

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08256

研究課題名(和文) エンハンサーRNAが制御するヒトヘムオキシゲナーゼ-1遺伝子発現増強機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of human heme oxygenase-1 gene induction by long non-coding RNAs derived from HO-1 gene enhancer region

研究代表者

猪瀬 敦史(丸山敦史)(INOSE-MARUYAMA, Atsushi)

東北医科薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：10431438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ヒトHO-1遺伝子エンハンサー領域由来eRNA E2sによる遺伝子発現増強分子機構の解明である。本目的の達成のために、まずeRNA E2sにより制御されるHO-1以外の遺伝子を探索した。その結果、AKR1C1遺伝子がeRNA E2sにより制御されることがわかった。HO-1およびAKR1C1遺伝子発現増強におけるeRNA E2sの影響を検討した結果、プロモーター領域へのRNA polymerase IIの結合増強がeRNA E2sの作用点の一つであることがわかった。HO-1とAKR1C1遺伝子は異なる染色体上に位置するため、eRNA E2sはトランス作用性の機能を持つと示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that eRNA E2s, a non-coding RNA derived from human heme oxygenase-1 E2 enhancer region, regulates DEM-responsive heme oxygenase-1 gene (HO-1) induction. Whereas it has been documented that most of enhancer RNAs (eRNAs) are cis-acting and modulate the expression of specific gene, we wondered whether eRNA E2s uniquely regulates HO-1 induction or not.

Here we found aldo-keto reductase family 1, member C1 gene (AKR1C1) is one of the eRNA E2s-regulated genes. Diethyl maleate (DEM) and arsenite (As)-responsive gene induction of AKR1C1 was attenuated in eRNA E2s knockdown human cells. In addition, we found As-induced Pol II binding to AKR1C1 promoter region is decreased by eRNA E2s knockdown. Interestingly, AKR1C1 is mapped on chromosome 10, though HO-1 and eRNA E2s is on chromosome 22. Thus, our findings indicate that eRNA E2s functions as a trans-acting regulator of gene induction.

研究分野：酸化ストレス応答

キーワード：Heme NRF2 enhancer RNA HO-1

1. 研究開始当初の背景

ヘムは、電子伝達や酸素代謝に関わる必須補欠因子である。近年、既知の役割に加え、ヘムがタンパク質の機能制御やガス分子応答、ストレス応答、免疫制御に関わることが報告され、シグナル分子としての機能が注目されている。細胞内ヘム量の過不足は、生体機能の障害を引き起こすため、その合成と分解は厳密に制御されている。

ヘム合成には7つの酵素が関与するが、分解を担うのはヘムオキシゲナーゼ (HO) のみである。HOには誘導型 HO-1 と構成型 HO-2 の2つが存在するが、ヘム恒常性維持の主役は HO-1 である。実際、HO-2 欠損マウスは目立った表現型を示さないのに対し、HO-1 欠損マウスや HO-1 欠損症患者は、ヘム代謝調節の崩壊により、出生率の低下や炎症増悪による若年死が報告されている。そのため、適切な HO-1 発現が生体維持に必須と考え、申請者は HO-1 遺伝子発現制御に着目している。

HO-1 は、ヘムや酸化ストレス、細菌感染などの生体内外の刺激により発現が強く誘導されるが、そのスイッチは転写因子 NRF2 である。NRF2 による転写制御の詳細は十分に解明されていないため、申請者はその分子機構に焦点を当てて解析を進めてきた。興味深いことに、HO-1 遺伝子は他の代表的 NRF2 標的遺伝子 NQO1 や TXNRD1 などと比べ、顕著に発現が増強する。そのため、HO-1 遺伝子に特化したユニークな発現増強機構が示唆されている。

最近申請者は、NRF2 が結合する HO-1 遺伝子エンハンサー領域に注目した解析から、細胞が酸化ストレスを受けた際にエンハンサー近傍から産生される複数の長鎖非コード RNA を見出し、eRNA E2s と名付けた。さらに eRNA E2s 発現を抑制すると、HO-1 発現増強が顕著に減弱した。この時エンハンサー領域への NRF2 結合は増強したが、RNA polymerase II (Pol II) の HO-1 遺伝子プロモーターおよびエンハンサーへの結合が有意に減弱したことから、eRNA E2s が Pol II 結合を介して HO-1 遺伝子発現を増強することがわかった。しかし、その詳細な分子機構は未解明である。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が見出したヒト HO-1 遺伝子エンハンサー領域から産生される新規 eRNA E2s による HO-1 遺伝子発現増強の分子機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1)eRNA E2s が制御する遺伝子の同定：これまでの解析から eRNA E2s は HO-1 遺伝子発現を選択的に増強することがわかったが、eRNA E2s が HO-1 遺伝子発現にのみ関与するか否かは未解析であった。そこで、eRNA E2s により制御される遺伝子を同定するため、マイクロアレイ解析を行った。

(2)eRNA E2 による発現制御機構の解析：最近、enhancer RNA が転写共役因子 (コファクター) の機能に関与するとの報告があった。HO-1 遺伝子発現増強には BRG1 および CBP が関与する。そこで、eRNA E2s が BRG1 および CBP の発現に影響を及ぼすか否かを検討するために、eRNA E2s 発現抑制細胞の BRG-1 および CBP 発現をイムノプロットにて検討した。また、これまでの検討から、eRNA E2s が HO-1 遺伝子プロモーターへの Pol II 結合制御を介して遺伝子発現を制御することがわかった。そこで、eRNA E2s により制御される遺伝子として見出した AKR1C1 遺伝子座への Pol II 結合挙動を ChIP 解析により検討した。

(3)eRNA E2s 相互作用タンパク質群の単離・同定：これまでの報告によれば、enhancer RNA は単独で機能するわけではなく、タンパク質(群)と特異的に相互作用し、エフェクター複合体を形成して活性を発揮する。そこで、eRNA E2s に相互作用するタンパク質(群)を同定するために、RNA 免疫沈降 (RIP) 解析を試みた。

(4)蛍光 *in situ* hybridization による遺伝子領域挙動の可視化：eRNA E2 は HO-1 遺伝子座への Pol II の結合増強に関与している。核内における HO-1 遺伝子座と Pol II ドメインの挙動を可視化するために、蛍光 *in situ* hybridization (FISH) 解析系の構築を試みた。

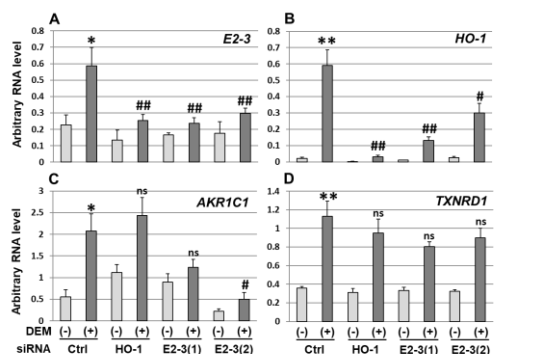
(5)ヒ素ストレス条件下における eRNA E2 による遺伝子発現制御の解析：ヒ素(As)は環境重金属であり、酸化ストレスを惹起することが知られている。As による遺伝子発現増強に eRNA E2 が関与するか否かを解析するために、eRNA E2 発現抑制細胞に As 処理を行い、HO-1 および AKR1C1 の発現を解析した。

(6)eRNA E2 の生理的機能解析：ヘムは酸化ストレスを惹起するとともに、脂質過酸化を引き起こす。ヘム処理時の脂質過酸化制御に eRNA E2 が関与するか否かを Click-iT™ Lipid Peroxidation Imaging Kit - Alexa Fluor™ 488 (Thermo) を用いて検討した。

4. 研究成果

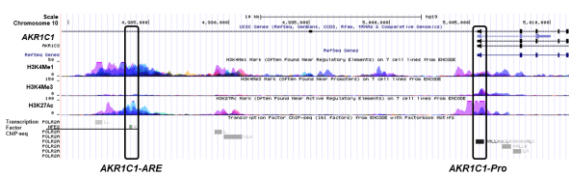
(1)eRNA E2s が制御する遺伝子の同定：eRNA E2s により制御される遺伝子を同定するため、HeLa 細胞へ eRNA E2s に対する二つの siRNA を導入し、eRNA E2s の発現を抑制した後 DEM 処理を行った。その後全 RNA を抽出・精製し、マイクロアレイ解析を行った。NRF2 標的遺伝子に着目したところ、eRNA E2s に発現増強が制御される遺伝子として aldo-keto reductase family 1, member C1 gene (AKR1C1) を見出した。この結果を検証するために、eRNA E2s を発現抑制した HeLa 細胞および

HaCaT 細胞において、AKR1C1 遺伝子の DEM による発現増強を定量的 PCR で検討した。その結果、AKR1C1 遺伝子発現が eRNA E2s によって制御されることがわかった。



AKR1C1 遺伝子の DEM による発現増強は eRNA E2s により制御される。HeLa 細胞を用いて検討した結果を示す。A: eRNA E2s, B: HO-1, C: AKR1C1, D: TXNRD1

(2) eRNA E2 による発現制御機構の解析: まず、eRNA e2s が BRG1 および CBP の発現に及ぼす影響を検討した。その結果 BRG1 は eRNA E2s 発現抑制細胞において発現低下が観察された。次に eRNA E2 が Pol II の挙動に与える影響を調べるために、eRNA E2s 発現を抑制した後、特異的抗体を用いた ChIP 解析を行った。その結果、eRNA E2s を発現抑制すると、AKR1C1 遺伝子プロモーター領域への DEM による Pol II 結合増強が、陰性対照細胞と比較して、有意に減弱していた。この Pol II 結合の減弱は、HO-1 遺伝子発現増強の際にも観察された。そのため、eRNA E2s の遺伝子発現制御点の一つは、遺伝子プロモーターへの Pol II 結合の制御であると考えられた。



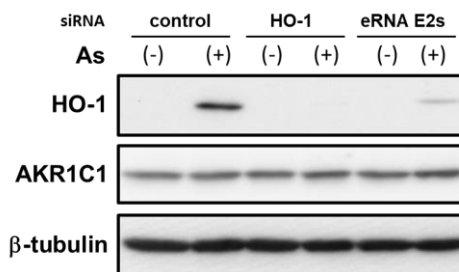
eRNA E2s は AKR1C1 遺伝子プロモーターの Pol II 結合増強に関与する

(3) eRNA E2s 相互作用タンパク質群の単離・同定: eRNA E2s による HO-1 遺伝子発現制御機構を解明するために、eRNA E2s に相互作用するタンパク質の検出を試みた。試験管内反応により合成した BrU 標識 eRNA E2-3:931 base を担体に固定し、HeLa 細胞の核抽出液から、相互作用するタンパク質を RIP 解析により検討した。しかしながら、eRNA E2s に

特異的結合するタンパク質は今のところ取得できていない。

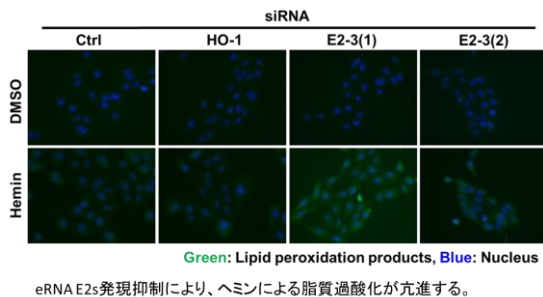
(4) 蛍光 *in situ* hybridization による遺伝子領域挙動の可視化: HO-1 遺伝子は 22 番染色体上にあり、AKR1C1 遺伝子は 10 番染色体に存在する。eRNA E2s が HO-1 と AKR1C1 の発現を制御するとすれば、NRF2 活性化により核内において 22 番染色体と 10 番染色体および Pol II の挙動が一致し、eRNA E2s 発現抑制によりその挙動が一致しなくなるのではないかと考えられる。この可能性を検討するために、DNA FISH (fluorescence *in situ* hybridization) と Pol II の免疫染色を行い、核内の染色体挙動を可視化したいと考えた。そこで、まず FISH 解析の条件検討を進めた。現在までに、HO-1 および AKR1C1 プローブを用いて検討を行ったが、シグナルは非常に弱いので、さらなる条件検討が必要である。

(5) ヒ素ストレス条件下における eRNA E2 による遺伝子発現制御の解析: ヒ素 (As) による HO-1 および AKR1C1 発現増強における、eRNA E2s の影響を検討した。その結果、HeLa 細胞において eRNA E2s 発現を抑制すると、As による HO-1 タンパク質発現増強が低下した。一方、AKR1C1 タンパク質発現を検討したところ、As による発現増強が観察できず、eRNA E2s 発現抑制による効果も見られなかった。



eRNA E2s はヒ素による HO-1 発現増強に関与する

(6) eRNA E2 の生理的機能解析: HO-1 遺伝子と AKR1C1 遺伝子は過酸化脂質の無毒化に関与するとの報告がある。そこで、eRNA E2s の脂質過酸化に対する貢献を検討した。その結果、eRNA E2s を発現抑制すると、陰性対照細胞と比較して、ヘミンによる脂質の過酸化が増強した。この結果から、eRNA E2s が脂質の過酸化防御に関与することが示唆された。また、HO-1 遺伝子単独の発現抑制細胞よりも eRNA E2s 発現抑制細胞において脂質過酸化が亢進したため、eRNA E2s は HO-1 だけでなく AKR1C1 などの複数の標的遺伝子を介して脂質過酸化制御に関与する可能性が考えられた。



eRNA E2s発現抑制により、ヘミンによる脂質過酸化が亢進する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Trehalose intake induces chaperone molecules along with autophagy in a mouse model of Lewy body disease. Kunikazu Tanji, Yasuo Miki, Atsushi Maruyama, Junsei Mimura, Tomoh Matsumiya, Fumiaki Mori, Tadaatsu Imaizumi, Ken Itoh, Koichi Wakabayashi. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (査読あり) 2015. 465, 746-752.
- ② Exosomes derived from SW480 colorectal cancer cells promote cell migration in HepG2 hepatocellular cancer cells via the mitogen-activated protein kinase pathway. Mitsuru Chiba, Narumi Watanabe, Miki Watanabe, Maki Sakamoto, Akika Sato, Mizuki Fujisaki, Shiori Kubota, Satoru Monzen, Atsushi Maruyama, Naoki Nanashima, Ikuo Kashiwakura and Toshiya Nakamura. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*. (査読あり) 2016. 48:305-312.
- ③ The role of NUB1 in α -synuclein degradation in Lewy body disease model mice. Kunikazu Tanji, Yasuo Miki, Atsushi Maruyama, Fumiaki Mori, Junsei Mimura, Ken Itoh, Tetsu Kamitani, Koichi Wakabayashi. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (査読あり) 2016. 470:635-642.

[学会発表] (計 10 件)

- ① Maruyama Atsushi, Itoh Ken, Associated gene regulation by long non-coding RNA transcribed from heme oxygenase-1 enhancer region. BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 01 日～2015 年 12 月 04 日、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
- ② 山寄 博未, 叶 鵬, 三村 純正, 猪瀬-

丸山 敦史, 伊東 健. リボソーム結合因子 GCN1L1 はマウス胎生中期以降の発生に必須の役割を果たす. 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会. 2016 年 08 月 30 日～2016 年 08 月 31 日. 仙台国際センター (宮城県・仙台市) .

- ③ エンハンサー由来ノンコーディング RNA が制御するヒトヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子発現制御機構の解析. 猪瀬-丸山 敦史. 第 35 回生体と金属・化学物質に関する研究会(チョークトーク 2016). 2016 年 08 月 25 日～2016 年 08 月 26 日. 作並温泉 ゆづくし Salon 一の坊 (宮城県・仙台市) .
- ④ 親電子性物質による ISR 経路の活性化. 三村 純正, 猪瀬-丸山 敦史, 小坂 邦男, 伊東 健. 第 89 回日本生化学会大会. 2016 年 09 月 25 日～2016 年 09 月 27 日. 仙台国際センター (宮城県・仙台市) .
- ⑤ リボソーム結合因子 GCN1L1 はマウス胎生中期以降の発生に必須の役割を果たす. 山寄 博未, 叶 鵬, 三村 純正, 猪瀬-丸山 敦史, 伊東 健. 第 89 回日本生化学会大会. 2016 年 09 月 25 日～2016 年 09 月 27 日. 仙台国際センター (宮城県・仙台市) .
- ⑥ 翻訳開始因子 eIF2 α のリン酸化に統合される酸化ストレスの BAG-1 による感知機構. 武田 洗樹, 猪瀬 敦史, 色川 隼人, 久下 周佐. 日本薬学会第 137 年会. 2017 年 03 月 24 日～2017 年 03 月 27 日. 仙台国際センター (宮城県・仙台市) .
- ⑦ オートファジー活性化を生かしたレビー小体病治療への応用. 丹治 邦和, 三木 康生, 猪瀬 (丸山) 敦史, 三村 純正, 松宮 朋穂, 森 文秋, 今泉 忠淳, 伊東 健, 若林 孝一. 日本生化学会 東北支部 第 82 回例会・シンポジウム. 2016 年 05 月 21 日～2016 年 05 月 22 日. 弘前大学医学部基礎大講堂、弘前大学医学部コミュニケーションセンター (青森県・弘前市)
- ⑧ 抗がん剤感受性における過酸化水素センサー因子 BAG-1 システイン残基の機能解析. 猪瀬 敦史, 土屋 沙恵, 武田 洗樹, 色川 隼人, 久下 周佐. フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー. 2017 年 09 月 01 日～2017 年 09 月 02 日. 東北医科薬科大学 (宮城県・仙台市) .
- ⑨ 活性酸素種センサータンパク質 BAG-1 による eIF2 α リン酸化レベル制御の解析. 猪瀬 (丸山) 敦史, 開沼 育美, 武田 洗樹, 久下 周佐. ConBio2017 2017 年度

生命科学系学会合同年次大会 第 40 回
日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会. 2017 年 12 月 06 日～2017 年
12 月 09 日. 神戸ポートアイランド (兵
庫県・神戸市) .

- ⑩ eIF2 α リン酸化レベル制御における活性
酸素種センサーBAG-1 の機能解析. 猪瀬
敦史, 櫻 麻理亜, 武田 洗樹, 久下 周
佐. 新学術領域研究 酸素生物学・ダイ
イングコード 第 2 回合同若手会議.
2018 年 1 月 30 日～2 月 1 日. 仙台秋保温
泉 岩沼屋 (宮城県・仙台市) .

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪瀬一丸山 敦史

(INOSE-MARUYAMA, Atsushi)

東北医科薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：10431438