

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation (AMED-CREST) “Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop” Innovative Medical Technologies”

研究開発課題名： (日本語) 酸化ステロールによる代謝制御基盤の構築と疾患発症の分子機構解明
(英語) Elucidation of molecular mechanisms by which oxysterols control metabolism linked to disease onset

研究開発担当者 (日本語) 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授 佐藤 隆一郎
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo; Professor; Ryuichiro Sato

実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語)
開発課題名： (英語)

研究開発分担者 (日本語)
所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

1) SREBP 活性化抑制の分子基盤解析

SREBP/SCAP 複合体の安定性を高める新たな因子として HSP90 を見出し、その機能解析を進め、投稿論文(Kuan, Y-C., et al., *J. Biol. Chem.* 2017, 292, 3106-3028.)として公表した。さらに SREBP/SCAP 間の結合を抑制する化合物探索のアッセイ系の構築を開始した。

2) INSIG 機能解析

酸化コレステロール結合タンパク質として機能する INSIG1/2 について、両遺伝子を欠損した CHO 細胞株にそれぞれを発現させた細胞株を樹立し、INSIG1/2 の機能分担について解析した。酸化コレステロール培地添加による転写因子 ATF4 タンパク質発現上昇応答は、INSIG1/2 欠損により著しく低下し、INSIG2 発現においてのみ顕著な回復を示した。

3) TGR5 機能解析のためのモデル動物解析

胆汁酸機能を仲介する受容体 TGR5 の機能解析を目的に、TGR5 欠損マウス、骨格筋への過剰発現マウスの解析を行い、TGR5/胆汁酸が骨格筋量を決定する役割を明らかにした。現在は投稿論文作成に着手している。

4) 自家蛍光ステロールの合成

コレステロール及び酸化ステロールの細胞内動態を顕微鏡下で観察するには、それらを可視化することが必要である。多くの蛍光プローブはその蛍光基の大きさため、ステロールのような低分子に結合させるとステロール分子そのものの物性が大きく変化してしまうことが懸念されている。最近、コレステロールだけでなく酸化ステロールにおいても、蛍光基の付加が必要ない自家蛍光ステロールの有用性が明らかになってきた。そこで、コレステロール及び酸化ステロールの自家蛍光体として、コレステロールから cholestatrienol (CTL) を、25-hydroxycholesterol (25-HC) から 25-hydroxycholestatrienol (25-HCTL) を合成し、来年度以降の解析に必要な量を得た。

5) 蛍光ステロールの細胞内輸送

自家蛍光ステロールの合成と平行して、市販の自家蛍光ステロール、dehydroergosterol (DHE) 及び蛍光標識コレステロール (Bodipy-Cholesterol) の細胞内輸送につき、共焦点レーザー顕微鏡を用いて予備検討を行った。その結果、細胞内にコレステロールを蓄積する NPC1 欠損細胞において、DHE、Bodipy-Cholesterol とともに顕著な蓄積が認められ、DHE のほか本年度合成した CTL や 25-HCTL 及び Bodipy-Cholesterol が細胞内ステロール輸送を解析する有用なプローブとなることが示唆された。

1) Molecular analyses for suppression of SREBP activation

HSP90 was identified as a novel stabilizing factor for the SREBP/SCAP complex. Functions of HSP90 were analyzed and the findings were reported in a published paper (Kuan, Y-C., et al., *J. Biol. Chem.* 2017, 292, 3106-3028.). In addition, we started to establish a novel assay system to search for chemical compounds that interfere with an interaction between SREBP and SREBP-1.

2) Analyses for INSIG functions

The separate roles for INSIG1 and INSIG2, oxysterol-binding proteins, were evaluated by overexpressing each of INSIGs in a CHO stable cell line lacking both proteins. Increased expression of ATF4 protein, a transcription factor, in response to addition of oxysterol to the culture medium was abolished in the INSIG1/2-deficient cells, but observed in the stable cells only expressing INSIG2.

3) Analyses for TGR5-deficient and -overexpressing mice

To evaluate functions of TGR5, a bile acid receptor, in skeletal muscle, transgenic mice overexpressing human TGR5 in skeletal muscle were analyzed comparing with TGR5-deficient mice. We found that TGR5 activation is involved in muscle hypertrophy and are now preparing a prepublication paper.

4) Synthesis of intrinsically fluorescent sterols

To monitor intracellular transport of cholesterol and oxysterols under a microscope, it is important to use relevant fluorescent analogues. Because most fluorophores are not small in size, they may affect physico-chemical properties of a small molecule such as cholesterol when attached to. Recently, not only an intrinsically fluorescent cholesterol analogue, but also an intrinsically fluorescent oxysterol have been reported. In the first year, we synthesized and obtained the intrinsically fluorescent cholesterol analogue cholestatrienol (CTL) and the oxysterol analogue 25-hydroxycholestatrienol (25-HCTL), to study intracellular trafficking of these probes in this project.

5) Intracellular transport of fluorescent sterols

Before employing CTL and 25-HCTL that we synthesized, dehydroergosterol (DHE), a commercially available intrinsically fluorescent sterol, and Bodipy-cholesterol, fluorescent dye-conjugated cholesterol were tested to monitor their distribution under a fluorescent microscope. We found that in Niemann-Pick C1-deficient cells, both DHE and Bodipy-cholesterol accumulate in the lysosome. These results suggested that CTL and 25-HCTL in addition to Bodipy-cholesterol are useful probes to monitor intracellular transport of sterols.

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 1 件）

1. Kuan, Y-C., Hashidume, T., Shibata, T., Uchida, K., Shimizu, M., Inoue, J., and Sato, R. Heat Shock Protein 90 Modulates Lipid Homeostasis by Regulating the Stability and Function of Sterol Regulatory Element-Binding Protein (SREBP) and SREBP Cleavage-Activating Protein. **J. Biol. Chem.** 2017, 292, 3106-3028.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Study on the sterol regulatory element-binding protein(SREBP)-binding sites in the WD40 domain of SREBP cleavage-activating protein (SCAP). 口頭, YEN-CHOU KUAN, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO. 2017 年度日本農芸化学会大会 2017.3.17-20, 国内
2. 酸化コレステロールは INSIG-2 を介して ATF4 の発現を制御する, 口頭, 三吉翔子、渡邊雄一、清水誠、井上順、佐藤隆一郎, 2017 年度日本農芸化学会大会 2017.3.17-20, 国内
3. 胆汁酸受容体 TGR5 が骨格筋機能に及ぼす影響および発現調節機構の解析, 口頭, 佐々木崇、三田萌子、村田翔太郎、久保山文音、清水誠、井上順、佐藤隆一郎, 2017 年度日本農芸化学会大会 2017.3.17-20, 国内
4. コレステロール代謝制御と食品機能, 口頭, 佐藤隆一郎, 第 71 回日本栄養・食糧学会 2017. 5. 19-21, 国内
5. Functions of G protein-coupled receptors in skeletal muscle, 口頭, 佐藤隆一郎, 2017 年台湾保健食品学会・台湾抗老化保健学会年次大会, 2017 年 3 月 10 日, 国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」研究開発領域
(英語) Advanced Research and Development Programs for Medical Innovation (AMED-CREST) “Studies on Specific Activities and Functions of Lipid Molecules to Develop” Innovative Medical Technologies”
- 研究開発課題名： (日本語) 酸化ステロールによる代謝制御基盤の構築と疾患発症の分子機構解明
(英語) Elucidation of molecular mechanisms by which oxysterols control metabolism linked to disease onset
- 研究開発担当者 (日本語) 東京大学大学院農学生命科学研究科 教授 佐藤 隆一郎
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo; Professor; Ryuichiro Sato
- 実施期間： 平成 28 年 10 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 酸化ステロールの産生・細胞内輸送・搬出の制御機構並びにその生理機能の解明
開発課題名： (英語) Studies on molecular mechanisms of biosynthesis, intracellular trafficking, and efflux of oxysterols, and on their physiological roles
- 研究開発分担者 (日本語) 東京大学大学院農学生命科学研究科 特任准教授 山内 祥生
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo; Associate Professor; Yoshio Yamauchi

II. 成果の概要（総括研究報告）

・ 研究開発代表者による報告の場合

・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：東京大学・大学院農学生命科学研究科・佐藤 隆一郎 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 2 件）

1. Methods for Monitoring ABCA1-Dependent Sterol Release, Yamauchi Y, Yokoyama S, Chang TY., **Methods in Molecular Biology**, 2017, 1583, 257-273.
2. Cellular cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease. Chang TY, Yamauchi Y, Hasan M, Chang CCY. **Journal of Lipid Research**. 2017, 印刷中.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. SREBP プロセッシングを阻害する新規低分子量化合物によって明らかになったヒトメラノーマ細胞における SREBP 依存的なメバロン酸経路の重要性, ポスター, 山内祥生, 太田晃成, 渡邊瑞貴, 五十嵐政智, 佐藤隆一郎, 上杉志成, 古川鋼一, 第39回日本分子生物学会年会, 2016/12/2, 国内.
2. ABCA1 依存的 HDL 形成におけるステロール分子特異性と膜ドメイン, 口頭, 山内祥生, 横山信治, Ta-Yuan Chang, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017/3/20, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

該当なし