

## 論文題目 核内受容体 LXR $\alpha$ タンパク質の発現及び相互作用の解析

氏名 渡辺 雄一郎

核内受容体 LXR $\alpha$ は肝臓の cDNA ライブラリーから、核内受容体遺伝子ファミリーとの相関性が高い、オーファン受容体としてクローニングされた。その後、遺伝子工学的手法を用いた研究により、オキシステロール受容体であると同定され、コレステロール代謝遺伝子の転写発現をリガンド依存的に調節し、脂質代謝制御の中心的役割を果たしていると考えられている。また、LXR $\alpha$  /  $\beta$ 欠損マウスを用いた解析や合成リガンドを用いた解析により、LXR $\alpha$ および $\beta$ が動脈硬化においても重要な役割を果たしていることが示唆されており、LXR リガンドは抗動脈硬化作用を持つことが期待されている。しかしながら、生理的に発現するタンパク質を検出できるモノクローナル抗体はいまだ得られておらず、これまでの研究は mRNA 発現や強制発現産物、*in vitro* translation 産物、ノックアウトマウス解析を中心になされており、生理的に発現している LXR $\alpha$ タンパク質を検出した報告は非常に少なかった。そこで本研究では、核内受容体 LXR $\alpha$ タンパク質に対する特異的モノクローナル抗体を樹立し、生理的に内在する LXR $\alpha$ タンパク質の検出及び発現の解析を行った。

まず、バキュロウイルス発現系を用いて発現させたヒト LXR $\alpha$ N末端 94 アミノ酸を免疫原として用いて、モノクローナル抗体 K-8607 を樹立した。イムノブロットにより、樹立されたモノクローナル抗体 K-8607 が、COS-7 細胞に強制発現したヒト LXR $\alpha$ タンパク質を特異的に認識し、ヒト LXR $\beta$ タンパク質と交差反応しないことが示された。免疫沈降の実験により、K-8607 が立体構造を保ったヒト LXR $\alpha$ タンパク質を認識することが明らかになった。ゲルシフトアッセイの結果から K-8607 が立体構造を保った LXR $\alpha$ タンパク質とその応答配列 DNA が結合した複合体を、認識可能であることが示唆された。

次に、K-8607 を用いて、生理的に発現する LXR $\alpha$ タンパク質を検出することを試みた。生理的に発現する LXR $\alpha$ タンパク質は非常に微量であることが予想され、その検出は非常に困難であると考えられた。そこで、生理的に発現する LXR $\alpha$ タンパク質のソースとして、これまでの検討で最も高い mRNA 発現レベルを示した、ヒト単球を GM-CSF 刺激して得られたマクロファージを選択した。K-8607 を用いたイムノブロットにより、LXR $\alpha$ タンパク質がヒト単球に存在せず、マクロファージにのみ発現していることを明らかにした。ヒト単球由来マクロファージに生理的に発現する LXR $\alpha$ タンパク質の量は、COS-7 細胞に強制発現した LXR $\alpha$ タンパク質と比較して非常に少なく、これまでの検出の困難さの原因を示唆するものであった。

ヒト LXR $\alpha$ 発現ベクターをトランスフェクションした COS-7 細胞の免疫染色結果から、K-8607 は免疫染色でヒト LXR $\alpha$ タンパク質を認識することが示された。そこで、ヒト単球由来マクロファージに生理的に発現する LXR $\alpha$ タンパク質の局在を明らかにする事を試みた。ヒト単球およびマクロファージの両方に陽性所見が見られた。イムノブロットの結果

や mRNA 発現解析等からヒト単球には LXR $\alpha$ タンパク質は存在しないと考えられる。したがって、K-8607 は免疫染色において、LXR $\alpha$ タンパク質以外のタンパク質と交差反応する可能性があり、生理的に発現する LXR $\alpha$ タンパク質の局在の解析には適さないことが明らかになった。

そこで、生理的に発現する LXR $\alpha$ タンパク質の免疫染色を可能にすべく、大腸菌に発現・精製した LXR $\alpha$ LBD を免疫原として用いて、モノクローナル抗体 PPZ0412 を新たに樹立した。PPZ0412 はイムノブロットにおいて LXR $\alpha$ タンパク質を特異的に認識し、ヒト単球由来マクロファージに発現する LXR $\alpha$ タンパク質を高感度かつ特異的に検出した。また、PPZ0412 は免疫沈降の実験で、未変性の立体構造を保ったヒト LXR $\alpha$ タンパク質を認識することができた。

これまでに LXR $\alpha$ タンパク質の局在は明らかにされていない。そこで LXR $\alpha$ タンパク質の局在を明らかにするために、PPZ0412 を用いてヒトおよびラット組織の免疫組織染色を行った。PPZ0412 は免疫染色において、ヒトおよびラット組織に生理的に発現する LXR $\alpha$ タンパク質を特異的に認識した。この抗体を用いた免疫染色によって、LXR $\alpha$ タンパク質が肝 Kupffer 細胞、脾臓マクロファージ、肺泡マクロファージ等のマクロファージに特に強く発現していることが明らかになった。また、肝臓実質細胞、脂肪細胞にも弱い発現が認められた。これらの細胞に生理的に発現する LXR $\alpha$ タンパク質は核に局在していることが明らかになった。LXR $\alpha$ タンパク質はヒト組織とラット組織で同様の発現分布を示していた。LXR $\alpha$ タンパク質の発現する臓器は、これまでに行われた Gene Chip による LXR $\alpha$ の mRNA 発現解析の結果ともよく一致していた。

LXR $\alpha$  /  $\beta$ 欠損マウスなどを用いた解析から、動脈硬化においてマクロファージに発現する LXR $\alpha$ および $\beta$ がその病状に大きく関わる事が予想されている。そこで、ヒト動脈硬化病変部位について PPZ0412 による免疫組織染色を試みたところ、動脈硬化病変において、LXR $\alpha$ タンパク質は浸潤した単核細胞と泡沫細胞に特異的に強く発現していた。粥状物質の多い部位では、泡沫細胞数が減少するだけでなく、LXR $\alpha$ タンパク質の発現量も低下していた。以上から、LXR $\alpha$ タンパク質が動脈硬化病変部位において、その病状の進行と深く関係している可能性が示唆された。LXR $\alpha$ 陽性所見が見られた細胞種を調べるために CD68 またはスカベンジャー受容体 A-I との二重染色を行ったところ、LXR $\alpha$ 陽性細胞と CD68 陽性細胞、スカベンジャー受容体 A-I 陽性細胞はほぼ一致していた。CD68 とスカベンジャー受容体 A-I はともにマクロファージのマーカータンパク質であり、LXR $\alpha$ 陽性細胞がマクロファージであることが示された。

今回作製された抗体 PPZ0412 は、生理的に発現する LXR $\alpha$ タンパク質を検出可能であり、免疫沈降に用いる事も可能である。この抗体を用いることにより、生理的に発現する LXR $\alpha$ タンパク質そのものをターゲットとした研究が可能になった。今後、この抗体をツールとして LXR $\alpha$ に関する研究が飛躍的に発展する事が期待される。

LXR $\alpha$ タンパク質は他のタンパク質（コファクター）との相互作用によって機能すると考

えられる。LXR $\alpha$ と結合するコファクターとしては、核内受容体に共通に結合する NCOA, NCOR などが知られている。しかし、LXR $\alpha$ に特異的に結合するコファクターはいまだ明らかにされていない。LXR $\alpha$ と特異的に相互作用するコファクターを探索することは、LXR $\alpha$ の機能を明らかにし、制御する上で非常に重要であるといえる。

そこで、LXR $\alpha$ LBD を Bait として用いて、ヒト肝臓ライブラリーから酵母 Two-Hybrid スクリーニングを行った。その結果、LXR $\alpha$ LBD に結合するタンパク質として ARA55 がスクリーニングされた。LXR $\alpha$ と結合することがすでに報告されている NCOA1 や RXR $\alpha$ も同時にスクリーニングされた。ARA55 は別名を TGF $\beta$ IT1 といい、核内受容体 AR と特異的かつリガンド依存的に相互作用することが知られているコファクターである。

スクリーニングに使用した Bait と ARA55 をコトランスフォーメーションした酵母を、濃度を変化させた LXR $\alpha$ リガンドを含む選択培地に播種したところ、リガンド濃度 0.1 $\mu$ M 以上を添加した培地にのみコロニーを形成した。免疫沈降の実験ではリガンド存在下でのみ、LXR $\alpha$ と ARA55 が共沈した。Mammalian Two-Hybrid 法で LXR $\alpha$ LBD と ARA55 の相互作用を確認したところ、リガンドを添加したときに、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼの活性が上昇した。以上の結果から LXR $\alpha$ と ARA55 は、酵母細胞、哺乳類細胞のどちらにおいても、リガンドの存在する場合のみ結合することが示された。その生理的意義については更なる解析を要するが、リガンド依存的に相互作用していることから、リガンド依存的転写制御に関わる分子であることが期待される。