

氏名(本籍)	ひろ せ のり ゆき (高知県) 廣 瀬 憲 幸		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 乙 第 2461 号		
学位授与年月日	平成 21 年 10 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	<b>ATF-2 regulates lipopolysaccharide-induced transcription in macrophage cells</b> (ATF-2 はマクロファージ細胞におけるリポ多糖誘導性転写を制御する)		
主 査	筑波大学教授	博士(医学)	澁 谷 彰
副 査	筑波大学教授	医学博士	住 田 孝 之
副 査	筑波大学教授	医学博士	高 橋 智
副 査	筑波大学教授	医学博士	加 藤 光 保

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### (目的)

免疫応答は自然免疫と獲得免疫に分類することができる。自然免疫は生体外から侵入した病原体によって惹起される免疫応答機構である。近年、Toll-like receptor ファミリーを中心とする解析により、病原体への感染防御機構の解明が分子レベルで進みつつある。しかし、Toll-like receptor シグナルの下流で機能しうる転写機構については未だ不明な点が多い。転写因子 CREB/ATF ファミリーの一員である ATF-2 は紫外線や低酸素などのストレスに応答し、機能する転写活性化因子である。ストレス応答において、ATF-2 は活性化された JNK や p38 によりリン酸化され、転写活性化能を獲得する。ショウジョウバエでは、活性化された JNK、p38 が自然免疫応答に関与する事がこれまでに報告されている。そこで JNK や p38 の下流で機能する ATF-2 の自然免疫応答への関与、並びにその詳細な分子機構の解明を目的とし本研究を行った。

### (方法)

- (1) ATF-2 の自然免疫応答における転写活性化能を解析する為、ウェスタンブロット法、並びにレポーターアッセイ法を用いて検討した。
- (2) 自然免疫応答における ATF-2 の標的遺伝子を同定するため、RNAi 法でマクロファージ細胞における ATF-2 発現レベルを低下させ、ノーザンブロット法、ならびにレポーターアッセイ法にてその標的遺伝子を同定した。
- (3) ATF-2 複合体による転写機構を明らかにするため、N 末端側に FLAG-HA- タグを付加した ATF-2 を発現する Hela S3 細胞を樹立した。作成した Hela S3 細胞の核抽出液より、抗 FLAG 抗体、並びに抗 HA 抗体を用いた免疫沈降法にて ATF-2 複合体を精製し、構成因子を質量分析法並びにウェスタンブロット法にて同定した。
- (4) ATF-2 複合体に含まれる構成因子に対する阻害剤を用いて、自然免疫応答で誘導される ATF-2 標的遺伝子の発現をノーザンブロット法で検討した。

## (結果)

ATF-2の活性化に必須な71番目のスレオニンのリン酸化はToll-like receptor リガンドであるLPS、MALP-2、CpG-ODNによる刺激依存的に亢進された。次にATF-2の上流で機能しうるp38、JNK、ERKに対する阻害剤を用いてATF-2のリン酸化を検討した。しかし、これらの阻害剤ではLPS刺激によるATF-2のリン酸化を阻害できなかった。

LPSによって活性化されたATF-2による発現制御機構を解析するためCRE配列を4つ含むプロモーターを用いてルシフェラーゼ遺伝子の発現を検討した。すると、活性化されたATF-2はルシフェラーゼ遺伝子の発現を誘導した。

次にLPS刺激で活性化されたATF-2の標的遺伝子をRNAi法、並びにノーザンブロット法により探索した。その結果SOCS-3遺伝子を同定した。

LPS刺激によって誘導されるATF-2活性化機構を更に解明する為、ATF-2複合体の精製を行い、HDAC1と結合するRbAp48を同定した。マクロファージ細胞にLPS刺激を行うと、刺激依存的にATF-2はHDAC1と結合した。次にHDAC阻害剤であるTSA処理を行い、ATF-2の標的遺伝子であるSOCS-3遺伝子発現量を検討した。TSA処理を行うとLPSによって誘導されるSOCS-3遺伝子の発現が著しく阻害された。

## (考察)

p38、JNK、ERKに対する阻害剤を用いてLPSによって誘導されるATF-2のリン酸化を検討したが、ATF-2のリン酸化は完全に抑制される事はなかった。このことはこれらの因子ではなく他の因子によりATF-2がリン酸化されている可能性を示唆している。

ATF-2はLPS刺激によってHDAC1との結合が促進された。一般的にHDAC1はアセチル化されたヒストンからアセチル基を外し、転写を抑制させる機能を持つ事が知られている。今回、HDAC阻害剤であるTSAを処理した後SOCS-3遺伝子の発現レベルを検討してみたところ、その発現レベルは著しく低下していた。これは、HDAC活性が転写に抑制的ではなく、むしろ促進的に機能している事を示唆している。これらの結果は、HDAC1を含むATF-2複合体による新たな転写制御機構の存在を予想させる点でも非常に興味深い。

## (結語)

1. ATF-2はLPSにより活性化される。
2. LPSによって活性化されたATF-2はSOCS-3遺伝子の発現を正に制御する。
3. ATF-2はLPSによって活性化されると、HDAC1と複合体を形成する。
4. SOCS-3遺伝子の発現にはHDAC活性が必須である。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文はLPSなどの刺激に対する自然免疫応答におけるATF-2の役割を解析し、その標的遺伝子としてSOCS3を初めて同定した論文で、きわめて質の高い研究成果である。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。