

TAK1 活性化の分子機構と生理機能の新展開

1. はじめに

サイトカインや増殖因子などの刺激により引き起こされる細胞内シグナル伝達系の基礎研究が進展し、様々な生体反応が分子レベルで理解できるようになってきた。特に、タンパク質のリン酸化およびユビキチン化は、シグナル伝達の中心的な修飾反応であることが明らかにされ、それら反応を触媒する酵素であるプロテインキナーゼおよびユビキチンリガーゼの研究が著しく進展した。これら酵素の過剰発現など、病態形成における役割についても明らかにさ

れつつあり、治療薬創生の分子標的としても注目されている。

TGF- β -activated kinase 1 (TAK1) は、その名前のとおり TGF- β によって活性化される mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAP3K)として同定された¹⁾。その後、炎症性サイトカインである tumor necrosis factor- α (TNF- α) や interleukin-1 (IL-1) によって活性化され、特に MAPK 経路だけではなく nuclear factor- κ B (NF- κ B) 経路の活性化にも関与していることが示唆されていたことから、サイトカインシグナルの中心的な役割を果たす分子として注目されてきた。本稿では、TAK1 活性化の分子機構や生理機能について、筆者らの研究成果を交えて概説するとともに、TAK1 研究の今後の展望についても述べたい。

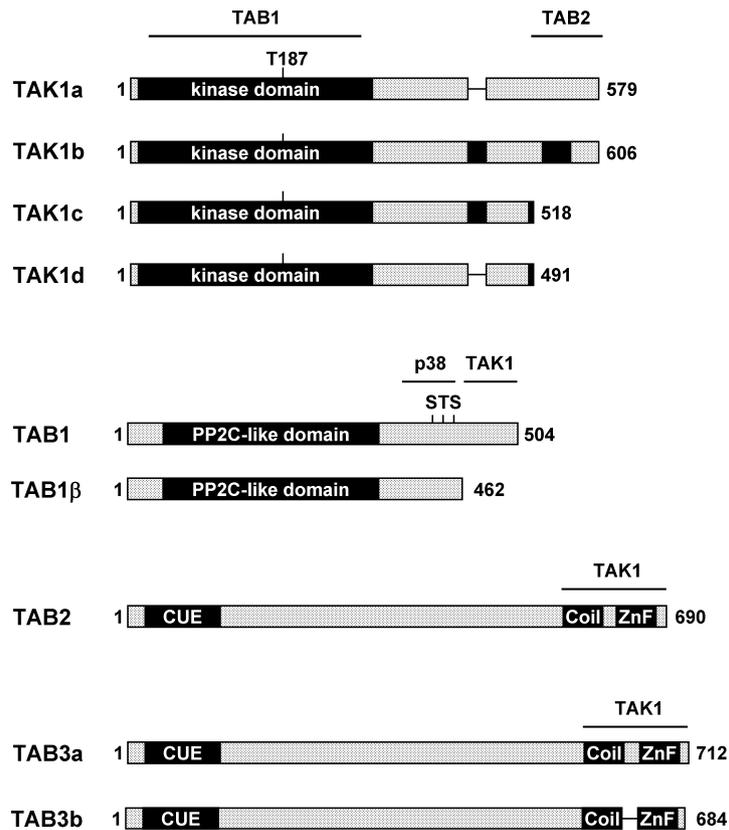


図1 TAK1, TAB1 および TAB3 の構造と複合体形成

TAK1 の N 末端側キナーゼドメインと TAB1 の C 末端側が結合し、TAK1 の C 末端と TAB2 または TAB3 の C 末端 (coiled-coil ドメインと Zn フィンガードドメインを含む) が結合する。TAB1 と TAB2/3 とは直接結合しない。PP2C, protein phosphatase 2C; CUE, conjugation to ER degradation.

