

平成23年 5月28日現在

機関番号： 82401
 研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2008～2010
 課題番号： 20590294
 研究課題名(和文)
 ノックアウトマウスを用いたATF2遺伝子ファミリーの機能解析
 研究課題名(英文) Functional analyses of transcription factors of ATF-2 gene family members by using knockout mouse
 研究代表者
 前川 利男 (MAEKAWA TOSHIO)
 独立行政法人理化学研究所・石井分子遺伝学研究室・副主任研究員
 研究者番号： 90201764

研究成果の概要(和文)：

ストレスで活性化される転写因子 ATF-2 遺伝子ファミリーメンバーのノックアウトマウスを用いて、ATF-2 と ATF-7 及び CRE-BPa の生理学的な役割を解析した。その結果、ATF-2 は中枢神経やマクロファージの発生・分化に関与しており、また、ATF-2 と CRE-BPa は脂肪細胞の分化にも関係していることが明らかになった。一方、ATF-7 は脳幹の背側縫線核においてセロトニン受容体の発現を抑制しており、この遺伝子が欠損するとセロトニンが欠乏して行動異常を起こすことがわかった。

研究成果の概要(英文)：

By the analyses of knockout mice of the ATF-2 gene family members, I have analyzed the physiological functions of ATF-2 gene family members. I have found that ATF-2 contribute to the developments of central nervous systems and macrophages. ATF-2 and CRE-BPa also contribute to the differentiations to the adipose tissue. On the other hand, ATF-7 represses the transcription of serotonin receptor 5b in the dorsal raphe nucleus in the brain stem. By the depletion of ATF-7, serotonin concentration was reduced and mouse showed abnormal behaviors.

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	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：ATF-2、ATF-7、ストレス、転写制御、エピジェネティクス、肥満、行動異常、セロトニン

1. 研究開始当初の背景

転写因子 ATF-2 は 1989 年に私が発見した

転写因子で、CRE と呼ばれる配列に結合して転写を調節する。特徴的な構造として、N 端側にメタ

ルフィンガー構造とC端側にB-Zip構造を持ち、CRE-BPaやATF-7と共に遺伝子ファミリーを形成している。ATF-7とCRE-BPaは主に転写を正に制御するのに対して、ATF-7は主に負に制御することが分かっている。

これまで、*in vitro*の培養細胞を用いた実験系を中心にして、ATF-2遺伝子ファミリーメンバーはストレスで活性化されたp38やJNKで直接リン酸化されて活性化され、アポトーシスを誘導することが分かってきた。しかし、生体内でどのような生理現象に関与しているのか、詳しくは分かっていなかった。

私はATF-2ファミリーメンバーの*in vivo*での生理的な役割を理解するために、これまでそれぞれのメンバーの遺伝子欠損マウスを作製して解析してきた。その結果ATF-2遺伝子ホモ欠損マウスは胎便吸引症で出生後数分で死亡した(Maekawa et al, 1999)。一方、ヘテロ欠損マウスは雌で生後一年以上経過すると高頻度で乳癌の発症が見られた(Maekawa et al, 2007)。CRE-BPa遺伝子のホモ欠損マウスも肺の形成不全で出生後死亡するが、ATF-7遺伝子欠損マウスは体が10%程度小さく成る程度で、一見正常に見えることが分かってきた。

2. 研究の目的

ATF-2ファミリーメンバーの遺伝子欠損マウスを作製・解析して、マウス個体での個々のメンバーの生理的な役割を理解することが研究の目的である。具体的には、

(1) *Atf-2^{+/+}Cre-bpa^{+/+}*のダブルヘテロ欠損マウスを飼育していると、加齢しても肥満化しにくい傾向があることが観察された。①そこでMEFを用いて*in vitro*で脂肪細胞への分化実験を行った。その結果、ATF-2とCRE-BPaがPPAR γ 2とC/EBP α の発現に関与する事が分かってきたので、そのメカニズムを明らかにする。

②また、ATF-2ファミリーの上流で働くp38の阻害剤をマウスに直接投与すると体重の増加が40%以上抑制されることが明らかになった。そこで、脂肪細胞の分化とp38-ATF-2経路の関連を解析してATF-2ファミリーの新たな役割を解明すると同時に肥満の予防に役立つ薬剤の開発を行う。

(2) ATF-7遺伝子欠損マウスで様々な行動実験を行った結果、セロトニンに係る行動異常が見られた。DNAマイクロアレイを用いて発現に差のある遺伝子を解析すると、脳幹部の背側縫線核でのセロトニンレセプター5b(5Htr5b)の過剰発現が原因である事が明らかに成った。そこで、①p38-ATF-7の経路がどのようなメカニズムで5Htr5bの発現制御を行い、行動異常に繋がるのかそのメカニズムを明らかにする。ATF-7はmAMを介してヒストンメチル化酵素SETDB1をリクルートする事が出来るので、特にヒストンの

メチル化との関連を明らかにする。

②野生型マウスに様々なストレスを与えた結果、離乳直後のマウスを一ヶ月間個別に飼育する分離ストレスを与えるとATF-7遺伝子欠損マウスで見られる行動異常が部分的に再現できることが分かった。そこで、このように長期の慢性的なストレスをかけたマウスでの5Htr5bの発現とヒストンのメチル化との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ATF-2とCRE-BPaがどのように肥満に関与するのか、①先ず*Atf-2^{+/+}Cre-bpa^{+/+}*ダブルヘテロ欠損マウスの脂肪を含めた各組織の重さを比較する。脂肪の付き方や量に関してはCTスキャナーを用いて詳細に解析する。

②次に、インシュリンやグルコースに対する感受性を調べる。

③この時、肥満に係るアディポカイン等の血中濃度と同時に脂肪酸やコレステロールの濃度も測定して、野生型マウスとの違いを比較する。

野生型マウスに高脂肪食を投与する時に、ATF-2とCRE-BPaの上流で働くp38の阻害剤を同時に経口投与すると体重の増加が顕著に抑制されることが予備実験で分かっている。そこで、

④p38阻害剤を経口投与したマウスを用いて、ダブルヘテロ欠損マウスと同じく、脂肪の付き方や量をCTスキャナーで測定する。

⑤また、インシュリンやグルコースに対する感受性、アディポカインや脂肪酸およびコレステロールの血中濃度も同様に調べる。

⑥次にPPAR γ 2とC/EBP α のプロモーターを用いて*in vitro*のレポーターアッセイ系でATF-2やCRE-BPa、ATF-7によってこれらの遺伝子が直接どのようなメカニズムで転写が活性化されるのかを検討する。

⑦また、脂肪細胞に分化するときにシグナル伝達系の上流で働く想定されるBMPやp38がどのようにATF-2遺伝子ファミリーの転写制御に関わっているのかについても検討する。

⑧代謝には様々な酵素が関与するが、代表的な律即酵素の発現をリアルタイムRT-PCR法で肝臓や筋肉、及び脂肪で測定して、これらがp38の経路に係っていないことを確かめる。

⑨また、*Atf-2^{-/-}Cre-bpa^{-/-}*のMEFが脂肪細胞への分化能が低い事が分かっている。そこで、DNAマイクロアレイを用いて脂肪分化誘導時に野生型と*Atf-2^{-/-}Cre-bpa^{-/-}*のMEFでの発現量に差のある遺伝子を探索し、脂肪分化に関与する新規の遺伝子をスクリーニングする。

(2) ①ATF-7遺伝子欠損マウスを用いて、脳幹部のどの部分で5Htr5bの過剰発現が見られるのか、*in situ*ハイブリダイゼーション法で確かめる。

②離乳直後のマウスを集団から隔離して、一ヶ月間個別に飼育して分離ストレスを与えると、ATF-7遺伝子欠損マウスと良く似た行動異常が見られるが、この時もまた、5Htr5bの過剰発現が見られるのか、*in situ*ハイブリダイゼーション法で確かめる。

③分離ストレスを与えたマウスを用いて、脳幹部の背側縫線核でATF-2とATF-7のリン酸化がどのように変化するかを免疫染色法とウェスタンブロッティング法で調べる。

④また、その時の5Htr5b遺伝子の転写制御領域のATF-2とATF-7の結合の変化とヒストンH3K9のトリメチル化の変化をクロマチンIP法で調べる。

変化が確認できれば個別飼育の期間や回数を増加させて5Htr5b遺伝子の転写とATF-2とATF-7の結合の変化及びヒストンH3K9のトリメチル化の関連を詳細に調べる。

⑤また、ATF7ノックアウトマウスの背側縫線核でのセロトニンの濃度を測定して5Htr5bのオートレセプターとしての機能も確認する。

(3) ATF-2とATF-7の脂肪細胞及び脳・神経系でのそれぞれの生理的な役割を理解するために *in vitro* と *in vivo* の両面からATF-2及びATF-7の複合体を精製して、構成するタンパク質のプロテオーム解析を行う。

①具体的にはFlagタグとHAタグを付けたATF-2及びATF-7をHeLa細胞やマウス個体で発現させて、Flag抗体とHA抗体を用いてATF-2及びATF-7の複合体を精製する。複合体に含まれる蛋白質をMAS解析して、新規の遺伝子が見つかればその生理的な役割を明らかにする。

4. 研究成果

私達はこれまでATF-2ファミリーメンバーの *in vivo* での生理的な役割を理解するためにそれぞれの遺伝子欠損マウスを作製して解析してきた。本研究において以下の事を明らかにした。

(1) *Atf-2^{-/-}Cre-bpa^{+/-}* のダブルヘテロ欠損マウスはやせ形の表現系を示した。先ず、各臓器の重さを比較した結果、内臓脂肪と皮下脂肪の割合が野生型に比べて *Atf-2^{-/-}Cre-bpa^{+/-}* のダブルヘテロ欠損マウスで有意に減少していることが明らかになった(図1)。褐色脂肪の割合に有意差は見られなかった。



図1 脂肪組織の減少

また、マウスのインシュリンやグルコースに対する感受性も有意に改善していた。

そこでMEFを用いて *in vitro* で脂肪細胞への分化実験を行い、野生型と *Atf-2^{-/-}Cre-bpa^{+/-}* のMEFで経時的に発現している遺伝子を解析した。その結果、*Atf-2^{-/-}Cre-bpa^{+/-}* のMEFでPPAR γ 2の発現が

野生型と比較して大きく低下していることが分かった。MEFを用いたレポーターアッセイを行い、PPAR γ 2遺伝子の転写制御メカニズムを詳しく解析した結果、ATF-2とCRE-BPaがPPAR γ 2のCREに結合してBMP依存的に発現を促進している事が明らかになった。

次に、ATF-2ファミリー遺伝子上流で働くp38の活性阻害剤をマウスに直接経口投与して、その効果を調べた。その結果、高脂肪食を投与した野生型マウスにおいて、p38の活性阻害剤を経口投与した群では体重の増加が40%以上抑制されることが明らかになった。CTスキャナーを用いて脂肪の蓄積を画像解析した結果、この時、内臓脂肪と皮下脂肪の割合が有意に大きく低下しており、マウスのインシュリンやグルコースに対する感受性も有意に上昇していた(図2)。

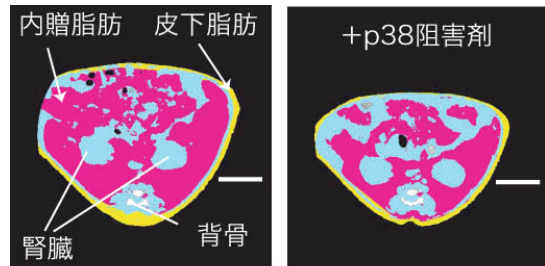


図2 p38阻害剤による脂肪組織の減少

また、脂肪組織におけるマクロファージの浸潤の程度やTNF α 、レプチン、遊離脂肪酸、コレステロールの血中濃度もp38阻害剤の投与によって大きく低下した。以上の事から脂肪細胞の分化にはp38-ATF-2+CRE-BPa経路が関与する事が明らかに成った。また、p38の活性阻害剤は抗肥満薬として機能することが分かり、これまで副作用も全く認められていない。

またこの時、代謝に関係する重要な遺伝子の発現が *Atf-2^{-/-}Cre-bpa^{+/-}* のダブルヘテロ欠損マウスで有意に変化していないかどうかを確認した。グルコース代謝やTCAサイクル、コレステロール合成、エネルギー消費等に関する合計14種類の酵素の発現を野生型と *Atf-2^{-/-}Cre-bpa^{+/-}* のダブルヘテロ欠損マウスの脂肪、肝臓、筋肉で比較したが、有意な差は認められなかった。24時間の酸素消費量を測定した結果、*Atf-2^{-/-}Cre-bpa^{+/-}* のダブルヘテロ欠損マウスで野生型と比較して有意な増加が認められた。

肥満は現在先進国で大きな社会問題になっているが、有効な治療薬が無いのが現状である。本研究の結果、p38阻害剤が肥満予防薬として役立つ可能性を示すことができた。

(2) 様々な行動実験を行った結果、ATF-7遺伝子欠損マウスは音に対する驚愕実験とPPI及びビー玉隠し実験で異常を示した。これらは、いずれもセロトニンに関係する行動異常であった。そこで、セロトニン神経の中核である脳幹部で発現している遺伝子を野生型とATF-7遺伝子欠損マウスでマイクロアレイを用いて比較した。その結果、5Htr5bの過剰発現が明らかになった。 *in situ* ハイブリダ

イゼーション法を用いて、脳幹部のどの領域で 5Htr5b の過剰発現が起こっているのかを確かめた結果、背側縫線核での過剰発現が原因である事が明らかに成った (図3)。

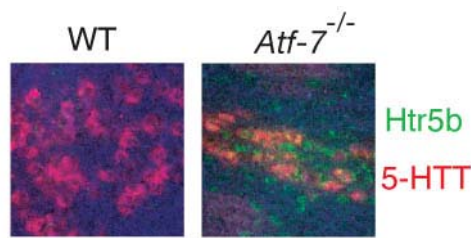


図3 背側縫線核でのHtr5bの発現

次に、p38-ATF-7 の経路がどのようなメカニズムで 5Htr5b の発現制御を行い、行動異常に繋がるのかそのメカニズムを解析した。まず、ゲルシフトアッセイ法で ATF-7 が 5Htr5b 遺伝子のどの領域に結合するのかを調べた結果、転写開始点上流域に CRE 配列に良く似た 3ヶ所の結合領域が見つかった。

縫線核由来の神経細胞 RN46A を用いてレポーターアッセイを行った結果、ATF-7 は 5Htr5b 遺伝子の転写開始点上流に結合して転写を抑制していることが明らかになった。さらにこのことを確かめるために、ATF-7 の結合部位 3ヶ所に変異を導入して ATF-7 が結合できない配列に変えると ATF-7 による転写の抑制は解除された。

また、ATF-7 は mAM を介してヒストンメチル化酵素 SETDB1 をリクルートしている事を免疫共沈実験で確かめた。

以上の結果とクロマチン IP 法で得られた結果から、ATF-7 遺伝子欠損マウスでは転写制御領域で SETDB1 をリクルートできず、ヒストン H3K9 のメチル化が低下する事から 5Htr5b の発現の亢進が起こる事が明らかに成った。5Htr5b はセロトニンのオートレセプターとして機能することが示唆されており、過剰発現によって放出されたセロトニンが素早く再吸収されるために、セロトニン濃度の低下を招いて行動異常を起こすと予想される。

野生型マウスに隔離ストレスを与えると、背側縫線核での 5Htr5b の過剰発現が起こり、ATF-7 遺伝子欠損マウスと同様の行動異常が見られた (図4)。

グループ飼育 個別飼育

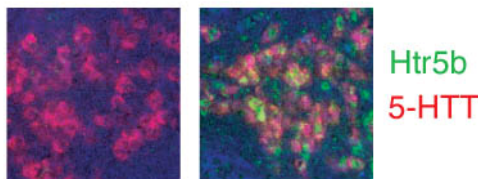


図4 背側縫線核でのHtr5bの発現

この時、脳幹部での ATF-2 と ATF-7 の活性化ドメインのリン酸化が顕著に亢進している

ことが確かめられたが、ATF-7 のリン酸化がより顕著に亢進していた。また、クロマチン IP の実験結果から、リン酸化された ATF-7 は 5Htr5b 遺伝子の転写制御領域から遊離することが明らかになった。

隔離ストレスを与えたマウスはヒトの引き籠りに似た性質を示すことが多い。今回の実験結果から、ATF-7 の活性化を未然に防ぐ事ができれば、神経症の発症を抑制する事ができると考えられ、ATF-7 を活性化する生理学的なストレスの解明とその阻害剤の探索が注目される。

(3) Flag と HA タグを付けた ATF-2 を HeLa 細胞で発現させ、核抽出液を Flag と HA 抗体を用いて精製し、MAS 解析を行った。その結果、Rb 結合蛋白質と HDAC1 が ATF-2 と特異的に相互作用することが明らかになった。

これらの相互作用の意味をマクロファージを用いて探った。マクロファージを LPS や CpG で刺激すると ATF-2 の Ser71 がリン酸化されて活性化された。LPS で誘導される遺伝子群を詳細に調べた結果、Socs-3 の発現誘導が ATF-2 のノックダウンによって顕著に阻害されることが明らかになった。

RAW264.7 細胞を用いたレポーターアッセイで LPS 刺激によって ATF-7 がリン酸化され、HDAC1 が ATF-2 と相互作用し、Socs-3 の発現を誘導することが明らかになった。

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6件)

①前川利男、石井俊輔：ATF-7 を介したストレスによるエピジェネティック変化 実験医学 エピジェネティクスと疾患 28 (15): 169-175 (2010) 査読なし

②*Maekawa T, Jin W, & *Ishii S. The role of ATF-2 family transcription factor in adipocyte differentiation :Antiobesity effects of p38 inhibitors. Mol. Cell. Biol. 30, 613-625 (2010) 査読有り

③*Maekawa T, Kim S-J, Nakai D, Makino C, Takagi T, Orura H, Yamada K, Chatton B & *Ishii S. Social isolation stress induces ATF-7 phosphorylation and impairs silencing of the 5-HT 5B receptor gene. *EMBO J.* 29, 184-195 (2010) 査読有り

④ Hirose N, Maekawa T, Shinagawa T & *Ishii S. ATF-2 regulates lipopolysaccharide-induced transcription in macrophage cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 385, 72-77 (2009) 査読有り

⑤ *Maekawa T, Sano Y, Shinagawa T, Sakuma T,

Nomura S, Licht JD & *Ishii S. ATF-2 controls transcription of Maspin and GADD45a genes independently from p53 to suppress mammary tumors. *Oncogene* 27, 1045-1054 (2008).

査読有り

⑥ Kojima M, Suzuki T, Maekawa T, Ishii S, Sumi-Ichinose C, Nomura T & *Ichinose H. Increased expression of tyrosine hydroxylase and anomalous neurites in catecholaminergic neurons of ATF-2 null mice. *J. Neurosci. Res.* 86. 544-552 (2008). 査読有り

〔学会発表〕(計6件)

① 前川利男、他6名、ATF-7 依存的なヒストンH3 メチル化を介したストレスによる転写制御、日本分子生物学会、2010年12月8日、神戸市

② S. Ishii, K. Seong, H. Shimizu, D. Li, T. Maekawa, Stress-induced epigenetic regulation via ATF-2 family transcription factors、日本分子生物学会、2010年12月8日、神戸市

③ T. Maekawa et al.、Social isolation stress induces ATF-7 phosphorylation and impairs silencing of the 5-HT 5B receptor gene、日本分子生物学会、2009年12月12日、横浜市

④ T. Maekawa, S. Ishii、Social isolation stress induces ATF-7 phosphorylation and impairs silencing of the 5-HT 5B receptor gene、The 24 Naito Conference on Nuclear Dynamics、Sapporo、Japan、25、June、2009

⑤ 前川利男、他6名、ATF-7 依存的、ヒストンH3 メチル化を介したストレスによる転写制御、日本分子生物学会、2008年12月10日、神戸市

⑥ T. Maekawa, S. Ishii、Role of ATF-2 family of transcription factors in adipocyte differentiation: anti-obesity effect of p38 inhibitor、The 21 Naito Conference on Nuclear Dynamics and RNA I、Yamanashi、Japan 26、June、2008

〔その他〕

ホームページ等

[http://rtcweb.rtc.](http://rtcweb.rtc.riken.jp/lab/mg/mg.html)

[riken.jp/lab/mg/mg.html](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)

独立行政法人理化学研究所・石井分子遺伝学研究室・副主任研究員

90201764

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし