Hydroxymethylglutaryl CoA Reductase

辻 田 代 史 雄*

I. 発見の経緯

コレステロールは Fig. 1 に示すように複雑な経路で生合成され、ステロイドホルモンや胆汁酸の原料や細胞膜の成分など生体の多くの重要な機能に関与している。一方、コレステロール生合成系からは、ドリコール、ユビキノンな

ど生体必須微量物質も作られる。コレステロール生合成系は、5ヵ所でコレステロールによってフィードバック制御を受けているが、この経路の律速段階は、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル (HMG)-CoA をメバロン酸に還元するところで、この段階を触媒するのが HMG-CoA 還元酵素 [(Mevalonate: NADP oxidoreductase (acylating CoA) EC

Fig. 1 Pathway of cholesterol synthesis and its regulation by cholesterol and nonsterol products.

* 三共株式会社第一生物研究所

原稿受取日: 1995年9月1日

Yoshio Tsujita: Pharmacology and Molecular Biology
Research Laboratories, Sankyo CO., Ltd.

1.1.1.34)]である。本酵素の存在は、Stewart と Rudney¹⁾によって酵母で明らかにされ、哺乳動物については1967年にLinn²⁾によって、ラット肝臓で示された。

II. 分子構造

HMG-CoA還元酵素は、酵母から哺乳動物まででは小胞体(ER)に結合した膜結合酵素である。触媒部位は細胞質にでており、高塩濃度存在下で凍結融解を繰り返すと触媒部位が可溶化され、この触媒部位は分子量53,000の蛋白として精製された³⁾。Full lengthのcDNAは、1982年Chinらによってチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞からクローニングされ、同じくChinら⁴⁾によってこのcDNAが887残基のアミノ酸をコードしていることが報告された。本酵素は分子量97,000の糖蛋白で、Liscumら⁵⁾によって小胞体膜を7回貫通する2次構造のモデルが示されたが、その後Simoniのグループ⁶⁾によって8回貫通型に訂正された。Fig. 2にLiscumらのモデルの膜貫通部分をSimoniらのモデルで修正したモデルを示す。N末端はメチオニンでC末端がアラニンで、ERの管腔側の281番目のアスパラギンに糖鎖が結合している。423番目のセリン部分でプロテアーゼ(カルパイン様中性プロテアーゼといわれている)により切断され触媒部位が可溶化される。膜貫通

部位を含めた可溶化は、界面活性剤のくみあわせと高塩濃度下ではじめて成功した⁷⁾。871番目のSerはリン酸化をうけて酵素が不活性化される。また、触媒部位の7個のヒスチジンを他のアミノ酸に置き換えると、865番目を換えた場合のみ活性が元の0.6%に低下したことから、このヒスチジンが活性発現に重要なことが示された⁸⁾。

ヒトの副腎細胞からもHMG-CoA還元酵素はクローニングされ、888残基のアミノ酸をコードしていた⁹⁾。ハムスターと違うのは、N末端の膜貫通部分で339残基のうち7残基で、C末端の触媒部分では439残基中22残基のみで相同性が高いが、リンカー部分は、110残基中32残基のアミノ酸がハムスターと異なっており相同性は低い。

HMG-CoA還元酵素は、今まで調べられたすべての臓器に存在しているが、isozymeは報告されていない。また、バクテリアにも存在するが、この酵素は可溶性で膜貫通部分をもたない。しかし、酵素化学的性質は動物などと同じである。

本酵素のサブユニットの数については、Rodwellらのハムスターの酵素でのSite-directed mutagenesisにより得られたMutant酵素のくみあわせより、ホモダイマーとして存在することが示された¹⁰⁾。この研究により、モノマーが向かいあった面に存在する558番目のグルタミン酸と766番目のアスパラギン酸のカルボキシル基の相互作用が活性に重要であることもわかった。さらにRodwellらは、*Pseudomonas mevalonii*のHMG-CoA還元酵素(可溶性部分のみでできている)の結晶構造解析により3次元構造を明らかにした¹¹⁾。強固に結合したホモダイマーで、サブユニットの向かいあった面に基質のHMG-CoAやNADPHが結合し、その近傍の構造も示された。

