

## 外来化合物に対する生体反応の分子機構

### Molecular Mechanism of Biological Response to Xenobiotics

代表研究者 東北大学大学院理学研究科 教授 藤井 義明  
Prof., Faculty of Science, Tohoku University  
Yoshiaki Fujii-Kuriyama

共同研究者 大阪市立大学 医学部 教授 船江 良彦  
Prof., Medical School, Osaka City University  
Yoshihiko Funac

東北大学大学院理学研究科 助教授 十川 和博  
Assoc. Prof., Faculty of Science, Tohoku University  
Kazuhiro Sogawa

東北大学大学院理学研究科 助手 菊池 康夫  
Res. Assoc., Faculty of Science, Tohoku University  
Yasuo Kikuchi

Functional roles of Ah receptor (AhR) /Ah receptor nuclear translocator (Arnt) complex in the drug-induction of cytochrome P4501A1 was investigated by using isolated cDNA clones for the two proteins. The AhR/Arnt complex enhanced *in vitro* transcription of CYP1A1 gene in cooperation with Sp1. The two transcription factors interacted with each other on their cognate DNA elements to enhance the transcription. cDNA clones for novel members of the b/HLH/PAS family were isolated from cDNA libraries of mouse embryos and their expressions were investigated by the RNA blot hybridization and whole mount *in situ* hybridization. They were expressed specifically in the limited tissues of the developing embryos, suggesting the functional roles in the development. One of the clones is mSim, a mouse counterpart of the human gene which is suggested to be a causative gene for Down Syndrome.

#### 研究目的

ダイオキシンやベンツピレンなどの環境汚染物質が生体に取り込まれると奇型の誘導、発癌のプロモーション、上皮組織の異形成、免疫力の低下、薬物代謝酵素の誘導などの多彩な生物作用を示す。これらの生物作用はマウスの遺伝学的研究によってAhリセプター(AhR)によって仲介されると考えられている。我々は薬物代謝酵素のシトクロムP450(CYP1A1)の誘導機構の研究を中心にしてこれらの生物作用の分子機構の研究を続けてきている。これまでにCYP1A1の外來異物による合成誘導にはCYP1A1遺伝子の5'上流に存在するXRE(xenobiotic responsive element)とBTE(basic transcription element)の制御配列が関わっていることを明らかにしてきた。cDNAクローニングの結果、AhRはXREに働くb/HLH/PAS構造を持つ新しい受容体型転写因子であること、一方BTEに働く因子はSp1であることが明らかとなった。

最近AhR遺伝子の相同組換えによる遺伝子破壊マウスの実験によって、AhRは肝及び免疫系の発生・分化に関与していることが報告され、AhRは生命現象に深く関わっていることが示唆されている。本研究の目的はAhRによる転写調節の機構を詳細に検討すること及びb/HLH/PAS構造を持つ新しい転写因子の生物学的意味を明らかにすることである。

#### 研究経過

薬物による薬物代謝酵素CYP1A1の誘導機構の研究から始まったAhRの研究はcDNAクローニ

ングによって、その一次構造が決定された結果、b/HLH/PAS構造モチーフを持つ新しい受容体型転写であることが明らかになった。以後の研究は1) AhRとSp1によるCYP1A1の誘導的発現機構、2) AhRの構造と機能、3) AhRと類似の構造モチーフを持つ転写因子の探索とその機能、の3つに大別される。研究は順調に推移しており、b/HLH/PASタンパク質に属するDrosophilaのSimのマウスホモログとしてcDNAが単離されたmSimがDown syndromeの原因遺伝子である可能性が示唆されて、予想外の研究の進展の可能も出始めている。

## 研究成果

### 1) AhRとSp1によるCYP1A1の誘導的発現機構

AhRは細胞質に存在しているときにはHSP90と結合しているが、この時にはArntとヘテロ2量体を形成することができない。しかしTCDDなどの誘導物質が細胞に取り込まれるとこれと結合してHSP90から解離し、Arntとヘテロ2量体を形成する。形成されたAhR/Arntヘテロ2量体はXRE結合能を示すことがゲルシフト法によって明らかになった。2量体形成には、HLH構造とPAS構造が重要であることが示された。Arntはそれ自身でホモ2量体を形成し回文構造のE box配列CACGTGを認識して結合することが示された。従ってXREのCACGCN(A/T)の塩基配列は、前半のCACはAhR/Arntヘテロ2量体のArnt、後半のGCN(A/T)はAhRのb領域によって認識されると結論された。*in vitro*の転写系ではXREとBTE配列の存在するプロモーターがAhR/ArntとSp1の添加によって相乗的に活性化されることが示された。DNase Iフットプリント法で検討すると両因子の各制御配列への結合性に相乗効果が認められた。即ち各々の制御配列へ結合する因子の一方が結合していると他方が結合し易くなる。

### 2) AhRの構造と機能

マウスにはTCDDなどに対して薬物代謝酵素の誘導性及び発癌性について感受性の違う系統が知られている。C57BL/6は高感受性、DBA/2は低感受性の代表的な系統である。これはAhRの違いによることが遺伝解析の結果明らかになっている。cDNAクローニングによってその構造を比較すると両者の間で5アミノ酸の置換が見出され、低感受性DBA/2のAhRのTCDDに対する解離定数(kd)は高感受性に比較して約6倍高いことが分かった。これはC57BL/6のAhRの371AlaがValに置換しているためであることが明らかとなった。このアミノ酸の位置は図-1に示されているPAS-B領域にあり、先にリガンド結合領域として報告されている部分である。このアミノ酸をAspに変えたりリガンド結合能は全く失われる。欠失変異を導入することによりHLHとPASの両領域が各々協同して2量体の形成に働くことが示された。

転写活性化ドメインについてはAhRの場合はGluに富む領域を中心に転写活性化能があり、ArntはC末端の34アミノ酸に転写促進活性があることが示された。

### 3) AhRと類似の構造モチーフを持つ転写因子の探索とその機能

マウス胎児cDNAライブラリーからRT-PCR法によって類似の塩基配列を持つcDNAのスクリーニングを行い、bHLH/PASの塩基配列がSimと高いホモロジーを示すクローンが2種類得られ、これをmSim、mSim2と命名した。mSimは発生の過程で間脳にのみ発現し、以後時間経過と共に鰓弓、前肢などにも特異的な発現が見られ、神経系及び比較的限られた組織で働いていることが分かった。mSimはArntと強い親和性を示し、AhRよりもむしろ強くArntとヘテロ2量体を形成する。最近、Down Syndrome Critical Region (DSCR) 21q22・2にdSimに類似の配列が存在することが報告され、このSim類似遺伝子がDown Syndromeの原因遺伝子である可能性が指摘された。mSimのFISH法による染色体マッピングを行ったところマウス染色体16番のC3.3-C4バンドに存在することが明らかになった。この部分はヒト染色体21q22・2を含む部分と相同の部分

