

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

目 次

文献No	課題番号			
20000937A	21008	血管壁細胞の抗血栓性機能の制御機構の解明と新規抗血栓薬の開発	加藤 久雄	1
938A	21019	組織内脂肪蓄積の予防及びGLUT4の発現増加を目指したインスリン抵抗性治療法の研究	江崎 治	14
939A	21045	慢性呼吸器疾患の発症機構の解明と医療への応用	斎藤 博久	18
940A	21052	閉経後骨粗鬆症の発症機構の解明とその予防と治療薬に関する研究	宮浦 千里	25
942A	21067	細菌感染に關与する病原遺伝子の発現機構の解明とその制御法の開発	渡辺 治雄	33
943A	21073	脳循環障害による神経細胞死の発症機序の解析と治療法の開発	内村 英幸	38
944A	21079	疾患モデルマウスを用いたβ-ガラクトシドシスの病態解析と治療への応用	松田潤一郎	46
945A	21081	精神疾患の分子メカニズムの解明と新しい診断・治療法の開発への応用	西川 徹	53
946A	21086	新しい生体防御調節物質の機能と作用の解析	鈴木 和男	60
948A	21089	感染症が誘発する自己免疫疾患病態の解明とその医療への応用に関する研究	大川原明子	68
949A	21092	生体膜脂質を介する細胞機能調節機構の解明とその医療への応用	西島 正弘	80
950A	21096	免疫・内分泌系による神経系の障害機構の解明とその制御	田平 武	88
951A	21102	移植免疫寛容とマイクロキメリズムに関する基礎的研究	木村 廣光	92
952A	21104	G蛋白質共役型受容体の個体レベルでのゲノム機能評価	辻本 豪三	98
953A	21107	難治性腎疾患の病態解明と医療への応用に関する研究	藤本純一郎	111
954A	21110	食細胞による感染防御機構の解明と医療への応用	網脇 祥子	118
955A	21121	抗酸化機能調節に及ぼす運動と栄養の影響に関する研究	樋口 満	126
956A	21130	神経変性疾患における神経細胞死の分子機構の解析	桃井 隆	134
957A	21142	C型肝炎ウイルスに対するインターフェロン(IFN)の治療効果を増強する新薬の開発研究	小長谷昌功	144
958A	21150	グリア細胞の機能調節による神経疾患治療法の開発	高坂 新一	149
959A	21166	新規破骨細胞形成抑制因子(OCIF)とそのリガンドである破骨細胞分化因子(ODF)の生理的役割の解明と医療への応用	高橋 直之	160
960A	21177	コレステロール代謝・動脈硬化関連遺伝子の発現調節因子の検索	松本 明世	167
961A	21179	血圧調節物質・動脈硬化起因物質などに関する分子生物学的、生化学的研究	南野 直人	178
964A	21215	アトピー性皮膚炎自然発症(NC)マウスを用いた皮膚搔痒症の発症機序の解明と新規治療薬の創製	廣田 直美	183
965A	21224	ヒト血液細胞情報伝達の解明とオリゴヌクレオチドを用いた治療法の開発	湯尾 明	193
966A	21225	癌化とウイルス感染を制御する細胞内情報伝達分子を標的とする薬剤の探索	松田 道行	200

20000969A	21228	細胞内シグナル伝達の解明による創薬シーズの探索	上原 至雅	……	204
968A	21234	スフィンゴ脂質の情報伝達の研究と抗血栓症薬開発	望月 直樹	……	208
969A	21279	中枢神経系におけるATP受容体の機能の解析と医療への応用	井上 和秀	……	213
941A	22055	宿主の防御機能動態と感染機構の解明と医療への応用	高津 聖志	……	221
949A	22088	ビタミンE欠乏性脊髄小脳失調症の病態解明と治療法の確立に関する研究	水澤 英洋	……	228
962A	22183	炎症・アレルギー性疾患の発症機構の解明と医療への応用	清水 孝雄	……	233
963A	22194	コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発のための基盤研究	新井 洋由	……	237

コレステロール代謝を標的とした抗動脈硬化薬開発の ための基盤研究

所 属 東京大学大学院 薬学系研究科
研究者 新井 洋由

分担研究者

(1) 東京大学大学院 薬学系研究科 青木淳賢

要旨

血漿リポ蛋白質の一つであるHDLは、心筋梗塞等の発症率と負の相関があり、抗動脈硬化作用を有することが知られている。最近、SR-BIと呼ばれる細胞表面受容体がHDLに対する受容体として初めて同定された。我々は、肝臓内においてSR-BIの細胞質ドメインに結合する新規蛋白質(CLAMP)を発見した。今年度の研究において、アデノウイルス発現系を用いて、PDZドメイン3及び4を欠損した変異型CLAMPをマウス肝臓に過剰発現させると、SR-BI蛋白質の発現が減少し、血漿中のHDLコレステロール濃度が上昇することが示された。さらに、肝臓におけるコレステロール生合成の新しい調節機構を明らかにすることを目的として、コレステロール生合成過程のなかでスクアレンエポキシダーゼ活性を特異的に促進する細胞質タンパク質の精製・クローニングに世界で初めて成功した。

