

## 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 進学

氏 名 中原真裕子

指導教官名 清水 誠

論文題目 胆汁酸によるコレステロール・胆汁酸代謝制御の分子細胞生物学的研究

肝臓においてコレステロールから合成された胆汁酸は、タウリンあるいはグリシン抱合体として胆汁中に分泌され、小腸で食事由来の脂質成分や脂溶性ビタミンの効率的な吸収を助ける。十二指腸に分泌された胆汁酸の 90%以上が下部小腸から再吸収されて肝臓に戻り、再び胆汁中に分泌されるが、一部は腸管から体外に排出される。肝臓における胆汁酸への異化はコレステロールの主要な体外排出経路であること、また、小腸においてはコレステロールの吸収を補助することから、胆汁酸はコレステロール代謝において重要な役割を果たすことが知られてきた。近年、胆汁酸、なかでも一次胆汁酸のケノデオキシコール酸 (CDCA) が、核内受容体 FXR (farnesoid X receptor) の内因性リガンドとして働くことが報告され、遺伝子発現を制御する分子としての新たな機能が明らかになってきている。

FXR は主に小腸、肝臓に特異的に発現しており、核内受容体の RXR とヘテロダイマーを形成する。応答遺伝子としては、小腸胆汁酸結合蛋白 I-BABP (intestinal bile acid-binding protein)、肝臓の胆汁酸排出トランスポーター BSEP (bile salt export protein) など胆汁酸代謝に関わる遺伝子の他に、コレステロールからの胆汁酸合成の律速酵素である CYP7A1 (cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase) の転写を負に制御する核内受容体 SHP (small heterodimer partner)、コレステロール逆転送系を促進するリン脂質輸送蛋白質 PLTP などが報告され

ている。よって FXR は胆汁酸センサーとして働き、胆汁酸代謝、コレステロール代謝を制御していると考えられ、酸化ステロールをリガンドとする核内受容体 LXR (liver X receptor) や、ステロール濃度に応じて転写活性が調節される転写因子 SREBP (sterol regulatory element-binding protein) などとともに、脂質ホメオスタシスの維持に重要な働きをしていることがわかってきた。

本研究では、胆汁酸によるコレステロール・胆汁酸代謝の制御機構の一端を解明することを目的として、小腸における FXR の標的遺伝子である I-BABP が FXR の転写活性に及ぼす影響についての検討と、胆汁酸による LDL 受容体遺伝子の発現上昇機構の解析を行った。

### 1. 胆汁酸による遺伝子調節における、I-BABP の作用の解析

I-BABP は、FABP (fatty acid-binding protein) スーパーファミリーに属する約 15kDa の細胞内蛋白で、小腸特異的に発現している。脂肪酸結合活性はなく胆汁酸に特異的に結合する。その機能については未知であるが、遊離胆汁酸の結合により、胆汁酸のもつ毒性の中和、胆汁酸の貯蔵、運搬などの役割が推測されている。I-BABP の発現は胆汁酸により核内レセプターFXR を介して誘導される。

小腸細胞内において、胆汁酸の流入により I-BABP の発現が上昇した場合、胆汁酸の一部は I-BABP と結合すると考えられるが、その結果 FXR がもつ転写活性に及ぼす影響として、以下の二つが考えられる。まず一つは、I-BABP による胆汁酸の結合により、FXR がリガンドを奪われる形となり転写活性が低下する可能性であり、もう一つは、逆に I-BABP が FXR に効率的にリガンドを受け渡すなどの作用により転写活性が上昇する可能性である。そこで、これらの可能性を検討し、FXR に及ぼす I-BABP の作用を解析した。

I-BABP 遺伝子の FXR 応答配列を含むプロモーター領域を、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込み、ルシフェラーゼアッセイにより FXR の転写活性を調べた。上記レポーターベクター、及び、FXR、RXR $\alpha$ 、I-BABP の発現ベクターを細胞に導入し、CDCA の添加による FXR の転写活性を調べたところ、I-BABP 共存による顕著な減少、あるいは増加は認められなかった。FXR の転写活性を調べる別のアッセイ系として、GAL4-DNA 結合ドメインの C 末端に FXR の全長を組み込み、融合蛋白を発現させて、FXR の転写活性を調べた。ヒト腎由来 HEK293 細胞に上記発現ベクター、GAL4 結合配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだベクター、及び、I-BABP 発現ベクターを導入して、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、FXR の転写活性が低いレベルではあるものの I-BABP の共存により上昇した。HEK293 細胞を用いて I-BABP

定常発現株を作成し、同様の実験を行ったところ I-BABP の発現量が高いクローンでは FXR の転写活性も高いことが示された。ラット小腸において金コロイド標識免疫電顕により I-BABP が細胞質だけでなく核にも存在することが報告されており、胆汁酸を結合した I-BABP が核に移行し、FXR に促進的に働いている可能性が示唆された。

## 2. 胆汁酸による LDL 受容体遺伝子発現上昇機構の解析

LDL 受容体の発現は細胞内コレステロール濃度に応じて転写因子 SREBP によって制御されていることが知られている。細胞内コレステロールが枯渇すると、小胞体膜上に存在する前駆体 SREBP が切り出され核に移行して活性型 SREBP となり、コレステロール合成系の酵素遺伝子や、LDL 受容体遺伝子の転写を亢進する。ヒト肝癌由来 HepG2 細胞において、胆汁酸を添加することにより、LDL 受容体の mRNA 量及び受容体数が増加するという報告が複数されているが、この分子メカニズムは不明であった。LDL 受容体遺伝子 5'上流の塩基配列を調べたところ、FXR のコンセンサス配列である IR-1 配列様の配列が存在したことから、LDL 受容体が FXR の標的遺伝子である可能性も推測され、この点も含めて、胆汁酸による LDL 受容体遺伝子の発現上昇機構について解析した。

HepG2 細胞を、CDCA を含む培地で 6 時間培養後、ノザンブロットを行ったところ、LDL 受容体 mRNA の顕著な上昇が認められた。同様の実験を SREBP の誘導が抑えられる条件である 25(OH)コレステロール存在下で行ったところ、CDCA による LDL 受容体の発現上昇が認められた。核抽出画分を用いたウェスタンブロットの結果、CDCA 処理による核内 SREBP-2 の量的な変化は検出されなかったことより、SREBP 非依存的な調節と考えられた。また、この効果への FXR の関与を、ノザンブロット及びルシフェラーゼアッセイにより検討した。FXR の強制発現及びその合成リガンドによる、LDL 受容体遺伝子発現の特異的な上昇は認められず、FXR 非依存的な調節機構であることが示された。胆汁酸はいくつかの細胞内情報伝達系に影響を与えることが報告されている。そこで次にシグナル伝達系の各種阻害剤で処理した HepG2 細胞を用いたノザンブロットを行った結果、CDCA による LDL 受容体遺伝子の発現上昇は MEK 阻害剤 PD98059、U0126 によりほぼ完全に抑制された。また、LDL 受容体の mRNA の安定性についてアクチノマイシン D 処理により検討したところ、CDCA 処理により LDL 受容体 mRNA の半減期が 2 倍に増加した。この CDCA による LDL 受容体 mRNA の安定化作用は MEK 阻害剤により消失した。

以上の結果、CDCA が MAP キナーゼ活性化を介して LDL 受容体 mRNA を安定化させ、遺伝子発現を上昇させることが示された。ヒト LDL 受容体遺伝子 3' 非翻訳領域には、

mRNA の迅速な分解に関与する配列である AU-rich element が3ヶ所含まれているがその分解機構の詳細は未知であり、MAP キナーゼによるリン酸化による調節機構に関してもさらに詳細な解析が必要である。この結果より、胆汁酸によりコレステロール代謝関連遺伝子を制御する、新たなメカニズムが明らかになった。

参考文献

Nakahara, M., Fujii, H., Maloney, P. R., Shimizu, M., and Sato, R. *J. Biol. Chem.*, 277, 37229-37234, 2002.

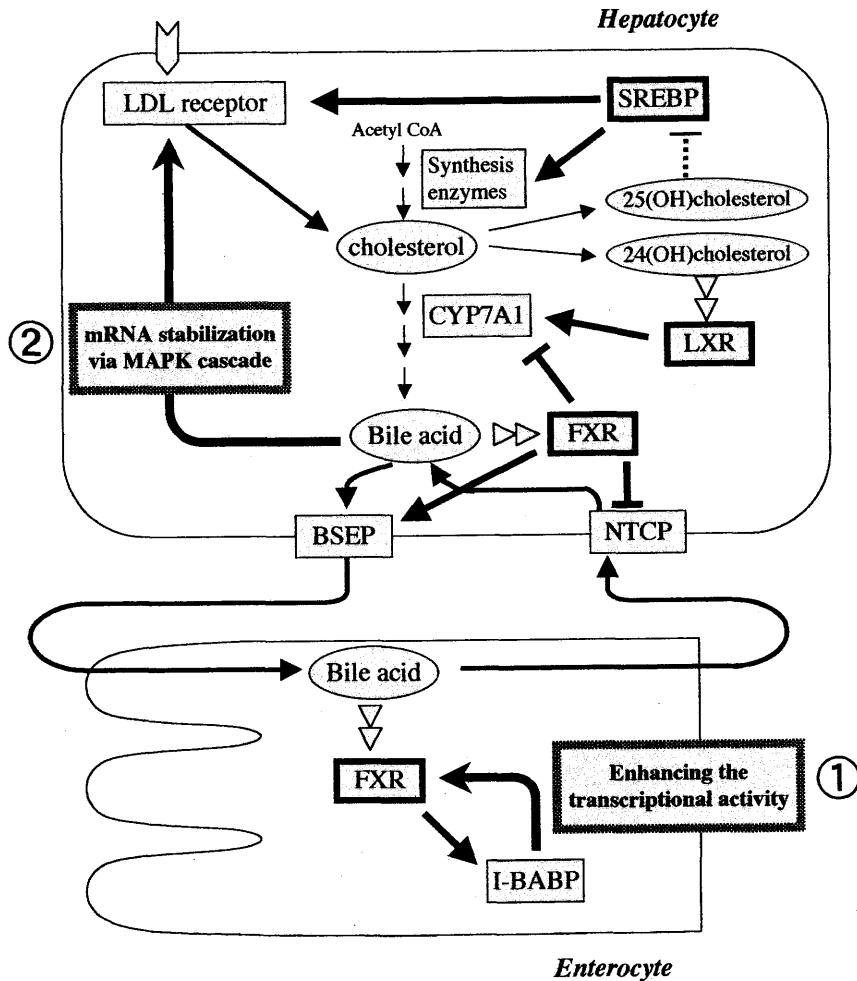


図 胆汁酸・コレステロールのホメオスタシスの制御  
本研究により①、②を示した。