

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成18年度博士課程 入学  
氏名 入沢 正人  
指導教員名 佐藤 隆一郎

### 論文題目

ステロールセンシングドメインタンパク質 TRC8 による SREBP 活性調節機構

### 第1章 序論

TRC8 (Translocation in renal cancer from chromosome 8) は遺伝的に腎がん (Renal cell carcinoma: RCC) を発症する家系において発見された遺伝子で、12回の膜貫通領域とタンパク質のユビキチン連結酵素 (E3) に広く存在する RING フィンガードメインを有する小胞体膜タンパク質である。さらに、軸形成や組織分化を調節している PTCH (Patched) と相同性が高く、PTCH はステロールセンシングドメイン (Sterol-sensing domain: SSD) を有することから、TRC8 も SSD タンパク質であることが示唆されている。現在までに明らかにされている SSD タンパク質として、NPC1 (Niemann-Pick type C1), NPC1L1 (NPC1 like 1), PTCH, SCAP (SREBP cleavage-activating protein), HMGR (HMG CoA reductase) が挙げられ、細胞内コレステロールに応じた様々な機能が推測されている。しかし、TRC8 の機能は未だ十分に明らかにされていない。TRC8 は小胞体の膜上に局在し、SCAP や HMGR と同様に脂質代謝を包括的に制御している転写因子 SREBP の活性化に関与している可能性が想定されることから (Fig 1)、本研究では SREBP 活性化機構に着目して研究を行った。

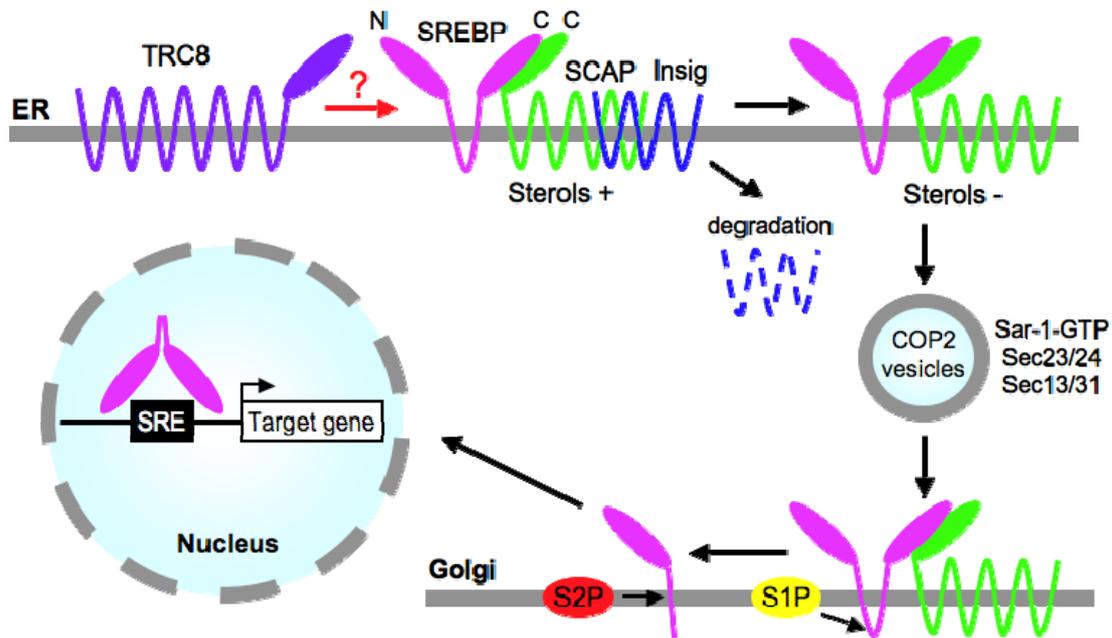


Fig 1 SREBP 活性化機構

## 第2章 TRC8 によるSREBP応答遺伝子発現への影響

細胞内コレステロールレベルを変化させた時の SREBP 応答遺伝子発現の変動に及ぼす TRC8 の影響を、SREBP2 応答遺伝子のプロモーター領域を用いた Luciferase assay により検討した。その結果、TRC8 の強制発現によりプロモーター活性が抑制された。さらに、Real-time PCR により内因性応答遺伝子発現への影響を検討したところ、TRC8 の発現による抑制が確認された。また、siRNA により内因性 TRC8 をノックダウンして検討した結果、応答遺伝子のプロモーター活性及び発現が亢進した。以上の結果から、TRC8 は SREBP 応答遺伝子発現を抑制することが明らかになった。

SREBP はゴルジ体で S1P と S2P によりプロセッシングを受けて核内型となり、核内に移行して応答遺伝子発現を促進する。そこで、プロセッシング後の核内型 SREBP2 と TRC8 を強制発現させ、応答遺伝子発現への影響を Luciferase assay により検討した。その結果、TRC8 は核内型 SREBP2 によるプロモーター活性上昇を抑制しなかった。従って、TRC8 は SREBP の転写活性を直接抑制するのではなく、小胞体からゴルジ体におけるプロセッシングを抑制することが示唆された。

また、TRC8 は E3 として機能していることが報告されているので、TRC8 の酵素活性が SREBP 応答遺伝子発現の抑制に関与しているかを、RING フィンガードメインの変異体を用いて Luciferase assay により検討した。その結果、野生型のみならず変異体においてもプロモーター活性が抑制された。従って、TRC8 は膜貫通領域を介して SREBP 応答遺伝子発現を

抑制することが明らかになった。

### **第3章 TRC8によるSREBPプロセッシングへの影響**

細胞内コレステロールレベルを変化させた時の SREBP2 プロセッシングに及ぼす TRC8 の影響を Western blotting により検討した。その結果、TRC8 の強制発現により核内型 SREBP2 の発現が減少したことから、TRC8 は SREBP2 プロセッシングを抑制することが明らかになった。さらに、RING フィンガードメインの変異体を用いて検討したところ、変異体においても SREBP2 プロセッシングが抑制された。また、siRNA を用いて内因性 TRC8 をノックダウンして検討した結果、SREBP2 プロセッシングが亢進した。以上の結果から、TRC8 は膜貫通領域を介して SREBP2 プロセッシングを抑制することが明らかになった。

そこで、GFP-SCAP 発現 CHO 細胞を用いて細胞内コレステロールレベルを変化させた時の SCAP のゴルジ体輸送に及ぼす TRC8 の影響を GFP の蛍光により検討した。その結果、TRC8 の強制発現により SCAP の輸送が抑制された。従って、TRC8 による SREBP プロセッシングの抑制機構として、

- 1 TRC8 が SREBP や SCAP と相互作用することにより SREBP/SCAP 複合体の輸送を抑制する。
- 2 TRC8 が SREBP/SCAP 複合体の輸送を行っている COP2 と相互作用することにより輸送を抑制する。

という2つの可能性が考えられる。

そこで、TRC8 と SREBP2 または SCAP を強制発現させ、免疫沈降と Western blotting により結合を検討した。その結果、TRC8 は SREBP2, SCAP それぞれと結合することが明らかになった。従って、TRC8 は SREBP や SCAP と結合することにより、SREBP/SCAP 複合体の輸送を抑制することが示唆された。

また、SREBP/SCAP 複合体の輸送は SCAP と COP2 の構成タンパク質の1つである Sec24 との結合を介していることが報告されている。そこで、TRC8 と Sec24 との結合を検討した結果、TRC8 は Sec24 と結合することが明らかになった。さらに、TRC8 と Sec24 との結合は SREBP2 の強制発現により抑制された。以上の結果から、本来 SREBP/SCAP 複合体も TRC8 も COP2 によりゴルジ体へ輸送されるが、TRC8 が SREBP2 や SCAP と結合することにより SREBP/SCAP 複合体も TRC8 も Sec24 との結合が抑制され、小胞体に留まることが示唆された。

### **第4章 TRC8 と相互作用するタンパク質の探索と同定**

上述した TRC8 による SREBP 活性化抑制作用は TRC8 タンパク質の機能の一部と考えら

れる。そこで、TRC8 の本来的機能を明らかにするため、相互作用するタンパク質の探索と同一を行った。まず、3 x FLAG-TRC8 (WT/RING MUT) 発現細胞を作製し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降した後に SDS-PAGE と銀染色を行い、相互作用するタンパク質のバンドを検出した。その結果、WT のサンプルにおいて分子量 49 kDa 付近にバンドを検出した。その後、バンドを切り出して質量分析装置 (MALDI-TOF-MS) により解析を行い、Glycogen 合成の開始点を形成するタンパク質 Glycogenin-1 (GYG1) を同定した。

次に、TRC8 と GYG1 を強制発現させ、TRC8 による GYG1 のユビキチン化を免疫沈降と Western blotting により検討した。その結果、GYG1 のユビキチン化は検出されなかった。また、SREBP2 プロセッシング及び TRC8 の発現に及ぼす GYG1 の影響を検討したところ、GYG1 の強制発現またはノックダウンにより SREBP2 プロセッシング及び TRC8 の発現に変化がみられなかった。銀染色の結果から、GYG1 は TRC8 の RING フィンガードメインに結合することが示唆された。一方で、TRC8 による SREBP2 プロセッシング抑制は RING フィンガードメイン非依存的である。従って、GYG1 は TRC8 による SREBP2 プロセッシング抑制には関与せず、TRC8 の RING フィンガードメインを介したイベントに関与している可能性が考えられる。

## **第5章 TRC8 の発現変動**

細胞内コレステロールレベルを変化させた時の TRC8 の発現への影響を Real-time PCR により検討した。その結果、TRC8 の発現に変動はみられなかった。さらに、Western blotting により検出したところ、半減期 12 時間程度で分解を受け、その分解は細胞内コレステロールレベルで変動しなかった。次に、リポタンパク質を除いた血清 (LPDS) を含む培地により細胞内コレステロールレベルを変化させ、Western blotting により TRC8 を検出した。その結果、TRC8 の発現上昇が確認された。しかし、コレステロールや 25-HC を添加しても TRC8 の発現上昇に変化がみられなかった。そこで、細胞を LPDS 培地で培養後、FBS 培地 (通常の培地) に交換して TRC8 を検出したところ、FBS 培地により TRC8 の分解が亢進した。以上の結果から、培地からのリポタンパク質供給の低下により TRC8 は安定化することが示唆された。

## **第6章 総合討論**

本研究により、1) TRC8 は SREBP/SCAP 複合体と結合することにより小胞体からゴルジ体への輸送を抑制する、2) 培地からのリポタンパク質供給の低下により TRC8 は安定化することが示唆された。リポタンパク質供給低下は SREBP の活性化を引き起こすことから、TRC8 は SREBP の活性化を負に制御することにより、細胞内コレステロールレベルの恒常性維持に関与していることが考えられる。