

平成15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

創薬のための生体機能解析に関する研究

目 次

課題番号

<p>20030895A KH21009</p>	リン脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	西島正弘 …… 1
<p>896A KH21010</p>	低酸素センサーを介する虚血性および変性性神経疾患の機序解明と新規治療薬開発	芝崎 太 …… 6
<p>897A KH21011</p>	細胞内情報伝達分子を標的とした抗ウイルス剤および抗癌剤の開発	松田道行 …… 19 新井洋由 …… 25
<p>898A KH21012</p>	抗動脈硬化性リポ蛋白質HDLの代謝制御機構	葛西正孝 …… 33
<p>899A KH21013</p>	ゲノム修復と細胞分裂に関連する因子の構造機能解析と応用に関する研究	井上和秀 …… 39
<p>900A KH21014</p>	難治性疼痛に関与するATP受容体の機能解析と医療への応用	望月直樹 …… 47
<p>901A KH21015</p>	動脈硬化症進展阻止のための血管内皮細胞特異的発現EDG受容体作働薬・拮抗薬の開発	上原至雅 …… 51
<p>902A KH21016</p>	天然物由来シグナル伝達制御物質の探索と創薬への応用に関する研究	江崎 治 …… 55
<p>903A KH21017</p>	肥満／糖尿病発症予防のためのターゲット遺伝子の同定と制御法の開発	絵野沢 伸 …… 59
<p>904A KH21018</p>	ゲノム情報にもとづいた移植免疫抑制にかかわる遺伝子の検索と創薬への応用に関する研究	田平 武 …… 62
<p>905A KH21019</p>	神経・免疫・内分泌相関による生体防御機構の解明と創薬	若宮伸隆 …… 67
<p>906A KH21020</p>	レクチン機能を利用した血管における生体防御システムの解明と創薬への応用	鈴木和男 …… 74
<p>907A KH21021</p>	感染症に関連した免疫異常の解析と新規制御物質の開発	川 茂幸 …… 84
<p>908A KH21022</p>	自己免疫性膵炎発症に関連するIgG 4型抗体の認識する自己抗原の検索、ならびに特異的診断システムの開発	北川隆之 …… 89
<p>909A KH21024</p>	動物細胞におけるラフト等の脂質膜ドメインを介した生体機能調節機構の解析と疾病関連因子探索への応用	山越 智 …… 95
<p>910A KH21025</p>	新規サイトカインの炎症性疾患における役割の解析と創薬への応用	辻本豪三 …… 104
<p>911A KH21026</p>	マイクロアレイDNAチップを用いた各種病態関連発現遺伝子の解析	桃井 隆 …… 111
<p>912A KH21027</p>	細胞死をもたらすストレスシグナル伝達機構の解析および生体防御機構の解明	鈴木康夫 …… 118
<p>913A KH22071</p>	ウイルスの侵入および発芽過程を標的とした次世代抗インフルエンザ薬の開発	吉村昭彦 …… 121
<p>914A KH22072</p>	サイトカインシグナル制御分子による慢性関節リウマチの治療薬の開発	宮武昌一郎 …… 125
<p>915A KH22073</p>	T細胞の活性化およびヘルパーT細胞サブセットの分化を特異的に制御する手法の樹立	目加田英輔 …… 133
<p>916A KH22082</p>	変異型HB-EGFノックインマウスによる循環器疾患の解析	

抗動脈硬化性リポ蛋白質HDLの代謝制御機構

所属 東京大学大学院薬学系研究科
研究者 新井 洋由

研究要旨：抗動脈硬化性リポ蛋白質 HDL の新しい制御機構の解明を目的に研究を行った。その結果、HDL 受容体結合蛋白質、肝臓におけるコレステロール生合成、食餌性高度不飽和脂肪酸という各視点から、HDL レベルの新たな調節機構を見出した。

分担研究者

- (1) 独立行政法人国立健康・栄養研究所 生活習慣病研究部 仲谷照代
(2) エーザイ（株）フロンティア研究所 創薬研究本部 佐伯隆生

A. 研究目的

わが国を含め欧米の先進国においては、虚血性心疾患や脳卒中などの動脈硬化性疾患は死因の上位を占め大きな社会問題となっており、動脈硬化に対する効率的な予防手段、ならびに有効な治療薬を開発することの意義は非常に大きい。動脈硬化症は血管壁内皮下にコレステロールが蓄積することにより起こる病気である。血中の低比重リポ蛋白質(LDL)はコレステロールを血管壁に蓄積させる作用があり、逆に高比重リポ蛋白質(HDL)は血管壁に蓄積したコレステロールを搬出し、最終的に肝臓に輸送する、いわゆるコレステロール逆転送作用を有している。したがって、HDL は抗動脈硬化作用を有すると考えられており、疫学的にも HDL レベルと動脈硬化症の発症率には逆相関が示されている。これまで LDL に関する研究に注目が集まり、そのレセプターを含めて合成および代謝機構が詳細に解明されてきた。また、スタチン系の薬物を中心とした LDL コレステロール低下剤が開発され、臨床現場においてもそれらの有効性が明らかにされてきている。一方、これまで抗動脈硬化作用を持つ HDL の生成・代謝機構等の解明は遅れているが、動脈硬化症をより効率的に防ぐには LDL を低下させるだけでなく、HDL

の抗動脈硬化作用を亢進させる薬物の開発の必要性にも関心が高まっている。HDL の代謝機構および HDL コレステロールの肝臓への受け渡し機構を詳細に解明することは、動脈硬化症領域における最重要課題の 1 つと言える。本研究では、動脈硬化治療薬の開発に新たな標的を提供することを目指して、我々独自の発見に基づいた新たな角度から HDL の合成・分解の調節機構、および肝臓への末梢コレステロールの転送機構について解明することを目的としている。

肝臓における HDL の受容体として SR-BI という膜蛋白質が同定されており、生理的にも HDL 代謝に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。研究代表者の新井らは、これまでに HDL レセプター-SR-BI と結合する新規蛋白質 (CLAMP と命名) を単離・同定した。この蛋白質を手がかりに、肝臓内 HDL レセプター-SR-BI の新規制御機構の解明を目的として、CLAMP による新たな HDL 調節機構について検討した。

ところで、肝臓と小腸は、全身で必要なコレステロールの大半が生合成し、全身に供給していることから、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。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が本体は不明のままであった。我々は、SPF の精製・クローニングに世界で初めて成功した。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、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 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。

一方、多価不飽和脂肪酸は血中 HDL レベルを増加すること、脂質代謝系酵素・受容体遺伝子などの発現調節に機能することが報告されている。とくに、核内受容体 PPAR や脂質代謝系遺伝子の転写因子 SREBP を介した長鎖脂肪酸の作用が注目を集めている。魚油には n-3 系脂肪酸が含まれているので、魚油摂取により肝臓の遺伝子発現が大きく変動する。分担研究者の中谷は、HDL 粒子の性質に関連する遺伝子、Hepatic triglyceride lipase (HTGL), scavenger receptor class B, type I (SR-BI), phospholipids transfer protein (PLTP), 及び cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) の肝臓での発現変動を魚油摂取により、どのように変動するか調べ、魚油の HDL 粒子への影響を推定した。

血中リポ蛋白組成の種差の問題から、小動物での動脈硬化モデルは数少なく、特に HDL 代謝を評価できるモデルは皆無に等しい。Cholesteryl ester transfer protein (CETP) は血中 HDL コレステロールの濃度、HDL 粒子のサイズ、さらには動脈硬化病変形成に影響を与える重要な因子である。しかし、モデル動物として多用されているマウスでは CETP が欠損している。このような状況下、遺伝子改変技術により CETP を発現するトランスジェニックマウスがいくつか報告され、HDL、CETP と動脈硬化病変形成の関係を探る *in vivo* モデルとして利

用されている。分担研究者佐伯は、動脈硬化の *in vivo* 評価モデル作製を目指し、マウスメタロチオネイン (MT) プロモーター/サル CETP cDNA を組み込んだトランスジェニック (Tg) マウス、C57BL/6-Tg(CETP)1Pnu を導入した。このマウスを用いて、正常マウスの HDL-C を上昇させるとの報告がある liver X receptor (LXR) アゴニストの作用について本トランスジェニックマウスを用いて検討した。

B. 研究方法

昨年度までの研究で、CLAMP がリン酸化されていること、およびそのリン酸化部位を特定していた。そこで、このリン酸化が SR-BI の発現に対してどのような影響を及ぼすか検討した。まず、内在的に SR-BI を発現する肝実質細胞の細胞株 Fao 細胞を用いて、肝細胞株に効率よく CLAMP を発現させるために、CLAMP およびリン酸化アミノ酸を変異させた CLAMP のアデノウイルスベクターを構築した。これらのアデノウイルスベクターを Fao 細胞に導入し、SR-BI 蛋白質の発現量をウ Western Blot 法により検討した。

SPF 欠損マウスの作製

マウス SPF は 11 番染色体上に約 23 kb にわたってコードされており、12 個のエクソンからなる。このうちエクソン 3,4,5 をネオマイシン耐性遺伝子に相同組換えさせて SPF 欠損マウスを作製した。こうして作製された SPF 欠損マウスとその同腹の仔である正常型マウスに対して、肝臓を摘出し、定量 PCR や Western Blot 法により、SPF 及びコレステロール生合成系酵素の mRNA 量や蛋白質発現量を調べた。

コレステロール欠乏/過剰食実験は次のように行った。C57BL/6J マウスを CR-LPF (コレステロール 0.03%含有) のみのコレステロール欠乏食、或いは CR-LPF に 2%コレステロールを添加したコレステロール過剰食を 6 日間与え、明暗 12 時間周期で飼育した。このマウスから肝臓を摘出し、定量 PCR や Western Blot 法により、コレステロール生合成系酵素の mRNA

量や SPF の mRNA 量や蛋白質発現量を調べた。

核内受容体合成アゴニスト投与実験は次のように行った。C57BL/6J マウスに PPAR α アゴニスト Fenofibrate と Ciprofibrate は 0.2 % 混餌で、PPAR δ アゴニスト GW50156 は 0.5 % メチルセルロース水溶液で懸濁液にして 10 mg/kg 経口投与で、PPAR γ アゴニスト Rosiglitazone は 0.5% メチルセルロース水溶液で懸濁液にして 10 mg/kg 経口投与で、LXR α アゴニスト T0901317 は 0.5 % メチルセルロース水溶液で懸濁液にして 50 mg/kg 経口投与で、FXR アゴニスト Cholic acid は 0.5% 混餌で 6 日間与え、明暗 12 時間周期で飼育した。こうした薬剤処理を施したマウスから肝臓を摘出し、定量 PCR や Western Blot 法により、SPF の mRNA 量や蛋白質発現量を調べた。

絶食状態における血漿脂質の測定は次のように行った。明暗 12 時間周期でしばらく飼育した 6 週齢雄の SPF 欠損マウスとその同腹の仔である正常型マウスに対して、暗期 4 時間から絶食を開始して、そのまま 48 時間飼育する。これらのマウスから絶食直前、24 時間後、48 時間後に眼窩静脈叢より採血し、血漿を調製し、コレステロール、トリグリセリド、グルコース濃度を測定した。

絶食状態における肝臓での SPF の発現量は次のように調べた。明暗 12 時間周期でしばらく飼育した 7 週齢雄の C57BL/6J マウスに対して、暗期 4 時間から絶食を開始する。絶食直前、絶食 24 時間後、48 時間後のマウスから、肝臓可溶性画分を調製し、Western Blot 法により肝臓での SPF の発現量を調べた。

絶食状態における肝臓でのコレステロール生合成酵素の発現量は次のように調べた。明暗 12 時間周期でしばらく飼育した 7 週齢雄の SPF 欠損マウスとその同腹の仔である正常型マウスに対して、暗期 4 時間から絶食を開始する。絶食直前、或いは絶食 24 時間後のマウス肝臓より total RNA を調製し、定量 PCR により、コレステロール生合成系の酵素、具体的には HMG-CoA synthase, HMG-CoA reductase, Squalene

synthase, Squalene epoxidase, Lanosterol synthase の発現量を調べた。

絶食状態における肝臓コレステロール生合成能の測定は次のように行った。明暗 12 時間周期でしばらく飼育した 7 週齢雄の SPF 欠損マウスとその同腹の仔である正常型マウスに対して、暗期 4 時間から絶食を開始する。絶食直前、或いは絶食 24 時間後のマウスに、RS-[2-14C] Mevalonolactone (1 mCi/0.2 mmol) の PBS 溶液を腹腔内投与する。投与して 30 分後に肝臓を摘出し、Bligh & Dyer 法により全脂質を抽出する。抽出溶液をエバポレーションした後、残査を 20 ml のクロロホルム/メタノール=2/1 に溶かして、TLC プレートにアプライする。石油エーテル/ジエチルエーテル/酢酸 = 70/30/2 の展開溶液で展開して、BAS1800 を用いて解析し、コレステロールの産生量を求めた。

低脂肪食、高脂肪食の 2 つの実験条件下の魚油 30 en% の効果を調べた。C57BL/6J 雌マウスを 4 群に分け、低脂肪食 (10 en% のサフラワー油)、低脂肪食 (10 en% のサフラワー油) + 魚油 (30 en%)、高脂肪食 (40 en% のサフラワー油)、高脂肪食 (40 en% のサフラワー油) + 魚油 (30 en%) の 4 群に分けて 4 ヶ月間飼育し、肝臓から RNA を抽出し、ノーザンブロット法で目的とする遺伝子の発現量を推定した。

C57BL/6-Tg(CETP)1Pnu のヘミ接合体系統のホモ化に向け、野生型マウスとヘミ/ホモマウスを識別するための血中 CETP 活性測定系の構築、後代検定を用いたホモ個体の選抜を実施した。LXR アゴニストの投与実験には Tg ホモマウスと B6 マウスとの N2 世代を用いた。ヘミ個体と野生型個体の識別は血中 CETP 活性を測定して行った。それぞれの遺伝子型群をコントロール群と T0101317 投与群 (10 mg/kg/day) に分け、9 日間経口投与した。投与後、血中脂質を測定するとともに肝中性脂質の測定、肝遺伝子発現の測定、血漿リポ蛋白質・アポリポタンパク質の解析を実施した。

C. 研究結果

最近米国のグループにより CLAMP のノックアウトマウスが作製され、このマウスでは肝臓の SR-BI 蛋白質が減少し、血中 HDL が増加していることが示され、CLAMP が *in vivo* でも SR-BI の制御に関わっていることが証明された。我々はまた、この SR-BI 蛋白質の安定化作用には、SR-BI と結合する CLAMP の N 末端側 PDZ ドメイン以外に、CLAMP の C 末端領域も必要であることを明らかにした。さらにこの C 末端領域に存在する 2 つのセリン残基 (509 番目と 512 番目) が肝臓内でリン酸化されていることがわかった。そこで、これら 2 つのセリン残基をアラニンに置換したところ、SR-BI 蛋白質の安定化作用が全く失われることが明らかになった。すなわち、CLAMP による SR-BI 蛋白質の安定化作用は CLAMP のリン酸化により制御されていることが示唆された。

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。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。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。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。

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。このことから 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。検討した薬剤の中で、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場合のみ、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。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。

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。生体は飢餓状態におかれると、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 の発現にどのような影響を与えるか検討した。その結果、野生型マウスを 24 時間絶食させたところ、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。そこで SPF 欠損マウスにおいて飢餓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。

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。

HTGL は肝臓で発現し、IDL, LDL, HDL の中性脂肪を肝細胞表面で分解する酵素である。魚油は、低脂肪食下で HTGL の発現量を 1.6 倍に増加させたが、高脂肪食では変化させなかった。魚油は、低脂肪食下でも高脂肪食でも、HDL 受容体 SR-BI の発現量を変化させなかった。PLTP は HDL3 粒子をより大きな粒子と末梢組織からのコレステロール引き抜き作用の強い preb-HDL へと変換する。魚油は、低脂肪食下でも高脂肪食でも、PLTP の発現量を 50% 減少させた。血清 PLTP 活性は BMI, 血中中性脂肪値と正相関があり、PLTP は悪玉と考えられている。魚油は、低脂肪食下でも高脂肪食でも、PLTP の発現量を 50% 減少させ、魚油の中性脂肪減少の 1 つの原因と考えられる。しかし、コレステロール引き抜き作用の強い preb-HDL を減少させる可能性もあり、今後さらに魚油摂取による PLTP 発現減少による影響を検討する必要がある。

LXR アゴニスト T0901317 投与によって、野生型マウスでは血漿 HDL-C の増加とともに、HDL 粒子サイズの増加が観察された。一方、Tg マウスでは HDL-C の若干の増加が認められたが、粒子サイズの増加はなかった。HDL 画分におけるリン脂質の増加はいずれのマウスにも見られた。ウェスタンブロットによって野生型ホモ個体では、T0901317 投与によって ApoA-I の増加とともに ApoA-II の増加が観察された。一方、CETP-Tg マウスでは野生型マウスと比べ、ApoA-I 及び ApoA-II の発現はともに低かった。T0901317 投与は、ApoA-I を若干増加させたが、ApoA-II の発現は変えなかった。肝中のコレステロール、リン脂質は T0901317 投与によっていずれの遺伝子型群も増加するとともに、肝重量も有意に増えた。肝の fatty acid synthase (FAS), PLTP, lipoprotein lipase (LPL) mRNA は T0901317 によって野生型マウス、CETP-Tg マウスともに発現は上昇した。

我々が用いた CETP-Tg マウスでは T0901317 投与によって HDL-C の若干の増加が認められ、これはヒト ApoA-I プロモーターで CETP を発

現させている Tg マウスの結果と同様であった。しかし、ヒト CETP ゲノムをそのまま導入したマウス、すなわち CETP 発現がその本来のプロモーターによって調節されている Tg マウスでは、T0901317 は HDL をなんら変動させないことが報告されている。ヒト CETP 遺伝子のプロモーターには LXR レスポンスエレメントが存在し、LXR アゴニスト投与によって肝 CETP mRNA が増加し、それとともに血中 CETP 活性が増加する。これが HDL のレベル及びサイズに変化を起こさせない原因と考えられている。これを裏付けるように、ApoA-I プロモーター/CETP-Tg マウスでは CETP 活性は変動しない。このように導入された遺伝子がどのような支配下にあるかによって、表現型、例えば化合物に対する反応性が異なることがわかってきた。

D. 考察

SR-BI の発現およびコレステロール逆転送系に CLAMP が重要な役割をしていることはこれまでに細胞レベル、個体レベルでの解析から明らかになっている。Kocher らは CLAMP のノックアウトマウスにおいて肝臓における SR-BI 蛋白質の発現が著しく低下していることを示している。これらの個体では血中コレステロール量の変化がみられ、SR-BI ノックアウトマウスに似た挙動を示すことが示されている。このように CLAMP と SR-BI の蛋白質発現量には相関が見られ、CLAMP の蛋白質発現が SR-BI の蛋白質発現量を制御していることが考えられる。また、この蛋白質発現量の変化は post-transcriptional に調節されることが明らかになっている。今回、我々は SR-BI の発現の安定化には CLAMP の C 末端のリン酸化が関与することを示したが、SR-BI が結合する N 末 PDZ ドメイン以外に SR-BI 蛋白質の発現制御に関与することを示した初めての例であると思われる。また、今回の点変異でのリン酸化の検討において、Ser 509 と Ser 512 のいずれかをアラニンに置換するとどちらの変異でもリン酸化は見られなくなった。CLAMP がどのようにリン酸

化されているか、どのような生理的条件下においてリン酸化状態が変化するかはまだ明らかになっていない。これまでに PDZ ドメインを持つ蛋白質がリン酸化される例はいくつか報告されている。最近、CLAMP の結合蛋白質として PKA 結合蛋白質である D-AKAP が報告された。これまでに AKAP が PKA カスケードを活性化することが知られており、PKA もまた検索システムを用いると CLAMP のリン酸化候補の候補となりうることから PKA により CLAMP のリン酸化が制御される可能性も考えられる。我々は以前、CLAMP が SR-BI の basolateral 側に極性局在することに関与していることを示唆するデータを示しており、CLAMP のリン酸化がこの現象に関わっている可能性が考えられ興味深い。今後、CLAMP のリン酸化がどのように制御されているか明らかにしていく必要がある。今後、CLAMP リン酸化による SR-BI の制御機構は明らかにしていくべき課題であるが、CLAMP のリン酸化により制御される蛋白質を見つけることで SR-BI と CLAMP の制御メカニズムを明らかにしていくことはできるかもしれない。

生体にとってコレステロールは必要不可欠な成分であり、飢餓状態のように外部からの摂取が全くできない状況では、生合成によりコレステロールレベルを維持する必要がある。実際、飢餓状態になっても血中トリグリセリドは低下するが、血中コレステロールは殆ど変化しないことがこれまで報告されている。しかしその一方で生体は飢餓状態におかれると、コレステロール生合成酵素の転写制御因子 SREBP の転写活性が低下し、その結果 HMG-CoA 合成酵素や HMG-CoA 還元酵素といった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。またこれらの酵素を含め、更にスクアレン合成酵素やスクアレンエポキシダーゼについても mRNA 発現が大幅に低下することを私は確認している。従ってコレステロール生合成酵素の転写発現が低下しているにもかかわらず、なぜ血中のコレステロールレベルが維持

されるのかという問題が生じる。しかしこれまでは飢餓は血中コレステロールレベルに関係しないと考えられ、この問題は殆ど顧みられず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、飢餓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(Fig.7)。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。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を解明することが今後の課題である。

HDL 関連遺伝子の中で、PLTP の発現量が魚油摂取により発現量が減少することを見出した。血清 PLTP 活性は BMI、血中中性脂肪値と正相関があり、PLTP は悪玉と考えられている。魚油は、低脂肪食下でも高脂肪食でも、PLTP の発現量を 50%減少させ、魚油の中性脂肪減少の 1 つの原因と考えられる。しかし、コレステロール引き抜き作用の強い preb-HDL を減少させる可能性もあり、今後さらに魚油摂取による PLTP 発現減少による影響を検討する必要がある。また、PLTP は LXR agonist により、発現量が増加することが知られており、魚油は LXR 活性を阻害する可能性がある。

我々が用いた CETP-Tg マウスでは T0901317 投与によって HDL-C の若干の増加が認められ、これはヒト ApoA-I プロモーターで CETP を発現させている Tg マウスの結果と同様であった (Jiang, *et al.* J. Biol. Chem. 278:49072 (2003))。しかし、ヒト CETP ゲノムをそのまま導入したマウス、すなわち CETP 発現がその本来のプロモーターによって調節されている Tg マウスでは、T0901317 は HDL をなんら変動させないことが報告されている (Masson, *et al.* J. Lipid Res. 45:543 (2004))。ヒト CETP 遺伝子のプロモーターには LXR レスポンスエレメ

ントが存在し、LXR アゴニスト投与によって肝 CETP mRNA が増加し、それとともに血中 CETP 活性が増加する。これが HDL のレベル及びサイズに変化を起こさせない原因と考えられている。これを裏付けるように、ApoA-I プロモーター/CETP-Tg マウスでは CETP 活性は変動しない。今回用いた MT/CETP-Tg マウスでの血中 CETP 活性測定は実施していないので、実際にどうなのか興味を持たれる。

E. 結論

HDL 受容体 SR-BI の結合蛋白質である CLAMP の C 末端側のセリン残基がリン酸化されていることが分かった。さらにこのリン酸化が CLAMP による SR-BI 蛋白質の安定化に深く関わることが示された。

肝臓や小腸に選択的に発現するコレステロール生合成促進蛋白質 SPF のノックアウトマウスの作製に成功した。このマウスは、正常食を与えている状態では血中コレステロールレベルに野生型マウスと差は見られなかったが、飢餓状態にすると野生型マウスに比べて有意にコレステロールレベルが低下することが明らかになった。

HDL 関連遺伝子の中で、リン脂質転送蛋白質 (PLTP) の発現量が高度不飽和脂肪酸を多く含む魚油摂取により発現量が減少することを見出した。

LXR アゴニスト投与により CETP トランスジェニックマウスの HDL コレステロールレベルを若干上昇させることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fibrates downregulate hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI) protein expression in mice. : P.Mardones, A.Pilon, M.Bouly, D.Duran, T.Nishimoto, H.Arai, F.Kozarsky, M.Altayo, J.F.Miquel, G.Luc, V.Clavey, B.Staels and A.Rigotti, J. Biol. Chem. 278, 7884-7890 (2003)

2. Vascular remodeling induced by naturally occurring unsaturated lysophosphatidic acid *in vivo*.: K. Yoshida, W. Nishida, K. Hayashi, Y. Ohkawa, A. Ogawa, J. Aoki, H. Arai and K. Sobue, Circulation 108, 1746-1752 (2003)

3. Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPAR γ agonist. : T.M.McIntyre, A.V.Pontsler, A.R.Silva, A.Hilaire, Y.Xu, J.C.Hinshaw, G.A.Zimmerman, K.Hama, J.Aoki, H.Arai, and G.D.Prestwich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 131-136 (2003)

2. 学会発表

1) スクアレンエポキシダーゼ活性促進因子 SPF

柴田識人、辻本雅文、寺社下浩一、新井洋由
第 35 回 日本動脈硬化学会総会、京都 (2003.9)

2) SR-BI 結合蛋白質 CLAMP のフィブラートによる発現制御とリン酸化の意義

西本貴子、柴田識人、新井洋由
第 35 回 日本動脈硬化学会総会、京都 (2003.9)

3) Supernatant protein factor (SPF), a cytosolic squalene epoxidase regulator

Norihito Shibata, Masafumi Tsujimoto, Kouichi Jishage, and Hiroyuki Arai

The 13th International Symposium on Atherosclerosis Society, Kyoto, Japan. (2003.10)

4) CLAMP, SR-BI C-terminal binding protein, regulates the SR-BI protein expression level in the liver.

Nishimoto Takako, Mamoru Ikemoto, Dongdong Feng, Noayuki Isoo, Kazuhisa Tsukamoto, and Hiroyuki Arai

The 13th International Symposium on Atherosclerosis Society, Kyoto, Japan.

(2003.10)

5) SR-BI-associated protein CLAMP (PDZK1)

Hiroyuki Arai

The 13th International Symposium on Atherosclerosis Society, Kyoto, Japan.

(2003.10)

6) Supernatant protein factor (SPF), a cytosolic squalene epoxidase regulator

Norihito Shibata, Masafumi Tsujimoto, Kouichi Jishage, and Hiroyuki Arai

The 76th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Yokohama, Japan,

(2003.10)

7) Regulation of HDL receptor SR-B1 and its associated protein CLAMP by PPAR-alpha agonist fibrates at a protein level.

Toshiyuki Nakamura, Takako Nishimoto, Norihito Shibata, Hiroyuki Arai

The 76th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Yokohama, Japan, (2003.10)

8) コレステロール生合成促進因子 SPF ノックアウトマウスの作製と解析

柴田識人、辻本雅文、寺社下浩一、新井洋由

フォーラム2003 衛生薬学・環境トキシコロジー 仙台 (2003.10)

9) 高脂血症治療薬フィブラートのコレステロール代謝系への影響

中村俊行, 西本貴子, 柴田識人, 新井洋由 (東京大・薬)

フォーラム2003 衛生薬学・環境トキシコロジー 仙台 (2003.10)

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

平成15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

創薬のための生体機能解析に関する研究

平成16年9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