

## 研究課題別評価

1 研究課題名: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

2 研究者氏名:牧野雄一

3 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。

4 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、IPAS ゲノムが HIF-3 $\alpha$  のゲノムと同一であり、IPAS、HIF-3 $\alpha$  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出ししていた。HIF-3 $\alpha$  は HIF-1 $\alpha$  の paralogue であり、やはり HIF-1 $\beta$  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 $\alpha$ ) 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 $\alpha$  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 $\alpha$  遺伝子の構造を詳細に対比し、IPAS と HIF-3 $\alpha$  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 $\alpha$  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

一を単離、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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 拮抗分子 IPAS の発現に HIF-1 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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(未発表)。

続いて、さきがけ研究開始前に確立していた IPAS/HIF-3 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$ 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蛋白質が存在していた。質量分析の結果、既知の RNA 結合蛋白『A』であることが判明した(未発表)。『A』は最近発見された RNA 結合蛋白であり、mRNA の核外への輸送、mRNA の分解制御等に関わることが示されてい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。かかる『A』による IPAS mRNA 特異的結合活性は低酸素マウスの小脳、肺の両組織の核抽出液中に共通して存在したが、正常酸素下飼育マウスの同臓器核抽出液では存在しなかった。従って、『A』は、臓器を問わず、低酸素環境下で 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。

かかる結果を受けて、『A』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を解析する事を試みた。遺伝子導入を行う必要があり、これまでのマウス組織由来 RNA の解析からマウス培養細胞由来 RNA の解析へと実験系を変更したが、培養細胞系では IPAS 発現レベルが低くエクソン 4a 含有の検出感度が低い事、また培養細胞系では『A』の核内発現量が極めて高く、『A』発現ベクターの導入等では細胞内(核内)『A』発現量を変化させる事は容易ではないことが問題点として浮上した。この問題を解決すべく、まず、IPAS エクソン 4a 周辺のゲノム配列を含むミニジーン(ミニクロモゾーム)を作製した。このミニジーンのマウス血管内皮細胞へ導入し、低酸素下培養後 RNA を採取し、上述 RT-PCR 法でスプライシングレベルを解析した結果、やはり低酸素依存性のエクソン 4a 含有が高感度で検出された。すなわち、マウス培養細胞系においても低酸素依存性 IPAS 特異的 mRNA スプライシングに寄与する細胞内装置が内在する事をしめす。一方、『A』の発現量を低下させる事を目的とする SiRNA 導入系を複数種施行したが、最終的に『A』発現量を約 30%にまで減少させる RNA 配列を得た。今後、これらミニジーン、SiRNA 実験系の組み合わせ、スプライシング解析を行う予定である。

一方、IPAS pre-mRNA エクソン 3 の 3' 側スプライシングは正常酸素下飼育マウス臓器では見られない。同スプライシング部位を含むミニジーンを作成し、正常酸素下で培養したマウス血管内皮細胞の核抽出液を用いて in vitro スプライシング解析を行ってもエクソン 3 の 3' 側スプライシングは認められない。さらに、同ミニジーンにスプライシング活性化シス配列を結合させた場合も正常酸素下細胞の核抽出液にはスプライシング活性は検出されなかった。すなわち、正常酸素分圧

下の細胞において IPAS スプライシングの或る部位を特異的に抑制するメカニズムが存在する可能性が示唆された。実際、正常酸素下細胞の核抽出液には IPAS エクソン 3 の 3' スプライシング部位特異的に結合する 37kd の蛋白質が検出される。現在、かかる結合蛋白質の同定を試みている(一部、Vilnius Biotechnology Institute の Kanopka 博士との共同研究)。

## 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。FLAG-IPAS の組織発現量の異なる Tg マウスを得る目的で、CMV プロモーターおよび CAGG プロモーター支配下で FLAG-IPAS を発現する 2 種類のマウスを作成した。CMV-FLAG-IPAS-Tg マウスにおいて、FLAG-IPAS の高発現組織では HIF-1 標的遺伝子の低酸素誘導性発現が抑制されており、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。さらにかかる FLAG-IPAS 発現マウスにおいては皮膚創傷の治癒が野生型マウスと比し有意に遅延していた。IPAS 導入肝がん細胞/移植肝がんにおいて、血管内皮増殖因子の低酸素誘導性発現および血管新生が抑制されることがすでに証明されており、本マウスにおいても生体内 IPAS 過剰発現により創傷治癒に不可欠な血管新生が阻害された可能性が示唆される。今後、本マウスを用いて、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。一方、CAGG-FLAG-IPAS-Tg マウスの繁殖も進んでおり、同様の解析を行う予定である。また、FLAG-IPAS 発現マウス由来の各組織抽出液を対象として、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降法を確立しつつある。本法により、生体内で IPAS と相互作用する蛋白質の同定を目指している。

## 5 自己評価:

IPAS 発現制御機構の解明に関して、HIF-1 が転写因子として直接に IPAS の発現を誘導するメカニズムを解明した事、IPAS mRNA 選択的スプライシングの制御に係わる蛋白質の候補を同定した事は、さきがけ研究開始前には単なる現象論でしかなかった低酸素応答のフィードバック制御機構に分子論的理解を導入する成果と考えている。一方で、ゲノム科学、RNA 科学は本研究の遂行中も爆発的に展開し続け、たとえば選択的スプライシング産物の生成過程、産物の存在意義などに関する理解も日々多様化している。本研究の成果も単なる 1 モデルとしてだけでなく、多様な生命現象の中での位置づけを常に検証してゆく必要性を強く感じている。

また、トランスジェニックマウス研究など個体を用いた研究は予想より時間がかかっているが、解析個体数を増加させる事などにより比較的安定したデータが得られている。個体研究は最終的には医学応用を目指す本研究において必須のプロセスであるので、時間や数を費やしても目標通り継続すべきと考えている。

最後に、IPAS のこれまで未知の機能、役割の探索という目標を掲げているが、十分な結果が得られていない。各実験系の標準化という意味でも、既存のラインから結果の予想、評価が行い易い実験を優先させてきたことによる帰結と考えている。今後、探索型の実験も多く展開させて行きたい。

## 6 研究総括の見解:

IPAS プロモーターの低酸素条件下での活性化、ならびに、IPAS 遺伝子と同じ DNA 塩基配列上に存在する HIF-1  $\alpha$  遺伝子の発現と HIF-1  $\alpha$  の IPAS プロモーターの結合配列への結合のこの活性化への関与を明らかにしたこと、また、IPAS mRNA への特異的スプライシングに関与する RNA 結合蛋白質を明らかにしたことは、低酸素シグナルによる生体機能調節機構の解明に貢

献した優れた成果と評価する。

## 7 主な論文等:

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

### 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. 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
2. 第1回がんとハイポキシア研究会 (2003年、京都市)  
IPAS による生体低酸素応答制御の分子機構  
牧野雄一
3. 第48回日本リウマチ学会学術集会 (2004年、岡山市)  
T 細胞における低酸素応答性転写因子 HIF-1 の役割の解析  
牧野雄一、中村博志、大沼圭、森本幾夫、田中廣壽
4. 6<sup>th</sup> International Symposium on von Hippel-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, Hirotoshi Tanaka
5. Vilnius Institute Biotechnology Seminar (2004, Vilnius, Lithuania)  
Negative feedback regulation of hypoxia-inducible gene expression by IPAS  
Yuichi Makino, Arvydas Kanopka, and Lorenz Poellinger