

論文内容の要旨

新規コレステロール生合成促進蛋白質 SPF の生理機能の解析

柴田 識人

1. 序論

コレステロールは、細胞膜の主要な成分であり、生命の維持に必要不可欠である。哺乳類では、肝臓と小腸において全身に必要なコレステロールの大半が生合成され、全身に供給されることから、肝臓や小腸におけるコレステロール生合成の調節機構を明らかにすることが大きな課題となる。

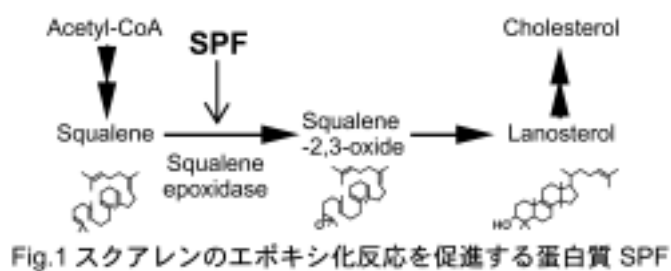


Fig.1 スクアレンのエポキシ化反応を促進する蛋白質 SPF

コレステロール生合成経路は20段階以上の多段階からなるが、この生合成過程の中で、スクアレンエポキシダーゼが触媒するスクアレンからスクアレン-2,3-オキサイドへの変換反応には SPF (Supernatant Protein Factor) という特異的な促進因子が存在することが1950年代に報告され、コレステロール生合成の調節機構として重要であると考えられていた(Fig.1)。私は修士課程において、SPFの精製・クローニングに世界で初めて成功した。SPFは構造上、Sec14ドメインと呼ばれる脂質認識ドメインを持ち細胞内脂質輸送蛋白質ファミリーに属することが分かっているが、それ以外にJelly-rollドメインと呼ばれる機能未知のドメインを持っているという特徴を持つ。SPFは肝臓や小腸に多く発現しており、肝細胞にSPFを発現させるとコレステロール生合成が促進されることが分かり、SPFがこれまでにない臓器特異的なコレステロール生合成促進蛋白質であることを示した。本研究では、まず個体レベルでSPFがどのような発現制御を受けるか検討し、更にSPF

過剰発現マウスや SPF 欠損マウスを確立してその生理機能を解析した。その結果、SPF が飢餓時におけるコレステロール供給の維持に寄与することを見出した。また SPF のドメイン構造について解析したところ、SPF は Sec14ドメインとJelly-rollドメインでそれぞれ異なる機能でコレステロール生合成を促進することが示唆された。

2. SPF 過剰発現マウスの作製

まず SPF がマウス個体レベルにおいてもコレステロール生合成の促進因子として機能しているのか、SPF リコンビナントアデノウィルスを作製し、これをマウスに感染させることで、SPF 肝臓過剰発現マウスを作製してこの点を検討した。その結果コントロールと比較して SPF 肝臓過剰発現マウスでは血中コレステロールレベルが有為に増加することが分かった (Fig.2)。またこのとき肝臓におけるコレステロール生合成系酵素の転写発現していることが分かった。以上の結果から SPF が個体レベルにおいてもコレステロール生合成の促進因子として機能していることが示唆された。

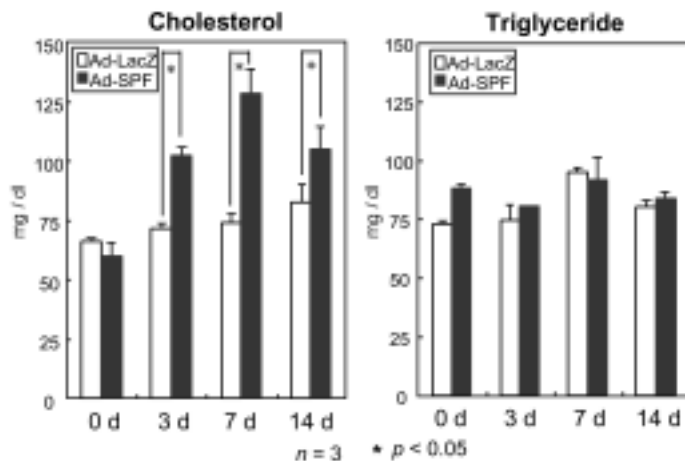


Fig.2 SPF過剰発現マウスの血中脂質値

3. SPF 欠損マウスの作製

SPF の生理機能を解明するため SPF 欠損マウスを作製した。得られたホモ欠損マウスは正常に発達し、外見上際立った表現型は見られなかった。また予想に反し、このマウスの血中コレステロール値は、野生型マウスとほぼ同程度の正常値であった (Fig.3)。そこで、肝臓におけるコレステロール生合成系の酵素の発現量を調べたところ、HMG-CoA 合成酵素、及びスクアレンエポキシダーゼと

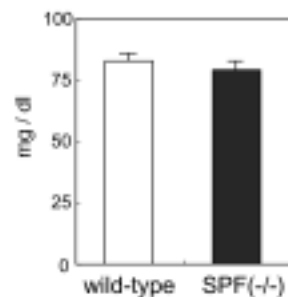


Fig.3 SPF欠損マウスの血中コレステロール値

いったコレステロール生合成の律速酵素の mRNA 発現が野生型マウスと比べて有意に増加していることを見出した (Fig.4-A)。更に、HMG-CoA 還元酵素に関しては、mRNA 発現は殆ど野生型マウスと変わらないが、蛋白質発現が SPF 欠損マウスで有意に増加していることが分かった (Fig.4-B)。従って、SPF 欠損マウスではコレステロール生合成酵素の発現が増加することによりコレステロールレベルが野生型マウスと同じレベルに維持されているものと考えられた。

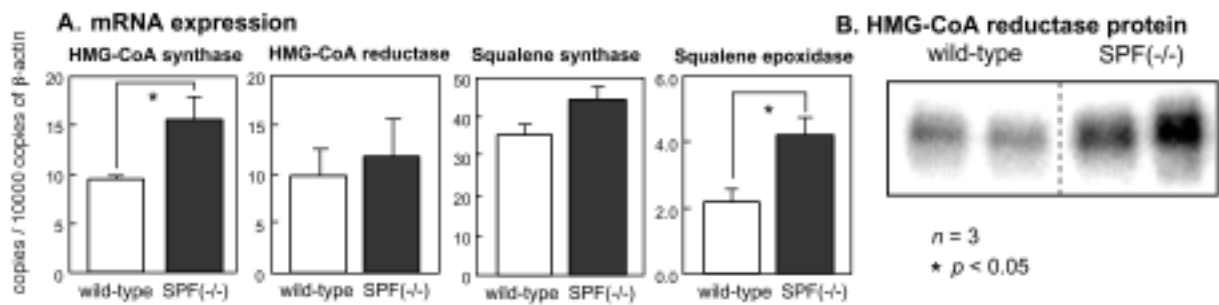


Fig.4 SPF欠損マウスにおけるコレステロール生合成酵素の発現レベル

4. 核内受容体 PPAR α による SPF の発現誘導

次に SPF がどのような発現制御を受けるか検討した。一般にコレステロール生合成酵素は、コレステロールにより、転写因子 SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) を介して発現制御されている。そこで SPF も SREBP による発現制御を受けるか検討した。しかし野生型マウスにコレステ

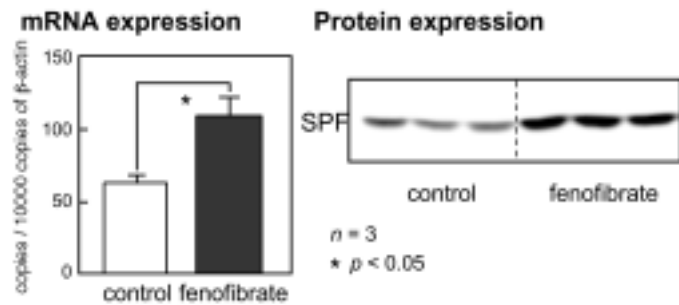


Fig.5 核内受容体 PPAR α の活性化による SPF の発現誘導

ロール過剰食、或いは欠乏食を与えても、SPF の mRNA 及び蛋白質の発現量は殆ど変化しなかった。従って SPF はコレステロールレベルに応じた発現制御を受けないと考えられた。

そこで脂質代謝を変化させる様々な薬剤をマウスに投与し、肝臓での SPF の発現を検討した。すると検討した薬剤の中で唯一、核内受容体 PPAR α のアゴニストとして知られているフィブラート系薬剤を与えたところ、肝臓における SPF の mRNA 及び蛋白質の発現量が有意に増加することが分かった (Fig.5)。また PPAR α 欠損マウスにフィブラートを与えても、肝臓での SPF の発現は増加しなかった。従って SPF は PPAR α を介した発現制御を受けることが分かった。

5. 絶食状態における SPF の役割

フィブラートは核内受容体 PPAR α の合成アゴニストだが、生理的なアゴニストは不飽和脂肪酸であると考えられている。生体は絶食状態におかれると、肝臓において不飽和脂肪酸が上昇し、PPAR α を活性化することで、全身へのエネルギー供給を維持して飢餓状態に対応することが知られている。そこで飢餓状態が SPF

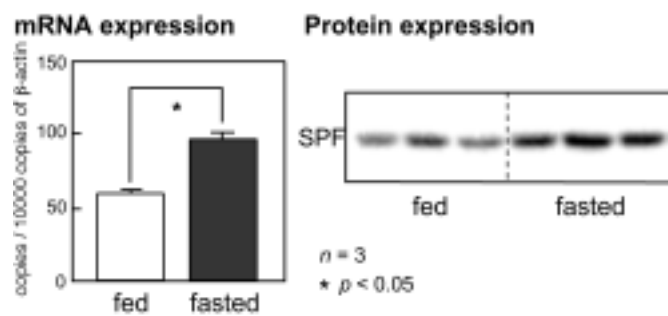


Fig.6 飢餓状態における SPF の発現誘導

の発現に影響を与えるか検討した。その結果、野生型マウスを 24 時間絶食させると、肝臓において SPF の mRNA 及び蛋白質の発現が有意に増加することが分かった(Fig.6)。

そこで SPF 欠損マウスにおいて絶食状態による血中脂質への影響を検討した。野生型マウスを 24 時間絶食させると、血中トリグリセリドは有意に低下したが、コレステロールは殆ど変化しなかった。一方 SPF 欠損マウスを 24 時間絶食させると、血中トリグリセリドが低下する点については野生型マウスと同じであったが、興味深いことに野生型マウスでは低下しなかった血中コレステロールが SPF 欠損マウスでは有意に低下することが分かった(Fig.7)。

以上の結果から SPF は飢餓状態においてもコレステロール生合成能を保ち、血中コレステロールレベルを維持する機能を有することが示唆された。これまで生体は絶食状態において、コレステロール生合成酵素の mRNA 発現が低下することが報告されているが、にもかかわらずなぜ血中のコレステロールレベルが維持されるのか、その点が解明されてこなかった。SPF 欠損マウスを用いた本研究の成果は、この問題点に対し、絶食状態におけるこうしたコレステロール生合成能の低下に対応して、SREBP による制御を受けず、PPAR α により制御される SPF の発現を増加させることでコレステロールレベルを維持しようとする、一種の補償機構が存在する可能性を私は初めて示した。すなわち、SPF が生体におけるコレステロール恒常性を維持するための飢餓応答遺伝子として機能するのではないかと考えられる。

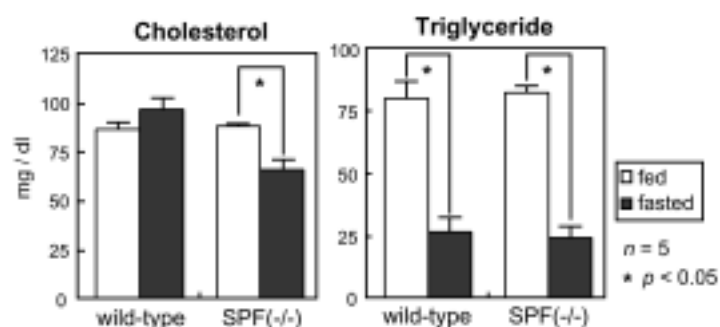


Fig.7 飢餓状態におけるSPF欠損マウスの血中脂質値の変動

6. SPF のドメイン解析

SPF が持つ C 末端側の Jelly-roll ドメインの機能を解析するため、この領域の欠損変異体すなわち脂質結合領域 (Sec14 ドメイン)のみを持つ変異体 SPF- Δ C を作製し、全長 SPF との機能の違いを検討した。その結果、スクアレンの輸送活性やスクアレンエポキシ化反応の促進活性については SPF- Δ C も全長 SPF と同程度の活性を持っていた。一方、全長 SPF にはステロール応答領域 SRE を介した転写を促進することをレポーター遺伝子アッセイよりこれまで示していたが、SPF- Δ C にはこの SRE を介した転写を促進できないことが分かった(Fig.8)。

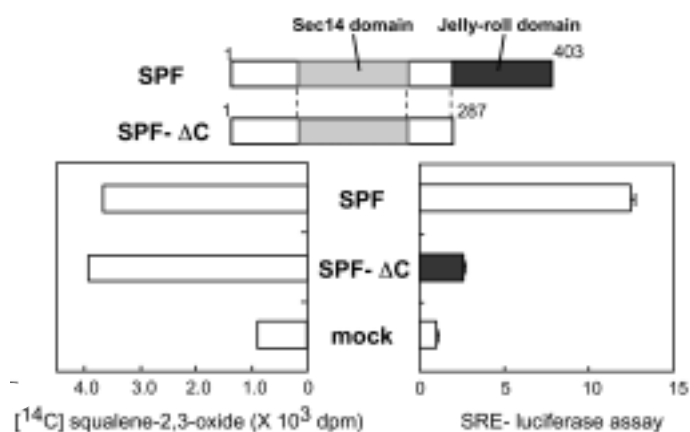


Fig.8 SPF C末端ドメインの機能解析

従って SPF は Sec14 ドメインによるスクアレン輸送を介したスクアレンエポキシ化反応の促進と、Jelly-roll ドメインによるコレステロール生合成酵素の転写促進

という二つの機能を非常にユニークなコレステロール生合成促進因子であることが示唆された。

7. 考察

本研究より SPF がコレステロール恒常性を維持するための飢餓応答遺伝子として機能する可能性が示された。これは従来考えられてこなかった絶食状態におけるコレステロール生合成の調節機構の存在を世界で最初に示唆したものである。またこのとき SPF は核内受容体 PPAR α により発現調節されたが、PPAR α は主に脂肪酸代謝の調節因子と考えられており、このことは PPAR α がコレステロール生合成をも調節しうることを意味し、換言すれば脂肪酸代謝とコレステロール代謝に SPF を介したクロストークが存在することを意味し、生体の栄養代謝という面からも興味深い。さらに SPF のドメイン解析の結果、SPF が Sec14ドメインと Jelly-rollドメインでそれぞれ独立のメカニズムでコレステロール生合成を調節する非常にユニークな因子である可能性が示された。従って SPF がどのような分子機構で飢餓状態におけるコレステロール生合成能を維持しているか、そこに SPF の二つのドメインがどのような役割を果たすのかを解明することが今後の課題である。