

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591089

研究課題名（和文）炎症制御に関わる核内受容体機能の分子基盤の解析

研究課題名（英文）Molecular Basis of the nuclear receptor function mediating  
Inflammation

研究代表者

北川 浩史 (KITAGAWA HIROCHIKA)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：20345234

研究成果の概要（和文）：

近年、炎症とエネルギー代謝の相互制御メカニズムが注目されるに至っているが、両者の核内でのクロストークは、「エピゲノム制御」を介した形をとることが近年明らかになりつつある。その主役を担う一連の転写因子群のひとつが、脂溶性リガンドによって制御される核内受容体である。

グルココルチコイドレセプター(GR)は、炎症を制御する代表的な核内受容体の一つである。GRの主な抗炎症メカニズムは炎症制御転写因子 AP-1 や NF- $\kappa$ B のリガンド依存性の転写抑制であることが知られている一方で、グルココルチコイドの長期投与による副作用は主に GR による転写活性化に起因することが知られている。しかし抗炎症作用メカニズムの理解には未だにコンセンサスが得られていない。そこで、我々はグルココルチコイド受容体による AP-1 の転写抑制メカニズムを明らかにしようと考え、マクロファージ細胞系における解析に取り組んでいる。その過程で、1) グルココルチコイド依存性の c-Jun 蛋白の Sumo 化が転写抑制の引き金となり、2) それに行き続くポリコムタンパク複合体 PRC2 の構成因子 (EZH2) を含む複合体によるヒストン H3K27 のメチル化によって可逆性のクロマチン構造変化がなされる、という 2 段階からなる未知の転写抑制制御メカニズムの存在を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Glucocorticoid is clinically successful in attenuating inflammation caused by diverse diseases, and its anti-inflammatory actions via nuclear glucocorticoid receptor (GR) are known to be mediated by transcriptional repression of inflammatory transcription factors like AP-1 and NF- $\kappa$ B. However, the molecular mechanism underlying hormonal transrepression largely remains to be uncovered at the level of chromatin. Here, we report that glucocorticoid-induced sumoylation of c-Jun via GR triggers transcriptional repression of AP-1 through a histone inactivating methylation (H3K27me3) by recruitment of a polycomb (PRC2) complex. Liganded GR serves as an adaptor for Sumo E3 ligase (PIAS1) to sumoylate c-Jun in the AP-1 unit, but not NF- $\kappa$ B. Sumoylated c-Jun induces association with a PRC2 complex, leading to H3K27 methylation by EZH2 and silencing of AP-1 binding sites on pro-inflammatory cytokine gene promoters. Ablation of EZH2 in mice abrogates glucocorticoid-induced transrepression of the cytokine genes that are induced by activated AP-1. Thus, these findings uncover a molecular mechanism of anti-inflammatory glucocorticoid actions for transrepression of AP-1 through repressive chromatin reorganization, and provide a clue for development of desirable GR synthetic ligands.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010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：分子生物学、生化学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：グルココルチコイド、炎症、Sumo化

1. 研究開始当初の背景

GRは炎症反応を制御する主要な核内受容体であり、そのリガンドであるグルココルチコイドは広く炎症疾患の治療薬として使用されている。しかし、その長期投与における副作用の重篤度から、治療効果を維持した上で副作用を軽減するための努力が長い間なされてきた。GRの主な抗炎症メカニズムは炎症制御転写因子 AP-1 や NF- $\kappa$ B のリガンド依存性の転写抑制であることが知られており、副作用は主に GR による転写活性化に起因することが知られている。しかし抗炎症作用メカニズムの理解には未だにコンセンサスが得られていない。

2. 研究の目的

本研究課題は、「核内受容体による炎症制御メカニズムの解明」であり、具体的には、グルココルチコイド受容体 (GR) による炎症制御転写因子の転写抑制メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

生化学的な手法を用いて、グルココルチコイド依存性の AP-1 の転写抑制メカニズムの探索を行う。

4. 研究成果

1) シグナル依存性の GR 転写抑制系解析シ

ステムの構築

本研究においては、GRの転写抑制メカニズムを明らかにする必要があるため、手始めにその解析系を作成する必要がある。炎症制御転写因子として AP-1 を用いて、転写抑制メカニズムのセットアップを開始した。

