

審査の結果の要旨

氏名 吉岡 広大

生体に必須の脂質であるコレステロールの生合成はコレステロール量によって厳密に制御されている。過剰なコレステロールはコレステロール合成酵素群のマスターレギュレーターである SREBP-2 (sterol regulatory element binding protein-2) の転写を抑制し、転写レベルでのネガティブフィードバック制御を行う。さらに、過剰なコレステロールはコレステロール合成酵素のユビキチンプロテアソームによる分解を促進し、翻訳後レベルでもネガティブフィードバック制御を行う。コレステロール依存的な分解を受けるコレステロール合成律速酵素の一例として SM (squalene monooxygenase) が知られている。SM は小胞体膜に局在する膜タンパク質であり、コレステロール合成において、最初の酸化ステップである、スクアレンのオキシドスクアレンへの変換を担う。SM はスクアレンの代謝に関与する触媒ドメイン (SM- Δ N100) と、コレステロール依存的な分解に必要な N 末端ドメイン (SM-N100) の二つの領域からなる。触媒ドメインである SM- Δ N100 はこれまで結晶構造の報告があるものの、SM-N100 は極めて高い疎水性が高く、精製タンパクによる構造解明が困難であり、具体的な構造は未解明である。よって 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が有用であると考えられた。

本研究では SM の安定性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い、ヒット化合物の標的タンパクから SM の安定性制御に重要な因子の同定を目指した。スクリーニングのために、スループットの高いアッセイ系として、SM とルシフェラーゼの融合タンパク安定発現細胞株を作成し、ルシフェラーゼ活性により SM の量を評価した。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た。768 種の化合物スクリーニングの結果ヒットとして得られたのは SM 阻害剤であった。阻害剤の SM 阻害活性と安定化作用の序列は対応しており、SM の安定化は SM 自身によるオンターゲットな作用であることが示唆された。

阻害剤による標的酵素の安定化は阻害剤が酵素へ直接結合した結果の作用であると考えられる。実際に阻害剤が結合する SM- Δ N100 の安定化が確認された。一方で興味深いことに、SM-N100 も同様に安定化されることが判明した。SM-N100 はコレステロールによって分解されるため、細胞内で評価を行なっている上記のアッセイ系においてはコレステロール量の変化も安定性に影響しうる。そこで SM 阻害剤以外のコレステロール合成酵素の阻害剤に関して、同様に SM-N100 の安定性を評価したところ、SM-N100 の安定化はコレ

ステロール合成酵素阻害剤の中でも SM 阻害剤に特異的な作用であることが判明した。これらの事実から SM の安定化は阻害剤の結合とコレステロール合成の阻害だけでは説明できないことが明らかになった。

SM 阻害剤により引き起こされる現象として、コレステロール合成の阻害に加え、SM の基質であるスクアレンの蓄積が挙げられる。そこで蓄積したスクアレンが SM-N100 の安定化に重要であると仮説を立て検証を行った。SM 阻害剤による SM-N100 の安定化は SQS (squalene synthase) 阻害剤の併用処理によって、キャンセルされ、この状態で外からスクアレンを過剰に加えるとその活性がレスキューされることを見出した。この実験事実はスクアレンが SM-N100 の安定化に重要であることを明確に示すものであった。

次にスクアレンによる SM-N100 安定化メカニズムの解析を行った。小胞体膜に局在する SM-N100 の安定性は脂質膜のプロパティによって制御されうる。スクアレンやその飽和体であるスクアランは脂質二重膜の内葉に存在することが示唆されており、スクアレンやスクアラン量の変化が膜のプロパティに影響を及ぼす可能性が考えられた。そこでスクアレンに加えて、スクアランの活性を確認したが、SM-N100 の安定化はスクアレン特異的な作用であった。この事実からスクアレンが SM-N100 に直接結合していると仮説を立て、検証を行った。スクアレンとスクアランに対応する光親和性標識プローブを合成し、SM-N100 に対するラベリング実験を行なった。スクアレンに対応するプローブは安定化作用を示し、SM-N100 は UV 依存的にラベリングされ、スクアレンによってラベリングは競合された。一方、スクアランに対応するプローブは安定化作用を示さず、UV 依存的なラベリングが見られなかった。以上の結果からスクアレンが SM-N100 に直接結合することが示唆された。

吉岡広大は上記のように、SM の安定性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い、その後のメカニズム解析から SM の基質であるスクアレンが直接 SM-N100 に結合して安定化を誘導していることを発見した。コレステロール合成経路において、基質が代謝酵素への直接結合を介してその安定性を向上させるという知見はこれまでに知られていなかった。本研究の成果はいくつもの制御因子が複雑に絡み合ったコレステロールホメオスタシスを理解する上での重要な発見であることが期待される。また、本研究では SM-N100 がリガンド結合部位となりうることを初めて実験的に示した。今後の構造活性相関研究や SM-N100 リガンドのスクリーニング等により、不安定化誘導化合物を見出すことができれば、そのような化合物は新たなコレステロール低下薬としての応用が期待される。

上述の成果と今後の展望を踏まえ、本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。