

ヒト皮膚線維芽細胞における脂肪酸、コレステロール代謝調節機構

東京大学大学院 農学生命科学研究科・応用生命化学

佐藤 隆一郎

In an attempt to identify unknown target genes for SREBP-1, total RNA from a stable CHO cell line (CHO-487) expressing a mature form of human SREBP-1a (amino acids 1 to 487) with a LacSwitch Inducible Mammalian Expression System was subjected to a PCR subtraction method. One of the fragments was found to have 90 and 86% homology with rat and human ATP citrate-lyase (ACL) cDNA, respectively. When Hep G2 cells are cultured under either sterol-loaded or -depleted conditions, expression of the gene is induced approximately 2 to 3-fold by sterol depletion. To investigate the direct effect of SREBP-1a on transcription, luciferase assays using the promoter of the human ACL gene were performed. These deletion studies indicated that a minimum 160-base pair segment contains the information required for the transcriptional regulation brought about by enforced expression of SREBP-1a. Luciferase assays using mutant reporter genes revealed that SREBP-dependent transcriptional regulation is mediated by two nearby motifs, the SREBP-binding site (a TCAGGCTAG sequence) and the NF-Y-binding site (a CCAAT box). It was confirmed by gel mobility shift assays that recombinant SREBP-1a binds to the sequence. Data from studies with transgenic mice and reporter assays show that the ACL gene promoter is activated by SREBP-1a more strongly than SREBP-2 in contrast to the HMG CoA synthase and LDL receptor gene promoters, which exhibit the same preference for the two factors. Therefore, SREBPs transcriptionally regulates ACL enzyme activity, which generates the cytosolic acetyl CoA required for both cholesterol and fatty acid synthesis.

1. 緒言

皮膚表面は皮脂によりコーティングされた表皮角質層、その下層に表皮細胞由来の脂質が多層構造をなし、水分バリア機能を担っている。この恒常性が破壊されたとき、種々の皮膚疾患が発症することを考えると、皮膚組織での脂質代謝調節維持が疾患予防、治癒にとり重要であることがうかがわれる。本研究課題では、脂肪酸合成・コレステロール代謝調節の中心的役割を担う転写因子 SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) の機能を、分子細胞生物学的アプローチにより明らかにすることにより、皮膚細胞における脂質代謝調節解明の基礎研究になることを目的とした。

SREBP は互いに 47% の相同性を持つ SREBP-1 と SREBP-2 の 2 種類の蛋白質から成るファミリーを形成するが、その機能的役割分担について不明な点が多い。SREBP-1 が主として脂肪酸代謝関連遺伝子、SREBP-2 がコレステロール代謝関連遺伝子を転写制御するものと考えられているが明確な知見は少ない^{1~3)}。我々は、それぞれを一過的に発現する細胞株を樹立し、SREBP-1、-2 のそれぞれに応答する遺伝子を subtract PCR 法にて同定することを試みた⁴⁾。

2. 実験

2.1 ヒト活性型 SREBP-1 を一過的に発現する CHO 細胞株の樹立

あらかじめ Lac I を安定発現する CHO 細胞株を樹立し (CHO-Lac)、これに Lac I により発現が抑制される発現プラスミドにヒト活性型 SREBP-1 を組み込んだものを遺伝子導入し、IPTG 含有培地で一過的に発現が認められる細胞株 CHO-487 を獲得した。

2.2 subtract PCR 法による応答遺伝子の単離

CHO-Lac ならびに CHO-487 細胞をコレステロールを過剰に含む培地に、1mMIPTG を添加し、19 時間培養し、総 RNA を回収した。定法に基づき、CHO-487 細胞で発現が亢進している遺伝子のフラグメントを獲得した。そのフラグメントを用いて、双方の細胞から回収した RNA を用いて Northern hybridization を行い、確かに CHO-487 細胞で発現の亢進が認められたクローンについてそれらの塩基配列を決定した。

2.3 Luciferase assay 法による応答領域の決定

応答遺伝子として新たに見出された ATP クエン酸リアーゼ (ACL) について、ヒト遺伝子の転写開始点から上流 300bp から下流 29bp を含む領域をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に挿入した ACL-300 を構築した。PCR 法により -251 から +29 を含む ACL-251、以下同様にして種々の長さのプロモーター領域を含むレポーター遺伝子を構築した。レポーター遺伝子と活性型 SREBP-1 発現プラスミドを HEK293 細胞に遺伝子導入し、2 日



Regulation of fatty acid and cholesterol metabolism in human fibroblast cells

Ryuichiro Sato

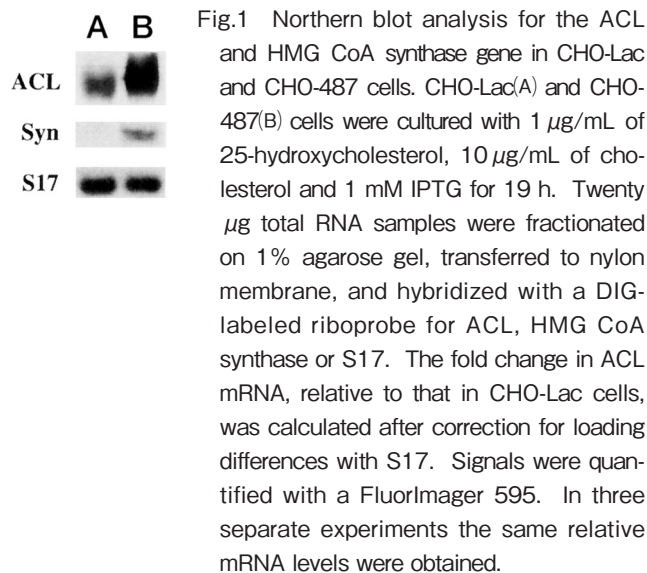
Department of Applied Biological Chemistry,
Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo

後にルシフェラーゼ活性を測定した。

3. 結果と考察

CHO-487 細胞で SREBP-1 を一過的に過剰発現させ転写が亢進した遺伝子を subtract PCR 法により単離し、その塩基配列を決定した。その結果、これまで報告のある SREBP 応答遺伝子の他に ACL 遺伝子が見出された。エネルギー過剰状態でミトコンドリア内で生成されたアセチル CoA は、そのままの形では細胞質へと移行できず、クエン酸へと変換後細胞質へ移行し、細胞質で ACL の働きにより再びアセチル CoA へと変換される。このアセチル CoA は脂肪酸、コレステロール合成の基質となる。従って、脂肪酸、コレステロール合成経路を調節する SREBP がその初発酵素の転写を制御することは、十分にあり得ることと言える。そこで新たな応答遺伝子として同定された ACL、SREBP の制御を受ける HMG CoA synthase mRNA の変動をそれぞれの CHO 細胞株を用いて検討した。CHO-Lac 細胞、CHO-487 細胞をコレステロールを過剰に含む培地に IPTG を添加し、19 時間培養し、総 RNA を回収し、アガロースゲルにて電気泳動し、それぞれのプローブを用いて Northern Blot 解析を行った (Fig. 1)。いずれの細胞でも過剰のコレステロールのために内因性の SREBP は不活性化状態であり、CHO-487 細胞でのみ IPTG により外因性のヒト活性型 SREBP-1 が発現されている。この状況下で、HMG CoA synthase mRNA は CHO-Lac 細胞では検出限界以下まで減少し、一方 CHO-487 細胞では外因性 SREBP-1 によりバンドが検出された。ACL については HMG CoA synthase mRNA と同様な濃淡のパターンは認められたものの、コレステロール過剰状況下の CHO-Lac 細胞でも発現が確認され、SREBP-1 は転写の一部を調節していることが推察された。

この様な ACL 遺伝子の転写制御が、SREBP-1 の過剰

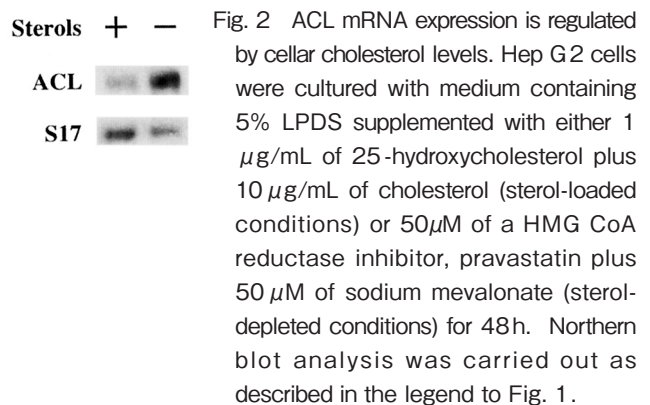


発現により観察される人為的な現象なのか、細胞内コレステロールの増減に応じて起こる SREBP の活性化によっても引き起こされるのかについて、ヒト肝細胞 Hep G2 による解析を行った。Hep G2 細胞をコレステロール過剰培地もしくはコレステロール合成阻害剤を含む培地で培養し、RNA を回収し、Northern Blot 解析を行った (Fig. 2)。ACL は細胞内のコレステロールの増加に伴い発現が低下し、減少に伴い発現増加が認められた。以上の知見は、生理的条件下での細胞内コレステロール量の変動に伴う内因性 SREBP の活性化、不活性化に伴い、本遺伝子が転写調節を受けうることを意味している。

続いてヒト ACL 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に挿入したレポーター遺伝子を用いたルシフェラーゼアッセイを行い、SREBP-1 による転写調節応答領域の同定を試みた。転写開始点から 131 bp 上流までは SREBP-1 による調節を受けたが、94 bp まで短くするとその調節は失われた (Fig. 3)。

そこで、131 から 94 bp の塩基配列中、SREBP の応答配列の候補部位を 3 ヶ所、SREBP 結合部位の近傍に存在し協調的に働く NF-Y の結合部位 1 ヶ所にそれぞれ変異を入れたレポーター遺伝子を構築し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、上流 110 bp 付近の配列に回答するとともに (ACL-131SREbKO)、それに近接する CCAAT 配列も調節に必須であることが明らかになった (Fig. 4)。SREb 配列への SREBP の結合はゲルシフトアッセイにより確認した。

ACL は脂肪酸合成、コレステロール合成の出発物質であるアセチル CoA 生成を触媒する酵素であり双方の経路に重要であるが、インスリンへの応答等これまでの知見からエネルギー過剰状況下で脂肪酸合成等を誘導するリポジェニック酵素として認識されている。従って、コレステロール代謝関連遺伝子の転写調節に主に機能する SREBP-2 に比べて脂肪酸代謝関連遺伝子の転写調節に関与する SREBP-1 による支配を強く受ける可能性がある。そこでルシフェラーゼアッセイの系にヒト SREBP-1、SREBP-2 発現プラスミッドをそれぞれ導入し、応答を検討した



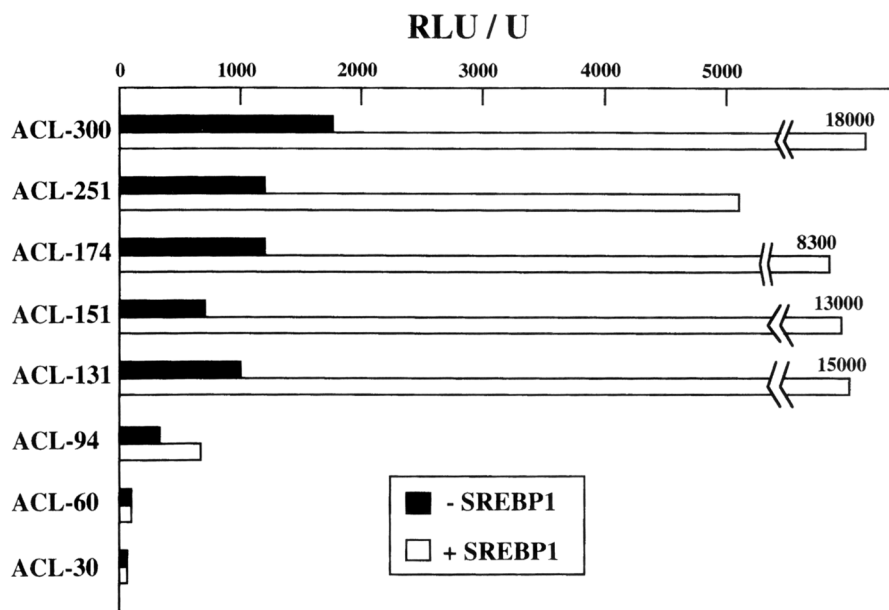


Fig. 3 Regulation of ACL promoter-luciferase reporter genes by SREBP-1a(1-487). HEK 293 cells were transfected with one of human ACL promoter reporter genes (200 ng), a plasmid encoding β -galactosidase (100 ng), and an expression plasmid (10 ng), pSREBP1(1-487) for 4 h. The cells were incubated for 48 h and then lysed, and enzyme activities were determined. The ratio of luciferase activity in relative light units (RLU) is divided by the β -galactosidase activity (U, units) to give a normalized luciferase value (RLU/U). The values given are the average of data from more than three experiments performed in triplicate.

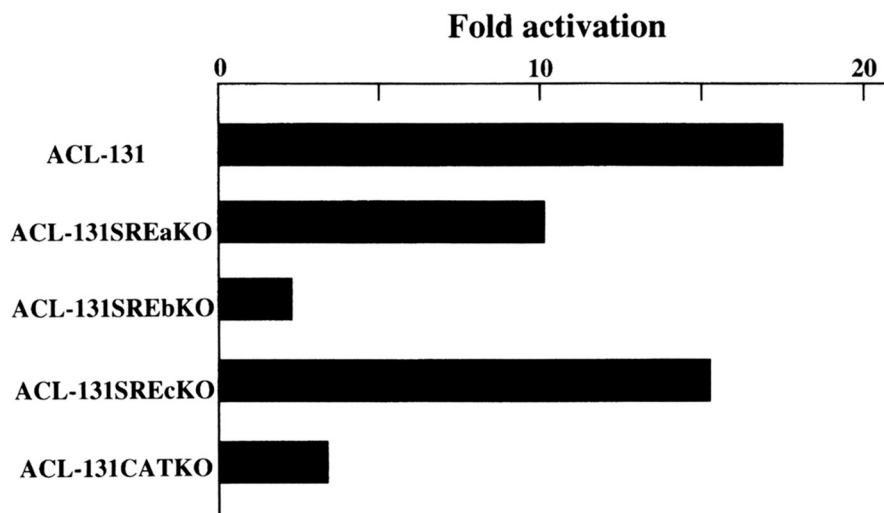


Fig. 4 Effect of the mutation of the SRE or the NF-Y binding site on the expression of reporter gene. HEK 293 cells were transfected and cultured as described in the legend to Fig. 3. The fold activation (luciferase activity with SREBP-1 versus without SREBP-1) is shown. The luciferase activities obtained by the reporter genes were in the range of 400 to 1000 RLU/U. The values given are the average of data from more than three experiments performed in triplicate.

(Fig. 5)。その結果、ACLはSREBP-1により高い感受性を持って反応した。一方、コントロールで用いたHMG CoA synthase、LDL受容体遺伝子は双方に対してほぼ同等の反応を示した。さらにSREBP-1、SREBP-2を過剰発現するトランスジェニックマウス肝臓中でのそれぞれの

mRNA量を測定したところ、HMG CoA synthase、LDL受容体 mRNAは両トランスジェニックマウス間で差が認められなかったのに対し、ACL mRNAはSREBP-1トランスジェニックマウスで高値を示し、ルシフェラーゼアッセイの結果と一致した。

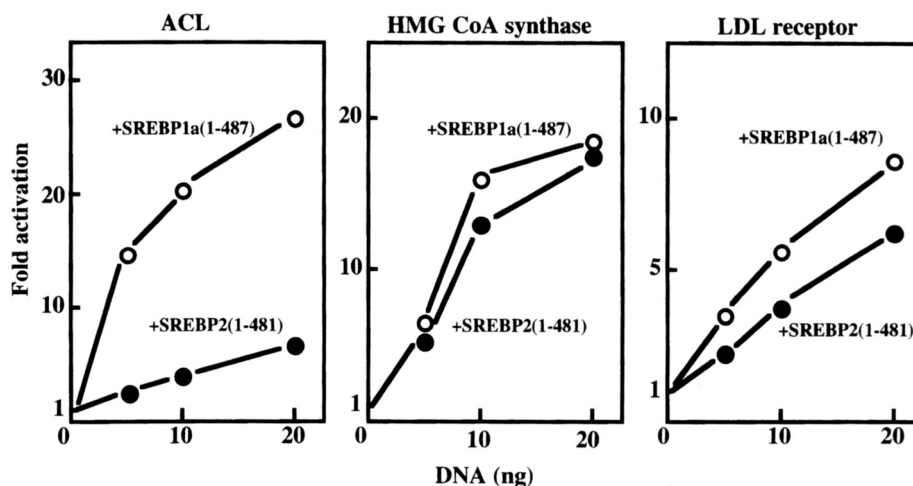


Fig. 5 Differential sensitivity of the ACL, HMG CoA synthase and LDL receptor promoters to overexpressed SREBP-1 a or SREBP-2. HEK 293 cells were transfected with one of reporter genes (ACL-131, pHMG S and pLDLE; 200ng), a plasmid encoding β -galactosidase (100ng), and an indicated amount of expression plasmid, pSREBP 1 a (1-487) or pSREBP2(1-481), for 4h. The cells were incubated for 48 h and then lysed, and enzyme activities were determined. The fold activation (luciferase activity in the presence of SREBP-1 a or SREBP-2 versus in the absence) is shown. The values given are the average of data from three experiments performed in triplicate.

4. 総括

脂質代謝関連遺伝子の転写を調節する SREBP の新規応答遺伝子として ACL を初めて同定し、その転写調節機構を明らかにした。同様な調節機構は皮膚線維芽細胞でも存在し、皮膚における脂質代謝のダイナミズムに深く関与している可能性がある。今後この様な基礎知見を積み重ねることにより、皮膚細胞での脂質代謝の恒常性維持を目指したコスメトロジー研究の発展が期待される。

(引用文献)

1) 佐藤隆一郎：膜結合型転写因子 SREBP 蛋白質核酸酵素, 45, 2612-2623, 2000.

2) Sato, R., Inoue, J., Kawabe, Y., 他 3 名：Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Biol. Chem.* 271, 26461-26464, 1996.

3) Sato, R., Miyamoto, W., Inoue, J., 他 3 名：Sterol regulatory element-binding protein negatively regulates microsomal triglyceride transfer protein gene transcription. *J. Biol. Chem.* 274, 24714-24720, 1999.

4) Sato, R., Okamoto, A., Inoue, J., 他 5 名：Transcriptional Regulation of the ATP Citrate-lyase Gene by Sterol Regulatory Element-binding Proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 12497-12502, 2000.