

(続紙 1)

京都大学	博士（薬学）	氏名	高島 皓平
論文題目	Regulation of Lipid Biosynthesis by Golgi-to-ER Retrograde Traffic via COPI-coated Vesicles （COPI被覆小胞を介するゴルジ体から小胞体への逆行輸送による脂質生合成の調節）		
(論文内容の要旨)			
＜第一章 ゴルジ体から小胞体への逆行輸送の阻害による脂肪滴の肥大化＞ <u>脂肪滴と小胞輸送との関係</u>			
脂肪滴は、トリアシルグリセロールやコレステロールエステルなどの脂質を貯蔵するオルガネラである。近年のsiRNAを用いた網羅的解析によって、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送に關与するCOPI被覆小胞のコートタンパク質や、COPIをゴルジ体へとリクルートする低分子量GTPaseのArf、およびArfの活性化因子であるGBF1をsiRNAによって発現抑制すると、脂肪滴の肥大化が起こることが明らかになった。しかし、その機構は不明であった。			
<u>ゴルジ体から小胞体への輸送の阻害による脂肪滴の肥大化と中性脂肪の蓄積</u>			
ゴルジ体から小胞体への小胞輸送と脂肪滴の形成との関係を確立するために、COPIと同じ輸送経路で働くArfあるいはArfの不活性化因子のsiRNAによる発現抑制や、GBF1の特異的な阻害剤による実験を行った。その結果、これらのどの条件でも脂肪滴の肥大化が起こることが判明した。さらに、すべての条件で細胞内のトリアシルグリセロール含量が増大した。これらの結果から、ゴルジ体から小胞体への輸送を阻害すると、細胞内にトリアシルグリセロールが蓄積して脂肪滴が肥大化することが明確になった。			
＜第二章 ゴルジ体から小胞体への逆行輸送の阻害によるSREBPの活性化が脂質の蓄積に關与する＞ <u>小胞輸送によるSREBPの活性化の調節</u>			
ゴルジ体から小胞体への輸送と脂肪滴（脂質合成）との関連から、トリアシルグリセロールやコレステロールの生合成に關与する酵素の遺伝子発現を亢進させる転写因子であるSREBP（Sterol Regulatory Element Binding Protein）に着目した。SREBPは膜貫通型前駆体として生合成され、通常は小胞体に局在するが、細胞のステロール含量の低下に伴ってゴルジ体へと輸送され、そこでS1PとS2Pというプロテアーゼによる切断を受けて活性化される。そして、SREBPのサイトゾル領域が核内に移行して転写因子として機能する。このような背景から、ゴルジ体から小胞体への輸送が阻害されると、SREBPが何らかの理由で活性化されて、応答遺伝子の発現			

亢進、脂質生合成の増大、脂肪滴の肥大化が起こるという仮説を立てた。

ゴルジ体から小胞体への逆行輸送の阻害によるSREBPの活性化

COPIまたはGBF1をsiRNAによって発現抑制すると、本来は活性化が起こらないコレステロール存在下でも、活性型SREBPの量が増大した。さらに、ルシフェラーゼアッセイやリアルタイムPCR法によって、SREBP応答遺伝子の発現が亢進することが判明した。これらの結果は、ゴルジ体から小胞体へのCOPI依存的な輸送の阻害によって、活性型SREBPの増大を介して脂質生合成が亢進する可能性を示唆する。

このSREBPが活性化される原因として、S1PとS2Pが誤って小胞体に局在する可能性と、SREBPが誤ってゴルジ体に局在する可能性を考えた。COPIをsiRNAで発現抑制すると、S1PとS2Pはゴルジ体に局在したままであるのに対して、SREBPはゴルジ体に蓄積したことから、後者の可能性が示唆される。すなわち、SREBPはコレステロール存在下でも小胞体からゴルジ体へと構成的に順行輸送され、本来は小胞体へと直ちに逆行輸送されるためにS1PやS2Pによる切断を受けにくい、COPIを介する逆行輸送が阻害されることによって、SREBPがゴルジ体に留まって切断を受けやすくなると考えられる。

ゴルジ体から小胞体への逆行輸送阻害による脂質生合成の亢進へのSREBPの関与

ゴルジ体から小胞体への逆行輸送の阻害による脂肪滴の肥大化がSREBPの活性化に起因することを証明するために、SREBPのゴルジ体への輸送のエスコートタンパク質であるSCAPを発現抑制した条件下で、COPIの発現抑制による脂肪滴の肥大化が起こるかどうかを観察した。SCAPをCOPIと同時にsiRNAによって発現抑制すると、COPI単独の発現抑制と比較して脂肪滴の肥大化が抑制された。この結果から、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送の阻害による脂質生合成の亢進には、SREBPの活性化が関与することが証明された。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

著者は第一章でまず、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送の阻害による脂肪滴の肥大化について解析した。

脂肪滴は、トリアシルグリセロールやコレステロールエステルなどの脂質を貯蔵するオルガネラである。近年のsiRNAを用いた網羅的解析によって、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送に関与するCOPI被覆小胞のコートタンパク質や、COPIをゴルジ体へとリクルートする低分子量GTPaseのArf、およびArfの活性化因子であるGBF1をsiRNAによって発現抑制すると、脂肪滴の肥大化が起こることが明らかになった。しかし、その機構は不明であった。

そこで著者は、ゴルジ体から小胞体への小胞輸送と脂肪滴の形成との関係を確立するために、COPIと同じ輸送経路で働くArfあるいはArfの不活性化因子のsiRNAによる発現抑制や、GBF1の特異的な阻害剤による実験を行った。それによって、これらのどの条件でも脂肪滴の肥大化が起こることともに、すべての条件で細胞内のトリアシルグリセロール含量が増大することを明らかにした。これによって著者は、ゴルジ体から小胞体への輸送を阻害すると、細胞内にトリアシルグリセロールが蓄積して脂肪滴が肥大化することを明確に示した。

次に著者は第二章で、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送の阻害による脂質の蓄積にSREBPの活性化が関与することを示した。

まず著者は、ゴルジ体から小胞体への輸送と脂肪滴（脂質合成）との関連から、トリアシルグリセロールやコレステロールの生合成に関与する酵素の遺伝子発現を亢進させる転写因子であるSREBPに着目した。SREBPは膜貫通型前駆体として生合成され、通常は小胞体に局在するが、細胞のステロール含量の低下に伴ってゴルジ体へと輸送され、そこでS1PとS2Pというプロテアーゼによる切断を受けて活性化される。そして、SREBPのサイトゾル領域が核内に移行して転写因子として機能する。このような背景から、著者は、ゴルジ体から小胞体への輸送が阻害されると、SREBPが何らかの理由で活性化されて、応答遺伝子の発現亢進、脂質生合成の増大、脂肪滴の肥大化が起こるという仮説を立てた。

COPIをsiRNAによって発現抑制すると、本来は活性化が起こらないコレステロール存在下でも、活性型SREBPの量が増大した。さらに、ルシフェラーゼアッセイやリアルタイムPCR法によって、SREBP応答遺伝子の発現が亢進することが明らかになった。これらの結果は、ゴルジ体から小胞体へのCOPI依存的な輸送の阻害によって、活性型SREBPの増大を介して脂質生合成が亢進する可能性を示唆する。

このSREBPが活性化される原因として、著者は、S1PとS2Pが誤って小胞体に局在する可能性と、SREBPが誤ってゴルジ体に局在する可能性を考えた。COPIをsiRNA

で発現抑制すると、S1PとS2Pはゴルジ体に局在したままであるのに対して、SREBPはゴルジ体に蓄積したことから、後者の可能性が示唆される。すなわち、SREBPはコレステロール存在下でも小胞体からゴルジ体へと構成的に順行輸送され、本来は小胞体へと直ちに逆行輸送されるためにS1PやS2Pによる切断を受けにくい。COPIを介する逆行輸送が阻害されることによって、SREBPがゴルジ体に留まって切断を受けやすくなると考えられる。

次に著者は、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送の阻害による脂肪滴の肥大化がSREBPの活性化に起因することを証明するために、SREBPのゴルジ体への輸送のエスコートタンパク質であるSCAPを発現抑制した条件下で、COPIの発現抑制による脂肪滴の肥大化が起こるかどうかを観察した。SCAPをCOPIと同時にsiRNAによって発現抑制すると、COPI単独の発現抑制と比較して脂肪滴の肥大化が抑制された。このような結果によって、著者は、ゴルジ体から小胞体への逆行輸送の阻害による脂質合成の亢進にはSREBPの活性化が関与することを証明した。

以上、著者は本論文において、SREBPが小胞体とゴルジ体間を構成的にサイクルすることと、SREBPのゴルジ体から小胞体への逆行輸送がCOPI被覆小胞を介して行われることを新たに発見した。さらに、このSREBPの逆行輸送の破綻が脂質合成に及ぼす影響を明らかにした。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成25年2月27日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降