

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：23803  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22590068  
 研究課題名（和文）細胞周期チェックポイントで機能する薬物代謝酵素発現制御因子とその制御機構の解明  
 研究課題名（英文）Regulation mechanism of expression of drug-metabolizing enzymes, UGT1A1 and CYP3A4, at cell-cycle check-point  
 研究代表者  
 菅谷 純子（SUGATANI JUNKO）  
 静岡県立大学・薬学部・教授  
 研究者番号：30098131

研究成果の概要（和文）：サイクリン依存性キナーゼ（cdk）阻害薬 roscovitine が薬物代謝酵素（UGT1A1 など）の発現を亢進することを認め、PXR に焦点を当て薬物代謝酵素発現調節機序を解析した。リガンド結合部位に変異を導入した PXR を用いて解析したところ、roscovitine は PXR の 350 番目セリンをリン酸化する CDK2 の作用を抑制することにより UGT1A1、CYP3A4 遺伝子転写を亢進させることが示された。S350D PXR は野生型と同様に核内移行するが、roscovitine 刺激後も活性の低下したアセチル化体であることを初めて明らかにし、CDK2 による S350 のリン酸化は PXR の核内での活性化シグナル伝達を阻害していることが推察された。

研究成果の概要（英文）： We have found that CDK inhibitor roscovitine markedly stimulated the expression of UGT1A1 mRNA and protein, whereas it slightly stimulated the expression of CYP1A1, CYP2B6, and CYP3A4 mRNAs and proteins in HepG2 cells. PXR-mediated transcriptional activity of the reporter gene in the absence of PXR ligand rifampicin by roscovitine was more prominently enhanced, compared with the basal-, CAR-, and AhR/ARNT-mediated transcriptional activities. Phosphomimetic mutations at positions T57, T290, S350, and T408 attenuated the induction of UGT1A1 and CYP3A4 mRNAs by roscovitine, while the residues T57, T290, S305, and T408 were involved in the suppression for rifampicin stimulation. Transfection with anti-CDK2 siRNA but not anti-CDK1 and CDK5 siRNAs led to stimulated expression of UGT1A1. Phosphomimetic mutant at S350 of PXR was detected in the nucleus, and co-transfection with co-activator SRC-2 but not SRC-1 recovered the PXR activity. Immunoprecipitation analysis revealed the binding of PXR with HDAC1 in the nucleus. T290D mutant YFP-PXR fusion proteins retained in the cytoplasm and were not translocated to the nucleus of the cells stimulated with roscovitine. These results indicate that phosphorylation at positions T290 retained PXR protein in the cytoplasm, and that roscovitine stimulated expression of UGT1A1 and CYP3A4 through inhibiting CDK2, which phosphorylated PXR at S350 to suppress the transactivation in the nucleus, that is, the binding of PXR with RXR and the deacetylation of PXR.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：(1) サイクリン依存性キナーゼ、(2) 薬物代謝酵素、(3) 転写調節、(4) 核内受容体、(5) シグナル伝達、(6) CDK 2、(7) 細胞周期

### 1. 研究開始当初の背景

生体異物の代謝・解毒・排泄に重要な役割を果たしている肝細胞に含まれる P450、トランスフェラーゼ等の酵素 (CYP2B6、UGT1A1 など) の発現レベルは中心静脈周辺の細胞に高く、肝動脈枝・門脈枝周辺の細胞では低いなど、同一細胞間でも差があることが指摘されてきたが、詳細な機序は不明であった。この酵素分布の違いが生育環境など後天的要因に依存し、転写調節に重要な働きを持つ核内受容体自身の発現変動と連携していることを示唆する成果が近年得られ、生体の順応性について分子レベルで解明する上でも重要な研究領域と捉えられる。

### 2. 研究の目的

細胞周期に依存した CYP2B6 や UGT1A1 の遺伝子転写制御機構に着目して、G1/S 期に発現が亢進する、あるいは活性化される転写調節因子を制御する因子を同定した。さらに、転写調節因子やそのコファクターの細胞周期に依存した核移行シグナル伝達機序、核内での活性化機序に焦点を合わせ、これまで不明であった核移行シグナルと転写因子活性化因子の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) サイクリン依存性キナーゼ阻害剤による UGT1A1 発現誘導機序の解析 各種阻害剤を用いて UGT1A1 発現調節に関わる因子の同定をリアルタイム PCR 法、ウエスタンブロット法を用いて解析した。

