

《若手研究者紹介》



転写因子およびエピジェネティクス系による トランスポーターの発現制御

菊 地 良 太 Ryota Kikuchi

東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室

1. はじめに

筆者は東京大学薬学部在籍時より杉山雄一教授の主宰する分子薬物動態学教室においてトランスポーター研究に携わり、修士課程・博士課程を修了後、平成19年4月からは日本学術振興会特別研究員(PD)として、同教室で日々研究に勤しむ日々を送っている(ことになっている)。最近では、数人の社会人研究生・大学院生・学部生とともに転写チームを結成し、自身の博士課程在籍中の研究成果を基盤としてトランスポーター研究の新たな方向性を探っている。同僚と研究成果を分かち合う喜びを感じる一方で、指導者としての自分の未熟さも痛感している今日この頃である。本稿では筆者が現在の研究課題に至った経緯にも触れつつ、これまでの研究成果・今後の展望について概説したい。

2. エピジェネティクスとの出会い

筆者が修士課程で取り組んだ研究テーマは、所属研究室における所謂「王道」な内容であった。詳細は割愛するが、修士課程2年間を通じて血液脳関門に発現する薬物トランスポーターの機能解析を行い、脳内から循環血中への排出輸送における有機アニオントランスポーター群の重要性を明らかとした。

筆者紹介：2002年3月東京大学薬学部薬学科卒業、2007年3月同大学大学院薬学系研究科博士後期課程修了、博士(薬学)を授与される。2006年4月～2007年3月日本学術振興会特別研究員(DC2)、2007年4月より同PDとして分子薬物動態学教室(杉山雄一教授)に所属。研究のモットー：常にストイック。楽な方向に行かない。趣味：20年来続けているピアノ、映画鑑賞。

その後博士課程に進学したわけだが、その頃の当研究室には、博士課程の学生は自分自身でPh. D.に値する研究テーマを設定し遂行するという暗黙の了解があった。筆者もこれに従い、いざ自身の研究テーマについて思いを巡らせてみたのだが、予想はしていたものの作業は難航を極めた。当初提案したテーマは、修士課程での研究テーマの延長とも呼ぶべきものであったが、いまいち具体性に欠けるとともに目新しさの感じられない内容であったように思う。そんな折、生物学系の雑誌の総説を読んで目に留まったのが、「エピジェネティクス」という単語であった。

当時、分子生物学・遺伝学の知識に乏しかった筆者には、この単語の意味することが全く想像できなかった。これは何だろう、そんな軽い気持ちで総説を読み進めていったのだが、次第に、エピジェネティクスというのは遺伝子発現制御に関する新しい概念であるということ、従来考えられていた転写因子群による発現制御システムよりも高次の制御システムであること、ポストゲノム時代における生命科学の新たなパラダイムであることがわかってきた。様々な実験ツールが揃い、分子論を含めた本格的な研究が始まったのは90年代以降らしい。この概念をトランスポーター研究に応用できたとしたら…。ここから筆者の博士課程の研究生活が始まった。

3. 研究の背景

前置きが長くなってしまったが、ここからは筆者らのこれまでの研究成果について概説していきたいと思う。できる限り平易に記したつもりだが、多少

なりの専門用語についてはご容赦いただきたい。

既に御存じの読者の方々も多いと思うが、トランスポーターは医薬品を含む低分子化合物の細胞膜透過を制御し、細胞内への取り込みあるいは排出を行う膜タンパク質群である。これらは肝臓、腎臓、小腸など体内の様々な組織に発現し、薬物・内因性物質の吸収・分布・排泄に重要な役割を果たしている。特に異物解毒に重要な組織である肝臓、腎臓には、異物排泄に働く薬物トランスポーター群が発現し、これまでの多くの *in vivo*, *in vitro* の研究により、トランスポーターの組織特異的発現は基質薬物の組織分布や消失経路、また薬効や毒性の重要な決定因子となっていることが明らかとなってきた¹⁾。

一般的に、比較的高分子量で両親媒性の薬物は主に肝臓での代謝・胆汁排泄を受けるのに対し、低分子量で親水性の薬物は主に腎臓において尿中に排泄される。両親媒性の有機アニオン化合物については、肝細胞の血管側膜に主に Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) family に属するトランスポーターが発現し、肝取り込み過程に重要な役割を果たしている。一方で、比較的亲水性の高い薬物や一部の両親媒性有機アニオン化合物について、腎臓近位尿細管上皮細胞の血管側膜に Organic Anion Transporter (OAT) family に属する二つのトランスポーター (OAT1 および OAT3) が同定され、*in vitro*, *in vivo* の解析によりこれらの化合物の尿細管分泌に関与することが示された。また OAT1, OAT3 と同じ遺伝子ファミリー (SLC22) に属する OAT4 および Urate Transporter 1 (URAT1) は尿細管再吸収に関与することが示唆されており、特に URAT1 は尿酸の再吸収に重要な役割を果たしている (図 1)。

