

博士論文（要約）

PCAF regulates HIF-1 activity at multiple steps

(PCAF は HIF-1 活性を多段階的に制御する)

倉田 遊

## 1.背景

低酸素誘導因子 (hypoxia-inducible factor; HIF) は、糖代謝、血管新生、造血などに関与する様々な遺伝子の発現を誘導し、低酸素への細胞応答を司る転写因子である。HIF は HIF- $\alpha$  と HIF- $\beta$  (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator; ARNT) の 2 つのサブユニットから構成され、両者は basic Helix-Loop-Helix-Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS) family に属する。HIF- $\alpha$  には 3 つのアイソフォーム (HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$ 、HIF-3 $\alpha$ ) が存在し、腎臓では HIF-1 $\alpha$  は主に尿細管上皮細胞で発現し、HIF-2 $\alpha$  は内皮細胞や間質線維芽細胞に発現している。HIF- $\alpha$  は酸素感受性があり、その発現は主に prolyl hydroxylase domain-containing protein (PHD) によって制御されている。正常酸素下では PHD により HIF- $\alpha$  の 2 つのプロリン残基が水酸化され、水酸化された HIF- $\alpha$  は、ユビキチン E3 リガーゼ複合体の構成要素である von Hippel-Lindau protein (pVHL) に認識され、ユビキチン化およびプロテアソーム分解を受ける。一方、PHD による HIF- $\alpha$  の水酸化には酸素を必要とするため、低酸素下では HIF- $\alpha$  は水酸化を免れ、細胞内に蓄積する。蓄積した HIF- $\alpha$  は核内に移動し、ARNT とヘテロ二量体を形成する。このヘテロ二量体は hypoxia response element (HRE) に結合し、転写コアクチベーターである CBP/p300 が HIF- $\alpha$  の C-terminal transactivation domain (CTAD) に誘導され、標的遺伝子の転写を促進する。

腎臓は心拍出量の 20-25% を受ける血流豊富な臓器であるが、動静脈シャントの存在により、その血液供給に対して酸素取り込み効率が相対的に低く、生理的に低酸素状態にある。さらに、慢性腎臓病 (chronic kidney disease; CKD) の進行は、糸球体硬化、毛細管周囲菲薄化、貧血などによる酸素供給量の減少により低酸素状態を増悪させる。一方で、慢性低酸素は、腎尿細管上皮細胞や内皮細胞のアポトーシス、線維芽細胞の活性化などを介して、CKD を進行させる。この悪循環は、末期腎疾患 (end-stage kidney disease; ESKD) への進行を加速させる。また、CKD では、酸化ストレス、HIF の糖化修飾異常、尿毒症物質などの様々な要因により、低酸素の程度に対して HIF の活性化が不十分であることが報告されている。

p300/CBP-associated factor (PCAF) は、Gcn5-related N-acetyltransferase (GNAT) ファミリーに属する転写コアクチベーターであり、アセチルトランスフェラーゼ活性および E3 ユビキチンリガーゼ活性を有する。前述の CBP/p300 はヒストン H3, H4 をアセチル化する一方で、PCAF は H2A, H2B, H3, H4 をアセチル化する。ヒストンアセチル化により、クロマチン構造が緩み、遺伝子の転写が促進される。さらに PCAF は、ヒストンだけでなく p53 などの非ヒストン蛋白をアセチル化することが報告されている。近年、Lim らは、PCAF が HIF-1 $\alpha$  をアセチル化し、HIF-1 $\alpha$  と p300 の相互作用を誘導することで HIF-1 転写活性を亢進させることを示した。さらに、山中らは、ESKD 患者の脂肪組織由来間葉系幹細胞において、PCAF の発現が減少しており、さらに HIF-1 および HIF-1 の標的遺伝子の一つである vascular endothelial growth factor (VEGF) の低酸素応答が抑制されていることを報告している。これらの結果から、PCAF が HIF-1 活性の調節に重要な役割を果たしてお

り、CKD 患者の HIF-1 活性の低下と関連している可能性が示唆された。しかし、PCAF が腎臓の HIF-1 活性に及ぼす影響は十分に解明されておらず、本研究では腎臓における PCAF と HIF-1 の関係を検討した。

## 2. 結果

ラットの腎臓における PCAF の発現を免疫組織化学染色により評価したところ、PCAF は主に尿細管細胞の核に発現していた。さらに片側虚血再灌流腎障害モデルラットの腎臓において、PCAF の発現が増加することを免疫組織化学染色およびウエスタンブロットにより確認した。

