

平成 22 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790114

研究課題名（和文） 生体内異物応答レセプターCAR 活性化機構の解明とそのインビトロ評価系の確立

研究課題名（英文） Studies on the activation mechanism of xenobiotic-responsive nuclear receptor CAR and establishment of *in vitro* evaluation system for its ligands

研究代表者

菅野 裕一郎 (KANNO YUICHIRO)

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号：40453849

研究成果の概要（和文）：

生体には医薬品や環境汚染物質などの生体外異物に対する防御機構が備わっている。核内受容体 CAR は生体外異物を認識し、生体外への排泄を促進する代謝酵素やトランスポーターなどの遺伝子群の発現を調節している。異物を認識した CAR の活性化は細胞質から核内への移行し、遺伝子上流の CAR 応答配列上でコファクタータンパク質をリクルートする。本研究では CAR の活性化の初期イベントである核移行には微小管ネットワーク及び importin/Ran system が関与していることを明らかにした。次に、コファクターのリクルートにリガンド結合を要しない CAR のリガンド結合依存性変異体を用いて、これまで不可能であった不死化培養細胞を用いたリガンドのスクリーニング系を確立した。これらの成果は、医薬品や環境化学物質による毒性発現に対する防御機構の解明だけでなく、薬物代謝酵素の誘導等による薬物相互作用の予測において動物愛護の観点からも重要である。

研究成果の概要（英文）：

Animals including human beings have a defense mechanism against the toxicity of xenobiotics such as medicinal compounds and environmental pollutants. The constitutive androstane receptor (CAR) plays an important role in this defense mechanism by transcriptionally activating target genes coding for the metabolic enzymes, transporters and so on. In this study, it was elucidated that the microtubule network and importin/Ran system played important roles in the activator mediated nuclear translocation of CAR in primary hepatocytes. In immortal cells, however, the ligand-free CAR is spontaneously translocated into the nuclear compartment where it transactivates target genes. Using the ligand-dependent CAR mutant, the novel screening system for CAR ligand was established without sacrificing animals. All these findings will be beneficial in not only understanding of the d

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学 環境系薬学

キーワード：シグナル伝達、薬学、バイオアッセイ

1. 研究開始当初の背景

生体外異物が侵入すると、これを認識したレセプター型転写調節因子が細胞質から核内へ移行し、標的遺伝子（酸化酵素、抱合酵素、トランスポーターなど）の発現を誘導して代謝・排泄が促進される。このような異物認識型核内受容体の1つである **Constitutive Androstane Receptor (CAR)** は継代培養細胞において生体内とは同じ挙動を示さず、非刺激下においても自発的に核へ移行してしまう。また CAR はリガンドの非存在下においても恒常的に活性化状態にあるため、生体内での CAR を介した転写活性化は主に細胞質から核への局在の変化によって調節されていると考えられるが、その詳細なメカニズムは解明されていない。また医薬品開発の初期には薬物相互作用の原因となる CAR の活性化能の評価は不可欠である。このような CAR の特質から、リガンドやアクチベーターによる CAR の活性化の評価には生体または初代培養肝細胞が用いざるを得ないが、倫理的観点や実験操作の煩雑性から継代培養細胞を用いた評価系が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、CAR の細胞内局在調節メカニズムを明らかにし、CAR の活性化の *in vitro* 評価系の確立を目的としている。

3. 研究の方法

継代培養細胞株及びラット初代培養肝細胞を用い、分子生物学的手法を駆使して、CAR の活性化機構について検討した。

(1) CAR の核移行機構の解析

- ①_r 初代培養肝細胞に微小管重合阻害剤と CAR の活性化剤であるフェノバルビタールを併用処置し、CAR による CYP2B の誘導及び GFP 融合 CAR の核移行を観察した。
- ②_r CAR の核移行に対する importin/Ran system の影響を検討するために、Ran 変異体（発現により、Ran system が攪乱する）を過剰発現し、GFP 融合 CAR の細胞内局在を観察した。
- ③_r AMPK 活性化剤である AICAR、阻害剤である Compound C を PB と併用し、CAR による CYP2B の誘導及び核移行を観察した。

(2) CAR 変異体を用いた *in vitro* スクリーニング系の構築

ヒト CAR のリガンド結合領域に 3 アミノ残基挿入し、リガンド依存的な活性化の観察できる変異体を作成した。これを発現させた培養細胞を用いて、レポーター遺伝子の活性化により、様々な化学物

質のスクリーニングを行い、アゴニスト～パーシャルアゴニスト～アンタゴニストに分類した。候補化合物について、CAR に対する作用を初代培養肝細胞を用いて確認した。

4. 研究成果

これまでの研究から CAR の自発的核移行には核移行シグナル(NLS1 もしくは NLS2)が必要であることを報告しており、さらに CAR を細胞質に保持するのに必要な領域 CRR を見い出している。ラット初代培養肝細胞（試験管内で *in vivo* を再現し得る系として用いられている）を用いた FRAP assay により CRR が CAR を細胞質に静的に保持するのに重要な役割を果たしていることを見出した。さらに、CRR による細胞質への静的な保持は継代培養細胞では失われており、培養細胞と初代培養肝細胞における CAR の局在の違いは CRR による細胞質保持機能の違いであることを明らかとしている（図 1）。

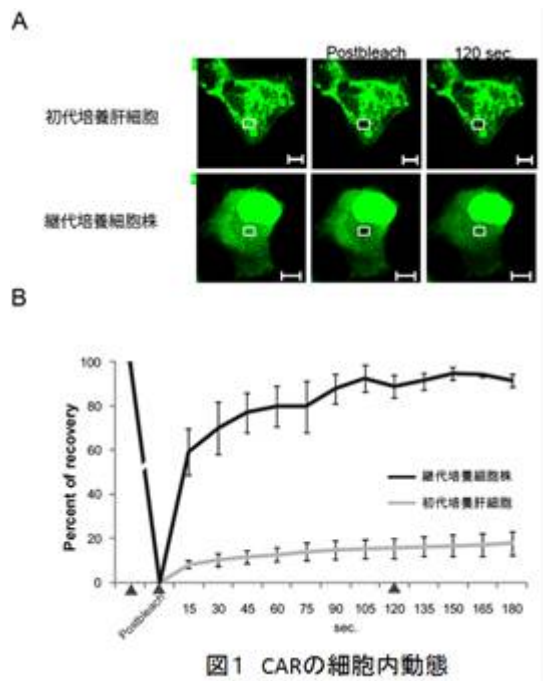


図 1 CAR の細胞内動態

本研究ではさらに、PB による CAR の核移行には NLS2 が関与すること、Importin13 のドミナントネガティブ体(mKO-IPO13C)の共発現により核移行が阻害されることなどから Importin 13 の関与を明らかとした (図 2、Kanno et. al. *Biochim. Biophys. Acta.-Mol Cell Res.- in press*)。

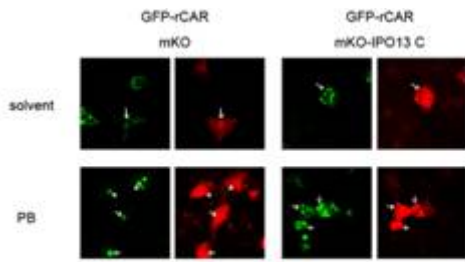


図2 ラット初代培養細胞におけるIPO13ドミナントネガティブ体によるPBIによるGFP融合CARの核移行阻害

次に、微小管重合阻害剤であるノコダゾール、コルヒチンにより PB 刺激後の CAR の核移行が阻害されたことから、CAR の核移行に微小管が関与していることを明らかとした (図3、*Mol. Pharmacol.* 77:311-316 (2010))。

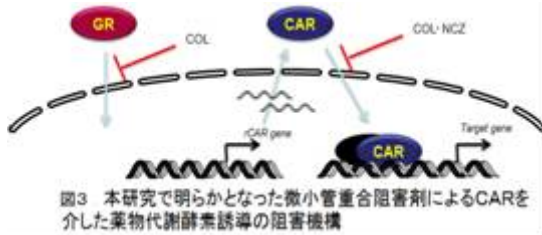


図3 本研究で明らかとなった微小管重合阻害剤によるCARを介した薬物代謝酵素誘導の阻害機構

さらに、AICAR は AMPK の活性を介して CAR の核移行を促進することが報告されているが、本研究で AICAR は AMPK 非依存的に CAR の核移行を阻害していることも明らかとした (Kanno et. al. *J.Toxicol Sci.* 2010-1, *in press*)。

これらの結果により CAR の核移行メカニズムについて新たな知見が加えられた。

CAR は初代培養肝細胞とは異なり、培養細胞では自発的に核内に移行するとともに、恒常的に活性化状態にあるため、他の核内受容体のように培養細胞を用いてリガンド機能を観察することが困難であった。そこで、リガンド結合領域に変異を有し、転写調節にリガンドの結合を要する CAR 変異体を用いてリガンドスクリーニング系を確立した(図4、Kanno et. al. *J. Toxicol Sci.* 2010-2, *in press*)。

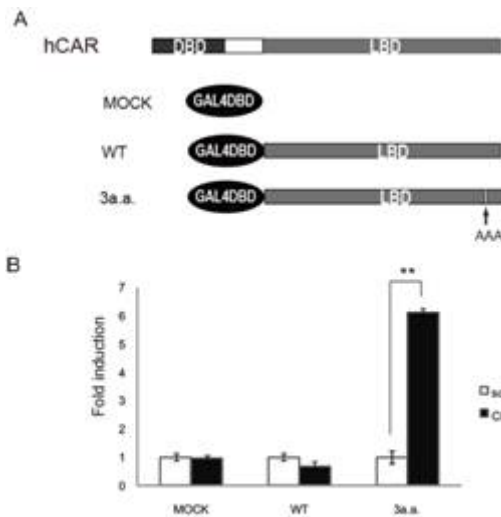


図4 CARのリガンドスクリーニングアッセイ系

この系を用いて、pp'-1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane(DDT) が ヒト CAR のリガンドであることなどを見い出した。

本研究により明らかとなった CAR の活性化・核移行メカニズム、及び構築したリガンドスクリーニング系は、医薬品や環境化学物質による毒性発生機構や薬物代謝酵素の誘導による薬物相互作用の予測に重要であると考えられる。

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4件)

1. Kanno Y, Miyama Y, Ando M, and Inouye Y. Dependence on the microtubule network and heat shock protein 90 of phenobarbital-induced nuclear translocation of the rat constitutive androstane receptor. *Mol. Pharmacol.* 77:311-316 (2010) 査読有
2. Kanno Y, and Inouye Y. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-ribofuranoside (AICAR) prevents nuclear translocation of constitutive androstane receptor by AMP-activated protein kinase (AMPK) independent manner. *J. Toxicol. Sci.* in press (2010-1) 査読有
3. Kanno Y, and Inouye Y. A consecutive three alanine residues insertion mutant of human CAR: a novel CAR ligand screening system in HepG2 cells *J. Toxicol. Sci.* in press (2010-2) 査読有
4. Kanno Y, Miyazaki Y and Inouye Y. The nuclear import of the constitutive androstane receptor by importin/Ran-GTP systems *Biochim. Biophys. Acta.-Mol Cell Res.-* in press (2010) 査読有

[学会発表] (計6件)

1. 菅野 裕一郎、井上 義雄 異物応答に關与する核内受容体CARの細胞内局在調節機構 日本薬学会第130年会 2010年3月28日 岡山
2. 菅野 裕一郎、深山 靖夫、井上 義雄 PBによる核内受容体CARの核移行における微小管とHsp90の役割 フォーラム2009 衛生薬学・環境トキシコロジー 2009年11月5日 沖縄
3. 菅野 裕一郎、張 淑芸、高根 優介、井上 義雄 Suppressive effect of aryl

hydrocarbon receptor repressor on
transcriptional activity of estrogen
receptor alpha 21th IUBMB
International Congress of Biochemistry
and Molecular Biology, 2009年8月4日 上
海、中国

4. 菅野 裕一郎、井上 義雄 CAR 変異体を用いたhuman CAR リガンドスクリーニング系の確立と評価② 日本薬学会第129年会 2009年3月28日 京都
5. 菅野 裕一郎、井上 義雄 The mechanism of spontaneous nuclear translocation of nuclear receptor CAR in cultured cell line 第81回日本生化学会大会・第31回日本分子生物学会年会合同大会 2008年12月9日 神戸
6. 菅野 裕一郎、井上 義雄 核内レセプターCARの核移行メカニズムの解析 フォーラム 2008 衛生薬学・環境トキシコロジー2008年 10月18日 熊本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 裕一郎 (KANNO YUICHIRO)
東邦大学・薬学部・講師
研究者番号：40453849

(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：