

## タウリンの代謝と生理機能の解析に関する研究：IL-1 $\beta$ によるシステインジオキシゲナーゼ遺伝子のダウンレギュレーション

細川 優<sup>1)</sup>, 梶田 泰孝<sup>1)</sup>, 谷河 精規<sup>2)</sup>, 戸谷 誠之<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup> 国立健康栄養研・母子栄養\*, (<sup>2)</sup> 島根医大・第二生化\*\*)

### IL-1 $\beta$ -induced down-regulation of cysteine dioxygenase gene

Yu HOSOKAWA<sup>1)</sup>, Yasutaka KAJITA<sup>1)</sup>, Yoshinori TANIGAWA<sup>2)</sup> and Masayuki TOTANI<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> *Division of Maternal and Child Health Science, National Institute of Health and Nutrition*

<sup>2)</sup> *Department of Biochemistry, Shimane Medical University*

Cysteine dioxygenase (CDO) catalyzes the first step reaction of L-cysteine metabolic pathway. This enzyme regulates taurine synthesis in mammals. A dose-dependent decrease in CDO mRNA level was observed by treatment of HepG2 cells with IL-1 $\beta$ . The CDO mRNA level decreased after 2h and reached a minimum at 6h - 16h after the IL-1 $\beta$  treatment. H7 completely blocked the IL-1 $\beta$ -induced down-regulation of CDO gene. HA-1004 also blocked the down-regulation only minimally. These results suggest that the protein kinase C (PKC) mediated signaling pathway may act mainly in the IL-1 $\beta$ -induced down-regulation of CDO gene. In contrast, treatment of HepG2 cells with each of cycloheximide or anisomycin increased the CDO mRNA level. The IL-1 $\beta$ -induced down-regulation of CDO gene was also observed in the cells treated with each of cycloheximide or anisomycin. These results suggest that the two independent regulatory mechanisms may exist in the regulation of CDO gene.

タウリンは、哺乳動物体内に最も多く含まれる遊離の含硫アミノ酸で、胆汁酸の抱合、浸透圧の調節、細胞内へのCa<sup>2+</sup>流入の調節作用などは古くから知られている。近年、タウリンの作用も分子レベルで解析され、アポトーシスの抑制<sup>1),2)</sup>、細胞増殖の抑制<sup>3)</sup>あるいは遺伝子発現の調節作用<sup>4)</sup>などが明らかになっている。我々は、ヒトでのタウリン代謝を明らかにする目的で、タウリン合成の律速酵素であるシ

---

\*所在地：新宿区戸山1-23-1 (〒162-3686)

\*\*所在地：出雲市塩治町89-1 (〒693-8501)

ステインジオキシゲナーゼ (CDO) の遺伝子を単離し、その構造を解析するとともに、ヒト肝癌由来培養株 HepG2 を用いて発現調節の解析を試みた<sup>5)</sup>。その結果、CDO 遺伝子は phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) の添加で3時間後から強いダウンレギュレーションを受ける現象を認めている。本研究では、ヒト CDO 遺伝子が IL-1 $\beta$  によってもダウンレギュレーションを受け、そのシグナル伝達にプロテインキナーゼ C (PKC) が関与する可能性を認めたので報告する。

## 実験方法

### 細胞と培養

ヒト肝癌由来培養株 HepG2 細胞 (ATCC HB-8065) は、10%牛胎児血清を含む DMEM 培地でコンフルエントになるまで培養後、実験に用いた。

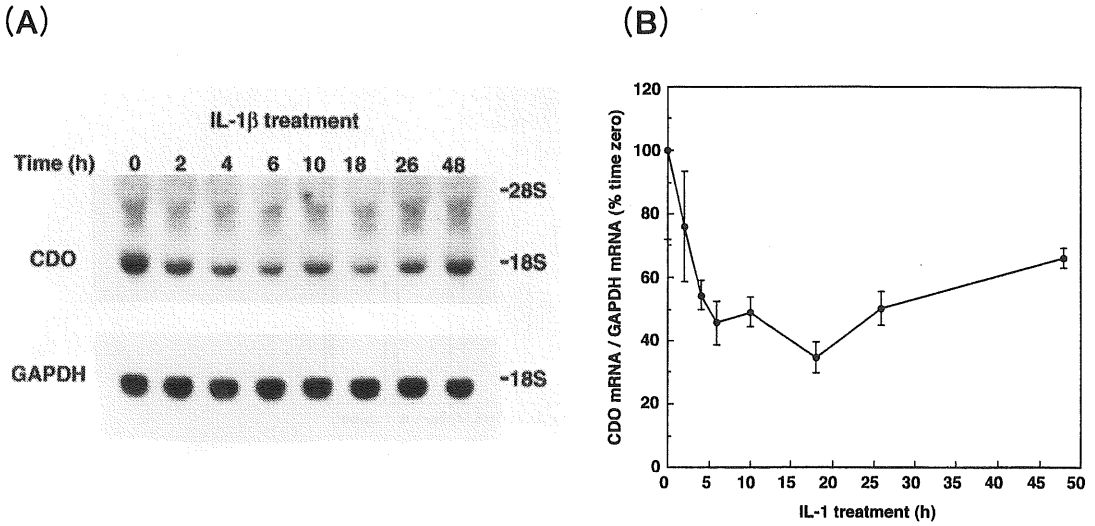
### ノーザン解析

AGPC (Acid Guanidium-Phenol-Chloroform) 法<sup>6)</sup> で粗 RNA を調製した。粗 RNA 15  $\mu$ g をホルムアルデヒドを変性試薬とした 1% アガロース電気泳動で分離後、ナイロンフィルターに転写した。ハイブリダイズとフィルター洗浄の条件、および用いたプローブの調製は前報<sup>5)</sup> の通りである。

## 結果と考察

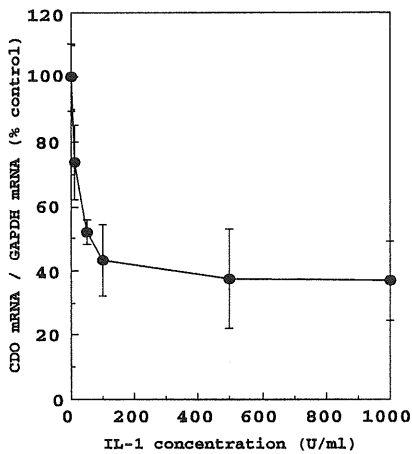
ラット肝臓 CDO 活性は、ハイドロコチゾンの注射で上昇し、グルカゴンあるいはジブチル cAMP の注射で著しく低下する。HepG2 細胞では、デキサメサゾンあるいはジブチル cAMP を添加しても、CDO mRNA レベルに変化は観察されなかった。しかし、PKC の活性化剤である PMA の添加で、CDO mRNA レベルは著しく低下することから、CDO には PKC を介する調節機序が存在すると推定している。IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの肝臓におけるシグナル伝達には、プロテインキナーゼが関与することが示唆されている<sup>7)</sup>。これらのサイトカインを添加して、CDO mRNA レベルの変化を経時的に検討した。IL-6、TNF- $\alpha$  の添加では CDO mRNA に変化は認められなかった。しかし、400 units/ml の IL-1 $\beta$  を添加すると CDO の mRNA は 2 時間後から低下し始め、6 時間から 18 時間にかけて最低になった後に徐々に上昇した (図 1)。IL-1 $\beta$  の効果は PMA に比べて持続的で、48 時間後でも対照レベルに比べて有意に低かった。また、IL-1 $\beta$  の作用は濃度依存的で、10 ng/ml から効果が認められ、100 ng/ml でほぼプラトーに達した (図 2)。IL-1 $\beta$  によるダウンレギュレーションの濃度依存性は、他の遺伝子で観察されている発現誘導の濃度依存性とほぼ同じであった。

次に、IL-1 $\beta$  による CDO mRNA の低下のシグナル伝達に、プロテインキナーゼが関与しているかを確かめるために、プロテインキナーゼ阻害剤の効果を検討した (図 3)。IL-1 $\beta$  による CDO のダウンレギュレーションは、PKC に特異性の高い H-7 (60  $\mu$ M) で完全に阻害された。H-7 の効果は濃度依存性であった。一方、プロテインキナーゼ A (PKA) に特異性の高い HA-1004 を 30  $\mu$ M の濃度で添加すると、CDO mRNA レベルは著しく低下した。従って、HA-1004 の効果を 15  $\mu$ M の濃度で検討したが、統計的に有意な IL-1 $\beta$  に対する阻害効果は見られなかった。以上の結果から、IL-1 $\beta$  で誘導される CDO mRNA の低下の機序には、PKC を介するシグナル伝達系が関与する可能性が強く示唆される。ラット肝臓 CDO 活



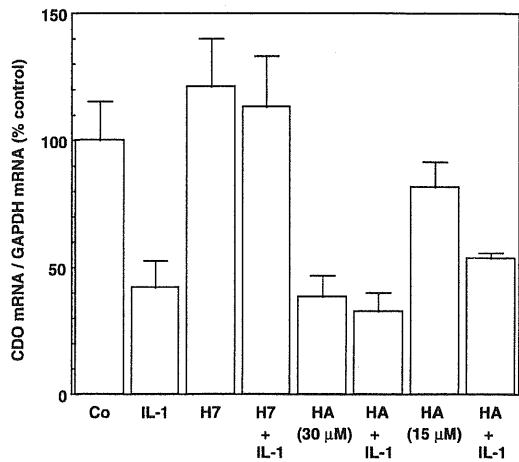
**Fig. 1** Time course of IL-1 $\beta$ -induced down-regulation of CDO mRNA

(A) HepG2 cells were treated with 400 units/ml of IL-1 $\beta$ . At the indicated time, cells were harvested and total RNA were isolated. Total RNA (15 $\mu$ g) was analyzed by Northern blotting and subsequently hybridized with [<sup>32</sup>P] random prime labeled cDNA probes for human CDO and GAPDH. (B) The relative levels of CDO and GAPDH mRNA were determined by densitometry. The ratio of CDO/GAPDH mRNA levels in control (time zero) is referred to 100%. The values represent means  $\pm$  SD from four independent experiments.

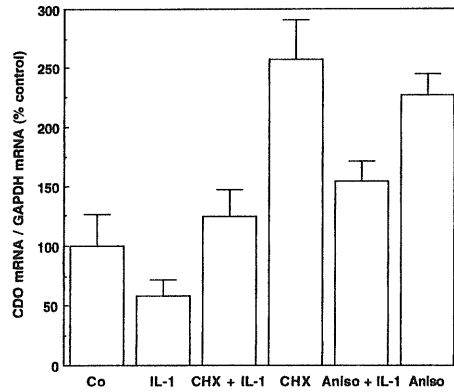


**Fig. 2** Dose-dependence of the down-regulation of CDO gene by IL-1 $\beta$

HepG2 cells were treated with increasing amounts of IL-1 $\beta$  for 9h.



**Fig. 3** Effect of protein kinase inhibitors on the IL- $\beta$ -induced down-regulation of CDO gene  
HepG2 cells were treated with 400 units/ml of IL-1 $\beta$  for 12 h with or without either H7 (60 $\mu$ M) or HA-1004 (HA, 15 or 30 $\mu$ M).



**Fig. 4** Effect of protein synthesis inhibitors on the IL-1 $\beta$ -induced down-regulation of CDO gene

HepG2 cells were treated with 400 units/ml of IL-1 $\beta$  for 14h with or without either cycloheximide (CHX, 40 mg/ml) or anisomycin (Aniso, 30  $\mu$ M). CHX or Aniso was added 30 min prior to the addition of IL-1 $\beta$ .

性は、細胞内cAMPの上昇を介して低下する<sup>8)</sup>と推定されている。HepG2では $10^{-3}$ MのジブチルcAMPを添加しても、CDOmRNAレベルは変化しないと考え合わせて、PKAを介する調節機序はない可能性が強い。

CDOmRNAの低下の時間経過は、新たなタンパク合成を必要としない初期遺伝子の発現誘導<sup>8)</sup>と比べて遅いことから、転写因子の合成を介する二次的な現象である可能性もある。次に、タンパク合成阻害剤の効果を検討した(図4)。意外なことに、シクロヘキシミドを添加すると、14時間後のCDOmRNAレベルは約2.5倍に上昇した。アニソマイシンの添加でも同様な誘導が見られた。シクロヘキシミドの添加30分後にIL-1 $\beta$ を添加すると、シクロヘキシミドの単独添加に比べて約50%に低下した。低下の度合いは、シクロヘキシミド無添加の場合とほぼ同じであった。アニソマイシンの添加では、IL-1 $\beta$ によりCDOmRNAレベルは68%に低下し、その程度はシクロヘキシミドに比べて小さかった。タンパク合成阻害剤でmRNAレベルが上昇する原因として、転写活性の上昇、mRNAの安定化あるいはその両方が関与する可能性がある。c-fos遺伝子では、タンパク合成阻害剤は転写レベルおよび転写後の修飾の過程で作用することが示唆されている<sup>9)</sup>。CDOの場合は今後の問題点である。また、シクロヘキシミドとアニソマイシンで、IL-1 $\beta$ によるCDOmRNAの低下の度合いが異なることから、CDOのダウンレギュレーションに新たなタンパク合成が必要である可能性は否定できない。しかし、少なくともタンパク合成阻害剤による誘導とIL-1 $\beta$ によるダウンレギュレーションに関与するシグナル伝達は異なると考えられ、詳細は今後の検討課題である。

文 献

- 1) William, R., G. Watson, H.P. Redmond, J.H. Wang and D. Bouchier-Hayes (1996) *J. Leukoc. Biol.* 60 : 625-632
- 2) Wang, J.H., H.P. Redmond, R.W.G. Watson, C. Condron and D. Bouchier-Hayes (1996) *Shock* 6 : 331-338
- 3) Zhang X., T.E. Tenner and J.B. Lombardini (1999) *Biochem. Pharmacol.* 57 : 1331-1339
- 4) Gurujeyalakshmi, G., S.N. Iyer, M.A. Hollinger and S.N. Giri (1996) *J. Pharmacol. Exp. Thera.* 277 : 1152-1157
- 5) Tsuboyama-Kasaoka, N., Y. Hosokawa, H. Kodama, A. Matsumoto, J. Oka and M. Totani (1999) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63 : 1017-1024
- 6) Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987) *Anal. Biochem.* 162 : 156-159
- 7) Faquin, W.C., T.J. Schneider and M.A. Goldberg (1992) *Blood* 79 : 1987-1994
- 8) Hosokawa, Y., K. Yamaguchi, N. Kohashi, N. Kori and I. Ueda (1978) *J. Biochem.* 84 : 419-424
- 9) Greenberg, M.E., A.L. Hermanowski and E.B. Ziff (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6 : 1050-1057