

論文内容の要旨

論文題目: Function of DPF3a and 3b as transcriptional coactivators in the SWI/SNF complex-dependent activation of the NF- κ B RelA/p50 heterodimer.

(SWI/SNF 複合体依存的な RelA/p50 の転写活性化における DPF3a および DPF3b の coactivator としての機能解析)

氏名 石坂 彩

転写因子 NF- κ B は、RelA (p65)、RelB、c-Rel、NF- κ B1 (p105/p50)、NF- κ B2 (p100/p52) の 5 種類の Rel ファミリータンパク質がそれぞれホモダイマーあるいはヘテロダイマーを形成することによって構成され、免疫・炎症・発生・細胞増殖・アポトーシスはもとより、多くのウイルスゲノムの遺伝子の発現も誘導する。こうした多彩な生命現象を正しく維持するためには、NF- κ B が選択性をもって標的遺伝子群のプロモーターを活性化させる必要があるが、その機構の詳細については未解明な点が多い。

NF- κ B を活性化させるシグナル伝達経路は大きく分けてふたつあって、最も一般的な経路は古典的経路と呼ばれ、その最下流では RelA/p50 ヘテロダイマーの活性化が誘導される。定常状態では RelA/p50 には inhibitor of κ B (I κ B) が結合していて、このダイマーは細胞質へ留められて転写には関与できない。しかし、tumor necrosis factor (TNF)- α や lipopolysaccharide (LPS) などによる刺激が入ると I κ B はプロテオソームによって分解され、遊離した RelA/p50 は核内へ移行し、標的遺伝子群のプロモーターへ動員されて転写を誘導する。もう一方の経路は非古典的経路と呼ばれ、この経路によって誘導されるダイマーは主に RelB/p52 であることが知られている。定常状態の RelB/p52 は不活性型の RelB/p100 として細胞質内に留められているが、Lymphotoxin などの刺激により非古典的経路が活性化すると p100 がプロセッシングを受けて p52 となり、核内へ移行する。このように異なるダイマーが刺激特異的に活性化されることは NF- κ B にプロモーターの選択性を与えるが、同一の刺激の下でも標的遺伝子の活性化は細胞種ごとに異なっていて一律に起こるわけではない。このため、シグナル伝達の最下流で各 NF- κ B ダイマーにプロモーター選択性を与える分子機構の解明も重要である。

NF- κ B の標的遺伝子の発現制御には、近傍のクロマチン環境も大きく影響を及ぼしている場合が多いと考えられる。近年我々の研究室では、クロマチン構造変換因子である SWI/SNF 複合体と RelB/p52 ヘテロダイマーを仲介する新規の cofactor として DPF2 (Requiem/REQ) を同定した。そして DPF2 には SWI/SNF 複合体の複数の構成サブユニットばかりでなく p52 に対する結合性があり、RelB/p52 依存的に SWI/SNF 複合体を標的遺伝子のプロモーターへ誘導することを示している。

DPF2 の属する d4 ファミリーには他に DPF1、DPF3a、DPF3b というメンバーが存在する。DPF3a と DPF3b は DPF3 遺伝子から選択的スプライシングによって産生される。本研究では、d4 ファミリーメンバー及びこれらの因子とその C 端部分の構造で類似する PHF10 が、生理的に代表的な NF- κ B ヘテロダイマーである RelA/p50、RelB/p52 あるいは c-Rel/p50 に対する coactivator として機能する可能性があるか否かを検討した。まず、HIV-1 LTR 由来の NF- κ B 応答配列 (2 つの NF- κ B 結合部位が 4 塩基対の距離をおいてタンデムに並んでいる) のみを保持する最小プロモーター (MinP) によってルシフェラーゼを発現させるコンストラクトを作製し、293FT 細胞に導入した安定発現株クローン (NF- κ B-MinP-Luc-A3 株) を用いたレポーターアッセイを行った。各候補因子は単独で強制発現させても転写活性化に影響をほとんど及ぼさなかったが、NF- κ B のヘテロダイマーと過剰発現させると、全ての因子が 3 種類の NF- κ B の転写活性化能をどれも著しく増強させた。以前の報告では主に RelB/p52 に特異的なアダプターとして機能すると考えていた DPF2 も、RelA/p50 とも協調的に働く可能性が十分にあることが分かった。この結果を踏まえ、我々は、炎症や免疫反応に特に重要な働きを担う点から RelA/p50 に着目し、この NF- κ B ダイマーにおける協調的な転写活性化について DPF1、DPF2、DPF3a、DPF3b および PHF10 がより生理的な環境に近い条件で機能しているか評価を進めた。293FT 細胞が 5 種類の候補全てを内在的に発現することから、shRNA を用いて内在性 DPF1、DPF2、DPF3a、DPF3b および PHF10 の発現をそれぞれ抑制させた後に、細胞を TNF- α で刺激することにより内在性 RelA/p50 を活性化させた。その結果、どの因子を抑制したときにも RelA/p50 による転写活性化が弱まったが、それが特に顕著であったのは DPF3a、DPF3b を抑制したときであった。これらの両方あるいは片方の発現を抑制すると、TNF- α によって誘導されるレポーター活性は約 20% に減弱した (図 1)。

次に、DPF3a、DPF3b と RelA/p50 や SWI/SNF 複合体の構成サブユニットの間に相互作用があるか否かを解析するために、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) pull-down アッセイを行った。大腸菌発現系を用いて GST-DPF3a、GST-DPF3b を精製し、in vitro 翻訳系でアイソトープラベルした RelA、p50 を pull-down したところ、GST-DPF3a、GST-DPF3b のどちらも RelA、p50 と相互作用していることが分かった。同様の pull-down アッセイを SWI/SNF 複合体の構成サブユニットの Brm、BRG1、BAF60a、Ini1、 β -actin を in vitro 翻訳系で合成して行ったところ、 β -actin 以外の 4 つのサブユニットは GST-DPF3a、GST-DPF3b により pull-down されていた。これらの結果より、DPF3a および DPF3b は RelA、p50 と SWI/SNF 複合体の各構成サブユニットとも直接的に相互作用することが明らかになった。

続いて、シグナル伝達のどの過程で DPF3a、DPF3b が SWI/SNF 複合体や RelA/p50 と細胞内では相互作用しているのかについて解析を行った。FLAG タグを融合させた DPF3a と DPF3b を

レトロウイルスベクターで 293FT 細胞内に導入し、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、DEP3a や DPF3b との RelA/p50 の結合は、TNF- α 刺激によって RelA/p50 が核内へ移行したときにみられることが明らかになった (図 2)。その結合は DPF3b の方が DPF3a よりも強かったが、転写活性化能の解析で両者に差が見られなかったことから、DPF3a の結合力も coactivator としての機能を果たすには十分であると考えられる。一方、SWI/SNF 複合体とは、DPF3a, 3b とともに TNF- α 刺激の有無にかかわらず常に核内で結合していた。また、同様の免疫沈降を whole cell lysate に対して行い RelA と DPF3a, DPF3b の結合効率を調べたが、TNF- α 刺激に依存した結合の強さの変化はほとんど見られなかった。RelA には TNF- α 刺激に応答してリン酸化やアセチル化などの複数の修飾が入ることが知られているが、これらの修飾は DPF3a, DPF3b との結合自体には必須でないと見える。以上の相互作用の解析結果より、DPF3a, DPF3b は、核内で SWI/SNF 複合体と常に相互作用しており、RelA/p50 との結合は TNF- α 刺激後に核内でおきると結論づけられる。

次に、DPF3a や DPF3b が SWI/SNF 複合体依存的に RelA/p50 による転写活性化を増強させる様子を標的遺伝子のプロモーター近傍の染色体領域における各因子の動態から解析した。NF- κ B 標的プロモーターとして、ルシフェラーゼアッセイに用いた NF- κ B-MinP と、野生型 LTR をもつ HIV-1 ウイルスベクターにルシフェラーゼ遺伝子を導入したレポーターを用いた。各プロモーターを染色体中に保持した 293FT 細胞を TNF- α で刺激し、内在性の DPF3, RelA/p50 および SWI/SNF 複合体の動員状況をクロマチン免疫沈降法で解析した。まず、各プロモーターへ動員されている NF- κ B を解析すると、どちらのプロモーターでも TNF- α 刺激に応答して p50 ホモダイマーから RelA/p50 ヘテロダイマーへ置換されている様子が検出された。一方、DPF3 と Brm および BRG1 型 SWI/SNF 複合体は TNF- α 刺激前からプロモーターへ動員されている。また、HIV-1 LTR の場合、刺激後に SWI/SNF 複合体と DPF3 が部分的にプロモーターから離脱する場合もあることが分かった。HIV-1 野生型 LTR への RelA の動員の kinetics と初期転写産物の産生の kinetics を比較すると、両者はよく一致しており、転写開始にあたって直接的な引き金となるのは RelA/p50 の動員であると考えられる。一方で DPF3 と SWI/SNF 複合体は標的プロモーター領域へあらかじめ動員されているが、その機構を説明するひとつとして、DPF3 が p50 ホモダイマーを認識して SWI/SNF 複合体を誘導している可能性が考えられる (図 3)。

本研究により、DPF3a および DPF3b が RelA/p50 ヘテロダイマーと SWI/SNF 複合体の間を仲介する因子として同定された。NF- κ B の標的遺伝子のプロモーターには、NF- κ B に応答する際に近傍のクロマチン構造変換を必要とするものとしなないものがあると考えられているが、HIV-1 LTR のようなクロマチン構造変換を要求する標的遺伝子のプロモーターの転写亢進には SWI/SNF 複合体と NF- κ B を仲介する DPF3a および DPF3b が重要な機能を担っていることが明らかになった。

DPF3b は、C 末端の PHD フィンガーを介してヒストン H3 や H4 の特定のメチル化修飾やアセチル化修飾を認識することが以前に報告されている。従って、HIV-1 LTR 上へ動員されている DPF3b は SWI/SNF 複合体や NF- κ B だけでなく、プロモーター近傍のヒストンとも相互作用しているのかもしれない。本研究で取り上げたその他の候補因子である DPF1、DPF2、PHF10 も C 末端に PHD フィンガーを保持しており、それぞれ DPF3b とは異なる修飾ヒストンを認識する

可能性がある。各候補因子が組織により異なるプロファイルで発現していることと、本研究で DPF1、DPF2、PHF10 にも NF- κ B の coactivator としての機能する可能性が示唆されていることを併せて考えると、組織ごとに SWI/SNF 複合体と NF- κ B を仲介する因子が異なることが NF- κ B によるプロモーターの制御に多様性を与える機構のひとつであると考えられる。

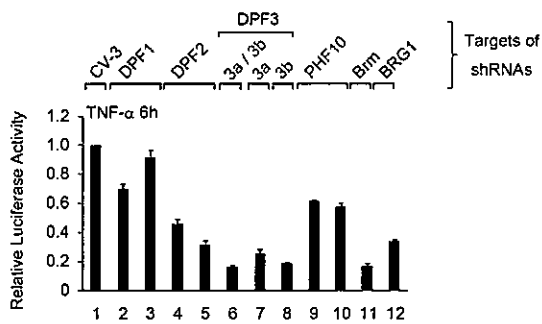


図1. DPF3a と DPF3b は TNF- α 刺激で活性化された RelA/p50 による転写活性化に必要である

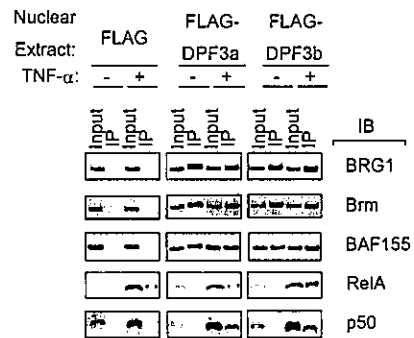


図2. DPF3a と DPF3b は SWI/SNF 複合体および RelA/p50 と核内で結合する

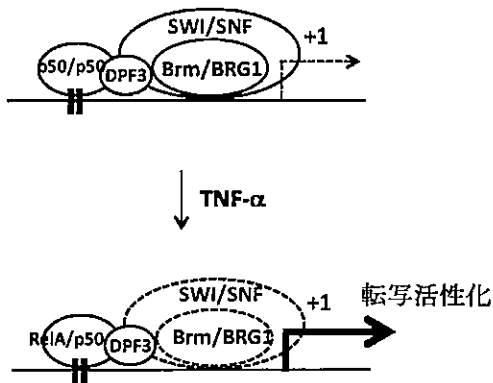


図3. DPF3a/b, SWI/SNF 複合体および RelA/p50 による標的プロモーターの制御のモデル。転写活性化の後に、SWI/SNF 複合体の一部がプロモーターから離脱する場合もある。