

- 20) Hao, B., Gong, W., Ferguson, T.K., James, C.M., Krzycki, J. A., & Chan, M.K. (2002) *Science*, 296, 1462-1466.
- 21) Ibba, M. & Söll, D. (2004) *Genes & Dev.*, 18, 731-738.
- 22) Zhang, Y. & Gladyshev, N. (2007) *Nucl. Acid Res.*, 35, 4952-4963.

松儀 実広

(自治医科大学医学部生化学講座構造生化学部門)

The system of selenoprotein biosynthesis
 Jitsuhiro Matsugi (Department of Biochemistry, Division of Structural Biochemistry, School of Medicine, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsuke-shi, Tochigi 329-0498, Japan)

リン脂質合成における CTP：ホスホコリンシチジリルトランスフェラーゼ α の転写制御

1. PC 合成経路

ホスファチジルコリン (PC) は真核生物の細胞膜を構成する最も含量の多いリン脂質であり、合成には二つの経

路が知られている。一つは CDP-コリン経路であり、もう一つはホスファチジルエタノールアミン (PE) からの PE のメチル化経路である (図 1)。PE のメチル化経路では CDP-エタノールアミン経路により生合成された PE のエタノールアミンがメチル化されることで PC が合成される。PE のメチル化経路による PC 合成は哺乳動物では肝臓に認められるが、主要な組織や細胞での主な PC 合成の経路は CDP-コリン経路である¹⁾。

CDP-コリン経路による PC 合成は 3 段階の反応により行われる。コリンは必須栄養素であり、コリン特異的輸送体により細胞内に取り込まれ、第 1 段階の反応においてコリンキナーゼによりリン酸化されホスホコリンが生成される。第 2 段階の反応は CTP：ホスホコリンシチジリルトランスフェラーゼ (CTP：phosphocholine cytidylyltransferase) (CT) によるホスホコリンの CTP 由来 CMP への転移反応であり、これにより CDP-コリンが生成される。第 3 段階の反応により CDP-コリンはコリンホスホトランスフェラーゼによりジアシルグリセロールに転移され PC が生合成される (図 1)。細胞内のホスホコリン、CDP-コリン、PC 量を比較すると CDP-コリン量が最も少ないことなどから、CDP-コリン経路の律速段階は CDP-コリン合成反応であり、律速酵素は CT と考えられている。

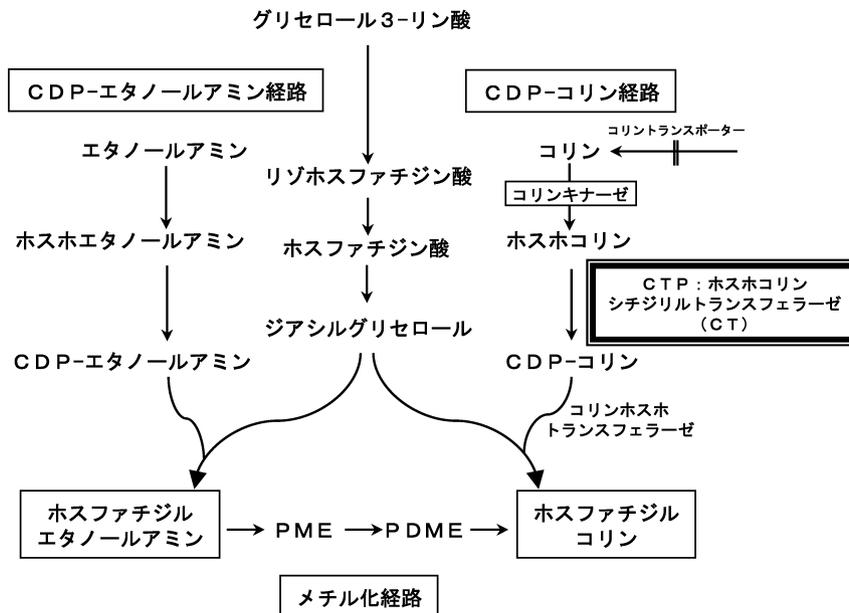


図 1 ホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンの合成経路
 PME, ホスファチジメチルエタノールアミン; PDME, ホスファチジジメチルエタノールアミン。

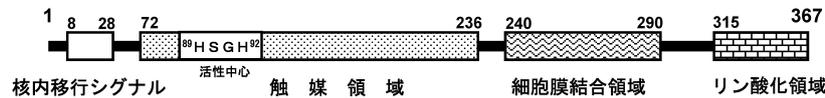
2. CT α の転写および転写後調節の概要

CTアイソフォームのなかでも発現量が最も多いCT α がラット肝臓からはじめて精製されたのは1986年であり、1990年にはcDNAクローニングがなされた²⁾。ラットCT α は367アミノ酸よりなり、N末端側には触媒領域(72-236)(nucleotidyltransferase共通の活性中心:⁸⁹HXGH⁹²)、C末端側にはセリンに富んだリン酸化領域(315-367)が認められ、それら領域の間には細胞膜/脂質結合領域(240-290)が存在する(図2A)。N末端には核内移行シグナル(8-28)が認められ、CT α は通常は主に核内に存在する。その後CTにはCT α ばかりでなく、CT β 2、CT β 3などのアイソフォームが知られるようになったが、多くの組織や細胞に発現し、最も活性が高いのはCT α である。CT α の転写レベルおよび転写後タンパク質レベルでの活性制御機構解明のための研究が現在でも盛んに行われているが、これは細胞内のPC量の制御機構が細胞の増殖や分化に深くかかわる重要な研究テーマであるとともに、リン脂質合成や分解のスピードがどこの代謝経路でどのような制御を受けているのかに関する機構が未だ不明確なためでもある。

CT α の転写後酵素レベルでの活性制御機構に関してはこれまでに多くの報告がなされてきたが、その機構は現在でも混沌としている¹⁾。活性制御にCT α の脂質結合領域およびリン酸化領域が重要であることに関しては一致している。それ以外の点に関して以下に私なりの考えを示すが異論もある。CT α の活性化は細胞膜内のジアシルグリセロール(DG)の増量とそれとともなうCT α の脂質結合領域を介した細胞膜への移行により行われ、これは脂肪酸合成促進からのDGの増量がフィードフォワードに働き、PC合成促進に結びつくためだと考えられる。CT α のC末端側のリン酸化は酵素活性の低下を引き起こすが、これは脂肪酸合成やコレステロール合成の律速酵素と同じような意味合いだと私は考えている。しかしながらエネルギー貯蔵に結びつく脂肪酸合成(トリアシルグリセロール合成)と細胞増殖に結びつくPC合成を同じレベルで議論はできないという指摘もある。またPC合成促進にはCT α の核内から核外への移行が重要であるという報告もなされている³⁾。

一方CT α の転写レベルでの制御に関しての報告は少なく、CT α のmRNA量は肝臓の発生分化過程で低下し、肝

A



B

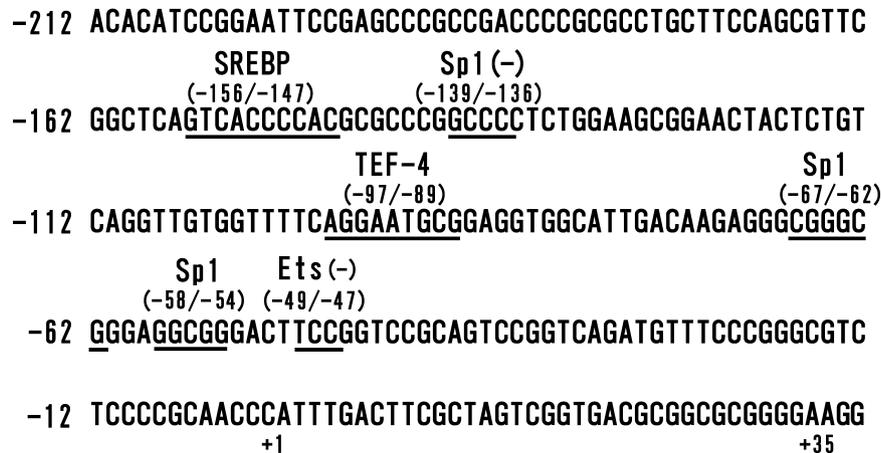


図2 A. ラットCTP:ホスホコリンシチジリルトランスフェラーゼ α (CT α) B. マウスCT α (*Pcyt1a*)プロモーターの塩基配列と結合タンパク質。SREBP, sterol response element binding protein; TEF-4, transcriptional enhancer factor-4.

部分切除後⁴⁾, M-CSF 刺激を受けたマクロファージ, S 期の細胞などにおいて増加するという報告がある. しかしどのような転写因子により CT α の転写が制御されているのか, 分子レベルでの CT α 転写制御機構の解明はこれまでほとんどなされていなかった. そこで我々は CT α のプロモーターにはどのような転写因子が結合し, それら転写因子によりどのように転写が制御されているのかを明らかにすることを目的に研究を進めてきた.

3. CT α の転写を促進する転写因子: Sp1, Ets1, TEF-4

1997 年に CT α 遺伝子 (*Pcyl1a*) が単離, クローニングされ, そのエクソン/イントロンは酵素分子内のそれぞれの機能ドメインに合わせて並んでいた⁵⁾. 我々は CT α の欠損プロモーターとルシフェラーゼとの融合プラスミドを作製し, 細胞にトランスフェクションさせ, ルシフェラーゼ活性の測定により基本転写に重要な領域を同定した (図 2 B)^{6,7)}. その結果 -52 から -71 の領域が転写に重要な領域であり, Sp1 が -67/-62 (CGGGCG) および -58/-54 (GGCGG) の GC に富む領域に結合することが明らかになった. それに並ぶ -53/-47 (GACTTCC) も転写に重要であり, この Ets binding site (EBS) (GGAA) には Ets1 が結合し, Sp1 と Ets1 がタンパク質相互作用により協調して転写促進に働くことを報告した^{7,8)}. また HeLa 細胞の核抽出液中には -100 前後のプロモーター領域に結合する DNA 結合タンパク質が存在する. yeast-one hybrid 法を用いてこの結合タンパク質が TEF-4 (transcriptional enhancer factor-4) であり, TEF 結合コンセンサスである -97/-89 (AGGAATGCG) に結合することも明らかにした⁹⁾. COS-7 細胞を用いて Ets1 や TEF-4 を高発現させると, ルシフェラーゼ活性ばかりでなく内因性の CT α mRNA 量も 2 倍に増加した.

Ets は avian erythroblastosis virus, E26 に見られる三つの transforming 遺伝子 (*myb* ドメイン, *ets* ドメイン, Δ -*gag* ドメイン) の一つとして 1983 年に初めて報告され, 1988 年には Watson らによりプロトオンコジーンである 441 アミノ酸をコードするヒト Ets1 遺伝子がクローニングされた¹⁰⁾. C 末端には Ets ドメインと呼ばれる Ets ファミリーの中でよく保存された DNA 結合領域が認められ, GGAA が結合コンセンサスコアである. TEF-4 は SV40 エンハンサーエレメントである GT-IIC に結合する TEF-1 のホモログであり, 1995 年に前神経細胞に高発現している遺伝子として cDNA クローニングされた¹¹⁾. 426 アミノ酸よりなり DNA に結合する TEA 領域を有する. これまでは CT α の転写そのものは主に “house-keeping” に維持され, 転写

後タンパク質レベルでの制御機構による酵素活性の調節が重要であると考えられてきた. しかし我々の研究によりプロトオンコジーンである Ets1 や TEF-4 がプロモーター領域に結合することが明らかになり, 細胞の状態に応じた転写レベルでの制御機構も CT α の活性制御に重要であることが示唆された. CT α の転写のスピードがこれら転写因子により促進され, 増殖が速い細胞に必要である PC の合成にそなえていると考えられる.

4. CT α の転写を抑制する転写因子: Net

18 種類以上の転写因子がヒト Ets ファミリーとしてこれまでに知られているが, その中には転写促進因子ばかりでなく転写抑制因子も存在する. と同じ EBS に結合し目的の遺伝子の転写を促進したり抑制したりすることが報告されるようになった¹²⁾. そこで我々は Ets ファミリータンパク質の中でも抑制性転写因子, Net, ERF, Elk-1, Fli に注目し CT α の転写に及ぼす影響を検討した. この結果 Net は EBS (-53/-47) に結合し, 細胞に高発現させるとルシフェラーゼ活性によって示される CT α の転写活性は著明に抑制され, 内因性 CT α mRNA 量も低下した. 他の抑制性転写因子には CT α の転写抑制効果は見られなかった⁸⁾. 細胞周期における CT α の mRNA 量は S 期から M 期に増加し, Ets1 や Net の mRNA 量も細胞周期に応じて増減した. このことにより Ets1 や Net の発現が細胞周期において制御され, それら転写因子により CT α の mRNA 量も制御を受けている可能性が示唆された (図 3). 細胞周期の早い時期にも PC 合成は促進するが, これは CT α の酵素レベルでの活性化によると考えられている.

Net は核内および核外移行シグナルをその分子内に有するが, 基本的には核内に認められる転写因子である. この核内移行シグナルに変異を加えると Net の転写抑制効果は減弱する. 我々は Net の N 末端に green-fluorescent-protein (GFP) を融合させ細胞内局在を検討したところ, 細胞周期が一回りする間に GFP-Net が細胞質に認められた. このことから Net は転写レベルばかりでなく核の内外を移行することにより CT α の転写を制御することが示唆されたが, どのようなメカニズムにより移行が制御されるのか詳細は不明である. Net が抑制する遺伝子には CT α ばかりでなく細胞質内タンパク質のフォールディングや細胞増殖に関係するシャペロニン θ サブユニット遺伝子も報告されているが¹³⁾, Net により CT α およびシャペロニン θ サブユニットの転写がともに抑制的に制御されていることは興味深い.

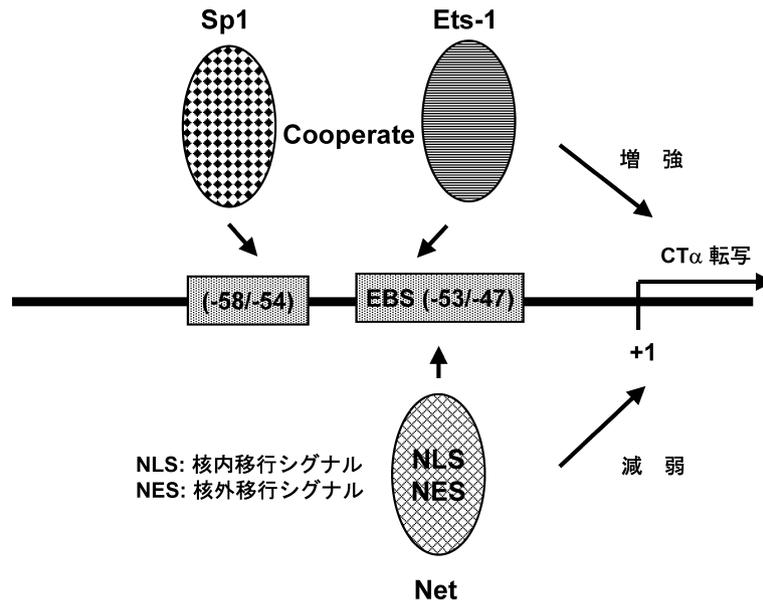


図3 Ets1, Sp1 および Net による CTα の転写制御

5. CTα の転写制御機構の多様性と重要性

CTα のプロモーターに結合し転写を制御する因子にはこのほかにもいくつか報告されている。-156/-147 には SRE (sterol regulatory element) が存在し, SREBP (SRE-binding protein) が SRE に結合することで II 型肺胞上皮細胞における CTα の転写が促進され, サーフアクトン生成に重要であることや¹⁴⁾, -139/-136 の GC-rich な領域には Sp1 と E2F が結合するが, G₀ 期においてはこれら複合体にヒストンデアセチラーゼ 1 も結合し転写抑制に働くことが報告された¹⁵⁾。最近では CTα の生体内での役割を明らかにするため臓器特異的な CTα 欠損マウスの作成が行われ, 肝臓特異的に CTα の欠損を持つマウスでは血中の HDL および VLDL 量が低下し¹⁶⁾, 肺に特異的に欠損を持つマウスではサーファクトンの生成が低下していた¹⁷⁾。

6. おわりに

PC 合成の律速酵素 CTα の転写は促進因子ばかりでなく抑制性転写因子によっても制御され, 細胞や組織の増殖および分化の状態に応じて精密に制御されていることが明らかになってきた。最近では臓器特異的な CTα 欠損マウスの作成により CTα の生体内での具体的な役割も明らかになりつつある。

1) Kent, C. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, 1348, 79-90.

- 2) Kalmar, G.B., Kay, R.J., Lachance, A., Aebersold, R., & Cornell, R.B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 6029-6033.
- 3) Northwood, I.C., Tong, A.H., Crawford, B., Drobnies, A.E., & Cornell, R.B. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 26240-26248.
- 4) Houweling, M., Tjburg, L.B., Vaartjes, W.J., Batenburg, J.J., Kalmar, G.B., Cornell, R.B., & Van Golde, L.M. (1993) *Eur. J. Biochem.*, 214, 927-933.
- 5) Tang, W., Keesler, G.A., & Tabas, I. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 13146-13151.
- 6) Bakovic, M., Waite, G.A., Tang, W., Tabas, I., & Vance, D.E. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1348, 79-90.
- 7) Sugimoto, H., Sugimoto, S., Tatei, K., Obinata, H., Bakovic, M., Izumi, T., & Vance, D.E. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 19716-19722.
- 8) Sugimoto, H., Okamura, K., Sugimoto, S., Satou, M., Hattori, T., Vance, D.E., & Izumi, T. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 40857-40866.
- 9) Sugimoto, H., Bakovic, M., Yamashita, S., & Vance, D.E. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 12338-12344.
- 10) Watson, D.K., McWilliams, M.J., Lapis, P., Lautenberger, J.A., Schweinfest, C.W., & Papas, T.S. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7862-7866.
- 11) Yasunami, M., Suzuki, K., Houtani, T., Sugimoto, T., & Ohkubo, H. (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 18649-18654.
- 12) Mavrothalassitis, G. & Ghysdael, J. (2000) *Oncogene*, 19, 6524-6532.
- 13) Yamazaki, Y., Kubota, H., Nozaki, M., & Nagata, K. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 30642-30651.
- 14) Mallampalli, R.K., Ryan, A.J., Carroll, J.L., Osborne, T.F., & Thomas, C.P. (2002) *Biochem. J.*, 362, 81-88.
- 15) Banchio, C., Lingrell, S., & Vance, D.E. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 10010-10015.
- 16) Jacobs, R.L., Devlin, C., Tabas, I., & Vance, D.E. (2004) *J.*

Biol. Chem., 279, 47402-47410.

- 17) Tian, Y., Zhou, R., Rehg, J.E., & Jackowski, S. (2007) *Mol. Cell. Biol.*, 27, 975-982.

杉本 博之
(獨協医科大学大学生化学)

Transcriptional regulation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase α in phospholipid biosynthesis
Hiroyuki Sugimoto (Department of Biochemistry, Dokkyo Medical University School of Medicine, 880 Kitakobayashi, Mibu, Tochigi 321-0293, Japan)

単球・マクロファージ遊走制御タンパク質「フロント」

1. はじめに

白血球の細胞遊走は、炎症・免疫応答において必要な場所に必要な細胞を動員するための重要な生命現象である。細胞遊走の基本的なメカニズムは、細胞性粘菌などの単細胞生物から哺乳類白血球細胞まで保存されており、遊走シグナルの受容にGタンパク質共役型受容体(GPCR)を用いること、ホスファチジルイノシトール3キナーゼ(PI3K)の局在化から細胞骨格の再構成に至る経路などほぼ共通している。細胞性粘菌ではcAMPまたは葉酸を遊走因子として感知するのに対して、白血球では遊走因子としてケモカインという約50種類にのぼる多様な分子群を感知する。ケモカインレセプターは約20種類が報告されており、白血球の細胞遊走は、この多様なケモカイン・ケモカインレセプターの組み合わせによって、複雑かつ巧妙に制御されていると考えられる。これまでの細胞遊走のメカニズムについての知見の多くは細胞性粘菌の研究から得られたものであり、白血球遊走の詳細についてはまだ不明な点が多い。最近、我々は炎症反応において中心的な役割を果たす白血球の一種、単球・マクロファージに発現するケモカインレセプターCCR2に会合し、これらの細胞の遊走を制御する因子として新規分子「フロント」を報告した¹⁾。本稿ではこれまで明らかとなっている白血球遊走制御の知見とこの新規分子フロントの機能について紹介したい。

2. 単球・マクロファージ遊走を制御するケモカインレセプターCCR2

単球は血中より炎症局所に動員され、局所でマクロ

ファージへと分化する。マクロファージは、感染細胞やアポトーシス細胞の貪食、各種のサイトカインの産生を担う炎症反応において重要な細胞である。しかしながら過剰な単球・マクロファージの集積は、動脈硬化症や関節リウマチなどの原因となる。ケモカインレセプターCCR2はこれらの単球・マクロファージに発現し、ケモカインCCL2などの刺激によって細胞遊走を誘導する。このCCR2の活性化制御によって単球・マクロファージの過剰な集積を防ぐことが、関連する疾患の予防・治療につながるものと期待される。

3. 白血球の遊走シグナル

細胞が遊走するとき、細胞に前後の極性が生じ、前方ではアクチン骨格の再構築による葉状仮足、糸状仮足の形成、後方では細胞接着が剥がれ収縮が行われる。葉状仮足、糸状仮足の形成にはそれぞれ低分子量Gタンパク質Rac, Cdc42が関与していることが知られている。これらの前方部特異的な活性化は、イノシトールリン脂質の一種であるPIP3という拡散速度の遅い分子が前方部に局在化することが重要である。これにより、PIP3に結合するPHドメインを有する分子が前方へリクルートされ、アクチン重合を引き起こす。PIP3の先端部への局在化は、PIP2からPIP3を産生するリン酸化酵素PI3Kの先端部への局在化およびPIP3をPIP2に代謝するホスファターゼ・テンシン・ホモログ(PTEN)の細胞後部への局在化によって厳密に制御されていると考えられている。最近では、後部におけるPIP3→PIP2の変換にチロシンホスファターゼSHP-1も重要な働きをしているという報告もなされている^{2,3)}。これまでの知見から、PIP3を先端部に局在化させる最上流はPI3Kということになるが、PI3Kの局在自体がアクチン重合依存的事実であることが明らかとなっており、さらにPI3Kの活性化を制御する未知の機構が存在すると考えられる。また生体内では細胞は非常に希薄なケモカイン濃度勾配を感知できるが、その細胞表面のケモカインレセプターの発現は均一であると考えられており、希薄なケモカイン濃度勾配を検知する初期シグナルと、それを細胞内シグナル分子の急勾配へと変換する増幅機構が存在すると考えられる。このように濃度勾配に応じた細胞の極性化の機構については、いまだ不明な点が存在する。

4. 遊走制御機構に重要なケモカインレセプターの細胞膜近傍C末端領域(Pro-C領域)

ケモカインレセプターの7回膜貫通領域以降のC末端