

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590338

研究課題名(和文) 核内因子 I κ B- ζ を介したエピジェネティックな転写調節研究課題名(英文) Epigenetic transcriptional regulation by the nuclear factor I κ B-zeta

研究代表者

山崎 創 (Yamazaki, Soh)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：70315084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：NF- κ Bは、微生物感染時の炎症性サイトカインや抗菌タンパク質の発現に必須な転写因子であり、I κ B- ζ は、一群のNF- κ B標的遺伝子の発現に不可欠な核タンパク質である。本研究では、クロマチン存在下でのI κ B- ζ による転写調節を明らかにすることを目指した。抗菌タンパク質をコードする二つのI κ B- ζ 依存性遺伝子に着目し、これらの発現がリポ多糖と糖質コルチコイドの刺激で相乗的に増大することを見出した。これらの転写誘導に関わるシスエレメントを決定し、さらにこのシスエレメントへのNF- κ B、グルココルチコイド受容体およびクロマチンリモデリング因子の結合がI κ B- ζ 依存的に協調して起きることを示した。

研究成果の概要(英文)：The transcription factor NF- κ B is essential for expression of proinflammatory cytokines and antimicrobial proteins upon microbial infection. I κ B-zeta is a nuclear protein required for expression of a subset of NF- κ B-target genes. In the present study, I attempted to elucidate transcriptional regulation by I κ B-zeta in the chromatin context. I found that expression of two genes, both encoding antimicrobial proteins, was synergistically induced by lipopolysaccharide and glucocorticoid. I specified cis-elements responsible for the transcriptional activation by the two stimulants, and revealed that upon stimulation NF- κ B, glucocorticoid receptor, and chromatin remodeling factors cooperatively associate with the cis-elements in an I κ B-zeta-dependent manner.

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

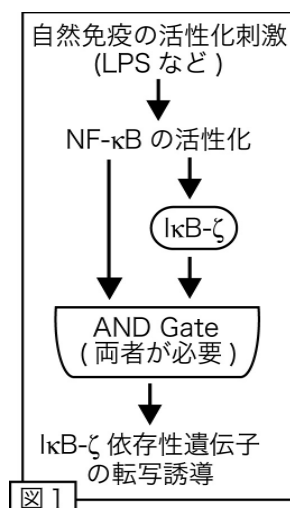
キーワード：転写 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

自然免疫系は、微生物感染に対する宿主防御の最前線に位置し、炎症の惹起や抗菌・殺菌機能の誘導のほか、獲得免疫の発動に不可欠な役割を果たしている。自然免疫の主要な担当細胞であるマクロファージは、リポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) などの微生物に特有の物質を、細胞表面に発現する Toll 様受容体 (Toll-like receptor, TLR) を通じて認識し、インターロイキン (interleukin, IL)-1 β 、IL-6、IL-12、腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α などの炎症性サイトカインや抗菌タンパク質などを産生する。転写因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B) は、これら宿主防御因子の多くの発現に不可欠な役割を果たしている。炎症性サイトカインが過剰に産生されると種々の炎症性疾患の原因となるため、NF- κ B の作用は厳密に制御されなければならない。

研究代表者は以前、自然免疫の活性化時に重要な役割を果たす因子を同定する目的で、マウスのマクロファージを LPS 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「IkB- ζ 」をクローニングした (Yamazaki *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 27657–27662)。その後の解析により、IkB- ζ が核タンパク質であることや、NF- κ B の p50 サブユニットと直接結合することが明らかになった。さらに、IkB- ζ の欠損マウス由来の細胞について遺伝子発現解析をおこなったところ、IkB- ζ は一群の NF- κ B 依存性遺伝子の発現に必須な役割を果たしていることが明らかになった (Yamamoto *et al.* (2004) *Nature* **430**, 218–222)。また、IkB- ζ の N 末端部分には転写活性化能を担う領域が存在することが判明した (Motoyama *et al.* (2005) **280**, 7444–7451)。

