

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590310

研究課題名(和文) ストレス応答性転写因子 ATF5 は炎症反応におけるネガティブレギュレーターか？

研究課題名(英文) N-terminal hydrophobic amino acids of ATF5 protein confer IL-1b-induced stabilization, and responsible for the suppression of the serum amyloid A1 (SAA1) and SAA2 gene expression

研究代表者

高橋 滋 (takahashi, shigeru)

東京薬科大学・生命科学部・准教授

研究者番号：10266900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、炎症制サイトカインIL-1によりATF5タンパク質の安定性が上昇しタンパク質量が増加すること。この安定化にはATF5タンパク質のN末端領域の疎水性アミノ酸が重要であった。この領域は平常時の不安定化領域そしてIL-1応答領域として機能していた。そしてIL-1はATF5mRNA翻訳効率を上げることもわかった。また、ATF5タンパク質は急性期応答タンパク質であるSerum amyloid AとSerum amyloid B mRNAのIL-1による発現上昇を抑制する事が示唆された。これらの結果はATF5の免疫応答における負のレギュレーターとしての働きを示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we show that IL-1b, a proinflammatory cytokine, increases the expression of ATF5 protein in HepG2 cells in part by stabilizing the ATF5 protein. The N-terminal domain rich in hydrophobic amino acids that is predicted to form a hydrophobic network was responsible for destabilization in steady-state conditions and served as an IL-1b response domain. Furthermore, IL-1b increased the translational efficiency of ATF5 mRNA via the 5' UTR and phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 2a (eIF2a). ATF5 knockdown in HepG2 cells up-regulated the IL-1b-induced expression of the serum amyloid A1 (SAA1) and SAA2 genes. Our results show that the N-terminal hydrophobic amino acids play an important role in the regulation of ATF5 protein expression in IL-1b-mediated immune response and that ATF5 is a negative regulator for IL-1b-induced expression of SAA1 and SAA2 in HepG2 cells.

研究分野：医学薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 薬理学一般

キーワード：ATF5 ストレス 急性期応答 炎症

1. 研究開始当初の背景

急性期応答は感染初期におこる発熱、急性期タンパク質の産生を特徴とする、早期の感染防御にあずかる反応である。しかし、過剰な免疫反応や、持続的な慢性炎症は自己免疫疾患、アレルギー性疾患、癌などを引き起こす。私は今までに転写因子 ATF5 が様々なストレスに応答し、その発現量が mRNA の安定化や mRNA 翻訳の効率化、およびタンパク質の安定化により上昇することを見いだしている。Activating transcription factor 5 (ATF5) は CREB/ATF ファミリーに属する bZIP 転写因子であり、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 遺伝子のプロモーター領域に存在する、LPS による転写の活性化に必要な G-CSF promoter element 配列に C/EBP γ とともに結合する転写因子として見いだされた。また、2007 年にマクロファージにおいて LPS 刺激により発現が上昇する遺伝子として ATF5 が同定されている。最近、私はヒト肝癌由来 HepG2 細胞内で ATF5 タンパク質量が interleukin 1 (IL-1) 刺激により上昇することを見いだした。これらの研究結果は、ATF5 が免疫応答において何らかの機能を持っていることを示唆している。そこで、急性期応答における ATF5 の機能を調べるための第一歩として、DNA マイクロアレイを用いて急性期応答時の肝臓における ATF5 のターゲット遺伝子の検出を試みた。その結果、ATF5 ノックアウトマウスにおいて一群の急性期応答タンパク質遺伝子の発現上昇が起らなくなることを発見した。さらに、これらの遺伝子の発現を半定量的 PCR により確認したところ、ATF5 欠損による急性期応答遺伝子発現の応答低下は、ATF5 遺伝子欠損によってもたらされる平常時 (非 LPS 刺激時) の遺伝子発現の上昇によることが示された。以上の事から、私は「ATF5 は肝臓において、急性期応答のネガティブレギュレーターとして働き、急性期応答の慢性炎症への移行や平常時における無用な炎症反応の活性化を防いでいる。」という仮説を立てた。上記、IL-1 β 刺激による ATF5 タンパク質量の上昇は、急性期応答の収束期の動態を表している可能性が示唆される。本研究はこの仮説を証明するために、今までに申請者が得た ATF5 遺伝子発現、および ATF5 標的遺伝子活性化能の解析結果を踏まえ、ATF5 が関わる、過度な免疫応答を抑制する新規メカニズムの解明を試みる。

2. 研究の目的

微生物の侵入などの感染初期に起きる急性期応答は発熱、急性期タンパク質の産生を特徴とする、早期の感染防御にあずかる反応であり、異物の排除が終わるとやがて終息する。つまり、この反応は、よけいな炎症を起こさず、組織への負担を最小限にとどめるために、厳密に制御される必要がある。本研究は、ストレス応答性転写因子 ATF5 を過度の免疫応

答を抑制するフィードバックシステムにおけるキーファクターとしてとらえ、免疫システムにおけるその役割の解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ATF5 遺伝子の標的となる急性期応答遺伝子の検索。

(2) ATF5 の標的である急性期応答遺伝子の ATF5 による発現制御機構を解明する。

(3) ATF5 遺伝子の発現が炎症によって、どのようなシステムを介して調節されているのかを解明する。

(4) ATF5 が関与する「平常時には無駄な炎症反応が起こらない仕組み」を解明する。今までの研究から ATF5 遺伝子は、様々な細胞で非ストレス負荷時にはその発現が低く抑えられていることがわかっている。一方で、肝臓では他の臓器に比べて非ストレス下においても ATF5 mRNA の発現が高いこともわかっている。肝臓において ATF5 遺伝子が高発現するメカニズムを解明するために、ATF5 タンパク質安定化メカニズムの解析を行い、ATF5 が関与する「平常時には無駄な炎症反応が起こらない仕組み」を解明する。