はじめに、グルココルチコイド投与による AP-1 転写抑制の解析を AP-1 を用いたレポーターアッセイにて開始した。使用する細胞としては human 胎児腎臓由来の 293F 細胞と human 肺癌細胞由来の A549,そして mouse マクロファージ由来の Raw264.7 細胞を用いた。その結果、Raw 264.7 細胞で転写抑制が強く認められることが明らかとなった。次に実際にサイトカイン分泌抑制作用を明らかにするために Raw 264.7 細胞と human monocyte 由来の THP-1 細胞においてサイトカイン分泌抑制作用をサイトカインアレイとリアルタイム PCR にて確認した。その結果、THP-1 細胞にてグルココルチコイド依存性のサイトカイン分泌の顕著な抑制をみることができた。以上から、以後は Raw 細胞と THP-1 細胞を解析に用いることにした。

2) グルココルチコイド受容体 (GR) 結合因子精製系の構築

当初 293F 細胞で stable transformant 株を作成し、結合する因子を取得する方向で準備を進めていたが、293 細胞では転写抑制が顕著ではないことを踏まえ、大量培養する細胞の変更を余儀なくされた。また、Raw 264.7 細胞、THP-1 細胞ともに stable transformant 作成は困難を

極めることから、*in vitro* での bait の作成とともに抗体カラムを用いての endogenous に発現するタンパクとその結合因子の同定システムを作成した。*In vitro* での bait の作成には成功したものの、結合因子の同定には至らず、結局抗体カラムによる精製を行うことにした。

一方で、GR の機能制御を担う因子は核内、細胞質内両方に存在する可能性が考えられたため、両方の画分の抽出液を作成して、リガンド依存性、炎症シグナル依存性に結合因子の取得を試みた。核画分からは Hsc70, 核画分からは DRIP150 などの既知因子の取得に成功し、精製同定システムの完成が確認された。

### 3) 細胞質画分から精製した GR の分解を制御する因子の機能解析

Raw 264.7 細胞を大量培養し、炎症刺激とデキサメサゾン刺激を行いながら、GR 結合因子群を GR 抗体カラムにて取得して、マスマイングプリンティングにて同定を行った。その結果、細胞質内での GR 結合因子の中に既知のユビキチンリガーゼ Itch とこれの調節因子として知られる N4BP1 を同定した。GR はリガンド投与後速やかにユビキチンプロテアソーム系によって分解されることが知られているため、これらの因子が GR の turnover を制御している可能性が考えられた。そのため、次にこれら二つの因子の RNAi によるノックダウン実験を行った結果、Itch のノックダウンではリガンド非存在下の GR が、N4BP1 のノックダウンでは、リガンド存在下の GR のタンパク量が増加した。Itch は c-Jun の分解も制御していることが知られているため、同時に c-Jun のタンパク量も調べたが、あまり変化は認められなかった。これは、Raw264.7 細胞に発現している c-Jun の量が低いと考えられる。次に転写への影響をレポーターアッセイにて確認した結果、GR の核内タンパク量が増えることによる転写制御活性の増強が認められた。以上のことから、これらのタンパク群が、炎症シグナルとグルココルチコイド依存性に、GR と AP-1 (c-Jun) のタンパク量の制御を介して、つまり turnover を制御することにより、AP-1 の転写活性を制御する可能性が示唆された。

AP-1 の転写活性制御において c-Jun の turnover 制御が重要であることが以前から知られていることを考えあわせ、この制御メカニズムの全貌を明らかにされることが今後期待される。

### 4) リガンド依存性の c-Jun の Sumo 化の解析

精製段階で GR と c-Jun の結合は非常に弱いことが明らかになった。加えて時系列で解析すると、GR が LPS 刺激によって分解されることが明らかになったことから、GR は短時間で分解するものの、c-Jun に何からの修飾を加えることによって、炎症シグナルと GR がクロストークをしているのではないかと考えるに至った。まず、リガンド依存性の c-Jun のリン酸化の度合いを調べたが、ほとんど変化が認められなかった。しかし、Sumo 化に関しては、Sumo1 による修飾の度合いが変化しないのに対し、Sumo2/3 による修飾がリガンド依存性に強くなることが明らかとなった。実際に THP-1 細胞からの c-Jun の抗体カラム精製においてもリガンド依存性に Sumo2/3 化 c-Jun の量が増加することが明らかになった。次に Sumo 化されない c-Jun mutant (K226R) を作成した結果、Raw264.7 細胞内ではリガンド依存性の c-Jun の Sumo2/3 化がなくなり、それに伴ってリガンド依存性の転写抑制が認められなくなった。この現象はそのパートナーの c-Fos の非 Sumo 化 mutant では認められない現象であること、また、LPS 刺激していない場合は逆の現象が認められることから、リン酸化された c-Jun がリガンド依存性に Sumo2/3 化され、この現象がリガンド依存性の GR による AP-1 の転写抑制のトリガーとなっている可能性が強く示唆された。一方で、リガンド刺激後の c-Jun には Polycomb complex である PRC2 complex の component EZH2 のリクルートが確認され、それに伴って、細胞内のヒストン H3K27 のメチル化が亢進していることも明らかになった。以上から、グルココルチコイド依存性の転写抑制には、c-Jun の Sumo 化依存性にリクルートされる PRC complex によるヒストンメチル化が関与している可能性が考えられた。

