが変化するかに関しては検討が行われていなかった。そこで、精製操作過程において ASK1 複合体の大きさが変化するのか、精製前後のサンプルを用いてゲル濾過クロマトグラフィー解析を行うことで検討した。その結果、精製前後いずれのサンプルにおいても ASK1 は同様のフラクションに検出されることが明らかとなった (Fig. 7)。この結果より、少なくともゲル濾過クロマトグラフィーで

検出される ASK1 複合体の大きさの変化は生じていないものと考えられる。以上の結果から、新規ケミカルプルダウン法は褐色脂肪細胞内在性の as-ASK1 を複合体として精製することが可能な実験系であることが確認出来た。

質量分析計解析による新規結合因子の同定

ASKA マウス由来初代培養褐色脂肪細胞を用いて、新規ケミカルプルダウン法により内在性の as-ASK1 複合体を精製した。精製したサンプルの一部はイムノブロットに供し、as-ASK1 が精製できているかの確認を行っている。また、実験回ごとのマウスの個体差や細胞分化程度の誤差を小さくするため、同様の実験を 3 回行い、3 回分のサンプルを混合し、質量分析計解析に用いた。その結果、複数の新規 ASK1 結合候補因子が同定された (Table 1)。

RIPK2 (Receptor interacting serine/threonine protein kinase 2) の機能と組織発現分布

初代培養褐色脂肪細胞における新規 ASK1 結合候補因子の一つとして RIPK2 が同定された。RIPK2 は RIP ファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼの一つである。RIPK2 はキナーゼドメインおよび CARD (Caspase Recruitment Domain, カスパーゼ誘引ドメイン) を有している³² (Fig. 8A)。キナーゼドメインを有している点はこの RIP ファミリー分子と共通しているが、RIPK2 キナーゼドメインの機能に関して現時点では明らかになっておらず、リン酸化基質となるタンパク質に関しても不明である。RIPK2 阻害剤によりリン酸化活性を抑制すると、細胞内の RIPK2 のタンパク量が減少することが分かっている³³。このことから、リン酸化活性を発揮できない状況下では RIPK2 は分解されてしまうと考えられており、キナーゼ活性の必要性の解析を難しくしている原因の一つとなっている。一方で、CARD は他の RIP ファミリーと異なる RIPK2 に特徴的なモチーフ構造となっている。CARD はシグナル伝達経路の中の 90-100 アミノ酸から構成されるモチーフ構造であり、他の分子との相互作用ドメインとして機能する³⁴。特に RIPK2 の CARD に関しては細菌感染時に機能することが知られている NOD1 または NOD2 との相互作用に必要であることが分かっている³⁵。NOD1 および NOD2 は一または二つの CARD と 1 つの LRR モチーフを持つ。NOD1 および NOD2 は LRR モチーフにより細菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンの分解産物を認識した結果、CARD を介してオリゴマー化する。NOD1 は iEDAP または TriDAP と呼ばれる分解産物を、NOD2 は MDP (Muramyl dipeptide) と呼ばれる分解産物をそれぞれ認識していることが分かっている³⁶。NOD のオリゴマー化に伴い、RIPK2 同士も自身の CARD を介して結合し、オリゴマー化が促進される。オリゴマー化した RIPK2 はアダプター分子として機能し、

様々な分子との結合が促進される。その結果、下流シグナルである MAPK 経路や NFκB 経路が活性化される³⁷⁻³⁹。NFκB 経路の下流では炎症性サイトカインの産生が誘導されることが示されており、このシグナル経路は細菌感染時における炎症応答の賦活化に重要な役割を担っている^{40,41}。そのため RIPK2 欠損マウスでは炎症応答に関連した表現型を示すことが明らかとなっている。リステリアを過剰に感染させるモデルにおいては、血中の炎症性サイトカイン量の増加抑制に伴い、生存期間が延長されることが分かっている⁴¹。一方で、クローン病モデルにおいては、細菌感染時に適切な炎症応答を誘導することができないため、その病態が増悪することが示されている^{42,43}。しかしながら、RIPK2 がこれらの機能をどのような組織で発揮しているかに関しては不明であったため、RIPK2 の組織発現分布を解析することとした。その結果、免疫系の細胞が多く存在する脾臓やクローン病に関わりの深い大腸と同様に、各種脂肪組織においても RIPK2 が多く発現していることが明らかとなった (Fig. 8B)。

RIPK2 の脂肪組織での機能に関する報告は存在しない。しかしながら、RIPK2 の関与する NOD 経路の脂肪組織での機能に関する報告は存在する。NOD1 および NOD2 を共に欠損させたマウスでは高脂肪食負荷依存的に増加する血中の炎症性サイトカイン量が減少し、それに伴いインスリン抵抗性が改善することが示されている²⁰ (Fig. 9A)。また、マウス個体に対する NOD1 リガンド投与により、脂肪組織での炎症性サイトカイン産生が誘導されることも示されており、NOD1 経路が肥満症における脂肪組織での炎症応答において重要な機能を担っているものと考えられる^{20,44-46} (Fig. 9B)。このことから、NOD1 経路において機能する RIPK2 も脂肪組織において炎症応答制御に関わる可能性が高いと考えられる。そこで、複数同定された結合候補因子の中で RIPK2 に着目し、脂肪細胞における ASK1 と RIPK2 の関わりを検討することとした。

RIPK2 と ASK1 との結合確認

新規結合因子候補として同定された RIPK2 と ASK1 との結合を確認するべく、複数の条件下で免疫沈降実験を行った。まず、HEK293A 細胞に ASK1-HA および RIPK2-Flag を共発現し、抗 Flag 抗体を用いて RIPK2 を免疫沈降した。その結果、ASK1 が共免疫沈降されることが確認された (Fig. 10)。また、初代培養褐色脂肪細胞に RIPK2-Flag を、アデノウイルスを用いて過剰発現し、抗 Flag 抗体により RIPK2 を免疫沈降した結果、内在性の ASK1 との結合が確認された (Fig. 11)。さらに、初代培養褐色脂肪細胞での内在性タンパク質同士の結合の検討も行った。初代培養褐色脂肪細胞より抗 ASK1 抗体または抗 RIPK2 抗体を用いて、内在性の ASK1 または RIPK2 の免疫沈降を行った。その結果、ASK1 を免疫沈降した実験では RIPK2 が、RIPK2 を免疫沈降した実験では ASK1

がそれぞれ共免疫沈降された (Fig. 12)。以上の結果から RIPK2 は ASK1 の新規結合因子であることが確認された。

NOD1 経路において RIPK2 は ASK1 シグナルの活性を制御しない

上述の通り、RIPK2 は NOD 経路において重要な機能を有していること、脂肪組織においては主に NOD1 が発現していることから NOD1 経路における RIPK2 と ASK1 の結合の意義の検討を行おうと考えた⁴⁵。ASK1 と RIPK2 の結合の意義に関しては二通りの考え方がある (Fig. 13)。一つ目は RIPK2 が ASK1 シグナルを制御している可能性であり、二つ目は ASK1 が RIPK2 シグナルを制御している可能性である。まず、前者の可能性に関して検討を行うこととした。

はじめに、RIPK2 の過剰発現により ASK1 の活性が変化するか検討を行った。HEK293A 細胞に RIPK2-Flag および ASK1-HA を共発現し、ASK1 の活性変化を検討した。ASK1 の活性は ASK1 の活性をモニターすることが出来ることが知られている抗 ASK1 リン酸化特異的抗体を用いて評価した³¹。その結果、RIPK2 の過剰発現による ASK1 の活性変化は認められなかった (Fig. 14)。そこで、さらに RIPK2 による ASK1 シグナル制御の可能性を検討するため、RIPK2 がオリゴマーを形成し、下流シグナルの活性化を誘導することが可能な細胞内状況において、ASK1 活性変化を検討することとした。過去の報告から、HEK293A 細胞において NOD を過剰発現するのみで、CARD を介したオリゴマー化が生じ、RIPK2 を介した下流シグナルが誘導されることが分かっている⁴⁷。そこで、NOD1 の過剰発現により ASK シグナルが活性化するか検討を行った。HEK293A 細胞に NOD1-HA および RIPK2-Flag を過剰発現し、内在性 ASK の活性変化を検討した結果、下流シグナルである p38 の活性化が生じる条件においても ASK の活性化は認められなかった (Fig. 15)。上述の通り、NOD1-RIPK2 経路はペプチドグリカンの分解産物である iEDAP により活性化される。そこで、NOD1-RIPK2 経路のさらなる活性化を誘導するために、iEDAP を模して合成された C12iEDAP を用いて刺激を行い内在性 ASK の活性を評価した。内在性 ASK の活性がポジティブコントロールとして用いた過酸化水素刺激により上昇する一方で、NOD1-HA および RIPK2-Flag を共発現し C12iEDAP 刺激を行った細胞において、下流シグナルである I κ B α の分解が検出される条件においても ASK の活性変化は認められなかった (Fig. 16)。さらに、RIPK2 が ASK1 の結合因子として同定された初代培養褐色脂肪細胞においても検討を行った。過去の報告から、初代培養褐色脂肪細胞は C12iEDAP 刺激に応答し、MAPK 経路や NF κ B 経路の活性化が誘導されることが報告されている⁴⁵。そこで初代培養褐色脂肪細胞に C12iEDAP 刺激を行い ASK の活性変化を評価したが、C12iEDAP 刺激依存的な ASK の

活性変化は検出されなかった (Fig. 17)。以上の結果から、少なくとも NOD1 経路において RIPK2 経路は ASK1 シグナルの活性を制御しないことが示唆された。

ASK1 は NOD1-RIPK2 経路において NFκB 経路を抑制的に制御する

続いて ASK1 が RIPK2 シグナルを制御する可能性に関して検討を行おうと考えた。NOD1-RIPK2 の下流では NFκB 経路および MAPK 経路の活性化が誘導されることが分かっている。そこで、NOD1-RIPK2 経路が活性化する条件下で ASK1 の過剰発現や発現抑制を行うことで、下流シグナルに変化が生じるか検討を行うこととした。

IκBα は NFκB と結合することで、NFκB の核内への移行を抑制しており、IκBα の分解により NFκB は転写因子として機能することが出来るようになる。そのため IκBα の分解を検討することでは NFκB 経路の活性を評価することが出来る。HEK293A 細胞に NOD1-HA と RIPK2-Flag の過剰発現を行うと、IκBα の分解が生じた。その際、さらに HA-ASK1 を共発現させると IκBα の分解が抑制された (Fig. 18A)。続いて、ASK1 のキナーゼ不活性型変異体である ASK1KR 変異体を用いて同様の実験を行ったところ、HA-ASK1KR の共発現によっても IκBα のタンパク量が増加した (Fig. 18B)。以上の結果より NOD1-RIPK2 経路において ASK1 はキナーゼ活性非依存的に NFκB 経路を抑制的に制御していることが示唆された。

次に、ASK1 の発現抑制による影響を検討した。ASK1 を発現抑制した HEK293A 細胞に RIPK2-Flag および NOD1-HA を過剰発現し、下流シグナルである IκBα の分解を評価した。その結果、コントロール細胞と比較して、ASK1 の発現抑制により IκBα のタンパク量が減少した (Fig. 19)。このことから、ASK1 が NOD1-RIPK2 経路において IκBα の分解に対して抑制的に機能し、ASK1 の発現量が減少することにより ASK1 による抑制効果が減弱し、IκBα の分解が亢進していることが示唆された。以上の結果より、ASK1 は NOD1-RIPK2 経路において NFκB 経路を抑制的に制御することが明らかとなった。

ASK1 は NOD1-RIPK2 経路において TAK1 の活性調節を介して NFκB シグナルを制御する

NOD1-RIPK2 経路において MAP3K の一つである TGF-beta activated kinase 1 (TAK1) が重要な機能を担っていることが報告されている。NOD1 経路においてオリゴマー化した RIPK2 には様々な種類の E3 ligase がリクルートされる。それら E3 ligase により 209 番目のリジンに K63 型のユビキチン化が生じ、それに伴い TAK1-TAB 複合体が RIPK2 にリクルートされる。複合体にリクルートされた TAK1 は活性化し、同じく RIPK2 にリクルートされる IKK をリン酸化する。IKK はリン酸化により活性化し、下流の IκBα をリン酸化す

る。リン酸化されたI κ B α はプロテアソームにより分解され、上述の通りNF κ Bが転写因子として機能する^{37,48-50} (Fig. 18A)。また一方で、TAK1とASK1の関係性に関する報告が過去に当研究室からなされている。この報告では、ASK1の過剰発現によりIL-1 β 依存的なNF κ B経路の活性化が抑制され、そのメカニズムとしてASK1によるTAK1とTAK1の活性制御に重要な働きをしているTRAF6の結合阻害が関与すると述べられている⁵¹。これらの事実から、NOD1-RIPK2経路におけるNF κ B経路の抑制効果がTAK1の活性調節を介している可能性に関して検討する必要があると考えられた。

HEK293A細胞にNOD1-HAおよびRIPK2-Flagを過剰発現することによって生じるTAK1の活性化が、ASK1の発現抑制により変化するか検討した。TAK1の活性は抗リン酸化TAK1抗体を用いて行い、イムノブロットのバンド強度を定量し、数値化することで評価した。その結果、ASK1の発現抑制によりNOD1-RIPK2過剰発現依存的なTAK1の活性化が亢進することが明らかとなった (Fig. 20)。以上の結果から、ASK1によるNOD1-RIPK2-NF κ B経路の抑制的な制御にはTAK1の活性制御が関わることを示唆された。

ASK1 は TAK と RIPK2 の結合を阻害する

次にASK1によるTAK1活性制御メカニズムに関して検討を行うこととした。NOD1-RIPK2経路においてTAK1はRIPK2への結合により活性化し、下流シグナルの活性化を誘導することが知られている⁴⁷。ASK1はRIPK2と結合することが分かっているため、ASK1によりTAK1とRIPK2の結合が阻害される可能性が考えられた。そこでまず、RIPK2のASK1の結合サイトの検討を行った。RIPK2はキナーゼドメイン (KD)、Intermediated ドメイン (IM)、CARDの3つのドメイン構造に分けられる (Fig. 21A)。そこで、各種部分欠損変異体を作製し、HEK293A細胞にASK1と共発現し、共免疫沈降実験を行った。その結果、KDのみがASK1と結合することが分かった (Fig. 21B)。過去の報告ではKD領域にTAK1のリクルートに重要なユビキチン化が生じる209番目のリジンが存在することが分かっている⁴⁷ (Fig. 21A)。以上のことから、ASK1がRIPK2のKDに結合することでTAK1との結合を阻害している可能性がより強く示唆された。

そこで、HEK293A細胞における過剰発現系においてASK1がTAK1とRIPK2の結合を阻害するか検討を行った。HEK293A細胞にTAK1-6Myc、RIPK2-Flag、HA-ASK1を過剰発現し、抗Flag抗体を用いてRIPK2を免疫沈降し、共免疫沈降されるTAK1の量がASK1過剰発現により影響を受けるか検討を行った。その結果、RIPK2と共免疫沈降されるTAK1の量がASK1の過剰発現により減少した (Fig. 22)。さらに同様の実験を先ほどの実験とは異なる組み合わせのタグを用いて行った。HEK293A細胞にTAK1-Flag、RIPK2-HA、

6Myc-ASK1を過剰発現し、抗Flag抗体を用いてTAK1を免疫沈降し、共免疫沈降されるRIPK2の量がASK1過剰発現により影響を受けるか検討を行った。その結果、TAK1と共免疫沈降されるRIPK2の量がASK1の過剰発現により減少した (Fig. 23)。以上の結果から、ASK1はRIPK2のKDに結合し、TAK1との結合を阻害していることが示唆された。

初代培養褐色脂肪細胞において C12iEDAP 刺激依存的に ASK1 が RIPK2 から解離する

ASK1とRIPK2の結合がNOD1-RIPK2経路のシグナル制御に与える影響に関しては不明であったため、初代培養褐色脂肪細胞を用いてNOD1-RIPK2経路が活性化される状況下においてASK1とRIPK2の結合に変化が生じるか検討を行った。初代培養褐色脂肪細胞にC12iEDAP刺激を行い、抗ASK1抗体を用いて内在性ASK1を免疫沈降し、共免疫沈降されるRIPK2の量が変化するか検討を行った。その結果、定常状態においては認められたASK1とRIPK2の結合が刺激依存的に減弱することが明らかとなった (Fig. 24)。

初代培養褐色脂肪細胞において C12iEDAP 刺激依存的な炎症性サイトカイン発現誘導が ASK1 欠損細胞で亢進する

ここまでの検討結果から、ASK1がNOD1-RIPK2経路のNF κ B経路を抑制的に制御することが分かった。そこで、このシグナル制御機構の生理的意義を検討しようと考えた。上述の通り、NOD1経路は脂肪細胞において炎症性サイトカイン産生に寄与することが分かっている^{20,45}。そこで野生型およびASK1欠損初代培養褐色脂肪細胞にC12iEDAP刺激を行い、炎症性サイトカイン発現誘導に差が生じるか検討を行った。その結果、炎症性サイトカインMCP1、CXCL2、TNF α のC12iEDAP刺激依存的な発現誘導がASK1欠損細胞で有意に亢進した (Fig. 25)。この結果から、ASK1によるNOD1-RIPK2-NF κ B経路の抑制的な制御が褐色脂肪細胞における炎症性サイトカイン産生を抑制していることが示唆された。

考察

新規ケミカルプルダウン法について

本研究では新規ケミカルプルダウン法を用いて初代培養褐色脂肪細胞より内在性の as-ASK1 複合体を精製し、複合体構成因子の同定を行った。これまで精製が可能なが確認されていた線維芽細胞 (MEF) 以外の細胞を用いた場合でも、内在性の as-ASK1 を精製することが可能なことが明らかとなった (Fig. 6)。このことから、本精製法を用いることで様々な種類の初代培養細胞における ASK1 複合体の精製およびその構成因子の同定が可能であると想像される。

