

- 2) Palmer, A.G. 3rd, Kroenke, C.D., & Loria, J.P. (2001) *Method Enzymol.*, 339, 204–238.
- 3) Mittermaier, A. & Kay, L.E. (2006) *Science*, 312, 224–228.
- 4) McElheny, D., Schnell, J.R., Lansing, J.C., Dyson, H.J., & Wright, P.E. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 5032–5037.
- 5) Boehr, D.D., McElheny, D., Dyson, H.J., & Wright, P.E. (2006) *Science*, 313, 1638–1642.
- 6) Eisenmesser, E.Z., Millet, O., Labeikovsky, W., Korzhnev, D. M., Wolf-Watz, M., Bosco, D.A., Skalicky, J.J., Kay, L.E., & Kern, D. (2005) *Nature*, 438, 117–121.
- 7) Henzler-Wildman, K.A., Thai, V., Lei, M., Ott, M., Wolf-Watz, M., Fenn, T., Pozharski, E., Wilson, M.A., Petsko, G.A., Karplus, M., Hübner, C.G., & Kern, D. (2007) *Nature*, 450, 838–844.
- 8) Henzler-Wildman, K.A., Lei, M., Thai, V., Kerns, S.J., Karplus, M., & Kern, D. (2007) *Nature*, 450, 913–916.
- 9) Dyson, H.J. & Wright, P.E. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 197–208.
- 10) Sugase, K., Dyson, H.J., & Wright, P.E. (2007) *Nature*, 447, 1021–1025.
- 11) 菅瀬謙治 (2007) 蛋白質核酸酵素, 52, 945–951.
- 12) Sugase, K., Lansing, J.C., Dyson, H.J., & Wright, P.E. (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 13406–13407.

菅瀬 謙治

(財団法人サントリー生物有機科学研究所・第1研究部)

Applications of relaxation dispersion spectroscopy

Kenji Sugase (Division of Spectroscopic and Structural Research, Suntory Institute for Bioorganic Research, 1-1-1 Wakayamadai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618-8503, Japan)

核タンパク質 IκB-ζ を介した炎症性遺伝子の発現調節

1. はじめに

内外のストレスに対する多くの細胞応答は、巧妙に制御された遺伝子発現に依存している。ストレス刺激に伴う一過的な遺伝子発現は、「必要な時」に「必要な分子」を「必要な量」だけ産生する極めて合理的な機構であり、遺伝子産物の速やかな合成と分解によって実現される。微生物感染等に起因する炎症時には、炎症性サイトカインをはじめ、各種ケモカインや抗菌タンパク質など多くの遺伝子の発現が誘導される。NF-κB は、これら炎症性遺伝子の発現誘導において中心的な役割を果たす転写因子であり、転写調節領域に存在する結合配列を介してその誘導を制御し

ている。また、ストレス応答遺伝子の mRNA 内には自身を不安定化するヌクレオチド配列が存在し、役割を終えた転写産物の速やかな分解に寄与している。

さまざまな機能を持つ非常に多くの炎症性遺伝子が NF-κB を介して誘導されるが、最近の詳細な発現解析を通じて、これらの遺伝子の発現パターンも多彩であることが明らかになってきている。発現様式の違いに基づいた遺伝子のクラス分けが行われ、各クラスを特徴づける分子機構が示されている。筆者らが同定した核内タンパク質 IκB-ζ が、一群の炎症性遺伝子の発現パターンを決定する上で鍵となる役割を果たしていることが明らかになりつつある。

2. NF-κB による炎症性遺伝子の転写誘導

NF-κB は、1986 年に B 細胞の免疫グロブリン κ 軽鎖エンハンサーに結合する転写因子として同定されたが、現在では、炎症等の免疫応答ばかりでなく細胞の増殖や分化などの多様な生命現象に関与していることが知られている¹⁾。哺乳類には、Rel ホモロジードメインと呼ばれる領域を持つ五つの NF-κB タンパク質 (p65, c-Rel, RelB, p105/p50, p100/p52) が存在し、これらは様々な組み合わせでホモあるいはヘテロ二量体を形成する。この中で、主に p65 サブユニットと、p105 前駆体から産生される p50 サブユニットが炎症性遺伝子の転写誘導に関わっている。炎症反応の主要な担当細胞であるマクロファージを TLR (Toll-like receptor; 微生物に特有の分子を認識する受容体) のリガンドで刺激した場合などに、NF-κB を介した多数の炎症性遺伝子の発現が誘導される²⁾。刺激を受けた細胞では、細胞質に存在する阻害タンパク質である IκB-α/β/ε がリン酸化を引き金として分解される結果、NF-κB が核へ移行し標的遺伝子の転写を活性化する。細胞質から核への NF-κB の局在変化はタンパク質の新規合成を伴わないため、短時間のうちに標的遺伝子の発現を誘導することができる。

3. 発現プロファイルに基づいた NF-κB 標的遺伝子のクラス分け

従래の方法に加え、最近のマイクロアレイ技術などを用いた包括的な遺伝子発現解析を通じて、NF-κB によって誘導される一連の炎症性遺伝子が、それぞれに固有の発現プロファイル (特定の刺激に対する発現の特異性、発現量の経時的变化など) を持つことが明らかになった。このことは、炎症性遺伝子の発現が NF-κB の核移行のステップだけでなく、転写および転写後レベルで遺伝子ごとに異な

る調節を受けていることを示している。発現プロファイルに基づいた炎症性遺伝子の分類と、各クラスの発現特異性を決定するメカニズムの解明が進められている。

明解な例として、現在10種類以上の存在が知られているTLRのうち、一部の受容体の下流で特異的に誘導される遺伝子群の発現機構が挙げられる。NF- κ Bは全てのTLRの下流で活性化されるが、別の転写因子であるIRF3(interferon regulatory factor 3)は、TRIF(Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- β)/TICAM-1(Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1)というアダプター分子が会合するTLR3とTLR4の下流でのみ特異的に活性化される。特異的に誘導される遺伝子の転写制御領域にはNF- κ BとIRF3両方の結合配列が存在し、その転写誘導には両者の活性化が必要である²⁾。

従来NF- κ Bの活性化の検出は、主に核移行と標的DNA配列への結合を指標にしたゲルシフトアッセイなどの*in vitro*の実験系に依存していたが、最近用いられるようになったクロマチン免疫沈降法(ChIP)により、NF- κ Bのプロモーターへの結合をそれぞれの遺伝子について個別に検討することができるようになった。その結果、NF- κ Bの標的プロモーターへの結合の時間変化は標的遺伝子によって異なり、細胞を刺激した後ごく短時間のうちにプロモーターに結合するものと、より長時間を要する遺伝子とに大きく分けられることが示された³⁾。NF- κ Bのプロモーターへの結合の時間変化は、実際のmRNAレベルの時間変化との間に整合性が認められる。ChIPアッセイによる転写因子の挙動の評価は、核内での転写調節機構を明らかにする上で非常に有用である。

4. 一次応答遺伝子と二次応答遺伝子

前述のように、NF- κ Bの活性化自体はシクロヘキシミドなどのタンパク質合成阻害剤により抑制されないが、炎症時に誘導される遺伝子の中には、mRNAの発現誘導に新規のタンパク質合成を必要とする一群が存在することが明らかになってきた^{4,5)}。このことは、NF- κ Bにより一次的に誘導される遺伝子(一次応答遺伝子)にコードされるタンパク質が、二次的に誘導される遺伝子(二次応答遺伝子)の発現に必要であることを示している(図1)。例として、サイトカインなどの分泌タンパク質を介したオートクリン/パラクリンによる二次応答遺伝子の誘導が挙げられる⁴⁾。この二段階の発現機構は、二次応答遺伝子の発現時期の調節やシグナルの増幅を可能にしていると考えられる。

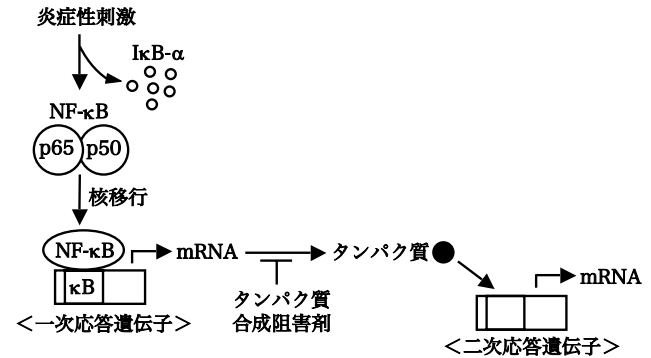


図1 一次応答遺伝子と二次応答遺伝子

炎症性遺伝子などの誘導性遺伝子は、その発現における新規タンパク質合成の必要性を指標に、一次応答遺伝子と二次応答遺伝子に分類することができる。一次応答遺伝子にコードされるmRNAは、NF- κ Bの活性化により直接誘導されるため、タンパク質合成阻害剤の影響を受けない。これに対し、二次応答遺伝子の発現は、一つあるいは複数の一次応答遺伝子産物のはたらしを必要とするので、タンパク質合成阻害剤により抑制される。

筆者らが以前報告した核タンパク質I κ B- ζ が、一群の炎症性二次応答遺伝子の発現に必要な分子であることが明らかになってきた。この分子を介した遺伝子発現調節に関する最近の知見を概説する。

5. 誘導性の核内NF- κ B調節因子I κ B- ζ

筆者らは以前、炎症性の刺激にตอบสนองしてごく短時間のうちに誘導される遺伝子のスクリーニングを行い、新規因子I κ B- ζ を同定した⁶⁾。奇しくも、国内の他の2グループからもほぼ同時期にこの因子が報告され、それぞれ、MAIL(molecule possessing ankyrin-repeats induced by lipopolysaccharide)⁷⁾、INAP(IL-1-inducible nuclear ankyrin-repeat protein)⁸⁾と命名されている。未刺激の細胞において、I κ B- ζ の発現はほとんど検出できないが、炎症性の刺激にตอบสนองして強く誘導される。I κ B- ζ は、NF- κ B調節因子として知られるI κ Bタンパク質ファミリーに特徴的なアンキリンリピートを持つが、前述のI κ B- α / β / ϵ とは異なり、核にのみ発現が認められる⁶⁻⁸⁾。I κ B- ζ のほか、ヒト慢性白血病の原因遺伝子産物として同定されていたBcl-3や、I κ B- ζ 以降に報告されたI κ B_{NS}が核局在型のI κ Bタンパク質として知られている。I κ B- ζ は、転写活性を持たないNF- κ Bのサブユニットであるp50と選択的に結合するが⁹⁾、これは核局在型I κ Bタンパク質に共通の特性である。

I κ B- ζ のノックアウトマウスは、出生率が低く、出生後は週齢とともに眼とその周辺の皮膚に炎症様の病変が観察されるようになるが、臓器の外観等に際立った特徴は認め

られない。驚いたことに、I κ B- ζ の欠損マクロファージや繊維芽細胞では、TLRやIL-1 β 刺激にตอบสนองして誘導される一群の炎症性遺伝子の発現が障害されていた⁹⁾。I κ B- ζ 自身が誘導性遺伝子であるので、この結果は、I κ B- ζ の標的遺伝子が二次応答遺伝子であることを示している(図2)。I κ B- ζ 自身の発現はNF- κ Bに依存しており¹⁰⁾、タンパク質合成阻害剤によって阻害されない。

I κ B- ζ がNF- κ Bと相互作用することや、発現にI κ B- ζ を必要とする遺伝子の転写調節領域にNF- κ Bの結合配列が存在することから、この分子が核内でNF- κ Bと協調して標的遺伝子の転写を誘導していることが予想された。そこで、ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイを行った結果、I κ B- ζ 自身が転写活性化能を示すことと¹¹⁾、プロモーターの配列特異的にI κ B- ζ が標的遺伝子の転写を誘導することが明らかになった¹²⁾。さらに、ごく最近のChIPを用いた実験により、NF- κ B p65サブユニットの標的プロモーターへの結合にはI κ B- ζ の発現が必要であることが判

明した(投稿中)(図2)¹³⁾。この結果は、p65の二次応答遺伝子のプロモーターへの結合の遅延³⁾が、I κ B- ζ の発現に要する時間に起因する可能性を示唆している。I κ B- ζ には既知のDNA結合ドメインが存在しないので、どのようにI κ B- ζ がp65のプロモーター結合を調節しているのかが次の興味である。

ところで、誘導性遺伝子であるI κ B- ζ 自身の発現パターンを詳細に検討してみると、ユニークな特性を示すことが明らかになった。I κ B- ζ のmRNAは、LPS(lipopolysaccharide)などの細菌由来分子によるTLRの活性化やIL-1 β の刺激にตอบสนองして強く誘導されるのに対し、これらと同様に他の炎症性遺伝子の発現を誘導するTNF- α の刺激ではほとんど誘導されなかった⁶⁾(図3)。まず、転写レベルでの刺激間の相違を期待してプロモーター解析や新生鎖ラン・オン解析を行ったが、意外にもI κ B- ζ 遺伝子の転写はTNF- α 刺激でもLPSやIL-1 β 同様に誘導されていた¹⁰⁾。そこで、次に転写後調節の一ステップであるmRNAの安定

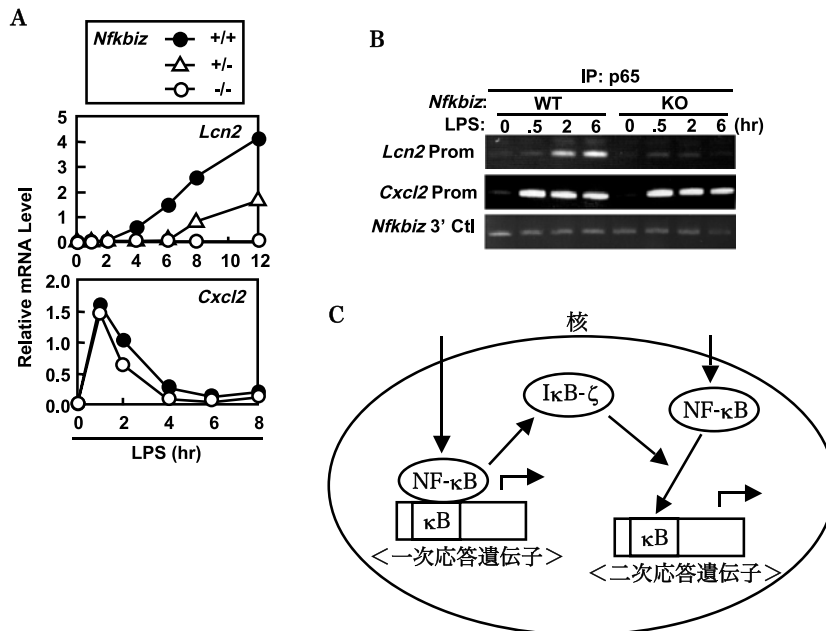


図2 I κ B- ζ (遺伝子名:*Nfkbiz*)を介した炎症性二次応答遺伝子の発現調節
(A)LPSで刺激した骨髄由来マクロファージにおけるmRNAの発現解析。I κ B- ζ の標的遺伝子である*Lcn2*(Lipocalin-2, 24p3)の発現がI κ B- ζ の欠損細胞で障害されているのに対し、コントロールのNF- κ B標的遺伝子である*Cxcl2*(MIP-2)の発現はほぼ正常である。(B)ChIPアッセイによるNF- κ B p65サブユニットの標的プロモーターへの結合の評価。野生型マクロファージにおいて、*Lcn2*プロモーターへのp65の結合は*Cxcl2*プロモーターへの結合に比べて遅い。I κ B- ζ の欠損細胞においては、p65の*Lcn2*プロモーターへの結合が認められない。*Nfkbiz* 3' Ctl: NF- κ Bが結合しないコントロールのゲノム領域。(C)一次応答遺伝子産物の一つであるI κ B- ζ は、p65が二次応答遺伝子のプロモーターに結合する際に必要である。

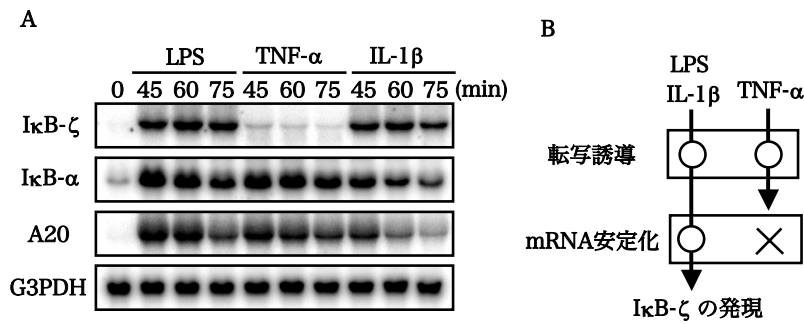


図3 刺激特異的な IκB-ζ の発現誘導

(A) 繊維芽細胞における炎症性遺伝子の mRNA 発現解析. IκB-ζ の発現は, LPS や IL-1β によって強く誘導されるが, TNF-α 刺激による誘導は非常に弱い. この時, 他の炎症性遺伝子は TNF-α によっても強く誘導されている. (B) IκB-ζ の刺激特異的な発現機構. IκB-ζ 遺伝子の転写は, LPS や IL-1β 同様に TNF-α 刺激でも誘導されるが, mRNA の安定化は LPS と IL-1β 刺激に特異的である.

化の可能性を検討した. IκB-ζ の mRNA は未刺激の細胞では検出が困難であるため, 構成的なプロモーターにより IκB-ζ mRNA 全長を発現する細胞株を樹立し, この細胞を転写阻害剤で処理した後の mRNA の分解速度を評価した. その結果, 細胞を LPS や IL-1β で刺激した場合にのみ IκB-ζ の mRNA が特異的に安定化されていた¹⁰⁾. 興味深いことに, IκB-ζ の標的遺伝子の発現誘導は, IκB-ζ と同様に LPS や IL-1β に選択的である例が複数報告されている. このことは IκB-ζ mRNA の刺激特異的な安定化が, これらの標的遺伝子の発現パターンを決定する主要な原因であることを示唆している. IκB-ζ を介した二次応答遺伝子の発現機構は, 特定の炎症性刺激に対する特異的な遺伝子発現パターンの形成に重要な役割を果たしていると考えられる.

6. おわりに

IκB-ζ による発現調節の生物学的な重要性が, 遺伝子発現の特異性の創出である可能性に触れたが, その特異性決定に関わる重要な分子機構は依然として不明である. 標的遺伝子の IκB-ζ 依存性を決める構造特性や IκB-ζ mRNA の刺激特異的な安定化に関わる分子機構の解明が今後の課題である.

特定の機能を担う個々の炎症性遺伝子がそれぞれに固有のパターンで発現することは, 最適な炎症反応の遂行やホメオスタシス維持に不可欠である. TNF-α の mRNA の 3'-非翻訳領域に存在する, 転写後の発現調節に重要な配列を改変したマウスで観察される炎症性の病態や¹⁴⁾, IκB-α の欠損マウスで見られる重篤な表現型が, IκB-α のプロモ-

ーターで誘導される IκB-β のノックインにより回復するという事実は¹⁵⁾, 遺伝子産物の発現様式がその構造や機能と同様に重要であることを示す例である.

遺伝子はその産物が必要とされる場で特異的に発現されるということを利用して, サブトラクションクローニングなどにより, 重要な分子がこれまでに多数同定されてきた. 遺伝子産物の構造-機能相関に加え, 必然性の高い発現-機能相関の例が今後も増えていくものと期待される.

謝辞

IκB-ζ のクローニングから現在までご指導いただきました, 竹重 公一朗 先生, 牟田 達史 先生ならびに当分野に在籍したメンバーの皆さんに厚くお礼申し上げます.

- 1) Hayden, M.S. & Ghosh, S. (2008) *Cell*, 132, 344-362.
- 2) Akira, S. & Takeda, K. (2004) *Nat. Rev. Immunol.*, 4, 499-511.
- 3) Saccani, S., Pantano, S., & Natoli, G. (2001) *J. Exp. Med.*, 193, 1351-1359.
- 4) Doyle, S.E., Vaidya, S., O'Connell, R., Dadgostar, H., Dempsey P., Wu, T., Rao, G., Sun, R., Haberland, M., Modlin, R., & Cheng, G. (2002) *Immunity*, 17, 251-263.
- 5) Ramirez-Carrozzi, V.R., Nazarian, A.A., Li, C.C., Gore, S.L., Sridharan, R., Imbalzano, A.N., & Smale, S.T. (2006) *Genes Dev.*, 20, 282-296.
- 6) Yamazaki, S., Muta, T., & Takeshige, K. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 27657-27662.
- 7) Kitamura, H., Kanehira, K., Okita, K., Morimatsu, M., & Saito, M. (2000) *FEBS Lett.*, 485, 53-56.
- 8) Haruta, H., Kato, A., & Todokoro, K. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 12485-12488.
- 9) Yamamoto, M., Yamazaki, S., Uematsu, S., Sato, S., Hemmi,

- H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Takeushi, O., Takeshige, K., Saitoh, T., Yamaoka, S., Yamamoto, N., Yamamoto, S., Muta, T., Takeda, K., & Akira, S. (2004) *Nature*, 430, 218–222.
- 10) Yamazaki, S., Muta, T., Matsuo, S., & Takeshige, K. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 1678–1687.
- 11) Motoyama, M., Yamazaki, S., Eto-Kimura, A., Takeshige, K., & Muta, T. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 7444–7451.
- 12) Matsuo, S., Yamazaki, S., Takeshige, K., & Muta, T. (2007) *Biochem. J.*, 405, 605–615.
- 13) Kayama, H., Ramirez-Carrozzi, V.R., Yamamoto, M., Mizutani, T., Kuwata, H., Iba, H., Matsumoto, M., Honda, K., Smale, S. T., & Takeda, K. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 12468–12477.
- 14) Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T.T., Cominelli, F., & Kollias, G. (1999) *Immunity*, 10, 387–398.
- 15) Cheng, J.D., Ryseck, R.P., Attar, R.M., Dambach, D., & Bravo, R. (1998) *J. Exp. Med.*, 188, 1055–1062.

山崎 創

(九州大学大学院医学研究院分子細胞生化学分野)

Regulation of inflammatory genes by the nuclear protein IκB-ζ
Soh Yamazaki (Department of Molecular and Cellular Biochemistry, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan)

脂肪酸の質の違いがもたらすインスリン抵抗性への影響—長鎖脂肪酸伸長酵素 Elovl-6 の解析から—

1. インスリン抵抗性研究の背景

多くの疫学エビデンスから、インスリン抵抗性は、2型糖尿病の病態のみならず動脈硬化症すなわち心血管疾患の発症リスクとして早期からの管理が求められている。脂肪毒性仮説とも呼ばれるが、細胞、組織内に脂質が蓄積することとインスリン作用障害の関連が注目されている。脂質蓄積に伴う種々の細胞内ストレス（活性酸素などの酸化ストレス、ERストレス、ミトコンドリアストレス等）の視点から、その病態機序の解析が進んでいる。しかし多くの場合脂質蓄積の量的変動が主たる問題で、蓄積している脂質の質の違いには今まであまり関心が払われていなかった。ところが最近我々は組織脂質の量だけでなく質の変化がインスリン抵抗性に重要な影響を与えることを観察した¹⁾。

2. 内因性脂肪酸合成：sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c の生理と病態

細胞内における内因性脂肪酸合成は、SREBP-1c が制御しており、生体のエネルギー貯蔵システムの主要な役割を果たしている^{2,3)}。細胞内において飽和脂肪酸はSREBP-1c を活性化し脂肪酸合成にはfeedbackがかからない。一方、多価不飽和脂肪酸はこれを抑制することにより内因性脂肪酸合成や血中トリグリセリドを低下させる。我々はエネルギー代謝の破綻に伴うこの転写因子の活性化が、組織の脂質蓄積とその機能異常特にインスリン作用の障害を来すことを観察してきたが⁴⁻⁸⁾、細胞内脂肪酸の不飽和度は、その合成制御や病態に深く関与している^{9,10)}一方、脂肪酸の鎖長による影響については、その多くが未だ不明であった。

細胞内の主要な脂肪酸である炭素数 16–18 の脂肪酸はほ乳類動物細胞における内因性脂肪酸合成の主要産物であり、エネルギー代謝、生体膜の流動性の調節、細胞膜やホルモンの構成材料等として細胞の生命活動に重要である。長鎖脂肪酸合成はいくつかの酵素によるステップからなる。なかでも細胞質に存在する脂肪酸合成酵素 (fatty acid synthase; FAS) は脂肪酸合成において主要な役割を担うが、この FAS によって合成される脂肪酸はパルミチン酸 (16:0) までである。主要な最終産物オレイン酸 (18:1n-9) やバクセン酸 (18:1n-7) は炭素数 18 であり、16 から 18 への鎖長伸長を別の酵素が担うはずである (図 1)。Stearoyl-CoA desaturase (SCD) は飽和脂肪酸ステアリン酸 (18:0) およびパルミチン酸 (16:0) に二重結合を導入し、オレイン酸 (18:1n-9) およびパルミトオレイン酸 (16:1n-7) を産生する。以前よりパルミチン酸およびパルミトオレイン酸にマロニル CoA から 2 個の炭素を付加してステアリン酸 (18:0) およびバクセン酸を合成する酵素活性が ER 分画に確認されていたものの、その遺伝子の同定はなされていなかった。FAS は細胞質で反応する一方、それ以降の鎖長伸長や不飽和化をつかさどる酵素は小胞体膜上に存在する。FAS とは異なる酵素が異なる場所で作用することから、炭素数 16 から 18 への伸長反応に特異的な機能や意義があることが示唆される。

3. 脂肪酸伸長酵素 Elovl-6 の同定

我々は SREBP-1a トランスジェニックマウスの肝臓の DNA マイクロアレイ解析により、新規 SREBP 標的遺伝子を探した。その結果、野生型と比較して SREBP-1a トラ