◆ 総 説 ◆

ハイポキシアで活性化される転写因子 Hypoxia-inducible factor 1 による 転写調節機構

十 川 和 博*

Transcriptional Regulatory Mechanism by the Transcription Factor,
Hypoxia-Inducible Factor 1, Activated in Hypoxia

Kazuhiro SOGAWA*

Key words: Arnt, heterodimer, PAS domain, basic-helix-loop-helix domain

はじめに

酸素はミトコンドリアの電子伝達系において、電子の最終的な受容体として働き、すべての高等動物の生命の維持に必須である。もし酸素分圧が低下したならば、それに適応するために生体はいろいろなレベルで応答する。遺伝子レベルにおいても、一群の遺伝子が活性化されるが、その転写調節機構は長い間不明であった。しかし、1995年に Semenza と Wang らによって酸素分圧の低下によって活性化される転写因子、Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) の cDNA がクローニングされた結果、ようやく分子レベルでの誘導機構の解析が可能となった¹⁾。HIF-1 はヘテロダイマー (HIF-1 α と HIF-1 β) であり、大きいサブユニットである HIF-1 α は、ハイポキシアに直接関与する新規の因子であったが、HIF-1 β は既知のタンパク質であり、外来異物をリガンドとして結合した Ah リセプター (AhR) とヘテロダイマーを形成し転写を活性化する、Arnt (Ah receptor

nuclear translocator) と同一のタンパク質であった。AhR はシトクローム P-450 をはじめとする薬物代謝の酵素の誘導をつうじてメチルコランズレン、ベンツピレンといった外来異物である芳香族炭化水素の代謝、発がん活性化に、またダイオキシンやジベンゾフラン類の毒性発現に、中心的役割を果たしている受容体型転写因子である²⁾。われわれは、以前から AhR と Arnt 複合体による誘導的転写調節機構を研究してきたが、低酸素によるストレスに応答する転写因子 HIF-1 が、外来異物によるストレスに応答する転写因子と共通のサブユニットをもつこと、また AhR, Arnt, HIF-1 α が、一次構造上類似性があり、同じ遺伝子ファミリーに属していることに興味をもち、ハイポキシアでの遺伝子調節機構について研究をはじめた。

HIF-1 を中心とする低酸素応答系の分子機構の研究は、まだ始まったばかりであり不明な点も多いが、この総説では HIF-1 α とその類似因子 HLF (HIF-1 α like factor, 別名 EPAS 1, HIF-2 α) の構造上の特徴をはじめとして、この

* 東北大学大学院理学研究科 [〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉]

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University, [Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan.]

図1 模式的に表した PAS タンパク質の構造
PAS; PAS ドメイン, bHLH; ベーシック-ヘリックス-ループ-ヘリックスドメイン, Q; グルタミンリッチ領域

二つの転写因子によって誘導される遺伝子, またあまりよく分かっていない低酸素シグナルの伝達機構について, 現在までの知見を述べることにする. 酸素センシング機構とハイポキシアに対する適応は高等動物に限られた現象ではなく, バクテリアや酵母のような微生物でも存在する普遍的生理現象であるが, この総説では, 高等動物でのハイポキシアに対する遺伝子調節機構に話題を限定させていただくことにする.

HIF-1 と HLF の構造

HIF-1 は, エリスロポエチンを低酸素依存的に発現する, ヒト肝がん由来の培養細胞である, Hep3B 細胞で見出された. その後, 種々の細胞に普遍的に発現している因子であることが分かり, 最終的に HeLa 細胞から分離, 精製された. 精製された HIF-1 は 2 つのサブユニットから

できていることが分かり, 分子量の大きいサブユニット (120 kD) が HIF-1 α と, 小さいサブユニット (91, 93, 94 kD) が, HIF-1 β と名づけられた¹⁾. HIF-1 β (Arnt) は AhR や, 中枢神経系の発生に必要な Sim に共通したパートナー分子であるので, HIF-1 α が低酸素応答に直接関係した因子であることが推定された. 図1に HIF-1 α , Arnt をはじめとするいくつかの転写因子の構造を模式的に示した. period 遺伝子をのぞいて, 共通して basic-helix-loop-helix (bHLH) ドメインと PAS ドメインと名づけられた構造単位が存在する. HLH ドメインは多くの転写因子に見られるドメイン構造で, 例えば c-myc や myoD のような細胞の分化や増殖などの重要な機能に直接関与するファクターに見出されている. それらの二量体形成に必要なドメインとして機能している. またその N 末端側に存在する塩基性アミノ酸に富んだベーシッ

	basic sequence	
HIF-1 α	KEKSRDAARSRR	
HLF	KEKSRDAARSRR	
Trh	KEKSRDAARSRR	
Arnt	RENHSEIERRRR	
AhR	EGIKSNPSKRHR	
Sim	KEKSKNAARTRR	
c-Myc	RRTHNVLERQRR	
MyoD	RKAATMRERRRL	
HRE Arnt	A CGCAC G T C _R	HIF-1 α
XRE Arnt	CAC G CN A _T	AhR
CME Arnt	CAC G T AC _T T	Sim
E box Arnt	CAC G T G (CANNTG)	Arnt

