

機関番号：13401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20570128
 研究課題名（和文） 有毒微量元素とレドックスシグナルによる転写調節因子 Id の活性変換
 研究課題名（英文） Changes in activity of the transcriptional regulator Id by toxic trace elements and redox signaling.
 研究代表者
 黒岡 尚徳（KUROOKA HISANORI）
 福井大学・医学部・准教授
 研究者番号：00293879

研究成果の概要（和文）：転写抑制因子 Id と他の転写因子との相互作用の制御を理解するために、本研究では、有毒微量元素であるヒ素やカドミウムによる Id3 の細胞内局在制御、そして、レドックスシグナルによる HLH タンパク質の分子間ジスルフィド結合の形成について、解析を行った。いずれもシステイン残基の関与が明らかになったが、どの残基が重要かは両者で違いがみられ、様々な制御が存在することが予想された。

研究成果の概要（英文）：To understand the regulation of interaction between the transcriptional repressor Id and other transcription factors, we analyzed the subcellular localization of Id3 regulated by toxic trace elements such as arsenite and cadmium, and the intramolecular disulfide bonds formed in the HLH proteins by redox signaling. Although the involvement of cysteine residues has been shown in both cases, they differ in which residues are important, suggesting that there are various regulations for the interaction.

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	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：Id、細胞内局在、ヒ素、ジスルフィド結合、レドックスシグナル、システイン、酸化ストレス、ホモ多量体

1. 研究開始当初の背景

哺乳類で4種類同定されている HLH (helix-loop-helix) タンパク質 Id ファミリーは、bHLH 型転写因子 (主に E タンパク質) の機能抑制因子であり、様々な細胞において分化抑制と増殖促進活性を示す。また Id は、腫瘍化細胞や種々のがん組織で、発現の亢進が報告されていることから、がん遺伝子としての性質を有していると言える。Id は bHLH

タンパク質以外にも、Ets や Pax などの転写因子に結合し、それらの機能を阻害することが示されており、Id と他の転写因子の相互作用がどのように制御されているのかを明らかにすることは、Id の生理機能を理解する上で不可欠である。

研究開始当初、Id と他の転写因子の相互作用の制御に重要であると考えられる、Id タンパク質の安定性や細胞内局在に関する新た

な知見が、相次いで報告された。Id タンパク質は半減期が非常に短く、細胞中で不安定であり、腫瘍化細胞や、がん組織における発現亢進と、Id タンパク質安定性の制御異常との関連が予想された。また研究代表者は、細胞内で Id1 と Id2 が、核と細胞質の間を自律的に行き来する nucleo-cytoplasmic shuttling 活性を持つことを初めて見出し、Id の活性が従来考えられていたよりもダイナミックに変動しうることを明らかにした。このように Id と他の転写因子との相互作用は、タンパク質の安定性や細胞内局在といった Id 分子の活性変換によって、時間的・空間的に制御されており、どのようにその活性変換が生じるかということが、次の大きな研究課題と考えられた。

2. 研究の目的

研究代表者は Id の活性制御機構を調べていく過程で、Id3 の細胞内局在が、代表的な有毒微量元素であるヒ素やカドミウム処理によって変動する（細胞質に集積する）ことを見出した（図1）。また、Id は *in vitro* において、非還元状態で、ジスルフィド結合を介してホモ二量体を形成することが示されている。さらに、E タンパク質も *in vitro* において、非還元状態で、ジスルフィド結合を介してホモ二量体を形成することが報告されている。これらのことは、有毒微量元素やタンパク質の酸化還元反応に基づくレドックスシグナルによって、Id 分子の様々な活性が制御されることを示唆しており、本研究は以下の2つの点を明らかにすることを目的として行うこととした。

