

大豆イソフラボンによるLDL受容体発現亢進機構の解析

佐藤隆一郎*

東京大学大学院農学生命科学研究科

Study on the Induced Expression of LDL Receptor by Soy Isoflavones

Ryuichiro SATO

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657

ABSTRACT

Based on our previous finding that LDL receptor mRNA is quite unstable, in the current study we investigated the molecular mechanism of the mRNA stability. The human LDL receptor mRNA has a long 3' untranslated region (~2.5 kb) with 4 potential AU-rich elements (ARE) that are thought to be involved in rapid turnover of various mRNA. The deletion analyses of the untranslated region revealed that the first ARE close to the stop codon is critical for the rapid turnover. We aimed to identify cytoplasmic proteins that interact with this ARE and determine the turnover rate of LDL receptor mRNA. We identified one of such ARE-binding proteins and found that the protein is implicated in the LDL receptor mRNA turnover. *Soy Protein Research, Japan* **12**, 138-141, 2009.

Key words : LDL receptor, AU-rich element, mRNA stability

エストロゲン活性が脂質代謝を制御することは広く知られている。閉経前の女性に虚血性心疾患の発症率が低く、閉経後に上昇する事実はその確たる証左と言える。その効果の一つとして、LDL受容体発現亢進が挙げられる。大豆イソフラボンにも同様の効果が認められ、脂質代謝改善効果はLDL受容体ノックアウトマウスでは認められないことから、主たる標的の一つはLDL受容体とすることができる¹⁾。

血中LDLコレステロール濃度は脂質異常症の診断基準の一つであり、動脈硬化発症と因果関係が深い。各

種細胞で発現するLDL受容体は血中LDLのクリアランスに直接関与しており、受容体の数を上昇させることはLDL低下に寄与する。LDL受容体遺伝子発現は、細胞内のコレステロール濃度により厳密に調節されており、その調節の中心には転写因子SREBPが位置し、転写レベルでの調節に寄与している。一方、我々はLDL受容体遺伝子発現の新たな制御機構として、LDL受容体mRNAが非常に短寿命で分解され、不安定であることを見出した²⁾。エストロゲン、イソフラボンの作用の一部がmRNAの安定性に寄与している可能性を明らかにする目的で、これまで不明であったLDL受容体mRNAの安定性の分子機構の解明を試みた。

*〒113-8657 文京区弥生1-1-1

方 法

mRNAの分解を規定するRNA領域の同定

ヒトLDL受容体mRNAは終止コドンの後方に約2.5 kbの比較的長い3' untranslated region (UTR) を有しており、そこには4ヶ所のAU-rich配列 (ARE) が見出される (Fig. 1). 多くのサイトカインmRNAの半減期は短く、これらはAREを有する。LDL受容体mRNAも同様に、これらAREのどれかにARE-binding protein (AUBP) が結合し、早い分解を促す可能性が考えられる。そこで、GFP遺伝子の後方に、ヒトLDL受容体mRNAのUTRを連結したコンストラクトを作製し、Hep G2細胞に導入し、安定発現株を樹立した。UTRを短くした、あるいは部分欠除させたコンストラクトを作製し、同様に細胞株を樹立した。これら細胞株を用い、GFPmRNAの半減期を測定した。

mRNA分解測定

上記Hep G2細胞を5 μ g/mLのアクチノマイシンDで処理した30分後を0時間として、0時間、6時間に培養細胞より総RNAを回収し、RT-PCRによりcDNAを調製後、GFP遺伝子に特異的なprimerを用いて定量PCRを行なった (ABI PRISM 7000使用)。

ARE結合たん白質の同定

解析の結果、終止コドンにもっとも近いARE1がmRNA分解に深く関与する事が明らかになった。そこでARE1配列を含む約600 bのriboprobeを [32 P] UTPを用いてラベル化した。Hep G2 細胞質画分をriboprobeとincubation後、UVを照射し、クロスリンクさせた。その後、RNaseA+RNaseT1処理をして、

