

機関番号：32665

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18077005

研究課題名（和文） 代謝環境センサーとして機能する核内受容体の分子ダイナミズム

研究課題名（英文） Dynamic regulation of metabolite-sensing nuclear receptors

研究代表者

榎島 誠 (MAKISHIMA MAKOTO)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：70346146

研究成果の概要（和文）：生体のホメオスターシスは、種々の細胞内外のシグナルに応答するセルセンサーによって調節されている。本研究では、化学的環境センサーとして脂質代謝を調節する核内受容体のリガンドシグナルから生体機能調節にいたるモーダルシフトを解析した。リガンド選択的な受容体応答、生理・薬理作用発現、他のセルセンサーとの情報統合を明らかにした。研究成果は、核内受容体が関連する疾病の病態の解明、新規治療法の開発へ応用できる。

研究成果の概要（英文）：Cellular sensors control body homeostasis by responding to numerous extracellular and intracellular signals. In this study project, we investigated the roles of nuclear receptors that regulate lipid metabolism as sensors for chemical environment and the modal shifts from ligand-receptor interaction to physiological regulation. We elucidated ligand-selective receptor sensing mechanisms and physiological/pharmacological actions, and integration of signaling systems with other cell sensors. The results can be applied to further elucidation of mechanisms of diseases involving nuclear receptors and development of new therapies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	12,300,000	0	12,300,000
2007年度	12,700,000	0	12,700,000
2008年度	12,700,000	0	12,700,000
2009年度	12,000,000	0	12,000,000
2010年度	12,000,000	0	12,000,000
総計	61,700,000	0	61,700,000

研究分野：生化学・分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：核内受容体、遺伝子、蛋白質、脂質、発現制御、代謝、セルセンサー、モーダルシフト

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 核内受容体は、リガンド結合ドメイン（センサーモジュール）、DNA結合ドメイン（DNA結合モジュール）、コファクター相互作用ドメイン（activation function 2ドメイン；コファクター相互作用モジュール）などを有する転写因子である。近年の研究により、liver X receptor (LXR)、farnesoid X

receptor (FXR)、vitamin D receptor (VDR)、pregnane X receptor、peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) などの retinoid X receptor (RXR) とヘテロ二量体を形成する核内受容体が、脂質代謝センサーとして機能することが明らかになった。

(2) 核内受容体は、リガンドと結合することで、細胞内外の化学的環境を感知し、分子内及び二量体パートナーの立体構造変化を起こす。その結果、コファクター複合体との相互作用を変化させ、特異的標的遺伝子の発現を調節する。リガンドが核内受容体のリガンド結合ポケットに結合してから、標的遺伝子の転写調節に至るまでの分子内・二量体間及びコファクター複合体との間のダイナミックなモーダルシフトについては、まだ十分に解明されていない。

(3) 細胞には、核内受容体スーパーファミリー以外にも、G 蛋白質共役受容体などの膜型受容体やダイオキシン受容体 (AhR) などのセルセンサーが存在する。核内受容体シグナル系と他のセルセンサーとの機能連関やリガンド情報のモーダルシフトもまだ十分に解明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、代謝センサー型核内受容体におけるリガンド特異的な分子内・分子間モジュール相互作用 (リガンドと受容体の時間・空間モーダルシフト)、リガンド選択的な作用や他のセルセンサーとの情報統合 (リガンドシグナルのモーダルシフト)、核内受容体の活性変化による代謝シグナルへの影響 (代謝のモーダルシフト) を解析し、代謝環境セルセンサーの分子機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 核内受容体のリガンド反応性の解析。脂質代謝環境センサーとして機能する RXR ヘテロ二量体型核内受容体 LXR $\alpha$ 、LXR $\beta$ 、FXR、VDR、PXR、PPAR $\alpha$ 、PPAR $\delta$ 、PPAR $\gamma$ 、及び RXR ( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ) のリガンド結合ポケット、activation function 2 ドメイン、二量体インターフェイスなど核内受容体の機能に重要な役割をすると考えられるアミノ酸残基の 1 点変異体を作成する。全長核内受容体とコンセンサス結合領域を含んだリポフェラーゼレポーター系、GAL4 キメラ受容体を用いる mammalian one-hybrid アッセイ系、GAL4-コファクターキメラ及びヘルペスウイルスの転写因子の活性化ドメインである VP16 と核内受容体のキメラを用いる mammalian two-hybrid assay 系などの複数の転写誘導活性評価系を構築する。VDR に対する 1 $\alpha$ , 25-hydroxyvitamin D3 (1, 25(OH)2D3) やリトコール酸 (LCA) などの種々の天然リガンド、及び合成リガンドの核内受容体及び変異体に対する活性を評価・解析し、構造活性相関を明らかにする。