薬物トランスポーター研究における分子生物学的アプローチが始まって 20 年以上が経過し、主要な

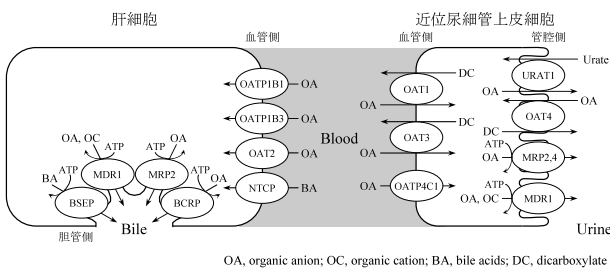


図 1 肝臓・腎臓における薬物の排泄に関与するトランスポーター

トランスポーターの基質特異性・組織分布については多くの情報が蓄積され体系化されつつある。一方で、トランスポーターの組織特異的発現制御メカニズムに関する知見は殆ど得られていない。だが上述したように、トランスポーターの組織特異性は基質薬物の体内動態や薬効、毒性と直結することから、そのメカニズムの解析は基礎のみならず臨床上も重要な意味を持っている。

従来、遺伝子発現制御機構を解析する際は転写因子群のネットワークによる制御系に主に焦点が当てられてきたが、近年、クロマチン構造を介したより高次の制御メカニズム (エピジェネティクス系) の重要性が認識されつつある。エピジェネティクスとは「細胞世代を超えて継承され得る、塩基配列の変化を伴わない遺伝子機能について研究する学問領域」と定義され、DNA メチル化やヒストンのアセチル化・メチル化などのクロマチン修飾は、エピジェネティック制御機構の中心的役割を果たしている。これまでにゲノムインプリンティング、X 染色体不活性化、発生・分化、発癌など、多くの生命現象がエピジェネティクス系により制御されることが報告されている。これらに加え、時期・組織特異的な遺伝子発現における DNA メチル化の重要性も明らかになりつつある²⁾。

脊椎動物においては 5'-CG-3' 配列 (CpG dinucleotide) 中の cytosine 残基が DNA メチル化のターゲットとなり、CpG dinucleotide のメチル化は、配列特異的な転写因子の結合阻害、あるいは配列非依的なクロマチンリモデリング因子 (メチル化 DNA 結合タンパク質やヒストン脱アセチル化酵素など) の結合によるヘテロクロマチン化を引き起こす。転写因子による調節は、DNA が低メチル化状態でクロマチンが弛緩している領域においてのみ有効であり、不活性化領域では機能できない。故に、DNA メチル化やヒストン修飾による転写制御は、遺伝子発現調節機構の最上位に位置する (図 2)。

筆者らが研究をスタートさせる以前は、主に肝臓に発現する薬物トランスポーターや胆汁酸トランスポーターに関して転写因子による制御機構が解析され情報が整理されていたが³⁾、一方で腎臓に発現するトランスポーターに関する情報は殆ど得られていなかった。また肝臓、腎臓いずれにおいても、エピジェネティクス系がトランスポーター発現制御に寄

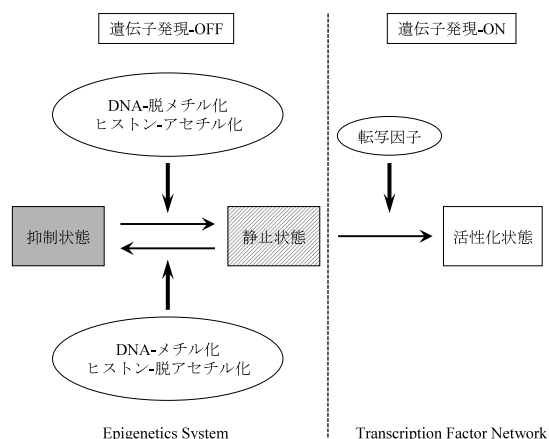


図2 転写因子とエピジェネティクス系による遺伝子発現調節機構

与するかどうかは検討されてこなかった。このような状況を踏まえ、筆者らは腎臓特異的に発現し薬物・内因性物質の尿細管分泌・再吸収に重要な役割を果たす OAT1, OAT3, URAT1 に焦点を当て、それらの組織特異的発現制御メカニズムを転写因子制御系、エピジェネティクス系の両面から解析した。