本精製法では ATP 結合部位に変異を加えたリン酸化酵素を用いている。ATP 結合部位への変異はキナーゼの酵素活性に影響を与えてしまう可能性が考えられる。序論で述べた通り、初代培養褐色脂肪細胞における ASK1 は β アドレナリン受容体作動薬処置により活性化し、UCP1 の発現誘導等を介して初代培養褐色脂肪細胞の成熟に関与することが示されている⁹。ASKA マウス由来の初代培養褐色脂肪細胞において、 β アドレナリン受容体作動薬処置による ASK1 の活性化程度の検討を行ったところ、ASK1 の活性化が検出された (Suppl. Fig. 1)。この結果から、ASKA マウス由来の初代培養褐色脂肪細胞における as-ASK1 は、少なくとも過去に報告されている機能を担うキナーゼ活性は保持しているものと考えられる。また精製する際に、ATP アナログである 1NA-PP1 が ATP 結合部位に結合することで、何らかの構造変化が生じ、定常状態では結合しないタンパク質が結合してしまう可能性が考えられる。この点に関しては、現状では 1NA-PP1 の結合により構造変化が生じるか不明であるため否定することが出来ない。今回、結合因子として同定され解析を行った RIPK2 に関しては、野生型マウス由来の初代培養褐色脂肪細胞において内在性同士のタンパク質の結合が免疫沈降実験により確認されたため、真の ASK1 複合体構成因子であると考えている (Fig. 12)。今回同定された他の複合体構成候補因子に関しても免疫沈降実験を行うことで、ASK1 複合体構成因子であることを証明する必要がある。序論で述べた通り、過剰発現した ASK1 を用いた結合因子同定では多くの非特異的結合タンパクが同定され得るという問題が存在する。多くの情報が蓄積され、今回同定された複合体構成因子に偽陽性のものが少なかった場合、本精製法が優れた実験方法であることを主張することができる可能性がある。しかしながら検出系の限界の問題があるため、その違いを明示することは難しい。

ASK1 複合体の精製について

本研究では巨大な ASK1 複合体を精製し、複合体に含まれる結合因子を同定したいと考え検討を行った。しかしながら、今回 as-ASK1 の結合因子として同定された RIPK2

が ASK1 複合体に含まれるかに関しては現在の結果からでは言及することが出来ない。RIPK2 が ASK1 の形成する大きな複合体に含まれるか検討を行うためには、ゲル濾過クロマトグラフィーにて ASK1 を含む大きな複合体が検出される画分を分取し、ASK1 複合体を免疫沈降する必要がある。今後このような検討を行うことで、今回同定された RIPK2 が巨大な ASK1 複合体の構成因子の一つであることを明らかにしたい。

また、ASK1 と RIPK2 の結合に関しては何らかの別の因子が必要な可能性も存在する。この点に関して結論を出すためには、合成タンパク質を用いた *In vitro* の実験系において ASK1 と RIPK2 の結合を検討する必要性がある。

同定された新規結合候補因子に関して

今回新規ケミカルプルダウン法を用いた ASK1 複合体構成因子解析により新規結合因子として RIPK2 が同定された (Table 1)。当研究室ではこれまでに HEK293A 細胞にタグ結合型の ASK1 を過剰発現し、結合因子を同定する試みが複数回行われてきた。しかしながら HEK293A 細胞に発現しているものの RIPK2 は、これまでのいずれの結合因子解析においても結合因子として同定されていなかった。この原因としては、ASK1 が過剰に存在する状況では結合出来ない可能性やタグが障害となり結合出来ない場合などが考えられる。いずれの理由であっても、RIPK2 は新規ケミカルプルダウン法を用いたことで初めて同定することが出来た分子であると言える。

結果で述べた理由から、本研究では RIPK2 と ASK1 の結合に着目して研究を進めた。しかしながら、その他にも興味深い結合候補タンパク質が同定されている (Table 1)。perilipin-4 は脂肪細胞の脂肪滴の形成において重要な機能を担っていることが知られている⁵²。CD36 は脂肪細胞において細胞外の長鎖脂肪酸を細胞内に取り込む細胞膜局在タンパク質である⁵³。このように脂肪細胞において重要な機能を持つ分子が同定されており、これらの分子と ASK1 の結合の意義に関する検討を行うことで、本研究で明らかにした炎症性サイトカイン発現誘導の抑制という機能以外にも脂肪細胞における ASK1 の新規機能解明に繋がる可能性がある。

RIPK2 が ASK1 の活性制御因子として機能する可能性について

本研究での検討結果より、少なくとも NOD1 経路においては ASK の活性レベルに RIPK2 が関与しないことが明らかとなった (Fig. 14-17)。また、褐色脂肪細胞において、 β アドレナリン受容体作動薬処置による ASK1 の活性化は RIPK2 の発現抑制により影響を受けないことも明らかにしている (Suppl. Fig. 2)。この結果から、ASK1 が活性化するシグナル経路において RIPK2 が普遍的なメカニズムにより ASK1 の活性を制御してい

る可能性は否定される。今後は過酸化水素など他の ASK1 活性化刺激環境下において、RIPK2 が ASK1 の活性を制御する状況が存在するか検討を行いたい。

ASK1 による NOD1-RIPK2 経路内での NFκB シグナルの制御

本研究では、ASK1 の過剰発現や発現抑制により NOD1-RIPK2 過剰発現依存的な IκBα の分解が影響を受けることが明らかとなった (Fig. 18, 19)。この制御メカニズムとして TAK1 の活性制御が関与する可能性を示唆するデータを得ている (Fig. 20)。さらに TAK1 の活性制御機構として ASK1 による TAK1 と RIPK2 の結合阻害が関与する可能性を示唆している (Fig. 22, 23)。しかしながら、ASK1 がどのような機能を発揮することで、直接的にはどの分子をターゲットとしているかに関しては不明な点が多く残されている。ASK1 のキナーゼ不活性化型変異体を用いた実験から、NFκB 経路の制御に ASK1 のキナーゼ活性が必要でないことが示唆されているため (Fig. 18)、ASK1 が RIPK2 や TAK1 をリン酸化することで制御している可能性は低い。ASK1 がキナーゼ活性を用いずに、NOD1-RIPK2-TAK1 シグナルを制御しているメカニズムとしてはいくつかの可能性が考えられるため、以下に主なものを列挙する。一つ目は ASK1 が RIPK2 と結合することにより NOD1 と RIPK2 の結合を阻害している可能性である。NOD1 と RIPK2 が結合出来ない場合は、RIPK2 のオリゴマー化が生じず、TAK1 の活性化も生じないものと考えられる。NOD1 と RIPK2 の結合は CARD を介している一方で、ASK1 は RIPK2 の KD と結合することが分かっているため (Fig. 21)、ASK1 が CARD に結合することで競合的に NOD1 と RIPK2 の結合を阻害している可能性に関しては否定的である。しかしながら、ASK1 の KD 部位への結合により RIPK2 の構造に変化が生じ、NOD1 と RIPK2 の結合が阻害される可能性はある。いずれにせよ、NOD1、RIPK2、ASK1 の共発現による免疫沈降実験を行い、ASK1 の共発現によって NOD1 と RIPK2 の結合強度が変化するかどうかを検討する必要がある。二つ目は、ASK1 が RIPK2 と結合することで、RIPK2 に何らかの翻訳後修飾が入ることを阻害している可能性である。RIPK2 に加わることが知られている修飾としては、ユビキチン化がある。オリゴマー化した RIPK2 には様々な種類のユビキチン化酵素がリクルートされることが知られている³⁷。RIPK2 の特に 209 番目のリジンへのユビキチン化は TAB-TAK1 複合体のリクルート及び TAK1 の活性化に必要であることが示されている⁴⁷。現在、ASK1 の過剰発現や発現抑制により RIPK2 のユビキチン化に影響が生じるかは不明であるため今後の検討が必要である。第三の可能性としては ASK1 が RIPK2 と結合することで物理的に TAK1 と RIPK2 の結合を阻害している可能性が考えられる。第三の可能性をさらに細かく分類すると、ASK1 が TAK1 と同一の場所にて RIPK2 と結合することで競合している場合と

TAK1 結合部位とは異なる部位に結合し、立体的に障害となることで結合を阻害しているという二通りの可能性が考えられる。RIPK2 の K209R 変異体では RIPK2 と TAK1 の結合が減弱することから、TAK1 は RIPK2 の 209 番目のリジンに生じたユビキチン鎖に結合するものと考えられている⁴⁷。また、過去の報告によると RIPK2 と TAK1 の結合は NOD リガンド刺激依存的に生じるものであるため、NOD リガンド刺激依存的に RIPK2 にユビキチン化が生じることで TAK1 がユビキチン鎖にリクルートされることが想定されている⁴⁷。一方本研究において、初代培養褐色脂肪細胞における ASK1 と RIPK2 の結合は定常状態で認められ、NOD1 経路の活性化と共にその結合強度は減弱した (Fig. 24)。この結果から、ASK1 は RIPK2 の 209 番目のリジンに生じたユビキチン鎖に結合することで TAK1 との結合を競合的に阻害している可能性は低いものと考えられる。ASK1 が RIPK2 の TAK1 結合サイト以外の KD 部位に結合することで立体的に障害となり TAK1 と RIPK2 の結合を阻害している可能性に関しては、KD 部分のさらなる部分欠損変異体を用いて RIPK2 の ASK1 結合サイトを正確に同定することで、ASK1 がどのように RIPK2 と TAK1 の結合を阻害しているか検討を行いたい。

脂肪細胞における NOD1-RIPK2 経路での NFκB 経路制御の生理的意義

本研究から脂肪細胞において ASK1 は NOD1 リガンド刺激依存的な炎症性サイトカインの遺伝子誘導を抑制的に制御していることが示唆された (Fig. 25)。このメカニズムとしては、今回明らかにした NOD1-RIPK2-TAK1-NFκB 経路の抑制的な制御が関与するのではないかと考えているが、現時点では詳細なメカニズムの検討に至っていない。初代培養褐色脂肪細胞を用いて NOD1 リガンド刺激依存的な IκBα の分解や TAK1 の活性化が ASK1 欠損細胞でどのように変化するか検討を行うことがまず必要であると考えている。また、褐色脂肪細胞における炎症性サイトカイン産生への RIPK2 および TAK1 の寄与に関しては情報が不足しているため、阻害剤などを用いた検討を行いたいと考えている。

TAK1 の下流では NFκB 経路だけでなく MAPK 経路が活性化することが知られている³⁷。過去の報告において、初代培養褐色脂肪細胞における NOD1 リガンド刺激依存的な炎症性サイトカイン産生には NFκB 経路及び p38 の活性化が必要であることがそれぞれの阻害剤を用いた解析で示されている。また、ASK1 の下流では p38 が活性化することが知られている⁹。そのため ASK1 欠損マウス由来の初代培養褐色脂肪細胞では p38 の活性が減弱することが想定される。実際に、初代培養褐色脂肪細胞において NOD1 リガンド刺激依存的な p38 の活性化が ASK1 欠損細胞では野生型と比較して減弱傾向にあるとの結果を得ている (data not shown)。p38 活性の減弱は炎症性サイトカイン産生に抑

制的に機能するため、今回得られている ASK1 欠損マウス由来細胞における炎症性サイトカイン産生亢進とは相反する結果であると言える。一方で、NFκB 経路に関しては ASK1 欠損マウス由来細胞において亢進することが想定されるため、炎症性サイトカイン産生亢進と同一方向であると言える。このため、ASK1 欠損細胞での炎症性サイトカイン産生亢進は、ASK1 による NFκB 経路抑制効果の抑制を介した結果ではないかと考えている。この点に関して結論を出すために、今後は ASK1 欠損細胞における NFκB 経路の活性化レベルを評価すると共に、NFκB の阻害剤及び p38 の阻害剤を用いることで、初代培養褐色脂肪細胞での NOD1-RIPK2 経路による炎症性サイトカイン産生にどちらの経路の寄与が大きいか検討を行いたいと考えている。

序論で述べた通り、脂肪細胞における炎症性サイトカイン産生の亢進は脂肪組織での炎症の惹起や慢性化に繋がることが知られている¹¹⁻¹³。脂肪組織での慢性的な炎症は肥満症の生じるメカニズムの一環であることが提唱されており、動脈硬化症や糖尿病など様々な関連病態を引き起こすと言われている¹¹⁻¹³。ASK1 欠損マウス由来の脂肪細胞での炎症応答の亢進はこのような肥満症病態の制御において重要な役割を担っている可能性が考えられる。序論で言及しているが、ASK1 欠損マウスでは高脂肪食負荷依存的な耐糖能の悪化が野生型と比較して増悪することが分かっている¹⁰。このメカニズムの一端として今回明らかにした ASK1 による NOD1-RIPK2-NFκB 経路の抑制的な制御に関わる可能性があり、今後は高脂肪食負荷時の炎症応答が ASK1 欠損マウスにおいて亢進しているか検討を行いたいと考えている。

NOD1 は細菌感染時に機能することが知られている分子である。しかしながら、序論で述べた通り、高脂肪食負荷依存的な炎症応答亢進に伴うインシュリン抵抗性の獲得に関わることが示唆されている²⁰。過去の報告によると NOD1 経路はペプチドグリカンの分解産物以外に長鎖脂肪酸により活性化されることが示されている⁵⁴。この報告から、一般に NOD1 経路における脂肪組織の炎症応答惹起には長鎖脂肪酸が関与するものと考えられている。本研究においては、初代培養褐色脂肪細胞への刺激としては NOD1 リガンドである C12iEDAP を用いた。今後はより生理的な刺激として長鎖脂肪酸刺激を行った際に、今回明らかにしたシグナル経路の制御が機能するか検討を行いたいと考えている。

本研究では初代培養褐色脂肪細胞において ASK1 が NOD1 リガンド刺激依存的な炎症性サイトカイン産生に抑制的に寄与することが示唆されたが、マウスの個体において肥満時の脂肪組織の炎症に関する報告は白色脂肪組織に関する報告であり、褐色脂肪組織での炎症に関してはその意義や、そもそも炎症が生じているかに関しても不明である。過去に初代培養褐色脂肪細胞を用いて NOD1 リガンド刺激依存的に炎症性サイトカイン

ン産生が生じることを報告している論文では、NOD1 リガンド刺激により前処置した初代培養褐色脂肪細胞では β アドレナリン受容体刺激依存的な UCP1 の発現量増加が減弱することを示している。この筆者らは NOD1 リガンド刺激依存的に誘導された炎症性サイトカインが細胞自律的に作用し、初代培養褐色脂肪細胞での UCP1 発現量増加を抑制しているのではないかと考えている⁴⁵。これらの背景を元に考えると、初代培養褐色脂肪細胞での炎症応答は UCP1 の発現量に影響を与え、初代培養褐色脂肪組織によるエネルギー消費を減少させ、肥満症の増悪化に関与するかもしれない。この点も含め、本研究が褐色脂肪細胞での炎症応答の意義を考える一端となれば良いと考えている。また、本研究では初代培養褐色脂肪細胞を用いて解析を行ったが、白色脂肪組織においても ASK1、RIPK2 共に発現が認められており (Fig. 2, 8B)、今回明らかにしたシグナル制御は白色脂肪細胞においても同様に機能することが想定される。白色脂肪組織における炎症応答は上述の通り、肥満症の増悪における重要な因子となることが既に広く知られているため、今後は白色脂肪細胞においても同様のシグナル制御メカニズムが存在するか検証したいと考えている。

NOD1-RIPK2 経路の刺激特異性について

樹状細胞やマクロファージに TLR4 作動薬である LPS 刺激を行った際の炎症性サイトカインの発現誘導が ASK1 欠損細胞で減弱することを当研究室は過去に報告している⁶。この事実は、炎症性サイトカイン発現誘導に与える影響としては今回の結果と相反するものとなっている。RIPK2 は NOD1 経路における炎症性サイトカイン発現誘導には寄与するが、TLR4 下流で生じる炎症性サイトカイン発現誘導には寄与しないことが知られている⁴⁰。このような差異が生じる理由として、TLR4 および NOD 下流で生じるシグナルにおいて RIPK2 が関与するかによって、ASK1 が p38 シグナルの亢進に寄与するか、NF κ B シグナルの抑制に寄与するか異なるためであると考えられる。脂肪組織においても β アドレナリン受容体下流での炎症性サイトカイン発現誘導に対し、ASK1 が促進的に機能することが分かっており¹⁰、脂肪細胞において ASK1 は刺激の種類により異なる方向に炎症応答を制御している可能性が考えられる。

ASK1 と RIPK2 の結合による下流シグナルの制御メカニズムについて

本研究での検討の結果、ASK1 と RIPK2 は定常状態で結合し、NOD1 リガンド刺激依存的に解離することが明らかとなっている (Fig. 24)。この結果から、定常状態において ASK1 が RIPK2 と結合することで TAK1 が結合出来ないため、下流シグナルが誘導されず炎症性サイトカイン発現誘導に関しても抑制されているものと考えられる。そのため、

ASK1 欠損マウスでは定常状態においても RIPK2 と TAK1 の結合を阻害する ASK1 が存在しないため、下流シグナルが活性化し、炎症性サイトカイン発現誘導が亢進する可能性が考えられる。しかしながら、今回の炎症性サイトカイン発現量の検討において、定常状態での野生型及び ASK1 欠損マウスでの炎症性サイトカイン発現量に差異は認められなかった (data not shown)。このことから RIPK2 経路における炎症性サイトカイン発現に対して ASK1 の解離は十分でなく、NOD1 経路を活性化させる刺激が加わる必要があると考えられる。

総括

本研究により、以下の点が明らかとなった。

1. 新規ケミカルプルダウン法を用いた複合体構成因子解析により初代培養褐色脂肪細胞における新規 ASK1 結合因子として RIPK2 を同定した
2. ASK1 はそのキナーゼ活性非依存的に、TAK1 の活性抑制を介して NOD1-RIPK2-NF κ B 経路を抑制する
3. ASK1 は RIPK2 と結合することで RIPK2 と TAK1 の結合を阻害し、TAK1 の活性化を抑制する
4. ASK1 は初代培養褐色脂肪細胞において NOD1-RIPK2 経路を抑制することで炎症性サイトカイン発現誘導を抑制する

初代培養褐色脂肪細胞において ASK1 は定常状態では RIPK2 と結合することで TAK1 と RIPK2 の結合を阻害し、NOD1-RIPK2-TAK1-NF κ B 経路を抑制的に制御していることが示唆された。また、ASK1 によるこのシグナル経路の制御は脂肪細胞における炎症性サイトカインの発現誘導の抑制に繋がることが示唆されている。脂肪組織における炎症応答は肥満症およびその関連疾患と深い関わりがある。ASK1 が脂肪細胞において RIPK2 を介して炎症応答を制御していることを鑑みると、ASK1 と RIPK2 の結合を制御することが可能な薬剤があれば、脂肪細胞での炎症を抑制的に制御し、肥満症に対する治療薬となる可能性がある。このような薬剤を探索するためにも、今後は ASK1 による NOD1-RIPK2 経路の制御メカニズムをより詳細に検討する必要がある。

さらに本研究では、新規ケミカルプルダウン法を用いて初代培養細胞より内在性のキナーゼ複合体を精製し、新規結合因子を同定することでキナーゼの新規機能を明らかにするに至っている。この新規ケミカルプルダウン法は他のキナーゼに関しても同様の手法を用いることで精製することが可能な実験系である。また、本研究では初代培養褐色脂肪細胞を用いたが、その他の初代培養細胞においても同様の解析を行うことが可能なものと考えられる。そのため、本研究の結果から新規ケミカルプルダウン法がキナーゼの組織特異的な新規機能を解明するために有用な実験系であることを主張することが出来ると考えている。

総じて、本研究により初代培養褐色脂肪細胞での NOD1-RIPK2 経路における炎症性サイトカイン産生抑制という ASK1 の新規機能明らかにすると共に新規ケミカルプルダウン法の有用性を示すに至った。

参考文献

- 1 Kyriakis, J. M. & Avruch, J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev* **92**, 689-737, doi:10.1152/physrev.00028.2011 (2012).
- 2 Ichijo, H. *et al.* Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* **275**, 90-94 (1997).
- 3 Hayakawa, Y. *et al.* Apoptosis signal-regulating kinase 1 and cyclin D1 compose a positive feedback loop contributing to tumor growth in gastric cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 780-785, doi:10.1073/pnas.1011418108 (2011).
- 4 Nakagawa, H. *et al.* Apoptosis signal-regulating kinase 1 inhibits hepatocarcinogenesis by controlling the tumor-suppressing function of stress-activated mitogen-activated protein kinase. *Hepatology* **54**, 185-195, doi:10.1002/hep.24357 (2011).
- 5 Izumiya, Y. *et al.* Apoptosis signal-regulating kinase 1 plays a pivotal role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodeling. *Circ Res* **93**, 874-883, doi:10.1161/01.RES.0000100665.67510.F5 (2003).
- 6 Matsuzawa, A. *et al.* ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol* **6**, 587-592, doi:10.1038/ni1200 (2005).
- 7 Cannon, B. & Nedergaard, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* **84**, 277-359, doi:10.1152/physrev.00015.2003 (2004).
- 8 Fedorenko, A., Lishko, P. V. & Kirichok, Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria. *Cell* **151**, 400-413, doi:10.1016/j.cell.2012.09.010 (2012).
- 9 Hattori, K. *et al.* ASK1 signaling regulates brown and beige adipocyte maturation. *in submission*.
- 10 古谷昌太朗. 成熟脂肪細胞における分泌タンパク質の発現制御に対する ASK1 の機能解析. 修士論文, 東京大学 (2015).
- 11 Fried, S. K., Bunkin, D. A. & Greenberg, A. S. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 847-850, doi:10.1210/jcem.83.3.4660 (1998).
- 12 Kanda, H. *et al.* MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose

- tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* **116**, 1494-1505, doi:10.1172/JCI26498 (2006).
- 13 Baker, R. G., Hayden, M. S. & Ghosh, S. NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab* **13**, 11-22, doi:10.1016/j.cmet.2010.12.008 (2011).
 - 14 Chawla, A., Nguyen, K. D. & Goh, Y. P. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol* **11**, 738-749, doi:10.1038/nri3071 (2011).
 - 15 Nishimura, S. *et al.* CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* **15**, 914-920, doi:10.1038/nm.1964 (2009).
 - 16 Feuerer, M. *et al.* Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med* **15**, 930-939, doi:10.1038/nm.2002 (2009).
 - 17 Vasanthakumar, A. *et al.* The transcriptional regulators IRF4, BATF and IL-33 orchestrate development and maintenance of adipose tissue-resident regulatory T cells. *Nat Immunol* **16**, 276-285, doi:10.1038/ni.3085 (2015).
 - 18 Nguyen, S. D. & Sok, D. E. Effect of 3,4-dihydroxyphenylalanine on Cu(2+)-induced inactivation of HDL-associated paraoxonase and oxidation of HDL; inactivation of paraoxonase activity independent of HDL lipid oxidation. *Free Radic Res* **38**, 969-976, doi:10.1080/10715760400000943 (2004).
 - 19 Tsukumo, D. M. *et al.* Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* **56**, 1986-1998, doi:10.2337/db06-1595 (2007).
 - 20 Schertzer, J. D. *et al.* NOD1 activators link innate immunity to insulin resistance. *Diabetes* **60**, 2206-2215, doi:10.2337/db11-0004 (2011).
 - 21 Noguchi, T. *et al.* Recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins to apoptosis signal-regulating kinase 1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death. *J Biol Chem* **280**, 37033-37040, doi:10.1074/jbc.M506771200 (2005).
 - 22 Zhang, S. Q., Kovalenko, A., Cantarella, G. & Wallach, D. Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity* **12**, 301-311 (2000).
 - 23 Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. An APAF-1/cytochrome c multimeric

- complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* **274**, 11549-11556 (1999).
- 24 Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* **10**, 417-426 (2002).
 - 25 Rub, A. *et al.* Cholesterol depletion associated with Leishmania major infection alters macrophage CD40 signalosome composition and effector function. *Nat Immunol* **10**, 273-280, doi:10.1038/ni.1705 (2009).
 - 26 Nagai, H. *et al.* Ubiquitin-like sequence in ASK1 plays critical roles in the recognition and stabilization by USP9X and oxidative stress-induced cell death. *Mol Cell* **36**, 805-818, doi:10.1016/j.molcel.2009.10.016 (2009).
 - 27 Morris, J. H. *et al.* Affinity purification-mass spectrometry and network analysis to understand protein-protein interactions. *Nat Protoc* **9**, 2539-2554, doi:10.1038/nprot.2014.164 (2014).
 - 28 Bishop, A. C. *et al.* A chemical switch for inhibitor-sensitive alleles of any protein kinase. *Nature* **407**, 395-401, doi:10.1038/35030148 (2000).
 - 29 Liu, Y., Shah, K., Yang, F., Witucki, L. & Shokat, K. M. Engineering Src family protein kinases with unnatural nucleotide specificity. *Chem Biol* **5**, 91-101 (1998).
 - 30 Mizukami, J. *et al.* ASK1 promotes the contact hypersensitivity response through IL-17 production. *Sci Rep* **4**, 4714, doi:10.1038/srep04714 (2014).
 - 31 Tobiume, K. *et al.* ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* **2**, 222-228, doi:10.1093/embo-reports/kve046 (2001).
 - 32 Humphries, F., Yang, S., Wang, B. & Moynagh, P. N. RIP kinases: key decision makers in cell death and innate immunity. *Cell Death Differ* **22**, 225-236, doi:10.1038/cdd.2014.126 (2015).
 - 33 Windheim, M., Lang, C., Pegg, M., Plater, L. A. & Cohen, P. Molecular mechanisms involved in the regulation of cytokine production by muramyl dipeptide. *Biochem J* **404**, 179-190, doi:10.1042/BJ20061704 (2007).
 - 34 Kufer, T. A. & Sansonetti, P. J. NLR functions beyond pathogen recognition. *Nat Immunol* **12**, 121-128, doi:10.1038/ni.1985 (2011).
 - 35 da Silva Correia, J., Miranda, Y., Leonard, N., Hsu, J. & Ulevitch, R. J.

- Regulation of Nod1-mediated signaling pathways. *Cell Death Differ* **14**, 830-839, doi:10.1038/sj.cdd.4402070 (2007).
- 36 Sorbara, M. T. & Philpott, D. J. Peptidoglycan: a critical activator of the mammalian immune system during infection and homeostasis. *Immunol Rev* **243**, 40-60, doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01047.x (2011).
 - 37 Vandenabeele, P. & Bertrand, M. J. The role of the IAP E3 ubiquitin ligases in regulating pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **12**, 833-844, doi:10.1038/nri3325 (2012).
 - 38 Zhang, D., Lin, J. & Han, J. Receptor-interacting protein (RIP) kinase family. *Cell Mol Immunol* **7**, 243-249, doi:10.1038/cmi.2010.10 (2010).
 - 39 Festjens, N., Vanden Berghe, T., Cornelis, S. & Vandenabeele, P. RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell Death Differ* **14**, 400-410, doi:10.1038/sj.cdd.4402085 (2007).
 - 40 Park, J. H. *et al.* RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J Immunol* **178**, 2380-2386 (2007).
 - 41 Kobayashi, K. *et al.* RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* **416**, 194-199, doi:10.1038/416194a (2002).
 - 42 Abbott, D. W., Wilkins, A., Asara, J. M. & Cantley, L. C. The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitylation of a novel site on NEMO. *Curr Biol* **14**, 2217-2227, doi:10.1016/j.cub.2004.12.032 (2004).
 - 43 Philpott, D. J., Sorbara, M. T., Robertson, S. J., Croitoru, K. & Girardin, S. E. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat Rev Immunol* **14**, 9-23, doi:10.1038/nri3565 (2014).
 - 44 Schertzer, J. D. & Klip, A. Give a NOD to insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **301**, E585-586, doi:10.1152/ajpendo.00362.2011 (2011).
 - 45 Bae, J. *et al.* Activation of pattern recognition receptors in brown adipocytes induces inflammation and suppresses uncoupling protein 1 expression and mitochondrial respiration. *Am J Physiol Cell Physiol* **306**, C918-930, doi:10.1152/ajpcell.00249.2013 (2014).
 - 46 Zhao, L., Hu, P., Zhou, Y., Purohit, J. & Hwang, D. NOD1 activation induces proinflammatory gene expression and insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **301**, E587-598,

- doi:10.1152/ajpendo.00709.2010 (2011).
- 47 Hasegawa, M. *et al.* A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. *Embo J* **27**, 373-383, doi:10.1038/sj.emboj.7601962 (2008).
- 48 Wang, C. *et al.* TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**, 346-351, doi:10.1038/35085597 (2001).
- 49 Adhikari, A., Xu, M. & Chen, Z. J. Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene* **26**, 3214-3226, doi:10.1038/sj.onc.1210413 (2007).
- 50 Kim, J. Y., Omori, E., Matsumoto, K., Nunez, G. & Ninomiya-Tsuji, J. TAK1 is a central mediator of NOD2 signaling in epidermal cells. *J Biol Chem* **283**, 137-144, doi:10.1074/jbc.M704746200 (2008).
- 51 Mochida, Y. *et al.* ASK1 inhibits interleukin-1-induced NF-kappa B activity through disruption of TRAF6-TAK1 interaction. *J Biol Chem* **275**, 32747-32752, doi:10.1074/jbc.M003042200 (2000).
- 52 Beller, M. *et al.* PERILIPIN-dependent control of lipid droplet structure and fat storage in Drosophila. *Cell Metab* **12**, 521-532, doi:10.1016/j.cmet.2010.10.001 (2010).
- 53 Silverstein, R. L. & Febbraio, M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal* **2**, re3, doi:10.1126/scisignal.272re3 (2009).
- 54 Zhao, L. *et al.* Differential modulation of Nods signaling pathways by fatty acids in human colonic epithelial HCT116 cells. *J Biol Chem* **282**, 11618-11628, doi:10.1074/jbc.M608644200 (2007).

謝辞

本研究にあたり、最適な実験環境を与えてくださり、ご指導、ご鞭撻頂きました
東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室 一條秀憲教授に深く感謝致します。

本研究にあたり、博士課程の3年間、
実験結果の解釈や研究の方向性に関する日々のディスカッションをはじめとした
様々な面において、常に親身にご指導して下さい、
また、挫けそうな日々において叱咤激励を下さることで研究生生活を支えて下さった
東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室 服部一輝特任助教に深く感謝致します。

本研究を遂行するための基礎を築き、多くのご助言を頂いただけでなく、
修士過程において博士課程へと繋がる研究の基礎をご指導下さった
北海道大学大学院遺伝子病制御研究所病態研究部門 丸山剛助教に深く感謝致します。

本研究にあたり、ご助言くださりました
東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室 名黒功講師
東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室 関根史織助教
東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室 本間謙吾特任助教
東京大学大学院薬学系研究科細胞情報学教室 渡邊謙吾特任研究員
東北大学大学院薬学研究科衛生化学分野 松沢厚教授
University of Oxford Nuffield Department of Medicine SGC 藤澤貴夫研究員
各位に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、新規ケミカルプルダウン法による新規結合因子の同定に関
してご協力頂きました
産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター 夏目徹博士
産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センター 八田知久博士
各位に深く感謝申し上げます。

新規ケミカルプルダウン法構築のための化合物合成に関してご協力頂きました
東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 薬科学分野 平野智也准教授
に深く感謝申し上げます。

本研究を行う上で、温かいご助言や実験でのご協力など様々な面で終始サポートして下さいました

森田賢君、坂内千尋さん、古谷 昌太郎君をはじめとする服部グループの皆様に深く感謝申し上げます。

本研究を行う上で、修士課程在籍時から同期として日々の研究生活を支えて下さった金丸雄祐君、神山美樹さん、圓谷奈保美さんに深く感謝申し上げます。

本研究を行う上で、研究生活を様々な面で支えて頂いた、巽圭子さんをはじめとする東京大学薬学系研究科細胞情報学教室の皆様に深く感謝申し上げます。

また、最後に

家族や友人をはじめ、私の生活を支えて下さった皆様に感謝申し上げます。

平成 28 年 1 月 22 日

曾我 真弓

図表

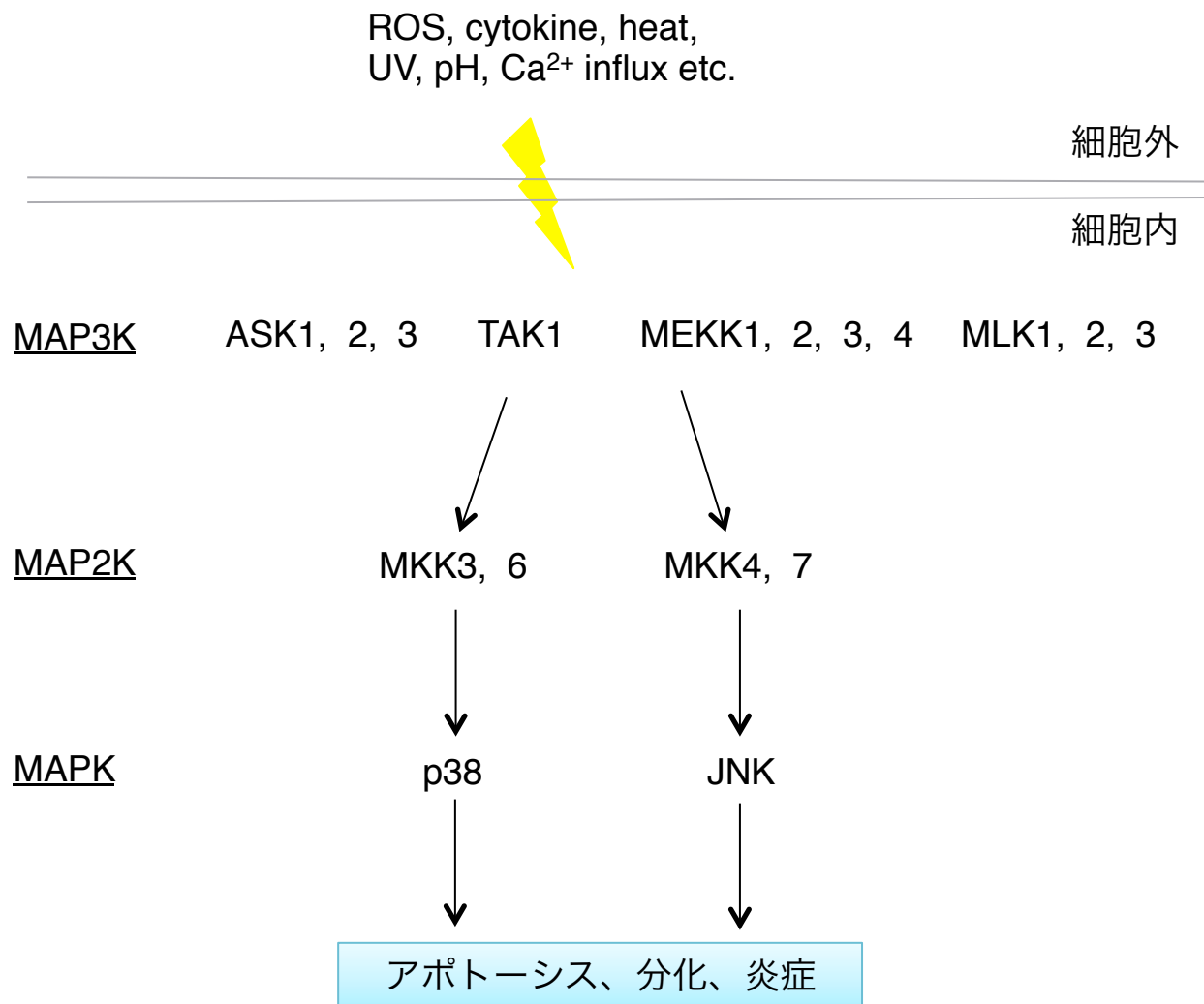
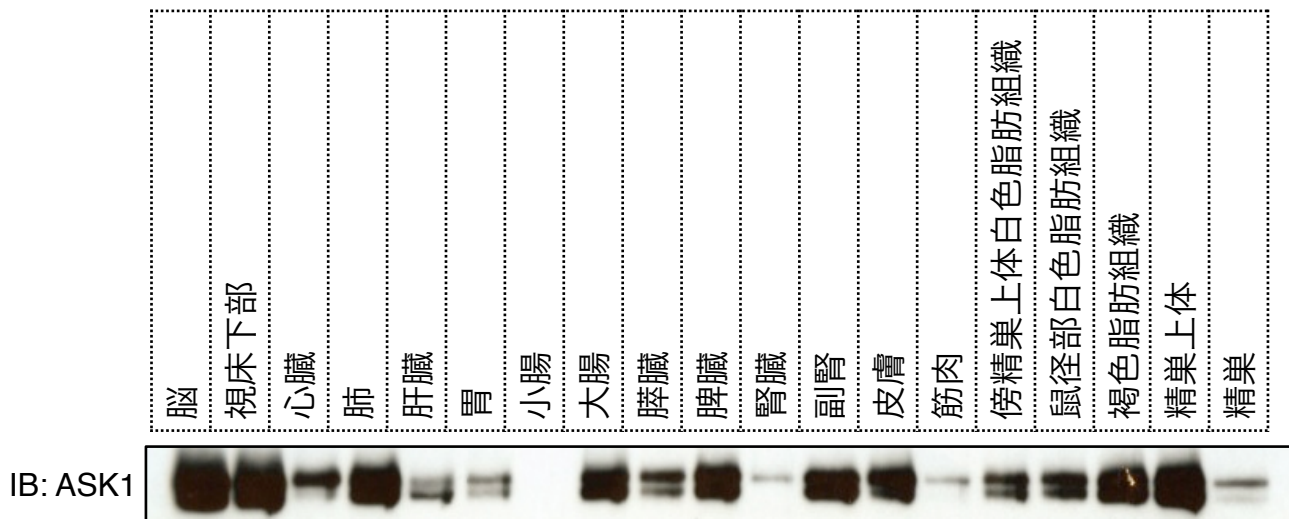


