

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790314

研究課題名(和文)炎症時におけるトランスローケタープロテイン遺伝子の転写調節機構に関する研究

研究課題名(英文)Transcription of TSP0 gene under the brain inflammation

研究代表者

田原 強 (Tsuyoshi, Tahara)

独立行政法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号：20419708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：TSP0は、炎症時に誘導されることが知られているため、炎症の特に脳内炎症の指標として、研究が行われている。しかしその遺伝子発現誘導機構については、不明な部分が多い。そこで、炎症応答性転写調節領域を明らかにするために、マウスおよびヒトTSP0遺伝子の炎症応答性領域の探索を行った。実験の結果、マウスTSP0遺伝子上流およそ1500bp、ヒトTSP0上流700bpにおいても、炎症応答性転写領域を見出すことはできなかった。以上の結果から、マウスおよびヒトTSP0遺伝子上流領域において、マウスでは1500bp、ヒトでは700bp上流領域には、炎症に応答する転写調節領域はない可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Since it is known that, during inflammation, TSP0 proteins are induced in the inflammation region and TSP0 plays a role as an indicator of inflammation, especially within a brain. However, there are many unknown about the induction mechanisms of TSP0 gene expression during inflammation. Then, in order to clarify an inflammation-specific transcriptional cis element in TSP0 gene, I carried out searching the inflammation responsive element in the upstream region of the mouse and the human TSP0 gene. In the about 1500 bp and 700 bp upstream of a mouse TSP0 gene and human TSP0 upstream, respectively, these regions could not response against inflammation stimulation such as LPS treatment. As results, I could find no inflammation responsive element in the about 1500 bp and 700 bp upstream regions in the mouse and human TSP0 gene, respectively.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬理学一般

キーワード：トランスローケタープロテイン 炎症 転写

## 1. 研究開始当初の背景

Translocator protein (TSPO ; 末梢型 benzodiazepine receptor としても知られる) は、18 kDa の 5 回膜貫通型タンパク質であり、ミトコンドリア外膜に存在し、細胞増殖、steroid 代謝、heme 代謝など多くの生理的機能に關与する重要なタンパク質である。TSPO は、炎症ストレスで活性化されたマクログリアにおいて強く誘導される上、上述のように、通常脳内における TSPO の発現量は低いいため、炎症によって誘導された TSPO は検出しやすい。そこで、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患患者の脳内炎症をモニターするために、Positron emission tomography (PET) を用いた TSPO の antagonist による炎症のイメージング研究が行われている。これまでの研究において、炎症時に強く誘導される TSPO が、マクログリアの細胞増殖および細胞死の調節だけでなく炎症性因子であるサイトカイン、細胞障害性フリーラジカル生成にも關与することから、神経細胞障害の増悪化に TSPO が関わっていると考えられている。そのため、PK11195 などの TSPO antagonist を用いた機能阻害を介する神経細胞保護を目指した研究も行われている。

さて、TSPO の機能および炎症モニタリングに関する研究とは違い、炎症時において誘導される TSPO 遺伝子の発現調節機構については不明な点が多く、これまで一切の報告もなされていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

炎症時に発現誘導される TSPO 遺伝子のプロモーターあるいはエンハンサー領域をクローニングし、炎症時に機能する転写調節領域および転写調節因子を明らかにする。

さらにこの炎症特異的配列をもつベクターを作製し、GFP や PET レポーター遺伝子と組み合わせて *in vivo* における炎症のモニタリング法を確立を目指すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1)細胞培養

ラットグリオーマ C6 細胞は、10% FCS、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含む DMEM 培地を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件において培養した。一方、ヒトグリオーマ U87 細胞は、RPMI1640 培地を用いて、あとは C6 細胞と同様に培養を行った。

レポーター解析を行うための遺伝子導入は、Lipofectamine 2000 のプロトコールに従って行った。

また、細胞に炎症を惹起するために、リポ

ポリサッカライド(LPS, 終濃度 1μg/ml)を細胞に添加し、24 時間培養を続けた。

### 2) ウエスタンブロット解析

LPS 処理 (6, 18, 24 時間) を行った細胞を回収し、PBS を用いて洗浄した後、SDS-PAGE 用サンプルを調製した。タンパク質濃度は、ブラッドフォード法によって決定した。サンプルは SDS-PAGE 電気泳動を行い、PVDF 膜に転写した後、スキムミルクを用いてブロッキングを行った。一次抗体は、抗 TSPO 抗体を使用した。二次抗体には、HRP 標識された抗 IgG 抗体を用い、化学発光シグナルを LAS-3000 を用いて検出を行った。

### 3) マウスおよびヒト Genomic DNA の調製

TSPO 遺伝子のプロモーター領域を PCR 法によって増幅するためのテンプレートとして、マウスおよびヒトの genomic DNA を用いるために、培養細胞より調製した。マウス genomic DNA は、1 × 10<sup>6</sup> 細胞のマウス神経系培養細胞 Neuro2a より調製した。一方、ヒト genomic DNA は、U87MG 細胞より調製を行った。Genomic DNA の調製は、Gen とくくん (タカラバイオ社) を使用し行った。

