様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19590124
研究課題名（和文）環境応答を担う核内受容体型転写因子機能のエピジェネティックな調節機構

研究課題名（英文） The epigenetic control of nuclear receptor functions in response to environmental stress

研究代表者
沼澤 聡（Satoshi Numazawa）
昭和大学・薬学部・准教授
研究者番号：80180686

研究成果の概要： 本研究は、フェノバルビタール（PB）型のシトクロム P450（CYP）誘導剤により AMP 活性化キナーゼ（AMPK）が活性化することを *in vivo* において明らかにした。また、PB による CYP2B 誘導が減弱し、さらに constitutive active receptor（CAR）の核移行及び PB 応答配列（PBREM）の転写活性が起きない肝がんモデルにおいて、PB による AMPK の活性化が全く生じなかった。さらに、AMPK 活性化は、CAR の核移行と PBREM の転写活性化を誘導し、AMPK を阻害すると PB による PBREM 転写活性化及び Cyp2b 誘導作用が抑制されたことから、PB による AMPK の活性化と Cyp2b の誘導には強い因果関係が存在することが明らかとなった。しかし、AMPK 活性化剤は、Cyp2b 誘導作用を示さなかったことから、AMPK 活性化は、*in vivo* において CYP2B 遺伝子の転写に対する必要十分条件ではないことが明らかとなった。そこで、PB による CYP2B 誘導のエピジェネティックな調節について解析したところ、AMPK 活性化は PBREM 領域付近のクロマチンの活性化とは無関係であることが示され、プロモーター領域における他の転写因子との相互作用が重要であると考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
19 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
20 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,300,000	690,000	2,990,000

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：環境衛生学、薬物代謝

１．研究開始当初の背景

個体に環境汚染物質など外来異物を暴露すると、生体防御を担う一連の生物応答システムが作動する。このシステム発動機構の分子レベルでの理解は、環境汚染物質の毒性把握や予防医学的観点から極めて重要であるだけに止まらず、環境汚染物質の健康影響を鋭敏に評価しうるバイオマーカーの探索などにも応用することが出来る。このような生物応答には、異物の代謝・排泄に関与する薬物代謝酵素や薬物輸送担体（トランスポータ）が含まれる。従って、これらの発現レベルの変化はファーマコキネティックスの個体差に伴う臨床リスクを生じさせる重大な原因のひとつともなる。これら薬物の吸収・代謝･排泄に係わる遺伝子群の発現調節には核内受容体が中心的な役割を担っており、細胞内での受容体機能の変化がタンパクレベルの変

化に直結していることを示す多くの研究結果が報告されてきている。

Constitutive androstane receptor (CAR) はcytochrome P450 (CYP)2Bファミリーの転写制御を担う核内受容体として見出された。しかし最近になりCYP2CやCYP3Aなど他の異物代謝の主要CYP分子種のみならず、硫酸 (Sult1a, Sult2a) およびグルクロン酸 (UGT1A) 抱合や一部のトランスポータ (Mrp3, Mrp4)の転写調節因子として働くことが明らかとなり、 pregnane X-receptor (PXR)とともに外来異物に対する生体防御センサー (xenosensors) としての機能が注目されている。

CARは核内では恒常的な活性を示し、その機能は主に細胞内局在により調節されている。すなわち、定常状態で細胞質に局在するCARは、活性化剤依存性に核に移行し、標的遺伝子の5'上流領域に存在するフェノバルビタール応答配列 (PBREM) と呼ばれるエンハンサーにretinoid X-receptor (RXR) と2量体を形成して結合することにより転写活性化を惹起する。従って、CARの核移行や核外排出、あるいは細胞質への保持機構を明らかにすることが、CAR標的遺伝子の転写活性化の制御機構を解明することにつながる。このような観点から、これまでCARの核移行機序について精力的な検討がなされ、特定の化合物 (1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene: TCPOBOPなど) についてはアゴニスト・リガンドとして直接CARに結合することによりその核移行を誘導することが明らかにされている。しかし、フェノバルビタール (PB) をはじめ多くのCAR活性化物質は直接リガンドとしてCARに結合しないことから、何らかの間接的な作用により核移行を誘導することが示唆されている。一方、CARの細胞質保持機構については、HSP90やHSP40関連タンパク (CCRP) などの分子シャペロンがCARと細胞質中において分子複合体を形成することが報告されている。しかし、どのようにしてCARが活性化物質依存性に複合体から乖離し核に移行するかに関しては明らかではなかった。

