

# 毛包、汗腺、皮脂腺など皮膚附属器官の形成に関わる細胞内シグナル伝達経路の解明

東京大学医科学研究所 癌・細胞増殖大部門 分子発癌分野

井上 純一郎

Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6 (TRAF6) transduces signals from members of the Toll/interleukin-1 (IL-1) receptor and members of the TNF receptor super family including CD40 and RANK. We have reported recently that TRAF6 deficiency results in defective development of epidermal appendices including guard hair follicles and sweat glands. Furthermore, our results suggest that this defect may be due to the impaired signaling of EDAR, XEDAR or TROY, members of the TNFR super family expressed in skin. Although TRAF6 plays a crucial role in formation of the skin appendices, the molecular mechanisms underlying regulation of TRAF6 are largely unknown. Thus, we began to search for proteins that bind to and activate TRAF6. We have identified TIFA, a TRAF-interacting protein with a forkhead-associated (FHA) domain. The FHA domain is a motif known to bind directly to phosphothreonine and phosphoserine. In transient transfection assays, TIFA activates NF $\kappa$ B and JNK. However, TIFA carrying a mutation that abolishes TRAF6 binding or mutations in the FHA domain that are known to abolish FHA domain binding to phospho-peptide fails to activate NF $\kappa$ B and JNK. TIFA, when overexpressed, binds both TRAF6 and IRAK-1 and significantly enhances the IRAK-1/TRAF6 interaction. Furthermore, analysis of endogenous proteins indicates that TIFA associates with TRAF6 constitutively, whereas it associates with IRAK-1 in an IL-1 stimulation-dependent manner *in vivo*. Thus, TIFA is likely to mediate IRAK-1/TRAF6 interaction upon IL-1 stimulation. These results suggest that TIFA may be involved in signaling that leads to the development of skin appendices. In such a case, TIFA could be important target molecule for drugs that affect skin condition. Inhibition of TIFA or TRAF6 may reduce the number of hair follicles. In contrast, activation of TIFA or TRAF6 may increase their number. Thus, TIFA and TRAF6 could be target molecules for developing compounds that could be used by hairy or bald-headed persons.

## 1. 緒言

毛包、汗腺、皮脂腺などいわゆる皮膚附属器官の形成の分子機構は、不明な点が多い。我々は最近、細胞内シグナル伝達因子 TRAF6 の遺伝子欠損マウスを作成し、その表現型の一つがヒト遺伝性疾患である無汗性外胚葉形成不全症 (Hypohidrotic ectodermal dysplasia:HED) のモデルマウスである Tabby (Ta), downless (dl), crinkled (cr) といった変異マウスに酷似していることを報告した<sup>1)</sup>。この疾患を有するヒトやマウスでは汗腺や皮脂腺などの顆粒分泌腺、毛包の形成が著しく阻害されている。本研究では、これら皮膚附属器官の形成機構を TRAF6 を中心に明らかにし皮膚を標的とする化粧品の開発、皮膚に副作用を有する化粧品の改良及び、毛生え薬や脱毛剤の開発などの基礎となる成果を挙げることを研究目的とした。

前述の HED のモデルマウス Ta では EDAR と呼ばれる TNF ファミリーリガンドタンパク質に<sup>2)</sup>、dl では EDAR と呼ばれる TNF 受容体ファミリータンパク質に<sup>3)</sup>、さらに cr では EDAR の細胞質領域に結合する EDARADD と呼ばれ

るシグナル伝達因子に<sup>4)</sup> 遺伝子レベルで異常が存在することが報告されている。すなわち、EDAR → EDARADD と伝達されるシグナルが皮膚附属器形成に必須であることを示している。一方で、皮膚には EDAR に類似した受容体分子 XEDAR<sup>5)</sup> や TROY<sup>6)</sup> が発現しておりやはり皮膚附属器形成に関与していると考えられている。我々の実験から TRAF6 はいずれの受容体からのシグナルにも関与していると判断されることから<sup>1)</sup>、TRAF6 のシグナル伝達機構を解明することにより本研究の目的が達成されると思った。我々は、TRAF6 シグナルの解明を目指し、TRAF6 に結合し TRAF6 の活性を制御する分子を探索してきた。新規 TRAF6 結合分子の同定に関して以下に報告する。

## 2. 実験

### 2.1 酵母 two-hybrid スクリーニングとノザンブロットティング

全長マウス TRAF6 を pBD-GAL4-Cam (Stratagene, La Jolla, CA) にサブクローニングし餌として pAD-GAL4-2.1 (Stratagene) で作成した ICR マウス (8-週齢メス) 骨髄 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。ヒト TIFA cDNA はヒト B-cell cDNA ライブラリーからクローニングした。マウス及びヒト TIFA の配列については DDBJ/EMBL/GenBank に accession number AB062111 及び AB062110 として各々登録した。マウス組織 RNA ブロット (Clontech, Palo Alto, CA) を [<sup>32</sup>P]-ラベル全長マウス TIFA cDNA または  $\beta$ -actin cDNA で 65°C においてハイブリダイズした。フィルターは 0.5 X



Identification of signal transduction pathways involved in formation of skin appendices including hair follicles, sweat glands and sebaceous gland.

Jun-ichiro Inoue

Division of Cellular and Molecular Biology  
Department of Cancer Biology  
Institute of Medical Science, University of Tokyo

SSC, 0.2 (w/v) % SDS, 65°C、30 分洗浄した。

## 2.2 GST 沈降アッセイ、免疫沈降アッセイ、ウェスタンブロットティング

GST 沈降アッセイでは、まず HEK293T 細胞に図に示した組み合わせと量で遺伝子導入した。36 時間後、細胞を 500 $\mu$ l の TNE buffer (50mM Tris-HCl pH8.0, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5 mM dithiothreitol) 破碎後、遠心し未破碎細胞を除去した sup を得、それを細胞破碎液とした。細胞破碎液を Glutathione-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) と混合し、吸着複合体を 8.5% polyacrylamide/SDS ゲルで分離した。免疫沈降アッセイでは同様に調製した細胞破碎液に示された抗体と protein G-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) を混合した。免疫沈降複合体を 10% または 12.5% polyacrylamide/SDS ゲルで分離した。各々のタンパク質の発現チェックの場合は細胞破碎液をそのまま用いた。ゲルで分離されたタンパク質は PVDF メンブレン (Millipore, Bedford, MA) にトランスファーした後、特異抗体と適当な horseradish peroxidase (HRP) - 2 次抗体、ECL Western blotting system (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて同定した。