1. 研究目的

コレステロールは生体膜の主要な構成成分の一つとして、また胆汁酸及びステロイドホルモンの前駆体として、生体にとって必須の成分である。一方、動脈硬化症は、動脈壁にコレステロールエステルに富むマクロファージが蓄積し、血管の閉塞を引き起こす病気である。

善玉リポ蛋白質として知られるHDLの抗動脈硬化作用は、HDLが末梢組織の細胞に蓄積した過剰のコレステロールを引き抜き、これを肝臓へ輸送して処理・排泄する経路に重要な役割を果たしていることで説明される。最近、肝臓において、HDLからコレステロールを引き抜き胆汁中に排泄する機能をもつ受容体蛋白質としてSR-BIが同定された。我々は、この蛋白質の細胞質ドメインと結合する新規蛋白質を同定・クローニングすることに成功し、CLAMP (C-terminal linking and modulating protein)と命名した。CLAMPはPDZドメインと呼ばれる蛋白質—蛋白質間相互作用に関わるドメインを4個もっている蛋白質である。本研究では、まず、肝臓におけるCLAMPの生理機能を明らかにすることを目的とした。

ところで、動物細胞は、①細胞内での生合成、②血中からLDL受容体を介しての供給、という二つの経路で自らに必要なコレステロールを獲得している。そして、細胞内でのコレステロールの生合成速度を制御したり、細胞外液からのコレステロールの取り込みや、細胞外への放出速度を、それぞれの細胞が合目的に変化させることによってその恒常性が保たれている。実際、LDL受容体やコレステロール生合成系酵

素群は、細胞内コレステロール量によりフィードバック制御されている。従って、このようなコレステロールの恒常性を維持する機構を明らかにすることは、臨床的にも大いに関心の持たれる研究分野である。このような背景のもと、20段階以上の複雑な過程からなるコレステロールの代謝経路についても精力的に研究がなされてきた。そのなかでもコレステロール生合成の律速酵素であるHMG-CoA還元酵素については阻害剤が開発され、動脈硬化を予防する抗高脂血症治療薬として現在もっとも広く用いられている。このように、コレステロールの代謝経路はその前半経路については、臨床的な興味も重りよく研究されてきたが、その一方で後半の経路については研究が遅れていた。しかしながら近年HMG-CoA還元酵素の下流に位置するイソペンテニルピロリン酸、ゲラニルピロリン酸、ファルネシルピロリン酸が、様々な蛋白質やRNA修飾の基質となっていることが分かった。なかでも、細胞内情報伝達や細胞増殖に重要な役割を果たすと考えられるp21 Ras や低分子量G蛋白質などの機能発現に必須な修飾に関わっていることが明らかとなった。この事実はHMG-CoA還元酵素の阻害剤が深刻な副作用を与えるのではないかという懸念を呼び起こし、実際、培養細胞にHMG-CoA還元酵素阻害剤を添加すると細胞周期が停止し、増殖が起こらなくなることが知られている。このため、このような非ステロール生合成の分岐以後のコレステロールの代謝経路、すなわちスクアレンからスクアレン-2,3-オキサイドを経てラノステロールに至る段階に対する関心が強まっている。この各段階を担う酵素、スクアレン合成酵素・スクアレンエポキシダーゼ・オキシドスクアレンシクラーゼは、各々1992年・1995年・1995年に哺乳類からのcDNAクローニングが報告され、その後各酵素の阻害剤の開発が進められてきているが、現在までに臨床応用されているものはまだ無い。

これら3酵素の中でもスクアレンエポキシダーゼは、コレステロール生合成系で唯一の酸素添加酵素であり、ステロール環形成の基質を合成する重要な酵素である。しかもHMG-CoA還元酵素と比較してもその比活性および発現量は極めて低いことから、この段階がボトルネックになっており、スクアレンエポキシダーゼの活性調節によりコレステロール生合成の後半経路の進行を決定していることが示唆される。スクアレンエポキシダーゼの生化学的な研究は1950年代より米国のKonrad Blochらのグループにより進められてきた。彼らはラットの肝臓を用いて、そのミクロソーム分画にスクアレンをエポキシ化するスクアレンエポキシダーゼが存在するを見い出したが、さらにこの酵素の活性化には、分子状酸素・FAD・NADPH・NADPH-シトクロームP-450還元酵素、そして肝臓可溶性分画(100,000×g遠心上清)が必要なことを明らかにした。その後、この肝臓可溶性分画中の活性化因子が調べられ、これが分子量47kDaの可溶性蛋白質であることが分かり、SPF (Supernatant Protein Factor)と命名され注目された。SPFによるスクアレンエポキシダーゼの活性化機構については、脂溶性基質であるスクアレンを活性中心へ移行するのに必要なのではないかという説も報告されている。しかしながらその後ほとんど研究は進展せず、クローニングもされていないことから、SPFの生理的な機能はもちろんのこと、その存在自体にも疑問をもたれたまま現在に至っている。

SPFには、スクアレンエポキシダーゼの活性を調節することで、コレステロール生合成に重要な役割を果たす可能性があり、また創薬の観点からも注目される。そこで本研究においては、SPFが本当に存在するのか、存在するとしたらその生理機能は何かという点の解明をもう一つの目的として、研究を進めた。

2. 研究方法

(1) PDZドメインを欠損した変異型CLAMPのSR-BIに対する作用の解析

CHO-CLAMP細胞にSR-BIを発現させるとコントロールCHO細胞に比べて、SR-BI蛋白質の発現量が増加し、DiI-HDLの取り込みが2-3倍上昇する。このCLAMPのSR-BIに対する機能の発現に、どのPDZドメインが必要であるかを調べる目的で、各種PDZドメイン欠損変異体発現CHO細胞を作製した。これらの細胞に、SR-BIを一過性に発現させて、SR-BI蛋白質の発現量およびDiI-HDLの取り込み量を調べた。

(2) 細胞レベルでのPDZ-1-2-のドミナントネガティブ効果

CHO-CLAMP/SR-BI細胞を作製し、Ad.PDZ-1-2-を感染させたときに、SR-BIとCLAMPの結合が阻害されるかどうかを解析した。具体的には、細胞を可溶性画分と膜画分とに分画し、CLAMP抗体でイムノプロテイングすることによりCLAMPの分布を比較した。また、蛍光抗体法により、CLAMPの局在の変化を観察した。

(3) Ad.PDZ-1-2-を感染したマウス肝臓におけるSR-BI蛋白質の発現レベルの解析

我々が今回用いたアデノウイルス感染システムでは目的蛋白質の99%以上がマウス肝臓に発現する。アデノウイルス(Ad.LacZ或いはAd.PDZ-1-2-)をマウス尾静脈から注入して3日後、肝臓を摘出しホモジナイズする。肝臓ホモジェネートを10万gで遠心し、上清画分と沈殿画分に分画し、SR-BI抗体でイムノプロテイングすることによりSR-BI蛋白質の発現量を調べた。また、GST-C45(SR-BIのC末端45アミノ酸とGSTをフュージョンさせた蛋白質)をプローブにしてウェストウエスタンブロッティングを行うことにより、PDZ-1-2-の発現を確認した。

(4) Ad.PDZ-1-2-を感染したマウスの血漿コレステロール濃度の解析

アデノウイルス(Ad.LacZ或いはAd.PDZ-1-2-)感染直後、3、7、14、21、28日後に採血し、血漿コレステロール濃度の推移を調べた。

(5) Ad.PDZ-1-2-を感染したマウスの各種リポ蛋白質中のコレステロール濃度の解析

アデノウイルス(Ad.LacZ或いはAd.PDZ-1-2-)感染直後、3、7、14、21、28日後に採血する。Superose 6ゲル濾過カラムにアプライすることにより、各種リポ蛋白質中のコレステロール濃度を解析した。

(6) Ad.PDZ-1-2-を感染したマウスのHDLクリアランスの解析

アデノウイルス(Ad.LacZ或いはAd.PDZ-1-2-)感染3日後、¹²⁵I-HDLを尾静脈から注入し、経時的に採血し、HDLのクリアランスを比較した。

(7) ラット肝臓可溶性画分からのSPFの精製・cDNAクローニング

ラット肝臓のミクロソーム画分を酵素源に[¹⁴C]-スクアレンから[¹⁴C]-スクアレン-2,3-オキサイドへの変換反応を行った。なお、オキシドスクアレンシクラーゼの阻害剤であるAmo1618を系中に添加することで、これ以降のコレステロール生合成反応を止めている。このような実験系において、ラット肝臓の可

溶性画分を添加すると、スクアレン-2,3-オキサイドの顕著な産生増加が確認された。従って、これをアッセイ系にして、ラット肝臓可溶性画分からのSPFの精製を行った。

(8) SPFのcDNAクローニング

活性と挙動の良く合うSDS-PAGE上のバンドを切り出し、リジルエンドペプチダーゼで処理し、DEAEブレイカラムの付いた逆相カラムでペプチドを分離し、自動アミノ酸分析機を用いて部分アミノ酸配列を決定した。この決定した部分アミノ酸配列をデータベースで検索したところ、ヒトのゲノムDNAの中で蛋白質として推定される配列として登録されていた、human similar to squid retinal-binding protein (GenBank accession number AL096881)と、非常に高い相同性を示したので、今回ラット肝臓可溶性画分から精製し部分アミノ酸配列を決定した蛋白質が、このhuman similar to squid retinal-binding proteinのラットホモログではないかと考え、このhumanの塩基配列をもとにプライマーを設計し、RT-PCRにより、rat liver total RNAからrat SPFのcDNAクローニングを行った。

(9) SPFによるスクアレン輸送活性の検討

一次構造上の相同性からSPFは、Sec14p・ α -TTP・CRALBPなどを含む一つの脂質輸送蛋白質ファミリーに属すると考えられる。これらの蛋白質はそれぞれに特異的な脂質を結合・輸送する蛋白質であり、しかもいずれも可溶性の蛋白質である。このような類似点を考慮すると、SPFもまた何らかの脂質を結合・輸送することが予想される。ところでSPFは、スクアレンエポキシダーゼの活性、すなわち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を促進する活性から、精製・cDNAクローニングしてきた蛋白質である。従って、SPFがスクアレンを認識し、結合・輸送する活性を持つのではないかと考えられる。そこでこの可能性を検討した。

具体的には[3H]-スクアレンを含むリポソームをDonorにして、このリポソームから、Acceptorであるラット肝臓のミトコンドリア膜画分への[3H]-スクアレンの移行率が、大腸菌に発現させたラットSPFのリコンビナント蛋白質により促進されるか調べた。

(10) SPFによる基質認識の特異性の検討

SPFによる基質認識の特異性を検討するため、[3H]-スクアレンの100倍量の非放射標識のコレステロール生合成中間体をリポソームに加えて、[3H]-スクアレンの輸送を阻害するか検討した。用いたコレステロール生合成中間体は、ファルネシルピロホスフェート、スクアレン、スクアレン-2,3-オキサイド、ラノステロール、コレステロールの計6種類である。

(11) 肝細胞におけるSPFの発現の確認

SPFには、スクアレンエポキシダーゼの活性を促進すること、及びコレステロール生合成中間体の中でスクアレンとスクアレン-2,3-オキサイドを特異的に認識することが分かっている。これらのことから、SPFが細胞内でコレステロール生合成に何らかの関与をしていることが想定される。このような観点から肝細胞内でのSPFの機能解析を行うにあたり、まず肝癌に由来する培養細胞やラット初代培養肝細胞におけるSPFの発現を、抗SPFポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロットティングにより調べた。

(12) コレステロール生合成に対するSPFの作用の検討

SPFにはスクアレン及びスクアレン-2,3-オキサイドを認識し輸送する活性をもつことが分かった。従っ

てSPFによりスクアレンからラノステロールへの反応が促進されることが予想され、SPFがコレステロール生合成に何らかの役割を果たすと考えられる。ところで、ラット肝癌由来細胞株McARH7777細胞にはSPFが内在的には発現していなかった。そこでMcARH7777細胞にSPFを発現させ、¹⁴C-酢酸を加え細胞内の脂質合成に対する影響を調べた。

(13) SPFによるコレステロール生合成酵素の転写制御の検討

コレステロール生合成酵素は一般に細胞内のコレステロールレベルに応じた転写制御を受けていると言われるが、この実体は各酵素のプロモーター領域に存在するステロール応答領域 (SRE: Sterol Regulatory Element) を介して、転写因子SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) がコレステロールレベルに依存的な転写調節を行うからであることが知られている。

(6) の実験よりSPFがコレステロールの生合成の促進活性を持つことが分かったが、コレステロールのみならずスクアレンの生合成も促進していたことから、SPFがコレステロール生合成酵素の発現レベルに影響を与えている可能性が考えられる。そこでこの可能性を検討するために、このSREを介した転写応答にSPFがどのような影響を与えるか調べた。具体的には、ヒトLDLレセプターのプロモーター領域に存在するSRE配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流配列に組み込んだものをレポーター遺伝子とし、SPFを共発現させたときの転写活性を調べた。

(14) SPFの臓器分布

ラットSPFのコーディング領域をプローブにしたノーザンブロットングにより、その臓器分布を調べた。メンブレンの各レーンにはラットの主要な12臓器の2 μ gのpoly(A)⁺ RNAが固定されており、100%マッチの条件でハイブリダイゼーションを行った。

3. 研究成果

(1) PDZドメインを欠損した各種変異型CLAMPを恒常的に過剰発現したCHO細胞にSR-BI遺伝子を一過的にトランスフェクトしたところ、CHO-CLAMP細胞で見られたSR-BI蛋白質の発現増加及びHDLからのコレステロールエステル取り込み亢進作用は、これらの変異型CLAMP発現細胞では全く観察されなかった。

(2) コントロールであるlacZを感染した細胞では、CLAMPはSR-BIとともにCHO細胞の膜画分に存在するが、PDZ-1-2-を感染させた細胞では、CLAMPとSR-BIの結合が競合的に阻害されて、大部分のCLAMPが可溶性画分に遊離してくることがわかった。CLAMP抗体を用いた蛍光抗体法によっても、同様の結果が導かれた。

(3) PDZ-1-2-を感染したマウスの肝臓ではコントロールマウスに比べて、SR-BI蛋白質の発現レベルが有意に減少していることがわかった。このとき、PDZ-1-2-は肝臓の膜画分と可溶性画分の両方に発現していることが確認された。

(4) PDZ-1-2-を感染したマウスでは、plasma total cholesterol量は7日目にピークをむかえるが、コントロールマウスに比べて有意に上昇していることがわかった。

(5) PDZ-1-2-を感染したマウスでは主にHDL画分中のコレステロールが増加していることがわかった。

(6) PDZ-1-2-を感染したマウスではHDLコレステロールのクリアランスがコントロールに比べて有意に落ちていることがわかった。

(7) ラット肝臓可溶性画分を出発物質に①アセトン沈殿②ゲル濾過カラム③Q-sepharoseカラム(素抜け画分)④Hydroxyapatiteカラム(溶出画分)⑤MonoSカラム(pH7.5)(素抜け画分)⑥MonoSカラム(pH6.5)(溶出画分)、といった手順で精製を進めた。その結果、②ゲル濾過カラムにおいて分子量約48kDaの位置に活性の鋭いピークが見られ、⑥MonoSカラム(pH6.5)(溶出画分)においてSDS-PAGE上に活性と挙動の良く合う分子量約45kDaのバンドを見出した。

(8) 同定されたバンドの部分アミノ酸配列をもとにデータベースを調べた結果、ラットSPFはこれまでに報告のない新規の蛋白質ではあること、およびヒトのゲノムDNAの中で蛋白質として推定される配列として登録されていた、human similar to squid retinal-binding protein (GenBank accession number AL096881)と、非常に高い相同性を示すことが分かった。この配列はヒト第22番染色体の長腕12番に位置し、12個のエクソンから成ると推定されているが、それ以上のことは何一つ分かっていない。我々は今回ラット肝臓可溶性画分から精製し部分アミノ酸配列を決定したラットSPFのヒトホモログが、このhuman similar to squid retinal-binding proteinではないか、すなわちヒトSPFではないかと考えた。

そこでこのヒトSPFの塩基配列をもとにRT-PCRにより、rat liver total RNAからrat SPFのcDNAクローニングに世界で初めて成功した。得られたcDNAから予想すると、SPFは403アミノ酸からなる新規蛋白質で、アミノ酸配列から分子量は46,165と考えられる。SPFの一次構造をもとに、ホモロジー検索を行ったところ、酵母のSec14p・ α -トコフェロール輸送蛋白質(α -TTP)・細胞内レチナール結合蛋白質(CRALBP)等の脂質輸送蛋白質と25%程度のホモロジーを持つことが分かった。Sec14pはホスファチジルイノシトールとホスファチジルコリンの交換輸送活性を持ち、酵母においてゴルジ体経由の蛋白質分泌に必須の因子である。 α -TTPは様々なトコフェロール同族体の中でも α -トコフェロールに特異的に輸送する蛋白質で、主に肝臓に発現しており、血中 α -トコフェロールレベルを規定する主要因子である[2,3]。CRALBPは11-cis-レチナールに特異的に結合する蛋白質で哺乳類の視覚器官にのみ発現しており、視覚機能の発現に重要な役割を果たしているのではないかと考えられている。この脂質輸送蛋白質ファミリーでは、特に良く保存された2つの領域を持っていることが知られているが、SPFもこの2つの領域を持っていた。またこの2つの領域に挟まれた部分は、Sec14pでのX線結晶構造解析の結果、6個の β シートが連なっており、この領域が疎水的なポケットになっていると考えられ、この領域がリガンド結合領域であると予想されるが、このファミリー間ではこのリガンド結合領域のホモロジーはそれほど高くはないが、この6個の β シートの繋ぎ目にあたるグリシンやプロリンは、SPFを含めこのファミリーで良く保存されており、リガンド認識部位の大まかな骨格が似ているのではないかと考えられる。

以上のことから考えて、SPFがこれらの蛋白質を含む一つの脂質輸送蛋白質ファミリーに属していて、SPFが何らかの脂質を輸送する活性を有しているのではないかと予想された。

(9) SPFの蛋白質量に依存的にスクアレンの膜間輸送活性の著しい上昇が認められた。一方、大腸菌で発現させたりコンビナントのラット α -TTPやBSAではほとんどスクアレンの膜間輸送は見られなかった。従って、SPFがスクアレンの膜間輸送活性を持つ蛋白質であることが示された。

(10) 今回競合物質として用いたコレステロール生合成中間体、ファルネシルピロホスフェート、スクアレン、スクアレン-2,3-オキサイド、ラノステロール、コレステロールのうち、スクアレン及びスクアレン-2,3-オキサイドでのみSPFによる[3H]-スクアレンの膜間輸送活性が顕著に阻害された。従って、SPFはコレステロール生合成中間体の中でも、スクアレン及びスクアレン-2,3-オキサイドを特異的に認識し輸送する活性を持った蛋白質であると考えられた。

(11) 抗SPFポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロットティングの結果、まずラット初代培養肝細胞では、SPFの発現量は培養直後から速やかに減少し、48時間後にはほぼ消失した。すなわち培養を続けるにつれSPFの発現量が十分には維持されておらず、機能解析を行うにはラット初代培養肝細胞は不向きであると考えた。またHepG2細胞やMcARH7777細胞といった肝癌に由来する培養細胞も含めほとんどの培養癌細胞においてSPFは内在的には発現していないことが分かった。従って培養細胞にSPFを発現させることで細胞内でのSPFの機能を解析できるのではないかと考えた。またこのように培養細胞レベルではSPFが発現していないことから、SPFは分化状態に応じた発現制御を受けているのではないかと示唆された。

(12) ラット肝癌由来細胞株McARH7777細胞にSPFを発現させると、コントロール細胞に比べてコレステロールの生合成が約2倍に増加した。今回のトランスフェクションの条件では約10%の細胞にSPFが発現していたので、SPFが発現している細胞では計算上約20倍ものコレステロール生合成の上昇が起きていることになる。一方もう一つの主要な脂質であるトリグリセリドの生合成はSPFを発現させても全く影響されなかった。このような結果から、SPFは細胞レベルにおいて、コレステロールの生合成を特異的に促進する活性を持つことが分かった。

(13) SRE配列を用いたレポータージーンアッセイの結果、SPFによりSREを介した転写活性がおよそ30倍もの強力な上昇を起こすことが分かった。このことから、SPFがコレステロール生合成酵素の転写制御にも関わる可能性が示唆された。

(14) SPFの臓器分布をノーザンブロットティングで調べたところ、SPFは肝臓が最も高く発現しており、次に小腸で、他に脳・肺・皮膚等で発現が見られた。肝臓と小腸は体内の90%以上のコレステロールを産生する主要臓器である。また脳は自らコレステロールを合成しなければならない臓器であり、皮膚は皮脂腺からスクアレン等の脂質を積極的に分泌していることが知られている。すなわち、SPFはコレステロール或いはスクアレンの合成の非常に盛んな臓器に発現していると言える。

4. 考察

PDZドメイン3及び4が欠損した変異型CLAMPをマウス肝臓に過剰発現させると、CLAMPとSR-BIの相互作用が阻害されることによりCLAMPのSR-BIに対する機能が損なわれ、つまりSR-BI蛋白質の発現量が減少することにより、HDL中のコレステロールレベルが上昇することが明らかとなった。このことから、CLAMPは個体レベルにおいてもSR-BIを介するHDLからのコレステロールエステル取り込みに重要な役割を果たしていることが示され、HDLコレステロールレベルを調節する新しい分子機構の存在が示された。今後は正常型CLAMPをマウス肝臓に過剰発現させたときに、HDLからのコレステロールエステ

ル取り込みが促進されて、血漿HDLコレステロール濃度が減少するかどうか調べ、創薬の観点からCLAMPが抗動脈硬化薬の新しいターゲット分子になるかどうか検討したいと考えている。また、CLAMPのPDZ2,3,4ドメインはSR-BI以外の何らかの細胞内蛋白質と相互作用していると考えられる。これらの分子は、形質膜の内側に取り込んだコレステロールエステルの細胞内輸送に関わっていると予想されるので、それらを同定し、クローニングすることにより、細胞内コレステロール輸送の分子機構を解明していきたいと考えている。

SPFは403アミノ酸からなる新規蛋白質で、構造上、酵母Sec14p・ α -トコフェロール輸送蛋白質・細胞内レチナル結合蛋白質などと共に一つの脂質輸送蛋白質ファミリーに属すると考えられた。実際SPFはスクアレンやスクアレン-2,3-オキサイドを輸送する活性を有しており、そのような脂溶性基質を酵素へ輸送することで促進活性を発揮するのではないかと考えられる。しかしながらその促進メカニズムを考える上でまだ明らかになっていない問題がある。それはSPFによるスクアレンエポキシダーゼの促進作用に、ある種の酸性リン脂質を要求するという点である。過去の知見では、促進効果の高いリン脂質（ホスファチジルグリセロールやホスファチジルセリン等）と、部分精製されたSPFが結合するという報告もあった。一方で、このようなリン脂質の共存下でもSPFとスクアレンの結合状態を検知できなかったため、リン脂質はSPFとスクアレンのインタラクションにはあまり寄与しないのではないかと考えられる。以上の知見をもとにすると、ある種の酸性リン脂質はSPFからスクアレンエポキシダーゼへのスクアレンの受け渡しに必要なのではないだろうか。例えばSPFがスクアレンエポキシダーゼを認識するのにリン脂質が必要なかもしれない。またスクアレンエポキシダーゼを認識したSPFが、まずリン脂質を介して小胞体膜にアンカーして、スクアレンの受け渡しをより安定にかつスムーズに行えるようになっているのかもしれない。一方でSPFのアミノ酸配列を、同じ脂質輸送蛋白質ファミリーに属する他の蛋白質と比較すると、SPFはC末端側が長いという特徴を持っている。従ってこのC末端側は、SPFに特有の機能、例えばスクアレンエポキシダーゼの認識に関わっているのかもしれない。もしこれが事実であるならば、リン脂質の役割を考える上でもこのSPFのC末端側は重要であると考えられる。

培養細胞にSPFを発現させると、コレステロールの生合成自体を大幅に亢進させる一方で、コレステロール生合成酵素の転写に重要なプロモーターであるSREの転写活性も亢進させた。以上のことからSPFが、スクアレンエポキシダーゼの段階の酵素的な促進と生合成酵素の転写制御という2つのメカニズムによる、コレステロール生合成の強力な活性化因子であることが示唆される。その一方で、肝臓に由来する培養細胞にはSPFの発現が認められなかったが、これらの培養細胞は正常なコレステロール生合成能を保持していることが分かっている。またラット初代培養肝細胞においてもSPFの発現は速やかに減少した。従って、SPFは個々の細胞レベルでのコレステロール産生には必要では無く、臓器全体の機能として必要な蛋白質ではないかと考えられる。それではこのような蛋白質がなぜ臓器では必要なのであろうか。SPFが特に高く発現している臓器は、生体内のコレステロール生合成のおよそ9割をまかなうと言われている肝臓と小腸である。従って、一つの可能性として、こうした臓器におけるコレステロール生合成の特異性を規定するのにSPFが関わっているのかもしれない。生体内のコレステロール産生の中心臓器である肝臓と小腸では、常に循環血中のコレステロール量をモニターしながら、生体全体のコレステロールバランスの

維持に努めている。従って場合によっては、肝臓や小腸の細胞自身では必要としないほど量のコレステロールを生合成する必要もある。このような状況にSPFが関与しているのではないだろうか。勿論この場合、コレステロールレベルに応じたSPFの発現量ないしその活性の制御が行われる必要があるが、まだこの点については明らかになっておらず、今後の更なる解析が必要となる。以上のように考察すると、SPFの生理機能を明らかにするには、SPFノックアウトマウスを作製し、このマウスのコレステロール代謝及びその恒常性がどのようにになっているかという点について解析をする必要があると考えられ、現在その作製に着手している。今後このSPFノックアウトマウスを用いた解析により、コレステロールの恒常性に対してSPFがどのような役割を果たすのか、引いてはSPFによって行われるコレステロール生合成の新たな制御機構が明らかにしていきたいと考えている。

5. 結論

本年度の研究において我々はHDL受容体結合蛋白質(CLAMP)に関して、以下の点を明らかにした。CLAMPのPDZドメイン3及び4が欠損したPDZ-1-2-をアデノウィルス発現系を用いてマウス肝臓に過剰発現させると、SR-BI蛋白質の発現量が減少すること、HDLのクリアランスが遅くなり、血漿HDLコレステロール濃度が上昇することを明らかにした。

