

LXR α の核小体への局在とリボソーム DNA 転写制御

大橋 瑠子

新潟大学医歯学総合病院病理部

(主任：味岡 洋一教授)

Liver X receptor- α localizes in nucleolus and stimulates rDNA transcription

Riuko Ohashi

Department of Pathology,

Niigata University Medical and Dental Hospital

別刷請求先：〒951-8520 新潟市中央区旭町通 1-754

新潟大学医歯学総合病院病理部 大橋 瑠子

Reprint requests to: Riuko OHASHI

Department of Pathology,

Niigata University Medical and Dental Hospital

1-754 Asahimachi-dori Chuo-ku, Niigata 951-8520 Japan

要旨

LXR α (Liver X receptor α) は LDL (low density lipoprotein) など酸化ステロールの受容体として機能し、脂質代謝、胆汁酸代謝などに関与する核内受容体である。しかし特異性の高い抗体がこれまでなかったため mRNA レベルの研究が多く、その組織細胞内局在や機能については不明な点が多い。本研究では最近作製された LXR α に対する特異的抗体を用いて、LXR α の細胞内局在とこれまで知られていなかったリボソーム生合成への関与について解析を行ったので報告する。LXR α は核小体内において fibrillarin、UBF および RNA polymerase I (RNA pol I) の転写活性の高い領域、すなわち dense fibrillar component と呼ばれる領域に局在することがわかった。HepG2 細胞において RNA pol I の転写活性を Actinomycin D 投与によって抑制すると、LXR α は核小体内に局在できず核質へ移行したことから LXR α の核小体内局在は RNA pol I の転写活性に依存していることがわかった。クロマチン免疫沈降法を用いた検討の結果、LXR α は 18S rDNA と 28S rDNA に結合することが判明した。さらに、HepG2 細胞に対して LXR α を活性化する合成リガンドである T0901317 を投与するとリボソーム前駆体 47S/45S rRNA の転写が促進されたが、LXR α を siRNA でノックダウンすると転写促進が起こらなかった。以上の結果より、LXR α はリボソーム生合成において重要な役割を担っていることが示唆された。

キーワード : LXR α 、核小体、リボソーム RNA、fibrillarin、UBF

緒言

核内受容体スーパーファミリーは低分子脂溶性物質をリガンドとする転写因子群であり、ヒトにおいては 48 種類存在する。エストロゲン受容体(ER)などのホルモン受容体のほか、マクロファージの脂質代謝と抗炎症作用に関わる LXR α , PPAR γ 等が存在する。多くの受容体が広く炎症、代謝、発癌などに関わり創薬分野で最近注目されている¹⁾が、特異性の高い抗体はごくわずかであったため、核内受容体の発現解析に関しては mRNA レベルの研究が多く、タンパク質レベルでの組織発現や細胞内局在については不明な点が多い。

これまで新潟大学と東京大学の研究グループ、ペルセウスプロテオミクス社は共同で、バキュロウイルス発現系を用い 48 種類の核内受容体全てに対し新規抗体の作製を行い、うち 26 受容体 31 種類について免疫染色にも使用可能な特異的抗体を作製することに成功した (<http://www.ppmx.com/products/antibody/NuclearReceptor/index.html>)。その抗体作製に成功した核内受容体のひとつが LXR α である²⁾³⁾。

LXR α は oxysterol、すなわち oxydized low-density lipoprotein (oxLDL) などのコレステロール酸化物をリガンドとする核内受容体で、リガンドの刺激により retinoid X receptor (RXRs) とヘテロダイマーを形成して ABCA1, ABCG5、ABCG8 などのコレステロール代謝に関わる遺伝子群や、CYP7A1 などの胆汁酸合成に関わる遺伝子、そして脂肪酸合成を行う SREBP-1c などの遺伝子の mRNA 転写を促進する機能が報告されている⁴⁾⁷⁾。上記の核内受容体抗体作製プロジェクトで作製に成功した抗 LXR α 抗体を用いて LXR α の発現と細胞内局在について検討を行った結果、筆者らのグループは LXR α はほ乳類において肝臓、小腸、脂肪組織やマクロファージの核内に発現すること、および核小体内に強く局在しており核質 (nucleoplasm) にはごく微弱なシグナルが存在するのみであることを明らかにした⁷⁾⁹⁾。核質は mRNA を転写する機能を有する RNA polymerase II

が存在する mRNA 転写の場であり¹⁰⁾、核質に存在する微量な LXR α はコレステロール代謝、胆汁酸合成、脂肪酸合成を行う遺伝子群の mRNA を転写すると解釈されるが、核小体内に発現している LXR α の機能についてはこれまで不明であった。

核小体は、酵母から植物やヒトに至るまで全ての真核生物に存在する核内構造の一つで、大量のリボソーム RNA (ribosome RNA、以下 rRNA) と、rRNA の転写に特異的に働く RNA ポリメラーゼである RNA polymerase I (以下 RNA pol I) 、そしてその付随因子が豊富に存在するリボソーム生合成 (ribosome biogenesis) の場である。核小体のさらに内部には3つの異なる領域が存在し、リボソーム DNA (以下 rDNA) からリボソーム RNA 前駆体 (precursor rRNA、以下 pre-rRNA) への転写は核小体の最深部のコアである fibrillar center とその周囲に存在する dense fibrillar component の境界部付近で起こり、核小体の外郭を形成する granular component において pre-rRNA から rRNA へのプロセッシングや修飾などを含む成熟やリボソームサブユニットの集合が起こると言われている。リボソームの制御は細胞の増殖や成熟、分裂などを支える基本過程であるとともに、細胞の機能分化とも密接に結びついている¹¹⁾¹²⁾。

そこで本研究では、LXR α の核小体内の詳細な局在を検討するとともに、LXR α がリボソーム生合成へ影響を及ぼすかどうかについて検討を行った。

実験材料と方法

1. 細胞培養と siRNA トランスフェクション

HepG2 細胞は、抗生物質・L-グルタミン・10%FBS 加 high glucose DMEM 培地で培養した。LXR α 刺激には LXR 特異的合成リガンド T0901317 (Cayman 社) を DMSO/PBS (DMSO : PBS=1 : 1) で溶解して使用した。また、RNA polymerase I 特異的抑制には Actinomycin D (和光純薬) を、RNA polymerase II, III 特異的抑制には α -amanitin (和光純薬) をそれぞれ DMSO/PBS で溶解して使用した。いずれも陰性対照には DMSO/PBS のみを同量投与した。

LXR α siRNA (LXR α si1: NR1H3-HSS115298 and LXR α si2: NR1H3-HSS173357) と陰性対照 siRNA (StealthTM RNAi Negative Control Medium GC duplex) は Invitrogen より購入した。Lipofectamine RNAi MAX (Invitrogen) と OPTI-MEM (GIBCO) を用いて HepG2 細胞に対する推奨プロトコールどおりにトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後に LXR 特異的合成リガンド T0901317 (Cayman 社) を最終濃度 10 μ M となるように培地に添加し、さらに 24 時間培養後に PBS でリンスした後、lysis buffer (1%TritonX100, 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH8.0) , 5mM EDTA, protease inhibitors または 1% NP-40, 0.5% Sodium deoxycholate, 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH7.6) , 5mM EDTA, protease inhibitors) を用いてタンパク抽出または ISOGEN を用いて RNA 抽出を行い western blot または定量 RT-PCR に用いた。

2. 抗体

使用抗体は以下のとおりである。

- ・ Mouse monoclonal anti-LXR α antibody (PPZ0412, K8608 ; ペルセウスプロテオミクス)