## 2.3 リコンビナント TIFA タンパク質のゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分離

Maltose-binding protein (MBP) -TIFA 融合タンパク質 (MBP-TIFA) を E. coli BL21 で発現させ Amylose-resin (New England BioLabs, Beverly, MA) をもちいてアフィニティー精製した。MBP-TIFA (24 $\mu$ g) を 2.4U の PreScission Protease (Amersham Pharmacia Biotech) で 4°C、4 時間反応させ MBP と TIFA の境界を切断した。その反応液を Superdex 75 column (0.32 $\times$ 30cm) にて分離し、各々のフラクションを 10% polyacrylamide-SDS ゲルで分離した。ゲルをクマシー染色しタンパク質を同定した。

## 2.4 ルシフェラーゼリポーターアッセイと JNK の *in vitro* キナーゼアッセイ

HEK293T 細胞に 1 ng の 3 $\times$  $\kappa$ B-luc または 3 $\times$ M $\kappa$ B-luc (mutant  $\kappa$ B sites), 10ng の  $\beta$ -actin- $\beta$ -gal と図に示された種々の発現プラスミドを遺伝子導入した。36 時間後、ルシフェラーゼ活性を Luciferase Assay System (TOYO INK, Tokyo) で測定した。また  $\beta$ -galactosidase 活性を測定し遺伝子導入効率の換算に用いた。JNK キナーゼアッセイでは、まず HEK293T 細胞に 10ng の pEF-T7-JNK と図に示した量の pME-FLAG-TIFA を遺伝子導入した。36 時間後 His-JNK を抗 T7 抗体で免疫沈降後、2 $\mu$ g の GST-c-JUN (1-89) 融合タンパク質 (New England BioLabs)

と 20 $\mu$ l の kinase buffer (20mM HEPES pH7.5, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 5 $\mu$ Ci [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3000Ci/mmol)) の中で 30°C、30 分反応させた。

## 3. 結果

### 3.1 TRAF6 結合タンパク質としての TIFA の同定

TRAF6 を餌として酵母 two-hybrid 法によりマウス骨髄 cDNA ライブラリーをスクリーニングして 184 アミノ酸からなるタンパク質をコードする cDNA を得た。このタンパク質が動物細胞内で TRAF6 と結合すること、一過性の遺伝子導入により NF $\kappa$ B や JNK を活性化すること及び分子中央に Forkhead-associated (FHA) ドメイン<sup>7)</sup>を有することから、このタンパク質を TRAF-interacting protein with an FHA domain (TIFA) と呼ぶことにした (Fig.1 A, C, D)<sup>8)</sup>。ノザンプロット解析から TIFA は脾臓に非常に多く発現し他の組織での発現は低かった (Fig.1 B)。FHA ドメインは 60 から 100 アミノ酸からなり主に真核細胞の核において細胞周期、DNA 修復や転位に関与するタンパク質に同定されている<sup>9), 10)</sup>。さらに重要なことに FHA ドメイン中にはリン酸化セリンやリン酸化スレオニン残基に直接結合する機能を有するものが報告されていることである<sup>11), 12)</sup>。これはちょうど SH2 ドメインがリン酸化チロシンに結合することがシグナル伝達で重要な役割を果たしていること<sup>13)</sup>を考えると TIFA の機能解析により TRAF6 のリン酸化が関与する新しい制御機構の解明につながる可能性を示唆する。

TIFA による NF $\kappa$ B や JNK 活性化における TRAF6 の関与を解明するため、TIFA における TRAF6 結合部位を同定した。種々の TIFA 欠失変異体を用いた結合実験から TIFA の C-ドメインが TRAF6 との結合に十分であることが判明した (Fig.2A, B)。さらのその C-ドメイン内にこれまで CD40, RANK, IRAK-1 で同定された TRAF6 結合配列 XXPXEXX- (aromatic/acidic) に合致する配列が存在していた<sup>14)</sup>。我々はすでに CD40 と TRAF6 との結合実験から結合配列中の E を A に置換するとその結合能が全く喪失することを明らかにしている<sup>15)</sup>。そこで TIFA の同配列に同様の変異を導入した (E178A 変異体) ところ TRAF6 結合能が喪失すると同時に TIFA による NF $\kappa$ B や JNK の活性化能もなくなった (Fig.2C, D)。即ち、この結果は TIFA のシグナル伝達に TRAF6 との結合が必須であることを示している。次に FHA ドメインの機能を解析した。そのために TIFA の 50 番目のグリシンをグルタミン酸にしかつ 66 番目のセリンをアラニンに置換した (G50E/S66A) 変異体を作成した。なぜならば、FHA ドメインを持つシロイヌナズナの KAPP タンパク質において同じ変異体が本来の結合相手であるリン酸化タンパク質に結合しないことが報告されているからである<sup>16)</sup>。興味あ

ることにより G50E/S66A 変異体は TRAF6 と結合するものの NF $\kappa$ B や JNK の活性化能を持っていなかった (Fig. 2C, D)。この結果は TIFA のシグナル伝達において TRAF6 との結合は必須であるが、十分でなく FHA ドメインの何らかの機能が必要であることを示唆している。

### 3.2 TRAF6 活性化における TIFA の自己集合能の関与 TRAF6 を細胞内で強制的に多量体形成させると下流に

シグナルを伝達することが報告されている<sup>17)</sup>。また同じ TRAF ファミリーである TRAF2 の結晶解析から TRAF2 はホモ 3 量体であると考えられている<sup>18)</sup>。従って我々は TIFA が TRAF6 の多量体形成を促進することにより TRAF6 を活性化するという仮説を立てた。この仮説を検討するためまず TIFA 自身の多量体形成とその活性との関係を検討した。GST-TIFA と FLAG-TIFA と共発現させ GST 沈降法により検討したところ TIFA は自己集合するこ

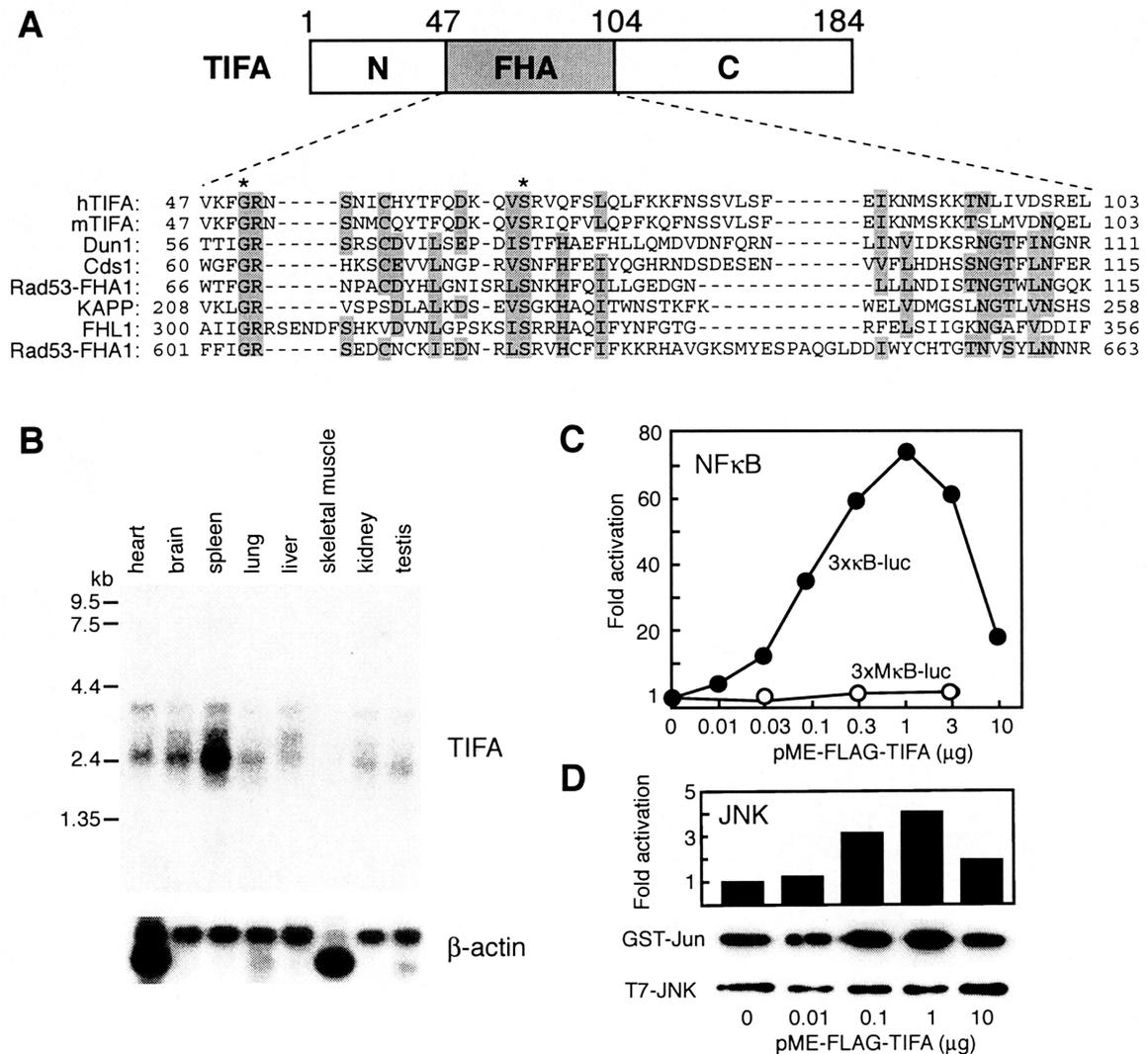


Figure 1 TIFA contains an FHA domain and activates NF $\kappa$ B and JNK. (A) Diagram of the overall structure of TIFA and alignment of the FHA domain of TIFA with that of other proteins. Amino acids identical or similar in at least six proteins are indicated by gray boxes. Asterisks indicate amino acids selected for site-directed mutagenesis. (B) Multiple-tissue Northern blot. A mouse multiple-tissue Northern blot (Clontech) was probed with a cDNA fragment of mouse TIFA (upper) or  $\beta$ -actin (lower). (C) Activation of NF $\kappa$ B by TIFA. HEK293T cells were transfected with 1 ng of 3xkB-luc or 3xM $\kappa$ B-luc (mutant  $\kappa$ B sites), 10 ng of  $\beta$ -actin- $\beta$ -gal and the indicated amounts of TIFA expression plasmid. Thirty-six hours after transfection, luciferase assays were performed. The results shown are the mean of duplicate experiments. (D) Activation of JNK by TIFA. HEK293T cells were transfected with 10 ng of pEF-T7-JNK and the indicated amounts of pME-FLAG-TIFA. Thirty-six hours after transfection, His-JNK was immunoprecipitated with anti-T7 antibody. Immunoprecipitates were subjected to an in vitro kinase assay using GST-Jun as a substrate. The results shown were representative of duplicate experiments.

とが明らかとなった (Fig. 3A)。さらに種々の欠失変異体を用いて検討したところ自己集合能にはFHAドメインとCドメインが両方とも必要でこれは欠失変異体のNFκBやJNKの活性化能と一致した (Fig. 2C, 3A)。即ち、TIFAの自己集合能がTRAF6の活性化に必要であることが強く示唆された。ところがG50ES66A変異体においてNFκBやJNKの活性化能がないのに自己集合能があることから、単にTRAF6と結合して自己集合するのでは十分でないことがあきらかとなった。そこで自己集合体の大き

さを調べるため大腸菌でTIFA及びそのG50ES66A変異体のリコンビナントタンパク質を発現後精製しSuperdex75ゲルろ過カラムで解析した (Fig. 3B)。その結果、TIFAの野生型が3量体に相当する大きさのところに溶出されたのに対してG50ES66A変異体は5量体あるいは6量体に相当する大きさのところに溶出された。従ってTRAF6の活性化にはTIFAの3量体形成が必要でありそれよりも大きい複合体を形成した場合にはTRAF6を活性化できないと考えられた。

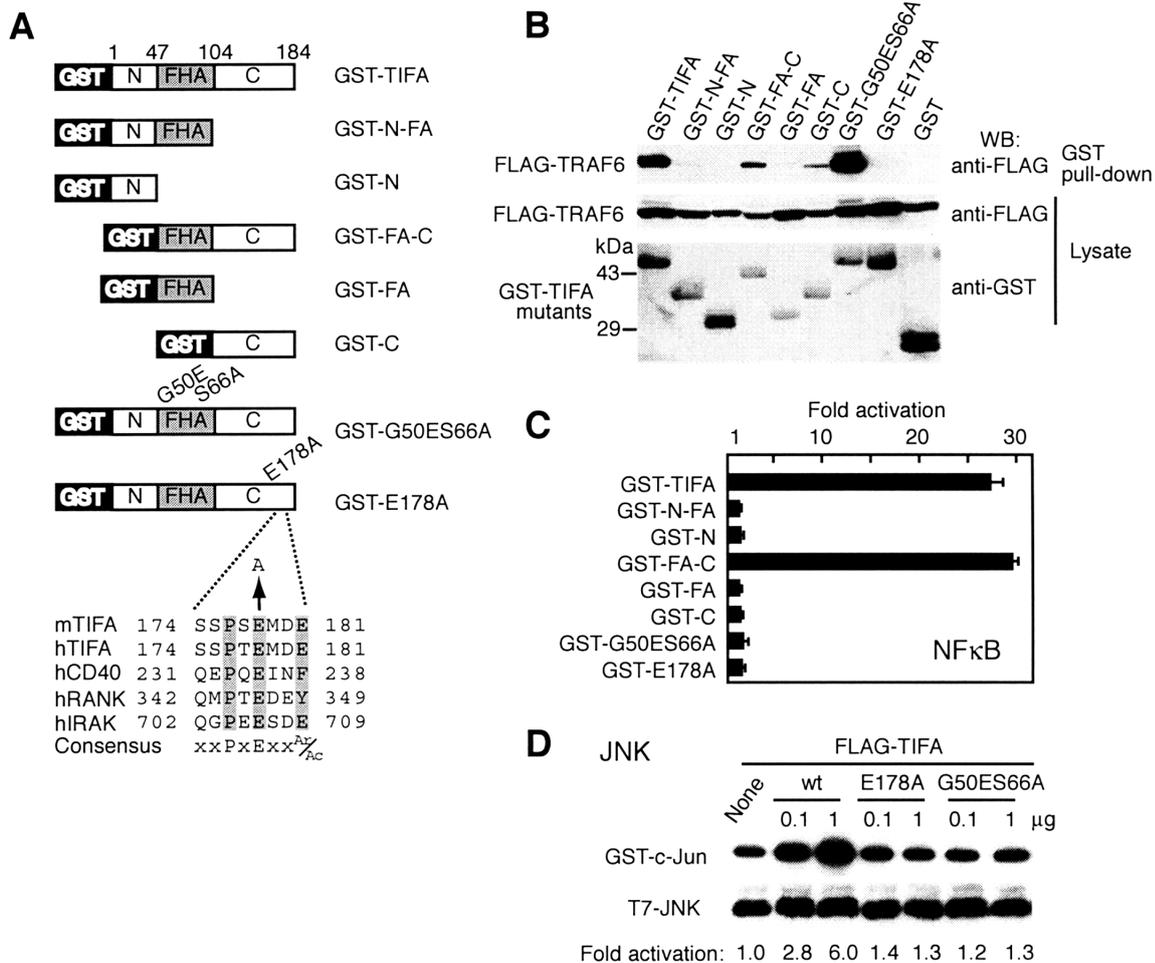


Figure 2 Both the TRAF6 binding site and the intact FHA domain are required for TIFA-induced activation of NFκB and JNK. (A) Structure of TIFA and its mutants and alignment of TRAF6 binding sites. (B) Identification of the TRAF6 binding site in TIFA. HEK293T cells were cotransfected with pME-GST-TIFA or pME-GST-TIFA mutant and pME-FLAG-TRAF6. Thirty-six hours after transfection, cell lysates were subjected to GST pull-down assay. (C) Activation of NFκB by TIFA mutants. HEK293T cell were transfected with 1 ng of 3xκB-luc or 3xMκB-luc (mutant κB sites), 10 ng of β-actin-β-gal and 5 μg of expression plasmid for TIFA or its mutants. Thirty-six hours after transfection, luciferase assays were performed. Results shown are the mean ± sd of triplicate experiments and are representative of two independent experiments. (D) Activation of JNK by TIFA mutants. HEK293T cells were transfected with 10 ng of pEF-T7-JNK and the indicated amounts of expression plasmid for TIFA or its mutants. Thirty-six hours after transfection, His-JNK was immunoprecipitated with anti-T7 antibody. Immunoprecipitates were subjected to in vitro kinase assay using GST-Jun as a substrate. The results shown are representative of duplicate experiments.

### 3.3 TIFAによる TRAF6 と IRAK-1 の相互作用の促進

これまでの実験から TIFA は TRAF6 の上流で働くと考えられたので、既に報告されている TRAF6 の上流分子と TIFA の結合を調べたところ IRAK-1 と結合した (Fig. 4A)。しかし、G50ES66A 変異体も IRAK-1 と効率良く結

合することから FHA ドメインの標的リン酸化タンパク質が存在するとしても IRAK-1 ではないと考えられた。つぎに TIFA が TRAF6 と IRAK-1 の両方に結合することから TIFA が TRAF6 と IRAK-1 との結合を促進する可能性を検討した。一定量の TRAF6 と IRAK-1 を発現させそこに

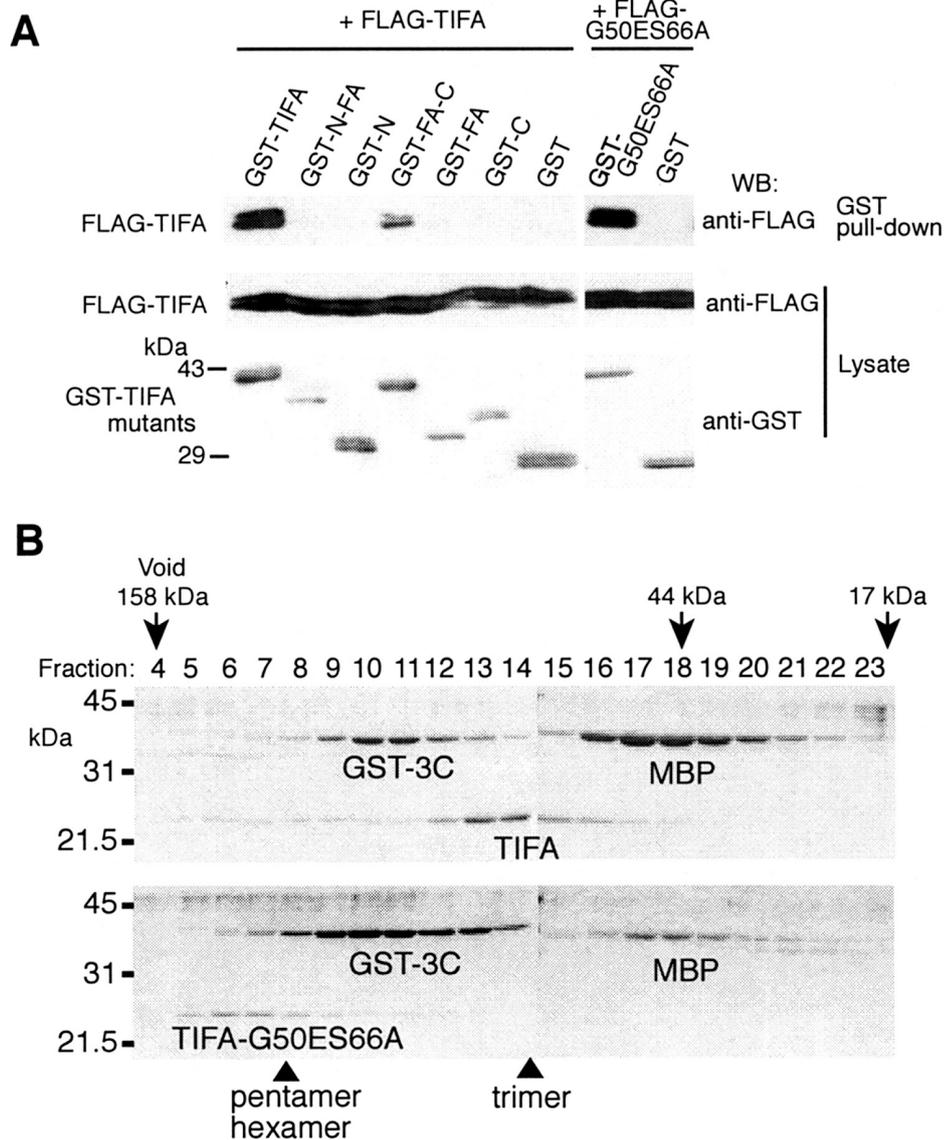


Fig. 3 Self-association of TIFA. A, Identification of the domain required for TIFA self-association. GST-TIFA or its mutants were coexpressed with FLAG-TIFA or FLAG-G50ES66A in HEK293T cells. GST pull-down assays were performed, and coprecipitated FLAG-TIFA was analyzed by Western blotting with anti-FLAG antibody. B, Oligomer formation of recombinant TIFA protein and that of mutant TIFA protein. MBP-TIFA (24 µg, upper) or MBP-TIFA-G50ES66A (lower) was cleaved with 2.4 U of PreScission Protease (GST-3C) at 4°C for 4 hr. The reaction mixture was applied to a Superdex 75 column, and fractions (20 µl) were collected. Fractions were analyzed on 10% polyacrylamide-SDS gel and proteins were visualized by coomassie brilliant blue staining. Arrows indicate the elution profile of the molecular-weight marker proteins (158 kDa,  $\gamma$ -globulin; 44 kDa, ovalbumin; 17 kDa, myoglobin) and the position of the void volume.

TIFA の量を変えて加えた場合での TRAF6 と IRAK-1 との結合を調べたところ、TIFA が存在しない場合に比較して TIFA の適当量添加により顕著に両者の結合が増加した (Fig. 4B)。この結果は TIFA がシグナル伝達時に TRAF6 と IRAK-1 の相互作用を促進する可能性を示唆している。次にこのことが生理的条件下に *in vivo* で再現されるか否かを検討した。まず抗 TIFA 抗体をウサギで作

成し、内在性 TIFA が TIFA cDNA から発現するタンパク質と一致することを確認した。IL-1 刺激有無で内在性 TRAF6 と TIFA の結合を調べたところ両者の結合は刺激に依存せず恒常的であることが明らかとなった (Fig. 5A)。つぎに IRAK-1 と TIFA の結合を調べた。まず FLAG-TIFA を発現するレトロウイルスベクターをマウス胎児線維芽細胞に感染させた。この際 FLAG-TIFA の過剰発現

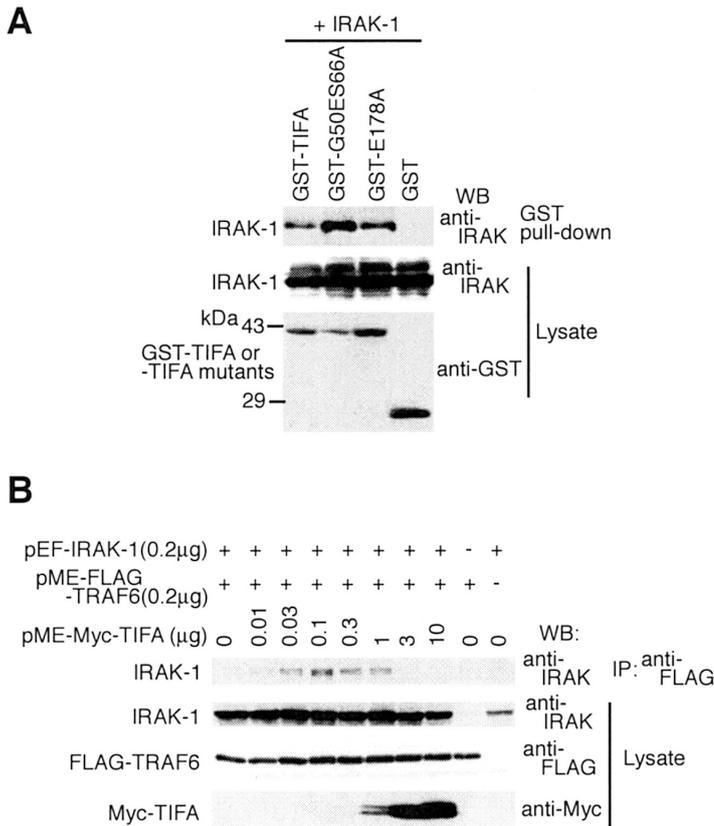


Figure 4 TIFA enhances the association of TRAF6 and IRAK-1. (A) Interaction of TIFA with IRAK-1. HEK293T cells were cotransfected with pME-GST-TIFA, pME-GST-TIFA mutant or pME-GST and pEF-IRAK-1. Thirty-six hours after transfection, cell lysates were subjected to GST pull-down assay. (B) TIFA links TRAF6 to IRAK-1. HEK293T cells were cotransfected with 0.2  $\mu$ g of pME-FLAG-TRAF6 and/or pEF-IRAK-1 and increasing amounts of pME-Myc-TIFA. FLAG-TRAF6 was immunoprecipitated with anti-FLAG antibody.

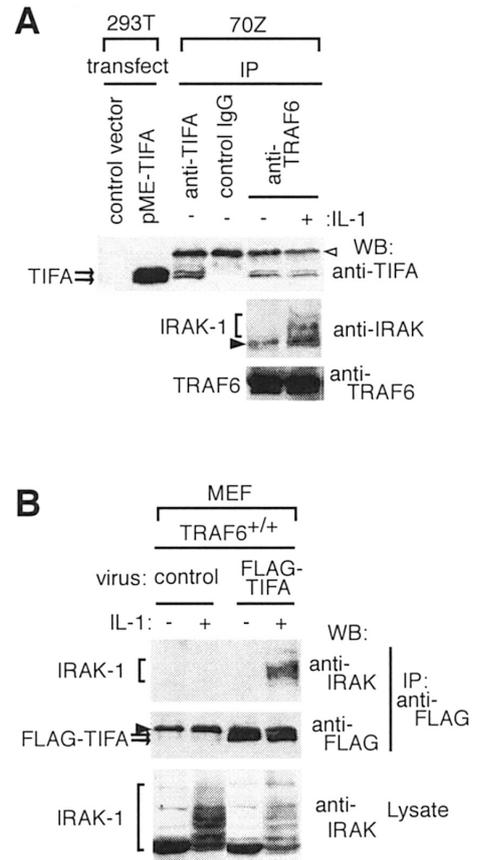


Figure 5 Interaction of TIFA with TRAF6 and IRAK-1 in vivo. (A) Interaction of TRAF6 with TIFA in 70Z pre-B cells. Lysates prepared from 70Z cells with (+) or without (-) IL-1 stimulation (20 ng/ml, 5 min) were immunoprecipitated with either anti-TIFA, control rabbit IgG or anti-TRAF6 antibody. Immunoprecipitates were analyzed by Western blotting with anti-TIFA, anti-IRAK and anti-TRAF6 antibodies. Lysates prepared from HEK293T cells transfected with pME-TIFA or control vector were analyzed on identical gels. Open and solid arrowheads indicate the Ig light chain and non-specific bands, respectively. (B) IL-1 stimulation-dependent interaction of TIFA and IRAK-1 in MEF cells. Wild-type MEFs were infected with retrovirus expressing FLAG-TIFA or control virus. Both types of MEFs were unstimulated (-) or stimulated (+) with IL-1 (20 ng/ml, 5 min). Anti-FLAG antibody immunoprecipitates were analyzed by Western blotting with anti-IRAK antibody. Solid arrowhead indicates Ig light chain. Lysates were also subjected to immunoblotting directly to analyze IRAK-1 expression.

を避けるためウイルス量を低く設定した。その結果内在性 FLAG-TIFA の発現は内在性 TIFA の約3倍であり、無刺激時の NF $\kappa$ B や JNK の活性化も起こっておらず、FLAG-TIFA を内在性 TIFA と考えて実験を進めて良いと判断した。IL-1 刺激有無において TIFA を免疫沈降し共沈してくる IRAK-1 を調べたところ、両者は無刺激時には結合しておらず、刺激依存的に結合することが明らかとなった (Fig. 5B)。さらに TIFA と共沈する IRAK-1 がリン酸化 IRAK-1 であることから、IRAK-1 が刺激により受容体複合体にリクルートされた後に複合体から解離してきた IRAK-1 が TIFA と結合すると考えられた。IRAK-1 は IRAK-4 によりリン酸化されるとともに複合体から解離し TRAF6 と結合すると考えられている<sup>19)</sup>。

### 3.4 NF $\kappa$ B 活性化における TIFA/IRAK-1/TRAF6 の位置関係

さらに NF $\kappa$ B 活性化シグナルにおける TIFA/IRAK-1/TRAF6 の位置関係を確認するためドミナントネガティブ変異体 (DN) として機能する G50ES66A 変異体の NF $\kappa$ B 活性化に与える影響を NF $\kappa$ B-ルシフェラーゼリポータープラスミドを用いて行った。IL-1 受容体、TLR4 による NF $\kappa$ B 活性化は TIFA-DN により抑制されたが TNF $\alpha$  による NF $\kappa$ B 活性化には影響がなかった (Fig. 6A)。TNF $\alpha$  のシグナルには TRAF6 が関与しないことからこの結果は TIFA が TRAF6 特異的に働くことを強く示唆するものである。次に TRAF6 の上流で働く MyD88, IRAK-1 による NF $\kappa$ B 活性化は抑制されたが、TRAF6 の下流で働く TAK1 による NF $\kappa$ B 活性化は抑制されなかった (Fig. 6B)。これは「TIFA が IRAK-1 と TRAF6 の間で働く」という考えを指示するものである。ところが TRAF6 による NF $\kappa$ B 活性化は TIFA-DN によりさらに活性化されてしまった (Fig. 6C)。これはおそらく TRAF6 がある程度活性化されていると TIFA-DN である G50ES66A 変異体でも TRAF6 結合能と自己集合能があるため TRAF6 をさらに活性化できると考えられる。従って、「TIFA が IRAK-1 と TRAF6 の間で働く」という考えに特に矛盾しないと考えられる。次に TIFA のよる NF $\kappa$ B 活性化に他のシグナル伝達因子の DN がどのような影響を及ぼすかを解析した。MyD88-DN は何も影響を与えなかったが、TRAF6-DN, TAK1-DN, Ubc13-DN は TIFA のよる NF $\kappa$ B 活性化を抑制した。また TIFA の上流と思われる IRAK-1 の DN も抑制した (Fig. 6D, E)。たとえ上流であっても TIFA の活性化に必要なプロセス (例えば 3 量体形成) を IRAK-1-DN が抑制することは考えられる。従っていずれの結果も「TIFA が IRAK-1 と TRAF6 の間で働く」という考えを指示するものである (Fig. 6C)。

## 4. 考察

これらの結果から IL-1 刺激において TRAF6 と結合してシグナル伝達に関与する分子 TIFA を同定できたと考える。また、IL-1 と同様に IRAK-1 や TRAF6 が関与する TLR シグナルにおいても TIFA が関与することが十分に考えられる。実際、TIFA-DN は TLR4 による NF $\kappa$ B 活性化を抑制する。また、内在性 TIFA が恒常的に TRAF6 と結合していることから皮膚附属器形成に関与する EDAR, XEDAR, TROY などのシグナルに TIFA が関与する可能性も十分に考えられ現在解析中である。

毛包、汗腺及び皮脂腺などの皮膚から派生する皮膚附属器は、外胚葉由来の表皮の細胞と中胚葉由来の真皮との細胞とのシグナルの相互のやり取りによって形成される。近年、皮膚附属器形成に必須な細胞間や細胞内シグナル伝達に関わるタンパク質が同定されているが、その詳細な分子機構は今だ不明な点が多い。また発生学的な観点とは別に、臨床的にも、毛髪を喪失した患者、火傷などで皮膚を失った患者、あるいは遺伝的疾患で皮膚附属器に欠陥が存在する患者などにおいて皮膚附属器を再生することは、患者の日常生活の QOL (Quality of Life) を高める意味で重要である。前述のように皮膚附属器形成に TRAF6 を介するシグナルが必須である。また最近、毛包原基形成のかなり初期の段階で TNF 受容体ファミリーである EDAR  $\rightarrow$  TRAF6 シグナルが働いていることを見出した<sup>20)</sup>。即ち表皮細胞における TRAF6 シグナルは皮膚附属器形成におけるキーポイントであり、TRAF6 の活性化を人工的に制御することにより皮膚附属器の人為的生成 (再生) を可能にすると考えられる。本研究から明らかになったように TIFA は TRAF6 の活性化因子と考えられしかもタンパク質としては分子量が小さい。従って、もし適当な方法で TIFA タンパク質を皮膚細胞内に導入できるならば毛包や汗腺の人為的な形成も可能になると考えられる。従来活性化型  $\beta$ -catenin の発現による毛包形成が報告されているが、そのあとにそこから腫瘍が発生している。本申請では TRAF6 シグナルを適時 OFF にすることにより腫瘍発生の抑制を実現し得る可能性もあり、検討する価値が十分に存在すると考えられる。また、化粧品においては特に皮膚に悪影響を与えるものは避けなければならない。例えば、それが TIFA/TRAF6 経路を活性化してしまう作用があれば、毛包形成が起こり毛深くなってしまいう可能性も考えられる。従って、今後開発された化粧品について TIFA/TRAF6 経路に何らかの影響を与えないかチェックすることが必要かもしれない。

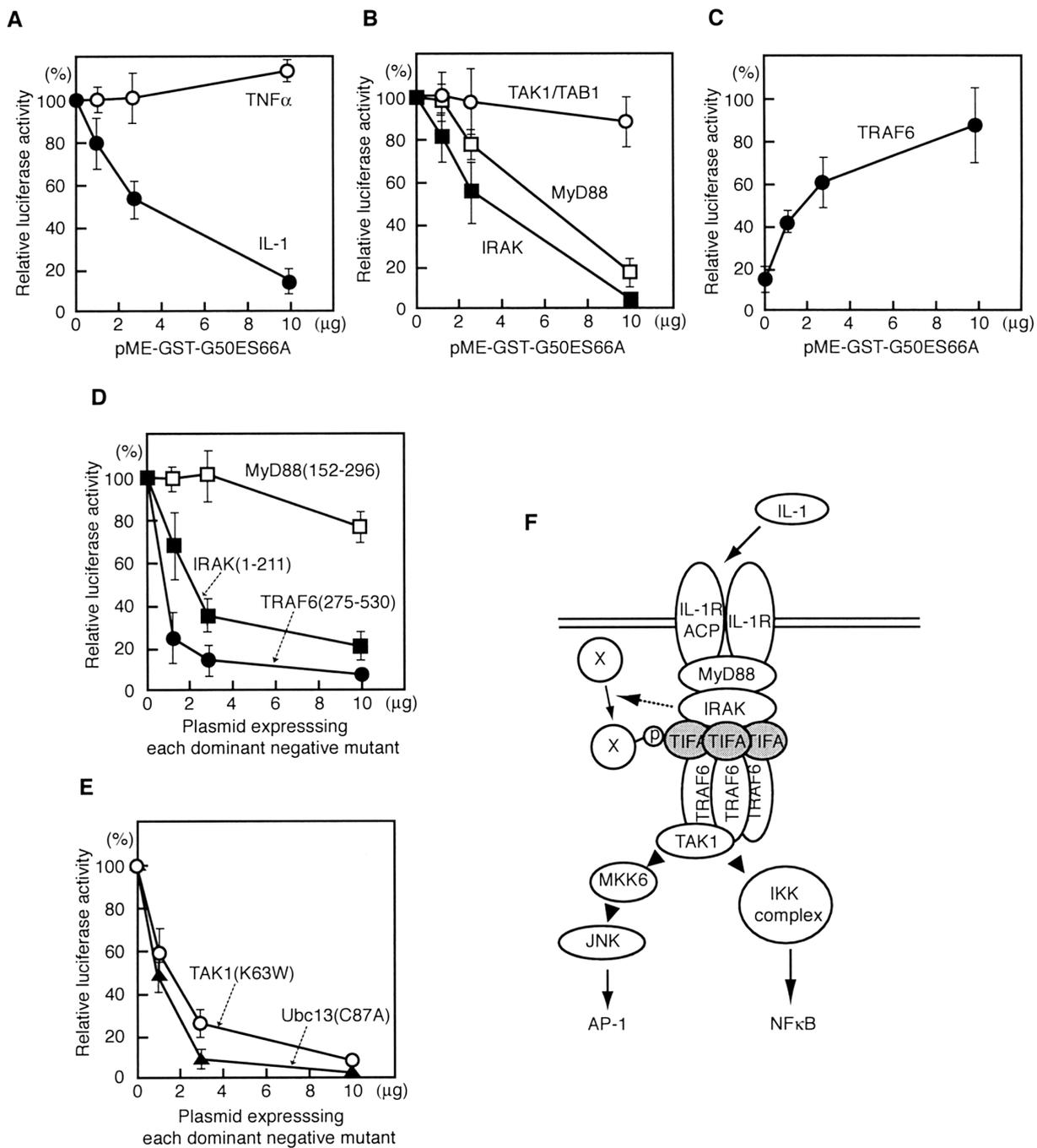


Figure 6 TIFA functions upstream of TRAF6 and downstream of IRAK-1. (A) HEK293T cells or HepG2 cells were transfected with 3xκB-luc and increasing amounts (0, 3 or 10 μg) of pME-GST-G50ES66A. Thirty hours after transfection, cells were either stimulated with TNFα(10 ng/ml, HEK293T) or IL-1 (20 ng/ml, HepG2) for 6 hr. (B, C) HEK293T cells were transfected with an expression plasmid encoding one of the NFκB activators including MyD88, IRAK-1, TAK1/TAB1 or TRAF6 in the presence of increasing amounts (0, 3 or 10 μg) of pME-GST-G50ES66A. (D, E) HEK293T cells were transfected with 0.1 μg of pME-TIFA in the absence or presence of expression vector encoding MyD88(152-296), IRAK-1(1-211), TRAF6(275-530), TAK1(K63W) or Ubc13(C87A). Thirty-six hours after transfection, luciferase activity was measured. Relative values in which the fold activation in the absence of each dominant-negative mutant was set to 100 (A, B, D, E) or in which the luciferase activity with reporter alone was set to 1 (C) are shown. Results shown are the mean ± sd of triplicate experiments and are representative of two independent experiments. (F) hypothesis of the TIFA-mediated signal pathways.

## (引用文献)

- 1) Naito, A, Yoshida, H, Nishioka, E, et al., TRAF6-deficient mice display hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 8766-8771, 2002.
- 2) Srivastava, AK, Pispas, J, Hartung, AJ, et al., The Tabby phenotype is caused by mutation in a mouse homologue of the EDA gene that reveals novel mouse and human exons and encodes a protein (ectodysplasin-A) with collagenous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 13069-13074, 1997.
- 3) Headon, DJ and Overbeek, PA, Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction. *Nat Genet*, 22, 370-374, 1999.
- 4) Headon, DJ, Emmal, SA, Ferguson, BM, et al., Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development. *Nature*, 414, 913-916, 2001.
- 5) Yan, M, Wang, LC, Hymowitz, SG, et al., Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors. *Science*, 290, 523-527, 2000.
- 6) Kojima, T, Morikawa, Y, Copeland, NG, et al., TROY, a newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, exhibits a homology with Edar and is expressed in embryonic skin and hair follicles. *J Biol Chem*, 275, 20742-20747, 2000.
- 7) Hofmann, K and Bucher, P, The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors. *Trends Biochem Sci*, 20, 347-349, 1995.
- 8) Takatsuna, H, Kato, H, Gohda, J, et al., Identification of TIFA as an adapter protein that links tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) to interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-1 (IRAK-1) in IL-1 receptor signaling. *J Biol Chem*, 278, 12144-12150, 2003.
- 9) Li, J, Lee, GI, Van Doren, SR, et al., The FHA domain mediates phosphoprotein interactions. *J Cell Sci*, 113, 4143-4149, 2000.
- 10) Sun, Z, Hsiao, J, Fay, DS, et al., Rad53 FHA domain associated with phosphorylated Rad9 in the DNA damage checkpoint. *Science*, 281, 272-274, 1998.
- 11) Durocher, D, Henckel, J, Fersht, AR, et al., The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. *Mol Cell*, 4, 387-394, 1999.
- 12) Durocher, D, Taylor, IA, Sarbassova, D, et al., The molecular basis of FHA domain:phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms. *Mol Cell*, 6, 1169-1182, 2000.
- 13) Yaffe, MB and Cantley, LC, Signal transduction. Grabbing phosphoproteins. *Nature*, 402, 30-31, 1999.
- 14) Ye, H, Arron, JR, Lamothe, B, et al., Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature*, 418, 443-447, 2002.
- 15) Tsukamoto, N, Kobayashi, N, Azuma, S, et al., Two differently regulated nuclear factor kappaB activation pathways triggered by the cytoplasmic tail of CD40. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 1234-1239, 1999.
- 16) Li, J, Smith, GP, and Walker, JC, Kinase interaction domain of kinase-associated protein phosphatase, a phosphoprotein-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 7821-7826, 1999.
- 17) Wang, C, Deng, L, Hong, M, et al., TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*, 412, 346-351, 2001.
- 18) Park, YC, Burkitt, V, Villa, AR, et al., Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2. *Nature*, 398, 533-538, 1999.
- 19) Kobayashi, K, Hernandez, LD, Galan, JE, et al., IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*, 110, 191-202, 2002.
- 20) Nishioka, E, Tanaka, T, Yoshida, H, et al., Mucosal addressin cell adhesion molecule 1 plays an unexpected role in the development of mouse guard hair. *J Invest Dermatol*, 119, 632-638, 2002.