細胞内コレステロール代謝はどのように調節されるか

佐藤 隆一郎*

細胞内コレステロール代謝は、コレステロールによる負のフィードバックコントロールにより、緻密な調節を受けている。コレステロールが枯渇すると、合成、LDLの取り込み上昇が、転写ならびに転写後レベルで調節される。最近、転写調節の中心的役割を担う転写因子が明らかにされた。その細胞内局在や活性調節機構がこれまでの転写因子に見られないものであることから注目を集めている。

血液中でコレステロールは、コレステロールエステルの形で主に低密度リポタンパク質 (LDL) の構成成分として存在する。このコレステロールの起源は、主に小腸で吸収され肝臓に輸送されたものであり、肝臓はこのコレステロールを超低密度リポタンパク質 (VLDL) の形で血液中へと分泌する。VLDL は血液中で LDL へと代謝され、その表面にあるアポタンパク質 B が細胞表面の LDL 受容体により認識され、細胞内へと取り込まれる。したがって、血中コレステロール量は、単純に考えると、食事由来のコレステロールによる肝臓での VLDL 分泌速度と肝外組織での LDL 受容体による LDL 取り込み速度によって規定される。血中コレステロール量が増加すると、各細胞へのコレステロール供給は過剰になり、

Regulation of Intracellular Cholesterol Metabolism

* Ryuichiro SATO, 大阪大学薬学部

結果として細胞表面の LDL 受容体の数は減少し、LDL 取り込み速度は低下する。こうして高コレステロール血症に陥ると、長時間を経て次第に動脈壁にコレステロールの蓄積が起こり、血管内膜の肥厚により血管の狭窄が生じる。このような血管内での動脈硬化発症機序については、他の優れた総説に譲るとして、ここでは各細胞内でのコレステロール代謝へと目を移してみたい。

すべての細胞はアセチル-CoA を基質とし、20 段階以上の酵素反応を介してコレステロールを産生すると同時に、細胞表面の LDL 受容体により細胞外から取り込んだ LDL をリソソームで分解し、コレステロールを確保している。一見すると、互いに独立したこの2つの経路は、最終産物であるコレステロールがその双方をネガティブフィードバックコントロールするという点で、密接に結びついている。

この複雑な調節機構の一つ一つを絡まり合う糸を解きほぐすようにして明らかにしていったのが、Goldstein, Brown 両博士であり、その偉業をたたえて1985年、40代半ばの若さで彼らはノーベル医学生理学賞を授与された。アメリカ・テキサス州ダラスにおける両博士の約25年に及ぶ研究業績は膨大なもので、コレステロール代謝研究の分野において「すべての道はダラスに通ず」と言っ

でも過言でないと思うのは決して筆者1人ではないであろう。本稿では、筆者が最近まで Goldstein, Brown 両博士のもとで行っていた研究の結果と彼らの長年の研究報告をもとに、細胞内でのコレステロール代謝調節機構についてまとめてみたい。

細胞内コレステロール代謝の全体像

細胞内でのコレステロール合成経路と LDL 取り込みの概略を図1に示した。この合成経路を介して作られる生理活性物質にはコレステロールの他に、電子伝達系に関わるヘム A やユビキノン、糖タンパク質合成に関与するドリコール、tRNA に存在するイソペンテニルアデニン、その数が100種類を越すことが知られている小分子 GTP 結合タンパク質などのファルネシル化タンパク質、ゲラニルゲラニル化タンパク質、ステロイドホルモンなどがある。ことに90年代に入ってから、ファルネシル化あるいはゲラニルゲラニル化タンパク質が広範囲の生命現象で機能していることが明らかにされるにつれ、コレステロール合成経路の重要性が再認識されている。

