

学 位 論 文 題 名

カロテノイドおよびレチノイン酸による転写調節因子
アрилハイドロカーボン受容体の新規調節機構について

学位論文内容の要旨

【背景と目的】薬物代謝酵素cytochrome P450 (CYP) 1Aサブファミリーの発現量は、リガンド依存性転写調節因子であるaryl hydrocarbon receptor (AHR)によって調節されている。リガンドが結合するとAHRは細胞質から核内へ移行し、AHR nuclear translocator (ARNT)と2量体を形成し、DNA上にある外来異物反応領域(XRE、xenobiotic responsive element)に結合して下流の遺伝子の転写を開始する。CYP1Aサブファミリーをはじめ、レチノイン酸の生成・分解に関与する多くの酵素がAHRによる転写調節を受けている。そのため、レチノイン酸の生成・代謝とAHRによる転写調節は相互に影響しあう可能性が考えられるが、その関連性に着目した研究はほとんどない。また、レチノイン酸の前駆物質であるカロテノイドはリガンド非依存性にAHRを活性化する可能性が示唆されているが、その詳細もまたいまだ明らかにされていない。本研究ではAHRによる遺伝子転写調節機構がカロテノイドやレチノイン酸によってどのような影響を受けるかについて明らかにした。

【第1章】Wistarラット(オス、8週齢)にカロテノイドの1つであるアスタキサンチン(Ax)を経口投与し(100 mg/kg/day、3日間)、肝臓におけるCYP1A1mRNAおよびタンパク質発現量の変化と代謝活性への影響を調べた。対照群に比べ、Ax投与群の肝臓ではCYP1A1のmRNAおよびタンパク質発現量がそれぞれ約5.5倍と約8.5倍に増加していた。しかし、Ax投与群のCYP1A活性は対照群の約2.5倍であり、タンパク質発現量の増加程度から予想したよりも小さい値であった。そこで、酵素反応に際してCYPに電子を供給するNADPH P450 reductaseの活性を測定したところ、その活性は対照群の約半分に低下していた。さらに、無処置ラットのミクロソームを用いてAx存在下でNADPH P450 reductase活性を測定したところ、その活性はAx濃度依存性に低下した。Axは脂質に高い親和性を示し、細胞内においてはリン脂質で構成される膜、特にミクロソームに局在すると報告されている。つまり、Axの摂取によってCYP1A1の発現量が誘導されるが、ミクロソーム膜に残存するAxはNADPH P450 reductaseによる電子供給を阻害することでCYP酵素活性を間接的に減少させることがわかった。

【第2章】AxによってCYP1A1の転写調節因子AHRがカロテノイドによってどのような影響を受けるかについて調べた。ラット肝癌由来細胞株H4IIEにおいてCYP1A1のmRNA発現量はAx濃度依存性に増加し、50 μ MのAxによって対照の約23倍に増加させた。また、Axは緑色蛍光タンパクを融合したヒトAHR (AHR-GFP)を細胞質から核へ移行させた。次に、CYP1A1の転写調節領域を用いたレポータ

ーアッセイから、Axは転写開始点から上流1.2kbの領域に作用してCYP1A1転写の活性化を引き起こすことが分かった。この領域にはAHRの標的シス配列であるXREが4つ存在する。そこでゲルシフトアッセイを行ったところ、Ax刺激後の核タンパク質はXREに結合することが示された。さらに、チロシンキナーゼ阻害剤genisteinによって、AxによるCYP1A1転写活性化作用は打ち消された。AxはAHRの典型的なリガンドとまったく異なる化学構造を有し、AHRのリガンド結合部位に対する親和性が非常に低いことが報告されている。これらのことから、Axはチロシンキナーゼカスケードを介して、間接的にAHRによる転写調節を活性化することが示唆された。

【第3章】多くのカロテノイドは生体内で代謝されてレチノイン酸に変換され、retinoic acid receptor (RAR)およびretinoid X receptor (RXR)を介してさまざまな生理活性を発揮する。そこで次に、レチノイン酸がAHRによる転写調節機構にどのような影響を与えるかを調べた。ヒト肝癌由来細胞HepG2に*all-trans* retinoic acid (atRA)を曝露した。CYP1A1転写調節領域における転写活性化能はatRA濃度依存性に対照の約半分まで減少し、10 nMのatRAはCYP1A1 mRNA発現量を対照の約45%まで減少させた。RARαおよびRXRαのノックダウンによりatRAによるCYP1A1転写抑制作用は打ち消されたことから、atRAはRARαおよびRXRαを介してCYP1A1の転写を抑制するとわかった。また、クロマチン免疫沈降法により、CYP1A1の転写調節領域におけるARNTのリクルートが1-100 nMのatRAによって強く阻害されることが明らかになった。これらの結果は、生理的濃度のatRAがARNTのXREへの結合を阻害し、AHR/ARNTによる転写調節を抑制するという全く新しい機構を示すものである。

【まとめ】AHRはCYP1A1などレチノイン酸の生成に関与する多くの遺伝子の転写制御を行っている。本研究により、レチノイン酸の前駆物質であるカロテノイドはAHRを活性化し、レチノイン酸はAHR/ARNTの機能を抑制することでその制御遺伝子の転写量を減少させることが明らかになった。これらは細胞内のレチノイン酸濃度の一定に保つことに寄与していると考えられ、AHRの重要な生理的機能の一つであると予想される。また、RARαおよびRXRαを介して低濃度のレチノイン酸がAHR/ARNTの転写調節機構を修飾したことは、RAR/RXR-AHR/ARNT間の新たな相互作用を示唆するものである。本研究の成果は、いまだ明らかになっていないAHRの生理的役割について有用な情報となると考える。

学位論文審査の要旨

主査	教授	石塚	真由美
副査	教授	稲波	修
副査	教授	木村	和弘
副査	講師	池中	良徳

学位論文題名

カロテノイドおよびレチノイン酸による転写調節因子 アリルハイドロカーボン受容体の新規調節機構について

多くの発がん前駆物質の活性化に関与するシトクロムP450 (CYP) 1Aサブファミリーの発現量は、リガンド依存性転写調節因子であるAryl hydrocarbon receptor (AHR) によって調節されている。リガンドが結合するとAHRは細胞質から核内へ移行し、AH Receptor Nuclear Translocator (ARNT) と2量体を形成し、DNA上にある外来異物反応領域 (XRE、xenobiotic responsive element) という配列に結合して下流の遺伝子の転写を開始する。AHRはダイオキシン受容体とも呼ばれており、ダイオキシン類や多環芳香族がリガンドとしてAHRに結合することが知られている。また、カロテノイド類などによりCYP1A1が誘導されることからリガンド非依存性のAHRによるCYP1A1誘導機構の存在も示唆されている。しかしながら、これまでの研究では、ダイオキシンなど高濃度の外来性リガンドによるAHRの活性化およびCYP1A1誘導に着目したものが多く、生理的条件下でのAHRの役割やリガンド非依存性カスケードについてはいまだに明らかになっていない。

大野田実氏の研究では、AHRのリガンド非依存性転写調節機構およびリガンド不在時のCYP1A1転写調節機構について注目し、カロテノイドとレチノイン酸を用いて、前述のAHRによる転写調節カスケードがどのような変化を受けるかを調べた。

カロテノイドの1つであるアスタキサンチン (Ax) をラットに投与した場合には、AxはCYP1A1の転写誘導を引き起こし、タンパク質発現量を増加させるが、ミクロソーム膜にAxが残存し、そのAxはNADPHシトクロムP450還元酵素による電子供給を阻害することでCYP酵素活性を間接的に減少させるという2相性の反応があることを見出した。また、ラット肝癌由来細胞株H4 II EにおいてAxは濃度依存性にCYP1A1のmRNA発現量を増加させたが、AHRの核内への移行の割合やその時間は典型的なリガンドの一つであるSudan IIIと異なっていることを見出した。Axは転写開始点から上流1.2kbの領域に作用してCYP1A1転写の活性化を引き起こし、Ax刺激後の核タンパク質はXREに結合することが示された。

一方、ヒト肝癌由来細胞HepG2に生理的濃度を含む0.1-1000nMのオールトランスレチノイン酸 (atRA) を曝露したところ、CYP1A1mRNA発現量およびCYP1A1転写調節領域における転写活性化能はatRA濃度依存性に対照の約半分まで減少した (EC_{50} は約5nM)。レチノイン酸受容体 α (RARA) のノックダウンおよびRAR阻害剤の添加によりatRAによるCYP1A1転写抑制作用は打ち消されたことから、atRAはRARAを介してCYP1A1の転写を抑制することがわかった。また、ヒトCYP1A1転写調節領域には4つのXREと1つのレチノイン酸反応領域 (RARE) が存在する。これらのシス配列を欠損または変異させたレポータープラスミドを用いて行ったレポーターアッセイから、XREは生理的条件下でのCYP1A1の恒常的発現に寄与することと、atRAによるCYP1A1の転写抑制はRAREではなくXREを介していることが示された。また、クロマチン免疫沈降法によりプロモーター領域へのAHRおよびARNTのリクルートを調べたところ、1-100nMのatRAによってARNTのリクルートのみが強く阻害された。

以上の結果から、大野円実氏は、カロテノイドやレチノイン酸といった食物成分がAHRによる転写調節機構を活性化または抑制することを新たに明らかにした。特に、生理的濃度のatRAがARNTのXREへの結合を阻害することでCYP1A1の転写を抑制するという全く新しい機構を提示している。本研究の成果は、いまだ明らかになっていないAHRの生理的役割について有用な情報であると評価した。よって、審査員一同は、上記学位論文提出者大野円実氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。