### 4) プラスミドの構築

マウス TSPO のプロモーター領域 (1507 bp) を PCR 法によって増幅し、pGEM T-easy vector に組み込み、DNA シークエンサーを用いて、配列の確認を行った。目的の配列がクローニングできたことを確認した後、SacI - XhoI 部位を用いて、レポーターベクターである pGL4 ベクターに挿入しサブクローニングを行い、レポーターアッセイ用ベクターの作製を行った(pGL-mTSPO1507)。一方、ヒト TSPO のプロモーター領域 (689 bp) もマウス同様に、PCR 法によって増幅し、クローニングベクターに挿入後、配列の確認を行った。ヒト TSPO プロモーターは、KpnI - XhoI 部位を用いて、レポーターベクターである pGL4 ベクターに挿入しサブクローニングを行い、レポーターアッセイ用ベクターの作製を行った(pGL-hTSPO689)。

### 5) レポーター解析

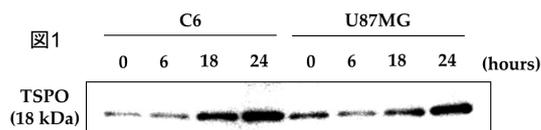
pGL-p(negative control), pGL-mTSPO1507、および pRL ベクターを C6 細胞にトランスフェクションし、16 時間培養した後、炎症を惹起させるため LPS (1μg/ml) 処理を行い、さらに 24 時間培養後、PBS を用いて洗浄後、Passive Lysis Buffer を加え細胞を溶解した。続いて遠心分離し、上清を酵素液とした。一方、ヒト TSPO 遺伝子のプロモーターを解析した時は、C6 細胞ではなく、ヒトグリオーマ U87MG 細胞に遺伝子を導入し、以降の実

験は、マウスと同様に行った。Photinus Luciferase および Renilla Luciferase の活性測定は、Dual-Luciferase Reporter Assay System のプロトコルに従って行った。まず、酵素液と LAR II を混和し、Photinus Luciferase による発光をルミノメーターを用いて測定した。続いて Stop&Glo Reagent を添加して、Renilla Luciferase による発光を計測した。トランスフェクションの効率は、内部コントロールとして Renilla Luciferase の活性により補正した。全ての実験は、それぞれ独立した実験を 3 回以上行った平均を求め、標準偏差を用いてグラフ化した。

#### 4. 研究成果

##### 1) LPS 刺激による TSPO タンパク質の発現誘導の確認

TSPO 遺伝子における炎症特異的応答転写配列を探索するために、まず確実に炎症で TSPO が誘導されるかどうかを調べるために、C6 細胞および U87MG 細胞に LPS 処理を行い、時間経過による TSPO タンパク質の発現量を調べたところ、図 1 に示すように、C6、U87MG 細胞ともに時間経過とともに TSPO タンパク質の発現量が増加していることが示され、24 時間後において、0 時間と比較して有意な増加をしていることが示された。この条件であれば、炎症特異的な転写領域の探索が行えることが示唆された。



##### 2) マウス TSPO 遺伝子の炎症特異的転写調節領域の構築

本研究において、マウス TSPO 遺伝子の上流領域として、1607 bp までクローニングすることができ、シークエンサーによって配列を確認後、転写機能解析用ベクター pGL4 の Sac I - Xho I 部位にサブクローニングし、pGL-mTSPO1607 を作製した。

##### 3) ヒト TSPO 遺伝子の炎症特異的転写調節領域の構築

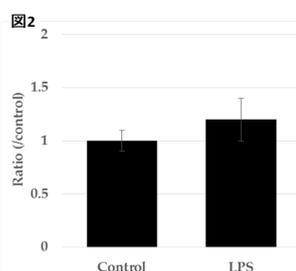
マウス TSPO 遺伝子の上流領域に続いて、本研究において、ヒト TSPO 遺伝子の上流領域として、689 bp までクローニングすることができ、シークエンサーによって配列を確認後、転写機能解析用ベクター pGL4 の Kpn I - Xho I 部位にサブクローニングし、

pGL-hTSPO689 を作製した。

##### 4) TSPO 遺伝子における炎症特異的転写調節の探索

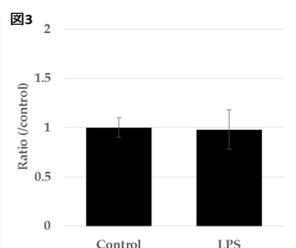
マウスおよびヒト TSPO 遺伝子の上流領域を用いて、炎症特異的転写調節領域の探索を行うために、C6 あるいは U87MG 細胞にルシフェラーゼアッセイ用ベクターをまずリポフェクションにより導入後、LPS により炎症を惹起させた後、24 時間後に細胞を回収しルシフェラーゼ活性を測定した。

その結果、まずマウス TSPO 遺伝子の上流領域において、図 2 に示すように、LPS 未処理群と比較してわずかに活性が上昇しているように見えるが、有意な活性上昇とは言えず、炎症時の TSPO タンパク質の発現量と比較すると、その上昇はごくわずかであり、炎症特異的な転写活性の上昇とは考えられない。すなわち、今回用いた 1600 bp 上流には、マウスの TSPO 遺伝子の炎症特異的転写調節領域は含まれないことが分かった。



一方、ヒト TSPO において、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、マウスと違い、コントロールと比べ、なんの変化も見られず、この領域にはマウスと同様に、炎症応答転写調節領域は含まれないことが示唆された(図 3)。

以上の結果から、TSPO 遺伝子における炎症特異的転写調節領域の特定はできなかったものの、今回用いた領域に炎症応答性の調節領域が含まれないことは新たに明らかになった。



#### 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 0件)

〔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

田原 強 (Tsuyoshi Tahara)  
理化学研究所ライフサイエンス技術基盤  
研究センター 研究員  
研究者番号：20419708

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：