この合成経路の調節機構として、その上流に位置する HMG-CoA (ヒドロキシメチルグルタリル CoA) 合成酵

素と HMG-CoA 還元酵素の活性調節が知られている。すなわち、細胞を LDL 存在下で培養すると、両酵素ともにその活性は10%以下になり、細胞にとって最小限必要な非ステロール化合物(スクアレン以前に合成されるドリコールなど)の合成に必要な活性のみが維持される⁽¹⁾。さらに、ファルネシル-2-リン酸合成酵素やステロール合成の第一段階であるスクアレン合成酵素も、ステロールによる活性調節を受けることが知られている。これと同時に、LDL 受容体の細胞表面の数も細胞内のコレステロールの増減に応じて調節されている。これらの調節機構を分類すると、転写調節と転写後調節の2つに大別できる。現在までのところ、転写後調節を受ける酵素は HMG-CoA 還元酵素にのみ認められている。一方、HMG-CoA 還元酵素を含め、それ以外のすべては転写調節を受けることが知られている。

HMG-CoA 還元酵素の転写後調節

HMG-CoA 還元酵素は HMG-CoA を還元し、メバロン酸を生成する反応を触媒し、この反応はコレステロール合成経路の律速過程と考えられている。HMG-CoA 還元酵素は、小胞体膜上に局在する分子量約 97 kd の膜

図1 ■ コレステロール合成経路と LDL 取り込み経路およびその調節
最終産物のコレステロールが転写調節、転写後調節に関与している。

タンパク質である。当初そのアミノ酸配列から、7回の膜貫通領域をもつものと信じられていたが、最近の報告によると8回の膜貫通領域をもち、長いC末端側が細胞質に突き出た形で小胞体膜上に存在する⁽²⁾。本酵素の活性調節機構は3種類あり、1つはmRNAの翻訳効率の調節、もう1つは酵素タンパク質自身の代謝回転調節、そしてリン酸化と脱リン酸化による酵素活性調節である⁽³⁾。

1. mRNAの翻訳効率の調節

細胞をステロール存在下で培養した際に、HMG-CoA還元酵素のmRNA量と^[35S]メチオニンをを用いたタンパク質合成量から翻訳効率を算出すると、ステロール非存在下の場合に比べ約5分の1に減少する⁽⁴⁾。HMG-CoA還元酵素遺伝子の5'上流には数個所の転写開始部位とスプライシング部位があり、結果として比較的短い5'非翻訳領域をもつmRNAと8つのAUGを含む354~670塩基の長い5'非翻訳領域をもつmRNAができる。細胞をステロール存在下で培養すると、前者のタイプのmRNAが全体の70%以上を占めるようになる。このような事実から、mRNAの5'非翻訳領域の違いが翻訳効率を決定している可能性が考えられている。しかし、どのような機序で非翻訳領域が翻訳効率を決定し、またそのシグナルは何かといった問いに対して答えは出されていない。

2. 代謝回転調節

本タンパク質の半減期はステロール非存在下で約6時間なのに対し、ステロール存在下では1時間程度になる。膜貫通領域を欠いたC末端側だけをHMG-CoA還元酵素欠損CHO株(UT-2細胞)に発現させると、細胞質中に局在するC末端はステロールの有無にかかわらず非常に安定であることから、膜貫通領域を介して小胞体膜上に局在することが短い半減期を決定づけていることがわかれる⁽⁴⁾。

近年、小胞体がタンパク質合成の場であると同時に、ある種のタンパク質を特異的に分解する場であることがわかってきた⁽⁵⁾。これらのタンパク質には、異常タンパク質(アミノ酸配列に変異があり、異常な高次構造をとるタンパク質)、複合体を形成する1サブユニットが過剰発現したものなどが挙げられる。すなわちこの機構は、異常タンパク質あるいは複合体の1サブユニットだけを細胞表面もしくは細胞外へ分泌して異常な生理現象が生じる前に、小胞体内にそれらを保持し、分解してしまう一種の防御機構と考えることができる。

興味深いことに、LDL粒子中の唯一のタンパク質であ

るアポBは異常タンパク質ではないのに、小胞体内で合成されたのち、分泌経路に乗る前にその一部が小胞体で分解される⁽⁶⁾。小胞体膜タンパク質のHMG-CoA還元酵素、各種異常タンパク質、そしてアポBのいずれも、小胞体もしくはその近傍でリソソーム非依存的に分解され、カルパイン阻害剤のALLN(*N*-acetyl-leu-leu-leucinal)によりその分解はほぼ完全に阻害される⁽⁷⁻⁹⁾。この事実から、小胞体タンパク質の代謝回転、異常タンパク質排除、分泌タンパク質分泌調節のいずれも、小胞体に存在するその詳細な機序が未だ不明な蛋白質分解機構を介して制御されていることが考えられる。

