

論文の内容の要旨

SWI/SNF クロマチン構造変換因子の結合タンパク質、REQUIEM による NF kappa B 活性化とその制御

指導教員 伊庭 英夫 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

病因病理学専攻

氏名 丹藤利夫

背景と目的

SWI/SNF 複合体はクロマチン構造変換因子として真核生物の多様な遺伝子発現制御において極めて重要な役割を果たしている。哺乳動物の SWI/SNF 複合体は少なくとも 9 個のタンパク質を構成成分とし、DNA とヒストンからなるヌクレオソームの構造を変化させることにより遺伝子発現をエピジェネティカルに制御する機構をもつ。この複合体は ATPase 活性をもつ触媒サブユニットとして Brm または BRG1 のいずれか一つを一分子ずつ有する。両触媒サブユニットはよく似た一次構造を持つが、機能的に両者は完全には重複しないと考えられている。我々の研究室ではこれまでに Brm を欠失したヒト細胞株に導入した MLV (Murine Leukemia Virus) の発現はジーンサイレンシングが頻繁に起きるが、BRG1 欠失細胞ではそのような性質は見られないことを示してきた。

また、SWI/SNF 複合体は多くの DNA 結合タンパク質と相互作用して転写制御に関与することが知られている。我々の研究室では、発癌や細胞増殖に関与する転写因子 AP-1 の構成タンパク質中、特に c-Fos/c-Jun ダイマーが SWI/SNF サブユニット BAF60a と高い親和性で相互作用して AP-1 依存的な転写活性化が誘導されることを見出している。また、SWI/SNF 複合体は転写活性化のみならず転写抑制にも働く。我々の研究室では Brm 型 SWI/SNF 複合体が

mSIN3A/HDAC2, CoREST といった corepressor との結合を介して転写因子、NRSF (REST)と大きな複合体を形成して転写抑制に働くことも報告している。

本研究は SWI/SNF 複合体の未知の遺伝子転写制御機構を明らかにすることを目的とした。具体的な方法として、Brm および BRG1 のタンパク質相互作用を指標として新たな結合タンパク質を探索し、そこから未知の遺伝子転写制御機構を解明することを目指した。SWI/SNF 複合体構成タンパク質とある程度の親和性で結合する新規タンパク質を同定することにより、SWI/SNF 複合体の新たな機能を解明する手がかりに十分なり得ると考えた。

結果と考察

SWI/SNF 複合体の触媒サブユニットである Brm, BRG1 の N 端に FLAG タグを付けた発現ベクターを HEK-293T 細胞にそれぞれトランスフェクションし、細胞核分画を調製した。それぞれの核抽出液に対して抗 FLAG 抗体により免疫沈降を行なった。FLAG-Brm、BRG1 免疫沈降産物を銀染色、抗 FLAG 抗体によるウエスタンブロットを行い、精製の確認をした。全免疫沈降産物をトリプシン消化したのち、LC/MS 解析にかけたところ、Brm、BRG1 をはじめとする既知の各 SWI/SNF 構成成分のペプチドが高頻度で検出された。LC/MS 解析で同定された SWI/SNF 構成タンパク質以外のペプチド断片のうち、SWI/SNF 複合体との結合がこれまでに知られていないタンパク質として、本研究ではヒト REQUIEM (hREQ)を精査することとした。hREQ 抗体を調製して、FLAG-Brm、BRG1 免疫沈降産物のウエスタンブロットを行い SWI/SNF 複合体との結合性は検証された。

hREQ と SWI/SNF 複合体との相互作用を詳細に *in vitro* で調べるため、GST-hREQ 発現ベクターを構築し GST pulldown assay を行なうこととした。*in vitro* の RNA 合成とタンパク合成により作製した Brm, BRG1, BAF60a, Ini1 および β -actin をそれぞれ GST-hREQ と混合し、各 SWI/SNF サブユニットと hREQ との結合性を調べた。その結果、 β -actin は hREQ と低い親和性を示したが、Brm, BRG1, Ini1 および BAF60a は hREQ と高い親和性を示した。さらに、hREQ の欠失変異体発現プラスミドを構築し詳細な解析を行なった結果、hREQ は NLS を含む N 端領域で Brm/BRG1, BAF60a および Ini1 といった複数の SWI/SNF 複合体のサブユニットと複数の接面で直接結合することが示された。

hREQ が SWI/SNF 複合体の複数のサブユニットと直接相互作用することから、hREQ が特定の転写因子と SWI/SNF 複合体とのアダプターとして転写制御に関与する可能性がある。そこで、hREQ の発現によって転写活性に影響を与える転写因子の検索を transient expression を使用して行なったが AP-1 や

NFκB の結合配列を接続したルシフェラーゼ遺伝子では一切効果が見られなかった。この原因として、ルシフェラーゼベクターを **transient expression** で導入したことによりベクターが正しいクロマチン構造をとれずに、**hREQ** の発現による転写活性の変化が見られない可能性が考えられた。そこで、薬剤耐性により選択された **NFκB** レポーターを安定発現する **HEK-293** 細胞株を作製して転写活性化を調べた。その結果、DNA トランスフェクションにより一過的に導入した **RelB/p52** ダイマーによる転写が **hREQ**、**Brm** に依存して活性化された。また、弱いながらも、**BRG1** 依存性も検出された。**RelA/p50** ダイマーではこのような **hREQ**、**Brm** 依存性は見られなかった。**c-Rel/p50** ダイマーでは弱い **hREQ** 依存性が見られたが、**Brm** 依存性は見られなかった。そこで、**RelB/p52** ダイマーを中心にこの後の解析を行うこととした。まず、*in vitro* の RNA 合成系、タンパク質合成系で作製した **NFκB** に対して **GST-hREQ** 融合タンパク質の *in vitro* pulldown assay を行なったところ **hREQ** は **p52** と高い親和性を示した。よって、**hREQ** は **p52** との結合を介して **RelB/p52** ダイマーによる転写活性化に関与することが示唆された。

内在性の **RelB/p52** に制御を受けることで知られる遺伝子 **BLC** および **ELC** に対して外来性の **RelB/p52** による活性化を行い、その活性化が同時に加えた **Brm**、**BRG1** および **hREQ** を標的とする short hairpin (sh) RNA によるノックダウンによって転写活性にどのような影響を与えるかを調べることにした。ここで shRNA に対するネガティブコントロールとして GFP に対する shRNA を用いた。トランスフェクション後 72 時間の細胞から RNA を抽出し、RT-PCR により mRNA を検出した。**ELC** は **RelA/p50** により強力に転写活性化され、**RelB/p52** では弱い活性化が見られた。**BLC** では **RelA/p50**、**RelB/p52** で同程度の活性化が見られた。各ノックダウンの影響については、**BLC**、**ELC** ともに **RelA/p50** では見られなかった。一方、**RelB/p52** による転写活性化では **Brm** および **hREQ** ノックダウンで活性化が減少した。この結果は、ルシフェラーゼレポーターアッセイの結果と基本的にはよく一致している。以上のことから、レポーター遺伝子と内在性遺伝子の両方で、**hREQ**、**Brm** は **RelB/p52** による転写活性化を選択的に制御していることが示唆された。

次に、**Lymphotoxin Receptor** を高発現している **HT-29** 細胞を用いて、**Lymphotoxin** により内在性の **RelB/p52** を活性化させた。**Lymphotoxin** 刺激による **BLC** 遺伝子の誘導は **hREQ**、**Brm** に対する shRNA を導入した株でほぼ完全に消失した。sh**BRG1** を導入した株ではネガティブコントロールである sh**GFP** とほとんど変わらなかった。以上の結果から、細胞内における **RelB/p52** 活性化はほぼ完全に **hREQ**、**Brm** に依存的して起きることが示唆された。

最後に、**HT-29** 細胞に **Lymphotoxin** による刺激を加え、内在性の **Brm**、**BRG1** および **hREQ** が内在性の **BLC** 遺伝子の発現誘導時に **BLC** 遺伝子プロモーター上に動員されるかどうかをクロマチン免疫沈降実験により調べた。抗体による

非特異的な結合を考慮して、rabbit normal IgG をネガティブコントロールとして用いた。その結果、抗 Brm 抗体および抗 hREQ 血清による免疫沈降標品において Lymphotoxin 刺激に依存した *BLC* 遺伝子プロモーターとの結合能の上昇がみられた。抗 BRG1 抗体は rabbit normal IgG と同等であったことから、これまでの結果と一貫して内在での *BLC* 遺伝子の転写活性化に関与しないことが示された。

以上のことから、Brm および BRG1 の結合タンパク質として同定された hREQ は RelB/p52 選択的に NFκB による転写活性化を誘導することが示唆された。これまでに SWI/SNF 複合体と NFκB の関係はほとんど何もわかっておらず、本研究を通して hREQ の存在により SWI/SNF 複合体と NFκB の転写活性化の機構の解明に貢献したことは転写制御の研究において大きな意義があると考えている。