(5) ATF5 タンパク質 N 末端が ATF5 タンパク質の安定性を制御するメカニズムの解明。

4. 研究成果

ATF5 の発現は、ストレスに応答して mRNA、タンパク質レベルで上昇する。一方、ストレス非存在下では、その発現は抑制されている。本研究、炎症制サイトカインである IL-1 により ATF5 タンパク質の安定性が上昇し、細胞内のタンパク質量が増加すること。この安定化には ATF5 タンパク質の N 末端領域の疎水性アミノ酸が重要である事を見いだした。ATF5 タンパク質の立体構造を Robetta server により計算したところ、疎水性アミノ酸に富んだ N 末端領域の α -ヘリックスが疎水性ネットワークを形成している事が予想された。この領域は平常時の不安定化領域そして IL-1 応答領域として機能していた。一方、予想に反して ATF5 の分解促進因子である NPM1 と ATF5 の相互作用は IL-1 β 刺激では低下しなかった。細胞内での凝集タンパク質の分解除去を促進するオートファジーの ATF5 分解への関与を検討したところ、オートファジー阻害因子は ATF5 タンパク質の発現に影響を与えなかった。さらに、IL-1 は ATF5 mRNA か

らタンパク質への翻訳にも作用し、翻訳開始因子 eIF2 のリン酸化を介して ATF5 mRNA 翻訳効率を上げること。その結果、細胞内に蓄積した ATF5 タンパク質は急性期応答タンパク質である Serum amyloid A と Serum amyloid B mRNA の IL-1 による発現上昇を抑制した。これらの結果は ATF5 の免疫応答における負のレギュレーターとしての働きを示唆するものである。

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 3 件)

1. Abe T., Kojima M., Akanuma S., Iwashita H., Yamazaki T., Okuyama R., Ichikawa K., Umemura M., Nakano H., Takahashi S. *, Takahashi Y.,
N-terminal Hydrophobic Amino Acids of Activating Transcription Factor 5 (ATF5) Protein Confer Interleukin 1 β (IL-1 β)-induced Stabilization.
J. Biol. Chem. (2014) **289**, 3888-3900
2. Hatano M., Umemura M., Kimura N., Yamazaki T., Takeda H., Nakano H., Takahashi S. *, Takahashi Y.,
The 5'-untranslated region regulates ATF5 mRNA stability via nonsense-mediated mRNA decay in response to environmental stress.
FEBS J. (2013) **280**, 4693-707
3. Yun Y.S., Noda S., Shigemori G., Kuriyama R., Takahashi S., Umemura M., Takahashi Y., Inoue H.,
Phenolic diterpenes from rosemary suppress cAMP responsiveness of gluconeogenic gene promoters.
Phytother Res. (2013), **27**, 906-10

* : corresponding author

[学会発表](計 10 件)

国際学会発表

1. Umemura, M., Hatano, M., Kimura, N., Yamazaki, T., Takeda, H., Nakano, H., Takahashi, S., Takahashi, Y., The 5'-untranslated region regulates the stability of ATF5mRNA by nonsense-mediated mRNA decay, *Cold spring harbor laboratory the 2011 meeting on eukaryotic mRNA processing*, 2011/8, New York, USA

国内学会発表

1. 鈴木誠人、飯田吉剛、青木満里恵、笹川洋、中野春男、梅村真理子、高橋滋、高橋勇二、マウス鋤鼻細胞の増殖とアポトーシスに関する転写因子ATF5、日本農芸化学会2014年度大会、2014/3、東京
2. 金子将人、雨宮ゆう子、中野春男、梅村真理子、高橋滋、高橋勇二、転写因子ATF5による嗅覚受容体の発現調節、日本農芸化学会2014年度大会、2014/3、東京
3. 飯田吉剛、鈴木誠人、青木満里恵、笹川洋、中野春男、梅村真理子、高橋滋、高橋 勇二、マウス鋤鼻器における転写因子ATF5の機能解析、第36回日本分子生物学会年会 2013/12、神戸
4. 阿部貴則、岩下弘実、奥山隆一、山崎高志、高橋 滋、高橋勇二、炎症性サイトカインIL-1 によるATF5タンパク質安定化とその役割、東京薬科大学 医薬工3大学包括連携推進シンポジウム 2013/12、八王子
5. 森 直人、梅村 真理子、松崎 彩子、中野 春男、高橋 滋、高橋 勇二、ATF5欠損マウスの脳内モノアミン量の解析、第86回日本生化学会大会、2013/9、横浜
6. 阿部貴則、岩下弘実、奥山隆一、山崎高志、高橋滋、高橋勇二、IL-1 β によるATF5タンパク質安定化の免疫応答における役割 日本生化学会 関東支部例会 2013/6、甲府
7. 大川佳子、山崎高志、中野春男、梅村真理子、高橋滋、高橋勇二、環境ストレスによるC/EBP γ mRNAの安定化制御、第85回日本生化学会大会、2012/12、博多
8. 山崎高志、阿部貴則、中野春男、梅村真理子、高橋滋、高橋勇二、ATF5/C/EBP γ heterodimer regulates sodium-arsenite induced DR5 gene expression in human hepatoma cells. 第85回日本生化学会大会、2012/12、博多
9. 幡野仁哉、梅村真理子、中野春男、高橋 滋、高橋勇二、ATF5 mRNA 5' 非翻訳領域を介したNMDによる新規ストレス応答性 mRNA 安定化機構、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012/3、京都

〔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

高橋 滋 (TAKAHASHI SHIGERU)

東京薬科大学・生命科学部・准教授

研究者番号： 10266900

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：