それでは、なぜHMG-CoA還元酵素の代謝回転だけがステロールにより調節されるのか? 世界の数個所の研究室で精力的に研究が進められているが、大きな進展はまだ見られない。しかし、HMG-CoA還元酵素、スクアレン合成酵素などの阻害剤を駆使した実験結果より、スクアレン以前の非ステロール化合物が不足状況下ではステロールによる分解亢進は十分に見られず、非ステロール化合物とステロールの両者が相乗的に働くことが認められている。さらに、代謝回転を直接調節する因子の同定も試みられており、酢酸ファルネシル、エチルファルネシルエーテルにHMG-CoA還元酵素の代謝回転を亢進する効果があることから、ファルネシル-2-リン酸そのものか、ファルネシル化された合成中間産物が非ステロール化合物の候補として挙げられ⁽¹⁰⁾、また24(S),25-oxidolanosterolがステロール中で特に強力な代謝回転亢進活性をもつことが報告されている⁽¹¹⁾。

3. リン酸化、脱リン酸化による活性調節

HMG-CoA還元酵素はリン酸化されると不活性化される。このリン酸化を担うキナーゼの解析が進められた。このキナーゼは、AMPにより活性化されることからAMP活性化キナーゼと命名され、新たなキナーゼファミリーの一員として認識されている^(12,13)。AMP活性化キナーゼは、HMG-CoA還元酵素以外に、脂肪酸合成のキー酵素であるアセチル-CoAカルボキシラーゼあるいは、ホルモン感受性リパーゼを基質にすることから、脂質代謝に深く関わるキナーゼと考えられる。さらに、AMP活性化キナーゼ自身リン酸化により活性型になることが知られており、少なくとも2段階に及ぶリン酸化、脱リン酸化カスケードが存在している。不思議なことに、HMG-CoA還元酵素の60~70%は常時リン酸化され不活性型で存在し、通常の生理条件の変化ではリン酸化の程度は変動しない。一方、アセチル-CoAカルボキシラーゼのリン酸化は種々の生理的条件の変化で大きく

図2 ■ 野生型、リン酸化部位変異型(Ser⁸⁷¹→Ala)HMG-CoA還元酵素の代謝回転

それぞれの還元酵素を発現する UT-2 細胞を 1 時間[³⁵S]メチオンで標識し、その後の追跡をステロールを含む(●)あるいは含まない(○)培地で行なった。HMG-CoA還元酵素抗体による免疫沈降物を SDS-ポリアクリルアミドゲルで展開後、オートラジオグラムを行なった。

変動し、それに伴い活性が変化し、AMP 活性化キナーゼによりその活性調節が行なわれている。

それでは、自然は何の目的のために HMG-CoA還元酵素に AMP 活性化キナーゼリン酸化部位を導入したのであろうか。リン酸化部位は C 末端から 17 番目のセリン残基であり、その部位にアラニンを導入した変異型を UT-2 細胞に発現させステロールによる代謝回転促進効果を観察したところ⁽¹⁴⁾、野生型と同じく代謝回転したことから、リン酸化による活性調節と代謝回転調節が互いに独立した調節機構であることが明らかになった(図 2)。

さらに、野生型、リン酸化部位変異型 HMG-CoA還元酵素をそれぞれ発現する UT-2 細胞を 2-デオキシグルコース処理し、細胞内 ATP を著しく低下させ AMP レベルを上昇させた条件下でコレステロール合成を測定した。その結果、AMP 活性化キナーゼによるリン酸化が起こりうる野生型でのみコレステロール合成が阻害された。すなわち、細胞中の ATP 濃度が著しく低下し AMP 濃度が上昇するような、細胞にとって危急存亡の状態を迎えたとき、細胞は HMG-CoA還元酵素をリン酸化し、酵素活性をゼロにし、コレステロール合成経路をシャットオフすることによりエネルギーの浪費を防ぎ、生命維持に最低限必要なエネルギーを確保するために、この活性調節機構を保持しているものと思われる⁽¹⁴⁾。