2. TAK1 と TAK1 結合タンパク質の構造 (図1)

TAK1 はその活性化因子である TAK1-binding protein 1 (TAB1), TAB2, および TAB3 と会合し, そのキナーゼ活性が制御されている^{2,3)}. TAB1 は TAK1 の N 末端側のキナーゼドメインに結合し, TAB2 および TAB3 は C 末端側の調節領域に結合する. TAB2 と TAB3 は構造的に類似性を持つが, TAB1 は全く異なった構造を持つ. ヒト TAK1 遺伝子は 16 個のエクソンから構成されているが, エクソン 12 と 16 の有無の組み合わせにより四つのスプライシング変種 (a-d) が存在する. 興味深いことに, エクソン 16 は TAB2/3 結合領域をコードしており, TAK1c および TAK1d は TAB1 によっては強く活性化されるが, TAK2/3 によっては全く活性化されない (筆者ら未発表データ). TAB1 には TAK1 と結合しないスプライス変種が存在し, MAPK kinase (MKK) 3/6 非依存的に直接 p38 と結合し, 活性化することが報告されている. TAB3 にも coiled-coil ドメインと Zn フィンガードメインの間に位置する配列が欠失したスプライス変種が存在するが, TAK1 との結合には影響がない. このように, 細胞内では TAK1-TAB1-TAB2 または TAK1-TAB1-TAB3 といった複合体として存在し, サイトカイン刺激などの生理的な条件下ではこれら TAB タンパク質が複合的に TAK1 活性を制御していると考えられるが, スプライス変種も含めて考えると複合体の構成は単純ではないようである.

3. サイトカインによる TAK1 活性化

TAK1 は TGF- β によって活性化される MAP3K として同定されたが, むしろ炎症性サイトカイン TNF- α や IL-1 シグナルにおける役割が注目されてきた. 我々は, TAK1 と TAB1 を過剰発現すると, c-Jun-N-terminal kinase (JNK) および p38 ストレス応答 MAPK の活性化に加えて, NF- κ B p65-p50 ヘテロ二量体の活性化を引き起こすことを見出した⁴⁾. その後, TAK1 活性化に伴い I κ B kinase (IKK) 複合体の活性化を介して NF- κ B 活性化が起こることが, TNF- α や IL-1 シグナルにおいて明らかにされている^{5,6)}. さらに, TNF リガンドスーパーファミリーに属する receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) や tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), および IL-1 受容体ファミリーに属する Toll-like receptor (TLR) シグナルによっても活性化されることが明らかにされている.

サイトカインによる TAK1 の活性化の分子機構解析も大きく進展した. TNF- α 刺激により TAK1 は I 型 TNF 受容体にリクルートされ, ユビキチン E3 リガーゼ活性を持つ TNF- α receptor-associated factor 2 (TRAF2) により TAB2/3 のユビキチン化が誘導される. 一方, IL-1 の場合も同様に, TRAF6 を介した TAB2/3 のユビキチン化が TAK1 複合体の活性化の引き金となる. その結果, 活性化ループ内 Thr-187 のリン酸化により TAK1 活性が誘導される⁷⁾. このリン酸化は分子間自己リン酸化反応であるが, TAB2/3

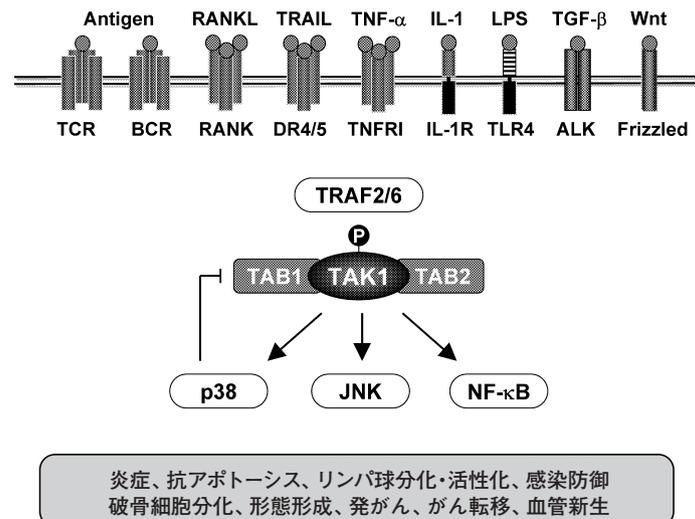


図2 TAK1 活性化を誘導する因子と生理機能

多くのサイトカインなどの細胞外因子により TAK1 は活性化される. 活性化には Thr-187 の自己リン酸化が必須であり, 下流の JNK, p38 および NF- κ B 活性化を介して様々な生理機能を発揮している.

