

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が発症する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化が起こる。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ている。

細胞小器官である小胞体内でのタンパク質折りたたみ機構の制御は、細胞の恒常性維持に必須であるばかりか、細胞分化過程にも機能する。この過程では、**XPB1**、**ATF4**、**ATF6 α** 、**ATF6 β** をはじめとした小胞体ストレス応答メディエータータンパク質による標的遺伝子の転写を介した遺伝子発現調節が行われる。タンパク質折りたたみ機構の制御機構がウイルス感染・炎症性サイトカイン・タンパク質変異・環境有害物質への曝露といった小胞体ストレスをきっかけに破綻すると、糖尿病、脂質異常症、骨代謝異常、癌、神経障害等の様々な疾患が引き起こされることもわかってきた。中でも、小胞体ストレスが脂質異常症発症に深くかかわっていることが近年報告されており、脂質との関連では、飽和脂肪酸が小胞体ストレス応答を惹起し、不飽和脂肪酸はこれを抑制することもわかりつつある。しかしながら、小胞体が脂質をどのように検知し応答するのか、そしてその応答シグナルはどのようにして核内に伝達され遺伝子発現を調節するのかといった詳細なメカニズムは不明である。

アルキルフェノール類のノニルフェノール（以下、**NP**と略記）は非イオン界面活性剤が河川等で微生物分解されたり、プラスチック製品の酸化防止剤が酸化・加水分解されて生じる。**NP**は主に生殖器系（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¹⁴⁾。

生体内の内分泌ホルモンは細胞内の種々のホルモン受容体タンパク質に結合することでその生理作用を発揮する⁵⁾。ホルモン受容体は様々な遺伝子の転写を調節する機能を持つ^{6,7)}。そして、ホルモン受容体による転写活性化には、転写共役因子と呼ばれる一群のタンパク質との結合が重要である。**AIB1**⁸⁾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⁹⁾。そして、**AIB1 HAT**ドメインのもつヒストンアセチル化酵素活性により転写が活性化される¹⁰⁾。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。

NP は、男性生殖器系（精巣・前立腺）を主な標的とし、小胞体内カルシウムの恒常性攪乱等により小胞体ストレッサーとして働く。本研究では平成25年度に、NP の受容体として、ヒト前立腺正常細胞から新規タンパク質 NPR1 (Nonylphenol Receptor 1) を同定した。そして、NP により小胞体がストレスを受けた場合、小胞体中の NPR1 が NP を受容して核内に移行し、小胞体ストレストランスデューサーとして、エピジェネティカルな遺伝子発現制御を担うヒストンアセチル化酵素 AIB1 と直接結合することを明らかにしている¹¹⁾。NP は、炭化水素基であるノニル基をもつことから、NPR1 は本来、炭化水素基を有する化合物をリガンドとする受容体として機能すると予測された。

そこで平成26年度は、NPR1 がヒト以外の生物種でどの程度保存されたタンパク質であるかを解析することで、NPR1 機能の普遍性を検証した。さらに、上記の化合物候補として脂肪酸を取りあげ、NPR1 と種々の脂肪酸、あるいはこうした脂肪酸を含むリン脂質との結合性に関する生化学的解析を行った。そして、脂肪細胞分化における小胞体ストレス応答としての新たなエピジェネティクス制御機構を解明して、この機構が深く関与すると考えられる脂質異常症の発症機構の解明に結びつけることを目的とした。これまでに、NPR1 が特定の脂肪酸、あるいはこれらを含むリン脂質と特異的に結合する「脂肪酸受容体」として機能することを見出したので報告する。

方法

1. 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 1 mM 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¹²⁾。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 Slide-A-Lyzer キット (Thermo Scientific) にて透析後、目的タンパク質の20倍モル過剰の Sulfo-NHS-LC-LC-biotin (EZ-Link® Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin キット (Thermo Scientific)) を加え、室温で30分間ビオチン化し、再度透析した。精製したタンパク質を SDS サンプルバッファー (62.5mM Tris-HCl (pH 6.8)、2 % SDS、10%グリセロール、0.35M 2-メルカプトエタノール) 中で96°C、5 分間処理した。10%アクリルアミドを分離ゲルとして用い、定電流 30mA にて50分間、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) によって分子量の違いで分離した。

2. 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、先端の厚みが変化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¹³⁾。本研究で NPR1 との結合性を解析した化合物は、飽和脂肪酸として、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステ

アリン酸、不飽和脂肪酸として、パルミトレイン酸、オレイン酸、リノール酸の6種類である。また、飽和又は不飽和の脂肪酸から構成されるホスファチジルコリン（**DSPC** 又は **DOPC**）をもとに作成したリポソームも結合解析に用いた。バイオセンサーを各化合物溶液に浸して、ビオチン化タンパク質と各化合物との結合性を解析し、解離平衡定数（ K_D ）を算出した。

結果

1. NCBI データベースを用いた NPR1 の保存性解析

NCBI データベースを用いて、DNA の塩基配列をもとに、NPR1 種間での保存性を解析したところ、NPR1 は、酵母からヒトに至る真核生物で保存されており（図1）、真核生物全般に対して NPR1 が普遍的な機能を有している可能性が考えられた。

2. NPR1 に対する脂肪酸、およびリン脂質の結合性評価

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化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た¹⁴⁾。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、不飽和脂肪酸のみが全て NPR1 と結合し、飽和脂肪酸では、NPR1 との結合性は検出されなかった（図2）。パルミトレイン酸、オレイン酸、リノール酸の K_D はそれぞれ、10mM、50 μ M、100 μ M であった。従って、NP の受容体として、元々単離した NPR1 は、不飽和脂肪酸に対する受容体として機能すると考えられた。

次に、**DSPC**（飽和脂肪酸であるステアリン酸の誘導体）又は **DOPC**（不飽和脂肪酸であるオレイン酸の誘導体）を用いてリポソームを作製し、NPR1 との結合性を調べた。その結果、**DOPC** リポソームは NPR1 との結合性を示すが、**DSPC** リポソームは結合性を示さないことが明らかになった（図3）。従って、NPR1 は遊離脂肪酸のみならず、膜構造を形成するホスファチジルコリンのうち、不飽和脂肪酸からなるものに特異的に結合すると考えられた。

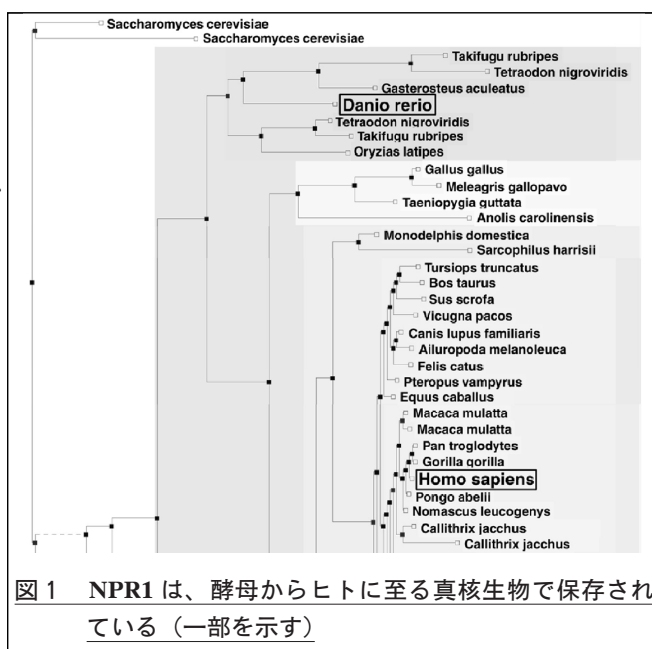


図1 NPR1 は、酵母からヒトに至る真核生物で保存されている（一部を示す）

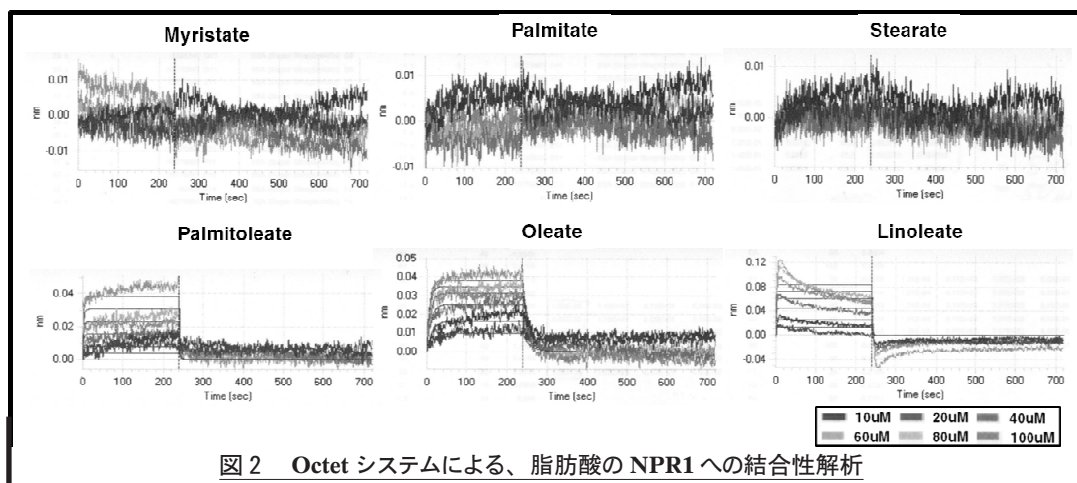


図2 Octet システムによる、脂肪酸の NPR1 への結合性解析

考察

本研究から、本来 NPR1 は小胞体膜中の不飽和脂肪酸を含むリン脂質に結合する形で小胞体に主に局在しているのではないかと推察された。NPR1 は、不飽和脂肪酸とも結合する性質をもつことから、小胞体膜近傍に不飽和脂肪酸が来た場合これを受容することで、立体構造が変化して、小胞体膜から外れるのではないかと考えられる。平成25年

度の成果から、NPR1 は、NP を受容すると一部の population が小胞体から核に移行することがわかっている。従って今後、不飽和脂肪酸を細胞に添加した場合にも、NPR1 が小胞体から核に移行するかを蛍光顕微鏡を用いて検証する必要がある。

本年度の成果から、NPR1 は、脂肪酸代謝の中で特に不飽和脂肪酸のセンサーとして働き、細胞内の不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸の量比をもとに、「小胞体ストレス情報」を核内の AIB1 に伝達するトランスデューサーとして機能する多機能なタンパク質であろうと考えられる。これまでに、小胞体ストレスが、脂肪細胞の分化を促進することもわかってきていることから、NPR1 が不飽和脂肪酸を特異的に受容する生理的意義を含め、脂肪細胞分化における NPR1 の小胞体ストレス応答センサー、そして、エピジェネティクス制御機構へのトランスデューサーとしての機能を解明して、この機構が深く関与すると考えられる脂質異常症の発症機構の解明に結びつけたい。

参考資料・引用文献

- 1) Nakai K, Satoh H (2002) Developmental neurotoxicity following prenatal exposures to

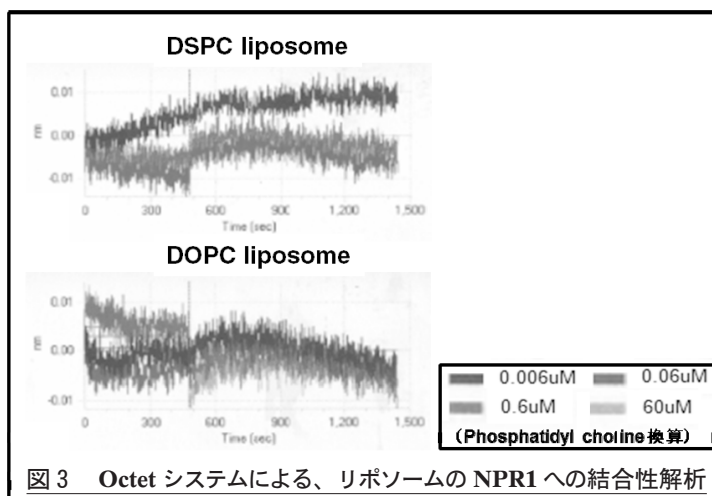


図3 Octet システムによる、リポソームの NPR1 への結合性解析

- methylmercury and PCBs in humans from epidemiological studies. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* **196**:89-98.
- 2) Biles J E, McNeal T P and Begley T H (1997) Determination of bisphenol A migrating from epoxy can coatings to infant formula liquid concentrates. *J Agr Food Chem* **45**: 4697-4700.
 - 3) 磯部 友彦、中田典秀、間藤ゆき枝、西山肇、熊田英峰、高田秀重 (2002) プラスチック製食器等からのノニルフェノールの溶出. *環境化学* **12**: 621-5.
 - 4) Kyselova V, Peknicova J, Buckiova D, Boubelik M (2003) Effects of p-nonylphenol and resveratrol on body and organ weight and in vivo fertility of outbred CD-1 mice. *Reprod Biol Endocrinol* **1**:30-9.
 - 5) Kahn CR (1976) Membrane receptors for hormones and neurotransmitters. *J Cell Biol* **70**:261-286.
 - 6) Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**: 889-95.
 - 7) Li Y, Luh CJ, Burns KA, Arao Y, Jiang Z, Teng CT, Tice RR, Korach KS (2013) Endocrine-Disrupting Chemicals (EDCs): In Vitro Mechanism of Estrogenic Activation and Differential Effects on ER Target Genes. *Environ Health Perspect* **121**: 459-66.
 - 8) Zhou XE, Suino-Powell KM, Li J, He Y, Mackeigan JP, Melcher K, Yong EL, Xu HE (2010) Identification of SRC3/AIB1 as a preferred coactivator for hormone-activated androgen receptor. *J Biol Chem* **285**: 9161-71.
 - 9) Zou JX, Zhong Z, Shi XB, Tepper CG, deVere White RW, Kung HJ, Chen H (2006) ACTR/AIB1/SRC-3 and androgen receptor control prostate cancer cell proliferation and tumor growth through direct control of cell cycle genes. *Prostate* **66**: 1474-86.
 - 10) Chen H, Lin RJ, Schiltz RL, Chakravarti D, Nash A, Nagy L, Privalsky ML, Nakatani Y, Evans RM (1997) Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 1997 **90**: 569-80.
 - 11) 伊藤 太二、山崎 俊介、太田 一樹、大村 正史、親泊 政一 (2014) 内分泌攪乱化学物質ノニルフェノールと結合する新たなタンパク質の同定. *日本栄養・食糧学会誌 in press*.
 - 12) Ito T, Yamauchi M, Nishina M, Yamamichi N, Mizutani T, Ui M, Murakami M, Iba H (2001) Identification of SWI.SNF complex subunit BAF60a as a determinant of the transactivation potential of Fos/Jun dimers. *J Biol Chem* **276**: 2852-7.
 - 13) Do T, Ho F, Heidecker B, Witte K, Chang L, Lerner L (2008) A rapid method for determining dynamic binding capacity of resins for the purification of proteins. *Protein Expr Purif* **60**: 147-50.
 - 14) 伊藤太二、大村正史、山崎俊介 (2014) 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. *鎌倉女子大学学術研究所報* **14**: 41-6.