

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成21年度博士課程 入学  
氏名 近田 裕美  
指導教員名 加藤 茂明

論文題目 新たなオキシステロール受容体相互作用因子の生化学的解析

### 第一章 序論

ステロイドホルモンや脂溶性ビタミンなどの低分子量脂溶性生理活性物質は、性分化や代謝調節など様々な生命現象において重要な役割を担う。これらの脂溶性生理活性物質の生理作用の多くは、リガンド依存的な転写因子である核内受容体を介して発揮される。核内受容体は、ホモダイマーあるいは **RXR** とのヘテロダイマーとして、標的遺伝子プロモーター上流の物理的認識配列に結合する。リガンド非存在下では、転写抑制化因子複合体とともに標的遺伝子の発現を抑制している。核内受容体にリガンドが結合すると、転写抑制化因子複合体が解離する一方、転写活性化因子複合体がリクルートされ、結果として標的遺伝子の転写が活性化される。

オキシステロール受容体 (**LXR**; **Liver X Receptor**) はコレステロールの酸化物であるオキシステロールをリガンドとして活性化する核内受容体であり、コレステロールホメオスタシスに重要な役割を担うことが知られている。**LXR** はコレステロール濃度に応じて、末梢マクロファージから肝臓へのコレステロール逆転送 (**RCT**; **Reverse cholesterol transport**) とそれに続く糞中へのコレステロールの排泄を制御する。また、**LXR** はコレステロール代謝と相互に関連し、脂肪酸合成制御や抗炎症作用を有することが知られている。

一方近年、転写因子とユビキチン・プロテアソームシステムの関連性が示唆されている。

ユビキチン・プロテアソームシステムとは、選択的なタンパク質分解システムである。ユビキチン付加反応は E1、E2、E3 の連鎖的な反応により引き起こされる。このうち、E3 は E2 との結合と標的基質の認識という 2 つの機能を発揮することで、標的タンパク質に対するユビキチン付加反応を仲介する。最近、当研究室において bHLH 型転写因子であるダイオキシン受容 (AhR) がリガンド依存的な E3 ligase 複合体を構成し、基質のユビキチン化を促進すると報告された (Ohtake et al., *Nature* 2007)。

以上のことから、LXR リガンドが重要なシグナルとなって、コレステロール濃度に応答した核内複合体を形成または解離し、転写制御または他の制御機構により、LXR の生理機能が発揮される可能性が考えられる。しかしながら、コレステロール濃度に応答して LXR の生理機能を制御するリガンド依存的な相互作用因子はほとんど明らかではない。そこで本研究では、RCT において重要な細胞種であるマクロファージに着目し、リガンド依存性の新たな LXR 相互作用因子を生化学的に同定することで、LXR 生理機能を解明することを目的とした。

## 第二章 オキシステロール受容体 LXR のリガンド依存性新規相互作用因子の同定

本章では、マクロファージの LXR に着目して、LXR の生理機能の分子基盤を理解するために、核内相互作用因子の生化学的同定を試みた。そのための材料として、マクロファージへの分化能を有するマウス白血病由来単球 Raw264.7 細胞、bait として GST 融合 LXR $\alpha$  (DEF) 及び GST 融合 LXR $\beta$  (DEF) 再構築タンパク質を用いた。Raw264.7 細胞核抽出液を調整し、GST 融合 LXR $\alpha$  (DEF) 及び GST 融合 LXR $\beta$  (DEF) と混合することで、多数の LXR 相互作用因子を精製した。また、これらの多くは LXR リガンド依存性に相互作用していた。

質量分析測定とデータベース検索により、転写共役活性化が報告されている TRRAP、Crebbp、SRC や転写開始に必要な Mediator complex の複数の構成因子が同定されたことから、本精製系の妥当性が確認できた。さらに最もスコアの高い Shkbp1 を機能未知因子として同定した。Shkbp1 は分子量 75 kDa のタンパク質で、BTB ドメインと WD40 リピートを有する。また、スコアは低かったものの、Shkbp1 と同じ BTB スーパーファミリーに属する機能未知因子 KCTD3 も同定された。293T 細胞における共免疫沈降法においても、Shkbp1 は LXR $\alpha$  と LXR $\beta$  の両者の相互作用が見られた。一方、この相互作用は細胞質と核の両画分で認められた。また相互作用の LXR リガンド依存性は、LXR $\beta$  において LXR $\alpha$  に比べて顕著であった。これ以降、リガンド依存性の強く認められた LXR $\beta$  を中心に検討を進めることとした。

### 第三章 Shkbp1 の機能解析

#### Shkbp1 の LXR 転写制御に与える影響の検討

まず、Shkbp1 の LXR へのリガンド依存的転写共役活性を luciferase assay による LXR への転写共役活性化能と real-time PCR による LXR 標的遺伝子発現量測定により検討した。その結果、Shkbp1 は LXR のリガンド依存性転写制御には影響しなかった。

#### Shkbp1 複合体の同定

そこで、LXR/Shkbp1 の機能を明らかにするために、Shkbp1 の相互作用因子の生化学的同定を試みた。FLAG 融合 Shkbp1 を bait として用い、アフィニティ精製を実施した。その結果、BTB スーパーファミリーに属する KCTD3 が高いスコアで同定された。この KCTD3 は LXR の精製においても同定された因子である。これらのことから、LXR/Shkbp1/KCTD3 は複合体を形成していることが推測された。さらに、E3 ligase 複合体として機能することが知られている Cullin3 が同定された。この Cullin3 は BTB ドメインを欠損させた FLAG 融合  $\Delta$ BTB では精製されなかった。

293T 細胞を用いた免疫沈降により、Shkbp1 の BTB ドメインを介して Cullin3 が相互作用することが確認された。以上より、Shkbp1 は Cullin3 を基盤とする E3 ligase 複合体の構成因子であることが明らかとなった。以降、この E3 ligase 複合体を CRL3<sup>Shkbp1</sup> と表記することとした。

次に CRL3<sup>Shkbp1</sup> の会合および活性における LXR リガンドの役割を検討した。まず複合体形成を検討した結果、Cullin3 は LXR リガンドにより解離することが明らかとなった。続いて、CRL3<sup>Shkbp1</sup> の自己ユビキチン化活性を *in vivo*、*in vitro* の両方で検討した。一般的に E3 ligase 複合体の構成因子はそれ自身がユビキチン化されることが知られているため、自己ユビキチン化活性はユビキチン化活性の指標とすることができる。*in vivo* において、Shkbp1 はユビキチン化されており、このユビキチン化は LXR リガンド依存的に減少した。さらに *in vitro* ubiquitination assay により、CRL3<sup>Shkbp1</sup> は自己ユビキチン化活性を有しており、それは LXR リガンドにより消失することが明らかとなった。これらのことから、CRL3<sup>Shkbp1</sup> は LXR リガンド非存在下ではユビキチン化活性を発揮するが、LXR リガンド存在下では Cullin3 が解離することによりユビキチン化活性は消失することが示唆された。

#### Shkbp1 複合体の基質候補群の探索

CRL3<sup>Shkbp1</sup> の生理的役割を明らかにするためには、基質の同定が必要不可欠である。そこで、まず LXR $\beta$  自身が基質候補となるかを検討した。その結果、LXR $\beta$  はわずかにユビキチン化されていたものの、そのユビキチンが LXR リガンドにより著しく消失しなかったことから、LXR $\beta$  自身は基質候補ではないことが示唆された。続いて、LXR $\beta$  相互作用因子群が基質候補となるかについて、LXR $\beta$  相互作用因子群のユビキチン化を免疫沈降法により検討した。LXR $\beta$  相互作用因子群は LXR リガンド非存在下ではユビキチン化されており、LXR

リガンド添加によりそのユビキチン化は減少した。この LXR リガンドによる LXR $\beta$ 相互作用因子群のユビキチン化制御は Shkbp1 のノックダウンにより消失した。このことから、CRL3<sup>Shkbp1</sup> は LXR $\beta$ 相互作用因子群のユビキチン化を LXR リガンド逆依存性に制御することが明らかとなり、LXR $\beta$ 相互作用因子群の中に基質が存在することが示唆された。

そこで、FLAG 融合 LXR $\beta$ を bait に用いた生化学的精製により、基質候補群を網羅的に探索した。その結果、基質候補群として、①転写抑制化因子複合体の分解と転写活性化因子複合体のリクルートに必要とされる TBL1XR1、②LXR を含む核内受容体の転写制御に関与する RXR、③ヒストンのリン酸化を認識して転写活性化に必要とされる 14-3-3 タンパク質、④NuRD complex の構成因子である RBBP4 など転写制御に関与する因子、が同定された。このことから、これら転写関連因子群が LXR リガンド非存在下では CRL3<sup>Shkbp1</sup>により分解され、LXR リガンド存在下では分解が抑制される可能性が考えられた。このことは、LXR リガンド依存性間接的遺伝子発現調節機構の存在を示唆するものであった。

#### 第四章 総合討論

本研究では、マウス白血病単球由来細胞株を用いた生化学的同定系を確立し、機能未知の LXR リガンド依存的相互作用因子として Shkbp1 を同定した。さらに Shkbp1 は Cullin3 を基盤とする E3 ligase 複合体の構成因子であることを見出した。また、この E3 ligase 複合体 (以下、CRL3<sup>Shkbp1</sup>) は LXR リガンド非存在下で形成され、LXR リガンド存在下では Cullin3 の解離により活性が消失することが示唆された。

LXR リガンドにより CRL3<sup>Shkbp1</sup> の Cullin3 が解離する機構は不明であるが、リガンドによる LXR の構造変換を介する可能性が考えられる。これまでに脂溶性低分子化合物がユビキチン化活性を制御するという報告は少ない。哺乳類においては、ダイオキシン受容体 (AhR) がリガンド依存性に E3 ligase 複合体を形成すること、また植物ホルモンのオーキシンが E3 ligase である TIR1 に直接結合し基質の認識を促進することのみである。これらのことから、本研究は E3 ligase 活性の抑制的制御という脂溶性低分子化合物の新規シグナル伝達経路を明らかにした。

さらに LXR リガンドは CRL3<sup>Shkbp1</sup> の活性を制御することにより、LXR リガンド依存性に転写関連因子群の分解を抑制し、コレステロール濃度に応じた遺伝子発現調節を行う可能性が考えられた。今後は、この分解機構の LXR の生理作用における重要性を検討する必要がある。これにより、LXR リガンド依存性の E3 ligase 複合体が LXR の生理作用を制御するという新たな経路を示すことができると期待される。

以上、本研究では LXR リガンドにより抑制的に制御される新たな E3 ligase 複合体を生化学的に同定し、その分子機能の一端を明らかにすることができた。