

学位論文

遺伝子 *CYP1A1* の発現と プロモーター領域の活性化

岩手大学大学院 連合農学研究科

生物資源科学専攻 ゲノム工学連合講座

弘前大学所属

80210007

下山 修司

主指導教員；菊池 英明 教授

副指導教員；石黒 誠一 教授

；山下 哲郎 准教授

【目次】

【第一章 BTE における CREM と Sp1 の働き】

- 1-1 要旨 3
- 1-2 背景 5
- 1-3 実験結果 8
- 1-4 考察 12

【第二章 Sp1 の脱リン酸化と PP2A の関与】

- 2-1 要旨 16
- 2-2 背景 18
- 2-3 実験結果 20
- 2-4 考察 25

【3. 実験材料と方法】 29

【4. 謝辞】 35

【5. 参考文献】 36

【6. 図説】 42

【7. 図】 47

【第一章 BTE における CREM と Sp1 の働き】

1-1. 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、標的遺伝子の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いるかは不明である。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系を経て *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、転写因子 Sp1、CREM およびヒストン脱アセチル化酵素 HDAC1 の関与が知られていたが、これらがどのように転写制御を担っているのか詳細なメカニズムはわかっていなかった。そこで DNAP assay により回収したタンパク質のサンプルをウエスタンブロッティング解析することにより Sp1、CREM、HDAC1 のプロモーター領域への結合を調べた。その結果、CREM に関しては明確なバンドが検出されなかったが、Sp1 は転写の有無に関係なく結合し、また、HDAC1 は転写活性化時にその結合量が減少するということがわかった。この実験は *in vitro* のクロマチン再構築系の実験のため生体内の状況を正確には反映できないため、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、CREM、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る。

【略語】

- AhR; aryl hydrocarbon receptor
- ARNT; aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
- BTE; basic transcriptional element
- CaMK IV; calcium/calmodulin-dependent kinase IV
- CBP; cyclic-AMP responsive element (CRE) binding protein (CREB)-binding protein
- ChIP assay; Chromatin Immunoprecipitation assay
- CREM; cyclic-AMP responsive element (CRE) modulator
- *CYP1A1*; cytochrome P-450 IA1
- DNAP assay; DNA affinity precipitation assay
- HAT; histone acetyltransferase
- HDAC1; histone deacetylase 1
- Hsp90; heat-shock protein 90
- IB; immunoblot
- IP; immunoprecipitation
- KLF; Kruppel-like factor
- OP; omeprazole
- PKA; protein kinase A
- qRT-PCR; quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
- RNAPII; RNA polymerase II
- siRNA; short interference RNA
- TCDD; 2,3,7,8-tetrahlorodibenzo-p-dioxin
- XAP2; hepatitis B virus X-associated protein 2
- XRE; xenobiotic responsive element

1-2. 背景

aryl hydrocarbon receptor (AhR)は bHLH PAS 型転写因子ファミリーに属しており、リガンドにより活性化される転写因子である [1]。不活性な状態の AhR は主に細胞質に局在し、分子シャペロンである Hsp90 や XAP2、イミュノフィリンである p23 といったタンパク質と複合体を形成している [2-4]。TCDD やベンズ [α] ピレン、3-メチルコラントレンといったリガンドが結合すると AhR は核内に移行し、パートナータンパク質である ARNT と複合体を形成する [5]。このヘテロダイマーは、*CYP1A1* や *CYP1A2* などのプロモーター上流域に存在する外来異物応答配列 (XRE: 5' - TNGCGTG - 3') を認識・結合し、転写を活性化することが知られている [6]。その一方で、プロモーター領域はどのようなメカニズムで変化が起きているかはあまり解明されていない。

CYP1A1 のプロモーター領域の近傍には BTE 配列という GC に富んだ配列が存在しており、GC に富んだ配列には Sp1/ KLF ファミリータンパク質が結合し、転写の制御を調節していると考えられている [7-8]。このファミリーのタンパク質は C 末端側に 3 つの Zn フィンガーモチーフを持っており、この部分を介して GC に富む配列を認識し、それぞれ転写を正または負に調節している [9]。過去の研究では、転写が不活性な時には KLF9 または KLF16 が結合し、活性化時には Sp1 が結合するという、転写因子の置き換えりが起きているのではないかという報告がされた。その一方で、Sp1 は転写の活性化に関係なく常に結合しているという報告もある [10]。この詳細については明らかにされていないが、どちらの場合も、この領域において転写抑制因子がはずれ、転写活性化因子が呼び込まれるという、ダイナミックな複合体の構築がされているのではないかと考えられる。

ヒストンはリンカーヒストンである H1、コアヒストンである H2A、H2B、H3、H4 からなっており、塩基性に富んでいる。そのため酸性の DNA と強く結びつくことができ、DNA をコンパクトに折りたたんでいる。ヒストンの N 末端側は特定の構造をとらないために、アセチル化、リン酸化、メチル化などの翻訳後修飾を受けやすく、これにより DNA との結合に変化が生じ、転写の調節がされている [11]。転写と最も密接な関係にあるアセチル化は、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) 活性を持ったタンパク質である、CBP/p300 や PCAF 複合体により引き起こされる [12]。アセチル化することにより、ヒストンの塩基

性が酸性に傾くことで DNA との結合がゆるみ、様々な転写活性化因子が呼びこまれ、最終的には RNA ポリメラーゼ II がプロモーターに結合し転写が起こる。また、不活性な時にはヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の働きにより、ヒストンは脱アセチル化状態に保たれ、ヒストンと DNA は固く結びついている[13]。このヒストンのアセチル化・脱アセチル化は *CYP1A1* 遺伝子の制御領域においても、その発現にしたがって劇的な変化が起きている[13]。HAT 活性を持ったタンパク質も HDAC のいずれも DNA 結合能は持っておらず、*CYP1A1* の遺伝子上流域においてどのような転写因子を介して作用しているのかも不明である。

CREM はロイシン-ジッパードメインを持つスーパーファミリーに属する転写因子で、cAMP や Ca^{2+} によって活性化され、二量体を形成することで cAMP 応答配列 (CRE: 5' - TGACGTCA - 3') に結合し転写の制御を行う[14,15]。CBP と結合する KID ドメインを持っているので、転写を正に制御できるが、選択的スプライシングにより、転写を負に制御するアイソフォームも確認されている[16,17]。リプレッサー型の CREM は HDAC1 と相互作用して転写を抑制することが知られている[18]。このように標的遺伝子を正あるいは負に制御することができる転写因子である。

CYP1A1 の転写活性化の誘導機構について、AhR のリガンドによる経路 (TCDD) とリガンドによらない経路 (OP) の二つがあると考えられ、私たちの研究室の以前の結果では、アクティベーターの CREM τ がこの転写を正に制御していることが示唆された[19,20]。しかしながら、siRNA による CREM のノックダウンをしたところ、どちらの経路においても *CYP1A1* の転写量が減少してしまう、という結果が得られた。現在までにリガンド非依存的な経路の方が、転写活性化能が低い、あるいは転写の始まりが遅い点以外大きな差は見られていない[21]。しかし、*CYP1A1* の遺伝子上流域には CRE は存在しないが、以前の研究で CREM τ が作用しているシスエレメントは BTE 配列であることも示唆されている[20]。

以上のことより、*CYP1A1* のプロモーター近傍にある BTE 配列は、その遺伝子発現において重要な役割を果たしており、転写因子のダイナミックな変化が起きていることが考えられる。本研究では、主に重要な役割を果たしていると考えられる、Sp1、CREM、CBP、HDAC1 に着目した。Sp1 はその相互作用する相手により転写の制御を変化させるタンパク質であると考えられており、このことより BTE 配列において、転写不活性時には HDAC1 と相互作用し、転写活

性化時には HAT 活性を持つ CBP と相互作用するのではないかと考えた。また、CREM は CBP をリクルートするために必要な因子として考え、この領域におけるこれら転写因子の挙動を ChIP assay により調べた。また、これらのタンパク質が相互作用しているかを、免疫沈降法およびウエスタンブロッティングにより調べた。さらに詳細な転写因子の挙動を調べるために、この領域に作用する他の転写因子を探索しようと DNAP assay を行なったあとにタンパク質を回収し、SDS-PAGE、銀染色法を行った。

1-3. 結果

1-3-1. Sp1 と HDAC1 は相互作用する

遺伝子 *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ト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 90 分間処理した後、タンパク質の全細胞抽出を回収した。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 加え免疫沈降を行ったあとに、ウエスタンブロット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 1A、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 1C)。しかしながら、TCDD、OP 処理いずれの場合もコントロールと比べバンドの濃さに差がないことがわかった。これは特定の遺伝子上流域のみではなく、全てのタンパク質における相互作用であるため、例えば変化があったとしても、ごくわずかなために、ウエスタンブロットティングでは差が確認できないのではないかと考えられた。したがって、*CYP1A1* の遺伝子上流域にしぼって確認する必要があると考え、DNAP assay という方法を用いて、その相互作用を確認しようと試みた。

1-3-2. Sp1 は BTE 配列に結合する

DNAP assay は *in vitro* クロマチン再構築系の実験であり、回収した核抽出タンパク質と、ビオチン化させたある特定の配列のオリゴヌクレオチドを反応させる。この反応により、タンパク質はある特定の配列に結合し、さらにそのタンパク質と相互作用する因子が結合し、DNA-タンパク質複合体を形成する。この複合体にストレプトアビジンを抱合した磁気ビーズを加えると、ビオチン-ストレプトアビジンの特異的な結合が起こり、磁石を用いると、DNA-タンパク質複合体を回収できるという実験系である。この実験系を用いて Sp1、CREM、HDAC1 の BTE 配列への結合をウエスタンブロット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 を 90 分間処理した後、核抽出タンパク質を準備した。1 mg の核抽出タンパク質を用意し、150 mM KCl の濃度になるように塩濃度のみを調節し、これに 5' 末端がビオチン化された BTE 配列のオリゴヌクレオチドを加え反応させた後、複合体を回収し、そのサンプルをウエスタンブロッティングで解析した。その結果を図 2 に示した。CREM 抗体で免疫反応させたものは、バンドがスマアールになってしまい、この領域に結合しているかどうかははっきりと確認できなかった(図 2A)。一方、Sp1 はインプットのサンプルと同じ位置にバンドが確認でき、また、転写の有無に関わらず常に結合していることがわかった(図 2B)。HDAC1 に関しては、転写不活性な状態ではこの領域に強く結合しているが、TCDD で処理すると結合量がかなり減少し、OP の場合でもコントロールに比べ結合量が減少することがわかった(図 2C)。しかしながら、これは *in vitro* の実験系であること、ヒストンの状況が全く無視されていることを踏まえ、より細胞内の状態を正確に反映する ChIP assay でプロモーター領域に作用する因子の解析を行った。

1-3-3. Sp1、CREM は転写の状態に関係なく常に結合している

ChIP assay は細胞内の転写因子の動態を詳細に解析するための実験系で、まず初めにホルムアルデヒド処理することで、DNA-タンパク質の複合体を維持させる。この状態で、PCR がかかりやすくなるように、DNA を超音波破碎により 200~1000bp 程度に断片化し、特異的な抗体を用いることで免疫沈降をし、目的の因子と DNA を回収する。回収してきたサンプルから DNA のみを抽出・精製し、PCR 解析を行う。目的のタンパク質がある特定の DNA 領域に結合していれば、DNA も同時に免疫沈降されているので PCR 解析を行うと、結合していないものと比べて明確な差が出るという手法である。

HepG2 細胞に 5 nM TCDD または 50 μ M OP を 90 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(図 3)を用いた。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 (RNAPII)は不活性な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 倍となっていた。

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

一領域への結合量は変化がなく、常に一定量結合した状態で *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。

1-3-4. *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* ではどのようなになっているかを ChIP assay で調べた。その結果を図 4 に示した。

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な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、TCDD、OP で処理した際に、アセチル化が促進されていることがわかった。これは前述の HDAC1 で脱アセチル化されていたヒストンが、CBP によってアセチル化されたためであると考えられる。

1-3-5. *CYP1A1* プロモーター領域に結合して転写の制御を行なう因子の探索

ChIP assay の結果より、Sp1 や CREM といった転写因子は BTE 配列に作用して、その領域への結合量を変化させることなく、*CYP1A1* の転写調節をしていることがわかった。このことから、これらの因子は転写の状態によって相互作用するタンパク質を変えることで、制御しているのではないかと考えられたため、これらのタンパク質と相互作用する因子を探索しようと試みた。Sp1 と相互作

用する因子の候補としては図 2C で得られた結果のように、以前の研究でも HDAC1 が相互作用するということが知られている[23]。CREM の相互作用する因子の候補としては、HDAC1[18]、CBP/p300[16]が挙げられる。しかしながら、Sp1-HDAC1 以外の相互作用が確認できなかったために、ある特定の遺伝子領域に絞ってその相互作用する因子を探索しようと、DNAP assay により回収したサンプルを用いて銀染色法を行なった。その結果を図 5 に示した。

その結果、コントロール、TCDD 処理、OP 処理で大きな差が見られた部位は多くはないが、いくつかのバンドに差が見られた。白矢印で示したものは、コントロールのみに存在し、TCDD または OP 処理の場合は消失していることが分かった。このバンドのタンパク質は転写を抑制している因子の一つであると考えられる。一方、黒矢印で示したものは TCDD または OP 処理により現れていることから、転写を活性化している因子であると考えられる。特に OP 処理した際に、250kDa 付近に現れたバンドは TCDD 処理の際には見られないバンドである。質量分析(MS 解析)にてこのタンパク質がどのようなものであるか解析しようと試みたが、5 分ほど現像しないとバンドが確認できないぐらい微量のタンパク質であったために、MS 解析に持ち込むことはできなかった。

1-4. 考察

CYP1A1 の転写誘導機構は AhR を中心に解明されつつあるが、プロモーター領域でどのような因子が、どのように転写制御を行なっているかはあまり調べられていない。

これまでの研究では、KLF9 または 16 が BTE 配列に結合し転写を抑制し、シグナルが入ることでこれらがはずれ、Sp1 がリクルートされてくると考えられていた[7-8]。しかしながら、Sp1 は BTE 配列に常に結合しているという報告[10]もある。Sp1 は転写を抑制する HDAC1 と結合することができ[23]、また CBP/p300 とも結合することが知られている[24]。さらに、Sp1 は同じ Sp1/KLF ファミリーの因子と置き換わることで転写の制御を担っており、標的遺伝子によって使い分けているものと考えられる[9]。今回私が行なった ChIP assay、DNAP assay どちらの結果でも、Sp1 は *CYP1A1* の BTE 配列に常に結合していることが証明された (図 3)。また、図 1 より、Sp1 と HDAC1 は相互作用していることがわかったが、TCDD または OP 処理によってこの相互作用に変化は見られなかった。この理由としては、免疫沈降法では特定の遺伝子領域ではなく、全タンパク質での挙動しか見られないために、小さな変化は見るができなかったのだと考えられる。これを踏まえ、DNAP assay により間接的にその相互作用を見たところ、HDAC1 のみが BTE 領域からはずれていることがわかり、Sp1-HDAC1 の相互作用が *CYP1A1* の BTE 領域でも起きている可能性が示唆された。しかしながら、DNAP assay は *in vitro* の実験系であり、生体内の状況を正確に反映しているわけではない点、その相互作用の変化を直接確認できたわけではない点が問題点として挙げられる。この問題点を解決する方法としては、Re-ChIP assay を行なうことで、ある特定の遺伝子上流域における転写因子の相互作用を確認できるものと考えている。

Re-ChIP assay は一回目の免疫沈降法を行なった後、免疫複合体を 1 度軽く洗い、上清をしっかりと除去した後、10 mM DTT (ジチオトレイトール) にて抗体を失活させ、タンパク質-抗体の結合を解除する。これを 50~100 倍希釈した状態で、別のタンパク質に対する抗体で二段階目の免疫沈降を行なう。これにより、2 つの目的タンパク質が、ある特定の遺伝子上流域で相互作用していれば、PCR 反応をさせた際にその遺伝子上流域が増幅されるというものである。今回行った免疫沈降での結果(図 2)からは、Sp1-HDAC1 の相互作用は確認できたが、

CREM と HDAC1 または Sp1 の相互作用は確認できなかった。この原因としては、その相互作用がタンパク質の回収の段階ではずれてしまっているためと考えている。そのため、こちらも Re-ChIP assay を行なうことにより感度が上昇し、さらに特定の領域での相互作用が調べることができると考えている。この相互作用が確認できれば *CYP1A1* プロモーター領域における転写メカニズムの解明に繋がると期待できる。

