

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07329

研究課題名（和文）コレステロール誘導体による生体内脂質の新規合成制御機構の解明

研究課題名（英文）Identification of a novel regulatory mechanism for phospholipid and cholesterol biosynthesis by cholesterol derivatives.

研究代表者

安戸 博美（Ando, Hiromi）

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：10704885

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：ホスファチジルエタノールアミン(PE)は細胞膜を構成する主要な脂質である。PE合成の律速酵素ETの転写制御機構に注目した。25-ヒドロキシコレステロール(25-HC)等のコレステロール誘導体は転写因子NF-YによるETプロモーター領域へのp300のリクルートとヒストンアセチル化を抑制し、ETの転写を抑制した。本研究でp300とNF-YBの直接の結合は確認できなかった為、DNA pull down assay法を用いてプロモーター領域に結合するタンパク質を解析した。ETプロモーターへのp300、NF-YBの結合を確認し、25-HCによりp300の結合は低下したがNF-YBの結合は低下しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳動物の細胞膜は主に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)などのリン脂質で構成される。これら脂質の組成比が一定である事は細胞膜の安定性に大きく関与し、「PC/PE比の異常」は強く疾患と関係する。肝臓の場合、脂肪肝や肝不全となる。そのため、PC、PEの合成制御機構の解明は上記の疾患の理解に繋がると考えられるが、PC合成の律速酵素CTに比べ、PE合成の律速酵素ETの転写制御機構は未だ不明な点が多く残っている。したがって、PE合成制御機構の解明により上述の疾患の発生機構の理解や治療応用への基礎的な知見を得ることができる。

研究成果の概要（英文）：Phosphatidylethanolamine (PE) is a major phospholipid component of mammalian cell membranes. CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (ET) is a rate-limiting enzyme of PE biosynthesis. Previously, I reported that oxysterols such as 25-hydroxycholesterol (25-HC) suppress ET transcription. The transcription of ET is decreased by 25-HC via the inhibition of p300 recruitment to the ET promoter by NF-Y and suppression of histone acetylation. In this study, direct binding of p300 and NF-YB was not observed. Therefore, I performed DNA pull down assay and showed that p300 and NF-YB bound to the ET promoter, and 25-HC suppressed p300 binding to the ET promoter, but not NF-YB.

研究分野：脂質生物学

キーワード：リン脂質 コレステロール 細胞膜 ヒストンアセチル化 p300

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜を構成する主な脂質に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が存在する。細胞膜のこれら脂質の組成比が一定である事は細胞膜の安定性に大きく寄与する。特に PC と PE のバランスは重要であり、それら脂質の絶対量の変化よりも「PC/PE 比の異常」がより強く疾患と関係し、脂肪肝や肝不全を引き起こす事が明らかになってきた (van der Veen et al. BBA 2017)。PE は、合成の律速酵素 CTP:ホスホエタノールアミンシチジルリルトランスフェラーゼ(ET)による酵素反応の産物 CDP-エタノールアミンと、ジアシルグリセロールから合成される。これまでに ET の転写を制御する転写因子等がいくつか明らかになった (Bakovic et al. Int. J Mol.Sci 2013)。しかし、PC 合成の律速酵素 CTP:ホスホコリンシチジルリルトランスフェラーゼ  $\alpha$  (CT $\alpha$ ) に比べ、ET の転写制御機構には未だ不明な点が多く残っている。

研究代表者らはコレステロールがヒドロキシル化を受けたオキシステロールにより、ET やコレステロール合成の律速酵素 HMG-CoA レダクターゼ (Hmgcr) の転写が抑制される事を明らかにしてきた (Ando et al. BBA 2010)。その後、転写促進因子 NF-Y が ET, Hmgcr のプロモーター領域に結合し転写を促進する事、オキシステロールがその転写促進作用を抑制する事を見出した (Ando et al. BJ 2015)。さらにオキシステロールが NF-Y による「ET, Hmgcr プロモーター領域のヒストンのアセチル化」を抑制し、転写を制御している事も見いだした (Ando et al. SBMB 2019) (図1)。しかし、オキシステロールがどのような機構により NF-Y の転写促進作用を抑制するのか詳細な分子基盤は不明であり、その解明は PE 合成制御機構の解明につながる重要な課題である。

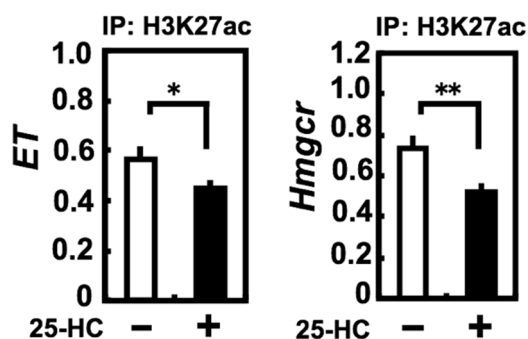


図1 ET, Hmgcr プロモーターのヒストンアセチル化がオキシステロール (25-HC) により低下 (ChIP assay)

### 2. 研究の目的

本研究の目的は細胞膜の主要な脂質である PE とコレステロールの、オキシステロールによる合成制御機構を詳細に調べる事である。オキシステロールによる転写制御機構は SRE や LXR を介する機構が広く知られているが、これまでの結果より全く新しい転写制御機構によって合成制御が行われると予想される。その新規転写制御機構の解明を PE 量の調節に応用し、PC/PE 比の異常に起因する疾患の治療へ応用可能な基礎的知見を得る。さらに、脂肪肝や高コレステロール血症などの PC/PE 比の異常と関連する疾患の治療に応用が可能か検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1) ET および Hmgcr のオキシステロールによる転写抑制機構の解明

転写促進因子 NF-Y は ET や Hmgcr のプロモーターに結合し、ヒストンアセチル化酵素 p300 をリクルートする。p300 はヒストンの H3Lys27 部位をアセチル化し転写を正に制御する。代表的なオキシステロールである 25-ヒドロキシコレステロール (25-HC) はこの p300 のリクルート、ヒストンアセチル化を阻害し転写を抑制する。研究代表者による以上の結果を踏まえ、p300 と NF-Y の直接の結合を免疫沈降 (IP) によって確認し、その結合が 25-HC により阻害されるのが確認する。

また、p300 と NF-Y が形成する巨大な転写因子複合体中のいずれかの因子が p300 と NF-Y との相互作用に関与していると考え、その因子を同定する。NF-Y 抗体を用いて IP を行い、転写因子複合体を回収する。その複合体を nano LC-MS/MS で解析し、構成タンパク質の詳細を同定する。さらに 25-HC 添加の有無により複合体を構成するタンパク質の違いを見出し、オキシステロールによる転写抑制機構にどのようなタンパク質が関与するのかを同定する。

#### (2) PE の合成制御により細胞膜 PC/PE の比の異常が改善されるのか

PC/PE 比の低下により発生したマウスの脂肪肝、肝不全がその量比を人為的に正常に戻すことで改善するという報告がある (Li et al. Cell metab 2006)。上記の事象を検討するため、PC 合成の律速酵素 CTα の KO 細胞を作成し PC、そして PC/PE 比を低下させる。そこにオキシステロールを投与し PE を低下させ、PC/PE 比が正常に戻るのか確認する。

#### 4. 研究成果

p300 と NF-Y のサブユニットである NF-YB の直接の結合や、25-HC による転写因子複合体の変化を確認するための実験を行った。免疫沈降法 (IP) で p300 と NF-YB の直接の結合は確認できなかった (図 2)。そのため、*ET*, *Hmgcr* プロモーター領域に特異的に結合するタンパク質を解析できる DNA pulldown assay 法を用いて解析した。その結果、*ET*, *Hmgcr* プロモーター領域への p300 と NF-YB の結合が確認できた。また、25-HC により *ET*, *Hmgcr* プロモーター領域への p300 の結合は低下したが、NF-YB の結合は低下しなかった (図 3)。そのため、DNA pulldown assay 法により *ET* プロモーター領域に結合する転写因子複合体を回収し、nano LC-MS/MS で解析を行なっている。

また、細胞膜を構成する主要なリン脂質である PC と PE 量の人為的な制御について検討するため、PC 合成の律速酵素 CTα の KO 細胞を作成した。LC-MS/MS を用いて細胞内のリン脂質組成の変化を評価したところ、CTα の KO 細胞では PC、PE ともにある特定の分子種が有意に減少した。PC、PE の絶対量も減少する傾向が見られたため、さらなる検討を進めている。

本研究では未だ不明な点が多い、PE 合成の律速酵素 *ET* の転写制御機構に注目して解析した。PE は合成の律速酵素 *ET* による酵素反応の産物 CDP-エタノールアミンとジアシルグリセロールから合成される。*ET*<sup>-/-</sup>マウス (ヘテロ遺伝子欠損マウス) では PE 合成が低下するため、PE 合成に利用されるはずのジアシルグリセロールがトリアシルグリセロール合成に流れる事により脂肪肝、高脂血症、インスリン抵抗性、肥満となり、メタボリックシンドローム状態になる (Fullerton et al. JBC 2009)。また、筋肉特異的 *ET* KO マウスは筋細胞の PE 量が低下し、細胞膜の脂質二重層の構造が変化することで細胞膜の安定性が低下し、筋ジストロフィーとなる (Cikes et al. Nat metab 2023)。さらに、ヒトで遺伝的な *ET* の変異

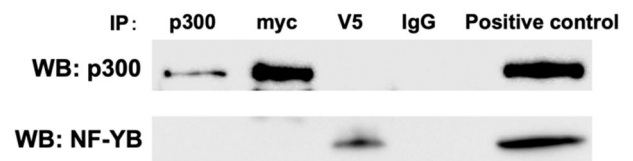


図 2 p300 と NF-YB は相互作用せず (Myc タグ付き p300, V5 タグ付き NF-YB を使用)

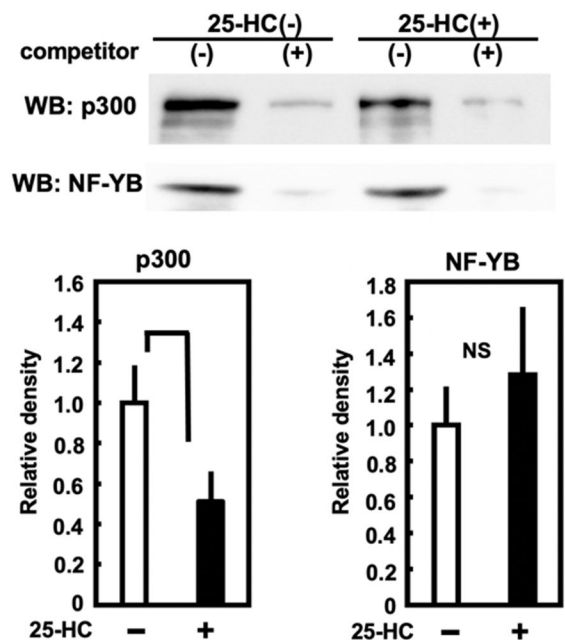


図 3 25-HC は *ET* プロモーターへの p300 の結合を阻害したが NF-YB の結合は阻害せず

により ET 活性が低下し、知的障害や下肢・四肢の痙性不全麻痺を生じるという報告もある (Vaz et al. Brain 2019)。上記の通り、PE は生体内で重要な役割があり PE 合成の低下、PC/PE 比の異常により疾患が生じる。このことから、PE 合成制御機構の解明はリン脂質異常に起因する疾患の治療への応用が期待されるため、本研究で得られた基礎的な知見はその応用への糸口となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ando H, Shinohara Y, Arai M, Yamashita S, Sugimoto H	4. 巻 1
2. 論文標題 Oxysterols, Phosphatidylethanolamine, Cholesterol, Pcyt2, Hmgcr, 25-Hydroxycholesterol, Cytochrome P450 46A1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dokkyo Medical Journal	6. 最初と最後の頁 157 - 166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.51040/dkmj.2022-018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shinohara Y, Ando H, Maekawa M, Arai M, Horibata Y, Satou M, Jojima T, Usui I, Aso Y, Sugimoto H.	4. 巻 6
2. 論文標題 Transcription of cytochrome P450 46A1 in NIH3T3 cells is negatively regulated by FBS	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.	6. 最初と最後の頁 159136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2022.159136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安戸博美、堀端康博、杉本博之
2. 発表標題 細胞膜を構成するリン脂質・コレステロールのオキシステロールによる合成を制御する転写因子とその機構解析
3. 学会等名 第96回 日本生化学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安戸博美
2. 発表標題 リン脂質・コレステロールのオキシステロールによる合成制御に関する転写因子とその機構解析
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安戸博美
2. 発表標題 細胞膜を構成するリン脂質・コレステロールのオキシステロールによる合成制御機構
3. 学会等名 第93回 日本生化学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------