(2) 核内受容体の立体構造変化検出系の構

築。核内受容体におけるリガンド依存性の分子内・分子間相互作用を、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用して転写誘導活性非依存的に検出する系を構築する。

(3) セルセンサー間相互作用の解析。核内受容体の代謝環境センシング機構と他の機構 (AhR や Wnt シグナル系など) との相互作用の解析を行う。

(4) リガンドまたは核内受容体の作用を細胞レベル、個体レベルで評価するために、各種培養細胞株、マウスを用いる。蛋白質発現は、ウェスタンブロットや ELISA を利用し、mRNA の発現は定量的リアルタイム PCR 法を利用して解析する。細胞の増殖、分化、アポトーシス、形態、DNA アダクト、化合物の代謝、動物の組織病理なども必要に応じて解析する。標的遺伝子上の核内受容体-コファクター複合体形成は、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) にて解析する。

(5) 遺伝子組換え実験について、カルタヘナ法及び日本大学遺伝子組換え実験規程に基づく手続きをとり、動物実験については、日本大学動物実験内規に定める手続きをとる。

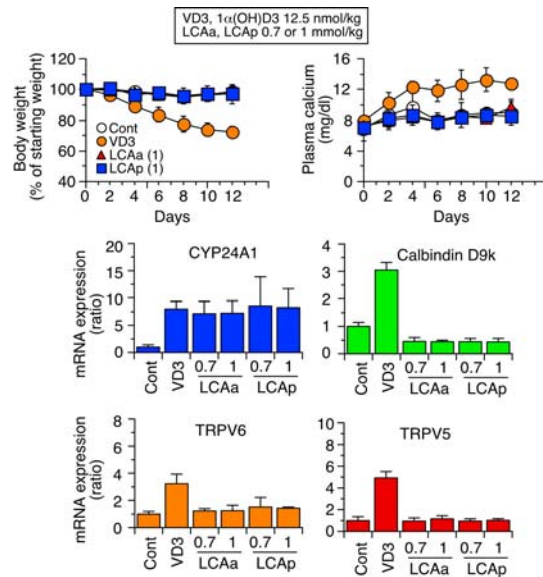
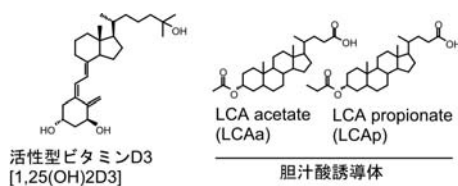
## 4. 研究成果

(1) VDR に対する 1, 25(OH)2D3 及びメチルラクトン環やアダマンタン環を側鎖に有する誘導体の効果を比較検討した。1, 25(OH)2D3 の側鎖に分子量の大きい側鎖を導入した誘導体は、細胞選択的に VDR のアンタゴニストまたはアゴニストとして機能した。誘導体のアゴニスト活性は、SRC-1 や DRIP205 などのコアクチベーターとのリガンド依存性 VDR 相互作用及び核におけるこれらコアクチベーター蛋白質の発現量と相関した。また、誘導体がアゴニスト作用を示す細胞では、リガンド依存性の VDR の核移行が認められたが、アンタゴニスト作用を示す細胞では認められなかった。誘導体の VDR への結合を介する RXR ヘテロ二量体形成及び RXR へのアロステリック効果とアゴニスト/アンタゴニスト活性との関連性は無かった。よって、コアクチベーターとの相互作用と発現量がアゴニスト活性に、VDR の核移行の有無がアンタゴニスト活性に重要であることが明らかになった (リガンドと受容体の時間・空間モーダルシフト)。

(2) リガンド依存性 VDR 蛋白質複合体のモーダルシフトの解析。VDR のホモ二量体、VDR とヘテロ二量体パートナーである RXR $\alpha$ 、コアクチベーター SRC-1 またはコリプレッサー SMRT とのダイナミックな相互作用を検討す

るため、FRET 実験系を構築した。リガンドが非存在下で、VDR はホモ二量体を形成し、SMRT と相互作用した。1, 25(OH)2D3 は、RXR ヘテロ二量体形成を誘導し、SMRT を解離させ、SRC-1 をリクルートした。パーシャルアゴニスト/アンタゴニスト活性を有するビタミン D 誘導体や LCA では、これらの効果が部分的であり、標的遺伝子の誘導効果は弱かった。mammalian two-hybrid アッセイや ChIP の結果と合わせて、リガンド選択的な VDR のダイナミック立体構造変化を示すことができた。また、ChIP によって、パーシャルアゴニスト/アンタゴニストビタミン D 誘導体は、細胞選択的な VDR-コファクター複合体を形成することが示された。リガンド選択的な VDR 立体構造変化と細胞選択的な環境の組合せが、標的遺伝子の発現調節に影響を与えることが明らかになった (リガンドと受容体の時間・空間モダルシフト)。

(3) VDR の天然リガンドとして、1, 25(OH)2D3 と胆汁酸である LCA が存在する。カルシウム代謝調節因子である 1, 25(OH)2D3 と腸内細菌が産生する二次胆汁酸 LCA とでは、生理的意義が大きく異なるため、2 つのリガンドによる選択的 VDR 作用の解析を行った結果、VDR リガンド結合ポケットへの結合様式が異なることを明らかにした (リガンドと受容体の空間モダルシフト)。構造活性相関の解析を進め、より VDR 活性化作用の強い LCA 誘導体 (LCA アセテート及び LCA プロピオネート) を見出した。腸管粘膜細胞における VDR 標的遺伝子 (ビタミン D 代謝酵素 CYP24A1 及びカルシウムチャネル TRPV6) の発現誘導効果を検討したところ、1, 25(OH)2D3 は、CYP24A1 に対するよりも低濃度で TRPV6 の発現を誘導したが、LCA 誘導体の CYP24A1 と TRPV6 の発現を誘導する濃度差は小さかった。マウスにおいて腎臓 CYP24A1 の発現を同程度に誘導する 1 $\alpha$ -ヒドロキシビタミン D3 (1 $\alpha$ (OH)D3) と LCA 誘導体の投与量を決定し、比較検討を行った。1 $\alpha$ (OH)D3 は、マウスの体内で速やかに 1, 25(OH)2D3 に変化されることが知られている。1 $\alpha$ (OH)D3 の投与は、腎臓や小腸粘膜におけるカルシウム代謝関連遺伝子の発現を誘導し、高カルシウム血症を引き起こしたが、LCA 誘導体はこれらの遺伝子の発現誘導はほとんど起こさず、血漿カルシウム値も上昇させなかった。結果は、リガンド選択的な VDR 作用の存在を示している (リガンドシグナルのモダルシフト)。



(4) LCA の受容体としても機能する VDR の胆汁酸代謝における役割を検討した。総胆管結紮による胆汁鬱滞モデルマウスへのビタミン D 投与の影響を解析した。1 $\alpha$ (OH)D3 投与により、腎臓の胆汁酸排出担体 MRP2 及び MRP4 は誘導されたが、総胆管結紮によって増加した血漿や肝臓の胆汁酸濃度は変化しなかった。一方、胆汁鬱滞における炎症性サイトカインの増加は、1 $\alpha$ (OH)D3 によって顕著に抑制された。免疫系細胞の VDR 機能の関与を示唆した。

胆汁酸を食餌添加したマウスに対する 1 $\alpha$ (OH)D3 の投与の効果を解析した。1 $\alpha$ (OH)D3 の投与は、ケノデオキシコール酸やデオキシコール酸を食餌添加したマウスにおける肝臓及び血漿の胆汁酸濃度を低下させた。1 $\alpha$ (OH)D3 は、また CDCA 添加にて増加した体内の胆汁酸の尿中排泄を促進した。腎臓において発現が増加する MRP2、MRP3、MRP4 の関与が示唆された。胆汁鬱滞モデルでの実験結果と合わせて考えると、VDR 活性化による生体異物代謝系が誘導されるが (代謝のモダルシフト)、一部の胆汁酸の排泄に限定されている。LCA センサーとしての VDR の生理的意義については、今後の課題である。

(5) 膜シグナルとの機能連関を検討した。Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 阻害作用を有する強心ステロイド bufalin が、1, 25(OH)2D3 による VDR 転写誘導活性を増強することを報告したが、そのメカニズムを解析した。VDR は、リガンド依存性に核移行するが、48 時間以降は核での発現は低下する。bufalin の併用は、VDR の核での発現を安定化させた。proteasome 阻害薬も同様に VDR の核での発現を安定化させ、VDR 標的遺伝子発現を増強した。Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 活性と VDR の核内発現及び転

写誘導活性との関連性を示唆している（リガンドシグナルのモーダルシフト）。

（6）水中から陸上への生物の進化における重力負荷と紫外線曝露の一致性に着目し、過重力のビタミンDシグナル系に対する影響を検討した。マウスへの過重力負荷は、ビタミンD合成酵素の発現が低下し、不活性化酵素の発現が上昇、その結果、血中1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の濃度の低下が見られた。重力センサーとビタミンDシグナル系との機能連関を示している（リガンドシグナル及び代謝のモーダルシフト）。

（7）代謝環境センサーとして、核内受容体以外にAhRが存在する。AhRの代謝のモーダルシフト及び核内受容体シグナル系との情報統合を解析した。煙草煙や加熱調理食品に含まれるベンゾ[a]ピレン（BaP）は、AhRの活性化を介して自ら誘導するCYP1ファミリー酵素により代謝活性化され、有害作用を及ぼすと考えられていたが、CYP1ファミリー酵素による代謝により、BaPのAhR活性化作用やDNAアダクト形成が减弱した。また、マクロファージにおいて、BaPによって活性化したAhRの存在化にて、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>によるビタミンD代謝酵素CYP24A1の発現誘導が増強され、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の不活性化が促進した。BaP-AhRシグナル系が、リガンドであるBaPの代謝を介して抑制的なフィードバックを誘導すること、ビタミンDシグナル系を修飾することが明らかになった（リガンドシグナル及び代謝のモーダルシフト）。

（8）VDRシグナル系のAhRシグナル系に対する影響を検討した。単球・マクロファージ系細胞において、VDRの活性化はAhRによる標的遺伝子CYP1A1の発現誘導を促進した。1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>の併用は、BaPによるCYP1A1の蛋白質発現、酵素活性の誘導、そしてDNAアダクト形成を促進した。VDRは、CYP1A1プロモーターに直接相互作用した。ビタミンDシグナルがAhR-代謝シグナル系を修飾することが明らかになった（リガンドシグナルのモーダルシフト）。

（9）AhRの活性化は、実験条件によって炎症反応を促進したり抑制したりすることが知られている。胆汁鬱滞モデルにおけるAhRシグナルの影響を解析した。コントロールマウスにおいて毒性を示さない低濃度のダイオキシンの投与により、総胆管結紮による炎症反応及び肝細胞壊死が顕著に認められた。CYP1A1欠損マウスでは、この効果がさらに増悪した。総胆管結紮下において、AhRの活性化は、病態の悪化をまねくが、誘導されるCYP1A1は病態を抑制することを示している

（病態を修飾する代謝のモーダルシフト）。

（10）コレステロール代謝センサーであるLXRと他のセルセンサーとの機能連関を検討した。細胞の増殖やがん化に有用な働きをしているβ-カテニンの転写誘導活性を、LXRα/LXRβがリガンド依存性に抑制することを見出していたが、メカニズムの解析を進めた。β-カテニンとLXRα及びLXRβは直接結合し、β-カテニン標的遺伝子のプロモーター上で複合体を形成した。LXRα/βダブル欠損マウスのMEFを用いた実験において、LXRリガンドによるβ-カテニン標的遺伝子の発現抑制は、LXR依存性であった。脂質代謝環境がセルセンサーLXRを介して細胞増殖調節系に影響を与えることを示唆している（リガンドシグナルのモーダルシフト）。

（11）オキシステロールの1α位誘導体が、リガンド依存性LXR-コリプレッサー複合体形成を誘導し、炎症性サイトカインの遺伝子発現を抑制した。VDRと同様にLXRのリガンドも、リガンド-受容体の相互作用様式の相違が、作用選択性に結びつくことを示唆している（リガンドと受容体の時間・空間モーダルシフト）。

（12）代謝に関連する核内受容体と時計遺伝子産物との機能連関を解析した。時計遺伝子DEC1及びDEC2が、代謝環境センサー型核内受容体LXR、VDRなどのヘテロ二量体パートナーRXRと相互作用し、その転写誘導活性を抑制した。特にDEC2は、肝細胞におけるLXR-RXRによる脂質代謝関連遺伝子の発現誘導を抑制した。末梢時計遺伝子と脂質代謝との機能連関を示している（リガンドシグナルのモーダルシフト）。

## 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59件）

- ① Ozeki J, Uno S, Ogura M, Choi M, Maeda T, Sakurai K, Matsuo S, Amano S, Nebert DW, Makishima M. Aryl hydrocarbon receptor ligand 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin enhances liver damage in bile duct-ligated mice. *Toxicology* 280: 10-17, 2011 査読有
- ② Cho Y, Noshiro M, Choi M, Morita M, Kawamoto T, Fujimoto K, Kato Y, Makishima M. The basic helix-loop-helix proteins DEC1 and DEC2 function as corepressors of retinoid X receptors. *Mol Pharmacol* 76: 1360-1369, 2009 査読

- 有
- ③ Nishida S, Ozeki J, Makishima M. Modulation of bile acid metabolism by lalpha-hydroxyvitamin D3 administration in mice. Drug Metab Disp 37: 2037-2044, 2009 査読有
  - ④ Ishizawa M, Iwasaki K, Kato S, Makishima M. Hypergravity modulates vitamin D receptor target gene mRNA expression in mice. Am J Physiol Endocrinol Metab 297: E728-E734, 2009 査読有
  - ⑤ 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. Toxicol Sci 10: 50-58, 2009 査読有
  - ⑥ Amano Y, Cho Y, Matsunawa M, Komiyama K, Makishima M. Increased nuclear expression and transactivation of vitamin D receptor by the cardiotonic steroid bufalin in human myeloid leukemia cells. J Steroid Biochem Mol Biol 114: 144-151, 2009 査読有
  - ⑦ Ogura M, Nishida S, Ishizawa M, Sakurai K, Shimizu M, Matsuo S, Amano S, Uno S, Makishima M. Vitamin D3 modulates the expression of bile acid regulatory genes and represses inflammation in bile duct-ligated mice. J Pharmacol Exp Ther 328: 564-570, 2009 査読有
  - ⑧ Uno S, Endo K, Jeong Y, Kawana K, Miyachi H, Hashimoto Y, Makishima M. Suppression of beta-catenin signaling by liver X receptor ligands. Biochem Pharmacol 77: 186-195, 2009 査読有
  - ⑨ 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. Toxicol Appl Pharmacol 230: 135-143, 2008 査読有
  - ⑩ Ishizawa M, Matsunawa M, Adachi R, Uno S, Ikeda K, Masuno H, Shimizu M, Iwasaki K, Yamada S, Makishima M. Lithocholic acid derivatives act as selective vitamin D receptor modulators without inducing hypercalcemia. J Lipid Res 49: 763-772, 2008 査読有
  - ⑪ Inaba Y, Yamamoto K, Yoshimoto N, Matsunawa M, Uno S, Yamada S, Makishima M. Vitamin D3 derivatives with adamantane or lactone ring side chains are cell type-selective vitamin D receptor modulators. Mol Pharmacol 71:

1298-1311, 2007 査読有

[学会発表] (計 88 件)

- ① 宇野茂之、リガンド選択的ビタミンD受容体の機能調節、第64回日本栄養・食糧学会大会、2010年5月22日、徳島
- ② 榎島誠、核内受容体による代謝制御と臓器連関、第115回日本解剖学会総会・全国学術集会、2010年3月29日、盛岡
- ③ Makishima M、Targeting of the vitamin D receptor, a nuclear receptor acting as an endocrine receptor and a metabolic sensor、Chem-Bio informatics Society 2008 International Symposium on Pathway/Network to Disease and Drug Discovery Specially Focused on Nuclear Receptors and Metabolic Syndrome、2008年10月22日、東京
- ④ 榎島誠、胆汁酸応答性核内レセプターによる生体機能調節、第13回 Hindgut Club Japan シンポジウム、2007年12月8日、東京
- ⑤ 榎島誠、胆汁酸センサーとして機能する核内受容体、第29回胆汁酸研究会、2007年11月24日、つくば

[産業財産権]

○出願状況 (計 5 件)

名称：パーシャルアゴニスト活性を持つ新規ビタミンD受容体モジュレーター  
発明者：榎島誠、山田幸子、常盤広明、工藤健  
権利者：学校法人日本大学、学校法人立教学院  
種類：特許  
番号：特願 2011-045022  
出願年月日：23年3月2日  
国内外の別：国内

名称：作用選択的ビタミンD受容体作用剤  
発明者：榎島誠、石澤通康、松縄学、山田幸子  
権利者：学校法人日本大学  
種類：特許  
番号：特願 2007-147866  
出願年月日：19年6月4日  
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ：業績リストを公開  
<http://www.med.nihon-u.ac.jp/~biochem/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

槇島 誠 (MAKISHIMA MAKOTO)  
日本大学・医学部・教授  
研究者番号：70346146

### (2) 研究分担者

山田 幸子 (YAMADA SACHIKO)  
日本大学・医学部・兼任講師  
研究者番号：10014078

宇野 茂之 (UNO SHIGEYUKI)  
日本大学・医学部・講師  
研究者番号：90307851

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

西田 滋 (NISHIDA SHIGERU)  
日本大学・医学部・講師  
研究者番号：90211458

崔 美花 (CHOI MIHWA)  
日本大学・医学部・助教  
研究者番号：30571012

遠藤 香織 (ENDO KAORI)  
日本大学・医学部・専修研究員  
研究者番号：10445744

石澤 通康 (ISHIZAWA MICHIIYASU)  
日本大学・医学研究科・大学院生

川名 克芳 (KAWANA KATSUYOSHI)  
大阪大学・医学系研究科・大学院生  
(H18)

天野 雄介 (AMANO YUSUKE)  
日本大学・歯学研究科・大学院生  
(H18-H20)

長 克武 (CHO YOSHITAKE)  
日本大学・医学部・ポストドクター  
研究者番号：70468742  
(H19-H21)

小倉 道一 (OGURA MICHITAKA)  
日本大学・医学研究科・大学院生  
(H19-H21)

小関 淳 (OGEKI JUN)  
日本大学・医学研究科・大学院生  
(H18-H21)