OP は AhR に結合することなく *CYP1A1* の転写誘導を引き起こすことから、TCDD によるものとは異なる経路をたどっているものと考えられ、リガンド非依存的な経路と位置付けられている。OP による転写誘導はマウス Hepa-1 細胞では起こらず、ヒト HepG2 細胞、MCF-7 細胞、Caco-2 細胞では起こることが知られている[19,20]。この生物間の違いを利用して、我々の研究室では、Hepa-1 細胞と HepG2 細胞のハイブリッド細胞を作製し、継代を重ねるごとに OP による感受性がどのように変化するかを確認していった。ハイブリッド細胞は、継代を重ねるごとにヒトの染色体が脱落していき、ある時点で OP による感受性が失われた。その時に失われたものが何であるかを調べた結果、ヒト 10 番染色体短腕部分に存在することがわかった[19]。さらに詳細に調べた結果、その遺伝子は CREM であることがわかった[20]。

CREM には様々なアイソフォームが存在し、同定されたのは CREM τ というアクティベーターである。siRNA により CREM τ をノックダウンし、TCDD または、OP 処理した際の *CYP1A1* の mRNA を逆転写リアルタイム PCR で確認したところ、CREM τ 約 90%ノックダウンで、OP の場合は約 70%転写量が減少した。しかしながら、TCDD の場合でも同程度の減少が見られた[下山修司、卒業論文参考:2008 年 9 月]。このことから、ヒトの場合、CREM τ は *CYP1A1* の転写誘導に必須の因子なのではないかという示唆が得られた。

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[15]。CREM 自身は PKA や CaMK IV 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 [15-18]。

CYP11A1 の遺伝子上流域について調節領域があるかどうかを調べたところ、CRE は存在していなかった。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[25-26]。このような配列であれば *CYP11A1* 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、転写の状態によらず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[17]。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。HDAC1 と CREM の相互作用が確認できなかった(図 1) 原因としては、HDAC1 の分子量 (約 58kDa) とウサギ抗体の H 鎖の分子量 (約 55kDa) がかなり近く、HDAC1 と相互作用していたとしても、バンドが重なってしまうためであると考えている。この問題点を解消するには、免疫沈降する際に、抗体と Dynabeads Protein G をあらかじめ架橋したものをを用い、溶出の際も SDS サンプルバッファーを入れずに、1 M グリシンでの溶出が有効であると考えている。これにより、抗体の H 鎖がサンプルに溶出される量は劇的に減少すると考えているので、この方法を用いて再度免疫沈降法による CREM と HDAC1 の相互作用を確認したいと考えている。また、CREM と CBP の相互作用の確認は今までに行っていないので、こちらも同様に行っていきたいと考えている。また、CREM は PKA や CaMKIV によってリン酸化されるが、転写の状況によってこのリン酸化がどのように変化しているのかも、免疫沈降法およびリン酸化抗体を用いたウェスタンブロッティングを用いて、確認したいと考えている。

ヒストンのアセチル化は電荷の偏りを解消することで、DNA-ヒストンの結合を緩ませ、ヘテロクロマチン状態からユークロマチン状態へと変化させる。これにより様々な因子が呼びこまれ、転写促進複合体が形成される[12]。特に大きな変化が見られるのが、ヒストン H3 の 9 番目のリシン残基であり、ここのアセチル化は転写活性化の目安にもなっている。そのほかにも H3K14 や K16 もアセチル化される[12]。マウスの *CYP11A1* の転写が活性化している時には、この部位のアセチル化がプロモーターでは大きく亢進していること、さらに、H3S10 のリン酸化や、H3K4 のトリメチル化が促進されていることも知られている[27]。このように様々なヒストンの修飾が複雑に絡み合っていて、転写の制御をしていることが、2000 年 Allis らによって「ヒストンコード仮説」として提唱されている[28]。ヒストンの翻訳後修飾の状態を調べることで、どのような因子がその修飾を引き起こしているのかを調べることができる。H3S10 のリン酸化を引き起こすものとしては、JNK (c-jun N-terminal kinase) や Aurora B kinase が挙げられる[29-30]。これらは酵素であるため、複合体を形成するというよりは修飾したら速やかに離れるということを繰り返していると考えられるが、転写を活性化させるために必要な因子である。

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。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、周辺の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 II がリクルートされ、*CYP11A1* の転写が起きているのではないかと考えている。

今後の展望としては、Re-ChIP assay により、*CYP11A1* 遺伝子上流域での目的タンパク質の相互作用を中心に解明していきたいと考えている。タンパク質を DSP (dithiobis succinimidyl propionate) で架橋することで、相互作用を保持した状態でタンパク質の回収を行えば、相互作用している因子の確認ができるのではないかと考えている。さらにこの領域に作用する因子を DNAP assay や免疫沈降法を用いて探索し、MS 解析によりこれらを同定し、siRNA によるノックダウンをすることで *CYP11A1* の転写への影響を調べることができると考えられる。

【第二章 Sp1 の脱リン酸化と PP2A の関与】

2-1. 要旨

Sp1 は遺伝子 *CYP1A1* の発現調節をしていることが報告されているが、詳細なメカニズムは解明されていない。そこで、Sp1 が *CYP1A1* のプロモーター領域にどのように作用しているのかを調べた。以前の私の実験結果より、Sp1 は *CYP1A1* の転写の状態に関係なく、常に結合していることがわかった。さらに、相互作用する相手を変えることで、転写の調節を担っているのではないかと予測できた。これは 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 や OP 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。この状態の時に、*CYP1A1* の転写は OA により阻害されていることも確認できた。また、同様の結果が PP2A に対する siRNA でも得られた。また、PP2A/Sp1 へのシグナルがどのように伝達されているかを調べるために、AhR のノックダウンを行い、TCDD や OP による pSer-59 の変化を調べたが、ノックダウンの有無による差は見られなかった。さらに、OA は AhR の細胞質内での発現量や核移行、XRE への結合能には全く影響がなかった。これらの結果は、PP2A/Sp1 へのシグナルは AhR とは独立した経路であることを示している。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^{2+} 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ことから、 Ca^{2+} が PP2A を活性化することで、Sp1 を脱リン酸化している可能性を示している。

以上のことから、TCDD や OP により Ca^{2+} 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 と協調して働くことで、*CYP1A1* の転写を活性化していることが示された。

【略語】

- CDK2; cyclin-dependent kinase 2
- DHFR; dehydrofolate reductase
- MAPK; mitogen-activated protein kinase
- OA; okadaic acid
- PP2A; Protein Phosphatase type 2A
- RNAi; RNA interference
- VEGF; vascular endothelial growth factor

2-2. 背景

遺伝子 *CYP1A1* のプロモーター上流域には GC-rich な BTE と呼ばれる調節領域があり、ここには転写因子である Sp1 が結合することがわかっているが、どのように転写の調節を担っているかはわかっていない。Sp1 は C₂H₂-type Zn finger motif を C 末端側に持っており、ここを介して DNA に結合することができる[31]。Sp1 は自身の翻訳後修飾の変化によって、標的遺伝子の選択とその発現調節を担っているとされている。様々な翻訳後修飾とその部位があるが、転写と密接な関係があるとされているのは、59 番目のセリン残基と 453 番目のスレオニン残基のリン酸化である(Ser-59、Thr-453) [32]。Ser-59 は CDK2 によりリン酸化され *DHFR* 遺伝子の転写が活性化され[33]、PP2A によって脱リン酸化されることで *CREM* 遺伝子の転写が活性化される[34]。この相反した現象は、Sp1 のリン酸化と標的遺伝子の転写調節は、ひとつのアミノ酸部位の翻訳後修飾によるものではなく、複数の部位のリン酸化やアセチル化が関係することを示している[32]。また、Thr-453 は MAPK によってリン酸化されることで *VEGF* 遺伝子の転写を活性化するという事も知られている。しなしながら、*CYP1A1* において、Sp1 のこれらのアミノ酸部位のリン酸化状態がどのように変化し、転写調節が行なわれているかはわかっておらず、これらの部位のリン酸化状態の変化に着目した。

PP2A は A (scaffold), B (regulatory), C (catalytic) の 3 つのサブユニットからなり、タンパク質中のセリン/スレオニン残基のリン酸化を取り除く、脱リン酸化酵素である[35]。A サブユニットは、B と C サブユニットを繋ぐ働きをしており、B サブユニットは細胞内での局在と標的タンパク質の選択に寄与している[36]。PP2A の標的タンパク質は多岐に渡り、それらのリン酸化状態を調節することで、細胞の生と死、発生と分化、代謝など幅広い生命活動の調節をしている[37]。PP2A の活性は、C サブユニットのメチル化によって制御されているという報告があるが、生体内ではほぼ常に活性状態にある。しかし、標的の選択は B サブユニットが担っており、B サブユニットへも何らかのシグナルが必要であると考えられている。近年の研究結果では、Ca²⁺の濃度上昇に従い PKC α が活性化され、PKC α が PP2A の B サブユニットのひとつである B56 α の 41 番目のセリン残基をリン酸化し、活性を調節しているという報告もある[38]。

また、TCDD や OP は Ca²⁺の濃度上昇を引き起こし、これにより *CYP1A1* の

転写を活性化しているという報告もある[39-41]。このことより、TCDD や OP のシグナルはCa²⁺を介してPP2Aへと伝えられ、Sp1 のpSer-59を脱リン酸化し、脱リン酸化されたSp1とTCDDやOPからのシグナルを受け取ったAhRが協調して働くことで、*CYP1A1*の転写を誘導しているのではないかと推測した。

本研究では、Sp1のSer-59とThr-453のリン酸化状態に着目し、これらがTCDDやOPによってどのように変化するのか、そして*CYP1A1*の転写調節にどのような関わっているのかを解明し、*CYP1A1*の詳細な転写メカニズムを明らかにすることを目的とした。

2-3. 結果

2-3-1. Sp1 と HDAC1 は *CYP1A1* プロモーター上流域で相互作用している

前章で示したように、Sp1 は *CYP1A1* の BTE 領域に結合しているが、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てきた。また、Sp1 は転写抑制因子である HDAC1 や転写活性化因子である CBP と相互作用することが知られていたため、転写の前後でこれら因子との相互作用が変化しているのではないかと推測した。そこで、Re-ChIP assay と言われる ChIP assay の免疫沈降の過程を二回行う実験を行ない、*CYP1A1* の BTE を含むプロモーター領域で Sp1 が HDAC1 や CBP と複合体を形成しているかどうかを調べた。HepG2 細胞を cont, 5 nM TCDD または 50 μ M OP で 90 分処理したものを Re-ChIP assay のサンプルとした。その結果、TCDD や OP で誘導をかけていない際には、Sp1 は HDAC1 と複合体を形成しているが、TCDD や OP 存在下ではこの複合体がはずれ、代わりに Sp1 は CBP と複合体を形成していることがわかった。この際、Sp1 自身の結合量は全く変化しなかった。また、RNAPII は転写の活性状態を示す指標として用いた(図 7)。

2-3-2. Sp1 の Ser-59 は TCDD や OP 処理により脱リン酸化される

前述したように、Sp1 は自身の BTE への結合量は変化しないが、相互作用する相手を変えることで *CYP1A1* の転写を調節していることがわかった。そこで、なぜ相互作用する相手が変わるのか、という疑問が生まれ、それは Sp1 の翻訳後修飾に起因するのではないかと考えた。転写と密接な関係にあるとされているのは、Ser-59 と Thr-453 であり、それぞれ脱リン酸化、リン酸化で標的遺伝子の転写が活性化するとされている。そこで、TCDD や OP 処理をした際に、この部位のリン酸化状態がどのように変化するかを、部位特異的抗体を用いた Western blotting で確認した。HepG2 細胞を cont, 5 nM TCDD または 50 μ M OP で 90 分処理後、核タンパク質を抽出し、それをサンプルとして用いた。その結果、59 番目のセリン残基がリン酸化されたもの(pSer-59)は TCDD や OP により大きく減少し、453 番目のスレオニン残基がリン酸化されたもの(pThr-453)は特に大きな変化はなかった(図 8)。

2-3-3. Sp1 の Ser-59 のリン酸化レベルの減少は OA により阻害される

Sp1 の pSer-59 は TCDD や OP により減少することがわかったが、これはこの部位をリン酸化する酵素の活性が低下した、あるいは脱リン酸化酵素が積極的に働いた、という二つの原因が考えられた。リン酸化レベルの減少が大きいこと、この部位を脱リン酸化する酵素が PP2A であるということがすでに知られていたことから、積極的に脱リン酸化されているのではないかと考え、PP2A の阻害剤である OA を用いた。TCDD や OP 処理の前に 2 時間、50 nM の OA で処理した結果、TCDD や OP による pSer-59 の減少は抑制され、コントロールと同じレベルにまでリン酸化状態が保たれていることがわかった(図 9)。

2-3-4. OA により CYP1A1、CYP1B1 の転写は抑制される

OA 処理した際に、pSer-59 の脱リン酸化は抑制されたことから、この際に CYP1A1 の転写がどのように変化するかを qRT-PCR により調べた。OA で 2 時間前処理をし、その後 24 時間 TCDD や OP で処理した細胞をサンプルとした。OA をこと前に処理しておいた細胞では、TCDD や OP による CYP1A1 の転写が起こらなかった(図 10A)。同様に AhR によって制御されている遺伝子である CYP1B1 も OA により転写が抑制された(図 10B)。また、AhR は転写に関係ないが、Sp1 によって転写が制御されている遺伝子である CREM は TCDD や OP、あるいは OA によって転写に変化は見られなかった(図 10C)。

2-3-5. PP2A の siRNA は Sp1 の pSer-59 の脱リン酸化と CYP1A1 の転写を抑制する

OA は *in vitro* の実験では、PP1 や PP2B といった PP2A 以外の脱リン酸化酵素も阻害するということが知られていたため、より PP2A の関与を確実にするため、siRNA を用いた実験を行なった。PP2A に対する siRNA を二種類用意し、それぞれのノックダウン効率を Western blotting で確認したところ、#2 がより強くノックダウンできることがわかった(図 11A)ので、これを用いて以降の実験を行なうこととした。PP2A ノックダウン時に、TCDD や OP による Sp1 の pSer-59 の減少は抑制され(図 11B)、また CYP1A1 の転写も大きく減少した(図 11C)。

以上の結果より、TCDD や OP から何らかのシグナルを受け取った PP2A が、Sp1 の Ser-59 を脱リン酸化し、*CYP1A1* の転写を活性化していることが示された。

2-3-6. AhR のノックダウンは Sp1 の Ser-59 の脱リン酸化に影響しない

TCDD や OP から PP2A へのシグナル経路を解明するにあたり、*CYP1A1* の転写を調節している中心分子である AhR との関係性を調べた。まず、TCDD や OP のシグナルが AhR に伝わり、そこからさらに何らかのシグナルで PP2A が活性化しているのではないかと考えた。AhR をノックダウンした際(図 12A, B)に、Sp1 の Ser-59 のリン酸化状態がどのように変化するのかを調べた。その結果、AhR をノックダウンしても TCDD や OP による Ser-59 の脱リン酸化には全く影響がないことがわかった(図 12A, C)。このことより、PP2A へのシグナルは AhR とは独立した経路であることが示唆された。

2-3-7. OA は AhR の細胞質内での存在量、核移行、XRE への結合には影響しない

OA 処理により Sp1 の Ser-59 の脱リン酸化および *CYP1A1* の転写が抑制されることがわかった。しかしながら、*CYP1A1* の転写が起こる際に、PP2A が AhR を活性化している可能性もあり、それが実際に起きているかどうか、OA 処理した際の AhR の存在量、核移行、XRE への結合を調べた。もし、これらが OA により減少していれば、PP2A は AhR の安定化や核移行、XRE への結合に必要であるということが言える。実験の結果、OA を処理しても、AhR の細胞質内での発現、核移行(図 13A)、XRE への結合(図 13B)はいずれも変化がなかった。以上のことより、PP2A は AhR そのものには全く影響を与えることなく *CYP1A1* の転写を制御していることがわかった。

2-3-8. Sp1 の Ser-59 がリン酸化されているものは BTE に結合している

Ser-59 が TCDD や OP により脱リン酸化されるという結果は、核抽出タンパク質を用いたものであるため、それが *CYP1A1* の BTE に限定された結果ではなかった。実際に BTE において Sp1 の Ser-59 が脱リン酸化されているのかどうか、

転写の状態によりリン酸化状態はどのように変化しているのかを、ChIP assay を用いて調べた。その結果、転写が起きていない際には pSer-59 が結合しているが、TCDD や OP 存在下では、結合していないことがわかった(図 14)。また、OA をこと前に処理しておいた際は、pSer-59 は TCDD や OP 存在下でも結合を保ったままであることがわかった。この際、Sp1 全体の結合量は転写の状態に関係なく一定量であり、Ser-59 のリン酸化状態だけが変化していることが分かった。