4. Hepatocyte Nuclear Factor 1 α/β による転写制御

腎臓特異的トランスポーターの発現制御に関わる転写因子を同定するため、筆者らはまずヒト (h) およびマウス (m) OAT1, OAT3, URAT1 遺伝子のプロモーター領域について、転写因子結合部位の *in silico* 予測を行った。その結果、いずれのトランスポーターにおいても転写開始点より 60 bp 程上流に Hepatocyte Nuclear Factor 1 (HNF1) の認識配列が存在し、このモチーフは種間で保存されていることが明らかになった。HNF1 は薬物トランスポーターを含む多くの肝臓特異的遺伝子の転写を正に制御する因子であり、HNF1 α と HNF1 β の2つの分子種が homo-あるいは heterodimer を形成して働く⁴⁾。

次に、*in silico* 予測の結果を検証するため、luciferase assay により h/mOAT1, OAT3, URAT1 のプロモーター解析を行った。HNF1 α/β を内因性に発現しない HEK293 細胞を用い、各トランスポーターのプロモーター活性に対する HNF1 α/β 強制発現の影響を検討したところ、いずれのトランスポーターにおいても HNF1 α/β による強いプロモーター活性上昇が観察された(図3)。また HNF1-motif へ

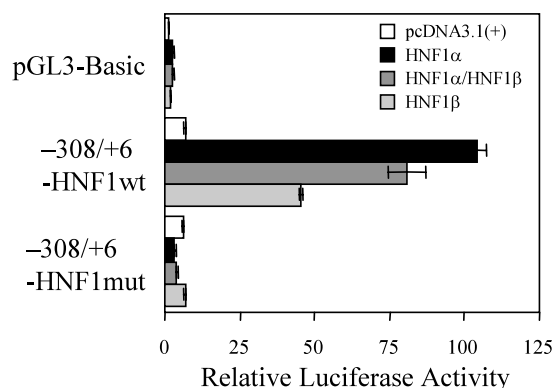


図3 HNF1 α/β による hOAT3 プロモーターの活性化

の変異の導入により HNF1 による転写活性化が低下すること、ゲルシフト法によりそれぞれの HNF1-motif には *in vitro* で HNF1 α/β が直接結合することを確認した。さらに HNF1 α -null マウスの腎臓では、Oat1, Urat1 の mRNA 発現量が顕著に低下していることを示した (Oat3 については、同時期に他グループより、HNF1 α -null マウスにおいて発現量が野生型マウスに比べて有意に低下していることが報告された⁵⁾)。以上の解析結果より、HNF1 α/β が腎臓特異的有機アニオントランスポーターの発現制御に関与する共通の因子であることが明らかとなった^{6~8)}。

5. エピジェネティクス系による発現制御

腎臓特異的有機アニオントランスポーター群の転写調節における HNF1 α/β の重要性を示したものの、組織特異的発現制御機構については、まだ解決せねばならない大きな問題があった。前述の通り、HNF1 が同定された当時は、肝臓特異的遺伝子の発現に重要な転写因子という位置付けであった。だが遺伝子欠損動物の作成・解析なども含めたその後の研究により、腎臓・膵臓など、肝外組織における HNF1 の機能が次第に明らかとなってきた。筆者らの研究結果もその一端をなし、腎臓トランスポーターの発現制御における HNF1 の役割を一般化した。だが、HNF1 α/β とそのターゲット遺伝子の組織分布は一致しない。HNF1 α/β は肝臓・腎臓・膵臓・小腸など様々な組織に発現しているが、筆者らが解析した OAT1, OAT3, URAT1 は腎臓特異的な発現を示す。同様な組織分布の不一致は、これまでに HNF1 による転写制御を受けることが示されているその他多くの遺伝子においても観察される。この問

題に対する答えはエピジェネティクス系にある，筆者はそう確信し，腎臓特異的トランスポーターの発現制御における DNA メチル化の関与を検討した。

まず筆者らは hOAT3 遺伝子が DNA メチル化による発現調節を受けていることを *in vitro* で実証した。HEK293 細胞に HNF1 α/β を一過性に発現させ，DNA メチル化阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5azadC) で処理し，RT-PCR 法により hOAT3 の発現を検討したところ，HNF1 α 単独あるいは HNF1 α と HNF1 β の両者を強制発現させ，DNA を脱メチル化することにより，hOAT3 の発現が転写誘導されることが明らかとなった (図 4)。この結果は，hOAT3 の転写には HNF1 α/β の発現と DNA 脱メチル化の協調作用が必要であることを示唆する⁶⁾。また mUrat1 遺伝子について，*in vivo* で組織特異的発現と DNA メチル化の間に負の相関があることを示した。マウス肝臓，腎臓皮質，及び腎臓髄質より genome DNA を抽出し，bisulfite sequencing 法によりプロモーター領域の DNA メチル化プ

