

平成23年5月18日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20570134
 研究課題名（和文） 誘導性転写調節因子 IκB-ζによる遺伝子特異的な発現制御
 研究課題名（英文） Control of Gene-specific Expression by the Inducible Transcription Regulator IκB-ζ
 研究代表者
 山崎 創 (Yamazaki, Soh)
 九州大学・医学研究院・講師
 研究者番号：70315084

研究成果の概要（和文）：

研究代表者が以前同定した新規因子 IκB-ζは、NF-κB と相互作用する核タンパク質であるが、これまでに、この分子が一群の NF-κB 標的遺伝子の発現に必須であることを報告している。本研究では、IκB-ζの欠損マウス由来の細胞および、IκB-ζの発現を亜鉛イオンの添加で人為的に誘導できるようにデザインした細胞を用いて、IκB-ζの作用機序の解明を試みた。その結果、IκB-ζが、標的遺伝子のプロモーター領域への NF-κB の結合に必要なことなどを明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：

We previously identified the new protein IκB-ζ, which binds to NF-κB in the nucleus. IκB-ζ is essential for expression of a group of NF-κB-regulated genes. In the present study, we attempted to elucidate mode of action for IκB-ζ in transcriptional up-regulation of target genes using the knockout cells and the cells in which IκB-ζ expression can be artificially induced by zinc. We revealed that IκB-ζ is necessary for association of NF-κB with the target promoters.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：遺伝子発現, 転写, クロマチン, 自然免疫, 炎症

1. 研究開始当初の背景

リポ多糖などの微生物由来成分の刺激時には、炎症関連因子(炎症性サイトカイン、

ケモカイン、細胞接着因子)や宿主防御因子(抗菌タンパク質など)の発現が誘導されるが、この時中心的な役割を果たすのが活性誘

導型の転写因子である NF- κ B である。研究代表者は以前、自然免疫の主要な担当細胞であるマクロファージをグラム陰性菌由来のリポ多糖で刺激した際に発現が誘導される遺伝子のスクリーニングをおこない、新規因子 I κ B- ζ を同定した (*J. Biol. Chem.* 2001)。その後の解析で、I κ B- ζ の発現には NF- κ B の活性化が必要であることを示した (*J. Biol. Chem.* 2005)。さらに、I κ B- ζ 欠損マウスの表現型を検討したところ、このマウス由来のマクロファージでは、Lipocalin-2 や顆粒球コロニー刺激因子などの一群の NF- κ B 標的遺伝子の発現がほぼ完全に障害されていた (*Nature* 2004)。I κ B- ζ は、核に局在するタンパク質であることから、標的遺伝子のプロモーター上で NF- κ B の活性を正に制御することが示唆されたが、具体的に I κ B- ζ 依存性遺伝子の転写誘導にどのように関わっているかについては不明であった。また、I κ B- ζ 自身の発現が NF- κ B に依存するため、I κ B- ζ 依存性遺伝子の発現における NF- κ B の役割が、I κ B- ζ の発現誘導のみであるのか、あるいは、I κ B- ζ とともに転写活性化に関与するのかを明らかにすることが困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、発現に I κ B- ζ を必要とする NF- κ B 標的遺伝子の発現誘導における I κ B- ζ の作用機序を明らかにすることを目的とする。さらに、これら標的遺伝子の発現における NF- κ B の役割を明らかにする。

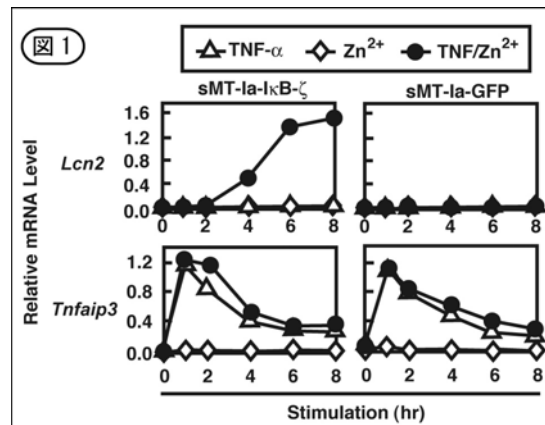
3. 研究の方法

繊維芽細胞において、LPS や IL-1 β は I κ B- ζ の発現を誘導するが、これらと同様に NF- κ B を活性化する TNF- α では I κ B- ζ の発現は誘導されない。亜鉛応答性プロモーターの制御下に I κ B- ζ を発現する繊維芽細胞を構築し、この細胞を亜鉛と TNF- α で刺激することにより、I κ B- ζ 依存性遺伝子の発現における I κ B- ζ と NF- κ B の役割の解明を試みた。また、今回構築した細胞や I κ B- ζ の欠損細胞を用いて、クロマチン免疫沈降解析をおこなうことにより、プロモーター領域への転写調節因子の結合における I κ B- ζ の必要性を評価した。

4. 研究成果

今回構築した繊維芽細胞を TNF- α や亜鉛で単独刺激した場合には、I κ B- ζ 依存性遺伝子

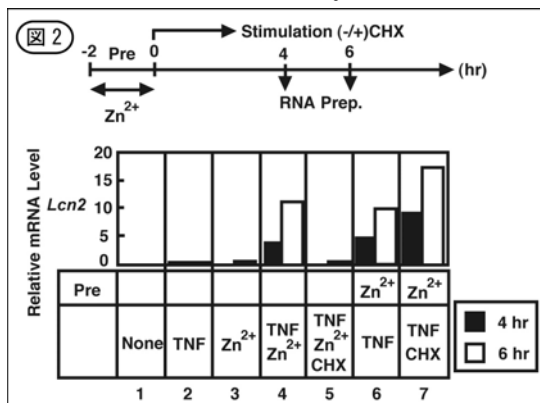
である *Lcn2* の発現は誘導されなかったが、TNF- α と亜鉛の両方で刺激した場合には誘導された (図 1, 左上)。また、亜鉛応答性プロモーターの下流で GFP を発現させるコントロール細胞では、TNF- α と亜鉛の両方で刺激した場合でも *Lcn2* 遺伝子の発現は誘導されなかった (図 1, 右上)。これに対し、I κ B- ζ 非依存性遺伝子である *Tnfaip3* などの発現は、TNF- α の単独刺激で誘導され、さらに亜鉛を加えてもほとんど影響を受けなかった (図 1, 左下)。亜鉛刺激によって I κ B- ζ を発現させただけでは I κ B- ζ 依存性遺伝子の発現が誘導されなかったことから、これらの転写誘導における NF- κ B の役割は、I κ B- ζ の発現誘導だけではなく、転写活性化への直接の関与であることが明らかになった。



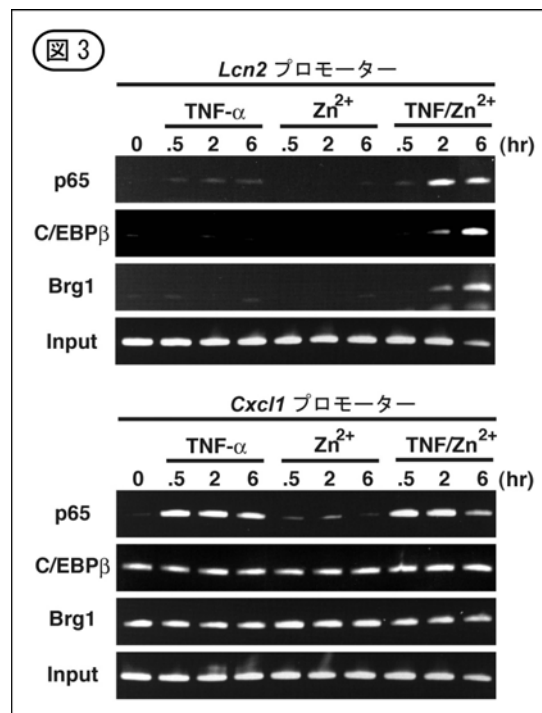
また、siRNA を用いた NF- κ B の各サブユニットの発現抑制実験を実施し、I κ B- ζ の作用には p50 サブユニットが必要であることを明らかにした。このことは、I κ B- ζ が p50 と選択的に相互作用することや、双方の欠損細胞において共通の遺伝子の発現が障害される事実とよく合致している。また、TNF- α によって活性化される NF- κ B 以外の転写因子である C/EBP も I κ B- ζ 依存性遺伝子の発現に必要であることを明らかにした。

I κ B- ζ などの mRNA の発現は、刺激後短時間のうちに誘導され、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX) の存在下で抑制されないことから、NF- κ B の活性化によって一次的に誘導されると考えられる。これに対し、*Lcn2* などの I κ B- ζ 依存性遺伝子の発現には、刺激によって I κ B- ζ タンパク質の発現が誘導されることが必要であるため、時間を要し、CHX によって抑制される。すなわち、I κ B- ζ 依存性遺伝子などの二次応答遺伝子の発現には、少なくとも一つの一次応答遺伝子によ

ってコードされるタンパク質の発現誘導が必要である。我々は、 $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ 依存性遺伝子の発現に必要な一次応答遺伝子は $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ だけで十分であるかを検討する目的で、以下の実験をおこなった。本研究で構築した細胞株における *Lcn2* の発現は、 $\text{TNF-}\alpha$ と亜鉛の同時刺激で誘導されるが、これは CHX の存在下で抑制される(図 2, カラム 4 と 5)。この細胞における *Lcn2* の発現は、亜鉛の前処理の後に $\text{TNF-}\alpha$ 刺激をおこなっても誘導することができる(図 2, カラム 6)。このようにして二段階の刺激で発現誘導させる場合には、CHX による抑制を受けなかったことから(図 2, カラム 7)、*Lcn2* の発現に必要な一次応答遺伝子産物としては、 $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ タンパク質で十分であることが明らかになった。



さらに、今回構築した細胞を用いて、クロマチン免疫沈降解析を実施し、 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ やC/EBPのプロモーター結合を検討した。 $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ の発現を誘導しない $\text{TNF-}\alpha$ の単独刺激時には、これらの転写因子は $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ 非依存性遺伝子である *Cxcl1*などのプロモーターには結合するが、*Lcn2*プロモーターには結合しなかった(図 3)。ところが、 $\text{TNF-}\alpha$ と亜鉛で同時に刺激した場合には、 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ やC/EBPβの*Lcn2*プロモーターへの結合が認められた。さらに、クロマチンリモデリング因子であるBrg1の*Lcn2*プロモーターへの結合も $\text{TNF-}\alpha$ と亜鉛の両者の刺激が必要であったことから、 $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ は、 $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ 依存性プロモーターのクロマチン構造を凝縮した状態から弛緩した状態に変換するのに必要であると考えられた。このことは、 $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$ 欠損マクロファージをリポ多糖で刺激した際に $\text{NF-}\kappa\text{B}$ やC/EBPβが*Lcn2*プロモーターに結合できないことから支持された。(図 1~3は、発表論文 2: *J. Biol. Chem.* 283, 32404 (2008)の図の一部を改変したものである。)



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 5 件)

1.

Toda A., Terawaki K., Yamazaki S., Saeki K., Shimizu T., and Yokomizo T.

「Attenuated Th1 induction by dendritic cells from mice deficient in the leukotriene B4」

Biochimie (査読有り) 92, 682-691 (2010)

2.

Yamazaki S., Matsuo S., Muta T., Yamamoto M., Akira S., and Takeshige K.

「Gene-specific requirement of a nuclear protein, $\text{I}\kappa\text{B}-\zeta$, for promoter association of inflammatory transcription regulators」

J. Biol. Chem. (査読有り) 283, 32404-32411 (2008)

3.

Zarnegar B., Yamazaki S., He J. Q., and Cheng G.

「Control of canonical $\text{NF-}\kappa\text{B}$ activation through the NIK-IKK complex pathway」

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (査読有り) 105, 3503-3508 (2008)

4.

山崎 創

「核タンパク質 I κ B- ζ を介した炎症性遺伝子の発現調節」

生化学 (査読無し) 80, 758-762 (2008)

5.

Yamazaki S., and Takeshige K.

「Protein synthesis inhibitors enhance the expression of mRNAs for early inducible inflammatory genes via mRNA stabilization」

Biochim. Biophys. Acta (査読有り) 1779, 108-114 (2008)

[学会発表] (計6件)

1.

山崎 創, 住本英樹

「LPS とグルコシルコリチンによる相乗的な遺伝子発現における核タンパク質 I κ B- ζ の役割」

BMB2010(第83回日本生化学会大会・第33回日本分子生物学会 合同大会)

2010年12月8日 神戸ポートアイランド

2.

山崎 創

「自然免疫系で重要な転写調節因子 I κ B- ζ の発見とその作用機序の解明 (平成22年度日本生化学会九州支部学術奨励賞受賞講演)」

平成22年度日本生化学会九州支部例会

2010年5月23日 鹿児島大学郡元キャンパス

3.

山崎 創, 住本英樹

「Gene regulation by the nuclear NF- κ B-I κ B- ζ complex in macrophages and fibroblasts」

第32回日本分子生物学会

2009年12月11日 パシフィコ横浜

4.

山崎 創, 住本英樹

「発現誘導型核内因子 I κ B- ζ と NF- κ B p50 サブユニットを介した遺伝子発現調節」

第82回日本生化学会

2009年10月23日 神戸ポートアイランド

5.

山崎 創, 住本英樹

「発現誘導型核タンパク質 I κ B- ζ を介した標的遺伝子の発現調節」

平成21年度日本生化学会九州支部例会

2009年5月16日 九州大学病院キャンパス

6.

山崎 創, 住本英樹

「Regulation of Lipocalin-2 expression via the inducible nuclear protein I κ B- ζ 」

BMB2008(第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会 合同大会)

2008年12月11日 神戸ポートアイランド

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 創 (九州大学大学院医学研究院・講師)

研究者番号: 70315084

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし