

論文の内容の要旨

論文題目 新規 NFAT5 制御分子 HES1 の高浸透圧ストレス応答における機能解析

氏 名 立野 浩輝

【序論】

生体は常に様々な物理化学ストレスに晒されており、高浸透圧ストレスもそのひとつである。これまで消化管や腎臓においてのみ観察されると考えられてきた高浸透圧や高塩濃度環境が近年では皮膚や脾臓・胸腺といった免疫系臓器においても形成されていることが明らかとなっている。さらに、これらの環境ストレスが生体内で免疫細胞を過剰に活性化することで、自己免疫疾患やアレルギーといった免疫系疾患の発病や増悪に関わることが報告されている。その一方で、この免疫活性化機構は抗腫瘍的に働くことも報告されており、高浸透圧や高塩濃度環境は新たな免疫制御要因として注目されている。

高浸透圧環境におけるストレス応答に不可欠な分子として転写因子 Nuclear factor of activated T-cells 5 (NFAT5)が知られている。NFAT5 は高浸透圧依存的な核内移行や転写活性の上昇を引き起こし、Aldose Reductase や Betaine-GABA Transporter1 (BGT1)などの浸透圧応答遺伝子群の発現を誘導することで高浸透圧ストレス応答を担う。また、NFAT5 の高浸透圧環境における活性化は免疫細胞の分化やサイトカイン産生を促進することが報告されており、免疫制御にも深く関わる分子である。当研究室では NFAT5 の高浸透圧依存的な核内移行という表現型に注目したゲノムワイド siRNA スクリーニングにより、Notch シグナル関連遺伝子 HES1 を新規 NFAT5 制御分子として同定していた。本研究では、転写抑制因子としての役割がよく知られる HES1 が高浸透圧環境という文脈において NFAT5 転写促進因子として機能する分子メカニズムおよび免疫応答における役割について解明を目指した。

【方法・結果】

1. HES1 は高浸透圧環境における NFAT5 による遺伝子発現の一部を選択的に制御する

これまでにゲノムワイド siRNA スクリーニングにより NFAT5 核内移行制御分子として Notch シグナル関連遺伝子 HES1 が同定されていた。そこで、高浸透圧環境において NFAT5 の核内移行に引き続き生じる遺伝子発現誘導に対する HES1 の影響をマイクロアレイ解析により網羅的に検討した。Control 群において NFAT5 により高浸透圧依存的に発現誘導される遺伝子 132 個のうち、81 個の遺伝子において HES1 の発現抑制による発現低下が確認された。一方、51 個の遺伝子については発現低下が認められなかった。代表的な NFAT5 下流遺伝子についても BGT1 は HES1 による発現制御を受けた一方で、Aldose Reductase については HES1 による発現制御の影響をほとんど受けなかった。以上の結果より、HES1 による NFAT5 の転写制御には遺伝子選択性が存在することが示唆された。

また、HES1 自身も高浸透圧ストレスに応答して mRNA およびタンパク質レベルで発現誘導されることが明らかとなった。この HES1 の発現誘導は BGT1 などの浸透圧応答遺伝子の発現が顕著に確認される刺激後 7.5 時間よりも前、刺激後 6 時間のタイムコースで確認された。さらに、人為的に HES1 の発現レベルを上昇させることで NFAT5 の核内移行や浸透圧応答遺伝子の発現誘導が増強された。以上の結果より、HES1 の発現誘導が NFAT5 による遺伝子発現誘導の促進に必要であることを示唆された。

2. HES1 は NFAT5 の標的遺伝子プロモーターに対するリクルートを促進する

HES1 による NFAT5 標的遺伝子の発現を制御する分子メカニズムに迫る上で HES1 と NFAT5 がともに転写因子であることを踏まえ、HES1 が NFAT5 の DNA 結合を制御する可能性に注目した。そこで、HES1 による「制御を受ける遺伝子」BGT1 と「制御を受けない遺伝子」Aldose Reductase のプロモーターに対する NFAT5 のリクルートを ChIP アッセイにより検討した。どちらのプロモーター上にも NFAT5 結合モチーフが存在し、その近傍領域における NFAT5 の結合量は高浸透圧刺激依存的に増加した。その際、HES1 による「制御を受ける遺伝子」BGT1 のプロモーターにおける NFAT5 の結合は HES1 の発現抑制により有意に低下した一方で、「制御を受けない遺伝子」Aldose Reductase においてはほとんど低下しなかった。さらに、BGT1 プロモーター上の NFAT5 結合モチーフの近傍には転写因子結合予測データベース JASPAR により予測される HES1 結合部位が存在した。実際、抗 HES1 抗体を用いた ChIP アッセイにより HES1 の高浸透圧ストレス依存的な DNA 結合が BGT1 プロモーター上の予測部位近傍において確認された。また、この HES1 結合予測部位に対する変異の導入は BGT1 のプロモーター活性を野生型に比べて有意に低下させることが Luciferase アッセイにより明らかとなった。これらの結果は、HES1 が高浸透圧ストレス依存的に NFAT5 の標的遺伝子プロモーターに対して結合、さらには NFAT5 のリクルートを促進することで遺伝子発現を制御していることを示唆している。

3. HES1 は高浸透圧環境における免疫応答を制御する

HeLa 細胞において BGT1 をはじめとする浸透圧応答遺伝子の発現を制御した HES1 が免疫系の細胞においても、高浸透圧環境におけるストレス応答や免疫応答に関与するか検討を行った。マウス腹腔より単離されたマクロファージにおいても、mRNA およびタンパク質レベルでの高浸透圧ストレス依存的な HES1 の発現誘導が確認された。以上の結果は、免疫系細胞においても高浸透圧環境という新たな文脈での HES1 の役割が存在することを示唆すると共に、それが生体内においても保存されたシステムである可能性を示唆するものである。そこで、HES1 が高浸透圧環境における NFAT5 を介した免疫応答に与える影響について、ヒト単球由来細胞株である THP-1 を用いて検討を行った。HeLa 細胞と同様に、HES1 の発現抑制は高浸透圧ストレス依存的な BGT1 の発現誘導を有意に低下させた。さらに、高浸透圧環境における NFAT5 を介した TNF や LTB といった炎症性サイトカインの産生についても HES1 の発現抑制により有意に低下した。これらの結果は HES1 が高浸透圧環境におけるストレス応答のみならず免疫応答にも寄与することを示唆している。

【まとめ・考察】

私は本研究において、Notch 関連遺伝子 HES1 を新規 NFAT5 制御分子として同定すると共に、その制御には遺伝子選択性が存在することを見出した。さらに、その分子メカニズムとして HES1 が高浸透圧刺激依存的に NFAT5 標的遺伝子プロモーターに結合し、その後の NFAT5 のリクルートを促進していることを明らかにした。また、HES1 は高浸透圧環境における NFAT5 を介した炎症性サイトカインの産生に必要であることも明らかとなった。

本研究で明らかにした HES1 による高浸透圧環境における NFAT5 制御は、高浸透圧ストレスの時間や強度に応じて発現上昇する HES1 が NFAT5 の高浸透圧応答を増強することで、

より強いストレスに対して1段階上の細胞応答を導き、細胞の生存を可能にする機構であると考えられる。また本研究では HES1 が NFAT5 の免疫応答を制御することも明らかにした。マクロファージでは炎症抑制性の M2 型に比べて炎症促進性の M1 型で HES1 の発現レベルが高いことが報告されており、この HES1 発現レベルの違いに応じて NFAT5 を介した TNF をはじめとする炎症性サイトカインの産生が M1 型では促進される一方、M2 型では低く抑えられると考えられる。このことは炎症促進性の高浸透圧や高塩濃度環境においても M1/M2 型マクロファージのバランスを維持し、過剰な炎症を抑制する機構になると考えられる。