以上のことより、*CYP1A1* の BTE を含むプロモーター領域でも Western blotting の結果同様に、TCDD や OP により Sp1 の Ser-59 が脱リン酸化されていることがわかった。

2-3-9. OA により Sp1-HDAC1 の複合体が維持される

Sp1 の翻訳後修飾により相互作用する相手が変わる、という推測の元に実験を行なって来たので、その相手がどのように変化するのかを調べた。Re-ChIP assay により、BTE を含む *CYP1A1* プロモーター領域での Sp1-HDAC1、Sp1-CBP の複合体の形成について調べた。その結果、OA をこと前に処理しておくことで、Sp1-HDAC1 の複合体が維持され、Sp1-CBP の複合体が形成されなくなっていることがわかった(図 15)。これは Sp1 の Ser-59 が脱リン酸化されなくなったためだと思われる。

2-3-10. Ca^{2+} キレーターである BAPTA-AM により、Ser-59 の脱リン酸化および *CYP1A1* の転写が起こらなくなる

BAPTA-AM を用いると、細胞内の Ca^{2+} がキレートされ、 Ca^{2+} によるシグナル伝達が抑制されるが、これを用いると TCDD や OP による *CYP1A1*, *CYP1B1* の転写が抑制されるということが分かった(図 16B, C)。この現象はすでに報告されていたが[39-41]、詳細なメカニズムはわかっていなかった。そのため、 Ca^{2+} のシグナルが PP2A へと伝達されているのではないかと考え、BAPTA-AM 存在下で Sp1 の Ser-59 のリン酸化状態がどのように変化するのかを調べた。その結果、BAPTA-AM は AhR の細胞質内での存在量、核移行に影響を与えないが、TCDD や OP による Sp1 の Ser-59 の脱リン酸化を抑制することがわかった(図

16A)。これにより、TCDD や OP が何らかのメカニズムで Ca^{2+} のシグナル伝達を活性化し、AhR に影響を与えることなく PP2A の活性化を引き起こし、*CYP1A1* の転写を誘導しているのではないかと考えられた。

2-4. 考察

2-4-1. TCDD と OP の経路の違い

この実験の目的のひとつは、TCDD、B[α]P のような AhR のリガンドとなる物質と、OP のような AhR のリガンドではないが、AhR を活性化する物質のシグナル伝達の経路の違いを解明することであったが、明確な差は見ることができなかった。現在までに TCDD と OP による *CYP1A1* の転写誘導機構で大きく異なる点は、PKA 阻害剤である H-89 を用いた際に、OP による *CYP1A1* の転写は抑制されるが、TCDD の経路は阻害されない、という報告のみである[19]。PKA はセリン・スレオニン残基をリン酸化する酵素であり、様々なタンパク質を標的とし、細胞の生と死、分化や代謝などに関わっている。細胞質、核いずれにも存在し、転写因子も標的となっているが、OP による *CYP1A1* の転写にどのように寄与しているかはわかっていない。TCDD と OP のシグナル伝達の違いは PKA の関与の有無だけである点[20]、OP の直接の標的がわかっていないという二点から、今回の実験では違いについて解明することができなかった。

2-4-2. Sp1、PP2A と *CYP1A1* の転写活性化について

Sp1 は基本転写因子 (TFIIs) 以外の転写因子では最も早くに同定され、数百から数千のおよぼ遺伝子の調節をしていることがわかっているが、どのように標的遺伝子の転写を調節しているかはあまり解明されていない。同じファミリータンパク質である KLF や Sp2,3 などとの置換が起こるとされているが、なぜ置き換わるのか、詳細なメカニズムは翻訳後修飾に起因すると考えられている[32]。その中でもリン酸化は転写と密接な関係にあるとされており、Ser-59 は脱リン酸化、Thr-453 はリン酸化で標的遺伝子の活性化をすることが示されている。*CYP1A1* の転写において、これらがどのように変化するかを確認したところ、pThr-453 は大きな変化は見られなかったが、pSer-59 は TCDD や OP により大きく減少することがわかった。さらに、これは OA による阻害や PP2A のノックダウンにより抑制されたことから、PP2A が積極的に脱リン酸化していることを示した。また、*CYP1A1* の転写誘導も大きく抑制された。しかしながら、OA では完全に抑制されたのに対し、siRNA の場合、PP2A のノックダウン効率が高い

にもかかわらず、OA ほどの効果は見られなかった。OA の阻害効果が *in vitro* では PP2A (IC₅₀ = 0.1 nM)、PP1 (IC₅₀ = 15–20 nM)、PP2B (>1 μM)であり、今回実験で用いた濃度は 50 nM であるため、PP1 も阻害されている可能性がある。OA による PP2A の阻害、siRNA によるノックダウンの結果の違いは、PP1 が AhR や Sp1、他の *CYP1A1* の転写に関与する因子に影響を与えているのではないかと推測できる。しかしながら、PP1 に関しては調べていないので、詳しいことはわからなかったが、PP2A が *CYP1A1* の転写において、Sp1 の Ser-59 を脱リン酸化し、活性化するということが本研究で明らかになった。

2-4-3. PP2A の B サブユニットと活性化メカニズムの予想

PP2A は A, B, C の 3 つのサブユニットからなり、B サブユニットは PP2A の局在と基質の選択性、および C サブユニットの活性化に寄与している[35-37]。B サブユニットは B, B', B'', B''' という 4 つのサブタイプに分類され、それぞれ特徴的なタンパク質相互作用ドメインを持っており、どの B サブユニットが Sp1 を認識しているのかが重要である。B サブタイプは 4 種類存在し、ほぼ全ての組織で発現している。WD repeat を持っており、主に細胞質内にあるタンパク質を基質としている。B' サブタイプは 5 種類あり、主に脳、心臓、筋肉に発現しており、ARM repeat を持っており、細胞質にも核にも存在している。B'' サブタイプは 3 種類あり、EF-hand motif を持っており、主に核に存在している。B''' サブタイプは 2 種類あり、脳に多く存在し、細胞質に局在している。また、B サブタイプと同じく WD repeat を持っており、CaM 結合能も保持している。これらの mRNA 量を簡易 RT-PCR で調べ、それぞれの特徴をまとめたのが図 17 である。この中で注目したのは、EF-hand motif を持った、B'' サブタイプである。B'' サブタイプ(PR72, PR130, PR48, G5PR)の EF-hand motif は 30 ほどのアミノ酸からなる Ca²⁺結合ドメインであり、Ca²⁺を配位することで活性化されるということが知られている[以上、UniProt より]。したがって、Ca²⁺がリガンドとなってこれらが活性化し、基質の選択や酵素活性を調節しているのではないかと考えた。以前の研究で、TCDD や oltiplaz は Caco-2 細胞において、細胞内 Ca²⁺を上昇させるという報告がある[39]。これと同様に HepG2 細胞でも細胞内 Ca²⁺が上昇しているのではないかと考えられる。実際、BAPTA-AM を処理すると、Sp1 の Ser-59 の脱リン酸化は抑制され、*CYP1A1* の転写も抑制される。また、Ca²⁺

の濃度上昇に従い、PKC α が活性化され、PP2A の B サブユニットである B56 α の Ser-41 がリン酸化される。これにより PP2A が活性化するというメカニズムが報告されている[38]。さらに、Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase I α 経路による CYP11A1 の転写も報告されている[41]ことから、Ca²⁺が重要であることが示されており、今回の実験ではその経路のひとつとして PP2A/Sp1 が確認できた。どの B サブユニットが Sp1 を認識しているのか、PP2A の活性そのものは上昇しているのか、など解明できなかった部分もあるが、STRING(<http://string-db.org/>)や PSIVER (<http://tardis.nibio.go.jp/PSIVER/>)による相互作用予測を用いて、関与しているであろう B サブユニットを絞り込み、ロックダウンすることで Sp1 の脱リン酸化への影響を調べたり、Ca²⁺に応じて蛍光を発する Furo-4 などを用いて解明することができるかと期待できる。

2-4-4. PIN1 と Sp1 の関係

Sp1 がなぜ脱リン酸化されるような構造になっているのかというのも重要な点である。リン酸化／脱リン酸化はそれぞれリン酸化酵素／脱リン酸化酵素による調節を受け、拮抗的に作用することで細胞内の様々な現象に関与している。リン酸化されたアミノ酸部位がタンパク質の表面に出なければ脱リン酸化されることはない。そのため、リン酸化されたアミノ酸残基を覆うようにしてリン酸化状態を保つシャペロンである 14-3-3[42]や、異性化することでリン酸化を保つ PIN1[43]などの働きが重要であると考えられる。このうち、PIN1 は STRING による Sp1 との結合予測や、Sp1 が PIN1 による認識部位を持っていることから、PIN1 によって、Sp1 の脱リン酸化が調節されている可能性がある。PIN1 はリン酸化 Ser/Thr-Pro を認識して、*cis* 型に変換する異性化酵素であり、リン酸化状態を保持することで安定化に寄与する。通常のペプチド結合の場合、C-N は二重結合性を帯びた単結合であり、容易に *cis-trans* の異性化は起こりづらく、ほとんどが *trans* 型となっている。しかしながら、Pro の場合は、五員環の中の N 原子が主鎖の C と結合した特殊なペプチド結合であり、通常のペプチド結合とは異なり、単純な単結合であり、容易に *cis-trans* の異性化が起こりやすい。PIN1 は Pro の N 末端側がリン酸化された Ser/Thr である部位を認識することができ、この部位を *cis* 型に異性化する。これによりリン酸化された Ser/Thr がタンパク質の内部に入り込み、脱リン酸化されにくい状態にし、安定化している。そこ

で、Sp1 の Ser-59 は PIN1 によって認識される配列かどうか調べた所、Ser-Pro という配列があるのが確認できた(図 18)。また、様々な生物種でアライメントした結果、広く保存されていることもわかり、重要な部分である可能性が示された。このことを踏まえ、TCDD や OP のシグナルが入った場合、PIN1 の活性が低下し、Sp1 の pSer-59-Pro の *cis* 型を保てなくなり、*trans* 型へと異性化するのではないかと推測した。これにより pSer-59-Pro がタンパク質の表面に露出し、PP2A により脱リン酸化されているのではないかと考えた。しかしながら、これらに関する実験データがない点、Sp1 の結晶構造が一部しか解析されていない点も含め、PIN1 の関与は確認できていないが、可能性のひとつとして示した。

2-4-5. *CYP1A1* 転写活性化メカニズムの新しい経路

AhR は *CYP1A1* の転写を担う中心分子であり、TCDD や OP からのシグナルを受け取っている。AhR のノックダウンは Sp1 の Ser-59 の脱リン酸化に全く影響しなかった。さらに、PP2A の阻害剤である OA は、AhR の細胞質内での発現量、核移行、XRE への結合に影響を与えなかった。これらのことから、TCDD や OP からのシグナルは、AhR と PP2A/Sp1 の二つの経路へ独立して伝達されているのではないかという示唆が得られた。以上を踏まえ、今回の実験で明らかになった *CYP1A1* の転写制御メカニズムのモデル図を示した(図 19)。TCDD や OP からのシグナルはまず AhR へと伝えられる。AhR は核移行をし、核内パートナータンパク質である ARNT と二量体を形成する。この二量体は標的遺伝子の調節領域である XRE に結合する。それと平行して、Ca²⁺の濃度上昇が引き起こされる。Ca²⁺により、PKC α が活性化され、PP2A のリン酸化および活性化を引き起こし、Sp1 の Ser-59 を脱リン酸化する。これにより、HDAC1 が Sp1 からはずれ、代わりに HAT 活性を持ったタンパク質である CBP が呼び込まれ、周辺のヒストンをアセチル化して、*CYP1A1* の転写が活性化するのではないかと考えられる。

[3. 実験材料と方法]

3-1. 細胞培養

ヒト肝臓ガン細胞 HepG2 細胞、ヒト乳ガン細胞 MCF-7 細胞、ヒト腸上皮細胞である Caco-2 細胞は American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) から購入し、5% FBS (Biosource, Rockville, USA)、ベンジルペニシリン、ストレプトマイシンを含む Dulbecco's modified Eagle's medium (D'MEM, Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) で 37°C, 5% CO₂ / 95% air の条件で培養した。

3-2. RNA の抽出、逆転写反応、リアルタイム PCR

RNA の抽出はグアニジン酸フェノール-クロロホルム法により行った[21]。1.0×10⁶ 個の HepG2 細胞をまき、翌日それぞれのディッシュに dimethyl sulfoxide (DMSO) で溶かした 5 nM TCDD または 50 μM OP を加え、2 時間、4 時間、6 時間処理した。細胞はメディウムごと回収し、-80°C にて凍らせた。これに solution D (4 M guanidium thiocyanate, 25 mM sodium citrate pH7.5, 0.5% sarcosyl, 100 mM 2-mercaptoethanol) を 500 μl 加え、超音波破碎機 (SONICS & Materials, INC: VCX - 130PB 130W model, Newtown, CT, USA) にて破碎した。その後、2 M NaOAc (pH4.0)、フェノール、クロロホルム/ イソアミルアルコールを加え、30 秒間ボルテックスにかけた。14,000×g, 4°C にて 15 分間遠心分離し、水層を別のチューブに移した。その半分量のイソプロパノールを加え、-30°C にて一晩インキュベートした。同様に遠心分離後、上清を捨て、RNA ペレットを 100 μl の solution D と 100 μl のイソプロパノールにて懸濁し、-30°C にて一晩インキュベートした。同様に遠心分離後、上清を捨て 70% EtOH で RNA のペレットを洗い、10 分間真空乾燥させた。50 μl の DEP 処理水で懸濁し、RNA 量を定量した。5 μg の RNA を量りとり、oligo (dT) 20 (5 μM) になるように DEP 処理水を加え、全量を 11 μl とした。これを 70°C で 5 分間処理し、その後氷上にてインキュベートした。さらに reverse transcriptase (Fermentas, UAB, Vilnius, Lithuania) のガイドラインに従って、逆転写反応をさせた。RT buffer, 1 mM dNTP, RNase inhibitor 8U, reverse transcriptase 200U を混ぜ、42°C で 60 分間インキュベートして逆転写反応を進め、70°C で 10 分処理することで反応を停止させた。反応後の溶液に 80 μl の TE buffer

を加え、-80°Cにて保存した。

この溶液のうち4 µl を SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) によるリアルタイム PCR 解析に用いた。*CYP11A1*、*CYP11B1*、*CREM*、*GAPDH* の鋳型 DNA 量は Light Cycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) にて定量した。95°Cで5分間加熱後、95°C、5秒間で変性、55°C、10秒間でアニーリング、72°C、15秒間で伸長反応をさせ、これを40サイクル行った。あらかじめ作成したスタンダードをもとに、検量線法にてそれぞれのコピー数を測定した。以下にこの反応に用いたプライマーの配列を示した。human *CYP11A1* forward; 5'-GTA TCG GTG AGA CCA TTG CC-3', reverse; 5'-TCT CAA GCA CCT AAG AGC GC-3', human *CYP11B1* forward; 5'-ATG CCC ACG TTG GTC TCT AC-3', reverse; 5'-CAT AAA GGA AGG CCA GGA CA-3', human *CREM* forward; 5'-CCA GAT CCG AGC TCC TAC TG-3', reverse; 5'-AAG CAC AGC CAC ACG ATT TT-3', human *GAPDH* forward; 5'-CAT CAC CAT CTT CCA GGA GC-3', reverse; 5'-GGA TGA TGT TCT GGA GAG CC-3'。GAPDH は内在性コントロールとして、それを元にそれぞれの遺伝子の発現量を、比として表した。

3-3. 全細胞抽出分画と核抽出分画

メディアウムを除去後、冷えた PBS (-) で2回細胞を洗い、その後細胞をかき集め、290×g、4°Cで5分間遠心した。上清を除去後、細胞のペレットに lysis buffer (20 mM HEPES pH7.9, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA pH7.9, 0.5% TritonX-100, Complete® protease inhibitor cocktail [Roche Diagnostics, Mannheim, Germany], 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM Na₂MoO₄) を加え、氷上で15分間インキュベートした。超音波破碎機にて細胞を破碎した後、20,000×g、4°Cで20分間遠心し、上清を全細胞抽出分画とした。

核の分画法は次に示した論文を参考に行った[22]。細胞を回収後、細胞のペレットの五倍量の hypotonic buffer A (20 mM HEPES pH7.9, 10 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT) を加え、氷上で15分間インキュベートした。290×g、4°Cで5分間遠心したのち、hypotonic buffer B (hypotonic buffer A に Complete® protease inhibitor cocktail, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM Na₂MoO₄を加えたもの) を1 ml 加え、Dounce homogenizer (WHEATON MILLVILLE, New Jersey, USA) にて40回ホモジナイズした。3,300×g、4°Cで5分間遠心し、核ペレットを hypotonic

buffer A で3回洗った。核ペレットに high salt buffer (20 mM HEPES pH7.9, 400 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, Complete® protease inhibitor cocktail, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM Na₂MoO₄) を加え、氷上で30分間おだやかに攪拌した。20,000×g, 4°Cで30分間遠心したのち、その上清を核抽出分画とした。

それぞれのサンプルのタンパク質濃度は Bio - Rad protein reagent (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA) を用いて Bradford 法で測定した。

3-4. 免疫沈降法

1 mg の全細胞抽出分画に 1 µg の抗体を入れ、4°Cで一晩回転反応させた。その後 5 µl の Dynabeads Protein G (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) を加え、4°Cで2時間回転反応させた。免疫複合体は immunoprecipitation buffer (20 mM HEPES pH7.9, 0.1% Triton X-100, 400 mM KCl, 10% glycerol, 1 mM EGTA pH7.9, 0.1% Tween20) で3回、wash buffer (20 mM HEPES pH7.9, 150 mM KCl, 10% glycerol, 1 mM EGTA pH7.9, 0.1% Tween20) で3回洗浄し、回収したビーズに SDS サンプルバッファーを加え煮沸した。遠心後、その上清を SDS-PAGE に用いた。

3-5. DNA affinity precipitation (DNAP) assay

1 mg の核抽出タンパク質を用意し、low salt buffer (20 mM HEPES pH7.9, 3 mM MgCl₂, 10% glycerol, Complete® protease inhibitor cocktail, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM Na₂MoO₄) を加え、150 mM KCl の濃度になるように調整した。このサンプルに 20 µl の Streptavidin Magnetic Beads® (S1420S, NEW ENGLAND Biolabs, Inc., Ipswich, MA, USA) を加え、4°Cで2時間回転反応させた。磁石で Magnetic beads を回収し、上清を別のチューブに移した。これに 1 µg のヒト *CYP11A1* 遺伝子 BTE 配列のアニーリング済み 5'ビオチン化プローブ (センス鎖 5' - CAG GGA AGG AGG CGT GGC CAC AC - 3', アンチセンス鎖 3' - GTC CCT TCC TCC GCA CCG GTG TG - 5') と 10 µg の poly (dI-dC) を加え、4°Cで2時間回転反応させた。5 µl の Streptavidin Magnetic Beads を加え、4°Cで1時間回転反応させた。オリゴヌクレオチド-タンパク質複合体は Wash buffer (20 mM HEPES pH7.9, 150 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10% glycerol, 0.1% TritonX-100, 0.1% Tween20) で3回洗い、SDS サンプルバッファーを加え、SDS-PAGE を行なった。

3-6. SDS - PAGE, 銀染色法, Western blotting

サンプルは SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) にて泳動し、続いて PVDF 膜 (Amersham Biosciences, London, UK) に 30V で一晩かけて転写させた。膜は 5 % スキムミルクにて室温で 90 分間ブロッキングした。一次抗体は 4°C で一晩、二次抗体は室温で 90 分間回転反応させた。二次抗体として用いたヤギ抗ウサギ抗体-HRP、ウサギ抗マウス抗体-HRP は DAKO (Glostrup, Denmark) から購入したものをを用いた。免疫複合体は enhanced chemiluminescence (ECL) または ECL plus kit (Amersham Biosciences, London, UK) または Immunostar® (WAKO, Osaka, Japan) にて検出した。

銀染色法は銀染色 MS キット (WAKO) のガイドラインに従って行った。電気泳動後のゲルは固定液 1 (50% EtOH、5% 酢酸) で 20 分、固定液 2 (50% EtOH) で 10 分間振とうさせたあと、DW にて 10 分洗浄した。さらに増感液で 1 分、続いて DW で 1 分を 2 回、染色液で 20 分、DW で 1 分を 2 回という作業をした後、現像液に浸して、バンドが現れるまで振とうさせながら反応させた。染色像が得られてから停止液を加え、反応を止めた。

3-7. Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assay, Re-ChIP assay

2.0×10^6 個の HepG2 細胞を 10 cm ディッシュにまき、24 時間培養した。それぞれのディッシュに 5 nM TCDD または 50 μ M OP を加え、90 分間処理した。タンパク質と DNA の複合体は 1% ホルムアルデヒドで 37°C、15 分間処理することで架橋させた。架橋反応は 125 mM グリシンを室温で 10 分間反応させることで停止させた。細胞を冷えた PBS (-) で 2 回洗い、その後回収し、290 \times g、4°C で 5 分間遠心した。集めた細胞に cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 10 mM EDTA pH8.0, 85 mM KCl, 0.5% NP-40, Complete® protease inhibitor cocktail) を加え、10 分間氷上でインキュベートした。3300 \times g、4°C で 5 分間遠心し、核を沈殿させた後、上清を捨て sonication buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 10 mM EDTA pH8.0, 1% SDS, protease inhibitor cocktail) を 200 μ l 加えて、氷上で 10 分間インキュベートした。その後、10 秒間超音波処理、10 秒間のインターバルを 3 回繰り返す、DNA を 200~1000bp 程度に断片化させた。20,000 \times g、4°C で 10 分間遠心分離し、上清を 2 ml チューブに移し、ChIP dilution buffer (16.7 mM Tris - HCl pH8.0, 1.2 mM EDTA pH8.0, 167 mM NaCl, 1.1% Triton X-100, 0.01% SDS, 0.11%

Tween20) にて 10 倍に希釈した。このうち 200 μ l を別に保存して 10% input サンプルとした。Salmon sperm DNA と BSA でコーティングした Dynabeads Protein G (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) を 10 μ l 加え、4°C で 2 時間回転反応をして、プレクリアーを行った。Dynabeads を磁石で集め、その上清を 500 μ l ずつ別のチューブに移し、それぞれ抗体を 1 μ g 加え、4°C で一晩回転反応させた。その後 5 μ l の Dynabeads Protein G を加え、4°C で 2 時間、回転反応させた。Dynabeads は回収したのち、RIPA buffer/150 mM NaCl (50 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA pH8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.1% Tween20), RIPA buffer/500 mM NaCl, LiCl wash buffer (10 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA pH8.0, 250 mM LiCl, 0.5% NP-40, 0.1% Tween20) でそれぞれ 1 回ずつ、TE buffer (10 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA pH8.0, 0.1% Tween20) で 2 回洗浄した。集めた Dynabeads に 100 μ l の elution buffer (100 mM NaHCO₃, 1% SDS, 10 mM DTT, 0.1% Tween20) を加え室温で 15 分間インキュベートした。このステップは 2 回繰り返す、1 つのチューブにまとめた。これに 250 mM になるように NaCl を加え、さらに 4 μ g の RNase A を加え 65°C で一晩インキュベートした。これにより、ホルムアルデヒドによる架橋をはずし、RNA の分解をした。その後、クロマチンに結合しているタンパク質を分解するために Proteinase K を加え、37°C で 4 時間インキュベートした。DNA はフェノール-クロロホルム法により、抽出・精製し、20 μ l の TE buffer に溶かした。このうち 4 μ l をリアルタイム PCR 解析に用いた。CYP11A1 遺伝子上流域の XRE を含むプライマーの配列は、forward; 5'-ACC CGC CAC CCT TCG ACA GTT C-3'、reverse; 5'- TGC CCA GGC GTT GCG TGA GAA G-3'、BTE 配列を含むプロモーター領域のプライマー配列は、forward; 5'-CTT GGA ATT GGG ACT TCC AGG TGT-3'、reverse; 5' - CAC ACG TAC AAG CCC GCC TAT AA - 3'である。

3-8. siRNA の作成とトランスフェクション

siRNA は *Silencer*® siRNA Construction Kit with manual (Ambion)を用いて、siGFP (cont)および siAhR を付属のマニュアルに沿って作製した。配列は以下に示した。siGFP; 5'-GGC UAC GUC CAG GAG CGC ACC-3'、siAhR; 5'-UAC UUC CAC CUC AGU UGG CTT-3'。PP2A の C サブユニットに対する siRNA は QIAGEN (Düsseldorf, Germany) から #1 (#SI02225783) と #2 (SI02225790) を購入した。

siRNA は Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen)を用いて、reverse transfection 法により、終濃度 50 nM になるようにトランスフェクションをした。

3-9. この実験で用いた抗体

この実験で用いた抗体の種類と購入先、用途を以下の表に示した。

抗体	会社名	カタログナンバー	用途
normal rabbit IgG	Santa Cruz Biotechnology	sc-2027	ChIP assay、 IP、IB
anti-AhR	Santa Cruz Biotechnology	sc-5579	ChIP assay、 IB
anti-CREM	Santa Cruz Biotechnology	sc-440	ChIP assay、 IP、IB
anti-Sp1	Santa Cruz Biotechnology	sc-14027	ChIP assay、 IP、IB
anti-GAPDH	Santa Cruz Biotechnology	sc-25778	IB
anti-Lamin B	Santa Cruz Biotechnology	sc-6217	IB
anti-pThr-453 (Sp1)	Abcam	ab59257	IB
anti-CBP	Abcam	ab2832	ChIP assay
anti-HDAC1	Upstate	#05-614	ChIP assay、 IB
anti-RNAP II	Upstate	#05-623	ChIP assay
anti-acetylated H3	MILLIPORE	#06-599	ChIP assay
anti-acetylated H4	MILLIPORE	#06-598	ChIP assay
PP2A C サブユニット	Cell Signaling Technology	#2259	IB

また、Sp1 の 59 番目のセリン残基がリン酸化された抗体(anti-pSer-59)は Dr. Brigitte Kahn-Perlès (TAGC – Inserm U1090, Marseille, France)に分与して頂いた。

3-10. データの統計処理および定量方法

ウエスタンブロットティング解析の結果は全て、ImageJによりバンドの濃さを数値化し、それぞれコントロールに対する比として表した。また、ウエスタンブロットティング解析、q-RT-PCR解析およびChIP assayの結果は全てt検定を行ない、有意差があるかどうかの確認をした。

[4. 謝辞]

指導教員である菊池英明教授には、様々なアドバイスおよび指導をして下さったことを厚くお礼申し上げます。また、副指導教員である石黒誠一教授、山下哲郎准教授には研究報告会や中間報告会などで、研究の進め方についての意見や質問などを承ったことを感謝いたします。また、弘前大学の農学生命科学部細胞工学講座のみなさまには、実験補助や助言などをして下さったことを感謝いたします。また、anti-pSer-59 を分与して下さった、Dr. Brigitte Kahn-Perlès には、この場を借りて感謝申し上げます。

[5. 参考文献]

- [1] Furness SG, Lees MJ, Whitelaw ML.
The dioxin (aryl hydrocarbon) receptor as a model for adaptive responses of bHLH/PAS transcription factors.
FEBS Lett. 2007 Jul 31;581(19):3616-25
- [2] McGuire J, Whitelaw ML, Pongratz I, Gustafsson JA, Poellinger L.
A cellular factor stimulates ligand-dependent release of hsp90 from the basic helix-loop-helix dioxin receptor.
Mol Cell Biol. 1994 Apr;14(4):2438-46.
- [3] Petrusis JR, Kusnadi A, Ramadoss P, Hollingshead B, Perdew GH.
The hsp90 Co-chaperone XAP2 alters importin beta recognition of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity.
J Biol Chem. 2003 Jan 24;278(4):2677-85. Epub 2002 Nov 12.
- [4] Kazlauskas A, Poellinger L, Pongratz I.
Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor.
J Biol Chem. 1999 May 7;274(19):13519-24.
- [5] Probst MR, Reisz-Porszasz S, Agbunag RV, Ong MS, Hankinson O.
Role of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in aryl hydrocarbon (dioxin) receptor action.
Mol Pharmacol. 1993 Sep;44(3):511-8.
- [6] Arellano LO, Wang X, Safe S.
Effects of cycloheximide on the induction of CYP1A1 gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in three human breast cancer cell lines.
Carcinogenesis. 1993 Feb;14(2):219-22.
- [7] Joanna Kaczynski, Jin-San Zhang, Volker Ellenrieder, Abigail Conley,

Tamara Duenes, Henri Kester, Bart van der Burg, and Raul Urrutia
The Sp1-like Protein BTEB3 inhibits Transcription via the
Basic Transcription Element Box by Interacting with mSin3A and
HDAC-1 Co-repressors and Competing with Sp1
J.Biol.Chem. 2001 Sep 28; 276 (39):36749-36756

- [8] Kaczynski JA, Conley AA, Fernandez Zapico M, Delgado SM, Zhang JS, Urrutia R. (2002) Functional analysis of basic transcription element (BTE)-binding protein (BTEB) 3 and BTEB4, a novel Sp1-like protein, reveals a subfamily of transcriptional repressors for the BTE site of the cytochrome P4501A1 gene promoter. *Biochem J.* Sep 15;366(Pt 3):873-82
- [9] Joanna Kaczynski, Tiffany Cook and Raul Urrutia
Sp1- and Krüppel-like transcription factors. *Genome Biology* 2003, 4:206
- [10] Khan S, Barhoumi R, Burghardt R, Liu S, Kim K, Safe S.
Molecular mechanism of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor/Sp1 cross talk in breast cancer cells.
Mol Endocrinol. 2006 Sep;20(9):2199-214.
- [11] Marmorstein R
Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Jun;2(6):422-32
- [12] Marmorstein R
Structure and function of histone acetyltransferases
Cell Mol Life Sci. 2001 May;58(5-6):693-703.
- [13] Mai A, Massa S, Rotili D, Cerbara I, Valente S, Pezzi R, Simeoni S, Ragno R
Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy
Med Res Rev. 2005 May;25(3):261-309
- [14] Don J, Stelzer G.

The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis.

Mol Cell Endocrinol. 2002 Feb 22;187(1-2):115-24

[15] Servillo G, Della Fazia MA, Sassone-Corsi P.

Coupling cAMP signaling to transcription in the liver: pivotal role of CREB and CREM. *Exp Cell Res.* 2002 May 1;275(2):143-54

[16] Sassone-Corsi P.

Coupling gene expression to cAMP signalling: role of CREB and CREM. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998 Jan;30(1):27-38

[17] Della Fazia MA, Servillo G, Sassone-Corsi P.

Cyclic AMP signalling and cellular proliferation: regulation of CREB and CREM. *FEBS Lett.* 1997 Jun 23;410(1):22-4

[18] Tenbrock K, Juang YT, Leukert N, Roth J, Tsokos GC.

The transcriptional repressor cAMP response element modulator alpha interacts with histone deacetylase 1 to repress promoter activity.

J Immunol. 2006 Nov 1;177(9):6159-64.

[19] Kikuchi H, Fukushige S, Shibazaki M, Shiratori Y.

Presence on human chromosome 10 of omeprazole-sensitivity gene whose product mediates CYP1A1 induction. *Cytogenet Genome Res.* 2002;97(1-2):51-7.

[20] Sasamori E, Shimoyama S, Fukushige S, Kikuchi H

Involvement of CREM in CYP1A1 induction through ligand-independent activation pathway of aryl hydrocarbon receptor in HepG2 cells

Arch Biochem Biophys. 2008 Oct 1;478(1):26-35

[21] 下山修司, (菊池英明教授), 卒業論文, 2008年9月

- [22] Chomczynski P, Sacchi N.
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal Biochem. 1987 Apr;162(1):156-9.
- [23] Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG.
Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* 1983 Mar 11;11(5):1475-89.
- [24] Weiqi Huang, Shujie Zhao, Sudhakar Ammanamanchi,
Michael Brattain, Kolaparthi Venkatasubbarao, James W. Freeman
Trichostatin A Induces Transforming Growth Factor Type II Receptor Promoter Activity and Acetylation of Sp1 by Recruitment of PCAF/p300 to a Sp1 NF-Y Complex. *J.Biol.Chem.* 2005 Mar 18; 280 (11):10047-10054
- [25] Li L, Sun J-M, Davie JR. Gene regulation by Sp1 and Sp3
Biochem Cell Biol 2004; 82:460-71
- [26] P R Manna, D W Eubank, E Lalli1, P Sassone-Corsi1 and D M Stocco
Transcriptional regulation of the mouse steroidogenic acute regulatory protein gene by the cAMP response-element binding protein and steroidogenic factor 1. *Journal of Molecular Endocrinology* (2003) 30, 381–397
- [27] Nozomu Hiraiwa, Tomonori Yabuta, Keijiro Yoritomi, Miki Hiraiwa,
Yuetsu Tanaka, Takeshi Suzuki, Mitsuaki Yoshida, and Reiji Kannagi
Transactivation of the fucosyltransferase VII gene by human T-cell leukemia virus type 1 Tax through a variant cAMP-responsive element
BLOOD (2003) VOLUME 101, NUMBER 9,3615-21
- [28] Michael Schnekenburger, Li Peng, Alvaro Puga
HDAC1 bound to the Cyp1a1 promoter blocks histone acetylation associated with Ah receptor-mediated trans-activation
Biochimica et Biophysica Acta 1769 (2007) 569–578

- [29] Brian D. Strahl & C. David Allis
The language of covalent histone modifications.
Nature 403, 41-45 (6 January 2000)
- [30] Ke Q, Li Q, Ellen TP, Sun H, Costa M
Nickel compounds induce phosphorylation of histone H3 at serine 10 by activating JNK-MAPK pathway. *Carcinogenesis*. 2008 Jun;29(6):1276-81
- [31] Li Y, Kao GD, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, Qin J, Phelan C, Lazar MA. A novel histone deacetylase pathway regulates mitosis by modulating Aurora B kinase activity. *Genes Dev*. 2006 Sep 15;20(18):2566-79
- [32] Joanna Kaczynski, Tiffany Cook and Raul Urrutia
Sp1- and Krüppel-like transcription factors. *Genome Biology* 2003, 4:206
- [33] Chu, S. (2012) Transcriptional regulation by post-transcriptional modification -role of phosphorylation in Sp1 transcriptional activity. *Gene* **508**, 1–8
- [34] Fojas de Borja, P., Collins, N.K., Du, P., Azizkhan-Clifford, J., and Mudryj, M. (2001) Cyclin A-CDK phosphorylates Sp1 and enhances Sp1-mediated transcription. *EMBO J*. **20**, 5737–5747
- [35] Juang, Y.T., Rauen, T., Wang, Y., Ichinose, K., Benedyk, K., Tenbrock, K., and Tsokos, G. C. (2011) Transcriptional activation of the cAMP-responsive modulator promoter in human T cells is regulated by protein phosphatase 2A-mediated dephosphorylation of SP-1 and reflects disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Biol. Chem*. **286**, 1795–1801
- [36] Zolnierowicz, S. (2000) Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochem. Pharmacol*. **60**, 1225–1235

- [37] Lechward, K., Awotunde, O.S., Swiatek, W., and Muszyńska, G. (2001) Protein phosphatase 2A: variety of forms and diversity of functions. *Acta Biochim. Pol.* **48**, 921–933
- [38] Janssens, V., Longin, S., and Goris, J. (2008) PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail). *Trends Biochem. Sci.* **33**, 113–121
- [39] Matthias D. Seidl and Peter Boknik König, Torsten Kristensen, Frank U. Müller, Uwe Kirchhefer, Alexander Heinick, Simone (2013) Protein phosphatase 2A is regulated by PKC α -dependent phosphorylation of its targeting subunit B56 α at Ser41. Published on November 13, 2013 *J. Biol. Chem.*
- [40]. Le Ferrec, E., Lagadic-Gossmann, D., Rauch, C., Bardiau, C., Maheo, K., Massiere, F., Le Vee, M., Guillouzo, A., and Morel, F. (2002) Transcriptional induction of CYP1A1 by oltipraz in human Caco-2 cells is aryl hydrocarbon receptor- and calcium-dependent. *J. Biol. Chem.* **277**, 24780–24787
- [41]. N'Diaye, M., Le Ferrec, E., Lagadic-Gossmann, D., Corre, S., Gilot, D., Lecureur, V., Monteiro, P., Rauch, C., Galibert, M.D., and Fardel, O. (2006) Aryl hydrocarbon receptor-and calcium-dependent induction of the chemokine CCL1 by the environmental contaminant benzo[a]pyrene. *J. Biol. Chem.* **281**, 19906–19915
- [42] Monteiro, P., Gilot, D., Langouet, S., and Fardel, O. (2008) Activation of the aryl hydrocarbon receptor by the Calcium / Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase Inhibitor Acid (STO-609) *Drug Metab. Dispos.* **36**, 2556–2563
- [43] Healy S, Khan DH, Davie JR (2011) Gene expression regulation through 14-3-3 interactions with histones and HDACs. *Discov Med.* 2011 Apr;11(59):349-58.
- [44] Theuerkorn M, Fischer G, Schiene-Fischer C. (2011) Prolyl cis/trans isomerase signalling pathways in cancer. *Curr Opin Pharmacol.* Aug;11(4):281-7

[6. 図説]

図 1. Sp1 と HDAC1 は相互作用する

HepG2 細胞を cont, 5 nM TCDD, 50 μ M OP で 90 分間処理した後、核タンパク質を抽出し、免疫沈降法を行なったサンプルを SDS-PAGE および Western blotting で目的のバンドを検出した。A, B は CREM 抗体で免疫沈降後、Sp1、HDAC1 で検出したもので、C は Sp1 抗体で免疫沈降後、HDAC1 で検出したものである。

図 2. Sp1 と HDAC1 は *CYP1A1* 遺伝子プロモーター近傍の BTE 配列に結合している

HepG2 細胞を cont, 5 nM TCDD, 50 μ M OP で 90 分間処理した後、核タンパク質を抽出し、DNAP assay を行なったサンプルを SDS-PAGE および Western blotting で目的のバンドを検出した。それぞれ、CREM (A)、Sp1 (B)、HDAC1 (C) 抗体で検出した結果を示した。

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

HepG2 細胞を cont, 5 nM TCDD または 50 μ M OP で 90 分間処理したサンプルを回収し、ChIP assay を行なった。それぞれ示した抗体で免疫沈降法を行い、BTE 領域を含む *CYP1A1* プロモーターに対するプライマーで qPCR 法により増幅した。それを input に対する割合で示した。n=3

図 4. *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

HepG2 細胞を cont, 5 nM TCDD または 50 μ M OP で 90 分間処理したサンプルを回収し、ChIP assay を行なった。それぞれ示した抗体で免疫沈降法を行い、BTE 領域を含む *CYP1A1* プロモーターに対するプライマーで qPCR 法により増幅した。それを input に対する割合で示した。n=3

図 5. DNAP assay からの BTE 配列に作用する因子の探索

HepG2 細胞を cont, 5 nM TCDD または 50 μ M OP で 90 分間処理し、核抽出タンパク質を用意した。1 mg のタンパク質で DNAP assay を行い、サンプルを

SDS-PAGE にかき、銀染色法を行なった。黒矢印は TCDD や OP 処理により増加したバンド、白いバンドは処理により減少したバンドを示している。

図 6. *CYP1A1* プロモーター近傍のモデル図

転写不活性時には、Sp1 と HDAC1 が複合体を形成し、これにより BTE 周辺のヒストンが脱アセチル化され、転写が抑制される。CREM はこの転写抑制複合体の一部を成していると考えられる。TCDD や OP の刺激が入ると、HDAC1 は Sp1 からはずれ、代わりに CBP が複合体を形成する。CBP は HAT 活性を持っており、周辺のヒストンをアセチル化することで、転写を活性化する。

図 7. Sp1 と HDAC1 は *CYP1A1* プロモーター上流域で相互作用している
HepG2 細胞を cont、5 nM TCDD または 50 μ M OP で 90 分間処理したサンプルを回収し、Re-ChIP assay を行なった。グラフに示した抗体でそれぞれ二度免疫沈降法を行ない、BTE を含む *CYP1A1* のプロモーター近傍に対するプライマーで qPCR を行ない、input に対する比で表した。n=3

図 8. Sp1 の Ser-59 は TCDD や OP 処理により脱リン酸化される

A, HepG2 細胞を cont、5 nM TCDD または 50 μ M OP で 90 分間処理したサンプルを回収し、核抽出タンパク質を用いて、それぞれ示した抗体で Western blotting を行なった。B, pSer-59(上)および pThr-453 の Western blotting の結果をグラフ化したものを示した。

図 9. Sp1 の Ser-59 のリン酸化レベルの減少は OA により阻害される

A, HepG2 細胞を vehicle (MilliQ) または 50 nM OA で 2 時間処理後、さらに cont、5 nM TCDD または 50 μ M OP で 90 分間処理したサンプルを回収し、核抽出タンパク質を用いて、それぞれ示した抗体で Western blotting を行なった。B, A の pSer-59 の Western blotting の結果をグラフ化したものである。n=3

図 10. OA により *CYP1A1*、*CYP1B1* の転写は抑制される

A, HepG2, MCF-7, Caco-2 細胞を vehicle (MilliQ) または 50 nM OA で 2 時間処理後、さらに cont、5 nM TCDD または 50 μ M OP で 24 時間処理した。RNA を回収し、逆転写リアルタイム PCR 法により *CYP1A1*、*CYP1B1*(B)、*CREM* (C) の

mRNA 量を定量し、グラフ化した。

図 11. PP2A の siRNA は Sp1 の pSer-59 の脱リン酸化と *CYP1A1* の転写を抑制する

A, PP2A の C サブユニットに対する siRNA を用意し、その効果を Western blotting にて調べた結果。終濃度 50 nM になるようにそれぞれ siRNA をトランスフェクションし、それぞれ示した時間にサンプルを回収し、PP2A の C サブユニットに対する抗体で検出した。GAPDH は内在性コントロールとして用いた。B, siCont, siRNA#2 をトランスフェクションして 48 時間後にそれぞれ cont, 5 nM TCDD, 50 μ M OP で 90 分処理した後にサンプルを回収し、Western blotting を行った結果。C, siCont, siRNA#2 をトランスフェクションして 48 時間後にそれぞれ cont, 5 nM TCDD, 50 μ M OP で 24 時間処理した後にサンプルを回収し、qRT-PCR を行った結果を示した。

図 12. AhR のノックダウンは Sp1 の Ser-59 の脱リン酸化に影響しない

A, siAhR をトランスフェクションして 48 時間後に、vehicle または 50 nM の OA で処理後、さらに cont, 5 nM TCDD, 50 μ M OP で 90 分処理した後にサンプルを回収し、Western blotting を行った結果。B, A の AhR のノックダウン効率を Western blotting で調べた結果を示した。C, A の結果の pSer-59 の量をグラフ化したものを示した。

図 13. OA は AhR の細胞質内での存在量、核移行、XRE への結合には影響しない

A, vehicle または 50 nM の OA で処理後、さらに cont, 5 nM TCDD, 50 μ M OP で 90 分処理した後にサンプルを回収し、細胞質分画、核分画にわけ、Western blotting を行った結果。B, A 同様に処理した後、AhR の ChIP assay を XRE にて行った結果を示した。

図 14. Sp1 の Ser-59 がリン酸化されているものは BTE に結合している

vehicle または 50 nM の OA で処理後、さらに cont, 5 nM TCDD, 50 μ M OP で 90 分処理した後にサンプルを回収し、それぞれの抗体を用いて ChIP assay を行った結果を示した。

図 15. OA により Sp1-HDAC1 の複合体が維持される

vehicle または 50 nM の OA で処理後、さらに cont, 5 nM TCDD, 50 μ M OP で 90 分処理した後にサンプルを回収し、それぞれの抗体を用いて Re-ChIP assay を行った結果を示した。

図 16. Ca^{2+} キレーターである BAPTA-AM により、Ser-59 の脱リン酸化および CYP1A1 の転写が起こらなくなる

A, vehicle または 50 μ M BAPTA-AM で 2 時間処理後、さらに cont, 5 nM TCDD, 50 μ M OP で 90 分処理した後にサンプルを回収し、細胞質分画および核分画タンパク質を抽出し、それぞれの抗体を用いて Western blotting にて検出した結果。B, vehicle または 50 μ M BAPTA-AM で 2 時間処理後、さらに cont, 5 nM TCDD, 50 μ M OP で 24 時間処理した後に RNA を回収し、逆転写リアルタイム PCR 法により CYP1A1(左), CYP1B1(右)の mRNA 量を定量し、グラフ化した。C, vehicle または 50 μ M BAPTA-AM で 2 時間処理後、さらに cont, 5 nM TCDD, 50 μ M OP で 90 分処理した後にサンプルを回収し、それぞれの抗体を用いて ChIP assay を行った結果。

図 17. PP2A B サブユニットの特徴と発現

PP2A の B サブユニットに関する UniProt のデータベースおよび、各細胞での mRNA 量を、簡易 PCR で確認し、まとめた表を示した。

図 18. Sp1 の Ser-59 は PIN1 の認識部位である可能性がある

CLUSTALW にて、ヒト、チンパンジー、ヤギ、マウス、ラット、ショウジョウバエの Sp1 の配列をアライメントした結果。囲っている部分は、PIN1 により認識されるであろう部位(Ser-59-Pro-60)を示しており、多くの種で保存されていることがわかった。

図 19. PP2A/Sp1 を含む経路の CYP1A1 転写メカニズムのモデル図

今回の実験より明らかになった CYP1A1 転写メカニズムのモデル図を示した。TCDD や OP の刺激が入ると、AhR に作用し、AhR は核内移行および、ARNT との結合を引き起こす。AhR-ARNT の複合体は XRE に結合する。これと並行して、何らかのメカニズムで Ca^{2+} が上昇し、PP2A が活性化される。活性化した

PP2A は Sp1 の 59 番目のセリン残基を脱リン酸化する。これにより、Sp1-HDAC1 の複合体がはずれ、代わりに Sp1-CBP の複合体が形成される。CBP の働きにより、周辺のヒストンがアセチル化され、クロマチンの構造が緩み、様々な転写コアクチベーターが呼び込まれ、*CYP1A1* の転写が活性化するものと考えられる。

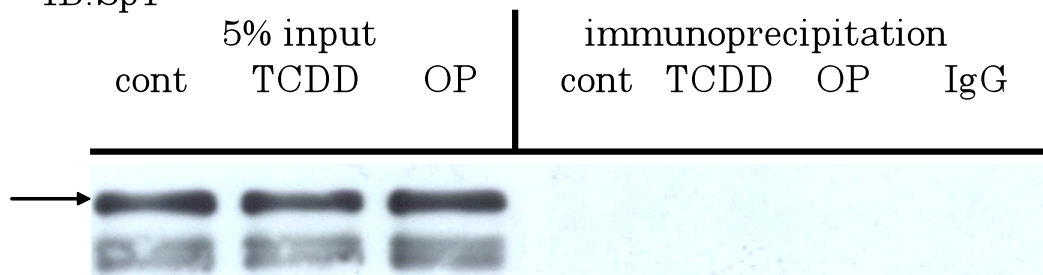
[7. ☒]

☒ 1

A.

IP.CREM

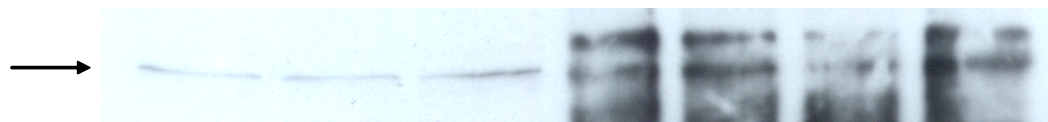
IB.Sp1



B.

IP.CREM

IB.HDAC1



C.

IP.Sp1

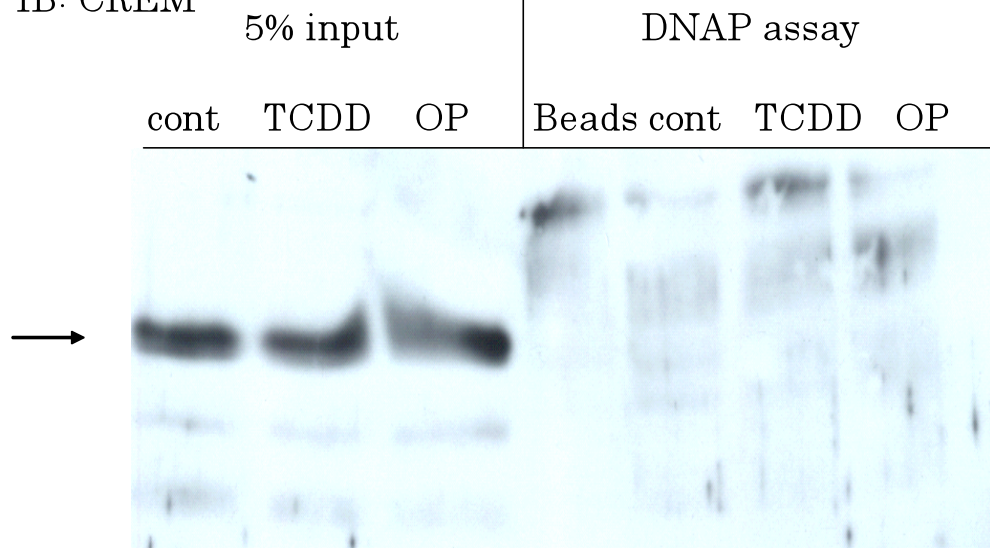
IB.HDAC1



図 2

A.

IB: CREM



B.

IB: Sp1



C.

IB: HDAC1

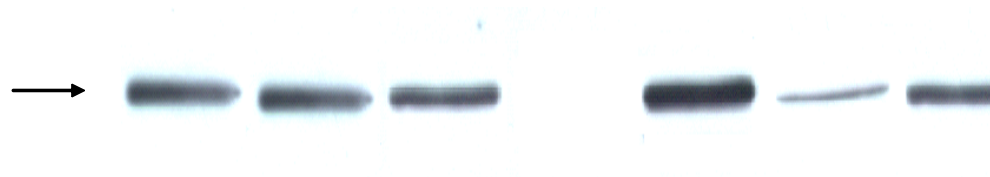


Figure 3

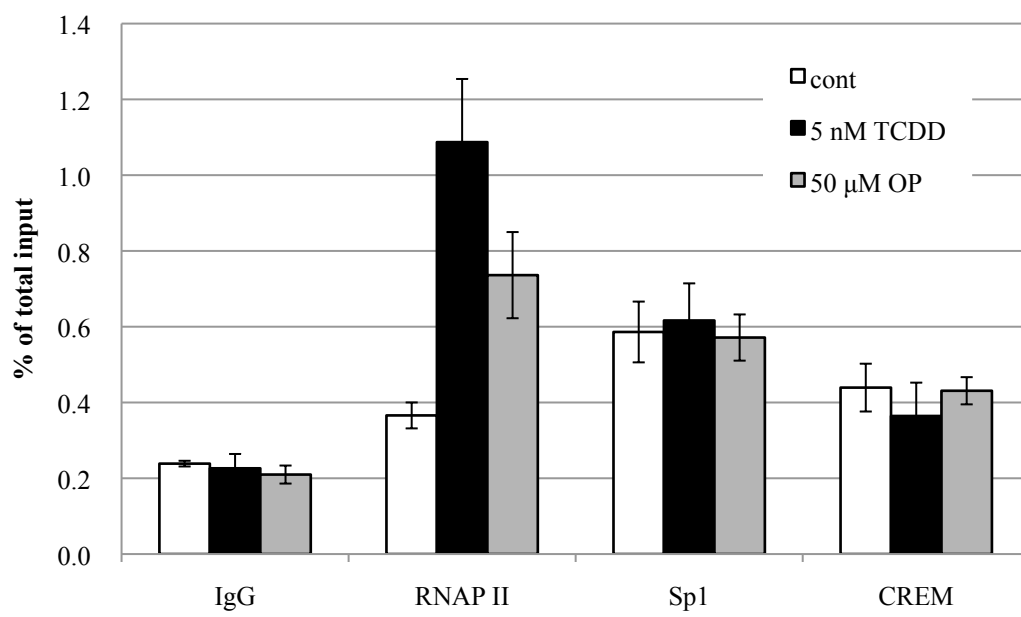


图 4

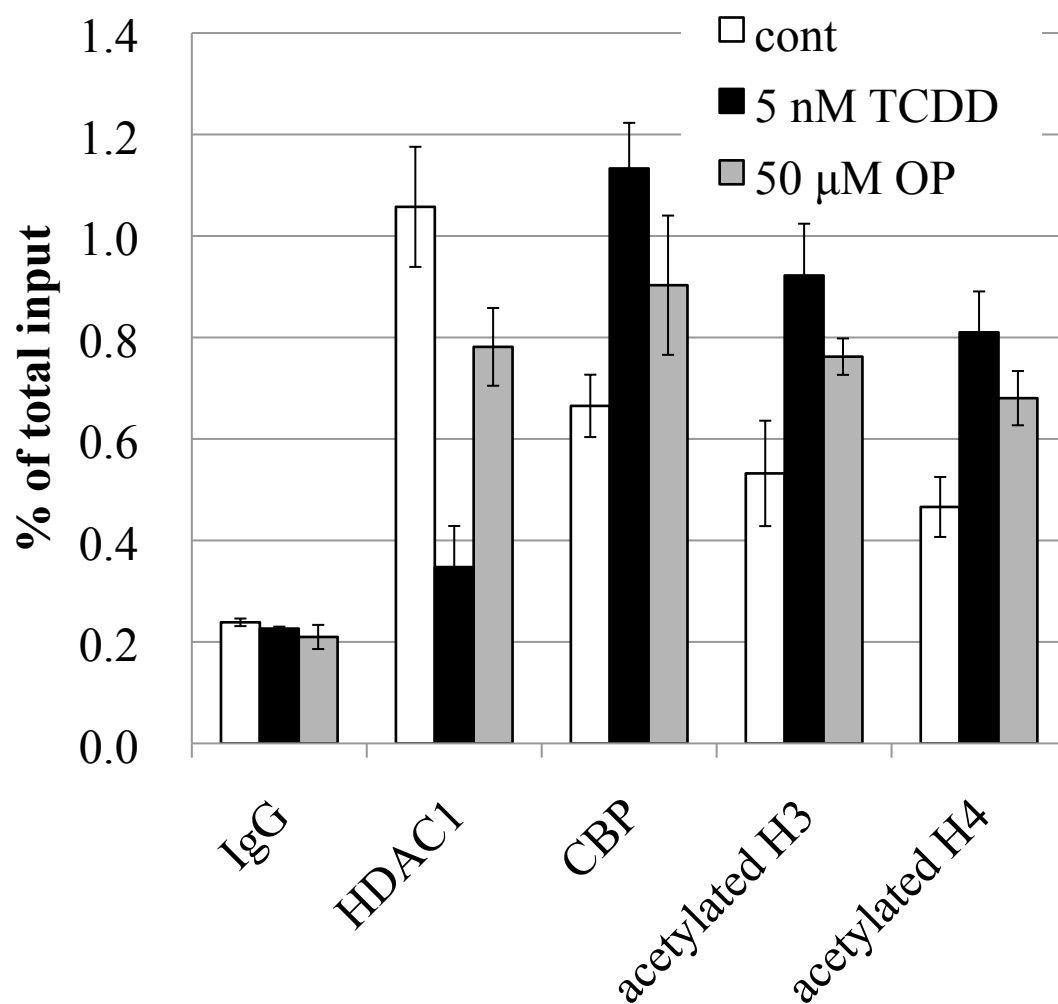


图 5

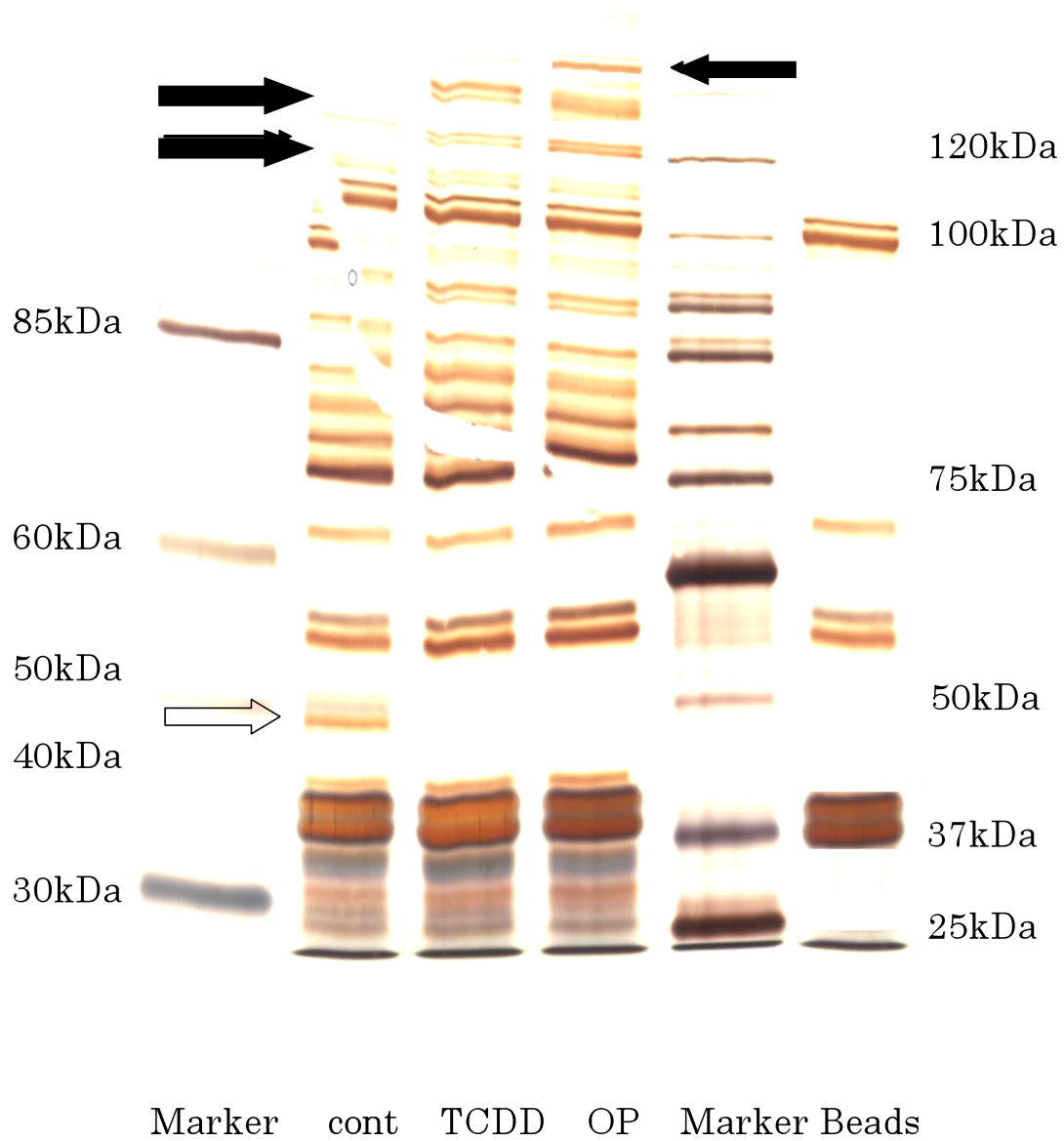


図 6

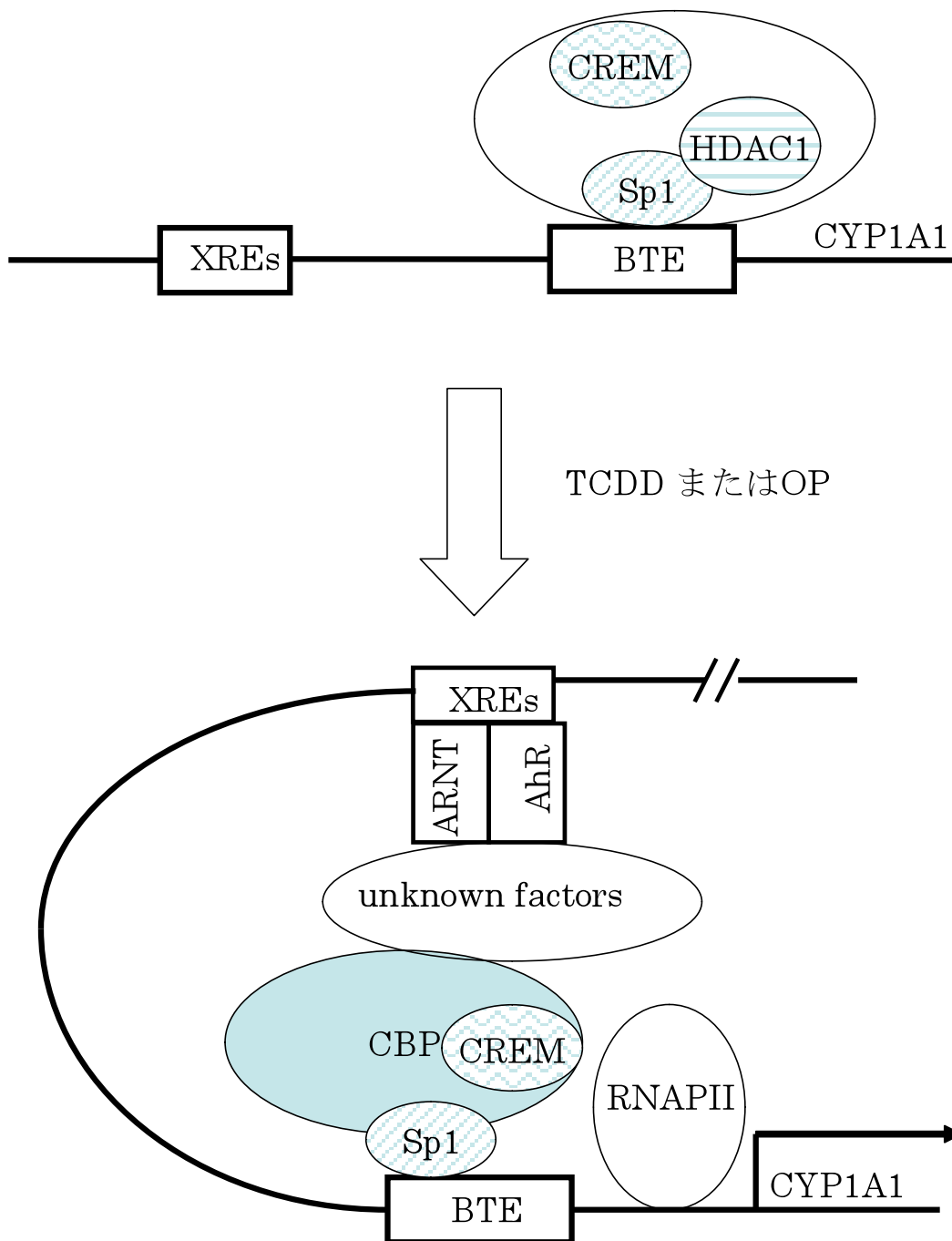


图 7

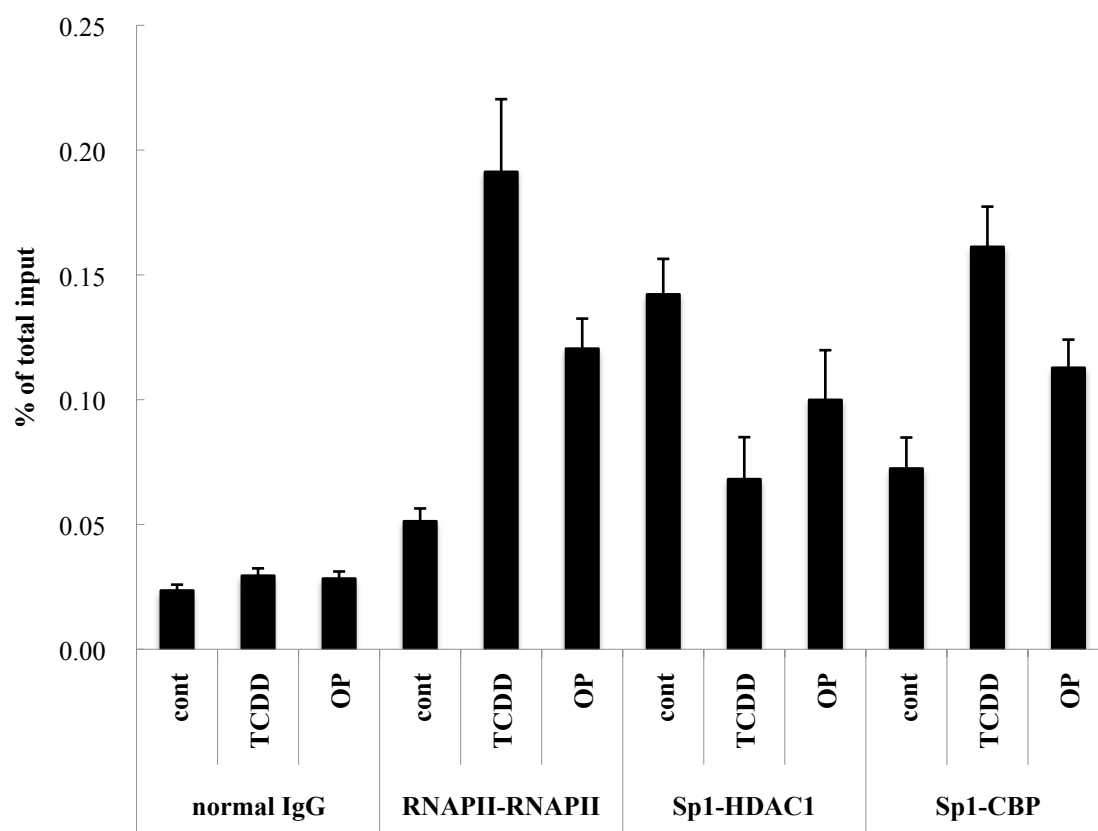


图 8

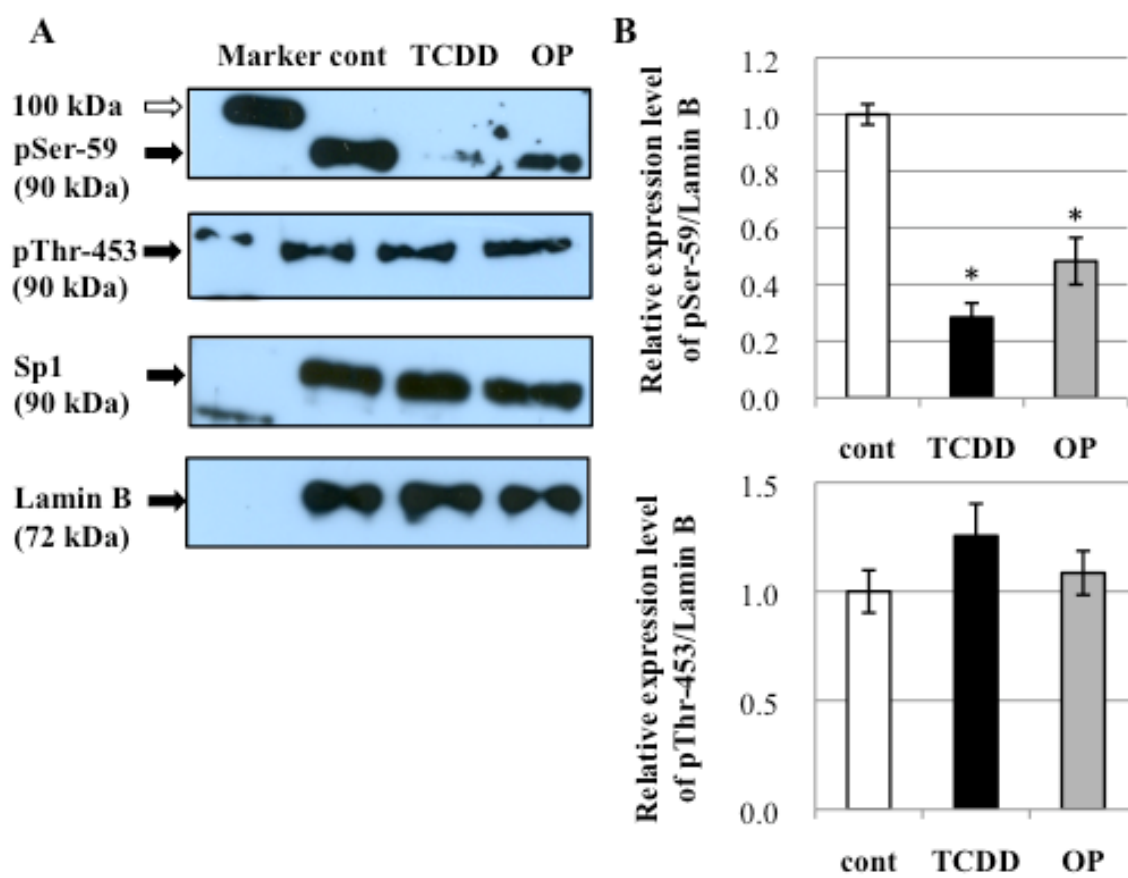
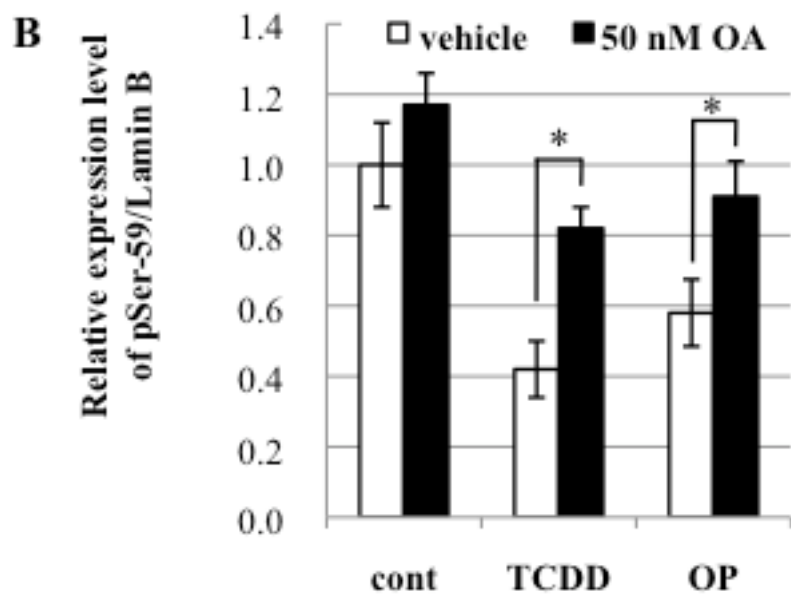
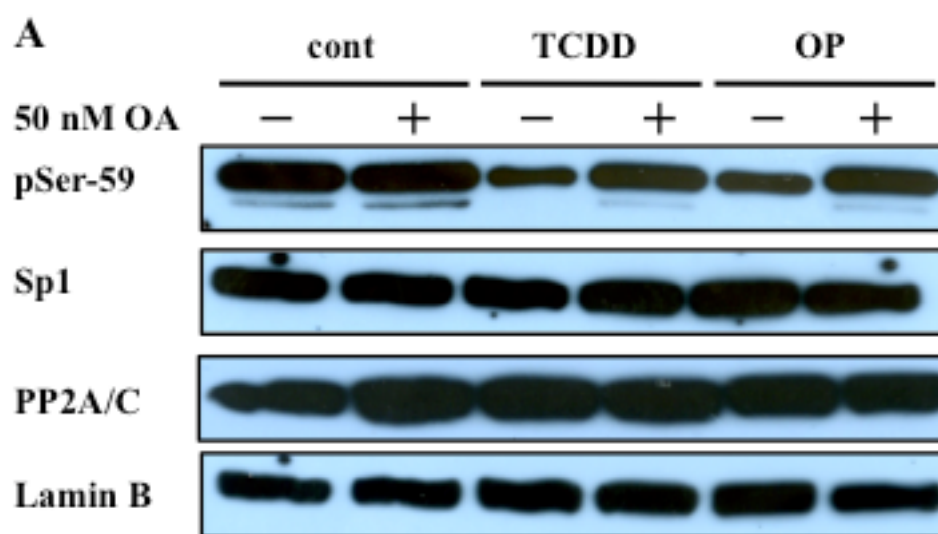
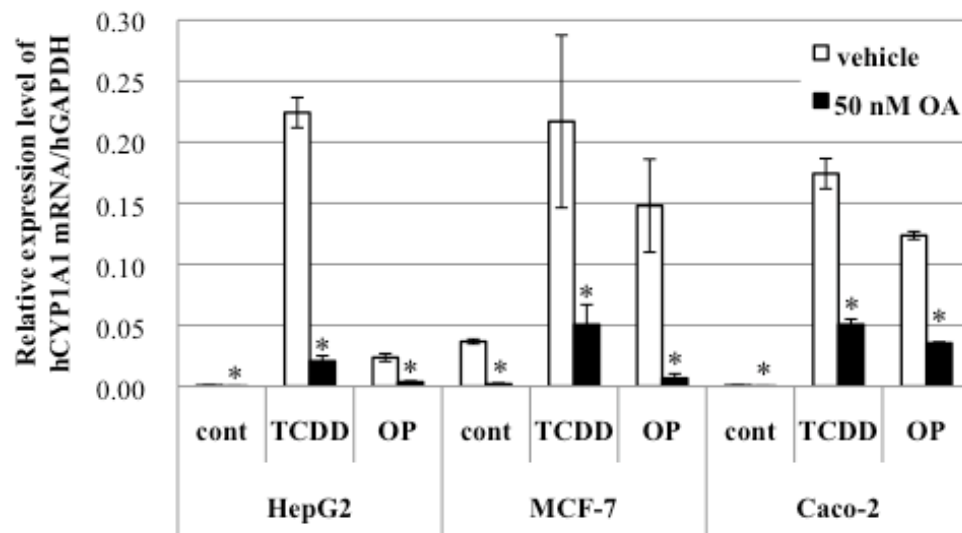


图 9

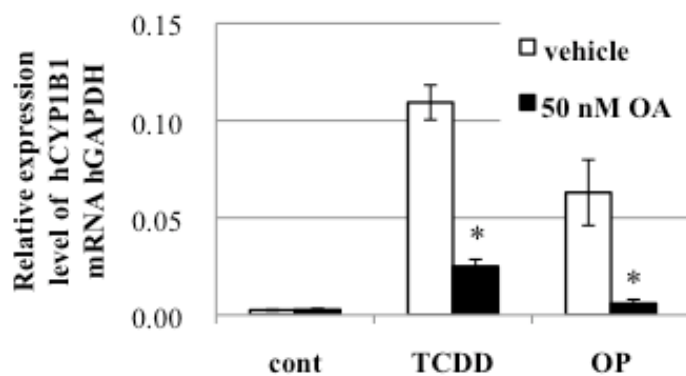


☒ 1 0

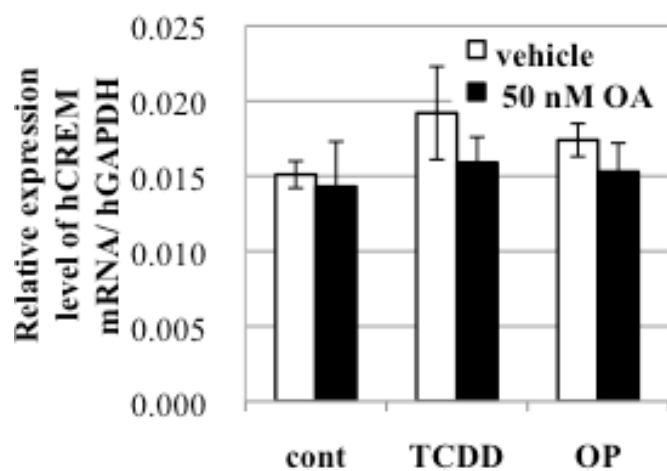
A



B



C



☒ 1 1

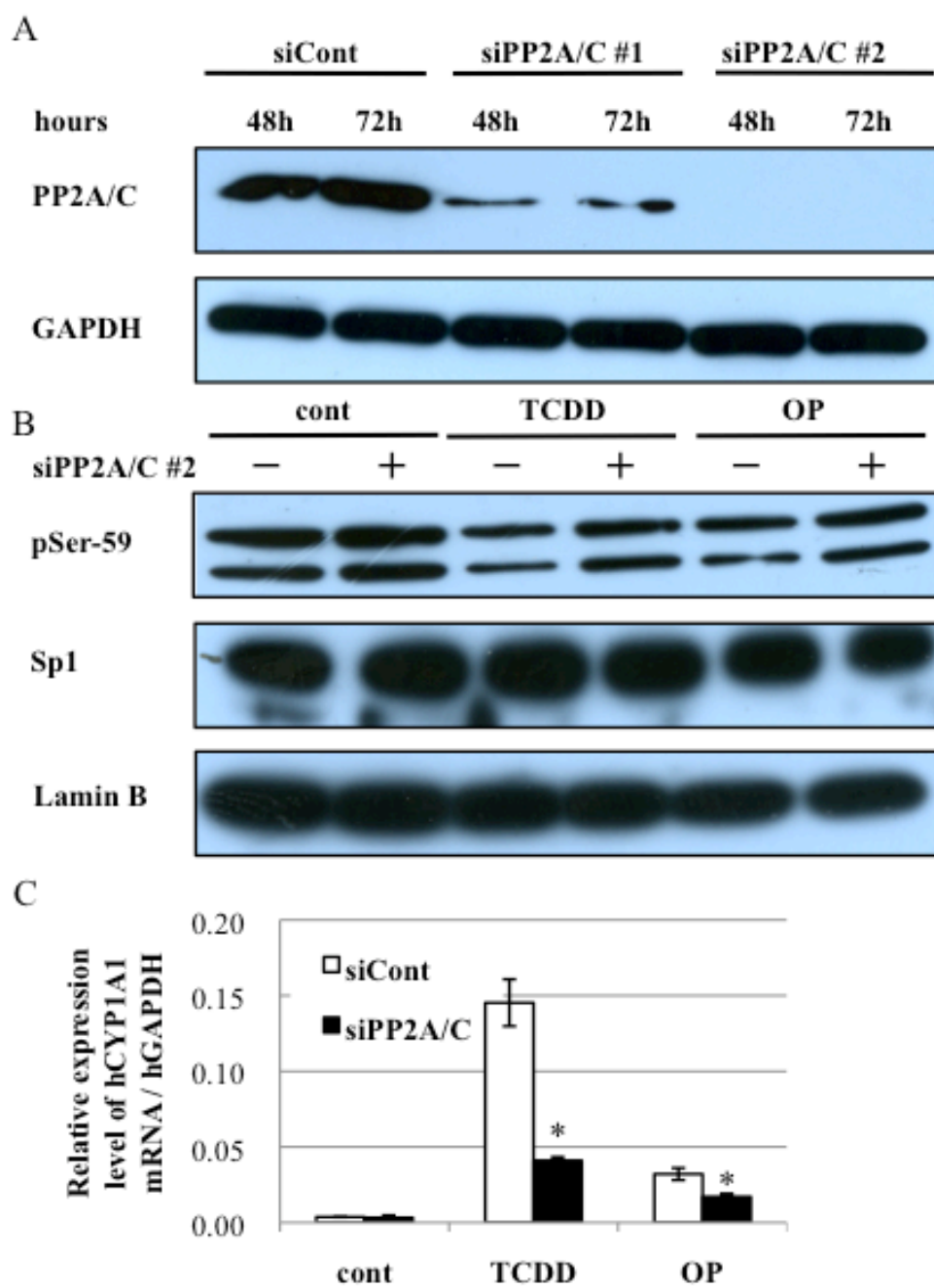


Figure 12

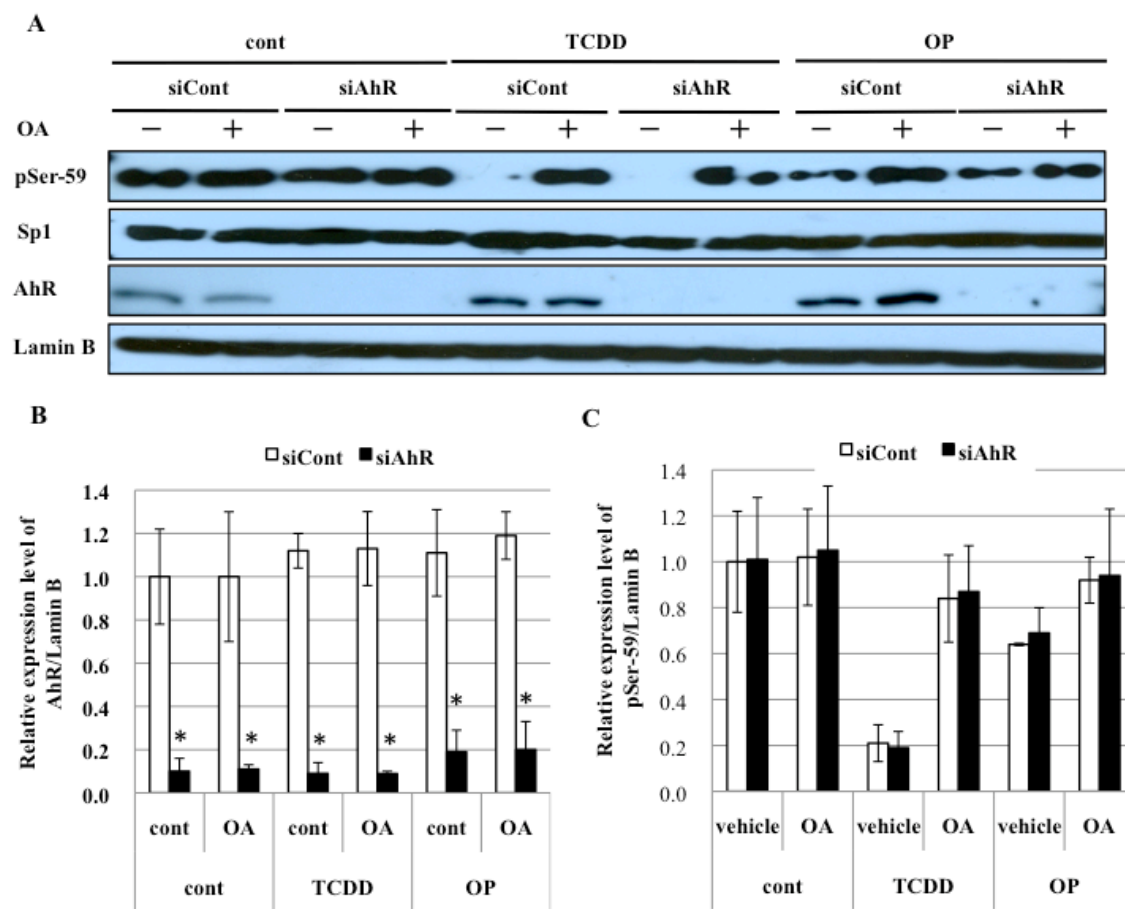


Figure 13

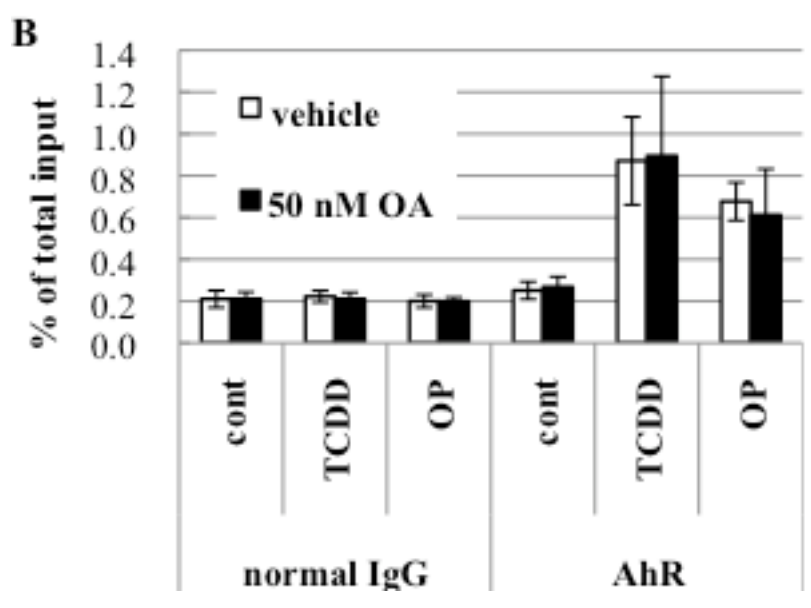
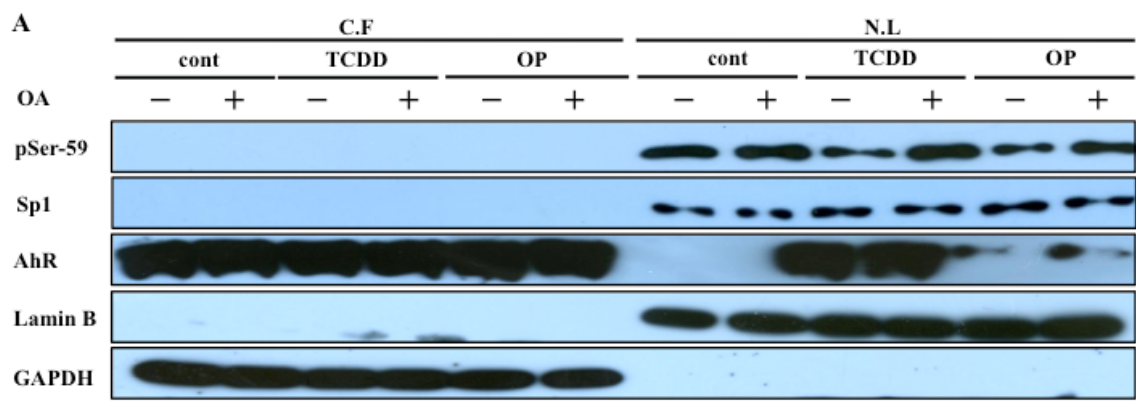


Figure 14

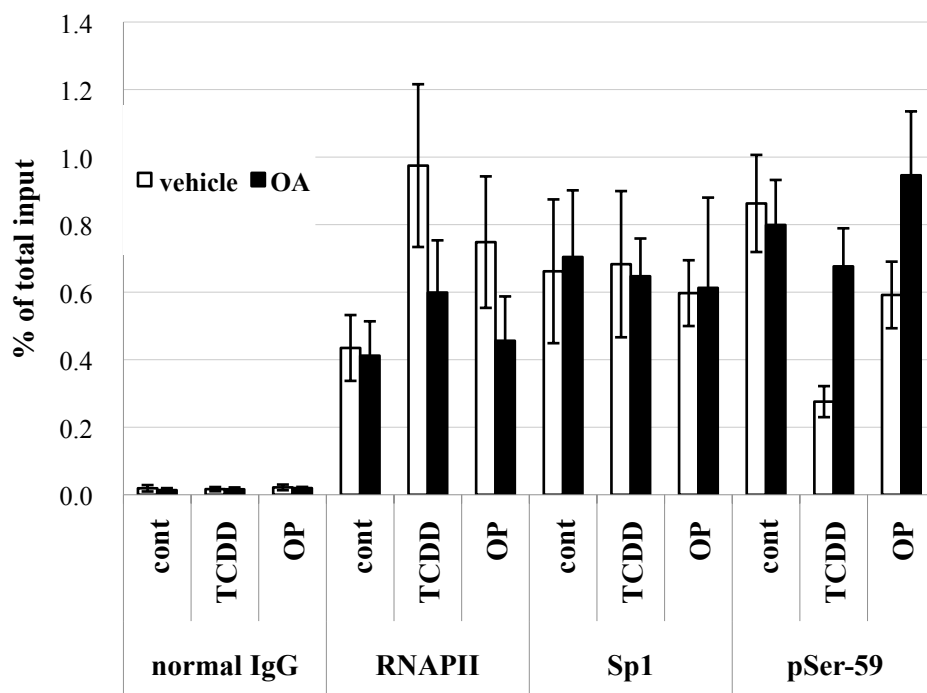
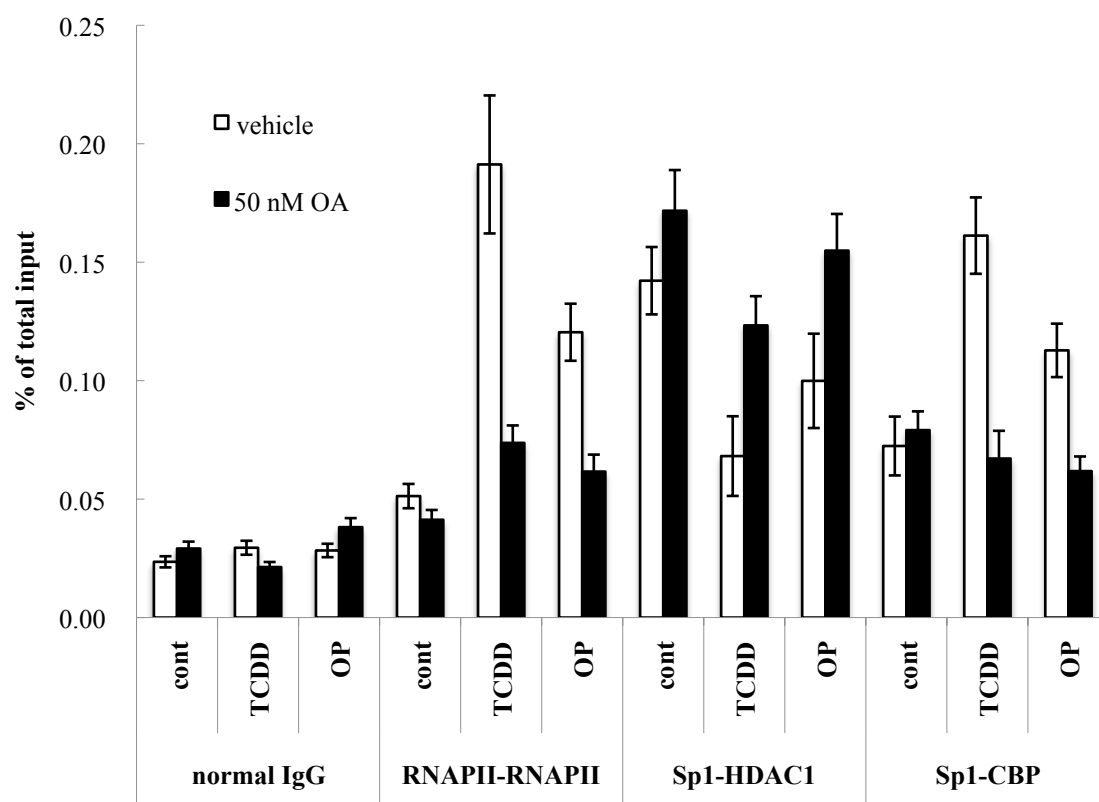


Figure 15



☒ 1 6

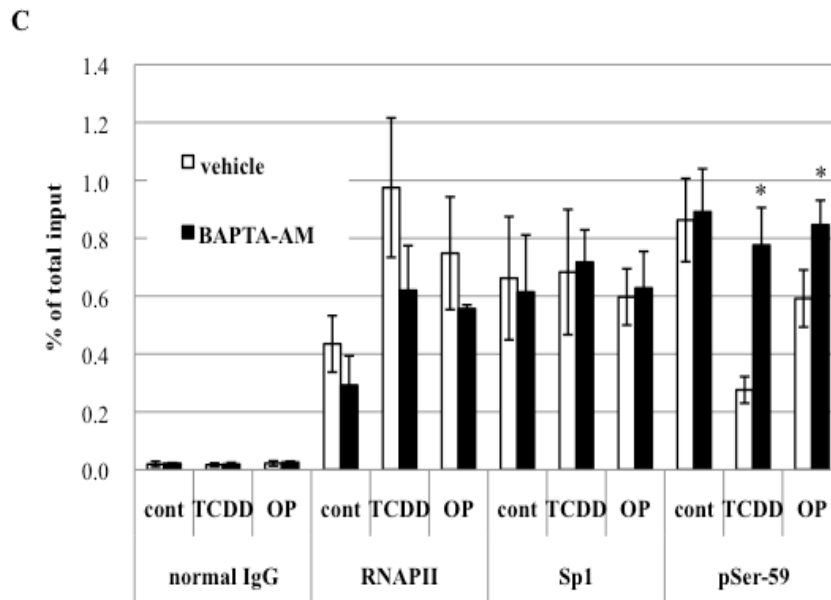
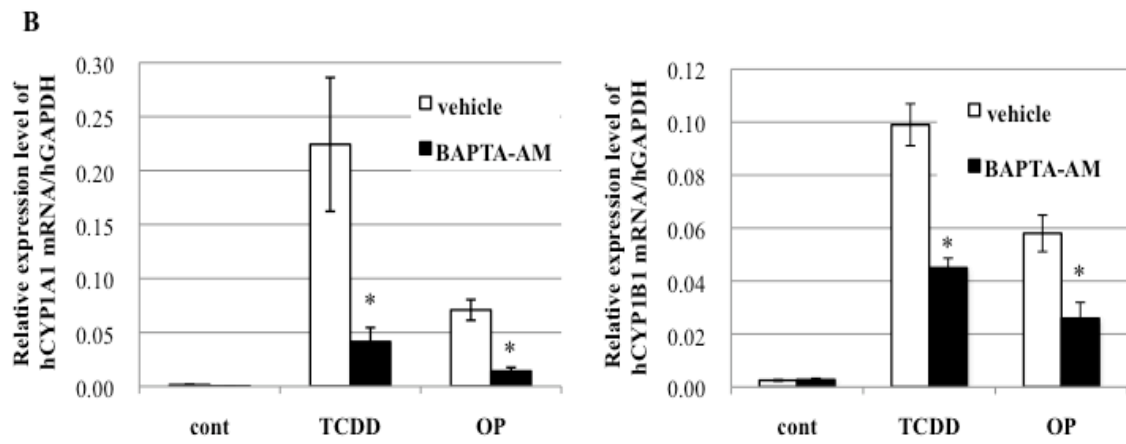
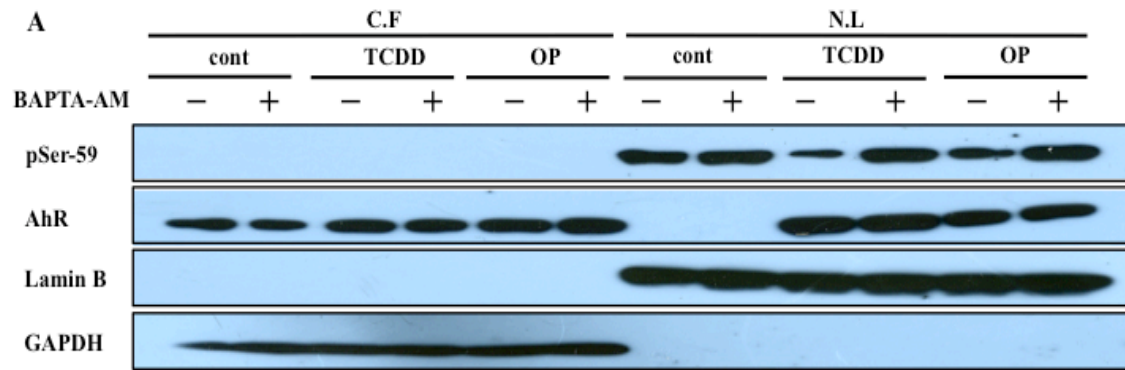


図 1 7

		HepG2	MCF-7	Caco-2	
B 発現が少ない	α	+	+	+	ほとんどの臓器で発現 細胞質に局在 7個のWD repeatを持つ
	β	-	-	+	
	γ	-	+	-	
	δ	+	+	+	
B' 発現が少ない	α	+	+	+	脳や筋肉、心臓に多い 主に細胞質、核にも存在 ARM repeatを持つ
	β	-	-	-	
	γ	+	++	+	
	δ	++	+	+	
	ϵ (発現が多い)	+	++	++	
B'' 発現が他に比べ 多い	α (発現が少ない)	+	+	+	EF-handを持つ 核に多く局在
	β	++	+	++	
	γ	++	+	+	
B''' 発現していない	STRN	-	-	-	脳に多く存在 細胞質に局在 CaM結合能がある WD repeatを持つ
	STRN3	-	-	-	

☒ 1 8

clustalw.aln

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
human      MSDQDHSMDDEMTAVVKIEKGVGGNNGGNGNGG-GAFSQARSSSTGSSSSTGGGG-QESQP
Chimpanzee MSDQDHSMDDEMTAVVKIEKGVGGNNGGNGNGG-GAFSQARSSSTGSSSSTGGGGQESQP
goat       MSDQDHSMDDEMTAVVKIEKGVGGNNGGNGNGS-GAFSQARSGSAGSSSSSGGGG-QESQP
mouse      MSDQDHSMDDEVTAVVKIEKDVGGNNGGSGNGGGAAFSQTRSSSTGSSSSSGGGGGQESQP
rat        MSDQDHSMDDEVTAVK-IEKGVGGNNGGSGNGGGAAFSQTRSSSTGSSSSSGGGGGQESQP
Drosophila -----MLTDMTPTAGQLYGSQIPAMGMNISNIATHLQKPQVNPDHPS-----LRG
          : ::*..      .      * . . . . : . * . . . . *      :

human      SPIALLAATCSRIESPENENSNNNSQGPSQSGGTGELDLTATQLSQGANGWQIISSSSGATP
Chimpanzee SPIALLAATCSRIESPENENSNNNSQGPSQSGGTGELDLTATQLSQGANGWQIISSSSGATP
goat       SPIALLAATCSRIESPENENSNNNSQGPSQSGGTGELDLTATQLSQGANGWQIISSSSGATP
mouse      SPIALLAATCSRIESPENENSNNNSQGPSQSGGTGELDLTATQLSQGANGWQIISSSSGATP
rat        SPIALLAATCSRIESPENENSNNNSQGPSQSGGTGELDLTATQLSQGANGWQIISSSSGATP
Drosophila TPLAMLAQC-----KLSNKSPPP-----LADAAVGKGFHPWKKSPNSPAAGS
          :***:*** * .      : **:* *      *: : : : * : * : ..*.* .
```

図 1 9

