

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 12 日現在

機関番号：34504

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06771

研究課題名(和文)核内受容体の転写運命決定因子の同定

研究課題名(英文)Identification of transcriptional regulators of nuclear receptors

研究代表者

宮田 将徳 (Miyata, Masanori)

関西学院大学・理工学部・助教

研究者番号：10756670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では核内受容体による複雑な転写制御機構を解明するため、核内受容体グルココルチコイド受容体 (GR) への相互作用分子の同定を試みた。プロテオーム解析のため、ChIP-MS 法および BioID 法を検討し、GRコンストラクトの発現および機能が良好であった BioID 法を採用した。BioID法により、GR と相互作用する分子をビオチン化タンパク質として検出した。タンパク質の精製効率が低く、質量分析装置を用いた新規分子の同定には至らなかったが実験手法の基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the complex transcriptional regulatory mechanism by nuclear receptors, we tried to identify interacting molecules to nuclear receptor glucocorticoid receptor (GR). For the proteome analysis, we examined ChIP-MS method and BioID method. We employ BioID method which had appropriate expression and function of the GR construct for the proteome analysis. BioID detected a molecule interacting with GR as a biotinylate protein. Although we need to improve the experimental condition to identify the interacting molecules to GR, we develop the foundation of the experiment system to gain our knowledge of transcription by GR.

研究分野：生物系薬学

キーワード：炎症 転写制御 シグナル伝達 創薬

1. 研究開始当初の背景

グルココルチコイド (GCs) は生体内ホルモンであり多種多様の生命維持活動を担う。

GCs は核内受容体グルココルチコイド受容体 (GR) を介してその機能を発揮する。GR は通常、細胞質に局在しており、GCs の結合に伴い核内へ移行し転写因子として機能する。これまでに GR による転写調節機構として転写誘導および抑制が報告されている (Busillo JM & Cidlowski JA, *Trend Endocrinol. Metab.* 2013; 24, 109-119). 転写誘導は GR が DNA 上の glucocorticoid response element (GRE) に直接結合することで開始される。一方、転写抑制機構として GR が DNA 上の negative GRE (nGRE) に直接結合すること、あるいは、GR が NF- κ B p65 および activator protein 1 (AP-1) と相互作用し NF- κ B p65 および AP-1 による転写を抑制することが報告されている (Surjit M et al, *Cell* 2011; 145, 224-241).

研究代表者は、炎症時に GCs によって発現が誘導される炎症シグナル抑制分子、Interleukin-1 β -receptor-associated kinase M (IRAK-M) を報告した。GR と NF- κ B p65 が IRAK-M プロモーター上で複合体を形成することにより、相補的に同プロモーター上への結合を促進し、転写活性を増大させていることが示唆された。GR および NF- κ B p65 は転写活動において互いに抑制的に働くことが報告されており (Luecke HF & Yamamoto KR, *Genes Dev.* 2005), どのようにして GR-p65 複合体が IRAK-M の転写を誘導しているのかは不明である。GR および p65 は翻訳後修飾により転写活性が制御されていること (Davies L, *Mol. Endocrinol.* 2008, Perkins ND, *Oncogene* 2006) から、GR-p65 が複合体を形成することにより GR および p65 各々の翻訳後修飾パターンが変化し、転写活性に影響を与えていることも推測される。あるいは、GR-p65 複合体に相互作

用する分子により、DNA polymerase II の活性が制御されている可能性がある。しかしながら、これら GCs の作用を決定する GR 複合体による転写の制御機構の詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では核内受容体 GR による転写制御機構の解明を目的とし、GR-p65 複合体への結合タンパク質の同定を試みた。

3. 研究の方法

Chromatin-interacting protein MS (ChIP-MS) 法および proximity-dependent biotin identification (BioID) 法によるプロテオーム解析を行うため、以下の二点を実施した。

- (1) GR の発現系および精製手法の構築
- (2) GR-p65 複合体のプロテオーム解析

4. 研究成果

(1) GR の発現系および精製手法の構築

ChIP-MS 法 (Wang CI et al, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013) を用いて、GR 相互作用タンパク質を同定するため、GR の C 末領域に HTB-tag (6xHis, tobacco etch virus (TEV), biotinylation target sequence) を導入した GR-HTB 発現プラスミドを作製した。しかしながら、同発現コンストラクトの細胞内発現効率が著しく低く、質量分析に適さないと判断した。ChIP-MS 法を断念し、BioID 法 (Roux KJ et al, *J. Cell. Biol.* 2012) を実施した。Gateway 法によってレンチウイルス発現コンストラクトを作製した。ビオチン付加シグナルである BirA* タグを付加した、GR-BirA* および NF- κ B p65-BirA* 発現プラスミドを HEK293 細胞に遺伝子導入し、各発現コンストラクトの発現を Western blot 法により確認した。その結果、コントロール BirA* および GR-BirA* タンパク質の発現が確認できたが、NF- κ B p65-BirA* の発現は

認められなかった. p65 と BirA* タグ間の配列および長さを調節することにより発現効率を今後増加させる予定である. 次に, GR-BirA* のビオチン化能を検討した. コントロール BirA* および GR-BirA* を遺伝子導入した HEK293 細胞にビオチン処理をし, Western Blot 法によりビオチン化タンパク質を検出した. その結果, コントロール BirA* と比較し GR-BirA* 発現細胞においてビオチン処理依存的な数種類のビオチン化タンパク質 (90, 65, 55, 45, 37 kDa) を検出した. 次に, この GR-BirA* が機能的であることを調べるために, 合成グルココルチコイドであるデキサメタゾン (DEX) 依存的な GR の核内移行を免疫蛍光染色法によって確認した. その結果, DEX 非処理時において, GR-BirA* は細胞質に局在し, DEX 処理依存的に核内移行した. ビオチン添加時において, GR-BirA* の細胞内局在は依存的に, ビオチン化タンパク質の増加が認められた. これらのことから, GR-BirA* は GR としての機能を保持していることが明らかになった. BioID 法の基盤が完成したので, コントロール- および GR-BirA* のレンチウイルスを用いて安定高発現ヒト気管支細胞 (BEAS-2B) を作製した.

(2) GR-p65 複合体のプロテオーム解析

プロテオーム解析用のサンプルを調整するために, コントロールおよび GR-BirA* 細胞に DEX および NF- κ B 活性化剤である TNF α を処理し, GR-p65 複合体が形成される 2 時間後に細胞を溶解した. 細胞溶解液中のビオチン化タンパク質を Streptavidin 磁気ビーズで精製し, 沈降物を洗浄, 脱架橋処理, 還元アルキル化およびトリプシン処理 (on-beads 消化) を行い, 上清を Zip-tip (Millipore) によって精製した. これを質量分析用サンプルとした. 質量分析機器 (LTQ Orbitrap XL EDT ion trap-orbitrap hybrid MS) を用いて質量分析を行い, Xcalibur software

およびデータベース検索ツール Mascot を用いて得られた断片化ペプチドを解析した. その結果, ribosomal protein, BirA protein, GR などのタンパク質を検出した. しかしながら, 新規なタンパク質は含まれなかったため, 条件最適化が今後の課題である.

本研究では, 核内受容体である GR の転写活性を制御する相互作用タンパク質を同定するための基盤を確立した. 本研究は GR および核内受容体の転写機構の解明に貢献するものであると考える.

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 5 件)

(1) Lee BC*, Miyata M* (*contributed equally), Lim JH, Li JD. Deubiquitinase CYLD acts as a negative regulator for bacterium NTHi-induced inflammation by suppressing K63-linked ubiquitination of MyD88. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Jan 12;113(2):E165-71. doi: 10.1073/pnas.1518615113. (査読あり)

(2) Andrews CS, Miyata M, Susuki-Miyata S, Lee BC, Komatsu K, Li JD. Nontypeable Haemophilus influenzae-Induced MyD88 Short Expression Is Regulated by Positive IKK β and CREB Pathways and Negative ERK1/2 Pathway. PLoS One. 2015 Dec 15;10(12):e0144840. doi: 10.1371/journal.pone.0144840. (査読あり)

(3) Tapadar S, Fathi S, Raji I, Omesiete W, Kornacki JR, Mwakwari SC, Miyata M, Mitsutake K, Li JD, Mrksich M, Oyelere AK. A structure-activity relationship of non-peptide macrocyclic histone deacetylase inhibitors and their anti-proliferative and anti-inflammatory activities. Bioorg Med Chem. 2015 Dec 15;23(24):7543-64. doi: 10.1016/j.bmc.2015.10.045. (査読あり)

(4) Lee JY, Komatsu K, Lee BC, Miyata M, O'Neill Bohn A, Xu H, Yan C, Li JD.

Vinpocetine inhibits Streptococcus pneumoniae-induced upregulation of mucin MUC5AC expression via induction of MKP-1 phosphatase in the pathogenesis of otitis media. J Immunol. 2015 Jun 15;194(12):5990-8. doi: 10.4049/jimmunol.1401489. (査読あり)

(5) Susuki-Miyata S*, Miyata M* (*contributed equally), Lee BC, Xu H, Kai H, Yan C, Li JD. Cross-talk between PKA-C β and p65 mediates synergistic induction of PDE4B by roflumilast and NTHi. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Apr 7;112(14):E1800-9. doi: 10.1073/pnas.1418716112. (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

(1) Miyata M, Lee BC, Lim JH, Li JD., Deubiquitinase CYLD acts as a negative regulator for bacterium NTHi-induced inflammation by suppressing K63-linked ubiquitination of MyD88., 第 89 回 生化学会 2016.9.25., 仙台国際センター (宮城県・仙台市)

(2) 宮田 将徳, 宮田(薄)聖子, 沖米田 司, Li Jian-Dong., 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 治療薬による相乗的分子制御機構の解明., 第 89 回日本薬理学会年会 2016.3.10, パシフィコ横浜 (神奈川・横浜市)

(3) Miyata M, Okiyoneda T, Li JD. Protein Profiling of Cyldromatosis (CYLD) in bacteria-Infected Mammalian Cells by MALDI-TOF Mass Spectrometry., 科学研究費補助金 新学術領域研究「ユビキチンネオバイオロジー」平成 27 年度 第 2 回 領域班会議 2015.12.16-18., 南房総富浦ロイヤルホテル (千葉県・南房総市)

(4) 宮田 将徳, 宮田(薄)聖子, 沖米田 司, Li Jian-Dong. 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の治療薬に対する生体応答機構の解明. 第 38 回分子生物学会年会・第 88 回生化学会大会合同大会 (BMB2015) 2015.12.03., 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

[図書] (計 2 件)

(1) 宮田 将徳, メディカルレビュー社, COPD 治療薬(グルココルチコイド, PDE4 阻害剤) の作用メカニズム. The LUNG perspectives 2016; Vol 24 No.3: 79-83.

(2) 宮田 将徳, 公益社団法人 日本生化学会, 抗炎症薬による細胞内シグナルフィードバックの制御. 「生化学」 ミニレビュー 2016 年 10 月刊行 88-5 号

[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

<http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~okiyoneda/okilab.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮田 将徳 (Masanori, Miyata)

関西学院大学・理工学部・助教

研究者番号：10756670

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()