CAR の核移行機構の理解の進展が遅れた理由として、これを解析する良い実験系が乏しかったことが上げられる。すなわち、培養細胞株では内因性の CAR 発現が認められない上に外来性に導入した CAR が核に局在するため、核移行を観察する実験系に適さない。従って、初代培養肝細胞や *in vivo* 遺伝子導入により解析しなければならず、これが多様な実験アプローチを排除してきた。一方、申請者らは肝がん組織では PB による CYP2B 誘導が減弱するが、これは PB 依存性の CAR 核移行応答が障害を受けた結果であることを明らかにしている (Numazawa S *et al.*, FEBS Lett. 2005, 579: 3560-4)。本実験結果は肝がん組織が CAR の核移行機構を解析するモデルとなり得ることを示すものと考える。

2．研究の目的

最近になり我々を含め複数の研究グループから CYP2B の誘導と CAR の核移行に AMP-activated protein kinase (AMPK)が一定の実験条件下において関与することが報告された (Rencurel F et al., J Biol Chem 2005, 280:4367-73, Rencurel F et al, Mol Pharmacol (2006) 70:1925-34, Shindo S, Numazawa S, Yoshida T, Biochem J, (2007) 401:735-41)。 AMPK は細胞のエネルギー状態のセンサーとしてATP合成を正に調節する。また、アディポサイトカインのシグナルを伝えることにより個体レベルでのエネルギーバランスにも寄与することで注目される酵素である。アディポサイトカインの生理活性のなかでも、アディポネクチンの脂肪酸燃焼増加作用において AMPK は核内受容体 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)α を直接活性化することも明らかにされており、本酵素の多機能性に興味が持たれる。上記報告の中で、Rencurel らは培養細胞や初代肝細胞で PB が AMPK 依存性に CAR の核移行と CYP2B 誘導を惹起することを示し、申請者らは *in vivo* で PB による AMPK の活性化が CYP2B 誘導に重要であることを確認している。さらに、申請者らは肝がんモデルラットでは PB による AMPK の活性化が全く生じないことも明らかにしている。これらの実験結果は、PB は AMPK を介して CAR の核移行と標的遺伝子発現を誘導することを示唆するものである。

ところが、Rencurel らは初代肝細胞において AMPK の活性化が CYP2B 誘導に必要・十分条件であったことを示したのに対し、申請者らが行なった *in vivo* の系において AMPK 活性化剤は CAR を活性化できるにも関わらず *CYP2B* 遺伝子発現を生じさせなかった。従って、*in vivo* において AMPK 活性化は *CYP2B* 遺伝子の転写に対する十分条件ではないことが明らかになった。一方、*CYP2B* の転写制御を主に担う PB 応答配列 (PBREM) を用いたリポータアッセイでは AMPK の活性化のみで転写活性化が認められたことから、ゲノム構造の違いにより CAR の転写制御が変化する可能性が考えられた。これは、PB が CAR の核移行を誘導すると同時に、*CYP2B* 遺伝子のゲノム構造を変化させることが、*in vivo* における本遺伝子の転写活性化に必要であることを意味する。本申請研究では、上記仮説を検証することを目的とする。

