

機関番号：82101  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21790565  
 研究課題名（和文） 臓器特異的なTCDD反応性のAhR依存的な遺伝子発現調節メカニ  
 ズムからの解析  
 研究課題名（英文） Studies on the mechanism of tissue-specific modulation of  
 AhR-dependent gene expression  
 研究代表者  
 鈴木 武博（SUZUKI TAKEHIRO）  
 独立行政法人国立環境研究所・環境健康研究領域・研究員  
 研究者番号：60425494

研究成果の概要（和文）：本研究では、肝臓と脾臓において、AhR 依存的に発現する CYP1A1 遺伝子発現調節の臓器特異性のメカニズムを転写抑制因子に着目して検討した。その結果、臓器特異的な CYP1A1 の発現調節には、AhRR や HDACs の発現量、及びヒストン修飾の変化が関連している可能性が示唆された。また、ChIP on chip による AhR 結合領域の網羅的解析から、AhR 依存的で XRE 非依存的に発現調節をうける可能性のある遺伝子を探索し、臓器特異的な TCDD 反応性に関係するメカニズムを理解する上で重要な知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the mechanism of tissue-specific modulation of AhR-dependent gene expression by focusing on the transcriptional repressor in the liver and spleen. The results of this study suggested that expression of AhRR and HDACs and changes of histone modifications were involved in the tissue-specific modulation of CYP1A1 gene expression. We explored the genes which potentially regulated in AhR-dependent and XRE-independent manner in genome wide analysis of AhR binding regions using ChIP on chip, and obtained important information for understanding the mechanism responsible for tissue-specific reactivity of TCDD.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：ダイオキシン、AhR、CYP1A1、臓器特異性

## 1. 研究開始当初の背景

AhR は、リガンド活性化型の転写因子であり、ダイオキシン（TCDD）による毒性発現を仲介する。動物実験の結果から TCDD は高用量では催奇形性、発癌の促進、体重減少、上皮細胞異形成、肝臓障害など、また低用量では胸腺委縮などの免疫抑制、生殖系異常などが報告されている。TCDD による毒性の発

現と、AhR 依存的な遺伝子発現はよく対応することが知られている。そのため、TCDD による生体への毒性影響を理解するためには、まず AhR によりどのように標的遺伝子の発現が調節されているのかを明らかにすることが重要であると考えられる。

TCDD による AhR 依存的な遺伝子発現調節メカニズムはこれまでに報告されており、

具体的には以下のようなものである。TCDDがAhRに結合すると、AhRが活性化されて核内に移行し、aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)とヘテロダイマーを形成する。その後、AhR/ARNT複合体は、p300などをリクルートしながら、Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1)をはじめとする種々の遺伝子のエンハンサー領域に存在するCACGCというコア配列をもつ xenobiotic responsive elements (XREs)に結合し、遺伝子発現の誘導や調節をおこなう(図1)。最近の研究から、AhR repressor (AhRR)の発現、ユビキチン/プロテアソーム系での分解によるAhR量の減少や、さらにはクロマチンリモデリング因子も、AhR依存的な遺伝子発現調節に関係することが示唆されている。

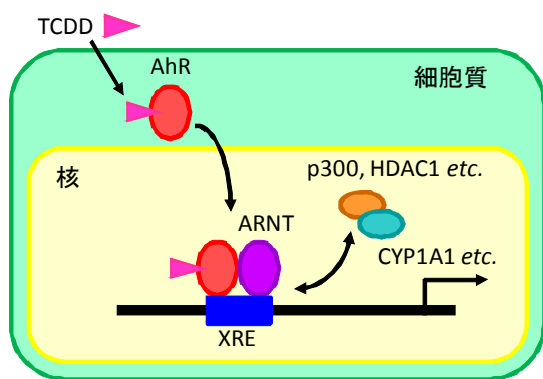


図1 AhR依存的な遺伝子発現の模式図

AhR依存的な遺伝子発現調節は、動物種、臓器、細胞、細胞の状態、リガンドの種類に依存することが知られている。AhR依存的な遺伝子発現調節の動物種特異性については、これまでの研究から動物種によってAhRの構造が異なるため、TCDDとの親和性が異なることが主な原因とされているが、同一のAhR構造を持つ1個体中においてもAhR依存的な遺伝子発現調節には細胞特異性や臓器特異性がみられることが最近の研究から示されている。しかしながら、各臓器においてどの因子がどのようにAhR依存的な遺伝子発現調節に関与しているのかについては、不明な点が数多く残されており、それらを解明することは極めて重要な課題である。

## 2. 研究の目的

我々の研究室では、TCDDの標的臓器である肝臓と免疫系臓器である脾臓におけるCYP1A1誘導の臓器特異性に着目して研究を進めてきた。これまでの研究で、TCDDを2 µg/kgで経口投与したC57マウスの曝露24時間後のCYP1A1 mRNAの発現は、肝臓で最も高く、脾臓の約700倍であることを明らかにしている。また、TCDD曝露24時間後のTCDD含有量は、肝臓では脾臓の約60倍

であることを明らかにしている。したがって、等量のTCDDで誘導されるCYP1A1 mRNAは、肝臓において、脾臓の約12倍高いことがわかった(表1)。しかしながら、この原因についてはいまだ明らかになっていない。

表1 TCDD臓器分布とCYP1A1誘導量

| TCDD曝露24時間                 | 脾臓                 | 肝臓              |
|----------------------------|--------------------|-----------------|
| TCDD量<br>(ng/g wet tissue) | 0.269<br>1         | 16.5<br>61.5    |
| CYP1A1誘導量<br>(相対値)         | 0.0023±0.0013<br>1 | 1.6±0.19<br>696 |
| 等量のTCDDで誘導<br>されるCYP1A1量比  | 1                  | 11.5            |

そこで本研究では、TCDDを曝露した雌のC57マウスの肝臓及び脾臓において、最も代表的なAhRの標的遺伝子であるCYP1A1を指標にし、主に転写抑制因子に着目したCYP1A1発現調節をおこなう各種因子の同定、作用メカニズムの比較検討をおこない、TCDDの臓器特異的な反応性を、臓器特異的なAhR依存的な遺伝子発現調節メカニズムから解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

雌のC57マウスにTCDDを2 µg/kgで経口投与し、48時間まで経時的に肝臓及び脾臓を採取した。肝臓及び脾臓からtotal RNAを抽出し、RT-PCRにより各遺伝子の発現を調べた。また、クロマチン免疫沈降法(ChIP assay)により、CYP1A1エンハンサー領域への各種因子の結合、及びヒストン修飾変化を調べた。さらに、ChIP on chipによるAhR結合領域の網羅的解析も試みた。

## 4. 研究成果

まず、肝臓と脾臓においてCYP1A1誘導のタイムコースを測定した。肝臓ではTCDD曝露6時間でCYP1A1が誘導され、48時間まで誘導が続いたが、脾臓では、TCDD曝露6時間で非常に弱い誘導がみられ、12時間でピークに達することが明らかになった。

肝臓と比較して脾臓における弱いCYP1A1誘導のメカニズムを探るために、まず、AhRのCYP1A1エンハンサー領域への結合をChIP assayにより調べた。その結果、肝臓ではTCDD曝露6時間でCYP1A1エンハンサー領域への強いAhRの結合がみられたのに対し、脾臓では非常に弱い結合しかみられなかった。AhRはTCDD曝露で分解されることが知られている。脾臓においてはAhRの分解が肝臓よりも早いことが考えられたため、ウェスタンブロッティングによりAhR量を調べ

た。その結果、TCDD 曝露 12 時間では、肝臓と脾臓で AhR 量に変化がないことが明らかになった。したがって、脾臓においては、肝臓と比較し AhR の分解が早いわけではなく、CYP1A1 エンハンサー領域への AhR の結合を抑制するなんらかの因子の存在が示唆された。

AhRR は、AhR 依存的に誘導され、AhR と ARNT を取り合い、AhR/Arnt ヘテロ 2 量体と AhRR/Arnt ヘテロ 2 量体の XRE への結合の拮抗により、AhR 依存的な遺伝子発現を抑制することが知られている。また、クロマチンリモデリング因子の 1 つであり転写抑制に重要な働きをするヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) も AhR 依存的な遺伝子発現調節に関与することが報告されている。そこで、肝臓と脾臓において、AhRR、及び HDACs (HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5) の誘導タイムコースを測定した。その結果、AhRR は、脾臓において TCDD 曝露 6 時間で強く誘導され、48 時間まで誘導が続いた (図 2)。この結果は、脾臓における弱い CYP1A1 誘導に対応した。また、脾臓においては、HDAC1、HDAC4 の発現量が TCDD 曝露に関わらず肝臓よりも高いことがわかった (図 2)。AhRR は、Ankyrinrepeat protein2 (ANKRA2) を介して HDAC4 あるいは HDAC5 と結合することが報告されている。そこで、ChIP assay により、脾臓における CYP1A1 エンハンサー領域への HDAC4 と HDAC5 の結合を調べたが、両者とも結合は観測されなかった。これらの結果から、脾臓においては、AhRR は ANKRA2/HDAC 複合体非依存的に CYP1A1 の誘導を抑制することが示唆された。

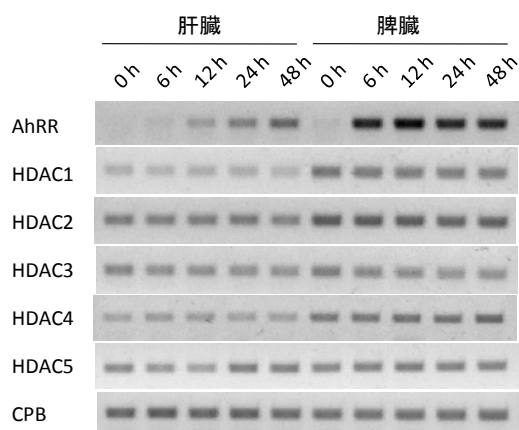


図 2 肝臓と脾臓における AhRR と HDACs の発現量 (CPB はハウスキーピング遺伝子)

ヒストン修飾は、クロマチン構造を変化させ、遺伝子の発現調節に重要な働きをすることが知られている。活性化型のヒストン修飾 (アセチル化ヒストンなど) は遺伝子発現の

活性化に関与し、逆に抑制型のヒストン修飾 (H3K9 ジメチル化、H3K27 トリメチル化など) は遺伝子発現の抑制に関与することが知られている。そこで、ChIP assay により、CYP1A1 誘導の臓器特異性におけるヒストン修飾の関与について調べた。その結果、脾臓の CYP1A1 エンハンサー領域では、TCDD 曝露していない状態でも、抑制型ヒストン修飾である H3K27 トリメチル化レベルが肝臓と比較して約 2 倍高く、ヒストン H3 及び H4 のアセチル化レベルが 8 倍~13 倍低かった。また、TCDD を曝露すると、肝臓では、CYP1A1 エンハンサー領域の H3K9 ジメチル化レベル、H3K27 トリメチル化レベル、ヘテロクロマチンプロテイン 1 $\alpha$  (HP1 $\alpha$ ) のリクルートが減少するのに対して、脾臓では、H3K27 トリメチル化レベルが増加傾向にあり、HP1 $\alpha$  のリクルートが有意に増加することがわかった。したがって、脾臓においては、CYP1A1 エンハンサー領域がもともと閉じたクロマチン構造であり、TCDD 曝露によりヘテロクロマチン化されるため、AhR の結合が抑制され、肝臓と比較し CYP1A1 誘導が弱くなったと考えられる。

以上の結果から、AhRR や HDAC の発現量及びヒストン修飾の変化が CYP1A1 遺伝子の発現調節の臓器特異性に関連する因子であることが示唆された。

AhR 依存的に発現調節される遺伝子は CYP1A1 のみではない。一般的に AhR は XRE に結合するが、たとえば CYP1A2 のように XRE が存在しない遺伝子も AhR 依存的に発現調節されることが報告されている。XRE 非依存的な遺伝子はこれまであまり研究されておらず、種類や機能が不明な点が多い。CYP1A2 量は肝臓と脾臓で異なるため、AhR 依存的で XRE 非依存的な遺伝子が TCDD の臓器特異的な反応性を決定している可能性が考えられた。そこで、ChIP on chip により、AhR が結合する領域を網羅的に検出し、それらの領域と XRE 配列の有無について解析をおこなった。

TCDD (2  $\mu$ g/kg) 曝露 0 時間と 12 時間の肝臓を用いて AhR 抗体による ChIP assay をおこなった。免疫沈降画分 DNA を Affymetrix のプロトコルに従って Mouse Promoter 1.0R Array にハイブリダイズし、スキャン後 Tiling Analysis Software でデータを解析した。TCDD 曝露 0 時間に対して曝露 12 時間で、有意に AhR の結合量が増加した領域から、遺伝子の転写開始点-2000~+1000 内に AhR 結合ピークが存在する 21 領域を選別し、XRE の有無についてまとめたエクセルファイルを作成した。得られた領域において PCR をおこない、ChIP on chip 実験系の妥当性を確認した。以上の結果から、肝臓において AhR 依存的で

XRE 非依存的な発現調節をうける遺伝子の候補を明らかにすることができ、臓器特異的な TCDD 反応性に関係するメカニズムを理解する上で非常に重要な知見を得ることができた。今後、脾臓についても同様の検討をおこなう予定である。

(2) 研究分担者  
該当なし

(3) 連携研究者  
該当なし

#### 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 Funatake CJ, Ao K., Suzuki T., Murai H., Yamamoto M., Fujii-Kuriyama Y., Kerkvliet NI., Nohara K. Expression of Constitutively Active Aryl Hydrocarbon Receptor in T-Cells Enhances the Down-regulation of CD62L, But Does Not Alter Expression of CD25 or Suppress the Allogeneic CTL Response. J Immunotoxicol. 6 (3) 194-203, 2009 査読有
- ② Nohara K., Suzuki T., Ao K., Murai H., Miyamoto Y., Inouye K., Pan X., Motohashi H., Fujii-Kuriyama Y., Yamamoto M., Tohyama C. Constitutively active aryl hydrocarbon receptor expressed in T cells increases immunization-induced IFN-gamma production in mice but does not suppress T(h)2-cytokine production or antibody production. Int Immunol. 21 (7) 769-777, 2009 査読有
- ③ Ao K., Suzuki T., Murai H., Matsumoto M., Nagai H., Miyamoto Y., Tohyama C., Nohara K. Comparison of immunotoxicity among tetrachloro-, pentachloro-, tetrabromo- and pentabromo-dibenzo-p- dioxins in mice. Toxicology. 256 (1-2) 25-31, 2009 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 鈴木武博, 高本沙代子, 野原恵子 ダイオキシン再投与によるダイオキシン標的遺伝子発現調節の臓器特異性の検討. 第 80 回日本衛生学会学術総会, 2010 年 5 月 10 日
- ② 鈴木武博, 高本沙代子, 野原恵子 ダイオキシンによるエピジェネティック修飾持続性の臓器特異性の検討. 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 12 日
- ③ 鈴木武博, 高本沙代子, 野原恵子 ダイオキシン毒性発現の臓器特異性とヒストン修飾との関連. 第 3 回日本エピジェネティクス研究会, 2009 年 5 月 23 日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鈴木 武博 (SUZUKI TAKEHIRO)  
独立行政法人国立環境研究所・  
環境健康研究領域・研究員  
研究者番号: 60425494