ヒトの尿細管細胞の細胞株である HK-2 を用いて、siRNA により PCAF のノックダウン (KD) を行った。低酸素下において、PCAF KD により、HIF-1 $\alpha$  の mRNA 発現量が増加した一方で、蛋白質発現量は減少した。また、HIF-1 $\alpha$  の標的遺伝子の一つである VEGF の mRNA 発現量は、PCAF KD により減少した。さらに、HIF-1 の転写活性を HRE-luciferase reporter assay (HRE-luc) により評価したところ、PCAF KD により、HRE-luc 活性が低下した。以上より、PCAF は、転写以降の段階において、HIF-1 活性を制御すると考えられた。

次に、Gal4-responsive element-driven luciferase reporter assay (GRE-luc) により、HIF-1 $\alpha$  の蛋白質発現量に依存しない転写活性を評価した。HK-2 および、ヒト子宮頸癌由来の細胞株である HeLa 細胞に対して、GRE luciferase reporter vector、Gal4 DNA binding domain (DBD)-fused HIF-1 $\alpha$  TAD vector をトランスフェクションし、HIF-1 の転写活性を評価した。2,2'-Bipyridyl による化学的低酸素下において、PCAF を KD したところ、GRE-luc activity が減少した。pCI-flag-PCAF プラスミドを鋳型として、HAT ドメイン・E3 ドメインをそれぞれ削除した PCAF $\Delta$ HAT、PCAF $\Delta$ E3 を作成し、HeLa 細胞にトランスフェクションした。PCAF、PCAF $\Delta$ E3 の過剰発現では GRE-luc activity が増加した一方で、PCAF $\Delta$ HAT では増加を認めなかった。以上より、HIF-1 の転写活性制御には PCAF の HAT ドメインが関与していると考えられた。

次に、HIF-1 の標的遺伝子発現への PCAF の関与を網羅的に検討するため、マイクロアレイ解析を行った。HK-2 を用いて、グループ 1 (正常酸素、コントロール)、グループ 2 (低酸素、コントロール)、グループ 3 (正常酸素、PCAF KD)、グループ 4 (低酸素、PCAF KD) の 4 群に分類し、各遺伝子発現を比較した。まず、グループ 1 とグループ 2 を比較し、低酸素により発現が誘導された 136 遺伝子 (低酸素誘導遺伝子群) を同定した。次に、この低酸素誘導遺伝子群を用いて、グループ 2 とグループ 4 を比較し、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を行った。その結果、低酸素誘導遺伝子群は、有意に多くグループ 2 で発現していた。また、Gene Expression Omnibus (GEO) データベース内のマイクロアレイデータセット (GSE99324) を用いて、低酸素下の HK-2 細胞に対して HIF-1 $\alpha$  を KD した際に発現が減少した 78 遺伝子 (HIF-1 $\alpha$  依存性遺伝子群) を同定した。同様にグル

ープ2とグループ4を比較し、GSEAを行ったところ、この遺伝子群は、有意に多くグループ2で発現していた。以上より、PCAFはHIF-1標的遺伝子の発現を全体的に制御することが示唆された。

次に、PCAFがHIF-1転写活性を制御する他の機序を検討するため、HIF-1 $\alpha$ の結合相手であるARNTと、PCAFの関係を評価した。HK-2細胞において、PCAF KDはARNTのmRNAおよび蛋白質発現量を減少させた。また免疫沈降法により、HIF-1 $\alpha$ -ARNT結合がPCAF KDにより減少することを示した。続いて、ARNTの発現がHIF-1依存적であることが他の細胞種において報告されており、HK-2細胞でも同様にHIF-1がARNTの発現に関与しているかどうかを検討した。HIF-1 $\alpha$ をKDしたところ、ARNTのmRNAおよび蛋白質発現量が減少した。HIF-1 $\alpha$  KDはPCAFのmRNA、蛋白質発現量に影響を与えておらず、PCAFのARNTへの影響はHIF-1 $\alpha$ を介していると考えられた。

最後に、PCAFのAhR/ARNTシグナルへの関与を検討した。ARNTはAhRの結合相手でもあり、AhR-ARNT複合体はxenobiotic response element (XRE)に結合することで生体異物代謝に関わる遺伝子群の転写調節を行う。代表的な尿毒素であるインドキシル硫酸 (indoxyl sulfate; IS)は、AhRの内因性リガンドの一つである。HK-2細胞において、PCAF KDは、IS存在下でARNT mRNAレベルを減少させたが、AhR-ARNTシグナルの標的であるCYP1A1, CYP1B1のmRNA発現量を変化させなかった。また、XRE luciferase reporter assay (XREluc)を用いて転写活性に与える影響を検討したが、PCAF KDはXREluc活性に影響を与えなかった。

### 3. 結語

本研究では、腎臓において、PCAFがHIF-1活性を多段階的に制御することを明らかにした。この結果は、腎不全患者におけるHIF-1活性の低下にPCAFが関与しているという仮説を支持するものである。しかし、末期腎不全患者の腎臓におけるPCAFの発現変動やそのメカニズムについては十分に評価されておらず、今後さらに検討する必要がある。