

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成 31 年度博士課程進学  
氏 名 丸山 貴史  
指導教員 佐藤 隆一郎

## 論文題目

ハイスループットスクリーニングによる SREBP-1 特異的阻害剤の探索

### 第一章 序論

食の西欧化や高齢化が進んだ現代において、エネルギーの過剰摂取や運動不足に伴うエネルギーの消費低下により、肥満を初めとした生活習慣病を発症する人の割合は増加している。そのため、脂質代謝制御の分子機構を明らかにすることは、生活習慣病の予防・治療への新しい戦略の提示になることが期待される。

SREBP-1 (Sterol regulatory element-binding protein-1) はエネルギー源となる脂肪酸合成系遺伝子の発現を包括的に制御する転写因子である。SREBP-1 の過剰な活性化は脂肪の蓄積に繋がり、肥満や脂肪肝、脂質異常症、II 型糖尿病の発症と密接に関連する。同じ SREBP ファミリーに属する SREBP-2 は細胞骨格やステロイドホルモン産生に重要なコレステロール合成系遺伝子の発現を包括的に制御する。そのため、生活習慣病の疾患予防、治療を考える上で、SREBP-1 を選択的に阻害することが望ましいと考えられる。SREBP は小胞体に不活性の前駆体として存在し、ステロール枯渇などの刺激に応じてゴルジ体で二段階の切断を受けるという SREBP-1 と SREBP-2 共通の活性化機構が知られているが、それぞれの生体内での役割や活性化刺激は異なるため、それぞれが特異的に活性化する分子機構の存在が想定される。本研究では、東京大学創薬機構の化合物ライブラリを用いて大規模なランダムスクリーニングを実施し、SREBP-1 特異的な活性化機構解明のツールとなり得る阻害剤を見出すことを目指した。しかしこれらの中に SREBP-1 に直接結合する化合物が含まれる可能性は高いことから、精製 SREBP-1 タンパク質を用いて直接的に SREBP-1 に結合する化合物の探索も同時に実施することとした。

### 第二章 SREBP-1 を特異的に阻害する化合物の評価系構築

これまで、SREBP-1 特異的な活性化の分子機構は知られておらず、SREBP-1 特異的な阻害剤も報告されていない。本章では SREBP-1 特異的な活性化分子機構解明のための実験ツールとして活用することを目指し、特異的かつ生理的な SREBP-1 の活性化を促す刺激に対して SREBP-1 活性化を阻害する化合物を探索することとした。

全身の細胞においてコレステロール量で活性調節される SREBP-2 と異なり、SREBP-1 は組

組織発現分布に偏りが見られ、それぞれの刺激による応答性は細胞種によって異なることから、適切な細胞種、活性化刺激、活性化を評価するための指標（リードアウト）の組み合わせが重要と考えた。また、阻害剤同定の成功確率を上げるため、大規模化合物ライブラリからの探索を行うべきと判断した。複数の細胞種、刺激、リードアウトを検討後、大規模なスクリーニング評価に耐えられる高スループットな評価系を構築した。

まずは SREBP-1 の選択的かつ生理的な活性化刺激として知られている、インスリンやエタノール、飽和脂肪酸を様々な細胞株に処理して応答性を検証したところ、スクリーニング評価を実施できるだけの高い S/B (signal-to-background) 比を得ることはできなかった。また、LXR (Liver x receptor) アゴニストも SREBP-1 の発現を誘導してその活性化を誘導すると考えられているが、SREBP-1 を介するよりも LXR が直接的に SREBP-1 標的遺伝子の発現を誘導する作用のほうが大きかったため、刺激としては不適と判断した。

次に脂肪細胞での脂肪滴形成過程における SREBP-1 活性化に着目した。脂肪細胞において脂肪滴が形成されると SREBP-1 が活性化し、SREBP-1 は脂肪酸合成を亢進することでさらに脂肪滴形成を促進するという正のフィードバック機構が提唱されている。そこで 3T3-L1 細胞の脂肪滴形成過程による SREBP-1 の活性化を検証したところ、活性型 SREBP-1 のタンパク質量の増加および SREBP-1 標的遺伝子の発現増加を確認できた。このとき、SREBP-2 標的遺伝子の発現変化は見られなかった。また既知の SREBP-1、SREBP-2 共通の阻害剤である Betulin 添加により脂肪滴の形成は抑制された。以上の結果より、脂肪滴形成過程で SREBP-1 が活性化し、SREBP-1 を阻害することで脂肪滴形成は抑制されることが明らかとなった。以上の結果より、脂肪滴形成による SREBP-1 の活性化をスクリーニング評価系として採用することとした。

脂肪滴の大きさが SREBP-1 の活性を反映しうることから、脂肪滴の大きさを定量する手法を独自に開発し、高スループットなスクリーニング評価系を構築した。384-well plate を用いた評価系のバラつきを低減するため、培養方法、培地への化合物添加条件、培養日数などを検討し、最適な評価条件を設定した。最終的に、連続複数枚のプレート評価においてバラつきの指標である %CV (Coefficient of variation) がすべてのプレートにおいて 20 以下であったことから、スクリーニング実施可能と判断した。終濃度 10  $\mu$ M で約 8 万化合物からスクリーニングを実施し、化合物未処理群における標準偏差の 3 倍以上の阻害活性を示す 1,734 化合物を選抜した。再現性が確認され、明確な細胞毒性を示さなかった 446 化合物に対して、SREBP 標的遺伝子プロモーターを用いたレポータージーンアッセイおよびラット初代肝細胞における遺伝子発現変化を解析した。その結果、SREBP-1 の活性を抑制し、SREBP-2 の活性を抑制しないと考えられた 16 化合物を選抜することに成功した。

### 第三章 SREBP-1 と特異的に結合する化合物の構築

第二章で同定された化合物は SREBP-1 活性化経路に存在する様々な因子に作用して SREBP-1 の活性化を阻害することが想定される。しかし SREBP-1 は転写因子であるため、酵素や受容体とは異なり活性を調節するためのポケットが存在しないことが想定され、ヒット化合物の中

には SREBP-1 に直接作用する化合物が含まれない可能性が高い。その一方、化合物ライブラリの中には SREBP-1 の活性には影響を与えないが、SREBP-1 と直接結合する化合物は存在する可能性が高いと考えられる。SREBP-1 に直接結合する化合物に阻害活性がない場合においても、プロテインノックダウン技術（標的タンパク質と結合する化合物と E3 ユビキチンリガーゼのリガンドをリンカーで繋いだ化合物を用いて、標的タンパク質と E3 ユビキチンリガーゼを近接させ強制的にユビキチン-プロテアソーム分解へ誘導する技術）を活用することで SREBP-1 特異的なタンパク質分解を誘導することができるため、SREBP-1 を特異的に阻害した際の表現型を解析するといった検証が可能となる。そのため本章では精製した SREBP-1 の組換えタンパク質を用いて、化合物との結合を評価するためのスクリーニング系を構築し、SREBP-1 に直接結合する化合物を探索した。

まずは SREBP-1 を発現、精製するための検討を実施した。SREBP-1 は 2 回膜貫通タンパク質であるため、膜貫通領域を除いた領域を昆虫細胞-バキュロウイルス発現系で発現させた。タグによる一段階目のアフィニティー精製後、ゲル濾過クロマトグラフィーによる二段階精製を実施したが、目的の分子量付近にピークは見られず、ほとんどのタンパク質が凝集したと考えられた。そのため、凝集の原因となり得る領域を除いた SREBP-1 タンパク質を再度発現させ、精製を試みた。先ほどと同様に二段階精製を実施したところ、今度は想定分子量に近い画分において単一のピークが確認され、Coomassie Brilliant Blue 染色およびウェスタンブロッティングの結果から、高純度の組換え SREBP-1 が得られたことを確認した。

組換え SREBP-1 の精製に成功したことから、TSA (Thermal shift assay) による結合評価系構築の検討を行った。TSA の原理は、化合物が目的タンパク質に結合することでその熱安定性に変化することを利用し、変性中点である  $T_m$  値のシフトを測定するというものである。 $T_m$  値の算出は、変性により露出した疎水面に結合する SYPRO Orange の蛍光シグナルをモニターすることで求められる。タンパク質濃度、SYPRO Orange 濃度、バッファー条件、塩、界面活性剤の種類や濃度などの検討を行い、384-well plate を用いた最適な評価条件を決定した。DMSO 濃度は評価系に影響のない 1% (化合物終濃度: 20  $\mu$ M) の条件を採用し、32,000 化合物を評価した。化合物非添加群の標準偏差 3 倍以上の  $T_m$  値の変化が見られた化合物を選抜後、カウンターアッセイを実施し、78 化合物を選抜した。

TSA で選抜した化合物の中には非特異的な結合を示す化合物が含まれる可能性があることから、これら 78 化合物について Surface Plasmon Resonance を利用した結合評価を実施した。その結果、チップ表面に固定化した精製 SREBP-1 に対して濃度依存的な結合シグナルの増加および結合飽和性が見られた 4 化合物を選抜した。

## まとめ

第二章で見出されたヒット化合物は SREBP-1 特異的な活性化機構を解明するための実験ツールとして、第三章で見出されたヒット化合物は SREBP-1 を特異的に阻害したときの表現型解析を行う上で、それぞれ有用であることが期待できる。本研究の成果は、これまで未知であった

SREBP-1 活性化の分子機構を化合物の作用機序解析という観点から明らかにするという、新たな研究アプローチを可能にするだけでなく、SREBP-1 が生活習慣の乱れを起点とする様々な疾患の予防、治療の標的分子としての妥当性検証を可能にすることが期待できる。