

時計遺伝子 DEC は核内受容体のコリプレッサーとして機能する

長 克武¹、能城 光秀²、槇島 誠¹

¹ 日本大学医学部, 東京都板橋区大谷口上町 30-1

² 広島大学大学院医歯薬総合研究科, 広島市南区霞 1-2-3

E-mail: maxima@med.nihon-u.ac.jp (M. Makishima)

(論文受付日 December 19,2009 ;公開日 February 4,2010)

要旨 : Differentiated embryo chondrocytes 1 (DEC1) 及び DEC2 は、概日リズムの調節に関与する塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス型転写因子である。我々は、DEC1 及び DEC2 が核内受容体 retinoid X receptor (RXR) のコリプレッサーとして機能することを見出した。食事の摂取及び栄養素の代謝は概日リズムと密接に関わっていることから、オキシステロール受容体 liver X receptor (LXR) などの代謝調節性核内受容体とヘテロ二量体を形成する RXR に対する DEC1 及び DEC2 の影響をトランスフェクションアッセイにて検討したところ、DEC1 及び DEC2 は RXR のリガンド依存的な転写誘導活性を抑制した。DEC2 の抑制活性は、DEC1 のものよりも強かった。内在性の DEC1 及び DEC2 の発現を抑制することで RXR の転写誘導活性は上昇した。DEC1 及び DEC2 は RXR と直接相互作用し、また他のコファクターと RXR との相互作用を変化させた。変異体を用いた実験から、DEC2 の C 末端が抑制の活性に重要であることが明らかとなり、また DEC1 及び DEC2 に存在する LXXLL モチーフも抑制活性に必須であることが示された。DEC1 及び DEC2 は LXR の転写誘導活性も抑制し、これらの過剰発現は LXR の内在性標的遺伝子の発現量を減少させた。DEC1 と DEC2 は他の RXR ヘテロダイマー (farnesoid X receptor 及び vitamin D receptor) の活性も抑制した。従って、概日リズム調節因子 DEC1 及び DEC2 は、代謝調節性 RXR ヘテロダイマー型核内受容体のリプレッサーとして機能する。

Abstract : The basic helix-loop-helix proteins differentiated embryo chondrocyte 1 (DEC1) and DEC2 are involved in circadian rhythm control. Since the metabolism of dietary nutrients has been linked to circadian regulation, we examined the effect of DEC1 and DEC2 on the function of metabolite-sensing nuclear receptors, ligand-dependent transcription factors including retinoid X receptor (RXR) and liver X receptor (LXR). Transfection assays showed that DEC1 and DEC2 repressed ligand-dependent transactivation by RXR. Knockdown of endogenous DEC1 and DEC2 expression with small interfering RNAs augmented ligand-dependent RXR α transactivation. DEC1 and DEC2 interacted directly with RXR α and ligand addition enhanced their association. DEC1 and DEC2 modified interaction of RXR α with cofactor proteins. Transfection assays using DEC1 and DEC2 mutants revealed that the C-terminal region of DEC2 is required for repression and that a LXXLL motif in DEC1 and DEC2 is necessary for RXR α repression. DEC1 and DEC2 repressed the induction of LXR target genes, associated with the promoter of an LXR target gene, and dissociated from the promoter with ligand treatment. Knockdown of endogenous DEC1 and DEC2 enhanced the LXR target gene expression in hepatocytes. DEC1 and DEC2 also repressed transactivation of other RXR

heterodimers, such as farnesoid X receptor and vitamin D receptor. Thus, DEC1 and DEC2 act as repressors of RXR heterodimers.

キーワード: 時計遺伝子、コリプレッサー、DEC、RXR、LXR、SREBP-1c

1. はじめに

概日リズムは、動物の摂食行動、睡眠サイクル、さらにエネルギーの恒常性維持に重要な役割をしている[1]。これまでの研究から、時計遺伝子産物 CLOCK 及び BMAL1 のヘテロダイマーが視床下部の視交叉上核及び末梢臓器において種々の遺伝子の発現を調節し、概日リズムの形成に重要な役割を果たすことが示されてきた。その機構として、CLOCK-BMAL1 が Per、Cry、DEC1 及び DEC2 のプロモーター上に存在する E-box に結合し、それらの発現量を亢進させる[1,2]。一方、これらの遺伝子産物は CLOCK-BMAL1 の活性を抑制する。これらのフィードバックループによってリズムが形成されると考えられる。Differentiated embryo chondrocyte (DEC) 1 及び DEC2 は、CLOCK と BMAL1 と同様に視交叉上核及び末梢組織において周期的に発現する塩基性ヘリックスループ-ヘリックス型転写因子である[2,3]。DEC は BMAL1 との結合、または E-box への競合的結合を介して CLOCK-BMAL1 の活性を抑制する[2,4,5]。DEC 欠損マウスは、概日リズムに異常を示す[6,7]。従って、DEC1 及び DEC2 は、時計遺伝子の重要な構成因子であると言える。

核内受容体は、リガンド依存的に活性化する転写因子であり、発生、分化、そして代謝など、様々な生体機能を調節している[8,9]。また、核内受容体は概日リズム調節にも関与している[10]。オーファン受容体である REV-ERB α と ROR α は BMAL1 の発現を調節する。脂肪酸受容体 peroxisome proliferator-activated receptor α と BMAL1 は相互に発現を調節する[11]。また、多くの核内受容体の遺伝子発現には概日リズムが存在する[12]。これらのことから、ホルモンまたは代謝シグナルは、核内受容体を介して概日リズムに関与する可能性がある。我々は、これまでの研究において、コレステロール代謝調節性核内受容体 liver X receptor (LXR) が DEC1 の発現を亢進させることを報告した[13]。今回は、DEC1 及び DEC2 の核内受容体に及ぼす影響を解析し、DEC

が retinoid X receptor (RXR) のコリプレッサーとして機能することを明らかにしたためここに紹介する[14]。

2. 材料及び方法

2.1 細胞培養、トランスフェクション及び mRNA 発現解析

HEK293 細胞を 5% ウシ胎児血清を含む DMEM を用いて培養した。トランスフェクションにはリン酸カルシウム法を用いた[15]。8 時間経過した後に RXR リガンド 9-シスレチノイン酸 (9CRA) または LXR リガンド T0901317 を添加した。さらに 16 時間培養し、ルシフェラーゼの活性を測定した。また、HepG2 細胞を 10% ウシ胎児血清を含む DMEM を用いて培養した。トランスフェクションにはリポフェクション法を用いた。24 時間経過した後に LXR リガンド T0901317 を添加した。さらに 24 時間経過した後に RNA を調整し、sterol regulatory element binding protein 1c の mRNA 量を real-time PCR 法を用い測定した。

2.2 共免疫沈降法

Green fluorescent protein 融合 RXR α (GFP-RXR) と FLAG-DEC1 または FLAG-DEC2 を HEK293 細胞にトランスフェクションした後、9CRA (100nM) を 2 時間処理した。得られた核抽出液から抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った。SDS-PAGE を行い抗 FLAG または抗 GFP 抗体により検出を行った。

3. 結果

3.1 DEC1 及び DEC2 は RXR 依存的な転写活性を抑制する

代謝センサーとして機能する LXR などは、RXR とヘテロダイマーを形成して作用することから、DEC の RXR のリガンド依存性転写誘導活性に及ぼす影響を検討した。RXR 応答配列を含むレポータープラスミド(CRBPII-tk-LUC)[16]と RXR α 発現プラスミドを DEC1 または DEC2 発現プラスミドと共に HEK293 細胞に導入し、RXR リガンドである 9CRA を処理、その後ルシフェラーゼ活性を測定した。この結果、DEC1 及び DEC2 は、RXR α 依存的な転写活性を抑制した。DEC1 と比較して DEC2 は強い抑制活性を示した。

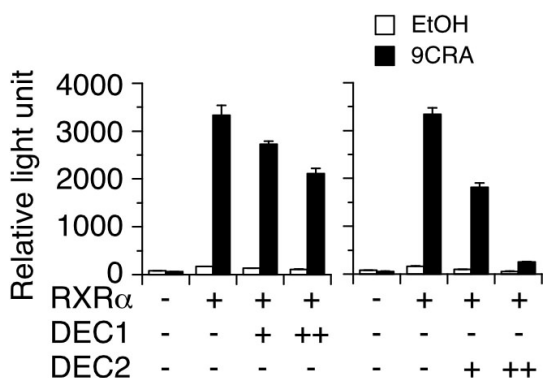


図 1 DEC1 及び DEC2 による RXR α 転写活性の抑制

次に、GAL4 応答配列を含むレポータープラスミド(MH100-tk-LUC)、及び GAL4 の DNA 結合領域と RXR α , RXR β , または RXR γ とのキメラタンパクの発現プラスミドを、DEC1 または DEC2 発現プラスミドと共に HEK293 細胞に導入し、9CRA を処理した。DEC1 及び DEC2 は 9CRA 依存性

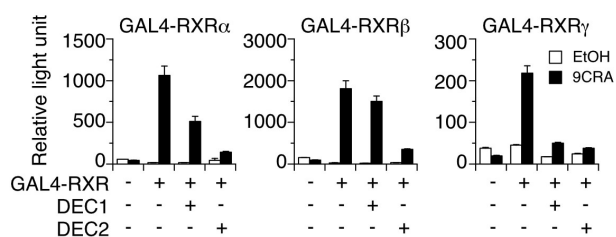


図 2 DEC1 及び DEC2 による GAL4-RXR キメラ受容体の転写活性の抑制

GAL4-RXR-LBD キメラの転写誘導活性も抑制した。以上の結果から、DEC1 及び DEC2 は RXR の LBD の活性を抑制することで RXR の転写活性を抑制することが示された。

3.2 DEC1 及び DEC2 は RXR と相互作用する

DEC1 及び DEC2 が RXR α と直接相互作用を有するかを検討するため、GFP 融合 RXR α と FLAG タグ融合 DEC1 または DEC2 発現プラスミドを HEK293 細胞に導入した。RXR α 、DEC1、さらに DEC2 は主に核内に局在することから、核抽出液を調整し、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行った。その後抗 GFP または抗 FLAG 抗体を用いてウエスタンブロットを行った結果、RXR α と DEC1 及び DEC2 が直接結合することが示された。

3.3 DEC1 と DEC2 は異なる機構により RXR の転写活性を抑制する

これまでに DEC1 及び DEC2 の転写抑制作用には、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)が関与することが報告されてきた[17,18]。そこで DEC による RXR 転写活性抑制機構を解析するため、RXR α に対する抑制活性に HDAC が関与しているか検討した。DEC1 及びコレプレッサー SMRT により抑制されたリガンド依存性 RXR 転写誘導活性は、HDAC 阻害剤トリコスタチン A の添加により回復したが、DEC2 による抑制は回復しなかった。この結果から、DEC2 は HDAC と関連しない機構で RXR の活性を抑制することが示唆された。

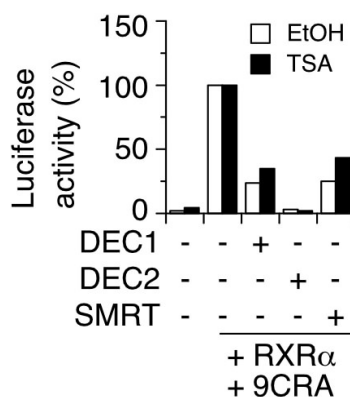


図 3 DEC1 及び DEC2 の RXR 転写抑制作用に対する HDAC 阻害剤トリコスタチン A (TSA) の効果

3.4 DEC2 の C 末端は抑制活性に重要な役割を示す

DEC2 は DEC1 と比較して、RXR に対して強い抑制活性を示す。アミノ酸配列の比較から、DEC1 と DEC2 は、N 末端側において 64% と高い相同性を示すが、C 末端側では 34% と相同性が低い[19]。そこで、DEC1 及び DEC2 の C 末端側を組み替えたキメラ変異体(1N2C, 2N1C)を作成し、それらの RXR 転写誘導活性に及ぼす影響を検討した。この結果、1N2C は DEC2 と同等の活性を示し、また 2N1C は DEC1 と同等の活性を示した。これらの結果から、DEC2 の C 末端が抑制活性に重要な役割を果たすことが明らかになった。

3.5 DEC は RXR-LXR の活性を抑制する

RXR は LXR など代謝センサー型核内受容体とヘテロダイマーを形成する[9]。そこで、RXR-LXR ヘテロダイマーに及ぼす DEC の影響を検討した。DEC1 及び DEC2 は RXR-LXR ヘテロ二量体のリガンド依存性転写誘導活性を抑制した。また、DEC1 及び DEC2 は、LXR の標的遺伝子である sterol regulatory element-binding protein 1c のプロモーターに結合し、その mRNA 発現を抑制した。

DEC1 及び DEC2 は、RXR とヘテロ二量体を形成する胆汁酸受容体 farnesoid X receptor 及び vitamin D receptor のリガンド依存性転写誘導活性も抑制した。

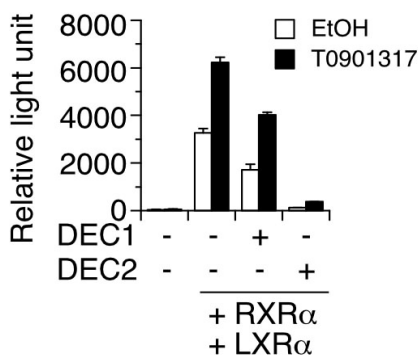


図 4 DEC1 及び DEC2 による RXRα-LXRαヘテロ二量体の転写活性の抑制

4. 考察

本研究により、DEC1 及び DEC2 が核内受容体 RXR と相互作用して、RXR、さらに RXR-LXR の転写活性を抑制することが明らかとなった。DEC は BMAL1 のみならず、MyoD や hypoxia-inducing factor 1αとも相互作用して、それぞれの転写因子の活性を抑制することが報告されている[2,5,20-23]。以上の結果から、DEC は E-box への競合的な結合と転写因子との相互作用を介して、転写リプレッサーとして機能すると考えられる。

ヒストンのアセチル化は転写活性を抑制することが広く知られている[24]。DEC1 及び DEC2 はそれぞれ HDAC 依存的、あるいは非依存的に転写活性を抑制することが報告されている[17,18,25]。HDAC 阻害剤は、RXR に対する DEC1 の抑制活性を阻害するが、DEC2 の活性に影響は及ぼさないこと、さらに DEC2 の C 末端が抑制活性に重要であることから、DEC2 の C 末端が HDAC 非依存的な活性抑制に関与していることが強く示唆される。

DEC1 は LXR の標的遺伝子である[13]。LXR はコレステロールのセンサーとして機能し、コレステロール及び糖・脂質代謝において重要な役割を果たしていることから、食事由来の脂質により DEC1 の発現が調節される可能性が考えられる。したがって、今後遺伝子欠損動物等を用いることで DEC の生体における役割が明らかになるものと期待される。

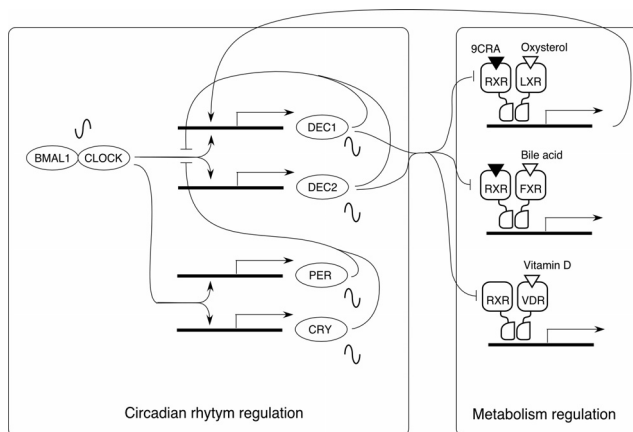


図 5 時計遺伝子と DEC による RXR 二量体活性抑制のモデル：時計遺伝子産物 CLOCK-BMAL1 は、PER、CRY、DEC1、DEC2 の発現を誘導する。PER 及び CRY と同様に DEC1 及び DEC2 も

CLOCK-BMAL1 の機能にフィードバックを及ぼすことによりリズムを形成する。DEC1 及び DEC2 は、代謝センサー型核内受容体である RXR ヘテロ二量体の機能を抑制する。また、DEC1 は、LXR の標的遺伝子である。DEC1 及び DEC2 が、概日リズムと代謝とを関連付ける因子として機能する可能性を示唆している。

本研究においてご指導・ご助言・ご協力を頂いた広島大学大学院医歯薬総合研究科の加藤幸夫教授、河本健博士、藤本勝巳博士、日本大学医学部の崔美花博士、大阪大学医学系研究科の森田健太郎博士に感謝申し上げます。

本研究内容の一部は、Chem-Bio Informatics Society 2008 International Symposium on Pathway/Network to Disease and Drug Discovery Specially Focused on Nuclear Receptors and Metabolic Syndrome にて発表し、Award for the Best Poster に選出された。

参考文献

- [1] Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease, *Nat Rev Neurosci*, **4**, 649-61 (2003).
- [2] Honma S, Kawamoto T, Takagi Y, Fujimoto K, Sato F, Noshiro M, et al. Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock, *Nature*, **419**, 841-4 (2002).
- [3] Noshiro M, Furukawa M, Honma S, Kawamoto T, Hamada T, Honma K, et al. Tissue-specific disruption of rhythmic expression of Dec1 and Dec2 in clock mutant mice, *J Biol Rhythms*, **20**, 404-18 (2005).
- [4] Li Y, Song X, Ma Y, Liu J, Yang D, Yan B. DNA binding, but not interaction with Bmal1, is responsible for DEC1-mediated transcription regulation of the circadian gene mPer1, *Biochem J*, **382**, 895-904 (2004).
- [5] Sato F, Kawamoto T, Fujimoto K, Noshiro M, Honda KK, Honma S, et al. Functional analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 in circadian regulation, Interaction with BMAL1, *Eur J Biochem*, **271**, 4409-19 (2004).
- [6] Nakashima A, Kawamoto T, Honda KK, Ueshima T, Noshiro M, Iwata T, et al. DEC1 modulates the circadian phase of clock gene expression, *Mol Cell Biol*, **28**, 4080-92 (2008).
- [7] Rossner MJ, Oster H, Wichert SP, Reinecke L, Wehr MC, Reinecke J, et al. Disturbed clockwork resetting in Sharp-1 and Sharp-2 single and double mutant mice, *PLoS ONE* **3**, e2762 (2008).
- [8] Makishima M. Nuclear receptors as targets for drug development: regulation of cholesterol and bile acid metabolism by nuclear receptors, *J Pharmacol Sci*, **97**, 177-83 (2005).
- [9] Shulman AI, Mangelsdorf DJ. Retinoid X receptor heterodimers in the metabolic syndrome, *N Engl J Med*, **353**, 604-15 (2005).
- [10] Teboul M, Guillaumond F, Grechez-Cassiau A, Delaunay F. Minireview: the nuclear hormone receptor family round the clock, *Mol Endocrinol*, **22**, 2573-82 (2008).
- [11] Canaple L, Rambaud J, Dkhissi-Benyahya O, Rayet B, Tan NS, Michalik L, et al. Reciprocal regulation of brain and muscle Arnt-like protein 1 and peroxisome proliferator-activated receptor {alpha} defines a novel positive feedback loop in the rodent liver circadian clock, *Mol Endocrinol*, **20**, 1715-27 (2006).
- [12] Yang X, Downes M, Yu RT, Bookout AL, He W, Straume M, et al. Nuclear receptor expression links the circadian clock to metabolism, *Cell*, **126**, 801-10 (2006).
- [13] Noshiro M, Usui E, Kawamoto T, Sato F, Nakashima A, Ueshima T, et al. Liver X receptors (LXRalpha and LXRbeta) are potent regulators for hepatic Dec1 expression, *Genes Cells*, **14**, 29-40 (2009).
- [14] Cho Y, Noshiro M, Choi M, Morita K, Kawamoto T, Fujimoto K, et al. The Basic Helix-Loop-Helix Proteins Differentiated Embryo Chondrocyte (DEC) 1 and DEC2 Function as Corepressors of Retinoid X Receptors, *Mol Pharmacol*, **76**, 1360-9 (2009).
- [15] Ishizawa M, Matsunawa M, Adachi R, Uno S, Ikeda K, Masuno H, et al. Lithocholic acid derivatives act as selective vitamin D receptor modulators without inducing hypercalcemia, *J Lipid Res*, **49**, 763-72 (2008).
- [16] Mangelsdorf DJ, Umesono K, Kliewer SA, Borgmeyer U, Ong ES, Evans RM. A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR, *Cell*, **66**, 555-61 (1991).
- [17] Sun H, Taneja R. Stra13 expression is associated with growth arrest and represses transcription through histone deacetylase (HDAC)-dependent and HDAC-independent mechanisms, *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 4058-63 (2000).
- [18] Fujimoto K, Hamaguchi H, Hashiba T, Nakamura T, Kawamoto T, Sato F, et al. Transcriptional repression by the basic helix-loop-helix protein Dec2: multiple mechanisms through E-box elements, *Int J Mol Med*, **19**, 925-32 (2007).
- [19] Fujimoto K, Shen M, Noshiro M, Matsubara K, Shingu S, Honda K, et al. Molecular cloning and characterization of DEC2, a new member of basic helix-loop-helix proteins, *Biochem Biophys Res Commun*, **280**, 164-71 (2001).

- [20] Hamaguchi H, Fujimoto K, Kawamoto T, Noshiro M, Maemura K, Takeda N, et al. Expression of the gene for Dec2, a basic helix-loop-helix transcription factor, is regulated by a molecular clock system, *Biochem J.*, **382**, 43-50 (2004).
- [21] Kawamoto T, Noshiro M, Sato F, Maemura K, Takeda N, Nagai R, et al. A novel autofeedback loop of Dec1 transcription involved in circadian rhythm regulation, *Biochem Biophys Res Commun.*, **313**, 117-24 (2004).
- [22] Azmi S, Ozog A, Taneja R. Sharp-1/DEC2 inhibits skeletal muscle differentiation through repression of myogenic transcription factors, *J. Biol. Chem.*, **279**, 52643-52 (2004).
- [23] Sato F, Bhawal UK, Kawamoto T, Fujimoto K, Imaizumi T, Imanaka T, et al. Basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 negatively regulates vascular endothelial growth factor expression, *Genes Cells.*, **13**, 131-44 (2008).
- [24] Rosenfeld MG, Lunyak VV, Glass CK. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response, *Genes Dev.*, **20**, 1405-28 (2006).
- [25] Nakamura H, Tanimoto K, Hiyama K, Yunokawa M, Kawamoto T, Kato Y, et al. Human mismatch repair gene, MLH1, is transcriptionally repressed by the hypoxia-inducible transcription factors, DEC1 and DEC2, *Oncogene*, **27**, 4200-9 (2008).