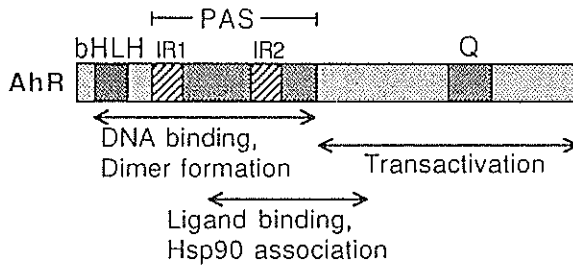


図-1 AhRの機能ドメイン  
Q、Gluに富む領域；IR1、IR2；繰り返し構造

87	TLDCFFVFWA-SGKIMFISETASVHLGLSQVELTGN	SIYEY	IRPSQHDE	mSim
86	TLDCFFVFWA-PGKIMFISETASVHLGLSQVELTGN	SIFEY	IRHNYQDE	dSim
119	ALNGFVLVVT-ADAFLFYASSTIICDYLGFQOSDVIHC	SVYELI	IRHTEDRRE	mAhr
121	ALNGFVLVVT-TDALVFYASSTIICDYLGFQOSDVIHC	SVYELI	IRHTEDRRE	hAhr
171	AADGFLFIVSCETGRVWVSDSMIVPVIHQPOSEWFG	STLYDQVHPD	VDK	mArnt
171	AADGFLFIVSCETGRVWVSDSMIVPVIHQPOSEWFG	STLYDQVHPD	VDK	hArnt
238	--DFECCVIRMHGCIMLITFTSITDVLGVERDMLGRSF	IRHVLKDRRT		dPer
<hr/>				
136	MTAVL-TAHPLHHHLQDE	-----	YE-----	mSim
135	MNAIL-SLHPHINQFLAQTHTPIGSPNGVQHPSA-YDHR	-----	-----	dSim
168	FRHV---HWALNP---DSAGCFDEAHGPPQAAVYTPDQ	-----	-----	mAhr
170	FRDQ---HWALNPSCQTESGQTEEATGLPQTVVQYNPDQ	-----	-----	hAhr
221	LREDLSTENALGFRVLDLKTETVKKEGQSSNRMCMSRRS	FICMRRCG		mArnt
221	LREDLSTENALGFRVLDLKTETVKKEGQSSNRMCMSRRS	FICMRRCG		hArnt
286	FASDI-----TIGSHIDSRGAVFKD	-----	AKSTFC-----	dPer
<hr/>				
156	-----IEREFTFRMKCVLAKRNAGLTCSGFKVIHCSGY	IRIKIRQYHLD		mSim
174	--GSHTIEIERTFFRMKCVLAKRNAGLTSGFKVIHCSGY	IRIKIRYDR		dSim
202	LPPENASFMERCFRCRLRCLLDNS-----SGFLAMNFQGR	IRKYLHGQKK		mAhr
208	IPPENSPLMERCFRCRLRCLLDNS-----SGFLAMNFQGR	IRKYLHGQKK		hAhr
271	TSSVDVEVMRRLSFRNRCRNGLSVKGEPEHFVVVHCTGY	IRKAWPPAGV		mArnt
271	SSVDVEVMRRLSFRNRCRNGLSVKGEPEHFVVVHCTGY	IRKAWPPAGV		hArnt
313	-----VMLRNYRGLKSGGFGVIGRP	-----	VSEPFRLG--IRHTEAEE	dPer
<hr/>				
198	MSLYDSCYQ---IVGLVAVGQ-SLPHS-AITEIKL--HNNFMERASLD			mSim
222	GDCQGS LIQ---NLGLVAVGH-SLPHS-AITEIKL--HNNFMERAKLD			dSim
246	KGKDGALP---POLALFAIAT-ELQPP-SILEIRT--KNFIRTKHRLD			mAhr
252	KGKDGSLP---POLALFAIAT-ELQPP-SILEIRT--KNFIRTKHRLD			hAhr
321	SIFDDPEAGQSRFCLVAIGRLQVTSSPNCIDMSNICOPTF	IRSRHNIE		mArnt
321	SIFDDPEAGQSRFCLVAIGRLQVTSSPNCIDMSNICOPTF	IRSRHNIE		hArnt
351	AREFDNYMVS-NRINMLVICAT-IRIKESYKVFEEIRSK	IRKPKFAIRHTAT		dPer
<hr/>				
240	LKLIFFDRVTELTGYEPDQLIERTL-YHHVRCCTFHLRY	AHLLLV-K		mSim
264	MKLIFFDRVSQLTGYEPDQLIEKTL-YQYIHAADIMAFRC	SHQILLY-K		dSim
289	FPIGCDKAGQLILGYTEVELTRGSGYCFIHAFDILHCA	IRSHIRMT-T		mAhr
295	FPIGCDKAGRIVLGYTEAELTRGSGYCFIHANMLYCA	IRSHIRMT-T		hAhr
371	SFTFVDHRCVATVGYDPELILKNI-VEFCHEEDQQLRDS	FQVVMK		mArnt
371	SFTFVDHRCVATVGYDPELILKNI-VEFCHEEDQQLRDS	FQVVMK		hArnt
399	GIISHVDSANSAALGYLPDILCRSU-MDEYHHEELSVNKE	IRTYETVMK-K		dPer
<hr/>				
288	QVYTKYK---RLLSKLGGVWVQSYNIVVHNSRSRPHCI	IRSVNYML		mSim
312	QVYTKYK---RFLTKGSGVWVQSYNIVVHNSRSRREVI	IRSVNYML		dSim
338	RESGTVF---RLLAKHSRWRWVQSNARLIY--RNGRPDI	IRIATQPL		mAhr
344	RESGIVF---RLLTKRNRWTVQSNARLLY--KNGRPDI	IRIVTQPL		hAhr
420	QVLSVMF---RFRSKTREWLMRISSEFTCNVYDEIRY	IRIICTNIV		mArnt
420	QVLSVMF---RFRSKTREWLMRISSEFTCNVYDEIRY	IRIICTNIV		hArnt
447	EQTAGASELCKPYRFLICNGCYMLEDEWTSVMEVSRKLE	IRVGHRRVF		dPer

図-2 b/HLH/PAS領域のアミノ酸配列の比較  
mArnt2と同じアミノ酸は実線で囲い、mSimと同じアミノ酸はシャドウで示してある。縦線は繰り返し配列の部分でN末端から各々IR-1、IR-2

であることが分かっているのでヒトのSim類似遺伝子に対応する遺伝子がmSim遺伝子であると結論された。遺伝子量の増加がどの様にこの病気に関わっているかは今後の問題である。

ArntのcDNAをプローブにしたスクリーニングにより、Arntに類似のcDNAクローンが単離された。塩基配列を決定した結果Arntによく似ていることからArnt2と命名した。Arnt2は2量体形成や転写活性化能などの性質に関してはArntとよく似ている。図-2にこれまで一次構造の解明されたb/HLH/PASタンパク質のPAS領域のアミノ酸配列の比較が示されている。この比較から構造の類似性によって2つのグループに分けられることが分かる。一つはPer, Arnt及びArnt2のグループ、他はAhR及びmSimのグループである。この構造の違いは2量体形成能の違いに反映していた。coimmunoprecipitation法や酵母細胞を用いたtwo hybrid法で2量体形成能を検討してみるとPerのグループはホモ2量体あるいは他のグループのbHLH/PASタンパク質とヘテロ2量体を形成する。しかしAhRのグループの2量体の形成は他のグループのタンパク質との間でのみ観察され、同じグループ内のタンパク質同志では2量体は形成されない。

Arnt2とArntの違いは組織特異的な発現パターンで認められた。RNAプロットハイブリダイゼーションではArntは殆ど全ての組織に発現が見られるのに対し、Arnt2は脳と腎にのみ発現することがわかった。胎児を用いたwhole mount hybridizationによってその発現を検討した結果でも、9.5日胚ではArntは可成り広い組織で発現するのに対して、Arnt2は神経管に特異的な発現が見られた。Arnt2の真のパートナー分子がどのようなものか、標的遺伝子は何かという問題が今後の重要な課題である。

#### 今後の課題と発展

薬物代謝酵素であるCYP1A1遺伝子の誘導機構の研究を更に詳細に展開することによって、受容体型転写因子AhRがRNAポリメラーゼIIを含む基本転写装置にどの様に働きかけて転写を活性化するのかをその機構が明らかになると考えられる。薬物代謝酵素遺伝子以外の標的遺伝子を明らかにして正常状態におけるAhR/Arntの役割を解明することも重要な課題である。AhRのPAS-B領域がリガンド結合部位であることがわかっているので、この部分の立体構造とリガントの結合性との構造的関連性を理解することが可能になれば薬剤の開発などにおける催奇性を考慮したドラッグデザインに大きな貢献をすることが期待できる。b/HLH/PAS転写因子はホモ2量体あるいはヘテロ2量体の形成によって、標的遺伝子の多様性を示すと考えられる。このような点でb/HLHあるいはb/HLH/LZ型の転写因子、MyoD、Myogenine、E47及びbZip型の転写因子、Fos、Jun、CREBなどと似ている。b/HLH/PAS転写因子は発見されてまだ日が浅いので、これまで発見されているものの他に、更に類似因子の検索を行うと共に、これまで我々によって構造の決定された因子mSim、mSim2、Arnt2、AhRについて、*in situ* hybridizationで発現の場所を検討すると共に遺伝子破壊マウスやトランスジェニックマウスを作製することによってその機能を明らかにしていきたいと考えている。mSimはヒトのDown Syndromeの原因遺伝子と考えられる遺伝子のマウス遺伝子であることが示されたのでこの遺伝子を用いて21番染色体トリソミーの病態発生の原因を検討したい。AhRはcDNAクローニングによる構造決定の結果、新しい受容体型転写因子であること、更に幾つかの類似因子も発見されて、生物の発生過程で重要な役割を演じている可能性が示唆されてきた。ダイオキシンなどの示す生物作用、催奇性、発癌のプロモーション作用、上皮組織の異形成の機構についてはまだ何もわかっていない状態であるがこれらの問題はAhRを含むb/HLH/PAS転写因子ファミリーの発生過程における役割などの研究の過程で明らかになるものと期待される。

本研究を推進するに当たって日産科学振興財団のご支援を賜り期待以上の成果が得られたと考えております。厚く御礼申し上げますと共に財団の益々のご発展をお祈り致します。

## 発表論文リスト

- Y. Fujii-Kuriyama. Drug-inducible P-450s. in Cytochrome P-450 Kodansha (Tokyo) and VCH (Weinheim, New York) ed. by T. Omura, Y. Ishimura and Y. Fujii-Kuriyama. 224-230 (1993)
- Y. Kikuta, E. Kusunose, K. Endo, S. Yamamoto, K. Sogawa, Y. Fujii-Kuriyama and M. Kusunose. A novel form of cytochrome P-450 family 4 in human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 268:9376-9380 (1993)
- K. Sogawa, H. Imataka, Y. Yamasaki, H. Kusume, H. Abe and Y. Fujii-Kuriyama. cDNA cloning and transcriptional properties of a novel GC box-binding protein, BTEB2. *Nucl. Acids Res.* 21:1527-1532 (1993)
- N. Watanabe, M. Kitazume, J. Fujisawa, M. Yoshida and Y. Fujii-Kuriyama. A novel cAMP-dependent regulatory region including a sequence like the cAMP-responsive element upstream of the human CYP21A2 gene. *Eur. J. Biochem.* 214:521-531 (1993)
- T. Tajima, K. Fujieda and Y. Fujii-Kuriyama. *De novo* mutation causes steroid 21-hydroxylase deficiency in one family of HLA-identical affected and unaffected siblings. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77:86-89 (1993)
- K. Sogawa and Y. Fujii-Kuriyama. Regulation of cytochrome P450 expression. Handbook of experimental pharmacology, Vol. 105, Cytochrome P450. ed. by J. B. Schenkman, H. Greim. Springer-Verlag( Berlin , Heidelberg) (1993)
- T. Tajima, K. Fujieda, K. Nakayama and Y. Fujii-Kuriyama. Molecular analysis of patient and carrier genes with congenital steroid 21-Hydroxylase deficiency by using polymerase chain reaction and single strand conformation polymorphism. *J. Clin. Invest.* 92:2182-2190 (1993)
- N. Matsushita, K. Sogawa, M. Ema, A. Yoshida and Y. Fujii-Kuriyama. A factor binding to the xenobiotic responsive element (XRE) of P-4501A1 gene consists of at least two helix-loop-helix proteins, Ah receptor and Arnt. *J. Biol. Chem.* 268:21002-21006 (1993)
- H. Imataka, A. Mizuno, Y. Fujii-Kuriyama and M. Hayami. Activation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat by BTEB, a GC box-binding transcription factor. *AIDS Res. & Hum. Retrovir.* 9:825-831 (1993)
- K. Sogawa, Y. Kikuchi, H. Imataka and Y. Fujii-Kuriyama. Comparison of DNA-binding properties between BTEB and Sp1. *J. Biochem.* 114:605-609 (1993)
- N. Ohe, Y. Yamasaki, K. Sogawa, J. Inazawa, T. Ariyama, M. Oshimura and Y. Fujii-Kuriyama. Chromosomal localization and cDNA sequence of human BTEB, a GC box binding protein. *Somatic Cell and Molecular Genetics.* 19:499-503 (1993)
- K. Nakayama, Y. Suwa, Y. Mizukami, K. Sogawa, and Y. Fujii-Kuriyama. Cloning and sequencing of a novel rat cytochrome P450 2B-encoding gene. *Gene.* 136:333-336 (1993)
- N. Watanabe, H. Inoue and Y. Fujii-Kuriyama. Regulatory mechanisms of cAMP-dependent and cell-specific expression of human steroidogenic cytochrome P450scc (CYP11A1) gene. *Eur. J. Biochem.* 222:825-834 (1994)
- J. Mimura, M. Ema, K. Sogawa, S. Ikawa, Y. Fujii-Kuriyama. A complete structure of the mouse Ah receptor gene. *Pharmacogenet.* 4:349-354 (1994)
- Y. Fujii-Kuriyama, M. Ema, J. Mimura, K. Sogawa. Ah receptor: A novel ligand-activated transcription factor. *Exp. Clin. Immunogenet.* 11:65-74 (1994)
- M. Ema, N. Matsushita, K. Sogawa, T. Ariyama, J. Inazawa, T. Nemoto, M. Ota, M. Oshimura and Y. Fujii-Kuriyama. Human arylhydrocarbon receptor: functional expression and chromosomal assignment to 7p21. *J. Biochem.* 116:845-851 (1994)
- M. Ema, N. Ohe, M. Suzuki, J. Mimura, K. Sogawa, S. Ikawa and Y. Fujii-Kuriyama. Dioxin-binding activities of polymorphic forms of mouse and human Ah receptors. *J. Biol. Chem.* 269:27337-27343 (1994)
- H. Imataka, K. Nakayama, K. Yasumoto, A. Mizuno, Y. Fujii-Kuriyama, and M. Hayami.

- Cell-specific translational control of transcription factor BTEB expression. *J. Biol. Chem.* 269:20668-20673 (1994)
- Y. Fujii-Kuriyama, M. Ema, J. Mimura, N. Matsushita and K. Sogawa. Polymorphic forms of the Ah receptor and induction of the CYP1A1 gene. *Pharmacogenetics* 5:S149-153 (1995)
- A. Kobayashi, K. Sogawa, H. Imataka and Y. Fujii-Kuriyama. Analysis of functional domains of a GC box-binding protein, BTEB. *J. Biochem.* 117:91-95 (1995)
- K.Sogawa, R.Nakano, A. Kobayashi, Y.Kikuchi, N.Ohe, N.Matsushita and Y.Fujii-Kuriyama. Possible function of Ah receptor nuclear translocator (Arnt) homodimer in transcriptional regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:1936-1940 (1995)
- M.Ema, M. Suzuki, K. Hirose, K. Sogawa, Y. Matsuda, O. Gotoh, and Y. Fujii-Kuriyama. cDNA cloning of a mouse homologue of *Drosophila* Sim, its dimerization properties and chromosomal localization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* in press.
- K. Sogawa, K. Iwabuchi, H. Abe, and Y. Fujii-Kuriyama. Transcriptional activation domains of the Ah receptor and Ah receptor nuclear translocator. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* in press