のユビキチン化がどのように TAK1 リン酸化を誘導するのかについては明らかにされていない。一方、TAB1 の C 末端側に位置する 68 アミノ酸からなる TAK1 活性化ドメイン内には Ser/Thr クラスタが存在し、それらのリン酸化が TAK1 の自己リン酸化の引き金となっている可能性も考えられる。

TAK1 活性は刺激数分以内にピークとなり、その後速やかに不活化される。これには、p38 による TAB1 のリン酸化 (Ser-423, Thr-431, Ser438) を介した負のフィードバック機構が関与している⁸⁾。一方、protein phosphatase 6 (PP6) が TAK1 複合体に会合することが報告されている⁹⁾。いずれの機構においても、TAK1 活性化に必須の Thr-187 が脱リン酸化されるが、両阻害機構の相互作用については明らかにされていない。

上述のように、TAK1 活性化には TAB タンパク質が協調的に働いていることが伺われる。しかしながら、TAB1 および TAB2 ノックアウトマウス由来の胚線維芽細胞 (MEF) を用いた検討¹⁰⁾では、予想外の結果が得られている (表 1)。つまり、TAK1 欠損 MEF では、TNF- α 、IL-1 や LPS による JNK および NF- κ B 活性化がほとんど起こらないのに対して、TAB1 または TAB2 欠損 MEF ではほとんど正常に活性化されるのである。TAB2 の場合は TAB3 が機能を相補している可能性が考えられることから、今後 TAB2/TAB3 のダブルノックアウトマウスの作製が待たれるところである。一方、TAB1 の場合はどのように考えればいいのか？ 一過的な過剰発現系では、TAK1 活性は TAB2/3 と比べて TAB1 によって圧倒的に強く誘導される。これらの結果から、TAB1 にも相補的な分子が存

在する可能性もある。逆に、そもそも生理的条件化ではサイトカイン刺激による TAK1 活性化に TAB1 は必要ではないのかもしれない。しかし、TAB1 欠損 MEF においては TGF- β に対する応答性が低下していることから、TAB1 はサイトカイン刺激ではなく、TGF- β 刺激による TAK1 活性化に特異的に関与している可能性もある。つまり、刺激により TAK1 活性化に関与する TAB タンパク質が異なっている可能性を示すものであり、大変興味深い。実際、表 1 に示したように、TAK1¹¹⁾、TAB1¹²⁾ および TAB2¹³⁾ ノックアウトマウスはすべて胎生致死となるが、その時期と表現型はそれぞれ異なっており、胚発生において各タンパク質固有の機能を持っている可能性が示唆されている。実際、TAB2 は核内にも局在し、転写コリプレッサー N-CoR やアンドロジェン受容体などの核内受容体とも相互作用することが知られており、TAK1 とは独立した機能の一端が明らかにされつつある。

4. リンパ球における TAK1 の役割

B または T 細胞選択的な TAK1 ノックアウトマウスが作製され、免疫系における TAK1 の役割が注目されている^{11,14)}。B 細胞受容体 (BCR) や T 細胞受容体 (TCR) からのシグナルは、CARMA1、MALT1 および Bcl10 複合体を介して下流の NF- κ B および MAPK に伝えられると考えられている。TAK1 はこの複合体と会合し、BCR や TCR シグナルに関与する可能性が示されていた。最近、TCR シグナルによる IKK 複合体の活性化には、TAK1 による IKK α/β のリン酸化と、CARMA1/MALT1/Bcl10 と会合した TRAF6 による IKK γ のポリユビキチン化の独立した二

