

---

ダイオキシン受容体 (AhR) の核移行  
制御機構と細胞内クロストークの解明

---

研究課題番号：11839025

平成11～12年度科学研究費補助金  
基盤研究 (C) (2) 研究成果報告書



平成13年3月

研究代表者 塚原富士子  
(東京女子医科大学・医学部・助手)



はしがき

ダイオキシンをはじめとする環境ホルモンは、その強い発癌性や内分泌攪乱作用により、社会的、生物学的に重大な関心事となっている。ダイオキシン受容体 (AhR) は、熱ショックタンパク質 hsp90 と複合体を形成して細胞質に存在するが、ダイオキシンが結合すると核内へ移行し種々の遺伝子発現を誘導することにより、その毒性を仲介する。すなわち AhR の細胞質—核間移行制御機構の解明は、AhR の作用発現調節機構を明らかにする上で重要である。本研究では、green fluorescent protein-AhR 融合タンパク質発現系を構築し、AhR の細胞質—核間移行制御機構および細胞内クロストークについて検討を行った。

まず受容体の核内および核外移行に対する hsp90 阻害薬の影響を観察した。Hsp90 阻害薬は、リガンド依存性 AhR の転写活性化作用を阻害することが従来より知られている。しかし、我々は hsp90 阻害薬自体に AhR の核内移行促進作用および核外移行促進作用があることを見出した。Hsp90 阻害薬による AhR の核内移行は一過性であり、核内に移行した AhR は遺伝子の転写活性化作用を発揮せず、速やかに核外へ移行した後、proteasome で分解されることが示唆された。

次にリガンド依存性 AhR の核内移行および核外移行に対するシャペロンおよびコシャペロンの影響を検討した。その結果、AhR の核内への局在は、核内 hsp90, hsc70, p60 および hsp40 によって制御されている可能性を明らかにした。AhR はこれらの分子シャペロンおよびコシャペロンを介して他の核内受容体、情報伝達系タンパク質とクロストークしていることが推察される。

本研究の成果は、環境ホルモンによる毒性発現機構の解明およびその毒性を防御する分子の研究開発において重要な基盤となると考える。

## 研究組織

研究代表者：塚原 富士子 (東京女子医科大学・医学部・助手)

研究分担者：村木 篁 (東京女子医科大学・医学部・教授)

研究分担者：吉岡 俊正 (東京女子医科大学・医学部・助教授)

## 研究経費

平成11年度	1,500 千円
平成12年度	1,200 千円
計	2,700 千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

- 1、Fujiko Tsukahara, Toshimasa Yoshioka, Takamura Muraki: Molecular and functional characterization of HSC54, a novel variant of human heat-shock cognate protein 70. *Molecular Pharmacology* 58, 1257-1263 (2000)
- 2、吉岡俊正、塚原富士子：融合遺伝子発現系によるタンパク質可視化技術の分子薬理学的応用、*日本薬理学雑誌* 116, 36-42 (2000)
- 3、Toshimasa Yoshioka, Noriko Iwamoto, Fujiko Tsukahara, Kaoru Irie, Ikuko Urakawa, Takamura Muraki: Anti-NO action of carvedilol in cell-free system and in vascular endothelial cells. *British Journal of Pharmacology* 129, 1530-1535 (2000)
- 4、Kazuyuki Mizushima, Yasuhide Miyamoto, Fujiko Tsukahara, Yoshiyuki Sakaki, Takashi Ito: A novel G-protein-coupled receptor gene expressed in striatum. *Genomics* 69, 314-321 (2000)
- 5、Dong-Kug Choi, Takashi Ito, Fujiko Tsukahara, Momoki Hirai, Yoshiyuki Sakaki: Developmentally-regulated expression of mNapor encoding an apoptosis-induced ELAV-type RNA binding protein. *Gene* 237, 135-142 (1999)
- 6、Fujiko Tsukahara, Toshimasa Yoshioka, Katsuya Tago, Michiko Iwabuchi, Ikuko Urakawa and Takamura Muraki: Heat shock protein 90 inhibitors induce the transient nuclear translocation of dioxin receptor (AhR). *Japanese Journal of Pharmacology* 85, Suppl. (2001) (in press)
- 7、Katsuya Tago, Fujiko Tsukahara, Toshimasa Yoshioka and Takamura Muraki: Role of nuclear heat shock protein 90 (HSP90) on glucocorticoid-mediated nucleocytoplasmic shuttling and transcription of glucocorticoid receptor. *Japanese*

Journal of Pharmacology 85 Suppl. (2001) (in press)

- 8、 Fujiko Tsukahara, Toshimasa Yoshioka, Katsuya Tago, Ikuko Urakawa, Takamura Muraki: Effects of HSP90 inhibitors, geldanamycin and radicicol, on the nuclear translocation of dioxin receptor. 7th World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics, Abstracts p.285 (2000)
- 9、 Fujiko Tsukahara, Toshimasa Yoshioka, Katsuya Tago, Ikuko Urakawa, Takamura Muraki: Modulation of nucleocytoplasmic trafficking of glucocorticoid receptor by nitric oxide. 10th Biennial of the International Society for Free Radical Research, Abstracts p.137 (2000)
- 10、 Toshimasa Yoshioka, Fujiko Tsukahara, Ikuko Urakawa, Noriko Iwamoto, Takamura Muraki: Characterization of the antioxidant property of human heat shock cognate protein 70 (HSC70). 10th Biennial of the International Society for Free Radical Research, Abstracts p.156 (2000)
- 11、 Fujiko Tsukahara, Toshimasa Yoshioka, Katsuya Tago, Ikuko Urakawa, Takamura Muraki: Nitric oxide (NO) modulates nucleocytoplasmic shuttling of glucocorticoid receptor. Japanese Journal of Pharmacology 82, Suppl. 120P (2000)
- 12、 Toshimasa Yoshioka, Fujiko Tsukahara, Takamura Muraki: An over expression of human heat shock cognate protein 70 (hsc70) protects oxidant stress-induced glucocorticoid insensitivity. Japanese Journal of Pharmacology 82, Suppl. 46P (2000)
- 13、 Katsuya Tago, Toshimasa Yoshioka, Fujiko Tsukahara, Takamura Muraki: Pharmacological evaluation of HSP90-dependent mechanism for nucleocytoplasmic shuttling of glucocorticoid receptor. Japanese Journal of Pharmacology 82, Suppl. 156P (2000)
- 14、 多胡克哉、塚原富士子、吉岡俊正、村木 篁、高野加寿恵：グルココルチコイド受容体(GR)の核－細胞質間移行における熱ショック蛋白質90(HSP90)の役割、日本内分泌学会雑誌 76, 1,182 (2000)
- 15、 Yoko Uchida, Ken-ichi Ohba, Fujiko Tsukahara, Kaoru Irie, Toshimasa Yoshioka, Takamura Muraki: Attenuation of tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced down regulation of lipoprotein lipase in brown adipocytes derived from iNOS-deficient mice. Japanese Journal of Pharmacology 82, Suppl. 267P (2000)

- 16、塚原富士子、吉岡俊正、多胡克哉、浦川育子、村木篁：構成型ストレスタンパク質 70 (HSC70) アイソフォーム、HSC54 のシャペロン活性阻害作用 日本薬理学雑誌 115, 1, 4P (2000)
- 17、吉岡俊正、塚原富士子、多胡克哉、村木篁：一酸化窒素 (NO) および構成型熱ショック蛋白質 70 (HSC70) によるグルココルチコイド作用の修飾機構の解析 臨床薬理 31, 2, 331-332 (2000)
- 18、塚原富士子、吉岡俊正、多胡克哉、浦川育子、村木篁：構成型熱ショックタンパク質 70 (HSC70) のシャペロン活性に対する HSC54 の阻害作用 第4回臨床ストレス蛋白質研究会 抄録集 p23 (1999)

## (2) 口頭発表

- 1、塚原富士子、吉岡俊正、多胡克哉、岩淵理子、浦川育子、村木篁：熱ショックタンパク質 90 阻害薬によるダイオキシン受容体 (AhR) の細胞質—核間移行誘導作用、第74回日本薬理学会年会発表予定、2001.3
- 2、多胡克哉、塚原富士子、吉岡俊正、村木篁：グルココルチコイド受容体の核—細胞質間移行およびグルココルチコイド依存性転写活性に対する核内熱ショック蛋白質 90 の役割、第74回日本薬理学会年会発表予定、2001.3
- 3、Fujiko Tsukahara, Toshimasa Yoshioka, Katsuya Tago, Ikuko Urakawa, Takamura Muraki: Effects of HSP90 inhibitors, geldanamycin and radicicol, on the nuclear translocation of dioxin receptor. 7th World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2000.7
- 4、Fujiko Tsukahara, Toshimasa Yoshioka, Katsuya Tago, Ikuko Urakawa, Takamura Muraki: Modulation of nucleocytoplasmic trafficking of glucocorticoid receptor by nitric oxide. 10th Biennial of the International Society for Free Radical Research, 2000.10
- 5、Toshimasa Yoshioka, Fujiko Tsukahara, Ikuko Urakawa, Noriko Iwamoto, Takamura Muraki: Characterization of the antioxidant property of human heat shock cognate protein 70 (HSC70). 10th Biennial of the International Society for Free Radical Research, 2000.10
- 6、塚原富士子、吉岡俊正、多胡克哉、浦川育子、村木 篁：一酸化窒素(NO) によるグルココルチコイド受容体の核—細胞質間移行の抑制、第73回日

- 本薬理学会年会、2000.3
- 7、吉岡俊正、塚原富士子、村木 篁：活性酵素によるグルココルチコイド抵抗性に対する HSC70 遺伝子導入の予防効果、第 73 回日本薬理学会年会、2000.3
  - 8、多胡克哉、吉岡俊正、塚原富士子、村木 篁：熱ショック蛋白質 90(HSP90)によるグルココルチコイド受容体の核-細胞質間移行の制御、第 73 回日本薬理学会年会、2000.3
  - 9、多胡克哉、塚原富士子、吉岡俊正、村木 篁、高野加寿恵：グルココルチコイド受容体(GR)の核-細胞質間移行における熱ショック蛋白質 90(HSP90)の役割、第 73 回日本内分泌学会総会、2000.6
  - 10、内田庸子、大場謙一、塚原富士子、入江かをる、吉岡俊正、村木 篁：iNOS 欠損マウス褐色脂肪細胞における腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )によるリポ蛋白質リパーゼ抑制作用減弱について、第 73 回日本薬理学会年会、2000.3
  - 11、菅沼太陽、入江かをる、塚原富士子、吉岡俊正、村木 篁、藤井恵美子：熱ショックによる LPS 血管透過性亢進作用の抑制、第 6 回日本エンドトキシン研究会、2000.11
  - 12、塚原富士子、吉岡俊正、多胡克哉、浦川育子、村木篁：構成型ストレスタンパク質 70 (HSC70) アイソフォーム、HSC54 のシャペロン活性阻害作用、第 101 回日本薬理学会関東部会、1999.10
  - 13、吉岡俊正、塚原富士子、多胡克哉、村木篁：一酸化窒素 (NO) および構成型熱ショック蛋白質 70 (HSC70) によるグルココルチコイド作用の修飾機構の解析、第 20 回日本臨床薬理学会年会、1999.3
  - 14、塚原富士子、吉岡俊正、多胡克哉、浦川育子、村木篁：構成型熱ショックタンパク質 70 (HSC70) のシャペロン活性に対する HSC54 の阻害作用、第 4 回臨床ストレス蛋白質研究会、1999.12

