

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510081

研究課題名(和文)ダイオキシンによるSp1転写因子の脱リン酸化を促進するカスケード因子の同定

研究課題名(英文)Identification of cascade factor that stimulates dephosphorylation of transcription factor Sp1 by dioxin

研究代表者

菊池 英明(KIKUCHI, HIDEAKI)

弘前大学・農学生命科学部・研究員

研究者番号：60006111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：部位特異的なリン酸基認識抗体を用いて、2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(TCDD)もしくはオメプラゾール(OP)処理によりHepG2細胞におけるpSer-59のリン酸化が減少することを示した。ホスファターゼPP2Aの阻害剤であるオカダ酸(OA)はSer-59の脱リン酸化をブロックし、CYP1A1の転写を大きく阻害することを示した。同様の結果は、PP2Aのノックダウンの実験でも得られた。これらの結果は、TCDDもしくはOPからのシグナルはPP2Aを介したSp1のSer-59の脱リン酸化をもたらし、CYP1A1の転写を誘導していることを示している。

研究成果の概要(英文)：We used a site-specific phospho-antibody to show that treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) or omeprazole (OP) reduced the level of pSer-59 in Sp1 from HepG2 cells. This reduction was too much, we hypothesized that the reduced phosphorylation level resulted from activation of phosphatase activity. Given that pSer-59 is dephosphorylated by PP2A, we examined the effect of a PP2A inhibitor, okadaic acid (OA), on pSer-59 and transcription of CYP1A1. The results showed that OA blocked dephosphorylation of Ser-59 and drastically inhibited transcription of CYP1A1. Similar results were obtained after knockdown of PP2A. Treatment with OA had no effect on the expression of AhR, its nuclear translocation, or its ability to bind to the XRE. Furthermore, dephosphorylation of Sp1 at Ser-59 was not affected by knockdown of AhR. These results indicate that the signals from TCDD or OP caused PP2A-mediated dephosphorylation of Sp1 at Ser-59 and induced CYP1A1 transcription.

研究分野：分子生物学

キーワード：ダイオキシン ダイオキシン受容体 Sp1 PP2A リン酸化

1. 研究開始当初の背景

ダイオキシンが、哺乳動物に示す様々な毒性機構は、重要な研究領域であるにもかかわらず、研究が遅れている。これは、ダイオキシンの毒性機構の中心分子であるダイオキシン受容体 (AhR) が、生体において本来どのような役割を果たしているか、明らかになっていない部分が多い。ダイオキシン受容体遺伝子の破壊マウスが作製され、様々な異常表現型が見出されている (心臓奇形、発生初期の血管構築異常、出産後の静脈管開存など)。また最近では、免疫 Th17 細胞の分化に AhR が重要な役割を果たしている報告がある (Kimura et al. 2008)。我々は、ダイオキシン受容体がリガンドの結合によらずに活性化される、全く新しい機構を明らかにしてきた (Kikuchi, et al., 1998, 2002)。

このことは、ダイオキシン受容体が生理的シグナルによって標的遺伝子を活性化していることを意味している。申請者はポジショナル・クローニングにより、ダイオキシン受容体の一代表的な標的遺伝子である *CYP1A1* の遺伝子活性化の初期過程に働く因子を CREM (CREB modulator) と同定し、それが作用するシス配列には Sp1 が結合していることを明らかにしてきた (Kikuchi and Sasamori, 2004, Sasamori et al. 2008)。

この問題は、特定の細胞で生理的シグナルが入って来ることによって、特定の遺伝子 (*CYP1A1*) が誘導されるが、そのシグナルが入って来るまで如何にしてその遺伝子がサイレンシングされているかという機構を明らかにすることである。これまで、活性化の機構に関してはヒストンのアセチル化がクロマチン構造を変化させる重要な現象として多くの HAT (Histone acetyltransferase) 活性を持つ因子が同定されてきた。しかしながら、速い転写誘導が必要とされる遺伝子に関しては、ダイオキシン受容体のような転写因子が速やかにクロマチン構造をほぐして、シス配列にアクセスできるような機構が存在すると予想される。最近、HDAC (Histone deacetylase) の研究が進んできたこともあり、遺伝子のプロモータ直近のシス配列 BTE (Basic transcription element) に結合する因子が、HDAC 分子を保持することにより遺伝子をサイレンシングしており、速い誘導発現に対応する機構として働いている可能性が考えられるようになってきた。また最近我々のグループは、ダイオキシン投与によって、リン酸化されていた Sp1-Ser59 が脱リン酸化されることを見出した (Shimoyama et al. 2011)。この部位の脱リン酸化は、Sp1 の転写活性化能を上昇させることが報告されていることから (Juang et al. 2011)、ダイオキシンが何らかのホスファターゼを活性化する可能性が出てきた。

