

機関番号：82601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590116

研究課題名(和文) 核内受容体 LXR 選択的モジュレーターによる特異的 HDL 上昇の分子機構

研究課題名(英文) Molecular basis for cell-type specific HDL generation by selective LXR modulators

研究代表者

最上 知子 (NISHIMAKI-MOGAMI TOMOKO)

国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学部・室長

研究者番号：90174333

研究成果の概要 (和文)：核内受容体 LXR は HDL 産生トランスポーター ABCA1 の発現を促進するが、lipogenesis を亢進することから、細胞組織・遺伝子選択的モジュレーターの開発が期待されている。本研究では LXR/RXR 選択的モジュレーターの分子機構を解析し、以下の知見を得た。LXR $\alpha$  アゴニスト/LXR $\beta$  アンタゴニスト Riccardin C による転写活性化には、LXR $\alpha$  のヘリックス 3-7 と 327 位のアラニンが決定的な役割を持つ。また RXR アゴニスト PA024、HX630、トリブチルスズは LXR/RXR を活性化する能力が異なり、細胞選択的に ABCA1 発現と HDL 産生を促進する。

研究成果の概要 (英文)：Nuclear receptor LXR stimulates HDL-generating ABC transporter A1 (ABCA1) expression. However, because LXR also enhances lipogenesis, cell-type or gene-selective LXR modulates may be promising strategies. We previously identified Riccardin C as a LXR $\alpha$  agonist/LXR $\beta$  antagonist that functions as a cell-type selective modulator. In this study, we investigated molecular basis of selective LXR/RXR modulators and showed the followings. Helix 3-7 of LXR $\alpha$  and Ala327 in this region play critical roles in Riccardin C-induced LXR $\alpha$  transactivation. The RXR agonists PA024, HX630, and tributyltin have different abilities to activate LXR/RXR, resulting in cell-type specific inductions of ABCA1 expression and HDL generation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	0	1,400,000
2009年度	1,100,000	0	1,100,000
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	0	3,600,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：核内受容体、LXR、HDL、選択的モジュレーター、ABCA1、PPAR $\gamma$ 、RXR

## 1. 研究開始当初の背景

低 HDL 血症は単独でも、またメタボリックシンドロームの危険因子として肥満・糖尿病などと複合すると相乗的に動脈硬化の発症率を高める。HDL は直接に粥状硬化病巣

を退縮する効果を示すことが実証され、HDL 上昇薬が待望されている。HDL 上昇の分子標的として最も有力視されるのが核内受容体 LXR (liver X receptor) である。LXR はコレステロールを感知する核内受容体であり、



LXR $\beta$  アンタゴニストのユニークな特性を示すことを見いだしている(Tamehiro et al., *FEBS Lett*, 579:5299-5304, 2005)。CV-1 細胞に LXR/RXR 発現ベクターおよび LXR 応答配列 (LXRE) をプロモーターに含むルシフェラーゼベクターを導入しレポーターアッセイを行うと、Riccardin C は 30  $\mu$ M までの範囲で濃度依存的に LXR $\alpha$ /RXR を活性化するが、LXR $\beta$ /RXR には全く活性を示さない。そこで LXR $\alpha$  と LXR $\beta$  のキメラ受容体を調製し検討した。LXR $\alpha$  と LXR $\beta$  の DNA 結合領域 (DBD) およびリガンド結合領域 (LBD/AF-2) のアミノ酸は 78% が相同である。LXR $\alpha$  の 127 位から 249 位までのアミノ酸 (AF-1 領域の一部、DBD、および LBD のヘリックス 1 から 2 を含む) (#1)、250 位から 346 位 (ヘリックス 3-7 を含む) (#2)、347 位から C 末端まで (ヘリックス 7-12 を含む) (#3) を LXR $\beta$  型に置換したキメラ受容体を作成した。キメラ受容体#1 および#3 は Riccardin C に対して LXR $\alpha$  と全く変わらない活性を示した。しかしヘリックス 3-7 を LXR $\beta$  に置換した#2 は、22R-HC および TO-901317 により変わらず活性化されるものの、RC による活性が完全に消失した。逆に LXR $\beta$  の同領域を LXR $\alpha$  型アミノ酸に置換したキメラ受容体#5 では LXR $\alpha$  の活性が約 40% まで復活し、この領域に RC による活性化に必要なドメインが存在することが判明した。LXR $\beta$  の#1 に相当する領域を LXR $\alpha$  に置換したキメラ受容体#4、#3 相当のキメラ#6 は Riccardin C には全く活性を示さなかった。

Riccardin C による活性化に必要な LXR $\alpha$  のヘリックス 3-7 領域には、LXR $\beta$  と相違するアミノ酸が 17 残基存在する。これらを LXR $\beta$  型のアミノ酸に転換した変異体を 17 種類作成し、Riccardin C による活性化を検討したところ、327 位のアラニンをヒスチジンに変異することにより活性が約 1/3 に低下することを見いだした。275 位のスレオニンをアラニンに、294 位のアラニンをスレオニンに、297 位のバリンをイソロイシンの変異した場合には、活性が約 20-30% 低下したが、その他の変異体においては活性低下は認められなかった。Riccardin C への活性が著しく低下した A327H 変異受容体は、LXR $\alpha$  と LXR $\beta$  のどちらでも活性化できる合成アゴニスト TO901317 や生理リガンドである 22R-HC に対しては、野生型と同程度の活性を示した。したがって、A327H は Riccardin C が LXR $\alpha$  を選択的に活性化する上で重要なアミノ酸であると考えられる。

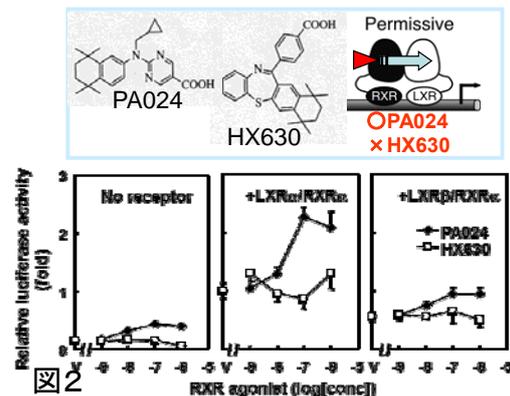
上述したように LXR $\beta$  のヘリックス 3-7 領域を LXR $\alpha$  に置換したキメラ受容体#5 は、Riccardin C に対して LXR $\alpha$  の約 40% の活性を示したが、この場合にも A327H 変異によ

り活性がさらに 1/2 低下することが判明した。逆に、LXR $\beta$  の 327 位のヒスチジンを LXR $\alpha$  型のアラニンに転換しても Riccardin C による活性は認められないままであった。しかしながら LXR $\alpha$  のヘリックス 3-7 領域を LXR $\beta$  に置換し活性を失ったキメラ受容体#2 に H327A 変異を導入すると、RC による活性化が認められた。したがって、LXR $\beta$  では 327 位のヒスチジンのかさ高さ、あるいは荷電が障害となり、RC が活性化できない可能性が推定される。

核内受容体はリガンド結合により構造が変化してコアクチベーターと複合体を形成することにより転写を活性化できるようになる。Riccardin C は LXR $\alpha$  と LXR $\beta$  のどちらにも結合するが、LXR $\alpha$  の場合のみコアクチベーター SRC-1 との会合を誘導する (Tamehiro et al., *FEBS Lett*, 579: 5299-5304, 2005)。そこで LXR $\alpha$  への A327H 変異導入の影響を検討した。LXR $\alpha$  の LBD と GST を融合したリコンビナントタンパクと TAMRA で蛍光標識 SRC-1 の部分ペプチド (ILRKLLQE) の会合を、蛍光偏光法により測定した。A327H 変異は、生理リガンド 22R-HC が誘導する会合には影響しなかったが、Riccardin C が誘導する会合を 20-50% 低下させた。したがって、A327H 変異は Riccardin C による LXR $\alpha$  の構造変化とコアクチベーターとの会合に影響することが推定された。

## (2) RXR アゴニストによる LXR/RXR の選択的活性制御

### ① RXR アゴニスト PA024 と HX630 は LXR/RXR 活性化能が異なる



PA024 と HX630 はそれぞれジベンゾジアゼピン骨格、ジフェニルアミン骨格をもつ RXR アゴニストであり (図 2)、RAR/RXR を RAR アゴニスト共存下に synergistic に活性化する能力が見いだされていた。PPAR/RXR あるいは LXR/RXR は permissive ヘテロダイマーに分類され、RXR アゴニスト単独で活性化されると考えられてきた。しかしながら、LXR/RXR を共発現した LXRE レポーターア

ッセイ系において、PA024 (10-100 nM) は LXR $\alpha$ /RXR を活性化するが HX630 は全く効果を示さないことを見いだした。PA024 と HX630 の両者とも LXR $\beta$ /RXR には効果を示さず、PPAR $\gamma$ /RXR を活性化した。したがって、HX630 はヘテロダイマー選択性を示すことが判明した。

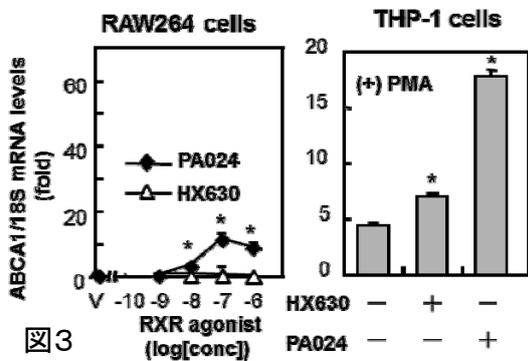


図3

マウスマクロファージ系細胞 RAW264 において、PA024 は ABCA1 mRNA 発現を強力に促進した(図3)。PA024 の効果は 100 nM がピークでありコントロールに比較して約 12 倍の増加が観察されたが、HX630 は 1 mM まで全く効果を示さなかった。ヒト単球由来細胞 THP-1 の場合にも、PA024 (100 nM) は約 7 倍の発現誘導効果を示したが、HX630 (100 nM) は効果を示さなかった。しかしながら、PMA でマクロファージ様に分化した THP-1 細胞では、HX630 (100 nM) は約 1.6 倍、PA024 (100 nM) は約 4 倍 ABCA1 mRNA 発現を促進した。さらに分化 THP-1 細胞において、アポ A-I に依存した細胞コレステロールの放出 (HDL 産生) を同濃度の PA024 は約 3.4 倍、HX630 は約 2 倍促進する効果を示した。

細胞依存的なリガンド機能発現のメカニズムを明らかにするために、ABCA1 プロモーター活性への影響をレポーター遺伝子アッセイで調べた。RAW264 細胞および未分化の THP-1 細胞では PA024 により ABCA1 プロモーター活性がそれぞれ約 4 倍、約 1.8 倍促進され、その効果はプロモーターの LXRE に変異を導入することにより消失した。HX630 はいずれの細胞でも全く活性に影響しなかった。分化した THP-1 細胞へのレポーター遺伝子導入は困難であった。したがって、PA024 は LXR 応答配列依存的に ABCA1 遺伝子の転写を促進する活性を示すが、HX630 の効果は細胞に依存しており、HX630 が細胞選択的に LXR/RXR を活性化する可能性が示唆された。

もう一つは、HX630 が PPAR-LXR-ABCA1 経路を活性化して ABCA1 mRNA 発現を促進する可能性がある。PPAR は活性化されると標的の LXR $\alpha$  mRNA 発現を促進するこ

とが知られる。また、PPAR $\gamma$  mRNA の発現は RAW264 細胞および THP-1 細胞では著しく低いが、THP-1 細胞では分化に伴い発現が上昇した。上述したように RAW264 細胞では HX630 は ABCA1 プロモーターを活性化できない。しかしながら、PPAR $\gamma$  を共発現すると、HX630 は PPAR $\gamma$  ベクター量に応じて LXRE レポーターならびに ABCA1 プロモーターの活性を増大した。したがって、PPAR $\gamma$  が発現している細胞では、HX630 は PPAR $\gamma$ /RXR を活性化することにより LXR 発現量を増加し、ABCA1 転写を促進すると解釈できる。HX630 が LXR/RXR を直接活性化できるか否かが細胞により異なる可能性よりは、PPAR $\gamma$  発現の違いにより PPAR-LXR-ABCA1 経路を活性化する能力に差が生じ、HX630 の細胞選択性が出現する可能性が大きいと思われる。

## ② トリブチルスズ (TBTC) による LXR/RXR 活性化と ABCA1 発現、HDL 産生の促進

トリブチルスズ (TBTC) は内分泌攪乱物質として環境への蓄積と生体影響が懸念されている。TBTC は RXR に結合し (le Maire et al. *EMBO report*, 10:367-73, 2009)、PPAR $\gamma$ /RXR を活性化する能力を持つことが知られている (Kanayama et al., *Mol. Pharmacol.*, 67: 766-74, 2005)。TBTC が LXR/RXR を活性化できるかレポーターアッセイで検討したところ TBTC は 100 nM をピークとして PA024 を上回る強さで LXR $\alpha$ /RXR を活性化すること、LXR $\beta$ /RXR は活性化しないことが判明した。TBTC は RXR/RXR を極めて強力に活性化すること (100 nM でコントロールの約 40 倍)、in vitro で LXR $\alpha$  とコアクチベーターとの会合を誘導しないことから、RXR に結合して LXR $\alpha$ /RXR を活性化すると推定される。さらに TBTC は 100 nM をピークとする濃度範囲において RAW264 マクロファージの ABCA1 遺伝子プロモーターを LXR 応答配列依存的に活性化し、ABCA1 の mRNA・タンパク発現を上昇し、HDL 産生を促進する活性を示した。RXR アゴニストが LXR/RXR を活性化できるか否かは、その化学構造に強く依存するが、TBTC は極めて低濃度で強力に LXR/RXR を活性化し、HDL 産生とともに細

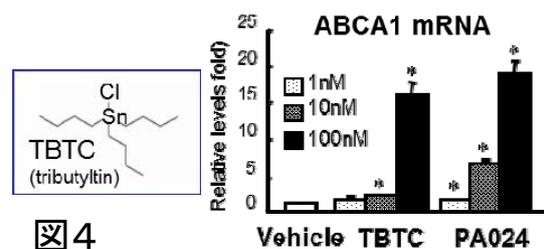


図4

胞コレステロール放出を制御する能力が判明した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Nishimaki-Mogami T, Tamehiro N, Sato Y, Okuhira K, Sai K, Kagechika H, Shudo K, Abe-Dohmae S, Yokoyama S, Inoue K, Sawada J.  
The RXR agonists PA024 and HX630 have different abilities to activate LXR/RXR and to induce ABCA1 expression in macrophage cell lines. *Biochem Pharmacol* 2008; **76**:1006-1013.
- ② Okuhira K, Fitzgerald ML, Tamehiro N, Ohoka N, Suzuki K, Sawada JI, Naito M, Nishimaki-Mogami T.  
Binding of PDZ-RhoGEF to ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) induces cholesterol efflux through RhoA activation and prevention of transporter degradation. *J Biol Chem* 2010; **285**: 16369-16377
- ③ Cui H, Okuhira K, Ohoka N, Naito M, Kagechika H, Hirose A, Nishimaki-Mogami T.  
Tributyltin chloride induces ABCA1 expression and apolipoprotein A-I-mediated

cellular cholesterol efflux by activating LXRalpha/RXR. *Biochem Pharmacol*. 2011; **81**: 819-824

- ④ 最上(西巻)知子 HDL 産生トランスポーターABCA1 の肝での二重転写制御機構  
*生化学* 2010; **82**:852-856

[学会発表] (計 3 件)

- ① 最上(西巻)知子: 核内レセプターと胆汁酸・脂質代謝 第 30 回胆汁酸研究会サテライトシンポジウム (2008.10)
- ② Tomoko Nishimaki-Mogami: Liver X receptor (LXR) modulators: potential therapeutic agents for raising HDL levels and protecting against atherosclerosis 第 41 回日本動脈硬化学会総会(シンポジウム) (2009.7)
- ③ Tomoko Nishimaki-Mogami: Regulation of human hepatic ABCA1 gene expression by sterols 第 42 回日本動脈硬化学会総会(シンポジウム) (2010.7)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

最上 知子 (Tomoko Nishimaki-Mogami)  
国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学部・室長  
研究者番号 : 9 0 1 7 4 3 3 3