## AhR の核—細胞質間移行制御機構における分子シャペロンおよびコシャペロンの役割

### 【目的】

Aryl hydrocarbon receptor (AhR、または dioxin receptor)の核—細胞質間移行における分子シャペロンおよびコシャペロンの役割を明らかにするために、green fluorescent protein (GFP) -AhR 融合タンパク質を発現させた COS7 細胞を用いて、AhR のリガンド依存性核内移行および核外移行に対する hsp90, hsc70, p60, hsp40 および p23 の作用を検討した。

### 【方法】

#### 1、プラスミドの作製と細胞内への導入

GFP-AhR 融合タンパク質発現プラスミド (pEGFP-AhR) を作製するために、ヒト AhR cDNA を RT-PCR にて増幅し、pEGFP-C1 にクローニングした。Red fluorescent protein (RFP)/FLAG-hsp90/hsc70/p60/hsp40/p23 融合タンパク質発現プラスミド (pDsRed/pFLAG-hsp90/hsc70/p60/hsp40/p23) を作製するためにヒト hsp90, hsc70, p60, hsp40 および p23cDNA を RT-PCR にて増幅し、各 cDNA 断片を pDsRed-C1 および pFLAG-CMV にクローニングした。さらに分子シャペロンを核内に過剰発現させるために、nucleoplasmine の核移行シグナル (NLS) を導入したプラスミド (pDsRed/pFLAG-NLS-hsp90/hsc70/p60/hsp40/p23) を作製した。プラスミドは、Superfect Transfection Reagent (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて COS7 細胞へ導入し、16-24 時間後、GFP-AhR および RFP-(NLS)-hsp90/hsc70/p60/hsp40/p23 の細胞内局在を観察した。

#### 2、細胞内局在の観察

AhR の核内移行は、3-methylcholanthrene (3MC) (0.1  $\mu$ M) を medium 中に加えた後、経時的に観察した。核外移行は、3MC (0.1  $\mu$ M) により AhR を核内へ移行させた後、細胞を洗浄しリガンドを除去した後、経時的に観察した。GFP-AhR および RFP-(NLS)-hsp90/hsc70/p60/hsp40/p23 の細胞内局在は、

倒立型蛍光顕微鏡（IX70, Olympus, Tokyo, Japan）で観察した。フィルターセットは、U-MNIBA（GFP-AhR）および U-MWIG（RFP-(NLS)-hsp90/hsc70/p60/hsp40/p23）を用いた。

#### 4、Nuclear localization score の計測

GFP-AhR の細胞内局在は、主に細胞質：-2、細胞質>核：-1、細胞質=核：0、核>細胞質：+1、主に核：+2、として評価し、平均値±標準誤差を求めた。

#### 【結果】

##### 1、分子シャペロンおよびコシャペロンの細胞内過剰発現（図1）

RFP-hsp90/hsc70/p60/hsp40/p23 融合タンパク質を COS7 細胞に過剰発現させ、蛍光顕微鏡で観察した。RFP のみの場合は、細胞質と核にほぼ均一に局在したが、NLS-RFP は核に局在した。RFP-hsp90/hsc70/p60 は核>細胞質、RFP-p23 は核=細胞質、RFP-hsp40 は細胞質>核であった。RFP-NLS-hsp90/hsc70/p60/hsp40/p23 融合蛋白質は、いずれも RFP-NLS と同様に核に局在することを確認した。

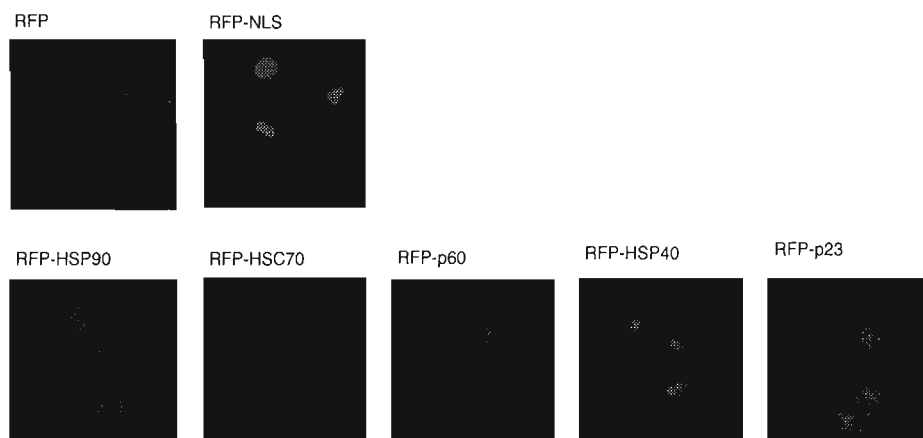


図1 RFP-(NLS)-hsp90/hsc70/p60/hsp40/p23 の細胞内局在



## 2、AhR のリガンド依存性核内移行に対する分子シャペロンおよびコシャペロンの影響 (図 2)

リガンド非存在下で AhR は主として細胞質に存在した。3MC (0.1  $\mu$ M) 添加後、AhR は経時的に核内へ移行し、60-90 分後には核>細胞質であった。しかし AhR の核内への移行は完全ではなく、120 分後においても細胞質にその局在が認められた。Hsp90, hsc70, p60, hsp40, p23 の細胞内過剰発現は、いずれも AhR の細胞内局在および 3MC 依存性核内移行に対して殆ど影響しなかった。一方、核内に hsp90/hsc70/p60/hsp40 を過剰発現させた場合には、AhR の核内局在が増加し、さらに 3MC 添加後の AhR の核内局在も増加した。しかし、AhR の核内移行速度には影響しなかった。P23 の核内過剰発現は、AhR の細胞内局在および 3MC 依存性核内移行に影響しなかった。

## 3、AhR の核外移行に対する分子シャペロンおよびコシャペロンの影響 (図 3)

3MC 除去後、AhR は緩やかに核から細胞質へ移行した。Hsp90、hsc70、p60 または hsp40 を核内過剰発現させた細胞では、3MC 除去後 AhR は比較的速やかに核外へ移行した。しかし hsp90 または p60 を核内過剰発現させた細胞では、3MC 除去 6 時間後においても AhR の核内局在は対照に比べ大であった。Hsc70 または hsp40 を核内過剰発現させたでは、3MC 除去 6 時間後の AhR の核内局在は対照とほぼ等しかった。P23 の核内過剰発現は、AhR の核外移行に殆ど影響しなかった。

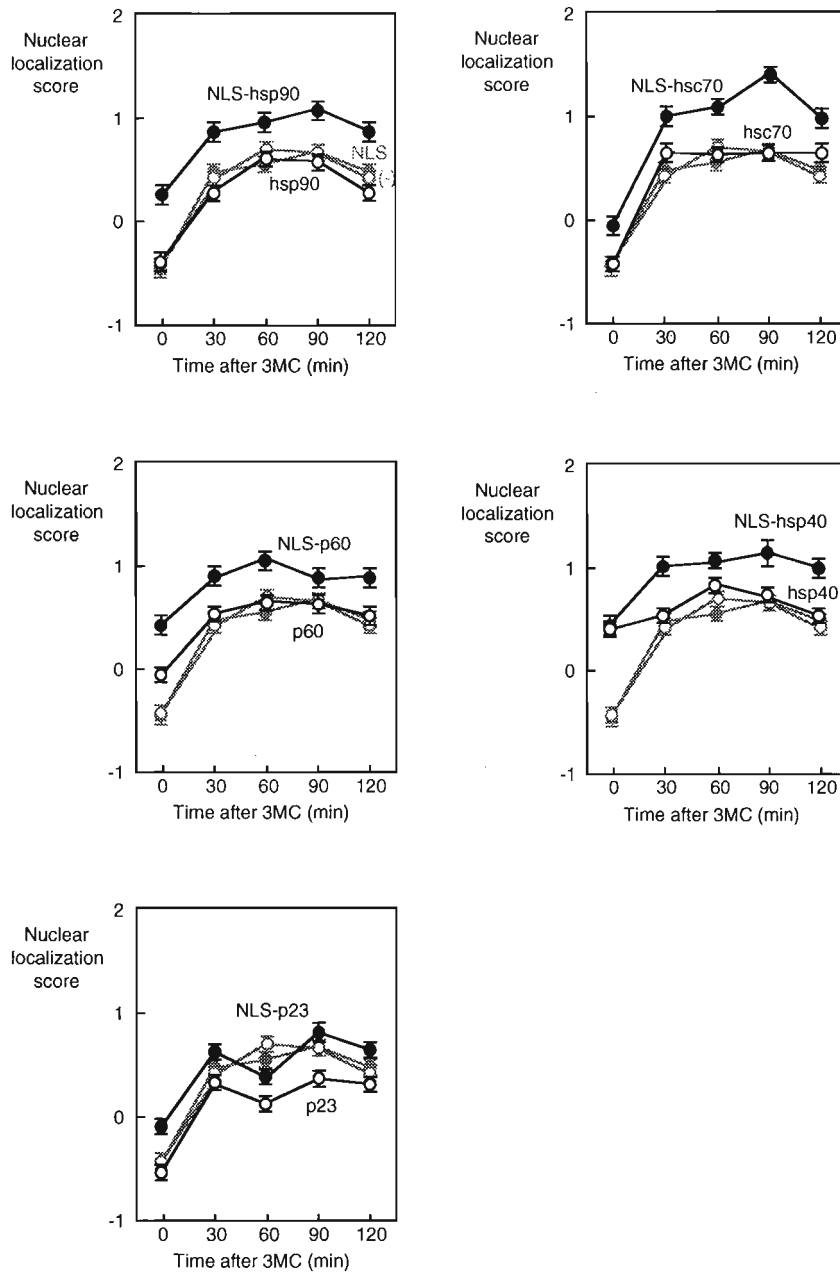


図2 AhR の核内移行に対する hsp90、hsc70、p60、hsp40、p23 の細胞内および核内過剰発現の影響

COS7 細胞に GFP-AhR および FLAG-hsp90/hsc70/p60/hsp40/p23 を共発現させ 3MC (0.1  $\mu$ M) 依存性 AhR の核内移行を蛍光顕微鏡にて経時的に観察した。さらに核内に FLAG-NLS-hsp90/hsc70/p60/hsp40/p23 あるいは FLAG-NLS を発現させ同様に AhR の核内移行を観察した。

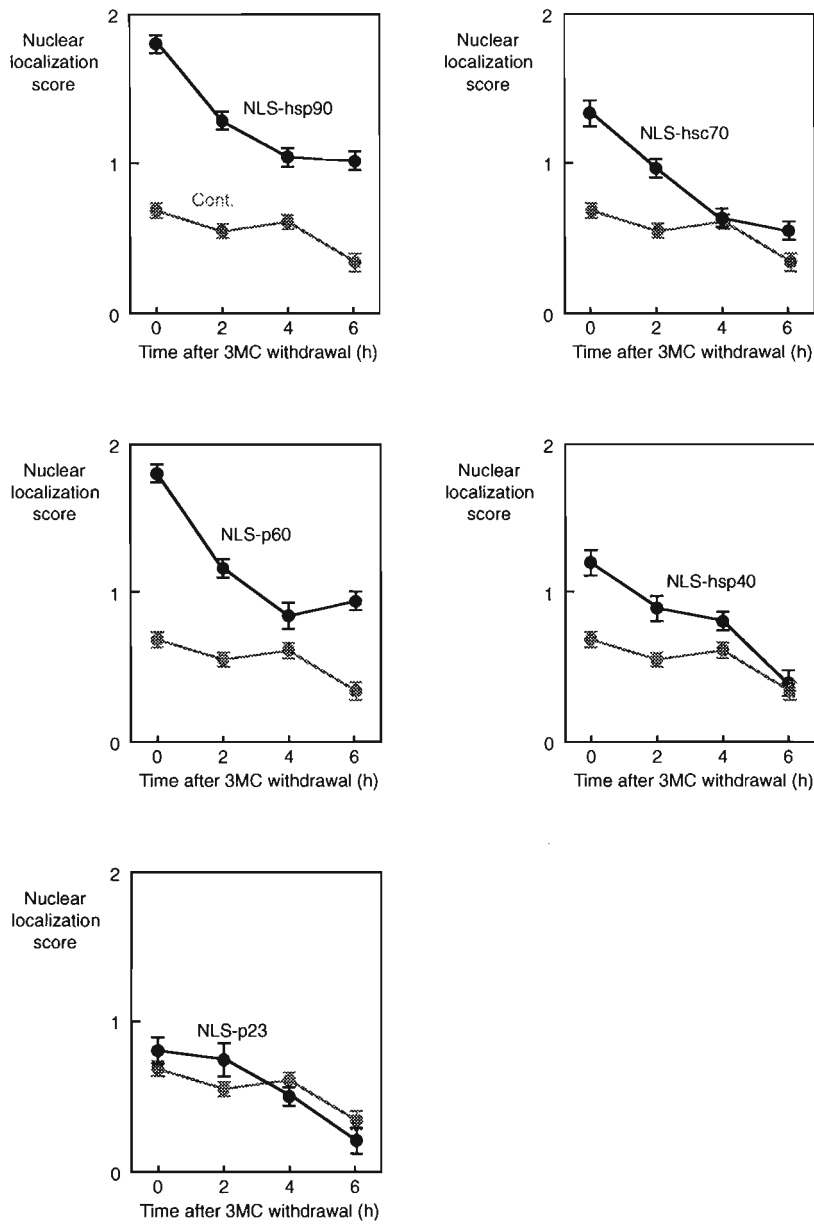


図3 AhRの核外移行に対するhsp90、hsc70、p60、hsp40、p23の核内過剰発現の影響  
 GFP-AhR および FLAG-NLS-hsp90/hsc70/p60/hsp40/p23 を共発現させた COS7 細胞を用い、3MC  
 (0.1  $\mu$ M) により AhR を核内へ移行させた後、3MC を洗浄、除去し、AhR の核外移行を蛍光  
 顕微鏡にて経時的に観察した。

## 【考察】

本研究結果から、AhR の核内局在は、核内 hsp90、hsc70、p60 および hsp40 により制御されていることが明らかとなった。AhR の核外移行は、核外移行配列 (nuclear export signal: NES) 受容体 CRM1 によって制御されていることが報告されている。従ってこれらの分子シャペロンおよびコシャペロンは AhR と CRM1 との相互作用を制御している可能性が示唆される。

一方、AhR の細胞質から核内への移行には、これらの分子シャペロンおよびコシャペロンの過剰発現は殆ど影響しなかった。細胞質には、もともとこれらの分子が十分量存在するためかもしれない。また p23 は、AhR の核内および核外移行いずれに対しても影響しなかった。今後さらにこれらの分子の発現量を制御した細胞を用いて、詳細に検討する必要がある。

Hsp90、hsc70 は、AhR 以外にも核内受容体 (グルココルチコイド受容体、エストロジェン受容体等) や Raf、p53 等と結合し、それらの作用を制御している。また p60、hsp40 は核内受容体と結合し、その作用を制御している。従ってこれらの分子シャペロンおよびコシャペロンを介した AhR と他の細胞内タンパク質とのクロストークがおこることが推察される。