図2 種々のPASタンパク質のベーシック配列とそれによって認識されるDNA配列

ク配列は、直接DNAを認識し結合する部位である。図2にそのアミノ酸配列と認識するDNA配列を示す。c-mycやmyoDの結合する、DNA塩基配列はEボックスと呼ばれ、更にいくつかに小分類されるが、原則としてCANNTGという対称構造をもっている。それに比べて、HIF-1 α 、AhR、Sim、Arntのベーシック配列は、Arntをのぞいてc-mycやmyoDとかなり異なっていて、認識される塩基配列も非対称構造となっている。

PASドメインはショウジョウバエ period 遺伝子産物 (PER)、ヒト Arnt、ショウジョウバエ sim 遺伝子産物 (SIM) に保存されたドメインとして名づけられた。260 から 300 アミノ酸からなり、ドメイン内に約 50 アミノ酸からなるそれほど強くは保存されていないが、ダイレクトリピート配列 (PAS A と PAS B) が存在する。PAS ドメインはさまざまな機能をもっているが、AhR と Arnt のヘテロダイマーで詳しく調べられた結果、二量体形成に必須であり、AhR ではリガンドとの結合、分子量 9 万の熱シ

ョックタンパク質 (HSP 90) との会合、DNA 結合活性への関与などが見出された²⁾。すべての PAS タンパク質のダイマー形成には、PAS ドメインと、HLH ドメインと両方が不可欠であると思われる。ただ PAS ドメインないでダイマー形成に必要な領域は PAS A 領域であることが指摘されている。PAS ドメインをもつ転写因子は遺伝子ファミリーを形成し、未発見のメンバーもまだかなりあるのではないかと考えられている。図3にいままで見出されてきた、PAS タンパク質の類縁関係を示す。HIF-1 α は通常 Arnt とヘテロダイマーを形成し転写を活性化すると考えられているが、最近 Arnt 3 (B-MAL 1, MOP 3) ともヘテロダイマーを形成し転写を活性化することが報告された³⁾⁴⁾。ショウジョウバエに HIF-1 α と構造が類似の因子が現在までに 2 種報告されている。Trh (tracheal-less) と Sima (similar) と名づけられたタンパク質のうち、Trh は発生過程における気管などのチューブ形成に重要な役割をもっている⁵⁾⁶⁾。Sima は HIF-1 α とより類似性が高く、HIF-1 α のショウジョウバエにおけるホモログと考えられるが、その生理機能はよく分かっていない⁷⁾。多くの PAS タンパク質は PAS ドメインの C 末端側に転写活性化ドメインや転写抑制ドメインが存在している。HIF-1 α について調べられた結果、分子の C 末端 83 アミノ酸残基中と中程に転写活性化ドメインが二カ所存在することが分かった^{8)~10)}。また、この転写活性化ドメインは転写のコアクティベーターである CBP/p 300 と相互作用することが報告されている¹¹⁾。HLF は HIF-1 α と一次構造上類似性が高く、とくに bHLH と PAS ドメインそれに C 末端の転写活性化ドメインが強く保存されている¹²⁾¹³⁾。HLF は HIF-1 α と同様 Arnt とヘテロダイマーを形成し、同じ DNA 結合特異性を示す。また転写活性化ドメインの性質もにている。しかしながら、HLF が発現している細胞は HIF-1 α の発現とかなり異なっており、HLF は肺で特に強く発現している。初期発生

図 3 PAS タンパク質の分子系統樹

Ahr, Ah リセプター; Trh, trachealess; Npas, Neuronal PAS domain protein; Sim, Single minded; Hif, hypoxia inducible factor; Hif, Hif-like factor; Epas, Endothelial PAS domain protein; Src, steroid receptor coactivator; Nrc, Nuclear receptor coactivator; Tif, transcriptional intermediary factor. h, human; m, mouse; r, rat; o, rabbit; f, trout; d, *D. melanogaster*; c, *C. elegans*.

過程でも肺では HIF-1 α に比べて非常に強く発現しており、その臓器形成、脈管系の形成に深く関与していると考えられている¹²⁾。

HIF-1 で活性化される遺伝子

ハイポキシアで誘導される遺伝子は古くから調べられ、多くの研究の蓄積がある。そのなかでもっとも著明で、またもっともよく研究されているのは、ハイポキシアでの酸素の輸送能力をあげるための赤血球産生の増加現象に関わる、エリスロポエチン (EPO) の誘導であろう。この誘導反応では、極端な低酸素状態において

EPO の血漿レベルが正常レベルの 1,000 倍にも達することが知られている。この増加は EPO mRNA の転写レベルでの誘導と、転写後の mRNA の安定化の二つの機構によって引き起こされる¹⁴⁾。主に腎臓で、少量は肝臓で誘導的に合成された EPO は骨髄の赤血球前駆細胞に働き、成熟赤血球に分化させる。このほかの適応現象として、酸素を必要としないエネルギー産生系である解糖系の諸酵素の、ハイポキシアによる活性上昇や、グルコース輸送系の活性化、また血管内皮細胞増殖因子である VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) やその受容体の増加による、血管新生などが知られている。

表 1 ハイポキシアで活性化される遺伝子と HIF-1 結合配列

遺 伝 子	種	HRE
エリスロポエチン	ヒ ト	TACGTGCTGT
エリスロポエチン	マウス	TACGTGCTGC
ホスホフルクトキナーゼ	マウス	TACGTGCTGC
アルドラーゼ A	ヒ ト	GACGTGACTC
エノラーゼ 1	ヒ ト	TACGTGACGG
グルコーストランスポーター 1	マウス	GGCGTGCCGT
VEGF	ヒ ト	TACGTGGGCT
トランスフェリン	ヒ ト	TACGTGCGCT
ヘムオキシゲナーゼ 1	マウス	GACGTGCTGG
誘導型一酸化窒素合成酵素	マウス	TACGTGCTGC
	consensus	TACGTGcTgc/t

現在では誘導される遺伝子の多くはクローニングされ、低酸素による転写調節に関わっている領域の解析も進んでいる。これらの領域の解析から、ハイポキシアに関係する DNA エLEMENT が明らかとなった。このELEMENT は hypoxia-response element (HRE) と呼ばれ、転写因子 HIF-1 が結合する。現在までに判明したおもなハイポキシアで誘導される遺伝子を表 1 に示した。現在もハイポキシアで誘導される遺伝子は続々と報告されており、この表は完全なものではない。この中にはすでに述べたように EPO, VEGF, いくつかの解糖系の酵素, 1 型グルコーストランスポーター (Glut 1), 誘導的一酸化窒素合成酵素 (iNOS), ヘムオキシゲナーゼ, トランスフェリンなどの遺伝子が含まれる。EPO は遺伝子の 3' 下流に HRE を含むエンハンサーが存在し、5' 上流のプロモーターと協調して、低酸素での活性化を行っている。エンハンサーには HRE 以外に核内レセプター結合部位があり、Hepatic nuclear factor 4 (HNF-4) が結合し、転写を活性化することが知られている¹⁵⁾。また同じく核内レセプターの一種である COUP も同じサイトに結合し、HNF-4 に対して拮抗的に機能する。プロモーターには TA-TA box や、CAAT box はなく、CACCC 部位や、GATA 結合部位などが存在している。内在性の EPO mRNA を生理的な条件で誘導的に発現する細胞として、ヒト肝がん由来の Hep 3 B と HepG 2 細胞が知られており、研究材料と

してよく使われている。EPO mRNA の安定性は 3'-非翻訳領域が関係していると考えられている¹⁵⁾。iNOS についてはハイポキシアで活性化される理由は不明であったが、最近 HIF-1 活性が一酸化窒素によって阻害され、ハイポキシアでの遺伝子活性化と一酸化窒素合成系の間に転写レベルでのクロストークが存在することが明らかにされた¹⁶⁾¹⁷⁾。表 1 に示された遺伝子のリストから、HIF-1 が低酸素濃度下において、細胞や生体の恒常性を維持する上に必要な遺伝子を活性化すること、またそれら遺伝子の生理機能が多岐に渡っていることから、ハイポキシアにおいて活性化される遺伝子の転写調節において、HIF-1 は決定的に重要な役割を担っていることがお分かりいただけるであろう。HLF も HIF-1 α と全く同じ DNA 結合特異性を示し、遺伝子を活性化することから、HLF も HIF-1 α と同じく重要であり、機能を分担していると考えられているが、HIF-1 α と HLF の役割分担については、ほとんど分かっていないのが現状である。ハイポキシアによって転写が抑制される遺伝子として、糖新生の酵素である phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK) が知られている¹⁵⁾。ハイポキシア以外にもコバルトによっても阻害されるので、活性化と同様のメカニズムによって阻害されると考えられるが、プロモーターに HIF-1 結合部位が存在するかどうかは今後の研究を待たねばならない。

HIF-1 活性化の分子機構

ハイポキシアでは HIF-1 α と Arnt の mRNA が誘導されるという結果がはじめ報告され、転写レベルでの活性化機構が想定されたが、その後の研究から、HIF-1 α と Arnt の mRNA レベルはハイポキシアにおいてもむしろ一定で、転写レベルより翻訳段階以降での調節が重要であると考えられるようになった。タンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミドを細胞に添加すると、HIF-1 の活性化が阻害され、EPO 遺伝子の誘導が抑えられるという観察もこの考えを支持している。低酸素下で細胞を培養すると、Arnt 量はそれほど変化しないが、HIF-1 α 量が著しく増加することが HIF-1 α に対する抗体を使って見出された。さらにこの増加は翻訳活性が増大するのではなく、タンパク質の低酸素下での安定化によると推定された¹⁸⁾¹⁹⁾。再酸素化すると、HIF-1 α は非常にはやく分解される。通常の酸素条件下では、HIF-1 α の半減期は、約 15 分であることが報告されている。この急速な HIF-1 α の分解には、ユビキチン依存性のタンパク質分解機構が関与していて、N 末端側の転写活性化ドメインを含む領域がこのタンパク質分解に必要な領域であると推定されている²⁰⁾。

HIF-1 の活性化が、そのリン酸化状態によって変化するという報告がある。プロテインキナーゼ阻害剤である 2 アミノプリンによって HIF-1 のハイポキシアでの活性化が阻害され EPO mRNA の誘導がおこらないこと、インビトロで核抽出液をフォスファターゼ処理すると、HIF-1 の DNA 結合活性が消失することが報告されている²¹⁾。しかしながら HIF-1 α のリン酸化が HIF-1 活性化のどの段階で関与しているかは不明であり、今後の問題である。AhR の活性化にもリン酸化が重要であり、HIF-1 α と同じく DNA 結合活性に必要であるということが知られているが²²⁾、二つの転写因子間に、共通のリン酸化メカニズムが存在するのかもしれ

ない。HIF-1 の活性化に関与しているもう一つの要素として、細胞のレドックス状態が関係していることが報告されている。過酸化水素を細胞に加えると、ハイポキシアにしても、EPO mRNA の誘導がおこらない¹⁵⁾。これは酸素センサーからの核へのセカンドメッセンジャーが過酸化水素であるという仮説に一致して興味深い観察であるが、還元剤であるジチオスレイトールも HIF-1 の活性化を阻害し、アンチオキシダントであるアスコルビン酸が HIF-1 を活性化しないことから更に検討を要するようである²²⁾。HIF-1 α に機能的に重要なシステインが推定されており、精製した HIF-1 や核抽出液を酸化剤やアルキル化試薬で処理すると、DNA 結合活性が失われる。またチオレドキシシンや REF-1 を共発現させると、HIF-1 の転写促進活性は更に増加する¹⁸⁾。このように HIF-1 α の活性化メカニズムについて 3 つの要素を述べたが、これらの要素を結びつけ統一的に理解するにはまだいたっていない。現在活発に研究が行われているところである。

酸素分圧がどのような分子機構によって細胞に感知されているのか、これも現在のところあまりよく分かっていないのが現状である。一般に酸素を結合するタンパク質として、ヘモグロビンや、チトクロームといった、ヘムタンパク質があげられる。酸素センサーとして働くタンパク質もヘムタンパク質が想定されていて、このことを裏付けるために、一酸化炭素下で EPO の誘導実験が行われた。一酸化炭素はよく知られているように、酸素よりもヘム鉄に強く結合する。一酸化炭素存在下では、低酸素で培養しても EPO の誘導はおこらず、一酸化炭素は阻害的に働くことが分かった²³⁾。この結果から酸素センサーのヘムに一酸化炭素が結合し、酸素センサータンパク質をオキシ型に固定することによって、低酸素シグナルが核に伝わらないと解釈されている。また一酸化炭素よりもヘム鉄に強く結合する一酸化窒素も、低酸素での HIF-1 や HLF の活性化を阻害することも、こ

の酸素センサーがヘムタンパク質であるという説を支持する¹⁶⁾。酸素センサーの精製を含めた生化学的性質の解明と、cDNA クローニングが決定的に重要であろう。

おわりに

HIF-1 α と HLF がクローニングされ、分子生物学的解析が進んだ結果、この三年間で飛躍的にハイポキシアでの遺伝子活性化機構に対するわれわれの理解は深まった。今後の課題としては、酸素センサータンパク質の同定、それから HIF-1 α と HLF の活性化にいたるシグナルトランスダクション機構の解明がもっとも重要な研究課題であり、活発に研究が行われている。また、HIF-1 α と HLF の発生段階での役割、この二つの因子のハイポキシアでの役割分担も重要な研究課題と思われる。HIF-1 α と HLF によって転写調節される下流側に存在する遺伝子のさらなるリストアップも、HIF-1 α と HLF の生理機能がどこまで、どのように及んでいるかを知るために必要である。

謝 辞: PAS タンパク質の分子系統樹を作製していただきました、埼玉がんセンター生化学部後藤修先生に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Wang GL, Jiang B-H, Rue EA, Semenza GL: Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 5510-5514, 1995.
- 2) Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y: Ah receptor, a novel ligand activated transcription factor. *J Biochem* **122**: 1075-1079, 1997.
- 3) Hogenesch JB, Gu Y-Z, Jain S, Bradfield CA: The basic-helix-loop-helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5474-5479, 1998.
- 4) Takahata S, Sogawa K, Kobayashi A, Ema M, Mimura J, Ozaki N, Fujii-Kuriyama Y: Transcriptionally active heterodimer formation of an Arnt-like PAS protein, Arnt3, with HIF-1 α , HLF, and Clock. *Biochem Biophys Res Commun* **248**: 789-794, 1998.
- 5) Isaac DD, Andrew DJ: Tubulogenesis in *Drosophila*: a requirement for the trachealess gene product. *Genes & Dev* **10**: 103-107, 1996.
- 6) Wilk R, Weizman I, Gazer L, Shilo B-Z: trachealess encodes a bHLH-PAS protein that is an inducer of tracheal cell fates in *Drosophila*. *Genes Dev* **10**: 93-102, 1996.
- 7) Nambu JR, Chen W, Hu S, Crews ST: The *Drosophila melanogaster* similar bHLH-PAS gene encodes a protein related to human hypoxia-inducible factor 1 alpha and *Drosophila* single-minded. *Gene* **172**: 1157-1167, 1996.
- 8) Jiang B-H, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL: Dimerization, DNA binding and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* **271**: 17771-17778, 1996.
- 9) Li H, Ko P, Whitlock JP Jr: Induction of phosphoglycerate kinase 1 gene expression by hypoxia, roles of Arnt and HIF-1 α . *J Biol Chem* **271**: 21262-21267, 1996.
- 10) Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ: Activation of hypoxia-inducible factor-1; Definition of regulatory domain within the α subunit. *J Biol Chem* **272**: 11205-11214, 1997.
- 11) Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, Livingston DM: An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 12969-12973, 1996.
- 12) Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y: A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 4273-4278, 1997.

- 13) Tian H, McKnight SL, Russell DW : Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* **11** : 72-82, 1997.
 - 14) Jelkmann W : Erythropoietin : Structure, control of production, and function. *Pharmacol Rev* **72** : 449-489, 1992.
 - 15) Bunn F, Poyton RO : Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev* **76** : 839-885, 1996.
 - 16) Sogawa K, Numayama-Tsuruta K, Ema M, Abe M, Abe H, Fujii-Kuriyama Y : Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 7368-7373, 1998.
 - 17) Liu Y, Christou H, Morita T, Laughner E, Semenza GL, Kourembanas S : Carbon monoxide and nitric oxide suppress the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor gene via the 5' enhancer. *J Biol Chem* **273** : 15257-15262, 1998.
 - 18) Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF : Activation of hypoxia-inducible factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its a subunit. *J Biol Chem* **271** : 32253-32259, 1996.
 - 19) Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L : Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : Posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **94** : 5667-5672, 1997.
 - 20) Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF : Regulation of hypoxia-inducible factor 1a is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 7987-7992, 1998.
 - 21) Wang GL, Jiang B-H, Rue EA, Semenza GL : Effect of protein kinase and phosphatase inhibitors on expression of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* **216** : 669-675, 1995.
 - 22) Wang GL, Jiang B-H, Semenza GL : Effect of altered redox states on expression and DNA-binding activity of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* **212** : 550-556, 1995.
 - 23) Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF : Regulation of the erythropoietin gene : Evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* **242** : 1412-1415, 1987.
-