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 14 件)

- (1) \*Kitagawa H., Fujiki R., Yoshimura K., Oya H., Kato S.: Williams syndrome is an epigenome-regulator disease. *Endocr J.* 8(2):77-85. 2011. (査読あり)
- (2) Akimoto C., Ueda T., Yamaoka I., Inoue K., Sakari M., Ohara K., Fujioka T., Nagahara A., Nonomura N., Tsutsumi S., Aburatani H., Miki T., Matsumoto T., Kitagawa H., \* Kato S.: TSPY represses the activity of the androgen receptor in androgen-dependent testicular germ cell tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(46):19891-6. 2010. (査読あり)
- (3) Matsuyama R, Takada I., Yokoyama A, Fujiyama-Nakamura S, Tsuji N, Kitagawa H., Fujiki R, Kim M, Kouzu-Fujita M, Yano T, Kato S.: Double PHD fingers protein DPF2 recognizes acetylated histones and suppresses the function of ERR{alpha} through histone deacetylase 1. *J Biol Chem.* 285(24):18166-76, 2010. (査読あり)
- (4) Takada I., Tsuji N, Youn MY, Fujiyama S, Okada M, Imai Y, Kondo S, Kitagawa H., Yasuda H, \*Kato S.: Purification and identification of estrogen receptor alpha co-regulators in osteoclasts. *Ann NY Acad Sci.* 192(1): 201-7. . 2010. (査読あり)
- (5) Ochiai E., Kitagawa H., Takada I., Fujiyama S., Sawatsubashi S., Kim M., Mezaki Y., Tshuushima Y., Takagi K., Yamaoka K., Kato S., Kamimura T.: CDP/Cut is an Osteoblastic Co-activator of the Vitamin D receptor (VDR). *Bone Miner Res. in press*, 2010. (査読あり)
- (6) Murai-Takeda A, Shibata H, Kurihara I, Kobayashi S, Yokota K, Suda N, Mitsuishi Y, Jo R, Kitagawa H., Kato S, Saruta T, Itoh H.: NF-YC functions as a corepressor of agonist-bound mineralocorticoid receptor., *J. Biol. Chem.*, 285, 8084-93, 2010. (査読あり)
- (7) Oya, H., Yokoyama, A., Yamaoka, I., Fujiki, R., Yonezawa, M., Youn, M., Takada, I., Kato, S. & Kitagawa, H.: Phosphorylation of Williams syndrome transcription factor by MAPK induces a switching between two distinct chromatin remodeling complexes., *J. Biol. Chem.*, 284, 32472-32482, 2009. (査読あり)
- (8) Kim, M., Kondo, T., Takada, I., Youn, M., Yamamoto, Y., Takahashi, S., Matsumoto, T., Fujiyama, S., Shiode, Y., Yamaoka, I., Kitagawa, H., Takeyama, K., Shibuya, H., Ohtake, F., Kato, S.: DNA demethylation in hormone-induced transcriptional derepression., *Nature.* 461, 1007-1012, 2009. (査読あり)
- (9) Yoshimura, K. & Kitagawa, H. (equal contribution), Fujiki, R., Tanabe, M., Takezawa, S., Takada, I., Yamaoka, I., Yonezawa, M., Kondo, T., Furutani, Y., Yagi, H., Yoshinaga, S., Masuda, T., Fukuda, T., Yamamoto, Y., Ebihara, K., Li, D.Y., Matsuoka, R., Takeuchi, J.K., Matsumoto, T., Kato, S.: Distinct function of 2 chromatin remodeling complexes that share a common subunit, Williams syndrome transcription factor (WSTF). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 9280-9285, 2009. (査読あり)
- (10) Fujiki, R., Chikanishi, T., Hashiba, W., Ito, H., Takada, I., Roeder, R. G., Kitagawa, H., and Kato, S.: GlcNAcylation of a histone methyltransferase in retinoic acid-induced granulopoiesis. *Nature.* 459, 455-459, 2009. (査読あり)
- (11) Kouzu-Fujita, M., Mezaki, Y., Sawatsubashi, S., Matsumoto, T.,

