

所属・職：理工学部 生命医化学科・助教

氏名：宮田 将徳

研究課題：核内受容体の転写運命決定因子の決定

研究期間：2016年4月1日～2017年3月31日

研究成果概要 (2,000字程度)

本研究の究極的な目的は、抗炎症薬の安全使用および耐性改善を可能にする制御方法の開発である。申請者のこれまでの研究成果 (*Biochemistry* 2010a, b, *Nat. commun.* 2012, 2013, 2015, *PNAS* 2015) で得られた知見を応用し、現在薬物療法を困難としている慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、肺線維症および小児がんの治療薬開発を目指す。

研究の背景および目的

申請者はこれまで、細胞内シグナル抑制因子の発現誘導が肺および中耳における免疫疾患に対して、新たな治療戦略になる可能性を示唆した (Lim JH et al, *Nat Commun.* 2012; Komatsu K et al., *Nat Commun.* 2013; Susuki-Miyata S, Miyata M et al., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015)。さらに申請者は、炎症時に GCs によって発現が誘導されるシグナル抑制分子のスクリーニングを行い、Interleukin-1 (IL-1)-receptor-associated kinase M (IRAK-M) を報告した (Miyata M. et al, *Nat. Commun.* 2015)。興味深いことに、GR と NF- κ B p65 は IRAK-M プロモーター上で複合体を形成することにより、相補的に同プロモーター上への結合を促進していることが示唆された (Miyata M. et al, *Nat. Commun.* 2015)。しかしながら、GR と NF- κ B p65 は転写活動において互いに抑制的に働くことが報告されており (Luecke HF & Yamamoto KR, *Genes Dev.* 2005)、実際どのようにして GR-p65 複合体が IRAK-M の転写を誘導しているのかは説明できていない。これらのことから「GR と相互作用する分子複合体により、GCs の作用が制御されている」と考えた。GR および p65 が DNA 上に結合している事を考慮すると、GR-p65 複合体に相互作用する分子によって転写が制御されている可能性がある。また、GR および p65 は翻訳後修飾により転写活性が制御されていること (Davies L, *Mol. Endocrinol.* 2008, Perkins ND, *Oncogene* 2006) から、GR-p65 が複合体を形成することにより GR および p65 各々の翻訳後修飾パターンが変化し、転写活性に影響を与えていることも推測される。しかしながら、これら GCs の作用を決定する GR 複合体による転写の制御機構の詳細は明らかになっていない。そこで、本申請研究では GR による転写制御機構を解明するため、GR へ結合するタンパク質を同定する事を目的とした。転写調節因子を同定するために、実験手法として質量分析機器を用いたプロテオーム解析を行った。

研究期間内の到達目標

1. GR-p65 複合体を発現する細胞系および複合体精製手法の構築
2. GR-p65 複合体のプロテオーム解析

1. GR を発現する細胞系および複合体精製手法の構築

Chromatin-interacting protein MS (ChIP-MS) 法 (Wang CI et al, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013) を用いて, GR 相互作用タンパク質を同定するため, GR の C 末領域に HTB-tag (6xHis, tobacco etch virus (TEV), biotinylation target sequence) を導入した GR-HTB 発現プラスミドを作製した. しかしながら, 同発現コンストラクトの細胞内発現効率が著しく低く, 質量分析に適さないと判断した. そこで ChIP-MS 法を断念し, 予備の質量分析法である BioID 法 (Roux KJ et al, *J. Cell. Biol.* 2012) を実施した. Gateway 法によってレンチウイルス発現ベクターを作製した. GR-BirA* および NF- κ B p65-BirA* 発現プラスミドを HEK293 細胞に遺伝子導入し, 各発現コンストラクトの発現を Western blot 法により確認した. その結果, コントロール BirA* および GR-BirA* タンパク質の発現が確認できたが, NF- κ B p65-BirA* の発現は認められなかった. p65 と BirA* タグ間の配列および長さを調節することにより発現効率を今後増加させる予定である. 次に, GR-BirA* のビオチン化能を検討した. コントロール BirA* および GR-BirA* を遺伝子導入した HEK293 細胞にビオチン処理をし, Western Blot 法によりビオチン化タンパク質を検出した. その結果, コントロール BirA* と比較し GR-BirA* 発現細胞においてビオチン処理依存的な数種類のビオチン化タンパク質 (90, 65, 55, 45, 37 kDa) を検出した. 次に, この GR-BirA* が機能的であることを調べるために, 合成グルココルチコイドであるデキサメタゾン (DEX) 依存的な GR の核内移行を免疫蛍光染色法によって確認した. その結果, DEX 非処理時において, GR-BirA* は細胞質に局在し, DEX 処理依存的に核内移行した. ビオチン添加時において, GR-BirA* の細胞内局在依存的に, ビオチン化タンパク質の増加が認められた. これらのことから, GR-BirA* は GR としての機能を保持していることが明らかになった. BioID 法の基盤が完成したので, コントロール- および GR-BirA* のレンチウイルスを用いて安定高発現ヒト気管支細胞 (BEAS-2B) を作製した.

2. GR-p65 複合体のプロテオーム解析

プロテオーム解析用のサンプルを調整するために, コントロールおよび GR-BirA* 細胞に DEX および NF- κ B 活性化剤である TNF α を処理し, 2 時間後に細胞を溶解した. 細胞溶解液中のビオチン化タンパク質を Streptavidin 磁気ビーズで精製し, 沈降物を洗浄, 脱架橋処理, 還元アルキル化およびトリプシン処理 (on-beads 消化) を行い, 上清を Zip-tip (Millipore) によって精製した. これを質量分析用サンプルとした. 質量分析機器 (LTQ Orbitrap XL EDT ion trap-orbitrap hybrid MS) を用いて質量分析を行い, Xcalibur software および データベース検索ツール Mascot を用いて得られた断片化ペプチドを解析した. その結果, ribosomal protein, BirA protein, GR など 9 種のタンパク質を検出した. しかしながら, 新規なタンパク質は含まれなかったため, 条件最適化が今後の課題である.

本研究では, 核内受容体である GR の転写活性を制御する相互作用タンパク質を同定するための手法 BioID 法を確立することに成功した. 本研究は GR および核内受容体の転写基盤の解明および人為的な制御法の確立に貢献するものであると考える.

【著書】

宮田 将徳

COPD 治療薬 (グルココルチコイド, PDE4 阻害剤) の作用メカニズム. *The LUNG perspectives* 2016; Vol 24 No.3: 79-83.

宮田 将徳

抗炎症薬による細胞内シグナルフィードバックの制御. 「生化学」 ミニレビュー 2016年10
月刊行 88-5号

【学会発表】

Miyata M, Lee BC, Lim JH, Li JD.

Deubiquitinase CYLD acts as a negative regulator for bacterium NTHi-induced inflammation by
suppressing K63-linked ubiquitination of MyD88.第89回 生化学会 2016年9月25日 仙台国際セン
ター

【外部獲得資金】

1. 科研費 研究活動スタート支援 (継続). 核内受容体の転写運命決定因子の同定
2. ひょうご科学技術協会 研究助成金. 慢性閉塞性肺疾患の治療薬PDE4阻害剤に対する薬
剤耐性獲得機構の解明
3. 上原記念生命科学財団 研究奨励金. リン酸化酵素シグナル経路を標的とした COPD の創薬
研究

本報告書は、データで gakunai@kwansei.ac.jp まで提出してください。