

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目            Regulation of the Krüppel-like zinc finger transcription factor  
KLF5/BTEB2/IKLF by the leukemia-associated protein SET

Krüppel-like zinc finger transcription factor KLF5/BTEB2/IKLF に対する  
白血病関連タンパク質 SET による抑制作用の研究

氏名                宮 本 索

動脈硬化症や経皮的バルーン血管拡張術後の再狭窄では細胞増殖、細胞遊走及び細胞外マトリックスの産生・分解過程を含む血管リモデリングと呼ばれる血管壁の構造変化が起こる。特に血管の構成細胞である血管平滑筋細胞はこれらの病変形成過程において脱分化し、ミオシン重鎖アイソフォームの発現パターンが変化することが知られている。これまでに血管障害に伴う新生内膜内の血管平滑筋細胞に胎児型ミオシン重鎖 (SMemb) が発現することが知られており、さらに SMemb のプロモーター領域に結合し、その発現を亢進させる核内転写因子として Krüppel-like zinc finger transcription factor 5 (KLF5, 別名 Basic transcriptional element binding protein-2 (BTEB2), Intestinal-enriched Krüppel-like factor (IKLF)) が発見されている。KLF5 は C 末端に 3 つの zinc フィンガードメインを DNA 結合領域として持つ特徴的構造から Krüppel-like factor ファミリー転写因子群の一員に分類されている。最近、私たちが作製した KLF5 ノックアウトマウスでは実験的血管障害処置による血管平滑筋の増殖が抑制されているのみならず、アンジオテンシン II 負荷による心筋細胞の肥大および間質の繊維化が減弱していた。これらの結果により KLF5 が血管平滑筋細胞の形質変化だけではなく、間質細胞の活性化及び血管新生を含む血管リモデリング全般に関与していると考えている。また、ヒトでは冠動脈の肥厚した内膜でも KLF5 の発現が認められている。さらに、tissue factor、platelet-derived growth factor-A (PDGF-A) 及び vascular cell adhesion molecule-1 などの血管病変に関連する

様々な因子が KLF5 の下流遺伝子にあることが報告されていることから KLF5 を介した転写機構を解析・制御することは平滑筋脱分化のみならず血管リモデリングの理解、血管病の予防・治療につながると考えられる。

哺乳類の遺伝子発現は単一の因子によるものではなく enhanceosome と概念的に呼ばれる様々な核内因子の巨大複合体により制御されているため、KLF5 による転写発現調節の研究においても核内相互作用因子を含めて解析することが必要と考えた。さらに、核内因子の zinc フィンガー構造領域は DNA への結合に寄与するのみではなく、タンパク質同士の相互作用に寄与すると報告されていることから本研究では KLF5 の DNA 結合領域に作用する核内相互作用因子を探索・同定し、その作用を解析することにより、KLF5 の転写制御機構を解明することを目的とした(Fig. 1)。

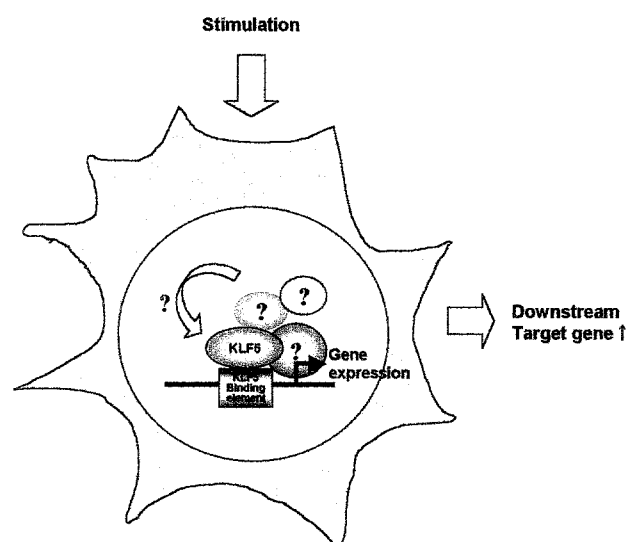


Fig. 1

KLF5 DNA 結合領域に結合する核内相互作用因子を得るために、ヒスチジンタグ付加 KLF5 DNA 結合領域を精製、ニッケル樹脂に固定し、これに血管平滑筋培養細胞の核抽出液を添加した。KLF5 DNA 結合領域と結合した因子は SDS-PAGE 上に多数みられ、それぞれについて TOF-Mass を用いた Mass finger printing 法及び Mass sequencing 法によりタンパク質を同定した。その内 SDS-PAGE 上 39kDa のタンパク質は SET であった。SET は急性白血病の原因蛋白として知られていた。また、クロマチン構造の変換に寄与すると考えられていたが、転写制御に関しては未解明であったことから SET の KLF5 に対する制御について解析することとした。まず、SET が KLF5 と結合することを確認するために、精製した SET と KLF5 DNA 結合領域もしくは KLF5 を用いて in vitro で KLF5 と SET が直接結合することを確認した。また、細胞抽出液を抗 KLF5 抗体で免疫沈降させた沈降物に SET が含まれており、培養細胞内で SET が KLF5 と結合していることを確認した。さらに、初代培養血管平滑筋細胞で SET は KLF5 と同じく核内に局在することを確認した。次に、SET の KLF5 に対する制御機能を解析するために SMemb のプロモーター領域をプローブとしてゲルシフトアッセイを行なったところ SET は

KLF5のプロンプへの結合を阻害した。さらに、KLF5の下流遺伝子であるSMemb及びPDGF-A鎖をレポーターとして用いたレポーターアッセイにより KLF5 によるこれら下流遺伝子の発現亢進を SET が抑制することがわかった。これらのことから SET は KLF5 の DNA 結合領域に結合し、KLF5 の活性を抑制する因子であると考えられた。このことを確認するため、KLF5 のみ、もしくは KLF5 と SET を安定的に発現する NIH3T3-3 細胞を作製し、KLF5 の細胞増殖亢進作用に対する SET の抑制作用を検討したところ KLF5 の細胞増殖亢進作用は SET により抑制されることがわかった。さらに、KLF5 もしくは SET を発現するアデノウイルスを作製し、KLF5 の細胞増殖亢進作用に対する SET の作用を調べたところ、やはり KLF5 の細胞増殖亢進作用を SET が抑制した。これらの結果により、細胞レベルにおいても SET に KLF5 の効果を抑制する作用があることがわかった。また、KLF5 はホルボールエステルによる細胞増殖刺激により早いタイミングで誘導がかかり増加することが知られていたが、同時に SET の発現及び下流遺伝子である PDGF-A 鎖の mRNA 量を測定したところ KLF5 が発現増加するのと同時に SET の発現が減少し、その後に PDGF-A 鎖 mRNA 量が増加していることがわかった。このことは刺激により SET の発現量が減少し、KLF5 の抑制を解除している可能性を示唆するものであった。また、この発現減少は KLF5 の発現増加と同じタイミングでおこることから SET が KLF5 と協調的に下流遺伝子の発現を調節していると考えられた。個体レベルではラットを用いたバルーン障害血管内膜肥厚モデルにおいて、肥厚した新生内膜において血管平滑筋細胞の核内に KLF5 と同様に SET の発現がみられた。このことから個体レベルでも SET が KLF5 を制御していると考えられた。バルーン障害血管内膜肥厚モデルは血管障害に呼応した生体の反応であり、KLF5 の過剰な作用、特に KLF5 に起因した過剰な細胞増殖亢進作用を SET が発現することにより抑制し、無制限に細胞が増殖することを抑制していると考えた。以上の結果から SET が KLF5 に対して抑制的に作用することを解明した。

次に p300 によるヒストンのアセチル化を SET が抑制するとの報告があること、また、KLF5 と類似の転写因子である Sp1 及び Erythroid Krüppel-like factor(EKLF)が p300 によりアセチル化を受けるとの報告があり KLF5 も同様にアセチル化される可能性があることから、KLF5 が p300 によりアセチル化され、このアセチル化が SET により調節されるという仮説を立て、検証した。まず、KLF5 が細胞レベルでアセチル化されるかを<sup>3</sup>H]acetate を用いて検討した結果、KLF5 は細胞内でアセチル化されることが示唆された。次に KLF5 の全長、DNA 結合領域のタンパク質ならびに DNA 結合領域を除いた領域のタンパク質を用いて、KLF5 の DNA 結合領域がアセチル化酵素である p300 により *in vitro* でアセチル化されることがわかった。p300 の機能としてアセチル化作用以外に核内因子間の橋渡し作用や転写因子群が集まるための足場となる作用を持つことが知られているため、p300 が KLF5 と相互作用しているか検討した。抗 p300 抗体を用いて細胞を免疫沈降した結果、免疫沈降物に KLF5 が存在しており、細胞内で KLF5 と p300 が結合していると考えられた。さらに、p300 の KLF5 の転写活性化に及ぼす影響を解析するためにレポーターアッセイを行なったところ、KLF5 による下流遺伝子の発現亢進を p300 が促進した。p300 のアセチル化領域欠損変異体では促進作用が減弱することから、

KLF5に対する促進作用の一部はp300によるKLF5のアセチル化に起因するものであることが判明した。以上の結果からKLF5はp300によりアセチル化され、さらにKLF5による転写活性化をp300が促進することが明らかとなった。

次にp300によるKLF5のアセチル化をSETが抑制するかを検討した。精製したKLF5のDNA結合領域がin vitroでp300によりアセチル化される条件下でSETを添加するとKLF5 DNA結合領域のアセチル化が抑制され、このアセチル化の抑制にはp300の添加前にSETを添加することが必要であることからアセチル化されたKLF5をSETが脱アセチル化するのではなく、SETがKLF5のアセチル化部位を覆い隠すことによりアセチル化を抑制するということがわかった。

本研究により、SETはKLF5のDNA結合を阻害し、転写の活性化を抑制するのに合わせてp300からのアセチル化を抑制し、KLF5の転写活性化効果を抑制するという2重の働きを持つ抑制性調節因子であることが判明した。また、細胞増殖刺激によりKLF5の発現が亢進すると同時にSETの発現が減少し、これによりKLF5に対する抑制を解除、下流遺伝子の発現増加につながるものと考えられる(Fig. 2)。将来的にはSETのKLF5に対する作用を模倣した低分子化合物が効果的にKLF5を抑制することにより、動脈硬化などの血管病の予防・治療につながると思われる。

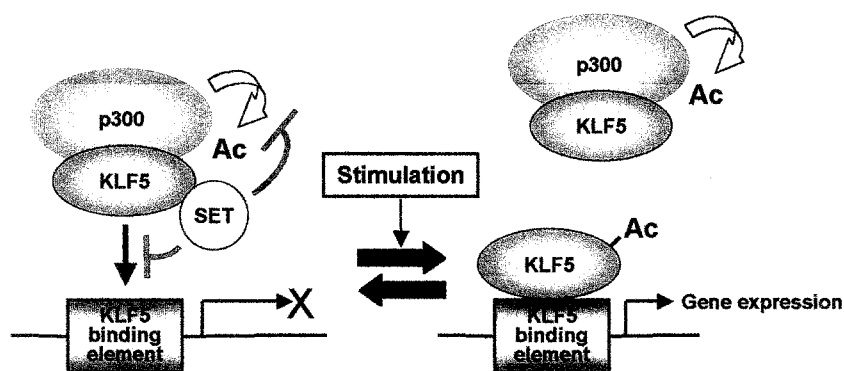


Fig. 2