- Yamaoka, I., Yano, T., Taketani, Y., Kitagawa, H., Kato, S.: Coactivation of estrogen receptor beta by gonadotropin-induced cofactor GIOT-4. *Mol. Cell. Biol.*, 29, 83-92, 2009 (査読あり)
- (12) Yokoyama, A., Takezawa, S., Schüle, R., Kitagawa, H., Kato, S.: Transrepressive function of TLX requires the histone demethylase LSD1. *Mol. Cell. Biol.*, 28, 3995-4003, 2008 . (査読あり)
- (13) Akimoto, C., Kitagawa, H., Matsumoto, T., Kato, S.: Spermatogenesis-specific association of SMCY and MSH5. *Genes Cells*, 13, 623-633, 2008 . (査読あり)
- (14) Okada, M., Takezawa, S., Mezaki, Y., Yamaoka, I., Takada, I., Kitagawa, H., Kato, S.: Switching of chromatin-remodelling complexes for oestrogen receptor-alpha. *EMBO Rep.*, 9, 563-568, 2008 . (査読あり)

[学会発表] (計8件)

- (1) Hirochika Kitagawa, Shigeaki Kato  
Dissection of a Novel Epigenetic Regulatory Mechanism linking Inflammation and Energy Metabolism  
BMB2010 2010.12.10. 神戸国際会議場
- (2) 北川 浩史  
慢性炎症性疾患の運命決定を担う核内エピゲノム制御メカニズムの解析  
北関東医学会 2010.10.7. 群馬大学
- (3) Hirochika Kitagawa, Shigeaki Kato  
Nuclear Receptors and its frontier' : The functional regulation of a chromatin remodeling complex 'WINAC' serving as a co-regulator complex for nuclear receptors 14th International Conference of Endocrinology; Satellite Symposium 2010.3.31 京都国際会議場
- (4) Hirochika Kitagawa, Shigeaki Kato  
Phosphorylation of WSTF by MAPK is required for the regulation of VDR-mediated transcription by WINAC

ICE 2010 2010.3.27 京都国際会議場

- (5) 北川 浩史、加藤茂明  
グルココルチコイドレセプター(GR)による炎症制御メカニズムの解析 ステロイドホルモン学会 2009.11.14 九州大学
- (6) 北川 浩史、加藤茂明  
核内受容体転写修飾因子として機能するクロマチン構造変換複合体の新規細胞内シグナル依存性機能制御メカニズムの解明:日本内分泌学会、2009.4.23 群馬県民文化会館
- (7) 北川 浩史、藤木 亮次、金 美善、吉村、公宏、大矢 博之、山本 陽子、松本 高広、高田 伊知郎、武山、健一、加藤 茂明  
ビタミンD レセプターの転写制御におけるクロマチン構造変換の役割: 日本骨代謝学会ミニシンポジウム:2008.10.30 大阪国際会議場
- (8) 北川 浩史、山岡 育子、岡田 麻衣子、藤山 沙理、加藤 茂明  
炎症制御に関与するグルココルチコイドレセプター(GR)の分解制御メカニズムの解析 日本生化学会 2008.10.21. 神戸国際会議場

[図書] (計1件)

1. 現代栄養学を理解するための分子生物学入門、加藤茂明他(分担著者)、2010年、光生館、総ページ221

[その他]

ホームページ等

<http://kakunai.dept.showa.gunma-u.ac.jp/kitagawa/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 浩史 (KITAGAWA HIROCHIKA)  
群馬大学・生体調節研究所・教授  
研究者番号：20345234

(2) 研究分担者

武山 健一 (TAKEYAMA KEN-ICHI)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・講師  
研究者番号：30323570  
(2008～2009年)

高田 伊知郎 (TAKADA ICHIRO)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
研究者番号：50361655  
(2008年)