

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 近田 裕美

ステロイドホルモンや脂溶性ビタミンなどの低分子量脂溶性生理活性物質は、性分化や代謝調節など様々な生命現象において重要な役割を担う。これらの脂溶性生理活性物質の生理作用の多くは、リガンド依存的な転写因子である核内受容体を介して発揮される。一方、低分子脂溶性化合物は転写制御の他、様々な分子機構を制御することが明らかとなりつつある。例えば、標的タンパク質の分解制御が挙げられ 2007 年には低分子脂溶性化合物であるダイオキシンが転写因子 AhR に結合し、タンパク質分解における E3 ligase 複合体を形成させることが報告されている。これらの報告から、低分子脂溶性化合物は受容体を介して、複合体の形成を制御し、多岐に渡る作用を発揮すると予想される。

本研究では、低分子脂溶性化合物のうち、コレステロール酸化物であるオキシステロールに着目した。オキシステロールは核内受容体 LXR のリガンドとして、コレステロール輸送を制御することが知られている。オキシステロールは血中や細胞においてコレステロールが酸化されて産生され、LXR を介して生理作用を発揮する。生体内で余剰のコレステロールは酸化 LDL の形態で末梢マクロファージに取り込まれた後、HDL の形態で肝臓へ逆転送される。肝臓ではコレステロールは胆汁酸に変換され、小腸を経て体外へ排泄される。マクロファージにおける余剰コレステロールの蓄積を防ぐために、LXR の活性化によるコレステロール排泄は重要な経路である。

このようなコレステロール排泄は LXR のリガンド依存的な遺伝子発現調節を介する。LXR はリガンド非存在下では、転写抑制因子複合体とともに標的遺伝子発現を抑制する。LXR がリガンドと結合すると、転写活性化因子複体のリクルートにより標的遺伝子発現が亢進する。マクロファージにおける標的遺伝子はコレステロールトランスポーターの ABCA1 や ABCG1 が挙げられる。しかしながら、これまでに明らかとなっている LXR による遺伝子発現調節のみでは、マクロファージにおけるコレステロール排泄制御の全てを

説明することはできない。また、マクロファージにおけるコレステロール排泄に重要な LXR 複合体群の性状は不明であった。

そこで本研究では、マクロファージにおけるリガンド依存性の新たな LXR 相互作用因子を生化学的に同定し、機能を解析することを目的としている。

第二章では、LXR の核内相互作用因子の生化学的同定を試みた。大腸菌より調整した GST 融合 LXR $\alpha$  (DEF) 及び GST 融合 LXR $\beta$  (DEF) 再構築タンパク質を bait とするアフィニティ精製を行った。同時に、マクロファージへの分化能を有するマウス白血病由来単球 Raw264.7 細胞からの核抽出法を確立した。この核抽出液と調製した精製の bait を混合し、GST sepharose beads にて回収することで、LXR 相互作用因子群を単離した。質量分析測定とデータベース検索により、転写開始や転写活性化に必要な複数の因子が同定され、本精製系の妥当性を確認した。さらに最もスコアの高い Shkbp1 を LXR の新規相互作用因子として同定した。

第三章では、Shkbp1 の機能解析を行った。その結果、Shkbp1 は Cullin3 を基盤とする E3 ligase 複合体の構成因子であることが明らかとなった。さらに LXR リガンドはこの E3 ligase 複合体の E3 ligase 活性を抑制的に制御していた。この E3 ligase 複合体の生理的役割を明らかにするために、基質の同定を試みた。その結果、基質候補群として、複数の転写因子および転写共役因子が同定された。このことは、LXR リガンド依存的に遺伝子発現を間接的に調節する機構の存在を示唆するものであった。

本論文では、LXR の核内相互作用因子の精製系を確立し、この精製系において同定した Shkbp1 が Cullin3 を基盤とする E3 ligase 複合体の構成因子であることを見出した。さらに LXR リガンドがこの E3 ligase 複合体の E3 ligase 活性を抑制的に制御することを明らかにした。これは、LXR 複合体として新たな E3 ligase 複合体の存在を示唆するものである。また、LXR リガンドの新たな作用経路の存在を明らかにしたものであり、LXR 生理作用の新たな分子基盤の解明へつながると期待される。以上より、審査委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。