

機関番号：27102

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592179

研究課題名 (和文) NF- $\kappa$ B, p65 のリン酸化の生理的および炎症反応における役割研究課題名 (英文) The role of phosphorylated NF- $\kappa$ B, p65 subunit on physiological and inflammatory responses

研究代表者 松尾 拓 (KOU MATSUO)

九州歯科大学・歯学部・歯学科・准教授

研究者番号：70238971

## 研究成果の概要 (和文)：

転写因子 NF- $\kappa$ B は免疫応答や炎症反応における炎症性サイトカイン、接着分子や抗細胞死分子などの様々な生命現象に関わる遺伝子の発現を調節する。NF- $\kappa$ B は無刺激状態では抑制分子 I $\kappa$ B との複合体として細胞質中に留まっている。しかし、炎症性サイトカインなどの刺激を受けると、I $\kappa$ B キナーゼによって I $\kappa$ B がリン酸化され、さらに分解される結果、NF- $\kappa$ B が遊離され、核へ移行し、標的遺伝子のプロモーターに結合することで、標的遺伝子の発現を調節する。しかしながら、幾つかの研究グループから I $\kappa$ B のリン酸化と分解の他に NF- $\kappa$ B の主要なサブユニットである p65 のリン酸化が NF- $\kappa$ B 依存性の遺伝子の転写活性を調節することが報告されている。幾つかのキナーゼによる p65 のリン酸化部位が複数同定されている。これらのリン酸化部位は NF- $\kappa$ B の転写活性を調節するが、各リン酸化部位の役割についてはよくわかっていない。

複数のリン酸化部位のうち、276 番目および 536 番目 (マウスでは 534 番目) のセリン残基のリン酸化が重要であるという報告が蓄積している。我々は 276 番目および 534 番目のセリン残基の生理学および炎症反応における役割を解明するために 276 番目および 534 番目のセリン残基をアラニンに置換したノックインマウス (S276A および S534A マウス) を作製した。これまでの細胞を用いた実験結果より S276A マウスは NF- $\kappa$ B の転写活性が著しく低下することから、p65 欠損マウス同様に胎生致死になることが予想されたが、胎生期の様々な時期に致死となり、その表現型も多様であった。この多様な表現型は 276 番目のセリン残基をアラニンに置換することで転写抑制因子であるヒストン脱アセチル化酵素が引き寄せられ、NF- $\kappa$ B 結合部位近辺の遺伝子の発現を負に制御するエピジェネティックな作用であると考えられた。また S534A マウスは野生型マウスと同様に成長するが、野生型マウスと比較して体重増加と皮下脂肪の増加が認められた。

さらに 276 番目のセリン残基のリン酸化を模倣する目的で 276 番目のセリン残基をアスパラギン酸に置換した S276D ノックインマウスを作製した。S276D マウスは生後すぐに成長障害がおこり、全身で炎症症状が現れ、生後 8～20 日で死亡した。そこで I 型 TNF 受容体欠損マウスと交配すると全身性の炎症症状は改善されたが、「ドライアイ」などの局所的な炎症症状は改善されなかった。これらの結果より、S276D マウスは全身性および局所性炎症疾患における NF- $\kappa$ B の役割を明らかにできるモデルであると考えられた。

## 研究成果の概要 (英文)

The transcription factor NF- $\kappa$ B regulates the expression of a wide range of genes, including various proinflammatory cytokines, cell adhesion proteins, and several anti-apoptotic molecules that together play pivotal roles in almost all aspects of immune and inflammatory responses. In resting cells, NF- $\kappa$ B associates with members of the inhibitory family of I $\kappa$ B proteins, resulting in retention of these complexes in the cytoplasm. Following appropriate stimulation, I $\kappa$ B proteins are phosphorylated on two specific NH<sub>2</sub>-terminal serine residues by one of the catalytic subunits of the I $\kappa$ B kinase (IKK). Phosphorylated I $\kappa$ Bs are subsequently ubiquitinated and degraded by the proteasome, leaving NF- $\kappa$ B free to translocate to the nucleus, where it binds to cognate enhancer/promoter elements in its cohort of target genes. However, we and others have shown that, besides the regulated degradation of I $\kappa$ Bs, phosphorylation of nuclear NF- $\kappa$ B p65 is also an obligatory step for efficient transcription of NF- $\kappa$ B-dependent genes. Several different protein kinases and putative sites of phosphorylation on p65 have been identified, and, in general, it is believed that these phosphorylation events occur

concomitantly with IKK-mediated phosphorylation of IκB proteins. We suggest that this additional step in the NF-κB activation pathway helps ensure that only NF-κB that enters the nucleus from the cytoplasm in response to appropriate inducing signals is able to trigger gene expression.

To address the biological importance of the putative sites of phosphorylation on p65, Ser 276 and Ser 534, we generated knock-in mice expressing a serine-to-alanine mutation. Instead of the expected embryonic lethality from hepatocyte apoptosis seen in the absence of NF-κB activity, the S276A knock-in embryos die at different embryonic days due to variegated developmental abnormalities. We demonstrate that this variegated phenotype is due to epigenetic repression resulting from the recruitment of histone deacetylases by the nonphosphorylatable form of NF-κB into the vicinity of genes positioned fortuitously near NF-κB-binding sites. Therefore, unphosphorylated nuclear NF-κB can affect expression of genes not normally regulated by NF-κB through epigenetic mechanisms. On the other hand, S534A knock-in mice demonstrated normal development with slight increasing body weight. Consistent with these results, we observed increased subcutaneous fat in S534A mice compared with control littermate.

To further determine whether changing the Ser 276 to a phosphomimetic amino acid could mimic phosphorylation, and to examine the biological consequences of such a modification, we knocked in a mutant form of p65, where Ser 276 was changed to aspartic acid (S276D), into the genome. Mice bearing the p65 S276D mutation are born at normal Mendelian ratios, but soon begin to display a progressive, systemic hyperinflammatory condition that results in severe runting and, typically, death 8–20 d after birth. We demonstrated that a significant number of NF-κB target genes are up-regulated in these mice, thereby explaining the hyperinflammatory phenotype. Remarkably, crossing the knock-in strain with mice lacking TNF receptor 1 (TNFR1) leads to a complete rescue of the systemic inflammatory phenotype, but not in certain local inflammatory conditions—including one that resembles human keratoconjunctivitis sicca (KCS) or “dry eye”. Therefore, the p65 S276D knock-in mice provide a unique model system, demonstrating the distinct roles of NF-κB in systemic inflammation and certain localized inflammatory diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：口腔病理学

科研費の分科・細目：歯学、形態系基礎歯科学

キーワード：歯学、

1. 研究開始当初の背景

1.) 口腔領域における炎症性疾患

口腔領域は、外界と内界の境界に当たり、外部からの侵襲に最も晒されやすい。また、口腔内には多くの細菌が常在しているため、全身の免疫力の低下などにより口腔内感染症を引き起こす。さらに歯科領域では、齲蝕、歯髄炎、歯周病や智歯周囲炎などの炎症性疾患が多く、口腔内疾患の大部分は炎症性疾患であると言っても過言ではない。このような観点から、歯科・口腔領域の疾患を理解し、治療する上で炎症の発症や進行過程を細胞レベル、分子レベルで理

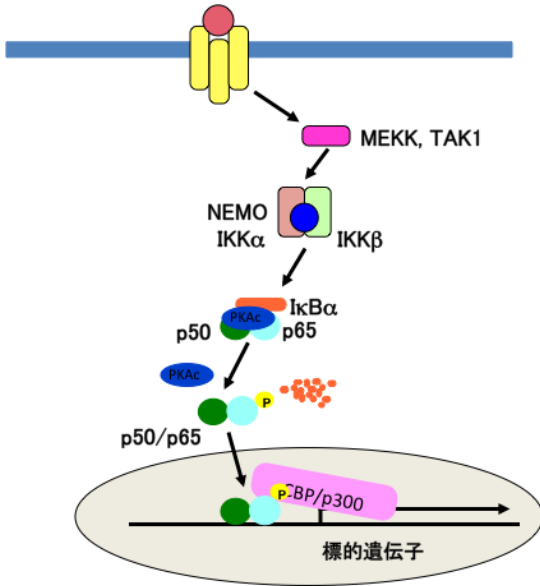
解することが重要である。

2.) 炎症反応に関わる細胞の分化や機能を調節する転写因子 NF-κB

炎症反応は異物による障害を取り除き、生体の恒常性を保つ機構であり、その背景には多くの免疫反応が介在する。炎症反応に関与する白血球(特に好中球)や単球・マクロファージは異物の貪食をおこなうことで生体の防御機構に重要な役割を果たす。また、これらの細胞が産生するサイトカインは、リンパ球の分化・増殖や機能を調節し、免疫応答を促す。このような様々な炎症反応や免疫反応に転写因子 NF-κB

が重要な役割を担っている。

NF- $\kappa$ B は、ホモまたはヘテロダイマーを形成する 5 つの転写因子、p50/p105(NF- $\kappa$ B 1), p52/p100(NF- $\kappa$ B 2), p65(RelA), c-Rel, および RelB の総称である。NF- $\kappa$ B は無刺激状態では抑制分子 I $\kappa$ B との複合体として細胞質中に留まっている。一方、細胞が TNF $\alpha$  や IL-1 などの炎症性サイトカインの刺激を受けると、I $\kappa$ B キナーゼ複合体によって I $\kappa$ B がリン酸化されとユビキチン化され、最終的に分解される結果、NF- $\kappa$ B が遊離され、核へ移行する。そして、特異的 DNA 配列を認識し、結合することで標的遺伝子の発現を調節する。しかし、近年では「I $\kappa$ B のリン酸化」=「NF- $\kappa$ B の活性化」という図式だけでは説明できない新たな制御機構が存在する可能性が示唆されている (図 1)。



(図 1) NF- $\kappa$ B の活性化機構

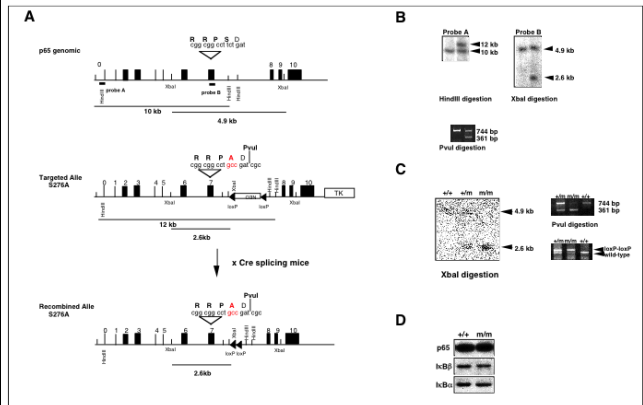
この新たな制御機構として、p65 サブユニットの 276 番目および 536 番目 (マウスでは 534 番目) セリン残基のリン酸化の重要性が報告されている。しかし、これらの報告は全て培養細胞を用いた実験結果であり、統一した結果は得られていない。培養細胞を用いた実験では、発生過程や特異的な臓器・組織での役割が解明できないことが最大の欠点である。

## 2. 研究の目的

このような背景から、我々は、生体内における p65 の 276 番目および 534 番目のセリンのリン酸化の役割を明らかにすることを目的に S276 および S534 をアラニンに置換したノックインマウス (S276A, S534A) を作出・解析し、各々のセリン残基のリン酸化が役割を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

① **S276A, S534A および S276D ノックインマウスの作製**: 129 系 p65 ゲノム DNA を用いて S276 に相当するエクソン 7、および S534A に相当するエクソン 10 のセリンをコードするヌクレオチドをそれぞれ、アラニンおよびアスパラギン酸に変換した。S276A, S276D および S534A の鑑別のため、おのおの PvuI, EagI および MfeI の制限酵素サイトを付加した。得られたゲノム DNA を pEasy ベクターに組み込み、129 系 ES 細胞株 TC-1 細胞にエレクトロポレーション法で遺伝子導入した。サザンブロット法を用いて相同組み換え体を解析し、陽性クローンを選別した。ES 細胞を導入し、高率のキメラマウスを C57/BL6 マウスと交配し、遺伝子変異が子孫へ伝達されたヘテロマウス同士を交配して目的のマウスを得た (図 2)。



(図 2) S276A マウスのターゲティングベクターとスクリーニング方法

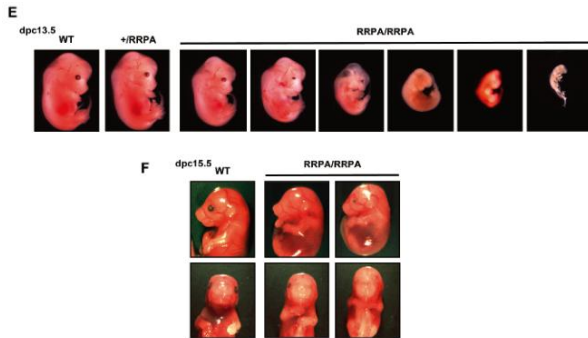
- ② **マウス胎仔線維芽細胞の調製 (MEF)**: 胎生 13.5 日の野生型および各ノックインマウスの胎仔から頭部および肝臓を摘出後、0.1% コラゲナーゼおよび 0.2% ディスパーセ処理し、得られた細胞をマウス胎仔線維芽細胞 (MEF) として実験に使用した。
- ③ **ウェスタンブロッティング**: 野生型および各ノックインマウス MEF を TNF $\alpha$  で刺激し、経時的にタンパク質を調製した。調製したタンパク質を 10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、各一次抗体を用いてブロットした。
- ④ **クロマチン免疫沈降法**: 野生型および各ノックインマウス MEF を TNF $\alpha$  で刺激し、DNA-核タンパク質を調製した。Pax6 プロモーターを用いて各抗体を用いて免疫沈降を行った後に PCR をおこなった。
- ⑤ **ゲルシフトアッセイ**: 野生型および各ノックインマウス MEF を TNF $\alpha$  で刺激し、経時的に核タンパク質を調製して、 $\kappa$ B 応答性領域を含むプローブを用いて、ゲルシフトアッセイ法を行った。また同様の刺激後に抗 p65, p50 抗体を用いてスーパーシフトを行った。
- ⑥ **組織学的解析**: 野生型および各ノックインマウスの臓器および組織を 3.7% ホルムアル

デヒドで固定した後、パラフィンまたは凍結切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色または、各抗体を用いた免疫染色をおこなった。

#### 4. 研究成果

##### (1) S276A マウスは多様な表現型を示す。

S276A ヘテロマウス同士を交配し、60 匹産まれたうちの2匹がノックインマウスであった。そこで、交配後経時的に胎仔を摘出し、生存を確認したところ、多様な表現型を示した。さらに眼の異常または欠損が多数認められた(図3)。



(図3) S276Aマウスの多様な表現型

##### (2) S276A マウス由来の MEF は野生型マウス由来の MEF 同様に TNF $\alpha$ に反応する。

野生型および S276A マウス由来 MEF を TNF $\alpha$ または LPS で刺激し、経時的にタンパクを調製し、抗 I $\kappa$ B $\alpha$ 抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、両者に差はなかった。また経時的に核タンパク質を調製し、ゲルシフトアッセイで NF- $\kappa$ B の DNA への結合能を検討したところ、両者に差はなかった。また DNA に結合した NF- $\kappa$ B は p50p65 サブユニットを含んでいた。

##### (3) S276A マウス由来の MEF は TNF $\alpha$ に刺激による転写活性が抑制される。

野生型および S276A マウス由来 MEF に $\kappa$ B 配列を繋いだルシフェラーゼ遺伝子導入し、TNF $\alpha$ または LPS で刺激 24 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。S276A マウス由来 MEF ではいずれの刺激においても転写活性の抑制が認められた。そこで野生型および S276A マウス由来 MEF を TNF $\alpha$ で刺激し、経時的に抗 p65 抗体で免疫沈降し、抗 CBP 抗体または抗ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)3 抗体でイムノブロットを行った。野生型マウス由来の MEF では TNF $\alpha$ 刺激 30 分後から p65 と CBP の会合が認められたが、S276A マウス由来 MEF では p65 と CBP の会合は殆ど認められず、p65 と HDAC1 の会合が認められた。さらに IL-6 および I $\kappa$ B $\alpha$  プロモーター上の $\kappa$ B 配列を含む部位にプライマーを設計し、抗 p65 抗体、抗 CBP 抗体または抗 HDAC3 抗体を用いてクロマチン免疫沈降法を

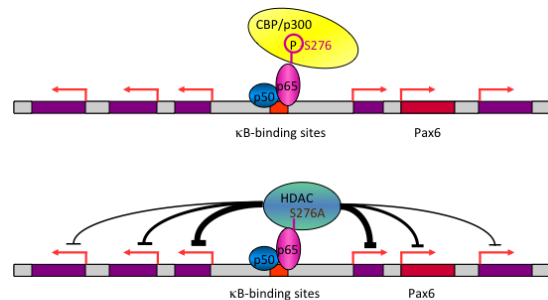
行った。両プロモーター領域においても、野生型マウス由来の MEF では TNF $\alpha$ 刺激2時間後に p65 および CBP のプロモーター上への結合が確認できた。また、HDAC3 は無刺激時にプロモーター上に結合しているが、TNF $\alpha$ 刺激2時間後にはプロモーター上から解離した。一方、S276A マウス由来 MEF では、TNF $\alpha$ 刺激2時間後に p65 のプロモーター上への結合はみとめられるものの、CBP の結合は認められなかった。さらに TNF $\alpha$ 刺激2時間後にも無刺激時と変わらず、HDAC3 が結合したままだった。

##### (4) S276A マウスでは眼の Pax6 の発現が抑制される。

S276A マウスでは眼の矮小や欠損が認められた(図3)。そこで、眼の発生に重要な因子である Pax6 の発現を検討したところ、眼に表現型が認められた胎仔において、眼部での Pax6 の発現低下が認められた。次に野生型および S276A マウス由来 MEF を TNF $\alpha$ で刺激し、経時的に $\square\square\square$ を調製し、Pax6 の発現を RT-PCR 法で検討したところ、S276A マウス由来 MEF では、Pax6 の発現が誘導されなかった。

##### (5) Pax6 の発現低下はエピジェネティックな作用である。

Pax6 のプロモーター領域を解析し、NF- $\kappa$ B が結合できる配列を検討したところ、上流 35kb ( $\kappa$ B site1)、22.8kb ( $\kappa$ B site2) および 0.5kb ( $\kappa$ B site3~5) のところに NF- $\kappa$ B が結合できる配列を確認できた。野生型および S276A マウス由来 MEF を TNF $\alpha$ で刺激し、DNA-核タンパク質を調製した。各々の NF- $\kappa$ B 結合配列を含むプライマーを設計し、抗 p65 抗体、抗 CBP 抗体または抗 HDAC3 抗体を用いてクロマチン免疫沈降法を行った。野生型 MEF では無刺激状態で p65 は僅かに結合しているが、S276A MEF では多くの p65 が結合していた。さらに HDAC3 および不活性型ヒストンも結合していた。さらにヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤を S276A MEF に添加すると Pax6 の発現抑制が解除された。このことから、S276A MEF では p65 に HDAC3 が結合することで、不活性型ヒストンが結合し、Pax6 の発現を抑制すると考えられた(図



(図4) S276AによるPax6発現抑制機構

4)。

(6) S276D マウスは全身に炎症症状を呈し、早期に死亡する。

S276D ヘテロマウス同士を交配するとメンデルの法則に従って、S276D ホモマウスが産まれた。しかし、生後すぐに成長障害が見られ、全身で炎症症状が現れ、生後8~20日で死亡した。そこでI型TNF受容体欠損マウスと交配すると全身性の炎症症状は改善されたが、「ドライアイ」などの局所的な炎症症状は改善されなかった。

(7) S534A マウスは肥満傾向が見られる。

S534A ヘテロマウス同士を交配するとメンデルの法則に従って、S534A ホモマウスが産まれた。生後から4週くらい迄は野生型とS534Aマウスの外見の区別が難しいが、6週齢を過ぎた頃からS534Aマウスは野生型マウスよりひと回り大きく、外見で区別できるようになった。この現象は雄で著明で、雌では殆どみられなかった。各臓器を摘出し、両マウス間で比較したが、著明な変化は認められなかった。しかし、S534Aマウスでは筋肉間、皮下脂肪の蓄積が認められた。

以上の結果から、276番目のセリン残基は遺伝子発現を転写レベルだけでなく、エピジェネティックな効果で制御し、534番目のセリン残基は代謝経路に重要な役割を担う可能性が示唆された。

#### 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6件)

1. Matsuo K, Akasaki Y, Adachi K, Zhang M, Ishikawa A, Jimi E, Nishihara T, Hosokawa R. Promoting effects of thymosin  $\beta$ 4 on granulation tissue and new bone formation after extraction in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011 (accepted). (査読有)
2. Dong J, Jimi E, Zeiss C, Hayden MS, Ghosh S. Constitutively active NF- $\kappa$ B triggers systemic TNF $\alpha$ -dependent inflammation and localized TNF $\alpha$ -independent inflammatory disease. *Genes Dev.* 2010 24:1709-1717. (査読有)
3. Yamamoto D, Shima K, Matsuo K, Nishioka T, Chen CY, Hu G-F, Sasaki A, Tsuji T. Ornithine Decarboxylase Antizyme Induces Hypomethylation of Genome DNA and Histone H3Lysine9 Dimethylation (H3K9me2) in Human Oral Cancer Cell Line. *PLoS ONE* 2010, e12554. (査読有)
4. Inuyama Y, Kitamura C, Nishihara T, Morotomi T, Nagayoshi M, Tabata Y, Matsuo K, Chen K-K, Terashita M. Effects

of hyaluronic acid sponge as a scaffold on odontoblastic cell line and amputated dental pulp. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010 92:120-128. (査読有)

5. Jimi E, Strickland I, Voll RE, Long M, Ghosh S. Differential role of NF- $\kappa$ B in selection of CD4 and CD8 thymocytes. *Immunity* 2008 29: 523-527. (査読有)
6. Dong J, Jimi E, Zhong H, Hayden MS, Ghosh S. Repression of gene expression by unphosphorylated NF- $\kappa$ B p65 through epigenetic mechanisms. *Genes Dev.* 2008 22:1159-1173. (査読有)

[学会発表] (計2件)

1. 松尾 拓:  $\beta$ -thymosins の歯科口腔外科治療応用に向けた基礎的研究. 第71回九州歯科学会総会 平成23年5月28日 北九州
2. Jimi E: Regulation of gene expression by phosphorylated NF- $\kappa$ B, p65 第31回日本分子生物学会 2008年12月12日 神戸

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 拓 (KOU MATSUO)  
九州歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号: 70238971

(2) 研究分担者

自見 英治郎 (EIJIRO JIMI)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 40276598

(3) 連携研究者

なし