

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2010

課題番号：21590302

研究課題名（和文） 転写抑制因子 ATF3 の遺伝子制御と生物機能の解析

研究課題名（英文） Gene expression of transcriptional repressor ATF3 and its biological role

研究代表者

北嶋 繁孝 (KITAJIMA SHIGETAKA)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：30186241

研究成果の概要（和文）：

ストレス応答は、個体の恒常性（ホメオスターシス）を保つ重要な生体反応であり、各種刺激によって迅速に誘導される初期応答遺伝子は、生体の”genomic gatekeeper”として細胞の増殖と死の Outcome を決定している。bZip 型転写抑制因子 ATF3 は、ストレス応答において細胞の増殖(pro-survival)と細胞死(pro-apoptotic)の相反する機能に深く関わっているが、当該年度において以下の点を明らかにした。1. ATF3 遺伝子の alternative promoter P1 がストレス応答とがん細胞での恒常的発現とで異なった制御を受けること、がん細胞における P1 promoter の選択的発現とがんにおける epigenetic 制御を明らかにした (*Nucleic Acid Res* 2009)。2. 皮膚細胞の低線量紫外線応答における ATF3 の新規標的遺伝子 p15 を同定し、ATF3 が DNA 修復に関わる一方で、高い dose の紫外線に対しては ATF3 が細胞死を誘導することを示し、紫外線量の違いによって、ATF3 の細胞運命制御が dual に制御されていることを明らかにした(共同研究 *Cell Death and Differentiation* 2008)。3. 遊離脂肪酸によるマクロファージの TLR4 活性化経路を ATF3 が negative に制御し慢性炎症を抑制、肥満を軽減する可能性を提示した(共同研究 *Circulation Research* 2008)。4. ヒト大腸がん HCT116 細胞の DNA damage 応答（がん抑制）と、ATF3 高発現ヒト前立腺がん LNCaP 細胞（発がん）のゲノムワイドな解析の結果、複数の ATF3 標的遺伝子を見出した。さらに、DNA damage では、ATF3 経路は p53 pathway の活性化に関わる一方で、「発がん」状態である ATF3 高発現がん細胞では、p53 経路が抑制されていることを見出した (*PLoSOne MS* 作成中)。ATF3 の Pro-apoptotic 作用に関わる標的遺伝子を同定し、ヒト大腸がん細胞を対象にがん治療に関わる研究を進めた (*H22 年度分子生物学会発表、論文作成中*)。5. ATF3 の遺伝子改変マウスを用いた個体レベルの解析のため、組織特異的 KO が可能である ATF3 floxed mouse を作成し、次いで EII-Cre マウスとの交配により Germline ATF3 KO マウスを作成した。さらに、P53-ATF3 loop 制御の解析を目的に、p53 ノックアウトマウスとの交配を開始し 53/atf3 ダブル KO 作成に着手した。

研究成果の概要（英文）：

Stress response is an adaptation mechanism to external stimuli of organism, which plays crucial role in determining cell fate such as cell proliferation or death. Thus, immediate early

response genes (IEG) sidered as genomic gatekeeper that controls downstream pathway in response to external stress. Among ~40 IEGs, Activating transcription factor (ATF) 3 is a member of the ATF/CREB family of basic-leucine zipper (b-Zip) type transcription factors. Its mRNA level is low or undetectable in most cells, but is greatly induced by a variety of stress signal. This response has dual effects on cell fate, such as cell cycle arrest and apoptosis, or cell survival and proliferation. In the period of this grant, we revealed following biological function of stress response IEG, ATF3. 1) The P1 promoter of ATF3 is conserved between human and mouse and is functional in response to various stimuli, whereas the P1 promoter was dominantly induced by serum and the P2 promoter was more efficiently activated in response to TGF- $\beta$  and oncogenic *HRAS*. In human prostate and Hodgkin Reed-Sternberg cancer cells with elevated expression of ATF3, the P1 promoter was constitutively activated and its chromatin structure was modified into active configuration. The differential usage of alternate promoters of the *ATF3* gene at both transcriptional and translational level and the modification of chromatin structure may provide a novel mechanism for expressing ATF3 in determining cell fate during stress response and cancer (*Nucleic Acid Res 2009*). 2) Novel target gene of ATF3 in UV-irradiated human keratinocyte, p15, was identified. At low dose of UV, ATF3-p15 pathway promotes DNA repair, but cell death pathway was induced at high dose UV via ATF3-Hif2alpha. This provides molecular basis why this stress response gene could control dual cell fate in stress response (*Cell Death and Differentiation 2008*). 3) ATF3 is negative regulator of Toll-like receptor4 in inflammation. Biological implication of ATF3 in FFA-treated macrophages shows that ATF3 may control inflammatory response in fatty tissue of obesity (*Circulation Research 2008*). 4) Using genome-wide analysis of DNA damage response genes by combination of expression microarray and ChIP-chip screening of ATF3-binding target genes, we found ATF3 functions an activator of p53 in DNA damage response, but negative regulator of p53 in human cancer such as prostate. 5) In order to further our research of p53-ATF3 axis, we developed ATF3 null mouse and p53/ATF3 double KO mouse.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
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：ゲノム医化学、遺伝制御

## 1. 研究開始当初の背景

ATF3 は、bZip 型転写因子 ATF/CREB ファミリーに属し、UV, DNA damage, 酸化、小胞体ストレスなどの刺激に反応して誘導され細胞運命決定に関わる。通常は、発現されていないか非常に低いレベルに抑制されており、ストレス刺激によって迅速に転写レベルでの発現が誘導される。

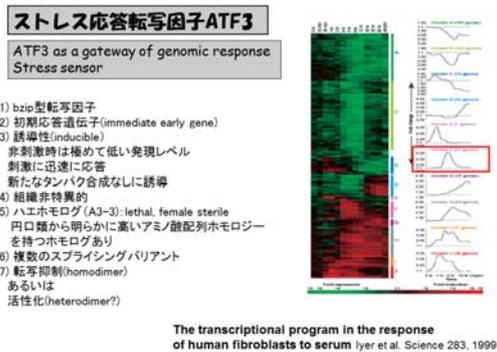


図1 ストレス応答転写因子 ATF3 は刺激に迅速に反応するおよそ 40 数個の IEGs の 1 つである

我々は、ATF3 の細胞傷害性機能とそのシグナル伝達について報告してきた (*Blood* 2000, *BBRC* 2000, 2001, *JBC* 2001, 2002, *NAR* 2002)。特に、ATF3 が JNK/SAPK の下流 (*Blood*, 2000) やがん抑制遺伝子 p53 の下流 (*BBRC* 2002) で誘導される細胞死誘導因子であること、ATF3 スプライシング variant による制御や (*NAR* 2002, *JBC* 2006)、抗がん剤、紫外線による細胞死経路 (*Cancer Res.* 2006, *Cell Death and Differentiation*. 2008) を見出した。さらに、最近、新規な UV シグナル伝達経路として ATF3-p15/KIAA0101 経路を見出し、p15 が PCNA と作用して UV 時の NER 型 DNA 修復の gatekeeper として働くことを提示している (*Cell Death and Differentiation revised*)。これらは、ATF3 の細胞傷害性機能とそれを防護する過程に ATF3 が働くことを裏付けている。

これに対し、我々は、2005 年に ATF3 が c-myc の標的遺伝子であり細胞増殖機能を持つことを初めて報告した (*EMBO J.* 2005)。その翌年には、国外の複数の研究室から、ヒト前立腺がんやホジキンリンパ腫、乳がん、皮膚がんにおいて ATF3 が高発現を示し、しかも悪性度と関連するとい

う報告が相次ぎ、さらに、マウス実験モデルで ATF3 の過剰発現が皮膚がんや乳がんを誘導することも示された。以上より、ATF3 が context-dependent に細胞死、細胞増殖・庇護という異なった生命現象に関わることは明らかである。

Pathways of ATF3 response and its biological outcomes

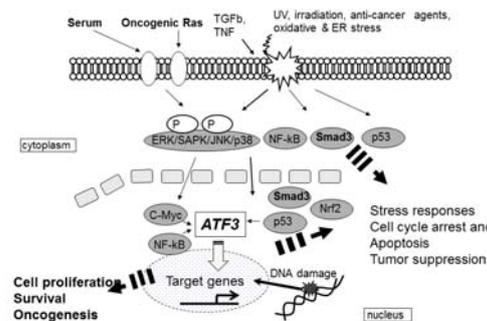


図2 ストレス応答転写因子 ATF3 の各種刺激に対するシグナル応答と細胞運命

さらに、我々は、ATF3 が性腺ゴナドトロピン分泌時に重要な役割を持つなど、内分泌における機能も明らかにした (*Endocrinology*. 2008)。

現在、我々は、(1) ストレス応答 ATF3 複合体と、ATF3 高発現ヒト前立腺がん細胞およびホジキン細胞における ATF3 核内複合体の解析、(2) 新規 ATF3 alternate promoter の機能解析、(3) ATF3 条件的遺伝子ノックアウト (Cre-loxP) マウスを用いた ATF3 の個体機能解析を進めている。これまでに、(1) ATF3 が HDAC1, G9a と強固な複合体を作ることを見出し ATF3 の転写抑制作用の分子機構と関係することを明らかにし (分生・生化学合同年会 2007, manuscript in preparation)、(2) の alternate promoter の機能解析については、論文投稿中 (*NAR submitted*) である。

また、2006 年、System biology のアプローチによって、ATF3 が自然免疫受容体 Toll-like receptor 4 シグナルの negative regulator であることが報告され (*nature*, 441, 173, 2006)、ウイルス感染、喘息アレルギーとの関わり報告され (*PNAS*, 105, 2544, 2008, *JEM*, 2008)、ATF3 と炎症、免疫疾患との関連も注目されている。

## 2. 研究の目的

ストレス応答は、個体の恒常性（ホメオスターシス）を保つ重要な生体反応であり、各種刺激によって迅速に誘導される初期応答遺伝子は、生体の”genomic gatekeeper”として細胞の増殖と死の Outcome を決定している。bZip 型転写抑制因子 ATF3 は、ストレス応答において細胞の増殖(pro-survival)と細胞死(pro-apoptotic)の相反する機能に深く関わっており、最近、がん、内分泌代謝、炎症、免疫、抗がん剤作用など多岐にわたる生物機能への関与が報告されている。本研究課題では、課題名「転写抑制因子 ATF3 の遺伝子制御と生物機能の解析」のもと、ATF3 の相反する dual 作用の基盤となる遺伝制御機構と、ATF3 の細胞レベル、個体レベルでの生物機能を明らかにする。

### 3. 研究の方法

1) ATF3 高発現前立腺がん LNCaP, ホジキン RS 細胞の ATF3 複合体の MS 解析を行い、ATF3-HDAC1-G9a 複合体を含めた複合体形成の様式と構造を解析する。全年度までに、B 細胞系ホジキンがん細胞を大量培養し、その ATF3 免疫沈降物の質量解析 (MS) を行ったが、B 細胞系であるために内在性 Immunoglobulin の混入が認められた。このため、T 細胞系ホジキンがん細胞を用いている。さらに、ATF3 のポリクローナル、モノクローナル抗体を作成している。さらに、細胞量、MS 解析の技術を高め新規な複合体因子同定を完成させる。

2) ATF3 の標的遺伝子を網羅的 ChIP-chip, 発現アレイ解析を組み合わせて同定する。

A) HCT116 ヒト大腸がん細胞を、MMS(DNA damage agent)で刺激を行い、発現アレイ解析と ATF3 抗体による ChIP-chip プロモーターアレイ解析を組み合わせた ATF3 の direct target gene の検索結果の公開、学会発表および論文発表を行う。

B) 同様に、ATF3 の発がん機能を解析するために、ATF3 恒常的発現前立腺がん LNCaP 細胞の発現アレイと ChIP-chip プロモーター解析を行い、学会発表を行った(分子生物学会。2009)。さらに、siRNA による ATF3 ノックダウン細胞、atf3 KO MEF も用いる。同様に、論文発表を行う。

### 転写制御の網羅的解析法

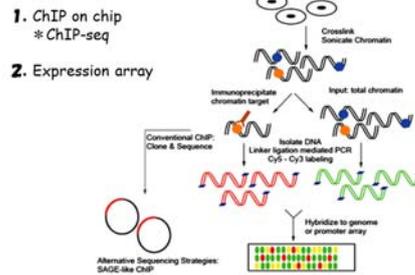


図 3 本研究で用いたシステムズバイオロジー

C) ATF3 ノックアウトマウスの作成を完成したので、個体レベル、細胞レベルの解析を進める。

### 4. 研究成果

当該研究期間において以下の点を明らかにした。

1) ATF3 遺伝子の新規 alternative promoter P1 がストレス応答とがん細胞での恒常的発現とで異なった制御を受けることを発表した。特に、がん細胞における P1 promoter の選択的発現から、がんにおける epigenetic 制御が示唆された (*NAR*, 2009)。

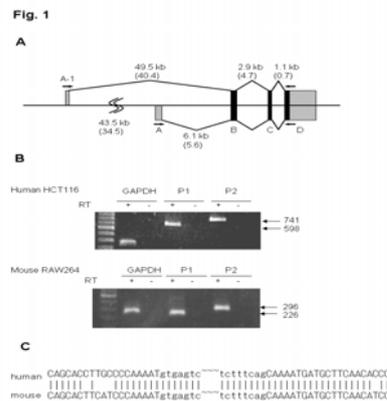


図 4 既知の P2 プロモーターより～40kb ほど上流に新規 P1 プロモーターが存在しヒト、マウスで保存されている

Fig. 3A

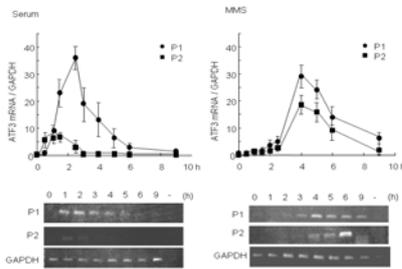


図5 P1, P2 プロモーター転写産物は刺激の種類によって異なる

Fig. 6A

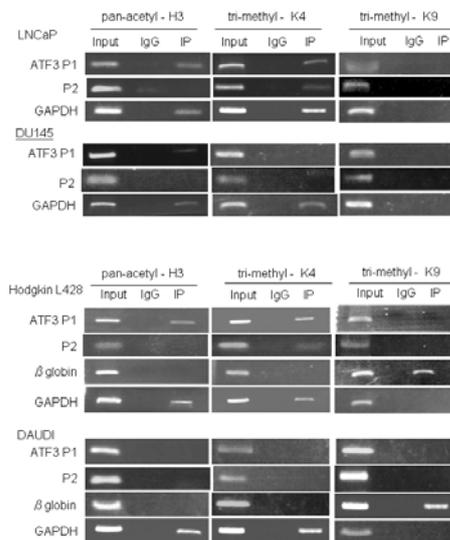


図6 ヒト大腸がん、ホジキンリンパ腫では P1 プロモーター領域のクロマチンは活性化状態にある

2) 皮膚細胞の紫外線応答において低い dose の刺激における ATF3 の新規標的遺伝子 p15 を同定し p15-p21 の置き換わり機構

によって DNA 修復に関わるが、一方で、高い dose の紫外線に対しては ATF3 が細胞死を誘導することを示して、紫外線の容量の違いによって、ATF3 の細胞運命制御が dual に制御されていることを明らかにした (共同研究 *Cell Death Differ*, 2009)。

3) 肥満において脂肪組織の慢性炎症の関与が指摘されている。遊離脂肪酸によるマクロファージの TLR4 活性化経路を ATF3 が negative に制御することによって慢性炎症を抑制し肥満を軽減する可能性を提示した。以上、ATF3 の、がん、DNA 修復、炎症など生物機能への関与を報告した (共同研究 *Circ Res*, 2009)。

4) ヒト大腸がん HCT116 細胞の DNA damage 応答 (がん抑制) と、ATF3 高発現ヒト前立腺がん LNCaP 細胞 (発がん) のゲノム解析 (ChIP-chip, 発現アレイ) を行った。実験は、ATF3 発現状態 (Ctrl) vs ATF3 KD の2つの条件での違いを網羅的に解析した。DNA damage における「がん抑制」においては、p53 pathway が活性化しており、「発がん」状態である ATF3 高発現がん細胞では、p53 経路が抑制されていることを見出した (*PLoSOne MS 作成中*)。

5) ゲノムワイドな解析の結果、新規 ATF3 標的遺伝子を同定し、その1つの TRAIL/TRAIL 受容体発現への ATF3 関与とがん治療バイオマーカーに関わる研究をスタートさせた。

6) p53-ATF3 の Postive, negative feedback 制御の生物機能を解析する目的で p53 ノックアウトマウスとの交配を開始し 53/atf3 ダブル KO 作成に着手した。

## 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4件)

Miyazaki K, Inoue S, Yamada K, Watanabe M, Liu Q, Watanabe T, Adachi M, Tanaka Y, Kitajima S. Differential usage of alternate promoters of the human stress response gene ATF3 in stress response and cancer cells. *Nucleic Acids Res*. 査読あり、Vol 37、2009年、p1438-p1451

Turchi L, Farih M, Aberdam E, Kitajima S, Simpson F, Wicking C, Aberdam D, Virrole T. ATF3 and p15PAF are novel gatekeepers of genomic integrity upon UV. Cell Death and Differentiation, 査読あり.vol6、2009年、p728-p737

Suganami T, Yuan X, Shimoda Y, Uchio-Yamada K, Nakagawa N, Shirakawa I, Usami T, Tsukahara T, Nakayama K, Miyamoto Y, Yasuda K, Matsuda J, Kamei Y, Kitajima S, Ogawa Y. Role of ATF3 constitutes as a negative regulator of saturated fatty acid/Toll-like receptor 4 signaling and macrophage activation in obese adipose tissue. Circ Res, 査読あり.vol105、2009年、p25-p32

Spohn D, Rossler OG, Phillip SE, Raubuch M, Kitajima S, Griesmer D, Hoth M, Thiel G. Thapsigargin induces expression of ATF3 in human keratinocytes involving Ca<sup>++</sup> ions and c-Jun N-terminal protein kinase. Mol Pharmacol. 査読あり. vol178、2010年、p865-p876

〔学会発表〕(計5件)

刘芹、川内潤也、小澤高嶺、山田一彦、宮崎敬介、田中裕二郎、北嶋繁孝 ATF3(activating transcription factor3)による転写抑制のメカニズム、第32回日本分子生物学会、平成21年12月、横浜

中村絢、田中裕二郎、森岡勝樹、武谷憲二、川内潤也、安達(玉盛)三美、田中博、北嶋繁孝 システムズ・バイオテクノロジーによるATF3 標的遺伝子の網羅的探索、第32回日本分子生物学会、平成21年12月、横浜

浅野慎一郎、安達三美、山田一彦、北嶋繁孝 ラット新生児心筋細胞のサイクリンD1 核内移行制御機構、第32回日本分子生物学会、平成21年12月、横浜

佐々木かおり、川内潤也、田中裕二郎、北嶋繁孝「ATF3 によるmicroRNAの発現制御機構」第33回日本分子生物学会、平成22年12月、神戸

武谷憲二、川内潤也、田中裕二郎、前原喜彦、北嶋繁孝「ストレス応答遺伝子ATFは

CamptothecinによるDR5 発現を正に制御する」第33回日本分子生物学会、平成22年12月、神戸

〔図書〕(計0件)  
〔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://www.tmd.ac.jp/mri/bgen/open.htm>  
1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北嶋繁孝(KITAJIMA SHIGETAKA)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授  
研究者番号：30186241

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

田中 裕二郎(TANAKA YUJIRO)  
東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学  
研究部・准教授  
研究者番号：00311613

川内 潤也(KAWAUCHI JUNYA)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教  
研究者番号：2054498