

審査の結果の要旨

氏名 勝部 彬

勝部彬は「LDL 受容体の発現制御機構に関する研究」と題して、以下の研究を行い、博士論文を執筆した。

コレステロールは生体膜を構成する、細胞の機能維持に必須の生体分子である。末梢組織は細胞膜に発現する low density lipoprotein (LDL) receptor (LDLR)を介して LDL を取り込み、コレステロールを獲得する。細胞は細胞内コレステロールの枯渇を防ぐため、ステロールセンサーとして働く SCAP-SREBP2 経路を有する。細胞内コレステロールが低下すると、本経路は速やかに活性化し、LDLR の発現を転写誘導することで細胞内コレステロール量を一定に保つ。このように SCAP-SREBP2 経路は細胞内コレステロールの恒常性維持において主要な役割を果たすが、近年、本経路以外にも細胞内コレステロール量を感じ、LDLR の転写制御に働く機構の存在が示唆されているが、その詳細は未だ明らかにされていない。勝部君はこれまで、HECT type E3 ubiquitin ligase の一種である ITCH とコレステロール関連遺伝子の関係性について研究を進めてきた。その過程で、ITCH の発現抑制下において、SREBP2 非依存的に LDLR 発現が誘導される可能性を見出した。本研究では、彼は SREBP2 非依存的な LDLR 発現制御機構の同定を目指した学位研究を実施した。

本研究の結果、彼は新規 LDLR 制御機構として、ITCH-JUN 経路を見出した。本経路は細胞内コレステロール枯渇時に活性化し、既存の SCAP-SREBP2 経路に依存しない機構である、と彼は結論付けている。以下に、彼が実施した実験の簡単な概要とともに紹介する。

ヒト肝癌由来の HepG2 細胞において、RNAi 法により ITCH を KD したところ、LDLR の RNA 及び、タンパク質発現量が上昇した。同条件下においては、SREBP2 の転写活性化の指標とされる、切断 SREBP2 量が減少し、SREBP2 による正の転写制御を受ける遺伝子群(HMGCR、PCSK9 等)は、LDLR を除き、RNA 発現量が低下していた。従って、ITCH KD による LDLR の RNA 発現量増加は、SREBP2 非依存的に生じることが示唆された。上記の事象は、コレステロール含有培養条件に比して、コレステロール枯渇培養条件でより顕著に認められた。ITCH は WW domain を介して、PY motif を持つタンパク質と相互作用し、E3 ligase として機能する。従って、ITCH は PY motif を持つ何らかの転写因子の発現量制御を介し、細胞内コレステロールレベル依存的に LDLR の転写をコントロールすると仮説を立てた。そこで in silico 解析を行い、候補転写因子を探索したところ、JUN、JUNB が ITCH-LDLR 経路に関与する候補転写因子として考えられた。HepG2 細胞において、ITCH ノックダウン(KD)により JUN、JUNB のタンパク質発現量の増加が確認された。また、JUN KD により、LDLR の RNA 及びタンパク質発現量が低下した。一方、JUNB KD では LDLR の発現量減少は認められなかった。ITCH KD による LDLR の発現量増強作用は、コレステロール

[別紙2]

含有培養条件に比してコレステロール枯渇培養条件で顕著に観察される。リン酸化 JUN(JUN 活性化体)は、コレステロール枯渇培養条件で有意に増加しており、JUN のリン酸化を担う JNK の阻害剤処理により、ITCH KD による LDLR の発現量増加は消失した。従って、細胞内ステロール量に応答する ITCH 依存的な LDLR の発現量制御は、JUN を介していることが示唆された。次に、JUN が LDLR の遺伝子領域に直接結合するかを検証するため、ChIP-qPCR を実施したところ、LDLR 遺伝子のエンハンサー領域と推測される領域において、JUN の結合が認められた。従って JUN は LDLR 遺伝子のエンハンサー領域に結合することで、LDLR の転写を制御していることが示唆された。以上の結果から、SCAP-SREBP2 経路とは異なる LDLR の新規転写制御機構として ITCH-JUN 経路が存在し、本機構は細胞ステロール枯渇に対する応答機構として機能する可能性がある、結論付けられている。

本研究により勝部君が見出した新規 LDLR 制御機構は、その破綻により、コレステロール枯渇に対する細胞の応答が顕著に抑制されることから、細胞のコレステロール恒常性維持において主要な役割を担うことが示唆された。コレステロールを適切に維持することは、生体の恒常性維持に必須であるため、本機構の細胞生物学的意義は大きいと考えられる。彼の研究を活かし、今後は様々な細胞、組織における当該機構の作用や既存の制御機構との住み分けを比較、検証することで、生体全体のコレステロール恒常性維持に対する本機構の重要性が解明されるものと期待する。

よって本論文は博士(薬科学)の学位請求論文として合格と認められる。