

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007—2008
 課題番号：19590127
 研究課題名（和文） ダイオキシンによる発がんプロモーター活性に係る転写因子の作用機序の解析
 研究課題名（英文） Transcriptional regulation mechanisms of arylhydrocarbon receptor (AhR), Arnt and E2F genes on proliferation process in A549 cells as promoter activity in carcinogenesis by dioxin
 研究代表者 手塚 雅勝 (TEZUKA MASAKATSU)
 日本大学・薬学部・教授
 00046294

研究成果の概要：ダイオキシン（TCDD）による発がんプロモーター活性を解析するために、その細胞内受容体であるアリルヒドロカーボン・レセプター（AhR）に着目した。TCDDの毒性発現には AhR など細胞内遺伝子の発現変化が強く関与していること、およびヒト肺がん由来細胞である A549 細胞の細胞増殖速度が促進されることを見出した。この促進作用にはがん関連転写因子である E2F が係っており、AhR による E2F の活性化機構並びに AhR と E2F の相互作用を追究した結果、AhR は Arnt と複合体を形成し、さらに E2F と複合体を形成すること、またその複合体の DNA 認識配列への結合にはコアクチベーターとして SRC-3 等が関与していることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
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・環境系薬学

キーワード：ダイオキシン，細胞増殖，Ah レセプター，E2F，AhR/Arnt，A549 細胞，SRC-3

1. 研究開始当初の背景

ダイオキシン（TCDD）による環境汚染は、現在わが国における重要な問題である。TCDD による生体への影響は種々報告されており、強力な体脂肪の減少、催奇形性、繁殖抑制、免疫抑制などを示すとともに、発がんプロモーター作用を有することが知られている。TCDD は細胞内に存在するアリルヒドロカーボン・レセプター（AhR）と結合し、核内に移行する。AhR はその構造内に DNA 結合部位を有する転写因子であり、TCDD の毒性発現には

細胞の遺伝子発現の変化が強く関与していることが推察される。そこで我々は培養細胞に及ぼす TCDD の影響を検討した結果、ヒト肺がん由来細胞である A549 細胞の細胞増殖速度が促進されることを見出した。さらに、DNA アレイを用いて細胞周期関連遺伝子の発現変化を検討した結果、TCDD 暴露細胞ではがん関連遺伝子である E2F の標的遺伝子の発現が増加していることを明らかにした。TCDD による発がんプロモーター活性に関する研究は、これまで発現量が変化する遺伝子の検索

を中心に行われてきた。我々は、TCDDの細胞内受容体である AhR の発現量が TCDD 暴露により変化すること、およびヒト肺がん由来細胞である A549 細胞の細胞増殖が促進されること、さらに A549 細胞において E2F が活性化されることを見出した。また、AhR、Arnt あるいは E2F の発現を RNAi 法により抑制した結果、E2F 依存的転写活性は AhR あるいは Arnt の発現抑制により低下すること、および E2F の発現抑制は AhR/Arnt による DNA 上の XRE 配列の転写活性を促進することが明らかとなった。これらの結果より、AhR/Arnt は E2F と複合体を形成し、E2F 結合配列に対する転写促進因子として作用することが示唆される。

2. 研究の目的

ヒト肺がん由来 A549 細胞におけるダイオキシンおよび AhR による E2F の活性化機構並びにそれに続く細胞増殖の促進作用を解析し、がん関連遺伝子発現に及ぼすダイオキシン暴露の影響を分子レベルで解明することを目的とする。そのために、A549 細胞内における AhR と Arnt との複合体形成、並びに E2F との係わりを詳細に追究することにより、がん細胞の細胞増殖における転写関連因子と細胞周期関連遺伝子とのクロストークを明らかにする。そうすることによって、ダイオキシンによる発がんプロモーター作用の分子基盤を提示する。

3. 研究の方法

(1) プラスミドの調製

E2F1 全長 cDNA は、A549 細胞から RT-PCR 法によって増幅し、pcDNA3.1 の HindIII/BamHI 部位にサブクローンした。AhR および Arnt 発現ベクターは我々の研究室で確立した方法で調製した。

(2) 細胞の培養とトランスフェクション

A549 細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンク (大阪) から購入し、常法により 10% 存在下で培養した。DNA および siRNA 遺伝子のトランスフェクションは、市販のキットを用いた。

siRNA 用に用いたヌクレオチド配列は次のとおりである。

E2F1: UGAAAGUUCUCCGAAGAGUCCACGG

AhR: UUAAGUCGGUCUCUAUGCCGCUUGG

Arnt: UCUCAUGGAAGACUGCUGACCUUCC

(3) 免疫プロット分析

細胞を溶解処理後、必要なタンパクを抽出し、SDS-PAGE で分画した後、抗 E2F1、抗 AhR、および抗 Arnt で処理して沈降させた。その後、タンパク質を可視化して LAS-1000plus を用いて検出した。

(4) リポーター・アッセイ

細胞に E2F エンハンサーエレメントの 4 コピ

ーを含むプラスミドとともにルシフェラーゼ配列を導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

(5) 免疫沈降法

A549 細胞を薬物で処理した後、細胞を融解させ、得られた細胞抽出液に AhR、Arnt、および E2F1 の特異抗体を作用させて免疫沈降を行い、さらに Protein G Magnetic Beads を用いて沈降した試料を SDS-PAGE により分画した後、それぞれのタンパクを検出した。

(6) クロマチン免疫沈降分析

A549 細胞を 1%ホルムアルデヒドで処理してクロスリンクを起こさせる。その後超音波処理により細胞を融解させた。クロマチン免疫沈降法は市販のアッセイキットを用いて行った。

4. 研究成果

(1) A549 細胞における AhR あるいは Arnt の発現抑制は細胞増殖を遅延させる

我々は、A549 細胞における AhR の過剰発現が細胞増殖を促進させることを見出している。そこで、内因性の AhR が細胞増殖の調節に関与するかを AhR、Arnt あるいは E2F の発現を RNAi 法によって抑制することにより検討した。その結果、AhR、Arnt あるいは E2F の発現抑制により、そのターゲットのタンパクレベルは有意に減少することがウエスタンブロッティング法により確認された。また、細胞増殖は、E2F 発現をノックダウンさせることによって遅延した。さらに、AhR あるいは Arnt のノックダウンによっても細胞増殖が阻害された。このように、A549 細胞の増殖には、AhR および Arnt が関与していることが明らかとなった。

(2) AhR のリガンドは E2F の E2F 依存性転写活性を増加させる

活性化された AhR はプロモーター領域において XRE 配列が欠如していても E2F ターゲット遺伝子のいくつかの発現を増大させることが報告されている。また、AhR は転写因子としてだけでなく転写のコファクターとしての役割を有することが最近報告されてきている。そこで、AhR が E2F 依存性の転写に対するコファクターとして機能するかを検討した。細胞に E2F 結合コンセンサス配列の 4 コピーとルシフェラーゼ活性を含むリポータープラスミドをトランスフェクトした後、AhR リガンドである 3-メチルコラントレン

(3-MC) で細胞を処理した。その結果、細胞の E2F 依存性転写活性は 3-MC の存在により有意に増加した。また 3-MC の作用は、AhR あるいは Arnt 発現のノックダウンにより減弱した。

(3) AhR は E2F ターゲット遺伝子のプロモーター領域における E2F 結合部位において E2F と複合体を形成する

AhR が E2F 依存性転写活性をプロモートするかを明らかにするため、AhR/Arnt 複合体が E2F と複合体を形成するかを検討した。AhR、Arnt あるいは E2F が 3-MC とその他の因子で処理した細胞から免疫沈降されるかをウェスタンブロット法により調べた。その結果、AhR に対する抗体は AhR のみならず Arnt および E2F も効果的に沈殿させた。一方、抗 E2F 抗体は AhR および Arnt といっしょに E2F を沈殿させた。これらの結果は、AhR、Arnt、および E2F が複合体を形成していることを示唆する。そこで、この複合体が E2F ターゲット遺伝子のプロモーター領域において E2F 結合部位上に結合するかをクロマチン免疫沈降法を用いて検討した。その結果、E2F は PCNA のプロモーター配列に結合することが示された。同様に、AhR も PCNA 遺伝子の E2F 結合配列上に弱いながら結合することが示された。このように、PCNA プロモーター上の E2F の一部は AhR と結合していることが明らかとなった。

(4)3-MC および AhR による E2F 転写活性化における SRC-3 の役割

AhR による E2F 転写活性の増強過程をさらに詳細に検討するため、ステロイドレセプター・コアアクチベーター (SRCs) および p300 のようなコアアクチベーターのリクルートに関する検討を行った。SRCs は AhR と同様に bHLH/PAS ファミリーに属し、HAT 活性を有している。SRCs の内の SRC-1 は AhR/Arnt の転写活性を調節することが知られている。ここでも、Cyp1A1 プロモーターにおける SRC-1 の 3-MC 依存性リクルートが認められた。SRC-1 は PCNA のプロモーター領域上にあるが、3-MC と関係なくリクルートされた。これに対して、SRC-3 は AhR/Arnt および E2F の両方にコアアクチベーターとして機能することが推察される。そこで、3-MC を用いて AhR を活性化したところ、Cyp1A1 のプロモーター上に SRC-3 がリクルートされることが認められた。SRC-3 は E2F 結合部位を有する PCNA プロモーター領域においてもリクルートされた。さらに、AhR が PCNA のプロモーター上において SRC-3 のリクルートに係るかどうかを調べるために、AhR ノックダウン細胞における PCNA のプロモーター上に SRC-3 が存在するか検討した。その結果、PCNA プロモーターへの SRC-3 のリクルートは AhR 発現のノックダウンによって阻止された。我々はまた、p300 が AhR 依存性の転写におけるコアアクチベーターかを AhR による E2F 依存性転写のプロモーションを調べることによって検討した。P300 は 3-MC 依存性の Cyp1A1 プロモーター領域に結合するが、3-MC 存在下における E2F ターゲット遺伝子とは結合しなかった。

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 1 件)

1. M. Hayashi, S. Shimba, M. Tezuka: Characterization of the Molecular Clock in Mouse Peritoneal Macrophages, 査読有 Biol. Pharm. Bull., 30(4), 621-626 (2007).

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 渡部雄一, 榛葉繁紀, 手塚雅勝: Ah レセプター (AhR) による E2F の転写活性化能の増加とそのメカニズム, 日本薬学会第 129 年会, 2009. 3. 26, 京都

2. 渡部雄一, 榛葉繁紀, 手塚雅勝: Ah レセプターと E2F のクロストーク, 第 31 回日本分子生物学会年会, 2008. 12. 10, 神戸

3. 渡部雄一, 榛葉繁紀, 手塚雅勝: ダイオキシン受容体 (AhR) と細胞周期関連因子 (E2F) の相互作用, フォーラム 2008: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2008. 10. 17, 熊本

4. 渡部雄一, 榛葉繁紀, 手塚雅勝: Ah レセプター/Arnt と E2F のクロストーク, 日本薬学会第 128 年会, 2008. 3. 27, 横浜

5. 渡部雄一, 榛葉繁紀, 手塚雅勝: 肺がん由来細胞における Ah レセプター/Arnt と E2F のクロストーク, 第 30 回日本分子生物学会年会, 2007. 12. 12, 横浜

6. 渡部雄一, 榛葉繁紀, 手塚雅勝: ダイオキシン受容体 (AhR)/Arnt と細胞周期関連因子 (E2F) の相互作用, フォーラム 2007: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2007. 11. 2, 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

手塚 雅勝 (TEZUKA MASAKATSU)

日本大学・薬学部・教授

00046294