

# Rho グアニンヌクレオチド交換因子による Toll 様受容体シグナルの制御

早水 良<sup>1)</sup>, 杉山 剛志<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>岐阜薬科大学感染制御学研究室, <sup>2)</sup>岐阜医療科学大学臨床検査学科

## Regulation of Toll-like receptor signal transduction by Rho guanine nucleotide exchange factors

Ryo Hayami<sup>1)</sup>, Tsuyoshi Sugiyama<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>Laboratory of Microbiology and Immunology, Gifu Pharmaceutical University

<sup>2)</sup>Department of Medical Technology, Gifu University of Medical Science

### Abstract

Toll-like receptors (TLRs) trigger innate immune responses by recognizing microbe-associated molecular patterns such as lipopolysaccharides and nucleic acids. However, overactivation or dysregulation of TLR system may lead to exaggerated inflammation and host tissue injury. TLR signaling can be controlled by other intracellular signaling, including Rho GTPases and RhoGEFs signaling. Knowledge of the molecular mechanisms underlying cross-talk of TLR and other signaling pathways can, therefore, be used for tailored therapeutic approaches to regulate local and temporal host immunity. In this review, we will focus on RhoGEFs which affect TLR signal transduction, and further we will discuss about the mechanisms of the cross-talk between TLRs and RhoGEFs. Future interests in this research field include establishing mechanistic understanding of TLRs and RhoGEFs cross-talk. This may furthermore open up novel therapeutic options for inflammatory or autoimmune diseases.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 38~41, 2018

**Key words** : TLR, RhoGEF, TRIF, MyD88, Rho GTPase

### はじめに

Toll 様受容体 (TLR) はリポ多糖体 (LPS) や核酸、細菌の鞭毛構成タンパク質などといった微生物関連分子パターンを認識することで免疫応答を誘導する。近年、TLR シグナルを標的とした疾患治療の研究が世界各国で進んでおり<sup>1)</sup>、また TLR シグナルにはさまざまな細胞内シグナル経路とのクロストークがあることが明らかとなってきている<sup>2)</sup>。

TLR シグナルは、細胞内アダプター分子の利用によって MyD88 依存的経路と TRIF 依存的経路に分けられる。TLR3 以外の TLR には細胞内ドメインに MyD88 が会合し、この経路によって主に転写因子 NF- $\kappa$ B が活性化される。一方、TLR3 および TLR4 には TRIF が会合し、この経路によって NF- $\kappa$ B とともに IRF-3 が活性化される。NF- $\kappa$ B の活性化は炎症性サイト

カインやケモカインの発現を誘導し、IRF-3 はインターフェロン関連遺伝子群の発現を誘導する。

Rho ファミリー低分子量 G タンパク質 (Rho GTPase) はアクチン骨格制御を介して細胞の運動性、極性、増殖を制御する分子であり、ヒトでは RhoA, Rac1, Cdc42 など 20 種が報告されている<sup>3)</sup>。Rho GTPase は不活性型である GDP 結合型と活性型である GTP 結合型の状態をとり、Rho グアニンヌクレオチド交換因子 (Rho guanine nucleotide exchange factors : RhoGEFs) が活性型への変換を、Rho GTPase 活性化タンパク質 (Rho GTPase activating proteins : RhoGAPs) が不活性型への反応を活性化することにより 2 つの状態が制御されている (図 1)。

RhoGEF は構造的特徴から Dbl ファミリーと Dock ファミリーの 2 つのファミリーに分類され、ヒトには前者が 70 種、後者が 11 種あるとされている<sup>3)</sup>。これら

早水 良 岐阜薬科大学感染制御学研究室 〒 501-1196 岐阜県岐阜市大学西 1-25-4

TEL : 058-230-8100 FAX : 058-230-8140 E-mail : 136027@gifu-pu.ac.jp

杉山 剛志 岐阜医療科学大学臨床検査学科 〒 501-3892 岐阜県関市市平賀字長峰 795-1

TEL : 0575-22-9401 FAX : 0575-23-0884

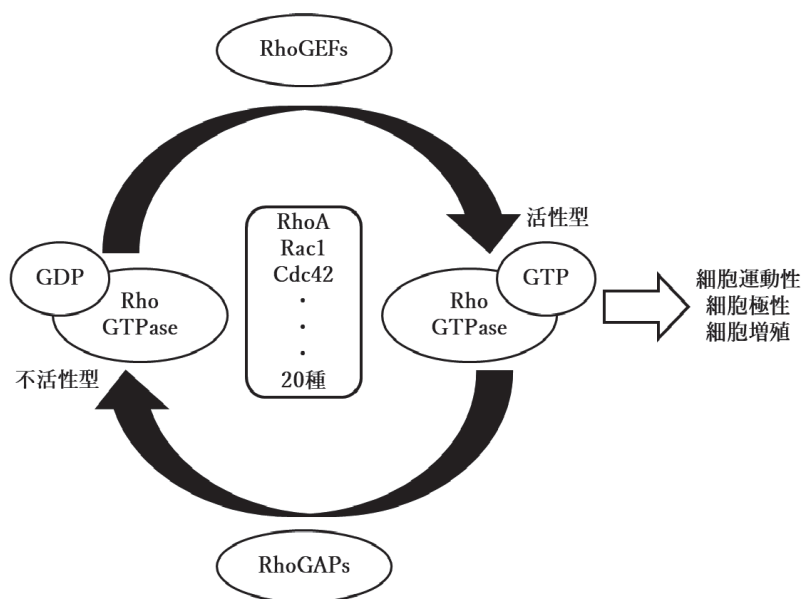


図 1 Rho GTPase の活性制御

の RhoGEF は臓器や細胞種で発現量が異なり、また G タンパク質共役型受容体 (GPCR) や Integrin<sup>3)</sup>, VEGF 受容体<sup>4)</sup>, Eph 受容体<sup>5)</sup> などからのシグナルによって活性化状態が変化することが報告されている。したがって、ある特定の RhoGEF の活性を制御することは、その RhoGEF の下流のシグナルを臓器や細胞種特異的に制御することにつながると考えられる。

RhoGEF の TLR シグナルへの影響についてはいくつかの報告があるが、80 種を超える RhoGEF のうちわずか数種に過ぎず、その影響の作用メカニズムの解明もいまだ十分とはいえない。

## 1. TLR シグナルに影響を与える RhoGEF

Vav1 は血球系細胞に発現するがん原遺伝子として発見され、その後 Rac1 などの Rho GTPase を活性化することが明らかになった RhoGEF である<sup>3)</sup>。Vav1 は TLR9 リガンドである CpG DNA 刺激によってリン酸化され、このリン酸化を抑制すると CpG DNA 刺激による細胞応答が抑制されると報告されている<sup>6)</sup>。

AKAP13 (ARHGEF13) は A キナーゼアンカータンパク質ファミリーに属する足場タンパク質であり、RhoA を活性化する RhoGEF である<sup>3)</sup>。AKAP13 は免疫細胞および腸管上皮細胞に発現し、TLR2 シグナルに影響すると報告されている<sup>7)</sup>。また、AKAP13 のノックダウンによって TLR2 刺激による NF- $\kappa$ B 活性化が抑制され、さらに AKAP13 の GEF 活性ドメインへの変異導入によって NF- $\kappa$ B 活性化が低下することから、下流の Rho GTPase の活性化の関与が示唆される。

GEF-H1 (ARHGEF2, KIAA0651) は RhoA や Rac1 を活性化する RhoGEF で、微小管に結合して活性が調

節される<sup>8)</sup>。GEF-H1 は LPS 刺激によって発現が増加し、RhoA の活性化を介して LPS 刺激による NF- $\kappa$ B の活性化および IL-8 の産生を増強する<sup>8)</sup>。

以上のように、TLR リガンド刺激による細胞応答に対するいくつかの RhoGEF の影響が報告されているが、RhoGEF が活性化する Rho GTPase はさまざまであり、RhoGEF が直接的に TLR シグナル分子と相互作用するのか、Rho GTPase やさらにその下流の分子が関与するのかなど、そのメカニズムについては不明な点が多い。そこでわれわれは、TLR の細胞内アダプター分子である MyD88 または TRIF と RhoGEF を発現プラスミドによって細胞内で過剰発現させ、TLR シグナルに影響する RhoGEF のスクリーニングを行った。その結果、いくつかの RhoGEF が TLR シグナルを増強することを見出しているため、以下に紹介する。

## 2. KIAA0915 による TRIF 依存的シグナル増強作用

KIAA0915 は神経細胞や血管平滑筋細胞に発現がみられ、RhoA を活性化する RhoGEF である。われわれは KIAA0915 が TRIF 依存的 IFN- $\beta$  プロモーターの活性化を増強することを見出し、そのメカニズムの一端を明らかにしている (図 2)。

KIAA0915 を TRIF とともに発現させると KIAA0915 の発現量依存的に IFN- $\beta$  プロモーターの活性化が増強される。また、TRIF を細胞内アダプター分子に持つ TLR3 および TLR4 を細胞に発現させ、それぞれのリガンドで刺激した際に誘導される IFN- $\beta$  プロモーターの活性化も同様に、KIAA0915 の発現量依存的に増強されることから、細胞内での KIAA0915 の発現量また

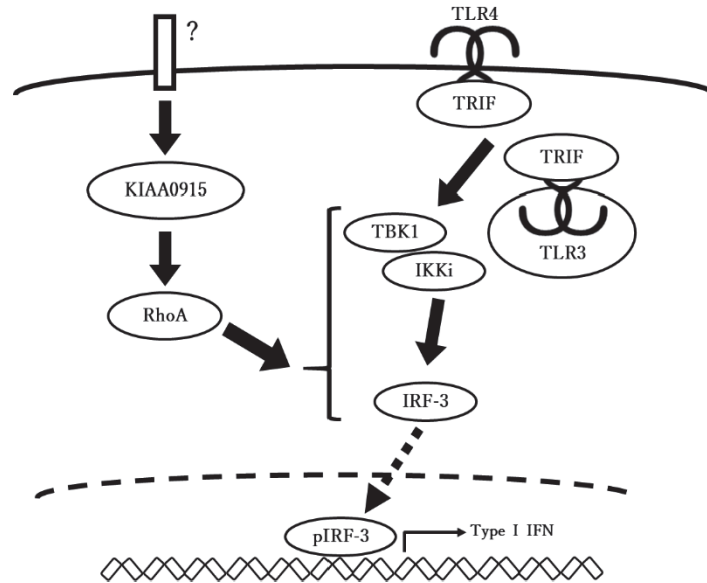


図 2 KIAA0915 による TRIF 依存的シグナル増強機構

は活性化状態によって TLR3 および TLR4 刺激による TRIF 依存的経路の活性化が影響を受けることが示唆される。

TRIF 依存的経路では下流のキナーゼ、TBK1 および IKKi の活性化を介して転写因子 IRF-3 がリン酸化することによって IFN- $\beta$  プロモーターの転写が開始されるが、TBK1 または IKKi を細胞に発現させた際に誘導される IFN- $\beta$  プロモーターの活性化も、TRIF を発現させた場合と同様に KIAA0915 の発現量依存的に活性化が増強される。しかし、活性化 IRF-3 でリン酸化されるセリンおよびスレオニンの 5 つの残基をアスパラギン酸 (D) に置換した活性型変異体、5D-IRF-3 の発現によって誘導される IFN- $\beta$  プロモーターの活性化は KIAA0915 の発現に影響されない。さらに、TLR3 または TLR4 刺激による IRF-3 のリン酸化は、KIAA0915 を発現させると発現量依存的に増強される。以上の結果から、KIAA0915 は TLR3 または TLR4 シグナルによる IRF-3 のリン酸化を増強することによって IFN- $\beta$  プロモーターの活性化を増強することが示唆される。また、この活性化増強作用は KIAA0915 による RhoA の活性化を介することが示唆されている。

### 3. PLEKHG ファミリー RhoGEF による TLR シグナル増強作用

PLEKHG (pleckstrin homology and RhoGEF domain containing G) ファミリー RhoGEF のうち、われわれは FLJ00018 (ARHGEF42, PLEKHG2) および KIAA0599 (ARHGEF43, PLEKHG3) の TLR シグナル増強作用を見出している。

FLJ00018 は MyD88 依存的な NF- $\kappa$ B の活性化を増強するが、TRIF 依存的な IFN- $\beta$  プロモーターの活性

化は増強しない。この MyD88 依存的シグナル増強作用には FLJ00018 の Rho GTPase を活性化するドメインが必要で、Rac1 の関与が示唆されている。

KIAA0599 は TRIF 依存的な IFN- $\beta$  プロモーターの活性化を増強する。この増強作用は KIAA0915 とは異なり、5D-IRF-3 を細胞に発現させた際の活性化も増強する。また、この増強作用には KIAA0599 による Rho GTPase 活性化は関与しないことが示唆されている。

これらの PLEKHG ファミリー RhoGEF による TLR シグナル増強作用は他の RhoGEF とは異なるものと考えられ、今後詳細な検討を行う予定である。

### 4. KIAA0362 による TLR シグナル増強作用

KIAA0362 (ARHGEF14, Dbs) は TRIF 依存的な IFN- $\beta$  プロモーターの活性化を増強し、TRIF による IRF-3 依存的なプロモーターの活性化だけではなく、TRIF 依存的な NF- $\kappa$ B 依存的プロモーターの活性化も増強する。また、KIAA0599 と同様に、5D-IRF-3 を細胞に発現させた際の活性化も増強する。さらに、IRF-3 依存的なプロモーターの活性化増強には下流の Rho GTPase である Rac1 の活性化が必要であるが、NF- $\kappa$ B 依存的プロモーターの活性化増強には Rac1 の活性化は関与しないという結果が得られており、KIAA0362 による TLR シグナル制御はさらに複雑な機構によることが示唆される。

### おわりに

TLR シグナルは両刃の剣であり、病原体の侵入に対して自然免疫系を活性化して感染防御に働くが、過剰に活性化すれば炎症性疾患や自己免疫疾患を引き起こ

す。逆に、これらの疾患治療のために TLR シグナル全般を抑制すれば易感染性を惹起する。臓器や細胞種特異的に存在する他のシグナル経路とのクロストークは、TLR シグナルを適切に制御できる可能性を秘める。今後、さらに多様な RhoGEF について検討し、TLR シグナルとのクロストークおよびそのメカニズムを明らかにしていきたい。

## 文 献

- 1) Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LA : Targeting Toll-like receptors : emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov* 9 : 293-307, 2010
- 2) Brown J, Wang H, Hajishengallis GN, et al. : TLR-signaling networks : an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J Dent Res* 90 : 417-427, 2011
- 3) Cook DR, Rossman KL, Der CJ : Rho guanine nucleotide exchange factors : regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene* 33 : 4021-4035, 2014
- 4) Kusahara S, Fukushima Y, Fukuhara S, et al. : Arhgef15 promotes retinal angiogenesis by mediating VEGF-induced Cdc42 activation and potentiating RhoJ inactivation in endothelial cells. *PLoS One* 7 : e45858, 2012
- 5) Margolis SS, Salogiannis J, Lipton DM, et al. : EphB-Mediated Degradation of the RhoA GEF Ephexin5 Relieves a Developmental Brake on Excitatory Synapse Formation. *Cell* 143 : 442-455, 2010
- 6) Stovall SH, Yi AK, Meals EA, et al. : Role of vav1- and src-related Tyrosine Kinases in Macrophage Activation by CpG DNA. *J Biol Chem* 279 : 13809-13816, 2004
- 7) Shibolet O, Giallourakis C, Rosenberg I, et al. : AKAP13, a RhoA GTPase-specific Guanine Exchange Factor, Is a Novel Regulator of TLR2 Signaling. *J Biol Chem* 282 : 35308-35317, 2007
- 8) Guo F, Tang J, Zhou Z, et al. : GEF-H1-RhoA signaling pathway mediates LPS-induced NF- $\kappa$ B transactivation and IL-8 synthesis in endothelial cells. *Mol Immunol* 50 : 98-107, 2012