

コレステロール合成酵素 SM の安定性を調節する
フィードフォワード型恒常性維持機構の発見とその解析

吉岡広大

はじめに

今から約90年前、Rudolph Schoenheimerらによって、コレステロールを過剰に摂取したマウスは体内のコレステロール合成量が減弱するという報告がなされた。当時コレステロール合成の制御機構はほとんど不明であったが、彼らの報告はコレステロールホメオスタシスの維持におけるネガティブフィードバックの存在を示唆したものであった。その後、いくつかのグループによってコレステロールによるネガティブフィードバック制御を司る標的の探索が行われていたようである。Konard E. Blochらにより、コレステロール生合成経路が明らかになり、Micheal S. Brown、Joseph L. Goldsteinらによるコレステロール合成酵素群のマスターレギュレーター、SREBP-2の発見は転写レベルでのコレステロールによるネガティブフィードバック制御の解明を大きく進展させた。生体内において、過剰なコレステロールはSREBP-2の転写を抑制し、コレステロール合成酵素群の発現を低下させる。

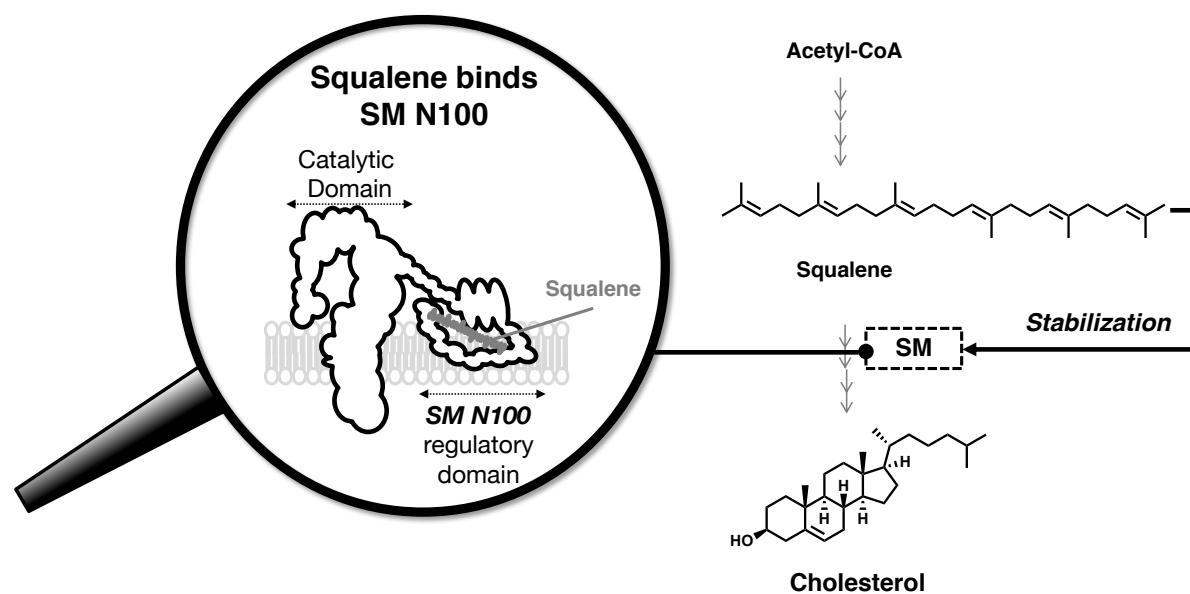
また、コレステロール合成の転写レベルでの制御が明らかになると同時に、コレステロール合成酵素の中には翻訳後レベルでもステロールによる制御を受けるものが存在することが明らかになった。コレステロール合成の律速酵素であるHMGCR (HMG-CoA Reductase) がその第1例であり、生体内に蓄積した酸化ステロールやコレステロール合成経路の中間体であるラノステロールにより分解が誘導される。このような分解を介した作用は転写レベルでの制御と比較して、短いタイムスケールで作用するものであり、転写レベルでの制御に加えてコレステロール合成のホメオスタシス維持に重要であると考えられている。

さらに近年では、コレステロール合成経路においてHMGCRの下流で働く、SM (Squalene Monooxygenase) も同様にステロール依存的な分解を受けることが明らかとなった。HMGCRはコレステロールだけでなく、イソプレノイドの合成にも関与していることから、HMGCRの分解はステロール選択的な遮断経路ではない。SMの分解に関する生理的な意義については議論の最中であるが、ステロールのみ合成を抑えるネガティブフィードバックとしてはSMの分解が適しており、SMがHMGCRに続く、コレステロール合成における第2の制御ポイントである可能性が示唆されている。

このようにコレステロール合成は転写レベルと翻訳後レベルでの二つの経路からネガティブフ

フィードバック制御を受けていることが明らかとなった。しかし、その精緻な制御機構に関して、分子レベルでは未解明な部分も多く残されている。SMのプロテオスタシスに関して、限られた情報しかなく、SMのステロール依存分解の機構は議論の最中である。というのも、SMの分解に必要なSMのN末端ドメイン（SM-N100）は非常に疎水性の高い領域であり、全長SMの精製を困難にしており、SM-N100の具体的な構造は未解明である。加えて、SM-N100の機能や安定性制御に関しては未知の部分が多く、これらの解析にはこれまでとは異なる方面からのアプローチもしくは様々なアプローチを組み合わせる手法が有用であると考えられた。

本研究ではケミカルジェネティクススクリーニングの手法により、SMのプロテオスタシス制御因子を低分子化合物ライブラリーから同定することを目指した。一連の解析から、SMの基質であるスクアレンがSM-N100への結合を介して、SMの安定化を誘導するという、アロステリックなフィードフォワード制御を見出すことに成功した。コレステロール合成経路においてこのような、代謝酵素が基質の蓄積によって安定化され、代謝能が亢進するといった現象が存在することはこれまでに知られていなかった。我々は化合物を用いたケミカルなアプローチから、コレステロール合成酵素の安定性を調節するポジティブフィードフォワード制御現象を見出し、コレステロールホメオスタシスの研究に寄与することができたと考えている。



本論文は以下の内容からなる

本文 1-5 章

スクアレンによる SM 安定化の発見と解析

補章

ステロールによる HMGCR の分解に関する研究

本文 1-5 章に関しては以下の学術誌に掲載済みである。

H. Yoshioka, H. W. Coates, N. K. Chua, Y. Hashimoto, A. J. Brown, K. Ohgane, A key mammalian cholesterol synthesis enzyme Squalene Monooxygenase is allosterically stabilized by its substrate, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. in press*, (2020)

また、補章 にもしても以下の学術誌に掲載済みである。

I. Sagimori*, H. Yoshioka*, Y. Hashimoto, K. Ohgane, Luciferase-based HMG-CoA reductase degradation assay for activity and selectivity profiling of oxy(lano) sterols, *Bioorg. Med. Chem.* **28** (3): 115298, (2020).

*equally contributed

目次

はじめに	3
------	---

本文

1 研究背景	7
--------	---

2 SM を安定化する化合物の発見	13
-------------------	----

3 SM 阻害剤による SM 安定化メカニズムの解析	18
----------------------------	----

4 スクアレンによる SM-N100 安定化の発見	23
---------------------------	----

5 スクアレンによる SM-N100 安定化メカニズムの解析	34
--------------------------------	----

6 結論および今後の展望	43
--------------	----

補章

1 ステロールによる SM の分解	62
-------------------	----

2 ステロールによる HMGCR の分解	65
----------------------	----

3 ステロール型ルシフェラーゼ阻害剤の発見	78
-----------------------	----

謝辞	90
----	----

1 研究背景

コレステロール合成のフィードバック制御は、転写因子としてのマスターレギュレーター SREBP-2、そしてコレステロール合成律速酵素 HMGCR と SM の研究から、多くが明らかになっている。第 1 章ではこれらのタンパクの内因性代謝物による機能制御に関して、本研究以前における知見をまとめ、本研究の方針を詳述する。

コレステロール生合成における転写レベルでの調節機構

コレステロール合成に関与する酵素群の発現は転写因子 SREBP-2 により制御されており、その転写はコレステロールにより抑制される。具体的には以下の図に示すようなモデルが提唱されている (Goldstein et al., 2006, Brown et al., 2018)。SREBP は SCAP (SREBP-cleavage activating protein) と複合体を形成し小胞体膜に局在している。コレステロールが枯渇している際は、この複合体がゴルジ体へ輸送され、プロセッシングを受け、核内へと輸送される。一方でコレステロールが過剰な状況下では、コレステロールが SCAP に結合 (Radhakrishnan et al., 2004) し、さらに SCAP-SREBP 複合体に Insig が結合し、Insig-SCAP-SREBP の三者複合体が形成される。この複合体はゴルジ体へ移行できないため、SREBP の活性化が阻害される。これまでの研究から、コレステロールは SCAP に結合 (Radhakrishnan et al., 2004)し、生体内の主たる酸化ステロールである 25HC は Insig に結合 (Radhakrishnan et al., 2007)することで、この三者複合体の形成を誘導する事がわかっている。

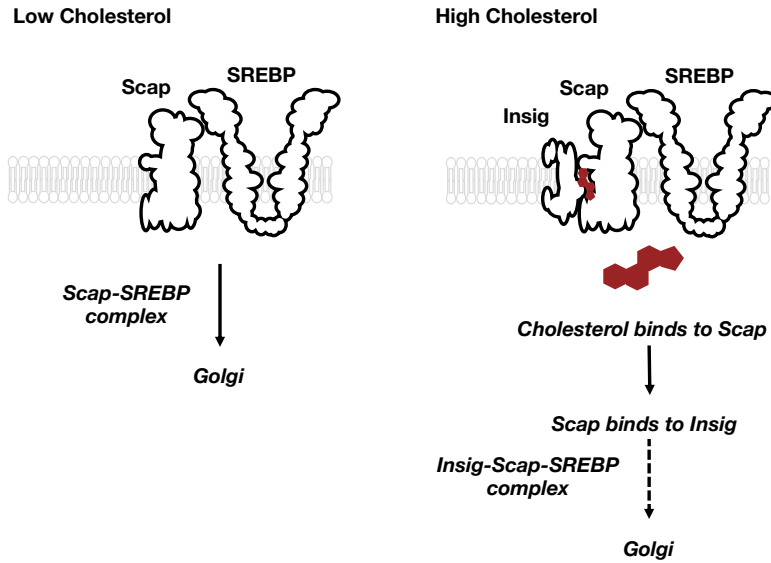


Figure 1-1. Cholesterol-mediated regulation of SREBP transcription

コレステロール生合成における翻訳後レベルでの調節機構 (HMGCR)

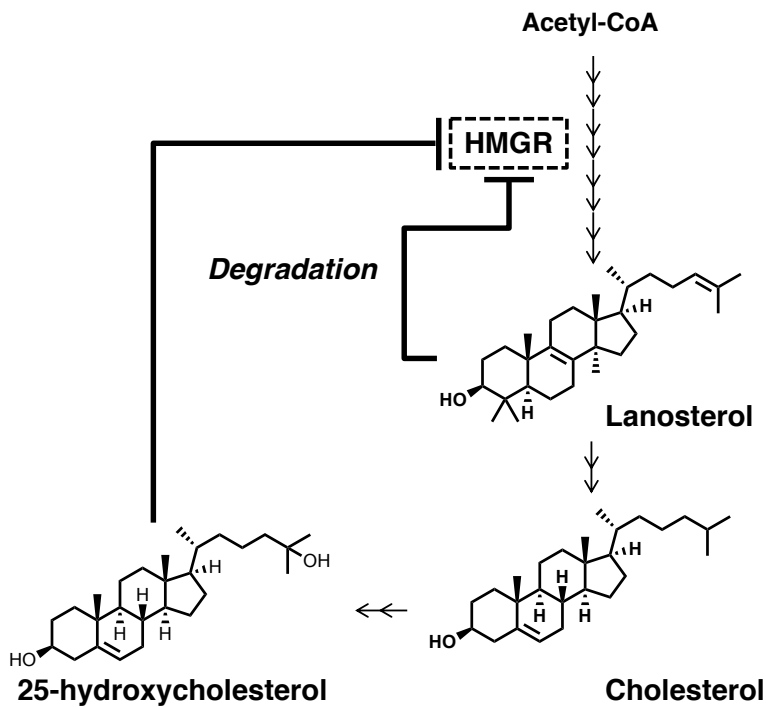


Figure 1-2. Endogeneous sterol-mediated degradation of HMGCR

上記のような転写レベルでのコレステロールによる制御に加え、いくつかのコレステロール合成酵素は翻訳後レベルでの制御、すなわちステロールによって分解が誘導される。そのような酵

素として最初に発見されたのは HMGCR (HMG-CoA reductase) である (Chin et al., 1985, Gil et al., 1985)。Insig は SREBP-SCAP と複合体を形成し、SREBP の足止めをするのみならず、E3 リガーゼをリクルートし、HMGCR と複合体を形成する。この際に HMGCR は E3 によるユビキチン化が促進され、分解される。このトリガーとなるのが 25HC をはじめとするオキシステロール (Song and Debose-boyd, 2004) やコレステロール合成の中間体である、ラノステロールや 24,25DHL である (Song et al., 2005, Chen et al., 2019)。25HC は Insig に結合することで、HMGCR と複合体を形成する。一方、ラノステロールや 24,25DHL は Insig に結合しない (Nguyen et al., 2009) が、HMGCR の分解を誘導するため、HMGCR へ直接結合し、Insig との複合体形成を促していると考えられている (Goldstein et al., 2006)。

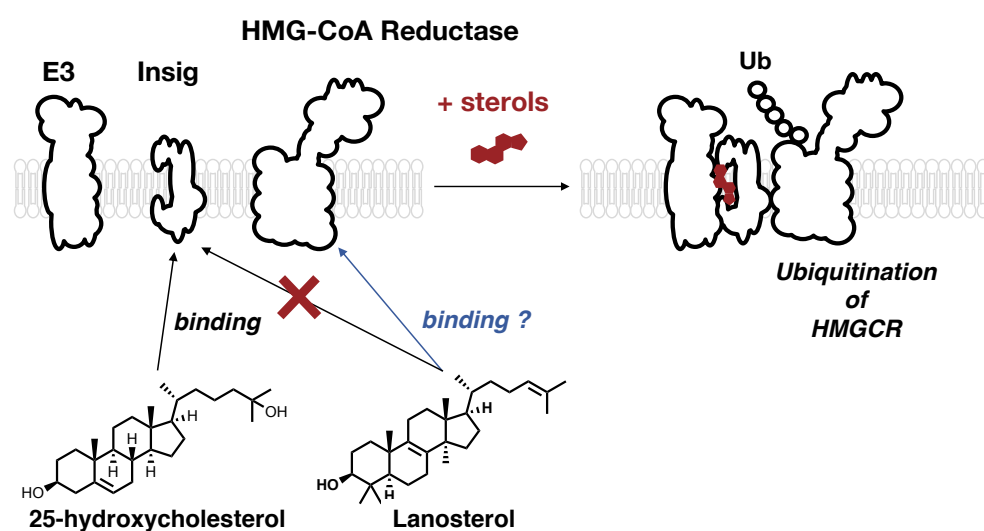


Figure 1-3. Model for sterol-mediated degradation of HMG CoA reductase

また HMGCR の分解はステロールのみならず、メバロン酸由来のイソプレノイドによっても制御されることが示唆されていた (Brown and Goldstein, 1980, Gil et al., 1985, Nakanishi et al., 1988) が、近年は GGPP (Geranylgeranyl pyrophosphate) が HMGCR の分解を制御するイソプレノイドの正体であり、その標的タンパクであるが明らかとなった (Schumacher et al. 2015)。現状次のようなモデルが提唱されている。GGPP が枯渇している状態では、UBIAD1 が HMGCR-Insig と複合体を形成し、この三者複合体は膜からの解離が起きず、プロテアソームによる分解を受けない。一方、GGPP 存在下では GGPP が UBIAD1 への結合を介して、Insig-HMGCR の複合体から解離する。Insig-HMGCR の複合体三者複は膜から解離し、プロテアソームによって分解される (Schumacher et al. 2015)。

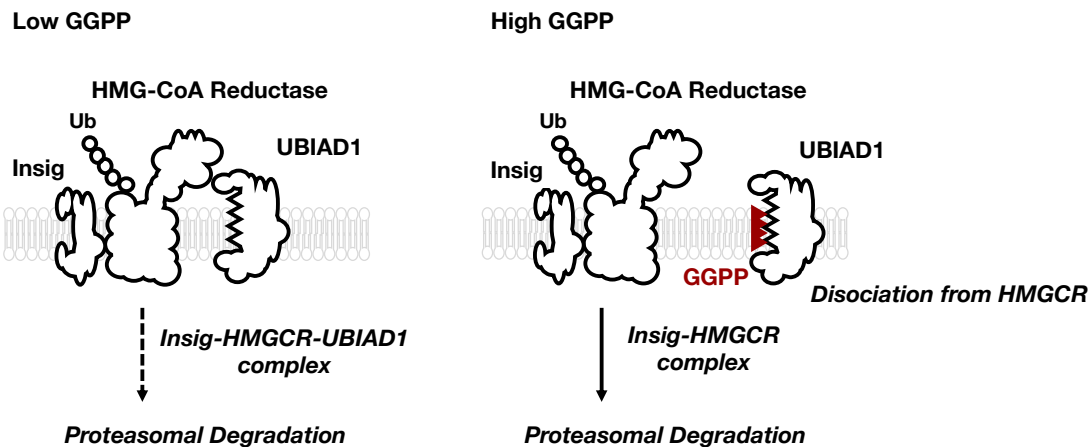


Figure 1-4. Model for isoprenoid-mediated degradation of HMG CoA reductase

コレステロール生合成における翻訳後レベルでの調節機構 (SM)

HMGCR 以外のコレステロール合成酵素群の制御機構は長年見過ごされてきたようである。本研究で扱う SM (Squalene Monooxygenase) もその例外にもれなかったが、HMGCR と同様に過剰なステロールによる分解を受ける酵素である事が明らかとなった。本発見の鍵となったのはコレステロール過剰の際に、SM の基質であるスクアレンが蓄積しているという過去の実験事実であった (Brown and Goldstein, 1980, Gonzalez et al., 1979)。Gill らは、スクアレンの蓄積が比較的短いタイムスケール (~8 時間) で起きることを見出し、その後の解析から、コレステロールによる SM 量の調整が、ユビキチンプロテアソーム系を介した分解によって制御されていることを明らかにした (Gill et al., 2011)。

SM の分解機構は HMGCR と異なる。第一に HMGCR の分解と異なり E3 をリクルートする Insig は SM の分解には関与していない。また、ステロールによる SM と HMGCR の分解は異なる構造活性相関が見られている。このような内在性ステロールによる分解選択性の生理的意義は未解明である。ところで、近年では SM のユビキチン化を担う E3、MARCH6 (Foresti et al., 2013, Zelcer et al. 2014) がステロールによって、安定化される事 (Sharpe et al., 2018) が報告されている。興味深いことにステロールによる SM の分解と MARCH6 安定化の構造活性相関は異なっている。SM 分解の標的はステロールによって異なるのであろうか。現状は謎である。

	SM degradation	MARCH6 stabilization	HMGCR degradation	
Cholesterol	+	+	-	
Desmosterol	-	-	-	
2425DHL	-	-/+	+	
Lanosterol	-	-	+	
25HC	-	+	+	
26HC	-	-	+	
7 α HC	+	-	-	- indicates no effect
19HC	+	ND	+	+ indicates effect
20HC	ND	ND	+	-/+ indicates nonsignificant effect
				ND indicates not determined

Figure 1-5. Profiling the activities of sterols on SM and HMGCR degradation, MARCH6 stabilization.

SM-N100 の機能、構造解析

SM は 574 アミノ酸残基からなる小胞体膜タンパク質であり、スクアレンのエポキシ化を触媒する。SM は分解に必要な十分な領域である SM-N100 と触媒ドメインから構成されている。これまでに触媒ドメインの X 線結晶構造解析 (Padyana et al., 2019) はなされているが、SM-N100 の構造決定は未だなされていない。SM-N100 単体、また全長 SM の精製は SM-N100 の疎水性の高さ故に非常に困難 (Nagumo et al., 1995, Gill et al., 2011) なのが現状である。よって、これまでの SM-N100 の構造の解析は SM-N100 のフォールディングや可溶化をアシストすべく、GFP や GST 融合タンパクを用いて行われている。SM-N100 の構造に関して現段階で解明されているのは、一つのリエンタラントループと両親媒性のヘリックスによって小胞体膜にアンカーされているということ (Howe et al., 2015, Chua et al., 2017) である。

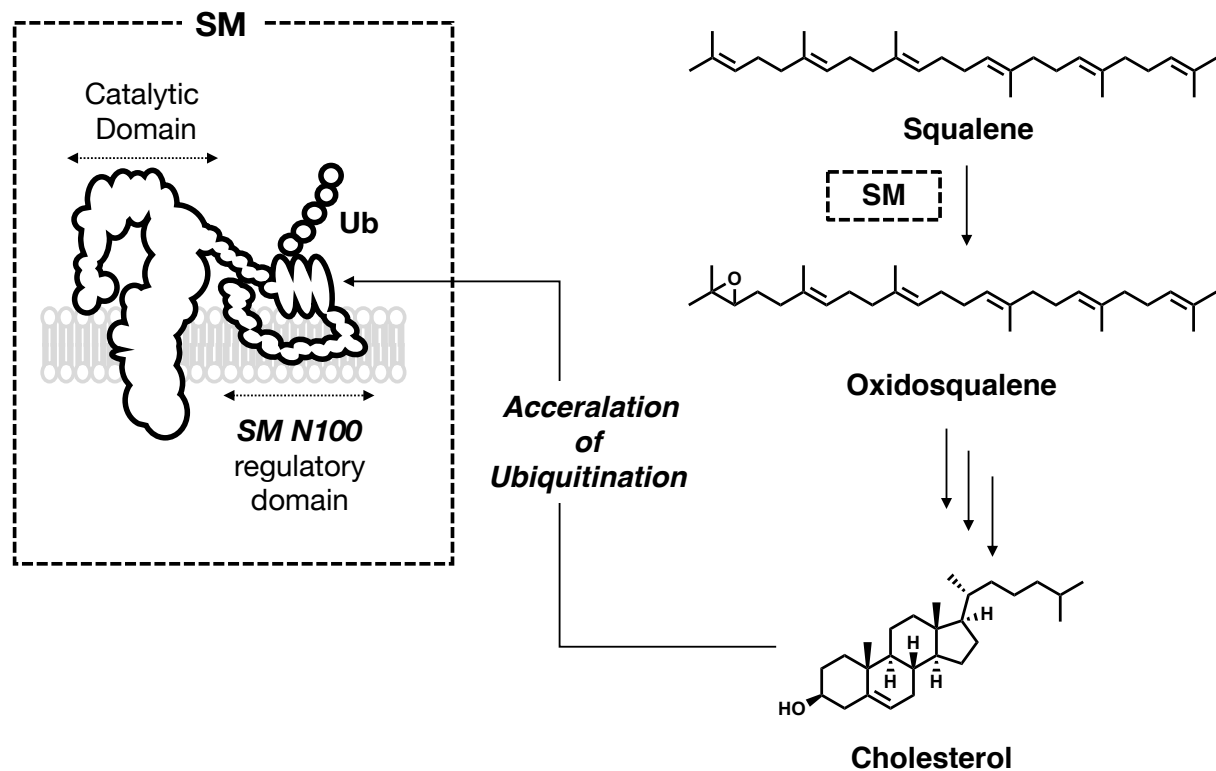


Figure 1-5. Function and structure of SM. SM catalyzes the conversion of squalene to oxidosqualene by its catalytic domain. SM stability is controlled by its regulatory domain (SM-N100) through cholesterol-dependent ubiquitination.

SM の翻訳後制御機構解析の意義

SM がコレステロール合成における律速酵素であること、さらには癌原遺伝子であること (Cirmena et al., 2018, Garcia-Bermudez et al., 2019, Mahoney et al., 2019) から、SM は新規創薬標的になりうる。しかし、ヒトに対する SM 阻害剤の開発 (Horie et al., 1990, Sawada et al., 2001) はこれまでに行われているものの、臨床応用には至っていない。SM 阻害剤が薬になっていない具体的な理由は不明であるが、我々は単なる阻害剤にとどまらない新たなアプローチ、例えばタンパクの寿命を低分子により制御する手法が有用であると考えた。そのようなアプローチを行う上で、SM の翻訳後レベルでの制御機構の解析は重要であると考えられる。先述のように、構造や機能に未知の部分が多い SM を扱う上で、まずは SM の制御因子を同定し、その理解を深めることとした。合理的な SM の機能制御を行う上でこれらの理解は必須である。そこで、本研究では新たな手法としてケミカルジェネティクススクリーニング (Schreiber et al., 2011,

Côté et al., 2011) を行い、SM の翻訳後制御機構の解明を目指すものとした。以降の章では本研究により見出された新たな SM 翻訳後制御機構の発見とその解析に関して述べる。

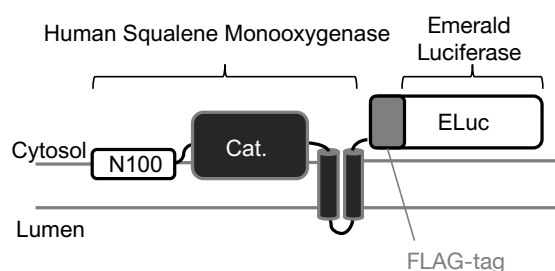
2 SM を安定化する化合物の発見

Gill らにより、SM の量をモニターするには融合タンパクが有用である事が示唆されていたため、SM の安定性を評価可能な融合タンパク発現ベクターを構築した。本研究ではスループットの高さを考慮し、融合タンパクとしてルシフェラーゼを用い、化合物ライブラリーとしては標的や作用機序のよく知られた、FDA 承認薬ライブラリーを用いることとし、研究を開始した。

ルシフェラーゼ融合タンパクによる SM の安定性の評価

はじめに human SM と ELuc (Emerald Luciferase) (Viviani et al., 1999, Nakajima et al., 2010) 融合タンパクを CMV プロモーターの制御のもと、発現するベクターを構築し、その安定発現細胞株を構築した。なお、SM の C 末端に Flag-tag と ELuc を融合している。これにより SM の安定性をルシフェラーゼの活性で評価する事が可能となった。タンパク質の量は合成と分解それぞれの速度により決まるため、CMV プロモーター制御下、一定の合成速度で融合タンパクが合成される本評価系ではルシフェラーゼの発光量を下げるものが分解を誘導するものであり、ルシフェラーゼの発光量を上げるものが分解速度を遅くする、すなわち安定化を誘導するものと考えられる事ができる。

SM-ELuc



Luciferase Assay

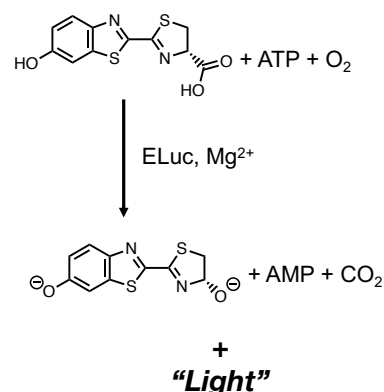


Figure 2-1. Luciferase-based assay monitoring SM stability. Emerald luciferase was fused to SM C-terminus. This fusion protein enables us to evaluate SM abundance by luciferase activity.