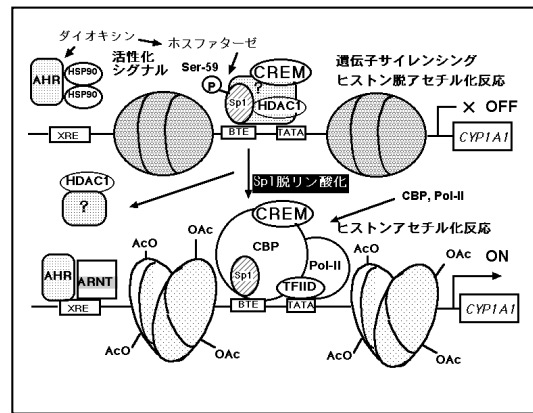


図1. 本研究で検証される仮説

2. 研究の目的

最近我々は、ダイオキシン投与によって、リン酸化されていた Sp1-Ser59 が脱リン酸化されることを見出した。そこで、それまで発現が抑制されていた標的遺伝子 (*CYP1A1*) が、ダイオキシン受容体の活性化と共に、どの分子種のホスファターゼの活性化が起こるかを同定する。またリン酸化 Ser に結合する Pin1 が関与している可能性も検討し、それにより転写が活性化される機構を明らかにする。さらに KLF は Sp1 を代表とする Znフィンガーを持つ複数の遺伝子からなるファミリーである。KLF9, 13, 16 は SID (Sin interacting domain) を持つことにより mSin3A と結合できる。この mSin3A はヒストンデアセチラーゼ (HDAC1) と結合しており、ヌクレオソームのヒストンを脱アセチル化することによって遺伝子をサイレンシングしている。しかしながら、Sp1 に関しては、mSin3A に相当する因子が同定されていない。そこで Sp1 と結合する因子を同定し、転写活性化の過程でこれまで我々が同定してきた CREM がどのように関与しているかを明らかにすることを目的とする (前ページの図1を参照)。

3. 研究の方法

(1) 活性化前の標的遺伝子がサイレンシングされている時のクロマチンの状況を検討する

どの分子種のホスファターゼが Sp1 の Ser-59 のリン酸基を脱リン酸化しているか明らかにする。

1) Sp1 のリン酸基を脱リン酸化するホスファターゼとして PP2A が報告されているので (Juang et al. 2011)、特異的阻害剤であるオカダ酸による処理で、転写活性が低下するかをルシフェラーゼを用いたレポーター遺伝子アッセイ法により検定する。

2) より特異性の高い PP2A の阻害効果を調べるために、siRNA により PP2A のノックダウンを行い、上記と同様の方法により検定する。また、この時の Sp1-Ser-59 のリン酸化状態をウエスタン法により確認する。

3) HDAC1 は mSin3A に相当する因子を介して

Sp1 と複合体を作っている可能性があり、DPI (diethylpimel-imidate) で架橋してから免疫沈降法で証明する。

(2) ダイオキシンからのシグナル伝達系により Sp1 が脱リン酸化され、転写複体に CBP がリクルートされる機構の検討

1) ダイオキシン処理により CYP1A1 遺伝子の転写が活性化されるまでの、ヒストンアセチル化の経時変化と Sp1 の存在量の変化を、アセチル化ヒストン抗体と、Sp1 抗体を用いた ChIP アッセイで比較する。

