

## 論文内容の要旨

論文題目 Role of Mrf-2/ARID5B in PPAR $\gamma$ 2 activation

和訳 Mrf-2/ARID5B の PPAR $\gamma$ 2 活性化における役割

指導教員 永井 良三教授

東京大学大学院医学系研究科  
平成 19 年 4 月入学

医学博士課程  
内科学専攻

氏名 大関 敦子

動脈硬化は、内皮障害・白血球の浸潤・泡沫細胞の形成・平滑筋細胞の遊走など、多くのステップを経て進行すると考えられている。血管平滑筋細胞は分化した状態では収縮蛋白に富んだ収縮型を示すが、動脈硬化病変では脱分化し、蛋白合成の亢進・遊走性を示すようになる。この分化の遷移は形質変換と呼ばれ、動脈硬化のキーポイントの一つである。私たちは、動脈硬化に重要な転写因子を検索するために、平滑筋の分化に関与する転写因子として ARID5B (AT rich interaction domain 5B; 別称 Mrf-2, DESRT) を同定した。

ARID5B 遺伝子は、ARID (AT rich interaction domain) と呼ばれる DNA 結合ドメインを共有する ARID family 転写因子のメンバーである。ARID5B は核蛋白で、 $\alpha$  (2.8kb)、 $\beta$  (3.6kb) という二つのアイソフォームを持ち、 $\beta$  は N 端側が 700bp ほど長い構造となっている。ARID は  $\alpha \cdot \beta$  の共通部分に含まれるが、他に  $\beta$  特異的構造に、Acetylated Lysin に結合するといわれる、ブロモ・ドメインを持っている。また、ARID family のいくつかの転写因子は、Histone demethylase 活性を持つ Jumonji

domain を含んでおり、ARID5B もヒストン・クロマチンの修飾に関与している可能性があると考えられている。ARID5B の null mice は、3 系統が報告されており、いずれも wild type より小型である。Whitson らは、ARID5B null mice は、脂肪組織に乏しく、high fat diet で飼育しても脂肪細胞は大きくなり、肥満に抵抗性であると報告している。また、石森らは、動脈硬化感受性の異なる 2 系統のマウスに、Quantitative Trait Loci 解析と、SNP 解析を組み合わせることで、動脈硬化進展に関与する遺伝子として ARID5B を同定したことを報告している。

私たちは、ヒトで、ARID5B と動脈硬化の関係を明らかにするために冠動脈疾患患者の遺伝子多型を解析した。冠動脈疾患群とコントロール群で、ARID5B の SNP を検討したところ、ひとつのハプロタイプ・ブロックに含まれる SNP 群が、虚血性心疾患の発生抑制に関与していることを認めた。コントロール群で各冠動脈疾患の危険因子と ARID5B の SNP の関連を調べると、糖尿病の発症と関連している可能性が示された。そこで、あらたに糖尿病群とコントロール群を用意し、ARID5B の SNP を検討したところ、同じハプロタイプ・ブロックに含まれる SNP が糖尿病の発生抑制にも関与していた。さらにコントロール群では、アディポネクチン血中濃度と、この SNP 群が関連していた。

このハプロタイプ・ブロックに含まれる Exon は Exon3 のみで、Exon3 に SNP は存在しなかったことから、冠動脈疾患や糖尿病発症抑制に関与している SNPs は intron SNPs で、ARID5B の発現を制御している可能性が高いと考えた。アディポネクチンは脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインのひとつで糖尿病や動脈硬化を抑制する働きをもつことが知られている。そこで、本論文では、ARID5B がアディポネクチン発現制御に寄与しているという仮説をたて、そのメカニズムを解析した。

メカニズムの解析のために、3T3-L1 細胞を解析に使用する妥当性を検討した。3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化の過程において、ARID5B $\alpha$ ・ $\beta$  アイソフォームとも未分化の段階から発現しており、ARID5B $\alpha$  のみ分化 day4 をピークに発現が上昇した。

これはアディポネクチンの発現上昇に先立つものであり、ARID5B $\alpha$  がアディポネクチン発現調節に寄与している可能性があると考えられた。またレトロウイルスを用いて 3T3-L1 細胞で ARID5B $\alpha$  を過剰発現させたところ、コントロールと比較しアディポネクチンの発現が数倍に上昇した。以上より ARID5B $\alpha$  がアディポネクチンの発現調節に寄与する可能性があり、3T3-L1 細胞の系は解析に良いモデルと考えられた。

アディポネクチンプロモーター転写調節のシスエレメントを解析するために、ルシフェラーゼ活性を指標としたレポーターアッセイを行った。3T3-L1 細胞で、ARID5B $\alpha$  単独では 2.0kb のアディポネクチンプロモーター活性は上昇しなかった。しかし、PPAR $\gamma$ 2 (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 2)、RXR $\alpha$  (retinoid X receptor  $\alpha$ )と共発現し、PPAR $\gamma$ 2 リガンドのロシグリタゾンを追加した条件で、さらに ARID5B $\alpha$  を追加するとプロモーター活性の上昇を認めた。次に、プロモーターの deletion assay と mutation assay を行い、PPRE (peroxisome proliferator responsive element)が ARID5B $\alpha$  がアディポネクチンの発現制御をする上で、重要であることが示された。

ARID5B によるアディポネクチンの発現制御メカニズムを検討するために、ARID5B と相互作用する蛋白の探索を行った。第一に、抗 ARID5B 抗体により Co-IP(coimmunoprecipitation) を行い、相互作用する蛋白を抽出し、mass spectrometry によりその蛋白を同定しようと考えた。そのために、ARID5B に対する抗体を作成したが、exogenous に発現した蛋白は認識したが、endogenous ARID5B を特異的に認識する抗体は作成できなかった。第二に、ARID5B が PPRE を介してアディポネクチンの発現制御を行っていることから、PPRE の制御に関する転写因子群との結合を mammalian two-hybrid assay で検討した。PPRE では、PPAR $\gamma$ 2/ RXR $\alpha$  がヘテロダイマーを形成し転写調節をしている。通常は、SMRT や N-CoR などの抑制因子が PPAR $\gamma$ 2/ RXR $\alpha$  ヘテロダイマーに結合し、転写を抑制しているが、PPAR $\gamma$ 2 リガンドが結合すると抑制因子はずれ、CBP $\cdot$ PGC1 $\alpha$  $\cdot$ SRC などの活性化因子が PPAR $\gamma$ 2/

RXR $\alpha$  ヘテロダイマーに結合し転写が活性化される。これらの蛋白と ARID5B $\alpha$  の相互作用を mammalian two-hybrid assay で評価したところ、three-hybrid assay で ARID5B $\alpha$  は SMRT を介して PPAR $\gamma$ 2 と結合していることを示唆する結果が得られ、ARID5B $\alpha$  はリガンド非存在下では抑制因子群のひとつに含まれると考えられた。

抑制因子群 N-CoR/SMRT corepressor complex は、ユビキチン・プロテアソーム系により制御されていることが知られている。Complex 中に含まれる TBL1/TBLR1 は ubiquitin conjugating/19S proteasome complex をリクルートするアダプター蛋白で、抑制因子を活性化因子に転換する。76 アミノ酸からなるユビキチンは、E1・E2・E3 から構成された複合酵素系によって標的タンパク質に共有結合する。標的タンパク質は、連続的にユビキチンが結合したポリユビキチン鎖によって機能が制御され、プロテアソームにより分解される。ユビキチン修飾はリガンド依存的な核内受容体でも機能しており、リガンドが結合することにより TBL1/TBLR1 の働きで ubiquitin conjugating/19S proteasome complex がリクルートされ、抑制因子が分解された後、活性化因子が結合し転写が活性化される。

この TBL1/TBLR1 と ARID5B $\alpha$  の相互作用を mammalian two-hybrid assay で検討したところ、TBL1 と ARID5B $\alpha$  の結合が示された。さらにこの結合を証明するために、ビオチン-ストレプトタビジン系のタンパク複合体精製法を利用した Co-IP assay を行った。まず ARID5B $\alpha$  の N 端側に、ビオチンリガーゼによって特異的にビオチン化されるリジンを含む 23 アミノ酸のペプチドタグを付加したコンストラクトを作製した。ビオチン化されたタグと強固に結合するストレプトタビジンビーズを用いて ARID5B $\alpha$  を含むタンパク複合体を精製したところ TBL1 の存在を認め、両者の相互作用が示された。

今回の解析により、アディポネクチン転写の過程において、リガンド非存在下では ARID5B $\alpha$  は抑制因子複合体の 1 つとして TBL1 と結合していることが示された。リガンドが PPAR $\gamma$ 2 に結合すると、TBL1 の ubiquitin conjugating/19S proteasome complex

リクルート作用をサポートしたり、ユビキチン化を促進したりなどして、抑制因子を排除し、活性化因子が転写活性を上昇させ、アディポネクチンの血中濃度を上昇させる可能性が示された。このようなメカニズムを介して、**ARID5B** は動脈硬化・糖尿病発症抑制に重要な役割を果たしていると思われる。