

原著

平成 25 年度 第一薬科大学・若手研究者奨励金
研究計画報告書

研究課題：転写因子 YY1 による RNA polymerase-I 転写調節制御の解明

廣村 信
第一薬科大学 臨床薬剤学分野

Transcriptional factor YY1 regulates RNA polymerase-I transcription

Makoto HIROMURA

*Laboratory of Evidence-Based Pharmacotherapy, Daiichi University of Pharmacy,
22-1, Tamagawa-cho, Minami-ku, Fukuoka, 815-8511, Japan*

1. 緒言

昨今、脳血管疾患や心疾患は日本の死亡率の約 3 割を占め、特に動脈硬化症は生活習慣病からの進展が大きく関与しており、その発症機序解明を含め、予防・診断・治療薬開発等、基礎から応用研究に至るまで盛んに行われている。血管構成成分である血管平滑筋細胞は、通常、その表現型は収縮型を示しているが、血管障害等により、PDGF-BB や TGF- β 等のホルモンやサイトカイン類および酸化ストレス等の影響により、増殖型へと形質転換を引き起こす¹⁾。この形質転換は新生内膜形成に深く関わっており、プラーク形成の土台となるため、血管平滑筋細胞の形質転換は動脈硬化症発症の初期ステージとして重要な部分とされる²⁾。しかしながら、この血管平滑筋細胞の形質転換における分子機序は不明な点が残されていた。

これまでに、血管平滑筋細胞の G₀/G₁ 期における細胞周期チェックポイントタンパク質複合体として転写因子 YY1 (ying-yang 1) と Rb (retinoblastoma protein) の複合体が、key regulator として機能していることが報告されていた³⁾。筆者は、細胞外刺激に応じた YY1 の O-GlcNAc 化、および Rb のリン酸化によるタンパク質翻訳後修飾が転写活性化能に影響を与えていることを発見した⁴⁾。この転写活性化の調節は、血管平滑筋細胞の分化・増殖に関わる遺伝子群の発現制御に関与していることも明らかにした。これら一連の研究は、YY1-Rb 複合体における血管平滑筋細胞の細胞周期調節が、血管平滑筋細胞の“増殖型”および“収縮型”の形質転換反応の制御に関わっている可能性を示唆するものであった。

2003 年、ジルベール症候群等の総血清ビリルビン濃度の高い患者は、動脈硬化症

の発症率が低いという疫学的調査結果が報告された⁵⁾。この報告をもとに、高ビリルビン血症を示す実験モデル動物を用いた研究において、正常マウスと比べ、新生内膜形成が形成されにくいという報告がなされ⁶⁾、また、**Balloon-injured** モデル動物においても、事前にビリルビンを損傷部位に投与しておくこと、新生内膜形成が形成されないという結果が示された⁷⁾。これらの結果から、ビリルビンは新生内膜形成に関わる血管平滑筋細胞の“増殖型”および“収縮型”への形質転換反応のシグナル伝達と細胞周期制御を行っているものと考えられた。そこで、**YY1-Rb** 複合体に着目して、分子機序に関する研究を行ったところ、ビリルビンはカルシウム依存性カルパインを活性化することで **YY1** のタンパク質分解の誘導を引き起こすことが判明した。また、ビリルビンは **Raf/MEK/ERK** シグナル伝達系を抑制することで、**Rb** タンパク質の低リン酸化体の増加を引き起こす作用も持ち合わせていた。これらの **YY1** および **Rb** の機能的抑制は、血管平滑筋細胞の収縮型から増殖型への変換反応を抑制する分子機序の一つであると結論付けた⁸⁾。さらに、**YY1-Rb** 複合体による転写制御を受ける遺伝子発現解析を行っていたところ、**YY1** タンパク質分解は、血管平滑筋細胞特異的遺伝子発現の制御のみならず、新たに、リボソーム RNA (rRNA) の産生を抑制することを見出した。リボソーム RNA は、**RNA Polymerase-I (Pol-I)** により制御される転写産物であり、**28S**, **18S** および **5.8S** 非翻訳系 RNA 分子を構成因子としており、これら因子はタンパク質合成複合体の構成成分である。

Pol-I は、真核生物における転写の一つである^{9,10)}。昨今、rRNA の転写活性化は、がんや炎症等において見られ、細胞生存における普遍的転写制御ではなく、疾患発症と関連した転写活性化が起こると言われている^{11,12)}。また、疾患と関連した新しい **Pol-I** 転写制御因子などの発見とともに、これら分子が、新規治療・診断薬開発のためのバイオマーカーとして注目を浴びている。これまでの筆者の研究で、新たに **YY1** が rRNA の転写制御を担っているのではないかと示唆する結果を得たことから、**YY1** は **Pol-I** 転写に関わる新しい制御因子であることが予想される。しかしながら、**YY1** による **Pol-I** 転写制御が直接的、あるいは間接的作用であるかは未だ不明である。そこで、**YY1** による **Pol-I** 転写制御の分子機序解明を目的として研究を行った。

2. 方法

2.1 細胞培養

実験には **Hela** 細胞を使用した。**Hela** 細胞は、10% ウシ胎児血清 (FBS)、1% ペニシリン/ストレプトマイシンを加えた **DMEM** 培地を用いて、37°C、5% **CO₂** 条件下で培養した。

2.2 核抽出液の調整

Hela 細胞 (10⁷ cells) は、細胞溶解液 (10 mM HEPES-NaOH pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, protease inhibitor) を用いて細胞を溶解し、4°C で 15 分間静置させた。次に、細胞懸濁液を攪拌させながら、10% NP40 を滴下させた (最

終濃度：0.5%)。その後、細胞懸濁液を遠心分離 (2,000 r.p.m x 5 分間) により、タンパク質抽出液と核沈殿物に分別した。核沈殿物に核抽出液 (20 mM Hepes-NaOH pH 7.9, 0.4 M KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 20% glycerol, protease inhibitor)を加え、再懸濁させ、4°Cで 30 分間静置させた。その後、遠心分離操作 (14,000 r.p.m x 15 分間) を行い、上清を核抽出液とした。

2.3 免疫沈降法

核抽出液に、抗 YY1 抗体、あるいは、抗 UBF1 抗体を加え、4°Cで 1 時間回転させながら反応させた。続いて、50%懸濁 A/G アガロースビーズを 20 μ L 加え、さらに、4°Cで 2 時間反応させた。反応終了後、遠心分離操作 (4°C、14,000 r.p.m. x 1 分間) にて、上清と沈殿物に分別し、沈殿物を Normal salt buffer (50 mM Hepes-NaOH pH7.9, 150 mM NaCl, 0.2% NP40, protease inhibitor) で 3 回洗浄し、さらに、High Salt Ibuffer (50 mM Hepes-NaOH pH 7.9, 500 mM NaCl, 0.2% NP40, protease inhibitor) で 3 回洗浄した。最後に、Normal salt buffer で 2 度洗った後、沈殿物を 2 \times SDS dye で 95°C5 分間熱処理することで、タンパク質複合体の抽出を行った。

2.4 SDS-PAGE と Immunoblotting 法

抽出液は、8% SDS-PAGE で分離を行った。SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜にタンパク質を転写した。ニトロセルロース膜を Tris-buffered saline (TBS)で洗浄した後、3.5% non-fat skim milk/TBS-0.2% Tween20 (TBS-T)で室温 1 時間ブロッキング反応を行った。ブロッキング終了後、抗 YY1 抗体および抗 UBF1 抗体を用いて抗原-抗体反応を行い、さらに、免疫複合体は西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識二次抗体と反応させた。

3. 結果

3.1 YY1 と UBF の複合体形成

RNA polymerase-I の転写開始複合体形成 (preinitiation complex: PIC) においては、基本転写因子である、SL-1 (Selective factor-1: TIF-IA/B/C/D 複合体) および UBF (Upstream binding factor)が構成因子とされている⁹⁾。特に UBF は、細胞刺激に応じてリン酸化を受け、Pol-I 転写活性の制御を行っている¹³⁾。はじめに、YY1 が Pol-I の転写調節に関与するか調べるために、免疫沈降法を用いて、YY1 と UBF との複合体形成を検討した。Figure 1 に示すように、抗 YY1 抗体で免疫沈降を行ったところ、UBF が共沈降してくる結果を得た (Figure 1. lane 3)。また、抗 UBF 抗体で免疫沈降を行った場合においても、YY1 が共沈降してくることから (Figure 1. lane 5)、両者は細胞内で複合体を形成していることが判明した。

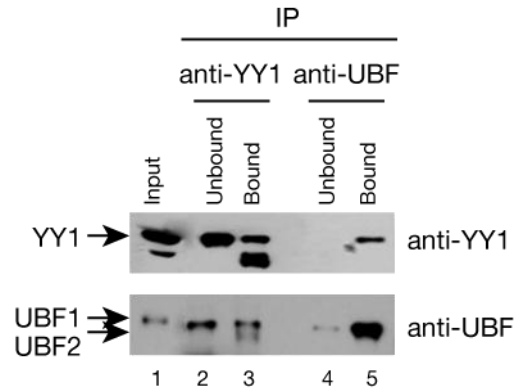


Figure 1. YY1 exists in a complex with UBF in nuclear extract from HeLa cells.

YY1 and UBF complex were analyzed by the immunoprecipitation assay against anti-YY1 antibody or anti-UBF antibody, respectively. Immunocomplexes were separated by SDS-PAGE and detected by immunoblotting analysis.

3.2 YY1 の DNA 結合領域の探索

UBF は、転写調節領域上に UCE (Upstream core element) と呼ばれる、シス領域に結合することで転写反応に影響を及ぼす¹⁴⁾。YY1 も DNA に対する特異的結合配列を有しており、DNA に結合することで転写反応を調節する転写因子である。前述の YY1 と UBF が複合体を形成している実験結果から、rRNA の転写調節領域には、YY1 特異的結合配列が含まれる可能性が示唆される。そこで、rRNA の転写調節領域の DNA 配列を用いて、TRANSFAC (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html>) および TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) の data base を使用し、YY1 が結合するシス配列の検索を行った。この探索の結果、ヒトの場合、転写開始点から -21 から -16 nt の領域に YY1 結合部位が存在すること判明した。また、マウスの場合 -132 から -127 nt、ラットの場合 -39 から -34 nt、であり、げっ歯類においても、YY1 のシス領域が存在していることが明らかとなった。このことは、YY1 による Pol-I 転写調節は、ヒトのみの制御ではなく、げっ歯類など他の生物種にも関与していることを示唆するものであり、YY1 は、Pol-I 転写調節において、SL-1 および UBF と同様に普遍的に作用する転写因子であると考えられる。

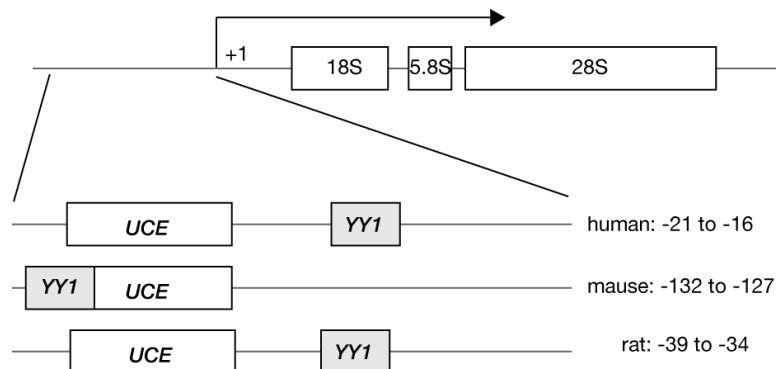


Figure 2. DNA binding sequence of YY1 locates on the ribosomal DNA promoter regions.

Specific DNA binding site of YY1 were analyzed by TRANSFAC or TFSEARCH programs using ribosomal DNA sequences of human (NR_046235), mouse (NR_046233) and rat (X00677), respectively. YY1 binding site shows gray boxes. UCE: upstream core element, 18S: 18S ribosomal RNA sequence region, 5.8S: 5.8S ribosomal RNA sequence region, 28S: 28S ribosomal RNA sequence region

