

Review Article

膜結合型プロスタグランジン E₂ 合成酵素の 転写調節機構 転写調節因子 Egr-1 の役割を中心に

奈良場博昭

国立循環器病センター研究所 薬理部薬物代謝研究室

Transcriptional Regulation of the Membrane-associated Prostaglandin E₂ Synthase Gene: ESSENTIAL ROLE OF THE TRANSCRIPTION FACTOR EGR-1

Membrane-associated prostaglandin (PG) E₂ synthase (mPGES) is an inducible terminal enzyme in the biosynthetic pathway for PGE₂, which participates in many biological processes. In this study, we investigated the molecular mechanism controlling the inducible expression of mPGES. The mouse *mPGES* gene consisted of three exons, and its 5'-proximal promoter contained consensus motifs for the binding of several transcription factors. Deletion and site-specific mutation analyses of the 5'-flanking region demonstrated that stimulus-inducible expression of mouse and human mPGES required tandem GC boxes adjacent to the initiation site. The stimulus-induced GC box-binding activity was present in nuclear extracts of cells, in which the proximal GC box was essential for binding. An 80-kDa stimulus-inducible nuclear protein that bound to this GC box was identified as the transcription factor Egr-1 (for early growth response-1). These results suggest that Egr-1 is a key transcription factor in regulating the inducible expression of mPGES.

Rec.2/2/2004,pp100-106

Hiroaki Naraba

Department of Pharmacology, National Cardiovascular Center Research Institute

Key words prostaglandin E₂, membrane-associated prostaglandin E₂ synthase, early growth response, transcription factor, GC box

はじめに

プロスタグランジン E₂ (PGE₂) は多彩な生理活性を有し、生態の恒常性の維持に重要な役割を果たしている。また同時に、PGE₂ は慢性炎症や癌などの病態における関与も注目されており、その産生を抑制することは臨床的に重要な意味を持つ。病態での PGE₂ 産生は強い誘導性を示すシクロオキシゲナーゼ (COX-2) により引き起こされると考えられ、その選択的阻害薬の臨床応用が急速に進みつつある。一方、最近になり PGE₂ 産生の最終段階に関する膜結合型 PGE₂ 合成酵素 (mPGES1) が同定された¹⁾。本酵素も COX-2 と同様に炎症性刺激により発現が誘導されることが明らかとなり²⁾、mPGES1 と COX-2 の協調した発現誘導の重要性が示唆されている³⁾。しかし、mPGES1 遺伝子のプロモーター領域には COX-2 遺伝子の

プロモーター領域に存在し、転写調節において重要性が示唆されている NF- κ B, CRE, E-box などの認識配列は認められない⁴⁾。このため、mPGES1 の誘導性の転写調節機構は COX-2 とは異なる可能性が考えられ、その解明が期待されている。mPGES1 の転写調節に関する研究は、まだ始まったばかりであるが、本稿では最近の研究の進展を解説する⁵⁾。なお、現在 PGE₂ 合成酵素には mPGES2⁶⁾ と細胞質型の cPGES⁷⁾ という異なるアイソザイムの存在が報告されている。

mPGES1 遺伝子のプロモーター領域

マウスの mPGES1 遺伝子は、3つの exon から構成され、全長は約 10kb であり比較的単純な構造を有している (図 1)。この構造は先に報告されたヒト mPGES1 の遺伝子構

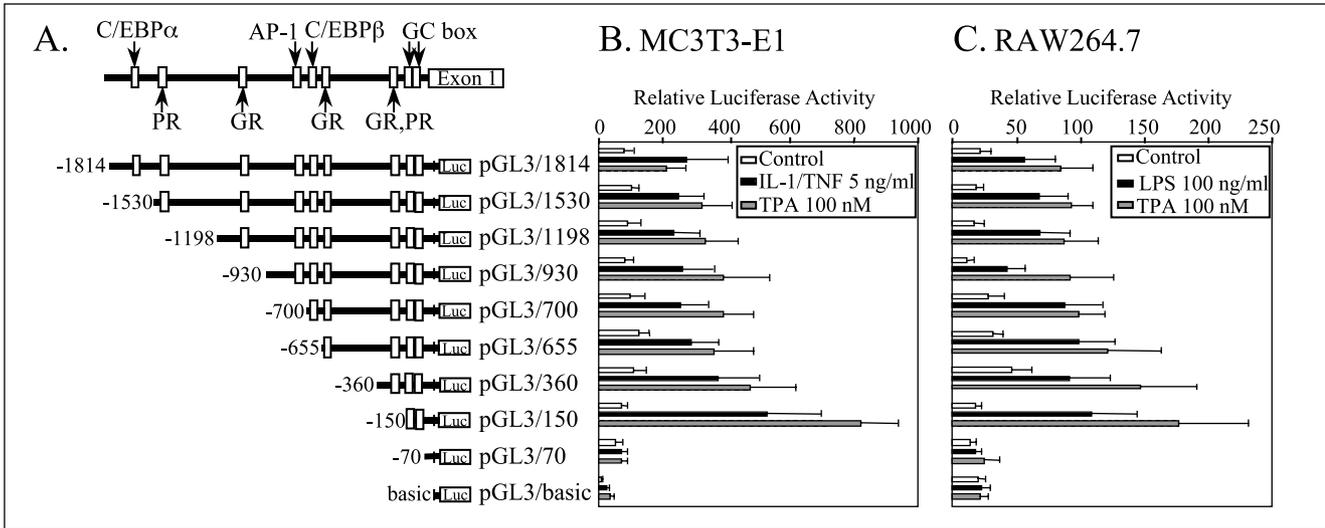


図2 マウス mPGES1 のレポーター遺伝子アッセイ

mPGES1プロモーターの代表的な転写調節因子の認識配列が一つずつ削られていくように設計した5'-deletion mutantをpGL3/basicベクターに連結したルシフェラーゼベクター(A)をMC3T3細胞およびRAW264細胞にトランスフェクションし、各刺激を加え、16時間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定した。ホタルルシフェラーゼ活性の値を、コトランスフェクションしたpRL-TKによるウミシイタケルシフェラーゼ活性の値で補正した(B)はMC3T3-E1細胞(C)はRAW264.7細胞における結果をmean ± S.E.M (n = 4)で表した。

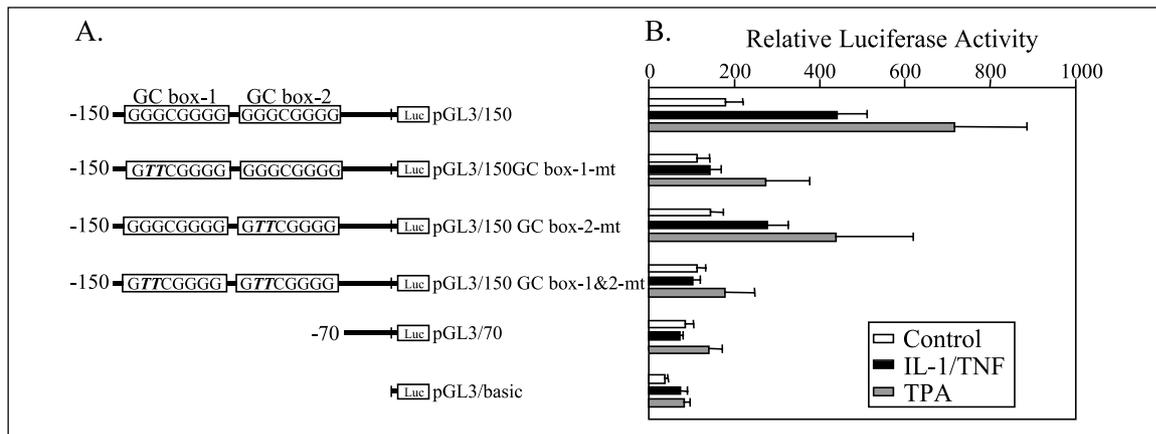


図3 GC box 配列の変異がルシフェラーゼ活性に及ぼす影響

MC3T3-E1細胞に変異ルシフェラーゼベクター(A)をトランスフェクションし、24時間後に各種刺激を加え、16時間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定した。ホタルルシフェラーゼ活性の値を、コトランスフェクションしたpRL-TKによるウミシイタケルシフェラーゼ活性の値で補正した。各値はmean ± S.E.M (n = 4)で表した。

ロモーター領域に存在するが、プロスタサイクリン合成酵素やトロンボキサン受容体などのプロスタグランジン関連の遺伝子のプロモーター領域にも存在することが報告されている。本稿では主にこのGC boxの役割について解説する。なお、mPGES1の遺伝子欠損マウスに関しては、2002年に大阪大学のグループが報告を行っている⁸⁾。

mPGES1の発現誘導に関わるプロモーター領域

マウス mPGES1 遺伝子のプロモーター領域から各転写

調節因子の認識領域が削れるように9種類の5' deletion mutantを作成し、これを luciferase reporter と連結したプラスミドを作成した(図2A)。これを用いてmPGES1のプロモーター活性をデュアルルシフェラーゼアッセイ法で測定した。

mPGES1の発現が確認されているマウス osteoblast MC3T3-E1細胞とマウス macrophage 様細胞 RAW264.7で検討したところ、プロモーター断片150 bpまでは強い活性の誘導が各刺激において認められた(図2B,C)。しかし、この150 bpから80 bpを削った70 bpのプロモーター

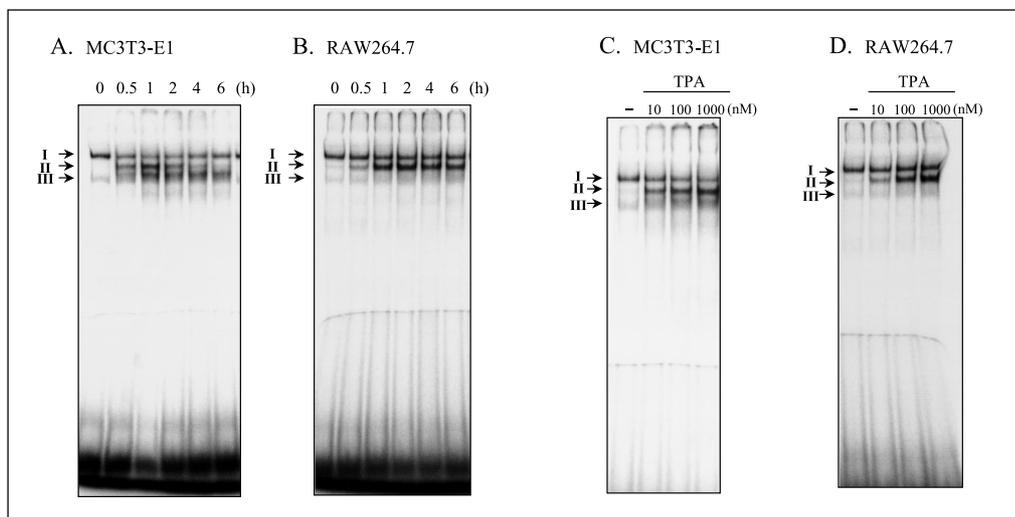


図4 ゲルシフトアッセイによる GC box 結合蛋白質の検出

MC3T3-E1細胞(A,C)およびRAW264.7細胞(B,D)を各濃度(C,D)のTPAで各時間(A,B)刺激し、核蛋白質を抽出し、ゲルシフトアッセイを行った。IIは刺激に伴い出現するGC box結合蛋白質を示す。3回の実験の代表的な一例を示した。

断片では誘導性の活性上昇は完全に消失していた。このことはmPGES1の発現誘導に、この80 bpの領域が必須であることを示すものと考えられるが、この領域には前述の2つのGC box配列が近接して存在する以外は、特に既知の転写調節因子の認識部位は認められなかった。そこで、それぞれのGC boxの配列および両方のGC boxの配列に変異を導入した変異プロモーターを作成し(図3A)、MC3T3-E1細胞を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、プロモーター活性は、各GC boxの配列に変異を導入した場合には刺激による活性上昇が減弱され、さらに両方のGC box配列に変異を導入した場合には、刺激誘導性の活性上昇はほぼ消失し、70 bpのプロモーター断片と同程度まで低下した(図3B)。

以上のことから、mPGES1の発現誘導には転写開始点から150 bp上流の領域が重要であり、特に2つのGC box配列の存在が必須であると考えられた。すなわち、このGC boxを認識する転写調節因子が存在し、mPGES1遺伝子の発現を制御することが推定された。

GC box結合活性の検出

次にゲルシフトアッセイ法を用いてGC boxに対する蛋白質の結合活性を測定した。その結果、常に存在する複数のバンドが認められたが、MC3T3-E1細胞およびRAW264.7細胞ともにホルボールエステル刺激に伴い、新たにGC boxに結合する蛋白質の存在が確認された。そして、この刺激誘導性の結合活性はホルボールエステル刺激の時間(図4A,B)やその濃度(図4C,D)に依存して

上昇した。

次に、この結合活性が2つのGC boxのどちらに由来するかを確認するために、それぞれのGC boxの配列および両方のGC boxの配列に変異を導入したプローブを作成し、ゲルシフトアッセイを行った。その結果、結合活性は上流側のGC box(GC box-1)に変異を導入した場合には、影響は全く認められなかったが、下流側のGC box(GC box-2)に変異を導入した場合、および両方のGC boxに変異を導入した場合には、刺激誘導性の結合活性は完全に消失した(図5A,B)。さらに、結合活性の特異性を確認するために非標識のGC boxプローブを過剰に反応系に加えた。この場合には、変異を導入していないプローブと上流側のGC boxに変異を導入したプローブの場合に結合活性が消失し(図5C,D)、下流側のGC boxに変異を導入したプローブの過剰添加は結合活性には全く影響を示さなかった(図5C,D)。

これらのことから、mPGES1のプロモーター領域に存在するGC boxには、刺激により新たに蛋白質が結合し、この蛋白質は下流側のGC boxを認識し結合していることが示唆された。前述のルシフェラーゼアッセイでは両方のGC boxが転写活性に関与することが示されたが、結合蛋白質は下流側のGC boxを認識して結合していることが明らかとなった。このことから、詳細は不明であるが、GC box結合蛋白質は下流側のGC boxに結合するが、十分な転写活性を発揮するために上流側のGC boxも何らかの役割を果たしているものと推定された。

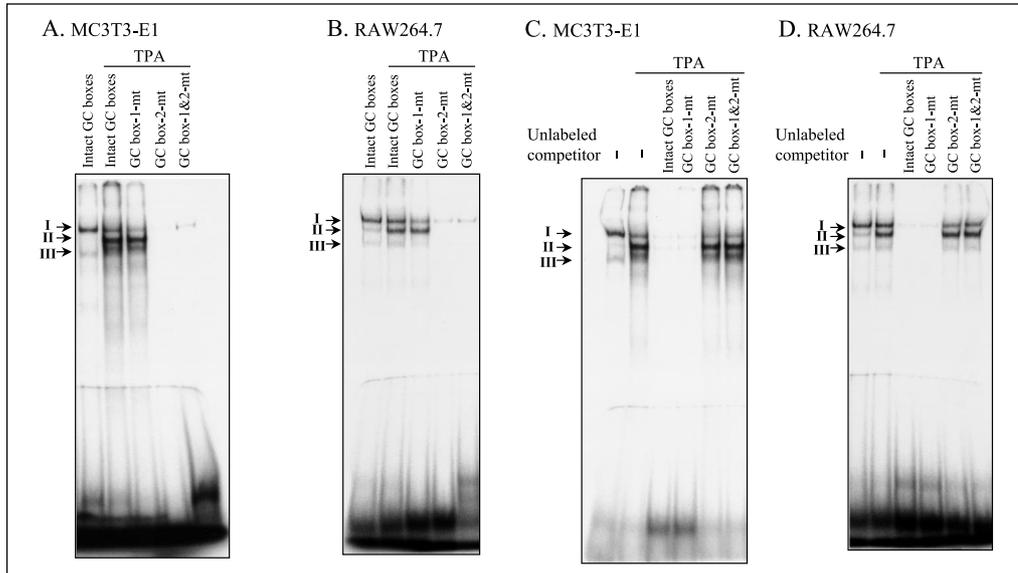


図5 ゲルシフトアッセイにおける GC box 結合蛋白質の特異性
MC3T3-E1細胞 (A, C) および RAW264.7 細胞 (B, D) を TPA で刺激し、ゲルシフトアッセイを行った。(A, B) は変異 (mt) を導入したプローブを用いた結果を示し (C, D) は過剰量の非標識プローブを添加した場合の結果を示した。3回の実験の代表的な一例を示した。

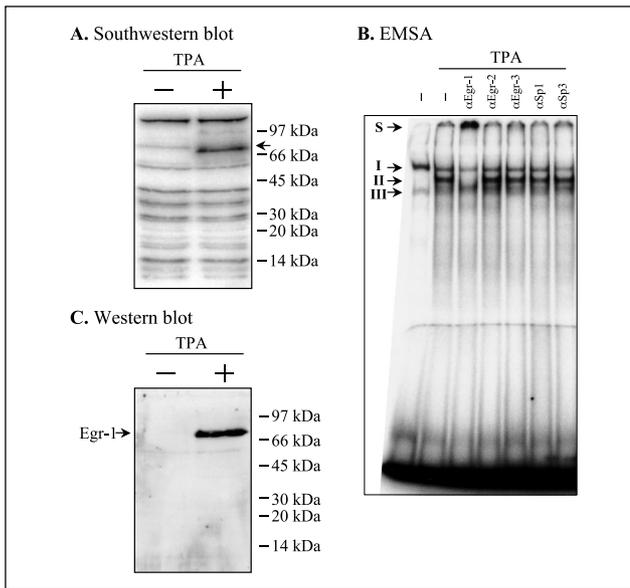


図6 GC box 結合蛋白質の同定
(A) は Southwestern blot 法を用いて GC box 結合蛋白質を検出した結果を示した (B) はゲルシフトアッセイ法に Egr ファミリーや Sp-1 ファミリーに属する転写調節因子の抗体を適用したスーパーシフトアッセイの結果を示した (C) は Southwestern blot 法で使用した転写膜を抗 Egr-1 抗体を用いた Western blot 法に適応した結果を示した。それぞれ3回の実験の代表的な一例を示した。

GC box 結合蛋白質の同定

GC box 結合蛋白質を同定するために、まず第一に Southwestern blot を行った。この方法は、電気泳動で分画

した蛋白質と標識した DNA の相互作用を直接検出することが可能であり、結合蛋白質の大きさの情報を得ることができる。まず、刺激した細胞と無処置の細胞から核蛋白質を抽出し、SDS/PAGE 電気泳動で分画し、膜に蛋白質を転写した後に丁寧に再生処理を施した。この膜から GC box 配列を有するプローブを用いて GC box 結合活性を有する蛋白質を検出した。その結果、約 80 kDa のバンドが刺激を行った細胞においてのみ認められた (図 6A)。

GC box 配列に結合する転写調節因子として Sp-1 ファミリーがよく知られている。しかし、Sp-1 ファミリーに属する転写調節因子の中で著明な刺激誘導性を示すものは少なく、これまで検討してきた性状とも異なるものと推定された。筆者らは、これまで得られた分子の大きさなどの情報と様々な転写調節因子の性状を比較した結果、mPGES1 の GC-rich な配列に結合する誘導性の転写調節因子として Egr ファミリーを候補として考えた。Egr (early growth response) は Zn フィンガードメインを有する初期応答性の転写調節因子であり⁹⁾、細胞増殖や細胞周期の制御に関わり、また誘導性の性質を有し疾患との関係も注目されている¹⁰⁾。

