

報告書

平成16年度 丸木記念特別奨学研究費A 研究実績報告書

時計遺伝子によるPPARのプロモーターへのコアクチベーター CBP/p300
およびSRC-1を介する作用究明

受賞者 井上 郁夫 (埼玉医科大学 内科学 内分泌・糖尿病内科部門)

共同研究者 中村 浩一¹⁾, 池田 正明²⁾

はじめに

ペルオキシゾーム増殖因子活性化受容体, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) はステロイド/甲状腺ホルモン受容体スーパーファミリーのひとつで, ペルオキシゾームが増殖する際の主要な転写因子として作用し, さまざまな遺伝子を調節する。加えて, PPARは, 最近注目されているメタボリックシンドロームとの関連性に興味をもたれている核内受容体でもある。特に, 齧歯動物, ヒト, 両生類において, 3種類のPPAR, PPAR α , PPAR β または PPAR δ , PPAR γ が確認されている。PPAR α は, 肝臓内で最も大量に発現され, ミトコンドリアとペルオキシゾームの β 酸化と関係している。PPAR β/δ は広く発現されるが, その機能的役割の解明は今後の課題となっている。PPAR α の活性化は, 脂肪酸の β 酸化を介して細胞中の脂肪酸含有量を減少させるが, PPAR γ の活性化は脂肪組織に選択的に発現される転写因子であり, 脂肪細胞の分化と関係しているものと思われる。

PPARは, デキサメタゾン等のステロイドホルモンによっても調節されていると言われ, ステロイドの日内変動の影響を受けることはよく知られている。さらに, 最近の成績によれば, 光刺激とは関係なく, 摂食周期が末梢時計を調節する可能性があることも示唆されている。相互に作用する正と負の転写・翻訳フィードバックループが, ショウジョウバエと哺乳動物の両方における概日発振を形成していることも報告されている。マウスにおける最も特徴的なフィードバックループには, 3つのPeriod 遺伝子 (mPER1-3) と2つのcryptochrome 遺伝子 (mCRY1, 2) が含まれていて, 現在では, mPERとmCRYの転写は, 交互にコンセンサス配列であるEボックス配列と結合するCLOCK/

BMAL1のヘテロ二量体を蓄積することによって形成されると考えられている。

最近, Peter McNamaraらは, レチノイド受容体であるレチノールX受容体 (RXR) とRARが時計遺伝子であるMOP4およびCLOCKと相互作用することを報告した。RXRはPPARと結合し, ペルオキシゾーム増殖因子応答配列 (PPRE) と結合するヘテロ二量体を形成する転写因子である。そこで, 我々は, PPREを有する, acyl-CoAオキシダーゼのプロモーター遺伝子, 細胞内レチノール結合蛋白質II (CRBP II) のプロモーター遺伝子, 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-補酵素A (HMG-CoA) シンターゼのプロモーター遺伝子などが, CLOCK/BMAL1によって, それらの転写活性がどのように調節されるかどうか, さらに, 逆に, PPAR/RXRによる, Period 遺伝子のプロモーター領域に存在するEボックス配列への作用を, それぞれ検討した。

材料と方法

DNA配列決定

自動シーケンサー (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer; Perkin Elmer, Foster City, CA) を使用し, PCR産物の直接配列決定を行った。全DNA配列は, 両DNA鎖を読み取って確認した。

ウエスタンブロッティング

蛋白発現量はウエスタンブロッティングにて評価した。特異的免疫活性は, Amersham ECLキットで測定し, その後に, 処理済みサンプルを10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) にアプライし, セミドライブロッティングによってニトロセルロース膜 (Millipore) にトランスファーした。ヒト時計遺伝子 (PER1, PER2, CYR1, CRY2) の蛋白質に対する抗体は, Santa Cruzから入手し, ニトロセルロース膜は, TBS-Tween/5%ドライミルクで一晩処理し, ヒトPER1, PER2, CRY1, CRY2抗体に対するヤギ抗蛋白質

1) 埼玉医科大学 生化学教室, 2) 埼玉医科大学 生理学教室

で1時間にわたってインキュベートした。ニトロセルロース膜は、洗浄後、ペルオキシダーゼとconjugatedした家兎抗ヤギモノクロナール抗体でインキュベートし評価した。

全長ヒトPPAR α , PPAR γ 1, RXR α , CLOCK, BMAL1のサブクローニング

全長ヒトPPAR α (Genebank L-02932), PPAR γ 1 (Genebank L-40904), RXR α (Genebank X-52773) cDNAの特異的DNAフラグメントは、骨格筋(#9514, 宝酒造株式会社)または肝臓(#9505, 宝酒造株式会社)からpCI-neo哺乳類動物発現ベクター (pCI-neo) (Promega, WI, USA)にサブクローニングし、自動シーケンサーで配列決定を行った。PPAR α については、1407 bp *Sal* I/*Not* IフラグメントをpCI-neoの*Sal* I/*Not* I部位にサブクローニングし、ベクターをpCI-PPAR α と命名した。PPAR γ 1もベクターの*Sal* I/*Not* I部位にサブクローニングしベクターをpCI-PPAR γ 1と命名した。RXR α もベクターの*Xho* I/*Not* I部位にサブクローニングしベクターをpCI-RXR α と命名した。CLOCKとBMAL1については、フラグメントをpcDNA3(Invitrogen)の*Sal* I/*Not* I部位にサブクローニングし、ベクターをpc-CLOCKおよびpc-BMAL1とそれぞれ命名した。

コアクチベーターのクローニング

PPARのコアクチベーターであるcAMP response element binding protein(CREB) binding protein(CBP/p300)およびsteroid receptor coactivator-1(SRC-1)に加えて、SRC-2, SRC-3, peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1(PGC-1) α , PGC-1 β のcDNA全長の特異的DNA断片は、肝臓(CLONTECH)のcDNAライブラリーから、pCI-哺乳類発現ベクター (Promega, 米国ウィスコンシン州)をサブクローンし作成した。上記で得られた遺伝子断片は、*Sal* I/*Not* I断片として生成し、pCI-neoの*Sal* I/*Not* Iサイトにサブクローンし、それぞれpCI-CBP, pCI-SRC-1, pCI-SRC-2, pCI-SRC-3, pCI-PGC-1 α , pCI-PGC-1 β とした。

PPARs/RXR α 活性とCLOCK/BMAL1のレポーターアッセイ

プロトコールに従い、TfxTM-50 試薬 (Promega)を用いてレポーターアッセイのための一時的なトランスフェクションを行った。トランスフェクション効率が高い、ヒト腎臓293T細胞 (293T cells), CV-1サル腎臓細胞 (CV-1 cells), NIH3T3細胞, COS-1細胞を使用した。

我々は、まず、PPREとEボックスの間にクロストークが存在するかどうかを検討するため、PPARs/RXR α またはCLOCK/BMAL1による標的遺伝子のPPREの転写活性を最初に測定した。次に、我々は、acyl-CoAオキシダーゼのプロモーター遺伝子、CRBP IIのプロモーター遺伝子、HMG-CoAシンターゼのプロモーターを使用した。これらの遺伝子はルシフェラー

ゼ遺伝子の上流のpGL3-Basic(pGL3-Basic) (Promega)の*Kpn* I/*Nco* I部位に連結させ、それぞれpAOX-Luc, pCRBP II-Luc, pHMG-Lucと命名した。さらに、我々は、CRBP IIのプロモーター遺伝子を使用し、Renillaルシフェラーゼ遺伝子の上流のphRG-B (Promega)の*Kpn* I/*Nco* I部位にも挿入しpCRBP II-R-Lucと命名した。

さらに、我々は、PPARs/RXR α またはCLOCK/BMAL1によるEボックスのための転写活性化を測定するため、ルシフェラーゼ遺伝子の上流のpGL3-Basic(pGL3-Basic) (Promega)の*Kpn* I/*Nco* I部位に、これらの遺伝子をクローニングし、pPER-Lucと命名した。次にマウスPER1のプロモーター領域を使用し、それらの転写活性を検討した。なお、マウスPER1のためのプロモーター領域(約2,000個の塩基対)には、3つのEボックス配列(5'-CACGTG-3')が存在する。以上で得られたそれぞれのコンストラクトpPPRE-Luc, pCRBP II-Luc, pHMG-LucまたはpPER-LucとpRL-TKは、pCI-PPAR α , pCI-PPAR γ 1, pCI-RXR α , pcDNA-CLOCKまたはpcDNA-BMAL1の存在下あるいは非存在下において、細胞に同時トランスフェクトさせ、24ウェルプレートで培養させ実験に使用した。トランスフェクトしたDNAの合計量(0.6 μ g)は、キャリアDNA(pCI-neoまたはpcDNA3)で標準化し、24時間後、PPARsリガンド/アクチベーターで細胞に刺激を加え、この状態を24時間継続した。最後に、pAOX-Luc, pCRBP II-Luc, pHMG-LucまたはpPER-Lucに対するルシフェラーゼ活性をRenillaルシフェラーゼ活性に対して標準化した。

一時トランスフェクション/同時トランスフェクション

pCI-PPAR α (3 μ g), pCI-PPAR γ 1 (3 μ g), pCI-RXR α (3 μ g), pcDNA (3 μ g)またはpcDNA-BMAL1 (3 μ g)の一時トランスフェクションは、TfxTM-50 試薬 (Promega)をプロトコールに従って使用し、100 mmディッシュ中の細胞(1 $\times$ 10⁶)に対して実施した。24時間後、試験薬で細胞を刺激し、この状態を24時間継続した。その後、ウエスタンブロッティングでも分析した。

CRBP II-Lucプラスミドの欠失(図1)

CRBP IIのプロモーターは、4つの反復配列を有している(5'-AG(G/T)TCA-3') (5'-gtgtccactctgtgtcacAGGTCACAGGTCAcAGGTCAcAGTTCAtttctctgtctgtc-3', -670 ~ +63)ので、CRBP II-Lucプラスミド(-670 ~ +63)に、PCR法またはExo/Mung Bean Deletionキット(Stratagene)を使用して、CRBP II-Lucの欠失させたプラスミドは、図1のように作成した。del-0-CRBP II-Lucプラスミドは、反復配列(5'-AG(G/T)TCA-3')が含まれていないコンストラクトで、del-1-CRBP II-Lucプラスミドは1つの反復配列(5'-AG(G/T)TCA-3')が含まれ、del-2-CRBP II-Lucプラスミドは2つの反復配列(5'-AG(G/T)TCA-3')が含まれ、さらに、del-3-CRBP II-

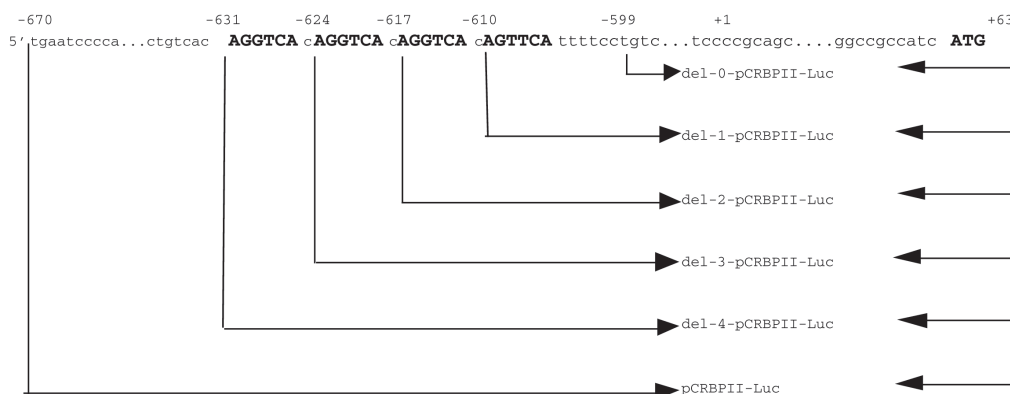


図1. CRBPPII-Lucプラスミドの欠失.

Lucプラスミドは3つの反復配列 (5'-AG(G/T)TCA-3') が含まれている. また, del-4-CRBPPII-Luc プラスミドは4つの反復配列 (5'-AG (G/T)TCA-3') が含まれているコンストラクトである.

統計解析

3回の実験に加え, 単独実験を4回実施した. パラメーターデータは, 平均±SDで表示し, 群間差はScheffeのF検定で評価した.

結果と考察

293T細胞におけるレポーター遺伝子アッセイにより, fenofibric acid (図2A) およびトログリタゾン (図2B) がacyl-CoAオキシダーゼの転写活性を用量依存性に増加させ, 50 ng のCLOCK/BMAL1 遺伝子の同時トランスフェクションによって, その活性が有意に減少した (図2A, 2B).