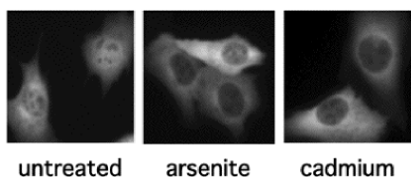


図1 NIH3T3細胞におけるGFP-Id3の細胞内局在

(1) 有毒微量元素によって転写調節因子 Id3 の活性がどのように変換されるのか

Id3 は、Id1 と類似の nuclear export signal (NES) 配列を HLH 領域の後半部分に持つが、Id1 とは異なり、通常は nucleo-cytoplasmic shuttling 活性を示さない。どのようにしてヒ素やカドミウムが、不活性状態にある Id3 の潜在的な nucleo-cytoplasmic shuttling 活性を表出させるのか、その詳しい分子機構を明らかにする。

(2) レドックスシグナルによって転写調節因子 Id の活性がどのように変換されるのか

レドックスシグナルによる、Id のホモ二量体形成の分子基盤を明らかにする。またレドックスシグナルによる、ホモ二量体形成以外の Id の活性変換について検討する。特に、E タンパク質とのヘテロ二量体形成におけるレドックスシグナルの関与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 有毒微量元素による転写調節因子 Id3 の活性変換

GFP と Id3 の融合タンパク (GFP-Id3) 質をマウスの線維芽細胞 NIH3T3 で一過性に発現させた後、有毒微量元素であるヒ素やカドミウムを培養液に直接添加し、その効果を蛍光顕微鏡下で観察した。まず初めに Id3 の変異体を作成し、ヒ素やカドミウムによる局在の変化に重要な領域、及びアミノ酸残基を決定した。またヒ素やカドミウムの効果が、リン酸化酵素などの活性化によるものかどうか検討した。さらに GFP-Id3 タンパク質の局在を変化させる、他の有毒微量元素や化合物についても調べた。そして、ヒ素やカドミウムが Id3 の転写調節機能に及ぼす影響について解析を行った。

(2) レドックスシグナルによる転写調節因子 Id の活性変換

各 Id タンパク質、或いは E タンパク質を HEK293T 細胞で一過性に発現させ、細胞回収後、全細胞粗抽出液を調整し、還元剤 (β -メルカプトエタノール) 非存在下で SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ニトロセルロース膜に転写後、ウエスタンブロットを行った。その際、還元剤存在下で電気泳動を行ったサンプルと比較することにより、ジスルフィド結合が形成されたかどうか判定した。ジスルフィド結合の形成が確認された場合、それぞれのタンパク質の変異体を作成し、ジスルフィド結合の形成に重要な領域やアミノ酸残基を決定した。また形成されたジスルフィド結合が、Id や E タンパク質の転写調節機能に及ぼす影響について検討した。

4. 研究成果

(1) 有毒微量元素による転写調節因子 Id3 の活性変換

① 有毒微量元素の中でもヒ素やカドミウムは、近接する複数のシステイン残基に強い親和性を持つことが示されている。Id3 には進化上高度に保存された5つのシステイン残基があることから、それぞれ変異体を作成し、ヒ素やカドミウムによる効果が、Id3 のシステイン残基を介して起きている可能性について検討した。その結果、N 末端領域の 10, 15, 16 番目のシステイン変異体では、ヒ素

による GFP-Id3 タンパク質の細胞質への集積が認められなかった (図 2)。一方で、47,118 番目のシステイン変異体は、野生型タンパク質と同じように、ヒ素による細胞質への集積が観察された。

