コレステロールによるコレステロール代謝, 脂肪酸代謝関連遺伝子の転写制御[†]

佐藤隆一郎

(大阪大学大学院薬学研究科)

Key words: cholesterol; LDL receptor; SREBP

コレステロールは細胞膜の構成成分として、また種々のステロイドホルモンの前駆体として動物細胞にとり必須な脂質である。すべての細胞はアセチル CoA を基質とし、20 段階以上の酵素反応を介してコレステロールを産生すると同時に、細胞表面の LDL 受容体により細胞外から取り込んだ LDL をリソソームで分解し、コレステロールを確保している。一見すると互いに独立したこの二つの経路は、最終産物であるコレステロールがその双方をネガティブフィードバックコントロールするという点で、密接に結びついている。すなわち、細胞内のコレステロール量が過剰になると、コレステロール合成と LDL 取り込みが減少し、一方、細胞内コレステロール量の低下に伴い、合成、取り込みが増加する。この調節は、コレステロール合成を担う数種の酵素の活性を上下させると同時に、細胞表面の LDL 受容体の数を増減させることにより行われる。主に調節は転写レベルで行われ、mRNA 量の増減を介して、タンパク質量、酵素活性が増減する。1993 年になり、この転写調節に関わる転写因子 SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) の精製、cDNA のクローニングが終了した。その後の研究から、本転写因子は細胞内コレステロール量に応じてその活性が制御されるという、他の転写因子では全く認められたことのない様式による調節を受けることが明らかとなった^(1,2)。

LDL 受容体プロモーター領域の解析と SREBP の発見

1980 年代の後半に、コレステロール合成に関わる HMG CoA 合成酵素、還元酵素そして LDL 受容体遺伝子の構造が明らかにされ、この情報に基づきステロールによる転写調節の機構がしだいに明らかにされていった。レポーター遺伝子であるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) の上流に上記の三つの遺伝子のいずれかの 5' 上流塩基配列を挿入し、これを CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞にトランスフェクションし、ステロール存在下でレポーター遺伝子の発現が抑制されることを指標にする、いわゆる CAT アッセイを用いて、調節領域の探索が進められた。その結果、三つの遺伝子の 5' 上流域にステロールに応答する SRE (Sterol Regulatory Element) 配列の存在することが明らかにされた。この知見に基づき LDL 受容体遺伝子の SRE 配列に特異的に結合する転写因子の精製が進められた。HeLa 細胞核抽出物を材料に、SRE 配列を用いた DNA 結合カラムなどを駆使して、SREBP の精製が行われた。この精製標品のペプチドシーケンスをもとに、cDNA がクローニングされ、SREBP-1 と SREBP-2 の全アミノ酸配列が明らかにされた。すなわち、精製標品には 2 種類のタンパク質が混在していたことになる。SREBP-1、-2 は互いに 47% のアミノ酸相同性を保持し、ともに SRE 配列への結合能をもつ (図 1)。両分子とも転写因子に良く見られる bHLH-Zip (basic Helix-Loop-Helix leucine Zipper) 領域をもち、さらに分子中央部に疎水性アミノ酸に富んだ 2 カ所の膜貫通部位を有している。細胞内での両分子の局在を調べる詳細な実験の結果、転写因子としては極めてまれなことであるが、2 カ所の膜貫通部位を介して核膜、小胞体膜上に膜タンパク質として局在することが明らかにされ

[†] Transcriptional Regulation of Genes for Cholesterol and Fatty Acid Metabolism

Ryuichiro SATO (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University)

図1 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。

図2 SREBP プロセッシングの模式図
SREBPのN末端側の網かけの部分にbHLH-Zip領域が含まれる。

た^(3,4)。N末端、C末端の両端側を細胞質側へ突き出し、2カ所の膜貫通部位がヘアピンループの形で膜を貫通することが確認された。このままの存在様式では核内で転写因子として機能することはできないが、細胞内のコレステロール量が減少すると小胞体内腔に存在するヘアピンループ部位で第1段階の切断が行われ、つづいて第1膜貫通部位の近傍で第2段階のプロセッシングが起こり、bHLH-Zip領域を含むN末端側が細胞質へと遊離され、これが核へと移行し、転写因子として働く機構が明らかにされた。細胞内コレステロールが過剰になると第1プロセッシングは起こらず、N末端側が切り出されることはなく、結果的に核内のSREBP量は減少し、LDL受容体遺伝子などの転写は抑制される(図2)。第2段階の切断を担う切断酵素のcDNAクローニングは終了したもの⁽⁵⁾、コレステロールにより調節される第1段階の切断を担う

表 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

酵素の実体は未だ不明である。

SREBP-1, -2の機能

表にこれまで報告のある、SREBPにより転写調節を受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受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による調節を受けることが明らかになった。その一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)、FAS(脂肪酸合成酵素)である^(6,7)。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⁽⁸⁾。また筆者らの研究結果から、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により自己調節を受けることが判明した⁽⁹⁾。さらに興味深いことは、SREBP-1の転写が脂肪細胞分化に呼応して上昇し、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事実である⁽¹⁰⁾。その詳細な機構に関しては今後の研究進展を待たねばならない。表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全く不明のままである。

一方、各組織でのmRNAの発現量を比較するとSREBP-1は肝臓、副腎など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. 実際ハムスターを用いた動物実験で, コレステロール合成阻害薬を投与して血中コレステロール濃度を低下させた際に, 肝臓組織から調製した核抽出画分中の SREBP-2 量は増加するものの, SREBP-1 はむしろ減少していたことから, 少なくとも肝臓では SREBP-2 がコレステロール代謝調節に関して中心的役割を演じていることが推察された⁽¹¹⁾. さらに最近の興味深い実験結果によると, SREBP-1 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ていたことが示された⁽¹²⁾. これらの事実を総合すると, 大まかに 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.

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. その後の研究からその半分に相当する 5'-(C/T)CA (C/T)-3' にも SREBP の結合することが確かめられている. 図 3 にこれまで明らかにされた SREBP による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 受容体遺伝子の SREBP による転写促進には SRE 配列の近傍に存在する Sp1 結合部位が必須であることが知られている. 興味深いことに, 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, 最近の実験結果からファルネシルピロリン酸合成酵素⁽¹³⁾, 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. 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入れた場合に, コレステロールによる転写調節が消失した⁽⁹⁾. 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十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

図 3 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.

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 SREBP と NF-Y の組み合わせで調節され⁽¹⁵⁾, 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当てはまるか否かは今後の解析をもつしかないが, 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. さらに最近の実験結果から, 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⁽¹⁴⁾.

おわりに

これまでブラックボックスとして扱われていたコレステロール代謝の転写調節機構が SREBP の発見からその詳細がしだいに明らかになり始めてきた. SREBP が膜蛋白質として小胞体膜上に局在すること, その活性化がコレステロールにより制御されるプロセッシングによるなど, そのすべてがこれまで報告のある転写因子の構造, 局在, 活性化機構とは異なる. この事実は, 進化の過程において生体はコレステロール代謝調節のために多大の労力を払って独特の機構を導入していることを意味しており, コレステロール代

謝とはそこまでして厳密に制御しなくてはならない、生命現象にとって重要な代謝機構であることを物語っている。

-
- (1) 佐藤隆一郎: 化学と生物, **34**, 38-45, 1996.
 - (2) M. S. Brown and J. L. Goldstein: *Cell*, **89**, 331-340 (1997).
 - (3) R. Sato, J. Yang, X. Wang *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **269**, 17267-17273 (1994).
 - (4) X. Wang, R. Sato, M. S. Brown *et al.*: *Cell*, **77**, 53-62 (1994).
 - (5) R. B. Rawson, N. G. Zelenski, D. Nijhawan, J. Ye, J. Sakai, M. T. Hasan, T. Y. Chang, M. S. Brown, and J. L. Goldstein: *Molecular Cell*, **1**: 47-57 (1997).
 - (6) J. M. Lopez, M. K. Bennett, H. B. Sanchez *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 1049-1053 (1996).
 - (7) M. M. Magana and T. F. Osborne: *J. Biol. Chem.*, **271**, 32689-32694 (1996).
 - (8) Y. Kawabe, R. Sato, A. Matsumoto *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **219**, 515-520 (1996).
 - (9) R. Sato, J. Inoue, Y. Kawabe *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **271**, 26461-26464 (1996).
 - (10) J. B. Kim and B. M. Spiegelman: *Genes & Dev.*, **10**: 1096-1107 (1996).
 - (11) Z. Sheng, H. Otani, M. S. Brown *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 935-938 (1995).
 - (12) H. Shimano, J. D. Horton, R. E. Hammer *et al.*: *J. Clin. Invest.*, **98**, 1575-1584 (1996).
 - (13) J. Ericsson, S. M. Jackson, B. C. Lee *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 945-950 (1996).
 - (14) J. D. Oliner, J. M. Andersen, S. K. Hansen *et al.*: *Genes & Dev.*, **10**, 2903-2911 (1996).
 - (15) J. Inoue, R. Sato, and M. Maeda: *J. Biochem.*, **123**, 1191-1198 (1998).
-