



Title	亜鉛結合タンパクFLJ34243の自己免疫疾患への関与の解析
Author(s)	三田, 恵理
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58517
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【78】					
氏	名	さん 三	だ 田	え 恵	り 理
博士の専攻分野の名称		博 士（理 学）			
学 位 記 番 号		第 2 4 6 8 2 号			
学 位 授 与 年 月 日		平 成 23 年 3 月 25 日			
学 位 授 与 の 要 件		学位規則第4条第1項該当 生命機能研究科生命機能専攻			
学 位 論 文 名		亜鉛結合タンパクFLJ34243の自己免疫疾患への関与の解析			
論 文 審 査 委 員		(主査) 教 授 平野 俊夫 (副査) 教 授 宮坂 昌之 教 授 審良 静男 准教授 村上 正晃			

論 文 内 容 の 要 旨

我々の研究室では、リウマチのマウスモデルの1つであるF759マウスのIL-6依存性の関節炎の解析を行ってきた。これまでの研究から、F759マウスに発症する関節炎は、リンパ球特にMHC class 2 拘束性のCD4+T細胞に依存することが判明した。最近、線維芽細胞や血管内皮細胞などの1型コラーゲン陽性細胞にIL-17AとIL-6が働くと相乗的にIL-6、ケモカイン等の炎症誘導分子を発現する“IL-6アンブ”を発見し、IL-6アンブの過剰な活性化が、F759マウスの関節炎のみならず多発性硬化症モデルである自己免疫性脳脊髄炎の発症にも関与していることを示した。一方、当研究室では“細胞内亜鉛信号”も研究してきた。この細胞内亜鉛信号とは、細胞外からの刺激にて細胞内の亜鉛の恒常性が変化し、細胞内タンパク質への亜鉛の結合状態が変わり、その分子の活性化状態が変化して、さらに、細胞の状態が変化することである。つまり、亜鉛がsecond messengerとして働く可能性を持っていることを証明することを目的としている。

このような背景のもと、私は、IL-6アンブの活性化と細胞内亜鉛信号の研究の融合の第一歩として本研究を行った。つまり、重要な1型コラーゲン陽性細胞に発現が認められる“zinc finger モチーフを持つ分子”と“IL-6アンブの活性化”との関係を解析した。

今回、私は、そのような分子として特にFLJ34243分子に注目した。FLJ34243は8つのzinc finger ドメインと1つのKRAB ドメインを持つ細胞内タンパク質であり、そのホモログは哺乳類のみならず鳥類、植物や線虫でも存在する。当研究室にて行ったゲノムワイドのshRNAのスクリーニングにてIL-6アンブの活性化に重要な遺伝子を探索するとともに、NF-κBとSTAT3との結合分子をLCMSにて同定したデータから、FLJ34243分子は、そのノックダウンにてIL-6アンブの活性化が抑制されて、NF-κBに結合することが示唆されていた。実際にFLJ34243分子を詳しく解析してみると、FLJ34243分子は、いくつかの1型コラーゲン陽性細胞にてノックダウンするとIL-17AとIL-6刺激で相乗的に発現されるIL-6がほとんど認められなくなった。遺伝子の発現の解析より、FLJ34243分子のノックダウンにてIL-6、ケモカイン等のNF-κB信号のターゲットである炎症関連遺伝子の発現が有意に抑制された。一方、SOCS3などのSTAT3信号のターゲットやNF-κBの信号伝達分子p65やp105自体の発現は変化していなかった。重要なことに、サイトカイン誘導性関節炎の発症は、関節局所でのFLJ34243分子のノックダウンにて有意に抑制された。生化学的な実験にてFLJ34243とNF-κB信号の関係を解析した。免疫沈降法により、核内にてFLJ34243はp65とp50と会合していることも判明した。しかし、FLJ34243ノックダウン細胞株においても、サイトカイン刺激後のp65のリン酸化や核移行は抑制されていなかった。一方、刺激後のNF-κBの転写活性について検討を行った結果、NF-κBレポーターを介する転写活性が減弱し、サイトカイン刺激依存性のp65のNF-κB結合配列への結合は、FLJ34243

分子の欠損にて有意に減弱されていた。また、サイトカイン刺激後に、NF- κ B依存性遺伝子のプロモーター領域：IL-6、Lcn2、Cxcl2へのp65のリクルートにFLJ34243分子が重要であることも明らかとなった。さらに、実験を行ってFLJ34243分子が、サイトカイン刺激後に、NF- κ B依存性遺伝子のプロモーター領域：IL-6、Lcn2、Cxcl2へリクルートされること、試験管内にてNF- κ B認識配列へのp65の結合を増強することが示された。

以上の結果より、FLJ34243分子は、核内にて、サイトカイン刺激後に、p65がNF- κ B依存性遺伝子のプロモーター領域へ結合することを強化する分子で、生体内では自己免疫疾患を含む炎症反応を制御している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者はIL-6アンブの活性化と細胞内亜鉛信号の研究の融合の第一歩として本研究を行いた。FLJ34243に注目した。生化学的な実験にてFLJ34243とNFkB信号の関係を解析していた。免疫沈降法により、核内にてFLJ34243はp65とp50と会合していることも判明した。しかし、FLJ34243KD細胞株においても、サイトカイン刺激後のp65のリン酸化や核移行は抑制されていなかった。一方、刺激後のNFkBの転写活性について検討を行った結果、NFkBレポーターを介する転写活性が減弱し、サイトカイン刺激依存性のp65のNFkB結合配列への結合は、FLJ34243の欠損にて有意に減弱されていた。また、サイトカイン刺激後に、NFkB依存性遺伝子のプロモーター領域へのp65のリクルートにFLJ34243が重要であることも明らかとなった。さらに、実験を行ってFLJ34243が、サイトカイン刺激後に、NFkB依存性遺伝子のプロモーター領域へリクルートされること、試験管内にてNFkB認識配列へのp65の結合を増強することが示されていた。

以上の結果より、FLJ34243は、核内にて、サイトカイン刺激後に、p65がNFkB依存性遺伝子のプロモーター領域へ結合することを強化する分子で、生体内にて自己免疫疾患を含む炎症反応を制御している可能性が示唆された。

以上の結果から、申請者 三田恵理が学位の授与に値すると認める。