

研究報告書

低酸素シグナルによる生体機能調節機構の解明と
疾患治療への応用

研究者氏名: 牧野 雄一

(研究期間: 平成 14 年 11 月 1 日 ~ 平成 18 年 3 月 31 日)

低酸素シグナルによる生体機能調節機構の解明と疾患治療への応用

牧野 雄一

研究のねらい

低酸素環境における生体応答あるいは低酸素シグナルによる生体機能の調節は実に多彩であり、その組織特異性、状況特異性などの多様性の分子機構については不明な点を多く残している。低酸素に対する生体適応の異常や破綻が多くの疾患・病態の成立に密接に関わることが明らかにされ、生体低酸素応答制御機構の本質的理解が生理学的のみならず臨床医学的にも要求されている。IPAS は低酸素などの細胞外環境因子によって誘導され、低酸素誘導性転写因子 HIF-1 とともに、低酸素シグナル伝達系におけるフィードバック制御、他の細胞内シグナルとのクロストークなどを媒介する重要な分子であり、低酸素下の生体機能の多様かつ精緻な制御に貢献していると考えられる。そこで、本研究は、① IPAS 発現制御機構の解析による生体低酸素応答のフィードバック制御機構の分子基盤の解明、② IPAS ネットワークの解析とその生理学的意義の解明、③ IPAS システムの異常と疾患・病態との関連の解明を目的とし、低酸素環境下における生体機能調節機構を分子から個体レベルまで明らかにして低酸素が関わる病態の克服法開発の分子基盤を築くことをめざして開始された。

研究成果

1) IPAS mRNA 発現における低酸素依存性 IPAS 遺伝子プロモーター活性化機構および低酸素依存性選択的スプライシング機構とその役割の究明

(さきがけ研究開始時の研究背景)

IPAS の低酸素誘導性発現は、HIF-1-IPAS ネガティブフィードバック制御系の成立の中核をなす重要な機構であり、その解明は生体低酸素応答制御機構の理解に新展開をもたらす可能性が高い。研究者はそのメカニズムの解析に取り組み、さきがけ研究開始時までに、IPAS ゲノムが HIF-3 α のゲノムと同一であり、IPAS、HIF-3 α が同一遺伝子の選択的スプライシング産物であることを見い出していた。HIF-3 α は HIF-1 α の paralogue であり、やはり HIF-1 β と 2 量体を形成して低酸素依存性に標的遺伝子の転写を活性化するらしい。低酸素応答の抑制 (IPAS)、促進 (HIF-3 α) という相反する機能を有する分子が同一の遺伝子領域から分かれ出することは非常に興味深い。さらに、低酸素下飼育マウスの各組織において IPAS 型 mRNA が優位に発現していることを突き止め、低酸素誘導性 IPAS 発現に IPAS/HIF-3 α 遺伝子の選択的スプライシング機構が密接に関わ

っている可能性を示していた。かかる低酸素依存性選択的スプライシングによる mRNA 発現の制御は、HIF-1 などによる遺伝子転写のレベルとは独立した、全く新しい低酸素誘導性遺伝子発現制御機構を提唱するものであり、その解明は低酸素応答における遺伝子発現の多様性の理解を進展させる上できわめて重要であることから、さきがけ研究において特に重点的に解明に取り組んだ。

(さきがけ研究の成果)

まず、IPAS、HIF-3 α 遺伝子の構造を詳細に対比し、IPAS と HIF-3 α がそれぞれ独立した第 1 エクソンを有することを明らかにした。IPAS の第 1 エクソン(エクソン 1a)は HIF-3 α の第 1 エクソン(エクソン 1)の約 6kb 上流に位置することから IPAS の primary transcript の生成には独自のプロモーターが関与している可能性が高く、IPAS スプライシング機構解明に先立って IPAS 遺伝子転写機構を明らかにすることは必須であった。IPAS 遺伝子転写開始点の上流約 5kb にわたるプロモーターを単離、断片化後、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を作成し、低酸素下培養細胞におけるプロモーター活性の解析を行い、IPASプロモーターが低酸素により活性化されることを明らかにした。かかるプロモーターの低酸素依存性活性化は HIF-1 α の発現およびプロモーター内の HIF-1 結合配列に依存し、さらに同配列への HIF-1 の結合に依存していた。すなわち HIF-1 α 拮抗分子 IPAS の発現に HIF-1 α が寄与するというフィードバックループがここに完成する。HIF-3 α プロモーターには低酸素誘導性は認められず、かかるプロモーターの選択的活性化は IPAS/HIF-3 α 発現制御における重要な基本メカニズムの一つと思われた。

続いて、さきがけ研究開始前に確立していた IPAS/HIF-3 α 各特異的エクソン-エクソン結合部を検出する PCR システムを用いて、低酸素下飼育マウス由来各組織中の mRNA スプライシングパターンの解析を行った。やはり、IPAS 型 mRNA 生成に関わる IPAS 特異的スプライシングは低酸素条件下でのみ認められ、一方、HIF-3 α 型スプライシング産物は正常酸素濃度下で優位に発現し、低酸素条件下ではほぼ消失している事が再確認された。すなわち、IPAS/HIF-3 α の選択的スプライシングが酸素分圧によって排他的制御を受けることをしめす。ここで、特に IPAS 型スプライシング産物の低酸素誘導性生成には、IPAS 特異的スプライシングが①低酸素下で活性化される、②正常酸素濃度下でスキップされる、という2つのメカニズムが関与することが想定される。研究者は IPAS 特異的スプライシング部位であるエクソン 4a の 3' スプライシング部位をモデルにかかる仮説の実証に取り組んだ。低酸素下で飼育されたマウスの小脳および肺に、IPAS mRNA が強く発現されていたが、かかる臓器の核抽出液中には IPASpre-mRNA エクソン 4a の 3' スプライシング部位特異的に結合する分子量約 75kDa の RNA 蛋白質が存在していた。かかる 75kDa RNA 結合蛋白質(RBP75)は既知の蛋白質であるが、選択的スプライシング制御における役割についてはほとんど知られていない。RBP75 による IPAS mRNA 特異的結合活性はマウスの小脳、肺の両組織の核抽出液中に共通して存在した。従って、RBP75 は、臓器を問わず、IPAS pre-mRNA 特異

的スプライシング部位への結合活性を示す蛋白質であり、IPAS mRNA の低酸素依存性スプライシングの制御に関わっている可能性が極めて高い。現在、RBP75 の細胞内発現量を変化させた場合の、IPASエクソン 4a 含有／排除に関する酸素分圧依存性制御の変化について解析、および酸素分圧の変化が RBP75 機能にあたる影響についての解析を進めている。

2)FLAG-IPAS 発現マウスの作出とその表現形質解析ならびに同マウス由来組織抽出液での IPAS 結合蛋白質検出システムの確立

FLAG 標識 IPAS(FLAG-IPAS)を高発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作出した。F2世代 CMV-FLAG-IPAS-Tg マウスを用いた解析から、IPAS は生体内においても HIF-1 拮抗分子として働く事が示唆された。

今後の展開

作出された FLAG-IPAS トランスジェニックマウスを用いて、関節炎モデル、担癌モデルなどを作成し低酸素応答／血管新生が密接に関連する病態の制御における IPAS の役割の解明を目指す。さらに、本研究の成果として明らかになりつつある IPAS 発現の制御機構に人為的に介入する方法を確立し、HIF-1-IPAS を中心とする生体低酸素応答システムの制御を標的とした新規分子療法開発の基盤としたい。

研究成果リスト

論文

1. Makiko Matsumoto, Yuichi Makino, Tetsuhiro Tanaka, Hirotoshi Tanaka, Nobuhiro Ishizaka, Eisei Noiri, Toshiro Fujita, and Masaomi Nangaku
Induction of Renoprotective gene expression by cobalt ameliorates ischemic injury of the kidney in rats. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 14: 1825-1832 (2003)
2. Tsunenori Kodama, Noriaki Shimizu, Noritada Yoshikawa, Yuichi Makino, Rika Ouchida, Kensaku Okamoto, Testuya Hisada, Hiroshi Nakamura, Chikao Morimoto, and Hirotoshi Tanaka.
Role of the glucocorticoid receptor for regulation of hypoxia-dependent gene expression
J. Biol. Chem., 278: 33384-33391 (2003)
3. Yuichi Makino, Hiroshi Nakamura, Eiji Ikeda, Kei Ohnuma, Kenji Yamauchi, Yuataka Yabe, Lorenz Poellinger, Yasunori Okada, Chikao Morimoto, and Hirotoshi Tanaka

Hypoxia-inducible factor regulates survival of antigen receptor-driven T cells

J. Immunol., 171: 6534-6540 (2003)

4. Helene Ameln, Thomas Gustafsson, Carl Johan Sundberg, Lorenz Poellinger, Eva Jansson, and Yuichi Makino

Physiological activation of hypoxia-inducible factor-1 in human skeletal muscle

FASEB J., 19: 1009-1011 (2005)

5. Hiroshi Nakamura, Yuichi Makino, Kensaku Okamoto, Lorenz Poellinger, Kei Ohnuma, Chikao Morimoto, and Hirotohi Tanaka

TCR-engagement increases HIF-1 α protein synthesis via rapamycin-sensitive pathway under hypoxic conditions in human peripheral T cells *J. Immunol.*, 174: 7592-7599 (2005)

特許出願 なし

総説

1. IPAS による低酸素応答性遺伝子発現の制御

牧野雄一

臨床免疫 41:472-476(2004)

2. 低酸素シグナルによる末梢での T 細胞の制御

牧野雄一、森本幾夫、田中廣壽

臨床免疫 43:92-96(2005)

学会発表・講演

1. 広島大学若手研究者によるクロマチン研究会 (2003 年、広島市)

IPAS による生体低酸素応答の制御

牧野雄一

2. 第8回酸素ダイナミクス研究会 (2003 年、神戸市)

HIF-1 機能抑制分子 IPAS による生体低酸素応答制御の分子機構

牧野雄一、中村博志、岡本健作、田中廣壽

3. 横浜市立大学大学院総合理学特別講義 (2003 年、横浜市)

生体の低酸素環境への適応機構

牧野雄一

4. 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター セミナー (2003年、川崎市)

低酸素誘導性転写因子による生体機能調節機構

牧野雄一

5. 6th International Symposium on vonHippel-Lindau Disease (2004, Kouchi, Japan)

Plenary workshop

Negative feedback regulation of hypoxia-inducible gene expression by a bHLH/PAS factor IPAS

Yuichi Makino, Arvydas Kanopka, Hiroshi Nakamura, Lorenz Poellinger, Hirotohi Tanaka

6. Vilnius Institute Biotechnology Seminar (2004, Vilnius, Lithuania)

Negative feedback regulation of hypoxia-inducible gene expression by IPAS

Yuichi Makino, Arvydas Kanopka, and Lorenz Poellinger

7. 国立成育医療センター研究所 特別セミナー (2005年、東京都)

低酸素誘導性転写因子群による生体機能調節機構

牧野雄一