

## 審査結果の要旨

論文提出者氏名 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 受容体や HMG-CoA 還元酵素などの転写制御を担う、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局在し、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。

本研究ではコレステロール代謝調節関連遺伝子の調節に係わる SREBP のプロテアーゼによるプロセッシングについて研究を行ない、下記の結果を得ている。

1. SREBP が最初に切断される小胞体ルーブ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 % MEGA9 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。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) に精製された。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 であることが認められた。Mp400 画分は 0.5 % Lubrol PX で可溶化し、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数種のペプチド性基質を用いて S1P の活性を *in vitro* で測定した。その結果からは 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検出できなかったことが考察された。また、ペプチド性基質に対する活性が低いことから、S1P は SREBP の小胞体内腔配列のみでなく、SREBP のタンパク質としての立体構造を認識して切断を行なっている可能性が考察された。

この考察に基づき、さらに 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の生化学的解析を目的として、これらタンパク質群をバキュロウィルス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の *in vitro* での解析を試み、以下の結果を得ている。

2. 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ィルスを作成した。SREBP のリコンビナントウィルスを 5 MOI で感染させてタンパク質の発現を観察したところ、SREBP の C 端に対するモノクローナル抗体 1C6 を用いた検出により、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。培養上清のタンパク質は 40,000g、20 分間の超遠心後の沈殿画分に回収され、これを用いてショ糖密度勾配遠心分離を行なうとウィ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、細胞外ウィルス上に発現していることが示唆された。野生型の細胞外ウィルスの膜上には 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、ウィルス画分からの SREBP の精製を試み、1% LysoPC によるウィルスからの可溶化、および抗体アフィニティークロマトグラフィーによる部分精製に成功した。

3. SCAP は 8 回膜貫通型タンパク質であり、コレステロール欠乏下の細胞で 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 SCAP は C 末端の WD ドメインを介して SREBP の C 末端と結合し、ヘテロ二量体を形成していると考えられている。SCAP の N 末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の構造を形成して発現す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指示された。

4. 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。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) を用いたウェスタンブロットを行ない、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。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、抗血清により検出されたのは前駆体の S1P であると考えられた。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上で構造を保って機能的に発現していると考えられた。

これらの結果は、これまで困難であった膜タンパク質の機能的な大量発現系、および膜タンパク質を基質とする膜酵素のアッセイ系の構築を可能とすることを示唆する重要な結果である。この系を用いることにより生体膜で調節されているコレステロールの調節機構の分子的解析が可能になることが考えられる。また、本研究により開発されたバキュロウイルス発現系による発芽型ウイルスを用いた技術は他の膜タンパク質による調節機構の研究への応用の可能性を含んでおり、これらに重要な技術を提供するものと考えられ、学位の授与に値するものである。