



Title	核内受容体LXR α の転写制御に関する分子生物学的研究
Author(s)	石本, 憲司
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/46541
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名	石 本 憲 司
博士の専攻分野の名称	博士 (薬学)
学位記番号	第 20255 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻
学位論文名	核内受容体 LXR α の転写制御に関する分子生物学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 土井 健史 (副査) 教授 田中 慶一 教授 松田 敏夫 教授 那須 正夫

論文内容の要旨

核内受容体の一種である LXR α は、主にコレステロール代謝に関わる組織である肝臓、小腸、脂肪組織などに特異的に発現している。LXR α は他の核内受容体 RXRs とヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子プロモーター上に存在する LXRE に結合して転写を調節している。これまでに LXR α は、コレステロール逆転送系の活性化や胆汁酸合成の促進など、コレステロールの代謝を調節する重要な因子であることが知られている。その一方で LXR α は、脂肪酸や中性脂肪の増加にも関与する。このように LXR α の生理的な機能は未だに不明な点が多く残されており、さらなる機能の解析が必要である。

そこで著者は、LXR α の機能を明らかにする目的でトランスクリプトーム解析を行った。LXR α の標的遺伝子群の網羅的解析を行うにあたり、遺伝子導入の影響を回避することが可能なテトラサイクリン誘導システムを用いて LXR α の発現を制御できる安定発現細胞株を樹立した。樹立した細胞株を用いてトランスクリプトーム解析を行ったところ、LXR α がリガンドに应答して、コレステロール代謝や脂肪酸合成に関わる遺伝子群の発現を誘導した。また、これまでに LXR α の標的として報告がされていない FDFT1 をはじめとするコレステロール生合成経路に関わる遺伝子群や、リポ蛋白質の取り込みに関わる受容体 LDLR や LRP1 の発現量も LXR のリガンドに应答して変化した。興味深いことに、LXR α は胚形成過程で左右対称決定に関与する遺伝子 LEFTY1 や細胞骨格に関わる MYLIP など、脂質とは無関係な遺伝子発現の変動にも関与することが明らかとなった。このように、本研究で樹立した細胞株は LXR α の機能を解析する上で、有用なツールとなることが示された。

今回のトランスクリプトーム解析の結果、LXR リガンドにより *ldlr* 遺伝子の発現が誘導されていた。LDLR は食事由来の LDL コレステロールを肝臓内に取り込む受容体である。LDLR は血中コレステロールの恒常性を維持しており、LDLR の発現を調節する HMG-CoA 還元酵素阻害剤のような薬剤は、現在でも高脂血症の治療薬として広く用いられている。また、LDLR の発現量は細胞内のコレステロール量に厳密に制御されている。この制御機構には転写因子 SREBP が重要であるが、SREBP は高コレステロール状態では効率よく LDLR の発現を上昇させることができない。そこで、LXR α が高コレステロール状態において LDLR 発現を調節できるか否かを調べた。まず、内在性の LXR α が発現している Huh-7 細胞を用いて、LXR リガンドの *ldlr* 遺伝子に対する発現変動を mRNA レベルで調べた。その結果、様々なコレステロール条件に影響を受けずに、LXR リガンドによって *ldlr* 遺伝子の発現が有意に上昇していた。次に LXR α による LDLR の転写制御機構を明らかにするために、約 4000 bp からなるヒト LDLR プロ

モーターのクローニングを行った。そして、高コレステロール条件下でレポーターアッセイを行ったところ、LDLR プロモーター上の -3788 bp から -3773 bp の領域に LXRE が存在すると考えられた。そこで、この領域に LXR α が結合するか否かをゲルシフトアッセイ、および、ChIP 法により調べた結果、LXR α は RXR α とヘテロダイマーを形成して *ldlr* 遺伝子の LXRE に結合していることが明らかとなった。このように、高コレステロール状態でも *ldlr* 遺伝子の発現を誘導できることから、LXR アゴニストは新しい高脂血症治療薬としての可能性が示唆された。

上記のような LXR α のトランスクリプトーム解析と LDLR のプロモーター解析を通じて、著者は細胞内での状況を反映し、かつ LXR α が転写制御に関わっているゲノム領域を、効率よく網羅的に探索するシステムの開発が必要であると考へた。具体的には、ChIP 法で得られたゲノム DNA をレポーターベクターの上流に組み込んでアッセイを行うというシステムで、ハイスループットに評価することが可能である。そこで、このシステムの開発のために、種々の実施条件の検討を行った。まず、LXR α が相互作用する多数のゲノム領域を効率よく得るために、厳密に ChIP 法の条件を検討した。その結果、超音波破碎や免疫沈降時の抗体反応の最適な条件を決定した。また、リガンドの添加後の LXR α の標的遺伝子のプロモーターへの結合量変化を、ChIP 法により経時的に調べた結果、リガンド添加時間 45 分が最適な時間であることを明らかにした。次に、ChIP 法で得られたゲノム領域が、真に LXR α の応答配列を含んでいるか否かを容易に評価できるレポーターアッセイ系の構築に着手した。近年報告された β -ラクタマーゼと FRET を応用したレポーターシステムを選択し、このアッセイ系に最適なプロモーターとして、c-Myc のマイナープロモーターを選別した。さらに ChIP 法で得られたゲノム断片の修復、およびベクターに組み込むための平滑化条件を決定し、レポータープラスミドの構築に成功した。著者はすでに今回開発した手法を駆使して、PPAR γ 1 の細胞内におけるゲノム上の相互作用領域の解析を行い、PPAR γ 1 により制御されるいくつかの候補遺伝子のゲノム領域を明らかにしている。今後この手法を用いた LXR α とその標的遺伝子群が構成するネットワークの解明が期待される。

以上の結果、今回著者が樹立した LXR α 安定発現細胞株を用いることにより、LXR α の標的遺伝子を網羅的に解析できることが考えられた。また、LXR α による *ldlr* 遺伝子の発現調節機構を明らかにすることで、LXR アゴニストが新しい抗高脂血症薬としての可能性を有していることを示した。さらに、LXR α が直接ゲノム上で制御している領域を探索できるシステムを開発した。今後、本研究結果を応用することにより、さらなる LXR α の機能の解明、ならびに、LXR α を標的とした創薬への寄与が期待される。

論文審査の結果の要旨

核内受容体の一種である LXR α は、主にコレステロール代謝に関わる組織である肝臓、小腸、脂肪組織などに特異的に発現している。これまでに LXR α は、コレステロール逆転送系の活性化や胆汁酸生合成の促進など、コレステロールの代謝を調節する重要な因子であることが知られているが、その一方で脂肪酸や中性脂肪の増加にも関与する。このように LXR α の生理的な機能は未だに不明な点が多く残されており、さらなる機能の解析が必要である。

このような背景の下、石本君は LXR α の機能を明らかにすることを目的として、分子生物学的手法を用い研究を展開した。

まず、テトラサイクリン誘導システムを用いて LXR α の発現を自在に制御できるヒト肝癌由来細胞株を樹立し、その細胞株を用いてトランスクリプトーム解析を行った。そして、これまでに LXR α の標的として報告がされていない FDFT1をはじめとするコレステロール生合成経路に関わる遺伝子群や、リポ蛋白質の取り込みに関わる受容体 LDLR や LRP1 の発現量も LXR のリガンドに応答することを明らかにした。次に、これら新規標的遺伝子の中で *ldlr* 遺伝子に着目し、さらに解析を進めた。LDLR の発現量を制御している SREBP は、高コレステロール状態では効率よく LDLR の発現を上昇させることができない。そこで、LXR α が高コレステロール状態において LDLR 発現を調節できるか否かを調べた結果、*ldlr* 遺伝子の -3800 付近に結合し、発現を上昇させることが明らかとなった。このように、高コレステロール状態でも *ldlr* 遺伝子の発現を誘導できることから、LXR アゴニストは新しい高脂血症治療薬としての可能性が示唆された。

次に、細胞内での状況を反映し、かつ転写制御に関わっているゲノム領域を効率よく網羅的に探索するシステムの

開発が必要であると考え、ChIP 法で得られたゲノム DNA をレポーターベクターの上流に組み込んでアッセイを行うシステムの構築を試みた。その結果、超音波破碎や免疫沈降時の抗体反応の最適な条件を決定し、また、FRET を応用したレポーターシステムのための最適なプロモーターを決定、レポータープラスミドの構築に成功した。

以上の研究成果は、核内受容体 LXR α の機能解明に大きく貢献することが考えられることより、博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。