Fig. 1 ASK1とストレス応答性MAPキナーゼ経路

細胞は日々様々なストレスにさらされているため、恒常性を保つための適切なストレス応答が必要となる。当研究室で同定し、詳細な解析を行ってきたストレス応答性キナーゼであるASK1は、細胞内外で生じる様々なストレスによって活性化し、適切な生理応答を引き起こす。

A



B

組織	心臓	肝臓	胃	脾臓	脂肪
ASK1 が 関与する現象	?	細胞死	増殖	サイトカイン 産生	遺伝子 発現
ASK1が 関与する病態	心肥大 リモデリング	肝障害	胃癌	敗血症	?

Fig. 2 ASK1の組織発現分布と機能、関与する病態

- A. 野生型マウスよりサンプリングした各組織をホモジナイズし、サンプル化したものを用い、イムノプロットを行った。各サンプルはタンパク定量を行い、全ての組織に関して同タンパク量のサンプルを実験に用いた。
- B. ASK1の機能や病態に関する過去の知見をまとめた。

野生型キナーゼ

Analog-Sensitive (as) キナーゼ

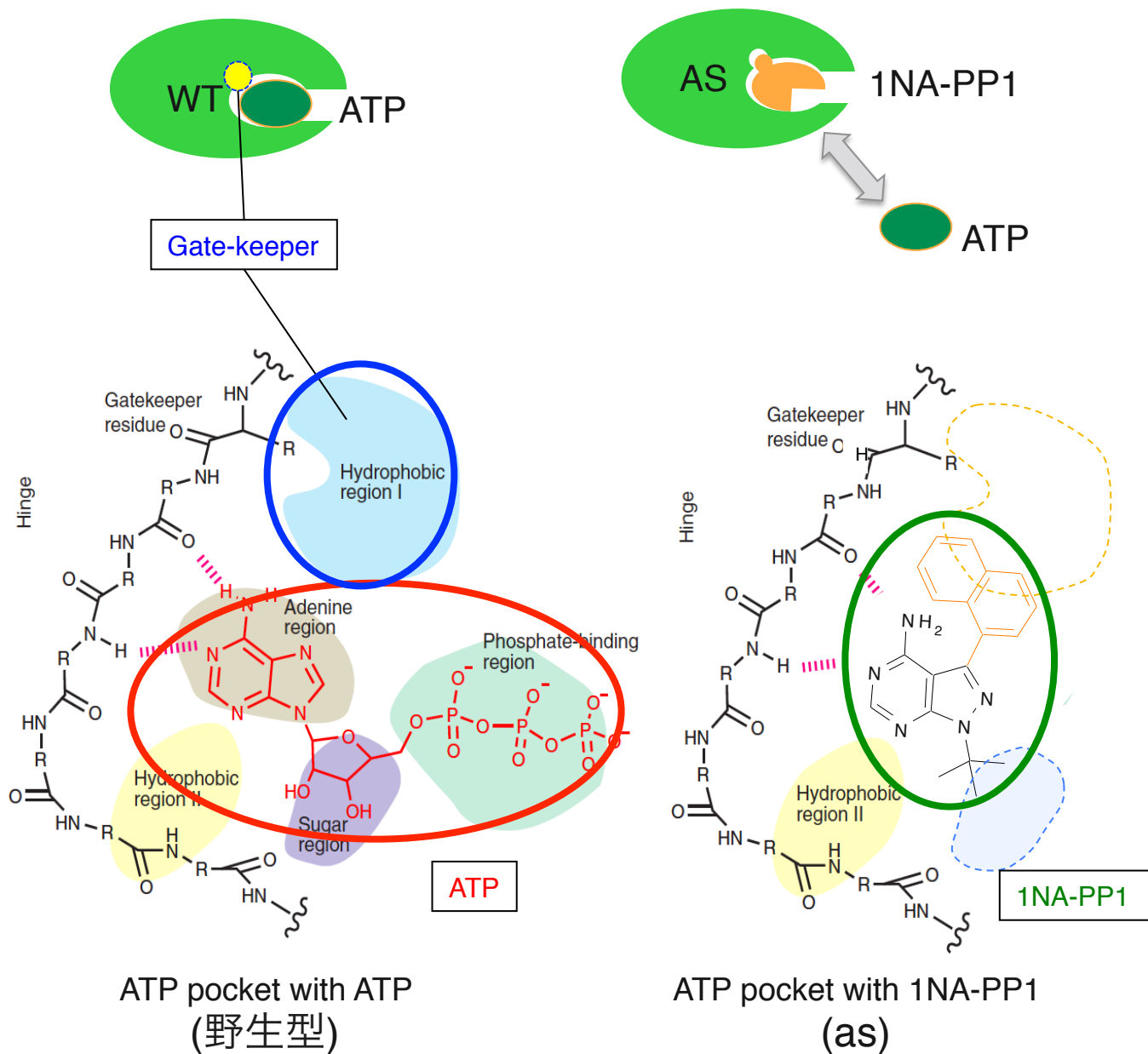


Fig. 3 Analog-sensitive (as) kinase allele (ASKA) テクノロジー

キナーゼのATP結合部位にはゲートキーパー領域が存在するため、かさ高いATPアナログである1NA-PP1は侵入することが出来ない。しかしながら、ゲートキーパー領域にアミノ酸変異を加えることで1NA-PP1はATP結合部位に結合することが可能になる。このような変異を加えたキナーゼをAnalog-Sensitive (as) キナーゼと呼ぶ。

Nat Chem Biol. **2** 358– 64 (2006), 改変済み

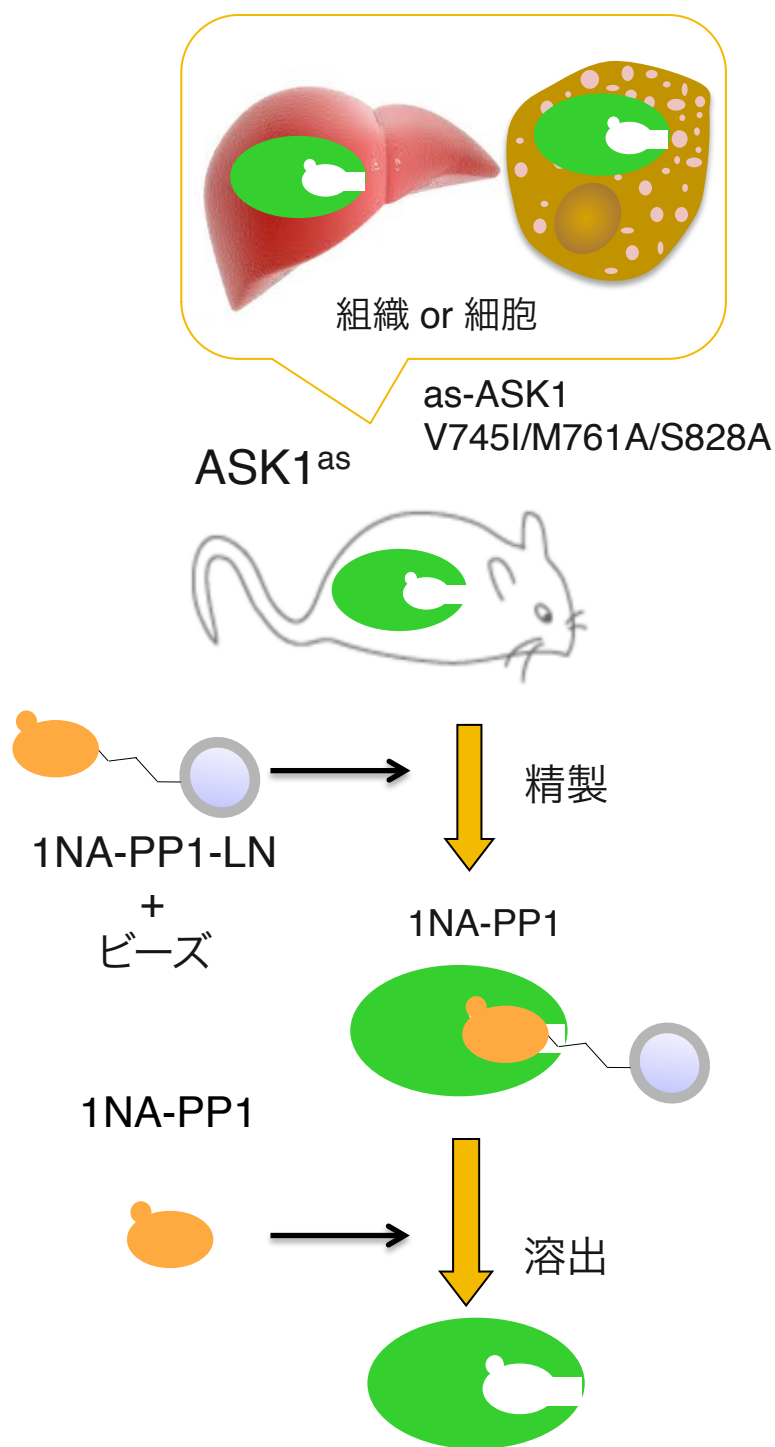
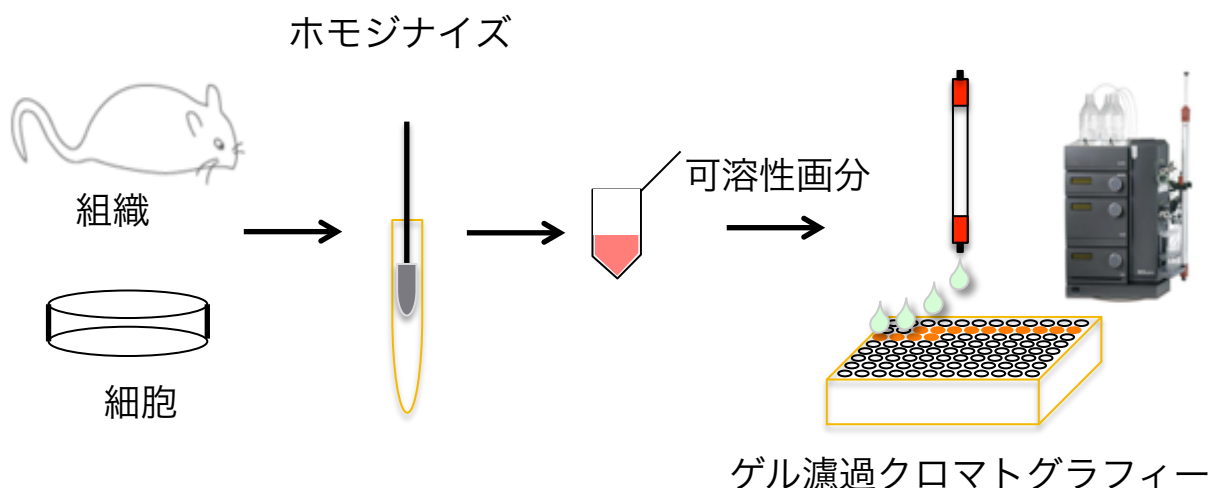


Fig. 4 新規ケミカルプルダウン法

新規ケミカルプルダウン法のプロトコル。本精製法ではas-ASK1 のノックインマウス、通称ASKAマウス 由来の初代培養細胞又は組織の溶解液と1NA-PP1をリンカーを介して結合させたビーズをインキュベートすることで内在性のas-ASK1を精製し、続いて1NA-PP1を過剰に加えることで、ビーズよりas-ASK1を溶出する。この実験系では1NA-PP1は野生型のリン酸化酵素のATPポケットには侵入することが出来ないため、as型に改変されていない他のリン酸化酵素は精製されず、as型に改変されたASK1のみを精製することが出来る。

A



B

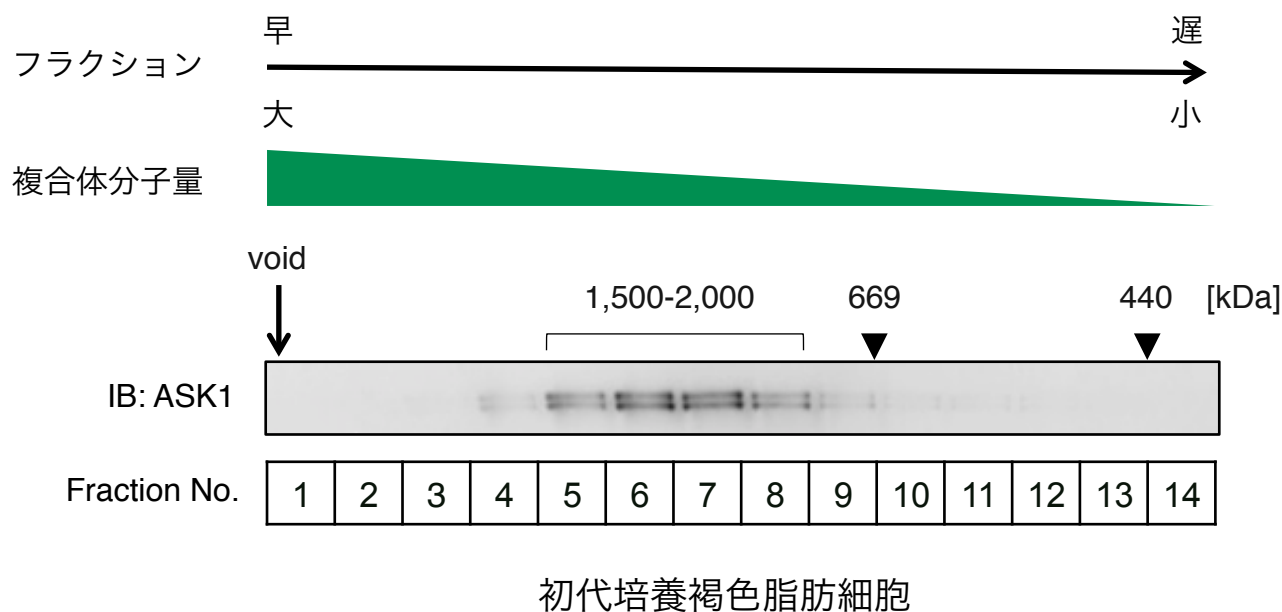


Fig. 5 ASK1は非常に大きな複合体を形成している

A. ゲル濾過クロマトグラフィー実験のプロトコル

B. day 6の初代培養褐色脂肪細胞をH buffer + 150 mM NaCl を用いて回収し、ホモジナイズした後に遠心し、回収した上清を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。回収した各フラクションを用いてイムノプロットを行い、ASK1の検出されるフラクションの検討を行った。

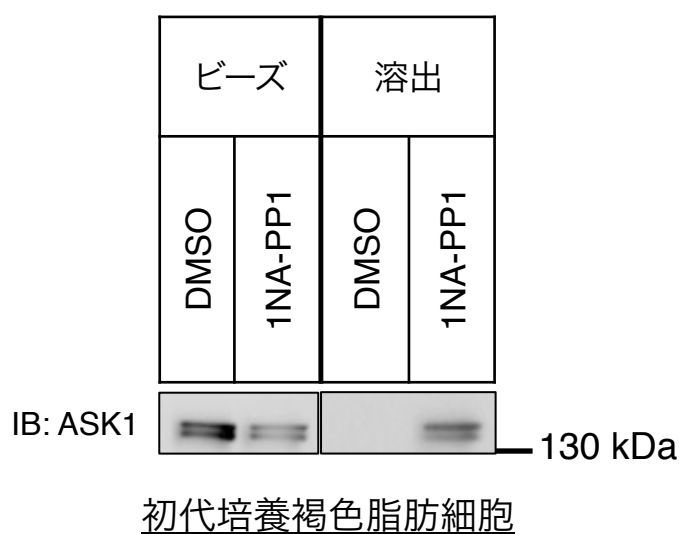
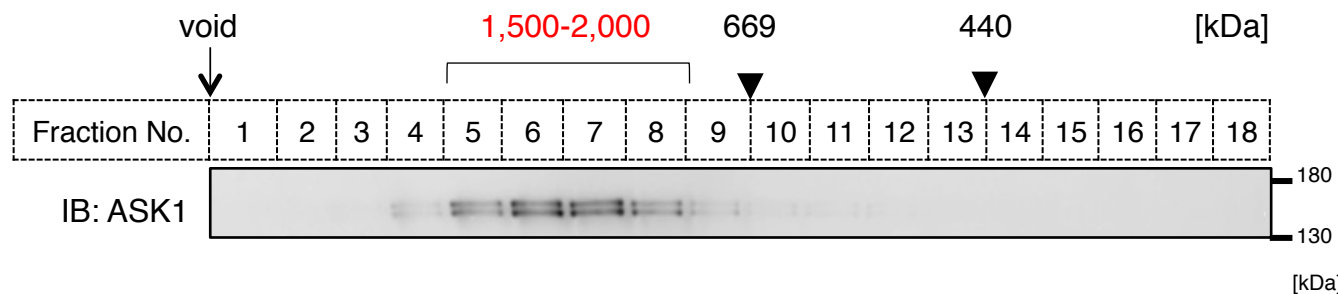


Fig. 6 新規ケミカルプルダウン法

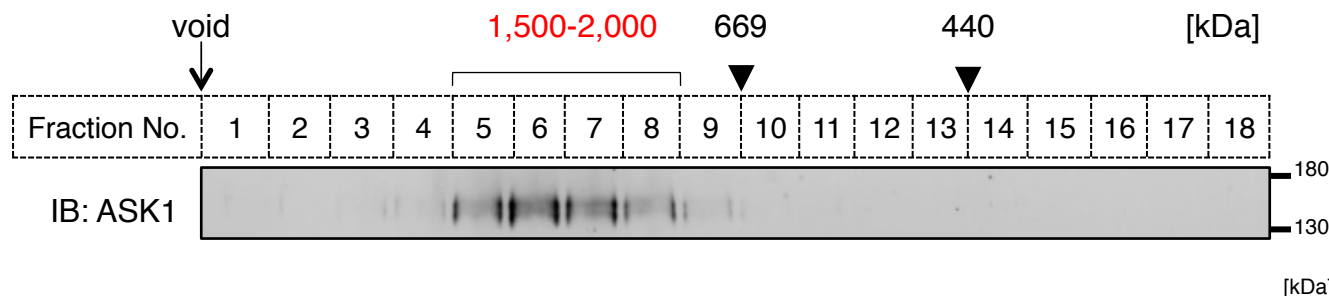
day 6の初代培養褐色脂肪細胞をH buffer+150 mM NaCl を用いて回収し、新規ケミカルプルダウン法により内在性as-ASK1を精製した。精製したサンプルは過剰量の1NA-PP1を加えることでビーズより溶出した。溶出したサンプルおよび残存ビーズを用いて抗ASK1抗体によりイムノブロットを行った。

A



初代培養褐色脂肪細胞 (精製前)

B

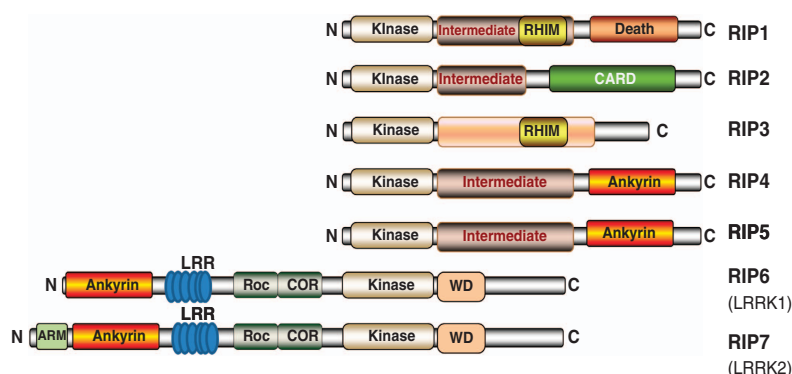


初代培養褐色脂肪細胞 (精製後)

Fig. 7 精製操作によりASK1複合体の大きさは変化しない

- 初代培養褐色脂肪細胞をH buffer+150 mM NaClを用いて回収し、ホモジナイズした後に、遠心を行い回収した上清をサンプルとして用い、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。回収した各フラクションはサンプル化した後にイムノプロットに用いた。
- 初代培養褐色脂肪細胞を用いて新規ケミカルプルダウン法により内在性のas-ASK1を精製、溶出後のサンプルをH bufferで希釈した後に、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。回収した各フラクションはサンプル化した後にイムノプロットに用いた。

A



B

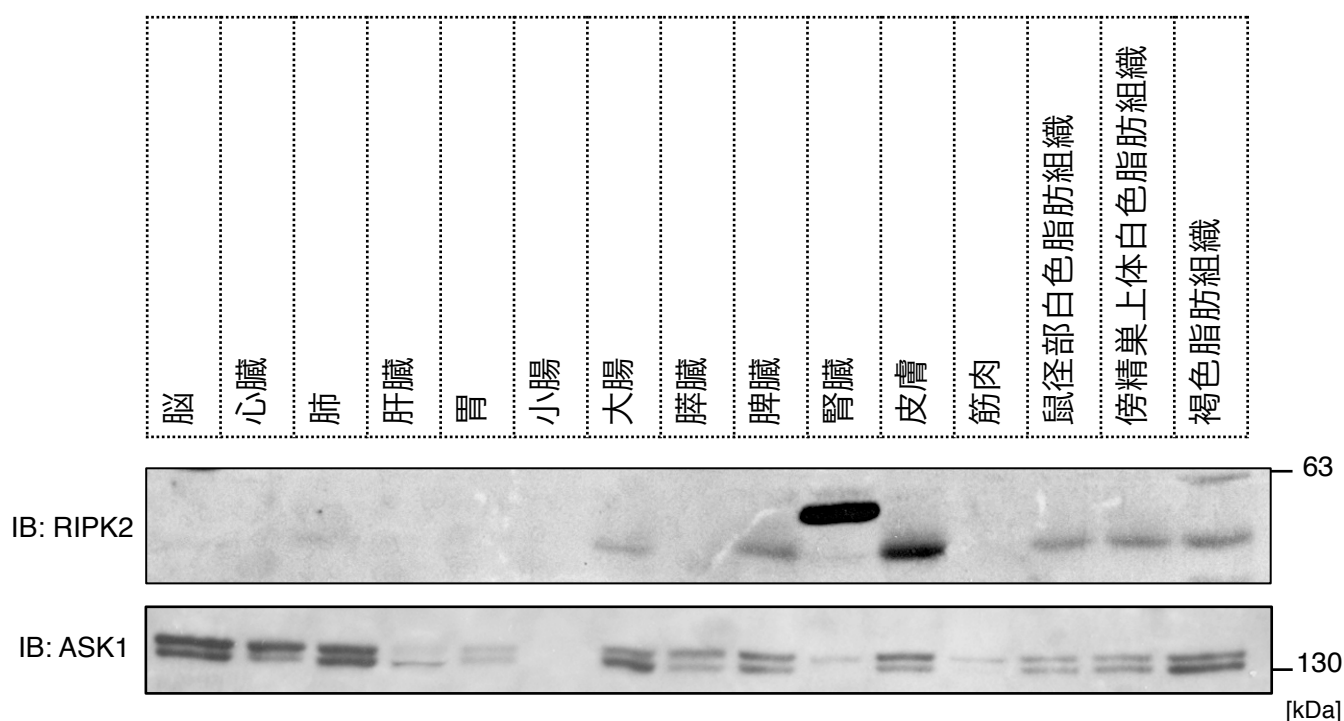


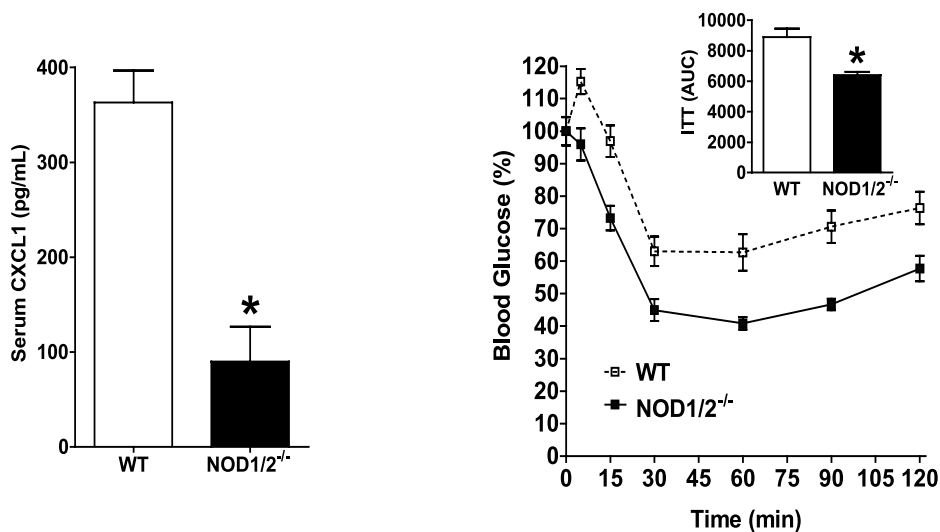
Fig. 8 RIPK2の一次構造と組織発現分布

- A. RIPK2の一次構造を示す。RIPK2は他のRIPファミリー分子と同様にキナーゼドメインを有している。CARDドメインはRIPK2のみが持つ特徴的なモチーフであり、RIPK2の機能を発揮するために重要であることが知られている。 *Cell Death Differ.* **22**, 225–236 (2014)
- B. 抗RIPK2抗体を用い、RIPK2の組織発現分布を検討した。野生型マウスよりサンプリングした各組織をホモジナイズし、サンプル化したものを用い、イムノブロットを行った。各サンプルはタンパク定量を行い、全ての組織に関して同タンパク量のサンプルを実験に用いた。

A

炎症性サイトカイン

インスリン負荷試験



B

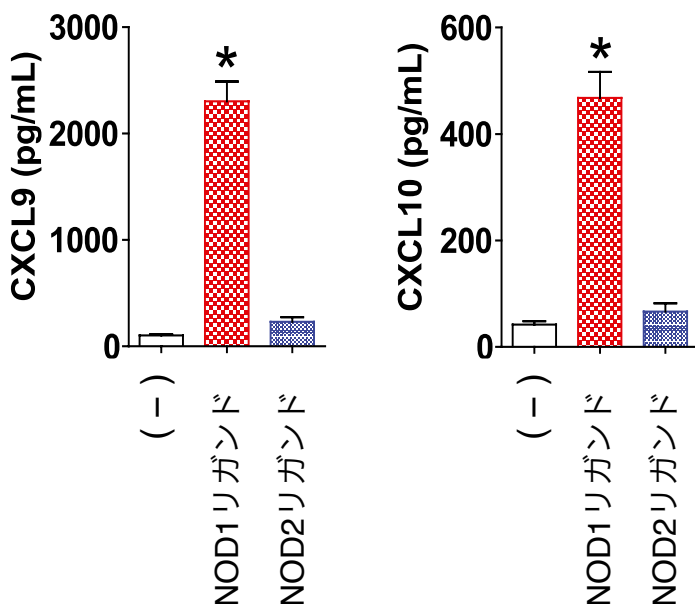


Fig. 9 NOD1経路の脂肪組織での既知の機能

A. NOD1およびNOD2を共に欠損させたマウスに高脂肪食負荷を行った後の血中炎症性サイトカイン量とインスリン負荷試験の結果。 *Diabetes*. **60**, 2206–2215 (2011), 改変済み

B. NOD1リガンドをマウスに投与した後、白色脂肪組織をサンプリングし、炎症性サイトカイン産生量をELISAにて定量した。 *Diabetes*. **60**, 2206–2215 (2011), 改変済み

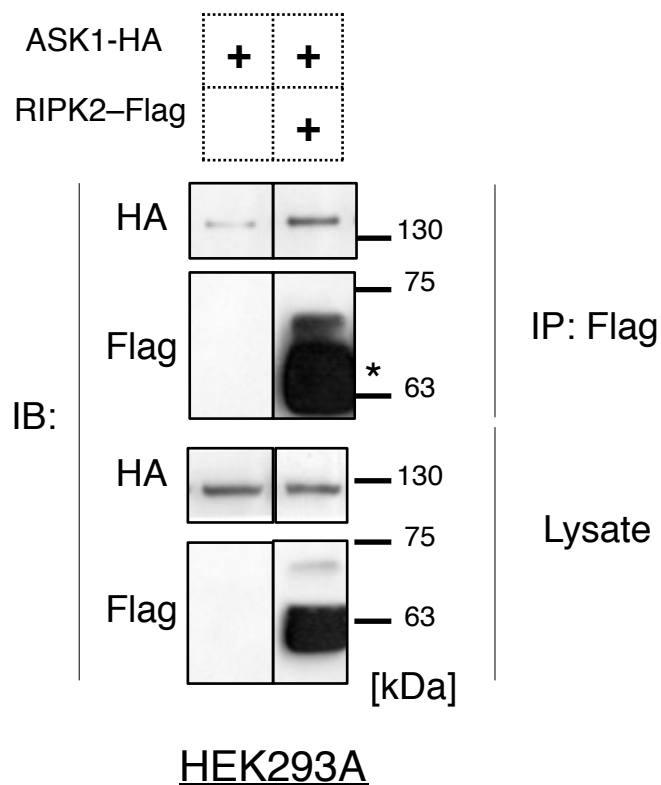
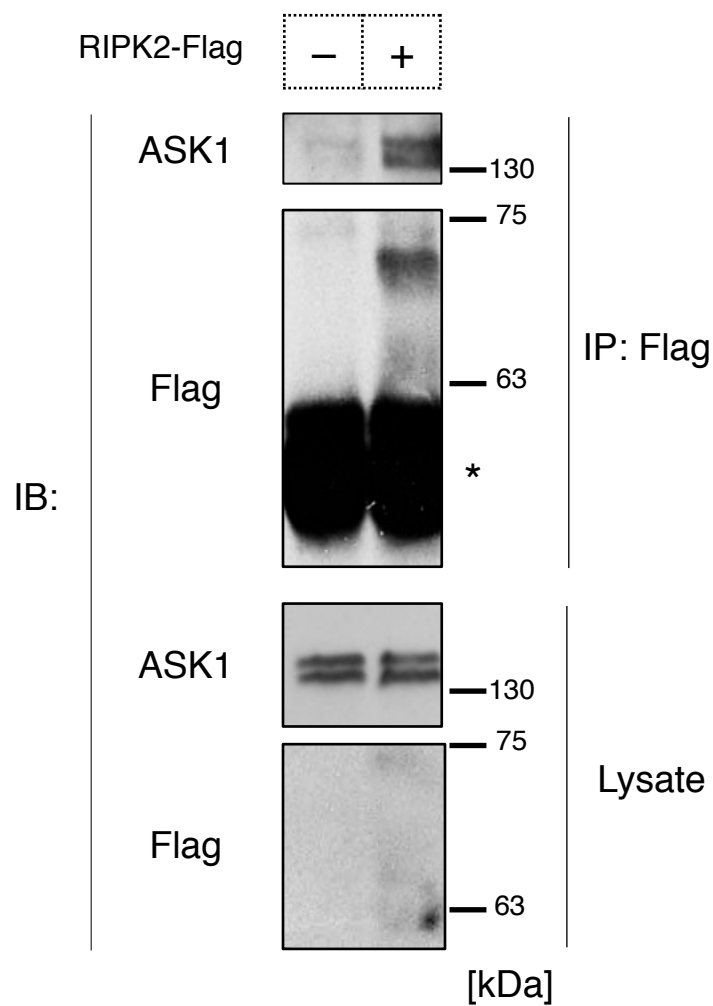
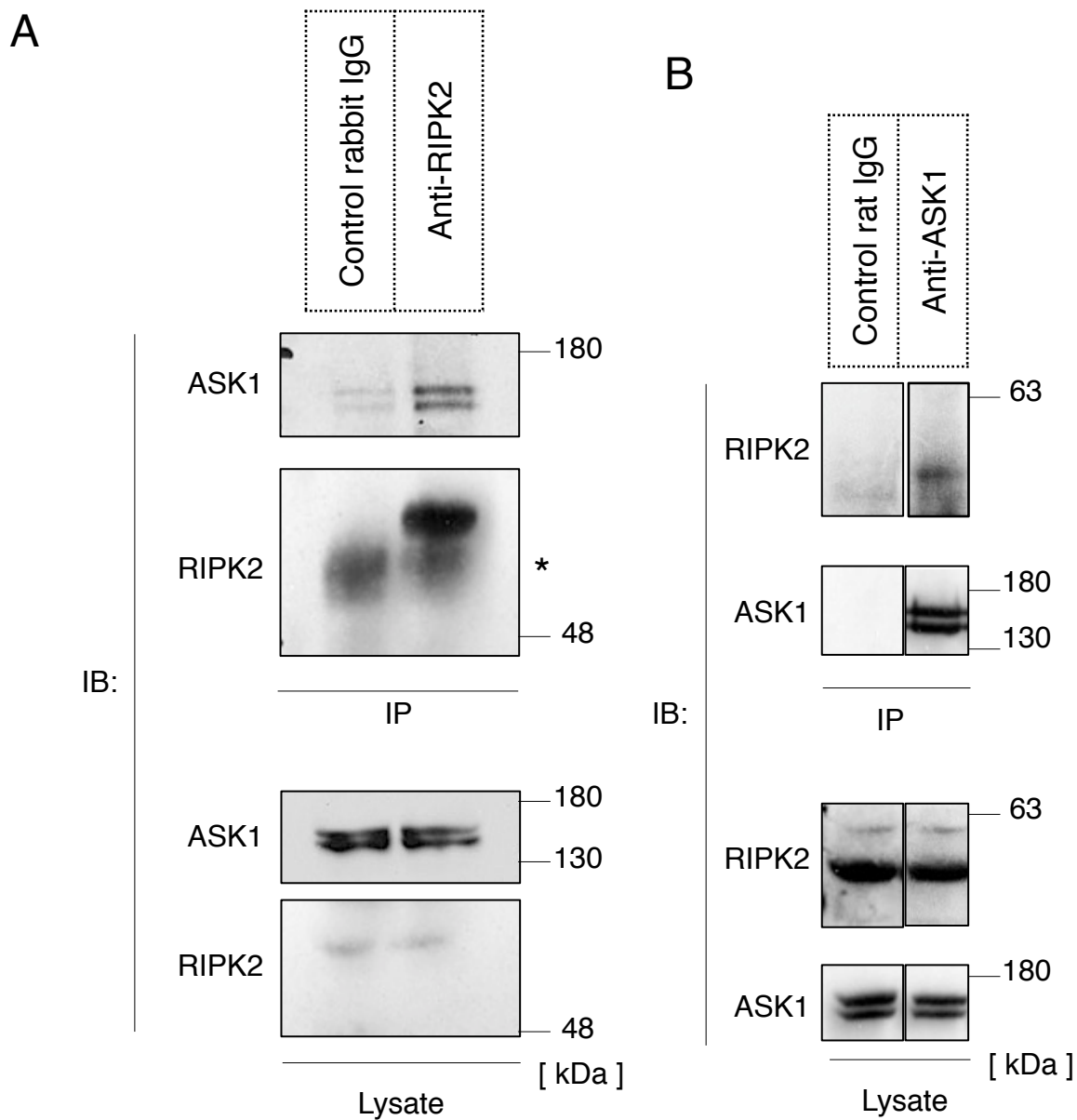


Fig. 10 HEK293A細胞において過剰発現したRIPK2とASK1は結合する
 HEK293A細胞にASK1-HA、RIPK2-Flagを共発現させ、抗Flag抗体によってRIPK2を免疫沈降し、抗HA抗体でRIPK2との結合を検出した。
 *は非特異的バンドを示す。



初代培養褐色脂肪細胞

Fig. 11 初代培養褐色脂肪細胞において、過剰発現したRIPK2と内在性のASK1は結合する
 day 2の初代培養褐色脂肪細胞にアデノウイルスを感染させることでRIPK2-Flagを過剰発現し、day 6まで培養した後に免疫沈降実験に用いた。抗Flag抗体ビーズによりRIPK2-Flagを免疫沈降し、抗ASK1抗体を用いて内在性のASK1との結合を確認した
 *は非特異的バンドを示す。



初代培養褐色脂肪細胞

Fig. 12 初代培養褐色脂肪細胞において内在性のRIPK2とASK1が結合する

A. 初代培養褐色脂肪細胞を用いて抗RIPK2抗体により内在性のRIPK2の免疫沈降を行った。抗ASK1抗体を用いて内在性のASK1とRIPK2の結合を確認した。

B. 初代培養褐色脂肪細胞を用いて抗ASK1抗体により内在性のASK1の免疫沈降を行った。抗RIPK2抗体を用いて内在性のASK1とRIPK2の結合を確認した。

*は非特異的バンドを示す。

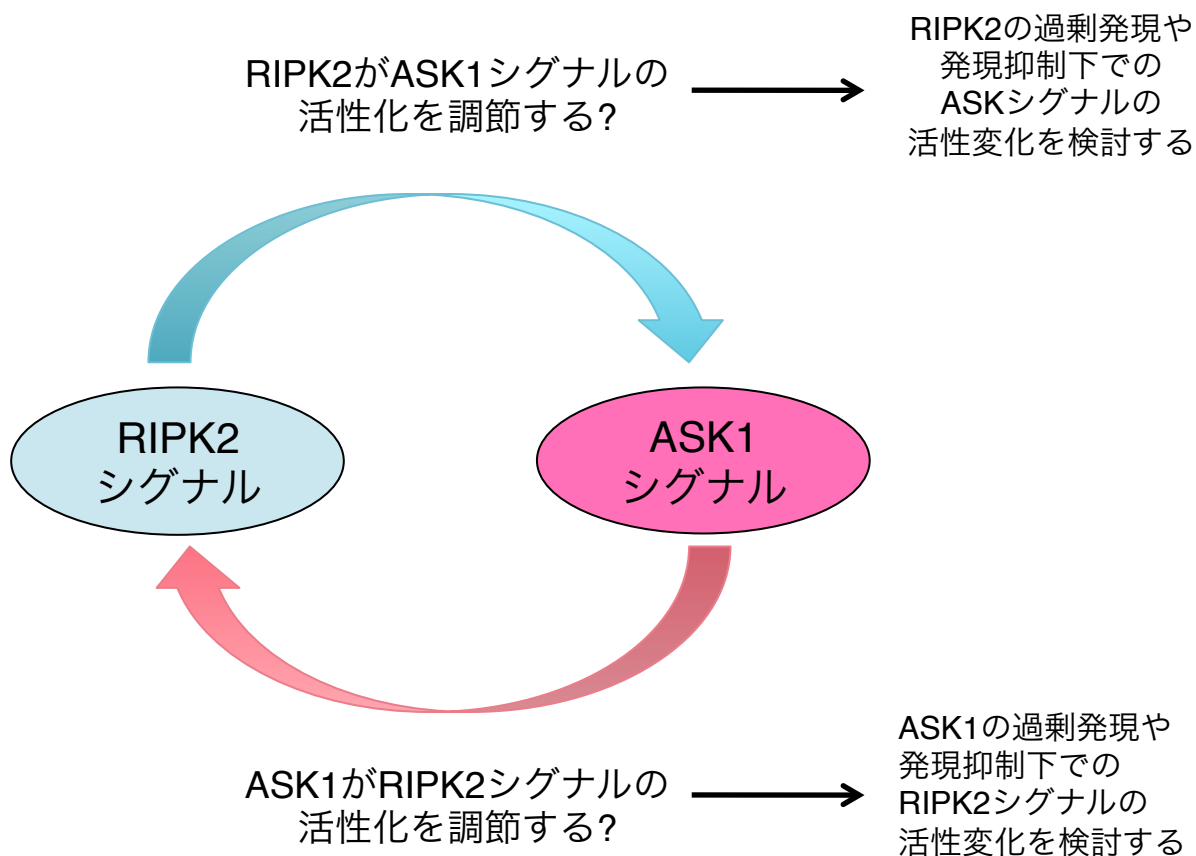


Fig. 13 NOD1経路におけるASK1とRIPK2の結合の意義の検討

RIPK2がNOD1経路において重要な機能を有していることから、NOD1経路におけるASK1とRIPK2の結合の意義を検討することとした。ASK1とRIPK2の結合の意義には二通りの可能性が考えられる。

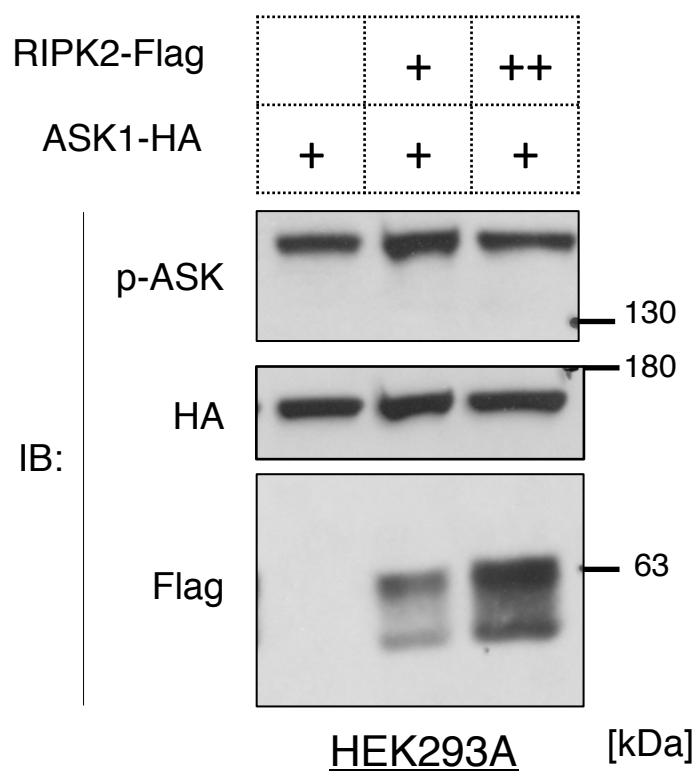


Fig. 14 HEK293A細胞においてASK1のRIPK2共発現依存的な活性化はみられない
 HEK293A細胞にASK1-HAおよびRIPK2-Flagを過剰発現した細胞を用いてイムノブロットを行った。ASK1の活性は当研究室で作製されたリン酸化ASK1抗体を用いて評価した。

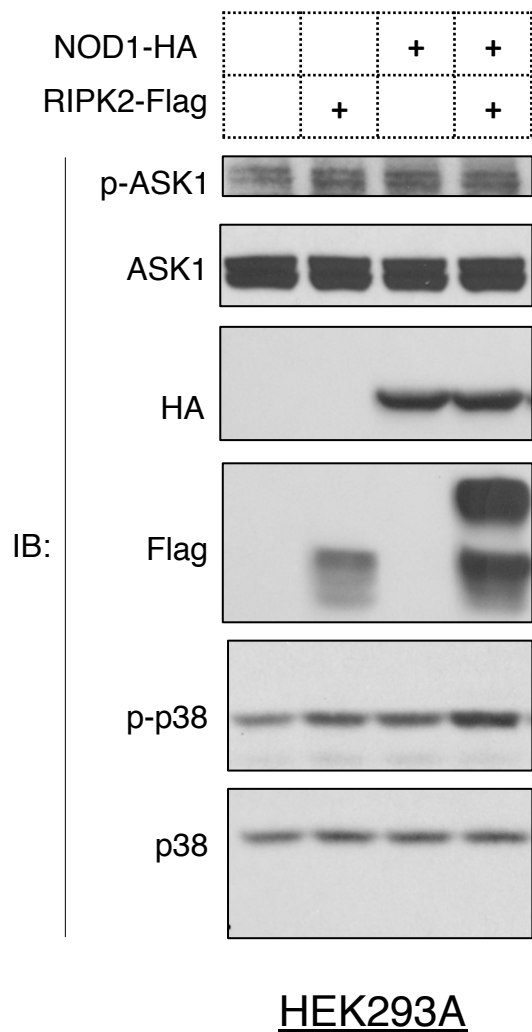
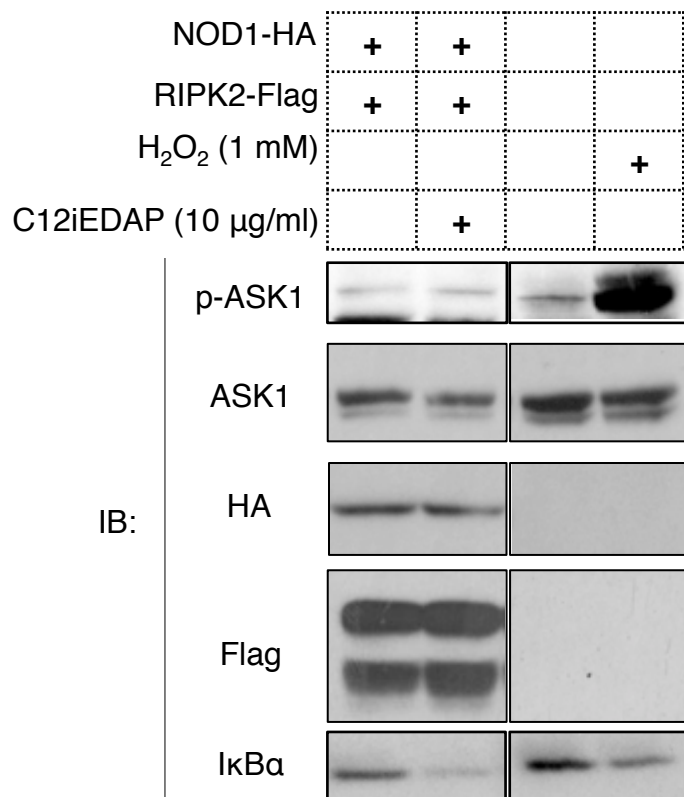


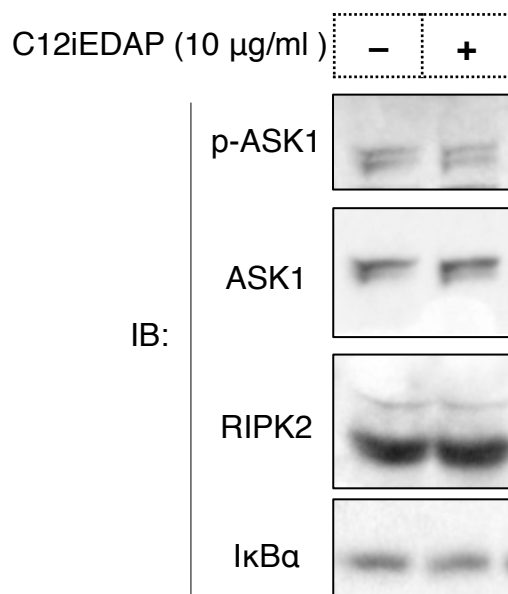
Fig. 15 HEK293A細胞においてNOD1およびRIPK2過剰発現依存的な内在性ASKの活性化はみられない

HEK293A細胞にNOD1-HAおよびRIPK2-Flagを過剰発現した細胞を用いイムノブロットを行った。内在性ASK1の活性は当研究室で作製されたリン酸化ASK1特異的抗体を用いて評価した。



HEK293A

Fig. 16 HEK293A細胞においてC12iEDAP依存的なASK1の活性化はみられない
 HEK293A細胞にNOD1-HAおよびRIPK2-Flagを過剰発現し、C12iEDAP (10 µg/mL) 刺激を1時間行った細胞を用いてイムノプロットを行った。内在性ASK1の活性化のポジティブコントロールとしてH₂O₂刺激 (1 mM) を15分間行った細胞を用意した。内在性ASK1の活性は当研究室で作製されたリン酸化ASK1特異的抗体を用いて評価した。

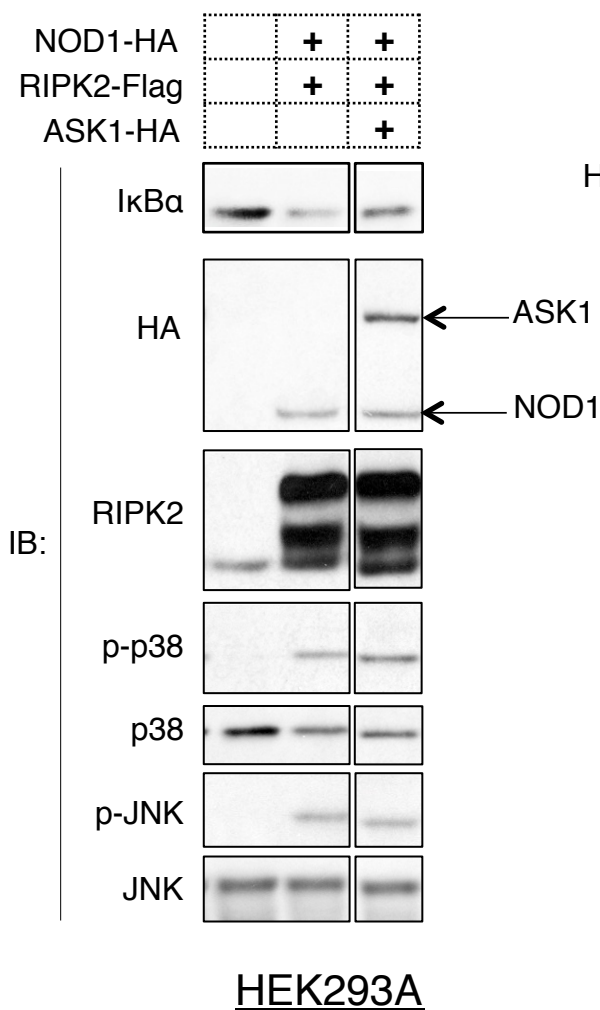


初代培養褐色脂肪細胞

Fig. 17 初代培養褐色脂肪細胞においてNOD1リガンド刺激依存的にASKの活性は変化しない

初代培養褐色脂肪細胞にC12iEDAP (10 μ g/mL) 処置を1時間行った細胞を用いてイムノブロットを行った。ASK1の活性は当研究室で作製されたリン酸化ASK1特異的抗体を用いて評価した。

A



B

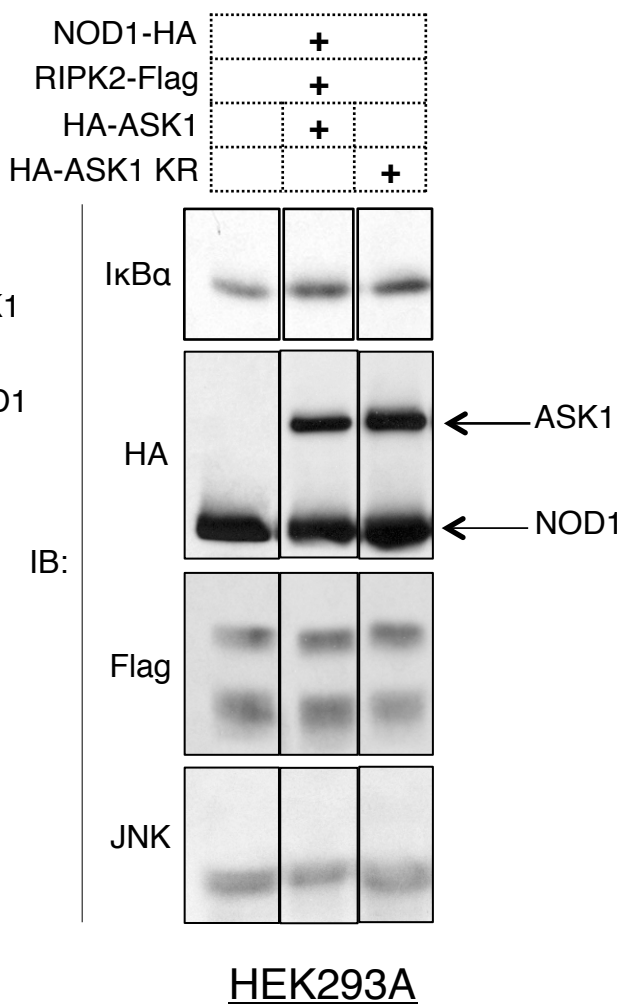


Fig. 18 ASK1はNOD1-RIPK2経路においてキナーゼ活性非依存的にNFκB経路を抑制的に制御する

- A. HEK293A細胞にNOD1-HA、RIPK2-Flag、HA-ASK1を過剰発現した細胞を用いてイムノブロットを行った。抗IkBα抗体を用いてIkBαの分解を検出することで、NFκBシグナルの活性化度合いを検討した。
- B. HEK293A細胞にNOD1-HA、RIPK2-Flag、HA-ASK1 (野生型またはKR変異体)を過剰発現した細胞を用いてイムノブロットを行った。抗IkBα抗体を用いてIkBαの分解を検出することで、NFκBシグナルの活性化度合いを検討した。

