

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がん由来 Huh-7 細胞株を樹立した。153 種類の食品由来成分およびその誘導体の中から、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 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、肝臓において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。

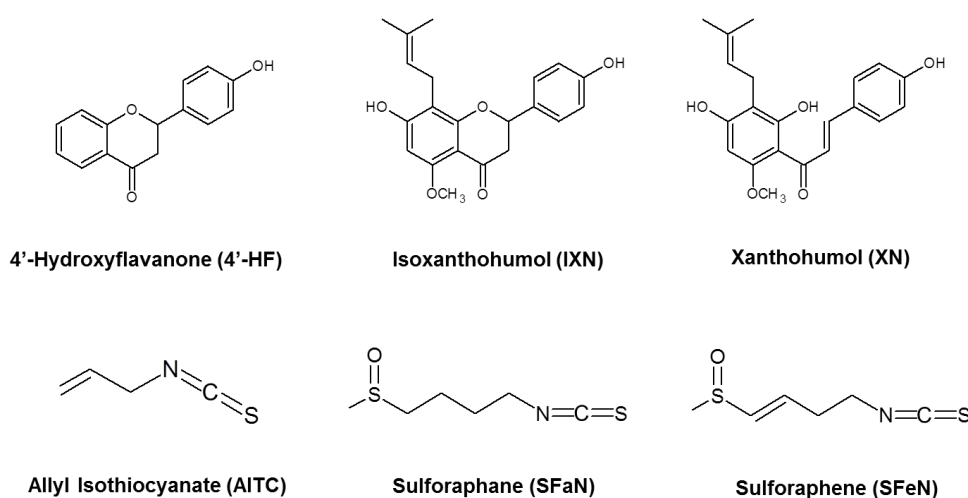


Fig. 1 本研究で見出したSREBP活性を低下させる化合物

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.