

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860202

研究課題名(和文) エンハンサー由来lncRNAによるNrf2依存的HO-1遺伝子発現増強機構の解明

研究課題名(英文) Emerging role of enhancer RNA in NRF2-dependent human HO-1 gene induction

研究代表者

丸山 敦史 (Maruyama, Atsushi)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10431438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヘム分解酵素の一つである、ヒトヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)遺伝子の発現制御領域であるエンハンサー近傍から産生される新規ノンコーディングRNA(以下eRNAs)の同定と、eRNAsのNRF2依存的HO-1遺伝子発現増強における機能について解析を行った。解析の結果、実際ヒト細胞内においてHO-1遺伝子エンハンサーからeRNAが複数産生されることがわかった。見出したeRNAsはNRF2活性化剤であるDEMやヘミンにより発現が増強した。さらにsiRNAを用いたeRNAs発現抑制実験から、eRNAsがHO-1遺伝子発現増強を選択的に制御することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Emerging evidence indicates that enhancer RNAs (eRNAs), which are long non-coding RNAs transcribed from gene enhancer regions, play important roles in the regulation of gene expression. However, it remains unknown whether eRNAs are involved in the human heme oxygenase-1 gene (HO-1) induction. HO-1 possesses two distantly located enhancers called E2 and E1 enhancers to regulate its transcription. In this study, I demonstrated that eRNAs are transcribed from the human HO-1 enhancers. Focusing on E2-derived enhancer RNA (eRNA E2), I found eRNA E2 is induced in response to HO-1 substrate heme and oxidative stress-causing reagents such as diethyl maleate (DEM) in an NRF2-dependent manner. I also found DEM-induced HO-1 expression was selectively down-regulated by knockdown of the eRNA E2. Furthermore, DEM-induced Pol II binding to human HO-1 regions is attenuated in eRNA E2 knockdown cells. These results indicate that eRNA E2 is functional and required for the induction of HO-1.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：ヘムオキシゲナーゼ1 NRF2 ノンコーディングRNA 転写制御 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

Heme oxygenase (HO)はヘムを鉄、一酸化炭素、ビリベルジンに分解する酵素である。HOには誘導的に発現するHO-1、構成的に発現するHO-2がある。HO-1遺伝子破壊マウスは、大半が胎児期に死亡するが約20%が出生する。しかし出生したマウスは、貧血、顕著な血清鉄の低値、肝臓や腎臓における鉄の沈着、成長遅延、組織障害、慢性炎症が見られる。ヒトHO-1欠損症例も報告されており、患者は遺伝子破壊マウスに類似した症状が認められ、繰り返し感染症により死亡した。以上から、HO-1発現の低下は、生体の生存に重篤な危機を及ぼす。

HO-1遺伝子は、重金属、活性酸素種などの環境ストレスに対して鋭敏に反応し、顕著に発現増強する。ヒトHO-1遺伝子では転写開始点上流4kb (E1)と9kb (E2)に遺伝子発現を制御するエンハンサー領域があり、その領域にストレス応答に必要なエレメントが存在する。両エンハンサー領域にはさまざまな因子が結合するが、酸化ストレス応答に重要な結合分子はNRF2である。

NRF2は酸化ストレスが関与する疾患から生体を防御する転写因子である。NRF2は活性酸素種などに反応してHO-1やチオレドキシ還元酵素(TXNRD1)をはじめとする生体防御遺伝子群の発現を包括的に増強する。これまで申請者らは、NRF2依存的転写活性化の分子機構を解明するために核内でNRF2に相互作用する因子を同定し、NRF2依存的転写活性化における機能を明らかにしてきた。中でも興味深い因子は、クロマチンリモデリング因子BRG1である。本因子はNRF2によるHO-1遺伝子発現を選択的に増強する。また、HO-1遺伝子は他のNRF2標的遺伝子に比べ迅速かつ顕著に発現増強する。そのため、HO-1遺伝子特異的な発現増強機構の存在が示唆されている。

申請者は、NRF2依存的HO-1遺伝子発現増強機構を調べるために、NRF2活性化時のNRF2とmRNA合成酵素(Pol II)の挙動を詳細に検討した。その結果、NRF2活性化時にHO-1遺伝子領域ではプロモーターだけでなく、エンハンサーにもPol IIが結合増強することがわかった。この結果から申請者は、ヒトHO-1遺伝子のエンハンサー領域が転写され、non-coding RNA(ncRNA)が産生される、という仮説を立てた。

ncRNAはタンパク質をコードしない転写産物であり、転写のノイズと考え

られてきた。しかし近年、ncRNAが転写やスプライシングの調節などに関与することが証明された。そこで申請者は、NRF2依存的HO-1遺伝子発現増強におけるncRNAの関与を仮定し、網羅的なヒトcDNAデータを検索した。その結果、ヒトHO-1遺伝子領域にタンパク質をコードする領域だけでなく、上述のエンハンサー領域周辺から産生される複数の転写産物を見出した。しかしながら、そのncRNAが実際に産生されるのか、またNRF2依存的HO-1遺伝子発現増強に関与するののかは、全く未解析であった。

2. 研究の目的

本研究は、申請者が見出した新規ncRNAによるNRF2依存的HO-1遺伝子発現増強機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1)ヒトHO-1遺伝子エンハンサー由来ncRNA(eRNA)の同定: NRF2活性化剤ジエチルマレイン酸(DEM)で処理したHeLa細胞の全RNAと領域特異的プライマーを用いてRT-PCRを行い、HO-1遺伝子エンハンサー近傍から転写産物が産生されているかを検討した。

(2)eRNAsの方向と転写開始点の同定: 検出したeRNAsの方向を決定するために、strand-specific RT-PCRを行った。さらに、eRNA E2-3およびeRNA E1-4については、転写開始点を決定するために、5' Rapid Amplification of cDNA End (5'RACE)解析を行った。

(3)eRNAsのヒト細胞における発現と発現挙動の解析: 見出したeRNAsの薬剤刺激による発現挙動を調べるために、HO-1遺伝子発現増強剤であるDEM、ヘミン、カドミウム、ジメチルフルマル酸(DMF)で細胞を処理した際のeRNAs発現を定量的RT-PCRにより検討した。また、細胞種による発現を検討するために、子宮頸がん由来HeLa細胞、神経芽細胞腫由来SH-SY5Y細胞、ヒト表皮角化細胞由来HaCaT細胞を用いて検討を行った。

(4)eRNAsの細胞内局在の解析: eRNAsの細胞内局在を検討するために、HeLa細胞抽出液から細胞質分画と核分画を調製し、eRNAsの含有量を定量的RT-PCRにより検討した。

(5)NRF2およびBACH1のeRNA E2-3発現に対する影響の解析: 見出したeRNAsのうちeRNA E2-3に着目し解析を進めた。eRNA E2-3はHO-1発現増強剤により発現が誘導されるため、その発現誘導にはHO-1遺伝子発現を制御するNRF2およびBACH1の

関与が考えられた。そこで、特異的 siRNA を用いて NRF2 および BACH1 発現を抑制し、eRNA E2-3 発現への影響を検討した。

(6) eRNA E2-3 が NRF2 標的遺伝子発現に及ぼす影響の解析：eRNA E2-3 が NRF2 標的遺伝子発現に及ぼす影響を検討するために、特異的 siRNA を用いて eRNA E2-3 発現を抑制し、HO-1, TXNRD1 などの NRF2 標的遺伝子発現を検討した。

(7) eRNA E2-3 が制御する HO-1 遺伝子発現機構の解析：eRNA E2-3 が関与する HO-1 遺伝子発現増強機構を検討するために、特異的 siRNA を用いて eRNA E2-3 発現を抑制し、NRF2 および Pol II の HO-1 遺伝子領域への結合挙動をクロマチン免疫沈降(ChIP)解析により検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト HO-1 遺伝子エンハンサー由来

ncRNA(eRNAs)の同定：上述したように、申請者は、ヒト HO-1 遺伝子領域にタンパク質をコードする領域だけでなく、エンハンサー領域周辺に複数の転写産物を見出した。

これらの転写産物が実際産生されているか否かを調べるために、HeLa 細胞の全 RNA と領域特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。その結果、E2 エンハンサー領域に 3 つの RT-PCR シグナル(E2-1, E2-2, E2-3) を、E1 エンハンサー領域に 2 つのシグナル(E1-3, E1-4)を認めた。さらにこれらの NRF2 活性化剤 DEM に対する応答性を検討するために、DEM 処理した HeLa 細胞の全 RNA を用いて定量的 RT-PCR を行った。その結果、E2-1, E2-2, E2-3, E1-4 の DEM による発現増強を認めた。以上から、HO-1 遺伝子エンハンサー領域から RNA が産生され、それらの発現が DEM により増強することがわかった。

これらの RNA はタンパク質をコードする領域以外から産生され、200 塩基以上であることから long ncRNA であると考えている。またエンハンサー領域近傍から産生されるため human HO-1 enhancer RNAs (以下 eRNAs とする)と名付けた。

