

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460377

研究課題名(和文) ノックアウトマウスを用いたATF-2遺伝子ファミリーの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of ATF2 gene family members by using knockout mouse

研究代表者

前川 利男 (Maekawa, Toshio)

国立研究開発法人理化学研究所・石井分子遺伝学研究室・研究員

研究者番号：90201764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子ATF7の機能を主にマウス個体を用いて調べた結果、ATF7はKu70/Ku80及びテロメラーゼと複合体を形成して、テロメアの長さを調節している事が分かった。また、この機能はヒトの細胞においても確認された。ATF7はマクロファージにおいて自然免疫系の遺伝子の発現調節に関与していた。LPSで刺激するとATF7を介したこれらの遺伝子の活性化が長期間持続し、細菌の感染を抑制した。この事から、自然免疫系にも長期記憶に似た現象が有る事が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We studied the function of stress-response transcription factor ATF7 by using the ATF7 gene knockout mouse. At first, we found that ATF7 made complex with Ku70/Ku80 and telomerase and regulated telomere length. This function was found not only in mouse cells but also in human cells. Second, we found that ATF7 suppressed a group of genes encoding factors involved in innate immunity in macrophages. Treatment with lipopolysaccharide increased basal expression of target genes. And these increased expressions were maintained for long periods, which enhanced resistance to pathogens. ATF7 might therefore be important in controlling memory in cells of the innate immune system.

研究分野：分子生物学

キーワード：転写因子 ストレス ATF7 テロメア 自然免疫 マクロファージ 長期記憶

1. 研究開始当初の背景

ATF2 は、私達が最初に同定した転写因子であり、CRE と呼ばれる特異的な配列 (TGACGTCA) に結合する。この転写因子は C₂H₂ タイプのメタルフィンガー構造を N 末端側に有し、B-Zip タイプの DNA 結合ドメインを C 末端側に有する。シグナル伝達系において、ATF2 は TNF- α などの炎症性サイトカインや低酸素刺激、UV 等の種々のストレスによって活性化されるストレス応答性キナーゼ p38/JNK によってリン酸化される。活性化されていない ATF2 は標的遺伝子の転写を抑制し、活性化された ATF2 は転写を誘導すると推定されている。私達はこれまでに、マウス変異体を作製して解析し、ATF2 が胎便吸引症候群や乳癌の発症、脂肪細胞への分化等に関与することを報告してきた。ATF2 ファミリーは ATF2 と ATF7、CRE-BPa の 3 つのメンバーから成り、これらはいずれも、p38/JNK によってリン酸化され、活性化される。ATF2 と CRE-BPa 遺伝子欠損マウスは、いずれも生後すぐに致死となる。一方私達は、ATF7 遺伝子欠損マウスを作製・解析し、このマウスは正常に発育するが、脳幹部の背側縫線核における、セロトニン受容体 5B (HTR5B) の顕著な発現上昇によって、自己受容体がシナプス間隙のセロトニン濃度を低下させ、行動異常を引き起こすことを見出した。メカニズムを詳細に解析した結果、ATF7 はヒストンメチル化酵素である ESET と複合体を形成して、HTR5B 遺伝子のプロモーターに ESET をリクルートし、H3K9 のトリメチル化を促進してヘテロクロマチンを誘導することによって転写を抑制していることが明らかになった¹。

2. 研究の目的

ストレスで活性化される転写因子 ATF2 遺伝子ファミリーメンバーの 3 つの因子 (ATF2 と ATF7、CRE-BPa) の生理学的な役割をノックアウトマウスを用いて、マウス個体で解明したい。

(1) ATF7 は Ku70/Ku80 と複合体を形成していることを発見し、*Atf7*^{-/-} MEF のテロメアの長さは野生型と比較して短いことが分かった。Ku70/Ku80 はテロメアの長さの維持にも関係しており、テロメアの維持とヘテロクロマチン形成における ATF7 の役割を明らかにしたい。

(2) ATF7 KO マウスは顔面に炎症を起こすので、その原因を探って炎症に至るメカニズムを解明したい。

(3) ATF2 と CRE-BPa は胎盤や肺の発生に関与することを発見しており、胎盤や肺の発生における低酸素の役割と ATF2 及び CRE-BPa の役割を明らかにしたい。

(4) マウスの雄に低蛋白質の餌を与えるとその影響が精子を介して子供に伝わる事が報告されたが²、この現象への ATF2 ファミリーの関与と役割を明らかにしたい。

(5) ATF2 ファミリーは細菌やウイルス感染によって活性化されることが知られているので、マクロファージを中心とした自然免疫系における ATF2 ファミリーの関与と役割を明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) HeLa 細胞や MEF を材料にして、ATF7 と Ku70/Ku80 及びテロメラーゼの相互作用がストレスによってどのように変化するかを調べる。次に ChIP 法を用いて、この時のテロメアへのリクルートの変化も解析する。また、ATF7 がテロメアに結合するメカニズムとストレスによるテロメアの長さの変化についても調べる。

(2) ATF7 KO マウスで発症する顔面の炎症を組織病理学的に診断し、マイクロアレイを用いて病変部における標的遺伝子を検出する。また、ATF7 KO マウスで誘導される血中サイトカインや免疫細胞の変化を検索する。

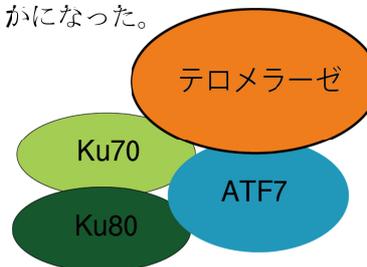
(3) ATF2 遺伝子ファミリーメンバーの KO マウスを用いて、肺と胎盤における標的遺伝子を探索する。特に免疫組織染色法を用いて、胚発生時の肺と胎盤での低酸素領域を検出し、ATF2 メンバーが活性化されている領域での標的遺伝子を調べる。

(4) 野生型と ATF7 KO マウスの雄に普通の餌と低蛋白質の餌を与え、子供の遺伝子発現に最も影響する遺伝子を特定する。特定した遺伝子の精子形成過程での ATF7 の結合と DNA やヒストンのメチル化を調べる。

(5) 自然免疫系で中心的な役割を担っているマクロファージにおける遺伝子発現を野生型と ATF7 KO マウスで比較する。

4. 研究成果

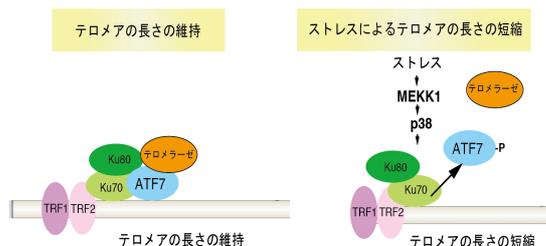
(1) HeLa 細胞を用いて ATF7 複合体を精製し、ChIP 法で解析した結果、ATF7 は Ku70/Ku80 及びテロメラーゼと複合体を形成して、テロメラーゼに結合していることが明らかになった。



(2) TNF- α 等のストレス刺激によって ATF7 が p38 キナーゼによってリン酸化されると ATF7 と Ku70/Ku80 及びテロメラーゼの複合体は解離してテロメアから離れ、テロメラーゼをテロメアにリクルートできなくなる

ので、テロメアが短くなることが分かった。

(3) また、ATF7 はテロメアにおいて Suv39h1 をリクルートしてヒストン H3K9me3 を導入することによってヘテロクロマチン形成を促進していることも明らかになった。このヘテロクロマチンはストレス刺激によって ATF7 がリン酸化されると ATF7 のテロメアからの遊離と共に H3K9me3 の低下によって壊された。



(4) ATF7 遺伝子欠損マウスで見られる鼻を中心とした顔面の炎症はブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* によるものであり、発がんとは関係がないことが病理診断から明らかになった。ブドウ球菌に感染していないマウスでは炎症は見られなくなった。

(5) ATF7 はマクロファージにおいて、自然免疫系の遺伝子の発現を抑制していることが明らかになった。このメカニズムを調べた結果、マクロファージでは ATF7 は G9a と複合体を形成して自然免疫系の遺伝子のプロモーター領域に H3K9me2 を導入することによって発現を抑制していることが明らかになった。そこで、マウスをあらかじめ LPS 等で刺激すると ATF7 が p38 キナーゼによってリン酸化され ATF7 がプロモーター領域から外れると同時に H3K9me2 が減少して自然免疫系の遺伝子の発現が誘導された。また、この活性化状態は長期間持続され、この期間の細菌感染が抑制されることが明らかになった。これまで、自然免疫系には長期記憶は無いと考えられてきたが、この現象は自然免疫系の長期記憶の存在を示唆している。

