ワークショップ 6 リポ蛋白受容体機能の調節機構

SREBP による転写調節¹佐 藤 隆一郎²

はじめに

細胞内のコレステロール量は、フィードバックコントロール機構により精密に制御されている。すなわち、細胞内コレステロール量が過多になると生合成ならびに取り込みが減少し、一方、枯渇条件下ではそのいずれもが上昇する。この制御機構は主として生合成、取り込みに関わる酵素、蛋白質の転写を調節することにより行われており、この調節に直接関与する因子として SREBP (Sterol Regulatory Element-binding Protein) が発見された。本稿では、LDL 受容体遺伝子の SREBP による転写調節機構について概説するとともに、他の遺伝子群の SREBP による転写調節機構についての最近の知見をまとめ、脂質代謝全般を制御する SREBP の機能ならびにその活性化機構について考察を行った。

I. LDL 受容体遺伝子の転写調節

LDL 受容体遺伝子の転写開始点のすぐ上流には TATA box が存在し、それより 20-30 bp 上流には転写因子 Sp1 の結合部位、それと隣接する形でその上流に SREBP の結合部位 (SRE) が存在する。それよりさらに 40-50 bp 上流にもう 1 か所 Sp1 結合部位が存在し、この 3 か所に結合する SREBP と Sp1 が協調的に作用することでコレステロールによる LDL 受容体遺伝子の転写調節は行われる。LDL 受容体遺伝子のプロモーター領域を含むレポーター遺伝子を用いたレポーターアッセイによると、これらの部位のい

れかに変異を導入し、転写因子の結合を阻害するとコレステロールによる転写調節は観察されなくなる。したがって、他の多くの転写因子とは異なり、SREBP はそれ単独でプロモーター領域の結合部位へ結合しただけでは転写促進作用はなく、協調的に働く転写因子の存在を必要とする。これまで内外の多くの研究者による研究報告から、FH 患者の LDL 受容体遺伝子の変異が明らかにされているが、そのほとんどが蛋白質をコードする領域のものであり、結果的に機能しない蛋白質の発現する例が多くみられる。わずかではあるが、プロモーター領域の変異による転写不全がもたらす FH の報告もなされており、5' 上流側の Sp1 結合部位の 3 bp の欠落¹⁾、TATA box に近い側の Sp1 結合部位の 1 塩基置換²⁾ による転写活性の著しい低下が報告されており、これらの事実はレポーターアッセイでの結果とよく一致する。

SREBP と協調的に働く転写因子としてはのちに NF-Y (後述) が明らかにされたが、人工的なプロモーターを構築した *in vitro* の実験系で既知の転写因子として NF1, Oct1 などは機能しないことが確認されている (Fig. 1)。さらに、Sp1 部位も逆方向に挿入するとコレステロールによる活性調節は認められなくなり、また LDL 受容体プロモーター領域に存在する CT 配列による Sp1 結合部位をチミジンキナーゼ遺伝子プロモーターの GC 配列からなる Sp1 結合配列と置換すると活性が著しく減弱する。Ap1 結合部位を挿入したときにはわずかにコレステロールに応答するものの、基本的には SREBP と Sp1 の組み合わせで、その結合部位の方向性も含めて LDL 受容体遺伝子プロモーター上の塩基配列に近似したものが高い活性をひきだすのに必須である³⁾。

II. SREBP の構造と機能

LDL 受容体のプロモーター領域に結合する蛋白質として SREBP は発見された^{4,5)}。SREBP には 2 種類の遺伝子によりコードされる SREBP-1 と SREBP-2 が存在する。さらに SREBP-1 にはスプライシングアイソフォームとして 1a, 1b, 1c の 3 種類が存在する。Fig. 2 には、SREBP-2 との相同

¹ 1998 年 11 月, 平成 10 年度日本動脈硬化学会冬季大会 (千葉) において発表。

² 東京大学大学院農学生命科学研究科・応用生命化学
Transcriptional regulation of genes involved in uptake and synthesis of cholesterol and fatty acids by SREBPs
Ryuichiro Sato: Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.
Key words: SREBP, Cholesterol, Transcriptional regulation, LDL receptor
原稿受取日: 1999 年 3 月 1 日

Fig. 1 SREBP と各種転写因子による LDL 受容体遺伝子の協調的転写調節。SREBP 結合部位 (SRE) を 3 カ所、その後方に各種転写因子の結合部位を挿入した人工的な LDL 受容体遺伝子様ルシフェラーゼレポーターを構築して、ステロールによる転写調節を調べた³⁾。

Fig. 2 SREBP-1 と SREBP-2 の構造とその比較。cDNA より推定したアミノ酸配列を示した。また、各部位の相同性を % で表示した。

性がもっとも高い SREBP-1a と SREBP-2 の構造を比較した。いずれの蛋白質も N 末端領域に酸性アミノ酸に富む転写活性化領域をもち、中央部に bHLH-Zip (basic helix-loop-helix leucine zipper) 領域、その後方に 2 カ所の膜貫通領域をもつ。これらの膜貫通領域を介して SREBP は小胞体ならびに核膜上に膜蛋白質として局在する他に例を見ない転写因子である。したがって、転写因子として機能するためには bHLH-Zip 領域を含む N 末端側が切断される必要があり、この成熟体が核へと移行する^{6,7)}。細胞内のコレステロール量が減少すると、小胞体内腔側のヘアピンループ部位で第 1 段階の切断が行われ、続いて第 1 膜貫通部位の近傍で第 2 段階の切断が起こるという連続したプロセッシング機構により活性型である成熟体は産生される⁸⁾。細胞

内コレステロールが過剰条件下では第 1 切断はおこらず、N 末端が切りだされることはなく、結果的に核内の成熟体量は減少し、種々の標的遺伝子の転写は抑制される (Fig. 3)。SREBP1 の場合、N 末端 24 アミノ酸を多く含む 1a とその領域を欠いた 1c の 2 種類の成熟体が 3 種類のアイソフォームから作りだされる。

一連のプロセッシングには、2 種類の酵素と 1 種類の蛋白質の参画することが明らかにされている (Fig. 4)。その蛋白質は、SCAP (SREBP Cleavage-Activating Protein) と命名され⁹⁾、8 回の膜貫通領域をもち、SREBP 同様、小胞体膜、核膜上に局在する。SREBP の C 末端側は SCAP の C 末端側に存在する WD Repeat 領域 (GH-X[23-41]-WD からなるアミノ酸配列の繰り返し。細胞内での蛋白質-蛋白質結合の多くに関与していると考えられている) と直接結合し、この結合を介してコレステロールによる SREBP のプロセッシングが制御されると考えられている。SCAP の膜貫通領域は同じく小胞体膜上に存在し、コレステロール合成の律速酵素である HMG CoA 還元酵素のそれと相同性が高い。HMG CoA 還元酵素は細胞内のコレステロール量が増加するとすみやかに分解され、その結果コレステロール合成のフィードバック調節が行われる^{10,11)}。この分解には膜貫通領域が必須で、膜貫通領域にコレステロール量をセンサーする機構が存在すると推察されていた。SCAP もそ

Fig. 3 細胞内コレステロールが減少したさいの SREBP の活性化様式。

Fig. 4 小胞体膜上における SREBP, SCAP, S1P, S2P の存在予想模式図。

SREBP の C 末端側と SCAP の C 末端側が結合する。ステロールにより調節される第 1 切断にこの複合体形成が関与するものと考えられている。第 1 切断酵素 (S1P), 第 2 切断酵素 (S2P) 他の蛋白質との複合体形成の有無は不明である。

れと似たように、膜内のコレステロール量をセンサーし、SREBP のプロセッシングを調節する可能性が考えられる。さらに、第 1, 第 2 切断を担う酵素の cDNA クローニングが終了し、第 1 切断酵素は膜を 1 回貫通するセリンプロテアーゼ¹²⁾、第 2 酵素は膜を 4~5 回貫通するメタロプロテアーゼ¹³⁾であることが判明した。これらの蛋白質、酵素がどのような連関を持ち、コレステロールにより調節される SREBP のプロセッシングに関与するのかについては、今後の更なる解析が必要である。

III. SREBP-1, -2 の機能

Table 1 にこれまで報告のある、SREBP により転写調節をうける遺伝子を列挙した。LDL 受容体、数種のコレステロール合成酵素については当初から転写調節をうけるものと考えられていたが、その後の研究から予想外の遺伝子が SREBP による調節をうけることが明らかになった。その 1 例が脂肪酸合成経路初期の律速酵素である ACC (アセチル CoA カルボキシラーゼ) と、FAS [脂肪酸合成酵素] である^{14,15)}。この事実から、コレステロール代謝と脂肪酸合成が SREBP を介してクロストークしていることが明らかになった¹⁶⁾。また筆者らは、転写因子である SREBP-2 の転写が細胞内コレステロール量に応じて変動し、そのプロモーター領域に存在する SRE 配列を介して SREBP により自己調節をうけることを明らかにした¹⁷⁾。一方、SREBP-1 は

Table 1. SREBP が転写調節する遺伝子。

コレステロール代謝関連酵素
HMG CoA 合成酵素
HMG CoA 還元酵素
ファルネシルピロリン酸合成酵素
スクアレン合成酵素
LDL 受容体
SREBP-2
脂肪酸代謝関連酵素
脂肪酸合成酵素
Acetyl CoA carboxylase
Glycerol-3-phosphate acyltransferase
Stearoyl CoA desaturase

脂肪細胞分化に呼応してその転写が上昇し、脂肪細胞での脂肪酸、コレステロール合成を促進することにより、それらの過剰蓄積に深く関与している¹⁸⁾。これらの事実は SREBP-1, -2 がそれぞれ固有の機能を保持していることを物語っている。Table 1 に示した遺伝子はその 5' 上流域を用いたレポーターアッセイで直接 SREBP による転写調節を受けることが確認されたものであるが、SREBP-1, -2 のいずれがその転写調節に強く寄与するのかという機能分担については不明な点が多い。

各組織での mRNA の発現量を比較すると、SREBP-1 は肝臓、副腎等の組織で高いのに対し、SREBP-2 はすべての組織で様な発現量が認められる。したがって SREBP-1 はある種の組織の機能に関係する特異的な遺伝子発現に関与し、一方、SREBP-2 はコレステロール代謝調節のようにすべての組織で普遍的に行われている転写調節に関与する可能性が考えられた。最近の興味深い実験結果によると、SREBP-1a を過剰発現したトランスジェニックマウスの肝臓は異常な脂肪蓄積を伴った脂肪肝を呈し、脂肪酸代謝関連遺伝子の転写が顕著に上昇し、一方、SREBP-2 を過剰発現したトランスジェニックマウスでは脂肪肝は観察されずに、コレステロール代謝関連遺伝子の転写が著しく亢進することが確認された^{19,20)}。これらの事実を総合すると、おおまかに SREBP-1 は脂肪細胞分化、脂肪酸代謝調節に深く関わっており、一方、SREBP-2 はコレステロール代謝を主に調節すると考えることができる。

IV. SREBP による転写調節機構

LDL 受容体遺伝子上流域に存在する SRE は 5'-ATCACCCCAC-3' からなる 10 塩基配列である。Fig. 5 にこれまで明らかにされた SREBP により転写調節を受ける遺伝子の 5' 上流域の転写調節必須エレメントを図示した。LDL 受容体遺伝子同様、脂肪酸合成酵素である ACC と FAS 遺伝子はいずれもその上流域に Sp1 結合部位と SREBP 結合部位をそれぞれ 1 カ所ずつもつ。一方、ファルネシルピロリン酸合成酵素²¹⁾、SREBP-2 遺伝子上流域には SREBP 結合部位と NF-Y 結合部位(CCAAT 配列)が存在し、協調的に働くことが明らかになっている。SREBP-2 遺伝子プロモーター領域を用いてわれわれが行った転写調節実験によれば、SREBP 結合部位(ATCACCCCAC)、そこから 18 塩基離れた CCAAT ボックス逆配列(ATTGG)のいずれか一方に変異をいれた場合に、コレステロールによる転写調節が消失した¹⁷⁾。すなわち SREBP による転写調節は、SRE 配列へ SREBP が結合するだけでは充分でなく、その近傍に Sp1 もしくは NF-Y の結合することが必須であることが明らかになった。不思議なことに、コレステロール合成経路のいくつかの酵素遺伝子はいずれも

Fig. 5 コレステロールにより転写調節を受ける各種遺伝子の 5' 上流域転写調節エレメントの比較。すべてヒトの遺伝子上流域を図示した²³⁾。

SREBP と NF-Y の組み合わせで調節され、脂肪酸合成経路の酵素遺伝子は Sp1 との組み合わせで調節されている。この組み合わせが他のコレステロール合成酵素遺伝子にもあてはまるか否かは今後の解析を待つしかないが、Sp1 は SREBP-1, NF-Y は SREBP-2 に対して高い親和性をもち、その結果としてより協調的に機能する可能性も考えられる。また SREBP-1, -2 の N 末端側に存在する転写活性化領域と CBP (CREB-binding protein) が結合することが認められ、CBP との結合を介して基本転写装置とリンクすることが明らかになった²²⁾。

結 語

LDL 受容体遺伝子の転写調節の研究は、ステロールによる転写調節に関与する塩基配列 SRE の同定から始まり、その部位に結合する新規蛋白質 SREBP の発見へと大きな展開をみせた。転写因子として SREBP を眺めたとき、その細胞内局在部位、膜蛋白質という存在様式、さらにはステロールにより調節されるプロセッシングによる活性化機構と、いずれもが他の転写因子に例をみないものであり、生命進化の過程でコレステロール代謝調節のために独特の調節機構が導入されたことを意味している。一方、その後の研究から SREBP はコレステロール代謝関連遺伝子のみならず脂肪酸代謝関連遺伝子の転写調節をも担うことが明らかにされている。すなわち、生命活動の恒常性維持において、SREBP は脂質代謝全般を制御する中心的役割を演じる転写因子として機能している。

文 献

- 1) Peeters AV, Kotze MJ, Scholtz CL, De Waal LF, Rubinstein DC, Coetzee GA, Zuliani G, Streiff R, Liu J, and der Westhuyzen DR: A 3-basepair deletion in repeat 1 of the LDL receptor promoter reduces transcriptional activity in a South African Pedi. *J Lipid Res*, 39: 1021-1024, 1998
- 2) Koivisto UM, Palvimo JJ, Janne OA, and Kontula K: A single-base substitution in the proximal Sp1 site of the human low density lipoprotein receptor promoter as a cause of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 10526-10530, 1994
- 3) Sanchez HB, Yieh L, and Osborne TF: Cooperation by sterol regulatory element-binding protein and Sp1 in sterol regulation of low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem*, 270: 1161-1169, 1995
- 4) Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL, and Brown MS: SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*, 75: 187-197, 1993
- 5) Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, Brown MS, Goldstein JL, and Wang X: SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 11603-11607, 1993
- 6) Sato R, Yang J, Wang X, Evans MJ, Ho YK, Goldstein JL, and Brown MS: Assignment of the membrane attachment, DNA binding, and transcriptional activation of sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1). *J Biol Chem*, 269: 17267-17273, 1994
- 7) Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X, and Goldstein JL: SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell*, 77: 53-62, 1994
- 8) Sakai J, Duncan EA, Rawson RB, Hua X, Brown MS, and Goldstein JL: Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell*, 85: 1037-1046, 1996
- 9) Hua X, Nohturfft A, Goldstein JL, and Brown MS: Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell*, 87: 415-426, 1996
- 10) Sato R, Goldstein JL, and Brown MS: Replacement of serine-871 of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase prevents phosphorylation by AMP-activated kinase and blocks inhibition of sterol synthesis induced by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 9261-9265, 1993
- 11) Kumagai H, Chun KT, and Simoni RD: Molecular dissection of the role of the membrane domain in the regulated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Biol Chem*, 270: 19107-19113, 1995
- 12) Sakai J, Rawson RB, Espenshade PJ, Cheng D, Seegmiller AC, Goldstein JL, and Brown MS: Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Molecular Cell*, 2: 505-514, 1998
- 13) Rawson RB, Zelenski NG, Nijhawan D, Ye J, Sakai J, Hasan MT, Chang TY, Brown MS, and Goldstein JL: Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Molecular Cell*, 1: 47-57, 1997
- 14) Lopez JM, Bennett MK, Sanchez HB, Rosenfeld JM, and Osborne TF: Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase: A mechanism for coordinate control of cellular lipid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 1049-1053, 1996
- 15) Magano MM and Osborne TF: Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter. *J Biol Chem*, 271: 32689-32694, 1996
- 16) Kawabe Y, Sato R, Matsumoto A, Honda M, Wada Y, Yazaki Y, Endo A, Takano T, Itakura H, and Kodama T: *Biochem Biophys Res Commun*, 219: 515-520, 1996
- 17) Sato R, Inoue J, Kawabe Y, Kodama T, Takano T, and Maeda M: Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem*, 271: 26461-26464, 1996
- 18) Kim JB and Spiegelman BM: ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev*, 10: 1096-1107, 1996
- 19) Shimano H, Horton JD, Hammer RE, Shimomura I, Brown MS, and Goldstein JL: Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J Clin Invest*, 98: 1575-1584, 1996
- 20) Shimano H, Shimomura I, Hammer RE, Herz J, Goldstein JL, Brown MS, and Horton JD: Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. *J Clin Invest*, 100: 2115-2124, 1997
- 21) Ericsson J, Jackson SM, Lee BC, and Edwards PA: Sterol regulatory element binding protein binds to a cis element in the promoter of the farnesyl diphosphate synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 945-950, 1996
- 22) Oliner JD, Andersen JM, Hansen SK, Zhou S, and Tjian R: SREBP transcriptional activity is mediated through an interaction with the CREB-binding protein. *Genes Dev*, 10: 2903-2911, 1996
- 23) Inoue J, Sato R, and Maeda M: Sterol regulatory element-binding protein and NF-Y are involved in sterol-regulated transcription of the genes for 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase and squalene synthase. *J Biochem*, 123: 1191-1198, 1998