３．研究成果

すでに PB は AMPK を活性化すること、AMPK の阻害は PB による CAR 活性化を阻害すること、更に AMPK 活性化物質は CAR の核移行及び PBREM 転写活性化を誘導することが明らかにしている。一方、AMPK 活性化物質は CYP2B の誘導作用を示さないという矛盾が生じたため、AMPK 活性化だけでは CYP 誘導に必要なクロマチン構造のリモデリングが生じていない可能性が考えられた。これまで、DNA 特異的転写因子群の 1 つの核内受容体の転写制御機構には、核内受容体とコアクチベーターなどの転写共役因子群との相互作用が（特にリガンド依存的受容体の場合）必要であることが知られていたが、最近それらの転写共役因子群は更なる複合体を形成し、複合体の主な機能の 1 つがプロモーター領域のクロマチン構造変換であることが明らかになりつつある。

そこで本研究では、CYP 誘導時のエピジェネティックな調節について検討を行うことにした。なお、これまで PB による CYP2B 誘導時のゲノム DNA の変化を報告する知見は発表されていない。

1) PB 及び AICAR のゲノム PBREM 領域と CAR の *in vivo* 相互作用に与える影響

PB 及び AICAR 処置により、ゲノム DNA 上の PBREM 領域への CAR の結合が変化するのかどうかについてクロマチン免疫沈降法（ChIP）により検討を行った。すなわち、マウスに PB 及び AICAR を屠殺前 24 時間および 6 時間に連続投与し、摘出した肝臓のクロマチン画分を調製し、CAR 抗体を用いて免疫沈降を行った。得られた免疫沈降物について、マウス PBREM 領域を増幅するプライマーセットを用いて PCR を行った（Fig.1）。その結果、PB 投与マウスの肝クロマチンでは PBREM 領域の増幅が明らかに認められたが、AICAR 投与による増幅は認められなかった。以上の結果から、AMPK 活性化物質は、マウス肝においてゲノム DNA の PBREM 領域への CAR の結合を誘導しないことが示唆された。

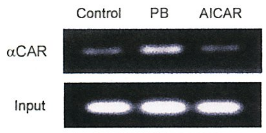
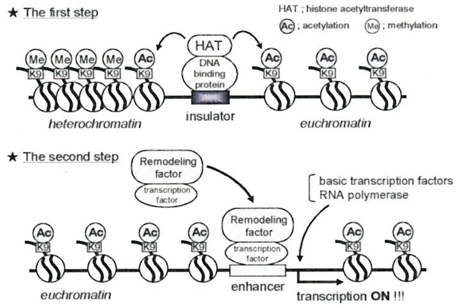


Fig.1 Effect of PB and AICAR on the in vivo interaction of PBREM and CAR.
C3H/He mice were treated twice with PB (100 mg/kg, ip.) or AICAR (500 mg/kg, ip.) 24 h and 6 h before sacrifice. Liver chromatin samples were subjected to ChIP assay using CAR specific antibody (2 μg) and a PBREM specific primer set. PCR products were analyzed on 2% acrylamide gel. A portion (1/42) of samples, which were not subjected to immunoprecipitation, was amplified with the same primer set as an internal control.

2) ゲノム PBREM 領域のヒストンアセチル化の変化



一般に遺伝子誘導に必要な転写活性化のプロセスには、ゲノム DNA 上のクロマチン構造がタイトである不活性な構造のヘテロクロマチンからオープンな活性構造のユークロマチンになることが含まれる（Fig. 2)。

Fig.2 Regulation of transcription by chromatin structure.

そこで本研究では、PBREM 及び TATA box 付近の Cyp2b プロモーター領域が、PB 及び AICAR によりユークロマチン構造になっているかを検討するため、ヒストン修飾の代表であるアセチル化についての検討によりプロモーター領域のクロマチン構造の変化を確認した。マウスに PB 及び AICAR 投与 0.5、1、3、6、24 時間後に調製した肝クロマチンを、ユークロマチンマーカーのヒストン H3K9 アセチル化抗体を用い、ChIP 法により検討した（Fig. 3)。

本検討では PCR 増幅の定量性を確保するために、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法により行った。その結果、PBREM 領域及び TATA box 付近の領域のどちらのプライマーを用いた場合でも、生理食塩水投与群と比較して PB 投与の効果は認められなかった。一方、AICAR でも TATA box 付近のヒストンアセチル化の変化は認められなかったが、PBREM 領域では投与 1 及び 3 時間後においてアセチル化の亢進が認められた。以上の結果から、PB は、クロマチン構造のリモデリングに影響することなく Cyp2b の転写誘導を起こしている可能性が示唆された。一方、AICAR は、Cyp2b の誘導とは無関係にクロマチン構造に一定の影響を与えることが示唆された。

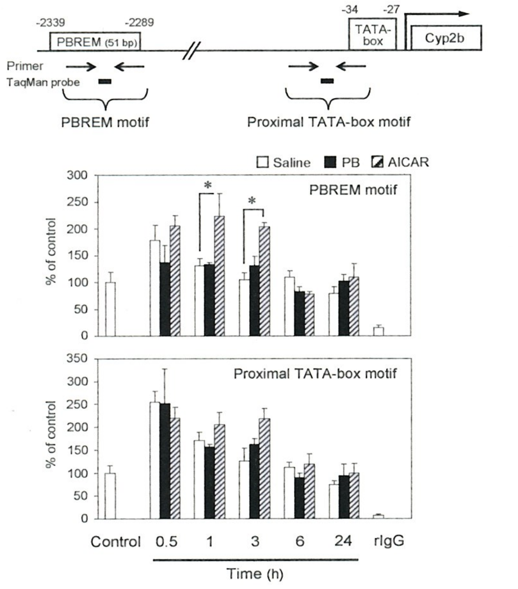


Fig. 3 Changes in the acetylation of histon H3 surrounding PBREM and proximal TATA-box motifs in the liver of C3H/He mice treated with PB or AICAR.
Mice were sacrificed 0.5, 1, 3, 6 or 24 h after treatment either with saline (10 mL/kg, ip.), PB (100 mg/kg, ip.) or AICAR (500 mg/kg, ip.). Liver chromatin samples were subjected to ChIP assay using acetyl-histone H3 (Lys9) antibody (2 ⌈g). Control animals were not treated. Rabbit-IgG instead of anti-acetyl-histon H3 antibody was used for the negative control (rIgG). Immunoprecipitated DNA samples were subjected to real time-PCR using TaqMan probes for PBREM (upper panel) and TATA-box (lower panel) motifs. Data represented are the mean ± S.E. of 3 mice. * $p < 0.05$, ANOVA followed by Tukey-Kramer test.

3) リモデリング因子に対する PB 及び AICAR の効果

リモデリング因子とは、周辺のクロマチン構造を認識し、転写因子がプロモーター領域へターゲティングする際に関与する因子であり、複数のタンパク質からなる。そこで、リモデリング因子が CAR をリクルートしているかについての検討を行った。リモデリング因子の中でも ATP 依存的クロマチンリモデリング複合体の SWI/SNF ファミリー（BAF (Fig. 4A)、WINAC (BAF型)、P-BAF) は、ATPase として Brg1/Brm を保持しているため、Brg1 抗体を用いて免疫沈降（IP）を行い、CAR 抗体を用いてウエスタンブロット法により Brg1 と相互作用した CAR のタンパクレベルを検出した（Fig. 4B）。マウスに PB 及び AICAR 投与 6 時間後の肝核抽出液を試料として検討したところ、Input において PB 投与により核内 CAR レベルの増加が確認されたが、Brg1 と共沈する CAR のレベルに PB や AICAR は影響を及ぼさなかった。

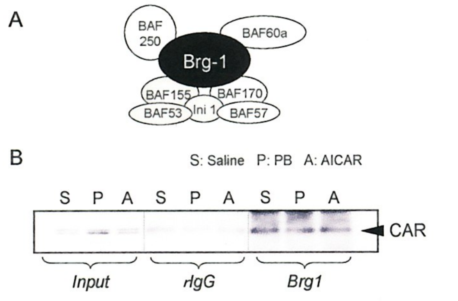


Fig. 4 Effect of PB and AICAR on the in vivo interaction of the remodeling factor and CAR in the liver of C3H/He mice.
A: Schematic structure of BAF type ATP-dependent remodeling factor complex. B: Mice were sacrificed 6 h after PB (100 mg/kg, ip.) or AICAR (500 mg/kg, ip.) injection. Hepatic nuclear extract (300 μg) was subjected to immunoprecipitation using Brg1 specific antibody. The immunoprecipitated sample was subjected to Western blot analysis using CAR (41 kDa) specific antibody. Rabbit-IgG (rIgG) was used instead of anti-Brg1 antibody for the negative control.

4) PB 及び AICAR の肝 Heterochomatin protein 1（HP1β）の細胞内局在に及ぼす影響

HP1 はクロマチンの維持を図る因子の 1 つでありヘテロクロマチンのマーカーとして見い出されたが、α、β、γ の 3 つのサブタイプのうち β 体はユークロマチンにも局在しているためユークロマチンのマーカーとして最近多用されている。そこで HP1β を用いて、PB 及び AICAR による肝組織核中のヘテロ及びユークロマチンの局在に与える影響を検討した（Fig. 5)。マウスに PB あるいは AICAR を屠殺 3 と 6 時間前に単回投与し、摘出した肝臓の凍結肝切片を作製した。一次抗体は HP1β 抗体を、二次抗体は蛍光ラベル抗体を用い、染色後対物 60 倍レンズを装着した蛍光顕微鏡で観察した。なお、核染色には DAPI を用いたがその蛍光顕微鏡像のドット状に見える部分がヘテロクロマチン、その周辺の暗い部分がユークロマチンである。

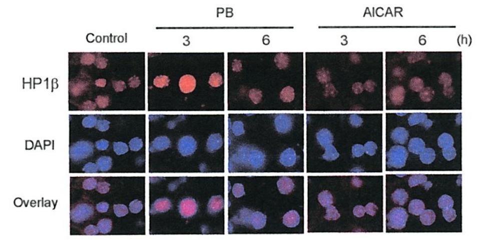


Fig. 5 Localization of HP1β in the nucleus of liver tissue from C3H/He mice treated with PB or AICAR.
Mice were sacrificed 3 or 6 h after PB (100 mg/kg, ip.) or AICAR (500 mg/kg, ip.) injection. A part of the liver sections were subjected to fluorescent immunohistochemistry using anti-HP1β antibody (1 : 1000). Nuclei were stained with DAPI.

その結果、PB 処置 3 時間後の切片では HP1β で染色されるユークロマチン部分の強染色が明らかに認められたが、AICAR 投与による変化は認められなかった。以上の結果から、PB により細胞内全体ではのユークロマチンの亢進が生じていることが明らかとなった。

考察

すでに *in vivo* の系において PB 型誘導物質は、AMPK の活性化を介して CAR 核移行及び PBREM 転写活性化を生じることを明らかにしている。しかし、AMPK 活性化物質により直接 AMPK を活性化しても CYP 誘導は起こらないことから、*in vitro* の系を用い

てPBがCYP2B誘導を生じたとする報告との間に矛盾を生じた。これを解明するため、CYP遺伝子発現の誘導作用についていわゆるセントラルドグマ仮説に則った転写調節に加え、エピジェネティックな調節機構の関与を想定し、以下の検討を行った。エピジェネティックな遺伝子発現制御は、これまで主に発生やがんの領域で成果が上げられてきているが、薬物や環境による遺伝子発現の変化におけるエピジェネティック調節に関する知見は極めて乏しい。一般にエピジェネティック修飾は単独で起きている事象ではなく、それぞれが密接に関連して遺伝子の発現調節を行っている。多くの転写因子複合体はヒストンアセチル化活性をもち、ユークロマチンを形成する。例えば、リガンド依存性核内受容体のvitamin D receptor（VDR）は、核内でATP依存的クロマチンリモデリング複合体（WSTF including nucleosome assembly complex; WINAC）やコアクチベーターまたはコリプレッサーと複合体を形成してゲノムDNA上のVD-responsive element（VDRE）に結合しており、VDRの転写抑制機構におけるクロマチン変化の過程でアセチル化ヒストンを認識することによって、プロモーター上での複合体の変換を制御していることが明らかとなっている。このように、エピジェネティック修飾の協調的な働きにより活性クロマチンからの遺伝子発現と不活性クロマチンによる転写抑制が行われており、これらのエピジェネティック調節によりクロマチンが動的に変化していることが想像できる。そこで、本研究では、CAR依存性の転写調節にエピジェネティック機構が関与するかどうかについて検討した。はじめに、AMPK活性化物質は、*in vivo*においてゲノムDNA上のPBREM領域にCARをリクルートできないことを明らかにした。この結果は、*in vivo*でAMPK活性化だけではCYP2B誘導が起こらないことと矛盾しない。しかし、PBREMリポーターベクターではPBREM転写活性化が生じたことから、AMPK活性化によってCARがPBREM領域に結合するためにはゲノム構造の変化が必要なことが示唆された。そこで次に、PB型誘導物質によってCYP2B遺伝子のゲノム構造の変化が起こっているかについて検討を進めた。しかし、PBREM領域のクロマチン構造や、ATP依存的クロマチンリモデリング複合体BAFとCARの相互作用はいずれもPBにより影響を受けなかった。BAFと相互作用する核内受容体については、estrogen receptor（ER）、androgen receptor（AR）、peroxisome proliferator-activated receptor（PPAR）がすでに報告されており、更にAMPKKのSTK11/LKB1についてはBrg1のATPase活性を強めることが明らかにされている。CARについてもPBとは無関係に定常時からこれらクロマチンリモデリング因子に結合している可能性が考えられた。しかし、CYP2Bプロモーター領域に限らず核全体のユークロマチン状態をHP1β細胞内局在により検討すると、PB処置により核内全体のクロマチンのユークロマチン化が認められた。従って、PBは、肝細胞においてグローバルなユークロマチン化を誘導することが示唆され、PBの発がんプロモーター作用などとの関連で興味が持たれた。

CARの核移行及び転写活性化の機能はリン酸化によって調節されていることが報告されており、AMPKが直接CARをリン酸化する可能性が考えられた。しかし、CARの一次配列中にAMPKの基質となり得るコンセンサス配列は見い出せなかった。一方、最近AMPKを介してhepatocyte nuclear factor 4α（HNF4α）のS304がリン酸化されること、それによりHNF4αの転写活性が低下することが報告され、HNF4αがAMPKの基質になることが明らかとなった。HNF4αは肝細胞の分化維持とともに、CYP2B及びCYP3Aの誘導にも深く関与していることが明らかになっている。CARは胆汁酸合成、糖新生、脂質β酸化の鍵となる遺伝子を負に調節しているが、HNF4αは逆にこれらを正に調節しており、CARはHNF4αと共通のコアクチベーターをめぐり競合的にHNF4αを阻害していることが報告されている。更に、PBによりHNF4αの核移行が促進するという報告が*in vitro*でなされている。これらの知見から、AMPKによるCARの調節機構へのHNF4αの関与が期待された。しかし結果には示さないが、*in vivo*の系において必ずしも*in vitro*で報告されているようなPBによるHNF4αの核移行を検出することはできなかった。これは、初代培養細胞では著しくHNF4αの発現が減少することと関係がある可能性が考えられた。更にHNF4αの結合領域は一部PBREM領域とオーバーラップしていたため、HNF4α結合領域とPBREM領域の相互作用が生じている可能性も考えられた。しかし、結果には示さないが、PB処置はゲノムDNA上のHNF4α結合領域にHNF4αをリクルートしないことをChIPアッセイにより認めている。従って、PBによるAMPKを介したCYP誘導に対するHNF4αの関与は低い可能性が示唆された。

PBがどの様にAMPKを活性化するかについては興味深い課題である。最近になり、ヒト及びマウス初代肝細胞またはトリ肝がん由来細胞を用いた研究で、PBによるAMPK活性化にはAMPKKのSTK11/LKB1（S428）のリン酸化が重要であるという報告がなされた。更に、AMPKKの活性化に活性酸素種（ROS）が介在することが明らかになり、そ

れは Protein kinase C（PKC）ζ を介して LKB1（S428）のリン酸化が起こることによるものと推定されている。ROS 生成の主な場所はミトコンドリアの呼吸鎖であり、薬物処置によるミトコンドリアの機能変化については多くの検討がなされている。結果には示していないが、マウスに PKC 特異的阻害剤 Ro-31-8220 を前処置すると、PB による AMPK 活性化の減弱傾向が認められた。今後、PB による PKC の活性化と AMPK の関連性などについて検討を加えなければならない。

本研究は、げっ歯類の PB 型誘導物質の肝 CYP 転写活性誘導に AMPK 経路が利用され、さらに AMPK が CAR の核移行を活性化することを *in vivo* で示したものである。一方、AMPK 活性化は、*in vivo* において CYP2B 及び CYP3A 遺伝子の転写に対する必要十分条件ではないことを明らかにした。PB による CYP2B 誘導のエピジェネティックな調節について PBREM 領域付近のクロマチンの活性化とは無関係であることが示唆され、今後はプロモーター領域及び他の転写因子との相互作用が重要であると考えられた。

いずれにしても薬物による CYP 誘導に AMPK が役割を演じていることが明らかとなり、現代の深刻な生活習慣病であるメタボリックシンドロームや肥満を含めて、従来その機序が不明であった異なる病理的あるいは栄養状態での CYP 誘導の差異を説明し得るものと考える。

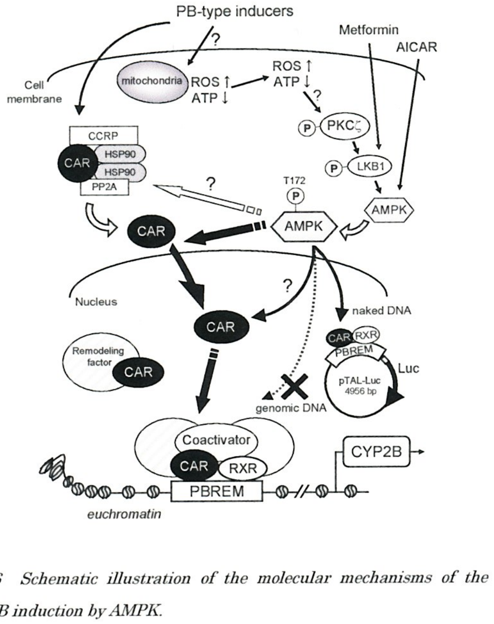


Fig. 6 Schematic illustration of the molecular mechanisms of the CYP2B induction by AMPK.

４．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　３件）

①Numazawa S, Sakaguchi H, Aoki R, Taira T, Yoshida T. Regulation of the susceptibility to oxidative stress by cysteine availability in pancreatic beta-cells. Am J Physiol Cell Physiol. (2008) 295:C468-74.

②Ashino T, Yamanaka R, Yamamoto M, Shimokawa H, Sekikawa K, Iwakura Y, Shioda S, Numazawa S, Yoshida T. Negative feedback regulation of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase gene expression by heme oxygenase-1 induction in macrophages. Mol Immunol. (2008) 45:2106-15.

③Kim BC, Jeon WK, Hong HY, Jeon KB, Hahn JH, Kim YM, Numazawa S, Yosida T, Park EH, Lim CJ. The anti-inflammatory activity of Phellinus linteus (Berk. & M.A. Curt.) is mediated through the PKCdelta/Nrf2/ARE signaling to up-regulation of heme oxygenase-1. J Ethnopharmacol. (2007) 113:240-7.

５．研究組織

(1)研究代表者

沼澤　聡（NUMAZAWA SATOSHI）
昭和大学・薬学部・准教授
研究者番号：80180686

(2)研究分担者

(3)連携研究者