(6) マウスの雄を離乳直後に 1 ~ 2 ヶ月間低蛋白質の餌で飼育して栄養ストレスを与えると、通常の餌で飼育した場合と比較して、その子供の世代の肝臓でのコレステロール生合成系の遺伝子発現が上昇することが報告された²。この実験を追試した結果、低蛋白食で飼育したマウス雄親の子供の肝臓でのコレステロール生合成系の遺伝子 17 遺伝子中 10 遺伝子が 2 倍以上の発現上昇を示した。一方、ATF7 のヘテロ KO の雄親では、2 倍以上に発現上昇する遺伝子は無く、最高でも 1.67 倍であった。この結果から、マウスでは雄親の食べた餌の情報が精子を介して子供に伝わるメカニズムが有り、この現象に ATF7 が深く関与することが明らかになった。

< 引用文献 >

¹ T. Maekawa et al., Social isolation stress

induces ATF-7 phosphorylation and impairs silencing of the 5-HT 5B receptor gene. *EMBO J.* 29, 184-195, 2010

² BR. Carone et al., Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell.* 143, 1084-96, 2010

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. B. Liu, T. Maekawa, B. Chatton, S. Ishii, In utero TNF- α treatment induces telomere shortening in young adult mice in an ATF7-dependent manner, *FEBS Open Bio*, (査読有り) 6, 56-63, 2016
doi: 10.1002/2211-5463.12006

2. K. Yoshida, T. Maekawa, Y. Zhu, C. Renard-Guillet, B. Chatton, K. Inoue, T. Uchiyama, K. Ishibashi, T. Yamada, N. Ohno, K. Shirahige, M. Okada-Hatakeyama, S. Ishii, The transcription factor ATF7 mediates lipopolysaccharide-induced epigenetic changes in macrophages involved in innate immunological memory, *Nature Immunology*, (査読有り) 16, 1034-1043, 2015
doi: 10.1038/ni.3257

(学会発表)(計 8 件)

1. K. Yoshida, T. Maekawa, Y. Zhu, C. Renard-Guillet, B. Chatton, K. Inoue, T. Uchiyama, K. Ishibashi, T. Yamada, N. Ohno, K. Shirahige, M. Okada-Hatakeyama, S. Ishii. The transcription factor ATF7 mediates lipopolysaccharide-induced epigenetic changes in macrophages involved in innate immunological memory. RIKEN Epigenetics International Symposium, RIKEN, Wako, Saitama, 15 Feb. 2016

2. T. Maekawa, L. Binbin, K. Yoshida, S. Ishii. ATF7 mediates stress-induced telomere shortening RIKEN Epigenetics International Symposium, RIKEN, Wako, Saitama, 15 Feb. 2016

3. Binbin Liu, Toshio Maekawa Shunsuke Ishii, TNF-alpha treatment in fathers programs telomere shortening in mouse offspring, 日本分子生物学会、神戸ポートアイランド、神戸市、2015 年 12 月 1 日

4. 前川利男、Binbin Liu、吉田圭介、仲村賢一、田久保海誉、増富健吉、小池学、石川冬木、石井俊輔、転写因子 ATF7 を介したストレスによるテロメアの長さの制御、日本分子生物学会、神戸ポートアイランド、神戸市、2015 年 12 月 2 日

5. 吉田圭介、前川利男、Yujuan Zhu、Claire R. Guillet、Bruno Chatton、井上健太郎、内山健、石橋健一、山田拓司、大野尚仁、白鬚克彦、岡田眞里子、石井俊輔、ATF7 はエピジェネティック記憶を通じて、自然免疫記憶を制御する、日本分子生物学会、神戸ポートアイランド、神戸市、2015 年 12 月 4 日

6. 前川利男、Binbin Liu、吉田圭介、仲村賢一、田久保海誉、石井俊輔、転写因子 ATF7 を介したストレスによるテロメアの長さの制御、日本分子生物学会、パシフィコ横浜、横浜市、2014 年 11 月 26 日

7. 前川利男、Binbin Liu、吉田圭介、仲村賢一、田久保海誉、石井俊輔、転写因子 ATF7 を介したストレスによるテロメアの長さの制御、日本分子生物学会、神戸ポートアイランド、神戸市、2013 年 12 月 5 日

8. 前川利男、石井俊輔、ストレスによるエピゲノム変化の遺伝、日本エピジェネティクス研究会、奈良県新公会堂、奈良市、2013 年 5 月 31 日

〔その他〕

理化学研究所・石井分子遺伝学研究室・ホームページ

<http://rtcweb.rtc.riken.jp/lab/mg/mg.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前川利男 (MAEKAWA, Toshio)

国立研究開発法人理化学研究所・石井分子遺伝学研究室・研究員

研究者番号：90201764

(4) 研究協力者

Liu Binbin