

## 学位論文題名

転写コリプレッサー KAP 1 による  
サイトカインシグナル調節機構の解析

## 学位論文内容の要旨

## (序論)

サイトカインは細胞から放出される生理活性物質のひとつで、細胞同士の情報伝達に用いられており、生体の恒常性維持に必要不可欠な因子である。サイトカインの機能異常は、感染、自己免疫疾患、癌など様々な疾患の病因となることが知られており、サイトカインシグナルの制御機構を解明することは、疾病治療において非常に重要なことだと考えられる。現在までに多数のサイトカインが発見され、またそのシグナル制御機構も解明されつつあるが、まだ十分ではない。我々の研究室では、サイトカインのひとつである IL-6 のシグナル制御機構を調べる中で、転写コリプレッサー KRAB-associated protein 1 (KAP1) が、その制御に深く関与していることを明らかにした。KAP1 は発見当初、KRAB zinc finger protein (KRAB-ZFP) と呼ばれる転写抑制因子群のコリプレッサーとして同定されたが、我々は、転写因子 STAT3 と直接結合して、IL-6 誘導性の STAT3 のセリンリン酸化を抑制することで、IL-6 シグナルを負に制御することを明らかにした。本研究では、サイトカインシグナルに対する KAP1 のさらなる機能を追究する目的で、IL-6 と同じ炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  のシグナリングや、STAT1 および STAT2 (STAT3 のファミリー蛋白質) により活性が制御されている IFN- $\alpha$  のシグナリングに対して、KAP1 の作用を調べた。(なお、解析にはヒト胎生腎癌細胞株 293T 細胞およびヒト子宮頸癌細胞株 HeLa 細胞を用いた。)

(第 1 章 : KAP1 による TNF- $\alpha$  シグナル制御機構の解析)

TNF- $\alpha$  シグナル伝達系に対する KAP1 の影響を調べる為、siRNA を用いて KAP1 遺伝子をノックダウンし (以下 KAP1 KD), TNF- $\alpha$  誘導性の IL-6 発現に対する影響を調べた。その結果、KAP1 KD 下では、IL-6 の発現誘導が mRNA レベルおよび蛋白質レベルで増強することが明らかとなった。また、TNF- $\alpha$  誘導性の IL-6 発現に深く関与している転写因子 NF- $\kappa$ B に対する KAP1 の影響を、レポーターアッセイにより調べたところ、KAP1 KD 細胞では NF- $\kappa$ B の転写活性も増強していることが明らかとなった。これらのことより、KAP1 は通常 TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B シグナルに対して、抑制的に働いていることが示唆された。

続いて、KAP1 による NF- $\kappa$ B 転写活性調節機構の解析を行った。TNF- $\alpha$  が細胞に作用すると、細胞質内で I $\kappa$ B- $\alpha$  の分解が起き、それに伴い、I $\kappa$ B- $\alpha$  と結合していた NF- $\kappa$ B (p50, p65) は、細胞質から核内に局在変化を起こす。さらに NF- $\kappa$ B は、核内移行後、ゲノム上の標的遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写を誘導すると言われている。そこで、まず I $\kappa$ B- $\alpha$  の分解に対する KAP1 KD の影響を調べたところ、殆ど影響は認められなかった。続いて、p65 の核移行およびクロマチン (IL-6 プロモーター) への結合を、免疫染色法および ChIP アッセイにより調べたところ、KAP1 KD により TNF- $\alpha$  刺激後の p65 核内貯留の割合

が増加し、また IL-6 プロモーターへの結合量も増加することが分かった。

p65 の核内貯留および標的遺伝子プロモーターへの結合には、p65 の翻訳後修飾、特に K310 のアセチル化が関与しているという報告があることから、KAP1 の p65 アセチル化に対する影響を調べた。その結果、KAP1 KD により p65 のアセチル化が増強することが確認された。

続いて、p65 のアセチル化に対する KAP1 の調節機構を調べた。p65 のアセチル化には STAT3 が関与しているという報告がある。TNF- $\alpha$  の刺激が細胞に加わると、STAT3 はリン酸化を受け、特に S727 のリン酸化は、p65 への p300 (アセチル基転移酵素) リクルートを促進する作用があり、この機能を通して、STAT3 は p65 のアセチル化を調節すると言われている。そこで、KAP1 が STAT3 の上記機能を介して、p65 のアセチル化を調節しているのか解析した。その結果、KAP1 は TNF- $\alpha$  誘導性の STAT3 セリンリン酸化に対して抑制的に働き、また p65 への p300 結合に対しても、抑制的に作用することが、免疫沈降実験により明らかとなった。

上記の結果から、KAP1 の TNF- $\alpha$  シグナル制御機構に、STAT3 が深く関与している可能性が考えられ、最後にその依存性を調べる為、STAT3 欠損下での KAP1 KD の影響を RT-PCR 法により調べた。その結果、KAP1 KD による IL-6 誘導増強作用が、STAT3 欠損下で抑制されることが明らかとなった。

以上の結果より、KAP1 は TNF- $\alpha$  シグナルに対して抑制的に働き、その作用に STAT3 が関与していることが明らかとなった。

## (第 2 章 : KAP1 による IFN- $\alpha$ /STAT1 シグナル制御機構の解析)

KAP1 と STAT3 が結合することを受けて、まず免疫沈降実験により、過剰発現および内在性の KAP1 と STAT1 の結合を調べたところ、両者の結合が確認された。また、IFN- $\alpha$  刺激による STAT1 の転写活性に対する KAP1 の影響を調べたところ、KAP1 KD 下では転写活性が増強することがレポーターアッセイにより分かった。さらに、STAT1 の標的遺伝子である IRF-1 や Mx1 の発現誘導も増強することが、RT-PCR の結果より明らかとなった。

続いてこのメカニズムを調べる為、IFN- $\alpha$  刺激により誘導される STAT1 のリン酸化、核移行、クロマチン (IRF-1 プロモーター) への結合を調べたところ、リン酸化や核移行には KAP1 KD の影響が見られなかったものの、クロマチンへの結合量が増加していることが確認された。さらに、KRAB-ZFP をはじめ複数の転写因子に対する KAP1 の転写抑制作用に、HDAC (ヒストン脱アセチル化酵素) が関与しているという報告があることから、HDAC 阻害剤 (トリコスタチン A) を用いて、KAP1 の STAT1 転写抑制作用に対する影響を調べた。その結果、KAP1 の抑制作用に HDAC の酵素活性が必要であることが明らかとなった。

一方、ウイルス感染時に見られる STAT1 転写活性に対しても、KAP1 が抑制作用を持つのかについて調べるため、Epstein-Barr ウィルス由来の癌現遺伝子 LMP1 を HeLa 細胞で過剰発現させて、KAP1 KD の影響を RT-PCR 法により調べた。その結果、IFN- $\alpha$  刺激の際と同じく、KAP1 が抑制的にはたらくことが明らかとなった。

## (結論)

本研究ではサイトカインシグナル伝達に対する KAP1 の調節機構の解析を行い、第 1 章では、KAP1 が TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B シグナリングに対して抑制的に働くこと、またその抑制機構に STAT3 が関与していることを明らかにした。また第 2 章では、IFN- $\alpha$ /STAT1 シグナリングに対しても KAP1 が抑制的に働き、その抑制機構に HDAC が関与していることを明らかにした。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 田 正  
副 査 教 授 前 仲 勝 実  
副 査 准教授 尾 瀬 農 之  
副 査 講 師 南 保 明日香

学 位 論 文 題 名

## 転写コリプレッサー KAP 1 による サイトカインシグナル調節機構の解析

サイトカインは細胞から放出される生理活性物質のひとつで、細胞同士の情報伝達に用いられており、生体の恒常性維持に必要不可欠な因子である。サイトカインの機能異常は、感染、自己免疫疾患、癌など様々な疾患の病因となることが知られており、サイトカインシグナルの制御機構を解明することは、疾病治療において非常に重要なことだと考えられる。現在までに多数のサイトカインが発見され、またそのシグナル制御機構も解明されつつあるが、まだ十分ではない。本論文はサイトカインのひとつである IL-6 のシグナル制御機構を調べる中で、転写コリプレッサー KRAB-associated protein 1 (KAP1) が、その制御に深く関与していることを明らかにした。KAP1 は発見当初、KRAB zinc finger protein (KRAB-ZFP) と呼ばれる転写抑制因子群のコリプレッサーとして同定されたが、さらに最近、転写因子 STAT3 と直接結合して、IL-6 誘導性の STAT3 のセリンリン酸化を抑制することで、IL-6 シグナルを負に制御することを明らかにした。特に本論文では、サイトカインシグナルに対する KAP1 のさらなる機能を追究する目的で、IL-6 と同じ炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  のシグナリングや、STAT1 および STAT2 により活性が制御されている IFN- $\alpha$  のシグナリングに対して、KAP1 の作用を検討し、以下の点を明らかにしており、博士（生命科学）の学位を授与するに十分であると判断した。

### 1. KAP1 による TNF- $\alpha$ シグナル制御機構の解析

TNF- $\alpha$  シグナル伝達系に対する KAP1 の影響を調べる為、siRNA を用いて KAP1 遺伝子をノックダウンし（以下 KAP1 KD）、TNF- $\alpha$  誘導性の IL-6 発現に対する影響を調べた。その結果、KAP1 KD 下では、IL-6 の発現誘導が mRNA レベルおよび蛋白質レベルで増強することが明らかとなった。また、TNF- $\alpha$  誘導性の IL-6 発現に深く関与している転写因子 NF- $\kappa$ B に対する KAP1 の影響を、レポーターアッセイにより調べたところ、KAP1 KD 細胞では NF- $\kappa$ B の転写活性も増強していることが明らかとなった。これらのことより、KAP1 は通常 TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B シグナルに対して、抑制的に働いていることが示唆された。

続いて、KAP1 による NF- $\kappa$ B 転写活性調節機構の解析を行った。TNF- $\alpha$  が細胞に作用すると、細胞質内で I $\kappa$ B- $\alpha$  の分解が起き、それに伴い、I $\kappa$ B- $\alpha$  と結合していた NF- $\kappa$ B (p50, p65) は、細胞質から核内に局在変化を起こす。さらに NF- $\kappa$ B は、核内移行後、ゲノム上の

標的遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写を誘導すると言われている。そこで、まず I $\kappa$ B- $\alpha$ の分解に対する KAP1 KD の影響を調べたところ、殆ど影響は認められなかった。続いて、p65 の核移行およびクロマチン (IL-6 プロモーター) への結合を、免疫染色法および ChIP アッセイにより調べたところ、KAP1 KD により TNF- $\alpha$ 刺激後の p65 核内貯留の割合が増加し、また IL-6 プロモーターへの結合量も増加することが分かった。

p65 の核内貯留および標的遺伝子プロモーターへの結合には、p65 の翻訳後修飾、特に K310 のアセチル化が関与しているという報告があることから、KAP1 の p65 アセチル化に対する影響を調べた。その結果、KAP1 KD により p65 のアセチル化が増強することが確認された。続いて、p65 のアセチル化に対する KAP1 の調節機構を調べた。p65 のアセチル化には STAT3 が関与しているという報告がある。TNF- $\alpha$ の刺激が細胞に加わると、STAT3 はリン酸化を受け、特に S727 のリン酸化は、p65 への p300 (アセチル基転移酵素) リクルートを促進する作用があり、この機能を通して、STAT3 は p65 のアセチル化を調節すると言われている。そこで、KAP1 が STAT3 の上記機能を介して、p65 のアセチル化を調節しているのか解析した。その結果、KAP1 は TNF- $\alpha$ 誘導性の STAT3 セリンリン酸化に対して抑制的に働き、また p65 への p300 結合に対しても、抑制的に作用することが、免疫沈降実験により明らかとなった。

上記の結果から、KAP1 の TNF- $\alpha$ シグナル制御機構に、STAT3 が深く関与している可能性が考えられ、最後にその依存性を調べる為、STAT3 欠損下での KAP1 KD の影響を RT-PCR 法により調べた。その結果、KAP1 KD による IL-6 誘導増強作用が、STAT3 欠損下で抑制されることが明らかとなり、KAP1 は TNF- $\alpha$ シグナルに対して抑制的に機能し、その機能には STAT3 が関与していることが明らかとなった。

## 2.KAP1 による IFN- $\alpha$ /STAT1 シグナル制御機構の解析

KAP1 と STAT3 が結合することを受けて、まず免疫沈降実験により、過剰発現および内在性の KAP1 と STAT1 の結合を調べたところ、両者の結合が確認された。また、IFN- $\alpha$ 刺激による STAT1 の転写活性に対する KAP1 の影響を調べたところ、KAP1 KD 下では転写活性が増強することがレポーターアッセイにより分かった。さらに、STAT1 の標的遺伝子である IRF-1 や Mx1 の発現誘導も増強することが、RT-PCR の結果より明らかとなった。

続いてこのメカニズムを調べる為、IFN- $\alpha$ 刺激により誘導される STAT1 のリン酸化、核移行、クロマチン (IRF-1 プロモーター) への結合を調べたところ、リン酸化や核移行には KAP1 KD の影響が見られなかったものの、クロマチンへの結合量が増加していることが確認された。さらに、KRAB-ZFP をはじめ複数の転写因子に対する KAP1 の転写抑制作用に、HDAC (ヒストン脱アセチル化酵素) が関与しているという報告があることから、HDAC 阻害剤 (トリコスタチン A) を用いて、KAP1 の STAT1 転写抑制作用に対する影響を調べた。その結果、KAP1 の抑制作用に HDAC の酵素活性が必要であることが明らかとなった。

一方、ウィルス感染時に見られる STAT1 転写活性に対しても、KAP1 が抑制作用を持つのかについて調べるため、Epstein-Barr ウィルス由来の癌現遺伝子 LMP1 を HeLa 細胞で過剰発現させて、KAP1 KD の影響を RT-PCR 法により調べた。その結果、IFN- $\alpha$ 刺激の際と同じく、KAP1 が抑制的に機能することが明らかとなった。

以上、本論文ではサイトカインシグナル伝達に対する KAP1 の調節機構の解析を行い、KAP1 が TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B シグナリングに対して抑制的に働くこと、またその抑制機構に STAT3 が関与していることを明らかにした。また、IFN- $\alpha$ /STAT1 シグナリングに対しても KAP1 が抑制的に働き、その抑制機構に HDAC が関与していることを明らかにした。