

令和元年6月20日現在

機関番号：23803

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07004

研究課題名(和文) 核内受容体CAR及びPXRの組換えタンパク質を用いた活性化機序解明と評価系構築

研究課題名(英文) Establishment of in vitro evaluation system for the activation of nuclear receptor CAR and PXR

研究代表者

志津 怜太 (Shizu, Ryota)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：50803912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：核内受容体CAR及びPXRは、種々の化学物質によって活性化され肝において薬物代謝酵素発現の誘導を引き起こす。よってその酵素誘導作用に起因した薬物間相互作用が問題となるため、両受容体の活性化を評価可能なインビトロ評価系が求められる。本研究では、現在まで調整法が確立されていなかったCAR及びPXR全長の組換えタンパク質の調整に成功し、それらを用いた生物物理学的解析により、無細胞系においてCAR及びPXRのリガンド依存的な活性化を評価可能な手法を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組換えタンパク質を利用した生物物理学的解析による受容体の活性化評価系は、動物個体や培養細胞を用いた解析では観察が困難な詳細な活性化機序解析を可能にするが、機能的な核内受容体全長の組換えタンパク質を精製した報告は少なく、CAR及びPXR全長の組換えタンパク質の報告は皆無であった。したがって、全長の核内受容体組換えタンパク質の調製法を確立し、それらを利用してDNA結合やリガンド応答性の解析を行った本研究成果は、CARやPXRの異物応答性核内受容体の研究領域にとどまらず、全ての核内受容体の研究に有益な共通した情報を提供でき、その学術的意義は大きいと期待される。

研究成果の概要(英文)：Hepatic nuclear receptor CAR and PXR play central roles in the xenobiotics-induced induction of drug metabolizing enzymes. The receptors are activated by lots of chemicals and the activation represents the basis for several clinically important drug-drug interactions. In this study, we have attempted to establish an in vitro evaluation systems for CAR and PXR activation to estimate drug-drug interaction of new chemicals. Recombinant CAR and PXR proteins were purified from E. coli as an 6x His and SUMO fusion proteins. These proteins were incubated with their ligands and subjected to fluorescence polarization assay with FITC-labeled oligo DNA which contains nuclear receptor binding motif. We observed the fluorescence polarization was induced by the ligand binding. By modifying this method, we will be able to establish the in vitro evaluation system for the receptors activation and drug-drug interaction.

研究分野：毒性学、分子生物学

キーワード：核内受容体 インビトロ評価系 組換えタンパク質 蛍光偏光解消法

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

核内受容体 CAR 及び PXR は肝に高発現し、生体外異物により活性化される転写因子であり、薬物代謝酵素などの遺伝子の転写制御により、異物からの生体防御において中心的に働いている。CAR 及び PXR のリガンドは、医薬品、食品、農薬、工業化学物質、環境化学物質と多岐にわたり、その酵素誘導作用に起因した薬物間相互作用がしばしば問題となる。さらに近年、両受容体の活性化は、糖尿病や肝繊維化、肝発がんなどの肝臓における毒性発現にも関与することが報告されている。両核内受容体は、核内で RXR $\alpha$  とヘテロ二量体を形成し、標的遺伝子のプロモーター配列に結合して転写制御を行うが、その転写活性化機序は未だ不明な点が多い。一方で、創薬の非臨床試験においては、候補化合物の酵素誘導作用や肝毒性の有無を効率的に評価可能な系が求められている。しかし、CAR 及び PXR の活性化機序は明確でなく、これらを介した有害作用の評価系は確立されていない。

両受容体は培養細胞内では生体内とは異なる挙動を示すことが知られている。培養細胞で CAR や PXR を過剰発現すると、リガンド非存在下にも関わらず両受容体は核に移行し、標的遺伝子の発現誘導を引き起こしてしまう。そのため、培養細胞を用いた実験系では、リガンド依存的な両受容体の活性化を評価・観測することは困難である。一方、マウス肝臓では、リガンド処置依存的な受容体の活性化は標的遺伝子 mRNA レベルの定量により評価可能であるが、高感度で特異的な抗体が存在しないことから、肝臓内の CAR や PXR ならびにそれらの細胞内複合体の検出は困難である。以上の背景から、動物や培養細胞を用いた解析では CAR 及び PXR の活性化機序の詳細を評価・解析することは難しい。

近年、遺伝子工学と分子生物学の急速な進歩により、タンパク質の可溶化や精製が容易となった。そのため、大腸菌から精製した組換えタンパク質を用いることで、インビトロで両受容体の活性化を解析できると考えられる。このような手法は、上記の問題点を克服でき、さらに「種々の DNA モチーフに対する結合選択性」など両受容体活性化の詳細な分子機序解析が可能である。しかしながら、現在、機能的な CAR 及び PXR 全長の組換えタンパク質を精製した報告はなく、結晶構造も報告されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、大腸菌から組換えヒト CAR 及び PXR タンパク質を調整し、それらを用いて蛍光偏光 (fluorescence polarization) を利用した分子間相互作用解析法である蛍光偏光解消法 (FP アッセイ) あるいは等温滴定型熱量測定法 (ITC) において CAR 及び PXR のリガンド依存的な DNA 結合能の解析等の生物物理学的解析により、活性化を評価・解析できるインビトロシステムを構築する。

### 3. 研究の方法

#### (1) CAR、PXR 及び RXR $\alpha$ の全長タンパク質の調整手法の確立

可溶性向上のため N 末端に 6xHis 及び SUMO タグを付加し、種々のタンパク質可溶化液バッファーで条件検討を行い、組換えヒト CAR、PXR 及び RXR $\alpha$  の全長のタンパク質を安定的に精製する方法を確立する。さらに、その後の解析における影響をできる限り少なくするため、タンパク質可溶化液の塩濃度の低下、界面活性剤の除去を試みる。また、必要に応じてリガンドの有無による可溶性の違いを検討し、最も簡素で最適な可溶化液を決定する。

#### (2) CAR/RXR $\alpha$ 、PXR/RXR $\alpha$ の結合 DNA 配列に対する結合、そのリガンド依存性の解析

調製した CAR、PXR 及び RXR $\alpha$  タンパク質及び、FITC 標識した CYP2B 遺伝子エンハンサー領域に存在する CAR 及び PXR の結合モチーフである NR1 のオリゴ DNA を用いて FP アッセイ、ゲルシフトアッセイによりリガンドである CITCO 処置時の DNA への結合を解析する。申請者らは、CAR や PXR はリガンドの種類により各標的遺伝子の転写選択性 (転写プロファイル) が異なることを見出している。そこで、FP アッセイを用いて、CAR/RXR $\alpha$ 、PXR/RXR $\alpha$  の結合 DNA の選択性、DNA 結合のリガンド依存性を評価可能な系を構築する。

#### (3) CAR、PXR のリガンド依存的な構造変化に伴う転写共役因子との結合の解析

リガンド依存的な核内受容体の構造変化を利用した評価系構築を試みる。核内受容体は AF2 領域と呼ばれるドメインをリガンドの結合依存的に構造変化させ、この領域を介して転写共役因子と結合する。よって、FITC 標識した転写共役因子 (PGC1 $\alpha$ ) の核内受容体結合モチーフである LXXLL を含む合成ペプチドを作製し、核内受容体ケミ変えタンパク質をリガンドとインキュベーションした後、FP アッセイによりコアクチベーターへの結合を解析する。本研究では、CAR 及び PXR は、AF2 のリガンド依存的な構造変化が生じない結果を得たため、AF2 領域の直前に 3 つのアラニンを加えた変異体 (3A 変異体) を作製し、培養細胞を用いたレポーターアッセイ、哺乳動物ツーハイブリッドアッセイにより、3A 変異体のリガンド依存的な活性化、転写共役因子との結合を確認後、本解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) CAR、PXR 及び RXR $\alpha$ の全長タンパク質の調整手法の確立

はじめに CAR、PXR 及び RXR $\alpha$  の全長組換えタンパク質の安定的に調整する方法の確立を行なった。大腸菌から GST タグ融合タンパク質として各受容体を精製したところ封入体を生じてしまったため、可溶性向上の目的で 6xHis 及び SUMO タグ融合タンパク質に変更し、精製用バッファー (25 mM Tris-HCl (pH 7.5)、500 mM NaCl、1 mM DTT、0.1 mM arginine、0.1 mM glutamine、0.35% CHAPS) についても収量が良好な条件を見出した。

以上により、CAR、PXR 及び RXR $\alpha$  の全長組換えタンパク質の精製法を確立したため、この方法を用いて大腸菌の大量培養と各組換えタンパク質の精製を行なった。

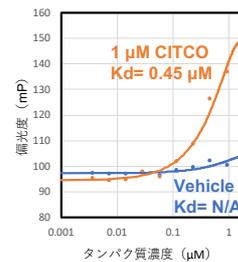
##### (2) CAR/RXR $\alpha$ 、PXR/RXR $\alpha$ の結合 DNA 配列に対する結合、そのリガンド依存性の解析

5'末端に蛍光色素である FITC を付与した CYP2B6 プロモーター上の DNA 結合配列 NR1 2本鎖 DNA (FITC-NR1) を用い、精製した CAR-RXR $\alpha$  ヘテロ二量体の NR1 への結合を FP アッセイ及びゲルシフトアッセイにより調べた。

FP アッセイでは、CAR 及び RXR $\alpha$  組換えタンパク質を混合し、段階的に希釈、FITC-NR1 と混合させ、黒色 96well プレートを用いて蛍光偏光の測定を行なった。図 1 左に示すように、CAR-RXR $\alpha$  ヘテロ二量体 はリガンドである CITCO 処置時のみ、タンパク質濃度依存的に偏光度を増加させたため (図 1)、CAR 組換えタンパク質は FITC-NR1 に結合することが観察できた ( $K_d=0.45 \mu\text{M}$ )。また、この FITC-NR1 への結合を、FITC の傾向によって視覚化させたゲルシフトアッセイにおいても同様に観察できた (図 1)。

さらに、PXR-RXR $\alpha$  ヘテロ二量体についても同様に解析を行い、リガンド依存的な DNA への結合を観察した。そこでさらに PXR のリガンドとして知られている、リファンピシン、クロトリマゾール、シンバスタチン、リファキシミン、SR12813 について、これらが PXR の DNA 結合を増加させるかについて解析し、いずれのリガンドにおいても FP アッセイにおける DNA 結合モチーフへの結合が観察した。以上から、組換えタンパク質を用いて、リガンド依存的な DNA との結合を評価・解析可能な評価系の構築に成功した。本評価系は、リガンドのスクリーニング系として利用可能であるのに加えて、ドメインを欠損させたタンパク質や変異体などを使用した核内受容体による標的遺伝子転写調節の分子機序解析に有用であると思われる。

##### FP アッセイ



##### ゲルシフトアッセイ

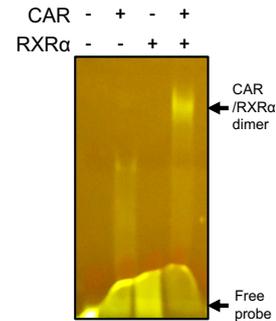


図 1、FP アッセイ及びゲルシフトアッセイ

##### (3) CAR、PXR のリガンド依存的な構造変化に伴う転写共役因子との結合の解析

②において、リガンド依存的な DNA への結合を FP アッセイにより観察することに成功したが、本実験系では、必ずタンパク質の段階的な希釈が必要であり、活性化物質のスクリーニング系としては、スループット性が著しく低い。よって、さらに本研究では、組換えタンパク質を用いリガンド依存的な受容体の構造変化を検出することで、リガンドの結合を評価可能な活性化評価系の構築を試みた。

核内受容体は通常、転写共役因子の結合領域である AF2 領域がリガンド結合依存的に構造変化を起こすことが知られている。よってこの構造変化に伴う転写共役因子の結合を、まず FITC 標識した転写共役因子 (PGC1 $\alpha$ ) の核内受容体結合モチーフである LXXLL を含む合成ペプチドを用いて FP アッセイにより調べた。しかしながら、予想に反して、両受容体はリガンド結合によって AF2 領域が構造変化せず、リガンド依存的な受容体活性化を観察できないという結果を得た。

そこで報告されている PXR のリガンド結合型 (PDBID:1SKX) 及び非結合型 (PDBID:1ILG) のタンパク質 3次元構造を比較した。その結果、図 2 に示すように、PXR は他の核内受容体とは異なりリガンド結合によっても AF2 領域の 3次元構造が変化しないことが明らかとなった。CAR については、結晶構造が報告されていないため、解析はできないが、PXR 同様に AF2 の構造変化が無い、あるいは変化が小さいと考えられた。一般的に PPAR $\gamma$  等の多くの核内受容体は、溶液中では AF2 領域とヘリックス 11 の間のリンカー領域が柔軟に動きまわるため、AF2 領域はリガンド非結合状態において定まった位置に存在しない (図 2、左、PDBID:1PRG)。核内受容体のリガンドバインディングポケットにリ

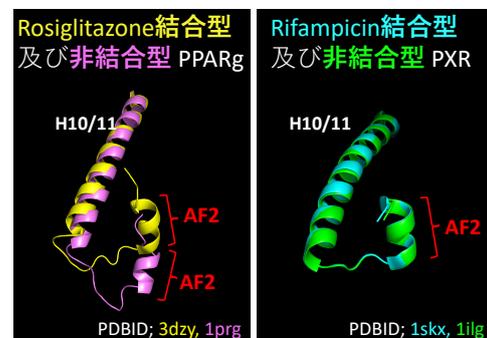


図 2、リガンド結合型及び非結合型の核内受容体タンパク質 3次元構造の比較

ガンドが結合すると、リガンドにより AF2 領域は転写共役因子が結合できる位置に固定される (図2、左、PDBID:3DZY)。一方で、PXR の AF2 はリガンドの結合に関わらず恒常的に転写共役因子が結合できる位置にあった (図2、右)。以上の結果より、PXR はリガンド依存的に PXR AF2 領域の構造変化を起こさないと考えられた。そこでこの領域をリガンド依存的に構造変化させる目的で、リンカー領域の自由度を増加させるために3つのアラニンがこの領域に導入した変異体を作製した (PXR-3A)。この変異体を用いて COS-1 細胞内でのリガンド依存的な活性化を調べた。CAR 及び PXR 結合 DNA 配列を含む CYP3A4 遺伝子エンハンサーを組み込んだレポータープラスミドと PXR3A 変異体及び野生型を用いてレポーターアッセイを行なったところ、リガンドであるリファンピシン (RIF) 非存在時のレポーター活性は PXR 野生型では増加したが、3A 変異により完全に消失した (図3、左)。また、転写共役因子である PGC1 $\alpha$  を強制発現させると、野生型ではリガンド非依存的にレポーター活性が増加したが、3A 変異体では、PGC1 $\alpha$  を強制発現によるレポーター活性の増加が抑えられ、リガンド依存的な活性化が確認された (図3、右)。

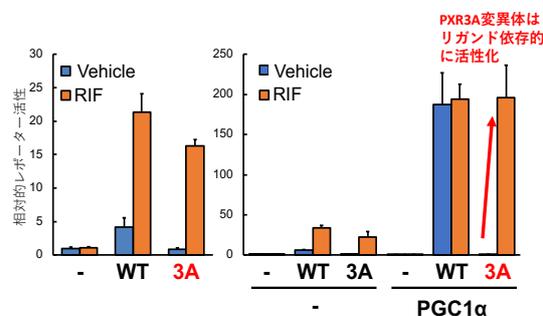


図3、PXR 活性化への 3A 変異体の影響 (レポーターアッセイ)

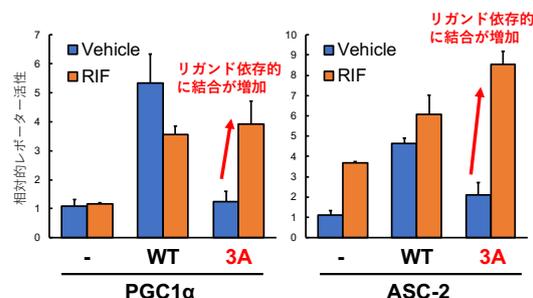


図4、転写共役因子との結合への 3A 変異体の影響 (哺乳動物ツーハイブリッドアッセイ)

さらに、哺乳動物ツーハイブリッドアッセイにより転写共役因子との結合への 3A 変異の影響を確認した。GAL4 の DNA 結合ドメインと PGC1 $\alpha$  あるいは ASC-2 の核内受容体結合モチーフの融合タンパク質、VP 16 転写調節ドメインと PXR 変異体の融合タンパク質を COS-1 細胞に発現させ、GAL4 応答領域を持つレポータープラスミドを用いて、リガンド依存的な結合を解析した。予想通り、野生型は初めから PGC1 $\alpha$  や ASC-2 と結合しており、リガンド依存的な結合の増加が観察されなかったが、3A 変異によりリガンド非存在下のレポーター活性の増加が抑えられ、リガンド処置依存的な転写共役因子との結合が確認できた。以上より、PXR に 3A の変異を導入することで、AF2 領域のリガンド依存的な構造変化が誘導され、リガンド依存的な転写共役因子との結合を評価可能な実験系を作製可能であると思われる。また、3A 変異によるリガンド依存的な AF2 構造変化観察の改善効果は、ヒト及びマウス PXR で共通して認められ、さらにヒト CAR 及びマウス CAR でも同様に観察することができた。

そこで最後に野生型と 3A 変異型 PXR リガンド結合ドメインの組換えタンパク質を 6xHis 及び SUMO タグ融合タンパク質として調整し、FP アッセイを用いてリガンド依存的な AF2 領域への転写共役因子の結合を調べた。その結果、3A 変異体において、リファンピシン依存的な転写共役因子との結合の観察することに成功した。今後、さらにいくつかのリガンドを用いて同様に解析する必要があると思われるが、リガンド依存的な構造変化を利用して FP アッセイによる転写共役因子部分ペプチドと核内受容体との結合を調べ、リガンド依存的な転写共役因子との結合の観察に成功した。

以上のように本研究では、核内受容体 CAR 及び PXR の組換えタンパク質の調整法を確立し、これらタンパク質を用いて、リガンド依存的な DNA への結合及び転写共役因子との結合を評価可能なインビトロ評価系構築に成功したが、上述したように、FP アッセイはスループット性が低い。今後は、リガンド依存的な AF2 領域の構造変化に伴う転写共役因子の結合を蛍光偏光ではなく、ランタノイド系の長寿命蛍光試薬を核内受容体に結合させ、蛍光標識した転写共役因子部分ペプチドとの結合を時間分解蛍光-蛍光共鳴エネルギー転移法 (TR-FRET 法) 等により評価することで、よりスループット性の高い核内受容体活性化インビトロ評価系の構築を目指す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

- ① Ryota Shizu, Makoto Osabe, Lalith Perera, Rick Moore, Tatsuya Sueyoshi, Masahiko Negishi, Phosphorylated Nuclear Receptor CAR Forms a Homodimer To Repress Its Constitutive Activity for Ligand Activation, *Molecular and Cellular Biology*, 査読あり、37 巻、2017 年、e00649-16、DOI : 10.1128/MCB.00649-16
- ② Ryota Shizu, Jungki Min, Mack Sobhany, Lars C Pedersen, Shingo Mutoh, Masahiko Negishi, Interaction of the phosphorylated DNA-binding domain in nuclear receptor CAR with its ligand binding domain regulates CAR activation, *Journal of Biological Chemistry*, 査読あり、293 巻、2018 年、333-344、DOI : 10.1074/jbc.M117.806604

〔学会発表〕(計 8件)

- ① 志津怜太、武藤信吾、根岸正彦、吉成浩一、フェノバルビタールによる核内受容体 CAR の活性化機構、第 63 回日本薬学会東海支部大会、口頭発表、2017 年 7 月、岐阜薬科大学 (岐阜県、岐阜)
- ② Ryota Shizu, Masahiko Negishi, Kouichi Yoshinari, CAR utilizes EGF signaling for activation, フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー (日韓次世代シンポジウム)、ポスター発表、2017 年 9 月、東北医科薬科大学 (宮城県、仙台)
- ③ 志津怜太、Su-Jun Lee、根岸正彦、吉成浩一、アンドロゲンレセプターの遺伝子一塩基変異のホモ二量体形成への影響、フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー、ポスター発表、2017 年 9 月、東北医科薬科大学 (宮城県、仙台)
- ④ Ryota Shizu, Jungki Min, Lars C Pedersen, Masahiko Negishi, Kouichi Yoshinari, Intramolecular interaction of CAR regulates heterodimerization with RXR $\alpha$ , 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX、ポスター発表、2018 年 10 月、石川県立音楽堂 (石川県、金沢)
- ⑤ Kanako Ezaki, Ryota Shizu, Yuta Otsuka, Chizuru Ishii, Takuomi Hosaka, Takamitsu Sasaki, Kouichi Yoshinari, The influence of nuclear receptor CAR activation on PPAR $\alpha$ -dependent lipid metabolism, 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX、ポスター発表、2018 年 10 月、石川県立音楽堂 (石川県、金沢)
- ⑥ 志津怜太、曾部圭一郎、阿部太紀、石村麻衣、保坂卓臣、佐々木崇光、吉成浩一、CAR 依存的肝細胞増殖における CAR と YAP の相互作用の役割、平成 30 年度内外環境応答・代謝酵素研究会、ポスター発表、2018 年 11 月、鳥取大学工学部 (鳥取県、鳥取)
- ⑦ 江崎香奈子、志津怜太、大塚祐多、石井千鶴、保坂卓臣、佐々木崇光、吉成浩一、核内受容体 CAR による PPAR $\alpha$  依存的な脂質代謝の調節、平成 30 年度内外環境応答・代謝酵素研究会、ポスター発表、2018 年 11 月、鳥取大学工学部 (鳥取県、鳥取)
- ⑧ 志津怜太、曾部圭一郎、阿部太紀、石村麻衣、保坂卓臣、佐々木崇光、吉成浩一、核内受容体 CAR 活性化による肝発がんプロモーションの分子機序解析、第 1 回医薬品毒性機序研究会、ポスター発表、2019 年 1 月、名古屋大学野依記念学術交流館 (愛知県、名古屋)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

無し

(2)研究協力者

研究協力者氏名 : 根岸 正彦 (米国国立環境衛生科学研究所)

ローマ字氏名 : Masahiko Negishi (NIEHS/NIH)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。