III. 遺伝子

ハムスターのHMG-CoA還元酵素の遺伝子は約25 kbで20のエクソンからなる¹²⁾。本酵素の蛋白をコードしているのはエクソン2-20で、それぞれの膜貫通部分は別々のエクソンにコードされ、5'非翻訳領域ははじめの二つのエクソンに、3'非翻訳領域は第20番目のエクソンにそれぞれ存在している。3'非翻訳領域の不均一性はポリアデニレーションサイトの多いことにより、5'非翻訳領域の不均一性は、転写開始点が多いことと、5'スプライスサイトが多いことによる。

IV. 生理特性

1) 日内変動、半減期

本酵素は特に肝臓で日内変動を示すことが多くの動物で認められている¹³⁾。ラット、マウス、ハムスター、モルモット、ヒトなどでは真夜中に昼間の活性の数倍高くな

Fig. 2 Model for the predicted secondary structure of HMG-CoA reductase. The model is illustrated by combination with Ref. 5 and 6.

る。HMG-CoA 還元酵素阻害剤をラットに投与しても日内変動は消失せず、変動全体のレベルが上昇する¹⁴⁾。ラットなどの肝臓の本酵素の日内変動には副腎皮質ホルモンのグルココルチコイドが関与しており、このホルモンの一種のグルコステロンの合成と分泌は、視床下部の視交叉の上部にある小構造体の視交叉上核 (SCN) によって制御され¹⁵⁾、SCN は光 (明/暗フェーズ) によって調節されている。また、肝臓にのみ発現するアルブミン遺伝子のシスアクティングエレメントの D に結合する転写因子 DBP の発現は、グルココルチコイドにより調節されて日内変動する。肝臓でのみ発現し日内変動する胆汁酸合成系の律速酵素のコレステロール 7 α ヒドロキシラーゼが DBP に連動していることから、HMG-CoA 還元酵素も DBP により制御されている可能性が指摘されている¹⁶⁾。

HMG-CoA 還元酵素の半減期は短く 3~4 時間である¹⁷⁾。また、この酵素の mRNA の不安定性についても指摘されている。

2) 調節機構

HMG-CoA 還元酵素は、Fig. 1 に示したようにコレステロールによるフィードバック制御の他、メバロン酸以降スクアレンまでの中間体および分枝経路で生成する物質 (Fig. 1 の非ステロール産物) による制御機構や、リン酸化および脱リン酸化による制御機構もあり、自然界でもっとも高度に制御されている酵素といわれている。

本酵素の遺伝子の 5' プロモーター領域には、ステロール (オキシステロールといわれている) によって転写が調節される領域があり、そのうちの一つに Seterol regulatory element 1 (SRE 1) が存在し、これと類似の構造が LDL レセプターと HMG-CoA 合成酵素のプロモーター領域にも存在し、同じようにステロールで調節されていると考えられた。ところが、SRE に結合する蛋白 (SREBP) が精製されその性質が調べられると、SREBP は LDL レセプターと HMG-CoA 合成酵素の SRE 1 には結合しそれらの発現を正に制御するが、SREBP 1a および SREBP 2 ともに HMG-CoA 還元酵素の発現に影響を与えないことがわかり¹⁸⁾、LDL レセプターなどとは別の転写因子により転写制御が行われていることが示唆された。

CHO 細胞に少量のメバロン酸を添加しても、HMG-CoA 還元酵素の mRNA は変化しないが、酵素合成が低下することから、メバロン酸以降の非ステロール産物が翻訳に影響を与えていることが示唆された¹⁹⁾。また、オキシステロールの 25 ヒドロキシコレステロールが、HMG-CoA 還元酵素の 3' 非翻訳領域に作用して、転写後の調節機構で mRNA の安定性を調節しており、その機構には蛋白合成が必要なことも最近報告された²⁰⁾。

膜画分を含まない触媒部位のみでの半減期は 24 時間以

上と長くなることから本酵素蛋白の分解には膜貫通部分に関与し、この分解にはステロールと非ステロール産物の両方が携わっている¹⁹⁾。膜貫通部分のどこが分解に関与するかは、アスパラギン結合型糖鎖がプロテアーゼによるタンパクの分解を防ぐことを利用して、ER 管腔側のループ F (Fig. 1) であることが報告された²¹⁾。この分解に関与するプロテアーゼは、カルパイン様の中性プロテアーゼである。また、ファルネシルピロリン酸類縁体が、HMG-CoA 還元酵素の mRNA の翻訳を低下させ、酵素の分解を促進したこと²²⁾、およびステロールや非ステロール産物による本酵素の調節が実際に動物 (ラット) でおこなっていることが最近報告された²³⁾。