まず、前述のゲルシフトアッセイ法に Egr ファミリーや Sp-1 ファミリーに属する転写調節因子の抗体を適用した。その結果、Egr-1 の抗体を前処理した場合に、刺激により出現するバンドが消失し、ゲルの上方にバンドがスーパーシフトした (図 6B)。

次にこの Egr-1 抗体を用いて、先ほどの Southwestern blot

され、この配列には転写調節因子 Egr-1 が結合することが明らかとなった。Egr-1 は、サイトカインや成長因子などの遺伝子のプロモーター領域に存在し、細胞周期や細胞増殖に関わり、炎症や癌などの疾患における関与が示唆されている。このことから、PGE₂ を含めて炎症反応に関わるある種の誘導性の分子が特定の転写調節因子を介して協調的に制御される可能性が考えられ興味深い。mPGES1 の転写調節に関する研究は、まだ始まったばかりであるが、今後の研究の進展により COX-2 との共通点や相違点が明確になり、その調節機構が明らかとなれば、病態の理解と制御に対して重要な情報が提供されるものと期待される。

謝 辞

本研究は、北里大学薬学部大石幸子前教授、笛木麻衣氏ならびに昭和大学薬学部工藤一郎教授、村上誠助教授との共同研究として国立循環器病センター薬理部において田辺忠前部長、横山知永子室長の指導と田子なおみ氏の協力のもとに行われたものであり、心より深謝致します。

文 献

- 1) Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, Samuelsson B: Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 7220-7225, 1999.
- 2) Naraba H, Murakami M, Matsumoto H, Shimbara S, Ueno A, Kudo I, Oh-ishi S: Segregated coupling of phospholipases A₂, cyclooxygenases, and terminal prostanoid synthases in different phases of prostanoid biosynthesis in rat peritoneal macrophages. *J Immunol*, 160: 2974-2982, 1998.
- 3) Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, Ikeda T, Fueki M, Ueno A, Oh-ishi S, Kudo I: Regulation of prostaglandin E₂ biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E₂ synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, 275: 32783-32792, 2000.
- 4) Forsberg L, Leeb L, Thoren S, Morgenstern R, Jakobsson P: Human glutathione dependent prostaglandin E synthase: gene structure and regulation. *FEBS Lett*, 471: 78-82, 2000.
- 5) Naraba H, Yokoyama C, Tago T, Murakami M, Kudo I, Fueki M, Oh-ishi S, Tanabe T: Transcriptional regulation of the membrane-associated prostaglandin E₂ synthase gene. Essential role of the transcription factor Egr-1. *J Biol Chem*, 277: 28601-28608, 2002.
- 6) Tanikawa N, Ohmiya Y, Ohkubo H, Hashimoto K, Kangawa K, Kojima M, Ito S, Watanabe K: Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem Biophys Res Commun*, 291: 884-889, 2002.
- 7) Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, Kudo I: Molecular identification of cytosolic prostaglandin E₂ synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E₂ biosynthesis. *J Biol Chem*, 275: 32775-32782, 2000.
- 8) Uematsu S, Matsumoto M, Takeda K, Akira S: Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E₂ production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E₂ synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway. *J Immunol*, 168: 5811-5816, 2002.
- 9) Christy BA, Lau, LF, Nathans D: A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with "zinc finger" sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 7857-7861, 1988.
- 10) Silverman ES, Khachigian LM, Lindner V, Williams AJ, Collins T: Inducible PDGF A-chain transcription in smooth muscle cells is mediated by Egr-1 displacement of Sp1 and Sp3. *Am J Physiol*, 273: H1415-H1426, 1997.
- 11) Subbaramaiah K, Yoshimatsu K, Scherl E, Das KM, Glazier KD, Golijanin D, Soslow RA, Tanabe T, Naraba H, Dannenberg AJ: Microsomal prostaglandin E synthase-1 is overexpressed in inflammatory bowel disease. Evidence for involvement of the transcription factor Egr-1. *J Biol Chem*, 2004 (in press).