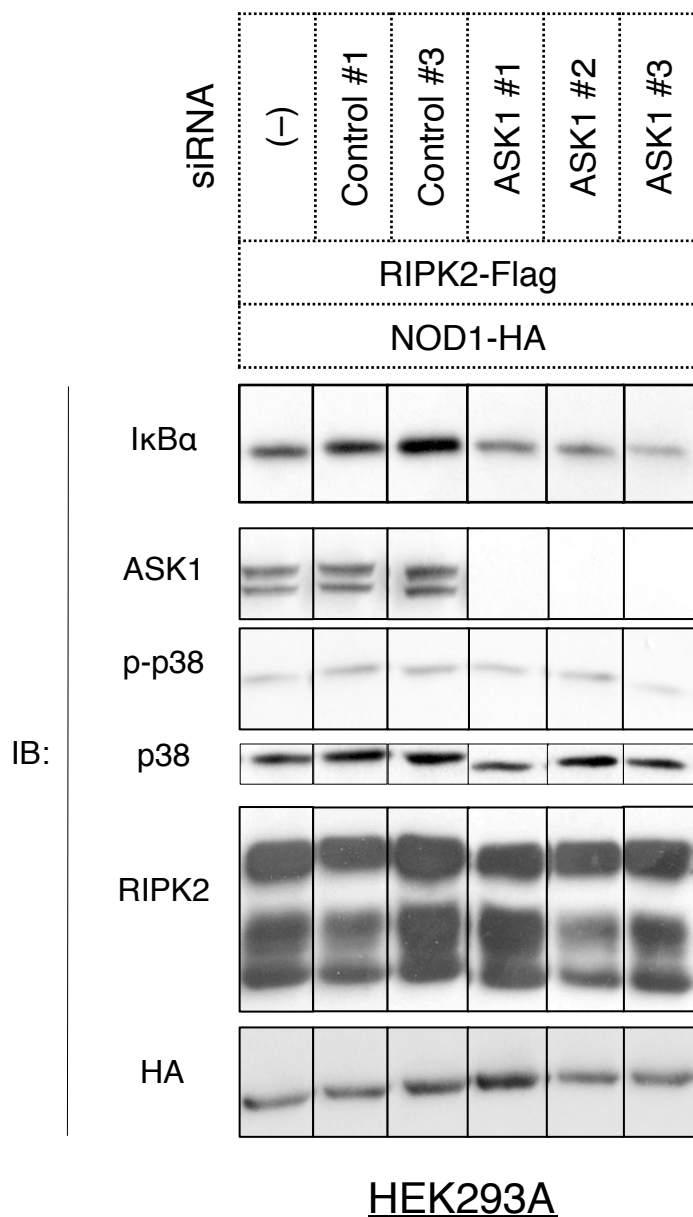


Fig. 19 HEK293A細胞においてNOD1およびRIPK2過剰発現依存的なIκBαの分解がASK1の発現抑制により亢進する

HEK293A細胞にASK1に対するsiRNAを導入後、NOD1-HAおよびRIPK2-Flagを過剰発現した細胞を用いてイムノブロットを行った。抗IκBα抗体を用いてIκBαの分解を検出することで、NFκBシグナルの活性化度合いを検討した。

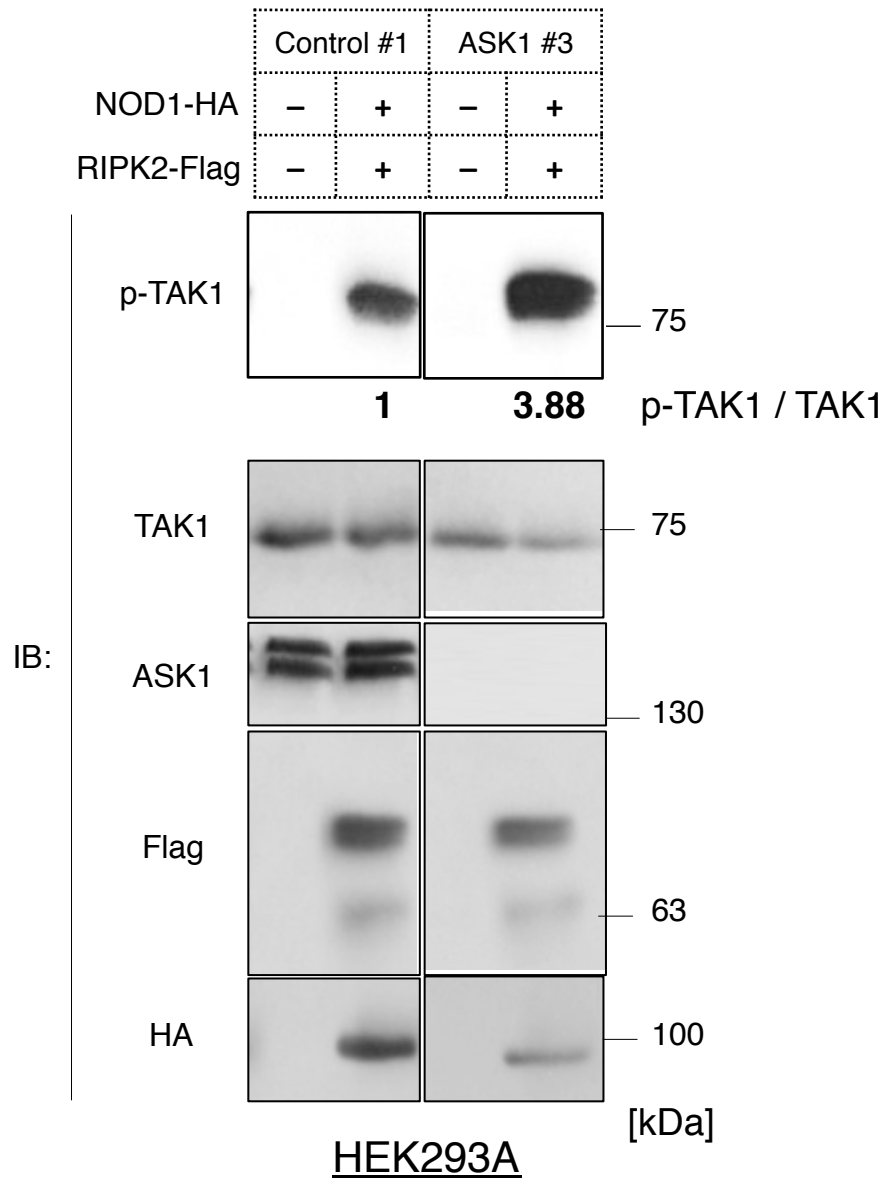
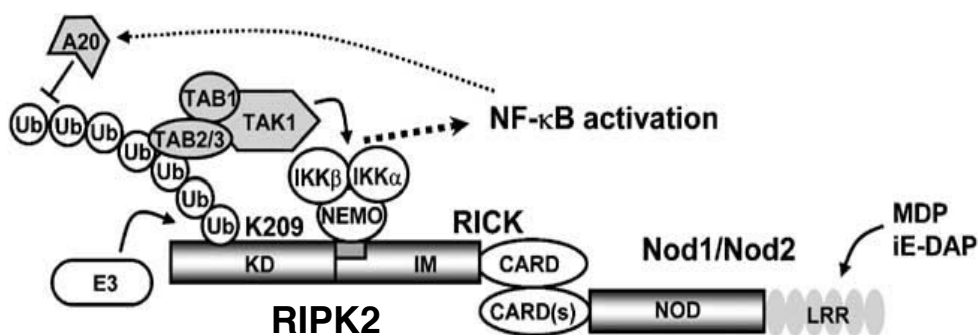


Fig. 20 HEK293A細胞においてNOD1およびRIPK2過剰発現依存的なTAK1の活性化がASK1の発現抑制により亢進する

HEK293A細胞にASK1に対するsiRNAを導入後、NOD1-HAおよびRIPK2-Flagを過剰発現した細胞を用いてイムノブロットを行った。TAK1の活性は抗リン酸化TAK1抗体を用いて評価した。p-TAK1およびTAK1のバンドをImage Jを用いて定量し、p-TAK1のバンド強度/TAK1のバンド強度の値を算出し、TAK1の活性化程度を比較するために用いた。

A



B

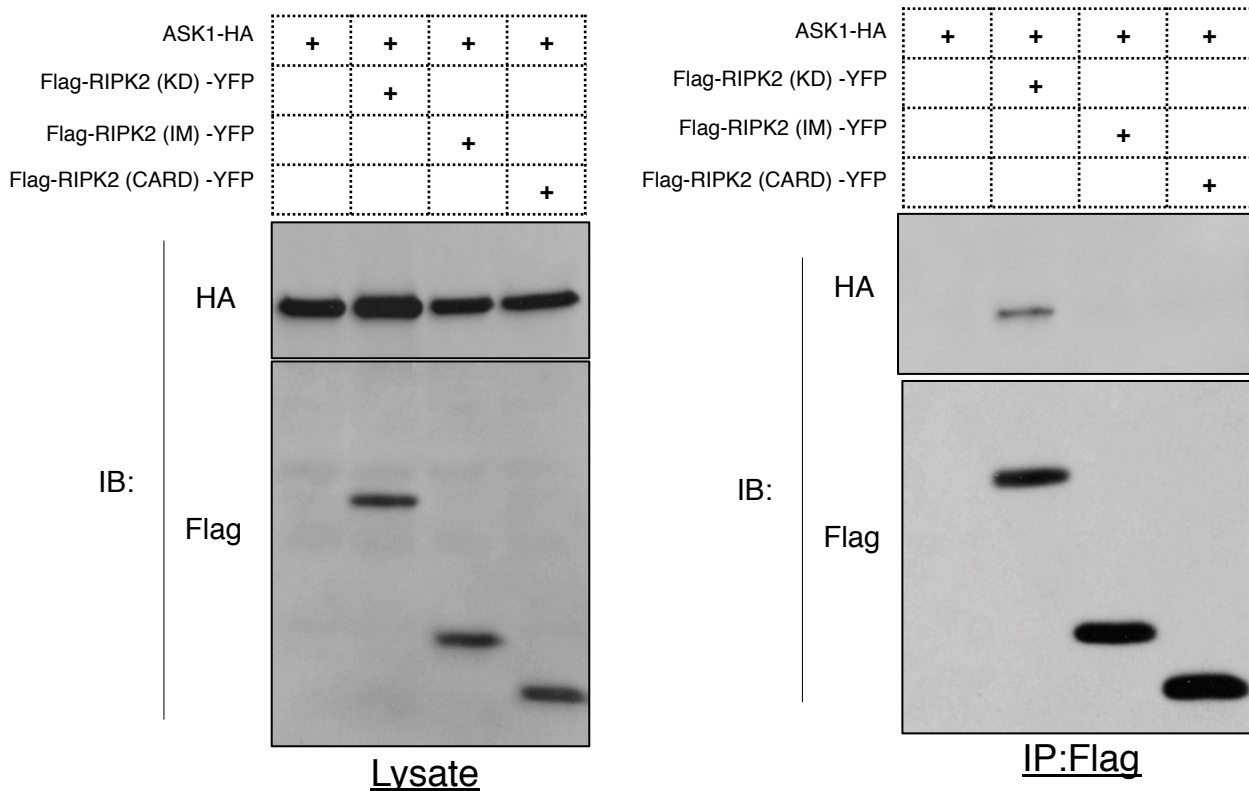


Fig. 21 HEK293A細胞においてRIPK2のKDと ASK1が結合する

- A. RIPK2はkinaseドメイン (KD)、intermediatedドメイン (IM)、CARD (CARD) が存在する。KDにはTAK1がRIPK2と結合するために必要なユビキチン化サイトが存在する。RICKがRIPK2のことを示す。 *EMBO J.* 27 373–83 (2008), 改変済み
- B. HEK293A細胞に、Flag-RIPK2 (KD) –YFP、Flag-RIPK2 (IM) –YFP、Flag-RIPK2 (CARD) –YFPをASK1-HAと共発現させ、抗Flag抗体によって各種部分欠損変異体を免疫沈降し、抗HA抗体でASK1との結合を検出した。

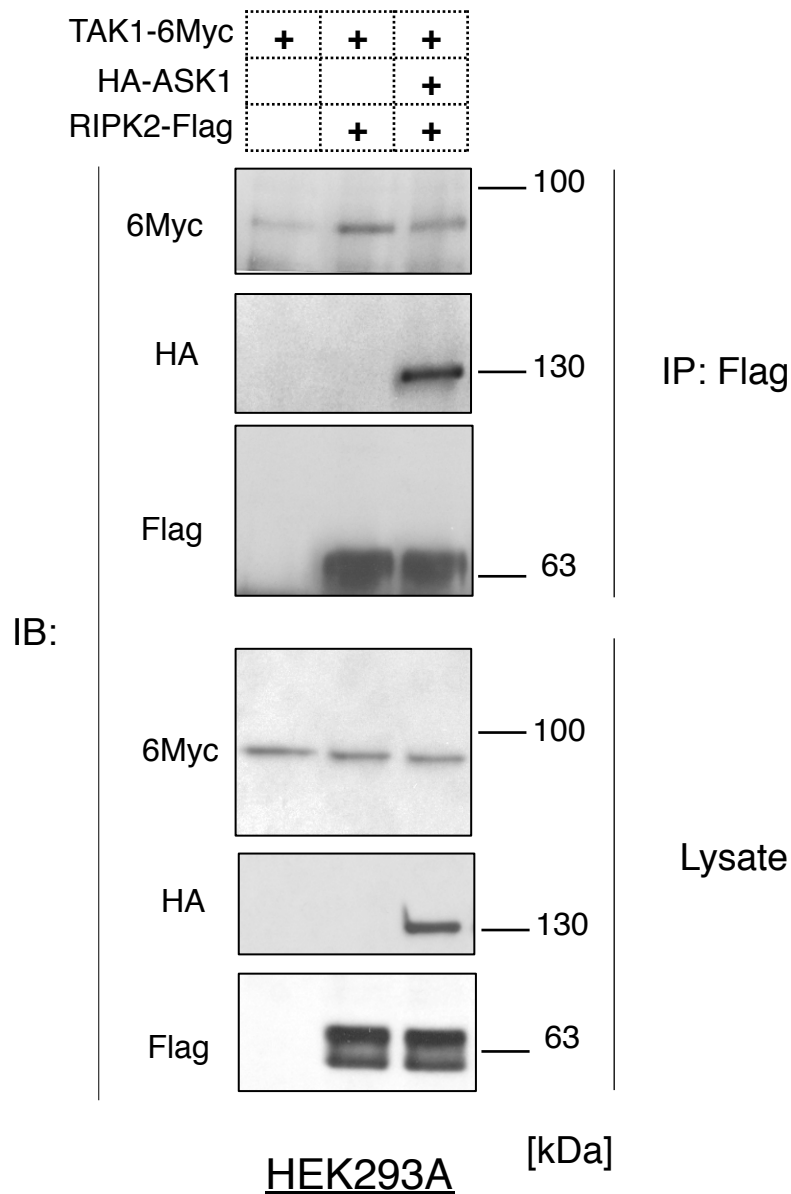


Fig. 22 ASK1の過剰発現によりRIPK2からTAK1が解離する
 HEK293A細胞にHA-ASK1、RIPK2-Flag、TAK1-6Mycを共発現させ、抗Flag抗体によってRIPK2を免疫沈降し、抗Myc抗体でTAK1との結合を検出した。

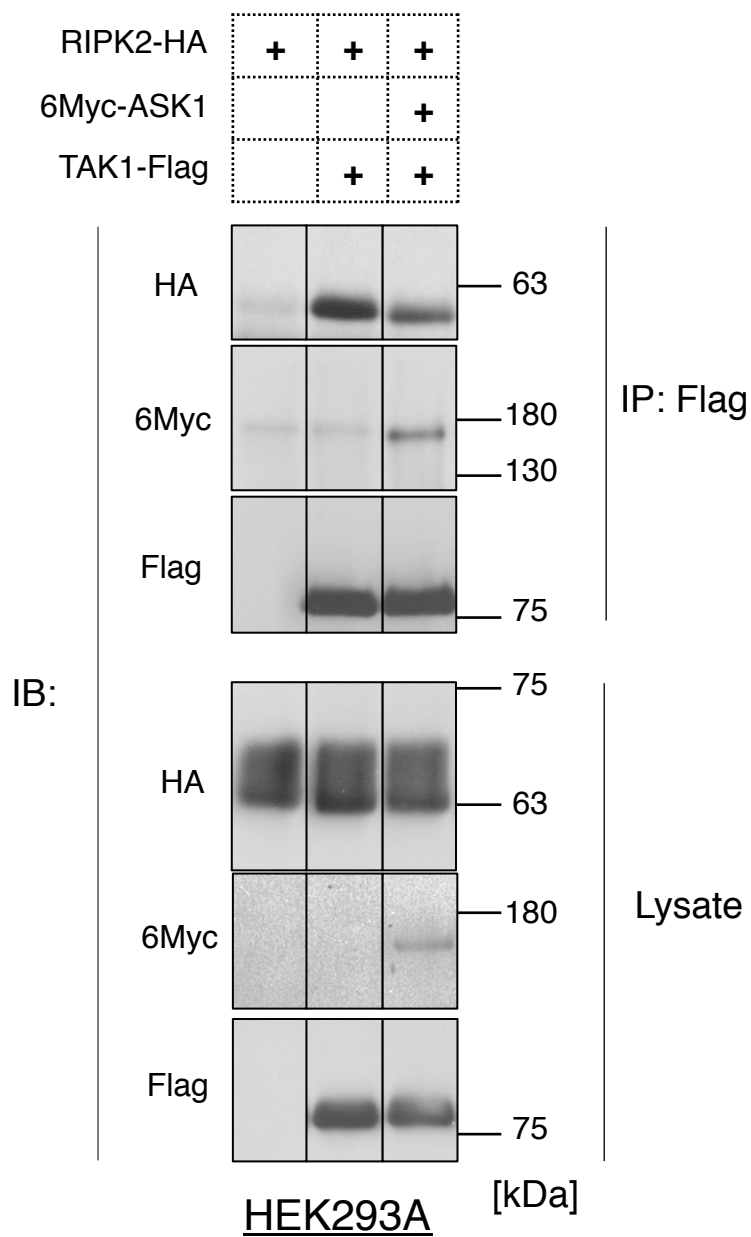
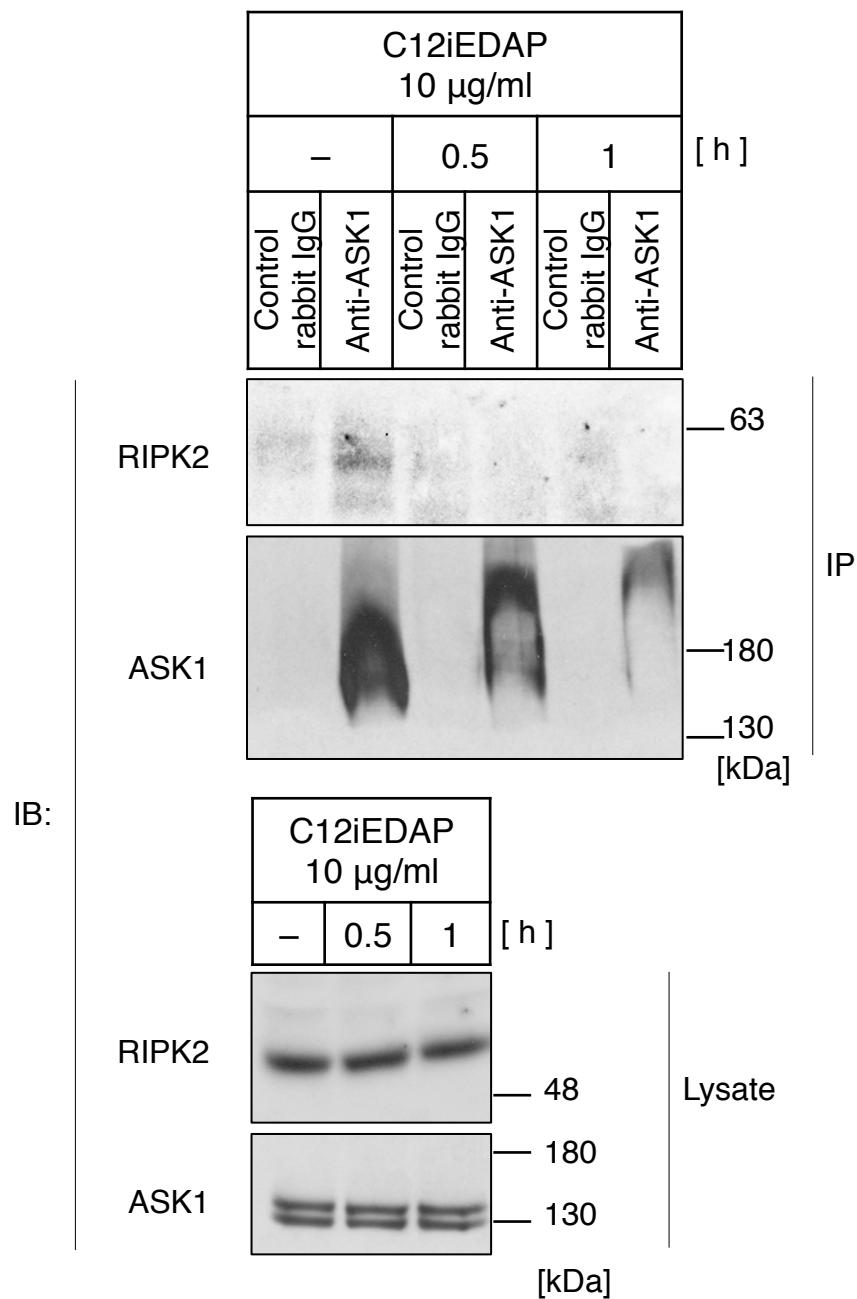


Fig.23 ASK1の過剰発現によりTAK1からRIPK2が解離する

HEK293A細胞に6Myc-ASK1、RIPK2-HA、TAK1-Flagを共発現させ、抗Flag抗体によってTAK1を免疫沈降し、抗HA抗体でRIPK2との結合を検出した。



初代培養褐色脂肪細胞

Fig. 24 初代培養褐色脂肪細胞においてNOD1リガンド刺激依存的にASK1からRIPK2が解離する

初代培養褐色脂肪細胞にC12iEDAP (10 μ g/mL) 処置を行い、0.5-1時間後に内在性のASK1を免疫沈降し、抗RIPK2抗体で内在性ASK1と内在性RIPK2の結合を検出した。

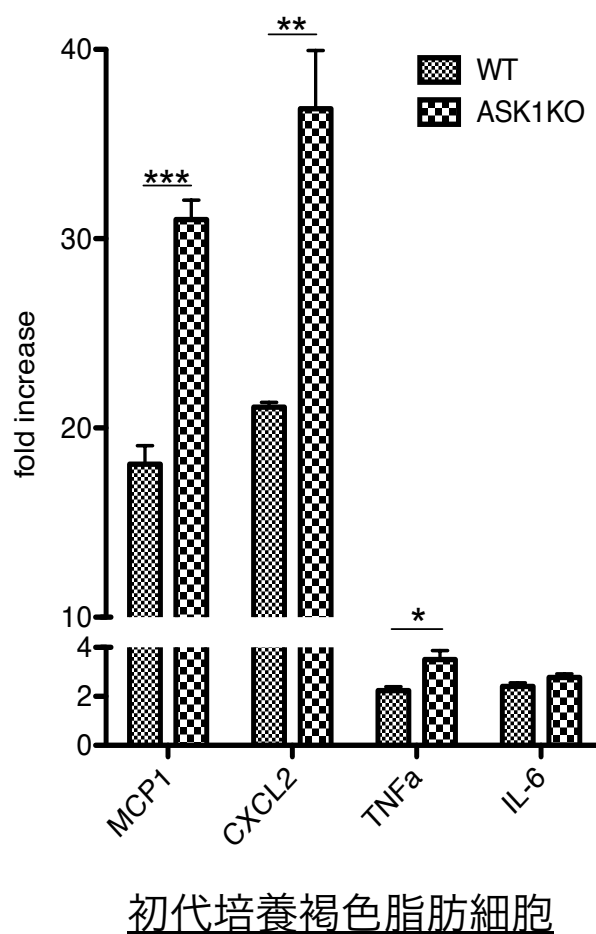


Fig. 25 ASK1は初代培養褐色脂肪細胞におけるNOD1リガンド刺激依存的な炎症性サイトカイン産生を抑制する

野生型またはASK1欠損マウス由来の初代培養褐色脂肪細胞にC12iEDAP (10 μ g/mL) を処置し、6時間後の細胞を用いてcDNAを作製した。MCP1、CXCL2、TNF α 、IL-6の発現レベルをリアルタイムPCR法により検討した。DMSOを処置した細胞の遺伝子発現量を1として、fold increaseを示してある。複数回実験を行った中での代表例をTriplicateのデータとして示した。(Mean \pm SEM、n=3、*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001、unpaired student's t-test)

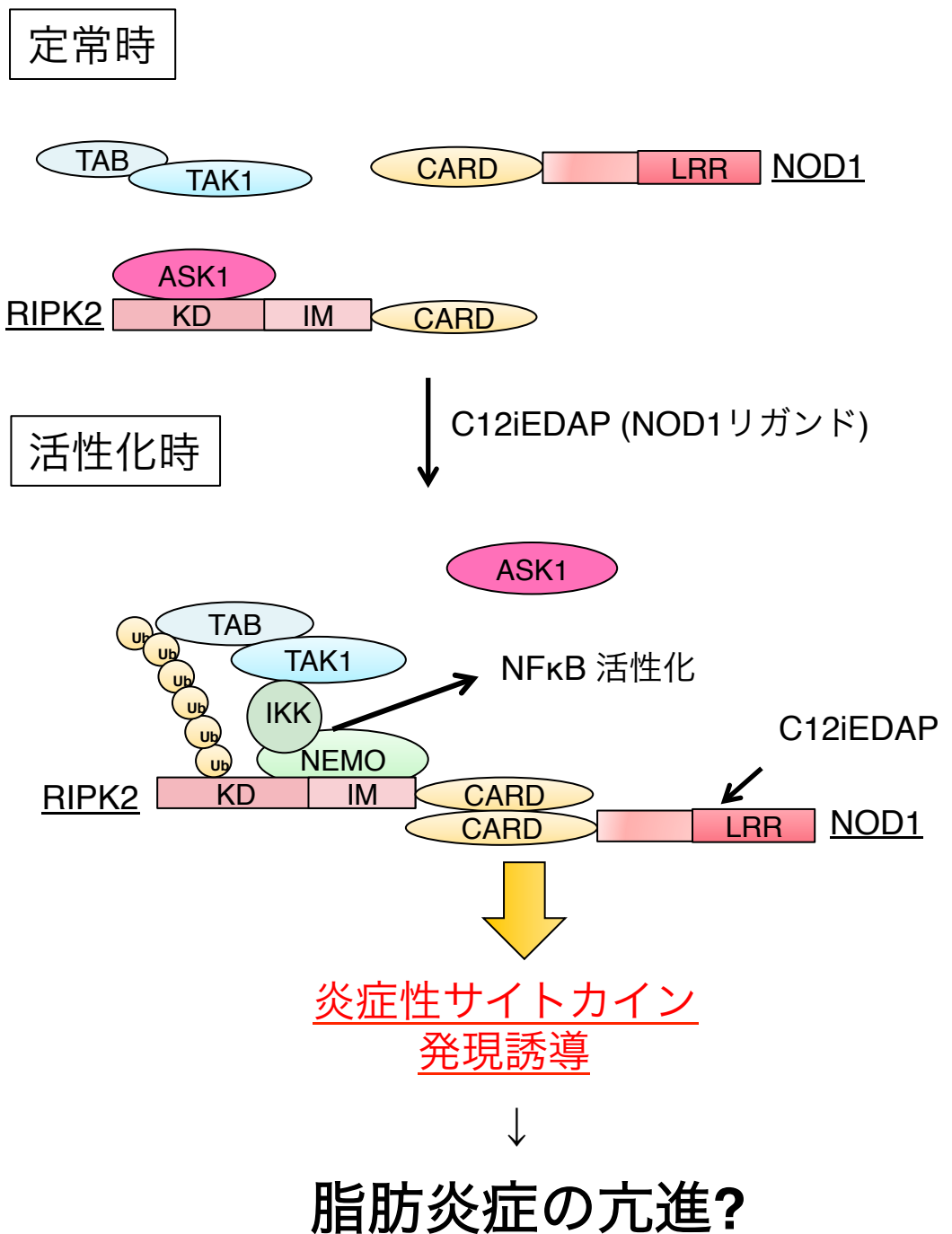
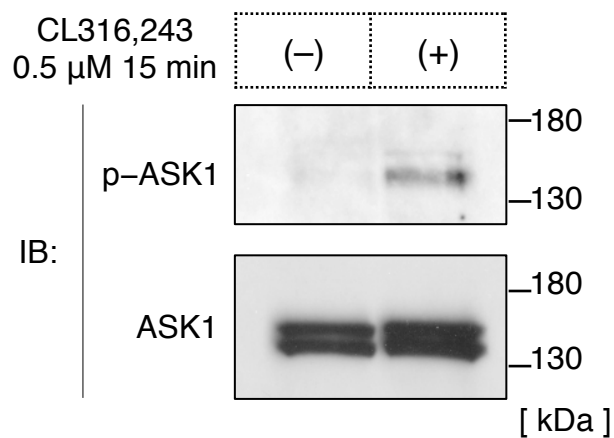


Fig. 26 まとめ図

本研究では初代培養褐色脂肪細胞におけるASK1の新規結合因子としてRIPK2を同定した。ASK1とRIPK2の結合の意義として、ASK1がNOD1-RIPK2経路におけるNFκBの活性化に対して抑制的に機能することが明らかとなった。このメカニズムとして、ASK1がRIPK2とTAK1の結合を阻害することで、TAK1の活性化を制御することが示唆された。また、ASK1によるNOD1-RIPK2経路でのNFκB活性化の抑制は脂肪細胞における炎症性サイトカインの発現誘導を制御することが示唆された。

Protein ID	description
A830073O21Rik	RIKEN cDNA A830073O21 gene
Actb	actin、 cytoplasmic 1
Ccdc82	coiled-coil domain-containing protein 82
Cd36	platelet glycoprotein 4
Col4a2	collagen alpha-2(IV) chain
Ddx3y	ATP-dependent RNA helicase DDX3Y
Dpep1	dipeptidase 1
Elavl1	ELAV-like protein 1
Gm10260IRps18IRps18-ps3	40S ribosomal protein S18
Hnrnpu	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
Hnrnpul1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1#isoform 1
Impdh1	inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 1
Krit1	krev interaction trapped protein 1
Lpl	lipoprotein lipase
Map3k5	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5
Map3k6	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6
Mapk1	mitogen-activated protein kinase 1
Myh9	myosin-9
Nes	nestin
Pck2	phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]、 mitochondrial
Plin1	perilipin-1
Plin4	perilipin-4
Psat1	phosphoserine aminotransferase
Rhox2h	reproductive homeobox 2H
Ripk2	receptor-interacting serine/ threonine-protein kinase 2
Rpl24	60S ribosomal protein L24
Rpl26	60S ribosomal protein L26
Rps16IRps16-ps2	40S ribosomal protein S16
Rps19	40S ribosomal protein S19
Sec13	protein SEC13 homolog
Sec16a	SEC16 homolog A
Tubb4b	tubulin beta-4B chain

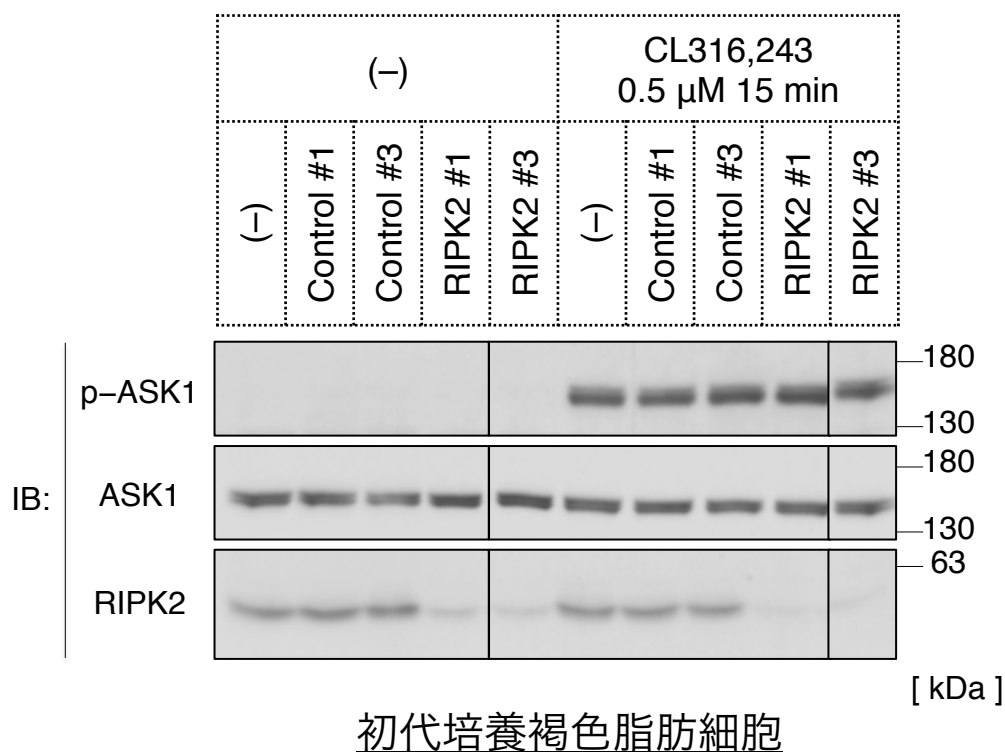
Table 1 質量分析計解析の結果
 質量分析計解析の結果複数のASK1結合候補因子が同定された。この表は同定された結合因子をまとめたものである。



初代培養褐色脂肪細胞 (ASKA)

Suppl. Fig. 1 as-ASK1も β アドレナリン受容体作動薬依存的に活性化する

ASKAマウス由来の初代培養褐色脂肪細胞に0.5 μ M CL316,243刺激を15分間行った細胞を用いてイムノプロットを行った。ASK1の活性は当研究室で作製されたリン酸化ASK1抗体を用いて評価した。



Suppl. Fig. 2 初代培養褐色脂肪細胞における β アドレナリン受容体作動薬依存的なASK1の活性化はRIPK2の発現抑制により影響を受けない
 day 2の初代培養褐色脂肪細胞にRIPK2に対するsiRNAを導入後、day 6まで培養し、0.5 μ M CL316,243刺激を15分間行った後に、イムノブロットを行った。ASK1の活性は当研究室で作製されたリン酸化ASK1抗体を用いて評価した。