ノーベル賞受賞者のKonrad Blochがかつて報告した、スクアレンエポキシダーゼの活性を促進する可溶性因子SPFに関して、本年度の研究において我々は以下の点を明らかにした。

- ・スクアレンエポキシダーゼの活性を促進活性を指標に、ラット肝臓可溶性画分よりSPFの精製・cDNAクローニングに世界で初めて成功し、このような蛋白質が実際に存在することが明らかにした。
- ・SPFは403アミノ酸から成る新規蛋白質で、一次構造上 α -TTP等を含む脂質輸送蛋白質ファミリーに属し、スクアレン及びスクアレン-2,3-オキサイドを認識し輸送する活性を持つことを明らかにした。
- ・SPFはほとんどの培養細胞には発現しておらず、また初代培養肝細胞でもその発現は速やかに消失したことから、SPFは分化状態に応じた発現制御機構を持っていると示唆された。
- ・培養肝細胞を用いた実験より、SPFはコレステロール生合成の強力な活性化因子であることを明らかにした。
- ・SPFは肝臓や小腸といったコレステロール生合成の盛んな臓器で特に高く発現していることを明らかにした。
- ・SPFは個々の細胞のコレステロール生合成には必須の因子ではないが、肝臓や小腸といったコレステロールを大量に合成し他の組織に供給するような臓器でのコレステロール生合成を促進する因子である可能性が示唆された。

6. 研究発表

(原著論文)

- (1) Supernatant protein factor (SPF), which stimulates the conversion of squalene to lanosterol, is a novel cytosolic squalene transfer protein and enhances cholesterol biosynthesis.
N. Shibata, M. Arita, Y. Misaki, N. Dohmae, K. Takio, T. Ono, K. Inoue, H. Arai

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 2244-2249 (2001)
- (2) Scavenger receptor class B type I-mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products.
N. Ohgami, R. Nagai, A. Miyazaki, M. Ikemoto, H. Arai, S. Horiuchi, H. Nakayama
J. Biol. Chem. in press (2001)
- (3) α -Tocopherol transfer protein is important for the normal development of placental labyrinthine trophoblasts in mice.
K. Jishage, M. Arita, K. Igarashi, T. Iwata, M. Watanabe, M. Ogawa, O. Ueda, K Inoue, H. Arai, H. Suzuki
J. Biol. Chem., 276, 1669-1672 (2001)
- (4) CD36, a member of class B scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products (AGE).
N. Ohgami, R. Nagai, M. Ikemoto, H. Arai, A. Kuniyasu, S. Horiuchi, H. Nakayama
J. Biol. Chem. 276, 3195-3202 (2001)
- (5) Identification of a PDZ-domain-containing protein that interacts with the scavenger receptor class B type I.
M. Ikemoto, H. Arai, D. Fen, K. Tanaka, J. Aoki, N. Dohmae, K. Takio, H. Adachi, M. Tsujimoto, K. Inoue
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97, 6538-6543 (2000)**
- (6) Platelet-activating factor (PAF)-dependent transacetylase and its relationship with PAF acetylhydrolases.
K. Bae, L. Longobardi, K. Karasawa, B.. Malone, T. Inoue, J. Aoki, H. Arai, K. Inoue, .T.-c. Lee
J. Biol. Chem., 275, 26704-26709 (2000)
- (7) Postmortem study of ataxia with retinitis pigmentosa by mutation of the α -tocopherol transfer protein gene.
T. Yokota, T. Uchihara, J. Kumagai, T. Shiojiri, M. Arita, H. Arai, M. Hayashi, R. Okeda, H. Mizusawa
J. Neurol. Neurosur. Psychi., 68, 521-525 (2000)
- (8) Dual Pathways for the Secretion of Lysosomal Cholesterol into a Medium from Cultured Macrophages.
M. Ikemoto, T. Furuchi, H. Arai, K. Inoue.
J. Biochem, 128, 251-259 (2000)

(総説)

1) 新井洋由

「スカベンジャー受容体の多様性」

THERAPEUTIC RESEARCH, 21,40-46, (2000)

2) 池本守、新井洋由

「HDL受容体ファミリー」

日本臨床, 59, 389-394, (2001)

3) 石井淳子、新井洋由

「Scavenger receptor expressed by endothelial cells (SREC)」

日本臨床, 59, 379-383, (2001)

4) 池本守、新井洋由

「スカベンジャー受容体ファミリーと異物排除の分子機構」

生化学,73, 161-166, (2001)

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

生体機能調節等の解明に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社