

201109013A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

小胞体ストレス改善性低分子化合物による新規神経変性
疾患治療開発の基礎的研究

平成 23 年度 総括研究報告書

研究代表者 大岡 伸通

平成 24 (2012) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

小胞体ストレス改善性低分子化合物による新規神経変性疾患治療開発の基礎的
研究 ----- 1

大岡 伸通

(資料1 ~ 資料7) 図1 ~ 図9

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 13

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 14

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

小胞体ストレス改善性低分子化合物による新規神経変性疾患治療開発の基礎的研究

研究代表者 大岡 伸通 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官

研究要旨

神経変性疾患は中枢神経系の特定部位のニューロンが、主として中年期以降に進行性に障害・脱落していく疾患の総称であり、代表的なものとしてはアルツハイマー病、パーキンソン病、ALS（筋萎縮性側索硬化症）、脊髄小脳変性症、プリオン病などがあげられる。社会が高齢化し、神経変性疾患を抱える人の数は著しく増加しているが、神経変性疾患の根本的な治療法は未だ見いだされておらず、新規作用機序による治療薬の開発が必要不可欠である。

これまでの国内外の基礎研究の結果から、ほとんど全ての神経変性疾患の発症過程で小胞体ストレスの関与が明らかになってきている。多くの神経変性疾患で原因となる異常タンパク質の蓄積は小胞体のもつ機能を様々な面から障害し、結果として小胞体ストレスを負荷することで、これによる細胞死を起因としたニューロンの脱落を惹起すると考えられている。細胞は恒常性を維持するために、小胞体ストレスに対応するシステムを有しているが、異常タンパク質の蓄積がこのシステムの処理能力を超えるとアポトーシスを起こすことがわかっている。私はこれまでの研究において、機能がよくわかっていなかったタンパク質TRB3が、小胞体ストレス時に細胞の生存を促す転写因子ATF4の強力なネガティブレギュレーターとして機能することを発見した。また、TRB3はATF4に結合することでその活性を阻害し、小胞体ストレス依存性の細胞死を誘導することを明らかにしてきた。今後の研究ではこのTRB3の作用メカニズムに着目し、新しい神経変性疾患治療薬の開発を目指す。本研究はその第一段階として、TRB3とATF4間の結合を阻害することができる低分子化合物を発見し、その化合物に小胞体ストレスによる神経細胞死の抑制効果が認められるかどうかを検証することで、新規神経変性疾患治療薬開発に向けたリード化合物の基盤を創りあげることが目的としている。TRB3とATF4の結合を阻害できる化合物は、小胞体ストレスによる細胞死を抑制し、神経変性疾患への治療効果が期待できる。

A. 研究目的

これまでの基礎研究から、ほとんど全ての神経変性疾患の発症過程で小胞体ストレスの関与が明らかになってきている（Cell Death Differ., 13: 385-392, 2006）。一方、現在国内外において神経変性疾患の根本的な治療法は未だ見いだされておらず、新規作用機序による治療薬の開発が必要不可欠である。本研究はこれまでの申請者の研究をもとに考案された、新規神経変性疾患治療薬に有用な候補化合物を発見することを目的としている。

小胞体ストレスが生じたときに細胞は、小胞体恒常性維持のためのシステムにより異

常を回復しようとするが、異常がその処理能力を超えると死に至る。即ち、この恒常性維持作用を高めることが神経細胞死を抑制し、強いては神経変性疾患の予防や治療につながると思われる。転写因子ATF4は小胞体ストレス応答で発現が上昇し、様々な抗小胞体ストレスに関わる遺伝子群の発現を誘導することで小胞体の機能を改善し、細胞の生存を高めている。申請者のこれまでの研究で、TRB3がATF4に結合し、その活性を強力に阻害することで小胞体ストレス依存性の細胞死を誘導していることが明らかになった（EMBO J., 24: 1243-55, 2005; J Biol Chem., 282: 35687-94, 2007）。これに基づき

本研究では、TRB3とATF4の結合を阻害できる低分子化合物のスクリーニングを行い、そして活性が見られた化合物に対して、小胞体ストレスによる神経細胞死の抑制効果が認められるかを検証する。将来的な目的は、本研究で見つけた化合物をもとに、実際に臨床で使用することができる医薬品化合物の開発へと研究を進めることである。本研究は小胞体の機能を改善するATF4の活性制御に着目した点、また、その分子メカニズムを基盤にスクリーニングを行う点を特色としている。これまでに小胞体ストレスを改善させる化合物は、ケミカルシャペロンと称される、小胞体シャペロンやフォールディング酵素の活性を上昇させる化合物群や、ATF4の上流で機能するeIF2 α キナーゼに作用するSalubrinalなどが発見されているが、本探索化合物とは作用機序が異なるためこれらとは区別できる。これまでに類を見ないATF4の活性制御を直接標的とした化合物を見つけ出すことが本研究の独創的な点である。

本研究において探索する化合物は、小胞体ストレスの改善を標的とするため、神経変性疾患全般に対しての治療効果が期待される。また同様に、糖尿病など他の小胞体ストレス関連疾患の治療に対しても有効であると考えられる。小胞体ストレス応答システムのコンポーネントは互いに複雑に絡み合っているため、一般に小胞体ストレス改善性化合物が大きな臨床効果を発揮するには複数のポイントに作用しうることが必要になると考えられる。このため、既に開発が進んでいるケミカルシャペロン等と作用機序の異なる本探索化合物に予想される活性が見られれば、その成果は臨床的にも、学術的にも評価されることが期待できる。

本研究は神経変性疾患の治療薬開発の基礎的研究として、厚生労働行政の難治療疾患対策に直接関連する。本研究が完成すれば、社会の高齢化に伴い深刻に増加しているアルツハイマー認知症の治療や進行の抑制にも貢献することが期待され、患者の生活の向上及び介護者の負担の減少の面から、社会的にもメリットがある。

上述した様に、本探索化合物は小胞体ストレス改善性化合物であることから、様々な小

胞体ストレス関連疾患に対して治療もしくは予防効果が期待でき、医薬品開発にかかる経済的なコストはそれぞれ個々の疾患に対して開発する場合と比べて、大幅に削減することができる。

B. 研究方法

ATF4標的遺伝子のプロモーター領域を挿入したレポーター遺伝子、もしくはGAL4システムを利用したレポーター遺伝子を用いたルシフェラーゼ・アッセイにより、ATF4の転写活性を簡便に測定することができる。さらにこの培養細胞系において、レポーター遺伝子に加え、ATF4（もしくはGAL4融合型ATF4）とTRB3を異所性に共発現させることで、TRB3によるATF4転写活性の抑制の程度を測定することが可能である（資料1, 図1参照）。

当初の研究計画では、この系により、TRB3によるATF4の転写活性の抑制を阻害できる低分子化合物のスクリーニングを行う予定であったが、研究開始当初の創薬オープンイノベーションセンター・生物機能制御化合物ライブラリー機構の方々とのディスカッションにおいて、この系では目的のメカニズムに沿わない、いわゆるネガティブな化合物が数多くヒットする可能性が高いとの意見をいただき、時間分解蛍光共鳴エネルギー転移(TR-FRET)法によるスクリーニング系へと変更した。TR-FRET系はテルビウムキレート標識分子を340nmの励起光で励起させたときに、近くに存在するフルオレッセイン標識分子に対して起こるエネルギー転移を利用した*in vitro*のアッセイ系である。この系は目的の分子メカニズムで作用する化合物を見つけ出すといった本研究の性質を考えると、ハズレの化合物を拾う可能性が低い最適な方法であると考えられる。

具体的な方法としてはMycタグTRB3とFlagタグATF4のリコンビナントタンパク質を*in vitro*で混合し、それぞれテルビウム標識抗Myc抗体、フルオレッセイン標識抗Flag抗体で認識させることで生じるTR-FRETを阻害することができる低分子化合物のスクリーニングを行う（資料1, 図2参照）。スクリーニングに必要なMyc-TRB3及びFlag-ATF4の全長

リコンビナントタンパク質の精製を行い、精製が困難な場合は、それぞれ両タンパク質の結合部位を含んだフラグメントタンパク質で代用する。これらのタンパク質を用いて、TR-FRET法によるスクリーニングを創薬オープンイノベーションセンター・生物機能制御化合物ライブラリー機構の低分子化合物ライブラリーに対して行い、両タンパク質の結合を阻害する化合物を見つける。

上記スクリーニングでヒットした化合物について、レポーターアッセイ系で、細胞内でもTRB3によるATF4転写活性の抑制を阻害するか確認する。

活性が見られた化合物が、実際に細胞内でATF4とTRB3の結合を阻害することでATF4の転写活性を阻害しているか、免疫沈降法により調べる。具体的には、培養細胞に化合物を添加することで、ATF4とTRB3の結合が減少するか検証する。

選別された化合物をSK-N-SHなどの神経細胞株に添加することで、ATF4ターゲット遺伝子の発現上昇作用が見られるか、定量性RT-PCRやウエスタンブロットにより検討する。また、同様にこれらの化合物を神経細胞株に添加することで、小胞体ストレスによる細胞死を抑制することができるか検証する。

(倫理面への配慮) 本研究は直接的な研究対象者が存在しないため、倫理面に問題はない。

C. 研究結果

スクリーニングに必要なリコンビナントタンパク質を精製するために、Myc-TRB3もしくはFlag-ATF4のコーディング領域をGST融合型タンパク質精製用プラスミドpGEX-6P-1に組み込んだ。それぞれ精製したプラスミドをプロテアーゼ欠損大腸菌株のBL21に導入した後、イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド(IPTG)添加によるGlutathione S-transferase(GST)融合型タンパク質の誘導発現を行った。目的のリコンビナントタンパク質が十分な量及び純度で精製可能であるか、大腸菌溶解後に可溶性画分、不溶性画分、Glutathione Sepharose 4B担体により精製した画分をSDS-PAGE後、クーマシーブリリアントブルー(CBB)染色

により確認した。(本精製においては、精製過程において特異的なプロテアーゼによるGSTの切除を行う。) その結果、Myc-TRB3の全長タンパク質はほとんど不溶性画分に存在し、可溶性画分には一部しか溶出しなかった(資料2, 図3参照)。Flag-ATF4に関しては多くが可溶性画分に存在していたが、GST-pull downによる精製画分には、十分量存在していなかった。

そこで、この打開策として両者の結合領域の同定を行い、結合部位付近を含んだフラグメントリコンビナントタンパク質で代用することとした。まず、Flagタグした様々なATF4の欠失変異体(N末端90アミノ酸欠失変異体: ΔN90、C末端140アミノ酸欠失変異体: N175、N末175アミノ酸欠失変異体: C176)を発現させるプラスミドを作製し、これらを各々Myc-TRB3発現プラスミドと293T培養細胞に共発現させ、免疫沈降法によりATF4内のTRB3結合領域を調べた。その結果、ATF4 ΔN90及びC176ではTRB3との結合が見られず、N175及び野生型では結合が見られたことから、ATF4のN末端90アミノ酸がTRB3との結合領域であることがわかった(資料3, 図4; 資料4, 図6参照)。次に、ATF4のN末端90アミノ酸付近のみでTRB3と結合可能であるか調べるために、N末端98アミノ酸のみのFlag-ATF4 N98とMyc-TRB3の結合を同様に調べたところ、これらの結合が確認されたことから、TRB3との結合にはATF4のN末端98アミノ酸のみで十分であることがわかった(資料3, 図5; 資料4, 図6参照)。そこで、N末端98アミノ酸のみのATF4フラグメントリコンビナントタンパク質が十分量精製できるか、このアミノ酸のコード領域をpGEX-6P-1プラスミドへと領域を導入し、BL21でのタンパク誘導及び精製の確認を行った(資料5, 図7参照)。図に示すように、ATF4のN末端98アミノ酸とGSTの融合タンパク質は十分な量及び純度で精製可能であることが確認できた。

同様の実験をTRB3についても行った。Mycタグした様々なTRB3の欠失変異体(N末端127アミノ酸欠失変異体: ΔN127、C末端76アミノ酸欠失変異体: ΔC76、C末端179アミノ酸欠失変異体: N179、N末179アミノ酸欠失

変異体: C179、C末端233アミノ酸欠失変異体: N125、N末116及びC末端111アミノ酸欠失変異体: 117-247、N末239アミノ酸欠失変異体: C119)を発現させるプラスミドを作製し、これらを各々Flag-ATF4発現プラスミドと293T培養細胞に共発現させ、免疫沈降法によりTRB3内のATF4結合領域を調べた(資料6, 図8; 資料4, 図6参照)。その結果、全ての欠失変異体で野生型TRB3に比べてATF4との結合が減弱するものの、両者の結合が確認された。この結果から、TRB3に関してはフラグメントタンパク質による代用も適切でないと考えられた。

そこでTRB3に関しては全長タンパク質の精製条件の検討を行った。誘導タンパク質がほとんど可溶性画分に存在していなかったことから、変性条件下での精製を検討した。変性条件下においてはGSTタンパク質を利用したpull downが行えないと考えられるので、Myc-TRB3のコーディング領域をHisタグタンパク質精製用プラスミドpET-28aに組み込み、尿素を含んだ変性条件下での大腸菌溶解、Ni-NTA精製を行ったところ、可溶性画分及び精製画分に十分量存在することが確認できた(資料7, 図9参照)。

D. 考察

本研究はTRB3によるATF4の転写活性の抑制を阻害できる低分子化合物を見つけ出すことを目的としており、このTRB3の活性にはATF4との結合が重要であると考えられることから、両者の結合を測定できるTR-FRET系に必要なリコンビナントタンパク質の精製を行った。全長タンパク質の精製において、Flag-ATF4に関しては多くが可溶性画分に存在していたにも関わらず、GST-pull downによる精製画分には、十分量存在していなかった。この解決策としてTRB3との結合領域を解析し、ATF4のN末端98アミノ酸のみがTRB3との結合に重要であることがわかり、さらにこの領域のGST融合リコンビナントタンパク質が十分な量及び純度で精製可能であることが確認できた。ATF4に関しては今後、GST融合Flag-ATF4 N98の本精製を行い、GST-pull down後に特異的なプロテアーゼによるGSTの切除を行うことで精製されるFlag-ATF4 N98を用

いてスクリーニング系を構築する予定である。

一方、Myc-TRB3に関しては全長タンパク質の精製において、ほとんど可溶性画分には存在しておらず、GST-pull downにより濃縮しても全く回収されなかった。TRB3におけるATF4との結合領域を解析したところ、全てのTRB3欠失変異体でATF4との結合が確認された。この結果のみを考えると、TRB3は複数の領域を介してATF4と結合していると想定され、TRB3に関してはフラグメントタンパク質による代用も適切でないと考えられた。しかし、この実験系ではTRB3の結合に特異性がなく、しっかり復元できていない可能性も考えられることから、実験系を再検討する必要もあると考えている。

一方、尿素を含んだ変性条件下ではMyc-TRB3全長タンパク質が精製可能であることがわかったので、本精製で問題なく精製できれば、このタンパク質をスクリーニングに用いる予定である。ただ、尿素を含まない通常の精製条件もIPTG誘導温度、時間など再検討の余地があると考えている。

今年度の研究から得られた新たな知見としては、ATF4におけるTRB3の結合領域が明らかになったことが挙げられる。ATF4が属するbZIPファミリーの転写因子群は、C末端に存在するロイシンジッパーで二量体を形成し、その近隣に存在する塩基性DNA結合領域で挟むようにDNAと結合し、フリーになったN末端で転写コアクチベーターをリクルートする。私の以前までの研究結果から、TRB3は同じbZIP型転写因子であるCHOPとN末端を介して結合し、転写コアクチベーターであるp300のリクルートを阻害することがわかっている。また、同様にTRB3がATF4とp300の結合を阻害することも明らかにしている。この結果から考えると、TRB3はCHOPに対してと同様に、ATF4のN末端に存在する転写活性化ドメインを介して結合すると予想され、実際今回の結果から、TRB3はCHOPに対してと同様のメカニズムによりATF4の転写活性を抑制していると考えられた。

E. 結論

TR-FRETスクリーニング系に必要なリコン

ビナントタンパク質の精製において、通常の精製条件ではTRB3及びATF4の全長タンパク質はどちらも十分量精製できなかった。

ATF4のN末端98アミノ酸のみがTRB3との結合に重要であり、この領域のリコンビナントタンパク質は通常の精製条件下で十分量精製可能であった。

TRB3は複数の領域を介してATF4と結合することから、本研究のスクリーニング系においてはフラグメントタンパク質により代用することは適切でないことがわかった。

TRB3の全長リコンビナントタンパク質は尿素を含んだ変性条件では十分量可溶性画分に存在することがわかった。

F. 健康危険情報

特に該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohoka N, Okuhira K, Cui H, Wu W, Sato R, Naito M, Nishimaki-Mogami T.

