



## コレステロール代謝制御の分子細胞生物学研究

東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 教授 佐藤 隆一郎

### 1. はじめに

東京大学大学院において栄養化学研究で学位をいただいた。その後、帝京大学薬学部の故高野達哉教授のもとで、動脈硬化発症の基盤となるコレステロール代謝調節の研究に従事する機会をいただいた。当時の高野研は、弱小私立大学にもかかわらず、科学技術庁の大型プロジェクトの分担研究を遂行しており、企業研究者が7-8名常駐しており、活況を呈していた。クリーンベンチの予定表は深夜2時3時まで埋まり、UVランプが点灯するのは深夜数時間という日が続いていた。その中で、細胞生物学的研究のイロハから学ぶ機会を得る事ができた。弁当を2食分持参して深夜までの実験に従事した。4年の助手生活の後に、大学の職を辞して、留学先のテキサスへと飛び立った。何のコネもない中、コレステロール代謝研究でノーベル生理学・医学賞を受賞されていたGoldstein/Brown両博士のもとに自身の研究内容を売り込み、留学の機会を懇願した所、運良く拾っていただくこととなった。かくして、コレステロール研究を開始してわずか4年数ヶ月で、その研究領域の世界的総本山とも言える研究室で研究する幸運に巡り会うこととなった。かくして本受章の課題は、高野・Goldstein/Brown先生からの薫陶の賜物であり、その後、阪大薬学研究科、さらに母校へ戻ってからの約20年間のスタッフ、院生らの協力によりなされたものである。本講演では多くの方々への感謝の念を込めて、代表してそれらの一部を紹介させていただく。

### 2. 肝臓におけるコレステロール分泌の分子制御

高野研究室において与えられた課題は、肝臓におけるリポタンパク質合成・分泌の制御機構に関する基礎研究という漠然としたものであった。肝臓はコレステロール合成の中心臓器で、アポリポタンパク質B100(アポB100)と脂質を会合させ、リポタンパク質VLDLとして分泌する能力を持つ。興味深いことにアポB100タンパク質は、他の分泌タンパク質と異なり、単独では分泌されることはなく、脂質と会合し、リポタンパク質の形状で初めて分泌される。アポB100は約4500アミノ酸からなる超巨大タンパク質で、合成途上で小胞体内腔においてコレステロールを含む脂質と会合し、リン脂質が取り囲むリポタンパク質粒子を形成する。アポB100の合成・分泌過程を追跡するために、ヒト肝臓細胞HepG2を $^{35}\text{S}$ Metを含む培地で培養し、いわゆるPulse-chase実験を行った。細胞内で $^{35}\text{S}$ Metを取り込み合成されたアポB100は、分泌に伴い減少し、その一方で培地中に回収される。不思議なことに何回となく実験を繰り返しても、細胞内と培地中のアポB100の総量は継時的に減少していた。コントロールとして測定したアポA-1は、細胞内量が低下すると、培地中に分泌されたアポA-1が増加し、総量は継時的に一定値を維持した。この結果は、アポB100は分泌前にその一部が細胞内で特異的

に分解されていることを示唆していた。この仮説を検証するために、当時まだ市販されていなかったBrefeldin Aを東大農芸化学の高月明先生から恵与いただき、分泌タンパク質の細胞内移行を阻害して解析を進めた。その結果、細胞内に留められたアポB100は特異的にproteasomeによる分解を受けることを証明することに成功した(Sato et al. *J.B.C.*,1990)。その後Brefeldin Aは細胞生物学の世界で多用され、数百から千近くの論文が出された。東大農芸化学で学んでいた頃にBrefeldin Aの話を目にしなければ、このようなアイデアには行きつかなかっただろう。Nature, Cellの姉妹誌など存在しない頃、JBC論文をゼロから築き上げることができたのは、何とか研究者としてやっていけるのではないかと多少の自信を与えてくれた。またこのような分泌タンパク質の細胞内分解は、当時、小胞体における品質管理という概念が提案され、小胞体分解という新たな細胞応答機構として認知されつつある頃であった。小胞体分解を解説する総説では、小胞体分解を受ける数少ないタンパク質の例として我々の論文が良く引用された。そして、この研究成果がその後の留学先へと誘う役割を果たしてくれた。

### 3. コレステロール合成フィードバック機構の分子制御

細胞内のコレステロール量は厳密に制御されている。すべての細胞はおおよそ30段階の酵素反応を介してコレステロールを合成することができる。同時に細胞表面にLDL受容体を発現させ、細胞内にコレステロールを取り込む。この2つの経路はいずれもネガティブフィードバック機構により、コレステロール量が多くなると転写、翻訳後レベルの調節を受ける。その一つが、コレステロール合成阻害治療薬スタチンの標的酵素であるHMG CoA還元酵素(HMGCR)の活性調節であり、細胞内コレステロール量が多くなると小胞体膜タンパク質のHMGCRは分解を受け、急速に酵素活性を失う。アポB100分解と共通性を持つHMGCR小胞体分解機構の解析を是非ともトライしたいという手紙を送ると、1985年ノーベル賞受賞者のGoldstein/Brown両博士は快く留学の機会を与えてくれた。しかしこのプロジェクトは難解を極め、苦渋の2年間を過ごすこととなった。その後6,7年の経過を経て、INSIG(Insulin inducing gene)の出現を待たないと、この課題を解決することは不可能であった。この様な中で、我々はHMGCRのリン酸化による活性抑制機構について解析を進めることに方針変更をした。その2年前に細胞内AMPにより活性化される新たなキナーゼAMPKが明らかにされ、その基質がHMGCRであることから、分解による活性調節とリン酸化による失活との機能相関を追跡した。その結果、AMPKによるリン酸化とコレステロール量に呼応して生じる分解は互いに独立した機構であることを明らかにすることに成功した(Sato et al. *P.N.A.S.*,1993)。本論文はヴォートの生化学教科書にも取り上げら

れ、紹介された。

同時に、コレステロール合成酵素群、LDL受容体遺伝子の発現を転写レベルで制御する転写因子SREBP(Sterol regulatory element-binding protein)の発見研究に従事した。我々が見出した新規転写因子は、驚いたことに小胞体膜タンパク質として合成されたのちに、細胞内のコレステロール量が低い時にのみ、N末端側が切断され活性化型として核内へ移行し、転写を正に制御すると言う、これまでに例を見ない活性化様式を持つことが明らかになった。こうして発見されたSREBP-1, SREBP-2はそれぞれ脂肪酸合成、コレステロール合成を担う酵素遺伝子発現を制御しており、それぞれの生理機能について、帰国後、種々の研究を展開した(図1)。SREBPの新たな応答遺伝子を見出し、SREBP活性化機構を解析し、さらに複数の核内受容体とのクロストークについて明らかにした。その結果、コレステロール、脂肪酸合成経路を介した脂質代謝の主たる調節機構にSREBP-1/2は関与し、その制御機構は複数の核内受容体との重層的なクロストークにより成立していることを明らかにすることに成功した。

#### 4. コレステロール代謝調節の分子制御

小腸より吸収された脂質、肝臓で合成された脂質はそれぞれリポタンパク質の形で血液へと転送される。この過程で脂質とアポBタンパク質を会合させる転送酵素MTP(Microsome triglyceride transfer protein)はリポタンパク質代謝の中心的役割を演じる。この遺伝子の発現制御機構、さらにその発現を抑制する食品成分を見出した。さらに、体の各組織へのコレステロール運搬を担うLDLを取り込むLDL受容体について、その発現がmRNAの安定性により調節される新たな機構を見出した。血中コレステロール濃度を調節する新たな標的としてLDL mRNAの安定性が重要視されるようになった。

コレステロールは肝臓で1日およそ1g合成されるが、我々はこれを分解することも、燃焼することもできない。体内においてコレステロールは最終的に肝臓へと輸送され胆汁酸へと異化され、やがて糞中へと排出される。こうして生成された胆汁酸は種々の機能を有する生理活性成分である事が近年の研究で明らかにされている。核内受容体FXRのリガンドとして胆汁酸がFXRを活性化し、小腸、肝臓において種々の応答遺伝子発現を調節する機構について明らかにした。また胆汁酸をリガンドとして認識するGタンパク質共役受容体TGR5について新たな知見を見出しつつある。TGR5を介して胆汁酸はインクレチンGLP-1分泌を亢進し、糖代謝改善効果を発揮する。さらに骨格筋では熱産生を上昇させ、抗肥満作用を発揮する。こうした胆汁酸の代謝改善効果を模倣する食品成分を柑橘類に見出し、TGR5アゴニストとして機能することを明らかにしている。コレステロール代謝産物の機能を模倣する機能性食品成分の発見として評価されている。さらにTGR5を骨格筋に過剰発現させたマウスを開発し、筋量増強効果を見出している。胆汁酸並びにその受容体を介した骨格筋機能維持が高齢社会におけるロコモティブシンドローム予防に結びつくことが期待される。

コレステロールの一部は酵素反応により22, 25, 27位に水酸基

が導入された酸化コレステロールへと形を変える。これら酸化コレステロールは核内受容体LXRのリガンドとして機能し、種々の応答遺伝子発現制御に寄与する。LXR活性化を介した種々の遺伝子発現応答制御について生化学的な知見を明らかにしてきた。複数の酸化コレステロール分子種がそれぞれ固有の機能を発揮する機構について今後更なる解析が必要とされている。

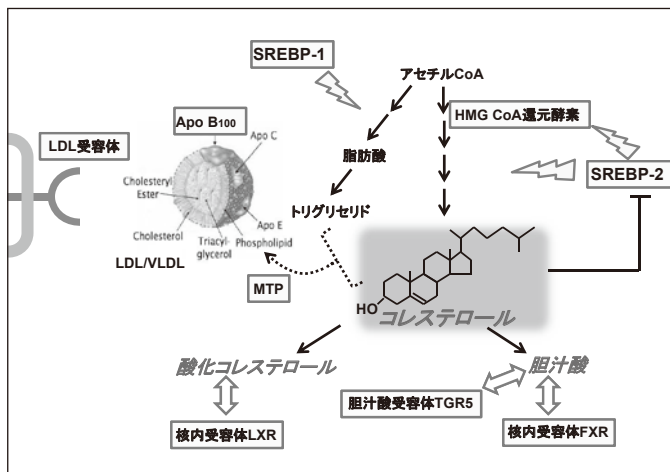


図1 コレステロール代謝制御の全容の模式図  
本研究で対象にした標的遺伝子、タンパク質を四角で囲んだ。

以上、コレステロール合成系を中心に、その最終産物コレステロール、さらにその代謝産物の酸化コレステロール、胆汁酸に焦点を当て、これらステロール化合物の生理的機能の解析、さらに脂質代謝制御に関する分子細胞生物学的な研究を行ってきた。炭素数27から成る複雑な構造化合物として合成されたコレステロールは、体内で様々な代謝産物へと形を変え、多様な生理作用を発揮する生理活性物質として機能する。これらの機能の一端を明らかにした本研究知見は、代謝制御破綻に起因する種々の生活習慣病の発症機構を理解する上で重要な科学的エビデンスであると同時に、機能性食品創製、創薬の方向性を示す基盤となることが期待される。また農芸化学領域において、本研究は栄養化学、食品科学、食品機能学をカバーする研究として位置付けられるが、同時に分子細胞生物学的手法を駆使し、生体の代謝調節機構を明らかにしたことにより、医学・薬学領域研究の発展にも少なからず貢献したものと考えている。

謝辞 東京大学大学院時代には東京大学名誉教授 内藤博先生、野口忠先生に研究の基礎をご指導いただきました。その後、帝京大学薬学部名誉教授 故高野達哉先生には、コレステロール代謝研究へと導いていただき、多くの事を学ばせていただきました。さらにテキサス大学 Goldstein博士、Brown博士には、研究の厳しさ、同時に先端研究の興奮の醍醐味を体感させていただき、感謝申し上げます。両博士との4年間の激務・奮闘努力なくして、今日の私はあり得ません。さらに帰国後、共同研究者としてご尽力いただいた先生方、院生、企業研究者の方々に感謝いたします。