SM はコレステロールやいくつかのオキシステロールによって分解されることが報告されている。分解誘導するのは 7KC、19HC など環構造に酸素官能基を持つコレステロール誘導体であり、25HC などの側鎖部位の酸化ステロールは分解活性を持たないようである (Gill et al., 2011)。さらに、コレステロール合成の中間体であるラノステロールなどのステロール骨格 4 位にジメチルを有するものも分解活性はない。このように SM の分解に関してステロールの構造活性相関が明確に見られることから、本評価系でも同様の傾向が見られるかに関して、確認を行った。

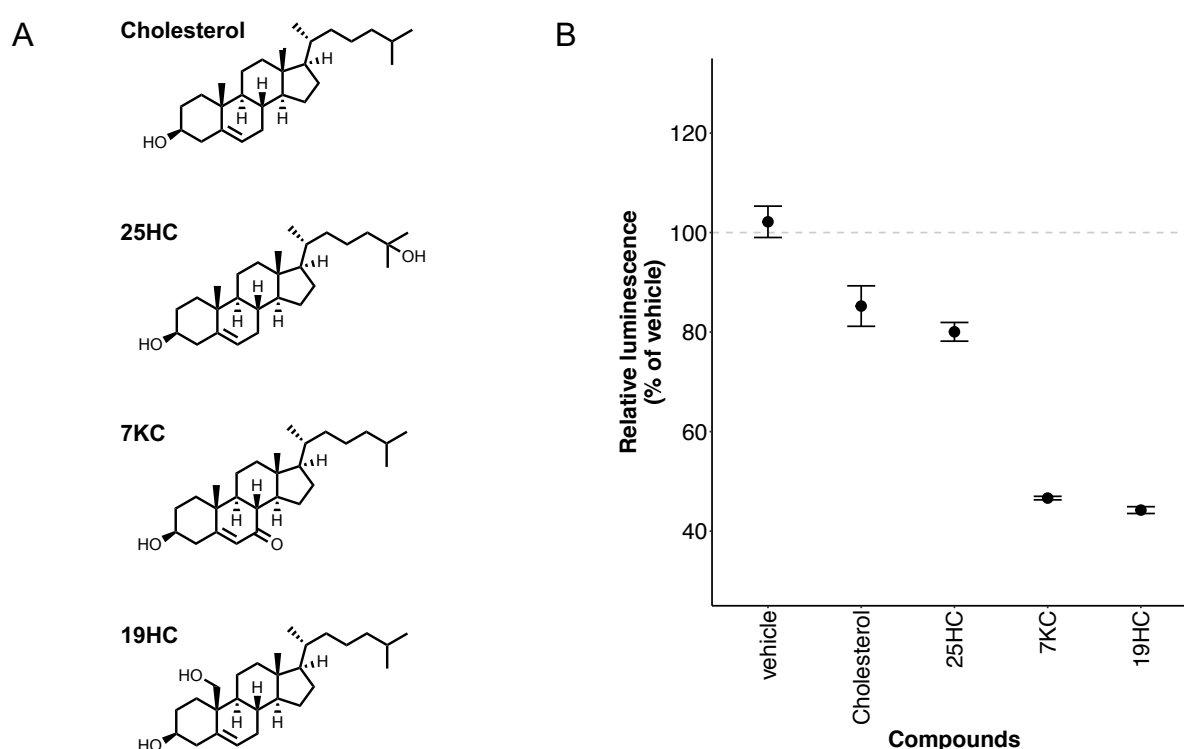


Figure 2-1. Sterol specificity for pCMV-SM-ELuc. HEK293 cells stably expressing SM-ELuc were treated with the indicated sterols, 20 μ g/mL of Cholesterol (water soluble cholesterol), 30 μ M of 25HC, 7KC and 19HC for 16 h, and expression levels were quantified by luciferase assay.

コレステロールは本評価系では報告ほど明確なダウンレギュレーション作用が見られないが、その他のステロール類によるダウンレギュレーション活性は報告通りであった。コレステロールによる分解が明確に見られない可能性として次の可能性が考えられる。それは用いている培地が、異なることである。一連の SM 分解に関する報告では血清からのコレステロール取り込みの影響を排除するために、LPDS (lipoprotein deficient serum) を用いているが、著者は FBS

(fetal bovine serum) を用いてアッセイを行なっている。FBS 由来コレステロールにより分解が十分に起きている状態ではコレステロール依存的な分解が、明確に見えない可能性がある。一方それ以上に活性の強力なオキシステロールによる分解はモニター可能であり、その構造活性相関も一致したことから、本アッセイ系は SM の安定性をモニターする系として機能していることが、確認された。

FDA 承認薬ライブラリーを用いたスクリーニング

本評価系の SM 安定性モニターとしての妥当性を確認したのちに、化合物ライブラリーによるスクリーニングを行うものとした。本スクリーニングでは FDA 承認薬ライブラリーを用いているが、承認薬ライブラリーに含まれる化合物は標的や作用機序が比較的良好に知られており、その後の解析を行う上で有益であると考えられたためである。化合物は 1 μM と 10 μM の二点で活性を確認し、以下にスクリーニング結果を示した。

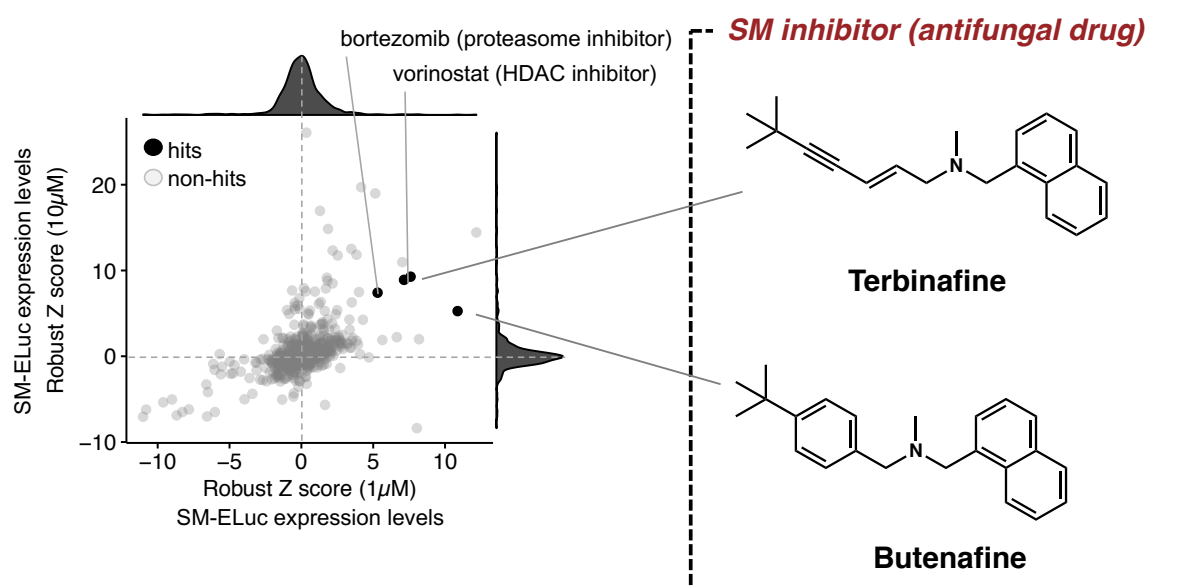


Figure 2-2. A chemical screen identifies SM inhibitors as SM stabilizers. HEK293 cells stably expressing SM-ELuc were treated with 1 μM or 10 μM test compounds for 16 h, and expression levels were quantified by luciferase assay. Hit compounds were those with a reproducible robust Z score of >5 .

外れ値による統計のばらつきを防ぐために、ロバスト Z スコアによる標準化を行なった。また本スクリーニングでは高濃度域における非特異的な作用を示す化合物を排除すべく、濃度依存性ならびに再現性が見られたものをヒット化合物として扱っている。まず x 軸、y 軸ともに、 $Z < 0$

の化合物群は分解誘導のヒットではなく細胞毒性を示す化合物のみであった。つぎに x 軸、y 軸ともに、Z>0 の化合物の中で、濃度依存性が見られたヒットは Bortezomib (プロテアソーム阻害剤) vorinostat (HDAC 阻害剤)、と terbinafine、butenafine (いずれも SM 阻害剤) の 4 種類であった。

SM がプロテアソーム依存的な分解を受ける (Gill et al., 2011, Chua et al., 2019) ことからプロテアソーム阻害剤である bortezomib がヒットである理由は明確である。また、vorinostat などの HDAC 阻害剤は CMV promote のエンハンサーであること (Choi et al., 2005) が報告されているため。偽陽性化合物として、その後の解析から外すこととした。得られた 2 種類の真菌に対する SM 阻害剤、terbinafine、butenafine に着目してその後の作用機序の解析を進めることとした。

承認薬ライブラリーには terbinafine、butenafine 以外に naftifine とよばれる真菌 SM 阻害剤も含まれていたが、naftifine は活性を示さなかった。さらにライブラリーに含まれてはいないが、哺乳類に対する選択的な SM 阻害剤として開発された NB-598 (Horie et al., 1990) の活性は真菌 SM 阻害剤と比較して非常に強力な作用であることが判明した。真菌 SM 阻害剤の哺乳類 SM 阻害剤に対する活性の序列と本評価系における安定化の活性の序列 (Iwasa et al. 1993) が対応している事が示唆され、SM の安定化が SM への直接的な作用、on-target な作用である事が示唆された。

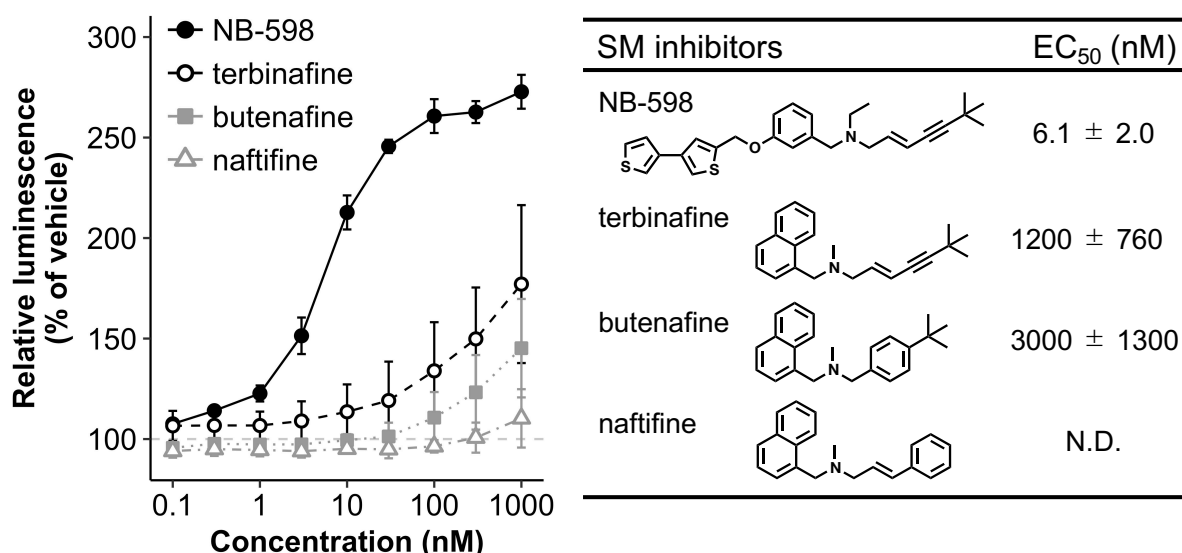


Figure 2-3. More potent inhibitors against human SM stabilized SM more potently. HEK293 cells stably expressing SM-ELuc were treated with the indicated concentrations of SM inhibitors for 16 h, and expression levels were quantified by luciferase assay (mean ± SD; n = 3 independent experiments). EC₅₀ values are mean ± SD (n=3 independent experiments).

第2章の小括

本章では SM の安定性をモニターするスループットの高い評価系を構築し、スクリーニングを行う事で SM 阻害剤が SM の安定化を誘導するという現象を見出した。この SM 阻害剤による安定化が SM への直接的な作用である事が、阻害剤としての活性と本評価系の安定化の活性の序列の対応から示唆された。次章以降では SM 阻害剤による安定化メカニズムのさらなる解析に関して述べる。

3 SM 阻害剤による SM 安定化メカニズムの解析

阻害剤がその標的酵素や受容体を安定化するという現象はこれまでにいくつかの報告がある (MacEwan et al., 1996, Stevens et al., 2000, Ramsey et al., 2001)。このような阻害剤の標的に対する直接結合を介した安定化に加えて、SM はもう一つの側面から安定化を考慮する必要があった。なぜならば、SM はコレステロールによる分解を受ける酵素であり、ステロールが合成される細胞内で SM の安定性を評価する限り、コレステロール量の増減も考慮する必要性があるためである。本章ではこのシンプルな SM 阻害剤による SM の安定化という現象に関して、阻害剤の直接結合による安定化とコレステロール合成阻害による安定化という二つの点から検証を行う。

NB-598 による SM 触媒ドメイン (SM- Δ N100) の安定化

SM 阻害剤による SM 安定化を説明するシンプルな仮説は SM 阻害剤が SM の触媒ドメインに結合した結果であるというものである。実際にこの仮説を示す結果は既知であり、触媒ドメインの X 線結晶構造を報告したグループにより示されている。結晶構造によると、NB-598 は触媒ドメインに結合している、そしてサーマルシフトアッセイでは NB-598 の結合によって触媒ドメインが安定化される事が示されている (Padyana et al., 2019)。本研究においても、触媒ドメインのみのルシフェラーゼ融合ベクターの実験から、同様の結果が得られることを確認している。SM の触媒ドメインは NB-598 の濃度依存的に安定化される。

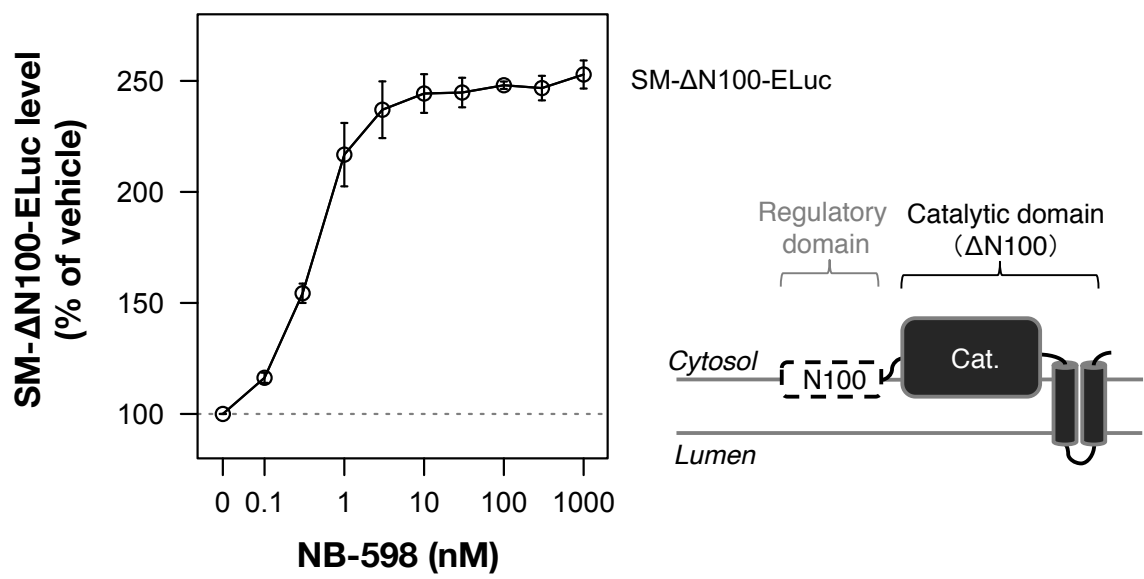


Figure 3-1. NB-598 stabilized the C-terminal catalytic domain of SM. HEK293 cells stably expressing SM-ΔN100-ELuc were treated with the indicated concentrations of NB-598 for 16 h, and expression levels were quantified by luciferase assay (mean ± SD; n = 3 independent experiments).

NB-598 による SM 制御ドメイン (SM-N100) の安定化

ところで、SM は SM-N100 というコレステロールにより安定性が制御される領域を有している。NB-598 による SM の安定化は触媒ドメインへの結合を介した寄与のみによるのか、もしくは SM-N100 も関与しているのかという点に興味を持たれた。そこで、SM-N100 ドメインのルシフェラーゼ融合ベクターを用意し、NB-598 による活性を確認した。その結果、SM-N100 も触媒ドメインと同様に NB-598 の濃度依存的に安定化されることがわかった。

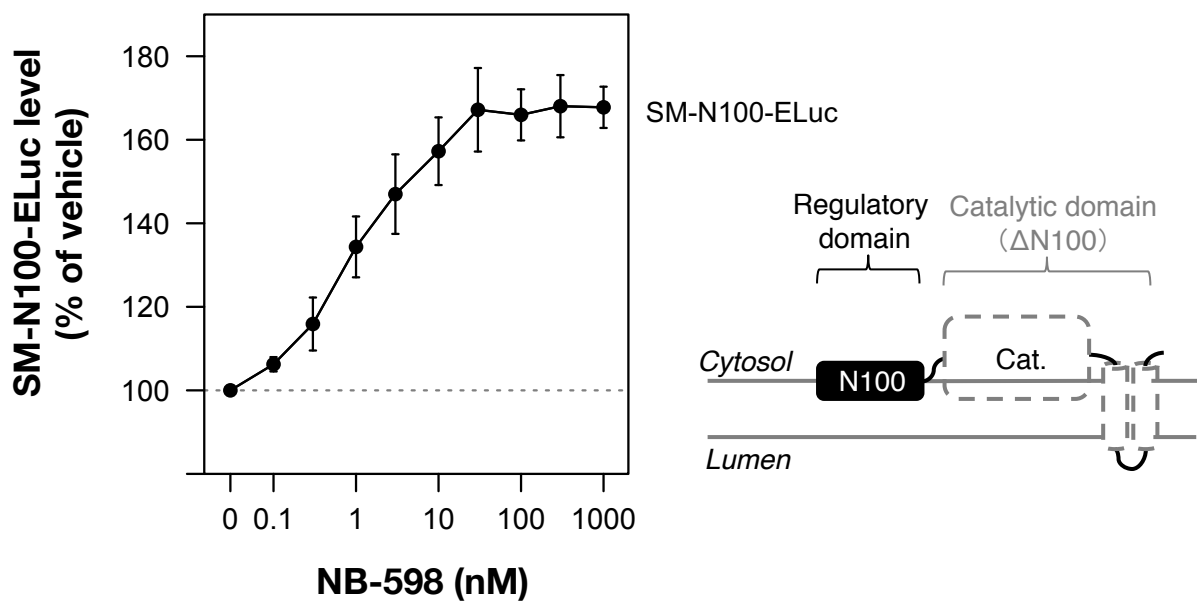


Figure 3-2. NB-598 stabilized the N-terminal domain of SM (SM-N100). HEK293 cells stably expressing SM- Δ N100-ELuc were treated with the indicated concentrations of NB-598 for 16 h, and expression levels were quantified by luciferase assay (mean \pm SD; n = 3 independent experiments).

また我々の共同研究者である Coates、Chua らにより異なる SM-N100 発現ベクター、さらには内在性の SM においても NB-598 依存的な安定化が見られることを確認している。

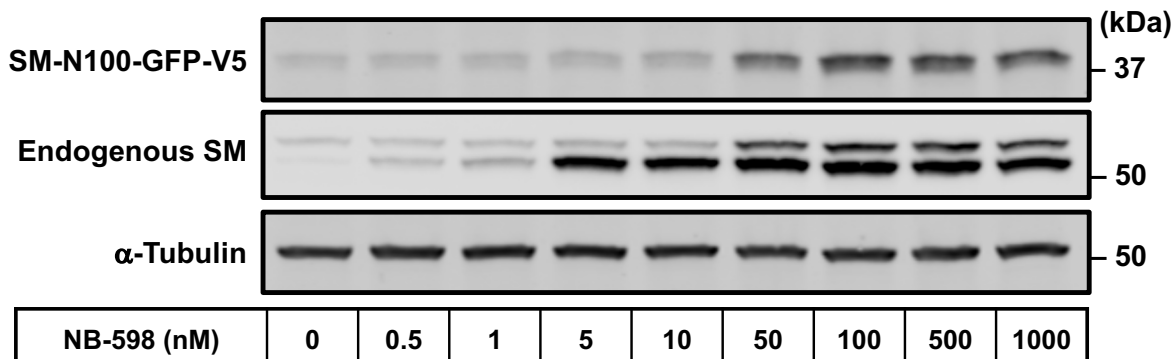


Figure 3-3. NB-598 stabilized SM-N100 in a different cell line. HEK293 cells stably expressing SM-N100-GFP-V5 were treated with the indicated concentrations of NB-598 for 16 h, and protein levels were determined by immunoblotting.

SM-N100 の安定化はコレステロール合成阻害によらない

SM-N100 の安定化はコレステロール合成阻害による作用と考える事ができる。なぜなら、SM-N100 がコレステロールによる分解に必要な十分な領域だからである。コレステロール量依存的に SM の分解が促進される (Gill et al., 2011) ことから、コレステロール合成阻害が関与している可能性が考えられた。

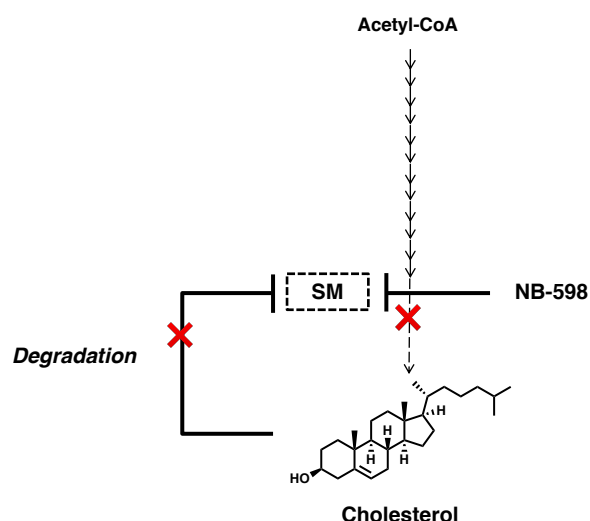


Figure 3-4. Is SM-N100 stabilized by inhibition of cholesterol synthesis?

そこで SM 阻害剤以外の他のコレステロール経路の阻害剤にも同様の作用が見られるかどうかを確認した。HMGCR の阻害剤として、Compactin (Endo et al., 1976)、また FPPS (farnesyl pyrophosphate synthase) の阻害剤として Risedronate (Dunford et al., 2000)、SQS (squalene synthase) の阻害剤として、TAK-475 (Miki et al., 2002, Amano et al., 2003, Nishimoto et al., 2003) を用いた。これらはコレステロール合成において、SM の上流に位置する酵素と阻害剤である。一方、下流の酵素に対する阻害剤としては、OSC (oxidosqualene cyclase) 阻害剤である BIBB-515 (Eisele et al., 1997)、CYP51A1 (also known as lanosterol 14 α -demethylase) 阻害剤である Miconazole (Favata et al., 1987)、DHCR7 (7-dehydrocholesterol reductase) 阻害剤である AY-9944 (L. G. Humber, 1964, Dvornik et al., 1963) を用いた。興味深いことに SM-N100 の安定化はコレステロール合成酵素阻害剤のなかでも、SM 阻害剤、NB-598 に特異的な作用であった。このことから SM-N100 の安定化はコレステロール合成阻害のみでは説明が不可能であると考え、他の仮説の検証を行うこととした。

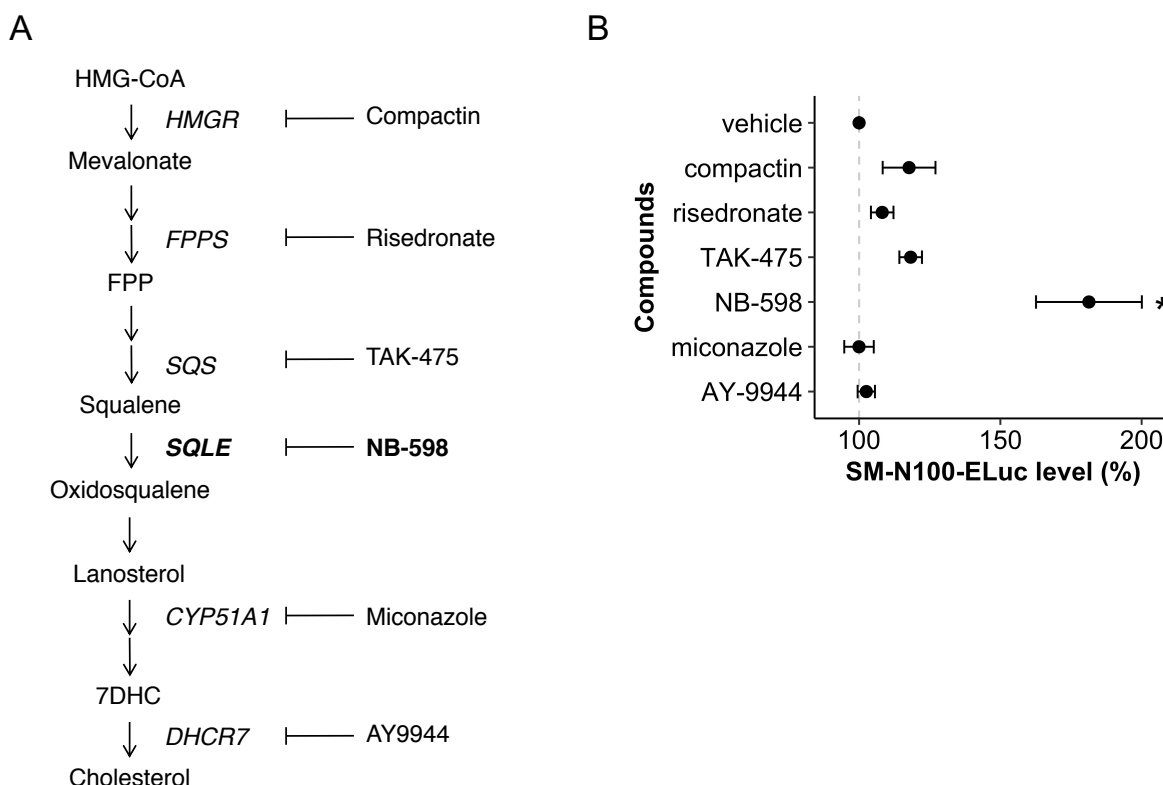


Figure 3-5. Inhibition of cholesterol synthesis is not required for stabilization of SM-N100. (A) Schematic representation of cholesterol biosynthesis enzymes and their inhibitors. (B) HEK293 cells stably expressing SM-N100-ELuc were treated with or without 1 μ M inhibitor for 16 h, and expression levels were quantified by luciferase assay (mean \pm SD; n = 3 independent

experiments). Multiple comparisons were performed using a Dunn Kruskal-Wallis test and the p values are adjusted based on Benjamini-Hochberg correction (n = 3 independent experiments, * p < 0.05, ** p<0.01).

第 3 章の小括

本章では SM 阻害剤による SM の安定化は触媒ドメインの安定のみならず、SM-N100 の安定化が関与していることを見出した。SM-N100 の安定性はコレステロールにより制御されることから、SM 阻害剤によるコレステロール合成の阻害が安定化に寄与していると考えたが、SM 阻害剤以外にそのような効果は見られなかった。次章以降では異なる仮説をもとに SM-N100 安定化のメカニズム解析を行う。

4 スクアレンによる SM-N100 安定化の発見

SM 阻害剤によってコレステロール合成が阻害されるのは確かである。しかし、これでは SM-N100 の安定化が説明できない。よって、SM 阻害剤がもたらす他の作用を考える必要がある。本章では SM 阻害剤によって、蓄積したスクアレンに着目し、スクアレンが SM-N100 の安定化を誘導しているものと仮説を立てその検証を行う。

SM-N100 の安定化はスクアレン合成酵素によって阻害され、スクアレンの添加により回復

SM 阻害剤はコレステロール合成を阻害し、基質であるスクアレンを蓄積させる。SM-N100 の安定化がコレステロールでは説明が不可能であることから、蓄積したスクアレンが重要であると仮説を立て検証を行うこととした。

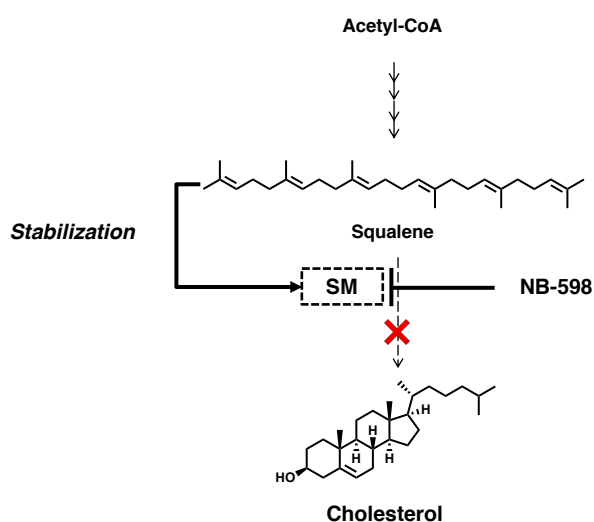


Figure 4-1. Is SM-N100 stabilized by accumulation of squalene?

本仮説は SM 阻害剤と SQS (squalene synthase) 阻害剤を併用処理することで検証可能であると考えられた。NB-598 による安定化がスクアレンの蓄積を介しているのならば、スクアレンの合成が阻害されている状態では、NB-598 による安定化も同様に阻害されるはずである。

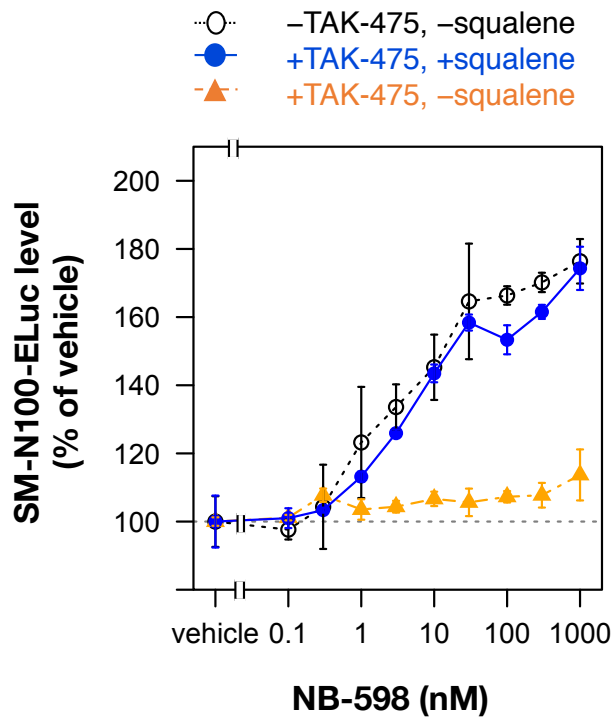
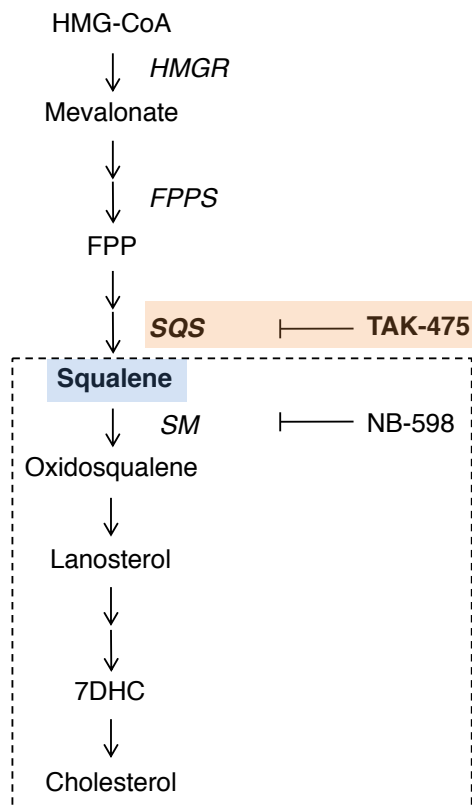


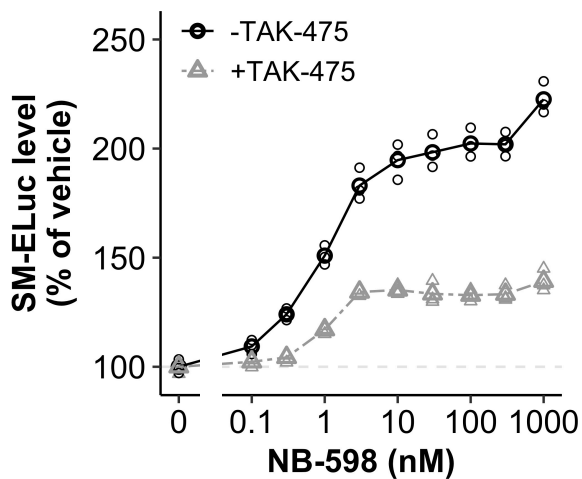
Figure 4-2. Squalene accumulation mediates the stabilization of SM-N100 by NB-598.

HEK293 cells stably expressing SM-N100-ELuc were treated with the indicated concentrations of NB-598, with or without 10 μ M TAK-475 and/or 300 μ M squalene, as indicated for 16 h, and expression levels were quantified by luciferase assay (mean \pm SD; n = 3 independent experiments).

Fig.4-2 に示すように SM-N100 は NB-598 により安定化されるが、SQS 阻害剤、TAK-475 を併用処理するとその安定化はキャンセルされる（オレンジの実線）。さらに、この状態でスクアレンを加えると、その活性は回復するということが示された（黒の破線）。このことからスクアレンが SM-N100 の安定化に重要であることが示された。

SM の安定化における SM-N100 の寄与

Full-length



Δ N100

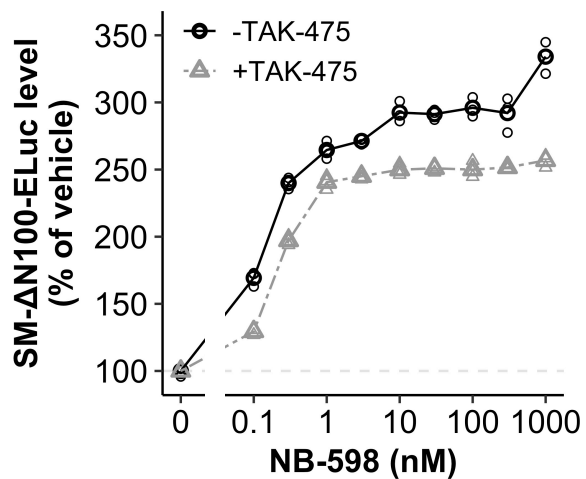


Figure 4-3. Contribution of squalene to the NB-598-mediated stabilization of full-length and Δ N100 SM-ELuc.

HEK293 cells stably expressing SM-ELuc (left) or SM- Δ N100-ELuc (right) were treated with the indicated compounds and assayed as described in Fig. 4-1.

Fig.4-3 に示すように SM (full-length) の Nb-598 による安定化は SQS 阻害剤によって阻害される。

SM-N100 の安定化とスクアレン蓄積の相関

ここまでにスクアレンが安定化に重要であることを示唆するデータを得たが、NB-598 の処理によって実際にスクアレンが蓄積しているかを確認する必要がある。そこで、スクアレンの蓄積量を GC-MS により定量し、蓄積量と安定化の相関を検証することとした。本実験は著者が作成した SM-N100-ELuc 安定発現 HEK-293 を用い、共同研究者である Coates、Chua らが脂質抽出、GC-MS による定量を行なった。

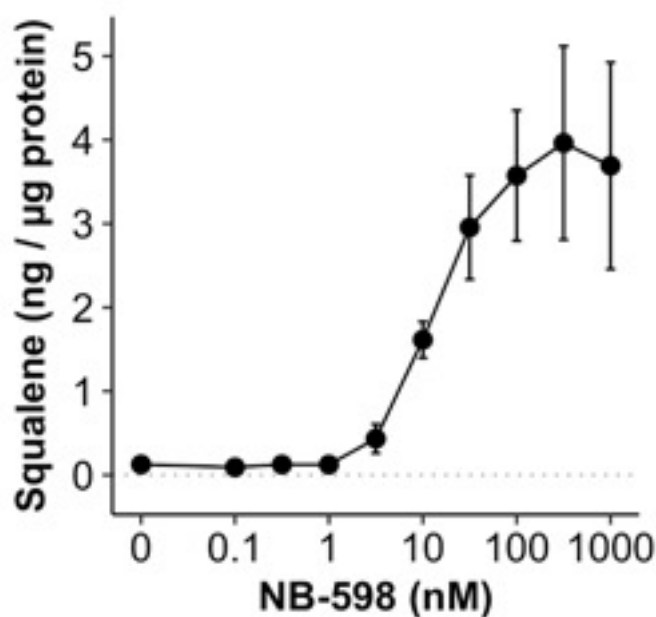


Figure 4-2. Squalene accumulation is induced by NB-598 in a dose-dependent manner.

HEK293 cells stably expressing SM-N100-ELuc were treated with the indicated concentrations of NB-598 for 16 h, non-saponifiable lipids were extracted, and squalene levels were analyzed using GC-MS (mean \pm SD; n = 3–4 independent experiments).

NB-598 を処理していない状態ではスクアレン量が $1 \mu\text{g}$ のタンパクあたりおよそ 200 pg と検出限界に近い数値であるが、NB-598 処理によりスクアレン量は濃度依存的に増加し、およそ 29 倍程度まで増加することが示された。さらにスクアレン蓄積の EC50 値は 13 nM であり、SM-N100 安定化の EC50 ($= 6.1 \pm 2.0 \text{ nM}$) と近い値をとることが判明した。

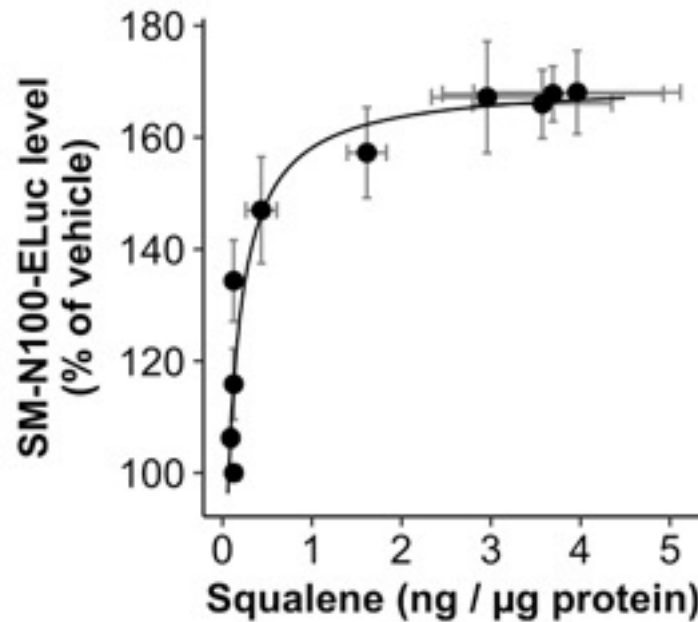


Figure 4-3. SM-N100- increased in a non-linear, saturable manner in response to accumulation of squalene. Correlation between squalene levels (from Fig.4-2) and SM-N100-ELuc levels (from Fig. 3-2). Black line indicates regression fit of a baseline-shifted Michaelis-Menten equation ($y = 59 + 111x / (x + 0.12)$).

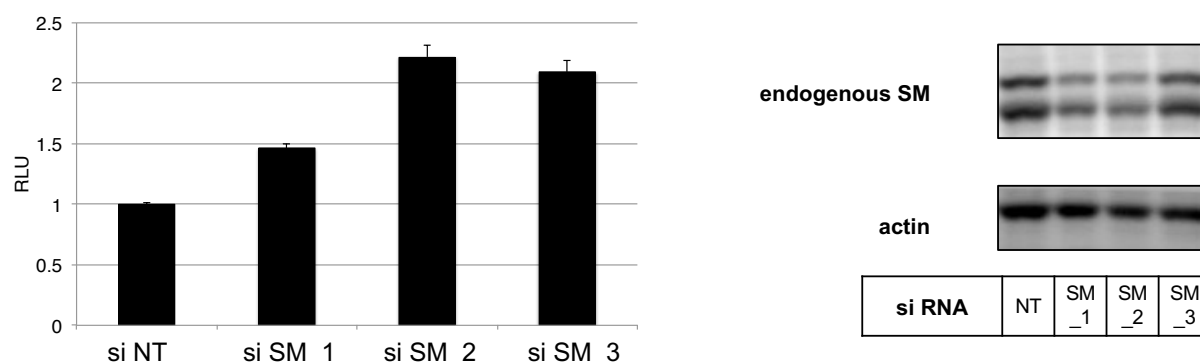
さらにスクアレンの蓄積量と安定化をプロットしその相関を評価した。わずかなスクアレンの蓄積により、SM-N100 が安定化され、スクアレン量と SM-N100 の安定化は飽和型の非線形の相関を取ることが示された。なお、プロット上の実線はミカエリスメンテン式を表している。酵素の反応速度と基質濃度の関係性を表す、ミカエリスメンテン式との相関がスクアレン蓄積量と SM-N100 の安定化においても見られたことから、スクアレンが SM-N100 に直接結合して安定化を誘導している可能性が考えられた。

第 4 章の小括

本章ではスクアレンが SM-N100 の安定化に重要であることを示した。脂質抽出と GC-MS によるスクアレン蓄積量の評価からは、スクアレンによる安定化が直接結合を介した作用である可能性が示唆された。次章ではスクアレンによる安定化メカニズムのより詳細な解析を行う。

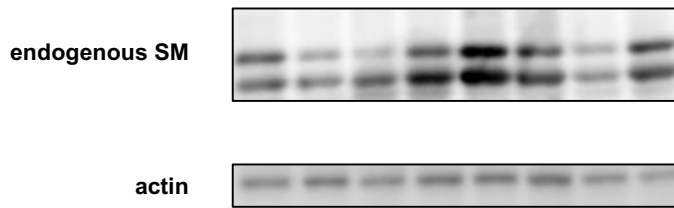
補足：SM ノックダウンによる SM-N100 の安定化とスクアレンによる内在性 SM の安定化

これまでに SM 阻害剤によって SM-N100 が安定化されることを示した。また、活性の本体は SM 阻害剤ではなく蓄積するスクアレンであることもこれまでに見出している。よって SM 阻害剤と同様に SM をノックダウンすることでも、スクアレンは蓄積するので、SM-N100 は安定化を受けるはずである。実際に siRNA により、SM をノックダウンすることで、SM-N100 が安定化されることが確認できた。一方で内在性 SM のノックダウン効率が低いように見受けられた。蓄積したスクアレンが内在性 SM を安定化するのであればノックダウン効率は低下する可能性が考えられる。SQS 阻害剤を併用処理することで、ノックダウン効率が向上したように見受けられたことから、内在性 SM の安定化においてもスクアレンの寄与を示唆するデータが得られた。



Knockdown of endogeneous SM induced stabilization of SM-N100. HEK293 cells stably expressing SM-N100-FLAG-ELuc were transfected with 30 nM siRNA for 72 h.

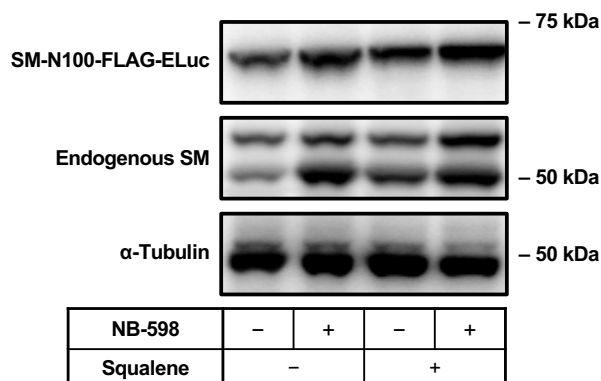
アンチセンス鎖の異なる3種類のSMに対するsiRNAを用意し、ルシフェラーゼアッセイによるSM-N100の量、ウエスタンブロットより内在性SMのノックダウンを確認した。いずれのsi SMでもSM-N100は安定化される様子が確認された。また、ノックダウン効率はsi SMによってことなり、si SM_3はノックダウン効率が低いように見受けられた。この実験事実からsi SMによって蓄積したスクアレンが内在SMの安定化を誘導している可能性が示唆されたため、スクアレン合成を阻害した状態でノックダウン実験を行い、スクアレンの内在SMに対する安定化を確認することとした。



si RNA	NT	SM _1	SM _2	SM _3	NT	SM _1	SM _2	SM _3
TAK-475 10 μ M	-				+			

Squalene synthesis disrupted knockdown of SM. HEK293 cells stably expressing SM-N100-FLAG-ELuc were transfected with 30 nM siRNA for 72 h and treated with or without 10 μ M TAK-475.

TAK-475によりスクアレン合成を阻害した状態では、いずれの si SM においてもノックダウン効率の向上を確認することができた。なお、si NT では TAK-475 の有無により、内在性 SM の量が異なる。TAK-475 を処理した状態ではコレステロール合成が阻害され、SREBP-2 の転写量が増加し、SM が転写レベルで増加することや翻訳語レベルでのフィードバックであるコレステロール依存的な分解量が減少しことが原因と考えられる。



Squalene stabilized endogenous SM. HEK293 cells stably expressing SM-N100-FLAG-ELuc were treated with or without 1 μ M NB-598/ 300 μ M Squalene for 16 h.

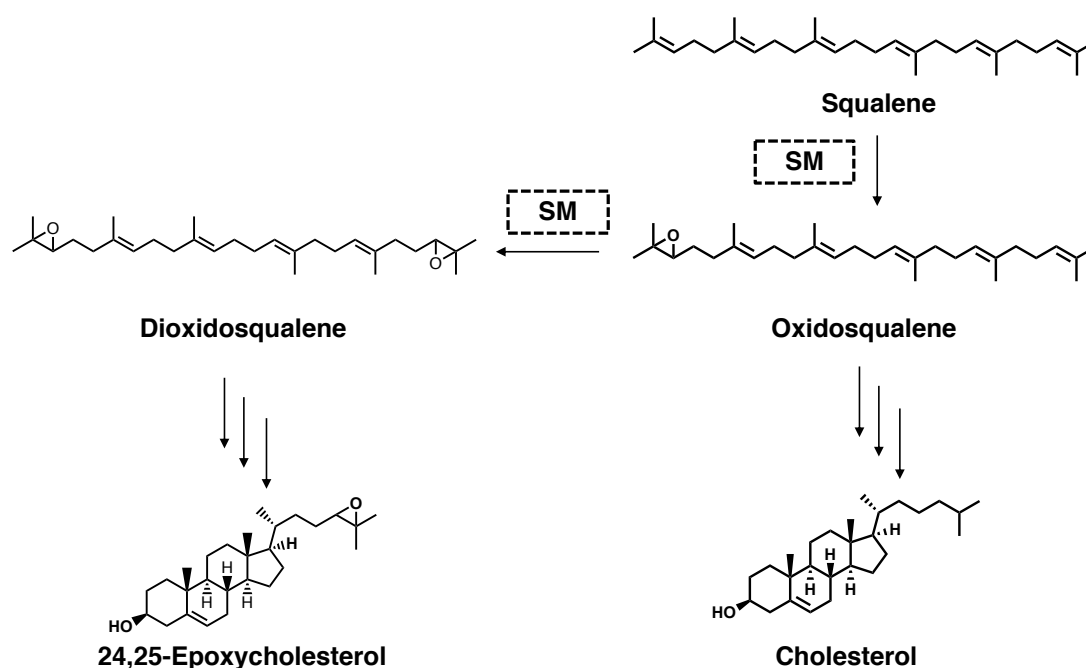
さらに、内在性 SM がスクアレンにより安定化される現象は別の実験でも確認している。内在性 SM は SM 阻害剤、NB-598 により安定化され、スクアレンによっても安定化される。SM 阻害剤とスクアレンを併用処理した状態ではさらに SM が安定化を受ける。

補足：オキシドスクアレンによる SM-N100 の安定化

研究の過程で、SM の一つ下流で働く OSC (oxidosqualene cyclase) 阻害剤である BIBB-515 によっても、SM-N100 が安定化されることを見出している。現状、得られているデータからスクアレンと同様にオキシドスクアレンも SM-N100 の安定化を誘導していると考えている。ここにこれまでに得られているデータをまとめ、OSC 阻害剤による SM-N100 の安定化について考察する。

OSC 阻害剤による SM の安定化はオキシドスクアレンの蓄積を介した作用である

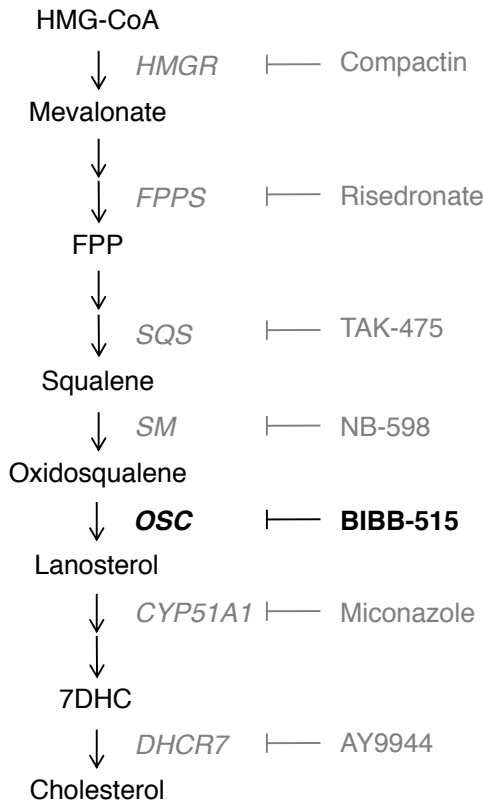
コレステロール合成経路の分岐経路として、オキシドスクアレンが、再度 SM によってエポキシ化され、ジオキシドスクアレンを生じ、24,25EC を生成することが報告されている (Nelson et al., 1981)。



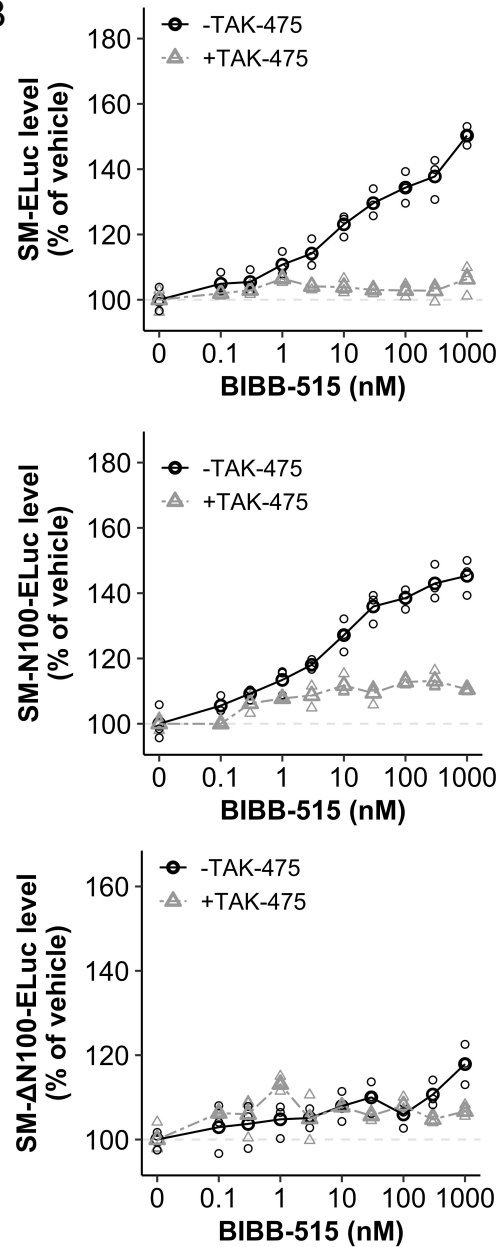
SM catalyzes the conversion of oxidosqualene to dioxidosqualene. Schematic representation of cholesterol biosynthesis and shunt pathway.

これまでに Bloch らのコレステロール合成経路に着目してきたが、こちらの分岐経路に着目すると、オキシドスクアレンもスクアレンと同様に SM の基質となることがわかる。オキシドスクアレンもスクアレンと同様に SM-N100 の安定化を誘導するのか興味を持たれたため、OSC 阻害剤と SQS 阻害剤の併用により、オキシドスクアレンの寄与を確認した。

A



B



Stabilizing effects of oxidosqualene mediated by binding to the N100 domain.

(A) Schematic representation of cholesterol biosynthesis enzymes and their inhibitors, with oxidosqualene cyclase (OSC) and its inhibitor BIBB-515 highlighted. (B) HEK293 cells stably expressing the indicated luciferase constructs were treated with the indicated concentrations of BIBB-515, with or without TAK-475, and assayed as described in Fig. 4-1. Data are a representative result (performed in triplicate) from $n = 2$ independent experiments is shown. As BIBB-515 does not bind the catalytic domain of SM, only oxidosqualene-mediated stabilization through the N100 domain was observed. This stabilization was prevented by the presence of TAK-475.

OSC 阻害剤、BIBB-515 は SM を安定化し、その活性は SQS 阻害剤、TAK-475 によりキャンセルされる。この事実は OSC 阻害によって蓄積したオキシドスクアレンが SM の安定化に需要であることを示唆するものであった。一方、SM-ΔN100 は BIBB-515 によって安定化されない。このことから BIBB-515 が SM の触媒ドメインに結合しないことが示唆された。よって BIBB-515 による SM の安定化は SM-N100 を介したものであると考えられた。上図に示すように SM-N100 は BIBB-515 により安定化され、その活性は TAK-475 によりキャンセルされる。第4章で示した、NB-598 と同様の結果が得られた。この結果は BIBB-515 により蓄積するオキシドスクアレンが SM の安定化に重要であることを示すものである。次に実際にオキシドスクアレンが蓄積しているか、確認を行うこととした。

Standard					Lipid extract (unsaponifiable)							
Oxido-Squalene (ng / μL)					BIBB-515 (nM)							
6.25	12.5	25	50	100	0	10 ⁻²	10 ⁻¹	1	10	10 ²	10 ³	10 ⁴



Oxidosqualene accumulation is induced by BIBB-515. HEK293 cells stably expressing SM-N100-ELuc were treated with the indicated concentrations of BIBB-515, non-saponifiable lipids were extracted, and squalene levels were analyzed using TLC.

HEK293 細胞に BIBB-515 を処理し、脂質抽出を行なった。検出は TLC により行なっている。高濃度域でわずかにオキシドスクアレンが蓄積していることが確認された。

Standard				Lipid extract (unsaponifiable)								
6.25	12.5	25	50	10 ²	10 ³	10 ⁴	10	10 ²	10 ³	10 ²	10 ³	10 ⁴
Squalene (ng / μ L)				Terbinafine (nM)			NB-598 (nM)			BIBB-515 (nM)		



Squalene accumulation is not induced by BIBB-515. HEK293 cells stably expressing SM-N100-ELuc were treated with the indicated concentrations of inhibitors, non-saponifiable lipids were extracted, and squalene levels were analyzed using TLC.

なお、BIBB-515がSM阻害剤として作用し、スクアレン蓄積を誘導している可能性は上記の脂質抽出の実験から否定されている。上述の結果を踏まえ、BIBB-515はSMの安定化を誘導し、その安定化はSM-N100ドメインの安定化によることさらにはオキシドスクアレンがSM-N100の安定化に重要であることが示された。

5 スクアレンによる SM-N100 安定化メカニズムの解析

これまでにスクアレンが SM-N100 の安定化を誘導していることを明らかにした。炭素と水素のみからなる極めて疎水性の高い有機化合物であるスクアレンがどのようにして、SM-N100 を安定しているのか。本章ではスクアレンが SM-N100 に対して結合して安定化を誘導していると仮説を立てその検証を行い、それに続くより詳細なメカニズムの解析に取り組んだ。

SM-N100 の安定化はスクアレンに特異的な作用である

スクアレンによる SM-N100 の安定化はコレステロールによる SM の分解で示唆されているような、脂質膜への非特異的な作用である可能性 (Kristiana et al., 2012) が考えられた。これまでにスクアレンやその飽和体であるスクアランは脂質膜の外葉と内葉の間に存在することが示唆されている (Hauss et al., 2002) ことから、スクアレンが脂質膜に取り込まれることで SM-N100 の安定性を制御している可能性は十分に考えられる。

一方で、スクアレンによる SM-N100 の安定がスクアレンの SM-N100 への直接結合を介した作用であるとも考えられる。前章でのスクアレン蓄積量と SM-N100 安定化の相関はリガンド依存的な作用を示唆する結果であった。

安定化に対するの二つの仮説、(1) スクアレンが脂質膜へ取り込まれ SM-N100 の安定性を変える、(2) スクアレンがリガンドとして SM-N100 に結合し、安定性を変えるの二つの仮説を検証すべく、実験を行なった。(1) に対してはスクアレンと同様の脂質膜への作用を示す、スクアランの活性を確認することで脂質膜への作用を間接的に評価した。(2) に関しては光親和性標識実験により直接結合説の検証を行うこととした。

まずは仮説 (1)、(2) の検証に必要な化合物を用意し、その活性を確認した。スクアランは市販の化合物を用い、光親和性標識実験に必要なプローブは別途合成を行なった (Supplementary Information)

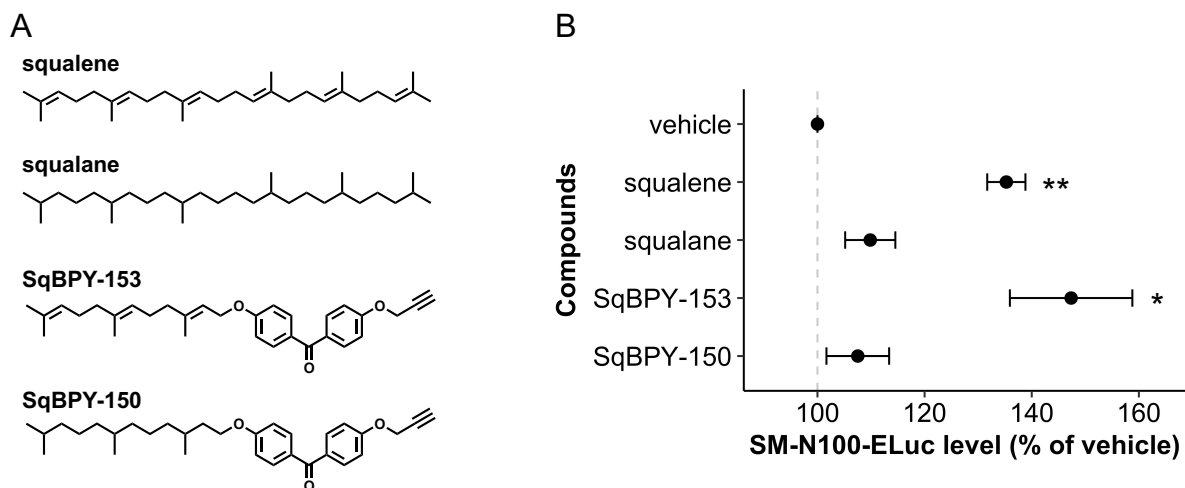


Figure 5-1. Specificity of squalene for SM-N100 stabilization. (A) Chemical structures of squalene, squalane, and corresponding photoaffinity probes. (B) HEK293 cells stably expressing SM-N100-ELuc were treated with 300 μ M squalene, 300 μ M squalane, 30 μ M SqBPY-153, or 30 μ M SqBPY-150, in the presence of 10 μ M TAK-475 and 1 μ M NB-598, for 16 h. SM-N100-ELuc expression levels were quantified by luciferase assay (mean \pm SD, n=3 independent experiments). Multiple comparisons were performed using a Dunn Kruskal-Wallis test and the p values are adjusted based on Benjamini-Hochberg correction (n = 3 independent experiments, * p < 0.05, ** p < 0.01).

スクアレンの活性は TAK-475 により、スクアレン合成を阻害し、NB-598 によりスクアレンの代謝を阻害した上で、確認した。他の化合物に関しても同様の条件で活性を確認している。興味深いことに、SM-N100 の安定化はスクアレンに特異的な作用であり、スクアランは活性を有さなかった。さらにスクアレンに対応する光親和性プローブ SqBPY-153 はスクアレンと同様の活性を有するが、スクアランに対応するプローブ SqBPY-150 は活性を示さなかった。これらの実験結果からスクアレンによる SM-N100 の安定化は脂質膜への作用ではなく、スクアレンの SM-N100 への直接結合を介した作用であることが示唆された。

スクアレンは SM-N100 に結合する

得られた二つのプローブ分子を用いて、スクアレンが SM-N100 に直接結合するかの検証を行うこととした。まず初めに HEK293 細胞の小胞体膜画分を回収し、プローブ分子により SM-N100 が UV 依存的にラベリングされるか確認を行なった。活性の有無によるラベリング依存性を確認することで UV 依存的なラベリングが非特異的なものでないことを確認し、あわせてラベ

リングが SM-N100 由来であることを確認した

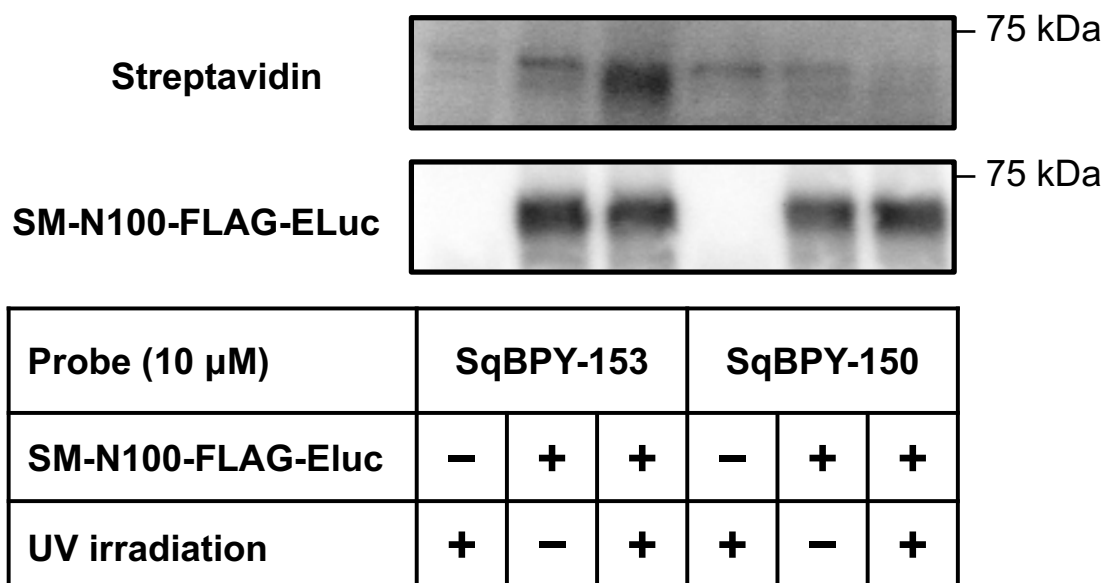


Figure 5-2. Specificity of SQBPY-153 for SM-N100 labeling. Membrane fractions isolated from HEK293 cells or HEK293 cells stably expressing SM-N100-ELuc were treated with the indicated probes for 30 min and photoaffinity labelling was performed with 365 nm UV light for 3 min at 4°C. Anti-FLAG immunoprecipitated products were biotinylated by click chemistry followed by immunoblotting (n=2, independent experiments)..

活性を有する SqBPY-153 は SM-N100 を UV 依存的にラベリングするが、不活性体 SqBPY-150 にはそのような作用は見られなかった。また、SM-N100-FLAG-ELuc が発現していない細胞ではプローブによるラベリングはみられず、SM-N100 由来のラベリングであることが示された。

スクアレンが SM-N100 に結合するのであれば、SQBPY-153 によるラベリングはスクアレンによって競合されるはずである。SqBPY-153 とスクアレンを併用処理し、ラベリング実験を行った。また、NB-598 によってスクアレンを蓄積させた状態でも同様にラベリング実験を行い、本仮説の検証を2つの点から行なった。

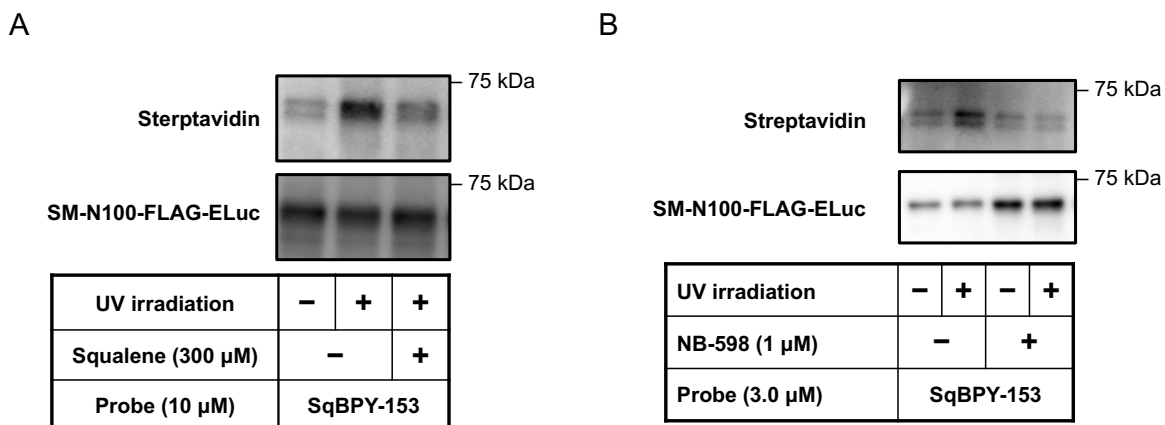


Figure. 5-3. Squalene is recognized by SM-N100 via direct binding. (A) Photoaffinity labeling was performed as described in (Fig.5-2), but SM-N100-ELuc were treated with or without squalene. (n=3, independent experiments) (B) Photoaffinity labeling was performed as described in (Fig.5-2), but cells were pre-treated with 1 μ M of NB-598 for 16 h prior to isolation of the membrane fractions and 3 μ M of SqBPY-153 probe was used (n=2, independent experiments).

上図に示すように、スクアレンの添加、また NB-598 の前処理によって UV 依存的なラベリングはキャンセルされることが判明した。Probe 量を減らし、スクアレンを NB-598 により蓄積させた状態ではより明確にラベリングのキャンセルが見られることが判明した。この2つの実験事実は、蓄積したスクアレンが SM-N100 に結合することを示唆している。

スクアレンは SM-N100 のユビキチン化を阻害する

ここまでの結果からスクアレンが SM-N100 に結合することを示した、では結合したスクアレンはどのようにして、SM-N100 の安定化を誘導しているのだろうか。SM-N100 は MARCH6 によってユビキチン化されるため、スクアレンが SM-N100 と MARCH6 の相互作用を弱めていると考えられる。そこで本仮説を MARCH6 のノックダウンと MARCH6 との共免疫沈降により、検証するものとした。なお本実験は共同研究者である Coates、Chua らにより行われた。

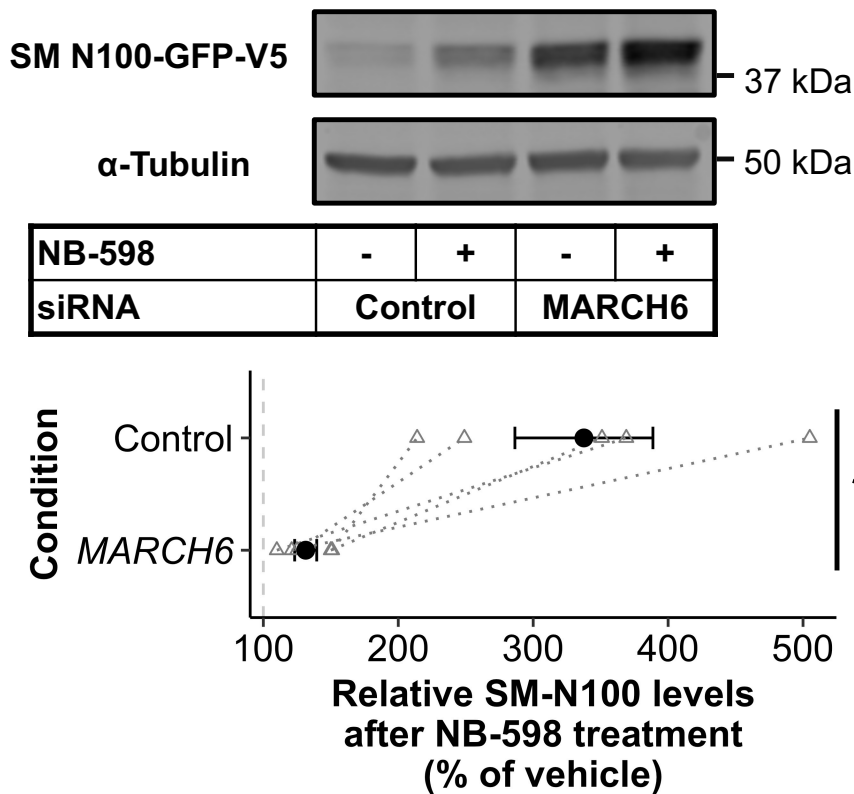


Figure 5-4. Knockdown of MARCH6 disrupted stabilization of SM-N100. HEK293 cells stably expressing SM-N100-GFP-V5 were transfected with 25 nM siRNA for 24 h and treated with or without 1 μ M NB-598 for 16 h. Graph shows densitometric representation of Western blot of SM-N100-GFP-V5 fold-stabilization (mean \pm SEM; n = 5 independent experiments; gray dotted lines denote each experiment; * p < 0.05, paired t test versus control siRNA).

MARCH6 をノックダウンすることで SM は安定化されるが、NB-598 による安定化は阻害されることが判明した。このことから蓄積したスクアレンによる安定化は MARCH6 依存的であることが示唆された。

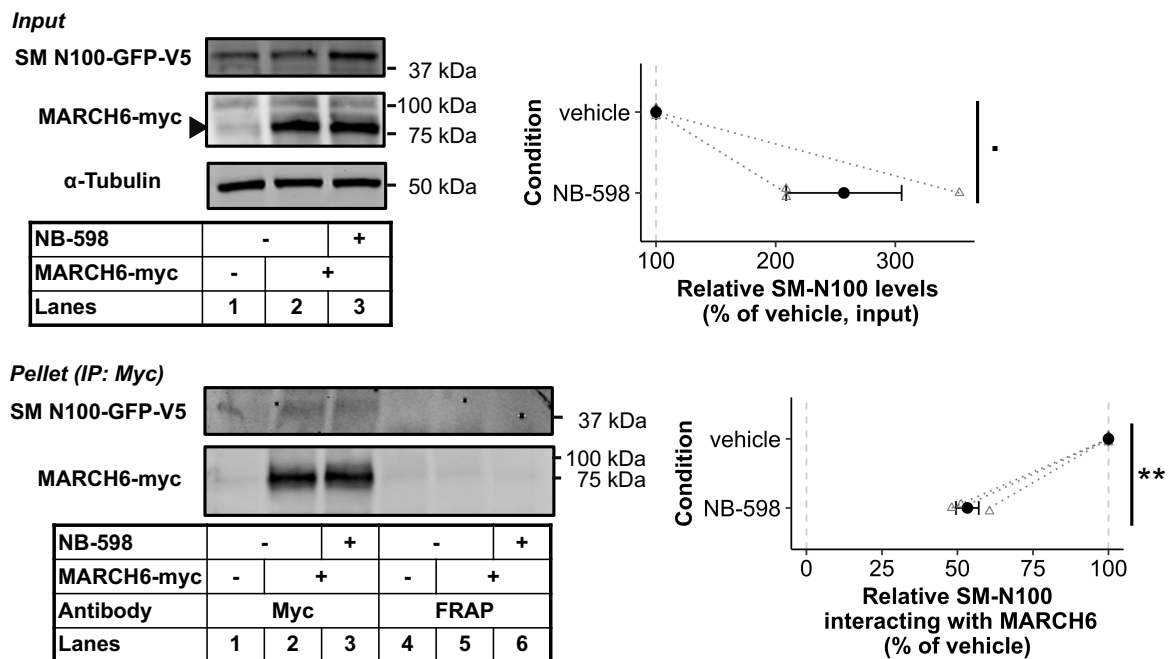


Figure 5-5. NB-598 reduced interaction of SM-N100 with MARCH6. HEK293 cells stably expressing SM-N100-GFP-V5 were transfected with MARCH6-myc for 24 h and treated with or without 1 μ M NB-598 for 16 h. Equal protein amounts were immunoprecipitated using anti-myc antibody, followed by immunoblotting. Graphs show densitometric representation of SM-N100-GFP-V5 levels in immunoprecipitation input, and relative interaction with MARCH6-myc (mean \pm SEM; n = 3 independent experiments; gray dotted lines denote each experiment; \bullet p < 0.1, $**$ p < 0.01, paired t test versus vehicle).

さらに、NB-598 を処理することで MARCH6 と SM-N100 の相互作用が減弱することが判明した。定量値を見てわかるように SM-N100 は NB 依存的に 2 倍ほど量が増加するが、相互作用する MARCH6 の量は変化しない。よって SM-N100 と相互作用する MARCH6 の量は NB 依存的に約半分になったことがわかる。

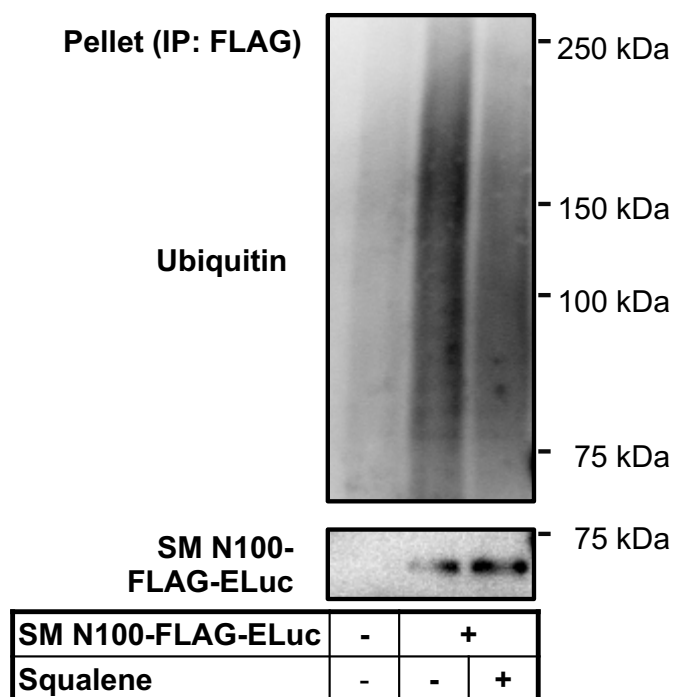


Figure 5-6. Squalene reduced the ubiquitination level of SM-N100. HEK293 cells or HEK293 cells stably expressing SM-N100-FLAG-ELuc were treated with or without 300 μ M squalene, in the presence of 10 μ M CB-5083, 1 μ M NB-598 and 10 μ M TAK-475, for 6 h. Equal protein amounts were immunoprecipitated using anti-FLAG antibody, followed by immunoblotting (n=2, independent experiments).

なお、MARCH6 ノックダウンや co-IP の実験結果と一致するようなデータが著者の行ったユビキチンアッセイにより示されている。内在性スクアレンの合成を阻害し、スクアレンの代謝を阻害した状態で外からスクアレンを添加すると、スクアレン依存的に SM-N100 のユビキチン化は阻害された。これまでの結果を踏まえ、蓄積したスクアレンは SM-N100 に結合し、MARCH6 との相互作用を減弱させることで、SM-N100 の安定化を誘導していると考えられる。

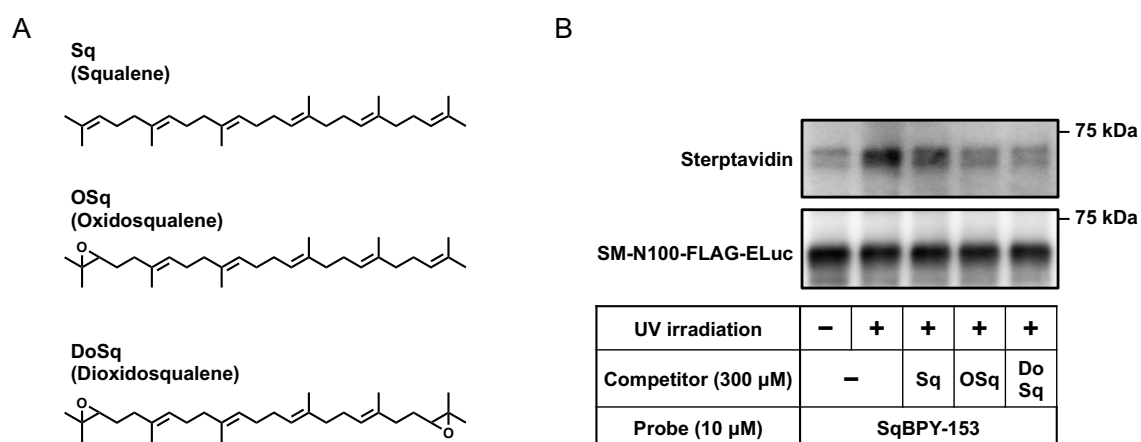
第 5 章の小括

本章ではスクアレンによる SM-N100 安定化メカニズムの解析を行った。一連の解析からスクアレンが SM-N100 に結合し、ユビキチン化を阻害することで SM-N100 の安定化を誘導することを示した。SM-N100 がリガンド結合部位であることはこれまでに報告されていなかった。著者の知る限りでは、スクアレンのような非常に疎水性の高い生体内の脂質が酵素のアロステリック部位に結合して安定化を誘導するという現象はこれまでにない初めての報告である。

補足：オキシドスクアレンやジオキシドスクアレンは SM-N100 のリガンドか？

前章の補足にて、オキシドスクアレンも SM の安定化を誘導することを報告した。本章の結果からオキシドスクアレンもスクアレンと同様に SM-N100 に結合して安定化を誘導していると考えられる。また、SM の基質ではないが、生体内にはジオキシドスクアレンも存在している。これら内在性スクアレンの SM-N100 への結合を評価した。

オキシドスクアレンやジオキシドスクアレンは SM-N100 に結合する



Oxidosqualene and Dioxidosqualene are recognized by SM-N100 via direct binding. (A)

Chemical structures of squalene and its endogenous derivatives. (B) Photoaffinity labeling was performed as described in (Fig.5-2), but SM-N100-ELuc were treated with or without squalene/its endogenous derivatives (n=2, independent experiments).

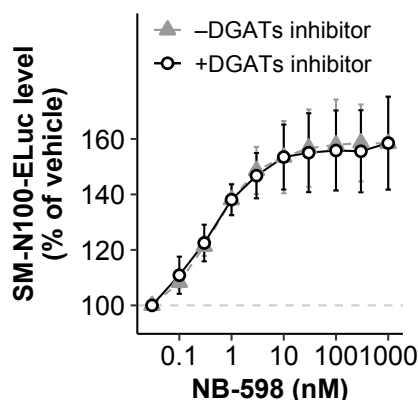
上図 B に示すように、オキシドスクアレンやジオキシドスクアレンをプローブと併用処理すると、ラベリングは競合される。SM-N100 にはこれらの酸化スクアレンも結合するようである。ただ現状、SM-N100 に対する各化合物の結合能を評価することはできていない。ラベリング実験では competitor の溶解性の影響を無視できないため、オキシドスクアレンによるラベリングの競合が、スクアレンとの溶解性もしくは結合能の差異であるのか、判断ができない。オキシドスクアレンの蓄積量が評価可能になれば、そのような定量的な評価が可能になると考えられる。

補足：SM-N100 安定化に対する Lipid Droplet の寄与

スクアレンによる SM-N100 の安定化には LD (Lipid Droplet) の寄与がある可能性が考えられた。スクアレンによって小胞体から LD が形成されること (M'barek et al., 2017)、あるがん細胞では、NB-598 によりスクアレンが蓄積し、LD が形成されることが報告されている (Gross et al., 2019)。また、LD に含まれるタンパクを調べた報告によると、そのなかに SM が含まれていた (Liu et al., 2004)。LD に取り込まれた SM の安定性に関しては現状謎であるが、異なる環境に置かれた SM のユビキチン化度合いは変化することが考えられる。ここにこれまでに得られた結果をまとめる。

NB による SM-N100 の安定化は LD によらない

LD は主にトリアシルグリセロールから構成される。よってトリアシルグリセロールの合成の最終段階を担う、DGAT1 や 2 を阻害することで LD の形成を阻害することが可能である (Harris et al., 2011, Bersuker et al., 2019)。DGAT1 阻害剤の T863、DGAT2 阻害剤の PF-06424439 を併用処理し、LD の形成を阻害した状態で、NB-598 による安定化を評価した。



Lipid droplet is not required for SM-N100 stabilization. HEK293 cells stably expressing SM-N100-ELuc were treated with the indicated concentrations of NB-598, with or without 10 μ M T863 and PF-06424439 as indicated for 16 h, and expression levels were quantified by luciferase assay (mean \pm SD; n = 3 independent experiments).

DGAT1 と 2 の阻害剤を併用処理しても NB による安定化は、阻害されないことが明らかになった。本結果から、我々の評価系では SM の安定化に LD が寄与していないことが示された。

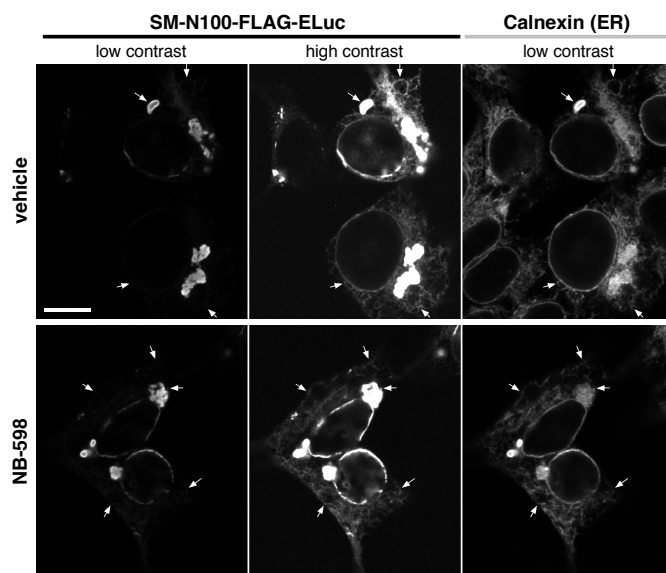
補足：スクアレンによる SM の安定化は小胞体で起きる

SM-N100 が小胞体膜に局在していることはこれまでに示されている (Chua et al., 2019b) が、スクアレンによる SM-N100 の安定化が小胞体膜で起きているかどうかはこれまでの実験では明確に示すことができていなかった。コレステロール依存分解が小胞体膜で起きていることを考えると、スクアレンによる制御も同様であると考えられる。細胞内オルガネラの分画と免疫染色により、スクアレンによる安定化がどこで起きているかを確認することとした。

SM-N100-FLAG-ELuc は小胞体に局在する

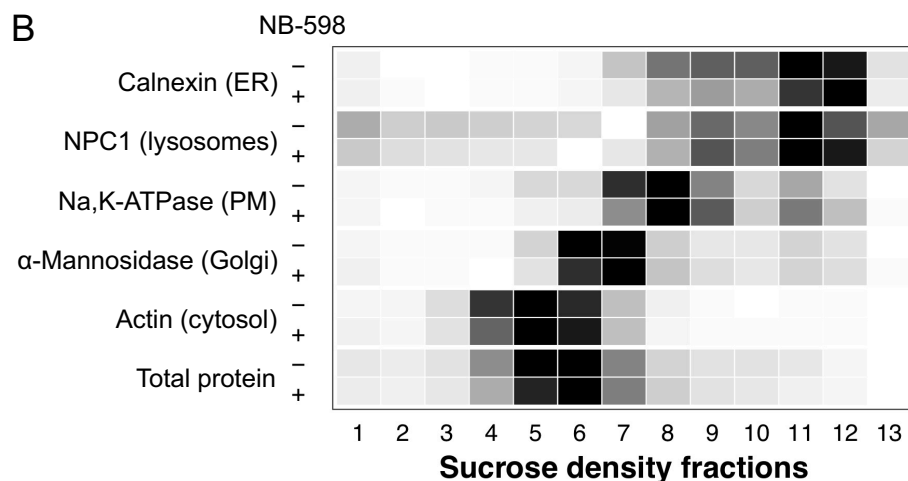
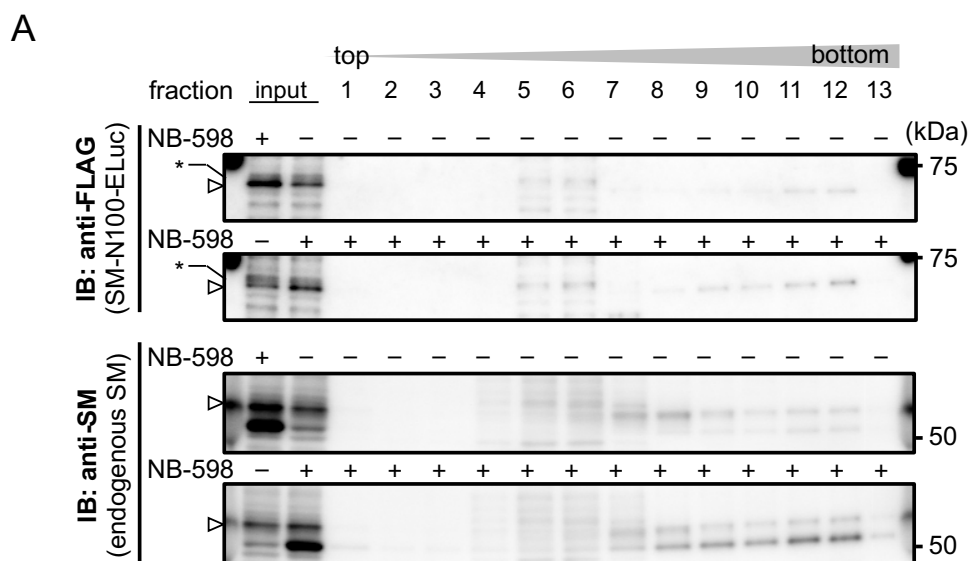
まずは免疫染色により、SM-N100 の局在を確認した。SM-N100-FLAG-Eluc 由来のシグナル強度は小胞体マーカーである Calnexin と比較して、バラツキが大きいように見えるものの、局在に関しては Calnexin と一致し、SM-N100 が小胞体局在であることが確認できた。SM-N100 の特徴的な発現パターンに関しては、小胞体膜タンパクを過剰発現させた際に誘導される

(Anderson et al., 1983, Yamamoto et al., 1996, Snapp et al., 2003)、クリスタロイド小胞体の形成を示唆するものと考えられる。



ER localization of SM-N100-FLAG-ELuc. HEK293 cells stably expressing SM-N100-FLAG-ELuc were treated with or without 1 μ M NB-598 for 16 h, and immunocytochemical staining was performed using anti-FLAG and anti- calnexin antibodies. Arrows are shown as reference points for comparison. Scale bar, 10 μ m.

これらと一致する結果が細胞内オルガネラの分画によっても確認された。小胞体膜タンパクであり、コレステロール結合タンパクである SCAP の細胞内分画の報告 (Radhakrishnan et al., 2007) をもとに、シヨ糖密度勾配遠心によるオルガネラ分画を行なった。本実験ではリソソームと小胞体がオーバーラップしている様子が見られるが、これは報告通り (Radhakrishnan et al., 2007, Abi-Mosleh et al., 2009) であり、サイトゾル、ゴルジ体やプラズマメンブレンとの分離は明確である。小胞体マーカーと SM-N100 の局在に関しては SM-N100-FLAG-ELuc のみならず、内在性 SM についても小胞体マーカーであるカルネキシンと同様の分布を示している。さらに NB 処理によって増えた SM が小胞体マーカーの分布と一致することも示された。



Squalene-mediated stabilization occurs at the ER. (A) HEK293 cells stably expressing SM-N100-FLAG-ELuc were treated with or without 1 μ M NB-598 for 16 h, and cell homogenates were fractionated by sucrose gradient ultracentrifugation. Fractions were collected and analyzed for the

presence of SM-N100-FLAG-ELuc and endogenous SM by immunoblotting. Open arrows denote SM-N100-FLAG-ELuc or endogenous, full-length SM. Asterisk indicates a non-specific band. Note that the fractions 5-6 showed higher background due to larger amount of total protein in the fractions. (B) The presence of the indicated organelle markers in cell fractions was quantified by immunoblotting or enzyme assays. Data is representative of n = 2 independent experiments with similar results.

6 結論および今後の展望

コレステロール合成に関与する制御因子の構造や機能解析は、タンパク間相互作用や、内在性脂質とタンパクの相互作用などいくつかの要素が複雑に絡み合った系を理解する上での重要な知見を提供することが期待される。また、コレステロールは必須の生体内脂質であるが、過剰なコレステロールは疾患の増悪因子となる。コレステロール合成の恒常性維持の解明は、脂質異常症に対する治療法の基礎研究として有益であると考えられる。以下に本研究で得た新たな知見と今後の研究につながる考察をまとめる。

スクアレンによる SM-N100 の安定化と構造解析

SM はコレステロールによって分解され、分解には SM の N 末端ドメイン、SM-N100 が必要十分である。しかし、SM-N100 の構造や機能は完全には明らかになっておらず、ステロールによる分解メカニズムも議論の最中である。本研究ではこれまでの研究とは異なるアプローチで、SM-N100 の構造や機能の解析に取り組むべく、SM のプロテオスタシスを指標としたケミカルジェネティクススクリーニングを行なった。その結果、SM 阻害剤が SM を安定化することを見出した。安定化に必要なのは阻害剤が SM の触媒ドメインへ直接結合することと、阻害剤によって蓄積したスクアレンが SM-N100 へ結合することであった。我々は SM-N100 に関する新たな知見として、基質であるスクアレンのセンサーであり、スクアレンによって安定化されるアロステリックな制御部位であるということを見出した。本研究で見出したスクアレンによる SM-N100 の安定化は、未だなされていない SM-N100 の精製や構造解析に役立つ重要な知見になるものと考えられる (Vedadi et al., 2006)。現在報告のある SM 触媒ドメインの構造に加えて、SM-N100 の構造が解き明かされることで、スクアレンがどのようにして SM-N100 に認識されるかといった構造生物学的解析が可能になると考えられる。

スクアレンによる SM の安定化の生理的意義

基質が蓄積した状態で、その代謝酵素の安定性が向上し、代謝能を亢進するといった制御機構は合理的なポジティブフィードフォワードであると考えられる。スクアレン蓄積によって SM の安定性がポジティブに制御されることは見出したが、SM の安定化がコレステロール合成をポジティブに制御するのかといった点や生理的にどのような意義があるかという点に関してはさらなる検証が必要である。生体内においてスクアレンが蓄積する状況として考えられるのは、低酸素状態である。なぜならスクアレンのエポキシ化に酸素が必要だからである。このような状況下

では、蓄積したスクアレンが SM の安定化を誘導し、スクアレンの代謝を少しでも亢進させることで、ラノステロールの生成を促していると考えられる。実際、低酸素状態では時間依存的にスクアレンやラノステロールが蓄積することが報告されている (Kuchorzewska et al., 2015)。ラノステロールの蓄積は HMGCR の分解を誘導し、コレステロール合成を翻訳後レベルで抑制する。ラノステロールからコレステロールへの代謝にも多くの酸素が動員されるため、低酸素状態においてはコレステロール合成における酸素の消費を回避すべく、このような機構が働いていると考えられている (Nguyen et al., 2007)。

生理活性物質としてのスクアレン

スクアレンは脂質膜の組成成分やコレステロール合成の中間体としての役割以外に、脂質の過酸化を防ぐ抗酸化剤として働き、ferroptosis を阻害する (Garcia-Bermudez et al., 2019) ことが知られている。そのほかのスクアレンの機能としてはホスファターゼである Wip1 の発現量亢進が知られている (Tatewaki et al., 2016)。我々は本研究において、スクアレンが代謝酵素のアロステリック部位へ結合を介して、その安定性を制御するという新奇なスクアレンの機能を見出した。スクアレンの代謝産物であるコレステロールは様々な標的タンパクと結合し (Hulce et al., 2013)、その機能を制御することが知られているが、スクアレンに関する知見は先述の例や本研究をはじめとしてわずかである。コレステロール合成における重要な中間体であるスクアレンがそのほかにどのようなタンパクの機能制御に関与しているのかは興味をもたれる。

リガンド結合部位としての SM-N100

本研究では光親和性標識実験により、SM-N100 がスクアレン結合サイトであることを見出した。SqBPY-153 のような合成低分子化合物も SM-N100 に結合し、安定化を誘導することから、SM-N100 の安定性を低分子によって制御できる可能性がある。現状見出しているのは安定化誘導化合物 SqBPY-153 のみであるが、スクリーニングや構造活性相関研究によって分解誘導化合物を創出できる可能性がある。ヒトに対する SM 阻害剤はこれまでに開発されているものの、実用化には至っていない (Belter et al., 2011)。SM は HMGCR の下流で働くことから、SM 分解誘導剤はコレステロール合成選択的な阻害薬として有望である。

References

- A. Belter, M. Skupinska, M. Giel-Pietraszuk, T. Grabarkiewicz, L. Rychlewski, J. Barciszewski, Squalene monooxygenase – a target for hypercholesterolemic therapy, *Biol. Chem.* **392**, 1053–1075 (2011).
- A. Chugh, A. Ray, J.B. Gupta, Squalene epoxidase as hypocholesterolemic drug target revisited, *Prog. Lipid. Res.* **42**, 37–50 (2003).
- A. Endo, M. Kuroda, Y. Tsujita, ML-236A, ML-236B, AND ML-236C, NEW INHIBITORS OF CHOLESTEROGENESIS PRODUCED BY PENICILLIUM CITRINUM, *J. Antibiotics*, **29**, 1346–1348, (1976).
- A. Radhakrishna, L.-P. Sun, H.J. Kwon, M.S. Brown, J.L. Goldstein, Direct Binding of Cholesterol to the Purified Membrane Region of SCAP: Mechanism for a Sterol-Sensing Domain. *Mol. Cell*, **15**, 259–268 (2004).
- A. Radhakrishnan, J.L. Goldstein, J.G. McDonald, M.S. Brown, Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance. *Cell Metabolism* **8**, 512–521 (2008).
- A. Yamamoto, R. Masaki, Y. Tashiro, Formation of crystalloid endoplasmic reticulum in COS cells upon overexpression of microsomal aldehyde dehydrogenase by cDNA transfection. *J. Cell Sci.* **109**, 1727–1738 (1996).
- A.D. Nguyen, J.G. McDonald, R.K. Bruick, R.A. DeBose-Boyd, Hypoxia stimulates degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase through accumulation of lanosterol and hypoxia-inducible factor-mediated induction of insigs. *J. Biol. Chem.* **282**, 27436–27446 (2007).
- A.D. Nguyen, S.H. Lee, R.A. DeBose-Boyd, Insig-mediated, sterol-accelerated degradation of the membrane domain of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in insect cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 26778–26788 (2009).

A.K. Padyana, S. Gross, L. Jin, G. Cianchetta, R. Narayanaswamy, F. Wang, R. Wang, C. Fang, X. Lv, S.A. Biller, L. Dang, C.E. Mahoney, N. Nagaraja, D. Pirman, Z. Sui, J. Popovici-Muller, G.A. Smolen, Structure and inhibition mechanism of the catalytic domain of human squalene epoxidase, *Nat. Commun.* **10**, 97–10 (2019).

B. Eisele, R. Budzinski, P. Müller, R. Maier, M. Mark, Effects of a novel 2,3-dioxidosqualene cyclase inhibitor on cholesterol biosynthesis and lipid metabolism in vivo, *J. Lipid Res.* **38**, 564–575, (1997).

B.-L. Song, N.B. Javitt, R.A. DeBose-Boyd, Insig-mediated degradation of HMG-CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. *Cell Metab.* **1**, 179–189 (2005).

B.-L. Song, R.A. DeBose-Boyd, Ubiquitination of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase in Permeabilized Cells Mediated by Cytosolic E1 and a Putative Membrane-bound Ubiquitin Ligase. *J. Biol. Chem.* **279**, 28798–28806 (2004).

B.A. Janowski, M.J. Grogan, S.A. Jones, G.B. Wisely, S.A. Kliewer, E.J. Corey, D.J. Mangelsdorf, Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRA and LXRβ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 266–271 (1999).

C. A. Harris, J. T. Haas, R. S. Streeper, S. J. Stone, M. Kumari, K. Yang, X. Han, N. Brownell, R. W. Gross, R. Zechner, R. V. Farese, DGAT enzymes are required for triacylglycerol synthesis and lipid droplets in adipocytes, *J. Lipid Res.* **52**, 657–667 (2011).

C.E. Mahoney, D. Pirman, V. Chubukov, T. Sleger, S. Hayes, Z.P. Fan, E.L. Allen, Y. Chen, L. Huang, M. Liu, Y. Zhang, G. McDonald, R. Narayanaswamy, S. Choe, Y. Chen, S. Gross, G. Cianchetta, A.K. Padyana, S. Murray, W. Liu, et al., A chemical biology screen identifies a vulnerability of neuroendocrine cancer cells to SQLE inhibition, *Nat. Commun.* **10**, 96 (2019).

D. Dvornik, M. Kraml, J. Dubuc, M. Givner, R. Gaudry, A Novel Mode of Inhibition of Cholesterol Biosynthesis, *J. Am. Chem. Soc.* **20**, 3309 (1963).

D. Ramsay, N. Bevan, S. Rees, G. Milligan, Detection of receptor ligands by monitoring selective stabilization of a Renilla luciferase-tagged, constitutively active mutant, G-protein-coupled receptor, *Br. J. Pharmacol.* **133**, 315–323 (2001).

D.J. Chin, G. Gil, J.R. Faust, J.L. Goldstein, M.S. Brown, K.L. Luskey, Sterols accelerate degradation of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase encoded by a constitutively expressed cDNA, *Mol. Cell Biol.* **5**, 634–641 (1985).

D.J. MacEwan, G. Milligan, Inverse agonist-induced up-regulation of the human beta2-adrenoceptor in transfected neuroblastoma X glioma hybrid cells, *Mol. Pharmacol.* **50**, 1479–1486 (1996).

E.L. Snapp, R.S. Hegde, M. Francolini, F. Lombardo, S. Colombo, E. Pedrazzini, N. Borgese, J. Lippincott-Schwartz, Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions, *J. Cell Biol.* **163**, 257–269 (2003).

F.R. Santori, P. Huang, W.D. Nes, D.R. Littman, Identification of Natural ROR γ Ligands that Regulate the Development of Lymphoid Cells. *Cell Metab.* **21**, 286–297 (2015).

G. C. Liu, E. H. Ahrens, P. H. Schreiber, J. R. Crouse, Measurement of squalene in human tissues and plasma: validation and application, *J. Lipid Res.* **17**, 38–45 (1976).

G. Cirmena, P. Franceschelli, E. Isnaldi, L. Ferrando, M. De Mariano, A. Ballestrero, G. Zoppi, Squalene epoxidase as a promising metabolic target in cancer treatment, *Cancer Letters* **425**, 13–20 (2018).

G. Gil, J.R. Faust, D.J. Chin, J.L. Goldstein, M.S. Brown, Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme, *Cell* **41**, 249–258 (1985).

Huang, E.Y., To, M., Tran, E., Dionisio, L.T.A., Cho, H.J., Baney, K.L.M., Pataki, C.I., and Olzmann, J.A., A VCP inhibitor substrate trapping approach (VISTA) enables proteomic profiling of endogenous ERAD substrates. *Mol. Biol. Cell* **29**, 1021–1030 (2018).

I. Coma, J. Herranz, J. Martin, Statistics and decision making in high-throughput screening. *Methods Mol. Biol.* **565**, 69–106 (2009).

I. Kristiana, W. Luu, J. Stevenson, S. Cartland, W. Jessup, J.D. Belani, S.D. Rychnovsky, A.J. Brown, Cholesterol through the looking glass: ability of its enantiomer also to elicit homeostatic responses. *J. Biol. Chem* **287**, 33897–33904 (2012).

J. Garcia-Bermudez, Lou Baudrier, E.C. Bayraktar, Y. Shen, K. La, R. Guarecuco, B. Yucel, D. Fiore, B. Tavora, E. Freinkman, S.H. Chan, C. Lewis, W. Min, G. Inghirami, D.M. Sabatini, K. Birsoy, Squalene accumulation in cholesterol auxotrophic lymphomas prevents oxidative cell death, *Nature* **567**, 118–122 (2019).

J. Stevenson, W. Luu, I. Kristiana, A.J. Brown, Squalene mono-oxygenase, a key enzyme in cholesterol synthesis, is stabilized by unsaturated fatty acids. *Biochem. J.* **461**, 435–442 (2014).

J.A. Nelson, S.R. Steckbeck, T.A. Spener, Biosynthesis of 24,25-Epoxycholesterol from Squalene_{2,3;22,23}-Dioxide, *J. Biol. Chem.* **256**, 1067–1068 (1981).

J.E. Dunford, K. Thompson, F.P. Coxon, S.P. Luckman, F.M. Hahn, C.D. Poulter, F.H. Ebetino, M.J. Rogers, Structure-Activity Relationships for Inhibition of Farnesyl Diphosphate Synthase in Vitro and Inhibition of Bone Resorption in Vivo by Nitrogen-Containing Bisphosphonates, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296**, 235–242 (2000).

J.L. Goldstein, R.A. Debose-boyd, M.S. Brown, Protein Sensors for Membrane Sterols. *Cell*, **124**, 35–46 (2006).

K. Ben M'barek, D. Ajjaji, A. Chorlay, S. Vanni, L. Forêt, A.R. Thiam, ER Membrane Phospholipids and Surface Tension Control Cellular Lipid Droplet Formation. *Dev. Cell* **41**, 591–604.e7 (2017).

K. Bersuker, J.M. Hendricks, Z. Li, L. Magtanong, B. Ford, P. H. Tang, M.A. Rpberts.B. Tong, T.J. Maimone, R. Zoncu, M.C. Bassolo, D.K. Nomura, S.J. Dixon, J.A. Olzmann, The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis, *Nature*, **575**, 688–692 (2019).

K. Ohgane, F. Karaki, K. Dodo and Y. Hashimoto, Discovery of oxysterol-derived pharmacological chaperones for NPC1: implication for the existence of second sterol-binding site. *Chem. Biol.* **20**, 391–402 (2013).

K.H. Choi, H. Basma, J. Singh, P.-W. Cheng, Activation of CMV promoter-controlled glycosyltransferase and beta -galactosidase glycoenes by butyrate, trichostatin A, and 5-aza-2'-deoxycytidine, *Glycoconj. J.* **22**, 63–69 (2005).

K.H. Stopsack, T.A. Gerke, J.A. Sinnott, K.L. Penney, S. Tyekucheva, H.D. Sesso, S.-O. Andersson, O. Andrén, J.R. Cerhan, E.L. Giovannucci, L.A. Mucci, J.R. Rider, Cholesterol Metabolism and Prostate Cancer Lethality. *Cancer Res.* **76**, 4785–4790 (2016).

L. Abi-Mosleh, R. E. Infante, A. Radhakrishnan, J. L. Goldstein, M. S. Brown, Cyclodextrin overcomes deficient lysosome-to-endoplasmic reticulum transport of cholesterol in Niemann-Pick type C cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 19316–19321 (2009).

L. Chen, M.-Y. Ma, M. Sun, L.-Y. Jiang, X.-T. Fang, S.M. Lam, G.-H. Shui, J. Luo, X.-J. Shi, B.-L. song, Endogenous sterol intermediates of the mevalonate pathway regulate HMGCR degradation and SREBP-2 processing. *J. Lipid Res.* **60** 1765–1775 (2019) .

L.G. Humber, Agents Affecting Lipid Metabolism. XII. N,N'-Disubstituted Cyclohexane-1,4-bis(methylamines), *J. Med. Chem.* **7**, 826–830, (1964).

M. Côté, J. Misasi, T. Ren, A. Bruchez, K. Lee, C.M. Filone, L. Hensley, Q. Li, D. Ory, K. Chandran, J. 20, *Nature* **477**, 344–348 (2011).

M. Honsho, Y. Abe, Y. Fujiki, Dysregulation of Plasmalogen Homeostasis Impairs Cholesterol Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **290**, 28822–28833 (2015).

M. Horie, Y. Tsuchiya, M. Hayashi, Y. Iida, Y. Iwasawa, Y. Nagata, Y. Sawasaki, H. Fukuzumi, K. Kitani, T. Kamei, NB-598: a potent competitive inhibitor of squalene epoxidase, *J. Biol. Chem.* **265**, 18075–18078 (1990).

M. Nakanishi, J.L. Goldstein, M.S. Brown, Multivalent Control of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.* **263**, 8929–8937 (1988).

M. Vedadi, F.H. Niesen, A. Allali-Hassani, O.Y. Fedorov, P.J. Finerty, G.A. Wasney, R. Yeung, C. Arrowsmith, L.J. Ball, H. Berglund, R. Hui, B.D. Marsden, P. Nordlund, M. Sundstrom, J. Weigelt, A.M. Edwards, Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 15835–15840 (2006).

M.F. Favata, J.M. Trzaskos, H.W. Chen, R.T. Fischer, R.S. Greenberg, Modulation of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A Reductase by Azole Antimycotics Requires Lanosterol Demethylation, but Not 24,25-Epoxy Lanosterol Formation, *J. Biol. Chem.* **262**, 12254–12260, (1987).

M.S. Brown, A. Radhakrishnan, J.L. Goldstein, Retrospective on Cholesterol Homeostasis: The Central Role of *Scap*, *Annu. Rev. Biochem.* **87**, 783–807 (2018).

M.S. Brown and J.L. Goldstein, Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J. Lipid Res.* **21**, 505–517 (1980).

M.M. Schumacher, R. Elsabrouy, J. Seemann, Y. Jo, R.A. DeBose-Boyd, The prenyltransferase

UBIAD1 is the target of geranylgeraniol in degradation of HMG CoA reductase. *Elife*, **4**, 1–21 (2015).

N. K. Chua, N. A. Scott, A. J. Brown, Valosin-containing protein mediates the ERAD of squalene monooxygenase and its cholesterol-responsive degron, *Biochem. J.* **476**, 2545–2560 (2019).

N. Tatewaki, T. Konishi, Y. Nakajima, M. Nishida, M. Saito, T. Eitsuka, T. Sakamaki, N. Ikekawa, H. Nishida, Squalene Inhibits ATM-Dependent Signaling γ IR-induced DNA Damage Response through Induction of Wip1 Phosphatase, *PLoS ONE*, **11**, e0147570.

N. Zelcer, L.J. Sharpe, A. Loregger, I. Kristiana, E.C.L. Cook, L. Phan, J. Stevenson, A.J. Brown, The E3 ubiquitin ligase MARCH6 degrades squalene monooxygenase and affects 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase and the cholesterol synthesis pathway, *Mol. Cell Biol.* **34**, 1262–1270 (2014).

N.K. Chua, G. Hart-Smith, A.J. Brown, Non-canonical ubiquitination of the cholesterol-regulated degron of squalene monooxygenase, *J. Biol. Chem.* **294**, 8134–8147 (2019a).

N.K. Chua, N.A. Scott, A.J. Brown, Valosin-containing protein mediates the ERAD of squalene monooxygenase and its cholesterol-responsive degron. *Biochem. J.* **476**, 2545–2560 (2019b).

N.K. Chua, V. Howe, N. Jatana, L. Thukral, A.J. Brown, A conserved degron containing an amphipathic helix regulates the cholesterol-mediated turnover of human squalene monooxygenase, a rate-limiting enzyme in cholesterol synthesis, *J. Biol. Chem.* **292**, 19959–19973 (2017).

Nagumo, T. Kamei, J. Sakakibara, T. Ono, Purification and characterization of recombinant squalene epoxidase, *J. Lipid Res.* **36**, 1489–1497 (1995).

O. Foresti, A. Ruggiano, H.K. Hannibal-Bach, C.S. Ejsing, P. Carvalho, Sterol homeostasis requires regulated degradation of squalene monooxygenase by the ubiquitin ligase Doa10/Teb4, *Elife* **2**, e00953 (2013).

P. Kucharzewska, H.C. Christianson, M. Belting, Global profiling of metabolic adaptation to hypoxic stress in human glioblastoma cells. *PLoS ONE* **10** e0116740 (2015).

P. Liu, Y. Ying, Y. Zhao, D.I. Mundy, M. Zhu, R.G.W. Anderson, Chinese Hamster Ovary K2 Cell Lipid Droplets to Be Metabolic Organelles Involved in Membrane Traffic. *J. Biol. Chem.* **279**, 3787–3792 (2004).

P.A. Stevens, N. Bevan, S. Rees, G. Milligan, Resolution of inverse agonist-induced up-regulation from constitutive activity of mutants of the alpha(1b)-adrenoceptor, *Mol. Pharmacol.* **58**, 438–448 (2000).

R. Leber, K. Landl, E. Zinser, H. Ahorn, A. Spök, S. D. Kohlwein, F. Turnowsky, G. Daum, Dual Localization of Squalene Epoxidase, Erg1p, in Yeast Reflects a Relationship between the Endoplasmic Reticulum and Lipid Particles, *Mol. Biol. Cell* **9**, 375–386 (1998).

R.G. Anderson, L. Orci, M.S. Brown, L.M. Garcia-Segura, J.L. Goldstein, Ultrastructural analysis of crystalloid endoplasmic reticulum in UT-1 cells and its disappearance in response to cholesterol, *J. Cell Sci.* **63**, 1–20 (1983).

R. Gonzalez, J.P. Carlson and M.E. Dempsey, Two major regulatory steps in cholesterol synthesis by human renal cancer cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **196**, 574–580 (1979).

S. Gill, J. Stevenson, I. Kristiana, A.J. Brown, Cholesterol-Dependent Degradation of Squalene Monooxygenase, a Control Point in Cholesterol Synthesis beyond HMG-CoA Reductase, *Cell Metab.* **13**, 260–273 (2011).

S. Haider, A. McIntyre, R.G.P.M. van Stiphout, L.M. Winchester, S. Wigfield, A.L. Harris, F.M. Buffa, Genomic alterations underlie a pan-cancer metabolic shift associated with tumour hypoxia. *Genome Biol.* **17**, 140–17 (2016).

S. Nachtergaele, L.K. Mydock, K. Krishnan, J. Rammohan, P.H. Schlesinger, D.F. Covey, R. Rohatgi, Oxysterols are allosteric activators of the oncoprotein Smoothed. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 211–220 (2012).

S. Nanjyo, K. Ohgane, H. Yoshioka, M. Makishima, Y. Hashimoto, T. Noguchi-Yachide, Structure-activity relationship study of estrogen receptor down-regulators with a diphenylmethane skeleton. *Bioorg. Med. Chem.* **27**, 1952–1961 (2019).

S.L. Schreiber, Chemical genetics resulting from a passion for synthetic organic chemistry, *Bioorg. Med. Chem.* **6**, 1127–1152 (1998).

T. A. Miettinen, Diurnal variation of cholesterol precursors squalene and methyl sterols in human plasma lipoproteins, *J. Lipid Res.* **23**, 466–473 (1982).

T. Hauss, S. Dante, N.A. Dencher, T.H. Haines, Squalane is in the midplane of the lipid bilayer: implications for its function as a proton permeability barrier, *Biochim. Biophys. Acta.* **1556**, 149–154 (2002).

T. Ikekawa, M. Umeji, T. Manabe, S. Yanoma, K. Irinoda, H. Mizunuma, N. Ikekawa, Studies on Antitumor Activity of Squalene and Its Related Compounds. *YAKUGAKU ZASSHI* **106**, 578–582 (1986)

T. Miki, M. Kori, H. Mabuchi, R. Tozawa, T. Nishimoto, Y. Sugiyama, K. Teshima, H. Yukimasa, Synthesis of Novel 4,1-Benzoxazepine Derivatives as Squalene Synthase Inhibitors and Their Inhibition of Cholesterol Synthesis, *J. Med. Chem.* **45**, 4571–4580 (2002).

T. Nishimoto, Y. Amano, R. Tozawa, E. Ishikawa, Y. Imura, H. Yukimasa, Y. Sugiyama, lipid-

lowering properties of TAK-475, a squalene synthase inhibitor, in vivo and invitro, *Br. J. Pharmacol.* **139**, 911–918 (2003).

V. Howe, N.K. Chua, J. Stevenson, A.J. Brown, The Regulatory Domain of Squalene Monooxygenase Contains a Re-entrant Loop and Senses Cholesterol via a Conformational Change, *J. Biol. Chem.* **290**, 27533–27544 (2015).

V.R. Viviani, A.C.R. Silva, G.L.O. Perez, R.V. Santelli, E.J.H. Bechara, F.C. Reinach, Cloning and Molecular Characterization of the cDNA for the Brazilian Larval Click-beetle *Pyrearinus termitilluminans* Luciferase, *Photochem. Photobiol.* **70**, 254–260 (1999).

Y. Amano, T. Nishimoto, R. Tozawa, E. Ishikawa, Y. Imura, Y. Sugiyama, Lipid-lowering effects of TAK-475, a squalene synthase inhibitor, in animal models of familial hypercholesterolemia, *Euro. J. Pharmacol.* **466**, 155–161 (2003).

Y. Fujimoto, H. Itabe, J. Sakai, M. Makita, J. Noda, M. Mori, Y. Higashi, S. Kojima and T. Takano, Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim. Biophys. Acta* **1644**, 47–59 (2004)

Y. Iwasawa, M. Horie, Mammalian squalene epoxidase inhibitors and structure-activity relationships, *Drugs of the Future* **18**, 911–918 (1993).

Y. Nakajima, T. Yamazaki, S. Nishii, T. Noguchi, H. Hoshino, K. Niwa, V.R. Viviani, Y. Ohmiya, Enhanced beetle Luciferase for high-resolution bioluminescence imaging, *PLoS ONE* **5**, e10011 (2010).

Supplementary Information

Materials

A library of FDA-approved drugs (Screen-Well FDA approved drug library V2 version 1.0) containing 768 drugs was purchased from Enzo Life sciences. Chemical reagents used in this study are listed below with the supplier; CB-5083 (Cayman), n-dodecyl-beta-D-maltoside (Dojindo), TAK-243 (CHEMIETEK), squalane (FUJIFILM Wako Pure Chemicals), squalene (TCI), TAK-475 (Sigma-Aldrich), NB-598 (Chemscone), BIBB-515 (Cayman), cholesterol complexed with methyl- β -cyclodextrin (Chol/CD) (Sigma), compactin (Sigma), mevalonate (Sigma) and 5 α -cholestane (Sigma), T863 (Sigma-Aldrich), PF-06424439 (Sigma-Aldrich). Small interfering RNA (siRNA) was purchased from Sigma-Aldrich. Oxidosqualene and dioxidosqualene were synthesized as reported previously (4). Fetal calf serum (FCS) was purchased from Life Technologies.

The following antibodies were used: monoclonal mouse anti-V5 (1:5000 for 1 h at room temperature, Thermo Fisher Scientific E96025) (5), rabbit polyclonal anti-SQLE(SM) (1:2,500 overnight at 4°C, Proteintech 12544-1-AP) (6), mouse monoclonal anti- α -tubulin (1:20,000 for 1 h at room temperature, Sigma T5168) (5), IRDye 800CW donkey anti-mouse IgG (1:10,000 for 1 h at room temperature, LI-COR Biosciences LCR-926-32212) (5), peroxidase AffiniPure donkey anti-rabbit IgG (1:5,000 for 1 h at room temperature, Jackson ImmunoResearch 711-035-152), penta-His HRP conjugate (1:2000 for 1 h at room temperature, Qiagen), rabbit polyclonal anti-myc (Abcam ab9106) (7), rabbit polyclonal anti-FKBP12-rapamycin-associated protein (mTOR) (FRAP H-266, Santa Cruz Biotechnology, sc-8319) (8), mouse monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma, F1804) (9), anti-FLAG M2 magnetic beads (Sigma, M8823) (9), Goat anti-mouse IgG HRP conjugate (Millipore, 12-349) (4), anti-rabbit IgG HRP, goat polyclonal (Cell Signaling, 7074S) (10–11), anti-Ub conjugated with HRP (Santa cruz biotechnology, sc-8017) (5), and ImmunoPure streptavidin-HRP (Pierce, 21126) (9), anti- α -tubulin mouse (1:5,000 for 1 h at room temperature, Millipore, 05-829) (12).

Expression Plasmids

All the PCR reactions were performed using KOD-plus- ver2 polymerase (Toyobo) following the manufacturer's protocol. Restriction enzymes were purchased from Promega for Sgfl and New England Biolab for MluI, and double digestion with these enzymes were performed at 37°C for 3 h followed by Sgfl-inactivation at 65°C for 20 min in the NEBuffer3 supplemented with BSA (New

England Biolab). Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP) for dephosphorylation of digested fragments was purchased from Toyobo. Ligation reactions were performed using Ligation High ver.2 (Toyobo) following the manufacturer's protocol. Integrity of the plasmids were confirmed by sequencing.

First, the full-length pCMV-SM-FLAG-ELuc plasmid was produced by inserting a fragment of SM coding sequence derived from pENTR221-SM (Flexi ORF clone ORH08872, from Kazusa DNA Research Institute) into a previously described empty vector pCMV-AC-FLAG-ELuc (10). Subcloning into the pCMV-AC-FLAG-ELuc was performed at Sgf I site (just before the start codon) and MluI site (just after the inserted coding sequence and before the linker), and SgfI-SM-MluI fragment was prepared using a set of primers, TAAGCGATCGCCATGTGGACTTTTCTGGGCATTG (SgfSqrF) with its appended SgfI site underlined, and CGTACGCGTATGAACCATATACTTCATTTCTGAG (MluSqrR) with its appended MluI site underlined. Thus, the overall coding sequence is as follows: human SM (without stop codon), a linker (TRTRPLE residues, containing MluI site), FLAG tag (DYKDDDDK residues), AS residues (containing NheI site), ELuc residues without stop codon, and an additional V residue as a part of MluI site.

Deletion constructs (pCMV-SM-N100-FLAG-ELuc and pCMV-SM- Δ N100-SM-FLAG-ELuc) were prepared by inverse PCR method using KOD-plus-ver.2 (Toyobo), DpnI (Toyobo), T4 kinase (Toyobo), Ligation High ver.2, and pairs of non-overlapping primers, ACGCGTACGCGGCCGCTCGAG (forward) and TTTTCTGCGCCTCCTGGCCTCG (reverse) for N100, and TAAGCGATCGCCATGGGAACCAATATTTTC (forward) and CATGGCGATCGCTTAAGCGGGTC (reverse) for Δ N100.

Cell culture, transfections, and stable cell lines

Clones of stable HEK293 cell lines expressing SM-ELuc, SM-N100-ELuc, or SM- Δ N100-ELuc under the control of CMV promoter were established as previously described (9). Briefly, HEK293 cells (obtained from ATCC) at around 80% confluence were transfected with the corresponding plasmids using Lipofectamine LTX (Invitrogen) transfection reagents, and selection pressure was applied with 0.4 mg/mL G418 sulfate. Single clones were isolated by limited dilution and expanded. The stable cell lines were cultured in high-glucose DMEM (Wako) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 2% penicillin/streptomycin at 37°C in a humidified

incubator (5% CO₂). HEK-SM-N100-GFP-V5 cells (13) were cultured and maintained in DMEM (high-glucose) supplemented with 10% (v/v) FCS, 200 µg/ml of hygromycin B, and penicillin (100 units/ml) and streptomycin (100 µg/ml). Where indicated, cells were conditioned in maintenance medium containing 10% (v/v) FCS, 10% (v/v) lipoprotein-deficient FCS (LPDS) or 10% (v/v) LPDS plus 5 µM compactin and 10 µM mevalonate. Inclusion of small amounts of mevalonate ensures that the production of isoprenoids essential for cell viability continues while the mevalonate pathway is inhibited by compactin. LPDS was prepared from FCS as described in (14). To knock down gene expression, cells were seeded in 12-well plates and transfected with 82.5 pmol universal control (SIC001), *MARCH6* (SASI_Hs01_00105239), or *SQLE* (SASI_Hs01_00149256) siRNA using RNAiMAX transfection reagent. After 24 h, cells were treated as indicated.

Protein harvest and immunoblotting of SM-N100-GFP-V5

HEK-SM-N100-GFP-V5 cells treated as indicated were washed with PBS and scraped in 2% SDS lysis buffer (2% [w/v] SDS, 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM NaCl and 2% [v/v] protease inhibitor cocktail [Sigma]). Lysates were passed 20 times through a 21-gauge needle and vortexed for 20 min, and total protein content was quantified using the bicinchoninic acid assay. Samples were normalized to a protein concentration of 0.80 µg/µl using 2% SDS lysis buffer and 0.25 vol Laemmli buffer, separated by 10% SDS-PAGE, and transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with 5% (w/v) skim milk in PBST and probed with the appropriate primary and secondary antibodies. Fluorescent detection of V5 and α-tubulin was performed using an Odyssey Clx imager (LI-COR Biosciences), while enhanced chemiluminescent detection of endogenous SM and MARCH6-myc was performed using Immobilon western chemiluminescence HRP substrate (Millipore) and a LAS 500 imager (GE Healthcare).

Co-immunoprecipitation of MARCH6 and SM-N100-GFP-V5

HEK-SM-N100-GFP-V5 cells were transfected with MARCH6-myc expression construct for 24 h and treated as indicated for 16 h. Cells were washed and scraped in cold PBS and centrifuged at 1,000 × g and 4°C for 10 min. The pellet was resuspended in 500 µl modified RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% [w/v] SDS, 1.5% [w/v] Nonidet P-40, 0.5% [w/v] sodium deoxycholate, 2 mM MgCl₂, 2% [v/v] protease inhibitor cocktail), passed 20 times through a 21-gauge needle and centrifuged at 20,000 × g and 4°C for 20 min. Total protein content of the

supernatant was quantified using the bicinchoninic acid assay, and equal amounts of protein were immunoprecipitated using 4 µg Dynabead-conjugated anti-myc or anti-mTOR by rotating at 4°C for 16 h. Beads were washed three times in modified RIPA buffer by rotating at 4°C for 1 h, and protein was eluted by vortexing in 50 µl elution buffer (20 µl 10% [w/v] SDS, 20 µl modified RIPA buffer, 10 µl 1× Laemmli buffer) at room temperature for 30 min. Eluates and equal amounts of input protein were separated and immunoblotted as described in the section “protein harvest and immunoblotting”. MARCH6-myc was detected using penta-His HRP conjugate.

Lipid extraction

HEK-SM-N100-ELuc cells treated as indicated were washed with PBS and lysed in 0.05 M NaOH. Total protein content was quantified using the bicinchoninic acid assay, and samples were adjusted to the lowest protein concentration using 0.05 M NaOH plus 4 µg 5α-cholestane as an internal standard. Lysates were saponified in 1 ml 100% (v/v) ethanol, 500 µl 75% (w/v) KOH, 1 µl 20 mM butyrate hydroxytoluene and 1 µl 20 mM EDTA at 70°C for 1 h. Non-saponifiable lipids were extracted by adding 1 ml 100% (v/v) ethanol and 2.5 ml hexane, centrifuging at 4,000 × g for 5 min, and collecting the organic phase. Samples were dried in a vacuum centrifuge. Dried lipids were resuspended in 50 µl *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and derivatized at 60°C for 1 h prior to GC-MS analysis.

GC-MS analysis

Derivatized lipids (1.5 µl) were injected via a heated (300°C) splitless with surge (38.0 psi for 0.50 min) inlet into a Thermo Trace gas chromatograph fitted with a Trace TR-50MS GC column (60 m × 0.25 mm, 0.25 µm film thickness) (Thermo Fisher Scientific). Analytes were separated with helium as the carrier gas at a constant flow of 1.2 ml/min with vacuum compensation, and temperature programming as follows: 70°C for 42 s, 20°C/min to 250°C, 3°C/min to 270°C, and 1.5°C/min to 315°C then held for 10 min. The GC column was coupled to a Thermo DSQIII mass spectrometer, with a transfer line temperature of 320°C and an ion source temperature of 250°C. For MS analysis the electron energy was 70 eV, the emission current was 130 µA and the detector gain was 3.0 × 10⁵. Squalene and 5α-cholestane standards were analyzed in scan mode (34–600 Da) to identify peaks and retention times, and identity was confirmed using the National Institute of Standards and Technology databases. Experimental samples were analyzed in selective ion monitoring mode to

detect squalene ($m/z = 81.0, 410.4$) and 5α -cholestane ($m/z = 149.1, 217.2, 372.4$), with a detection width of 0.1 and dwell time of 200 ms. Chromatographic peaks were integrated using Thermo Xcalibur software (v2.2 SP1.48), and the peak area of squalene was normalized to that of the 5α -cholestane internal standard. A squalene standard curve ranging from 1.56–100 ng/ μ l was constructed to quantify squalene in experimental samples, and data were adjusted to total protein content of the cell lysate.

Data analysis

Luciferase data were normalized to the respective vehicle conditions, which were set equal to 100%, and is represented as mean \pm SD of the indicated number of independently repeated experiments unless otherwise noted. Densitometry analysis of protein levels following immunoblotting was performed using ImageStudioLite v5.2 or ImageJ v1.52q along with Band/Peak Quantification macro (15) and normalized to the respective vehicle condition, which was set equal to 100%. Cholesterol-mediated degradation was defined as the proportion of protein degraded by Chol/CD in each condition, normalized to the vehicle condition which was set equal to 100%. Therefore, a value of 100% indicates a similar level of cholesterol-induced degradation to the vehicle condition, whereas a value of 0% indicates no cholesterol-induced degradation. To determine the relative interaction between SM-N100-GFP-V5 and MARCH6-myc, SM-N100-GFP-V5 levels in immunoprecipitation input and pellet fractions were quantified in the presence of MARCH6-myc and normalized to the vehicle condition. To account for differences in input protein, normalized SM-N100-GFP-V5 levels in the immunoprecipitation pellet were adjusted relative to the immunoprecipitation input. Densitometry data is represented as mean \pm SEM along with each raw data points from independent experiments. For densitometry data from immunoblots, the data in each experiment were normalized to that of the indicated control condition, to enable comparison of the independently repeated experiments. For statistical analysis of the immunoblotting data, differences between control and samples were tested with paired t-test, and p values were adjusted for multiple comparison as indicated in the figure legends. For luciferase data, statistical tests indicated in the figure legends were applied to pooled data set from three independent experiments. All the statistical analyses were performed with R version 3.3.3 and RStudio 1.0.153. Visualization of the data were performed with *ggplot2* package, and Dunn's Kruskal-Wallis test was done using *dunn.test* package (version 1.3.5) (16–19).

Ubiquitination assay

Confluent cells on a 6-well plate were treated with 10 μ M CB-5083 and the indicated compounds for 6 h. Then cells were washed once with PBS and lysed in TNED buffer (25 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, and 0.5% DDM) freshly supplemented with cOmplete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche) and 10mM N-ethylmaleimide on ice for 1 h. The lysate was centrifuged to remove cell debris (14,000 g, 10 min, 4°C), and total protein concentration was determined by BCA protein assay to adjust protein concentration to 2.0 μ g/ μ L. The diluted lysate (300 μ L) was mixed with pre-washed anti-FLAG M2 magnetic beads (4 μ L bed volume/sample) and the mixtures were rotated overnight at 4°C. The beads were washed twice with 300 μ L of TNED, and eluted with 30 μ L of 1.5x SDS sample buffer by heating at 60°C for 15 min. The samples (10 μ L/lane) were resolved by SDS-PAGE (40 mA, 45 min, in an ice-water bath) using (5–12% SuperSep Ace gel, Wako). The proteins were then transferred to Immobilon P PVDF membrane (Millipore), blocked with 1%BSA [w/v]-TBST (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 137 mM NaCl, 0.1% [v/v] Tween 20) for 1h, and stained overnight at 4°C with anti-Ub antibody conjugated with HRP (1/2000 dilution, P4D1, mouse monoclonal antibody) in a signal enhancer CanGetSignal solution 2 (Toyobo). The membrane was washed with TBST and detected with Immobilon Western chemiluminescence reagent (Millipore) on an EzCapture imaging system (ATTO). The blotted membrane was washed with water, and incubated with a stripping buffer (2% [w/v] SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH6.8, 100 mM 3-mercapto-1,2-propandiol) at 50°C for 30 min. The stripped blot was washed with water and TBST, and blocked again with 1%BSA-TBST for 1 h. The membrane was washed with TBST, and incubated with anti-FLAG M2 antibody (1/2000 dilution) diluted in CanGetSignal solution 1 for 1 h. After five washes in TBST, the membrane was shaken in goat polyclonal anti-mouse IgG conjugated with HRP diluted in CanGetSignal 2 (1/2000 dilution) for 1 h. The membrane was washed five times and chemiluminescent detection was performed as described above.

Subcellular fractionation

The subcellular fractionation by sucrose density ultracentrifugation was basically performed as described by Radhakrishnan et al. (20), but with additional layers of sucrose solutions to separate lipid droplets fractions, if any (21).

HEK293 cells stably expressing SM-N100-FLAG-ELuc grown on a 10 cm dish in

10%FBS-DMEM were treated with 1 μ M NB-598 or vehicle (0.1% DMSO) for 16 h. Cells were washed twice with ice-cold PBS and scraped into 1 mL of ice-cold PBS. The cell pellets were collected by centrifugation at 500 g for 5 min and resuspended in 15% (w/v) sucrose-TBS supplemented with a protease inhibitor cocktail (Millipore, cOmplete protease inhibitor cocktail, EDTA-free). Cells were homogenized by passing nine times through a Balch homogenizer (isobiotec) with a 12 μ m clearance on ice, and the homogenate was centrifuged at 3,000 g for 10 min to obtain a post-nuclear supernatant. The obtained post-nuclear supernatant was diluted three fold with 15% sucrose-TBS, and 2 mL was used for the subsequent sucrose gradient ultracentrifugation, and the rest was saved as input. A sucrose gradient was prepared in a 26 mL polycarbonate bottle (Beckman Coulter, #355618) by gently overlaying following sucrose solutions (%w/v): 2 mL of 45% solution, 4 mL of 30% solution, 2 mL of 15% solution, 2 mL of the diluted post-nuclear supernatant, 2 mL of 7.5%, and 1 mL of 2% solution. The bottles were centrifuged at 125,000 g for 1.5 h in a Type 50.2Ti fixed angle rotor on an Optima L-70K ultracentrifuge (Beckman Coulter) with slow acceleration/deceleration setting. Fractions (1 mL each) were then collected from the bottom by using a peristaltic pump (ATTO, SJ-1211). Alternatively, fractions could be collected carefully from the top (at meniscus) using a Pasteur pipette, giving similar result. Note that we numbered the fractions from top. The obtained fractions were kept on ice and analyzed within the same day. For western blotting, 40 μ L of the fractions was treated with 10 μ L of 5x SDS sample buffer, heated at 60°C for 15 min, and stored frozen at -20°C until analysis by western blotting. The samples were centrifuged at 14,000 g for 10 min and the supernatants were loaded on the SDS-PAGE gels.

Approximate densities of each fractions were measured by weighing 200 μ L of the fractions. Total protein concentration was determined by BCA protein assay using BSA as standard. α -Mannosidase activity was measured as a Golgi marker (22); 10 μ L of the fractions was mixed with 40 μ L of 1.25 mM 4-methylumbelliferyl α -mannoside (TCI) in 50 mM MES-NaOH buffer (pH6.5) containing 0.05% Triton X-100 in a black 96-well plate, incubated at 37°C for 1 h, and the reaction was stopped by adding 50 μ L of 0.5M glycine-NaOH buffer (pH 10.6). Fluorescence (excitation 355 nm, emission 450 nm) was measured on an EnVision plate reader (PerkinElmer). Alkaline α -glucosidase activity, an ER marker, was similarly measured using 4-methylumbelliferyl α -glucoside (Sigma-Aldrich) in 100 mM glycine-NaOH buffer (pH9.0) containing 0.05% Triton X-100 (22). Alkaline phosphatase activity, as a plasma membrane marker, was similarly measured by using the

following substrate solution; 10 μ L of the fractions was mixed with 40 μ L of 1.25 mM 4-methylumbelliferyl phosphate (TCI) in 100mM glycine-NaOH buffer (pH 10.4) containing 0.05% Triton X-100 and 0.5 mM magnesium acetate (22). Note that 4-nitrophenyl phosphate failed to give detectable absorbance, and BluePhos colorimetric phosphatase substrate (KBL) required longer incubation to give detectable signal. Acid phosphatase activity, a lysosome marker, was measured as follows; 10 μ L of the fractions was mixed with 40 μ L of 6.25 mM p-nitrophenyl phosphate in 50 mM acetate-sodium acetate buffer (pH4.0) containing 0.05% Triton X-100, and incubated at 37°C for 2 h, and absorbance at 405 nm was measured after stopping the reaction with 50 μ L of 0.5M glycine-NaOH buffer (pH10.6). To detect other organelle markers, western blotting was performed basically as described above (see "Ubiquitination assay" section) with the following antibodies: rabbit polyclonal anti-NPC1 (Novus Biologicals, NB-400-168, 1/3,000 dilution in CanGetSignal 1) (9), mouse monoclonal anti-Na,K-ATPase alpha 1 subunit (Abcam, ab7671, 1/3,000 dilution in TBST) (9), mouse monoclonal anti- β -actin (Sigma-Aldrich, A5441, 1/4,000 in TBST) (9), mouse monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich, F1804, 1/3000 in CanGetSignal 1), rabbit polyclonal anti-PDI (Enzo Life Sciences, ADI-SPA-890, 1/4,000 in TBST) (9), rabbit polyclonal anti-calnexin (Abcam, ab22595, 1/4,000 in TBST) (23), rabbit polyclonal anti-SM (proteintech, 12544-1-AP, 1/4,000 in CanGetSignal 1), goat polyclonal anti-mouse IgG HRP conjugate (Millipore, 12-349, 1/4,000 in CanGetSignal 2), and goat polyclonal anti-rabbit IgG HRP conjugate (Cell Signaling, 7074S, 1/4,000 in CanGetSignal 2). Detection of calnexin or PDI was performed with the strip of PVDF membrane after Na,K-ATPase detection or after actin detection, after stripping at 45°C for 30 min in a stripping buffer (2% [w/v] SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH6.8, 100 mM 3-mercapto-1,2-propandiol).

Immunocytochemical staining and microscopy

HEK293 cells stably expressing the indicated SM-FLAG-ELuc construct were grown on a glass-based dish (AGC techno glass) coated with poly-D-lysine, and treated with 1 μ M NB-598 for 16h. Cells were fixed with 10% [v/v] formalin-PBS for 15 min, followed by 3 min wash with 10 mM glycine in PBS. The cells were permeabilized with 0.1% [v/v] Triton X-100 in PBS for 10 min, blocked with 1% [w/v] BSA in PBST for 1h, and stained with anti-FLAG M2 mouse monoclonal antibody (Sigma-Aldrich, F1804) and anti-Calnexin rabbit polyclonal antibody (Abcam, ab22595) (23) diluted in 1%BSA-PBST (1/500) for 1.5 h. After three 3-min washes with PBS, cells were incubated with anti-

mouse IgG AlexaFluor 488 conjugate (Invitrogen, A11001) and anti-rabbit IgG AlexaFluor 568 conjugate (Invitrogen, A11011) diluted in 1%BSA-PBST (1/500) for 1.5 h, followed by three 3-min washes with PBS. Images were acquired on an FV3000 confocal microscope (Olympus) equipped with $\times 100$ objective lens (UPLSAPO 100XS) for analysis of colocalization.

Colocalization analysis was performed using ImageJ and EzColocalization plugin. Pearson's correlation coefficient, excluding zero-zero pixels, was calculated for manually selected ROIs surrounding each cell (24).

Photoaffinity labeling

Membrane fraction was prepared from the indicated cell lines as described previously (9). The membrane fractions prepared from HEK293 or HEK293 cells stably expressing pCMV-SM-N100-FLAG-ELuc (98 μ L, adjusted to 2.0 μ g/ μ L total protein) were incubated at 4°C with or without squalene (300 μ M, 1 μ L) and SqBPY-153 (10 μ M as indicated in the figure legend, 1 μ L) or SqBPY-150 (10 μ M, 1 μ L) for 30 min. The samples were irradiated with UV (365 nm) for 3 min using LED365-SPT/L (~2 cm from the sample, 64 mW when measured with Spectra-Physics 407A power meter, Optcode co.). The membrane fractions were lysed and denatured by adding 1/10 volume of 10%[w/v] SDS-10%[v/v] Triton X-100 stock solution on ice for 30 min. Solubilized membrane was mixed with biotin-PEG3-azide (A2523, Tokyo Chemical Industry Co. Ltd.) (5 mM in DMSO, 1 μ L) by gentle pipetting. Click reaction was performed as described previously (25) with slight modifications. Click reaction mixture was prepared by vortexing 2.5 μ L of 100 mM aqueous CuSO_4 , 11.3 μ L of water, 7.5 μ L of 1.7mM TBTA in t BuOH/DMSO (4:1, v/v), 31.3 μ L of 200 mM aminoguanidine, and 62.5 μ L of freshly prepared 100 mM sodium ascorbate. To the membrane fractions containing biotin-PEG3-azide (112.5 μ L) was added 12.5 μ L each of this click reaction mixture, and the mixtures were incubated at room temperature for 1h. After the click reaction, the mixtures were diluted 10-fold with 1125 μ L of TNET (25 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, and 1%[v/v] Triton X-100) supplemented with cOmplete protease inhibitor cocktail. The diluted mixture was mixed with pre-washed anti-FLAG M2 magnetic beads and the mixtures were rotated overnight at 4°C. The beads were washed with 400 μ L of TBS twice, and 400 μ L of TNET and eluted with 30 μ L of 1xSDS sample buffer by heating at 60°C for 15 min and cooled on ice for 15min. SDS-PAGE, transfer to PVDF membranes, and blocking of the membrane were performed as described above for the ubiquitination assay. After blocking, the PVDF membrane was probed

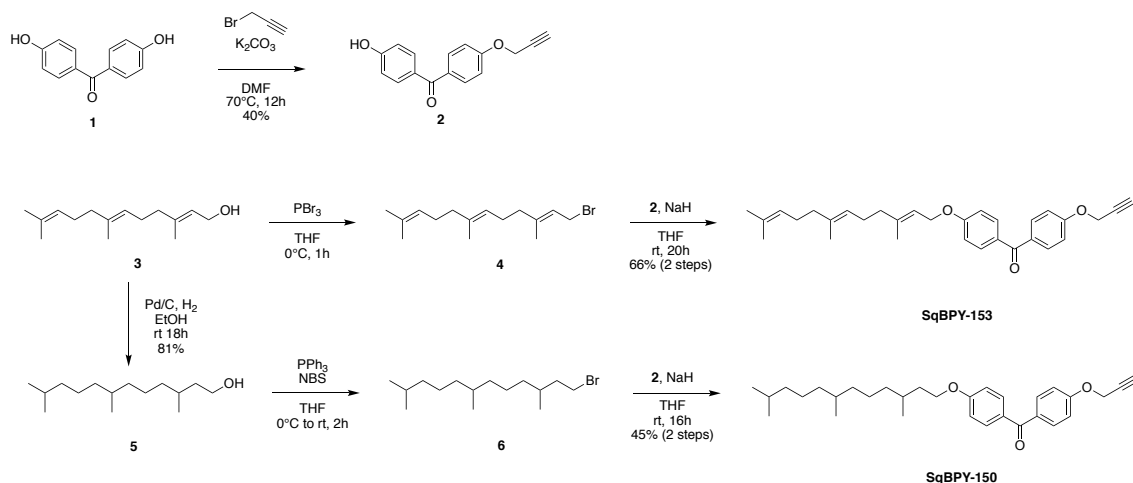
with ImmunoPure streptavidin-HRP (Pierce, x30,000 in TBST) for 1 h and chemiluminescence detection was performed as described above. Similarly, the membrane was re-probed with anti-FLAG antibody after stripping.

Protein harvest and immunoblotting of endogenous SM and SM-N100-FLAG -ELuc

HEK293 cells stably expressing pCMV-SM-N100-FLAG-ELuc were treated as indicated. The cells were washed with PBS and lysed with TNED buffer freshly supplemented with cOmplete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche) on ice for 30min. The lysates were centrifuged to remove cell debris (14,000 g, 10 min, 4°C), and total protein concentration was determined by BCA protein assay to adjust protein concentration to 2.0 µg/µL with TNED buffer. The diluted lysate (0.8 vol) was mixed with 5x SDS sample buffer (0.2 vol) by pipetting and heated at 60°C for 15 min. After centrifugation at 14,000 g for 10 min, the samples were separated and immunoblotted as described above. The same PVDF membrane was probed first with anti-SM (1/5,000 in CanGetSignal solution 1, rt, 1 h), then anti-FLAG (1/5,000 in CanGetSignal solution 1, rt, 1 h), and finally anti-α-tubulin (Millipore, 1/5,000 in CanGetSignal solution 1), using the stripping/re-probing procedure described for “ubiquitination assay” and “subcellular fractionation”.

Chemical synthesis and characterization of photoaffinity probes

General methods: All chemical reagents were obtained from commercial suppliers and used without further purification. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was performed using silica gel 60 F₂₅₄ (Merck). Flash chromatography was performed using 40-50 µm silica gel 60N (Kanto Chemical Co., Inc.). ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a JEOL JNM-ECA-500 (¹H: 500 MHz, ¹³C: 125 MHz). Chemical shift values are reported in δ (ppm) with reference to internal residual solvents [¹H NMR, CDCl₃ (7.26), CD₃OD (3.31); ¹³C NMR, CDCl₃ (77.0)]. Coupling constants (*J*) are reported in Hertz (Hz). The following abbreviations were used to designate the multiplicities; s = singlet, d = doublet, t = triplet, m = multiplet. High-resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a Bruker micrOTOF spectrometer (ESI-TOF) with internal calibration with Bruker low concentration tuning mix (G1969-85000).



4-Hydroxy-4'-propargyloxybenzophenone 2. To a solution of 4,4'-dihydroxybenzophenone **1** (1.50 g, 7.00 mmol) in DMF (14 mL) at 0°C were added K₂CO₃ (484 mg, 3.50 mmol) and propargyl bromide (265 μ L, 3.50 mmol). The reaction mixture was stirred at 80°C for 12 h, cooled to rt, and quenched with H₂O (30 mL). The mixture was extracted twice with ethyl acetate. The combined extracts were washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated. The residue was purified by flash column chromatography (hexane/EtOAc 1:2) to give **2** (710 mg, 40%) as a white solid: ¹H NMR (CD₃OD) δ 7.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.69 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.11 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 4.85 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 3.01 (t, *J* = 2.0 Hz, 3H).

SqBPY-153. Under a argon atmosphere, phosphorus tribromide (0.110 mL, 1.17 mmol) was added to a solution of farnesol **3** (400 mg, 1.80 mmol) in THF (9 mL) at 0°C and stirred for 1 h. Saturated NaHCO₃ (10 mL) was added and the mixture was extracted with hexane (3 x 20 mL). The combined organic layers were dried over Na₂SO₄ and concentrated in vacuo. The half amount of crude product was used for next reaction without further purification or characterization. Under an argon atmosphere, **2** (227 mg, 0.90 mmol) dissolved in dry THF (3 mL) was added dropwise to a suspension of sodium hydride (24 mg, 0.99 mmol) in dry THF (3 mL) and stirred for 2 h. Crude product **4** dissolved in DMSO (3 mL) was added and the mixture was stirred for 20 h. The mixture was poured onto ice-water and extracted with EtOAc. The combined organic layers were dried over Na₂SO₄, concentrated in vacuo and purified by flash column chromatography (hexane to hexane/EtOAc 8:1) to give **SqBPY-153** (271 mg, 1.18 mmol, 66%, over 2 steps) as a pale yellow solid: ¹H NMR (CDCl₃) δ 7.79 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.78 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.04 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.96 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 5.50 (m, 1H), 5.13–5.07 (m, 2H), 4.77 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H), 4.62 (d, *J* = 7.0

Hz, 2H), 2.57 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H), 2.17–2.04 (m, 6H), 1.99–1.96 (m, 2H), 1.76 (s, 3H), 1.67 (s, 3H), 1.61 (s, 3H), 1.60 (s, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 194.4, 162.3, 160.5, 141.9, 135.5, 132.2, 132.1, 131.6, 131.3, 130.4, 124.3, 123.5, 118.8, 114.3, 114.1, 65.1, 55.8, 39.7, 39.5, 26.7, 26.2, 25.7, 17.7, 16.7, 16.0; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{O}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 479.2551, found 479.2557.

Saturated alcohol 5. To a solution of farnesol **3** (100 mg, 0.449 mmol) in EtOH (5 mL) at rt was added Pd/C (10 % w/w, 10 mg), and the flask was purged with H_2 . After stirring for 18 h, the mixture was filtered through a pad of Celite using EtOH (10 mL). The solvent was removed under reduced pressure, and the residue was purified by silica gel column chromatography (hexane to hexane/EtOAc 8:1) to give saturated alcohol **5** (83.0 mg, 0.364 mmol, 81%, mixture of diastereoisomers) as a colorless oil: ^1H NMR (CDCl_3) δ 3.73–3.64 (m, 2H), 1.63–1.07 (m, 14H), 0.90–0.84 (m, 12H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 61.28, 40.04, 39.97, 39.35, 37.48, 37.45, 37.36, 37.31, 37.26, 32.77, 29.53, 27.97, 24.78, 24.36, 22.71, 22.61, 19.73, 19.68, 19.62.

SqBPY-150. A solution of N-bromosuccinimide (28 mg, 0.13 mmol) in dry CH_2Cl_2 (2 mL) was added dropwise to a solution of saturated alcohol **5** (30 mg, 0.13 mmol) and triphenylphosphine (41 mg, 0.16 mmol) in dry CH_2Cl_2 (2 mL) at 0°C . After stirring 2 h at room temperature, the reaction mixture is evaporated. The crude is dispersed in hexane and then purified by flash column chromatography on a silica gel (hexane) to afford bromide **6** as a colorless oil. Under an argon atmosphere, **2** (32 mg, 0.13 mmol) dissolved in dry THF (2 mL) was added dropwise to a suspension of sodium hydride (7 mg, 0.15 mmol) in dry THF (2 mL) and stirred for 2 h. Bromide **6** dissolved in DMSO (2 mL) was added and the mixture was stirred for 16 h. The mixture was poured onto ice-water and extracted with EtOAc. The combined organic layers were washed with brine and dried over Na_2SO_4 , concentrated in vacuo and purified by flash column chromatography (hexane to hexane/EtOAc 8:1) to give **SqBPY-150** (27 mg, 0.059 mmol, 45%, over 2 steps) as a pale yellow solid. ^1H NMR (CDCl_3) δ 7.79 (d, $J = 9.5$ Hz, 2H), 7.78 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.04 (d, $J = 9.5$ Hz, 2H), 6.95 (d, $J = 9.5$ Hz, 2H), 4.78 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 4.09–4.05 (m, 2H), 2.56 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H), 1.86 (m, 1H), 1.70 (m, 2H), 1.40–1.06 (m, 14H), 0.96 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 0.86 (m, 9H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 194.43, 162.57, 160.58, 132.28, 132.08, 131.65, 130.28, 114.31, 113.96, 66.60, 55.85, 39.34, 37.36, 37.32, 37.25, 36.08, 36.00, 32.77, 29.82, 27.96, 24.79, 24.32, 22.71, 22.61, 19.73, 19.67; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{O}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 485.3026, found 485.3017.

Supplementary References

1. R.G. Anderson, L. Orci, M.S. Brown, L.M. Garcia-Segura, J.L. Goldstein, Ultrastructural analysis of crystalloid endoplasmic reticulum in UT-1 cells and its disappearance in response to cholesterol, *J. Cell Sci.* **63**, 1–20 (1983).
2. A. Yamamoto, R. Masaki, Y. Tashiro, Formation of crystalloid endoplasmic reticulum in COS cells upon overexpression of microsomal aldehyde dehydrogenase by cDNA transfection. *J. Cell Sci.* **109**, 1727–1738 (1996).
3. E.L. Snapp, R.S. Hegde, M. Francolini, F. Lombardo, S. Colombo, E. Pedrazzini, N. Borgese, J. Lippincott-Schwartz, Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions, *J. Cell Biol.* **163**, 257–269 (2003).
4. S.E. Sen, G.D. Prestwich, Trisnorsqualene alcohol, a potent inhibitor of vertebrate squalene epoxidase, *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 1508–1510 (1989).
5. N.K. Chua, N.A. Scott, A.J. Brown, Valosine-containing protein mediates the ERAD of squalene monooxygenase and its cholesterol-responsive degron, *Biochem. J.* **476**, 2545–2560 (2019).
6. S. Gill, J. Stevenson, I. Kristiana, A.J. Brown, Cholesterol-Dependent Degradation of Squalene Monooxygenase, a Control Point in Cholesterol Synthesis beyond HMG-CoA Reductase, *Cell Metab.* **13**, 260-273 (2011).
7. J. Stevenson, W. Luu, I. Kristiana, A.J. Brown, Squalene mono-oxygenase, a key enzyme in cholesterol synthesis, is stabilized by unsaturated fatty acids. *Biochem. J.* **461**, 435–442 (2014).
8. M.E. Harris-White, K.G. Ferbas, M.F. Johnson, P. Eslami, A. Poteshkina, K. Venkova, A. Christov, K. Hensley, A cell-penetrating ester of the neural metabolite lanthionine ketimine stimulates autophagy through the mTORC1 pathway: Evidence for a mechanism of action with pharmacological implications for neurodegenerative pathologies. *Neurobiol. Disease* **84**, 60–68 (2015).
9. K. Ohgane, F. Karaki, K. Dodo and Y. Hashimoto, Discovery of oxysterol-derived pharmacological chaperones for NPC1: implication for the existence of second sterol-binding site. *Chem. Biol.* **20**, 391–402 (2013).

10. S. Nanjyo, K. Ohgane, H. Yoshioka, M. Makishima, Y. Hashimoto, T. Noguchi-Yachide, Structure-activity relationship study of estrogen receptor down-regulators with a diphenylmethane skeleton. *Bioorg. Med. Chem.* **27**, 1952–1961 (2019).
11. J. Zeng, G. Slodkowicz, L.C. James, Rare missense variants in the human cytosolic antibody receptor preserve antiviral function, *Elife* **8**, 1061 (2019)
12. H. Yamashita, S. Tomoshige, S. Nomura, K. Ohgane, Y. Hashimoto, M. Ishikawa, Application of protein knockdown strategy targeting β -sheet structure to multiple disease-associated polyglutamine proteins, *Bioorg. Med. Chem.* **28**, 115175 (2020)
13. N. Zelcer, L.J. Sharpe, A. Loregger, I. Kristiana, E.C.L. Cook, L. Phan, J. Stevenson, A.J. Brown, The E3 ubiquitin ligase MARCH6 degrades squalene monooxygenase and affects 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase and the cholesterol synthesis pathway. *Mol. Cell Biol.* **34**, 1262–1270 (2014).
14. J.L. Goldstein, S.K. Basu, M.S. Brown, Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol.* **98**. 241–260 (1983).
15. K. Ohgane, H. Yoshioka, Quantification of gel bands by an image J macro, Band/Peak Quantification Tool, *protocols.io*, dx.doi.org/10.17504/protocols.io.7vghn3w.
16. R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
17. RStudio Team (2016). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
18. H. Wickham (2009). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York.
19. A. Dinno (2017). dunn.test: Dunn's Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums. R package version 1.3.5. <https://CRAN.R-project.org/package=dunn.test>
20. A. Radhakrishnan, J.L. Goldstein, J.G. McDonald, M.S. Brown, Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance, *Cell metabolism* **8**, 512–521 (2008).
21. Y. Fujimoto, H. Itabe, J. Sakai, M. Makita, J. Noda, M. Mori, Y. Higashi, S. Kojima, T. Takano, Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7, *Biochim. Biophys. Acta.* **1644**, 47–59 (2004).

22. G.J. Choukroun, V. Marshansky, C.E. Gustafson, M. McKee, R.J. Hajjar, A. Rosenzweig, D. Brown, J.V. Bonventre, Cytosolic phospholipase A(2) regulates golgi structure and modulates intracellular trafficking of membrane proteins, *J. Clin. Invest.* **106**, 983–993 (2000).
23. G. Charron, M.M.H. Li, M.R. MacDonald, H.C. Hang, Prenylome profiling reveals S-farnesylation is crucial for membrane targeting and antiviral activity of ZAP long-isoform, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 11085–11090 (2013)
24. W. Stauffer, H. Sheng, H.N. Lim, EzColocalization: An ImageJ plugin for visualizing and measuring colocalization in cells and organisms, *Sci. Rep.* **8**, 15764–13 (2018).
25. A.L. MacKinnon, J. Taunton, Target Identification by Diazirine Photo-Cross Linking and Click Chemistry, *Curr. Protoc. Chem. Biol.* **1**, 55–73 (2009).

補章

ステロールによる HMGCR の分解

HMGCR の分解に関する研究は、二つの興味深い点がある。一つは内在性ステロールによる分解メカニズムの解明。そしてもう一つは HMGCR 分解リガンドが医薬として有用であるかという点である。筆者の所属研究室の鷲森により創製されたラノステロール誘導体や、オキシステロールの標的選択性を評価し、HMGCR 選択的な分解誘導剤や結合証明に必要な光親和性標識プローブの創製に有用なリード化合物が得られたので、本章にて述べる。

ラノステロールは HMGCR に結合するのか

HMGCR のステロール依存性分解に関して、未だに実験的には明らかにされていない点がある。それは HMGCR を分解するラノステロールの標的である。第 1 章でも述べたように 25HC は Insig に結合して HMGCR の分解を誘導するが、ラノステロールや 2425DHL は Insig に結合しない。一方で、HMGCR の結合試験の報告はこれまでにない。具体的な理由は報告されていないが、HMGCR の精製による結合試験は、うまくいっていないようである (Goldstein et al., 2006)。よってラノステロールの HMGCR への結合を評価するには精製タンパクを用いない光親和性標識プローブによる結合試験が有用であると考えられた。

HMGCR 結合リガンドにより HMGCR の分解を制御可能か

また、HMGCR の分解がリガンド依存的事であることは HMGCR の寿命を合成低分子化合物により制御できることを意味する。これまでに HMGCR の阻害剤として、スタチンが医薬として用いられてきたが、スタチンは長期投与により効果を示さなくなることが知られている。これはスタチンによる HMGCR 量の増加が一因として考えられている。HMGCR の増加は二つの経路により説明される。一つ目はスタチンによるステロール合成阻害を介した、転写レベルでのフィードバックによる HMGCR の増加である。二つ目はスタチンによる HMGCR 分解誘導ステロール、イソプレノイド量の減少による HMGCR の半減期の延長である。現状スタチンにより増えた HMGCR を減らす有効な手立ては報告されていないが、HMGCR 分解誘導化合物はこれを解決する一つの手段であることが示唆されている (Jiang et al., 2018)。

ステロール標的選択性のアッセイ系

HMGR の分解は触媒ドメインを除く膜貫通領域で十分であることが示されている (Gil et al., 1985)。これまでに HMGR の触媒ドメインを β -galactosidase で置き換えた融合タンパクにより、HMGR のステロール依存性分解をモニター可能であることが示されている (Skalnik et al., 1988)。本研究では β -galactosidase より感度が高く、たんぱく質のサイズも小さい Emerald Luciferase をレポーターとして用いることにした。Insig や HMGR に結合する化合物は HMGR を分解するためこれらの標的に対する結合を分解として間接的に評価可能である。

また、LDL 受容体のプロモーターは SCAP-SREBP 複合体によって活性化されることから、LDL 受容のプロモーターアッセイ (Ohgane et al., 2013) により SREBP 転写活性を評価している。SREBP 転写活性は Insig や SCAP により制御されることから、Insig や SCAP に結合する化合物は LDL 受容体のプロモーター活性を阻害する。

HMGR-dCat.-ELuc



LDLr-Luc

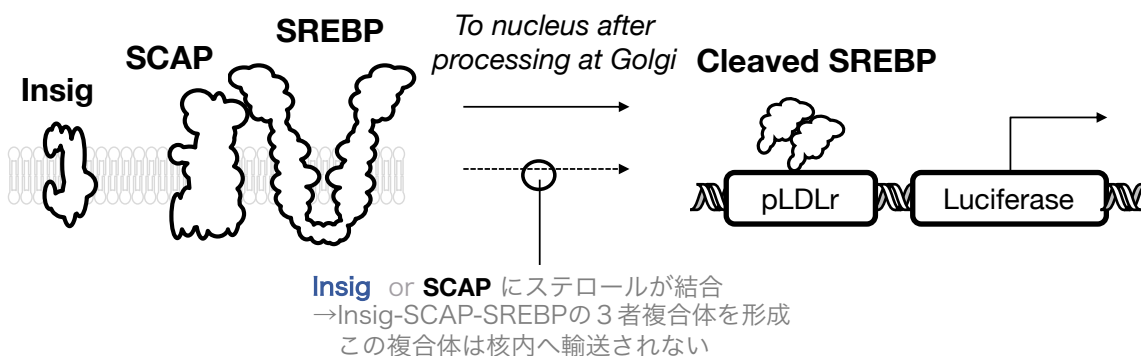


Figure S1-1. Selectivity profiling assay using in this study. Schematic representation of HMGR-dCat.-ELuc and LDLr-Luc constructs.

オキシステロール類の標的選択性

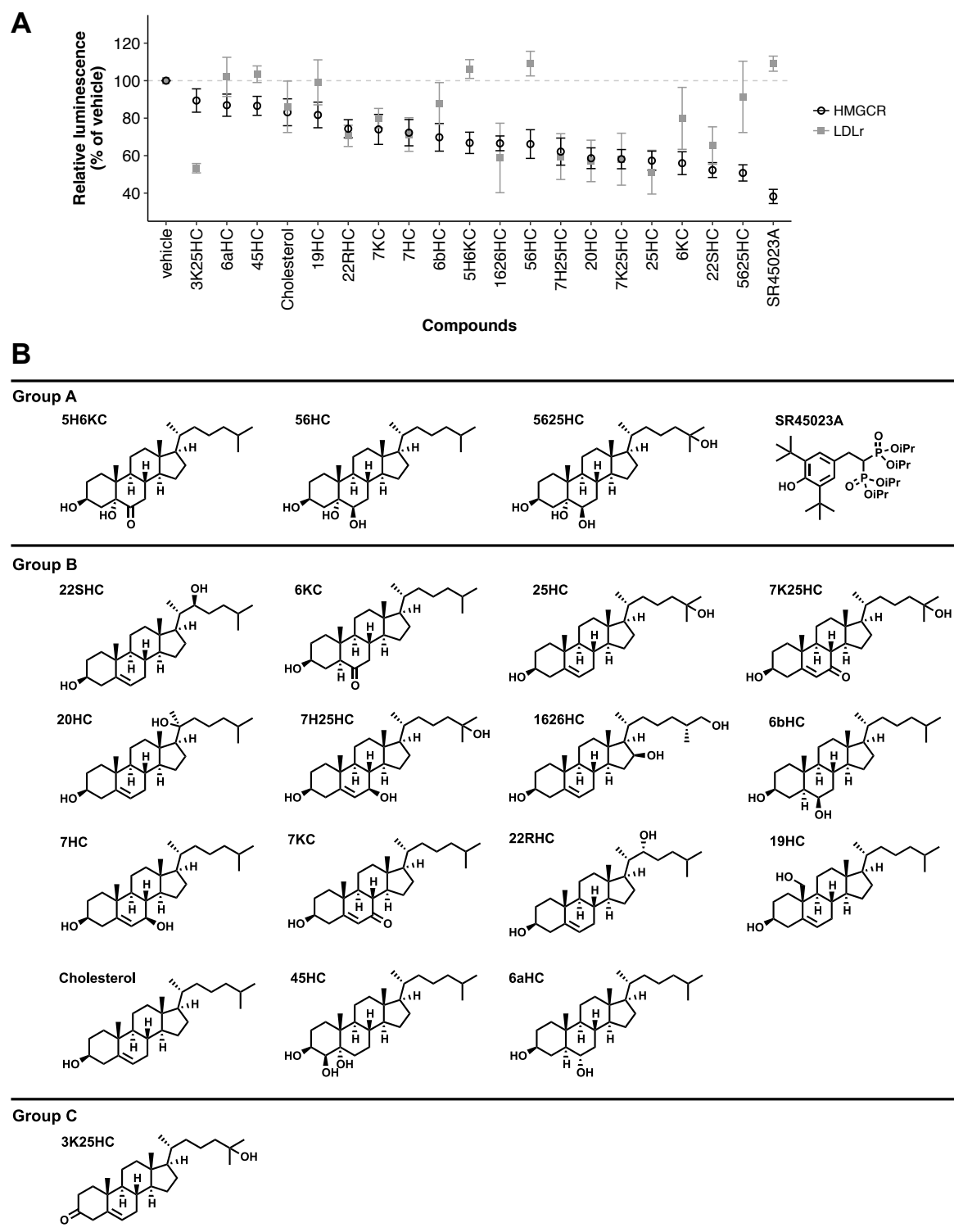


Figure S2-2. Profiling the activities of oxysterols on induction of HMGCR degradation and inhibition of the SREBP pathway. (A) HMGCR degradation activity and SREBP pathway-inhibitory activity of selected oxysterols. The data are the mean \pm SD (n = 3 independent

experiments). The black circles denote HMGCR degradation activity, and the gray filled triangles denote inhibition of the SREBP pathway, as monitored by means of the LDLr-luciferase assay. (B) Structures of SR45023A and the oxysterols used in this study. Group A is selective for HMGCR degradation. Group B is non-selective, consisting of sterols acting on both HMGCR degradation and SREBP inhibition. Group C is selective for SREBP inhibition.

ステロイドのスクリーニング（各化合物 10 μ M）を行い、化合物群を3つのグループに分類した。Group AはHMGCR分解選択的なもの、Group Bは選択性がないもの、Group CはLDLr選択的な化合物である。SR45023AはHMGCRを分解するが、SREBPの転写を阻害しないこと、さらに25HCが選択性のない化合物であることは過去の報告（Roitelman et al., 2004）から明らかであり。本アッセイ系でも同様の結果を得ることを確認した。Group Aのステロール構造を見てわかるように、HMGCR分解選択的な化合物の創製には5、6位の両方への酸素原子への導入が鍵であることが示唆された。次に各グループの代表化合物を選び、その濃度依存性を確認した。

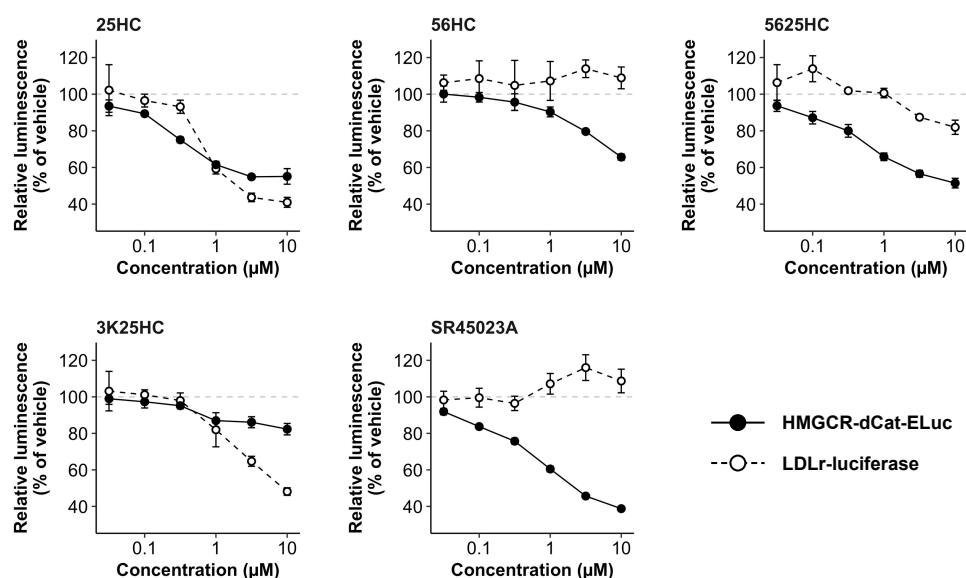


Figure S3-3. Dose-response analysis of selected oxysterols and SR45023A for HMGCR degradation activity and SREBP pathway-inhibitory activity. The black filled circles and error bars represent mean \pm SD (biological replicates, n=3) for HMGCR degradation activity, and the open circles represent mean \pm SD (biological replicates, n=3) for SREBP-inhibitory activity. The data are representative of two independent experiments, which gave similar results.

濃度依存性を確認し、ステロールによる活性が高濃度域における非特異的な作用でないことが確認できた。25HC、56HC、5625HCの活性を比較すると、SREBP転写活性には25位のヒドロキシ基が重要であり、その活性が5,6位へのヒドロキシ基の導入で減弱することが判明した。Group Cに唯一含まれる3K25HCはSREBP選択的な化合物であり、25HCとは異なるメカニズムでSREBP転写活性の抑制を行なっていると考えられる。

ラノステロール類の標的選択性

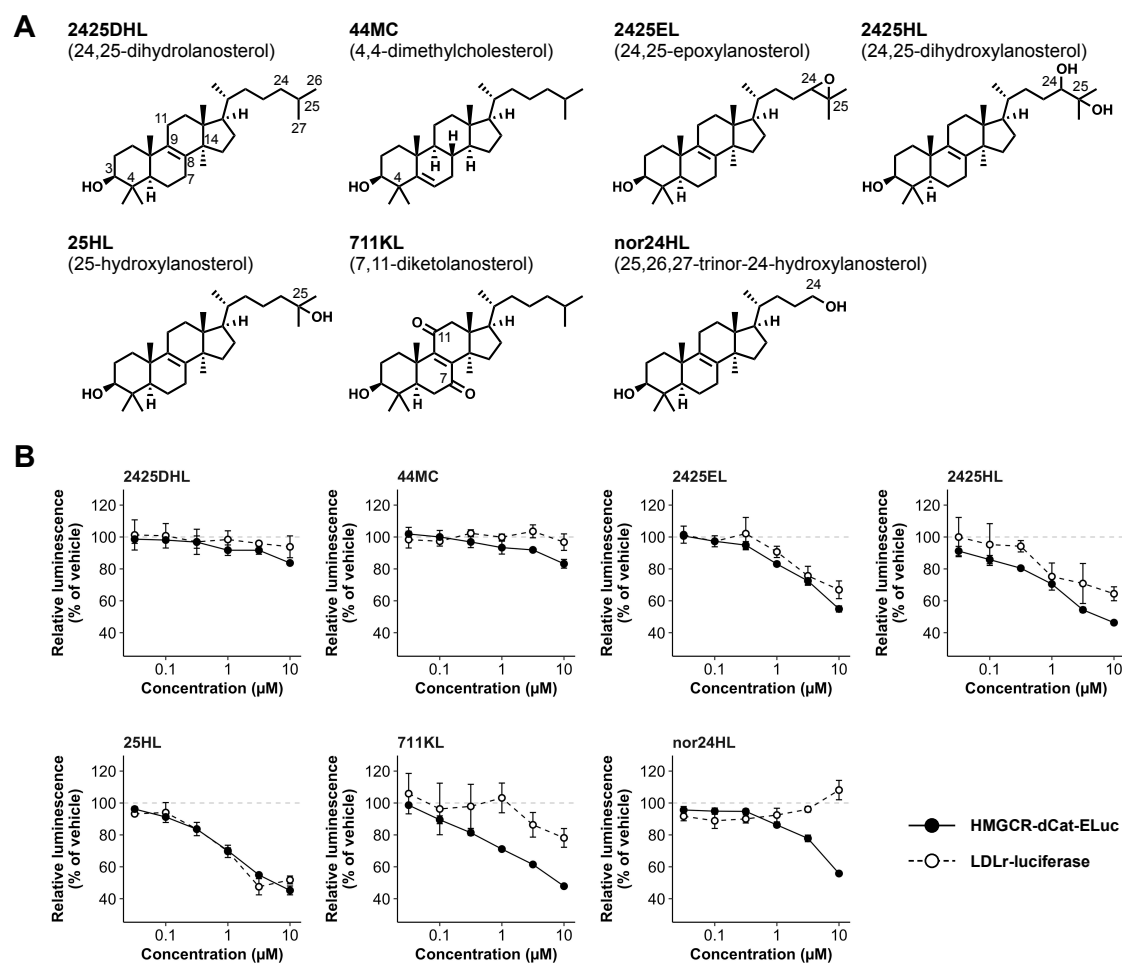


Figure S2-4. Activity profile of selected lanosterol derivatives. (A) Structures of lanosterol derivatives and a lanosterol-related cholesterol derivative. (B) HMGCR degradation activity and SREBP pathway-inhibitory activity of the lanosterol derivatives. The circles and error bars denote mean \pm SD (biological replicates, $n = 3$) from representative experiments independently performed twice. The filled circles represent HMGCR degradation activity and the open circles

represent SREBP-inhibitory activity.

先にも述べたようにラノステロールは HMGCR 分解に選択的な化合物である。そこでラノステロールをリード化合物とすることで HMGCR 選択的な分解誘導化合物の創製を目指した。まずはラノステロールの溶解性の悪さを考慮し、種々のオキシラノステロール誘導体を合成することでその改善を図った。合成した化合物群の中で、25 位に酸素官能基を有するラノステロール類 (2425EL、2425HL、25HL) は選択性のない化合物であった。オキシステロールの結果を合わせてみると、25 位へのヒドロキシ基の導入はステロールの母核構造の違いによらず、選択性を失わせてしまうことが示唆された。また、HMGCR 分解選択的な化合物として 711KL、これよりも選択性の高い nor24HL が得られた。

まとめ

近年では CRISPR/Cas9 により、ラノステロールからコレステロールの代謝に関わる酵素をノックアウトすることで、内在性ラノステロール類の HMGCR 分解や SREBP-2 の転写阻害を評価した報告がなされた (Chen et al., 2019)。本研究による遺伝学的アプローチでは、代謝酵素のノックアウトにより、合成中間体を蓄積させることで、その活性を明らかにしている。本研究からはラノステロールのみが HMGCR 分解に選択的であることが示されている。

一方、我々は HMGCR の分解と SREBP 阻害に関して、構造活性相関研究により、選択性に関する初歩的な情報を得ることに成功した。これらの化合物を構造展開していくことでさらに高活性かつ HMGCR 分解選択的なラノステロール誘導体を得ることが可能であると考えられる。

また、本研究において SREBP 選択的な化合物として 3K25HC を得ることに成功した。この化合物の標的は未知であるが、SCAP に結合するために SREBP 選択的である可能性が考えられる。コレステロールのように SCAP に結合することで、SREBP を阻害しているのか、もしくは 25-hydroxy vitamin D のように SCAP に結合し、その分解を誘導することで、SREBP を阻害 (Asano et al., 2017) しているのか、より詳細な SREBP 阻害メカニズムに興味を持たれる。

補足：HMGCR-dCat-FLAG-ELuc ウェスタンでの検出

HMGCR-dCat-FLAG-ELuc	+		+				-	+
Lysis	RIPA		RIPA + sonication					
IP (FLAG)	-	+	-	+	-	+	+	+
Solubilization	37 °C		37 °C		60°C		37 °C	

IB: anti-FLAG

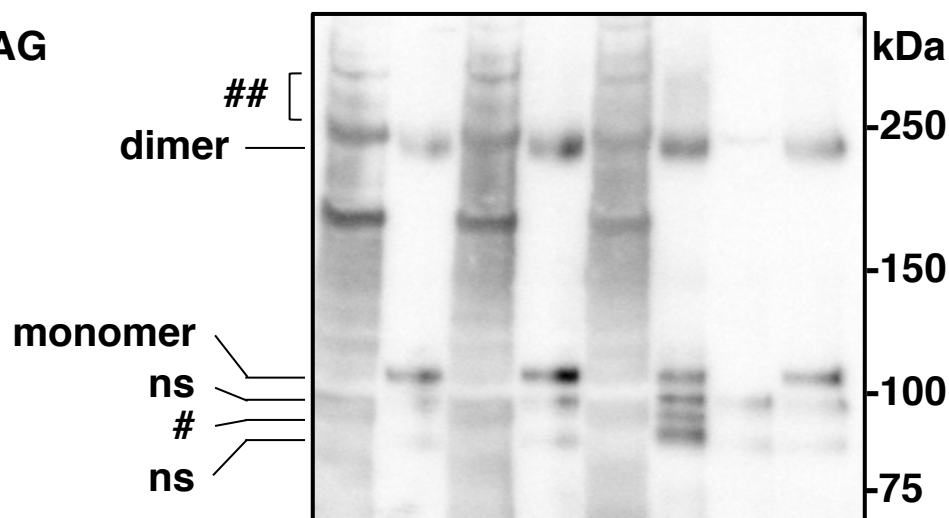


Figure S2-5. Relatively low expression level of HMGCR-dCat-FLAG-ELuc in the stable cell line. Detection of HMGCR-dCat-FLAG-ELuc by western blotting. HEK293 cells or HEK293 cells stably expressing HMGCR-dCat-FLAG-ELuc were lysed, and HMGCR-dCat-FLAG-ELuc was immunoprecipitated with anti-FLAG. The samples were treated with denaturing membrane protein solubilization buffer, heated at the indicated temperature, and resolved by SDS-PAGE. The gels were processed for western blotting, and immunoblotted with anti-FLAG antibody. For details, see supporting materials and methods. Here, “monomer” and “dimer” indicate bands from HMGCR-dCat-FLAG-ELuc. “ns” represents non-specific bands that are also observed for samples from HEK293 cells. “#” and “##” denote possible degradation products of HMGCR-dCat-FLAG-ELuc.

本アッセイ系で用いた HMGCR-dCat-FLAG-ELuc の安定発現細胞株は発現量が非常に低く、ウエスタン上での検出が困難であった。目的のバンドが非特異バンドに埋もれてしまうため、免疫沈降を行うことでようやく検出できるレベルであった。特筆すべきはこのような低い発現量にも関わらず、ルシフェラーゼアッセイでは感度良く、化合物濃度依存的な定量結果を得ることができた点である。

References

S.-Y. Jiang, H. Li, J.-J. Tang, J. Wang, J. Luo, B. Liu, J.-K. Wang, X.-J. Shi, H.-W. Cui, J. Tang, F. Yang, W. Qi, W.-W. Qiu, B.-L. Song, Discovery of a potent HMG-CoA reductase degrader that eliminates statin-induced reductase accumulation and lowers cholesterol, *Nat. Commun.* **9**, 5138, (2018).

D.G. Skalnik, H. Narita, C. Kent, R.D. Simoni, The Membrane Domain of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A Reductase Confers Endoplasmic Reticulum Localization and Sterol-regulated Degradation onto β -Galactosidase, *J. Biol. Chem.* **263**, 6836–6841, (1988).

L. Chen, M.-Y. Ma, M. Sun, L.-Y. Jiang, X.-T. Zhao, X.-X. Fang, S.M. Lam, G.-H. Shui, J. Luo, X.-J. Shi, B.-L. Song, Endogenous sterol intermediates of the mevalonate pathway regulate HMGCR degradation and SREBP-2 processing, *J. Lipid Res.* **60**, 1765–1775, (2019).

K. Ohgane, F. Karaki, K. Dogo, Y. Hashimoto, Discovery of Oxysterol-Derived Pharmacological Chaperones for NPC1: implication for Existence of Second Sterol-Binding Site, *Chem. Biol.* **20**, 391–402, (2013).

J. Roitelman, D. Masson, R. Avner, C. A.-Zufferey, A. Perez, Y. G.-Gellin, C.L. Bentzen, E.J. Niesor, Apomine, a Novel Hypocholesterolemic Agent, Accelerates Degradation of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A Reductase and Stimulates Low Density Lipoprotein Receptor Activity, *J. Biol. Chem.* **279**, 6465–6473, (2004)

L. Asano, M. Watanabe, Y. Ryoden, K. Usuda, T. Yamaguchi, B. Khambu, M. Takashima, S. Sato, J. Sakai, K. Nagasawa, M. Uesugi, Vitamin D Metabolite, 25-Hydroxyvitamin D, Regulates Lipid Metabolism by Inducing Degradation of SREBP/SCAP, *Cell Chem. Biol.* **24**, 207–217, (2017)

Supplementary Information

Materials

Lipoprotein-deficient serum (LPDS) was prepared from FBS using Cab-O-sil (Kodak) as previously reported⁵. TAK-475 was from Sigma-Aldrich, and CB5083 was from Cayman Chemicals.⁶ Other sterols were purchased from the indicated sources: 22(*S*)-hydroxycholesterol (22SHC, from Sigma-Aldrich), 22(*R*)-hydroxycholesterol (22RHC, from Sigma-Aldrich), 6-ketocholesterol (6KC, from Sigma-Aldrich), 25-hydroxycholesterol (25HC, from Sigma-Aldrich), 19-hydroxycholesterol (19HC, from Cayman Chemicals), and water-soluble cholesterol (from FUJIFILM Wako Pure Chemicals). The following oxysterols were previously synthesized in our laboratory, and their characterization data was published in the previous reports^{3,7}: 5 α -hydroxy-6-ketocholesterol (5H6KC), 5 α ,6 β -dihydroxycholesterol (56HC), 5 α ,6 β ,25-trihydroxycholesterol (5625HC), 7-keto-25-hydroxycholesterol (7K25HC), 7 β ,25-dihydroxycholesterol (7H25HC), 20(*S*)-hydroxycholesterol (20HC), 6 β -hydroxy-5 α -cholestan-3 β -ol (6bHC), 6 α -hydroxy-5 α -cholestan-3 β -ol (6aHC), 7 β -hydroxycholesterol (7HC), 7-ketocholesterol (7KC), 4 β ,5 α -dihydroxycholestan-3 β -ol (45HC), and 25-hydroxycholest-4-en-3-one (3K25HC). SR45023A was synthesized as previously reported⁸. 25(*R*)-Cholest-5-en-3 β ,16 β ,26-triol (1626HC) was synthesized by modified Clemmensen reduction of diosgenin (from Tokyo Chemical Industries) according to the reported procedure⁹. 24,25-Epoxylanosterol (2425EL) and 24,25-dihydrolanosterol (2425DHL) were prepared from commercially available lanosterol (purchased from Tokyo Chemical Industries) containing >50% 24,25-dihydrolanosterol¹⁰. 7,11-Diketolanosterol (711KL) was prepared by ruthenium-catalyzed allylic oxidation²⁰ from 24,25-dihydrolanosterol acetate²¹. 4,4-Dimethylcholesterol was synthesized as reported previously⁴. 24,25-Dihydroxylanosterol (2425HL) was synthesized as reported previously^{11,13}. Stock solutions of the sterols and other compounds were basically prepared as 10 mM DMSO solutions and stored at -20°C. For 25HC, which is poorly soluble in DMSO, the stock solution was a 10 mM ethanol solution. The following antibodies were used; mouse monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma, F1804)¹, anti-FLAG M2 magnetic beads (Sigma, M8823)¹, and goat anti-mouse IgG HRP conjugate (Millipore, 12-349)¹.

Expression vector for HMGCR-dCat-ELuc

The coding sequence of human HMGCR (GenBank AB527413) was PCR-amplified from pFN21A-HT-hHMGCR (Promega / Kazusa DNA Research Institute, FHC11622)¹⁴ with flanking SgfI and MluI sites by using the following pair of primers: forward, AACGCGATCGCCATGTTGTCAAGACTTTTTTCGAATG; reverse, ATTACGCGTGGCTGTCTTCTTGGTGCAAG. The PCR-amplified fragment was purified by agarose gel electrophoresis followed by the use of MagExtractor (Toyobo), and the fragment was digested with SgfI (Promega) and MluI (NEB) in NEBuffer 3 supplemented with BSA at 37°C for 3 h, followed by inactivation of SgfI at 65°C for 20 min. A previously reported blank vector pCMV-AC-FLAG-ELuc¹⁵ was similarly digested with SgfI and MluI, and dephosphorylated with calf intestine phosphatase. The obtained SgfI-hHMGCR-MluI fragment and the vector fragment were ligated with Ligation high ver 2 (Toyobo). The integrity of the plasmid was confirmed by DNA sequencing. To delete the catalytic domain of pCMV-hHMGCR-FLAG-ELuc, PCR mutagenesis was performed using a KOD-plus mutagenesis kit (Toyobo) with the following primers: forward, ACGCGTACGCGGCCGCTCGAGGACTAC; reverse, TAGACATTCTTCATTAGGCCGAG. The deletion of the catalytic domain and the integrity of the plasmid were confirmed by DNA sequencing.

Stable cell lines

HEK293 cells (ATCC) cultured in DMEM (Wako, product No. 044-29765) supplemented 10% FBS and penicillin-streptomycin (Nacalai, product No. 26253-84) were transfected with pCMV-hHMGCR-dCat-FLAG-ELuc using Lipofectamine LTX (Invitrogen). Selection pressure was applied to the cells by adding 0.4 mg/mL G418 (Calbiochem). Single clones were isolated by the limiting dilution method. Four clones were tested for their response to 25HC treatment, and similar dose-dependent degradation of HMGCR-dCat-ELuc was observed for all of them. Of the four clones, the one with the highest expression level was selected and used throughout this study.

HMGCR degradation assay

The stable cell line expressing HMGCR-dCat-ELuc was cultured on 96-well white plates (Greiner, product No. 655098) to about 90% confluency, and the cells were treated with a test compound for 4 h. Luciferase activity and cytotoxicity were simultaneously assessed by CytoRed-luciferase multiplex assay as reported previously.¹⁶

Luciferase reporter assay for LDL receptor promoter

The reporter gene assay for LDLr promoter was performed as described previously using HEK293 cells.² HEK293 cells on white 96-well plates were transiently transfected with pGL4-LDLr-luciferase along with pCMV-beta-galactosidase. After 24 h, the medium was replaced with DMEM supplemented with 10% LPDS, test compounds were added, and the cells were further cultured for 24 h. Luciferase activity and beta-galactosidase activity were determined as described previously.¹⁷⁻¹⁹

Immunoblotting of HMGCR-dCat-FLAG-ELuc

The stable cell line expressing HMGCR-dCat-FLAG-ELuc was cultured on 100 mm dishes (TPP, 93100) for 48 h. Cells were washed once with 5 mL PBS and lysed with 1 mL of RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 2 mM MgCl₂, 0.1% SDS, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA) supplemented with cComplete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche). Alternatively, the cells were scraped into 1 mL of RIPA buffer, and the resulting cell suspension was disrupted with a probe sonicator (USP-600A, Shimadzu) on ice. The lysates were centrifuged at 14,000 g and 4 °C for 10 min. Total protein concentration was determined by BCA protein assay and the protein concentration was adjusted to 2.0 µg/µL. The lysates were mixed with 1 volume of membrane protein solubilization buffer (62.5 mM Tris pH 6.8, 8 M urea, 100 mM DTT, 15% SDS, 10% glycerol) and 0.67 volume of Laemmli buffer. The diluted lysates were heated at 60°C for 15 min or incubated at 37°C for 30 min. These samples (10 µL/lane) were resolved by SDS-PAGE (40 mA, 45 min, in an ice-water bath) using 5–12% SuperSep Ace gel (Wako). The proteins were then transferred to Immobilon-P PVDF membrane (Millipore), blocked with 1% BSA [w/v]-TBST (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 137 mM NaCl, 0.1% [v/v] Tween 20) for 1 h, and then stained with anti-FLAG M2 antibody (1/2500 dilution) diluted in CanGetSignal solution

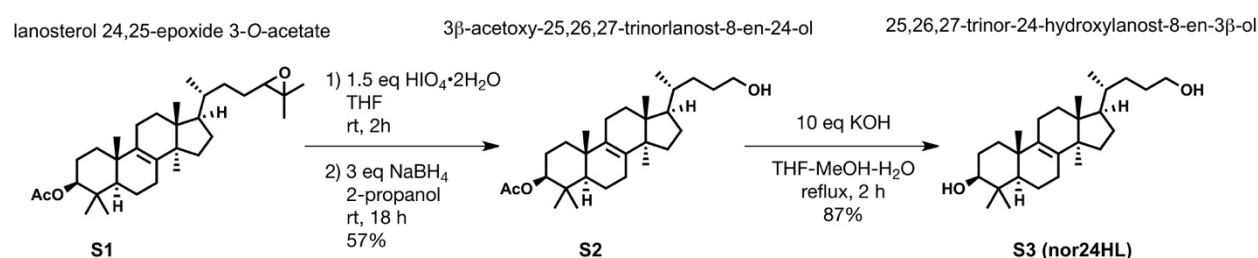
1 (Toyobo) for 1 h. After four washes in TBST, the membrane was shaken in goat polyclonal anti-mouse IgG conjugated with HRP diluted in CanGetSignal 2 (1/2500 dilution) for 1 h. The membrane was washed four times and bands were detected with Immobilon Western chemiluminescence reagent (Millipore) on an EzCapture imaging system (ATTO).

Immunoprecipitation of HMGCR-dCat-FLAG-ELuc

Cell lysates containing equal amounts of protein (2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) were prepared as described above. The diluted lysates (300 μL) for immunoprecipitation were mixed with pre-washed anti-FLAG M2 magnetic beads (4 μL bed volume / sample) and the mixtures were rotated overnight at 4°C. The beads were washed twice with 400 μL of RIPA buffer supplemented with cComplete mini EDTA-free protease inhibitor cocktail, and eluted with 7.5 μL of membrane protein solubilization buffer (62.5 mM Tris pH 6.8, 8 M urea, 100 mM DTT, 15% SDS, 10% glycerol)^{22,23} and 22.5 μL of 1.25 x Laemmli sample buffer by heating at 60°C for 15 min or incubated at 37°C for 30 min. The samples were separated and immunoblotted as described above.

Synthesis of 25,26,27-trinor-24-hydroxylanost-8-en-3 β -ol (nor24HL)

The title compound (**S3**, nor24HL) was synthesized as shown in **Scheme 1** from lanosterol 24,25-epoxide 3-O-acetate **S1**, which was prepared as reported.¹⁰



Scheme 1. Synthesis of nor24HL.

General methods. All chemical reagents and solvents were purchased from Sigma-Aldrich, Kanto Chemical Industry and Wako Pure Chemical Industries, and used without further purification. Moisture-sensitive reactions were performed under an atmosphere of argon, unless otherwise

noted, and monitored by thin-layer chromatography (TLC; Merck silica gel 60 F254 plates). Bands were visualized using UV light, iodine vapor, and/or acidic phosphomolybdic acid stain. Flash chromatography was carried out with silica gel (Silica gel 60 N, 40-50 μm particle size) purchased from Kanto Chemical. NMR spectra were recorded on a JEOL JNM-ECA500 spectrometer at 500 MHz for ^1H NMR and at 125 MHz for ^{13}C NMR. Proton and carbon chemical shifts are expressed in δ values (ppm) relative to internal tetramethylsilane (0.00 ppm), residual CHCl_3 (7.26 ppm) for ^1H NMR and internal tetramethylsilane (0.00 ppm) or CDCl_3 (77.16 ppm) for ^{13}C NMR. Data are reported as follows: chemical shift, multiplicity (s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, multiplet; br, broad), coupling constants (Hz), and integration. High-resolution mass spectra were recorded using a Bruker micrOTOF II mass spectrometer.

3 β -acetoxy-25,26,27-trinorlanost-8-en-24-ol (S2). To a solution of lanosterol 24,25-epoxide 3-O-acetate (**S1**, 727 mg, 1.50 mmol) in dehydrated THF (140 mL) was added $\text{HIO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (513 mg, 2.25 mmol) under an argon atmosphere. The mixture was stirred for 2 h, water was added, and THF was removed under reduced pressure. The residue was extracted with ethyl acetate, and the organic layer was washed with brine, dried over sodium sulfate, and concentrated under reduced pressure to give a colorless solid. The crude aldehyde was unstable, and so was immediately used for the next reaction without purification. The crude aldehyde was dissolved in 2-propanol (70 mL) and treated with NaBH_4 (170 mg, 4.50 mmol), and the reaction mixture was stirred overnight at ambient temperature. After 18 h, the reaction was quenched with saturated aqueous ammonium chloride solution at 0°C , and 2-propanol was removed under reduced pressure. The residue was extracted with ethyl acetate, and the organic layer was washed with brine, dried over sodium sulfate, and concentrated. Purification of the residue by flash column silica gel chromatography (ethyl acetate : hexane : dichloromethane = 1 : 2 : 2) afforded the title compound (382 mg, 57%) as a colorless solid. ^1H -NMR (CDCl_3) δ 4.50 (dd, J = 11.8, 4.3 Hz, 1H), 3.67–3.62 (m, 2H), 2.05 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.92 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 0.88 (s, 6H), 0.87 (s, 3H), 0.69 (s, 3H); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ 171.03, 134.41, 134.23, 80.91, 63.61, 50.46, 50.33, 49.78, 44.45, 37.78, 36.87, 36.21, 35.24, 32.07, 30.93, 30.77, 29.56, 28.17, 27.89, 26.35, 24.22, 24.15, 21.33, 20.96, 19.17, 18.65, 18.09, 16.52, 15.75; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 467.3496, found 467.3483.

25,26,27-trinor-24-hydroxylanost-8-en-3 β -ol (nor24HL, S3). The acetate (80.1 mg, 0.180 mmol) was dissolved in THF (6 mL) and MeOH (3 mL), and the solution was treated with 3.3 M aqueous KOH (0.6 mL, 2.0 mmol). The reaction mixture was refluxed for 2 h, diluted with water, and extracted

with dichloromethane. The organic layer was washed with brine, dried over sodium sulfate, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash column chromatography (ethyl acetate : hexane : dichloromethane = 1 : 2 : 2) to afford the title compound (63.5 mg, 0.158 mmol, 87%) as a colorless solid. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 3.64–3.61 (m, 2H), 3.24 (dd, J = 11.8, 3.8 Hz, 1H), 1.00 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.92 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.81 (s, 3H), 0.69 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 134.39, 134.34, 78.97, 63.61, 50.37, 50.34, 49.79, 44.46, 38.88, 36.70, 36.21, 35.56, 32.08, 30.96, 30.81, 29.58, 28.18, 27.94, 27.82, 26.48, 24.23, 20.97, 19.13, 18.66, 18.23, 15.75, 15.41; HRMS (ESI) not detected in positive and negative ion modes.

Supplementary References

1. Brown MS, Radhakrishnan A, Goldstein JL. Retrospective on cholesterol homeostasis: The central role of Scap. *Annu Rev Biochem.* 2018;87(1):783-807. doi:10.1146/annurev-biochem-062917-011852.
2. Ohgane K, Karaki F, Dodo K, Hashimoto Y. Discovery of oxysterol-derived pharmacological chaperones for NPC1: implication for the existence of second sterol-binding site. *Chem Biol.* 2013;20(3):391-402. doi:10.1016/j.chembiol.2013.02.009.
3. Ohgane K, Karaki F, Noguchi-Yachide T, Dodo K, Hashimoto Y. Structure-activity relationships of oxysterol-derived pharmacological chaperones for Niemann-Pick type C1 protein. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014;24:3480–3485. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.05.064>.
4. Jiang S-Y, Li H, Tang J-J, et al. Discovery of a potent HMG-CoA reductase degrader that eliminates statin-induced reductase accumulation and lowers cholesterol. *Nat Commun.* 2018;9(1):5138. doi:10.1038/s41467-018-07590-3.
5. Gibson KM, Hoffmann G, Schwall A, et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in cultured fibroblasts from patients with mevalonate kinase deficiency: differential response to lipid supplied by fetal bovine serum in tissue culture medium. *J Lipid Res.* 1990;31(3):515-521.
6. Huang EY, To M, Tran E, et al. A VCP inhibitor substrate trapping approach (VISTA) enables proteomic profiling of endogenous ERAD substrates. *Mol Biol Cell.* 2018;29(9):1021-1030. doi:10.1091/mbc.E17-08-0514.
7. Karaki F, Ohgane K, Dodo K, Hashimoto Y. Structure-activity relationship studies of Niemann-Pick type C1-like 1 (NPC1L1) ligands identified by screening assay monitoring pharmacological chaperone effect. *Bioorg Med Chem.* 2013;21(17):5297-5309. doi:10.1016/j.bmc.2013.06.022.

8. Nguyen L, Niesor E, Bentzen C, Phan H. Inhibition of Cholesterol Synthesis and Antiproliferative Activity of a Series of Novel Phenol-Substituted 1,1-Bisphosphonate Esters. *Curr Med Chem*. 2002;2(3):205-217. doi:10.2174/1568013023358843.
9. Martin R, Schmidt AW, Theumer G, et al. Synthesis and biological activity of the (25R)-cholesten-26-oic acids--ligands for the hormonal receptor DAF-12 in *Caenorhabditis elegans*. *Org Biomol Chem*. 2009;7(5):909-920. doi:10.1039/b817358c.
10. O'Keeffe R, Kenny O, Brunton NP, et al. Synthesis of novel 24-amino-25,26,27-trinorlanost-8-enes: Cytotoxic and apoptotic potential in U937 cells. *Bioorg Med Chem*. 2015;23(9):2270-2280. doi:10.1016/j.bmc.2015.02.034.
11. Shingate BB, Hazra BG, Salunke DB, Pore VS, Shirazi F, Deshpande MV. Synthesis and antimicrobial activity of novel oxysterols from lanosterol. *Tetrahedron*. 2013;69(52):11155-11163. doi:10.1016/j.tet.2013.10.090.
12. Kavtaradze LK, Manley-Harris M, Nicholson BK. A low-toxicity method for the separation of lanosterol and dihydrolanosterol from commercial mixtures. *Steroids*. 2004;69(10):697-700. doi:10.1016/j.steroids.2004.07.003.
13. Ukiya M, Hayakawa T, Okazaki K, et al. Synthesis of lanostane-type triterpenoid N-glycosides and their cytotoxicity against human cancer cell lines. *Chem Biodivers*. 2018;15(7):e1800113. doi:10.1002/cbdv.201800113.
14. Nagase T, Yamakawa H, Tadokoro S, et al. Exploration of human ORFeome: high-throughput preparation of ORF clones and efficient characterization of their protein products. *DNA Res*. 2008;15(3):137-149. doi:10.1093/dnares/dsn004.
15. Nanjyo S, Ohgane K, Yoshioka H, Makishima M, Hashimoto Y, Noguchi-Yachide T. Structure-activity relationship study of estrogen receptor down-regulators with a diphenylmethane skeleton. *Bioorg Med Chem*. 2019;27(10):1952-1961. doi:10.1016/j.bmc.2019.03.042.

16. Ohgane K, Yoshioka H, Hashimoto Y. Multiplexing fluorogenic esterase-based viability assay with luciferase assays. *MethodsX*. 2019;6:2013-2020. doi:10.1016/j.mex.2019.09.008.
17. Shioi R, Toyota Y, Noguchi-Yachide T, et al. Unexpected emergence of luciferase-inhibitory activity during structural development study of phenyloxadiazole-based PPAR ligands. *HETEROCYCLES*. 2018;97(2):854-864.
18. Forman BM, Umesono K, Chen J, Evans RM. Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell*. 1995;81(4):541-550. doi:10.1016/0092-8674(95)90075-6.
19. Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, et al. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*. 1999;284(5418):1362-1365. doi:10.1126/science.284.5418.1362.
20. Burton PM, Swinney DC, Heller R, et al. Azalanstat (RS-21607), a lanosterol 14 α -demethylase inhibitor with cholesterol-lowering activity. *Biochem Pharmacol*. 1995;50:529-544.
21. Song B-L, Javitt NB, DeBose-Boyd RA. Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. *Cell Metab*. 2005;1:179-189.
22. Chin DJ, Luskey KL, Faust JR, MacDonald RJ, Brown MS, Goldstein JL. Molecular cloning of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and evidence for regulation of its mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982;79(24):7704-7708. doi:10.1073/pnas.79.24.7704.
23. Chin DJ, Luskey KL, Faust JR, MacDonald RJ, Brown MS, Goldstein JL. Molecular cloning of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and evidence for regulation of its mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982;79(24):7704-7708. doi:10.1073/pnas.79.24.7704.

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始ご懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました、橋本祐一教授に心より感謝致します。橋本先生のご指導のもと、生体有機化学研究室での素晴らしい研究環境がなければ、本研究は成し遂げられなかったと存じます。

また、研究の諸事万端について、終始ご懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました、大金賢司助教に心より感謝致します。大金先生のご指導がなければ、本研究の成果はありませんでした。

そして本研究はコレステロールホメオスタシスにおける SM 研究の第一人者である Andrew J. Brown 教授と二人の博士学生 Hudson W. Coates、Ngee Kiat Chua と共に進めてきたものです。ここに衷心より感謝の意を表します。また、Brown 教授との共同研究の契機に関して、お力添えをいただいた、佐藤隆一郎教授に深く感謝致します。

折に触れて有機化学、創薬化学の見地からご助言ならびにご激励をいただきました、石川稔教授、藤井晋也准教授、谷内出友美准教授、実験の一部を共に進めてきた鷺森郁也修士、そして、ご討議いただいた生体有機化学研究分野の方々に深く感謝致します。

本論文の審査にあたり、有益なご指摘を賜りました浦野泰照教授、花岡健二郎准教授、河野望准教授、高田龍平講師に心より感謝致します。

本研究の一部は日本学術振興会の特別研究員として行った成果であります。財政的な支援をいただいたことに感謝の意を表します。

最後になりますが、上述の方々以外にも、私は常に家族や友人をはじめとする周りの人に支えられ、育てられて本論文を成就しました。この場を借りて深謝の意を表します。