さらに本酵素には、リン酸化による不活性化機構と脱リン酸化による再活性化機構がある。リン酸化されるのは 871 番目のセリン²⁴⁾で、AMP 依存性キナーゼ²⁵⁾による。このリン酸化による調節は、細胞レベルでは短時間 (30 分) の早い活性の調節に関与していることが示されているが、*in vivo* ではリン酸化された酵素は一定量であるなどの報告があり、その関与は不明の点が多い。

V. 測定法と正常値

1) 反応機構

HMG-CoA 還元酵素は以下の反応を触媒している。

反応は二つの部分に分けられ、まず第 1 段階では HMG-CoA が酵素と結合し、Binary complex を形成し、次いで 1 分子の NADPH が結合し Ternary complex を形成後 NADP が遊離し、Enzyme-mevaldic hemithioacetal 複合体の中間体が生成する。第 2 段階では、もう 1 分子の NADPH がこの複合体に結合し、NADP, CoA, メバロン酸の順に酵素から遊離する²⁶⁾。

HMG-CoA (D 体) に対するラット肝臓の可溶化 HMG-CoA 還元酵素の k_m は 1~3 μM である。

2) 測定法

Shapiro らの方法²⁷⁾を基本として、反応産物のメバロンラクトンを溶媒で抽出せず直接 TLC にかける方法である²⁸⁾。すなわち、6.4 nmol の DL [3-¹⁴C] HMG-CoA (144 MBq/nmol), 50 nmol の NADPH, 500 nmol のジチオススレイトール, 500 nmol の EDTA $\cdot$ 2 Na を終濃度 100 mM のリン酸カリ緩衝液 (PH 7.4) で 40 μl として、37°C, 3 分予熱後 10 μl のミクロソーム懸濁液 (HMG-CoA 還元酵素) を加え 37°C, 15 分インキュベーションし、2N 塩酸を 10 μl 加えさらに 37°C, 15 分インキュベーションし、生じたメバロン酸をラクトン化させ、その反応液 40 μl を直接シリカゲルプレートにスポットし、ベンゼン-アセトン (1:1) の

Table 1 Hepatic HMG-CoA reductase activity in various animal species.

Animal	Strain	Sex	Age or body w.	Assay point	n	HMG-CoA reductase (pmol/min/mg protein)	Ref.
Chick	White leghorn	M	14 days	Day	4	1152.7±36.3*	31
				Night	4	577.2±12.5*	
Rat	Wistar	M	200-500 gr	Day	6	96 ± 7*	32
				Night	6	650 ± 62*	
Mouse	Swiss Webster		35.7±0.6 gr	Day	8	15 ± 3*	33
				Night	8	62 ± 17*	
Hamster	Golden Syrian	M	139±7 gr	Day	6	26.9± 9.5**	34
	Syrian	M	95-125 gr	Day	10	11.2	35
Ginea pig	English	M	250-450 gr	Day	4	2.3 ^a	36
				Night	4	10.1± 0.02*	
Prairie dog		M	8 month	Day	4	121 ± 23*	37
Rabbit	New Zealand W.	M	4-5 month	Day	5	2.8± 1.0*	14
Dog	Mongrel	M, F	Young	Day		290	38
Swine		M	8-10 weeks	Day	5	255	39
Monkey	African Green	M		Day	3	9.7± 5.0* ^b	40
					3	8.5± 3.8* ^c	
Human (with gallstone)		M, F	31-71 years	Day	20	105 ± 14*	41

*Mean±S.E.M. ; **Mean±S.D. ; ^a value obtained from the figure ; ^b low cholesterol diet ; ^c 0.29% cholesterol diet.

展開溶媒でTLCを行い、メバロノラクトン部分 (R_f 0.2~0.6) をかきとり放射能をカウントする。TLCのかわりにイオン交換樹脂 (Biorex-5, Bio-Rad 製) を反応液に加え、HMG-CoA を吸着させる方法²⁹⁾もある。その他関連の詳しい方法については成書³⁰⁾を参照されたい。

3) 各種動物の肝臓での HMG-CoA 還元酵素の活性

活性測定条件の相違もあると思われるが、Table 1 に示すように各種動物の肝臓における HMG-CoA 還元酵素活性は 2~1,200 pmol/min/mg protein とかなりの開きがある。日内変動が報告されている動物については、その数値を記載したが、まだ報告がない動物でも日内変動を示す可能性は高い。

VI. 臨床的意義

1) HMG-CoA 還元酵素阻害剤

著者らは、1971 年よりコレステロール合成を阻害する物質を微生物からスクリーニングし、1973 年には青カビの一種から世界ではじめて HMG-CoA 還元酵素の特異的阻害剤、ML-236B (一般名メバスタチン) を見い出した⁴²⁾。本物質はラット、マウス以外の多くの動物で強力な血清コレステロール低下作用を示した。その後、その多くの誘導体のなかから強い活性と、ターゲット臓器である肝臓および小腸選択的なコレステロール合成阻害を示すこと⁴³⁾より、プラバスタチンを選択し開発し、1989 年に商品名メバロチンとして発売した。現在、世界 52 カ国の 200 万人以上の高脂血症患者に処方されている。

プラバスタチン関連化合物の構造を Fig. 3 に示すが、プ

ラバスタチンの構造類縁体として、ロバスタチンとシンバスタチンがあり、ともに高脂血症剤として用いられ、シンバスタチンは日本でも発売されている。現在、化学合成により得られた阻害剤が、多くの企業で開発中で⁴⁴⁾、Fig. 3B に示す化合物は臨床試験が進んでおり、フルバスタチンについては、アメリカ、カナダをはじめ数カ国ですでに発売されている。

2) HMG-CoA 還元酵素阻害剤の血清脂質低下作用など

プラバスタチンは、10~20 mg/day の投与量で家族性高コレステロール血症 (ヘテロ接合体) を含む高脂血症患者の血漿コレステロールを 16~21% 低下させ、その低いレベルが投与期間中維持されている。悪玉の LDL コレステロールが優先的に低下し、善玉の HDL コレステロールはむしろ上昇する⁴⁵⁾。また、本薬剤は、糖尿病性、高血圧性、腎障害性などの 2 次性高脂血症にも有効である。プラバスタチンを含む HMG-CoA 還元酵素阻害剤は、血漿コレステロール低下作用では最強の薬剤で、しかも一般に副作用も少ない。

HMG-CoA 還元酵素阻害剤は、Fig. 1 のコレステロール生合成経路が示すように、 ras タンパクのファルネシル化も阻害することから、一部の癌に対する制癌効果も認められている。

3) HMG-CoA 還元酵素阻害剤の抗動脈硬化作用

(1) WHHL ウサギでの抗動脈硬化作用

WHHL ウサギは家族性高コレステロール血症のモデル動物で、高脂血症のため成熟齢に達すると全例で動脈硬化

コレステロール生合成の日内変動とその調節機構

A

B

Fig. 3 Structure of pravastatin and its related compounds.

を発症する。プラバスタチンを動脈硬化がまだ発症していない若い WHHL ウサギに 6ヵ月間投与すると、冠状動脈病変の進展抑制が認められた。さらに成熟期のウサギに 1 年間投与することにより、すでに発症した動脈硬化の進展抑制が認められ、この病変の改善にはプラークを安定化する質的な変化が伴っていることが観察された⁴⁶⁾。

(2) 臨床での抗動脈硬化作用

動脈硬化疾患の発症予防試験には、心疾患を発症していない人の発症の予防をみる 1 次予防試験と、心疾患を発症した患者の病変の進展、再発をみる 2 次予防試験がある。プラバスタチンをはじめ、ロバスタチンやシンバスタチンを用いた動脈硬化疾患の予防試験が、欧米を中心にいくつ

Table 2 Pooled analysis (PLAC I, PLAC II, REGRESS and KAPS) of clinical events of pravastatin treatment on atherosclerosis.⁴⁷⁾

Clinical endpoint	Rate of events (%)		% Risk reduction	Logrank P-value
	Placebo (n=936)	Pravastatin (n=955)		
Nonfatal or fatal MI	6.4	2.4	62.3	0.001
Nonfatal MI or CHD Death	7.1	3.4	51.4	0.006
All-cause mortality	3.3	1.8	45.6	0.168
Nonfatal MI or all-cause mortality	8.5	4.0	53.0	0.003
Nonfatal MI, all-cause mortality, Stroke, or PTCA/CABG	19.5	13.7	30.0	0.002

MI, Myocardial infarction; CHD, coronary heart disease; PYCA, percutaneous transluminal coronary angioplasty; CABG, coronary artery bypass graft

も実施されている。

プラバスタチン (投与量は 20~40 mg/day) を用いた 2 次予防試験 (退縮試験も含む) には, PLAC I, PLAC II, REGRESS, KAPS の 4 試験があり, すでに終了している。これらの 4 試験を統合した対象 1,891 人のメタアナリシスが実施され, Table 2 に示すように, 心筋梗塞と冠動脈疾患死をあわせた数は, プラセボ群が 936 人中 52 人であったのに対して, プラバスタチン群では 955 人中 29 人であった⁴⁷⁾。また, シンバスタチンを用いた 2 次予防試験 (4S)⁴⁸⁾ も発表されている。20~40 mg/day のシンバスタチンを患者に 5.4 年間投与したところ, LDL コレステロールは 35% 低下し, 冠動脈疾患による死亡は, プラセボ群が 2,223 人中 189 人であったのに対して, 投与群では 2,221 人中 111 人であった。1 次予防については, プラバスタチンを用いた約 6,600 人, 6 年間の WOS 試験の結果が 1995 年 11 月に報告された⁴⁹⁾。その結果によるとプラバスタチンは, 非心血管系疾患による死亡率には影響を与えず, 心血管系疾患による死亡率と総死亡率を, プラセボ群と比べそれぞれ 31% および 22% 低下させた。

HMG-CoA 還元酵素阻害剤のこれらの抗動脈硬化作用に関する臨床試験の結果から, プラバスタチンはイギリス, カナダなど 5 カ国で, シンバスタチンはアメリカで, 抗動脈硬化作用の効能が追加された。

文 献

- 1) Stewart R and Rudney H: The biosynthesis of β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A in yeast. *J Biol Chem*, 241: 1222-1225, 1966
- 2) Linn T: The demonstration and solubilization of β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A reductase from rat. *J Biol Chem*, 242: 984-989, 1967
- 3) Edwards PA, Lemongello D, Kane J, Shechter I, and Fogelman AM: Properties of purified rat hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and regulation of enzyme activity. *J Biol Chem*, 255: 3715-3725, 1980
- 4) Chin DJ, Cil G, Russell DW, Liscum L, Luskey KL, Basu SK, Okayama H, Berg P, Goldstein JL, and Brown MS: Nucleotide sequence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a glycoprotein of endoplasmic reticulum. *Nature*, 308: 613-617, 1984
- 5) Liscum L, Finer-Moore J, Stroud RM, Luskey KL, Brown MS, and Goldstein JL: Domain structure of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a glycoprotein of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 260: 522-530, 1985
- 6) Olender EH and Simoni RD: The intracellular targeting and membrane topology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J Biol Chem*, 267: 4223-4235, 1992
- 7) Vermilion JV and Schroepfer GJ Jr: Solubilization of the 97-kDa native form of liver microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Biol Chem*, 265: 9984-9992, 1990
- 8) Darnay BG and Rodwell VW: His865 is the catalytically important histidyl residue of syrian hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J Biol Chem*, 268: 8429-8435, 1993
- 9) Luskey KL and Stevens B: Human 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase. *J Biol Chem*, 260: 10271-10277, 1985
- 10) Frimpong K and Rodwell VW: The active site of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase resides at the subunit interface and incorporates catalytically essential acidic residues from separate polypeptides. *J Biol Chem*, 269: 1217-1221, 1994
- 11) Lawrence CM, Rodwell VW, and Stauffer CV: Crystal structure of *Pseudomonas mevalonii* HMG-CoA reductase at 3.0 angstrom resolution. *Science*, 268: 1758-1762, 1995
- 12) Reynolds GA, Basu SK, Osborne TF, Chin DJ, Gil G, Brown MS, Goldstein JL, and Luskey KL: HMG-CoA reductase: a negatively regulated gene with unusual promoter and 5' untranslated regions. *Cell*, 38: 275-285, 1994
- 13) 辻田代史雄: コレステロール 生合成の日内変動とその調節機構。動脈硬化, 22: 695-705, 1995
- 14) Fujioka T, Nara F, Tsujita Y, Fukushima J, Fukami M,

- and Kuroda M: The mechanism of lack of hypocholesterolemic effects of pravastatin sodium, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, in rats. *Biochim Biophys Acta*, 1254: 7-12, 1994
- 15) Meijer JH and Rietveld WJ: Neurophysiology of the suprachiasmatic circadian pacemaker in rodents. *Physiol Rev*, 69: 671-707, 1989
 - 16) Lavery DJ and Schibler U: Circadian transcription of the cholesterol 7 α hydroxylase gene may involve the liver-enriched bZIP protein DBP. *Genes Dev*, 7: 1871-1884, 1993
 - 17) Tormanen CD, Srikantiah MV, Hardgrave JE, and Scallen TJ: Evidence for the presence of a natural inactivating factor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in soluble extracts from rat liver microsomes. *J Biol Chem*, 252: 1561-1565, 1977
 - 18) Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, Brown MS, Goldstein JL, and Xiaodong W: SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 11603-11607, 1993
 - 19) Nakanishi M, Goldstein JL, and Brown MS: Multivalent control of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Biol Chem*, 263: 8929-8937, 1988
 - 20) Choi JW and Peffley DM: 3'-Untranslated sequences mediate post-transcriptional regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase mRNA by 25-hydroxycholesterol. *Biochem J*, 307: 233-238, 1995
 - 21) Sekler MS and Simoni RD: Mutation in the luminal part of the membrane domain of HMG-CoA reductase alters its regulated degradation. *Biochem Biophys Res Commun*, 206: 186-193, 1995
 - 22) Bradfute DL and Simoni RD: Non-sterol compounds that regulate cholesterologenesis. *J Biol Chem*, 269: 6645-6650, 1994
 - 23) Ness GC, Eales S, Lopez D, and Zhao Z: Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression by sterols and nonsterols in rat liver. *Arch Biochem Biophys*, 308: 420-425, 1994
 - 24) Sato R, Goldstein JL, and Brown MS: Replacement of serine-871 of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase prevents phosphorylation by AMP-activated kinase and blocks inhibition of sterol synthesis induced by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90: 9261-9265, 1993
 - 25) Carling D, Clarke PR, Zammit VA, and Hardie DG: Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. *Eur J Biochem*, 186: 129-136, 1989
 - 26) Tanzawa K and Endo A: Kinetic analysis of the reaction catalyzed by rat-liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase using two specific inhibitors. *Eur J Biochem*, 98: 195-201, 1979
 - 27) Shapiro DJ, Imblum RL, and Rodwell VW: Thin-layer chromatographic assay for HMG-CoA reductase and mevalonic acid. *Anal Biochem*, 31: 383-390, 1969
 - 28) Kuroda M and Endo A: Inhibition of *in vitro* cholesterol synthesis by fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, 486: 70-81, 1977
 - 29) Germershausen JI, Hunt VM, Bostedor RG, Bailey PJ, Karkas JD, and Alberts AW: Tissue selectivity of the cholesterol-lowering agents lovastatin, simvastatin and pravastatin in rats *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*, 158: 667-675, 1989
 - 30) 辻田代史雄, 黒田正夫: 抗動脈硬化薬, 医薬品の開発 9 巻, 医薬の探索 II, 斎藤 洋, 野村 靖編, pp 79-111, 広川書店, 東京, 1990
 - 31) Ramirez H, Alejandro MJ, and Carcia-Peregrin E: Development of the diurnal rhythm of chick 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Lipids*, 17: 434-436, 1982
 - 32) Balasubramaniam S, Szanto A, and Roach PD: Circadian rhythm in hepatic low-density-lipoprotein (LDL)-receptor expression and plasma LDL levels. *Biochem J*, 298: 39-43, 1994
 - 33) Gebhard RL, Prigge WF, Andreini JP, and Freeman ML: Effect of probucol on blood cholesterol and basal and lovastatin-induced 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in mice. *J Lab Clin Med*, 117: 299-304, 1991
 - 34) Ochoa B, Gee A, Jackson B, and Suckling KE: Regulation of cholesterol ester metabolism in the hamster liver. *Biochim Biophys Acta*, 1044: 133-138, 1990
 - 35) Suckling KE, Benson GM, Bond B, Gee A, Glen A, Haynes C, and Jackson B: Cholesterol lowering and bile acid excretion in the hamster with cholestyramine treatment. *Atherosclerosis*, 89: 183-190, 1991
 - 36) Greene YJ, Harwood HJ Jr, and Stacpoole PW: Ascorbic acid regulation 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and cholesterol synthesis in guinea pig liver. *Biochim Biophys Acta*, 834: 134-138, 1985
 - 37) Cohen BI, Mosbach EH, and McScherry CK: Effect of previous nutritional status on the formation of cholesterol gallstones in the prairie dog. *Lipids*, 23: 798-803, 1988
 - 38) Ho PPK, Esterman MA, Towner RD, and Turner RK: Dog liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Enzyme*, 22: 242-248, 1977
 - 39) Rogers DH, Kim DN, Lee KT, Reiner JM, and Thomas WA: Circadian variation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in swine liver and ileum. *J Lipid Res*, 22: 811-819, 1981
 - 40) McCall MR, Mehta T, Leathers CW, and Foster DM: Psyllium husk I: effect on plasma lipoproteins, cholesterol metabolism, and atherosclerosis in African green monkeys. *Am J Clin Nutr*, 56: 376-384, 1992
 - 41) Reihner E, Rudling M, Stahlberg D, Berglund L, Ewerth S, Bjorkhem I, Einarsson K, and Angelin B: Influence of pravastatin, specific inhibitor of HMG-CoA reductase, on hepatic metabolism of cholesterol. *N Engl J Med*, 323: 224-228, 1990
 - 42) Endo A, Kuroda M, and Tsujita Y: ML-236A, ML-236B and ML-236C, new inhibitor of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot*, 29: 1346-1348, 1976
 - 43) Tsujita Y, Kuroda M, Shimada Y, Tanzawa K, Arai M, Kaneko I, Tanaka M, Masuda H, Tarumi C, Watanabe Y, and Fujii S: CS-514, a competitive inhibitor of

- 3-hydrox-3-methylglutaryl coenzyme A reductase : tissue-selective inhibition of sterol synthesis and hypolipidemic effect on various animal species. *Biochim Biophys Acta*, 877 : 50-60, 1986
- 44) Tsujita Y, Serizawa N, Hosobuchi M, Komai T, and Terahara A : HMG-CoA reductase inhibitors as potent cholesterol lowering drugs. *Jap Technol Rev*, Section E : Biotechnology, 5 : No. 1, Gordon and Breach Science Publishers, Switzerland, 1994
- 45) 山本 章, 後藤由夫, 吉田 尚, 斎藤 康, 大島研三, 八杉忠男, 高久史麿, 折茂 肇, 秦 葭哉, 中谷矩章, 熊谷 朗, 竹田亮祐, 馬淵 宏, 葛屋文男, 河合忠一, 北 徹, 垂井清一郎, 松沢佑次, 梶山悟朗, 国府達郎, 中村元臣, 荒川規矩男 : 高脂血症に対するCS-514 (Pravastatin) の長期投与による臨床的有用性の検討. *臨床医薬*, 4 : 409-437, 1988
- 46) Shiomi M, Ito T, Tsukada T, Yata T, Watanabe Y, Tsujita Y, Fukami M, Fukushige J, Hosokawa T, and Tamura A : Reduction of serum cholesterol levels alters lesional composition of atherosclerotic plaque : Effect of pravastatin sodium on atherosclerosis in mature WHHL rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15 : 1938-1944, 1995
- 47) Byington RP, Jukema JW, Salonen JT, Pitt B, Bruschke AV Hoen H, Furberg CD, and Mancini GB : Reduction in cardiovascular events during pravastatin therapy : Pooled analysis of clinical events of the pravastatin atherosclerosis intervention program. *Circulation*, 92 : 2419-2425, 1995
- 48) Scandinavian Simvastatin Survival Group : Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease : the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*, 344 : 1383-1389, 1994
- 49) Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, Macfarlane PW, McKillop JH, and Packard CJ : Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med*, 333 : 1301-1307, 1995