(2) UGT1A1 発現調節に関わる CDK の同定 UGT1A1 発現調節に関わる CDK を CDK1, 2 siRNA をトランスフェクトしノックダウンした HepG2 細胞、リアルタイム PCR 法、ウエスタンブロット法を用いて解析した。

(3) 細胞周期に依存した薬物代謝酵素の発現変動の解析 Double thymidine block 法によって S 期に同調させた細胞を用いて、細胞周期に依存した薬物代謝酵素の発現変動をウエスタンブロット法を用いて解析した。

(4) 細胞増殖抑制シグナル伝達系と連携した薬物代謝酵素発現誘導に関わる核内受容体の同定 HepG2 細胞に核内受容体を強制発現させ、HNF1 $\alpha$ 結合部位を含む近位転写調節領域と gtPBREM を含む遠位転写調節領域を連結したレポーター遺伝子を用いて CDK 阻害剤 roscovitine により活性化される核内受容体を同定した。

(5) CDK2 によりリン酸化される PXR アミノ酸の同定と PXR 活性低下機序の解析 PXR リガンド結合部位のセリン、スレオニン残基をそれぞれアラニン、アスパラギン酸に変異させたリン酸化欠損変異体、偽リン酸化変異体を作製し、PXR 活性への影響を UGT1A1 mRNA 発現誘導から、また CDK2 によるリン酸化に及ぼす影響を解析することから同定した。PXR と heterodimer を形成し活性化される PXR の RXR との結合を、roscovitine を作用させた細胞の核タンパク質を調製し、免疫沈降法、ウエスタンブロット法を用いて解析した。CDK2 によりリン酸化される部位は、チミジンブロック法から解放後 2 時間の SW480 細胞より Cell lysate を調製し、in vitro キナーゼアッセイ法を用いて解析した。

### 4. 研究成果

(1) サイクリン依存性キナーゼ阻害剤による UGT1A1 発現誘導機序の解析 Roscovitine、SU9516、CDK inhibitor p35 はいずれも UGT1A1 の発現を亢進させたが、Roscovitine を作用させると、UGT1A1 mRNA、蛋白質の発現量は顕著に増大した (図 1)。また、CYP2B6、CYP3A4 の発現量も増加していた。これらの結果から、CDK が UGT1A1 の発現に抑制的に作用していることが推察された。

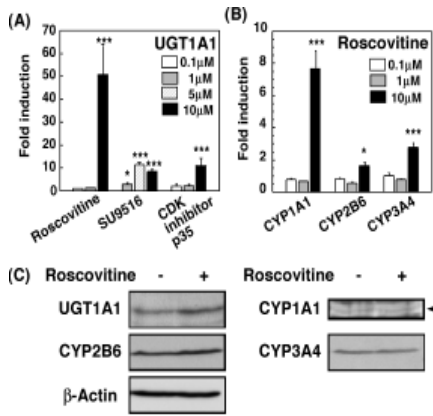


Fig. 1. Effect of CDK inhibitors on expression of UGT1A1, CYP1A1, CYP2B6, and CYP3A4 in SW480 cells.

(2) UGT1A1 発現調節に関わる CDK の同定  
 Roscovitine は CDK1、CDK2 および CDK5 を阻害するため、UGT1A1 発現亢進に関与する CDK を同定するために siRNA を用いてこれらをノックダウンしたところ、CDK2 をノックダウンさせた細胞でのみ UGT1A1、CYP2B6、CYP3A4 mRNA ならびにタンパク質の発現量が有意に増大し、CDK2 が CYP2B6、CYP3A4 の発現を抑制的に制御することが示された (図 2)。

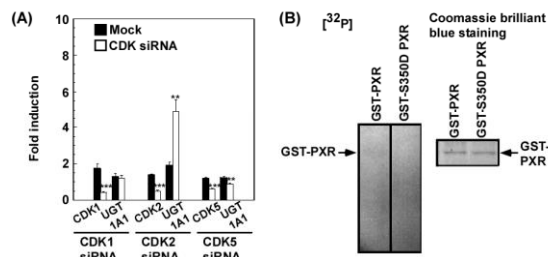


Fig. 2. Effect of anti-CDK1, anti-CDK2, and anti-CDK5 siRNA transfection on expression of UGT1A1 mRNA and phosphorylation of PXR at Ser350 by CDK2.

(3) 細胞周期に依存した薬物代謝酵素の発現変動の解析  
 リン酸化され活性化した CDK2 の蛋白質発現レベルは、同調から解放後、2~4h 後までの S 期に高く、この期間は薬物代謝酵素蛋白質の発現は低い結果が得られた (図 3)。UGT1A1、CYP2B6 の蛋白質発現レベルは 8h 後から増加し始めており、UGT1A1、CYP2B6 の発現レベルの増大に先行して CDK2 の脱リン酸化が認められ、活性化 CDK2 による負の制御が推察された。

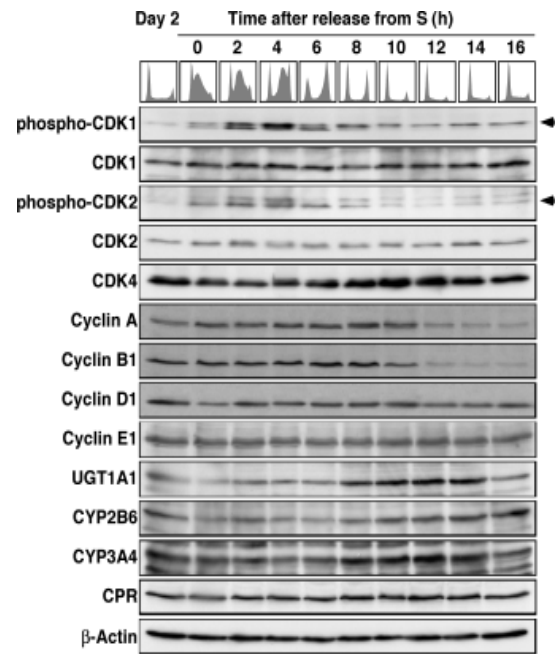


Fig. 3. Cell cycle-dependent expression of UGT1A1, CYP2B6, and CYP3A4 in SW480 cells.

(4) 細胞増殖抑制シグナル伝達系と連携した薬物代謝酵素発現誘導に関わる核内受容体の同定  
 CAR、PXR、AhR 発現プラスミドを導入した HepG2 細胞を用いて、CAR や PXR リガンドのリファンピシン、AhR リガンドのベンザピレンによる転写誘導作用に及ぼす roscovitine の作用を解析した。CAR や AhR リガンドのベンザピレンによる転写誘導作用に対して roscovitine は 5 μM をピークに僅かに亢進した。PXR はリガンド非存在下では転写誘導作用は非常に低く、また PXR リガンドであるリファンピシン存在下 roscovitine の亢進作用は認められなかったが、PXR を強制発現させた細胞に roscovitine を作用させると、リガンド非存在下でもリガンド存在下と同レベルの転写誘導作用が認められた。PXR を強制発現させた HepG2 細胞で roscovitine による UGT1A1 mRNA およびタンパク質の顕著な発現亢進が認められたことから、roscovitine による UGT1A1 発現亢進作用には PXR が関与していることが推察された (図 4)。

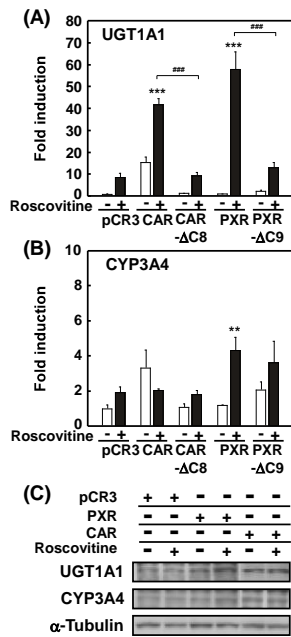


Fig. 4. Effect of roscovitine on expression of UGT1A1 and CYP3A4 in HepG2 cells expressing CAR or PXR.

(5) CDK2によりリン酸化される PXR アミノ酸の同定と PXR 活性低下機序の解析 CDK2はSer/Thrキナーゼであることから、CDK2によって制御される活性部位を同定するために、PXRのligand binding domainに含まれる9箇所のSer/Thrに焦点を当て解析した。偽リン酸化変異であるAsp変異体において、Thr<sup>290</sup>、Ser<sup>350</sup>、Thr<sup>408</sup>でroscovitineによるUGT1A1 mRNAの発現亢進が顕著に低下した(図5)。また、ウェスタンブロット法を用いて偽リン酸化体PXRの核内移行能を検討したところ、Thr<sup>290</sup>のAsp変異体ではroscovitineによるPXRの核内移行が抑制されたが、Ser<sup>350</sup>のAsp変異体では野生型PXRと同程度にroscovitineによる核内移行が認められた(図6)。これらの結果から、PXRのSer<sup>350</sup>のリン酸化反応はPXRの核内での活性化の制御に関与していると推察された。CDK2の基質特異性がSer350を含むアミノ酸配列に認められることから、P<sup>32</sup>放射線標識したATP存在下CDK2を作用させたところ、野生型PXRはリン酸化されるが、Ser350をAspに変異させたPXRでは、リン酸化が抑制されており、CDK2の作用点がSer350であることを明らかにした(図2)。

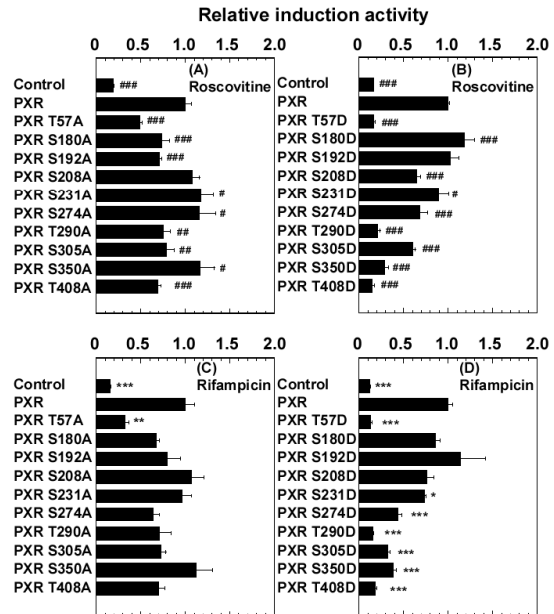


Fig. 5 Relative transactivation capacity of UGT1A1 by phosphodeficient (A and C) and phosphomimetic (B and D) mutant PXR.

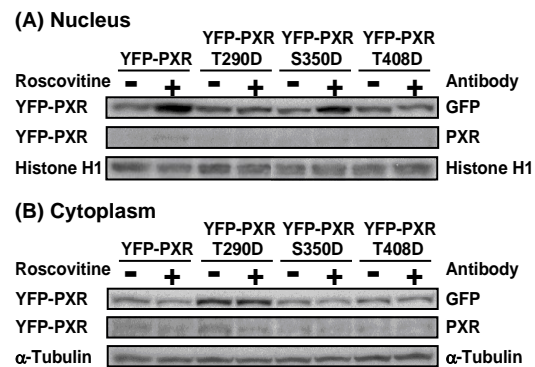


Fig. 6. Western blot analysis of expressed PXR constructs fused with YFP in HepG2 cells.

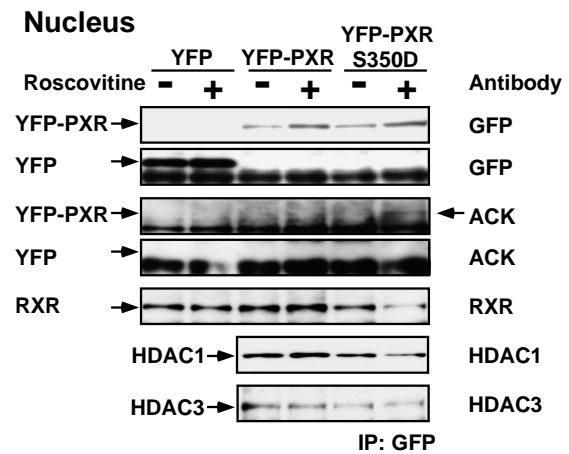


Fig. 7. Binding of wild-type or mutant YFP-PXR fusion protein to nuclear RXR, HDAC1, and HDAC3, and acetylation of wild-type or mutant protein.

PXR は核内において retinoid X receptor (RXR) とヘテロ 2 量体を形成することで標的遺伝子に結合することができる。また、PXR の活性化には PXR の脱アセチル化が関与していることが報告されている。そこで、Ser<sup>350</sup> の Asp 変異体 PXR の核内でのアセチル化レベルおよび RXR との複合体形成能を共免疫沈降法を用いて検討した。HepG2 細胞に YFP タンパク質、野生型 PXR の YFP 融合タンパク質または Ser<sup>350</sup> の Asp 変異体 PXR の YFP 融合タンパク質を発現させ、その核タンパク質を用いて anti-GFP 抗体で免疫沈降反応を行った後、SDS-PAGE で分離後ウェスタンブロットにより解析した。野生型 PXR の YFP 融合タンパク質と RXR との複合体形成能は roscovitine によって亢進したが、Ser<sup>350</sup> の Asp 変異体 PXR の YFP 融合タンパク質と RXR の複合体形成能は野生型 PXR に比べると顕著に低下していた (図 7)。野生型 PXR の YFP 融合タンパク質と histone deacetylase (HDAC) 1 との複合体形成は roscovitine によって亢進したが、Ser<sup>350</sup> の Asp 変異体 PXR の YFP 融合タンパク質と HDAC1 との複合体形成能は減少していた (図 7)。Ser<sup>350</sup> の Asp 変異体 PXR は野生型 PXR に比べて RXR だけでなく、HDAC1 との複合体形成能が低下しており、roscovitine で活性化された後も核内でのアセチル化レベルが高いことの原因の一つと考えられる。

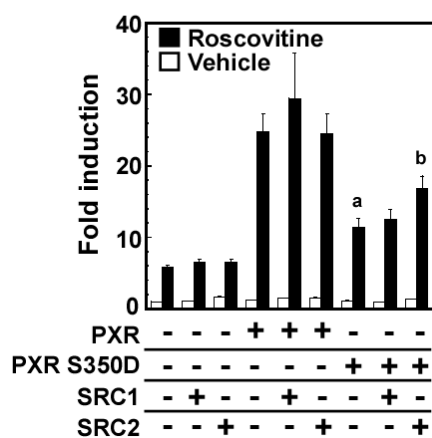


Fig. 8. SRC-2 is a critical transcriptional coactivator for S350D mutant PXR in HepG2 cells.

またコアクチベーターSRC 2 とともに過剰発現させると PXR 活性が回復することから、Ser350 をリン酸化するとコアクチベーターや RXR との結合親和性が低下し、活性が低下することが推察された。

本研究において、PXR の 350 番目のセリン残基がリン酸化されても核内移行は抑制されないが、roscovitine 刺激後も脱アセチル化されず、また retinoid X receptor (RXR) との複合体形成能が低下しており、roscovitine は PXR の Ser<sup>350</sup> のリン酸化に関わる CDK2 の作用を抑制することにより UGT1A1 遺伝子転写を亢進させること、言い換えると、CDK2 による PXR の Ser<sup>350</sup> のリン酸化が核内での転写抑制に働き、負の制御に関わっていることを明らかにした。PXR は薬物代謝酵素の発現調節だけでなく、糖代謝、脂質代謝などにも関与しており、その活性制御機構の解明は生活習慣病の発症メカニズムの解明への寄与も期待できると考えられる。

#### 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 5 件)

1. Sugatani J, Sadamitsu S, Kurosawa M, Ikushiro S, Sakaki T, Ikari A, Miwa M: Nutritional status affects fluvastatin-induced hepatotoxicity and myopathy in rats. *Drug Metab. Dispos.* **38**, 1655-1664 (2010) 査読有 doi:10.1124/dmd.110.034090
2. Sugatani J, Osabe M, Kurosawa M, Kitamura N, Ikari A, Miwa M: Induction of UGT1A1 and CYP2B6 by an antimetogenic factor in HepG2 cells is mediated through suppression of cyclin-dependent kinase 2. *Drug Metab. Dispos.* **38**, 177-186 (2010) 査読有 doi:10.1124/dmd.109.029785
3. Sugatani J, Sadamitsu S, Wada T, Yamazaki Y, Ikari A, Miwa M: Effects of dietary inulin, statin, and their co-treatment on hyperlipidemia, hepatic steatosis and changes in drug-metabolizing enzymes in rats fed a high-fat and high-sucrose diet. *Nutr. Metab.*, **9**, 23 (2012) 査読有 doi:10.1186/1743-7075-9-23 (21pages)
4. Sugatani J, Uchida T, Kurosawa M, Yamaguchi M, Yamazaki Y, Ikari A, Miwa M: Regulation of pregnane X receptor (PXR) function and UGT1A1 gene expression by posttranslational modification

of PXR protein. *Drug Metab. Dispos.*, **40(10)**, 2031-2040 (2012) 査読有 doi:10.1124/dmd.112.046748

5. **Sugatani J**: Function, genetic polymorphism, and transcriptional regulation of human UDP-glucuronosyl transferase (UGT) 1A1. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **28(2)**, 83-92 (2013) 査読有 doi:10.2133/dmpk.DMPK-12- RV-096

[学会発表] (計10件)

1. 黒澤雅俊、内田貴啓、五十里彰、三輪匡男、**菅谷純子**: CDK シグナル伝達系を介した核内受容体 CAR 発現調節機序の解明 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 (神戸) p.191、2010年12月7日
2. **菅谷純子**: Transcriptional regulation of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 gene expression and the alteration in its protein expression by intracellular factors controlling cell proliferation. 第25回日本薬物動態学会 (東京)、講演要旨集 p.178、2010年10月8日
3. 内田貴啓、黒澤雅俊、山崎泰広、五十里彰、三輪匡男、**菅谷純子**: 核内受容体 PXR を介した UGT1A1 発現調節機構の解析 第131年回日本薬学会 (静岡)、講演要旨集 3、p.173、2011年3月30日
4. 内田貴啓、黒澤雅俊、平川城太朗、山崎泰広、五十里彰、三輪匡男、**菅谷純子**: Cyclin-dependent kinase 2 down-regulates expression of drug-metabolizing enzymes UGT1A1 and CYP3A4 through phosphorylation of nuclear receptor PXR in S phase. 第34回日本分子生物学会年会 (横浜)、プログラム、p.360、2011年12月16日
5. **Junko Sugatani**: Nutritional status influences basal and drug-induced expression of drug-metabolizing enzymes and transporters and drug-adverse effects. 第26回日本薬物動態学会 (広島)、講演要旨集 p.189 2011年11月18日
6. 内田貴啓、黒澤雅俊、平川城太朗、山崎泰広、五十里彰、三輪匡男、**菅谷純子**: Cyclin-dependent kinase 2 down-regulates expression of drug-metabolizing enzymes UGT1A1 and CYP3A4 through phosphorylation of nuclear receptor PXR in S phase.

第34回日本分子生物学会年会 (横浜)、プログラム、p.360、2011年12月16日

7. **菅谷純子**、内田貴啓、黒澤雅俊、山崎泰広、五十里彰、三輪匡男: 核内受容体 PXR のリガンド結合部位を介した活性化制御機構について 第132年会日本薬学会 (札幌)、講演要旨集、p.203、2012年3月29日
8. **Junko Sugatani**: Regulation of PXR function by post-translational modification. 19<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (MDO) and 12<sup>th</sup> European Regional ISSX Meeting (Noordwijk aan Zee, the Netherlands) Abstracts, p. 15, p. 147 2012年6月20日
9. Takahiro Uchida, Yoshiki Hattori, Masahiko Yamaguchi, Yasuhiro Yamazaki, Akira Ikari, **Junko Sugatani**: Regulation of PXR function and *UGT1A1* gene expression by post-translational modification of PXR protein. The 1<sup>st</sup> International Conference on Pharma-Food (ICPF 2012) (Shizuoka), Abstract, p. 118, 2012年11月16日
10. 内田貴啓、服部芳規、黒澤雅俊、山口賢彦、山崎泰広、五十里彰、**菅谷純子**: 翻訳後に修飾された核内受容体 PXR の UGT1A1 発現におよぼす影響 第85回日本生化学会大会 (福岡) プログラム、p.147、2012年12月16日

[図書] (計1件)

1. **Junko Sugatani and Masao Miwa**: Transcriptional regulation of human bilirubin: UDP-glucuronosyltransferase *UGT1A1* gene and implication of defects in the *UGT1A1* gene promoter in "Bilirubin: Chemistry, Regulation and Disorder" (Jakub F. Novotny and Florian Sedlacek eds) NOVA Science Publishers pp. 8.1-8.27 (2011)

[その他]

ホームページ等  
<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/~rinsho/>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
菅谷 純子 (SUGATANI JUNKO)  
静岡県立大学・薬学部・教授  
研究者番号: 30098131