HNF4 α Increases Liver-Specific Human ATP-Binding Cassette Transporter A1 Expression and Cholesterol Efflux to Apolipoprotein A-I in Response to Cholesterol Depletion.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012; 32(4):1005-14.

2. Okuhira K, Ohoka N, Sai K, Nishimaki-Mogami T, Itoh Y, Ishikawa M, Hashimoto Y, Naito M.

Specific degradation of CRABP-II via cIAP1-mediated ubiquitylation induced by hybrid molecules that crosslink cIAP1 and the target protein.

FEBS Lett. 2011; 585(8):1147-52.

2. 学会発表

1. 大岡 伸通, 林 秀敏, 内藤 幹彦, 佐藤 隆一郎

ヒト肝癌細胞株におけるTRB3によるSREBP-2制御機構の解明

日本薬学会第132年会 2012年3月29日(札幌)

2. 大岡 伸通, 林 秀敏, 内藤 幹彦, 佐藤 隆一郎

ヒト肝癌細胞株におけるTRB3によるSREBP-2制御機構の解明

第34回日本分子生物学会年会 2011年12月15日(横浜)

3. 大岡 伸通, 林 秀敏, 内藤 幹彦, 佐藤 隆一郎

ヒト肝癌細胞株におけるTRB3によるSREBP-2制御機構の解明

第70回日本癌学会学術総会 2011年10月4日(名古屋)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特に該当なし。

2. 実用新案登録

特に該当なし。

3. その他

特に該当なし。

資料1

図1

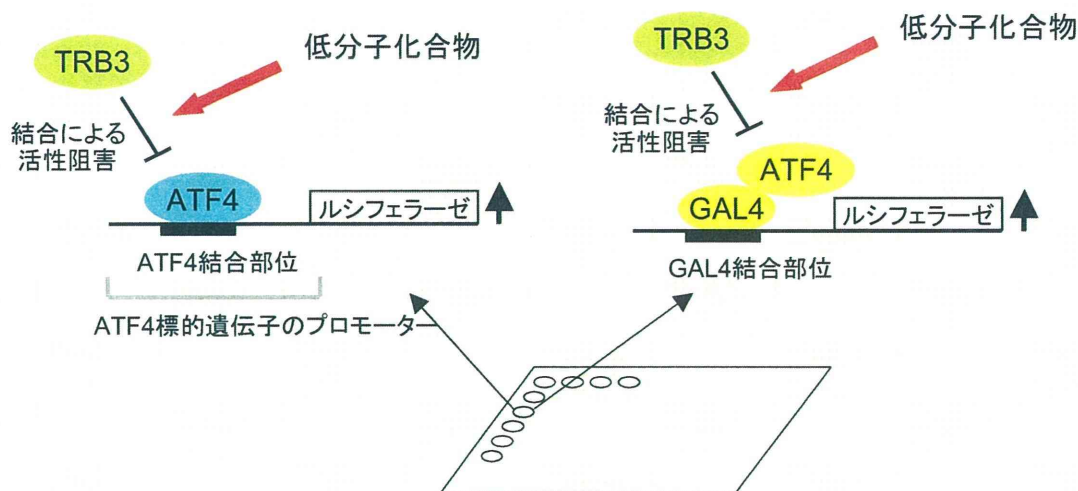


図1. ルシフェラーゼアッセイを用いた低分子化合物スクリーニング系 HeLa細胞などの培養細胞にATF4標的遺伝子のプロモーター領域を挿入したレポーター遺伝子、もしくはGAL4システムを利用したレポーター遺伝子を用いたルシフェラーゼ・アッセイにより、ATF4の転写活性を測定する。このアッセイ系では、レポーター遺伝子に加え、ATF4(もしくはGAL4融合型ATF4)とTRB3を異所性に共発現させることで、TRB3によるATF4転写活性の抑制の程度を測定できる。この系により、TRB3によるATF4の転写活性の抑制を阻害することができる低分子化合物のスクリーニングを行う予定であった。

図2

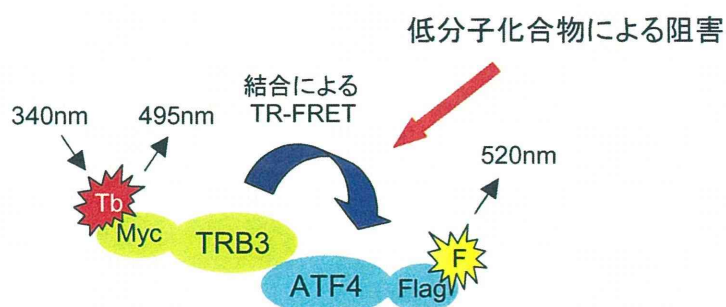


図2. TR-FRET(時間分解蛍光共鳴エネルギー転移)を利用した低分子化合物スクリーニング系 テルビウム(Tb)標識分子であるTRB3とフルオレセイン(F)標的分子であるATF4が結合するとエネルギー転移が生じ、アクセプター(ATF4)の蛍光が増加してドナー(TRB3)の蛍光は減少する。エネルギー転移の程度を測定することで、目的の低分子化合物をスクリーニングする。

図3

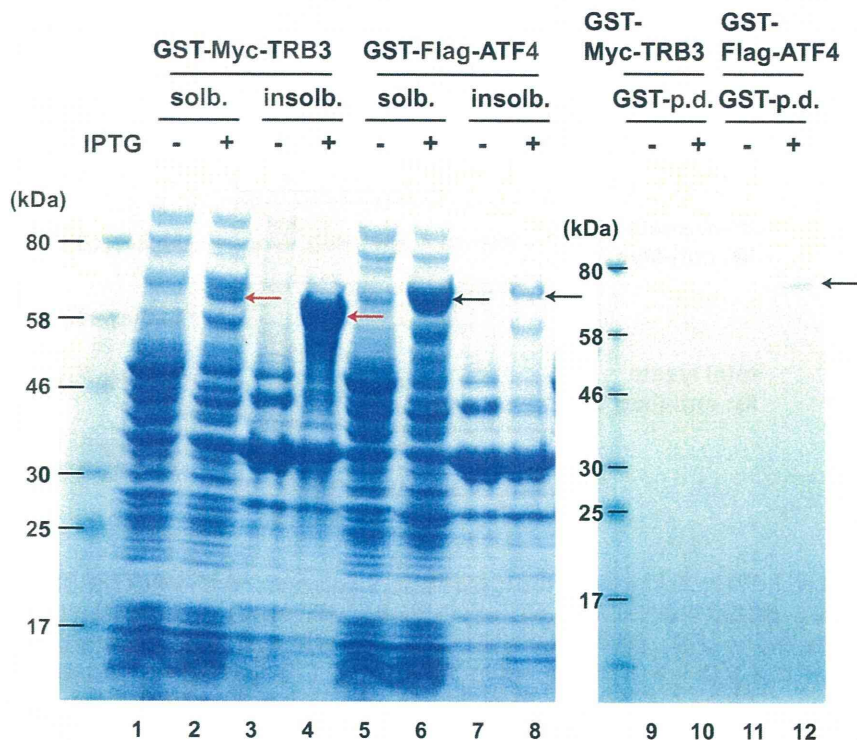


図3. 全長Myc-TRB3, Flag-ATF4リコンビナントタンパク質の精製
 pGEX-6P-Myc-TRB3もしくはpGEX-6P-Flag-ATF4をBL21に導入し、0.2mM IPTGを添加後、30℃で4時間培養しタンパク質の発現を誘導した。それぞれのBL21を可溶化バッファーで再懸濁後、sonicationにより溶解し遠心分画することで、上清を可溶性画分 (soluble fraction: solb.)、沈殿物を不溶性画分 (insoluble fraction: insolb.) とした。さらに上清はGlutathione Sepharose 4B担体により精製した (GST-pull down: GST-p.d.)。それぞれの画分タンパク質をSDS-PAGEで分離後、CBB染色により確認した。(赤矢印: GST-Myc-TRB3, 黒矢印: GST-Flag-ATF4)

資料3

図4

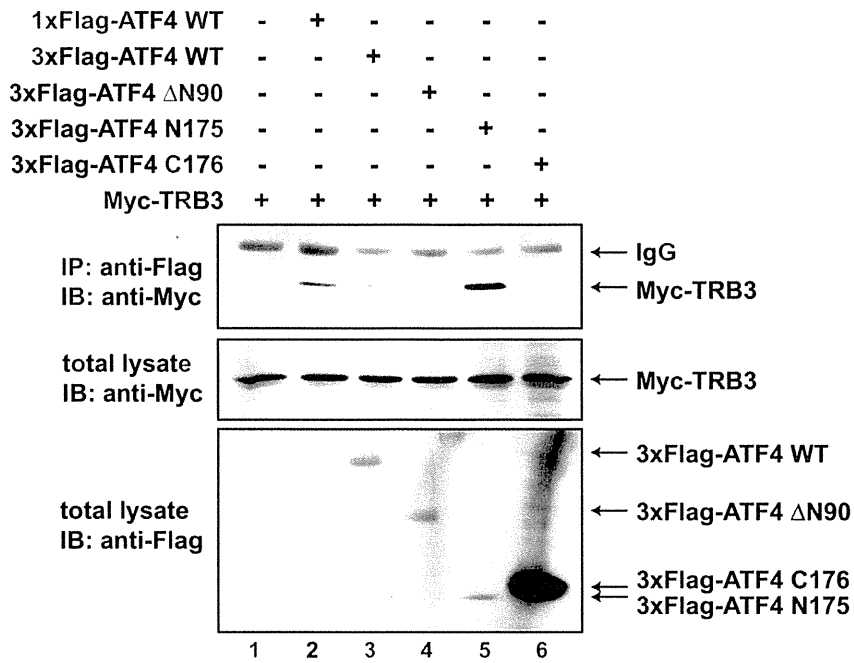


図4. 様々なATF4の欠失変異体とTRB3の結合を調べることで、ATF4内のTRB3結合領域を調べた。293T細胞に、図に示すようにFlag-ATF4野生型(WT: wild type), 欠失変異体, もしくはMyc-TRB3をトランスフェクション後、抗Flag抗体を用いて免疫沈降(IP: Immunoprecipitation)を行い、抗Myc抗体を用いたイムノブロット(IB: immunoblot)により解析した。1xFlag-ATF4は検出限界以下しか発現しなかったが、TRB3との結合は検出可能であった。ATF4の発現を確認するために(検出感度を上げるために)3xFlag-ATF4を用いた。

図5

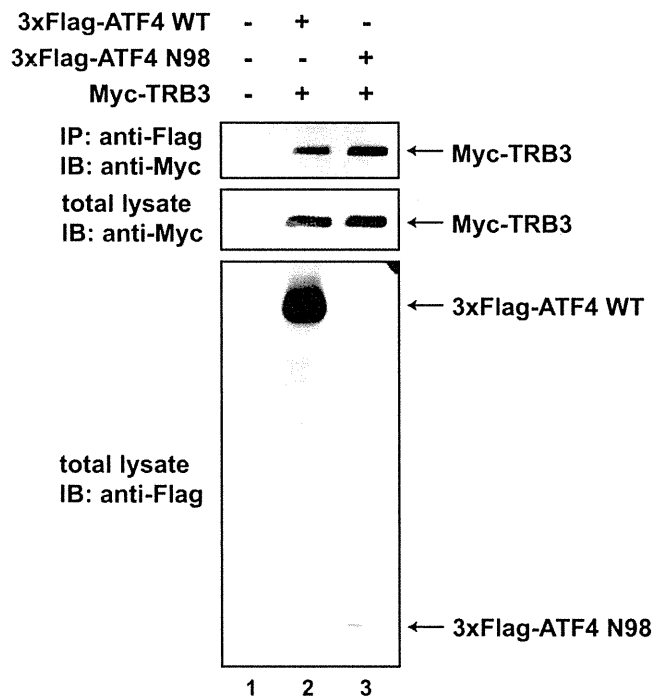


図5. ATF4のN末端98アミノ酸のみでTRB3と結合できるか調べた。293T細胞に、図に示すようにFlag-ATF4野生型(WT: wild type), N98, もしくはMyc-TRB3をトランスフェクション後、抗Flag抗体を用いて免疫沈降(IP: Immunoprecipitation)を行い、抗Myc抗体を用いたイムノブロット(IB: immunoblot)により解析した。

資料4

図6

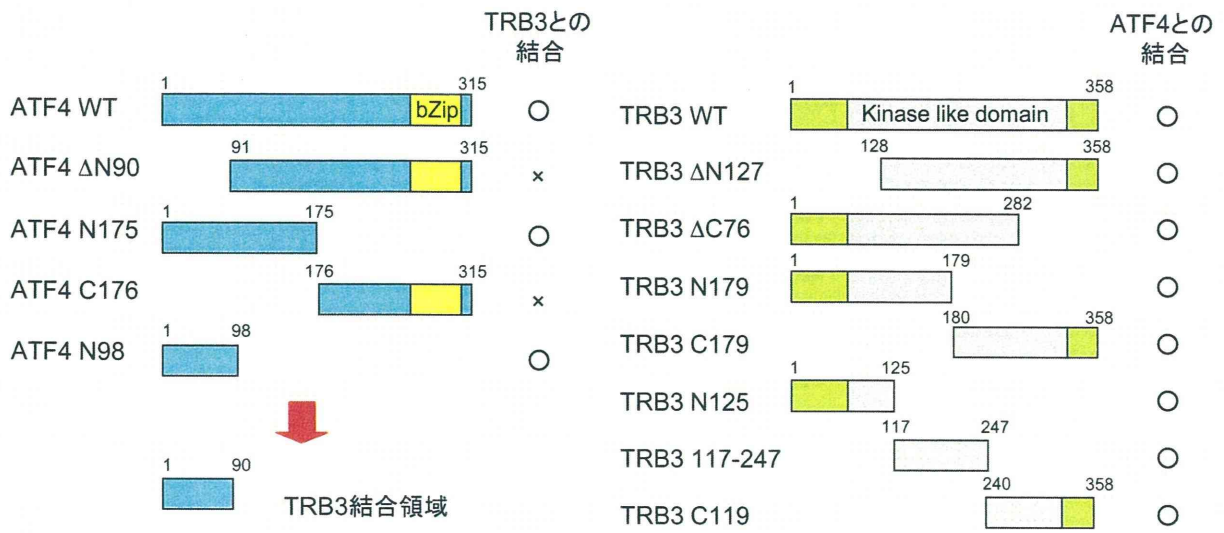


図6. 欠失変異体を利用したATF4とTRB3の結合領域の同定

資料5

図7

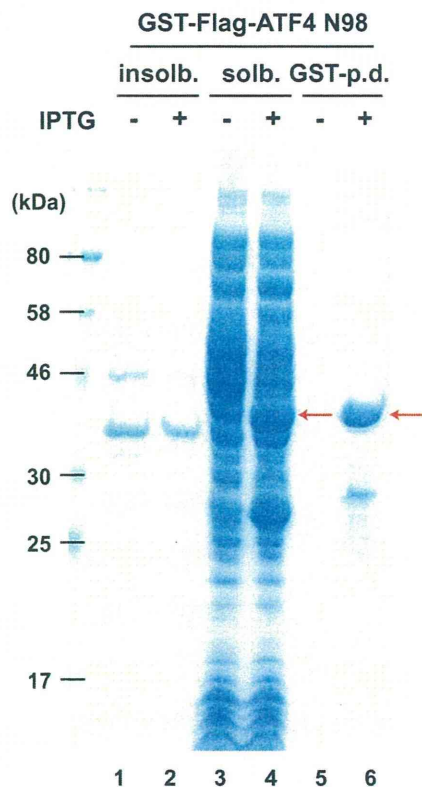


図7. Flag-ATF4 N98 リコンビナントタンパク質の精製

pGEX-6P-pGEX-6P-Flag-ATF4 N98をBL21に導入し、0.2mM IPTGを添加後、30℃で4時間培養しタンパク質の発現を誘導した。それぞれのBL21を可溶化バッファーで再懸濁後、sonicationにより溶解し遠心分画することで、上清を可溶性画分 (soluble fraction: solb.)、沈殿物を不溶性画分 (insoluble fraction: insolb.) とした。さらに上清はGlutathione Sepharose 4B担体により精製した (GST-pull down: GST-p.d.)。それぞれの画分タンパク質をSDS-PAGEで分離後、CBB染色により確認した。(赤矢印: GST-Flag-ATF4 N98)

資料6

図8

1xFlag-ATF4	+	+	+	+	+	+	+	+
Myc-TRB3 WT	+	-	-	-	-	-	-	-
Myc-TRB3 ΔC76	-	+	-	-	-	-	-	-
Myc-TRB3 ΔN127	-	-	+	-	-	-	-	-
Myc-TRB3 N179	-	-	-	+	-	-	-	-
Myc-TRB3 C179	-	-	-	-	+	-	-	-
Myc-TRB3 N125	-	-	-	-	-	+	-	-
Myc-TRB3 117-247	-	-	-	-	-	-	+	-
Myc-TRB3 C119	-	-	-	-	-	-	-	+

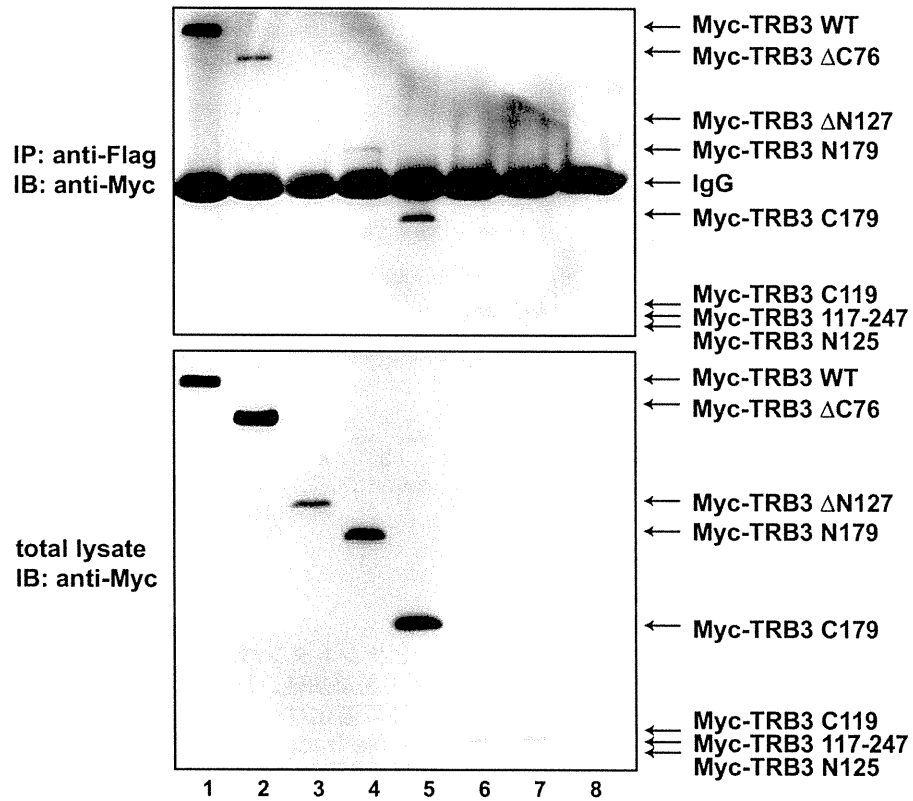


図8. 様々なTRB3の欠失変異体とATF4の結合を調べることで、TRB3内のATF4結合領域を調べた。293T細胞に、図に示すようにMyc-TRB3野生型(WT: wild type), 欠失変異体, もしくはFlag-ATF4をトランスフェクション後、抗Flag抗体を用いて免疫沈降(IP: Immunoprecipitation)を行い、抗Myc抗体を用いたイムノブロット(IB: immunoblot)により解析した。

資料7

図9

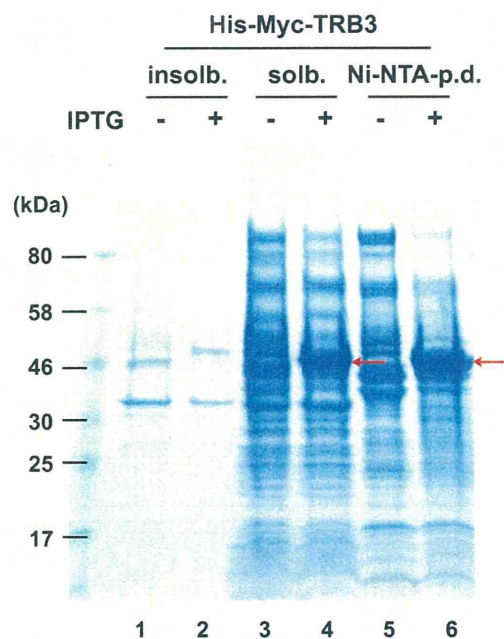


図9. 変性条件におけるMyc-TRB3全長リコンビナントタンパク質の精製
pET-Myc-TRB3をBL21に導入し、0.2mM IPTGを添加後、30°Cで4時間培養しタンパク質の発現を誘導した。それぞれのBL21を尿素を含んだ変性可溶化バッファーで再懸濁後、sonicationにより溶解し遠心分画することで、上清を可溶性画分 (soluble fraction: solb.)、沈殿物を不溶性画分 (insoluble fraction: insolb.) とした。さらに上清はNi-NTA agarose担体により精製した (Ni-NTA-pull down: Ni-NTA-p.d.)。それぞれの画分タンパク質をSDS-PAGEで分離後、CBB染色により確認した。
(赤矢印: His-Myc-TRB3)

書籍 特に該当なし

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nobumichi Ohoka, Keiichiro Okuhira, Hongyan Cui, Weijia Wu, Ryuichiro Sato, Mikihiro Naito, Tomoko Nishimaki-Mogami	HNF4 α Increases Liver-Specific Human ATP-Binding Cassette Transporter A1 Expression and Cholesterol Efflux to Apolipoprotein A-I in Response to Cholesterol Depletion	Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology	32 (4)	1005-14	2012
Keiichiro Okuhira, Nobumichi Ohoka, Kimie Sai, Tomoko Nishimaki-Mogami, Yukihiro Itoh, Minoru Ishikawa, Yuichi Hashimoto, Mikihiro Naito	Specific degradation of CRABP-II via cIAP1-mediated ubiquitylation induced by hybrid molecules that crosslink cIAP1 and the target protein.	FEBS Letters	585 (8)	1147-52	2011

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



HNF4 α Increases Liver-Specific Human ATP-Binding Cassette Transporter A1 Expression and Cholesterol Efflux to Apolipoprotein A-I in Response to Cholesterol Depletion

Nobumichi Ohoka, Keiichiro Okuhira, Hongyan Cui, Weijia Wu, Ryuichiro Sato,
Mikihiko Naito and Tomoko Nishimaki-Mogami

Arterioscler Thromb Vasc Biol 2012, 32:1005-1014: originally published online
January 26, 2012

doi: 10.1161/ATVBAHA.111.238360

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is published by the American Heart Association,
7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2012 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 1079-5642. Online
ISSN: 1524-4636

The online version of this article, along with updated information and services, is
located on the World Wide Web at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/32/4/1005>

Data Supplement (unedited) at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/suppl/2012/01/25/ATVBAHA.111.238360.DC1.html>

Subscriptions: Information about subscribing to Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular
Biology is online at
<http://atvb.ahajournals.org//subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters
Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax:
410-528-8550. E-mail:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/reprints>

HNF4 α Increases Liver-Specific Human ATP-Binding Cassette Transporter A1 Expression and Cholesterol Efflux to Apolipoprotein A-I in Response to Cholesterol Depletion

Nobumichi Ohoka, Keiichiro Okuhira, Hongyan Cui, Weijia Wu, Ryuichiro Sato, Mikihiko Naito, Tomoko Nishimaki-Mogami

Objective—Hepatic ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) plays the major role in maintaining plasma high-density lipoprotein levels by producing cholesterol-accepting nascent high-density lipoprotein, whereas peripheral ABCA1 is responsible for releasing cellular cholesterol. We previously reported that in rodents, cholesterol depletion reduces ABCA1 expression in peripheral but not hepatic cells by increasing a liver-specific *ABCA1* transcript via the sterol regulatory element-binding protein-2 system. However, the regulatory element is not conserved in humans. Here we investigated the mechanism of sterol-regulated human hepatic *ABCA1* gene expression.

Methods and Results—*ABCA1* mRNA variant *type L3* is a novel and human-liver-specific transcript accounting for $\approx 25\%$ of total *ABCA1* mRNA in the liver and is induced by cellular cholesterol depletion. Specific knockdown or forced expression revealed that *type L3* produces functional ABCA1 protein in cholesterol efflux. We identified a regulatory enhancer element for *L3* expression lying within intron 3 of the human *ABCA1* gene, to which hepatocyte nuclear factor (HNF) 4 α binds in response to cholesterol depletion. HNF4 α knockdown abolished induction of liver-specific *L3* and *L2b* transcripts (and consequently the liver-type response of ABCA1 expression to cellular cholesterol status) and diminished cholesterol efflux activity.

Conclusion—These findings indicate that HNF4 α regulates human hepatic ABCA1 expression in response to cholesterol depletion. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:1005-1014.)

Key Words: ABC transporter ■ gene expression ■ lipoproteins ■ cholesterol regulation

The ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) is a plasma membrane transporter involved in cholesterol and phospholipid transport that plays a critical role in apolipoprotein A-I (apoA-I)-dependent biogenesis of high-density lipoprotein (HDL).^{1,2} *ABCA1* gene mutations cause Tangier disease and familial HDL deficiencies characterized by a near absence of circulating HDL. The essential role of ABCA1 in HDL biogenesis was further demonstrated by studies that included ABCA1 overexpression and deletion in mice.^{3,4}

Although ABCA1 is widely expressed in many tissues, gene-targeting studies in mice revealed that hepatic ABCA1 is responsible for approximately 80% of plasma HDL production.⁵ Further studies suggested that the role of hepatic ABCA1 in maintaining plasma HDL levels is distinct from that of extrahepatic ABCA1.⁶ Hepatic ABCA1 is critical for phospholipidating lipid-free apoA-I to generate cholesterol-poor early nascent HDL particles that in turn provide efficient cholesterol acceptors for peripheral cells, whereas ABCA1 in peripheral cells, such as macrophages and fibroblasts, mediates release of excess cellular cholesterol by generating

mature HDL particles,⁶ probably in a sequential collaboration with ABCG1.⁷ The proposed roles of hepatic and peripheral ABCA1 are consistent with a classic model of the reverse cholesterol transport pathway, in which HDL transports excess cholesterol from peripheral cells to the liver, where cholesterol can be converted into bile acids for excretion.⁸

Hepatic and peripheral ABCA1 are under distinct gene regulation. ABCA1 expression in peripheral cells is upregulated by a liver X receptor (LXR)-driven promoter system in response to cholesterol loading.⁹ Conversely, cholesterol depletion or treatment of cells with statins that inhibit endogenous LXR ligand synthesis represses ABCA1 expression,^{10,11} collectively indicating that cellular cholesterol homeostasis is stringently controlled by the LXR-ABCA1 pathway in peripheral cells. In contrast, hepatic *ABCA1* expression appears to be unaffected by sterols as suggested by the failure of cholesterol feeding of mice to elevate hepatic ABCA1 expression^{12,13} and the inability of cholesterol depletion to repress expression.¹⁴⁻¹⁷ In the preceding study using rodents,¹⁴ we identified a liver-specific ABCA1 mRNA

Received on: September 6, 2011; final version accepted on: January 13, 2012.

From the Division of Biochemistry and Molecular Biology, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan (N.O., K.O., H.C., W.W., M.N., T.N.-M.); Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan (R.S.).

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://atvb.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/ATVBAHA.111.238360/-/DC1>.

Correspondence to Tomoko Nishimaki-Mogami, PhD, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan. E-mail: mogami@nihs.go.jp

© 2012 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.238360

Downloaded from <http://atvb.ahajournals.org/> by guest on March 15, 2012

variant and a corresponding promoter element driven by sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2), a transcription factor activated by cellular cholesterol depletion, in addition to the peripheral-type *ABCA1* mRNA in the liver. Thus, cholesterol negatively and positively affects the liver-type SREBP-2 and peripheral-type LXR promoters, respectively, to control hepatic *ABCA1* expression. This SREBP-2- and LXR-driven dual promoter system appears to ensure that hepatic *ABCA1* expression is constant even under fluctuating cholesterol conditions and may be associated with *ABCA1*'s specific role in producing cholesterol acceptors in the reverse cholesterol transport pathway. Recently, microRNA-33 was shown to contribute to sterol-responsive *ABCA1* gene regulation. MicroRNA-33, located within the gene encoding *SREBP2*, inhibits the expression of *ABCA1* and makes a significant contribution to hepatic *ABCA1* and plasma HDL levels in mice.^{18,19} Thus, multiple systems are likely to regulate hepatic *ABCA1* expression.

In human hepatoma HepG2 cells, *ABCA1* mRNA levels are slightly augmented on statin treatment,^{16,17} which suggests that a liver-type regulation also occurs in humans. However, the SREBP-2 binding element (sterol regulatory element) in the liver-type promoter is not conserved in humans, suggesting that a different system may drive liver-specific *ABCA1* expression in humans. We report here that hepatocyte nuclear factor (HNF) 4 α regulates expression of liver-specific *ABCA1* transcripts in response to cholesterol depletion.

Methods

An expanded Material and Methods section is available in the online-only Data Supplement. 5'-rapid amplification of cDNA end (RACE), plasmid construction, cell culture, RNA extraction and quantitative real-time reverse transcription (RT)-PCR, Northern and Western blot analyses, RNA interference, reporter gene assays, cholesterol efflux assays, chromatin immunoprecipitation assay, electrophoretic mobility shift assay, avidin biotin-conjugated DNA assay, lentivirus infection, and statistical analysis are described in detail in the online-only Data Supplement.

Results

Expression of Liver-Specific *ABCA1* mRNA

Variants in Human Liver Tissue and Hepatic Cells

To identify liver-specific *ABCA1* transcripts, we performed 5'-rapid amplification of cDNA end on total RNA extracted from human liver and identified 4 major bands (Figure 1A) containing 5 major *ABCA1* mRNA 5'-ends, which were designated *types L2a/b*, *L3*, and *L4a/b* (Figure 1B, bottom; details are shown in Figure 1A in the online-only Data Supplement), in addition to the previously described peripheral-type (type P) *ABCA1* transcript.¹⁴ In contrast, peripheral THP-1 cells had only *type P* transcript. *Type L3* is a novel transcript that lacks exon 1/exon 2 and has a newly identified 303-bp sequence (exon L3) upstream of exon 3. Exon L3 appears to be unique to humans because of no homologous sequence in rodent *ABCA1* genes. *Type L2a* and *L2b* were homologous to rodent types *L* and *L'*, which we previously identified¹⁴ (Figure 1A–1C in the online-only Data Supplement). *Type L4a* and *L4b* were similar to the human liver-type transcripts previously identified²⁰ and were expressed mainly in the liver (Figure 1I in the online-only Data

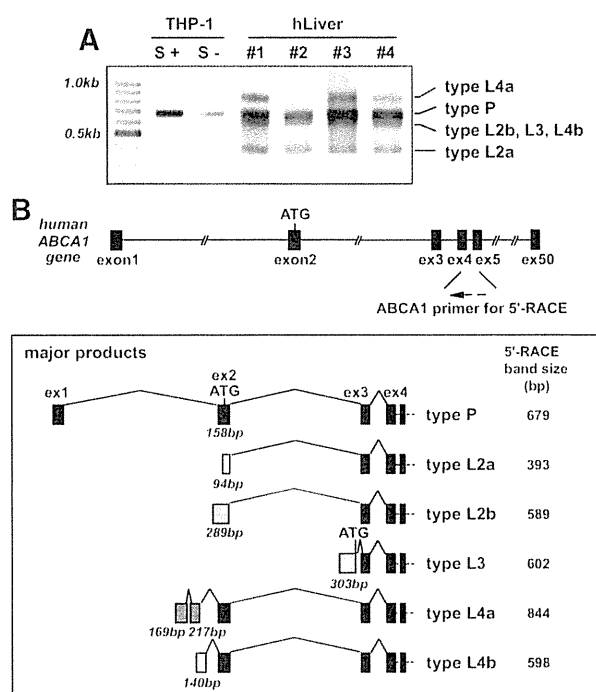


Figure 1. Identification of alternative ATP-binding cassette transporter A1 (*ABCA1*) transcripts in human liver. **A**, 5'-rapid amplification of cDNA end (RACE) was performed on total RNA extracted from 4 human livers and THP-1 cells treated with sterols (10 μ g/mL cholesterol plus 1 μ g/mL 25-hydroxycholesterol; sterols + [S+]) or compactin (50 μ mol/L with 40 μ mol/L mevalonate; sterols - [S-]) in the medium containing 10% delipidated serum for 16 hours. The amplified products were then subjected to electrophoresis in a 2% agarose gel. **B**, Structure of human *ABCA1* gene and major transcripts. **Black boxes** indicate exons (ex) for type P transcript. **Gray boxes** indicate liver-variant specific exons.

Supplement). *Type L2b* was less abundant compared with *type L2a*. Several minor transcripts, including those identified by Singaraja et al.²⁰ and Cavellier et al.²¹ are shown in Figure 1D in the online-only Data Supplement. All products identified here were spliced according to the GT-AG splicing rule.

Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) showed that newly identified *type L3* and *L2b* variants were expressed exclusively in the liver, whereas *type P* was expressed in various human tissues (Figure 2A). *Type L2a* levels were not measured because there were no variant-specific regions in this transcript. To determine the abundance of *type L3*, *L2b*, or *type P* relative to that of total *ABCA1* mRNA, we used variant-specific and universal RT-PCR probe/primers (Figure 1A in the online-only Data Supplement) and a standard curve based on serial dilution of cDNAs containing 2 target sequences for the qRT-PCR probe (*L3*/universal, *L2b*/universal, or *P*/universal, respectively). The *type L3* mRNA represented $26.2 \pm 9.4\%$ of total *ABCA1* mRNA in human liver RNA preparations ($n=4$), whereas *type P* and *type L2b* mRNA were estimated to be $33.4 \pm 5.5\%$ and $12.3 \pm 4.8\%$, respectively, of total *ABCA1* mRNA, indicating that *type L3* is a novel and major *ABCA1* transcript expressed in human liver. *Type L3* was expressed in purified human hepatocytes at a higher level than that in the original total liver-cell preparations (Figure 2B).

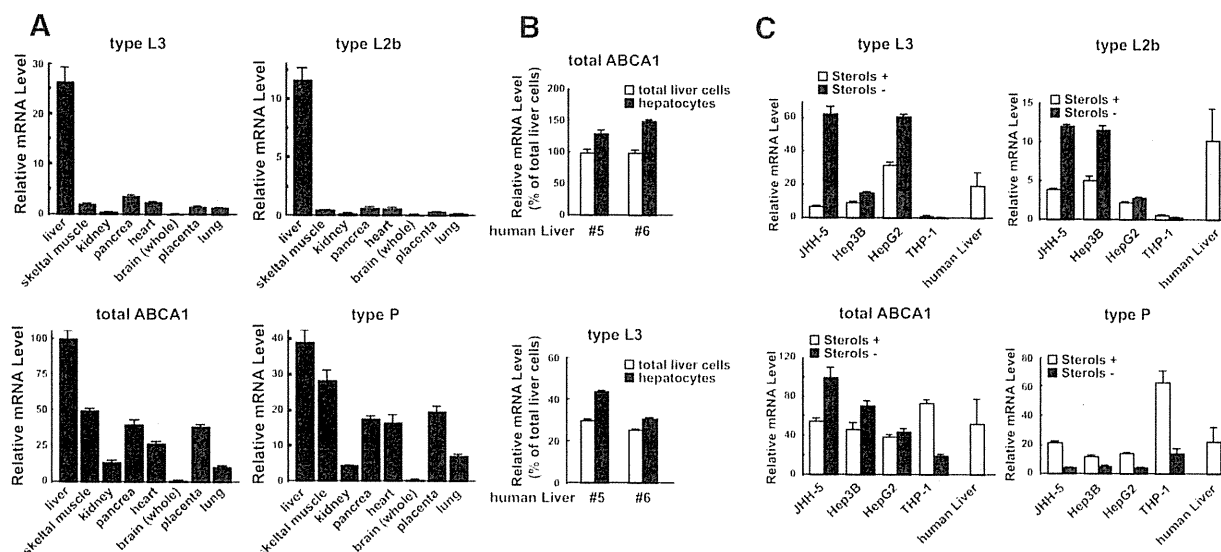


Figure 2. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) mRNA expression profile. Shown is quantitative real-time reverse transcription–polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis of total and variant ABCA1 mRNA levels in different human tissues (**A**); total liver cell preparations and purified hepatocytes originated from the same donors (**B**); and human hepatoma cell lines, THP-1 macrophage-like cells, and human livers (from 4 donors) (**C**). **A**, Multiple human tissue cDNA (BD multiple tissue cDNA) panel in which expression levels were normalized with a set of 4 housekeeping genes (α -tubulin, β -actin, GAPDH, and rRNA S29). **C**, HepG2, Hep3B, JHH-5, and THP-1 cells were treated with sterols (10 μ g/mL cholesterol plus 1 μ g/mL 25-hydroxycholesterol: sterols +) or compactin (50 and 40 μ mol/L mevalonate: sterols –) for 16 hours. The mRNA levels were normalized with 18S rRNA. Values represent means \pm SD ($n=3$) relative to the expression level in the liver (**A** and **B**) or JHH-5 cells (sterols –) (**C**) (expressed as the percentage of hepatic total ABCA1 mRNA).

Type L3 and *L2b* mRNAs were highly expressed in human hepatoma cells (HepG2, Hep3B, and JHH-5²²) at levels comparable to that in human liver tissues ($n=4$) but undetectable in peripheral THP-1 cells (Figure 2C). The expression of *type L3* and *L2b* transcripts was augmented by cholesterol depletion in 3 hepatoma cell lines, as was rodent *type L*.¹⁴ Conversely, in all cell lines tested, *type P* mRNA expression decreased in response to cholesterol depletion, as was reported previously.⁹ *Type L4a* and *L4b* mRNA levels were extremely low and undetectable in all cell lines (data not shown). The total ABCA1 mRNA level in hepatic cell lines was either unaffected or mildly elevated by cholesterol depletion, whereas for peripheral THP-1 cells, total ABCA1 mRNA declined similarly to *type P* mRNA levels. These findings indicate that ABCA1 mRNA expression in human hepatoma cell lines is composed of sterol-repressed (*type L2* and *L3*) and sterol-augmented (*type P*) mRNA expression.

Type L3 Is a Major ABCA1 Transcript Producing a Functional ABCA1 Protein

We investigated whether *type L3* mRNA encodes a functional ABCA1 protein using a short interfering RNA (siRNA) specific to the *type L3* transcript. In cholesterol-depleted JHH-5 and Hep3B cells, transfection of *type L3*-specific siRNA effectively diminished *type L3* mRNA expression without decreasing *type L2b* and *type P* mRNA levels (Figure 3A). Notably, specific knockdown of *type L3* mRNA caused a significant reduction in the total ABCA1 mRNA (Figure 3A) and protein levels (Figure 3B). To exclude off-target effects, we repeated the experiments using 3 other siRNAs specific to *type L3*, and we confirmed that these siRNAs also effectively diminished *type L3* mRNA and decreased total ABCA1

mRNA and protein expression (Figure 3D and Figure 4V). Northern blot analysis confirmed the *L3* mRNA knockdown and an accompanying decrease in total ABCA1 mRNA band (Figure 3C). Furthermore, siRNA treatment caused an $\approx 45\%$ decrease in apoA-I-dependent [³H]cholesterol efflux from JHH-5 cells under cholesterol-depleted conditions (Figure 3E). Also, 3 siRNAs to *type L3* significantly decreased the mass of free cholesterol efflux under normal culture conditions (Figure 3F). Although *type L3* ABCA1 mRNA lacks exon 2, which includes a known translation start codon, ATG^{9,23} (Figure 1B and Figure III in the online-only Data Supplement), the *L3* transcript could be initiated at using the predicted start codon located at the 3'-end of exon L3 (Figures 1C and III in the online-only Data Supplement). We constructed an expression vector of *type L3* ABCA1 fusing green fluorescent protein to the C terminus and obtained JHH-5 cells stably expressing L3-ABCA1–green fluorescent protein, in which marked increases of ABCA1 expression and cholesterol efflux activity were observed (Figure 3G and 3H). Together, these results clearly show that *type L3* is a major transcript producing a functional ABCA1 protein in the liver.

Identification of the *Type L3* Promoter and Its Cholesterol-Responsive Enhancer Elements

To explore the mechanisms by which *type L3* transcripts were increased by cholesterol depletion, we searched for a possible promoter region for the *L3* transcript in the region upstream of the putative transcription initiation site (+1) for *type L3* mRNA (1010 or 4208 bp) (Figure 4A and 4B, *Luc1–Luc3*; Figure VI in the online-only Data Supplement). Although these regions did not have basal promoter activity and were unresponsive to cholesterol depletion in a luciferase assay, a reporter con-

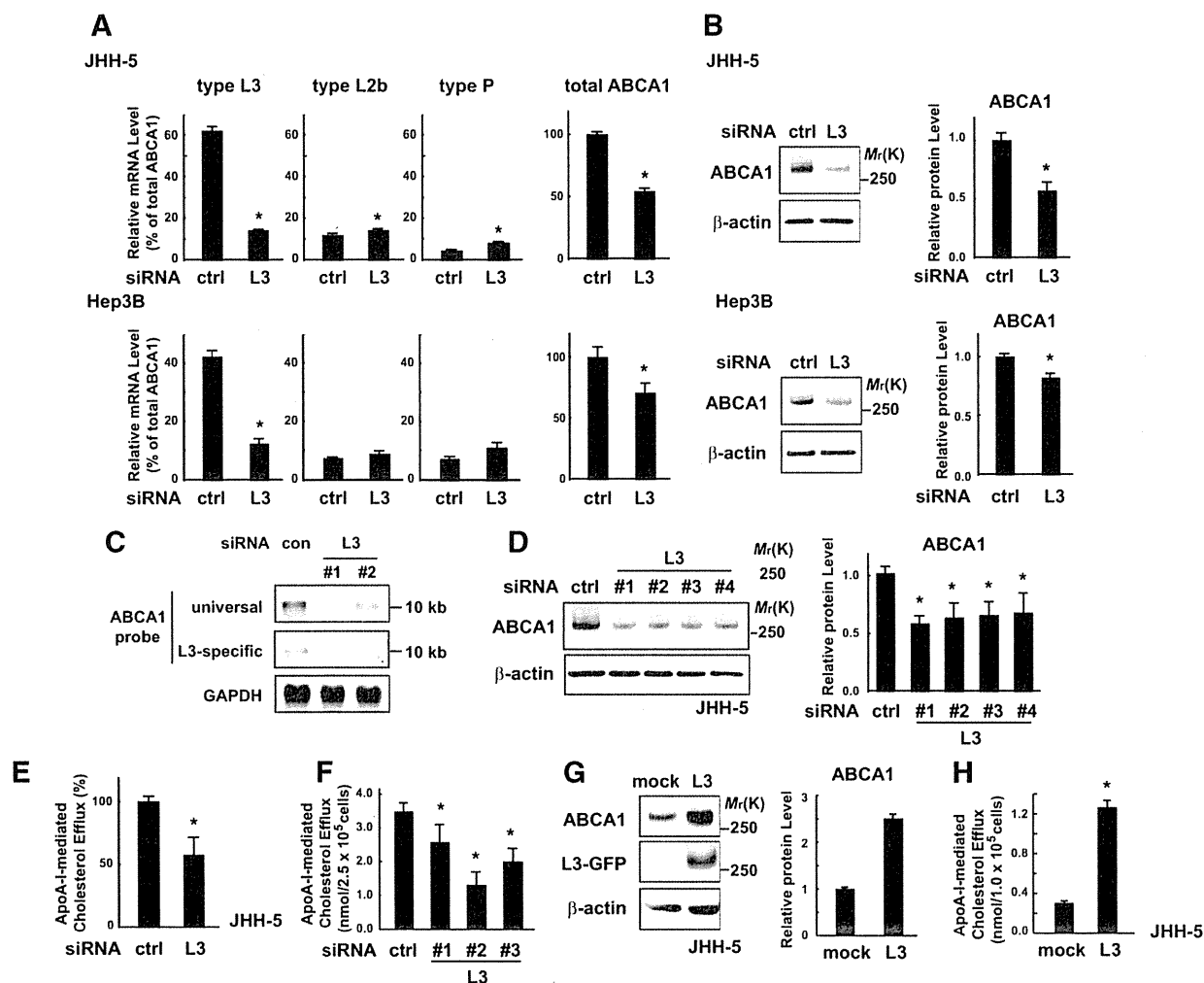


Figure 3. Specific knockdown or forced expression of type L3 mRNA modulates total ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) mRNA and protein expression and apolipoprotein A-I (apoA-I)-dependent cholesterol efflux. **A to F,** JHH-5 or Hep3B cells were transfected with either short interfering RNA (siRNA) against ABCA1 type L3 (**A, B, and E, #1; C to F, #1, 2, 3, or 4**) or a negative control (ctrl, con) siRNA. After 32 hours, cells were treated with compactin (50 and 40 μ M/L mevalonate; sterols⁻) for 16 hours. **A,** Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis of total and variant ABCA1 mRNA levels. Data were normalized with 18S rRNA and represent means \pm SD ($n=3$). **C,** Northern blot analysis of total and variant ABCA1 mRNA levels using ABCA1 total and L3-specific probes. **B and D,** Immunoblot analysis of ABCA1 and the loading control anti- β -actin. **Bar graphs** represent means \pm SD ($n=4$). **E, F, and H,** Efflux of [³H]cholesterol (**E**) or cholesterol mass (**F and H**) from the cells to the media was determined as described in Materials and Methods. **G and H,** JHH-5 cells stably expressing ABCA1 type L3-green fluorescent protein (GFP). **G,** Immunoblot analysis for ABCA1, GFP, and the loading control anti- β -actin. **Bar graphs** represent means \pm SD ($n=3$). **H,** Efflux of cholesterol mass from the cells to the media was determined. Data represent means \pm SD ($n=3$). * $P<0.05$ vs control siRNA-transfected (**A-F**) or mock-transfected (**H**) cells.

struct containing an element from +426 to +480 did show basal transcriptional activity and caused mild activation on cholesterol depletion (Figure 4B, *Luc5*), albeit at a level that is likely insufficient to produce a full response to sterols.

The promoter activities of several genes are often regulated by distal enhancers. Sequence alignment of 5 mammalian *ABCA1* genes identified a highly conserved region in intron 3 (positioned between +3103 and +3378 in humans) (Figure 4A; Figures VI and VII in the online-only Data Supplement). Therefore, we examined whether this region functions as an enhancer for the *ABCA1* type L3 promoter by inserting the conserved region of intron 3 into the 3'-end of the poly A site (Figure 4A). We found that insertion of this region effectively enhanced type L3 promoter activity, and this activity was

further amplified by cholesterol depletion (Figure 4C, *Luc7*). Furthermore, introducing this region into a reporter plasmid driven by the *SV40* promoter instead of the type L3 promoter potentiated both basal promoter activity and a sterol response (Figure 4D, *Luc9*). These results suggest that the conserved region in *ABCA1* intron 3 functions as a distal enhancer of the type L3 promoter that could be responsible for upregulation under sterol-depleted conditions.

To identify the sterol-responsive elements in this enhancer region, we performed a deletion analysis in this region. Deleting the 5'-end up to +3171 enhanced the promoter activity and sterol-mediated response (*Luc10*), whereas further deletion greatly diminished these effects (Figure 4E, *Luc11-Luc14*). The region between +3172 and +3183