

博士学位論文

ヒト全長芳香族炭化水素受容体
(AhR) の精製と生化学的性質

**Purification and biochemical
properties of human full-length
aryl hydrocarbon receptor (AhR)**

秋田大学大学院 理工学研究科 博士後期課程

総合理工学専攻 生命科学領域

上村 盛弥

2021

目次

| | |
|--|----|
| 第1章 序論 | 1 |
| 1-1) 受容体とは | 2 |
| 1-1-1) 膜貫通受容体 | 2 |
| 1-1-2) 核内受容体 | 3 |
| 1-2) 芳香族炭化水素受容体 (Aryl hydrocarbon receptor; AhR) | 5 |
| 第2章 ヒト全長 AhR の発現・精製と生化学的性質 | 9 |
| 2-1) 緒言 | 10 |
| 2-2) 実験方法 | 12 |
| 2-2-1) ヒト全長 AhR の発現・精製 | 12 |
| 2-2-1-1) 遺伝子組み換え AhR の発現 vector の構築 | 12 |
| 2-2-1-2) 全長 AhR の不溶性画分発現と精製 (抗体作成用) | 12 |
| 2-2-1-3) 全長 AhR の可溶性画分発現と精製 (タンパク質解析用) | 13 |
| 2-2-2) HSP90, XAP2, p23 の精製 | 14 |
| 2-2-2-1) HSP90 の精製 | 14 |
| 2-2-2-2) XAP2 の精製 | 14 |
| 2-2-2-3) p23 の精製 | 15 |
| 2-2-3) ヒト全長 AhR に対する抗体作製 | 16 |
| 2-2-4) 蛍光免疫染色 | 16 |
| 2-2-5) β -naphthoflavone affinity chromatography | 17 |
| 2-2-6) 共免疫沈降 | 17 |
| 2-2-7) CD スペクトル測定 | 18 |
| 2-2-8) 分子モデリング | 18 |
| 2-2-9) 二次構造予測 | 18 |
| 2-3) 実験結果 | 19 |
| 2-3-1) ヒト全長 AhR の発現 | 19 |
| 2-3-2) 全長 AhR の抗体作製と精製 | 23 |
| 2-3-3) 精製した全長 AhR はリガンド結合能及び複合体形成能を有する | 28 |
| 2-3-4) AhR の構造変化と分子モデリング | 30 |
| 2-4) 考察 | 34 |
| 第3章 抗がん剤 cisplatin の AhR 活性化機構の解析 | 37 |
| 3-1) 緒言 | 38 |
| 3-2) 実験方法 | 42 |

| | |
|--|----|
| 3-2-1) 細胞の培養 | 42 |
| 3-2-2) AhR-PAS, AhR- Δ AD の精製 | 42 |
| 3-2-2-1) AhR-PAS の精製 | 42 |
| 3-2-2-2) AhR- Δ AD の精製 | 42 |
| 3-2-3) Trypsin 消化耐性実験 | 43 |
| 3-2-4) 蛍光免疫染色 | 43 |
| 3-2-5) Cisplatin affinity chromatography | 44 |
| 3-2-6) CD スペクトル測定 | 44 |
| 3-2-7) GST pull-down assay | 45 |
| 3-3) 実験結果 | 46 |
| 3-3-1) AhR は HSP90 により trypsin から保護される | 46 |
| 3-3-2) Cisplatin は AhR のリガンドになりうる | 48 |
| 3-3-3) Cisplatin 存在下において AhR 複合体は維持される | 51 |
| 3-4) 考察 | 52 |
| | |
| 第 4 章 総括 | 57 |
| | |
| 参考文献 | 60 |
| | |
| 研究業績 | 66 |
| | |
| 謝辞 | 67 |

第 1 章

序論

1-1) 受容体とは

生物が生きていくためには、生体内・生体外の環境に適応しなければならない。細胞増殖、細胞死、分化、生体防御といった様々な生命現象は、環境からのシグナルを受容し、それに反応するシグナル伝達経路により生じる。基本的にシグナル伝達は、シグナル分子が細胞膜、細胞質中の受容体に結合、活性化することで核へとシグナルが伝わり、核内の転写因子により特定の遺伝子が転写調節されるという流れである。シグナル伝達経路は、お互いに他のシグナル伝達経路と関連し合いながら（クロストーク）ネットワークを形成し、細胞の情報伝達を制御することで生体内の恒常性を維持している。これらシグナル伝達経路に異常が生じることで、がんや免疫疾患などの多くの病気が引き起こされる [1-2]。

受容体はシグナル伝達に関わるタンパク質であり、ホルモンや化学物質などのシグナル分子をリガンドとして特異的に結合し、細胞応答を開始させる。基本的に1つの受容体は1つのリガンドのみと結合し、リガンドごとに異なる受容体が存在しており、細胞の種類によって受容体の分布も大きく異なる。受容体は大きく分けて、細胞膜に存在する膜貫通受容体と、細胞質及び核内に存在する核内受容体の2種類がある。

1-1-1) 膜貫通受容体

受容体の多くは膜貫通受容体であり、細胞膜の脂質二重層を通過できない親水性のリガンドと結合する。膜貫通受容体は細胞外シグナル分子が結合すると活性化され、細胞内シグナル分子（セカンドメッセンジャー）を用いて核内へシグナルを伝達する。構造と機能により、Gタンパク質共役型受容体、イオンチャネル型受容体、酵素連結型受容体に分類される。

Gタンパク質共役型受容体は7回膜貫通型受容体とも呼ばれ、三量体のGタンパク質を介して細胞内にシグナルを伝達する。リガンドが結合すると受容体は構造変化し、結合したGDPをGTPと交換することでGタンパク質を活性化、サブユニットを解離することで下流のシグナル伝達カスケードを活性化する [3]。

イオンチャネル型受容体は、リガンドが結合することにより構造変化が起こり、特定のイオンが通り抜けられるようになることで膜電位が変化する。特定のイオンのみを通過させるイオンチャネル型受容体、複数のイオンを通過させるイオンチャネル型受容体が存在する。

酵素連結型受容体は、細胞内ドメインに酵素活性を有する、もしくは酵素活性を有する別のタンパク質が結合している受容体である。リガンドが結合することでプロテインキナーゼなどが活性化することで細胞内にシグナルを伝達する。

1-1-2) 核内受容体

核内受容体は細胞質または核内に存在する受容体であり，細胞膜を透過することのできる疎水性のリガンドと結合する．リガンドが結合することにより活性化し，核内で特定の DNA 配列を認識，結合することで転写因子として働き，転写の活性または抑制を行う．代表的なものとして，ステロイドホルモン受容体や甲状腺ホルモン受容体が挙げられる．

核内受容体の一般的な構造を Fig. 1-1-2A に示した．N 末端に AF-1 (Activation function-1) ドメインがあり，リガンド非依存的な転写活性化能を有する．中央部の DNA 結合ドメイン (DNA binding domain; DBD) は，2つの Zn フィンガーが存在し，ホルモン応答配列 (Hormone response element; HRE) などの特定の DNA 配列と結合する．C 末端側にリガンド結合ドメイン (Ligand binding domain; LBD) があり，リガンド結合やコアクチベーターとの相互作用に関与している．リガンド結合ドメインの C 末端に存在する α -helix は AF-2 と呼ばれており，結合ポケットへのリガンド結合により構造変化し，受容体の活性調節に関わる．DBD と LBD はヒンジ領域によりつながっており，受容体に構造的な柔軟性を与える [4-5]．

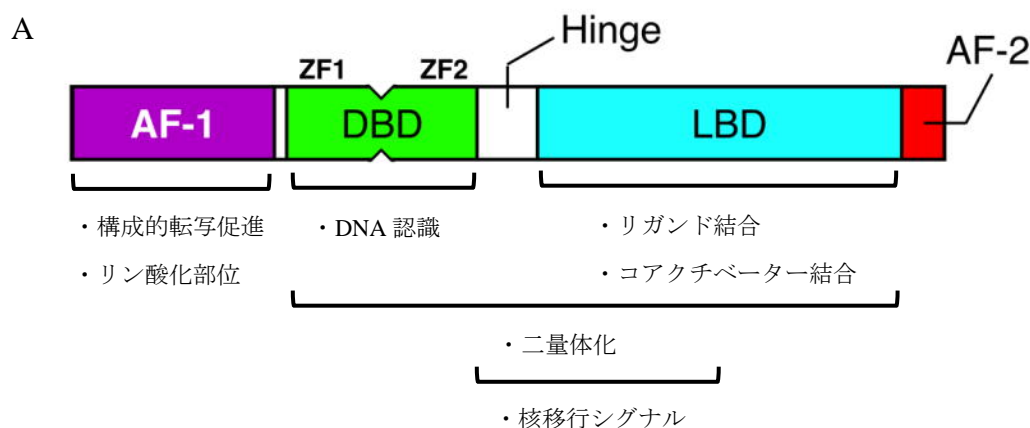


Fig. 1-1-2 核内受容体の構造と活性化

(A) 核内受容体の模式図．文献[4-5]より一部改変．

リガンド非存在下において核内受容体は、熱ショックタンパク質もしくはイムノフィリンシャペロンと複合体を形成した状態で細胞質中に存在するか、核内で HRE と構成的に結合しコリプレッサーと抑制複合体を形成する。前者の場合は、リガンドが結合することにより分子シャペロンと解離、核内に移行し、HRE と結合及びコアクチベーターと複合体を形成することで標的遺伝子の転写を調節する (Fig. 1-1-2B)。後者の場合は、リガンドが結合することによりコリプレッサーと解離し、コアクチベーターと複合体を形成することで標的遺伝子の転写を調節する。このような複合体構成の変化は、リガンド結合による AF-2 の構造変化により引き起こされる。また、核内受容体は通常ホモダイマーもしくはヘテロダイマーを形成して転写調節を行う [6-9]。

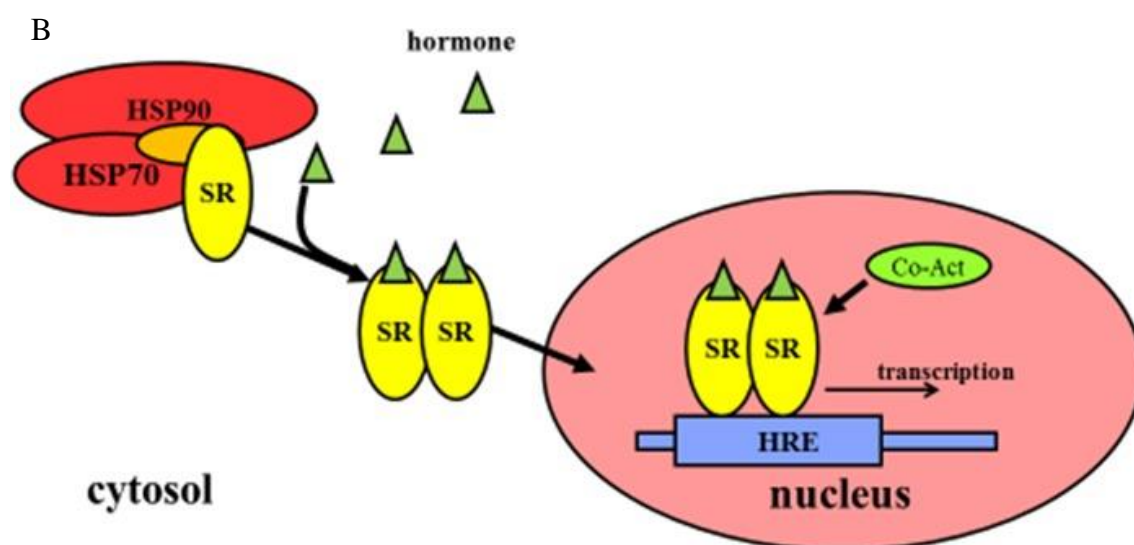


Fig. 1-1-2 核内受容体の構造と活性化

(B) ステロイドホルモン受容体の活性化機構. 文献[9]より抜粋.

1-2) 芳香族炭化水素受容体 (Aryl hydrocarbon receptor; AhR)

AhR は bHLH-PAS (Basic helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim) ファミリーに属しており、受容体型転写因子としての役割を果たす [10-11]. AhR はアミノ酸配列が解明されるまで、作用様式から核内受容体であるステロイドホルモン受容体ファミリーのメンバーであると考えられていた. cDNA クローニングによる構造解析により、AhR はステロイドホルモン受容体との類似性を示さないことが明らかとなった [12-13]. リガンドとなる化合物も多く存在し、構造も含め他の受容体と大きく異なる点が存在する.

ヒト AhR は 848 アミノ酸からなるタンパク質であり、いくつかの機能性ドメインで構成されている. Fig. 1-2A はヒト AhR の模式図を示している [14]. bHLH (Basic helix-loop-helix) ドメインは AhR の N 末端領域に存在し、DNA を認識、結合する塩基性の basic 領域と二量体形成に関与する helix-loop-helix 領域から構成される. bHLH ドメインには、核局在化シグナル (Nuclear localization signal; NLS) と核外移行シグナル (Nuclear export signal; NES) が存在している. PAS (Per-ARNT-Sim) ドメインは AhR の中央部にあり、PAS-A および PAS-B ドメインで構成されている. PAS-A ドメインはタンパク質-タンパク質相互作用の機能を有しており、bHLH ドメインと共に ARNT (AhR nuclear translocator) とのヘテロダイマー形成に関与している. PAS-B ドメインはリガンド結合部位である. 転写活性化ドメイン (Transactivation domain; TAD) は AhR の C 末端領域に存在し、glutamine の豊富な領域 (Q-rich) が含まれている [15-19].

A

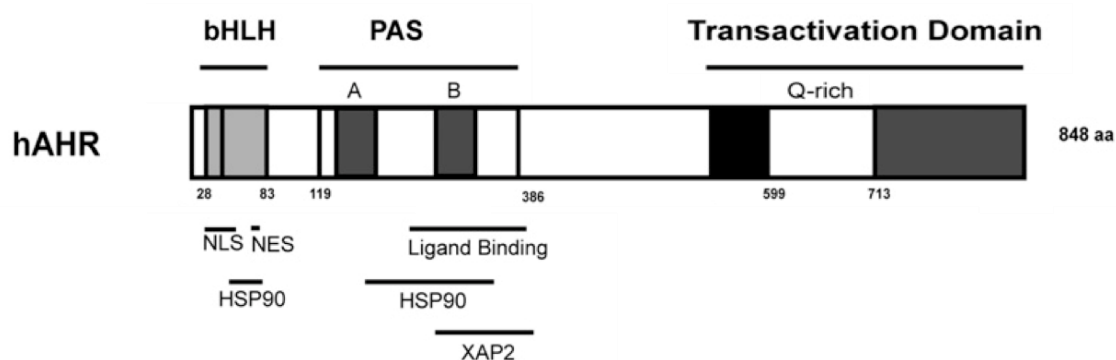


Fig. 1-2 AhR の構造と活性化

(A) AhR の模式図. 文献[14]より抜粋.

AhR は多くの多環芳香族炭化水素化合物 (Polycyclic aromatic hydrocarbon compound; PAH) をリガンドとして結合し、食品や環境物質に対する生体異物の応答に重要な役割を果たす。代表的なリガンドとして、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), β -naphthoflavone (β -NF), 3-methylcholanthrene (3-MC) などの外因性リガンドが挙げられる [20-21]。食品由来のリガンドとしては、緑茶に含まれる lutein や、ブロッコリーなどのアブラナ科の植物に含まれる indole-3-carbinol などが知られている [22-23]。AhR は長い間内在性リガンドが不明であり、オーファン受容体とされてきた。現在では、niacin を生合成する際の間体である kynurenine や尿中に排泄される indirubin などの tryptophan 代謝産物が AhR の内在性リガンドとして報告されている [24-25]。Fig. 1-2B は AhR のリガンドの一部を示している。

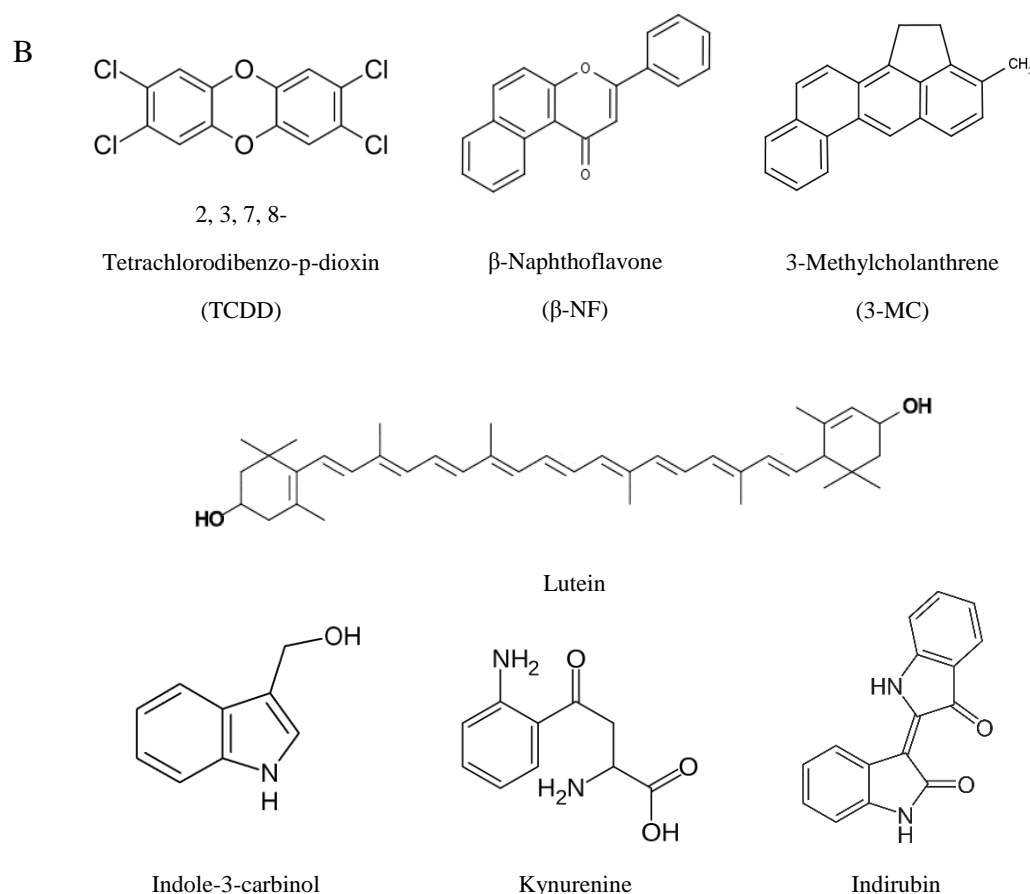


Fig. 1-2 AhR の構造と活性化

(B) AhR のリガンドの例。文献[20-25]より抜粋。

リガンド非存在下において AhR は、分子シャペロン heat shock protein 90 (HSP90), hepatitis B virus X-associated protein 2 (XAP2), コシャペロン p23 と複合体を形成して細胞質に存在する [26-30]. HSP90 は真核細胞の細胞質で最も発現しているタンパク質であり, 300 以上のクライアントタンパク質の機能を調節する [31-32]. HSP90 は AhR の bHLH ドメイン及び PAS-B ドメインに結合する [33-35].

リガンドが AhR に結合すると, AhR は分子シャペロン複合体とともに核内へ移行する. 核移行後, AhR は分子シャペロン複合体から解離し, bHLH ドメイン及び PAS-A ドメインを介して ARNT とヘテロダイマーを形成する. このヘテロダイマーの bHLH ドメインは, 異物応答配列 (Xenobiotic response element; XRE) に結合する. これにより転写の活性化が起こり, 薬物代謝酵素 cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) などが誘導される [36-37]. Fig. 1-2C は AhR の活性化機構を示している.