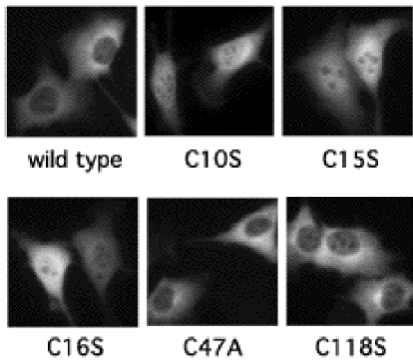


図 2 ヒ素による GFP-Id3 の細胞内局在に変化におけるシステイン残基の重要性

② 有毒微量元素であるヒ素やカドミウムは、p38MAP キナーゼや JNK のようなストレス反応性のタンパク質リン酸化酵素を活性化することが知られている。そこで、やはりこれらの酵素を活性化することがわかっているアノマイシンで細胞を処理したが、GFP-Id3 タンパク質の細胞内局在に変動は認められなかった。また ERK, p38MAP キナーゼ、JNK に対する特異的阻害剤を用いた場合も、ヒ素やカドミウムによる GFP-Id3 タンパク質の細胞質への集積は阻害されなかった。さらにシステイン残基に親和性を持たない亜鉛、鉄、銅、コバルト、ニッケルなどの金属は、GFP-Id3 タンパク質の細胞内局在を変動させなかった。これらのことは ① の結果と併せて、ヒ素やカドミウムが Id3 タンパク質 N 末端領域の近接する 3 つのシステイン残基に直接結合することにより、GFP-Id3 タンパク質を細胞質に集積させることを強く示唆している。また変異体を用いた解析から、Id3 N 末端のシステイン残基を含む領域自身が NES 配列として機能するのではなく、HLH 領域の後半部分にあり、通常は不活性な NES 配列が、ヒ素の結合に伴って生じる立体構造の変化などによって間接的に活性化され、GFP-Id3 タンパク質が細胞質へ集積することが推測された。ヒ素やカドミウムが、タンパク質に直接結合し、その機能を変換する例は、まだあまり報告されておらず、本研究によって得られた成果は、毒性研究の分野に少なからず貢献するものと期待される。

③ ヒ素やカドミウムは、ストレス反応性のタンパク質リン酸化酵素を活性化し、c-Fos や Egr1 などの初期応答遺伝子の発現を有意に上昇させる。その際に、Ets 型転写因子が重要な働きをすることがわかっているが、Id

は Ets 型転写因子に結合し、その機能を阻害することから、Id3 の転写抑制機能に対するヒ素やカドミウムの効果についてレポーターアッセイを用いて解析を行った。その結果、Id3 N 末端領域のシステイン変異体は、ヒ素やカドミウムによる c-Fos や Egr1 の遺伝子発現を、野生型に比べて、より強く抑制することが判明した。これらの変異体は、ヒ素やカドミウムで処理しても細胞内局在が変動しないことから、核内の Ets 型転写因子に対する抑制効果が強いことが推測される。今後は Id3 ノックアウトマウスを用いて、ヒ素やカドミウム感受性に関する解析を行い、個体レベルで Id3 の生理機能を明らかにしていく予定である。

(2) レドックスシグナルによる転写調節因子 Id の活性変換

① 細胞内のレドックスシグナルを活性化させるために、それぞれの Id タンパク質を一過性に発現させた細胞を過酸化水素水で処理した。その結果、Id1 と Id3 タンパク質は、細胞内でジスルフィド結合を介してホモ二量体～多量体を形成することが判明した。一方で Id2 タンパク質は、ホモ二量体～多量体を殆ど形成しないことがわかった (図 3)。特に、Id3 タンパク質のホモ二量体～多量体形成は、低い過酸化水素水濃度、かつ短時間で生じることから、生理的に何らかの役割を担っていることが予想される。また Id1 と Id3 は、Id2 と異なり、N 末端領域にシステイン残基を含むことから、各システイン変異体を作成し、それらのホモ二量体～多量体形成能を調べたところ、予想に反し、Id ファミリー間で保存された HLH 領域前半部分と C 末端領域にあるものを含めた、すべてのシステイン残基の関与が明らかになった。In vitro では、HLH 領域前半部分のシステイン残基が、ホモ二量体形成に重要であること、そしていずれの Id もホモ多量体は形成されないことから、細胞内では、別のレドックス制御が行われていると考えられる。

