

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 11 日現在

機関番号：27102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15686

研究課題名(和文)NF- $\kappa$ Bシグナルの新たな時空間的制御機構の解明研究課題名(英文)A novel regulatory mechanism of NF- $\kappa$ B signaling

研究代表者

自見 英治郎(Eijiro, Jimi)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40276598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はNF- $\kappa$ B, p65サブユニットの534番目のセリン残基の生理的役割を解析するために534番目のセリン残基をアラニンに置換したノックインマウスを作製した。野生型およびS534Aマウス由来の線維芽細胞株(MEF)を樹立し、TNF $\alpha$ で刺激したところ、S534A MEFではp65の核移行が長時間持続し、NF- $\kappa$ Bの転写活性が亢進した。これらの結果から、p65 S534のリン酸化特異的な負のフィードバック機構が存在すると考え、p65 S534のリン酸化特異的に結合する分子を同定し、さらにNF- $\kappa$ Bによる新たな調節機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To investigate the physiological role of the serine residue at position 534 of the NF- $\kappa$ B, p65 subunit, we generated knock-in mice (S534A mice) in which the serine residue at position 534 was substituted with alanine. We established mouse embryonic fibroblasts (MEF) derived from wild-type and S534A mice. When we treated with TNF $\alpha$ , the nuclear translocation of p65 persisted for a longer time and enhanced transcriptional activity of NF- $\kappa$ B in S534A cells compared with wild-type cells. These results led us to, thought that there is phosphorylation-specific negative feedback mechanism of p65 S534. Therefore, we identified a novel molecule binding specifically to phosphorylation of p65 S534, and further revealed a new regulatory mechanism by NF- $\kappa$ B.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：NF- $\kappa$ B 活性化機構

## 1. 研究開始当初の背景

転写因子 NF- $\kappa$ B は、炎症性サイトカイン、ケモカイン、抗アポトーシスや増殖因子などの発現を調節し、炎症反応、免疫応答、細胞分化や増殖などの様々な生命現象に深く関与する。その一方で、制御不全による恒常的な NF- $\kappa$ B の活性化は慢性関節リウマチやがんなどの病態形成に関わることから、NF- $\kappa$ B の活性化は一過性となるように厳密に制御される必要がある。

NF- $\kappa$ B は定常状態では、阻害タンパク質 inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B)と複合体を形成し細胞質内に存在する。細胞が刺激を受けるとキナーゼ活性を持つ I $\kappa$ B kinase (IKK)  $\alpha$ と IKK $\beta$ 、調節サブユニット NF- $\kappa$ B essential modulator (NEMO)から構成される IKK 複合体が活性化され、I $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化とプロテアソームによる分解を誘導する。その結果、フリーとなった NF- $\kappa$ B (主に p65 と p50 のヘテロダイマー)が核へ移行し、標的遺伝子のプロモーター領域に存在する特異的配列に結合することで遺伝子の発現を誘導する。その後 NF- $\kappa$ B は、「核から細胞質へ戻る」または「核内で分解される」ことで核から消失(負のフィードバック)する。

NF- $\kappa$ B の p65 サブユニットは、NF- $\kappa$ B の転写活性化において重要であり、NF- $\kappa$ B の転写活性の調節に p65 のリン酸化が重要な役割を果たしていることが報告されている。特に C 末端の 536 番目(マウスでは 534 番目:S534)のセリン残基のリン酸化に関する報告は多いが、その殆どが遺伝子導入による実験であり、p65 S534 の生理的役割は良くわかっていない。

そこで我々は p65 S534 のリン酸化の役割を明らかにするために S534 をアラニンに置換した機能抑制型ノックインマウス(S534A)を作製したところ、脂質代謝異常が認められた他に、細胞外刺激によって核へ移行した p65 が長時間核に留まった。そこで、我々は p65 S534 のリン酸化特異的な負のフィードバック機構が存

在する可能性を考えた。

## 2. 研究の目的

がん、慢性関節リウマチや肥満の病態形成に転写因子 NF- $\kappa$ B の恒常的な活性化が深く関わることから、NF- $\kappa$ B の活性化は特定の臓器(空間)で一過性(時間)となるように厳密に制御されている。この「一過性」の活性化には「負のフィードバック」が重要である。一方、NF- $\kappa$ B, p65 サブユニットは NF- $\kappa$ B の転写活性化に重要で、p65 の複数のセリン残基のリン酸化が転写活性を調節すると考えられている。その中で 536 番目(マウスでは 534 番目)のリン酸化の役割に関する報告が蓄積しているが、未だ統一した見解は得られていない。そこで我々は 534 番目のセリン残基をアラニンに置換した機能抑制型(S534A)マウスを作製した。このマウス由来の細胞では細胞外刺激によって核に移行した p65 が長時間持続することから、p65 S534 のリン酸化特異的な負のフィードバック機構が存在する可能性を考え、その調節機構を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1. p65 S534 と会合する分子の解析

我々は野生型および S534A マウス由来の線維芽細胞株(MEF)を樹立した。野生型および S534A MEF を TNF $\alpha$ で刺激 0 分、30 分後に核タンパク質を調製し、抗 p65 抗体で免疫沈降を行い、TNF $\alpha$ 刺激 30 分後に野生型のみで p65 と会合するタンパク質のスポットを切り取り、質量分析法により、p65 S534 のリン酸化依存的に p65 と会合する分子群を選別する(1次選別)。さらに、これまでに明らかになっている機能や文献的情報をもとに、「核・細胞質をシャトルする分子」、または「核内でタンパク質分解に関わる分子」を絞り込む(2次選別)。

### 2. p65 S534A の機能解析

質量分析の結果が得られる迄、p65 S534A

MEF を用いて、以下の実験を行う。

- ① 標的遺伝子の発現とプロモーターへの結合能の検討: 野生型および p65 S534A の MEF を TNF $\alpha$  で刺激し、経時的に RNA を調製し、標的遺伝子 (IkB $\alpha$  や IL-6 など) 発現量の変化を Real-time PCR で、プロモーターへの結合能をクロマチン免疫沈降法で検討する。⇒ p65 S534A が標的遺伝子のプロモーターへ長く結合することで、標的遺伝子の発現を促進することが確認できる。
- ② p65 S534A の半減期およびユビキチン化の検討: 野生型および p65 S534A の MEF をシクロヘキシミドで前処理した後に TNF $\alpha$  で刺激し、細胞質および核タンパク質に存在する p65 を Western blot で検討する。また、抗 p65 抗体で免疫沈降した後に、抗ユビキチン抗体で blot し、p65 のユビキチン化を比較する。⇒ p65 S534A のリン酸化によって p65 がユビキチン-プロテアソーム系で分解されるか否か確認できる。

### 3. 候補分子 X の同定とその機能解析

2.-②の結果から、p65 S534A がユビキチン-プロテアソーム系で分解されるか、核から細胞質へ運ばれるか判定できる。質量分析の結果より、候補となる複数の分子の shRNA を設計する。野生型 MEF に shRNA を遺伝子導入した後に TNF $\alpha$  で刺激し、細胞質および核タンパク質に存在する p65 の量を Western blot で検討する。S534A 同様に核に長く留まるものを X として同定する (3次選別)。

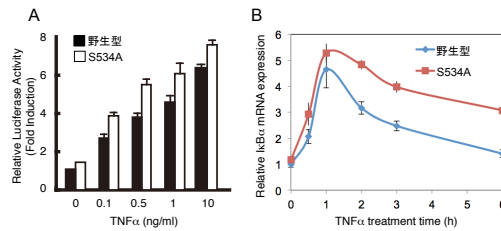
- ① 候補分子 X 遺伝子のクローニングと変異体の作製: 候補分子 X の遺伝情報をもとに、X 遺伝子をクローニングする。または、他研究室から供与してもらい、それをもとに機能促進型、または抑制型変異体を作製する。
- ② 候補分子 X と p65 の会合領域の同定: p65 と候補分子 X の変異体を作製し、会合領域を同定する。
- ③ 候補分子 X の機能の解析
  - ① ユビキチン-プロテアソームによる分解: 野生型 p65 が X と会合すると分解され、p65 S534A は分解されないこと、また野生型 p65 が X の変異体では p65 が分解されないことを確認する。
  - ② 核外への搬出: 野生型 p65 が X と会合すると細胞質に存在し、p65 S534A は核に留まること、野生型 p65 が X の変異体では細胞質に存在しないことを確認す

る。

### 4. 研究成果

#### (1) p65S534A は転写活性が上昇する

野生型および S534A MEF に $\kappa$ B ルシフェラーゼ遺伝子を遺伝子導入した後に TNF $\alpha$  で刺激すると S534A MEF で転写活性が上昇した。さらに NF- $\kappa$ B の標的遺伝子の1つである IkB $\alpha$  の mRNA の発現量も上昇していた (図1)。

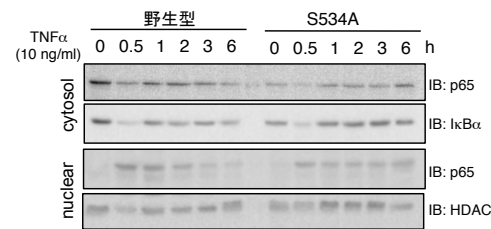


(図1) p65S534Aは転写活性が上昇する  
A: 野生型およびS534A MEFに $\kappa$ Bルシフェラーゼ遺伝子を遺伝子導入した後に様々な濃度の TNF $\alpha$ で刺激し、24時間後にNF- $\kappa$ Bの転写活性を測定した。  
B: 野生型およびS534A MEFをTNF $\alpha$ で刺激し、NF- $\kappa$ Bの標的遺伝子の1つであるIkB $\alpha$ の mRNAの発現量の変化を経時的に測定した。

#### (2) p65S534A は核に長く存在し、標的遺伝子のプロモーターへの結合が長くなる

野生型および S534A MEF を TNF $\alpha$  で刺激した後に細胞質および核タンパク質を調製し p65 の発現を抗 p65 抗体を用いた Western Blot 法および免疫染色法で検討したところ、p65 が核に長く存在した (図2)。

また S534A は IkB $\alpha$  プロモーターへの結合が延長した。

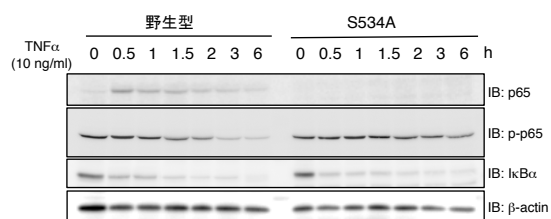


(図2) p65S534Aは核に長く存在する  
野生型およびS534A MEFをTNF $\alpha$ で刺激した後に細胞質および核タンパク質を調製しp65の発現をWestern Blot法で検討した。

#### (3) p65S534A はタンパクの半減期が延長する

野生型および S534A MEF をシクロヘキシミド (CHX) で前処理した後に TNF $\alpha$  で刺激し p65 の発現を抗 p65 抗体を用いた Western Blot で検討したところ、S534A MEF では野生

型と比較して p65 が長時間検出できた(図3)。さらに、抗 p65 抗体で免疫沈降した後に抗ユビキチン抗体で Blot すると S534AMEF では p65 のユビキチン化が抑制された。



(図3) p65S534Aはタンパクの半減期が延長する  
野生型およびS534A MEFをシクロヘキシミドで前処理した後に  
TNFαで刺激し、p65の発現をWestern Blotで検討した。

#### (4) p65 S534 と会合する分子の質量分析の結果

質量分析の結果、p65 の S534 のリン酸化特異的に会合する分子 X を同定した。X はユビキチン化に関わる分子であり、X は他の分子とともに複合体を形成することがわかった。複合体を形成する分子についても明らかにしているが、現在論文作成中のため詳細を記載すること控えたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

自見 英治郎 (Eijiro Jimi)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：40276598

##### (2) 研究分担者

福島 秀文 (Hidefumi Fukushima)  
東北大学・歯学部・准教授  
研究者番号：70412624

##### (3) 研究分担者

古株 彰一郎 (Shoichiro Kokabu)  
九州歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号：30448899