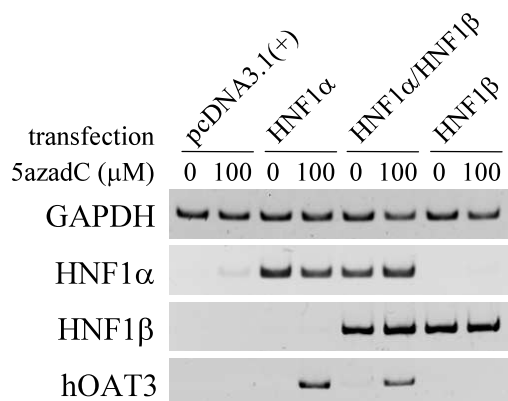


図 4 DNA 脱メチル化による hOAT3 の発現誘導

ロファイルを決めたところ，肝臓および腎臓髄質においてプロモーター領域は高メチル化状態である一方で，腎臓皮質では低メチル化状態であった (図 5)。この DNA メチル化プロファイルは腎臓皮質特異的に発現する mUrat1 の組織分布と一致していた⁷⁾。OAT1 遺伝子については，現在，DNA メチル化のみならずクロマチン構造も視野にいれ，腎臓特異的発現の決定因子としてのエピジェネティクス系の関与を検討している。

6. 今後の展望

筆者らの解析から，OAT3，URAT1，そしておそらく OAT1 の腎臓特異的発現は，DNA メチル化による転写抑制及び HNF1 α/β による転写活性化の協調作用により成り立っていることが示唆された (図 6)。腎臓皮質ではプロモーター領域が低メチル化状態であるためクロマチンが弛緩した状態にあり，HNF1 α/β がプロモーター内の認識配列に結合し転写が活性化される。一方で，肝臓など腎臓以外の組織においては DNA メチル化がスイッチとなって近

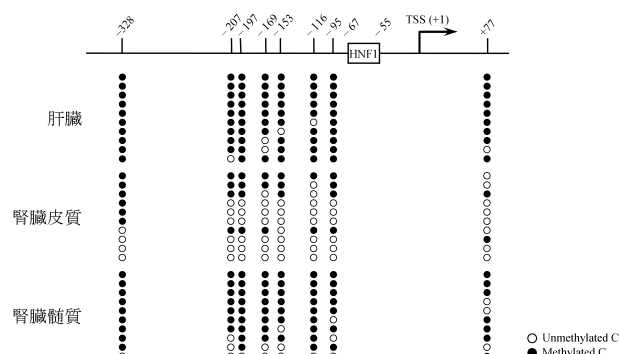


図 5 mUrat1 プロモーターの DNA メチル化プロファイル

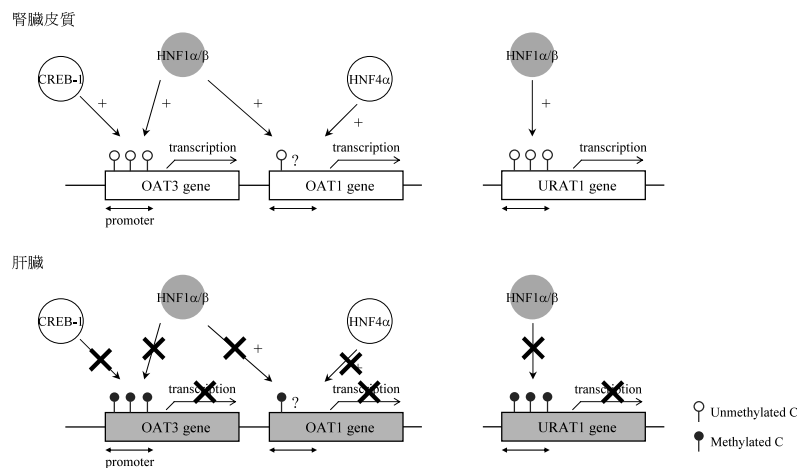


図 6 腎臓特異的トランスポーターの発現制御メカニズム

傍のクロマチン領域が凝縮することで、HNF1 α / β とプロモーターの相互作用が起こらず、腎臓特異的トランスポーターの発現が抑制されているものと思われる。従来、組織特異的遺伝子発現は複数の転写因子のネットワークにより制御されていると考えられてきた。だが、筆者らはより高次のレベルから組織特異性について解析し、DNAメチル化とHNF1の協調作用という概念を構築・実証した。今後はこのメカニズムが他の多くの肝臓・腎臓特異的遺伝子について成り立つのかどうか、HNF1以外の転写因子についても同様の概念が成り立つのかどうか、より網羅的な解析が望まれる。