- ・ Mouse monoclonal anti-RXR α antibody (K8508 ; ペルセウスプロテオミクス)
- ・ Rabbit polyclonal anti-fibrillarin antibody (ab5821 ; Abcam)
- ・ Rabbit polyclonal anti-UBF (upstream binding factor) antibody(H-300 ; Santa Cruz) または Mouse monoclonal anti-UBF antibody (F-9 ; sc-13125 ; Santa Cruz)
- ・ Mouse monoclonal anti-nucleophosmin (NPM) antibody (Zymed)
- ・ Mouse monoclonal anti-Nucleoporin p62 antibody (611962 ; BD Biosciences)
- ・ Alexa Fluor 568 F(ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) (invitrogen)
- ・ Alexa Fluor 488 F(ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L) (invitrogen)
- ・ Anti-mouse IgG, HRP-linked F(ab')₂ fragment sheep (GE healthcare)

2. 蛍光免疫染色

培養細胞は各 reagent を投与する前に約 48 時間 glass chamber slide (Nunc) で培養したのちに使用した。PBS でリンスしたのちに 4% paraformaldehyde/PBS で 5 分間 4℃ 固定し PBS で 5 分ずつ 2 回洗浄後 0.5% TritonX-100/PBS を用いて 5 分室温で透過処理した。PBS で 5 分ずつ 2 回洗浄後 10% normal goat serum/PBS で 30 分ブロッキングし一次抗体を入れて 4℃ overnight 反応を行った。PBS で 5 分間 3 回洗浄後蛍光二次抗体をそれぞれ 1000 倍希釈で室温 1 時間反応を行った。Mouse monoclonal anti-nucleophosmin antibody は Zenon Alexa Fluor 488 mouse IgG1 labeling kit (Invitrogen) を用いて推奨プロトコールどおり標識し最終濃度 50 倍希釈として室温 2 時間反応を行った。PBS で洗浄後、ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen) で封入し共焦点レーザー顕微鏡 LSM510META (Carl Zeiss) で観察、撮影した。

3. *In situ* run-on transcription assay

HepG2 細胞を約 48 時間 glass chamber slide (Nunc) で培養したのちに、RNA polymerase

II, III の選択的阻害薬である α -amanitin を最終濃度 50 μ g/ml となるように投与して 2 時間 37°C, 5% CO₂ 下で培養した。陰性対照として PBS のみを投与した HepG2 細胞を用いた。その後 5-ethynyl uridine (EU) で培養 HepG2 細胞を 1 時間処理し、緑色蛍光の Alexa Fluor® 488 azide と Click-iT® Cell Reaction Buffer Kit (Invitrogen) を用いて推奨プロトコールどおり染色することにより EU の取り込み部位すなわち 1 時間以内の RNA の新規転写部位を検出した。本法は “click chemistry” とも称されている¹³⁾¹⁴⁾。その後、抗 LXR α 抗体 (PPZ0412) を用いて蛍光免疫染色を行い、ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen) で封入したのちに共焦点レーザー顕微鏡 LSM510META (Carl Zeiss) で観察、撮影した。

4. Western blot

得られたサンプルに Laemmli sample buffer を加え 98°C 3 分間熱変性を行った。8.5% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で蛋白を分離し、PDVF メンブレン (GE healthcare) に転写した。転写メンブレンを blocking buffer (5% スキムミルク/PBS) で 4°C overnight マスキングし、blocking buffer で希釈した一次抗体を 4°C 一晚または室温 1 時間かけ抗体反応を行った。反応後 PBS で 5 分ずつ 3 回洗浄後、blocking buffer で 2000 倍希釈した二次抗体 (Anti-mouse IgG, HRP-linked F(ab')₂ fragment sheep; GE healthcare) を室温 1 時間反応させ、PBS で 5 分ずつ 3 回洗浄後、ECL Plus Western Blotting Detection System (GE healthcare) で検出した。

5. 定量 RT-PCR

RT は The SuperScript® VILO (Invitrogen) を、定量 PCR は iQ SYBR Green Supermix と CFX96 リアルタイム解析システム (BIO-RAD) を常法通り使用した。使用したプライマーは Table 1 に示した。LXR は各 3 well、rRNA は各 2 well 測定を 3 回実施した。rRNA

については 2 well の平均値から有意差を検定した。

7. 免疫沈降

タンパク抽出液に等量の Protein A または Protein G-sepharose を入れて 4℃30 分転倒混和して前除去を行った。一次抗体を加えたのちに 4℃ overnight 転倒混和した。Protein A または Protein G を入れて 4℃ 2h 転倒混和したのち 5000rpm, 30 秒遠心または磁石でビーズを回収し、PBS で 3 回洗浄後に Sample buffer を加え、98℃ 3 分間煮沸したのちに上清で SDS-PAGE (8.5% アクリルアミドゲル) を施行し western blot に用いた。

8. クロマチン免疫沈降-定量 PCR (ChIP-qPCR) およびクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq)

HepG2細胞を1% formaldehydeで室温10分処理しglycine を0.2Mになるよう加えた。冷PBSで洗浄後、細胞をcell scraperで回収し、SDS lysis buffer [50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS, and protease inhibitors] に溶解した。超音波処理を行い13,000gで10分間4℃で遠心後、上清をChIP dilution buffer [0.01% SDS, 1.1% tritonX100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl, pH8.1, 167mM NaCl, and protease inhibitors] で10倍希釈した。一次抗体を入れ4℃一晩転倒混和したのちProtein G-sepharoseを加えて 2 時間転倒混和し、sepharoseを回収、洗浄し、elution buffer [1% SDS, 0.1M NaHCO₃, 100 µg/ml Pronase] を加えて42℃ 2 時間、その後65℃で一晩インキュベートさせて溶出し、したものをPCR purification kit (Qiagen) で抽出して次世代シーケンサーもしくはreal time qPCRに用いた。ChIP-seqサンプルはIllumina社の推奨プロトコールどおりに用意し、次世代シーケンサー Genome Analyzer 1G (Illumina社) を用いて解析した。得られたシーケンスをマッピングする際のリファレンスゲノムにはrDNAが含まれていないため、リファレンスゲノム Build #36のクロモソーム 1 の130,000,001~130,042,999番配列にrDNA (GenBank accession

No. U13369)を挿入した後にマッピングを実施した。ChIP-qPCRで用いたプライマーを Table 1に示す。

結果

1. HepG2 細胞を用いた LXR α の核小体内局在の解析

核小体は、外殻を形成する Granular component (GC)、その内部に位置する Dense fibrillar component (DFC)、さらにその内部に存在する Fibrillar center (FC) の三層の微細構造からなる。GC には nucleophosmin (B23/NPM) が、DFC には fibrillarin が、DFC と FC の境界部および FC には RNA pol I と結合して rRNA の転写を活性化する転写調節因子である Upstream binding factor (UBF) が局在し、それぞれの部位を示す局在マーカーとして広く用いられている¹²⁾。HepG2 細胞に対して抗 LXR α 抗体とこれら核小体内微細構造マーカー蛋白に対する抗体とを用いた二重染色を行い検討した。LXR α は nucleophosmin の局在部位のさらに内部に位置し、核小体内に局在することが示されたが nucleophosmin とは共局在しなかった (図 1A)。LXR α は fibrillarin と完全一致し、核小体の dense fibrillar component に局在することが判明した (図 1B)。さらに、LXR α と UBF¹²⁾ とも核小体内で部分的に共局在した (図 1C)。そして、HepG2 細胞に RNA pol I の特異的 inhibitor として知られている Actinomycin D¹⁵⁾を低濃度 (50ng/ml) で投与し 37°C, 5% CO₂ 下で 2 時間培養を行うと LXR α 、fibrillarin, UBF はいずれも核小体から核質へと移行した (図 1B, C)。なお、この局在変化は、RNA polymerase II, III の選択的 inhibitor である α -amanitin¹⁵⁾の投与では起こらなかった (data not shown)。以上の結果から、LXR α の核小体内局在、ことに dense fibrillar component への局在は RNA pol I による rRNA の転写活性に依存していることが示唆された。