(2) eRNAs の方向と転写開始点の同定：

見出した 5 つの eRNAs の転写方向を調べるために strand-specific RT-PCR を行った。その結果、E2-1 は HO-1 遺伝子の向き(5'-3')に対して逆向き(3'-5')であったが、それ以外の 4 つの eRNAs は順向き(5'-3')であることがわかった。

次に eRNAs の転写開始点を決定するために、5'RACE 解析を行った。その結果、E2-3 および E1-4 の転写開始点を見出すことに成功した。

(3) eRNAs のヒト細胞における発現と発

現挙動の解析：見出した eRNAs の HO-1 遺伝子発現との関連を調べるために、HeLa 細胞において HO-1 発現増強剤による eRNAs の発現挙動を検討した。その結果、HO-1 遺伝子同様に、DEM とヘミンにより E2-1, E2-3 および E1-4 が有意に発現増強することがわかった。一方、HeLa 細胞におけるカドミウムおよび DMF による HO-1 および eRNAs の発現増強は有意ではなかった。さらに、他のヒト培養細胞における eRNAs の発現を検討したところ、ヒト表皮角化細胞由来細胞 HaCaT では DEM により E2-1, E2-3, E1-4 の発現増強が認められた。また、ヒト神経芽細胞腫由来細胞 SH-SY5Y では DEM により E2-1, E2-3 の発現増強が検出できた。以上の結果から、eRNAs は HO-1 発現増強剤により発現が増強する事およびその発現挙動はヒト細胞種により異なることがわかった。

(4) eRNAs の細胞内局在の解析：eRNA の機能を推定するために、eRNAs の細胞内局在を検討した。HeLa 細胞を用いて細胞質分画と核分画を調製し、eRNAs の含有量を定量的 RT-PCR により検討したところ、E2-1, E2-3, E1-4 は核内に局在することがわかった。この結果から、eRNAs は転写制御などの核内反応に関与することが示唆された。

(5) NRF2 および BACH1 の eRNA E2-3 発現に対する影響の解析：見出した eRNAs のうち HeLa 細胞において最も発現の高い eRNA E2-3 に着目し解析を進めた。HO-1 遺伝子エンハンサーに結合し、HO-1 遺伝子発現制御に関与する NRF2 および BACH1 の eRNA E2-3 発現に対する影響を調べるために NRF2 および BACH1 に対する siRNA を用いて NRF2 および BACH1 発現を抑制し、eRNA E2-3 発現を検討した。NRF2 発現を抑制すると NRF2 標的遺伝子である HO-1 や TXNRD1 と同様に eRNA E2-3 発現が减弱した。さらに BACH1 発現を抑制すると HO-1 と同様に eRNA E2-3 発現が増強した。以上から、eRNA E2-3 発現は NRF2 および BACH1 により制御されることがわかった。

(6) eRNA E2-3 が NRF2 標的遺伝子発現に及ぼす影響の解析：eRNA E2-3 が NRF2 標的遺伝子発現に及ぼす影響を検討するために、eRNA E2-3 特異的 siRNA を用いて発現抑制を行い、HO-1, TXNRD1 などの NRF2 標的遺伝子発現を検討した。その結果、eRNA E2-3 発現を抑制すると、DEM による HO-1 遺伝子発現増強およびタンパク質発現増強が减弱した。一方、他の NRF2 標的遺伝子(TXNRD1, GCLC, SLC7A11 など)の DEM による発現増強は維持されていた。以上から、eRNA E2-3 は HO-1 発現の選択的増強に関与することがわかった。

(7) eRNA E2-3 発現が制御する HO-1 遺伝

子発現機構の解析：eRNA E2-3 が関与する HO-1 遺伝子発現増強機構を検討するために、eRNA E2-3 特異的 siRNA を用いて発現抑制を行い、NRF2 および Pol II の HO-1 遺伝子領域への結合挙動をクロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析により検討した。まず、NRF2 核蓄積に対する影響を検討したところ、eRNA E2-3 を発現抑制しても DEM による NRF2 核蓄積に変化は見られなかった。また、その際の NRF2 の HO-1 E2 エンハンサー結合増強にも有意な差は見られなかった。次に Pol II の HO-1 遺伝子領域への結合を検討したところ、eRNA E2-3 発現抑制により DEM による Pol II のエンハンサーおよびプロモーター結合増強が有意に低下していた。以上のことから、eRNA E2-3 は Pol II の HO-1 遺伝子領域への結合を介して HO-1 遺伝子発現制御に関与することがわかった。

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 7 件)

Maruyama A, Mimura J, Itoh K. Non-coding RNA derived from the region adjacent to the human *HO-1* E2 enhancer selectively regulates *HO-1* gene induction by modulating Pol II binding. ***Nucleic Acids Research***. 2014, 42(22): 13599-13614. (査読有) doi: 10.1093/nar/gku1169

Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Maruyama A, Nikaido Y, Mimura J, Mori F, Warabi E, Yanagawa T, Ueno S, Itoh K, Wakabayashi K. p62 deficiency enhances α -synuclein pathology in mice. ***Brain Pathology***. (2014) (In press). (査読有) doi: 10.1111/bpa.12214

Ushijima Y, Ohniwa RL, Maruyama A, Saito S, Tanaka Y, Morikawa K. Nucleoid compaction by MrgA^{Asp56Ala/Glu60Ala} does not contribute to staphylococcal cell survival against oxidative stress and phagocytic killing by macrophage. ***FEMS Microbiology Letters***. 2014, 360(2): 144-151. (査読有) doi: 10.1111/1574-6968.12598

Ye P, Mimura J, Okada T, Sato H, Liu T, Maruyama A, Ohyama C, Itoh K. Nrf2- and ATF4-Dependent Upregulation of xCT Modulates the Sensitivity of T24 Bladder Carcinoma

Cells to Proteasome Inhibition. ***Molecular and Cellular Biology***. 2014, 34(18):3421-3434. (査読有) doi: 10.1128/MCB.00221-14

Tanji K, Miki Y, Ozaki T, Maruyama A, Yoshida H, Mimura J, Matsumiya T, Mori F, Imaizumi T, Itoh K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Phosphorylation of serine 349 of p62 in Alzheimer's disease brain. ***Acta Neuropathology Communications***. 2014, 2:50. (査読有) doi:10.1186/2051-5960-2-50

Maruyama A, Mimura J, Harada N, Itoh K. Nrf2 activation is associated with Z-DNA formation in the human HO-1 promoter. ***Nucleic Acids Research***. 2013, 41(10):5223-5234. (査読有) doi: 10.1093/nar/gkt243

Tanji K, Maruyama A, Odagiri S, Mori F, Itoh K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Keap1 is localized in neuronal and glial cytoplasmic inclusions in various neurodegenerative diseases. ***Journal of Neuropathology & Experimental Neurology***. 2013, 72(1): 18-28. (査読有) doi:10.1097/NEN.0b013e31827b5713

[学会発表] (計 6 件)

Maruyama A, Itoh K, Emerging role of enhancer RNA in human HO-1 gene induction. **第37回日本分子生物学会年会**, 2014年11月25日—27日, パシフィコ横浜, 横浜市, 2P-0256

Maruyama A, Itoh K. Regulation of oxidative stress-responsive HO-1 expression by enhancer-derived non-coding RNAs. ***Hirosaki International Symposium on Transplant***, October 31, 2014, Hirosaki, Japan, P-7.

Maruyama A, Itoh K. Enhancer RNA derived from human HO-1 E2 enhancer region is required for HO-1 gene induction. **8th International Conference on Heme Oxygenases, Biolron & Oxidative Stress**, October 8-11, 2014, Sydney, Australia, P-48.

Maruyama A, Mimura J, Itoh K.
Functional role of eRNAs derived from human HO-1 enhancer regions for HO-1 gene induction. *International Conference for The Environmental Response IV*, February 28–March 2, 2014, Sendai, Japan, P-15

Maruyama A, Mimura J, Itoh K.
eRNAs from human HO-1 enhancer regions are required for HO-1 gene induction. *The 36th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan*, 2013年12月3日–6日, 神戸ポートアイランド, 神戸市. 3P-0193

丸山 敦史, 伊東 健. Nrf2 依存的 HO-1 発現を制御するエンハンサー由来 non-coding RNAs の解析. *日本生化学会東北支部 第79回例会・シンポジウム*, 2013年5月11日, 東北大学 片平さくらホール, 仙台市. D)-3

〔図書〕(計 1 件)

1. **Maruyama A**, Itoh K. Role of the Keap1-Nrf2 Pathway in Protection against Ionizing Radiation. *Fukushima Nuclear Accident: Global Implications, Long-Term Health Effects and Ecological Consequences*, Nova Science Publishers, Editor: Shizuyo Sutou, Chapter 7: 115-134, 2015.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

弘前大学大学院医学研究科附属高度先進
医学研究センター分子生体防御学講座
<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/admed/department/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 敦史 (Maruyama Atsushi)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・
助教

研究者番号 : 1 0 4 3 1 4 3 8

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号 :