

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590358

研究課題名(和文)細胞膜の脂質組成恒常性維持のための新規転写因子の同定および調節機構の解明

研究課題名(英文) Identification of novel transcriptional factors and their roles for homeostasis of lipid composition of cell membrane

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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は細胞膜を構成する主な脂質ホスファチジルエタノールアミン(PE)とコレステロール(Cho)に注目し、それら脂質合成の律速酵素CTP:ホスホエタノールアミンシチジルトランスフェラーゼ(ET)やHMG-CoAレダクターゼ(HMGCR)の転写や活性制御機構を解析した。これら酵素の転写や活性は血液中のオキシステロールや25-ヒドロキシコレステロール(25-OHC)により同様な容量依存性を示して抑制を受けた。これら酵素のプロモーター解析から、両プロモーターにはNF-Yが結合し、25-OHCの添加はNF-YのRNAポリメラーゼIIのリクルートの阻害によることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：ET (CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase) is the rate-limiting enzyme in mammalian PE (phosphatidylethanolamine) synthesis. We found that ET mRNA levels increased in cells after serum starvation, an effect that could be suppressed by low-density lipoprotein or 25-HC (25-hydroxycholesterol). Transcription of Hmgcr, which encodes 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, is also suppressed by 25-HC. Nevertheless, a sterol-regulatory element was not detected in the Pcyt2 promoter region. The important element for transcriptional control of ET by 25-HC (1.25 μM) was determined to reside between -56 and -36 and NF-Y (nuclear factor-Y) binds the site. Moreover, NF-Y binds to the Hmgcr promoter in gel-shift analysis. ChIP analysis revealed that 25-HC inhibited the interaction between NF-Y and RNA polymerase II on the Pcyt2 and Hmgcr promoters. We conclude that NF-Y is important for the basal transcription of Pcyt2 and is involved in the inhibitory effects of 25-HC.

研究分野：脂質生化学

 キーワード：オキシステロール ホスホエタノールアミン シチジルトランスフェラーゼ HMG-CoAレダクターゼ
 NF-Y 25-ヒドロキシコレステロール ホスファチジルエタノールアミン コレステロール

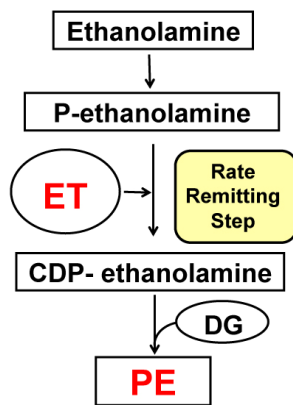
1. 研究開始当初の背景

細胞膜は主にホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、コレステロール(Cho)などの脂質から構成され、これら脂質の組成はおおよそ一定(1:1:1)に保たれている。本研究の目的は細胞膜を構成する主な脂質の中でも特に PE と Cho に注目し、それら脂質の合成律速酵素である CTP:ホスホエタノールアミンシチジルルトランスフェラーゼ(ET)や HMG-CoA レダクターゼ(HMGCR)の転写や

活性制御機構を解

析し、PE と Cho の合成がどのようなメカニズムにより協調して行われ細胞膜脂質組成の恒常性が維持されているのか、その新たな分子基盤を見いだすことである(図1)。

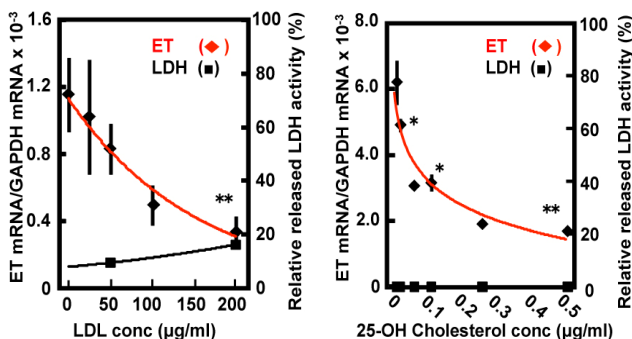
図1 PE の合成経路



2. 研究の目的

(1) これまでの研究から、これら律速酵素の転写や活性は、細胞培養液中の FBS (fetal bovine serum)濃度を低下させると増加し、この増加は FBS ばかりでなく LDL (low density lipoprotein)や LDL に含まれるオキシステロール(酸化コレステロール)投与により同様な容量依存性を示して低下することを見いだした(図2)(文献1)。本研究では

図2 ET 転写の LDL および 25-OHC による抑制



オキシステロールの中でも特に 25-ヒドロキシコレステロール(25-OHC)に注目し、25-OHC により転写抑制を受ける ET および HMGCR のプロモーター領域を同定する。

(2) 25-OHC により転写抑制を受ける ET および HMGCR のプロモーター領域の同定が成功した場合、本領域に結合する転写因子を yeast one hybrid 法により cDNA クローニングを行う。

(3) 本領域に結合する転写因子を同定し、どのような機構で 25-OHC により ET および HMGCR の転写が抑制されるのか、その分子基盤を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) プロモーター・レポーター解析を用いた 25-OHC による転写抑制領域の同定 ET および HMGCR の欠損および変異プロモーターとレポーターとの融合プラスミドを作成し、NIH3T3 細胞にトランスフェクションし、それぞれのルシフェラーゼ活性を測定する。細胞に 25-OHC を添加し、ルシフェラーゼ活性への影響を解析する。

(2) 25-OHC に応答する領域に結合する転写因子の同定 25-OHC に応答する領域が同定されたならば、約 30bp 領域を bait にして、本領域に結合する転写因子を yeast one hybrid 法により cDNA クローニングおよび同定を行う。

(3) 内因性転写因子の同部への結合 Gel-shift 法と抗体により内因性転写因子の同部への結合を解析する。

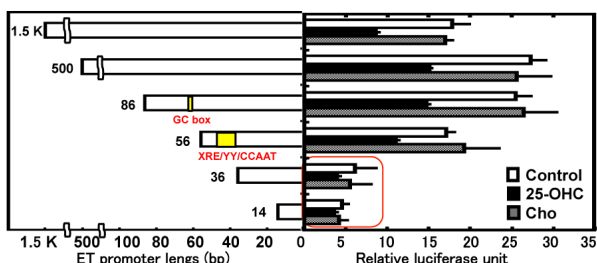
(4) ChIP 法による結合因子の解析 25-OHC とクローニングできた転写因子との相互作用を ChIP 法で解析し、25-OHC による転写抑制機構を分子基盤から明らかにする。

4. 研究成果

(1) PE 合成の律速酵素 CTP:ホスホエタノールアミン・シチジルルトランスフェラーゼ(ET)の 25-OHC による転写抑制機構

図3より、25-OHCの抑制作用にตอบสนองするETプロモーター領域は-56/-36であることが同定された。

図3 ETプロモーター・レポーター解析：25-OHCによる転写抑制領域の同定



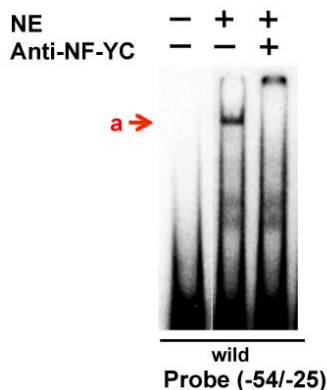
変異コンストラクトの作成から、レポーター活性には-37CAAT-41領域が重要であることが明らかになった。

-56/-36をbaitにした yeast one hybrid法による結合転写因子の遺伝子クローニング

- ・ nuclear factor-Y(NF-Y)
- ・ Yin Yang1 (YY1) を得た。

Gel-shift法により、内因性NF-Yが-37CAAT-41領域に結合することが明らかになった。(図4)。

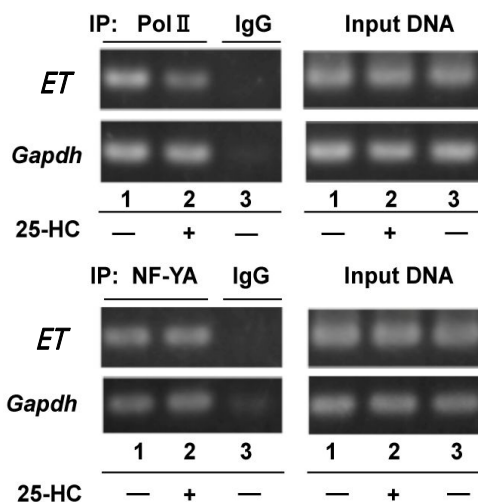
図4 Gel-shift法による内因性NF-YのETプロモーターへの結合



NF-YはRNA polymerase II (Pol III)をリクルートし転写促進作用を有することが知ら

れている。ChIP解析から、25-OHCはNF-YによるPol IIIのリクルートを抑制することでETの転写抑制作用を有することが示された(図5)。

図5 ChIP解析：25-OHCによるPol IIIのETプロモーター上のNF-Yへの結合の抑制



(2) コレステロール合成の律速酵素HMG-CoAレダクターゼ(HMGCR)の25-OHCによる転写抑制機構

ETのプロモーター解析を参考にしてHMGCRのプロモーター解析を行い、-16/-12にNF-Yが結合することをGel-shift法により見いだした(図6)。

図6 HMG-CoAレダクターゼのプロモーター配列

```

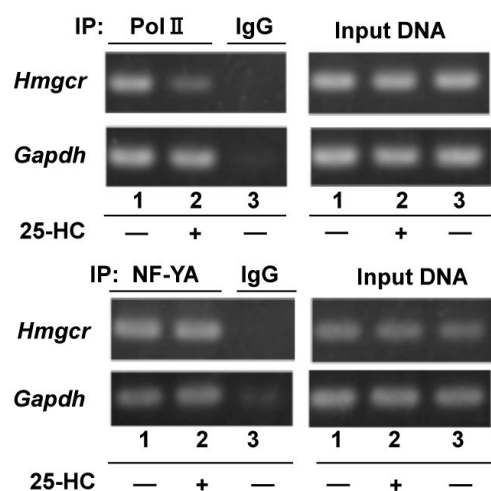
-150
CCGACCCGTC ATTGGTTGGC TCTGCCGTGG TGAGAGATGG TGCGGTGCCG GTTCTCCGCC
                YY1       SRE
-90
CGGGTGCAG CAGTGGGCGG TTGTTAGGGA GACCGTTCGT GACGTAGGCC GTCAGGCTGA
-30      NF-Ym:GTT      +1
GCAGCCGCC GACGATTGGC TAGGGGATCG GACGATCCTT CCTTATTGGC GGCCCGCTGG
-15 NF-Y
  
```

HMGCRの転写にもNF-Yが重要であることをプロモーター・レポーター解析から明らかにした。

ChIP解析から、HMGCRの転写においても、25-OHCはNF-YによるPol IIIのリクルートを抑制することで転写抑制を示すことが明

かになった(図7)。

図7 ChIP法: 25-OHCによるPol IIIのHMGCRプロモーター上のNF-Yへの結合の抑制

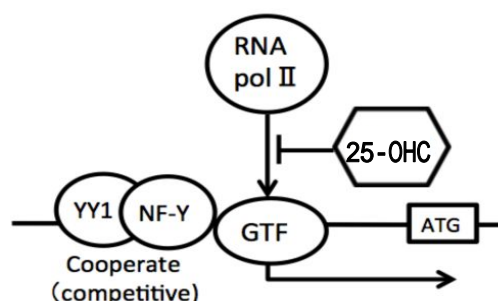


5. まとめ

細胞膜は主にホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、コレステロール(Cho)などの脂質から構成され、これら脂質の組成はおおよそ一定(1:1:1)に保たれている。細胞を FBS 欠乏培地(0.5% FBS)で培養することで、ET および HMGCR の mRNA 量が増加し、この増加は 25-OHC(1.25 μM)添加により同様な容量依存性を示して抑制されることを見いだした。そこでこれら酵素の転写は同様な転写機構により制御を受けるのではないかと想定し研究を進めた。その結果、両酵素とも NF-Y により促進性の転写調節を受けることが明らかになった。NF-Y は RNA polymerase II (Pol III) をリクルートし転写促進作用を有することが知られている。ChIP 解析から、25-OHC は NF-Y による Pol III のリクルートを抑制することで ET の転写抑制作用を有することが示された。以上の結果から右上図の機構を想定している。

今後は 25-OHC がどのような分子機構により転写抑制作用を有するのか、25-OHC の細胞内での局在、ヒストンアセチル化への影響等

を考慮して研究を進める予定である。



< 引用文献 >

Ando Hiromi, Horibata Yasuhiro, Yamashita Satoko, Oyama Tetsunari, Sugimoto Hiroyuki, Low-density lipoprotein and oxysterols suppress the transcription of CTP:Phosphoethanolamine cytidyltransferase in vitro. *Biochim Biophys Acta*, 査読あり, vol 1801, 2010, 487-495.

doi: 10.1016/j.bbalip.2009.12.014.

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3件)

Ando Hiromi, Aoyama Chieko, Horibata Yasuhiro, Satou Motoyasu, Mitsuhashi Satomi, Itoh Masahiko, Hosaka Kohei, Sugimoto Hiroyuki, Transcriptional suppression of CTP: phosphoethanolamine cytidyltransferase by 25-hydroxycholesterol is mediated by nuclear factor-Y and Yin Yang 1. *Biochem J.*, 査読あり, vol 471, 2015, 369-379. doi: 10.1042/BJ20150318.

Horibata Yasuhiro, Ando Hiromi, Itoh Masahiko, Sugimoto Hiroyuki, Enzymatic and transcriptional regulation of the cytoplasmic acetyl-CoA hydrolase ACOT12. *J Lipid Res.*, 査読あり, vol 54, 2013, 2049-2059. doi: 10.1194/jlr.M030163.

Itoh Masahiko, Tsukita Sachiko, Yamazaki Yuji, Sugimoto Hiroyuki, Rho GTP exchange factor ARHGEF11 regulates the integrity of epithelial junctions by connecting ZO-1 and RhoA-myosin II signaling. Proc Natl Acad Sci U S A. , 査読あり, vol 109, 2012, 9905-9910. doi: 10.1073/pnas.1115063109.

[学会発表](計5件)

Ando Hiromi, Aoyama Chieko, Horibata Yasuhiro, Satou Motoyasu, Itoh Masahiko, Sugimoto Hiroyuki.

Oxysterol derivatives and transcriptional factors regulating phosphatidylethanolamine and cholesterol biosynthesis.

第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会合同会

神戸 2015年12月1日~4日

Ando Hiromi, Aoyama Chieko, Horibata Yasuhiro, Sugimoto Hiroyuki.

Transcriptional suppression of CT: phosphoethanolamine cytidyltransferase and HMG-CoA reductase by 25-hydroxycholesterol is mediated by nuclear factor-Y and Yin Yang1.

Deuel Conference on Lipids

Monterey, California, March 3-6, 2015

Horibata Yasuhiro, Ando Hiromi, Itoh Masahiko, Sugimoto Hiroyuki.

Regulatory systems of acyl-CoA thioesterase 12 (ACOT12) that control cytosolic acetyl-CoA degradation and the lipid biosynthesis.

Deuel Conference on Lipids

Monterey, California, March 3-6, 2015

安戸博美、青山智英子、山下智子、堀端康博、佐藤元康、三橋里美、杉本博之

ホスファチジルエタノールアミン合成を制御するオキシステロール代謝産物と転写因子の同定

第86回 日本生化学会大会

横浜 2013年09月11日~13日

堀端康博、安戸博美、伊藤雅彦、杉本博之

脂質生合成を制御する細胞質アセチルCoA分解酵素 Acyl-CoA チオエステラーゼ 12(ACOT12)の活性調節機構の解析

第86回 日本生化学会大会

横浜 2013年09月11日~13日

6. 研究組織

(1) 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

2012-2015

(2) 研究分担者

青山 智英子 (AOYAMA Chieko)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90420778

2012-2015

佐藤 元康 (SATOU Motoyasu)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号: 0418891

2012-2015

堀端 康博 (HORIBATA Yasuhiro)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号: 0392116

2012-2013

安戸 博美 (ANDO Hiromi)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10704885

2014-2015