未刺激の細胞では、IkB- ζ の発現はほとんど認められず、刺激時に NF- κ B によって誘導されることから、IkB- ζ 依存性遺伝子は、図 1 に示すような「coherent feed-forward system」を介して発現が誘導されることが明らかになった (山崎 創 (2008) *生化学* **80**, 758–762)。IkB- ζ を介した遺伝子発現誘導系では、一定量の IkB- ζ タンパク質が蓄積するまでは IkB- ζ 依存性の標的遺伝子が発現しないので、持続的な強い活性化シグナルだけに応答して遺伝子を転写することができる。すなわち、ノイズシ



グナルのカットに重要であると考えられる。また、発現開始の時期を遅延させるのにも重要であると予想される。さらに、この遺伝子発現誘導系は、細胞が受容した刺激物質の種類に応じて発現する遺伝子を変える仕組みとしても極めて重要である。IkB- ζ の発現は、LPS や IL-1 β の刺激で誘導されるが、これらと同様に NF- κ B や MAP キナーゼを活性化する TNF- α の刺激では誘導されない (Yamazaki *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 27657–27662 ; Eto *et al.* (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 495–501)。研究代表者は、IkB- ζ が発現するためには、NF- κ B による転写誘導に加えて、LPS や IL-1 β などの、シグナルの伝達に MyD88 というアダプター分子を利用するタイプの刺激を必要とすることを明らかにした (Yamazaki *et al.* (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 1678–1687)。

上述のように、IkB- ζ を介した転写誘導の生物学的意義が明らかになってきたが、IkB- ζ による遺伝子発現調節の分子機構に関しては未だに不明な点が多い。NF- κ B の標的遺伝子の中には、発現に IkB- ζ を必要とする遺伝子と必要としない遺伝子とが存在するが、IkB- ζ 依存性遺伝子に共通の塩基配列は不明であった。一方で、研究代表者は、IkB- ζ 欠損マクロファージ細胞を用いたクロマチン免疫沈降実験により、IkB- ζ が標的遺伝子への NF- κ B p65 サブユニットの結合に必要であることを明らかにした (Yamazaki *et al.* (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 32404–32411)。IkB- ζ 欠損細胞では、p65 だけでなく、他の転写因子である C/EBP β やクロマチンリモデリング因子のプロモーター結合も障害されることから、IkB- ζ 依存性遺伝子のプロモーター付近のクロマチン構造は、刺激に伴って凝縮した構造から弛緩した構造に変換され、その結果、上述の転写活性化因子が結合できるようになると考えられる。すなわち、IkB- ζ は、標的プロモーターのクロマチン構造に作用することにより、accessibility を調節すると考えられた。

また、本研究を開始する少し前に、研究代表者は、二つの IkB- ζ 依存性遺伝子の発現が、LPS と合成糖質コルチコイドであるデキサメサゾン (dexamethasone, Dex) により相乗的に誘導されることを見出した。この相乗的な効果が、IkB- ζ 依存的なクロマチン構造の変換に起因する可能性が予想された。

2. 研究の目的

本研究では、下記の 3 点を明らかにすべく、研究を推進した。

- 1) IkB- ζ および NF- κ B のプロモーター結合に関わる分子機構の解明
- 2) IkB- ζ とクロマチンリモデリング因子の作用機序の解明
- 3) IkB- ζ を介した標的プロモーターの accessibility 調節機構の解明

3. 研究の方法

1) I κ B- ζ および NF- κ B のプロモーター結合に関わる分子機構の解明:

NF- κ B は哺乳類では5種類存在するサブユニット (p65, p50, c-Rel, RelB, p52) が様々な組合せでホモあるいはホテロ二量体を形成して存在する。自然免疫系における転写誘導では、p65-p50 ヘテロダイマーと p50 ホモダイマーが主要な役割を果たす。I κ B- ζ は単独で DNA に結合する活性を持たないが、p50 と選択的に結合することから (Yamazaki *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 27657-27662)、刺激に伴って発現が誘導される I κ B- ζ は、p50 を介して標的プロモーターへリクルートされると考えられる。p50 のホモダイマーは未刺激の細胞内で、核に局在し標的プロモーター上に存在するとの報告や (Zhong *et al.* (2002) *Mol. Cell* **9**, 625-636)、刺激に伴う p65 のプロモーター結合には I κ B- ζ が必要であることを考慮し (Yamazaki *et al.* (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 32404-32411)、プロモーター活性化に関わる分子機構の解明に取り組んだ。まず、野生型マウス骨髄由来マクロファージ LPS 刺激し、詳細なタイムコースを追った ChIP 解析を行なった。I κ B- ζ 、p50、p65 がプロモーターにリクルートされる順序や転写活性化状態にあるタンパク質複合体の構成因子を評価した。I κ B- ζ と p50 に関しては、一方のノックアウト細胞における他方のプロモーター結合を解析することにより相互の依存関係の解明を試みた。p50 ホモダイマーや p65-p65 ヘテロダイマーが I κ B- ζ と相互作用することにより DNA 結合能が変化する可能性も予想されたので、I κ B- ζ を過剰発現した細胞における p50 および p65 のプロモーター結合の評価や *in vitro* での DNA 結合実験をおこなった。また、p65 のプロモーター結合は p50 とヘテロダイマーを形成することが必要である可能性があるため、p50 の欠損細胞における p65 のプロモーター結合も検討した。

2) I κ B- ζ とクロマチンリモデリング因子の作用機序の解明:

クロマチンリモデリング因子複合体の ATPase サブユニットである Brm1 や Brg1 も I κ B- ζ 依存的に標的プロモーターにリクルートされる (Yamazaki *et al.* (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 32404-32411)。まず、I κ B- ζ 自身がクロマチンリモデリング因子複合体を直接プロモーターに呼び込む可能性を探るため、I κ B- ζ とクロマチンリモデリング因子複合体の構成因子との間の相互作用を探った。二者を同時に細胞に導入し、免疫共沈降を行なうほか、pull-down による検討も試みた。また、ATPase 活性を欠く Brg1 変異体を安定に発現する細胞株の表現型を解析した。

3) I κ B- ζ を介した標的プロモーターの accessibility 調節機構の解明: まず、野生型

マクロファージを用いて LPS 単独、Dex 単独および LPS と Dex の同時刺激をおこない、遺伝子発現解析をおこなった。LPS と Dex の同時刺激により発現が相乗的に誘導された遺伝子については、転写開始点上流域の DNA 断片を取得し、ルシフェラーゼ遺伝子の upstream に融合してレポーター活性を検討した。すでに LPS 応答に必要なエレメントが報告されている遺伝子もあったが、独自に、より長い領域を取得したのものもあった。レポーター活性が LPS と Dex の同時刺激によって相乗的に誘導されることを確認したら、種々の欠失・点変異体プロモーターを作成し、転写活性化に必要なシスエレメントを決定した。さらに同定したシスエレメントへの p65、グルココルチコイド受容体 (glucocorticoid receptor, GR) およびクロマチンリモデリング因子 Brg1 の結合を評価した。特に、LPS と Dex で同時に刺激した時のプロモーター結合を LPS 単独や Dex 単独で刺激した時の結果と比較した。

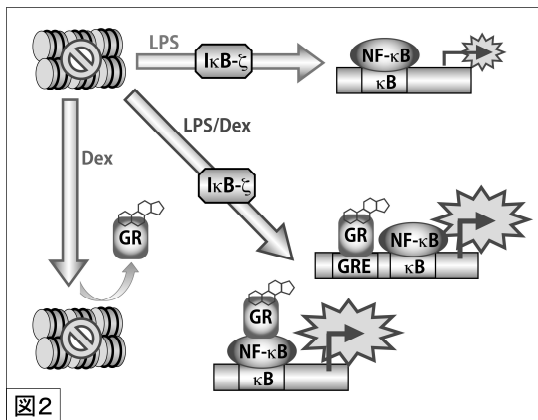
4. 研究成果

1) I κ B- ζ および NF- κ B のプロモーター結合に関わる分子機構の解明: 野生型マクロファージを LPS 刺激し、詳細なタイムコースを追って ChIP 解析をおこなったところ、p50 や I κ B- ζ に比べ、p65 のプロモーター結合は遅れていたことと、p50 の欠損細胞では p65 のプロモーター結合が低下していたことから、刺激後、初めに p50 と I κ B- ζ が一次的な転写活性化複合体を形成し、遅れて p65 を含む二次的な複合体が形成されると考えられた。現時点では、二次的な転写活性化複合体が p65 の他にどの因子を含むかについては不明である。

