

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 12 年度博士課程入学

氏 名 平野 祐子

指導教官名 清水 誠

論文題目 脂質代謝を制御する転写因子 SREBP の 翻訳後修飾による機能調節に関する研究

SREBP (sterol regulatory element-binding protein) は、コレステロールや脂肪酸の生合成に関わる主要な酵素や、コレステロールの取込みに関わる LDL (low density lipoprotein) 受容体をコードする遺伝子を転写レベルで調節する因子である。SREBP は、bHLH-Zip (basic helix-loop-helix leucine zipper) motif を含む転写因子群に属し、SREBP family はスプライシングの違いにより生じる SREBP-1a と SREBP-1c、と SREBP-2 から構成される。SREBP-1 は脂質代謝の盛んな肝臓や副腎などで高発現して脂肪酸合成の制御に、一方 SREBP-2 は各組織で一様に発現しコレステロール代謝に関わる。

SREBP は、膜結合型の前駆体として小胞体上に生合成されて二段階の切断によるプロセッシングにより活性化される。このプロセッシングは細胞内コレステロール量により厳密に調節されており、細胞内にコレステロールが豊富な状態では前駆型 SREBP は小胞体上に留まるが、コレステロールが枯渇すると、膜貫通領域がプロセッシング酵素による段階的な切断を受けてN末端が切り出され活性型 SREBP となる。細胞質に放出された活性型 SREBP は、核内移行に関わる importin β により核内へと輸送され、コレステロール・脂肪酸・糖代謝や脂肪細胞分化などの広範な代謝領域の転写調節因子として機能する。

これまで、SREBP の調節に関してはプロセッシングに焦点が当てられ、活性化後の調節は注目されなかったが、核内移行した活性型 SREBP が翻訳後修飾を受けて、その活性や安定性が調節される可能性がある。この点に着目し、活性型 SREBP の機能発現を核内における調節という新たな視点から評価した。

1. ポリユビキチン化修飾とプロテアソームによる分解

多くの転写調節因子や核内分子は短寿命であり、その存在量はエネルギー依存的なタンパク質分解系であるユビキチン-プロテアソーム系により制御されている。翻訳後修飾分子として知られるユビキチンは、ユビキチンシステム、すなわちユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2) とユビキチン連結酵素 (E3) により基質へと付加され、蛋白質分解のシグナルとして働く。中でも、E3 は基質認識に与り、分解すべき蛋白質を決定する重要な酵素である。ポリユビキチン化された蛋白質はプロテアソームに認識され迅速に壊される。このような選択的な分解は、細胞周期、シグナル伝達や転写制御など生物の多様な高次機能の制御と、ストレス応答や蛋白質の品質管理などの恒常性の維持に必須である。

そこで、活性型 SREBP がユビキチン-プロテアソーム系に支配されるか、阻害剤を用いて検討した。その結果、内因性の活性型 SREBP がプロテアソーム阻害剤で細胞を処理した場合にポリユビキチン化修飾を受けた状態で安定化されることから、プロテアソームにより分解されることが示唆された。

プロテアソーム阻害剤により安定化された活性型 SREBP が転写活性化能を保持しているかをノザンプロット解析により検討したところ、プロテアソーム阻害剤により SREBP の標的遺伝子である HMG CoA 合成酵素、LDL 受容体と脂肪酸合成酵素の発現が亢進した。また、変異型ユビキチンの導入によっても、活性型 SREBP は安定化されると同時に HMG CoA 合成酵素の転写を亢進させた。すなわち、安定化された活性型 SREBP がその標的遺伝子の転写を活性化することから、生理的条件下においてはプロテアソームが活性型 SREBP を速やかに除去することで、その転写を終結させることが示唆された。

さらに活性型 SREBP のユビキチン化の機構を明らかにするために、SREBP の *in vitro* ユビキチン化アッセイ系の構築を試みた。細胞から pull down した SREBP を基質とし、ATP の存在下で大腸菌から精製した E1、E2 と GST-Ub と反応させ、抗 SREBP 抗体によりポリユビキチン化を検出した。本アッセイ系により活性型 SREBP は、pull down 時に共沈してきた E3 と Ubc4/5 (E2) により、ユビキチン化されることが明らかになった。

2. SUMO-1 化修飾

SUMO (small ubiquitin-related modifier) -1 はユビキチンと 18 %の相同性を有する 101 アミノ酸残基の、進化の過程で極めてよく保存された翻訳後修飾分子である。SUMO-1 はユビキチン化と類似の酵素カスケード、すなわち SUMO-1 活性化酵素 (E1)、SUMO-1 結合酵素 (E2) である Ubc9 と SUMO-1 連結酵素 (E3) により、標的蛋白質の SUMO-1 化コンセンサス配列 (I/V/L)KX(D/E) に存在するリジン残基に単一分子が可逆的に付加される。SUMO-1 化

の基質は、p53、Wm、I κ B α 、PCNA (proliferating cell nuclear antigen) や RanGAP1 など多岐に渡り、細胞癌化や老化、染色体 DNA の複製や組換え、その他にも様々な機能に関わっている。SUMO-1 化は、基質の構造に変化をもたらし、蛋白質蛋白質間の相互作用・細胞内局在・転写活性などに影響を与えることが報告されている。

SREBP-1a には 4 箇所 (Lys¹²³, Lys³⁸¹, Lys⁴¹⁸ と Lys⁴⁷⁰)、SREBP-2 には 2 箇所 (Lys⁴²⁰ と Lys⁴⁶⁴)の種間で保存された SUMO-1 化コンセンサス配列が存在する。そこで、活性型 SREBP の SUMO-1 化を調べる為に、細胞に SUMO-1 と活性型 SREBP を発現させたところ、SREBP-1 では 2 残基、SREBP-2 では 1 残基が SUMO-1 を結合することが示唆された。活性型 SREBP の SUMO-1 化リジン残基を同定するために、リジン残基をアルギニン残基に置換した変異型 SREBP を用いて SUMO-1 化を検出した結果、活性型 SREBP-1 では Lys¹²³ と Lys⁴¹⁸ が、活性型 SREBP-2 では Lys⁴⁶⁴ が SUMO-1 化されることを同定した。

活性型 SREBP の SUMO-1 化が転写活性に及ぼす影響をルシフェーラスアッセイにより調べた。その結果、SUMO-1 化部位変異 SREBP において正常型と比較して有意な活性の上昇が検出され、活性型 SREBP の SUMO-1 化はその転写活性を負に制御することが示された。興味深いことに、SUMO-1 化領域は SC motif や RDM (regulatory domain motif) といった従来より知られる転写抑制配列と一致し、また活性型 SREBP の SUMO-1 化部位を含んだ C 末端領域は転写抑制に関与するという報告があることから、これらの抑制機構に SUMO-1 修飾が関与する可能性が示唆された。

I κ B α や PCNA では SUMO-1 化とユビキチン化のリジン残基が競合し、機能的に相反する作用をもたらすことが知られている。SREBP も SUMO-1 化とユビキチン化をともに受けることから、SUMO-1 化がユビキチン化に競合し活性型 SREBP を安定化する可能性について検討した。Pulse-chase 実験により、正常型と変異型 SREBP-2 の半減期は約 2 時間とかわらず、SREBP の SUMO-1 化はユビキチン-プロテアソーム系による分解に影響を及ぼさないことが示唆された。また *in vitro* ユビキチン化アッセイにより、正常型と変異型 SREBP は同程度にポリユビキチン化されたことから、ユビキチン化と SUMO-1 化は同一のリジン残基を競合しないことが示唆された。すなわち活性型 SREBP の SUMO-1 化は、ユビキチン化及びその安定性に影響を及ぼさないと結論された。さらに、活性型 SREBP の転写活性が前駆型 SREBP のプロセッシングと同様にコレステロール依存的に制御されるかについて検討した。内因性の活性型 SREBP が存在しない M19 細胞において、コレステロール過剰または枯渇のいずれにおいても外因性の活性型 SREBP の半減期及び SUMO-1 化は変化せず、細胞内のコレステロールの状態は活性型 SREBP のユビキチン-プロテアソーム系による分解及び SUMO-1 化に影響を及ぼさないことが示された。

3. まとめ

コレステロールは、細胞膜を構成するとともに、胆汁酸・ステロイドホルモンなどの生理活性前駆物質となるなど生体に必須な成分である。しかし、その摂取過多は高脂血症、肥満症といった生活習慣病を招く。細胞は厳密にそのコレステロール量を認識して、コレステロール生合成と血中からの取り込みをフィードバック制御する。転写因子 SREBP はこの過程に関与しており、コレステロール・脂肪酸代謝関連酵素の転写を制御することで包括的に脂質代謝を調節することが明らかにされてきた。

活性型 SREBP の翻訳後修飾に注目し、ユビキチン化修飾について解析したところ、ユビキチン化はプロテアソームによる分解を通して活性型 SREBP の転写活性を抑制することが明らかになった。また SUMO-1 化修飾について検討したところ、活性型 SREBP の SUMO-1 化は、その転写を抑制することが示された。さらに、活性型 SREBP のユビキチン化と SUMO-1 化は競合しないことから、異なる独立した経路で転写を負に制御することが示唆された。SUMO-1 化は、SREBPばかりでなく様々な転写因子の転写活性を変化させるが、結果として転写活性を正に調節する場合もあれば、負に調節することもある。SUMO-1 化は転写因子活性に対する一般的な調節系であるようだが、生理的な条件下においていかに機能を発揮し調節されるかはほとんど知られていない。最近、SUMO-1 化 E3 や組織特異的に発現する脱 SUMO-1 酵素に関する知見が報告されており、これらの解析が糸口となり、基質に特異的な SUMO-1 化の調節機構が明らかになることが期待される。

本研究から SREBP は、SUMO-1 化による質的な調節とユビキチン-プロテアソーム系による量的な調節という2つの独立した異なる過程により不活性化されることが明らかになった。今後は、このユビキチン化や SUMO-1 化がいかに制御されているか、その機構の解明が重要と考える。

参考文献 Hirano,Y., Yoshida,M., Shimizu,M. and Sato,R. (2001) Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.*, **276**, 36431-36437.