

## 論文の内容の要旨

論文題目 HNF4 $\alpha$ の標的遺伝子のプロファイリングと機能解析

氏名 寿見 孝一

### 核内受容体

Hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  (HNF-4 $\alpha$ ) は核内受容体スーパーファミリーに属する転写因子であり、肝臓、膵臓、小腸、腎臓、大腸、胃で発現している。HNF-4 $\alpha$ は肝臓において、脂質代謝、グルコース代謝、脂肪酸代謝、発現に関与する遺伝子の発現に関与する。HNF4 $\alpha$ はプロモーター領域に存在するHNF-4 $\alpha$ 結合配列 DR1 (direct repeat with one base spacing) GGGC/GCA n AGGT/CCA にホモダイマーとして結合し、標的遺伝子の転写調節を行う。

核内受容体には NH<sub>2</sub> 端より、リガンド非依存性転写活性化ドメイン(AF-1, activation function-1); 2つのジンクフィンガーを含むDNA結合ドメイン(DNA); ヒンジドメイン(hinge); リガンド結合部位 / 2量体形成部位 (Ligand Binding / Dimerization); リガンド依存性転写活性化部位 (AF-2) が存在する。リガンドが結合すると核内受容体は高次構造が変化しコファクターとの相互作用の調節を行い標的遺伝子の転写活性の制御を行う。HNF-4 $\alpha$ には、PGC-1 (peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1)、GRIP-1 (glucocorticoid receptor-interacting protein 1)、SRC-1 (steroid receptor coactivator-1) といったコアクティベーターが相互作用し、種々のHNF-4 $\alpha$ の標的遺伝子の転写活性化に関与する。

HNF4 $\alpha$  は maturity-onset diabetes of the young (MODY-1)の原因遺伝子である。MODY1 患者では、グルコース応答性インスリン分泌が低下する。HNF-4 $\alpha$ の変異、及び HNF1 $\alpha$  プロモーターに存在する HNF-4 $\alpha$  結合部位の変異は糖尿病の原因となる。さらに、HNF-4 $\alpha$ の  $\beta$ 細胞特異的プロモーターである P2 プロモーターの変異が2型糖尿病の原因となることが指摘されている。HNF-4 $\alpha$ は膵  $\beta$ 細胞において、グルコース代謝やインスリン分泌に関与する遺伝子発現を調節することが指摘されている。HNF-4 $\alpha$ の標的遺伝子の具体例として、GLUT2 (Glucose transporter 2)、L-PK (Liver-type pyruvate kinase)、glucokinase、aldolase B、insulin が挙げられる。

### 生活習慣病と核内受容体

コレステロールホメオスタシスは、食事からのコレステロール吸収、アセチル CoA からの生合成、肝臓から胆汁中へのコレステロールの排出、コレステロールから胆汁酸やステロイドホルモンなどへの異化によって制御される。リガンド依存性転写因子である核内受容体が、オキシステロールや胆汁酸などのコレステロール代謝関連化合物の受容体として機能し、チトクローム P450 などの脂質代謝律速酵

素や、ABC 蛋白質 (ATP-binding cassette transporters) などの細胞膜を介する脂質輸送体 (脂質トランスポート)、細胞内における脂質輸送 (脂質トランスファー) に関する蛋白質の発現調節を介してコレステロールの恒常性を制御していることも明らかにされつつある。

脂質の過剰摂取は現代病である高脂血症、糖尿病や動脈硬化などの生活習慣病の原因となるゆえ、肝臓におけるコレステロールの胆汁への排出及びコレステロールから胆汁酸への異化は、コレステロールホメオスタシスの維持において重要な経路である。近年、細胞のコレステロールホメオスタシスを維持する転写因子、核内受容体が明らかにされつつある。肝細胞において HNF-4 $\alpha$  は、コレステロールから胆汁酸を合成する経路の律速酵素 cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1)、及び、コール酸合成経路の酵素でありコール酸とケノデオキシコール酸の生成比を調節する sterol 12 $\alpha$ -hydroxylase (CYP8B1) の遺伝子発現を介して、コレステロールから胆汁酸への異化に関与する。ヒト *CYP7A1*、ヒト *CYP8B1* プロモーター領域には HNF-4 $\alpha$  が結合する DR-1 配列が存在する。これらの酵素 CYP7A1、CYP8B1 は核内受容体ファミリーに属する転写因子 LXR (liver X receptor) や FXR (farnesoid X receptor) によっても制御される。

またコレステロールホメオスタシス維持には、細胞外へのコレステロール排出は必須であり、ステロール輸送体 ABC 蛋白質を介して細胞外へ排出 (トランスポート) される。そしてこの ABC 蛋白質も核内受容体 LXR や FXR によって発現が制御されることが近年明らかとなった。

## ABC 蛋白質

ABC 蛋白質は、トランスポーター、チャネル、レセプターという多種多様な機能を持つ膜蛋白質のファミリーであり、細胞内 ATP によって駆動あるいは制御されている。ABC 蛋白質がコレステロールやリン脂質などを輸送することが指摘され、ABC 蛋白質ファミリーが生体異物排出ポンプとしてだけでなく、ステロールホメオスタシスにとって重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。

ヒト染色体上には 49 の ABC 蛋白質遺伝子がコードされているが、それらの一部が体内の脂質輸送に関係していることが知られている。体内の脂質ホメオスタシスにおける ABC 蛋白質の重要性を示す例として、血中の高密度リポ蛋白質 (HDL) が極端に減少する遺伝病であるタンジール病の原因が *ABCA1* (ATP-binding cassette, sub-family A, member 1) 遺伝子の異常であるという例が挙げられる。*ABCA1* は 12 の膜貫通ドメインと 2 つのヌクレオチド結合領域を持つ ABC 蛋白質であり、HDL の形成に必須な役割を果たす。*ABCA1* 遺伝子の変異により家族性低 HDL 血症が引き起こされる。*ABCA1* 遺伝子は細胞内のコレステロール濃度の上昇に応じてその代謝産物であるオキシステロールをリガンドとする転写因子 LXR により転写が活性化される。さらに LXR は *ABCG1*、*ABCG5*、*ABCG8* 遺伝子発現に関与しており、脂質トランスポートに LXR が重要な役割を果たしていることが指摘されている。

ABC 蛋白質ファミリーに属する *ABCG5*、*ABCG8* はハーフトランスポーターであり、*ABCA1* が 12

の膜貫通領域と2つのATP結合ドメインを持つのに対し、ABCG5とABCG8はそれぞれ6つの膜貫通領域と1つのATP結合ドメインを持ちヘテロダイマーを形成している。ABCG5/G8ヘテロダイマーは、肝臓や小腸の細胞の膜上に存在し、コレステロール、及び、シトステロールなどのステロール排出の制御に関与する。

ヒト*ABCG5*及びヒト*ABCG8*遺伝子は染色体2p21上に逆方向に存在し、それらの遺伝子間にはヒト*ABCG5*プロモーター及びヒト*ABCG8*プロモーターとして機能する全長374bpの双方向プロモーターが存在する。*ABCG5*及び*ABCG8*遺伝子に変異が生じると、シトステロール症が引き起こされる。シトステロール症患者は $\beta$ -シトステロールなどのステロール吸収の増加、胆汁へのステロール排出減少といった症状が見られる。*G5G8*<sup>-/-</sup>マウスでは、胆汁へのコレステロール排出が減少する一方、ABCG5、ABCG8を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは胆汁中コレステロール濃度上昇、ステロール排出増加が見られることより、ABCG5及びABCG8発現は胆汁へのコレステロール排出に非常に重要であることが指摘されている。

## 研究の目的及び結果

HNF4 $\alpha$ は、コレステロールから胆汁酸への異化に関与する酵素CYP7A1やCYP8B1の転写活性化に影響を及ぼすことが指摘されていたが、コレステロールホメオスタシスにおけるHNF4 $\alpha$ の果たす役割の全貌は明らかではなかった。そこで本研究では、(1)脂質恒常性維持に関与する転写因子・核内受容体、(2)細胞膜や分子集合体を介する脂質輸送(脂質トランスポート)に関与する脂質トランスポーター、(3)細胞内における脂質輸送(脂質トランスファー)に関与する脂質トランスファー蛋白質、に及ぼす転写因子HNF4 $\alpha$ の果たす役割、特に生活習慣病における制御に関わるメカニズムを明らかにすることを目的とした。

まず、リガンドや標的遺伝子の不明な点の多いHNF4 $\alpha$ の機能解明のため、ヒト肝細胞において、RNAi(RNA interference)によりHNF4 $\alpha$ 蛋白質をノックダウンした場合と、アデノウイルスによりHNF4 $\alpha$ 蛋白質を過剰発現した場合につき、cDNAマイクロアレイを用いて遺伝子発現の変動を系統的に明らかにし、代謝制御に関わる標的遺伝子を抽出した。

次に、その抽出された新規の標的遺伝子を対象として、その制御機構に核内受容体HNF4 $\alpha$ がどう関与するかを転写調節機構から明らかとした。

HNF4 $\alpha$ の機能解析を、肝細胞におけるトランスクリプトーム解析を用いて標的遺伝子抽出とそのプロモーター解析から、HNF4 $\alpha$ は、コレステロールホメオスタシスにおいて、従来知られるCYP7A1およびCYP8B1のp450ファミリー遺伝子の制御に加え、脂質トランスポーターであるABCG8,G5の転写活性化を行うことを明らかとした。