2) この間の、CBP が Sp1 複体にリクルートされて来る時間経過を免疫沈降反応によって検討する。

4. 研究成果

(1) Sp1 の Ser-59 のリン酸化レベルの減少は OA により阻害される

Sp1 の pSer-59 は TCDD や OP により減少することがわかったが、これはこの部位をリン酸化する酵素の活性が低下した、あるいは脱リン酸化酵素が積極的に働いた、という二つの原因が考えられた。リン酸化レベルの減少が大きい事、この部位を脱リン酸化する酵素が PP2A であるということがすでに知られていたことから、積極的に脱リン酸化されているのではないかと考え、PP2A の阻害剤である OA を用いた。TCDD や OP 処理の前に 2 時間、50 nM の OA で処理した結果、TCDD や OP による pSer-59 の減少は抑制され、コントロールと同じレベルにまでリン酸化状態が保たれている事がわかった(図 2)。

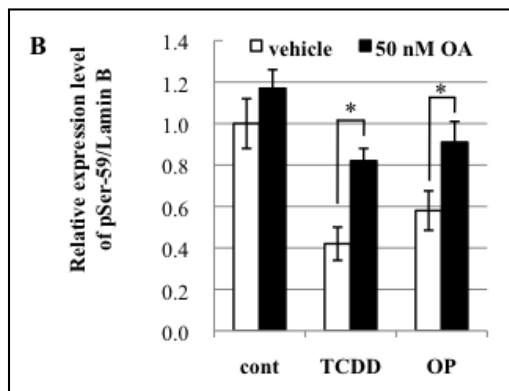


図 2 .Sp1 の Ser-59 のリン酸化レベルの減少は OA により阻害される

(2) OA により CYP1A1 の転写は抑制される

OA 処理した際に、pSer-59 の脱リン酸化が抑制された事から、この際に CYP1A1 の転写がどのように変化するかを qRT-PCR により調べた。OA で 2 時間前処理をし、その後 24 時間 TCDD あるいは OP で処理した細胞をサンプルとした。OA を事前に処理しておいた細胞では、TCDD や OP による CYP1A1 の転写が起らなかった(図 3)。この現象は、調べた 3 種類の細胞、HepG2 (肝臓癌細胞)、MCF-7 (乳

癌細胞)、Caco-2 (大腸癌細胞) で同様な傾向が見られた。

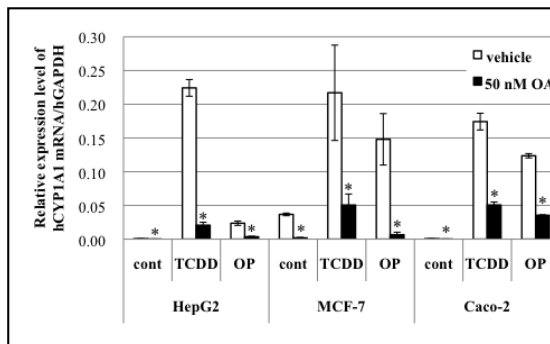


図 3 .OA により CYP1A1 の転写は抑制される

(3) Sp1 の Ser-59 がリン酸化されているものは BTE に結合している

Ser-59 が TCDD や OP により脱リン酸化されるという結果は、核抽出タンパク質を用いたものであるため、それが CYP1A1 の BTE に限定された結果ではなかった。実際に BTE において Sp1 の Ser-59 が脱リン酸化されているのかどうか、転写の状態によりリン酸化状態はどのように変化しているのかを、ChIP (クロマチン免疫沈降) アッセイを用いて調べた。その結果、転写が起きていない際には pSer-59 が結合しているが、TCDD や OP 存在下では、結合していない事がわかった(図 4)。また、OA を事前に処理しておいた際は、pSer-59 は TCDD や OP 存在下でも結合を保ったままである事が分かった。この際、Sp1 全体の結合量は転写の状態に関係なく一定量であり、Ser-59 のリン酸化状態だけが変化している事が分かった。

