

# 論文の内容の要旨

## 論文題目 LDL 受容体の発現制御機構に関する研究

氏名 勝部 彬

### 【序論】

コレステロール(Ch)は生体膜を構成する、細胞の機能維持に必須の生体分子である。生体内の Ch は食物あるいは、肝臓での生合成に由来し、Low density lipoprotein(LDL)など、リポタンパク質の構成成分として血液を介して体内を循環する。末梢組織は Ch 生合成をほとんど行わず、細胞膜に発現する Low density lipoprotein receptor(LDLR)を介して LDL を取り込み、Ch を獲得する。細胞は細胞内 Ch の枯渇を防ぐため、Ch センサーとして働く SCAP-SREBP2 経路を有する。細胞内 Ch が低下すると、本経路は速やかに活性化し、LDLR の発現を転写誘導することで細胞内 Ch 量を一定に保つ。このように SCAP-SREBP2 経路は細胞内 Ch の恒常性維持において主要な役割を果たすが、SREBP2 欠損時においても、細胞内 Ch 低下に伴い、LDLR の転写が誘導されることから、本経路以外にも細胞内 Ch 量を感じ、LDLR の転写制御に働く機構が存在すると推測される。しかしながら LDLR の Ch 応答に関わる制御因子は SCAP-SREBP2 を除き明らかになっていない。

当研究室では HECT type E3 ubiquitin ligase の一種である ITCH と Ch 関連遺伝子の関係性について研究を進めている。私は、ITCH の発現抑制下において、SREBP2 非依存的に LDLR の発現が誘導される可能性を見出した。本知見を活用し、本研究では SREBP2 非依存的な LDLR 発現制御機構の同定を目指した。

## 【方法・結果】

### 1. ITCH は SREBP2 非依存的に LDLR の発現量を負に制御する

ヒト肝癌由来の HepG2 細胞において、RNAi 法により ITCH をノックダウン(KD)したところ、LDLR の RNA 及び、タンパク質発現量が上昇した。同条件下においては、SREBP2 の転写活性化の指標とされる、切断 SREBP2 量が減少し、SREBP2 による正の転写制御を受ける遺伝子群 (HMGCR、PCSK9 等)は、LDLR を除き、RNA 発現量が低下していた。従って、ITCH KD による LDLR の RNA 発現量増加は、SREBP2 非依存的に生じることが示唆された。

上記の事象は、10% FBS(Normal)培養条件に比して、10% lipid depleted serum(LPDS)培養条件でより顕著に認められた。

### 2-1. ITCH を介した LDLR の発現量制御に関わる転写因子の探索

ITCH は WW domain を介して、PY motif を持つタンパク質と相互作用し、E3 ligase として機能する。従って、ITCH は PY motif を持つ転写因子の発現量制御を介し、LDLR の転写に関わると推測される。SREBP2 を除き、LDLR の転写因子に関する報告が乏しいことから、*in silico* 解析を行い、候補分子を探索した。その結果、JUN、JUNB を LDLR の転写因子の候補分子として選定した。

### 2-2. LDLR の発現量制御における JUN、JUNB の関与の検証

HepG2 細胞において、ITCH KD により JUN、JUNB のタンパク質発現量の増加が確認された。また、JUN KD により、Normal 培養条件、LPDS 培養条件のいずれにおいても LDLR の RNA 及びタンパク質発現量が低下した。一方、JUNB KD では LDLR の発現変動は認められなかった。

ITCH KD による LDLR の発現量増強作用は、Normal 培養条件に比して LPDS 培養条件で顕著に観察される。リン酸化 JUN(JUN 活性化体)は、LPDS 培養条件で有意に増加しており、JUN のリン酸化を担う JNK の阻害剤(SP600125)処理により、ITCH KD による LDLR の発現量増加は消失した。従って、細胞内脂質量に応答する ITCH 依存的な LDLR の発現量制御は、JUN を介していることが示唆された。

次に、JUN が LDLR の遺伝子領域に直接結合するかを検証するため、抗 JUN 抗体を用いた ChIP-qPCR を実施した。2-1. の ChIP-seq 解析で JUN の結合が示唆された、LDLR の転写開始点(TSS)より約+5700、+2900、+2500 の領域において、control IgG に比して、抗 JUN 抗体で有意なシグナルの増強が確認された。これらの領域では、エンハンサー領域の指標として用いられる H3K4Me1、H3K27Ac、DNase sensitivity が LDLR 遺伝子上の他領域と比べ高いことから、LDLR 遺伝子のエンハンサーとして働く可能性が考えられる。

#### 【結論・今後の展望】

本研究により、SCAP-SREBP2 経路とは異なる LDLR の転写制御機構として ITCH-JUN 経路の存在が示唆された。JUN は LDLR のエンハンサー領域に結合し、LDLR の転写活性を調節していると推測される。今後は、ITCH の機能制御機構、LPDS 培養条件で JUN が活性化する機序を明らかにし、本経路の生理学的意義を検証していきたい。