

審査の結果の要旨

氏名 中村 俊行

生体内において、コレステロールは VLDL, LDL というリポ蛋白質を介して肝臓から末梢組織へ供給される。一方、末梢組織の過剰なコレステロールは、HDL というリポ蛋白質へ受け渡され、さらに肝臓へ輸送され、処理、排泄される。動物細胞は、コレステロールを分解する能力がないため、HDL を介するコレステロールの末梢組織からの排出系は、生体の過剰なコレステロールを処理するための重要な経路であり、「コレステロール逆転送系」と呼ばれている。SR-BI (Scavenger Receptor Class B Type I) は、肝臓において HDL からコレステロールを受け取る主要な受容体として同定された膜蛋白質である。SR-BI を介して HDL から肝臓に取り込まれたコレステロールは、VLDL 合成系に再利用されることはなく選択的に胆汁酸排泄されることが示されている。このように肝臓 SR-BI はコレステロールの生体からの排出に重要な役割を担っている受容体であり、肝臓 SR-BI の発現制御機構を解明することは非常に重要である。これまでに SR-BI の C 末端細胞質領域と結合する蛋白質として PDZK1 が同定されている。PDZK1 は 4 つの PDZ ドメインを持ち、最も N 末端側の PDZ ドメインを介して SR-BI と結合する。また、PDZK1 は SR-BI の肝細胞膜での発現を蛋白質レベルで増加させ、SR-BI 蛋白質の発現量および HDL コレステロールの選択的取り込みを増加させることが培養細胞および *in vivo* レベルで明らかになっている。しかし、PDZK1 および SR-BI の肝臓における発現制御機構、ならびに PDZK1 による SR-BI の発現制御機構に関してはあまり解明されていなかった。本研究において、中村は PDZK1 による SR-BI の発現制御機構についてさらに詳細に解析し、SR-BI の発現量の増加には PDZK1 の C 末端領域のリン酸化が関与していることを見出した。

SR-BI の発現量の増加には PDZK1 の C 末端領域も必要であることが示され、また、ラット PDZK1 の C 末端領域の 509 番目の Ser が肝臓内でリン酸化されていることが明らかになっている。これらのことから、中村は C 末端領域の PDZK1 のリン酸化が PDZK1 による SR-BI の発現量の増加に関与している可能性が考え、C 末端領域の PDZK1 のリン酸化について、さらに詳細に解析した。まず、中村は PDZK1 の C 末端領域をリン酸化するキナーゼの同定を試みた。データベースを用いて PDZK1 の Ser509 をリン酸化するキナーゼを検索したところ、PDZK1 の Ser509 は PKA および p70S6K によりリン酸化されることが予測された。そこで、まずリコンビナント PDZK1 およびリン酸化部位変異型 PDZK1 を用いて PKA *in vitro* キナーゼアッセイを行った。その結果、PKA により PDZK1 はリン酸化されたが、リン酸化部位変異型 PDZK1 ではリン酸化されなかった。このことから PDZK1 の Ser509 は *in vitro* において PKA によりリン酸化されることが明らかになった。

また、中村は PDZK1 のリン酸化は細胞レベルにおいても PKA により制御されるのか検討した。CHO-PDZK1 定常発現細胞株に PKA 活性化剤フォルスコリンおよび PKA 阻害剤 H-89 を添加し、PDZK1 の Ser509 のリン酸化抗体にて PDZK1 のリン酸化の変化を見た。その結果、フォルスコリンを添加したことにより、PDZK1 のリン酸化が亢進し、H-89 添加では PDZK1 のリン酸化が抑制された。

同様に p70S6K によっても PDZK1 の Ser509 がリン酸化されるのか検討したところ、p70S6K も PDZK1 の Ser509 をリン酸化させることが *in vitro* および培養細胞レベルで明らかになった。これらの結果から、PDZK1 の Ser509 のリン酸化は細胞内において PKA および p70S6K により制御されることが示された。

次に、中村は PDZK1 の Ser509 のリン酸化が SR-BI の発現制御に關与するのか検討した。ほとんどの肝癌細胞は内在性の SR-BI および PDZK1 を発現していなかったが、ラット肝癌細胞株 Fao 細胞は、その中で唯一 SR-BI を内在性に発現していた。そこで、正常型 PDZK1 または Ser509 を Ala に変異させた変異型 PDZK1 を、Fao 細胞にアデノウイルスを用いて発現させ、SR-BI の蛋白質発現量を比較した。まず、正常型 PDZK1 を Fao 細胞に発現させると SR-BI 蛋白質の発現量が増加し、これまで CHO 細胞で得られていた結果と同様の結果が得られた。一方、変異型 PDZK1 では、正常型 PDZK1 のような SR-BI 蛋白質発現の増加は見られなかった。このことから、PDZK1 による SR-BI 蛋白質の発現の安定化作用は PDZK1 のリン酸化が關与していることが示唆された。

ところで、グルカゴンは生体内で最も強力な血糖上昇作用ホルモンで、血糖維持に重要な働きをしており、グルカゴンレセプターを介して細胞内の PKA を活性化することが知られている。これまでに、グルカゴン投与時には血中 HDL コレステロール量が減少することが報告されていたが、そのメカニズムは不明のままであった。本研究のこれまでの結果から、中村はグルカゴンによる血中 HDL コレステロールの低下作用は、PKA 活性化を介した PDZK1 のリン酸化の亢進による SR-BI 蛋白質発現レベルの増加に伴う、HDL コレステロールの肝臓への取り込みの促進による可能性を考えた。そこで、中村はグルカゴンを投与したラット、血中グルカゴン濃度が低下している肥満ラットの Zucker ラットを用いて検討を行った。まず、ラットにグルカゴンを投与し、肝臓の SR-BI, PDZK1 蛋白質発現量、リン酸化 PDZK1 量について western blotting により検討した。その結果、グルカゴン投与時のラットでは肝臓の SR-BI, PDZK1 蛋白質発現量がコントロールと比較して増加することが示された。一方、リン酸化 PDZK1 量は PDZK1 の蛋白質発現量の増加よりも大きく増加することが示された。このことから、グルカゴン投与による SR-BI の発現量の増加は PKA 活性化を介したリン酸化 PDZK1 量の増加が關与することが考えられた。また、グルカゴン投与時の肝臓 SR-BI, PDZK1 の mRNA 量について定量 RT-PCR を用いて検討した。その結果、SR-BI, PDZK1 ともにグルカゴン投与による変化は見られなかった。このことから、グルカゴン投与による SR-BI, PDZK1 の変化は翻訳後の制御であることが示された。次に Zucker ラットの肝臓における SR-BI, PDZK1 蛋白質、PDZK1 リン酸化について調べた。その結果、グルカゴン投与の場合とは逆に、Zucker ラットの肝臓においては、SR-BI の発現量の低下とともに、PDZK1 蛋白質およびリン酸化 PDZK1 のレベルも大きく減少していることが示された。また、Zucker ラットの肝臓中の SR-BI, PDZK1 の mRNA 量は、コントロールラットと比較して有意な差は見られなかった。このことから、Zucker ラットにおける SR-BI, PDZK1 レベルの低下は翻訳後の制御であることが示唆された。

本研究において、中村は SR-BI の発現安定化には PDZK1 の C 末端領域の 509 番目の Ser のリン酸化が關与すること、PDZK1 の Ser509 が PKA、および p70S6K によりリン酸化されること、PKA を活性化するグルカゴンの変動に応じて、PDZK1 のリン酸化および SR-BI の発現量が変動することを示した。このことから、グルカゴン投与ラットや Zucker ラットにおいては血中 HDL コレステロール量が変動するメカニズムは、グルカゴンによる PKA を介した肝臓 PDZK1 のリン酸化の制御、および肝臓 SR-BI 蛋白質の発現変動による、肝臓への HDL コレステロールの取り込み量の変化であることが強く示唆された。グルカゴンをラットに投与すると、血中 HDL コレステロールが減少するだけでなく、コレステロールの胆汁酸による排泄も促進することが報告されている。一方、Zucker ラットにおいて、胆汁酸へのコレステロールの排泄は低下していることが知られている。SR-BI は選択的に HDL コレステロールを胆汁酸により排泄することが知られており、これらを併せて考えると、血中のグルカゴンが上昇すると、HDL コレステロールは積極的に胆

汁酸により排泄されるが、その働きには PDZK1 のリン酸化による SR-BI 蛋白質の発現安定化が関与することが考えられた。

本研究は、PDZK1 による SR-BI の発現制御機構の一端を明らかにしたものであり、また本研究において提唱したグルカゴンによる肝臓 PDZK1 の制御を介した肝臓 SR-BI の発現制御は、糖代謝、エネルギー代謝を制御するホルモンであるグルカゴンとコレステロール代謝とのクロストークの新たなメカニズムを提唱するものであり、現在注目されている生活習慣病の一つであるメタボリックシンドロームの発症機序に新たな情報を提示しているものと考えられ、薬学(博士)に充分値するものと判断した。