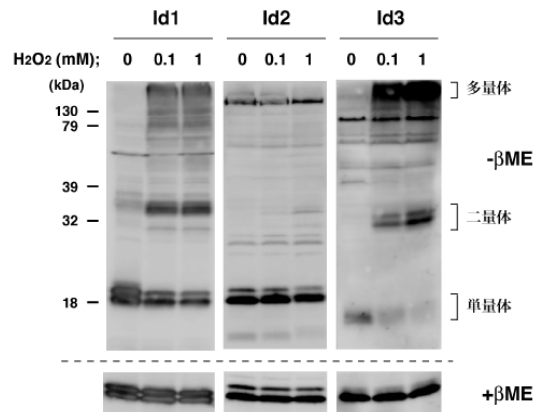


図 3 過酸化水素水処理による Id のホモ二量体～多量体形成

② Id は E タンパク質の機能抑制因子であるが、その機序は HLH 領域を介した不活性なヘテロ二量体形成であることから、レドックスシグナルの影響について調べた。その結果、過酸化水素水処理によって、Id/E タンパク質間にジスルフィド結合が形成され、これは、ホモ二量体ー多量体間のジスルフィド結合に優先して形成されることが明らかになった。そして、ヘテロ二量体間のジスルフィド結合の形成には、Id ファミリー間で保存された C 末端領域のシステイン残基が重要であることが判明した。一方、*in vitro* でホモ二量体間のジスルフィド結合に重要とされる HLH 領域前半部分のシステイン残基は、細胞内におけるヘテロ二量体間のジスルフィド結合形成には関与しないことが判明した。E タンパク質の場合も、Id と同様に、C 末端領域のシステイン残基が重要であり、HLH 領域前半部分のシステイン残基は、ヘテロ二量体間のジスルフィド結合形成には関与しないことがわかった。また、ヘテロ二量体間のジスルフィド結合は、短時間で消失するのに対し、ホモ多量体間のジスルフィド結合は、比較的長時間持続すること、さらに、ヘテロ二量体間の結合の強さは、ジスルフィド結合の有無で変わらないのに対し、ホモ多量体はジスルフィド結合により安定化することが明らかになった。これらのことは、酸化ストレスによって引き起こされるレドックスシグナルが、Id と E タンパク質のヘテロ二量体形成を制御しているというよりも、Id のホモ二量体ー多量体形成を促進することにより、新たな機能を付与する可能性を示唆している。研究代表者は最近、Id が、過酸化水素水処理依存的に、酸化ストレスに応答する、bHLH 型転写因子以外の転写因子に結合することを見出していることから、ストレス応答における Id の積極的な関与が予想される。

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 2 件)

- ① Nakahiro, T., Kurooka, H., Mori, K., Sano, K., and Yokota, Y. Identification of BMP-responsive elements in the mouse Id2 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有、第 399 巻、2010、416-421.
- ② Hosono, N., Kishi, S., Iho, S., Urasaki, Y., Yoshida, A., Kurooka, H., Yokota, Y., and Ueda, T. Glutathione

S-transferase M1 inhibits dexamethasone-induced apoptosis in association with the suppression of Bim through dual mechanisms in a lymphoblastic leukemia cell line. *Cancer Sci.*, 査読有、第 101 巻、2010、767-773.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 黒岡尚徳、横田義史「酸化ストレスにより形成される HLH タンパク質の分子間ジスルフィド結合」第 33 回日本分子生物学会年会/第 83 回日本生化学会大会合同大会、2010 年 12 月 7 日、神戸
- ② 中廣剛士、黒岡尚徳、佐野和生、横田義史「BMP シグナルによる転写調節因子 Id2 の遺伝子発現制御機構」日本生化学会北陸支部第 27 回大会、2009 年 5 月 23 日、福井
- ③ 中廣剛士、黒岡尚徳、佐野和生、横田義史「BMP シグナルによる転写調節因子 Id2 の遺伝子発現機構の解析」第 31 回日本分子生物学会年会/第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月 11 日、神戸

[その他]

ホームページ等

<http://www1.fukui-med.ac.jp/SEIKAI/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒岡 尚徳 (KUROOKA HISANORI)
福井大学・医学部・准教授
研究者番号：00293879

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

菅井 学 (SUGAI MANABU)
京都大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・講師
研究者番号：90303891

(4) 研究協力者

松井 幸恵 (MATSUI YUKIE)
福井大学・医学部・技術補佐員