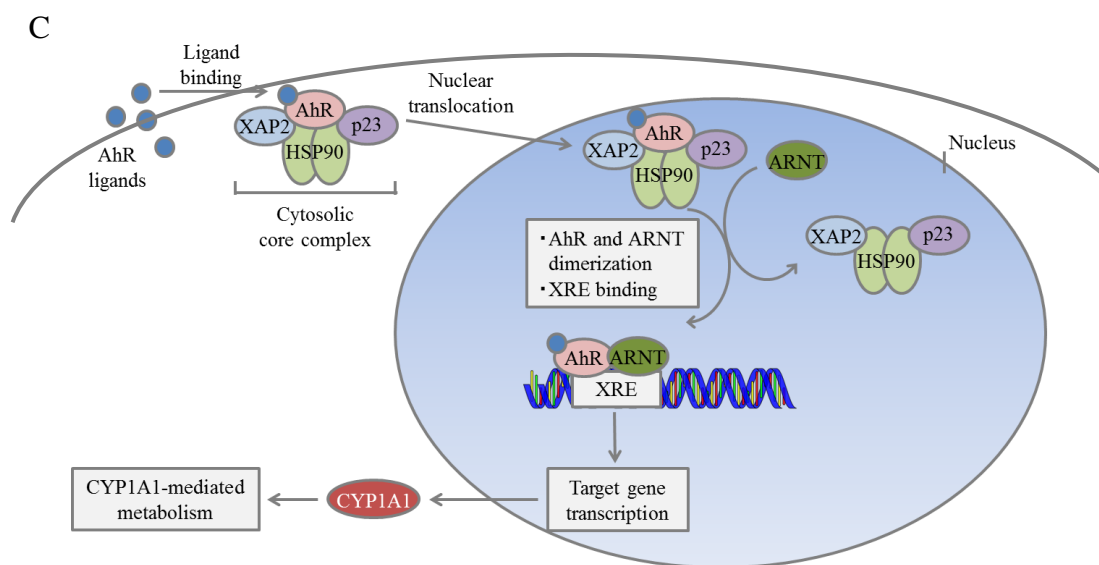


Fig. 1-2 AhR の構造と活性化

(C) AhR の活性化機構. 文献[20, 36]より一部改変.

CYP1A1 などの P450 は、リガンドとして細胞に入った低分子有機化合物を酸化的に修飾し、誘導される解毒酵素と共に働くことで体外へ排出させる解毒反応が起こる。しかし、代謝過程で化学的に反応性の高い代謝物に活性化することもある。これにより生成した化学的に反応性の高い代謝物が DNA に共有結合して遺伝子損傷を起こし、発がんの原因となるなど、毒性発現に関与する側面もある [38-39]。また、TCDD などのダイオキシン類は代謝されずに体内に蓄積される。これにより、ホルモンなどの代謝に変化が生じ生理的機能が攪乱されることが考えられている [40]。一方で、AhR 欠損マウスにおいて肝血管系に異常が生じることや、AhR が T 細胞の分化を制御しておりリガンドに応じて Th17 細胞または制御性 T 細胞への分化が誘導されることなど、正常な細胞の発達や免疫調節における AhR の生理機能が示唆されている [41-44]。また、炎症やがんにおいては tryptophan 代謝が亢進し、その代謝産物であり内在性リガンドである kynurenine により AhR が活性化され制御性 T 細胞を生成することが報告されている [45]。これまで、ダイオキシン類による AhR の活性化機構の多くは解明されてきた。しかし、AhR のリガンドや生理機能は非常に多く、リガンドの認識や構造変化、反応機構に関して未だ未解明な部分が多い。

第 2 章

ヒト全長 AhR の 発現・精製と生化学的性質

2-1) 緒言

これまで、AhR のリガンドは TCDD をはじめとするダイオキシン類や 3-MC といった毒性を示すものが主に報告されており、それらのリガンドによる AhR の活性化機構の多くは解明されてきた。さらに近年では、TCDD の前処理により、マウスにおいて prostaglandin E2 (PGE2) の産生を促進し、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) によって誘導された潰瘍性大腸炎の炎症反応を抑制することが報告された (Fig. 2-1) [46]。また、AhR の活性化により、ヒト肺繊維芽細胞における煙草の煙から肺を保護する作用が報告されている [47]。これらの報告から、AhR 経路の活性化に伴う消化管・気道粘膜の障害保護作用が示唆されている。また、AhR が NK 細胞による IL-10 産生に関与する補因子であることも報告されている [48]。AhR の活性化による薬物代謝酵素の誘導やそれに伴う毒性発現だけでなく、抗炎症作用や免疫系への関与などの新たな知見が得られてきている。

このような知見は、そのほとんどが *in vivo* における研究結果によるものであり、*in vitro* における研究報告は少なく生化学的知見に乏しい。その原因として、AhR の発現、精製が極めて困難であることが挙げられる。真核生物の転写因子の誘導には、大腸菌を用いた高発現系が機能しない場合がある。また、AhR の TAD 中に存在する Q-rich 領域は大腸菌に対して毒性がある。*Baculovirus* を用いた全長 AhR の発現はわずかに報告されているが、大腸菌を用いた全長 AhR の発現は全く報告されていない [49-50]。したがって、当研究室ではこれまで bHLH ドメインや PAS ドメインなどの AhR のドメインを使用して *in vitro* での研究を行ってきた [33-35]。しかし、AhR に多型が存在するマウスにおいて TAD の違いが TCDD 感受性の違いに影響していること、ヒト AhR において Q-rich 領域が転写活性化において重要であることが報告されている [51-52]。したがって、TAD を含むヒト全長 AhR を用いた *in vitro* の研究は、AhR の生化学的知見を得るにあたって価値のあるものだと考えられる。

本研究では、ヒト全長 AhR の発現及び精製方法を確立するとともに、生化学的性質の解析を目的にしている。

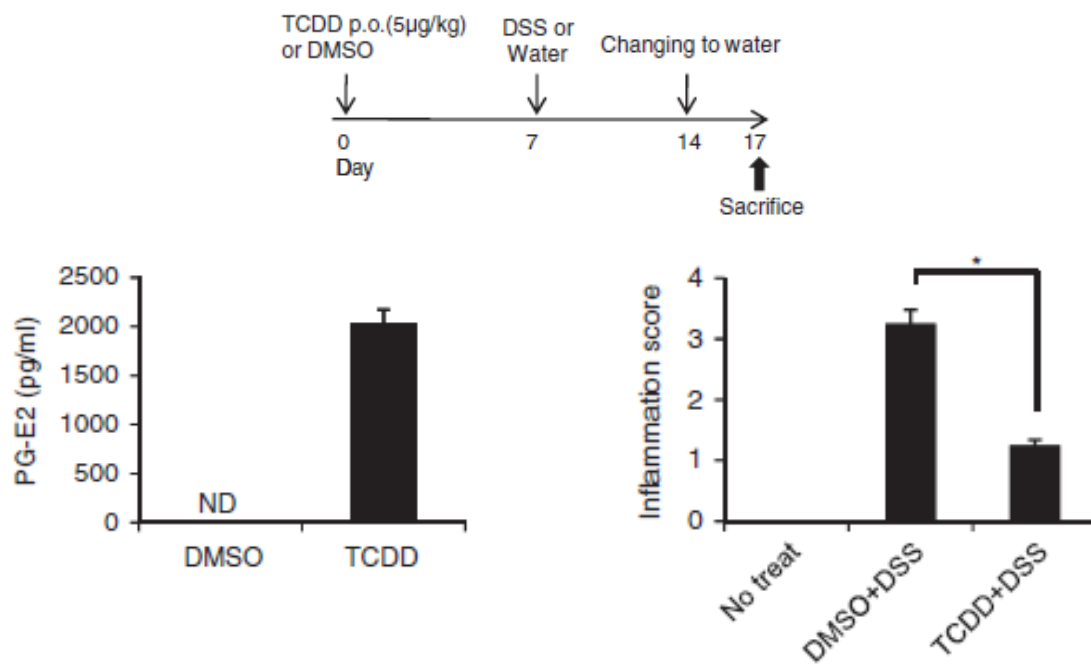


Fig. 2-1 TCDD 前処理による PGE2 産生の促進と潰瘍性大腸炎の炎症抑制
文献[46]より抜粋.

2-2) 実験方法

リコンビナントタンパク質はすべて human のものを用いた。

2-2-1) ヒト全長 AhR の発現・精製

pGEX-5X-3 vector を用いて、GST 融合 AhR の発現系を構築した。

2-2-1-1) 遺伝子組み換え AhR の発現 vector の構築

1. PCR によりヒト全長 AhR の配列を増幅させた。下記の cDNA 及び primer を用いた。

cDNA : HeLa 細胞

Forward primer : 5'-GTCGACATGAACAGCAGCAGCGCCAAC-3'

Reverse primer : 5'-GCGGCCGCTTACAGGAATCCACTGGATGTCAAA-3'

2. pGEX-5X-3 vector の Sal I-Not I 部位に増幅した配列を組み込んだ。
3. 低温で GST の除去を行うため、PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (タカラバイオ) を用いて Factor Xa Protease 認識配列を PreScission Protease 認識配列 (LEVLFGQP) に置換した。

下記の primer を用いて 3 回の PCR 反応を順に行った。

1 回目

Forward primer : 5'-AACCTTTATTTTCAAGGTCGTGGGATCCCCAGG-3'

Reverse primer : 5'-TTGAAAATAAAGGTTTTTCGATCAGATCCGATTT-3'

2 回目

Forward primer : 5'-TCCTTGAAGTCCTTTTTCAAGGTCGTGGGATCC-3'

Reverse primer : 5'-AAAGGACTTCAAGGATCAGATCCGATTTTGGAG-3'

3 回目

Forward primer : 5'-CAAGGTCCCGGGATCCCCAGGAATTCC-3'

Reverse primer : 5'-GATCCCGGGACCTTGAAAAGGACTT-3'

4. DNA sequencer を用いて配列を確認した。

2-2-1-2) ヒト全長 AhR の不溶性画分発現と精製 (抗体作成用)

1. 構築した vector を発現用大腸菌 OverExpress C41 (DE3) pLysS (Lucigen) に形質転換した。
2. Ampicillin (終濃度 100 µg/ml) を添加した LB 培地で 37°C, 250 rpm, overnight 培養した。
3. 培養した大腸菌を 100 倍量の LB 培地 (終濃度 100 µg/ml の ampicillin を含む) に添加し、OD₆₀₀ が 0.6 になるまで 37°C, 250 rpm で培養した。
4. 培養後、IPTG を終濃度 1.0 mM になるように添加し、37°C, 250 rpm, 3 hr 培養した。
5. 培養後、4°C, 13000 rpm, 15 min 遠心分離して大腸菌を回収し、10 mM Tris-

HCl buffer pH 7.4 で懸濁した。

6. 回収した大腸菌を超音波破碎した後、4°C, 13000 rpm, 15 min 遠心分離して沈殿を回収した。
7. 沈殿を 1.0 M arginine/10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で懸濁した。
8. 脱塩カラム Bio-Gel P-6DG Gel (Bio-Rad) を用いて arginine を除去した。
9. GST-AhR を含む懸濁液を digestion buffer (150 mM NaCl/1 mM EDTA/1 mM DTT/50 mM Tris-HCl buffer pH 7.0) に添加し、懸濁液 1 ml に対して 90 units の PreScission Protease を添加した。Digestion 反応は 4°C, 5 rpm, 16 hr 行った。
10. Digestion 後、SDS-PAGE (7%) で電気泳動し、AhR のバンド部分を切り出した。
11. MODEL BE-883 (BIO CRAFT) を用いて切り出したゲルから AhR を溶出した。

2-2-1-3) ヒト全長 AhR の可溶性画分発現と精製 (タンパク質解析用)

可溶性画分での発現を目的に低温で発現誘導を行った。

1. 構築した vector を発現用大腸菌 OverExpress C41 (DE3) pLysS (Lucigen) に形質転換した。
2. Ampicillin (終濃度 100 µg/ml) を添加した LB 培地で 37°C, 250 rpm, overnight 培養した。
3. 培養した大腸菌を 100 倍量の LB 培地 (終濃度 100 µg/ml の ampicillin を含む) に添加し、OD₆₀₀ が 0.5 になるまで 37°C, 250 rpm で培養した。
4. 培養後、10°C, 30 min インキュベートした後、IPTG を終濃度 1.0 mM になるように添加し、10°C, 250 rpm, 48 hr 培養した。
5. 培養後、4°C, 13000 rpm, 15 min 遠心分離して大腸菌を回収し、10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で懸濁した。
6. 回収した大腸菌を超音波破碎した後、4°C, 13000 rpm, 15 min 遠心分離して上清を回収した。
7. 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で平衡化した Q-Sepharose column に上清を加え、pass 画分を回収した。
8. 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で平衡化した Glutathione Sepharose 4B column に Q-Sepharose column の pass 画分を加えた。
9. 0.5 M NaCl/10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で洗浄した。
10. 20 mM glutathione/50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 で溶出した。
11. Ultrafiltration (100 kDa cut) を行った。
12. GST-AhR を digestion buffer (150 mM NaCl/1 mM EDTA/ 1 mM DTT/50 mM Tris-HCl buffer pH 7.0) に添加し、GST-AhR 250µg に対して 50 units の PreScission

Protease を添加した。Digestion 反応は 4°C, 5 rpm, 16 hr 行った。

2-2-2) HSP90, XAP2, p23 の精製

以下のタンパク質は当研究室において以前構築されたものを用いた。

2-2-2-1) HSP90 の精製

Vector : pCold I

Competent cell : BL21 (DE3)

制限酵素 : BamH I-Xba I

Forward primer : 5'-GGATCCATGCCTGAGGAAACCCAGAC-3'

Reverse primer : 5'-TCTAGATTAGTCTACTTCTTCCATGCGTGA-3'

HSP90 は N 末端に 6xHis が付加した His タグ融合タンパク質として発現した。

1. Ampicillin (終濃度 100 µg/ml) を添加した LB 培地で 37°C, 250 rpm, overnight 培養した。
2. 培養した大腸菌を 100 倍量の LB 培地 (終濃度 100 µg/ml の ampicillin を含む) に添加し, OD₆₀₀ が 0.5 になるまで 37°C, 250 rpm で培養した。
3. 培養後, 15°C, 30 min インキュベートした後, IPTG を終濃度 0.5 mM になるように添加し, 15°C, 250 rpm, 24 hr 培養した。
4. 培養後, 4°C, 13000 rpm, 15 min 遠心分離して大腸菌を回収し, 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で懸濁した。
5. 回収した大腸菌を超音波破碎した後, 4°C, 13000 rpm, 15 min 遠心分離して上清を回収した。
6. 上清に等量の Ni-NTA column apply buffer (40 mM imidazole/10 mM Tris-HCl pH 7.4) を混合し, Ni-NTA column 平衡化 buffer (20 mM imidazole/0.3 M NaCl/10 mM Tris-HCl pH 7.4) で平衡化した Ni-NTA column に加えた。
7. Ni-NTA column wash buffer (50 mM imidazole / 0.3 M NaCl/10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4) で洗浄した。
8. Ni-NTA column elution buffer (0.1~0.5 M imidazole/0.3 M NaCl/10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4) で溶出した。
9. SDS-PAGE で精製確認後 HSP90 rich fraction を回収し, 0.3M NaCl/10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で平衡化した Q-Sepharose column に加えた。
10. 0.3 M NaCl/10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で洗浄した。
11. 0.3~0.6 M NaCl/10 mM Tris-HCl buffer pH7.4 で溶出した。
12. SDS-PAGE で精製確認後 HSP90 rich fraction を回収し, ultrafiltration (100 kDa cut) を行った。

2-2-2-2) XAP2 の精製

Vector : pET21a

Competent cell : BL21 (DE3) arctic

制限酵素 : Nde I-EcoR I

Forward primer : 5'-CATATGGCGGATATCATCGCAAG-3'

Reverse primer : 5'-GAATTCTCAATGGGAGAAGATCCCC-3'

1. Ampicillin (終濃度 100 µg/ml) を添加した LB 培地で 37°C, 250 rpm, overnight 培養した.
2. 培養した大腸菌を 100 倍量の LB 培地 (終濃度 100 µg/ml の ampicillin を含む) に添加し, OD₆₀₀ が 0.5 になるまで 37°C, 250 rpm で培養した.
3. 培養後, 10°C, 30 min インキュベートした後, IPTG を終濃度 0.5 mM になるように添加し, 10°C, 250 rpm, 24 hr 培養した.
4. 培養後, 4°C, 13000 rpm, 15 min 遠心分離して大腸菌を回収し, 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で懸濁した.
5. 回収した大腸菌を超音波破碎した後, 4°C, 13000 rpm, 15 min 遠心分離して上清を回収した.
6. 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で平衡化した Heparin column に上清を加えた.
7. 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で洗浄した.
8. 0~0.5 M NaCl/10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で溶出した.
9. SDS-PAGE で精製確認後 XAP2 rich fraction を回収し, 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で overnight 透析した.
10. 10mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で平衡化した Q-Sepharose column に加えた.
11. 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で洗浄した.
12. 0~0.6 M NaCl/10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で溶出した.
13. SDS-PAGE で精製確認後 XAP2 rich fraction を回収し, ultrafiltration (30 kDa cut) を行った.

2-2-2-3) p23 の精製

Vector : pET21a

Competent cell : BL21 (DE3) pLysS

制限酵素 : Nde I-EcoR I

Forward primer : 5'-CATATGCAGCCTGCTTCTCCAAAGTG-3'

Reverse primer : 5'-GAATTCTTACTCCAGATCTGGCATT-3'

1. Ampicillin (終濃度 100 µg/ml), chloramphenicol (終濃度 30 µg/ml) を添加した LB 培地で 37°C, 250 rpm, overnight 培養した.
2. 培養した大腸菌を 100 倍量の LB 培地 (終濃度 100 µg/ml の ampicillin, 終濃度 30 µg/ml の chloramphenicol を含む) に添加し, OD₆₀₀ が 0.6 になるまで

37°C, 250 rpm で培養した.

3. 培養後, IPTG を終濃度 0.5 mM になるように添加し, 37°C, 250 rpm, 3 hr 培養した.
4. 培養後, 4°C, 13000 rpm, 15 min 遠心分離して大腸菌を回収し, 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で懸濁した.
5. 回収した大腸菌を超音波破碎した後, 4°C, 13000 rpm, 15 min 遠心分離して上清を回収した.
6. 10mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で平衡化した Q-Sepharose column に加えた.
7. 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で洗浄した.
8. 0.1~0.6 M NaCl/10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で溶出した.
9. 13. SDS-PAGE で精製確認後 p23 rich fraction を回収し, ultrafiltration (10 kDa cut) を行った.

2-2-3) ヒト全長 AhR に対する抗体作製

1. 2-1-2 で溶出した AhR 200 µl と complete Freund's adjuvant を混合し, ウサギに免疫した.
2. 溶出した AhR 600 µl と incomplete Freund's adjuvant を混合し, ウサギに免疫を行った. 追加の免疫は 2 週間の期間を空けて 3 回行った.
3. 4 回目の免疫から 10 日後に全採血を行い, 血清を回収した.
4. 血清を 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で平衡化した DEAE column (GE Healthcare) に加え, pass 画分から IgG を回収した.

