

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月6日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590507

研究課題名（和文）転写共役因子 REQUIEM を介した HIV-1 転写制御機構の解析

研究課題名（英文）Requiem protein links RelB/p52 and the Brm-type SWI/SNF complex in a noncanonical NF-kappaB pathway.

研究代表者

水谷 壮利 (Mizutani Taketoshi)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：00376617

研究成果の概要（和文）：

本研究では NF- κ B の新規の coactivator を同定することを目的として、DPF2 の属する d4 ファミリーの他のメンバーである DPF1, DPF3a, DPF3b と、これらと C 末端の構造が類似する PHF10 が、代表的な NF- κ B ダイマーの coactivator として機能するか否かを評価した。In vitro の解析から DPF3a, DPF3b はどちらも SWI/SNF 複合体の構成サブユニットや RelA, p50 と直接結合していることが分かった。HIV-1 の野生型 LTR を用いたクロマチン免疫沈降により標的遺伝子のプロモーター上での三者の挙動を解析すると、このプロモーターの活性化には SWI/SNF 複合体と RelA/p50 が揃う必要があり、両者を結び付ける DPF3a/b は coactivator として重要な機能を担っていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we identify the human requiem protein (REQ/DPF2) as an adaptor molecule that links the NF-kappaB and SWI/SNF chromatin remodeling factor.

Using sensitive 293FT reporter cell clones that had integrated a SWI/SNF-dependent NF-kB reporter gene, we find in this study that the overexpression of DPF1, DPF2, DPF3a, DPF3b, and PHF10 significantly potentiates the transactivating activity of typical NF-kB dimers. Knockdown analysis using 293FT reporter cells that endogenously express these five proteins at low levels clearly showed that DPF3a and DPF3b, which are produced from the DPF3 gene by alternative splicing, are the most critical for the RelA/p50 NF-kB heterodimer transactivation induced by TNF- α stimulation. Our data further show that this transactivation requires the SWI/SNF complex. DPF3a and DPF3b are additionally shown to interact directly with RelA, p50, and several subunits of the SWI/SNF complex in vitro and to be co-immunoprecipitated with RelA/p50 and the SWI/SNF complex from the nuclear fractions of cells treated with TNF- α . In ChIP experiments, we further found that endogenous DPF3a/b and the SWI/SNF complex are continuously present on HIV-1 LTR, whereas the kinetics of RelA/p50 recruitment after TNF- α treatment correlate well with the viral transcriptional activation levels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：SWI/SNF 複合体、HIV-1、NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

転写因子 NF- κ B は、RelA (p65)、RelB、c-Rel、NF- κ B1 (p105/p50)、NF- κ B2 (p100/p52) の 5 種類の Rel ファミリータンパク質がそれぞれホモダイマーあるいはヘテロダイマーを形成することによって構成され、免疫・炎症・発生・細胞増殖・アポトーシスはもとより、多くのウイルスゲノムの遺伝子の発現も誘導する。こうした多彩な生命現象を正しく維持するためには、NF- κ B が選択性をもって標的遺伝子群のプロモーターを活性化させる必要があるが、その機構の詳細については未解明な点が多い。NF- κ B を活性化させるシグナル伝達経路は大きく分けてふたつあって、最も一般的な経路は古典的経路と呼ばれ、その最下流では RelA/p50 ヘテロダイマーの活性化が誘導される。定常状態では RelA/p50 には inhibitor of kappa B (I κ B) が結合していて、このダイマーは細胞質へ留められて転写には関与できない。しかし、tumor necrosis factor (TNF)- α や lipopolysaccharide (LPS) などによる刺激が入ると I κ B はプロテオソームによって分解され、遊離した RelA/p50 は核内へ移行し、標的遺伝子群のプロモーターへ動員されて転写を誘導する。もう一方の経路は非古典的経路と呼ばれ、この経路によって誘導されるダイマーは主に RelB/p52 であることが知られている。定常状態の RelB/p52 は不活性型の RelB/p100 として細胞質内に留められているが、Lymphotoxin などの刺激により非古典的経路が活性化すると p100 がプロセッシングを受けて p52 となり、核内へ移行する。このように異なるダイマーが刺激特異的に活性化されることは NF- κ B にプロモーターの選択性を与えるが、同一の刺激の下でも標的遺伝子の活性化は細胞種ごとに異なっていて一律に起こるわけではない。このため、シグナル伝達の最下流で各 NF- κ B ダイマーにプロモーター選択性を与える分子機構の解明も重要である。NF- κ B の標的遺伝子の発現制御には、近傍のクロマチン環境も大きく影響を及ぼしている場合が多いと考えられる。