表 1 ノックアウトマウスの表現型とシグナル伝達

ノックアウトマウス		欠損細胞のシグナル伝達			
遺伝子	表現型	細胞	刺激	NF- κ B	JNK
TAK1	致死 (胎生 10 日), 神経変形態異常	胚線維芽細胞	TNF, IL-1	低下	低下
TAK1 (コンディショナルノックアウト)					
B 細胞	B-1 B 細胞分化異常, 液性免疫異常	脾臓 B 細胞	LPS, CpG	低下	低下
		脾臓 B 細胞	α IgM	正常	低下
T 細胞	制御性 T 細胞分化異常, 炎症性腸疾患	胸腺 T 細胞	α CD3/28	低下	低下
		CD4/8 T 細胞	α CD3/28	(-)* ¹	低下
			PMA/IONO	正常	低下
表皮	皮膚炎症, ケラチノサイトアポトーシス	ケラチノサイト	TNF, IL-1	低下	低下
TAB1	致死 (妊娠後期), 血管, 肺の形態異常	胚線維芽細胞	TNF, IL-1	正常	正常
TAB2	致死 (胎生 12.5 日), 肝細胞アポトーシス	胚線維芽細胞	TNF, IL-1	正常	正常

*1: α CD3/28 による活性化が認められない。

つのシグナルが必須であることが明らかにされている¹⁵⁾。いずれにしても、ノックアウトマウスから単離したB細胞やT細胞を用いた解析から、基本的にはBCR/TCRシグナルにおけるTAK1の関与が証明されている。しかしながら、TAK1欠損B細胞においては、LPSやCpG DNAなどのTLRからのNF- κ B活性化は低下していたものの、BCRからのNF- κ Bシグナルは正常であった。ニワトリB細胞株DT40を用いた解析では、TAK1欠損によりBCRを介したNF- κ B活性化は低下することから¹⁶⁾、BCRシグナルにおけるTAK1の役割については未だに不明な点が残る。一方、TAK1を欠損した成熟胸腺細胞においては、TCRによるNF- κ B/JNK活性化は低下しているが、CD4またはCD8陽性のエフェクターT細胞におけるNF- κ B活性化にTAK1は必須ではない。最近、Ubc13 E2 ユビキチン共役酵素を欠損したマウス胸腺細胞において、ホルボールエステルとカルシウムイオノフォアによって起こるTAK1 Thr-187のリン酸化がほぼ完全に消失していることが明らかにされており、T細胞シグナルにおけるTAK1活性化の分子機構についても解析が進んできた。

リンパ球におけるTAK1の欠損は、細胞機能にも影響を与える。B細胞分化では、脾臓内の濾胞や辺縁帯のB細胞分化は正常であるが、自然免疫に関与するB-1 B細胞(腹腔、胸腔に多く局在し、細胞表面にCD5分子を発現している)の分化に異常が認められる¹¹⁾。また、TAK1を欠損した脾臓B細胞は、BCR活性化やCD40による細胞増殖の誘導がほとんど認められず、B細胞活性化においてもTAK1は重要な役割を果たしている¹¹⁾。一方、T細胞においては、最近注目されている転写因子Foxp3を発現している制御性T細胞の分化に異常が認められている点が注目される¹⁴⁾。また、成熟CD4陽性胸腺細胞では、抗CD3抗体および抗CD28抗体による共刺激によるCD25およびIL-2産生がほぼ完全に消失しており、結果的に細胞増殖が誘導されない¹⁴⁾。しかしながら、エフェクターT細胞では、NF- κ B活性化と同様に、TAK1はTCR活性化によるIL-4およびIFN- γ 産生には関与しないにもかかわらず、IL-2、IL-7やIL-15による細胞増殖や生存には必須である¹⁴⁾。これには、TAK1によるp38活性化が関与している可能性が考えられている。

以上のように、分化度や成熟度によって微妙に異なるものの、TAK1はリンパ球の分化、生存および活性化においても中心的な役割を果たす分子であることが明らかとなった。

5. TAK1と疾患

TAK1は、炎症性サイトカインやリンパ球の分化・活性化シグナルに深く関与していることが明らかになってきた(表1)。したがって、免疫系の関与する病態形成における役割について関心が集まっている。T細胞選択的にTAK1を欠失させたマウスは、炎症性腸疾患を自然発症する。これは制御性T細胞の分化異常が原因である可能性が示唆されている。皮膚ケラチノサイト選択的にTAK1を欠損したマウスでも、尋常性乾癬に類似した皮膚疾患が発症する。このマウスから単離したケラチノサイトは、TNF- α によるNF- κ BおよびJNKの生存シグナルの活性化が認められず、結果的にTNF- α によるアポトーシスが引き起こされる。実際、同時にTNF- α を欠失すると皮膚疾患を認めなくなる。このように、TAK1は免疫系を中心とした恒常性維持に重要であり、その破綻により種々の疾患が発症する可能性が考えられる。一方で、自然免疫シグナルによるTAK1活性化の病態形成における役割も注目される。食中毒菌である*Yersinia enterocolitica*のYopPタンパク質が、宿主細胞の感染防御機構を回避するためにIL-1によるTAK1シグナルを抑制することが明らかにされている¹⁷⁾。

TNF- α やTRAILなどの抗アポトーシスシグナルにおける役割など、TAK1は炎症によるがん悪性化に関与している可能性が示されている。我々は、マウス結腸がん細胞株colon 26を培養系にてTNF- α で刺激すると、細胞浸潤能や肺転移能の促進が認められ、これにはTAK1活性化が必須であることを明らかにしている¹⁸⁾。また、がん細胞選択的にアポトーシスを誘導し、新しい抗がん剤として期待されているTRAILのシグナル伝達系においても、TAK1はNF- κ B、JNK、p38活性化を制御し、TRAIL誘導性アポトーシスに対する抵抗性を担っていることを見出している¹⁹⁾。さらに、発がんタンパク質Taxを発現するhuman T-cell leukemia virus-1 (HTLV-1)感染T細胞において、恒常的なTAB2の過剰発現によるTAK1活性化が起こっていることや²⁰⁾、EBウイルスの発がんタンパク質であるLMP-1複合体にもTAK1が含まれていることが明らかにされており²¹⁾、ウイルス発がん過程におけるTAK1の関与も考えられる。実際、皮膚がん細胞などで正常細胞に比べTAB3が過剰に発現していることや、TAK1-p38シグナルががん細胞生存に重要な上皮細胞増殖因子受容体(EGFR)機能を修飾していること²²⁾、テロメラゼ遺伝子の転写を抑制し細胞老化を引き起こすことなどが報告されてお

り²³⁾、発がん過程やがん細胞の悪性化における TAK1 の役割についての今後の展開が期待される。

6. おわりに

本稿では、主にサイトカインシグナルやリンパ球受容体シグナルにおける TAK1 の役割について紹介した。これ以外にも、TAK1 は TGF- β や Wnt シグナルにおいても重要な役割を果たしている。しかし、TAK1 以外にも ASK1 や MEKK3 などの多くの MAP3K が同定されており、それぞれ JNK, p38 や NF- κ B 活性化シグナルに関与しているという報告がある。それでは、多くの MAP3K の役割分担はどのようになっているのであろうか？ サイトカインシグナルにおいて TAK1 が重要であることを紹介したが、実際には TAK1 がなくても下流のシグナルは完全には消失しない。また、TNF- α による NF- κ B 活性化という現象は、一見して一つのシグナルが流れているように錯覚を覚えるが、実際には複数の異なったシグナルの総和として捉えるのが自然である。時間や細胞内空間といった要素も考慮に入れながら、TAK1 活性化について検討を加える必要があり、まだまだ解析することが多く残されている。TAK1 は線虫からヒトに至るまで広く保存されており、その多彩な生理機能については今後も新しい発見が続くものと期待される。

謝辞：本稿で紹介した筆者らの研究は、田辺製薬株式会社において杉田尚久博士のもと着手し、富山大学に異動後も済木育夫教授のもと継続しているものである。本研究を支えてくれた共同研究者の皆様に深く感謝いたします。

- 1) Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E., & Matsumoto, K. (1995) *Science*, **270**, 2008–2011.
- 2) Shibuya, H., Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Tonegawa, A., Gotoh, Y., Ueno, N., Irie, K., Nishida, E., & Matsumoto, K. (1996) *Science*, **272**, 1179–1182.
- 3) Ishitani, T., Takaesu, G., Ninomiya-Tsuji, J., Shibuya, H., Gaynor, R.B., & Matsumoto, K. (2003) *EMBO J.*, **22**, 6277–6288.
- 4) Sakurai, H., Shigemori, N., Hasegawa, K., & Sugita, T. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **243**, 545–549.
- 5) Sakurai, H., Miyoshi, H., Toriumi, W., & Sugita, T. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 10641–10648.
- 6) Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., & Matsumoto, K. (1999) *Nature*, **398**, 252–256.
- 7) Singhirunnusorn, P., Suzuki, S., Kawasaki, N., Saiki, I., & Sakurai, H. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 7359–7368.
- 8) Cheung, P.C., Campbell, D.G., Nebreda, A.R., & Cohen, P.

- (2003) *EMBO J.*, **22**, 5793–5805.
- 9) Kajino, T., Ren, H., Iemura, S., Natsume, T., Stefansson, B., Brautigan, D.L., Matsumoto, K., & Ninomiya-Tsuji, J. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 39891–39896.
- 10) Shim, J.H., Xiao, C., Paschal, A.E., Bailey, S.T., Rao, P., Hayden, M.S., Lee, K.Y., Bussey, C., Steckel, M., Tanaka, N., Yamada, G., Akira, S., Matsumoto, K., & Ghosh, S. (2005) *Genes Dev.*, **19**, 2668–2681.
- 11) Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., & Akira, S. (2005) *Nat. Immunol.*, **6**, 1087–1095.
- 12) Komatsu, Y., Shibuya, H., Takeda, N., Ninomiya-Tsuji, J., Yasui, T., Miyado, K., Sekimoto, T., Ueno, N., Matsumoto, K., & Yamada, G. (2002) *Mech. Dev.*, **119**, 239–249.
- 13) Sanjo, H., Takeda, K., Tsujimura, T., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., & Akira, S. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 1231–1238.
- 14) Wan, Y.Y., Chi, H., Xie, M., Schneider, M.D., & Flavell, R.A. (2006) *Nat. Immunol.*, **7**, 851–858.
- 15) Shambharkar, P.B., Blonska, M., Pappu, B.P., Li, H., You, Y., Sakurai, H., Darnay, B.G., Hara, H., Penninger, J., & Lin, X. (2007) *EMBO J.*, **26**, 1794–1805.
- 16) Shinohara, H., Yasuda, T., Aiba, Y., Sanjo, H., Hamadate, M., Watarai, H., Sakurai, H., & Kurosaki, T. (2005) *J. Exp. Med.*, **202**, 1423–1431.
- 17) Thiefes, A., Wolf, A., Doerrie, A., Grassl, G.A., Matsumoto, K., Autenrieth, I., Bohn, E., Sakurai, H., Niedenthal, R., Resch, K., & Kracht, M. (2006) *EMBO Rep.*, **7**, 838–844.
- 18) Choo, M.K., Sakurai, H., Koizumi, K., & Saiki, I. (2006) *Int. J. Cancer*, **118**, 2758–2764.
- 19) Choo, M.K., Kawasaki, N., Singhirunnusorn, P., Koizumi, K., Sato, S., Akira, S., Saiki, I., & Sakurai, H. (2006) *Mol. Cancer Ther.*, **5**, 2970–2976.
- 20) Suzuki, S., Singhirunnusorn, P., Mori, A., Yamaoka, S., Kitajima, I., Saiki, I., & Sakurai, H. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 25177–25181.
- 21) Uemura, N., Kajino, T., Sanjo, H., Sato, S., Akira, S., Matsumoto, K., Ninomiya-Tsuji, J. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 7863–7872.
- 22) Singhirunnusorn, P., Ueno, Y., Matsuo, M., Suzuki, S., Saiki, I., & Sakurai, H. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 12698–12706.
- 23) Fujiki, T., Miura, T., Maura, M., Shiraiishi, H., Nishimura, S., Imada, Y., Uehara, N., Tashiro, K., Shirahata, S., & Katakura, Y. (2007) *Oncogene*, **26**, 5258–5266.

櫻井 宏明

(富山大学和漢医薬学総合研究所)

New insights into physiological functions of the kinase TAK1
Hiroaki Sakurai (Institute of Natural Medicine, University of
Toyama, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan)