

遺伝子発現モニタリングによる脂質異常症の新たな診断法の開発

伊藤 太二（管理栄養学科・講師）・大村 正史（管理栄養学科・教授）

山崎 俊介（管理栄養学科・准教授）

緒言

脂質異常症は、遺伝的要因に、生活習慣を主とする環境的要因が加わり発症する。環境的要因とは主に栄養であり、栄養状態により種々の遺伝子の発現が変化して脂質異常症発症に結びつくことが最近明らかになってきた。例えば、高脂質食は、飽和脂肪酸の摂取過多となり、細胞内小器官である小胞体にストレスを与える。これに対する応答として遺伝子発現変動が起こる。そしてこの一連の過程は脂質異常症発症に重要な寄与をしている。

脂質異常症の診断と治療には、患者様の病態変化を迅速かつ低侵襲の方法で把握することが重要である。従って本研究では、脂質異常症の病態の進行度を詳細かつ的確に把握し加療したり、治療効果・予後を検証したりするための新たなツールを確立することを目的とした。

平成25年度は、遺伝子発現に対する脂質の作用メカニズムを明らかにするために、脂質の化学構造を模倣しており、脂質異常症発症への関与も報告されている内分泌攪乱物質^[1]ノニルフェノール（NP）にまず注目した。アルキルフェノール類のNPは、非イオン界面活性剤が河川等で好気性・嫌気性微生物分解されたり、合成樹脂の酸化防止剤が酸化・加水分解されて生じる。NPは、生殖器系（前立腺・精巣）及び神経系を標的とし、生殖細胞の癌化、精子数の減少、神経発達障害との関わりが考えられている。例えば、マウスへの投与により、F1及びF2マウスでの精巣・前立腺の退縮や精子分化不全が報告されている。またNPは、脂肪細胞分化させた3T3-L1細胞中でのリポタンパク質リパーゼmRNAの合成を阻害し、その活性発現の著しい低下を引き起こすとともに、中性脂肪であるトリアシルグリセロールの細胞内蓄積も著しく低下させることが報告されており、脂質異常症との関連も考えられている。平成25年度は、このNPを認識する新規タンパク質を同定したので報告する。

方法

1. 酵母 two-hybrid 法による内分泌攪乱物質受容体タンパク質の単離

転写共役因子 AIB1^[2]の「LxxLL」領域のみを bait とし、これを融合した GAL4 の DNA 結合ドメイン（DB）と、ヒト正常前立腺由来の cDNA ライブラリーを融合した転写活性化ドメイン（AD）をそれぞれコードするプラスミドを作製する。これらのプラスミド DNA を両方、酵母内に導入する。酵母内で各プラスミドから、各融合タンパク質が発現する。酵母の LacZ、HIS3 遺伝子は bait と cDNA ライブラリーがそれぞれコードするタンパク質同士が結合しなければ転写されない。HIS3 が転写されると、酵母はヒスチジン欠乏培地でも生育できる。LacZ（ β -ガラクトシダーゼ）は、X-gal を分解し、青色を呈する物質（4-Cl-3-Br-indigo）を生成する^[3]。実際のスクリーニングは SC（-L、-T、-

H、+3AT、+NP) 培地で行う。NP 依存的結合性は、NP (+) 又は (-) 培地で生育させた酵母の β -ガラクトシダーゼ活性測定で調べる。

こうして選択された酵母から、Bait に結合するタンパク質をコードする AD-cDNA プラスミドを抽出して DNA 配列を決定する。この実験で転写共役因子 AIB1 に NP 依存的に結合するタンパク質として NPR1 (Nonylphenol Receptor 1) を単離した。

2. 大腸菌を用いたタンパク質の精製

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質発現プラスミド DNA を大腸菌 DH5 α 株に導入し、対数増殖期において 1mM IPTG で発現誘導した。誘導したタンパク質は凍結融解により全タンパク質の中からグルタチオンビーズによって精製した。そして、このビーズに 40mM グルタチオンを添加することで、目的タンパク質を溶出した。さらに、溶出したタンパク質を透析後、Sulfo-NHS-LC-LC-biotin 溶液を加えビオチン化し、再度透析した。精製したタンパク質は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) を用い分子量の違いにより分離した。