2. 研究の目的

本申請課題では我々がこれまでに SWI/SNF 複合体と直接相互作用することを見いだした hREQ を介した Brm 型 SWI/SNF 複合体および NF-kappa B の HIV-1 プロモーターにおける転写開始とクロマチン構造変換の連続的な転写制御の分子機構の解明を目指した

ものである。さらに我々が今回発見した hREQ は p52 と強く結合することを明らかにしており、主に RelB/p52 タイプの NF-kappa B においてその機能を発揮することが期待されるが、NF-kappa B を構成する 5 種類のコンポーネントの組み合わせは複雑であり、さらに詳細にそれぞれの組み合わせ、および hREQ の転写共役因子としての機能を解析する必要があり、HIV-1 転写開始におけるその必要性の検討を進める。

本研究では 2 部構成で研究を進めた。すなわちまず第一に REQUIEM の SWI/SNF 複合体と NF-kappa B をつなぐアダプター因子としての機能解析を進め、さらにそのファミリータンパク質 (DPF ファミリー) について NF-kappa B に対する選択的な転写共役因子としての機能を解析した。

3. 研究の方法

本研究では NF-kappa B の応答配列をそのプロモーターに有する HIV-1 LTR を指標に免疫沈降法、クロマチン免疫沈降法等を行い、プロモーターに動員される DPF ファミリー複合体と NF-kappa B 構成因子の組み合わせを明らかにする。

また強制発現系を用い、TNF α 刺激による NF-KappaB 活性化における DPF ファミリー因子の必要性を明らかにする。

4. 研究成果

①SWI/SNF クロマチン構造変換因子の結合タンパク質、REQUIEM による NF kappa B 活性化とその制御

SWI/SNF 複合体の触媒サブユニットである Brm, BRG1 の N 端に FLAG タグを付けた発現ベクターを HEK-293T 細胞にそれぞれトランスフェクションし、細胞核分画を調製した。それぞれの核抽出液に対して抗 FLAG 抗体により免疫沈降を行なった。FLAG-Brm、BRG1 免疫沈降産物を銀染色、抗 FLAG ウェスタンブロットにより精製の確認を行なった。全免疫沈降産物をトリプシン消化したのち、LC/MS 解析にかけたところ、Brm、BRG1 をはじめとする既知の各 SWI/SNF 構成成分のペプチドが高頻度で検出された。LC/MS 解析で同定された

SWI/SNF 構成タンパク質以外のペプチド断片のうち、SWI/SNF 複合体との結合がこれまでに知られていないタンパク質として、本研究ではヒト REQUIEM (hREQ)を精査することとした。hREQ 抗体を調整して、FLAG-Brm、BRG1 免疫沈降産物のウェスタンブロットを行い SWI/SNF 複合体との結合性は検証された。

hREQ と SWI/SNF 複合体との相互作用を詳細に *in vitro* で調べるため、GST-hREQ 発現ベクターを構築し GST pulldown assay を行なうこととした。*in vitro* の RNA 合成とタンパク合成により作製した Brm, BRG1, BAF60a, In11 および β -actin をそれぞれ GST-hREQ カラムに加え、各 SWI/SNF サブユニットと hREQ との結合性を調べた。その結果、Brm, BRG1, In11 および BAF60a は hREQ と直接的な相互作用を示したが、 β -actin は hREQ との結合はみられなかった。さらに、hREQ の欠失変異体発現プラスミドを構築し詳細な解析を行なった結果、hREQ は NLS を含む N 端領域で Brm/BRG1, BAF60a および In11 といった複数の SWI/SNF 複合体のサブユニットと複数の接面で直接結合することが示された。

hREQ が SWI/SNF 複合体の複数のサブユニットと直接相互作用することから、hREQ が特定の転写因子と SWI/SNF 複合体とのアダプターとして転写制御に関与する可能性がある。そこで、hREQ の発現によって転写活性に影響を与える転写因子の検索を transient expression を使用して行なったが AP-1 や NF κ B の結合配列を接続したルシフェラーゼ遺伝子では一切効果が見られなかった。この原因として、ルシフェラーゼベクターを transient expression で導入したことによりベクターが正しいクロマチン構造をとれず、hREQ の発現による転写活性の変化が見られない可能性が考えられた。そこで、薬剤耐性により選択された NF κ B レポーターを安定発現する HEK-293 細胞株を作製して転写活性化を調べた。その結果、DNA トランスフェクションにより一過的に導入した RelB/p52 ダイマーによる転写が hREQ、Brm に依存して特異的に活性化された。また、弱いながらも、BRG1 依存性も検出された。RelA/p50 ダイマーではこのような hREQ、Brm 依存性は見られなかった。c-Rel/p50 ダイマーでは弱い hREQ 依存性が見られたが、Brm 依存性は見られなかった。そこで、RelB/p52 ダイマーを中心にこの後の解析を行うこととした。まず、*in vitro* の RNA 合成系、タンパク質合成系で作製した NF κ B に対して GST-hREQ 融合タンパク質の *in vitro* pulldown assay を行なったところ hREQ は

p52 と強く直接結合することが示された。さらに、RelB 単独では直接結合しないが、RelB と p52 を混合してタンパク合成を行い pulldown assay を行なったところ、hREQ は、p52 との結合を介して RelB/p52 ダイマーとも安定に複合体を形成しうることが示された。

次に内在性の RelB/p52 に制御を受けることで知られる遺伝子 *BLC* および *ELC* に対して外来性の RelB/p52 による活性化を行い、その活性化が同時に加えた Brm, BRG1 および hREQ を標的とする short hairpin (sh) RNA によるノックダウンによって転写活性にどのような影響を与えるかを調べることとした。ここで shRNA に対するネガティブコントロールとして GFP に対する shRNA を用いた。トランスフェクション後 72 時間の細胞から RNA を抽出し、RT-PCR で mRNA を定量した。ELC は RelA/p50 により強力に転写活性化され、RelB/p52 では弱い活性化が見られた。BLC では RelA/p50、RelB/p52 で同程度の活性化が見られた。各ノックダウンの影響については、BLC、ELC ともに RelA/p50 では見られなかった。一方、RelB/p52 による転写活性化では Brm および hREQ ノックダウンで活性化が減少した。この結果は、ルシフェラーゼレポーターアッセイの結果と基本的にはよく一致している。以上のことから、レポーター遺伝子と内在性遺伝子の両方で、hREQ、Brm は RelB/p52 による転写活性化を選択的に制御していることが示された。

さらに、Lymphotoxin Receptor を高発現している HT-29 細胞を用いて、Lymphotoxin により内在性の RelB/p52 を活性化させた。Lymphotoxin 刺激による BLC 遺伝子の誘導は hREQ、Brm に対する sh RNA を導入した株でほぼ完全に消失した。shBRG1 を導入した株ではネガティブコントロールである shGFP とほとんど変わらず、再び BRG1 非依存性が示された。以上の結果から、細胞内における RelB/p52 活性化はほぼ完全に hREQ、Brm に依存的して起きることが示された。

最後に、HT-29 細胞に Lymphotoxin による刺激を加え、内在性の Brm, BRG1 および hREQ が内在性の *BLC* 遺伝子の発現誘導時に *BLC* 遺伝子プロモーター上に動員されるかどうかをクロマチン免疫沈降実験により調べた。抗体による非特異的な結合を考慮して、rabbit normal IgG をネガティブコントロールとして用いた。その結果、抗 Brm および抗 hREQ 抗体による免疫沈降標品において Lymphotoxin 刺激に依存した *BLC* 遺伝

子プロモーターとの結合能の上昇がみられた。抗 BRG1 抗体は rabbit normal IgG と同等であったことから、これまでの結果と一貫して内在での *BLC* 遺伝子の転写活性化に関与しないことが示された。

