コレステロール恒常性に関する分子栄養生化学的研究

(平成 23 年度日本栄養・食糧学会奨励賞受賞)

井 上 順^{*,1}

(2011 年 6 月 28 日受付; 2011 年 7 月 26 日受理)

要旨: 生体においてコレステロールは主に二つの経路により供給されている。一つは肝臓における生合成であり、もう一つは小腸より吸収された食事由来コレステロールである。コレステロールの恒常性は、転写レベル・翻訳レベル・翻訳後修飾レベルで厳密に制御されており、この恒常性の破綻が動脈硬化性疾患発症のリスクを高めることが知られている。Sterol regulatory element-binding protein (SREBP) は、コレステロール恒常性を転写レベルで制御する因子であり、生体におけるコレステロール恒常性維持に重要な役割を担っている。本研究では、SREBP の活性制御機構について分子レベルでの解析を行い、複数の新規な制御機構について明らかにした。本稿ではそれらの中から、1) 小胞体膜上における活性制御、2) 翻訳後修飾による活性制御、3) 他の転写因子との相互作用による活性制御について概説する。

キーワード: コレステロール, SREBP, 翻訳後修飾, プロセッシング

SREBP はコレステロール合成や脂肪酸合成を担う酵素群の転写を制御する転写因子であり、生体内の脂質恒常性維持に関与している。SREBP-1a, SREBP-1c, SREBP-2 の 3 種類のアイソフォームが存在し、SREBP-1c は主に脂肪酸合成系を、SREBP-2 はコレステロール合成系を、SREBP-1a は両方の酵素群の転写を活性化する¹⁾。SREBP 活性は大きく分けて三つの段階で厳密に制御されているが、その主たる制御は前駆体 SREBP を活性型 (核内型) SREBP へと変換するプロセッシング制御である²⁾。SREBP は転写因子でありながら小胞体膜を 2 回貫通する膜タンパク質であり、合成後は不活性型 (前駆体) として小胞体膜上に局在する。SREBP は小胞体膜上で SREBP cleavage-activated protein (SCAP) と複合体を形成しており、この SCAP がコレステロールセンサーとして機能する。細胞内コレステロールレベルが低いときには、SREBP/SCAP 複合体は COPII 小胞によりゴルジ体へと輸送され、ゴルジ体に局在するプロテアーゼ S1P (Site-1 protease) および S2P (Site-2 protease) により 2 段階のプロセッシングを受け、N 末端側が切り離され、核内へと移行して転写因子として機能する。一方で細胞内コレステロールレベルが高いときには、コレステロールが SCAP に結合することで SCAP の構造が変化し、SCAP は Insig (小胞体膜タンパク質) と複合体を形成する。これにより SREBP/SCAP 複合体は小胞体膜上に止まり、不活性型として維持される。2 つめの制御はシグナルに応じた SREBP 自身の転写レベルでの

調節である。これは前駆体 SREBP 量の制御と言い換えることができる。この制御の一部は SREBP のセルフレギュレーションにより行われている³⁾⁴⁾。3 つめの制御は SREBP の翻訳後修飾や他の転写因子との相互作用による活性制御である⁵⁻⁷⁾。このように SREBP 活性は多段階で多様な制御を受けていることが知られている。

新規ステロールセンシングドメインタンパク TRC8 による SREBP プロセッシング制御

TRC8 (Translocation in renal cancer from chromosome 8) は遺伝的に腎がんを発症する家系の原因遺伝子として発見された遺伝子であり、12 回の膜貫通領域と RING フィンガードメイン (タンパク質のユビキチン E3 リガーゼに広く存在する) を有する小胞体膜タンパク質である⁸⁾⁹⁾。さらに TRC8 に特徴的なドメイン構造としては、ステロールセンシングドメイン (Sterol-sensing domain: SSD) を挙げることができる。SSD を有するタンパク質としては TRC8 の他に、コレステロール生合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素や上記の SCAP, NPC1 (Niemann-Pick type C1) 等があり、SSD は細胞内のコレステロールレベルを感知し、それぞれのタンパク質の機能を制御すると考えられている¹⁰⁻¹²⁾。TRC8 は小胞体膜に局在し、SCAP と同様に SSD を有することから、コレステロール代謝制御に関与する可能性について、特に SREBP プロセッシング制御の可能性について検討を行った¹³⁾。

* 連絡者・別刷請求先 (E-mail: ajinoue@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科 (113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1)

Figure 1 TRC8 affects the expression of SREBP target genes. A, HEK293 cells were transfected with expression plasmids for Flag-TRC8, β -galactosidase, and a reporter gene containing the human HMG CoA synthase promoter (HMG S-Luc). After transfection, the cells were cultured under either a sterol-loaded or sterol-depleted condition for 48 h. Luciferase activities were normalized to β -galactosidase. B, HEK293 cells were transfected with either control (siCon) or TRC8 siRNA oligonucleotides (siTRC8). After 24 h, the cells were transfected with HMG S-Luc and then cultured as described in A. Relative mRNA levels (TRC8/GAPDH) were determined by real-time PCR after being normalized to GAPDH mRNA. C, HEK293 cells were transfected with an expression plasmid for Flag-TRC8 and then cultured under either a sterol-loaded or -depleted condition for 24 h. Relative mRNA levels were determined by real-time PCR after being normalized to GAPDH mRNA. D, HEK293 cells were transfected with either control (siCon) or TRC8 siRNA oligonucleotides (siTRC8) and then cultured under either a sterol-loaded or -depleted condition for 48 h. Relative mRNA levels were determined by real-time PCR after normalization to GAPDH mRNA. E, HEK293 cells were transfected with expression plasmids for Flag-TRC8, a nuclear form of SREBP-2 [SREBP2(1-481)] and β -galactosidase together with HMG S-Luc. Luciferase activities were normalized to β -galactosidase. All data (A to E) presented as means $\pm$ S.D. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

まず初めに, TRC8 が SREBP 活性に影響を及ぼすかどうかを, SREBP-2 応答遺伝子である HMG-CoA 合成酵素遺伝子のプロモーター領域を用いたレポーターアッセイにより検討した。リポプロテインを欠失した血清 (LPDS) を含む培地で培養することで細胞内のコレステロールを低下させると, SREBP が活性化し HMG-CoA 合成酵素遺伝子のプロモーター活性は上昇する。この条件下で TRC8 を過剰発現させると, ルシフェラーゼ活性の低下が見られた (Figure 1A)。逆に, siRNA を用いて TRC8 発現を低下させたところ, さらに上昇が確認された (Figure 1B)。同様の傾向は HMG-CoA 合成酵素およびスクアレン合成酵素遺伝子の発現レベルでも確認できた (Figure 1C, D)。以上の結果より, TRC8 は SREBP 活性を抑制することが示唆された。

次に TRC8 による SREBP 活性抑制のメカニズムについて検討を行った。考えられる抑制メカニズムとしては, 1) 核内型 SREBP の活性抑制, 2) SREBP のプロセッシング抑制がある。そこでまず初めに, 核内型 SREBP-2 活性への TRC8 の影響についてレポーターアッセイを用いて検討したところ, TRC8 は核内型 SREBP 活性を抑

制しなかった (Figure 1E)。次に, SREBP プロセッシングへの影響を検討した。LPDS 培地で培養することにより, 核内型 SREBP-2 量 (N) が増加するが, TRC8 の過剰発現により核内型 SREBP-2 量は減少し, 逆に TRC8 のノックダウンにより上昇した (Figure 2A, B)。以上の結果より, TRC8 は SREBP-2 のプロセッシングを抑制することが示唆された。TRC8 にはユビキチン E3 リガーゼに広く存在する RING フィンガードドメインを持つことから, TRC8 の RING フィンガードドメインが SREBP プロセッシング抑制に関与するかどうかについて変異体 TRC8 を用いて検討した。その結果, 変異体 TRC8 においても SREBP プロセッシングを抑制した (Figure 2C, D)。以上の結果より, TRC8 は SREBP プロセッシングを抑制するが, その抑制には RING フィンガードドメインは関与しないことが明らかになった。

次に, TRC8 による SREBP プロセッシング抑制メカニズムについて検討を行った。TRC8 と前駆体 SREBP-2 を過剰発現させ, SREBP-2 を免疫沈降法により回収し, ウエスタンブロットにより検出したところ, TRC8 と SREBP-2 が結合していることが明らかになった (Figure

Figure 2 TRC8 hinders SREBP-2 processing. A to C, Hep G2 cells were transfected with one of the expression plasmids for Flag-TRC8 (A and C) or either control or TRC8 siRNA oligonucleotides (B) and then cultured for 48 h. The cells were cultured under either a sterol-loaded or sterol-depleted condition for the last 12 h, and harvested. Whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblot analysis. P and N denote the precursor form and the N-fragment of SREBP-2, respectively. D, Three Flag-TRC8 proteins expressed in these experiments are illustrated.

3A)。また、この結合はRINGフィンガードメインを欠失した変異体TRC8でも観察され、いずれの結合もコレステロール添加によって影響を受けなかった (Figure 3A)。核内型SREBP-2 (1-481) はTRC8と結合せず、N末端側を欠失したSREBP-2 (521-1141) ではTRC8と結合が確認された (Figure 3B, C)。さらにTRC8はSCAPとも結合していた (Figure 3D)。これらの結果より、TRC8はSREBPやSCAPと複合体を形成することによりSREBPプロセッシングを抑制する可能性が示された。SREBP/SCAP複合体はゴルジ体へと輸送後プロセッシングを受けるが、このゴルジ体への輸送には、SCAPのLoop6ドメインとSec24 (COPII小胞の構成タンパク質の一つ) との結合が必須であることが報告されてい

Figure 3 TRC8 interacts with SREBP-2 and SCAP. A, HEK293 cells were transfected with expression plasmids for HA-SREBP2 (1-1141) and either Flag-TRC8 or Flag-TRC8 ΔRING. The cells were cultured under either a sterol-loaded or -depleted condition for 48 h. Whole cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-Flag antibody. Both cell lysates (Input) and immunoprecipitates (IP) were subjected to immunoblot analysis. B to D, HEK293 cells transfected with indicated expression plasmids were cultured with DMEM medium containing FBS for 48 h. Whole cell lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-Flag antibody. Both cell lysates (Input) and immunoprecipitates (IP) were subjected to immunoblot analysis. E, HEK293 cells were transfected with expression plasmids for TRC8, Flag-Sec24 and GST-SCAP-Loop6. Whole cell lysates were subjected to GST pull-down. Both cell lysates (Input) and GST pull-down samples (GST pull-down) were subjected to immunoblot analysis. This research was originally published in *J Biol Chem*¹³. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

る¹⁴⁾。そこで SCAP の Loop6 ドメインと Sec24 との結合に及ぼす TRC8 の影響を検討した。その結果、TRC8 の濃度依存的に SCAP の Loop6 ドメインと Sec24 との結合が抑制された (Figure 3E)。したがって、TRC8 は SCAP と Sec24 の結合を阻害することにより SREBP/SCAP 複合体のゴルジ体への移行を低下させ、SREBP プロセッシングを抑制していると考えられる。

TRC8 を安定的に発現する細胞株を樹立し解析を行ったところ、LPDS 培地で培養することで、TRC8 タンパク質量が増加した。そこで、シクロヘキシミド処理により翻訳を抑制し、タンパク分解速度を測定した。その結果、FBS 培地と比較すると、LPDS 培地により TRC8 タンパク質が安定化していた。さらに、プロテアーゼ阻害剤である ALLN 処理により TRC8 タンパク質は安定化したことから、TRC8 はユビキチン-プロテアソームシステムにより分解されている可能性が考えられる。

一方で RING フィンガードメインに変異を導入した TRC8 は、極めて安定であった。実際、野生型 TRC8 ではポリユビキチン化を受けていたが、RING 変異体はポリユビキチン化を受けていなかった。さらに LPDS 処理により TRC8 のユビキチン化が時間依存的に抑制された。以上の結果より、TRC8 は自己ユビキチン化により速い分解を受けているが、細胞内コレステロールの枯渇により自己ユビキチン化が抑制され、安定化することが明らかになった。安定化した TRC8 は SREBP プロセッシングを抑制し、コレステロール枯渇時に上昇した核内型 SREBP 量を低下させることで、過剰な SREBP 活性化を防いでいると考えられる。

SREBP-SUMO 化による活性調節

SREBP の翻訳後修飾による活性制御については、これまでに様々な報告がなされている。SREBP は ERK や GSK-3, PKA 等のリン酸化酵素により直接リン酸化を受け、活性が制御されている¹⁵⁻¹⁸⁾。また、ポリユビキチン化を受け、プロテアソーム系による分解を受けるが、この分解が GSK-3 によるリン酸化により抑制されることが報告されている¹⁹⁾。さらにアセチル化によって活性が上昇すること、およびアセチル化とユビキチン化が拮抗することが示されている²⁰⁾。このように、様々な翻訳後修飾による SREBP 活性の制御が報告されており、さらにそれぞれの翻訳後修飾のクロストークについても明らかにされている。

そこで本研究では、SREBP の新たな翻訳後修飾による活性制御の可能性について検討した。SUMO はユビキチン様タンパク質の一つであり、およそ 100 アミノ酸からなるタンパク質である。ユビキチンと比較するとアミノ酸レベルで約 20% と低い相同性を示すが、立体構造は類似しており、この構造はユビキチンホールドと呼ばれている。その修飾反応は、ユビキチンの場合と同様に、E1-E2-E3 カスケードにより修飾される。SUMO 化

Figure 4 Involvement of HDAC3 in sumoylation-dependent suppression of SREBP transcriptional activity. A, HEK293 cells were transfected with expression plasmids for either wild type (WT) or a mutant version of Gal4-SREBP-2, pG5Luc containing five copies of the Gal4 binding sites, and pRL-CMV and cultured under the cholesterol-loaded conditions for 48 h. The cells were incubated with 330 nM TSA for the last 6 h. B, HEK293 cells were transfected with expression plasmids for HA-HDAC3 and either GST-SREBP2-WT, GST-SREBP2-K464R or GST. The cells were analyzed in the same manner as described in Fig. 3E. C, Hep G2 cells were transfected with either control or HDAC3 siRNA, and incubated for 72 h. The cell lysates were subjected to SDS/PAGE and immunoblot (IB), and total RNA was subjected to real-time PCR analysis. Relative mRNA levels were obtained after normalizing to S17 mRNA. * $p < 0.05$.

のコンセンサス配列は (I/L/V)-K-X-(E/D) であり、配列中の Lys 残基が SUMO 化を受ける。SREBP-1 および SREBP-2 のアミノ酸配列を検索すると、それぞれ 4 カ所、2 カ所のコンセンサス配列を含んでいた。SREBP が実際に SUMO 化を受けるかどうかを検討したところ、SREBP-1a では Lys123 および Lys418 の 2 カ所、SREBP-2 では Lys464 で SUMO 化を受けることが確認され、SUMO 化により SREBP の転写活性が抑制された²¹⁾。

次に、SUMO 化修飾による SREBP 転写活性低下のメカニズムについて検討を行った²²⁾。SUMO 化による転写活性の抑制に DNA への結合は関係しないことから²¹⁾、SUMO 化によって転写活性を負に制御する因子がリクルートメントされることを想定し、HDAC 阻害剤の効果を検討した。その結果、野生型 SREBP-2 ではトリコスタチン A 処理により転写活性の上昇が見られ

Figure 5 HDAC3 knockdown stimulates SREBP activity in Hep G2 cells. HEK293 cells were transfected with expression plasmids for HA-HDAC3 and either Flag-SREBP-2-WT or K464R and processed for ChIP analyses. After the immunoprecipitation (IP) with anti-HA or anti-Flag antibodies, PCR was performed with the primer set covering a sterol regulatory element (SRE) in the human LDL receptor promoter. 1% of the samples before IP was subjected to PCR as a control (input). A schematic diagram of the SREBP/HDAC3 complex formation on the SRE sequence is shown. This research was originally published in *J Biol Chem*²²⁾. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