3. 分子間相互作用解析

Octet RED システムは、バイオレイヤー干渉法 (BLI) を基盤とし、バイオセンサーの上側から白色光を照射し先端からの反射光の干渉波を解析する。そして、バイオセンサー先端に低分子化合物が結合した場合、先端の厚みが増加することで反射光がシフトして元の波長との相違が発生し、これを $\Delta\lambda$ (波長シフト) として計測する。本研究で NPR1 との結合性を解析した低分子化合物は、内分泌攪乱物質として、NP、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、ビスフェノール A、NP 前駆体物質として、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル、トリス-ノニルフェニルホスファイト、内分泌ホルモンとして、cis-アンドロステロンの 6 種類である。バイオセンサーを各低分子化合物溶液に浸して、ビオチン化タンパク質と低分子化合物との結合性を解析する。解析したデータから解離平衡定数 (K_D) を算出する。

4. 蛍光顕微鏡観察

本研究では 580nm 付近の緑黄色光により励起され、610nm 付近の赤色蛍光を発する mCherry タンパク質を用い、NPR1 との融合タンパク質 (mCherry-NPR1) を発現するプラスミド DNA を作製する。これをリポフェクタミン LTX 試薬を用いたリポフェクション法により、ヒト前立腺癌由来の LNCap.FGC 細胞株に導入する。導入 24 時間後、10 μ M の NP を添加する。さらに 48 時間後、小胞体の特異的に染色する ER tracker-Blue White-DP X により染色を行い、倒立型蛍光顕微鏡 IX71 (オリンパス製) により観察を行う。

5. 免疫染色と共焦点レーザー顕微鏡観察

LNCap.FGC 細胞を MAS コートされたスライドガラス上で培養し、10 μ M の NP により 24 時間刺激を行う。培地を除き、1%ホルムアルデヒドで細胞をスライドガラスに固定する。界面活性剤 Triton X-100 (0.01%) で細胞膜と核膜に穴を開けた後、1%BSA でブロッキングを行う。ラビット抗 NPR1 抗体、及びマウス抗 AIB1 抗体を、それぞれ TOYOCO

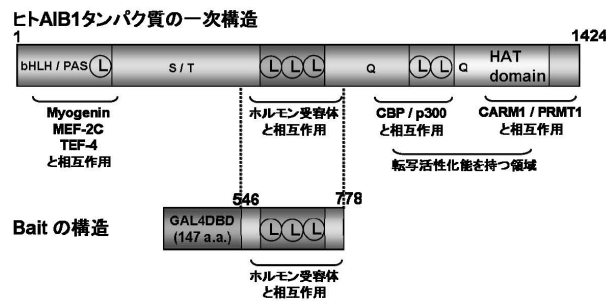


図 1. 酵母 two-hybrid スクリーニングに用いた bait の構造

ヒト AIB1 タンパク質の一次構造と各機能領域、および酵母 two-hybrid スクリーニングに用いた bait の構造を示す。各図の上部にはタンパク質を構成するアミノ酸の番号を示し、機能ドメインを一次構造図中に記載した。各図の下部には、AIB1 が相互作用することが分かっているタンパク質を示した。なお、bHLH； basic helix-loop-helix domain、PAS； Per/ARNT/Sim homologous domain、L； LXXLL-helix motif、S/T； serine/threonine-rich region、Q； glutamine-rich domain をそれぞれ表している。

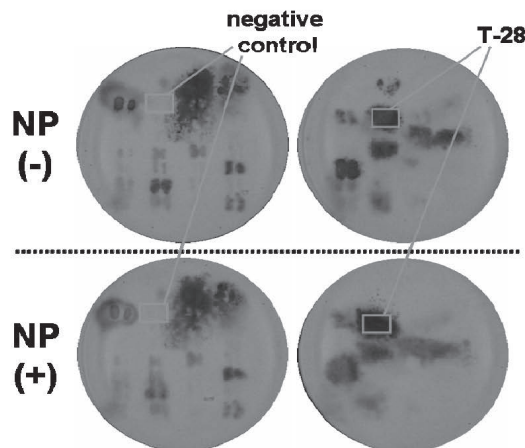


図 2. X-gal フィルターアッセイによる、AIB1-NPR1 結合の NP 依存性解析

図 1 で作製した bait を発現する出芽酵母 MaV203 株に、ヒト正常前立腺 cDNA ライブラリーを導入して、bait に結合するタンパク質をコードする cDNA を持つ酵母をスクリーニングした。得られた酵母クローンを $10 \mu\text{M}$ の NP を含まない培地と含む培地で培養した後、ニトロセルロースフィルター上で、酵母を凍結融解させた。酵母中の LacZ 活性とその NP 依存性を X-gal 溶液中で酵母が青色に染色されるまでの時間経過により評価した。青色になるまでの時間が短いほど、bait に対して強く結合するタンパク質であることを示す。

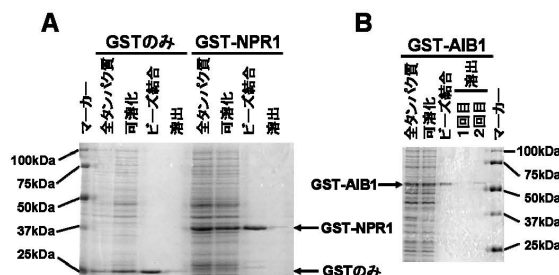


図 3. 精製タンパク質の SDS-PAGE による確認

GST のみと GST-NPR1 の精製結果 (A)、および GST-AIB1 の精製結果 (B) を示す。

製「Can Get Signal B 溶液」で20倍に希釈した一次抗体を作製し37℃、1時間反応させる。それぞれの抗体に対して、Alexa488 標識二次抗体、及び Alexa568 標識二次抗体で25℃、1時間反応させる。その後 Hoechst33258で核を染色する。これを共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV10iw (オリンパス製)) により観察する。位相差観察後、蛍光色素に対応する励起光を照射してタンパク質・核などを観察する。また Hoechst33258 は 405nm の紫外線レーザーで励起し、核を青色に染色する。Alexa488 は 473nm の青色レーザーを照射することで、NPR1 を緑色に染色し、Alexa568 は 559nm の緑色レーザーを照射することで、AIB1 を赤色に染色する。

結果および考察

1. Two-hybrid 法による内分泌攪乱物質受容体候補のスクリーニングと配列決定

転写共役因子 AIB1 のアミノ酸一次構造と、既知の機能ドメイン、モチーフを (図 1) に示す。AIB1 は、中央部分の「LxxLL」モチーフを介して、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体等の様々なホルモン受容体タンパク質と結合する。これらの受容体は様々な遺伝子の転写を調節する機能を持つ。そして、ホルモン受容体による転写活性化には、AIB1 HAT ドメインのもつヒストンアセチル化酵素活性が必須である。真核生物の遺伝情報は、DNA とこれに結合するヒストン (タンパク質) の修飾状態が規定しており、これらを合わせて「エピゲノム」と呼ぶ。すなわち AIB1 は、ヒストンアセチル化という「エピゲノム修飾」により、遺伝子発現をグローバルに制御する「司令塔」的役割を持つ。Bait として図 1 に示す AIB1 の「LxxLL」領域のみを GAL4DB と融合させた。

cDNA ライブラリー 70 万種を SC (−L, −T, −H, +10mM 3AT, 10 μM NP) プレートでスクリーニングした。その結果、このヒスチジン欠乏培地で 50 コロニーが得られ、これらに対して、X-gal を用いた β-galactosidase 活性測定を行った。この際、酵母は 10 μM の NP を含む培地と含まない培地で培養したものをを用いた (図 2)。

AIB1 の LxxLL モチーフ部分のタンパク質に対して、NP に依存して、結合性が増強するものを探索したところ、クローン T-28 が得られた。T-28 がコードするタンパク質は、既知の機能ドメインを有さないタンパク質であり、NPR1 (Nonylphenol Receptor 1) と命名した。NCBI データベース検索の結果、NPR1 はヒト以外にもマウス、ラット、ゼブラフィッシュといった真核生物の間で保存されているタンパク質であった (データ掲載せず)。

2. NPR1 に対する低分子化合物の結合性評価

大腸菌で発現誘導されたタンパク質を SDS-PAGE で解析した結果、全タンパク質と可溶性タンパク質のバンドの濃さが同じであり、ほぼ 100% の可溶化率であることがわかった。ビーズに結合したタンパク質及び溶出したタンパク質では、いずれも単一のバンドが検出されていることから、高い純度で精製できたと考えられる (図 3)。精製したタンパク質はビオチン化し、ストレプトアビジンセンサーへ結合させた。

このバイオセンサーを用いて BLI 法にて解析を行ったところ、10 μM ~ 100 μM の範囲の NP のみが NPR1 と結合し、これを除く 5 種について NPR1 との結合性は確認できなかった (データ掲載せず)。NP についてはさらに 6 段階の希釈を行い同様の解析を行い

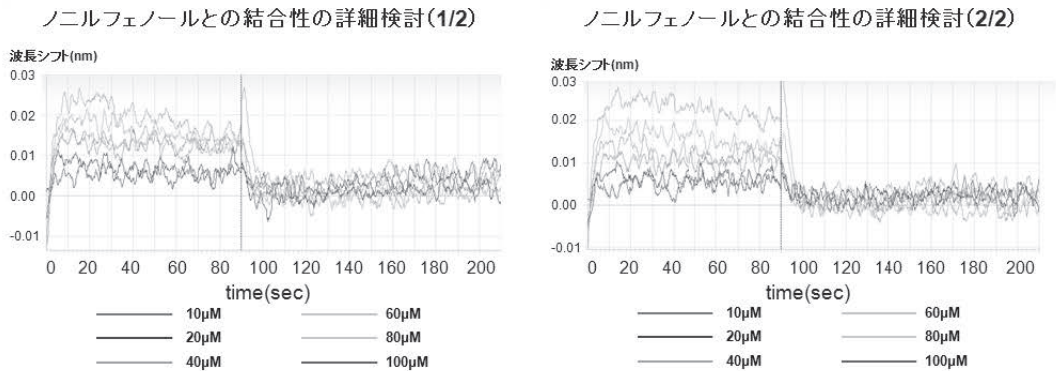


図4. NPR1 タンパク質に対する NP の結合性解析
NPR1 タンパク質に対する NP の結合性について、6 種類の濃度の NP を用いて解析した。横軸において、0 sec ~ 90 sec は結合実験結果を、90 sec ~ 210 sec は解離実験結果を、それぞれ表している。K_D 値を算出するために、A、B の独立した 2 回の実験を行った。

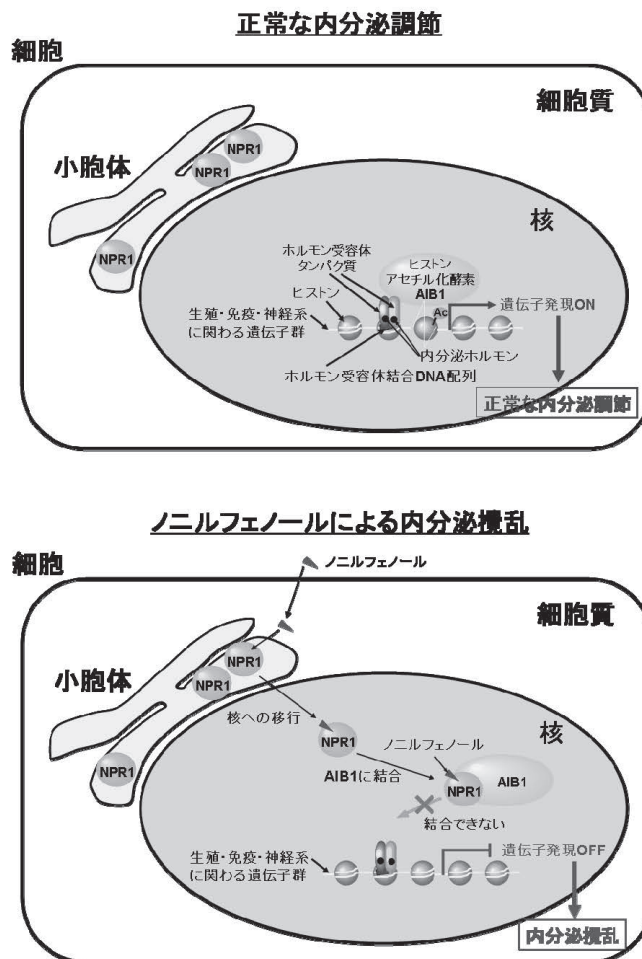


図5. エピジェネティクス制御を標的とする、NP の内分泌攪乱機構の新たなモデル

(図4)、得られた波長シフトデータをプロットし解離平衡定数 (K_D) の算出を行ったところ、NP の K_D は $176 \mu\text{M}$ であった。

3. NPR1 が NP を受容した場合の AIB1 との結合性評価

NPR1 は NP 依存的に AIB1 と結合する分子として単離した分子である。BLI 法にて、この結合が直接的な結合であるかを調べ、 K_D を算出する実験を行った。まず、精製した GST-AIB1 をストレプトアビジンセンサーに結合させ、バイオセンサーを作製した。これに対して、精製したマルトース結合タンパク質 (MBP) 融合 NPR1 (GST の精製と同様に精製) が NP 依存的に結合するか解析した。

その結果、NP 存在下でのみ、NPR1 と AIB1 との結合が観察され、他の条件では結合性はほとんど確認されなかった (データ掲載せず)。このことから、NPR1 と AIB1 のみでは結合性が非常に弱いものの、NPR1 は NP を結合した場合のみ、AIB1 と特異的に結合すると考えられた。この場合の解離平衡定数 K_D は、ほぼ $1 \mu\text{M}$ であった。

4. 蛍光タンパク質を用いた NPR1 の NP 応答性解析

NPR1 タンパク質の細胞内局在性を調べるために、mCherry-NPR1 融合タンパク質を作製し、NPR1 タンパク質の細胞内局在性を蛍光顕微鏡で調べた。NP 非存在下では、NPR1 の赤色蛍光は小胞体の緑色蛍光と重なり、黄色で表示された (データ掲載せず)。従って、NPR1 は NP 非存在下で、主に小胞体に局在すると考えられる。一方、NP 存在下では NPR1 は一部が核に局在した。この結果から NPR1 は NP 存在下で小胞体から核に一部が移行すると考えられた。

5. AIB1 と NP 受容体 NPR1 の細胞内局在性解析

NPR1 が NP を受容した場合、核内で AIB1 との共局在が見られるか、LNCap.FGC 細胞を用いて免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。AIB1 は NP 存在下及び非存在下で主に核に存在した。一方、NPR1 は NP 非存在下では細胞質に存在した。従って NP 非存在下では NPR1 と AIB1 は共局在しなかった。NP を加えた場合、NPR1 の一部が核に存在している細胞が観察された。NP 存在下では、NPR1 の一部と AIB1 が共局在していることもわかった。また NP を加えた場合のみ、核型異常や仮足伸長等、多くの形態異常が観察された (データ掲載せず)。

以上の結果から、NP が、小胞体中の NPR1 を利用してエピジェネティクス制御因子 AIB1 を直接攪乱することで、細胞の遺伝子発現プロファイルを劇的に変化させ、内分泌攪乱を起こす可能性が示唆された (図5)。

参考資料・引用文献

- [1] よくわかる内分泌攪乱物質学、シーア・コルボーン著、1998年、環境新聞社
- [2] Xu J. et.al. Review of the *in Vivo* Functions of the p160 steroid Receptor Coactivator Family. Mol. Endocrinol. 17 (9):1681-1692 (2003)
- [3] Vidal M. et.al. Genetic characterization of a mammalian protein-protein interaction domain by using a yeast reverse two-hybrid system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10321-10326 (1996)