

コレステロール生合成の新たな制御ポイント ——スクアレンモノオキシゲナーゼの基質による アロステリックな安定化——

大金 賢司¹, 吉岡 広大²

1. はじめに

コレステロールは、細胞膜の構成成分やステロイドホルモン・胆汁酸の原料として、高等生物の生存に必須な脂質である。その一方で、過剰なコレステロール、特に血中の低密度リポタンパク質は、心血管疾患のリスクとして広く認知されている。コレステロールは、アセチルCoAから約30段階の酵素反応を経て、多くのATPと酸素を利用して合成されることから、コストの高い脂質である。それゆえ、コレステロールの生合成と食餌由来のコレステロールの細胞内への取り込みは、何重もの制御を受けて厳密に制御されている。たとえば、コレステロールが多い状況では、コレステロールを生合成する必要も外から取り込む必要もないことから、生合成酵素や取り込みに関わるタンパク質群の転写が抑制される。このような転写レベルでのネガティブフィードバック制御およびその分子メカニズムについては、1985年にノーベル生理学医学賞を受賞したMichael S. Brown教授とJoseph L. Goldstein教授らの研究グループを中心とした研究から理解が進んでいる。一方で、翻訳後のレベルでの制御機構の存在も知られている。たとえば、コレステロール合成の律速酵素でありスタチンの標的として知られるHMG-CoA還元酵素は、コレステロール合成の中間体であるラノステロールやコレステロ-

ルの酸化体であるオキシステロールにより分解が加速する^{1,2)}。また、コレステロール合成経路においてステロイド骨格の形成直前に位置するスクアレンモノオキシゲナーゼ(squalene monooxygenase: SM)は、コレステロールによりその分解が加速することが近年になり報告されている(図1A)³⁾。このSMがどのようにしてコレステロール量を感知し分解されるのか、生化学的アプローチで研究が進められてきたが、まだ完全には解明されておらず、SMの分解調節機構についてはわからないことが多く残されていた⁴⁻⁷⁾。

著者らのグループでは、生化学や遺伝学というアプローチとは異なる観点として、化合物を中心とした化学のアプローチでこの課題に取り組み、SMが自身の基質であるスクアレンを感知して安定化するという、フィードフォワード型の制御機構の存在を見いだした(図1A)⁸⁾。本稿においては、その発見の概要を、(共同)研究の経緯などの論文には書かれていない内容も含めて紹介したい。

2. スクアレンによるSM安定化作用の発見

まず著者らが興味を持ったのは、SMの安定性が生体内でどう制御されているのか、コレステロールがどのようにSMを不安定化するのかという点である。この問題に関して著者らのとったアプローチは、化学遺伝学と分類される。遺伝学的スクリーニングにおいては、SMの安定性を変化させる遺伝子を(発現抑制あるいは過剰発現させて)探す。化学遺伝学の方法では、SMの安定性を変化させる化合物を探索し、その化合物の作用機序からSMの安定性制御機構を理解する。理解のみを目的にするのであれば、やや遠回りな方法かもしれないが、遺伝学的手法では拾えないものが拾える場合があることや、得られた化合物自体に医薬候補・ツールとしての利用価値がある、という利点もある。

翻訳後レベルで起こるSMの安定性変化をモニターするため、著者らはヒトSMとルシフェラーゼの融合タンパク質をCMVプロモーター下流に発現させ、SM量をルシフェラーゼ活性で検出する方法を用いた。この実験系を

¹ 東京理科大学理工学部応用生物科学科 (〒278-8510 千葉県野田市山崎2641)

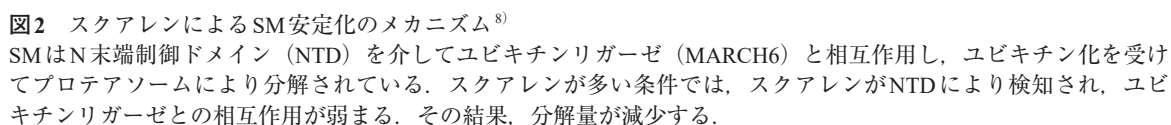
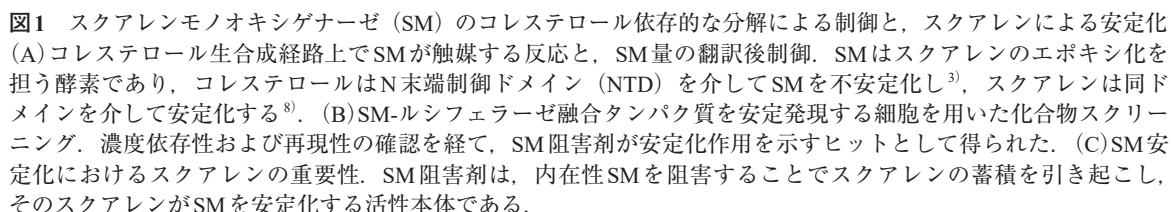
² 理化学研究所環境資源科学研究センターケミカルバイオロジー研究グループ (〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1)

Allosteric stabilization of a key cholesterol biosynthetic enzyme squalene monooxygenase by its substrate

Kenji Ohgane¹ and Hiromasa Yoshioka² (¹Department of Applied Biological Science, Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan, ²Chemical Biology Research Group, Center for Sustainable Resource Science, RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako-shi, Saitama 351-0198, Japan) 本論文の図版はモノクロ(冊子版)およびカラー(電子版)で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930147

© 2021 公益社団法人日本生化学会



用いて生物活性が既知の化合物ライブラリーをスクリーニングしたところ、分解を起こす化合物は見つからなかったが、SMを安定化する化合物としてテルピナフィンおよびブテナフィンを同定した(図1B)。これらは真菌のSMの阻害剤であった。これらはヒトSMに対する阻害活性は弱く、安定化作用にも高濃度が必要であるが、強力なヒトSM阻害剤として知られていたNB-598が数nMで安定化作用を示すことがわかった。さらに興味深いことに、これら阻害剤の結合部位である触媒ドメインがないSMにおいても安定化作用が観察され、SMのN末端にあるコレステロール依存的な分解に必要な領域がこの安定化作用に必要十分であることがわかった。

なぜ安定化が起きるのであろうか。結論からいうと、SM阻害剤が内在性SMを阻害してスクアレンの蓄積を起こし、スクアレンがN末端ドメインに結合してSMを安定化していた。本稿では詳細は割愛するが、SM阻害剤により細胞内にスクアレンが蓄積し、それと同じ濃度域でSM(N末端ドメイン)の安定化が観測された。さらにスクアレン上流の代謝経路を阻害してその供給を止めると安定化はみえなくなり、外からスクアレンを追加すると再びSMの安定化がみえた(図1C)。これにより、スクアレンが安定化を起こす活性本体であることがわかった。その後、光親和性標識法(photoaffinity labelingあるいはphoto crosslinking)を用いることで、直接結合していることを示し、上記の結論に至った。その後の解析から、スクアレンがSMのN末端ドメインへ結合することで、SMと同様に小胞体膜に存在するユビキチン化酵素MARCH6との相互作用が弱まり、ユビキチン化の減少、そしてSMの分解量の減少が起こることが明らかとなった(図2)。

スクアレンの蓄積が安定化に必要なとわかった時点で、安定化のメカニズムとして、脂肪滴へのSMの隔離という仮説も著者らの中で議論に上がった。SMはコレステロール合成が行われる小胞体膜に存在するとされていたが、脂肪滴にも分布するとの報告がなされたこと⁹⁾、および酵母においてはスクアレンの蓄積により脂肪滴のサイズが大きくなるとの報告に基づいたものである¹⁰⁾。そこで著者らは、安定化により増加したSMが脂肪滴に分布するのか、脂肪滴がSMの安定化に必要なかを調べることにした。脂肪滴は非常に軽い細胞小器官であり、スクロス密度勾配遠心法による細胞小器官の分画において、上清に分画されることが知られている¹¹⁾。SMは上清ではなく小胞体画分に検出され、その量がNB-598処理により増加することがわかった。また、脂肪滴形成に重要なジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼを阻害した条件下でも安定化が見られ、さらに共焦点顕微鏡によるSMの局在パターンもNB-598の有無にかかわらず小胞体マーカーと一致することも確認された。以上より、少なくとも著者らの用いた

細胞株においては、脂肪滴のSM安定化に対する寄与はほとんどないとの結論に至った。

本研究で得られたデータは、スクアレンがSMのN末端ドメインと相互作用することが安定化を起こすという可能性を支持しているが、一方で研究過程においては、直接結合によらないメカニズムの可能性も挙がっていた。スクアレンが小胞体膜の性質を変え、その結果SMの安定性が変化するというものである。スクアレンは脂質二重膜の中間層(外葉と内葉の間)に分布するとの報告があることから¹²⁾、膜の性質に影響を与える可能性は十分にある。SMのコレステロール依存性分解の研究においては、膜の性質変化を介したコレステロールの鏡像異性体を用いるアプローチにより、(キラルな)タンパク質を介した作用なのか、膜への作用などより物理化学的な作用なのかを検証する研究が行われている¹³⁾。しかしながら、コレステロールの鏡像異性体でもある程度の分解誘導活性がみられており、タンパク質による認識を介した可能性と膜を介した作用の両方が寄与している可能性があるとされている。スクアレンは不斉炭素を持たないアキラルな分子であり、鏡像異性体を用いた検証はできない。著者らは物理的性質が近い化合物として、スクアレンの二重結合が単結合に置き換わったスクアランを用いて検討を行ったところ、安定化作用を示さないことがわかった。さらに光親和性標識プローブにおいても、二重結合の単結合への置換で安定化作用および結合が失われることを確認したことから、著者らはタンパク質による直接的な認識の可能性が高いと考えるに至った。膜を介した作用を完全に否定することはできないが、上記のデータより何かしら積極的な認識機構があるものと考えている。

本稿では、SMの安定性制御機構に関する現在の知見を紹介したが、未解決事項は多い。スクアレンがどのようにしてMARCH6との相互作用を変化させるのか、そもそもN末端制御ドメインはどのような構造をしていてスクアレンをどう認識するであろうか。また、コレステロールによるSMの分解に関しては、コレステロールがSMに直接結合することで分解を誘導するのか、それとも何か別のメカニズムが存在するのか等が、今後明らかにすべき課題として挙げられる。また、近年SMはがん¹⁴⁾との関連も指摘されており、2019年にはSMの触媒ドメインの結晶構造が解かれる¹⁵⁾など、研究の進展が著しい。SMの活性や安定性を制御する機構の理解は、これらの疾患の理解・治療法の開発にもつながりうるものであろう。

3. Andrew Brownラボとの共同研究のきっかけと、そこから学んだこと

上記の研究は、著者らとオーストラリアのニューサウス

ウェールズ大学の Andrew J. Brown 教授との共同研究の成果である。Brown 教授は SM がステロール依存的に分解することを見つけた張本人であり、関連分野では著名な先生である。著者らが Brown 教授らと共同研究を開始したきっかけは、2018 年度の生化学会であった。ちょうどシンポジウムの招待講演を行うために Brown 教授が来日していたのであった。学会では、当時博士課程 2 年であった筆頭著者の吉岡博士が、上記のスクアレノンの話の途中までをポスター発表していた。Brown 教授自身は多忙でポスター会場にはきていなかったが、そのシンポジウムのオーガナイザーの 1 人で、Brown & Goldstein 研究室出身の佐藤隆一郎教授（東大農）が見に来てくださり、そこで Brown 教授が東大で講演予定があることをうかがった。さらに佐藤教授の取り計らいで、講演後にディスカッションの時間まで設けていただいた。ここで Brown 教授と話したことで、ケミカルバイオロジーを主要なスキルとする著者らと脂質生化学の Brown ラボの共同研究が始まることになった。間を取り持ってくれた佐藤教授と、実質無名な著者らとの共同研究をフェアな立場で引き受けてくださった Brown 教授には感謝が尽きない。

Brown 教授の帰国後、Brown ラボで SM に関する研究を行っていた当時 PhD candidate の Jake (Dr. Ngee Kiat Chua) と Brown 教授とのメールでのディスカッションが始まった。双方の持っているデータの共有から始め、考えられる可能性と検証方法を整理し、互いに行う実験を割り振る形で研究が進行した。かたや北半球かたや南半球で、先方は輸出入制限の厳しいオーストラリアということもあり、最小限の研究材料・生物材料の共有にもかなりの時間と労力がかかった（膨大な書類を処理してくれた Jake に感謝）。材料だけでなく、細かいスキルも簡単に共有できないものもあり、実験分担は得意分野・材料・コツや経験値に応じて割り振ることとなり、必ずしも理想的な実験を実行できたわけではない。しかしながら、先方は publication-oriented な考え方で必要かつ重要な実験を明確にしてきっちり結果を出すスタイルで、著者らはそれに見合う仕事をするべく必死であった。著者らも先方の考え方に学び、今まで以上に何が必要か・そのためには何をすべきかをしっかりと考えるようになった。先方の研究グループに新しいメンバーとして PhD candidate の Hudson (Hudson W. Coates) が加わり、双方で実験が進行し始めてからは、わずか半年ほどではほぼ研究としてまとまりのある形となった。

実際に論文の形を作って詳細を詰める段階に入り、メールでやりとりするよりも直接ディスカッションしたほうが早いということで、1 週間ほどシドニーに招待していただき、合宿形式での論文書きが始まった。午前中に集まって担当セクションの分担と修正の方針を議論し、午後から夜

にかけて各自で作業するというスタイルの繰り返しであった。英語を母国語としない著者らにとっては、集中力とパワーを必要とする作業であったが、合宿のおかげで帰国時には投稿直前までたどり着くことができた。研究者駆け出しの著者らにとって、Brown 教授のストーリー・議論を組み立てる力には完全に脱帽し、経験値の違いを感じるとともに、Brown ラボのスマートなスタイル・働き方・研究に対する姿勢からは多くのことを学ぶことができた。

この研究を始めた当初、「あの論文の人」であった Brown 教授と一緒に仕事ができるとは思ってもいなかった。生化学会がきっかけで始まったこの共同研究は、わずか 1 年半ではあるが著者らにとっては非常に実りの多いものであった。

4. おわりに

本稿では、著者らが最近報告したスクアレニンによる SM の安定化という現象および SM を巡る研究の現状に関して概説するとともに、Brown 教授との共同研究の裏側についても述べさせていただいた。少しでも参考になる点があれば幸いである。

謝辞

最後に、本研究を行うにあたり全面的にサポートしてくださった東京大学定量生命科学研究センター橋本祐一教授（現・東京大学名誉教授）に心より感謝申し上げます。当時、（通常は独立ポジションではない）助教であった著者に、非常に大きな裁量と自由度を与え本研究を任せくださいました。そのおかげで、独立した研究者としてやっていく上での必要な経験を積むことができました。また、本文中でも述べましたが、Brown 教授との縁を結んでくださった、東京大学農学系研究科佐藤隆一郎教授にも感謝申し上げます。また、本稿で紹介した研究は、日本学術振興会科学研究費補助金（課題番号 JP17K15487, JP18J14851, JP17H03996）の支援を受けて行われました。

文 献

- 1) Song, B.-L., Javitt, N.B., & DeBose-Boyd, R.A. (2005) Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. *Cell Metab.*, **1**, 179-189.
- 2) Chen, L., Ma, M.-Y., Sun, M., Jiang, L.-Y., Zhao, X.-T., Fang, X.-X., Man Lam, S., Shui, G.-H., Luo, J., Shi, X.-J., et al. (2019) Endogenous sterol intermediates of the mevalonate pathway regulate HMGCR degradation and SREBP-2 processing. *J. Lipid Res.*, **60**, 1765-1775.
- 3) Gill, S., Stevenson, J., Kristiana, I., & Brown, A.J. (2011) Cholesterol-dependent degradation of squalene monooxygenase, a control point in cholesterol synthesis beyond HMG-CoA

- reductase. *Cell Metab.*, **13**, 260–273.
- 4) Howe, V., Chua, N.K., Stevenson, J., & Brown, A.J. (2015) The regulatory domain of squalene monooxygenase contains a re-entrant loop and senses cholesterol via a conformational change. *J. Biol. Chem.*, **290**, 27533–27544.
 - 5) Chua, N.K., Howe, V., Jatana, N., Thukral, L., & Brown, A.J. (2017) A conserved degron containing an amphipathic helix regulates the cholesterol-mediated turnover of human squalene monooxygenase, a rate-limiting enzyme in cholesterol synthesis. *J. Biol. Chem.*, **292**, 19959–19973.
 - 6) Chua, N.K., Scott, N.A., & Brown, A.J. (2019) Valosin-containing protein mediates the ERAD of squalene monooxygenase and its cholesterol-responsive degron. *Biochem. J.*, **476**, 2545–2560.
 - 7) Chua, N.K., Coates, H.W., & Brown, A.J. (2020) Squalene monooxygenase: a journey to the heart of cholesterol synthesis. *Prog. Lipid Res.*, **79**, 101033.
 - 8) Yoshioka, H., Coates, H.W., Chua, N.K., Hashimoto, Y., Brown, A.J., & Ohgane, K. (2020) A key mammalian cholesterol synthesis enzyme, squalene monooxygenase, is allosterically stabilized by its substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 7150–7158.
 - 9) Liu, P., Ying, Y., Zhao, Y., Mundy, D.I., Zhu, M., & Anderson, R.G.W. (2004) Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J. Biol. Chem.*, **279**, 3787–3792.
 - 10) Ta, M.T., Kapterian, T.S., Fei, W., Du, X., Brown, A.J., Dawes, I.W., & Yang, H. (2012) Accumulation of squalene is associated with the clustering of lipid droplets. *FESB J.*, **279**, 4231–4244.
 - 11) Fujimoto, Y., Itabe, H., Sakai, J., Makita, M., Noda, J., Mori, M., Higashi, Y., Kojima, S., & Takano, T. (2004) Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim. Biophys. Acta*, **1644**, 47–59.
 - 12) Hauss, T., Dante, S., Dencher, N.A., & Haines, T.H. (2002) Squalene is in the midplane of the lipid bilayer: implications for its function as a proton permeability barrier. *Biochim. Biophys. Acta*, **1556**, 149–154.
 - 13) Kristiana, I., Luu, W., Stevenson, J., Cartland, S., Jessup, W., Belani, J.D., Rychnovsky, S.D., & Brown, A.J. (2012) Cholesterol through the looking glass. *J. Biol. Chem.*, **287**, 33897–33904.
 - 14) Liu, D., Wong, C.C., Fu, L., Chen, H., Zhao, L., Li, C., Zhou, Y., Zhang, Y., Xu, W., Yang, Y., et al. (2018) Squalene epoxidase drives NAFLD-induced hepatocellular carcinoma and is a pharmaceutical target. *Sci. Transl. Med.*, **10**, eaap9840.
 - 15) Padyana, A.K., Gross, S., Jin, L., Cianchetta, G., Narayanaswamy, R., Wang, F., Wang, R., Fang, C., Lv, X., Biller, S.A., et al. (2019) Structure and inhibition mechanism of the catalytic domain of human squalene epoxidase. *Nat. Commun.*, **10**, 97.

著者寸描

●大金 賢司 (おおがね けんじ)



東京理科大学理工学部応用生物科学科助教。博士（薬学）。

■略歴 2008年東京大学薬学部卒業。3年同大学院薬学系研究科博士課程修了（橋本祐一教授）。13～17年ERATO袖岡生細胞プロジェクト研究員および理化学研究所基礎科学特別研究員（袖岡幹子主任研究員）。17年東京大学定量生命科学研究所助教（橋本祐一教授）。20年より

現職。

■研究テーマと抱負 化学のアプローチでの生命現象の解明と制御を目指しています。特にタンパク質が生まれて分解されるまでの過程に影響を与えるような、低分子化合物の少し変わった作用に興味があります。

■ウェブサイト https://researchmap.jp/k_ohgane

■趣味 登山、自転車（山）、ランニング。

●吉岡 広大 (よしおか ひろまさ)



理化学研究所特別研究員。博士（薬科学）。

■略歴 2015年横浜市立大学国際総合科学部（理学）卒業。20年東京大学大学院薬学系研究科博士後期課程修了。この間、18～20年日本学術振興会特別研究員、20年より現職。

■研究テーマと抱負 化合物を用いて生命現象の謎を解き明かすことを目指しています。有機合成から生化学実験まで様々な技術を学び、研究に取り組んでいます。

■ウェブサイト https://researchmap.jp/hy_oka

■趣味 料理、筋トレ。