2-2-4) 蛍光免疫染色

1. HeLa 細胞 1×10^5 個を 3 cm シャーレに播種した.
2. 1 日後, 終濃度 3 µM になるように 3-MC を添加し, インキュベータで 2 hr 培養した.
3. 培地を捨て, 氷冷 1xPBS で 2 回洗浄した.
4. 氷冷 methanol 2 ml を加えてインキュベート (4°C, 15 min) し, カバーガラスに細胞を固定した.
5. 1xPBS で 3 回洗浄した.
6. 1% BSA/1xPBS を加え, ブロッキング (25°C, 1 hr) した.
7. 1xPBS で洗浄した.
8. 1% BSA/1xPBS で希釈した anti-AhR IgG を加え, インキュベート (4°C, overnight) した.
9. 1xPBS で 3 回洗浄した.
10. 1% BSA/1xPBS で希釈した Alexa488- or Alexa546-conjugated secondary antibody

を加え、インキュベート (25°C, 3 hr) した。

11. 1xPBS で 3 回洗浄した。
12. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) を加え、インキュベート (25°C, 30 min) した。
13. ProLong Gold 褪色防止剤 (Invitrogen) を用いてスライドガラスに固定した。
14. 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

2-2-5) β -naphthoflavone affinity chromatography

1. Epoxy-activated Sepharose 6B (GE Healthcare) の乾燥粉末を蒸留水で膨潤・洗浄した (100 ml/g)。
2. カップリング溶液 (0.1 M NaHCO₃ pH 8.0) に β -naphthoflavon を溶解した。
3. β -naphthoflavon 溶液に洗浄した樹脂を加えた。
4. インキュベート (40°C, 16 hr) 後、過剰量の β -naphthoflavon を蒸留水, カップリング溶液 (0.1 M NaHCO₃ pH 8.0), 0.1 M CH₃COOH pH 4.0 で洗浄した。
5. 1M ethanolamine を加えてインキュベート (40°C, 4 hr) し、活性基をブロックした。
6. β -naphthoflavon を溶解していないカップリング溶液を用いて同様に 1~5 の操作を行い、これを mock 樹脂とした。
7. 50 mM HEPES-KOH buffer pH 7.4 で β -naphthoflavon affinity 樹脂及び mock 樹脂 50 μ l を平衡化した。
8. 平衡化した樹脂に 2-1-3) で精製した AhR を添加し, rotate (4°C, 1 rpm, 1 hr) した。
9. 4°C, 5000 rpm, 10 sec 遠心分離し, 上清を取り除いた。
10. 樹脂に 25 mM HEPES-KOH buffer pH 7.4 を 200 μ l 加え洗浄を行い, 4°C, 5000 rpm, 10 sec 遠心分離し, 上清を取り除いた。この操作を 3 回行った。
11. SDS sample buffer を加え boil (100°C, 5 min) し, SDS-PAGE 及び western blot により解析した。

2-2-6) 共免疫沈降

1. Buffer A (0.1 M KCl/10 mM MgCl₂/20 mM Na₂MoO₄/0.6 M NaCl/5% glycerol/0.1% NP-40 in 25 mM HEPES-KOH buffer pH 7.4) 250 μ l に AhR, HSP90, XAP2, p23 をそれぞれ終濃度 2.5 μ M になるよう添加した。
2. 総量が 500 μ l になるように buffer B (5% glycerol/0.1% NP-40 in 25 mM HEPES-KOH buffer pH 7.4) を添加した。リガンドを添加するサンプルには終濃度 10 μ M となるように 3-MC を添加し, インキュベート (25°C, 5 rpm, 30 min) した。

3. Anti-AhR IgG または preimmune rabbit IgG をサンプルに添加し、インキュベート (4°C, 5 rpm, 16 hr) した。
4. Buffer C (50 mM KCl/5mM MgCl₂/10 mM Na₂MoO₄/0.3 M NaCl/5% glycerol/0.1% NP-40 in 25 mM HEPES-KOH buffer pH 7.4) で洗浄した Protein A Sepharose (GE Healthcare) 50 µl をサンプルに添加し、インキュベート (4°C, 5 rpm, 1 hr) した。
5. 4°C, 5000 rpm, 10 sec 遠心分離し、上清を取り除いた。
6. Buffer C を加え洗浄を行い、4°C, 5000 rpm, 10 sec 遠心分離し、上清を取り除いた。この操作を 3 回行った。
7. SDS sample buffer を加え boil (100°C, 5 min) し、SDS-PAGE 及び western blot により解析した。

2-2-7) CD スペクトル測定

CD スペクトル測定は Jasco J-720 spectropolarimeter (Jasco) を用いて行った。終濃度 1.5 µM になるように AhR を 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で希釈し、1/1000 量の DMSO または DMSO で溶解した 5 mM 3-MC を添加した。CD スペクトルは以下の条件で測定した；190$\lambda$$250$ nm, データ間隔 0.2 nm, 走査速度 100 nm/min, レスポンス 1.0 sec, バンド幅 2.0 nm, 0.1 cm セル, 積算 6 回。J-700 for Windows 蛋白二次構造解析 (Jasco) を用いて二次構造を予測した。

2-2-8) 分子モデリング

分子モデリングは MF myPresto v2.1 (FiatLux) を用いて行った。HIF-2 α の構造データは Protein Data Bank (PDB ID: 3H82) から入手した。3H82 は HIF-2 α と ARNT C 末端 PAS ドメインのヘテロダイマーの構造を示している。リガンドとのドッキングシミュレーションは 3H82 から HIF-2 α PAS-B の構造を抽出したものをを用いた。トポロジーデータとグリッドポテンシャルはデフォルトのパラメータを、sievgene ドッキングシミュレーションの計算方法は precise を設定した。

2-2-9) 二次構造予測

二次構造予測は PredictProtein 及び PROFphd-Secondary Structure, Solvent Accessibility and Transmembrane Helices Prediction を用いて行った。AhR のアミノ酸配列データは Human Protein Reference Database (HPRD ID: 02596) から入手した。

2-3) 実験結果

2-3-1) ヒト全長 AhR の発現

ヒト全長 AhR を発現及び精製するために、GST 融合タンパク質として pGEX-5X-3+AhR 発現 vector を構築し、Factor Xa Protease 認識配列を PreScission Protease 認識配列に置換した (Fig. 2-3-1A). PreScission Protease は GST と human rhinovirus 3C protease の融合タンパク質である。切断反応の至適温度が 4°C であり、融合タンパク質の活性を損ないにくい条件での反応が可能な protease である。

A

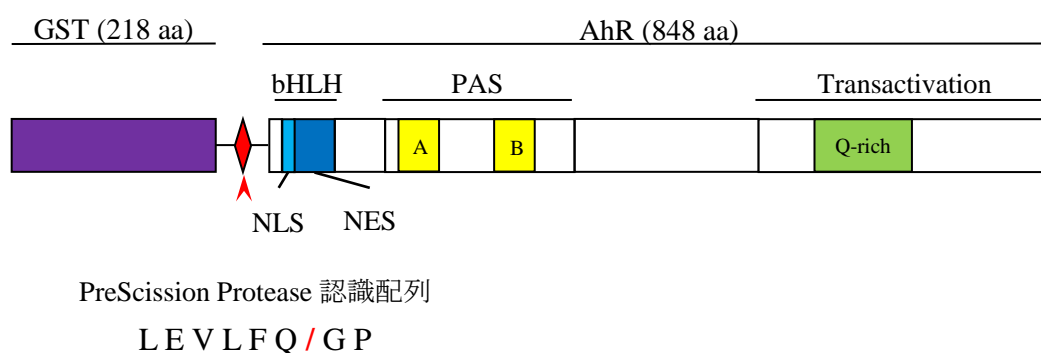


Fig. 2-3-1 GST-AhR の発現

(A) GST-AhR の模式図。赤矢印は PreScission Protease 認識部位を示す。PreScission Protease は認識配列中の赤斜線の部分で切断を行う。

まず、リコンビナントタンパク質の発現に一般的に用いられる大腸菌 BL21 (DE3) competent cell を用いて GST-AhR の発現を試みた。0~1.0 mM の IPTG を添加し、37°C で3時間インキュベートすることにより GST-AhR を誘導したが、可溶性画分でのタンパク質発現は検出できず、不溶性画分での発現量も少なかった (Fig. 2-3-1B, 左のカラム)。AhR の transactivation domain に存在する Q-rich の細胞毒性が原因であると考え、毒性タンパク質に耐性を示す OverExpress C41 (DE3) pLysS competent cell を用いて GST-AhR の発現を試みた。0~1.0 mM の IPTG により GST-AhR を誘導した結果、不溶性画分でのタンパク質発現量は増加したが、可溶性画分での発現は検出できなかった (Fig. 2-3-1B, 右のカラム)。

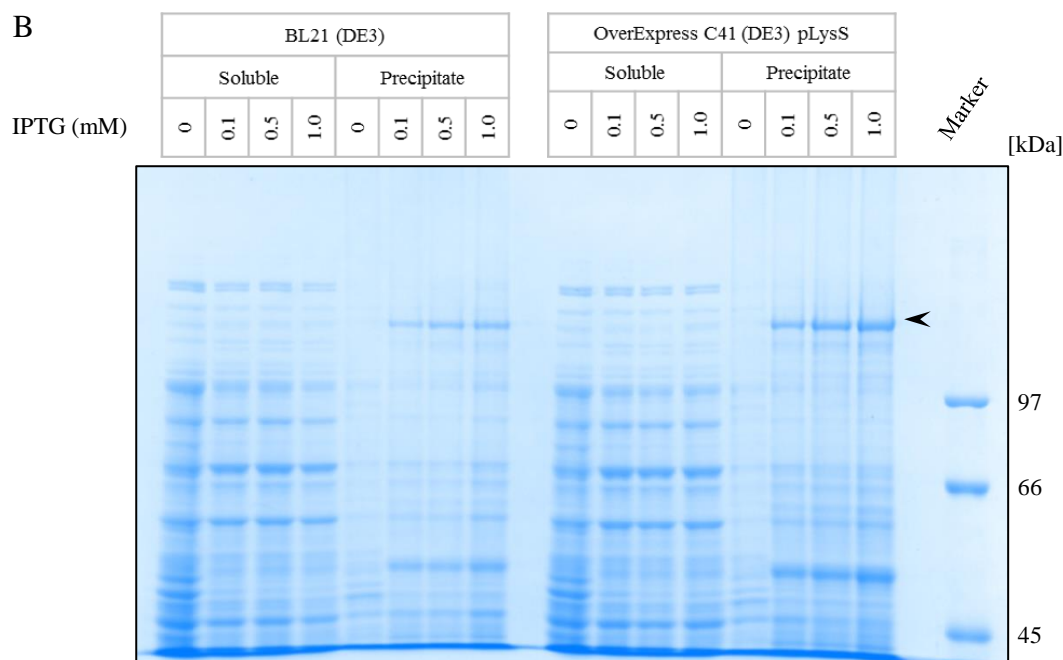


Fig. 2-3-1 GST-AhR の発現

(B) BL21 (DE3) または OverExpress C41 (DE3) pLysS を用いた GST-AhR の発現。0, 0.1, 0.5, 1.0 mM の IPTG を添加し、37°C, 3時間インキュベートした。10 mM Tris-HCl pH7.4 で回収, 超音波破碎し, 可溶性画分と不溶性画分を SDS-PAGE で解析した。矢印は GST-AhR を示す。

不溶性画分で発現する原因として、タンパク質が正しい立体構造を取っていないことが挙げられる。発現時の培養温度を低温へと変化させることで、タンパク質のフォールディングを緩やかに進行させることができる [53]。また、低温で培養することにより宿主である大腸菌由来のタンパク質発現や内在性 protease の活性を低下させることができる。そこで、10°C、24 時間の低温培養により発現させると、Fig. 2-3-1C に示すように主に可溶性画分で GST-AhR の発現が検出できた。ここで誘導されたタンパク質は anti-AhR 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) と特異的に反応した。これにより発現誘導させたタンパク質が AhR であることを確認した。

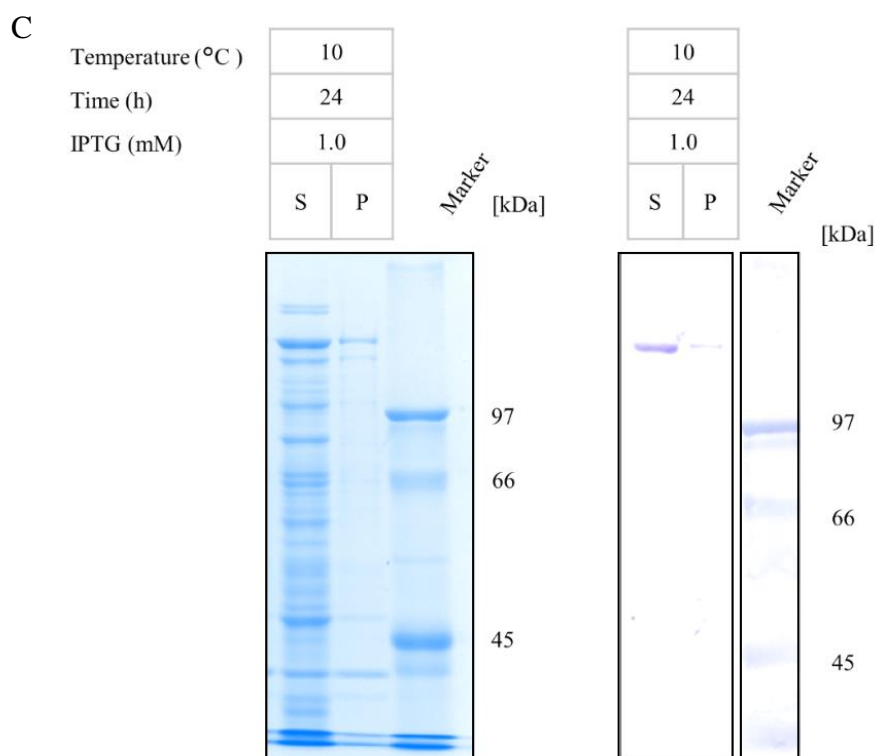


Fig. 2-3-1 GST-AhR の発現

(C) 10°C、24 時間での GST-AhR 発現。超音波破碎後、SDS-PAGE 及び western blot により解析を行った。

IPTG の添加後、10°C で 24 時間または 48 時間のインキュベーションを行い発現条件の検討を行った。どちらの培養時間においても、GST-AhR の可溶性画分での発現が検出でき、48 時間において発現量の増加が確認できた (Fig. 2-3-1D)。この結果より、GST-AhR の発現条件は 1.0 mM IPTG 及び 10°C、48 時間のインキュベーションに決定し、以降の実験を行った。

D

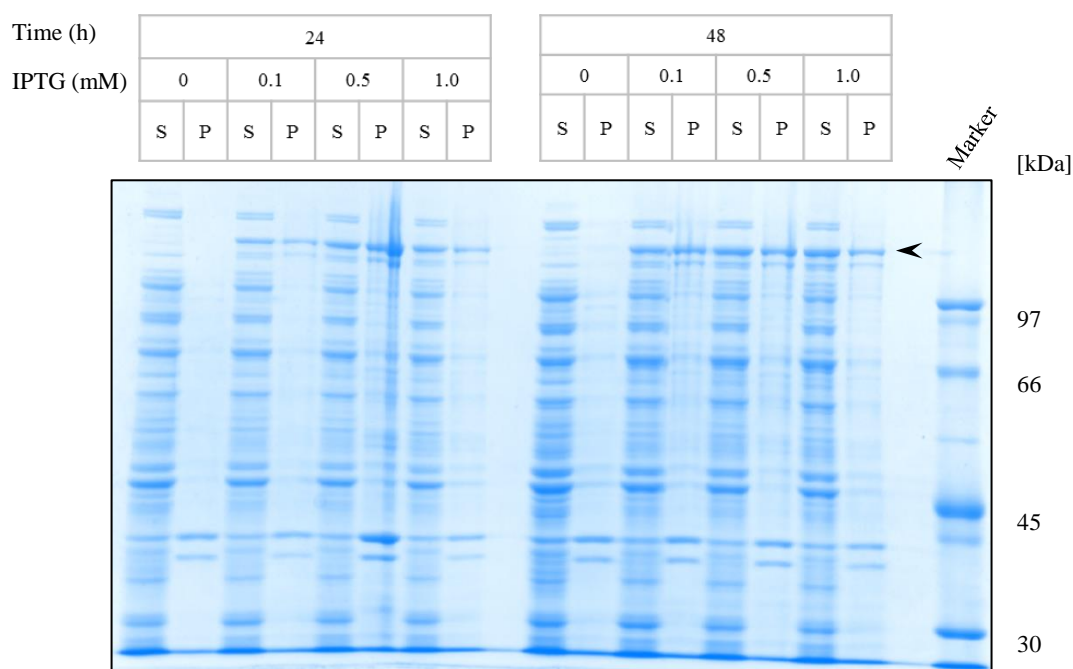


Fig. 2-3-1 GST-AhR の発現

(D) GST-AhR の発現時間検討. 0, 0.1, 0.5, 1.0 mM の IPTG を添加し、10°C、24 または 48 時間インキュベーションした。10 mM Tris-HCl pH7.4 で回収、超音波破碎し、可溶性画分と不溶性画分を SDS-PAGE で解析した。矢印は GST-AhR を示す。

2-3-2) 全長 AhR の抗体作製と精製

最初に不溶性画分から GST-AhR を精製し、AhR に対するポリクローナル抗体の作製を行った。モノクローナル抗体と異なり、作製するポリクローナル抗体は全長 AhR の多数の部位をエピトープとして認識できる。そのため、構造変化や複合体形成などにより AhR のエピトープの一部がマスクされた場合でも、別のエピトープを認識し特異的に結合することができるという利点がある。まず、2-2-1-2) に記載したように、発現誘導を行った大腸菌を超音波破碎し、不溶性タンパク質を 1.0 M Arginine/10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 に溶解した後、arginine を除去した (Fig. 2-3-2-1A, レーン 2)。その後、PreScission Protease を用いて GST-AhR の digestion を行った (Fig. 2-3-2-1A, レーン 3)。Digestion を行って得られた全長 AhR のタンパク質バンドを SDS ポリアクリルアミドゲルから切り出し、MODEL BE-883 (BIO CRAFT) を用いて溶出を行い、全長 AhR を電気泳動により精製した (Fig. 2-3-2-1A, レーン 4)。次に、2-2-3) に記載した手順にしたがって精製した AhR をウサギに免疫し、抗体を作製した。

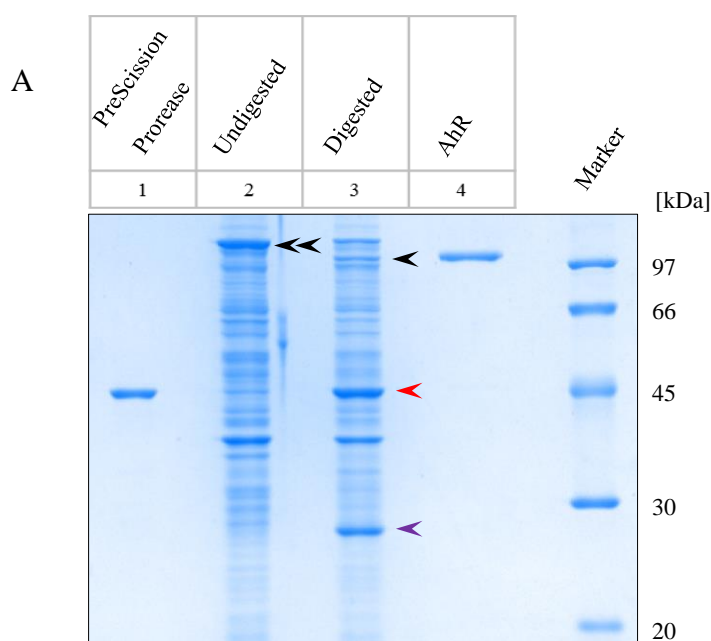


Fig. 2-3-2-1 Anti-AhR 抗体の作製

(A) 全長 AhR をゲルから切り出し溶出した結果。レーン 2 は不溶性画分で発現させた GST-AhR を arginine 懸濁後、脱塩したサンプルであり、二重矢印は GST-AhR を示す。レーン 3 は PreScission Protease による digestion を行ったサンプルであり、黒矢印は全長 AhR、赤矢印は PreScission Protease、紫矢印は GST を示す。レーン 1 は PreScission Protease、レーン 4 は溶出した全長 AhR を示す。

Fig. 2-3-2-1B に示すように，作製した anti-AhR 抗体を用いた western blot ではリコンビナント AhR を発現させた大腸菌において GST-AhR 及び AhR のバンドのみが検出された．また，Fig. 2-3-2-1B に示すように HeLa 細胞における western blot においても同様に AhR のバンドのみが検出された．Fig. 2-3-2-1D に示すように，作製した抗体を用いた蛍光免疫染色では既存のリガンドである 3-MC 投与による AhR の核移行を観察することができた．したがって，作製した anti-AhR 抗体は AhR に対して非常に特異的なものであり，変性した AhR 及び天然状態の AhR を認識できるということが確認できた．

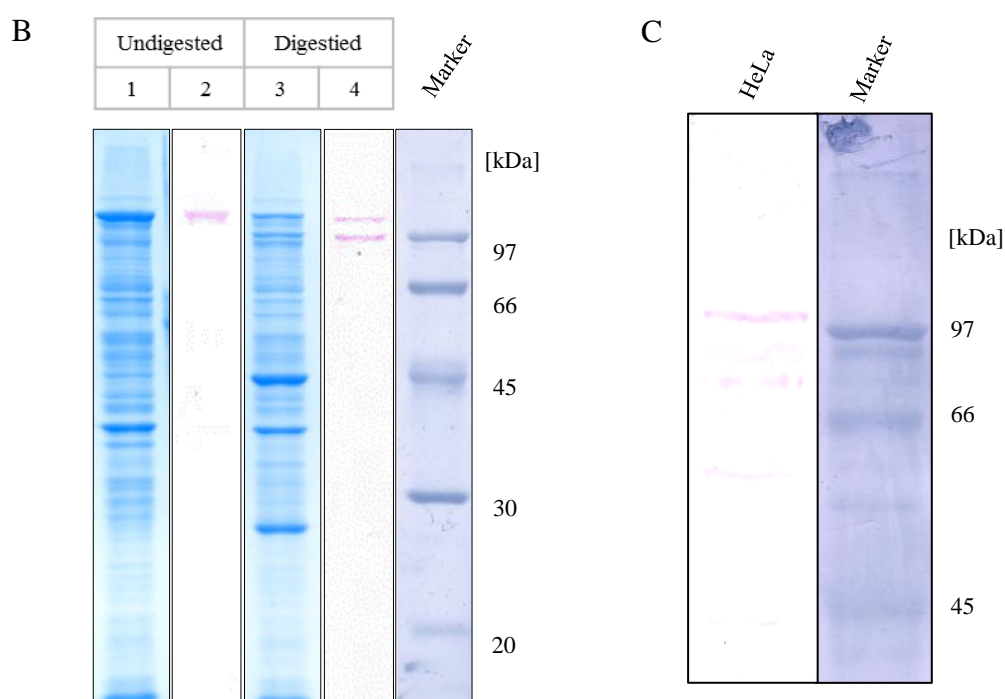


Fig. 2-3-2-1 Anti-AhR 抗体の作製

(B) 作製した抗体の特異性の確認． Undigested 及び digested サンプルを SDS-PAGE (レーン 1, 3) 及び作製した anti-AhR 抗体を用いた western blot (レーン 2, 4) により解析した． (C) 作製した抗体の特異性の確認． HeLa 細胞破碎溶液に対して作製した anti-AhR 抗体を用いた western blot を行った結果を示している．

D

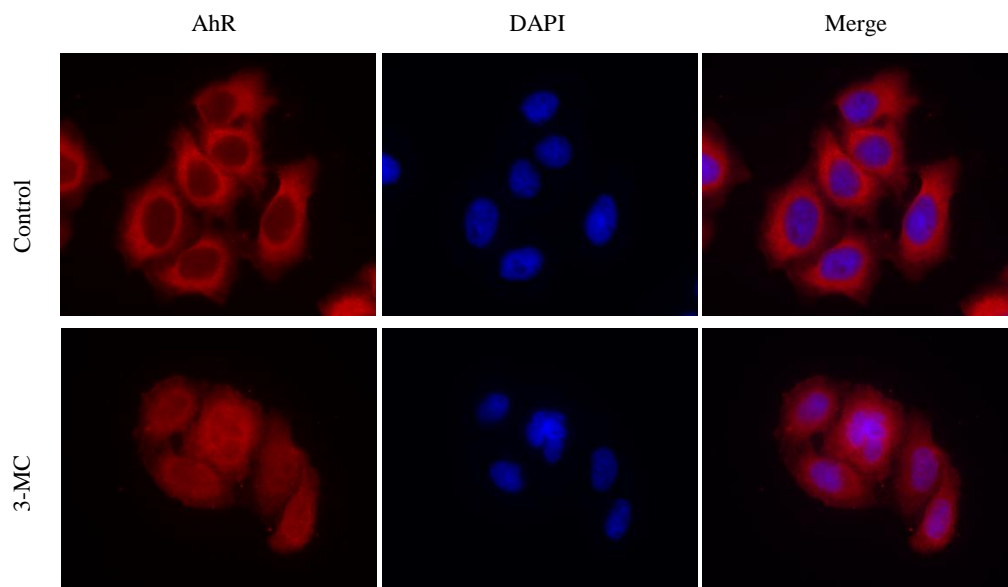


Fig. 2-3-2-1 Anti-AhR 抗体の作製

(D) 3-MC 投与から 2 時間後の蛍光免疫染色の結果. 上のカラムはコントロール, 下のカラムは 3-MC を投与した場合の結果を示している.

タンパク質解析を行うため、可溶性画分から AhR の精製を行った。2-2-1-3) に記載したように、Q-Sepharose column と Glutathione Sepharose 4B column を用いた。発現誘導を行った大腸菌を超音波破碎し、可溶性タンパク質を Q-Sepharose column に加え、pass 画分を回収した。その pass 画分を Glutathione Sepharose 4B column に加え、0.5 M NaCl/10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で洗浄した後、20 mM glutathione/50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 により GST-AhR を溶出した (Fig. 2-3-2-2A, レーン 1)。精製した GST-AhR は PreScission Protease により digestion を行った (Fig. 2-3-2-2A, レーン 2)。Fig. 2-3-2-2B, レーン 1 に示すように、AhR (97 kDa)、PreScission Protease (46 kDa)、GST (26 kDa) の 3 つのタンパク質バンドが存在する。Glutathione Sepharose 4B column を用いて、GST 及び PreScission Protease を除去した。これにより、全長 AhR を精製した (Fig. 2-3-2-2B, レーン 2)。

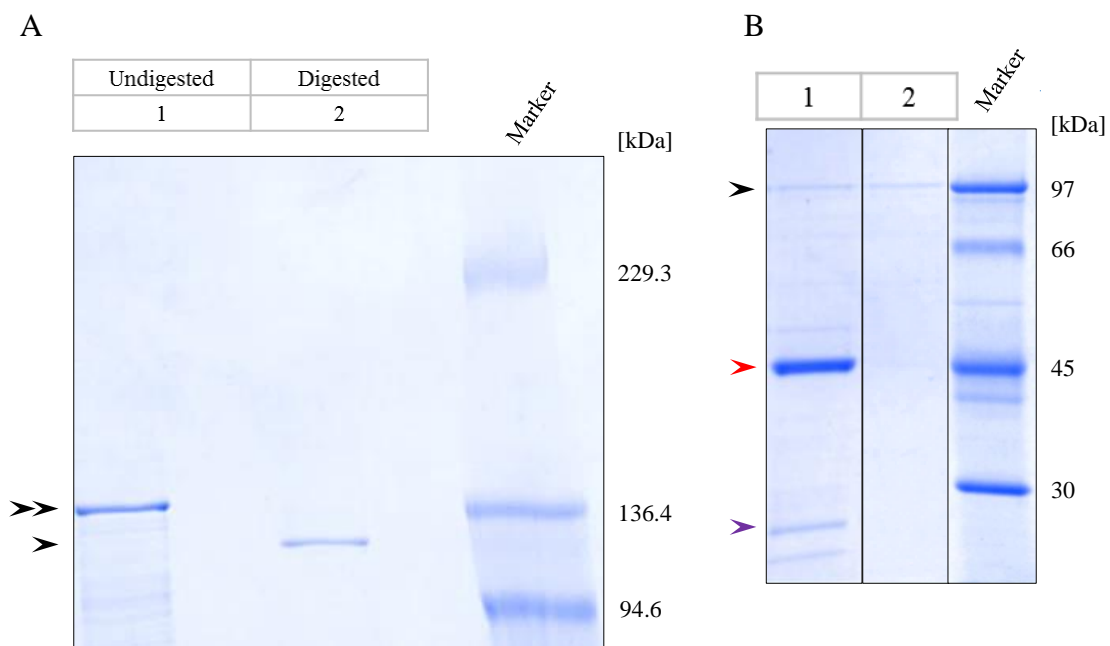


Fig. 2-3-2-2 全長 AhR の精製

(A) GST-AhR の精製. 可溶性画分で発現させた GST-AhR を Q-Sepharose column 及び Glutathione Sepharose 4B column を用いて精製した. レーン 1 は PreScission Protease による digestion 前のサンプルであり, 二重矢印は GST-AhR を示す. レーン 2 は PreScission Protease による digestion を行ったサンプルであり, 矢印は全長 AhR を示す. (B) 全長 AhR の精製. レーン 1 は GST-AhR を digestion したサンプルであり, 全長 AhR (黒矢印), PreScission Protease (赤矢印), GST (紫矢印) を含む. レーン 1 のサンプルから Glutathione Sepharose 4B column を用いて全長 AhR を精製した. レーン 2 は PreScission Protease 及び GST を取り除き精製した全長 AhR を示す.

2-3-3) 精製した全長 AhR はリガンド結合能及び複合体形成能を有する

精製した AhR がリガンドに結合できるかどうかを、リガンドの 1 つである β -NF を用いて調べた。Epoxy-activated Sepharose 6B に β -NF をカップリングし、 β -naphthoflavone affinity chromatography を行った。Fig. 2-3-3A はその結果を示しており、mock 樹脂には AhR が結合していないが、 β -NF affinity 樹脂では western blot により AhR のバンドが検出できた。したがって、精製された全長 AhR はリガンド結合能を有すると考えられる。

次に、精製した AhR が AhR-分子シャペロン複合体を形成できるかどうかを共免疫沈降により調べた。2-2-2) に記載した手順で HSP90, XAP2, p23 を精製した (Fig.2-3-3B)。リガンドの 1 つである 3-MC 存在下または非存在下において anti-AhR 抗体を用いて共免疫沈降を行い、anti-HSP90 抗体, anti-XAP2 抗体, anti-p23 抗体を用いた western blot によりタンパク質を検出した。Fig. 2-3-3C はその結果を示しており、コントロールとなる preimmune rabbit IgG では HSP90, XAP2, p23 は検出されないが、anti-AhR 抗体ではリガンドである 3-MC の存在下、非存在下どちらにおいても HSP90, XAP2, p23 が検出され、AhR-分子シャペロン複合体を形成していることが確認できた。この結果は、リガンド非存在下において細胞質中で複合体を形成して存在し、リガンドが結合した際に複合体を形成したまま核移行するという AhR の活性化機構と一致する。

以上のことから、本研究で発現、精製を行ったヒト全長 AhR はリガンド結合能や複合体形成能など機能を有する天然状態の AhR であると考えられる。

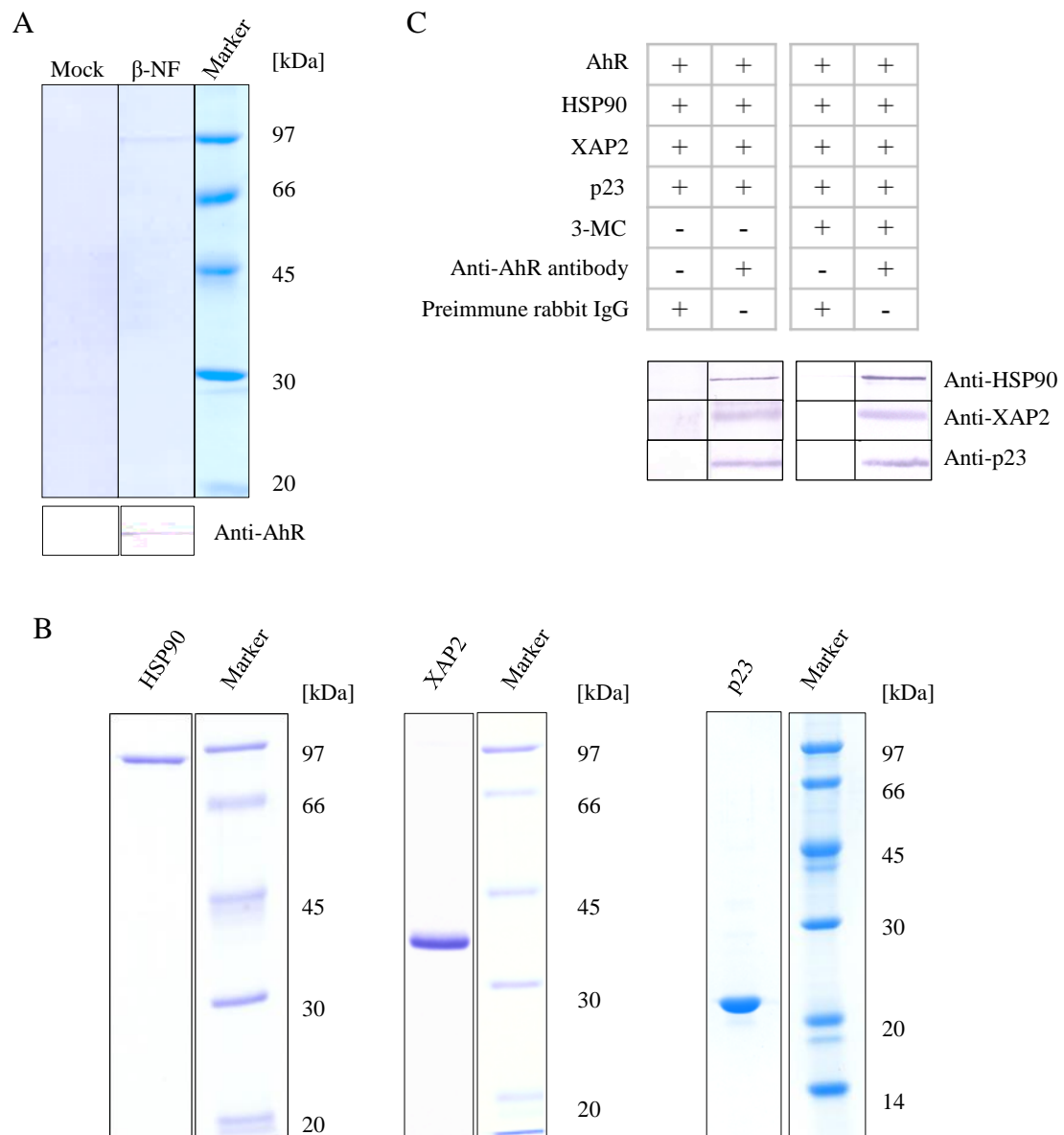


Fig. 2-3-3 全長 AhR のリガンド, タンパク質結合解析

(A) β -Naphthoflavone affinity chromatography. 精製した AhR を mock 及び β -NF affinity 樹脂に添加し, SDS-PAGE 及び western blot により解析した. (B) HSP90, XAP2, p23 の精製結果. (C) AhR-分子シャペロン複合体形成の解析. Anti-AhR を用いて 3-MC 存在下, 非存在下における共免疫沈降を行った. コントロールとして preimmune rabbit IgG を用いた.

2-3-4) AhR の構造変化と分子モデリング

CD スペクトル測定を行い，全長 AhR のリガンド結合による構造変化を解析した．CD スペクトルを測定した結果，リガンドである 3-MC の存在下では AhR の二次構造が変化した (Fig. 2-3-4-1A)．3-MC 存在下では， β -sheet (217 nm) が減少し， α -helix (206 nm) とランダム構造 (190 nm) が増加する．二次構造の予測を Table. 2-3-4-1 に示した．一方，コントロールとして測定した GST では 3-MC の存在下，非存在下において CD スペクトルの変化がほとんどなく，3-MC と GST は結合せず，構造変化も引き起こされることがわかる (Fig. 2-3-4-1B)．Table. 2-3-4-1 に示した二次構造予測においても，AhR と異なり GST の場合は大きな変化は予測されていない．

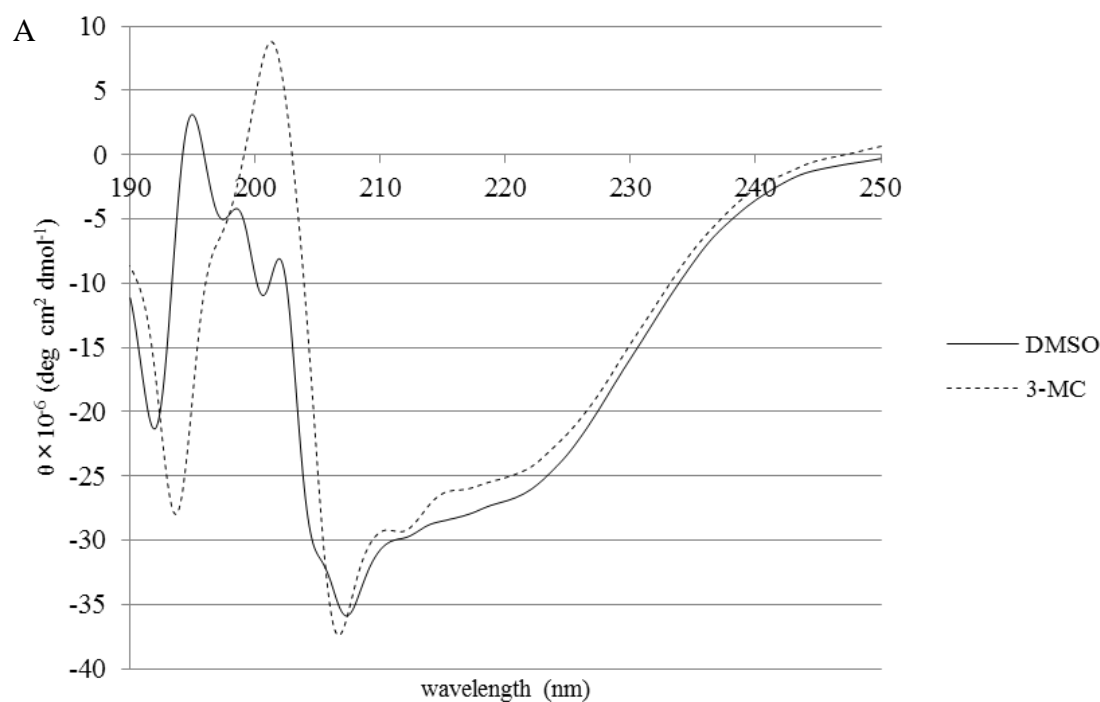


Fig. 2-3-4-1 AhR 及び GST の CD スペクトル測定

(A) 全長 AhR にリガンドを添加した際の CD スペクトル．実線は DMSO (リガンド無し)，破線は 3-MC を示す．

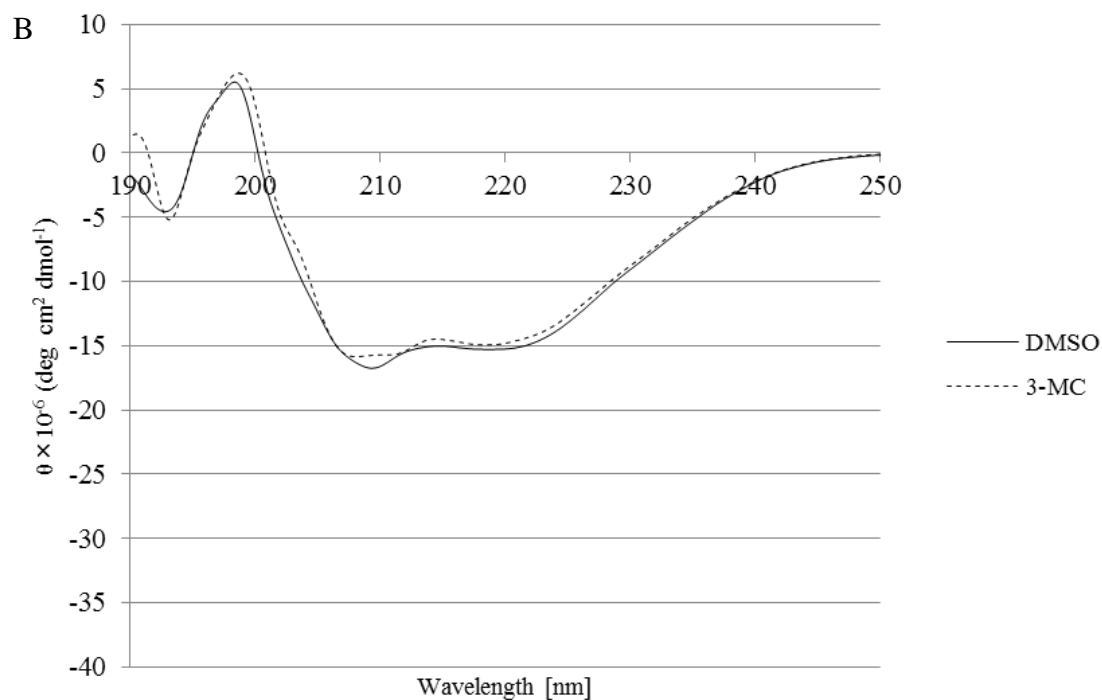


Fig. 2-3-4-1 AhR 及び GST の CD スペクトル測定

(B) GST に AhR のリガンドを添加した際の CD スペクトル. 実線は DMSO (リガンド無し), 破線は 3-MC を示す.

Table. 2-3-4-1 リガンド添加時の二次構造予測

| | AhR | | GST | |
|--------|------|------|------|------|
| | DMSO | 3-MC | DMSO | 3-MC |
| Helix | 16.0 | 24.0 | 25.2 | 27.4 |
| Beta | 30.1 | 4.3 | 22.2 | 22.8 |
| Turn | 20.8 | 35.0 | 19.1 | 18.8 |
| Random | 33.1 | 36.7 | 33.4 | 31.0 |

AhR とリガンド間の相互作用を、MF myPresto v2.1 (FiatLux) による分子モデリングを用いて検証した。ただし、AhR の立体構造は明らかになっていないので、AhR の構造を予測するための鋳型として HIF-2 α (Hypoxia-inducible factor-2 α) の PAS-B ドメインを使用した。Hypoxia-inducible factor は、細胞への酸素供給が不足した際に誘導されるタンパク質である [54]。HIF-2 α は AhR と同じ bHLH-PAS ファミリーに属し、転写因子として機能する [55]。HIF-2 α は AhR と 51% のアミノ酸相同性を有しており、AhR の鋳型構造として用いられる [56-57]。HIF-2 α の PAS B ドメインには、2つの α -helix, 5つの β -sheet, ランダム構造が存在する (Fig. 2-3-4-2B)。PredictProtein 及び PROFphd-Secondary Structure, Solvent Accessibility and Transmembrane Helices Prediction を用いてヒト AhR の PAS-B ドメインの二次構造を予測した。Fig. 2-3-4-2A に示すように、AhR の PAS-B ドメインは3つの α -helix, 4つの β -sheet, ランダム構造を有しており、23.94% H (α -helix), 23.94% E (β -sheet), 52.11% L (ランダム構造) であった。したがって、ヒト AhR-PAS-B ドメインの構造は HIF-2 α の PAS-B ドメインの構造とほぼ同様であるといえる。Fig. 1-2B において AhR のリガンドである TCDD, β -NF, 3-MC の構造を示した。これらのリガンドはすべて PAS-B ドメインの β -sheet 付近に結合する可能性が高い (Fig. 2-3-4-2B)。リガンドである TCDD, β -NF, 3-MC は分子モデルにおいて同様の結合様式であることが確認できた。リガンドが受容体によく結合する場合、docking score は負の値を示す。Table. 2-3-4-2 は AhR への docking score を示しており、TCDD, β -NF, 3-MC はすべて負の値を示した。

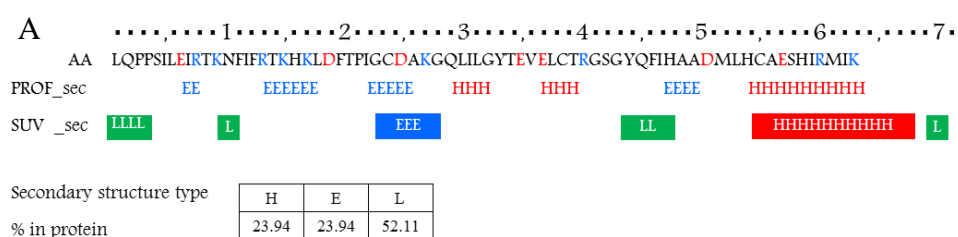


Fig. 2-3-4-2 分子モデリング

(A) AhR-PAS-B ドメインの二次構造予測。予測は AhR の 272-342 アミノ酸を用いて行った。

Table. 2-3-4-2 分子モデルの docking score

| | Docking score |
|-------------|---------------|
| TCDD | -2.54 |
| β -NF | -2.59 |
| 3-MC | -2.97 |

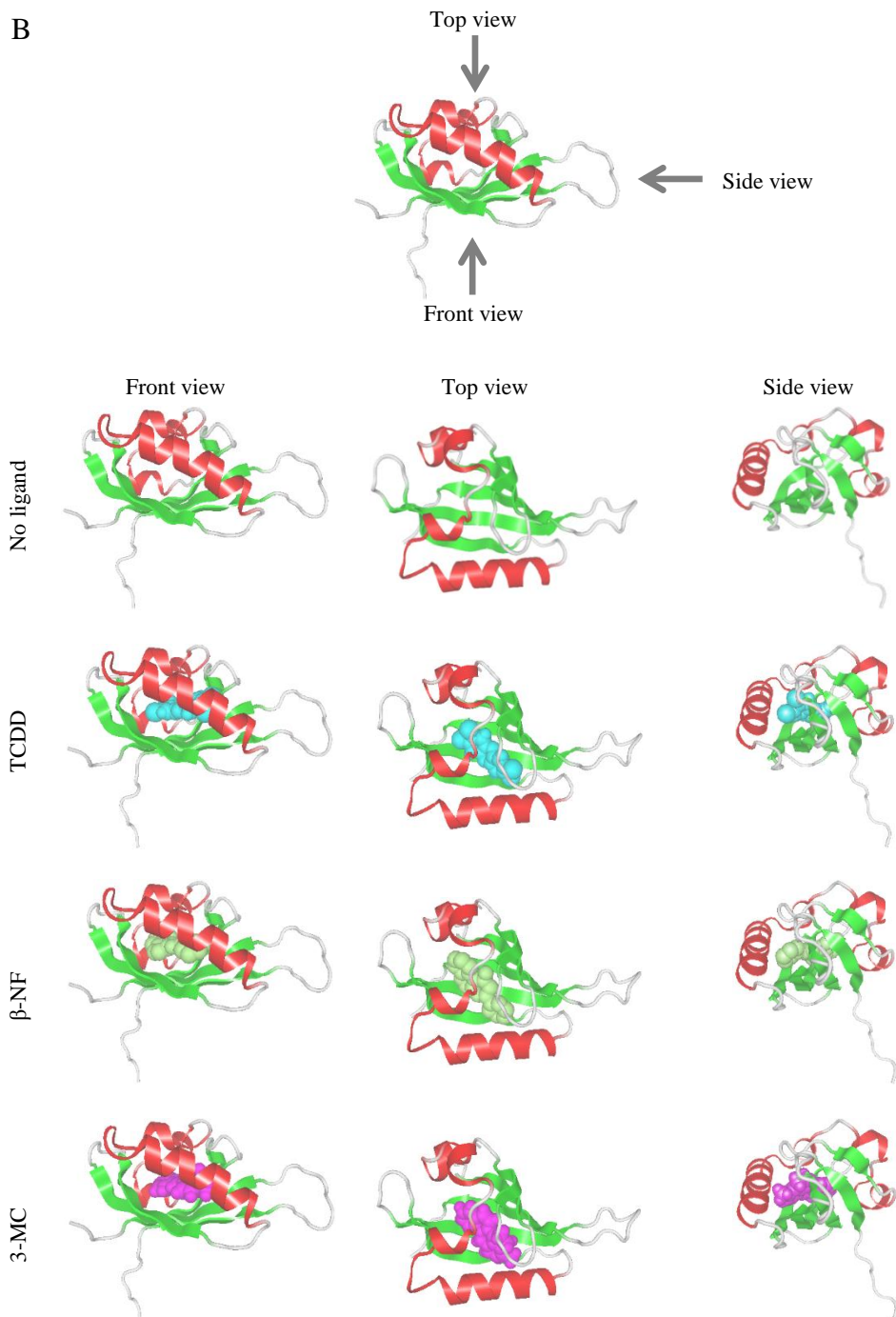


Fig. 2-3-4-2 分子モデリング

(B) リガンドを用いた HIF-2 α の分子モデル. 分子モデルはリガンド (TCDD, β -NF, 3-MC) の非存在下, 存在下における front view, top view, side view を示す.

2-4) 考察

Baculovirus 発現系を使用した全長 AhR の発現及び精製は以前に報告されている [49-50]. 一方, 大腸菌発現系を使用した全長 AhR の精製に関する報告はされていない. 当研究室では過去に, いくつかの大腸菌発現 vector 及びいくつかの大腸菌 competent cell (ArcticExpress (DE3) competent cell, Origami B (DE3) competent cell, Rosseta B (DE3) competent cell) を使用して, 全長 AhR の発現及び精製を試みた. しかし, いずれの場合でも AhR が全く発現しない, もしくは不溶性画分において極少量しか発現しなかった. AhR は, C 末端の transactivation ドメイン中に Q-rich 領域が存在する (Fig. 2-3-1A). Q-rich 領域は大腸菌に対して毒性を示すため, AhR は大腸菌発現系で発現させるのは困難である. OverExpress C41 (DE3) pLysS は, BL21 (DE3) の変異株である OverExpress C41 (DE3) が T7 RNA ポリメラーゼの天然阻害剤である T7 リゾチームをコードする chloramphenicol 耐性プラスミドを保持したものである. pLysS を有する大腸菌は少量の T7 リゾチームを生成するため, 非誘導下での目的タンパク質の発現が抑制される. OverExpress C41 (DE3) pLysS は, 特に毒性のあるタンパク質をコードする組み換え体を安定化させるために用いられる.

我々は, OverExpress competent cell を使用して, 全長 AhR の発現を試みた. OverExpress C41 (DE3) pLysS を使用して全長 AhR を GST-AhR 融合タンパク質として構築, 発現, 精製を行った. 融合タンパク質は, 可溶性画分と不溶性画分の両方で発現した (Fig. 2-3-1D). したがって, OverExpress competent cell は毒性タンパク質を可溶性画分で発現させることに効果的であった. GST を用いて精製後 PreScission Protease により digestion を行うことで, ヒト全長 AhR を精製した.

次に, 精製した AhR のリガンド結合能を調べた. Epoxy-activated Sepharose 6B は, C=O, N=N, C=C 結合を含むリガンドをカップリングできる. TCDD, 3-MC, β -NF などの AhR リガンドの中では, β -NF のみが C=O 結合を含んでいる. Epoxy-activated Sepharose 6B を用いて, β -NF affinity 樹脂を作製した. Epoxy-activated Sepharose 6B (Mock 樹脂) に可溶性画分から精製した AhR は結合しなかったが, β -NF affinity 樹脂では AhR の結合が検出された (Fig. 2-3-3A). この結果は, 可溶性画分から精製された全長 AhR がリガンド結合能を有することを示唆している.

AhR は, リガンドの存在下または非存在下の両方で, HSP90, XAP2, p23 に結合した (Fig. 2-3-3C). この結果は, AhR-PAS または AhR-bHLH ドメインを使用した場合と同じである [33-35]. 本研究で精製された全長 AhR は, リガンド結合能を有し, 分子シャペロンと複合体を形成する. したがって, 大腸菌発現系を使用して精製されたヒト全長 AhR は, 天然状態であるといえる.

また, CD スペクトル測定により 3-MC 存在下または非存在下における AhR の構造変化を分析した. リガンド非存在下では, AhR の CD スペクトルパターン

は α -helix, β -sheet, ランダム構造などの基本的なタンパク質二次構造を示した。逆に, リガンド存在下では α -helix の増加, β -sheet の減少が見られた (Fig. 2-3-4-1, Table 2-3-4-1)。リガンドの存在下または非存在下で AhR の構造変化を検出できた。GST の場合では 3-MC の向きが固定されていないため, 3-MC 由来のスペクトルは相殺されて検出されない。しかし, 全長 AhR の CD スペクトルは, AhR の構造変化によるスペクトルと AhR に 3-MC が結合したことで 3-MC の向きが固定されたことによるスペクトルの両方を検出している。そのため, 実際の AhR の構造変化は Table 2-3-4-1 の値よりも小さいのではないかと考えられる。

ドッキングシミュレーションソフトウェアを使用して, AhR のリガンド結合メカニズムを予測した。AhR-PAS-B ドメインの正確な立体構造は報告されていないため, AhR-PAS-B ドメインと非常に類似していることが知られている HIF-2 α の PAS-B ドメインを鋳型構造として使用した。HIF-2 α の PAS-B ドメインには, 2 つの α -helix, 5 つの β -sheet, ランダム構造が存在する。一方, ヒト AhR-PAS-B ドメインは, PredictProtein の結果 3 つの α -helix, 4 つの β -sheet, ランダム構造を有することが予測された。予測の結果, AhR と HIF-2 α の PAS-B ドメインはよく似た構造を有することが確認できた。TCDD, β -NF, 3-MC といったリガンドは PAS-B ドメインに結合し, 各 docking score は非常に高い値であった (Fig. 2-3-4-2A, Table 2-3-4-2)。各リガンドは基本的に PAS-B ドメインの β -sheet に結合する。CD スペクトル測定により, リガンドが存在する場合に α -helix とランダム構造の増加, β -sheet の減少が検出されている。AhR の構造変化は, リガンドが PAS-B ドメインの β -sheet に結合することにより引き起こされると考えられる。一般的に, アミノ酸 M, E, K, A, L は α -helix に適したアミノ酸として知られている。ヒト AhR-PAS-B ドメインにおいて, 1L, 7L, 8E, 11K, 18K, 20K, 56A, 57A といった α -helix を形成しない領域のアミノ酸 (Fig. 2-3-4-2B) が, リガンド結合後に α -helix を形成する可能性がある。最近, Schulte らはアミノ酸残基 23-273 をコードするヒト AhR を使用して, ターゲット DNA に結合した AhR-ARNT コア複合体の結晶構造を報告した [58]。彼らは, bHLH および PAS-A ドメインを含む AhR-ARNT 転写因子複合体の結晶構造が 12mer の二本鎖 DNA (dsDNA) に結合していることを示した。これにより, 核 AhR-ARNT 複合体の XRE 結合メカニズムが解明された。

本研究では, 一般的な大腸菌発現系を使用して簡便な方法でヒト全長 AhR を発現, 精製した。今回の結果は, 全長 AhR の立体構造解析や, AhR の新たなリガンドの探索などの新たな知見を得ることにつながるだろう。

第 3 章

抗がん剤 **cisplatin** の **AhR** 活性化機構の解析

3-1) 緒言

細胞質中で AhR と複合体を形成しているタンパク質である HSP90 は 300 種類以上のクライアントタンパク質を有する分子シャペロンである [31-32]. 分子シャペロンは生体内でクライアントタンパク質の折りたたみ, 高次構造形成, 生理機能制御などに関わるタンパク質であり, 多くの分子シャペロンは熱や薬物などのストレスに応答し発現誘導される熱ショックタンパク質 (Heat shock protein; HSP) である. HSP90 は真核生物の細胞質中に最も多く発現しているタンパク質の 1 つであり, クライアントタンパク質の凝集抑制, 構造安定化, 輸送, 分解など非常に多くの役割が報告されている [59-62]. HSP90 は二量体で機能するタンパク質であり, ATP 結合部位が存在する N ドメイン, 二量体形成に関与する C ドメイン, 2つのドメインをつなぐ M ドメインの 3つにより構成されている. ATP 非存在下において HSP90 は open conformation をとる. ATP が結合すると, N ドメインが会合し closed conformation となる. ATP を加水分解した後, HSP90 は open conformation に戻る (Fig. 3-1-1). HSP90 は CDC37, HOP, AHA1 などと協調しながら, クライアントタンパク質が正しくシグナルに応答して機能するための因子として ATP 依存的に機能している [63]. HSP90 発現レベルを低下させると, AhR が不安定となり転写活性化が起こらないことが報告されており, HSP90 は AhR の安定化と転写活性に必須な存在であると示唆されている [64].

HSP90 の阻害剤は radicicol や geldanamycin, geldanamycin の誘導體である 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) など様々なものが報告されている. HSP90 は, がんの発生や増殖, 浸潤や転移に関わる転写因子やシグナル伝達分子の機能を制御することでがん細胞の生存に寄与することが報告されており, HSP90 阻害剤は抗がん剤として着目されている [65]. Cisplatin は数多くのがんの有効性が認められている抗がん剤であり, 臨床において広く用いられている. Cisplatin は DNA に結合することで DNA 鎖内に架橋を形成し, 転写, 複製を阻害することでがん細胞の成長を抑制する [66]. 以前, 当研究室では cisplatin が HSP90 の C ドメイン付近に結合する特異的阻害剤であり, HSP90 の凝集抑制機能を阻害することを報告した [67].

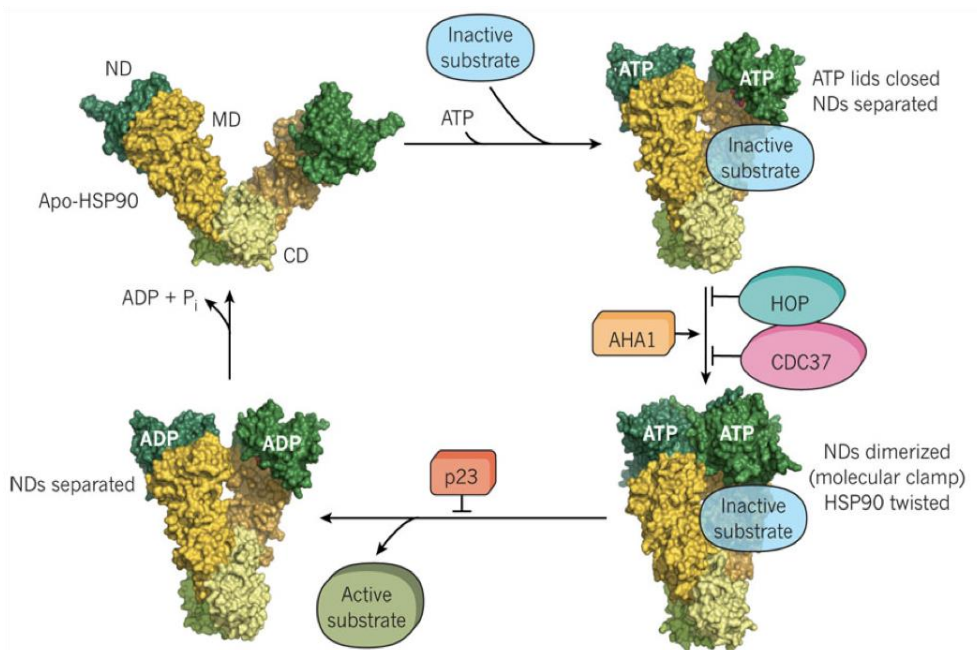
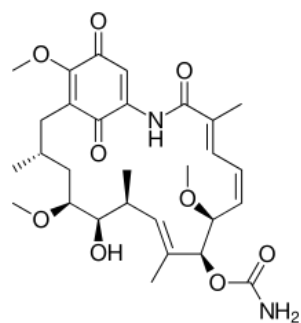
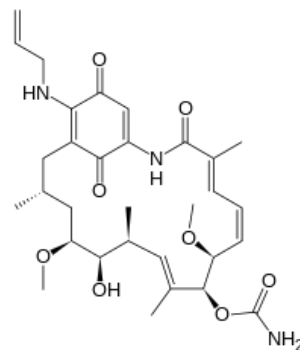


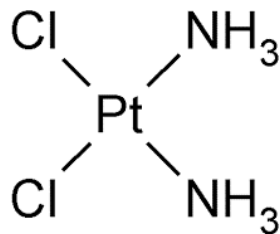
Fig. 3-1-1 HSP90 の ATP 加水分解サイクル
文献[53]より抜粋.



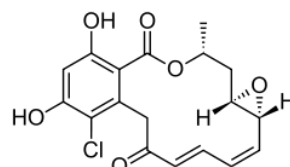
Geldanamycin



17-N-Allylamino-17-
demethoxygeldanamycin
(17-AAG)



Cisplatin



Radicicol

Fig. 3-1-2 HSP90 阻害剤の例

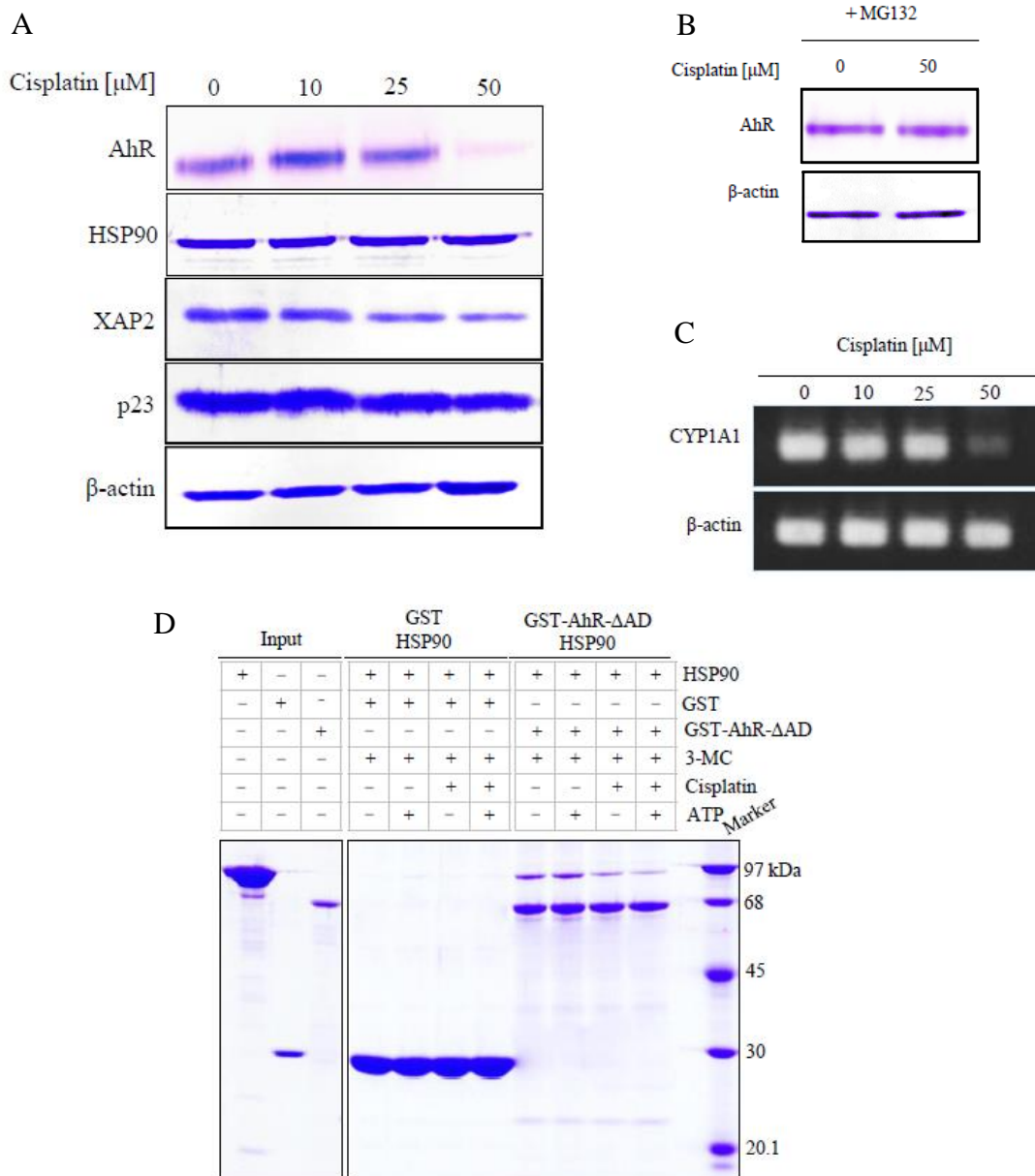


Fig. 3-1-4 Cisplatin が AhR に及ぼす作用

(A) HeLa 細胞に cisplatin を添加した際のタンパク質発現量変化. (B) MG132 と cisplatin 添加による AhR の発現量変化. (C) Cisplatin 添加による CYP1A1 mRNA 量変化. (D) Cisplatin 添加時の GST pull-down assay. 3 μM 3-MC, 50 μM cisplatin, 1 mM ATP の存在下または非存在下において行われた. 文献[35]より抜粋.

3-2) 実験方法

リコンビナントタンパク質はすべて human のものを用いた.

3-2-1) 細胞の培養

HeLa 細胞は 10% ウシ胎児血清 (BIOLOGICAL INDUSTRIES), 0.1% penicillin-streptomycin (GIBCO) を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (SIGMA) で 37°C にて 5% CO₂, 飽和湿度の気相インキュベータで培養した.

3-2-2) AhR-PAS, AhR- Δ AD の精製

以下のタンパク質は当研究室において GST 融合タンパク質として以前構築されたものを用いた.

3-2-2-1) AhR-PAS の精製

Vector : pGEX-5X-3

Competent cell : BL21 (DE3) Arctic

制限酵素 : Sal I-Not I

Forward primer : 5'-GTCGACATGGGAGAATTCTTATTACAGGCTCTGA-3'

Reverse primer : 5'-GCGGCCGCTCATCCATTTTTATAAAGCAGG-3'

1. Ampicillin (終濃度 100 μ g/ml) を添加した LB 培地で 37°C, 250 rpm, overnight 培養した.
2. 培養した大腸菌を 100 倍量の LB 培地 (終濃度 100 μ g/ml の ampicillin を含む) に添加し, OD₆₀₀ が 0.5 になるまで 37°C, 250 rpm で培養した.
3. 培養後, 10°C, 30 min インキュベートした後, IPTG を終濃度 0.5 mM になるように添加し, 10°C, 250 rpm, 24 hr 培養した.
4. 培養後, 4°C, 13000 rpm, 15 min 遠心分離して大腸菌を回収し, 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で懸濁した.
5. 回収した大腸菌を超音波破碎した後, 4°C, 13000 rpm, 15 min 遠心分離し, 沈殿を 1M arginine/10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で懸濁した.
6. 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で overnight 透析した.
7. 4°C, 13000 rpm, 15 min 遠心分離して上清を回収し, 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で平衡化した Glutathione Sepharose 4B column に加えた.
8. 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で洗浄した.
9. 20 mM glutathione/50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 で溶出した.
10. Ultrafiltration (30 kDa cut) を行った.

3-2-2-2) AhR- Δ AD の精製

Vector : pGEX-5X-3

Competent cell : BL21 (DE3) Arctic

制限酵素：Sal I-Xho I

Forward primer：5'- GTCGACATGAACAGCAGCAGCCGCCAAC -3'

Reverse primer：5'- CTCGAGCTATTTTCGTAAATGCTCTGTTCC -3'

1. Ampicillin (終濃度 100 $\mu\text{g/ml}$) を添加した LB 培地で 37°C, 250 rpm, overnight 培養した.
2. 培養した大腸菌を 100 倍量の LB 培地 (終濃度 100 $\mu\text{g/ml}$ の ampicillin を含む) に添加し, OD₆₀₀ が 0.5 になるまで 37°C, 250 rpm で培養した.
3. 培養後, 10°C, 30 min インキュベートした後, IPTG を終濃度 0.5 mM になるように添加し, 10°C, 250 rpm, 24 hr 培養した.
4. 培養後, 4°C, 13000 rpm, 15 min 遠心分離して大腸菌を回収し, 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で懸濁した.
5. 回収した大腸菌を超音波破碎した後, 4°C, 13000 rpm, 15 min 遠心分離し, 沈殿を 1M arginine/10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で懸濁した.
6. 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で overnight 透析した.
7. 4°C, 13000 rpm, 15 min 遠心分離して上清を回収し, 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で平衡化した Glutathione Sepharose 4B column に加えた.
8. 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 で洗浄した.
9. 20 mM Glutathione/50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 で溶出した.
10. Ultrafiltration (50 kDa cut) を行った.

3-2-3) Trypsin 消化耐性実験

1. Assay buffer (50 mM KCl/5mM MgCl₂/1 mM DTT/2 mM AMP-PNP/25 mM HEPES-KOH pH 7.4) に GST-AhR-PAS または GST, HSP90 をそれぞれ終濃度 5 μM になるよう添加した.
2. 終濃度 2 mM になるように ATP を加え, インキュベート (37°C, 15 min) した.
3. 終濃度 15 nM になるように trypsin を加え, インキュベート (37°C, 15 min) した.
4. SDS sample buffer を加えて反応を停止させ, SDS-PAGE により解析した.

3-2-4) 蛍光免疫染色

15. HeLa 細胞 1×10^5 個を 3 cm シャーレに播種した.
16. 1 日後, 終濃度 50 μM になるように cisplatin を添加し, インキュベータで 1 hr 培養した.
17. 培地を捨て, 氷冷 1xPBS で 2 回洗浄した.
18. 氷冷 methanol 2 ml を加えてインキュベート (4°C, 15 min) し, カバーガラス

に細胞を固定した.

19. 1xPBS で 3 回洗浄した.
20. 1% BSA/1xPBS を加え, ブロッキング (25°C, 1 hr) した.
21. 1xPBS で洗浄した.
22. 1% BSA/1xPBS で希釈した anti-AhR IgG, anti-HSP90 IgG を加え, インキュベート (4°C, overnight) した.
23. 1xPBS で 3 回洗浄した.
24. 1% BSA/1xPBS で希釈した Alexa488- or Alexa546-conjugated secondary antibody を加え, インキュベート (25°C, 3 hr) した.
25. 1xPBS で 3 回洗浄した.
26. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) を加え, インキュベート (25°C, 30 min) した.
27. ProLong Gold 褪色防止剤 (Invitrogen) を用いてスライドガラスに固定した.
28. 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した.

3-2-5) Cisplatin affinity chromatography

1. CnBr Sepharose 4B (GE Healthcare) の乾燥粉末を 1 mM HCl で膨潤し, カップリング溶液 (0.1 M NaHCO₃ pH 8.0) で洗浄した (100 ml/g).
2. 0.9% NaCl 溶液に cisplatin を溶解した.
3. Cisplatin 溶液と洗浄した樹脂を混合した.
4. インキュベート (25°C, 2 hr) 後, 25°C, 3500 rpm, 5 min 遠心分離し, 上清を捨てた.
5. 1M ethanolamine を加えてインキュベート (25°C, 2 hr) し, 活性基をブロックした.
6. 50 mM HEPES-KOH buffer pH 7.4 で cisplatin affinity 樹脂 50 µl を平衡化した.
7. 平衡化した樹脂に AhR-ΔAD または GST, または GST-AhR を発現させた大腸菌を超音波破碎・PreScission Protease 処理した溶液を添加し, rotate (4°C, 1 rpm, 1 hr) した.
8. 4°C, 5000 rpm, 10 sec 遠心分離し, 上清を取り除いた.
9. 樹脂に 25 mM HEPES-KOH buffer pH 7.4 を 200 µl 加え洗浄を行い, 4°C, 5000 rpm, 10 sec 遠心分離し, 上清を取り除いた. この操作を 3 回行った.
10. SDS sample buffer を加え boil (100°C, 5 min) し, SDS-PAGE 及び western blot により解析した.

3-2-6) CD スペクトル測定

CD スペクトル測定は Jasco J-720 spectropolarimeter (Jasco) を用いて行った. 終

濃度 1.5 μM になるように AhR- ΔAD を 10 HEPES-KOH buffer pH 7.4 で希釈し、1/400 量の 0.9% NaCl または 0.9% NaCl で溶解した 2 mM cisplatin を添加した。CD スペクトルは以下の条件で測定した； $190 < \lambda < 250 \text{ nm}$ ，データ間隔 0.2 nm，走査速度 100 nm/min，レスポンス 1.0 sec，バンド幅 2.0 nm，0.1 cm セル，積算 6 回。J-700 for Windows 蛋白二次構造解析 (Jasco) を用いて二次構造を予測した。

3-2-7) GST pull-down assay

1. Buffer A (0.1 M KCl/10 mM MgCl_2 /20 mM Na_2MoO_4 /0.6 M NaCl/5% glycerol/0.1% NP-40 in 25 mM HEPES-KOH buffer pH 7.4) 75 μl に GST または AhR- ΔAD ，HSP90 をそれぞれ終濃度 2.5 μM ，XAP2，p23 をそれぞれ終濃度 5.0 μM になるよう添加した。
2. 総量が 150 μl になるように buffer B (5% glycerol/0.1% NP-40 in 25 mM HEPES-KOH buffer pH 7.4) を添加し，インキュベート (37°C，5 rpm，10 min) した。
3. Buffer A (0.1 M KCl/10 mM MgCl_2 /20 mM Na_2MoO_4 /0.6 M NaCl/5% glycerol/0.1% NP-40 in 25 mM HEPES-KOH buffer pH 7.4) 75 μl に cisplatin を終濃度 20 μM ，ATP を終濃度 2 mM になるように添加した。これを 3. でインキュベートしたサンプルに添加した (GST または AhR- ΔAD ，HSP90 終濃度 1.25 μM ，XAP2，p23 終濃度 2.5 μM ，cisplatin 終濃度 10 μM ，ATP 終濃度 1 mM)。
4. インキュベート (37°C，5 rpm，30 min) した。
5. 4°C，5000 rpm，10 sec 遠心分離後，上清を buffer C (50 mM KCl/5mM MgCl_2 /10 mM Na_2MoO_4 /0.3 M NaCl/5% glycerol/0.1% NP-40 in 25 mM HEPES-KOH buffer pH 7.4) で平衡化した GST 樹脂に添加し，インキュベート (4°C，5 rpm，15 min) した。
6. 4°C，5000 rpm，10 sec 遠心分離し，上清を取り除いた。
7. Buffer C を加え洗浄を行い，4°C，5000 rpm，10 sec 遠心分離し，上清を取り除いた。この操作を 3 回行った。
8. SDS sample buffer を加え boil (100°C，5 min) し，SDS-PAGE 及び western blot により解析した。

3-3) 実験結果

3-3-1) AhR は HSP90 により trypsin から保護される

文献[35]において cisplatin が HSP90 を阻害することで AhR の分解に関与することが示唆された。すなわち、複合体を形成している状態では HSP90 が AhR を分解経路から保護しているといえる。そこで、HSP90 と複合体を形成する部位である AhR-PAS を用いて trypsin 消化耐性実験を行った。

Trypsin は、lysine 及び arginine 残基のカルボキシル基末端側を特異的に切断する serine protease である。AhR-PAS と HSP90 が複合体を形成することで AhR-PAS の trypsin 認識部位がマスクされると、AhR-PAS は trypsin による消化を受けなくなる。この原理を用いて AhR が HSP90 と複合体を形成することで分解から保護されているか解析した。

Fig. 3-3-1A より、HSP90 単独及び GST-AhR-PAS 単独では trypsin により消化されていることがわかる。HSP90 と GST-AhR-PAS の共存在下では、GST-AhR-PAS 単独の場合と比較して GST-AhR-PAS のバンド強度が強くなっている。Fig. 3-3-1B より、GST は単独及び HSP90 との共存在下のどちらの場合においても trypsin により消化されず、HSP90 の影響を受けないことがわかる。したがって、AhR-PAS は HSP90 と複合体を形成し、それにより trypsin による消化から保護されていることが示唆される。

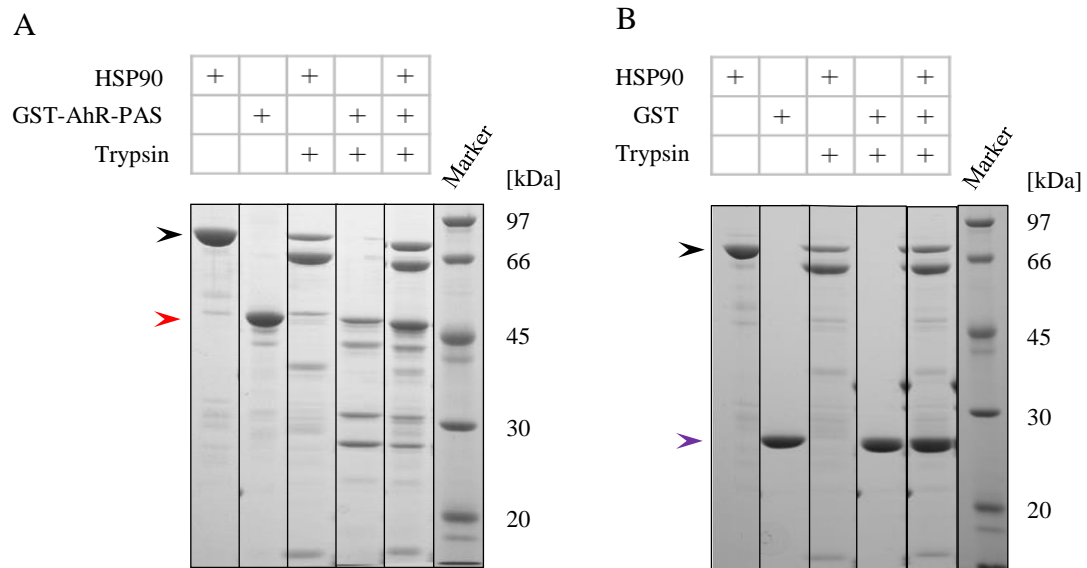


Fig. 3-3-1 AhR-PAS 及び HSP90 の trypsin 消化耐性実験

(A) GST-AhR-PAS と HSP90 を用いて行った結果. 黒矢印は HSP90, 赤矢印は GST-AhR-PAS を示している. (B) GST と HSP90 を用いて行った結果. 黒矢印は HSP90, 紫矢印は GST を示している.

3-3-2) Cisplatin は AhR のリガンドになりうる

蛍光免疫染色を用いて, cisplatin を投与した際の HeLa 細胞における AhR 及び HSP90 の細胞内局在を確認した. Fig. 3-3-2A の結果より, cisplatin 投与から 1 時間後に AhR と HSP90 が核移行していることがわかる. したがって, cisplatin は HSP90 を阻害するだけでなく, AhR のリガンドとなる可能性が示唆された. そこで, リガンド結合部位である PAS ドメイン, リガンド結合により露出する NLS を有する bHLH ドメインを含む AhR- Δ AD を主に用いて, 結合及び構造変化の解析を行った.

Fig. 3-3-2B は AhR- Δ AD を用いて cisplatin affinity chromatography を行った結果を示している. GST では Resin にバンドが検出できないが, AhR- Δ AD では resin に GST-AhR- Δ AD のバンドが検出できた. Fig. 3-3-2C は全長 AhR を用いて cisplatin affinity chromatography を行った結果を示している. AhR を発現させた大腸菌を超音波破碎した溶液がレーン 1, PreScission Protease を用いて GST を切断した溶液がレーン 2 である. レーン 2 の溶液を cisplatin affinity 樹脂に添加・洗浄を行った resin がレーン 3 である. 右のカラムはレーン 3 について anti-AhR IgG を用いて western blot を行った結果を示しており, AhR のバンドが検出できた. Fig. 3-3-2B, C の結果より, AhR は cisplatin に特異的に結合することが示唆された.

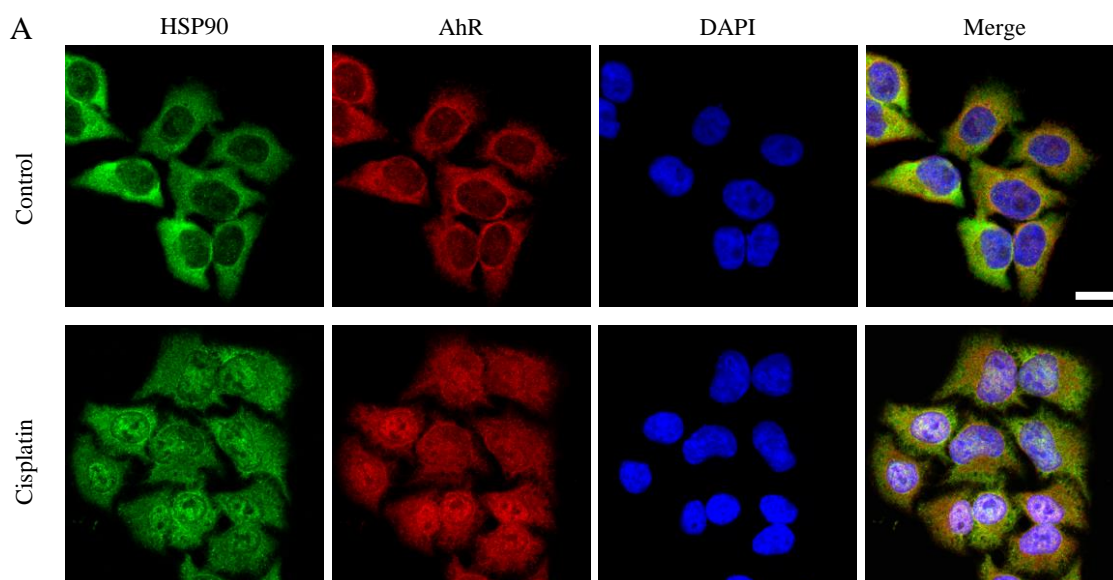


Fig. 3-3-2 Cisplatin による AhR の細胞内局在と結合確認

(A) Cisplatin 添加から 1 時間後の蛍光免疫染色の結果. 上のカラムはコントロール, 下のカラムは cisplatin を添加した場合の結果を示している.

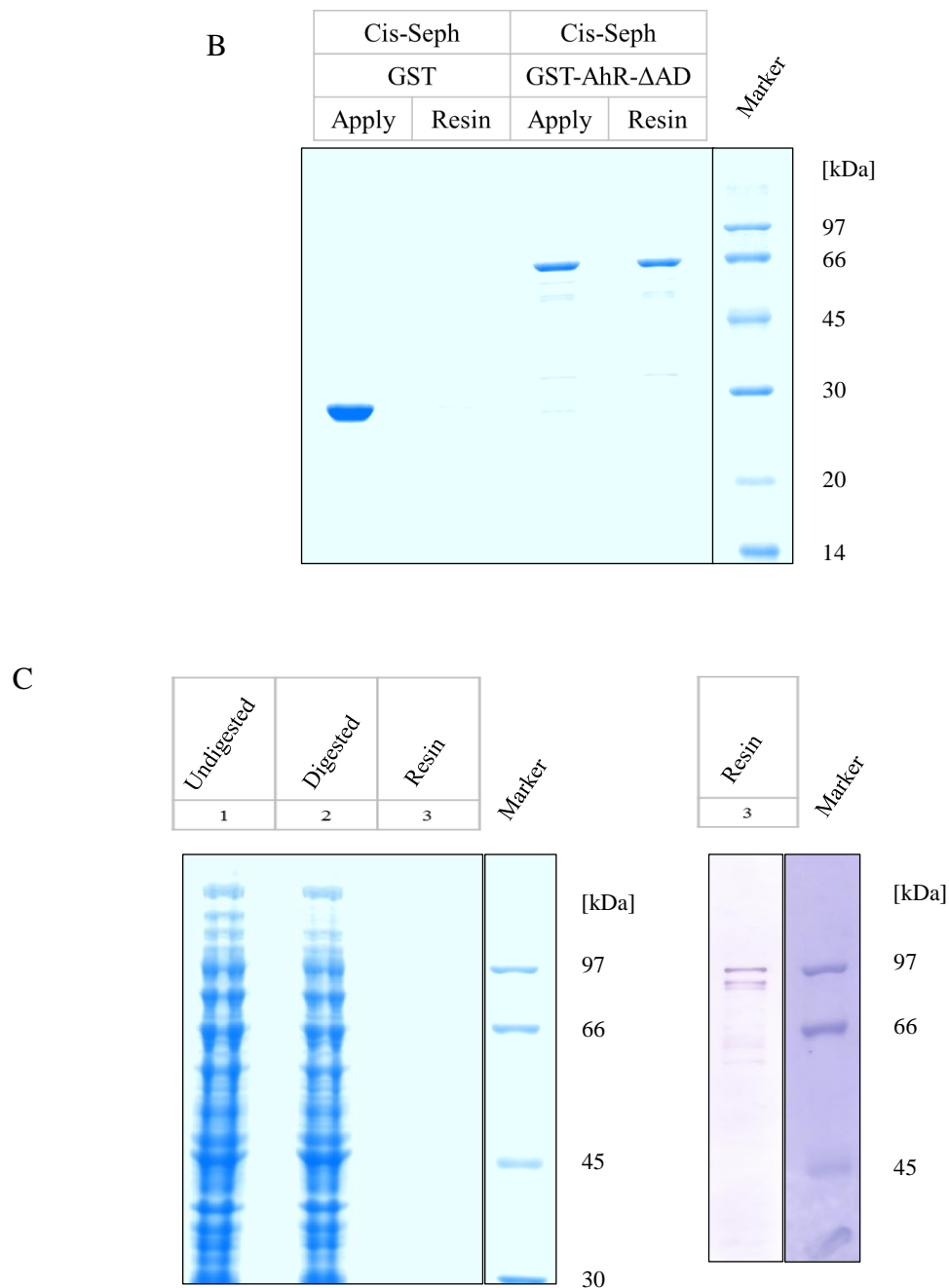


Fig. 3-3-2 Cisplatin による AhR の細胞内局在と結合確認

(B) AhR- Δ AD を用いた cisplatin affinity chromatography の結果. (C) 全長 AhR を用いた cisplatin affinity chromatography の結果. 左のカラムは SDS-PAGE の結果, 右のカラムは western blot の結果を示している.

Fig. 3-3-2D は AhR- Δ AD に終濃度 5 μ M となるように cisplatin を添加した際の CD スペクトル測定の結果を示している。二次構造予測より、 α -helix が減少し、 β -sheet が増加していることがわかる。したがって、AhR- Δ AD は cisplatin と結合することで構造変化していることが示唆された。

HeLa 細胞に cisplatin を投与することで HSP90 とともに AhR が核移行すること、AhR は cisplatin に特異的に結合し構造変化することから、cisplatin は AhR のリガンドになりうることが示唆された。

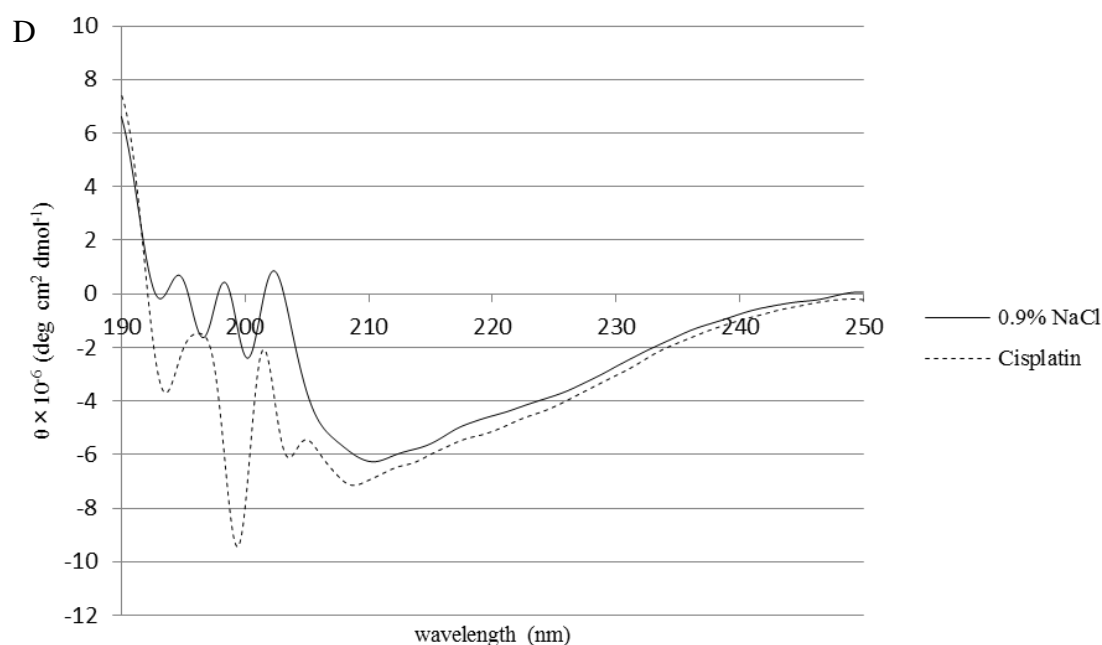


Fig. 3-3-2 Cisplatin による AhR の細胞内局在と結合確認
(D) AhR- Δ AD に cisplatin を添加した際の CD スペクトル。

Table. 3-3-2 Cisplatin 添加時の二次構造予測

| | 0.9% NaCl | Cisplatin |
|--------|-----------|-----------|
| Helix | 26.9 | 12.6 |
| Beta | 5.1 | 29.4 |
| Turn | 26.5 | 12.0 |
| Random | 41.5 | 46.0 |

3-3-3) Cisplatin 存在下において AhR 複合体は維持される

3-3-2) の結果より, cisplatin は AhR のリガンドになりうることを示唆された。AhR は細胞質中では HSP90, XAP2, p23 と複合体を形成しており, リガンドが結合することで核移行する。Cisplatin が AhR に結合することでこの複合体に影響を与えるかどうかを GST pull-down assay を用いて解析した。

Fig. 3-3-3 は GST-AhR- Δ AD を用いて GST pull-down assay を行った結果を示している。XAP2 及び p23 は western blot により検出を行った。Cisplatin 及び ATP の存在下及び非存在下どちらにおいても, GST-AhR- Δ AD 存在下では HSP90, XAP2, p23 のバンドが検出された。したがって, AhR, HSP90, XAP2, p23 の複合体は cisplatin によって解離しないと考えられる。 β -NF をリガンドとして用いた際に, AhR と HSP90 の結合は ATP の影響を受けないことを報告している [33]。そのため, cisplatin の場合も既存のリガンドと同様に, リガンド結合後複合体の状態での核移行し, 核内で複合体が解離し AhR と転写因子が複合体を形成・転写活性化することが示唆される。

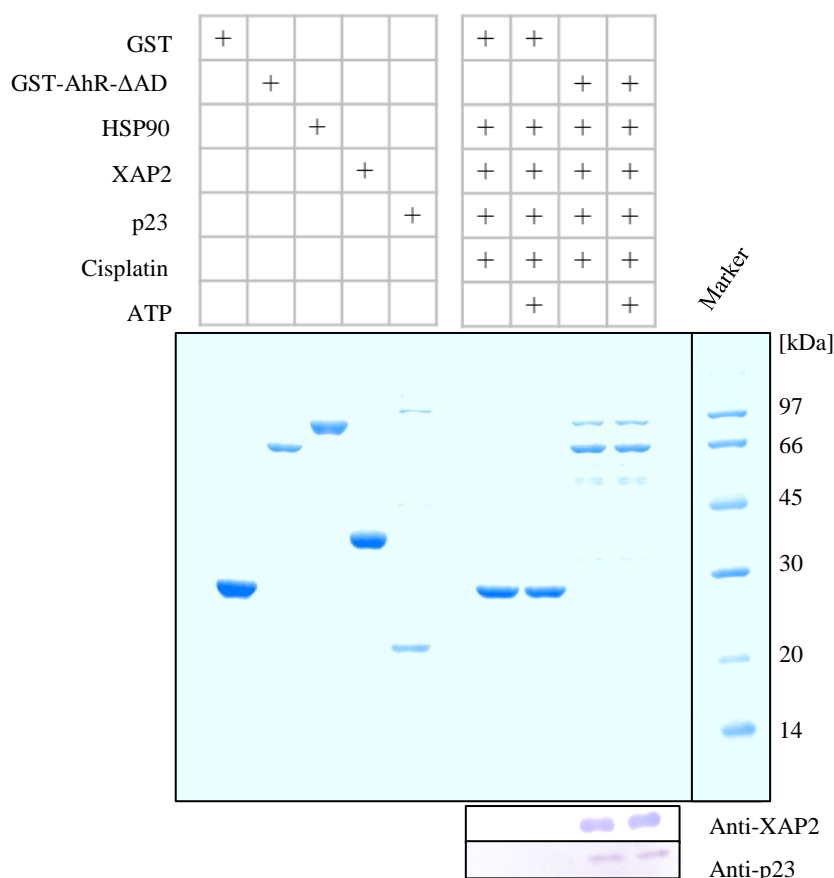


Fig. 3-3-3 Cisplatin 添加時の GST pull-down assay の結果

3-4) 考察

HSP90 阻害剤である 17-AAG を添加することで、複合体を形成しているタンパク質である HSP90, XAP2, p23 の発現量は変化しないが AhR の発現量が減少し転写活性が抑制されることが報告されている [69]. Cisplatin 添加による AhR 発現量及び転写活性が減少することを報告しており、この変化は 17-AAG の場合と同様である. また, MG132 により cisplatin 添加による AhR の発現量の減少が抑制されている [35]. 17-AAG や cisplatin は HSP90 を阻害することで AhR-分子シャペロン複合体の解離を引き起こし、その結果 AhR が分解されると考えられている [70]. 複合体を形成している状態では HSP90 により AhR がプロテアーゼによる分解経路から保護されていることが考えられたため, trypsin 消化耐性実験を行った. AhR-PAS ドメインは単独では trypsin により消化されるが, HSP90 との共存下では trypsin による消化が抑制されている (Fig. 3-3-1). したがって, AhR-PAS の trypsin 認識部位が HSP90 と複合体を形成することによってマスクされ trypsin による消化から保護されるという形で複合体を形成していることが示唆される. この結果は, 当研究室が以前報告した AhR-分子シャペロン複合体構造モデルを強く支持する (Fig. 3-4-1)[34].

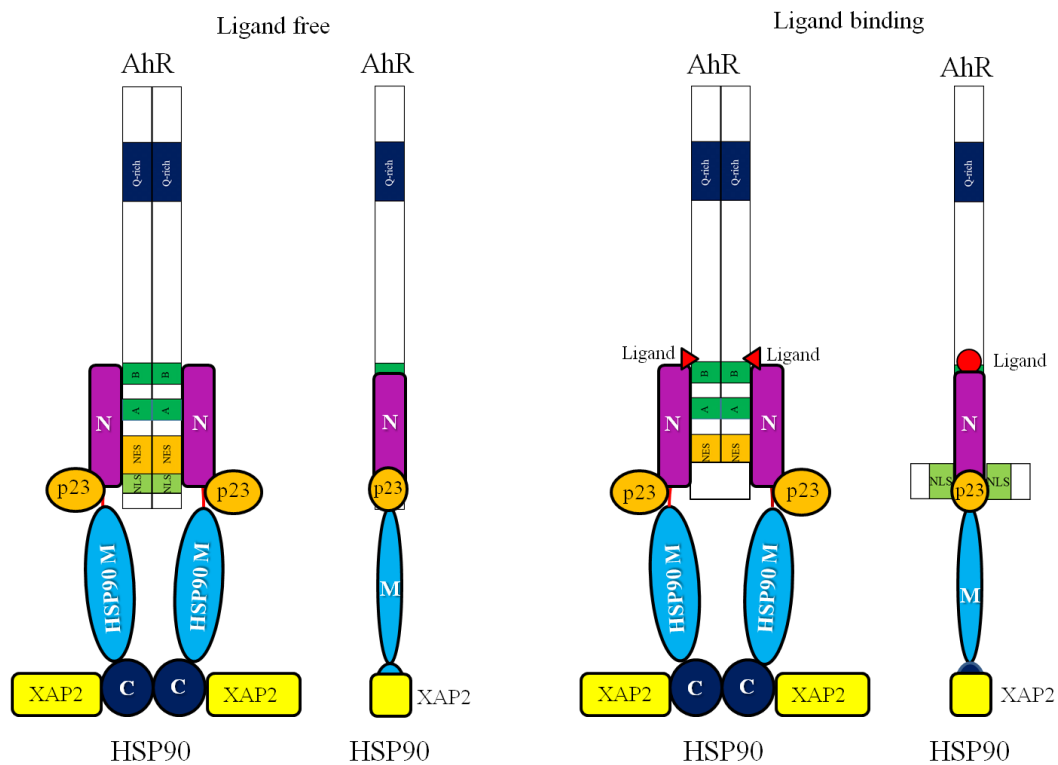


Fig. 3-4-1 AhR-分子シャペロン複合体構造モデル

AhR の bHLH ドメイン及び PAS ドメインは HSP90 の N ドメインと結合する。p23 と XAP2 はそれぞれ HSP90 の N ドメインと C ドメインに結合する。リガンド非存在下においては AhR の NLS は露出していないが、リガンドが結合することで構造変化し NLS が露出する。文献[34]より抜粋。

一方、cisplatin 添加による AhR の細胞内局在を蛍光免疫染色により解析した結果、HSP90 と共に核移行していることが確認できた (Fig. 3-3-2A). CnBr Sepharose 4B を用いて、cisplatin affinity 樹脂を作製した。それを用いて cisplatin affinity chromatography を行った結果、GST は cisplatin affinity 樹脂に結合しないが GST-AhR- Δ AD は cisplatin affinity 樹脂に結合すること、大腸菌破砕溶液という非常に多くの種類のタンパク質が高濃度に存在する条件下であっても AhR のみが cisplatin affinity 樹脂に結合することが示された (Fig. 3-3-2B, C). したがって、AhR は cisplatin に特異的に結合することが示された。CD スペクトル測定及び二次構造予測の結果、 α -helix が減少し、 β -sheet が増加していることがわかる。したがって、AhR- Δ AD は cisplatin と結合することで構造変化していることが示された (Fig. 3-3-2D, Table. 3-3-2). 以上の結果より、cisplatin は芳香族炭化水素ではなく、重金属である Pt を含む金属錯体であるにもかかわらず AhR のリガンドになりうることが示唆された。Hepa 1c1c7 細胞に TCDD または重金属イオン (Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+}) を添加すると、重金属イオン単独により CYP1A1 mRNA 誘導が促進されること、TCDD との同時投与により Hg^{2+} , Pb^{2+} では CYP1A1 mRNA 誘導がさらに促進されること、 Cu^{2+} では CYP1A1 mRNA 誘導が抑制されることが報告されている [71]. このように、重金属が AhR の活性化に影響を与えることが示されている。

Cisplatin により AhR と HSP90 の複合体形成が減少するが、全て解離するわけではない [35]. AhR 及び HSP90 に cisplatin が結合した場合、AhR-分子シャペロン複合体に与える影響を解析した結果、XAP2 と p23 の解離は観察されず、AhR-分子シャペロン複合体は維持されていた。したがって、cisplatin により HSP90 の一部は解離するが、XAP2 と p23 には影響を与えないことが考えられる。そのため、cisplatin がリガンドとして AhR に結合した場合も、3-MC などの既存のリガンドの場合と同様に AhR-分子シャペロン複合体の状態での核移行するのではないかと考えられる。

AhR は腫瘍において形成、進行、転移など様々な段階に影響を及ぼすことや、多種多様ながん細胞において正常細胞と比較して高いレベルの AhR 発現、慢性的な活性化が報告されている。Tryptophan の分解産物である kynurenine は AhR の内在性リガンドであり、がんの浸潤と免疫回避に関わっている。したがって、AhR アンタゴニスト、弱いアゴニストはがん治療に使用できる可能性があると考えられている [72-73].

当研究室の以前の報告及び本研究の結果から、cisplatin は HSP90 を阻害することで AhR と HSP90 を解離させ、AhR を分解させる。その一方で cisplatin は AhR にリガンドとして結合し核移行することが示された。Cisplatin による AhR 核移行後のタンパク質誘導については更なる研究が必要であるが、CYP1A1 を

誘導しないことから別の経路を活性化するアゴニスト,あるいは cisplatin は AhR の部分アゴニストもしくはアンタゴニストであるかもしれない (Fig. 3-4-2)[35]. 以上のことから, 抗がん剤 cisplatin は DNA に結合し, 架橋を形成することによるがん細胞の成長抑制だけではなく, AhR の分解と活性の減少, 今後の研究結果次第ではあるが AhR に対する拮抗作用により抗がん作用を示す可能性が示唆された.

本研究では, cisplatin が AhR の新規リガンドとなりうることを示した. 今回の結果は, cisplatin の作用機序解明及び新規用途開発や, 芳香族炭化水素に限らない AhR 新規リガンドの発見につながることを期待される.

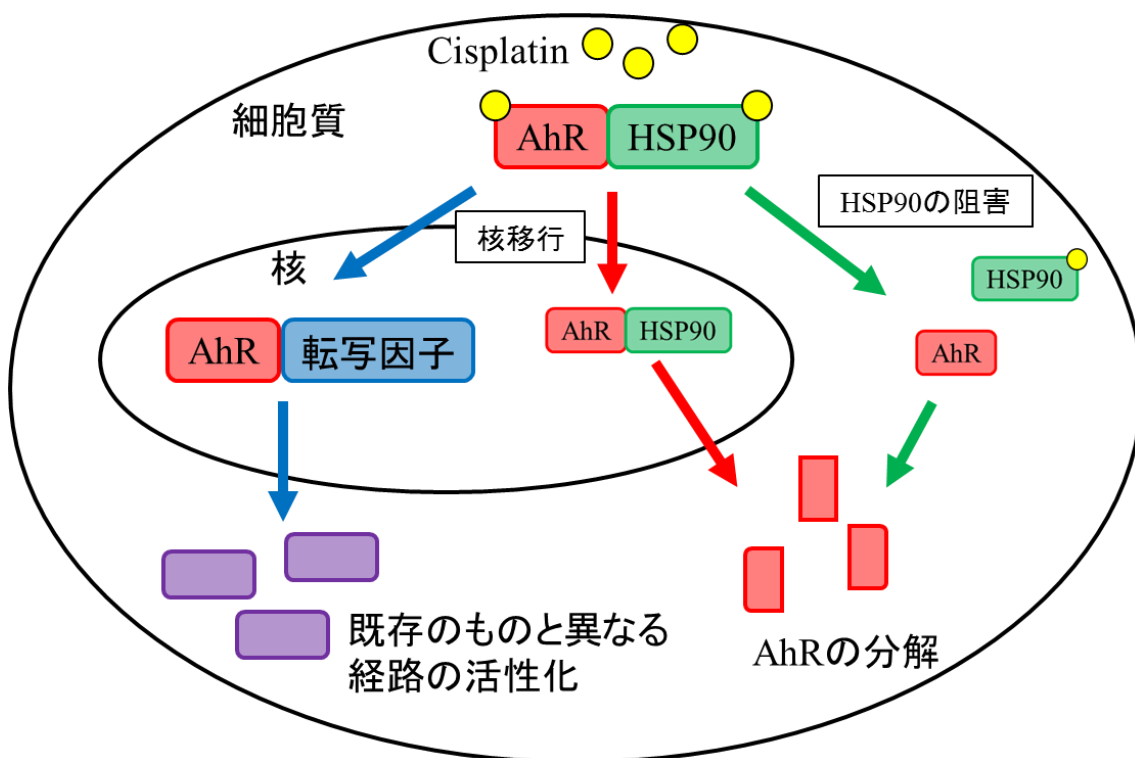


Fig. 3-4-2 Cisplatin 投与により予測される AhR のモデル

緑矢印は cisplatin が HSP90 を阻害し複合体が解離する場合, 赤矢印は cisplatin が AhR の部分アゴニストとして作用する場合, 青矢印は cisplatin が AhR のアゴニストとして働く場合に考えられる経路を示している.

第 4 章

総括

本論文では、芳香族炭化水素受容体 AhR に焦点を当て研究を行った。従来 AhR は芳香族炭化水素により活性化され薬物代謝酵素を誘導することが報告されてきた。しかし近年では、抗炎症作用やがんにおける役割などが着目されており、AhR の詳細な機能、構造を解明することは重要なことだといえる。

第 2 章では、ヒト全長 AhR の発現及び精製方法を確立するとともに、生化学的性質の解析、リガンド結合による構造変化の解析を目的に研究を行った。Q-rich 領域が大腸菌に対して毒性を示すために発現させるのは困難であるとされていた AhR を、GST-AhR 融合タンパク質として構築、毒性タンパク質に耐性を示す OverExpress C41 (DE3) pLysS competent cell を用いて低温で発現誘導を行うことで発現、精製に成功した。大腸菌発現系を用いて精製したヒト全長 AhR は、リガンド結合能及び分子シャペロンとの複合体形成能を有しており、天然状態であるといえる。ドッキングシミュレーションにより、リガンドは AhR-PAS-B ドメインの β -sheet に結合し、それにより AhR の構造変化が引き起こされると考えられる。

第 3 章では、抗がん剤及び HSP90 の阻害剤である cisplatin が AhR に及ぼす影響を解明することを目的に研究を行った。Cisplatin 添加により AhR-分子シャペロン複合体から HSP90 の解離が引き起こされ、AhR が分解されること、CYP1A1 mRNA レベルが減少することは既に報告されている。その一方で、cisplatin の添加により AhR が HSP90 と共に核移行すること、AhR は cisplatin と特異的に結合し構造変化することを明らかにした。これにより、芳香族炭化水素ではない cisplatin が AhR のリガンドになりうることが示唆された。また、cisplatin の AhR 及び HSP90 への結合によって AhR-分子シャペロン複合体から XAP2, p23 は解離しないことを示した。

本論文の結果は、AhR の高次構造解析やより詳細な生化学的知見を得ること、芳香族炭化水素以外を含む新規リガンドの発見の可能性、cisplatin の作用機序解明及び新規用途開発につながることを期待される。

参考文献

- [1] Kolch W., Halasz M., Granovskaya M., Kholodenko B.N. (2015) The dynamic control of signal transduction networks in cancer cells. *Nat Rev Cancer*. **15**, 515-527
- [2] Sun S.-C. (2017) The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*. **17**, 545-558
- [3] Belmonte S.L., Blaxall B.C. (2011) G-protein coupled receptor kinases (GRKs) as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Circ Res*. **109**, 309-319
- [4] Sonoda J., Pei L., Evans R.M. (2008) Nuclear Receptors: Decoding Metabolic Disease. *FEBS Lett*. **582**, 2-9
- [5] Moore J.T., Collins J.L., Pearce K.H. (2006) The nuclear receptor superfamily and drug discovery. *ChemMedChem*. **1**, 504-523
- [6] Pratt W.B., Toft D.O. (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev*. **18**, 306-360
- [7] Rosenfeld M.G., Lunnyak V.V., Glass C.K. (2006) Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev*. **20**, 1405-1428
- [8] Li Y., Lambert M.H., Xu H.E. (2003) Activation of nuclear receptors: a perspective from structural genomics. *Structure*. **11**, 741-746
- [9] Liu K., Zou C., Qin B. (2017) The association between nuclear receptors and ocular diseases. *Oncotarget*. **8**, 27603–27615
- [10] Kwapiszewska G., Johansen A.K.Z., Gomez-Arroyo J., Voelkel, N.F. (2019) Role of the aryl hydrocarbon receptor/ARNT/cytochrome P450 system in pulmonary vascular diseases. *Circ. Res*. **125**, 356–366
- [11] Bock K.W. (2019) Aryl hydrocarbon receptor (AHR): from selected human target genes and crosstalk with transcription factors to multiple AHR functions. *Biochem. Pharmacol*. **168**, 65–70
- [12] Ema M., Sogawa K., Watanabe N., Chujoh Y., Matsushita N., Gotoh O., Funae Y., Fujii-Kuriyama Y. (1992) cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. **184**, 246-253
- [13] Burbach K.M., Poland A., Bradfield C.A. (1992) Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**, 8185-8189
- [14] Flaveny C.A., Perdew G.H. (2009) Transgenic Humanized AHR Mouse Reveals Differences between Human and Mouse AHR Ligand Selectivity. *Mol Cell Pharmacol*. **1**, 119-123

- [15] McGuire J., Coumailleau P., Whitelaw M.L., Gustafsson J.A., Poellinger L. (1996) The basic helix-loop-helix/PAS factor Sim is associated with hsp90. Implications for regulation by interaction with partner factors. *J. Biol. Chem.* **270**, 31353–31357
- [16] Antonsson C., Arulampalam V., Whitelaw M.L., Pettersson S., Poellinger L. (1995) Constitutive function of the basic helix-loop-helix/PAS factor Arnt. Regulation of target promoters via the E box motif. *J. Biol. Chem.* **270**, 13968–13972
- [17] Wu D., Potluri N., Kim Y., Rastinejad F. (2013) Structure and dimerization properties of the aryl hydrocarbon receptor PAS-A domain. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 4346–4356
- [18] Feng S., Cao Z., Wang X. (2013) Role of aryl hydrocarbon receptor in cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* **1836**, 197–210
- [19] Jain S., Dolwick K.M., Schmidt J.V. Bradfield C.A. (1994) Potent transactivation domains of the Ah receptor and the Ah receptor nuclear translocator map to their carboxyl termini. *J. Biol. Chem.* **269**, 31518–31523
- [20] Wang H., Wei Y., Yu D. (2015) Control of lymphocyte homeostasis and effector function by the aryl hydrocarbon receptor. *Int Immunopharmacol.* **28**, 818-824
- [21] Mimura J., Fujii-Kuriyama Y. (2003) Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim. Biophys. Acta.* **1619**, 263–268
- [22] Fukuda I., Sakane I., Yabushita Y., Kodoi R., Nishiumi S., Kakuda T., Sawamura S.-i., Kanazawa K., Ashida H. (2004) Pigments in green tea leaves (*Camellia sinensis*) suppress transformation of the aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin. *J Agric Food Chem.* **52**, 2499-2506
- [23] Hubbard T.D., Murray I.A., Nichols R.G., Cassel K., Podolsky M., Kuzu G., Tian Y., Smith P., Kennett M.J., Patterson A.D., Perdew G.H. (2017) Dietary Broccoli Impacts Microbial Community Structure and Attenuates Chemically Induced Colitis in Mice in an Ah receptor dependent manner. *J Funct Foods.* **37**, 685-698
- [24] Denison M.S., Nagy S.R. (2003) Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **43**, 309-334
- [25] Adachi J., Mori Y., Matsui S., Takigami H., Fujino J., Kitagawa H., Miller 3rd C.A., Kato T., Saeki K., Matsuda T. (2001) Indirubin and Indigo Are Potent Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands Present in Human Urine. *J Biol Chem.* **276**, 31475-31478
- [26] Meyer B.K., Pray-Grant M.G., Vanden Heuvel J.P., Perdew G.H. (1998) Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 978–988

- [27] Nebert D.W., Gonzalez F.J. (1987) P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 945–993
- [28] Kazlauskas A., Poellinger L., Pongratz I. (1999) Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor. *J. Biol. Chem.* **274**, 13519–13524
- [29] Schopf F.H., Biebl M.M., Buchner J. (2017) The HSP90 chaperone machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 345–360
- [30] Sahasrabudhe P., Rohrberg J., Biebl M.M., Rutz D.A., Buchner J. (2017) The plasticity of the Hsp90 co-chaperone system. *Mol. Cell.* **67**, 947–961
- [31] Nair S.C., Toran E.J., Rimerman R.A., Hjermstad S., Smithgall T.E., Smith D.F. (1996) A pathway of multi-chaperone interactions common to diverse regulatory proteins: estrogen receptor, Fes tyrosine kinase, heat shock transcription factor Hsf1, and the aryl hydrocarbon receptor. *Cell Stress Chaperones.* **1**, 237–250
- [32] Perdew G.H. (1988) Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.* **263**, 13802–13805
- [33] Tsuji N., Fukuda K., Nagata Y., Okada H., Haga A., Hatakeyama S., Yoshida S., Okamoto T., Hosaka M., Sekine K., Ohtaka K., Yamamoto S., Otaka M., Grave E., Itoh H. (2014) The activation mechanism of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) by molecular chaperone HSP90. *FEBS Open Bio.* **4**, 796–803
- [34] Kudo I., Hosaka M., Haga A., Tsuji N., Nagata Y., Okada H., Fukuda K., Kakizaki Y., Okamoto T., Grave E., Itoh H. (2018) The regulation mechanisms of AhR by molecular chaperone complex. *J. Biochem.* **163**, 223–232
- [35] Sasaki-Kudo E., Kudo I., Kakizaki Y., Hosaka M., Ikeda S.-i., Uemura S., Grave E., Togashi S., Sugawara T., Shimizu G., Itoh H. (2018) Cisplatin inhibits AhR activation. *Am. J. Mol. Biol.* **8**, 69–82
- [36] Murray I.A., Patterson A.D., Perdew G.H. (2014) Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat. Rev. Cancer.* **14**, 801–814
- [37] Beischlag T.V., Luis Morales J., Hollingshead B.D., Perdew G.H. (2008) The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **18**, 207–250
- [38] Guengerich F.P., Shimada T. (1991) Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem Res Toxicol.* **4**, 391–407
- [39] Shimada T., Hayes C.L., Yamazaki H., Amin S., Hecht S.S., Guengerich F.P., Sutter T.R. (1996) Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res.* **56**, 2979–2984

- [40] Shinkyo R., Sakaki T., Ohta M., Inouye K. (2003) Metabolic pathways of dioxin by CYP1A1: species difference between rat and human CYP1A subfamily in the metabolism of dioxins. *Arch Biochem. Biophys.* **409**, 180–187
- [41] Schmidt J.V., Su G.H., Reddy J.K., Simon M.C., Bradfield C.A. (1996) Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 6731-6736
- [42] Quintana F.J., Basso A.S., Iglesias A.H., Korn T., Farez M.F., Bettelli E., Caccamo M., Oukka M., Weiner H.L. (2008) Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature.* **453**, 65-71
- [43] Veldhoen M., Hirota K., Westendorf A.M., Buer J., Dumoutier L., Renauld J.-C., Stockinger B. (2008) The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature.* **453**, 106-109
- [44] Hao N., Whitelaw M.L. (2013) The emerging roles of AhR in physiology and immunity. *Biochem Pharmacol.* **86**, 561-570
- [45] Mezrich J.D., Fechner J.H., Zhang X., Johnson B.P., Burlingham W.J., Bradfield C.A. (2010) An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol.* **185**, 3190-3198
- [46] Takamura T., Harama D., Matsuoka S., Shimokawa N., Nakamura Y., Okumura K., Ogawa H., Kitamura M., Nakao A. (2010) Activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway may ameliorate dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Immunol Cell Biol.* **88**, 685-689
- [47] Martey C.A., Bagloli C.J., Gasiewicz T.A., Sime P.J., Phipps R.P. (2005) The aryl hydrocarbon receptor is a regulator of cigarette smoke induction of the cyclooxygenase and prostaglandin pathways in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **289**, 391-399
- [48] Wagage S., John B., Krock B.L., Hall A.O., Randall L.M., Karp C.L., Simon M.C., Hunter C.A. (2014) The aryl hydrocarbon receptor promotes IL-10 production by NK cells. *J Immunol.* **192**, 1661-1670
- [49] Chan W.K., Chu R.Y., Jain S., Reddy J.K., Bradfield C.A. (1994) Baculovirus expression of the Ah receptor and Ah receptor nuclear translocator – evidence for additional dioxin-responsive element-binding species and factors required for signaling. *J. Biol. Chem.* **269**, 26464–26471
- [50] Fan M.Q., Bell A.R., Bell D.R., Clode S., Fernandes A., Foster P.M., Fry J.R., Jiang T., Loizou G., MacNicoll A., Miller B.G., Rose M., Shaikh-Omar O., Tran L., White S. (2009) Recombinant expression of aryl hydrocarbon receptor for quantitative ligand-binding analysis. *Anal. Biochem.* **384**, 279–287

- [51] Ema M., Ohe N., Suzuki M., Mimura J., Sogawa K., Ikawa S., Fujii-Kuriyama Y. (1994) Dioxin binding activities of polymorphic forms of mouse and human arylhydrocarbon receptors. *J Biol Chem.* **269**, 27337-27343
- [52] Kumar M.B., Ramadoss P., Reen R.K., Vanden Heuvel J.P., Perdew G.H. (2001) The Q-rich subdomain of the human Ah receptor transactivation domain is required for dioxin-mediated transcriptional activity. *J Biol Chem.* **276**, 42302-42310
- [53] Song J.M., An Y.J., Kang M.H., Lee Y.-H., Cha S.-S. (2012) Cultivation at 6-10°C is an effective strategy to overcome the insolubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* **82**, 297-301
- [54] Semenza G.L. (2004) Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)*. **19**, 176–182
- [55] Wang G.L., Jiang B.H., Rue E.A., Semenza G.L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA.* **92**, 5510–5514
- [56] Key J., Scheuermann T.H., Anderson P.C., Daggett V., Gardner K.H. (2009) Principles of ligand binding within a completely buried cavity in HIF2alpha PAS-B. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 17647–17654
- [57] Motto I., Bordogna A., Soshilov A.A., Denison M.S., Bonati L. (2011) New aryl hydrocarbon receptor homology model targeted to improve docking reliability. *J. Chem. Inf. Model.* **51**, 2868–2881
- [58] Schulte K.W., Green E., Wilz A., Platten M., Daumke O. (2017) Structural basis for aryl hydrocarbon receptor-mediated gene activation. *Structure.* **25**, 1025–1033
- [59] Csermely P., Schnaider T., Soti C., Prohászka Z., Nardai G. (1998) The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther.* **79**,129-168
- [60] Young J.C., Moarefi I., Hartl F.U. (2001) Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol.* **154**, 267-273
- [61] Wegele H., Müller L., Buchner J. (2004) Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* **151**, 1-44
- [62] Pearl L.H., Prodromou C. (2006) Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem.* **75**, 271-294
- [63] Hartl F.U., Bracher A., Hayer-Hartl M. (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature.* **475**, 324-332
- [64] Carver L.A., Jackiw V., Bradfield C.A. (1994) The 90-kDa heat shock protein is essential for Ah receptor signaling in a yeast expression system. *J Biol Chem.* **269**, 30109-30112

- [65] Workman P., Burrows F., Neckers L., Rosen N. (2007) Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress. *Ann N Y Acad Sci.* **1123**, 202-216
- [66] Takahara P.M., Rosenzweig A.C., Frederick C.A., Lippard S.J. (1995) Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Nature.* **377**, 649-652
- [67] Itoh H., Ogura M., Komatsuda A, Wakui H., Miura A.B., Tashima Y. (1999) A novel chaperone-activity-reducing mechanism of the 90-kDa molecular chaperone HSP90. *Biochem J.* **343**, 697-703
- [68] Rosenhagen M.C., Söti C., Schmidt U., Wochnik G.M., Hartl F.U., Holsboer F., Young J.C., Rein T. (2003) The heat shock protein 90-targeting drug cisplatin selectively inhibits steroid receptor activation. *Mol Endocrinol.* **17**, 1991-2001
- [69] Hughes D., Guttenplan J.B., Marcus C.B., Subbaramaiah K., Dannenberg A.J. (2008) Heat shock protein 90 inhibitors suppress aryl hydrocarbon receptor-mediated activation of CYP1A1 and CYP1B1 transcription and DNA adduct formation. *Cancer Prev Res (Phila).* **1**, 485-493
- [70] Davarinos N.A., Pollenz R.S. (1999) Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J Biol Chem.* **274**, 28708-28715
- [71] Korashy H.M., El-Kadi A.O. (2005) Regulatory mechanisms modulating the expression of cytochrome P450 1A1 gene by heavy metals. *Toxicol Sci.* **88**, 39-51
- [72] Murray I.A., Patterson A.D., Perdew G.H. (2014) Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat Rev Cancer.* **14**, 801-814
- [73] Prendergast G.C. (2011) Cancer: Why tumours eat tryptophan. *Nature.* **478**, 192-194

研究業績

発表論文 (査読付き)

・ Sasaki-Kudo E., Kudo I., Kakizaki Y., Hosaka M., Ikeda S.-i., **Uemura S.**, Grave E., Togashi S., Sugawara T., Shimizu G., Itoh H. (2018) Cisplatin inhibits AhR activation. *Am. J. Mol. Biol.* **8**, 69-82

・ **Uemura S.**, Nakajima Y., Yoshida Y., Furuya M., Matsutani S., Kawate S., Ikeda S.-i., Tsuji N., Grave E., Wakui H., Itoh H. (2020) Biochemical properties of human full-length aryl hydrocarbon receptor (AhR). *J. Biochem.* **168**, 285-294 (**Journal of Biochemistry, Volume 168, Issue 3, September 2020, Cover picture 採用**)

学会発表

・ **上村 盛弥**, 中島 康智, 吉田 雄毅, 松谷 駿, 川手 慎也, 古屋 もゑこ, 池田 駿一, Ewa Grave, 涌井 秀樹, 伊藤 英晃: ヒト全長 Arylhydrocarbon receptor (AhR) の生化学的性質. 日本生化学会 東北支部第 86 回例会・シンポジウム, 演題番号 O-07, 2020 年 5 月 30 日, 誌上開催 (**優秀口頭発表賞受賞**)

・ **上村 盛弥**, 工藤 生, 福田 佳奈, 岡田 浩孝, 工藤 絵理奈, 伊藤 英晃: 抗がん剤 Cisplatin の AhR 活性化機構の解析. 第 93 回日本生化学大会, 演題番号 P-198, 2020 年 9 月 14 日~9 月 16 日, Web 開催

謝辞

本研究は、秋田大学大学院 理工学研究科 生命科学専攻 生化学・分子生物学研究室 伊藤英晃教授のもとで行われました。

3年生の後半という早い時期から研究室に配属させて頂き、ほとんど知識のない私に、自身のこれまで経験されたことや知識、研究の面白さなどを熱心にご指導してくださり、ここまで導いていただいた伊藤英晃教授に心から感謝申し上げます、ここに厚く御礼申し上げます。

伊藤英晃教授の退官後、指導教員として学位論文や発表のご指導をしていただきました、秋田大学大学院 理工学研究科 生命科学専攻 疾患生物学研究室 涌井秀樹教授に心から感謝申し上げます、ここに厚く御礼申し上げます。

分子生物学を始め、多くの生命科学分野における基礎的知識をご教授していただきました、生命科学専攻の教員の皆様に心から感謝し、ここに厚く御礼申し上げます。

遺伝子組み換え発現 **vector** の構築をを行うにあたり、**DNA sequencer** の使用方法や問題解決方法など、円滑に実験を行うために様々な面でサポートしていただき、多大なるご支援をいただきました、秋田大学 医学部 分子医学部門の職員の皆様に心から感謝し、ここに厚く御礼申し上げます。

実験補助や研究室の行事など、研究室の生活における様々な面でご支援いただきました、卒業生を含む研究室のメンバーに心から感謝し、ここに厚く御礼申し上げます。

新型コロナウイルス感染防止対策のため入構規制が行われる中、円滑な手続き及び審査のため尽力していただきました、秋田大学総合学務課 理工大学院担当 加藤翼様、秋田大学大学院 理工学研究科 生命科学専攻 技術員 三浦瑞穂様に心から感謝し、ここに厚く御礼申し上げます。

社会人ドクターとして働きながらの学位取得をご支援していただきました、同仁医薬化工株式会社の皆様に心から感謝し、ここに厚く御礼申し上げます。

最後に、学部から始まり博士後期課程までの10年間という長い学生生活を不自由なく送られるように支援してくれた親族に心から感謝します。

振り返ると、多くの方々に支えられ、歩んできた学生生活だったと改めて感じます。ここで得た知識と経験を、少しでも社会に還元できるように、今後も励んでいきたいと思えます。

2021年 上村 盛弥