

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 17 年度博士課程 入学
氏名 有戸 光美
指導教員名 佐藤 隆一郎

論文題目

転写因子 SREBP の SUMO 化修飾による活性制御機構に関する研究

1. 序論

高血圧、脂質異常症、糖尿病、肥満などの生活習慣病は、高齢化社会において一層の増加が予想されている。生活習慣病は生体における脂質代謝異常に端を発するものであり、これが引き金となって動脈硬化さらには心疾患、脳血管疾患に至る。

SREBP (sterol regulatory element binding protein)はコレステロール・脂肪酸の生合成に関与する酵素やコレステロールの取り込みに関与する LDL (low density lipoprotein)受容体など脂質代謝関連遺伝子を包括的に制御する転写因子である。従って、SREBP の活性調節機構について知見をかさねることは脂質代謝異常が原因である生活習慣病の予防、治療法確立への一助となるものと期待される。

SREBP は、bHLH-Zip (basic helix-loop-helix leucine zipper) motif を含む転写因子で、異なる遺伝子からなる SREBP-1 と SREBP-2 から構成される。SREBP-1 には、スプライシングの違いにより生じる SREBP-1a と SREBP-1c が存在する。主に SREBP-1 は脂肪酸代謝に関与する遺伝子の、SREBP-2 はコレステロール代謝に関与する遺伝子の転写調節に関与している。

SREBP は小胞体膜上で前駆体として合成される。細胞内にコレステロールが十分にあるときには、SREBP

は小胞体膜上に局在しているが、不足すると、小胞体からゴルジへ移行し、2段階のプロセッシングを介して、ホモダイマーを形成し、核へ移行して、脂質合成系の遺伝子群の転写を正に制御する。核内においては、SREBPは、転写共役因子CBP (cAMP response element-binding protein)や核内受容体HNF (hepatocyte nuclear factor)-4 α と相互作用し活性が上昇すること、核内受容体LRH (liver receptor homolog)-1と相互作用し活性が減少すること⁽¹⁾の他、翻訳後修飾を受けることによりその活性調節がなされていることが近年明らかとなってきた。これまで焦点が当てられていた核外でのプロセッシングによる活性調節は、核内で精巧な活性調節が行われて初めて意味をなすことから、核内で行われている活性調節について詳細を明らかにすることは、恒常的な脂質代謝制御機構の包括的理解につながるものと期待される。

当研究室の研究で、核内に移行したSREBPがユビキチン化修飾を受け、26sプロテアソーム系において分解される、すなわち「量的調節」を受けること⁽²⁾、またそれとは独立して、翻訳後修飾タンパク質の1つであるSUMO (small ubiquitin like modifier)-1化修飾を受け、その活性が負に制御される、すなわち「質的調節」を受けること⁽³⁾を明らかにしてきた。しかし、SUMO-1化修飾に関する詳細な分子メカニズムは不明である。そこで、本研究では、核内における「質的調節」機構の一端を明らかにするために、いかにしてSUMO-1化修飾が制御されるか、またSUMO-1化修飾を受けることによりどのような分子メカニズムでその転写活性が負に制御されるか解明することを目的とした。

2. Growth factor による SUMO-1 化修飾制御機構の解明

本章では、SREBPのSUMO-1化の生理的意義付けを目的とし、SUMO-1化修飾の制御機構について明らかにした。

SREBPは種々の翻訳後調節を受けるので、本章では他の翻訳後修飾との関係に着目し、解析を進めた。これまで、当研究室は、「SREBPのSUMO-1化修飾はユビキチン化と独立して起こること」を示した。また、「SREBPのユビキチン化は、アセチル化と競合している」との報告や「SREBPはMAPKカスケード活性化を介してリン酸化修飾を受け、その転写活性が上昇する」という報告があるが、SUMO-1化と他の翻訳後修飾との関連性は見出されていない。

SREBP-1a/2のアミノ酸の一次構造を調べた結果、SREBP1a/2両方とも、SUMO-1化部位の近傍に、「MAPKによりリン酸化を受ける」Ser残基が存在していることが明らかとなった。このSer残基は、SREBP-1aでは「SUMO-1化部位である123番目のLys残基の近くである」117番目に、SREBP-2では「SUMO-1化部位である464番目のLys残基の近くである」432番目と455番目に存在している。まずは、SREBP-2に着目し、Ser432及びSer455がSREBPのSUMO-1化修飾に関与するか調べるために、リン酸化を受けない変異体SREBP-2 (S432A)もしくは(S455A)、リン酸化修飾をミミックした変異体SREBP-2(S455D)を発現するプラスミドを構築し、細胞に野生型SREBP-2もしくは変異体SREBP-2と

SUMO-1 を共発現させ、SREBP-2 野生型及び変異体の SUMO-1 化量を調べた。その結果、変異体 SREBP-2 (S455A)の SUMO-1 化量は野生型より多く、変異体 SREBP-2 (S455D)の SUMO-1 量はほとんど検出されなかった。このことから SREBP-2 の SUMO-1 化修飾に Ser455 が重要であることが示唆された。この Ser455 は、MAPK カスケード活性化によりリン酸化修飾を受けるので、MAPK 活性化剤として PMA, IGF-(insulin like growth factor)-1 また MAPK カスケード阻害剤として MEK 阻害 U0126 による野生型 SREBP-2 の SUMO-1 化量への影響を調べた。その結果、PMA, IGF-1 により SREBP-2 の SUMO-1 化修飾は減少、U0126 により増加した。一方で、変異体 SREBP-2 (S455A)の SUMO-1 化量に変化はなかった。

また、SREBPs はインシュリン等の刺激によりリン酸化修飾を受け、その転写活性が上昇することが報告されている。そこで、その転写活性調節に SUMO-1 化修飾が直接関与しているか検討した。GAL4-UAS システムを用い、IGF-1 による野生型 SREBP-2、リン酸化を受けない変異体 SREBP-2 (S455A)もしくは SUMO-1 化修飾を受けない変異体 SREBP-2 (K464R)の転写活性への影響を調べた結果、IGF-1 により野生型 SREBP-2 の転写活性は上昇した。一方、二者の変異体 SREBP-2 での変化は見られなかった。以上のことから、SREBP-2 の SUMO-1 化修飾に、SUMO-1 化部位近傍の Ser455 の状態が重要であること、また、IGF-1 による MAPK を介した生理的刺激にตอบสนองし SUMO-1 化修飾が減少し、SREBP の活性が正に制御されることが明らかとなった。SREBP の SUMO-1 化修飾は、Growth factor による細胞膜脂質供給促進メカニズムに関与する生理学的に重要な翻訳後調節であると言える。

3. SUMO-1 化修飾による SREBP 活性調節抑制機構の解明

本章では、SUMO-1 化修飾により SREBP の活性は負に制御される分子メカニズムに関して詳細に検討し、その一端を明らかにした。

はじめに、SREBP の SUMO-1 化修飾による活性の抑制に、転写共役抑制因子の関与を考え、その 1 つであるヒストンデアセチラーゼ (HDAC)ファミリーが関与しているかについて調べた。HDAC 活性阻害剤であるトリコスタチン A (TSA)による野生型 SREBP-2 及び SUMO 化修飾を受けない変異体 SREBP-2 (K464R) の転写活性への影響を調べた。その結果、TSA 処理により野生型 SREBP の転写活性は、変異体 SREBP-2 の転写活性程度まで、有意に上昇したが、変異体 SREBP-2 の転写活性に変化は無く、SUMO-1 化修飾による SREBP の転写活性抑制に HDAC ファミリーが関与していることが示された。そこで、どの HDAC 分子が SREBP の活性調節に関与しているか調べるために、細胞に、種々の HDAC 及び SREBP を共発現させ、その相互作用を検討した結果、HDAC3 と SREBP-2 の相互作用が確認された。そこで、HDAC3 と変異体 SREBP-2 (K464R)の相互作用を調べたところ、その相互作用は見られなかった。また、SREBP の応答遺伝子のプロモーター内 SRE 上でも同様の相互作用が見られるか調べるために、野生型もしくは変異体 SREBP-2 及び HDAC3 を共発現した細胞を用いて CHIP アッセイを行った結果、

SRE 上でも同様の結果が得られた。以上より、SREBP の SUMO-1 化修飾依存的に HDAC3 がリクルートされることが明らかとなった。この現象が、SUMO 化修飾による SREBP の転写活性低下に関与しているかを調べるために、siRNA 法を用い、内因性 HDAC3 をノックダウンし、SREBP 応答遺伝子群の mRNA レベル及び野生型 SREBP-2 及び変異体 SREBP-2 (K464R)の転写活性を調べた結果、siHDAC3 により SREBP 応答遺伝子群の mRNA は上昇傾向にあり、野生型 SREBP-2 の転写活性は有意に上昇したのに対し、変異体 SREBP-2 (K464R) の転写活性に変化はなかった。さらに siHDAC3 による LDL 受容体タンパク質発現亢進を Dil-LDL 取り込み実験により調べた結果、HDAC3 発現低下により LDL の取り込みは有意に上昇した。

以上より、SREBP-2 は SUMO 化修飾依存的に HDAC3 をリクルートし、その活性が負に調節されることが明らかとなった。

4. まとめ

これまで、脂質代謝を包括的に制御する転写因子 SREBP の活性調節には、小胞体-ゴルジにおけるプロセシングによる活性化機構に焦点があてられてきた。厳密なプロセシング機構は、核内での精巧な活性調節が行われて初めて意味をなすことから、核内で行われている活性調節についても詳細を明らかにすることは、恒常的な脂質代謝制御機構の総合的理解につながるものと期待される。

本研究により、SREBP の核内における質的な調節機構の一端が明らかとなった。核内における SREBP-2 の SUMO-1 化修飾に、SUMO-1 化部位近傍の Ser455 の状態が重要であること、また、Growth factor である IGF-1 による MAPK を介した生理的刺激に応答し SUMO-1 化修飾が減少し、SREBP の活性が正に制御されることを示した。さらにその SUMO-1 化修飾による SREBP-2 の活性減少は、SREBP-2 の SUMO 化修飾依存的な HDAC3 のリクルートに起因することを示した。

以上のことから、SREBP の SUMO-1 化修飾は、Growth factor による細胞への膜脂質供給メカニズムに関与する生理学的に重要な翻訳後調節であると結論した。

- 1) Kanayama, T., Arito, M., So, K., Hachimura, S., Inoue, J. and Sato, R. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 10290-10298
- 2) Hirano, Y., Yoshida, M., Shimizu, M. and Sato, R. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276** 36431-36437.
- 3) Hirano, Y., Murata, S., Tanaka, K., Shimizu, M. and Sato, R. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 16809-16819

