

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 李 娟

食の欧米化や運動不足は、肥満を引き起こし、肥満者では、脂質異常症、糖尿病、高血圧が発症しやすく、さらに、動脈硬化症を引き起こす可能性が高くなる。このような疾患を予防するために、血中脂質レベルをコントロールすることは非常に重要である。

MTP は ApoB と脂質の会合を触媒し、VLDL と Chylomicron の分泌を促進する。MTP 阻害剤は血中 TG と Chol を低下させることから、MTP の活性抑制は抗動脈硬化の有望な標的と考えられている。

まず MTP 遺伝子発現を抑制する食品成分を探索し、MTP プロモーター活性を抑制する食品成分として、Luteolin を同定した。

次に、Luteolin による MTP 遺伝子プロモーター活性抑制のメカニズムを検討した。今回用いた MTP プロモーターの配列には、HNF1 $\alpha$  結合配列と HNF4 $\alpha$  結合配列の A B C が複数存在する。そこでそれぞれの配列に変異を導入し、Luteolin の効果を検証した。その結果、HNF4 $\alpha$  B や HNF1 $\alpha$  結合配列に変異を導入することにより Luteolin による抑制効果が弱くなった。一方、HNF1 $\alpha$  と HNF4 $\alpha$  B 結合配列両方に変異を導入すると Luteolin による抑制効果が見られなくなった。

HNF4 $\alpha$  は核内受容体の一種でホモダイマーとして機能する。MTP の他、ApoB、PEPCK、G6Pase、CYP7A1、及び MTP Promoter に結合する HNF1 $\alpha$  が標的遺伝子として知られている。次に、Luteolin が HNF4 $\alpha$  の活性を抑制する可能性について検討した。

HNF4 $\alpha$  応答配列を含むレポーター Plasmid の Luciferase 活性変動に及ぼす Luteolin の効果を検討したところ、HNF4 $\alpha$  の発現により、活性が上昇し、Luteolin 処理は、その活性を低下させた。また、Luteolin は HNF4 $\alpha$  標的遺伝子である ApoB、PEPCK、G6Pase 及び HNF1 $\alpha$  発現を抑制した。以上の結果より、Luteolin は HNF4 $\alpha$  活性を抑制することが示唆された。

Luteolin 処理による ApoB 分泌への影響を調べた。HepG2 細胞において、Luteolin 12 時間処理によって、ApoB 分泌量が顕著に低下し、細胞内の Apo B 量も低下した。

一方、HepG2 細胞において、Luteolin 3 時間処理により、MTP の発現は抑制されなかったが、Apo B 分泌が低下した。このことから、Luteolin による ApoB 分泌抑制には、MTP-HNF4 $\alpha$  以外の経路も存在すると考えられる。

次に、Luteolin による HNF4 $\alpha$  活性抑制機構の解析について検討を行った。Luteolin による HNF4 $\alpha$  活性の抑制メカニズムは大きく分けて 2 つに分類できる。一つは細胞外から Signal 経路を介して作用する間接的な効果、もう一つは HNF4 $\alpha$  への直性結合による効果である。

はじめに、細胞内へ取り込まれにくい Luteolin 配糖体を用いて検討を行った。HepG2

細胞において、HNF4 $\alpha$  標的遺伝子を調べ、Luteolin 及び配糖体処理による HNF4 $\alpha$  活性の変動について検討したところ、Luteolin には抑制効果が見られたが、配糖体にはそのような効果は見られなかった。

次に Luteolin が HNF4 $\alpha$  と直接結合するかどうかについて、Absorption Spectrum、Trypsin cleavage、BIACORE と Luteolin Beads の方法を検討したところ、HNF4 $\alpha$  と Luteolin は直接結合していることが示唆された。

そして、Luteolin がどのようにして HNF4 $\alpha$  活性を抑制するかについて解析を行った。はじめに、Chip Assay により、DNA 結合活性を検討したところ、HNF4 $\alpha$  標的遺伝子 Promoter への HNF4 $\alpha$  の結合は Luteolin 処理により抑制された。またヒストン H3 のアセチル化の抑制も同時に見られた。以上の結果から、Luteolin は HNF4 $\alpha$  の DNA への結合を抑制することが示唆された。

次に、GAL4-UAS system を用いて、Luteolin が HNF4 $\alpha$  への Cofactor の recruitment を変動させるかどうかについて検討した。その結果、GAL4-HNF4 $\alpha$  融合蛋白質発現による活性の上昇は Luteolin 添加により抑制された。Luteolin は Cofactor の Recruitment に影響を与える可能性もあると考えられる。

次に Luteolin の動物レベルでの効果を検討した。

5 週齢の野生型マウスを HFD えさを 11 週間投与後、三つの Group に分け、それぞれに HFD, または 0.6%Luteolin 及び 1.5%Luteolin を添加した餌を八週間食べさせた。Luteolin 食により、肝臓での MTP の発現、血中と肝臓の脂質、血中の Apo B、インスリン、血糖値が低下した。肝臓中脂質量を低下させる原因は FA 合成関連因子の低下と Chol 異化関連因子の増加と考えらる。Luteolin は抗肥満、脂質代謝改善、インスリン感受性改善効果を示した。一方、今回同定した Luteolin は動物レベルでも、MTP 発現と血中分泌された Apo B 量を抑制した。

一方、フラボノールである Quercetin は血中脂質を抑制すると報告された。Quercetin は MTP 転写活性を抑制しなかったから、ApoB 転写活性への影響を検討した。Caco-2 細胞において、Quercetin は ApoB Promoter 活性を抑制した。次に、その抑制メカニズムを解析した、deleted promoter レポーター遺伝子を用いて、Quercetin の効果を検討したところ、C/EBP binding site を同定した。次に、Quercetin が C/EBP の活性を抑制する可能性について検討したところ、Quercetin が C/EBP 活性を抑制するには細胞内に取り込まれるて、C/EBP  $\beta$  に直接結合して、C/EBP  $\beta$  への Cofactor の Recruitment を変化させることにより、C/EBP 活性を抑制すると考えられる。

以上の結果より、フラボノイド類は生活習慣病予防の可能性があると考えられる。

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。