

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月25日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510065

研究課題名（和文）ダイオキシン受容体の標的遺伝子サイレンシング解除にCREMが関与する機構の研究

研究課題名（英文）Involvement of CREM in the silencing mechanism of target gene of Aryl hydrocarbon receptor

研究代表者

菊池 英明（KIKUCHI HIDEAKI）

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：60006111

研究成果の概要（和文）：これまで、CYP1A1 プロモーター領域に、Sp1、CREM という因子が転写の状態にかかわらず常に結合していることを明らかにしてきた。さらに、転写が抑制されているときには、HDAC1 というヒストン脱アセチル化酵素が結合し、ヒストンアセチル基転移酵素活性を持つ CBP が結合する結果を得た。また、Re-ChIP アッセイ法を行い、転写が起きていないときには、Sp1 と HDAC1 の結合が観察され、転写が開始されるとこの結合が外れることが示された。Sp1 の Ser-59 は脱リン酸化されることで、標的遺伝子の転写が亢進することが知られている。TCDD 処理により活性化された PP2A が Sp1 の Ser-59 の脱リン酸化を引き起こし、CYP1A1 の転写が活性化される機構が考えられた。

研究成果の概要（英文）： CREMtau acts on the basic transcriptional element (BTE), which is located upstream of the CYP1A1 promoter. The results of the chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay showed that CREMtau and Sp1 bind to BTE, but there were no changes in the amount of binding at the transcriptional state before and after the induction of transcription. In addition, histone deacetylase 1 (HDAC1) binds to this region at a transcription-suppressive state. In the transcriptionally active state, CREB-binding protein (CBP), which has histone acetyltransferase activity, binds to the site of HDAC1. Using the Re-ChIP assay, an interaction between Sp1 and HDAC1 was observed when the transcriptionally suppressed state of CYP1A1 was analyzed. In contrast, interaction between CREMtau and CBP was detected with the transcriptionally active state of CYP1A1. We performed immunoprecipitation, western blotting, and the Re-ChIP assay using an anti-phospho-Ser antibody. The results showed that the level of phosphorylation of Sp1 was changed by treatment with TCDD or OP.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新分野

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：ダイオキシン、Ah レセプター、CREM、ヒストンデアセチラーゼ、Sp1、PP2A

1. 研究開始当初の背景

ダイオキシンが、哺乳動物に示す様々な毒性機構は、重要な研究領域であるにもかかわらず、研究が遅れている。これは、ダイオキシンの毒性機構の中心分子であるダイオキシン受容体が、生体において本来どのような役割を果たしているか、明らかになっていない部分が多い。ダイオキシン受容体遺伝子の破壊マウスが作製され、様々な異常表現型がみだされている（心臓奇形、発生初期の血管構築異常、出産後の静脈管開存など）。我々は、ダイオキシン受容体リガンドの結合によらずに活性化される、全く新しい機構を明らかにしてきた（Kikuchi, et al., 1998, 2002）。

このことは、ダイオキシン受容体が生理的シグナルによって標的遺伝子を活性化していることを意味している。我々はポジショナル・クローニングにより、ダイオキシン受容体の代表的な標的遺伝子である CYP1A1 の遺伝子活性化の初期過程に働く因子を CREM (CREB modulator) と同定し、それが作用するシス配列には Sp1 が結合していることを明らかにしてきた（Kikuchi and Sasamori, 2004, Sasamori et al. 2008）。

2. 研究の目的

(1) 研究の目的は、特定の細胞で生理的シグナルが入って来ることによって、特定の遺伝子 (CYP1A1) が誘導されるが、そのシグナルが入って来るまで如何にしてその遺伝子がサイレンシングされているかという機構を明らかにすることである。これまで、活性化の機構に関してはヒストンのアセチル化がクロマチン構造を変化させる重要な現象として多くの HAT (Histone acetyl transferase) 活性を持つ因子が同定されてきた。しかしながら、速い転写誘導が必要とされる遺伝子に関しては、ダイオキシン受容体のような転写因子が速やかにクロマチン構造をほぐしてシス配列にアクセスできるような機構が存在すると予想される。最近、HDAC (Histone deacetylase) の研究が進展してきたこともあり、遺伝子のプロモータ直近のシス配列 BTE (Basic transcription element) に結合する因子が、HDAC 分子を保持することにより遺伝子をサイレンシングしており、速い誘導発現に対応する機構として働いている可能性が考えられるようになってきた。

(2) 研究期間内の目的

KLF は Sp1 を代表とする Zn フィンガーを持つ複数の遺伝子からなるファミリーである。KLF9, 13, 16 は SID (Sin interacting domain) を持つことにより mSin3A と結合できる。この mSin3A はヒストンデアセチラ

ーゼ (HDAC1) と結合しており、ヌクレオソームのヒストンを脱アセチル化することによって遺伝子をサイレンシングしている。しかしながら、Sp1 に関しては、mSin3A に相当する因子が同定されていない。そこで本研究の課題としては、それまで発現が抑制されていた標的遺伝子 (CYP1A1) が、ダイオキシン受容体の活性化と共に、どのようにして転写が活性化されていくか、また Sp1 と結合する因子は何か、そしてその過程でこれまで申請者が同定してきた CREM という因子がどのように関与しているかを明らかにすることである（前ページの図を参照）。

3. 研究の方法

(1) 活性化前の標的遺伝子がサイレンシングされている時のクロマチンの状況を検討する

① ヒト HepG2 細胞を用いた EMSA 法で、既に BTE 配列に Sp1 が結合していることを示している (Sasamori, 2004)、BTE 配列に Sp1 と HDAC1 が複合体を形成して結合していることを Sp1 の抗体を用いた免疫沈降法により証明する。

② BTE 配列付近のプライマーを用いて、Sp1 と HDAC1 が実際の細胞の中で複合体を形成していることを、ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) アッセイ法により証明する。

(2) リガンド非依存性に活性化される細胞における標的遺伝子 CYP1A1 クロマチンの状況の時間経過を検討する

Sp1 がどのような時間経過で活性型 Sp1 に置き換わっていくのかを、Sp1 リン酸化抗体を用いた ChIP アッセイ法により検討する。

4. 研究成果

(1) 免疫沈降法によるタンパク質の相互作用の確認

CYP1A1 のプロモーター上流域で中心的な働きをしていると考えられる、CREM、Sp1、HDAC1 の相互作用を免疫沈降法、およびウエスタンブロッティングにより確認した。HepG2 細胞に 5 nM TCDD または 50 μ M OP で 60 分間処理した後、タンパク質の全細胞分画を回収した。それぞれ 1 mg のサンプルを用意し、これに CREM、または Sp1 抗体を 1 μ g 加え免疫沈降を行い、それをウエスタンブロッティングにより解析した。その結果、CREM と HDAC1、あるいは Sp1 の相互作用は確認できなかった (図 1 A, B)。CREM と HDAC1 に関しては、normal IgG で免疫沈降したものと CREM 抗体で免疫沈降したもので同じバンドが出てきてしまったために、分子量としては同じ位置にバンドが出ているが、相互作用しているとは言い切れない。一方、Sp1 抗体で

免疫沈降を行い、HDAC1 で検出したサンプルは相互作用が確認できた (図 1 C)。

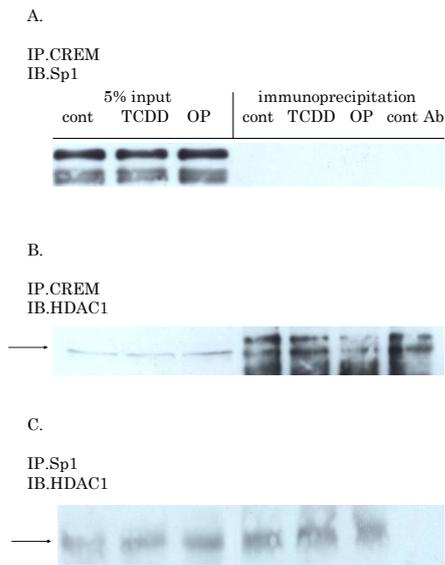


図 1. Sp1 と HDAC1 は相互作用している
A. 5 nM TCDD または 50 μ M OP で 60 分間処理した際の 1 mg の全細胞抽出画分を CREM 抗体で免疫沈降後、Sp1 抗体でウエスタンブロッティングしたもの。矢印で示したバンドが Sp1 である。B. 矢印で示したバンドが HDAC1 である。C. 矢印で示したものが HDAC1 である。

