

平成22年 5月19日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790234

研究課題名 (和文) 転写因子 NF- $\kappa$ B の活性制御機構の解析研究課題名 (英文) The analysis of NF- $\kappa$ B regulation system

研究代表者

朝光 かおり (ASAMITSU KAORI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20381783

研究成果の概要 (和文)：転写因子 Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)は、多彩な標的遺伝子を持ち、その発現制御を通じて炎症や免疫反応など様々な生命現象の調節に関与する重要な転写因子である。その活性制御を行う分子として新規 NF- $\kappa$ B 相互作用因子 FKBP4 を同定した。FKBP4 は NF- $\kappa$ B の転写活性を正に制御し、その効果には HSP90 が必須であった。FKBP4 は HSP90 とともに NF- $\kappa$ B の核内移行を促進していると考えられる。FKBP4 による NF- $\kappa$ B の制御様式が明らかになるとともに、HSP90 が NF- $\kappa$ B の転写活性化を制御するという新たな知見を得た。

研究成果の概要 (英文)：Nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) is one of the critical transcription factors in inflammatory responses and cancer progression. In this study, we have identified FKBP4 as a binding partner of NF- $\kappa$ B p65 subunit and modified the NF- $\kappa$ B mediated transcription activity. FKBP4 is a binding protein to an immunosuppressive drug FK506 and known to involve with nuclear translocation. FKBP4 have enhanced NF- $\kappa$ B-dependent gene expression in combination with HSP90, suggesting that FKBP4 may be contributed to NF- $\kappa$ B translocation to the nucleus. The new regulation system of NF- $\kappa$ B via FKBP4 and HSP90 has been revealed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：生体分子医学、NF- $\kappa$ B、発現制御、転写

## 1. 研究開始当初の背景

NF- $\kappa$ B は、炎症や免疫反応をはじめとする様々な生命現象の調節に関与する重要な転写因子である。また、本分子は関節リウマチや多数の癌や白血病において恒常的な活性化が認められ、これらの病態の進行に関与していることが知られている。従って、NF- $\kappa$ B の活性

を制御することはこれらの疾患の効果的な治療法となることが期待され、その制御機構の解明と阻害剤開発が急がれている。

NF- $\kappa$ B は通常、阻害タンパクである I $\kappa$ B と結合し、不活性化型として細胞質に局在している。活性化刺激により I $\kappa$ B リン酸化酵素 (IKKs) が活性化されると、I $\kappa$ B はリン酸化・

分解され、活性化型となった NF- $\kappa$ B は核内に移行し標的遺伝子の転写を活性化する。NF- $\kappa$ B の活性制御機構は、このように主にシグナル伝達経路から I $\kappa$ B 分解へと至る経路、すなわち I $\kappa$ B を主体とするものと、活性化型となった NF- $\kappa$ B とタンパク間相互作用を通じて結合し機能を調節するという、いわば NF- $\kappa$ B を主体とするものとの大別することができる。現在まで国内外でその責任分子について検討が行われており、前者に関与するものとしては MEKK1、NIK などのシグナル伝達因子や TRAF などのアダプター分子、後者に関与するものとしては TFIID などの転写因子や CBP/p300 などの転写活性化補助因子などが明らかになっている。NF- $\kappa$ B の活性はこれらの分子により厳密に制御されているといえる。申請者は一貫して主に NF- $\kappa$ B そのものを主体とした解析を行ってきており、現在まで7種の相互作用因子を同定し、それらの分子が主に核内にて NF- $\kappa$ B と結合し転写活性を正もしくは負に制御していることを見出している。

## 2. 研究の目的

NF $\kappa$ B サブユニットである p65 (Rel A) をベイトに用いた yeast two-hybrid スクリーニングから得られた新規相互作用分子 FKBP4 をもとに、NF $\kappa$ B の新たな制御システムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) yeast two-hybrid

p65 の N 末部分(aa 1-186)に相当するアミノ酸が発現するバイトプラスミド (pB27-p65-(1-186)) を構築し、ライブラリーは CD4(+) T cell line 由来 human cDNA library (CEMC7\_RP) を用いてスクリーニングを行った。

