

平成 21 年 2 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790358
 研究課題名 (和文) 自然免疫における NF-IL6 の転写活性化様式とそのアイソフォームの機能解析
 研究課題名 (英文) Analysis of transcriptional activation and isoforms of NF-IL6 in innate immunity
 研究代表者 植松 智 (UEMATSU SATOSHI)
 大阪大学・微生物病研究所・助教
 研究者番号：50379088

研究成果の概要：

我々は転写因子 NF-IL6 の主要な転写活性化因子 34 kDa LAP を欠如した KI マウス (*C/ebpb^{M20A/M20A}* KI マウス) を作製して解析を行い、34 kDa の LAP は活性化したマクロファージにおいて NF-IL6 による遺伝子誘導には必須であるが、細胞内寄生菌に対する殺菌には必要不可欠ではないことを明らかにした。また、転写抑制因子の LIP を欠如したノックインマウス (*C/ebpb^{M151A/M151A}* KI マウス) を作製して解析を行い、LIP は *in vivo* において LAP の機能を抑制しないことがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：NF-IL6、アイソフォーム、LAP、LIP、細胞内寄生菌、細胞内殺菌、転写制御 LPS 誘導性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

NF-IL6 は生体内で広く発現している転写因子で、感染防御、代謝、肝臓の再生、発生、細胞周期、癌新生など、様々な生理現象に関わっている。NF-IL6 には、38 kDa LAP、34 kDa LAP そして 20 kDa LIP と呼ばれる 3 つのアイソフォームが存在している。LIP は N 末の転写活性化ドメインを持っていないため、LAP による転写活性化に拮抗する因子と考えられている。NF-IL6 のアイソフォームの重要性や特異性は様々な論文で研究されてきたが、

これらのアイソフォームの *in vivo* における役割は十分に解析されてこなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、炎症・感染時における NF-IL6 の各アイソフォームの機能解析や活性化のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

アイソフォームの解析のために、各転写開始点のメチオニンをアラニンに置換した遺伝子変異ノックイン (KI) マウスを、転写活性

化の解析のために、188番目と217番目のスレオニンをアラニンに置換した遺伝子変異KIマウスを作製し、個体レベルで解析を行っていく。

4. 研究成果

平成19年度、我々はNF-IL6のアイソフォームのうち、主要な活性化因子である34 kDa LAPを欠如したノックインマウス (*C/ebpb^{M20A/M20A}* ノックインマウス) を作製して解析を行った。*C/ebpb^{M20A/M20A}* のマクロファージでは、リポポリサッカライド(LPS)によるNF-IL6の標的遺伝子の発現が消失しており、リステリア感染に感受性を示した。さらに、アクネ菌に対するTh1誘導や肉芽腫形成、それに伴うLPSショックは著しく障害されていた。にもかかわらず、NF-IL6のノックアウトマウスで最も顕著な表現型である細胞内寄生菌に対する殺菌障害に関しては、全く障害されていなかった。したがって、34 kDaのLAPは活性化したマクロファージにおいてNF-IL6による遺伝子誘導には必須であるが、細胞内着せ菌に対する殺菌には必要不可欠ではないことが明らかになった。平成20年度、我々は転写抑制因子のLIPを欠如したノックインマウス (*C/ebpb^{M151A/M151A}* KIマウス) を作製して解析を行った。*C/ebpb^{M151A/M151A}* KIマウスはメンデルの法則に従い正常に生まれた。*C/ebpb^{M151A/M151A}* KIマウスのマクロファージでは、LIPが激減していたが、なおも微量のLIP蛋白が発現しており38 kDa LAPや34 kDa LAPからcleavageを受けて作られることが分かった。*C/ebpb^{M151A/M151A}* KIマウスでは、LIPが激減しているにもかかわらず、LAPの転写機能は抑制されていなかった。NF-IL6のターゲット分子は正常に誘導されており、過剰発現することもなかった。また、細胞内寄生菌に対する殺菌能も野生型とかわらなかった。以上のことから転写によって作られるLIPは*in vivo*においてLAPの機能を抑制しないことがわかった。

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 31 件) **全て査読あり**

- 1)) Kawakami A, Osaka M, Aikawa M, Uematsu S, Akira S, Libby P, Shimokado K, Sacks FM, Yoshida M. Toll-Like 2 Receptor Mediates Apolipoprotein CIII-Induced Monocyte Activation. *Circ Res*. 2008 Dec 5;103(12):1402-9.
- 2)) Saitoh T*, Fujita N*, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, Omori H, Noda T,

