

論文の内容の要旨

論文題目 小胞体膜タンパク質による細胞内
コレステロール調節の分子機構の研究

氏名 山口 美峰子

ステロール調節エレメント結合タンパク質 (SREBP) は LDL 受容体、HMG-CoA 還元酵素などの転写調節を担う、細胞内コレステロール調節の中心となる転写因子である。SREBP は前駆体蛋白質として小胞体膜や核膜に存在し、ステロール欠乏刺激により小胞体腔内の部位で切断される。続いて膜貫通部位がサイト 2 プロテアーゼ (S2P) による切断を受け、小胞体膜から細胞質へ遊離し核へ移行する。

本研究では最初に切断される小胞体ループ切断部位を含むペプチド性基質を用いたアッセイ系を構築し、ハムスター肝臓ミクロソーム画分に 0.5 % MEGA 9 で可溶化されるペプチダーゼ活性を認めた。この活性はゲル濾過により、三つの画分 (Mp400、Mp60、Mp30) に分離された (図 1)。Mp30 画分の活性は配列特異的阻害剤で阻害され、カラムクロマトグラフィーにより SDS 電気泳動上 1 バンド (32 kDa) に精製した (図 2)。アミノ酸配列決定により、このタンパク質は一本鎖カテプシン B であることがわかった。Mp400 画分は 0.5 % Lubrol PX で可溶化を行ない、カラムクロマトグラフィーによる精製を行なったところ、ネプリリシンに一致するアミノ酸配列が決定された。

1998 年、Sakaiら によって SREBP の切断が起きない細胞変異株から S1P の候補遺伝子がクローニングされた。この遺伝子によりコードされるタンパク質は活性部位がセリンプロテアーゼと相同性が高く、C 端側に膜貫通部位を一ヶ所持つ。この遺伝子を変異株に導入すると SREBP の最初の切断活性が補われると報告された。

1999年に Seidah、Espenshade らは膜貫通部位を除いた分泌型の S1P を細胞に発現させて培養上清からこれを精製し、SREBP 小胞体内腔配列を含むペプチド性基質などを用いて、S1P の活性を *in vitro* で測定した。この測定で得られた結果からは S1P のペプチド性基質に対する酵素活性は他のエンドプロテアーゼに比べてはあまり高くなく、本実験で構築したアッセイ系では S1P はメジャーな活性として得られなかったことが考えられた。本研究で精製されたプロテアーゼは分解系の酵素であったが、SREBP の小胞体内腔配列を切断する活性が強いことや SREBP は分解による調節も示唆されている事などから SREBP の分解調節の系に関与している可能性も考えられる。

ペプチド性基質に対する活性の低いことから、S1P は SREBP の小胞体内腔配列のみでなく、タンパク質としてのコンフォメーションを認識して特異的な切断を行なっている可能性も考えられた。

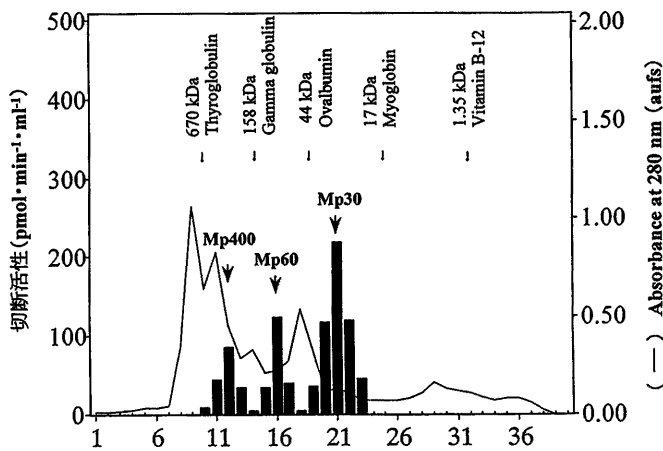


図 1: ゲル濾過カラムのクロマトチャート

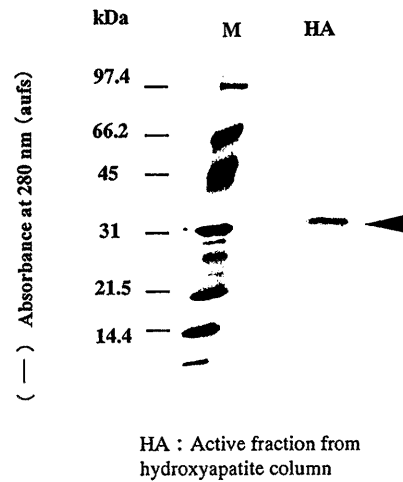


図 2: ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー後の活性画分の SDS-PAGE。矢印は 32kDa を示す。

コレステロール応答性の SREBP プロセッシングの機構は、Brown らによって提唱されている仮説が主流であるが、これは細胞変異株を用いた分子生物学的手法によって得られた結果から成っており個々のタンパク質の生化学的解析はほとんどされていない。本研究では、SREBP、S1P を含むコレステロール調節に関与する小胞体膜タンパク質群をバキュロウィルスの発現系を用いて機能的発現を行ない、膜タンパク質を基質とする膜型プロテアーゼの活性を *in vitro* で解析することを試みた。

ヒト SREBP、S1P、SCAP を組み込んだトランスファーベクターとウィルスゲノ

ム DNA を昆虫細胞 *Spodoptera frugiperda* (Sf9) に導入して、各 DNA のリコンビナントウイルスを作成した。SREBP のリコンビナントウイルスを 5 MOI で感染させてタンパク質の発現を観察したところ、細胞内では感染後 24 時間から発現が観察され 48 時間で大量のタンパク質の発現が認められた。また培養上清にも 48 時間目から大量のタンパク質の発現が認められた (図 3)。検出に用いたモノクローナル抗体 1C6 は SREBP の C 端に対する抗体で、ATCC よりハイブドーマを入手した。培養上清のタンパク質は 40,000g、20 分の超遠心後の沈殿画分に回収され、これを用いてシヨ糖密度勾配遠心分離を行なうとウイルスのマーカートンパク質である gp64 と同じ画分に分布することから、細胞外ウイルス上に発現していることが示唆された。野生型の細胞外ウイルスの膜上には gp64 以外のタンパク質はほとんど発現していないことから、ウイルス画分を用いて SREBP の精製を試みた。SREBP は 1% LysoPC によりウイルスからの可溶化に成功し、抗体アフィニティークロマトグラフィーによって部分精製を行なった。

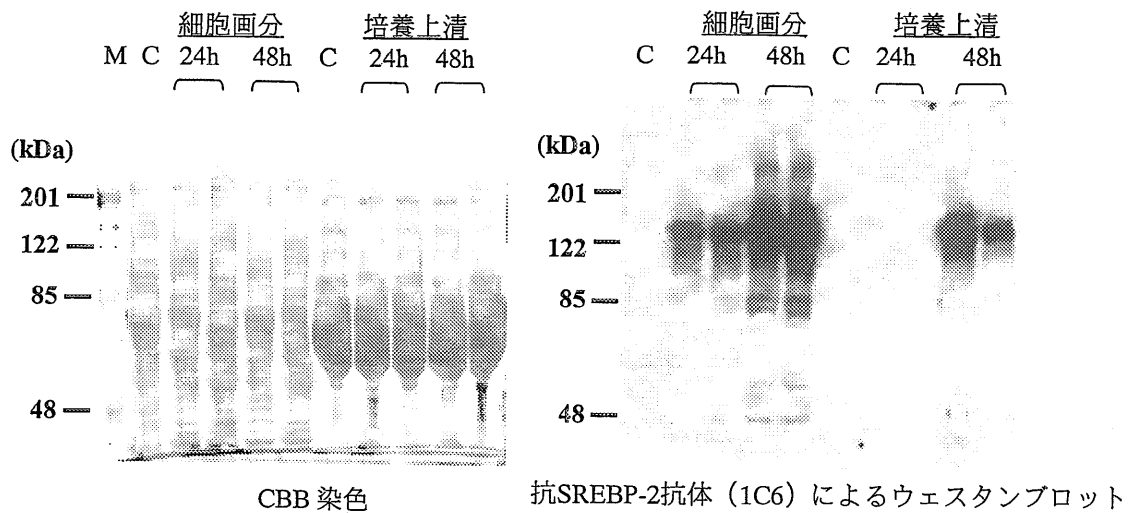


図 3 : バキュロウイルス発現系における SREBP の発現

SCAP は 8 回膜貫通型タンパク質で、コレステロール欠乏状態で SREBP のプロセッシングを活性化するタンパク質としてクローニングされた。細胞内では SREBP の C 端と SCAP の C 端の WD ドメインを介して SREBP と SCAP はヘテロ二量体を形成していると考えられている。SCAP の N 端にヒスチジンタグを付けて Sf9 細胞に発現させると、細胞内では凝集をおこすが細胞外ウイルス上では凝集を起こさないで発現することを示唆する結果が得られたことから細胞外ウイルスでは膜タンパク質として構造を保って発現している可能性が考えられた。また SREBP と SCAP のリコンビナントウイルスを共感染させ、感染 72 時間後に回収した細胞外ウイルス画分を 1% LysoPC で可溶化し、Ni-NTA を用いて免疫沈降を行なったところ、これらが共沈してくることが認められた。この結果から SREBP と SCAP が細胞外ウイルス上で複合体を形成することが示唆された。

同様に S1P のリコンビナントウイルスを 5 MOI で Sf9 細胞に感染させて細胞外ウイルスを調製した。ウェスタンブロットを行ない、ヒト S1P のアミノ酸 589-604 のペプチドを抗原として作成した抗血清 (R03) で免疫染色したところ、感染後約 72 時間で細胞外ウイルスに発現していることを認めた (図 4)。S1P は自己分解によって活性化すること報告されているが、図 4 で示したバンドは前駆体の S1P であると考えられる。

また、細胞外ウイルス上に発現した S1P は SREBP の切断活性を保持していることを示唆する結果が得られており、S1P を始めとするこれら一群の膜タンパク質は細胞外ウイルスに構造を保って機能的に発現していると考えられた。

これらの結果から、膜タンパク質の機能的発現と、これによる膜タンパク質を基質とした膜プロテアーゼの活性を *in vitro* でアッセイする系の作成ができたと考えられる。

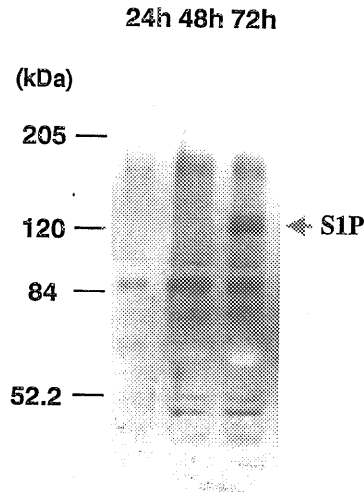


図 4 : 細胞外ウイルスへの S1P の発現