

論文の内容の要旨

論文題目 転写因子 NF- κ B の時空間的制御メカニズムの解析

氏名 関 崇生

【緒言】

転写因子 NF- κ B は、細胞の増殖分化やアポトーシスの制御に関わる多数の遺伝子を発現誘導することにより、多様な器官の形成や免疫炎症反応、骨代謝に必要な不可欠な役割を果たしている。NF- κ B ファミリーは、5つのメンバーで構成されており、細胞内ではホモ2またはヘテロ2量体で存在している。NF- κ B 活性化経路には主に2つの経路が存在し、p50/RelA は古典的経路で p52/RelB は非古典的経路で活性化される。p50/RelA の古典的経路による活性化は細胞の増殖分化、細胞死の抑制等を誘導し多様な生命現象に関与している。これまでの先行研究で、p50/RelA 核内量の振動によってその転写活性が制御されていると考えられている。刺激依存的に抑制分子 I κ B α が分解されると p50/RelA が核移行し、標的遺伝子の転写が誘導される。核移行した RelA は速やかに脱リン酸化されて転写能を失うため、p50/RelA は刺激依存的に誘導された I κ B α によって一度核外へ行き、再び活性化することで転写能を維持していると考えられている。

一方、p52/RelB の非古典的経路による活性化はより特異的な機能を持っており、具体的には、リンパ器官の形成、マクロファージや破骨細胞分化あるいは B 細胞分化等で必須な役割を持っている。このような非古典的経路の重要性にもかかわらず、古典的経路に比べ

てその制御機構の解明が遅れている。非古典的経路の分子機構は、刺激依存的に p100 の C 末端側の I κ B 様領域が分解され p52/RelB 複合体となり核に移行すると考えられている。しかし、p52/RelB がその後 p50/RelA のように核と細胞質の間で振動するかどうかについては報告が無い。そこで、我々は RelB を可視化することで、非古典的活性化経路のダイナミクスと標的遺伝子の発現制御メカニズムを詳細に解明することを目的として研究を遂行した。

【方法と結果】

RelB は N 末端領域に DNA 結合領域が存在するため、この機能が阻害されないように C 末端領域に蛍光タンパク質 Venus を結合することにした。Venus を最終エクソンと終止コドンの間に挿入し、RelB-Venus タンパク質が内在性プロモーター制御下で発現するノックインマウスを作製した。作製したノックインマウスはメンデルの法則に従って生まれ、RelB ノックアウトマウスで確認される異常は認められなかった。このことは、RelB-venus タンパク質が内在性の RelB と同等の機能を有していることを示している。

RelB-Venus ノックインマウスから得られた MEF を不死化し、細胞追跡のマーカーとして、mCherry-Nuc (赤色蛍光タンパク質 mCherry の C 末端側に核移行シグナルがタンデムに 3 つ結合させたもの) を導入した。共焦点顕微鏡は FV-1000D IX81 (Olympus) を使用し、レーザー 515nm (venus)、559nm (mCherry) 倍率 20 倍、撮影間隔 10 分、撮影時間 18 時間の条件で撮影した。以上の条件下で、RelB-Venus MEF に抗 LT β R 抗体で刺激後 RelB の挙動をタイムラプスイメージングで追跡した。MEF の細胞周期は約 20 時間であるため、タイムラプスイメージングで撮影した動画から 10 時間以上細胞分裂しなかった細胞について解析した。蛍光量の解析は、mCherry の蛍光を指標に画像解析ソフト NIS-Elements Advanced Research (Nikon) で細胞を追跡し、核内の蛍光量を算出した。また、細胞の総蛍光量は手動で計測した。核内蛍光量を総蛍光量で割ることで、核内 RelB 量と総 RelB 量の経時的な割合をグラフ化した。その結果、RelB が 1 回核移行、核内維持、またはオシレーションすることが明らかとなった。

次に、核内平均輝度値の推移のデータをフーリエ変換することで、オシレーションの周期を同定した。単一のパルス波や人の声による不規則な音波といった周期的でない波形は、連続的に変化する異なった周波数の波を重ね合わせて表すことができる。このような一般的で複雑な波を様々な周波数の正弦波に分解して解析する手法はフーリエ変換と呼ばれている。最終的に 96 個の細胞の周期をフーリエ変換によって同定した。その結果、RelB のオシレーションは、1.0~2.5 時間周期のオシレーションをする細胞群 (83.3%) が多いことが分かった。

次に、RelB のオシレーションが核内で分解されることによって起きているのか、それとも核外移行によってオシレーションしているのか明らかにすることを試みた。古典的活性化経路のオシレーションでは、誘導された I κ B α が核内の RelA/p50 ヘテロダイマーと結合し、I κ B α の N 末端領域の核外移行シグナル (NES) に CRM1 が結合することによって I κ B α /RelA/p50 複合体が核外へ移行することが知られている。そこで、

CRM1の阻害剤であるLeptomycin B (LMB) を処理することでRelBのオシレーションが抑制されるのかどうか検討した。MEFに抗LTβR抗体刺激を加え4時間RelBの挙動をタイムラプスイメージングで撮影した。その後LMBを処理し、さらに10時間撮影した。抗LTβR抗体刺激によって核移行したRelBは、LMB処理によって核内に留められた。さらに、同様の実験をタンパク質合成阻害剤であるCycloheximide (CHX)処理においても同様の結果が得られた。この結果から、RelBのオシレーションにはRelBの分解ではなく、CRM1依存的な核外移行とタンパク質合成が必要であることが明らかとなった。

古典的活性化経路のオシレーションは、IkBαによってCRM1依存的に核内のRelA/p50ヘテロダイマーが核外へ排出される。p100はC末端領域のアンキリンリピート内のアミノ酸配列831番~840番の間にNESが存在するため、p100が核内のRelB/p52をCRM1依存的に核外へ排出しているのではないかと考えた。そこで、p100を標的としたsiRNAを細胞に導入し発現抑制することで、RelBのオシレーションが抑制されるのかどうか試みた。p100 siRNAをMEFに導入し、抗LTβR抗体刺激のRelBの挙動をタイムラプスイメージングで撮影した。驚くべきことに、約70%の細胞が自立的なRelBのオシレーションを示した。さらに、オシレーションの周期をフーリエ変換によって決定したところ、1.0時間~2.5時間周期だった。従って、p100以外のNESを持つ分子の関与が示唆された。また、siRNA耐性のp100を発現させるとこの現象は見られなくなることから、p100はRelBを細胞質に留め、オシレーションを抑制していることが示唆された。また、p100発現抑制細胞のオシレーションもLMBとCHXによって阻害されたため、抗LTβR抗体刺激によるオシレーションと同じメカニズムと考えられる。

興味深いことに、p100発現抑制細胞ではIkBαの発現量が増加していることが分かった。そこで、IkBαが核内のRelBを核外輸送しているのではないかと考え、siRNAを用いた発現抑制実験を試みた。IkBα発現抑制細胞では、抗LTβR抗体刺激依存的にRelBが核移行するが、オシレーションせずに核外へ出てく細胞が多いことが分かった。さらに、p100、IkBα同時発現抑制細胞ではRelBが自立的オシレーションを示さず、核内に維持されることも明らかとなった。この結果から、刺激依存的に核移行したRelBはIkBαによって核外排出されていることが示唆された。

最後に、RelBのオシレーションと転写活性の関係を解析した。NF-κBの転写活性とRelBの挙動を同時追跡出来る系を構築するため、NF-κB活性依存的にmCherryが発現するレトロウイルスベクターを構築し、RelB-Venus MEFに発現させた。私はこの細胞に抗LTβR抗体刺激を加え、RelBの挙動がオシレーション、1回核移行、核内維持の3種類の細胞についてmCherryの発現誘導を解析した。その結果、RelBがオシレーションした細胞では他の2種類の細胞に比べmCherryの発現が早く強く誘導されることが明らかとなった。さらに、抗LTβR抗体刺激依存的なRelBのオシレーションをLMB処理によって抑制することで、誘導されたmCherryは速やかに分解されることが明らかとなった。従って、RelBは核外移行することで転写活性を維持していることが示唆された。

【結語】

これまでの結果から、非古典的活性化経路において抗 LT β R 抗体刺激依存的に RelB は 1.0~2.5 時間周期でオシレーションし、核内に移行した RelB は NES/CRM1 とタンパク質合成依存的に核外排出されることが明らかとなった。p100 と I κ B α の発現抑制実験の結果から、RelB は p100 と I κ B α によって細胞質に繫留され、刺激依存的に核移行した RelB が短い周期で核外排出される機構には主に I κ B α が関わっていると考えられる。さらに mCherry レポーター実験の結果から、RelB はオシレーションすることで転写活性を維持していることが示唆された。今後は、オシレーションが特定の標的遺伝子群の発現を制御しているのか明らかにしたいと考えている。