

## 審査の結果の要旨

氏名 宮田 慎吾

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 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。

SREBP-1 の標的遺伝子である FAS 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、カラシなどに含まれる成分である。また、IXN の類縁体 Xanthohumol (XN)、AITC の類縁体 Sulforaphane (SFaN), Sulforaphene (SFeN) も SREBP 活性抑制効果を有することを示した。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、見出した 6 種類の化合物は 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。

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、プロセッシングへの影響を解析したところ、いずれの化合物も活性型 SREBP-1, -2 を減少させた。その中で、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。

XN による活性型 SREBP 減少の分子機構解明を試みた。SREBP はプロセッシングを受ける際に SCAP 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。XN を処理した細胞から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ところ、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。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 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ところ、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。

SFaN, SFeN, IXN による前駆体 SREBP 減少機構を解析した。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・プロテアソーム系の阻害剤 MG132 を前処理したところ、いずれの化合物による前駆体 SREBP 減少も抑えられた。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、SFaN, SFeN, IXN により前駆体 SREBP のユビキチン化が亢進した。

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。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、血中脂質量、血中インスリン値が減少していた。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。また、0.1% の SFaN を 60 日間摂食させた場合にも同様の結果が得られた。

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た。その中で、XN は 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。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。