

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 入沢 正人

高齢社会を迎えた日本において、メタボリックシンドロームの罹患率は増加の一途を辿っている。日本人の死因の約30%を占める心疾患や脳血管疾患の原因となる動脈硬化を引き起こすメタボリックシンドロームをいかに予防するか、その社会的要請度は極めて高い。メタボリックシンドロームは主として脂質代謝制御不全に起因しているため、脂質代謝制御のメカニズムを明らかにすることがその予防法や治療法の確立に不可欠である。そこで、本研究では脂質代謝制御の中心的役割を担う小胞体膜結合型の転写因子 SREBP と、細胞内コレステロールレベルに応じた様々な機能が推測されているステロールセンシングドメインを有する小胞体膜タンパク質 TRC8 に着目した。そして、脂質代謝制御のさらなる解明を目指して、小胞体膜上における SREBP 活性化機構に及ぼす TRC8 の影響を明らかにすることを研究の目的とした。

第2章では TRC8 と SREBP 応答遺伝子発現制御との接点についての解析を行った。まず、細胞内コレステロールレベルを変化させた時の SREBP 応答遺伝子発現の変動に及ぼす TRC8 の影響を、SREBP2 応答遺伝子のプロモーター領域を用いた Luciferase assay により検討した。その結果、TRC8 の強制発現によりプロモーター活性が抑制された。さらに、Real-time PCR により内因性応答遺伝子発現への影響を検討した結果、TRC8 の発現による抑制が確認された。また、siRNA により内因性 TRC8 をノックダウンして検討したところ、応答遺伝子のプロモーター活性及び発現が亢進した。以上の結果から、TRC8 は SREBP 応答遺伝子発現を抑制することが明らかになった。

SREBP は小胞体膜上で SCAP と複合体を形成し、COP2 小胞によりゴルジ体へ輸送され、S1P と S2P によるプロセッシングを受けて核内型 SREBP となり、核内に移行して応答遺伝子発現を促進させる。そこで、プロセッシング後の核内型 SREBP2 と TRC8 を強制発現させ、応答遺伝子発現への影響を Luciferase assay により検討した。その結果、TRC8 は核内型 SREBP2 によるプロモーター活性上昇を抑制しなかった。従って、TRC8 は SREBP の転写活性を直接抑制するのではなく、小胞体からゴルジ体における SREBP プロセッシングを抑制することが示唆された。

また、TRC8 はユビキチン連結酵素 (E3) として機能していることが報告されているので、TRC8 の E3 活性が SREBP 応答遺伝子発現の抑制に関与しているかを、RING フィンガードメインの変異体を用いて Luciferase assay により検討した。その結果、変異体においてもプロモーター活性が抑制された。従って、TRC8 は膜貫通領域を介して SREBP 応答遺伝子発現を抑制することが明らかになった。

第3章では SREBP プロセッシングに及ぼす TRC8 の影響について解析を行った。まず、細胞内コレステロールレベルを変化させた時の SREBP2 プロセッシングに及ぼす TRC8 の

影響を Western blotting により検討した。その結果、TRC8 の強制発現により核内型 SREBP2 量が減少したことから、TRC8 は SREBP2 プロセッシングを抑制することが明らかになった。さらに、RING フィンガードメインの変異体を用いて検討した結果、変異体においても SREBP2 プロセッシングが抑制された。また、siRNA を用いて内因性 TRC8 をノックダウンして検討したところ、SREBP2 プロセッシングが亢進した。以上の結果から、TRC8 は膜貫通領域を介して SREBP2 プロセッシングを抑制することが明らかになった。

これまでの結果から、TRC8 は SREBP/SCAP 複合体に直接作用することにより SREBP プロセッシングを抑制することが推測された。そこで、TRC8 と SREBP2 または SCAP を強制発現させ、免疫沈降と Western blotting により結合を検討した。その結果、TRC8 は SREBP2, SCAP それぞれと結合することが明らかになった。従って、TRC8 は SREBP や SCAP と結合することにより SREBP プロセッシングを抑制することが示唆された。そこで、SREBP/SCAP 複合体のゴルジ体輸送に及ぼす TRC8 の影響について検討した。SREBP/SCAP 複合体のゴルジ体輸送は SCAP の 6 番目のループ (Loop6) と COP2 小胞の構成タンパク質である Sec24 との結合を介していることが報告されている。まず、TRC8 と Sec24 との結合を検討した結果、TRC8 は Sec24 と結合することが明らかになった。また、SCAP-Loop6 と Sec24 との結合は TRC8 の強制発現により抑制された。さらに、TRC8 と Sec24 との結合は SREBP2 の強制発現により抑制された。以上の結果から、本来 SREBP/SCAP 複合体も TRC8 も COP2 によりゴルジ体へ輸送されるが、TRC8 が SREBP/SCAP 複合体と結合することにより SCAP, TRC8 共に Sec24 との結合が抑制され、SREBP/SCAP 複合体は小胞体に留まることが示唆された。

第 5 章では TRC8 の安定性の解析を行った。まず、リポタンパク質を除いた血清 (LPDS) を含む培地でタイムコースをとって培養し、Western blotting により TRC8 のタンパク質量を検出した。その結果、タイムコース依存的な TRC8 のタンパク質量の上昇が確認された。そこで、細胞を LPDS 培地で培養後、FBS 培地 (通常の培養に用いている培地) に交換して TRC8 の分解を検出した結果、FBS 培地により TRC8 の分解が亢進した。以上の結果から、培地からのリポタンパク質供給の低下により TRC8 は安定化することが明らかになった。リポタンパク質供給の低下は SREBP の活性化を引き起こすことから、安定化した TRC8 が SREBP の活性化を抑制する可能性が考えられる。そこで、リポタンパク質供給の低下による SREBP2 プロセッシングと TRC8 安定化の経時的変化を Western blotting により検討した。その結果、リポタンパク質供給低下後にまず SREBP2 プロセッシングが亢進し、TRC8 のタンパク質量の上昇と同時期に SREBP2 プロセッシングが抑制された。従って、TRC8 は SREBP の活性化を負に制御することにより、細胞内コレステロールレベルの恒常性維持に関与していることが推測された。

本研究で得られた新たな知見は、SREBP による脂質代謝制御のメカニズムのさらなる解明に繋がることを期待される。

よって審査員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。