また, acyl-CoAオキシダーゼのPPREを介する転写活性が, 活性炭未処理培地において, CLOCK/BMAL1 遺伝子導入によって減少し, 50 ng のCLOCK/BMAL1 遺伝子量で最低値となった (図3A-C). さらに, CLOCK/BMAL1 遺伝子のトランスフェクトする遺伝子量をさらに増大させると, CLOCK/BMAL1 遺伝子によるacyl-CoAオキシダーゼのPPREを介する転写活性が再び増大し, 80 ng のCLOCK/BMAL1 でピーク値に達した (図3A-C). そしてその転写活性は, PPAR α /RXR α 遺伝子 (図3B), PPAR α リガンド/アクチベーターである fenofibric acid (図3C) を加えることにより増大した. なお, 使用した培地を活性炭 (Charcoal/Dextran Treated FBS, HyCLone) で処理することで, 培地から内因性 PPARs/RXR α リガンド/アクチベーターを完全に除去することが可能となるが, 培地から内因性 PPARs/RXR α リガンド/アクチベーターを完全に除去した場合, その転写活性の最高値と最低値となる CLOCK/BMAL1 遺伝子量がそれぞれ

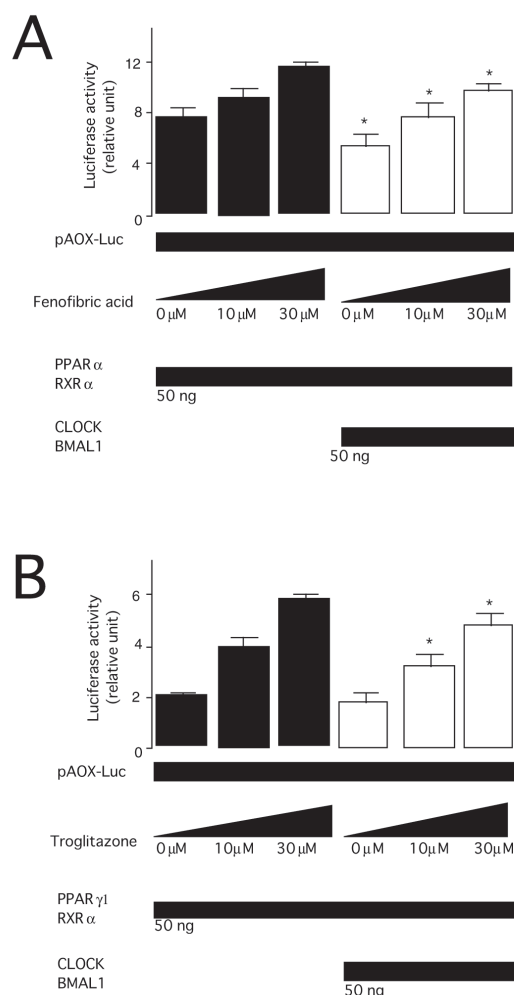


図2. ヒト腎臓 293T 細胞における CLOCK/BMAL1 遺伝子による acyl-CoA オキシダーゼの PPAR α /RXR α を介する転写活性の抑制 (A) と PPAR γ 1/RXR α を介する転写活性の抑制 (B). pAOX-Luc のルシフェラーゼ活性は pRL-TK のルシフェラーゼ活性に対して標準化した. 3 回の実験に加え, 4 回の単独実験を実施した. 全てのデータは, 平均±SD で表示した. CLOCK/BMAL1 遺伝子によって処理されていない細胞と比較し, 0.05 未満を有意とした (* $p < 0.05$).

れ, 30 ng (最高値), 80~90 ng (最低値)と変化した(図3D-F). さらに, これらの変動は, CBP, SRC-1, SRC-2, SRC-3, PGC-1 α , PGC-1 β などの様々なコアクチベーターの種類により, 大きく変化することも明らかになった(データ未発表).

以上の我々の成績から, PPAR α /RXR α 遺伝子あるいはPPAR α リガンド/アクチベーターの両方または一方が, CLOCK/BMAL1 遺伝子によるPPREの転写活性に作用していることを示している. さらに, それらの変動が, 再び減少するという, 新たな制御機構の存在の可能性が示唆された. また, 結果に示していないが, 各量のCLOCK/BMAL1 遺伝子でトランスフェクトした293T細胞でのヒト時計遺伝子(PER1, PER2, CYR1, CRY2)の蛋白発現分析を行ったところ, 実際, それらの蛋白発現変動が明らかに認められ, CLOCK/BMAL1 遺伝子によるPPREの転写活性への作用の機序に, これらの時計遺伝子の蛋白発現変動がそれぞれ関与している可能性が考えられた.

次に, CLOCK/BMAL1 遺伝子のmPERの転写対

する作用が, PPAR α /RXR α によって, 変動するかどうかを検討するため, 239T細胞, COS-1細胞, NIH33細胞において, PER 遺伝子の転写に対するCLOCK/BMAL1 遺伝子の作用を評価した. mPER1 遺伝子の転写活性は, CLOCK/BMAL1 遺伝子によって, 添加したCLOCK/BMAL1 遺伝子量に依存して活性化され(図4), PPAR α /RXR α を添加すると, mPERの転写活性が有意に低下する結果が得られた(図4).

結論として, 本研究の結果から, CLOCK/BMAL1 遺伝子とPPAR群/RXR α による, PPREとEボックスとの間にクロストークが存在するという, 新たな調節機序の存在が示唆された. また, それらのCLOCK/BMAL1 遺伝子によるPPREの転写活性は, PPAR群/RXR α 遺伝子およびそれらのリガンド/アクチベーターの両方または一方によって調節されている可能性も示された(図5). 今後, メタボリックシンドロームと時計遺伝子がどのように関り, 最近, 我々が注目している腸管粘膜での脂質代謝にも, 時計遺伝子がどのように関与するか, さらに検討を加える予定である.

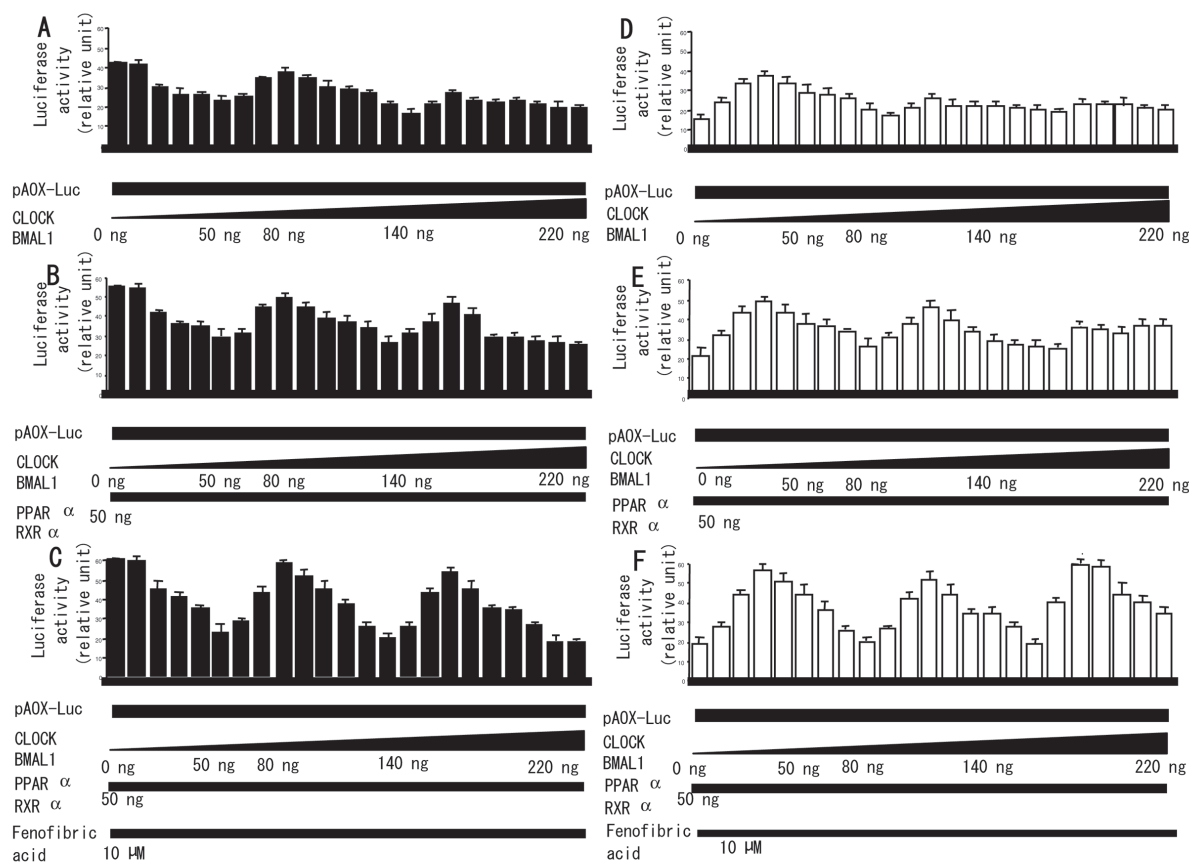


図3. ヒト腎臓293T細胞における用量依存性CLOCK/BMAL1 遺伝子(0~220 ng)によるacyl-CoAオキシダーゼ(AOX)のPPAR α /RXR α を介する転写活性の変動. 活性炭未処理培地(A~C)と活性炭処理培地(D~F)における結果. pAOX-Lucのルシフェラーゼ活性は, pRL-TKのルシフェラーゼ活性に対して標準化した. 測定は3回実施し, 4回の単独実験を実施し, 全てのデータは, 平均 $\pm$ SDで表示した.

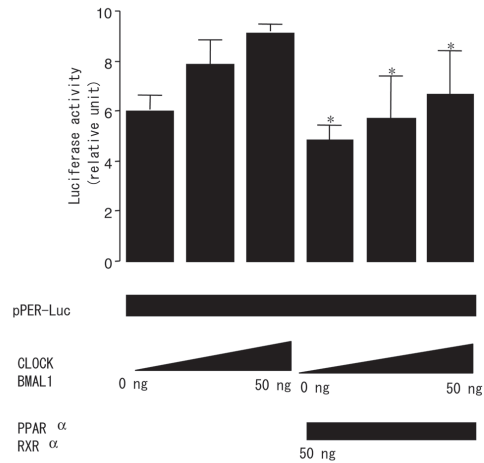


図4. ヒト腎臓293TにおけるPPAR α /RXR α 遺伝子の、CLOCK/BMAL1遺伝子によるPeriodic (PER)プロモーターの活性化の抑制作用. pPER-Lucのルシフェラーゼ活性は、pRL-TKのルシフェラーゼ活性に対して標準化した。測定は3回実施し、4回の単独実験を実施し、全てのデータは、平均±SDで表示した。PPAR α /RXR α 遺伝子によって処理されていない細胞と比較し、0.05未満を有意とした(*p<0.05)。

参考文献

- 1) Kunishima C, Inoue I, Oikawa T, et al. Activating effect of Benzbromarone, a uricosuric drug, on peroxisome proliferator-activated receptors. PPAR Res (in press).
- 2) Nakano T, Inoue I, Koyama I, et al. Disruption of the murine intestinal alkaline phosphatase gene Akp3 impairs lipid transcytosis and induces visceral fat accumulation and hepatic steatosis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007;292:G1439-49.
- 3) Kanazawa K, Inoue I, Katayama S. Angiotensin type I receptor blocker: Olmesartan, induces transcription of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) mRNA through the promoter of PPAR γ . The 21th Scientific Meeting the International Society of Hypertension (ISH 2006). (Young Investigator's Award).
- 4) Nagasaka H, Inoue I, Inui A, et al. Relationship between oxidative stress and antioxidant systems

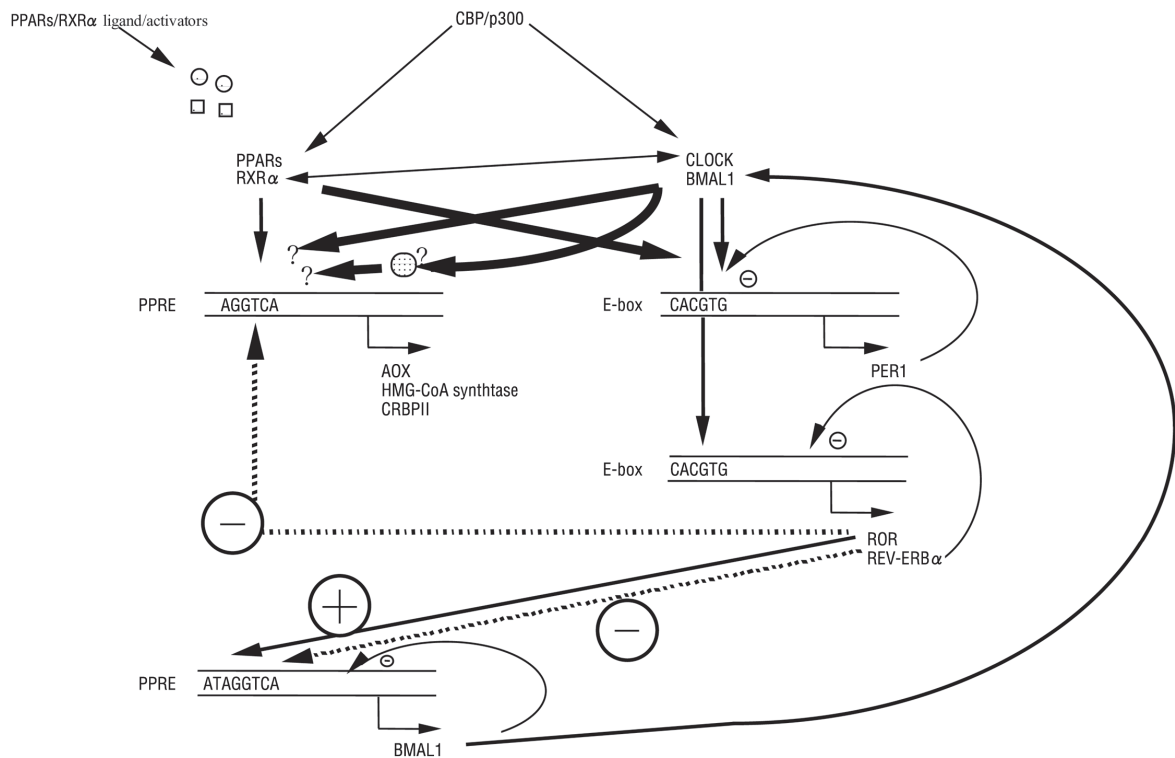


図5. PPREとEボックス間のクロストークの予想モデル。

RXR：レチノイドX受容体

CBP：CREB結合蛋白質

CREB：cAMP応答配列結合蛋白質

PPRE：PPARの応答配列

ROR α ：レチノイン酸受容体関連オーファン受容体 α

○：RXRのリガンド

□：PPARsのリガンド

- in the liver of patients with Wilson disease: hepatic manifestation in Wilson disease as a consequence of augmented oxidative stress. *Pediatr Res* 2006;60: 472-7.
- 5) Inoue I, Shinoda Y, Nakano T, et al. Acarbose ameliorates atherogenicity of low-density lipoprotein in patients with impaired glucose tolerance. *Metabolism* 2006;55:946-52.
 - 6) Shinoda Y, Inoue I, Nakano T, et al. Acarbose improves fibrinolytic activity in patients with impaired glucose tolerance. *Metabolism*. 2006;55: 935-9.
 - 7) Nakano T, Miyazaki S, Shinoda Y, Inoue I, et al. Proposed reference material for human free immunoglobulin light chain measurement. *J Immunoassay Immunochem* 2006;27:129-37.
 - 8) Nakano T, Shimanuki T, Matsushita M, Koyama I, Inoue I, et al. Involvement of intestinal alkaline phosphatase in serum apolipoprotein B-48 level and its association with ABO and secretor blood group types. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;341: 33-8.
 - 9) Inoue I. Hyperlipidemia and peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-regulation of the PPAR α gene by CLOCK: BMAL1 *Nippon Rinsho* 2005;63: 643-56. Review.
 - 10) Inoue I, Shinoda Y, Ikeda M, et al. CLOCK/BMAL1 is involved in lipid metabolism via transactivation of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) response element. *J Atheroscler Thromb* 2005;12:169-74.
 - 11) Shimazu T, Inoue I, Araki N, et al. A peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist reduces infarct size in transient but not in permanent ischemia. *Stroke* 2005;36:353-9.
 - 12) Nakajima T, Matsunaga T, Kawai S, Hokari S, Inoue I, et al. Characterization of the epitopes specific for the monoclonal antibody 9F5-3a and quantification of oxidized HDL in human plasma. *Ann Clin Biochem* 2004;41(Pt 4):309-15.
 - 13) Inoue I, Katayama S. The possible therapeutic actions of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) agonists, PPAR γ agonists, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors, angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors and calcium (Ca)-antagonists on vascular endothelial cells. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*. 2004;4:35-52. Review.