2) I κ B- ζ とクロマチンリモデリング因子の作用機序の解明: I κ B- ζ と Brg1 との直接相互作用は認められなかったが、p50 存在下でこれら二者が相互作用する可能性が示唆された。ATPase 活性を欠く Brg1 を恒常的に発現する細胞の表現型については現在解析途中である。LPS 刺激に伴うクロマチンリモデリングを必要とする遺伝子に選択的に表現型が現われたら興味深い。

3) I κ B- ζ を介した標的プロモーターの accessibility 調節機構の解明: 研究代表者は、本研究課題推進中に、二つの I κ B- ζ 依存性遺伝子の発現が LPS と Dex の刺激によって相乗的に増強されることを見出した。この二つの遺伝子はいずれも抗菌タンパク質をコードしていた。この発現増強効果は炎症メディエーターなどの多くの LPS 誘導性遺伝子の発現が Dex によって強く抑制されることと対照的である。この二つの抗菌タンパク質の発現は Dex 単独刺激では全く誘導されなかった。まず、この二つの遺伝子について転写開始点上流域のプロモーター活性を検討し、LPS 刺激や Dex 刺激に応答するシスエレメントを同定した。一方についてはすでに LPS

応答エレメントが示唆されていたが、今回これよりも上流に長い領域を用いると、報告されていたよりもはるかに強い LPS 応答性が観察され、さらに Dex による増強効果も観察されるようになった。LPS と Dex によるプロモーターの活性化機構は異なり、NF- κ B と GR がそれぞれの結合配列と相互作用してプロモーターを活性化する場合と、GR が DNA と結合するのではなく、DNA 上の NF- κ B と直接タンパク質間で相互作用することによりプロモーターを活性化する可能性が示唆された。また、LPS や Dex 刺激に伴う NF- κ B と GR のプロモーター結合を検討したところ、GR は、Dex の単独刺激時には標的遺伝子の発現制御領域に結合しないが、LPS との同時刺激時には結合していた。また、I κ B- ζ の欠損細胞では、NF- κ B p65 サブユニットや Brg1 ばかりでなく GR のプロモーター結合も障害されていた (図 2)。



感染応答時に TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインレベルが上昇すると、副腎から放出される糖質コルチコイドによって炎症応答が抑制されることが知られているので、本研究で見出した抗菌タンパク質の発現増強は、過度の炎症反応を抑えつつ感染防御能を維持する上で重要であると考えられる。

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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

1.

山崎 創, 住本 英樹
「NF- κ B p50 サブユニットと I κ B- ζ によるエンハンサー活性化機構」
第 85 回日本生化学会大会
2012 年 12 月 16 日
福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

2. Soh Yamazaki, Hideki Sumimoto

「Transcriptional regulation by I κ B- ζ and the NF- κ B p50 subunit」
Keystone symposium, NF- κ B signaling and biology: from bench to bedside
2012 年 3 月 21 日
Whistler, British Columbia, Canada

3. 山崎 創, 住本 英樹

「抗菌タンパク質をコードする遺伝子の転写誘導における NF- κ B とグルココルチコイド受容体 (GR) の協調作用」
第 34 回日本分子生物学会年会
2011 年 12 月 15 日・16 日
パシフィコ横浜

4. 山崎 創, 住本 英樹

「転写調節因子 I κ B- ζ (zeta) 依存的に誘導される抗菌タンパク質の発現に対するグルココルチコイドの増強作用の分子機構」
平成 23 年度日本生化学会九州支部例会
2011 年 5 月 22 日
久留米大学医学部筑水会館

[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

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

()

研究者番号：

(3)連携研究者：なし
()

研究者番号：