- Yamamoto N, Komatsu M, Tanaka K, Kawai T, Tsujimura T, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature*. 2008 Nov 13;456(7219):264-8.
- 3) Zhu Q, Egelston C, Vivekanandhan A, Uematsu S, Akira S, Klinman DM, Belyakov IM, Berzofsky JA. Toll-like receptor ligands synergize through distinct dendritic cell pathways to induce T cell responses: Implications for vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Oct 21;105(42):16260-5.
 - 4) Santiago-Raber ML, Kikuchi S, Borel P, Uematsu S, Akira S, Kotzin BL, Izui S. Evidence for genes in addition to tlr7 in the yaa translocation linked with acceleration of systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2008 Jul 15;181(2):1556-62.
 - 5) Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, Sato S, Tsujimura T, Yamamoto M, Yokota Y, Kiyono H, Miyasaka M, Ishii KJ, Akira S. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol*. 2008 Jul;9(7):769-76.
 - 6) Elander N, Ungerbeck J, Olsson H, Uematsu S, Akira S, Soderkvist P. Genetic deletion of mPGES-1 accelerates intestinal tumorigenesis in APC(Min/+) mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Jul 18;372(1):249-53.
 - 7) Zucchini N, Bessou G, Traub S, Robbins SH, Uematsu S, Akira S, Alexopoulou L, Dalod M. Cutting Edge: Overlapping Functions of TLR7 and TLR9 for Innate Defense against a Herpesvirus Infection. *J Immunol*. 2008 May 1;180(9):5799-5803.
 - 8) Shin OS, Isberg R, Akira S, Uematsu S, Behera AK, Hu LT. Distinct roles for MyD88, TLR2, TLR5, and TLR9 in phagocytosis of *Borrelia burgdorferi* and inflammatory signaling. *Infect Immun*. 2008 Jun;76(6):2341-51.
 - 9) Hirata N, Yanagawa Y, Ebihara T, Seya T, Uematsu S, Akira S, Hayashi F, Iwabuchi K, Onoe K. Selective synergy in anti-inflammatory cytokine production upon cooperated signaling via TLR4 and TLR2 in murine conventional dendritic cells. *Mol Immunol*. 2008 May;45(10):2734-42.
 - 10) Ishii KJ, Kawagoe T, Koyama S, Matsui K, Kumar H, Kawai T, Uematsu S, Takeuchi

- O, Takeshita F, Coban C, Akira S. TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature*. 2008 Feb 7;451(7179):725-729.
- 11) Zhang B, Ramesh G, Uematsu S, Akira S, Reeves WB. TLR4 Signaling Mediates Inflammation and Tissue Injury in Nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol*. 2008 May;19(5):923-32.
- 12) Nakano Y, Kuroda E, Kito T, Uematsu S, Akira S, Yokota A, Nishizawa S, Yamashita U. Induction of prostaglandin E(2) synthesis and microsomal prostaglandin E synthase-1 expression in murine microglia by glioma-derived soluble factors. *J Neurosurg*. 2008 Feb;108(2):311-319.
- 13) Chang SY, Cha HR, Uematsu S, Akira S, Igarashi O, Kiyono H, Kweon MN. Colonic patches direct the cross-talk between systemic compartments and large intestine independently of innate immunity. *J Immunol*. 2008 Feb 1;180(3):1609-18.
- 14) Vijay-Kumar M, Aitken JD, Kumar A, Neish AS, Uematsu S, Akira S, Gewirtz AT. TLR5KO mice have dysregulated intestinal gene expression and non-specific resistance to Salmonella-induced typhoid-like disease. *Infect Immun*. 2008 Mar;76(3):1276-81.
- 15) Yamakawa K, Kamekura S, Kawamura N, Saegusa M, Kamei D, Murakami M, Kudo I, Uematsu S, Akira S, Chung UI, Nakamura K, Kawaguchi H. Association of microsomal prostaglandin E synthase 1 deficiency with impaired fracture healing, but not with bone loss or osteoarthritis, in mouse models of skeletal disorders. *Arthritis Rheum*. 2007 Dec 28;58(1):172-183.
- 16) Noor S, Goldfine H, Tucker DE, Suram S, Lenz LL, Akira S, Uematsu S, Girotti M, Bonventre JV, Breuel K, Williams DL, Leslie CC. Activation of cytosolic phospholipase A2alpha in resident peritoneal macrophages by *Listeria monocytogenes* involves listeriolysin O and TLR2. *J Biol Chem*. 2007 Feb 22;282(8):4744-55.
- 17) Uematsu S, Akira S. Toll-Like Receptors (TLRs) and Their Ligands. *Handb Exp Pharmacol*. 2008;183:1-20.
- 18) Vijay-Kumar M, Sanders CJ, Taylor RT, Kumar A, Aitken JD, Sitaraman SV, Neish AS, Uematsu S, Akira S, Williams IR, Gewirtz AT. Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J Clin Invest*. 2007 Dec;117(12):3909-21.
- 19) Hawn TR, Berrington WR, Smith IA, Uematsu S, Akira S, Aderem A, Smith KD, Skerrett SJ. Altered Inflammatory Responses in TLR5-Deficient Mice Infected with *Legionella pneumophila*. *J Immunol*. 2007 Nov 15;179(10):6981-7.
- 20) Uematsu S, Kaisho T, Tanaka T, Matsumoto M, Yamakami M, Omori H, Yamamoto M, Yoshimori T, Akira S. The C/EBPbeta Isoform 34-kDa LAP Is Responsible for NF-IL-6-Mediated Gene Induction in Activated Macrophages, but Is Not Essential for Intracellular Bacteria Killing. *J Immunol*. 2007 Oct 15;179(8):5378-86.
- 21) Koyama S, Ishii KJ, Kumar H, Tanimoto T, Coban C, Uematsu S, Kawai T, Akira S. Differential Role of TLR- and RLR-Signaling in the Immune Responses to Influenza A Virus Infection and Vaccination. *J Immunol*. 2007 Oct 1;179(7):4711-20.
- 22) Bevelander M, Mayette J, Whittaker LA, Pavaglio SA, Jones CC, Robbins J, Hemenway D, Akira S, Uematsu S, Poynter ME. Nitrogen dioxide promotes allergic sensitization to inhaled antigen. *J Immunol*. 2007 Sep 15;179(6):3680-8.
- 23) Yamamoto M, Uematsu S, Okamoto T, Matsuura Y, Sato S, Kumar H, Satoh T, Saitoh T, Takeda K, Ishii KJ, Takeuchi O, Kawai T, Akira S. Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. *J Exp Med*. 2007 Sep 3;204(9):2233-9.
- 24) Li J, Song W, Czerwinski DK, Varghese B, Uematsu S, Akira S, Krieg AM, Levy R. Lymphoma Immunotherapy with CpG Oligodeoxynucleotides Requires TLR9 Either in the Host or in the Tumor Itself. *J Immunol*. 2007 Aug 15;179(4):2493-500.
- 25) Kuroda E, Noguchi J, Doi T, Uematsu S, Akira S, Yamashita U. IL-3 is an important differentiation factor for the development of prostaglandin E(2)-producing macrophages between C57BL/6 and BALB/c mice. *Eur J Immunol*. 2007 Aug;37(8):2185-95.
- 26) Saha S, Takeshita F, Matsuda T, Jounai N, Kobiyama K, Matsumoto T, Sasaki S, Yoshida A, Xin KQ, Klinman DM, Uematsu S, Ishii KJ, Akira S, Okuda K. Blocking of the TLR5 Activation Domain Hampers Protective Potential of Flagellin DNA Vaccine. *J Immunol*. 2007 Jul 15;179(2):1147-54.
- 27) Shim DH, Chang SY, Park SM, Jang H,

Carbis R, Czerkinsky C, Uematsu S, Akira S, Kweon MN. Immunogenicity and protective efficacy offered by a ribosomal-based vaccine from *Shigella flexneri* 2a. *Vaccine*. 2007 Jun 15;25(25):4828-36.

28) Ramesh G, Zhang B, Uematsu S, Akira S, Reeves WB. Endotoxin and cisplatin synergistically induce renal dysfunction and cytokine production in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Jul 293(1):F325-32.

29) Kawagoe T, Sato S, Jung A, Yamamoto M, Matsui K, Kato H, Uematsu S, Takeuchi O, Akira S. Essential role of IRAK-4 protein and its kinase activity in Toll-like receptor-mediated immune responses but not in TCR signaling. *J Exp Med*. 2007 May 14;204(5):1013-24.

30) Andersen-Nissen E, Hawn TR, Smith KD, Nachman A, Lampano AE, Uematsu S, Akira S, Aderem A. Cutting Edge: Tlr5^{-/-} Mice Are More Susceptible to *Escherichia coli* Urinary Tract Infection. *J Immunol*. 2007 Apr 15;178(8):4717-20.

31) Uematsu S, Akira S. Toll-like Receptors and Type I Interferons. *J Biol Chem*. 2007 May 25;282(21):15319-23.

[学会発表] (計6件)

1) 植松 智、Regulation of Humoral and Cellular Gut Immunity by Lamina Propria Dendritic Cells Expressing Toll-Like Receptor 5、第38回日本免疫学会総会・学術集会、2008年12月3日、国立京都国際会館

2) 植松 智、Regulation of Humoral and Cellular Gut Immunity by Lamina Propria Dendritic Cells Expressing Toll-Like Receptor 5、Toll 2008、2008年9月26日、Hotel Cascais Miragem

3) 植松 智、感染防御とTLR、第2回移植医療のための次世代テクノロジー研究会、2008年9月19日、大阪国際会議場

4) 植松 智、腸管における Toll-like receptor 5 の機能と *Salmonella typhimurium* 感染における役割、第81回日本細菌学会総会、2007年3月26日、国立京都国際会館

5) 植松 智、C/EBP β isoform, 34 kDa LAP is responsible for NF-IL6-mediated gene induction in activated macrophages but not essential for intracellular bacteria killing、日本免疫学会総会、2007年11月21日、グランドプリンスホテル新高輪

6) 植松 智、A new *in vivo* function of Toll-like receptor 5 in mouse small

intestine.、国際粘膜免疫学会、2007年7月11日、品川プリンスホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植松 智 (UEMATSU SATOSHI)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：50379088

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし