

博士論文

食品成分による転写因子 SREBP
活性抑制の分子機構解析

東京大学大学院 農学生命科学研究科
応用生命化学専攻 食品生化学研究室

平成 25 年度進学 宮田 慎吾

指導教員 佐藤 隆一郎

目次

| | |
|--|-----|
| 略語一覧 | 1 |
| 第1章 <u>序論</u> | 6 |
| 第2章 <u>SREBP 活性を抑制する食品成分の探索</u> | 31 |
| 2-1. 緒言 | 32 |
| 2-2. 実験材料および手法 | 32 |
| 2-3. 結果 | 46 |
| 2-4. 考察 | 63 |
| 第3章 <u>Isoxanthohumol, 4'-Hydroxyflavanone, Allyl Isothiocyanate</u> <u>および類縁体による SREBP 活性抑制効果の検証</u> | 66 |
| 3-1. 緒言 | 67 |
| 3-2. 実験材料および手法 | 67 |
| 3-3. 結果 | 73 |
| 3-4. 考察 | 99 |
| 第4章 <u>Xanthohumol による活性型 SREBP 減少機構の解析</u> | 104 |
| 4-1. 緒言 | 105 |
| 4-2. 実験材料および手法 | 105 |
| 4-3. 結果 | 113 |
| 4-4. 考察 | 138 |
| 第5章 <u>生体内における Xanthohumol の効果検証</u> | 144 |
| 5-1. 緒言 | 145 |
| 5-2. 実験材料および手法 | 145 |
| 5-3. 結果 | 152 |
| 5-4. 考察 | 169 |

| | |
|---|-----|
| 第 6 章 <u>Sulforaphane, Sulforaphene, Isoxanthohumol による</u> <u>前駆体 SREBP 減少機構の解析</u> | 174 |
| 6-1. 緒言 | 175 |
| 6-2. 実験材料および手法 | 175 |
| 6-3. 結果 | 184 |
| 6-4. 考察 | 208 |
| 第 7 章 <u>生体内における Sulforaphane の効果検証</u> | 216 |
| 7-1. 緒言 | 217 |
| 7-2. 実験材料および手法 | 217 |
| 7-3. 結果 | 220 |
| 7-4. 考察 | 232 |
| 第 8 章 <u>総合討論</u> | 236 |
| 引用文献 | 247 |
| 原著論文 | 278 |
| 要旨 | 279 |
| 謝辞 | 283 |

略語一覽

| | |
|----------------|---|
| ABCG | ATP-binding cassette subfamily G member 8 |
| ACC | Acetyl-CoA carboxylase |
| ACO | Acyl-CoA oxidase |
| AITC | Allyl Isothiocyanate |
| ACL | ATP-citrate lyase |
| ACS | Acetyl-CoA synthase |
| ACSL3 | Acyl-CoA synthase long-chain family member 3 |
| AEBSF | 4- (2-Aminomethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride |
| Akt | Protein Kinase B |
| ALT | Alanine aminotransferase |
| AMPK | AMP-activated protein kinase |
| ARC105 | Activator-recruited cofactor 105 |
| AST | Aspartate aminotransferase |
| ATF6 | Activating transcription factor 6 |
| ATGL | Adipose triglyceride lipase |
| ATP | Adenosine triphosphate |
| bHLH-Zip | Basic helix-loop-helix leucine zipper |
| BFA | Brefeldin A |
| BSA | Bovine serum albumin |
| BSD | Blastcidin S deaminase |
| CAPS | 3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid |
| CBP | cAMP response element-binding protein |
| CDTA | Chenodeoxycholic acid |
| Cdk1 | Cyclin-dependent kinase 1 |
| CHX | Cycloheximide |
| C/EBP α | CCAAT/enhancer-binding protein α |
| COP II | Common coated protein II |
| CPT-1a | Carnitine palmitoyltransferase-1a |
| CRTC2 | CREB regulated transcription coactivator 2 |

| | |
|-------------------|--|
| DGAT1 | Diacylglycerol acyltransferase 1 |
| DHA | Docosahexaenoic acid |
| Dio2 | Deiodinase, iodothyronine, type II |
| DMEM | Doubecco's modified Eagle's medium |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylene diamine tetraacetic acid |
| EPA | Eicosapentaenoic acid |
| ER | Endoplasmic reticulum |
| ERK | Extracellular signal-regulated kinase |
| FADH ₂ | Flavin adenine dinucleotide |
| FAS | Fatty acid synthase |
| FBS | Fetal bovine serum |
| Fbw7 | F-box and WD repeat domain containing |
| GA | Gallic acid |
| GAPDH | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| GBN | Glabridin |
| GFP | Green fluorescent protein |
| GPAT | Glycerol-3-phosphate acyltransferase |
| GSK-3 β | Glycogen synthase kinase-3 β |
| GTP | Guanosine triphosphate |
| HAT | Histone acetyltransferase |
| HBSS | Hank's balanced salt solution |
| HDL | High density lipoprotein |
| HEPES | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid |
| HMGB1 | High mobility group protein B1 |
| HMGCR | 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase |
| HMGCS | 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA synthase |
| HNF-4 α | Hepatocyte nuclear factor-4 α |
| IKK β | I κ B kinase β |
| Insig | Insulin-induced gene |

| | |
|----------|---|
| IRS | Insulin receptor substrate |
| IXN | Isoxanthohumol |
| Jak/Stat | Janus kinase/signal transducers and activators of transcription |
| KS | β -ketoacyl synthase |
| LDL | Low density lipoprotein |
| LDLR | Low density lipoprotein receptor |
| LPDS | Lipoprotein deficient serum |
| LRH-1 | Liver receptor homolog-1 |
| LXR | Liver X receptor |
| LXRE | Liver X receptor element |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase |
| mTORC1 | Mammalian target of rapamycin complex 1 |
| MTP | Microsomal triglyceride transfer protein |
| NADH | Nicotine amide adenine dinucleotide |
| NF-Y | Nuclear factor-Y |
| NF-1 | Nuclear factor-1 |
| Nrf2 | Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 |
| OGTT | Oral glucose tolerance test |
| ONPG | o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside |
| PAGE | Poly acrylamide gel electrophoresis |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PCSK9 | Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 |
| PGC-1 | Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 |
| PKA | Protein kinase A |
| PKC | Protein kinase C |
| PMSF | Phenylmethylsulfonyl fluoride |
| PPAR | Peroxisome proliferator-activated receptor |
| PVDF | Polyvinylidene difluoride |
| RNF20 | Ring finger protein 20 |
| RT | Reverse transcription |

| | |
|-------------------|---|
| SCAP | SREBP cleavage-activating protein |
| SCD | Stearoyl CoA desaturase |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate |
| S1P | Site-1 protease |
| S2P | Site-2 protease |
| SCAP | SREBP cleavage-activating protein |
| SCD | Stearoyl-CoA desaturase |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate |
| SFaN | Sulforaphane |
| SFeN | Sulforaphene |
| SNARE | soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors |
| Sp1 | Specific protein 1 |
| SQS | Squalene synthase |
| SRE | Sterol regulatory element |
| SREBP | Sterol regulatory element binding protein |
| SSD | Sterol sensing domain |
| SUMO | Small ubiquitin-like modifier |
| TBS | Tris-buffered saline |
| TEMED | N,N,N',N'-tetramethyl- ethylenediamine |
| TG | Triglyceride |
| TLC | Thin-Layer Chromatography |
| TNF- α | Tumor necrosis factor- α |
| Ub | Ubiquitin |
| Ubx _{d8} | UBX domain-containing protein 8 |
| UCP1 | Uncoupling protein 1 |
| VLDL | Very low density lipoprotein |
| XN | Xanthohumol |
| α -NF | α -Naphthoflavone |
| β -NF | β -Naphthoflavone |
| 2'-HF | 2'-Hydroxyflavanone |

| | |
|-------|-----------------------|
| 3'-HF | 3'-Hydroxyflavanone |
| 4'-HF | 4'-Hydroxyflavanone |
| 6-HF | 6-Hydroxyflavanone |
| 25-HC | 25-Hydroxycholesterol |

第 1 章

序論

メタボリックシンドローム

過剰な内臓脂肪蓄積に起因する肥満症は、II型糖尿病、高血圧、脂質異常症といった生活習慣病を引き起こしやすいことが知られている。内臓脂肪型肥満とともに上述した疾患の複数が一個人に集積した状態をメタボリックシンドロームと呼び、心血管疾患の発症リスクが30倍以上に跳ね上がるとも言われている。厚生労働省の平成19年国民健康・栄養調査によると、40~74歳の中老年男性において2人に1人、女性においては5人に1人がメタボリックシンドロームおよびその予備軍に該当し、その数は2000万人に達する。さらに同年の人口動態統計では、国民の全死亡のうち動脈硬化性疾患は30%（心疾患17.6%、脳血管疾患12.7%）を占めることが明らかとなった。食の欧米化や高齢化が加速する現代社会において、肥満症を頂点とした生活習慣病の罹患者が今後ますます増加することは不可避の事態である。これらの疾病の予防・治療法の確立のため、脂質代謝制御機構の解明は急務となっている。

脂質代謝

コレステロール代謝

コレステロールの生理機能

コレステロールは細胞膜の構築や維持に必要であり、広範囲の温度帯で膜の流動性を安定にする働きがある。また、内分泌物質や調節因子（胆汁酸、副腎皮質ホルモン、性ホルモン、ビタミンDなど）の前駆体となる。このように、コレステロールは生体内の恒常性維持に必要不可欠な成分である。

コレステロールの吸収、生合成、細胞内への取り込み

食事由来のコレステロールは小腸上皮で吸収された後、キロミクロンとしてリンパを經由して鎖骨下大静脈に流入し、肝臓へと運ばれる。同時に、肝臓（をはじめとする全身の組織）ではコレステロール合成が行われている。これは、アセチルCoAを原料とする約30段階の酵素反応である（[Fig. 1-1](#)）。肝臓において、

食事由来の、あるいは合成されたコレステロールはリポタンパク質の一種 VLDL (Very low density lipoprotein) を形成し、血中に放出されると、抹消組織へと運ばれる。血中において VLDL は LDL (Low density lipoprotein) に異化され、各組織の細胞表面に存在する LDL 受容体 (LDLR: LDL receptor) に結合し、細胞内に取り込まれる。生体内では、取り込みと生合成を調節することにより、細胞内コレステロール量は厳密に制御されている。

コレステロール代謝異常による疾患

コレステロールは生体に必須の物質である。しかし、血中にコレステロールが過剰に存在する状態、高コレステロール血症は動脈硬化性疾患の主要なリスクファクターと言われている [1]。高コレステロール血症では、血球細胞である単球の動脈内皮表面への結合、さらには内皮細胞下への浸潤が誘導される。また、血中 LDL が過剰に存在すると、酸化型 LDL コレステロールが増加する。動脈に浸潤した単球はマクロファージに分化した後、酸化 LDL を貪食することで細胞内に大量の脂質を蓄積し、こぶ状の動脈硬化巣形成に至る。

現在、高コレステロール血症の治療薬として用いられるスタチンは、コレステロール合成の律速酵素である HMGCR (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase) を阻害する。細胞内のコレステロールが減少すると、LDL 受容体の発現が亢進し、細胞は血中の LDL を積極的に取り込む。これは後述する転写因子 SREBP-2 (Sterol regulatory element-binding protein-2) による制御を利用したものである。

脂肪酸代謝

脂肪酸の生理機能

脂肪酸はコレステロールを除くほとんどの脂質の前駆体であり、多くの場合他の脂質へ代謝されたり、タンパク質に結合して機能を発揮する。例えば、エネルギー源としての脂肪酸はトリグリセリドとして脂肪組織に貯蔵されているが、 β 酸化により代謝されると大量の ATP を放出する。また、酵素反動的にコレステロールに付加されることにより、コレステロールエステルを形成し、コレステロールの抹消から肝臓への輸送型、あるいは細胞における貯蔵型として

機能する。多価不飽和脂肪酸はエイコサノイドなどの生理活性物質の前駆体として、シグナル伝達や炎症反応に関与する。

脂肪酸の生合成、 β 酸化

脂肪酸の生合成は肝臓、腎臓、脳、肺、乳腺、脂肪組織など多くの組織で行われているが、特に肝臓では脂肪酸合成に関与する酵素の活性が高い。アセチル CoA に炭化水素が付加されてマロニル CoA が生成する酵素反応を律速として、炭素数2単位の付加を繰り返す形で、脂肪酸合成は細胞質において進行する (Fig. 1-2)。肝臓において、合成された、あるいは輸送されてきた脂肪酸とグリセロール 3-リン酸がエステル結合し、トリグリセリドが合成されると、VLDL として血中に分泌されて抹消組織に運ばれる。

生物はエネルギーを摂取すると、それを即座に脂肪酸、トリグリセリドに変換し、脂肪組織に蓄え、飢餓に適応するべく備えている。一方、エネルギーが必要な際には、脂肪組織でトリグリセリドから分解された脂肪酸は肝臓へと運ばれ、そこで酸化分解を受けて ATP を産生する。脂肪酸の分解は細胞内のミトコンドリアで起こり、カルボキシル基から β 位の炭素が酸化され、炭素数が2個少ない脂肪酸 CoA とアセチル CoA へ変換される。この過程で生じた $FADH_2$, NADH から ATP を生成する。

脂肪酸代謝異常による疾患

脂肪酸代謝の異常は、インスリン抵抗性や II 型糖尿病に寄与することが知られている [2]。

体内に脂肪酸が過剰に存在すると、脂肪細胞への過度の脂質蓄積、つまり肥満を惹起してしまう。肥満状態では、TNF- α (Tumor necrosis factor α) の産生が亢進し、それによるインスリンシグナルの阻害はインスリン抵抗性の原因となる。さらに、TNF- α はアディポサイトカインの一種であるアディポネクチンの発現の抑制にも関与する。アディポネクチンは、糖の取り込みや脂肪酸燃焼を促進するとともに糖新生を抑制しており、肥満や II 型糖尿病では発現が顕著に減少することが知られている。アディポネクチンの投与により高脂肪食負荷によるインスリン抵抗性が改善したという例もあり、これを利用した抗肥満薬、抗糖尿病薬の開発が期待されている。

また、遊離脂肪酸は骨格筋や肝臓に運ばれ、PKC θ (Protein kinase C θ), IKK β (I κ B kinase β) を活性化する。その結果、IRS (Insulin receptor substrate) のセリンリン酸化が起こり、インスリンシグナルが正常に伝達されなくなるという阻害経路も存在する。

SREBP (Sterol regulatory element-binding protein)

以上のように、生体内の脂質代謝は厳密に制御される必要がある。この調節を転写レベルで担っているのが転写因子 SREBP である。

SREBP

SREBP の発見

細胞内のコレステロール量の増減に伴い、LDLR, HMGCS (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA synthase), HMGCR の mRNA 量に変動することが知られていた。その後の解析により、これらいずれの遺伝子の 5'上流領域にも 5'-ATCACCCAC-3'様の配列 SRE (Sterol regulatory element) が存在することが明らかとなった。培養細胞の核抽出物より、この配列に特異的に結合するタンパク質が精製され、SREBP (Sterol regulatory element-binding protein) と命名された [3-6]。以後、SREBP は脂質代謝を包括的に制御する転写因子として着目され、種々の研究が進められている。

SREBP の構造および細胞内局在

SREBP はおよそ 1140 アミノ酸から構成される。N 末端に酸性アミノ酸に富む転写活性化領域、その後方に bHLH-Zip (basic helix-loop-helix leusine zipper) 領域を持ち、さらにその後方に2ヶ所の疎水性アミノ酸に富む膜貫通領域を持つ [7]。SREBP は小胞体膜上に前駆体として合成され、N 末端側と C 末端側を細胞質に突き出す形で存在している [7]。その後、後述するプロセッシングを受け活性型となり、転写因子として機能する。

SREBP のアイソフォームおよび発現部位

SREBP には 3 種類のアイソフォーム-1a, -1c, -2 が存在する (Fig. 1-3. A)。SREBP-1a, -1c は同一遺伝子から異なるプロモーターによって転写され、その後異なるスプライシングを受けて合成される [8]。SREBP-1c は-1a の N 末端側 24 アミノ酸を欠き、-1a に比べて転写活性が低い [8]。SREBP-2 は別の遺伝子から合成され、-1a と 47% のアミノ酸相同性を示す [9]。

SREBP-1c は肝臓や副腎、白色脂肪組織など脂質代謝が盛んな組織で高発現しているのに対し、-1a は小腸や脾臓など細胞増殖が盛んな組織で発現が高い [6, 10]。一般的に、培養細胞においても SREBP-1a が-1c よりも優位に発現している [10]。一方、SREBP-2 は全身の組織にユビキタスに発現している [9]。

SREBP の標的遺伝子

SREBP-1c は標的遺伝子プロモーター上の SRE-like 配列と E-box 配列 (5'-CANNTG-3') に結合し [11]、ACC (Acetyl-CoA carboxylase), FAS (Fatty acid synthase), SCD (Stearoyl-CoA desaturase) など脂肪酸代謝に関わる遺伝子群の発現を制御する [8]。SREBP-2 は SRE 配列に結合し [11]、HMGCS, HMGCR, SQS (Squalene synthase) などコレステロール代謝に関わる遺伝子群の発現を制御する [12]。SREBP-1a は脂肪酸・コレステロール代謝の両方の遺伝子を誘導する [13] (Fig. 1-3. B)。

また、SREBP-1c, -2 のプロモーター上にはそれぞれ E-box, SRE 配列が存在するため、自身によって転写活性化される [14, 15]、つまり正のフィードバック調節が行われている。さらに、SREBP-2 の活性化に伴い合成されたコレステロールは後述する SREBP プロセッシングを抑制する。このように、SREBP の制御には転写レベルでの正のフィードバック調節機構、翻訳後レベルでの負のフィードバック調節機構が存在し、発現および活性が複雑かつ厳密にコントロールされている。

プロセッシングによる SREBP 活性制御

不活性型の前駆体として合成された SREBP は、プロセッシングを受けて活性型の成熟体となり、転写活性化能を獲得する。

SREBP プロセッシング

SREBP プロセッシングの進行は、細胞内ステロール量の変動により制御されることが知られている。ステロールが豊富に存在する状態では、前駆体 SREBP は SCAP (SREBP cleavage-activating protein), Insig (Insulin-induced gene) と三者複合体を形成しており、小胞体膜上に留まっている [16-18]。細胞内ステロール量が減少すると SCAP の立体構造が変化し、SCAP/SREBP 複合体が Insig から解離する。SCAP/SREBP 複合体は COP II (Common coated protein II) 小胞複合体を介してゴルジ体へと輸送され、そこでセリンプロテアーゼ S1P (Site-1 protease), メタロプロテアーゼ S2P (Site-2 protease) による二段階の切断を受ける [19-27]。これにより bHLH-Zip 領域を含む N 末端側の約 500 アミノ酸残基が切り出され、成熟体として細胞質へ放出される。SREBP が切断・活性化されるこの一連の流れを、プロセッシングと呼ぶ (Fig. 1-4)。

このようなステロールによるプロセッシング制御は、SREBP のアイソフォーム間で異なる。SREBP-1 に比べて、-2 はステロール量の変動に対する感受性が強いと言われている。特に SREBP-1c はステロールによる制御を受けないという報告もある [28]。

SREBP-1c プロセッシングを制御する因子としてインスリンが知られている。分泌されたインスリンはインスリン受容体に結合し、細胞内のリン酸化カスケードにシグナルを伝える。そのシグナル伝達経路の因子であるセリンスレオニンキナーゼ Akt は、Insig-2a mRNA の分解に関与すること [29, 30]、下流因子である mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) を介してプロセッシングを促進すること [31] が報告されている。ただし、詳細なメカニズムやアイソフォームの特異性の原因については未だ不明であり、今後解明されるべき課題となっている。

SCAP

SCAP はステロールによる SREBP プロセッシング制御に関与するタンパク質として発見された [32]。1276 アミノ酸から構成され、8 回の膜貫通領域を持つ [32]。主に小胞体膜上に局在し、C 末端側に存在する WD Repeat 領域 (約 40 アミノ酸 GH-X²³⁻⁴¹-WD からなる配列の繰り返し) が SREBP の C 末端側と結合する [24]。SCAP の膜貫通領域はステロールセンシングドメイン (SSD) を構成しており、

ここにコレステロールが結合することで自身の立体構造変化を起こし、Insig と強固に結合する [16, 17]。

近年の研究により、SCAP とステロール、そして SREBP プロセッシングの関係が少しずつ解明されてきた。SCAP の 6 番目のループ構造 (Loop 6) は細胞質側に突き出ており、MELADL というアミノ酸配列を有する [19]。COP II 小胞複合体の構成分子 Sec24 がこの配列を認識し結合すると考えられており、SCAP/SREBP は COP II 小胞に組み込まれ、ゴルジ体へと輸送される [19]。しかし高ステロール条件下では、SCAP の構造変化により MELADL が小胞体膜近傍へと移動してしまい、Sec24 が結合する空間的余裕が失われてしまうと考えられている [20]。

Insig

Insig は 6 回の膜貫通領域を持つ小胞体膜タンパク質であり、59%の相同性を有する 2 種類のアイソフォーム-1, -2 が存在する [17, 18]。インスリン刺激に応答して発現が上昇する遺伝子として最初に発見された Insig を-1 とし、277 アミノ酸から構成される [17]。Insig-1, -2 は同様の機能を持つと考えられており、SCAP と結合し SREBP-SCAP-Insig 複合体を形成することで、SCAP による SREBP の輸送を抑制している [17, 18]。

ただし、Insig-1, -2 は異なる制御を受けることが報告されている。Insig-1 は SREBP の標的遺伝子であるため、低ステロール条件下では SREBP プロセッシングの亢進に伴い転写活性化される [33]。しかし、この条件下で合成された Insig タンパク質は速やかにユビキチン化され、プロテアソームによる分解を受ける [34, 35]。高ステロール条件下では、Insig-1 は SCAP と結合し安定化されている [34]。

一方、Insig-2 は SREBP による制御を受けない [18]。サブタイプの 1 つ Insig-2a は肝臓で高発現しており (その他の組織では主に-2b が発現している)、インスリンにより mRNA 量が減少することが報告されている [36]。この現象はインスリン刺激下における SREBP-1c プロセッシングの亢進に寄与するが、それに伴い Insig-1 の発現を誘導することで、慢性的な活性化を防ぐ負のフィードバック制御を行っている。

COP II 小胞

COP II 小胞は、積み荷タンパク質を選択的に取り込んで、小胞体からゴルジ体、液胞、エンドソーム、細胞膜などへの輸送を担う膜小胞である [37]。COP II 小胞の形成は、グアニンヌクレオチド交換因子 Sec12 により、GTPase である Sar1 が GDP 結合型から GTP 結合型に変換されることで始まる [38]。GTP 結合型となった Sar1 は小胞体膜に結合した後、Sec23 と Sec24 からなるヘテロダイマーをリクルートし、Sec23 を介して結合する [39]。これと同時に Sec24 が小胞体膜上の積み荷タンパク質と結合する [40]。このようにして、Sar1-Sec23/24-積み荷タンパク質からなる出芽前駆複合体が形成される。さらに、Sec13/31 複合体が出芽前駆複合体同士を架橋していくことにより、COP II 小胞が形成され、小胞体膜から出芽する [41, 42] (Fig. 1-5)。

yeast Sec24 には A-site (Glu504, Asp505, Met721, Arg724, Asp731, His732, Thr893, Leu896, Trp897)、B-site (Arg230, Arg235, Tyr237, Tyr296, Leu298, Val557, Arg559, Arg561, Asp581, Leu582, Leu616) と呼ばれる積み荷タンパク質結合部位が存在する [43]。また、Arg342 に変異を入れると、輸送小胞膜と輸送先の標的膜との融合に必要な SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) タンパク質の 1 種である Sec22 の COP II 小胞への取り込みが抑制されることから、Arg342 も積み荷タンパク質の結合に重要なアミノ酸の 1 つであると考えられている [44]。さらに、酵母では Sec24 に加え、Iss1 (Sec24 と 62%のアミノ酸相同性)、Lst1 (Sec24 と 23%のアミノ酸相同性) という 2 つのホモログが [45, 46]、哺乳類では Sec24A, B, C, D の 4 つのアイソフォームが存在している [47]。このように、Sec24 のタンパク質結合部位やホモログ、アイソフォームを使い分けることにより、多数の積み荷を効率的かつ選択的に認識し、COP II 小胞に取り込むことが可能になっていると考えられる。

また、Sar1, Sec23, Sec31 にもそれぞれ A, B の 2 種類のアイソフォームが存在する [48-50]。これらはアイソフォームにかかわらず、COP II 小胞形成、小胞輸送に関与することが確認されているが、それぞれの機能の差異の詳細に関しては解明されていない部分が多く残されている。

SREBP の転写制御

摂食時に分泌されるインスリンはそのシグナルの下流因子である Akt、さらに

mTORC1 を介して、SREBP-1c のプロセッシングを促進するだけでなく、転写レベルでも発現を誘導する [51-53]。前述したように SREBP-1c は自己転写制御を受けるため、インスリンによる発現誘導には、プロセッシングで生成された活性型 SREBP-1c の寄与も考えられる。このように、摂食時には SREBP-1c の発現、プロセッシングが亢進し、脂肪酸を合成することで、エネルギーを脂質として蓄える。

また、SREBP-1c は核内受容体 LXR (Liver X receptor) の応答遺伝子であることが知られている [54]。LXR は酸化コレステロールをリガンドとして活性化される受容体である [55-57]。したがって、過剰のコレステロールにより酸化コレステロール濃度が上昇すると、LXR が活性化され、SREBP-1c の発現が上昇する。これにより合成された脂肪酸は、遊離コレステロールをエステルに変換して細胞内蓄積型とすることで、無毒化しているとも考えられる。

一方、絶食時に分泌されるグルカゴンは SREBP-1c の発現を抑制する [58]。これは、PKA (Protein kinase A) を介して LXR をリン酸化し不活性化するためであると報告されている [59]。

核内における SREBP の活性制御

核内において、活性型 SREBP は種々の転写共役因子や核内受容体と相互作用すること、また多様な翻訳後修飾を受けることが知られている。

核内移行

プロセッシングを受けた後、活性型 SREBP は細胞質に放出され、Zip 配列を介して二量体を形成する [60]。Importin- β が SREBP 二量体の bHLH-Zip 領域を認識すると、SREBP と複合体を形成し核内へ輸送する [61-63]。

核内に移行した活性型 SREBP は、標的である脂質合成系遺伝子のプロモーター上で転写因子 Sp1 (Specific protein 1) [64] や NF-Y (Nuclear factor-Y) [65] と協調的に作用し、その転写を活性化する。

核内における相互作用

活性型 SREBP は、HAT (Histone acetyltransferase) 活性を持つ転写共役因子 CBP (cAMP response element-binding protein) [66] や p300 [67]、また PGC-1 β

(Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 β) [68]と相互作用し、活性が正に制御される。また、クロマチン結合タンパク質 HMGB1 (High mobility group protein B1) と相互作用し、DNA 結合性が上昇すること [69]、転写共役因子 ARC105 (Activator-recruited cofactor 105) との相互作用が SREBP による脂質代謝調節に必要であることも報告されている [70]。さらに、当研究室における研究により、SREBP は核内受容体 HNF-4 α (Hepatocyte nuclear factor-4 α) との相互作用により活性が上昇すること [71]、核内受容体 LRH-1 (Liver receptor homolog-1) と相互に活性を抑制することが明らかとなった [72]。

核内における翻訳後修飾

インスリンにより MAPK (Mitogen-activated protein kinase) が活性化されると、ERK-1/-2 (Extracellular signal-regulated kinase-1/-2) が SREBP-1a の Ser117 [73-75]、SREBP-2 の Ser432, Ser455 をリン酸化し、活性化する [76]。当研究室では、SREBP が翻訳後修飾タンパク質の一種である SUMO (Small ubiquitin-like modifier) による修飾を受け、活性が抑制されることを見出し [77]、インスリンによる SREBP のリン酸化が SUMO 化の抑制を介して転写活性を促進することを明らかにした [78]。

インスリン非存在下では、セリンスレオニンキナーゼ GSK-3 β (Glycogen synthase kinase-3 β) が活性化する [79]。GSK-3 β は SREBP-1 をリン酸化する (-1a では Thr426, Ser430 がリン酸化される) [80, 81]。当研究室では、SREBP はユビキチン化修飾を受け、プロテアソームにより分解されることを明らかにしたが [82]、その後、SREBP-1a の Thr426, Ser430 のリン酸化により E3 ユビキチンリガーゼ Fbw7 (F-box and WD repeat domain containing 7) と相互作用し、ユビキチン化されることが示された [81]。

また、PKA により SREBP-1a の Ser338 がリン酸化され、転写活性が低下すること [83]、細胞周期の M 期において、Cdk1 (Cyclin-dependent kinase 1) /cyclin B により SREBP-1a の Ser439 がリン酸化され、活性が上昇することも報告されている [84, 85]。

以上のリン酸化を中心とした翻訳後修飾は、絶食時には SREBP の活性を抑制し、摂食時や細胞分裂時には活性を促進する、つまり生体内における必要に応じて脂質合成の ON/OFF を切り替えるシステムを担っている。

また、転写共役因子 CBP, p300 は SREBP-1a, -2 のアセチル化を介して転写活性を上昇させる [86]。これはユビキチン化を受ける Lys 残基がアセチル化されることにより、ユビキチン化が拮抗的に阻害されるためであると報告されている [86]。したがって、転写共役因子を介した転写が進行している間は、SREBP はアセチル化修飾により分解を免れ、転写終結後にユビキチン化による分解へ導かれると考えられる。

生活習慣病における SREBP

肥満マウスの肝臓において、SREBP-1c の発現、プロセッシングが亢進していることが報告されている [87, 88]。肥満はしばしばインスリン抵抗性を伴い、インスリンが効かない状態であるにもかかわらず、SREBP-1c は活性化している。インスリンによる糖新生の抑制作用が損なわれている一方で、もう一つの作用である脂質合成の活性化は正常に行われている状態を選択的インスリン抵抗性と呼ぶ [89, 90]。その原因として主に、

- ① 糖新生経路にシグナルを伝える IRS-2 の働きのみが損なわれ、SREBP-1c の経路にシグナルを伝える IRS-1 は正常に作用する [52, 91]
- ② 肥満による小胞体ストレスは IRS-1, -2 を阻害するが [92]、同時に SREBP-1c プロセッシングを促進する [88, 93]
- ③ インスリンシグナル経路中の因子である mTORC1 は過剰な栄養分摂取により直接的に活性化され [94, 95]、SREBP-1c の転写 [90]、プロセッシング [31] を促進するとともに、小胞体ストレスを誘導する [96]

といった3つの説が提唱されている。

また、肝臓特異的 SREBP-1c トランスジェニックマウスは脂肪肝を呈し、通常のマウスと比べ体重、脂肪組織重量が大きくなることも確認されている [97]。SREBP-1c の過剰活性化が肥満や II 型糖尿病の原因であるのか、それとも結果であるのかは未だ明らかにされていないが、これらの病態における重要性は広く認知されている。SREBP の活性を抑制することにより、食餌性肥満マウス、II

型糖尿病マウスの体重増加や脂肪肝が抑制されたという報告もなされており [98, 99]、SREBP は生活習慣病改善のターゲットとして有効であると考えられる。

食品成分による SREBP 活性制御

近年、食品由来の天然化合物が SREBP の活性を制御するという例がいくつか報告されている。不飽和脂肪酸、特にエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) をはじめとする多価不飽和脂肪酸は SREBP-1 mRNA の分解促進 [100]、プロセシングの抑制 [101] により、その活性を抑制する。不飽和脂肪酸は Insig-1 の分解を抑制するという報告もなされており [102]、これは SREBP-1 活性抑制機構の一部を説明し得る。さらに、肥満マウスに多価不飽和脂肪酸を摂食させると、肝臓における活性型 SREBP-1 の減少、脂肪肝の改善が観察されている [103]。その一方で、飽和脂肪酸は SREBP-1 の発現を転写レベルで誘導し、それによりさらに脂肪酸合成を促進するという正のフィードバック調節の存在が知られている。

また、大豆イソフラボンである Genistein は、S1P を転写レベルで負に制御することにより SREBP-1 プロセシングを抑制する [104]。その他にも、I 型糖尿病ラットにウコンの黄色色素である Curcumin を経口投与することにより、腎臓における SREBP-1 タンパク質が減少し腎障害が軽減すること [105]、ラットにゴマリグナン的一种である Sesamin を摂食させることにより、SREBP-1 の発現、プロセシングが抑制されることが報告されている [106]。

しかし、食品成分が SREBP に対してどのように作用するのか、その詳細な分子メカニズムを解明した例はほとんど存在しない。分子レベルでの作用機構の解析は、未だ不明な点が多く残る SREBP 活性制御機構の一端を紐解くうえでも、今後の重要な課題である。

タンパク質分解

細胞内で行われるタンパク質分解には、主に「ユビキチン・プロテアソーム系」による選択的な分解と、「オートファジー・リソソーム系」によるバルクな分解の 2 つの経路が存在する。この 2 つの分解機構が独立に、時には協調的に働くことにより、細胞内のタンパク質恒常性が維持されている。

ユビキチン・プロテアソーム系

ユビキチンは76アミノ酸から構成され、酵母からヒトまで高度に保存された普遍的なタンパク質であり、C末端のカルボキシル基を介して標的タンパク質のリジン残基にイソペプチド結合する(ユビキチン化) [107, 108]。

ユビキチン化は、3つの酵素、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、ユビキチンリガーゼ(E3)による一連の反応により起こる [109]。E1は、ATP依存的に自身の活性中心のシステイン残基とユビキチンC末端のGly76のカルボキシル基との間にチオエステル結合を形成する。E1により活性化されたユビキチンは、E2の活性中心のシステイン残基に転移し、E1と同様にチオエステル結合を形成する。ユビキチンと結合したE2はE3の活性中心と結合し、ユビキチンはE3と結合している標的タンパク質のリジン残基と結合する。さらに、ユビキチンのリジン残基に別のユビキチンが結合し、ポリユビキチン鎖が形成される。ポリユビキチン化された標的タンパク質は、巨大なタンパク質分解酵素複合体である26Sプロテアソームに認識され、分解を受ける (Fig. 1-6)。

ヒトでは、E1は2種類、E2は40種類程度であるのに対し、E3は600種類以上存在すると言われている [110]。このようなE3の多様性は、状況に応じて多数存在する標的タンパク質を選択的に識別するのに重要であると考えられる。

オートファジー・リソソーム系

オートファジーとは、自己の細胞質成分をオートファゴソームと呼ばれる分解コンパートメントに取り込んで分解する機構である [111]。細胞がアミノ酸飢餓や異常タンパク質の蓄積などのストレスに晒されると、細胞質に隔離膜と呼ばれるカップ状の脂質膜構造が生じる。これが細胞質成分やオルガネラを取り囲みながら進展していくことで、オートファゴソームを形成する。オートファゴソームはリソソームと膜融合しオートリソソームとなり、リソソームに含まれる加水分解酵素の作用により、取り込まれた内容物が分解される (Fig. 1-7)。オートファジーの基本的な生理機能として、飢餓時に細胞質の成分を非選択的かつ大量に分解しアミノ酸の供給を行うことや、障害・異常のあるオルガネラやタンパク質の蓄積時にそれらが無作為に分解し除去することが挙げられる。つまり、選択的な分解を行うユビキチン・プロテアソーム系に対し、オートファジー・リソソーム系は非特異的かつ大規模な分解を行うと考えられている。

ただし、近年では、オートファジー・リソソーム系がポリユビキチン化タンパク質の選択的な分解も担うことが明らかになってきている [112]。

Xanthohumol, Isoxanthohumol

Xanthohumol

Xanthohumol (キサントフモール) は、ホップに最も多く含まれるプレニル化フラボノイドである。ビールの醸造や生体内における代謝の過程で、酵素非依存的に Isoxanthohumol へ、さらに酵素依存的に 8-Prenylnaringenin や Desmethyl Xanthohumol へ変換される [113]。Xanthohumol には抗酸化作用 [114]、抗炎症作用 [115]、抗菌作用 [116]、抗がん作用 [117]、免疫系調節作用 [118] など多様な生理活性が認められている。

脂質代謝に関する報告例も存在しており、肝細胞において Xanthohumol は DGAT1 (Diacylglycerol acyltransferase 1) の活性低下を介したトリグリセリドの合成抑制、MTP (Microsomal triglyceride transfer protein) の活性低下を介したリポタンパク質の形成抑制により、トリグリセリドの分泌を減少させる [119]。また、転写因子 PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ), C/EBP α (CCAAT/enhancer-binding protein α) の発現低下に伴い、脂肪細胞の分化を抑制する [120]。

Xanthohumol の効果は動物個体レベルでも検証されている。II 型糖尿病マウスに Xanthohumol を摂食させることにより、血糖値、血中・肝臓中トリグリセリド量の低下や脂肪酸代謝の改善が見られること [121]、肥満ラットへの経口投与により体重、血糖値が低下することが報告されている [122]。また、Xanthohumol-rich hop extract を混合した高脂肪食を摂食させたラットでは、肝臓における SREBP-1c mRNA 量や脂肪酸合成に関与する酵素活性の低下を伴い、血中・肝臓中トリグリセリド量、体重の減少が観察されている [123]。

Isoxanthohumol

Isoxanthohumol (イソキサントフモール) は、ホップ由来のプレニル化フラボノイドである。元々ホップには微量しか含まれていないが、ビールの醸造過程で

ホップ中の Xanthohumol から生成されることが知られており、ビールにはプレニル化フラボノイドの中でも最も多く含まれている [124]。

Isoxanthohumol には抗がん作用が知られている。例えば、乳がん、大腸がん、卵巣がんの細胞増殖を抑制すること [125]、特定のシトクロム P450 の活性低下を介して発がん物質の生成を抑制すること [126] が報告されている。また、抗炎症作用も知られており、Isoxanthohumol は Jak/Stat シグナルの阻害を介して炎症性遺伝子の誘導を抑制することが示されている [127]。がんや炎症に対する効果として、Xanthohumol についても同様の作用が報告されているが、Xanthohumol の方がより強い効力を持つと言われている。

また、脂肪細胞において、DGAT1 の発現およびトリグリセリド蓄積を抑制する [120]。

Allyl Isothiocyanate およびその類縁体

Allyl Isothiocyanate

Allyl Isothiocyanate (アリルイソチオシアネート) は、ワサビやカラシなどのアブラナ科植物に含まれる辛み成分として知られている。植物中にはグルコシノレート的一种 Sinigrin として存在するが、すりおろしや咀嚼により植物組織が破壊されミロシナーゼに触れることで、または腸内細菌が持つミロシナーゼ活性により、Allyl Isothiocyanate に変換される [128]。Allyl Isothiocyanate は生体内でグルタチオン抱合体となり、腎臓にてメルカプツール酸へと代謝された後、尿中に排出される [129]。

Allyl Isothiocyanate の機能として抗がん作用がよく知られており、前立腺がん [130]、結腸がん [131] の細胞増殖抑制、前立腺がん細胞のアポトーシスの誘導 [130, 132]、肝がん細胞の転移抑制 [133] などが報告されている。さらに、ラットに Allyl Isothiocyanate あるいは Sinigrin を摂食させることにより、大腸がん [134]、肝がん [135] の腫瘍形成抑制が観察されている。また、Allyl Isothiocyanate は Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2) の活性化を介して抗酸化タンパク質や第 II 相解毒酵素の発現を誘導し [136, 137]、これにより酸化や発がん物質から生体を防御する効果を持つ [138]。

これまでになされた脂質代謝に関連する報告例は少ないが、ラットへの経口投与により体重、血糖値の低下 [139] が確認されている。また、マウスに Allyl Isothiocyanate を摂食させると、高脂肪食負荷によるミトコンドリアの機能障害を抑えることで肥満やインスリン抵抗性を改善することが報告されている [140]。

Sulforaphane, Sulforaphene

Sulforaphane (スルフォラファン), Sulforaphene (スルフォラフェン) は、それぞれブロッコリー、ハツカダイコン由来のイソチオシアネートである [141, 142]。これら 2 種類の化合物は Allyl Isothiocyanate と同様に、グルコシノレートである Glucoraphanin, Glucoraphenin がミロシナーゼにより加水分解されることで生じ、メルカプツール酸経路を介して代謝される。

Sulforaphane, Sulforaphene もまた Nrf2 を介して生体防御作用を高めることが知られている [142, 143]。特に Sulforaphane は、ラットに腹腔内投与することで、虚血再灌流による障害から肝臓 [144] や心臓 [145] を保護することが確認されている。また、抗がん作用も数多く報告されており、Sulforaphane は前立腺がん [146]、白血病 [147]、大腸がん [148]、膀胱がん [149]、乳がん [150]、卵巣がん [151]、膵臓がん [152]、メラノーマ [153]、髄芽腫 [154] の細胞増殖抑制やアポトーシス誘導に寄与する他、*in vivo* における腫瘍形成抑制効果も示されている [155]。一方、Sulforaphene も赤白血病、T リンパ球、子宮頸がん、大腸がんの細胞増殖を抑制する [156, 157]。その他にも、Sulforaphane は炎症性遺伝子の発現を抑制することが報告されており [158]、その生理活性は多岐に渡る。

さらに、Sulforaphane-rich broccoli sprout extract をハムスターに摂食させることにより、肝臓における SREBP および標的遺伝子の mRNA 発現低下、コレステロールの減少が観察されている [159]。また、マウスに Sulforaphane を混合した高脂肪食を摂食させると、精巣上体周囲白色脂肪組織において AMPK (AMP-activated protein kinase) のリン酸化亢進と PPAR γ , C/EBP α の発現低下による脂質合成、脂肪細胞分化の抑制を伴い、抗肥満効果が認められる [160]。

本研究の目的

近年、メタボリックシンドローム罹患者数、およびそれに起因する動脈硬化性疾患による死者数は増加の一途を辿っている。食の欧米化や高齢化の進行に伴い、これらの疾患の罹患者数は今後もますます増加することが懸念される。また、肥満症を頂点とした生活習慣病は、一度発症すると完治は非常に困難であると言われている。したがって、その対策として、医薬品に頼った受動的な治療だけでなく、自発的な食生活の改善、すなわち食品が保有する機能の有効活用による予防が重要だと考えられる。

生活習慣病の発症基盤は、主に脂質代謝制御の破綻である。**SREBP** は脂肪酸・コレステロール合成系酵素の遺伝子発現を誘導することにより脂質合成を促進する転写因子であり、近年、生活習慣病における重要性が唱えられている。例えば、II型糖尿病マウスの肝臓では**SREBP-1c**の発現、プロセッシングが亢進していることが確認されている。また、**SREBP**の活性を抑制することにより、食餌性肥満マウス、II型糖尿病マウスの体重増加や脂肪肝が抑制されることが報告されている。したがって、**SREBP**は生活習慣病改善のターゲットとして有効であると考えられる。

SREBPの活性制御機構については未だ不明な点が多く、近年、**SREBP**の活性が食品成分により制御されることが示されているものの、詳細な分子メカニズムの解明に至った例はほとんど存在しない。本研究では、**SREBP**の活性を低下させる食品成分を新たに見出し、その効果を検証するとともに、分子レベルでの詳細な作用機構を解明することを目的とした。

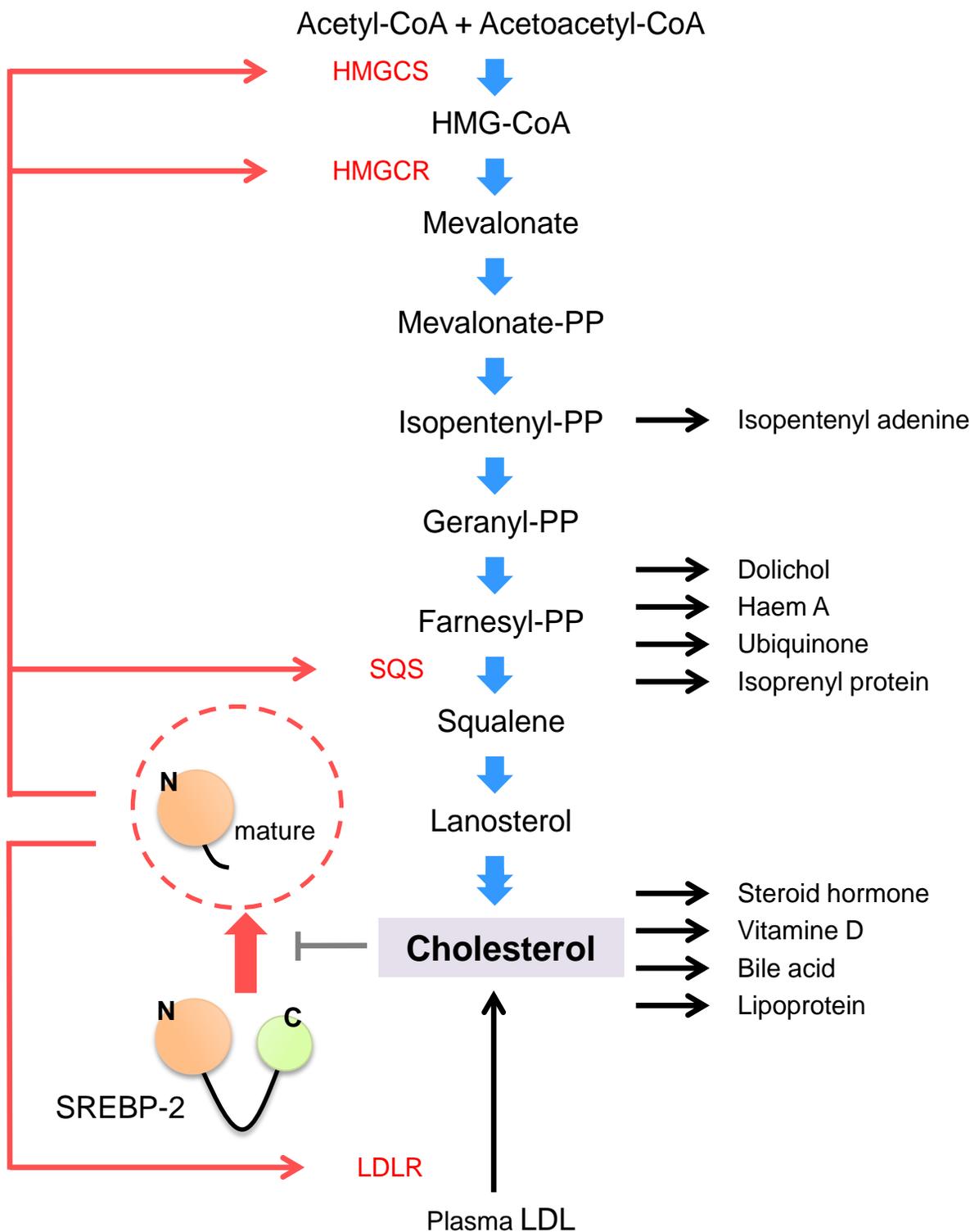


Fig. 1-1. コレステロール合成制御におけるSREBP

SREBP-2はコレステロール合成、取り込みに関与する特定の遺伝子を転写活性化する。また、合成されたコレステロールによるフィードバック調節機構が存在する。

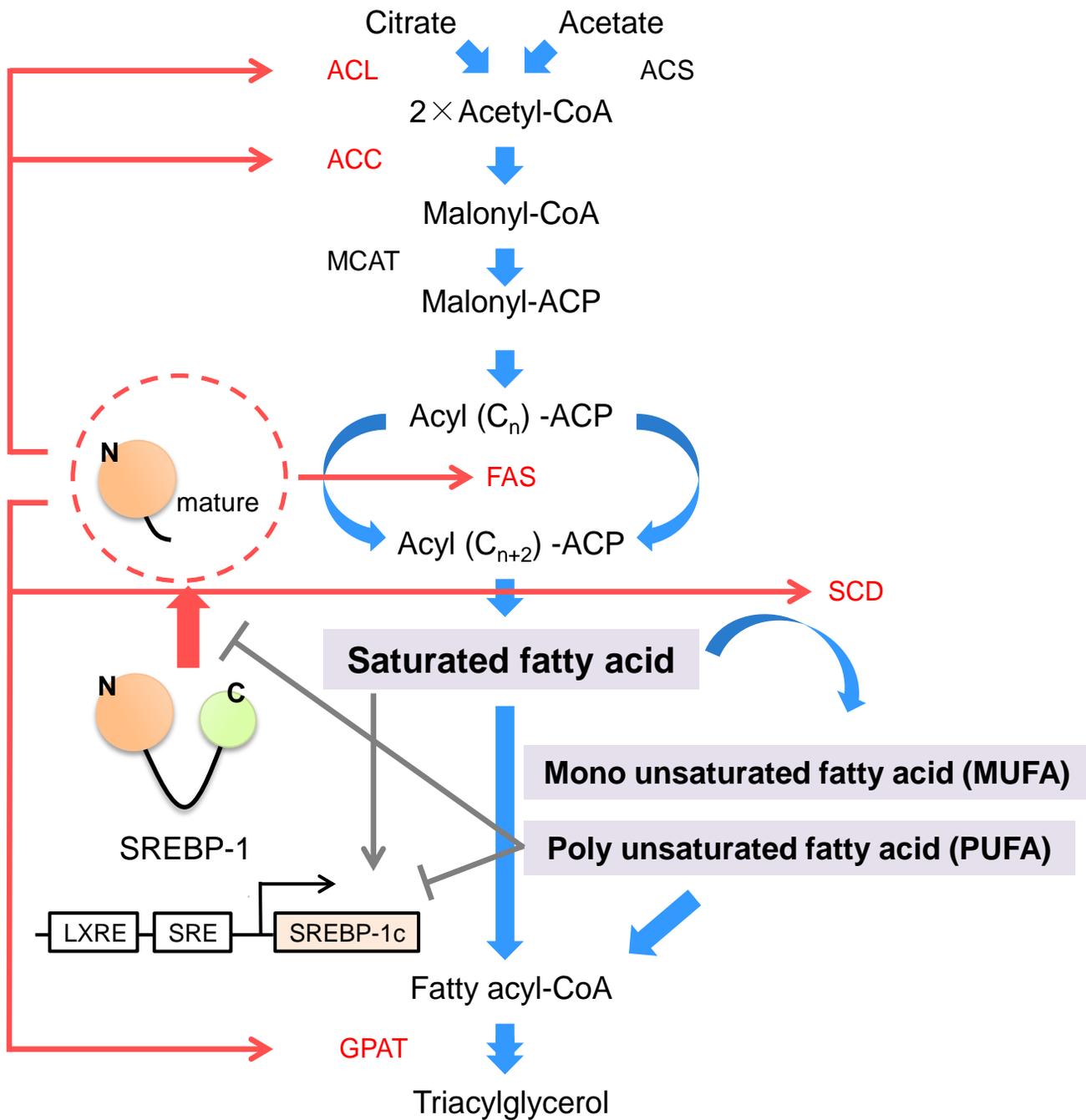


Fig. 1-2. 脂肪酸合成制御におけるSREBP

SREBP-1は脂肪酸合成系の特定の酵素遺伝子を転写活性化する。また、合成された脂肪酸によるフィードバック調節機構が存在する。

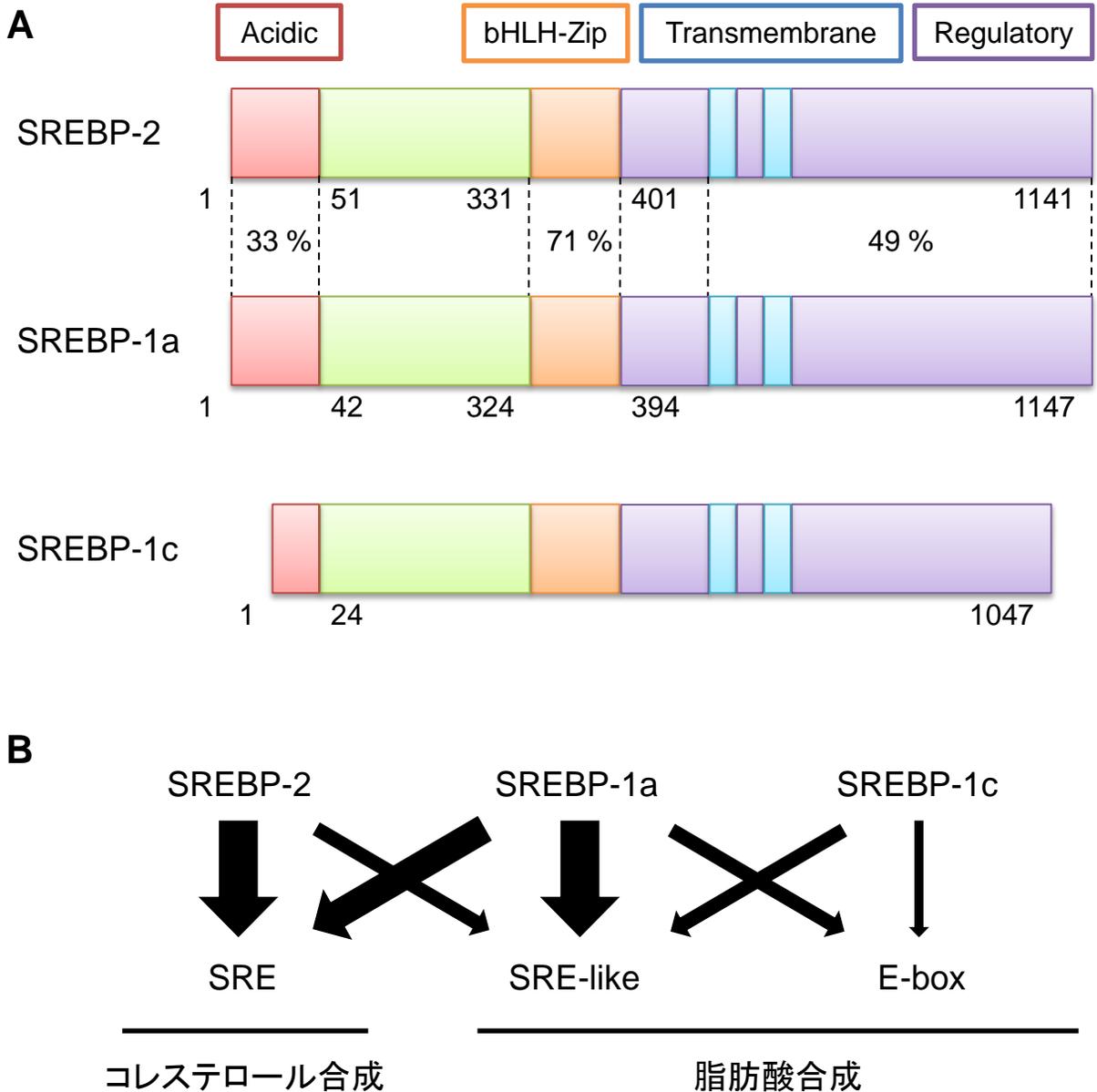


Fig. 1-3. SREBPアイソフォーム

(A) SREBPアイソフォームの構造

SREBP-1と-2は互いに47%のアミノ酸相同性がある。SREBP-1cはN末端の転写活性化領域が短く、-1aよりも転写活性が低い。

(B) SREBPアイソフォームの結合配列

SREBP-2はSRE配列に結合しコレステロール合成に関わる遺伝子群の転写に、-1cはSRE-like配列とE-box配列に結合し脂肪酸合成に関わる遺伝子群の転写に、-1aは両方に関与する。

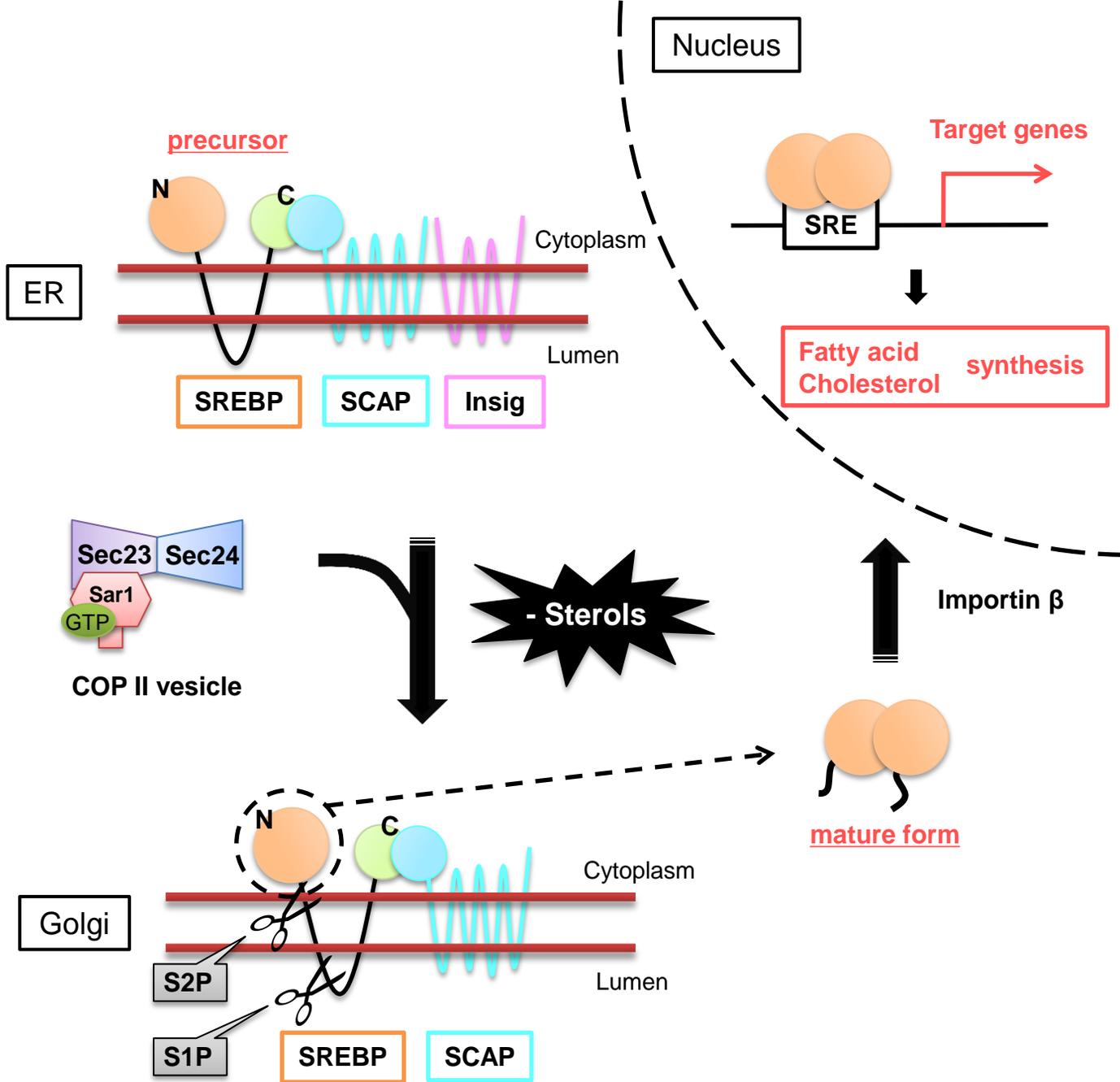


Fig. 1-4. SREBPのプロセッシング機構

細胞内ステロール濃度が高いときは、前駆体SREBPはSCAP, Insigと三者複合体を形成しており、小胞体膜上に留まっている。細胞内ステロール濃度が低下すると、SCAP/SREBP複合体はInsigから解離し、COPII小胞に結合する。SREBPはゴルジ体へ輸送され、プロテアーゼによる二段階の切断を受け、N末端側が活性型として切り出される。活性型SREBPはホモダイマーを形成し核内へ移行して、標的遺伝子の転写を活性化する。

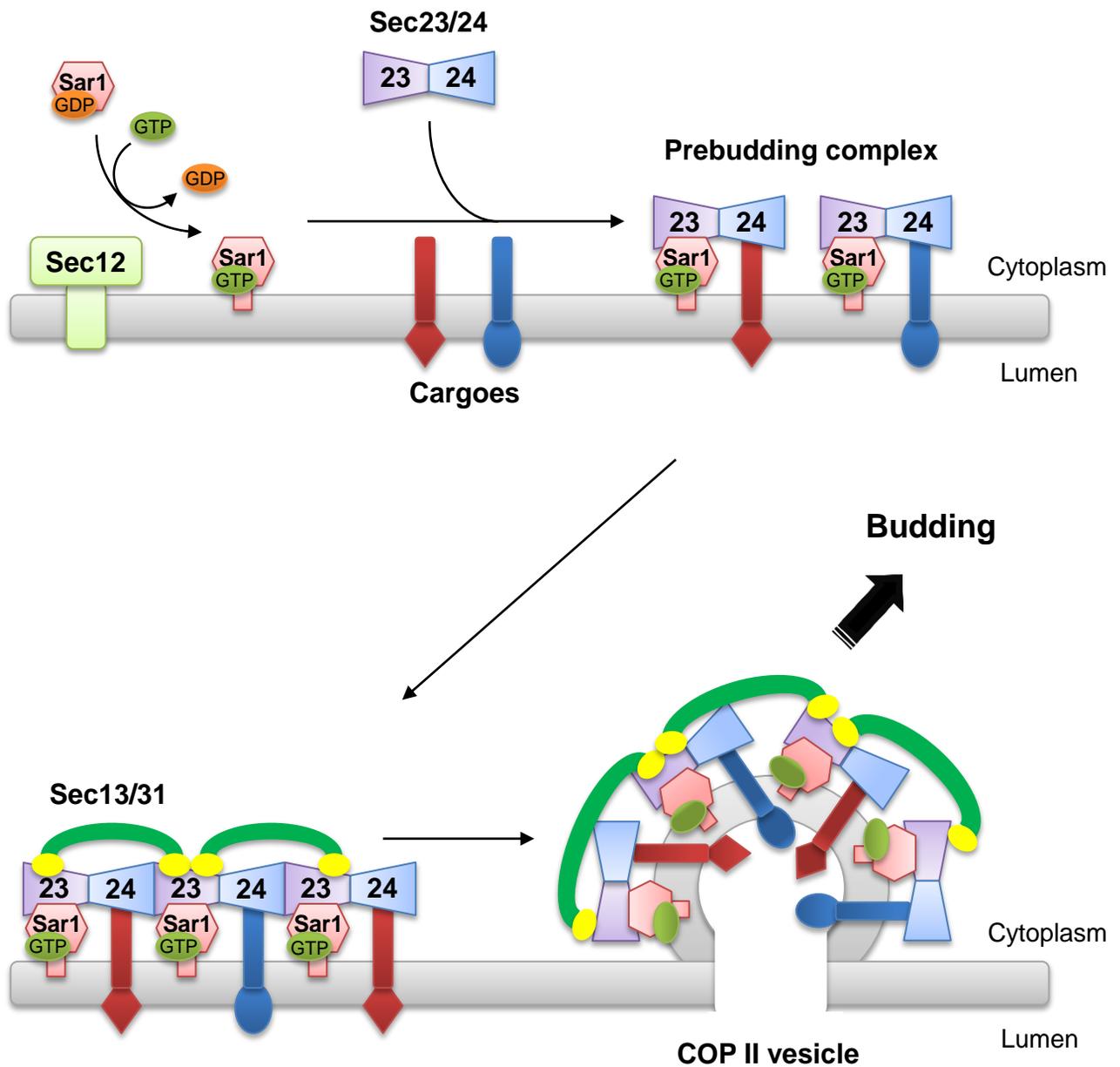


Fig. 1-5. COP II小胞の形成

Sar1はSec12によりGDP結合型からGTP結合型に変換されると、構造変化を起こし小胞体膜に結合する。膜に結合したGTP結合型Sar1がSec23/24複合体とSec23を介して結合すると同時に、Sec24は積み荷タンパク質と結合し、出芽前駆複合体 (Prebudding complex) が形成される。出芽前駆複合体同士をSec13/31複合体が架橋していくことにより、COP II複合体が形成され、小胞体膜から出芽 (Budding) する。

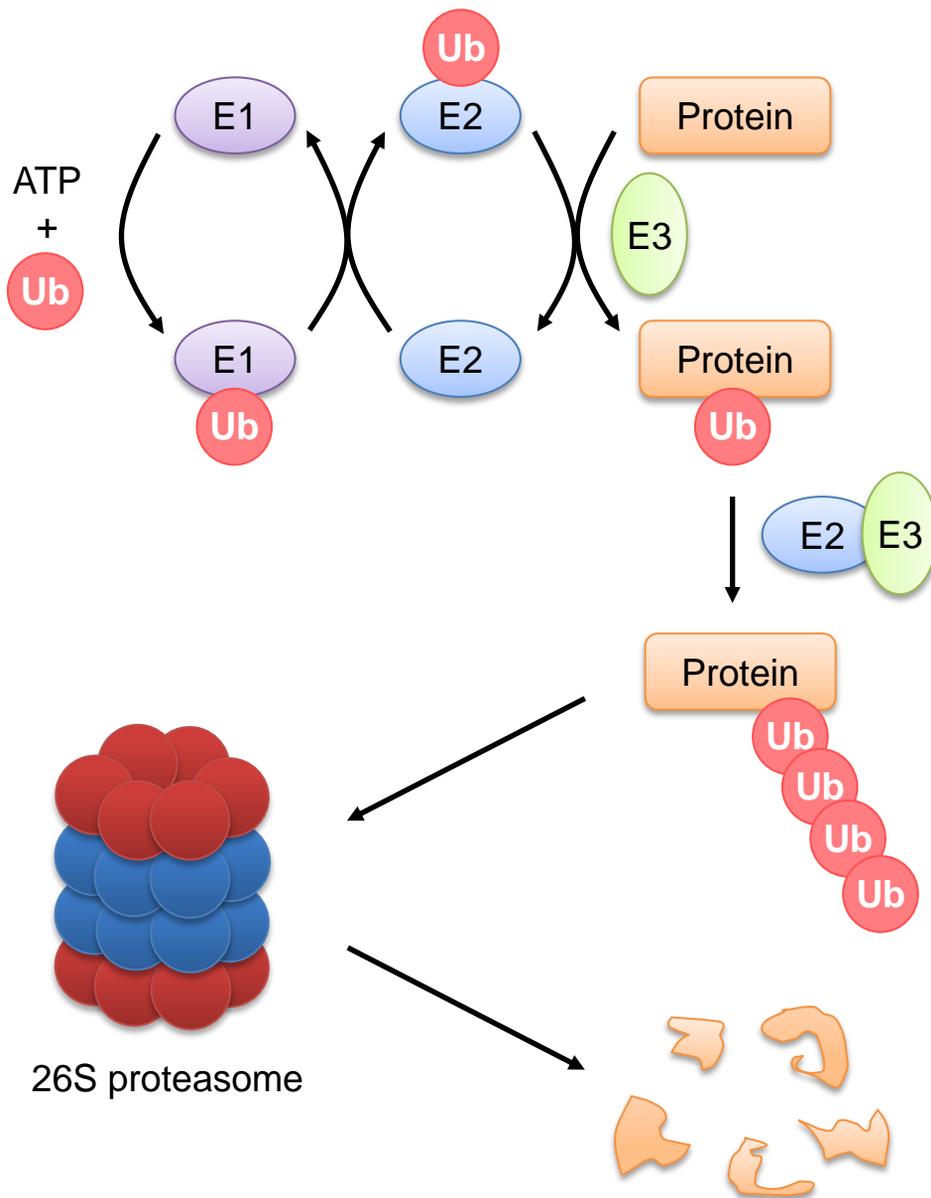


Fig. 1-6. ユビキチン・プロテアソーム系によるタンパク質分解

E1はATPのエネルギーを利用して、自身の活性中心とユビキチンを結合する。ユビキチンは、E1からE2の活性中心に渡された後、E3依存的に標的タンパク質に結合する。その後、ユビキチンがポリマー化すると、26Sプロテアソームに認識され、分解を受ける。

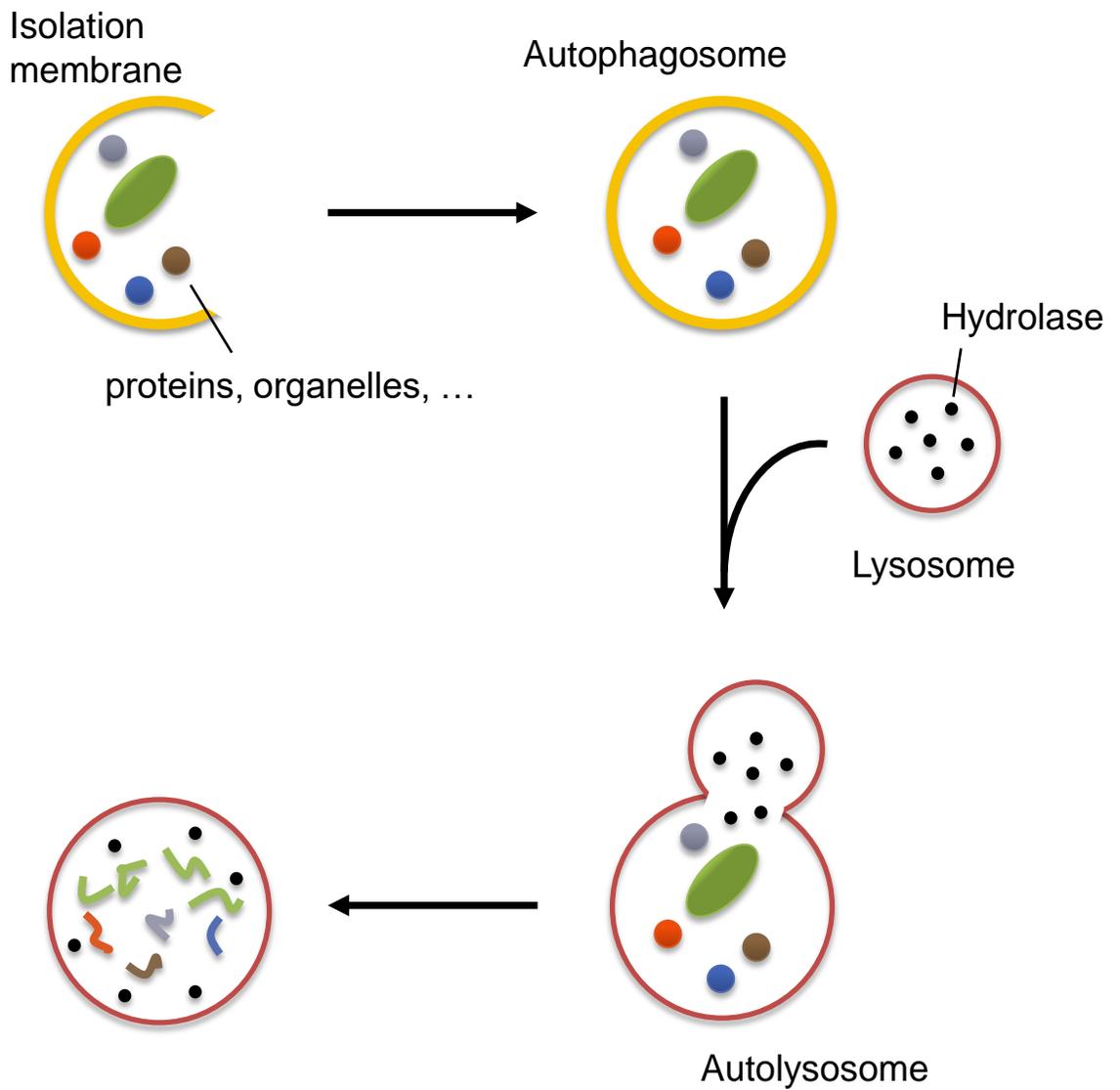


Fig. 1-7. オートファジー・リソソーム系によるタンパク質分解

細胞質内に生じた隔離膜は、細胞内のタンパク質やオルガネラを取り込みながら伸展し、オートファゴソームを形成する。そこにリソソームが膜融合することによりオートリソソームとなり、リソソームに含まれる加水分解酵素が取り込んだ内容物を分解する。

第 2 章

SREBP 活性を抑制する食品成分の探索

2-1. 緒言

SREBP は脂肪酸・コレステロール合成系の酵素遺伝子の発現を誘導する転写因子であり、生体内における脂質恒常性維持に重要な役割を担っている。これまでに行われてきた研究から、肥満や II 型糖尿病における SREBP の重要性や、SREBP が生活習慣病改善のターゲットとして有効であることが示唆されている。そこで、本章では SREBP の活性を抑制する食品成分の選抜を目的とし、スクリーニング系の構築、およびその実験系を用いてスクリーニングを行った。さらに、見出した化合物が脂質合成に及ぼす効果を検討した。

2-2. 実験材料および手法

実験材料の調製

<試薬>

Blastcidin S HCl

Invitrogen より購入し、滅菌水に溶解して 10 mg/mL の溶液としたものをフィルター滅菌し、-20°C に保存した。

25-Hydroxycholesterol (25-HC)

SIGMA より購入し、エタノールに溶解して 1 mg/mL のストック溶液として -20°C に保存した。

食品由来化合物

Isoxanthohumol はキリンビール株式会社より提供して頂き、DMSO に溶解して 100 mM のストック溶液として -20°C に保存した。4'-Hydroxyflavanone はフナコシより、Allyl Isothiocyanate は Wako よりそれぞれ購入し、DMSO に溶解して 100 mM のストック溶液として -20°C に保存した。

その他、特に指定のない試薬に関しては、Wako、ナカライテスク、SIGMA の特級、生化学実験用のものを用いた。

<細胞培養>

PBS (Phosphate-buffered saline) 溶液

NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9 g, KH₂PO₄ 0.2 g を 1 L の milliQ 水に溶解し、オートクレーブ滅菌した。

ウシ胎児血清 (FBS: Fetal bovine serum)

-20°Cで凍結保存した FBS (JRH bioscience) を溶解した後、56°Cで 30 分間インキュベートし、補体成分の非働化を行った。その後、分注して-20°Cで保存した。

リポタンパク質欠乏血清 (LPDS: Lipoprotein deficient serum)

-20°Cで凍結保存した LPDS (SIGMA) を溶解した後、56°Cで 30 分間インキュベートし、補体成分の非働化を行った。その後、分注して-20°Cで保存した。

ペニシリン-ストレプトマイシン (P/St) 溶液

ペニシリン G カリウム粉末 (明治) 100 万単位、硫酸ストレプトマイシン粉末 (明治) 1 g を 10 mL の PBS に溶解し、分注して-20°Cに溶解した。

トリプシン-EDTA 溶液

トリプシン粉末 (Difco) を 0.5% (w/v) になるように 0.02% EDTA (Wako) を含む PBS 溶液に溶解し、フィルター滅菌したものを分注して-20°Cで保存した。使用時には、PBS 溶液で 10 倍希釈して使用した。

Huh-7 細胞

ヒト肝がん由来 Huh-7 細胞は、10% FBS, 0.1% P/St 溶液を含む DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (High glucose) (Wako) を用い、37°C, 5% CO₂ 下で培養した。

細胞の継代

100 mm dish で培養した細胞を PBS で洗浄した後、トリプシン-EDTA 溶液を 1 mL 加え、37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で 5 分間インキュベートした。顕微鏡観察により細胞が剥がれたのを確認した後、通常培養に用いる基本培地 2 mL

を加えてトリプシンを失活させ、50 mL チューブに回収した。1,000 rpm で5分間遠心後、上清を除去し、5 mL の培地を加え、ピペッティングにより懸濁した。ヘモサイトメーターを用いて細胞数を計測し、必要な細胞数を含む一部の懸濁液を新たな dish に播いた。

<プラスミド>

pGL4. 10 [luc2]

Promega より購入した。

pGL4-FAS

当研究室 OG・島田聡子修士が作製したものをを用いた。pGL4. 10 [luc2] のルシフェラーゼ遺伝子上流にヒト FAS 遺伝子 (-987~+121) (開始メチオニンの A を+1 とする) が挿入されている。

pMAM2-BSD

科研製薬株式会社より購入した。SV40 プロモーターの下流に Blastcidin S deaminase (BSD) 遺伝子が挿入されている。

pGL4-ACC1

human genomic DNA (Clontech) を鋳型として、5'末端側に *Bgl* II の制限酵素サイト、3'末端側に *Hind* III の制限酵素サイトを付加したプライマーおよび KOD-Plus-Neo (TOYOBO) を用いて、PCR 反応によりヒト ACC1 のプロモーター領域 (-460~+121) を増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製を行い、*Bgl* II/*Hind* III 処理後、pGL4. 10 [luc2] のルシフェラーゼ遺伝子上流 *Bgl* II/*Hind* III サイトに挿入した。以下にプライマーの配列を示す。

Forward: 5'-ATATAGATCTGTCCCTGATGCGAGGCG-3'

Reverse: 5'-ATATAAGCTTCACCTCAGGGTGGCAACGTG-3'

pGL4-SCD1

human genomic DNA (Clontech) を鋳型として、5'末端側に *Bgl* II の制限酵素サイト、3'末端側に *Hind* III の制限酵素サイトを付加したプライマーおよび

KOD-Plus-Neo (TOYOBO) を用いて、PCR 反応によりヒト SCD1 のプロモーター領域 (-483~+139) を増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製を行い、*Bgl* II/*Hind* III 処理後、pGL4. 10 [luc2] のルシフェラーゼ遺伝子上流 *Bgl* II/*Hind* III サイトに挿入した。以下にプライマーの配列を示す。

Forward: 5'-ATATAGATCTTCCAGAGAGAAAGCTCCC-3'

Reverse: 5'-ATATAAGCTTGATGCCGGGATCACTTTCCA-3'

pCMV-β-gal

当研究室にて作製されたものを用いた。CMV プロモーターの下流に β-gal がコードされている。

PCR (Polymerase chain reaction)

PCR 反応は Invitrogen のカスタムプライマー合成サービスを利用して設計したプライマー、および KOD-Plus-Neo (TOYOBO) を用いて、以下に示した組成の反応溶液を調製して行った。

| | |
|-------------------------|--------------|
| 10×PCR buffer | 5 μL |
| 2 mM dNTP mix | 5 μL |
| 25 mM MgSO ₄ | 3 μL |
| 10 μM Forward primer | 1.5 μL |
| 10 μM Reverse primer | 1.5 μL |
| Template DNA | 10 pg~200 ng |
| KOD-Plus-Neo | 1 μL |
| 滅菌 milliQ 水 | up to 50 μL |

PCR 反応装置は、TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL (TakaRa) を使用した。反応条件は以下のように行った。

| | | |
|---------------|----------------|-------------|
| Pre-denature: | 94°C、2 min | |
| Denature: | 98°C、10 sec | } 45 cycles |
| Extension: | 68°C、30 sec/kb | |

アガロースゲル電気泳動

50×TAE

2 M Tris-HCl (pH 7.5)

2 M Acetic acid

50 mM EDTA

アガロースゲル

1×TAE

1% Agarose ME (nacalai tesque)

0.1% SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen)

マーカーは、1 kb DNA Ladder あるいは 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs) を用いた。泳動槽は、Mupid-2 (コスモバイオ) を使い、トランスイルミネーターは、Safe Imager™ 2.0 Blue-Light Transilluminator (Invitrogen) を用いた。

アガロースゲルからの DNA 断片回収

GENECLEAN® KIT (BIO101) を用いた。

切り取ったゲルをチューブに移し、ヨウ化ナトリウム溶液を加え、55°Cでゲルを溶解した。EZ-GLASSMILK®を加え、室温で 5 分静置後に遠心し、沈殿を Washing buffer (New WASH 1.4 mL、エタノール 28 mL、滅菌水 31 mL を混合したもの) 1 mL で 2 回洗浄した。滅菌水を加えて懸濁した後に遠心し、上清を回収して DNA 溶液とした。

制限酵素処理

制限酵素は、タカラバイオ、TOYOBO、New England BioLabs より購入した。添付された Buffer を使い、37°Cで 2 時間から一晩、反応を行った。

ライゲーション

Ligation high は、TOYOBO より購入した。説明書に従って反応液を調製し、16°Cで 3 時間以上反応を行った。

大腸菌用培養培地

LB 培地

LB Broth (SIGMA) を 1 L あたり、20 g となるように溶解し、オートクレーブ滅菌した。

アンピシリン、カナマイシンプレート

LB 培地に 1.5% となるように寒天粉を加え、オートクレーブ滅菌した。必要に応じて、各抗生物質を以下の量加え、100 mm plate に流し込み、固めた。

| 抗生物質 | 終濃度 |
|--------------|-----------|
| アンピシリン (Amp) | 100 µg/mL |
| カナマイシン (Kan) | 20 µg/mL |

コンピテントセルの作成

TFB1 (pH5.8)

30 mM CH₃COOK
100 mM RbCl₂
10 mM CaCl₂
50 mM MnCl₂
15% Glycerol

TFB2 (pH6.5)

10 mM MOPS
75 mM CaCl₂
10 mM RbCl₂

大腸菌 K-12 由来株である Tg1 株を OD₅₅₀ ≒ 0.7 になるまで 37°C で培養した。氷上に 15 分静置した後、4°C で遠心した。上清を除き、菌体に培養液の 1/10 量の TFB1 を加え、丁寧に懸濁した。氷上に 5 分間静置した後、再び 4°C で遠心した。上清を除き、菌体に培養液の 1/25 量の TFB2 を加え、丁寧に懸濁した。氷上に 15 分静置し、コンピテントセルを得た。コンピテントセルは -80°C に保存した。

トランスフォーメーション

コンピテントセル溶液 50 µL に DNA 溶液を加え、20 分間静置した後、42°C で 45 秒間ヒートショックを与え、氷上に 2 分間静置した。LB 培地を加え、37°C で 1 時間培養し、抗生物質を含む寒天培地にまいた。

ミニプレップ

リゾチーム溶液 (Solution 1)

10 mM EDTA (pH8.0)

25 mM Tris-HCl (pH.8.0)

アルカリ-SDS 溶液 (Solution 2)

1% SDS

0.2 M NaOH

酢酸ナトリウム緩衝溶液 (Solution 3)

3 M CH₃COONa (pH5.2)

TE (pH 8.0)

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

1 mM EDTA (pH 8.0)

フェノール-クロロホルム溶液

平衡化したフェノール溶液に等量のクロロホルムを加え、よく攪拌してから、水層を 1 cm 程度残し、褐色瓶中で冷暗所に保存した。

大腸菌のコロニーを 3 mL の抗生物質を含む LB 培地で半日振盪培養し、チューブに移して遠心し、菌体を回収した。回収したペレットに Solution 1 を 100 μ L 加え、懸濁した。次に Solution 2 を 200 μ L 加え、混合した。さらに Solution 3 を 150 μ L 加え、混合した。遠心後、上清を別のチューブに移し、同量のフェノール-クロロホルム溶液を加え、激しく攪拌し、15,000 rpm、4°C で遠心した。水層を回収し、100%エタノールを 1 mL 加え攪拌し、15,000 rpm、4°C で遠心した。上清を除去後、70%エタノール溶液を加え、15,000 rpm、4°C で遠心した。上清を除いた後、DNA 沈殿は室温で数分間風乾させた。滅菌水 30 μ L で溶解し、10 mg/mL RNase A を 1 μ L 加え、プラスミド DNA を得た。

ミディプレップ

Plasmid Midi kit (QIAGEN) を使用した。

大腸菌のコロニーを 100 mL の抗生物質を含む LB 培地に懸濁し、37°C で一晩振盪培養し、チューブに移して遠心し、菌体を回収した。回収したペレットに、Buffer P1 (+RNase) を 4 mL 加え、懸濁した。次に Buffer P2 を 4 mL 加えた後に、

Buffer P3 を 4 mL 加えて混合し、氷上で 15 分間インキュベートした。遠心し、上清をろ過した後、Buffer QBT を 4 mL 加えて平衡化した QIAGEN-tip 100 に吸着させた。Buffer QC を 10 mL 加えてカラムを 2 回洗浄し、Buffer QF 5 mL で溶出した。溶出液に約 0.7 倍量の 2-プロパノールを加えて攪拌し、15,000 rpm、4°C で 30 分間遠心した。上清を除き、70% エタノールを 1 mL 加え、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心した。上清を除いた後、DNA 沈殿は室温で数分間風乾させ、滅菌水で溶解した。

シーケンス解析

シーケンス解析は、マクロジェンジャパンに委託した。Plasmid Midi kit (QIAGEN) で精製し、100 ng/μL に調整したプラスミド、および目的の配列を読み取るように設計した 5 μM のプライマーを送付した。

細胞への遺伝子発現ベクターの導入 (リポフェクション法)

遺伝子導入の前日に、細胞を 80~90% コンフルエントとなるように、60 mm dish に播種した。

| (A) | | (B) | |
|-----------------------|--------|----------------------------------|--------|
| Plasmid DNA (1 μg/μL) | x μL | Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) | 2.7 μL |
| Opti-MEM (GIBCO) | 135 μL | Opti-MEM | 135 μL |

(A) (B) を混合して、室温で 20 分間インキュベートした。あらかじめ、1.2 mL の Opti-MEM に培地交換した細胞に (A) (B) 混合溶液 270 μL を添加し、4~6 時間後に基本培地に交換した。

FAS 安定発現 Huh-7 細胞株 (Huh-7/FAS) の作製

リポフェクション法により、Huh-7 細胞に pGL4-FAS 7.62 μg、pMAM2-BSD 0.38 μg を導入し、翌日に 100 mm dish に継代した。さらにその翌日に 8 μg/mL の Blastcidin S HCl を含む培地に交換し、3 日に 1 回の割合で培地交換しながら、2 週間程度培養を続けた。適当な大きさのコロニーを、ペニシリンキャップの中でトリプシン処理し、96 well plate に播いた。徐々にスケールアップしていき、細胞の量が十分となったところで、一部を残して凍結保存した。

ステロール枯渇処理

(Fig. 2-3~2-9) 培養した細胞を PBS で洗浄した後、10% FBS, 0.1% P/St 溶液、50 μ M Sodium Mevalonate, 12.5 μ M Fluvastatin (HMGCR inhibitor) を含む DMEM (High glucose) で培地交換した。

(Fig. 2-3~2-9 以外) 培養した細胞を PBS で洗浄した後、5% LPDS, 0.1% P/St 溶液、50 μ M Sodium Mevalonate, 12.5 μ M Fluvastatin を含む DMEM (High glucose) で培地交換した。

細胞への遺伝子発現ベクターの導入 (リン酸カルシウム法)

2×HBSS

0.28 M NaCl

10 mM KCl

1.38 mM NaH₂PO₄

11.1 mM Glucose

42 mM HEPES

以上を NaOH にて pH 7.05 に調整した。

遺伝子導入の前日に、細胞を 50~70% コンフルエントとなるように、12 well plate に播種した。以下の表に従って DNA 溶液を調製しよく混合した後、同量の 2×HBSS を 1 滴ずつ滴下した。20 回のバブリングを行い、20 分間室温でインキュベートした後、細胞に滴下した。トランスフェクションから 4 時間後に培地交換を行った。

DNA 溶液

| Components | Volume (μ L) |
|-------------------------------|-------------------|
| Plasmid DNA (100 ng/ μ L) | x |
| 2.5 M CaCl ₂ | 5 |
| 滅菌水 | up to 50 |
| Total | 50 |

ルシフェラーゼアッセイ

1×Luciferase Lysis Buffer

25 mM Tris-phosphate (pH 7.8)

2 mM DTT

2 mM CDTA (*trans*-1,2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid)

10% Glycerol

1% Triton X-100

Luciferase substrate reagent

20 mM Tricine

1.07 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

2.67 mM MgSO_4

0.1 mM EDTA

0.53 mM ATP

33.3 mM DTT

0.27 mM Coenzyme A

0.47 mM Luciferin (nacalai tesque)

アシストチューブ (SARSTEDT) 中で Luciferase substrate reagent 50 μL に cell lysate 10 μL を加え、ホタルルシフェラーゼ活性を mini Lumat LB9506 (Berthold) により 10 秒間測定した。

β -galactosidase (β -gal) アッセイ

0.1 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.5)

0.2 M Na_2HPO_4 : 0.2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 = 41 : 9$ で混合した。(混合するだけで pH 7.5 になる)

100×Mg Solution

1 M MgCl_2 20 μL 、2-Mercaptoethanol 63 μL 、滅菌水 117 μL を混合した。

1×ONPG (*o*-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside)

0.1 M リン酸ナトリウムバッファーで 4 mg/mL に調製した。

氷冷した 96 well-plate 上で、β-gal substrate reagent 90 μL (100×Mg solution 1 μL、1×ONPG 22 μL、0.1 M リン酸ナトリウムバッファー 67 μL) に、cell lysate を 10 μL 混合し、37°C でインキュベートした。肉眼で黄色に発色したことが確認できたところで、405 nm (reference: 570 nm) の吸光度を測定した。測定には Microplate Reader Model 680 (BIO RAD) を用いた。

mRNA の定量

<細胞からの RNA 抽出>

6 well plate で培養した細胞を PBS 1 mL で洗浄し、ISOGEN (株式会社日本ジーン) を 500 μL ずつ well に加えた。室温で 5 分間振とうした後、それぞれを 1.5 mL チューブに回収した。次に 100 μL のクロロホルムを加え、15 秒間ボルテックスした。そのまま室温で 2~3 分間インキュベートした後、4°C、12,000×g で 15 分間遠心分離した。上清 200 μL を新たな 1.5 mL チューブに回収し、160 μL のイソプロパノールを加え、十分に攪拌した。5~10 分間、室温でインキュベートした後、4°C、12,000×g で 10 分間遠心分離した。上清をピペットできれいに取り除き、沈殿を 600 μL の 70% エタノールで洗浄した。その後 4°C、7,500×g で 5 分間遠心分離し、70% エタノールを除去した。70% エタノールによる洗浄は 2 回行った。70% エタノールをピペットによりきれいに取り除いた後、室温で 5 分間乾燥させ、30 μL の RNase-free water を加えた。ここで得られた RNA 溶液は分光光度計 (NANO DROP 1000) により濃度を測定した後、DNase 処理を行った。すなわち、RNA 溶液から 2 μg の RNA を 0.2 mL チューブに移し、RNase-free water で 8 μL にメスアップし、続いてそこに 1/30 DNase I 溶液 (Roche) を 2 μL 加えた。この溶液を 37°C で 30 分間インキュベートし、最後に 75°C で 10 分間処理をすることで、DNase を不活性化した。ここで得られた 10 μL の溶液を RNA サンプルとし、逆転写反応に用いた。

<逆転写反応 (Reverse transcription, RT)>

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems) を用いて RT を行った。以下にその詳細を示す。

逆転写反応液

| | |
|----------------------|--------|
| 10×RT Buffer | 2.0 μL |
| 25×dNTP Mix (100 mM) | 0.8 μL |
| 10×RT Random Primers | 2.0 μL |
| RTase (200 U/μL) | 0.5 μL |
| RNase-free water | 4.7 μL |
| RNA サンプル (DNased) | 10 μL |

上記の試薬を 0.2 mL チューブでピペッティングにより混合し、25°C で 10 分間、37°C で 120 分間逆転写反応を行い、85°C で 5 秒間処理して逆転写酵素を不活化した。

<Real-time PCR>

モニタリング試薬として、Taq[®]Man probe (Applied Biosystems) と SYBR Green (Roche) を使い、各遺伝子の mRNA 発現量を定量した。反応液の組成は以下の通りである。

Taq[®]Man probe

| | |
|---|--------|
| Taq [®] Man Universal PCR Master Mix, NO Amp Erase UNG (2X) ² | 5 μL |
| 20×Assay on Demand [™] Gene Expression Assay Mix | 0.5 μL |
| 滅菌水 | 2.5 μL |
| Template cDNA | 2 μL |

SYBR Green

| | |
|---------------------------------|--------|
| Power SYBR Green PCR Master Mix | 5 μL |
| 10 μM Forward Primer | 0.4 μL |
| 10 μM Reverse Primer | 0.4 μL |
| 滅菌水 | 2.6 μL |
| Template cDNA | 2 μL |

MicroAmp™ Optical 96-well Reaction Plate (Applied Biosystems) 中で上記の反応液を混合し、スピンドダウン後、Step One Plus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) を用いて反応、及び定量を行った。それぞれの遺伝子の mRNA 量は、GAPDH mRNA 量で除する事で補正した。また、1 回の試行につき 3 連のサンプルを用い、平均値と標準偏差を算出した。

以下に使用した Gene Expression Assay、Primer の情報を記す。

TaqMan Gene Expression Assays

| | |
|--------|---------------|
| hGAPDH | Hs00266705_g1 |
| hFAS | Hs00188012_m1 |
| hSCD1 | Hs00748952_s1 |

Primer

| | |
|----------|----------------------------|
| hACC1-F | TGGGCCTCAAGAGGATTTGT |
| hACC1-R | TCCACTGTTGGCTGATACATAGATG |
| hHMGCS-F | GACTTGTGCATTCAAACATAGCAA |
| hHMGCS-R | GCTGTAGCAGGGAGTCTTGGTACT |
| hHMGCR-F | CTTGTGTGTCCTTGGTATTAGAGCTT |
| hHMGCR-R | GCTGAGCTGCCAAATTGGA |
| hSQS-F | CGCCAGGATGGAGTTCGT |
| hSQS-R | GAAGCGCACCAGGTTGTAGAA |
| hLDLR-F | CAGAGGCAGAGCCTGAGTCA |
| hLDLR-R | CGGGTGTCTCAGGCACTTAA |
| hACSL3-F | CCCCTGAAACTGGTCTGGTG |
| hACSL3-R | TCCGCCTGGTAATGTGTTTAA |

脂質の新規合成量の定量

LPDS 培地

DMEM (High glucose)

5% LPDS

0.1% P/St

以下に 12 well-plate で行った場合について記す。

[1-¹⁴C] Acetic acid (Perkin elmer) を 60 kBq/well 含む培地で細胞を 6 時間培養し、PBS 500 μ L で洗浄した後、さらに PBS 500 μ L を加え、細胞をスクレイパーでかきとって 1.5 mL チューブに回収した。室温、5,000 \times g で 5 分間遠心し、上清を除去した。ねじ口試験管に 10 N KOH 400 μ L を入れ、滅菌水 100 μ L に再懸濁した細胞を加え、混合した。さらにエタノール 500 μ L を加えてよく攪拌した後、蓋をして、ヒートブロック (As One) を用いて 100 $^{\circ}$ C で 2 時間加熱することで鹼化を行った。

完全に室温まで冷えてから石油エーテル 1 mL を加え、ボルテックス後、室温、1,000 rpm で 3 分遠心し、上清をとって新しいガラス試験管に移した。この抽出操作を 2 回繰り返す、得られたサンプルをコレステロール画分とした。

残った水層に 12 N HCl 500 μ L を加え、脂肪酸の塩を遊離させた。完全に冷えたことを確認してから石油エーテル 1.5 mL を加え、ボルテックス後、室温、1,000 rpm で 3 分遠心し、上清をとって新しいガラス試験管に移した。この抽出操作を 2 回繰り返す、得られたサンプルを脂肪酸画分とした。

各画分をヒートブロックで 80 $^{\circ}$ C に加熱することで乾固させ、クロロホルム:メタノール (2: 1) 液 120 μ L を加えて懸濁した。各サンプルを、パスツールを用いて TLC (Thin-Layer Chromatography) plate にスポットし、展開槽に入れて展開し、乾燥させた後にラップで包んでイメージングプレートにセットした。約 12 時間後、FLA3000 (Fuji film) を用いて検出を行った。

統計解析

データは平均値 \pm 標準誤差で示した。二群間の比較は Student's *t* test 法を用いた。多重比較検定は Tukey-Kramer 法を用いた。有意水準は両側検定、 $p < 0.05$ を採用した。

※本章の結果はすべて修士論文より引用した。

2-3. 結果

SREBP 活性を抑制する食品成分のスクリーニング系の構築

SREBP の活性を低下させる食品成分を簡便に選抜することを目的とし、スクリーニング系の構築を行った。そこで、SREBP-1 の代表的な標的遺伝子である FAS のプロモーター活性を、ルシフェラーゼアッセイを用いて定量することにした。この際、スクリーニングをより簡便に行うために、FAS の安定発現株の樹立を試みた。本実験では、通常培養下で SREBP が活性化状態であるヒト肝がん由来 Huh-7 細胞を用いた。Huh-7 細胞に、FAS のプロモーター領域 (-987~+121) (Fig. 2-1. A) を挿入したルシフェラーゼレポーターベクター、BSD (Blastcidin S deaminase) 発現ベクターをリポフェクション法によりトランスフェクションした (Fig. 2-1. B)。その後、タンパク質合成を阻害する抗生物質である Blastcidin S を含む培地で培養した。Blastcidin S 耐性の細胞コロニーを単離した後、スケールアップしていき、9 個のコロニー由来の細胞の生存を確認した。これらの細胞株のルシフェラーゼ活性を測定したところ、②を除く 8 個の細胞株について活性を確認することができた (Fig. 2-2. A)。SREBP はステロール枯渇条件では活性化し、ステロール過剰条件では低活性であることが知られている。そのため、標的遺伝子である FAS のプロモーター活性もステロールによる制御を受ける。そこで、この 8 種類の細胞株をステロール枯渇培地で 16 時間培養し、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 25-Hydroxycholesterol (25-HC) を処理して、あるいはそのままステロール枯渇処理を続け、さらに 24 時間培養した。その後、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、③④⑤⑥の細胞株においてステロール枯渇による活性上昇、ステロール添加による活性低下が見られた (Fig. 2-2. B)。これらの結果から、ルシフェラーゼ活性の基底値が十分に高く、ステロールに対する応答が良好な⑤の細胞株をスクリーニングに用いることにした。以下、この細胞株を Huh-7/FAS と記述する。

SREBP 活性を抑制する食品成分のスクリーニング

Huh-7/FAS 細胞を用いて、その活性を低下させる化合物のスクリーニングを行った。スクリーニングは当研究室が保有する 153 種類の食品由来成分およびその誘導体を含む化合物 (フラボノイド>カロテノイド>ステロイドが約 80%含

まれている) を対象とした。Huh-7/FAS 細胞をステロール枯渇培地で 16 時間培養した後に各化合物を 100 μ M で 24 時間処理し、ルシフェラーゼアッセイにより活性を測定した (Fig. 2-3~2-5)。活性を 0.8 倍以下に低下させた 20 種類の化合物について、さらにルシフェラーゼアッセイの測定値をタンパク質量で補正した (Fig. 2-6)。最終的に FAS プロモーター活性を低下させる化合物として 8 種類をピックアップした (Fig. 2-7)。次に、これらの化合物が一過的に発現させた FAS のプロモーター活性を低下させるかどうかを検討した。Huh-7 細胞に、前述したのと同じ FAS プロモーターを含むレポーターベクターをリン酸カルシウム法によりトランスフェクションした後、ステロール枯渇処理、各化合物処理を行い、24 時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、6-Hydroxyflavanone (6-HF) が活性を低下させなかったことを除き、他の化合物については FAS の安定発現株における結果と同様に活性低下が見られた (Fig. 2-8)。ただし、Glabridin (GBN) は細胞をほとんど死滅させたため、候補化合物から除外した。以上より、6 種類の化合物が SREBP-1 の標的遺伝子である FAS のプロモーター活性を低下させることが示された。しかし、今回用いた FAS プロモーターには様々な転写因子の結合部位が含まれている (Fig. 2-1. A)。そのため、これらの化合物が SREBP 以外の因子を介して作用する可能性が考えられた。そこで、FAS 以外の SREBP-1 標的遺伝子 ACC1, SCD1 についても検討を行った。ACC1 のプロモーター (-460~+121) (Fig. 2-9. A), SCD1 のプロモーター (-483~+139) (Fig. 2-9. B) それぞれを含むレポーターベクターを一過的に発現させプロモーター活性を測定したところ、FAS における結果と同様に、6-Hydroxyflavanone と Glabridin (活性が低下しているように見えるが死細胞が多い) を除く 6 種類の化合物が活性を低下させた (Fig. 2-9. C)。

次に、これらの化合物が内因性の遺伝子発現に効果を及ぼすかどうかを検討した。Huh-7 細胞に各化合物を 100 μ M で 24 時間処理して、SREBP-1 標的遺伝子の mRNA 量を Real-time RT-PCR 法によって解析したところ、Isoxanthohumol (IXN), 4'-Hydroxyflavanone (4'-HF), Allyl Isothiocyanate (AITC) により mRNA 量が低下することが示された (Fig. 2-10. A)。さらに、これら 3 種類の化合物は SREBP-2 標的遺伝子の mRNA 量も低下させることが明らかとなった (Fig. 2-10. B)。また、SREBP の標的遺伝子ではない ACSL3 (Acyl-CoA synthase long-chain family member 3) の mRNA 量は低下しなかった (Fig. 2-11)。

以上の結果より、外因性の SREBP-1 標的遺伝子のプロモーター活性、内因性の SREBP-1, -2 標的遺伝子の mRNA 量を低下させることが示された Isoxanthohumol, 4'-Hydroxyflavanone, Allyl Isothiocyanate に着目し、解析を進めることにした。これら 3 種類の化合物の構造式を、[Fig. 2-12](#) に示した。Isoxanthohumol はホップ、Allyl Isothiocyanate はワサビ、カラシなどアブラナ科植物に含まれる成分である。なお、4'-Hydroxyflavanone はフラバノンの合成アナログであり、天然の食品由来成分ではないが、本章で行ったスクリーニングによって選抜された化合物として以下の解析に用いることにした。

Isoxanthohumol, 4'-Hydroxyflavanone, Allyl Isothiocyanate は新規脂肪酸・コレステロール合成を抑制する

Isoxanthohumol, 4'-Hydroxyflavanone, Allyl Isothiocyanate により、SREBP-1 の標的である脂肪酸合成系の酵素遺伝子、SREBP-2 の標的であるコレステロール合成系の酵素遺伝子の mRNA 量が低下することが明らかとなった。そこで、これら 3 種類の化合物が実際に脂肪酸・コレステロール合成を抑制するかどうかを検討した。Huh-7 細胞を 5% LPDS を含む培地で 16 時間培養した後、各化合物をそれぞれ 100 μ M で 18 時間処理した。[1-¹⁴C]-acetic acid を含む培地で 6 時間培養し、細胞内脂質を抽出して TLC 展開を行い、脂肪酸・コレステロールへの [1-¹⁴C]-acetic acid の取り込み量を測定した。その結果、Isoxanthohumol, 4'-Hydroxyflavanone, Allyl Isothiocyanate により、脂肪酸・コレステロールの新規合成量が低下することが示された ([Fig. 2-13](#))。以上の結果より、Isoxanthohumol, 4'-Hydroxyflavanone, Allyl Isothiocyanate は、SREBP の活性低下を介して脂肪酸・コレステロール合成を抑制することが示唆された ([Fig. 2-14](#))。

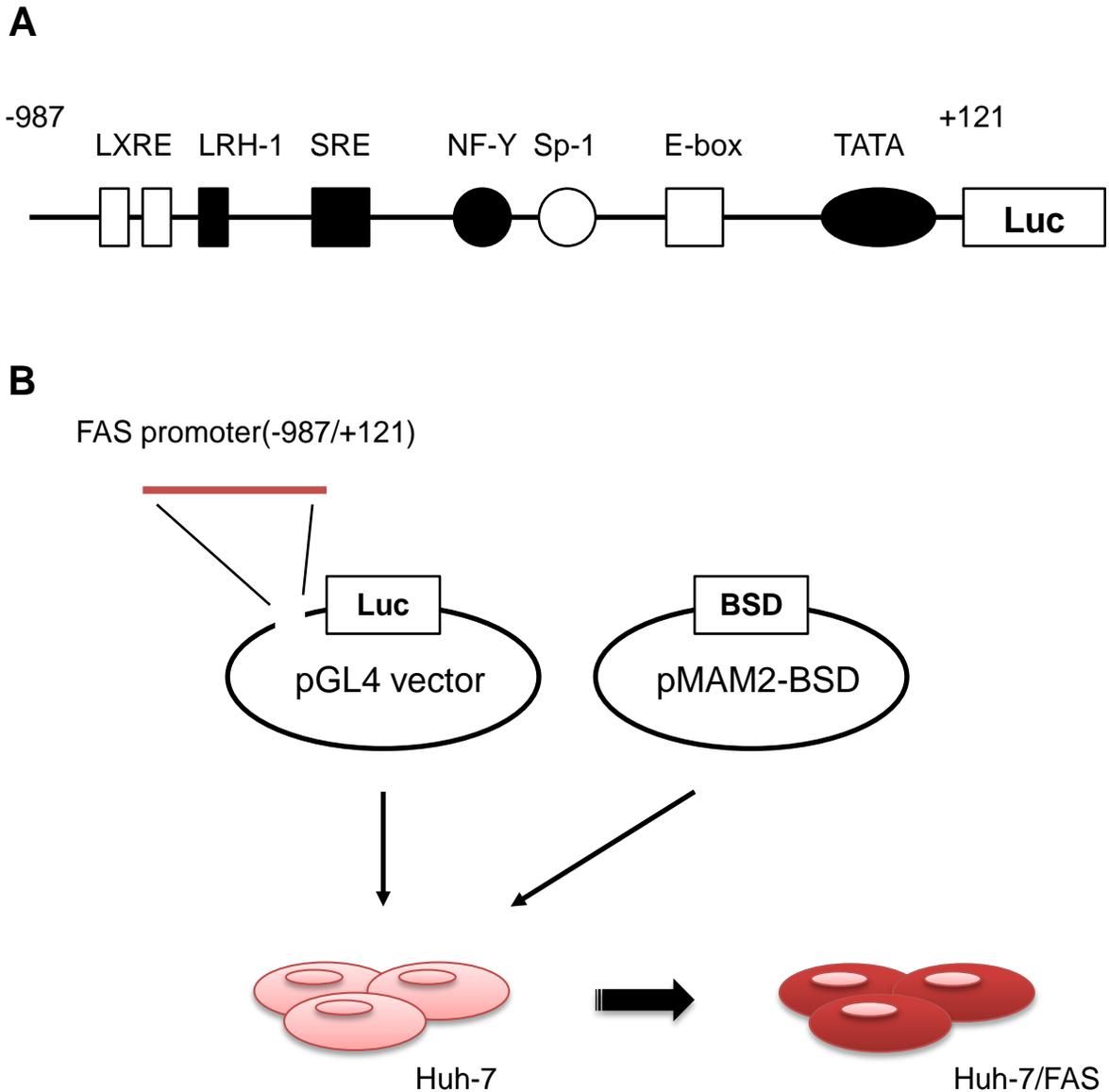


Fig. 2-1. Huh-7/FAS stable cell lineの作製概略

(A) FAS promoter (-987/+121) の模式図

(B) Huh-7/FASの作製概略図

Huh-7細胞を60 mm dishに播種して24時間培養した。
Lipofectamine 2000を用いてpGL4-FAS (7.62 $\mu\text{g}/\text{dish}$) とpMAM2-BSD (0.38 $\mu\text{g}/\text{dish}$)を
トランスフェクションし、24時間後に継代した。その翌日からBlastcidin Sにより
薬剤選択を行い、生存した細胞コロニーを単離した。

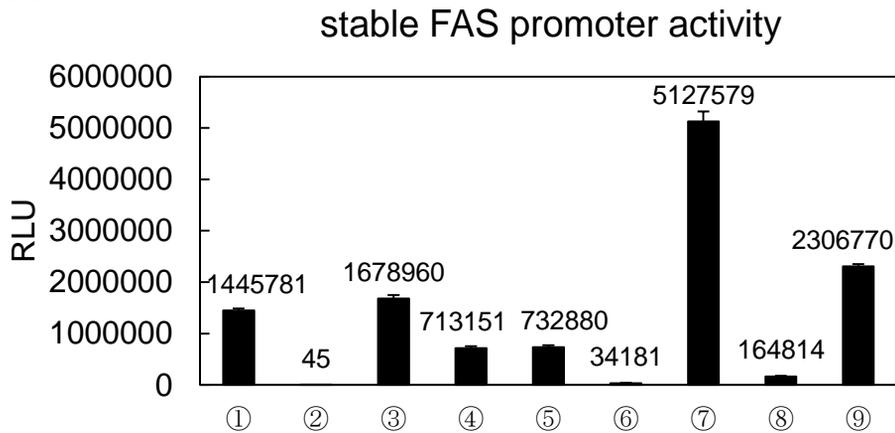
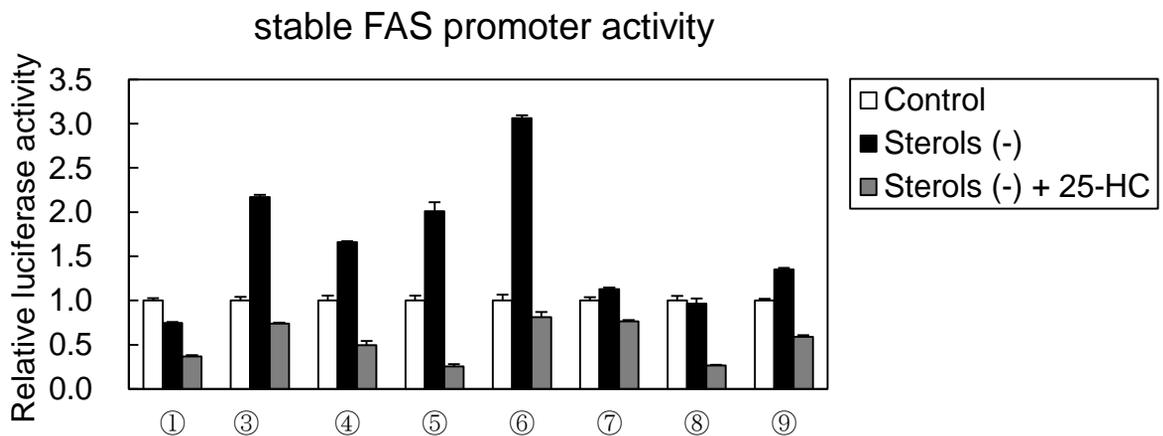
A**B**

Fig. 2-2. Huh-7/FAS stable cell lineの活性確認

(A) 9個のコロニー由来のHuh-7/FAS細胞をそれぞれ12 well plateに播種して72時間培養した。細胞をLysis bufferに溶解し、Luciferase assayに供した。(n=3)

(B) (A)と同様に細胞を播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の25-Hydroxycholesterol (25-HC)、またはEtOHを添加し、さらに24時間培養した。なお、Controlはステロール枯渇処理を行わずに培養したものである。細胞をLysis bufferに溶解し、Luciferase assayに供した。グラフはControl群の値を1として、平均値 \pm 標準誤差で示した。(n=3)

| No. | sample | activity |
|-----|--|----------|
| 1 | α -Naphthoflavone <7,8-Benzoflavone> | 0.042 |
| 2 | β -Naphthoflavone <5,6-Benzoflavone> | 0.049 |
| 3 | Glabridin | 0.275 |
| 4 | Isoxanthohumol | 0.279 |
| 5 | Cinnamaldehyde <3-Phenyl-2-propenal> | 0.349 |
| 6 | 3'-Hydroxyflavanone | 0.380 |
| 7 | 2'-Hydroxyflavanone | 0.450 |
| 8 | 4'-Hydroxyflavanone | 0.499 |
| 9 | Troglitazone | 0.519 |
| 10 | Fisetin <3,3',4',7-Tetrahydroxyflavone> | 0.529 |
| 11 | Allyl Isothiocyanate | 0.530 |
| 12 | Quercetin <2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5,7-Trihydroxy-4H-1-Benzopyran-4-one> | 0.580 |
| 13 | Nobiletin <Hexamethoxyflavone> | 0.590 |
| 14 | Luteolin | 0.599 |
| 15 | Esculetin <Cichorigenin> | 0.709 |
| 16 | Gingerol | 0.745 |
| 17 | N-Acetyl-D-erythro-Sphingosine <C2 Ceramide> | 0.752 |
| 18 | 6-Hydroxyflavanone | 0.752 |
| 19 | Silibinin <2,3-Dihydro-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(hydroxymethyl)-6-(3,5,7-trihydroxy-4-oxobenzopyran-2-yl)benzodioxin> | 0.777 |
| 20 | Gallic Acid <3,4,5-Trihydroxybenzoic Acid> | 0.791 |
| 21 | Phytol | 0.801 |
| 22 | 10t,12c-18:2 <Conjugated Linoleic Acid(10E,12Z)> | 0.810 |
| 23 | (+/-)-Taxifolin <3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavanone> | 0.819 |
| 24 | (3aR)-(+)-Sclareolide | 0.823 |
| 25 | Rhamnetin <3,3',4',5-Tetrahydroxy-methoxyflavone> | 0.856 |
| 26 | Carbacyclin | 0.861 |
| 27 | Oleanolic Acid <Caryophyllin> | 0.862 |
| 28 | Hexadecanol | 0.865 |
| 29 | Rosmarinic Acid | 0.866 |
| 30 | Peonidine-3-Glucoside Chloride | 0.868 |

| No. | sample | activity |
|-----|--|----------|
| 31 | Naringin <4',5,7-Trihydroxyflavanone 7-rhamnoglucoside> | 0.882 |
| 32 | Carnosol | 0.896 |
| 33 | Vitamin K2 <Menaquinone 4><Menatetrenone> | 0.897 |
| 34 | Syringaldehyde <3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzaldehyde> | 0.901 |
| 35 | Fucoxanthin | 0.905 |
| 36 | Homogentisic Acid <2,5-Dihydroxyphenylacetic acid> | 0.914 |
| 37 | 9Z,12Z,15Z-Octadecatrienoic Acid <Linolenic Acid> | 0.917 |
| 38 | Capsazepine | 0.918 |
| 39 | Zeaxanthin | 0.934 |
| 40 | Canthaxanthin | 0.937 |
| 42 | Silymarin | 0.942 |
| 42 | Ellagic Acid <4,4',5,5',6,6'-Hexahydroxydiphenic acid 2,6,2',6'-dilactone> | 0.945 |
| 43 | 9c,11t-18:2 <Conjugated Linoleic Acid(9Z,11E)> | 0.946 |
| 44 | Humulone< α -苦味酸>< α -Bitter acid>< α -Lupulic acid><(R)-3,5,6-Trihydroxy-2,6-bis(3-methyl-2-butenyl)-4-(3-methylbutyryl)-2,4-cyclohexadienone> | 0.953 |
| 45 | Keracyanin Chloride <Cyanidin-3-O-Rutinoside Chloride> | 0.955 |
| 46 | 2-(4-Hydroxyphenyl) propionic acid | 0.955 |
| 47 | (-)-Menthol | 0.956 |
| 48 | 4-(4-Hydroxyphenyl)-2-Butanone <Raspberry Ketone> | 0.956 |
| 49 | Capsaicin | 0.959 |
| 50 | Procyanidin B2 <(-)-Epicatechin-(4 β →8)-(-)-Epicatechin> | 0.963 |
| 51 | 1-Oleoyl-rac-glycerol <1-(cis-9-Octadecenoyl)-rac-glycerol> | 0.964 |
| 52 | Kaempferol <3,4',5,7-Tetrahydroxyflavone> | 0.967 |
| 53 | Santonin | 0.975 |
| 54 | Lupulone< β -苦味酸>< β -Bitter acid>< β -Lupulic acid><3,5-Dihydroxy-2,6,6-tris(3-methyl-2-butenyl)-4-(3-methylbutyryl)-2,4-cyclohexadienone> | 0.977 |
| 55 | Eicosapentaenoic Acid | 0.988 |
| 56 | 1-Tetradecanol | 0.989 |
| 57 | Procyanidin B1 <(-)-Epicatechin-(4 β →8)-(+)-Catechin> | 1.002 |
| 58 | Geranylgeraniol | 1.003 |
| 59 | Gibberellic Acid | 1.005 |
| 60 | Chlorogenic Acid | 1.010 |

Fig. 2-3. 食品由来成分によるstable FAS promoter activityの変動①

Huh-7/FAS細胞を12 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渴処理を行った。16時間後に100 μ Mの各種食品由来成分を添加し、さらに24時間培養した。細胞をLysis bufferに溶解し、Luciferase assayに供した。表は、DMSO添加群の値を1として、各群の平均値を昇順に1~60位まで示した。(n=3)

| No. | sample | activity |
|-----|---|----------|
| 61 | Astaxanthin <3,3'-Dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione> | 1.013 |
| 62 | Myricetin | 1.020 |
| 63 | Sedanolid <3-Butyl-3a,4,5,6-Tetrahydro-1(3H)-Isobenzofuranone> | 1.021 |
| 64 | Scopoletin <7-Hydroxy-5-methoxycoumarin> | 1.021 |
| 65 | Protocatechuic Acid | 1.021 |
| 66 | Glycitein | 1.035 |
| 67 | Tamarixetin <Quercetin-4'-Methylether><3,3',5,7-Tetrahydroxy-4'-methoxyflavone> | 1.036 |
| 68 | Oleic Acid <cis-9-Octadecenoic acid> | 1.042 |
| 69 | Peonidin Chloride <3,4',5,7-Tetrahydroxy-3'-methoxy flavylium chloride> | 1.043 |
| 70 | Umbelliferone <7-Hydroxycoumarin> | 1.046 |
| 71 | Phloretin | 1.048 |
| 72 | d-Limonene | 1.050 |
| 73 | Limonin | 1.050 |
| 74 | Linoleic Acid <cis-9,cis-12-Octadecadienoic acid> | 1.051 |
| 75 | 1,4-Cineole <Isocineole> | 1.051 |
| 76 | Cyanin Chloride <Cyanidin-3,5-Di-O-Glucoside Chloride> | 1.054 |
| 77 | Sesamol <3,4-(Methylenedioxy)phenol> | 1.054 |
| 78 | (-)-Borneol | 1.062 |
| 79 | DL-Linalool | 1.065 |
| 80 | Linoleamide | 1.067 |
| 81 | Perillic Acid | 1.067 |
| 82 | Cuminaldehyde | 1.070 |
| 83 | Rutin <Quercetin-3-O-rutinoside> | 1.070 |
| 84 | Isoprene | 1.073 |
| 85 | Dipropyl Disulfide <Propyl Disulfide> | 1.077 |
| 86 | (-)-trans-Caryophyllene < β -Caryophyllene> | 1.078 |
| 87 | Lutein <Xanthophyll> | 1.086 |
| 88 | Austricine | 1.087 |
| 89 | Leucomisine | 1.087 |
| 90 | Aminogenistein <4'-Amino-6-hydroxyflavone> | 1.088 |
| 91 | Eicosanol | 1.093 |

| No. | sample | activity |
|-----|--|----------|
| 92 | 1-Dodecanol | 1.111 |
| 93 | Isoferulic Acid | 1.113 |
| 94 | Citral | 1.122 |
| 95 | Bixin | 1.123 |
| 96 | Geraniol | 1.126 |
| 97 | Dihydrogenistein | 1.126 |
| 98 | (+)-Borneol | 1.130 |
| 99 | Pelargonidine Chloride <3,4',5,7-Tetrahydroxyflavylium chloride> | 1.133 |
| 100 | Oleamide <cis-9,10-Octadecenoamide> | 1.134 |
| 101 | (-)-Bilobalide | 1.142 |
| 102 | Octanol | 1.143 |
| 103 | Palmitoyl Coenzyme A, Free Acid | 1.149 |
| 104 | Vanillin <4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyde> | 1.153 |
| 105 | 6"-O-Acetyldaizin | 1.163 |
| 106 | Retinyl Acetate <Retinol acetate> | 1.163 |
| 107 | Oenin Chloride <Malvidin-3-Glucoside Chloride> | 1.166 |
| 108 | Ferulic Acid | 1.166 |
| 109 | 4-Coumaric Acid | 1.170 |
| 110 | Malvidin Chloride <3,4',5,7-Tetrahydroxy-3',5'-Dimethoxy Flavilium Chloride> | 1.174 |
| 111 | Caffeic Acid | 1.175 |
| 112 | Caffeine <Thein><1,3,7-Trimethylxanthine> | 1.176 |
| 113 | Hesperidin <Hesperitin-7-rutinoside> | 1.192 |
| 114 | Stearyl Alcohol | 1.197 |
| 115 | Apigenin <4',5,7-Trihydroxyflavone> | 1.213 |
| 116 | Delphinidin Chloride <3,3',4',5,5',7'-Hexahydroxyflavylium chloride> | 1.217 |
| 117 | (R,S)-Equol <4',7-Isosoflavandiol> | 1.241 |
| 118 | Carminic Acid | 1.250 |
| 119 | Cyanidin Chloride <3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavylium chloride> | 1.256 |
| 120 | Vanillylacetone <Zingerone> | 1.261 |
| 121 | Eugenol | 1.289 |
| 122 | Tannic Acid <Gallotannin><Tannin> | 1.300 |

Fig. 2-4. 食品由来成分によるstable FAS promoter activityの変動②

Huh-7/FAS細胞を12 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渴処理を行った。16時間後に100 μ Mの各種食品由来成分を添加し、さらに24時間培養した。細胞をLysis bufferに溶解し、Luciferase assayに供した。表は、DMSO添加群の値を1として、各群の平均値を昇順に61~122位まで示した。(n=3)

| No. | sample | activity |
|-----|--|----------|
| 123 | Glycitin | 1.301 |
| 124 | Sesamine | 1.303 |
| 125 | Brassinin | 1.305 |
| 126 | Perillaldehyde | 1.332 |
| 127 | Abietic Acid | 1.352 |
| 128 | Flavanone <2,3-Dihydroflavone> | 1.354 |
| 129 | trans-Crocetin | 1.411 |
| 130 | Docosahexaenoic Acid <DHA> | 1.434 |
| 131 | all trans-Retinoic Acid | 1.471 |
| 132 | Flavonol <3-Hydroxyflavone> | 1.547 |
| 133 | Morin <2',3,4',5,7-Pentahydroxyflavone> | 1.589 |
| 134 | Guggulsterone (Z form)<4, 17(20)-(trans)-pregnadien-3, 16-dione> | 1.605 |
| 135 | Galangin <3,5,7-Trihydroxyflavone><Norizalpinin> | 1.619 |
| 136 | Juvenile Hormone III <trans,trans-10,11-Epoxy-3,7,11-trimethyl-2,6-dodecadienic acid methyl ester> | 1.637 |
| 137 | Daidzin <4',7-Dihydroxyisoflavone, 7-O-β-D-Glucopyranoside> | 1.789 |
| 138 | trans,trans-Farnesyl Acetate <(E,E)-3,7,11-Trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-ol acetate> | 1.809 |
| 139 | cis-trans-Farnesyl Acetate | 1.862 |
| 140 | Naringenin | 1.904 |
| 141 | 7-Hydroxyflavanone | 2.026 |
| 142 | Hesperetin | 2.181 |
| 143 | trans,trans-Farnesol <(E,E)-3,7,11-Trimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-ol> | 2.227 |
| 144 | Acacetin <5,7-Dihydroxy-4'-methoxyflavone> | 2.236 |
| 145 | Piperine | 2.236 |
| 146 | Decanol | 2.302 |
| 147 | Pinoembrine | 2.305 |
| 148 | Daidzein | 2.358 |
| 149 | Genistin <Genistein, 7-O-β-D-Glucopyranoside> | 2.360 |
| 150 | Resveratrol | 2.429 |
| 151 | Genistein | 2.790 |
| 152 | Sphingosine, Free Base, Bovine Brain | 0.00001 |
| 153 | Curcumin <Indian Saffron, Turmeric Yellow> | 0.0002 |

Fig. 2-5. 食品由来成分によるstable FAS promoter activityの変動③

Huh-7/FAS細胞を12 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に100 μMの各種食品由来成分を添加し、さらに24時間培養した。細胞をLysis bufferに溶解し、Luciferase assayに供した。表は、DMSO添加群の値を1として、各群の平均値を昇順に123~153位まで示した。(n=3)ただし、Sphingosine, Curcuminを処理すると細胞が死滅したため、除外した。

| No. | sample | activity/protein |
|-----|--|------------------|
| 1 | α -Naphthoflavone <7,8-Benzoflavone> | 0.059 |
| 2 | β -Naphthoflavone <5,6-Benzoflavone> | 0.053 |
| 3 | Glabridin | 0.720 |
| 4 | Isoxanthohumol | 0.780 |
| 5 | Cinnamaldehyde <3-Phenyl-2-propenal> | 0.860 |
| 6 | 3'-Hydroxyflavanone | 1.075 |
| 7 | 2'-Hydroxyflavanone | 1.261 |
| 8 | 4'-Hydroxyflavanone | 0.512 |
| 9 | Troglitazone | 0.870 |
| 10 | Fisetin <3,3',4',7-Tetrahydroxyflavone> | 1.599 |
| 11 | Allyl Isothiocyanate | 0.635 |
| 12 | Quercetin <2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5,7-Trihydroxy-4H-1-Benzopyran-4-one> | 0.960 |
| 13 | Nobiletin <Hexamethoxyflavone> | 0.946 |
| 14 | Luteolin | 1.187 |
| 15 | Esculetin <Cichorigenin> | 1.385 |
| 16 | Gingerol | 0.896 |
| 17 | N-Acetyl-D-erythro-Sphingosine <C2 Ceramide> | 1.818 |
| 18 | 6-Hydroxyflavanone | 0.656 |
| 19 | Silibinin <2,3-Dihydro-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(hydroxymethyl)-6-(3,5,7-trihydroxy-4-oxobenzopyran-2-yl)benzodioxin> | 0.933 |
| 20 | Gallic Acid <3,4,5-Trihydroxybenzoic Acid> | 0.489 |

Fig. 2-6. 食品由来成分によるstable FAS promoter activityの変動④

Fig. 2-3~2-5において、活性を0.8倍以下に低下させた化合物について、同様に Huh-7/FAS細胞に処理し、Luciferase assayとタンパク質定量を行った。それぞれの活性をタンパク質量で補正して表に示した。(n=3) は活性/タンパク質量を0.8倍以下に低下させた化合物を示す。

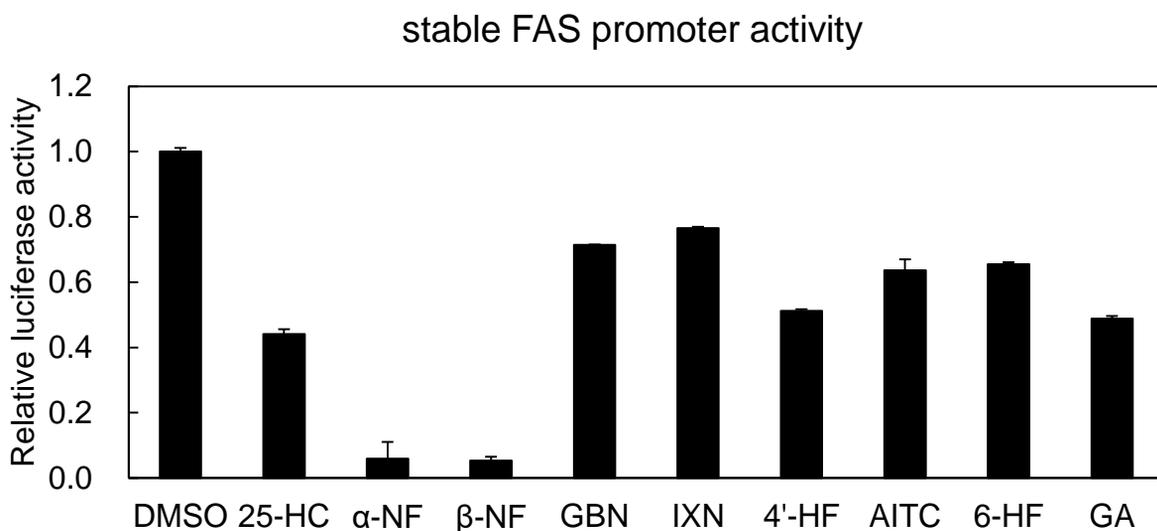


Fig. 2-7. 食品由来成分によるstable FAS promoter activityの変動

Huh-7/FAS細胞を12 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に1 μg/mLの25-HC、または100 μMの各種食品由来成分を添加し、さらに24時間培養した。細胞をLysis bufferに溶解し、Luciferase assayに供した。また、同じ処理をした細胞をRIPA bufferに溶解し、タンパク質定量に供した。グラフは、Luciferase assayの値をタンパク質量で補正し、DMSO添加群の値を1として平均値±標準誤差で示した。(n=3) α-NFはα-Naphthoflavone、β-NFはβ-Naphthoflavone、GBNはGlabridin、IXNはIsoxanthohumol、4'-HFは4'-Hydroxyflavanone、AITCはAllyl Isothiocyanate、6-HFは6-Hydroxyflavanone、GAはGallic acidを示す。

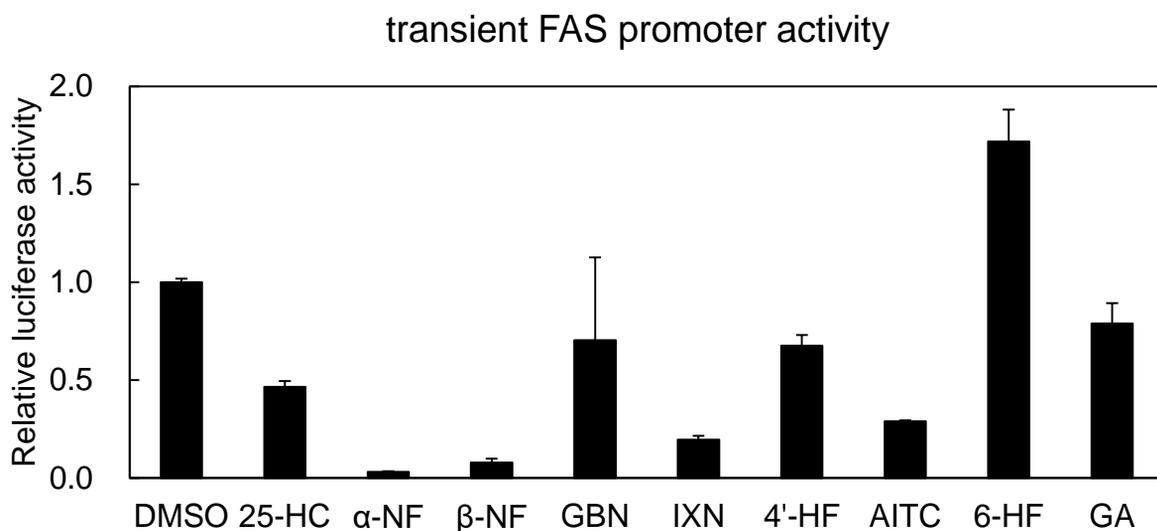


Fig. 2-8. 食品由来成分によるtransient FAS promoter activityの変動

Huh-7細胞を12 well plateに播種して24時間培養した。リン酸カルシウム法によりpGL4-FAS (0.3 μg/well), pCMV-β-gal (0.3 μg/well) をトランスフェクションし、4時間後にステロール枯渇培地に交換した。16時間後に各種食品由来成分または1 μg/mLの25-HC、または100 μMの各種食品由来成分を添加し、さらに24時間培養した。細胞をLysis bufferに溶解し、Luciferase assayとβ-gal assayに供した。グラフは、Luciferase assayの値をβ-gal assayの値で補正し、DMSO添加群の値を1として平均値±標準誤差で示した。(n=3)

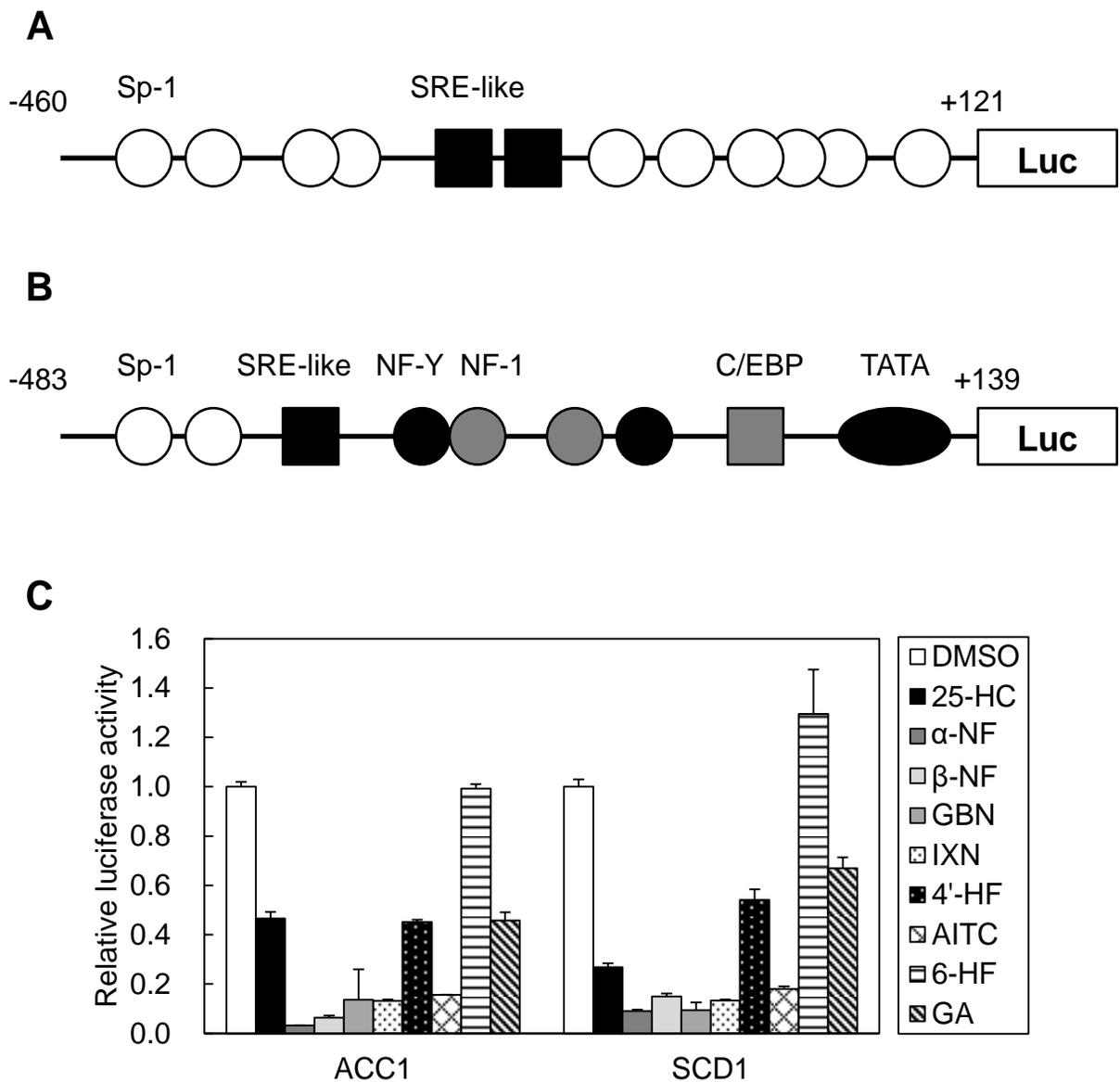


Fig. 2-9. 食品由来成分によるtransient ACC1, SCD1 promoter activityの変動

(A) ACC1 promoter(-460/+121)の模式図

(B) SCD1 promoter(-483/+139)の模式図

(C) Huh-7細胞を12 well plateに播種して24時間培養した。リン酸カルシウム法によりpCMV-β-gal (0.3 μg/well) とpGL4-ACC1、またはpGL4-SCD1 (0.3 μg/well) をトランスフェクションし、4時間後にステロール枯渇培地に交換した。16時間後に各種1 μg/mLの25-HC、または100 μMの各種食品由来成分を添加し、さらに24時間培養した。細胞をLysis bufferに溶解し、Luciferase assayとβ-gal assayに供した。グラフは、Luciferase assayの値をβ-gal assayの値で補正し、DMSO添加群の値を1として平均値±標準誤差で示した。(n=3)

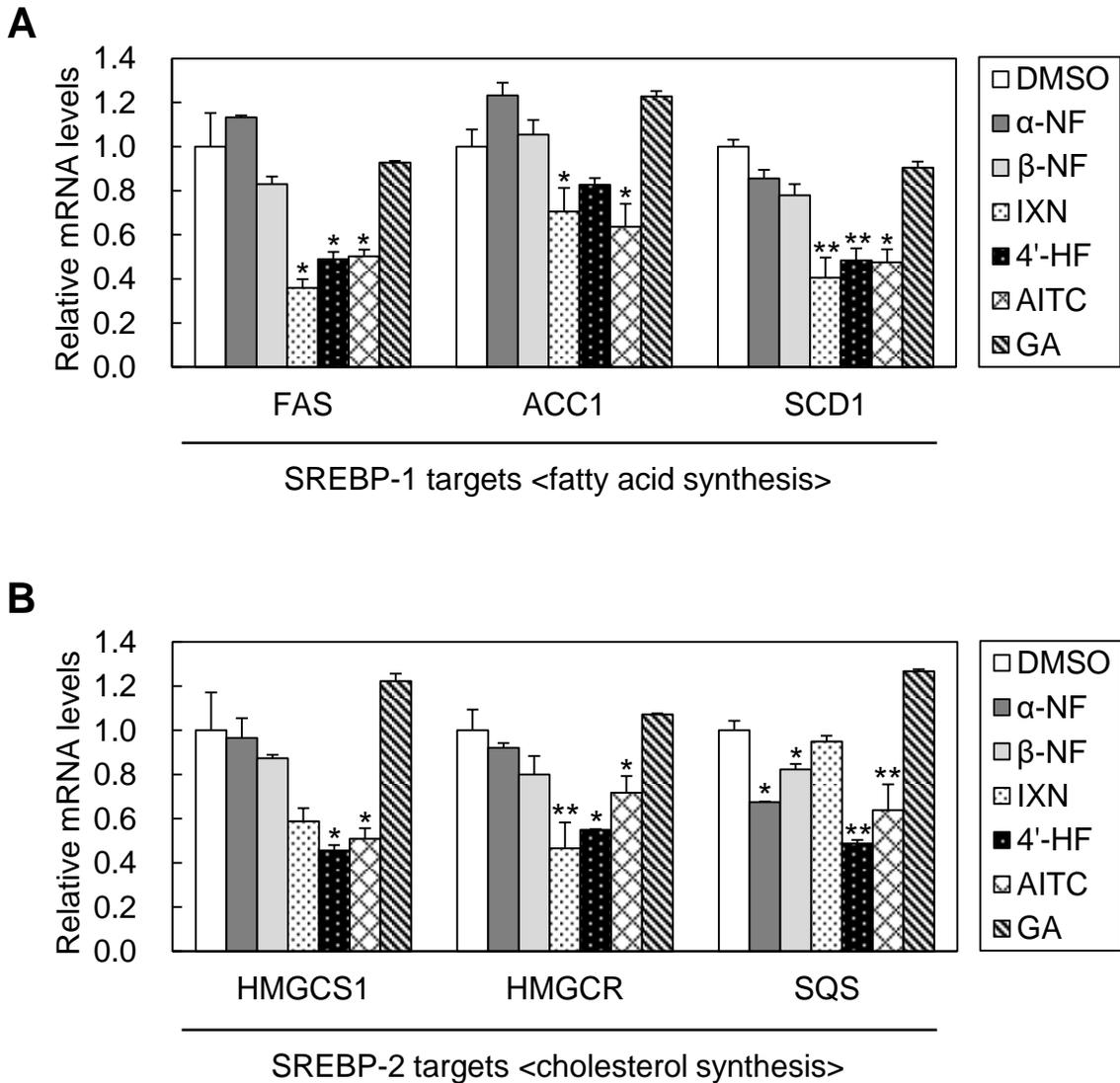


Fig. 2-10. 食品由来成分によるSREBP標的遺伝子mRNAの変動

Huh-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に100 μ Mの各種食品由来成分を添加し、さらに24時間培養した。細胞を回収し、total RNAを抽出してRT反応によりcDNAを得た。FAS, ACC1, SCD1 (A), HMGCS, HMGCR, SQS (B) およびGAPDHのmRNA量をReal-time PCRにより測定した。グラフは、各遺伝子の測定値をGAPDHの値で補正し、DMSO添加群の値を1として平均値±標準誤差で示した。t検定を行い、有意差 $p < 0.05$ を*で、 $p < 0.01$ を**で示した。(n=3)

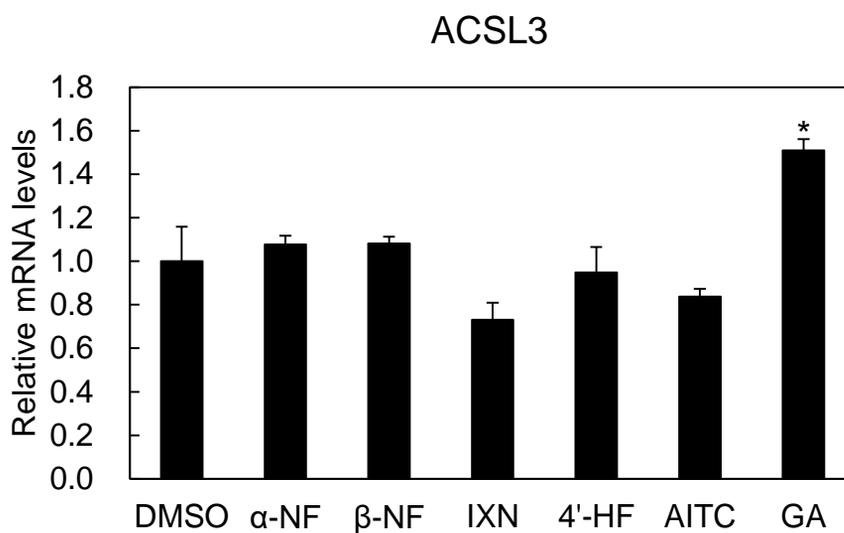
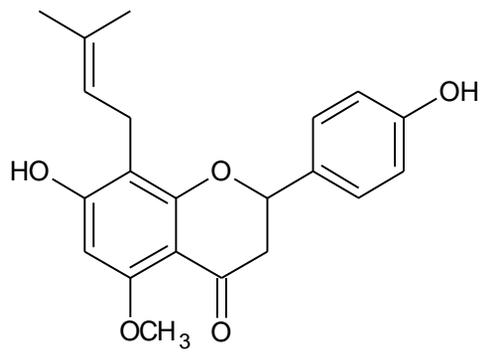
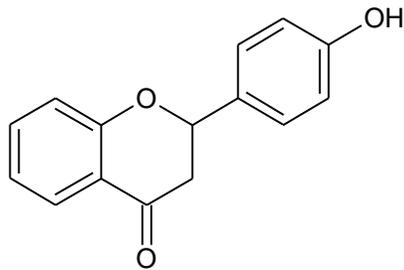


Fig. 2-11. 食品由来成分によるACSL3 mRNAの変動

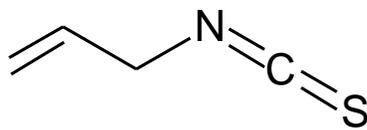
Huh-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に100 μ Mの各種食品由来成分を添加し、さらに24時間培養した。細胞を回収し、total RNAを抽出してRT反応によりcDNAを得た。ACSL3およびGAPDHのmRNA量をReal-time PCRにより測定した。グラフは、ACSL3の測定値をGAPDHの値で補正し、DMSO添加群の値を1として平均値 \pm 標準誤差で示した。t検定を行い、有意差 $p < 0.05$ を*で示した。(n=3)



Isoxanthohumol (IXN)



4'-Hydroxyflavanone (4'-HF)



Allyl Isothiocyanate (AITC)

Fig. 2-12. SREBP標的遺伝子mRNA発現を低下させる化合物の構造式

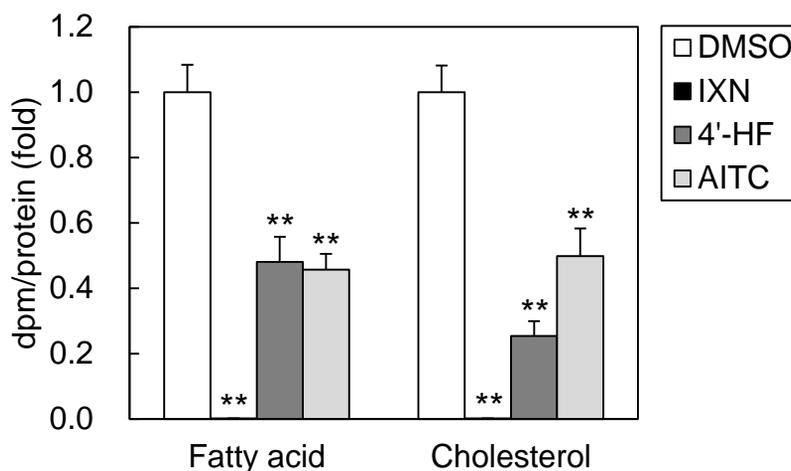


Fig. 2-13. Isoxanthohumol, 4'-Hydroxyflavanone, Allyl Isothiocyanateによる新規脂合成量の変動

Huh-7細胞を12 well plateに播種して24時間培養した後、LPDS培地に交換した。16時間後に100 μ MのIXN、または4'-HF、またはAITCを添加し、さらに18時間培養した。60 kBq [1- 14 C] Acetic acidを添加し6時間培養した後、細胞から脂質を抽出し、TLC板上で展開して脂肪酸およびコレステロールのバンドを定量した。また、細胞をRIPA bufferで溶解してタンパク質定量に供した。グラフは、脂肪酸およびコレステロールの値をタンパク質量で補正し、DMSO添加群の値を1として平均値 \pm 標準誤差で示した。t検定を行い、有意差 $p < 0.01$ を**で示した。(n=3)

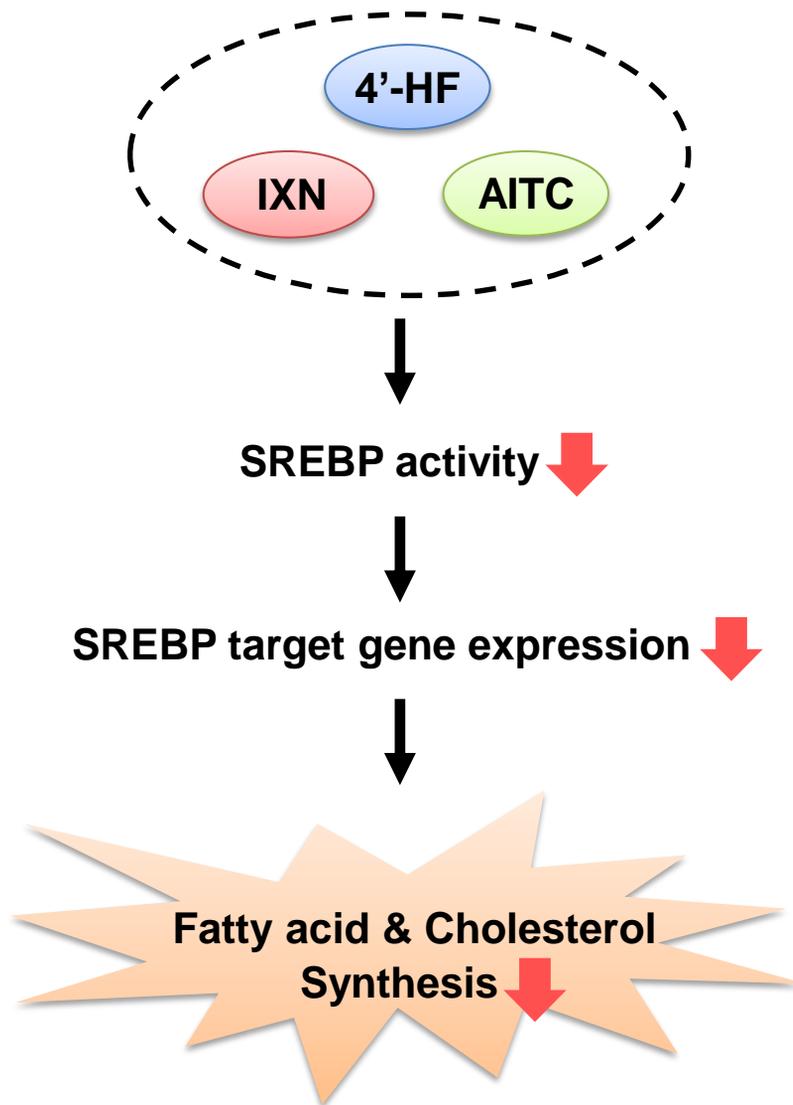


Fig. 2-14. Isoxanthohumol, 4'-Hydroxyflavanone, Allyl Isothiocyanate による脂質合成抑制経路概略

IXN, 4'-HF, AITCはSREBP標的遺伝子である脂質合成系酵素遺伝子発現を抑制する。このSREBPの活性抑制を介して、脂肪酸、コレステロール合成を低下させると考えられる。

2-4. 考察

SREBP の活性を低下させる化合物を探索するにあたり、本章ではまず活性評価の系を構築した。そして、実際にスクリーニングを行い、そこからさらに候補化合物の絞り込みを行った。化合物探索の流れを以下に示す。これにより、3種類の化合物 Isoxanthohumol, 4'-Hydroxyflavanone, Allyl Isothiocyanate を見出した。

- ① Huh-7/FAS 細胞における stable promoter activity を低下させるか ⇒8 種類
- ② Huh-7 細胞における transient FAS, ACC1, SCD1 promoter activity を低下させるか ⇒6 種類
- ③ Huh-7 細胞における内因性 SREBP 標的遺伝子の mRNA 量を低下させるか ⇒3 種類: Isoxanthohumol, 4'-Hydroxyflavanone, Allyl Isothiocyanate

①により 8 種類の化合物が選抜されたが、②ではそのうち、6-Hydroxyflavanone が活性を低下させないこと、また、Glabridin が細胞を死滅させることから、候補から外れた。前者については、スクリーニングに用いた安定発現株ではポジションエフェクトにより活性が抑制された可能性、後者については、トランスフェクション時のプラスミドや試薬を処理する操作により、細胞の Glabridin 耐性が低下した可能性などが考えられるが、明確な原因は不明である。

②により選抜された 6 種類の化合物のうち 3 種類は、③において SREBP 標的遺伝子の mRNA 量を低下させなかった。これについても原因は特定できないが、これら 3 種類の化合物は SREBP 標的遺伝子のプロモーター活性を低下させるのではなく、ルシフェラーゼ活性を特異的に抑制していた可能性などが挙げられる。しかし、一部の SREBP 標的遺伝子については mRNA 量が低下していることから、処理時間や濃度を検討することで効果が見られるかもしれない。このように、②③において選抜から外れた化合物について、さらなる解析を行うことでより精細な評価が必要とされるが、本研究ではこの段階で残った 3 種類の化合物 Isoxanthohumol, 4'-Hydroxyflavanone, Allyl Isothiocyanate を用いて解析を

進めることに決定した。

Isoxanthohumol はホップに含まれる成分であり、これまでに抗がん作用 [125, 126]、抗炎症作用 [127] などが報告されている。また、脂肪細胞において脂質蓄積の抑制効果 [120] が見られているが、SREBP との関連を示した研究は未だ報告されていない。

Allyl Isothiocyanate はワサビやカラシなどのアブラナ科植物に含まれる成分であり、こちらも抗がん作用 [130-135] がよく知られている。ラットに Allyl Isothiocyanate を経口投与することにより、血糖値低下を伴う体重減少が確認されている [139]。また、マウスに摂食させることによりミトコンドリアの機能障害が抑えられ、肥満、インスリン抵抗性が改善されたという報告もあり、この研究では肝臓における SREBP-1c と標的遺伝子の mRNA 発現の減少が認められている [140]。しかし、その作用メカニズムは不明である。

4'-Hydroxyflavanone は合成フラバノンであり、線維芽細胞におけるコラーゲン合成抑制 [161]、ラットの冠動脈における血管弛緩 [162] などの生理活性が報告されている。しかし、現在までに脂質代謝との関連を示した例はない。

本章で用いた FAS のプロモーター領域には、SREBP 以外にも LXR, LRH-1, NF-Y, Sp-1 といった他の転写因子の結合部位も存在するため、見出した化合物がそれらの因子を介して活性を低下させる可能性も考えられる。また、FAS を制御する SREBP-1c も LXR 標的遺伝子として知られている [54]。しかし、Isoxanthohumol, 4'-Hydroxyflavanone, Allyl Isothiocyanate は LXR 標的遺伝子である ACSL3 の mRNA 量を低下させなかったことから、SREBP-1c やその標的遺伝子の mRNA 量の低下に LXR は関与していないと考えられる。さらに、FAS 以外の SREBP 標的遺伝子 ACC1, SCD1 のプロモーター活性を低下させたこと、SREBP 標的遺伝子の mRNA 量を軒並み低下させたこと、ステロール枯渇処理による SREBP 活性化状態における活性変動を評価していることを考慮すると、これら 3 種類の化合物の効果は SREBP を介している可能性が高いと考えられる。ただし、それぞれの転写因子の結合部位を欠損させ、見出した化合物のプロモーター活性への影響を検討するなどさらなる解析が必要とされる。

本章ではさらに、Isoxanthohumol, 4'-Hydroxyflavanone, Allyl Isothiocyanate が脂肪酸・コレステロールの新規合成量を低下させることを明らかにした。③の結果を考慮すると、これらの化合物は SREBP を介した経路で脂肪酸・コレステロ

ール合成を抑制すると考えられる。また、Isoxanthohumol により合成が 1%以下にまで抑制されたことから、SREBP 非依存的な経路の存在も示唆された。この点については、第 3 章で検討を行った。

第 3 章

Isoxanthohumol, 4'-Hydroxyflavanone,
Allyl Isothiocyanate および類縁体による
SREBP 活性抑制効果の検証

3-1. 緒言

第2章の結果より、Isoxanthohumol, 4'-Hydroxyflavanone, Allyl Isothiocyanate が SREBP-1, -2 標的遺伝子の mRNA 量を低下させ、脂肪酸・コレステロール合成を抑制することが示された。これらの化合物にはそれぞれ似た構造を持つ類縁体の存在が知られている。SREBP 活性抑制効果を発揮するうえで、Isoxanthohumol, 4'-Hydroxyflavanone, Allyl Isothiocyanate の構造に特異性があるかどうかを調べるために、本章ではそれぞれの化合物の類縁体について、その効果を検討した。

また、SREBP は不活性型の前駆体として合成された後、プロセッシングを受けて活性型の成熟体となることが知られている。そこで、各化合物が活性型 SREBP を減少させるかどうかを検討した。

3-2. 実験材料および手法

実験材料の調製

<試薬>

食品由来化合物

3'-Hydroxyflavanone, Xanthohumol は Wako より、2'-Hydroxyflavanone, Sulforaphane はフナコシより、Flavanone は SIGMA よりそれぞれ購入し、DMSO に溶解して 100 mM のストック溶液として-20℃に保存した。Sulforaphane はフナコシより購入し、Methanol に溶解して 100 mM のストック溶液として-20℃に保存した。

その他は 2-2 に準じた。

<細胞培養>

2-2 に準じた。

<抗体> (【】内は使用条件)

anti-SREBP-1 抗体 (2A4) 【1: 200】は、Santa Cruz Biotechnology より購入した。

anti- β -actin 抗体 (AC-15) 【1: 5000】 は、SIGMA より購入した。anti-SREBP-2 抗体 【1: 250】 は、以前当研究室で作製されたものを使用した。

ステロール枯渇処理

(Fig. 3-2, 3-4, 3-8) 培養した細胞を PBS で洗浄した後、10% FBS, 0.1% P/St 溶液、50 μ M Sodium Mevalonate, 12.5 μ M Fluvastatin (HMGCR inhibitor) を含む DMEM (High glucose) で培地交換した。

(Fig. 3-2, 3-4, 3-8 以外) 培養した細胞を PBS で洗浄した後、5% LPDS, 0.1% P/St 溶液、50 μ M Sodium Mevalonate, 12.5 μ M Fluvastatin を含む DMEM (High glucose) で培地交換した。

ルシフェラーゼアッセイ

2-2 に準じた。

β -galactosidase (β -gal) アッセイ

2-2 に準じた。

mRNA の定量

2-2 に準じた。

脂質の新規合成量の定量

2-2 に準じた。

タンパク質の定量

タンパク質定量には、BCA protein Assay Kit (Pierce) を用いた。96 well-plate 上で、タンパク質サンプル 5 μ L に BCA Protein Assay 反応液 (A 液: B 液=50: 1 の割合で混合したもの) を 150 μ L 加え、37°C で 30 分間インキュベートした。肉眼で発色を確認後、570 nm における吸光度を測定した。測定には Microplate Reader Model 680 (BIO RAD) を用いた。

タンパク質の検出

<細胞からのタンパク質抽出>

RIPA buffer

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

150 mM NaCl

1% Triton X-100

0.5% Deoxycholate

0.1% SDS

4°Cで保存し、使用時に以下を添加した。

Protease inhibitor cocktail (1/100 量)

1 mM PMSF

Phosphatase inhibitor cocktail (1/100 量)

6×Laemmli Sample buffer

280 mM Tris-HCl (pH 6.8)

30% Glycerol

10% SDS

93 mg/mL DL-Dithiothreitol for electrophoresis

Bromophenol blue 色がつく程度

分注して-20°Cで保存した。

以下の操作は氷上で行った。6 well plate で培養した細胞を、氷冷した PBS 1 mL で洗浄した後、さらにPBS 1 mLを加え、細胞をスクレイパーでかきとって1.5 mL チューブに回収した。4°C、4,000 rpm で5分間遠心し、上清を除去した。ペレットをRIPA buffer 100 µLに懸濁し、氷上で30分間インキュベートして溶解した。4°C、15,000 rpm で5分間遠心し、上清をタンパク質溶液としてサンプリングした。定量後、サンプルの濃度を揃えた後、1/5量の6×LaemmLi Sample bufferを加え、37°Cで30分間加熱処理した。これをタンパク質サンプルとして、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供した。

<SDS-PAGE>

10% (w/v) 過硫酸アンモニウム

過硫酸アンモニウム (nacalai tesque) 1 g を滅菌水 10 mL に溶解した。

Runnig buffer

25 mM Tris

192 mM Glycine

0.1% (w/v) SDS

分離ゲル (7.5% ミニゲル 1 枚)

| | |
|--|------------|
| 1 M Tris-HCl (pH 8.8) | 2.25 mL |
| 30% (w/v) アクリルアミド/ビス混合液 (29:1) (nacalai tesque) | 1.5 mL |
| milliQ 水 | 2.19 mL |
| 10% (w/v) 過硫酸アンモニウム | 60 μ L |
| N, N, N', N',-tetramethyl-ethylenediamine (nacalai tesque) | 3 μ L |

濃縮ゲル (ミニゲル 1 枚)

| | |
|--|-------------|
| 1 M Tris-HCl (pH 8.8) | 350 μ L |
| 30% (w/v) アクリルアミド/ビス混合液 (29:1) (nacalai tesque) | 300 μ L |
| milliQ 水 | 1.69 mL |
| 10% (w/v) 過硫酸アンモニウム | 40 μ L |
| N, N, N', N',-tetramethyl-ethylenediamine (nacalai tesque) | 2.5 μ L |

ゲルボックスに Running buffer を入れ、ゲル板をセットした。ゲルの各ウェルに Prestained XL-Ladder (APRO) を 10 μ L、サンプルを 20 μ g になるようにアプライして、定電圧 100 V で電気泳動を行った。

<ブロットイング>

Blotting buffer

100 mM Tris

192 mM Glycine

5% Methanol

Anode buffer

60 mM Tris-HCl (pH 8.6)

40 mM CAPS

Bio craft セミドライ式ブロットイング装置を用いてブロットイングを行った。PVDF (Polyvinyliden difluoride) 膜 (Millipore) はあらかじめメタノールに浸した後、いずれかの buffer に浸しておいた。SDS-PAGE 後のゲルをいずれかの buffer に浸した後、ブロットイング装置に、マイナス極側から濾紙 3 枚、ゲル、PVDF 膜、濾紙 3 枚の順にセットした。ブロットイングは PVDF 膜 1 cm² あたり、2.4 mA の定電流で 1 時間行った。

<抗体反応>

PBS-T

ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート [ICI 社商標 Tween 20 相当 (WAKO)] を終濃度 0.1%になるように PBS に加えた。

5% (w/v) スキムミルク溶液

PBS-T にスキムミルク粉末 (WAKO) を溶解した。

ブロットイング後、PVDF 膜を 5% (w/v) スキムミルク溶液に浸し、室温で 1 時間振とうしてブロッキングした。

各一次抗体を、それぞれ 5% (w/v) スキムミルク溶液または Signal Enhancer HIKARI solution A (nacalai tesque) にて適当な濃度に希釈し、PVDF 膜を浸して 4°Cで一晩インキュベートした。PBS-T で 3 回洗浄した後、各二次抗体を 5% (w/v) スキムミルク溶液または Signal Enhancer HIKARI solution B (nacalai tesque) にて適当な濃度に希釈し、PVDF 膜を浸して室温で 1 時間インキュベートした。その後 PBS-T で 3 回洗浄した。

ECL (GE healthcare) または Immobilon Western (Millipore) に PVDF 膜を浸し、シグナルをルミノイメージアナライザー LAS-1000 mini (Fujifilm) で検出した。解析は Image Gauge ソフトウェアで行った。

統計解析

2-2 に準じた。

※本章の Fig. 3-1~3-13 の結果は修士論文より引用した。

3-3. 結果

Flavanone, 2'-Hydroxyflavanone, 3'-Hydroxyflavanone は FAS promoter 活性を抑制しない

4'-Hydroxyflavanone と水酸基の位置が異なる類縁体 2'-Hydroxyflavanone, 3'-Hydroxyflavanone、さらにこれらの基本骨格である Flavanone について、FAS プロモーター活性に影響を及ぼすかどうかを検討した (いずれも Fig. 2-3~2-6 で活性を調べているが、Flavanone に関しては Fig. 2-6 のようにタンパク質量による補正を行っていなかったこともあり、今回すべての化合物の活性を同時に解析し直した)。これらの化合物の構造式は、Fig. 3-1 に示した。Huh-7/FAS 細胞に各化合物をそれぞれ 100 μ M で 24 時間処理した後、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、4'-Hydroxyflavanone (4'-HF) だけが FAS プロモーター活性を低下させた (Fig. 3-2)。この結果より、FAS プロモーター活性の抑制には B 環 4' 位の水酸基が重要であることが示された。

Xanthohumol は SREBP 活性を抑制し、新規脂肪酸・コレステロール合成量を低下させる

Isoxanthohumol の類縁体として、同じくホップに含まれる成分である Xanthohumol が存在する。構造式は Fig. 3-3 に示した。まず、Xanthohumol が FAS プロモーター活性を抑制するかどうかを検討した。Huh-7/FAS 細胞に 100 μ M の Xanthohumol を処理すると、細胞がほとんど死滅したため、処理濃度を 10, 30 μ M として実験を行った。Huh-7/FAS 細胞に 10, 30 μ M の Xanthohumol、または 10, 30, 100 μ M の Isoxanthohumol を 24 時間処理したところ、Xanthohumol (XN) により FAS プロモーター活性が低下した (Fig. 3-4)。Isoxanthohumol (IXN) は 100 μ M では活性を低下させたが、10 μ M や 30 μ M では効果が見られなかった (Fig. 3-4)。

次に、SREBP 標的遺伝子の mRNA 量への影響を検討した。Huh-7 細胞に Xanthohumol を 10, 30 μ M で 24 時間処理したところ、ACC1 の mRNA 量は低下しなかったものの、それ以外の SREBP-1, -2 標的遺伝子の mRNA 量が低下した (Fig. 3-5)。一方、Isoxanthohumol は、100 μ M で処理した際には SREBP-1, -2 標的遺伝子の mRNA 量の低下が確認できていたが (Fig. 2-10. A, B)、10 μ M や 30 μ M で処理しても効果が見られなかった (Fig. 3-5)。

Xanthohumol により、SREBP-1 の標的である脂肪酸合成系酵素遺伝子、SREBP-2 の標的であるコレステロール合成系酵素遺伝子の mRNA 量が低下した。そこで、実際に脂肪酸・コレステロール合成を抑制するかどうかを検討した。Huh-7 細胞に Xanthohumol を 10, 30 μM で 24 時間処理し、最後の 6 時間における脂肪酸・コレステロール合成量を測定した。その結果、両者の合成量が低下することが示された (Fig. 3-6)。

以上の結果より、Xanthohumol は SREBP の活性低下を介して脂肪酸・コレステロール合成を抑制することが示唆された。

Sulforaphane, Sulforaphene は SREBP 活性を抑制し、新規脂肪酸・コレステロール合成量を低下させる

Allyl Isothiocyanate の類縁体として、Sulforaphane, Sulforaphene が知られており、これらはそれぞれブロッコリー、ハツカダイコンから単離・同定された成分である。構造式は Fig. 3-7 に示した。まず、これらの化合物が FAS プロモーター活性を抑制するかどうかを検討した。10, 30, 100 μM の Sulforaphane, Sulforaphene、または Allyl Isothiocyanate を処理したところ、Sulforaphane (SFaN), Sulforaphene (SFeN) により FAS プロモーター活性が低下した (Fig. 3-8)。Allyl Isothiocyanate (AITC) は 100 μM では活性を低下させたが、10 μM や 30 μM では効果が見られなかった (Fig. 3-8)。

次に、SREBP 標的遺伝子の mRNA 量への影響を検討した。Sulforaphane, Sulforaphene, Allyl Isothiocyanate をそれぞれ 100 μM で処理したところ、SREBP-1,-2 標的遺伝子の mRNA 量は 3 種類の化合物により同程度に低下した (Fig. 3-9)。

続いて、脂肪酸・コレステロール合成への影響を検討した。その結果、これら 3 種類の化合物により脂肪酸・コレステロールの新規合成量が低下することが示された (Fig. 3-10)。

以上の結果より、Sulforaphane, Sulforaphene は SREBP の活性低下を介して脂肪酸・コレステロール合成を抑制することが示唆された。

Isoxanthohumol, Xanthohumol, Allyl Isothiocyanate, Sulforaphane, Sulforaphene は SREBP 非依存的な経路でも新規脂肪酸・コレステロール合成を抑制する

第2章、本章の結果より、Isoxanthohumol, Xanthohumol, Sulforaphane, Sulforaphene により脂質合成が抑制されることが示された。この抑制は、脂質合成系酵素群の mRNA 量の低下から予想されるものより顕著であった。この原因として、SREBP 依存的な経路以外にも、別の経路を介した抑制があるのではないかと推測された。そこで、食品成分が SREBP 標的遺伝子の発現レベルに影響を及ぼさないような処理時間における脂質合成量を解析することにした。Huh-7 細胞に Isoxanthohumol 30, 100 μ M、Xanthohumol 30 μ M を3時間処理し、最後の2時間における脂肪酸・コレステロール合成量を測定した。また、同じ条件下での SREBP-1, -2 標的遺伝子の mRNA 量を Real-time RT-PCR 法によって解析した。Isoxanthohumol を 30, 100 μ M で3時間処理したところ、SREBP-1 標的遺伝子の mRNA 量に有意な低下は見られなかった (Fig. 3-11. A)。このとき、30 μ M 処理では脂肪酸合成は変動しなかったが、100 μ M 処理では有意に抑制された (Fig. 3-11. B)。また、Xanthohumol も mRNA 量を変動させずに脂肪酸合成を顕著に抑制した (Fig. 3-11. A, B)。したがって、Isoxanthohumol, Xanthohumol による脂肪酸合成抑制は、合成系遺伝子の発現量に依存しないことが示された。一方、Isoxanthohumol 30, 100 μ M 処理により、いずれの濃度でも HMGCS, HMGCR の mRNA 量が 0.7~0.8 倍程度に低下した (Fig. 3-11. A)。コレステロール合成については 30 μ M 処理時にも抑制が見られ、特に 100 μ M 処理では 0.1 倍以下に抑制された (Fig. 3-11. B)。Xanthohumol は HMGCS の mRNA 量を 0.7 倍程度に低下させたのみであったが (Fig. 3-11. A)、コレステロール合成をほぼ完全に抑制した (Fig. 3-11. B)。したがって、コレステロール合成抑制についても、合成系遺伝子の発現量に依存しないことが示された。

また、同様の実験を 100 μ M の Allyl Isothiocyanate, Sulforaphane, Sulforaphene について行った。その結果、これらの化合物を3時間処理しても SREBP-1, -2 標的遺伝子の mRNA 量は低下しなかった (Fig. 3-12. A)。Allyl Isothiocyanate は、24時間処理では SQS の mRNA 量を低下させたが (Fig. 3-9)、予想に反して3時間処理では上昇させた (Fig. 3-12. A)。このとき、Allyl Isothiocyanate, Sulforaphane, Sulforaphene により脂肪酸・コレステロール合成が抑制されることが示された (Fig. 3-12. B)。

以上の結果より、Isoxanthohumol, Xanthohumol, Allyl Isothiocyanate, Sulforaphane, Sulforaphene は SREBP の活性低下を介して脂肪酸・コレステロール合成を抑制すると考えられるが、SREBP 非依存的な経路でも合成を抑制することが示された (Fig. 3-13)。

4'-Hydroxyflavanone, Xanthohumol, Isoxanthohumol, Allyl Isothiocyanate, Sulforaphane, Sulforaphene は活性型 SREBP-1, -2 を減少させる

第2章、本章のこれまでの結果より、本研究で見出した化合物が SREBP の活性を抑制することが示唆された。SREBP は不活性型の前駆体として合成された後、プロセッシングを受けて活性型の成熟体となることが知られている。そこで、それぞれの化合物が活性型 SREBP タンパク質を減少させるかどうかを検討した。Huh-7 細胞をステロール枯渇培地で 16 時間培養した後、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 25-HC を 3 時間処理し、SREBP-1, -2 のタンパク質量を Western Blotting により解析した。25-HC は SREBP プロセッシングを抑制することが知られており、実際に活性型 SREBP (mature) が減少し、前駆体 SREBP (precursor) が増加することが確認された (Fig. 3-14)。そこで、25-HC と同様に 10, 30, 100 μM の 4'-Hydroxyflavanone を 3 時間処理した。その結果、10, 30 μM ではほとんど変動が見られなかったが、100 μM 処理時には活性型 SREBP-1, -2 が減少した (Fig. 3-14)。

続いて、Xanthohumol, Isoxanthohumol について検討を行った。10, 30 μM の Xanthohumol, 10, 30, 100 μM の Isoxanthohumol を同様に Huh-7 細胞に処理したところ、活性型 SREBP-1, -2 が減少した (Fig. 3-15. A, B)。また、Isoxanthohumol を 100 μM で処理すると、活性型 SREBP だけでなく前駆体 SREBP も減少した (Fig. 3-15. B)。

Allyl Isothiocyanate もまた、100 μM で処理することにより活性型 SREBP を減少させた (Fig. 3-16)。Sulforaphane, Sulforaphene を 10, 30, 100 μM で処理すると、濃度依存的に活性型 SREBP が減少したが、同時に前駆体 SREBP も減少した (Fig. 3-17. A, B)。

以上の結果より、見出した 6 種類の化合物により活性型 SREBP が減少することが示された。

Xanthohumol は活性型 SREBP を減少させる

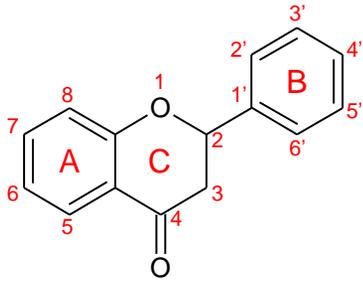
Sulforaphane, Sulforaphene は前駆体 SREBP を減少させる

Isoxanthohumol は活性型 SREBP, 前駆体 SREBP を減少させる

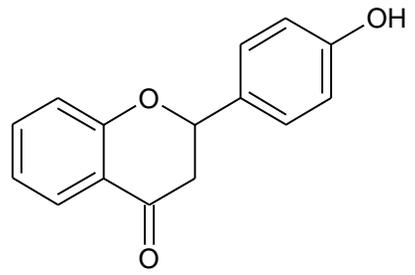
本研究で見出した化合物がそれぞれ活性型 SREBP を減少させることが示されたが、中には前駆体 SREBP を減少させるものも認められた。そこで、各化合物処理後の経時的な活性型、前駆体のタンパク質量の変動を解析した。まず、30 μM の Xanthohumol を処理したところ、1 時間後には活性型が減少し、9 時間後まで観察しても前駆体が減少することはなかった (Fig. 3-18. A)。次に、100 μM の Isoxanthohumol を処理すると、1 時間後には活性型が減少したが、3 時間後から前駆体の減少も見られた (Fig. 3-18. B)。

また、100 μM の Allyl Isothiocyanate は前駆体にはほとんど影響を与えず、活性型に関しても 3 時間後、9 時間後に減少させたものの、全体的に効果が弱く安定しなかった (Fig. 3-19)。100 μM の Sulforaphane, Sulforaphene は、処理 1 時間後には活性型よりも先に前駆体を減少させた (Fig. 3-20. A, B)。

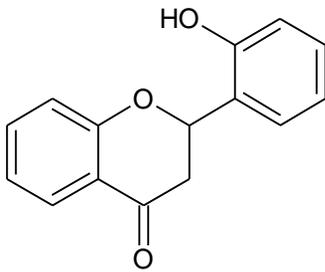
以上の結果より、Sulforaphane, Sulforaphene は主に前駆体 SREBP を減少させ、その結果として活性型 SREBP が減少することが示唆された。一方、Xanthohumol は活性型 SREBP のみを減少させることが示された。また、Isoxanthohumol は SREBP の前駆体、活性型両方を減少させる効果を持つことが示された (Fig. 3-21)。



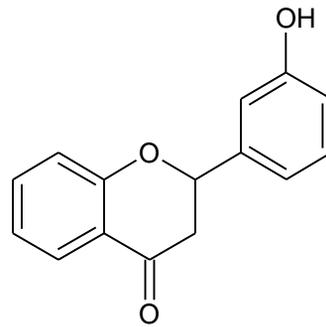
Flavanone



4'-Hydroxyflavanone (4'-HF)



2'-Hydroxyflavanone (2'-HF)



3'-Hydroxyflavanone (3'-HF)

Fig. 3-1. 4'-Hydroxyflavanone類縁体の構造式

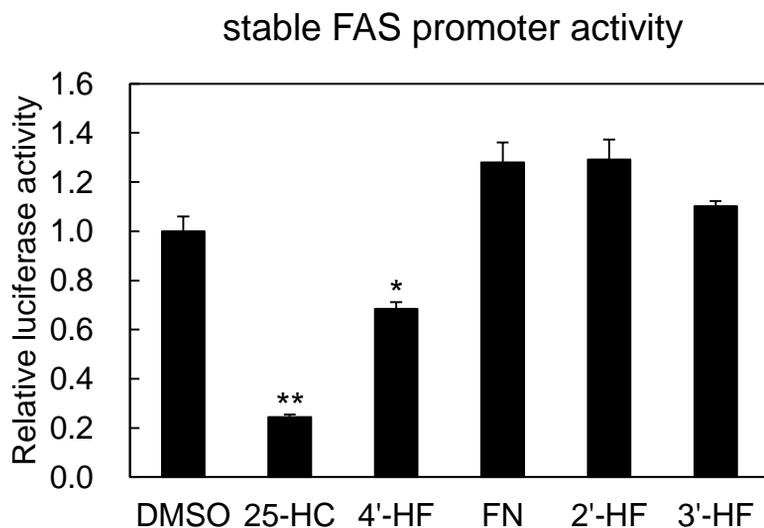
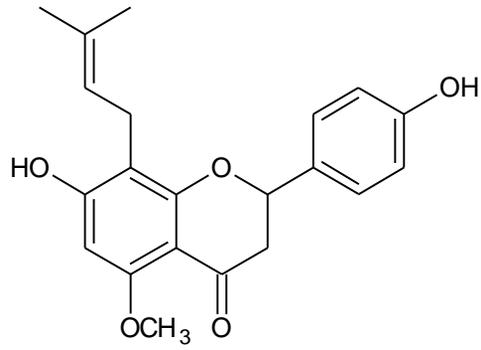
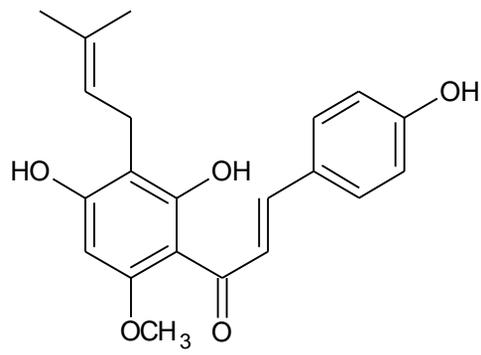


Fig. 3-2. 4'-Hydroxyflavanone類縁体によるstable FAS promoter activityの変動

Huh-7/FAS細胞を12 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に1 $\mu\text{g/ml}$ の25-HC、または100 μM の4'-HF、またはFlavanone (FN)、または2'-Hydroxyflavanone (2'-HF)、または3'-Hydroxyflavanone (3'-HF)を添加し、さらに24時間培養した。細胞をLysis bufferに溶解し、Luciferase assayに供した。また、同じ処理をした細胞をRIPA bufferに溶解し、タンパク質定量に供した。グラフは、Luciferase assayの値をタンパク質量で補正し、DMSO添加群の値を1として平均値±標準誤差で示した。t検定を行い、有意差 $p < 0.05$ を*で、 $p < 0.01$ を**で示した。(n=3)



Isoxanthohumol (IXN)



Xanthohumol (XN)

Fig. 3-3. Isoxanthohumol類縁体の構造式

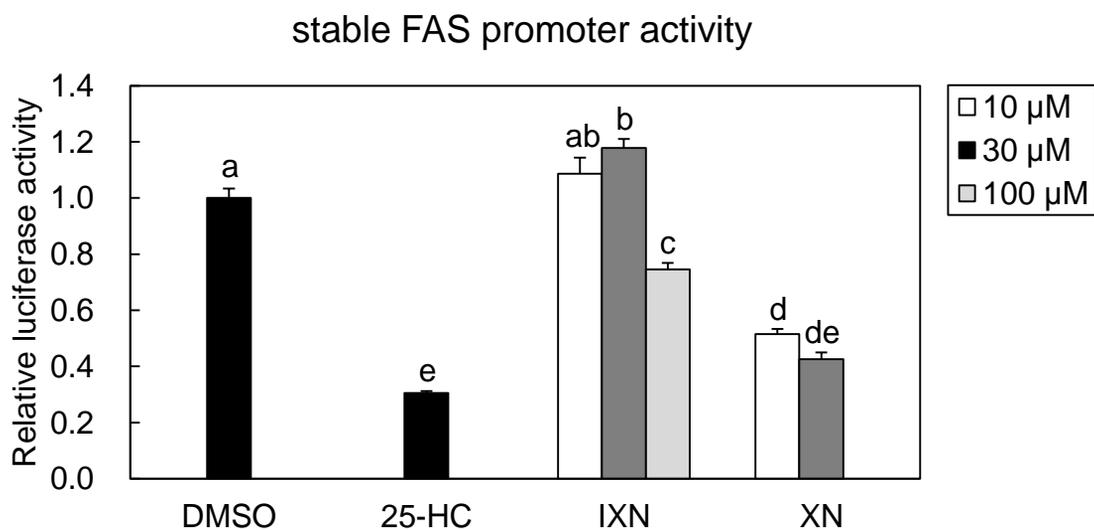


Fig. 3-4. Xanthohumolによるstable FAS promoter activityの変動

Huh-7/FAS細胞を12 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渴処理を行った。16時間後に1 μ g/mlの25-HC、または10, 30, 100 μ MのIXN、または10, 30 μ MのXanthohumol (XN) を添加し、さらに24時間培養した。細胞をLysis bufferに溶解し、Luciferase assayに供した。また、同じ処理をした細胞をRIPA bufferに溶解し、タンパク質定量に供した。グラフは、Luciferase assayの値をタンパク質量で補正し、DMSO添加群の値を1として平均値 \pm 標準誤差で示した。一元配置分散分析を行い、多重比較検定 (Tukey-Kramer法) を行った。(a~dは異なる文字間での有意差 $p < 0.05$ を示す。n=3)

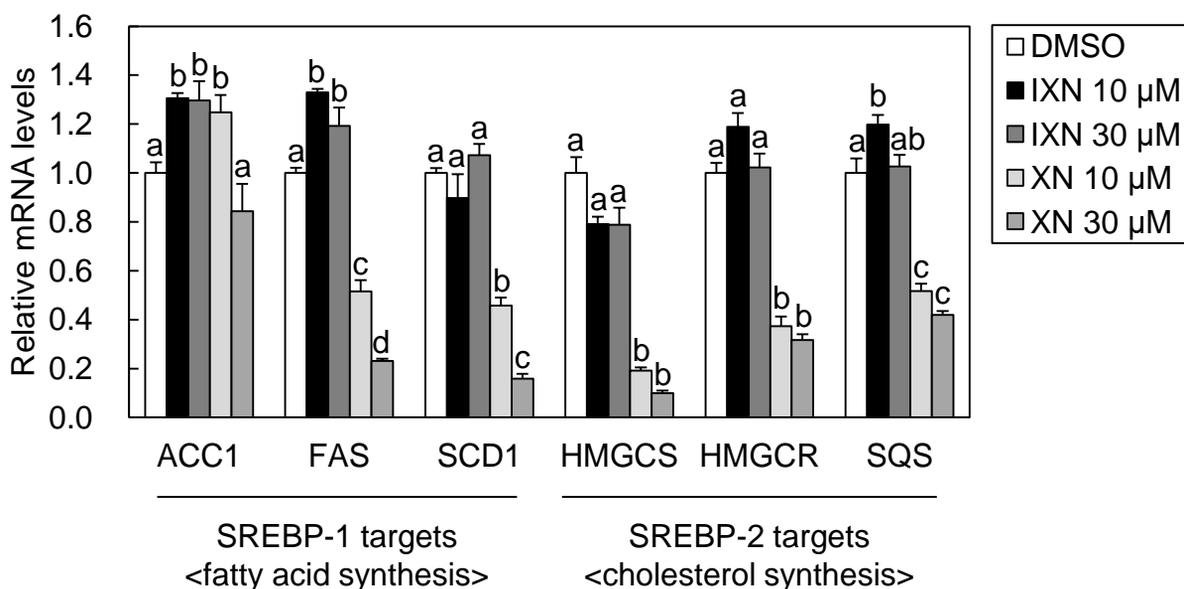


Fig. 3-5. XanthohumolによるSREBP標的遺伝子mRNAの変動

Huh-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に10, 30 μMのIXN、またはXNを添加し、さらに24時間培養した。細胞を回収し、total RNAを抽出してRT反応によりcDNAを得た。FAS, ACC1, SCD1, HMGCS, HMGCR, SQSおよびGAPDHのmRNA量をReal-time PCRにより測定した。グラフは、各遺伝子の測定値をGAPDHの値で補正し、DMSO添加群の値を1として平均値±標準誤差で示した。一元配置分散分析を行い、多重比較検定 (Tukey-Kramer法) を行った。(a~dは異なる文字間での有意差 $p < 0.05$ を示す。n=3)

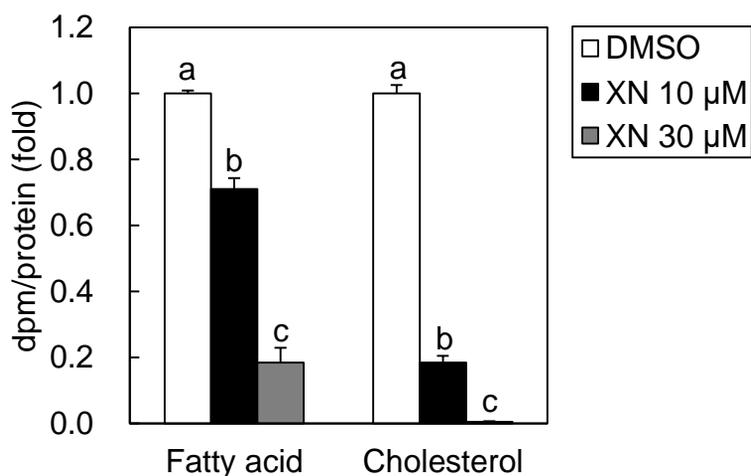
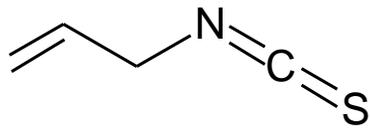
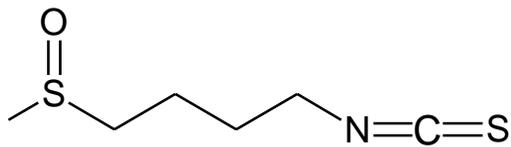


Fig. 3-6. Xanthohumolによる新規脂質合成量の変動

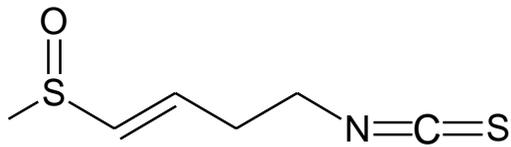
Huh-7細胞を12 well plateに播種して24時間培養した後、LPDS培地に交換した。16時間後に10, 30 μ MのXNを添加し、さらに18時間培養した。60 kBq [1- 14 C] Acetic acidを添加し6時間培養した後、細胞から脂質を抽出し、TLC板上で展開して脂肪酸およびコレステロールのバンドを定量した。また、細胞をRIPA bufferで溶解してタンパク質定量に供した。グラフは、脂肪酸およびコレステロールの値をタンパク質量で補正し、DMSO添加群の値を1として平均値 \pm 標準誤差で示した。一元配置分散分析を行い、多重比較検定 (Tukey-Kramer法) を行った。(a~cは異なる文字間での有意差 $p < 0.05$ を示す。n=3)



Allyl Isothiocyanate (AITC)



Sulforaphane (SFaN)



Sulforaphene (SFeN)

Fig. 3-7. Allyl Isothiocyanate類縁体の構造式

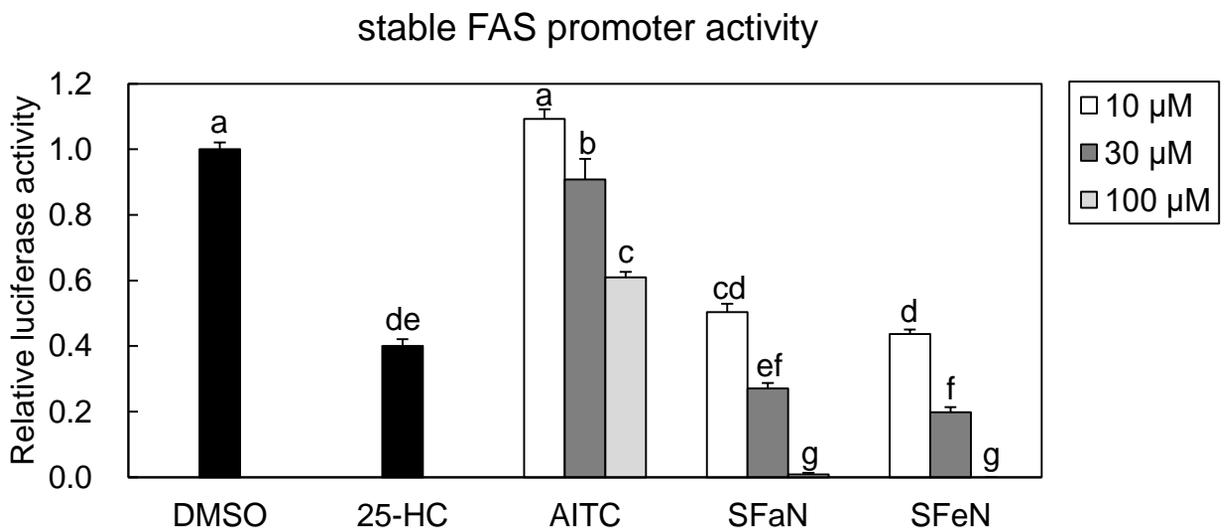


Fig. 3-8. Sulforaphane, Sulforapheneによるstable FAS promoter activityの変動

Huh-7/FAS細胞を12 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に1 μ g/mlの25-HC、または10, 30, 100 μ MのAITC、またはSulforaphane (SFaN)、またはSulforaphene (SFeN)を添加し、さらに24時間培養した。細胞をLysis bufferに溶解し、Luciferase assayに供した。また、同じ処理をした細胞をRIPA bufferに溶解し、タンパク質定量に供した。グラフは、Luciferase assayの値をタンパク質量で補正し、DMSO添加群の値を1として平均値 \pm 標準誤差で示した。一元配置分散分析を行い、多重比較検定 (Tukey-Kramer法) を行った。(a~gは異なる文字間での有意差 $p < 0.05$ を示す。n=3)

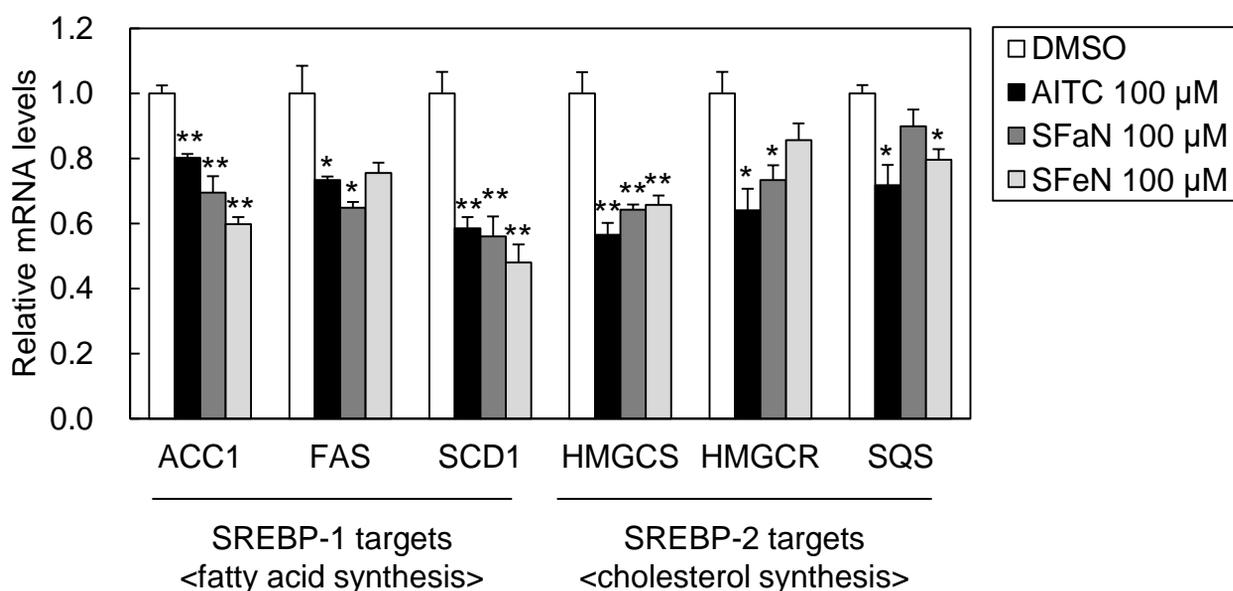


Fig. 3-9. Sulforaphane, SulforapheneによるSREBP標的遺伝子mRNAの変動

Huh-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に100 μMのAITC、またはSFaN、またはSFeNを添加し、さらに24時間培養した。細胞を回収し、total RNAを抽出してRT反応によりcDNAを得た。FAS, ACC1, SCD1, HMGCS, HMGCR, SQSおよびGAPDHのmRNA量をReal-time PCRにより測定した。グラフは、各遺伝子の測定値をGAPDHの値で補正し、DMSO添加群の値を1として平均値±標準誤差で示した。t検定を行い、有意差p<0.05を*で、p<0.01を**で示した。(n=3)

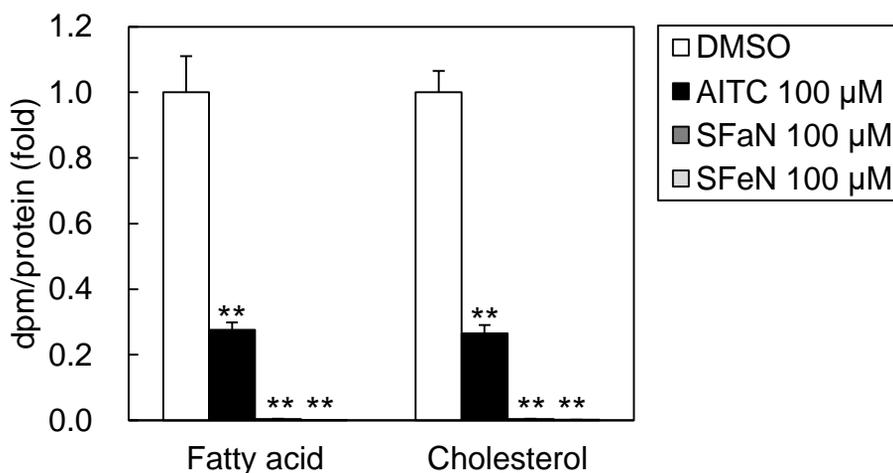


Fig. 3-10. Sulforaphane, Sulforapheneによる新規脂質合成量の変動

Huh-7細胞を12 well plateに播種して24時間培養した後、LPDS培地に交換した。16時間後に100 μ MのAITC、またはSFaN、またはSFeNを添加し、さらに18時間培養した。60 kBq [1- 14 C] Acetic acidを添加し6時間培養した後、細胞から脂質を抽出し、TLC板上で展開して脂肪酸およびコレステロールのバンドを定量した。また、細胞をRIPA bufferで溶解してタンパク質定量に供した。グラフは、脂肪酸およびコレステロールの値をタンパク質量で補正し、DMSO添加群の値を1として平均値 \pm 標準誤差で示す。t検定を行い、有意差 $p < 0.01$ を**で示した。(n=3)

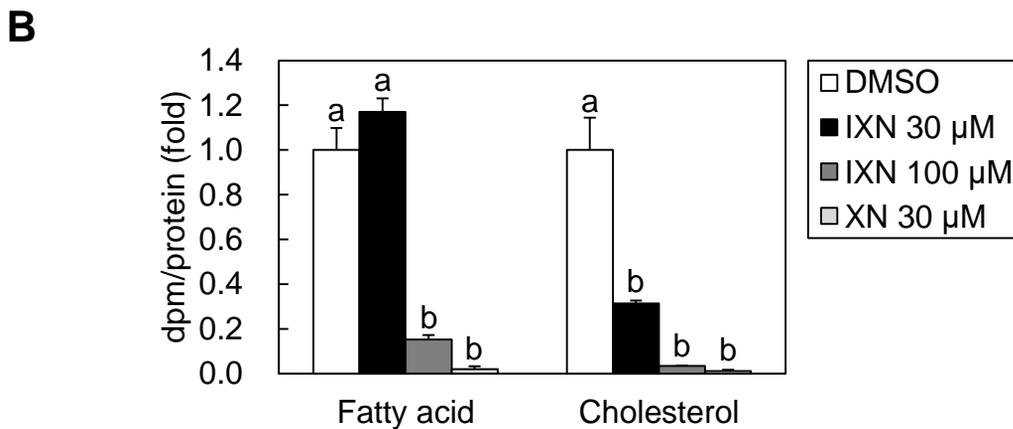
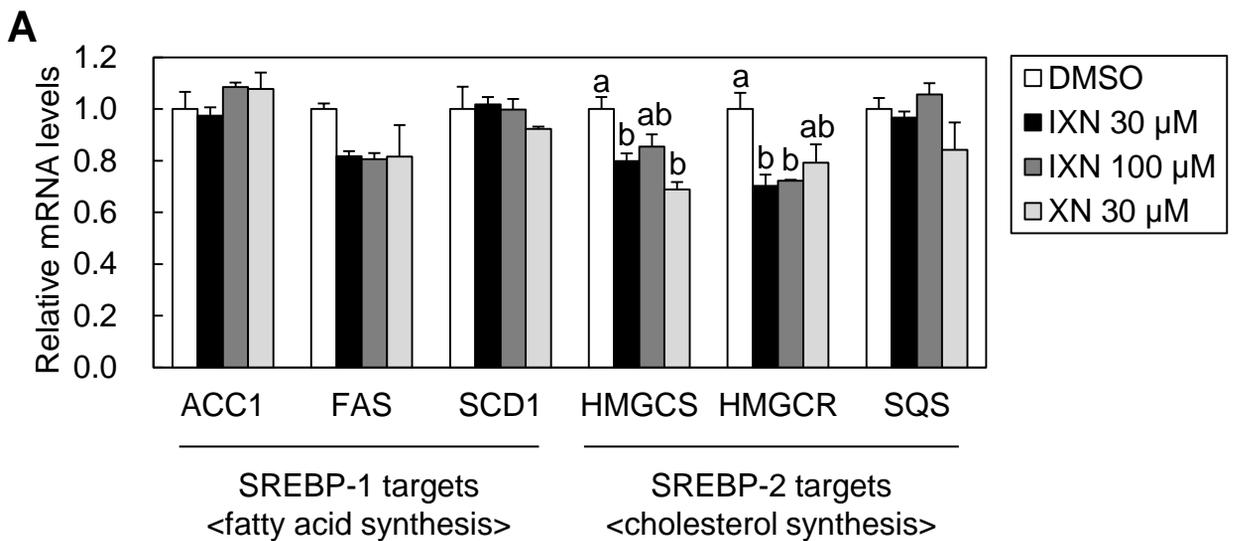


Fig. 3-11. Isoxanthohumol, XanthohumolによるSREBP非依存的な新規脂肪酸合成量の変動

(A) Huh-7細胞を12 well plateに播種して24時間培養した後、LPDS培地に交換した。16時間後に30, 100 μMのIXN、または30 μMのXNを添加し、さらに3時間培養した。細胞を回収し、total RNAを抽出してRT反応によりcDNAを得た。FAS, ACC1, SCD1, HMGCS, HMGCR, SQSおよびGAPDHのmRNA量をReal-time PCRにより測定した。グラフは、各遺伝子の測定値をGAPDHの値で補正し、DMSO添加群の値を1として平均値±標準誤差で示した。

(B) (A)と同様にIXN, XNを処理し、1時間培養した。60 kBq [1-¹⁴C] Acetic acidを添加し2時間培養した後、細胞から脂質を抽出し、TLC板上で展開して脂肪酸、コレステロールのバンドを定量した。また、細胞をRIPA bufferで溶解してタンパク質定量に供した。グラフは、脂肪酸、コレステロールの値をタンパク質量で補正し、DMSO添加群の値を1として平均値±標準誤差で示す。

一元配置分散分析を行い、多重比較検定 (Tukey-Kramer法) を行った。(a, bは異なる文字間での有意差 $p < 0.05$ を示す。n=3)

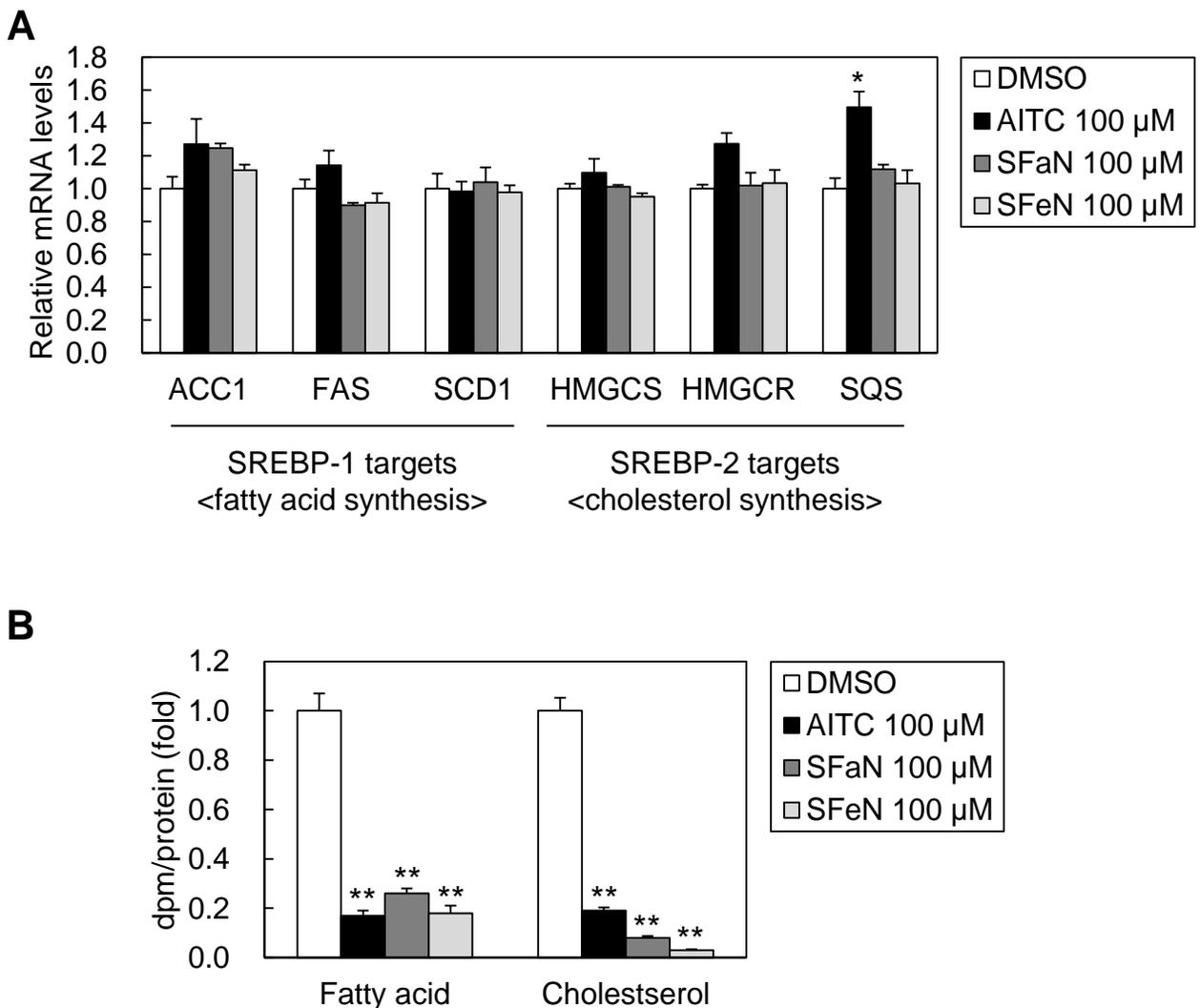


Fig. 3-12. Allyl Isothiocyanate, Sulforaphane, SulforapheneによるSREBP非依存的な新規脂肪酸合成量の変動

(A) Huh-7細胞を12 well plateに播種して24時間培養した後、LPDS培地に交換した。16時間後に100 μ MのAITC、またはSFaN、またはSFeNを添加し、さらに3時間培養した。細胞を回収し、total RNAを抽出してRT反応によりcDNAを得た。FAS, ACC1, SCD1, HMGCS, HMGCR, SQSおよびGAPDHのmRNA量をReal-time PCRにより測定した。グラフは、各遺伝子の測定値をGAPDHの値で補正し、DMSO添加群の値を1として平均値±標準誤差で示した。

(B) (A)と同様にAITC, SFaN, SFeNを処理し、1時間培養した。60 kBq [1-¹⁴C] Acetic acidを添加し2時間培養した後、細胞から脂質を抽出し、TLC板上で展開して脂肪酸、コレステロールのバンドを定量した。また、細胞をRIPA bufferで溶解してタンパク質定量に供した。グラフは、脂肪酸、コレステロールの値をタンパク質量で補正し、DMSO添加群の値を1として平均値±標準誤差で示す。

t検定を行い、有意差 $p < 0.05$ を*で、 $p < 0.01$ を**で示した。(n=3)

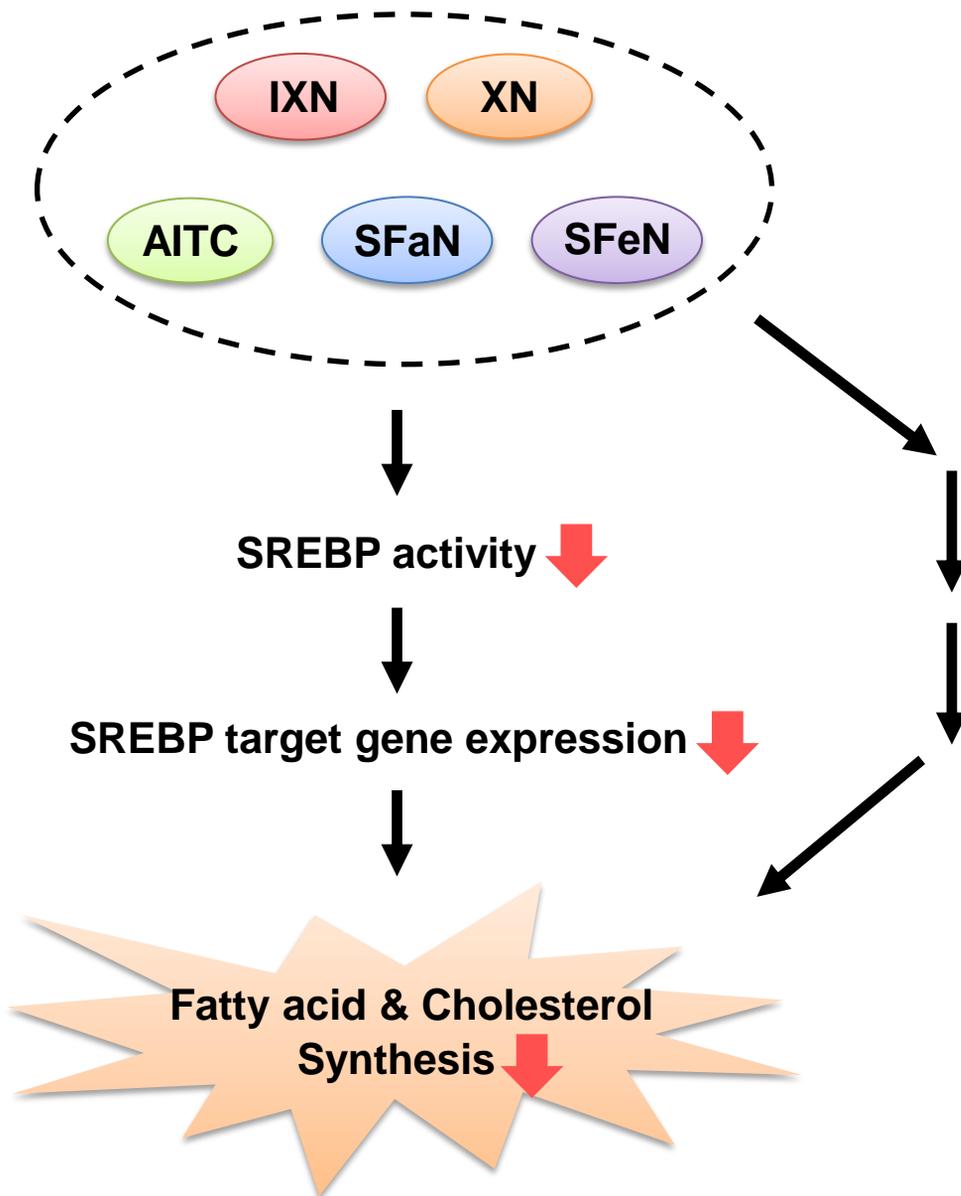


Fig. 3-13. Isoxanthohumol, Xanthohumol, Allyl Isothiocyanate, Sulforaphane, Sulforapheneによる脂質合成抑制経路概略

IXN, XN, AITC, SFaN, SFeNはSREBP標的遺伝子である脂質合成系酵素遺伝子発現を抑制する。このSREBPの活性抑制を介して、脂肪酸、コレステロール合成を低下させる。ただし、これらの化合物はSREBPを介さずに別の経路でも脂質合成を抑制すると考えられる。

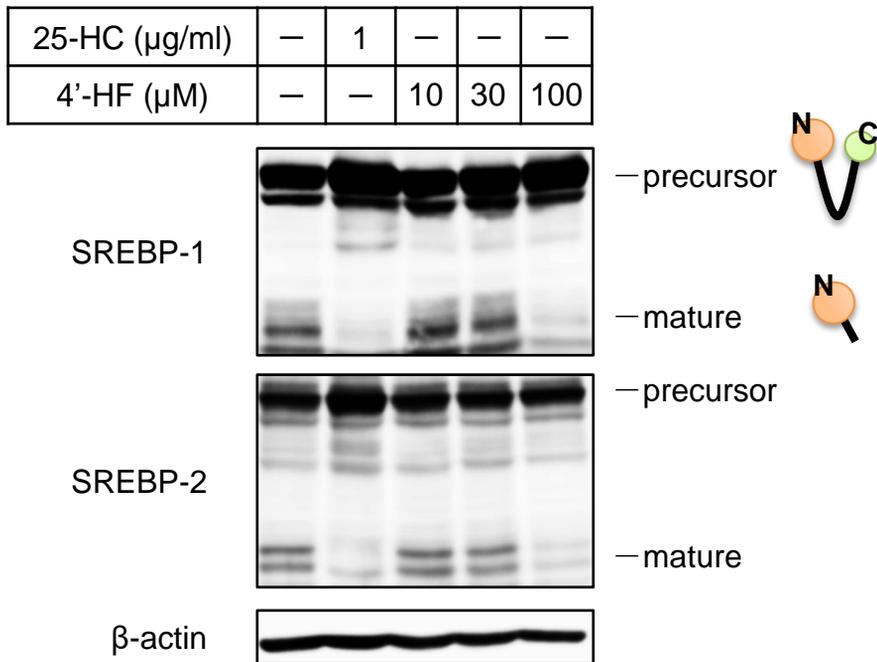


Fig. 3-14. 4'-HydroxyflavanoneによるSREBPタンパク質の変動

Huh-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に1 $\mu\text{g/ml}$ の25-HC、または10, 30, 100 μM の4'-HFを添加し、さらに3時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、SREBP-1抗体 (2A4)、SREBP-2抗体 (RS004) を用いてWestern Blottingを行った。

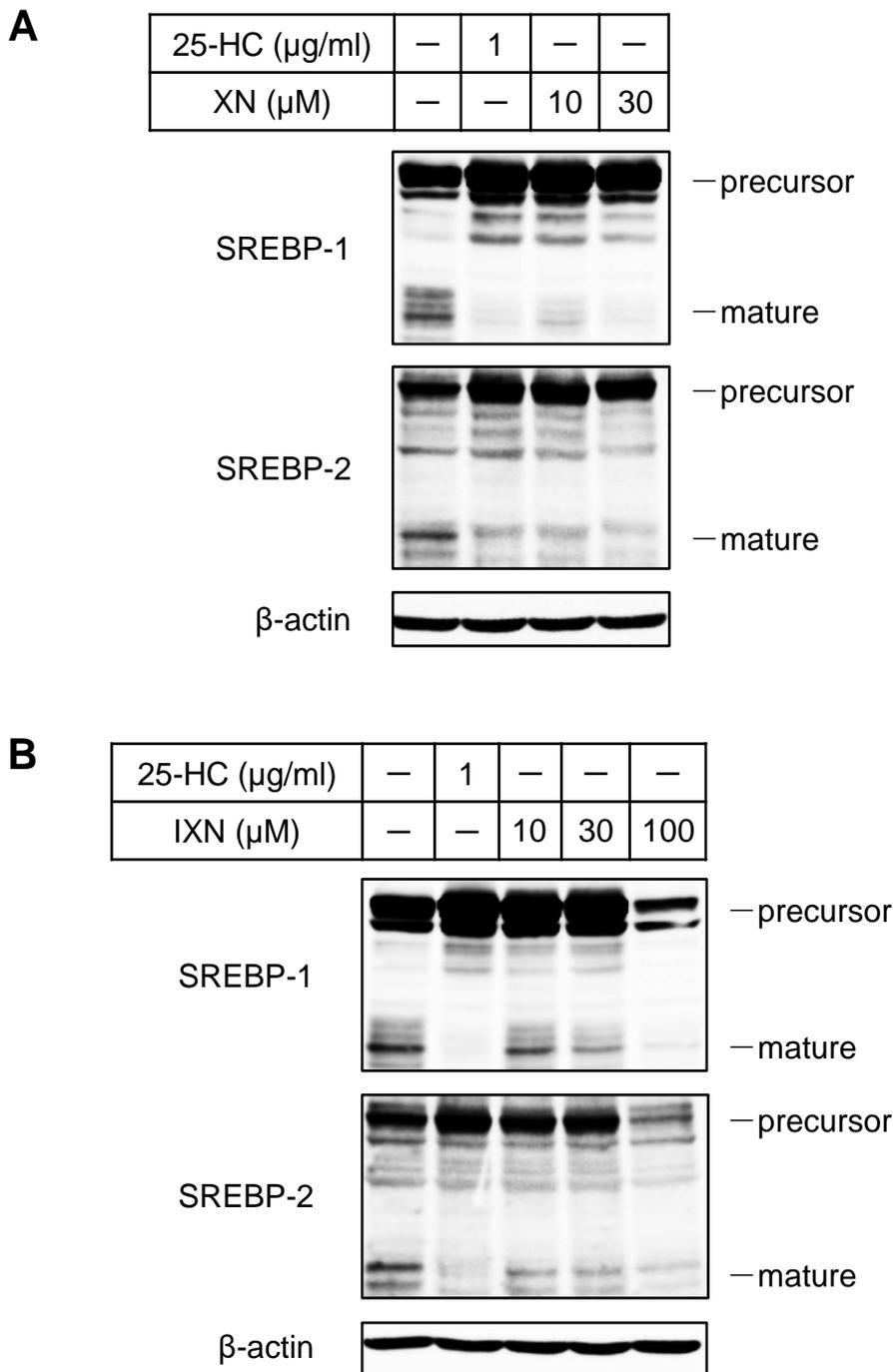


Fig. 3-15. Xanthohumol, IsoxanthohumolによるSREBPタンパク質の変動

Huh-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に1 $\mu\text{g/ml}$ の25-HC、または10, 30 μM のXN (A)、または10, 30, 100 μM のIXN (B)を添加し、さらに3時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、SREBP-1抗体 (2A4)、SREBP-2抗体 (RS004)を用いてWestern Blottingを行った。

| | | | | | |
|---------------|---|---|----|----|-----|
| 25-HC (μg/ml) | — | 1 | — | — | — |
| AITC (μM) | — | — | 10 | 30 | 100 |

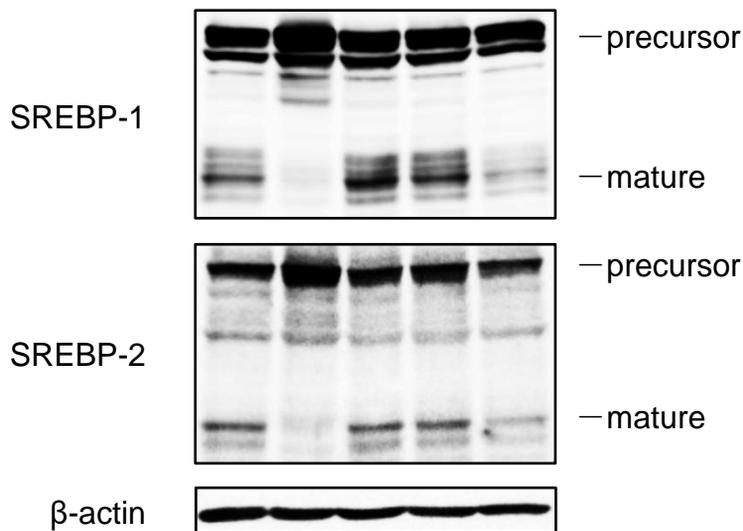


Fig. 3-16. Allyl IsothiocyanateによるSREBPタンパク質の変動

Huh-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に1 μg/mlの25-HC、または10, 30, 100 μMのAITCを添加し、さらに3時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、SREBP-1抗体 (2A4)、SREBP-2抗体 (RS004) を用いてWestern Blottingを行った。

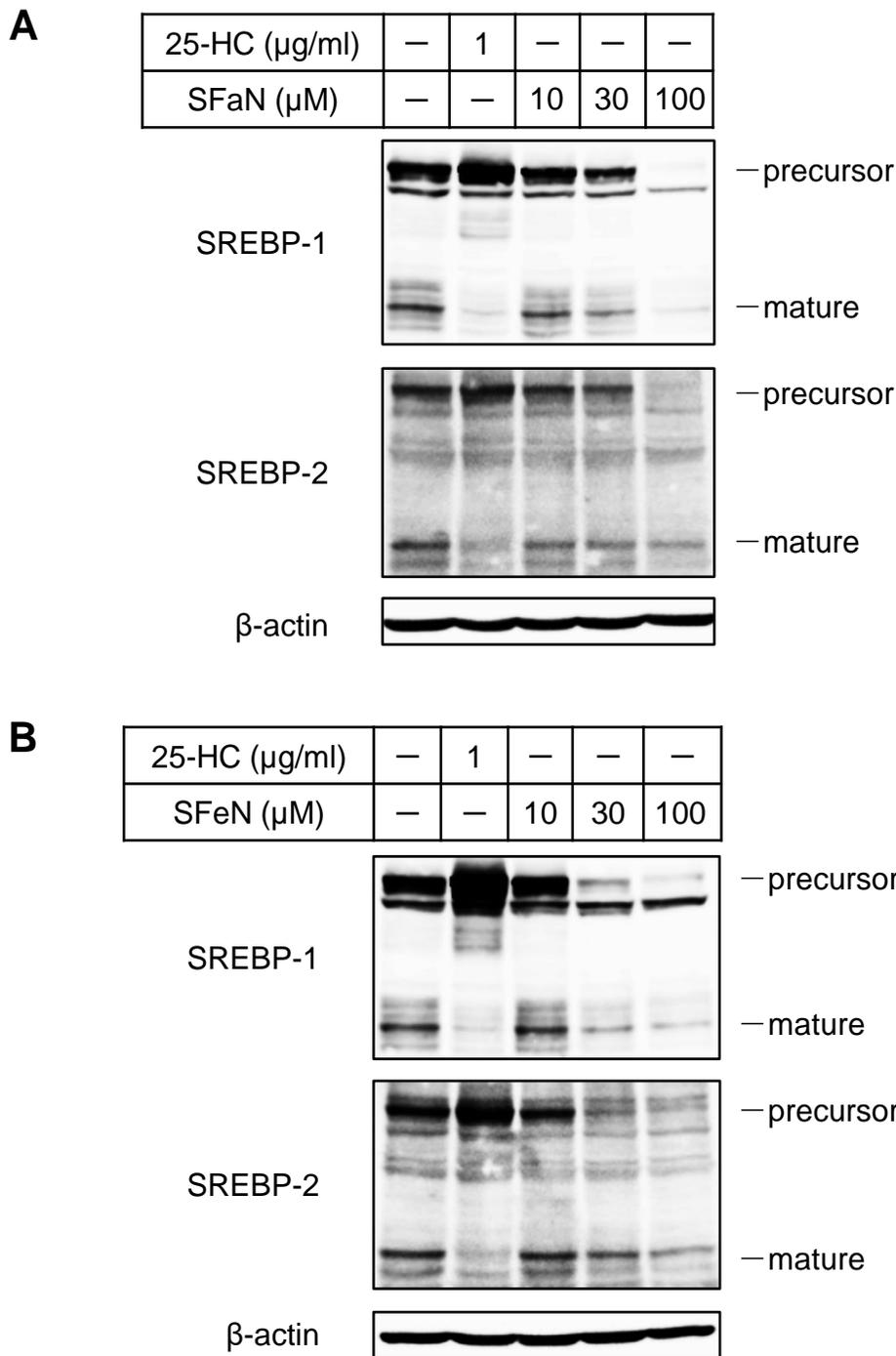


Fig. 3-17. Sulforaphane, SulforapheneによるSREBPタンパク質の変動

Huh-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に1 $\mu\text{g/ml}$ の25-HC、または10, 30, 100 μM のSFaN (A)、または10, 30, 100 μM のSFeN (B) を添加し、さらに3, 6時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、SREBP-1抗体 (2A4)、SREBP-2抗体 (RS004) を用いてWestern Blottingを行った。

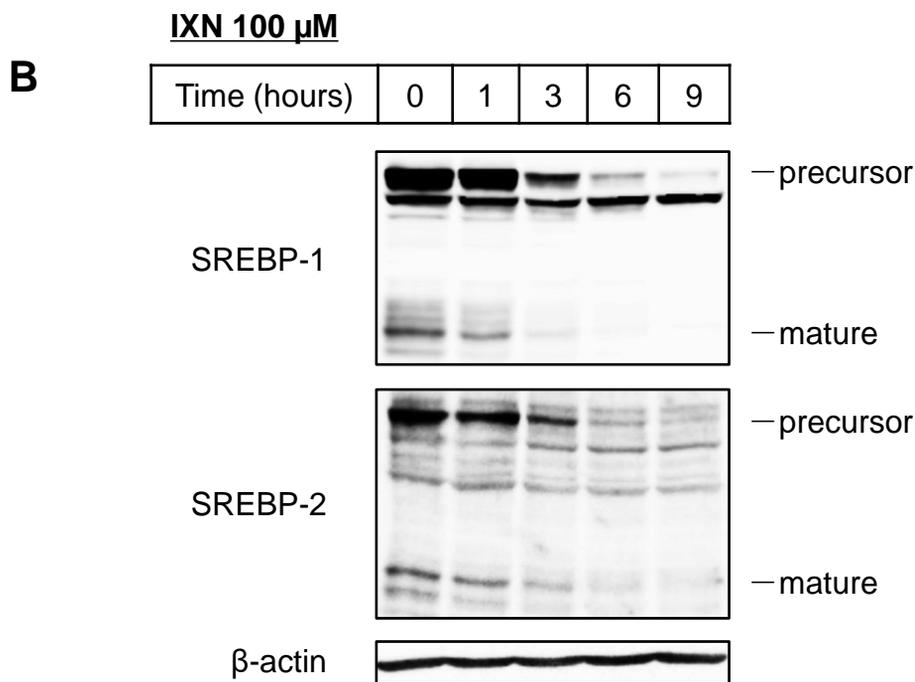
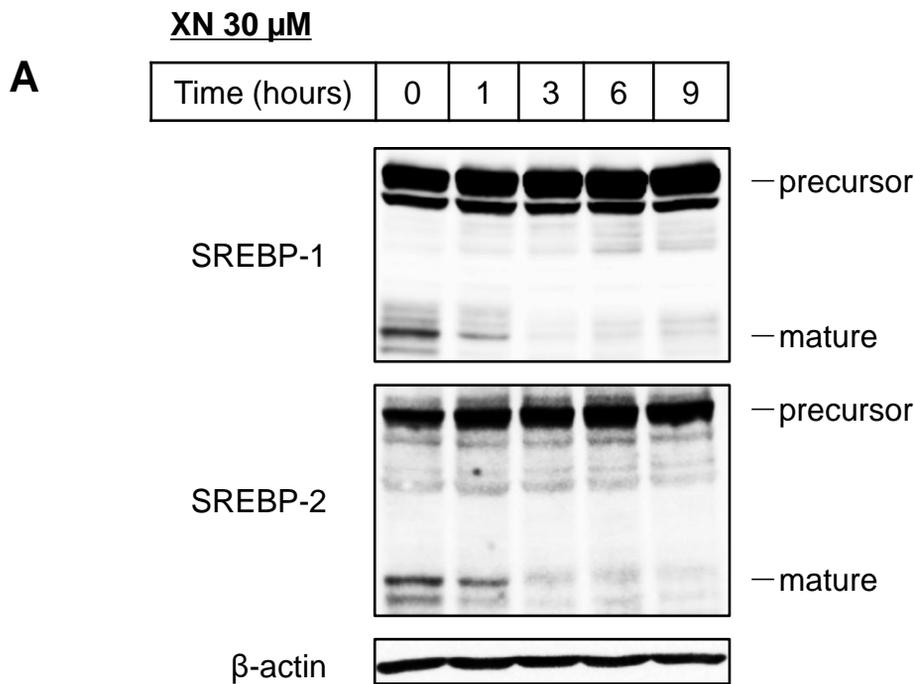


Fig. 3-18. Xanthohumol, IsoxanthohumolによるSREBPタンパク質の経時変動

Huh-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に30 μ MのXN (A)、または100 μ MのIXN (B)を添加し、さらに0, 1, 3, 6, 9時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、SREBP-1抗体 (2A4)、SREBP-2抗体 (RS004)を用いてWestern Blottingを行った。

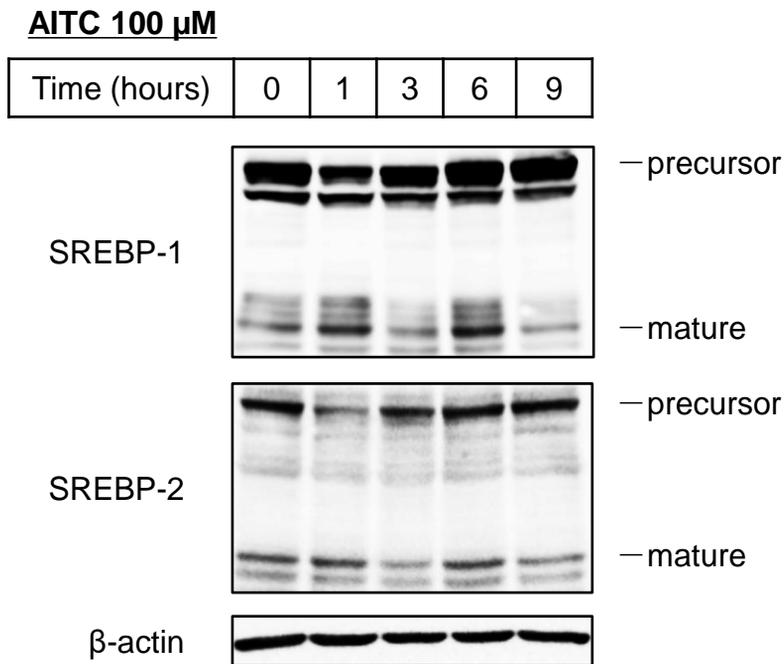


Fig. 3-19. Allyl IsothiocyanateによるSREBPタンパク質の経時変動

Huh-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に100 μ MのAITCを添加し、さらに0, 1, 3, 6, 9時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、SREBP-1抗体 (2A4)、SREBP-2抗体 (RS004) を用いてWestern Blottingを行った。

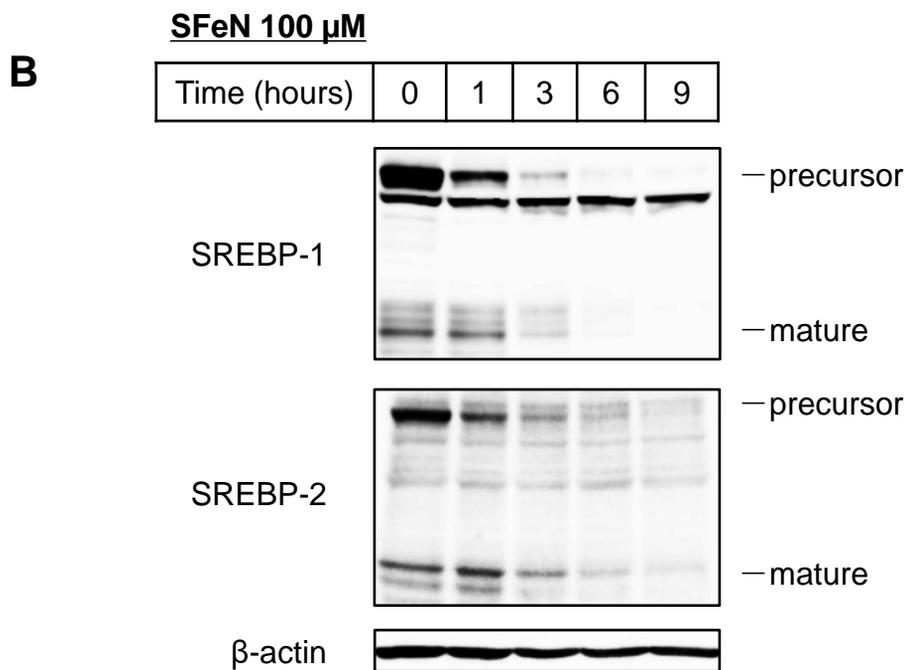
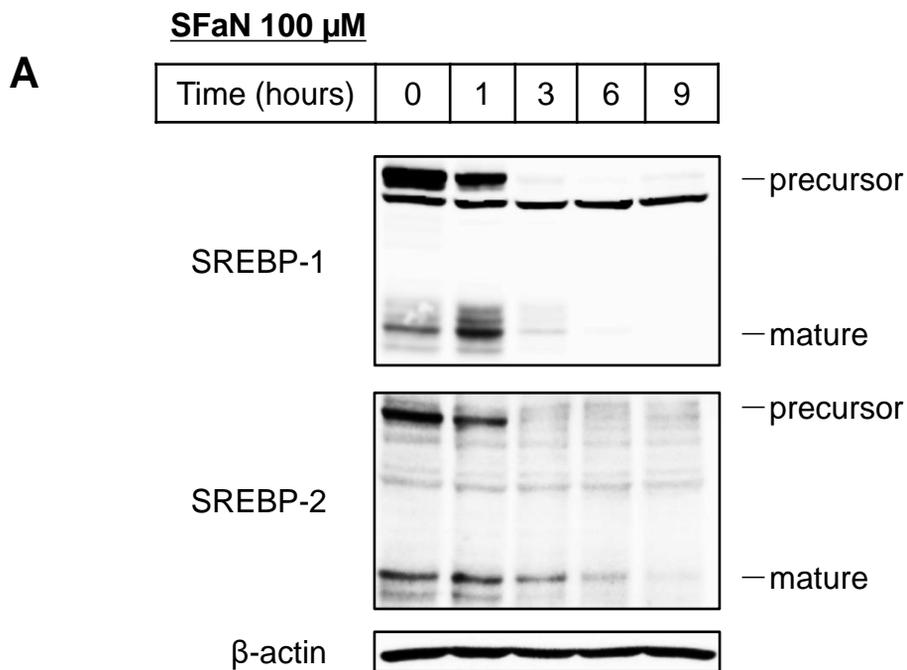


Fig. 3-20. Sulforaphane, SulforapheneによるSREBPタンパク質の経時変動

Huh-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に100 μ MのSFaN (A)、またはSFeN (B) を添加し、さらに0, 1, 3, 6, 9時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、SREBP-1抗体 (2A4)、SREBP-2抗体 (RS004)を用いてWestern Blottingを行った。

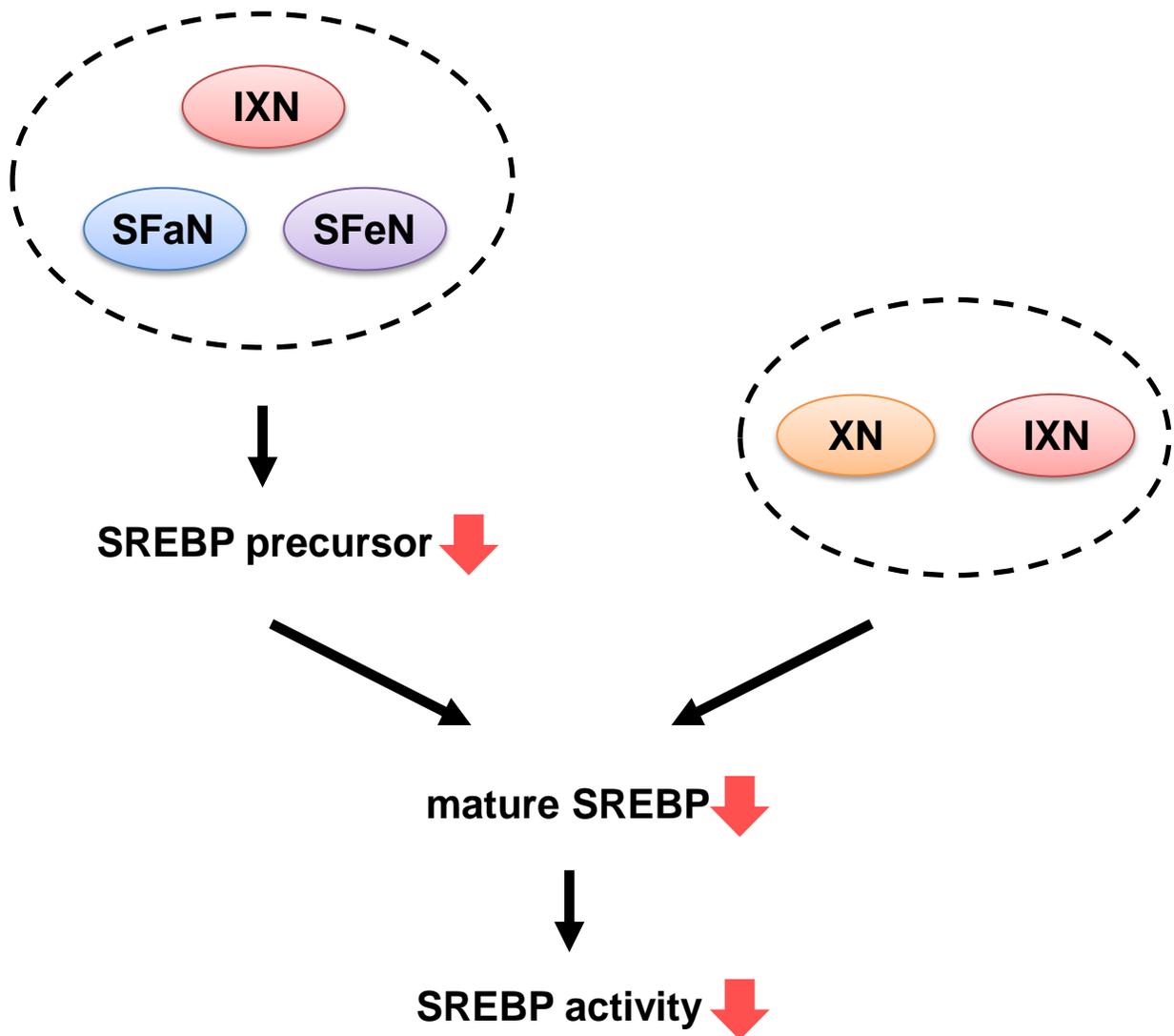


Fig. 3-21. Isoxanthohumol, Xanthohumol, Sulforaphane, SulforapheneによるSREBP活性抑制経路概略

SFaN, SFeNは主に前駆体SREBPタンパク質を減少させる。一方、XNは主に活性型SREBPタンパク質を減少させる。また、IXNは前駆体SREBP、活性型SREBPの両タンパク質を減少させる。結果的に、それぞれの化合物は活性型SREBPを減少させ、それによりSREBP活性を抑制すると考えられる。

3-4. 考察

本章における結果を以下に示す。

- ① Flavanone、または B 環 2', 3', 4'位に水酸基を有する Flavanone の中で、4'-Hydroxyflavanone だけが FAS プロモーター活性を抑制した。
- ② Isoxanthohumol の類縁体 Xanthohumol は、FAS プロモーター活性、SREBP-1, -2 標的遺伝子の mRNA 量、脂肪酸・コレステロール合成量を低下させた。
- ③ Allyl Isothiocyanate の類縁体 Sulforaphane, Sulforaphene は、FAS プロモーター活性、SREBP-1, -2 標的遺伝子の mRNA 量、脂肪酸・コレステロール合成量を低下させた。
- ④ Isoxanthohumol, Xanthohumol, Allyl Isothiocyanate, Sulforaphane, Sulforaphene は、SREBP-1, -2 標的遺伝子の発現抑制に依存せずに、処理後 3 時間以内に脂肪酸・コレステロール合成量を低下させた。
- ⑤ 4'-Hydroxyflavanone, Isoxanthohumol, Xanthohumol, Allyl Isothiocyanate, Sulforaphane, Sulforaphene は活性型 SREBP を減少させた。
- ⑥ Xanthohumol は活性型 SREBP のみを減少させた。
Sulforaphane, Sulforaphene は活性型より先に前駆体を減少させた。
Isoxanthohumol は活性型、前駆体両方を減少させた。

①の結果より、Flavanone において B 環 4'位の水酸基が FAS プロモーター活性の抑制に重要であることが示された。4'-Hydroxyflavanone はコラーゲン合成抑制作用や血管弛緩作用を有するが、6-Hydroxyflavanone も同様の作用を発揮することが報告されている [161, 162]。つまり、これらの生理活性に重要な水酸基の位置は 4'位に限らないことが示されている。したがって、4'-Hydroxyflavanone に

よる FAS プロモーター活性の抑制作用は、これまでに報告されている生理作用とは別の経路を介していると考えられる。

Xanthohumol は Isoxanthohumol と同様にホップ中の成分であり、ホップに最も多く含まれるプレニル化フラボノイドである。その生理活性は抗酸化作用 [114]、抗がん作用 [117]、抗炎症作用 [115] など多岐に渡る。また、肝細胞においてトリグリセリドの合成・分泌を抑制すること [119]、脂肪細胞の分化を抑制することが報告されている [120]。*in vivo* でも肥満や II 型糖尿病の改善 [121-123] が確認されており、肝臓における SREBP-1c mRNA 発現の低下が認められているが [123]、作用機構は解明されていない。

②の結果について、Xanthohumol は 10 μ M や 30 μ M で SREBP 標的遺伝子の mRNA 量を低下させることが示された (Fig. 3-5)。一方、Isoxanthohumol はこれらの濃度では SREBP 標的遺伝子の mRNA 量を低下させないことが確認されている (Fig. 3-5)。このことから、Xanthohumol は Isoxanthohumol よりも高い活性を有すると考えられる。これまでも、抗がん作用や抗炎症作用において Xanthohumol の方がより強力な効果を示すという報告がある [115, 117]。また、⑥に示すように、Xanthohumol が活性型 SREBP のみを減少させる (Fig. 3-18. A) のに対し、Isoxanthohumol は活性型、前駆体両方を減少させる (Fig. 3-18. B) という異なる作用が認められた。両者の構造を比較すると、Xanthohumol は Isoxanthohumol の C 環が開環した形となっている (Fig. 3-3)。したがって、これら 2 種類の化合物の作用の違いは、この構造の相違に起因する可能性が考えられる。

Sulforaphane, Sulforaphene はそれぞれブロッコリー、ハツカダイコンから単離、同定されたイソチオシアネートである。Allyl Isothiocyanate と同様に抗がん作用 [146-157] や Nrf2 を介した生体防御作用 [142-145] が知られており、その他にも抗炎症作用 [158] が報告されている。また、Sulforaphane はハムスターの肝臓において、SREBP および標的遺伝子の mRNA 発現、コレステロール量を低下させる [159]。しかし、SREBP 活性調節メカニズムやタンパク質レベルでの解析はなされていない。

③の結果について、Sulforaphane, Sulforaphene を Huh-7/FAS 細胞に処理すると、Allyl Isothiocyanate 処理時よりも強くプロモーター活性が抑制され、100 μ M 処理時には活性が 1% 以下に低下した (Fig. 3-8)。一方、Sulforaphane, Sulforaphene に

よる SREBP 標的遺伝子の mRNA 量の低下は Allyl Isothiocyanate と同程度であった (Fig. 3-9)。このような効力の違いが生じる原因は、今のところ不明である。今後、さらにプロモーター活性について検討を行うなど、SREBP 活性抑制効果をより精細に解析する必要がある。

また、Allyl Isothiocyanate, Sulforaphane, Sulforaphene はいずれも SREBP 標的遺伝子の mRNA 量の低下、脂質合成量の低下に効果的であったことから、これらの効果にはイソチオシアネート基 (-N=C=S) が重要であると推察される。さらに、Sulforaphane, Sulforaphene により脂質合成がほぼ完全に抑制されたこと (Fig. 3-10) や、Allyl Isothiocyanate は前駆体 SREBP にほとんど影響を与えない (Fig. 3-19) のに対し、Sulforaphane, Sulforaphene は前駆体 SREBP を顕著に減少させる (Fig. 3-20. A, B) ことを考慮すると、Sulforaphane, Sulforaphene が有するスルフィニル基 [-S(=O)-] もまた重要である可能性が考えられる。今後、構造活性相関についてさらに解析していく必要がある。

④の結果について、この作用機序として、脂質合成経路中に存在する特定の因子の活性を阻害していることが推測される。さらに、各化合物が脂肪酸・コレステロール両方の合成を抑制したことを考慮すると、両者に共通するアセチル CoA の合成までの経路を阻害している可能性がある。本実験では、 ^{14}C でラベルされた酢酸を用いて、その脂肪酸・コレステロールへの取り込み量を測定していることから、Acetyl-CoA synthetase (酢酸からアセチル CoA を合成する酵素) の活性を阻害している、もしくは酢酸の細胞内への取り込みを阻害していることも考えられる。この点については、 ^{14}C ラベル酢酸以外にも、 ^3H ラベル H_2O など他のラベル体を用いて実験を行うことで確認することができるだろう。

また、FAS の阻害剤として知られている C75 と Cerulenin は、脂肪酸合成だけでなくコレステロール合成も阻害することが報告されている [163]。この研究では、Cerulenin は脂肪酸合成とコレステロール合成を同程度に抑制し、C75 はコレステロール合成をより強く阻害するという結果も示されている [163]。しかし、これら 2 種類の FAS 阻害剤がコレステロール合成を阻害するメカニズムは解明されていない。ただし、これらの阻害剤は、7つの触媒ドメインから構成される FAS の KS (β -ketoacyl synthase) ドメインに結合し、基質となるアシル ACP の結合を阻害することが明らかにされている [164, 165]。本研究で見出した化合物についても、このドメインに作用し FAS を阻害する可能性が考えられる。今

後、脂質合成経路を網羅的に解析し、それぞれの化合物による阻害部位を特定する必要がある。

本研究で見出した食品成分は、SREBP に依存しない経路でも脂肪酸・コレステロール合成を抑制することが示された。それぞれの化合物の作用メカニズムを解明するうえで、この SREBP 非依存的な効果も重要であると考えられるため、今後解析していく予定である。

本研究では SREBP の活性抑制に焦点を当てており、これまでもその観点から研究を進め、見出した食品成分が実際に SREBP 標的遺伝子の発現を低下させることを示してきた。そこで、本章では食品成分の SREBP への作用に着目し、さらなる解析を行った。その結果、⑤に示すように、見出した 6 種類の化合物が活性型 SREBP を減少させることを明らかにした (Fig. 3-14~3-17)。また、活性型 SREBP の減少は各化合物処理後 3 時間で観察された。したがって、各化合物処理により活性型 SREBP が減少し、その結果として SREBP 標的遺伝子 mRNA 量が低下すると考えられる。この結果を受けて、本章以降では、それぞれの化合物の詳細な SREBP 活性抑制機構の解析を行っている。ただし、4'-Hydroxyflavanone に関しては、天然の食品成分ではないため、SREBP 標的遺伝子発現、新規脂質合成の低下および活性型 SREBP の減少を確認して [166]、解析に区切りをつけた。

⑥の実験では、Allyl Isothiocyanate に関しても、処理後の経時的な SREBP タンパク質の変動を観察したが、活性型 SREBP を減少させる効果は他の化合物と比べて弱く安定しなかった。そこで、この化合物の解析もここまでとし [167]、その他の 4 種類の食品成分に着目して、引き続き作用解析を進めた。

Isoxanthohumol は、処理 1 時間後の時点で前駆体 SREBP よりも先に活性型 SREBP を減少させた (Fig. 3-18. B) ことから、Xanthohumol と同様に直接的に活性型 SREBP を減少させる効果を持っていると考えられる。しかし、構造の類似する Xanthohumol が活性型 SREBP のみを減少させる (Fig. 3-18. A) のに対し、Isoxanthohumol は前駆体 SREBP も顕著に減少させる (Fig. 3-18. B) という興味深い結果を捉えた。そこで、本研究では、Xanthohumol との作用の違いを追求するという観点もふまえ、Isoxanthohumol に関しては前駆体 SREBP を減少させる効果に着目し、同様の効果を持つ Sulforaphane, Sulforaphene とともに第 6 章で作用

メカニズムの解析を行った。また、Xanthohumol による活性型 SREBP を減少させる作用の分子機構については、第 4 章で詳細に解析を進めた。

第 4 章

Xanthohumol による活性型 SREBP 減少機構の解析

4-1. 緒言

第 2 章の結果より、Xanthohumol は活性型 SREBP を減少させることにより SREBP 活性を低下させ、脂肪酸・コレステロール合成を抑制することが示された。そこで本章では、Xanthohumol がどのようにして活性型 SREBP を減少させるのか、その分子機構の解明を試みた。まず、SREBP を小胞体膜上に繋ぎ止めプロセッシングを負に制御する因子 Insig の欠損株においても活性型 SREBP を減少させるかどうかを検討した。次に、

- ① 活性型 SREBP の分解を促進するか
- ② 前駆体 SREBP の切断を抑制するか
- ③ 前駆体 SREBP の小胞体・ゴルジ体間輸送を抑制するか

について検討した。さらに、Xanthohumol と SCAP/SREBP の輸送に関与するタンパク質との相互作用や、SCAP/SREBP の COP II 輸送小胞への取り込みの変動について解析した。

4-2. 実験材料および手法

実験材料の調製

<試薬>

Cycloheximide

SIGMA から購入し、DMSO に溶解して 50mM のストック溶液として-20℃に保存した。

AEBSF [4- (2-Aminomethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride]

SIGMA から購入し、滅菌水に溶解して 300 mM の溶液としたものをフィルター滅菌し、-20℃に保存した。

Brefeldin A

SIGMA から購入し、Methanol に溶解して 1 mg/mL のストック溶液として-20°C に保存した。

Cholesterol

SIGMA より購入し、エタノールに溶解して 10 mg/mL のストック溶液として-20°C に保存した。

Xanthohumol ビーズ

理化学研究所 ケミカルバイオロジー研究基盤施設施設長 長田裕之博士に作製して頂いた。

Thapsigargin

SIGMA より購入し、DMSO に溶解して 500 μ M のストック溶液として-20°C に保存した。

その他は 2-2 に準じた。

< siRNA >

Control siRNA (sc-37007)、Insig-1 siRNA (h) (sc-44432)、Insig-2 siRNA (h) (sc-45781) は、Santa cruz biotechnology より購入した。すべて DEPC 水に溶解し、20 μ M のストック溶液として-20°C に保存した。

< 細胞培養 >

CHO-7 細胞

チャイニーズハムスター卵巣由来 CHO-7 細胞は、Dr. DeBose-Boyd, R.A. よりご供与頂いた。10% FBS, 0.1% P/ST 溶液を含む DMEM/Ham's F-12 (Wako) を用い、37°C、5% CO₂ 下で培養を行った。

SRD-15 細胞

SRD-15 細胞は、Dr. DeBose-Boyd, R.A. よりご供与頂いた。この細胞は、CHO-7 細胞において Insig-1, -2 を欠損させたものである。10% FBS, 0.1% P/ST 溶液を含む DMEM/Ham's F-12 (Wako) を用い、37°C、5% CO₂ 下で培養を行った。

CHO/pGFP-SCAP 細胞

CHO/pGFP-SCAP細胞は、Dr. Goldstein, J.L., Dr. Brown, M.S.よりご供与頂いた。この細胞は、SCAP欠損株であるSRD-13A細胞にGFP-SCAPを導入し、安定発現株としたものである。10% FBS, 0.1% P/ST溶液を含むDMEM/Ham's F-12 (Wako) を用い、37°C、5% CO₂下で培養を行った。

その他は 2-2 に準じた。

<抗体> (【】内は使用条件)

anti-SCAP 抗体 (9D5) 【1: 500】、anti-Sec23 抗体 (E-19) 【1: 200】は、Santa Cruz Biotechnology より購入した。anti-GM130 抗体 【1: 1000】は、BD Biosciences より購入した。anti-Sec61α 抗体 【1: 1000】は、Millipore より購入した。anti-Sec24C 抗体 【1: 200】は、Cell Signaling より購入した。anti-ATF6 抗体は、Bio Academia より購入した。anti-mouse IgG-HRP 抗体 【1: 5000】、anti-rabbit IgG-HRP 抗体 【1: 5000】、anti-mouse IgG-Cy3 抗体 【1: 800】は、Jackson より購入した。その他は 3-2 に準じた。

<プラスミド>

pCMV-3×Flag-SREBP-1a (2-487)

当研究室の OB・金山知彦博士が作製したものをを用いた。pCMV-3×Flag-7.1 (SIGMA) にヒト SREBP-1a (アミノ酸 2-487) が挿入されている。

pCMV-3×Flag-SREBP-1c (2-463)

当研究室の OB・金山知彦博士が作製したものをを用いた。pCMV-3×Flag-7.1 (SIGMA) にヒト SREBP-1a (アミノ酸 2-463) が挿入されている。

pCMV-3×Flag-SREBP-2 (2-481)

当研究室の OB・金山知彦博士が作製したものをを用いた。pCMV-3×Flag-7.1 (SIGMA) にヒト SREBP-1a (アミノ酸 2-481) が挿入されている。

ステロール枯渇処理

培養した細胞を PBS で洗浄した後、5% LPDS, 0.1% P/St 溶液、50 μM Sodium Mevalonate, 12.5 μM Fluvastatin を含む DMEM (High glucose) で培地交換した。

mRNA の定量

2-2 に準じた。

以下に使用した Gene Expression Assay の情報を記す。

TaqMan Gene Expression Assays

| | |
|----------|---------------|
| hInsig-1 | Hs01650977_g1 |
| hInsig-2 | Hs00379223_m1 |

タンパク質の定量

3-2 に準じた。

タンパク質の検出

3-2 に準じた。

細胞への siRNA の導入 (リバーストランスフェクション法)

コラーゲンコートした 6 well plate に、Opti-MEM 500 μL と siRNA 40 pmol を加えた後、Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen) を 7.5 μL 加え、穏やかに混合し、室温で 10~20 分間インキュベートした。

抗生物質不含の基本培地で、Huh-7 細胞を 5×10^5 cells/well に調整し、各 well に 2.5 mL 加え、穏やかに混合した。

細胞への遺伝子発現ベクターの導入 (リン酸カルシウム法)

2-2 に準じた。

小胞体、ゴルジ体画分の調製 (Fig. 4-12 参照)

RIPA buffer

50 mM Tris-HCl (pH 7.5)

150 mM NaCl

4°Cで保存し、使用時に以下を添加した。

Protease inhibitor cocktail (1/100 量)

1 mM PMSF

Phosphatase inhibitor cocktail (1/100 量)

以下の操作は氷上で行った。100 mm dish で培養した細胞を、氷冷した PBS 5 mL で洗浄した後、さらに PBS 1 mL を加え、細胞をスクレイパーでかきとって 1.5 mL チューブに回収した。4°C、500×g で 10 分間遠心し、上清を除去した。ペレットを 15% (w/v) Sucrose / RIPA buffer 1 mL に懸濁し、25 G 注射針で 30 回ホモジェナイズした。4°C、3,000×g で 10 分間遠心し、上清を回収した。上清に 15% (w/v) Sucrose / RIPA buffer を加え Total volume を 3 mL とし、サンプルとした。そのうち 100 μL を Whole cell fraction として回収した。13 PET チューブ (HITACHI) に下から、45% (w/v) Sucrose / RIPA buffer 3 mL、30% (w/v) Sucrose / RIPA buffer 5 mL、15% (w/v) Sucrose / RIPA buffer + サンプル 3 mL、7.5% (w/v) Sucrose / RIPA buffer 2 mL の順で重層した。超遠心機 himac CP85β (HITACHI) を用いて、4°C、24,000 rpm、ACCEL: 1、DECEL: HOLD で 1 時間遠心した。その後、25 G の注射針でチューブの側面に穴を開け、Sucrose 濃度 14~18% の部分に形成される Light fraction、34~38% の部分に形成される Heavy fraction のバンド周辺の溶液を 1 mL ずつ回収した。それぞれの fraction には以下の細胞内小器官が含まれる。

Light fraction: ゴルジ体、細胞膜、エンドソーム

Heavy fraction: 小胞体、ペルオキシソーム

等量ずつ回収したサンプルに 1/5 量の 6×LaemmLi Sample buffer を加え、37°C で 30 分間加熱処理した。これをタンパク質サンプルとして、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供した。

免疫染色

Poly-D-Lysine Cellware 4-Well Culture Slide (BD BioCoat™) で培養した細胞を PBS で洗浄した後、3% (w/v) Paraformaldehyde / PBS 溶液を加え、37°C で 15 分間インキュベートした。室温でさらに 15 分間インキュベートし、PBS で 3 回洗浄した。0.2% (v/v) Triton X-100 / PBS 溶液を加え、室温で 5 分間振とうした後、PBS で 3 回洗浄した。2% (w/v) BSA 溶液を加え、室温で 1 時間振とうすることでブロッキングした。その後、anti-GM130 抗体 (1: 100) を含むブロッキング溶液を加え、室温で 1 時間振とうし、PBS で 3 回洗浄した。anti-mouse-IgG-Cy3 抗体 (1: 800) を含むブロッキング溶液を加え、遮光しながら室温で 30 分間振とうした。PBS で 3 回洗浄した後に、スライド上部のチャンバーを取り除き、Gel Mount™ Aqueous Mounting Medium (SIGMA) を用いてカバーガラス (MATSUNAMI) を接着させた。遮光しながら室温で 30 分間静置した後、カバーガラスの 4 辺をマニキュアでシールした。共焦点レーザー顕微鏡 FV500 (OLYMPUS) を用いて、GFP, Cy3 の蛍光を観察した。

Xanthohumol ビーズ結合タンパク質の検出

Binding buffer

10 mM Tris-HCl (pH 7.6)

50 mM KCl

5 mM MgCl₂

1 mM EDTA

4°C で保存し、使用時に以下を添加した。

Protease inhibitor cocktail (1/100 量)

1 mM PMSF

Phosphatase inhibitor cocktail (1/100 量)

以下の操作は氷上で行った。100 mm dish で培養した細胞を、氷冷した PBS 5 mL で洗浄した後、さらに PBS 1 mL を加え、細胞をスクレイパーでかきとって 1.5 mL チューブに回収した。4°C、500×g で 10 分間遠心し、上清を除去した。ペレットを Binding buffer 200 μL に再懸濁し、25 G 注射針で 30 回ホモジェナイ

ズした。4°C、15,000×g で 15 分間遠心した後、上清を回収し、タンパク質定量を行った。20 μL を分注し、6×LaemmLi Sample buffer 4 μL を加え、95°C で 5 分間加熱処理し、input のサンプルとした。タンパク質 1 mg にコントロールビーズ 10 μL を加え、4°C で 1 時間回転混合した。4°C、15,000×g で 1 分間遠心した後、上清を回収し、コントロールビーズ、または Xanthohumol ビーズ 15 μL を加え、4°C で 12 時間回転混合した。4°C、1,000×g で 5 分間遠心し、上清を除去した。ビーズを Binding buffer 1 mL を加え、4°C、1,000×g で 5 分間遠心し、上清を除去した。Binding buffer による洗浄をさらに 2 回繰り返した。ビーズに binding buffer 20 μL、6×LaemmLi Sample buffer 8 μL を加え、95°C で 5 分間加熱処理した。4°C、1,000×g で 5 分間遠心した後、上清を回収し、これをタンパク質サンプルとして、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供した。

免疫沈降

Nonidet P-40 lysis buffer

50 mM Tris-HCl (pH 7.6)

100 mM NaCl

1.5 mM MgCl₂

1% (v/v) Nonidet P-40

1 mM DTT

4°C で保存し、使用時に以下を添加した。

Protease inhibitor cocktail (1/100 量)

1 mM PMSF

Phosphatase inhibitor cocktail (1/100 量)

以下の操作は氷上で行った。100 mm dish で培養した細胞を、氷冷した PBS 5 mL で洗浄した後、さらに PBS 1 mL を加え、細胞をスクレイパーでかきとって 1.5 mL チューブに回収した。4°C、500×g で 10 分間遠心し、上清を除去した。ペレットを Nonidet P-40 lysis buffer 1 mL に再懸濁し、25 G 注射針で 20 回ホモジエナイズした。4°C で 1.5 時間回転混合した後、4°C、20,000×g で 30 分間遠心し、上清を回収した。そのうちの 50 μL を分注し、6×LaemmLi Sample buffer 10 μL を加え、95°C で 5 分間加熱処理し、input のサンプルとした。残りのタンパク質

溶液に anti-SCAP 抗体 (9D5) 2 μg を加え、4°C で 1.5 時間回転混合した後、Protein A-sepharose beads (GE Healthcare) 50 μL を加え、さらに 1.5 時間回転混合した。4°C、300 \times g で 3 分間遠心し、上清を除去した。ビーズに Nonidet P-40 lysis buffer 1 mL を加え、4°C、300 \times g で 3 分間遠心し、上清を除去した。Nonidet P-40 lysis buffer による洗浄をさらに 2 回繰り返した。ビーズに 2 \times Laemmli Sample buffer 100 μL を加え、95°C で 5 分間加熱処理した。4°C、1,000 \times g で 3 分間遠心した後、上清を回収し、これをタンパク質サンプルとして、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供した。

ドッキングシミュレーション

Xanthohumol と Sec24 の結合を、リガンドドッキングツール GOLD を用いてシミュレーションした。human Sec23A/24A 複合体 (Protein Data Bank code: 2NUT) の Sec24A 付近に限定して、Xanthohumol を 500 回ドッキングさせ、GOLD スコアの高かった上位 10 個の結合部位を示した。なお、本解析は東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 生物情報工学研究室准教授 中村周吾先生に行って頂いた。

※本章の [Fig. 4-1](#), [4-2](#), [4-11](#) の結果は修士論文より引用した。

4-3. 結果

Xanthohumol は Insig 非依存的に活性型 SREBP を減少させる

Xanthohumol が活性型 SREBP を減少させるメカニズムを解析するために、まず、SCAP/SREBP 複合体を小胞体膜上に繋ぎとめ SREBP プロセッシングを負に制御する因子である Insig に着目した。チャイニーズハムスター卵巣由来 CHO-7 細胞において Insig-1, -2 を欠損させた SRD-15 細胞を用いて、Xanthohumol 処理時の SREBP タンパク質の変動を検討することにした。この細胞のモデル図を Fig. 4-1 に示した。

CHO-7 細胞、SRD-15 細胞をステロール枯渇培地で 16 時間培養し、30 μ M の Xanthohumol、または 1 μ g/mL の 25-HC を 3 時間処理した後、Western Blotting による解析を行った。25-HC は Insig に結合することにより SREBP プロセッシングを抑制することが知られており、実際に親株である CHO-7 細胞においては活性型 SREBP-1, -2 が減少するが、Insig 欠損株である SRD-15 細胞においては減少しなかった (Fig. 4-2. lanes 2, 5)。一方、Xanthohumol (XN) を処理した場合には、CHO-7, SRD-15 両細胞において活性型が減少した (Fig. 4-2. lanes 3, 6)。

また、Huh-7 細胞において、siRNA を用いて Insig-1, -2 をノックダウンした場合の Xanthohumol の効果を検証した。リバーストランスフェクション法によりそれぞれ 40 pmol の siRNA を導入した後、ステロール枯渇培地で 16 時間培養した。30 μ M の Xanthohumol を 3 時間処理し、Insig-1, -2 の mRNA 量を解析した。その結果、Insig-1 では約 50%、Insig-2 では約 40% のノックダウンを確認した (Fig. 4-3. A. DMSO 添加群同士の比較)。このとき、25-HC による活性型 SREBP 減少は Insig-1, -2 のノックダウンによって一部抑えられた (Fig. 4-3. B. lanes 2, 5) のに対し、Xanthohumol の効果は Insig-1, -2 をノックダウンしても変わらなかった (Fig. 4-3. B. lanes 3, 6)。ただし、25-HC, Xanthohumol は SREBP 活性を抑制するため、おそらくこれに起因して標的遺伝子である Insig-1 の mRNA が減少していた (Fig. 4-3. A)。また、予想外なことに、Xanthohumol により Insig-2 の mRNA 量も低下した (Fig. 4-3. A)。

以上の結果より、Xanthohumol は Insig を介さずに活性型 SREBP を減少させるという 25-HC とは異なる制御を行うことが明らかとなった。

Xanthohumol は活性型 SREBP の分解を促進しない

次に、活性型 SREBP が減少するメカニズムとして、以下の 3 点に着目して解析を行った (Fig. 4-4)。

- ① 活性型 SREBP の分解促進
- ② 前駆体 SREBP の切断抑制
- ③ 前駆体 SREBP の小胞体・ゴルジ体間輸送の抑制

最初に、1 つ目の可能性として、Xanthohumol が活性型 SREBP の分解を促進するかどうかを検討した。まず、活性型 SREBP-1a (アミノ酸 2-487) の発現プラスミド [pCMV-3×Flag-SREBP-1a (2-487)] をトランスフェクションした CHO-7 細胞に 50 μ M の翻訳阻害剤シクロヘキシミドを処理した。30 分後に 30 μ M の Xanthohumol、または 1 μ g/mL の 25-HC を 2, 4, 6 時間処理し、Western Blotting による解析を行った。その結果、シクロヘキシミドにより経時的に活性型 SREBP-1a が減少した (Fig. 4-5. A. lanes 1~4)。25-HC は活性型 SREBP の分解に関与しないことが報告されており [168]、実際に今回の実験でも分解は促進されなかった (Fig. 4-5. A. lanes 1~4, 5~8)。また、Xanthohumol も活性型 SREBP-1a の分解を促進しなかった (Fig. 4-5. A. lanes 1~4, 9~12)。Fig. 4-5. B は、Fig. 4-5. A における Western Blotting のバンドを定量しグラフに示したものである。活性型 SREBP-1c (アミノ酸 2-463) の発現プラスミド (Fig. 4-6. A, B)、活性型 SREBP-2 (アミノ酸 2-481) の発現プラスミド (Fig. 4-7. A, B) をトランスフェクションした場合も、それぞれ同様の結果が得られた。

次に、Xanthohumol が内因性の活性型 SREBP の分解を促進するかどうかを検討した。上記の外因性 SREBP についての実験では翻訳阻害剤シクロヘキシミドを用いたが、今回の実験の場合、翻訳を止めてもプロセッシングによる活性型 SREBP の供給を防ぐことができない。そのため、プロセッシングを阻害するために、セリンプロテアーゼ阻害剤である 4- (2-Aminomethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF) を用いた。AEBSF は S1P を阻害し、それにより前駆体 SREBP が切断を受けなくなることが示されている [169]。CHO-7 細胞をステロイド枯渇培地で 16 時間培養した後、300 μ M の AEBSF を処理した。30 分後に 30 μ M の Xanthohumol、または 1 μ g/mL の 25-HC を 1, 2, 3 時間処理し、Western

Blotting による解析を行った。その結果、AEBSF により経時的に活性型 SREBP-1, -2 は減少した (Fig. 4-8. A. lanes 1~4)。そして、25-HC, Xanthohumol によりその減少は促進されなかった (Fig. 4-8. A. lanes 1~4, 5~8, 9~12, B, C)。また、意外なことに AEBSF により前駆体 SREBP も減少した (Fig. 4-8. A. lanes 1~4)。しかし、25-HC, Xanthohumol によりその減少が一部抑えられた (Fig. 4-8. A. lanes 1~4, 5~8, 9~12)。

以上の結果より、Xanthohumol は活性型 SREBP の分解を促進しないことが示された。

Xanthohumol は SREBP の切断を抑制しない

2 つ目に、Xanthohumol が S1P, S2P による SREBP の切断を抑制する可能性が考えられる。S1P, S2P はゴルジ体において前駆体 SREBP を切断するプロテアーゼであり、この切断により活性型 SREBP が形成される。Xanthohumol がゴルジ体における SREBP の切断を抑制するかどうかを検討するために、Brefeldin A (BFA) を用いた。糸状菌などが産生するマクロライド系抗生物質の一種である BFA は、ゴルジ体に結合しているコートタンパク質を遊離させることにより、ゴルジ体の分解を引き起こす。その結果、ゴルジ体に局在していたタンパク質は小胞体へ逆行輸送され、ゴルジ体が小胞体に融合したような状態となる。したがって、BFA を処理すると、もともとゴルジ体にあった S1P, S2P が小胞体に局在するようになる。そのため、SREBP はステロールによる小胞体・ゴルジ体間輸送の調節を受けずに、常に切断され活性型が形成される [170] (Fig. 4-9)。このとき、Xanthohumol を処理しても活性型 SREBP が形成されるようであれば、Xanthohumol は S1P, S2P による SREBP の切断を抑制しないことが想定される。反対に、活性型 SREBP の形成が抑制されるようであれば、Xanthohumol は S1P, S2P を阻害すると考えられる。CHO-7 細胞をステロール枯渇培地で 16 時間培養した後、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の BFA を処理した。2 時間後に 30 μM の Xanthohumol、または 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 25-HC を 3 時間処理し、Western Blotting による解析を行った。その結果、BFA 存在下では 25-HC を処理しても活性型 SREBP が形成されることが確認された (Fig. 4-10. lanes 2, 5)。また、BFA 存在下で Xanthohumol を処理しても、同様に活性型 SREBP が形成された (Fig. 4-10. lanes 3, 6)。したがって、Xanthohumol は S1P, S2P による SREBP の切断を抑制しないことが示唆された。

Xanthohumol は SCAP/SREBP のゴルジ体への輸送を妨げる

3 つ目に、Xanthohumol が SREBP の小胞体・ゴルジ体間輸送を抑制する可能性が考えられる。SREBP は S1P, S2P による切断を受ける前に、SCAP とともに小胞体からゴルジ体へ輸送されることが知られている。そこで、Xanthohumol がこの輸送を抑制するかどうかを検討した。そのために、

1) GFP-SCAP の細胞内局在変動の観察

2) 小胞体、ゴルジ体画分における SCAP, SREBP タンパク質量の解析

を行った。

まず、GFP-SCAP を安定発現する CHO 細胞 (CHO/pGFP-SCAP) を用いて、SCAP の細胞内局在の変動を蛍光観察により解析した。3 時間のステロール枯渇処理を行った CHO/pGFP-SCAP 細胞に 30 μ M の Xanthohumol、または 10 μ g/mL の Cholesterol と 1 μ g/mL の 25-HC を処理し、さらに 3 時間培養した。細胞を固定し、ゴルジ体マーカーである GM130 を赤色色素 Cy3 で染色した後、共焦点顕微鏡で観察した。その結果、ステロール枯渇条件では GFP-SCAP は細胞内の一点に集中しており (Fig. 4-11. A)、GM130 と局在が一致した (Fig. 4-11. A~C) ことから、GFP-SCAP はゴルジ体に局在していると考えられる。一方、ステロール過剰条件では GFP-SCAP は細胞全体に網目状に拡散しており (Fig. 4-11. D)、GM130 との一致は弱かった (Fig. 4-11. D~F)。Xanthohumol を処理したサンプルでは、ステロール過剰条件と同様の傾向が見られ、GFP-SCAP はゴルジ体に集積していなかった (Fig. 4-11. G~I)。したがって、Xanthohumol は SCAP/SREBP のゴルジ体への輸送を抑制することが示唆された。

次に、細胞を分画し、小胞体とゴルジ体、それぞれの画分における SCAP, SREBP タンパク質量の変動を解析することにした。CHO-7 細胞をステロール枯渇培地で 16 時間培養した後、30 μ M の Xanthohumol、または 1 μ g/mL の 25-HC を 3 時間処理し、細胞を回収した。スクロース密度勾配溶液の中に細胞抽出液を加え、超遠心を行うことにより細胞分画を行い、ゴルジ体を含む画分 (Light fraction) と小胞体を含む画分 (Heavy fraction) を調製した (Fig. 4-12)。その後、それぞれの画分におけるタンパク質量を Western Blotting により解析した。まず、分画する前の全細胞画分において、25-HC, Xanthohumol 処理により SCAP, SREBP

の総量は変動しないこと、活性型 SREBP が減少することが確認された (Fig. 4-13. lanes 1~3)。また、Light fraction にゴルジ体マーカー GM130 が (Fig. 4-13. lanes 4, 6, 8)、Heavy fraction に小胞体マーカー Sec61 α が (Fig. 4-13. lanes 5, 7, 9) それぞれ局在していることも確認された。ステロール枯渇処理したコントロールのサンプルでは、SREBP プロセッシングが亢進していることが想定され、実際に SCAP は Light fraction に局在していた (Fig. 4-13. lanes 4, 5)。この条件では、SREBP は切断され活性型となった後にゴルジ体から細胞質に放出されてしまうため、ほとんど検出されなかった (Fig. 4-13. lanes 4, 5)。一方、25-HC を処理したサンプルでは、SCAP、前駆体 SREBP は Heavy fraction に局在していた (Fig. 4-13. lanes 6, 7)。これらの結果より、ステロール枯渇条件では SCAP/SREBP がゴルジ体に移行するが、ステロール過剰条件では小胞体に留まっているという、これまでに報告されているプロセッシング制御機構を確認することができた。そして、Xanthohumol を処理したサンプルでは、25-HC 処理時と同様に SCAP、前駆体 SREBP は Heavy fraction に局在していた (Fig. 4-13. lanes 8, 9)。以上の結果より、Xanthohumol は SCAP/SREBP を小胞体に留め、ゴルジ体への輸送を抑制することが示された。

Xanthohumol は Sec23/24 に結合する

これまでの結果から、Xanthohumol は SCAP/SREBP の小胞体・ゴルジ体間輸送に関与するタンパク質に結合することが推測された。ステロール枯渇条件では、SCAP が Sec23/24 に結合することにより、SCAP/SREBP が COP II 小胞に取り込まれ、ゴルジ体へ輸送されていくことが知られている。そこで、Xanthohumol が SCAP, SREBP, COP II タンパク質と結合するかどうかを検討することにした。そのために、Xanthohumol を固定化したアガロースビーズ (Xanthohumol ビーズ: Fig. 4-14. A) を用いた。Xanthohumol ビーズでは、Xanthohumol は官能基非依存的にビーズに連結されており、すべての部位でタンパク質と相互作用することができる。このビーズと CHO-7 細胞から抽出したタンパク質を混合してプルダウンを行い、Western Blotting により結合タンパク質の検出を試みた。また、Sec23 には A, B の 2 種類 [49]、Sec24 には A, B, C, D の 4 種類 [47] のアイソフォームが存在しているが、それぞれどのアイソフォームが SCAP/SREBP との結合に重要であるかは明らかにされていない。ただし、過去の報告では SCAP/SREBP の

COP II 小胞への取り込みを解析する際に Sec23A, Sec24C を用いて実験を行っている例がある [171, 172]。本実験では、Sec23 に関しては A, B 両方を検出する抗体を、Sec24 に関しては C を検出する抗体を用いた。その結果、コントロールビーズ結合タンパク質はほとんど検出されなかった (Fig. 4-14. B. lane 3) のに対し、Xanthohumol ビーズ結合タンパク質として、SCAP, SREBP は検出されなかったものの、Sec23, Sec24 が検出された (Fig. 4-14. B. lane 5)。さらに、細胞培養時に 50 μ M の Xanthohumol を処理しておいたサンプルでは、Xanthohumol ビーズに結合した Sec23, Sec24 の量が減少しており (Fig. 4-14. B. lanes 5, 6)、これは Xanthohumol が Sec23, Sec24 と Xanthohumol ビーズとの結合を競合阻害したことを示唆している。以上の結果より、Xanthohumol は Sec23/24 に結合することが示された。

Xanthohumol は SCAP/SREBP の COP II 小胞への取り込みを抑制する

Xanthohumol が Sec23/24 に結合すること、SCAP/SREBP の小胞体・ゴルジ体間輸送を抑制することから、Xanthohumol が SCAP/SREBP の COP II 小胞への取り込みを阻害する可能性が考えられた。そこで、SCAP と Sec23/24 との結合が Xanthohumol により減弱されるかどうかを検討した。CHO-7 細胞をステロール枯渇培地で 16 時間培養した後、30 μ M の Xanthohumol、または 1 μ g/mL の 25-HC を 3 時間処理した。細胞を回収し、SCAP 抗体を用いて免疫沈降を行った後、Western Blotting による解析を行った。その結果、ステロール枯渇処理を行ったコントロールのサンプルでは SCAP と Sec23 との結合が認められた (Fig. 4-15. lanes 4)。25-HC 処理時には、まず、SCAP と結合する前駆体 SREBP の量が増加していた (Fig. 4-15. lanes 4, 5)。これは SREBP プロセッシングが抑制された結果だと考えられ、免疫沈降前のタンパク質サンプルにおいて、25-HC により活性型 SREBP が減少し、前駆体 SREBP が増加したと一致している (Fig. 4-15. lanes 1, 2)。また、25-HC を処理すると SCAP と結合する Sec23 の量が減少することが確認された (Fig. 4-15. lanes 4, 5)。この結果は、ステロールが COP II タンパク質と SCAP との結合を阻害するという過去の報告 [20] とも合致する。そして、Xanthohumol もまた SCAP と結合する前駆体 SREBP の量を増加させ、さらに SCAP と結合する Sec23 の量を減少させた (Fig. 4-15. lanes 4, 6)。以上の結果より、

Xanthohumol は SCAP/SREBP の COP II 小胞への取り込みを抑制することが示唆された。

Xanthohumol は ATF6 プロセッシングを抑制しない

ATF6 (Activating transcription factor 6) は小胞体ストレスに応答して活性化するタンパク質であり、SREBP と同様に COP II 小胞により小胞体からゴルジ体へ輸送され [173]、S1P, S2P による切断を受けることが知られている [174]。そこで、Xanthohumol が SREBP だけでなく ATF6 のプロセッシングも抑制するかどうかを検討した。まず、Huh-7 細胞に 250 nM の Thapsigargin (Tg) を 5 時間処理した。Tg は小胞体カルシウムポンプを阻害することにより小胞体ストレスを引き起こし、ATF6 プロセッシングを促進する作用を持つ。その後、30 μ M の Xanthohumol、または 300 μ M のセリンプロテアーゼ阻害剤 AEBSF (S1P を阻害する) を 3 時間処理し、Western Blotting による解析を行った。その結果、Tg により ATF6 プロセッシングが亢進した (Fig. 4-16. lanes 1, 2) が、それは AEBSF により抑制されることが確認された (Fig. 4-16. lanes 2, 3)。しかし、Xanthohumol を処理しても、活性型 ATF6 量にほとんど影響はなかった (Fig. 4-16. lanes 2, 4)。一方、SREBP プロセッシングに関しては、AEBSF, Xanthohumol いずれを処理した場合においても抑制された (Fig. 4-16. lanes 2~4)。以上の結果より、Xanthohumol は特定のタンパク質の COP II 小胞を介した輸送を抑制することが示唆された。

Xanthohumol は Sec24 の A-site 付近に結合することが想定される

Xanthohumol と Sec23/24 の結合部位を解析するために、リガンドドッキングツール GOLD を用いてシミュレーションを行った。Sec23 は、Sar1 との結合を介した小胞体膜への結合 [175] や、Sec13/31 との結合を介した COP II 小胞構造の形成に関与することが知られている [176]。一方、Sec24 は積み荷タンパク質と結合し、それを COP II 小胞に取り込むと考えられている。特に、yeast Sec24 では、A-site, B-site など複数の積み荷タンパク質結合領域の存在が明らかにされている。また、Fig. 4-16 の結果より、Xanthohumol は特定のタンパク質の COP II 輸送を抑制することが示唆されている。したがって、Xanthohumol は、COP II 輸送全般に重要な Sec23 よりも、積み荷タンパク質の認識を担う Sec24 に結合する可能性が高いと考えられたため、Xanthohumol と Sec24 との結合を解析した。

また、Fig. 4-14の実験では Sec24C に関して解析を行ったが、今回の実験では、構造解析が最も進んでおり Sec23 との複合体の立体構造も明らかにされている Sec24A を用いた。human Sec23A/24A 複合体 (Protein Data Bank code: 2NUT) の Sec24A と Xanthohumol の結合をシミュレーションしたところ、GOLD スコアの高かった上位 10 個の Xanthohumol は、1 つを除いて皆 human Sec24A の A-site に相当する領域付近に密集して結合した (上位 5 個の GOLD スコアは 59 以上) (Fig. 4-17)。以上の結果より、Xanthohumol は Sec24 の A-site 周辺に結合することが想定された。

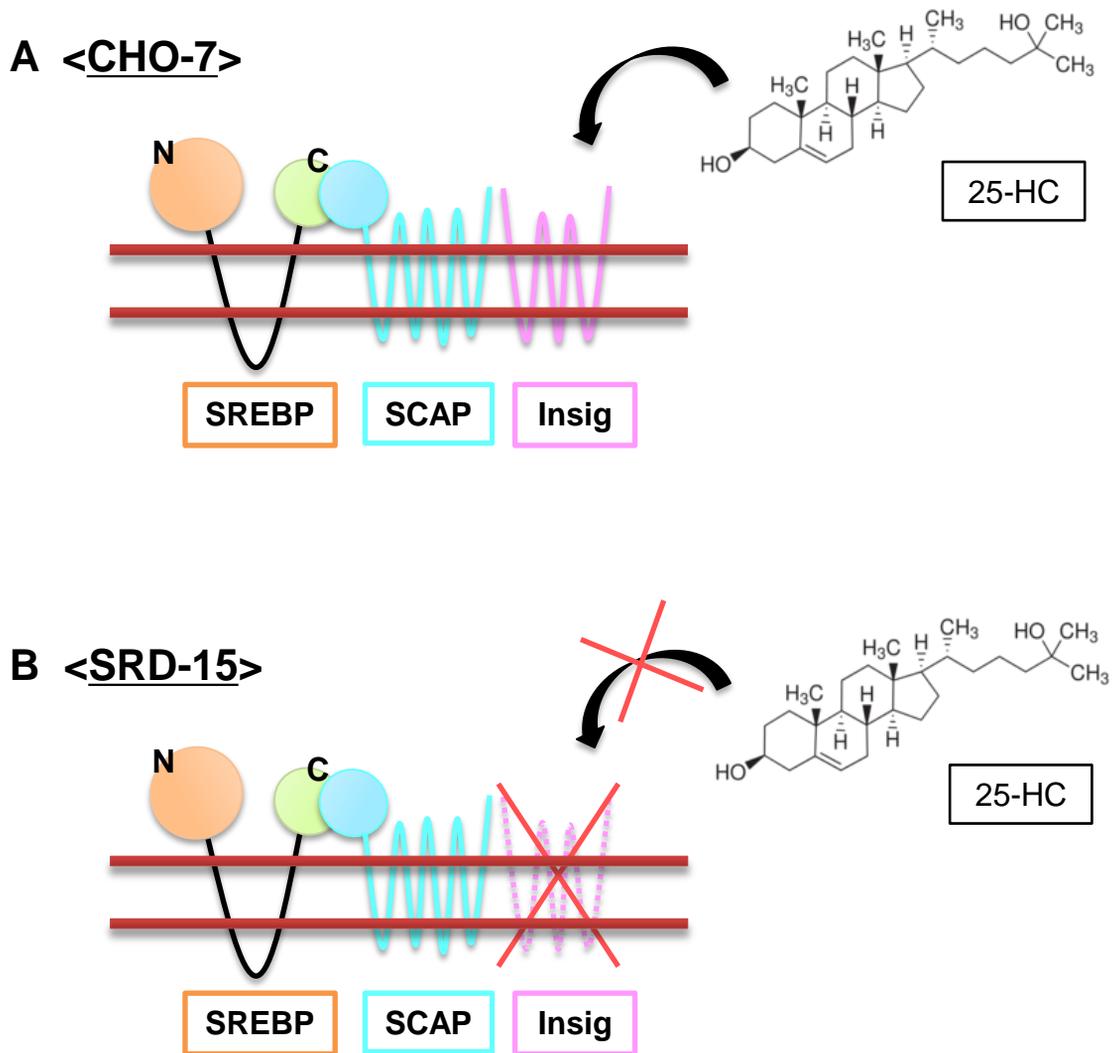


Fig. 4-1. Insig欠損株SRD-15におけるSREBPプロセッシング制御モデル

(A) CHO-7細胞における25-HCの作用

SRD-15の親株であるCHO-7では、25-HCを処理するとInsigに結合する。それによりSCAPの構造が変化し、SCAP/SREBPとInsigの結合が増強される。

(B) SRD-15細胞における25-HCの作用

Insig欠損株SRD-15では、25-HCを処理してもInsigに結合することができない。したがって、SREBPプロセッシングは抑制されない。

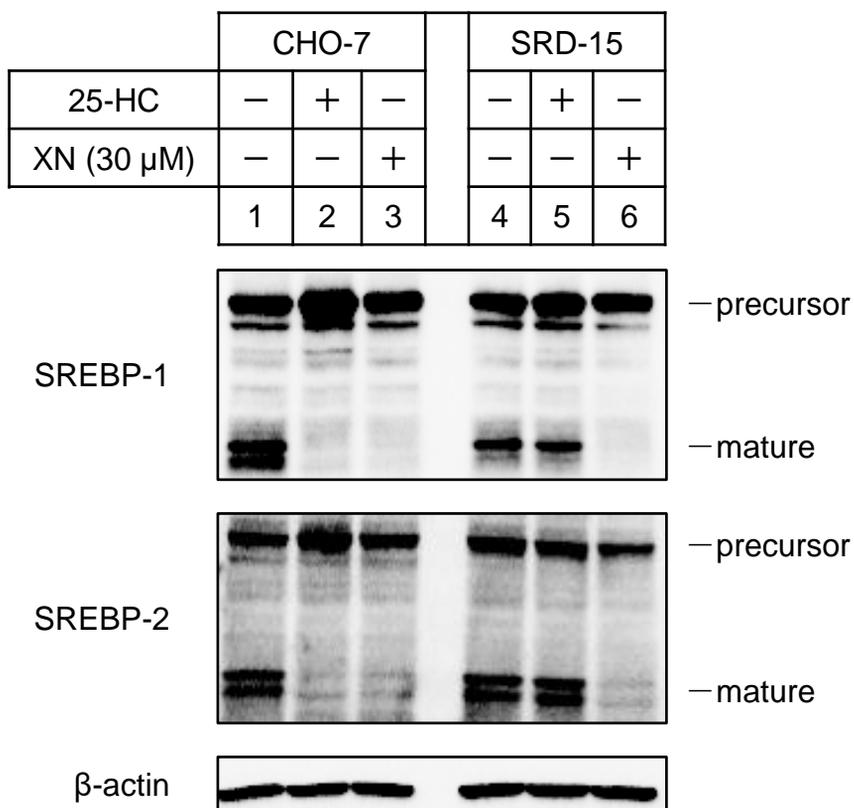


Fig. 4-2. Insig欠損株におけるXanthohumolによるSREBPタンパク質の変動

CHO-7細胞、SRD-15細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に30 μ MのXN、または1 μ g/mLの25-HCを添加し、さらに3時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、SREBP-1抗体 (2A4)、SREBP-2抗体 (RS004)を用いてWestern Blottingを行った。

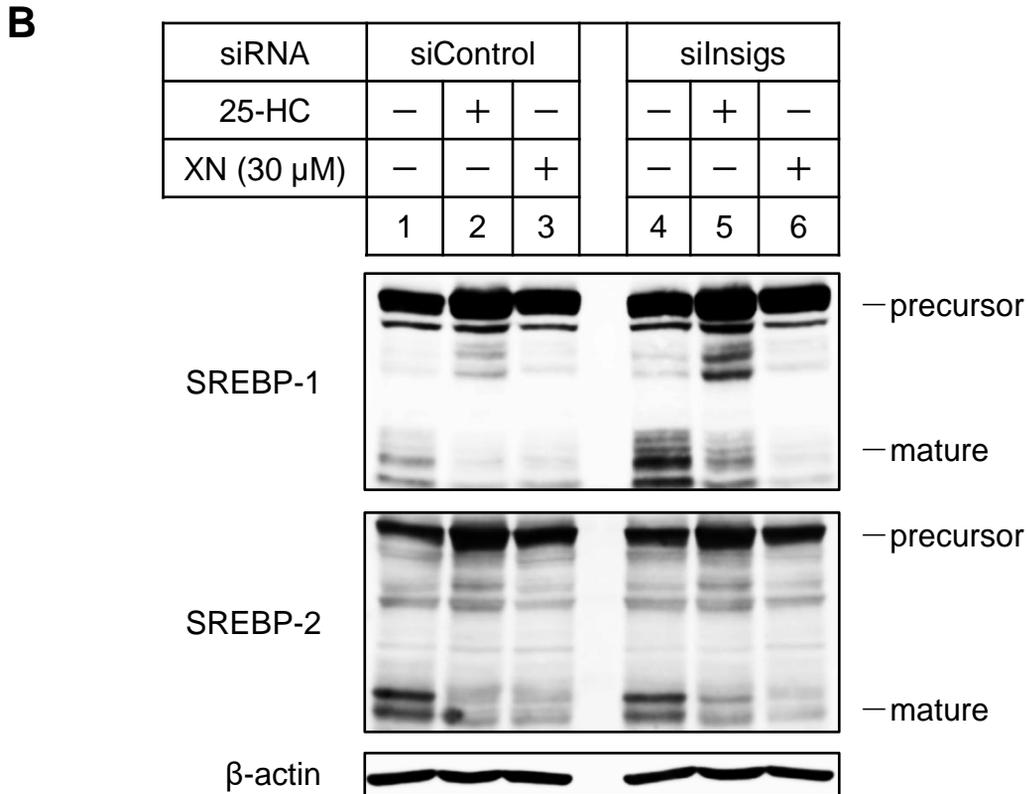
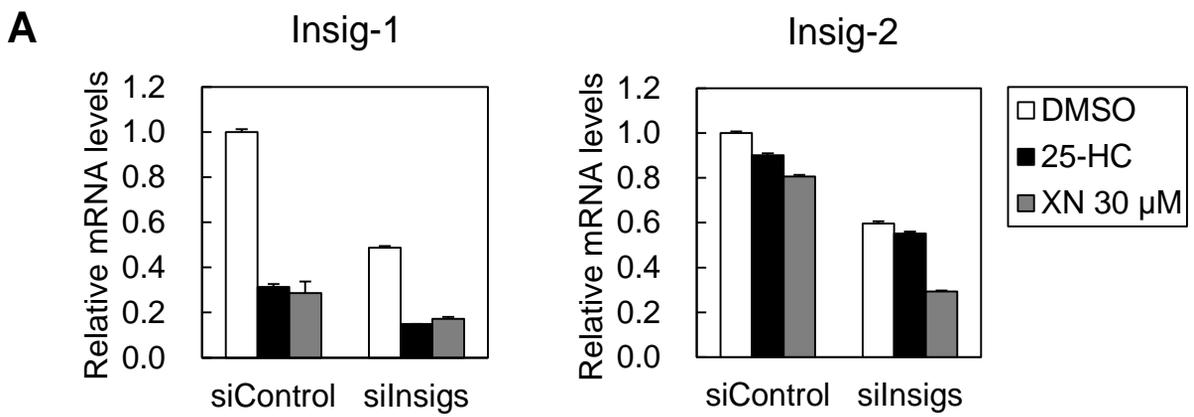


Fig. 4-3. Insig-1, -2ノックダウン時におけるXanthohumolによるSREBPタンパク質の変動

6 well plateで40 pmol/wellのsiInsig-1, siInsig-2をHuh-7細胞にリバーストランスフェクションして24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に1 μg/mLの25-HC、または30 μMのXNを添加し、さらに3時間培養した。

(A) 細胞を回収し、total RNAを抽出してRT反応によりcDNAを得た。Insig-1, Insig-2およびGAPDHのmRNA量をReal-time PCRにより測定した。グラフは、各遺伝子の測定値をGAPDHの値で補正し、DMSO添加群の値を1として平均値±標準誤差で示した (n=3)。

(B) 細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、SREBP-1抗体 (2A4)、SREBP-2抗体 (RS004) を用いてWestern Blottingを行った。

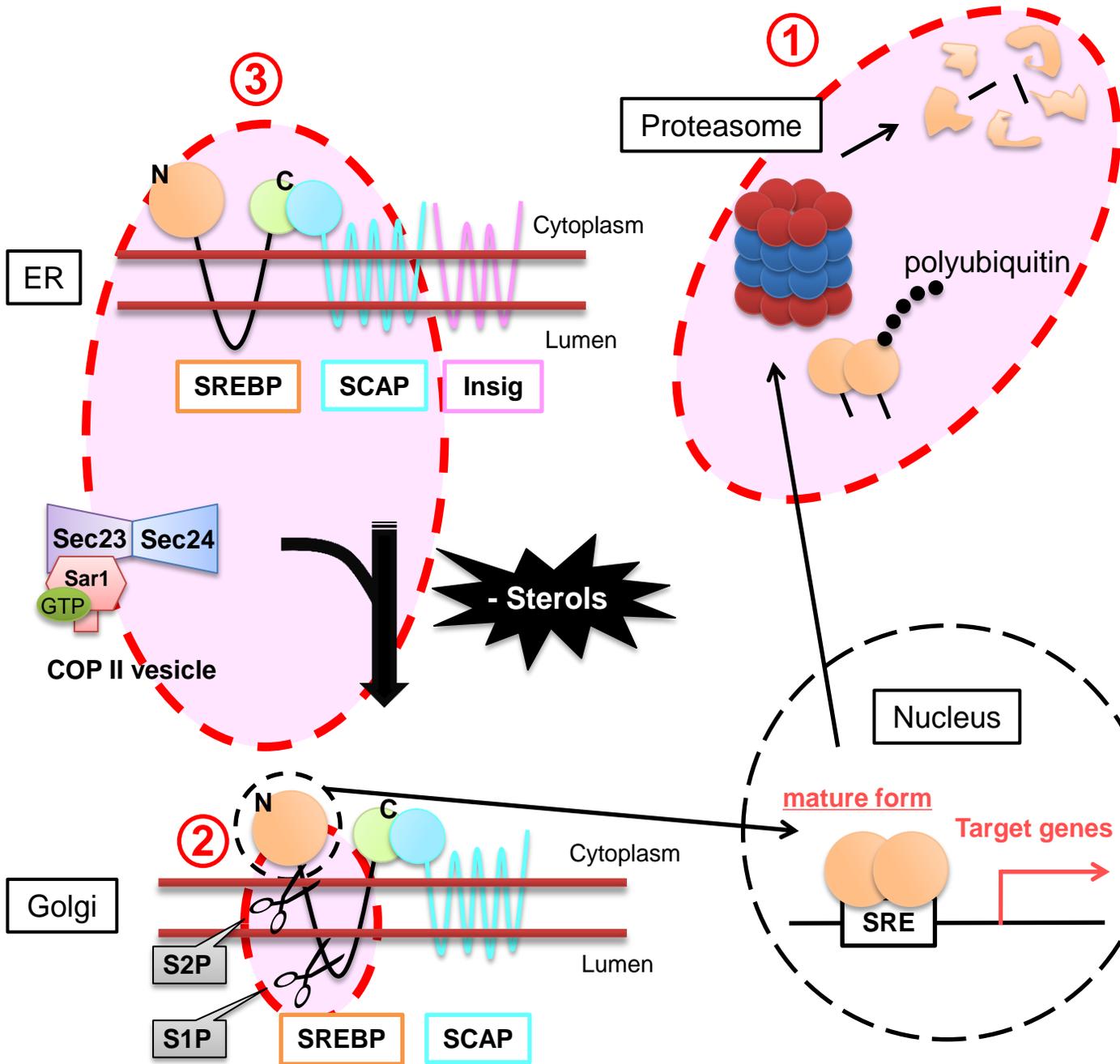


Fig. 4-4. Xanthohumolによる活性型SREBP減少機構の3つの可能性

図中の赤い点線は、XNが活性型SREBPを減少させる際の作用点として想定される3つの可能性を示す。

- ① 活性型SREBPの分解
- ② 前駆体SREBPの切断
- ③ 前駆体SREBPの小胞体・ゴルジ体間輸送

以降、XNがこれら3つのポイントに関与するかどうかを検討した。

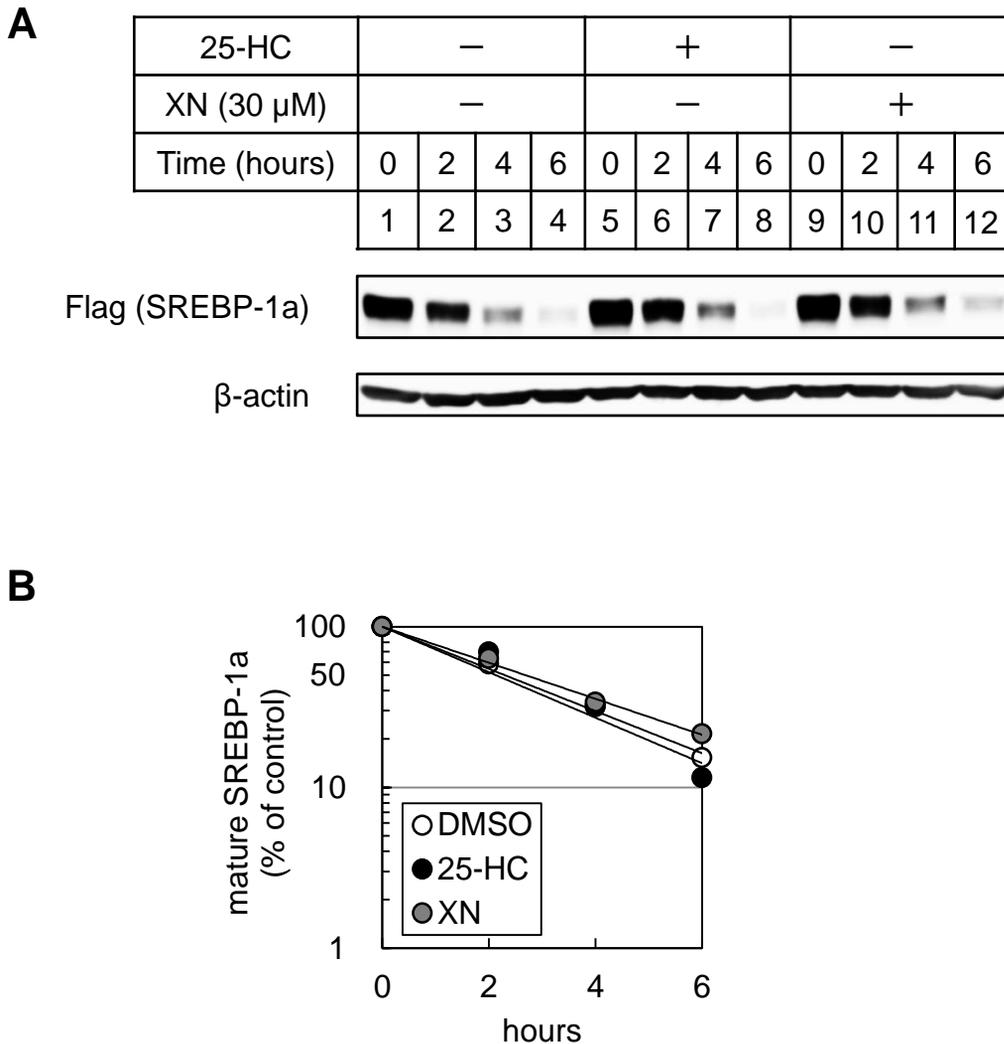


Fig. 4-5. Xanthohumolが外因性活性型SREBP-1aの分解に関与する可能性の検証

(A) リン酸カルシウム法によりpCMV-3×Flag-SREBP-1a (2-487)を導入したCHO-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、50 μ MのCycloheximide (CHX)を添加し、30分間培養した。1 μ g/mLの25-HC、または30 μ MのXNを添加し、さらに0, 2, 4, 6時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、Flag抗体を用いてWestern Blottingを行った。

(B) (A)のWestern BlottingのFlag (SREBP-1a)のバンドを定量し、グラフに示した。

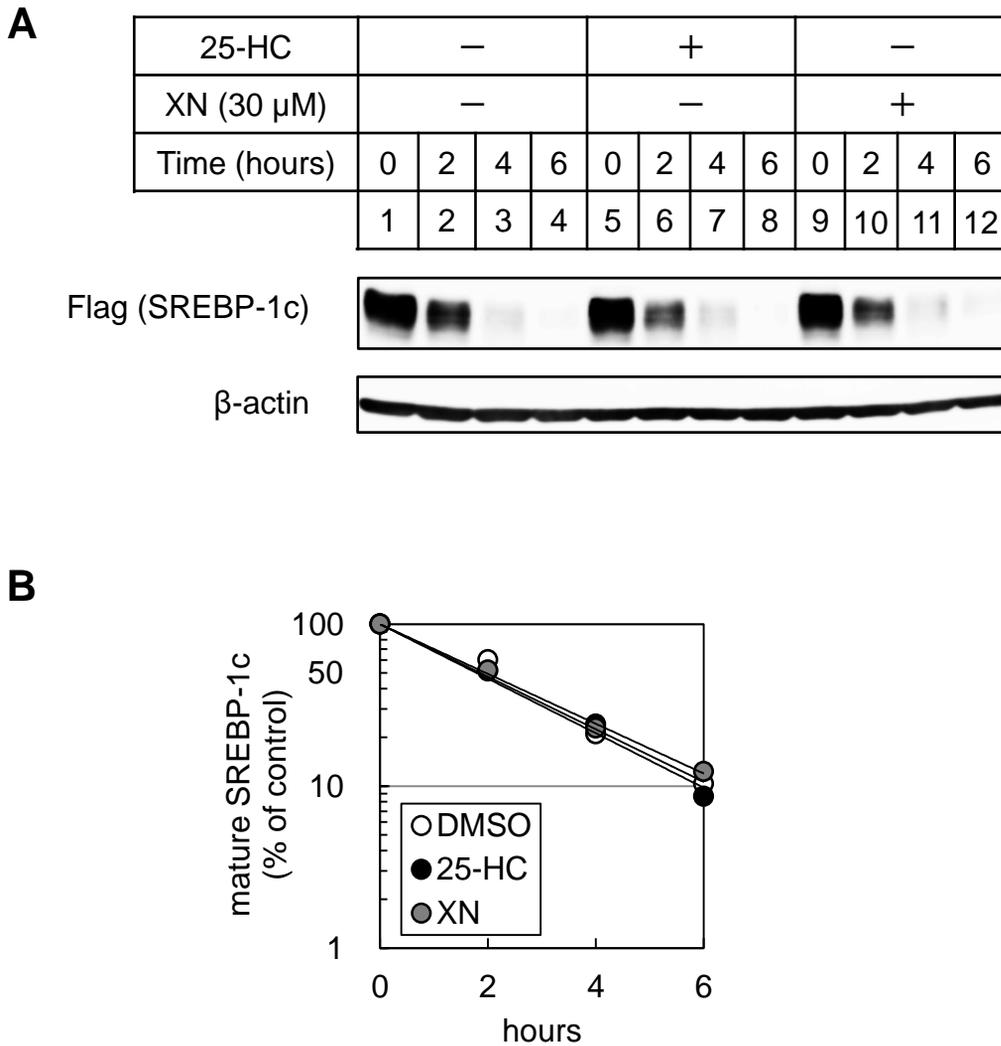


Fig. 4-6. Xanthohumolが外因性活性型SREBP-1cの分解に関与する可能性の検証

(A) リン酸カルシウム法によりpCMV-3×Flag-SREBP-1c (2-463)を導入したCHO-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、50 μ MのCHXを添加し、30分間培養した。1 μ g/mLの25-HC、または30 μ MのXNを添加し、さらに0, 2, 4, 6時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、Flag抗体を用いてWestern Blottingを行った。

(B) (A)のWestern BlottingのFlag (SREBP-1c)のバンドを定量し、グラフに示した。

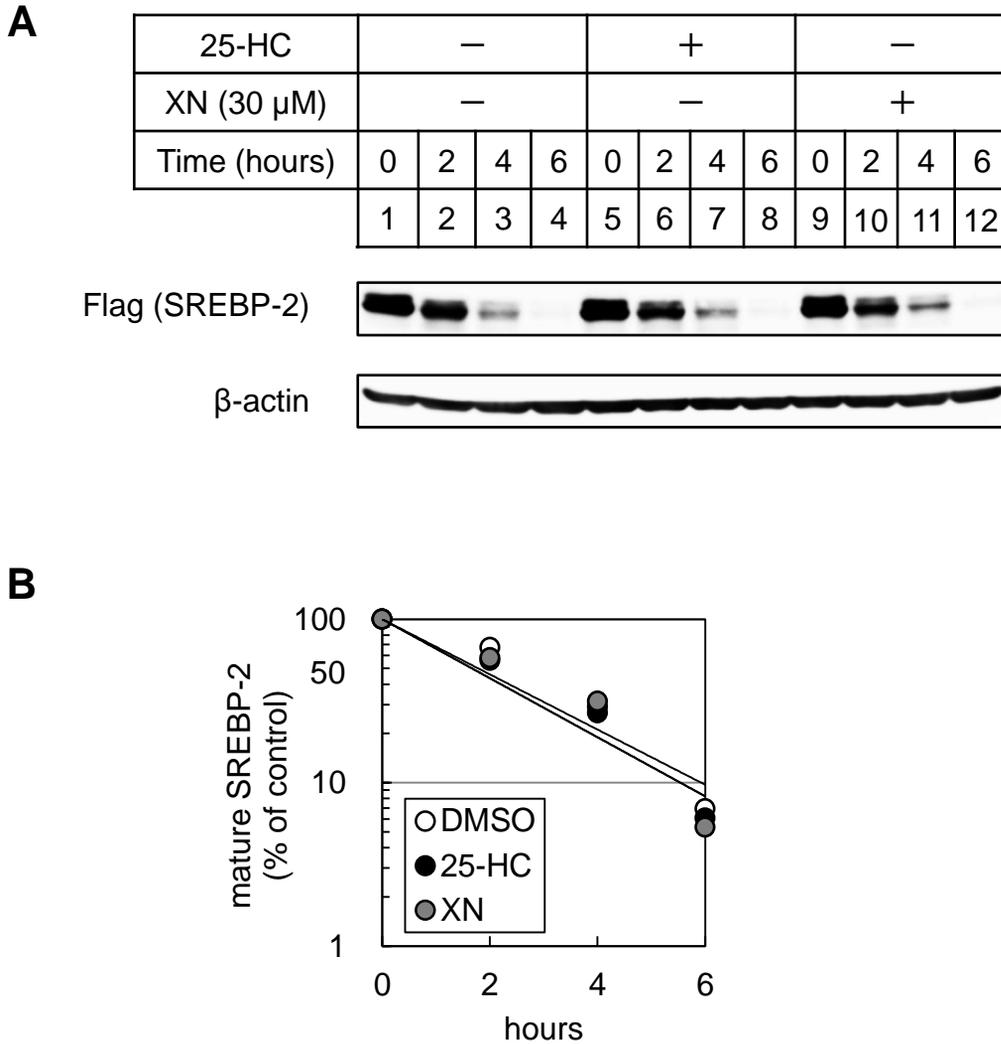


Fig. 4-7. Xanthohumolが外因性活性型SREBP-2の分解に関与する可能性の検証

(A) リン酸カルシウム法によりpCMV-3×Flag-SREBP-2 (2-481) を導入したCHO-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、50 μ MのCHXを添加し、30分間培養した。1 μ g/mLの25-HC、または30 μ MのXNを添加し、さらに0, 2, 4, 6時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、Flag抗体を用いてWestern Blottingを行った。

(B) (A)のWestern BlottingのFlag (SREBP-2) のバンドを定量し、グラフに示した。

A

| | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| 25-HC | - | | | | + | | | | - | | | |
| XN (30 μ M) | - | | | | - | | | | + | | | |
| Time (hours) | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 1 | 2 | 3 |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |

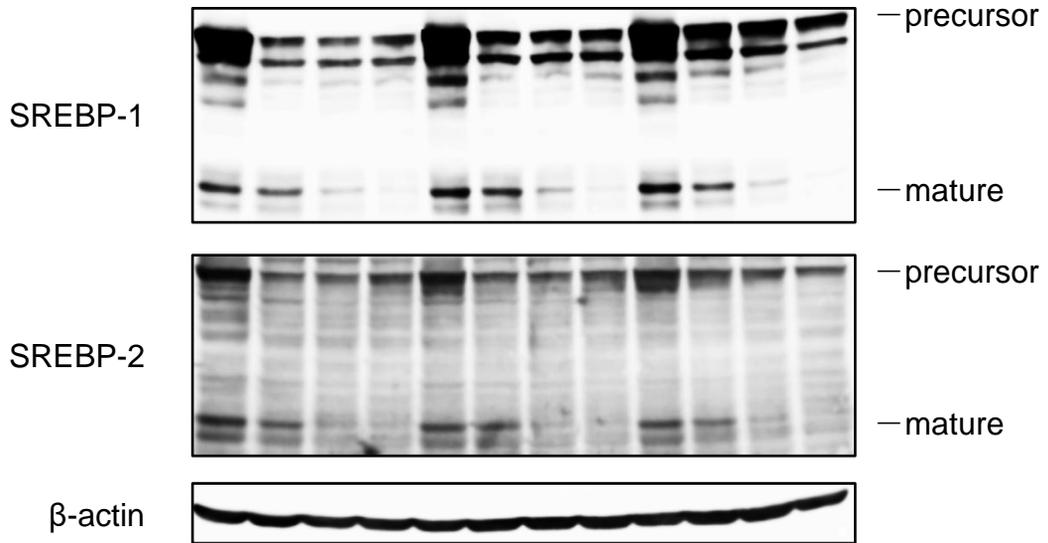
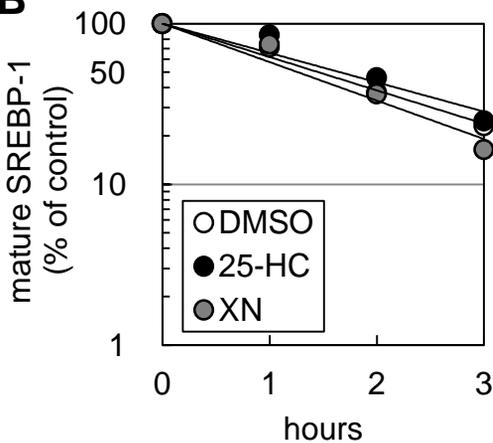
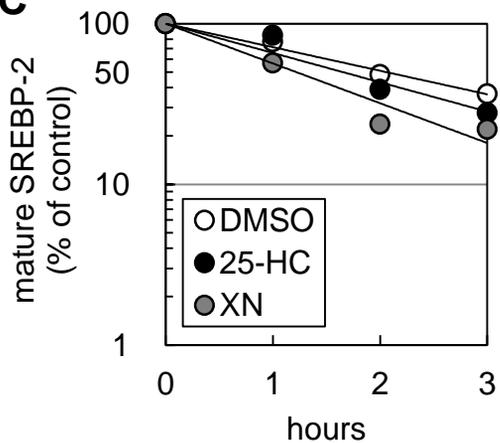
**B****C**

Fig. 4-8. Xanthohumolが内因性活性型SREBPの分解に関与する可能性の検証

(A) CHO-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に300 μ Mの4-(2-Aminomethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF) を添加し、30分間培養した。1 μ g/mLの25-HC、または30 μ MのXNを添加し、さらに0, 1, 2, 3時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、SREBP-1抗体 (2A4)、SREBP-2抗体 (RS004) を用いてWestern Blottingを行った。
 (B)(C) (A)のWestern Blottingの活性型SREBP-1 (mature) (B)、活性型SREBP-2 (mature) (C) のバンドを定量し、グラフに示した。

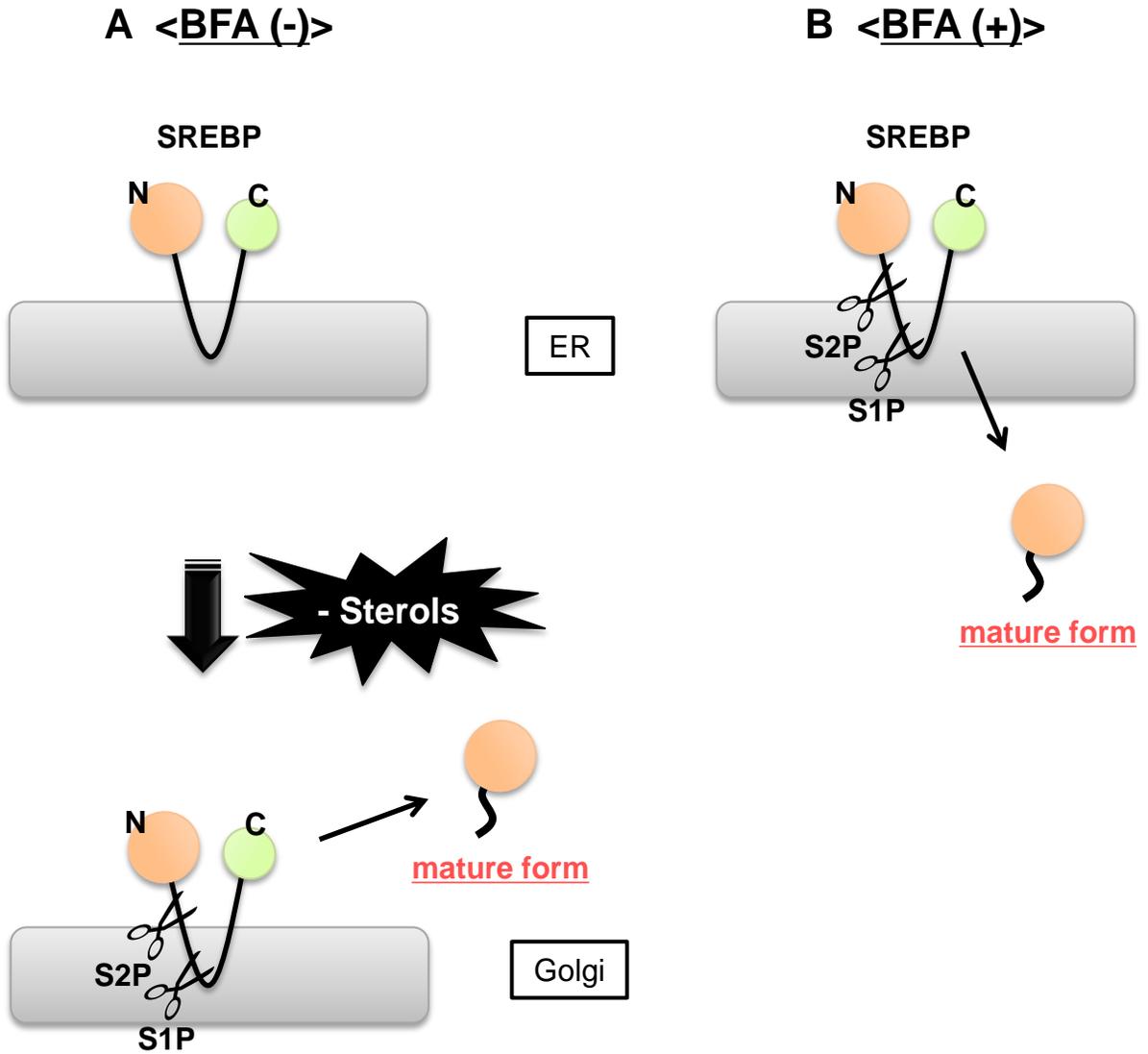


Fig. 4-9. Brefeldin A処理時におけるSREBPプロセッシング制御モデル

(A) Brefelidin A (BFA) 非存在下におけるSREBPプロセッシング

通常時では、SREBPはステロール枯渇刺激により小胞体からゴルジ体へ輸送される。その後、ゴルジ体でS1P, S2Pによる切断を受け、活性型となる。

(B) BFA存在下におけるSREBPプロセッシング

BFAを処理すると、S1P, S2Pが小胞体に局在するようになる。そのため、SREBPはステロールの有無に関わらずにS1P, S2Pによる切断を受け、活性型が形成される。

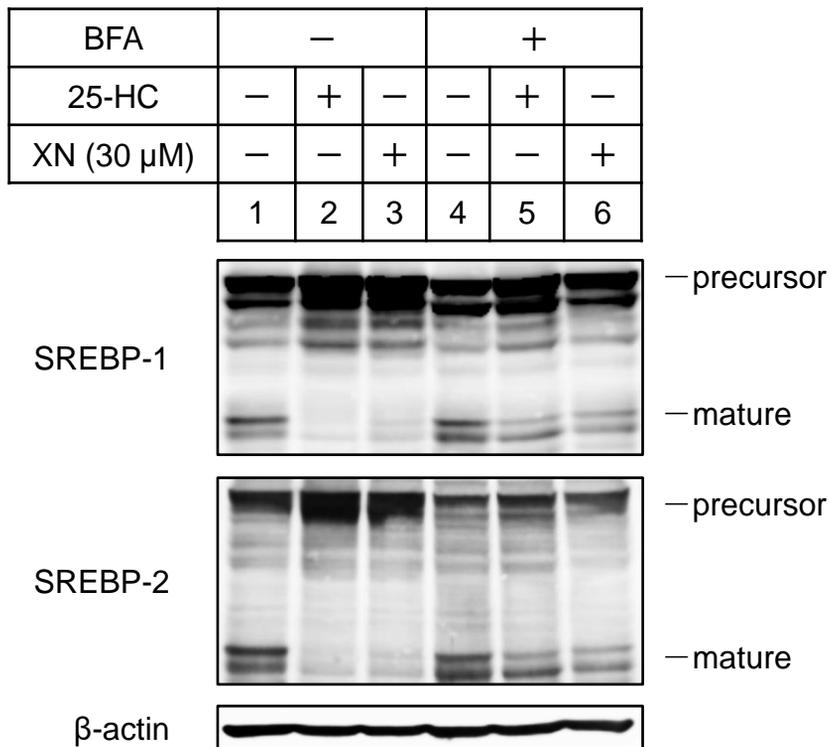


Fig. 4-10. Xanthohumolが前駆体SREBPの切断に関与する可能性の検証

CHO-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に1 μ g/mlのBFAを添加し、2時間培養した。1 μ g/mLの25-HC、または30 μ MのXNを添加し、さらに3時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、SREBP-1抗体 (2A4)、SREBP-2抗体 (RS004) を用いてWestern Blottingを行った。

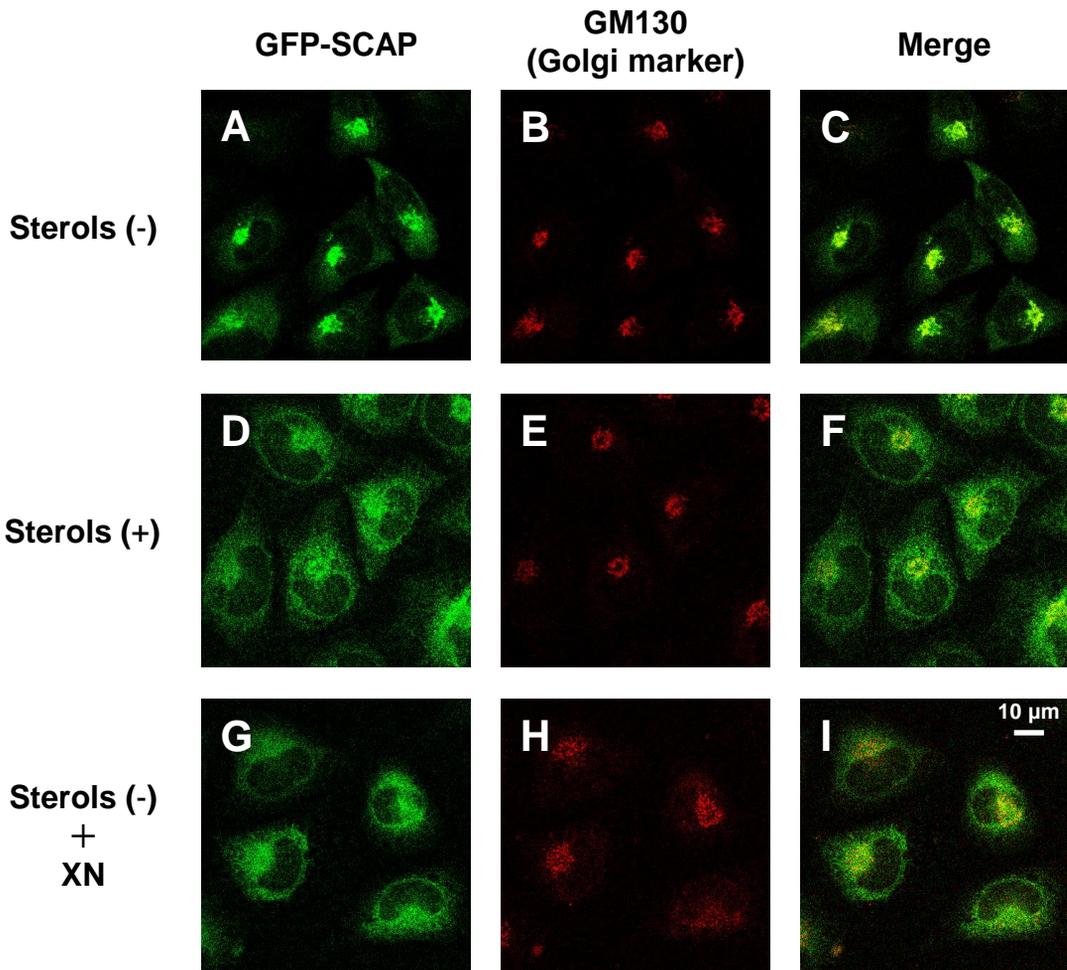


Fig. 4-11. XanthohumolによるSCAPの細胞内局在変動

CHO/pGFP-SCAP細胞を4-well Culture Slideに播種して48時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。3時間後に30 μ MのXN、または10 μ g/mLのCholesterol, 1 μ g/mLの25-HCを添加し、さらに3時間培養した。細胞を固定し、GM130抗体、Cy3抗体を用いて免疫染色を行った。共焦点顕微鏡を用いて、GFP-SCAP (A, D, G), GM130 (B, E, H)の蛍光を観察した。C, F, Iは、GFP-SCAPとGM130の蛍光を重ね合わせた画像を示す。

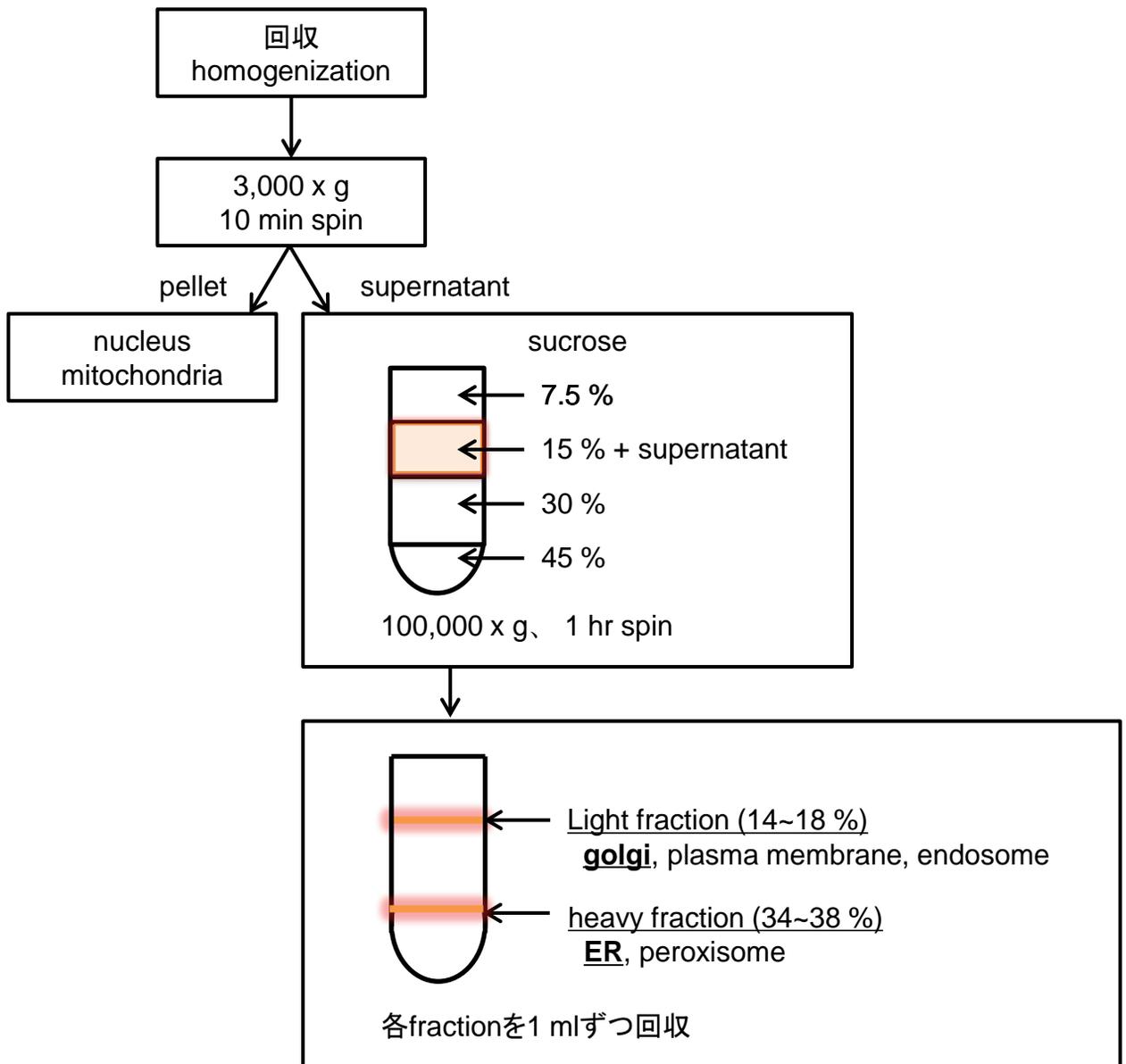


Fig. 4-12. 超遠心による細胞分画の模式図

RIPA bufferに懸濁し破碎した細胞を遠心した後、核、ミトコンドリアを含むペレットを残して上清を回収した。RIPA bufferに45, 30, 15, 7.5 (w/v) となるようにスクロースを加えた溶液をチューブに入れた。このとき、細胞溶液をスクロース15%溶液に加えた。これを超遠心につけ、14~18%部分に形成されるLight fraction、34~38%部分に形成されるHeavy fractionのバンド周辺の溶液をそれぞれ回収した。Light fractionにはゴルジ体、細胞膜、エンドソーム、Heavy fractionには小胞体、ペルオキシソームが含まれる。

W: Whole cell
L: Light fraction (Golgi)
H: Heavy fraction (ER)

| | | | | | | | | | |
|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 25-HC | - | + | - | - | + | - | | | |
| XN (30 μ M) | - | - | + | - | - | - | + | | |
| Fraction | W | W | W | L | H | L | H | L | H |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |

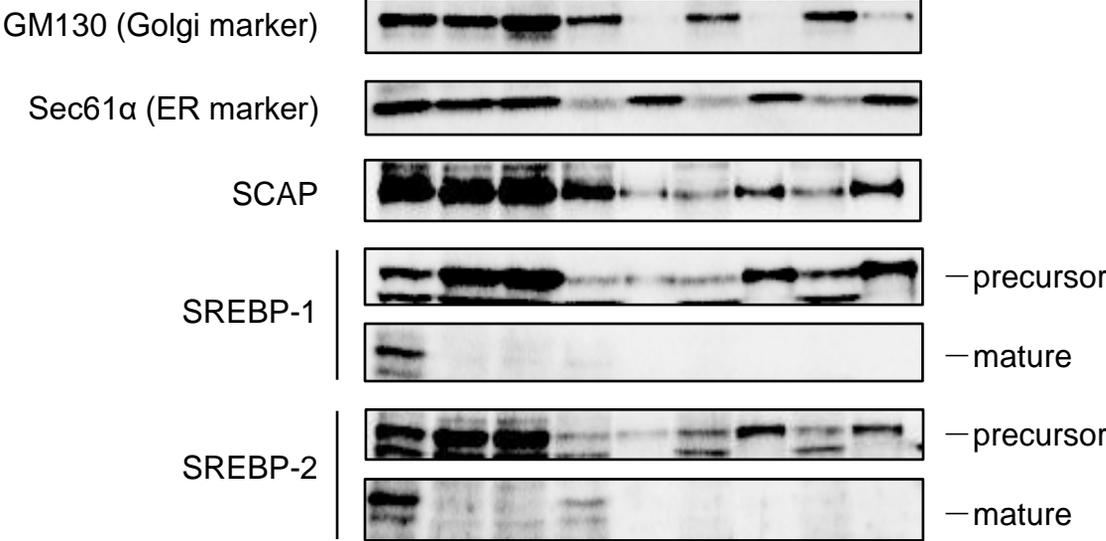


Fig. 4-13. XanthohumolによるSCAP, SREBPの細胞内局在変動

CHO-7細胞を100 mm dishに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に1 μ g/mLの25-HC、または30 μ MのXNを添加し、さらに3時間培養した。細胞を回収後、超遠心によりゴルジ体を含む画分 (Light fraction) と小胞体を含む画分 (Heavy fraction) に分離し、それぞれの画分からタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、GM130抗体、Sec61 α 抗体、SCAP抗体、SREBP-1抗体 (2A4)、SREBP-2抗体 (RS004) を用いてWestern Blottingを行った。表中のfractionの行に記載されているWはwhole cell、LはLight fraction、HはHeavy fractionを示す。

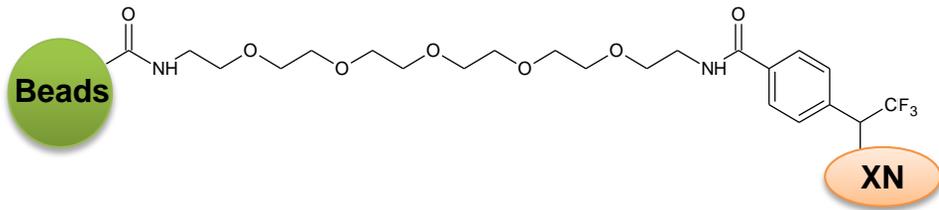
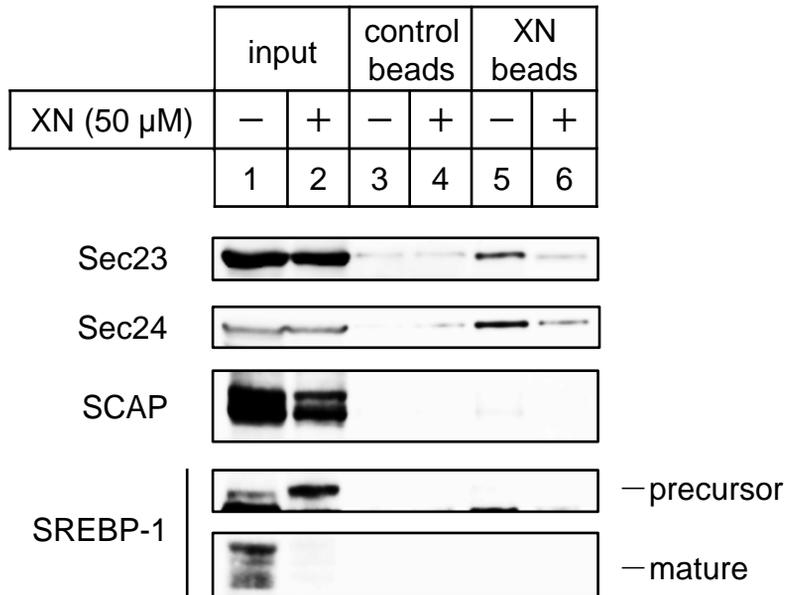
A**B**

Fig. 4-14. Xanthohumolビーズ結合タンパク質の検出

(A) XNビーズの化学構造

(B) CHO-7細胞を100 mm dishに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に1 μ g/mLの25-HC、または50 μ MのXNを添加し、さらに3時間培養した。細胞を回収し、XNビーズを用いてプルダウンを行った。XNビーズ結合タンパク質をSDS-PAGEに供した後、Sec23抗体、Sec24C抗体、SCAP抗体、SREBP-1抗体 (2A4) を用いてWestern Blottingを行った。

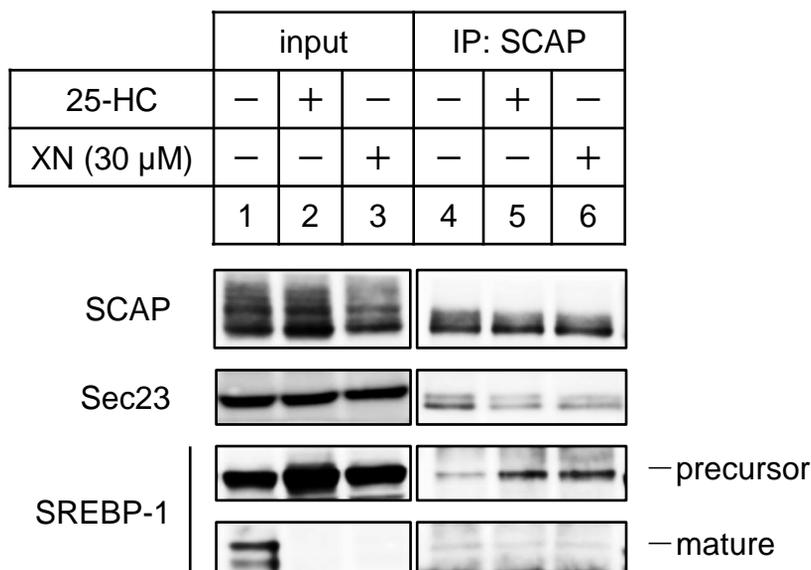


Fig. 4-15. XanthohumolによるSCAPとCOP IIタンパク質の結合の変動

CHO-7細胞を100 mm dishに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に1 μ g/mlの25-HC、または30 μ MのXNを添加し、さらに3時間培養した。細胞を回収し、SCAP抗体を用いて免疫沈降を行った。沈降したタンパク質をSDS-PAGEに供した後、Sec23抗体、SCAP抗体、SREBP-1抗体 (2A4) を用いてWestern Blottingを行った。

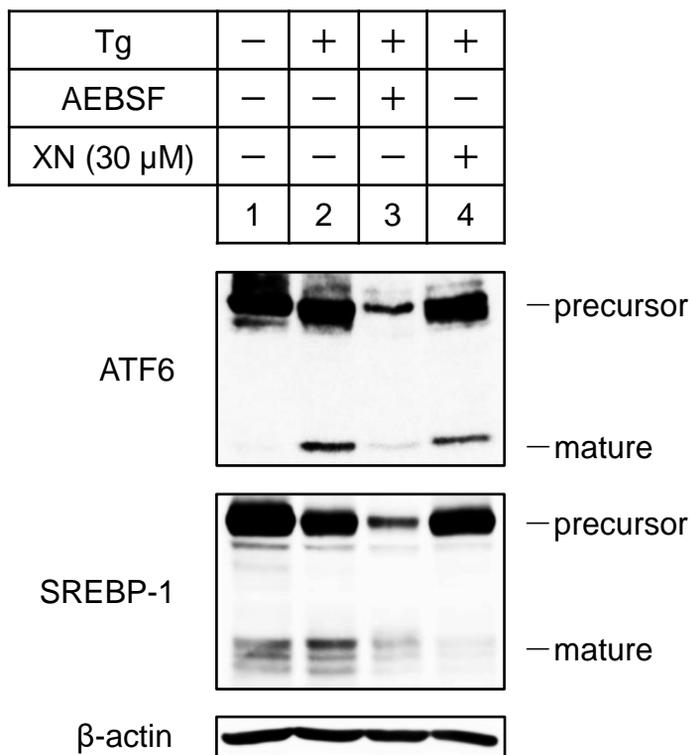


Fig. 4-16. XanthohumolによるATF6タンパク質の変動

Huh-7細胞を6 well plateに播種して48時間培養した後、250 nMのThapsigargin (Tg) を添加し、2時間培養した。300 μ MのAEBSF、または30 μ MのXNを添加し、さらに3時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、ATF6抗体、SREBP-1抗体 (2A4) を用いてWestern Blottingを行った。

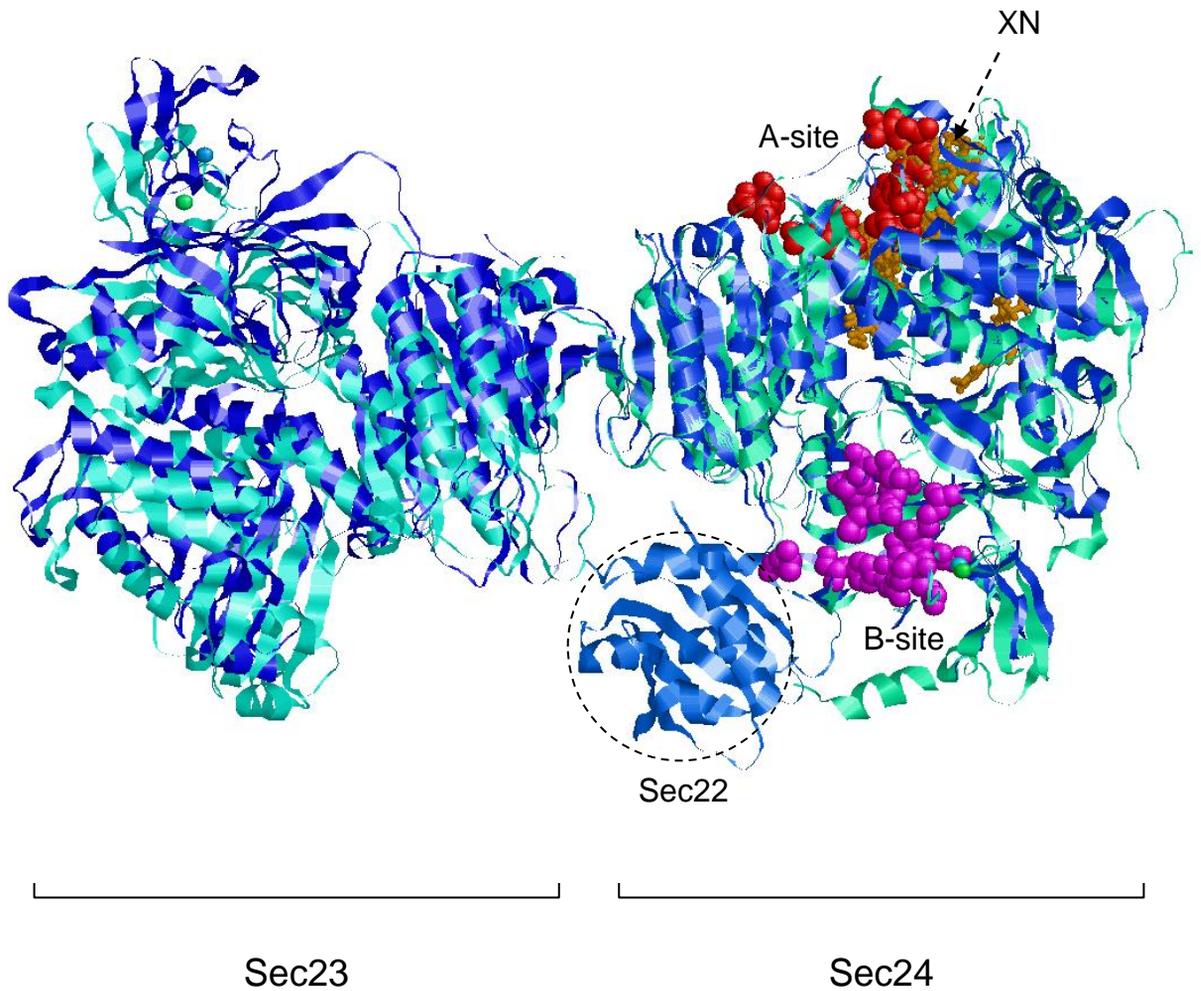


Fig. 4-17. XanthohumolとSec24のドッキングシミュレーション

リガンドドッキングツールGOLDを用いてXNとhuman Sec24Aの結合をシミュレーションした。左側がSec23の立体構造、右側がSec24の立体構造をそれぞれ示し、human Sec23A/24A複合体 (Protein Data Bank code: 2NUT) (青色) と yeast Sec23/24複合体 (Protein Data Bank code: 1M2V) (水色) を重ね合わせて表示している。また、yeast Sec24のA-siteを赤色、B-siteを紫色、XN (GOLDスコアの高かった上位10個を表示) を橙色でそれぞれ示す。なお、図示したSec23/24複合体にはSec22が結合しているが、ドッキングシミュレーションはSec22のない状態で行った。

4-4. 考察

本章における結果を以下に示す。

- ① Xanthohumol は Insig 非依存的に活性型 SREBP を減少させた。
- ② Xanthohumol は活性型 SREBP の分解を促進しなかった。
- ③ Xanthohumol は SREBP の切断を抑制しなかった。
- ④ Xanthohumol は SCAP/SREBP のゴルジ体への輸送を抑制した。
- ⑤ Xanthohumol は Sec23/24 に結合した。
- ⑥ Xanthohumol は SCAP/SREBP の COP II 小胞への取り込みを抑制した。

①に関して、SREBP プロセッシングを制御する代表的な化合物であるステロールの作用には Insig が不可欠であると言われている。コレステロールは SCAP に [177]、25-HC などの酸化ステロールは Insig にそれぞれ結合し [178]、いずれも SCAP と Insig との結合を増強させることが報告されている。このように、Insig は SREBP プロセッシングの調節において非常に重要な因子であり、本章で行ったような Insig 非存在下におけるプロセッシング制御機構解析は、これまでに例を見ない新規なアプローチである。Insig 以外のプロセッシングに関わる因子に作用して SREBP 活性を抑制する食品成分の例としては、大豆イソフラボンである Genistein が報告されている [104]。これは前駆体 SREBP を切断するプロテアーゼ S1P の発現レベルを低下させ、SREBP プロセッシングを抑制する。本研究では、同じく Insig を介さずに作用する食品成分として、SREBP の小胞体からゴルジ体への輸送を抑制する効果を持つ Xanthohumol を見出した。

また、Insig-1, -2 のノックダウン実験では、25-HC による活性型 SREBP 減少は一部しか抑えられなかった (Fig. 4-3. B. lanes 2, 5)。今回の実験において、Insig-1 では約 50%、Insig-2 では約 40%のノックダウンが確認されたが、ノック

ダウン効率をさらに上げることで、より変動が見やすくなる可能性がある。しかし、少なくとも今回の実験においても、通常時では 25-HC と Xanthohumol による活性型 SREBP 減少効果は同程度であったが (Fig. 4-3. B. lanes 1~3)、Insig-1, -2 ノックダウン時では 25-HC の効果は減弱される (Fig. 4-3. B. lanes 2, 5) のに対し、Xanthohumol は Insig-1, -2 の有無にかかわらず同程度に活性型 SREBP を減少させる (Fig. 4-3. B. lanes 3, 6) ことが確認でき、両者の作用に差異が認められた。この結果も、Xanthohumol が Insig 非依存的に活性型 SREBP を減少させるというステロールとは異なる作用機構を有することを示す一助になると考えられる。

②の実験では、AEBSF により S1P を阻害すると、活性型だけでなく前駆体の減少も観察された (Fig. 4-8. A. lanes 1~4)。通常、プロセッシングを抑制すると活性型が減少し、その分前駆体はむしろ増加することが知られているため、この結果は意外なものであった。AEBSF を用いて SREBP プロセッシング抑制を解析した研究は過去に報告されている [169]。その研究においても前駆体が減少しており、本研究の結果と一致する。その原因として、前駆体 SREBP が S1P により切断されずにゴルジ体に留まっていると分解されてしまう可能性が考えられる。実際に、S1P ノックアウトマウスの肝臓や S1P 欠損株では、活性型 SREBP だけでなく前駆体の減少も観察されている [179, 180]。また、AEBSF による前駆体 SREBP の減少は、25-HC、または Xanthohumol 処理により一部抑えられた (Fig. 4-8. A. lanes 1~4, 5~8, 9~12)。25-HC や Xanthohumol を処理すると前駆体 SREBP が小胞体に留まる、つまりゴルジ体に移行しなくなるため、前駆体は分解されずに済むのかもしれない。

③に関して、本来であれば S1P, S2P の酵素活性の測定などが必要とされるが、本章ではより簡便な手法として BFA 処理時の SREBP プロセッシング制御を解析した。先行研究においても、化合物による SREBP 活性抑制メカニズム解析にこの手法が用いられている例が存在する [99]。合成化合物である Fatostatin は SCAP に結合することにより SREBP の輸送を妨げ、プロセッシングを抑制することが報告されているが、その際に今回の実験と同様に BFA を用いた解析を行い、SREBP の切断には影響しないことを確認している [99]。また、BFA 存在下では、ステロールを処理しても SREBP プロセッシングは抑制されないはずであるが、今回の実験では 25-HC を処理するとコントロールに比べ活性型 SREBP の量が少なく、

一部プロセッシングが抑制されているような結果となった (Fig. 4-10. lanes 4, 5)。この結果に関しては、BFAによりすべてのゴルジ体が小胞体に融合した状態になるわけではなく、ステロールによる制御が完全には失われていないためであると考えられる。上記の Fatostatin の研究で行われた実験でも、やはり BFA 存在下でステロールを処理すると一部活性型 SREBP が減少しており [99]、本研究での実験結果と合致する。このような状況をふまえ、BFA に加え Xanthohumol を処理した際にも、コントロールと比較して SREBP プロセッシングが抑制されたが (Fig. 4-10. lanes 4, 6)、25-HC 処理時と活性型 SREBP の量が同程度である (Fig. 4-10. lanes 5, 6) ことから、BFA 存在下で Xanthohumol を処理しても活性型 SREBP が形成される、つまり Xanthohumol は SREBP の切断を抑制しないと結論づけた。

④の結果について、まず、GFP-SCAP 安定発現細胞株を用いてゴルジ体マーカーを免疫染色し、蛍光観察することにより、Xanthohumol 処理時に SCAP がゴルジ体に局在しなくなることを示した (Fig. 4-11. G~I)。しかし、この実験では局在を視覚的に評価しているに過ぎないため、より定量性の高い手法で結論を確定すべく、超遠心による細胞分画実験を行った。これにより、Xanthohumol 処理時に SCAP, SREBP タンパク質がゴルジ体を含む画分 (Light fraction) において減少し、小胞体を含む画分 (Heavy fraction) において増加することを明らかにした (Fig. 4-13. lanes 8, 9)。Heavy fraction には小胞体以外にもペルオキシソームが含まれているが、現在のところ SCAP, SREBP は小胞体・ゴルジ体間を移行するという認識が一般的である。また、GFP-SCAP の蛍光観察の結果から、Xanthohumol を処理したサンプルでは、ステロール処理時と同様に GFP-SCAP が細胞内全体に網目状に拡散していることが認められるが (Fig. 4-11. D, G)、これは小胞体に特徴的な局在パターンとして知られている。以上より、SCAP, SREBP は Xanthohumol 処理時に小胞体に局在している可能性が高く、Xanthohumol は SCAP/SREBP のゴルジ体への輸送を抑制し、小胞体に留めると考えられる。

⑤の実験では、Xanthohumol ビーズを用いて Sec23, Sec24 との結合を確認した (Fig. 4-14. lanes 3, 5)。しかし、この実験では、全細胞タンパク質抽出物と Xanthohumol ビーズを混合しているため、Sec23, Sec24 が他のタンパク質を介して間接的に Xanthohumol ビーズに結合した可能性も考えられる。したがって、今後、Sec23, Sec24 のタンパク質を精製して、Xanthohumol ビーズと直接結合するかどうかを検討していく必要がある。

⑥に関して、免疫沈降実験により、Xanthohumol 処理時に SCAP と Sec23 の結合が減弱されることが示されたが (Fig. 4-15. lanes 4, 6)、SCAP と Sec24 との結合を検出することはできなかった。Sec23/24 複合体は、一般的に Sec24 が積み荷タンパク質を認識することにより、それを COP II 小胞に取り込むことが知られている。したがって、SCAP と直接結合するのもおそらく Sec24 であると考えられているが、今回の実験で両者の結合を検出することができなかった原因は不明である。この実験では Sec24 アイソフォームの中でも SCAP と結合する可能性が高いと考えられる Sec24C について解析を行ったが、実際には SCAP と結合するのは他のアイソフォームである可能性もあるため、今後の検討が必要である。また、COP II 小胞は様々なタンパク質の輸送を担うため、Xanthohumol が Sec23/24 に作用することによって SCAP/SREBP 以外のタンパク質の輸送も阻害する可能性がある。ただし、本章では、少なくとも ATF6 の輸送、活性化には影響を与えないことが示された (Fig. 4-16. lanes 2, 4)。したがって、Xanthohumol の効果には選択性があり、特定のタンパク質の輸送を抑制するものと考えられる。

ドッキングシミュレーションの結果より、Xanthohumol が human Sec24A の A-site に相当する領域付近に結合することが想定された (Fig. 4-17)。yeast Sec24 の A-site には、輸送小胞膜と輸送先の標的膜との融合に必要な SNARE タンパク質である Bet1、ゴルジ体やエンドソームに局在するタンパク質 Sys1 が結合することが報告されている [44]。したがって、Xanthohumol がこれらのタンパク質をはじめ、A-site 周辺に結合するタンパク質の輸送を抑制する可能性が考えられる。また、今回は立体構造解析が最も進んでいる Sec24A に関してシミュレーションを行ったが、SCAP が Sec24 のどのアイソフォームのどの領域に結合するのか、そもそも SCAP が Sec24 に直接結合するかどうかにも明らかにされていない。今後、Sec24 の他のアイソフォームや COP II 輸送に関与する他のタンパク質と Xanthohumol との結合を解析することや、X 線結晶構造解析を行い結合部位や様式を精査することが必要である。

第 3 章では、Xanthohumol が活性型 SREBP を減少させ脂質合成を抑制することを見出した。そして、本章では、Xanthohumol による SREBP プロセッシング抑制の分子メカニズムを解析してきた。本研究のこれまでの結果より、Xanthohumol は Insig 非依存的に SCAP/SREBP の COP II 小胞への取り込みを阻害することにより、SCAP/SREBP の小胞体・ゴルジ体間輸送を抑制し、活性型

SREBP の形成を妨げ、その結果として SREBP 活性を低下させるという作用機構が想定される (Fig. 4-18)。これまで、*in vitro* における Xanthohumol の作用とそのメカニズムを解析してきたが、第 5 章では、*in vivo* における Xanthohumol の効果を検証した。

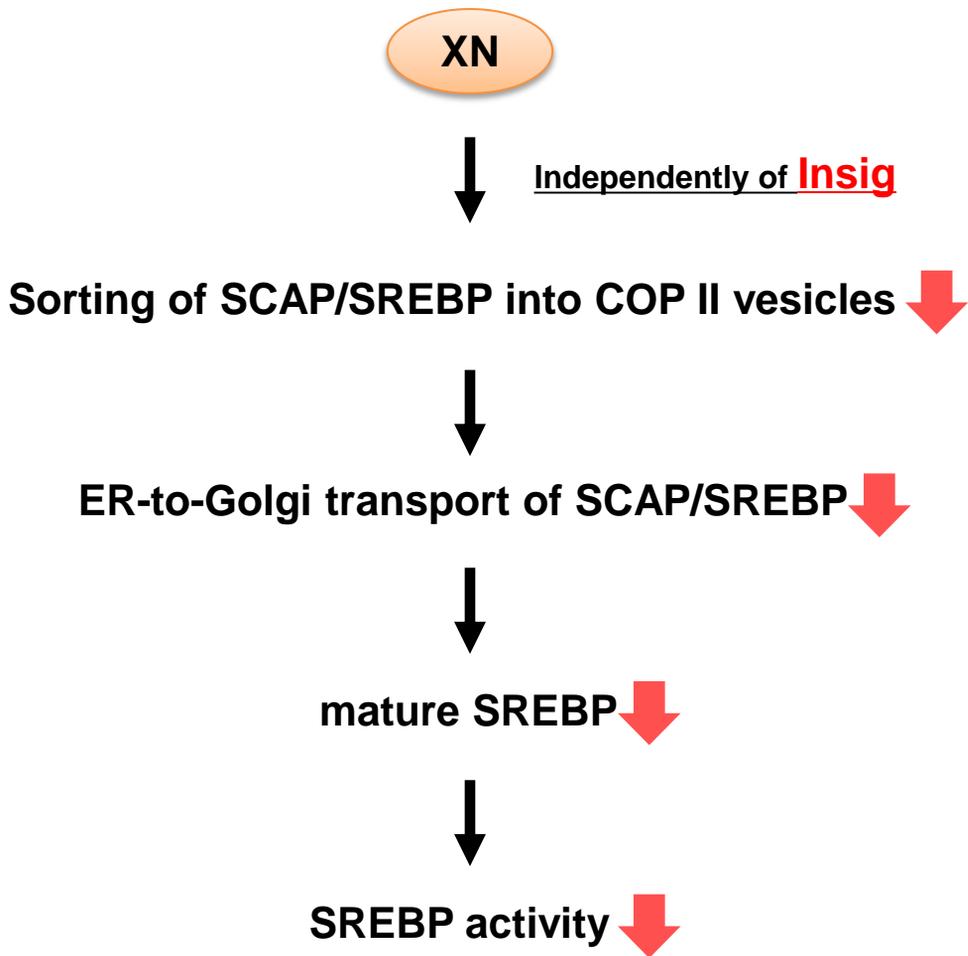


Fig. 4-18. XNによる活性型SREBP減少機構概略

XNはSCAP/SREBPのCOP II小胞への取り込みを阻害することが示唆されている。これによりSCAP/SREBPの小胞体・ゴルジ体間輸送を抑制し、活性型SREBPの形成を妨げる、つまりSREBP活性を低下させると考えられる。

第 5 章

生体内における Xanthohumol の効果検証

5-1. 緒言

第3章、第4章の結果より、Xanthohumol は培養細胞において活性型 SREBP を減少させ、脂質合成を抑制することが明らかとなった。本章では、マウスを用いて、Xanthohumol が生体内においても SREBP 活性を抑制するか、そして抗生活習慣病効果を発揮するかどうかを検討するために、短期投与実験および長期摂食実験を行った。

5-2. 実験材料および手法

実験材料の調製

< 試薬 >

Xanthohumol (92.4% pure)

Hopsteiner より購入したものをキリンビール株式会社よりご供与頂いた。

< 抗体 > (【】内は使用条件)

anti-SREBP-1 抗体 (H-160) 【1: 200】は、Santa Cruz Biotechnology より購入した。anti-P-Akt 抗体 (Ser473) 【1: 1000】、anti-P-Akt (Thr308) 抗体 【1: 1000】、anti-T-Akt 抗体 【1: 1000】、anti-P-S6K (Thr389) 抗体 【1: 1000】、anti-T-S6K 抗体 【1: 1000】、anti-P-AMPK (Thr172) 抗体 【1: 1000】、anti-T-AMPK 抗体 【1: 1000】は、Cell Signaling より購入した。その他は 3-2 に準じた。

実験動物

マウス

6 週齢、オスの C57BL/6J マウスを日本クレア株式会社より購入した。

飼育条件

動物室は、室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ に調節し、12 時間おきに明期 (9:00-21:00) と暗期 (21:00-9:00) を繰り返す明暗サイクルに設定した。個別ケージに入れ、固形飼料 (ラボ MR ストック、日本農産工業株式会社) と水 (オートクレーブ水) を自由摂

取させた。床敷はアルファドライ (エルエスジー株式会社) を使用し、ケージは夏目製作所、飲水ボトルは日本クレアよりそれぞれ購入したものをを用いた。

解剖

解剖は、自由摂食時にソムノペンチルを腹腔内投与した後に行った。採血は下大静脈から行い、肝臓、精巣上体周囲白色脂肪組織、腸間膜白色脂肪組織、皮下白色脂肪組織、鼠蹊部白色脂肪組織、肩甲骨間褐色脂肪組織を摘出した。摘出した臓器は、PBS 溶液で洗浄した後速やかに液体窒素で凍結し、解析時まで -80°C で保存した。

また、すべての動物実験は、東京大学動物実験実施規則に基づいて行った。

経口投与

6週齢、オスの C57BL/6J マウスを1週間予備飼育した後、体重によりコントロール群、75 mg/kg body weight Xanthohumol 投与群、150 mg/kg body weight Xanthohumol 投与群の3群に分けた (n=5/group)。各群に1日1回、3日間ゾンデによる経口投与を行い、4日目に解剖し、肝臓を摘出した。Xanthohumol は、DMSO (Wako) と Cremophr EL (ナカライテスク) の等量混合液を5%マンニトール液 (Wako) で10倍希釈したものに溶解した。

長期摂食実験

6週齢、オスの C57BL/6J マウスに10週間高脂肪食 (D12492, Research Diets Inc.) (タンパク質 20 kcal%、炭水化物 20 kcal%、脂質 60 kcal%) を摂食させた後、体重、血糖値により高脂肪食群、0.2% (w/w) Xanthohumol 添加高脂肪食群、0.4% (w/w) Xanthohumol 添加高脂肪食群の3群に分けた (n=10-11/group)。体重、摂食量を2日に1回測定しながら、Xanthohumol 添加食を50日間摂食させた後、解剖を行い、血液、肝臓、精巣上体周囲白色脂肪組織、腸間膜白色脂肪組織、皮下白色脂肪組織、鼠蹊部白色脂肪組織、肩甲骨間褐色脂肪組織を摘出した。また、35日目にCTスキャン、44日目にOGTTを行った。

CT スキャン

実験動物用 X 線 CT (Latheta LCT-200、日立アロカメディカル) を用いて、イソフルラン麻酔下で CT 画像を撮影した。付属の解析ソフトウェアを用いて腹囲脂肪率、肝脂肪率および腹囲脂肪量 (内臓脂肪量と皮下脂肪量) を算出した。腹囲脂肪率、脂肪量は第 12 肋骨から恥骨最下端までを測定範囲として、スライス長 2 mm の間隔で CT 画像を得た。また、肝脂肪率は第 13 肋骨から椎骨 2 本分を範囲として、スライス長 0.1 mm の間隔で CT 画像を得た。実験操作は、東京大学環境安全本部の完全密閉式 X 線装置の取り扱い方法に従って行った。

血中パラメーターの測定

採取したマウスの血液をサンプルとして、以下のキットを用いて血中パラメーターを測定した。方法はメーカーのプロトコルに準じた。

- ・ グルコース CII-テストワコー (Wako)
- ・ レビス[®]インスリン-マウス T (シバヤギ)
- ・ レビス[®]C-ペプチド-マウス T (U タイプ) (シバヤギ)
- ・ トランスアミナーゼ CII-テストワコー (Wako)

また、血中リポタンパク質プロファイルは LipoSEARCH (Skylight Biotech) に委託して解析した。

肝臓中の脂質量の測定

150 mg の肝臓片をガラス製キャップ付き試験管へ移し、Chroloform/Methanol (2:1, v/v) 4 mL を加え、ポリトロンホモジェナイザーにより破碎した。常温で 30 分間インキュベートした後、50 mM NaCl 1 mL を加えて攪拌し、4°C、1,500×g で 30 分間遠心した。パスツールピペットを用いて下層 (有機層) を別の試験管へ移した。そこに 0.36 M CaCl₂/Methanol (1:1, v/v) 1 mL を加え攪拌した後、4°C、1,500×g で 10 分間遠心し、上層 (水層) を除いた。この操作をもう一度繰り返し、残った下層 (Chroloform 層) をメスフラスコに移し、Chroloform で 5 mL にメスアップした。これを肝脂質抽出液とした。

肝脂質抽出液 200 μL、Triton-X 100 Solution (50% Triton-X 100 in Chroloform) 10 μL をガラスチューブ内で混合した後、ドラフト内に静置し、Chroloform を完全

に気化させた。このガラスチューブにトリグリセライド E-テストワコー発色液 500 μ L、またはコレステロール E-テストワコー発色液 500 μ L を加え、37°C で 10 分間インキュベートした。遠心により上清を回収し、595 nm における吸光度を測定した。使用した肝臓重量で測定値を除すことで、肝臓重量あたりの脂質量を算出した。

糞中の脂質量の測定

採取した糞を乾燥させて重量を測定した後、すり鉢で破碎した。糞 1 g を三角フラスコに入れ、加温しておいたエタノール 25 mL を加え、65°C で 2 時間インキュベートした。濾紙を用いて濾液をガラス管に集め、ガラス製メスシリンダーに移し、エタノールで 25 mL にメスアップした。そのうち 5 mL をねじ口ガラス試験管に移し、ロータリーエバポレーター (Type N-N、東京理科機械) を用いて減圧乾固した。乾固したサンプルに 2-プロパノール 2 mL を加え、よく攪拌した。これを糞中脂質抽出液とした。

糞中脂質抽出液 100 μ L をガラスチューブに入れ、トリグリセライド E-テストワコー発色液 500 μ L、またはコレステロール E-テストワコー発色液 500 μ L を加え、37°C で 10 分間インキュベートした。遠心により上清を回収し、595 nm における吸光度を測定した。採取した糞の重量と日数から、1 日あたりの糞中脂質量を算出した。

OGTT (Oral glucose tolerance test)

16 時間絶食をかけた後に 2 g/kg body weight のグルコース水溶液をゾンデにより経口投与し、15, 30, 60, 90, 120 分後の血糖値を測定した。血液は尾静脈より採取した。

mRNA の定量

<組織からの RNA 抽出>

摘出したマウスの肝臓、皮下白色脂肪組織、褐色脂肪組織を 14 mL チューブに入れ、100 mg あたり 1 mL の ISOGEN を加え、氷上でポリトロンホモジェナイザーにより破碎した。その後、懸濁液を 1.5 mL チューブに移し、室温、13,000

rpm で 10 分間遠心した後、上清 500 μ L を回収した。次に、100 μ L のクロロホルムを加え、15 秒間ボルテックスした。以降の操作は 2-2 に準じた。

<逆転写反応 (Reverse transcription, RT)>

2-2 に準じた。

<Real-time PCR>

2-2 に準じた。

以下に使用した Gene Expression Assay、Primer の情報を記す。

TaqMan Gene Expression Assays

| | |
|--------------|---------------|
| mACC1 | Mm01304286_m1 |
| mFAS | Mm00662319_m1 |
| mHMGCS | Mm00524111_m1 |
| mSREBP-2 | Mm01306283_m1 |
| mATGL | Mm00503040_m1 |
| mAdiponectin | Mm00456425_m1 |

Primer

| | |
|-------------|----------------------------|
| mSCD1-F | CCGGAGACCCCTTAGATCGA |
| mSCD1-R | TAGCCTGTAAAAGATTTCTGCAAACC |
| mSREBP-1a-F | GAACAGACAGTGGCCGAGAT |
| mSREBP-1a-R | GGGAGTCACTGTCTTGGTTG |
| mSREBP-1c-F | GAGCCATGGATTGCACATTT |
| mSREBP-1c-R | CGGGAAGTCACTGTCTTGGT |
| mHMGCR-F | CCGGCAACAACAAGATCTGTG |
| mHMGCR-R | ATGTACAGGATGGCGATGCA |
| mSQS-F | CACACTGGCTGCCTGTTACAA |
| mSQS-R | CCCCTTCCGAATCTTCACTACTC |
| mABCA1-F | TCCTCATCCTCGTCATTCAA |
| mABCA1-R | GGACTTGGTAGGACGGAACCT |
| mABCG5-F | TGTCCTACAGCGTCAGCAACC |

| | |
|--------------------|----------------------------|
| mABCG5-R | GGCCACTCTCGATGTACAAGG |
| mABCG8-F | AGAGTTGCATCCCCCTAGCC |
| mABCG8-R | TCCTTGACACAGGCATGAAGC |
| mCYP7A1-F | AGCAACTAAACAACCTGCCAGTACTA |
| mCYP7A1-R | GTCCGGATATTCAAGGATGCA |
| mPPAR α -F | CTCGCGTGTGATAAAGC |
| mPPAR α -R | CGATGCTGTCCTCCTTG |
| mACO-F | CAGCACTGGTCTCCGTCATG |
| mACO-R | CTCCGGACTACCATCCAAGATG |
| mCPT-1a-F | TGGGCTACTCAGAGGATGG |
| mCPT-1a-R | AAGGTGTCAAATGGGAAGG |
| mHSL-F | GCTGGGCTGTCAAGCACTGT |
| mHSL-R | GTAAGTGGGTAGGCTGCCAT |
| mPPAR γ 2-F | CTCTGTTTTATGCTGTTATGGGTGA |
| mPPAR γ 2-R | GGTCAACAGGAGAATCTCCCAG |
| mTNF α -F | CAGCCGATGGGTGTGACCTT |
| mTNF α -R | GGCAGCCTTGTCCTTGA |
| mUCP1-F | GGAGGTGTGGCAGTGTTTCATTGG |
| mUCP1-R | AGCATTGTAGGTCCCCGTGTAGCG |
| mDio2-F | CCACCTTCTTGACTTTGCCA |
| mDio2-R | GGTGAGCCTCATCAATGTATAC |
| mPGC-1 α -F | TTCTGGGTGGATTGAAGTGGTG |
| mPGC-1 α -R | TGTCAGTGCATCAAATGAGGGC |

タンパク質の定量

3-2 に準じた。

タンパク質の検出

<組織からのタンパク質抽出>

以下の操作は氷上で行った。摘出したマウスの肝臓、皮下白色脂肪組織を 14 mL チューブに入れ、100 mg あたり 1 mL の RIPA buffer (3-2 参照) を加え、ポリ

トロンホモジェナイザーにより破碎した。その後、懸濁液を 1.5 mL チューブに移し、氷上で 30 分間インキュベートした。4°C、14,000 rpm で 10 分間遠心し、上清 500 μ L をタンパク質溶液としてサンプリングした。以降の操作は 3-2 に準じた。

<SDS-PAGE>

3-2 に準じた。

<ブロットイング>

3-2 に準じた。

<抗体反応>

3-2 に準じた。

統計解析

2-2 に準じた。

5-3. 結果

Xanthohumol はマウス肝臓において活性型 SREBP-1 を減少させる

まず、Xanthohumol がマウス肝臓において SREBP プロセッシングを抑制するかどうかを検討するために、Xanthohumol の短期投与実験を行った。75, 150 mg/kg body weight の Xanthohumol をマウスに 1 日 1 回、3 日間経口投与した。その結果、Xanthohumol (XN) 投与により、摂食量 (Fig. 5-1. A)、体重 (Fig. 5-1. B) に影響はなかった。解剖後に摘出した肝臓からタンパク質を抽出し、Western Blotting による解析を行ったところ、Xanthohumol 投与により濃度依存的に活性型 SREBP-1 が減少していた (Fig. 5-2. A)。また、肝臓から RNA を抽出し、Real-time PCR による解析を行ったところ、SCD1 の mRNA 量が有意に低下していたが、ACC1, FAS, HMGCS, HMGCR, SQS など他の SREBP 標的遺伝子に変動は見られなかった (Fig. 5-2. B, C)。以上の結果より、Xanthohumol はマウス肝臓においても SREBP プロセッシングを抑制することが示唆された。

Xanthohumol 長期摂取によりマウスの食餌性肥満が抑えられる

次に、Xanthohumol の肥満に対する効果を検証するために、0.2, 0.4% の Xanthohumol を混合した高脂肪食を 50 日間マウスに摂食させた。摂食実験期間中で各群の摂食量に差は見られなかったが (Fig. 5-3. A)、Xanthohumol を摂取したマウスでは濃度依存的に体重増加が抑えられた (Fig. 5-3. B)。さらに、解剖後に摘出した各臓器の重量を測定したところ、Xanthohumol 摂取により肝臓、精巢、上体周囲白色脂肪組織、腸間膜白色脂肪組織、皮下白色脂肪組織、鼠蹊部白色脂肪組織、肩甲骨間褐色脂肪組織の重量が有意に低下していた (Table. 5-1)。また、35 日目に CT スキャンによる画像解析を行ったところ、Xanthohumol により腹囲脂肪率と肝脂肪率 (Fig. 5-4. A)、内臓脂肪量と皮下脂肪量 (Fig. 5-4. B) がそれぞれ低下していた。以上の結果より、Xanthohumol は食餌性肥満を抑えることが示された。

Xanthohumol 長期摂取により血中、肝臓中の脂質が減少する

Xanthohumol 摂取により脂質吸収が抑制される

Xanthohumol を 50 日間摂取させた後、血液を採取して、血中の各リポタンパク質が含有するトリグリセリド、コレステロールの量を測定した。その結果、血中の全トリグリセリド量、カイロミクロン、VLDL 中のトリグリセリド量は低下傾向であったが、LDL, HDL (High density lipoprotein) 中のトリグリセリド量は有意に低下していた (Table. 5-2)。コレステロール量に関しては、カイロミクロン、VLDL 中の量は低下傾向であり、血中のトータルの量、LDL, HDL 中の量は有意に低下していた (Table. 5-2)。肝機能異常のマーカーである ALT (Alanine aminotransferase) 値、AST (Aspartate aminotransferase) 値は低下傾向であるものの、有意な差はなかった (Table. 5-2)。肝臓中の脂質蓄積量も測定したところ、Xanthohumol 摂取によりトリグリセリド、コレステロールともに減少しており (Table. 5-2)、上記のように肝臓重量、肝脂肪率が低下していたことと合致する。

また、Xanthohumol が脂質の吸収を抑制するかどうかを検討するために、糞中の脂質量を測定した。その結果、糞中コレステロール量に変動は見られなかったが (Fig. 5-5. B)、トリグリセリド量は 0.2% Xanthohumol 摂取により増加傾向であり、0.4% Xanthohumol 摂取により有意に増加した (Fig. 5-5. A)。したがって、Xanthohumol を摂取することにより、脂質の吸収が抑制されることが示唆された。

Xanthohumol 長期摂取により血中インスリン値が低下する

Xanthohumol 長期摂取による糖代謝への影響を解析するために 44 日目に OGTT を行ったところ、各群間で耐糖能に差は見られなかった (Fig. 5-6. A, B)。しかし、解剖後に採取した血液の解析を行った結果、Xanthohumol 摂取群では血糖値が低下傾向であり、さらに血中インスリン値、C-ペプチド (プロインスリンからインスリンが生成される際に同時に生成される物質) 値が有意に低下していた (Fig. 5-6. C~E)。この結果より、Xanthohumol は食餌性肥満マウスにおいてインスリン感受性を改善することが示唆された。

Xanthohumol 長期摂取により肝臓におけるリン酸化 AMPK が増加する

Xanthohumol は培養細胞において AMPK のリン酸化を促進しない

続いて、Xanthohumol 長期摂取による肝臓におけるインスリンシグナル関連タンパク質の活性への影響を評価するために、そのリン酸化の変動を Western Blotting により解析した。まず、Akt のリン酸化に変動は見られなかった (Fig. 5-7. A)。リン酸化 S6K タンパク質量は Xanthohumol 摂取により増加していたが、Xanthohumol 摂取群では S6K 自体のタンパク質量も増加していた (Fig. 5-7. A)。一方、AMPK のリン酸化は Xanthohumol により亢進していた (Fig. 5-7. A)。そこで、この AMPK のリン酸化亢進が培養細胞でも観察されるかどうかを検討した。CHO-7 細胞をステロール枯渇培地で 16 時間培養した後、10, 30 μ M の Xanthohumol を 3 時間処理した。しかし、Xanthohumol 処理により活性型 SREBP の減少が確認されたのに対し、AMPK のリン酸化に変動は見られなかった (Fig. 5-7. B)。

Xanthohumol 長期摂取により肝臓における活性型 SREBP-1 量および標的遺伝子発現が低下する

Xanthohumol 長期摂取により肝臓におけるコレステロール代謝関連遺伝子発現が上昇する

Xanthohumol 長期摂取による肝臓における SREBP 活性への影響を解析した。その結果、Xanthohumol 摂取群では肝臓中の活性型 SREBP-1 タンパク質が減少しており (Fig. 5-8. A)、その標的である脂肪酸合成系遺伝子 ACC1, FAS, SCD1 の mRNA 量も低下していた (Fig. 5-8. B)。これらの結果より、Xanthohumol はマウス肝臓において SREBP プロセッシングを抑制することにより脂質合成を低下させることが示唆された。一方、SREBP-2 の標的であるコレステロール合成系遺伝子 HMGCS, HMGCR, SQS の発現に変動は見られなかった (Fig. 5-8. C)。しかし、その他のコレステロール代謝関連遺伝子の発現を解析したところ、コレステロールの排出に関与する ABCG8 (ATP-binding cassette subfamily G member 8)、コレステロール異化の酵素遺伝子 CYP7A1 (Cholesterol 7 α -hydroxylase) の mRNA 量が Xanthohumol 摂取群で増加していた (Fig. 5-9. A)。また、脂肪酸 β 酸化関連遺伝子 PPAR α (Peroxisome proliferator-activated receptor α), ACO (Acyl-CoA oxidase),

CPT-1a (Carnitine palmitoyltransferase-1a) の発現は変動していなかった (Fig. 5-9. B)。

Xanthohumol 長期摂取により白色脂肪組織における活性型 SREBP-1 は減少しない

次に、Xanthohumol 長期摂取による皮下白色脂肪組織への影響を調べた。まず、SREBP タンパク質量を解析したところ、Xanthohumol により活性型 SREBP-1 に変動は見られなかったが、意外なことに前駆体が減少していた (Fig. 5-10. A)。そして、FAS の mRNA 量は低下していたが、ACC1 や SREBP-1c は変動していなかった (Fig. 5-10. B)。これらの結果より、Xanthohumol は白色脂肪組織において SREBP 活性を抑制しないことが示唆された。また、Xanthohumol 摂取群の白色脂肪組織では、脂質分解に関与する ATGL (Adipose triglyceride lipase)、アディポサイトカインの一種である Adiponectin、熱産生に関与する UCP1 (Uncoupling protein 1) の mRNA 量が増加していた (Fig. 5-10. B)。また、褐色脂肪組織では、Xanthohumol 摂取により熱産生に関与する遺伝子 UCP1, Dio2 (Deiodinase, iodothyronine, type II), PGC-1 α (PPAR γ coactivator-1 α) の発現は変動しなかった (Fig. 5-11)。

以上の結果より、Xanthohumol は生体内において様々な代謝改善効果を発揮するが、肝臓における SREBP 活性化の抑制が高脂肪食負荷による肥満や脂肪肝の抑制に寄与することが示唆された。

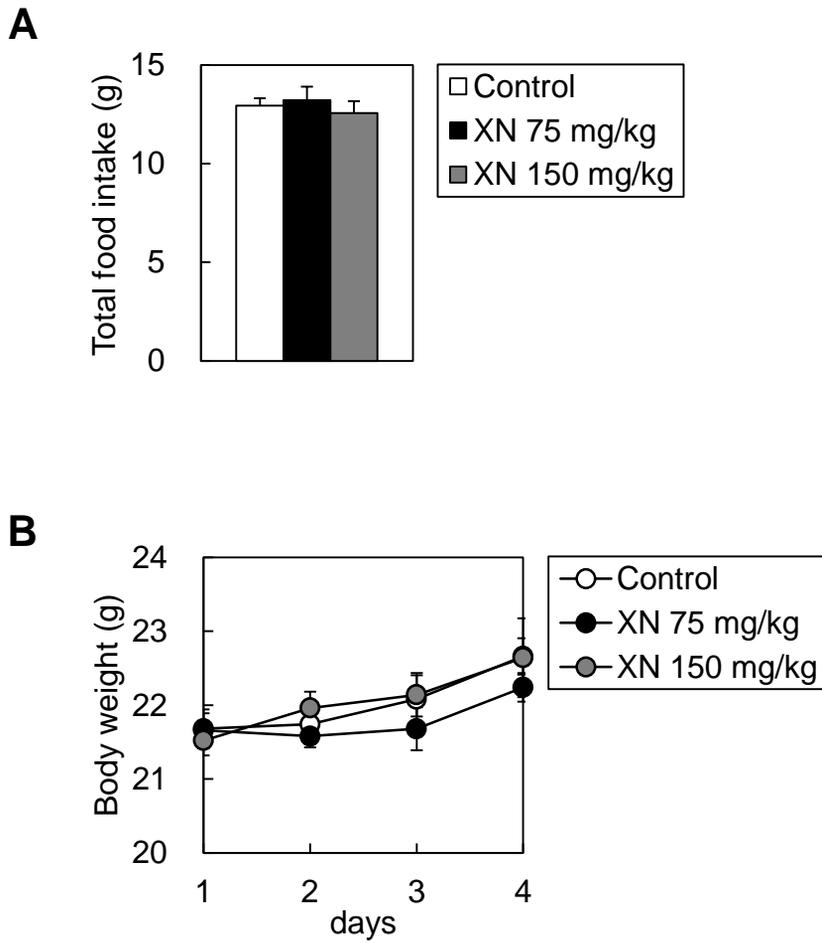


Fig. 5-1. Xanthohumolを短期投与したマウスの摂食量、体重の変動

6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに75, 150 mg/kg body weightのXNを1日1回、3日間 (day 1, 2, 3) 経口投与した。4日目に自由摂食状態で解剖を行い、肝臓を摘出した。

(A) 4日間の総摂食量

(B) 4日間の体重変動

グラフは平均値±標準誤差で示した。(n=5)

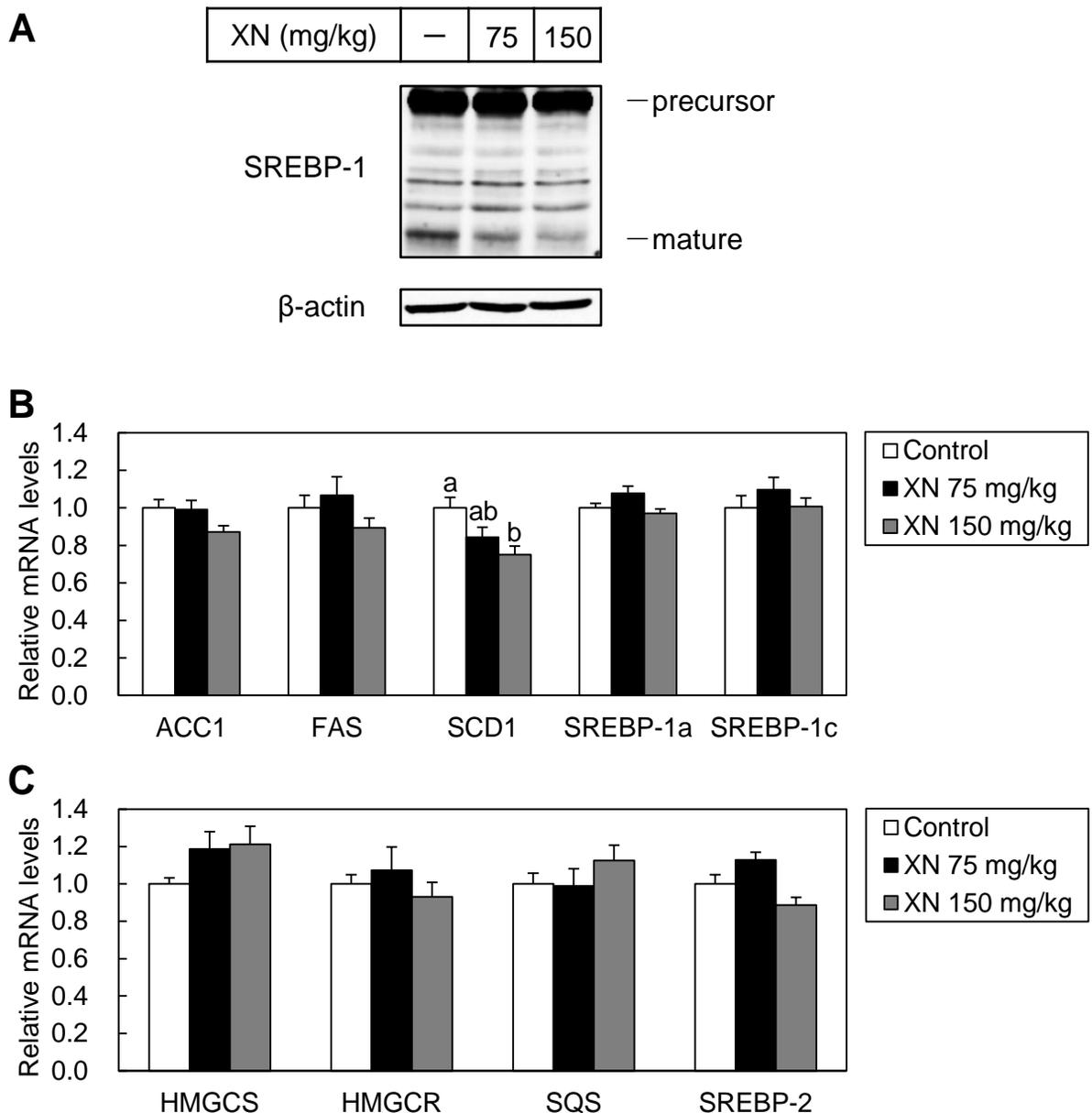


Fig. 5-2. Xanthohumolを短期投与したマウス肝臓におけるSREBPタンパク質、標的遺伝子mRNAの変動

6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに75, 150 mg/kg body weightのXNを1日1回、3日間 (day 1, 2, 3) 経口投与した。4日目に自由摂食状態で解剖を行い、肝臓を摘出した。肝臓から抽出したタンパク質を群ごとにプールし、SDS-PAGEに供した後、SREBP-1抗体 (H-160)を用いてWestern Blottingを行った (A)。また、肝臓からRNAを抽出し、ACC1, FAS, SCD1, SREBP-1a, SREBP-1c (B), HMGCS, HMGCR, SQS, SREBP-2 (C) のmRNA量および18S rRNA量をReal-time PCRにより測定した。グラフは、各遺伝子の測定値を18Sの値で補正し、Control群の値を1として平均値±標準誤差で示した。一元配置分散分析を行い、多重比較検定 (Tukey-Kramer法) を行った。(a, bは異なる文字間での有意差 $p < 0.05$ を示す。n=5)

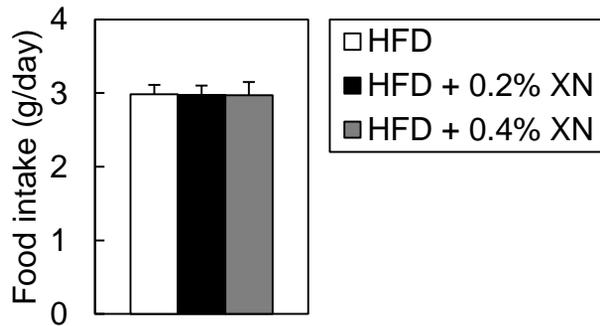
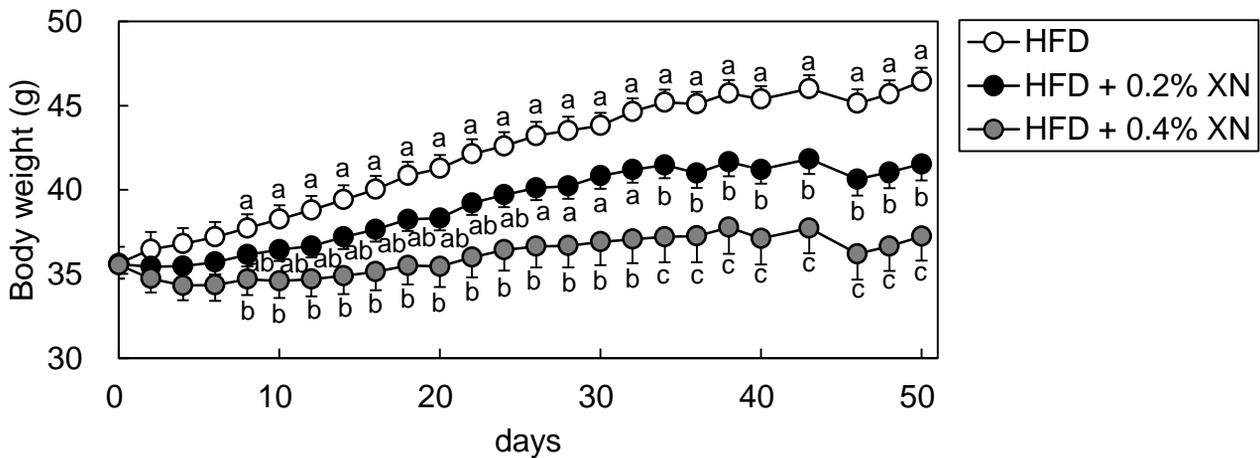
A**B**

Fig. 5-3. Xanthohumol長期摂取マウスの摂食量、体重変動

6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに10週間高脂肪食を摂食させた後、高脂肪食、または0.2%、0.4%のXNを混合した高脂肪食を50日間摂食させた。

(A) 1日あたりの摂食量

(B) 50日間の体重変動

グラフは平均値±標準誤差で示した。一元配置分散分析を行い、多重比較検定(Tukey-Kramer法)を行った。(a~cは異なる文字間での有意差 $p < 0.05$ を示す。n=10-11)

Table. 5-1. Xanthohumol長期摂取マウスの肝臓、脂肪組織重量

6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに10週間高脂肪食を摂食させた後、高脂肪食、または0.2, 0.4%のXNを混合した高脂肪食を50日間摂食させた。50日後に自由摂食状態で解剖を行い、肝臓、精巣上体周囲白色脂肪組織 (Epididymal WAT)、腸間膜白色脂肪組織 (Mesenteric WAT)、皮下白色脂肪組織 (Subcutaneous WAT)、鼠蹊部白色脂肪組織 (Inguinal WAT)、肩甲骨間褐色脂肪組織 (Interscapular BAT) を採取した。数値は平均値±標準誤差で示した。一元配置分散分析を行い、多重比較検定 (Tukey-Kramer法) を行った。(a~cは異なる文字間での有意差 $p<0.05$ を示す。n=10-11)

| | HFD | HFD + 0.2% XN | HFD + 0.4% XN |
|-----------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| Liver (g) | 2.10±0.49 ^a | 1.53±0.23 ^b | 1.36±0.23 ^b |
| Epididymal WAT (g) | 2.35±0.44 ^a | 2.43±0.27 ^a | 1.83±0.53 ^b |
| Mesenteric WAT (g) | 1.35±0.25 ^a | 0.87±0.28 ^b | 0.55±0.19 ^c |
| Subcutaneous WAT (g) | 1.55±0.25 ^a | 1.19±0.24 ^b | 0.77±0.29 ^c |
| Inguinal WAT (g) | 1.03±0.16 ^a | 0.93±0.28 ^{ab} | 0.74±0.26 ^b |
| Interscapular BAT (g) | 0.25±0.05 ^a | 0.19±0.08 ^b | 0.08±0.06 ^c |

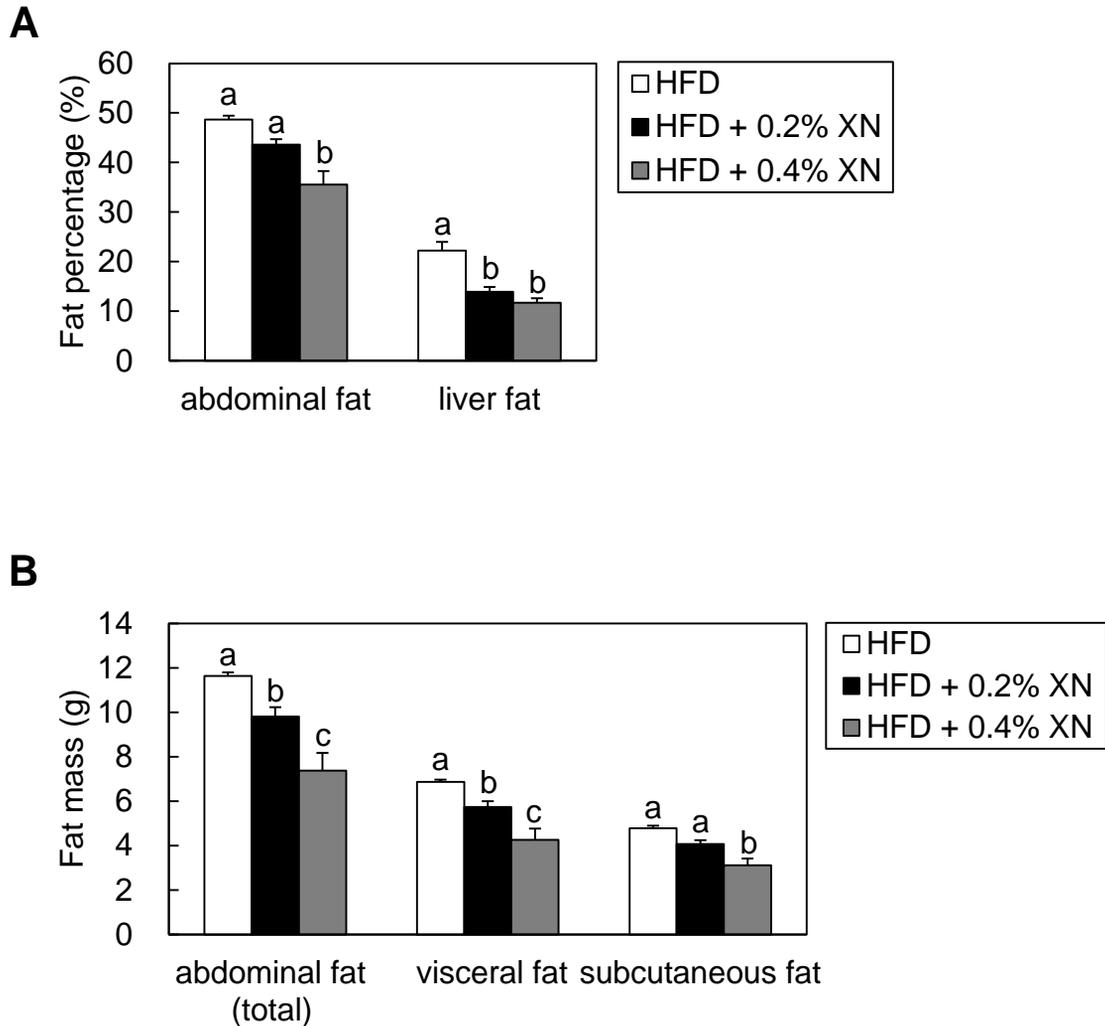


Fig. 5-4. Xanthohumol長期摂取マウスの腹囲脂肪率、脂肪量

6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに10週間高脂肪食を摂食させた後、高脂肪食、または0.2%、0.4%のXNを混合した高脂肪食を50日間摂食させた。XN混合食を摂食させ始めてから35日後にCTスキャン画像解析し、腹囲脂肪率と肝脂肪率(A)、腹囲全体と内臓(visceral fat)、皮下(subcutaneous fat)の脂肪量(B)を算出した。グラフは平均値±標準誤差で示した。一元配置分散分析を行い、多重比較検定(Tukey-Kramer法)を行った。(a~cは異なる文字間での有意差 $p < 0.05$ を示す。n=10-11)

Table. 5-2. Xanthohumol長期摂取マウスの血中リポタンパク質プロファイルと肝臓中脂質蓄積量

6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに10週間高脂肪食を摂食させた後、高脂肪食、または0.2, 0.4%のXNを混合した高脂肪食を50日間摂食させた。50日後に自由摂食状態で解剖を行い、血液、肝臓を摘出した。血中の各リポタンパク質が含有するトリグリセリド、コレステロールの量、血中ALT, AST値を測定した。また、肝臓から脂質を抽出し、トリグリセリド、コレステロールの量を測定した。数値は平均値±標準誤差で示した。一元配置分散分析を行い、多重比較検定 (Tukey-Kramer法) を行った。(a~cは異なる文字間での有意差 $p < 0.05$ を示す。n=10-11)

| | HFD | HFD + 0.2% XN | HFD + 0.4% XN |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Plasma | | | |
| Triglyceride (mg/dl) | | | |
| Total | 56.8±10.0 | 59.2±27.6 | 34.1±11.0 |
| CM | 7.7±2.0 | 8.0±5.0 | 3.8±1.2 |
| VLDL | 30.4±6.4 | 37.6±20.7 | 19.9±7.8 |
| LDL | 15.7±3.6 ^a | 11.7±3.0 ^{ab} | 8.7±2.0 ^b |
| HDL | 3.0±0.5 ^a | 2.0±0.4 ^b | 1.7±0.4 ^b |
| Cholesterol (mg/dl) | | | |
| Total | 180.4±5.5 ^a | 143.3±17.0 ^b | 120.9±13.0 ^c |
| CM | 0.9±0.2 | 1.0±0.6 | 0.6±0.3 |
| VLDL | 5.4±1.6 | 4.9±2.3 | 3.2±1.0 |
| LDL | 40.0±1.8 ^a | 27.0±5.7 ^b | 20.7±3.1 ^b |
| HDL | 134.1±6.0 ^a | 110.5±11.1 ^b | 96.4±9.5 ^b |
| ALT (IU/l) | 88.6±15.9 | 37.2±3.5 | 57.8±21.9 |
| AST (IU/l) | 122.6±31.4 | 51.9±4.5 | 78.1±22.8 |
| Liver | | | |
| Triglyceride (mg/g) | 130.8±31.2 ^a | 46.2±19.5 ^b | 29.6±8.8 ^b |
| Cholesterol (mg/g) | 2.1±0.9 ^a | 1.3±0.3 ^b | 1.1±0.3 ^b |

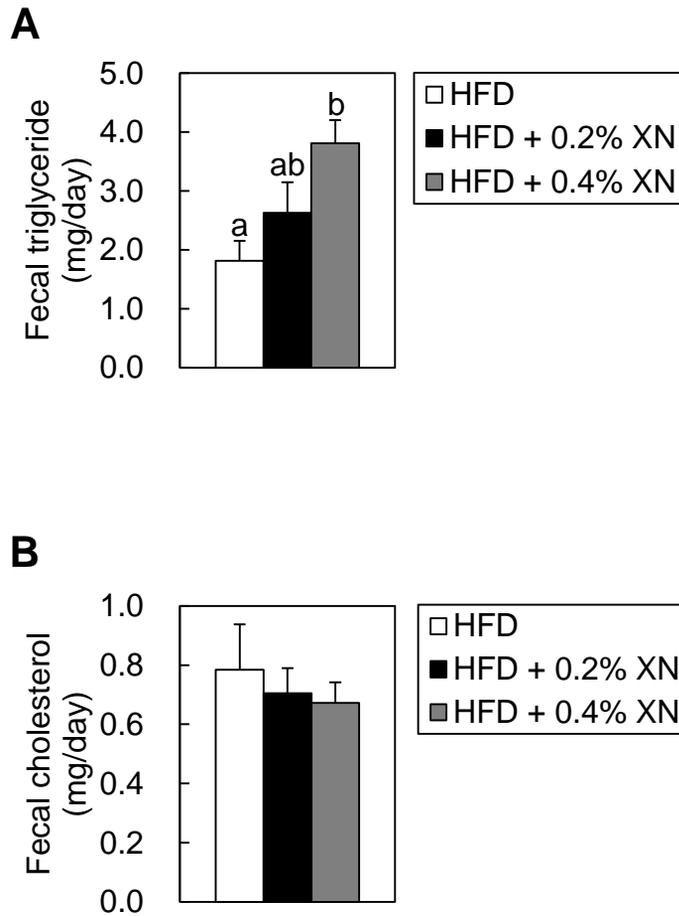


Fig. 5-5. Xanthohumol摂取マウスの糞中脂質量

6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに高脂肪食、または0.2, 0.4%のXNを混合した高脂肪食を8日間摂食させ、最後の4日間で糞を回収した。糞から脂質を抽出し、トリグリセリド(A)、コレステロール(B)の量を測定した。グラフは平均値±標準誤差で示した。一元配置分散分析を行い、多重比較検定(Tukey-Kramer法)を行った。(a, bは異なる文字間での有意差 $p < 0.05$ を示す。n=5)

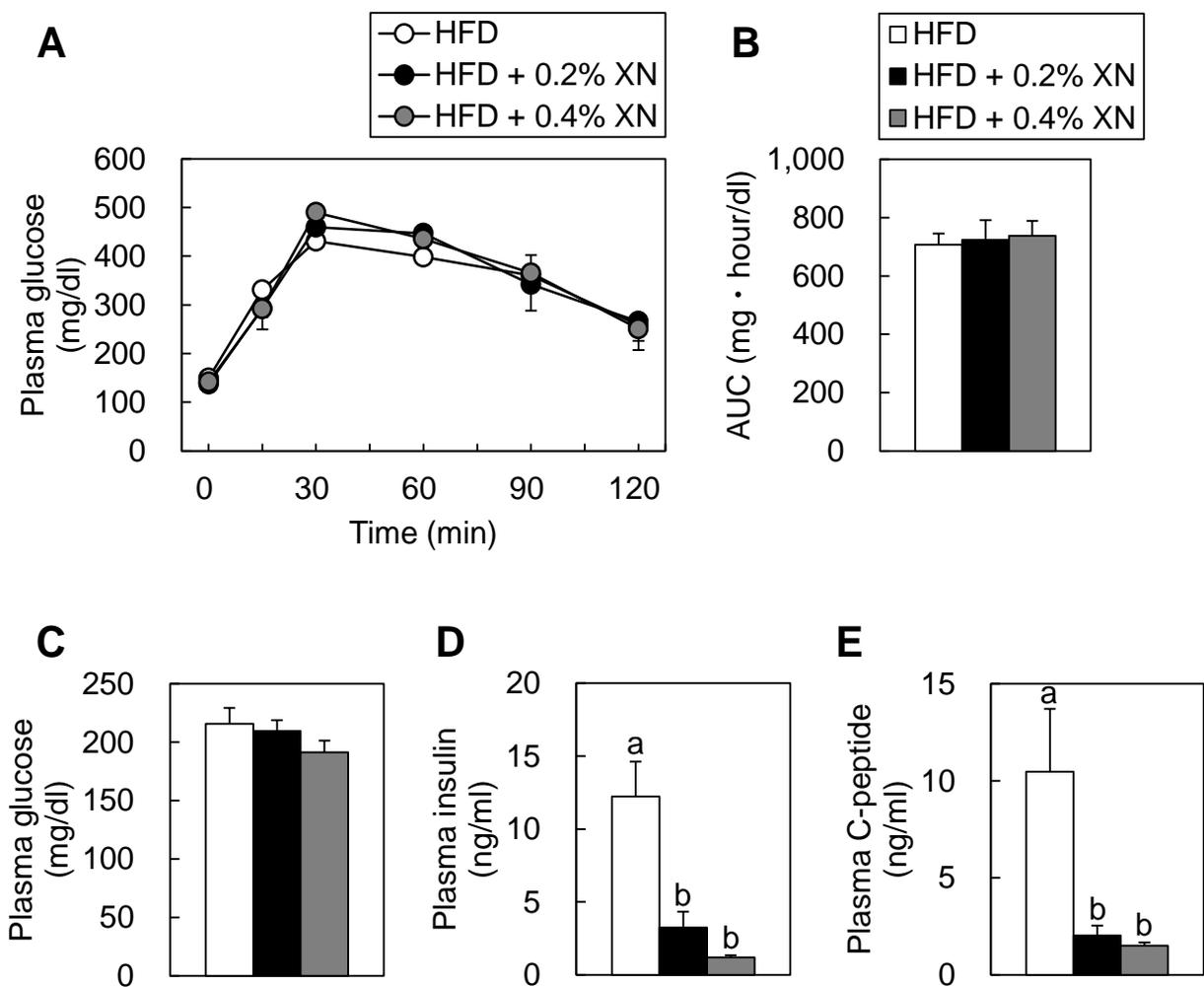


Fig. 5-6. Xanthohumol長期摂取マウスのグルコース耐性、血糖値、インスリン値

6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに10週間高脂肪食を摂食させた後、高脂肪食、または0.2%、0.4%のXNを混合した高脂肪食を50日間摂食させた。XN混合食を摂食させ始めてから44日後にOGTTを行い、グルコース耐性を解析した。16時間絶食後に2 g/kg body weightのグルコースを経口投与し、その後経時的に血糖値を測定した(A)。また、(A)の曲線下側面積(the area under the curve: AUC)を算出した(B)。50日後に自由摂食状態で解剖を行い、血液を採取し、血糖値(C)、インスリン値(D)、C-ペプチド値(E)を測定した。グラフは平均値±標準誤差で示した。一元配置分散分析を行い、多重比較検定(Tukey-Kramer法)を行った。(a, bは異なる文字間での有意差 $p < 0.05$ を示す。n=10-11)

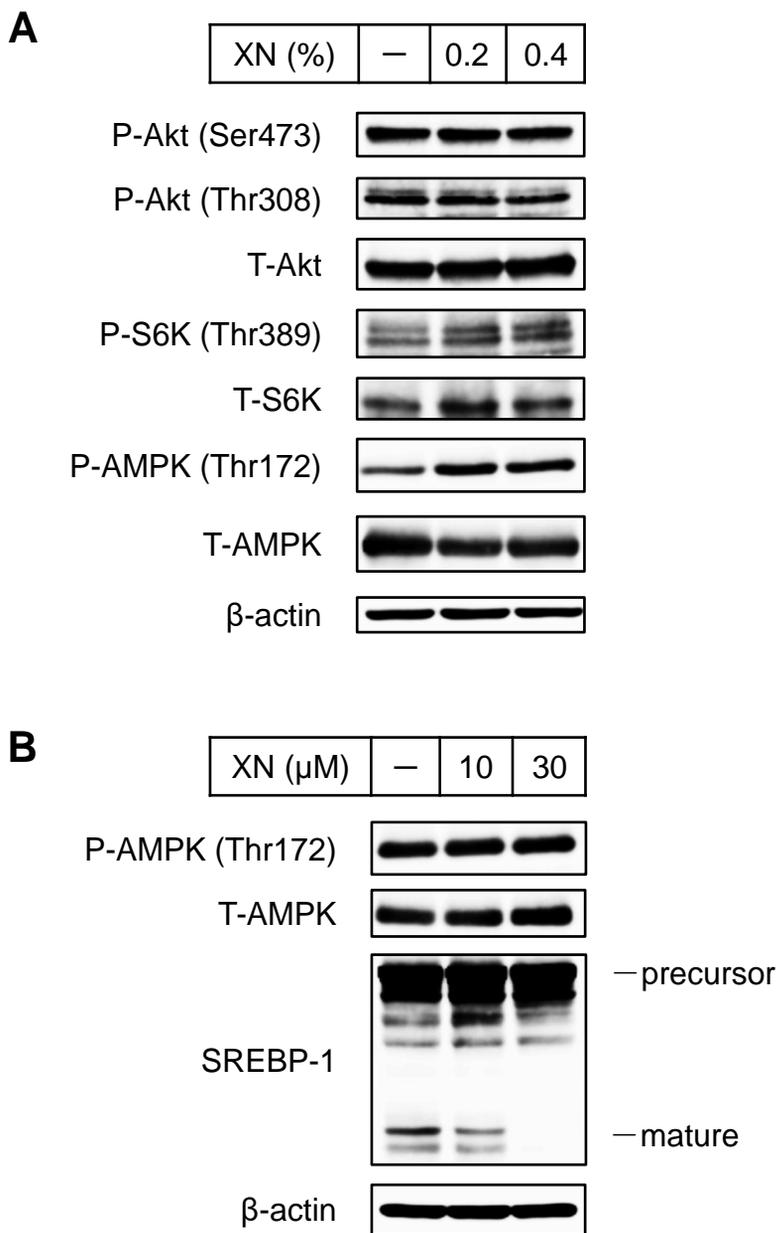


Fig. 5-7. Xanthohumol長期摂取マウス肝臓におけるインスリンシグナル関連タンパク質のリン酸化状態と培養細胞におけるXNのAMPKリン酸化への影響

(A) 6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに10週間高脂肪食を摂食させた後、高脂肪食、または0.2, 0.4%のXNを混合した高脂肪食を50日間摂食させた。50日後に自由摂食状態で解剖を行い、肝臓を採取した。肝臓から抽出したタンパク質を群ごとにプールし、SDS-PAGEに供した後、P-Akt (Ser473) 抗体、P-Akt (Thr308) 抗体、T-Akt抗体、P-S6K (Thr389) 抗体、T-S6K抗体、P-AMPK (Thr172) 抗体、T-AMPK抗体を用いてWestern Blottingを行った。

(B) CHO-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に10, 30 μ MのXNを添加し、さらに3時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、P-AMPK (Thr172) 抗体、T-AMPK抗体、SREBP-1 抗体 (2A4) を用いてWestern Blottingを行った。

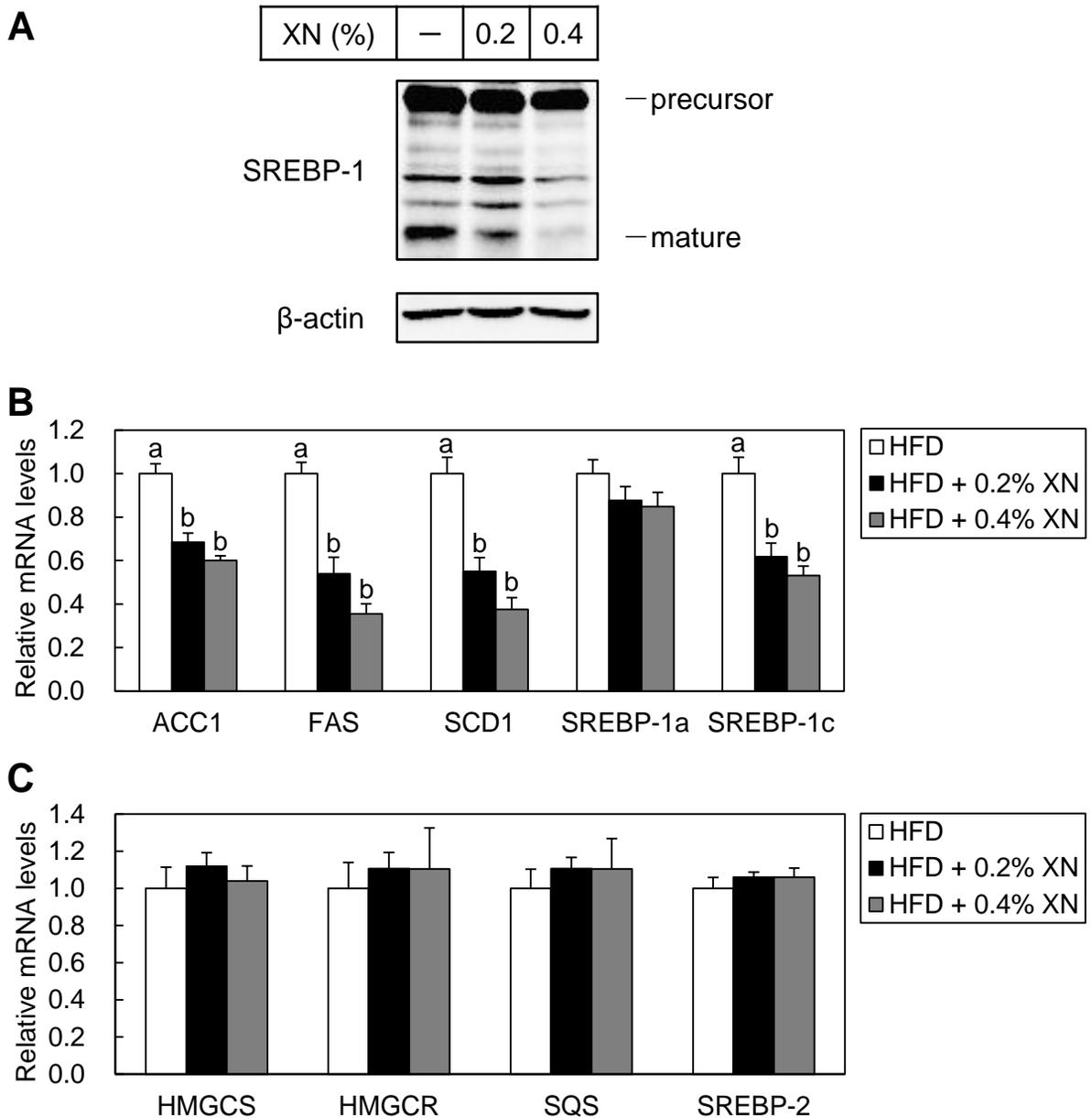


Fig. 5-8. Xanthohumol長期摂取マウス肝臓におけるSREBPタンパク質、標的遺伝子mRNAの変動

6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに10週間高脂肪食を摂食させた後、高脂肪食、または0.2, 0.4%のXNを混合した高脂肪食を50日間摂食させた。50日後に自由摂食状態で解剖を行い、肝臓を採取した。肝臓から抽出したタンパク質を群ごとにプールし、SDS-PAGEに供した後、SREBP-1抗体(H-160)を用いてWestern Blottingを行った(A)。また、肝臓からRNAを抽出し、ACC1, FAS, SCD1, SREBP-1a, SREBP-1c (B), HMGCS, HMGCR, SQS, SREBP-2 (C) のmRNA量および18S rRNA量をReal-time PCRにより測定した。グラフは、各遺伝子の測定値を18Sの値で補正し、HFD群の値を1として平均値±標準誤差で示した。一元配置分散分析を行い、多重比較検定(Tukey-Kramer法)を行った。(a, bは異なる文字間での有意差 $p < 0.05$ を示す。n=10-11)

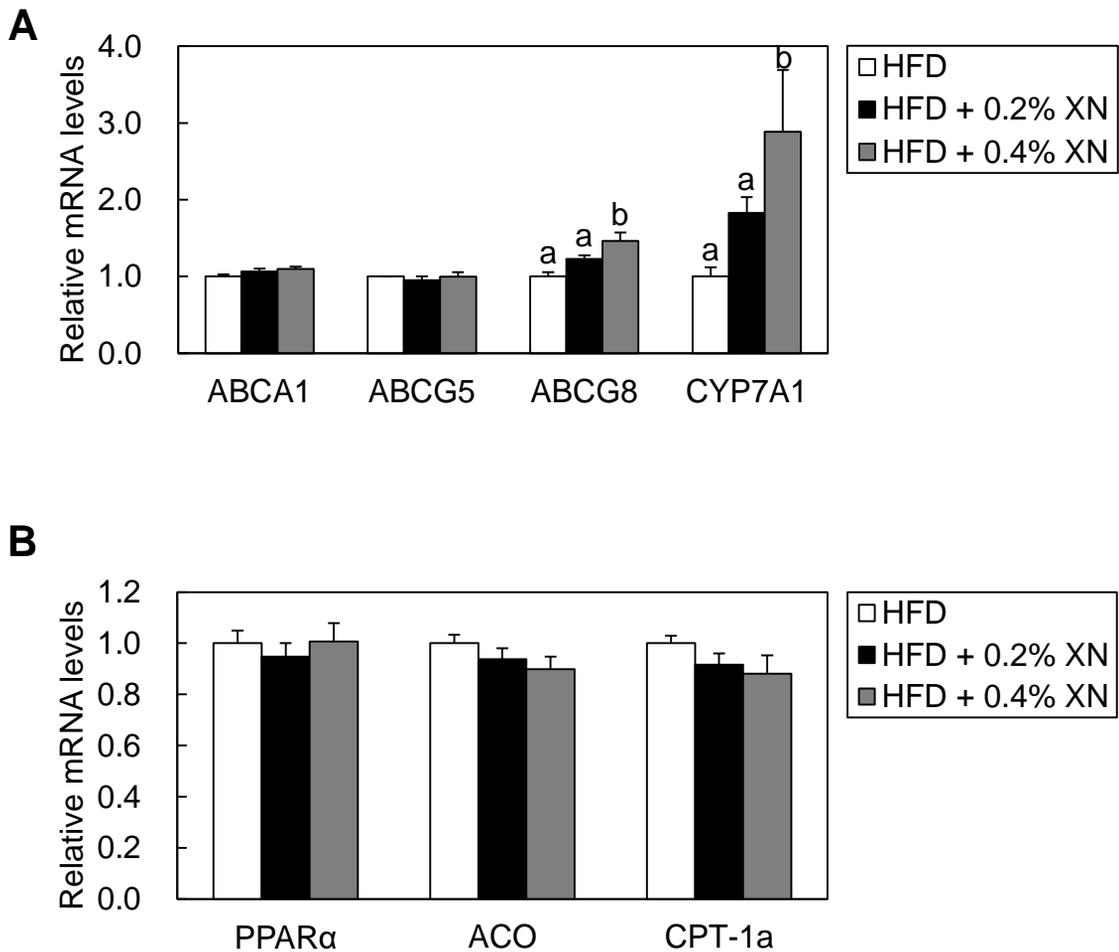


Fig. 5-9. Xanthohumol長期摂取マウス肝臓におけるコレステロール排出・異化関連遺伝子、脂肪酸酸化関連遺伝子mRNAの変動

6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに10週間高脂肪食を摂食させた後、高脂肪食、または0.2, 0.4%のXNを混合した高脂肪食を50日間摂食させた。50日後に自由摂食状態で解剖を行い、肝臓を採取した。肝臓からRNAを抽出し、ABCA1, ABCG5, ABCG8, CYP7A1 (A), PPAR α , ACO, CPT-1a (B) のmRNA量および18S rRNA量をReal-time PCRにより測定した。グラフは、各遺伝子の測定値を18Sの値で補正し、HFD群の値を1として平均値±標準誤差で示した。一元配置分散分析を行い、多重比較検定 (Tukey-Kramer法) を行った。(a, bは異なる文字間での有意差 $p < 0.05$ を示す。n=10-11)

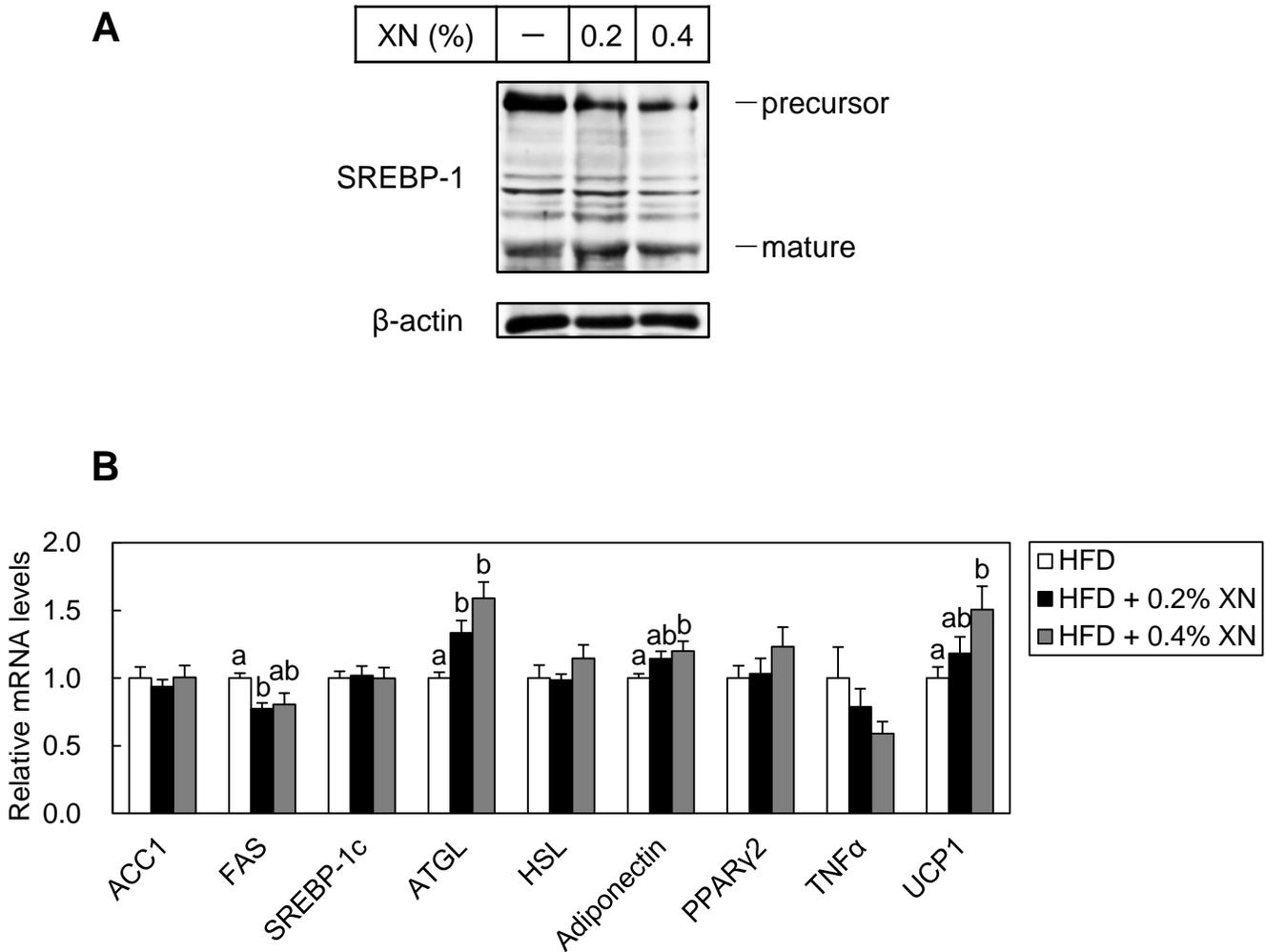


Fig. 5-10. Xanthohumol長期摂取マウス皮下白色脂肪組織におけるSREBPタンパク質、各種遺伝子mRNAの変動

6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに10週間高脂肪食を摂食させた後、高脂肪食、または0.2, 0.4%のXNを混合した高脂肪食を50日間摂食させた。50日後に自由摂食状態で解剖を行い、皮下白色脂肪組織を採取した。皮下白色脂肪組織から抽出したタンパク質を群ごとにプールし、SDS-PAGEに供した後、SREBP-1抗体(H-160)を用いてWestern Blottingを行った(A)。また、皮下白色脂肪組織からRNAを抽出し、ACC1, FAS, SREBP-1c, ATGL, HSL, Adiponectin, PPAR γ 2, TNF α , UCP1のmRNA量および18S rRNA量をReal-time PCRにより測定した(B)。グラフは、各遺伝子の測定値を18Sの値で補正し、HFD群の値を1として平均値±標準誤差で示した。一元配置分散分析を行い、多重比較検定(Tukey-Kramer法)を行った。(a, bは異なる文字間での有意差 $p < 0.05$ を示す。n=10-11)

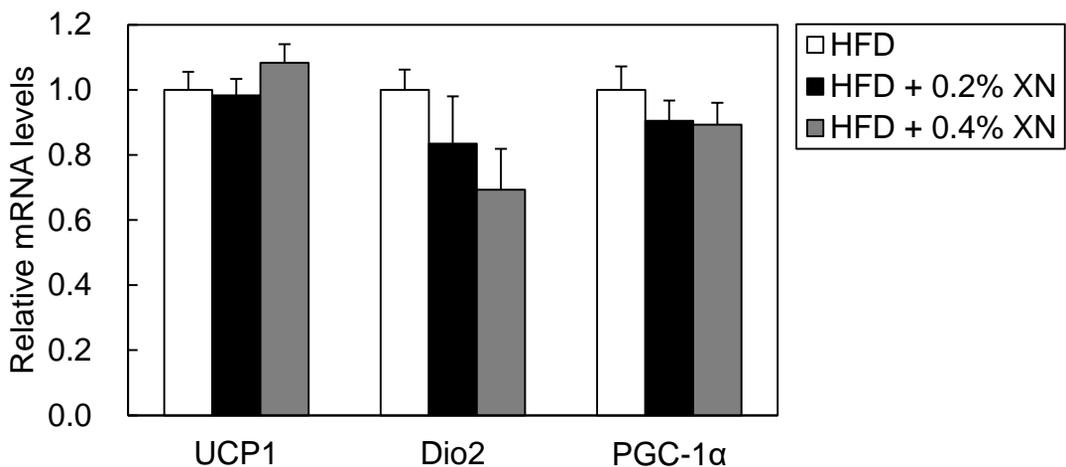


Fig. 5-11. Xanthohumol長期摂取マウス肩甲骨間褐色脂肪組織における熱産生関連遺伝子mRNAの変動

6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに10週間高脂肪食を摂食させた後、高脂肪食、または0.2, 0.4%のXNを混合した高脂肪食を50日間摂食させた。50日後に自由摂食状態で解剖を行い、肝臓を採取した。肝臓からRNAを抽出し、UCP1, Dio2, PGC-1αのmRNA量および18S rRNA量をReal-time PCRにより測定した。グラフは、各遺伝子の測定値を18Sの値で補正し、HFD群の値を1として平均値±標準誤差で示した。(n=10-11)

5-4. 考察

本章における結果を以下に示す。

- ① Xanthohumol 短期投与により、
 - ・肝臓における活性型 SREBP-1 が減少した。
 - ・肝臓における SREBP 標的遺伝子発現に大きな変動は見られなかった。

- ② Xanthohumol 長期摂食により、
 - ・マウスの食餌性肥満、脂肪肝が抑えられた。
 - ・血中、肝臓中脂質量が低下した。
 - ・血中インスリン値が低下した。
 - ・肝臓におけるリン酸化 AMPK が増加した。
 - ・肝臓における活性型 SREBP-1 が減少した。
 - ・肝臓における SREBP-1 標的遺伝子発現が低下した。
 - ・肝臓における ABCG8, CYP7A1 の発現が上昇した。
 - ・白色脂肪組織における活性型 SREBP-1 は減少しなかった。
 - ・白色脂肪組織における ATGL, Adiponectin, UCP1 の発現が上昇した。

①の実験より、Xanthohumol は培養細胞だけでなく、動物個体においても活性型 SREBP-1 を減少させることが示された (Fig. 5-2. A)。ただし、マウス肝臓サンプルでは SREBP-2 タンパク質を検出することはできなかった。また、今回の実験で Xanthohumol を 3 回投与しただけでは、SCD1 の発現は有意に低下していたものの、その他の SREBP 標的遺伝子にまで効果が及ばなかった (Fig. 5-2. B, C)。これに関しては、投与期間を延ばしていけば、次第に SREBP 標的遺伝子の発現低下が見られるようになると考えられる。

②の Xanthohumol 長期摂食実験では、肝臓における活性型 SREBP-1 減少とともに標的遺伝子の発現低下も認められた (Fig. 5-8. A, B)。一方、SREBP-2 標的遺伝子発現に変動は見られなかった (Fig. 5-8. C) ことから、Xanthohumol 摂取によりマウス肝臓において活性型 SREBP-2 は減少しなかった可能性が考えられる。この実験でも SREBP-2 タンパク質を検出することはできなかったため詳細は不

明であるが、Xanthohumol 摂食による SREBP-2 プロセッシングへの影響を解析することは重要な課題である。過去の研究では、肥満マウスの肝臓において、活性型 SREBP-1c は顕著に増加しているのに対し、SREBP-2 はほとんど変動していないという報告もなされている [87]。この知見を考慮すると、今回の実験の高脂肪食負荷マウスの肝臓では SREBP-2 が十分に活性化していなかったため、Xanthohumol 摂取による SREBP-2 への効果がほとんど見られなかった可能性も考えられる。あるいは、Xanthohumol 摂取によりある段階で SREBP-2 プロセッシングが抑制されていたが、それに伴うコレステロールの減少により SREBP-2 が活性化され、解剖時には活性型 SREBP-2 の産生が回復していたという可能性もある。Xanthohumol が活性型 SREBP-2 を減少させたかどうかは定かではないが、その他のコレステロール代謝関連遺伝子を解析したところ、Xanthohumol を摂食したマウスの肝臓では、コレステロールの排出に関与する ABCG8 や、コレステロールを胆汁酸に異化する律速酵素遺伝子である CYP7A1 の発現が上昇していた。これらの結果から、Xanthohumol 摂取によりコレステロールの排出や異化が亢進しており、それが肝臓中のコレステロールを減少させる一因になったのではないかと考えられる。

Xanthohumol を摂食したマウスでは、血中インスリン値が顕著に低下していた (Fig. 5-6. D, E)。インスリンは、肝臓において優勢な SREBP-1 アイソフォームである SREBP-1c のプロセッシングを促進することが知られている [29-31] ため、Xanthohumol 摂取によるインスリン値の低下が SREBP-1 プロセッシング抑制に寄与した可能性を無視することはできない。インスリンによる SREBP-1c プロセッシング促進には Akt/mTOR/S6K 経路の活性化が重要であることが報告されている [31]。しかし、Xanthohumol を摂食したマウスの肝臓では、Akt, S6K の活性化の指標となるリン酸化タンパク質量は減少していなかった (Fig. 5-7. A)。したがって、今回の Xanthohumol 摂食実験における肝臓中の活性型 SREBP-1 の減少は、血中インスリン値の低下に起因するものではないと考えられる。また、Xanthohumol 摂取により血中インスリン値が顕著に低下していたのに対し、血糖値、耐糖能には大きな変動は見られなかった (Fig. 5-6. A~C)。これは、Xanthohumol 添加高脂肪食群では少量のインスリンでも、高脂肪食群における多量のインスリンと同程度の糖処理能力を発揮することを示しており、Xanthohumol によりインスリン感受性が改善されたことが示唆された。

これまでに、Xanthohumol を混合したウェスタンダイエットを摂食した ApoE ノックアウトマウスの肝臓において AMPK のリン酸化が亢進していたという報告がなされている [181]。本研究の Xanthohumol 摂食実験でも、肝臓においてリン酸化 AMPK が増加していた (Fig. 5-7. A)。リン酸化により活性化した AMPK は SREBP プロセッシングを抑制するという過去の報告 [182] を考慮すると、今回の実験において観察された活性型 SREBP-1 減少の一因として、AMPK の活性化が挙げられる。この可能性を検討するために、培養細胞レベルで Xanthohumol による AMPK への影響を解析した。しかし、CHO-7 細胞に Xanthohumol を処理することにより、活性型 SREBP は減少したものの、そのときリン酸化 AMPK は増加していなかった (Fig. 5-7. B)。したがって、AMPK の活性化は Xanthohumol による SREBP プロセッシング抑制に不可欠ではないと考えられる。

今回の Xanthohumol 摂食実験では、白色脂肪組織においては活性型 SREBP が減少せず、標的遺伝子も一部の発現が低下するのみであった (Fig. 5-10. A, B)。Xanthohumol 摂取により前駆体 SREBP が減少した原因は不明であるが、白色脂肪組織において Xanthohumol は SREBP プロセッシングには影響しないことが示唆された。また、Xanthohumol を摂食したマウスの白色脂肪組織では、ATGL, UCP1 の発現が上昇していたこと (Fig. 5-10. B) から、脂質分解や熱産生によるエネルギー消費が亢進したと考えられる。さらに、Xanthohumol 摂取により Adiponectin の発現も上昇していた (Fig. 5-10. B)。脂肪組織から分泌されるアディポサイトカインである Adiponectin は、骨格筋での脂肪酸の取り込みと燃焼、エネルギー消費を促進することにより、骨格筋や肝臓におけるトリグリセリド含量を減少させ、インスリン感受性を改善することが知られている。したがって、白色脂肪組織における Adiponectin の発現上昇も、Xanthohumol 摂取による肥満や脂肪肝の抑制に寄与すると考えられる。

また、Xanthohumol を摂食したマウスでは、肝臓や白色脂肪組織のみならず、褐色脂肪組織の重量も減少していた (Table. 5-1)。褐色脂肪組織では、脂肪酸を酸化分解し、その際に放出されたエネルギーを UCP1 により熱へと変換・散逸している。つまり、白色脂肪組織が主に過剰なエネルギーを脂肪として蓄積するのに対し、褐色脂肪組織では逆にエネルギーが盛んに消費されている。そのため、抗肥満の観点から見れば、褐色脂肪組織が減少することは好ましいことではないだろう。今回の Xanthohumol 摂食実験で、褐色脂肪組織の重量が低下

していた原因は不明であるが、少なくとも褐色脂肪組織における熱産生関連遺伝子の発現に変動は見られなかった (Fig. 5-11) ため、機能は損なわれていないと考えられる。

本研究のように、Xanthohumol の摂食や投与によりマウスやラットにおいて抗肥満効果が認められた例は散見され、それに関する様々な作用が報告されている。Xanthohumol-rich hop extract を摂食したラットの肝臓では、SREBP-1c mRNA 発現量が減少しており、FAS をはじめとする脂肪酸合成に関与する酵素活性が低下していた [123]。また、Xanthohumol-rich hop extract により糞中へのトリグリセリド排出量の増加や血中への Adiponectin 分泌量の増加が観察されており [123]、これらの結果は本研究における Xanthohumol 摂食実験の結果と合致する。さらに、マウスに Xanthohumol を摂食させると肝臓における CPT-1a の発現が上昇すること [181] や、ラットに Xanthohumol を経口投与することにより、脂肪酸β酸化異常のマーカである dicarboxylic fatty acid, acylcarnitines の血中濃度が低下していること [183] が報告されており、Xanthohumol が脂肪酸β酸化を促進することが示唆されている。ただし、本研究で行った Xanthohumol 摂食実験では、肝臓における脂肪酸酸化関連遺伝子の発現に変動は見られなかった (Fig. 5-9. B)。

このように、Xanthohumol は生体内で様々な作用を介して抗肥満効果を発揮することが想定される。本研究においても、マウスに Xanthohumol を長期摂食させることにより抗肥満効果が認められた。そして、本研究では Xanthohumol による SREBP の活性抑制に焦点を当てて解析を進め、実際に Xanthohumol を摂取したマウスの肝臓において活性型 SREBP が減少するという結果を捉えることができた [184]。しかし、今回の実験で観察された Xanthohumol による抗肥満効果は、もちろん SREBP の活性抑制だけによる結果ではなく、様々な要因が寄与しているだろう。また、肝臓における SREBP-1c の活性は、肥満マウスより通常のマウスで低いことが知られているため、Xanthohumol 摂取によりマウスの肥満が抑えられた結果として、コントロールの肥満マウスと比較して活性型 SREBP-1 の量が減少した可能性も考えられる。しかし、本章の①の実験では、Xanthohumol の3回の投与により、マウスの体重には影響を与えることなく (Fig. 5-1. B)、肝臓における活性型 SREBP-1 の減少が観察された (Fig. 5-2. A)。この結果を考慮すると、②の長期摂食実験において、Xanthohumol は抗肥満効果を発揮するよりも

先に、初期段階で SREBP の活性化を抑制し始めた可能性が高い。また、過去の研究において、前述した合成化合物である Fatostatin [99] や、シラカバの樹皮成分である Betulin [98] など、SREBP プロセッシングを抑制する小分子化合物が生体内で抗肥満効果を示すことが報告されている。このような知見も考慮すると、Xanthohumol による抗肥満効果には、少なくとも一部に SREBP 活性抑制が寄与していると推察される。ただし、Xanthohumol の生体内での効果における SREBP 活性抑制の重要性を検証するためには、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを用いたさらなる詳細な解析が必要とされるだろう。

第 6 章

Sulforaphane, Sulforaphene, Isoxanthohumol による前駆体 SREBP 減少機構の解析

6-1. 緒言

第2章、第3章の結果より、Sulforaphane, Sulforaphene, Isoxanthohumol は SREBP 活性を低下させ脂質合成を抑制すること、さらにそのメカニズムとして、前駆体 SREBP タンパク質を減少させることが示された。そこで、これらの化合物がどのようにして前駆体 SREBP を減少させるのか、その分子機構の解明を試みた。それぞれの化合物が前駆体 SREBP のタンパク質分解を促進する可能性を考え、その主要な経路であるユビキチン・プロテオソーム系、あるいはオートファジー・リソソーム系を介しているかどうかを検討した。そして、実際に SREBP のユビキチン化を促進するかどうかを検討し、さらに分解には SREBP のどの領域が重要であるかを解析した。

6-2. 実験材料および手法

実験材料の調製

<試薬>

2-2, 3-2, 4-2 に準じた。

<細胞培養>

2-2 に準じた。

<抗体>

3-2, 4-2 に準じた。

<プラスミド>

pCMV14-3×Flag

SIGMA より購入した。

pCMV-SREBP-1a (2-1147) -3×Flag

ヒト肝がん由来 HepG2 細胞から得た cDNA を鋳型とし、5'末端側に *Not I* の制限酵素サイトと RGS-6×His タグ、3'末端側に *Xba I* の制限酵素サイトを付加したプライマーおよび KOD-Plus-Neo を用いて、PCR 反応によりヒト SREBP-1a のコーディング領域 (アミノ酸 2-1147) を増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製を行い、*Not I/Xba I* 処理後、pCMV14-3×Flag の *Not I/Xba I* サイトに挿入した。以下にプライマーの配列を示す。

Forward:

5'-ATATGCGGCCGCGATGAGAGGATCGCATCATCACCATCACCACGACGAGCC
ACCCTTCAGCGAG-3'

Reverse:

5'- ATATCTAGAGCTGGAAGTGACAGTGGTCC-3'

pCMV-SREBP-1a (479-1147) -3×Flag

pCMV-SREBP-1a (2-1147) -3×Flag を鋳型として、5'末端側に *Not I* の制限酵素サイトと RGS-6×His タグ、3'末端側に *Xba I* の制限酵素サイトを付加したプライマーおよび KOD-Plus-Neo を用いて、PCR 反応によりヒト SREBP-1a のアミノ酸 479-1147 の領域を増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製を行い、*Not I/Xba I* 処理後、pCMV14-3×Flag の *Not I/Xba I* サイトに挿入した。以下にプライマーの配列を示す。

Forward:

5'-ATATGCGGCCGCGATGAGAGGATCGCATCATCACCATCACCACAGCCGGG
GCATGCTGGACCG-3'

Reverse:

5'- ATATCTAGAGCTGGAAGTGACAGTGGTCC-3'

pCMV-SREBP-1a (2-594) -3×Flag

pCMV-SREBP-1a (2-1147) -3×Flag を鋳型として、5'末端側に *Not I* の制限酵素サイトと RGS-6×His タグ、3'末端側に *Xba I* の制限酵素サイトを付加したプライマーおよび KOD-Plus-Neo を用いて、PCR 反応によりヒト SREBP-1a のアミノ酸 2-594 の領域を増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製を行い、*Not I*/*Xba I* 処理後、pCMV14-3×Flag の *Not I*/*Xba I* サイトに挿入した。以下にプライマーの配列を示す。

Forward:

5'-ATATGCGGCCGCGATGAGAGGATCGCATCATCACCATCACCACGACGAGCC
ACCCTTCAGCGAG-3'

Reverse:

5'- ATATCTAGAGGCCAGGTCCAGGTCAGCCT-3'

pCMV-SREBP-1a (479-594) -3×Flag

pCMV-SREBP-1a (2-1147) -3×Flag を鋳型として、5'末端側に *Not I* の制限酵素サイトと RGS-6×His タグ、3'末端側に *Xba I* の制限酵素サイトを付加したプライマーおよび KOD-Plus-Neo を用いて、PCR 反応によりヒト SREBP-1a のアミノ酸 479-594 の領域を増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製を行い、*Not I*/*Xba I* 処理後、pCMV14-3×Flag の *Not I*/*Xba I* サイトに挿入した。以下にプライマーの配列を示す。

Forward:

5'-ATATGCGGCCGCGATGAGAGGATCGCATCATCACCATCACCACAGCCGGG
GCATGCTGGACCG-3'

Reverse:

5'- ATATCTAGAGGCCAGGTCCAGGTCAGCCT-3'

pCMV-SREBP-1a (2-1147) (K675R, K684R, K727R) -3×Flag

Lys675, Lys684, Lys727 をそれぞれ Arg に置換したヒト SREBP-1a の発現プラスミドを作製した。

まず、pCMV-SREBP-1a (2-1147) -3×Flag を鋳型として、5'末端側に *Not* I の制限酵素サイトと RGS-6×His タグを付加した Forward プライマーと Lys675, Lys684 をそれぞれ Arg に置換した変異 Reverse (K675R, K684R Reverse) プライマーおよび KOD-Plus-Neo、Lys675, Lys684 をそれぞれ Arg に置換した変異 Forward (K675R, K684R Forward) プライマーと 3'末端側に *Xba* I の制限酵素サイトを付加した Reverse プライマーおよび KOD-Plus-Neo を用いて、1st PCR を行った。1st PCR 産物を鋳型として、5'末端側に *Not* I の制限酵素サイトと RGS-6×His タグを付加した Forward プライマーと 3'末端側に *Xba* I の制限酵素サイトを付加した Reverse プライマーおよび KOD-Plus-Neo を用いて、2nd PCR を行った。2nd PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製を行い、*Not* I/*Xba* I 処理後、pCMV14-3×Flag の *Not* I/*Xba* I サイトに挿入した。これにより、pCMV-2KR SREBP-1a (2-1147) -3×Flag を作製した。以下にプライマーの配列を示す。

Forward:

5'-ATATGCGGCCGCGATGAGAGGATCGCATCATCACCATCACCACGACGAGCC
ACCCTTCAGCGAG-3'

K675R, K684R Reverse:

5'-GAGGTGCCCCGCCTGTGTGCCTCCCCATGGTGTGCAGCTGGTGCAGCCTAT
GGTAGACCAGGGCTGC-3'

K675R, K684R Forward:

5'-GCAGCCCTGGTCTACCATAGGCTGCACCAGCTGCACACCATGGGGAGGCA
CACAGGCGGGCACCTC-3'

Reverse:

5'- ATATCTAGAGCTGGAAGTGACAGTGGTCC-3'

次に、pCMV-2KR SREBP-1a (2-1147) -3×Flag を鋳型として、5'末端側に *Not I* の制限酵素サイトと RGS-6×His タグを付加した Forward プライマーと Lys727 を Arg に置換した変異 Reverse (K727R Reverse) プライマーおよび KOD-Plus-Neo、Lys727 を Arg に置換した変異 Forward (K727R Forward) プライマーと 3'末端側に *Xba I* の制限酵素サイトを付加した Reverse プライマーおよび KOD-Plus-Neo を用いて、1st PCR を行った。1st PCR 産物を鋳型として、5'末端側に *Not I* の制限酵素サイトと RGS-6×His タグを付加した Forward プライマーと 3'末端側に *Xba I* の制限酵素サイトを付加した Reverse プライマーおよび KOD-Plus-Neo を用いて、2nd PCR を行った。2nd PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製を行い、*Not I*/*Xba I* 処理後、pCMV14-3×Flag の *Not I*/*Xba I* サイトに挿入した。これにより、pCMV-3KR SREBP-1a (2-1147) -3×Flag を作製した。以下にプライマーの配列を示す。

Forward:

5'-ATATGCGGCCGCGATGAGAGGATCGCATCATCACCATCACCACGACGAGCC
ACCCTTCAGCGAG-3'

K727R Reverse:

5'-GGCCCGTGGGAGACTGGTCCTCACTCTCAATGCAGCCGC-3'

K727R Forward:

5'-GCGGCTGCATTGAGAGTGAGGACCAGTCTCCCACGGGCC-3'

Reverse:

5'-ATATCTAGAGCTGGAAGTGACAGTGGTCC-3'

pCMV-SREBP-1a (2-1147) (K587R, K675R, K684R, K727R) -3×Flag

Lys587, Lys675, Lys684, Lys727 をそれぞれ Arg に置換したヒト SREBP-1a の発現プラスミドを作製した。

pCMV-3KR SREBP-1a (2-1147) -3×Flag を鋳型として、5'末端側に *Not I* の制限酵素サイトと RGS-6×His タグを付加した Forward プライマーと Lys587 を Arg

に置換した変異 Reverse (K587R Reverse) プライマーおよび KOD-Plus-Neo、Lys587 を Arg に置換した変異 Forward (K587R Forward) プライマーと 3'末端側に *Xba* I の制限酵素サイトを付加した Reverse プライマーおよび KOD-Plus-Neo を用いて、1st PCR を行った。1st PCR 産物を鋳型として、5'末端側に *Not* I の制限酵素サイトと RGS-6×His タグを付加した Forward プライマーと 3'末端側に *Xba* I の制限酵素サイトを付加した Reverse プライマーおよび KOD-Plus-Neo を用いて、2nd PCR を行った。2nd PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製を行い、*Not* I/*Xba* I 処理後、pCMV14-3×Flag の *Not* I/*Xba* I サイトに挿入した。これにより、pCMV-4KR SREBP-1a (2-1147) -3×Flag を作製した。以下にプライマーの配列を示す。

Forward:

5'-ATATGCGGCCGCGATGAGAGGATCGCATCATCACCATCACCACGACGAGCC
ACCCTTCAGCGAG-3'

K587R Reverse:

5'-GGTCCAGGTCAGCCTGCCTGCGATGCCTCCAGAAG-3'

K587R Forward:

5'-CTTCTGGAGGCATCGCAGGCAGGCTGACCTGGACC-3'

Reverse:

5'-ATATCTAGAGCTGGAAGTGACAGTGGTCC-3'

PCR (Polymerase Chain Reaction)

2-2 に準じた。

アガロースゲル電気泳動

2-2 に準じた。

アガロースゲルからの DNA 断片回収

2-2 に準じた。

制限酵素処理

2-2 に準じた。

ライゲーション

2-2 に準じた。

大腸菌用培地

2-2 に準じた。

コンピテントセルの作製

2-2 に準じた。

トランスフォーメーション

2-2 に準じた。

ミニプレップ

2-2 に準じた。

ミディプレップ

2-2 に準じた。

シーケンス解析

2-2 に準じた。

細胞への遺伝子ベクターの導入 (リン酸カルシウム法)

2-2 に準じた。

ステロール枯濁処理

4-2 に準じた。

タンパク質の定量

3-2 に準じた。

タンパク質の検出

3-2 に準じた。

免疫沈降 (anti-Flag M2 Affinity gel)

Nonidet P-40 lysis buffer

4-2 に準じた。

TBS (Tris-buffered saline) 溶液

NaCl 8 g, 1 M Tris-HCl (pH 7.5) 100 mL を milliQ 水に溶解し、1 L にメスアップした後、オートクレーブ滅菌した。

anti-Flag M2 Affinity gel

SIGMA より購入した。各サンプルに対して 30 μ L となるように適量の anti-Flag M2 Affinity gel を分注した後、4°C、6,000 \times g で 1 分間遠心し、上清を除去した。TBS 1 mL を加え混合し、4°C、6,000 \times g で 1 分間遠心し、上清を除去した。再度 TBS 1 mL を加え混合した後、サンプルの数だけ 1.5 mL チューブに分注した。4°C、6,000 \times g で 1 分間遠心した後、上清を除去し、それぞれのチューブにサンプルを加えて免疫沈降を行った。

3 \times Flag Peptide

SIGMA より購入した。3 \times Flag Peptide を TBS で 5 倍希釈し、それを 100 μ L の TBS に対し 3 μ L の割合で混合して使用した。

以下の操作は氷上で行った。100 mm dish で培養した細胞を、氷冷した PBS 5 mL で洗浄した後、さらに PBS 1 mL を加え、細胞をスクレイパーでかきとって

1.5 mL チューブに回収した。4°C、500×g で 10 分間遠心し、上清を除去した。ペレットを Nonidet P-40 lysis buffer 400 μL に再懸濁し、25 G 注射針で 20 回ホモジェナイズした。4°C で 1.5 時間回転混合した後、4°C、20,000×g で 30 分間遠心し、上清を回収した。そのうちの 50 μL を分注し、6×LaemmLi Sample buffer 10 μL を加え、95°C で 5 分間加熱処理し、input のサンプルとした。残りのタンパク質溶液を調製した anti-Flag M2 Affinity gel に加え、4°C で一晩回転混合した後、4°C、6,000×g で 1 分間遠心し、上清を除去した。anti-Flag M2 Affinity gel に TBS 500 μL を加え、4°C、6,000×g で 1 分間遠心し、上清を除去した。TBS による洗浄をさらに 2 回繰り返した。調製した 3×Flag Peptide を 50 μL ずつ加え、氷上で 1 時間振とうさせた。4°C、6,000×g で 1 分間遠心した後、上清を回収し、6×LaemmLi Sample buffer 10 μL を加え、95°C で 5 分間加熱処理した。これをタンパク質サンプルとして、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供した。

6-3. 結果

Sulforaphane, Sulforaphene はステロールの有無にかかわらず前駆体 SREBP を減少させる

Isoxanthohumol はステロール過剰条件では前駆体 SREBP を減少させない

第3章より、Sulforaphane, Sulforaphene は前駆体 SREBP を減少させることが示されたが、これはステロール枯渇条件における結果である。この条件では、SREBP プロセッシングが亢進しており、前駆体 SREBP は小胞体からゴルジ体へ輸送され活性型 SREBP が形成される。一方、ステロール過剰条件では、前駆体 SREBP は小胞体膜上に留められ、SREBP プロセッシングが抑制されている。そこで、ステロール過剰条件でもそれぞれの化合物が前駆体 SREBP を減少させるかどうかを検討した。ステロール枯渇培地、または 10 $\mu\text{g/mL}$ のコレステロールと 1 $\mu\text{g/mL}$ の 25-HC を添加したステロール過剰培地で Huh-7 細胞を 16 時間培養した後、100 μM の Sulforaphane (SFaN)、または Sulforaphene (SFeN) を 6 時間処理し、Western Blotting による解析を行った。その結果、これらの化合物はステロール枯渇、ステロール過剰のいずれの条件でも前駆体 SREBP を減少させることが示された (Fig. 6-1. lanes 1~3, 4~6)。

また、100 μM の Isoxanthohumol (IXN) を処理して同様の実験を行ったところ、ステロール枯渇条件では前駆体 SREBP が減少した (Fig. 6-2. lanes 1, 2) のに対し、ステロール過剰条件ではほとんど変動が見られなかった (Fig. 6-2. lanes 3, 4)。

以上の結果より、Sulforaphane, Sulforaphene はステロールの有無にかかわらず前駆体 SREBP を減少させることが示された。一方、Isoxanthohumol による前駆体 SREBP 減少はステロール過剰条件では抑えられることが明らかとなった。

Sulforaphane, Sulforaphene は翻訳阻害下で前駆体 SREBP の分解速度を上昇させる

それぞれの化合物による前駆体 SREBP 減少は、処理後 1~3 時間程度で認められることから、この作用は転写を介した制御ではなく、タンパク質レベルでの制御であることが推測された。そこで、これらの化合物の作用メカニズムとして、前駆体 SREBP タンパク質の分解を促進するのではないかと考えた。そこで、第4章 Fig. 4-5~4-7 と同様に翻訳阻害剤シクロヘキシミドを用いた実験を行った。

翻訳阻害下で化合物を処理したときに、翻訳阻害剤のみを処理したコントロール以上に前駆体 SREBP の分解速度が上昇するようであれば、化合物は前駆体 SREBP タンパク質の分解を促進することが想定される。プロセッシングによる前駆体 SREBP の減少を防ぐために Huh-7 細胞をステロール過剰培地で 16 時間培養した後、50 μM のシクロヘキシミドを処理した。30 分後に 100 μM の Sulforaphane を 1, 3, 6, 9 時間処理し、Western Blotting による解析を行った。その結果、シクロヘキシミドにより経時的に前駆体 SREBP-1, -2 が減少したが (Fig. 6-3. A. lanes 1~5)、Sulforaphane によりその減少速度が上昇した (Fig. 6-3. A. lanes 1~5, 6~10)。Sulforaphane に関しても、同様の結果が得られた (Fig. 6-3. B. lanes 1~5, 6~10)。以上の結果より、Sulforaphane, Sulforaphene は前駆体 SREBP タンパク質の分解を促進することが示唆された。

Sulforaphane, Sulforaphene はユビキチン・プロテアソーム系を介して前駆体 SREBP の分解を促進する

タンパク質分解のメカニズムとして、主にユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系の 2 種類の経路が知られている。そこで、Sulforaphane, Sulforaphene がこれらの経路を介して前駆体 SREBP を分解するかどうかを検討するために、プロテアソーム阻害剤 MG132 とリソソーム阻害剤 NH_4Cl を用いて実験を行った。Huh-7 細胞をステロール枯渇培地で 16 時間培養した後、10 μM の MG132、または 20 mM の NH_4Cl を処理した。30 分後に 100 μM の Sulforaphane、または Sulforaphene を 6 時間処理し、Western Blotting による解析を行った。活性型 SREBP はユビキチン・プロテアソーム系による分解を受けることが知られており、実際にプロテアソーム阻害剤 MG132 を処理するとタンパク質量が増加することが確認された (Fig. 6-4. A. lanes 1, 4)。また、Sulforaphane, Sulforaphene による前駆体 SREBP-1, -2 の減少は、 NH_4Cl を前処理しても抑えられなかったが (Fig. 6-4. A. lanes 1~3, 7~9)、MG132 により一部抑えられた (Fig. 6-4. A. lanes 1~3, 4~6)。これらの結果は、ステロール過剰条件でも同様であった (Fig. 6-4. B)。したがって、Sulforaphane, Sulforaphene はユビキチン・プロテアソーム系を介して前駆体 SREBP の分解を促進することが示唆された。

Sulforaphane, Sulforaphene は SREBP-1a のユビキチン化を促進する

次に、Sulforaphane, Sulforaphene が SREBP のユビキチン化を促進するかどうかを検討した。まず、C 末端に 3×Flag タグを付加した全長 SREBP-1a (アミノ酸 2-1147) 発現プラスミド [pCMV-SREBP-1a (2-1147)-3×Flag] と、N 末端に HA タグを付加したユビキチンの発現プラスミド (pMT123-HA-Ub) をトランスフェクションした Huh-7 細胞に 10 μM のプロテアソーム阻害剤 MG132 を 30 分間処理した後、100 μM の Sulforaphane、または Sulforaphene を添加して 3 時間培養した。細胞からタンパク質を抽出し、Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った後、Western Blotting による解析を行った。この実験では、免疫沈降を行う前のサンプル (input) において、Fig. 6-4 の内因性 SREBP に関する実験と同様に、MG132 を処理しても Sulforaphane, Sulforaphene による前駆体 SREBP-1a 減少は完全には抑えられなかった (Fig. 6-5. input)。そこで、免疫沈降を行ったサンプルについては、SDS-PAGE に供するタンパク質量を調節して前駆体 SREBP-1a の量が同程度になるようにしたうえで、ユビキチン化の変動を解析した。以降の免疫沈降実験についても同様に行った。その結果、Sulforaphane, Sulforaphene を処理したサンプルでは、ユビキチン化バンドのシグナルが増大していた (Fig. 6-5. IP: Flag)。以上の結果より、Sulforaphane, Sulforaphene は SREBP-1a のユビキチン化を促進することが示唆された。

Sulforaphane, Sulforaphene による前駆体 SREBP-1a 減少には SREBP-1a の C 末端側 (アミノ酸 595-1147) の領域が重要である

続いて、Sulforaphane, Sulforaphene による前駆体 SREBP 分解には、SREBP のどの領域が重要であるかを検討することにした。SREBP は小胞体膜上に局在する 2 回膜貫通タンパク質であり、N 末端側と C 末端側が細胞質側に突き出している。そこで、SREBP-1a の N 末端側の細胞質側に出ている領域を欠損した ΔN SREBP-1a 発現プラスミド [pCMV-SREBP-1a (479-1147)-3×Flag]、同様に C 末端側の細胞質側に突き出している領域を欠損した ΔC SREBP-1a 発現プラスミド [pCMV-SREBP-1a (2-594)-3×Flag] を作製した。これらのプラスミド、または Fig. 6-5 で用いた全長の Wild Type (WT) SREBP-1a 発現プラスミドをトランスフェクションした Huh-7 細胞に 100 μM の Sulforaphane、または Sulforaphene を 3 時間処理し、Western Blotting による解析を行った。その結果、ΔN SREBP-1a は

WTと同様に Sulforaphane, Sulforaphene 処理により減少したが (Fig. 6-6. lanes 1~3, 4~6)、 Δ C SREBP-1a では減少が抑えられた (Fig. 6-6. lanes 1~3, 7~9)。N 末端側、C 末端側それぞれを欠損した SREBP-1a に関してユビキチン化の変動を解析したところ、 Δ N SREBP-1a では、WTと同様に Sulforaphane, Sulforaphene 処理によりユビキチン化が亢進したが (Fig. 6-7. A)、 Δ C SREBP-1a ではユビキチン化が亢進しなくなり (Fig. 6-7. B)、Fig. 6-6 と合致する結果が得られた。したがって、Sulforaphane, Sulforaphene による前駆体 SREBP-1a 減少には、SREBP-1a の C 末端側 (アミノ酸 595-1147) の領域が重要であることが示された。

Sulforaphane, Sulforaphene による前駆体 SREBP-1a 減少には SREBP-1a の C 末端側領域の中で特にアミノ酸 595-784 の領域が重要である

SREBP-1a の C 末端側領域の中で、Sulforaphane, Sulforaphene による分解に特に重要な部位を絞り込むために、 Δ C SREBP-1a (2-594) 発現プラスミドの他に、アミノ酸 2-784, 2-968 それぞれの領域の発現プラスミド [pCMV-SREBP-1a (2-784) -3×Flag]、[pCMV-SREBP-1a (2-968) -3×Flag] を作製した。これらのプラスミド、または Δ C SREBP-1a (2-594) 発現プラスミド、または WT SREBP-1a 発現プラスミドをトランスフェクションした Huh-7 細胞に 100 μ M の Sulforaphane、または Sulforaphene を 3 時間処理し、Western Blotting による解析を行った。その結果、SREBP-1a (2-968), SREBP-1a (2-784) は WT と同様に Sulforaphane, Sulforaphene 処理により減少し (Fig. 6-8. lanes 1~3, 4~6, 7~9)、 Δ C SREBP-1a (2-594) のみ減少が抑えられた (Fig. 6-8. lanes 1~9, 10~12)。したがって、Sulforaphane, Sulforaphene による前駆体 SREBP-1a 減少には、SREBP-1a の C 末端側領域の中でも特にアミノ酸 595-784 が重要であることが示唆された。

SREBP-1a のアミノ酸 595-784 の領域に存在する 3 つのリジン残基に変異を入れても Sulforaphane, Sulforaphene による分解は抑えられない

上記の実験より、Sulforaphane, Sulforaphene による SREBP-1a 減少には、SREBP-1a のアミノ酸 595-784 が重要であると示されたことから、この領域にユビキチン化部位が存在する可能性が考えられた。ユビキチンは標的タンパク質中のリジン残基に結合することが知られている。そこで、この領域中の 675, 684, 727 番目に存在する 3 つのリジン残基すべてをアルギニンに置換した 3KR

SREBP-1a (2-1147) 発現プラスミド [pCMV-SREBP-1a (2-1147) (K675R, K684R, K727R) -3×Flag] を作製した。このプラスミド、または WT SREBP-1a 発現プラスミドをトランスフェクションした Huh-7 細胞に 100 μM の Sulforaphane、または Sulforaphene を 3 時間処理し、Western Blotting による解析を行った。その結果、3KR SREBP-1a は WT と同様に Sulforaphane, Sulforaphene 処理により減少した (Fig. 6-9. lanes 1~3, 4~6)。

SREBP-1a のアミノ酸 479-784 の領域に存在する 4 つのリジン残基に変異を入れても Sulforaphane, Sulforaphene による分解は抑えられない

上記の実験より、SREBP-1a のアミノ酸 595-784 の領域に存在する 3 つのリジン残基すべてに変異を入れても Sulforaphane, Sulforaphene による分解は抑えられなかった。これまで SREBP-1a のアミノ酸 595 番目以降の領域に着目してきたが、Fig. 6-6, 6-7. A より、SREBP-1a (479-1147) も Sulforaphane, Sulforaphene 処理によりユビキチン化が亢進し分解を受けることが示されている。これらの結果を考慮すると、SREBP-1a のアミノ酸 479-594 の領域にもユビキチン化部位が存在する可能性がある。そこで、アミノ酸 595-784 の領域に存在する 3 つのリジン残基に加えて、アミノ酸 479-594 に存在する 587 番目のリジン残基をアルギニンに置換した 4KR SREBP-1a (2-1147) 発現プラスミド [pCMV-SREBP-1a (2-1147) (K587R, K675R, K684R, K727R) -3×Flag] を作製した。このプラスミド、または WT SREBP-1a 発現プラスミドをトランスフェクションした Huh-7 細胞に 100 μM の Sulforaphane、または Sulforaphene を 3 時間処理し、Western Blotting による解析を行った。その結果、4KR SREBP-1a は WT と同様に Sulforaphane, Sulforaphene 処理により減少した (Fig. 6-10. lanes. 1~3, 4~6)。また、4KR SREBP-1a のユビキチン化の変動を解析したところ、WT と同様に Sulforaphane, Sulforaphene 処理によりユビキチン化が亢進した (Fig. 6-11)。

Isoxanthohumol はユビキチン・プロテアソーム系を介して前駆体 SREBP の分解を促進する

Isoxanthohumol に関しても、ユビキチン・プロテアソーム系、あるいはオートファジー・リソソーム系を介して前駆体 SREBP を分解するかどうかを検討した。Huh-7 細胞をステロール枯渇培地で 16 時間培養した後、10 μM の MG132、また

は 20 mM の NH₄Cl を処理した。30 分後に 100 μM の Isoxanthohumol を 6 時間処理し、Western Blotting による解析を行った。その結果、まず、MG132 により活性型 SREBP が増加することを確認した (Fig. 6-12. lanes 1, 3)。また、Isoxanthohumol による前駆体 SREBP-1, -2 の減少は、NH₄Cl を前処理しても抑えられなかったが (Fig. 6-12. lanes 1, 2, 5, 6)、MG132 により一部抑えられた (Fig. 6-12. A. lanes 1~4)。したがって、Isoxanthohumol はユビキチン・プロテアソーム系を介して前駆体 SREBP の分解を促進することが示唆された。

Isoxanthohumol は SREBP-1a のユビキチン化を促進する

次に、Fig. 6-5 で行ったものと同様の実験系を用いて、Isoxanthohumol が SREBP のユビキチン化を促進するかどうかを検討した。C 末端に 3×Flag タグを付加した WT SREBP-1a 発現プラスミドと N 末端に HA タグを付加したユビキチン発現プラスミドをトランスフェクションした Huh-7 細胞をステロール枯渇培地で 16 時間培養した後、10 μM のプロテアソーム阻害剤 MG132 を処理した。30 分後に 100 μM の Isoxanthohumol を添加して 6 時間培養した。細胞からタンパク質を抽出し、Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った後、Western Blotting による解析を行った。その結果、Isoxanthohumol により、SREBP-1a のユビキチン化が亢進していた (Fig. 6-13)。

SREBP-1a の N 末端側、C 末端側のいずれの領域を欠損しても Isoxanthohumol による分解は抑えられない

続いて、Isoxanthohumol による前駆体 SREBP-1a 減少に SREBP-1a のどの領域が重要であるかを検討した。ΔN SREBP-1a、または ΔC SREBP-1a、または WT SREBP-1a を発現させた Huh-7 細胞に 100 μM の Isoxanthohumol を 6 時間処理し、Western Blotting による解析を行った。その結果、ΔN SREBP-1a, ΔC SREBP-1a はいずれも WT と同様に Isoxanthohumol 処理により減少した (Fig. 6-14. lanes 1~6)。N 末端側、C 末端側それぞれを欠損した SREBP-1a に関してユビキチン化の変動を解析したところ、予想外なことに、ΔN SREBP-1a では、Isoxanthohumol を処理してもほとんどユビキチン化は亢進していなかった (Fig. 6-15. A)。また、ΔC SREBP-1a では、Isoxanthohumol によりユビキチン化の亢進を確認することができた (Fig. 6-15. B)。

SREBP-1a の N 末端側と C 末端側両方の領域を欠損すると Isoxanthohumol による分解が抑えられる

次に、Isoxanthohumol により N 末端と C 末端両方を除いた SREBP-1a が分解を受けるかどうかを検討した。そのために、N 末端側、C 末端側両方の細胞質に突き出している領域を欠損した $\Delta N\Delta C$ SREBP-1a 発現プラスミド [pCMV-SREBP-1a (479-594) -3 \times Flag] を作製した。このプラスミド、または WT SREBP-1a、または ΔN SREBP-1a、または ΔC SREBP-1a を発現させた Huh-7 細胞に 100 μ M の Isoxanthohumol を 6 時間処理し、Western Blotting による解析を行った。その結果、WT SREBP-1a, ΔN SREBP-1a, ΔC SREBP-1a は Isoxanthohumol により減少した (Fig. 6-16, lanes 1~6) のに対し、 $\Delta N\Delta C$ SREBP-1a では減少が抑えられた (Fig. 6-16, lanes 1~6, 7, 8)。また、 $\Delta N\Delta C$ SREBP-1a では、Isoxanthohumol 処理時にユビキチン化の亢進は見られなかった (Fig. 6-17)。

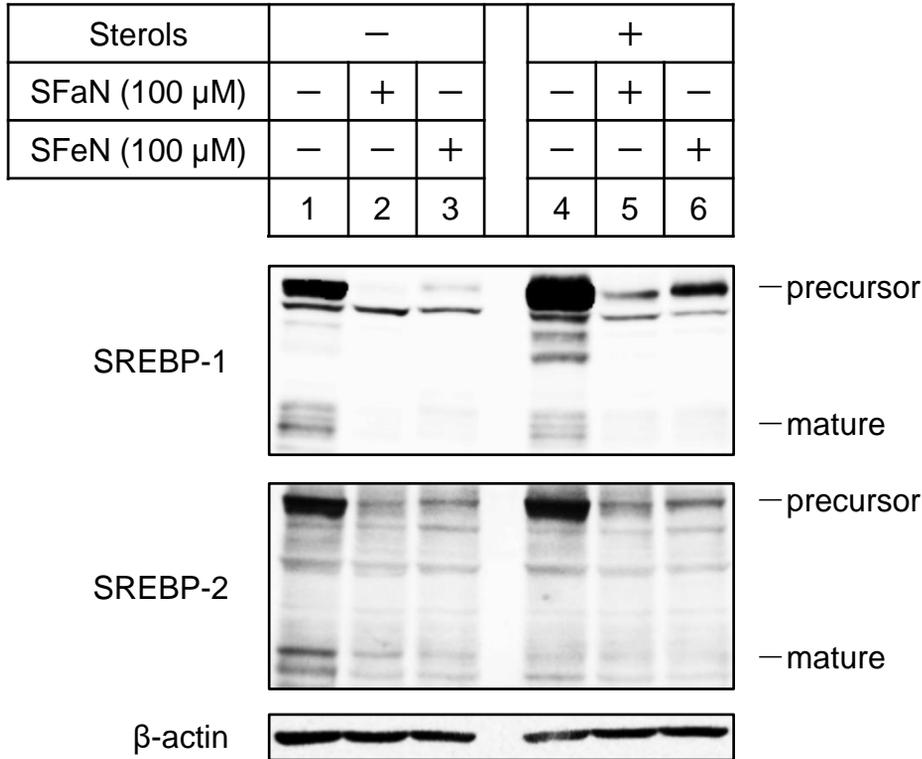


Fig. 6-1. ステロール枯渇条件、ステロール過剰条件におけるSulforaphane, SulforapheneによるSREBPタンパク質の変動

Huh-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇培地、またはステロール添加培地に交換した。16時間後に100 μ MのSFaN、またはSFeNを添加し、さらに3時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、SREBP-1抗体 (2A4)、SREBP-2抗体 (RS004) を用いてWestern Blottingを行った。

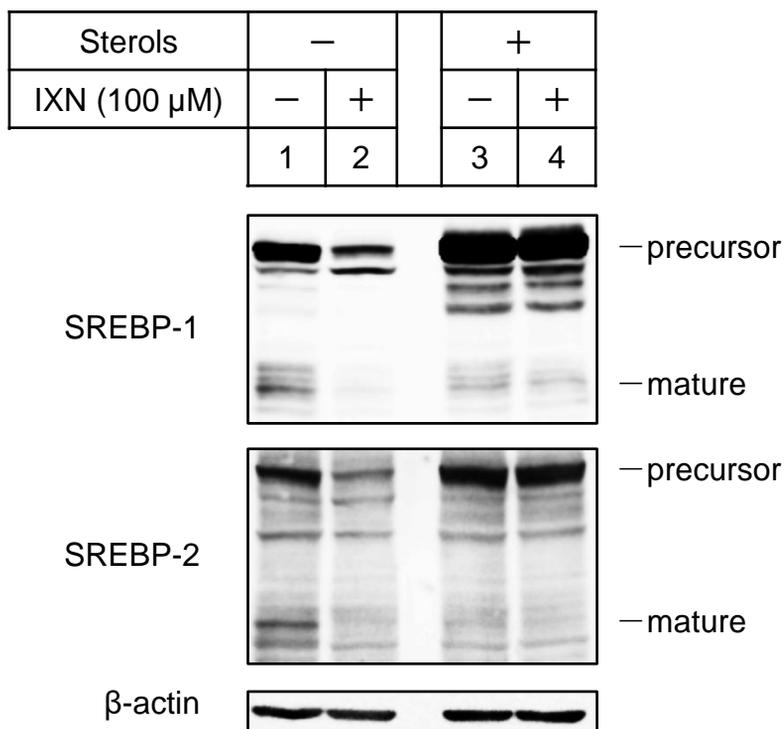


Fig. 6-2. ステロール枯渇条件、ステロール過剰条件におけるIsoxanthohumolによるSREBPタンパク質の変動

Huh-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇培地、またはステロール添加培地に交換した。16時間後に100 μ MのIXNを添加し、さらに6時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、SREBP-1抗体 (2A4)、SREBP-2抗体 (RS004) を用いてWestern Blottingを行った。

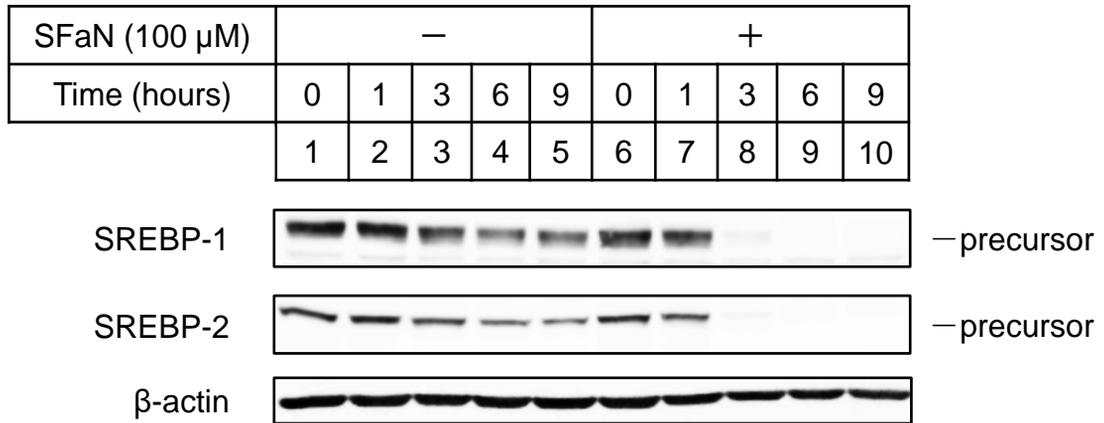
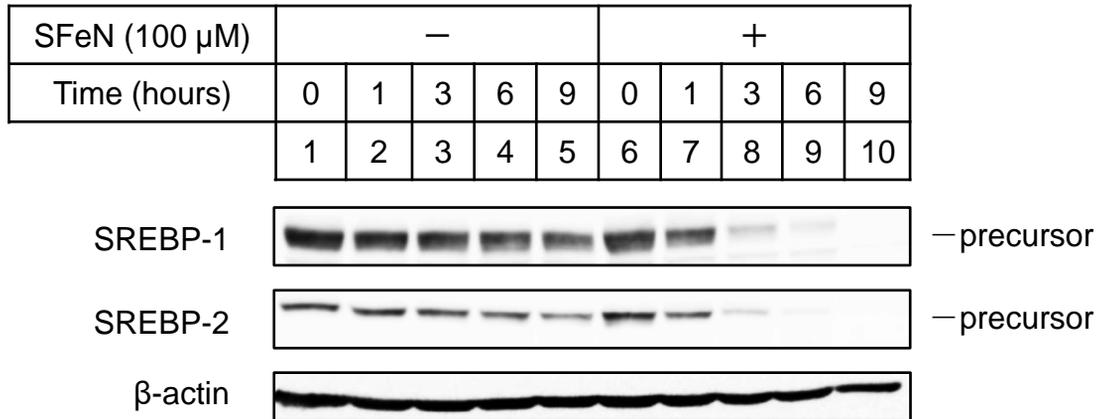
A**B**

Fig. 6-3. 翻訳阻害剤CHX存在下におけるSulforaphane, SulforapheneによるSREBPタンパク質の変動

Huh-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール添加培地に交換した。16時間後に50 μ MのCHXを添加し、30分間培養した。100 μ MのSFaN、またはSFeNを添加し、さらに0, 1, 3, 6, 9時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、SREBP-1抗体 (2A4)、SREBP-2抗体 (1C6) を用いてWestern Blottingを行った。

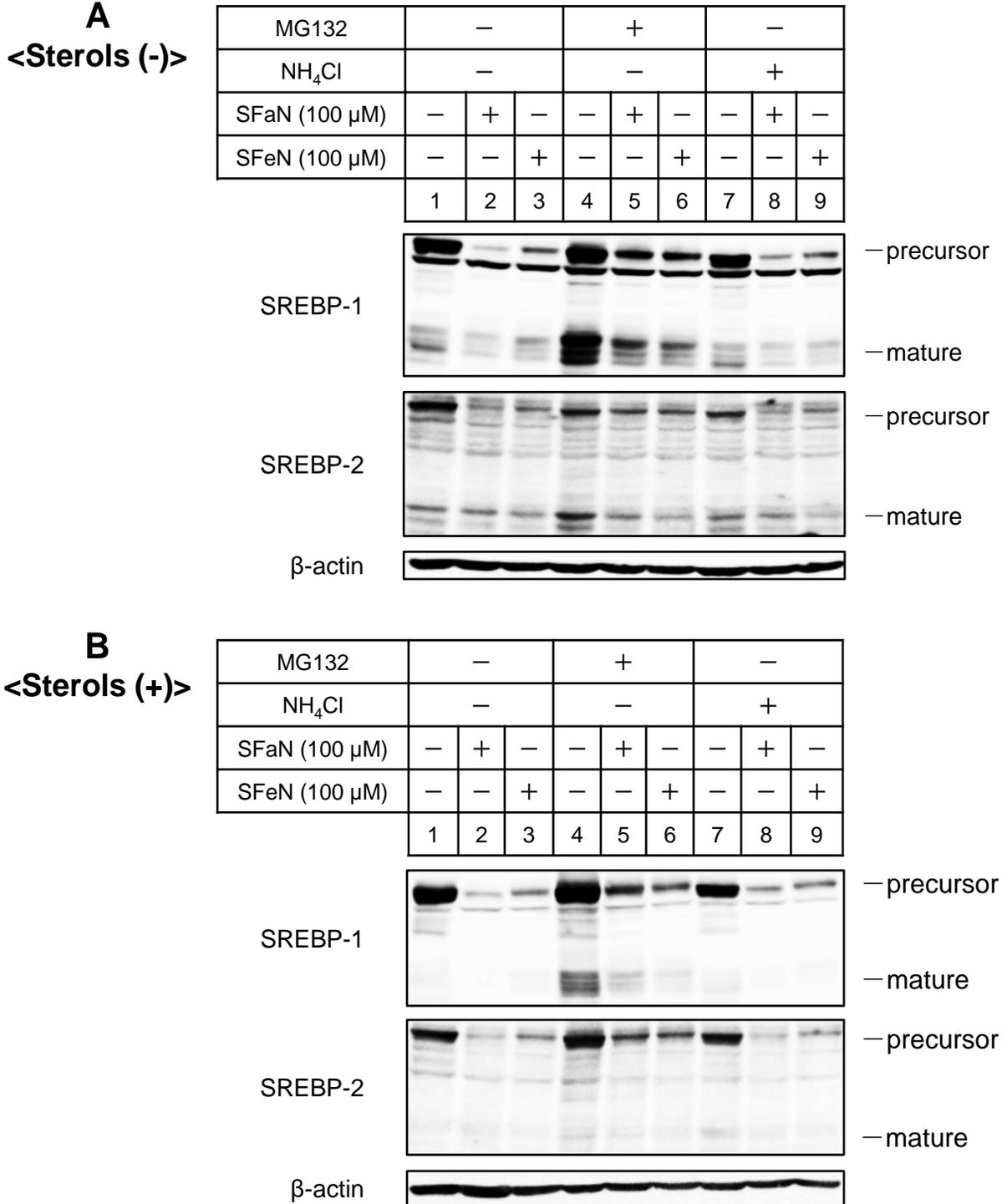


Fig. 6-4. プロテオソーム阻害剤MG132、リソソーム阻害剤NH₄Cl存在下における Sulforaphane, SulforapheneによるSREBPタンパク質の変動

Huh-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇培地 (A)、またはステロール添加培地 (B) に交換した。16時間後に10 μMのMG132、または20 mMのNH₄Clを添加し、30分間培養した。100 μMのSFaN、またはSFeNを添加し、さらに6時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、SREBP-1抗体 (2A4)、SREBP-2抗体 (RS004) を用いてWestern Blottingを行った。

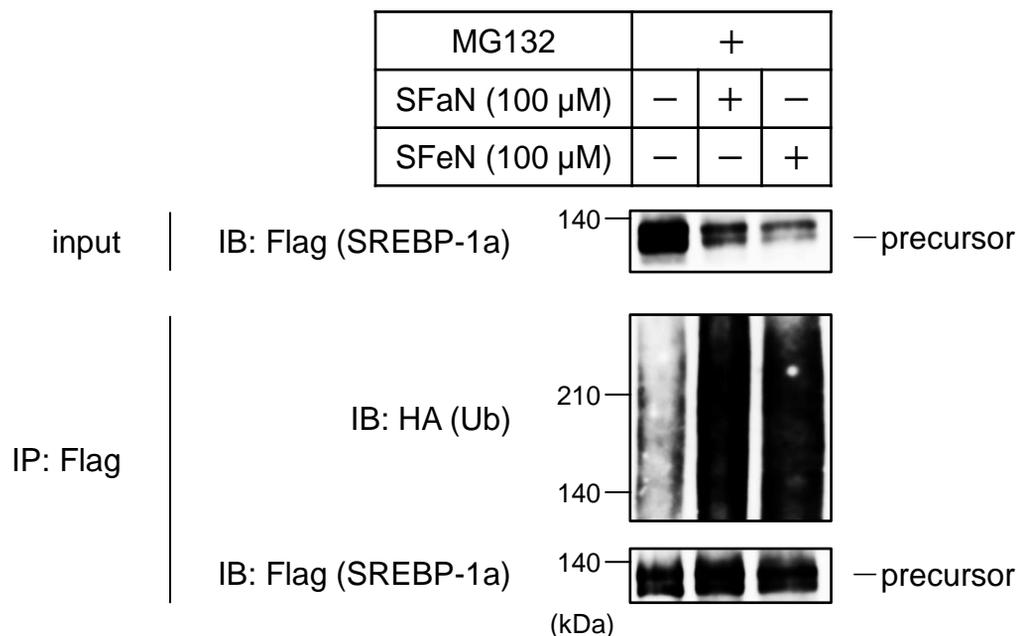


Fig. 6-5. Sulforaphane, SulforapheneによるSREBP-1aのユビキチン化への影響

リン酸カルシウム法によりpCMV-SREBP-1a (2-1147) -3 \times Flag, pMT123-HA-Ubを導入したHuh-7細胞を100 mm dishに播種して24時間培養した後、10 μ MのMG132を添加し、30分間培養した。100 μ MのSFaN、またはSFeNを添加し、さらに3時間培養した。細胞を回収し、anti-Flag M2 affinity gelを用いて免疫沈降を行った。沈降したタンパク質をSDS-PAGEに供した後、Flag抗体、HA抗体を用いてWestern Blottingを行った。inputのサンプルは各等量をSDS-PAGEに供し、IP: FlagのサンプルはSREBP-1aの量が同程度になるようにアプライ量を調節した。

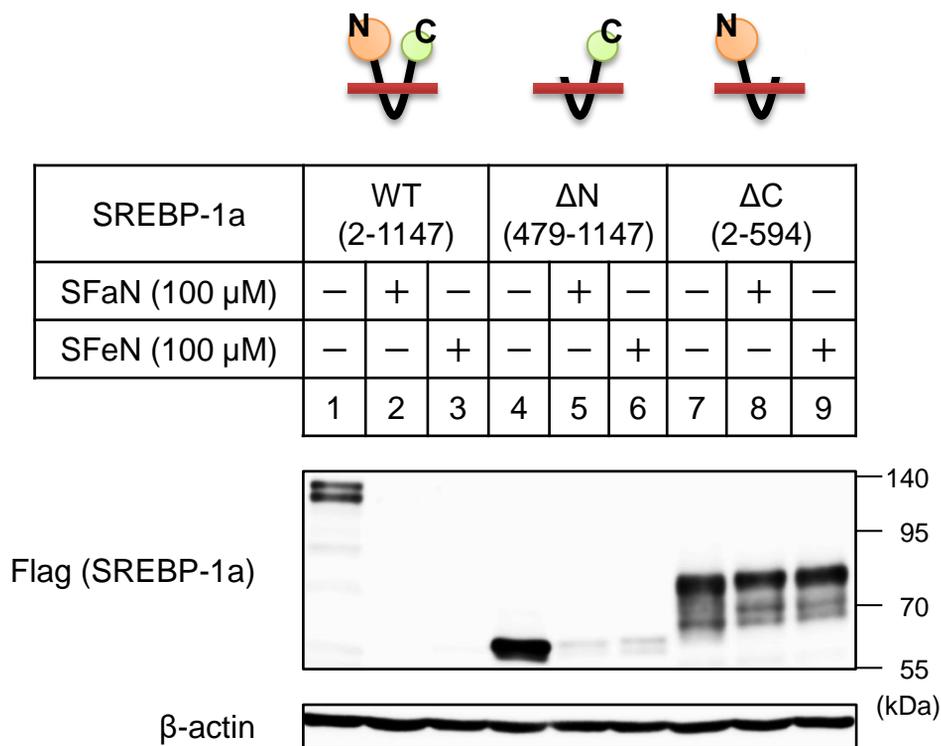
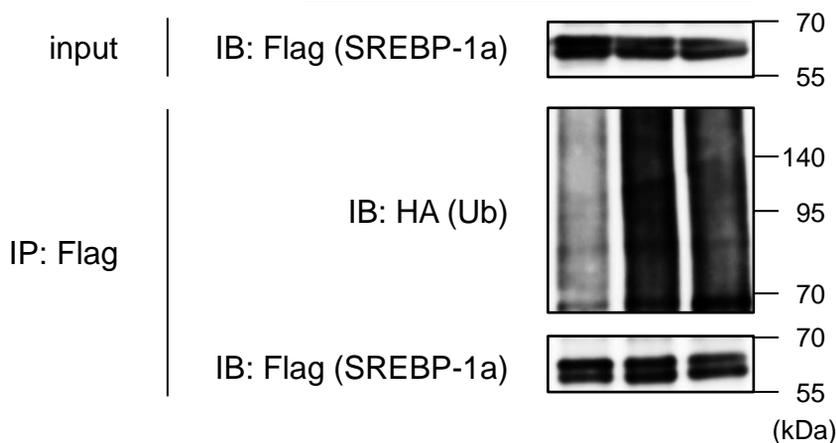
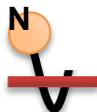


Fig. 6-6. Sulforaphane, SulforapheneによるN末端、C末端領域を欠損したSREBP-1aタンパク質の変動

リン酸カルシウム法によりpCMV-SREBP-1a (2-1147, 479-1147, or 2-594) -3×Flagを導入したHuh-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した。100 μMのSFaN、またはSFeNを添加し、さらに3時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、Flag抗体を用いてWestern Blottingを行った。

A

| | | | |
|---------------|---------------|---|---|
| SREBP-1a | ΔN (479-1147) | | |
| MG132 | + | | |
| SFaN (100 μM) | - | + | - |
| SFeN (100 μM) | - | - | + |

**B**

| | | | |
|---------------|------------|---|---|
| SREBP-1a | ΔC (2-594) | | |
| MG132 | + | | |
| SFaN (100 μM) | - | + | - |
| SFeN (100 μM) | - | - | + |

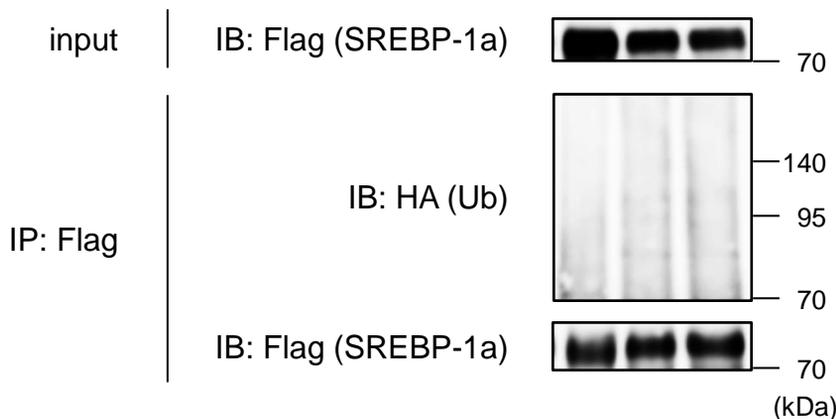


Fig. 6-7. Sulforaphane, SulforapheneによるN末端、C末端領域を欠損したSREBP-1aのユビキチン化への影響

リン酸カルシウム法によりpCMV-SREBP-1a (479-1147) -3×Flag (A)、またはpCMV-SREBP-1a (2-594) -3×Flag (B)、pMT123-HA-Ubを導入したHuh-7細胞を100 mm dishに播種して24時間培養した後、10 μMのMG132を添加し、30分間培養した。100 μMのSFaN、またはSFeNを添加し、さらに3時間培養した。細胞を回収し、anti-Flag M2 affinity gelを用いて免疫沈降を行った。沈降したタンパク質をSDS-PAGEに供した後、Flag抗体、HA抗体を用いてWestern Blottingを行った。inputのサンプルは各等量をSDS-PAGEに供し、IP: FlagのサンプルはSREBP-1aの量が同程度になるようにアプライ量を調節した。

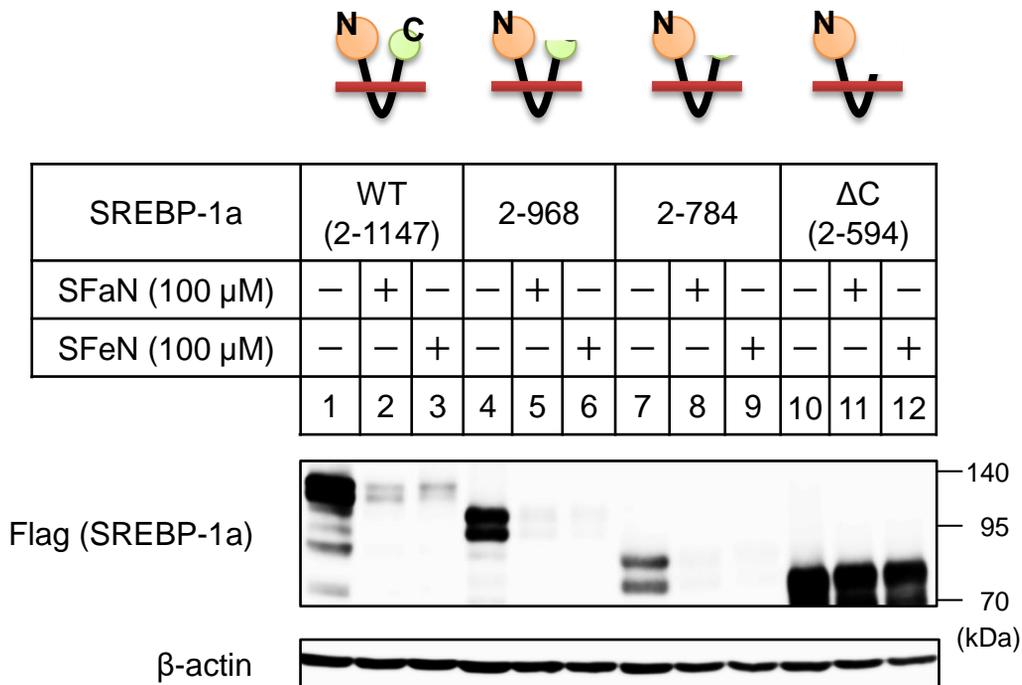


Fig. 6-8. Sulforaphane, SulforapheneによるC末端領域を欠損したSREBP-1aタンパク質の変動

リン酸カルシウム法によりpCMV-SREBP-1a (2-1147, 2-968, 2-784, or 2-594) -3×Flagを導入したHuh-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した。100 μMのSFaN、またはSFeNを添加し、さらに3時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、Flag抗体を用いてWestern Blottingを行った。

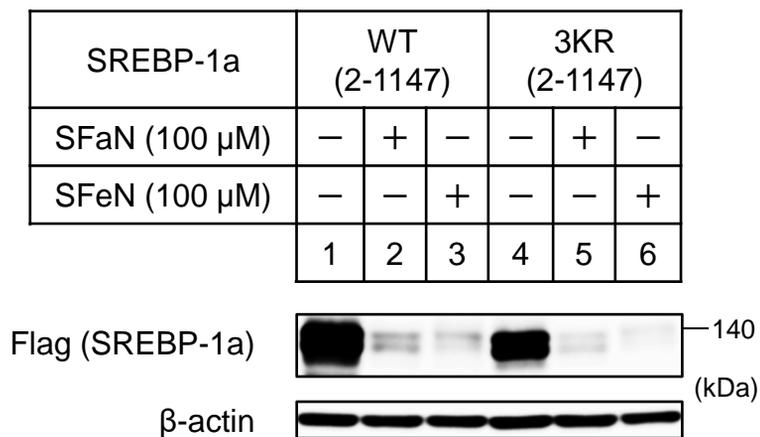


Fig. 6-9. Sulforaphane, SulforapheneによるSREBP-1a (K675R, K684R, K727R) タンパク質の変動

リン酸カルシウム法によりpCMV-SREBP-1a (2-1147) (K675R, K684R, K727R) - 3×Flagを導入したHuh-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した。100 μ MのSFaN、またはSFeNを添加し、さらに3時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、Flag抗体を用いてWestern Blottingを行った。

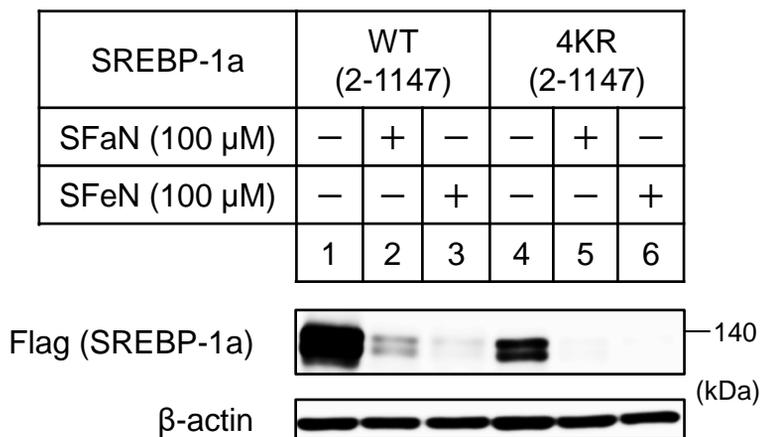


Fig. 6-10. Sulforaphane, SulforapheneによるSREBP-1a (K587R, K675R, K684R, K727R) タンパク質の変動

リン酸カルシウム法によりpCMV-SREBP-1a (2-1147) (K587R, K675R, K684R, K727R) -3×Flagを導入したHuh-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した。100 μ MのSFaN、またはSFeNを添加し、さらに3時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、Flag抗体を用いてWestern Blottingを行った。

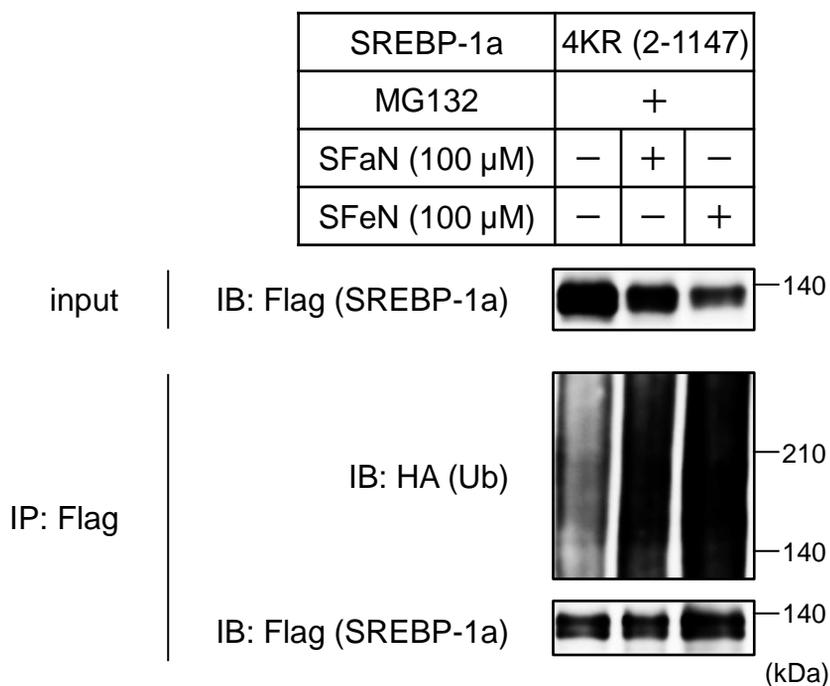


Fig. 6-11. Sulforaphane, SulforapheneによるSREBP-1a (K587R, K675R, K684R, K727R) のユビキチン化への影響

リン酸カルシウム法によりpCMV-SREBP-1a (2-1147) (K587R, K675R, K684R, K727R) -3 \times Flag, pMT123-HA-Ubを導入したHuh-7細胞を100 mm dishに播種して24時間培養した後、10 μ MのMG132を添加し、30分間培養した。100 μ MのSFaN、またはSFeNを添加し、さらに3時間培養した。細胞を回収し、anti-Flag M2 affinity gelを用いて免疫沈降を行った。沈降したタンパク質をSDS-PAGEに供した後、Flag抗体、HA抗体を用いてWestern Blottingを行った。inputのサンプルは各等量をSDS-PAGEに供し、IP: FlagのサンプルはSREBP-1aの量が同程度になるようにアプライ量を調節した。

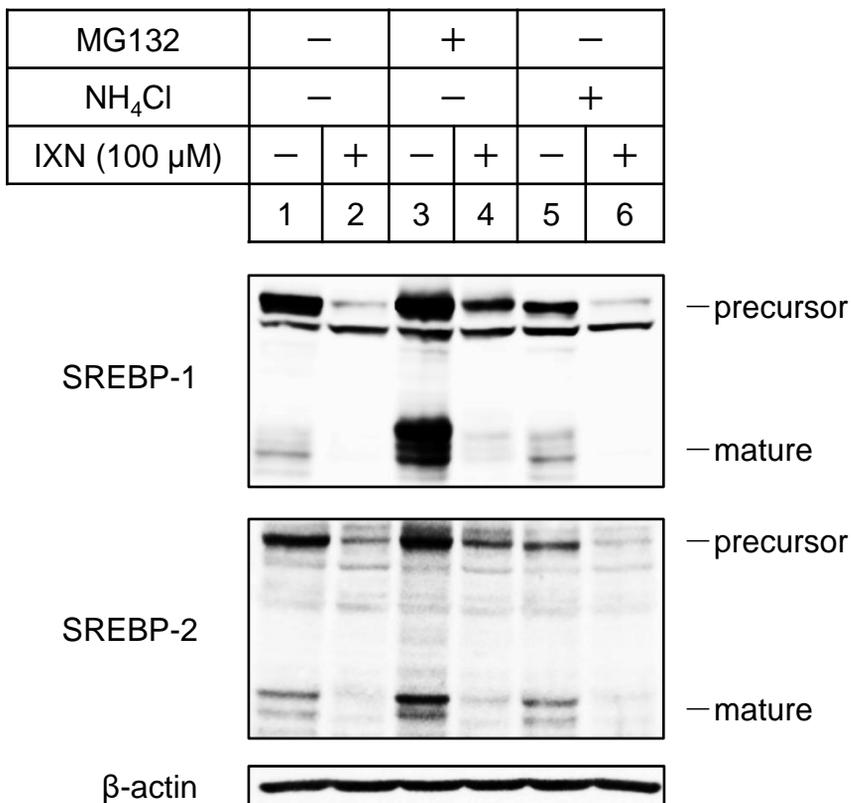


Fig. 6-12. プロテオソーム阻害剤MG132、リソソーム阻害剤NH₄Cl存在下における IsoxanthohumolによるSREBPタンパク質の変動

Huh-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に10 μMのMG132、または20 mMのNH₄Clを添加し、30分間培養した。100 μMのIXNを添加し、さらに6時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、SREBP-1抗体 (2A4)、SREBP-2抗体 (RS004) を用いてWestern Blottingを行った。

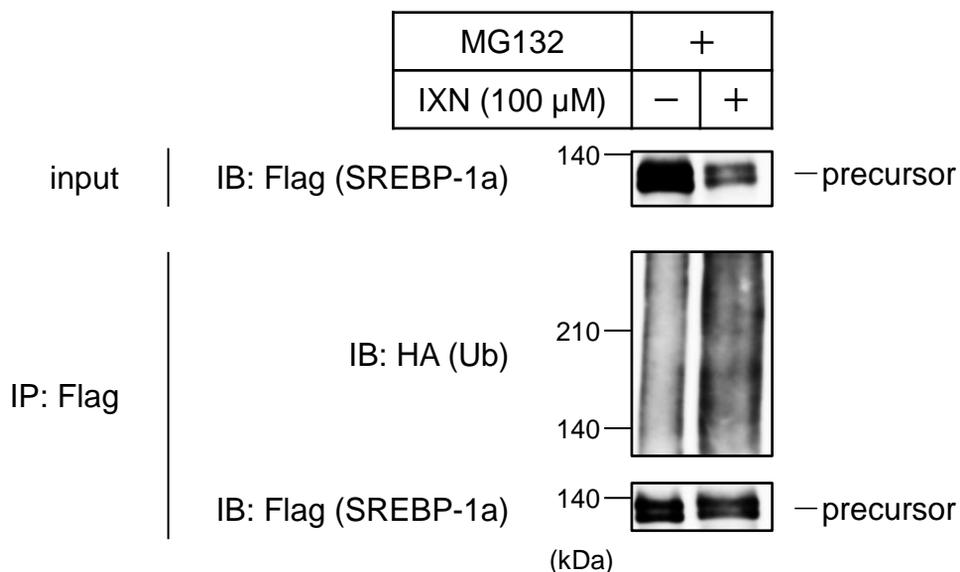


Fig. 6-13. IsoxanthohumolによるSREBP-1aのユビキチン化への影響

リン酸カルシウム法によりpCMV-SREBP-1a (2-1147) -3 \times Flag, pMT123-HA-Ubを導入したHuh-7細胞を100 mm dishに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に10 μ MのMG132を添加し、30分間培養した。100 μ MのIXNを添加し、さらに6時間培養した。細胞を回収し、anti-Flag M2 affinity gelを用いて免疫沈降を行った。沈降したタンパク質をSDS-PAGEに供した後、Flag抗体、HA抗体を用いてWestern Blottingを行った。inputのサンプルは各等量をSDS-PAGEに供し、IP: FlagのサンプルはSREBP-1aの量が同程度になるようにアプライ量を調節した。

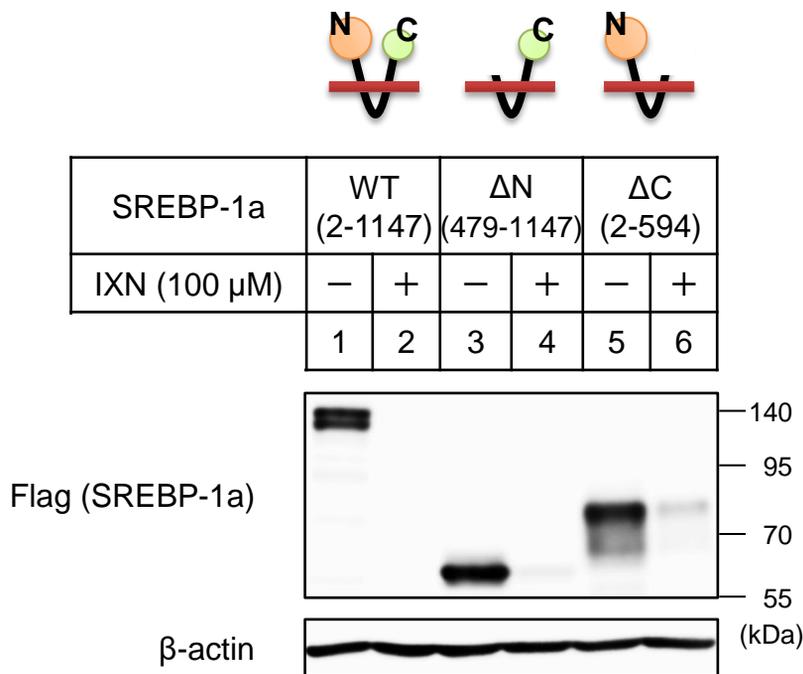
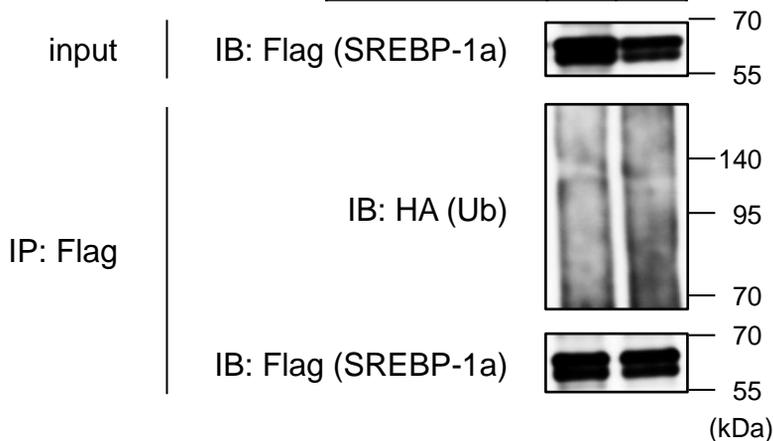
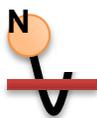


Fig. 6-14. IsoxanthohumolによるN末端、C末端領域を欠損したSREBPタンパク質の変動

リン酸カルシウム法によりpCMV-SREBP-1a (2-1147, 479-1147, or 2-594) -3×Flagを導入したHuh-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に100 μMのIXNを添加し、さらに6時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、Flag抗体を用いてWestern Blottingを行った。

A

| | | |
|--------------|------------------|---|
| SREBP-1a | ΔN (479-1147) | |
| MG132 | + | |
| IXN (100 μM) | - | + |

**B**

| | | |
|--------------|---------------|---|
| SREBP-1a | ΔC (2-594) | |
| MG132 | + | |
| IXN (100 μM) | - | + |

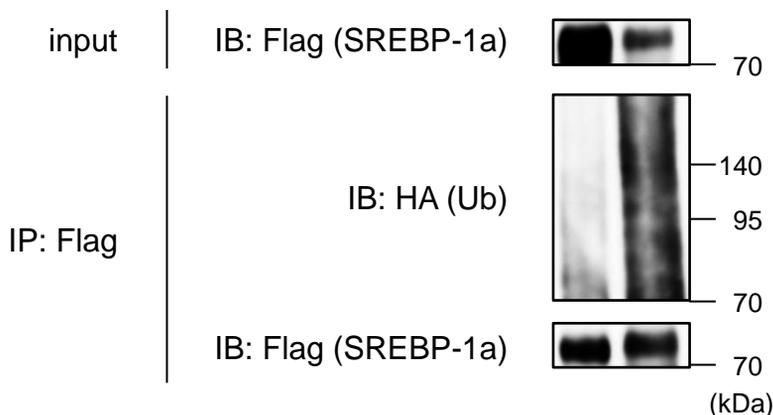


Fig. 6-15. IsoxanthohumolによるN末端、C末端領域を欠損したSREBP-1aのユビキチン化への影響

リン酸カルシウム法により pCMV-SREBP-1a (479-1147) -3×Flag (A)、または pCMV-SREBP-1a (2-594) -3×Flag (B)、pMT123-HA-Ubを導入したHuh-7細胞を100 mm dishに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に10 μMのMG132を添加し、30分間培養した。100 μMのIXNを添加し、さらに6時間培養した。細胞を回収し、anti-Flag M2 affinity gelを用いて免疫沈降を行った。沈降したタンパク質をSDS-PAGEに供した後、Flag抗体、HA抗体を用いてWestern Blottingを行った。inputのサンプルは各等量をSDS-PAGEに供し、IP: FlagのサンプルはSREBP-1aの量が同程度になるようにアプライ量を調節した。

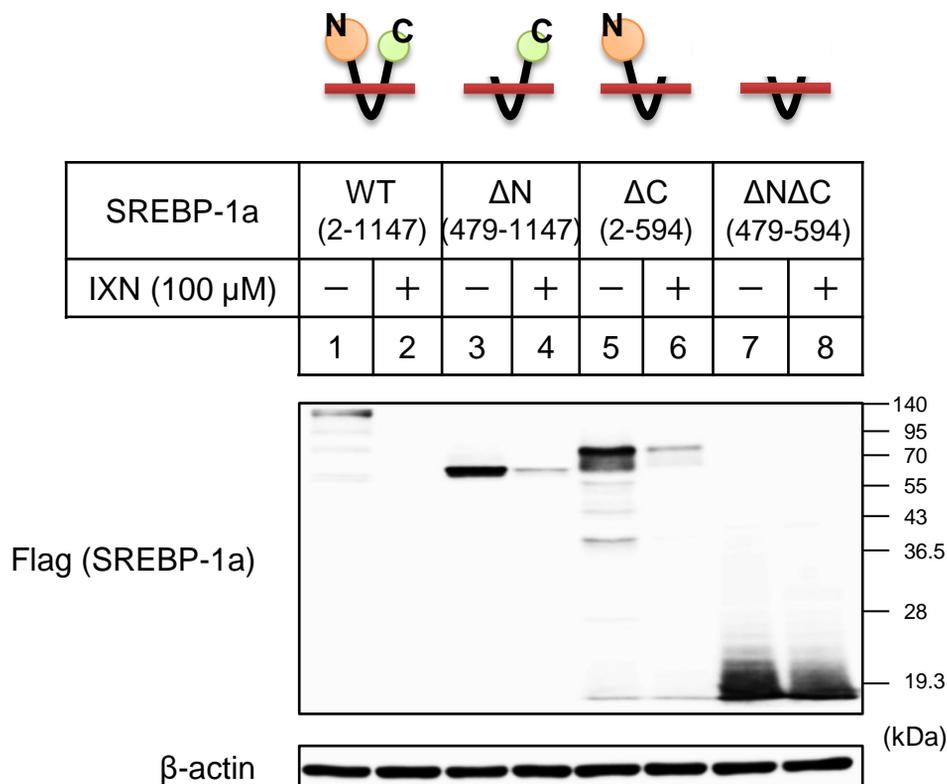


Fig. 6-16. IsoxanthohumolによるN末端・C末端両領域を欠損したSREBPタンパク質の変動

リン酸カルシウム法によりpCMV-SREBP-1a (2-1147, 479-1147, 2-594, or 479-594) - 3×Flagを導入したHuh-7細胞を6 well plateに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に100 μMのIXNを添加し、さらに6時間培養した。細胞を回収し、RIPA bufferで溶解してタンパク質を抽出した。SDS-PAGEに供した後、Flag抗体を用いてWestern Blottingを行った。

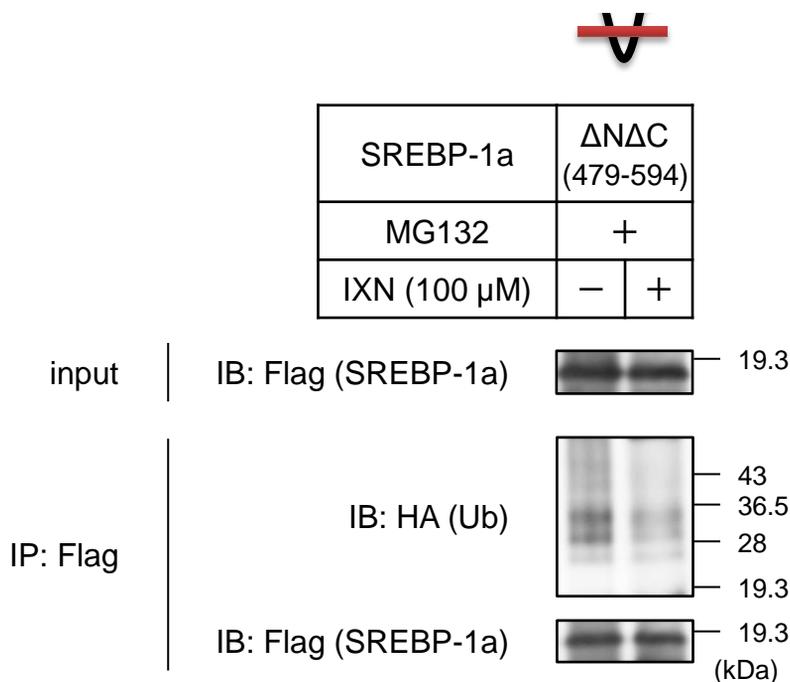


Fig. 6-17. IsoxanthohumolによるN末端・C末端両領域を欠損したSREBP-1aのユビキチン化への影響

リン酸カルシウム法によりpCMV-SREBP-1a (479-594) -3×Flag, pMT123-HA-Ubを導入したHuh-7細胞を100 mm dishに播種して24時間培養した後、ステロール枯渇処理を行った。16時間後に10 μ MのMG132を添加し、30分間培養した。100 μ MのIXNを添加し、さらに6時間培養した。細胞を回収し、anti-Flag M2 affinity gelを用いて免疫沈降を行った。沈降したタンパク質をSDS-PAGEに供した後、Flag抗体、HA抗体を用いてWestern Blottingを行った。inputのサンプルは各等量をSDS-PAGEに供し、IP: FlagのサンプルはSREBP-1aの量が同程度になるようにアプライ量を調節した。

6-4. 考察

本章における結果を以下に示す。

- ① Sulforaphane, Sulforaphene はステロールの有無にかかわらず前駆体 SREBP を減少させた。
Isoxanthohumol はステロール過剰条件では前駆体 SREBP を減少させなかった。
- ② Sulforaphane, Sulforaphene は翻訳阻害下で前駆体 SREBP の分解速度を上昇させた。
- ③ Sulforaphane, Sulforaphene, Isoxanthohumol による前駆体 SREBP 減少はプロテアソーム阻害剤 MG132 により一部抑えられた。
- ④ Sulforaphane, Sulforaphene, Isoxanthohumol は SREBP-1a のユビキチン化を促進した。
- ⑤ Sulforaphane, Sulforaphene による前駆体 SREBP-1a 減少、ユビキチン化は、SREBP-1a の N 末端側領域を欠損しても認められるが、C 末端側領域を欠損すると抑えられた。
- ⑥ Sulforaphane, Sulforaphene による前駆体 SREBP-1a 減少には、SREBP-1a のアミノ酸 595-784 が重要である。
しかし、この領域に存在するリジン残基に変異を入れても Sulforaphane, Sulforaphene による分解は抑えられなかった。
- ⑦ Isoxanthohumol による前駆体 SREBP-1a 減少は、SREBP-1a の N 末端側領域、C 末端側領域のいずれを欠損しても認められた。
一方、ユビキチン化は、C 末端側領域を欠損しても認められるが、N 末端側領域を欠損すると抑えられた。

①に関して、SREBP は元々小胞体に局在しており、ステロール枯渇刺激によりゴルジ体へ移行する。一方、ステロール過剰条件では SREBP は小胞体に留まっている。Sulforaphane, Sulforaphene はステロール過剰条件でも前駆体 SREBP を減少させた (Fig. 6-1. lanes 4~6) ことから、この作用は小胞体に局在する SREBP に対して起こると考えられる。一方、Isoxanthohumol はステロール枯渇条件では前駆体 SREBP を減少させたが (Fig. 6-2. lanes 1, 2)、ステロール過剰条件では減少させなかった (Fig. 6-2. lanes 3, 4)。このことから、Isoxanthohumol はゴルジ体へ輸送された後の前駆体 SREBP の分解に関与している可能性が考えられる。SREBP が小胞体からゴルジ体へ輸送されるには SCAP と結合することが必要であり、両者はお互いの C 末端領域同士で結合することが知られている [24]。また、C 末端領域を欠損した SREBP では、SCAP との結合や活性型の形成が認められなくなることも報告されている [24]。したがって、C 末端領域を欠損した SREBP は、ステロールを処理しなくても小胞体に留まることが想定される。しかし、⑦より、本章で作製した Δ C SREBP-1a 発現プラスミドを用いて実験を行ったところ、Isoxanthohumol により分解されることが示された (Fig. 6-14. lanes. 5, 6)。この結果を考慮すると、Isoxanthohumol はゴルジ体へ輸送された後の前駆体 SREBP を分解するのではなく、輸送される前の小胞体に局在する SREBP の分解に関与すると考えられる。ただし、今回用いた Δ C SREBP-1a が本当に小胞体に局在し、ステロールの有無に関わらず小胞体に留まるかどうかを確かめる必要がある。また、それ以外にも、ステロールを過剰に処理したことにより、たとえば細胞膜の組成が変化し Isoxanthohumol の透過性が低下したことにより、細胞内に到達しにくくなった結果として効果が消失したなどの可能性もある。

②の実験では、翻訳阻害剤シクロヘキシミドを用いて前駆体 SREBP タンパク質が新たに供給されるのを阻害した。通常であれば、SREBP プロセッシングにより前駆体が活性型に変換されても、前駆体は常に合成されているため、プロセッシングが亢進している状況でもトータルの前駆体量が顕著に減少することはない。しかし、翻訳阻害下では、プロセッシングによる前駆体 SREBP 減少の影響が大きくなってしまふことが想定される。それを防ぐために、この実験はステロール過剰条件で行った。しかし、①の結果より、Isoxanthohumol はステロール過剰条件では前駆体 SREBP を減少させなかった (Fig. 6-2. lanes 3, 4)。そのため、

Isoxanthohumol に関しては②の実験を行わなかったが、今後解析していく必要がある。

③の結果より、Sulforaphane, Sulforaphene, Isoxanthohumol による前駆体 SREBP 減少にはユビキチン・プロテアソーム系が関与することが示唆された。しかし、これらの化合物の効果は MG132 処理により一部が抑えられるのみであった (Fig. 6-4. A. B. lanes 1~3, 4~6, Fig. 6-12. lanes 1~4)。この結果を考慮すると、これらの化合物による前駆体 SREBP 減少にはユビキチン・プロテアソーム系以外の経路も関与している可能性がある。ただし、Fig. 6-4. A. B. lanes 1~3, 7~9, Fig. 6-12. lanes 1, 2, 5, 6 の結果より、オートファジー・リソソーム経路は関与していないと考えられる。また、食品成分の処理濃度・時間の問題である可能性も考えられ、条件によっては、MG132 処理時により明確に前駆体 SREBP の減少が抑えられるという結果が得られるのかもしれない。この点に関して、今後さらなる解析が必要とされる。

④⑤に関して、Sulforaphane, Sulforaphene により SREBP-1a のユビキチン化亢進が認められた (Fig. 6-5)。また、SREBP-1a の N 末端領域を欠損しても、依然として分解、ユビキチン化が亢進した (Fig. 6-6. lanes 1~3, 4~6, Fig. 6-7. A)。これまでに、SREBP-1a のユビキチン化には Thr426 と Ser430 が重要であると報告されている [81]。この2つのアミノ酸残基がリン酸化されることにより、E3 ユビキチンリガーゼ Fbw7 が SREBP-1a に結合し、ユビキチン化を引き起こすことが示されている [81]。今回の実験では、これらのアミノ酸残基を含まない Δ N SREBP-1a (479-1147) もユビキチン化を受けることを明らかにした。ただし、Thr426, Ser430 を含む WT SREBP-1a (2-1147) に関しては、Fbw7 によるユビキチン化を検出している可能性も考えられる。しかし、上記の研究より、前駆体 SREBP における Thr426, Ser430 はリン酸化を受けず、活性型 SREBP 中の Thr426, Ser430 のみがリン酸化され、Fbw7 により分解が促進されることが示されている [81]。また、今回用いた SREBP-1a 発現プラスミドでは C 末端に 3×Flag タグが付加されているため、Flag 抗体で Western Blotting を行った場合、切り出された N 末端領域のみから成る活性型 SREBP は検出されないはずである。したがって、本実験においては、これまでに既知である Fbw7 を介した経路以外での SREBP のユビキチン化を検出することができたと考えられる。

また、SREBP-1a の C 末端領域を欠損すると、Sulforaphane, Sulforaphene による分解、ユビキチン化亢進が見られなくなった (Fig. 6-6. lanes 1~3, 7~9, Fig. 6-7. B)。そこで、C 末端領域に着目して、⑥に示すようにアミノ酸 595-784 が Sulforaphane, Sulforaphene による分解に必要であることを示した (Fig. 6-8. lanes 1~9, 10~12)。しかし、この領域に存在する 3 つのリジン残基に変異を入れても、Sulforaphane, Sulforaphene による分解は抑えられなかった (Fig. 6-9. lanes 1~3, 4~6)。この結果を考慮すると、アミノ酸 595-784 の領域には、ユビキチン化部位ではなく、E3 ユビキチンリガーゼなどのユビキチン化促進因子の結合部位が含まれている可能性が考えられる。また、その他に重要である可能性が考えられたアミノ酸 479-594 の中に存在する 587 番目のリジン残基にも変異を入れたが、Sulforaphane, Sulforaphene による分解、ユビキチン化は抑えられなかった (Fig. 6-10. lanes 1~3, 4~6, Fig. 6-11)。したがって、アミノ酸 479-784 の領域にユビキチン化部位は存在しないと推察される。ただし、これはユビキチン化部位が 1 ヶ所であると仮定した場合の考察である。ユビキチン化部位が複数ヶ所あるとすれば、そのうちの 1 ヶ所がユビキチン化されなくなっても、他の部位がユビキチン化を受けることでタンパク質が分解されることが想定される。これまでの結果を考慮すると、今回観察された SREBP-1a の分解には複数ヶ所のユビキチン化が関与していることが考えられる。その場合、アミノ酸 479-784 の領域にもユビキチン化部位が存在する可能性があるが、それ以外の部位におけるユビキチン化の影響もあり、4KR SREBP-1a の分解が抑えられなかったのだろう。今後、ユビキチン化部位を特定し、分解機構を詳細に解明していくことが必要である。

Isoxanthohumol もまた SREBP-1a のユビキチン化を促進した (Fig. 6-13)。また、⑦に示すように、SREBP-1a の C 末端領域を欠損しても Isoxanthohumol による分解、ユビキチン化が亢進していた (Fig. 6-14. lanes 1, 2, 5, 6, Fig. 6-15. B)。一方、N 末端領域を欠損すると、Isoxanthohumol により分解され (Fig. 6-14. lanes 1~4)、その分解はプロテアソーム阻害剤 MG132 により抑えられる (Fig. 6-15. A. input) にもかかわらず、ユビキチン化は亢進しなかった (Fig. 6-15. A. IP: Flag)。したがって、Isoxanthohumol による Δ N SREBP-1a の分解は、ユビキチン・プロテアソーム系による SREBP 以外の他のタンパク質の分解を介していると考えられる。つまり、Isoxanthohumol 処理時に見られる SREBP-1a の分解は、SREBP-1a 自身のユビキチン化を介した経路と、他のタンパク質のユビキチン化を介した経路

の2通りにより制御されている可能性がある。そして、前者の経路には SREBP-1a の N 末端領域が、後者には C 末端領域がそれぞれ重要であると考えられ、そのどちらの領域も欠損した $\Delta N\Delta C$ SREBP-1a では分解が抑えられた (Fig. 6-16. lanes 1, 2, 7, 8)。Isoxanthohumol による SREBP 分解に関しても、ユビキチン化部位の特定や分解に関わるタンパク質の同定などの課題が残されている。

これまでに、活性型 SREBP の分解に関する研究はいくつか報告されている。前述したように活性型 SREBP がリン酸化を受けることで E3 ユビキチンリガーゼ Fbw7 によりユビキチン化されること [81]、また、E3 ユビキチンリガーゼ RNF20 (Ring finger protein 20) は PKA により活性化され活性型 SREBP のユビキチン化を促進すること [185] などが示されている。一方、前駆体 SREBP の分解に関する研究はほとんど報告されていない。酵母において、E2 ユビキチン結合酵素 Ubc7、E3 ユビキチンリガーゼ Hrd1 が前駆体 Sre1 (酵母における SREBP ホモログ) の分解に関与することが示されているが [186]、実際に前駆体 Sre1 のユビキチン化を解析する実験は行われていない。また、哺乳類における研究報告は現在のところ皆無である。本研究では、見出した化合物がヒト SREBP のユビキチン化を促進し、プロテアソームによる前駆体タンパク質の分解を引き起こすことを示した。また、前駆体 SREBP が活性型 SREBP とは異なるユビキチン化部位を持つ、つまり活性型 SREBP とは異なるユビキチン化制御機構を受けることを示唆する結果を得た。ただし、本章におけるユビキチン化の解析は、外因的に発現させた SREBP とユビキチンを用いて行ったため、今回見られたユビキチン化の変動が細胞内で本当に観察されるかどうかは定かではない。今後、それぞれの化合物の内因性 SREBP のユビキチン化への影響を解析していくことが重要な課題である。また、今回用いた各変異体 SREBP が正常に小胞体膜上に局在するかどうかは不明である。もし局在が変わっているのであれば、野生型とは異なる制御を受けてしまう恐れがある。したがって、変異体 SREBP の局在を確認したうえでそれぞれの結果を確定させる必要がある。さらに、本章のユビキチン化の解析では SREBP-1a のみに関して実験を行った。本研究のこれまでの実験では、基本的に各アイソフォーム間で同様の結果が得られてきたため、ユビキチン化の解析実験においても違いは出ないことが予測される。しかし、SREBP の他のアイソフォームについても解析を行い、それぞれの化合物による SREBP 制御の全体像を明らかにしていくことが必要である。

第2章、第3章では、Sulforaphane, Sulforaphene, Isoxanthohumol が前駆体 SREBP を減少させ、SREBP 活性を低下させることで脂質合成を抑制することを見出した。本章では、これらの化合物による前駆体 SREBP 減少の作用機構を解析した。本研究のこれまでの結果より、Sulforaphane, Sulforaphene は前駆体 SREBP のユビキチン化を促進し分解に導くことにより、SREBP 活性を低下させることが想定される (Fig. 6-18)。また、Isoxanthohumol も前駆体 SREBP のユビキチン化、分解を促進すると考えられるが、それ以外のタンパク質のユビキチン化、分解を介した前駆体 SREBP の分解経路の存在も示唆された (Fig. 6-19)。続いて、第7章では *in vivo* における Sulforaphane の効果を検証した。

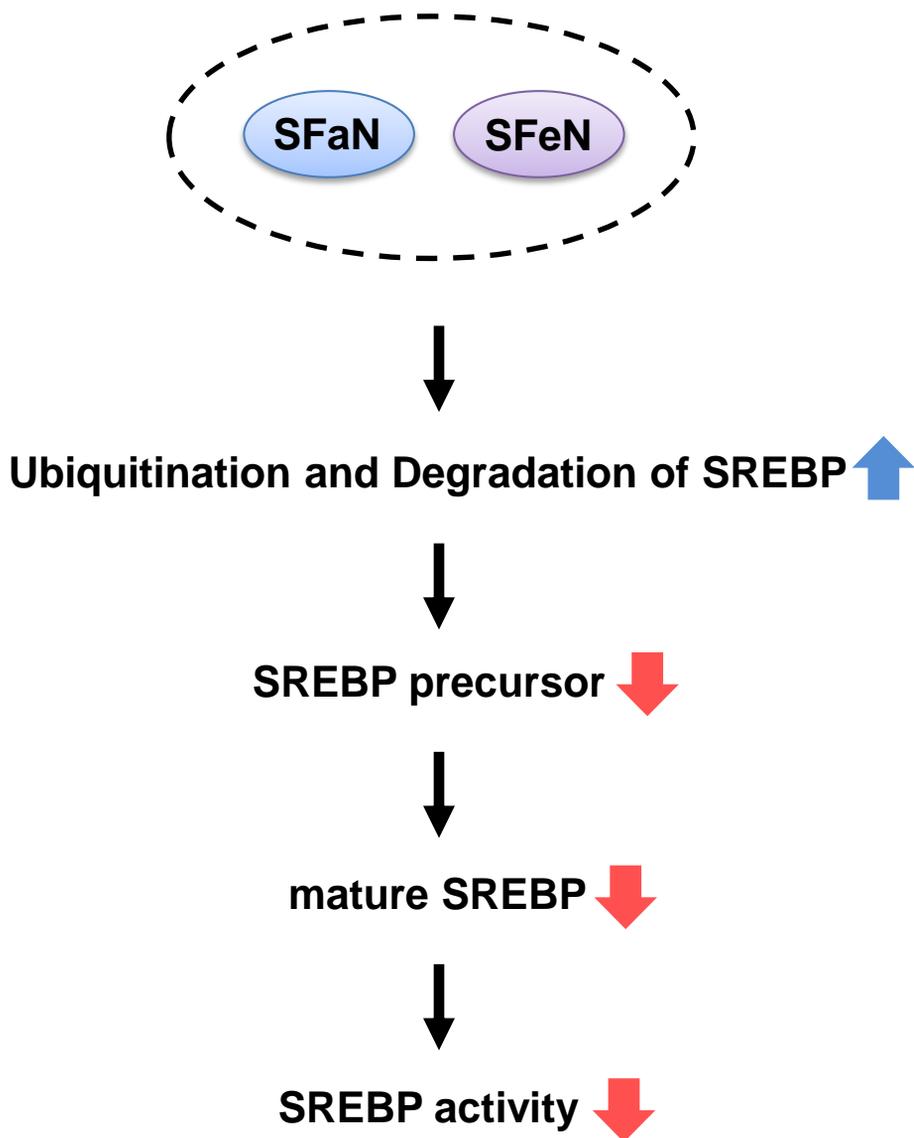


Fig. 6-18. SFaN, SFeNによる前駆体SREBP減少機構概略

SFaN, SFeNは前駆体SREBPのユビキチン化を促進しプロテアソームによる分解に導くことが示唆された。これにより前駆体SREBPを減少させる結果として、活性型SREBP量、さらにはSREBP活性を低下させると考えられる。

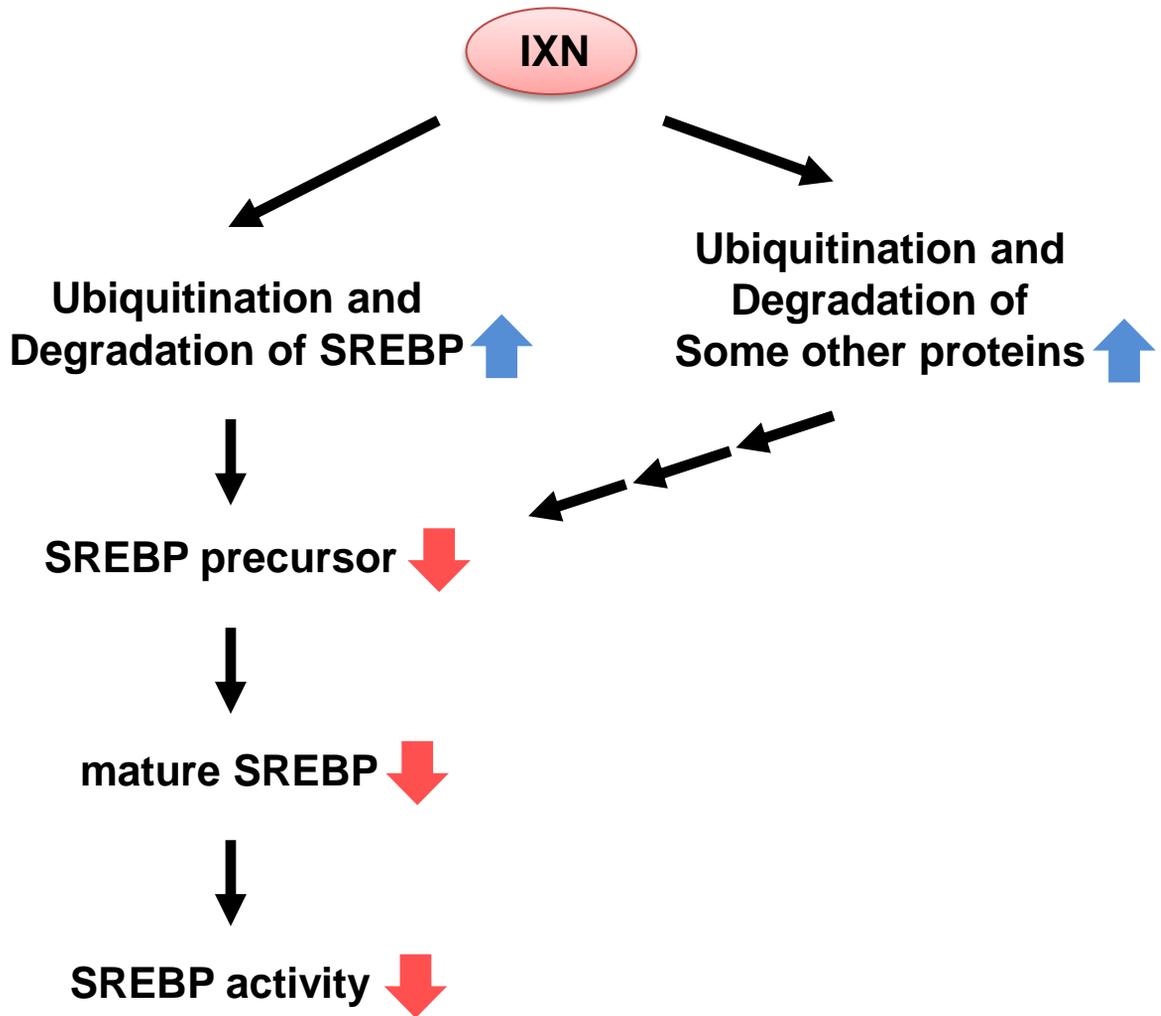


Fig. 6-19. IXNによる前駆体SREBP減少機構概略

IXNは前駆体SREBPのユビキチン化を促進しプロテアソームによる分解に導くことにより、前駆体SREBPを減少させることが示唆された。また、SREBP以外のタンパク質のユビキチン化、分解を介して前駆体SREBPを減少させる可能性もある。これらの結果として、活性型SREBP量、さらにはSREBP活性を低下させると考えられる。

第7章

生体内における Sulforaphane の効果検証

7-1. 緒言

第3章、第6章の結果より、Sulforaphane は培養細胞において前駆体 SREBP を減少させることにより SREBP 活性を低下させ、脂質合成を抑制することが明らかとなった。本章では、マウスを用いて、Sulforaphane が生体内においても SREBP 活性を抑制するか、そして抗生活習慣病効果を発揮するかどうかを検討するために、短期投与実験および長期摂食実験を行った。

7-2. 実験材料および手法

実験材料の調製

<試薬>

Sulforaphane

Toronto Research Inc.より購入した。

<抗体>

5-2 に準じた。

実験動物

5-2 に準じた。

経口投与

6週齢、オスの C57BL/6J マウスを1週間予備飼育した後、体重によりコントロール群、75 mg/kg body weight Sulforaphane 投与群、150 mg/kg body weight Sulforaphane 投与群の3群に分けた (n=5/group)。各群に1日1回、3日間ゾンデによる経口投与を行い、4日目に解剖し、肝臓を摘出した。Sulforaphane は、DMSO (Wako) と Cremophr EL (ナカライテスク) の等量混合液を5%マンニトール液 (Wako) で10倍希釈したものに溶解した。

長期摂食実験

6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに7週間高脂肪食(D12492, Research Diets Inc.) (タンパク質 20 kcal%、炭水化物 20 kcal%、脂質 60 kcal%)、または通常食(ラボMRストック)を摂食させた後、高脂肪食を与えてきたマウスを体重、血糖値により高脂肪食群、0.1% (w/w) Sulforaphane 添加高脂肪食群の2群に分けた(n=8/group)。通常食を与えてきたマウスは、通常食群としてそのまま飼育を続けた。体重、摂食量を2日に1回測定しながら、Sulforaphane 添加食を60日間摂食させた後、解剖を行い、血液、肝臓、精巣上体周囲白色脂肪組織、腸間膜白色脂肪組織、皮下白色脂肪組織、鼠蹊部白色脂肪組織、肩甲骨間褐色脂肪組織を摘出した。また、45日目にCTスキャンを行った。

CTスキャン

5-2に準じた。

血中パラメーターの測定

採取したマウスの血液をサンプルとして、以下のキットを用いて血中パラメーターを測定した。方法はメーカーのプロトコルに準じた。

- ・トリグリセライドE-テストワコー (Wako)
- ・コレステロールE-テストワコー (Wako)

その他は5-2に準じた。

肝臓中の脂質量の測定

5-2に準じた。

mRNAの定量

5-2に準じた。

タンパク質の定量

3-2に準じた。

タンパク質の検出

5-2 に準じた。

統計解析

2-2 に準じた。

7-3. 結果

Sulforaphane はマウス肝臓において活性型 SREBP を減少させる

まず、Sulforaphane がマウス肝臓において前駆体 SREBP を減少させるかどうかを検討するために、Sulforaphane の短期投与実験を行った。75, 150 mg/kg body weight の Sulforaphane をマウスに 1 日 1 回、3 日間経口投与した。その結果、Sulforaphane (SFaN) 投与により、摂食量 (Fig. 7-1. A)、体重 (Fig. 7-1. B) に影響はなかった。解剖後に摘出した肝臓からタンパク質を抽出し、Western Blotting による解析を行ったところ、Sulforaphane 投与により濃度依存的に活性型 SREBP-1 が減少していた (Fig. 7-2. A)。しかし、意外にも前駆体の量はほとんど減少しなかった (Fig. 7-2. A)。また、肝臓から RNA を抽出し、Real-time PCR による解析を行ったところ、ACC1, FAS, HMGCR の mRNA 量は 75 mg/kg body weight の Sulforaphane 投与により、また SREBP-2 の mRNA 量は 75, 150 mg/kg body weight の Sulforaphane 投与によりそれぞれ有意に低下していたが、その他の SREBP 標的遺伝子に変動は見られなかった (Fig. 7-2. B, C)。以上の結果より、Sulforaphane はマウス肝臓において活性型 SREBP を減少させることが示された。

Sulforaphane 長期摂取によりマウスの食餌性肥満が抑えられる

続いて、Sulforaphane の肥満に対する効果を検証するために、0.1% の Sulforaphane を混合した高脂肪食を 60 日間マウスに摂食させた。摂食実験期間中で、高脂肪食に Sulforaphane を添加したことによる摂食量の変動は見られなかったが (Fig. 7-3. A)、Sulforaphane を摂取したマウスでは体重増加が抑えられた (Fig. 7-3. B, C)。さらに、解剖後に摘出した各臓器の重量を測定したところ、Sulforaphane 摂取により肝臓、腸間膜白色脂肪組織の重量が有意に低下していた (Table. 7-1)。また、Sulforaphane 混合食を摂食させ始めて 45 日目に CT スキャンによる画像解析を行ったところ、Sulforaphane により腹囲と肝臓の脂肪率には有意な差はなかったものの (Fig. 7-4. A)、内臓脂肪量と皮下脂肪量がそれぞれ有意に低下していた (Fig. 7-4. B)。以上の結果より、Sulforaphane は食餌性肥満を抑えることが示された。

Sulforaphane 長期摂取により血中、肝臓中の脂質が減少する

Sulforaphane 長期摂取により血中インスリン値が低下する

Sulforaphane を 60 日摂取させた後、血液を採取して各種パラメーターの解析を行ったところ、血中コレステロール値、血糖値に変動は見られなかった (Table. 7-2)。また、肝機能異常のマーカーである ALT 値、AST 値は低下傾向であるものの、有意な差はなかった (Table. 7-2)。トリグリセリド値、インスリン値は、Sulforaphane 摂取により有意に低下していた (Table. 7-2)。さらに肝臓中の脂質量を測定したところ、Sulforaphane によりトリグリセリド量、コレステロール量ともに減少していた (Table. 7-2)。

Sulforaphane 長期摂取により肝臓におけるリン酸化 Akt, S6K が増加する

次に、Sulforaphane 長期摂取による肝臓におけるインスリンシグナル関連タンパク質の活性への影響を、リン酸化の変動を解析することにより評価した。その結果、Sulforaphane 摂取により AMPK のリン酸化は亢進していなかったが、Akt の Ser473、S6K の Thr389 のリン酸化は亢進していた (Fig. 7-5)。

Sulforaphane 長期摂取により肝臓における活性型 SREBP-1 および標的遺伝子発現が低下する

Sulforaphane 長期摂取により肝臓における CYP7A1, PPAR α の発現が上昇する

また、Sulforaphane 長期摂取による肝臓における SREBP 活性への影響を解析した。その結果、Sulforaphane 摂取群では肝臓中の活性型 SREBP-1 タンパク質が減少しており (Fig. 7-6. A)、その標的である脂肪酸合成系遺伝子 ACC1, FAS, SCD1 の mRNA 量も低下していた (Fig. 7-6. B)。これらの結果より、Sulforaphane はマウス肝臓において活性型 SREBP-1 を減少させることにより脂質合成を低下させることが示唆された。しかし、本実験でも Sulforaphane 摂取により前駆体 SREBP-1 はほとんど減少しなかった (Fig. 7-6. A)。一方、SREBP-2 の標的であるコレステロール合成系遺伝子発現に関しては、予想外なことに Sulforaphane により上昇傾向であり、特に HMGCS の発現、また SREBP-2 自身の発現は有意に上昇していた (Fig. 7-6. C)。また、その他のコレステロール代謝関連遺伝子の発現を解析したところ、コレステロール異化の律速酵素遺伝子 CYP7A1 の mRNA 量

が Sulforaphane 摂取群で増加していた (Fig. 7-7. A)。さらに、脂肪酸 β 酸化関連遺伝子 PPAR α の発現も Sulforaphane 摂取により上昇していた (Fig. 7-7. B)。

以上の結果より、Sulforaphane による肝臓における SREBP 活性低下が高脂肪食誘導性肥満や脂肪肝の抑制に寄与することが示唆された。

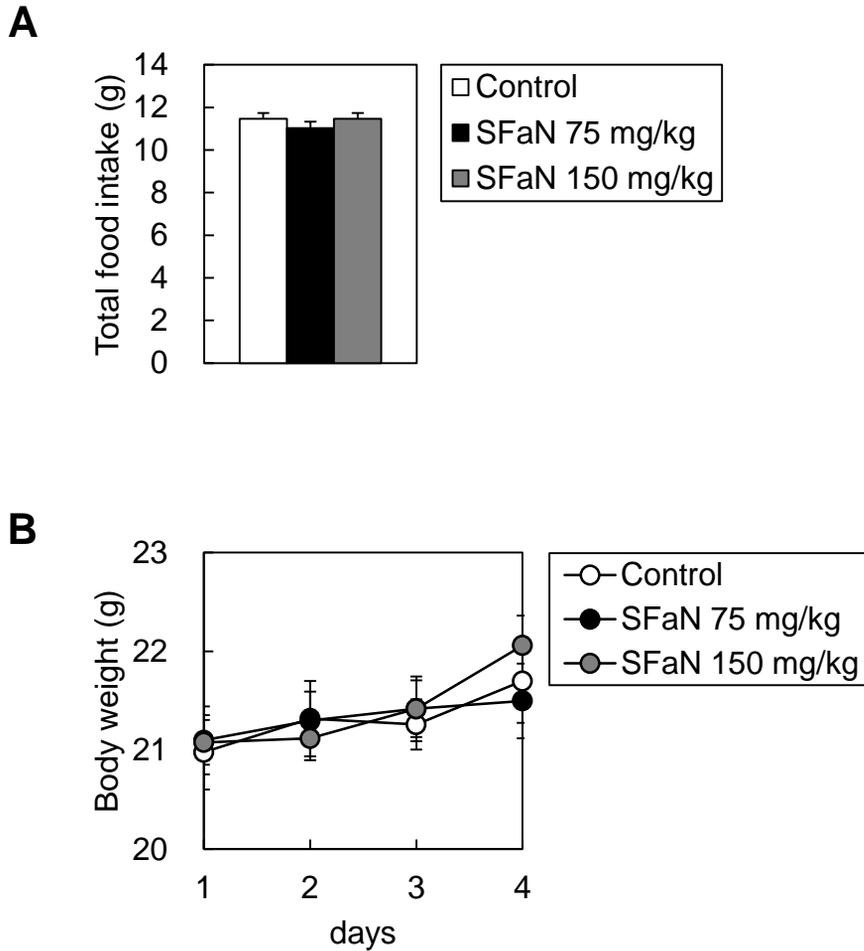


Fig. 7-1. Sulforaphaneを短期投与したマウスの摂食量、体重の変動

6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに75, 150 mg/kg body weightのSFaNを1日1回、3日間 (day 1, 2, 3) 経口投与した。4日目に自由摂食状態で解剖を行い、肝臓を摘出した。

(A) 4日間の総摂食量

(B) 4日間の体重変動

グラフは平均値±標準誤差で示した。(n=5)

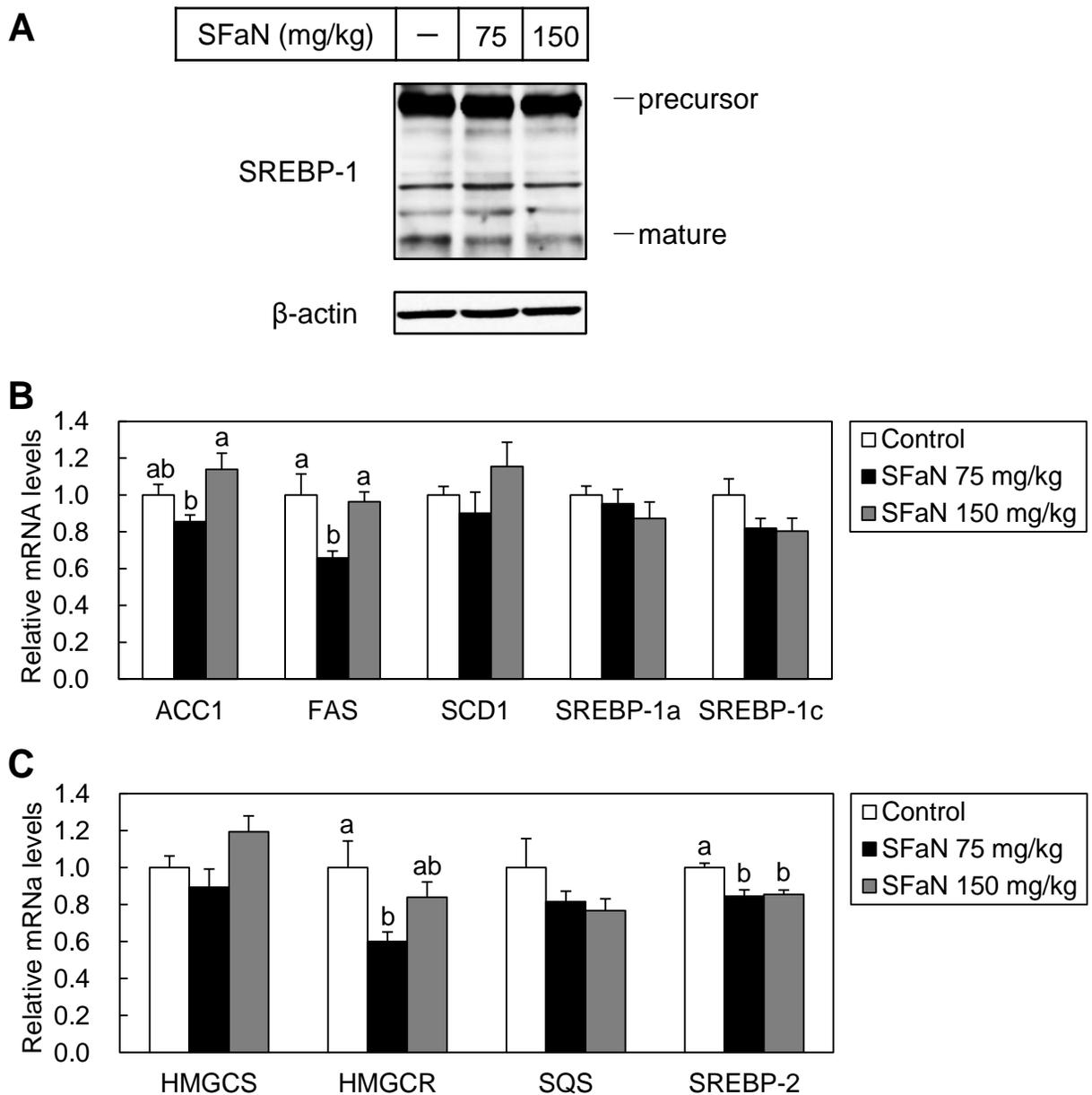


Fig. 7-2. Sulforaphaneを短期投与したマウス肝臓における**SREBP**タンパク質、標的遺伝子**mRNA**の変動

6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに75 or 150 mg/kg body weightのSFaNを1日1回、3日間 (day 1, 2, 3) 経口投与した。4日目に自由摂食状態で解剖を行い、肝臓を摘出した。肝臓から抽出したタンパク質を群ごとにプールし、SDS-PAGEに供した後、SREBP-1抗体 (H-160)を用いてWestern Blottingを行った (A)。また、肝臓からRNAを抽出し、ACC1, FAS, SCD1, SREBP-1a, SREBP-1c (B), HMGCS, HMGCR, SQS, SREBP-2 (C) のmRNA量および18S rRNA量をReal-time PCRにより測定した。グラフは、各遺伝子の測定値を18Sの値で補正し、Control群の値を1として平均値±標準誤差で示した。一元配置分散分析を行い、多重比較検定 (Tukey-Kramer法)を行った。(a, bは異なる文字間での有意差 $p < 0.05$ を示す。n=5)

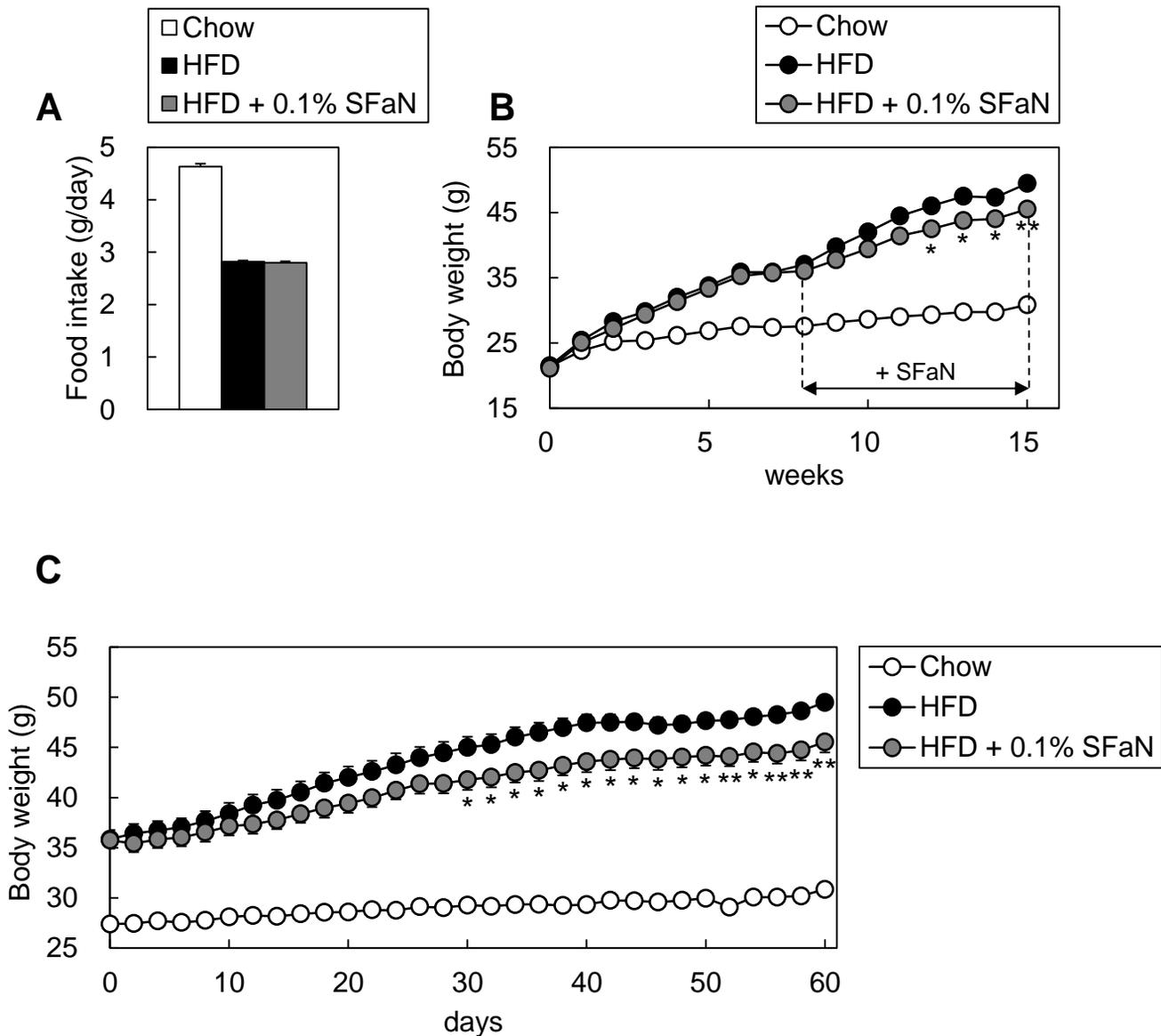


Fig. 7-3. Sulforaphane長期摂取マウスの摂食量、体重変動

6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに7週間高脂肪食を摂食させた後、高脂肪食、または0.1%のSFaNを混合した高脂肪食を60日間摂食させた。

(A) 1日あたりの摂食量

(B) 高脂肪食を摂食させ始めてからの15週間の体重変動

(8週目から15週目にSFaNを混合した高脂肪食を摂食させた。)

(C) SFaNを混合した高脂肪食を摂食させ始めてからの60日間の体重変動

(B)のグラフの8週目から15週目の期間に相当する。)

グラフは平均値±標準誤差で示した。HFD群とHFD + 0.1% SFaN群との差に関してt検定を行い、有意差 $p < 0.05$ を*で、 $p < 0.01$ を**で示した。(n=8)

Table. 7-1. Sulforaphane長期摂取マウスの肝臓、脂肪組織重量

6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに7週間高脂肪食を摂食させた後、高脂肪食、または0.1%のSFaNを混合した高脂肪食を60日間摂食させた。60日後に自由摂食状態で解剖を行い、肝臓、精巣上体周囲白色脂肪組織 (Epididymal WAT)、腸間膜白色脂肪組織 (Mesenteric WAT)、皮下白色脂肪組織 (Subcutaneous WAT)、鼠蹊部白色脂肪組織 (Inguinal WAT)、肩甲骨間褐色脂肪組織 (Interscapular BAT) を採取した。数値は平均値±標準誤差で示した。HFD群とHFD + 0.1% SFaN群との差に関してt検定を行い、有意差 $p < 0.05$ を*で示した。(n=8)

| | Chow | HFD | HFD + 0.1% SFaN |
|-----------------------|-----------|-----------|--------------------|
| Liver (g) | 1.93±0.12 | 2.44±0.19 | 1.91±0.12* |
| Epididymal WAT (g) | 0.51±0.02 | 2.18±0.16 | 2.36±0.12 |
| Mesenteric WAT (g) | 0.23±0.02 | 1.55±0.05 | 1.10±0.15* |
| Subcutaneous WAT (g) | 0.31±0.01 | 2.26±0.07 | 2.21±0.13 |
| Inguinal WAT (g) | 0.05±0.02 | 0.80±0.10 | 0.71±0.05 |
| Interscapular BAT (g) | 0.10±0.00 | 0.24±0.03 | 0.25±0.02 |

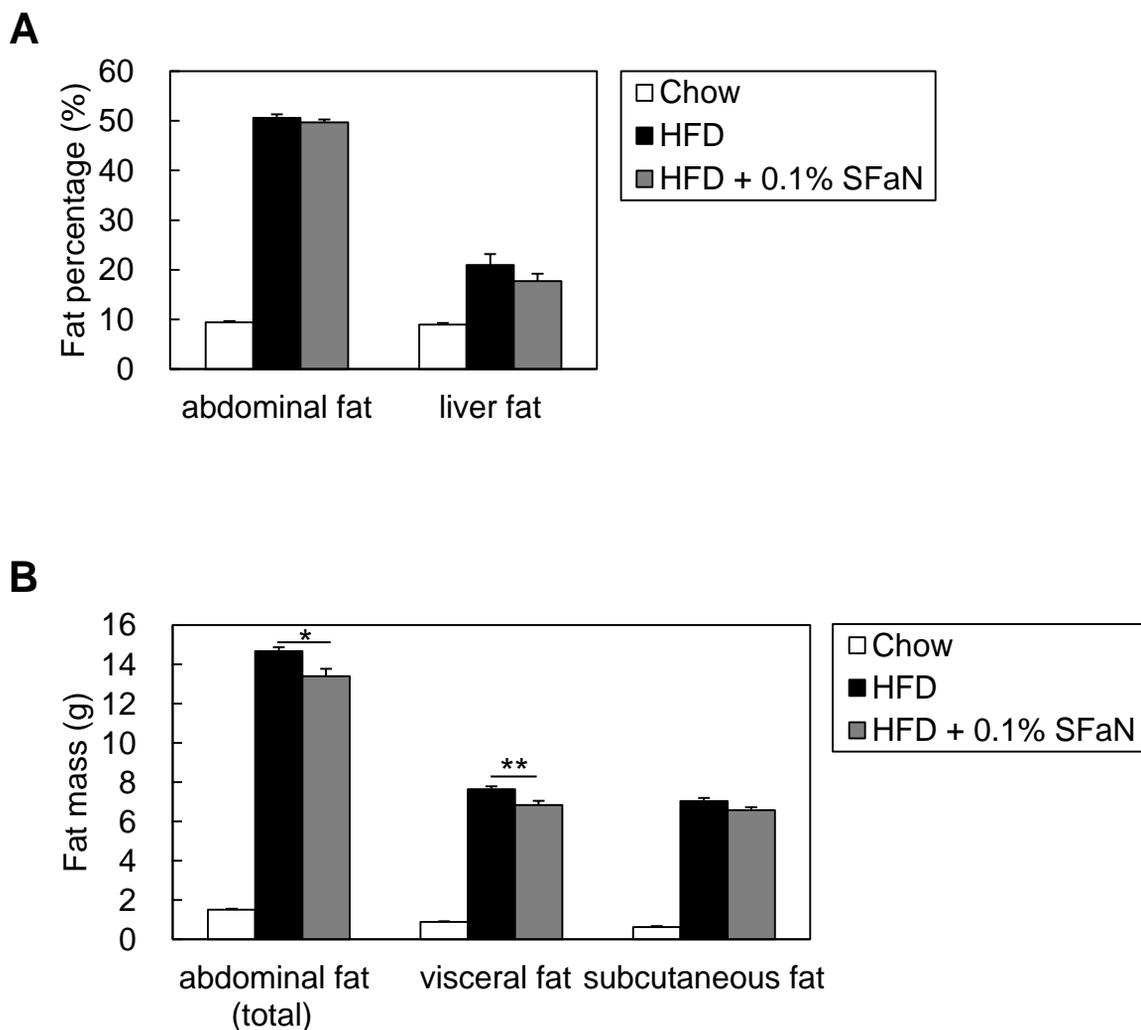


Fig. 7-4. Sulforaphane長期摂取マウスの腹囲脂肪率、脂肪量

6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに7週間高脂肪食を摂食させた後、高脂肪食、または0.1%のSFaNを混合した高脂肪食を60日間摂食させた。SFaN混合食を摂食させ始めてから45日後にCTスキャン画像解析し、腹囲脂肪率と肝脂肪率(A)、腹囲全体と内臓(visceral fat)、皮下(subcutaneous fat)の脂肪量(B)を算出した。グラフは平均値±標準誤差で示した。HFD群とHFD + 0.1% SFaN群との差に関してt検定を行い、有意差 $p < 0.05$ を*で、 $p < 0.01$ を**で示した。(n=8)

Table. 7-2. Sulforaphane長期摂取マウスの血中パラメーターと肝臓中脂質蓄積量

6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに7週間高脂肪食を摂食させた後、高脂肪食、または0.1%のSFaNを混合した高脂肪食を60日間摂食させた。60日後に自由摂食状態で解剖を行い、血液、肝臓を摘出した。血中のトリグリセリド、コレステロール、グルコース、インスリン、ALT, ASTの量を測定した。また、肝臓から脂質を抽出し、トリグリセリド、コレステロールの量を測定した。数値は平均値±標準誤差で示した。HFD群とHFD + 0.1% SFaN群との差に関してt検定を行い、有意差 $p < 0.05$ を*で、 $p < 0.01$ を**で示した。(n=8)

| | Chow | HFD | HFD + 0.1% SFaN |
|----------------------|--------------|--------------|--------------------|
| Plasma | | | |
| Triglyceride (mg/dl) | 156.2 ± 15.2 | 125.7 ± 7.2 | 79.2 ± 5.6* |
| Cholesterol (mg/dl) | 58.7 ± 1.3 | 165.4 ± 11.3 | 155.5 ± 6.2 |
| Glucose (mg/dl) | 200.1 ± 4.4 | 269.9 ± 34.4 | 266.7 ± 11.9 |
| Insulin (ng/ml) | 0.7 ± 0.0 | 39.8 ± 10.9 | 5.3 ± 1.8* |
| ALT (IU/l) | 21.9 ± 2.5 | 91.2 ± 50.6 | 24.9 ± 2.4 |
| AST (IU/l) | 36.6 ± 2.2 | 127.6 ± 59.3 | 58.7 ± 4.0 |
| Liver | | | |
| Triglyceride (mg/g) | 3.1 ± 0.1 | 106.8 ± 14.8 | 39.0 ± 8.4** |
| Cholesterol (mg/g) | 1.6 ± 0.5 | 4.0 ± 0.5 | 2.5 ± 0.5* |

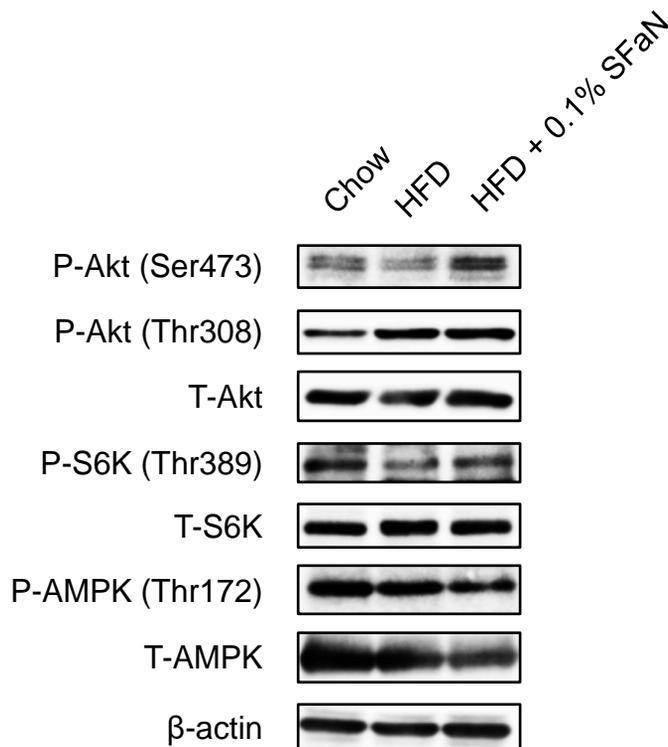


Fig. 7-5. Sulforaphane長期摂取マウス肝臓におけるインスリンシグナル関連タンパク質のリン酸化の変動

6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに7週間高脂肪食を摂食させた後、高脂肪食、または0.1%のSFaNを混合した高脂肪食を60日間摂食させた。60日後に自由摂食状態で解剖を行い、肝臓を採取した。肝臓から抽出したタンパク質を群ごとにプールし、SDS-PAGEに供した後、P-Akt (Ser473) 抗体、P-Akt (Thr308) 抗体、T-Akt抗体、P-S6K (Thr389) 抗体、T-S6K抗体、P-AMPK (Thr172) 抗体、T-AMPK抗体を用いてWestern Blottingを行った。

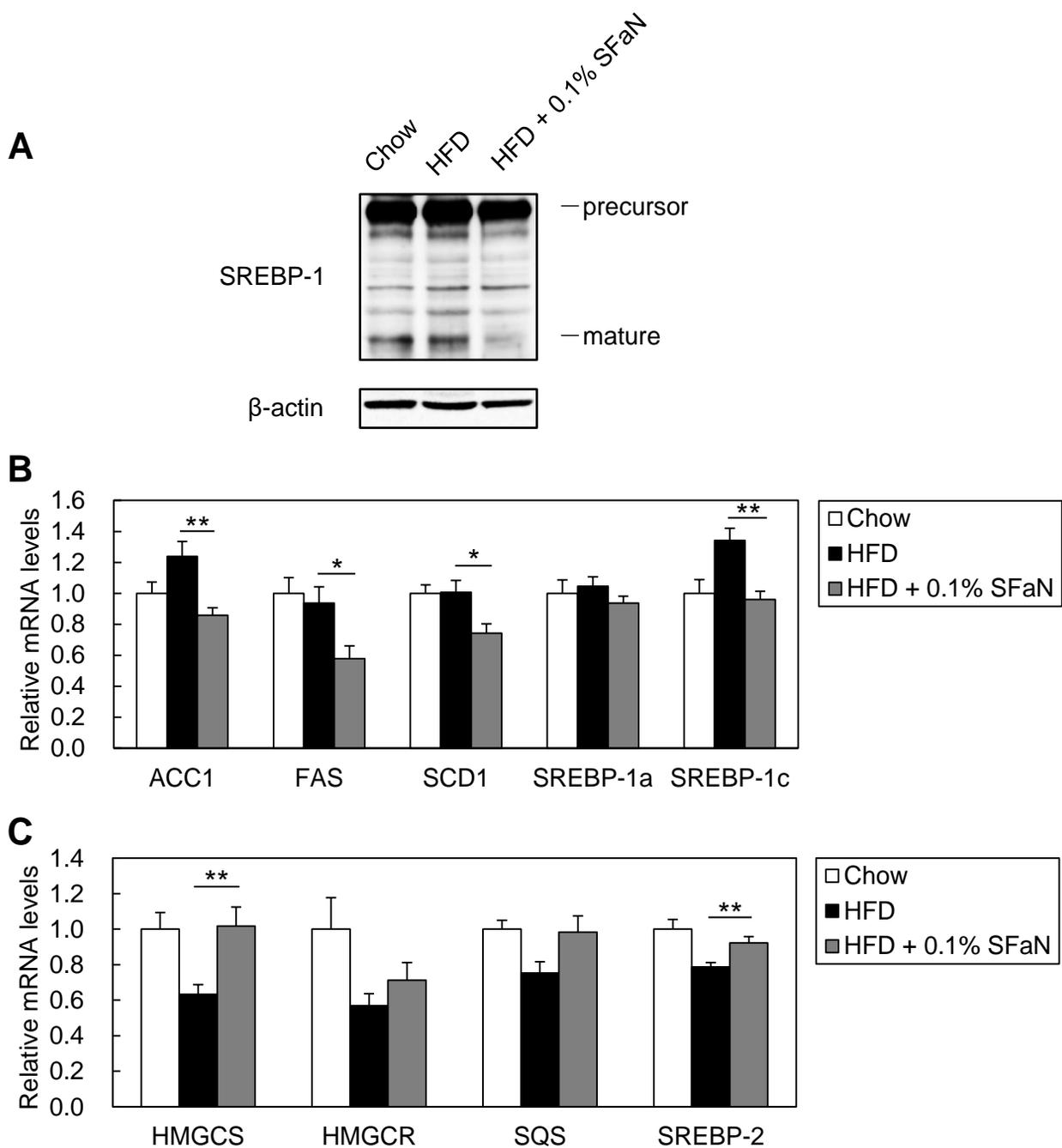


Fig. 7-6. Sulforaphane長期摂取マウス肝臓におけるSREBPタンパク質、標的遺伝子mRNAの変動

6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに7週間高脂肪食を摂食させた後、高脂肪食、または0.1%のSFaNを混合した高脂肪食を60日間摂食させた。60日後に自由摂食状態で解剖を行い、肝臓を摘出した。肝臓から抽出したタンパク質を群ごとにプールし、SDS-PAGEに供した後、SREBP-1抗体(H-160)を用いてWestern Blottingを行った(A)。また、肝臓からRNAを抽出し、ACC1, FAS, SCD1, SREBP-1a, SREBP-1c (B), HMGCS, HMGCR, SQS, SREBP-2 (C) のmRNA量および18S rRNA量をReal-time PCRにより測定した。グラフは、各遺伝子の測定値を18Sの値で補正し、Chow群の値を1として平均値±標準誤差で示した。HFD群とHFD + 0.1% SFaN群との差に関してt検定を行い、有意差 $p < 0.05$ を*で、 $p < 0.01$ を**で示した。(n=8)

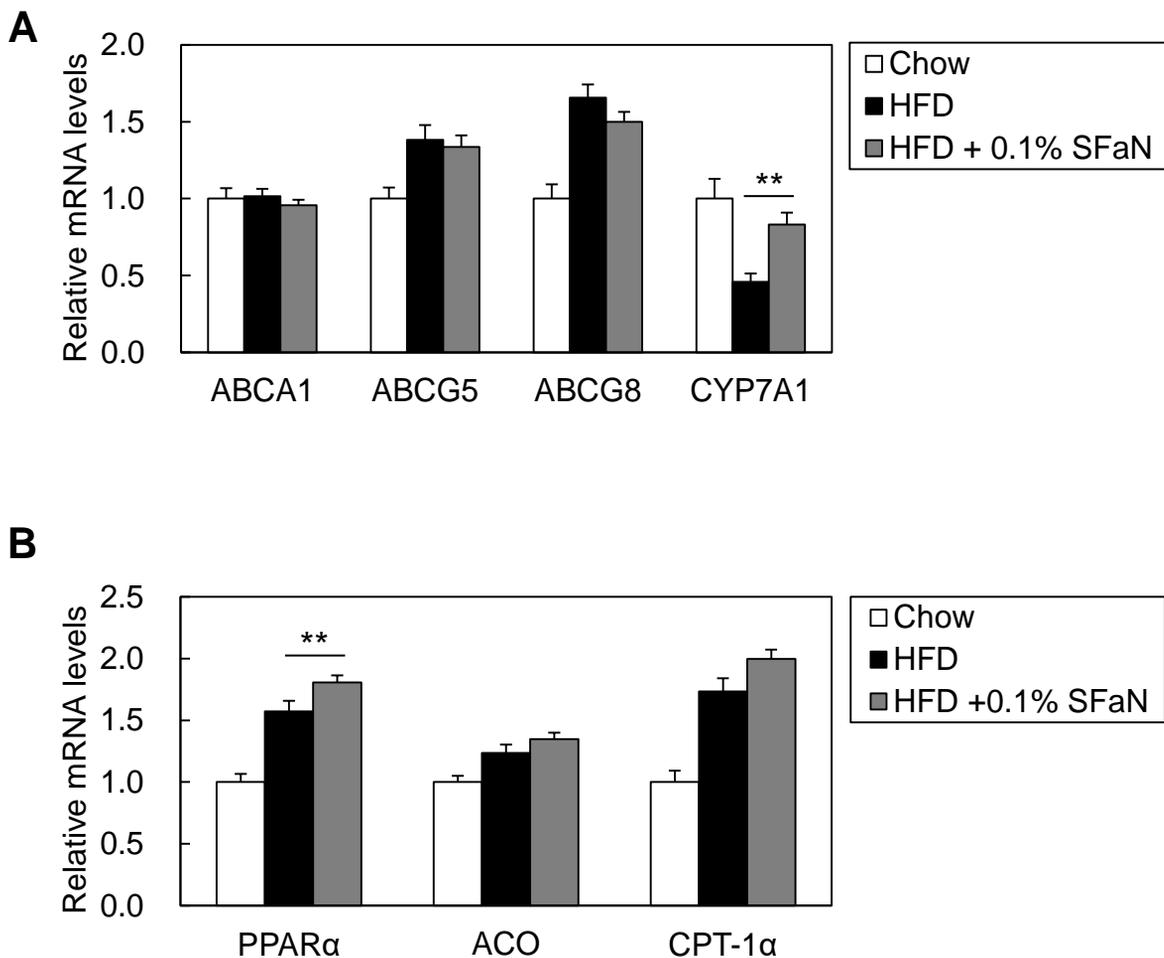


Fig. 7-7. Sulforaphane長期摂取マウス肝臓におけるコレステロール排出・異化関連遺伝子、脂肪酸酸化関連遺伝子mRNAの変動

6週齢、オスのC57BL/6Jマウスに7週間高脂肪食を摂食させた後、高脂肪食、または0.1%のSFaNを混合した高脂肪食を60日間摂食させた。60日後に自由摂食状態で解剖を行い、肝臓を採取した。肝臓からRNAを抽出し、ABCA1, ABCG5, ABCG8, CYP7A1 (A), PPAR α , ACO, CPT -1a (B) のmRNA量および18S rRNA量をReal-time PCRにより測定した。グラフは、各遺伝子の測定値を18Sの値で補正し、Chow群の値を1として平均値±標準誤差で示した。HFD群とHFD + 0.1% SFaN群との差に関してt検定を行い、有意差 $p < 0.01$ を**で示した。(n=8)

7-4. 考察

本章における結果を以下に示す。

- ① Sulforaphane 短期投与により、
 - ・肝臓における活性型 SREBP-1 が減少した。
 - ・肝臓における SREBP 標的遺伝子発現に大きな変動は見られなかった。

- ② Sulforaphane 長期摂食により、
 - ・マウスの食餌性肥満が抑えられた。
 - ・血中、肝臓中脂質量が低下した。
 - ・血中インスリン値が低下した。
 - ・肝臓におけるリン酸化 Akt, S6K が増加した。
 - ・肝臓における活性型 SREBP-1 が増加した。
 - ・肝臓における SREBP-1 標的遺伝子発現が低下した。
 - ・肝臓における CYP7A1, PPAR α の発現が上昇した。

①の実験より、Sulforaphane は培養細胞だけでなく、動物個体においても活性型 SREBP-1 を減少させることが示された (Fig. 7-2. A)。しかし、培養細胞では顕著な前駆体の減少が観察されたのに対し、マウス肝臓では前駆体の量はほとんど変動しなかった (Fig. 7-2. A)。ただし、培養細胞では、100 μ M の Sulforaphane を処理すると前駆体 SREBP、活性型 SREBP とともに減少したが、それより低濃度、たとえば 10 μ M では前駆体にはほとんど影響しないが、活性型を減少させた (Fig. 3-17. A)。Sulforaphane の体内動態を解析した研究では、マウスに 440 μ mol/kg body weight (=78 mg/kg body weight) の Sulforaphane を経口投与すると、Sulforaphane 代謝物の最大濃度は血中で約 14 μ M、肝臓中で約 41 nmol/g であったと報告されている [187]。本研究における 75, 150 mg/kg body weight の Sulforaphane 投与実験でも、血中や肝臓中の濃度はこれらの結果と近い数値になると推察され、前駆体 SREBP を顕著に減少させるほどの高濃度には達しなかった可能性が考えられる。また、一部の SREBP 標的遺伝子の発現は 75 mg/kg body weight の Sulforaphane 投与時にのみ低下していた (Fig. 7-2. B, C)。しかし、活性

型 SREBP-1 タンパク質は 75 mg/kg body weight 投与時よりも 150 mg/kg body weight 投与時の方が大きく減少していた (Fig. 7-2. A) ことから、この結果には SREBP 以外の因子が影響しているのかもしれない。ただし、全体としては、Sulforaphane の短期投与により SREBP 標的遺伝子発現は大きく変動しなかった。

②の Sulforaphane 長期摂食実験でも、肝臓における前駆体 SREBP-1 タンパク質はほとんど減少しなかったが、活性型 SREBP-1 が減少し、さらに標的である脂肪酸合成系遺伝子の発現低下も認められた (Fig. 7-6. A, B)。ただし、一般的には、高脂肪食により肥満状態となったマウスの肝臓では、SREBP-1c が顕著に活性化していると言われているが、今回の実験の高脂肪食群では通常食群と比較して活性型 SREBP-1 タンパク質や標的遺伝子 mRNA は大きく増加していなかった (Fig. 7-6. A, B)。さらに、SREBP-2 の標的遺伝子に関しては、高脂肪食負荷により発現が低下していた (Fig. 7-6. C)。肥満マウスの肝臓では、SREBP-2 も SREBP-1c ほどではないにしろ活性化する傾向にあると言われているため、この結果も予想外なものであった。これらの原因は不明であるが、高脂肪食の摂食期間の問題である可能性が考えられ、今回の実験においても SREBP-1, -2 が活性化している時期があったものと推察される。また、高脂肪食により低下した SREBP-2 標的遺伝子発現は、Sulforaphane により上昇し、通常食群と同程度まで回復していた (Fig. 7-6. C)。この原因としては、肝臓中のコレステロール量の変動による SREBP-2 活性化のフィードバック制御が考えられる。Sulforaphane 摂取群の肝臓で観察された CYP7A1 の発現上昇 (Fig. 7-7. A)、もしくはそれに加えて Sulforaphane により一時的に SREBP-2 の活性が低下していた可能性もあり、これらの寄与による肝臓中コレステロール減少 (Table. 7-2) が SREBP-2 プロセッシングを促進し、標的遺伝子の発現を上昇させたのかもしれない。今回の Sulforaphane 摂食実験においても、SREBP-2 タンパク質を検出し、プロセッシングの変動を解析することがこれらの問題を解決する糸口になるだろう。

Sulforaphane の作用として、Nrf2 タンパク質の活性化を介して抗酸化タンパク質や第 II 相解毒酵素の発現を誘導し、酸化や発がん物質から生体を防御することが広く知られている。過去の研究では、Sulforaphane によるマウス、ラットの肝臓における Nrf2 活性化は、5 mg/kg body weight の経口投与 [188] や腹腔内投与 [189] で認められている。また、本研究における 0.1% の Sulforaphane 摂食は、1 日あたり 69 mg/kg body weight の Sulforaphane を摂取することに相当し、今回

の摂食実験で肝臓において Nrf2 が活性化している可能性は十分に考えられる。また近年では、Nrf2 ノックアウトマウスの肝臓で SREBP-1c とその標的遺伝子の発現が上昇していること [190]、逆に Nrf2 を活性化させるとマウス肝臓における SREBP-1c および標的遺伝子の発現が低下すること [191] が報告されている。これまでに Sulforaphane による Nrf2 活性化と SREBP の制御を関連付けた研究は発表されていないが、本研究の Sulforaphane 摂食実験で観察された SREBP-1c や標的遺伝子の発現低下に Nrf2 活性化が寄与している可能性が考えられ、さらに言えば Sulforaphane によるマウス肝臓での活性型 SREBP-1 タンパク質減少にも Nrf2 活性化が関与しているのかもしれない。この点に関しては、今後さらなる解析が必要とされる。

Sulforaphane を摂食したマウスでは、血中インスリン値が顕著に低下していた (Table. 7-2)。そこで、インスリンシグナル関連タンパク質のリン酸化の変動を解析したが、リン酸化 Akt, S6K は減少していなかった (Fig. 7-5)。したがって、今回の Sulforaphane 摂食実験において、肝臓における活性型 SREBP-1 の減少は血中インスリン値の低下に起因するものではないと考えられる。また、リン酸化 Akt, S6K は Sulforaphane 摂取により減少していないばかりかむしろ増加していたため、インスリンシグナル伝達が亢進している、つまりインスリン感受性が改善されたことが示唆された。

本研究以外にも、Sulforaphane による抗肥満効果を示した例は過去に報告されている。その研究では、マウスに Sulforaphane を混合した高脂肪食を摂食させることにより、精巣上体周囲白色脂肪組織におけるリン酸化 AMPK の増加とその標的である脂質合成酵素タンパク質 ACC, HMGCR の不活性化、精巣上体周囲白色脂肪組織重量の低下が観察されている [160]。本研究では、肝臓における AMPK の解析を行ったが、Sulforaphane 摂取によりリン酸化は亢進していなかった (Fig. 7-5)。今回の Sulforaphane 摂食実験で精巣上体周囲白色脂肪組織における AMPK のリン酸化が亢進しているのかは不明である。しかし、本実験において腸間膜白色脂肪組織の重量は有意に低下していたものの、精巣上体周囲白色脂肪組織をはじめ他の脂肪組織の重量低下は認められなかった (Table. 7-1)。したがって、今回行った実験条件では、Sulforaphane 摂取により脂肪組織における脂質代謝には大きな影響がなかったと推察されるが、今後解析していく必要があるだろう。

現在のところ、動物個体における Sulforaphane による抗肥満効果の報告は上記の研究のみである。また、ハムスターに Sulforaphane-rich broccoli sprout extract を摂食させることにより、肝臓における SREBP および標的遺伝子の mRNA 量、コレステロール量が低下することが報告されているが、この研究では SREBP タンパク質や体重の変動については言及されていない [159]。本研究では、Sulforaphane 摂取による肝臓中の活性型 SREBP タンパク質減少および SREBP 活性の低下と抗肥満効果の関連を初めて示すことができた。今後、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを用いて Sulforaphane 摂食実験を行うことにより、Sulforaphane による抗肥満効果における SREBP 活性抑制の寄与の大きさを明らかにする必要がある。また、細胞実験と同様に動物実験でも、Sulforaphane が活性型 SREBP を減少させ SREBP 活性を低下させることを示すことができたのは大変意義深い。しかし、培養細胞における結果と異なり、本章の動物実験で Sulforaphane により前駆体 SREBP がほとんど減少しなかったことに関して、作用の違いやその原因を詳細に追求していくことが今後の重要な課題となるだろう。

第 8 章

総合討論

本研究では、脂質代謝を包括的に制御する転写因子 **SREBP** に着目し、その活性を抑制する食品成分の探索および機能解析を行った。本章では、まず各章から得られた結果についてまとめる。次に本研究から得られた知見や過去の報告を参考にし、今後の展望等について考察を行う。

各章の結果

第2章 SREBP 活性を抑制する食品成分の探索

FAS をはじめとする **SREBP-1** 標的遺伝子のプロモーター活性を低下させる化合物として、ホップ由来の成分 **Isoxanthohumol**、合成フラバノン **4'-Hydroxyflavanone**、ワサビやカラシに含まれる成分 **Allyl Isothiocyanate** を見出した。これらの化合物はヒト肝がん由来 **Huh-7** 細胞において、**SREBP-1, -2** の標的である脂肪酸・コレステロール合成系遺伝子の mRNA 量を低下させることを示した。さらに、これらの化合物により脂肪酸・コレステロールの新規合成が抑制されることも明らかにした。したがって、**Isoxanthohumol, 4'-Hydroxyflavanone, Allyl Isothiocyanate** は **SREBP** の活性低下を介して脂質合成を抑制することが示唆された。

第3章 Isoxanthohumol, 4'-Hydroxyflavanone, Allyl Isothiocyanate および類縁体による SREBP 活性抑制効果の検証

ホップ由来の成分 **Xanthohumol**、ブロッコリー由来の成分 **Sulforaphane**、ハツカダイコン由来の成分 **Sulforaphene** も FAS プロモーター活性、**SREBP-1, -2** 標的遺伝子の mRNA 量を低下させ、脂肪酸・コレステロール合成を抑制することを明らかにした。したがって、**Xanthohumol, Sulforaphane, Sulforaphene** も **SREBP** の活性低下を介して脂質合成を抑制することが示唆された。

また、第2章、本章で見出した5種類の食品成分は、**SREBP** 標的遺伝子の発現低下に依存せずに脂肪酸・コレステロール合成を抑制したことから、**SREBP** の活性低下を介さない脂質合成抑制経路の存在も示唆された。

第2章、本章で見出した6種類の化合物は、**Huh-7** 細胞において活性型 **SREBP-1, -2** タンパク質を減少させた。その中でも特に、**Xanthohumol** は活性型 **SREBP** を

顕著に減少させることを示した。一方、Sulforaphane, Sulforaphene, Isoxanthohumol は前駆体 SREBP を顕著に減少させた。

第 4 章 Xanthohumol による活性型 SREBP 減少機構の解析

Xanthohumol は Insig 欠損株においても活性型 SREBP を減少させた。つまり、Xanthohumol は Insig 非依存的に活性型 SREBP を減少させるというステロールとは異なる制御を行うことを明らかにした。

活性型 SREBP を減少させるメカニズムとして、Xanthohumol は SCAP/SREBP を小胞体に留め、ゴルジ体への輸送を妨げることを示した。さらに、Xanthohumol は Sec23/24 に結合すること、SCAP と Sec23 の結合を減弱させることを示した。以上より、Xanthohumol は SCAP/SREBP の COP II 小胞への取り込みを阻害し、SCAP/SREBP の小胞体・ゴルジ体間輸送を妨げることにより、活性型 SREBP の形成を抑制し、SREBP 活性を低下させるという分子機構が想定された。

第 5 章 生体内における Xanthohumol の効果検証

マウスに 75, 150 mg/kg body weight の Xanthohumol を経口投与することにより、肝臓における活性型 SREBP-1 が減少した。

また、マウスに 0.2%、または 0.4% の Xanthohumol を混合した高脂肪食を 50 日間摂食させたところ、肝臓における活性型 SREBP-1 減少を伴い、肥満や脂肪肝が抑えられた。

第 6 章 Sulforaphane, Sulforaphene, Isoxanthohumol による前駆体 SREBP 減少機構の解析

Sulforaphane, Sulforaphene, Isoxanthohumol による前駆体 SREBP 減少はプロテアソーム阻害剤 MG132 を処理すると一部抑えられた。さらに、これらの化合物は SREBP のユビキチン化を促進した。以上より、Sulforaphane, Sulforaphene, Isoxanthohumol は前駆体 SREBP のユビキチン化を促進し、プロテアソームによる分解に導くことにより SREBP 活性を抑制することが示唆された。

第7章 生体内における Sulforaphane の効果検証

マウスに 75, 150 mg/kg body weight の Sulforaphane を経口投与したところ、肝臓において培養細胞で見られた顕著な前駆体 SREBP 減少は認められなかったものの、活性型 SREBP の減少が確認された。

さらに、マウスに 0.1% の Xanthohumol を混合した高脂肪食を 60 日間摂食させたところ、肝臓における活性型 SREBP-1 減少を伴い、肥満や脂肪肝が抑えられた。

総合討論

Xanthohumol による SREBP プロセッシング抑制に関して

本研究では、Xanthohumol が SREBP プロセッシングを抑制することにより、SREBP 活性を低下させることを明らかにした。これまでに、SREBP プロセッシングを抑制する天然由来の小分子化合物の例はいくつか報告されている。例えば、シラカバの樹皮成分である Betulin は SCAP に結合し、SCAP と Insig の結合を増強させることにより、SCAP/SREBP の小胞体・ゴルジ体間輸送を抑制することが解明されており [98]、これは SREBP プロセッシングを抑制することが広く知られている化合物であるステロールと同様の作用機構である。この研究では、食餌性肥満マウスに Betulin を経口投与することにより、肝臓における活性型 SREBP の減少、脂質パラメーターやインスリン抵抗性の改善も観察されている [98]。また、多価不飽和脂肪酸は、Insig-1 と Ubx8 (UBX domain-containing protein 8) との結合を減弱させることにより、ユビキチン化された Insig-1 の小胞体膜からの引き抜きを妨げ、Insig-1 のプロテアソームによる分解を抑制することが示されている [102]。さらに、肥満マウスに多価不飽和脂肪酸を摂食させると、肝臓における活性型 SREBP-1 の減少を伴い、脂肪肝が改善されることが報告されている [103]。これらの化合物は皆、Insig の機能に影響を及ぼすことにより、SREBP プロセッシングを抑制する。Insig は SCAP/SREBP を小胞体膜上に繋ぎとめる因子であり、SREBP プロセッシングを制御するうえで重要な役割を担っている。本研究では、Insig 欠損株を用いた実験から、Xanthohumol が Insig 非依存的に活性型 SREBP を減少させることを明らかにした (Fig. 4-2)。

Xanthohumol の Insig を介さない SREBP プロセッシング抑制メカニズムとして、Sec23/24 に結合して COP II 小胞による SREBP の小胞体・ゴルジ体間輸送を妨げることが示された。COP II 小胞は数多くのタンパク質の輸送を担っており、その輸送を阻害することは生体にとって様々な影響を与えることが想定される。たとえば、頭蓋骨骨芽細胞において Sec23A に変異が入ることで頭蓋異形成の一種 Cranio-lenticulosutural dysplasia が引き起こされることが報告されている [192]。また、Sec23B ノックアウトマウスは膵臓の分泌組織や唾液腺の形成不全を伴い生後数日で死亡してしまうこと [193]、Sec24D ノックアウトマウスは胎生致死であることが確認されている [194]。さらに、Sec24B に変異を入れたマウスでは、細胞極性の確立や収斂伸長運動、神経管の閉鎖に重要なタンパク質の輸送を行うことができず、頭蓋脊椎披裂を発症することが認められている [195]。一方、Sec24A ノックアウトマウスの肝臓では、LDLR の分解に関与するタンパク質 PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) の分泌不全により、LDLR の発現が上昇し、血中コレステロール値が低下することが報告されている [196]。したがって、Sec24A は心疾患をはじめとする高コレステロール血症に関連する疾病の治療のターゲットとしての可能性が見込まれている。また、肥満における COP II 小胞による SREBP の輸送制御に関する報告もなされている。CRTC2 (CREB regulated transcription coactivator 2) は Sec31A と結合し、Sec23A-Sec31A 結合を競合阻害することで COP II 小胞による SREBP-1 の輸送を妨げることが示された [197]。そして、摂食時や肥満時のマウスの肝臓では、mTOR により CRTC2 がリン酸化されることで Sec31A との結合が減弱され、それに伴い Sec23A と Sec31A の結合が増強され、SREBP-1 プロセッシングの亢進が認められた [197]。さらに、リン酸化を受けない変異型 CRTC2 を過剰発現させた肥満マウスでは、肝臓における活性型 SREBP-1 の減少、脂肪肝やインスリン抵抗性の改善が観察された [197]。この研究は、COP II 輸送制御を介した SREBP 活性化抑制が代謝改善に寄与し得ることを示しており、本研究を支持するものであると言えるだろう。本研究の Xanthohumol 長期摂食実験で観察されたマウス肝臓における活性型 SREBP 減少が、培養細胞での結果と同様に COP II 小胞による SREBP 輸送の抑制に起因するのか、また SREBP 以外に及ぼす副作用など、まだ様々な検討の余地が残されているが、Xanthohumol は SREBP 活性を低下させ抗生活習慣病に貢献する化合物として確かな効果を持つと考えられる。

Sulforaphane, Sulforaphene, Isoxanthohumol による前駆体 SREBP 分解に関して

SREBP 活性を低下させる化合物に関する研究は数多く存在し、その中でも活性型 SREBP を減少させるものは散見されるが、一方で前駆体 SREBP タンパク質を減少させる化合物に関する研究は報告されていない。本研究では、初めて前駆体 SREBP タンパク質の分解を促進する化合物 Sulforaphane, Sulforaphene, Isoxanthohumol を見出した。第 6 章の結果より、これらの化合物は前駆体 SREBP のユビキチン化を促進しプロテアソームによる分解に導くと考えられる。酵母では、E2 ユビキチン結合酵素 Ubc7、E3 ユビキチンリガーゼ Hrd1 により前駆体 SREBP の分解が亢進することが報告されており [186]、前駆体 SREBP がユビキチン・プロテアソーム系によるタンパク質分解を受けることが示唆されている。しかし、この研究では実際に前駆体 SREBP がユビキチン化されるかどうかは明らかにされていない。また、哺乳類においても Ubc7 や Hrd1 が前駆体 SREBP の分解に関与するのかわ不明である。本研究において観察された前駆体 SREBP 分解に関しても、Ubc7, Hrd1 が寄与しているかどうかを検討することをはじめ、前駆体 SREBP のユビキチン化を促進する因子を突き止めていくことが、Sulforaphane, Sulforaphene, Isoxanthohumol の作用メカニズム、さらには前駆体 SREBP 分解制御の基礎を解明する一助になるだろう。

Sulforaphane, Sulforaphene, Isoxanthohumol はいずれも前駆体 SREBP を減少させるが、Sulforaphane, Sulforaphene は活性型 SREBP よりも先に前駆体 SREBP を減少させる (Fig. 3-20. A, B) のに対し、Isoxanthohumol は前駆体よりも先に活性型を減少させる (Fig. 3-18. B) ことが示された。したがって、Isoxanthohumol は前駆体を減少させた結果として活性型を減少させるだけでなく、直接的に活性型を減少させる効果も持っていることが想定される。その作用機構として、SREBP プロセッシングを抑制すること、さらには構造類似体である Xanthohumol と同様に Sec23/24 に作用し SREBP の小胞体・ゴルジ体間輸送を抑制することも考えられ、この点に関しても今後解析していく必要があるだろう。このように、Isoxanthohumol による活性型 SREBP 減少は前駆体 SREBP 減少とは独立して起こるのかもしれないが、両者が関連している可能性もある。たとえば、SCAP は SREBP と複合体を形成し SREBP をゴルジ体へエスコートする役割を担い、活性型 SREBP を産生するのに重要であるが、SCAP が欠損すると前駆体 SREBP が不安定化し分解されてしまうことが示唆されている [198, 199]。このことを考慮す

ると、もし Isoxanthohumol が SCAP のタンパク質量を減少させたり、SCAP と SREBP の結合を減弱させるのであれば、プロセッシングを抑制するだけでなく前駆体 SREBP の分解を促進することが推察される。同様に、前駆体 SREBP の切断酵素である S1P に関しても、ロックアウトマウスや欠損株で前駆体 SREBP の分解が速くなることが示唆されている [179, 180]。したがって、S1P のタンパク質量や活性を低下させることで活性型 SREBP と前駆体 SREBP の両方を減少させることができるだろう。このように、Isoxanthohumol の作用点次第では、活性型 SREBP を減少させ、その副次的な効果として前駆体 SREBP 減少にも寄与する可能性が考えられる。

また、Sulforaphane, Sulforaphene, Isoxanthohumol は前駆体 SREBP のユビキチン化を促進するという結果が得られたが、Isoxanthohumol に関してはそれ以外にも、SREBP 以外のタンパク質のユビキチン・プロテアソーム系を介した分解を促進し、その結果 SREBP を分解に導くという経路の存在が示唆された。つまり、この経路では、SREBP の安定化に寄与するタンパク質を標的として分解していると考えられる。このような Isoxanthohumol による前駆体 SREBP 分解経路の詳細や、同様に Sulforaphane, Sulforaphene の作用機構を解明するためには、各化合物の結合タンパク質を網羅的に解析し同定することが必要であると考えられる。今後、各化合物が結合タンパク質の機能に及ぼす作用の解析を通じて、分子レベルでの作用メカニズムを明らかにしていきたい。

食品成分による SREBP 非依存的な脂質合成阻害に関して

本研究では、SREBP 活性を抑制する食品成分の探索を目的としてスクリーニングを行い、それにより見出した化合物が実際に活性型 SREBP 量や標的遺伝子の mRNA 量を低下させ、脂肪酸・コレステロール合成を抑制することを明らかにしてきた。しかし、第 3 章では、見出した 5 種類の食品成分が SREBP 非依存的に脂質合成を抑制することが示された。つまり、これらの化合物による脂質合成抑制効果には、SREBP 活性抑制を介した経路と、SREBP 非依存的な抑制経路の 2 つが存在していると考えられる。

このように、脂質代謝に関して二面性を持つ因子として Insig が知られている。Insig の機能の 1 つは、前述したように SCAP/SREBP を小胞体膜上に留めプロセッシングを抑制することである。さらに、2 つ目の機能として、Insig はコレステ

ロール合成系酵素である HMGCR の分解に関与することが示されている。HMGCR はユビキチン・プロテアソーム系によるタンパク質分解を受けるが [200]、Insig はステロール依存的に HMGCR に結合し、ユビキチン化、分解を促進することが報告されている [201]。つまり、Insig はステロール依存的に 2 種類のタンパク質 SCAP, HMGCR に結合するが、それぞれに及ぼす作用はまったく異なる、非常に興味深い因子である。また、SCAP は SREBP の輸送に関与する因子、HMGCR は SREBP の標的遺伝子であり、どちらも SREBP に関連が深いということも特筆すべき点である。本研究で見出した食品成分についても、脂質代謝に関連する複数の因子に作用するようなタンパク質に効果を及ぼし、その複合的な作用により脂質合成が抑制されている可能性が考えられ、今後のさらなる研究が期待される。

Xanthohumol, Sulforaphane のヒトへの応用に関して

本研究では、Xanthohumol がマウス個体において SREBP 活性を低下させ、抗肥満効果を発揮することを示したが、Xanthohumol は生体内において酵素非依存的に Isoxanthohumol に、さらに腸内細菌や肝臓中の酵素によって 8-Prenylnaringenin など他のプレニル化フラボノイドに変換されることが知られており、決してバイオアベイラビリティが高いとは言えない [113]。しかし、Xanthohumol をラットに経口投与し、プレニル化フラボノイドの血中濃度を測定すると、72 時間後まで Xanthohumol がその代謝産物よりも高濃度であることが報告されている [113]。また、本研究では Isoxanthohumol も SREBP 活性を低下させ脂質合成を抑制する効果を有することを示した。ただし、その *in vivo* の効果は解析していない。Xanthohumol 摂取による作用を詳細に解析するためには、Isoxanthohumol, 8-Prenylnaringenin などの代謝物に関しても、生体内で SREBP 活性抑制効果や抗肥満効果に寄与するかどうかを検討していく必要がある。

また、第 5 章で行った Xanthohumol 長期摂食実験では、0.2% Xanthohumol 摂食群で有意な抗肥満効果が認められた。この群における 1 日あたりのマウスの Xanthohumol 摂取量は、156 mg/kg body weight であった。この値から体表面積換算 [202] により、60 kg のヒトでの 1 日あたりの必要摂取量を推定すると 759 mg となる。Xanthohumol はホップ特有のフラボノイドであり、食品として摂取する主要な方法は「ビールを飲む」ということになる。しかし、ビールの醸造過程

で大部分が Isoxanthohumol に異性化されることが知られており、ビール中に含まれる量は Isoxanthohumol が 400~700 µg/L であるのに対し、Xanthohumol は 10~40 µg/L 程度であると言われている [203]。したがって、単純に本研究の結果から推定される Xanthohumol の必要量を摂取するためには、19000~75900 L ものビールを飲まなければならない。ビール中に Xanthohumol の 10 倍以上含まれる Isoxanthohumol も抗肥満効果を発揮するのであれば、必要とされるビールの量は上記の量より少なくすることが可能である。ただし、培養細胞を用いて行った実験では、Isoxanthohumol の SREBP 活性抑制効果は Xanthohumol に比べて弱いものであったことを考慮すると、*in vivo* でも同様の傾向になることが推察される。したがって、いずれにせよ、ビールを飲むことで SREBP 活性抑制効果や抗肥満効果を得るのは現実的ではないだろう。しかし、たとえばサプリメントとして摂取することが可能であると考えられ、今後機能性食品としての応用が期待される。

第 7 章の Sulforaphane 長期摂食実験では、0.1% Sulforaphane 摂食群の 1 日あたりの摂取量は、69 mg/kg body weight であった。同様に、この値を 60 kg のヒトの 1 日あたりの必要摂取量に換算すると 336 mg となる。Sulforaphane はブロッコリースプラウト 100 g 中に 1153 mg もの量が含まれると言われており [204]、本研究の結果から推定すれば、SREBP 活性抑制効果および抗肥満効果を発揮するために必要な量は約 29 g と算出される。これまでに、20~36 歳の健常な男女 12 人に 1 週間毎日 100 g のブロッコリースプラウトを食べさせると、血中コレステロール値、特に LDL コレステロール値が有意に低下したという報告 [205] や、18~60 歳の II 型糖尿病患者 21 人に 4 週間毎日 10 g のブロッコリースプラウトを食べさせた結果、血糖値、血中インスリン値が低下しインスリン抵抗性が改善したという報告がなされている [206]。これらの効果のメカニズムは明らかにされていないが、本研究の成果も考慮に入れば、ブロッコリースプラウト中の Sulforaphane がヒトの体内で SREBP 活性を低下させ、抗生活習慣病効果を示すことは十分に考えられる。

総括

近年、長寿・高齢化や食の欧米化の進展に伴い、生活習慣病罹患者数が増加し、医療費も高騰し続けている。生活習慣病の完治は困難であり、一度発症す

ると一生付き合わざるを得ない、不治の病とも言われている。したがって、日々の生活改善による予防の重要性が唱えられており、食品の三次機能を利用した機能性食品が注目を集めている。機能性食品の活用により、毎日の食生活を通じて疾患の発症を予防できるだけでなく、医療費の増大を抑えることにも繋がると考えられる。発症してから医薬品で治療するのではなく、発症する前に食品で予防することこそが、健康で豊かな生活を送るうえで非常に重要である。

本研究では、これまでの基礎研究により示されてきた生活習慣病における SREBP の重要性に関する知見に基づきアッセイ系を構築し、SREBP 活性を低下させる 6 種類の食品由来成分を見出した。これらの化合物は SREBP 活性を抑制し、脂質合成の異常な活性化を防ぐことで、生活習慣病を予防する可能性が示唆された。見出した食品成分の 1 つである Xanthohumol は SREBP の COP II 小胞への取り込みを阻害し、SREBP の小胞体・ゴルジ体間輸送を妨げることにより、Insig 非依存的にプロセッシングを抑制し、SREBP 活性を低下させるというメカニズムを解明した。また、Sulforaphane, Sulforaphene, Isoxanthohumol は前駆体 SREBP のユビキチン化を促進し、プロテアソームによる分解に導くことで SREBP 活性を低下させることを示した (Fig. 8-1)。これらの詳細な解析により得た知見は、未だ解明されていない点の多い前駆体 SREBP および活性型 SREBP 制御機構の基礎研究にフィードバックすることが可能だろう。さらに、本研究では、見出した食品成分の生体内における効果を検証し、Xanthohumol, Sulforaphane をマウスに摂食させることにより、肝臓における SREBP 活性低下を伴い、食餌性肥満や脂肪肝が抑制されることを明らかにした。このように *in vitro* における基礎研究と *in vivo* における応用を見据えた解析を両立させた本研究の成果は、生活習慣病予防に関して詳細な科学的根拠に基づいた信頼性の高い新規機能性食品創成への発展に貢献するものと期待される。

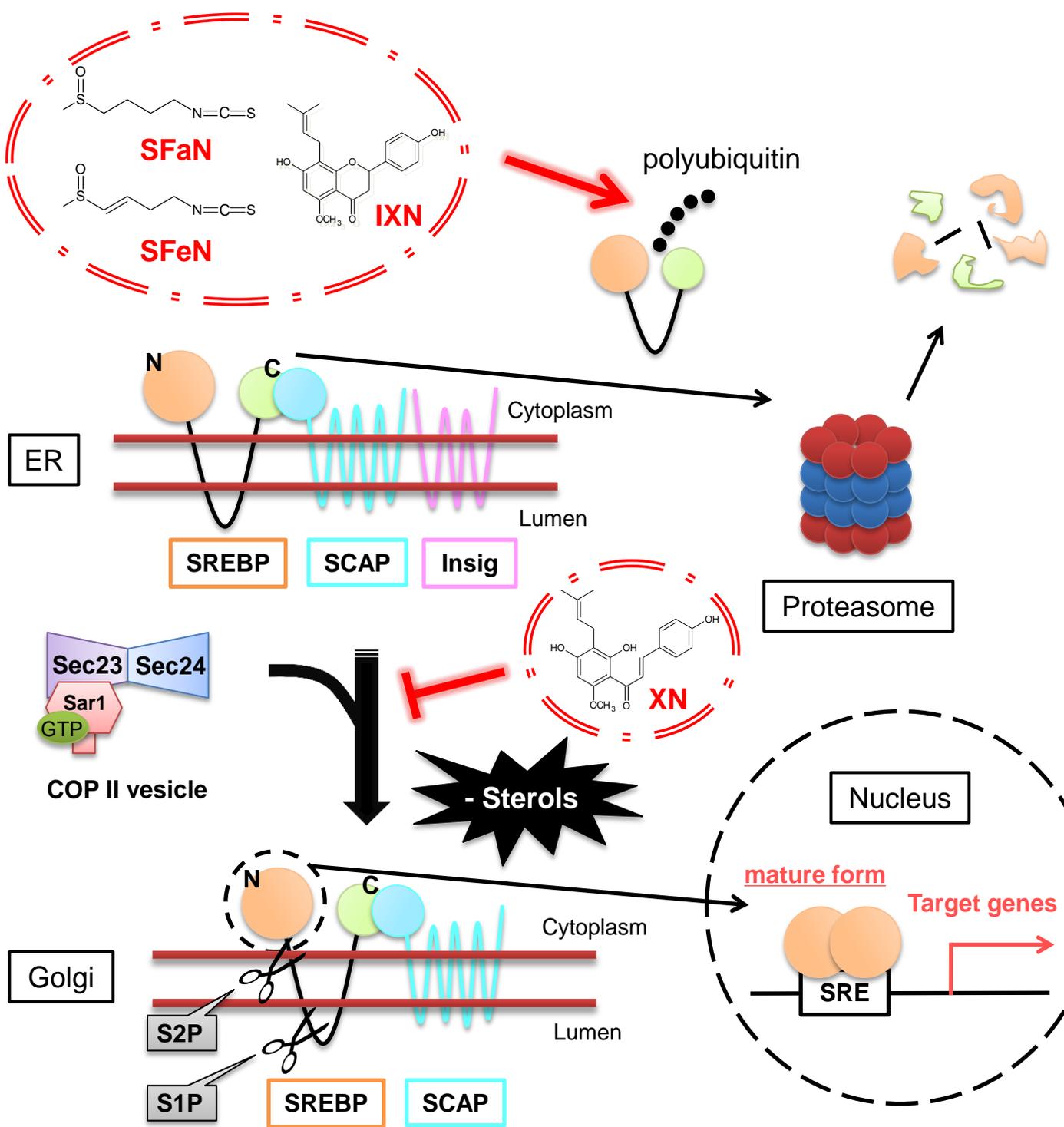


Fig. 8-1. XanthohumolとSulforaphane, Sulforaphene, Isoxanthohumolの作用点

XNは前駆体SREBPのCOP II小胞への取り込みおよび小胞体・ゴルジ体間輸送を抑制することにより、活性型SREBPの形成を妨げる。一方、SFaN, SFen, IXNは前駆体SREBPのユビキチン化を促進し、プロテアソームによる分解に導く。お互いに作用点は異なるが、いずれもSREBP活性を低下させる。

引用文献

- [1] Steinberg, D. (2002). Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat. Med.* **8**, 1211-7.
- [2] Brunzell, J.D., and Hokanson, J.E. (1999). Dyslipidemia of central obesity and insulin resistance. *Diabetes Care* **22** (Suppl 3), C10-3.
- [3] Briggs, M.R., Yokoyama, C., Wang, X., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1993). Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. *J. Biol. Chem.* **268**, 14490-6.
- [4] Hua, X., Yokoyama, C., Wu, J., Briggs, M.R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Wang, X. (1993). 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. U. S. A.* **90**, 11603-7.
- [5] Wang, X., Briggs, M.R., Hua, X., Yokoyama, C., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1993). Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **268**, 14497-504.
- [6] Yokoyama, C., Wang, X., Briggs, M.R., Admon, A., Wu, J., Hua, X., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1993). SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* **75**, 187-97.
- [7] Wang, X., Sato, R., Brown, M.S., Hua, X., and Goldstein, J.L. (1994). SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* **77**, 53-62.

- [8] Shimano, H., Horton, J.D., Shimomura, I., Hammer, R.E., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J. Clin. Invest.* **99**, 846-54.
- [9] Hua, X., Yokoyama, C., Wu, J., Briggs, M.R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Wang, X. (1993). 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. U. S. A.* **90**, 11603-7.
- [10] Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1997). Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J. Clin. Invest.* **99**, 838-45.
- [11] Amemiya-Kudo, M., Shimano, H., Hasty, A.H., Yahagi, N., Yoshikawa, T., Matsuzaka, T., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J., Harada, K., Gotoda, T., Sato, R., Kimura, S., Ishibashi, S., and Yamada, N. (2002). Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J. Lipid Res.* **43**, 1220-35.
- [12] Horton, J.D., Shimomura, I., Brown, M.S., Hammer, R.E., Goldstein, J.L., and Shimano, H. (1998). Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Clin. Invest.* **101**, 2331-9.
- [13] Shimano, H., Horton, J.D., Hammer, R.E., Shimomura, I., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1996). Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a.

J. Clin. Invest. **98**, 1575-84.

- [14] Amemiya-Kudo, M., Shimano, H., Yoshikawa, T., Yahagi, N., Hasty, A.H., Okazaki, H., Tamura, Y., Shionoiri, F., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J., Harada, K., Gotoda, T., Sato, R., Kimura, S., Ishibashi, S., and Yamada, N. (2000). Promoter analysis of the mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene. *J. Biol. Chem.* **275**, 31078-85.
- [15] Sato, R., Inoue, J., Kawabe, Y., Kodama, T., Takano, T., and Maeda, M. (1996). Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Biol. Chem.* **271**, 26461-4.
- [16] Brown, A.J., Sun, L., Feramisco, J.D., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2002). Cholesterol addition to ER membranes alters conformation of SCAP, the SREBP escort protein that regulates cholesterol metabolism. *Mol. Cell.* **10**, 237-45.
- [17] Yang, T., Espenshade, P.J., Wright, M.E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* **110**, 489-500.
- [18] Yabe, D., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2002). Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 12753-8.
- [19] Sun, L.P., Li, L., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2005). Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro. *J. Biol. Chem.* **280**, 26483-90.

- [20] Sun, L.P., Seemann, J., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2007). Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 6519-26.
- [21] Adams, C.M., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2003). Cholesterol-induced conformational change in SCAP enhanced by Insig proteins and mimicked by cationic amphiphiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 10647-52.
- [22] Sakai, J., Duncan, E.A., Rawson, R.B., Hua, X., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1996). Sterol-Regulated Release of SREBP-2 from Cell Membranes Requires Two Sequential Cleavages, One Within a Transmembrane Segment. *Cell* **85**, 1037-46.
- [23] Duncan, E.A., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Sakai, J. (1997). Cleavage Site for Sterol-regulated Protease Localized to a Leu-Ser Bond in the Luminal Loop of Sterol Regulatory Element-binding Protein-2. *J. Biol. Chem.* **272**, 12778-85.
- [24] Sakai, J., Nohturfft, A., Cheng, D., Ho, Y.K., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). Identification of Complexes between the COOH-terminal Domains of Sterol Regulatory Element-binding Proteins (SREBPs) and SREBP Cleavage-Activating Protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 20213-21.
- [25] Rawson, R.B., Zelenski, N.G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M.T., Chang, T.Y., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). Complementation Cloning of S2P, a Gene Encoding a Putative Metalloprotease Required for Intramembrane Cleavage of SREBPs. *Mol. Cell.* **1**, 47-57.
- [26] Sakai, J., Nohturfft, A., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1998). Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires

interaction with SREBP cleavage-activating protein: Evidence from in vivo competition studies. *J. Biol. Chem.* **273**, 5785-93.

- [27] Duncan, E.A., Davé, U.P., Sakai, J., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1998). Second-site cleavage in sterol regulatory element-binding protein occurs at transmembrane junction as determined by cysteine Panning. *J. Biol. Chem.* **273**, 17801-9.
- [28] Espenshade, P.J., Li, W.P., and Yabe, D. (2002). Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 11694-9.
- [29] Yellaturu, C.R., Deng, X., Park, E.A., Raghow, R., and Elam, M.B. (2009). Insulin enhances the biogenesis of nuclear sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c by posttranscriptional down-regulation of Insig-2A and its dissociation from SREBP cleavage-activating protein (SCAP).SREBP-1c complex. *J. Biol. Chem.* **284**, 31726-34.
- [30] Yecies, J.L., Zhang, H.H., Menon, S., Liu, S., Yecies, D., Lipovsky, A.I., Gorgun, C., Kwiatkowski, D.J., Hotamisligil, G.S., Lee, C.H., and Manning, B.D. (2011). Akt stimulates hepatic SREBP1c and lipogenesis through parallel mTORC1-dependent and independent pathways. *Cell Metab.* **14**, 21-32.
- [31] Owen, J.L., Zhang, Y., Bae, S.H., Farooqi, M.S., Liang, G., Hammer, R.E., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2012). Insulin stimulation of SREBP-1c processing in transgenic rat hepatocytes requires p70 S6-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 16184-9.
- [32] Hua, X., Nohturfft, A., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1996). Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP

cleavage-activating protein. *Cell* **87**, 415-26.

- [33] Engelking, L.J., Kuriyama, H., Hammer, R.E., Horton, J.D., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Liang, G. (2004). Overexpression of Insig-1 in the livers of transgenic mice inhibits SREBP processing and reduces insulin-stimulated lipogenesis. *J. Clin. Invest.* **113**, 1168-75.
- [34] Gong, Y., Lee, J.N., Lee, P.C., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Ye, J. (2006). Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake. *Cell Metab.* **3**, 15-24.
- [35] Lee, J.N., Song, B., DeBose-Boyd, R.A., and Ye, J. (2006). Sterol-regulated degradation of Insig-1 mediated by the membrane-bound ubiquitin ligase gp78. *J. Biol. Chem.* **279**, 45257-65.
- [36] Yabe, D., Komuro, R., Liang, G., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2003). Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3155-60.
- [37] Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M., Schekman, R. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**, 895-907.
- [38] Barlowe, C., Schekman, R. (1993). SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature* **365**, 347-9.
- [39] Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S.Y., Hamamoto, S., Schekman, R., Yeung, T. (1998). COPII-coated vesicle formation

reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* **93**, 263-75.

- [40] Miller, E., Antony, B., Hamamoto, S., Schekman, R. (2002). Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *EMBO J.* **21**, 6105-13.
- [41] Stagg, S.M., Gürkan, C., Fowler, D.M., LaPointe, P., Foss, T.R., Potter, C.S., Carragher, B., Balch, W.E. (2006). Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature* **439**, 234-8.
- [42] Stagg, S.M., LaPointe, P., Razvi, A., Gürkan, C., Potter, C.S., Carragher, B., Balch, W.E. (2008). Structural basis for cargo regulation of COPII coat assembly. *Cell* **134**, 474-84.
- [43] Mossesso, E., Bickford, L.C., Goldberg, J. (2003). SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell* **114**, 483-95.
- [44] Miller, E.A., Beilharz, T.H., Malkus, P.N., Lee, M.C., Hamamoto, S., Orci, L., Schekman, R. (2003). Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell* **114**, 497-509.
- [45] Kurihara, T., Hamamoto, S., Gimeno, R.E., Kaiser, C.A., Schekman, R., Yoshihisa, T. (2000). Sec24p and Iss1p function interchangeably in transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **11**, 983-98.
- [46] Roberg, K.J., Crotwell, M., Espenshade, P., Gimeno, R., Kaiser, C.A. (1999). LST1 is a SEC24 homologue used for selective export of the plasma membrane ATPase from the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **145**, 659-72.

- [47] Tang, B.L., Kausalya, J., Low, D.Y., Lock, M.L., Hong, W. (1999). A family of mammalian proteins homologous to yeast Sec24p. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **258**, 679-84.
- [48] Shen, K.A., Hammond, C.M., Moore, H.P. (1993). Molecular analysis of SAR1-related cDNAs from a mouse pituitary cell line. *FEBS Lett.* **335**, 380-5.
- [49] Paccaud, J.P., Reith, W., Carpentier, J.L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Schekman, R., Orci, L. (1996). Cloning and functional characterization of mammalian homologues of the COPII component Sec23. *Mol. Biol. Cell* **7**, 1535-46.
- [50] Stankewich, M.C., Stabach, P.R., Morrow, J.S. (2006). Human Sec31B: a family of new mammalian orthologues of yeast Sec31p that associate with the COPII coat. *J. Cell Sci.* **119**, 958-69.
- [51] Foretz, M., Guichard, C., Ferré, P., and Foufelle, F. (1999). Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 12737-42.
- [52] Shimomura, I., Matsuda, M., Hammer, R.E., Bashmakov, Y., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2000). Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol. Cell* **6**, 77-86.
- [53] Porstmann, T., Griffiths, B., Chung, Y.L., Delpuech, O., Griffiths, J.R., Downward, J., and Schulze, A. (2005). PKB/Akt induces transcription of enzymes involved in cholesterol and fatty acid biosynthesis via activation of SREBP. *Oncogene* **24**, 6465-81

- [54] Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Mangelsdorf, D.J. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* **14**, 2819-30.
- [55] Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R., and Mangelsdorf, D.J. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR α . *Nature* **383**, 728-31.
- [56] Janowski, B.A., Grogan, M.J., Jones, S.A., Wisely, G.B., Kliewer, S.A., Corey, E.J., and Mangelsdorf, D.J. (1999). Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXR α and LXR β . *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 266–271.
- [57] Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Oliver, B.B., Su, J.L., Sundseth, S.S., Winegar, D.A., Blanchard, D.E., Spencer, T.A., and Willson, T.M. (1997). Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J. Biol. Chem.* **272**, 3137-40.
- [58] Foretz, M., Pacot, C., Dugail, I., Lemarchand, P., Guichard, C., Le, Lièpvre, X., Berthelie-Lubrano, C., Spiegelman, B., Kim, J.B., Ferré, P., and Foufelle, F. (1999). ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol. Cell Biol.* **19**, 3760-8.
- [59] Yamamoto, T., Shimano, H., Inoue, N., Nakagawa, Y., Matsuzaka, T., Takahashi, A., Yahagi, N., Sone, H., Suzuki, H., Toyoshima, H., and Yamada, N. (2007). Protein kinase A suppresses sterol regulatory element-binding protein-1C expression via phosphorylation of liver X receptor in the liver. *J. Biol. Chem.* **282**, 11687-95.

- [60] Nagoshi, E., and Yoneda, Y. (2001). Dimerization of sterol regulatory element-binding protein 2 via the helix-loop-helix-leucine zipper domain is a prerequisite for its nuclear localization mediated by importin beta. *Mol. Cell Biol.* **21**, 2779-89.
- [61] Nagoshi, E., Imamoto, N., Sato, R. and Yoneda, Y. (1999). Nuclear import of sterol regulatory element-binding protein-2, a basic helix-loop-helix-leucine zipper (bHLH-Zip)-containing transcription factor, occurs through the direct interaction of importin beta with HLH-Zip. *Mol. Biol. Cell* **10**, 2221-33.
- [62] Nagoshi, E. and Yoneda, Y. (2001). Dimerization of sterol regulatory element-binding protein 2 via the helix-loop-helix-leucine zipper domain is a prerequisite for its nuclear localization mediated by importin beta. *Mol. Cell Biol.* **21**, 2779-89.
- [63] Lee, S.J., Sekimoto, T., Yamashita, E., Nagoshi, E., Nakagawa, A., Imamoto, N., Yoshimura, M., Sakai, H., Chong, K.T., Tsukihara, T., and Yoneda, Y. (2003). The structure of importin-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor. *Science* **302**, 1571-5.
- [64] Yieh, L., Sanchez, H.B. and Osborne, T.F. (1995). Domains of transcription factor Sp1 required for synergistic activation with sterol regulatory element binding protein 1 of low density lipoprotein receptor promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 6102-6.
- [65] Ericsson, J., Jackson, S.M. and Edwards, P.A. (1996). Synergistic binding of sterol regulatory element-binding protein and NF-Y to the farnesyl diphosphate synthase promoter is critical for sterol-regulated expression of the gene. *J. Biol. Chem.* **271**, 24359-64.
- [66] Ericsson, J. and Edwards, P.A. (1998). CBP is required for sterol-regulated

and sterol regulatory element-binding protein-regulated transcription. *J. Biol. Chem.* **273**, 17865-70

- [67] Oliner, J.D., Andresen, J.M., Hansen, S.K., Zhou, S. and Tjian, R. (1996). SREBP transcriptional activity is mediated through an interaction with the CREB-binding protein. *Genes Dev.* **10**, 2903-11.
- [68] Lin, J., Yang, R., Tarr, P.T., Wu, P.H., Handschin, C., Li, S., Yang, W., Pei, L., Uldry, M., Tontonoz, P., Newgard, C.B., and Spiegelman, B.M. (2005). Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1beta coactivation of SREBP. *Cell* **120**, 261-73.
- [69] Najima, Y., Yahagi, N., Takeuchi, Y., Matsuzaka, T., Sekiya, M., Nakagawa, Y., Amemiya-Kudo, M., Okazaki, H., Okazaki, S., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Harada, K., Gotoda, T., Nagai, R., Kadowaki, T., Ishibashi, S., Yamada, N., Osuga, J., and Shimano, H. (2005). High mobility group protein-B1 interacts with sterol regulatory element-binding proteins to enhance their DNA binding. *J. Biol. Chem.* **280**, 27523-32.
- [70] Yang, F., Vought, B.W., Satterlee, J.S., Walker, A.K., Jim, Sun, Z.Y., Watts, J.L., DeBeaumont, R., Saito, R.M., Hyberts, S.G., Yang, S., Macol, C., Iyer, L., Tjian, R., van, den, Heuvel, S., Hart, A.C., Wagner, G., and Näär, A.M. (2006). An ARC/Mediator subunit required for SREBP control of cholesterol and lipid homeostasis. *Nature* **442**, 700-4
- [71] Misawa, K., Horiba, T., Arimura, N., Hirano, Y., Inoue, J., Emoto, N., Shimano, H., Shimizu, M., and Sato, R. (2003). Sterol regulatory element-binding protein-2 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 to enhance sterol isomerase gene expression in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **278**, 36176-82.

- [72] Kanayama, T., Arito, M., So, K., Hachimura, S., Inoue, J. and Sato, R. (2007). Interaction between sterol regulatory element-binding proteins and liver receptor homolog-1 reciprocally suppresses their transcriptional activities. *J. Biol. Chem.* **282**, 10290-8.
- [73] Streicher, R., Kotzka, J., Muller-Wieland, D., Siemeister, G., Munck, M., Avci, H. and Krone, W. (1996). SREBP-1 mediates activation of the low density lipoprotein receptor promoter by insulin and insulin-like growth factor-I. *J. Biol. Chem.* **271**, 7128-33.
- [74] Kotzka, J., Müller-Wieland, D., Koponen, A., Njamen, D., Kremer, L., Roth, G., Munck, M., Knebel, B., and Krone, W. (1998). ADD1/SREBP-1c mediates insulin-induced gene expression linked to the MAP kinase pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**, 375-9.
- [75] Roth, G., Kotzka, J., Kremer, L., Lehr, S., Lohaus, C., Meyer, H.E., Krone, W. and Muller-Wieland, D. (2000). MAP kinases Erk1/2 phosphorylate sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1a at serine 117 in vitro. *J. Biol. Chem.* **275**, 33302-7.
- [76] Kotzka, J., Lehr, S., Roth, G., Avci, H., Knebel, B. and Muller-Wieland, D. (2004). Insulin-activated Erk-mitogen-activated protein kinases phosphorylate sterol regulatory element-binding Protein-2 at serine residues 432 and 455 in vivo. *J. Biol. Chem.* **279**, 22404-11.
- [77] Hirano, Y., Murata, S., Tanaka, K., Shimizu, M. and Sato, R. (2003). Sterol regulatory element-binding proteins are negatively regulated through SUMO-1 modification independent of the ubiquitin/26 S proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* **278**, 16809-19.
- [78] Arito, M., Horiba, T., Hachimura, S., Inoue, J., and Sato, R. (2008). Growth

factor-induced phosphorylation of sterol regulatory element-binding proteins inhibits sumoylation, thereby stimulating the expression of their target genes, low density lipoprotein uptake, and lipid synthesis. *J. Biol. Chem.* **283**, 15224-31.

- [79] Sutherland, C., Leighton, I.A., and Cohen, P. (1993). Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem. J.* **296**, 15-9.
- [80] Kim, K.H., Song, M.J., Yoo, E.J., Choe, S.S., Park, S.D., and Kim, J.B. (2004). Regulatory role of glycogen synthase kinase 3 for transcriptional activity of ADD1/SREBP1c. *J. Biol. Chem.* **279**, 51999-2006.
- [81] Sundqvist, A., Bengoechea-Alonso, M.T., Ye, X., Lukiyanchuk, V., Jin, J., Harper, J.W. and Ericsson, J. (2005). Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF(Fbw7). *Cell Metab.* **1**, 379-91.
- [82] Hirano, Y., Yoshida, M., Shimizu, M. and Sato, R. (2001). Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 36431-7.
- [83] Lu, M., and Shyy, J.Y. (2006). Sterol regulatory element-binding protein 1 is negatively modulated by PKA phosphorylation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **290**, C1477-86.
- [84] Bengoechea-Alonso, M.T., Punga, T. and Ericsson, J. (2005). Hyperphosphorylation regulates the activity of SREBP1 during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11681-6.

- [85] Bengoechea-Alonso, M.T., and Ericsson, J. (2006). Cdk1/cyclin B-mediated phosphorylation stabilizes SREBP1 during mitosis. *Cell Cycle*. **5**, 1708-18.
- [86] Giandomenico, V., Simonsson, M., Grönroos, E., and Ericsson, J. (2003). Coactivator-dependent acetylation stabilizes members of the SREBP family of transcription factors. *Mol. Cell Biol.* **23**, 2587-99.
- [87] Shimomura, I., Bashmakov, Y., and Horton, J.D. (1999). Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J. Biol. Chem.* **274**, 30028-32.
- [88] Kammoun, H.L., Chabanon, H., Hainault, I., Luquet, S., Magnan, C., Koike, T., Ferré, P., and Foufelle, F. (2009). GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 1201-15.
- [89] Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2008). Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab.* **7**, 95-6
- [90] Li, S., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2010). Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 3441-6.
- [91] Michael, M.D., Kulkarni, R.N., Postic, C., Previs, S.F., Shulman, G.I., Magnuson, M.A., and Kahn CR. (2000). Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell.* **6**, 87-97.
- [92] Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L.H., and Hotamisligil, G.S. (2004).

Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. **306**, 457-61.

- [93] Bobrovnikova-Marjon, E., Hatzivassiliou, G., Grigoriadou, C., Romero, M., Cavener, D.R., Thompson, C.B., and Diehl, J.A. (2008). PERK-dependent regulation of lipogenesis during mouse mammary gland development and adipocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 16314-9.
- [94] Khamzina, L., Veilleux, A., Bergeron, S., and Marette, A. (2005). Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology*. **146**, 1473-81.
- [95] Newgard, C.B., An, J., Bain, J.R., Muehlbauer, M.J., Stevens, R.D., Lien, L.F., Haqq, A.M., Shah, S.H., Arlotto, M., Slentz, C.A., Rochon, J., Gallup, D., Ilkayeva, O., Wenner, B.R., Yancy, W.S. Jr., Eisenson, H., Musante, G., Surwit, R.S., Millington, D.S., Butler, M.D., and Svetkey, L.P. (2009). A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab.* **9**, 311-26.
- [96] Ozcan, U., Ozcan, L., Yilmaz, E., Düvel, K., Sahin, M., Manning, B.D., and Hotamisligil, G.S. (2008). Loss of the tuberous sclerosis complex tumor suppressors triggers the unfolded protein response to regulate insulin signaling and apoptosis. *Mol. Cell* **29**, 541-51.
- [97] Knebel, B., Haas, J., Hartwig, S., Jacob, S., Köllmer, C., Nitzgen, U., Muller-Wieland, D., and Kotzka, J. (2012). Liver-specific expression of transcriptionally active SREBP-1c is associated with fatty liver and increased visceral fat mass. *PLoS One*. **7**, e31812.

- [98] Tang, J.J., Li, J.G., Qi, W., Qiu, W.W., Li, P.S., Li, B.L., and Song, B.L. (2011). Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques. *Cell Metab.* **13**, 44-56.
- [99] Kamisuki, S., Mao, Q., Abu-Elheiga, L., Gu, Z., Kugimiya, A., Kwon, Y., Shinohara, T., Kawazoe, Y., Sato, S., Asakura, K., Choo, H.Y., Sakai, J., Wakil, S.J., and Uesugi, M. (2009). A small molecule that blocks fat synthesis by inhibiting the activation of SREBP. *Chem. Biol.* **16**, 882-92.
- [100] Xu, J., Teran-Garcia, M., Park, J.H., Nakamura, M.T., and Clarke, S.D. (2001). Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. *J. Biol. Chem.* **276**, 9800-7.
- [101] Hannah, V.C., Ou, J., Luong, A., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2001). Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 4365-72.
- [102] Lee, J.N., Zhang, X., Feramisco, J.D., Gong, Y., and Ye, J. (2008). Unsaturated fatty acids inhibit proteasomal degradation of Insig-1 at a postubiquitination step. *J. Biol. Chem.* **283**, 33772-83.
- [103] Sekiya, M., Yahagi, N., Matsuzaka, T., Najima, Y., Nakakuki, M., Nagai, R., Ishibashi, S., Osuga, J., Yamada, N., and Shimano, H. (2003). Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. *Hepatology* **38**, 1529-39.
- [104] Shin, E.S., Lee, H.H., Cho, S.Y., Park, H.W., Lee, S.J., and Lee, T.R. (2007). Genistein downregulates SREBP-1 regulated gene expression by inhibiting site-1 protease expression in HepG2 cells. *J. Nutr.* **137**, 1127-31.

- [105] Soetikno, V., Sari, F.R., Sukumaran, V., Lakshmanan, A.P., Harima, M., Suzuki, K., Kawachi, H., and Watanabe, K. (2012). Curcumin decreases renal triglyceride accumulation through AMPK-SREBP signaling pathway in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *J. Nutr. Biochem.* ahead of print.
- [106] Ide, T., Ashakumary, L., Takahashi, Y., Kushiro, M., Fukuda, N., and Sugano, M. (2001). Sesamin, a sesame lignan, decreases fatty acid synthesis in rat liver accompanying the down-regulation of sterol regulatory element binding protein-1. *Biochim. Biophys. Acta.* **1534**, 1-13.
- [107] Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D.H., Niall, H.D., Boyse, E.A. (1975). Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 11-5.
- [108] Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L., Rose, I.A. (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 1783-6
- [109] Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* **30**, 405-39.
- [110] Deshaies, R.J., Joazeiro, C.A. (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 399-434.
- [111] Kobayashi, S. (2015). Choose Delicately and Reuse Adequately: The Newly Revealed Process of Autophagy. *Biol. Pharm. Bull.* **38**, 1098-103.
- [112] Kraft, C., Peter, M., Hofmann, K. (2010). Selective autophagy:

ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat. Cell Biol.* **12**, 836-41.

- [113] Legette, L., Ma, L., Reed, R.L., Miranda, C.L., Christensen, J.M., Rodriguez-Proteau, R., and Stevens, J.F. (2012). Pharmacokinetics of xanthohumol and metabolites in rats after oral and intravenous administration. *Mol. Nutr. Food Res.* **56**, 466-74.
- [114] Miranda, C.L., Stevens, J.F., Ivanov, V., McCall, M., Frei, B., Deinzer, M.L., and Buhler, DR. (2000). Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones in vitro. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3876-84.
- [115] Lupinacci, E., Meijerink, J., Vincken, J.P., Gabriele, B., Gruppen, H., and Witkamp, R.F. (2009). Xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) is an efficient inhibitor of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor- α release in LPS-stimulated RAW 264.7 mouse macrophages and U937 human monocytes. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 7274-81.
- [116] Gerhäuser, C. (2005). Broad spectrum anti-infective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**, 827-31.
- [117] Colgate, E.C., Miranda, C.L., Stevens, J.F., Bray, T.M., and Ho, E. (2007). Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF- κ B activation in prostate epithelial cells. *Cancer. Lett.* **246**, 201-9.
- [118] Xuan, N.T., Shumilina, E., Gulbins, E., Gu, S., Götz, F., and Lang, F. (2010). Triggering of dendritic cell apoptosis by xanthohumol. *Mol. Nutr. Food Res.* **54** (Suppl 2), S214-24.

- [119] Casaschi, A., Maiyoh, G.K., Rubio, B.K., Li, R.W., Adeli, K., and Theriault, A.G. (2004). The chalcone xanthohumol inhibits triglyceride and apolipoprotein B secretion in HepG2 cells. *J. Nutr.* **134**, 1340-6.
- [120] Yang, J.Y., Della-Fera, M.A., Rayalam, S., and Baile, C.A. (2007). Effect of xanthohumol and isoxanthohumol on 3T3-L1 cell apoptosis and adipogenesis. *Apoptosis.* **12**, 1953-63.
- [121] Nozawa, H. (2005). Xanthohumol, the chalcone from beer hops (*Humulus lupulus* L.), is the ligand for farnesoid X receptor and ameliorates lipid and glucose metabolism in KK-A(y) mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **336**, 754-61.
- [122] Legette, L.L., Moreno, Luna, A.Y., Reed, R.L., Miranda, C.L., Bobe, G., Proteau, R.R., and Stevens, J.F. (2012). Xanthohumol lowers body weight and fasting plasma glucose in obese male Zucker fa/fa rats. *Phytochemistry.* ahead of print.
- [123] Yui, K., Kiyofuji, A., Osada, K. (2014). Effects of xanthohumol-rich extract from the hop on fatty acid metabolism in rats fed a high-fat diet. *J. Oleo. Sci.* **63**, 159-68.
- [124] Wunderlich, S., Zürcher, A., and Back, W. (2005). Enrichment of xanthohumol in the brewing process. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**, 874-81.
- [125] Miranda, C.L., Stevens, J.F., Helmrich, A., Henderson, M.C., Rodriguez, R.J., Yang, Y.H., Deinzer, M.L., Barnes, D.W., and Buhler, D.R. (1999). Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. *Food. Chem. Toxicol.* **37**, 271-85.

- [126] Henderson, M.C., Miranda, C.L., Stevens, J.F., Deinzer, M.L., and Buhler, D.R. (2000). In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, *Humulus lupulus*. *Xenobiotica*. **30**, 235-51.
- [127] Serwe, A., Rudolph, K., Anke, T., and Erkel, G. (2012). Inhibition of TGF- β signaling, vasculogenic mimicry and proinflammatory gene expression by isoxanthohumol. *Invest. New. Drugs*. **30**, 898-915.
- [128] Rungapamestry, V., Duncan, A.J., Fuller, Z., and Ratcliffe, B. (2006). Changes in glucosinolate concentrations, myrosinase activity, and production of metabolites of glucosinolates in cabbage (*Brassica oleracea* Var. capitata) cooked for different durations. *J. Agric. Food. Chem.* **54**, 7628-34.
- [129] Zhang, Y. (2010). Allyl isothiocyanate as a cancer chemopreventive phytochemical. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**, 127-35.
- [130] Xiao, D., Srivastava, S.K., Lew, K.L., Zeng, Y., Hershberger, P., Johnson, C.S., Trump, D.L., and Singh, S.V. (2003). Allyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables, inhibits proliferation of human prostate cancer cells by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. *Carcinogenesis*. **24**, 891-7.
- [131] Musk, SR., and Johnson, I.T. (1993). Allyl isothiocyanate is selectively toxic to transformed cells of the human colorectal tumour line HT29. *Carcinogenesis*. **14**, 2079-83.
- [132] Xu, C., Shen, G., Yuan, X., Kim, J.H., Gopalkrishnan, A., Keum, Y.S., Nair, S., and Kong, A.N. (2006). ERK and JNK signaling pathways are involved in the regulation of activator protein 1 and cell death elicited by three isothiocyanates in human prostate cancer PC-3 cells. *Carcinogenesis*. **27**, 437-45.

- [133] Hwang, E.S., and Lee, H.J. (2006). Allyl isothiocyanate and its N-acetylcysteine conjugate suppress metastasis via inhibition of invasion, migration, and matrix metalloproteinase-2/-9 activities in SK-Hep 1 human hepatoma cells. *Exp. Biol. Med.* **231**, 421-30.
- [134] Smith, T., Musk, S.R., and Johnson, I.T. (1996). Allyl isothiocyanate selectively kills undifferentiated HT29 cells in vitro and suppresses aberrant crypt foci in the colonic mucosa of rats. *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 381S.
- [135] Tanaka, T., Mori, Y., Morishita, Y., Hara, A., Ohno, T., Kojima, T., and Mori, H. (1990). Inhibitory effect of sinigrin and indole-3-carbinol on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in male ACI/N rats. *Carcinogenesis*. **11**, 1403-6.
- [136] Ye, L., and Zhang, Y. (2001). Total intracellular accumulation levels of dietary isothiocyanates determine their activity in elevation of cellular glutathione and induction of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis*. **22**, 1987-92.
- [137] Jeong, W.S., Keum, Y.S., Chen, C., Jain, M.R., Shen, G., Kim, J.H., Li, W., and Kong, A.N. (2005). Differential expression and stability of endogenous nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) by natural chemopreventive compounds in HepG2 human hepatoma cells. *J. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 167-76.
- [138] Matsuda, H., Ochi, M., Nagatomo, A., and Yoshikawa, M. (2007). Effects of allyl isothiocyanate from horseradish on several experimental gastric lesions in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **561**, 172-81.
- [139] Lewerenz, H.J., Plass, R., Bleyl, D.W., and Macholz, R. (1988). Short-term toxicity study of allyl isothiocyanate in rats. *Nahrung*. **32**, 723-8.

- [140] Ahn, J., Lee, H., Im, S.W., Jung, C.H., Ha, T.Y. (2014). Allyl isothiocyanate ameliorates insulin resistance through the regulation of mitochondrial function. *J. Nutr. Biochem.* **25**, 1026-34.
- [141] Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C.G., and Posner, G.H. (1992). A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 2399-403.
- [142] Posner, G.H., Cho, C.G., Green, J.V., Zhang, Y., and Talalay, P. (1994). Design and synthesis of bifunctional isothiocyanate analogs of sulforaphane: correlation between structure and potency as inducers of anticarcinogenic detoxication enzymes. *J. Med. Chem.* **37**, 170-6.
- [143] Hong, F., Freeman, M.L., and Liebler, D.C. (2005). Identification of sensor cysteines in human Keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane. *Chem. Res. Toxicol.* **18**, 1917-26.
- [144] Zhao, H.D., Zhang, F., Shen, G., Li, Y.B., Li, Y.H., Jing, H.R., Ma, L.F., Yao, J.H., and Tian, XF. (2010). Sulforaphane protects liver injury induced by intestinal ischemia reperfusion through Nrf2-ARE pathway. *World J. Gastroenterol.* **16**, 3002-10.
- [145] Piao, C.S., Gao, S., Lee, G.H., Kim, do S., Park, B.H., Chae, S.W., Chae, H.J., and Kim, S.H. (2010). Sulforaphane protects ischemic injury of hearts through antioxidant pathway and mitochondrial K(ATP) channels. *Pharmacol. Res.* **61**, 342-8.
- [146] Chiao, J.W., Chung, F.L., Kancherla, R., Ahmed, T., Mittelman, A., and Conaway, C.C. (2002). Sulforaphane and its metabolite mediate growth arrest and apoptosis in human prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.* **20**, 631-6.

- [147] Fimognari, C., Nüsse, M., Cesari, R., Iori, R., Cantelli-Forti, G., and Hrelia, P. (2002). Growth inhibition, cell-cycle arrest and apoptosis in human T-cell leukemia by the isothiocyanate sulforaphane. *Carcinogenesis*. **23**, 581-6.
- [148] Gamet-Payrastre, L., Lumeau, S., Gasc, N., Cassar, G., Rollin, P., and Tulliez, J. (1998). Selective cytostatic and cytotoxic effects of glucosinolates hydrolysis products on human colon cancer cells in vitro. *Anticancer Drugs*. **9**, 141-8.
- [149] Tang, L., and Zhang, Y. (2004). Dietary isothiocyanates inhibit the growth of human bladder carcinoma cells. *J. Nutr.* **134**, 2004-10.
- [150] Pledge-Tracy, A., Sobolewski, M.D., and Davidson, N.E. (2007). Sulforaphane induces cell type-specific apoptosis in human breast cancer cell lines. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 1013-21.
- [151] Chaudhuri, D., Orsulic, S., and Ashok, B.T. (2007). Antiproliferative activity of sulforaphane in Akt-overexpressing ovarian cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 334-45.
- [152] Pham, N.A., Jacobberger, J.W., Schimmer, A.D., Cao, P., Gronda, M., and Hedley, D.W. (2004). The dietary isothiocyanate sulforaphane targets pathways of apoptosis, cell cycle arrest, and oxidative stress in human pancreatic cancer cells and inhibits tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 1239-48.
- [153] Misiewicz, I., Skupinska, K., and Kasprzycka-Guttman, T. (2003). Sulforaphane and 2-oxohexyl isothiocyanate induce cell growth arrest and apoptosis in L-1210 leukemia and ME-18 melanoma cells. *Oncol. Rep.* **10**, 2045-50.

- [154] Gingras, D., Gendron, M., Boivin, D., Moghrabi, A., Théorêt, Y., and Béliveau, R. (2004). Induction of medulloblastoma cell apoptosis by sulforaphane, a dietary anticarcinogen from Brassica vegetables. *Cancer Lett.* **203**, 35-43.
- [155] Chung, F.L., Conaway, C.C., Rao, C.V., and Reddy, B.S. (2000). Chemoprevention of colonic aberrant crypt foci in Fischer rats by sulforaphane and phenethyl isothiocyanate. *Carcinogenesis.* **21**, 2287-91.
- [156] Nastruzzi, C., Cortesi, R., Esposito, E., Menegatti, E., Leoni, O., Iori, R., and Palmieri, S. (2000). In vitro antiproliferative activity of isothiocyanates and nitriles generated by myrosinase-mediated hydrolysis of glucosinolates from seeds of cruciferous vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3572-5.
- [157] Barillari, J., Iori, R., Papi, A., Orlandi, M., Bartolini, G., Gabbanini, S., Pedulli, G.F., and Valgimigli, L. (2008). Kaiware Daikon (*Raphanus sativus* L.) extract: a naturally multipotent chemopreventive agent. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 7823-30.
- [158] Heiss, E., Herhaus, C., Klimo, K., Bartsch, H., and Gerhäuser, C. (2001). Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated anti-inflammatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* **276**, 32008-15.
- [159] Rodríguez-Cantú, L.N., Gutiérrez-Urbe, J.A., Arriola-Vucovich, J., Díaz-De, La Garza, R.I., Fahey, J.W., and Serna-Saldivar, S.O. (2011). Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) sprouts and extracts rich in glucosinolates and isothiocyanates affect cholesterol metabolism and genes involved in lipid homeostasis in hamsters. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 1095-103.
- [160] Choi, K.M., Lee, Y.S., Kim, W., Kim, S.J., Shin, K.O., Yu, J.Y., Lee, M.K., Lee, Y.M., Hong, J.T., Yun, Y.P., Yoo, H.S. (2014). Sulforaphane attenuates

obesity by inhibiting adipogenesis and activating the AMPK pathway in obese mice. *J. Nutr. Biochem.* **25**, 201-7.

- [161] Stipcevic, T., Piljac, J., and Vanden Berghe, D. (2006). Effect of different flavonoids on collagen synthesis in human fibroblasts. *Plant. Foods. Hum. Nutr.* **61**, 29-34.
- [162] Calderone, V., Chericoni, S., Martinelli, C., Testai, L., Nardi, A., Morelli, I., Breschi, M.C., and Martinotti, E. (2004). Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* **370**, 290-8.
- [163] Wu, M., Singh, S.B., Wang, J., Chung, C.C., Salituro, G., Karanam, B.V., Lee, S.H., Powles, M., Ellsworth, K.P., Lassman, M.E., Miller, C., Myers, R.W., Tota, M.R., Zhang, B.B., and Li, C. (2011). Antidiabetic and antisteatotic effects of the selective fatty acid synthase (FAS) inhibitor platensimycin in mouse models of diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 5378-83.
- [164] Rendina, A.R., and Cheng D. (2005). Characterization of the inactivation of rat fatty acid synthase by C75: inhibition of partial reactions and protection by substrates. *Biochem. J.* **388**, 895-903.
- [165] Johansson, P., Wiltschi, B., Kumari, P., Kessler, B., Vonrhein, C., Vonck, J., Oesterhelt, D., and Gringer, M. (2008). Inhibition of the fungal fatty acid synthase type I multienzyme complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 12803-8.
- [166] Miyata, S., Inoue, J., Shimizu, M., and Sato, R. (2012). 4'-Hydroxyflavanone suppresses activation of sterol regulatory element-binding proteins and de novo lipid synthesis. *FEBS Lett.* **586**, 1778-82.

- [167] Miyata, S., Inoue, J., Shimizu, M., and Sato, R. Allyl isothiocyanate suppresses the proteolytic activation of sterol regulatory element-binding proteins and de novo fatty acid and cholesterol synthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem. in press.*
- [168] Hirano, Y., Yoshida, M., Shimizu, M., Sato, R. (2001). Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 36431-7.
- [169] Colgan, S.M., Tang, D., Werstuck, G.H., and Austin, R.C. (2007). Endoplasmic reticulum stress causes the activation of sterol regulatory element binding protein-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 1843-51.
- [170] DeBose-Boyd, R.A., Brown, M.S., Li, W.P., Nohturfft, A., Goldstein, J.L., Espenshade, P.J. (1999). Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi. *Cell* **99**, 703-12.
- [171] Espenshade, P.J., Li, W.P., Yabe, D. (2002). Sterols block binding of COPII proteins to SCAP, thereby controlling SCAP sorting in ER. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 11694-9.
- [172] Sun, L.P., Li, L., Goldstein, J.L., Brown, M.S. (2005). Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro. *J. Biol. Chem.* **280**, 26483-90.
- [173] Schindler, A.J., Schekman, R. (2009). In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 17775-80.
- [174] Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown,

- M.S., Goldstein, J.L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* **6**, 1355-64.
- [175] Yoshihisa, T., Barlowe, C., Schekman, R. (1993). Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science* **259**, 1466-8.
- [176] Bi, X., Mancias, J.D., Goldberg, J. (2007). Insights into COPII coat nucleation from the structure of Sec23.Sar1 complexed with the active fragment of Sec31. *Dev. Cell* **13**, 635-45.
- [177] Radhakrishnan, A., Sun, L.P., Kwon, H.J., Brown, M.S., Goldstein, J.L. (2004). Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain. *Mol. Cell* **15**, 259-68.
- [178] Radhakrishnan, A., Ikeda, Y., Kwon, H.J., Brown, M.S., Goldstein, J.L. (2007). Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 6511-8.
- [179] Liang, G., Yang, J., Horton, J.D., Hammer, R.E., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J. Biol. Chem.* **277**, 9520-8.
- [180] Rawson, R.B., Cheng, D., Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1998). Isolation of cholesterol-requiring mutant Chinese hamster ovary cells with defects in cleavage of sterol regulatory element-binding proteins at site 1. *J. Biol. Chem.* **273**, 28261-9.
- [181] Doddapattar, P., Radović, B., Patankar, J.V., Obrowsky, S., Jandl, K.,

- Nusshold, C., Kolb, D., Vujić, N., Doshi, L., Chandak, P.G., Goeritzer, M., Ahammer, H., Hoefler, G., Sattler, W., Kratky, D. (2013). Xanthohumol ameliorates atherosclerotic plaque formation, hypercholesterolemia, and hepatic steatosis in ApoE-deficient mice. *Mol. Nutr. Food. Res.* **57**, 1718-28.
- [182] Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M.M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J.Y., Gao, B., Wierzbicki, M., Verbeuren, T.J., Shaw, R.J., Cohen, R.A., Zang, M. (2011). AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab.* **13**, 376-88.
- [183] Kirkwood, J.S., Legette, L.L., Miranda, C.L., Jiang, Y., Stevens, J.F. (2013). A metabolomics-driven elucidation of the anti-obesity mechanisms of xanthohumol. *J. Biol. Chem.* **288**, 19000-13.
- [184] Miyata, S., Inoue, J., Shimizu, M., Sato, R. (2015). Xanthohumol Improves Diet-induced Obesity and Fatty Liver by Suppressing Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP) Activation. *J. Biol. Chem.* **290**, 20565-79.
- [185] Lee, J.H., Lee, G.Y., Jang, H., Choe, S.S., Koo, S.H., Kim, J.B. (2014). Ring finger protein20 regulates hepatic lipid metabolism through protein kinase A-dependent sterol regulatory element binding protein1c degradation. *Hepatology* **60**, 844-57.
- [186] Hughes, B.T., Nwosu, C.C., Espenshade, P.J. (2009). Degradation of sterol regulatory element-binding protein precursor requires the endoplasmic reticulum-associated degradation components Ubc7 and Hrd1 in fission yeast. *J. Biol. Chem.* **284**, 20512-21.
- [187] Clarke, J.D., Hsu, A., Williams, D.E., Dashwood, R.H., Stevens,

- J.F., Yamamoto, M., Ho, E. (2011). Metabolism and tissue distribution of sulforaphane in Nrf2 knockout and wild-type mice. *Pharm. Res.* **28**, 3171-9.
- [188] Noh, J.R., Kim, Y.H., Hwang, J.H., Choi, D.H., Kim, K.S., Oh, W.K., Lee, C.H. (2015). Sulforaphane protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* **80**, 193-200.
- [189] Chi, X., Zhang, R., Shen, N., Jin, Y., Alina, A., Yang, S., Lin, S. (2015). Sulforaphane reduces apoptosis and oncosis along with protecting liver injury-induced ischemic reperfusion by activating the Nrf2/ARE pathway. *Hepatol. Int.* **9**, 321-9.
- [190] Zhang, Y.K., Yeager, R.L., Tanaka, Y., Klaassen, C.D. (2010). Enhanced expression of Nrf2 in mice attenuates the fatty liver produced by a methionine- and choline-deficient diet. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **245**, 326-34.
- [191] Shin, S., Wakabayashi, J., Yates, M.S., Wakabayashi, N., Dolan, P.M., Aja, S., Liby, K.T., Sporn, M.B., Yamamoto, M., Kensler, T.W. (2009). Role of Nrf2 in prevention of high-fat diet-induced obesity by synthetic triterpenoid CDDO-imidazolide. *Eur. J. Pharmacol.* **620**, 138-44.
- [192] Fromme, J.C., Ravazzola, M., Hamamoto, S., Al-Balwi, M., Eyaid, W., Boyadjiev, S.A., Cosson, P., Schekman, R., Orci, L. (2007). *Dev. Cell* **13**, 623-34.
- [193] Tao, J., Zhu, M., Wang, H., Afelik, S., Vasievich, M.P., Chen, X.W., Zhu, G., Jensen, J., Ginsburg, D., Zhang, B. (2012). SEC23B is required for the maintenance of murine professional secretory tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E2001-9.

- [194] Sarmah, S., Barrallo-Gimeno, A., Melville, D.B., Topczewski, J., Solnica-Krezel, L., Knapik, E.W. (2010). *PLoS One* **5**, e10367.
- [195] Merte, J., Jensen, D., Wright, K., Sarsfield, S., Wang, Y., Schekman, R., Ginty, D.D. (2010). Sec24b selectively sorts Vangl2 to regulate planar **cell** polarity during neural tube closure. *Nat. Cell. Biol.* **12**, 41-6
- [196] Chen, X.W., Wang, H., Bajaj, K., Zhang, P., Meng, Z.X., Ma, D., Bai, Y., Liu, H.H., Adams, E., Baines, A., Yu, G., Sartor, M.A., Zhang, B., Yi, Z., Lin, J., Young, S.G., Schekman, R., Ginsburg, D. (2013). SEC24A deficiency lowers plasma cholesterol through reduced PCSK9 secretion. *Elife* **2**, e00444.
- [197] Han, J., Li, E., Chen, L., Zhang, Y., Wei, F., Liu, J., Deng, H., Wang, Y. (2015). *Nature* **524**, 243-6.
- [198] Rawson, R.B., DeBose-Boyd, R., Goldstein, J.L., Brown, M.S. (1999). Failure to cleave sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) causes cholesterol auxotrophy in Chinese hamster ovary cells with genetic absence of SREBP cleavage-activating protein. *J. Biol. Chem.* **274**, 28549-56.
- [199] Matsuda, M., Korn, B.S., Hammer, R.E., Moon, Y.A., Komuro, R., Horton, J.D., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Shimomura, I. (2001). SREBP cleavage-activating protein (SCAP) is required for increased lipid synthesis in liver induced by cholesterol deprivation and insulin elevation. *Genes Dev.* **15**, 1206-16.
- [200] Ravid, T., Doolman, R., Avner, R., Harats, D., and Roitelman, J. (2000). The ubiquitin-proteasome pathway mediates the regulated degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.* **275**, 35840-7.

- [201] Sever, N., Song, B.L., Yabe, D., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and DeBose-Boyd, R.A. (2003). Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol. *J. Biol. Chem.* **278**, 52479-90.
- [202] Reagan-Shaw, S., Nihal, M., Ahmad, N. (2007). Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* **22**, 659-61.
- [203] Stevens, J.F., Page, J.E. (2004). Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochemistry* **65**, 1317-30.
- [204] Nakagawa, K., Umeda, T., Higuchi, O., Tsuzuki, T., Suzuki, T., Miyazawa, T. (2006). *J. Agric. Food Chem.* **54**, 2479-83.
- [205] Murashima, M., Watanabe, S., Zhuo, X.G., Uehara, M., Kurashige, A. (2004). Phase 1 study of multiple biomarkers for metabolism and oxidative stress after one-week intake of broccoli sprouts. *Biofactors* **22**, 271-5.
- [206] Bahadoran, Z., Tohidi, M., Nazeri, P., Mehran, M., Azizi, F., Mirmiran, P. (2012). Effect of broccoli sprouts on insulin resistance in type 2 diabetic patients: a randomized double-blind clinical trial. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **63**, 767-71.

原著論文

本論文に関する原著論文

1. Miyata, S., Inoue, J., Shimizu, M., Sato, R. (2012) 4'-Hydroxyflavanone suppresses activation of sterol regulatory element-binding proteins and de novo lipid synthesis. *FEBS Lett.* **586**, 1778-1782.
(第2章、第3章)
2. Miyata, S., Inoue, J., Shimizu, M., Sato, R. (2015) Xanthohumol Improves Diet-induced Obesity and Fatty Liver by Suppressing Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP) Activation. *J. Biol. Chem.* **290**, 20565-20579.
(第3章、第4章、第5章)
3. Miyata, S., Inoue, J., Shimizu, M., Sato, R. Allyl isothiocyanate suppresses the proteolytic activation of sterol regulatory element-binding proteins and de novo fatty acid and cholesterol synthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *in press*.
(第2章、第3章)

その他の原著論文

1. Ochiai, A., Miyata, S., Shimizu, M., Inoue, J., Sato, R. (2015) Piperine Induces Hepatic Low-Density Lipoprotein Receptor Expression through Proteolytic Activation of Sterol Regulatory Element-Binding Proteins. *PLoS One.* **10**, e0139799.

論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻
平成 25 年度博士課程 進学
氏 名 宮田 慎吾
指導教員名 佐藤 隆一郎

論文題目

食品成分による転写因子 SREBP 活性抑制の分子機構解析

第 1 章 序論

メタボリックシンドロームを代表とする生活習慣病は、エネルギーの過剰摂取や消費低下に起因するが、その発症基盤は脂質代謝制御の破綻だと考えられている。SREBP (Sterol regulatory element-binding protein) は脂肪酸・コレステロール合成系遺伝子の発現を誘導することにより、脂質合成を促進する転写因子である。SREBP の過剰活性化は脂肪肝やインスリン抵抗性を惹起することが知られており、II 型糖尿病マウスの肝臓では SREBP の発現上昇や活性化が認められる。したがって、生活習慣病予防のためには SREBP の活性を適度に抑制することが望まれる。本研究では、SREBP の活性を低下させる食品成分を新たに見出し、その効果を検証するとともに分子レベルでの詳細な作用機構を解明することを目的とした。

第 2 章 SREBP 活性を抑制する食品成分の探索

SREBP-1 の標的遺伝子である FAS (Fatty acid synthase) のプロモーター領域 (-987~+121) を含むレポーター遺伝子を安定発現するヒト肝癌由来 Huh-7 細胞株を樹立した。155 種類の食品由来成分およびその誘導體の中から、このプロモーター活性を低下させる化合物を選抜した。さらに Huh-7 細胞において、一過的に発現させた SREBP-1 標的遺伝子のプロモーター活性、内因性の SREBP-1, -2 標的遺伝子の mRNA 量を低下させる化合物として、Isoxanthohumol (IXN), 4'-Hydroxyflavanone (4'-HF), Allyl Isothiocyanate (AITC) の 3 種類を見出した。IXN はホップに含まれる成分、4'-HF はフラバノンの合成アナログ、AITC はワサビ、カラシなどのアブラナ科植物に含まれる成分である。次に、これらの化合物による脂質合成への影響を解析したところ、脂肪酸・コレステロール合成が抑制された。したがって、IXN, 4'-HF, AITC は SREBP の活性低下を介して脂質合成を抑制することが示唆された。

第3章 IXN, 4'-HF, AITC および類縁体による SREBP 活性抑制効果の検証

IXN, 4'-HF, AITC の類縁体についても、SREBP 活性抑制効果を有するかどうか検討を行った。4'-HF の類縁体 Flavanone, 2'-Hydroxyflavanone, 3'-Hydroxyflavanone を FAS 安定発現株に処理しても活性は低下せず、4'-HF のみに SREBP 活性抑制効果が見られた。また、IXN の類縁体 Xanthohumol (XN)、AITC の類縁体 Sulforaphane (SFaN), Sulforaphene (SFeN) を Huh-7 細胞に処理したところ、IXN や AITC と同様に SREBP 標的遺伝子の mRNA 量を低下させ、脂質合成を抑制することが示された。したがって、IXN, AITC の類縁体も SREBP の活性低下を介して脂質合成を抑制することが示唆された。

SREBP タンパク質は前駆体として合成された後に、プロセッシングを受け、活性型となることが知られている。そこで、本研究で見出した化合物によるプロセッシングへの影響を Western Blotting により解析したところ、いずれの化合物も活性型 SREBP-1, -2 を減少させた。その中でも特に、XN は活性型 SREBP を顕著に減少させることが示された。また、SFaN, SFeN, IXN は活性型 SREBP よりも前駆体 SREBP を優先的に減少させた。したがって、SFaN, SFeN, IXN は前駆体 SREBP の減少を介して、一方 XN は活性型 SREBP の減少を介して、それぞれ SREBP 活性を低下させることが示唆された。

第4章 XN による活性型 SREBP 減少機構の解析

XN がどのようにして活性型 SREBP を減少させるのか、その分子機構の解明を試みた。まず、SREBP プロセッシングを負に制御する因子 Insig (Insulin-induced gene) に着目した。チャイニーズハムスター卵巣由来 CHO-7 細胞において Insig を欠損させた SRD-15 細胞を用いて、XN が SREBP 活性を抑制するかどうかを検討した。その結果、XN は Insig 非存在下でも活性型 SREBP を減少させることが明らかとなった。

SREBP はプロセッシングを受ける際に SCAP (SREBP cleavage-activating protein) にエスコートされ、小胞体からゴルジ体へ輸送される。そこで、XN がこの輸送を抑制するかどうかを検討した。CHO-7 細胞に XN を処理し、超遠心により調製した小胞体、ゴルジ体画分における SREBP, SCAP のタンパク質量を解析した。その結果、SREBP, SCAP はゴルジ体において減少し、小胞体において増加していた。また、GFP-SCAP を発現する CHO 細胞を用いて、XN 処理後の SCAP の細胞内局在を調べたところ、SCAP のゴルジ体への集積が抑制された。したがって、XN は SCAP/SREBP の小胞体・ゴルジ体間輸送を妨げることが示された。

続いて、XN を固体化したアガロースビーズを用いて、SREBP の輸送に関与するタンパク質との結合を解析したところ、XN が COP II (Common coated protein II) 小胞の構成タンパク質 Sec23, Sec24 に結合することが示された。SREBP は、それと複合体を形成している SCAP が Sec23/24 に結合することにより COP II 小胞に取り込まれ、ゴルジ体へと輸送されていく。そこで、XN が SCAP/SREBP の COP II 小胞への取り込みを抑制する可能性を考えた。XN を処理した CHO-7 細胞からタンパク質を抽出し、SCAP 抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、XN により SCAP と Sec23 との結合が減弱された。したがって、XN は SCAP/SREBP の COP II 小胞への取り込み

を抑制することが示唆された。

第5章 生体内における XN の効果検証

マウスを用いて、生体内における XN の SREBP 活性抑制効果および抗生活習慣病効果を検証した。まず、マウスに 75, 150 mg/kg body weight の XN を 1 日 1 回、3 日間経口投与し、肝臓における SREBP タンパク質の変動を解析したところ、活性型 SREBP の減少が確認された。したがって、XN はマウス肝臓においても SREBP プロセッシングを抑制することが示唆された。

次に、マウスに 0.2%、または 0.4% の XN を混合した高脂肪食を 50 日間摂食させた。その結果、XN の濃度依存的に体重増加が抑えられ、肝臓重量や脂肪組織重量、肝臓中脂質量が減少していた。それと同調して、CT スキャンによる画像解析から、XN の摂食により肝脂肪率、腹囲脂肪率および脂肪量が低下していることが示された。また、血中脂質量、血中インスリン値も有意に低下していた。さらに、XN を摂食させたマウスの肝臓では、活性型 SREBP-1 タンパク質の減少、標的遺伝子発現の低下が認められた。したがって、XN の摂食による肝臓における SREBP 活性化抑制が高脂肪食負荷による肥満や脂肪肝の抑制に寄与することが示唆された。

第6章 SFaN, SFeN, IXN による前駆体 SREBP 減少機構の解析

SFaN, SFeN, IXN がどのようにして前駆体 SREBP を減少させるのか、その作用機構を解析した。これらの化合物が前駆体 SREBP のタンパク質分解を促進する可能性を考え、その主要な経路であるユビキチン・プロテアソーム系、あるいはオートファジー・リソソーム系を介しているかどうかを検討した。Huh-7 細胞にプロテアソーム阻害剤 MG132、またはリソソーム阻害剤 NH₄Cl を前処理した後、各化合物を処理し、前駆体 SREBP タンパク質の挙動を解析した。その結果、いずれの化合物による前駆体 SREBP 減少も MG132 により抑えられることが示された。したがって、SFaN, SFeN, IXN がユビキチン・プロテアソーム系を介して前駆体 SREBP を減少させることが示唆された。次に、これらの化合物が SREBP のユビキチン化を促進するかどうかを検討した。C 末端に 3×Flag タグを付加した全長 SREBP-1a とユビキチンを過剰発現させた Huh-7 細胞に MG132 および各化合物を処理し、Flag 抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、それぞれの化合物によりユビキチン化シグナルが増大していた。したがって、SFaN, SFeN, IXN が前駆体 SREBP のユビキチン化を促進することが示唆された。

第7章 生体内における SFaN の効果検証

マウスを用いて、生体内における SFaN の SREBP 活性抑制効果および抗生活習慣病効果を検証した。まず、マウスに 75, 150 mg/kg body weight の SFaN を 1 日 1 回、3 日間経口投与し、肝臓における SREBP タンパク質の変動を解析した。その結果、培養細胞で見られた顕著な前駆体 SREBP の減少は認められなかったが、活性型 SREBP の減少が確認された。したがって、SFaN はマウス肝臓においても SREBP 活性を低下させることが示された。

次に、マウスに 0.1% の SFaN を混合した高脂肪食を 60 日間摂食させた。その結果、有意に体

重増加が抑えられ、腹囲脂肪量や肝臓重量、肝臓中脂質量の減少が認められた。また、SFaNの摂食により血中の脂質量、インスリン値も低下していた。さらに、SFaN摂食群の肝臓において、活性型SREBP-1タンパク質が減少し、標的である脂質合成系遺伝子発現が低下していた。したがって、SFaNの摂食による肝臓におけるSREBP活性低下が高脂肪食誘導性肥満や脂肪肝の抑制に寄与することが示唆された。

第8章 総合討論

本研究により、SREBP活性を低下させ脂質合成を抑制する食品成分として6種類の化合物を新たに見出し (Fig. 1)、その中で特に強い効果を示した4種類の化合物に関して作用機構解析を行った。まず、XNはSREBPのCOP II小胞への取り込みを阻害することにより、SREBPの小胞体・ゴルジ体間輸送を抑制し、活性型SREBPの形成を妨げ、その結果としてSREBP活性を低下させるというメカニズムを解明した。また、SFaN, SFeN, IXNは前駆体SREBPのユビキチン化を促進し、プロテアソームによる分解に導くことで、SREBP活性を低下させることを明らかにした。さらに、XN, SFaNをマウスに摂食させることにより、肝臓におけるSREBP活性低下を伴い、食餌性肥満や脂肪肝が抑制されることを示した。本研究の成果は、抗生活習慣病に関して科学的エビデンスに基づく新たな機能性食品の開発に貢献するものと考えられる。

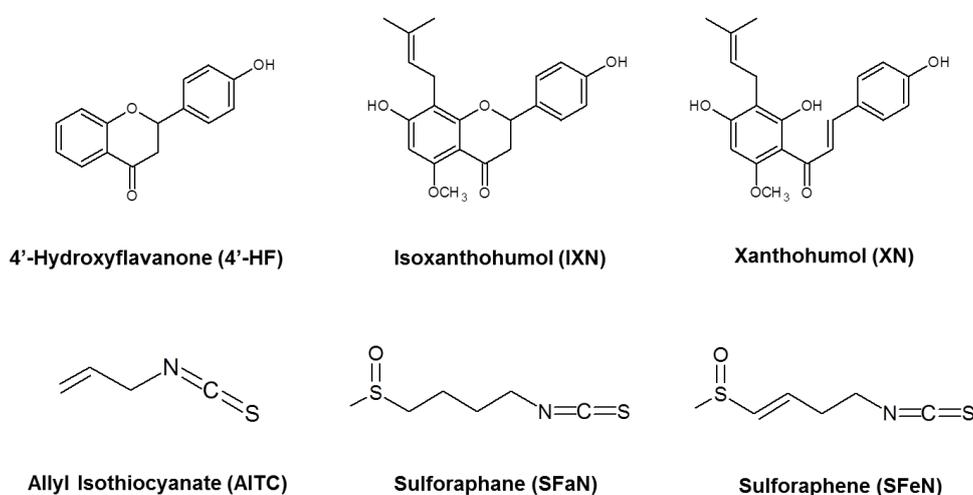


Fig. 1 本研究で見出したSREBP活性を低下させる化合物

発表論文

- 1) Miyata, S., Inoue, J., Shimizu, M., Sato, R. (2012) *FEBS Lett.* **586**, 1778-1782.
- 2) Miyata, S., Inoue, J., Shimizu, M., Sato, R. (2015) *J. Biol. Chem.* **290**, 20565-20579.
- 3) Miyata, S., Inoue, J., Shimizu, M., Sato, R. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press.

謝辞

本研究は、東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻 食品生化学研究室にて行われたものです。本研究を行うにあたり、多くの方々にご協力頂きました。

本研究を遂行するにあたり、豊富な知識と経験の下、熱心なご指導と適切なご助言を頂き、また日々のディスカッションを通して研究者としての姿勢をご教授下さいました、食品生化学研究室教授 佐藤隆一郎先生に、深く感謝致しますとともに、御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、興味深い研究テーマを与えて下さり、研究における考え方や進め方を一から指導して頂くとともに、日々の実験から本論文の執筆まで熱心にご教示して下さいました、食品生化学研究室准教授 井上順先生に深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、様々なご指導、ご鞭撻を賜りました、食品生化学研究室助教 清水誠先生に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、実験に関する相談をはじめ精神面のケアまで、研究室生活全般に渡りご支援をして下さいました、東京大学 高齢社会総合研究機構 リーディング大学院特任助教 橋詰力先生に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、Isoxanthohumol, Xanthohumol をご供与下さいました、キリンビール株式会社に心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、Xanthohumol ビーズをご供与下さいました、理化学研究所 ケミカルバイオロジー研究基盤施設施設長 長田裕之博士に篤く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、ドッキングシミュレーション解析を行って下さ

いました、東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻准教授 中村周吾先生に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、研究用 X 線装置をご貸与下さいました、東京大学 総括プロジェクト機構 総括寄付講座「食と生命」研究室特任教授 加藤久典先生に深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、マウスの解剖にご協力頂きました、井上聖哉博士、佐々木崇博士、塚本大介修士、毛受佑斗学士、安本啓甫学士に心より御礼申し上げます。

修士課程・博士課程の 5 年間に渡る研究室生活をともに過ごし、数多くの場面で支えて頂きました、丸山竜人修士に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、経済面でご支援賜りました、日本学術振興会に深く感謝申し上げます。

最後に、研究を行う上で、温かいご指導、ご配慮、ご助力を頂き、研究生活を有意義なものにしてくださいました食品生化学研究室の皆様、心より感謝申し上げます。

平成 27 年 12 月 末日
東京大学大学院 農学生命科学研究科
応用生命化学専攻 食品生化学研究室
宮田 慎吾