4. おわりに

Pol-I による転写産物は、タンパク質合成装置に含まれる rRNA である。この Pol-I による転写反応は、Pol-II 転写反応とは異なり、ある一定量普遍的な転写反応であると長らく信じられてきた。近年、がんや炎症等の疾患発症に関わる生化学・分子生物学的観点からの詳細な検討により、Pol-I の転写活性は、これら疾患発症時には転写活性化能が亢進しており、かつ、細胞増殖や分裂などを指令する細胞外刺激に応じて調節されることが明らかとなってきた。これまでに、p53 や Rb 等のがん抑制遺伝子や、c-Myc 等のがん遺伝子が Pol-I の転写活性化制御に関与している転写調節因子であることが報告されている¹²⁾。また、mitogen や血清等の細胞外刺激によるグナル伝達の活性化においては、Erk kinase が UBF をリン酸化することで Pol-I 転写活性化を行い、mitogen 刺激依存的な rRNA 合成を促進することも明らかとなっている¹³⁾。最近では、栄養素シグナルとして知られる AMP-activated protein kinase が、グルコース飢餓時において、Pol-I の基本転写因子である TIF-IA をリン酸化することで、Pol-I 転写の抑制を行う報告もされ¹⁵⁾、エネルギー代謝のバランス変化によっても調節されていることが示された¹⁶⁾。また、同じ栄養素シグナルに関わるとされる mTOR complex-1 の場合は、chromosomal nucleolus organizer region (NORs) に作用することで、クロマチンレベルにおける Pol-I 転写活性の調節を行っていることが示されている¹⁷⁾。現在では、細胞状態を反映するように、Pol-I 転写制御が行われていることから、疾患発症時に特異的に Pol-I 転写活性化に寄与する分子の同定を行っていけば、疾患発症の新たな分子の機能、および転写機序に基づいた創薬開発等も可能になると考えられる。

参考文献

1. Doran AC., Meller N. and McNamara CA. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 28, 812-819 (2008)
2. Libby P., Ridker P. and Hansson GK. *Nature* 473 317-325 (2011)
3. Petkova V., Romanowski MJ., Suljoadikusumo I., Rohne D., Kang P. Shenk T. and Usheva A. *J. Biol. Chem.* 276, 7932-7936 (2001)
4. Hiromura M., Choi CH., Sabourin NA., Jones H., Bachvarov D. and Usheva A. *J. Biol. Chem.* 278, 14046-14052 (2003)
5. Novotny L. and Vitek L. *Exp. Biol. Med.* 228, 568-571 (2003)
6. Öllinger R., Bilvan M., Erat A., Froio A., McDaid J., Tyagi S., Csizmadia E., Graca-Souza AV., Liloia A., Soares MP., Otterbein LE., Usheva A., Yamashita K. and Bach FH. *Circulation.* 112, 1030-1039 (2005)
7. Öllinger R., Yamashita K., Bilbant M., Erat A., Kogler P., Thomas M., Csizmadia E., Usheva A., Margreiter R. and Bach FH. *Cell Cycle* 6, 39-43 (2007)
8. Stoeckius M., Erat A., Fujikawa T., Hiromura M., Koulova A., Otterbein L., Bianchi C., Tobiasch E., Dagon Y., Selkce FW. And Usheva A. *J. Biol. Chem.* 287, 15418-15426 2012
9. Grummt I. *Genes Dev.* 17, 1691-1702 (2003)
10. Moss T. and Stefanovsky VY. *Cell* 109, 545-548 (2002)
11. Boisvert FM., Konigsbruggen SV., Navascués J. and Lamond AI. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8, 574-585 (2007)
12. White RJ. *Trends in Genetics* 24, 622-629 (2008)
13. Stefanovsky VY., Pelletier G., Hannan R., Gagnon-Kugler T., Rothblum LI. and Moss T. *Mol. Cell* 8, 1063-1073 (2001)
14. Hannan R., Stefanovsky V., Arino T., Rothblum L. and Moss T. *Nuc. Acid Res.* 27, 1205-1213 (1999)
15. Hoppe S., Bierhoff H., Cado I., Weber A., Tiebe M., Grummt I. and Voit R. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 106, 17781-17786 (2009)
16. Ford E., Voit R., Liszt G., Magin C. Grummt I. and Guarente L. *Genes Dev.* 20, 1075-1080 (2006)
17. Vazquez-Martin A., Cafı S., Oliveras-Ferraros C. and Menendez AJ. *Cell Cycle.* 10, 3140-3152 (2011)