

厚生科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

分担研究報告書

ダイオキシンの毒性発現の作用機序に関する研究

(2) SXR の細胞質・核間輸送の分子機構の解析

主任研究者 川尻 要 埼玉県立がんセンター（研究室）主幹

研究要旨 SXR (Steroid and Xenobiotic Receptor) は内分泌攪乱物質を含むさまざまな薬物のセンサーとして機能し、薬物代謝酵素 CYP3A4 やトランスポーターMDR1 の誘導的発現に関与している。ダイオキシンを含めた内分泌攪乱物質の複合的な生物機能への影響を解析するために、SXR の細胞質・核間輸送の分子機構について解析した。SXR の核移行シグナル (NLS) を同定し、NLS ではなく XRS (Xenochemical Response Signal) が核移行に関与していると報告されている薬物受容体 CAR (Constitutively Active Receptor) と比較した。

A. 研究目的

環境中の内分泌攪乱物質の汚染は複合的であり、その影響は細胞内の多様な受容体間の相互作用により生じると考えられる。我々は AhR/ARNT システムを中心とした研究を進展させることによりダイオキシンの毒性発現のメカニズムの解明をすすめているが、同時に受容体間の相互作用の研究も重要であると考えている。このような視点より、昨年度は内分泌攪乱物質の重要な作用点と考えられる性分化に関与する核内受容体である Ad4BP/SF-1 とその抑制因子である Dax-1 との細胞内での相互作用について、主に Dax-1 の細胞質・核間輸送の視点で解析した (*Mol. Endocrinol.*, 17, 2003 in press)。

本年度は AhR の他に SXR のリガンド依存的な核移行の分子機構について解析した (*Mol.*

Pharmacol., 63, 524-531 2003)。SXR (steroid and xenobiotic receptor) は PXR、PAR と呼ばれるリガンド依存的転写因子であり、核内オーファン受容体の一つである。SXR は広いリガンド特異性を持っており、多くの薬物、化学物質（内分泌攪乱物質）そして内在性のステロイドで活性化される。SXR は薬物の代謝及び排泄に関与する遺伝子を制御するだけでなく、二次胆汁酸等のステロイドセンサーとしても重要な役割を担っている。SXR は外来異物や lithocholic acid のような有毒な胆汁酸を解毒、排泄させるために薬物代謝酵素 CYP3A4 や薬物排泄トランスポーターMDR1 の発現を誘導することが知られている。

B. 方法

マウスに PXR (SXR) のリガンドである PCN (pregnenolone 16 α -carbonitorile) を投与し、肝臓の凍結切片を用いて免疫組織染色を行い、*in vivo* での PXR (SXR) のリガンド依存的核移行を検討した。SXR のさまざまな欠損変異体と β -galactosidase 融合タンパク及び Myc 融合タンパク発現プラスミドを作成し、HeLa 細胞に発現させ、活性染色または抗体染色を行って NLS 領域を同定した。GST と GFP の間に SXR の NLS 領域およびその変異型を融合させたりコンビナントタンパクを大腸菌で発現させ、これらの GFP 融合タンパクを HeLa 細胞の細胞質にマイクロインジェクションして、直接的な核移行活性を検討した。*In vitro* nuclear transport assay および *in vitro* nuclear rim targeting assay を行い、SXR の NLS と importin α の 3 つのサブファミリーとの相互作用を検討した。標的遺伝子 CYP3A4 の転写に SXR の NLS が影響を及ぼすか検討した。HepG2 細胞に CYP3A4 ルシフェラーゼレポータープラスミドと各種 SXR をコトランスフェクトし、転写活性を測定した。

C. 研究結果

肝臓における SXR の細胞内局在を検討するために、PCN 投与マウスとコントロールマウス由来の肝臓の凍結切片を用いて、SXR のマウスホモログの PXR の細胞染色をおこなった。PCN 投与マウスの肝臓において、PXR は明らかに核に存在していることが観察され、一方コーン油投与のマウスの肝では細胞質に分布していた。これらの結果により、PXR はリガ

ンド非存在下では肝細胞の細胞質中にとどまっているが、リガンドを投与することにより核へ移行することが示唆された。

SXR の核移行の分子機構を明らかとするため、HeLa 細胞に SXR を一過性に発現させ、抗 PXR 抗体で細胞を染色した。その結果、SXR はリガンド非依存的に核に局在していた。また SXR の N 末端に Myc-Tag を結合させた融合たんぱく質を発現させ、抗 c-Myc 抗体で染色しても SXR は核に局在していた。これらの結果により、HeLa 細胞において過剰に発現させた SXR はリガンド非存在下でも核へ移行することが示された。従って、これらの *in vitro* の系は SXR の核移行に必要なシグナル配列を決定するための有効な手段であると考えられる。

SXR の核移行に必要な領域を同定するために、PCR により様々な SXR の cDNA 断片を作成し、 β -gal 融合たんぱく質発現ベクターに組み込んだ。これらの β -gal 融合たんぱく質発現ベクターを HeLa 細胞で発現させ最終的に SXR の NLS は DBD 中のアミノ酸残基 66-92 に存在していることを明らかにした。

SXR(66-92)の核移行活性を直接的に示すために、精製した GFP との融合たんぱく質を HeLa 細胞の細胞質にマイクロインジェクションして核移行活性を証明した。SXR の NLS は SXR (66-71: RRAMKR) と SXR (88-92: RKTRR) という二つの塩基性アミノ酸クラスターで構成される双節型の NLS であることを様々な変異体により確認した。さらに、SXR(66-92)のアミノ酸残基 70 番目のリジンをセリンに置換すると移行活性は見られなか

った。なお、この変異は CAR の NLS 領域に相当するものである。

全長 SXR 分子中において SXR(66-92)が NLS として機能するか証明するために、推測される NLS 領域の変異型及び欠損型 Myc/SXR を HeLa 細胞で一過性に発現させた。その結果、R66A/R67A/R91A/R92A の変異を導入した際には核移行活性はみられなかった。また、SXR(66-92)を欠損した変異型の核移行活性も観察されなかった。従って、SXR(66-92)は NLS として機能しており、SXR の NLS は双節型の NLS であることが示された。

In vitro nuclear transport assay をおこない、SXR-NLS の核移行のメカニズムを検討した。NLS を含む GFP 融合たんぱく質を Ehrlich 腹水腫瘍細胞の細胞質抽出液と共に ATP 存在下 37°C でインキュベートしたところ、明らかな核への集積が確認され、対照的に、SXR(66-92)に R66A/R67A/R91A/R92A の変異を導入した SXR の mutant (Mt) NLS は核移行活性は全く観察されなかった。

SXR-NLS と様々な種類の importin α 間の相互作用の特異性を検討するために、3 つの GST-importin α (PTAC58, NPI1, Qip1) 及び importin β (PTAC97) の融合たんぱく質を用いて、*In vitro* nuclear rim targeting assay を on ice でおこなった。GST-SXR(66-92)-GFP とそれぞれの importin α をインキュベートすると、GFP 融合たんぱく質の核膜孔への集積が観察された。従って、SXR(66-92)はこれら 3 種類の importin α 分子に認識されることが示唆された。

本研究で明らかにした NLS が SXR の転写機能にとり本質的かどうかについて検討した。CYP3A4 ルシフェラーゼレポータープラスミド p3A4-362(7836/7) と野生型 SXR を HepG2 細胞に transfect するとリガンド (RIF) により約 30 倍転写活性は誘導される。しかしながら、NLS 内に R66A/R67A/R91A/R92A の変異を導入した SXR(Mt-SXR) または SXR(66-92) の領域を欠損させた SXR[Δ NLS-SXR] を HepG2 細胞にトランスフェクトすると、RIF 依存的な CYP3A4 レポーター活性は野生型 SXR のそれと比して大幅に減少した。これらの結果より SXR が核へ移行することは標的遺伝子の発現過程における第一段階であり、NLS である SXR(66-92)が SXR の核移行を通じて転写活性化に強く関与していることが示された。

D. 考察

SXR(PXR)は VDR や CAR と構造的かつ機能的に相関しており、これらのたんぱく質で核内受容体サブファミリー-NR1I を構成している。SXR の cDNA は 434 のアミノ酸をコードしており、DBD において hVDR とは 68%、hCAR とは 66% の相同性を持っている。核移行を制御する領域と DNA 結合する領域は多くの転写因子で重複することが知られており、機能的な共進化の結果によるものと考えられる。今回、SXR の核移行の分子機構と CAR の核移行の分子機構が全く異なるという興味深い結果が示唆された。SXR の核移行は双節型 NLS の SXR(66-92)によっておこなわれ、この領域は DBD であるアミノ酸残基 41~106