得られる情報の臨床応用も興味深い。DNAメチル化と癌との関連が指摘されているが、エピジェネティクス系による制御が生命科学の多岐の分野に及んでいることを考慮すると、その他多くの疾患の要因としてDNAメチル化・クロマチン修飾を念頭に入れる必要があるだろう⁹⁾。各細胞・組織や正常、病態時におけるゲノム全域のエピジェネティック状況の解析、情報のデータベース化を目的としたエピゲノムプロジェクトも始まっており、様々な研究分野における成果を期待したい。

7. おわりに

修士課程・博士課程を通じて、筆者の研究に際し終始御指導・御鞭撻を頂いた当研究室・杉山雄一教授、楠原洋之准教授に心より深謝いたします。またエピジェネティクス系の解析にあたり、多くの御助言を頂いた東京大学大学院農学生命科学研究科・塩田邦郎教授、八木慎太郎特任教授、服部中博士、佐藤俊博士、HNF1 α -nullマウスの御供与を頂いたNIHのDr. Gonzalez, Dr. Kimに感謝いたします。そして最後に、筆者の研究を支えてくださったグループの皆様に、この場を借りて深くお礼申し上げます。

引用文献

- 1) H. Kusuhara, Y. Sugiyama, Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: Transporters in the liver, small intestine, brain and kidney, *J. Control. Release*, **78** (1-3), 43-54 (2002).
- 2) K. Shiota, DNA methylation profiles of CpG islands for cellular differentiation and development in mammals, *Cytogenet. Genome Res.*, **105** (2-4), 325-334 (2004).
- 3) G.A. Kullak-Ublick, M.B. Becker, Regulation of drug and bile salt transporters in liver and intestine, *Drug Metab. Rev.*, **35** (4), 305-317 (2003).
- 4) D.Q. Shih, M. Bussen, E. Sehayek, M. Ananthanarayanan, B.L. Shneider, F.J. Suchy, S. Shefer, J.S. Bollileni, F.J. Gonzalez, J.L. Breslow, M. Stoffel, Hepatocyte nuclear factor-1alpha is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism, *Nat. Genet.*, **27** (4), 375-382 (2001).
- 5) J.M. Maher, A.L. Slitt, T.N. Callaghan, X. Cheng, C. Cheung, F.J. Gonzalez, C.D. Klaassen, Alterations in transporter expression in liver, kidney, and duodenum after targeted disruption of the transcription factor HNF1alpha, *Biochem. Pharmacol.*, **72** (4), 512-522 (2006).
- 6) R. Kikuchi, H. Kusuhara, N. Hattori, K. Shiota, I. Kim, F.J. Gonzalez, Y. Sugiyama, Regulation of the expression of human organic anion transporter 3 by hepatocyte nuclear factor 1 alpha/beta and DNA methylation, *Mol. Pharmacol.*, **70** (3), 887-896 (2006).
- 7) R. Kikuchi, H. Kusuhara, N. Hattori, I. Kim, K. Shiota, F.J. Gonzalez, Y. Sugiyama, Regulation of tissue-specific expression of the human and mouse urate transporter 1 gene by hepatocyte nuclear factor 1 alpha/beta and DNA methylation, *Mol. Pharmacol.*, **72** (6), 1619-1625 (2007).
- 8) T. Saji, R. Kikuchi, H. Kusuhara, I. Kim, F.J. Gonzalez, Y. Sugiyama, Transcriptional regulation of human and mouse organic anion transporter 1 by hepatocyte nuclear factor 1 {alpha}/beta, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, in press (2007).
- 9) J.D. Lieb, S. Beck, M.L. Bulyk, P. Farnham, N. Hattori, S. Henikoff, X.S. Liu, K. Okumura, K. Shiota, T. Ushijima, J.M. Greally, Applying whole-genome studies of epigenetic regulation to study human disease, *Cytogenet. Genome Res.*, **114** (1), 1-15 (2006).