

令和元年6月11日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08351

研究課題名(和文) 異物認識受容体CARによる選択的標的遺伝子調節機構

研究課題名(英文) The mechanism of selective gene regulation Xenobiotic receptor CAR

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：核内受容体核内受容体CARは、様々な環境化学物質や医薬品などの生体外異物をリガンドとして、異物の代謝などで重要な役割を果たしている。しかしながら、CARによる転写調節機構についてはほとんど検討されていない。そこで、CARによる転写活性化に重要な因子(転写共役因子)を明らかとするために、CAR結合タンパク質の同定を行った。その結果、CAR結合タンパク質として同定された、TRIM24やCCAR1がCARの転写共役因子として、CARによる転写活性化の転写調節などの機能を担っていることを明らかとした。またこれらの転写共役因子はCARによる遺伝子転写調節に遺伝子選択的にかかわっていることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、まだ不明な点が多い受容体型転写因子による遺伝子選択的な発現調節機構の一端が明らかとなった。受容体型転写因子である核内受容体による選択的遺伝子発現機構の解明は、選択的核内受容体調節薬のような作用を選択的に利用できる医薬品の開発の一助になると考えている。

研究成果の概要(英文)：The constitutive active/androstane receptor (CAR) controls genes involved in xenochemical metabolism. Although numerous cofactors have been reported to be involved in CAR-mediated transactivation, unknown and poorly defined proteins recruited by CAR have yet to be characterized. In this study, a novel CAR-interacting proteins, cell cycle and apoptosis regulator 1 (CCAR1) and Tripartite Motif Containing 24 (TRIM24), were identified as novel CAR binding proteins. Furthermore, knock down of these cofactors are showed different effect of CAR-induced transactivation. These findings demonstrated CCAR1 and TRIM24 to be novel transcriptional cofactors for CAR and provided insight regarding the mechanism of CAR-mediated gene-selective transactivation.

研究分野：衛生薬学、分子生物学

キーワード：核内受容体 受容体型転写因子 遺伝子発現調節 転写共役因子 異物代謝 構成的アンドロスタン受容体

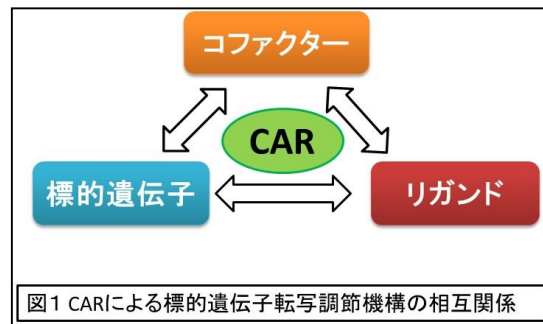
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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。脂溶性の生体外異物(リガンド)が侵入すると、これを認識した受容体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。核内受容体スーパーファミリーに属する CAR は、異物・薬物代謝酵素である CYP2B6、CYP2C9、CYP3A4 等の異物による発現誘導に関与している。CAR は、リガンドの結合により活性化し、標的遺伝子である CYP2B6 や CYP3A4 遺伝子プロモーター上に存在する phenobarbital-responsive enhancer module (PBREM) や xenobiotic-responsive enhancer module(XREM)などの CAR 応答配列に、別の核内受容体 retinol X receptor(RXR)とヘテロダイマーを形成して結合し、標的遺伝子の転写を促進する。これまでの報告で、CAR のリガンドの種類によって標的遺伝子の誘導パターンが異なることが見られているが、その詳細は不明である。しかしながら、薬物の代謝においてシクロフォスファミドなどに見られるように、代謝される酵素によって作用が変化することが考えられるため、代謝酵素の誘導様式の理解は重要である。

2. 研究の目的

CAR のような核内受容体による転写調節には転写共役因子複合体群(コファクター)が必要であることが知られている。このようなコファクターと核内受容体の相互作用は核内受容体に作用するリガンド、及び調節する遺伝子のエンハンサーによって異なることが示唆されているが、いまだ明らかとなっていない部分が多い。したがって、CAR による遺伝子発現調節機構は異なっており、遺伝子ごとの発現調節は、コファクター、リガンド、標的遺伝子の3つの因子の相互関係によって決定されていることが考えられる。これまでに我々及び様々な研究者により、多くの CAR リガンドや標的遺伝子が明らかになってきた。しかしながら、リガンドによる選択的な遺伝子発現調節機構に関する知見、特にコファクターの関与を含めた知見はほとんどない。そこで、本研究では異物による CAR を介した異物・薬物代謝酵素及びエネルギー代謝関連遺伝子発現調節における3因子(コファクター、リガンド、標的遺伝子)の相互関係の分子機構を明らかとする(図1)。



3. 研究の方法

初めに CAR によるコファクター、リガンド、標的遺伝子の3因子の相互作用による選択的な遺伝子発現調節機構を明らかとするために、ほとんど明らかとなっていない CAR と相互作用するコファクターを同定する。さらに同定した個々のコファクターによる CAR 転写調節機構を明らかとしていくことによりコファクターによる CAR の活性制御機構を解明する。次に、これまでに明らかとなっているリガンドによるコファクターと CAR の相互作用に対する影響を詳細に解析する。

4. 研究成果

核内受容体 Constitutive active/androstane receptor (CAR) は、様々な環境化学物質や医薬品などの生体外異物をリガンドとして、異物の代謝などで重要な役割を果たしている。しかしながら、CAR による転写調節機構についてはほとんど検討されていない。そこで、CAR による転写活性化に重要な因子(転写共役因子)を明らかとするために、CAR 結合タンパク質の同定を行った。初めに、ヒト肝がん由来 HepG2 細胞に FLAG タグで標識した CAR を発現する細胞株を樹立した。その細胞の細胞溶解液より抗 FLAG 抗体を用いた免疫共沈降法を用いて、CAR 結合タンパク質複合体を精製した。得られた複合体を質量分析により網羅的に解析を行ったところ、多くの CAR 結合候補タンパク質が明らかとなった。その候補タンパク質には、これまでに核内受容体の転写共役因子として知られているものや一般的な転写調節に関与する因子が含まれていた。さらに、候補タンパク質としていくつかの代謝酵素も含まれていた。以上のことより、CAR は多くのタンパク質と複合体を形成し、転写調節などの機能を担っていることが考えられた。そこで、いくつかの分子に着目して詳細な制御機構の解析を行った。

(1) Tripartite Motif Containing 24 (TRIM24) は、これまでにいくつかの核内受容体の転写共役因子として報告されている。免疫共沈降法による確認により、CAR と TRIM24 の相互作用が明らかとなった。また、TRIM24 の過剰発現による CAR 依存的なルシフェラーゼレポーター活性の増強及びノックダウンによる減弱が認められた。さらに、クロマチン免疫沈降法により TRIM24 が CAR の存在下において標的遺伝子エンハンサー上にリクルートされることが明らかとなった。このことより、CAR の転写共役因子として TRIM24 が関与していることが明らかとなった。さらに、TRIM24 のノックダウンは CAR による CYP2B6 遺伝子の発現誘導を抑

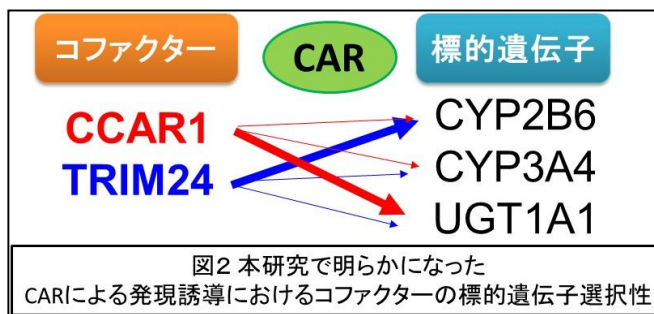
制したが、CYP3A4 の発現誘導には影響しなかった。このことより TRIM24 は、遺伝子選択的な CAR の転写共役因子であることが示唆される。

(2) Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1 (CCAR1) は、アポトーシスの制御や細胞周期の調節にかかわる因子として同定された。さらに、様々な遺伝子転写のメディエーターとして作用することも報告されてきている。初めに、免疫共沈降法により CAR と CCAR1 の相互作用を確認した。また、CCAR1 の過剰発現による CAR 依存的なルシフェラーゼレポーター活性の増強及びノックダウンによる減弱が認められた。CCAR1 のノックダウンは CAR による UGT1A1 の発現誘導に大きく影響したが、CYP2B6 の誘導には影響しなかった。

加えて、クロマチン免疫沈降法による検討により CAR の発現は CCAR1 の UGT1A1 遺伝子エンハンサー領域 (gtPBREM) へリクルートを増強したが、CYP2B6 遺伝子エンハンサー領域 (PBREM) へのリクルートは変化しなかった。

以上の結果より、これらの転写共役因子は遺伝子選択的に CAR による発現誘導に関与している可能性が示唆された。

したがって、核内受容体 CAR による遺伝子発現調節は標的遺伝子 (エンハンサー) により寄与するコファクターが選択されることで、多様な遺伝子発現調節が制御されていることを明らかにすることができた (図 2)。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

Kanno Y, Zhao S, Yamashita N, Saito N, Ujiie A, Iijima R, Kikawa N, Nemoto K, Inouye Y., Cell Cycle and Apoptosis Regulator 1, CCAR1, Regulates Enhancer-Dependent Nuclear Receptor CAR, Mol Pharmacol., 査読有, 2019 95 120-126, DOI:doi: 10.1124/mol.118.114272.

Yamashita N, Saito N, Zhao S, Terai K, Hiruta N, Park Y, Bujo H, Nemoto K, Kanno Y., Heregulin-induced cell migration is promoted by aryl hydrocarbon receptor in HER2-overexpressing breast cancer cells, Exp Cell Res., 査読有, 2018 366 34-40, DOI:doi: 10.1016/j.yexcr.2018.02.033.

Kanno Y, Kure Y, Kobayashi S, Mizuno M, Tsuchiya Y, Yamashita N, Nemoto K, Inouye Y., Tripartite Motif Containing 24 Acts as a Novel Coactivator of the Constitutive Active/Androstane Receptor, Drug Metab Dispos., 査読有, 2018 46 46-52, DOI: 10.1124/dmd.117.077693

Kanno Y, Yatsu T, Yamashita N, Zhao S, Li W, Imai M, Kashima M, Inouye Y, Nemoto K, Koike K. , Alisol B 23-acetate from the rhizomes of Alisma orientale is a natural agonist of the human pregnane X receptor., Phytomedicine., 査読有, 2017 26 22-27, DOI:doi: 10.1016/j.phymed.2017.01.003.

Kanno Y, Tanuma N, Yazawa S, Zhao S, Inaba M, Nakamura S, Nemoto K, Inouye Y., Differences in Gene Regulation by Dual Ligands of Nuclear Receptors Constitutive Androstane Receptor (CAR) and Pregnane X Receptor (PXR) in HepG2 Cells Stably Expressing CAR/PXR., Drug Metab Dispos., 査読有, 2016 44 1158-1163, DOI:doi: 10.1124/dmd.116.070888.

[学会発表] (計 9 件)

菅野 裕一郎, 齋藤 菜緒, 日下部 太一, 加藤 恵介, 根本 清光, 選択的アンドロゲン受容体調節薬 YK11 による選択的遺伝子発現調節機構, 日本薬学第 139 年会, 2019 年

戴 維, 趙 帥, 根本 清光, 菅野 裕一郎, ANGPLT4 遺伝子発現における CAR と PPAR のクロストーク, 日本薬学第 139 年会, 2019 年

Nao Saito, Naoya Yamashita, Kiyomitsu Nemoto, Yoshio Inouye, Yuichiro Kanno, Cell cycle and apoptosis regulator 1, CCAR1, regulates nuclear receptor CAR transactivation, MDO/JSSX in Kanazawa, 2018 年

氏家 葵, 飯島 理枝, 倉澤 友里恵, 土屋 佑実, 水野 真理子, 根本 清光, 菅野 裕一郎, 核内受容体 CAR に対する転写共役因子 cell cycle and apoptosis regulator 1 (CCAR1) の遺伝子選択的活性調節機構, 日本薬学会第 137 年会, 2017 年

倉澤 友里恵, 高橋 友美, 氏家 葵, 土屋 佑実, 水野 真理子, 根本 清光, 菅野 裕

一郎、生体外異物センサーCAR と酸化ストレスセンサーNrf2 応答系による Aldehyde dehydrogenase1A1(ALDH1A1)発現調節機構、日本薬学会第137年会、2017年

土屋 佑実, 小林 沙織, 氏家 葵, 倉澤 友里恵, 水野 真理子, 根本 清光, 菅野 裕一郎、CITCOによるCARを介した選択的遺伝子発現調節機構、日本薬学会第137年会、2017年

水野 真理子, 呉 由貴, 氏家 葵, 倉澤 友里恵, 土屋 佑実, 根本 清光, 菅野 裕一郎、Tripartite motif-containing 24 (TRIM24)による核内受容体CARの転写活性調節機構、日本薬学会第137年会、2017年

菅野 裕一郎、異物受容体CARの活性調節機構、フォーラム2017：衛生薬学・環境トキシコロジー、2017年

宇田川 有咲, 丸茂 昂平, 野山 裕可, 木川 奈海, 根本 清光, 菅野 裕一郎、核内受容体CARの細胞内局在調節機構、フォーラム2017：衛生薬学・環境トキシコロジー、2017年

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当者なし

(2)研究協力者

該当者なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。