遊離のRNAを分解した。同様に、ARE1配列に変異を入れた変異riboprobeも作製し、同様の結合、分解処理を行なった。クロスリンクをした結果、ラベルUTPを結合したたん白質は、その後SDS-PAGEを行ない、放射活性をバンドとして検出した。

結果および考察

これまでAREに結合し、mRNAの分解促進もしくは安定化に関与する細胞質たん白質が数多く明らかにされている。LDL受容体mRNA分解にもARE配列に特異的なたん白質が結合し、その半減期を規定している可能性が高い。そこで、GFP遺伝子の後方にLDL受容体mRNAのUTRを連結した、人工的mRNAをHep G2細胞に発現させ、その分解を追跡した。UTRを連結しないGFP遺伝子は極めて安定であった (data not shown)。しかし、2.5 kbのUTRを連結したmRNAは6時間で20%以下にまで低下し、速やかな分解を受けた (Fig. 2)。そこで、3端から徐々にUTRを短くした。ARE1を含む限り、mRNAの分解は速やかであった。一方、ARE1を欠落させた場合、あるいはARE1に変異を導入した際には、mRNAは安定化し、6時間後にも70~80%程度が検出された。以上の結果より、終止コドンにもっとも近いARE1がLDL受容体mRNAの半減期を規定する機能を有した領域であると結論した。

この領域に結合するたん白質を、ARE1を含むriboprobeを用いて標識し、SDS-PAGEにより展開した。数本の標識バンドが検出され、ARE1に変異を入れたriboprobeにおいては50 kDaのバンド以外は消失した (Fig. 3)。この結果より、ARE1には複数のたん白質が結合し、その分解に寄与している事が推察さ

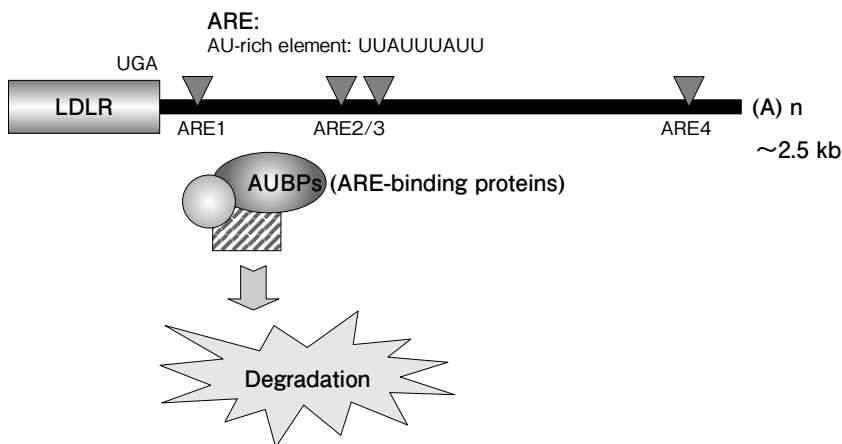


Fig. 1. The structure of 3' untranslated region of the human LDL receptor mRNA.

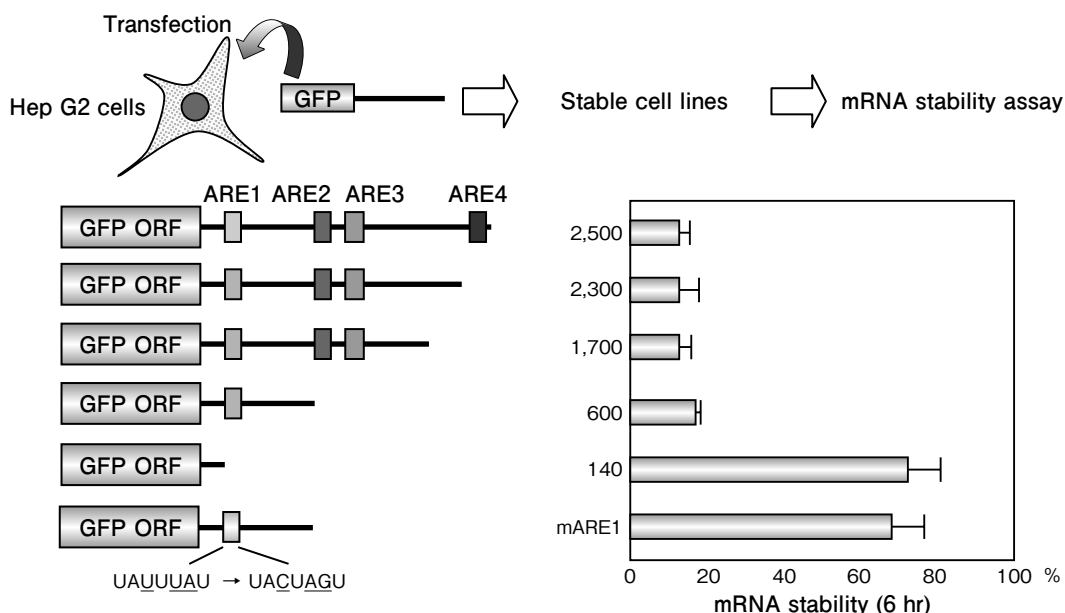


Fig. 2. The stability of GFP mRNA containing various types of the LDL receptor 3' untranslated region. Stable cell lines of Hep G2 cells expressing GFP fusion mRNA containing the LDL receptor 3' untranslated region were established. Using these cells, mRNA stability assays were carried out in the presence of actinomycin D (5 μ g/mL). The graph shows calculated remaining GFP mRNA (%) after actinomycin treatment (6 hr).

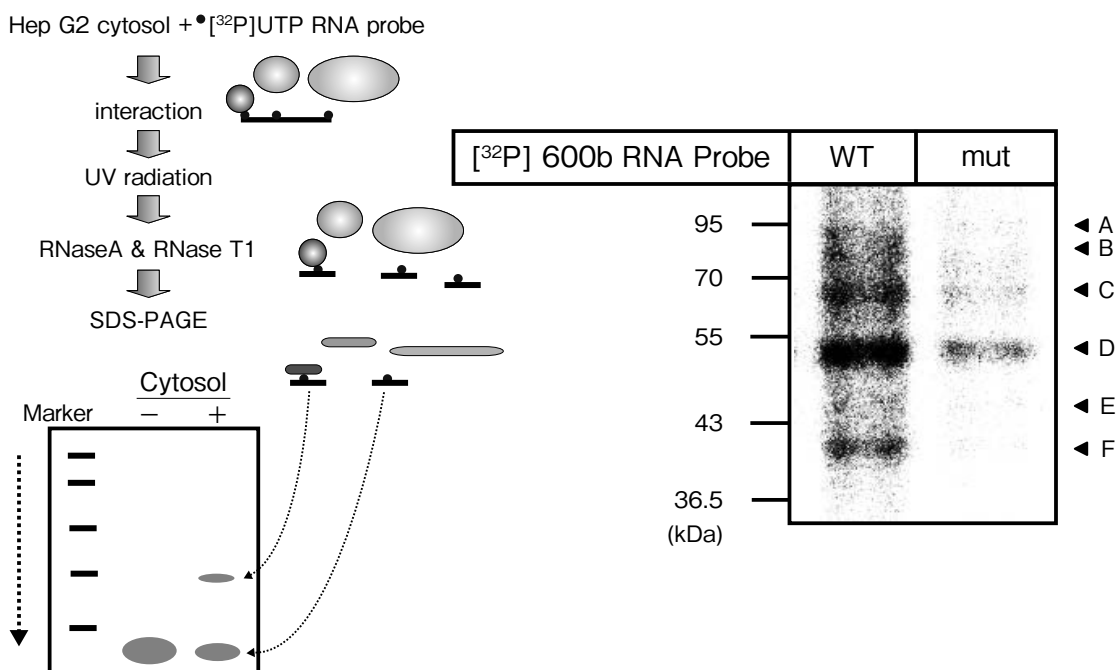


Fig. 3. Detection of mRNA-binding proteins in Hep G2 cytosol fraction. Hep G2 cytosolic fraction was incubated with $[^{32}\text{P}]$ UTP-labeled RNA probe (~ 600 nt). After cross-linked by UV radiation, the protein-RNA complex was digested with RNase A and RNase T1. The radiolabeled complex was subjected to SDS-PAGE.

れた。各バンドの分子量は標識UTPを含むものであり、実際の分子量を意味していないものの、その数値に近い事は推察される。そこで、これらのバンドの分子量に近い、これまで報告のあるAUBPについて、検討を行った。それぞれの遺伝子発現を抑制する目的でsiRNAを設計した。これらをHep G2細胞に導入し、内因性のAUBP発現を低下させ、その際のLDL受容体mRNA分解を測定した。その結果、候補AUBPの一つの発現を低下させると、LDL受容体mRNAはさらに速やかに分解される事が判明した (data not shown)。従って、本AUBPはLDL受容体mRNAに結合し、その安定化に寄与する機能を持つ事が推察された。実際、このAUBPはLDL受容体mRNAと結合する事が確認され (data not shown)、今後はさらにその分解機構を明らかにする必要がある。

今回、新たに見出されたAUBPがエストロゲンあるいはイソフラボン刺激により、LDL受容体mRNAの安定性を促進する可能性を追跡した。これまでも複数のAUBPが細胞外からの刺激に対応して、核と細胞質間を移動する事が明らかにされており^{3,4)}、このような可能性を含めて検討を行った。しかし、エストロゲン・イソフラボン刺激に、そのような活性を見出す事はできなかった。昨年の報告 (大豆たん白質研究 vol. 11 138-141) において、エストロゲン刺激がLDL受容体mRNAを上昇させる事を報告しており、この作用の一部が今回見出したAUBP、もしくはまだ同定していない複数のバンドのAUBPの機能を介してmRNA安定性により発揮されている可能性をさらに検討して行く必要がある。

要 約

ヒトLDL受容体mRNAの安定性の分子機構を明らかにすべく、mRNA結合たん白質の同定を行った。はじめに、LDL受容体mRNAの3'非翻訳領域に含まれる4ヶ所のAU-rich配列の重要性を検討した。その結果、終止コドンにもっとも近いARE1にmRNAの短寿命を決定する機能を見出した。そこでこのARE1に結合するたん白質の同定を試みた。その結果、既知のARE結合たん白質の一つがこの配列に結合し、LDL受容体mRNAの安定性に寄与する事が判明した。本たん白質によるmRNA安定化機能とイソフラボン作用との連関について、更なる研究が必要と考えられる。

文 献

- 1) Kirk EA, Sutherland P, Wang SA, Chait A and LeBoeuf RC (1998): Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr*, **128**, 954-959.
- 2) Nakahara M, Fujii H, Maloney PR, Shimizu M and Sato R (2002): Bile acids enhance low density lipoprotein receptor gene expression via a MAP kinase cascade mediated stabilization of mRNA. *J Biol Chem*, **277**, 37229-37234.
- 3) Yaman I, Fernandez J, Sarkar B, Schneider RJ, Snider MD, Nagy LE and Hatzoglou M (2002): Nutritional control of mRNA stability is mediated by a conserved AU-rich element that binds the cytoplasmic shuttling protein HuR. *J Biol Chem*, **277**, 41539-41546.
- 4) Tran H, Maurer F and Nagamine Y (2003): Stabilization of urokinase and urokinase receptor mRNAs by HuR is linked to its cytoplasmic accumulation induced by activated mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *Mol Cell Biol*, **23**, 7177-7188.