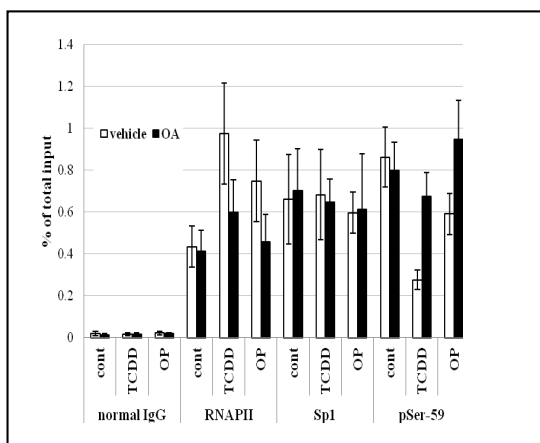


図 4 .Sp1 の Ser-59 がリン酸化されているものは BTE に結合している

以上の事より、CYP1A1 の BTE を含むプロモーター領域でも Western blotting の結果同様に、TCDD や OP により Sp1 の Ser-59 が脱リン酸化されている事がわかった。

Sp1 は転写因子として早期に同定され、数百から数千におよぶ遺伝子の調節をしてい

ることがわかっているが、どのように標的遺伝子の転写を調節しているかはあまり解明されていない。同じファミリータンパク質である KLF や Sp2,3 などとの置換が起こるとされているが、なぜ置き換わるのか、詳細なメカニズムは翻訳後修飾に起因すると考えられている。その中でもリン酸化は転写と密接な関係にあるとされており、Ser-59 は脱リン酸化、Thr-453 はリン酸化で標的遺伝子の活性化をすることが示されている。CYP1A1 の転写において、これらがどのように変化するかを確認したところ、Thr-453 のリン酸化レベルには大きな変化は見られなかったが、Ser-59 は TCDD や OP により大きく減少することがわかった。さらに、これは OA による阻害や PP2A のノックダウンにより抑制されたことから、PP2A が積極的に脱リン酸化していることを示した。また、CYP1A1 の転写誘導も大きく抑制された。しかしながら、OA では完全に抑制されたのに対し、siRNA の場合、PP2A のノックダウン効率が高いにもかかわらず、OA ほどの効果は見られなかった。OA の阻害効果が *in vitro* では PP2A (IC50 = 0.1 nM)、PP1 (IC50 = 15-20 nM)、PP2B (>1 μM) であり、今回実験で用いた濃度は 50 nM であるため、PP1 も阻害されている可能性がある。OA による PP2A の阻害、siRNA によるノックダウンの結果の違いは、PP1 が AhR や Sp1、他の CYP1A1 の転写に関与する因子に影響を与えているのではないかと推測できる。しかしながら、PP1 に関しては調べていないので、詳しいことはわからなかったが、PP2A が CYP1A1 の転写において、Sp1 の Ser-59 を脱リン酸化し、活性化するということが本研究で明らかになった。

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6件)

(1) Hideki Otori, Takumi Higashiyama, Atsushi Uehara, Miho Kainuma, Yukako Kudo, Toru Kamimura, Tasuku Kond, Katsumi Mochitate, Hideaki Kikuchi, Yasubumi Furuya, Signal change of surface acoustic wave (SAW) by H2O2 damage to SV40-T2 cells cultivated on SH-SAW Sensor, *Sensors and Actuators A* (査読あり) **200**, (2013) **162-167**
doi:10.1016/j.sna.2012.11.002

(2) Shuya Kasai, Takanori Ishigaki, Ryo Takumi, Tohoru Kamimura, Hideaki Kikuchi, β -catenin signaling induces CYP1A1 expression by disrupting adherens junctions in Caco-2 human colon carcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta*, (査読あり) **1830** (2013) **2509-2516**
doi:10.1016/j.bbagen.2012.11.007

(3) Matsumiya T, Xing F, Ebina M, Hayakari

R, Imaizumi T, Yoshida H, Kikuchi H, Topham MK, Satoh K, Stafforini DM. Novel Role for Molecular Transporter Importin 9 in Posttranscriptional Regulation of IFN- α Expression. *J Immunol.* (査読あり) **200** (2013) **1907-1915**
doi: 10.4049/jimmunol.1201925.

(4) Shuji Shimoyama, Shuya Kasai, Brigitte Kahn-Perlès and Hideaki Kikuchi, Dephosphorylation of Sp1 on Ser-59 by Protein Phosphatase 2A (PP2A) is required for CYP1A1 transcription induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and omeprazole treatment. *Biochim. Biophys. Acta*, (査読あり) **1839** (2014) **107-115**
doi: 10.1016/j.bbagr.2013.12.004.

(5) Takumi Higashiyama, Akihiro Katsuyama, Hideki Otori, Toru Kamimura, Atsushi Uehara, Miho Kainuma, Ryo Takumi, Yukako Kudo, Masayuki Ebina, Katsumi Mochitate, Yasubumi Furuya and Hideaki Kikuchi, Detection of cellular damage by hydrogen peroxide using SV40-T2 cells on shear horizontal surface acoustic wave (SH-SAW) sensor. *Ultrasonics* (査読あり) **54** (2014) **1431-1438**
doi:10.1016/j.ultras.2014.04.026

(6) Akihiro Katsuyama, Syuji Shimoyama, and Hideaki Kikuchi, The Mycotoxin Patulin Decreases Expression of Density-Enhanced Phosphatase-1 by Down-Regulating PPAR α in Human Colon Cancer Cells. *Tohoku J. Exp. Med.* (査読あり) **233** (2014) **265-274**
<http://doi.org/10.1620/tjem.233.265>

[学会発表](計9件)

Hideaki Kikuchi(菊池英明) and Katsumi Mochitate(持立克身), 医薬品・環境汚染物質検出用バイオセンサ デバイス、第28回寒地技術シンポジウム、10月30~11月1日、2012年、弘前

H. Otori, A. Uehara, M. Kainuma, Y. Kudo, T. Higashiyama, T. Kon, K. Mochitate, H. Kikuchi, Y. Furuya: "Signal Change of Surface Acoustic Wave (SAW) by H2O2 Damage to SV40-T2 Cells Cultivated on SH-SAW Sensor", The International Workshop on Piezoelectric Materials and Applications (IWPMA) 2012, 22nd - 25th April 2012, Hirosaki, Japan

Moto Takeshita, Tomohiro Sato, Masayuki Ebina, Shuji Shimoyama, Satomi Ito and Hideaki Kikuchi: Myosin 9 exists in nucleus and its interaction with cleavage and polyadenylation specificity

factors may influence transcription efficiency. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Nuclear Organization & Function, August 19-23, 2014, NY, USA

大島秀貴, 上原篤詞, 貝沼美帆, 工藤優佳子, 東山拓海, 今大健, 持立克身, 菊池英明, 古屋泰文: 表面弾性波(SH-SAW)基板に培養した細胞の損傷による信号変化. 第21回インテリジェント材料システムシンポジウム(東京)2012年1月10日, 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

下山 修司, 葛西 秋宅, 菊池 英明: CYP1A1 転写における PP2A を介した Sp1 の Ser-59 の脱リン酸化の関与. 第35回日本分子生物学会年会(福岡), 2012年12月11~14日

勝山 明裕, 下山 修司, 菊池 英明: パツリンによる Claudin-4 のリン酸化と DEP-1 の機能阻害. 第35回日本分子生物学会年会(福岡), 2012年12月11~14日

赤坂 遼平, 石垣 貴則, 葛西 秋宅, 下山 修司, 菊池 英明: AhR の調節領域に対する β -catenin の関与. 第35回日本分子生物学会年会(福岡), 2012年12月11~14日

東山 拓海, 大島 秀貴, 工藤優佳子, 磯野晶宏, 今 大健, 持立 克身, 菊池 英明, 古屋泰文: SH-SAW 電極間に培養した SV40-T2 細胞の薬液損傷モニタリング. 第22回インテリジェント材料/システムシンポジウム(東京), 2013年1月8日

勝山 明裕, 下山 修司, 菊池英明: パツリンによる Density Enhanced Phosphatase-1 (DEP-1) の阻害と claudin-4 のリン酸化の亢進. 第36回日本分子生物学会(神戸), 2013年12月3~6日

〔その他〕

ホームページ等

<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/lab/2/celltech2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 英明 (KIKUCHI HIDEAKI)

弘前大学農学生命科学部・研究員

研究者番号: 60006111