と完全に重複している。一方 hCAR の核移行は LBD 内に存在する C 末端の leucine に富む XRS によっておこなわれていることが示されている。SXR の NLS と NR1I サブファミリーに属するたんぱく質のそれに対応する領域を比較した。RRxxKR というように 9 種類の VDR たんぱく質及び 2 種類の benzoate X receptor (BXR) を含む 7 種類の SXR 間で N 末端のアミノ酸クラスターが完全に保存されていた。しかしながら、VDR および SXR (PXR, BXR) たんぱく質間で保存されているリジン 70 が RRxxS(L)K のようにセリン(ヒト、ラット、マウス CAR) またはロイシン (chicken xenobiotic receptor) に置換していた。対照的に、双節型 NLS の C 末端塩基性アミノ酸クラスターは R(K)xxRR のように NR1I サブファミリーの 20 種類全てのたんぱく質間で完全に保存されていた。従って、保存されているリジンのセリンまたはロイシンへのアミノ酸置換が CAR の核移行活性を減少させていると考えられる。実際 K70S としてアミノ酸置換をおこなった SXR(66-92)の変異型の核移行活性の消失がマイクロインジェクションで示された。

hCAR の LBD に存在するロイシンに富む XRS 領域と NR1I に属する 20 種類のたんぱく質のそれに対応する領域も比較した。9 種類の VDR たんぱく質は LxxLxxL という共通した配列を持っていた。7 種類の PXR(SXR, BXR) と 2 種類の CAR(マウス、ラット)は MxxLxxL の配列を、hCAR と chicken xenobiotic receptor は LxxLxxL の配列を持っていた。それゆえ、Zelko らによって同定された XRS

を @xxLxxL(@は isoleucine、methionine、leucine のような脂肪族アミノ酸)というコンセンサス配列としてみなすことができる。XRS モチーフは hCAR のリガンド依存的核移行に関与しているが、直接的な核移行のシグナルとして機能しているわけではないと思われる。このことは XRS を含む SXR(141-434)と β -gal との融合たんぱく質が全く核移行活性を有してなかったことで示された。XRS はヘリックス-ヘリックス疎水性結合を通じていくつかのタンパク因子と分子間相互作用すると考えられる。これらのタンパク因子がリガンド非存在下で肝細胞において、SXR や CAR のような xenosenser を細胞質に留めていると考えられる。

CAR と PXR (SXR) はマウス肝細胞の細胞質に局在し、それぞれのリガンドを添加すると核へ移行することが示された。このことは肝細胞において薬物受容体の LBD にリガンドが結合すると、受容体とその受容体の XRS モチーフに結合するアンカーリングたんぱく質間の相互作用の変化を通じ、これらの受容体の核移行が促進されるものと思われる。双節型の NLS を介する核移行メカニズムの活性が促進されることにより SXR は核へ輸送され、一方、CAR は NLS 活性が弱く、40kDa という小さい分子量のため受動拡散機構により核へ移行するものと推測できる。

しかしながら、この 2 種類の薬物受容体を培養細胞で過剰に発現させると、リガンド非依存的な核移行が観察された。これは in vivo と in vitro の実験系の違いによるものと考えられる。In vivo の実験系では定常状態の受容

体たんぱく質の局在を見ており、in vitro では過剰発現した受容体たんぱく質の局在を見ている。DBD 中の NLS 及び LBD 中の XRS が 2 種類の薬物受容体の細胞内局在に関与していることを考慮すると、in vitro では受容体が過剰に発現しているため、それを細胞質にとどめておくたんぱく質が不足してしまい自発的に受容体が核へ移行できるものと考えられる。しかし以上の推測を明確に証明するには薬物受容体の核移行における NLS 及び XRS のそれぞれの役割や相互作用の更なる研究が望まれる。

E. 結論

SXR の NLS を同定しその核移行の分子機構を解析した。NLS と XRS との相互作用がこれらの薬物受容体の核移行に重要であることが明らかになった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kawajiri, K., Ikuta, T., Suzuki, T., Kusaka, M., Muramatsu, M., Fujieda, K., Tachibana, and M., Morohashi, K. Role of LXXLL-motif and AF2 domain in subcellular localization of Dax-1. *Mol. Endocrinol.*, 17, (2003) in press

2) Kawana, K., Ikuta, T., Kobayashi, Y., Gotoh, O., Takeda, K., and Kawajiri, K.

Molecular mechanism of nuclear translocation of an orphan nuclear receptor, SXR. *Mol. Pharmacol.*, 63, 524-531 (2003)

2. 学会発表

1) Kawana, K., Ikuta, T., Takeda, K., and Kawajiri, K. Molecular mechanism of nuclear translocation of the nuclear orphan receptor-SXR.

14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, July, 2002, Japan (Sapporo)

2) 川名克芳、生田統悟、小林康人、後藤 修、武田 健、川尻 要：核内受容体 SXR の細胞質・核間輸送の分子機構 第 25 回日本分子生物学会年会 2002 年 12 月、横浜

3) 諸橋憲一郎、杉山紀之、鈴木大河、水崎博文、笠原 恵、吉岡秀文、Mohamad, Z., 生田統悟、川尻 要、福井由宇子：生殖腺・副腎皮質の形成を支える核内受容体の機能調節機構 第 25 回日本分子生物学会年会 2002 年 12 月、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし