

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590070
 研究課題名 (和文) 細胞周期チェックポイントで増大する核内受容体 CAR の発現制御機構とその役割の解明
 研究課題名 (英文) Expression of nuclear receptor CAR during G1 in human cells and its role in cell proliferation
 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：

核内受容体 CAR は、CYP2B、UGT1A1 等の薬物代謝酵素/トランスポーター遺伝子転写に中心的役割を演じている細胞内因子である。本研究では細胞周期に依存した CAR の発現調節機構とその新規な役割について解析し、細胞周期を調節する CDK4 シグナルによって CAR の発現が制御され G1 期早期に発現すること、血清飢餓ストレスによる Elk を介した新規な応答機構の存在を明らかにすることができ、CAR が薬物代謝酵素だけでなく細胞増殖関連因子の転写調節にも深く関わっている可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
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・生物系薬学

キーワード：核内受容体、CAR、転写調節、細胞周期、血清飢餓ストレス、Elk

1. 研究開始当初の背景

肝臓の主たる機能である異物代謝（解毒）に肝細胞中の薬物代謝酵素（CYP2B6、UGT1A1 など）が関わっているが、肝組織細胞の全てに等しく分布しているのではなく中心静脈周辺部の細胞に高く、肝動脈枝・門脈枝周辺の細胞には発現が低いなど、生体異物の代謝・解毒・排泄に重要な役割を果たしているこれら薬物代謝酵素の同一組織細胞間の発現量に差があることが知られている。この酵素分布の差が細胞分化によるものかあるいは生育環境に依存している可能性が考えられたが、その詳細な機構については不明

であった。課題担当者は UGT1A1 転写調節機序を解析する過程で、細胞増殖因子添加培地で生育した肝がん由来細胞株 HepG2 細胞内に有意な量の核内受容体 CAR は検出できないが、細胞の生育環境を整え同調培養した細胞では細胞周期 G1 期チェックポイントで CAR mRNA 並びに蛋白質レベルが顕著に増大することを明らかにしている。さらに、増殖因子添加培地で培養した HepG2 細胞では血清因子（増殖因子）により活性化された核内因子が CAR 遺伝子の発現を制御していると推察される知見を得ている。近年、CAR が薬物代謝酵素/薬物トランスポーター遺伝子の転写調

節に加え糖代謝やアポトーシスの制御にも関与するなど多様な機能を持つとの研究報告もあり注目されているが、CAR の発現制御のメカニズムについては未解明である。

2. 研究の目的

薬物による薬物代謝酵素誘導において核内受容体 CAR、PXR が中心的役割を演じているが、継代培養化された細胞では核内受容体の発現量が極めて低く、薬物などによる薬物代謝酵素誘導にどのアイソフォームが機能しているのか、核内受容体の発現調節に関する研究に継代培養細胞を利用することができず、未解明な分野として取り残されてきた。課題担当者はエクソン 1 とエクソン 2 の 2 つの転写開始部位の存在を示唆するアイソフォームを得ているが、多様な機能を持つ CAR の、薬物による誘導や組織細胞内の生育環境に基づく選択的スプライシング、選択的転写開始を含む特異的遺伝子発現様式についての知見はこれまで得られていない。本研究は、課題担当者がこれまでに得ている薬物代謝酵素発現と CAR を中心とした核内受容体の研究成果を基に EST や cDNA 配列をゲノム配列にマップすることにより、選択的スプライシング、選択的転写開始を含む特異的遺伝子発現様式を明らかにし、細胞周期チェックポイントにおける CAR の役割を解明することである。

3. 研究の方法

(1) 細胞周期チェックポイントで発現が亢進するヒト CAR プロモーター遺伝子の同定

作成済みの CAR プロモーター遺伝子 (CAR 構造遺伝子 5' 上流 12kbp を分割して作製した種々のサイズの DNA) をルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に繋いだプラスミド DNA をトランスフェクトした HepG2 細胞を用いて、CAR の発現が亢進する条件下で細胞を培養し、レポーターアッセイ、クロマチン免疫沈降アッセイを行い CAR 遺伝子の転写制御に関与する DNA 応答エレメントを同定する。

(2) 細胞周期チェックポイントで CAR 遺伝子の発現を制御する因子の同定

細胞増殖シグナルと連携した CAR 遺伝子発現制御に関わる DNA 応答エレメントを研究方法 1 項で同定した DNA 応答エレメントを

基に転写制御因子の同定を進める。

(3) 細胞増殖シグナルと連携した CAR 発現調節機構の解明

CAR 遺伝子転写制御機構を、細胞周期制御因子や増殖シグナル伝達因子 siRNA を用いて、細胞増殖シグナルとの連携の中で解析する。

4. 研究成果

(1) SW480 細胞、HepG2 細胞における細胞周期に依存した CAR の発現 細胞周期の進行に伴い CAR の発現および細胞内局在性が変化するか否かを検討するため、10%FCS 添加培地で 96 時間培養した SW480 細胞と HepG2 細胞の細胞周期の分布を、anti-lamin A/C 抗体、anti-phospho-histone H3 抗体 (有糸分裂マーカー)、細胞周期に関わるマーカーとして anti-cyclin D1 抗体 (G1 期) および anti-cyclin A 抗体 (S 期) を用いて、CAR と共に蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡によって解析を行った結果、lamin A/C の発現している全ての細胞に CAR は共発現していることをみいだした (Fig. 1)。Lamin A/C は分裂中期に核内構造と同様に消失するが、細胞質分裂後期/G1 期初期には、大部分の lamin A/C は細胞質全体に分散し、G1 期後期には主に核、(核ラミナおよび核チューブ様構造) の中で検出されることが報告されている。Cyclin D1 も CAR と共に細胞質および核内に共発現していた。一方、cyclin A が発現している細胞では CAR は

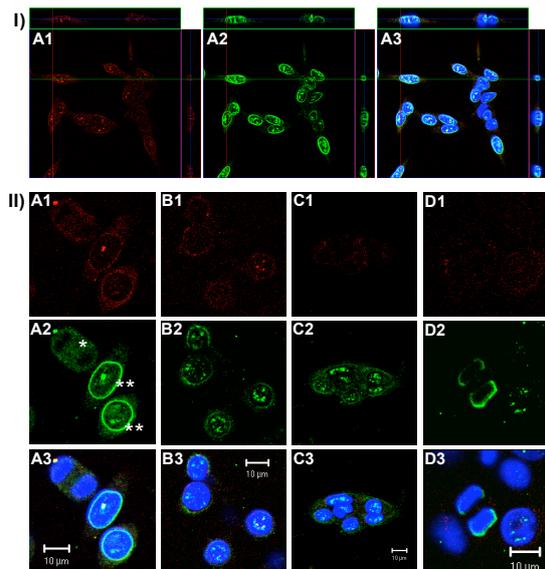


Fig. 1 Confocal images of SW480 cells expressing CAR (A1, B1, C1, D1) and lamin A/C (A2), cyclin D1 (B2), cyclin A (C2) or phospho-histone H3 (D2). *, late

cytokinesis/early G1; **, late G1. Bar, 10 μ m. 細胞質に発現しているが、核内では CAR の発現は非常に弱かった。細胞分裂周期の phospho-histone H3 の発現した細胞では、CAR の検出は困難であり、M 期に消失することが示された。

(2) CAR は早期 G1 期に集積し、後期 S 期に消失する SW480 細胞をダブルサイミジンブロックによって S 期に同調し、同調から解放後 2 時間ごとに細胞を採取し、細胞周期に依存した CAR の発現変動を細胞質、核内蛋白質を用いて解析した。SW480 細胞は 6 時間後には S 期に、10 時間後には M 期へ完全に移行した (Fig. 2A)。細胞周期の変化を正確に評価するために、核内での cyclin A、cyclin B1、cyclin D1、cyclin E、phosphorylated RB、CDK2 および CDK4 蛋白質発現レベルを対照として解析した。細胞溶解液および核蛋白質中の RXR 蛋白質発現レベルは細胞周期に関係なく変動は認められなかったの

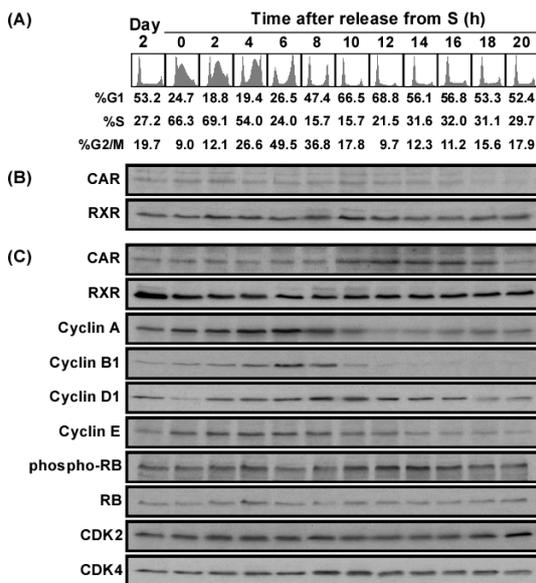


Fig. 2 Cell cycle expression of CAR.

して、細胞溶解液 中の CAR 蛋白質はサイミジンブロックから解放 2 時間後までは検出されたが、S 期後期から M 期に減少し、G1 期になり再び増加した (Fig. 2B)。核内での CAR 蛋白質発現レベルも同様に、S 期から G2/Mcyclin D1、cyclin E、phosphorylated RB、CDK2 および CDK4 蛋白質発現レベルを対照として解析した。細胞溶解液および核蛋白質中の RXR 蛋白質発現レベルは細胞周期に関係なく変動は認められなかったのに対して、細胞溶解液 中の CAR 蛋白質はサイミジン

ブロックから解放 2 時間後までは検出され期にかけて減少しており、G1 期になり cyclin B1 の発現レベルが減少するにつれて増加することが示された (Fig. 2C)。cyclinD1 と CDK4 の蛋白質発現レベルは 8 時間後から増加し始めており、CAR の発現レベルの増加に先行した顕著な増加が認められた (Fig. 2C)。核内での CAR 蛋白質および RB のリン酸化の増大がそれぞれサイミジンブロックから解放 12 時間後と 14 時間後に、CDK4 の活性化に続いて認められた。

(3) SW480 細胞、HepG2 細胞において CDK 阻害薬および anti-CDK4 siRNA の導入によって CAR mRNA および蛋白質の発現が抑制される SW480 細胞、HepG2 細胞における細胞周期に依存した CAR の発現変動に及ぼす CDK の関与を検討するため、種々の CDK 阻害薬 (purvalanol A: CDK2、CDK5 阻害薬、SU9516: CDK1、CDK2、CDK4 阻害薬、CDK inhibitor p35: CDK1、CDK2 阻害薬、bohomine: CDK1 阻害薬) を用いて CAR および RXR mRNA 発現レベルに及ぼす影響をリアルタイム PCR 法を用いて解析した。その結果、これらの CDK 阻害薬の中で SU9516 が CAR mRNA 発現レベルの容量依存的な抑制を示した。次に細胞周期に依存した CAR の発現変動に CDK4 が関与するか検討するため、SW480 細胞、HepG2 細胞に anti-CDK4 siRNAs を導入した。anti-CDK4 siRNAs を導入することにより SW480 細胞と HepG2 細胞において、CDK4 蛋白質発現レベルの減少が認められ、同時に CAR 蛋白質発現レベルの減少が認められた。

(4) CAR の発現の増大が UGT1A1 および MDM2 の発現の増大に寄与する

SW480 細胞と比較して、anti-CAR siRNAs の導入によって HepG2 細胞において、CAR mRNA 発現レベルの著しい抑制が認められた。SW480 細胞において anti-CAR siRNA の導入により CAR mRNA レベルの 58% の抑制が認められ、HepG2 細胞では 100% の抑制がそれぞれ認められた。これらの CAR mRNA 発現レベルの抑制によって、SW480 細胞および HepG2 細胞では、UGT1A1 mRNA (48% および 100% の抑制)、MDM2 mRNA 発現レベル (49% および 81% の抑制) の誘導がそれぞれ抑制された。さらに、anti-CAR siRNAs を導入した SW480 細胞と HepG2 細胞において、CAR 蛋白質発現レベルの抑制と同様、MDM2

蛋白質発現レベルの抑制が認められた。HepG2 細胞と比較して、SW480 細胞では siRNAs による抑制が非常に弱かったことを解析した。CAR の発現抑制によって、p21 から、anti-CAR siRNAs を導入した HepG2 細胞を用いて、CAR の発現と細胞増殖との関係蛋白質発現レベルが増加し、細胞増殖の指標である BrdU の取り込み量にわずかであるが有意な減少が認められた。

(5) HGF による生育障害では CAR、MDM2、p53、p21 および p16 の発現が変動する

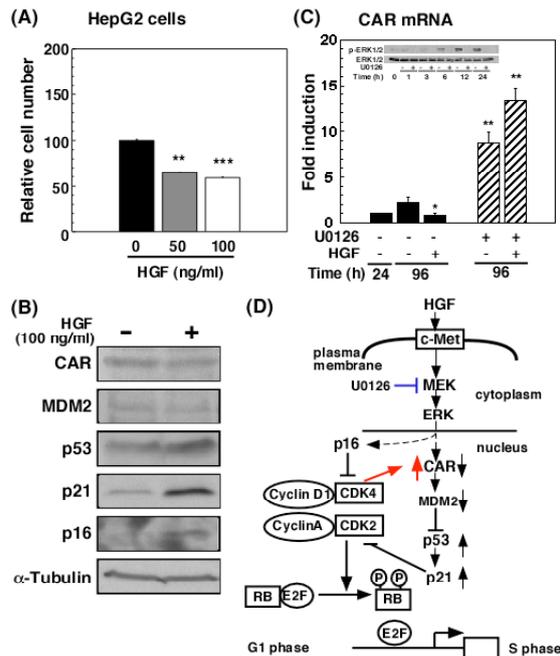


Fig. 3 Effect of HGF on the expression of CAR, MDM2, p53, p21, and p16 in HepG2.

CAR の細胞周期に依存した発現変動や機能について、今後、細胞のガン化がこの発現変動と関係しているのか否か確認する必要があるが、課題担当者が得た結果から HepG2 細胞における anti-CAR siRNA や HGF の投与による CAR の発現抑制機序について、Fig. 3D に示す機序が推定された。

(i) HGF の投与によって発現が誘導された p16 による直接的な CDK4 の抑制、あるいは ERK シグナルの経路を介した未知のメカニズムによって CDK4 の抑制が起こり、CAR の発現が抑制される。

(ii) CAR の発現が抑制されると、p53 のユビキチン化による分解を促進しその機能を抑制していた MDM2 の発現が低下し、その結果 p53 によって p21 の発現が誘導される。

(iii) p21 は CDK2 と直接結合しその活性を

抑制する。さらに HGF によって発現が誘導された p16 が CDK4 と結合することで、CDK2 と CDK4 に結合していた p21 と p27 の再分配が起き、CDK2 の活性を抑制する。その結果、RB のリン酸化が抑制され、転写因子 E2F が離れることができず、サイクリン E などの S 期進行や DNA 複製に必要な遺伝子群の発現が抑制され、細胞増殖の抑制に結びつくと推察している (Fig. 3D)。

これらの結果から、細胞核内で CAR が適切な時期に発現することによって、細胞周期の進行を監視するチェックポイントの内のひとつ、言葉を変えると G1 チェックポイントの回避に関わっている可能性が示唆された。本研究において、これまで報告されていた CAR が内因性、外因性物質の代謝・排泄に関わる薬物代謝酵素やトランスポーター遺伝子の転写調節機能のみならず、細胞増殖関連遺伝子の発現に関わるその新規な役割を有することを示唆する結果を得ることが出来た。

(6) 血清飢餓ストレス負荷による核内受容体 CAR の発現誘導 血清無添加培地で生育させ G1 期に同調させた HepG2 細胞において、CAR mRNA、蛋白質発現レベルの増大が認められ、UGT1A1 や CYP2B6 の発現が亢進することを見いだした。この細胞に EGF を添加すると CAR mRNA、蛋白質発現レベルの亢進が抑制された。ERK 阻害剤 U0126、PI3-kinase 阻害剤 LY204002 存在下では CAR の発現の亢進が増強され、ERK ならびに PI3-kinase 情報伝達系が CAR の発現に抑制的に作用していることが示された。

(7) CAR 構造遺伝子エクソン 1 の 5' 上流における血清飢餓ストレス応答エレメントの同定 血清飢餓ストレスに応答する CAR プロモーター領域を解明する為、CAR 構造遺伝子 5' 上流 12kbp の DNA 断片を用いたレポーターアッセイを行った。その結果、CAR 構造遺伝子エクソン 1 5' 上流 0.2kbp に最も強い活性が認められた。この DNA 断片の ETS 結合部位 SRE1、SRE2 に変異を導入すると SRE1 においてより強くレポーター活性が低下し、SRE1、SRE2 両方に変異を導入すると完全にレポーター活性が消失したことから GR や HNF4 結合部位とは異なる血清飢餓ストレスによる応答エレメントが存在することを明らかにした。

(8) 血清飢餓ストレス応答エレメント

に結合する転写因子の同定

CAR 構造遺伝子エクソン1 5'上流 0.2kbp に存在する ETS 結合部位 SRE1、SRE2 に結合する転写因子を同定するために、抗 ETS 抗体ならびに抗 ELK 抗体を用いて免疫クロマチンアッセイを行った。Fig.4 に示すように、抗 ETS 抗体を用いてもバンドは検出されないが、抗 ELK 抗体を用いるとバンドが検出され、ELK が SRE2 でなく SRE1 により強く結合することが示された。これらの結果は、レポーター遺伝子の SRE1、SRE2 に変異を導入した時に認められた活性の変動とよく一致していたことから、血清飢餓ストレスに応答して SRE1 に結合する転写因子が ELK であることが強く示唆された。

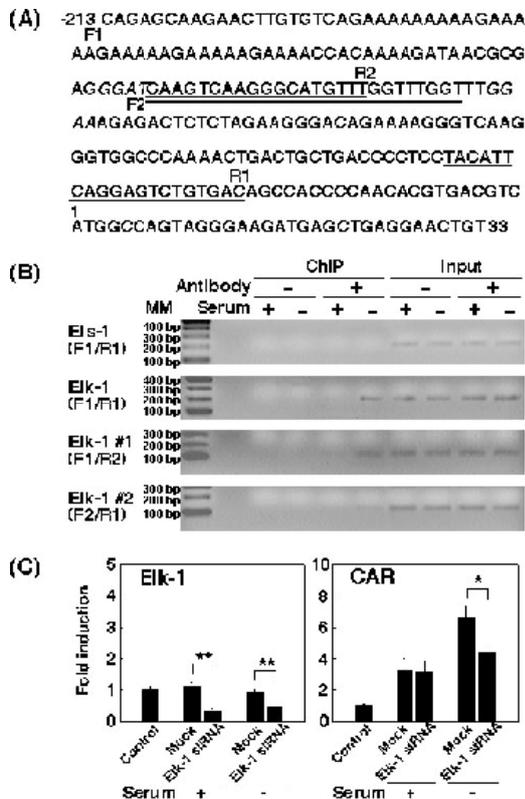


Fig. 4 Elk-1 directly binds to the serum response element on the CAR gene.

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. M. Osabe, **J. Sugatani**, A. Takemura, M. Kurosawa, Y. Yamazaki, A. Ikari, M. Miwa: Up-regulation of CAR expression through Elk-1 in HepG2 and SW480 cells by serum starvation stress. *FEBS Letters*, 583(5), 885-889 (2009) [IF 3.263]
2. M. Osabe, **J. Sugatani**, A. Takemura, Y. Yamazaki, A. Ikari, N. Kitamura, M. Negishi, M. Miwa: Expression of CAR in SW480 and HepG2 cells during G1 is associated with cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 369 (4), 1027-1033 (2008) [IF 2.855]
3. T. Takahashi, Y. Moriyama, A. Ikari, **J. Sugatani**, T. Suzuki, M. Miwa: Surface localization of the nuclear receptor CAR in influenza A virus-infected cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 368(3), 550-555 (2008) [IF 2.855]
4. T. Sueyoshi, R. Moore, **J. Sugatani**, Y. Matsumura, M. Negishi: PPP1R16A, the membrane subunit of protein phosphatase 1b, signals nuclear translocation of the nuclear receptor CAR. *Mol. Pharmacol.*, 73(4), 1113-1121 (2008) [IF 4.469]
5. M. Osabe, **J. Sugatani**, T. Fukuyama, S. Ikushiro, A. Ikari, M. Miwa: Constitutive androstane receptor and peroxisome proliferator-activated receptor α are activated in liver of male rats fed a high-fat and high-sucrose diet and the hepatic expression of UGT1A1 and UGT1A6 is enhanced. *Drug Metab. Dispos.*, 36(2), 294-302 (2008) [IF 3.638]
6. **J. Sugatani**, K. Mizushima, M. Osabe, K. Yamakawa, S. Kakizaki, H. Takagi, M. Mori, A. Ikari, M. Miwa: Transcriptional regulation of human UGT1A1 gene expression through distal and proximal promoter motifs: implication of defects in the UGT1A1 gene promoter. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 377 (4-6), 597-605 (2008) [IF 2.779]

[学会発表] (計 10 件)

1. 竹村明子、黒澤雅俊、長部 誠、山崎泰広、五十里彰、菅谷純子：血清飢餓ストレスによる核内受容体 CAR の発現誘導機構
日本薬学会第 129 年会 (京都)、講演要旨集 3、p.188、2009 年 3 月 28 日
2. 黒澤雅俊、竹村明子、長部 誠、山崎泰広、五十里彰、菅谷純子：サイクリン依存性キナーゼ 2 はヒト UDP-グルクロン酸転移酵素 UGT1A1 発現を抑制する。
日本薬学会第 129 年会 (京都)、講演要旨集 3、p.188、2009 年 3 月 28 日
3. 菅谷純子、長部 誠、竹村明子、黒澤雅俊、山崎泰広、五十里彰、三輪匡男：ストレス刺激により誘導される核内受容体 CAR の発現調節機構の解析
BMB2008、第 81 回日本生化学会大会 (神戸)、講演要旨集、p.205、2008 年 12 月 9 日
4. 菅谷純子、長部 誠、竹村明子、黒澤雅俊、山崎泰広、五十里彰、三輪匡男：細胞生育環境による UGT1A1 発現変動の解析
第 11 回 P450 研究会、第 3 回 UGT 研究会合同開催 (福岡)、2008 年 10 月 25 日
5. Junko Sugatani, Makoto Osabe, Akiko Takemura, Yasuhiro Yamazaki, Akira Ikari, Masao Miwa: Transcriptional regulation of *UGT1A1* gene expression and its cell-cycle-dependent expression by nuclear receptor CAR
The 12th International Glucuronidation and UGT Workshop (Quebec, Canada), p.38、2008年7月24 - 27日
6. 竹村明子、長部 誠、黒澤雅俊、山崎泰広、五十里彰、菅谷純子：細胞周期に依存した薬物代謝酵素誘導の解析
第 54 回日本薬学会東海支部総会・大会 (名古屋)、講演要旨集、p.55、2008 年 7 月 5 日
7. 長部 誠、菅谷純子、福山知哲、竹村明子、山崎泰広、五十里彰、三輪匡男：核内受容体 CAR の細胞周期に基づく発現制御とその機能について
日本薬学会第 128 年会 (横浜)、講演要

旨集 3、p.27、2008 年 3 月 28 日

8. Makoto Osabe, Junko Sugatani, Tomoaki Fukuyama, Yasuhiro Yamazaki, Akira Ikari, Masao Miwa: Expression of CAR and its function associated with cell cycle.
BMB2007、第 80 回日本生化学会大会 (横浜)、p. 224、2007 年 12 月 12 日
9. Junko Sugatani, Kousuke Mizushima, Makoto Osabe, Tadanobu Takahashi, Akira Ikari, Masao Miwa: Transcriptional regulation of human UGT1A1 gene expression through distal and proximal reporter genes by nuclear receptors.
The 5th International Symposium on Receptor Mechanisms, Signal Transduction and Drug Effects, International Receptor Symposium, Shizuoka, Japan, p.108, May 10-11, 2007
10. 長部誠、菅谷純子、福山知哲、水嶋康介、高橋忠伸、五十里彰、三輪匡男：細胞生育環境に依存した核内受容体 CAR 発現調節
第 127 年回日本薬学会 (富山)、講演要旨集、p.25、2007 年 3 月 30 日

[図書] (計 1 件)

1. 菅谷純子、三輪匡男：加水分解酵素 3.1.4.39～3.1.4.51、4.6.1.14 「酵素ハンドブック (第 3 版)」八木達彦、福井俊郎、一島英治、鏡山博行、虎谷哲夫編集 朝倉書店、pp. 557-559、p.832 (2008)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅谷純子

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし