

令和 2 年 2 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15266

研究課題名(和文) 脂質代謝制御因子Insigによる新規代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) The novel function of Insig; acting as a mediator for stress response by oxysterol.

研究代表者

渡邊 雄一 (Watanabe, Yuichi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：70792729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、酸化ステロールによりストレス応答性の転写因子ATF4の発現が亢進することが報告された。しかし、その詳細なメカニズムは不明であった。本研究成果により、酸化ステロールによるATF4発現亢進には、Insigの発現が重要でありATF4の下流遺伝子特にアポトーシス関連遺伝子の発現にも影響を及ぼすことが明らかになった。さらに、その応答変化が細胞生存率に影響することが示唆された。また、ヒト肝がん由来細胞を用いた解析においても同様の応答変化を示しており、細胞腫によらない応答であることが示された。これらの研究成果は、酸化ステロール-Insigによる細胞内応答機構に新たな知見を加えるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸化ステロール-Insigによる細胞内応答機構は脂質代謝制御や抗ウイルス機能など様々な機能が報告されてきた。本研究成果は、酸化ステロール-Insigによる細胞内応答機構に新たな知見を加えるものであり、その学術的意義は大きい。また、近年では動脈硬化や脂肪肝など代謝異常症における酸化ステロールの蓄積等が注目されるなか、本研究成果で明らかとした新規機能はそれら失調の治療や予防のターゲットとなる可能性を有しており、社会に与えるインパクトも大きいものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recently, it was reported that several oxysterols, especially 25-hydroxycholesterol, promote the stress-inducible transcription factor ATF4 expression. However, the precise of that induction mechanism was unclear. In this study, we revealed that Insig was involved in this ATF4 induction by oxysterol. Moreover, we also revealed that ATF4 induced by oxysterol selectively promoted the expression of pro-apoptotic gene expressions. Lacking Insig reduced these promoted reactions and improved the cell viability. This information is the novel function induced by Insig-oxysterol interaction.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：酸化ステロール Insig ATF4 細胞死

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

コレステロールは生体内において ROS などによる化学的な反応や CYP などによる酵素反応により代謝され、様々な酸化ステロールへと変換される。このように生成された酸化ステロールは CYP7A1 や CYP27A1 などにより胆汁酸へと代謝される。酸化ステロールはこれまで胆汁酸生成経路における中間産物の一つであると考えられてきた。しかしながら、近年これら酸化ステロールをリガンドとする GPCR の発見や核内受容体等の発見により、ただの中間産物ではなく、それ自体が生理活性を有する分子であると考えられるようになった。

これら酸化ステロールのうち 25-hydroxycholesterol (25HC) は生体内においてコレステロール代謝を最も強力に制御する因子の一つとしても機能しており、Insig はその機能メディエーターとして働く小胞体膜タンパク質である。Insig は酸化ステロールと結合することで、SREBP 活性制御や HMG-CoA 還元酵素の分解制御を介した脂質代謝調節を担う。Insig はこれら脂質代謝制御以外にも、抗ウイルス機能を有するタンパク質の制御に関わるなど、多様な機能を有している。近年、この 25HC によりストレス応答性の転写因子 ATF4 が誘導されることが報告された。ATF4 はアミノ酸代謝関連遺伝子や糖脂質代謝関連遺伝子、アポトーシス関連遺伝子などの発現を調節することで生体内恒常性の維持を担っている。しかしながら、この酸化ステロールによる ATF4 発現機序の詳細については不明であった。

### 2. 研究の目的

研究代表者は酸化ステロールによる ATF4 発現において Insig が関与することを示唆する結果を得た。本研究では酸化ステロール-Insig による新機能の解明を目的として、Insig と酸化ステロールによる ATF4 発現調節機構について解析を試みた。

### 3. 研究の方法

本研究では、主に Chinese hamster 卵巣由来の CHO-7 細胞とその Insig 欠損株 SRD-15 を用いて解析を行った。

#### (1) ATF4 発現を亢進する酸化ステロールの同定と Insig の関連解析

CHO-7 細胞及び SRD-15 細胞に 7 種の酸化ステロール (5  $\mu$ M) を処理し、これらの酸化ステロール添加による ATF4 発現応答を解析した。さらに、CHO-7 細胞と SRD-15 細胞間での応答差を比較することで、Insig の発現が与える酸化ステロールによる ATF4 発現応答への影響を解析した。

また、SRD-15 細胞に Insig の二つのアイソフォーム Insig1 と Insig2 をそれぞれレンチウイルスベクターにより発現させ、酸化ステロールに対する ATF4 発現応答変化をイムノプロット法により解析した。

#### (2) 酸化ステロールによる ATF4 発現亢進が下流遺伝子発現に与える影響解析

Insig を介した酸化ステロールによる ATF4 発現亢進が ATF4 標的遺伝子の発現に及ぼす影響を明らかにするために、25HC (5  $\mu$ M) を 12、18、24 時間処理後の各種遺伝子発現変動を RT-qPCR 法により解析した。

#### (3) 酸化ステロールによる細胞死に Insig が与える影響の解析

CHO-7 細胞並びに SRD-15 細胞における 25HC (5  $\mu$ M)、48 時間処理後の細胞生存率を MTT assay により測定し、Insig を介した酸化ステロールによる ATF4 発現、さらにそれに伴うアポトーシス関連遺伝子の発現亢進が細胞死に影響を及ぼすのか検証した。

#### (4) ヒト肝がん由来細胞 HuH-7 細胞を用いた検証

酸化ステロールによる Insig を介した ATF4 発現亢進が種を超えて保存されているかを検討するため、ヒト肝がん由来細胞 HuH-7 細胞を用いて CRISPR/Cas9 システムにより Insig 欠損株を樹立し、酸化ステロール 25HC (15  $\mu$ M) に対する応答変化を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) ATF4 発現を亢進する酸化ステロールの同定と Insig の関連解析

酸化ステロールによる ATF4 発現亢進に Insig の発現が関与するのか、また ATF4 発現亢進に寄与する酸化ステロールを同定するため、CHO-7 細胞及び SRD-15 細胞を 7 種の酸化ステロールで処理した際の ATF4 発現をイムノプロット法により解析した。その結果、CHO-7 細胞において Insig 結合能の高い 25HC、27HC (27-hydroxycholesterol)、24SHC (24S-hydroxycholesterol) の三種の酸化ステロールにより ATF4 の発現が顕著に亢進した。一方、Insig 欠損株 SRD-15 細

胞では ATF4 発現亢進のポジティブコントロールであるサブシガルジンの処理により ATF4 の発現は亢進したものの、これら三種の酸化ステロールによる ATF4 発現亢進は顕著に減弱した。また、SRD-15 細胞を用いた Insig のレスキュー実験により、Insig の発現回復が ATF4 発現に与える影響を解析した。その結果、Insig1、Insig2 いずれの発現においても酸化ステロールによる ATF4 発現亢進が回復した(図 1)。これらの結果から、酸化ステロールによる ATF4 発現亢進は Insig を介して行われていること、またこれらの応答において Insig1 と Insig2 は同等の機能を有することが示唆された。

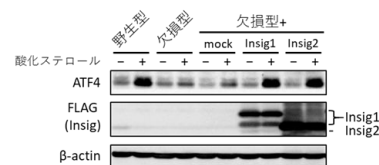


図1. Insigの発現と25HCによるATF4応答

### (2) 酸化ステロールによる ATF4 発現亢進が下流遺伝子発現に与える影響解析

ストレス応答性の転写因子である ATF4 は各種ストレスに対応し、アミノ酸代謝関連遺伝子やアポトーシス関連遺伝子など様々な遺伝子の発現を制御する。そこで、酸化ステロール、とくに 25HC によって発現が亢進した ATF4 が下流遺伝子の発現に及ぼす影響について、その遺伝子発現変動を解析した。

その結果、CHO-7 細胞においてアミノ酸代謝関連遺伝子の発現に比べ、アポトーシス関連遺伝子の発現は 25HC により時間依存的に強く誘導された。さらにこの発現誘導は SRD-15 細胞において有意に減弱していた。これらの結果から、25HC により亢進した ATF4 は選択的にアポトーシス経路を誘導することが示唆された。

### (3) 酸化ステロールによる細胞死に Insig が与える影響の解析

Insig 欠損による酸化ステロール 25HC に対する応答変化が細胞生存率に及ぼす影響を MTT アッセイにより解析した。その結果、48 時間の 25HC の処理により CHO-7 細胞においては顕著に細胞生存率が低下したのに対し、SRD-15 細胞においてその低下はわずかであった(図 2)。このことから、Insig の発現は 25HC による細胞死にも影響を及ぼすことが示唆された。

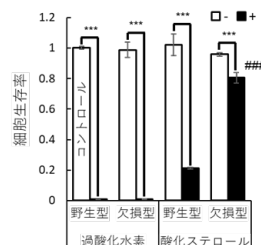


図2. 25HCによる細胞生存率変化

### (4) ヒト肝がん由来細胞 HuH-7 細胞を用いた検証

HuH-7 細胞 (WT)並びに CRISPR/Cas9 システムにより樹立した Insig 欠損株 Insig1 KO および Insig2 KO に 25HC を 24 時間処理した際の ATF4 発現応答及び ATF4 標的遺伝子の発現変動を解析した。その結果、CHO-7 細胞と SRD-15 細胞の時同様、WT において 25HC の処理により発現が亢進した ATF4 は Insig の欠損によりその発現亢進が減弱した。さらに、ATF4 標的遺伝子 *CHOP* の発現も WT で 25HC の処理により発現が亢進し、Insig1 KO 及び Insig2 KO でその発現亢進が減弱した(図 3)。

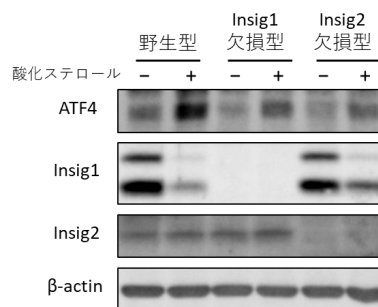


図3. HuH-7細胞における25HC応答変化

以上のデータより、25HC による ATF4 発現亢進には、Insig の発現が重要であり ATF4 の下流遺伝子特にアポトーシス関連遺伝子の発現にも影響を及ぼすことが明らかになった。さらに、その応答変化が細胞生存率に影響することが示唆された。また、ヒト肝がん由来細胞を用いた解析においても同様の応答変化を示しており、細胞腫によらない応答であることが示された。

酸化ステロール-Insig による細胞内応答機構は脂質代謝制御や抗ウイルス機能など様々な機能が報告されてきた。本研究成果は、酸化ステロール-Insig による細胞内応答機構に新たな知見を加えるものであり、その学術的意義は大きい。また、近年では動脈硬化や脂肪肝など代謝異常症における酸化ステロールの蓄積等が注目されるなか、本研究成果で明らかとした新規機能はそれら失調の治療や予防のターゲットとなる可能性を有しており、社会に与えるインパクトも大きいものであると考えられる。現在、以上の内容をまとめて論文投稿準備中である。

## 5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 5 件)

渡邊 雄一、三吉 翔子、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎、酸化ステロールは Insig を介して細胞死を誘発する、日本農芸化学会 2019 年度大会、2019

渡邊 雄一、三吉 翔子、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎、酸化コレステロールは Insig を介して ATF4 発現を亢進する、第 60 回 日本脂質生化学会、2018

渡邊 雄一、三吉 翔子、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎、酸化コレステロール結合タンパク質 Insig1/2 による ATF4 発現亢進機構の解明、日本農芸化学会 2018 年度大会、2018

渡邊 雄一、三吉 翔子、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎、酸化コレステロールは Insig2 を介して ATF4 の発現を誘導する、2017 年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017)、2017

三吉 翔子、渡邊 雄一、清水 誠、山内 祥生、佐藤 隆一郎、酸化コレステロールは Insig2 を介して ATF4 の発現を制御する、日本農芸化学会 2017 年度大会、2017

## 6 . 研究組織

なし

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。