以上のことから、SWI/SNF 複合体の結合タンパク質として同定された hREQ は RelB/p52 選択的に Brm 型 SWI/SNF 複合体と協調して NF κ B による転写活性化を誘導することが示された。これまでに SWI/SNF 複合体と NF κ B の関係はほとんど何もわかっておらず、本研究を通して hREQ の存在により SWI/SNF 複合体と NF κ B の転写活性化の機構を明らかにできたことは転写制御の研究において大きな意義があると考えている。

②SWI/SNF 複合体依存的な RelA/p50 の転写活性化における DPF3a および DPF3b の coactivator としての機能解析

上記①の結果では、クロマチン構造変換因子である SWI/SNF 複合体と RelB/p52 ヘテロダイマーを仲介する新規の cofactor として DPF2 (Requiem/REQ) を同定した。そして DPF2 には SWI/SNF 複合体の複数の構成サブユニットばかりでなく p52 に対する結合性があり、RelB/p52 依存的に SWI/SNF 複合体を標的遺伝子のプロモーターへ誘導することを示している。

DPF2 の属する d4 ファミリーには他に DPF1、DPF3a、DPF3b というメンバーが存在する。DPF3a と DPF3b は *DPF3* 遺伝子から選択的スプライシングによって産生される。本研究では、d4 ファミリーメンバー及びこれらの因子とその C 端部分の構造で類似する PHF10 が、生理的に代表的な NF κ B ヘテロダイマーである RelA/p50、RelB/p52 あるいは c-Rel/p50 に対する coactivator として機能する可能性があるか否かを検討した。まず、HIV-1 LTR 由来の NF κ B 応答配列 (2つの NF κ B 結合部位が 4 塩基対の距離においてタンデムに並んでいる) のみを保持する最小プロモーター (MinP) によってルシフェラーゼを発現させるコンストラクトを作製し、293FT 細胞に導入した安定発現株クローン (NF κ B-MinP-Luc-A3 株) を用いたレポーターアッセイを行った。各候補因子は単独で強制発現させても転写活性化に影響をほとんど及ぼさなかったが、NF κ B のヘテロダイマーと過剰発現させると、全ての因子が 3 種類の NF κ B の転写活性化能をどれも著しく増強させた。以前の報告では主に RelB/p52 に特異的なアダプターとして機能すると考えていた DPF2 も、RelA/p50 とも協調的に働く可能性が十分にあることが分

かった。この結果を踏まえ、我々は、炎症や免疫反応に特に重要な働きを担う点から RelA/p50 に着目し、この NF κ B ダイマーにおける協調的な転写活性化について DPF1、DPF2、DPF3a、DPF3b および PHF10 がより生理的な環境に近い条件で機能しているか評価を進めた。293FT 細胞が 5 種類の候補全てを内在的に発現することから、shRNA を用いて内在性 DPF1、DPF2、DPF3a、DPF3b および PHF10 の発現をそれぞれ抑制させた後に、細胞を TNF- α で刺激することにより内在性 RelA/p50 を活性化させた。その結果、どの因子を抑制したときにも RelA/p50 による転写活性化が弱まったが、それが特に顕著であったのは DPF3a、DPF3b を抑制したときであった。これらの両方あるいは片方の発現を抑制すると、TNF- α によって誘導されるレポーター活性は約 20%に減弱した (図 1)。

次に、DPF3a、DPF3b と RelA/p50 や SWI/SNF 複合体の構成サブユニットの間に相互作用があるか否かを解析するために、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (*GST*) pull-down アッセイを行った。大腸菌発現系を用いて GST-DPF3a、GST-DPF3b を精製し、*in vitro* 翻訳系でアイソトープラベルした RelA、p50 を pull-down したところ、GST-DPF3a、GST-DPF3b のどちらも RelA、p50 と相互作用していることが分かった。同様の pull-down アッセイを SWI/SNF 複合体の構成サブユニットの Brm、BRG1、BAF60a、Ini1、 β -actin を *in vitro* 翻訳系で合成して行ったところ、 β -actin 以外の 4 つのサブユニットは GST-DPF3a、GST-DPF3b により pull-down されていた。これらの結果より、DPF3a および DPF3b は RelA、p50 とともに SWI/SNF 複合体の各構成サブユニットとも直接的に相互作用することが明らかになった。

続いて、シグナル伝達のどの過程で DPF3a、DPF3b が SWI/SNF 複合体や RelA/p50 と細胞内では相互作用しているのかについて解析を行った。FLAG タグを融合させた DPF3a と DPF3b をレトロウイルスベクターで 293FT 細胞内に導入し、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、DPF3a や DPF3b との RelA/p50 の結合は、TNF- α 刺激によって RelA/p50 が核内へ移行したときにみられることが明らかになった (図 2)。その結合は DPF3b の方が DPF3a よりも強かったが、転写活性化能の解析で両者に差が見られなかったことから、DPF3a の結合力も coactivator としての機能を果たすには十分であると考えられる。一方、SWI/SNF 複合体とは、DPF3a、3b とともに TNF- α 刺激の有無にかかわらず常に核内で結合していた。また、同様の免疫沈降を whole cell lysate に対して行い RelA と DPF3a、DPF3b の結合効

率を調べたが、TNF- α 刺激に依存した結合の強さの変化はほとんど見られなかった。RelA には TNF- α 刺激に応答してリン酸化やアセチル化などの複数の修飾が入ることが知られているが、これらの修飾は DPF3a, DPF3b との結合自体には必須でないと言える。以上の相互作用の解析結果より、DPF3a, DPF3b は、核内で SWI/SNF 複合体と常に相互作用しており、RelA/p50 との結合は TNF- α 刺激後に核内でおきると結論づけられる。

次に、DPF3a や DPF3b が SWI/SNF 複合体依存的に RelA/p50 による転写活性化を増強させる様子を標的遺伝子のプロモーター近傍の染色体領域における各因子の動態から解析した。NF- κ B 標的プロモーターとして、ルシフェラーゼアッセイに用いた NF- κ B-MinP と、野生型 LTR をもつ HIV-1 ウイルスベクターにルシフェラーゼ遺伝子を導入したレポーターを用いた。各プロモーターを染色体中に保持した 293FT 細胞を TNF- α で刺激し、内在性の DPF3, RelA/p50 および SWI/SNF 複合体の動員状況をクロマチン免疫沈降法で解析した。まず、各プロモーターへ動員されている NF- κ B を解析すると、どちらのプロモーターでも TNF- α 刺激に応答して p50 ホモダイマーから RelA/p50 ヘテロダイマーへ置換されている様子が検出された。一方、DPF3 と Brm および BRG1 型 SWI/SNF 複合体は TNF- α 刺激前からプロモーターへ動員されている。また、HIV-1 LTR の場合、刺激後に SWI/SNF 複合体と DPF3 が部分的にプロモーターから離脱する場合もあることが分かった。HIV-1 野生型 LTR への RelA の動員の kinetics と初期転写産物の産生の kinetics を比較すると、両者はよく一致しており、転写開始にあたって直接的な引き金となるのは RelA/p50 の動員であると考えられる。一方で DPF3 と SWI/SNF 複合体は標的プロモーター領域へあらかじめ動員されているが、その機構を説明するひとつとして、DPF3 が p50 ホモダイマーを認識して SWI/SNF 複合体を誘導している可能性が考えられる (図 3)。

本研究により、DPF3a および DPF3b が RelA/p50 ヘテロダイマーと SWI/SNF 複合体の間を仲介する因子として同定された。NF- κ B の標的遺伝子のプロモーターには、NF- κ B に応答する際に近傍のクロマチン構造変換を必要とするものとしなないものがあると考えられているが、HIV-1 LTR のようなクロマチン構造変換を要求する標的遺伝子のプロモーターの転写亢進には SWI/SNF 複合体と NF- κ B を仲介する DPF3a および DPF3b が重要な機能を担っていることが明らかになった。

DPF3b は、C 末端の PHD フィンガーを介してヒストン H3 や H4 の特定のメチル化修飾やアセチル化修飾を認識することが以前に報告されている。従って、HIV-1 LTR 上へ動員されている DPF3b は SWI/SNF 複合体や NF- κ B だけでなく、プロモーター近傍のヒストンとも相互作用しているのかもしれない。本研究で取り上げたその他の候補因子である DPF1, DPF2, PHF10 も C 末端に PHD フィンガーを保持しており、それぞれ DPF3b とは異なる修飾ヒストンを認識する可能性がある。各候補因子が組織により異なるプロファイルで発現していることと、本研究で DPF1, DPF2, PHF10 にも NF- κ B の coactivator としての機能する可能性が示唆されていることを併せて考えると、組織ごとに SWI/SNF 複合体と NF- κ B を仲介する因子が異なることが NF- κ B によるプロモーターの制御に多様性を与える機構のひとつであると考えられる。

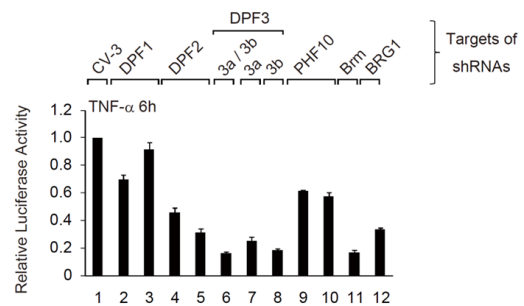


図1. DPF3a と DPF3b は TNF- α 刺激で活性化された RelA/p50 による転写活性化に必要な

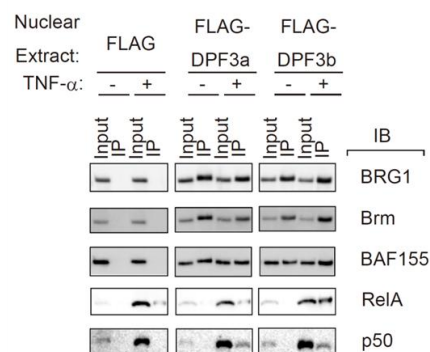


図2. DPF3a と DPF3b は SWI/SNF 複合体および RelA/p50 と核内で結合する

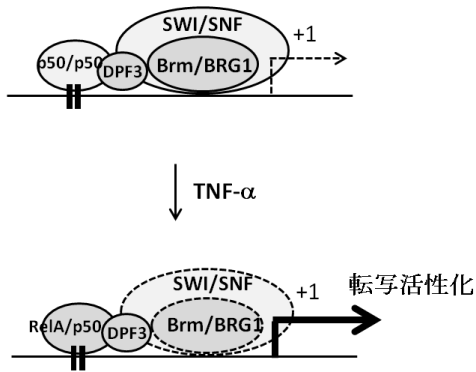


図3. DPF3a/b, SWI/SNF 複合体および RelA/p50 による標的プロモーターの制御のモデル。転写活性化の後に、SWI/SNF 複合体の一部がプロモーターから離脱する場合もある。

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 Ishizaka A, Mizutani T, Kobayashi K, Tando T, Sakurai K, Fujiwara T, Iba H. Double PHD finger proteins DPF3a and 3b are required as transcriptional coactivators in the SWI/SNF complex-dependent activation of the NF- κ B RelA/p50 heterodimer. *J Biol Chem.* 287(15), 11924-11933, 2012 doi: 10.1074/jbc.M111.322792 April 6, 2012 査読有り

② Tando T, Ishizaka A, Watanabe H, Ito T, Iida S, Haraguchi T, Mizutani T, Izumi T, Isobe T, Akiyama T, Inoue J, Iba H. Requiem protein links RelB/p52 and the Brm-type SWI/SNF complex in a noncanonical NF-kappaB pathway. *J. Biol. Chem.* 285(29), 21951-21960, 2010 doi: 10.1074/jbc.M109.087783 July 16, 2010 査読有り

[学会発表] (計2件)

① 水谷 壮利, 石坂 彩, 伊庭英夫, HIV-1 の Tat 非依存的な発現における SWI/SNF 複合体の作用点の解析、第58回 日本ウイルス学会学術集会、2010年11月7日-9日、徳島県 あわぎんホール、査読有り

② Mizutani T, Ishizaka A, and Iba H, Analysis for the regulation of transcriptional elongation of HIV-1 transcript by proviral non-coding RNA、The 10th Awajishima International Forum on Infection and Immunity、2010年9月7日-10日、兵庫県 淡路島 夢舞台国際会議場、査読有り

[その他]

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/div-host-parasite/Version1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 壮利 (MIZUTANI TAKETOSHI)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：00376617

(2) 研究分担者

伊庭 英夫 (IBA HIDEO)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：60111449