

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	分子遺伝情報科学領域 分子生物学教育研究分野 藤田 裕貴
(論文題目) IL-3-induced immediate expression of <i>c-fos</i> and <i>c-jun</i> is modulated by the IKK2-JNK axis. (IKK2-JNK 経路は IL-3 による <i>c-fos</i> と <i>c-jun</i> 遺伝子の発現を調節する。)	
(内容の要旨) < 緒言 > インターロイキン(IL)-3 は造血系細胞の増殖・生存・分化などの細胞応答を誘導するサイトカインである。IL-3 が細胞膜上の IL-3 受容体と結合すると細胞内シグナルが活性化し、多様な遺伝子の発現を通じて細胞応答を調節する。IL-3 に応じて短時間で発現する <i>c-fos</i> , <i>c-jun</i> , <i>c-myc</i> などの最初期遺伝子群は、転写因子として二次的な遺伝子発現を誘導し、IL-3 による細胞応答を調節する重要な遺伝子と考えられている。 Inhibitor of nuclear factor- $\kappa$ B kinase (IKK) 1/2 は様々な遺伝子の発現を制御する転写因子 NF- $\kappa$ B の制御因子である。近年、IKK1/2 が IL-3 に応じて活性化し、アポトーシスの抑制や肥満細胞の分化に関与することが報告された。したがって、IKK1/2 は IL-3 による生物学的応答に関与する重要な因子と考えられる。しかし、IL-3 によって誘導される最初期遺伝子群と IKK1/2 の関係は明らかになっていない。 本研究は IL-3 による最初期遺伝子群の発現への IKK1/2 の関与を検証し、その発現機構の解明を目的とした。  < 方法 > 本研究では IL-3 依存性マウス由来造血系細胞 Ba/F3 および 32D を用いた。IKK1/2 のノックアウト実験では、IKK1 あるいは IKK2 を欠失する Ba/F3 を CRISPR-Cas9 法を用いて作製した。IL-3 刺激では、標的細胞を IL-3 非含有培地で 6 時間培養し、その後 IL-3 を細胞に添加して以後の実験を行なった。  < 結果 > 1. 最初期遺伝子群の発現に対する IKK1/2 の関与 IL-3 による <i>c-fos</i> , <i>c-jun</i> , <i>c-myc</i> の発現に対する IKK1/2 阻害剤の影響を定量 PCR 法で評価した。Ba/F3 では IKK1/2 阻害剤によって <i>c-fos</i> および <i>c-jun</i> の発現量が減少したが、 <i>c-myc</i> の発現量が変化しなかった。32D では <i>c-jun</i> の発現が確認できなかったが、Ba/F3 と同様に <i>c-fos</i> の発現量が減少し、 <i>c-myc</i> の発現量が変化しなかった。 さらに IKK1 あるいは IKK2 を欠失した Ba/F3 で上記遺伝子の発現量を評価した。IKK1/2 阻害剤実験の結果と一致して、IL-3 による <i>c-fos</i> と <i>c-jun</i> の発現量が減少した。以上より、IKK1 および IKK2 が <i>c-fos</i> および <i>c-jun</i> の発現に関与することが明らかになった。  2. IL-3 による古典的 NF- $\kappa$ B 活性の評価 IKK2 は古典的 NF- $\kappa$ B シグナルの制御因子である。そこで、IL-3 によって活性化した IKK1/2 が古典的 NF- $\kappa$ B シグナルの活性に寄与しているかを検証した。Ba/F3 細胞において、イムノブロット法により IL-3 刺激後のリン酸化 IKK1/2 の増加を確認した。一方、核内 NF- $\kappa$ B 量や NF- $\kappa$ B 抑制性タンパク質 I $\kappa$ B 量は IL-3 刺激の前後で変動が認めら	

れなかった。したがって、IL-3 に応じて古典的 NF- $\kappa$ B シグナルは活性化せず、IKK1/2 は NF- $\kappa$ B 非依存的な機構を介して最初期遺伝子群の発現を誘導することが示唆された。

### 3. *c-fos* および *c-jun* の発現を調節する IKK1/2 下流シグナルの検討

IKK1/2 は JNK の活性化を通じて肥満細胞の増殖を亢進することが報告されている。また、JNK は *c-jun* の転写を制御する転写因子 c-Jun を活性化する。以上より、(1) IL-3 によって活性化された IKK は JNK の活性を調節すること、(2) JNK が *c-jun* や *c-fos* の発現を制御すること、を着想した。この仮説を検証するために、IKK1 あるいは IKK2 欠失 Ba/F3 細胞における JNK のリン酸化をイムノブロット法で評価した。その結果、IKK2 欠失細胞で IL-3 刺激後の JNK のリン酸化が減少していた。さらに、JNK 阻害剤により *c-jun* および *c-fos* の発現量が減少した。以上より、IKK2 は JNK の活性化を介して *c-jun* および *c-fos* の発現を調節することが明らかになった。

#### < 考察 >

本研究は IL-3 に応じて IKK1/2 が NF- $\kappa$ B 非依存的に *c-fos* および *c-jun* の発現を制御することを明らかにした。*c-fos* や *c-jun* は転写因子 AP-1 として様々な遺伝子の発現を制御することで長期的な細胞応答を調節する。IKK1/2 は IL-3 に応じた細胞の生存・増殖・分化への関与が報告されていることから、本研究成果は IL-3 による長期的な細胞応答を制御する機構の一端を明らかにしたと考えられる。

IKK2 は JNK を介して *c-fos* や *c-jun* の遺伝子発現を調節する。一方、IKK1 の下流シグナルは未解明である。IKK1 は NF- $\kappa$ B 関連因子以外に様々なタンパク質の活性を制御することが知られている。本研究は、IL-3 シグナルにおいて IKK1 を介した新たな最初期遺伝子群を調節する機構の存在を示唆する。