

令和元年6月24日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08284

研究課題名(和文)細胞のオキシステロール産生を調節するFBS由来因子の同定と新規情報伝達機構の解明

研究課題名(英文) Identification of regulation factor for oxysterol production in FBS and its nobel signal transduction

研究代表者

杉本 博之 (Sugimoto, Hiroyuki)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：00235897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：コレステロールが水酸化を受けたオキシステロール(25-ヒドロキシコレステロール(25-HC)など)はコレステロールやリン脂質合成酵素の転写を抑制する。本研究により、25-HCはこれら酵素のプロモーターに結合した転写促進因子NF- $\kappa$ Bとp300との結合を阻害し転写を抑制することを明らかにした。そこで、細胞内の25-HCの濃度の調節機構に関するコレステロールから25-HCを産生するコレステロール25-ヒドロキシラーゼ(CH25H)の細胞レベルでの活性制御に興味をもち研究を進めた。結果、FBS中にCH25Hの転写を抑制する因子の存在を見出し、現在精製中ではあるが、糖タンパクである事をつきとめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

25-HCは細胞膜を構成するコレステロールやリン脂質合成酵素の転写を抑制し、細胞増殖に深く関与することが推定される。また、マクロファージがインターフェロンにより刺激を受けるとCH25Hの転写が促進し、25-HCが放出され、paracrine様に25-HCが抗ウイルス作用を示すことが報告された(Cell Immunity, 2017)。本研究で見出した、FBS中のCH25H転写抑制因子の同定と治療目的の除去や阻害剤の開発は、ウイルス疾患や細胞増殖の盛んながんの治療、およびオキシステロールが脂肪酸合成を調節することからメタボリック症候群などの脂質代謝異常症などの治療への応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Oxysterols are hydrolyzed cholesterol and one of which such as 25-hydroxycholesterol suppressed transcription of rate limiting enzymes for cholesterol and phospholipid biosynthesis (phosphatidylethanolamine (PE)), HMG-CoA reductase and CTP: phosphoethanolamine citydyltransferase, respectively. In this study, 25-hydroxycholesterol was found to suppress the interaction between NF- $\kappa$ B and p300 on their enzyme promoters and suppressed their transcription. Therefore, we were interested in the regulation of 25-hydroxycholesterol concentration in cells and regulation of transcription and enzyme activity of cholesterol 25-hydroxylase which catalyze cholesterol to 25-hydroxycholesterol in cells. We found that unknown factors in fetal bovine serum suppressed transcription and enzyme activity of cholesterol 25-hydroxylase, are now trying to purify the factor which may be a glycoprotein.

研究分野：脂質生化学

キーワード：オキシステロール コレステロール25-ヒドロキシラーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜を構成する主な脂質は、リン脂質であるホスファチジルコリン(PC)やホスファチジルエタノールアミン(PE)およびコレステロールであり、これら脂質組成はほぼ一定に保たれている。これら脂質の調和ある合成調節機構を解明するため、はじめに PC 合成の律速酵素 CTP:phosphocholine cytidyltransferase (CT)の転写調節機構を解析し、TEF-4 や強力な転写促進因子 Ets-1 で転写調節を受けることを見出した (Sugimoto H et al. *J. Biol. Chem.* 276:12338-12344 (2001), *J. Biol. Chem.* 278:19716-19722 (2003), *J Biol Chem.* 280:40857-40866 (2005))。

そこで細胞膜の他の脂質にも興味を持ち、脂質合成の律速酵素がどのような転写や活性制御を受けているのか興味を持ち解析を進めた。その結果、コレステロール合成の律速酵素 HMG-CoA レダクターゼ (HMGR) および PE 合成の律速酵素 CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (ET)の転写や活性が、同様な容量依存性を示しながら、細胞培養液中の fetal bovine serum(FBS)濃度(0.5%~10%)を上げると抑制されることを見出した。そこで FBS に含まれるこれら律速酵素の転写抑制因子を同定し、この因子がリポタンパク質などに含まれるオキシステロール (25-hydroxycholesterol) (25-HC)であることを見出し報告した (Ando H, et al. *Biochim. Biophys. Acta* 1801: 487-495 (2010)), (11)。

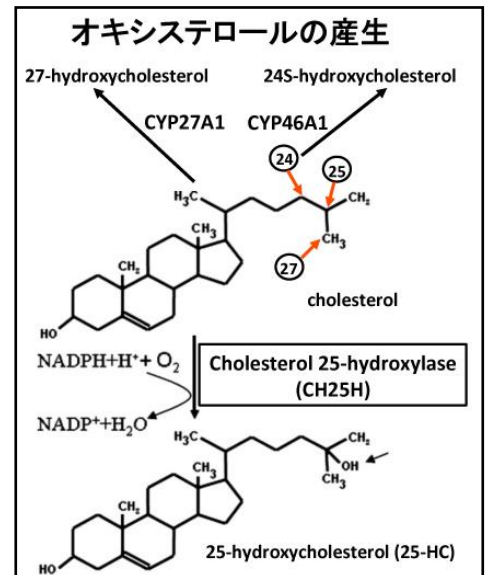
これまでの研究から LDL にはオキシステロールが含まれる事が知られている。しかしながら培養細胞内において、内因性に産生される 25-HC 濃度の調節機構およびコレステロールからのオキシステロール合成に関与する内因性酵素の転写および活性の制御機構の研究は少ない。そこで NIH3T3 細胞等の培養細胞レベルでも生理的条件下で細胞内オキシステロール量の変化がおきる可能性を考え、細胞内オキシステロール量の定量や、一連のオキシステロール合成の律速酵素の活性調節機構に興味を持ち、本研究遂行の着想に至った。

### 2. 研究の目的

生体内にはコレステロールがヒドロキシル化を受けた種々のオキシステロールが存在する。肝臓が産生し、血液中においては、リポタンパク質、特にLDLに取り込まれている事が知られている。研究代表者はfetal bovine serum (FBS)中のオキシステロールが培養細胞のコレステロールやホスファチジルエタノールアミン (PE)合成の律速酵素の転写や活性を抑制し、細胞膜脂質組成の調節に寄与することを見出し報告した (Ando H, et al. *Biochim. Biophys. Acta* 1801: 487-495 (2010)), (11)。そこで培養細胞自身が有する内因性オキシステロール合成の制御機構を解明するため研究を進めた。

### 3. 研究の方法

細胞内の主なオキシステロール産生経路は、コレステロールから「Cholesterol 25-hydroxylase (CH25H)や cytochrome3A (Cyp3A)による 25-HC の産生」、 「CYP27A1 による 27-HC の産生」、 「CYP46A1 による 24-HC の産生」が知られている(右上図)。そこでこれら一連のオキシステロール産生酵素の mRNA 量がどのような転写制御を受けるのか、細胞への FBS の添加で変化するのか否かを解析した。FBS 由来の各種精製分画を NIH3T3 細胞に添加後、これらオキシステロール産生酵素の mRNA 量を RT-PCR により測定し、FBS に由来する転写抑制因子の部分精製や精製を試みた。CH25H 酵素への抗体を作成するため、遺伝子情報か



らペプチドを作成し、ウサギを免疫することでCH25H への特異的抗体を作成し、western blot により細胞内でのタンパク質レベルでの発現を解析した。

#### 4. 研究成果

結果、これらオキシステロール産生酵素のなかでも、25-HC 合成に関与する CH25H が培養液中の FBS 濃度の増加 (0.5~10%) により転写や酵素活性が抑制されることを見出した。質量分析装置を用いた最近の研究からも、内因性 25-HC の産生や、Cholesterol-d7(重水素ラベル-コレステロール)からの 25-HC-d 産生も FBS 添加により抑制された。以上の結果から、研究代表者は FBS 中に CH25H の転写を抑制する因子が存在することを確信した。

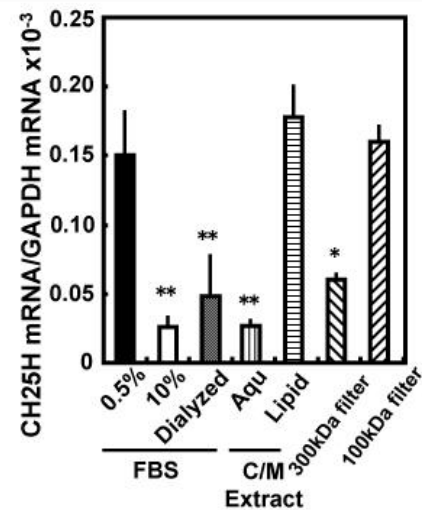
そこで、生成物阻害を考慮しオキシステロールを NIH3T3 細胞に添加したが、CH25H の転写レベルに変化はなかった。このことは同じ FBS が関与するが、血液に由来するオキシステロールが関与する HMGR や ET の転写抑制機構と CH25H の転写抑制機構は大きく異なることが推測された。

FBS 由来の精製分画を NIH3T3 細胞に添加し、CH25H の mRNA 量を RT-PCR により測定し、FBS に由来する転写抑制因子の精製を試みた。その結果、本抑制因子は Bligh-Dyer 法(クロロホルム・メタノール分画)の水溶性画分に存在し、分子量フィルター解析や、protease K および glycopeptidase F の処理により失活することから糖タンパク質ではないかと推測した。

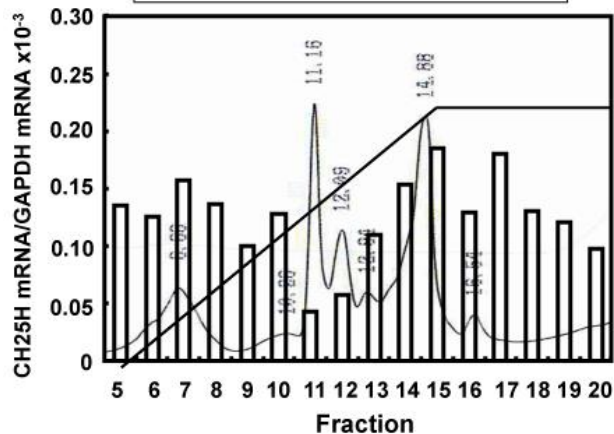
本抑制因子を精製するため、FBS から Bligh-Dyer 法の水溶性画分から得られた本抑制因子を、HPLC 逆相 C18 カラムにかけた。結果、本因子は逆相 C18 カラムに結合しアセトニトリルにより溶出する分子であった(右図)。

今後推測分子に即した糖タンパク質精製カラムによりさらに精製を進め、本大学で保有する質量分析装置(LC-MS/MS (Qtrap 5500 Sciex)、nanoLC-MS/MS(Triple-TOF/MS 6600、Sciex))により分子を同定する予定である。

FBS由来CH25H転写抑制因子の性質  
C/M抽出の水層に存在し、100kDa前後



C18-HPLCによる転写抑制因子の精製  
Fr.11に抑制因子が認められる



#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- (1) Horibata Y, Elpeleg O, Eran A, Hirabayashi Y, Savitzki D, Tal G, Mandel H, Sugimoto H. EPT1 (selenoprotein I) is critical for the neural development and maintenance of plasmalogen in humans. *Journal of Lipid Research*, 59: 1015-1026, 2018. (査読あり)
- (2) Itoh M, Nakadate K, Matsusaka T, Hunziker W, Sugimoto H.

Effects of the differential expression of ZO-1 and ZO-2 on podocyte structure and function. *Genes to Cells*. 23: 546-556, 2018. (査読あり)

(3) Horibata Y, Ando H, Satou M, Shimizu H, Mitsuhashi S, Shimizu Y, Itoh M, Sugimoto H. Identification of the N-terminal transmembrane domain of StarD7 and its importance for mitochondrial outer membrane localization and phosphatidylcholine transfer. *Scientific Report*, 7: 8793, 2017. (査読あり)

(4) Itoh M, Radisky D, Hashiguchi M, Sugimoto H. The exon 38-containing ARHGEF11 splice isoform is differentially expressed and is required for migration and growth in invasive breast cancer cells. *Oncotarget*, 8: 92157-92170, 2017. (査読あり)

(5) Nakamura Y, Shimizu Y, Horibata Y, Tei R, Koike R, Masawa M, Watanabe T, Shiobara T, Arai R, Chibana K, Takemasa A, Sugimoto H, Ishii Y. Changes of plasmalogen phospholipid levels during differentiation of induced pluripotent stem cells 409B2 to endothelial phenotype cells. *Scientific Report*, 7: 9377, 2017. (査読あり)

(6) Shimizu Y, Satou M, Hayashi K, Nakamura Y, Fujimaki M, Horibata Y, Ando H, Watanabe T, Shiobara T, Chibana K, Takemasa A, Sugimoto H, Anzai N, Ishii Y. Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry reveals changes of phospholipid distribution in induced pluripotent stem cell colony differentiation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409: 1007-1016, 2017. (査読あり)

(7) Horibata Y, Ando H, Zhang P, Vergnes L, Aoyama C, Itoh M, Reue K, Sugimoto H. StarD7 protein deficiency adversely affects the phosphatidylcholine composition, respiratory activity, and cristae structure of mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 291: 24880-24891, 2016. (査読あり)

(8) Satou M, Kaiya H, Nishi Y, Shinohara A, Kawada S, Miyazato M, Kangawa K, Sugimoto H. Mole ghrelin: cDNA cloning, gene expression, and diverse molecular forms in *Mogera imaizumii*. *General and Comparative Endocrinology*, 232: 199-210, 2016. (査読あり)

(9) Aso C, Araki M, Ohshima N, Tatei K, Hirano T, Obinata H, Kishi M, Kishimoto K, Konishi A, Goto F, Sugimoto H, and Izumi T. Protein purification and cloning of diacylglycerol lipase from rat brain. *Journal of Biochemistry*, 159: 585-97, 2016. (査読あり)

(10) Satou M, Nishi Y, Hishinuma A, Hosoda H, Kangawa K, Sugimoto H. Identification of activated protein C as a ghrelin endopeptidase in bovine plasma. *Journal of Endocrinology*, 224: 61-73, 2015. (査読あり)

(11) Ando H, Aoyama C, Horibata Y, Satou M, Mitsuhashi S, Itoh M, Hosaka K, Sugimoto H. Transcriptional suppression of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase by 25-hydroxylcholesterol is mediated by nuclear factor- $\gamma$  and Yin Yang 1. *Biochem J*. 471: 369-379, 2015. (査読あり)

[学会発表] (計 11 件)

(1) 安戸博美、堀端康博、青山智英子、杉本博之  
オキシステロールによるホスファチジルエタノールアミンおよびコレステロール合成の制御に

関与する転写因子の同定と機構解析

第 41 回日本分子生物学会

2018 年

(2) 堀端康博、Orly Elpeleg、平林義雄、Hanna Mandel、杉本博之

EPT1 はエタノールアミンプラズマローゲンの産生と維持に主要な役割を担い、脳神経系の正常な発達を司る

第 60 回日本脂質生化学会

2018 年

(3) 堀端康博、Orly Elpeleg、平林義雄、Hanna Mandel、杉本博之

プラズマローゲンの保持における EPT1 の役割とその変異による脳変性疾患

第 91 回日本生化学会

2018 年

(4) Hiroyuki Sugimoto

Regulation of cellular oxysterol-producing enzymes by a novel serum-derived factor BRIDGING DISCOVERY RESEARCH with THERAPIES (招待講演) (国際学会)

2017 年

(5) Hiromi Ando, Chieko Aoyama, Yasuhiro Horibata, Hiroyuki Sugimoto

25-hydroxycholesterol suppress the transcription of CTP:phosphoethanolamine

cytidyltransferase and HMG-CoA reductase by inhibiting interaction of p300 and NF-Y and H3K27 acetylation

BRIDGING DISCOVERY RESEARCH with THERAPIES (国際学会)

2017 年

(6) Chieko Aoyama, Hiromi Ando, Satoko Yamashita, Maki Arai, Hiroyuki Sugimoto

The analysis of cellular lysophospholipase D and interacting molecules

BRIDGING DISCOVERY RESEARCH with THERAPIES (国際学会)

2017 年

(7) 堀端康博、安戸博美、青山智英子、佐藤元康、清水泰生、伊藤雅彦、杉本博之

StarD7 が有する膜貫通領域の同定とミトコンドリア局在および PC 輸送における役割

第 59 回脂質生化学会

2017 年

(8) 堀端康博、伊藤雅彦、Peixiang Zhang、Laurent Vergnes、安戸博美、青山智英子、Karen Reue、杉本博之

StarD7 によるミトコンドリアのホスファチジルコリン組成および機能と形態形成の維持

第 58 回日本脂質生化学会

2016 年

(9) 安戸博美、青山智英子、堀端康博、佐藤元康、伊藤雅彦、杉本博之

オキシステロールによるホスファチジルエタノールアミンおよびコレステロール合成の制御に関与する新規転写因子の同定と機能解析

第 58 回日本脂質生化学会

2016 年

(10) Hiromi ando, Cheko Aoyama, Yasuhiro, Horibata, Masahiko Itoh, Hiroyuki Sugimoto

Oxysterol derivatives and transcriptional factors regulating phosphatidylethanolamine and cholesterol biosynthesis

第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会・合同会

2015 年

(11) Chieko Aoyama, Hiromi Ando, Satoko Yamashita, Hiroyuki Sugimoto

The analysis of intercellular lysophospholipase D consist of G alpha-Gbeta complex and other interacting molecules

第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会・合同会

2015 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：安戸 博美

ローマ字氏名：Ando Hiromi

所属研究機関名：獨協医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：10704885

### (2) 研究分担者

研究分担者氏名：青山智英子

ローマ字氏名：Aoyama Chieko

所属研究機関名：獨協医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：90420778

### (2) 研究協力者      なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。