

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成 20 年度博士課程 進学  
氏 名 八代 拓也  
指導教員名 佐藤 隆一郎

### 論文題目

LDL 受容体遺伝子の発現調節に関する研究

### 第 1 章 序論

動脈硬化性疾患は、日本人の死因の約 30%を占め、ガンと並んで日本人の二大死因とされている。今後、高齢社会の進展と共に、患者数は益々増加することが懸念されており、その予防・治療法の確立は極めて重要な課題となっている。

動脈硬化性疾患発症の最重要危険因子は、血中の LDL (Low density lipoprotein)であることが立証されており、LDL の細胞内取り込みを担う LDL 受容体 (LDLR : Low density lipoprotein receptor) の高発現が、動脈硬化性疾患発症のリスクを低減させることが知られている。従って、LDLR 遺伝子の発現調節機構の解明は、抗動脈硬化性疾患を謳う機能性食品や治療薬の開発に繋がると期待される。

転写調節および翻訳後調節における LDLR の発現調節機構に関しては解明されつつあるが、転写後調節、つまり mRNA の安定性調節機構に関しては未解明な部分が多く残されている。また、食品成分が LDLR の発現を変動させるという報告はあるが、そのメカニズムは未解明なものも多く存在する。本研究では、これらの課題に取り組み、LDLR 遺伝子の発現調節機構の包括的な解明による、動脈硬化性疾患に対する新たな予防・治療法の提案を目指した。

## 第2章 HuRによるLDL受容体mRNAの安定性調節機構の解析

LDLR mRNA の安定性を制御する因子を探索するため、RNA 結合タンパク質に対する siRNA スクリーニングを行ったところ、HuR (Human antigen R)がその候補として見出された。HuR はユビキタスに発現する AUBP (AU-rich element binding protein) で、通常は核内に存在するが、ある種の刺激に応じて細胞質に移行し、標的 mRNA の 3'UTR (Untranslated region)上の ARE (AU-rich element)に結合して、mRNA の分解を抑制することが報告されている。そこで、本章では、HuR による LDLR mRNA の安定性調節機構の解析を行った。

遺伝子操作により、HuR をノックダウンすると LDLR mRNA は不安定化し、逆に過剰発現すると LDLR mRNA は安定化することが示された。また、同様に LDLR のタンパク質も増減することが示された。

次に、これらの現象が HuR と LDLR mRNA の直接の結合に起因するかについて検討した。HuR 抗体で免疫沈降した共沈物中に LDLR mRNA が含まれるか解析した結果、HuR と LDLR mRNA の結合が示された。

最後に、HuR と LDLR mRNA の結合に必要な領域の決定を試みた。LDLR mRNA は、約半分の 2500b を 3'UTR が占めており、3'UTR には ARE が 4 つ存在することが明らかとなっている。そのため、様々な LDLR mRNA 3'UTR の RNA プローブを作製し、HuR との結合を解析したところ、HuR は最も 5'側に位置する ARE に結合することが示された。また、HuR には、RNA との結合に必要な RRM (RNA recognition motif) が 3 つ存在するが、RRM2 を欠いた変異体では、LDLR mRNA と結合できないことが示された。

以上の結果より、HuR は、LDLR mRNA に結合することで mRNA を安定化させて、LDLR の発現を正に制御していることが明らかとなった。

## 第3章 AICARによるLDL受容体発現誘導機構の解析

AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside)は、細胞に取り込まれるとアデノシンキナーゼによってリン酸化され、ZMP (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide)となる。ZMP は、AMP 同様 AMPK (AMP-activated protein kinase)に結合して活性化する。AICAR は、AMPK の活性化を介して、脂肪酸合成に関与する ACC (Acetyl-CoA carboxylase) をリン酸化不活性化することや、コレステロール合成の律速酵素である HMGCR (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase)をリン酸化不活性化することなどが報告されており、脂質代謝改善効果があるとされている。

近年、HepG2 細胞において、AICAR が LDLR mRNA 量を増加させると報告され、AICAR による LDLR 発現誘導が、AICAR の脂質代謝改善効果の一翼を担っている可能性が示された。そこで本章では、AICAR による LDLR 発現誘導機構の解析を行った。

HepG2 細胞を AICAR で処理して、LDLR を含む脂質代謝関連遺伝子の mRNA 量の変化を解析したところ、AICAR による LDLR mRNA 量のみが増加が示された。また、AICAR が LDLR のプロモーター活性に及ぼす影響をレポーターアッセイにて解析したところ、AICAR は LDLR の転写には関与しないことが示された。そこで、AICAR による LDLR mRNA の安定性への影響を解析したところ、AICAR は LDLR mRNA の分解を抑制し、安定化させることが示された。

次に、AICAR による LDLR mRNA 安定化のシグナル伝達経路を解明するために、各種阻害剤を用いて検討した。その結果、AICAR による LDLR mRNA 安定化は、AMPK ではなく、MEK/ERK (Extracellular signal regulated-kinase) 経路を介して誘導されることが示された。

培養細胞を用いた実験から、AICAR による LDLR mRNA 安定化は、LDLR タンパク質および LDL 取込み能の上昇にまで及ぶことが示されたため、生体において、AICAR が同様の作用を及ぼすかについて検討した。高コレステロール状態にしたハムスターに、AICAR を投与して、血中脂質成分を測定したところ、AICAR による血中 LDL コレステロール値の低下が示された。

以上の結果より、AICAR は、LDLR mRNA の安定化を介して LDLR の発現を亢進し、LDL のクリアランスを高めることが明らかとなった。

#### 第 4 章 Resveratrol による LDL 受容体発現誘導機構の解析

フランス人が、他の欧米諸国の人々よりも動物性脂肪を大量に摂取しているにもかかわらず、動脈硬化性疾患での死亡率が低いことは、「フレンチ・パラドックス」と呼ばれて広く認知されている。一般に、この現象の理由として、赤ワインに豊富に含まれるポリフェノールが動脈硬化巣形成の要因となる酸化 LDL の生成を抑制することによると考えられている。その他に、赤ワインの成分で HepG2 細胞を処理すると、LDLR の mRNA 量および活性が増加することから、遺伝子発現を介したポリフェノールの生体調節機能の関与も考えられている。そこで本章では、赤ワインに含まれるポリフェノールの中でも特に注目度の高いリスベラトロールが、LDLR の遺伝子発現を誘導するかについて検討した。

HepG2 細胞を様々な濃度のリスベラトロールで処理して、LDLR を含む脂質代謝関連遺伝子の mRNA 量の変化を解析したところ、リスベラトロールの濃度依存的に LDLR や SQS (Squalene synthase)、HMGCR などの mRNA 量が増加が示された。

これら全ての遺伝子の転写には、共通して転写因子 SREBP (Sterol regulatory element-binding protein) が関与することから、リスベラトロールによる LDLR の発現誘導に SREBP が関与することが考えられた。そこで、リスベラトロールが LDLR のプロモーター活性に及ぼす影響をレポーターアッセイにて解析したところ、リスベラト

ロールによる LDLR 転写亢進への SREBP の関与が示された。

次に、リスベラトロールによる SREBP 活性化のメカニズムを検討するために、SREBP のタンパク質を解析したところ、リスベラトロールは SREBP の前駆体から活性型へのプロセッシングを亢進することが示された。そこで、細胞を過剰なコレステロールで処理してプロセッシングを阻害したところ、リスベラトロールによる LDLR mRNA 量の増加が抑制された。

以上の結果より、リスベラトロールが SREBP のプロセッシングを亢進して LDLR を含む標的遺伝子の発現を誘導することが明らかとなった。

## 第 5 章 総合討論

既存の LDL コレステロール低下薬であるスタチンは、動脈硬化性疾患の予防に多大な貢献をしてきたが、過去に心臓発作などの経験がある高リスク患者においては、より LDL コレステロールを低下させる必要がある。そのため、スタチンとは異なるメカニズムで LDLR の発現を亢進することが、先進的な動脈硬化予防法として望まれている。

本論文で明らかにした「HuR による LDLR mRNA 安定化」および「AICAR による LDLR mRNA 安定化」は、正にスタチンとの相乗効果が期待できる薬剤の開発の一助となり得るだろう。

また、「リスベラトロールによる LDLR の転写亢進」は、日々摂取する食品成分が、LDL コレステロールの上昇を抑制する可能性を示したものであり、抗動脈硬化性疾患を謳う機能性食品の開発の一助となり得るだろう。