

新たな酸化ストレス依存性経路の同定

順天堂大学大学院 医学研究科 免疫学
中野 裕康

1. はじめに

正常な代謝過程において副産物として、また様々な刺激により産生される活性酸素種(ROS)は、生体にとり有害(例えばDNA損傷や炎症の惹起、あるいは発がんの促進など)であるばかりでなく、生理的に多彩な機能を発揮していることが明らかにされつつある。

我々はこれまでにTumor necrosis factor (TNF)によるNF- κ Bの活性化のメカニズムの解析、およびNF- κ Bにより誘導される細胞死抑制のメカニズムの研究に従事してきた。その過程で、NF- κ Bの新たな細胞死抑制機能の一つが、TNF α 刺激により誘導されるROSの蓄積およびc-Jun N-terminal kinase (JNK)の活性化を抑制することであることを明らかにしてきた。また、ある種の細胞ではTNF α 刺激によりROS依存性にERストレスが誘導されること、さらにその時に生じるROSは、ツニカマイシンなどにより弱いERストレスを誘導することで(preconditioning)顕著に抑制されることを明らかにした。さらに最近我々は、NF- κ BによるROS蓄積およびJNKの活性化抑制機能は*c-Flip*と呼ばれる抗アポトーシス遺伝子の発現を介していることを明らかにした⁷⁻⁹。

このように生体内で生じるROS産生は複雑な制御を受けており、さらに様々な生体応答に関与することが報告されている。ROS依存性にどのようなシグナル伝達経路が誘導されるかについては、標的分子の同定も含めた分子レベルでの解明は、例外を除き、依然として未解明である。また、生体内においてどの時期にどの程度の酸化ストレスが誘導されているかをモニタリングすることは容易ではなく、さらにROS産生をリアルタイムでモニタリングすることは、非常に困難なのが現状である。そこで、本研究では培養細胞を用いた*in vitro*における酸化ストレス実験、および様々な酸化ストレス誘導マウスモデルを作製し、ゲノムワイドなトランスクリプトーム解析を行い、酸化ストレス依存性に誘導されてくる遺伝子群やシグナル伝達経路を同定する。次にそれらの遺伝子群の中から酸化ストレスに対する特異性の高いものを選択し、その遺伝子のプロモーター解析を行い、どのような転写因子がその発現誘導に関与しているかを明らかにする。その遺伝子のプロモーター領域の下流に*green fluorescence protein (gfp)*遺伝子を連結したベクターを構築し、*in vitro*の系において酸化ストレス依存性に*gfp*の発現が誘導されるかを明らかにする。最終的には同定した遺伝子のBACクローンを用いて遺伝子の開始コドンのATG直下に*gfp*遺伝子を挿入したベクターを構築し、トランスジェニックマウス(*Tg*)を作製する。

2. 方法

- 1) 酸化ストレスにより特異的に誘導される遺伝子群を同定するために、*in vitro*および*in vivo*の二つの系を用いて、ゲノムワイドなトランスクリプトーム解析を行う。まず刺激の簡便性および特異性を考慮し、培養細胞の刺激にはH₂O₂を用いる事にし、刺激する培養細胞としては申請者がこれ

まで汎用し、かつ酸化ストレス応答実験に主に使用してきた細胞である胎児線維芽細胞(MEFs)を用いて実験を行う。

- 2) 酸化ストレスを *in vivo* でモニタリングすることより、1) で同定した遺伝子群のなかから *in vivo* において酸化ストレス依存性に発現が誘導される遺伝子を選択する。この目的のために *in vivo* における酸化ストレス障害モデルを用いて行う。酸化ストレスモデルとしては、ConA 投与や anti-Fas 抗体投与により誘導される劇症肝炎を用い（このモデルでは酸化ストレスの指標の一つである還元型 GSH が低下することを我々は確認している）、誘導前と後で肝臓より RNA を抽出し、1) の解析で同定した遺伝子の発現を検討する。
- 3) 酸化ストレスにより発現誘導の確認された遺伝子については、そのプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子の upstream に連結し、プロモーター - 解析を行う。酸化ストレスに対して最も反応性の高いプロモーターを *LacZ* や *gfp* 遺伝子の upstream に組み込み、種々の細胞株に遺伝子導入し、実際に酸化ストレス刺激により *LacZ* や *gfp* の発現が誘導されるかを検討する
- 4) 最終候補として選択した遺伝子のエクソン1を含むBACクローンをを用いて開始コドンのATG直下に *LacZ* や *gfp* を連結したベクターを構築し、それをを用いて *Tg* マウスを作製する。

3. 研究成果および考察

酸化ストレスにより誘導され、組織修復に関与する遺伝子を同定するために胎児線維芽細胞(MEFs)を *in vitro* で H_2O_2 刺激し、ゲノムワイドなトランスクリプトーム解析を行い、組織修復に関与する候補遺伝子を同定し、Oxidative stress-inducible factor (OIF) と仮に命名した。*Oif* 遺伝子は H_2O_2 刺激により mRNA レベルおよびタンパクレベルで誘導され、さらに劇症肝炎に伴い発現が誘導されることが明らかとなった。OIF は初代培養の肝細胞に添加することにより組織修復に関与する転写因子 STAT3 のリン酸化を誘導し、OIF 自身も H_2O_2 刺激依存性に肝細胞から主に分泌され、Kupffer 細胞からはほとんど分泌されないことが明らかとなった。次に *oif* 遺伝子の転写制御機構を解析した結果、*oif* 遺伝子の発現には ROS 依存性の ERK2 の活性化が必要であることが MEK (ERK の活性化キナーゼ) のインヒビターである U0126 処理や、*erk2* siRNA 処理により *oif* の発現が著明に抑制されることから明らかとなった。さらに *oif* promoter を用いたレポーターアッセイの結果、*oif* の酸化ストレス依存性の発現誘導には upstream に存在する二つの AP1 のエレメントが必須であり、この領域に変異を導入することにより、酸化ストレス依存性のプロモーターの活性化がほぼ完全に抑制されることが明らかとなった。そこで AP1 のエレメントに会合する転写因子をクロマチン免疫沈降法により検討したところ Fos ファミリーに属する *Fra1* が恒常的にこのエレメントに結合しており、さらに酸化ストレスが加わることによりその結合が増強することが明らかとなった。また *fra1* siRNA により酸化ストレス依存性の OIF 産生は著明に抑制されることが明らかとなった。以上のことより今回の我々の研究により、ROS-ERK2-Fra1 という新たな酸化ストレス依存性のシグナル経路の存在が明らかとなり、さらにその経路を介して OIF の発現が誘導されることが初めて明らかとなった (論文投稿中)。今後は OIF の生体における機能を種々の肝炎モデルや肝がんの発がんのモデルを用いて検討していきたいと考えている。

また、*oif* promoter の downstream に *gfp* を連結した酸化ストレスの imaging のためのベクターの構築は終了し、現在生まれてきた *Tg* マウスの tail の PCR を行っているところである。今後 *Tg* マウスを樹立した後は、様々な酸化ストレスを誘導する実験を行い、*in vivo* における酸化ストレスの imaging

を行っていきたいと考えている。

最後に助成金をいただいた公益財団法人 アステラス病態代謝研究会の皆様はこの場をお借りして深謝致します。

5. 発表論文

1. Tokunaga, F., T. Nakagawa, M. Nakahara, Y. Saeki, M. Taniguchi, S. Sakata, K. Tanaka, H. Nakano, and K. Iwai. 2010. Sharpin is a component of the NF- κ B activating linear ubiquitin chain assembly complex. *Nature* in press.
2. Ushio, H., T. Ueno, Y. Kojima, M. Komatsu, S. Tanaka, A. Yamamoto, Y. Ichimura, J. Ezaki, K. Nishida, S. Komazawa-Sakon, F. Niyonsaba, T. Ishi, T. Yanagawa, E. Kominami, H. Ogawa, K. Okumura, and H. Nakano. 2010. Crucial role for autophagy in degranulation of mast cells. *J Allergy Clin Immunol* in press.
3. Missiou, A., P. Rudolf, P. Stachon, D. Wolf, N. Varo, P. Aichele, C. Colberg, N. Hoppe, S. Ernst, C. Munkel, C. Walter, B. Sommer, I. Hilgendorf, H. Nakano, C. Bode, and A. Zirlik. 2010. TRAF5 deficiency accelerates atherogenesis in mice by increasing inflammatory cell recruitment and foam cell formation. *Circ Res* 107:757-766.
4. Masszi, A., P. Speight, E. Charbonney, M. Lodyga, H. Nakano, K. Szaszi, and A. Kapus. 2010. Fate-determining mechanisms in epithelial-myofibroblast transition: major inhibitory role for Smad3. *J Cell Biol* 188:383-399.
5. Ando, K., K. Hasegawa, K. Shindo, T. Furusawa, T. Fujino, K. Kikugawa, H. Nakano, O. Takeuchi, S. Akira, T. Akiyama, J. Gohda, J. Inoue, and M. Hayakawa. 2010. Human lactoferrin activates NF-kappaB through the Toll-like receptor 4 pathway while it interferes with the lipopolysaccharide-stimulated TLR4 signaling. *FEBS J* 277:2051-2066.
6. Tanaka, S., and H. Nakano. 2009. NF-kappaB2 (p100) limits TNF-alpha-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 119:2879-2881.
7. Kraus, Z.J., H. Nakano, and G.A. Bishop. 2009. TRAF5 is a critical mediator of in vitro signals and in vivo functions of LMP1, the viral oncogenic mimic of CD40. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:17140-17145.
8. Blackwell, K., L. Zhang, G.S. Thomas, S. Sun, H. Nakano, and H. Habelhah. 2009. TRAF2 phosphorylation modulates tumor necrosis factor alpha-induced gene expression and cell resistance to apoptosis. *Mol Cell Biol* 29:303-314.