1. プロモーター塩基配列の解析

1980 年代半ば、Goldstein, Brown 研究室で HMG-CoA 合成酵素、還元酵素、そして LDL 受容体の各遺伝子の構造が明らかにされ、この情報に基づきステロールによる転写調節の機構が次第に明らかにされていった。調節領域の探索は、レポーター遺伝子の 5' 上流塩基配列を挿入し、これを CHO 細胞にトランスフェクトし、ステロール存在下でレポーター遺伝子の発現が抑制されることを指標に進められ、SRE-1(sterol regulatory element)配列を明らかにすることに成功した⁽¹⁵⁾。SRE-1 配列は、ステロール非存在下で転写を促進し、5'-CACCCCAC-3' 配列をもち、いずれの方向でも機能することが認められた。

図 3 に 3 つの遺伝子における SRE-1 配列の位置を示した。LDL 受容体遺伝子の 5' 上流には、リピート 1, 2, 3 と呼ばれる 16 bp の繰り返し配列があり、SRE-1 はそのうちのリピート 2 に含まれる。リピート 1 と 3 はともにほとんどすべての細胞に普遍的に見られる転写因子の Sp1 結合部位であり、特にリピート 3 は重要な役割を演じている。実際にリピート 2, 3 だけをレポーター遺伝子の 5' 上流に挿入してもステロールによる調節を受け、リピート 3 に比較的弱く結合する Sp1 が、隣り合うリピート 2 に結合する転写因子と相乗的に転写促進作用をもつものと考えられている。

HMG-CoA 合成酵素の場合、SRE-1 配列と近似した SRE-2 塩基配列の直後に 2 つの SRE-1 配列が並んでいる。このいずれかの塩基配列に変異を導入した場合、ステロール欠乏時に見られる転写促進は失われるが、ステロール存在下で見られる低い転写活性は維持される。TATA 配列の前方に 2 カ所の NF-1 結合部位と想定される塩基配列が認められるが、これらと SRE との関係の詳細は不明である。

HMG-CoA 還元酵素のプロモーター領域の様子は上述の 2 つとは少々異なる。プロモーター領域には SRE-1 配列と逆向きで 1 塩基異なる 5'-CACCGCAC-3' 配列が認められるが、不思議なことにこの部位に変異を導入するとステロール存在下でも高い転写活性が維持される。また、LDL 受容体プロモーター中の SRE-1 の 5 番目の C を G へ置換して HMG-CoA還元酵素プロモーター中の SRE-1 様配列に一致させると、ステロールによる調節が失われる。すなわち、HMG-CoA還元酵素の転写調節は LDL 受容体、HMG-CoA 合成酵素のそれとは異なり、プロモーター中の SRE-1 様配列はステロール存在

図3 ■ HMG-CoA 合成酵素, 還元酵素, LDL 受容体遺伝子の5' 上流域の模式図

SRE(sterol regulatory element)の位置とその塩基配列を示した, +はステロールの有無によらず転写に必須な領域, 矢印は転写開始部位を示す, HMG-CoA 還元酵素は TATA box をもたず, 数個所の転写開始部位をもつ⁽¹⁵⁾.

下で転写を抑制する働きを担っている可能性が考えられる。

2. SREBP(sterol regulatory element binding protein)の構造

以上の情報に基づき, SRE-1 塩基配列を特異的に認識する新規転写因子の精製が始められた。大量培養が比較的容易で, これまでに多くの転写因子が精製されている HeLa 細胞の核抽出画分より, ヒト LDL 受容体遺伝子プロモーターのリピート 2 と 3 を 2 コピー含む合成 DNA に結合する活性を追跡することにより, 精製が進められた。このような人工的なプロモーター配列を用いた理由は, それまで行なわれた数多くの CAT アッセイにおいて, リピート 2 と 3 を 2 コピー含む配列が本来の LDL 受容体遺伝子プロモーターと同様な応答をより感度良く示すという結果に基づいている。実際には, ³²P で標識したヒトリピート 2+3, マウスリピート 2+3, 転写促進活性を示さない点変異を入れたリピート 2+3 を用い, ゲルシフトアッセイを行なうことにより, ヒトとマウスの塩基配列にのみ結合するタンパク質の精製を進めていった。

HeLa 細胞の核抽出画分より, イオン交換, ゲル濾過, さらに DNA 結合クロマトグラフィーにより, 約 38,000 倍にまで精製された結合タンパク質が得られた⁽¹⁶⁾。この精製標品は, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上で, 分子量 59~68 kd の数本のバンドとして確認された。この標品をトリプシン消化して得られた 6 種類のペプチド断片の amino 酸配列をもとに, HeLa 細胞の λgt10 cDNA ライブラリーより SREBP-1 の cDNA がクロ-

ニングされた⁽¹⁷⁾。SREBP-1 の推定 amino 酸配列中に, 6 種類のペプチド断片のうち 5 種類が認められた。そこで, 残りのペプチド断片の amino 酸配列をもとに, 再び HeLa 細胞の cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ, SREBP-1 と 47% の相同性をもつ SREBP-2 の cDNA が得られた⁽¹⁸⁾。

図 4 に両者の構造の比較を示した。SREBP-1a は 1,147 amino 酸, SREBP-2 は 1,141 amino 酸から成り, ともにその中央部に bHLH-Zip (basic-helix-loop-helix-leucine zipper) 領域をもつ。DNA 結合ならびに二量体もしくは多量体形成に関与すると思われる bHLH-Zip 領域は, 両者の間で 71% の相同性を保持している。この領域は, 同様に bHLH-Zip 領域をもつ Max, Myc, TFE3 といった転写因子と 30~40% 程度の相同性を示した。これらの転写因子は E-box と呼ばれる CACGTG 配列中の CAC と結合することが確認されており, SREBP の場合, その認識配列中に含まれる 2 つの CAC(ATCACCCAC) と直接結合することが予想される。

さらに, SREBP に特徴的な構造として, N 末端側に酸性 amino 酸に富む配列をもつことと, bHLH-Zip 領域の C 末端側後方に膜結合領域と推定される部位を含む, 長いポリペプチド鎖が続くことが挙げられる。酸性配列については, いくつかの転写因子において転写因子活性に不可欠な活性化領域として知られている。SREBP-1 においても, この領域を欠落した cDNA を構築すると, DNA 結合能は維持されるものの転写活性は消失し, 活性化領域として機能することが確認されている⁽¹⁹⁾。一方, C 末端側のポリペプチド鎖は, SREBP-1 と -2 の間で

図4 ■ SREBP-1a と SREBP-2 の構造とその比較

cDNA より推定したアミノ酸配列を示した。また各部位の相同性を%表示した⁽¹⁸⁾。

49%の相同性を保持しているものの、これまで報告のあった既知のタンパク質との相同性は見られず、その機能は不明である。驚くべきことに、この領域には2個所の疎水性アミノ酸に富む部位があり、これを介してSREBPは小胞体膜ならびに核膜上に膜タンパク質として局在している⁽¹⁹⁾。

各組織におけるSREBP-1のmRNA発現を調べると、LDL受容体が多く発現している肝臓や副腎で高い発現が認められた⁽¹⁷⁾。一方、SREBP-2のmRNAは各組織で一様に高い発現が認められ、その分布に差が認められた⁽¹⁸⁾。この事実は、SREBP-1が組織特異的なLDL受容体の発現調節により深く関わり、SREBP-2がすべての組織で基礎コレステロール代謝を調節しているかのような印象を筆者らに与えたが、後述の研究結果からすると必ずしもこの推測は当たっていなかったようである。

3. SREBPの細胞内プロセッシング

SREBP-1と-2の推定分子量は、いずれもおおよそ120

kd程度であり、核抽出画分より精製されたタンパク質の分子量59~68kdに比べて大きかった。また、これまで報告のあったbHLH-Zip領域をもつ転写因子が、いずれもせいぜい数百アミノ酸から成るのに対し、SREBP-1と-2は約1,100アミノ酸から成り、異様に大きかった。精製タンパク質は、DNA結合能を指標に分画されたことから、DNA結合部位を含むN末端側の約500アミノ酸から成り、一つの可能性として、精製の過程で分解が起こったことが考えられる。一方、1,100アミノ酸から成る前駆体が合成された後に、細胞内でプロセッシングが起こり、核内にはプロセッシングを受けた成熟体が集積することも考えられる。

このことを明らかにする目的で、SREBP-1全長とアミノ酸1~410をコードしているcDNAをそれぞれ発現ベクターに組み込み、COS細胞に発現させ、間接蛍光抗体法によりその分布を調べた⁽¹⁹⁾ (図5)。その結果、SREBP全長は核膜、小胞体膜と思われる部位に局在するのに対し、アミノ酸(1~410)は核内にのみ存在した。

図5 ■ SREBP-1全長とアミノ酸(1~410)を発現した細胞の共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡解析像

ハムスター-SREBP-1全長あるいはアミノ酸(1~410)をコードするcDNAを発現ベクターに組み込み、COS細胞に強制発現させた。膜結合領域をもつSREBP-1全長は主に小胞体膜と思われる部位(網目状に見える)に局在するのに対し(左図)、SREBP-1(1~410)は核内に局在した^(19, 20)(右図)。

図6 ■ SREBP の細胞内プロセッシングの模式図

SREBP は合成後、膜結合領域を介して主に小胞体膜上に局在する。その後、プロセッシング酵素による分解を受け、bHLH-Zip 領域を含む N 末端側が細胞質に放出され、核へと移行する。このプロセッシング過程が細胞内のステロールにより調節されている。核内では SRE 配列に結合し、LDL 受容体、HMG-CoA 合成酵素などの転写を促進する。

さらに HeLa 細胞を用いて細胞内分画を行ない、各分画内での SREBP-1 と-2 の存在をウェスタンブロット法で調べたところ、膜分画には 120 kd 程度の前駆体のみが認められ、核内にはのみ成熟体が検出された⁽²⁰⁾。以上の結果は、SREBP が転写因子としては前例のないことであるが、合成後、小胞体膜、核膜の膜タンパク質として存在し、細胞内でプロセッシングを受けた後に、bHLH-Zip 領域を含む N 末端側が核内へと移行し、転写因子として働くことを示している。

4. SREBP の機能とその調節

SREBP-1 と-2 ともに、ATCACCCCAC 配列を認識し、各塩基に点変異を入れた合成 DNA を用いて認識塩基配列の特異性を比較した限りでは、両者の間にまったく差は見られなかった。また HMG-CoA 合成酵素、還元酵素、LDL 受容体のプロモーター領域をそれぞれレポーター遺伝子(CAT)の上流に挿入し、SREBP-1 あるいは SREBP-2 とともに細胞にトランスフェクトして CAT アッセイを行なった結果、SREBP-1 と-2 ともに HMG-CoA 合成酵素、LDL 受容体プロモーターによる CAT の発現を著しく上昇させたのに対し、HMG-CoA 還元酵素プロモーターはまったく応答しなかった⁽¹⁸⁾。HMG-CoA 還元酵素プロモーター中の SRE-1 配列(5'-CACC-GCAC-3')は、合成酵素、LDL 受容体プロモーター中の SRE-1 配列とは 1 塩基異なり、ゲルシフトアッセイの結果によると精製 SREBP とは結合しないことから、妥当な結果といえる。したがって、SREBP-1、-2 は HMG-CoA 合成酵素、LDL 受容体プロモーター中の SRE に結

合し、転写を促進する転写因子と考えることができる。

細胞内での前駆体から成熟体へのプロセッシングについては、このプロセッシングが行なわれない限り、SREBP は核内へ移行できず、転写因子として働くことはできないことから、細胞内のコレステロール量に応じて調節されているのではないかと仮説を立てた。そこで、HeLa 細胞をステロールを含む培地で培養し、核抽出画分中の成熟体の量をウェスタンブロット法で調べたところ、ステロールの添加により成熟体量が減少し、それに伴って膜画分の前駆体量の増加が認められた⁽²⁰⁾。すなわち、作業仮説の通り、プロセッシングは細胞内のステロール量により調節されており、これまでブラックボックスとして扱われていた転写のネガティブフィードバック機構は、ステロールによるプロセッシングの調節によるものであることが明らかになった(図6)。最近、プロセッシング酵素の精製が進み、本酵素が ICE(interleukin- β converting enzyme)様の酵素であると報告された⁽²¹⁾。ステロールによる活性調節が見られるのか否かなど、不明な点がまだ多く、さらなる解析が必要と思われる。

5. CHO 変異株の解析

図6に示したプロセッシング機構の正当性は、別のアプローチで行なった一連の実験の結果からも確かめられた。筆者らは、コレステロール代謝調節機構の詳細を解析する目的で、CHO 変異株を獲得し、その解析を行ってきた。そのうちの数個の変異株では、培地中のステロールの有無によらず、常時 HMG-CoA 合成酵素、還元酵

素, LDL 受容体の mRNA レベルが高かった。筆者らの作業仮説としては、これら変異株では SREBP のいずれかの遺伝子に変異が生じているものと考えた。詳細な解析の結果、いずれの変異株でも SREBP-2 遺伝子に変異が認められ、その結果として膜結合領域を含む C 末端側が欠落した SREBP-2 タンパク質が発現していることが確かめられた⁽²²⁾。すなわち、これらの変異株ではステロールによるプロセッシング調節機構が作動せず、ステロールの多寡にかかわらず活性型の SREBP-2 が核内へと移行し、転写を促進していると考えられる。SREBP-2 でのみ、このような変異が見られた理由としては、SREBP-2 遺伝子には膜結合領域をコードするエクソンのすぐ 5' 側に 3 kbp もの長いイントロンがあるのに対し、SREBP-1 遺伝子は 116 bp しかない短いイントロンをもつために、高い確率で SREBP-2 遺伝子に異常のある変異株がとられたものと思われる。

この実験結果から出てくる唯一の疑問点は、上述の CAT アッセイの結果から SREBP-2 は HMG-CoA 還元酵素の転写調節には関与していないことが予想されていたにもかかわらず、これらの変異株で還元酵素の転写が常時亢進している点である。この疑問に対する解答を筆者らは持ち合わせていないが、数日の培養で結果を出す CAT アッセイでは見ることができない SREBP-2 の HMG-CoA 還元酵素の転写亢進効果が、長期間培養して獲得された変異株では副次的効果として認めることができたと考えることはできる。

これまで述べたように、CHO 細胞や HeLa 細胞を用いた実験において、ステロールを含む培地で培養すると核内の成熟体の SREBP-1, -2 はともに減少し、2 種類の転写因子の間に機能とその調節において差異は見られなかった。ところが、ハムスターを用い、食餌に血中コレステロール低下薬物を添加して、肝臓の核抽出画分中の SREBP-1, -2 の成熟体量を経時的に追跡すると、両者の間で異なる応答が得られた⁽²³⁾。薬物添加により核内の SREBP-2 成熟体量が増加すると、LDL 受容体の mRNA の上昇と血中コレステロール濃度の低下が見られたのに対し、核内の SREBP-1 成熟体量は減少していた。上述のように、肝臓で SREBP-1 が特別な機能を有しているものと予想されていたが（各組織での mRNA 発現量を調べた実験結果より）、この事実は、少なくともハムスターの肝臓では SREBP-1 はコレステロール代謝を制御する転写因子として働いていなかったことを意味する。このことが肝臓に特異的な現象で、他の組織ではこれまで細胞培養の系で認められた事実が当てはまるのかどうか、今後の解析が待たれる。

*

以上、コレステロール代謝の転写ならびに転写後調節機構について最近の知見をまとめてみた。転写調節に関しては、ここ数年で大きな進展が見られたが、それでもいずれの調節機構にも不明な点は多く残っている。高齢化社会を迎える日本において、循環器病疾患は確実に増えており、コレステロール代謝の全体像を正確に把握することは、予防、治療の両面から重要な課題と言えよう。

文 献

- 1) M. S. Brown & J. L. Goldstein : *J. Lipid Res.*, **21**, 505 (1980).
- 2) J. Roitelman, E. H. Olender, S. Bar-Nun, W. A. Dunn & R. D. Simoni : *J. Cell Biol.*, **117**, 959 (1992).
- 3) J. L. Goldstein & M. S. Brown : *Nature*, **343**, 425 (1990).
- 4) M. Nakanishi, J. L. Goldstein & M. S. Brown : *J. Biol. Chem.*, **263**, 8929 (1988).
- 5) J. S. Bonifacino & J. Lippincott-Schwartz : *Current Opinion in Cell Biol.*, **3**, 592 (1991).
- 6) R. Sato, T. Imanaka, A. Takatsuki & T. Takano : *J. Biol. Chem.*, **265**, 11880 (1990).
- 7) S. Inoue, S. Bar-Nun, J. Roitelman & R. D. Simoni : *J. Biol. Chem.*, **266**, 13311 (1991).
- 8) S. Inoue & R. D. Simoni : *J. Biol. Chem.*, **267**, 9080 (1992).
- 9) N. Sakata, X. Wu, J. L. Dixon & H. N. Ginsberg : *J. Biol. Chem.*, **268**, 22967 (1993).
- 10) D. L. Bradfute & R. D. Simoni : *J. Biol. Chem.*, **269**, 6645 (1994).
- 11) S. R. Penini, T. A. Delate & M. Sinensky : *J. Biol. Chem.*, **267**, 12647 (1992).
- 12) D. Carling, K. Aguan, A. Woods, A. J. M. Verhoeven, R. K. Beri, C. H. Brennan, C. Sidebottom, M. D. Davidson & J. Scott : *J. Biol. Chem.*, **269**, 11442 (1994).
- 13) K. I. Mitchenhill, D. Stapleton, G. Gao, C. House, B. Michell, F. Katsis, L. A. Witterws & B. E. Kemp : *J. Biol. Chem.*, **269**, 2361 (1994).
- 14) R. Sato, J. L. Goldstein & M. S. Brown : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9261 (1993).
- 15) J. R. Smith, T. F. Osborne, M. S. Brown, J. L. Goldstein & G. Gil : *J. Biol. Chem.*, **263**, 18480 (1988).
- 16) X. Wang, M. R. Briggs, X. Hua, C. Yokoyama, J. L. Goldstein & M. S. Brown : *J. Biol. Chem.*, **268**, 14497 (1993).
- 17) C. Yokoyama, X. Wang, M. R. Briggs, A. Adman, J. Wu, X. Hua, J. L. Goldstein & M. S. Brown : *Cell*, **75**, 187 (1993).
- 18) X. Hua, C. Yokoyama, J. Wu, M. R. Briggs, M. S. Brown, J. L. Goldstein & X. Wang : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11603 (1993).
- 19) R. Sato, J. Yang, X. Wang, M. J. Evans, Y. K. Ho, J. L. Goldstein & M. S. Brown : *J. Biol. Chem.*, **269**, 17267 (1994).
- 20) X. Wang, R. Sato, M. S. Brown, X. Hua & J. L. Goldstein : *Cell*, **77**, 53 (1994).
- 21) X. Wang, J. Pai, E. A. Wiedenfeld, J. C. Medina, C. A. Slaughter, J. L. Goldstein & M. S. Brown : *J. Biol. Chem.*, **270**, 18044 (1995).
- 22) J. Yang, R. Sato, J. L. Goldstein & M. S. Brown : *Genes Dev.*, **8**, 1910 (1994).
- 23) Z. Sheng, H. Otani, M. S. Brown & J. L. Goldstein : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 935 (1995).