

ヒト LXR α 新規スプライシング変異体の
作用機序の解明

日本大学 医学部 生体機能医学系 生化学分野

梅田 香織

2012 年

指導教員 榎島 誠

目次

第1章 概要	1
第2章 緒言	3
第3章 実験方法	7
第4章 実験結果	16
第5章 考察	30
第6章 まとめ	33
謝辞	34
表・図	35
引用文献	68
研究業績	74
基幹論文	79

略語表

22R	22(<i>R</i>)-hydroxycholesterol
22S	22(<i>S</i>)-hydroxycholesterol
AA	arachidonic acid
ABC	ATP-binding cassette
AF	activation function
AP	alkaline phosphatase
bp	base pair
cDNA	complementary DNA
CMV	cytomegalovirus
CYP7A	cholesterol 7 α -hydroxylase
DAPI	4',6-diamidino-2- phenylindole
DBD	DNA-binding domain
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	deoxyribonucleic acid
DR	direct repeat
DRIP205	vitamin D receptor-interacting protein 205
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	2-({2-[bis(carboxymethyl)amino]ethyl})(carboxymethyl)amino) acetic acid
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EMSA	electrophoretic mobility shift assays
FAS	fatty acid synthase
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GRIP	glucocorticoid receptor-interacting protein

GW3965	3-[3-[N-(2-chloro-3-trifluoromethylbenzyl)-(2,2-diphenylethyl) amino]propyloxy]phenylacetic acid hydrochloride
HEK	human embryonic kidney
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
HRP	horseradish peroxidase
IR	inverted repeat
LA	linolenic acid
LBD	ligand-binding domain
LRH-1	liver receptor homolog-1
LXR	liver X receptor
LXRE	LXR-responsive element
MT	mutant
N-CoR	nuclear receptor corepressor
NF- κ B	nuclear factor-kappaB
NMD	nonsense-mediated mRNA decay
NR	nuclear receptor
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
RLU	relative light unit
RNA	ribonucleic acid
RXR	retinoid X receptor
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamidegel electrophoresis
siRNA	small interfering RNA
SMRT	silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
snRNPs	small nuclear ribonucleoproteins
SRC	steroid receptor activator
SREBP-1c	sterol regulatory element-binding protein -1c

SR	serine/arginine-rich
T0901317	N-(2,2,2-trifluoro-ethyl)-N-[4-(2,2,2-trifluoro-1-hydroxy-1-trifluoro-methyl-ethyl)-phenyl]-benzenesulfonamide
TBE	TCF-binding element
TCF	T-cell factor
TE	Tris-EDTA
UAS	upstream activation sequence
UTR	untranslated region
VDR	vitamin D receptor
WT	wild type

第1章 概要

核内受容体 liver X receptor (LXR) はリガンド依存性転写因子であり、LXR α 及び LXR β が存在する。LXR は体内で脂質やコレステロールの代謝調節センサーとして働くことから、動脈硬化やメタボリックシンドロームなどの標的として注目されている。本研究において、我々はヒト LXR α の2種のスプライシング変異体 LXR α 4 及び LXR α 5 を同定した。これまで核内受容体のスプライシング変異体に関して数多くの報告があり、組織特異的な機能や病態との関連が示唆されているが、LXR α 変異体についてはまだその詳細は明らかではない。そこで、同定した2種を含む3種のヒト LXR α 変異体 LXR α 3、LXR α 4 及び LXR α 5 の生体内における発現、機能及び病態との関連性を検討した。まず、各種ヒト組織及びがん由来細胞株における変異体の mRNA またはタンパク質発現を調べたところ、がん細胞では LXR α 3 の明らかな発現が、LXR α 4 及び LXR α 5 の弱い発現が確認された。また、ヒト正常組織の各変異体の発現は野生型 LXR α (LXR α 1) と比べ弱いものであった。ヒト LXR α 遺伝子は、LXR α による正の自己調節が知られている。興味深いことに、細胞株における各変異体の発現も LXR リガンド処理によって変化し、この効果は細胞間で異なることが示された。次に、各変異体のリガンド依存性転写誘導活性を評価したところ、LXR α 4 のみで弱い活性が示された。また、DNA への結合性を調べたところ、LXR α 4 及び LXR α 5 が DNA 上の LXR 結合領域へ結合した。ヘテロ二量体パートナーであるレチノイド X 受容体 (retinoid X receptor, RXR) 及びコファクタータンパク質との相互作用を評価したところ、LXR α 4 は RXR と相互作用した。また、LXR α 4 及び LXR α 5 はコファクタータンパク質と弱く相互作用するが、その様式は LXR α 1 と異なることが明らかとなった。さらに、LXR α 1 に対する変異体のドミナントネガティブ効果を検討したところ、LXR α 5 のみが LXR α 1 の活性を抑制した。以上の結果から、各 LXR α スプライシング変異体は、組織、細胞間で異なる発現パターンを示し、リガンド刺激に対し細胞選択的に異なる制御が行われることが示された。また転写レベルにおいて、リガンド結合からコファク

ター複合体の形成、DNA の応答配列への結合に至る過程に選択性があることから、LXR のスプライシング制御機構の代謝関連疾患等 LXR が関与する病態への関連性が示唆された。

第2章 緒言

2-1. 核内受容体の構造と機能

核内受容体 (nuclear receptor, NR) はリガンド依存性転写因子であり、発生、代謝、恒常性など生命機能の維持に不可欠な遺伝子の転写制御を行っている。1980年代に Evans らのグループによって初めてグルココルチコイド受容体がクローニングされた[1]。その後、遺伝子工学のクローニング技術の発達によりアミノ酸配列が類似するリガンド未知の受容体”オーファン受容体”が次々と同定され、リガンドや機能が明らかとなった。

ヒト核内受容体は現在 48 種類が報告され、大きなスーパーファミリーを構成している。このファミリーにはアンドロゲン、エストロゲンを認識するステロイドホルモン受容体、レチノイン酸受容体 RXR を始めとするホモ二量体型オーファン受容体、ビタミン D 受容体 (vitamin D receptor, VDR) などの RXR ヘテロ二量体型受容体、そして liver receptor homolog-1 (LRH-1) などの単量体型受容体のグループが存在する[2,3]。核内受容体の構造は広く保存された特徴的な構造を有している。アミノ末端側の activation function (AF)-1 ドメインは、リガンド非依存性の転写制御に関与すると言われている。2つの高度に保存された Zinc フィンガーモチーフを含む DNA 結合ドメイン (DNA-binding domain, DBD) は、標的遺伝子のプロモーターへの結合を担っている。カルボキシル末端側のリガンド結合ドメイン (ligand-binding domain, LBD) は、リガンドの結合及び RXR などとの二量体形成に必須である。また、AF-2 ドメインは、リガンド依存性転写制御に重要な役割を果たしている。核内受容体は、リガンドが LBD に結合することにより立体構造変化を起こし、一部の細胞質に存在する受容体は核内へ移行する。そして、ホモ二量体もしくは RXR とのヘテロ二量体形成 (もしくは単量体で存在) を経て、steroid receptor activator-1 (SRC-1) などのコアクチベータータンパク質と転写複合体を形成し、DBD を介して NR 応答配列と呼ばれる規則配列に結合することで標的遺伝子の調節を行う(図 1)。

2-2. Liver X receptor (LXR) の機能と病態との関連

LXR は、RXR とヘテロ二量体を形成するオーファン受容体として同定された[4,5,6]。LXR には LXR α (NR1H3) と LXR β (NR1H2) の2種類のアイソフォームが存在し、LXR α は主に肝臓、小腸、脂肪組織、マクロファージなどに発現し、一方 LXR β は全身に発現している。1996年に Mangelsdorf らのグループによって、コレステロール代謝産物である 24(S),25-epoxycholesterol や 22(R)-hydroxycholesterol などのオキシステロールが LXR の内在性リガンドであることが報告された[7]。その後、LXR 欠損マウスの解析により、LXR が体内でコレステロール代謝調節センサーとして働くことが明らかとなった[8]。肝臓の LXR は ABC トランスポーター (ATP-binding cassette) ABCG5/G8 の発現を誘導してコレステロールを胆汁への排泄を促す。齧歯類では、LXR α は cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A) を誘導し、胆汁酸合成を刺激する。また、肝臓の LXR は脂肪酸代謝関連遺伝子の発現を制御する転写因子 sterol regulatory element-binding protein -1c (SREBP-1c) を誘導し、中性脂肪合成を刺激する。さらに小腸粘膜の LXR はステロール排出ポンプである ABCG5/G8 や ABCA1 の発現を制御する。マクロファージでは、LXR は ABCA1 やアポ E の発現を誘導し、コレステロール逆転送系を刺激する。アポ E 欠損動脈硬化モデルマウスに LXR 欠損マウスの骨髄を移植すると動脈硬化は増悪し[9]、また LXR アゴニストを投与したマウスでは動脈硬化の進展が抑制されることから[10]、LXR リガンドは動脈硬化を始めとする循環器疾患のターゲット分子として期待されている。また、マクロファージの LXR はコレステロール代謝制御だけでなく、nuclear factor-kappaB (NF- κ B) 経路を介する炎症反応を抑制することも報告されている。さらに、我々は大腸癌細胞において LXR が Wnt- β -catenin シグナルを抑制することにより、細胞増殖を抑制することを見出した[11]。

これらのことから、LXR は過剰なコレステロールを、その代謝産物であるオキシステロールを感知することで様々な遺伝子の発現を制御し、コレステロール恒常性を維持するだけでなく、脂質代謝や自然免疫、細胞増殖を制御するなど、多岐にわたる機能を有している。

2-3. LXR スプライシング変異体の同定

近年、詳細なゲノム解析により、多種多様なタンパク質を作り出すための重要な過程である RNA スプライシング機構が注目され、核内受容体についても数多くのスプライシング変異体やスプライシング異常と疾患との関連性が報告されてきた。近年、我々は住友化学株式会社の藤森 (現：大阪薬科大学) らとの共同研究によって3種のヒト LXR α スプライシング変異体 LXR α 3、LXR α 4、LXR α 5 を同定した。このうち、LXR α 3 は既にデータベースに登録されており (GenBank Accession No. BC008819)、2005 年に Chen らから報告されていた[12]。従って、今回報告する新規変異体は LXR α 4 及び LXR α 5 である。また、LXR α 4 及び LXR α 5 については 30%以上相同性の有するアミノ酸配列がデータベース上に存在しないことを確認している。

図 2 にヒト LXR α の遺伝子、mRNA 及びタンパク質のドメイン構造を示した。ヒト LXR α はスプライシングを経て 1 から 10 のエクソンによって構成され、タンパク質に翻訳される。エクソン 1 は非翻訳領域 (untranslated region, UTR) であり、エクソン 5 以降が LBD に該当する。よって、3 種の変異体 LXR α 3、LXR α 4、LXR α 5 は全て LBD に変異を有することになる。

変異体 LXR α 4 はエクソン 6-7 間のイントロン 6 (192 塩基、64 アミノ酸) が挿入されているが、挿入部分が 3 の倍数であるためエクソン 7 以降のアミノ酸配列は野生型 (LXR α 1) と同じであり、511 アミノ酸 (1,533 塩基) からなるタンパク質となる (図 3)。変異体 LXR α 5 はエクソン 7 と 8 の間のイントロン 7 の一部の 109 塩基対が挿入されているが、途中で in-frame で終止コドンが存在するため、エクソン 7 以降に 26 アミノ酸が挿入された、356 アミノ酸からなるポリペプチドが翻訳される。変異体 LXR α 3 はエクソン 5 (180 塩基、60 アミノ酸) が欠損した変異体であるが、欠損するエクソンが 3 の倍数であるため、エクソン 7 以降のアミノ酸配列は LXR α 1 と同じであることから、387 アミノ酸 (1,161 塩基) からなるタンパク質が翻訳される。

一般的に、核内で遺伝子が pre-mRNA へと転写された後、スプライソソーム複合体内でイントロンが除去され、エキソン同士が連結して成熟 mRNA が産生される反応を mRNA スプライシングという。mRNA スプライシングには、1 つの遺伝子から 1 種類の mRNA が産生される恒常的スプライシング (constitutive splicing) と、エキソンが選択されて複数の mRNA が産生される選択的スプライシング (alternative splicing) が存在する。生物が遺伝子の数よりもはるかに多くのタンパク質を生み出すことができる背景には、この選択的スプライシング機構の働きがあげられる。スプライシング反応には、遺伝子配列において、エキソンとイントロンの境目の配列は、5'側は必ず GT で始まり (splice donor site)、3'側は AG で終わる (splice acceptor site)、GT-AG 則と呼ばれる法則が存在する。この規則性は、真核生物の全ての細胞において保存されている [13]。本研究にて同定した変異体 LXR α 5 はイントロン 7 の一部がエキソンとして挿入されているが、その挿入配列の両末端にも他のエキソンと同様に GT 及び AG 配列が存在し、スプライス部位として認識されている (図 4)。スプライス部位の誤認識や周辺のコンセンサス配列に変異が生じると、エキソンのスキップや変異による新たなスプライス部位の形成が観察され (cryptic splice site という)、結果、選択的スプライシング反応が生じ本来とは異なる構造の mRNA が産生される。こうしたスプライシング異常と遺伝性疾患との関連も近年報告されている。核内受容体においては、前立腺がん患者のサンプルから同定されたアンドロゲン受容体 (androgen receptor, AR) のスプライシング変異体で、cryptic splice site の出現により、AR の DBD へ 23 アミノ酸の挿入が認められた例が報告されている [14]。今回報告する 3 種の変異体は、いずれもスプライス部位での点変異は存在せず、上記のように、挿入及び欠損部位以外は野生型 LXR α 1 と同一の配列を有するが、原因は不明ながらヒト組織での発現が確認されたため、野生型 LXR の機能に変化を及ぼし、その結果として LXR が関与する代謝及び循環器関連疾患、メタボリックシンドロームなどへの影響が示唆される。本研究では、これらのヒト LXR α スプライシング変異体の組織及び細胞株における発現、また生体内における機能の解明を目的とする。

第3章 実験方法

3-1. 使用試薬

N-(2,2,2-Trifluoro-ethyl)-N-[4-(2,2,2-trifluoro-1-hydroxy-1-trifluoro-methyl-ethyl)-phenyl]-benzenesulfonamide (T0901317) は Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI) から、24(*S*),25-Epoxycholesterol (EC) は Enzo Life Science (Farmingdale, NY) から、22(*R*)-Hydroxycholesterol (22R) 及び 22(*S*)-hydroxycholesterol (22S) は Steraroids (Newport, RI) から、アラキドン酸 (arachidonic acid, AA) 及びリノレン酸 (linolenic acid, LA) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。3-[3-[N-(2-Chloro-3-trifluoromethyl-benzyl)-(2,2-diphenylethyl)amino]propyloxy]phenylacetic acid hydrochloride (GW3965) は岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 創薬生命科学専攻 創薬科学講座 有機医薬品開発学分野の宮地弘幸教授より供与して頂いた[15]。

3-2. 細胞培養

ヒト胎児腎臓由来 human embryonic kidney (HEK) 293 細胞は RIKEN Cell Bank (Tsukuba, Japan) から購入し、5%ウシ血清 (fetal bovine serum, FBS) 及び抗生物質 (100 unit/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培地を用いて継代培養を行った。細胞は 37°C に保温した 5% CO₂ を含むインキュベーター内で培養し、継代及び培地交換は 1 日置きに行った。ヒト肝癌由来 HepG2 細胞及びアフリカミドリザル腎臓由来 Cos-7 細胞は RIKEN Cell Bank から、ヒト大腸癌由来 HCT116、SW480、神経芽腫由来 NT2-D1 細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA) から購入し、ヒトケラチノサイト HaCaT 細胞は日本大学 医学部 皮膚科学分野 照井正教授より供与して頂いた。上記の各細胞は 10% FBS 及び抗生物質 (100 unit/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン) を含む DMEM 培地を用いて継代培養を HEK293 細胞と同様に行った。ヒト大腸癌由来 CaCO₂、骨肉腫由来 MG63 及び神経芽腫由来 SK-N-SH 細胞は RIKEN Cell Bank から購入し、

10% FBS 及び抗生物質 (100 unit/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン) を含む minimal essential medium 培地を用いて継代培養を HEK293 細胞と同様に行った。ヒト単球系 U937、HL-60、THP-1 細胞は RIKEN Cell Bank から、ヒト乳癌由来 MCF-7 細胞は American Type Culture Collection から購入し、10% FBS 及び抗生物質 (100 unit/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン) を含む RPMI1640 培地を用いて継代培養を HEK293 細胞と同様に行った。

3-3. プラスミド

ヒト野生型 LXR α 1 (GenBank accession no. NM_005693)[5]、Tontonoz らによって報告されたスプライシング変異体 LXR α 3 (GenBank accession no. NM_001130101)[12]、住友化学株式会社 藤森 (現:大阪薬科大学) らとの共同研究により同定された新規スプライシング変異体 LXR α 4 及び LXR α 5 の各全長フラグメントは PCR を用いて増幅し、pFLAG-CMV2 (Sigma-Aldrich) ベクターに挿入することで、それぞれ pFLAG-CMV2-LXR α 1、pFLAG-CMV2-LXR α 3、pFLAG-CMV2-LXR α 4 及び pFLAG-CMV2-LXR α 5 を作製した。ヘルペスウイルス由来転写因子 VP16 の転写活性化ドメインは pCMX-VP16 ベクター[16]から制限酵素 HindIII を用いて切り出し、各 pFLAG-CMV2-LXR α 変異体ベクターに挿入することで、pFLAG-CMV2-VP16-LXR α 1、pFLAG-CMV2-VP16-LXR α 3、pFLAG-CMV2-VP16-LXR α 4 及び pFLAG-CMV2-VP16-LXR α 5 を作製した。各 LXR α スプライシング変異体 LBD は PCR 法を用いて増幅し、得られたフラグメントを pCMX-GAL4 ベクターに挿入することで pCMX-GAL4-LXR α 1、pCMX-GAL4-LXR α 3、pCMX-GAL4-LXR α 4 及び pCMX-GAL4-LXR α 5 を作製した。全長 EGFP フラグメントは pEGFP-C1 (Clontech, Mountain View, CA) を鋳型として PCR 法を用いて増幅し、各 pFLAG-CMV2-LXR α 変異体ベクターに挿入することで pFLAG-CMV2-EGFP-LXR α 1、pFLAG-CMV2-EGFP-LXR α 3、pFLAG-CMV2-EGFP-LXR α 4 及び pFLAG-CMV2-EGFP-LXR α 5 を作製した。作製したプラスミドは全て DNA シークエンスを用いて配列を確認した。ヒト野生型 β -catenin 発現プラスミド pCMX- β -catenin-WT、恒常的活性型変異体

β -catenin (S33A, S37A, T41A 及び S45A) 発現プラスミド pCMX- β -catenin-MT、各種発現プラスミド pCMX-GAL4、pCMX-RXR α (GenBank accession number NM_002957)、pCMX-GAL4-RXR α 、pCMX-VP16-RXR α 、pCMX- β -galactosidase、pCMX-GAL4-SRC1 (amino acids 595-771; GenBank accession No. U90661)、pCMX-GAL4-DRIP205 (amino acids 578-728; GenBank accession No. Y13467)、pCMX-GAL4-SMRT (amino acids 2003-2517; GenBank accession No. AF113003)、pCMX-GAL4-N-CoR (amino acids 1990-2416; GenBank accession No. U35312)及び各ルシフェラーゼレポータープラスミド rCYP7A1-DR4x3-tk-LUC、IR1x3-tk-LUC、TOPGLOW 及び MH100(UAS)x4-tk-LUC は以前当研究室で作製または報告されたものを用いた[11,16]。

3-4. マウスの飼育及び繁殖

C57BL/6J マウスは日本チャールス・リバー株式会社 (Yokohama, Japan) から購入した。LXR α 及びLXR β ダブル欠損マウス(Lxr α (-/-)/Lxr β (-/-)マウス)は David J. Mangelsdorf 博士 (University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, TX) より供与して頂いた[17]。Lxr α (-/-)/Lxr β (-/-)マウスは自然交配による繁殖が困難であるため、雄及び雌 Lxr α (-/-)/Lxr β (+/-)マウスを自然交配させることによって得た。生まれたマウスは遺伝子型を判別する必要があるため、尻尾を 1 cm 程度カットし、DNA 抽出を行った後、PCR 反応を行い遺伝子型 (+/-または-/-)を判別した。ケージ内での個体識別のため耳にパンチで穴を開けた。マウスは室温 23 \pm 1 $^{\circ}$ C 及び湿度 45–65%の管理下に保ち、水及び飼料 (Laboratory Animal Diet MF; オリエンタル酵母株式会社, Tokyo, Japan) は自由摂取させ飼育した。実験に用いたマウスの各組織は 8 から 9 週齢の雄マウスを用い炭酸ガスで安楽死させた後、採取した。全てのマウス実験は日本大学医学部の定めた動物実験指針に従って行った。

3-5. 細胞及びマウス組織からの総 RNA 抽出、逆転写反応による cDNA 合成

細胞及びマウス各臓器からの総 RNA 抽出は以下に示すように acid guanidine

thiocyanate-phenol/chloroform 法に基づいて行った。各種細胞は 6 ウェルプレートに 2×10^5 cells/well で播種し、48 時間培養した。リガンド処理は、播種 24 時間後に T0901317 (1 μ M) を処理し、再び 24 時間培養した。培地を除去し、PBS で洗浄後、Solution D mixture (水飽和フェノール 0.6 mL, 2 M sodium acetate 60 μ L 及び Solution D (+) 溶液 (4 M guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate (pH 7.0), 0.5% Sarkosyl (L-laurelsarcosine), 0.72% 2-メルカプトエタノール) 0.6 mL) 1.26 mL を加え細胞を溶解後、2.0 mL チューブに回収した。マウス各臓器は 5 mm 片を 1.26 mL Solution D mixture 溶液に入れ、ホモジェナイザーを用いて破碎し、2.0 mL チューブに回収した。クロロホルム/イソアミルアルコール (50 : 1) 溶液を 130 μ L 加え、激しく攪拌した。氷上で 15 分間静置後、15,000 rpm、4°C で 20 分間遠心分離した。新しい 1.5 mL チューブに水層を移し、イソプロパノール 500 μ L を加え 4 回転倒混和後、-20°C にて 30 分間静置した。15,000 rpm で 10 分間遠心分離後、溶液を除去し、75% エタノール 500 μ L で洗浄した。遠心分離後、溶液を完全に除去し、ペレットを超純水に溶解した。得られた総 RNA 抽出液は、分光光度計を用いて OD₂₆₀ 及び OD₂₈₀ 値を測定し、濃度を算出した。総 RNA 抽出液は超純水で 250 ng/ μ L に希釈した。

cDNA の合成は ImProm-II Reverse Transcription system (Promega Corporation, Madison, WI) を用い、プロトコールに従い行った。500 ng の RNA (250 ng/ μ L を 2 μ L) に 10 μ M oligo dT プライマー 0.5 μ L と超純水を加え 5 μ L の反応液を作成し、サーマルサイクラーPCR を用いて 70°C で 5 分間加温し、4°C で 5 分間冷却した。このサンプルに ImProm-II 5xReaction buffer 2 μ L、25 mM MgCl₂ 1.2 μ L、10 mM deoxynucleotide triphosphates mixture 0.5 μ L、ImProm-II Transcriptase 0.5 μ L 及び超純水の混合液を加え 10 μ L の反応液を調製した。逆転写反応はサーマルサイクラーPCR を用いて 25°C で 15 分間加温後、42°C で 60 分間伸長反応を行った。その後 70°C で 15 分間加温することで酵素を失活させ、4°C に冷却した。得られた cDNA は Tris-EDTA (TE) バッファーで 3 倍希釈し、-20°C で保存した。

3-6. PCR 反応及びリアルタイム PCR

PCR 反応は GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて行った。培養細胞の RNA 溶液から合成した cDNA 1 μ L に Go Taq DNA polymerase master mix (Promega Corporation) 7.5 μ L、forward primer (10 μ M) 0.3 μ L、reverse primer (10 μ M) 0.3 μ L 及び超純水を加えて反応溶液を調製した。反応に用いたプライマーの配列は表 1 に示した。PCR 反応は次のように行った。まず、94°C で 2 分間反応させた。次に 94°C で 30 秒間熱変性させ、60°C で 30 秒間アニール後、72°C で 1 分間伸長反応を行い、ここまですを 1 サイクルとし、計 30 サイクル反応させた。反応後 ethidium bromide を含む 1% アガロースゲルにて電気泳動を行い、紫外線照射し、バンドを確認した。

リアルタイム PCR 反応は ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて行った。ヒト培養細胞及びマウス組織から抽出した総 RNA より合成した cDNA 2 μ L に Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 7.5 μ L、forward primer (10 μ M) 0.3 μ L、reverse primer (10 μ M) 0.3 μ L 及び超純水を加えて反応溶液を調製した。ヒト組織 cDNA パネル (Clontech) は 5 ng (1 ng/ μ L を 5 μ L) 用いた。反応に用いた各プライマーの配列は表 2 (ヒト) または表 3 (マウス) に示した。PCR 反応は次のように行った。まず、95°C で 10 分間反応させた。次に 94°C で 15 秒間熱変性させ、アニール及び伸長反応は 60°C、1 分間で行い、2 ステップを 1 サイクルとし 40 サイクル行った。発現量の計算は逆転写させた総 RNA 1 ng あたりのコピー数を算出することによって行った。コピー数計算のための標準サンプルとして、各 LXR α 変異体の発現ベクターを用いた。また、内部標準として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の値を用いて RNA 発現量を補正した。

3-7. プラスミドの導入及びルシフェラーゼレポーターアッセイ

HEK392 細胞へのプラスミド導入はリン酸カルシウム法にて行った。まず、ルシフェラーゼレポーターアッセイについては、96 ウェルプレートに細胞を 1×10^4 cell/well にて播種した。翌日、各発現プラスミド (15 ng/well)、レポータ

ープラスミド (50 ng/well) 及び β -ガラクトシダーゼ発現プラスミド (10 ng/well) の導入を行った。8時間後リガンドを処理し、16-18時間後、ルシフェラーゼ及び β -ガラクトシダーゼの活性を評価した。活性評価はルミノメーター及びマイクロプレートリーダー (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を用いて行った。実験データはルシフェラーゼ活性値を β -ガラクトシダーゼ活性値で補正し算出した。タンパク質検出用実験では、10 cm dish に細胞を 1×10^6 cell/dish にて播種した。翌日、各発現プラスミド (10 μ g/dish) を導入し、24時間後にタンパク質を抽出した。SW480 細胞へのプラスミド導入は FuGene HD (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) を用いて行った。細胞は 6 ウェルプレートに 2×10^5 cell/well で播種した。翌日、各発現プラスミド (2.5 μ g/well) を導入し、培養した。48時間後、上記の通りに総 RNA を抽出した。

3-8. Small interfering RNA (siRNA) の導入

LXR α (siLXR α -1; Dharmacon RNA Technologies, Lafayette, CO) 及びコントロール siRNA は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) より購入した。LXR α (siLXR α -2; 5'-AGA AAC UGA AGC GGC AAG A-3') 及び LXR α/β (siLXR α/β ; 5'-CAU CAA CCC CAU CUU CGA G-3') に対する siRNA 配列は Yangsik Jeong 博士 (Department of Biochemistry, Institute of Lifestyle Medicine, and Nuclear Receptor Research Consortium, Yonsei University Wonju College of Medicine) による供与を受けた。siRNA の細胞への導入は以下の通りに行った。HaCaT 及び HepG2 細胞はそれぞれ 10 cm dish に 1×10^6 cell/dish で播種した。翌日、各 siRNA (0.2-0.3 nmol) をそれぞれ DharmaFECT1 reagent (Thermo Fisher Scientific) 及び Trans IT-TKO Reagent (Mirus Bio, Madison, WI) を用いて導入し 48時間培養した。

3-9. 細胞タンパク質の調製、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 及びウェスタンブロッティング

内在性 LXR α 変異体の検出用の細胞核抽出サンプルは以下の通りに調製した。HaCaT 及び HepG2 細胞は、siRNA 導入 48時間後、PBS で洗浄、1.5 mL チュー

ブに細胞を移し、Buffer A (10 mM HEPES (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA (pH 8.0), 0.1 mM EGTA (pH 8.0)) 0.4 mL で懸濁し、氷上で 15 分間静置した。10% Nonidet P-40 10 μ L を加えて激しく攪拌し、3,000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離した。上清 (細胞質画分) を除き、沈殿に Buffer C (50 mM HEPES-KOH (pH 7.9), 420 mM KCl, 0.1 mM EDTA (pH 8.0), 5 mM MgCl₂, 20% Glycerol) を 0.1 mL 加え、4°C にて 60 分間回転混和した。15,000 rpm、4°C にて 15 分間遠心分離し、上清を核画分として回収した。

強制発現 LXR α 変異体検出用タンパク質は以下の通りに調製した。HEK293 細胞は、プラスミド導入 24 時間後、細胞を PBS にて洗浄後 1.5 mL チューブに移し、Lysis buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 1% Glycerol, Protease inhibitor cocktail) 0.1 mL を加えた。ホモジェナイザーを用いて細胞を破碎し、15,000 rpm、4°C にて 10 分間遠心分離を行った。上清を Whole cell lysate として回収した。

得られたタンパク質は Pierce BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific) を用い、ウシ血清アルブミンを標準サンプルとして定量した。各タンパク質は 30 μ g/15 μ L に希釈後、1.5 mL チューブに移し 2x サンプルバッファー (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% Glycerol, 2% SDS, 5% 2-メルカプトエタノール, 0.05% ブロモフェノールブルー) を 15 μ L 加え、95°C で 5 分間加熱し、サンプルを調製した。SDS-PAGE は 10%ポリアクリルアミドゲルを用いて行い泳動後、タンパク質をニトロセルロース膜に転写した。転写後のニトロセルロース膜は 5%スキムミルクを含む PBST (1xPBS, 0.1% Tween 20) で 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後、1 次抗体を 4°C で一晩反応させた。抗 LXR α 抗体は Perseus Proteomics Inc. (Tokyo, Japan)、抗 FLAG 抗体は Sigma-Aldrich から購入した。翌日、膜を PBST にて洗浄後、2 次抗体を室温で 60 分間反応させた。2 次抗体、HRP 標識抗マウス IgG 及び AP 標識抗マウス IgG は Dako (Glostrup, Denmark) から購入した。反応後、化学発光 (ECL Plus Western Blotting Detection System, GE healthcare, Buckinghamshire, UK) またはアルカリホスファターゼ染色 (AP Conjugate Substrate Kit, Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて検出した。各タ

ンパク質の検出方法、抗体の希釈倍率及び組み合わせは以下に示した。

タンパク質サンプル	1次抗体	2次抗体	検出方法
HaCaT, HepG2 細胞 (核画分)	抗 LXR α 抗体 (500 倍希釈)	HRP 標識抗マウス IgG (1,000 倍希釈)	化学発光 (ECL)
HEK293 細胞 (Whole cell lysate)	抗 FLAG 抗体 (1,000 倍希釈)	AP 標識抗マウス IgG (2,500 倍希釈)	AP 発色

3-10. ゲルシフトアッセイ

Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) は以前の文献に従って行った [12,18]。LXR α 変異体及び RXR α タンパク質は pFLAG-CMV2-LXR α 変異体発現プラスミドまたは pCMX-RXR α を鋳型に TNT Quick-Coupled Transcription/Translation System (Promega Corporation) を用いて合成した。マウス SREBP-1c プロモーターの LXRE を含む 2 本鎖オリゴヌクレオチド 5'-CAG TGA CCG CCA GTA ACC CCA GC-3' (LXREa) 及び 5'-GGA CGC CCG CTA GTA ACC CCG GC-3' (LXREb) は Yoshikawa らの論文[18]、ラット CYP7A プロモーター上の LXRE を含む 2 本鎖オリゴヌクレオチド 5'-GCT TTG GTC ACT CAA GTT CAA GTT A-3' は Lu らの論文[19]、ラット FAS プロモーター上の LXRE を含む 2 本鎖オリゴヌクレオチド 5'- GAT CAC GAT GAC CGG TAG TAA CCC CGC C-3'は Chen らの論文[12]に従い合成した。オリゴヌクレオチドは $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 、T4 DNA ポリヌクレオキナーゼを用いてアイソトープラベルを行った。ラベルしたオリゴヌクレオチドとタンパク質を reaction buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 mM KCl, 0.05 mM EDTA (pH 8.0), 2.5 mM MgCl₂, 8.5% glycerol, 1 mM dithiothreitol, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ poly(dI-dC), 0.1% Triton X-100 及び nonfat milk) 内において 30 分間氷中で結合反応を行った。未ラベルのプローブ及び抗 LXR α 抗体 (Perseus Proteomics Inc.) は競合実験及びスーパーシフト実験に用いた。反応後サンプルは 5%ポリアクリルアミドを用いて SDS-PAGE を行い、オートラジオグラフィーにてプローブを検出した。

3-11. LXR α スプライシング変異体の細胞内局在の観察

Cos-7 細胞を 1 cm² スライドチャンバーに 1x10⁵ cell/well で播種した。翌日、各 pFLAG-CMV2-EGFP-LXR α 変異体発現プラスミド (1 μ g/well) を FuGene HD (Roche Applied Science) を用いて導入し、培養した。48 時間後、細胞を PBS で洗浄し、4%パラホルムアルデヒドを 10 分間処理し細胞を固定した。PBS で洗浄後、0.05% Triton X-100 を 5 分間処理した。さらに、PBS で洗浄後、PBS で 50,000 倍に希釈した 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 溶液を室温で 5 分間処理した。PBS で洗浄後、スライドガラスに封入材 ProLong® Gold Antifade Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) を塗り、カバーガラスを被せた。細胞は蛍光顕微鏡 (KEYENCE, Osaka, Japan) を用いて観察した。EGFP は励起波長 488 nm、蛍光波長 509 nm、DAPI は励起波長 358 nm、蛍光波長 461 nm にて検出した。

3-12. モデリングによる LXR α 4 構造予測

LXR α 4-LBD の構造予測は Sybyl 7.3 (Tripos, St. Louis, MO) を用いて行った。LXR α 4-LBD のアミノ酸配列を Swiss-Prot ExPASy proteomics tools に入力し、Protein Data Bank (PDB) に登録されたヒト LXR β -LBD の X 線結晶構造 (PDB file No. 1p8d) [20] を元に概形を構築した。得られた構造に、Svensson らによって報告されたヒト LXR α 1-LBD、リガンド (T0901317) 及び RXR β -LBD 複合体の X 線結晶構造 (PDB file No. 1uhl)[21] を標準として、エネルギー計算を行った。さらに SRC-1 の核内受容体相互作用ドメインにある LXXLL モチーフを含むペプチド[20] を標準とし解析した。

3-13. 統計処理

全ての実験結果は平均値±標準誤差として示した。有意差検定は Student's-t 検定を用いて算出した。

第4章 実験結果

4-1. ヒト及びマウスにおける LXR α 変異体の発現

ヒト各種細胞株において新規 LXR α 変異体 mRNA を検出するため、サーマルサイクラーPCR を用いて mRNA 発現量を評価した。PCR 反応には、エキソン4-エキソン8間を増幅するプライマーセット (4-8 プライマー) 及びエキソン6-エキソン8間を増幅するプライマーセット (6-8 プライマー) を用いた (表1)。4-8 プライマーでは、LXR α 1、LXR α 3、LXR α 4 及び LXR α 5 が検出される。各 LXR α 変異体発現ベクターを標準サンプルとして PCR 反応を行った結果、LXR α 1 は 844 bp、LXR α 3 は 652 bp、LXR α 4 は 472 bp と理論値と一致する位置でバンドが検出された (図 5A)。LXR α 5 は理論上 735 bp の位置で検出されるが、発現ベクターにはエキソン8の配列が含まれないため標準サンプルとして使用できなかった。細胞株 cDNA を用いて PCR 反応を 30 サイクル行った結果、野生型 LXR α 1 の発現は全ての細胞株で発現が確認され、LXR α 3 は MG63 細胞を除く多くの細胞株で発現が認められた。LXR α 4 細胞は乳癌由来 MCF-7 細胞などで発現が認められた。LXR α 5 は本実験条件では検出されなかった (図 5A)。6-8 プライマーを用いた PCR 反応では LXR α 1、LXR α 4 及び LXR α 5 が検出される。標準サンプルの PCR 反応より、LXR α 1 は 235 bp、LXR α 4 は 427 bp の位置にバンドが確認され、計算値と一致した (LXR α 5 は理論上 318 bp で検出される) (図 5B)。細胞株 cDNA を用いた PCR 反応の結果、5-8 プライマーと同様全ての細胞株で LXR α 1 の発現が認められた。LXR α 4 の発現は HepG2、MCF-7 細胞などで検出された。この条件においても LXR α 5 は検出されなかった (図 5B)。

次に、LXR α 変異体のヒト各組織及び細胞株での mRNA 発現量を、リアルタイム PCR を用いて定量するため、各変異体を特異的に増幅するプライマーを設計した。各変異体のエキソン上にプライマー配列の位置を図6に示した。LXR α 1 は forward プライマーがエキソン6-7、reverse プライマーはエキソン8間で設計した (増幅サイズは 197 bp)。LXR α 3 は forward プライマーがエキソン5、reverse プライマーはエキソン5-6間で設計した (増幅サイズは 166 bp)。LXR α 4 は

forward プライマーがイントロン 6、reverse プライマーはエキソン 8 間で設計した (増幅サイズは 233 bp)。LXR α 5 は forward プライマーがエキソン 6-7、reverse プライマーはイントロン 7 間で設計した (増幅サイズは 155 bp)。いずれのプライマーセットについても LXR α 変異体発現ベクターを用いて PCR 反応を行い、目的の変異体以外は増幅されないことを確認した (図 6)。これら設計した各プライマーを用いてリアルタイム PCR 反応を行い、各細胞株における LXR α 変異体の mRNA 発現量を定量し、結果を図 7 に示した。各 LXR α 変異体の発現量を比較した結果、測定した全ての細胞株で野生型 LXR α 1 が最も高発現していた。LXR α 3 の発現は大腸癌由来 CaCO2 を除く細胞株で LXR α 1 の次に発現が高かった。MG63 細胞では、変異体の発現はほとんど認められなかった。また、CaCO2 細胞では LXR α 4 が LXR α 3 と比べ高発現していた。LXR α 5 の発現は全ての細胞株で非常に低かった。

次にヒト正常組織における LXR α 変異体の発現を調べるため、各組織由来 cDNA パネルを用いてリアルタイム PCR 反応を行った (図 8)。野生型 LXR α 1 は肝臓、脾臓、精巣、膵臓、胸腺で高発現が認められた。LXR α 3、LXR α 4 及び LXR α 5 の発現は肝臓、脾臓、卵巣、小腸、大腸で認められたが、LXR α 1 と比較するとそれらの発現量は非常に低かった。

さらに、他の生物種における LXR α 変異体発現の有無を検討するため、マウス各組織における LXR α 変異体の発現を調べた。ヒト野生型 LXR α 1 (GenBank accession no. NC_000011.9) 及びマウス野生型 LXR α (GenBank accession no. NC_000068.6) のゲノム配列を比較し、ヒト LXR α のエキソンまたはイントロンと同じ位置の配列を特異的に認識するプライマーを設計した。両生物間の遺伝子配列を比較したところ、マウス LXR α 遺伝子上ではイントロン 7 と相同性の高い配列が確認できなかったため、本実験では LXR α 3 及び LXR α 4 の発現のみを検討した。リアルタイム PCR による mRNA 定量結果を図 9 に示した。LXR α 3、LXR α 4 は野生型マウス (WT) の肝臓、腎臓、腸管、脾臓、心臓、肺で弱い発現が認められた。ヒト組織、細胞株の結果と異なり、マウスの組織では LXR α 3 と比べ LXR α 4 の発現量が高かった (図 9A)。また、Lxr α (-/-)/Lxr β (-/-)マウスは

LXR α のエキソン 4 から 7 を欠損しているため[22]、両 LXR α 変異体発現は LXR α 1 と同様に Lxr α (-/-)/Lxr β (-/-)マウスから採取した組織では発現が認められなかった (図 9B)。これらの結果から、ヒト組織または細胞株で 3 種類の LXR α 変異体 LXR α 3、LXR α 4 及び LXR α 5 が野生型 LXR α 1 と比べ弱いものの mRNA レベルで発現していることが示された。また、ヒトだけでなくマウス組織においても 2 種類の LXR α 変異体 LXR α 3、LXR α 4 の mRNA レベルでの発現が確認された。

次に、ヒト細胞株 HaCaT または HepG2 細胞における各 LXR α 変異体のタンパク質発現を検討した。各細胞に 3 種類の LXR α 発現をノックダウンする siRNA (siLXR α -1, siLXR α -2, siLXR α / β)をトランスフェクションし、核画分を抽出後、ウェスタンブロッティングを行い、抗 LXR α 抗体を用いて内在性 LXR α タンパク質を検出した。各変異体のアミノ酸配列からタンパク質の質量を算出したところ、LXR α 1 は 50.4 kDa、LXR α 3 は 43.5 kDa、LXR α 4 は 57.3 kDa、LXR α 5 は 39.5 kDa であった。図 10A において、HaCaT 細胞では、50 kDa 付近で検出された LXR α 1 は 3 種類の siRNA により発現は抑制された。LXR α 3 は LXR α 1 と比べ弱いながら 43 kDa 付近で検出された。LXR α 3 発現は siLXR α -1 及び siLXR α / β により抑制されたが siLXR α -2 では抑制されなかった。これは、siLXR α -1 がエキソン 5、6、8 に対する siRNA の混合物、siLXR α / β がエキソン 8 に対する siRNA であるのに対し、siLXR α -2 は LXR α 3 が欠損しているエキソン 6 に対する siRNA であるためである。LXR α 4 は 54 kDa 付近に弱い発現が検出され、siLXR α -2 及び siLXR α / β により抑制された。LXR α 5 と考えられるバンドは検出されなかった。HepG2 細胞においても LXR α 1 は 3 種類の siRNA により発現は抑制され、LXR α 3 は siLXR α -1 及び siLXR α / β に、LXR α 4 は siLXR α -2 及び siLXR α / β により抑制された (図 10B)。これらの実験結果から、2 種類の LXR α 変異体 LXR α 3、LXR α 4 は、ヒト細胞株において mRNA 発現と同様に LXR α 1 と比べ弱いながらタンパク質レベルでも発現していることが示された。

4-2. LXR 合成リガンドによる LXR α 変異体の mRNA 発現変化

過去の報告より、ヒト LXR α プロモーター上には LXRE が存在し、マクロファージなどの細胞で LXR はリガンド依存的に直接自身の発現を誘導する auto-regulation 機構が知られている[23,24]。この機構による各 LXR α 変異体の mRNA 発現変化を調べるため、ヒト細胞株 HepG2、SW480、THP-1 及び MCF-7 細胞に LXR の強い合成アゴニストである T0901317 [25]を処理し、24 時間後の各 LXR α 変異体の mRNA 発現量を、リアルタイム PCR を用いて評価した (図 11)。LXR α 1 の発現は MCF-7 細胞を除く HepG2、SW480、THP-1 細胞でリガンド処理により増加した。同様に LXR α 4、LXR α 5 の発現量についてもこれらの細胞株で増加が認められた。一方、LXR α 3 は SW480 細胞で増加したが、HepG2、THP-1 細胞では変化せず、MCF-7 細胞ではむしろ減少した。これらの結果から、各 LXR α 変異体は細胞種の違いまたはリガンド処理によって異なる発現制御を受けることが明らかとなった。

4-3. LXR α 変異体のリガンド依存性転写誘導活性評価

各 LXR α 変異体の転写因子としての機能を評価するため、HEK293 細胞を用いてリガンド依存性転写誘導活性を評価した。HEK293 細胞に各 LXR α 変異体の発現プラスミドを導入後、24 時間後に総タンパク質を抽出し、抗 FLAG 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、全ての LXR α 変異体は理論上の分子量付近で均等に過剰発現し、細胞内のタンパク質分解制御等を受けず、安定に発現することを確認した (図 12)。

次に、上記の各 LXR α 変異体の発現プラスミドを HEK293 細胞に導入し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。LXR α は RXR α とヘテロ二量体を形成後、標的遺伝子プロモーター上のコンセンサス配列 (AGGTCA) が 4 塩基隔てて順方向に並んだ direct repeat 4 (DR4) 及び 1 塩基隔てて逆方向に並ぶ inverted repeat 1 (IR1) に結合する[26]。本実験では、ラット Cyp7a1 プロモーター上の LXRE (DR4) を 3 つ含むルシフェラーゼレポーター rCYP7A1-DR4x3-tk-LUC または AGGTCA 配列の IR1 を 3 つ含む人工的レポーター (IR1x3-LUC)

を使用した。

rCYP7A1-DR4x3-tk-LUC を用いて T0901317 による転写誘導活性評価を行ったところ、RXR α 非導入下 (内在性RXRを利用) では野生型LXR α 1はT0901317処理濃度依存的に強く転写活性を増加させた (図13A上)。新規LXR α 変異体のうち、LXR α 4はLXR α 1と比べ弱い転写活性を誘導したのに対し、LXR α 5は転写活性を認めなかった。LXR α 3は過去の報告と一致し転写活性は認めなかった [12]。RXR α を導入すると、LXR α 1はT0901317非依存性転写活性を増加させた (図13A下)。LXR α 4はT0901317依存性転写活性を増加させたがLXR α 3、LXR α 5による転写活性は認められなかった。同様の実験をIR1x3-LUCレポーターを用いて行った結果、RXR α の導入の有無も含めDR4レポーターとほぼ同様の傾向が観察された (図13B)。

次に、LXR α 変異体の転写誘導活性に対する別のLXRリガンドの効果について検討した。合成アゴニストであるGW3965は、T0901317が別の核内受容体pregnane X receptorなどにも作用するのに対し[27]、LXR選択的リガンドとして報告されている[28]。rCYP7A1-DR4x3-tk-LUCレポーターを用いて転写誘導活性を評価したところ、T0901317の効果と同様に、GW3965及びLXR天然リガンドであるオキシステロール、24(S),25-epoxycholesterol (EC)、22(R)-hydroxycholesterol (22R)はLXR α 4の転写活性化を示したが、その効果はLXR α 1よりも弱かった (図14A-C)。またこれらのリガンドもまたLXR α 3及びLXR α 5を転写活性化しなかった。オキシステロール22(S)-hydroxycholesterol (22S) 及び不飽和脂肪酸アラキドン酸 (arachidonic acid, AA) 及びリノレン酸 (linolenic acid, LA) はLXRアンタゴニストとして機能することが報告されている [29,30,31]。これらのLXRアンタゴニストはいずれのLXR α 変異体も活性化しなかった (図14D-F)。これらの結果から、新規LXR α 変異体のうち、LXR α 4のみが弱い転写誘導活性を保持することが複数のリガンドを用いたアッセイにより示された。

4-4. LXR α 4 の転写誘導活性に対する LXR アンタゴニストの効果

図 13,14 に示すように、転写活性化能を有する LXR α 4 についてアンタゴニスト活性を評価した。図 14 で用いた LXR アンタゴニスト 22S または AA は、各アゴニスト (T0901317, GW3965, EC, 22R) により誘導された LXR α 1 の転写活性を濃度依存的に抑制した (図 15)。また、アゴニストにより誘導された LXR α 4 の転写活性についても同様に抑制した。これらの結果から、LXR α 4 の転写誘導活性は LXR アンタゴニストにより抑制されたことから、野生型 LXR α 1 と同様の機構で転写制御が行われることが示唆された。

4-5. LXR α 変異体の細胞内局在の評価

転写因子が機能するためには核での局在が不可欠である。VDR などの一部の核内受容体はリガンドによって細胞質から核へ移行するシグナルが働いているのに対し[32]、LXR は、ラットのマクロファージに発現する LXR をモノクローナル抗体で免疫染色したところ、内在性 LXR は通常核に局在することが報告された[33]。そこで、LXR α 変異体の細胞内局在を観察するため、各 LXR α 変異体のアミノ末端側に EGFP をつないだ EGFP-LXR α キメラベクターを作製した。Cos-7 細胞に各 EGFP-LXR α 変異体を導入し、24 時間後、細胞を固定しマーカーとして核を DAPI で染色後、蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、コントロールである単独の EGFP は細胞質及び核に存在していた (図 16)。一方、EGFP-LXR α 1 を導入すると、EGFP-LXR α 1 は核に局在していた。EGFP-LXR α 変異体はいずれも EGFP-LXR α 1 と同様に核での局在が観察された。これらのことから、転写誘導活性を持たない LXR α 3、LXR α 5 を含む各 LXR α 変異体においても、野生型 LXR α 1 と同様に通常核内に存在し、変異による細胞内局在に変化は認められなかった。

4-6. LXR α 変異体の β -catenin 転写抑制活性評価

我々はこれまでの研究から、canonical Wnt- β -catenin シグナル経路が恒常的に活性化した大腸癌細胞において、LXR がリガンド依存的に β -catenin に結合し、

β -catenin による転写誘導活性を抑制することを報告した (図 17)[11]。そこで、この LXR の β -catenin 転写抑制機構に対する LXR α 変異体の効果をルシフェラーゼレポーターアッセイにて検証した。TCF-binding element (TBE) を 4 つ含むレポータープラスミド TOPGLOW を導入すると内在性の転写因子 TCF が TBE に結合し、さらに β -catenin が TCF に結合することで転写活性を誘導することが知られている。コントロールベクターを導入しても活性は認められないが(図 18A)、図 18B に示したように野生型 β -catenin (β -catenin-WT) を発現させると転写活性が誘導され、さらに核外移行に必須なリン酸化を受けるセリン残基をアラニンに変異させた核内安定型 β -catenin (β -catenin-MT) を発現させるとその転写活性はさらに増強された (図 18C)。LXR α 1 はリガンド依存的にこれらの β -catenin の活性を抑制したが、他の LXR α 変異体については抑制効果が認められなかった。これらの結果から、LXR 転写誘導活性を有した LXR α 4 は LXR α 1 とは異なり β -catenin 転写抑制効果は示さず、その効果には選択性が認められた。

4-7. VP16-LXR α 変異体の転写誘導活性評価の検討

LXR α 変異体と RXR、コファクタータンパク質との相互作用を評価するため、ヘルペスウイルスの転写因子 VP16 ドメイン (78 アミノ酸) をアミノ末端側につないだ VP16-LXR α キメラベクターを作製した。作製した各ベクターを HEK293 細胞に導入し、総タンパク質を抽出し、FLAG タグを認識するモノクローナル抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。図 19 に示すように、全ての VP16-LXR α 変異体タンパク質の発現を確認した。

次に、作製したベクターを用いて VP16-LXR α 変異体の転写誘導活性を評価した。これまでの報告から、VP16-核内受容体は DNA 上の応答配列に結合すると VP16 を介するメカニズムでリガンド非依存的に転写誘導活性を示すことが知られている。そこで、rCYP7A1-DR4x3-tk-LUC レポーターを用いて VP16-LXR α 変異体の転写誘導活性を評価した。その結果、VP16-LXR α 1 は非リガンド依存的な転写活性を示し、リガンドにより転写活性は若干増強した (図 20A 上)。この結果は VP16-LXR α 1 がレポーター上の LXRE に結合していることを示してい

る。LXR α 変異体のうち、VP16-LXR α 4 はリガンド依存性の弱い転写活性を示し、VP16-LXR α 5 はリガンド非依存性の非常に弱い転写活性を示した。同じ実験を IRx3-tk-LUC レポーターを用いて行ったところ、全く一致する結果が得られた (図 20B 上)。さらに、RXR α を共に導入すると、図 20A 上図で認められた VP16-LXR α 1、VP16-LXR α 4、VP16-LXR α 5 の活性はさらに増強された (図 20A 下, 20B 下)。VP16-LXR α 1 に関してはリガンド依存性が消失した。また、RXR α によって VP16-LXR α 4 のリガンド非依存的な転写活性が増加した。これらの結果から、VP16-LXR α 1 はリガンド非存在下でも DNA に結合すること、VP16-LXR α 3 は DNA に結合しないこと、VP16-LXR α 4 は DNA に結合できるがリガンド及び RXR が必要であること、VP16-LXR α 5 はリガンド非依存的に非常に弱く DNA に結合することが示された。

4-8. LXR α 変異体の DNA 結合能評価

次に、LXR α 変異体の DNA 上に存在する LXRE への direct な結合を調べるため、EMSA アッセイを行った。

始めに *in vitro* で合成した LXR α 1 を用いて SREBP-1c プロモーター上に存在する LXRE への結合を評価した。ヒト SREBP-1c プロモーターには 2 種類の LXRE (LXREa または LXREb) が存在するが[18]、本実験では LXREa について検討した。図 21A より、LXR α 1 は RXR α との共存下でのみ LXRE へ結合した。また、LXR α 抗体を加えたところバンドはスーパーシフトした。さらに、競合阻害分子として過剰量の非ラベル体プローブを加えるとバンドは消失した。これらの結果から、LXR α 1-RXR α は LXRE に特異的かつ直接結合することが示された。次に、各 LXR α 変異体について検討した。LXR α 1 と同様に RXR α 存在下で検討したところ、いずれの変異体についても LXRE への結合は認められなかった。また、リガンドによる効果も認められなかった (図 21B)。さらに、図 20 において VP16-LXR α 5 に転写誘導活性が認められたことから、LXR α 5 に関しては SREBP-1c プロモーターの LXREb、CYP7A、FAS のプロモーター上の LXRE [18,19,12] についても検討したところ全ての LXRE について LXR α 1-RXR α の結

合が認められたが、LXR α 5 の結合は観察できなかった (図 21C)。

4-9. LXR α 変異体と RXR α のヘテロ二量体形成能の検討

LXR 転写活性化機構において、RXR とのヘテロ二量体形成は必須な過程である。そこで、LXR α 変異体と RXR α との相互作用を評価するため、HEK293 細胞に VP16-LXR α 変異体と GAL4-RXR α を過剰発現させ、mammalian two-hybrid アッセイを行った。VP16-LXR α 1 は GAL4-RXR α とリガンド非依存的に強く結合し、T0901317 処理の効果は観察されなかった。VP16-LXR α 4 と GAL4-RXR α との相互作用はリガンド依存的に弱く誘導された。VP16-LXR α 3 及び VP16-LXR α 5 はリガンド処理の有無に関わらず GAL4-RXR α との結合は示さなかった (図 22A)。次に、GAL4 キメラ体と VP16 キメラ体を逆の組み合わせ、すなわち GAL4-LXR α 変異体と VP16-RXR α との相互作用を同じく mammalian two-hybrid アッセイにより検討した。GAL4-LXR α 1 と VP16-RXR α の相互作用は図 22A と同様に、リガンド非依存的に強い相互作用を示した。また、リガンド処理により若干相互作用は増強した。全ての GAL4-LXR α 変異体は VP16-RXR α との相互作用を示さなかった (図 22B)。これらの結果より、LXR α 4 に関しては LBD のみを GAL4 につないだキメラ体では RXR α とのヘテロ二量体を形成できないことが示唆された。

4-10. LXR α 変異体とコファクタータンパク質との相互作用の検討

核内受容体は、通常リガンド非結合時には、N-CoR や SMRT などのコリプレッサー類と結合しており、それらのタンパク質はリガンド結合によりすみやかに解離する。リガンドが受容体の LBD に結合するとタンパク質の立体構造変化を起こし、(LXR の場合、RXR とのヘテロ二量体形成を経て) SRC-1 や DRIP205 などのコアクチベーター類を動員し、大きな転写複合体を形成する。これら受容体とコファクターとの結合には、コファクタータンパク質の相互作用ドメインに存在する”LXXLL モチーフ”と呼ばれる規則的な配列が必要である[34]。

そこで、各 LXR α 変異体とコファクターとの相互作用を解析するため、

HEK293 細胞に GAL4 と LXXLL 配列を含むコファクター相互作用ドメインとのキメラ体 (GAL4-コファクター) 及び各 VP16-LXR α 変異体を導入し、mammalian two-hybrid アッセイを行った。まず、RXR α を過剰発現しない条件下では、VP16-LXR α 1 はリガンド非依存的に GAL4-SRC-1 や GAL4-DRIP205 と相互作用し、リガンド存在下でその結合を増強させた。VP16-LXR α の変異体はいずれもリガンド処理の有無に関わらずコアクチベーターとの相互作用を起こさなかった (図 23A 左, 23B 左)。次に、LXR とコアクチベーターとの結合における RXR の影響を検討するため、RXR α を過剰発現し、同様の実験を行った。VP16-LXR α 1 はリガンド非存在下で GAL4-SRC-1 と結合し、リガンドによってその相互作用を増強させた。VP16-LXR α 1 は、RXR α によってリガンド非依存的な GAL4-DRIP205 との結合を増強させ、リガンドによる更なる効果は観察されなかった。VP16-LXR α 4 は RXR α によって GAL4-SRC-1 と弱い相互作用を形成し、リガンドによってわずかに結合を増強させた。また、VP16-LXR α 4 は GAL4-DRIP205 と弱く結合し、リガンドによる相互作用の増強効果が認められた (図 23A 左, 23B 左)。これらの結果から、VP16-LXR α 4 は VP16-LXR α 1 と比べ、弱いながらコアクチベーターとの結合能を保持していることが示された。しかしながら、RXR α 過剰発現下においても VP16-LXR α 3、VP16-LXR α 5 とコアクチベーターとの相互作用は観察されなかった。次に VP16-LXR α 変異体とコリプレッサーの相互作用について検討した。野生型 VP16-LXR α 1 は、GAL4-N-CoR と結合し、リガンドによって相互作用は減弱された。また、VP16-LXR α 1 は、GAL4-SMRT と相互作用を形成したが、リガンドによる減弱効果は観察されなかった。VP16-LXR α 変異体の中で、VP16-LXR α 5 のみがリガンド非依存性に弱く GAL4-N-CoR 及び GAL4-SMRT と結合した (図 24A-B)。これらの結果から、VP16-LXR α 5 はコリプレッサーと相互作用する能力を保持することが示された。

4-11. LXR α 変異体の LXR α 1 に対するドミナントネガティブ効果の検討

各 LXR α 変異体の野生型 LXR α 1 に対するドミナントネガティブ効果を検討

した。以前に同定された LXR α 3 については既にドミナントネガティブ効果を持たないことが報告されている[12]。そこで、HEK293 細胞を用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを行い、LXR α 1 により誘導されるリガンド依存性転写誘導活性に対する LXR α 変異体の影響を評価した。図 25A に示すように、LXR α 4 または LXR α 3 を過剰量トランスフェクションしても、LXR α 1 による活性は抑制されなかった。一方、LXR α 5 についてはトランスフェクション濃度依存性に LXR α 1 の転写誘導活性は抑制された。これらの結果から、LXR α 5 のみが LXR α 1 に対しドミナントネガティブ機能を有することが示された。

次に、内在性 LXR に対する各 LXR α 変異体のドミナントネガティブ効果を調べるため、SW480 細胞にコントロールベクターまたは各 LXR α 変異体発現プラスミドを導入し、T0901317 処理 24 時間後の LXR 標的遺伝子 SREBP-1c 及び ABCA1 の mRNA 発現量を、リアルタイム PCR を用いて定量した。コントロールベクターを導入すると、内在性 LXR により SREBP-1c 及び ABCA1 の mRNA 発現がリガンドにより誘導された (図 25B)。LXR α 1 を過剰発現すると、両遺伝子発現は有意に増強された。これは導入した LXR α 1 が内在性 SREBP-1c もしくは ABCA1 プロモーターに結合し、転写因子として機能したことを示している。これに対し、LXR α 5 を過剰発現させるとどちらの遺伝子も発現量が減少した。LXR α 3、LXR α 4 の導入による遺伝子発現量の変化は認められなかった。これらの結果から、各 LXR α 変異体のうち、LXR α 5 は内在性 LXR に対してもドミナントネガティブ体として機能することが明らかとなった。

更に、上記実験で観察された LXR α 5 の LXR α 1 に対するドミナントネガティブ効果に対する LXR アンタゴニストの影響を検証した。HEK293 細胞に LXR α 1 と LXR α 5 をトランスフェクションし、LXR アゴニストとして GW3965 または EC を処理した。同時に LXR アンタゴニストである 22S、AA を処理し、ルシフェラーゼレポーター活性を測定した (図 25C)。アゴニストのみを処理すると LXR α 5 濃度依存的な LXR α 1 に対するドミナントネガティブ効果が観察された。アンタゴニストを同時に処理すると、その抑制効果はさらに増強された。

4-12. LXR α 変異体タンパク質の構造予測

これまでの細胞株を用いた実験から、転写レベルにおいて各 LXR α 変異体にはリガンド結合による RXR とのヘテロ二量体形成、コファクターのリクルートメントを経て DNA の応答配列へ結合する過程に選択性があることが示唆された。これらの結果を分子構造学的に考察するため、LXR α 変異体 LBD のドッキングモデルを作製し、各変異体の構造予測を試みた。

ヒト LXR α -LBD (LXR α 1-LBD) の X 線結晶構造は、リガンドとして T0901317 が結合し RXR β -LBD、glucocorticoid receptor-interacting protein (GRIP-1) ペプチドと複合体を形成した構造として、2003 年に Svensson らにより初めて報告された[21]。図 26A にその X 線結晶構造 (PDB file; 1uhl) を示した。他の多くの核内受容体と同様に LXR α -LBD もまた高度に保存された 10 つの α -ヘリックスと 2 つの β -シートを含む 3 層 α -ヘリックス (helix, 以下 H) サンドイッチ構造を形成し、リガンドとの相互作用に必須である H12 (AF-2 ドメイン) を有する。LXR α と T0901317 との結合にはヒスチジン残基 His421 との水素結合が必須であり、また H12 に位置するトリプトファン残基 Trp443 も hydrogen donor として存在する。RXR との相互作用には H7、9、10 がヘテロ二量体インターフェースとして機能する。多くの核内受容体には H3 のカルボキシル末端側にリジン (Lys) 残基が、H12 にグルタミン酸 (Glu) 残基が保存されて存在し、この陽電荷 (Lys) 及び陰電荷(Glu)を帯びた 2 つの残基は”charge clamp”を形成し、コファクタータンパク質に存在する LXXLL モチーフの適切な位置での相互作用形成に必須であることが報告されている[35]。別の核内受容体 VDR においても、遺伝性 VDR 変異によるビタミン D 抵抗性 2 型くる病の患者の VDR ミスセンス変異 (Glu420Lys) は charge clamp を形成できず、コアクチベーターとの相互作用、VDR の転写活性化を阻害することから H12 の Glu 残基が必須であることが示されている[36]。ヒト LXR α 1 においてもこの 2 つの残基は保存されており、それぞれ Lys273 及び Glu441 に該当し、GRIP-1 ペプチドと安定な相互作用を形成している[21]。

上述の LXR α -LBD の構造を元に、まず転写誘導活性を持たない LXR α 変異体

LXR α 3 及び LXR α 5 の構造を考察した。LXR α 3 はエクソン 6 からコードされる 60 アミノ酸を欠損しているが、この領域は LBD のコア部分である H3 及び H4-5 に該当する。したがって、LBD は基本的なポケット構造を維持することができず、リガンドとの結合も不可能であることが示唆された。この推測は、細胞レベルで行った全てのアッセイにおいてネガティブであった結果と一致し、LXR α 3 を同定した Chen らの報告においても同様の見解が述べられている[12]。LXR α 5 は、イントロン 7 途中の終止コドンの出現により、結果としてエクソン 8 以降を全て欠損するタンパク質として合成される。AF-2 ドメインを欠損した LXR α 5 はリガンドと結合できず、その結果転写誘導活性が認められない。ただしカルボキシル末端以外は LXR α 1 と同一であるため、コリプレッサーとの相互作用や、LXR α 1 に対するドミナントネガティブ効果を保持する可能性が示唆された。

次に、弱い転写誘導活性が認められた LXR α 4 の構造を予測するため、単量体における LXR α 4-LBD の構造予測を試みた。すでに PDB に登録されているヒト LXR β -LBD の構造 (PDB file No. 1p8d)[20]を鋳型とし、SWISS-MODEL work-space を用いて LXR α 4-LBD モノマーモデル M1 を作製した。なお、ヒト LXR α と LXR β における LBD の相同性は 75%、全体の相同性は 54%である[37]。SYBYL7.3 software を用いて論文[21]の構造から T0901317 を抽出し、M1 に merge した。得られた複合体を minimize し、図 26B に示すモデル M2 を得た。M2 より、LXR α 4 のイントロン 6 に相当する挿入部分は H10-11 の手前から外へ飛び出し、 β -シート及び α -ヘリックス構造を形成し、H8 の下から再びポケット内へ入る構造が得られた。ラマチャンドラプロットを作製した結果、このモデルがエネルギー的に安定であることは確認できたが、RXR と二量体を形成することは極めて難しいことが示された。

しかしながら、mammalian two-hybrid アッセイの結果では LXR α 4 が弱く RXR とヘテロ二量体を形成できることが示唆されたことから (図 22)、この結果を裏付けるため M2 のイントロン部分に位置するセリン残基 Ser282 の二面角 (ψ [psi], ϕ [phi]) を分子エネルギー的に安定な範囲内で回転させ、LXR α 4-LBD と

RXR β -LBD がヘテロ二量体を形成できるモデルの作成を試みた。Ser282 の二面角を回転したモデルに、論文[21]より RXR β -LBD と T0901317 を抽出し merge させた。得られた複合体の minimization は RXR β -LBD, T0901317 を固定して行い、モデル M3 を図 26C に示した。LXR α 4 のイントロン 6 に相当する部分は M2 と比べて前方に飛び出した形となり、RXR とのヘテロ二量体形成能を有することが示唆された。また、M3 モデルにおいて minimization による LBD 全体の大きな構造変化は認められなかった。更に LXR α 4 とコアクチベーターとの相互作用についても M3 モデルを用いて検討した。文献[20]より SRC-1 の LXXLL モチーフを含むペプチドを抽出し、M3 モデルに merge させ、モデル M4 を得た。図 26D より、merge させた SRC-1 ペプチドの両端に charge clamp を形成する 2 つのアミノ酸残基 Lys273 及び Glu441 が位置しており、LXR α 4 は コファクタータンパク質との相互作用が形成できることが示唆され、これは mammalian two-hybrid アッセイの結果と一致した。また、LXR α 4 と RXR がヘテロ二量体を形成できる可能性として LBD 以外の相互作用が示唆された。2008 年に DNA に結合した核内受容体 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) と RXR α のヘテロ二量体の X 線結晶構造が報告された[38]。この X 線結晶構造では、PPAR γ と RXR との相互作用は LBD 同士間のみで起こるものではなく、PPAR γ -LBD の β -ストランド領域が RXR α -DBD の方向に位置し、両者が弱く相互作用することを示していた。これより、RXR とヘテロ二量体を形成する他の核内受容体についても同様の傾向が示唆され、LXR α 4 についても LBD と RXR-DBD のみで弱く相互作用している可能性が示唆された。

第5章 考 察

本研究において、2種の新規ヒト LXR α スプライシング変異体 LXR α 4、LXR α 5 を同定し、発現及び機能解析を行った。細胞株を用いた実験によって LXR α 4 はリガンド依存性転写誘導活性、RXR との二量体形成、DNA との結合、コファクタータンパク質との相互作用能を保持することが明らかとなった。しかし、その効果は LXR α 1 と比べ効果は弱かった。分子モデリングにより LXR α 4-LBD のタンパク質構造をシミュレーションした結果、イントロン 6 の 63 アミノ酸の挿入により、RXR との二量体形成が可能ながら不安定であることが示唆された。また、LXR α 4 の機能はリガンド処理により増強されたことから、リガンドの LBD への結合がタンパク質全体の安定化をもたらすことが示唆された。

LXR α 5 はリガンド結合に必須である AF-2 ドメインを含む 91 アミノ酸を欠損するため、転写誘導活性、RXR との二量体形成能が認められなかった。一方、DNA、コリプレッサータンパク質との弱い結合が認められ、LXR α 1 活性を競合阻害することが明らかとなった。これは、カルボキシル末端は失われたものの、DBD を含む前方の配列は全て保存されていることが機能の一部分を保持している理由と考えられる。

LXR α 3 は本研究によって、LXR 転写制御における過程での機能が全て失われていることが示された。EMSA 法により LXR α 変異体の直接的な LXRE への結合を評価したところ、全ての変異体で DBD は保存されているにも関わらず、結合は確認できなかった。Chen らの報告では LXR α 3 の FAS プロモーター上 LXRE への結合が観察されたことから[12]、実験条件の違いによりタンパク質の安定化に変化が生じている可能性が示唆された。

各 LXR α 変異体の mRNA 発現量を定量した結果、ヒトまたはマウス正常組織において LXR α 3、LXR α 4、LXR α 5 の発現は LXR α 1 と比べ非常に低かった (図 8,9)。また、がん細胞株では MCF-7、NT2-D1、SK-N-SH 細胞では変異体の発現の割合が比較的高かったが、いずれも LXR α 1 と比べると発現量は低かった (図

7)。LXR α 2 は精巣での発現が LXR α 1 よりも高いことが報告されたが[12]、本研究では各変異体が pre-dominant に発現する組織を見つけることはできなかった。しかし、細胞や組織、正常もしくはがん細胞などにより、変異体の発現パターンが異なることから、LXR α 遺伝子のスプライシング制御は組織または細胞選択的に行われていることが示唆された。また、ヒト正常組織と比較すると、がん細胞株において野生型 LXR α 1 に対する各変異体の発現比率が高いことから(図 7, 8)、変異体発現増加とがんとの関連が示唆される。核内受容体エストロゲン受容体 β 及び PPAR γ において報告されたスプライシング変異体は、ともに野生型に対しドミナントネガティブ効果を有するが、両変異体はがん組織または細胞から同定された[39,40]。よって、がん細胞において各 LXR α 変異体、特に LXR α 5 が増加し細胞内代謝系に影響を及ぼす可能性は示唆されるが、変異体の発現増加に伴いがん化が進展するのか、もしくはがん化の結果発現が増加するのかという点はスプライシング機構が複雑に制御されているため未だ不明であり、今後の課題である。

RNA スプライシング反応は serine/arginine-rich (SR)タンパク質や small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs) などのメディエーターによって厳密に制御されており、これらが破綻するとがんや神経疾患などに関与することが知られている[13,41]。核内受容体であるレチノイン酸受容体のリガンド all-trans retinoic acid が神経芽腫細胞において SR タンパク質 SC35 の発現を介してプロテインキナーゼ C δ の選択的スプライシングを制御するという報告もあるため[42]、LXR リガンド及び LXR タンパク質とスプライシング制御機構との関連についても今後の課題としてあげられる。さらに、近年異常な mRNA を分解する機構として、ナンセンスコドン介在性 mRNA 分解機構 (non-sense-mediated mRNA decay, NMD) が注目されるようになった。NMD は、遺伝子変異により mRNA の正常な終止コドンの位置よりも上流に終止コドンが出現するとナンセンスコドンとして認識し mRNA が翻訳される前に分解することで RNA の品質を維持している[43]。LXR α 5 はイントロン 7 中に終止コドンが出現した変異体であり、他の変異体と比べ mRNA 発現量が非常に低いことから NMD に代表される RNA の

品質管理機構によって通常細胞内で分解されている可能性が示唆される。

LXR は生体内でコレステロールや脂質のバランスを調節する重要なメディエーターである。LXR α 5 のようなドミナントネガティブ変異体の発現が上昇すると、体内のコレステロールバランスを保つことができなくなる。特に、LXR α は肝臓におけるコレステロール排出、末梢組織からのコレステロール逆転送系に主に関わることが報告されているため、LXR の機能不全により各組織でのコレステロール蓄積、それに伴う細胞障害、動脈硬化を発症する危険性が示唆される。本研究では、発現は低いながらも選択的機能を持つヒト LXR α スプライシング変異体 LXR α 4, LXR α 5 を同定した。特に、LXR α 5 は LXR α 1 の機能を阻害するため、LXR が関与する循環器疾患やメタボリックシンドロームのターゲットとなりうることから、スプライシング制御機構が治療ターゲットとなる可能性が見出された。

第7章 まとめ

選択的スプライシングは多種多様なタンパク質を生み出し、最近のハイスループット配列解析技術の進歩により、複数のエキソンを持つ遺伝子の95%以上が選択的スプライシングを受けていることが明らかとなっている[44]。その一方で、スプライシング異常により選択的に生み出された一部の変異体はがんなどの様々な疾患との関与が示唆されている。本研究では、ヒトLXR α において、選択的スプライシングにより産生される2種類の変異体を同定し、いずれもLXRの機能を選択的に維持することが明らかとなった。また、野生型LXR α の機能を阻害する変異体の存在が明らかとなったことから、スプライシング制御機構がLXRの関与する疾患に対するターゲットとなりうる可能性を見出した。

謝 辞

本研究にあたり、終始ご懇意なるご指導、ご鞭撻を賜りました日本大学 医学部 生体機能医学系 生化学分野 榎島 誠教授に謹んで御礼申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、数多くの助言をいただきました東京医科歯科大学 名誉教授・日本大学 元客員教授 山田幸子博士、住友化学株式会社 生物環境科学研究所 斎藤幸一氏、内藤義一氏、大阪薬科大学 薬学部 生体防御学研究室 准教授 藤森 功博士、日本大学 医学部 生体機能医学系 生化学分野 専任講師 宇野茂之博士、立教大学 理学部 化学科 理論創薬・分子設計研究室 教授 常盤広明博士、日本大学 工学部 生命応用化学科 助教 山岸賢司博士に厚く御礼申し上げます。

本研究で用いた $Lxr\alpha(-/-)/Lxr\beta(-/-)$ マウスを提供して頂きました Dr. David J. Mangelsdorf (Department of Pharmacology, University of Texas Southwestern Medical Center), LXR リガンド GW3965 を合成して頂きました 岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 有機医薬品開発学分野 教授 宮地弘幸博士、 $siLXR\alpha$, $siLXR\alpha/\beta$ の配列を提供頂きました Dr. Yongsik Jeong (Department of Biochemistry, Institute of Lifestyle Medicine, and Nuclear Receptor Research Consortium, Yonsei University Wonju College of Medicine) に深く御礼申し上げます。

最後に、本研究を進めるにあたり、いつも支えてくれた家族、友人に深く感謝申し上げます。

表・図

表 1 サーマルサイクラーPCR に用いたヒト LXR α プライマー配列

プライマー名		配 列
4-8 プライマー	Fw	5'-CAT GGA CAC CTA CAT GCG TC-3'
	Rev	3'-CAA GGC AAA CTC GGC ATC A-5'
6-8 プライマー	Fw	5'-GGT GAA GAC CTC TGG GAT CG-3'
	Rev	3'-CAA GGC AAA CTC GGC ATC A-5'

Fw; forward, Rev; reverse

表 2 リアルタイム PCR に用いたプライマー配列と増幅サイズ (ヒト)

遺伝子 [accession No.]		配 列	(bp)
LXR α 1 [NM_005693]	Fw	5'-CTG CGA TCG AGG TGA TGC TT-3'	197
	Rev	3'-CAA GGC AAA CTC GGC ATC A-5'	
LXR α 3 [NM_001130101]	Fw	5'-TGA AGC GGC AAG AGG AGG AA-3'	166
	Rev	3'-GAA GCA TCA CCG TGA CTC GA-3'	
LXR α 4	Fw	5'-CGT TTG AGG TTT GCT GCT TG-3'	233
	Rev	3'-CAA GGC AAA CTC GGC ATC A-5'	
LXR α 5	Fw	5'-CTG CGA TCG AGG TGA TGC TT-3'	155
	Rev	3'-GCT GCA TTG AGC CAT GAT TG-5'	
SREBP-1c [NM_004176]	Fw	5'-GCG CCT TGA CAG GTG AAG TC-3'	200
	Rev	3'-GCC AGG GAA GTC ACT GTC TTG-5'	
ABCA1 [NM_005502]	Fw	5'-AAT CCT GAC CGG GTT GTT CCC-3'	200
	Rev	3'-CCG CCT TCA CGT GCT TCT CA-5'	
GAPDH [NM_002046]	Fw	5'-ACT TCG CTC AGA CAC CAT GG-3'	139
	Rev	3'-GTA GTT GAG GTC AAT GAA GGG-5'	

Fw; forward, Rev; reverse

表3 リアルタイム PCR に用いたプライマー配列と増幅サイズ (マウス)

遺伝子 [accession No.]		配列	(bp)
LXR α 1	Fw	5'-CTG CAA TCG AGG TCA TGC TT-3'	198
[NM_013839]	Rev	3'-GCA GAG CAA ACT CAG CAT CA-5'	
LXR α 3	Fw	5'-TGA AGC GGC AAG AAG AGG AA-3'	189
	Rev	3'-CTC TCC AGA AGC ATG ACC GT-5'	
LXR α 4	Fw	5'-CCT GTC TGA AAG ATG CTG CT-3'	216
	Rev	3'-GCA GAG CAA ACT CAG CAT CA-5'	
GAPDH	Fw	5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA G-3'	176
[NM_008084]	Rev	3'-GAT GCA GGG ATG ATG TTC-5'	

Fw; forward, Rev; reverse

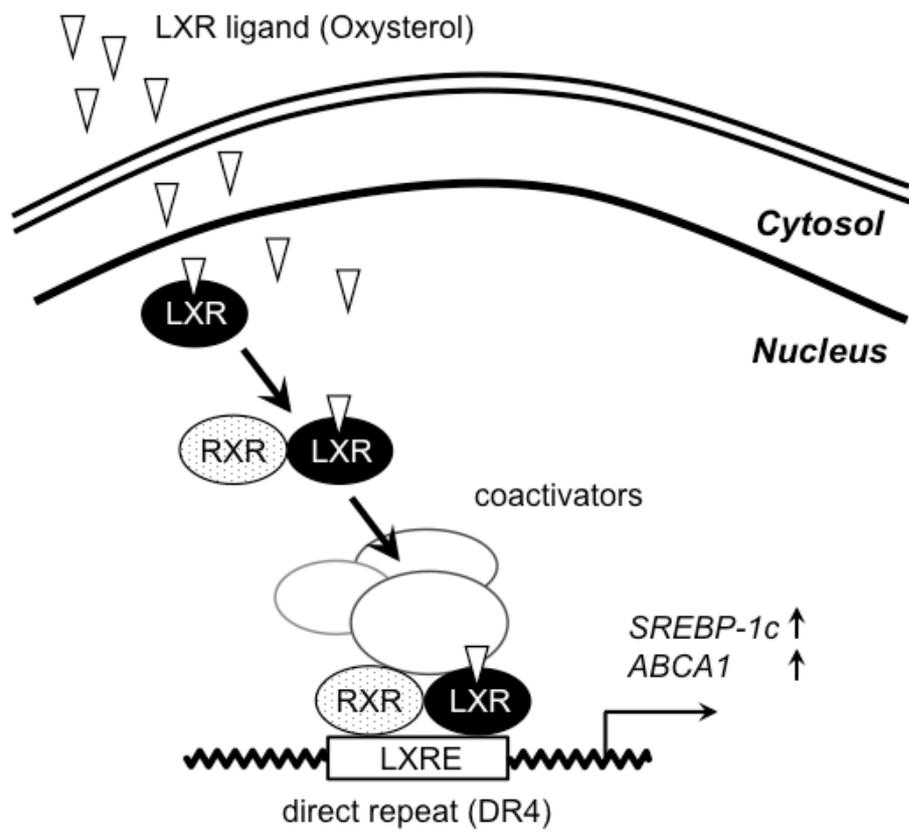


図1 LXRによる転写制御機構

LXR リガンドであるオキシステロールは細胞核内に取り込まれると LXR の LBD に結合する。リガンドが結合した LXR は立体構造変化を起こし、RXR とヘテロ二量体を形成する。SRC-1 などのコアクチベータータンパク質群と大きな転写因子複合体を形成し、プロモーター上の LXRE に結合し、標的遺伝子の発現を誘導する。

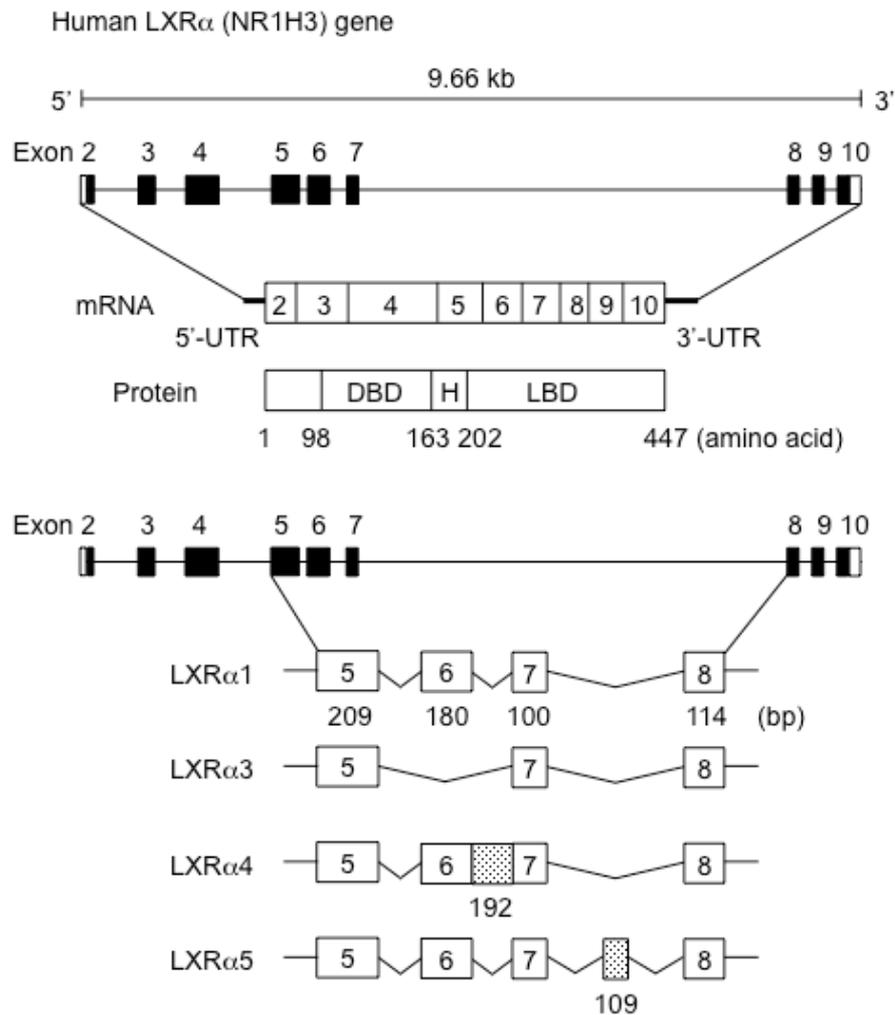


図2 ヒト LXR α スプライシング変異体の構造

(Endo-Umeda et al, *Mol.Pharmacol.* **81**, 800-810, 2012 より引用)

ヒト LXR α の mRNA は 1 から 10 のエクソンで構成され (エクソン 1 は非翻訳領域)、各変異体 LXR α 3、LXR α 4、LXR α 5 は LBD に変異が存在する。LXR α 3 はエクソン 6 が欠損し、LXR α 4 はエクソン 6 と 7 の間のイントロン (イントロン 6) が含まれる。LXR α 5 はエクソン 7 と 8 の間の一部のイントロン (イントロン 7) を含む。

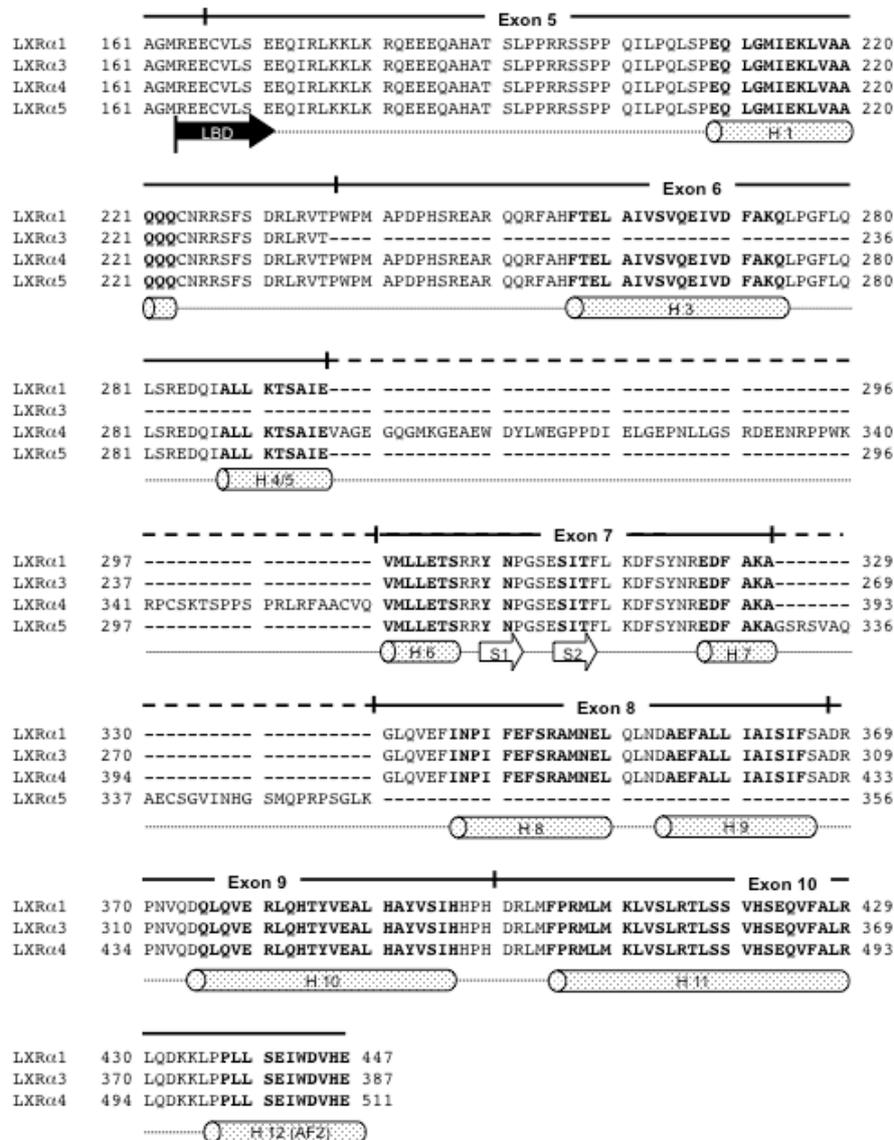


図3 ヒト LXRαスプライシング変異体のアミノ酸配列

(Endo-Umeda et al, *Mol.Pharmacol.* **81**, 800-810, 2012 より引用)

野生型 LXRα1 タンパク質は 447 アミノ酸で構成されるが、LXRα3 はエキソン 6 の欠損により 60 アミノ酸を欠損する。LXRα4 はイントロン 6 の挿入により 64 アミノ酸が増加する。LXRα5 はイントロン 7 を含むが、途中で in frame で終止コドン TGA が存在するため、以降のアミノ酸が翻訳されない。結果、91 アミノ酸が欠損したタンパク質となる。

```

AGGAGGGGAG GGCTGTGGTC ACCAGGCAGG AAGGAGGGGT GGCCTGACCC CTCGGCAGTC CCTCCCTCA GCCTTTCCCC
AAATTGCTAC TTCTCTGGGG CTCCAGGTCC TGCTTGTGCT CAGCTCCAGC TCACTGGCTG GCCACCGAGA CTTCTGGACA
GGAAACTGCA CCATCCTCTT CTCCAGCAA GGGGGCTCCA GAGACTGCC ACCCAGGAAG TCTGGTGGCC TGGGGATTG
Exon1
GTGGGTCTGC TCCTTAGCAG TGGCCTGGGG CTCTGTGTGT GTATCTGGGG TGGGGTCGGG GAATGTCCTA AGGATCTGAG
AAGGGGGTTT CTGGGGAGAA GTGAGGGGTG ATGGTGATGG AAGCTTGGGA CAGGAGCAGG ACTCTGGGTC CCAGAATAAC
TCATGAGGGG CTCAGGGGAG GAGGTCCCTCT ATGTGAATTG GGGAGATTCT TGGAGACAGG TTTGTGCTGG GACCCCTGGAA
AGTGGCACGA GCGAGGTTCT CTAATAAGCA GCGTGTTCCT CTGGGTGGAG TGAGCTGTCC TCAGTGTGG AGTGAGGGGG
AAGGGGCCCA AGAGAAGCAG GGCAGATGCA CCCAAACATT CCCTGCTGGC CTGGAGGGGA CTTTGGGGGA GAAAAGCCGG
CACGGTGGCT GGGAGCCAG ACTTTGGAGT CAGAGGAGGG TTGGAGTCTT GACTCTACCG CCGCCTAACT GTGTGACCAT
AGTTACTTAA TCTCTTTGAA CCTCAGTTTG CTTATCTGTA AAATGAGTTT AAGAATAGTC CTGAGCCAGG AGCAGTAGCG
TGC GCCCATA ATCTCAGATA CTCAGGAAGC TGAAACCTGA TTGCTTCAGC CCAGTAGTTT GAGGCGATAG TGTCTATTA
TTGCACCTGT GAATAGCACT GAGTTCAGC CTGGGCAACA TAGAGAGACC CCATCTCAA AAAAAAATTA ATAGTTTGA
CCTCAGAGGG ATATTATGAG GAAAGCACAT AAAGCCTTAT AACAGGCTGG GCGCAGTGGC TTA CTCAAAT AATCCCCACA
CTTTGGGAGG CCCAGGTGAG AGGATCACTT GAGCCCAGGA ATCTCTAGAC TAGCCTGGGC AAAATAGGGA GAACCTGTCT
CTAAAAAACA TAATAGTAAT ATAATAAAGC CTTAGTACAG GCTAATATAT GGCAAGTAAA TGTTAGCTGA TATTGTTGAT
ATTGATAAAA GGGAGGATCA GGTGGAGAAG GGAGCTGAGG CCAGAAAGGA GCCCAGTTCT AGAAGAGTAT AATCTGGGTC
CTTCCTGCAG GACAGTGCCT TGGTAATGAC CAGGGCTCCA GGAAGAGATG TCCTTGTGGC TGGGGGCCCC TGTGCCTGAC
Exon2 START (LXR $\alpha$ 1, $\alpha$ 3, $\alpha$ 4, $\alpha$ 5)
ATTCCTCCTG GTAAAGCTTCA TTCCATCCCT CTCCCCTGAG CCCAGACCGC AGGCTCCACG CCTCCTGTAG GAATCAGCCT
CCTTCATTAC CTGCCTTCTT CCTTCCTCCA GAGAGCAGTC CAGAGTCATT CTTAGTCGTG CTTCCTCCC GCCCAGATCA
CCTCTCCCCT GGTTCAGTG CCTGGCCCTT GCAGGCACCC GCCCAGTCCT CCCAGTCTG GATTTGCTGC TAGAGAGTTG
GCCAGCTGAG TGCTTACCCT GCTCTGGCTT TGAAGAGTTT TATCTGATCT CTGAAATGCA TACTCTCCAG CCCCCAAAG
GGACAAGGAT TAACATCTC ATTTAAGGTC CTGAGATGTA AGAACTACA AGTGACTAGT CCTAGCTAGA GCCCACACAG
ACTCTAGGGT CCCAAAGCCT GAGCTGGGAC TTTGCTGCCC TCTAAGGGTG GGGATAAGTT TGCAGTTTCC CAGCTAGGAC
GCTGGGCCGT GGAGCCGGGA TGGGGCTGA GACCCCTTG TGCTCTCTT TTGGAGCTCA CACTCTGCGG TGGAGCTGTG
GAAGCCAGGC GCACAGGATG CAAGCAGCCA GGCCAGGGA GGCAGCAGCT GCATCCTCAG AGAGGAAGCC AGGATGCCCC
ACTCTGCTGG GGGTACTGCA GGGGTGGGGC TGGAGGCTGC AGAGCCACA GCCCTGCTCA CCAGGGCAGA GCCCCCTTCA
Exon3
GAAGCCACAG GTGAGGAGCT TCTGGGTTTG GAGGAGGTAG GGGTCCAGAT TCCAGGTCCT GGATCTGGAA GAGGTTCTT
GGGGTTTTT ACCTTATATA TAATCTCATG GTTAAGTTCA GAGGCTTTAG AGCTAACTAA ATCTGACTGA TCTAAGTGTG

```

図 4 ヒト LXR α 遺伝子配列 (GenBank accession no. NC_000011.9 より引用)

各エクソンを灰色、splice donor site (GT)、splicing acceptor site (AG) をそれぞれ赤色で示した。イントロン挿入部分は青色で示した。[ATG]及び[TGA]はそれぞれ開始コドン、終止コドンを示した。

AATTTTGTCT CTAGGCCTTT CTGAGCCTCA CTTTCCTTGT TTATAAAATG GAAATAAAAA TTATGGTTGT CATAAGGATC
AGTGCATATA AAAGGCTCAT ACAGTACCTA GAACATAATG GCACTTGCCA AATGAGGGCT ACTCTTCTCA TAAAAGAGAG
ACTGGAGTTT GTATAATGAA GGAATGAAG GTCACCTGAGT GCCCAGGGCA GTGGCTGAGT CAGGGAGAAC ATGATGTTTT
TCCTCGGGG AGAGCGTTGA AGCACTTTCC TGTATCC**AGA** **GATCCGTCCA** **CAAAGCGGA** **AAAAGGGCC** **AGCCCCAAA**
ATGCTGGGA **ACGAGCTATG** **CAGCGTGTGT** **GGGACAAGG** **CCTCGGGCTT** **CCACTACAAT** **GTTCTGAGCT** **GCGAGGGCTG**
CAAGGGATC **TTCCGCCGA** **GCGTCATCA** **GGGAGCGCAC** **TACATCTGCC** **ACAGTGGCGG** **CCACTGCCCC** **ATGGACACCT**
ACATGCGTCG **CAAGTGCCAG** **GAGTGTCCG** **TTCGCAAATG** **CCGTGAGGCT** **GGCATGCGGG** **AGGAGTGA** GTTCTGGGG
Exon4
CTGGAGTGGG GAAGAGGCTG AGGGGAAAGA GGGGGCCAGG GTGTGACCCA AAACAGGTGC CTGAACTTGC AGGGGCTAAC
TGATCCCTAA GTATGGATCC CAGTATCTTT CTTGACCGGG CGGGTGGCT CATGCCTGTA ATCCAGCAC TTTGGGAGGC
CGAAGCGGGT GGATCACCTG AGATCAGAAG TCCGAGACCA GCCTGGCCAA CATAGTGAAA CCCCAGCTCT ACTAAAATA
CAAAAATTAG CCGGGTGTGG TGGTGAAGCG CTGTAATCCC AGCTACTCAA GAGACTGAGG CAGGAGAATC ACTTGAACAC
GGGAGGTGGA GGTGACAGT TGCCAAGATC ATGCCACTGC ACTCCAGCCT GAGCAAGTGT GAGACTCTGT TTCAAAAAA
AAAAATCTTC TTGCCTTAC CCAGTGTCTG CTGCTTTTCT GGAGCCCAA ACCACCCCTT TTGCCCCATC CTCCCTCCT
GTCTTTCCC CACCCCTTG CCCCATCCTT TCCCATCTG CTCCTTCCT CATATTTGGC CCTGTCTTA **GGTCTCTGT**
CAGAAGAACA **GATCCCGCTG** **AAGAACTGA** **AGCGGCAAGA** **GGAGGAACAG** **GCTCATGCCA** **CATCCTGCC** **CCCCAGGGCT**
TCCTCACCCC **CCAAATCCT** **GCCCCAGCTC** **AGCCCGAAC** **AACTGGGCAT** **GATCGAGAAG** **CTCGTCGCTG** **CCCAGCAACA**
GTGTAACCGG **CGCTCCTTT** **CTGACCGGCT** **TCGAGTCAG** **GTA**CTTGACA CACCTGGGA GAGCGGCTG CGCCAGATC
Exon5
ACCAGTGGGC TTCTTGATGT CCGACTCAA GCGCTTGGC TTTCCCTCC TGGGT**AGCCT** **TGGCCATGG** **CACCAGATCC**
CCATAGCCGG **GAGGCCCTG** **AGCAGCGCTT** **TGCCACTTC** **ACTGAGCTGG** **CCATCGTCTC** **TGTGCAGGAG** **ATAGTTGACT**
TTGCTAAACA **GCTACCCGGC** **TTCTGCAGC** **TCAGCCGGGA** **GGACCAGATT** **GCCCTGCTGA** **AGACCTCTGC** **GATCGAGGTG**
Exon6
GCTGGAGAAG **GGCAAGGGAT** **GAAGGGAGAA** **GCAGAGTGGG** **ATTATCTGTG** **GGAGGGCCCT** **CCAGACATCG** **AGCTGGGAGA**
Intron6
GCCAAATCTG **CTGGGAAGCA** **GGGATGAGGA** **GAATCGGCCT** **CCCTGGAAGA** **GGCCATGCTC** **CAAGACCAGC** **CCTCCTAGTC**
CCCGTTTGAG **GTTTGTCTG** **TGTGTG**ACG**** **TGATGCTTCT** **GGAGACATCT** **CGGAGGTACA** **ACCCTGGGAG** **TGAGAGTATC**
ACCTTCCTCA **AGGATTCAG** **TTATAACCGG** **GAAGACTTTG** **CCAAAGCAG** **TG**GAGAACTGA GATCACACAG GGATTGGGGT
Exon7
TGGGTGGACA GATGCTTCTT TTTTATTTT TTATTTTAA AAATTGAGGG CCAGGCGCGG TGGCTCATGC CTGTAATCCC
AGCACTTTGG GAGGCCGAGG TGGGCAGATC ACCAGGTGAG TAGATCAAGA CCATTCTGGC TAACACGGTG AAACCTGTG
TCTACTGAAA ATACAAAAA TTAGTCAGGC ATGGTGGCAC GCGCTGTAG CCCCAGCTAC TTGGGAGATC GAGGCAGGAG
AATCACTTGA ATCTGGGAGG CAGAGTTGT AGTGAGCCAA GATCGCACCA CTGCACTCCA GCCTGGGCAA CAACAACAAC

図 4 ヒト LXR α 遺伝子配列続き

(GenBank accession no. NC_000011.9 より引用)

AACAACAAAA ATTGAGATAG AGTCTTACTA TGTTGCCAG GTTGGTCCCA AACTCCTGGC CTCAGTGAT CCTCCTGCCT
CTGACTCCCA AAGTGTGGG ATTACAGGCG TGAGCCACCC ACCATGCCCG GCCAAGTACT TTTTTTTTGT TTCATTTTTT
TTTTTAGACA GAGTTTGCTC TGTCACCCAA GCAGGAGTGC AGTGGCGTGA TCTTGGCTCA CTACAACCTC CGCCTCCCGG
GTTCAAGCAA TTCTCCTGCT TCAGCTTCTC AAGTAGCTGG GATTAGGTGC ACCACCATGC CCAGCTAATT TTTGTACTTT
TAGTAGAGAC AGGGTTTTAC CATGTTGACC AGGCTGGTCT TGAACCTCTG ACCTTAAGTG ATCCATGTGC CTCAGCCTCC
CAAAATGCTG GGATTACAGG CATGAGCCAC TGAACCTGGC CAGGACTGGT GCTTTTTTGT AGAGGCCCAT AGTGACTACA
GAGCCACAGG CCAATGTTT GGGTGGCTGG TAAGGGAAGG CTCCTTGTT TTTTGAAGAT AGAAAATTGG AATGCTGATA
GGCTTCTCTC AGCTGCTCCA GATAGACCCC TGTCTCTGT TGCTTTAGGT CAGTGGTTTT CAAACTGTAT TCCAAGGAAC
CTGAGAGATA TATGGAATGG CACCTTGGAG GAGAAACAGG GAGGCACAGG AATGTCCTTC ATCTTTACTT TAGCCAAACA
AGAAGCTCCA TTAAATCTG CATTATATAT TGCAGTCTA CATAGATTTT TGCTTGCAGA TTTTACAGCT TGAAAAAAA
GTTTGAAACT CAGTGCACCT AACTTTTTAG TAGTCAAAAA GTGAACAAAT CTCCTCACA TGTGCTCTTT GGGGATCATG
GGGGCTGATT TCCCCTACTT TTTTTTTTTT TTTGAGATAA GTTCTTGCTC TGTACGCAG GCTGAAGTGC AGTGGCATGA
ACGTGGCTCA CTGCAGCCTC AACCACTGG GCTCCAGTAA TCCTCCTGCC TCAGCCCCA AGTAGGTGGG ACTACAGGCA
TGCACCACCA TGCCAGGCTA ATTTTTATAT TTTTTTGTAG AGAGTGGGTT TCGCCATGTT GCCCAGGCTG GTCTCAAAAT
GGTCTCGAAC TCCTGAGCTC AAGTGATCCA CCCACCTCGG CCTCCCAATG TGCTGGGATT ACAGGCATGA GCCACCACAC
ACAGCCTCCC CTA CTCTTTTT TCTTTTTTTT TCTTTTCTTT TTTTTTTTTT TTGAGATGGA TTCTCACTCT GTTCCAGGC
TGGAGTGCAG TGACGCGATC TTGGTCACT GCAACTTCTG CCTCCCGGAT TCAAACGATT CCCCTGCCTC AGCCTCCTGA
GTAGCTGGGA CTACAGGCGC GCGCCACTAC GCTCAGTAA CTTTTGTATT TTAGTAGAG ATGGGGTTTC ACTGTTTTGC
CCAGGCTGGT CTGAACTCC TGAGCTCAGG CAATCCGCC GCCTTGGCCT CCCAAAGTCC TGGGATTACA GCCATGAGCC
ACTTGTCCAG GCCCCTCCCC TACTCTTTTT CAATTGCACT TTCTGACGAA CCAGAACCAT GGCATGGCAA ACATGCCAG
AGAGGATGTA CAATAAGAGC GAATGCTTCC ATCTCCATCC TATATCTGAA GTATTTCTC CAAAATTAG TTCATTCTGC
GGCTCTCTAT CTGATGCTCG CTTGGGAGCT ACGCAGAAGG GGTTCCTCA TATTCAACTA TTGATAATGT TTGTATCATG
AGAAGTGGCC TGGGAAAGGA CGGGAGGCTG AGGGAGTTTT GGAGGGACTG GAATTGAGCT TCAGCAGGAA ACCAAGTAGC
TTAACGACTG GATGAGTGGG GCTGTAAAAAT ATGGCTGATG CCCTGACTCC ACTCTCAGGG CTGGTAGATC TGTGGCCAGG
CCAGTCATCA AGCCTTCCTT GGTTCCTGAT AACTCAGGCC AGCTCACGTG CCTCTTGCTC TCCCAACGCA GTCCACCCAG
TGAGCTTTCT AGGAAGGCCA CTCTTCGCTG TAGGGCATAA CAGGGCTATG TTGGCACCTT TTGCCTTCTA TAGTAACCGG
TGTGCTGCCT GGATGTATTG ACACCTAATG GGGTGATTTA ATGACTTTAT CCAGCTTTAA AGCCAGCCC TGCTCCCTC
TTCCAAACCA CTTTTCTCTC GATGGTTATT ATCTCAGACC TTCTTAACCG TGGCTCTCCC CTCCTTCAGA ATATCTCTCT

図 4 ヒト LXR α 遺伝子配列続き

(GenBank accession no. NC_000011.9 より引用)

TGTGGAACCC TGCCAGTTC TAAGATCTTT GTATTCCTTT GGCACCTGTA GACTCATGCT ATCTGAATCT GCACCTATTC
 ATAGATTAT TTATACAAGC AGTTTTGAAG TAATCATGCT TGCATTCTT ATTCATGAG TGAGGTCTTG GGGAGAAGGA
 ACAGGAGCTC TGCTTGTCAA GTCTCCTCCC CTCCTATCC GCTACTATTT ACTGCATGCA GTAGATAACT GGTGACATGG
 ACTGAGCACA TTTGAGGTGT TCATTCCGTG GGCATCAGCA GACCCTCAGA GGTGCATTAG CTAACATAG AACCTCCTCT
 TAATTTCTCT ATAAAGGGGG CTGTTTGCCA CACTTTGGGG CTCAAAACCT CACCAAGAAA TGCTTTAGAA AATGGGGCTT
 GCCGCCGGG GTGGTGGCTT ACACCTGAAA TCCCAGCACT TTGGGAGGCC GAGGCAGGCG GATCACCTGA GGTGAGGAGT
 TCGAGACCAG CCTGGCCAT ATGGCAAAAC CCCATCTCTA CTGAAAATAC AAAAAATTAG TGGGCGTGGT GGTGCACACC
 TGTGGTCCCA GCTACTCAGG AGGCTGAGGC AGGAGAATTG CTTGAACCAG AAGGCTGAGG TTGCAGTGAG CTGAGATCGC
 GCCACTGCAC TCCAGCTGG GTGACAGAGC AAGACTCCAT CTCAAAAAAA GAAAAAAGAA AAAGAAAATG GGGCTGCC
 ATTAAATGGA CCAACACACA ACACCTGATA AACATCAGGG TGAAAGTACA GGAAGTGACT CACCAAGAAG CCTTGAATGG
 AAAAGTGTAG CAGATGGTTG CTAAGAAA TCTGACAAA CTTGGGGAAC TCTGTAGGGT GCAGAGACTT TGACAAATGTG
 TATGAGAGAC ATCTCTAGG TATCATTACT TTAGCTCATG TTTTGTGCA TTTTAGTCTT CTCAGCAGGA AGACTGTTTC
 CAAGAAAAAT GTATTATTTA TTGACCAGGC GCGGTGGCTC ATGCCTGTAA TCCCAGTACT TTGGGAGGCC GAGGCAGGCA
 GATCACGAGG TCAAGAGATC GAGACCATCC TGGCCAACAT GGTGAAATCC TGTCTCTACT AAAAATACAA AAATTAGCTG
 GCGTGGTGA CATGCACCAG TAGTCCCAGC TACTCAAGAG GCTGAGGCAG GAGAATTGCT TGAACCTGGG AGGCAGAGCT
 TGCAGTGAGC CGAGATCATG CAACTGCACT CTAGTCTGGC AACAGAGCAA GACTCTTTGT CTCAAAAAAA ATTTTTTTAT
 TTATTTTACA AACACTTATG TGGTAGTTAC CATATATGCC ACATATTTAT GAGATAGGTA CTATTATTAT TCCCATTTA
 CAGATGGGAA AACCAAAGCC CAGAGAGGTT AAATAACTTA CACAAGGTCA CACTGCCTTG TAAGTGGTAG AGGCAGGACT
 CAACCCGAGG CAGTCTGGCA CAAAATCCA CATCTCACC CATACTGCAA TATTCCTCG AGGATGTGAT ACATGAAATG
 TATCTTAGT GTTCAAATAA GTAAGCCAA TGCCAGTGAA AAACAAGTCT TTTTTTTTTT TTTGAAACAG **GGTCTCGCTC**
TGTCGCCAG GCTGAATGCA GTGGTGTGAT CAATCATGGC TCAATGCAGC CTCGACCTTC TGGGCTCAAG TGAATCCTCT
 inserted intron7 STOP (LXR α 5)
TGAGTAGCTG GGACTACAGC GTGAACCAC CGTGCCCTGC TGA AAAAGGA TTTTTTTTTT TTTGAGCCA GAATCTTGCT
 CTGTCGCCCA GGCTGGAGTG CAAGTAGAAC AATCTCGGCT CACTGCAACC TCCACCTCCC AGGTTCAAGC AATTCGCCGTG
 CTCAGCCTCC CGAGTAGCTG GGA CTACAGG TGCGCCACCA TGCCAGTTA ATTTTGTAT TTTTAGTAGA GACC GGGTTT
 CACTGTGTTG CCCAGGCTG TCTCAAATC TTGAGCTCAG GCAATCCGTC TGCCCTCGGC TCCTAAAGTG CTGGGATTAT
 AGGGATAAGC CACCGCATCC AGCCTTTTTT CTTTTCTTT TTTTTTTTTT GAGATGGAGT TTCGCTCTGT CATCCAGGCT
 GGAGTGCAGT GCGGTGATCT CGGCTTACTG CAACCTCCGC CTCAGGATT CAAGCAATTC TCCTGCCTCA GCCTCCTAAG
 TAGCTGGAAT TACAGGAGTG CACCACCAG CCCAGCTAAT TTTTGTATT TCAGTGAGAC AGGGTTTTGC CATGTCGGCC

図 4 ヒト LXR α 遺伝子配列続き

(GenBank accession no. NC_000011.9 より引用)

AGGCTGGTCT CAAACTCCTG AACTCAGGTG ATCCCCCTGC CTCGGCCTCC CAAAATACTG GGATTACAGG CATGAACCGC
 CGTGCCCTGC TGAAAAACGA TTCTTGATAA AAAAAATAA GAGTTGCCTC TATTTCTAGA AATGTGGAGC CCTCAAGAAAT
 TTTAATGACA GAATTGGCAG GTGATGGTGT CTGGTGCCTG TAATCCCAGC ACTTTGGGAG GCGGAGGCGG GTGGATTGCT
 TGAGTCCAGG AGTTCGAGAC CAGCCTGGGC AACATGGTGA AATCCTGTCA CAACTGAAAA TATAAGAATT AGCTACTTGT
 GATGGTATGC ACCTGTAGTC CCAGCTACTA GGGAGGCTGA AGTAGGAGGA TGGCTTGCAC CCGGAGGTC GAGGCTGCAG
 TGAGCTGTGA TTGTGCCACT GCACTCCAGT CTGGGTGATA GAACAAGACC CTGTCTCAA GAAAAAAAAAC AAGAATACCA
 GAATTATTAT TTAATTCAGC ACCTCTTGTG TGCCAGACAC AGCGCTAAGT GCCCTGCATA CTTTGTCAAT GAACTATACC
 AACAAATTTT TGAGAAGGGT TCAGATATGA TTCCCATTTT ACAGATGAGG CTTATAGAGG GGTTAAGACA TTTGCTCAAG
 GTTACACAGC AAAGCCTTGT AGACCTTTTT TTTTTTTTTG ACGGAATCTC GCTCTATCGC CCAGCTGGA GTGCAGTAGT
 GCAATCTTGG GTCACGTCAA CCTCTGCCTC CCGTGTTC A GCAATCTCC TGCCCTCAGCC TCCCAAGTAG CTGGGATTAC
 AGGCACCTGC CACCACGCC GGCTAGTTTT TGTGTTTTTA GTACAGACGG GGTTCGCCA TGTTGGCCAG GCTCTTCTCG
 AACTCCTGAC TTCAGGTGAT CCGCCCGCT CAGCCTCCGA AAGTGCTGGG ATTACAGGCG TGAGCCACTG TGCCCGGCT
 CAGTAAACTT CTTAGTGAGT TCCTAATAGT FCCCTAAGGT GAGGAGAGAA GAAAGTTCCT GCTGCTCCTG CTGCTTGCCT
 CAGCCTCCCT TCTTCTCC **CAGGGCTGCA AGTGGAAATC ATCAACCCCA TCTTCGAGTT CTCCAGGGCC ATGAATGAGC**
TGCAACTCAA TGATGCCGAG TTGCCTTGC TCATTGCTAT CAGCATCTC TCTGCAGGTG TGAGAGGAGG GCAATGGGAA
 ACAGCAAGAG ACTTACACCA AGGAGGGCTG CAGGTCCAC AGGAATCGGT GGGGGGAGG GGGTGGTGGC TTGGGAGGGT
 GGAGGCATT GCTGTGTTAT TTTAGGATGA GAGAGCTTGG CTGGAGCATG TCTCTATATT TTGGTTGCAA TTTGGGAT
 GGAAGTGGAC CCTGGCCAGA CCTGCTCCTC AACTCTCTTGTGACCTATA **GACCGGCCA ACCTGCAGGA CCAGCTCCAG**
GTAGAGAGGC TGCAGCACAC ATATGTGGAA GCCCTGCATG CCTAGCTTC CATCCACCAT CCCCATGTA GTCTCCCAT
 GGTGTTCCCTT TTCCTCCTC CCACACACAG GCCCATCCC TGACATACCT ACTTCCCTT CAAGAATTC TCTCTGACTG
 CATGCTGTGC AGACAATCA CCTCTCCAC AACTCCCCTA CTCTTGCCCC GCTTCCCTGG GGACAGGCAA AAGCTGTGTT
 TGTCTCTCTC CTTTCCC **AG GACCGACTGA TGTCCCACG GATGCTAATG AAAGTGGTGA GCCTCCGGAC CCTGAGCAGC**
GTCCACTCAG AGCAAGTGT TGCCTGCGT CTGCAGGACA AAAAGCTCCC ACCGCTGCTC TCTGAGATCT GGGATGTGCA
CGAATGACTG TTCTGTCCC ATATTTCTG TTTCTTGGC CGGATGGCTG AGCCTGGTG GCTGCCTCCT AGAAGTGGAA
 STOP (LXR α 1, α 3, α 4)
CAGACTGAGA AGGGCAAACA TTCCTGGGAG CTGGGCAAGG AGATCCTCCC GTGGCATTAA AAGAGAGTCA AAGGTTGCG
AGTTTTGTGG CTAAGTGA GGTGAGCCCT CGCTAACACT GTGCTGTGTC TGAAGATCAT GCTGACCCCA CAAACGGATG
GGCCTGGGG CCACTTTGCA CAGGGTCTC CAGAGCCCTG CCCATCCTGC CTCCACCACT TCCTGTTTTT CCCACAGGGC
 CCCAAGAAA ATTCTCCACT GTCA
 Exon8
 Exon9
 Exon10

図 4 ヒト LXR α 遺伝子配列続き

(GenBank accession no. NC_000011.9 より引用)

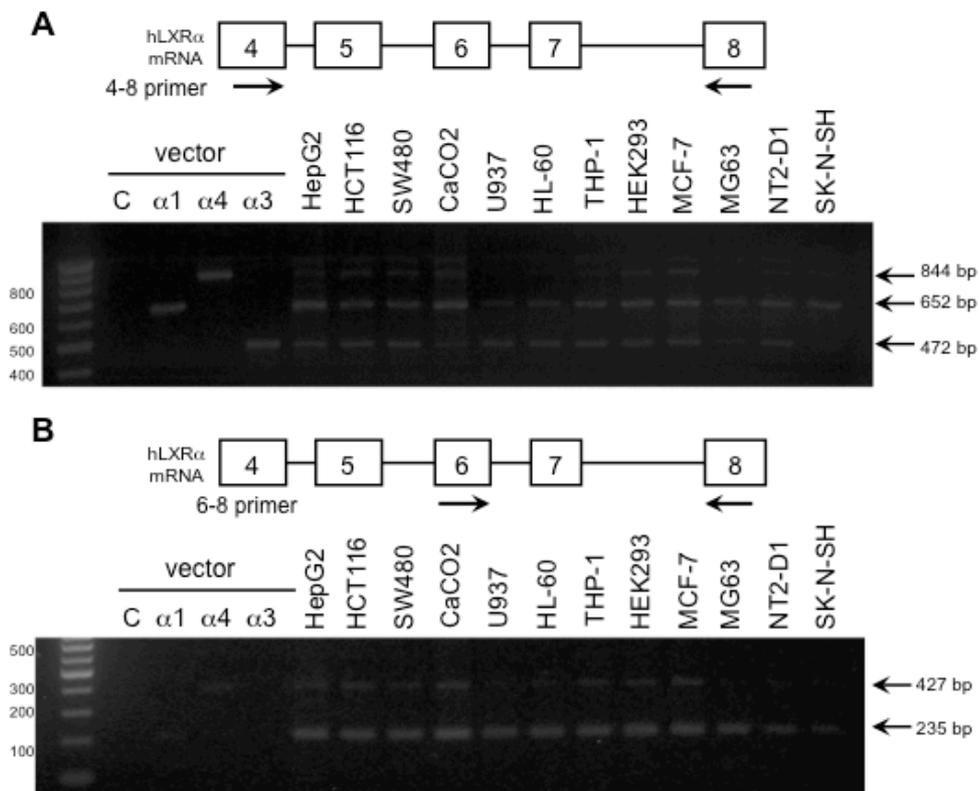


図5 LXR α 変異体のヒト細胞株における mRNA 発現

ヒト肝癌由来 HepG2、ヒト大腸癌由来 HCT116、SW480、CaCO2、ヒト単球系 U937、HL-60、THP-1、腎臓由来 HEK293、乳癌由来 MCF-7、骨肉腫由来 MG63、神経芽腫由来 NT2-D1、SK-N-SH 細胞より抽出した mRNA から cDNA を合成し、PCR 反応を行った。PCR 反応にはエクソン 4-8 間を増幅するプライマー (A)、エクソン 6-8 間を増幅するプライマー (B) を用いた。各変異体の増幅サイズを確認するためのコントロールとして、各変異体の発現プラスミドを増幅させた。

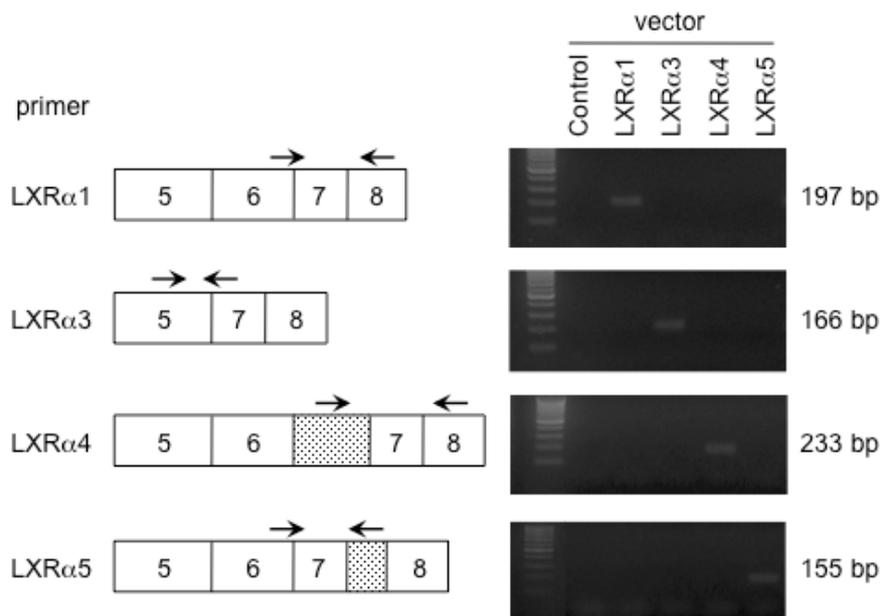


図 6 LXRα変異体のリアルタイム PCR 用プライマーの特異性の確認

コントロールベクター (pFLAG-CMV2) 及び各 LXRα変異体の発現プラスミド (pFLAG-CMV2-LXRα変異体) を鋳型とし、各 LXRα変異体のプライマーセット (表 2) を用いて PCR 反応を行った。

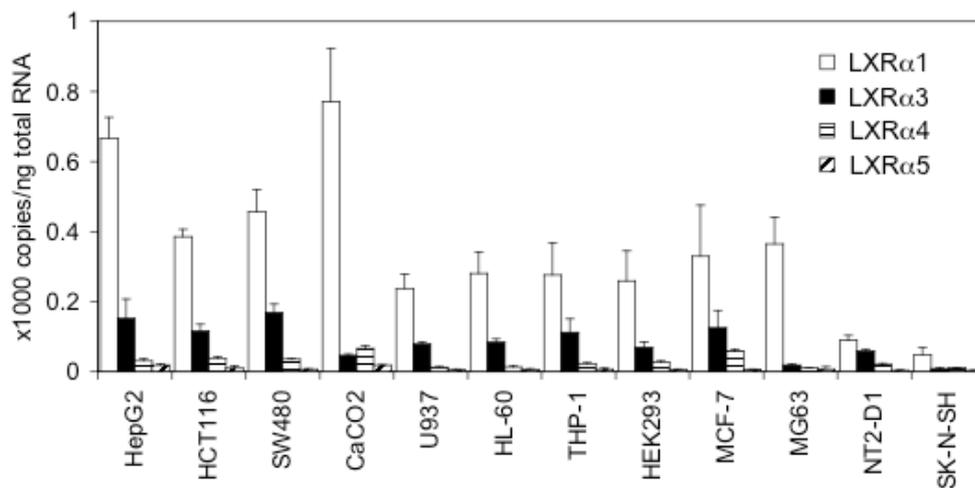


図7 ヒト細胞株における LXR α 変異体の mRNA 発現量の定量

(Endo-Umeda et al, *Mol.Pharmacol.* **81**, 800-810, 2012 より引用)

各細胞株から RNA を抽出し、合成した cDNA を用いてリアルタイム PCR 反応を行った。プライマーは表 2 に示したものをを用いた。各変異体の発現量は GAPDH の発現量で補正した。

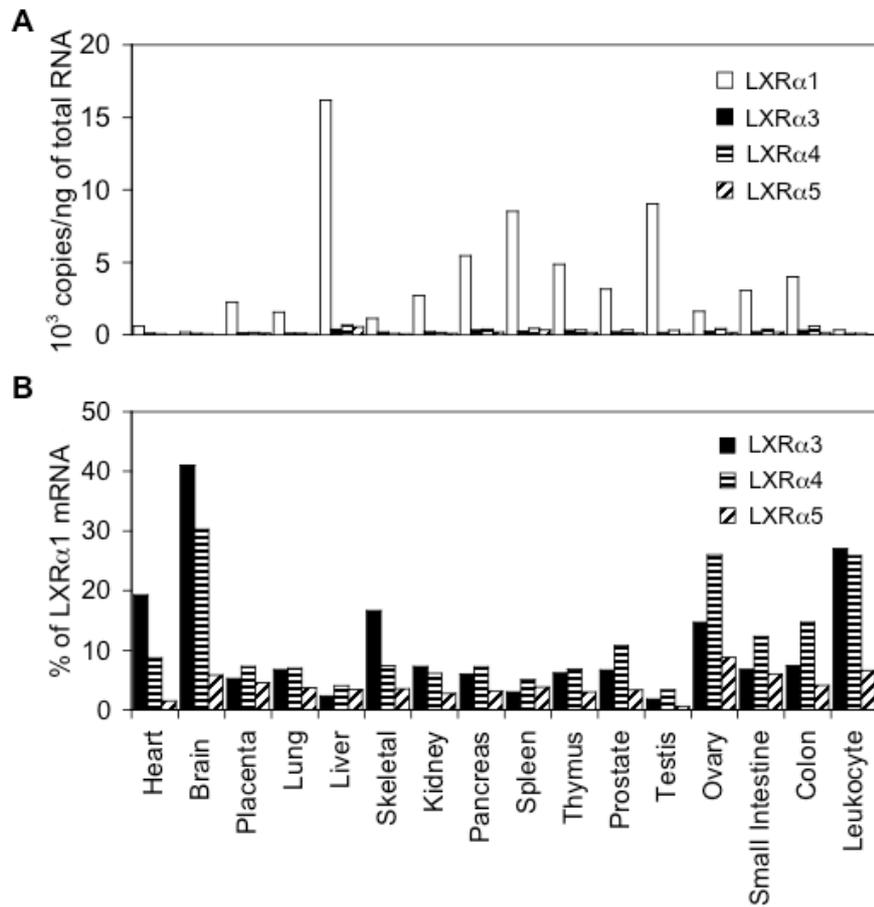


図 8 ヒト正常組織における LXRα 変異体の mRNA 発現量

(Endo-Umeda et al, *Mol.Pharmacol.* **81**, 800-810, 2012 より引用)

(A) 各ヒト正常組織由来の cDNA パネルを用いてリアルタイム PCR 反応を行い、各 LXRα 変異体の mRNA 発現量を定量した。各変異体の発現量は GAPDH の発現量で補正した。プライマーは表 2 に示したものをを用いた。(B) 各 LXRα 変異体の発現量を野生型 LXRα1 に対する割合で示した。

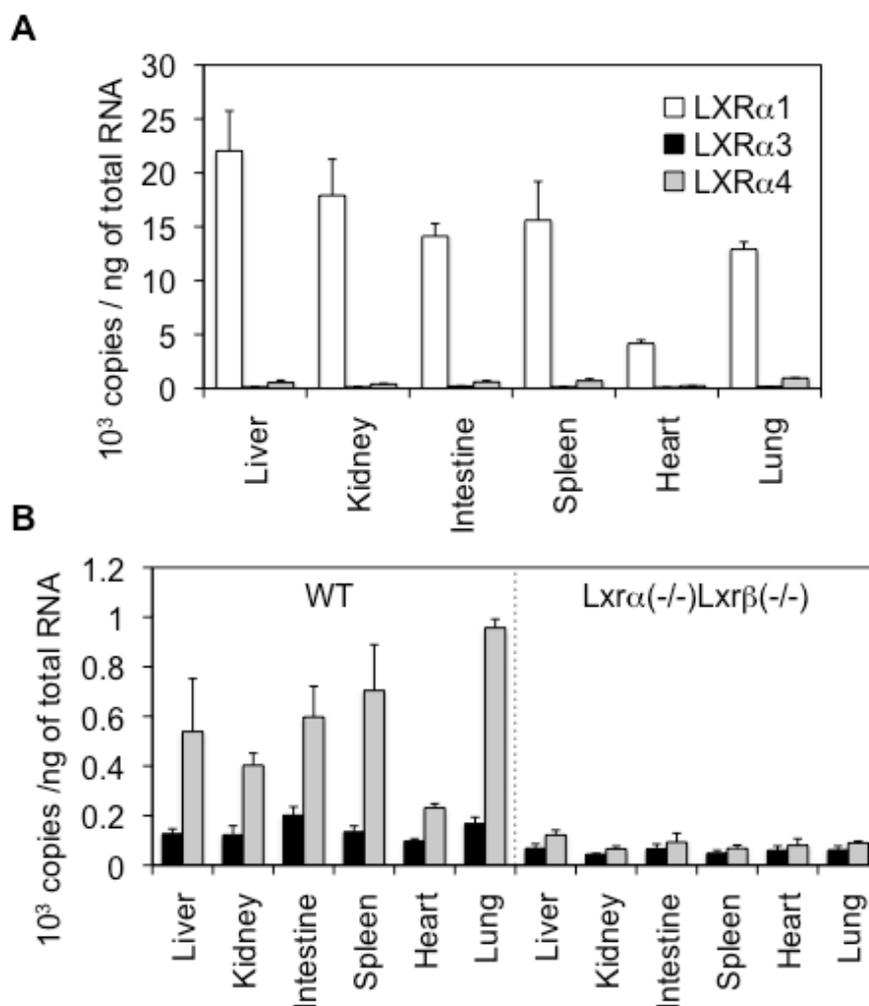


図9 マウス組織における LXRα 変異体の mRNA 発現量の定量

(Endo-Umeda et al, *Mol.Pharmacol.* **81**, 800-810, 2012 より引用)

WT または $Lxr\alpha(-/-)Lxr\beta(-/-)$ マウスから各臓器を摘出し、RNA を抽出した。RNA から合成した cDNA を用いてリアルタイム PCR 反応を行った。プライマーは表 3 に示したのものを用いた。各変異体の発現量は GAPDH の発現量で補正した。(A) WT マウス由来組織における野生型 LXRα1、変異体 LXRα3、LXRα4 の mRNA 発現量。WT または $Lxr\alpha(-/-)Lxr\beta(-/-)$ マウス由来組織における変異体 LXRα3、LXRα4 の mRNA 発現量の比較。

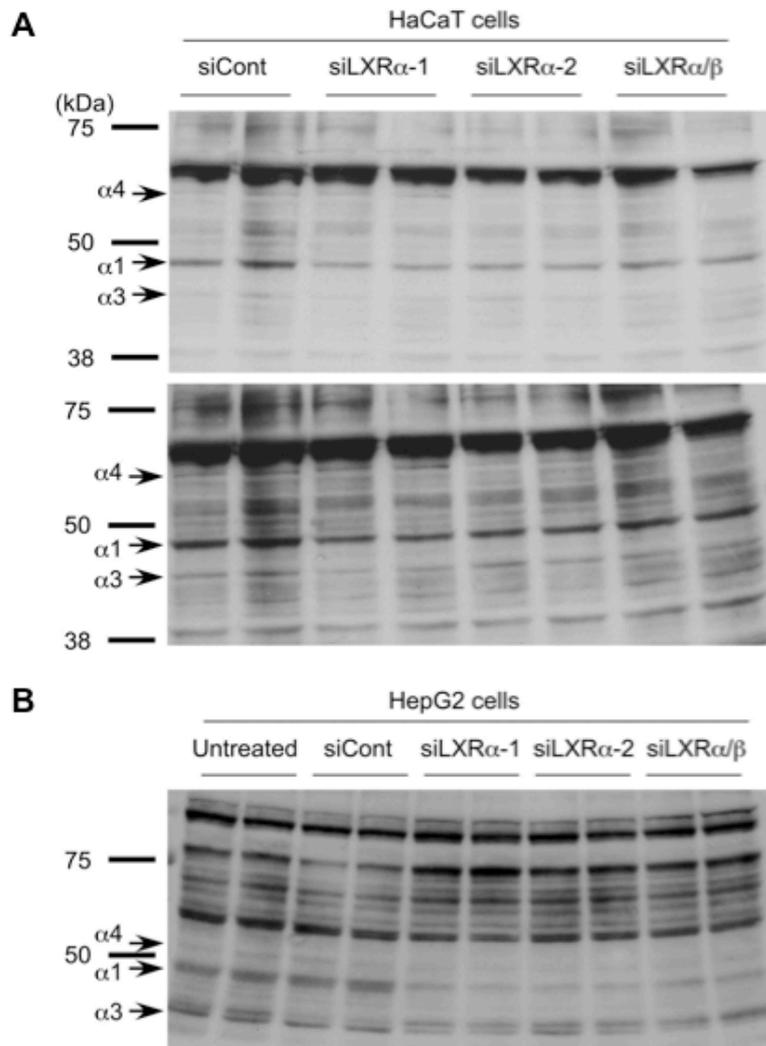


図 10 ヒト細胞株における内在性 LXR α 変異体タンパク質の発現

(Endo-Umeda et al, *Mol.Pharmacol.* **81**, 800-810, 2012 より引用)

(A) HaCaT 細胞にコントロール siRNA または LXR α siRNA (siLXR α -1, siLXR α -2, siLXR α/β) をトランスフェクションし、24 時間後に核画分を抽出し、得られたタンパク質 (30 μ g) を用いてウェスタンブロッティングを行い、抗 LXR α 抗体で検出した。上段は X 線照射を 90 秒、下段は 180 秒行った。(B) HepG2 細胞に各 siRNA をトランスフェクションし、抽出した核タンパク質を用いてウェスタンブロッティングを行い、抗 LXR α 抗体で検出した。

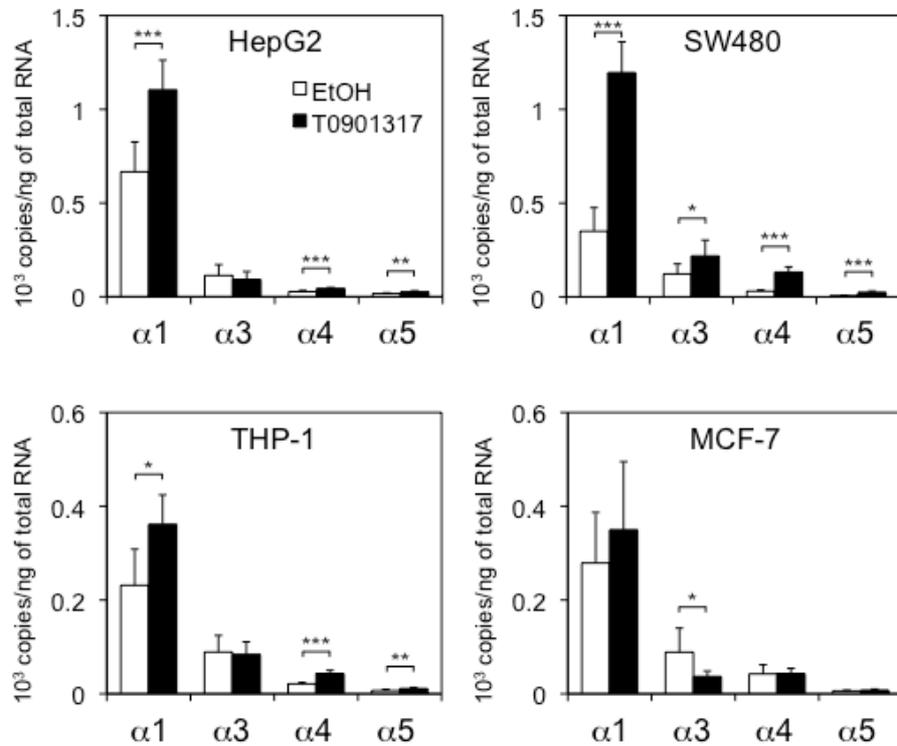


図 11 細胞株における LXR α 変異体発現に対するリガンドの効果

(Endo-Umeda et al, *Mol.Pharmacol.* **81**, 800-810, 2012 より引用)

HepG2、SW480、THP-1 及び MCF-7 細胞に T0901317 (1 μ M)を 24 時間処理後、RNA を抽出した。合成した cDNA を用いてリアルタイム PCR 反応を行い、各 LXR α 変異体の mRNA 発現量を定量した。プライマーは表 2 に示したものを用いた。各変異体の発現量は GAPDH の発現量で補正した。***, $P < 0.001$, **, $P < 0.01$ and *, $P < 0.05$ compared with *EtOH* control.

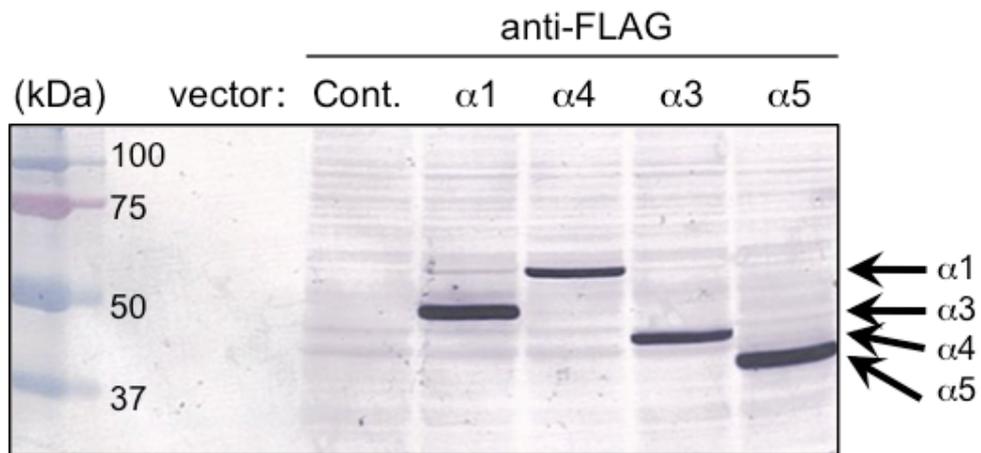


図 12 発現 LXR α 変異体のタンパク質発現

HEK293 細胞に pFLAG-CMV2 (Cont.)、pFLAG-CMV2-LXR α 1 (α 1)、LXR α 4 (α 4)、LXR α 3 (α 3)、LXR α 5 (α 5) ベクターをトランスフェクションし、24 時間後に細胞の総タンパク質を抽出し、抗 FLAG 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

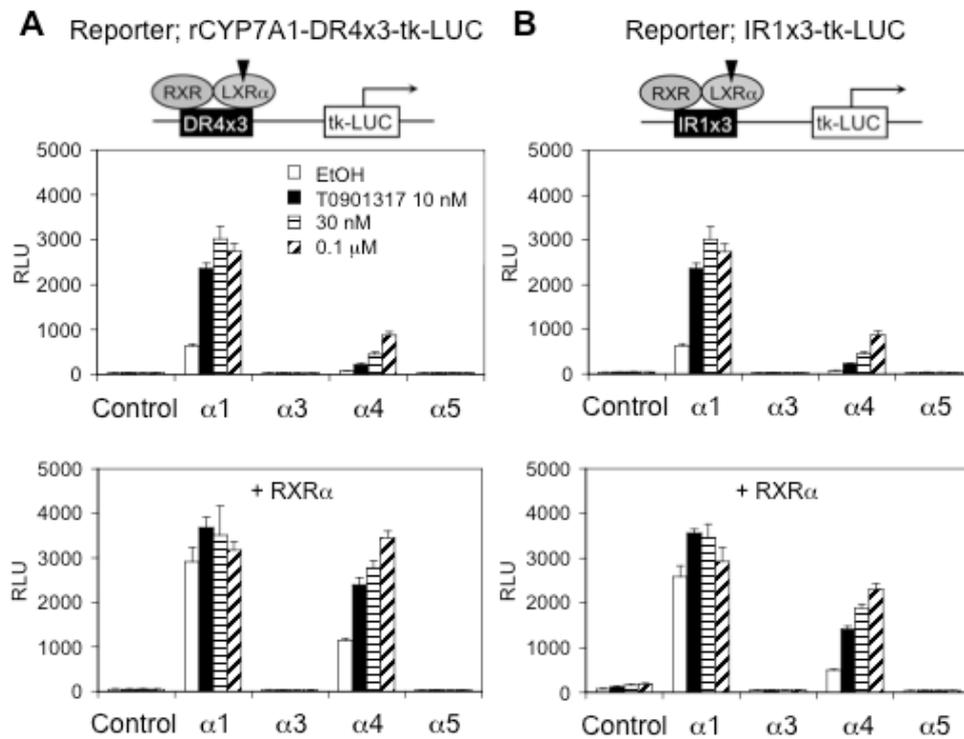


図 13 T0901317 誘導性 LXR α 変異体の転写誘導活性化能の評価

(Endo-Umeda et al, *Mol.Pharmacol.* **81**, 800-810, 2012 より一部引用)

HEK293 細胞にルシフェラーゼレポーター (A: rCYP7A1-DR4x3-tk-LUC, B: IR1x3-tk-LUC)、コントロールベクターまたは各 LXR α 変異体発現プラスミドをトランスフェクションし、EtOH または T0901317 (10 nM, 30 nM, 0.1 μ M) を処理した。下段は各 LXR α 変異体とともに RXR α 発現プラスミドをコトランスフェクションした。

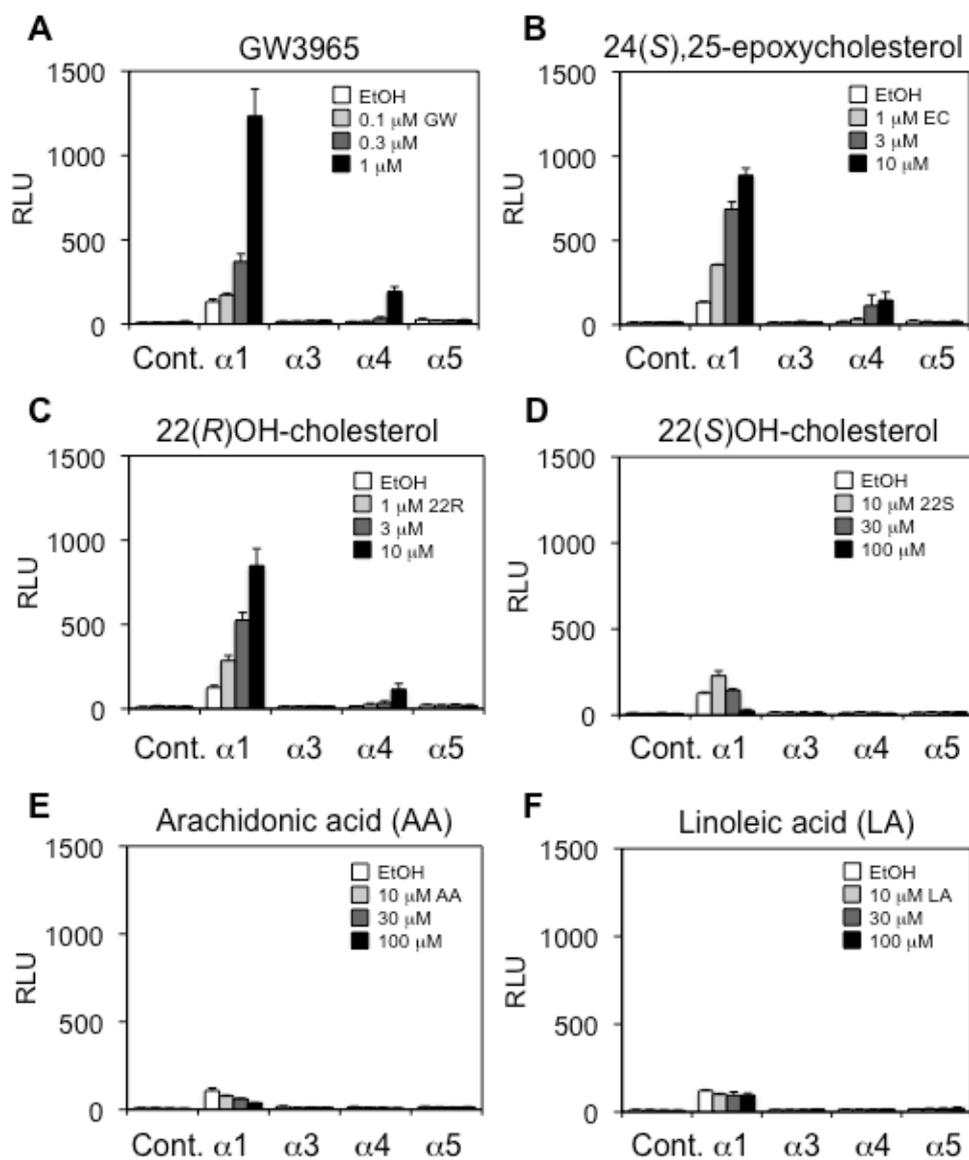


図 14 各種 LXR リガンド誘導性 LXRα変異体の転写誘導活性化能の評価

(Endo-Umeda et al, *Mol.Pharmacol.* **81**, 800-810, 2012 より一部引用)

HEK293 細胞にルシフェラーゼレポーター (rCYP7A1-DR4x3-tk-LUC)、コントロールベクターまたは各 LXRα変異体発現プラスミドをトランスフェクションし、EtOH または GW3965 (A)、24(S),25-epoxycholesterol (EC) (B)、22(R)OH-cholesterol (22R) (C)、22(S)OH-cholesterol (22S) (D)、Arachidonic acid (AA) (E)、Linoleic acid (LA) (F) をグラフに記載された濃度で処理した。

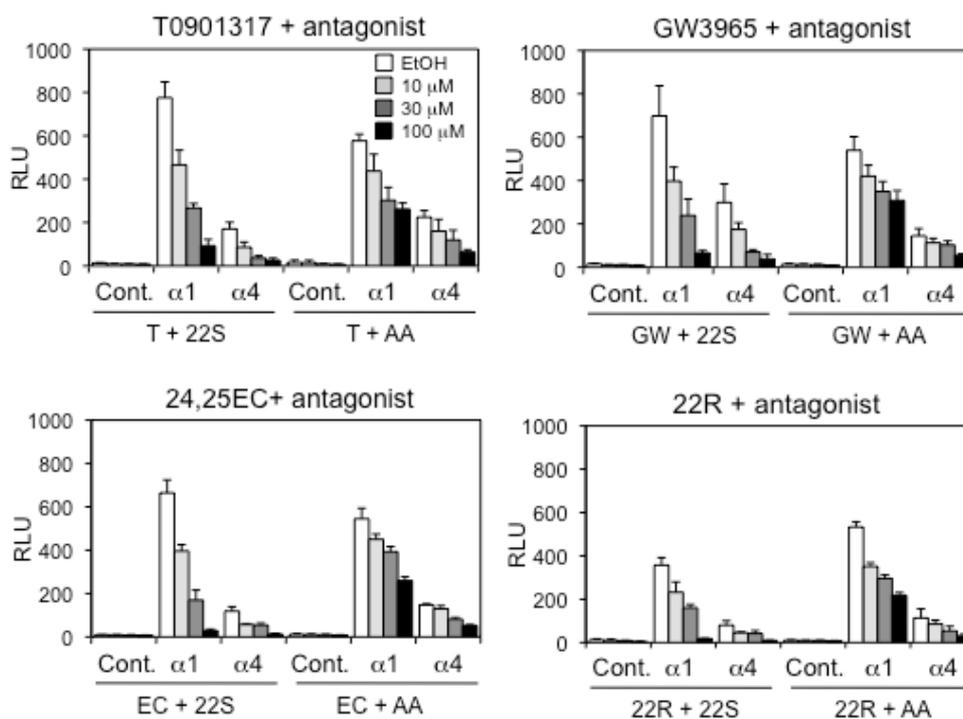


図 15 LXR $\alpha 1$ 、LXR $\alpha 4$ のリガンド依存性転写誘導活性に対する LXR アンタゴニストの効果

(Endo-Umeda et al, *Mol.Pharmacol.* **81**, 800-810, 2012 より一部引用)

HEK293 細胞にレポータープラスミド (rCYP7A1-DR4x3-tk-LUC)、コントロールベクター、LXR $\alpha 1$ 、LXR $\alpha 4$ 発現プラスミドをトランスフェクションし、各 LXR アゴニスト (T0901317; 0.1 μM , GW3965; 1 μM , 24,25EC; 10 μM , 22R; 10 μM) 及びアンタゴニスト (22S または AA; 10 μM , 30 μM , 100 μM) を処理した。

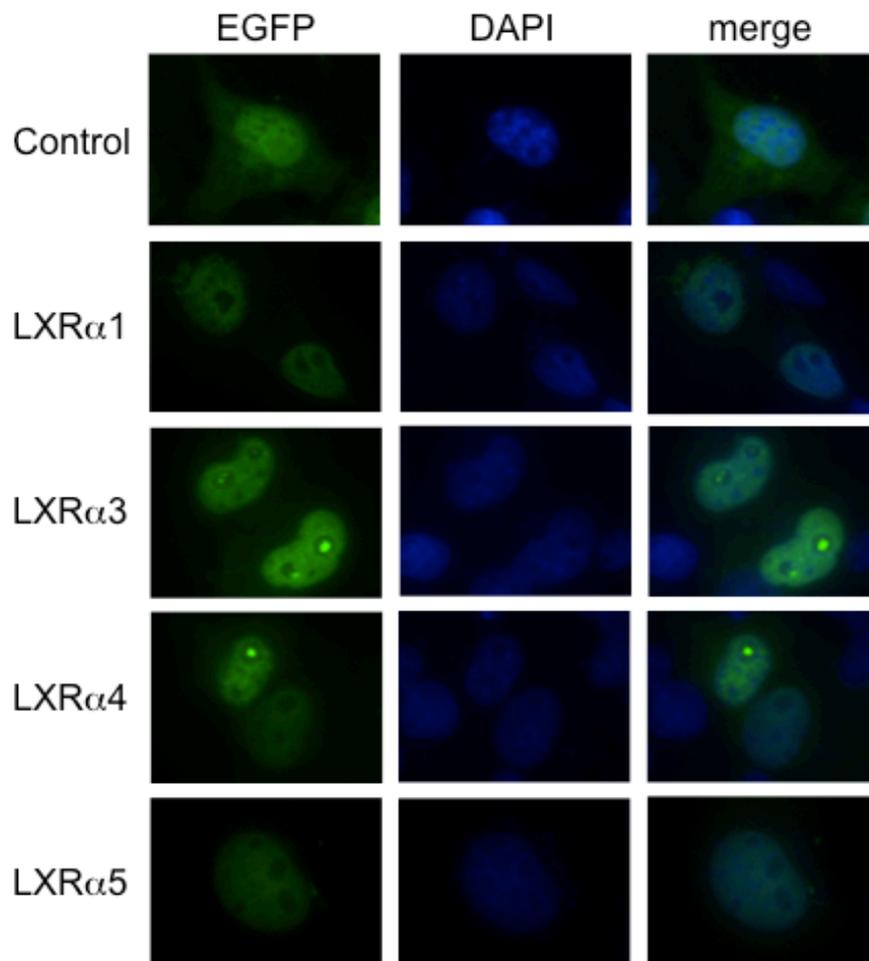


図 16 各 LXR α 変異体の細胞内局在の評価

Cos-7 細胞に EGFP コントロール (pFLAG-CMV2-EGFP) または各 EGFP-LXR α 変異体発現プラスミド (pFLAG-CMV2-EGFP-LXR α 変異体) をトランスフェクションし、24 時間後細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定した。細胞核は DAPI を用いて染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。

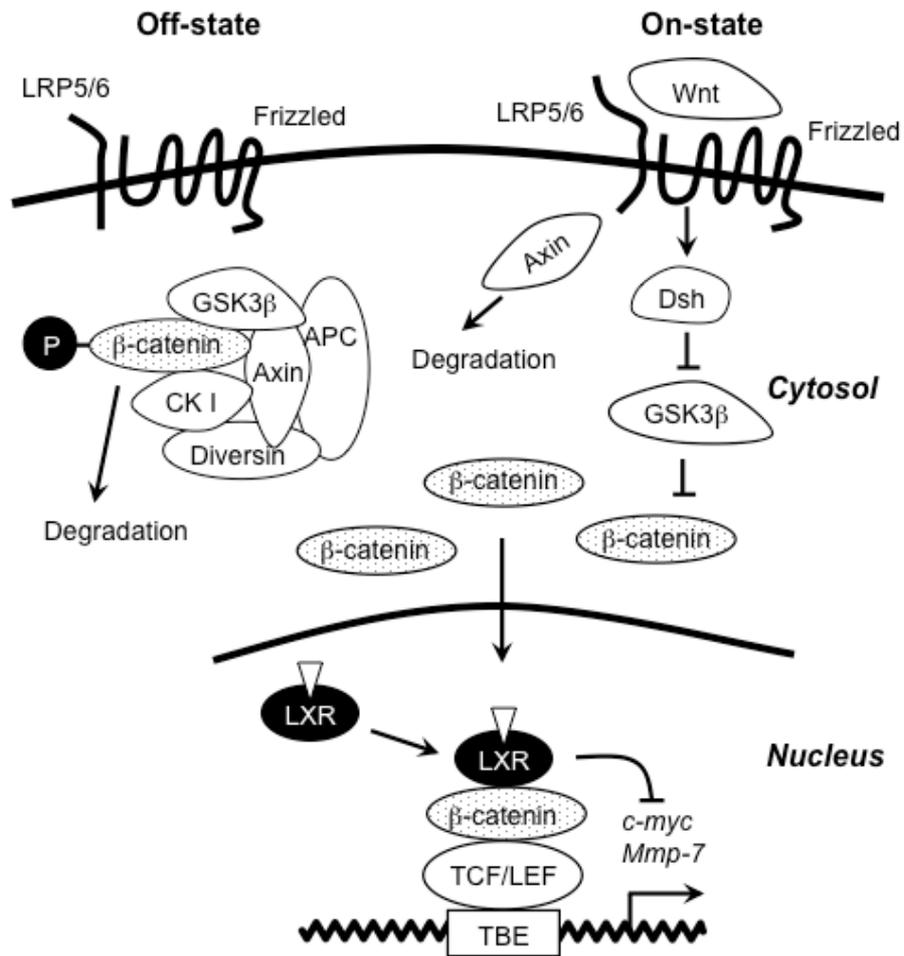


図 17 LXR による canonical Wnt-β-catenin シグナル経路の抑制機構

Wnt シグナルは不活性化状態ではβ-catenin は GSK3β によりリン酸化されずみやかに分解される。Wnt リガンドが膜受容体 Frizzled に結合するとβ-catenin リン酸化経路が抑制されβ-catenin は核内に移行する。β-catenin は転写因子 TCF/LEF に結合し標的遺伝子の発現を誘導する。LXR は LXR リガンド依存的に核内でβ-catenin と相互作用し TCF 応答配列 (TBE) に結合し、β-catenin の標的遺伝子の発現を抑制する[11]。

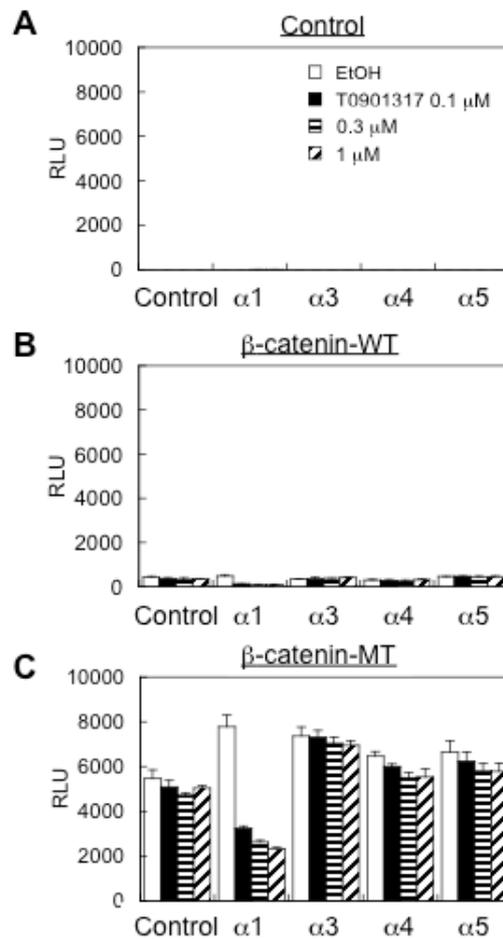


図 18 LXR α 変異体の β -catenin 転写活性に対する効果

(Endo-Umeda et al, *Mol.Pharmacol.* **81**, 800-810, 2012 より一部引用)

HEK293 細胞に TBE を 4 つ含むレポータープラスミド (TOPGLOW)、pCMX コントロール (A)、pCMX- β -catenin-WT (B)、pCMX- β -catenin-MT (C) プラスミド、各 LXR α 変異体の発現プラスミドをトランスフェクションし、EtOH または T0901317 (0.1 μ M, 0.3 μ M, 1 μ M) を処理した。

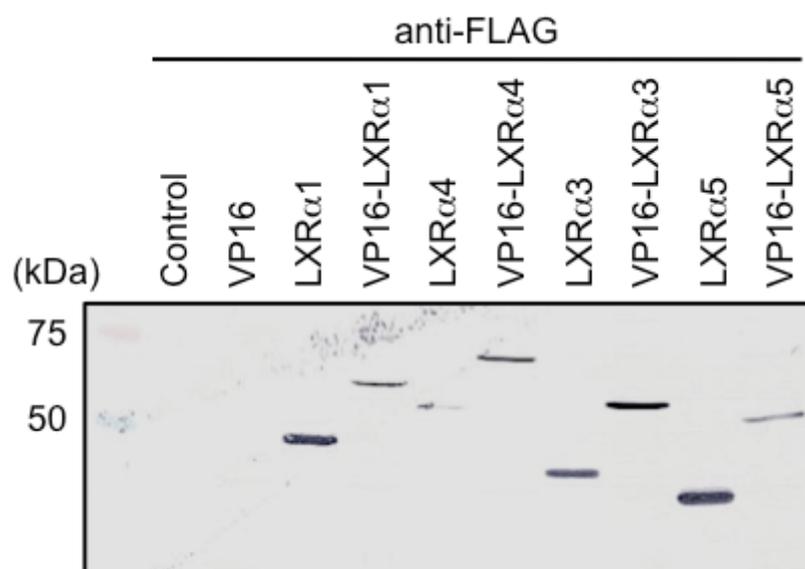


図 19 過剰発現 VP16-LXR α 変異体のタンパク質発現

(Endo-Umeda et al, *Mol.Pharmacol.* **81**, 800-810, 2012 より引用)

HEK293 細胞に、pFLAG-CMV2 (Cont.)、pFLAG-CMV2-VP16 (VP16)、pFLAG-CMV2-LXR α 1 (LXR α 1)、pFLAG-CMV2-VP16-LXR α 1 (VP16-LXR α 1)、pFLAG-CMV2-LXR α 4 (LXR α 4)、pFLAG-CMV2-VP16-LXR α 4 (VP16-LXR α 4)、pFLAG-CMV2-LXR α 3 (LXR α 3)、pFLAG-CMV2-VP16-LXR α 3 (VP16-LXR α 3)、pFLAG-CMV2-LXR α 5 (LXR α 5)、pFLAG-CMV2-LXR α 5 (VP16-LXR α 5) ベクターをトランスフェクションし、24 時間後に細胞の総タンパク質を抽出し、抗 FLAG 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

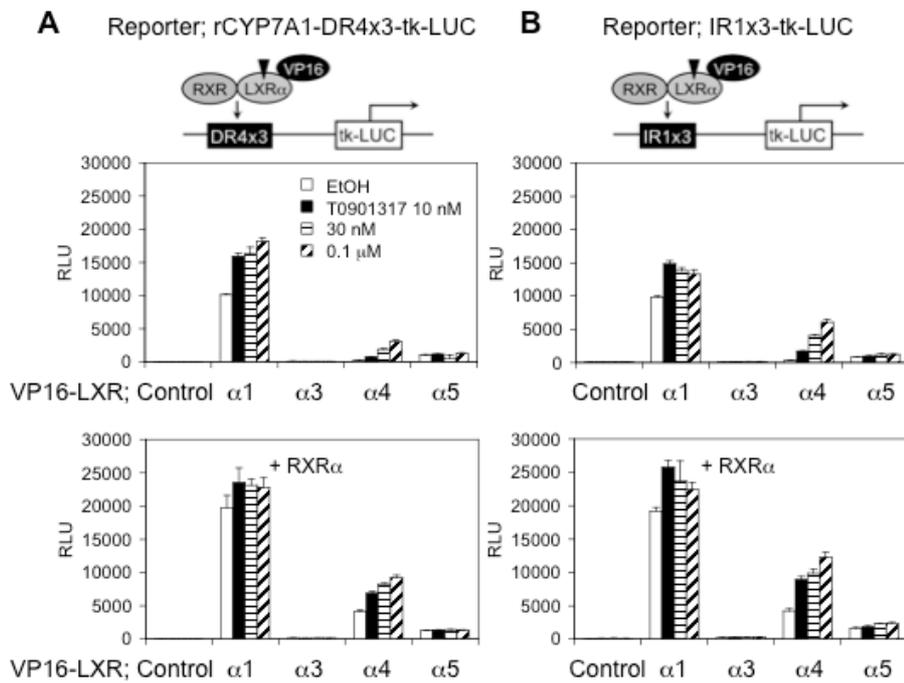


図 20 VP16-LXR α 変異体の T0901317 誘導性転写誘導活性化能の評価

(Endo-Umeda et al, *Mol.Pharmacol.* **81**, 800-810, 2012 より一部引用)

HEK293 細胞にルシフェラーゼレポーター (A: rCYP7A1-DR4x3-tk-LUC, B: IR1x3-tk-LUC)、VP16 コントロールベクターまたは各 VP16-LXR α 変異体発現プラスミドをトランスフェクションし、EtOH または T0901317 (10 nM, 30 nM, 0.1 μ M) を処理した。下段は VP16-LXR α とともに RXR α 発現プラスミドをコトランスフェクションした。

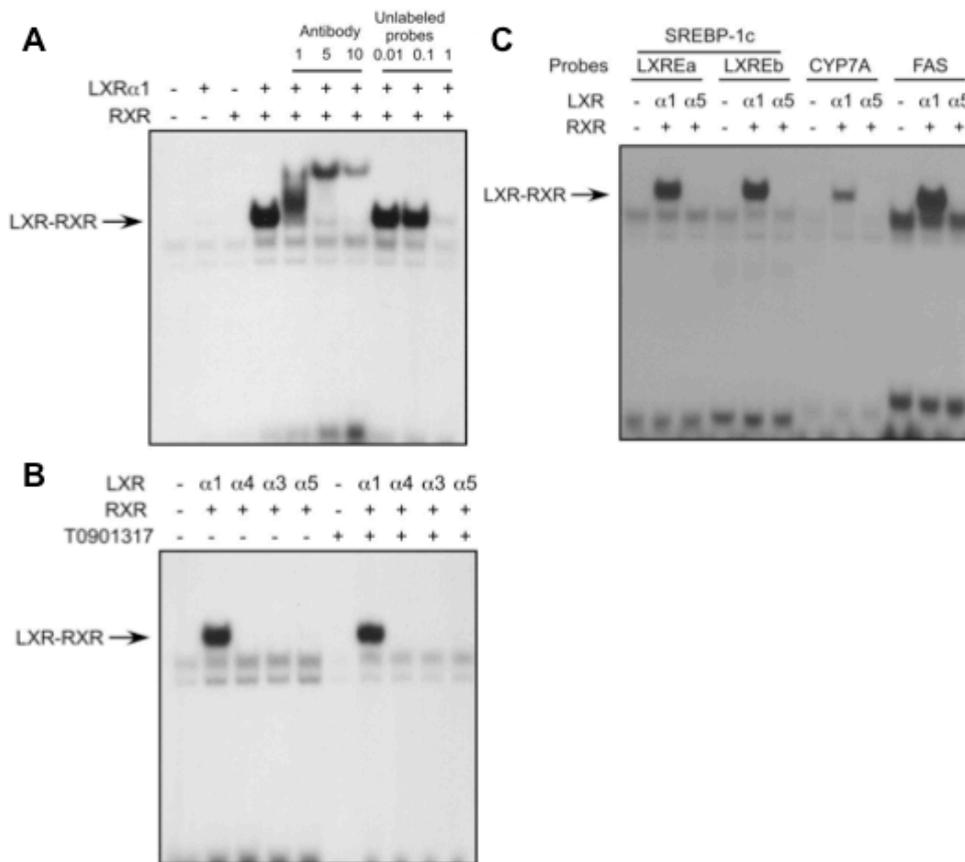


図 21 EMSA 法による LXR α 変異体の LXRE への結合評価

(Endo-Umeda et al, *Mol.Pharmacol.* **81**, 800-810, 2012 より引用)

(A) ^{32}P ラベルした SREBP-1c プロモーター由来 LXRE (LXREa) プローブと *in vitro* で合成した LXR α 1 及び RXR α タンパク質をインキュベートした。また、同時に抗 LXR α 抗体を加えスーパーシフトを、非ラベル化 LXRE α を加えてバンドの消失を確認した。(B) 各 LXR α 変異体タンパク質をラベル化 SREBP-1c プロモーターLXREa プローブ、RXR α タンパク質とともにインキュベートした。(C) LXR α 1 または LXR α 5 タンパク質を RXR α タンパク質、各ラベル化 LXRE プローブ (SREBP-1c 由来 LXREa, LXREb, CYP7A 由来 LXRE, FAS 由来 LXRE) とともにインキュベートした。各反応溶液を用いて SDS-PAGE を行い、オートラジオグラフィーにてバンドを検出した。

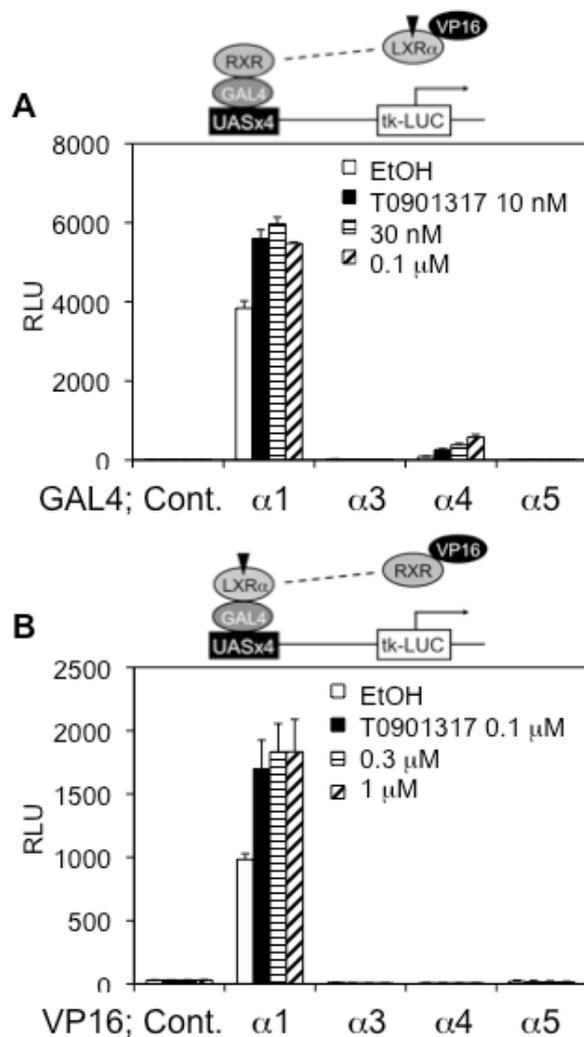


図 22 各 LXR α 変異体と RXR α とのヘテロダイマー形成能の評価

(Endo-Umeda et al, *Mol.Pharmacol.* **81**, 800-810, 2012 より一部引用)

(A) HEK293 細胞に MH100(UAS)x4-tk-LUC レポーター、VP16-RXR α 及び GAL4-LXR α 変異体をトランスフェクションし、EtOH または T0901317 (0.1 μ M, 0.3 μ M, 1 μ M) を処理し、mammalian two-hybrid アッセイを行った。(B) HEK293 細胞に MH100(UAS)x4-tk-LUC レポーター、GAL4-RXR α 及び VP16-LXR α 変異体をトランスフェクションし、EtOH または T0901317 (0.1 μ M, 0.3 μ M, 1 μ M) を処理し、mammalian two-hybrid アッセイを行った。

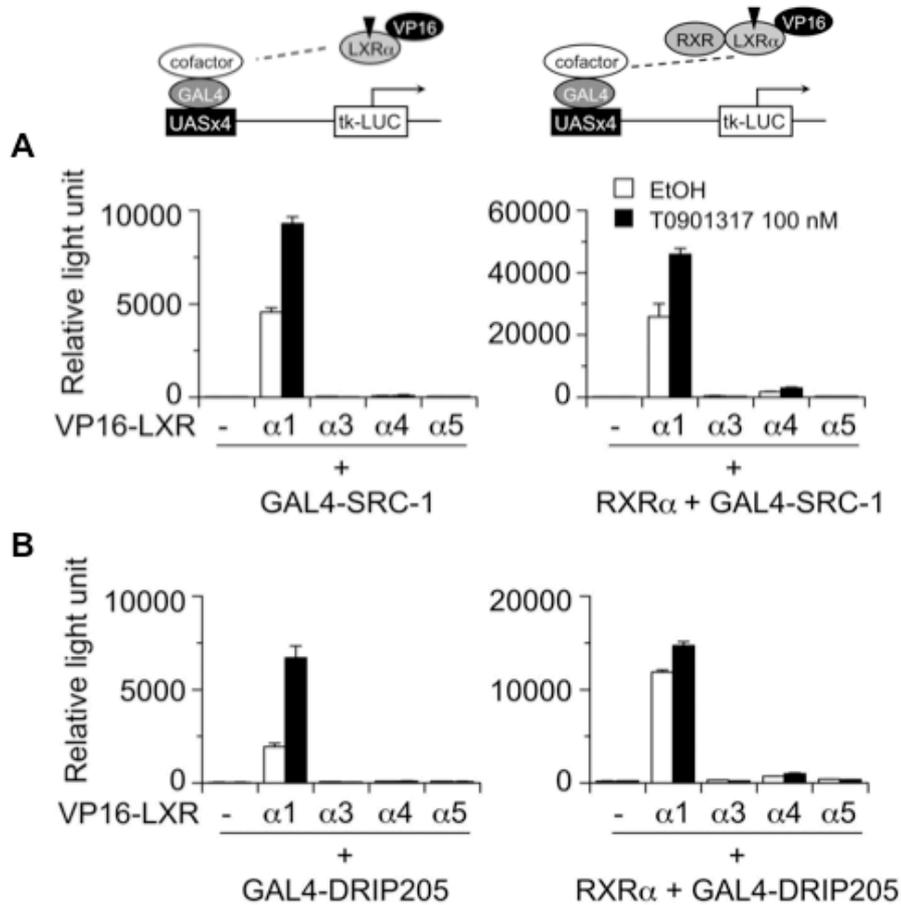


図 23 各 LXR α 変異体とコアクチベータータンパク質との相互作用

(Endo-Umeda et al, *Mol.Pharmacol.* **81**, 800-810, 2012 より引用)

HEK293 細胞に MH100(UAS)x4-tk-LUC レポーター、VP16-LXR α 変異体及び GAL4-DRIP205 (A)または GAL4-SRC-1 (B)をトランスフェクションし、EtOH または T090137 (0.1 μ M) を処理し、mammalian two-hybrid アッセイを行った。A, B ともに右図では RXR α をコトランスフェクションした。

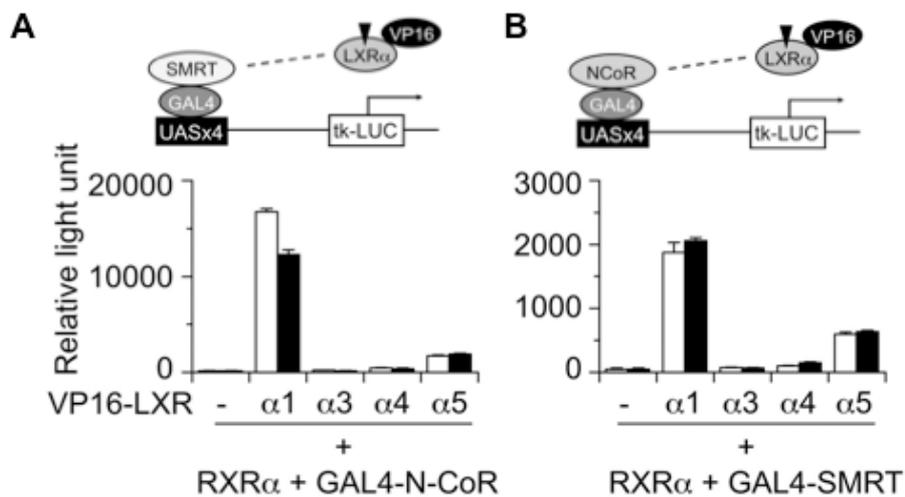


図 24 各 LXR α 変異体とコリプレッサータンパク質との相互作用

(Endo-Umeda et al, *Mol.Pharmacol.* **81**, 800-810, 2012 より引用)

HEK293 細胞に MH100(UAS)x4-tk-LUC レポーター、VP16-LXR α 変異体及び GAL4-N-CoR (A)または GAL4-SMRT (B)をトランスフェクションし、EtOH または T0901317 (0.1 μ M) を処理し、mammalian two-hybrid アッセイを行った。

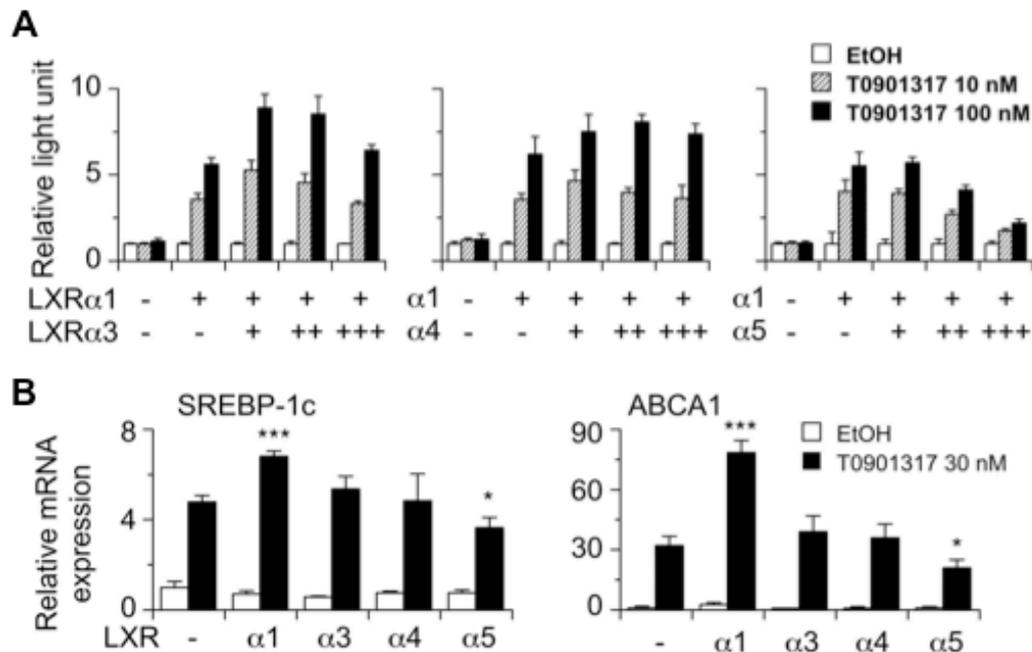


図 25 各 LXR 変異体の LXR α 1 に対するドミナントネガティブ効果の検討

(Endo-Umeda et al, *Mol.Pharmacol.* **81**, 800-810, 2012 より引用)

(A) HEK293 細胞に rCYP7A1-DR4x3-tk-LUC レポーター、LXR α 1 発現プラスミド (+; 0.1 ng) 及び LXR α 3、LXR α 4、LXR α 5 発現プラスミド (+; 15 ng, ++; 30 ng, +++; 60 ng) をそれぞれトランスフェクションし、EtOH または T0901317 (10 nM, 100 nM) を処理した。(B) SW480 細胞にコントロールベクターまたは各 LXR α 変異体プラスミドをトランスフェクションし、EtOH または T0901317 (30 nM) を処理した。24 時間後、RNA を抽出し、合成した cDNA を用いてリアルタイム PCR 反応を行い、SREBP-1c 及び ABCA1 の mRNA 発現量を定量した。各変異体の発現量は GAPDH の発現量で補正した。***, $P < 0.001$, **, $P < 0.01$ and *, $P < 0.05$ compared with EtOH control.

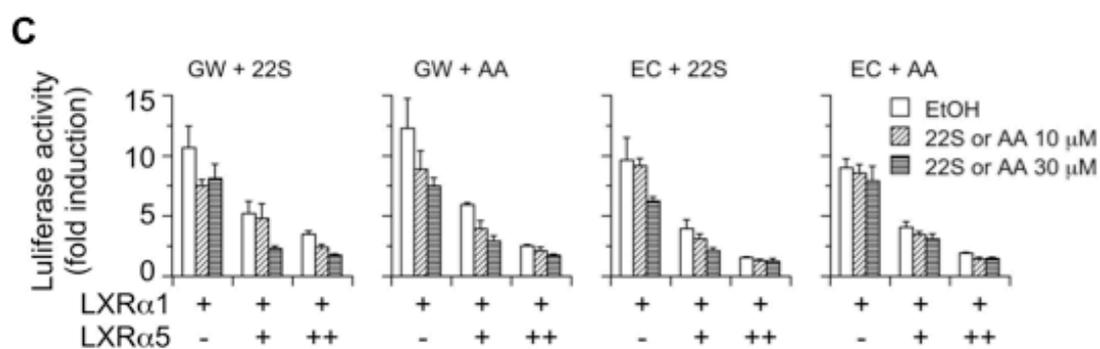


図 25 各 LXR 変異体の LXR α 1 に対するドミナントネガティブ効果の検討続き
(Endo-Umeda et al, *Mol.Pharmacol.* **81**, 800-810, 2012 より引用)

(C) HEK293 細胞に rCYP7A1-DR4x3-tk-LUC レポーター、LXR α 1 発現プラスミド (+; 0.1 ng) 及び LXR α 3、LXR α 4、LXR α 5 発現プラスミド (+; 15 ng, ++; 30 ng) をそれぞれトランスフェクションし、アゴニスト (GW3965; 1 μ M, EC; 10 μ M) またはアンタゴニスト (22S, AA; 10 μ M, 30 μ M) を処理した。

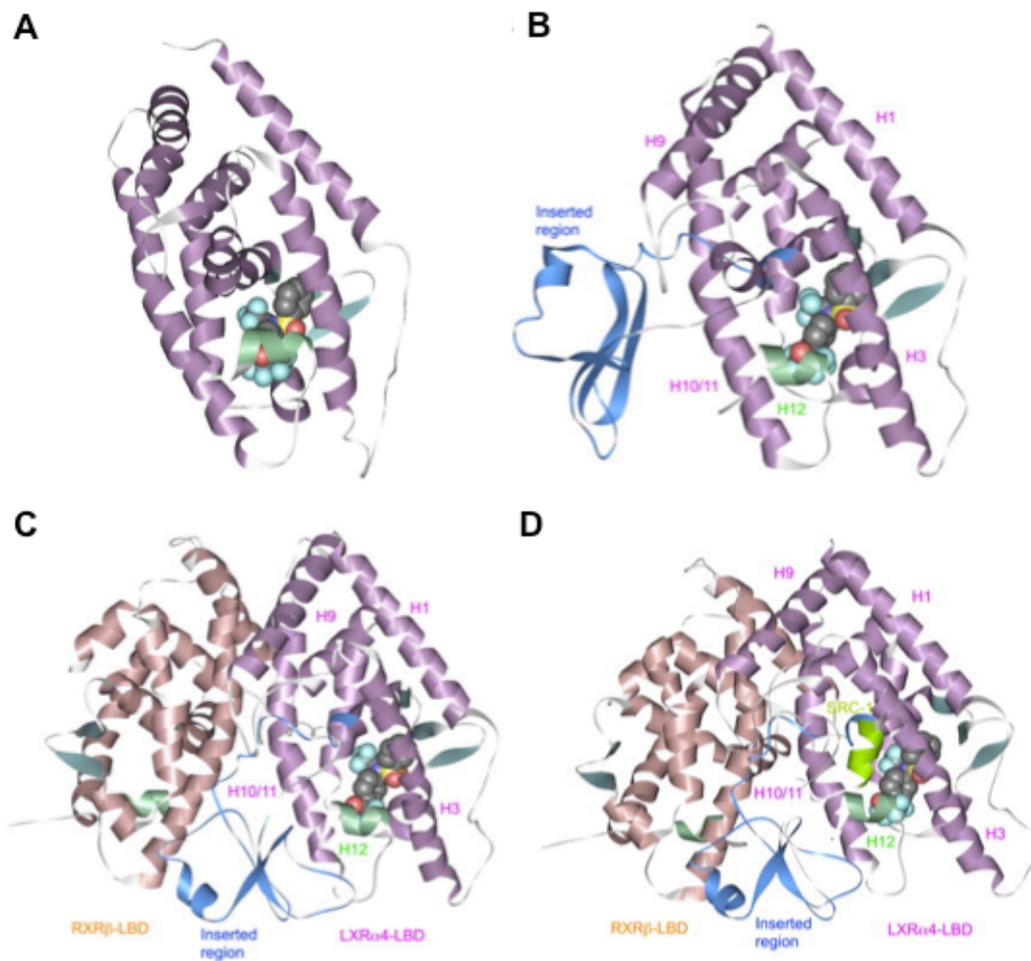


図 26 モデリングにより構築した LXR α 4-LBD の分子構造モデル

(Endo-Umeda et al, *Mol.Pharmacol.* **81**, 800-810, 2012 より引用)

(A) LXR α 1-LBD の X 線結晶構造。PDB file; 1uhl [21] より引用した。(B) LXR α 4-LBD の単量体モデル (M2)。LXR β -LBD (PDB file; 1p8d) [20] を用いて M1 モデルを構築し、T0901317 を merge した。(C) LXR α 4-LBD と RXR β -LBD のヘテロ二量体モデル (M3)。M2 モデルの二面角 (S282)を回転させ、RXR β -LBD を merge した。(D) M3 モデルと SRC-1 ペプチドとの相互作用モデル (M4)。LXXLL モチーフを含む SRC-1 ペプチドを M3 モデルに merge させた。

引用文献

1. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature*. **318**:635-641.
2. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. **83**:835-839.
3. Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science*. **294**:1866-1870.
4. Apfel R, Benbrook D, Lernhardt E, Ortiz MA, Salbert G, Pfahl M. (1994) A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol Cell Biol*. **14**:7025-7035.
5. Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. (1995) LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev*. **9**:1033-1045.
6. Teboul M, Enmark E, Li Q, Wikström AC, Pelto-Huikko M, Gustafsson JA. (1995) OR-1, a member of the nuclear receptor superfamily that interacts with the 9-*cis*-retinoic acid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**:2096-2100.
7. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR α . *Nature*. **383**:728-731.
8. Tontonoz P, Mangelsdorf DJ. (2003) Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol*. **17**:985-993.
9. Tangirala RK, Bischoff ED, Joseph SB, Wagner BL, Walczak R, Laffitte BA, Daige CL, Thomas D, Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Wang X, Lusis AJ, Tontonoz P, Schulman IG. (2002) Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**:11896-11901.

10. Joseph SB, McKilligin E, Pei L, Watson MA, Collins AR, Laffitte BA, Chen M, Noh G, Goodman J, Hagger GN, Tran J, Tippin TK, Wang X, Lusic AJ, Hsueh WA, Law RE, Collins JL, Willson TM, Tontonoz P. (2002) Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**:7604-7609.
11. Uno S, Endo K, Jeong Y, Kawana K, Miyachi H, Hashimoto Y, Makishima M. (2009) Suppression of β -catenin signaling by liver X receptor ligands. *Biochem Pharmacol.* **77**:186-95.
12. Chen M, Beaven S, Tontonoz P. (2005) Identification and characterization of two alternatively spliced transcript variants of human liver X receptor α . *J Lipid Res.* **46**:2570-2579.
13. Warf MB, Berglund JA. (2010) Role of RNA structure in regulating pre-mRNA splicing. *Trends Biochem Sci.* **35**:169-178.
14. Jagla M, Fève M, Kessler P, Lapouge G, Erdmann E, Serra S, Bergerat JP, Céraline J. (2007) A splicing variant of the androgen receptor detected in a metastatic prostate cancer exhibits exclusively cytoplasmic actions. *Endocrinology.* **148**:4334-4343.
15. Noguchi-Yachide T, Aoyama A, Makishima M, Miyachi H, Hashimoto Y. (2007) Liver X receptor antagonists with a phthalimide skeleton derived from thalidomide-related glucosidase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* **15**:3957-3961.
16. Kaneko E, Matsuda M, Yamada Y, Tachibana Y, Shimomura I, Makishima M. (2003) Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. *J Biol Chem.* **278**:36091-36098.
17. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ. (2000) Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science.* **289**:1524-1529.
18. Yoshikawa T, Shimano H, Amemiya-Kudo M, Yahagi N, Hasty AH, Matsuzaka

- T, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Kimura S, Ishibashi S, Yamada N. (2001) Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Mol Cell Biol.* **21**:2991-3000.
19. Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, Mangelsdorf DJ. (2000) Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell.* **6**:507-15.
 20. Williams S, Bledsoe RK, Collins JL, Boggs S, Lambert MH, Miller AB, Moore J, McKee DD, Moore L, Nichols J, Parks D, Watson M, Wisely B, Willson TM. (2003) X-ray crystal structure of the liver X receptor β ligand binding domain: regulation by a histidine-tryptophan switch. *J Biol Chem.* **278**:27138-27143.
 21. Svensson S, Ostberg T, Jacobsson M, Norström C, Stefansson K, Hallén D, Johansson IC, Zachrisson K, Ogg D, Jendeberg L. (2003) Crystal structure of the heterodimeric complex of LXR α and RXR β ligand-binding domains in a fully agonistic conformation. *EMBO J.* **22**:4625-4633.
 22. Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ. (1998) Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Cell.* **93**:693-704.
 23. Laffitte BA, Joseph SB, Walczak R, Pei L, Wilpitz DC, Collins JL, Tontonoz P. (2001) Autoregulation of the human liver X receptor α promoter. *Mol Cell Biol.* **21**:7558-68.
 24. Li Y, Bolten C, Bhat BG, Woodring-Dietz J, Li S, Prayaga SK, Xia C, Lala DS. (2002) Induction of human liver X receptor α gene expression via an autoregulatory loop mechanism. *Mol Endocrinol.* **16**:506-14.
 25. Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B. (2000) Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev.* **14**:2831-2838.
 26. Willy PJ, Mangelsdorf DJ. (1997) Unique requirements for retinoid-dependent

- transcriptional activation by the orphan receptor LXR. *Genes Dev.* **11**:289-98.
27. Mitro N, Vargas L, Romeo R, Koder A, Saez E. (2007) T0901317 is a potent PXR ligand: implications for the biology ascribed to LXR. *FEBS Lett.* **581**:1721-1726.
 28. Joseph SB, McKilligin E, Pei L, Watson MA, Collins AR, Laffitte BA, Chen M, Noh G, Goodman J, Hagger GN, Tran J, Tippin TK, Wang X, Lusic AJ, Hsueh WA, Law RE, Collins JL, Willson TM, Tontonoz P. (2002) Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**:7604-7609.
 29. Spencer TA, Li D, Russel JS, Collins JL, Bledsoe RK, Consler TG, Moore LB, Galardi CM, McKee DD, Moore JT, Watson MA, Parks DJ, Lambert MH, Willson TM. (2001) Pharmacophore analysis of the nuclear oxysterol receptor LXR α . *J Med Chem.* **44**:886-897.
 30. Ou J, Tu H, Shan B, Luk A, DeBose-Boyd RA, Bashmakov Y, Goldstein JL, Brown MS. (2001) Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**:6027-6032.
 31. Yoshikawa T, Shimano H, Yahagi N, Ide T, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, Nakakuki M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Takahashi A, Sone H, Osuga Ji J, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. (2002) Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J Biol Chem.* **277**:1705-1711.
 32. Miyauchi Y, Michigami T, Sakaguchi N, Sekimoto T, Yoneda Y, Pike JW, Yamagata M, Ozono K. (2005) Importin 4 is responsible for ligand-independent nuclear translocation of vitamin D receptor. *J Biol Chem.* **280**:40901-40908.
 33. Sakamoto A, Kawasaki T, Kazawa T, Ohashi R, Jiang S, Maejima T, Tanaka T,

- Iwanari H, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Naito M. (2007) Expression of liver X receptor α in rat fetal tissues at different developmental stages. *J Histochem Cytochem.* 55:641-649.
34. Rosenfeld MG, Lunyak VV, Glass CK. (2006) Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev.* 20:1405-1428.
35. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, Rosenfeld MG, Willson TM, Glass CK, Milburn MV. (1998) Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Nature.* 395:137-43.
36. Malloy PJ, Xu R, Peng L, Clark PA, Feldman D. (2002) A novel mutation in helix 12 of the vitamin D receptor impairs coactivator interaction and causes hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets without alopecia. *Mol Endocrinol.* 16:2538-2346.
37. Färnegårdh M, Bonn T, Sun S, Ljunggren J, Ahola H, Wilhelmsson A, Gustafsson JA, Carlquist M. (2003) The three-dimensional structure of the liver X receptor β reveals a flexible ligand-binding pocket that can accommodate fundamentally different ligands. *J Biol Chem.* 278:38821-38828.
38. Chandra V, Huang P, Hamuro Y, Raghuram S, Wang Y, Burris TP, Rastinejad F. (2008) Structure of the intact PPAR- γ -RXR- nuclear receptor complex on DNA. *Nature.* 456:350-356.
39. Sabatino L, Casamassimi A, Peluso G, Barone MV, Capaccio D, Migliore C, Bonelli P, Pedicini A, Febbraro A, Ciccodicola A, Colantuoni V. (2005) A novel peroxisome proliferator-activated receptor γ isoform with dominant negative activity generated by alternative splicing. *J Biol Chem.* 15:26517-25.
40. Zhao C, Matthews J, Tujague M, Wan J, Ström A, Toresson G, Lam EW, Cheng G, Gustafsson JA, Dahlman-Wright K. (2007) Estrogen receptor β 2 negatively regulates the transactivation of estrogen receptor α in human breast cancer cells.

Cancer Res. **67**:3955-62.

41. Long JC, Caceres JF. (2009) The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem J.* **417**:15-27
42. Apostolatos H, Apostolatos A, Vickers T, Watson JE, Song S, Vale F, Cooper DR, Sanchez-Ramos J, Patel NA. (2010) Vitamin A metabolite, all-*trans*-retinoic acid, mediates alternative splicing of protein kinase C δ VIII (PKC δ VIII) isoform via splicing factor SC35. *J Biol Chem.* **285**:25987-25995.
43. Isken O, Maquat LE. (2008) The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation. *Nat Rev Genet.* **9**:699-712.
44. Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet.* **40**:1413-1415.

研究業績

梅田 香織

1	発 表	① 一般発表	15	
		② 特別発表	なし	
2	論 文	① 原著論文	10	(共 10)
		② 症例報告	なし	
		③ 総説	なし	
3	著 書		なし	

以 上

1 発表

① 一般発表

1. 遠藤香織, 島崎美佳, 宮本由紀子, 塚原義人, 山本恵子, 山田幸子, 清水正人: プレビタミンD及びその光異性体の機能解析, 第126回日本薬学会, 仙台, 2006年3月
2. 遠藤香織, 宇野茂之, 山田幸子, 榎島 誠: ベンゾ[a]ピレンのDNA付加体形成とダイオキシン受容体の転写活性化におけるCYP1ファミリー酵素の役割, 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会, 横浜, 2007年12月
3. 遠藤香織, 榎島 誠: ヒトLXR α スプライシング変異体の作用機序の解明, 特定領域研究「細胞感覚」第2回若手の会, 福岡, 2008年2月
4. 遠藤香織, 宇野茂之, 榎島 誠: ベンゾ[a]ピレンのDNA付加体形成とダイオキシン受容体の転写活性化におけるCYP1ファミリー酵素の役割, 特定領域研究「細胞感覚」夏の班会議, 札幌, 2008年7月
5. 遠藤香織, 宇野茂之, 藤森 功, 内藤義一, 斎藤幸一, 山田幸子, 榎島 誠: ヒトLXR α スプライシング変異体の作用機序の解明, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2008年12月
6. 遠藤香織, 榎島 誠: オキシステロール受容体LXR新規リガンドの探索, 特定領域研究「細胞感覚」第4回若手の会, 沖縄, 2009年6月
7. 宇野茂之, 遠藤香織, 榎島 誠: ダイオキシン受容体及び核内受容体による代謝環境シグナル制御, 特定領域研究「細胞感覚」夏の班会議, 沖縄, 2009年6月
8. 遠藤香織, 宇野茂之, 藤森 功, 内藤義一, 斎藤幸一, 山田幸子, 榎島 誠: 新規ヒトLXR α スプライシング変異体の作用機序の解明, 博多シンポジウム「内・外環境と生物応答」, 福岡, 2009年10月
9. 宇野茂之, 遠藤香織, 榎島 誠: ベンゾ[a]ピレン代謝におけるヒトCYP1A1の役割, 博多シンポジウム「内・外環境と生物応答」, 福岡, 2009年10月

10. 遠藤香織, 宇野茂之, 山田幸子, 榎島 誠 : 7-デヒドロコレステロール誘導体による選択的 LXR 作用機構, 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月
11. 宇野茂之, 遠藤香織, 榎島 誠 : ベンゾ[a]ピレン代謝活性化を抑制するヒト CYP1A1, 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月
12. 宇野茂之, 松縄 学, 赤木大輔, 遠藤香織, 榎島 誠 : 活性化ビタミン D3 による AhR-CYP1A1 誘導メカニズム増強作用, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010 年 12 月
13. 榎島 誠, 松縄 学, 赤木大輔, 遠藤香織, 宇野茂之 : ヒト単球系細胞株におけるビタミン D 受容体の生体異物代謝修飾, 第 63 回ビタミン学会大会, 広島, 2011 年 6 月
14. 青山 惇, 梅田(遠藤) 香織, 宮地弘幸, 榎島 誠, 橋本 祐一 : LXR リガンドの構造展開による選択的 IL-6 産生抑制剤の創成, 日本レチノイド研究会 第 22 回学術集会, 東京, 2011 年 11 月
15. 中馬真幸, 梅田(遠藤) 香織, 榛葉繁紀, 山田幸子, 榎島 誠 : Hairless によるリガンド選択的 VDR 活性の抑制作用, 日本レチノイド研究会 第 22 回学術集会, 東京, 2011 年 11 月

② 特別発表

なし

2 論文

① 原著論文

1. Endo K, Uno S, Seki T, Ariga T, Kusumi Y, Mitsumata M, Yamada S, Makishima M. Inhibition of aryl hydrocarbon receptor transactivation and DNA adduct formation by CYP1 isoform-selective metabolic deactivation of benzo[a]pyrene. *Toxicology and Applied Pharmacology* 230: 135-143, 2008
2. Uno S, Endo K, Jeong Y, Kawana K, Miyachi H, Hashimoto Y, Makishima M. Suppression of β -catenin signaling by liver X receptor ligands. *Biochemical Pharmacology* 77:186-195, 2009
3. Matsunawa M, Amano Y, Endo K, Uno S, Sakaki T, Yamada S, Makishima M. The aryl hydrocarbon receptor activator benzo[a]pyrene enhances vitamin D3 catabolism in macrophages. *Toxicological Science* 109:50-58, 2009
4. Uno S, Endo K, Ishida Y, Tateno C, Makishima M, Yoshizato K, Nebert DW. CYP1A1 and CYP1A2 expression: comparing 'humanized' mouse lines and wild-type mice; comparing human and mouse hepatoma-derived cell lines. *Toxicology and Applied Pharmacology* 237:119-126, 2009
5. Nunomura S, Endo K, Makishima M, Ra C. Oxysterol represses high-affinity IgE receptor-stimulated mast cell activation in Liver X receptor-dependent and -independent manners. *FEBS Letter* 584:1143-1148, 2010
6. Fukunaga M, Nunomura S, Nishida S, Endo K, Gon Y, Hashimoto S, Hashimoto Y, Okayama Y, Makishima M, Ra C. Mast cell death induced by 24(S),25-epoxycholesterol. *Experimental Cell Research* 316:3272-3281, 2010
7. Chuma M, Endo-Umeda K, Shimba S, Yamada S, Makishima M. Hairless modulates ligand-dependent activation of the vitamin D receptor-retinoid X receptor heterodimer. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35:582-587, 2012
8. Endo-Umeda K, Uno S, Fujimori K, Naito Y, Saito K, Yamagishi K, Jeong Y, Miyachi H, Tokiwa H, Yamada S, Makishima M. Differential Expression and

Function of Alternative Splicing Variants of Human Liver X Receptor α .
Molecular Pharmacology, 81:800-810, 2012.

9. Matsunawa M, Akagi D, Uno S, Endo-Umeda K, Yamada S, Ikeda K, Makishima M. Vitamin D Receptor Activation Enhances Benzo[a]pyrene Metabolism via CYP1A1 Expression in Macrophages. *Drug Metabolism and Disposition*, 40:2059-2066, 2012
10. Aoyama A, Endo-Umeda K, Kishida K, Ohgane K, Noguchi-Yachide T, Aoyama H, Ishikawa M, Miyachi H, Makishima M, Hashimoto Y. Design, synthesis, and biological evaluation of novel transrepression-selective liver X receptor (LXR) ligands with 5,11-dihydro-5-methyl-11-methylene-6H-dibenz[b,e]azepin-6-one skeleton. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55:7360-7377, 2012

② 症例報告

なし

③ 総説

なし

3 著書

なし