

(様式4)

学位論文の内容の要旨

(増井和美) 印

(学位論文のタイトル)

Interaction of silencing mediator for retinoid and thyroid receptors with steroid and xenobiotic receptor on multidrug resistance 1 promoter

(Steroid and xenobiotic受容体(SXR)を介する多剤耐性遺伝子MDR1の転写に及ぼす転写共役因子SMRTの作用)

(学位論文の要旨)

【背景】

Steroid and xenobiotic受容体 (SXR)は肝臓、小腸等に高発現しており、代謝酵素cytochrome P 450 (CYP)3A4やP糖タンパクの発現を制御する核内受容体である。CYP3A4は薬剤、ステロイド、化学物質、発癌性物質等さまざまな物質の肝代謝に中心的に関与している。また、P糖タンパクは多剤耐性遺伝子(multidrug resistance 1; MDR1)にコードされ、腫瘍細胞から抗癌薬を排出するポンプ作用を持ち細胞内の薬物濃度に影響を与えることが知られている。SXRはretinoid X 受容体 (RXR)とヘテロダイマーを形成し標的遺伝子のプロモーター領域にあるxenobiotic-responsive enhancer modules (XREMs)に作用して転写を調整する。これらの核内受容体に対してsteroid receptor coactivator (SRC)-1、nuclear receptor corepressor (NCoR)、及びsilencing mediator for retinoid and thyroid receptors (SMRT)等多くの転写共役因子が作用し、ヒストンのアセチル化及び脱アセチル化を介して転写を制御していることが報告されている。

我々は、HepG2細胞(ヒト肝細胞由来)において、SMRTがSXRを介するCYP3A4の転写をリガンド存在下で抑制するが、NCoRでは影響ないことを報告した。しかし、MDR1のSXRによる転写制御に対するSMRT及びNCoRの作用は十分に解明されていない。

【目的】

ヒト大腸癌由来のLS174T細胞を用いて、MDR1プロモーター上のSXRを介する転写調節におけるSMRT及びNCoRの作用を解析することを目的とした。

【方法】

1. MDR1プロモーター上のSXRを介する転写におけるSMRT及びNCoRの作用を解析するため、LS174T細胞を用い、SXR発現ベクターと、レポーターとしてMDR1-TK-LUCベクターを遺伝子導入し、レポータージーンアッセイを行った。
2. 半定量的 RT-PCR法を用いて、LS174T細胞におけるMDR1 mRNA発現量に対するSMRT 及びNCoRの影響を検討した。
3. MDR1プロモーターにおけるSMRT-SXRの相互作用を解析するため、サル腎線維芽細胞由来のCV-1細胞を用いてmammalian one-hybrid アッセイを行った。MDR1-TK-LUC、SXR発現ベクターに加え、VP16と融合したSMRTおよびNCoRの受容体結合領域(receptor interacting region; RID)を含む発現ベクターを遺伝子導入し解析した。
4. SMRTのSXR への結合を検討するため、SMRTおよびSXRを遺伝子導入後、胎児腎由来のHEK293細胞を用いて免疫沈降法を行った。

【結果】

1. レポータージーンアッセイでは、SXRの遺伝子導入により、リファンピシン存在下で約3倍の転写活性が認められた。SMRTの遺伝子導入によりリファンピシン存在下のSXRによる転写活性が抑制された。一方、NCoRの遺伝子導入ではリファンピシンの有無に関わらず有意差は認められなかった。
2. 上記実験により、SXRを介するリファンピシンによる転写活性がSMRTにより抑制されたことから、半量的RT-PCR法を用いてLS174T細胞におけるMDR1 mRNA発現量に対するSMRTおよびNCoRの影響を検討した。SXRを遺伝子導入するとMDR1 mRNA発現量はリガンド依存性に著しく増大した。SXRとSMRTを同時に遺伝子導入するとリファンピシン添加によるMDR1 mRNA発現量は減少した。しかしNCoRとSXRを同時に導入しても

MDR1 mRNAの発現に有意差はなかった。

3. CV-1細胞を用いたmammalian one-hybrid アッセイにおいて、SXRを遺伝子導入すると、VP16-SMRTでリファンピシン非存在下で著明な転写活性の上昇が認められた。SXRとSMRTの相互作用はリファンピシン濃度依存的に上昇したが、SXRとNCoR間では変化に有意差は認められなかった。

4. HAタグ標識SMRTとFLAGタグ標識SXRをHEK293細胞に遺伝子導入し、SMRTとSXRタンパクの結合を免疫沈降法にて解析したところ、リファンピシンの有無に関わらず、FLAG-SXRとHA-SMRTの結合が認められた。

【結論】

LS174T細胞においてリファンピシン存在下でNCoRではなくSMRTがSXRに結合することにより、SXRを介するMDR1遺伝子の転写を抑制することがわかった。SMRTはSXRによる標的遺伝子の過剰発現を制御する機能を持つことが示唆された。