

氏名	塩 見 信 行
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与の番号	博 甲 第 2 4 7 6 号
学位授与の日付	平 成 1 5 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	TNF- α の新規転写因子LITAFの特徴に関する研究
論文審査委員	教授 福井 一博 教授 滝川 正春 教授 高柴 正悟

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF)- α は、炎症局所で他のサイトカインの産生を促すとともに、破骨細胞に直接作用して分化させるなどの特徴を有しており、歯周組織の破壊に深く関わる。したがって、その産生メカニズムを解明し、その産生量を調節することは、歯周病の病態解析と治療を考える上で重要な研究課題となる。従来、ヒト TNF- α の産生については転写因子の1つである NF- κ B を介する刺激伝達系が転写を制御すると理解されていた。1999年に Myokai らが LPS 刺激したヒト単球系細胞から TNF- α の新規転写因子 lipopolysaccharide (LPS) - induced TNF- α factor (LITAF) を同定した。さらに、この因子の antisense RNA を強制発現するヒト単球細胞株では、LPS 刺激時の TNF- α mRNA 量が抑制されることを報告した。この研究成果によって、TNF- α 産生のメカニズムは本転写因子を介する新しい刺激伝達系からも捉える必要がでてきた。本研究は、LITAF の性状解析を目的とし、LPS 刺激したヒト白血球系細胞において、本因子の遺伝子発現制御と動態について mRNA とタンパクレベルで解析した。

【材料および方法】

- 細胞培養と刺激：** ヒト単球系細胞株 (THP-1 細胞) とヒト T 細胞系細胞株 (Jurkat 細胞) の培養は、ウシ胎児血清 (FCS) を 10 %の割合に含む RPMI1640 (GIBCO) 中で、5 %炭酸ガス存在下 37°Cで行なった。細胞の刺激は、*Escherichia coli* 由来の LPS (055:B5 ; Sigma-Aldrich) を種々の濃度を含む上述の培地で 1~24 時間培養することによって行った。なお、THP-1 細胞は、phorbol 12-myristate 13-acetate (Sigma-Aldrich) を 200 nM の濃度を含む培地内で 24 時間培養して分化させた後に、LPS で刺激した。
- 抗体：** LITAF タンパクの検出には一次抗体として抗 LITAF マウスモノクローナル抗体 (BD Biosciences Clontech) を使用し、そして二次抗体として Horseradish peroxidase (HRP) 酵素標識抗マウス Ig 抗体 (Amersham BioScience) を使用した。なお、内部コントロールには、一次抗体として抗アクチンラビットモノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich) を、二次抗体として HRP 酵素標識抗ラビット Ig 抗体 (Amersham BioScience) を用いた。
- タンパクの検出と定量：** Towbin らの記載にしたがって、抗原を PVDF 膜 (Millipore) へ転写し、一次抗体と二次抗体に反応させた。そしてこれを ECL 蛍光検出キット (Amersham BioScience) を用いて発色させ、LITAF タンパクを検出した。また、細胞からの抗原タンパクの抽出は、THP-1 細胞から NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (PIERCE) を用いて、核内タンパクと細胞質内タンパクを分離して抽出した。
- 免疫染色：** ヒストファインシンプルス테인 (ニチレイ) を用いた免疫ペルオキシダーゼ法によって行った。すなわち、パラホルムアルデヒドで固定した THP-1 細胞に、一次抗体と標識ポリマーを反応させて染色した。一次抗体として上述した一次抗体を、標識ポリマーとしてアミノ酸ポリマーに HRP と抗マウス Ig を結合させたものを用いた。
- LITAF アミノ酸の構造解析：** LITAF の遺伝子配列から予想されるアミノ酸配列を基に、PROSITE データベースから ScanProsite (<http://kr.expasy.org/prosite/>) を用いたモチーフ検索によって行った。
- LITAF mRNA の定量：** 定量性 RT-PCR 法を用いて行った。すなわち、Jurkat 細胞から TRIZOL® RNA 分離キット (GIBCO) を用いて RNA を抽出し、それを逆転写 (RT) した。これを鋳型として SYBR® green (ABI) を用いたポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) 法を行い、PCR 産物が有する蛍光量を Gene Amp®5700 (Perkin-Elmer Biosystems) にて定量した。

7. **LITAF 遺伝子の転写開始点の決定：** プライマー伸長法は、McKnight らの方法²⁰⁾にしたがって行った。LITAF cDNA の 5'側の非翻訳領域に一本鎖 DNA を合成し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Amersham Bioscience) で末端標識した。LPS 刺激した THP-1 細胞から調製した mRNA にハイブリダイズさせた後、逆転写酵素反応によって伸長させた。反応産物をポリアクリルアミド上に展開し、オートラジオグラフィを行った。
8. **LITAF 遺伝子のプロモーター領域の塩基配列の決定と特徴的配列の検索：** LITAF ゲノム DNA を各種制限酵素によって断片化し、サザンハイブリダイゼーションを行った。プローブには LITAF cDNA の 5'非翻訳領域を $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ で標識した。ハイブリダイズした DNA 断片は、pZerO-2 ベクター (Incyte Genomics) にクローン化した。この領域の塩基配列の決定は、Sanger らの記載に準じた dideoxy chain termination 法で行った。この領域に結合する可能性のある転写制御因子を、SIGNAL SCAN (<http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/signal/>) と TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCHJ.html>) を用いて検索した。
9. **プロモーター活性の測定：** 上記で得た領域をレポーターベクターである pGL-3 Basic ベクター (Promega) に組み換え、エクソヌクレアーゼ (Stratagene) を用いてインサートの一部分を欠失した 5 種類のクローンを得た。遺伝子導入は、Jurkat 細胞にリポフェクション法で行った。尚、内部コントロールとして pRL-TK ベクター (Promega) を同時に遺伝子導入した。そしてルミノメーター (Promega) を用いて、遺伝子導入した細胞質中のホタルルシフェラーゼの濃度を測定し、これを内部コントロールであるウミシイタケルシフェラーゼの濃度で除した値をルシフェラーゼ活性として表した。

【結果】

1. **LITAF タンパク量の変化：** LITAF タンパク量は、分化させた THP-1 細胞の核内において、2 時間の LPS 刺激で増加した。しかし、細胞質内における量は、LPS 刺激によっても顕著な変化はなかった。
2. **LITAF タンパクの極在性：** 免疫染色法で PMA によって分化させた THP-1 細胞内の LITAF タンパクを検出した。LPS 無刺激の条件では、細胞質内と核内の染色性に違いはなかった。しかしながら、2 時間の LPS 刺激では、核内に濃い染色像を観察した。
3. **LITAF の構造解析：** モチーフ検索によって推定される構造は、proline-rich region と zinc finger-ring domain という転写因子に特徴的な機能ドメインが存在した。しかし、核内移行シグナルをコードする既知の配列は存在しなかった。
4. **LITAF mRNA の発現動態：** Jurkat 細胞から LITAF mRNA を検出できた。その量は LPS 刺激の 2~4 時間後に最大となった。
5. **LITAF プロモーター領域の LPS 刺激によるルシフェラーゼ活性：** LITAF 遺伝子の転写開始点から上流約 1.1 kb までの領域には、既知の転写因子 (Sp1, NF-IL6, AP-1, AP-2, AP-4) が結合する配列が複数存在した。ルシフェラーゼ活性は、転写開始点より -209 から -43 塩基上流の部分を含んだクローンを導入した細胞で最も高かった。この部分に結合する可能性のある転写因子は、AP-1 と NF-IL6 であった。

【考察および結論】

免疫染色とウェスタンブロットによる結果は、ヒト単球系細胞においては LPS 刺激 2 時間後に核内での蛋白量が増大することから、LPS 刺激によって LITAF が細胞質から核内に移行されることを示唆している。LITAF タンパクは、既知の核移行シグナルを欠くものの DNA やタンパクに結合する転写因子に特徴的な構造を持つことが推定されたので、LITAF が核内にさえ移行されれば、TNF- α のプロモーター領域に結合する転写因子としての機能を持つと考えられる。そのためには、LITAF は他の核移行シグナルを持つタンパクと複合体を形成することが必要である。なお、LPS 刺激によって LITAF mRNA 量は一過性に上昇するものの、無刺激および LPS 刺激 12 時間以降では細胞質内のタンパク量に大きな変化はない。このことは、この因子が細胞内で持続的に一定量になるように調節されているものと解釈できる。また、LPS 刺激時の LITAF 遺伝子のプロモーター活性は、AP-1 と NF-IL6 が結合する配列を含む領域に最も高い値を検出した。このことは、LPS 刺激による LITAF 遺伝子の転写は、これらの転写制御因子の上流にある刺激伝達系を介して制御される可能性を示している。LITAF が TNF- α 遺伝子のプロモーター領域に結合する、あるいは LITAF が他のタンパクと複合体を形成するということはまだ明らかではないが、これらの機能を示唆する機能ドメインを持つことと、LPS 刺激時のタンパクの動態から、この遺伝子由来のタンパクが遺伝子の転写を制御する分子である可能性を示した。したがって、TNF- α 遺伝子発現制御に関わる転写因子の中でも、特に LITAF は今後において注目すべき対象であることを本研究において示した。

LITAF タンパクは、無刺激の状態では細胞質内と核内に存在し、LPS 刺激によって核内へと移行する可能性がある。LITAF mRNA は無刺激の状態でも発現しているが、LPS 刺激によってその量がさらに高まる。そして LITAF 遺伝子は AP-1 あるいは NF-IL6 によってその発現が誘導される可能性がある。

論文審査結果の要旨

最近 LPS 刺激したヒト単球系細胞から腫瘍壊死因子 (TNF- α) の新規転写因子 lipopolysaccharide (LPS) -induced TNF- α factor (LITAF) が同定され, この因子の発現を抑制すると LPS 刺激時の TNF- α mRNA 量の増加が抑制されることが報告された。この研究成果によって, TNF- α 産生のメカニズムは NF- κ B 以外に LITAF を介する新しい刺激伝達系からも捉える必要がでてきた。本研究は, LITAF の性状解析を目的とし, 本因子の遺伝子発現制御と動態について mRNA とタンパクレベルで解析したものである。

申請論文は次の内容を示すものであった。 1) LITAF タンパクは無刺激の状態では細胞質, 核内に同程度に存在するものの, LPS 刺激した際には核内に豊富に存在した。 2) LITAF のコードするアミノ酸配列を構造解析すると, 転写因子に特徴的な機能ドメインとリン酸化部位が存在した。 3) LITAF mRNA は LPS によって誘導された。約 1.1kb の LITAF 遺伝子のプロモーター領域を同定し, 転写開始点より -209 から -43 塩基上流の部分に高い転写活性があった。その領域には, AP-1 と NF-IL6 の結合する可能性のある配列が存在した。

これらの結果は LITAF が転写因子である可能性と LITAF 遺伝子発現の制御機構の一端を解明したものである。したがって, LITAF は TNF- α 遺伝子の発現を制御する転写因子として注目すべき対象であることを示唆するものである。

以上によって, 本申請論文は学位論文として価値があると認めた。