2. LXR α の核小体内局在部位は RNA の新規転写活性部位に一致する

LXR α が rRNA の転写に関与しているならば、RNA pol I による新規転写活性部位に一致して LXR α が局在するはずである。RNA の新規転写部位を描出するためには DNA

には含まれず RNA にのみ含まれる核酸である uridine のアナログ、たとえば 5-Bromouridine 5'-triphosphate (BrUTP) や 5-ethynyl uridine (EU)、水素の放射性同位体である H3 を含む H3-uridine などを用いた培養細胞に取り込ませ、取り込まれた誘導体を染色あるいはオートラジオメーターで検出する *In situ* run-on transcription assay あるいは EU を用いた方法については“click chemistry” と称されている手法が用いられる^{12)-14), 16)}。

RNA polymerase II, III の選択的阻害薬である α -amanitin を投与し RNA pol I の転写のみが起こっている状態にした細胞に対して 1mM EU を投与して一時間培養し、細胞を固定して透過処理し、新規合成された RNA に取り込まれた EU を、“click” chemistry” の手法を用いて検出した。その結果、RNA pol I によって EU 投与後 1 時間の間に新たに転写された核小体内領域と LXR α とが共局在した (図 1D)。

3. 免疫沈降法を用いた LXR α と UBF の相互作用の検討

培養 HepG2 細胞に対して LXR α の合成リガンド T0901317 を投与またはコントロールとして少量の DMSO を投与したのち、タンパク抽出を行った whole cell lysate を用いて LXR α 抗体 (K8608) による免疫沈降を行った。その結果、fibrillarin、UBF とともにヒト LXR α との共沈は明らかでなかったが、リガンド依存的な相互作用の増大は確認されなかった(図 2A, 2B) が、マウス肝組織においては LXR α と UBF の共沈が観察された (図 2C)。

4. クロマチン免疫沈降法 (ChIP-qPCR) および全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) による LXR α タンパクの ribosomal DNA との結合部位の検出

HepG2 細胞における LXR α のゲノム結合領域を網羅的に見るため、抗 LXR α を用いて ChIP-seq 解析を実施した。得られたシーケンスを rDNA 配列が挿入されたリファレンスゲノムにマッピングした結果、18S、28S rDNA に LXR α がリガンド依存性に結合

していることが見出された(図 3A)。本結果をより定量的に確認するため、ChIP-qPCR を施行した。18S、28S rDNA におけるリガンド依存的な LXR α の結合が特に強く見られた部位(図 3A の矢印 1、2)、陰性対照 (矢印 3)、にそれぞれプライマーを設計し ChIP-qPCR を行った結果、リガンド依存的な結合性が確認された (図 3B)。また、rDNA 遺伝子領域 (矢印 4) についても ChIP-qPCR を施行したが、LXR α との結合、リガンド依存的な結合は有意でなかった(図 3B)。

LXR α は脂肪酸代謝に関係する遺伝子各種の mRNA を転写する際には RXR α とヘテロダイマーを形成し、LXR α のリガンド投与によって RXR α が間接的に転写活性を有することが知られている⁴⁾⁶⁾。そこで LXR α の rDNA 遺伝子への結合における RXR α の関与を RXR 抗体による ChIP-seq(図 3A)および ChIP-qPCR (図 3B)で同様に確認したが、LXR α リガンド投与の有無に関わらず RXR α の rDNA への結合は検出されなかった。以上の結果は rRNA の転写はヘテロダイマーを形成することなく LXR α のモノマーまたはホモダイマーで行われている可能性が示唆された。

5. LXR α のリガンド投与による rRNA 転写促進の有無の検討

HepG2 細胞において、リガンドにより LXR α を活性化させた際の rRNA の転写量が変化するかどうか LXR α 特異的 siRNA と定量 RT-PCR を用いて解析した。

まず、HepG2 細胞に対して LXR α 特異的 siRNA をトランスフェクションして LXR α のノックダウンが確実に起こることを確認する実験を行った。LXR α 特異的 siRNA トランスフェクション群ではコントロール siRNA をトランスフェクションした群と比べて LXR α タンパクの発現量 (図 4A) と LXR α mRNA の発現量 (図 4B) が減少した。LXR α のリガンド T0901317 (最終濃度 10 μ M) を加えて 24 時間培養するとコントロール siRNA 群で強く、LXR α ノックダウン群では弱く LXR α のタンパクおよび mRNA 発現が上昇した (図 4A, B)。この結果は LXR α に対するリガンド刺激により LXR α 自身が転写さ

れるというこれまでの報告と合致している⁵⁾。

Becherel ら¹⁵⁾、Young ら¹⁶⁾ および Shimono ら¹⁷⁾が用いたプライマーセットで上記条件のサンプルを rRNA 前駆体である 47S/45S rRNA (pre-rRNA) と成熟 rRNA である 28S rRNA の発現量を定量 RT-PCR で解析した。結果、リガンド投与群では 47S/45S rRNA および 28S rRNA の有意な転写促進が観察された (図 4C,D) 。LXR α をノックダウンするとリガンド投与した際の 47S/45S rRNA の転写量は有意に減少した (図 4C) 。28S rRNA に関してはリガンド投与した際の転写量の減少傾向が見られたが、2 つのうちの 1 つの siRNA については有意差が見られなかった。 (図 4D) 。 また、リガンド投与なしで単に LXR α をノックダウンしただけでも 47S/45S rRNA の転写は有意に抑制された。

考察

核内受容体はその全てが様々な mRNA を標的とした転写因子としての役割を担い、各々の受容体についてその標的遺伝子や転写機構に関する報告がなされてきた。LXR α についても、その主たる機能は ABCA1、ABCG5、ABCG8、CYP7A1、SREBP-1c などのコレステロールの合成・代謝や胆汁酸合成などに関わる遺伝子の mRNA 転写を行うこととされ、それに関する詳細な報告がなされてきた⁴⁻⁷⁾。mRNA を転写するためには RNA polymerase II が存在する mRNA の転写の場である核質にその転写因子が局在する必要がある¹⁰⁾。本稿では、我々が作成した抗 LXR α 抗体を用いて蛍光免疫染色を行うことにより、核質における LXR α の発現は極めて微弱であり、核小体内の rRNA 転写部位である DFC 領域に LXR α タンパクが濃く発現している (図 1) こと、さらには LXR α が rDNA と結合して rRNA 転写を促進する機能、すなわちリボソーム生合成に関与することについて証明した。このことは、LXR α の局在が弱い核質での mRNA 転写は LXR α の機能の副次的側面であり、むしろ LXR α が強く局在する核小体内での機能であるリボソーム生合成の方がより LXR α の主たる機能である可能性を示唆している。そして本研究は、これまで mRNA の転写因子としての機能のみが報告されてきた核内受容体スーパーファミリーに属するタンパク質において rRNA 転写に対する機能を有する核内受容体が存在することを報告する初の論文である。

LXR α と類似のアミノ酸配列およびドメイン構造を有する類縁核内受容体である LXR β については Lall らが cyan fluorescent protein (CFP) と LXR β のキメラをコードした cDNA 配列を組み込んだ plasmid を COS-7 細胞にトランスフェクションして強制発現する系により LXR β が核小体に局在することを報告しているがその核小体内での詳細な機能についての解析はなされていない。Lall らは同様の実験を CFP と LXR α のキメラで行っているが、LXR α は核質に局在したと結論づけている¹⁸⁾。また、Prüfer らは

YFP-LXR α キメラを HEK293 細胞にトランスフェクションする強制発現系で実験を行い、Lall らと同じく LXR α は核質に局在した結果を得ている¹⁹⁾。これらの報告と本実験における LXR α の局在結果の差異について考察すると、Lall らおよび Prüfer らの解析は強制発現系という人工的な発現系での局在解析であるので CFP などの蛍光タグタンパク質とキメラとなることにより分子量を増すことやタンパク質の翻訳後修飾などの影響でタンパク質の立体構造が変化したりするなどの影響でタンパク質の正確な細胞内輸送ができなくなり自然界で本来生理的に局在すべき細胞内部位とは異なる部位にタンパク質が移行する可能性が生ずるのに対して、本実験は内在性の LXR α をターゲットとしているためと考えられる。つまり本実験系の方が自然界における LXR α のより正確かつ特異的な局在を示していると考ええる。

UBF は RNA pol I および rDNA と直接結合して rRNA 転写を調節する働きを有するタンパクである^{12), 20)-22)}。UBF と共局在および結合してかつ rDNA のプロモーター領域と結合し pre-rRNA の転写促進に働くタンパクとしては MCRS1、Mi-2 β 、RFP¹⁷⁾、c-Myc²³⁾²⁴⁾、C/EBP α ²⁵⁾、RasL11a²⁶⁾、DHX33²⁷⁾ などが、また、転写抑制に働くタンパクとしては Runx2¹⁶⁾、p14^{ARF}²⁸⁾ などがこれまでに報告されている。HepG2 細胞において LXR α は UBF と共局在し (図 1C)、かつ新規 rRNA 転写部位とは共局在した (図 1D)。LXR α と UBF との結合は HepG2 細胞においては観察されなかったが (図 2B)、マウス肝では観察された (図 2C)。ChIP-seq 解析から LXR α の rDNA 遺伝子領域へ結合およびリガンド依存的な結合の増大が見られている (図 3)。さらに LXR α の特異的リガンドによる pre-rRNA の転写促進および LXR α ノックダウンによる転写抑制も観察された (図 4)。以上のことから、LXR α は核小体内において UBF と結合し、rRNA 転写を調節する働きを持つ可能性が示唆された。HepG2 細胞における LXR α と UBF の結合が見られなかったのは、抗 LXR α 抗体や抗 UBF 抗体とヒトあるいはマウスの内在性タンパクとの親和性の差や、LXR α が核小体内において微量しか存在しないことなどが実験結果に影響し

た可能性がある。本研究の実験結果で得られた LXR α の rDNA 遺伝子領域結合パターンが過去に報告されている UBF のそれ²⁹⁾ とよく似ていることから、ヒトにおいても LXR α と UBF の結合が存在する可能性が極めて高いと考えられる。これまで UBF と結合することが報告されている上記の各種タンパクと異なり、LXR α はリガンドの投与によって pre-rRNA 転写が促進される点、および LXR α の rDNA との結合性がリガンド依存性に結合性が高くなるという点が非常に特徴的である。これまで報告されている pre-rRNA の転写促進に働くタンパクの多くにおいて、rRNA の転写促進が細胞増殖や分化に関与することが示されている²³⁾⁻²⁷⁾。本研究結果は LXR α もマクロファージをはじめとする LXR α を発現する種々の細胞における細胞分化に関わるタンパクの mRNA の転写を促進するのみならず、リボソーム生合成が機能分化に関与している可能性を示唆している。

fibrillarin は box C/D small nucleolar RNP と呼ばれる核小体低分子リボ核タンパク質 (small nucleolar ribonucleoprotein; snoRNP) の構成因子で、U3 snoRNA (small nucleolar RNA) および pre-rRNA と結合し、pre-rRNA のプロセッシングやメチル化による rRNA の成熟、すなわち真核生物においては成熟 rRNA である 18S, 5.8S, 28S rRNA の形成やリボソームの会合に関与すると考えられている³⁰⁾⁻³³⁾。今回の実験結果では、HepG2 細胞において LXR α は fibrillarin と結合性を示したことから (図 2)、LXR α は pre-rRNA のプロセッシングなどの成熟過程に何らかの役割を担っていることが示唆された。実際、LXR α のリガンド投与で mature-rRNA (28 rRNA) の転写上昇が観察されたが、LXR α のノックダウンによる mature-rRNA の有意な低下は見られなかった (図 4D)。UBF を介した pre-rRNA の転写は前述のとおり非常に多くのタンパクが関与していることが証明されつつあるが^{16), 17), 23)-27)}、fibrillarin と結合するタンパクや rRNA のプロセッシングに関与することが推測されるタンパクは BIG1³³⁾、HIV Tat protein³⁴⁾、PIP2³⁵⁾など少数の報告があるのみであり、また、プロセッシングの過程そのものについても未だ不明な点が多い³⁶⁾。

リボソーム生合成は細胞の生命維持にとって最低限必要な基本過程であるので、非常に多数の分子が相補的に関与していることが予測され、LXR α はあくまでもそのうちの一つの候補であって LXR α だけが発現が低下したりリガンドが不足したりする状況があったとしてもほかのタンパクで補ったりしながら互いにバランスをとって細胞の増殖・分化・成熟に関与していると考えられる。今後、実際に LXR α が snoRNA と結合しているかどうかや、全ての成熟 rRNA の発現態度についての検討を実施し、より詳細に fibrillarin との結合における役割の検討が必要である。また、pre-rRNA のプロセッシングなどの成熟過程に LXR α はむしろ抑制的に働いている可能性や、LXR α が転写活性化あるいは抑制するなんらかの下流転写因子が pre-rRNA のプロセッシングに影響している可能性があり、今後の詳細な検討を要する。

興味深いことに、一般的に LXR α を介した mRNA の転写においてはリガンド投与によって LXR α -RXR ヘテロダイマーが形成される^{4)-6), 37)} のに対して、rDNA と結合しているのは LXR α のみで RXR との結合は検出されなかった (図 3)。この実験結果から、X 線構造解析ではその存在が確認されているもののこれまで mRNA 転写に対する機能的効果の有無が疑問視されてきた LXR α モノマーまたはホモダイマー³⁷⁾ が rDNA 遺伝子領域に結合している可能性が推定される。十分量の RXR の存在下において LXR α モノマーまたはホモダイマーはすぐに LXR α -RXR ヘテロダイマー化するといわれている³⁷⁾ ことから、LXR α の発現量とリガンドの有無のみならず RXR の有無が rRNA 転写と mRNA 転写のどちらに進むかの調節に関与していると考えられる。これまでの複数の報告で RXR は核質に局在し核小体には局在しないことが示されており^{38) 39)}、本質的には RXR の局在自体が mRNA 転写を調節している可能性があると考えられる。

結語

HepG2 細胞を用い、LXR α の詳細の細胞内局在とこれまで知られていなかったリボゾーム生合成への関与について解析した。LXR α は核質には薄く観察されるのみであるが核小体内の DFC と呼ばれる領域に多く局在し、これまで専ら LXR α の主たる機能とされてきたコレステロールの合成・代謝や胆汁酸合成などに関わるさまざまな遺伝子の mRNA 転写を行うのみでなく、核小体の中心的機能であるリボゾーム生合成にも関与する。また、mRNA 転写には LXR α -RXR ヘテロダイマー化が必要であることが知られているのに対して、rRNA 転写には LXR α モノマーまたはホモダイマーが関与する。

謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科分子細胞病理学分野教授 内藤 眞先生、同准教授 長谷川 剛先生、同 分子・診断病理学分野教授 味岡 洋一先生、新潟大学医歯学総合病院病理部准教授 梅津 哉先生、新潟医療技術専門学校教授 八神 淑英先生、東京大学先端科学技術研究センター計量生物医学分野教授 浜窪 隆雄先生、同助教 太期 健二先生、東京大学先端科学技術研究センターシステム生物医学ラボラトリー教授 児玉 龍彦先生、ならびに細胞培養および標本作製において援助いただいた新潟大学大学院医歯学総合研究科分子細胞病理学分野青山 崇技官、大谷内 健二技官、圓山 理子技官、高橋 美恵子技官に深謝いたします。

本研究に関連して平成 16・18・19 年度新潟大学プロジェクト推進経費(若手研究)、平成 19 年度日本学術振興会科学研究費補助金(若手研究 B)(19790254)、平成 22・23・24 年度新潟大学科学研究費応募支援プログラム(惜敗プログラム)による補助金および平成 23 年度塚田医学奨学金の助成をいただき、深謝いたします。

参考文献

- 1) Jakobsson T, Treuter E, Gustafsson JÅ, Steffensen KR: Liver X receptor biology and pharmacology: new pathways, challenges and opportunities. *Trends Pharmacol Sci.* 33(7): 394-404, 2012
- 2) Watanabe Y, Jiang S, Takabe W, Ohashi R, Tanaka T, Uchiyama Y, Katsumi K, Iwanari H, Noguchi N, Naito M, Hamakubo T, Kodama T: Expression of the LXRalpha protein in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(3): 622-7, 2005
- 3) Watanabe Y, Tanaka T, Uchiyama Y, Takeno T, Izumi A, Yamashita H, Kumakura J, Iwanari H, Shu-Ying J, Naito M, Mangelsdorf DJ, Hamakubo T, Kodama T: Establishment of a monoclonal antibody for human LXRalpha: Detection of LXRalpha protein expression in human macrophages. *Nucl Recept* 1(1): 1, 2003
- 4) von Grafenstein S, Mihaly-Bison J, Wolber G, Bochkov VN, Liedl KR, Schuster D: Identification of novel liver X receptor activators by structure-based modeling. *J Chem Inf Model* 52(5): 1391-400, 2012
- 5) Edwards PA, Kennedy MA, Mak PA: LXRs; oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. *Vascul Pharmacol* 38(4): 249-56, 2002
- 6) Peet DJ, Janowski BA, Mangelsdorf DJ: The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr Opin Genet Dev* 8(5): 571-5, 1998
- 7) Kazawa T, Kawasaki T, Sakamoto A, Imamura M, Ohashi R, Jiang S, Tanaka T, Iwanari H, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Naito M: Expression of liver X receptor alpha and lipid metabolism in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophage. *Pathol Int* 59(3): 152-60, 2009
- 8) Sakamoto A, Kawasaki T, Kazawa T, Ohashi R, Jiang S, Maejima T, Tanaka T, Iwanari H,

- Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Naito M: Expression of liver X receptor alpha in rat fetal tissues at different developmental stages. *J Histochem Cytochem* 55(6): 641-9, 2007
- 9) Takegoshi S, Jiang S, Ohashi R, Savchenko AS, Iwanari H, Tanaka T, Hasegawa G, Hamakubo T, Kodama T, Naito M: Protein expression of nuclear receptors in human and murine tissues. *Pathol Int* 59(2): 61-72, 2009
 - 10) Szentirmay MN, Sawadogo M: Spatial organization of RNA polymerase II transcription in the nucleus. *Nucleic Acids Res* 28(10): 2019-25, 2000
 - 11) Dundr M, Misteli T: Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J* 356(Pt 2): 297-310, 2001
 - 12) Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernandez-Verdun D: Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol* 129:13–31, 2008
 - 13) Gomes C, Smith SC, Youssef MN, Zheng JJ, Hagg T, Hetman M: RNA polymerase 1-driven transcription as a mediator of BDNF-induced neurite outgrowth. *J Biol Chem* 286(6): 4357-63, 2011
 - 14) Jao CY, Salic A: Exploring RNA transcription and turnover in vivo by using click chemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(41): 15779-84, 2008
 - 15) Becherel OJ, Gueven N, Birrell GW, Schreiber V, Suraweera A, Jakob B, Taucher-Scholz G, Lavin MF: Nucleolar localization of aprataxin is dependent on interaction with nucleolin and on active ribosomal DNA transcription. *Hum Mol Genet* 15(14): 2239-49, 2006
 - 16) Young DW, Hassan MQ, Pratap J, Galindo M, Zaidi SK, Lee SH, Yang X, Xie R, Javed A, Underwood JM, Furcinitti P, Imbalzano AN, Penman S, Nickerson JA, Montecino MA, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS: Mitotic occupancy and lineage-specific transcriptional control of rRNA genes by Runx2. *Nature* 445(7126): 442-6, 2007
 - 17) Shimono K, Shimono Y, Shimokata K, Ishiguro N, Takahashi M: Microspherule protein 1,

- Mi-2beta, and RET finger protein associate in the nucleolus and up-regulate ribosomal gene transcription. *J Biol Chem* 280(47): 39436-47, 2005
- 18) Lall R, Kuruvilla S, Prüfer K: Liver X receptor beta with mutations in the activation function-2 region is excluded from the nucleolus. *Cell Biol Int* 33(3): 447-52, 2009
 - 19) Prüfer K, Boudreaux J: Nuclear localization of liver X receptor alpha and beta is differentially regulated. *J Cell Biochem* 100(1): 69-85, 2007
 - 20) Mais C, Wright JE, Prieto JL, Raggett SL, McStay B: UBF-binding site arrays form pseudo-NORs and sequester the RNA polymerase I transcription machinery. *Genes Dev* 19(1): 50-64, 2004
 - 21) Gébrane-Younès J, Fomproix N, Hernandez-Verdun D: When rDNA transcription is arrested during mitosis, UBF is still associated with non-condensed rDNA. *J Cell Sci* 110 (Pt 19): 2429-40, 1997
 - 22) Roussel P, André C, Masson C, Géraud G, Hernandez-Verdun D: Localization of the RNA polymerase I transcription factor hUBF during the cell cycle. *J Cell Sci* 104 (Pt 2): 327-37, 1993
 - 23) Arabi A, Wu S, Ridderstråle K, Bierhoff H, Shiue C, Fatyol K, Fahlén S, Hydbring P, Söderberg O, Grummt I, Larsson LG, Wright AP: c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* 7(3): 303-10, 2005
 - 24) Grandori C, Gomez-Roman N, Felton-Edkins ZA, Ngouenet C, Galloway DA, Eisenman RN, White RJ: c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat Cell Biol* 7(3): 311-8, 2005
 - 25) Müller C, Bremer A, Schreiber S, Eichwald S, Calkhoven CF: Nucleolar retention of a translational C/EBPα isoform stimulates rDNA transcription and cell size. *EMBO J* 29(5): 897-909, 2010

- 26) Pistoni M, Verrecchia A, Doni M, Guccione E, Amati B: Chromatin association and regulation of rDNA transcription by the Ras-family protein RasL11a. *EMBO J* 29(7):1215-24, 2010
- 27) Zhang Y, Forsys JT, Miceli AP, Gwinn AS, Weber JD: Identification of DHX33 as a mediator of rRNA synthesis and cell growth. *Mol Cell Biol* 31(23): 4676-91, 2011
- 28) Ayrault O, Andrique L, Fauvin D, Eymin B, Gazzeri S, Séité P: Human tumor suppressor p14ARF negatively regulates rRNA transcription and inhibits UBF1 transcription factor phosphorylation. *Oncogene* 25(58): 7577-86, 2006
- 29) Zentner GE, Saiakhova A, Manaenkov P, Adams MD, Scacheri PC: Integrative genomic analysis of human ribosomal DNA. *Nucleic Acids Res* 39(12): 4949-60, 2011
- 30) Tollervey D, Lehtonen H, Jansen R, Kern H, Hurt EC: Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* 72(3): 443-57, 1993
- 31) Sienna N, Larson DE, Sells BH: Altered subcellular distribution of U3 snRNA in response to serum in mouse fibroblasts. *Exp Cell Res* 227(1): 98-105, 1996
- 32) Wang H, Boisvert D, Kim KK, Kim R, Kim SH: Crystal structure of a fibrillarin homologue from *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile, at 1.6 Å resolution. *EMBO J* 19(3): 317-23, 2000
- 33) Padilla PI, Uhart M, Pacheco-Rodriguez G, Peculis BA, Moss J, Vaughan M: Association of guanine nucleotide-exchange protein BIG1 in HepG2 cell nuclei with nucleolin, U3 snoRNA, and fibrillarin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(9): 3357-61, 2008
- 34) Ponti D, Troiano M, Bellenchi GC, Battaglia PA, Gigliani F: The HIV Tat protein affects processing of ribosomal RNA precursor. *BMC Cell Biol* 9:32, 2008

- 35) Yildirim S, Castano E, Sobol M, Philimonenko VV, Dzajak R, Venit T, Hozák P: Involvement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in RNA polymerase I transcription. *J Cell Sci* 126, 2730-9, 2013
- 36) Sloan KE, Mattijssen S, Lebaron S, Tollervey D, Pruijn GJ, Watkins NJ: Both endonucleolytic and exonucleolytic cleavage mediate ITS1 removal during human ribosomal RNA processing. *J Cell Biol* 200(5): 577-88, 2013
- 37) Fradera X, Vu D, Nimz O, Skene R, Hosfield D, Wynands R, Cooke AJ, Haunsø A, King A, Bennett DJ, McGuire R, Uitdehaag JC: X-ray structures of the LXRalpha LBD in its homodimeric form and implications for heterodimer signaling. *J Mol Biol* 399(1): 120-32, 2010
- 38) Tanaka T, Dancheck BL, Trifiletti LC, Birnkrant RE, Taylor BJ, Garfield SH, Thorgeirsson U, De Luca LM: Altered localization of retinoid X receptor alpha coincides with loss of retinoid responsiveness in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *24*(9): 3972-82, 2004
- 39) Feige JN, Gelman L, Tudor C, Engelborghs Y, Wahli W, Desvergne B: Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. *J Biol Chem* 280(18): 17880-90, 2005

図の説明

図1. LXR α の細胞内局在

細胞周期を同期していないHepG2細胞に蛍光免疫染色を行い、間期核を対象として共焦点レーザー顕微鏡LSM510METAを用いて撮影した。核DNAの対比染色にはHoechst33342を用いた。

(A) LXR α (赤) と核小体のgranular componentに存在する nucleophismin (NPM) との重染色。LXR α は核小体内に局在するが、nucleophosminとは共局在しない。

(B, C) LXR α (赤) と核小体のdense fibrillar componentに存在するfibrillarin (緑) (B) 、UBF (緑) (C) との重染色。LXR α とfibrillarinおよびUBFは核小体内で共局在した。Actinomycin D (50ng/ml) で2時間処理するとLXR α 、fibrillarin, UBFは核小体から核質へと移行した。

(D) *In situ* run-on transcription assay の結果。RNA polymerase II, IIIの選択的阻害薬である α -amanitin (50 μ g/ml) を投与して1時間培養し、その後EU (1mM) を投与してHepG2細胞を1時間処理した。新しく合成されたRNAに取り込まれたEUを緑色蛍光にて検出し、その後LXR α を赤で染色し、共焦点レーザー顕微鏡LSM510METAを用いて観察、撮影した。RNA polymerase I の転写活性部位、すなわちリボゾームRNA新規転写部位とLXR α の局在部位が一致した。

図2. 免疫沈降法を用いたLXR α とUBFの相互作用の検討

(A) HepG2細胞におけるヒトLXR α とfibrillarinとの免疫沈降法の結果。リガンド(-)でInputと類似のバンドが検出されたが、若干分子量が異なっており、確実にfibrillarinが沈降されているとは判断できない。

(B) HepG2細胞におけるヒトLXR α とUBFとの免疫沈降法の結果。

(C) マウス肝臓のwhole lysateを用いたマウスLXR α とUBFとの免疫沈降法の結果。

図3. クロマチン免疫沈降法によるLXR α タンパクとribosomal DNAとの結合の検討

(A) ChIP-seqの結果。結果のグラフの下に模式図はribosomal DNA repeatの相当部位を示したものである。

(B) ChIP-qPCRの結果。ChIP-seqでrDNAとの結合性が観察された抗LXR α 抗体 (clone PPZ0412) と、別の抗LXR α 抗体 (clone K8608) を同時に解析したが、clone PPZ0412での免疫沈降の方が効率よくrDNAとの結合性を示した。RXR α とrDNAとの結合は明らかでなかった。

図4. LXR α のリガンド投与によるrRNA転写促進の有無の検討

(A, B) LXR α 特異的siRNAとコントロールsiRNAをHepG2にトランスフェクションし、LXR α タンパクおよびmRNAを対象としてノックダウン効率を検討した。

(A) LXR α のwestern blotの結果。リファレンスタンパクとしてnucleoporin p62を用いた。

(B) LXR α mRNAをターゲットとしたreal time RT-PCRの結果。リファレンス遺伝子としてCyclophilinを用いた。

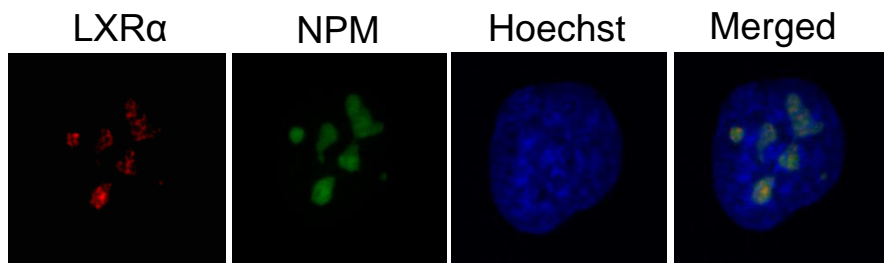
(C, D) HepG2細胞に対しLXR α 特異的リガンドT0901317 (10 μ M) を投与すると24時間後には47S/45S rRNAの転写促進が観察された ($p < 0.05$)。LXR α をノックダウンするとリガンド投与時の47S/45S rRNAの転写促進は有意に ($p < 0.01$) 抑制された (C)。同様に28S rRNA の転写量もリガンド投与によって軽度上昇し ($p < 0.05$)、LXR α をノックダウンした際およびリガンド投与時には軽度抑制された ($p < 0.05$) (D)。同じ実験を3回行なった。

Table 1. 本研究で使⽤した PCR プライマーセット

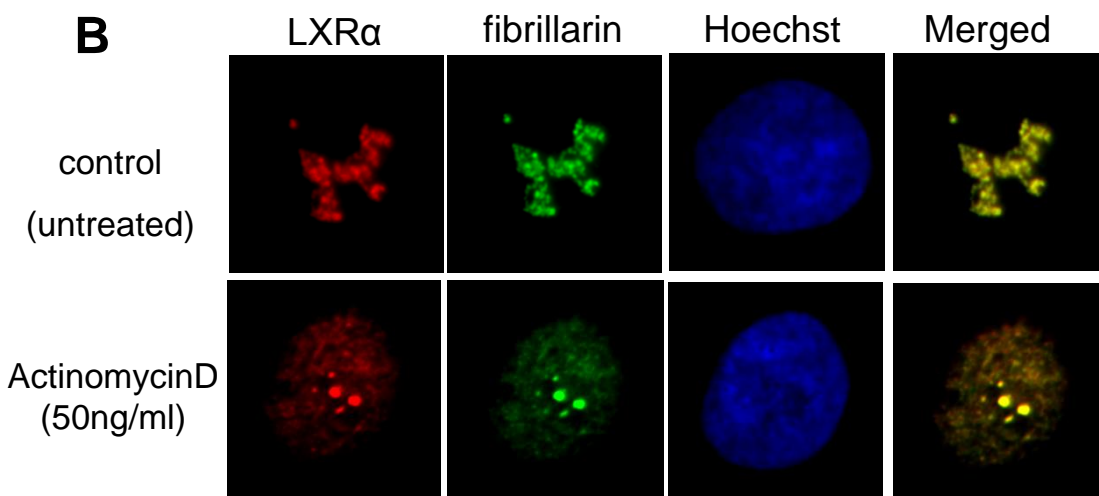
Gene	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
LXR α	5'-ATGATGCCGAGTTTGCCTTG-3'	5'-ATGGGGATGGTGGATGGAG-3'
28S rRNA	5'-TGTCGGCTCTTCCTATCATTGT-3'	5'-ACCCAGCTCACGTTCCCTATTA-3'
47S/45S rRNA	5'-GAACGGTGGTGTGTCGTTC-3'	5'-GCGTCTCGTCTCGTCTCACT-3'
Cyclophilin	5'-TTCGTGCTCTGAGCACTGGAGA-3'	5'-GGACCCGTATGCTTTAGGATGAAG-3'
rDNA1	5'-AACCCCATTCGTGATGGGGATC-3'	5'-GCTTATGACCCGCACTTACTCG-3'
rDNA2	5'-GCGTTCATAGCGACGTCGCTTT-3'	5'-TCCAACGCTTGGCGAATTCTGC-3'
rDNA3	5'-CACCGTGCCCGGCTAACTTTTT-3'	5'-GTCAGGAGATCGAGACCATC-3'
rDNA4	5'-CTTTGAGATCGTGCTCTCGG-3'	5'-TTTCCGGAGCTCTGCCTAGCT-3'
ABCA1	5'-TGCTTTCTGCTGAGTGACTGAACTAC- 3'	5'-CAATTACGGGGTTTTTGCC-3'

1

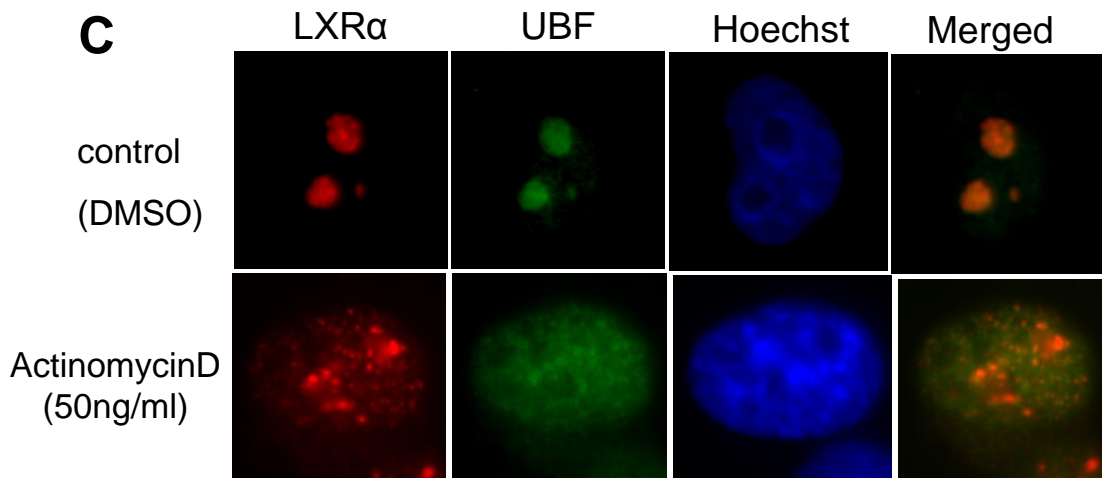
A



B



C



D

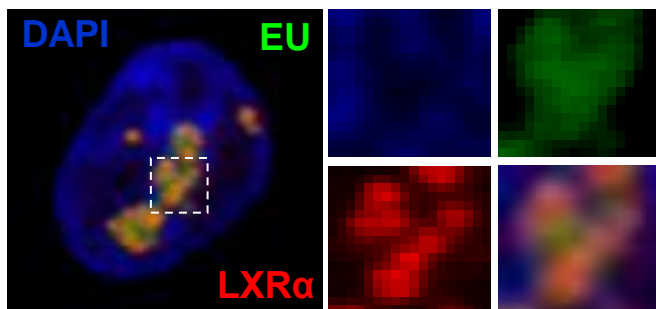
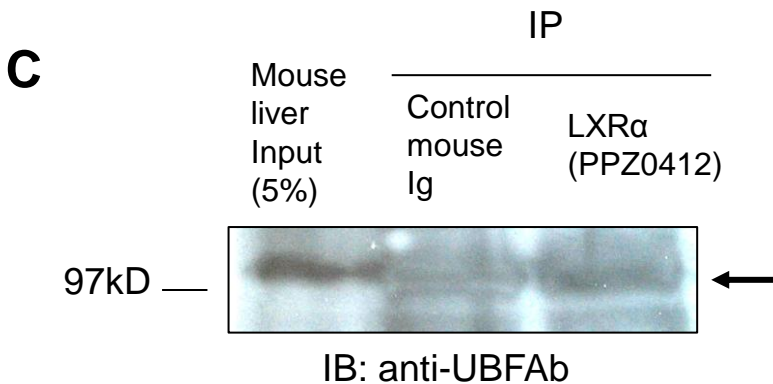
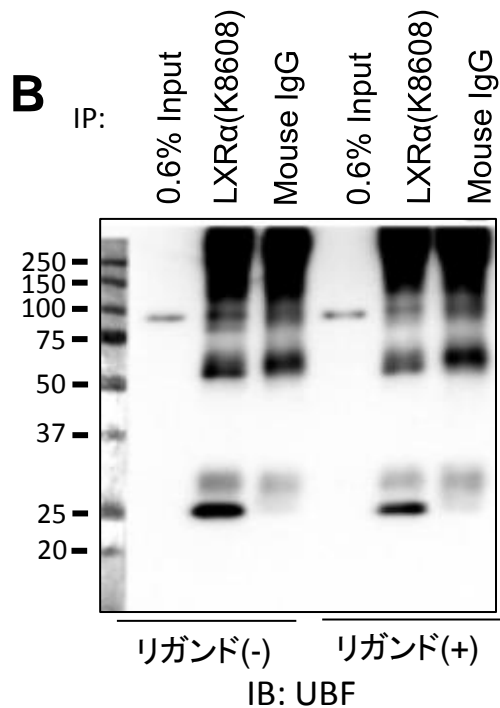
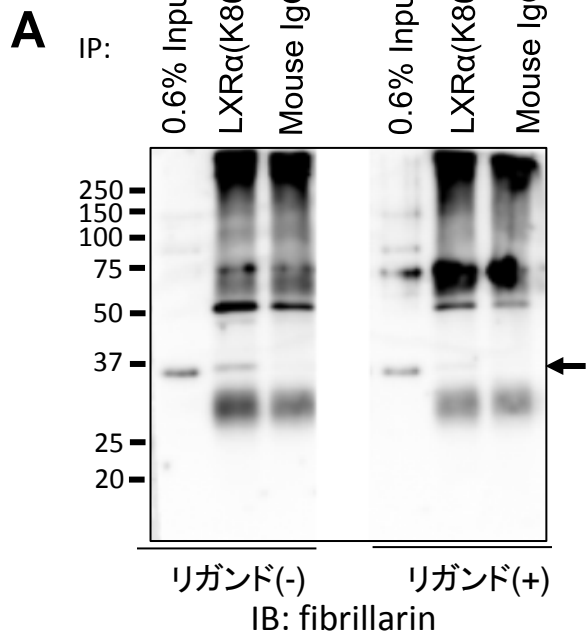


図2



3A

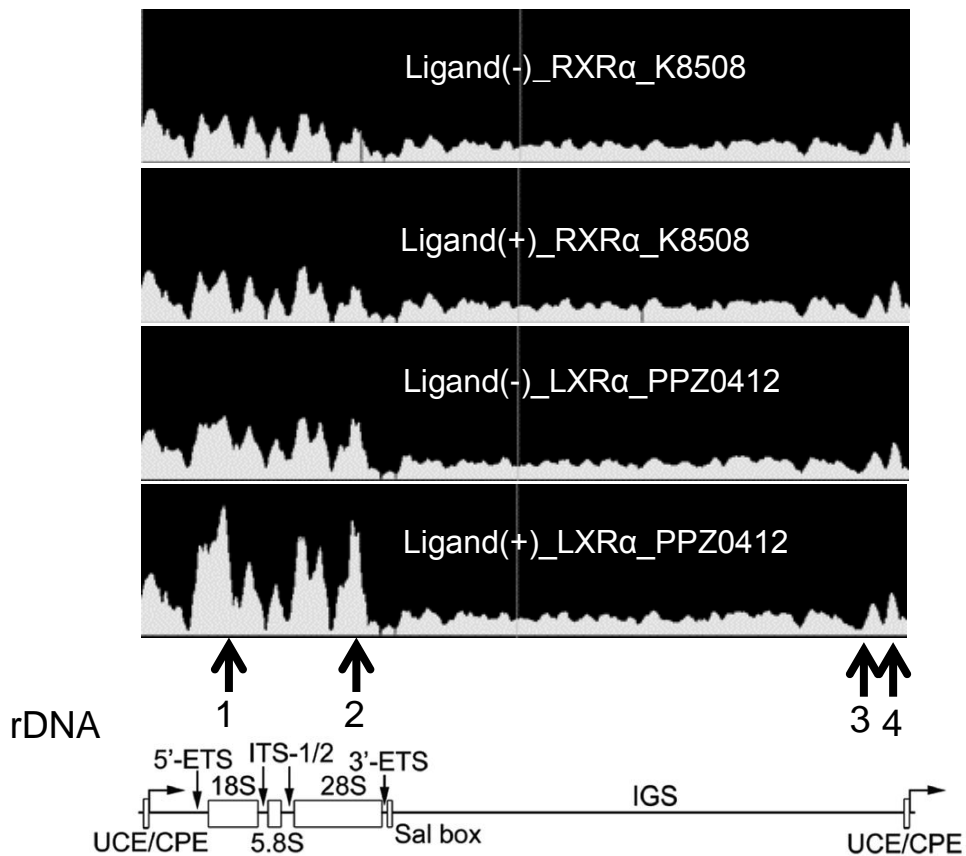
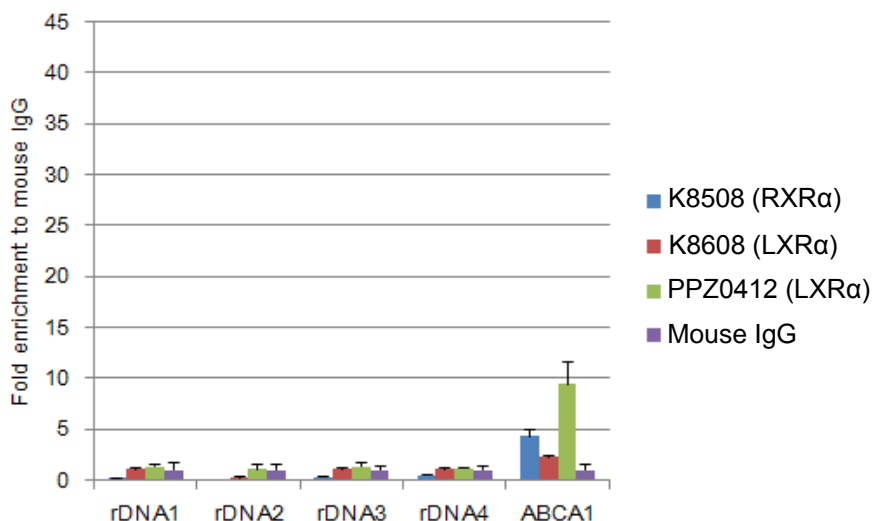


図3B

リガンド(-)



リガンド(+)

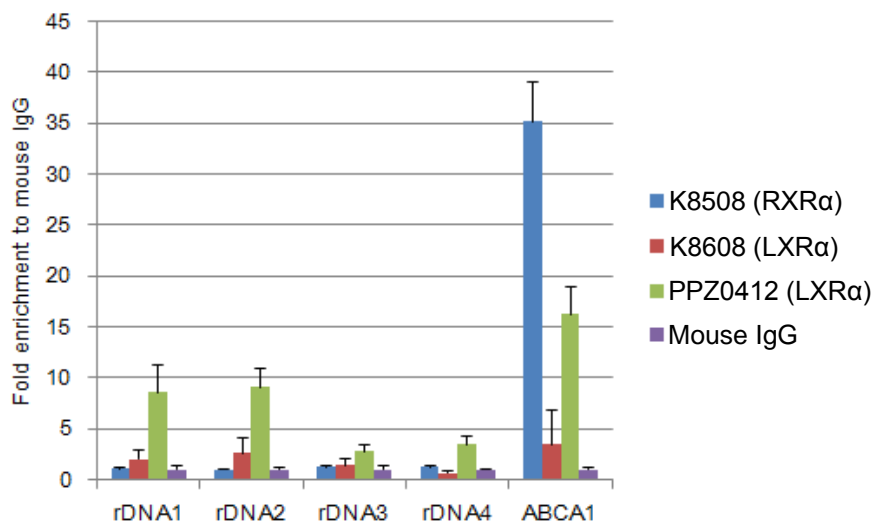
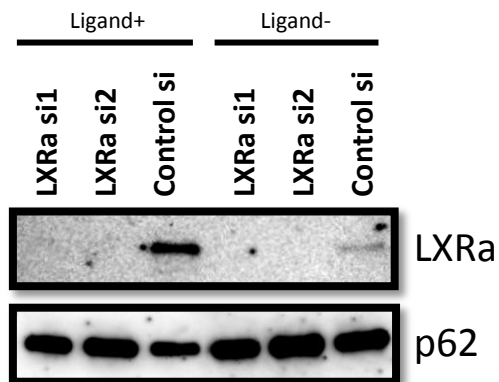
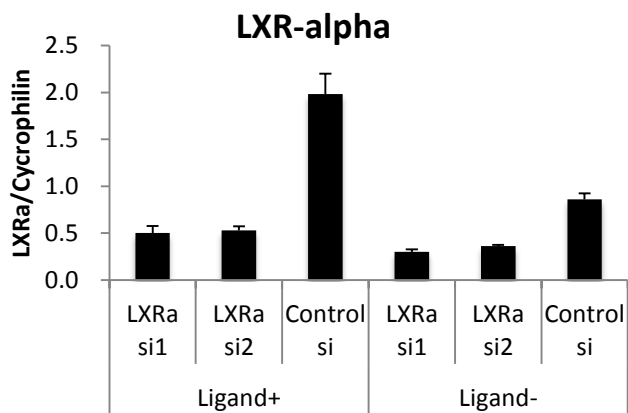


图4

A

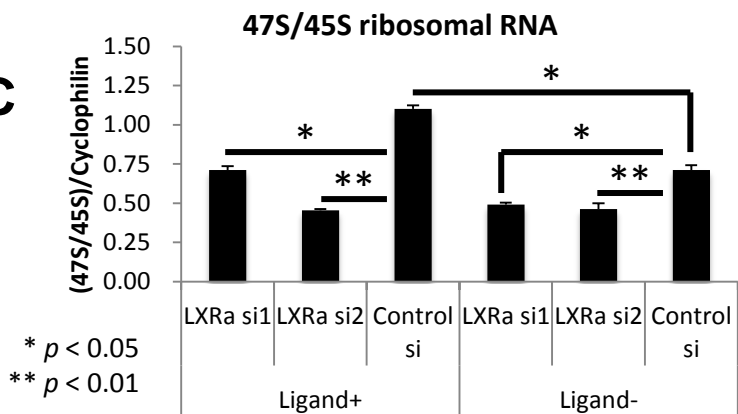


B



4

C



D

