

学内グラント 終了時報告書

平成20年度 学内グラント報告書

トポイソメラーゼIの概日リズム性発現の解析： 時間治療の分子基盤確立を目指して

研究代表者 池田 正明（埼玉医科大学 医学部 生理学）

研究分担者 佐々木 康綱¹⁾，藤田 健一¹⁾，楊 芳²⁾，熊谷 恵³⁾，
中島 芳浩⁴⁾，近江谷 克裕⁴⁾

Keywords: Topoisomerase I, Circadian rhythm, clock genes, chronotherapy, Camptothecine

要 旨：

トポイソメラーゼI（トポI）はDNAの2重螺旋構造を解くのに必須の酵素であるが，細胞周期の全期間に亘って核に発現し，抗がん剤のカンプトテシン（CPT）の標的としても知られている．最近，トポIが概日リズム性の発現を示し，しかもその発現は内因性のグルココルチコイドレベルに依存していること，また，CPTの抗がん作用は，トポI活性が上昇した時に増強されることが報告された．しかし，トポIの概日リズム性発現が時計遺伝子によるものであるかは明らかではない．また，抗がん剤CPTの時間治療を確立するためには，トポIの概日リズム性発現の分子機構を明らかにすることが重要である．そこで私たちは，先ず細胞レベルでトポIが概日リズム性発現をすることを確認するため，NIH3T3細胞に2時間のデキサメサゾン刺激を同調刺激として加え，この刺激から24から48時間後のトポI mRNAを測定し，それが概日リズム性の発現を示すことを確認した．次に転写レベルでの発現調節を解析するため，ヒト，マウスのトポIのプロモーター領域を比較し，エクソン1の両方で配列が高度に保存されている領域内に2カ所のE-box（E1, E2）および1カ所のD-boxがあることを見いだした．ゲルシフトアッセイによって，E2配列およびD-boxにはBMAL1/CLOCKヘテロ二量体およびDBPがそれぞれ結合することが示された．次に，トポIプロモーター下流にPEST配列を

含むルシフェラーゼ遺伝子を挿入し，NIH3T3細胞にトランスフェクションを行い，その活性変動を，発光を指標にリアルタイムで計測（クロノス）し，このプロモーターに自律的な概日リズム性発現があることを確認した．またこの発現位相は*Per2*と極めて近いことが示された．更にこれらのE-boxおよびD-boxの変異体を作成し，クロノス解析を行ったところ，E2, E1/E2, D, E1/D, D, E1/E2/Dを欠失させたトポIプロモーターは，振幅が60%以上低下した．以上の結果より，トポIは，細胞レベルにおいて，E2およびD-boxを介して時計遺伝子によって自律的に概日リズム性発現することが示された．本研究で得られた結果は，トポIの発現とカンプトテシン感受性との関連を分子レベルで解析する為の実験的証左を提供するものであり，同薬物による腫瘍の時間治療に，分子レベルでの手がかりを与えることが期待される．

緒 言

二本鎖のDNAは生理的な条件では二重らせん構造を形成しており，この二重らせんにはねじれが生じていることが知られている．このねじれ構造を超らせん構造というが，このDNAの立体構造を変える酵素として，トポイソメラーゼがある．トポイソメラーゼにはIとIIがあり，2本鎖の片方だけを切断して再結合させるトポイソメラーゼI（トポI），両方を切断して再結合させるタイプのトポイソメラーゼII（トポII）がある．

トポIは二重らせん構造を変化させる機能があるが，このような機能を通して，DNA複製などに関与していることが知られている．また，JUNなどの転写因子によるRNAポリメラーゼIIの活性化にもコファク

1) 埼玉医科大学 国際医療センター 腫瘍内科

2) 埼玉医科大学 大学院 生物医学専攻（生理学）

3) 埼玉医科大学 医学部 生理学

4) 産業技術総合研究所・関西センター セルエンジニアリング研究部門 セルダイナミクス研究グループ

ターとして関与することも報告されている。さらに、CPTの誘導体である抗がん薬イリノテカン (irinotecan) の標的分子で、トポI活性阻害を介して抗がん作用が発現することことも広く知られている¹⁾。さらに、肺小細胞がんや卵巣がんなど様々ながん細胞でその発現が増加していることが報告されており、またこの発現量はカンプトテシン感受性とも関連することが指摘されている。カンプトテシンの感受性や副作用は、生体に投与する時間帯によって変動することが知られており²⁾、この変動はトポIの発現動態と関連している可能性が指摘されている。カンプトテシンによるがん治療に時間治療を応用するためには、カンプトテシンの吸収、代謝ばかりでなく、その標的因子であるトポIの発現動態を解析する必要がある。Kuramotoらはマウス肝臓におけるトポI RNAの変動に日内リズムがあること、またそのリズムは副腎の摘出で消失することから、トポI RNAの日内変動は副腎皮質ホルモンのリズムによって制御されている可能性を報告している^{3,4)}。しかし、トポIの概日リズム性発現を、転写レベルで解析した報告はなく、概日リズム性発現調節機構を分子レベルで解析するためには、トポIのプロモーター解析を行なう必要がある。本研究ではマウス トポIのプロモーター^{5,6)}をクローニングし、継時的に長時間プロモーター活性を計測可能な系を本研究に応用することにより、時計遺伝子によるリズム発現機構を明らかにした。

材料と方法

マウス トポIプロモーターのクローニングと変異体の作成

マウス トポIプロモーターはマウスゲノム由来DNA (Novagen) を鋳型として、プロモーター領域に設定したプライマーを用いてPCRを行ない、得られたPCR産物はEluc-PEST-T (Toyobo) に導入した。E-box および D-box 時計遺伝子結合領域の変異体は、QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) によって変異導入用プライマー

mTopoI-E1mut:5'-

CACGCTTCAATCCAGGGTGTGGGGGGCAGAGGC-3';

mTopoI-Dbox-mut: 5'-

GAAATGCGAACTTAGGCTGGGACACAACCTGCTGGG-3';

mTopoI-E2mut: 5'-

GAACTTAGGCTGTTACATTACTGCTGGGGTCTGTTC-3';

mTopoI-E2/Dmut: 5'-GAACTTAGGCTGGGACATTACTGCTGGGGTCTGTTC-3'

をそれぞれ用いて作成した。

ルシフェラーゼアッセイ

レポーターコンストラクトおよび一過性細胞発現

コンストラクトはLipofectamine (Invitrogen) によってNIH3T3細胞に導入した。NIH3T3細胞は24 wellプレートにトランスフェクションの前日に1 wellあたり5万個となるように播種した。培地は10%のウシ胎児血清、ペニシリン (25 U/ml), ストレプトマイシン (25 µg/ml) を加えたDMEM (Invitrogen) を用いた。発現効率の補正のため内部標準としてphRG-TK (Promega) を共発現させた。典型的なアッセイでは1 wellあたり60 ngのレポーターベクター、50 ngの発現ベクター、6 ngのphRG-TKベクターを混合し、さらに最終のDNA濃度を一定にするためpcDNA3を加えて合計260 ngとした。トランスフェクション後24時間経過した時点において、細胞はPBSで洗浄後、Passive Lysis buffer (Promega) を用いて溶解し、Dual Luciferase Assay kit (Promega) によってホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。測定にはFluoroskan Ascent FLルミノメーター (Labsystems) を使用した。

時計遺伝子プロモーター活性のリアルタイム計測

トランスフェクション前日に NIH3T3 細胞を35 mm プレートに30万個になるように播種し、lipofectamine PLUS (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。24時間後、細胞は0.1 µMデキサメサゾン (Nakalai Tesques) で2時間処理し、10%ウシ胎児血清、10 mM HEPES バッファー (pH 7.2), 0.1 mM ルシフェリン (Toyobo), 25 U/ml ペニシリン, 25 µg/ml ストレプトマイシンを含むDMEMで置き換え、クロノス (AB2500 Kronos; ATTO) によって10分間隔で発光量を測定した。細胞は4日以上培養し発光量は10ポイント移動平均をとり、12時間の移動平均を用いてデトレンドを行った。

リアルタイムRT-PCRによるRNAの定量

NIH3T3細胞はデキサメサゾン2時間処理し、処理から24時間経過した時点から4時間間隔で24時間にわたって同細胞からRNAを抽出した。RNA抽出にはISOGEN (日本ジーン) を用いた。RNAは逆転写酵素で1本鎖DNAを合成後、トポIおよびGAPDH 特異的プライマー、One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit (Takara) を用いてABI 7300 (Applied Biosystems) により定量化した。

ゲルシフトアッセイ

CLOCK, BMAL1, DBPタンパクはTNT T7 coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) によってCLOCK/pCR3.1, BMAL1/pcDNA3, DBP/pcDNA3.1を用いて合成した。トポIプロモーター/エンハンサー領域にある2箇所のE-box, 1箇所のD-box周辺領域配列を合成後、二本鎖としプローブとして用いた。二本鎖オリゴヌクレオチドはT4ポリヌクレオチドキナーゼ (Takara) を用いて [γ -³²P] ATP (Amersham) によりラベルした後、各蛋白と結合バッファー (5 mM MgCl₂, 2.5 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 250 mM NaCl, 50 mM Tris-

HCl (pH 7.5), 0.25 ug/ul poly dIdC in 20% glycerol) 中で 4°C, 20 分間インキュベーションし, 6% ポリアクリルアミドゲルで 130 V の条件で電気泳動した. 泳動後ゲルはゲルドライヤーで乾燥し, BAS-5000 画像解析システム (Fuji Photo Film) を用いて解析した. ゲルシフトに用いたプローブの配列は以下の通りである. 下線は時計遺伝子結合コア配列およびその配列に対応する変異導入配列を示している.

mTopo-E1: 5'-

GCCTTTAAGGCCTACCACGTGGCCGCCCGGGTG-3';

mTopoI-E1-mut: 5'-

GCCTTTAAGGCCTACGGTGTGGCCGCCCGGGTG-3';

mTopoI-E2: 5'-

GAAGTTAGGCTGTTACACAACTGCTGGGGTCTGTT-3';

mTopoI-E2-mut: 5'-

GAAGTTAGGCTGTTACATTACTGCTGGGGTCTGTT-3';

mTopoI-D: 5'-

GAAATGCGAACTTAGGCTGTTACACAACTGCTGGGG-3';

mTopoI-D-mut: 5'-GAAATGCGAACTTAGGCTGGGACACAACTGCTGGGG-3'

結果および考察

トポI RNAおよびプロモーターはNIH3T3 細胞でリズム発現する

リアルタイム RT-PCR によって NIH3T3 細胞におけるトポI RNA の発現を解析したところ, デキサメサゾン刺激終了後 24 時間目より発現の増加がみられ, 約 32 時間目でその発現はピークに達し, その後 48 時間までの間に徐々に低下した (Fig. 1A). 統計解析 (one-way ANOVA) ではこの発現変動に有意差 ($P < 0.05$) がある

ことが示された. 次にトポIのプロモーターにリズム発現があることを確認するため Kronos を用いたプロモーター活性リアルタイム測定を行なった. この解析ではトポIプロモーター活性のピークがデキサメサゾン添加の約 30 時間後にみられ, RNA リズムのピークより約 2 時間早く活性のピークが出現することが示された (Fig. 1B). これら 2 種類の解析により, トポI発現には細胞レベルで概日リズムがあること, このリズムはグルココルチコイドの変動とは独立のものであることが明らかとなった⁷⁾.

トポIのプロモーター領域配列の解析

マウスのトポIプロモーター領域をゲノムデータベースより抽出し, 転写因子結合部位を MatInspector (Genomatix) を用いて解析したところ, 2 箇所の E-box (E1: CACGTG, E2: CAAGT) と 1 箇所の D-box があることが明らかになった. これらの時計遺伝子結合配列^{8,9)}のうち, E2, D-box は転写開始点より下流のエクソン 1 に存在していた (Fig. 2A, B). マウスのトポIプロモーター領域をヒトの同領域と比較すると, E1, E2 および D-box の配列は両種で 100% 一致することが示され, 時計遺伝子結合配列は極めて高く保存されていることが明らかになった (Fig. 2C). リアルタイムプロモーター活性の測定解析の結果を合わせると, この領域は強いプロモーター活性を示すとともに, リズム発現のための必要かつ十分な領域も含まれていることが裏付けられた.

E-boxおよびD-boxはトポIのリズム発現に必要である

トポIのプロモーター領域にある E-box (E1, E2) および D-box が, 概日リズム性発現に関与していることを確認するため, これらの配列に変異を導入したプロモーターを 5 種類 (E1, E2, D, E1/E2, E1/D, E1/E2/D-box) 作成した. E1, E2 および D-box の各 1 箇所に変異を導入したプロモーターでは, E2 および D-box の