### (2) プラスミド

FKBP4(full), FKBP4 (N, aa 1-261), FKBP4 (C, aa 262-459)は相当するアミノ酸が発現するように pcDNA3.1(invitrogen)に組み込んだ。

### (3) ルシフェラーゼアッセイ

$0.8 \times 10^5$  個の 293 細胞を 24 穴プレートにまき、翌日に p65(10ng)、FKBP4 を発現するプラスミド(25ng, 50ng)と pcDNA3.1(25ng, 0ng)、 $\kappa$ B レポーター(30ng)を Fugene6(Roche)を用いて細胞内に導入し、48 時間後に細胞を回収し、ピッカジーン(日本インキ)を使用してルシフェラーゼアッセイを行った。活性化刺激で刺激する際は、トランスフェクション後 24 時間に刺激し、さらに 24 時間培養後細胞を回収した。

### (4) IP-ウェスタン

293 細胞に FKBP4 発現プラスミドを細胞内に導入し、48 時間後細胞を lysis buffer(300mM NaCl, 0.5% NP40, 50mM Tris pH8.0, 10% Glycerol, 1X protease inhibitor cocktail)を用いて回収し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降後抗 p65 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

## 4. 研究成果

### (1) in vivo における p65 と FKBP4 の結合の確認

p65 の制御システムをさらに解析するために p65 をバイトに用い、yeast two-hybrid 法を施行し、新規相互作用因子として FKBP4 を同定した。FKBP4 は、もともと免疫抑制剤である FK506 に結合するタンパク質の一つとして同定された immunophilin であり、HSP90 と結合しステロイドレセプターの機能獲得や核内輸送に関与することが報告されている分子である。機能ドメインとして N 末に PPIase ドメイン(peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase) と TPR ( tetratricopeptide repeat) を持ち (Fig. 1a)、それぞれタンパク分子のフォールディングとタンパク間相互作用に関与している。

FKBP4 と p65 が結合するかどうか、FLAG タグ付きの full-length FKBP4 発現ベクター (FKBP4(FL)) とその変異体 (FKBP4(N)、FKBP4(C)) を作成し (Fig. 1a)、抗 FLAG 抗体を用いた IP-ウェスタンを行い確認した。細胞は HEK293 細胞を用いた。その結果、FKBP4(FL) と FKBP4(N)においてバンドが検出され、FKBP4 は in vivo においても結合し、結合には N 末領域が必要であることが明らかになった (Fig. 1 b)。

### (2) FKBP4 が p65 の転写活性化に与える影響

FKBP4 が p65 の機能にどのように影響を与えているか、ルシフェラーゼアッセイを行い検討した。FKBP4 は p65 の転写活性を若干増強したが、劇的なものではなかった。次に変異体を用いて同等の検討を行ったところ、N 末は転写活性に対し特に影響を示さなかったが、C 末は転写活性を抑制した (Fig. 2a)。

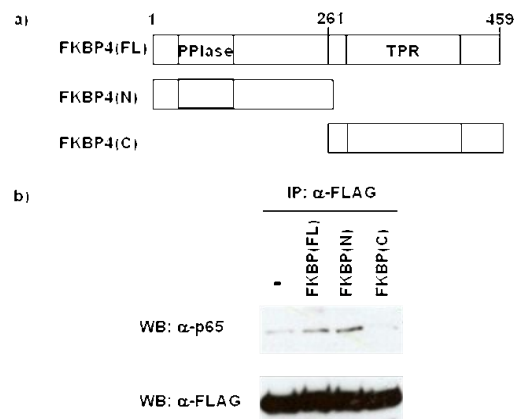


Fig.1 in vivo における p65 と FKBP4 の結合の確認

a)FKBP4 の機能ドメインと作成した変異体  
b)IP-western による p65 と FKBP4 の結合

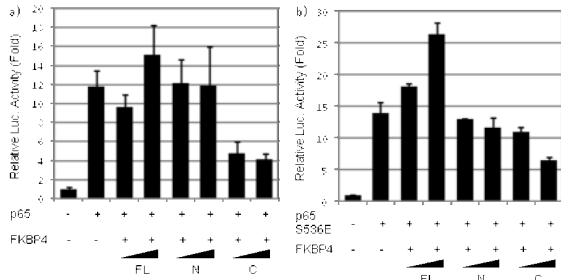


Fig.2 FKBP4によるp65の転写活性化に与える影響

- a)野生型p65依存性の転写活性化への結果
- b)p65変異体依存性の転写活性化への結果

次にこの効果がp65の核移行能と関連する

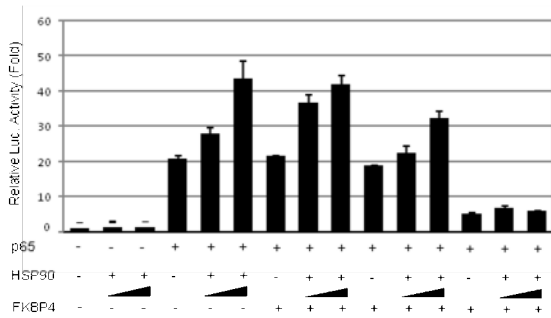


Fig.3 FKBP4とHSP90がp65の転写活性化に与える影響

かどうか、p65の536番目のセリンをグルタミン酸に変異させた変異体を用いて検討した。536番目のセリンは刺激によりリン酸化を受け、p65の核移行と転写活性を正に制御することが明らかになっているが、本変異体は536セリンのリン酸化型p65をグルタミン酸に変異することにより模倣したものである。結果、FKBP4は本変異体による転写活性化を増強することが明らかになった (Fig. 2b)。また、N末では特にp65の転写活性化に対し特に影響を示さないものの、C末の抑制効果は野生型p65に与えるものと比較し、マイルドなものであった。以上の結果から、FKBP4はp65の核移行に関与することが示唆された。

(3) FKBP4の効果とHsp90の関連性

FKBP4は熱ショックタンパク質HSP90とC末で結合することが明らかになっている。そ

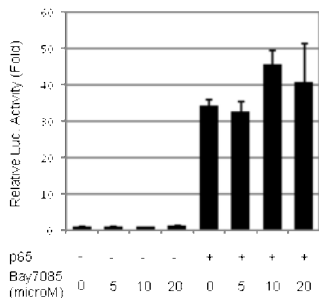


Fig.4 IKK阻害剤がp65依存性の転写活性化に与える影響

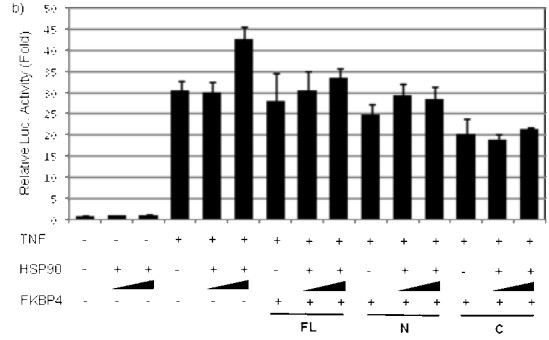
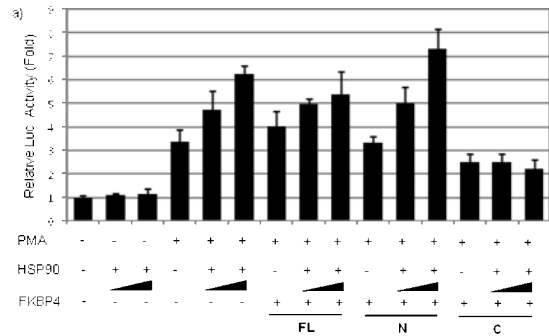


Fig.5 生理的活性化刺激におけるFKBP4とHSP90によるNFκBの転写活性化に与える影響

- a) TNF刺激による結果
- b) PMA刺激による結果

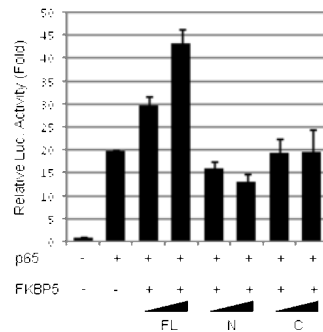


Fig.6 FKBP5がp65の転写活性化に与える影響

こで、FKBP4の効果に対しHSP90が関与するかどうか検討した (Fig. 3)。まず、HSP90の転写活性をさらに増強した。FKBP4 (FL) 発現下ではさらにその効果は増大するものの、効果には限界があった。FKBP4のN末の発現下において、HSP90によりp65の転写活性化が増強された。しかしながら、C末発現下ではHSP90発現によっても転写活性の増強が認められなかった。HSP90によりp65の転写活性は正に制御されるが、FKBP4のC末はHSP90の機能を阻害し、転写活性を抑制されることが明らかになった。

(4) IKK複合体がp65転写活性化に与える影響の検討

HSP90はIKK複合体に含まれていることが

知られている。HSP90 の p65 転写活性増強効果が IKK 複合体を標的でないことを確認するために、IKK 阻害剤である Bay7085 を用い検討した (Fig. 4)。その結果、IKK 阻害剤の添加によっても p65 の転写活性は抑制されず、p65 発現による転写活性化に対し IKK は特に関与していないことが明らかとなった。HSP90 による p65 の転写活性増強は IKK を介していないことが示唆された。

#### (5) 生理的シグナルにおける FKBP4 と HSP90 の機能

NF $\kappa$ B 活性化刺激に対する NF $\kappa$ B の転写活性化に対し、FKBP4 と HSP90 がどのように影響を与えるか検討した。

まず、PMA 刺激において HSP90 は NF $\kappa$ B の転写活性を正に制御した (Fig. 5a)。FKBP4 (FL) は NF $\kappa$ B の転写活性を若干増強したが、HSP90 により活性はさらに増強された。また、FKBP4 の N 末は、NF $\kappa$ B の転写活性を特に影響を与えなかったが、HSP90 発現により活性はさらに増強された。しかしながら、C 末の発現により転写活性は阻害され、HSP90 を発現させても活性の増強が見られるということとはなかった。

また、TNF 刺激においても、HSP90 発現により転写の活性が増強された (Fig. 5b)。しかしながら、FKBP4 (FL) や N 末発現下では、HSP90 は NF $\kappa$ B の転写活性化を特に増強するというとはなかった。C 末は転写活性を抑制した。FKBP4 は NF $\kappa$ B の活性化シグナルにより異なる働きをすることが示唆された。

#### (6) FKBP4 のホモロジー分子である FKBP5 の NF $\kappa$ B 活性化における機能

FKBP4 の高い相同性を持つ FKBP5 は、IKK 複合体に含まれることが明らかになっているが、その生理的機能は明らかにはなっていない。そこで、p65 の転写活性化に与える影響について検討した (Fig. 6)。その結果、野生型の FKBP5 は p65 の転写活性化を増強するが、N 末領域は若干の抑制効果を示した。また、興味深いことに C 末は特に転写活性化に対し特に影響を与えないことが明らかになった。

#### (7) まとめ

以上から、FKBP4 は p65 の転写活性を正に制御し、その効果には HSP90 を必要とすることが明らかになった。FKBP4 は HSP90 とともにタンパク質の核内輸送に関与することが明らかになっていることから、p65 についても HSP90 とともに複合体を形成し、核内輸送に関与することが考えられる。今後の検討が必要である。

### 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 2 件)

- 1: Tsuchiya, A., Imai, K., Asamitsu, K., Hibi, Y., Otsuka, T., Okamoto, T. Inhibition of inflammatory cytokine production from rheumatoid synovial fibroblasts by a novel I $\kappa$ B kinase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* (in press). 2010. 査読有
- 2: Asamitsu, K., Yamaguchi, T., Nakata, K., Hibi, Y., Victoriano, A.F., Imai, K., Onozaki, K., Kitade, Y., and Okamoto, T. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by blocking I $\kappa$ B kinase with noraristeromycin. *J Biochem*. **144**:581-589, 2008. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

Asamitsu, K., Ishibashi, T., Tanaka, K., Hibi, Y., Kobayashi, Y., Okamoto, T., Identification of an active ingredient on *Inula helenium* extracts for NF-kappa B inhibition 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 9 日 パシフィコ横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/molgene.dir/index.html>

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

朝光 かおり (ASAMITSU KAORI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 20381783

#### (2) 研究分担者

なし

#### (3) 連携研究者

なし