論文の内容の要旨

論文題目

A novel gene regulation system by transcriptional factor FOXO1 and nucleoporin NUP98

（転写因子 FOXO1 と核膜孔タンパク質 NUP98 による新規遺伝子制御機構）

氏　　名　　荒　井　珠　貴

背景と研究目的

転写因子 FOXO1 は、肝臓における糖新生酵素遺伝子 *PCK1* の転写を、血糖値が低い時には正に制御し、血糖値が上昇した時にはインスリン依存的に負に制御している事が知られている。現在急速に増加している 2 型糖尿病では、この肝臓におけるインスリン依存的な *PCK1* の転写抑制が破綻している事で、血糖値が上昇し、病態を誘起している事が知られている。よって、肝臓におけるインスリン依存的な *PCK1* の転写抑制機構の解明は、その機構に基づく新薬や治療法を開発するにあたって重要である。これまでに、*PCK1* の転写抑制は、インスリン依存的な FOXO1 の核外移行に起因する現象だとするモデルが提唱されている(核外移行モデル)。しかし、この提唱されたモデルが FOXO の過剰発現によって解析された事に起因し、様々な問題点や矛盾する結果が報告されている。よって、インスリン依存的な FOXO1 による *PCK1* の転写抑制には、核外移行モデルの他にも制御メカニズムがある可能性が考えられる。

一方で、FOXO は、生体のストレス耐性や寿命延長を制御する鍵タンパク質である事が明らかにされつつある。インスリンシグナル伝達経路の変異により、線虫、ショウジョウバエ、哺乳類で長寿命化が誘起され、その長寿命化には FOXO と、FOXO 結合サイトがある遺伝子が重要である事が明らかにされたからである。この長寿命化した生物はストレス抵抗性が高い事が特徴で、その表現型は FOXO 依存的である。FOXO は、細胞周期停止や DNA ダメージ修復を担う

GADD45A や p21 の転写を活性化する事が報告されている。ストレスに応じた、細胞周期停止や DNA ダメージ修復を担う遺伝子は、細胞のストレス耐性と生存に重要であり、個体の寿命との関係性も考えられる。しかし、それら遺伝子の FOXO による転写制御機構はほとんど解明されていない。

そこで、本研究では、FOXO1 による糖新生酵素遺伝子 *PCK1* と、ストレス耐性遺伝子 *GADD45A* と *p21* の転写制御機構の解明を研究目的とした。

結果と結論

【インスリン依存的な FOXO1 による糖新生酵素遺伝子 *PCK1* の転写制御機構の解析】

まず、転写制御に重要であるとされる Ser256 がリン酸化された内在性 FOXO1(S256P-FOXO1)が、インスリン刺激依存的に核膜近傍に移行し、核膜孔タンパク質 NUP98 と共局在化する事を、ヒト肝細胞由来の HepG2 細胞を用いて明らかにした。この FOXO1 の核膜移行は、タンパク質輸送因子である CRM1 依存的であった。そして、核膜タンパク質濃縮画分を用いた免疫沈降法により、インスリン依存的に FOXO1 が核膜孔 NUP98 と相互作用する事が示唆された。

次に、S256P-FOXO1 が NUP98 の N 末端領域と相互作用する事を GST プルダウン法により明らかにした。この NUP98 の N 末端領域に GFP を融合したタンパク質(Nterm-NUP98)は、核膜には局在化せずに核内に広く分布し、S256P-FOXO1 の核膜移行を阻害した。なお、Nterm-NUP98 は、インスリンシグナル上流のキナーゼ活性には影響を与えない事を確認した。そこで、Nterm-NUP98 を FOXO1 の核膜移行阻害剤として利用し、解析を進めた。結果、FOXO1 の核膜移行が阻害されると、インスリン依存的な *PCK1* の転写抑制も阻害される事が明らかになった。そして、インスリン刺激後も、S256P-FOXO1 は *PCK1* のプロモーター領域に結合したままであり、*PCK1* 遺伝子領域自体も、核膜近傍へと核内で空間的配置変換をする事を明らかにした。

次に、インスリン刺激依存的に *PCK1* 遺伝子のプロモーター領域のヒストン H3 の 9 番目のリシンのジメチル化(H3K9Me2)と、ヒストン H3 の 9 番目、14 番目のリシン(H3K9/14Ac)の脱アセチル化が誘起される事を明らかにした。これらヒストンの化学修飾変化は、FOXO1 の核膜移行阻害剤によって阻害された。そして、インスリン刺激依存的に、S256P-FOXO1 がヒストンジメチル化酵素 EHMT2 と相互作用する事、そしてそれは、核膜移行阻害剤により阻害される事を明らかにした。そして、siRNA による EHMT2 のノックダウンにより、インスリン依存的な *PCK1* プロモーター領域の H3K9 のジメチル化が阻害され、*PCK1* の転写抑制が阻害される事を明らかにした。

これらの結果から、インスリン依存的な *PCK1* の転写抑制は、FOXO1 の核膜移行に伴う、EHMT2 による *PCK1* プロモーター領域の H3K9 のジメチル化によって制御されているという新規制御機構の存在が示唆された（図 A)。

【ストレス依存的な FOXO1 による DNA ダメージ修復遺伝子の転写制御機構の解析】

まず、DNA ダメージストレスや細胞周期チェックポイントを活性化させるストレス処理依存的に、S256P-FOXO1 が核膜孔 NUP98 と相互作用する事を明らかにした。次に、ストレス処理依存的な FOXO1 の核膜局在化が、CDK キナーゼ阻害剤により減弱した事から、FOXO1 と核膜で相互作用する NUP98 に、CDK のリン酸化モチーフ配列(S/T-P-X-R/K)があるかを解析した。結果、NUP98 の C 末端領域の Ser822 が CDK のリン酸化モチーフ配列(822-SPDR-825)である事を見いだした。そこで、NUP98 の C 末端領域の Ser822 を、中性アミノ酸である Ala に置換した変異体(Cterm-S822A)と、負電荷をもつ Asp に置換したリン酸化模倣変異体(Cterm-S822D)を作製し、GST プルダウン法により相互作用解析を行った。結果、Cterm-S822A と FOXO1 の親和性は低かったが、Cterm-S822D は FOXO1 との高い親和性を示した。この事から、NUP98 の C 末端領域の S822 が負電荷を持つ事が、FOXO1 の核膜での NUP98 との相互作用を促進させている可能性が示唆された。さらに、NUP98 全長の S822 を Ala に置換した S822A-NUP98 発現細胞では、ストレス処理依存的な FOXO1 と NUP98 の核膜共局在率が有意に低下した。そして、S822A-NUP98 や Nterm-NUP98 によって FOXO1 と NUP98 の核膜共局在化が阻害される条件下では、ストレス依存的な *p21* 及び *GADD45A* の有意な発現上昇が阻害された。そして、ストレス依存的な FOXO1 の核膜局在化の生理的意義について検証した結果、FOXO1 が核膜局在化している細胞では、していない細胞と比較して、ストレス処理により誘起された γH2AX(:DNA ダメージの指標)が減少している事を明らかにした。

これらの結果から、ストレス依存的に FOXO1 が NUP98 と核膜で共局在化することが、細胞周期停止と DNA ダメージ修復を担う *p21* と *GADD45A* の発現を誘起し、γH2AX(:DNA ダメージの指標)の減少を誘起している事が示唆された(図 B)。

考察

FOXO1 は、インスリン刺激の場合には、転写抑制機構に核膜孔 NUP98 を使用し、DNA ダメージや細胞周期チェックポイントを活性化させるようなストレス刺激の場合には、転写活性化機構に核膜孔 NUP98 を使用している可能性が示唆された。

核膜孔タンパク質が遺伝子の発現に関与しているという事はこれまでにいくつか報告されているが、核膜孔複合体が転写活性化に寄与しているという報告と、反対に転写抑制に寄与しているとの報告がある。どのような場合に転写活性化に寄与し、どのような場合に転写抑制機構に寄与するのかについてはこれまで明らかになっていない。本研究では、その差異を生み出す理由について「緊急要求性遺伝子制御モデル」を提唱する。細胞が DNA ダメージストレスなどに曝された場合には、細胞周期停止や DNA ダメージ修復を担う遺伝子 *p21* や *GADD45A* を緊急

に発現する必要があり、そのような緊急性のある遺伝子は、核膜孔 NUP98 によって転写が活性化されるというものである。これは、mRNA を素早く核外に移行させて発現させる事に非常に有利に働くと考えられる。一方、糖新生酵素遺伝子 *PCK1* などは緊急発現要求性が低い。なぜなら、血糖値が減少する過程では、まずグリコーゲン分解が血糖値維持に寄与するからであり、*PCK1* は比較的長い時間を経て発現上昇するからである。*PCK1* はむしろ、血糖値の上昇を防ぐために、インスリン依存的に抑制される事の方が重要であり、確実に抑制するために、核内で比較的安定な構造体である核膜周辺構造を、クロマチン構造や転写抑制タンパク質の足場として利用し、転写抑制を確実に行っている可能性が考えられる。

本研究は、緊急性・役割の異なる遺伝子が異なる目的で核膜孔タンパク質を使用している事を初めて示したものであり、核膜周辺構造体と遺伝子制御メカニズムの関係性を解明していく上で重要な知見になると考えられる。

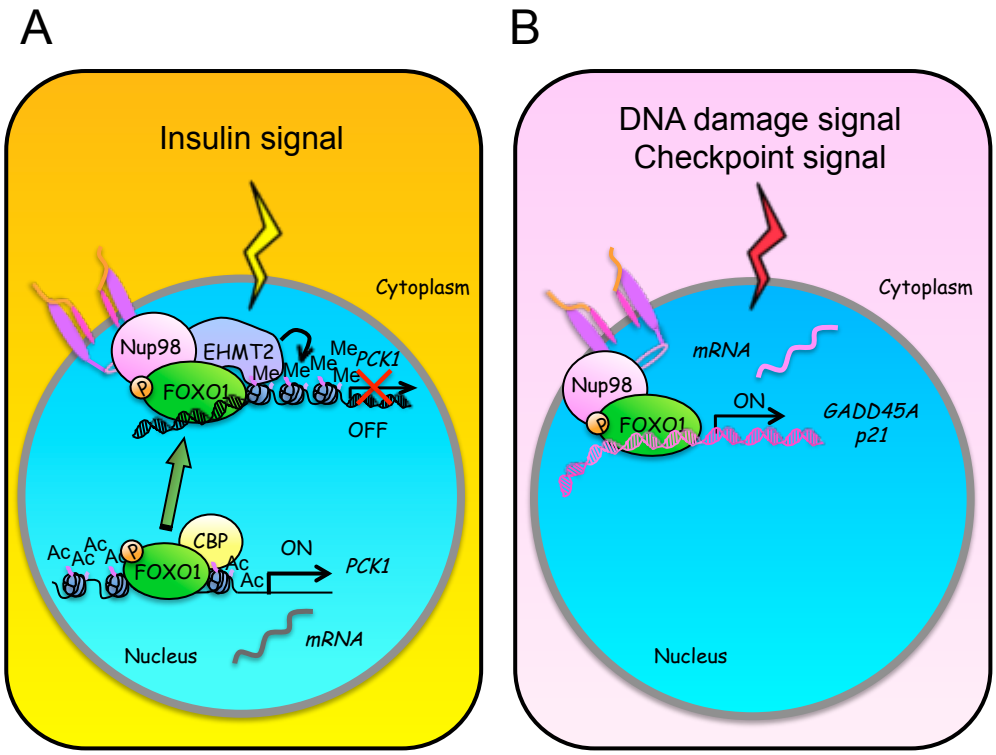


図　(A) インスリン依存的な *PCK1* の転写制御モデル

(B) ストレス依存的な *p21*, *GADD45A* の転写制御モデル