

シモヤマ シュウジ

**氏 名** 下山 修司

本籍（国籍） 秋田県

学位の種類 博士（学術）

学位記番号 連研第 608 号

学位授与年月日 平成 26 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士

研究科及び専攻 連合農学研究科 生物資源科学専攻

**学位論文題目**

遺伝子 *CYP1A1* の発現とプロモーター領域の活性化（Induction of *CYP1A1* gene and its promoter activation）

学位審査委員 主査 教授 菊池 英明

副査 教授 石黒 誠一

副査 准教授 山下 哲郎

副査 教授 佐藤 英世

## 論文の内容の要旨

遺伝子 *CYP1A1* は外来異物に応答して転写が活性化されることが知られている。中心的な役割を果たしているダイオキシン受容体 (AhR) は外来異物と結合し、活性化することで核内に移行、パートナータンパク質である ARNT と二量体を形成することでエンハンサー領域である XRE に結合し、転写活性化を引き起こす。しかしながら、XRE はプロモーターの約 1000bp 上流にあり、どのような仕組みでプロモーターの活性化が引き起こされておるかは不明である。また、AhR に直接結合する TCDD、結合はしないが AhR を活性化させて *CYP1A1* の転写活性化を引き起こすオメプラゾール (OP) という 2 種類の誘導剤が、どのようなシグナル伝達を経て *CYP1A1* のプロモーターに影響を与えているのかも不明である。

本研究は、それぞれの誘導剤を用いて遺伝子 *CYP1A1* のプロモーター領域 (BTE) における転写制御因子を中心に実験を進めた。以前の研究結果より、Sp1、CREM および HDAC1 の関与が知られていたが、詳細なメカニズムはわかっていなかった。ChIP assay によりこれらの結合量を調べた。その結果、CREM と Sp1 は転写の状態に関係なく、常に一定量結合していることがわかった。通常の転写因子の場合、転写抑制因子と転写活性化因子が置き換わることによって制御されていることが多いが、変化しないという、特殊な現象を示すことができた。また、HDAC1 は TCDD や OP 処理により、結合量が減少することが確認できた。転写因子の結合量が変化しないが、転写への影響は変化するということを踏まえ、Sp1 と相互作用する因子が変化するのではないかと考え、Re-ChIP assay を行い、Sp1、HDAC1 と CBP の *CYP1A1* の BTE 上で複合体を形成しているかどうかを調べた。その結果、転写が不活性な状態では Sp1 は HDAC1 と複合体を形成

し、TCDD や OP 存在下では、この複合体が解離し、Sp1 と CBP が複合体を形成することがわかった。この複合体の置き換わりは、Sp1 自身の翻訳後修飾が何らかのメカニズムで変化し、それが相互作用に影響をしているのではないかと考え、59 番目のセリン残基 (Ser-59) および 453 番目のスレオニン残基 (Thr-453) のリン酸化状態について調べた。これらは Sp1 の転写調節に重要なリン酸化部位であるとされており、これらが TCDD または OP によりどのように変化するのかを Western blotting で調べた結果、Thr-453 は特に大きな変化は見られなかったが、Ser-59 は劇的にリン酸化が減少した。これはリン酸化酵素が積極的に働きかけて、脱リン酸化しているのではないかと考え、脱リン酸化酵素である PP2A に着目した。

PP2A の阻害剤であるオカダ酸 (OA) 処理、または P2A の触媒サブユニットである C サブユニットを siRNA でノックダウンした結果、TCDD や OP による Ser-59 の脱リン酸化は大きく抑制された。また、この際の *CYP1A1* の転写の様子を、qRT-PCR で調べた結果、OA 処理, siRNA による PP2A のノックダウン、いずれも転写が大きく抑制された。これらのことより、PP2A は Sp1 の Ser-59 を脱リン酸化する事で、*CYP1A1* の転写を活性化していることがわかった。また、ChIP assay により、リン酸化 Ser-59 は転写が不活性な状態の時に BTE に結合し、活性化されるとはずれるということがわかった。また、Sp1 は OA 存在下では、HDAC1 と複合体を形成し、TCDD や OP による CBP との複合体形成が抑制されることもわかった。これらのことより、Sp1 は自身のリン酸化状態の変化によって、相互作用する因子を変化させ、転写調節を行なっていることが明らかになった。

*CYP1A1* は AhR を中心として転写が制御されているので、PP2A/Sp1 と AhR の関係について調べた。その結果、AhR のノックダウンは Ser-59 のリン酸化状態に全く影響を与えず、OA 処理も AhR の細胞質内での発現量、TCDD や OP による核内移行および XRE への結合に影響を与えなかった。以上より、PP2A/Sp1 の経路は AhR とは独立した経路で、TCDD や OP からシグナルを受け取り、*CYP1A1* の転写に寄与していることが示された。

また、PP2A/Sp1 へのシグナルがどのようなものであるかを調べた結果、細胞内 Ca<sup>2+</sup>キレーターである BAPTA-AM により、TCDD や OP による Ser-59 の脱リン酸化や *CYP1A1* の転写が大きく抑制された。この際、AhR での細胞質内での発現量、TCDD や OP による核内移行および XRE への結合に何の影響も与えなかった。

以上の結果より、TCDD や OP のシグナルを受け取った AhR は核内移行と XRE への結合をする。これと独立した経路で、Ca<sup>2+</sup>によるシグナル伝達を介して PP2A が活性化し、Sp1 の Ser-59 が脱リン酸化する。脱リン酸化された Sp1 は CBP と複合体を形成し、AhR と協調して働くことにより、*CYP1A1* の転写を活性化しているものと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

遺伝子 *CYP1A1* は外来異物に応答して転写が活性化されることが知られている。中心的な役割を果たしているダイオキシン受容体 (AhR) は外来異物と結合し、活性化することで核

内に移行、パートナータンパク質である ARNT と二量体を形成することでエンハンサー領域である XRE に結合し、転写活性化を引き起こす。しかしながら、XRE はプロモーターの約 1000 bp 上流にあり、どのような仕組みでプロモーターの活性化が引き起こされているかは不明であった。

本研究は、TCDD 投与後のプロテインホスファターゼ PP2A の働きにより、プロモーターに存在している転写因子 Sp1 が脱リン酸化され、*Cyp1a1* 遺伝子の転写活性化に関与していることを示唆する結果を明らかにしたものである。

まず、誘導剤を用いて遺伝子 *CYP1A1* のプロモーター領域における転写制御因子を中心に実験を進めた。細胞内の動態をより詳細に調べることができるクロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) を行なった。その結果、Sp1 は転写の有無に関係なく常に結合しており、ヒストンアセチル基転移酵素 CBP は活性化時に、HDAC1 は不活性化時に結合していることがわかった。また、免疫沈降法により、Sp1 と HDAC1 は相互作用していることがわかり、転写活性化時には Sp1 は相互作用する相手を変えることで、*CYP1A1* のプロモーターの活性化を担っているものと考えられた。

次に、Sp1 の翻訳後修飾が、*CYP1A1* の転写を活性化する前後で変化しているのではないかと考え、Sp1 のリン酸化状態の変化に注目し、実験を進めた。転写調節と密接な関係にあるとされる 59 番目のセリン残基リン酸化(pSer-59)は、TCDD 処理により減少した。また、この部位を脱リン酸化するとされる PP2A の阻害剤であるオカダ酸(OA)を用いたところ、脱リン酸化は起こらなくなった。また、同様の結果が PP2A をノックダウンした実験でも得られた。PP2A/Sp1 へのシグナルがどのようなものであるかを、細胞内 Ca<sup>2+</sup>キレーターである BAPTA-AM を用いたところ、AhR に全く影響を与えないが、PP2A による Sp1 の pSer-59 の脱リン酸化が阻害された事から、Ca<sup>2+</sup>が PP2A を活性化する事で、Sp1 を脱リン酸化している可能性を示していた。

以上のことから、TCDD や OP により Ca<sup>2+</sup>が何らかのメカニズムで上昇し、これにより PP2A が活性化され、Sp1 の 59 番目のセリン残基が脱リン酸化され、AhR と協調して働く事で、*CYP1A1* の転写を活性化している事が示された。

#### 学位論文の基礎となる学術論文

1. Shimoyama S, Kasai S, Kahn-Perlès B, Kikuchi H. Dephosphorylation of Sp1 at Ser-59 by Protein Phosphatase 2A (PP2A) is required for induction of CYP1A1 transcription after treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin or omeprazole. *Biochim. Biophys. Acta*, 1839, 107-115 (2014)

#### 参考論文

1. Eriko Sasamori, Shuichi Shimoyama, Shinichi Fukushige, Masahiko Shibazaki and Hideaki Kikuchi Involvement of CREM in CYP1A1 induction through ligand-independent activation pathway of aryl hydrocarbon receptor in HepG2 cells. *Arch. Biochem. Biophys*, 478, 26-35 (2008)