(2) Sp1、CREM は転写の状態に関係なく常に結合している

HepG2 細胞に 5 nM TCDD または 50 μ M OP を 60 分間処理したサンプルを回収し、ChIP assay を行なった。プライマーは BTE 配列を含む CYP1A1 のプロモーター近傍に対するもので、その結果転写活性化の目安として用いた RNA ポリメラーゼ II は不活性化時には結合しておらず、活性化するとプロモーター領域に結合することがわかった。TCDD 処理の際にはコントロールの約 3 倍、OP の場合には約 2 倍となっており、この結合量の差が転写量の差となって表れているものと考えられる。

Sp1 はコントロール、TCDD、OP いずれの場合も BTE 配列を含むプロモーター領域への結合量は変化がなく、常に一定量結合したまま、CYP1A1 の転写へ影響を与えているものと考えられる。CREM の場合も、その結合量はやや少ないが転写の状態に関わらず一定量結合していることがわかった (図 2)。

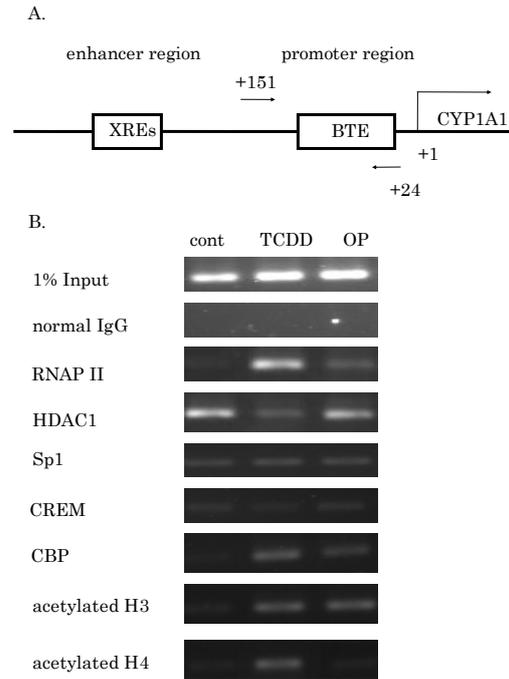


図 2. Sp1、CREM は CYP1A1 遺伝子プロモーター領域に常に結合している

A. ChIP assay で使用したプライマーの位置を模式的に示した。B. プロモーター領域への各因子のリクルート量を ChIP assay で調べた。1% input はポジティブコントロールとして、IgG サンプルはネガティブコントロールとして用いた。

(3) CYP1A1 のプロモーター近傍のヒストンは CBP によりアセチル化されている

転写が起こる際には、プロモーター近傍のヒストンのアセチル化が起こることが一般的に知られており、CYP1A1 ではどのようになっているかを ChIP assay で調べた。HDAC1 は DNA には直接結合することはできないが、何らかの因子を介して周辺のヒストンを脱アセチル化することで転写を抑制していることが知られている。CYP1A1 遺伝子のプロモーター近傍では不活性化時には強く結合しており、TCDD 処理ではそのほとんどがこの領域からはずれ、OP 処理では約半分がはずれることがわかった。この結果は DNAP assay の結果と一致した。

一方、ヒストンのアセチル化を促すことで転写を活性化させる CBP の動態を調べたところ、TCDD ではコントロールに比べ、約 2 倍、OP では約 1.5 倍に増加した。何らかのシグナルが入ることで、HDAC1 がはずれ、代わりに CBP がこの領域に結合することがわかった。

この際のヒストン H3、H4 のアセチル化状態について調べた結果、HDAC1 がはずれ、CBP がこの領域にリクルートされることでアセ

チル化が亢進することがわかった。CBP のリクルート量によってアセチル化されるヒストンの量が増加していることがわかった (図 3)。これによって DNA-ヒストンの強い結合が緩んで、様々な転写因子がこの領域にリクルートされることで転写が起こるものと考えられる。

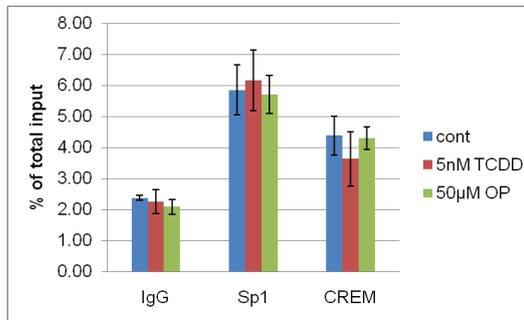


図 3. Sp1, CREM は CYP1A1 遺伝子プロモーター領域に常に結合している

5 nM TCDD または 50 μM OP で 60 分間処理した際のプロモーター領域への各因子のリクルート量を ChIP assay で調べた。リアルタイム PCR で定量した結果を示した。n=3 で実験を行い、縦軸はインプットに対する比で示した。

(4) 考察

CREM は CRE (5' -TGACGTCA-3') という 8 塩基のパリンドローム配列に二量体として結合することで転写の制御をしている (Servillo G, et al. 2002)。CREM 自身は PKA や CaMKIV によりリン酸化されることで活性化し、この領域に結合する。一般的にアイソフォームの置き換えりによって転写の制御がされており、通常は抑制型の CREM がこの領域に結合し、HDAC1/mSin3A の転写抑制複合体を形成している。一度シグナルが入ると、この複合体ははずれ、活性化型の CREM あるいは CREB がリクルートされ、CBP/p300 などと複合体を形成し、転写を活性化させる (Tenbrock K, et al. 2006)。

CYP1A1 の遺伝子上流域について見てみると、CRE は存在していない。過去の報告では、CREM あるいは CREB は完全な CRE ではなく、CRE の一部や CRE に似た配列にも結合できるという報告がある (Manna PR, et al. 2003)。このような配列であれば CYP1A1 の遺伝子上流域にも存在するが、私たちの研究室の過去の結果では、CREM は、直接か間接かは不明であるが、BTE 配列に作用していることがわかっていたので、ここを中心に実験を行なった。今回 ChIP assay によって得られた結果は、今までの CREM の転写の様式とは大きく異なる

ことが示唆された。CREM τ は活性化型であるにも関わらず、BTE 配列に結合したままであり、大きな変化は見られなかった。この理由としては、CREM も Sp1 同様に、相互作用する相手を変えることで、転写の制御をしているのではないかと考えられた。特に CREM の働きとして注目しているのは、CBP/p300 との相互作用である。これらのタンパク質は HAT 活性を持っており、転写の促進には重要な働きを担っており、CREM の KID (kinase inducible domain) と CBP/p300 の KIX ドメインは相互作用することが知られている (Dela Fazio, et al. 1997)。また、抑制型の CREM α と HDAC1 は CREM α のある領域と相互作用でき、その領域は CREM τ にも存在することより、CREM τ の場合は、元々 HDAC1 と相互作用して転写抑制複合体を形成していたものが、シグナルが入ることで、CBP/p300 をリクルートし転写の活性化をしているのではないかと考えられる。

以上の結果を踏まえて、転写不活性化時、活性化時におけるモデル図を示した (図 6)。不活性化状態では、Sp1 が BTE 配列に結合し、CREM τ、HDAC1 と相互作用をしているものと考えられる。今回、直接的な相互作用は確認できなかったが、複合体の構成因子として各々が含まれているものと考えている。一旦シグナルが入ると、HDAC1 を含む転写抑制複合体がプロモーター領域からはずれ、代わりに HAT 活性を持った CBP がリクルートされ、周辺ヒストンをアセチル化する。これにより、転写促進因子複合体が形成され、最終的に RNA ポリメラーゼがリクルートされ、CYP1A1 の転写が起きているのではないかと考えている (図 4)。

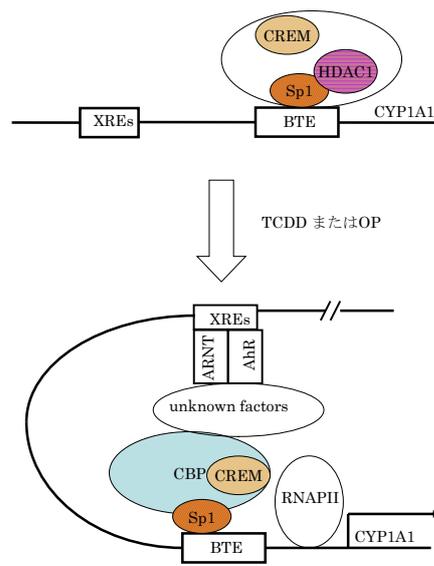


図 4. 仮説モデル

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)

①M. Ebina, M. Shibasaki, K. Kudo, S. Kasai, and H. Kikuchi, Correlation of Dysfunction of Nonmuscle Myosin IIA with Increased Induction of Cyp1a1 in Hepa-1 cells (査読有) *Biochim. Biophys. Acta*, 1809, 2011, 176-183

② T. Kawauchiya, R. Takumi, Y. Kudo, A. Takamori, T. Sasagawa, K. Takahashi and H. Kikuchi, Correlation between the destruction of tight junction by patulin treatment and increase of phosphorylation of ZO-1 in Caco-2 human colon cancer cells.

(査読有) *Toxicology Letters*, 205, 2011, 196-202

③S. Kasai, and H. Kikuchi, The Inhibitory Mechanisms of the Tyrosine Kinase Inhibitors Herbimycin A, Genistein, and Tyrphostin B48 with Regard to the Function of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Caco-2 Cells. (査読有) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 2010, 36-43

④M. Ishida, T. Itsukaichi, D. Kobayashi and H. Kikuchi, Alteration of the PKC- δ -Vav1 complex and phosphorylation of Vav1 in TCDD-induced apoptosis in the lymphoblastic T cell line, L-MAT. (査読有) *Toxicology*, 275, 2010, 72-78

[学会発表] (計 6 件)

① 下山修司・葛西秋宅・菊池英明, The function of Sp1 and CREM・induction of CYP1A1 in human HepG2 cells.

第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13~16日 横浜

② S. Shimoyama, E. Sasamori, S. Kasai and H. Kikuchi, Function of Sp1 and CREM τ in induction of CYP1A1 in human HepG2 cells.

7TH DUESSELDORF SYMPOSIUM ON IMMUNOTOXICOLOGY.

Biology of the Arylhydrocarbon Receptor, 2011年9月21-24日 デュッセルドルフ (ドイツ)

③K. Kudo, T. Takeuchi, Y. Murakami, M. Ebina and H. Kikuchi. Analysis of the region of

the aryl hydrocarbon receptor required for ligand dependency of transactivation.

17th International Conference on Cytochrome P450. 2011年6月26-30日, マンチェスター (英国)

④川内谷知子、高森章子、内匠涼、高橋衡平、菊池英明、カビ毒パツリンによる大腸癌細胞株 Caco-2 のタイトジャンクション崩壊機構、第83回日本生化学会大会、2010年12月7日、神戸ポトアイランド (神戸市)

⑤蝦名真行、柴崎晶彦、工藤恭子、葛西秋宅、菊池英明、Inhibition or depletion of Nonmuscle myosin IIA leads to enhancement of Cyp1a1 induction by TCDD in Hepa-1 cells.

第83回日本生化学会大会 2010年12月7日、神戸ポトアイランド (神戸市)

⑥中平卓也、工藤恭子、菊池英明、Functional analysis of transactivation domain of human Ah receptor by amino acid-replacement of possible phosphorylation sites.

第83回日本生化学会大会 2010年12月7日、神戸ポトアイランド (神戸市)

[図書] (計1件)

①K. Kudo, T. Takeuchi, Y. Murakami, M. Ebina and H. Kikuchi, *Medimond International Proceedings (Bologna) Italy.*

17th International Conference on Cytochrome P450, Biochemistry, Biophysics and Structure (ISBN 978-88-7587-616-6), 2011, 69.

[その他]

ホームページ

<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/lab/2/celltech2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 英明 (KIKUCHI HIDEAKI)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：60006111