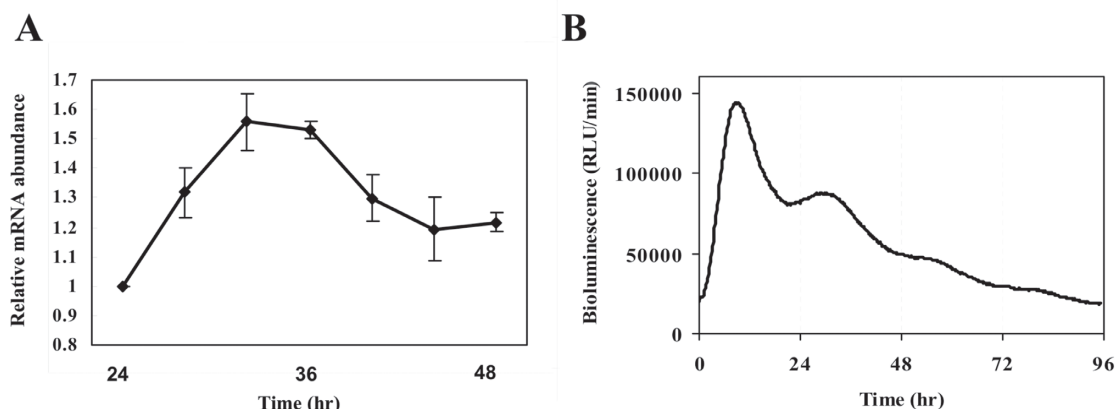


Fig. 1. NIH3T3細胞におけるトポイソメラーゼI (トポI) の発現. (A) トポIのRNA発現レベルをリアルタイムPCRによって解析した. RNAはデキサメサゾン刺激24時間後に4時間毎に細胞から抽出し, トポI RNAを定量した. エラーバーは標準偏差を示す. リズム性発現は, 継続的にサンプリングしたデータをone-way ANOVAにより解析 ($P < 0.05$) した. (B) トポIプロモーターレポーターを NIH3T3 細胞にトランスフェクションし, クロノスによって10分間隔で継続的にプロモーター活性を計測した. 同調には 0.1 μ M デキサメサゾンを2時間添加した.

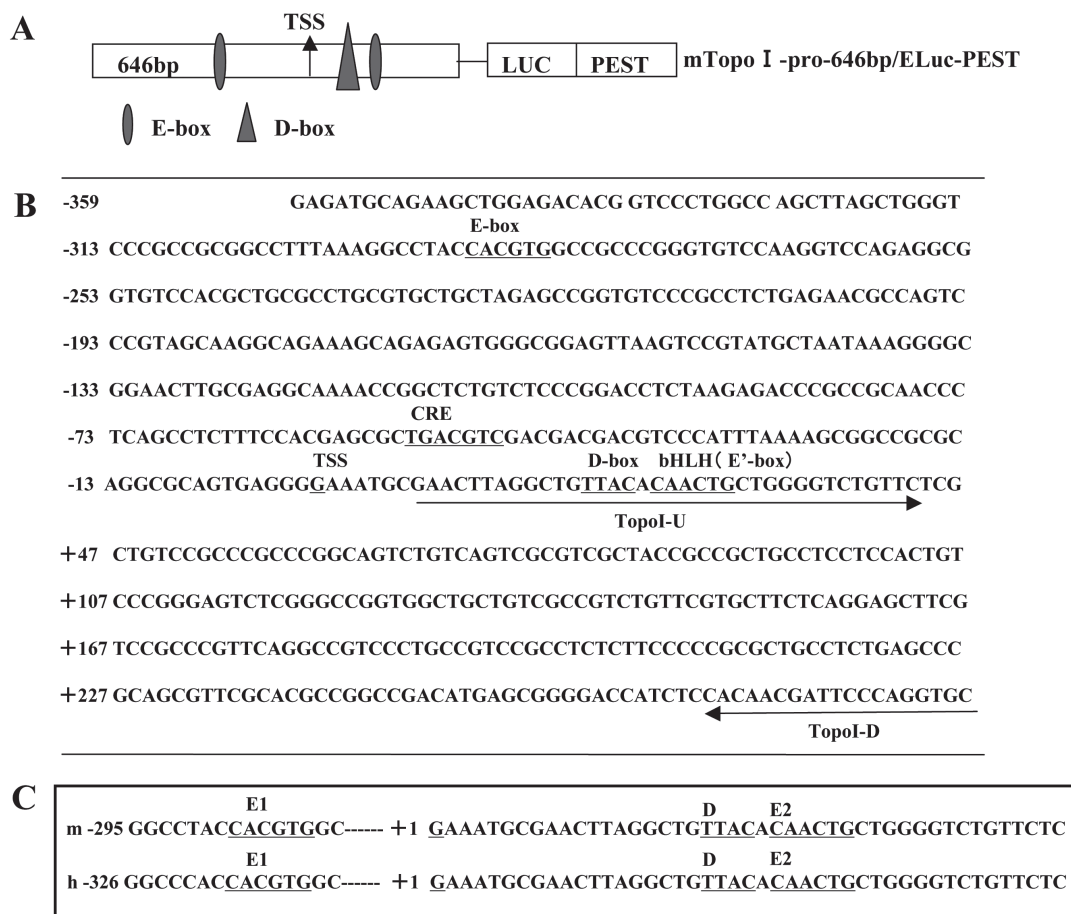


Fig. 2. マウス トポI プロモーターの構造と転写因子結合部位. (A) マウス トポI プロモーター構造の模式図. マウス トポI のプロモーター配列はマウスゲノムDNAを鋳型にしてPCR によって得た. PCR断片はTA法によりレポーターベクター (ELuc-PEST-T-vector) に導入した. 646bpの配列には2箇所のE-box (E1, E2) とD-boxがあることがMatInspector による解析から示された. (B) マウス トポI プロモーター領域の塩基配列と転写因子結合部位. マウス トポI プロモーターにはE-box, D-box を始めCREがあることが示された. E2, D-box は転写開始点 (TSS) より下流のエクソン1に存在する. (C) マウスとヒトのトポI プロモーター領域の比較. E-box (E1, E2) とD-boxの配列, 位置および周辺配列が両者間で極めて保存されている.

変異体で60%以上の振幅の低下が見られた. これに対してE1の変異では大きな低下はなく, リズム発現にはE2およびD2が主に関与していることが示唆された (Fig. 3). 時計遺伝子結合配列に2箇所以上変異を導入したコンストラクト (E1/E2, E1/D, E1/E2/D-box) は著しく振幅が低下した (Fig. 3). 以上の結果よりリズム発現にはE2およびD-boxの両者が協調的に機能してプロモーターレベルでリズム性の転写発現制御を行っていることが示された.

トポIはCLOCK/BMAL1ヘテロダイマーおよびDBPによって転写活性化される

時計遺伝子による転写制御を確認するため, ルシフェラーゼアッセイによってトポIプロモーターがCLOCK/BMAL1 およびDBPによって転写制御を受ける可能性を検索した. NIH3T3細胞にトポIプロモーターレポーターコンストラクトとCLOCK/BMAL1あるいはDBP発現コンストラクトを同時にトランス

フェクションし, ルシフェラーゼ活性を測定したところ, CLOCK/BMAL1のトランスフェクション量依存的にレポーター活性の増加がみられた (Fig. 4A). またDBPも同様にトポIプロモーターレポーターの活性を増加させた (Fig. 4A). 以上より, トポIは時計遺伝子CLOCK/BMAL1およびDBPによって転写が増加することを確認した.

CLOCK/BMAL1およびDBPはそれぞれE1およびD-boxに結合する

トポIのプロモーター領域にある時計遺伝子結合配列E1, E2およびD-boxに時計遺伝子産物が結合することを確認するため, ゲルシフト法で解析した. 時計遺伝子産物は網状赤血球ライゼートの系で合成し, トポIのプロモーター領域由来のE1, E2およびD-box配列に対する時計遺伝子産物の結合を検討した. CLOCK/BMAL1はE2に対してはバンドシフトが見られたが, E1に対しては結合はみられなかった (Fig. 4B). E1,

E2 変異体を用いたクロノスによるリズム解析において、E1 変異体では殆ど振幅変化が見られなかったことを考え合わせると、E1 配列はBMAL1/CLOCKが結合してリズム発現調節を行なっている可能性は極めて低いことが示唆された。これに対してE2, D-boxにはCLOCK/BMAL1, DBPがそれぞれ結合する結果が得られ、クロノスによる変異体の解析によってE2, D-box変異が振幅を著しく低下させた結果と合わせると、トポIはプロモーター領域にあるE2, D-boxを介して、時計遺伝子CLOCK/BMAL1, DBPによってリズム発現していることが強く示唆された。

概日リズムは*Clock*, *Bmal1*, *Per*, *Cry*によって構成される転写、翻訳からなるネガティブフィードバック機構によって、作り出されていると考えられている^{8,9)}。生体内で概日リズム性発現する遺伝子は、時計遺伝子によって直接転写制御を受けることによってリズム発現するものと、副腎皮質ホルモンの濃度変化に応答してリズム発現するものの2種類に大きく分けられるとされている⁷⁾。本研究からトポIは細胞レベルでリズム発現すること、プロモーターがNIH3T3細胞で自律的にリズム発現すること、変異体の実験からプロモーター領域にあるE2, D-boxを介して時計遺伝子によるリズム発

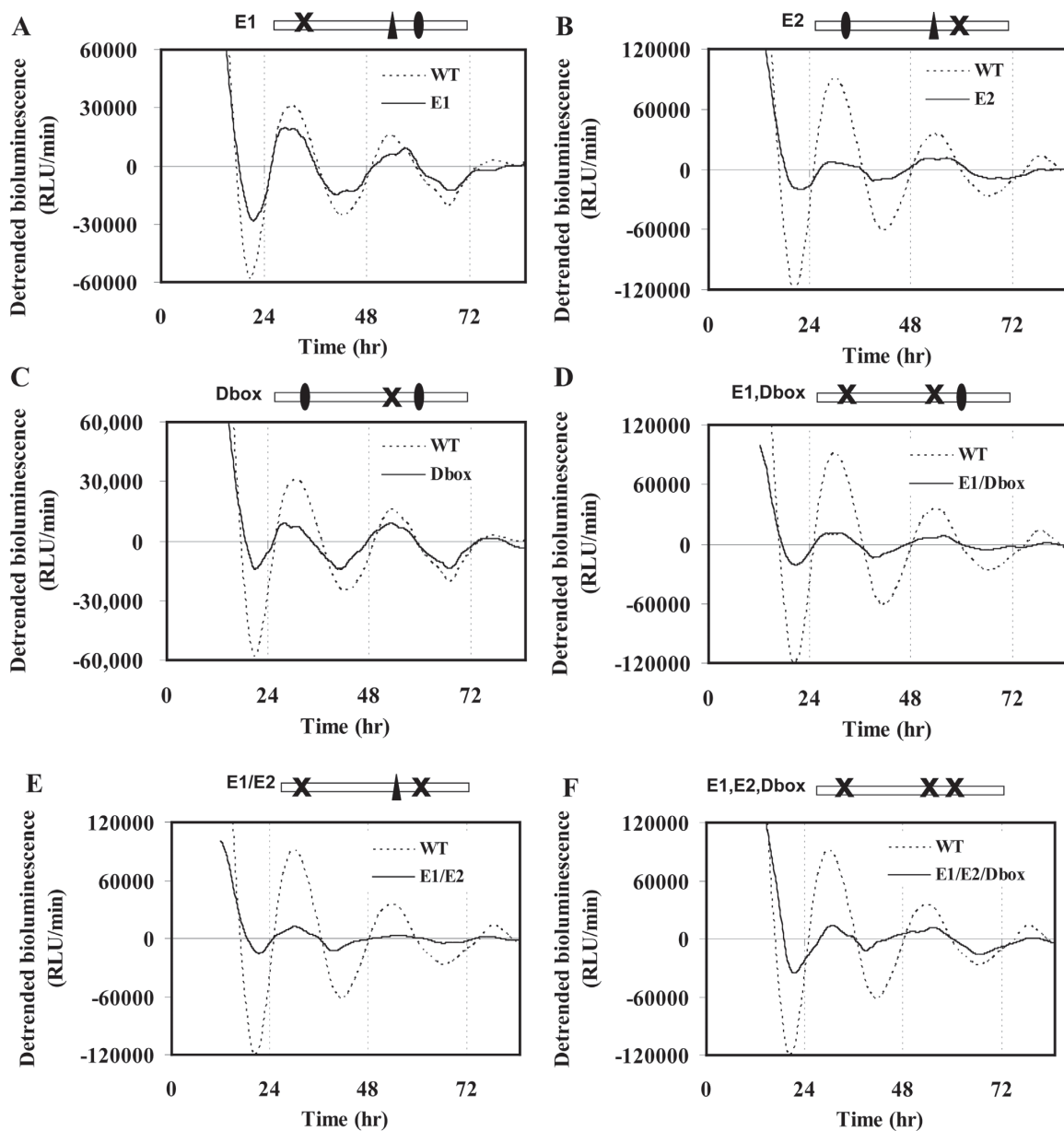


Fig. 3. リアルタイムレポーター活性測定によるトポIプロモーターの概日リズム性転写活性変動とE, D-boxの関与。NIH3T3細胞にトポIプロモーターベクターをトランスフェクションし、デキサメサゾンによる同調刺激を加えた後、クロノス(Kronos)によりリアルタイムでレポーター活性を測定した。プロモーター領域にあるE1, E2 およびD-boxは変異導入を行い、変異体を作成してリズム発現を解析した。A; E1変異体, B; E2変異体, C; D-box 変異体, D; E1/D-box 変異体, E; E1/E2 変異体, F; E1/E2/D-box 変異体。

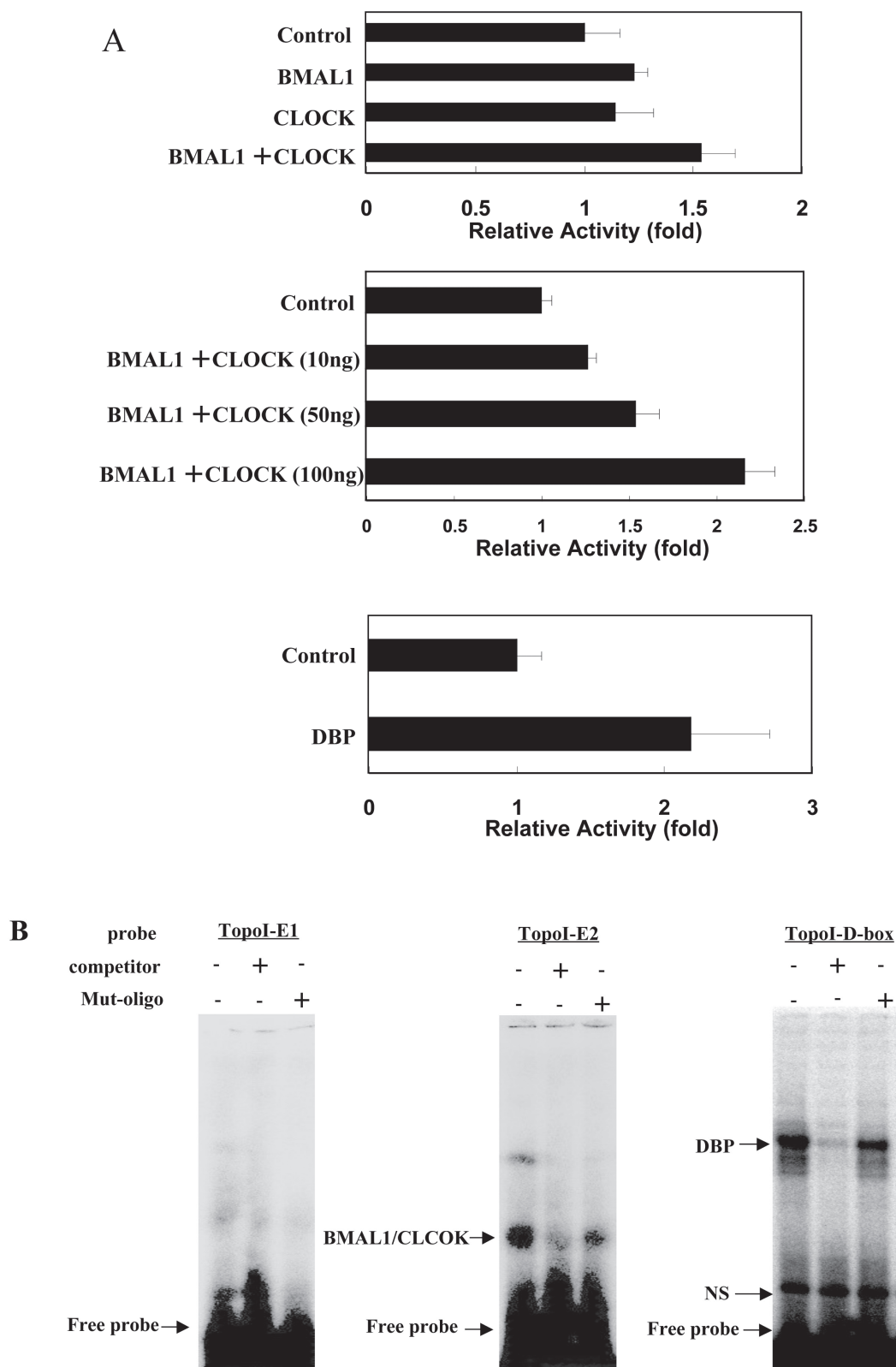


Fig. 4. トポIプロモーターはBMAL1/CLOCK, DBPによって転写制御される。(A) ルシフェラーゼアッセイによるトポIプロモーターのBMAL1/CLOCK, DBPによる転写調節の解析。BMAL1/CLOCK発現ベクターのトランスフェクション量に依存して転写活性化が起こる。DBPによって約2倍の転写活性化が見られる。(B) ゲルシフトアッセイによるBMAL1/CLOCK, DBPのトポIプロモーター内に存在する時計遺伝子結合候補配列への結合実験。BMAL1/CLOCKはE2に結合するがE1配列には結合能が見られない。また、DBPはD-boxに特異的に結合する。

現制御を受けていることが明らかになった。カンプトテシンはトポI活性の高い腫瘍細胞で感受性が高いことが知られており、正常細胞と腫瘍細胞においてトポIのリズム発現位相が異なる場合は、腫瘍細胞における発現のピークに薬物を投与することで薬物への感受性が高く、正常細胞に対する影響を最小にすることが可能である¹⁰⁻¹³⁾。今後は種々の腫瘍と正常細胞・臓器との間のトポI位相の相違、カンプトテシン感受性の概日リズムを解析し、腫瘍に対する時間治療を確立するための分子基盤を確立していく予定である。

結 語

トポIは細胞レベルでリズム発現すること、プロモーターがNIH3T3細胞で自律的にリズム発現すること、変異体の実験からプロモーター領域にあるE2, D-boxを介して時計遺伝子によるリズム発現制御を受けていることが明らかになった。トポIの概日リズム性発現の分子機構が明らかになったことから、トポIを標的としているカンプトテシンなどの抗がん剤による時間治療について、分子レベルでの理解が進む可能性がある。

謝 辞

本研究の多くは埼玉医科大学ゲノム医学研究センタープロジェクト研究部門分子時計プロジェクトで実施された。実験施設と機器を提供していただいたゲノム医学研究センターの皆様へ感謝します。本研究は平成20年度学内グラントにより支援を受けて実施された。

文 献

- 1) Liu LF. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annu Rev Biochem* 1989;58: 351-75.
- 2) Ohdo S, Makinosumi T, Ishizaki T, Yukawa E, Higuchi S, Nakano S, et al. Cell cycle-dependent chronotoxicity of irinotecan hydrochloride in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;283:1383-8.
- 3) Kuramoto Y, Hata K, Koyanagi S, Ohdo S, Shimeno H, Soeda S. Circadian regulation of mouse topoisomerase I gene expression by glucocorticoid hormones. *Biochem Pharmacol* 2006;71:1155-61.
- 4) Filipinski E, Lemaigre G, Liu XH, Mery-Mignard D, Mahjoubi M, Levi F. Circadian rhythm of irinotecan tolerability in mice. *Chronobiol Int* 2004;21:613-30.
- 5) Kunze N, Klein M, Richter A, Knippers R. Structural characterization of the human DNA topoisomerase I gene promoter. *Eur J Biochem* 1990; 194:323-30.
- 6) Baumgartner B, Heiland S, Kunze N, Richter A, Knippers R. Conserved regulatory elements in the type I DNA topoisomerase gene promoters of mouse and man. *Biochim Biophys Acta* 1994;1218:123-7.
- 7) Oishi K, Amagai N, Shirai H, Kadota K, Ohkura N, Ishida N. Genome-wide expression analysis reveals 100 adrenal gland-dependent circadian genes in the mouse liver. *DNA Res*. 2005;12:191-202.
- 8) Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, et al. CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*. 1998;280:1564-9.
- 9) Ueda HR, Hayashi S, Chen W, Sano M, Machida M, Shigeyoshi Y, et al. System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat Genet*. 2005;37:187-92.
- 10) Lévi F. The circadian timing system, a coordinator of life processes. implications for the rhythmic delivery of cancer therapeutics. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2006;Suppl:6736-9.
- 11) Lévi F, Filipinski E, Iurisci I, Li XM, Innominato P. Cross-talks between circadian timing system and cell division cycle determine cancer biology and therapeutics. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2007;72:465-75.
- 12) Qvortrup C, Yilmaz M, Ogreid D, Berglund A, Balteskard L, Ploen J, et al. Chronomodulated capecitabine in combination with short-time oxaliplatin: a Nordic phase II study of second-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer after failure to irinotecan and 5-fluorouracil. *Ann Oncol*. 2008 J;19:1154-9
- 13) Ohdo S. Circadian rhythms in the CNS and peripheral clock disorders: chronopharmacological findings on antitumor drugs. *J Pharmacol Sci*. 2007;103:155-8.

研究成果リスト

学会：

- 1) Yang F, Nakajima Y, Kumagai M, Ikeda M. The molecular mechanism regulating circadian rhythm of TopI expression in NIH3T3 cells.
第15回 日本時間生物学会学術大会 平成20年11月8-9日 岡山

原著：

- 1) Yang F, Nakajima Y, Kumagai M, Ohmiya Y, Ikeda M. The molecular mechanism regulating the autonomous circadian expression of Topoisomerase I in NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;380:22-7.