たが、SUMO 化を受けない変異体(Lys464 を Arg に変異)では活性に変化が見られなかった (Figure 4A)。この結果から、SUMO 化による SREBP の転写抑制は HDAC 活性を介していることが示された。そこで HDAC ファミリーと SREBP の結合を検討したところ、HDAC3 との結合が確認された (Figure 4B)。次に siRNA により内因性 HDAC3 発現を抑制した条件下における SREBP の活性を検討したところ、その上昇が確認された (Figure 4C)。この結果は HDAC3 が SREBP の活性抑制に関与していることを示している。次に HDAC3 が SREBP を介して SREBP 標的遺伝子プロモーター上にリクルートメントされるかどうかを ChIP アッセイにより検討した。野生型 SREBP は HDAC3 を標的遺伝子プロモーター上にリクルートメントしたが (Figure 5, 左下パネル, 4 レーン目), SUMO 化を受けない変異体ではその効果は消失しており (Figure 5, 右下パネル, 3 レーン目), HDAC3 が SUMO 化 SREBP 特異的に結合し、標的遺伝子の転写を抑制していることが明らかになった。最近になって HDAC3 遺伝子肝臓特異的ノックアウトマウスが作製された。そのマウスは顕著な脂肪肝を呈することから、HDAC3 が脂質代謝の制御に関与していると考えられる²³⁾。今回の我々の結果と考え合わせると、HDAC3 遺伝子の欠損により SREBP の転写活性が上昇した結果として脂肪酸合成が増加し、脂肪肝が発症する可能性が考えられる。HDAC3 欠損による脂肪肝発症に SREBP 活性がどの程度関与しているのか、今後の詳細な解析が待たれる。

次に、SREBP の SUMO 化レベルが生体の代謝変動において制御されるかどうかを検討したところ、IGF-1

Figure 6 LRH-1 gene knockdown affects the SREBPs. A, Huh7 cells were transfected with either a control siRNA (siCon) or siRNA targeting LRH-1 (siLRH-1); they were then cultured with a medium containing 5% lipoprotein-deficient serum supplemented for 96 h to increase in the amount of active nuclear SREBPs and total RNA was isolated. Real-time PCR analysis was performed, and relative mRNA levels were obtained after normalizing to S17 mRNA. B, Huh7 cells were cultured under cholesterol-loaded or -depleted condition for 48 h, and then total RNA was isolated. Real-time PCR analysis was performed and relative mRNA levels were obtained after normalizing to S17 mRNA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. This research was originally published in *J Biol Chem*²⁵⁾. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

刺激による ERK1/2 を介したリン酸化により SUMO 化レベルが抑制されることを見出した。SREBP-1a では Ser117 のリン酸化により Lys123 の SUMO 化が抑制され、SREBP-2 では Ser455 のリン酸化により Lys464 の SUMO 化が抑制された。この結果は、インスリン等のシグナルによる ERK1/2 を介した SREBP リン酸化は、SUMO 化を抑制し、HDAC3 を介した転写活性の抑制が解除され、SREBP の転写活性が上昇することを示している。リン酸化を介した SUMO 化抑制の分子機構に関しては現時点では明らかにされていないが、SUMO 化 E3 リガーゼのアクセスが阻害されることに起因しているのではないかと想定し解析を行っている。

核内受容体 LRH-1 と SREBP の結合は お互いの転写活性を抑制する

転写因子同士の結合による相互の活性調節については多くの報告があり、SREBP に関してもいくつかの報告がある⁶⁾²⁴⁾。SREBP は脂質代謝を包括的に制御する転写因子であり、核内受容体も脂質成分をリガンドとして脂質代謝制御に関わることが報告されている。そこで本研

究では、核内受容体と SREBP の相互作用について検討を行った²⁵⁾。GAL4-UAS システムを用いて解析を行ったところ、核内受容体 LRH-1 により SREBP 活性が抑制されることを見出した。LRH-1 は CYP7A1 (コレステロールを胆汁酸へと異化する律速酵素) や Apo-AI (HDL に含まれるアポリポタンパク質) の遺伝子の転写を亢進する転写因子であり、その活性化は生体内のコレステロール代謝を改善する方向に働くことが知られている²⁶⁾。

次に LRH-1 活性に及ぼす SREBP の影響を検討したところ、SREBP により LRH-1 活性の抑制が観察された。またこれらの相互の活性抑制は、内因性の遺伝子発現レベルでも確認された (Figure 6A, B)。さらに、SREBP が LRH-1 と直接結合すること、および SREBP の結合により、コアクチベーターである PGC-1 α の LRH-1 への結合が抑制されることを示した。

以上、SREBP は自らが転写因子として機能するばかりではなく、他の転写因子の機能を制御することが明らかになった。SREBP は生体内の脂質代謝恒常性維持に関して重要な役割を担っており、その機能の破綻が動脈硬化性疾患へとつながる。SREBP 活性制御機構の正確な理解が生活習慣病の治療・予防の一助になると共に、生体内におけるコレステロール代謝の理解に重要であり、さらなる解析が必要である。

本稿を終えるにあたり、荣誉ある日本栄養・食糧学会奨励賞を授与されたことに対し、選考委員の先生方をはじめ、関係の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科食品生化学研究室にて行われたものです。終始ご指導・ご助言をいただきました東京大学大学院農学生命科学研究科佐藤隆一郎教授に深く御礼申し上げます。また、本研究にご理解とご協力をいただきました東京大学大学院農学生命科学研究科清水誠教授、八村敏志准教授に深く御礼申し上げます。最後に、これまでご指導ならびにご協力を賜りました諸先生方と共同研究者の皆様に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Amemiya-Kudo M, Shimano H, Hastay AH, Yahagi N, Yoshikawa T, Matsuzaka T, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Sato R, Kimura S, Ishibashi S, Yamada N (2002) Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterol genes. *J Lipid Res* **43**: 1220-35.
- 2) Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS (2006) Protein sensors for membrane sterols. *Cell* **124**: 35-46.
- 3) Sato R, Inoue J, Kawabe Y, Kodama T, Takano T, Maeda M (1996) Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *J Biol Chem* **271**: 26461-4.
- 4) Amemiya-Kudo M, Shimano H, Yoshikawa T, Yahagi N,

- Hasty AH, Okazaki H, Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Sato R, Kimura S, Ishibashi S, Yamada N (2000) Promoter analysis of the mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene. *J Biol Chem* **275**: 31078-85.
- 5) Hirano Y, Yoshida M, Shimizu M, Sato R (2001) Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **276**: 36431-7.
- 6) Misawa K, Horiba T, Arimura N, Hirano Y, Inoue J, Emoto N, Shimano H, Shimizu M, Sato R (2003) Sterol regulatory element-binding protein-2 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 to enhance sterol isomerase gene expression in hepatocytes. *J Biol Chem* **278**: 36176-82.
- 7) Yamamoto T, Shimano H, Nakagawa Y, Ide T, Yahagi N, Matsuzaka T, Nakakuki M, Takahashi A, Suzuki H, Sone H, Toyoshima H, Sato R, Yamada N (2004) SREBP-1 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 α and interferes with PGC-1 recruitment to suppress hepatic gluconeogenic genes. *J Biol Chem* **279**: 12027-35.
- 8) Gemmill RM, West JD, Boldog F, Tanaka N, Robinson LJ, Smith DI, Li F, Drabkin HA (1998) The hereditary renal cell carcinoma 3;8 translocation fuses FHIT to a patched-related gene, TRC8. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9572-7.
- 9) Gemmill RM, Bemis LT, Lee JP, Sozen MA, Baron A, Zeng C, Erickson PF, Hooper JE, Drabkin HA (2002) The TRC8 hereditary kidney cancer gene suppresses growth and functions with VHL in a common pathway. *Oncogene* **21**: 3507-16.
- 10) Roitelman J, Olender EH, Bar-Nun S, Dunn WA, Jr., Simoni RD (1992) Immunological evidence for eight spans in the membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: implications for enzyme degradation in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **117**: 959-73.
- 11) Hua X, Nohturfft A, Goldstein JL, Brown MS (1996) Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell* **87**: 415-26.
- 12) Ohgami N, Ko DC, Thomas M, Scott MP, Chang CC, Chang TY (2004) Binding between the Niemann-Pick C1 protein and a photoactivatable cholesterol analog requires a functional sterol-sensing domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 12473-8.
- 13) Irisawa M, Inoue J, Ozawa N, Mori K, Sato R (2009) The sterol-sensing endoplasmic reticulum (ER) membrane protein TRC8 hampers ER to Golgi transport of sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2)/SREBP cleavage-activated protein and reduces SREBP-2 cleavage. *J Biol Chem* **284**: 28995-9004.
- 14) Sun LP, Li L, Goldstein JL, Brown MS (2005) Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro. *J Biol Chem* **280**: 26483-90.
- 15) Roth G, Kotzka J, Kremer L, Lehr S, Lohaus C, Meyer HE, Krone W, Muller-Wieland D (2000) MAP kinases Erk1/2 phosphorylate sterol regulatory element-binding

- protein (SREBP)-1a at serine 117 in vitro. *J Biol Chem* **275**: 33302–7.
- 16) Kotzka J, Lehr S, Roth G, Avci H, Knebel B, Muller-Wieland D (2004) Insulin-activated Erk-mitogen-activated protein kinases phosphorylate sterol regulatory element-binding Protein-2 at serine residues 432 and 455 in vivo. *J Biol Chem* **279**: 22404–11.
 - 17) Kim KH, Song MJ, Yoo EJ, Choe SS, Park SD, Kim JB (2004) Regulatory role of glycogen synthase kinase 3 for transcriptional activity of ADD1/SREBP1c. *J Biol Chem* **279**: 51999–2006.
 - 18) Lu M, Shyy JY (2006) Sterol regulatory element-binding protein 1 is negatively modulated by PKA phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**: C1477–86.
 - 19) Sundqvist A, Bengoechea-Alonso MT, Ye X, Lukiyanchuk V, Jin J, Harper JW, Ericsson J (2005) Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF (Fbw7). *Cell Metab* **1**: 379–91.
 - 20) Giandomenico V, Simonsson M, Gronroos E, Ericsson J (2003) Coactivator-dependent acetylation stabilizes members of the SREBP family of transcription factors. *Mol Cell Biol* **23**: 2587–99.
 - 21) Hirano Y, Murata S, Tanaka K, Shimizu M, Sato R (2003) Sterol regulatory element-binding proteins are negatively regulated through SUMO-1 modification independent of the ubiquitin/26 S proteasome pathway. *J Biol Chem* **278**: 16809–19.
 - 22) Arito M, Horiba T, Hachimura S, Inoue J, Sato R (2008) Growth factor-induced phosphorylation of sterol regulatory element-binding proteins inhibits sumoylation, thereby stimulating the expression of their target genes, low density lipoprotein uptake, and lipid synthesis. *J Biol Chem* **283**: 15224–31.
 - 23) Knutson SK, Chyla BJ, Amann JM, Bhaskara S, Huppert SS, Hiebert SW (2008) Liver-specific deletion of histone deacetylase 3 disrupts metabolic transcriptional networks. *EMBO J* **27**: 1017–28.
 - 24) Ngo TT, Bennett MK, Bourgeois AL, Toth JJ, Osborne TF (2002) A role for cyclic AMP response element-binding protein (CREB) but not the highly similar ATF-2 protein in sterol regulation of the promoter for 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Biol Chem* **277**: 33901–5.
 - 25) Kanayama T, Arito M, So K, Hachimura S, Inoue J, Sato R (2007) Interaction between sterol regulatory element-binding proteins and liver receptor homolog-1 reciprocally suppresses their transcriptional activities. *J Biol Chem* **282**: 10290–8.
 - 26) Fayard E, Auwerx J, Schoonjans K (2004) LXR-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. *Trends Cell Biol* **14**: 250–60.

J Jpn Soc Nutr Food Sci **64**: 297–303 (2011)

Review

Molecular and Nutritional Biochemical Study of Cholesterol Metabolism Regulation

(Young Investigator Award of JSNFS (2011))

Jun Inoue^{*,1}

(Received June 28, 2011; Accepted July 26, 2011)

Summary: In humans, cholesterol is derived from two main sources: diet and *de novo* synthesis in the liver. Cholesterol homeostasis is tightly regulated at the transcriptional, translational, and post-translational levels, and its disruption increases the risk of arteriosclerotic disease. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) regulate a wide variety of genes involved in cholesterol and fatty acid synthesis, and function as the main regulator of cholesterol homeostasis. In the present study, we analyzed the molecular mechanisms controlling the activities of SREBPs and identified several novel mechanisms. This review focuses on the latest developments in our understanding of SREBP regulation.

Key words: cholesterol, SREBP, post-translational modification, processing

* Corresponding author (E-mail: ajinoue@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

¹ Department of Applied Biological Chemistry, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan