

博士論文

多価不飽和脂肪酸 (PUFA) による  
SREBP-1 特異的な抑制機序の解明

升田 紫

## 目次

要旨	・ ・ ・ ・ ・	1
略語一覽	・ ・ ・ ・ ・	3
序文	・ ・ ・ ・ ・	4
実験方法	・ ・ ・ ・ ・	17
実験結果	・ ・ ・ ・ ・	54
考察	・ ・ ・ ・ ・	70
総括	・ ・ ・ ・ ・	80
謝辞	・ ・ ・ ・ ・	81
引用文献	・ ・ ・ ・ ・	82

## 要旨

多価不飽和脂肪酸(PUFA)は肝臓における中性脂肪合成を抑制し、高脂血症治療薬に用いられる。肝臓における脂肪酸・トリグリセリド・コレステロール合成を制御する転写因子としてSREBP (sterol regulatory element-binding protein) が知られるが、SREBP に対する PUFA の作用機序は未解明の点が多い。

我々は先行研究において、アデノウイルスで導入したルシフェラーゼレポーターの定量を行い、生きたマウスの肝臓における SREBP の切断活性を *in vivo* imaging system (IVIS) で評価するアッセイ系を構築した。その先行研究では、PUFA が SREBP-1 の切断活性を特異的に抑制すること(一方で SREBP-2 の切断活性は抑制しないこと)を明らかにしたが、詳細な機序は未解明のままであった。

そこで、SREBP-1上のPUFA作用ドメインを絞り込むことを目的として、本研究を行った。まず、レポーター遺伝子の発現を安定化させる工夫として既報を参考に転写活性化因子を改変したところ、培養細胞においても生体(マウス肝臓)においても、十分高いルシフェラーゼ値が得られたため、先行研究に比較してより強いレポーター活性を有する転写活性化因子を用いて実験を進めることが可能となった。。

また、SREBP-1とSREBP-2のハイブリッド分子等、SREBPの配列を改変した分子を複数作成し、培養細胞やIVISを用いてそれらの特性を評価した。培養細胞を用いた実験から、SREBPのC-terminal regulatory domainにおけるSCAPとの相互作用部位が、transmembraneからSREBP-1c 777、SREBP-2 796の間にある可能性が示唆された。ま

た、IVISを用いた実験から、SREBP-1上の PUFA作用ドメインがCOOH末端側に存在することが判明した（具体的には、SREBP-1c 777より更にCOOH末端側に存在する可能性が示唆された）。このように、具体的なSREBP配列をもとに、SREBPに対するPUFAの作用ドメインを模索し、同定した先行研究がまだ無いため、ここに報告する。

## 略語一覽

Cop I : coat protein I

Cop II : coat protein II

DHA: docosahexaenoic acid

EPA: eicosapentaenoic acid

HDL: high density lipoprotein

INSIG : insulin inducing gene

IVIS: in vivo imaging system

LDL : low density lipoprotein

PUFA : polyunsaturated fatty acid

S1P : site 1 protease

S2P : site 2 protease

SCAP: SREBP cleavage-activating protein

SRE : sterol regulatory element

SREBP-1: sterol regulatory element-binding protein-1

SREBP-2: sterol regulatory element-binding protein-2

SSD : sterol sensing domain

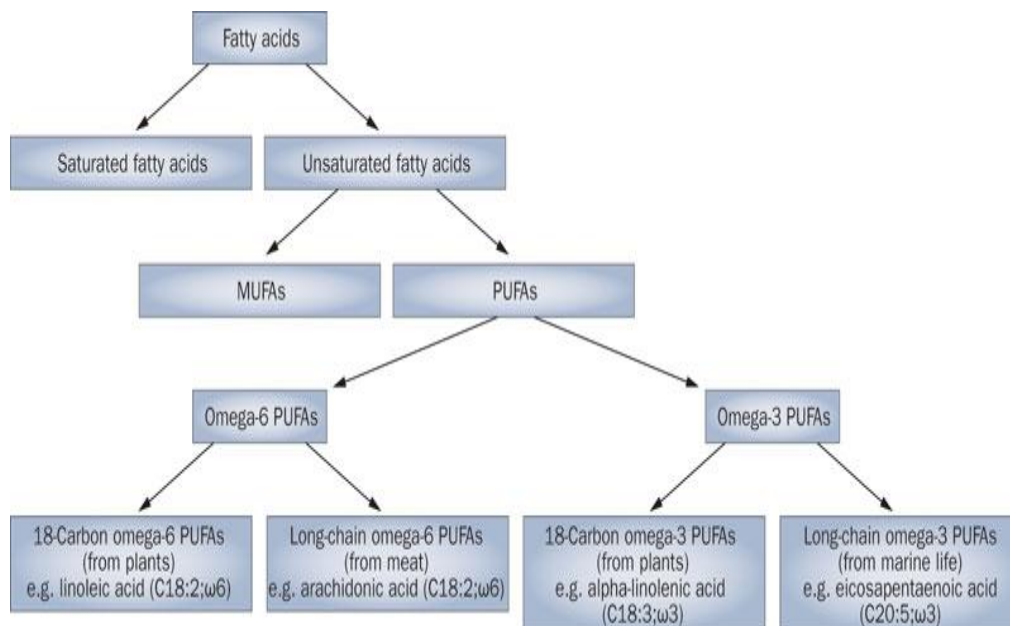
TG: triglyceride

## 序文

脂肪酸は、分子構造から、二重結合をもたない飽和脂肪酸 (saturated fatty acid) と、二重結合を有する不飽和脂肪酸 (unsaturated fatty acid) に分類される (Fig. 1)

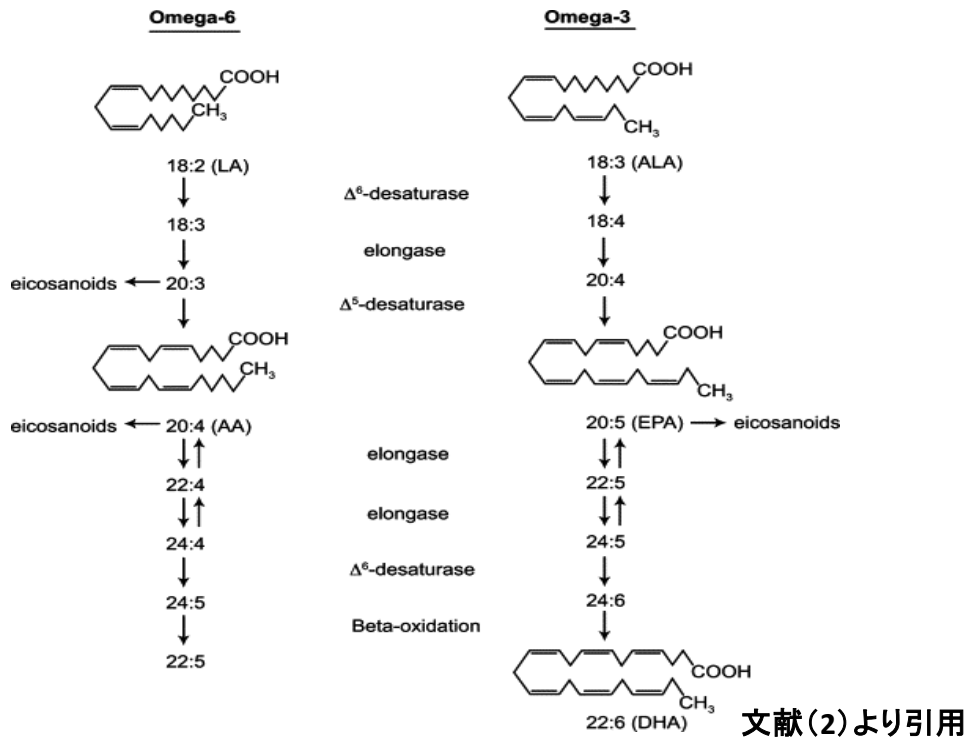
(1)。不飽和脂肪酸は更に、二重結合を1つ持つ一価不飽和脂肪酸 (monounsaturated fatty acid) と、2つ以上持つ多価不飽和脂肪酸 (PUFA: polyunsaturated fatty acid) に分かれる。PUFAは、二重結合の始まる位置によって、n-6系多価不飽和脂肪酸と、n-3系多価不飽和脂肪酸に大別される (Fig. 2) (2)。前者には、リノール酸、 $\gamma$ -リノレン酸、アラキドン酸等があり、植物油に多く含まれる。後者には、 $\alpha$ リノレン酸、エイコサペンタエン酸 (EPA: eicpsapentaenoic acid)、ドコサヘキサエン酸 (DHA: docosahexaenoic acid) 等があり、魚油に多く含まれる。人体に存在するPUFAは生体内で合成されず、そのほとんどが食物由来の脂肪酸である。

Fig.1 脂肪酸の分類



文献(1)より引用

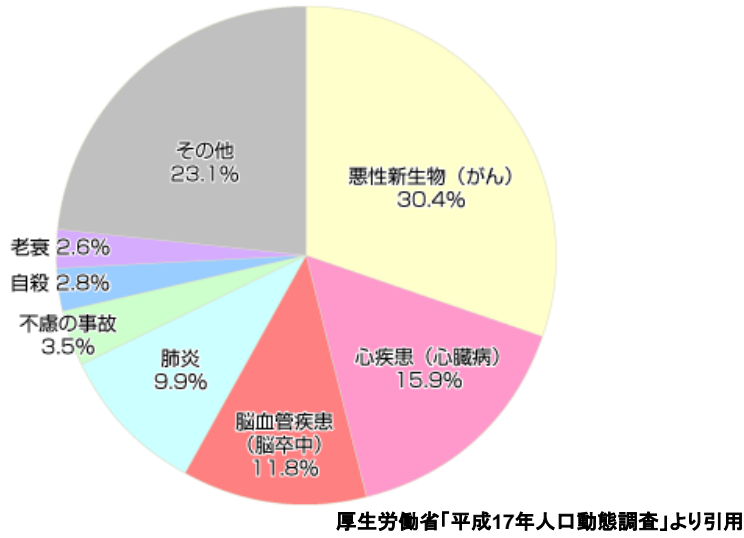
Fig.2 多価不飽和脂肪酸の代謝および構造



PUFA には、肝臓での中性脂肪合成を抑制する働きがあることが 1960 年代から知られてきた (3)。同時期より、Keys らによる 7 か国研究 (Seven Countries Study) において、北欧や米国と比較し、日本や地中海諸国における虚血性心疾患の死亡率が低いことが観察された (4)。1970 年代に入り、Dyerberg らが、グリーンランドイヌイットではデンマーク人に比較して血中総コレステロール値、中性脂肪値が低く、虚血性心疾患の死亡割合が少ないことを報告した (5)。

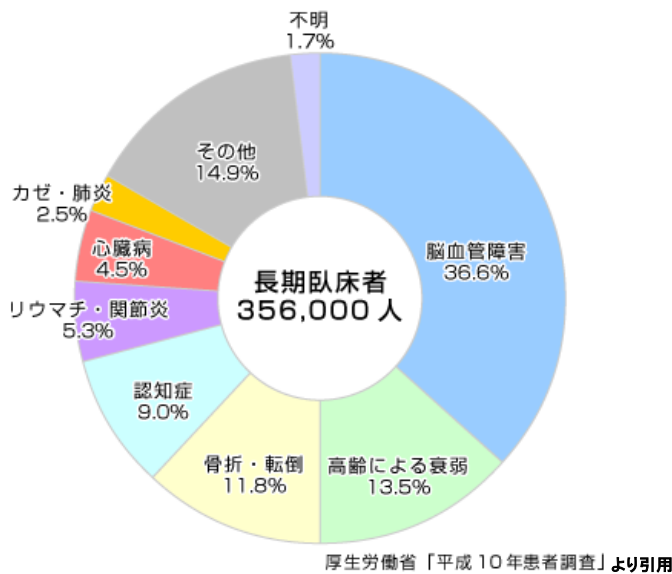
しかし一方で、本邦における平成 17 年度の死因の統計 (Fig. 3) を見ると、虚血性心疾患や脳血管障害が約 3 分の 1 もの割合を占めていることが分かる。

Fig.3 本邦における死亡原因の割合



更に、長期臥床を強いられる原因疾患として脳血管障害が約4割を占めるという厚生労働省の報告 (Fig. 4) もある。

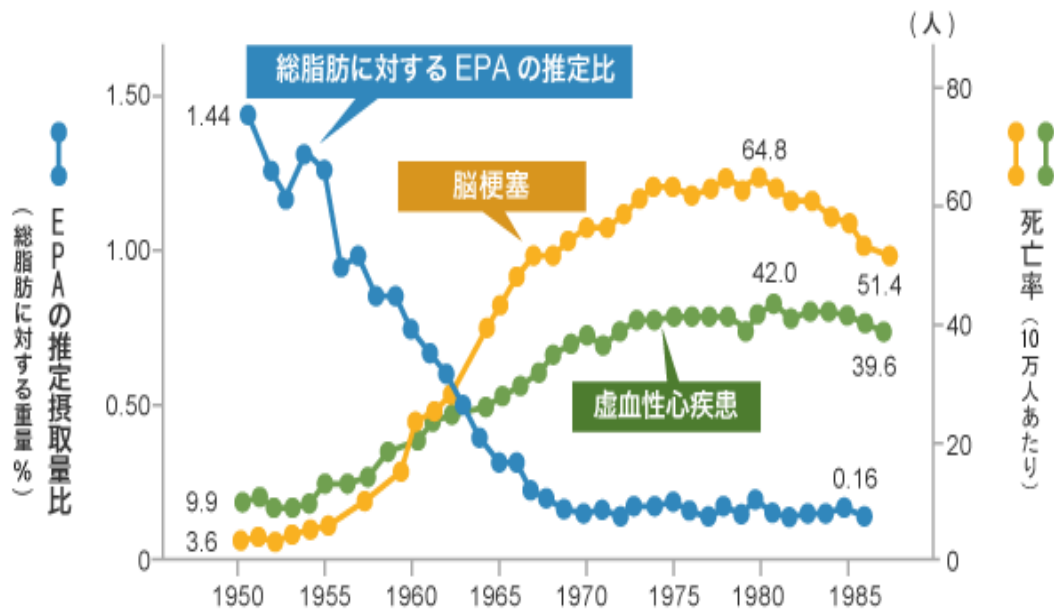
Fig.4 本邦における「寝たきり」の原因の割合



歴史的に見ても、日本では食生活の欧米化等に伴い魚の摂取量が年々減少しているが、この動きと対称的に虚血性心疾患や脳梗塞による死亡数が増加している (Fig. 5)。



Fig.5 EPA摂取量と動脈硬化性疾患死亡率



厚生統計協会:国民衛生の動向, 厚生指標 36:48.1989より引用

こうした流れを受け、1990年代に入り、PUFAの一種であるEPAが高脂血症治療薬として開発され、臨床応用されるに至った。

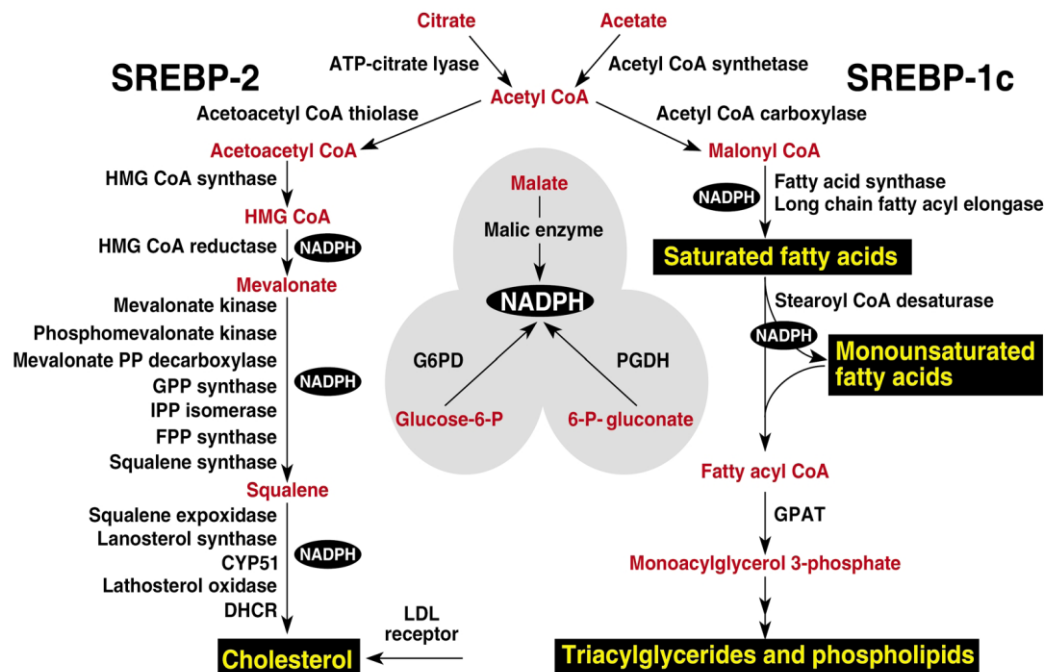
その後、日本人の高脂血症患者における高純度EPA製剤の長期投与による冠動脈イベントの発症抑制効果（1次予防および2次予防）を検討するため、世界で初めての大規模無作為化比較試験 Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS) が1996年から実施された。結果、冠動脈疾患の1次及び2次予防に対してEPAが有用であることが判明し、高中性脂肪血症管理の重要性がより広く認識されるようになった（6）。

このように動脈硬化性疾患との関連が知られる一方で、本来コレステロールや脂肪酸は、生体の維持に重要な働きを担っている。コレステロールは脳や副腎を始め各臓器に存在して細胞膜の主要成分となり、副腎皮質ホルモンや性腺ホルモンの原料にもなる。脂肪酸は骨格筋などのエネルギー源として $\beta$ 酸化に利用されたり、褐色細胞組織では熱産生に利用されたりもする。特にコレステロールは、1980年代後半より研究が進み、細胞内で一定の含量を維持する繊細な調整がなされていることが判明した。

すべての細胞は、アセチル CoA を出発物質として、30 段階近くの酵素反応を介してコレステロールを合成することが出来る (Fig. 6) (7)。それと同時に、細胞は細胞膜表面に LDL (low density lipoprotein) 受容体を発現し、血液中の LDL を取り込み、そこに含まれるコレステロールを細胞外から獲得することも出来る。この取り込み経路により、細胞がコレステロール供給過多の状態になると、フィードバック機構が働き、合成や取り込みが抑制され、細胞内コレステロール量は減少する。このフィードバックは主として転写レベルで行われ、コレステロール合成の初期を触媒するヒドロキシメチルグルタリル CoA (HMG-CoA) 合成酵素や還元酵素、更に LDL 受容体の mRNA 量は、細胞内コレステロール量と連動を示す。この機構を明らかにする目的で、これら遺伝子の 5' 上流域に存在するコレステロールによる転写制御に応答するシスエレメントである SRE (sterol regulatory element) が同定され、それに結合する転写因子の精製が進められた。そして 1993 年、脊椎動物の肝臓における脂肪酸・トリグリセ

リド・コレステロール合成を制御する転写因子として、SREBP (sterol regulatory element-binding protein) の存在が判明した (8)・(9)。

Fig.6 脂質代謝に関する諸酵素

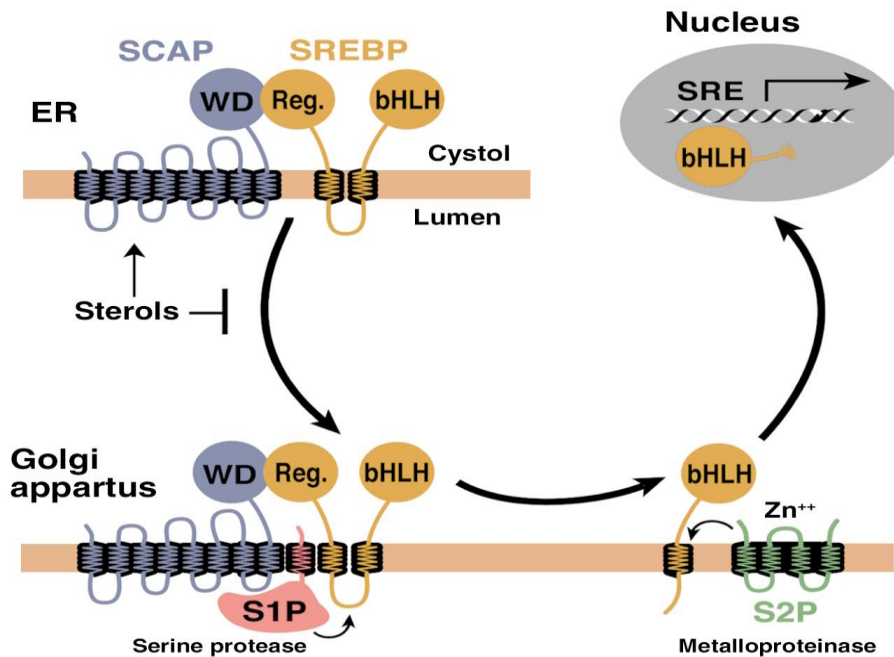


文献(7)より引用

SREBP は、bHLH-Zip(basic-helix-loop-helix-leucine zipper)型の転写因子であり、小胞体膜に2回膜貫通型の前駆体タンパクとして存在する (Fig. 7) (7)。この時 SREBP は、C末端同士で SCAP(SREBP cleavage-activating protein)と結合し複合体を形成しており、この SCAP がコレステロールセンサーとして機能する (10)。

なお、SCAP は8回膜貫通領域を持ち、C末端側を細胞質に突き出す形で、主に小胞体膜上に存在する。SCAP の解析の結果、その一次配列を解析すると、コレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素等に見られる SSD(sterol sensing domain)が見出された (11)。

Fig.7 SREBPの分子動態（切断による活性化）



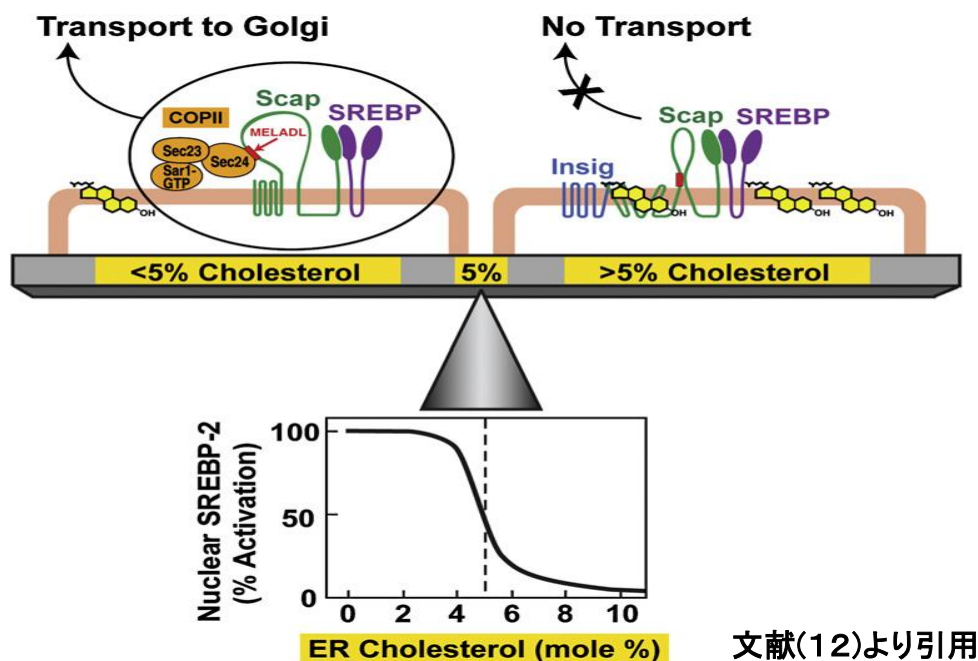
文献(7)より引用

小胞体膜中のコレステロール含量は細胞膜等に比べ少ないことが分かっているが、この量がモル比で5%を超えている場合は、SSDにコレステロールが結合し、構造変化したSCAPをInsig (insulin inducing gene)が認識し、三量体を形成する (Fig. 8)

(12)。このSCAPを介してSREBPも小胞体上に留められるため、活性化されない。一方、コレステロール含量が5%を下回ると、三量体の形成は抑制され、MELADLという配列を介してSCAPがCop II (coat protein II)タンパクに結合することで、SCAP/SREBP複合体がゴルジ体へ輸送される (13)。

ゴルジ体では膜結合部位周辺でタンパク分解酵素 (S1P、S2P) によって2か所の切断を受けると、N末端側が遊離し、核内へ移行し、転写因子として働く (Fig. 7) (7)・(Fig. 8) (12)。

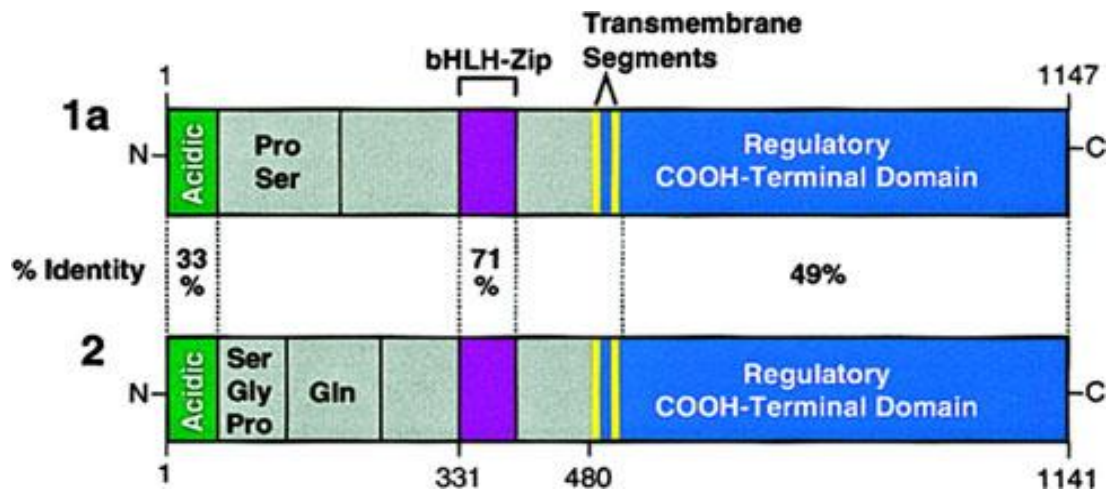
Fig.8 小胞体膜コレステロール含量による  
SREBP活性化の調節機構



文献(12)より引用

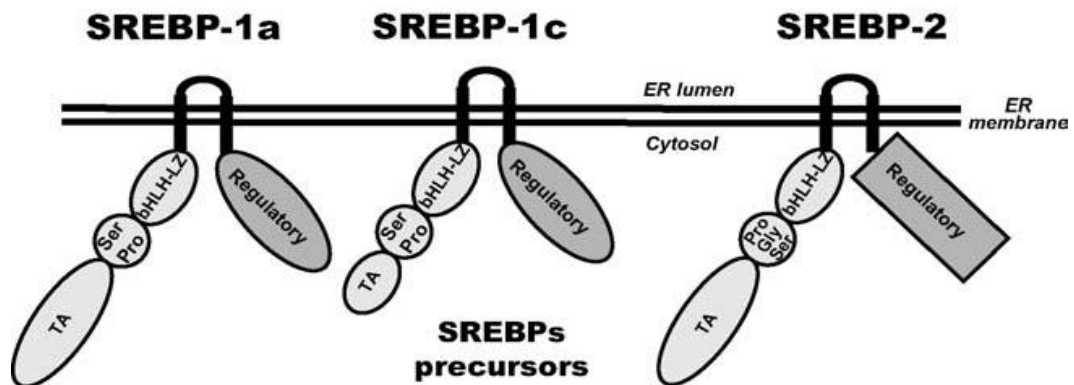
現時点で SREBP ファミリーとして、2 種類の遺伝子にコードされた SREBP-1 と SREBP-2 が知られている (Fig. 9) (14)。SREBP-1 には、開始コドンを含むエキソン 1a と、そこから 14kb 下流の同じく開始コドンを含むエキソン 1c から、スプライシングの違いにより生じる 2 種類のスプライシングアイソフォームが存在する (Fig. 10) (15)。その結果、SREBP-1a と SREBP-1c は N 末端側が異なり、SREBP-1a に比べて、SREBP-1c は 24 アミノ酸残基が欠落している。転写活性化領域が短い分、SREBP-1c は転写因子活性が弱い。また、これらの発現割合は細胞毎に異なっている。肝臓などの分化した組織の細胞では SREBP-1c と SREBP-2 が主要なアイソフォームであり、SREBP-1a は培養細胞や増殖が活発な細胞での主要なアイソフォームである (16)。

Fig.9 SREBP-1とSREBP-2の配列比較



文献(14)より引用

Fig.10 小胞体膜上のSREBP-1とSREBP-2



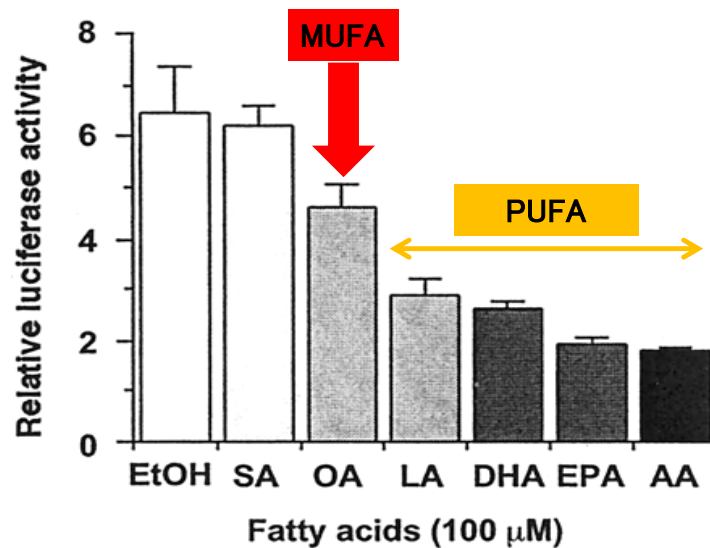
文献(15)より引用

興味深いことに、SREBP-1 と SREBP-2 は、比較的高いアミノ酸相同性を有しているにも関わらず (Fig.9) (14)、それぞれ固有の働きを担う (SREBP-1c は脂肪酸やトリグリセリドの合成、SREBP-2 はコレステロールの合成、SREBP-1a は脂肪酸・コレステロールの両方の合成を制御する) ことが判明してきた。

具体的には、SREBP-1 欠損マウスでは摂食による中性脂肪合成系の遺伝子発現誘導が顕著に低下しており、血中中性脂肪値も低いことが報告された (17)。次に PUFA やそれを豊富に含む魚油を投与したマウスの肝臓では、SREBP-1 の核内活性型タンパク質量が顕著に減少する一方、SREBP-2 は全く影響を受けないことが判明した (18)。さらに、切断活性化が不要な核型 SREBP-1c をトランスジーンとして発現したマウスに PUFA ないし魚油を投与したところ、このマウスでは核型 SREBP-1 タンパク質量は PUFA 投与の影響を受けなかった。このことから、PUFA による核型 SREBP-1 タンパク質量低下の作用機序として、核型 SREBP-1 タンパクの分解促進によるものではなく、膜結合型の前駆体タンパク質の切断の過程で行われている可能性がもっとも高いと推定された。加えて、同報告では、PUFA で影響を受けないトランスジーンを発現したジェニックマウスでは、SREBP-1 下流の中性脂肪合成系遺伝子に PUFA の抑制効果が見られず、PUFA の抑制効果は SREBP-1 の抑制を介したものであることも証明された (18)。次にその機序を更に解明をするため、SREBP-1 の切断による活性化を定量するアッセイ系の開発が取り組まれた。当初、培養細胞での実験結果では、PUFA に特異的であるはずの SREBP-1 抑制が 1 価の不飽和脂肪酸においても認められるという問題が生じた (Fig. 11) (19)。しかし、生体 (マウス肝臓) においてはそうした問題は生じず、PUFA に特異的に SREBP-1 の抑制が認められた (Fig. 12) (18)。つまり、SREBP に対する PUFA の作用を検討するためには、培養細胞ではなく、マウス肝臓を用いた系を確立する必要があると考えられた。そこで我々は、生きたマウスの肝臓で評価出

来るアッセイ系を用いることとし、IVIS (in vivo imaging system) (Fig. 13) で評価する系を構築した。

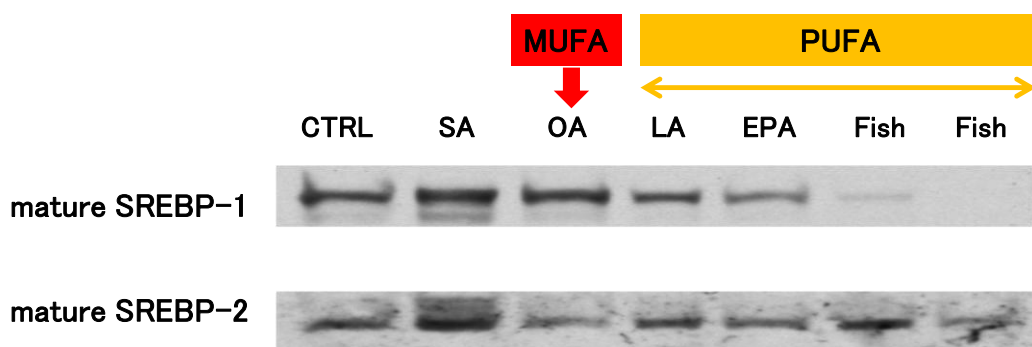
**Fig.11 培養細胞における  
1価不飽和脂肪酸によるSREBP-1の抑制**



培養細胞において、PUFAに特異的であるはずのSREBP-1の抑制が、なぜか1価不飽和脂肪酸(OA: oleic acid)においても認められた。

文献(19)より改変

**Fig.12 生体(マウス肝臓)における  
1価不飽和脂肪酸のSREBP-1に対する影響**



文献(18)より改変

一方、生体(マウス肝臓)においては、培養細胞の結果(Fig. 11)と異なり、PUFAに特異的にSREBP-1の抑制が認められた。

そのため、SREBP-1に対するPUFAの作用を検討する為には、in vitroではなく、in vivoにおける実験系を確立する必要が生じた。



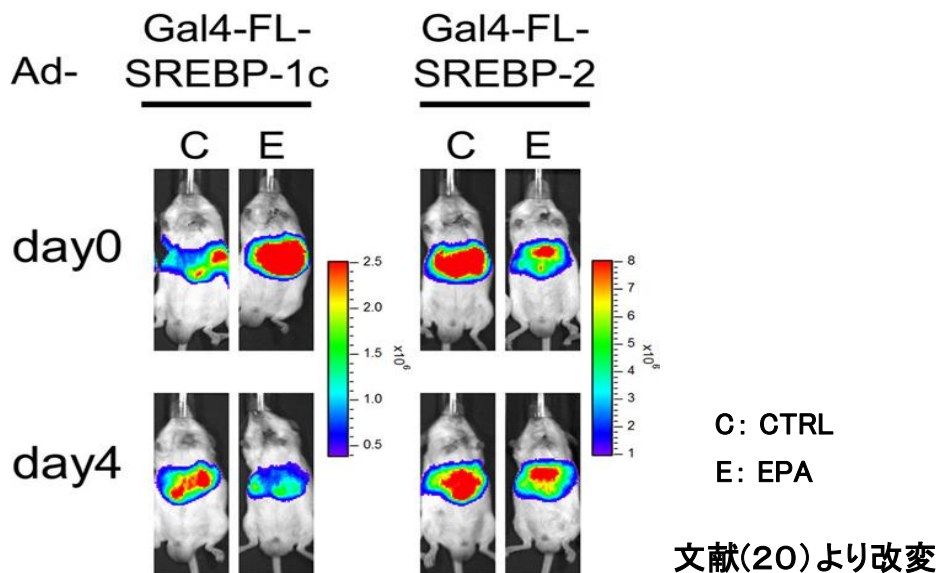
Fig.13 in vivo imaging system (IVIS)



Xenogen社 HPより引用

具体的には、アデノウイルスで肝臓へ導入した切断活性評価のためのルシフェラーゼレポーターの定量を IVIS で行うことにより、切断活性を測定した (in vivo Ad-luc 解析法)。その結果、PUFA は SREBP-1 切断活性を特異的に抑制し、SREBP-2 に対しては抑制しないことが判明した (Fig. 14) (20)。

Fig.14 IVISを用いたPUFAによるSREBP切断活性の評価



我々のグループの先行研究において、PUFAがSREBP-1の切断活性を特異的に抑制する一方で、SREBP-2の切断活性は抑制しないことが判明した。

しかし、PUFA が選択的に SREBP-1 の切断を抑制することの詳細な機序は不明のままであった。そこで本研究では、転写促進因子の改変を行いレポーター遺伝子の発現を安定化させる工夫を凝らしつつ、SREBP-1 と SREBP-2 のハイブリッド分子などを作成し、その特性を評価することで、PUFA による SREBP-1 特異的な切断活性化抑制の分子メカニズムを調べたため、ここに報告する。

## 実験方法

### (1) 実験材料

エイコサペンタエン酸 (EPA) エチルエステル (95%純度) は持田製薬 (株) から供与された。エイコサペンタエン酸 (EPA) とドコサヘキサエン酸 (DHA) の混合製剤 (EPA 約 49%、DHA 約 40%) は武田製薬 (株) から供与された。High-Sucrose fat-free diet (カゼイン 20%、シュクロース 70%、セルロースパウダー 2.7%、ミネラル混合 5%、ビタミン混合 2%、DL-メチオニン 0.3%) はオリエンタル酵母 (株) から購入した。

### (2) 実験動物および食餌

動物の飼育は東京大学動物施設の規則に従った。5~7 週令の雄の ICR マウス (25~34g) は三協ラボサービス (株) より購入し、最低 4 日間以上、飼育環境に順応させてから実験に用いた。すべてのマウスは、12 時間毎の明暗周期の飼育室で、一定の室温 (約 23℃) にて、自由に餌と水を与えられた。食事は酸化を避けるため、毎日新たに与えた。実験に際しては、各グループのマウスは、自由摂食状態で、主に明期の時間帯に解析された。

### (3) 肝臓からの核タンパク質の抽出

マウスの肝臓からの核タンパク抽出は既報に従った (21)。マウス肝臓 (1 匹あたり 0.5g を使用) を、それぞれ 5ml の緩衝液 A (10mM HEPES pH 7.9、25mM KCl、

1mM Na-EDTA、2M Sucrose、10% glycerol、0.15mM spermine、2mM spermidine、  
1mM phenylmethane-sulfonyl fluoride (PMSF)、2.5  $\mu$ g/ml pepstatin A、2  $\mu$ g/ml  
leupeptin、2.5  $\mu$ g/ml aprotinin、12.5  $\mu$ g/ml ALLN) 中で、ポリトロンにより氷上で  
ホモジェナイズした。同一の条件のマウスが複数いる場合、ホモジェナイズ後に検体  
を混合した。その後、ポッター型ホモジェナイザーでさらに1ストロークのホモジェ  
ナイズを加え、ガーゼで濾し、あらかじめ10mlの緩衝液Aをいれた超遠心チューブ  
の上から静かに重層させた。その後、スウィングローター(SW-28)上で24000rpm 4°C  
にて1.5時間超遠心し、沈澱を0.8mlの緩衝液B(10mM HEPES pH 7.9、100mM KCl、2mM  
MgCl<sub>2</sub>、1mM Na-EDTA、10% glycerol、1mM PMSF、2.5  $\mu$ g/ml pepstatin A、2  $\mu$ g/ml  
leupeptin、2.5  $\mu$ g/ml aprotinin、1mM DTT、12.5  $\mu$ g/ml ALLN)に溶解。さらに0.08ml  
の5M NaClを加え、4°Cにて30分ローテーター上で攪拌してから、89000rpmで4°Cに  
て30分超遠心して得た上清を、核タンパク質抽出液として用いた。

#### (4) ウェスタンブロッティング

(3) で得られたタンパク質の濃度を、ブラッドフォード法にて測定した。50  $\mu$ g  
の核タンパク質抽出物に対し、タンパク質溶液と等量の2×SDS loading bufferを加  
え、99°Cにて3分間熱し、室温まで冷ました。その後、10% SDS-polyacrylamide  
gel(SDS-PAGE)を用いて、Glycine buffer(0.25M Tris、1.92M Glycine、1% SDS)中に  
て電気泳動を行った。20%メタノールを含むGlycine bufferにて、4°C、一晩でゲル

内のタンパク質をメンブレン (Hybond ECL; Amersham Pharmacia Biotech) へトランスファーした。その後、5%スキムミルク (50ml TBS-Tween (0.2%Tween-20 (Santa Cruz)), 2.5g スキムミルク) にてメンブレンをブロッキングし、1次抗体用の抗体を1/1000 希釈し、5%スキムミルクにて2時間メンブレンと反応させた。TBS-Tween にて3回洗浄した後、2次抗体を1/2000 希釈し、5%スキムミルクにて1時間メンブレンと反応させた。さらにTBS-Tween で3回洗浄した後、ECL Western Blotting Detection System (Amersham Pharmacia Biotech) で反応させ、X線フィルム (XAR-5film (Eastman Kodak Co)) に現像し、バンドを検出した。フィルムはXAR-5film (Eastman Kodak Co) を用いた。ここで用いた1次抗体である、うさぎポリクローナル抗マウス SREBP-1 (931 抗体) は、島野らによって作成されたものである (22)。

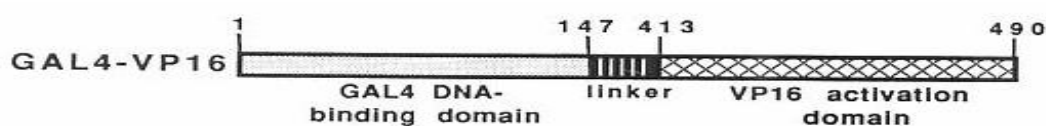
## (5) 自作のコンストラクトの作成

### (5) -① GAL4-minimumVP16の作成

#### <step1 activation domainのアミノ酸配列の確認>

酵母の転写因子 GAL4 は、N 端が DNA 結合ドメインで、C 端が酸性アミノ酸から成る活性化ドメインである。一方、単純ヘルペスウイルスの転写活性化因子 VP16 は、DNA 結合能は無いが、強力な転写活性化ドメインを持つ。従って、GAL4 の DNA 結合領域と VP16 の転写活性化領域を持つ GAL4-VP16 は、GAL4 部位に結合しながら VP16 特有の強い転写活性化を発揮することで知られる (Fig. 15) (23)。

**Fig.15 GAL4 DBD-VP16の配列**



文献(23)より引用

先行研究 (20) ではVP16が使用された。しかし、VP16は強力な転写活性化因子であるが、細胞毒性が懸念されてきた (24)。一方で、VP16転写活性化ドメインはPhe442を残存させていればアミノ酸の一部を削除した最小領域であっても転写活性は低下せず、最小領域の2回の繰り返し反復配列で転写活性が上昇した (25) ことや、最小領域 (minimum VP16) まで削減した転写活性化因子は宿主細胞への毒性低減が期待された (26) こと、これらにより非発現誘導時に残存するTRE配列への結合活性が抑えられ、宿主細胞への毒性が低減し、哺乳類細胞での発現と安定性が期待される (26) という既報をふまえ我々の実験系では転写活性化因子VP16を改変することとした。

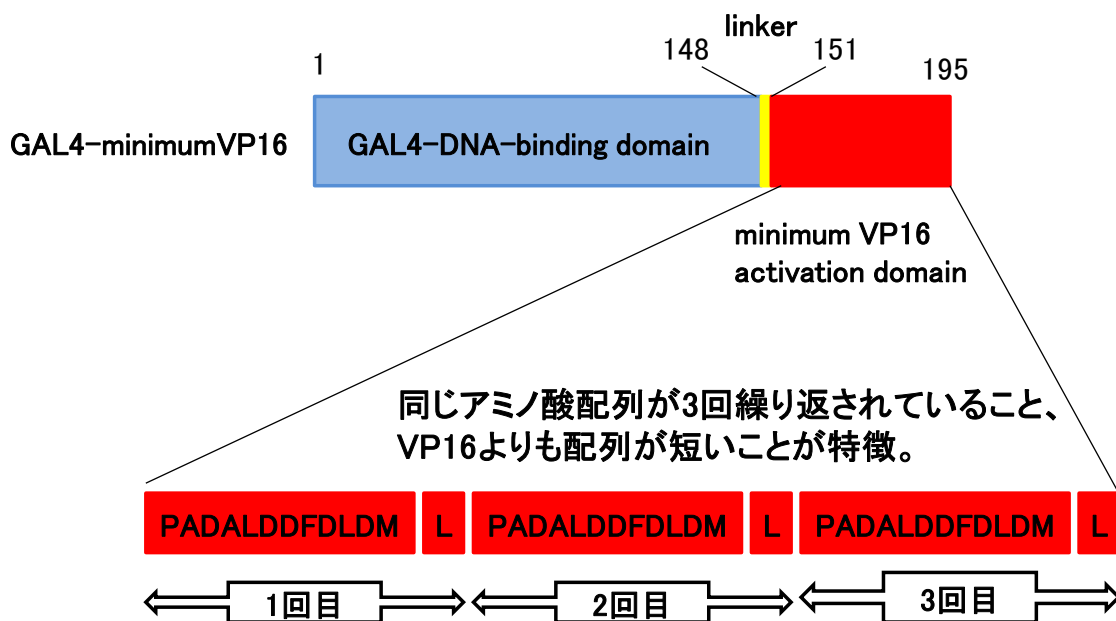
具体的には、activation domainを最小領域の3回反復配列に置き換えた minimumVP16

(以下、minVP16) を後述のように自作した。この改変した転写活性化因子である

minVP16のアミノ酸配列の概略図を (Fig. 16) に示した。

Fig.16 GAL4 DBD–minimumVP16の作成

(step1) activation domainのアミノ酸配列の確認



<step2 PCRで作成する配列の設計> (Fig. 17)

GAL4-minVP16 の5´側には順に、HindIII (AAGCTT)、Sal I (GTCGAC)、Kozak (GCCACC)、開始コドン (ATG)、Myc-tag (GAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG)を付加した。また、3´側には順に Sfi I サイト (GGCCAAATCGCC GGCCATAAGGGCC)および Xba I (TCTAGA)を付加した。このような PCR で得られた GAL4-minVP16 の両端は HindIII と Xba I で囲ま

れているため、HindIIIと Xba I で切り出しを行い、pCDNA3.1 (+) (Invitrogen)や pENTR4 (Invitrogen)内に挿入出来るようにした。

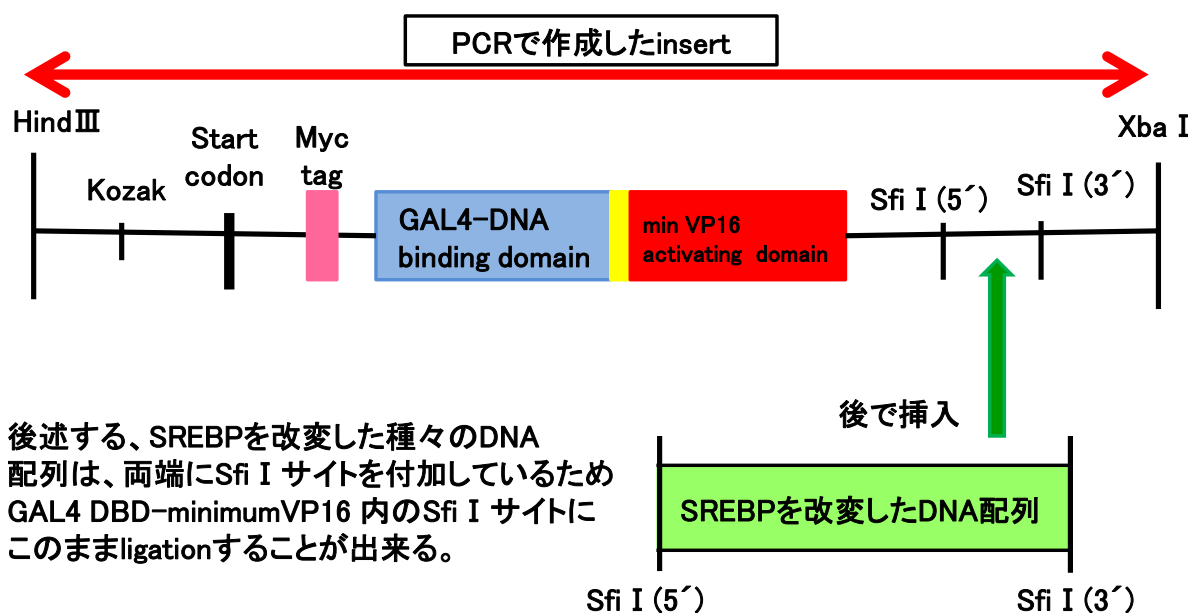
なお (5) -②で後述する SREBP の配列を改変した各種 DNA 配列は、5´側及び3´側を Sfi I サイトで挟み込むように設計し、PCR (polymerase chain reaction)を行った。

これにより、Sfi I サイトに囲まれたまま自作の DNA 配列をそのまま切り出し、

GAL4-minVP16 内の Sfi I サイトにそのまま挿入出来るよう工夫した。

### Fig.17 GAL4 DBD-minimumVP16の作成 (step2) PCRで作成する配列(insert)の設計

下記のように設計し、PCRを行い、HindIIIとXba I で切り出したinsertを、pCDNA.3.1(+ )やpENTR4に挿入した。





< GAL4-minVP16 の具体的な配列 >

上述の、HindIII と Xba I で囲まれた GAL4-minVP16 の全配列を下記に示した。

(青下線部は GAL4-DNA binding domain、赤下線部が minVP16 に相当する)

HindIII Sal I Kozak startcodon Myc-tag

AAGCTT GTCGAC GCCACC ATG GAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTG

ATGAAGCT ACTGTCTTCT ATCGAACAAG CATGCGATAT TTGCCGACTT AAAAAGCTCA AGTGCTCCAA

AGAAAAACCG AAGTGCGCCA AGTGTCTGAA GAACAACCTGG GAGTGTCGCT ACTCTCCCAA

AACCAAAAGG TCTCCGCTGA CTAGGGCACA TCTGACAGAA GTGGAATCAA GGCTAGAAAG

ACTGGAACAG CTATTTCTAC TGATTTTTCC TCGAGAAGAC CTTGACATGA TTTGAAAAT

GGATTCTTTA CAGGATATAA AAGCATTGTT AACAGGATTA TTTGTACAAG ATAATGTGAA

TAAAGATGCC GTCACAGATA GATTGGCTTC AGTGGAGACT GATATGCCTC TAACATTGAG

ACAGCATAGA ATAAGTGCGA CATCATCATC GGAAGAGAGT AGTAACAAAG GTCAAAGACA

GTTGACTGTA TCGCCG GAATTCCCAGCCGACGCCCTTGACGATTTTGACCTTGACATGCTCCCT

GCAGATGCCCTTGACGACTTTGACCTTGATATGCTGCCTGCTGACGCTCTTGACGATTTTGACCT

Sfi I

Xba I

TGACATGCTCGAAGGATCCTTCGACCA GGCCAAATCGGCC GGCCATAAGGGCC TCTAGA

<GAL4-minVP16 作成の PCR 用プラスミドテンプレート>

筑波大学 武内謙憲先生より頂戴した pMvector の GAL4 下流に存在する MCS 内の EcoR I -BamH I 間に minVP16 を挿入したプラスミド (unpublished) を利用した。このプラスミドは、下記のように作成された。まず、rtTA (reverse tetracycline-controlled TransActivators) を発現させる uPHD172-1neo 内の BamH1 サイトに minVP16 の配列が挿入されたプラスミドをテンプレートとし、PCR を行って、minVP16 の両端に EcoR I -BamH I サイトを付加した。その PCR product を T-vector にクローニングし、EcoR I - minVP16-BamH I フラグメントを切り出し、pMvector の GAL4 下流に存在する MCS 内の EcoR I -BamH I 間に挿入した。

<GAL4-minVP16 作成の PCR 用 primer>

下記の 2 種類を自作した。

Sense Primer

AAGCTTGTCGACGCCACCATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGATGAAGCTACTGTCTTCTATCGAA

CA

Antisense Primer

TCTAGAGGCCCTTATGGCCGGCCGATTTGGCCTGGTCGAAGGATCCTTCGAGC

#### <GAL4-minVP16 作成の PCR 条件>

PCR の際は、AmpliTaQ DNA Polymerase (Invitrogen) を利用した。最初に 94°C 5 分を 1 サイクル、次に 94°C 1 分→60°C 1 分→72°C 1 分を 35 サイクル、最後に 72°C 10 分を 1 サイクル行った。

#### <GAL4-minVP16 のクローニング>

PCR product をゲルで泳動し、およそ 667bp の場所に DNA が存在することを確認の上、TAcloning を行った。その後、Plasmid Midi Kit (QIAGEN) を用いて DNA midipreparation を行い、HindIII と Xba I で十分な時間切断し、HindIII-GAL4-minVP16-Xba I フラグメントを切り出した。

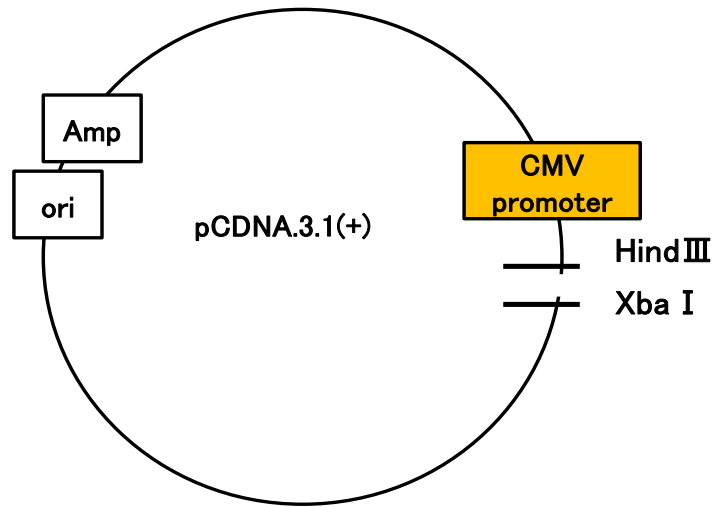
#### <GAL4-minVP16 を挿入する vector の作成>

今回我々は 2 種類の vector (pCDNA3.1(+) および pENTR4) に HindIII-GAL4-minVP16-Xba I フラグメントを挿入するため、下記のように vector の作成を行った。

##### ① pCDNA3.1(+) (Invitrogen) の作成

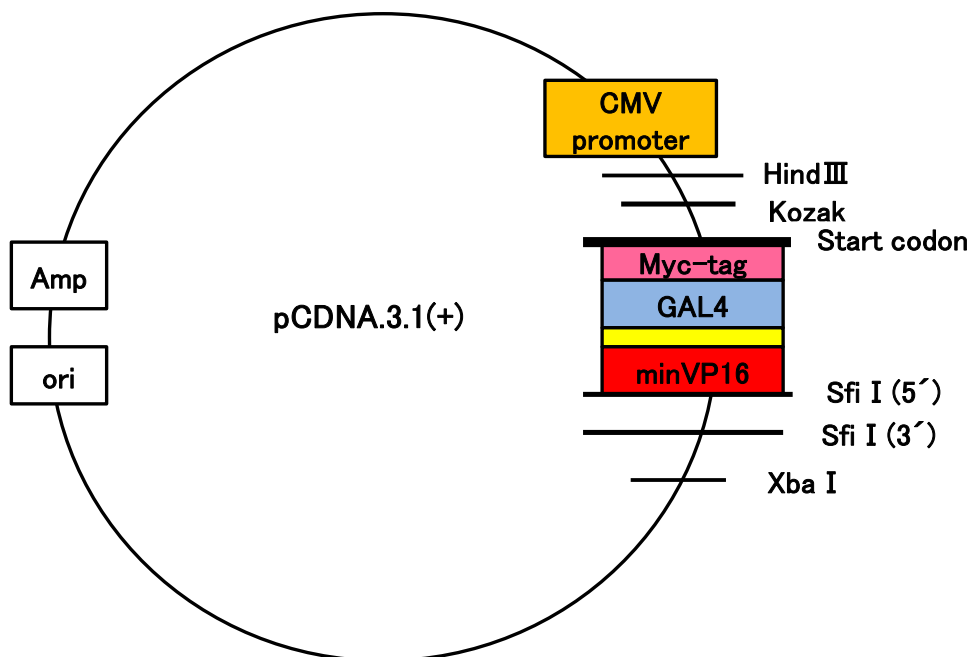
pCDNA3.1(+) (Invitrogen) に関しては、十分な時間をかけた制限酵素処理により、MCS 内の HindIII と Xba I で開口した (Fig. 18)。その後、切り出した HindIII-GAL4-minVP16-Xba I フラグメントを挿入した (Fig. 19)。

Fig.18 GAL4 DBD–minimumVP16の作成 (step3-1)  
vectorの作成 (pCDNA.3.1(+))版)



MCS内のHindⅢとXba I でpCDNA.3.1(+)を開口してvectorを作成し、Insertである(HindⅢとXba I で囲まれた)GAL4 DBD–minimumVP16を挿入した。

Fig.19 全体図  
(pCDNA.3.1(+))にGAL4 DBD–minimumVP16を挿入したプラスミド)



## ② pENTR4 (Invitrogen) の作成

pENTR4 (Invitrogen) に関しては、ATG を含む NCO I (CCATGG) 及び ccdB を消去した pENTR4 (NCO1(-)、ccdB (-)) を筑波大学 武内謙憲先生より頂戴した。HindIII-GAL4-minVP16-Xba I フラグメントを挿入するために、pENTR4 (NCO1(-)、ccdB (-)) に HindIII を付加する必要があるため、まずは下記の step で、MCS 内の Sal I (GTCGAC) および BamH I (GGATCC) 内に HindIII を挿入した。

(HindIII 挿入の step) (Fig. 20)

(Step1)

まずオリゴマー (sense、antisense) を用いて、Sal I - HindIII - BamH I を作成した。

Sense : AAA GTC GAC AAG CTT GGA TCC TTT

Antisense : AAA GGA TCC AAG CTT GTC GAC AAA

これをそれぞれ 13.5  $\mu$ l (10  $\mu$ M) ずつ作成し、H Buffer (TaKaRa)

(500mM Tris-HCl (pH7.5)、100mM MgCl<sub>2</sub>、10mM Dithiothreitol、1000mM NaCl) 3  $\mu$ l

と氷上で混合した。95°C 2分→72°C 1分、その後は 22°C まで約 30 分間かけて温度

を下げる条件で PCR を行い、得られた PCRproduct は 80% イソプロパノールおよび

100% エタノールを用いて精製した。

(Step2)

次に pENTR4 (Nco1(-)、ccdB (-)) を Sal I および BamH I で十分な時間をかけて制限酵素処理を行った。

(Step3)

(Step2) で Sal I および BamH I で開口した pENTR4 (Nco1(-)、ccdB (-)) に、(Step1) で得た Sal I - HindIII-BamH I を挿入した。

(Step4)

(Step3) で得られた pENTR4 (Nco I (-)、ccdB (-)) に HindIII を挿入した vector を、今度は十分な時間をかけて HindIII と Xba I で制限酵素処理を行い、最終的に Hind III- GAL4-minVP16- Xba I フラグメントを挿入した (Fig. 21)。

**Fig.20 GAL4 DBD-minimumVP16の作成 (step3-2)  
vectorの作成 (pENTR4版)**

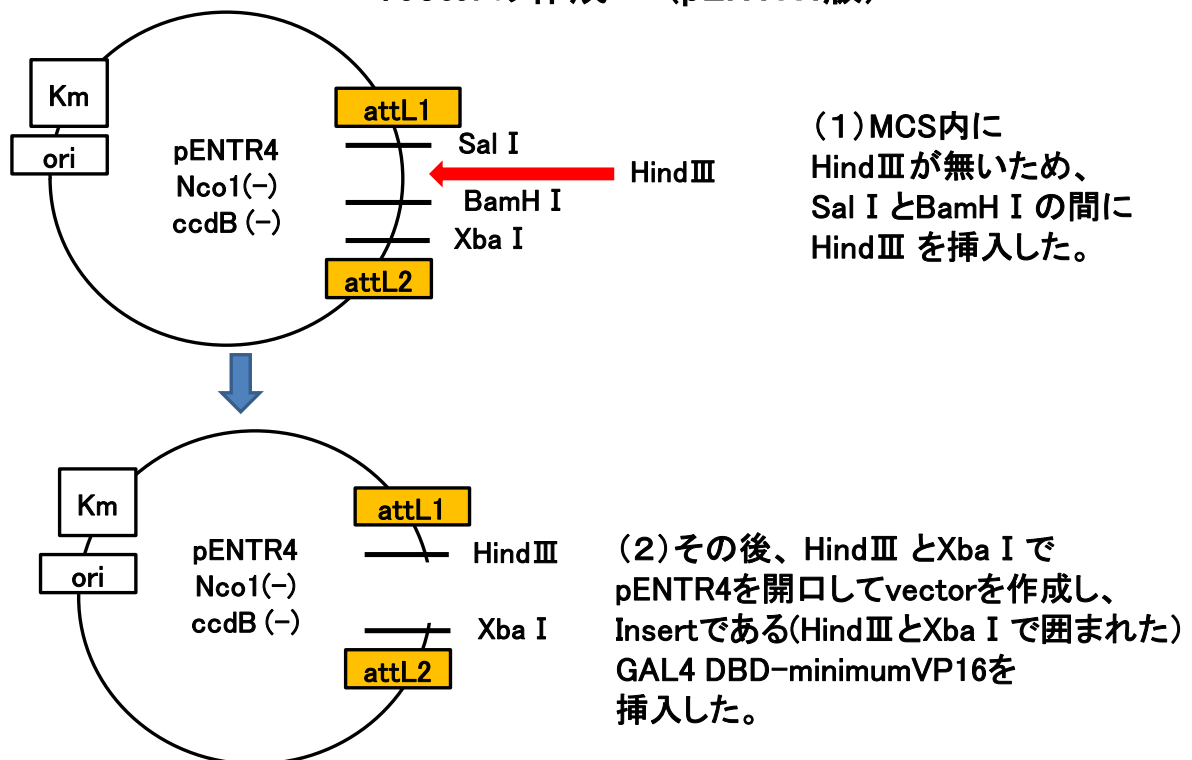
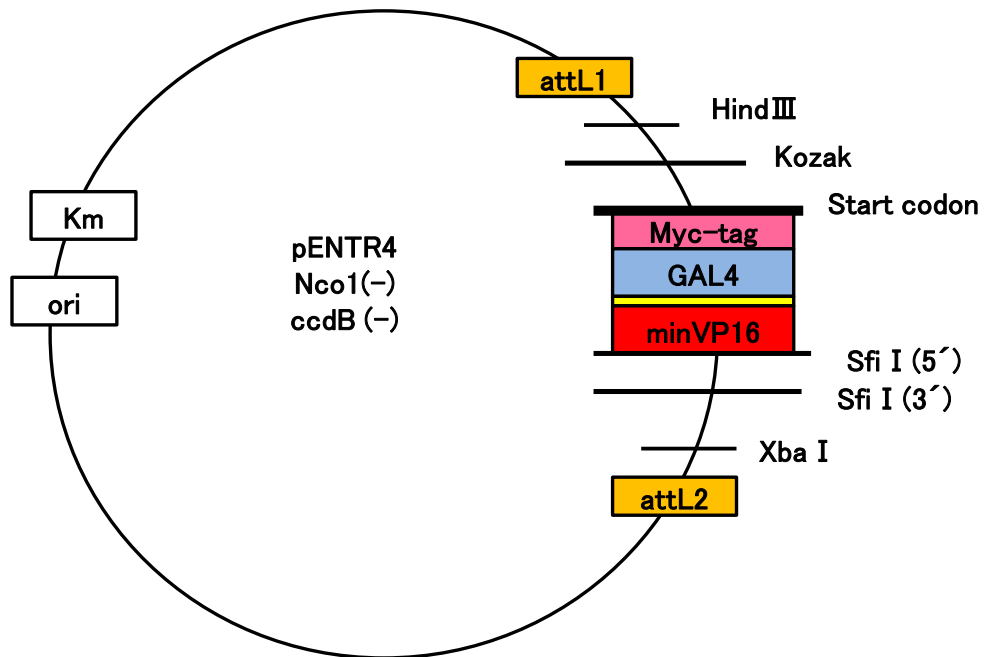


Fig.21 全体図  
 ( pENTR4にGAL4 DBD-minimumVP16を挿入したプラスミド)



このようにして、pCDNA3.1(+)+GAL4-minVP16や、pENTR4+GAL4-minVP16が完成した。

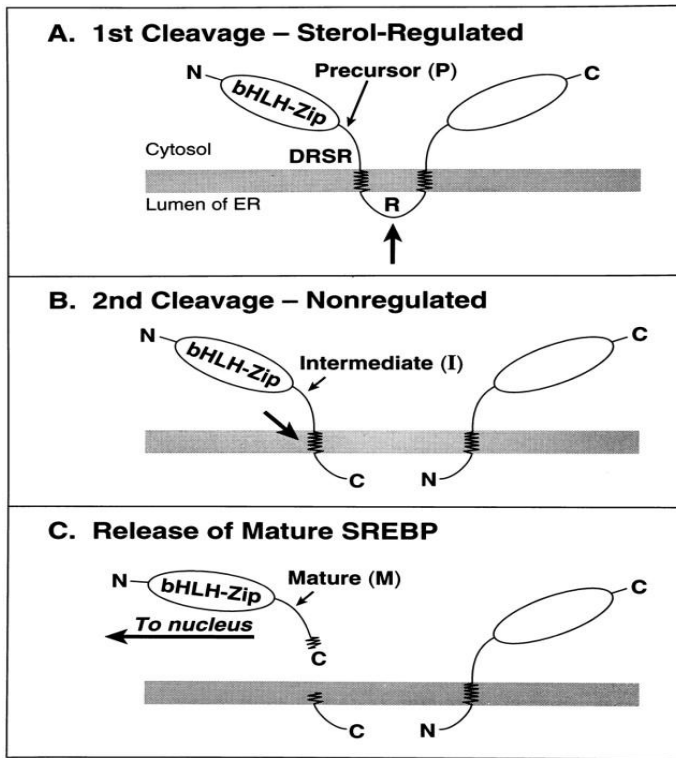
次に、SREBPの転写因子としての特性（SREBP上のPUFA応答性ドメインの絞り込み）を配列の違いから評価するために、下記のようにSREBPの配列を様々な改変したDNAの作成を行った。これら自作のDNA配列は、GAL4-minVP16のSfi Iサイト内に挿入出来るように、両端をSfi Iサイトに囲まれるように設計した。

(5) -② SREBP配列を改変したDNA配列の作成

2段階に及ぶSREBP切断機構は、小胞体内腔に突出するループのほぼ中央に存在するSite-1でSREBPを切断するプロテアーゼにより開始される (Fig. 22) (27)・(Fig. 23)

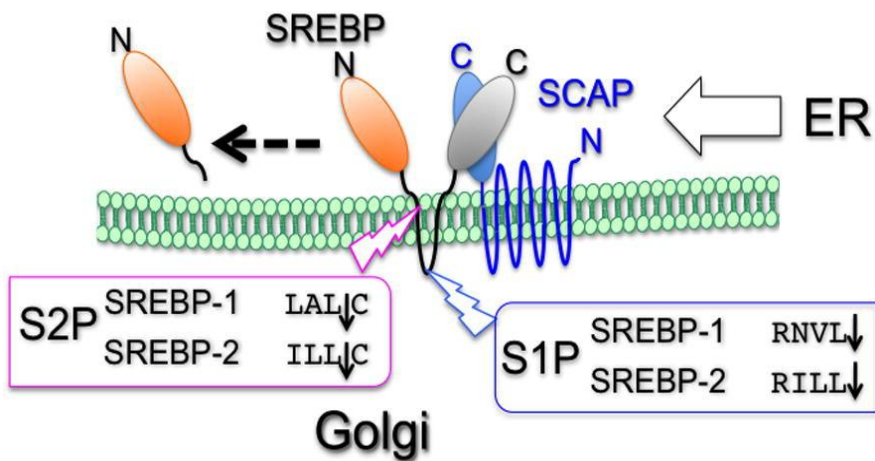
(28)。

Fig.22 SREBPの2段階切断機構



文献(27)より引用

Fig.23 SREBPの2段階切断部位

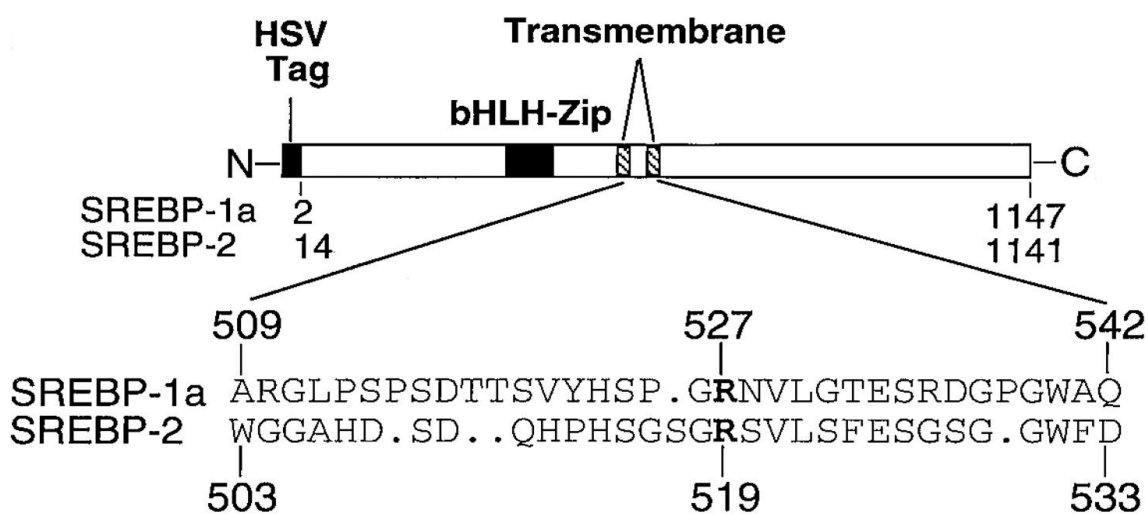


文献(28)より引用



Site-1プロテアーゼ (S1P) (サブチリシン様セリンプロテアーゼ) の切断の際、特にR (アルギニン) はS1Pの認識部位として重要である (Fig. 24) (29)。この切断により、SREBPはNH2末端部とCOOH末端部に二分断されるが、それらはまだ膜に結合したままである。

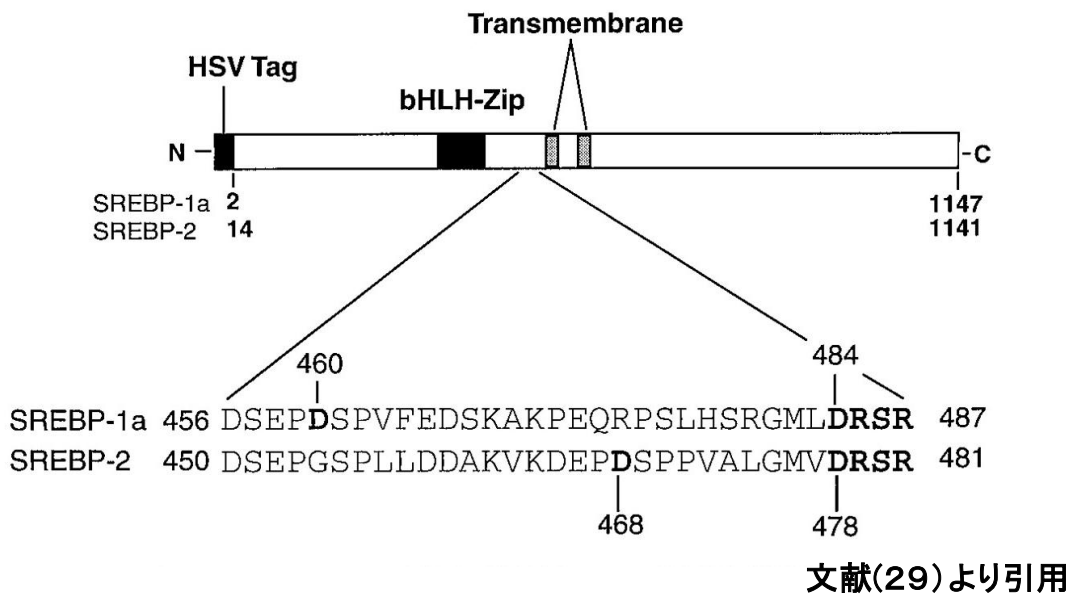
Fig.24 SREBPの2段階切断部位 (S1Pの切断)



文献(29)より引用

この後すぐにSite-2プロテアーゼ (S2P) (メタロプロテアーゼ) によってNH2末端部の中間体SREBPは、疎水性アミノ酸から構成される第1膜貫通シーケンスの内側のL (ロイシン) -C (システイン) 結合で切断を受ける。S2P切断は、第1膜貫通シーケンスのすぐNH2末端側にあるDRSRの4アミノ酸残基を必要とする (Fig. 25) (29)。このようなS1P及びS2Pの2段階の切断により、SREBPは最終的な成熟型SREBPに変換され、小胞体膜から細胞質へと切り離され、即座に核へと移行する。そこでSREBPは脂質代謝に関与する標的遺伝子のプロモーターに結合し、転写を活性化する。

Fig.25 SREBPの2段階切断機構 (S2Pの切断)



今回我々は、SREBP上のPUFA応答性ドメインの絞り込みを行う目的で、human SREBP全長のみならず、NH2末端部やCOOH末端部の一部を削除した分子や、SREBP-1とSREBP-2を組み替えたhybrid分子等の人工的な配列を有する分子を作成し、それぞれ前述((5)-①)したGAL4-minimumVP16のSfi I サイト内に挿入した。

<SREBP配列を改変した各種DNA配列の呼称について>

まず、呼称について下記に記載する。FLはfull length、RegはC-terminal regulatory domain、NucはN-terminal nuclear partより命名した。右の数字は全長配列におけるアミノ酸数を示す。なお、SREBP-2においては、13アミノ酸部分のメチオニンがKozak配列に囲まれており、転写開始点の重複が生じることを避けるため、NH2末端部の13アミノ酸が除かれた配列を用いた(29)。

●SREBP-1c FL 1-1123

●SREBP-1c Reg 431-1123

●SREBP-1c Reg 431-777

●SREBP-1c Nuc 1-436

●SREBP-1c Nuc 1-777

●SREBP-2 FL 14-1141

●SREBP-2 Reg 450-1141

●SREBP-2 Reg 450-796

●SREBP-2 Nuc 14-460

●SREBP-2 Nuc 14-796

●hybrid N1C2

(N-terminal nuclear partがSREBP-1c(1-518)、C-terminal regulatory domainがSREBP-2(547-1141))

-2(547-1141))

●hybrid N2C1

(N-terminal nuclear partがSREBP-2(14-546)、C-terminal regulatory domainがSREBP-1c

(519-1123))

次に、各々の DNA 配列の概図を (Fig. 26) (Fig. 28) (Fig. 29) に示すとともに、具体的な PCR 方法について下記に示した。全ての PCR の際は Prime STAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa) を用いた。用いた PCR primer をまとめた一覧表を (Fig. 31) (Fig. 33) に示し、PCR 条件をまとめた一覧表も (Fig. 32) (Fig. 34) に示した。

なお、今回我々は最初に SREBP-1c FL 1-1123 及び SREBP-2 FL 14-1141 を作成し、T-vector と TA クローニングを行った。そこで完成した T-vector + SREBP-1c FL 1-1123 や、T-vector + SREBP-2 FL 14-1141 を、他種の DNA 配列作成のための PCR 用プラスミドテンプレートとして用いた。下記に記載したのは、SREBP-1c FL 1-1123 及び SREBP-2 FL 14-1141 を作成する PCR を行った際にプラスミドテンプレートとして用いた、pM vector + GAL4-VP16-SREBP-1c FL 及び pTK-HSV-SREBP-2 FL に関する作成背景である (いずれのプラスミドも、筑波大学 武内謙憲先生より頂戴した)。

(pM vector + VP16-SREBP-1c FL について)

このプラスミドは先行研究 (20) で使用された。まず pM vector の GAL4-DBD の 3' 側の EcoRI-BamHI に、pACT vector から EcoRI-BamHI で切り出した VP16 を挿入した (pM-VP16)。次に、pM-VP16 内の MCS の SalI を ClaI に変更した vector (pM-VP6-ClaI) に、ClaI-XbaI で、SREBP-1c FL を挿入した。ClaI-XbaI を用いた理由は、既報 (29) において pTK-HSV vector に、ClaI-XbaI で SREBP-1c FL が挿入されていたことを活用した。

(pTK-HSV- SREBP-2 FLについて)

このプラスミドは既報 (29) で使用された。まず、pXH4 vectorのKpn I-Sal I からSREBP-2 (316-1141) を切り出した。次にオリゴマー(Not I とKpn I で囲まれた) SREBP-2 (14-351) をPCRで作成し、pXH4 vector内のSREBP-2 (316-1141) とligationを行った。その後、pTK-HSV vectorのSal I (blunted with Klenow fragment)- Not I に、pXH4 vectorのNot I-Sal I で切り出したSREBP-2 (14-1141) が挿入され、pTK-HSV-SREBP-2 FL 14-1141が作成された。

SREBP配列を改変した各種DNA配列の作成においては、(Fig. 30)-(1)で示した通り、自作したSREBP-1c FL 1-1123やSREBP-2 FL 14-1141 (いずれも両端にSfi I を有する) をTAクローニングして得たプラスミドである、T-vector+ SREBP-1c FL 1-1123(「Sfi I 挿入後①」と称する)、T-vector+ SREBP-2 FL 14-1141(「Sfi I 挿入後②」と称する)を PCR用プラスミドテンプレートとして、PCRを行った。

また、2種類の hybrid に関しては他の10種と異なり、megaprimer PCR法を用いた2段階のPCRを経て作成した (Fig. 27)-(1)。本実験では、具体的には (Fig. 27)-(2) で示した様に、PCR で C-terminal regulatory domain 部分のみを作成し、この PCRproduct そのものを megaprimer として使用し、N-terminal nuclear part を含めた全 hybrid 配列をPCRで得た。詳細を下記にも示した。

<hybrid NIC2の作成>

DNA配列を、N-terminal nuclear partが $\delta$ -1c(1-518)、C-terminal regulatory domainが-2(547-1141))となるように設計し、megaprimer PCR法を用いて作成した。

(step1) C-terminal regulatory domain 部分の作成

(1stPCR 用プラスミドテンプレート)

T-vector+ SREBP-2 FL 14-1141 を利用 (「Sfi I 挿入後②」)。

(1st PCR 用 Primer)

Sense Primer : CTGGCTGGGCCAGTGGATGATGCCTACTCTTCTCTTAT

これは hybrid の境目となる部分であり、赤文字は SREBP-1c、黒文字は SREBP-2 の配列となるように設計した。

Antisense Primer : antisense2-①を利用 (Fig. 33)。

(PCR 条件) 98°C 10 秒→60°C 15 秒→68°C 2 分を 35 サイクル行った。

この 1stPCR product を切り出し (これが megaprimer となる、次の 2nd PCR 用プラスミドテンプレート (後述) と 94°C 10 分置き、denature させた。その後、室温で冷まし、2nd PCR に進んだ。

(step2) megaprimer を用いた hybrid 全長の作成

(2nd PCR 用プラスミドテンプレート)

T-vector+ SREBP-1c FL 1-1123 を利用 (「Sfi I 挿入後①」)。

(2nd PCR 用 Primer)

Sense Primer : sense1-①を利用 (Fig. 31)。

Antisense Primer : 1stPCR product そのものを megaprimer として使用。

(PCR 条件) 98°C 10 秒→60°C 15 秒→68°C 4 分を 35 サイクル行った。

以上の 2 段階の PCR により、目的とする hybrid N1C2 の全長配列を得ることが出来た。

hybrid N2C1 に関しても、同様の手順で作成した。

<hybrid N2C1の作成>

N-terminal nuclear partが<sup>Δ</sup>-2(14-546)、C-terminal regulatory domainが<sup>Δ</sup>-1c

(519-1123)となるように、megaprimer PCR法を用いて作成した。

(1stPCR 用プラスミドテンプレート)

T-vector+ SREBP-1c FL 1-1123 を利用 (「Sfi I 挿入後①」)。

(1st PCR 用 Primer)

Sense Primer : GGCTGGTTTGACTGGCTGCTGCCCCAGTGGTCTGGCTG

黒文字は SREBP-2 で、赤文字は SREBP-1c の配列である。

Antisense Primer : antisense1-①を利用 (Fig. 31)。

(PCR 条件) 98°C 10 秒→60°C 15 秒→68°C 2 分を 35 サイクル行った。

この 1stPCR product を切り出し (これが megaprimer となる)、次の 2nd PCR 用プラスミドテンプレート (後述) と 94°C 10 分置き、denature させた。その後、室温で

冷まし、2nd PCRに進んだ。

(2nd PCR用プラスミドテンプレート)

T-vector+ SREBP-2 FL 14-1141 を利用 (「Sfi I 挿入後②」)。

(2nd PCR用Primer)

Sense Primer:sense2-①を利用 (Fig. 33)。

Antisense Primer:1stPCR product そのものを megaprimer として使用。

(PCR 条件) 98°C 10 秒→60°C 15 秒→68°C 4 分を 35 サイクル行った。

以上、2段階のPCRにより、目的とする hybrid N2C1 の全長配列を得ることが出来た。

Fig.26 SREBP配列を改変した各種DNA配列 (hybridの配列)

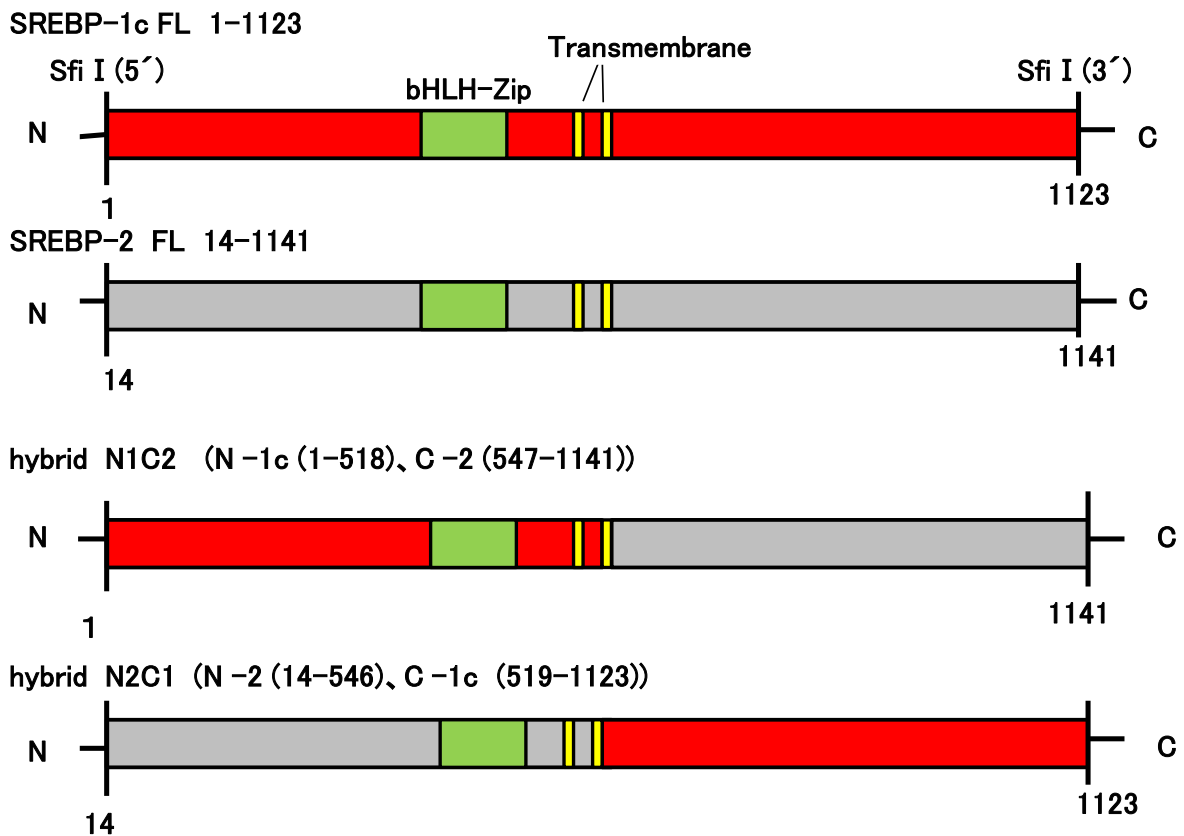




Fig.27-(1) megaprimer法の概図

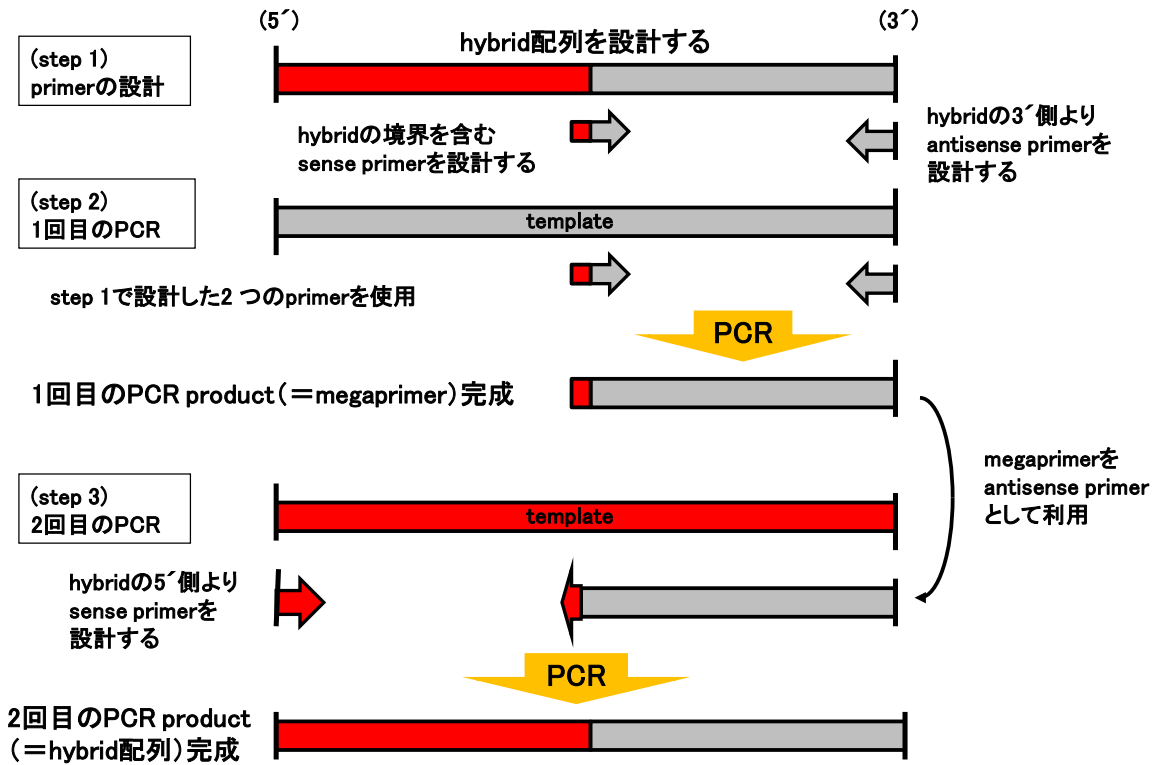


Fig.27-(2) 本研究で用いたmegaprimer法によるhybrid作成例

hybrid N1C2 (N-1c (1-518)、C-2 (547-1141))作成例

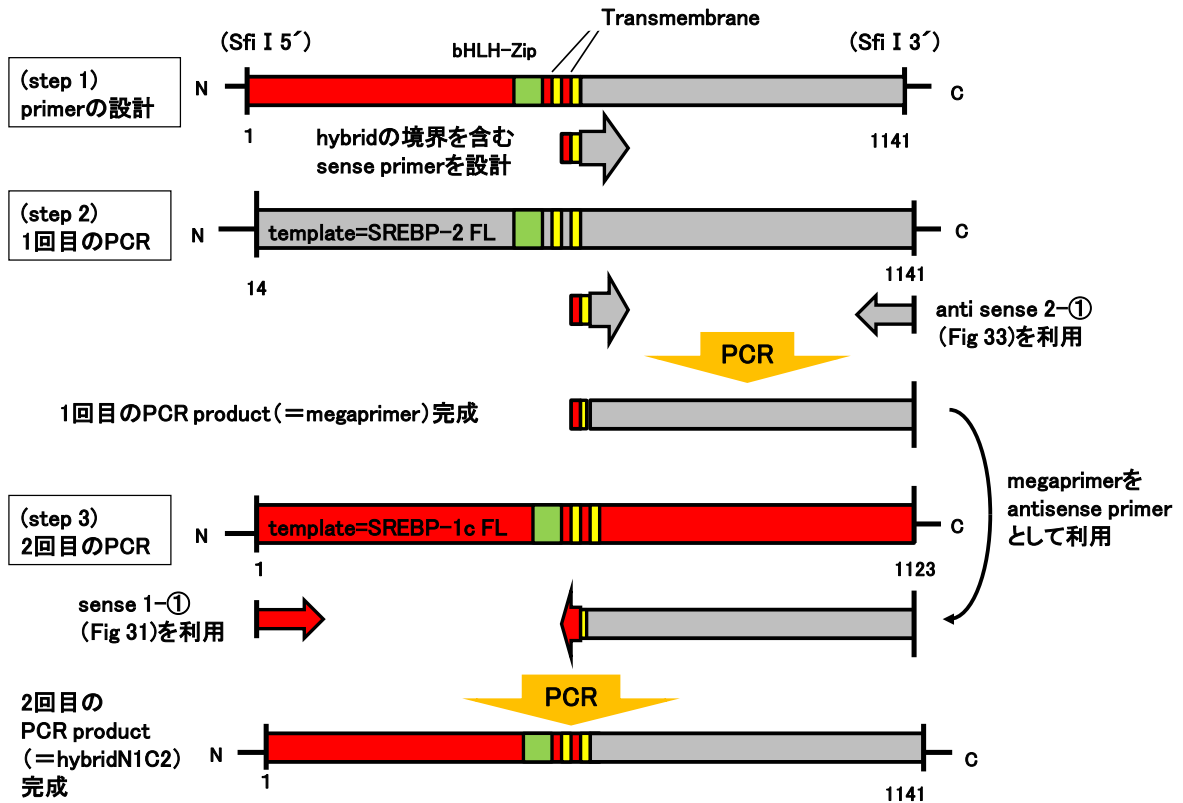


Fig.28 SREBP配列を改変した各種DNA配列 (SREBP-1cの改変)

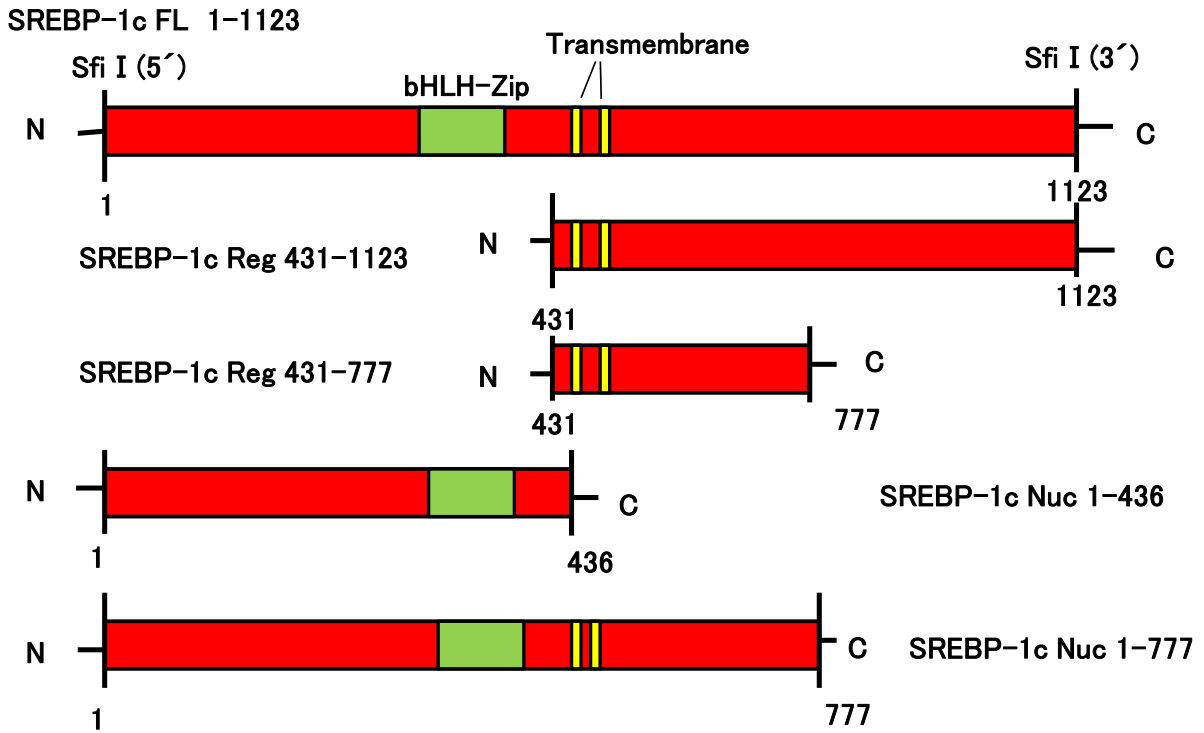


Fig.29 SREBP配列を改変した各種DNA配列 (SREBP-2の改変)

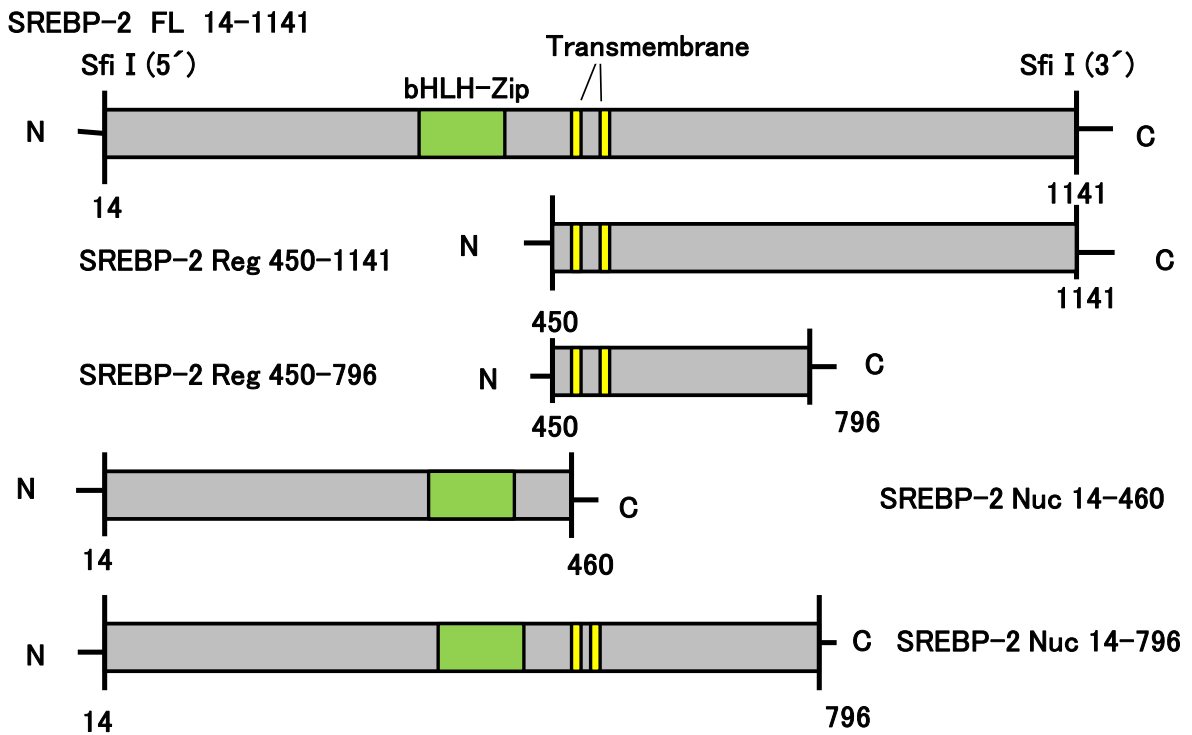
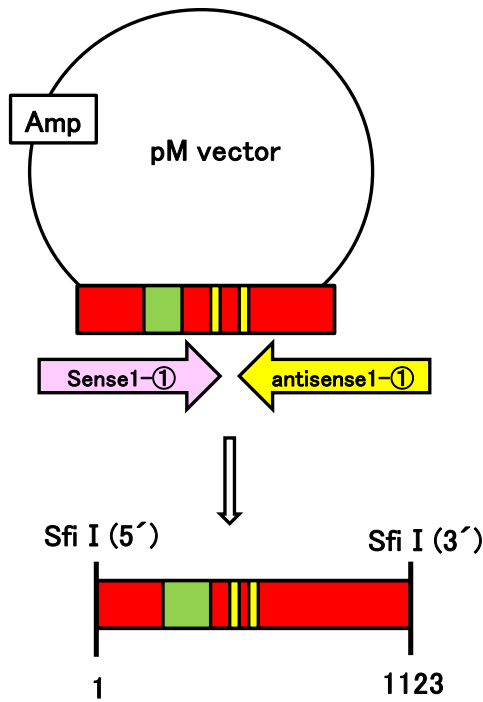


Fig.30-(1) SREBP配列を改変した各種DNA作成のPCR方法



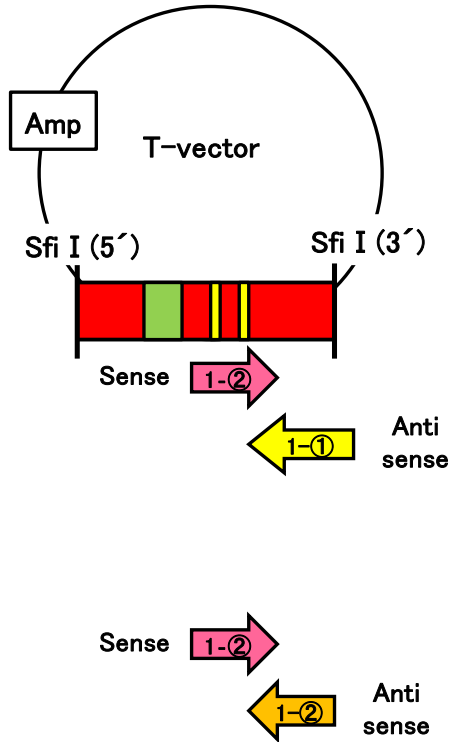
SREBP-1c の配列の改変を例に説明する。

(step1)

pM vectorにSREBP-1c FLが挿入されたプラスミド(これを「Sfi I サイト未挿入プラスミド」と呼称する)を用いて、左図のPCRを行い、SREBP-1c FLの両端にSfi I サイトを付加した。

両端にSfi I サイトが付加されたSREBP-1c 1-1123が完成したため、TAクローニングを行った。

Fig.30-(2) SREBP配列を改変した各種DNA作成のPCR方法



(step2-1 Regバージョンの作成)

T-Vector に、(step1)で完成したSREBP-1c FL 1-1123(両端にSfi I サイト付加)を挿入したプラスミド(「Sfi I 挿入後①」と呼称)をPCRテンプレートとして、2種類のRegを作成した。

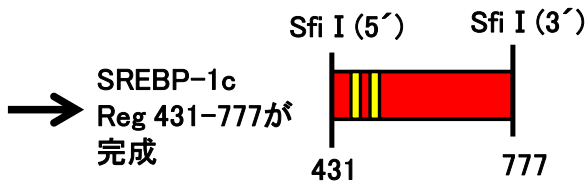
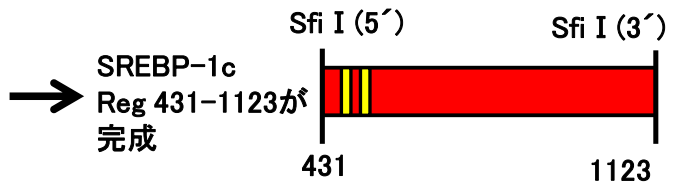


Fig.30-(3) SREBP配列を改変した各種DNA作成のPCR方法

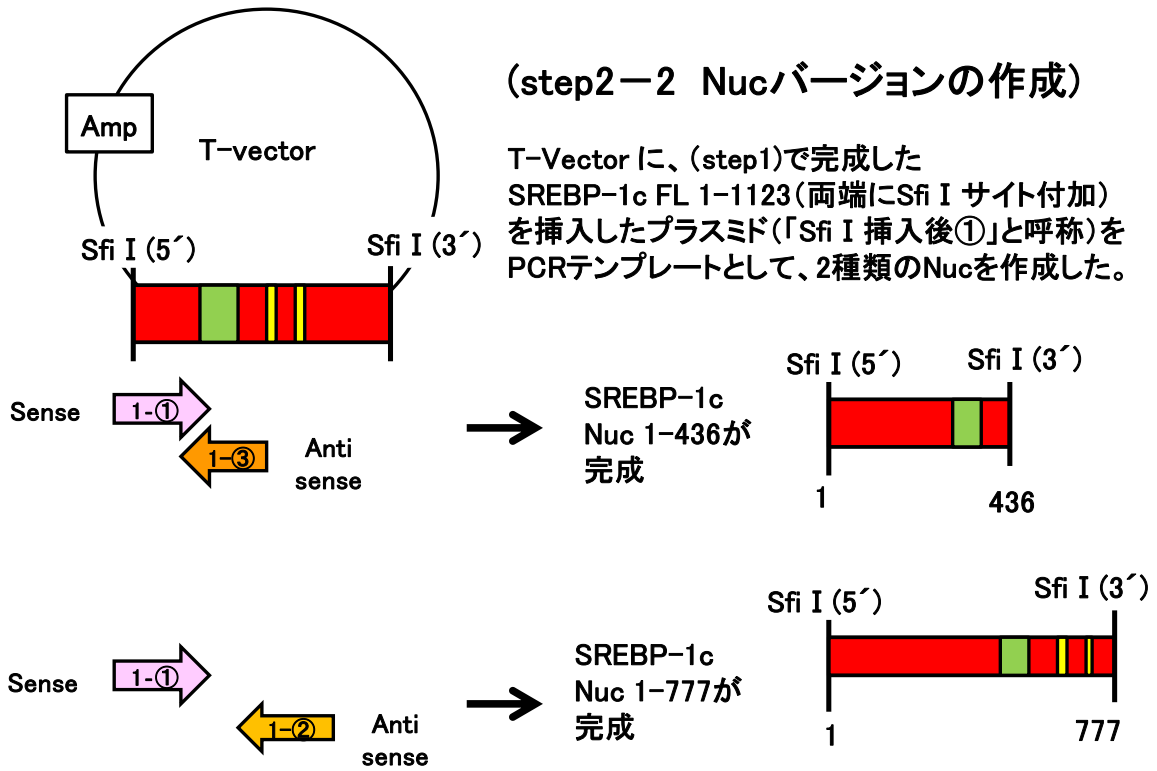


Fig.31 SREBP配列を改変した各種DNA作成のPCR  
(SREBP-1cの改変に用いたprimer一覧)

<b>Sense</b>	
Sense primer 1-①	GGC CAA ATC GGC CAT GGA TTG CAC TTT CGA AGA CAT G
Sense primer 1-②	GGC CAA ATC GGC CAG TGA CTC GGA GGC TGA CAG
<b>Antisense</b>	
Antisense primer 1-①	GGC CCT TAT GGC CCT AGC TGG AAG TGA CAG TGG TC
Antisense primer 1-②	GGC CCT TAT GGC CCT ACA CCT GGG CCA GGG
Antisense primer 1-③	GGC CCT TAT GGC CCT AGT CAG GCT CCG AGT CAC T

Fig.32 SREBP配列を改変した各種DNA作成のPCR  
(SREBP-1cの改変に用いたPCR条件一覧)

DNA 配列	Plasmid template	Sense primer	Antisense primer	denature	annealing	extention	cycle
SREBP-1c FL 1-1123	Sfi I 未挿入 プラスミド	Sense 1-①	Antisense 1-①	98°C 10秒	60°C 15秒	68°C 4分	35
SREBP-1c Reg 431-1123	Sfi I 挿入後①	Sense 1-②	Antisense 1-①	98°C 10秒	55°C 15秒	68°C 2分	35
SREBP-1c Reg 431-777	Sfi I 挿入後①	Sense 1-②	Antisense 1-②	98°C 10秒	55°C 15秒	68°C 2分	35
SREBP-1c Nuc 1-436	Sfi I 挿入後①	Sense 1-①	Antisense 1-③	98°C 10秒	60°C 15秒	68°C 3分	35
SREBP-1c Nuc 1-777	Sfi I 挿入後①	Sense 1-①	Antisense 1-②	98°C 10秒	60°C 15秒	68°C 3分	35

Fig.33 SREBP配列を改変した各種DNA作成のPCR  
(SREBP-2の改変に用いたprimer一覧)

<b>Sense</b>	
Sense primer 2-①	GGC CAA ATC GGC CAT GGA CGA CAG CGG CGA GCT GGG TGG TCT GGA GAC CAT GGA GAC CCT CAC GGA GCT G
Sense primer 2-②	GGC CAA ATC GGC CGA CTC TGA GCC AGG AAG CC
<b>Antisense</b>	
Antisense primer 2-①	GGC CCT TAT GGC CTC AGG AGG CGG CAA TG
Antisense primer 2-②	GGC CCT TAT GGC CTC AAA TGG GGT CAG CTG G
Antisense primer 2-③	GGC CCT TAT GGC CTC AAT CAT CCA ATA GAG GGC TT

Fig.34 SREBP配列を改変した各種DNA作成のPCR  
(SREBP-2の改変に用いたPCR条件一覧)

DNA 配列	Plasmid template	Sense primer	Antisense primer	denature	annealing	extention	cycle
SREBP-2 FL 14-1141	Sfi I 未挿入 プラスミド	Sense 2-①	Antisense 2-①	98°C 10秒	60°C 15秒	68°C 4分	35
SREBP-2 Reg 450-1141	Sfi I 挿入後②	Sense 2-②	Antisense 2-①	98°C 10秒	64°C 15秒	68°C 2分	35
SREBP-2 Reg 450-796	Sfi I 挿入後②	Sense 2-②	Antisense 2-②	98°C 10秒	55°C 15秒	68°C 2分	35
SREBP-2 Nuc 14-460	Sfi I 挿入後②	Sense 2-①	Antisense 2-③	98°C 10秒	60°C 15秒	68°C 3分	35
SREBP-2 Nuc 14-796	Sfi I 挿入後②	Sense 2-①	Antisense 2-②	98°C 10秒	60°C 15秒	68°C 3分	35

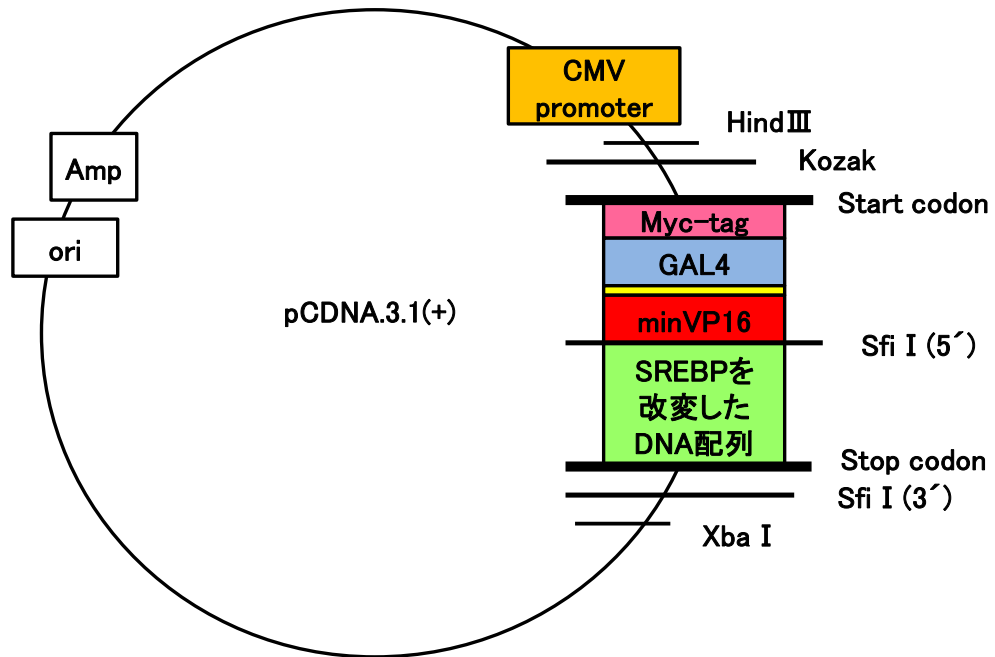
<SREBP を改変した各種 DNA 配列の PCR product のクローニング>

上記のようにして得られた各種の PCR product は、T4 Polynucleotide Kinase (NEW ENGLAND BioLabs) を用いて 37°C、2 時間反応させてリン酸化処理を行った。一方、pENTR4 (CCDB<sup>-</sup>) を EcoRV で十分な時間切断し、100%イソプロパノールと 70%エタノールで精製した vector を予め用意し、この vector は CIAP (NIPPON GENE) を用いて 37°C、6 時間反応させて脱リン酸化処理を行った。

insert (リン酸化処理後の PCR product) と vector (EcoRV で切断して更に脱リン酸化処理を行った pENTR4 (CCDB<sup>-</sup>)) を、T4 DNA Ligase (Promega) を用いて ligation を行った。その後は、氷上で 30 分間 Competent E. coli DH5 $\alpha$  (NIPPON GENE)内に取り込ませ、カナマイシン培地で selection し、クローニングを行った。シーケンスが適切であることを確認し、Plasmid Midi Kit(QIAGEN)を用いて DNA midipreparation を行った後、SfiI を用いて十分な時間切断 (50°C) の上、切り出した。

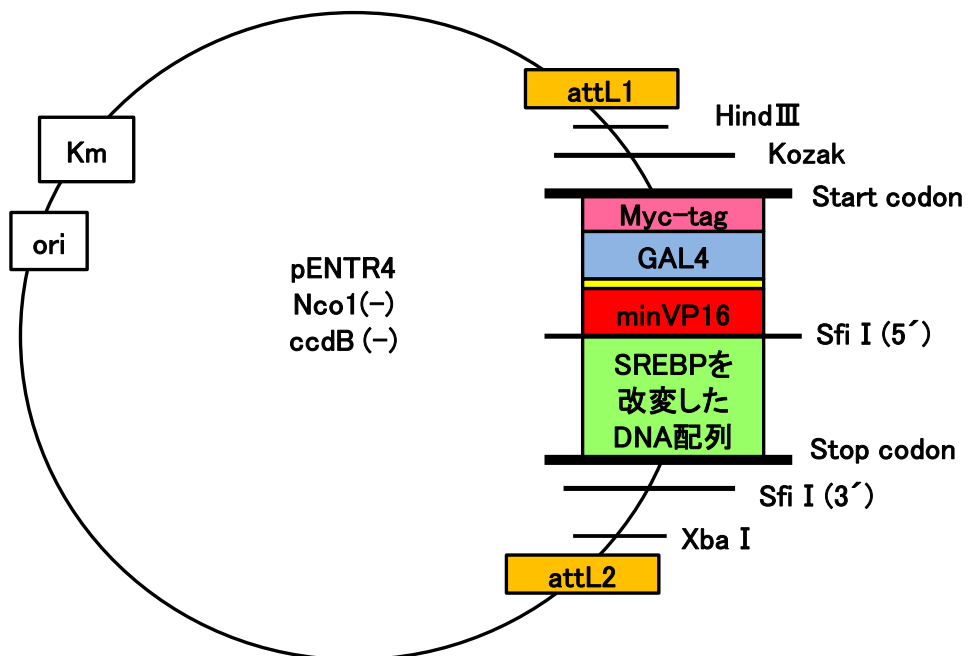
最後に、SfiI サイトで囲まれた、これらの SREBP を改変した DNA 配列は、実験方法 (5)-①で作成済みの pCDNA3.1(+)+GAL4-minVP16 や pENTR4+GAL4-minVP16 における GAL4-minVP16 下流の Sfi I サイト内に挿入した。最終的に得られた pCDNA3.1(+)+GAL4-minVP16-SREBP や pENTR4+GAL4-minVP16-SREBP の概図を (Fig. 35) (Fig. 36) に示した。

Fig.35 自作のプラスミドの全体図 (pCDNA.3.1(+版)  
 ( pCDNA.3.1(+)+GAL4 DBD-minimumVP16に、改変したSREBP配列を挿入後)



両端をSfi I サイトで囲んでいる各種DNA配列をinsertとして、  
 GAL4 DBD-minimumVP16内のSfi I サイトに挿入した。

Fig.36 自作のプラスミドの全体図 (pENTR4版)  
 ( pENTR4 +GAL4 DBD-minimumVP16に改変したSREBP配列を挿入後)



両端をSfi I サイトで囲んでいる各種DNA配列をinsertとして、  
 GAL4 DBD-minimumVP16内のSfi I サイトに挿入した。



(6) 293 細胞の培養

293細胞は、25mM glucose Dulbecco's modified Eagle's medium、100 units/ml penicillin、100  $\mu$ g/ml streptomycin sulfate、10% fetal bovine serumにて、37°C、5% CO<sub>2</sub>のインキュベーター内で培養し、細胞を良好な状態に保つよう定期的に継代した。

(7) トランスフェクションおよびルシフェラーゼ活性の測定

48-well プレートに 293 細胞を 80~90% confluent まで培養した。ルシフェラーゼレポーターベクターとして、pGL3 Basic Vector (Promega) の Cla I (ATCGAT) と Hind III (AAGCTT)内に 17m8-luc (GAL4-DBD が特異的に結合する部分であり、17mer の UAS(upstream activation site)配列を 8 個タンデムにつないだ、下記の配列) が挿入されたものを用いた (30)。

この 17m8-luc の配列は以下の通りである。

(□で囲まれた部分が 17mer の同じ配列になっている)

```
ATCGATAGGTA□CTCGGAGGACAGTACTC□CGTAC□CTCGGAGGACAGTACTC□CGTA□CTCGGAGGACAGTACTC□CGTA  
□CTCGGAGGACAGTACTC□CGTAC□CTCGGAGGACAGTACTC□CG□CTCGGAGGACAGTACTC□CG□CTCGGAGGACAGTA  
□CTC□CG□CTCGGAGGACAGTACTC□CGATCCGTCGACTCTAGAGGGTATATA□AAGCTT
```

このpGL3-17m8-luc 200ng/wellと、SREBP配列を改変した各種DNA（作成法は実験方法 (5) -①および (5) -②にて前述）を挿入したpCDNA3.1(+)-GAL4minimumVP16-SREBPプラスミド 100ng/wellを混合し、SCAPの共発現の有無により2群に分けた（SCAPは200ng/well添加した。SCAPを共発現しない群においてはpCDNA3.1(+)-mockを混合し、トランスフェクトするDNA量を統一した）。

上記と、SuperFect transfection reagent (Qiagen) 1  $\mu$ /well、Opti-MEM (Invitrogen) 20  $\mu$ /well、medium 105  $\mu$ /wellをよく混合し、室温で15分静置。その後、37°Cでインキュベートした。3時間後、mediumを慎重に吸い取り、新たなmedium 500  $\mu$ /wellを入れ、再び37°Cでインキュベートした。24時間後、プレートを室温に持ち込み、Reporter Lysis 5 $\times$ buffer (Promega)にて細胞を回収の上、十分溶解した。全量を4°C、15000rpm、10分間遠心分離し、上清のみを回収。luciferase assay reagent (Promega)を用いて、ルシフェラーゼ値をルミノメーターで測定した。実験は各種全てtripleで行い、その平均を取って評価した。

#### (8) アデノウイルスの増殖と精製

上述 (5) -②で作成した、SREBP配列を改変した各種DNAをGateway entry vector pENTR4 (Invitrogen) に挿入し、Gateway LR Clonase Enzyme Mix (Invitrogen)を用いて、pAd/CMV/V5-DEST vector (Invitrogen)に組み替えた。組み替えたpAd-DESTプラスミドは制限酵素PacIにてリニアライズした後、Wizard DNA Clean-Up

System(Promega)を用いて精製した。最終的にTE (pH7.9) 20  $\mu$  lで抽出した液と、SuperFect transfection reagent (Qiagen)4  $\mu$  /well、Opti-MEM (Invitrogen)80  $\mu$  /wellをよく混合し、室温で15分静置。その後、medium500  $\mu$  /wellを追加し、12well-plateで培養中の293細胞(80% confluent)へトランスフェクトし、約2週間、37°Cでインキュベートした。その後、感染した細胞を回収し、液体窒素を用いて凍結・融解を4回繰り返した後、3500rpm 15分遠心。上清を回収の上、scale-upした大きさのdishで、293細胞に感染させた。この後は、細胞を感染させてから概ね48~72時間後に、各dishにおいて9割以上の細胞が感染していることを顕微鏡で確認の上、細胞を回収しては凍結・融解するプロセスを繰り返した。最終的には、150mm培養用dish 20枚分の293細胞に感染させたアデノウイルスを回収した。150mm培養用dish 20枚分の細胞をmediumごと回収した後は、3500rpm 15分遠心の上、上清を捨て細胞のみを集め、最終的に3ml $\times$ 2本分のmediumになるようにした。これを4回凍結・融解し、精製に回した。

精製は、Centrifuge Tube(Beckman)に、CsCl 1.4 (CsCl(WAKO) 5.3g+10mM Tris-HCl(pH7.9) 8.7ml) 1.42ml、CsCl 1.2 (CsCl (WAKO)2.68g+10mM Tris-HCl(pH7.9) 9.2ml) 1.06ml、アデノウイルスが溶解したmedium 3mlをこの順番で慎重に重層させ、89000rpm 3時間遠心。ウイルスが存在する最下層のみを21G針で慎重に回収した。その後、PD-10 Desalting Columns(GE Healthcare)を用いて、PBSCa(Invitrogen)溶液と置換し、精製。吸光度を確認した後、得られた液体の4分の1量の50% glycerolと

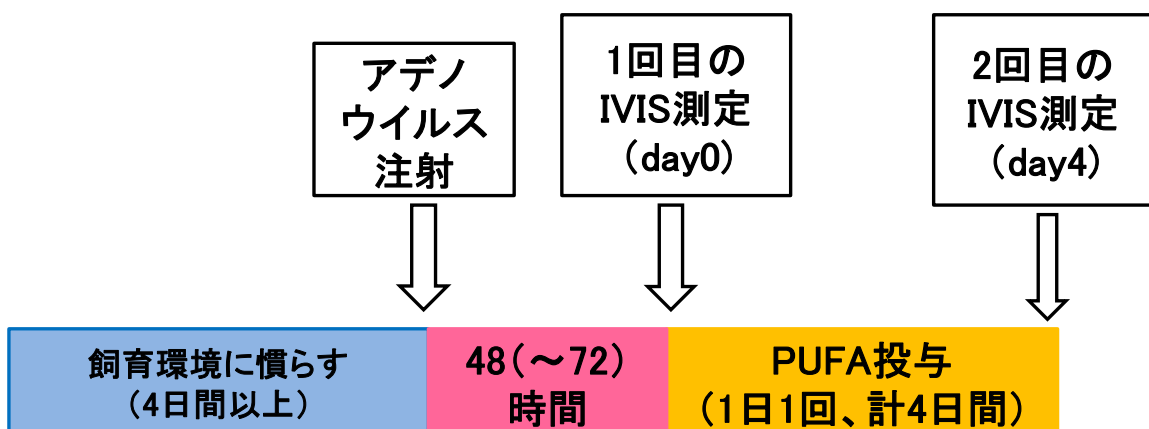
併せ、冷凍保存した。

なお、レポーターとして注射したAd-GAL4-RE-Lucについては、筑波大学 武内謙憲先生より既報（20）で利用したウイルス（pGL3-17m8-lucのNot I -Sal I で切り出したinsertをpENTR4のMCS内のNot I -Sal I に挿入し、Clonase反応を行ったもの）を頂戴した。

#### (9) IVIS (In Vivo Imaging System) の測定

実験方法（8）のように精製したAd-GAL4-RE-Lucと、自作して精製した各種Ad-GAL4-SREBPをよく混合し、マウスに経頸静脈投与した。頸静脈投与を行ってから48時間（～72時間）後をday0として、IVIS（IVISTM, Xenogen）を用いて撮影を行い、ルシフェラーゼ値を測定した。day 0測定後より、CTRL群とPUFA (EPA) 投与群に分け、4日間に渡るPUFA投与後の測定をday4とした（Fig. 37）。

**Fig.37 実験の流れ**



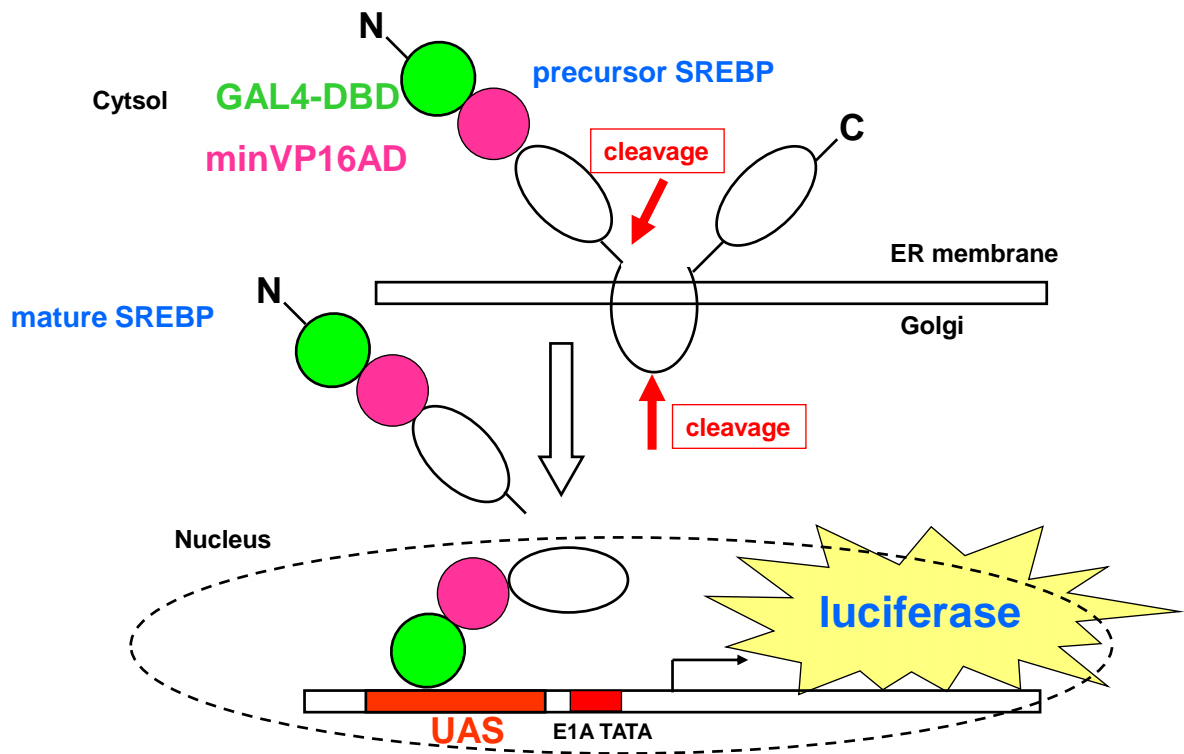
この撮影の際は、全てのマウスにおいて、同一マウス間のday0とday4における露光時間やビニング等の撮影条件は統一した。ルシフェラーゼ値を測定する際は、仰臥位で撮影されたマウスの肝臓に相当する部位を短径2.5cm×長径3.5cm大の楕円形で囲み計測したが、全てのマウスにおいて、同一マウス間のday0とday4における楕円形の大きさや形を統一した。

全てのマウスはisofluraneおよび酸素を用いた麻酔条件下で非侵襲的に解析された。まず、ルシフェリンを注射する前に、マウスをIVIS内に仰臥位で静置した状態で撮影し、ルシフェラーゼ値の測定を行った。ここで得た値はbackgroundとして、解析の際、ルシフェリン注射後に得たルシフェラーゼ値から差し引くこととした。

そして次に、ルシフェリン(phosphate-buffered salineで7.5 mg/mlになるよう調整)を0.4ml/body準備し、マウスの腹腔に左右より0.2mlずつ注射。その後速やかにマウスをIVIS内に仰臥位で静置し、注射5分後にルシフェラーゼ値を測定した。

day0のルシフェラーゼ値を測定した後、同日よりマウスをcontrol群 (CTRL : PUFAと同液量の水道を投与) と、PUFA(EPA)投与群の2群に分けた。PUFAは、購入時のマウスの体重をもとに、7.5g/kg/dayになるよう調整し(20)、4日間に渡り、1日1回(24時間毎)経口投与した。PUFAを4日間連日投与した後、day0と同様にIVISを用いてルシフェラーゼ値を測定した(この2回目の測定をday4とした)。以上のような方法で、我々はSREBPの切断活性を評価した(Fig. 38)。

Fig.38 SREBPの切断活性を評価するレポーター系の概略



(10) 肝臓に発現しているルシフェラーゼ値の測定 (ルミノメーターを用いた測定)

実験方法 (9) のようにIVISで得られたルシフェラーゼ値と、実際に肝臓に発現しているルシフェラーゼ値の相関を調べる目的で、day4測定後、速やかにマウス肝臓を採取し、ルミノメーターを用いてルシフェラーゼ値を測定した。肝臓は1匹あたり正確に50mg採取し、全て氷上で行った。まず、300  $\mu$  lのReporter Lysis 5 $\times$  buffer (Promega)を準備した2mlチューブに、採取した肝臓片を入れ、ポリトロンで十分に破碎。15000rpmで4 $^{\circ}$ Cにて10分遠心後、濁った上清を全て回収。これを更に15000rpmで4 $^{\circ}$ Cにて10分遠心し、透明度が増した上清を回収。このうち10  $\mu$  lを、実験

方法 (7) と同様に96well plateに入れ、luciferase assay reagent (Promega) を用いてルシフェラーゼ値をルミノメーターで測定した。実験は各種全てtripleで行い、その平均を取って評価した。

#### (11) 統計解析

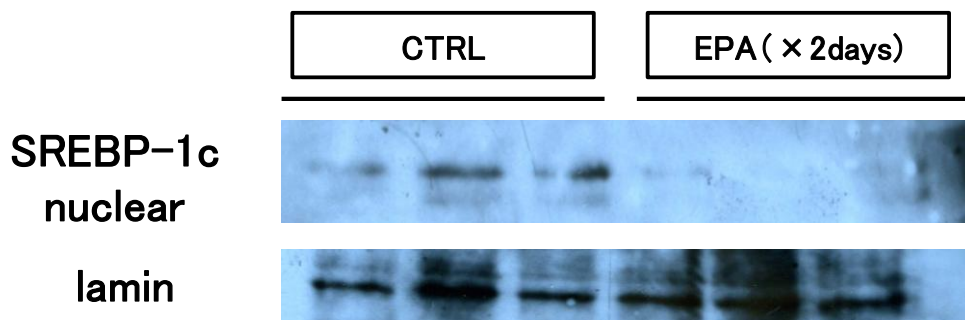
有意差検定は、t 検定により  $P < 0.05$  を有意とした。データは平均値  $\pm$  SEM (Standard Error of the Mean) で表示した。

## 実験結果

### (1) 多価不飽和脂肪酸 (PUFA) によるマウス肝臓の SREBP-1 タンパク質量抑制

まず、マウス肝臓における PUFA による核型 SREBP-1 タンパク質量の抑制効果を調べる目的で、高シヨ糖食摂取下で、PUFA (EPA) 7.5g/kg/day を ICR マウスに 2 日間投与し、肝臓の核タンパク質抽出物をウエスタンブロッティング法により解析した。その結果、CTRL (非投与群) に比較して EPA 投与群では、核型 SREBP-1c タンパク質量が低下していることが認められた (Fig. 39)。

**Fig.39 PUFAによる核型SREBP-1cの抑制**

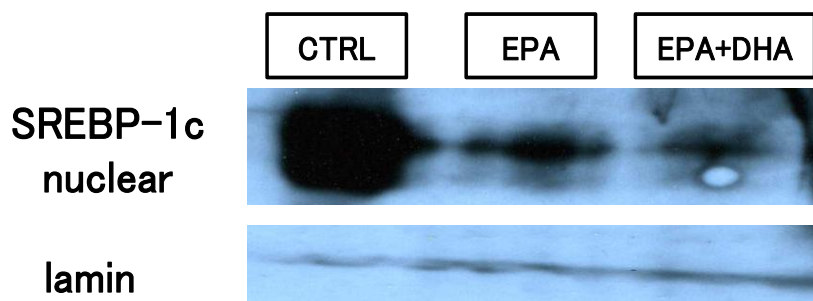


**マウスにEPA(7.5g/kg/day)を2日間経口投与した後、肝臓から核を抽出し、ウエスタンブロッティングを施行した(n=3)。**

次に、高シヨ糖食摂取下で、PUFA (EPA、EPA+DHA) 7.5g/kg/day を ICR マウスに 4 日間投与し、肝臓の核タンパク質抽出物をウエスタンブロッティング法により解析した。その結果、CTRL に比較して PUFA 投与群のマウスでは、両者ともに核型 SREBP-1c タンパク質量が低下していることが判明した (Fig. 40) 。この抑制効果は、2 回の独立した実験において認められた。毎回の実験において、マウスの体重を測定したが、各群間で差はなく、ほぼ同量の食事摂取を行っているものと推定された。



**Fig.40 PUFAによる核型SREBP-1c の抑制  
(PUFAの種類別による比較)**



マウスにEPA(7.5g/kg/day)、EPA+DHA(7.5g/kg/day)を4日間経口投与した後、肝臓から核を抽出し、ウエスタンブロッティングを施行した(n=2)。

## (2)培養細胞におけるルシフェラーゼ値の比較

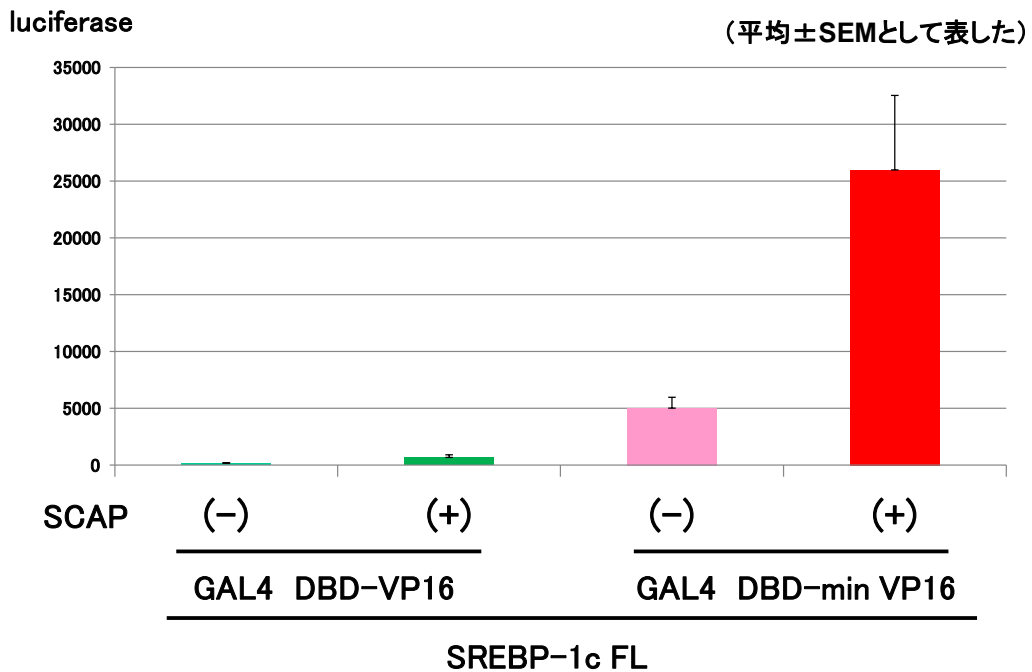
実験方法 (6) をもとに、SREBP 配列を改変した各種 DNA を挿入した

pCDNA3.1(+)-GAL4-minimumVP16-SREBP プラスミドを 293 細胞にトランスフェクトし、ルシフェラーゼ値を測定した。全種類のコンストラクトにおいて、SCAP 共発現の有無により 2 群に分け、ルシフェラーゼ値の変化を評価することで、培養細胞内における SREBP の切断活性がどのように変化するかを検討した。なお、SREBP-1c FL については、先行研究 (20) の pCDNA3.1(+)-GAL4-VP16-SREBP-1c FL プラスミドも同様にトランスフェクトし、ルシフェラーゼ値を測定した。

まず、2 種類の転写活性化因子 (従来の VP16、および今回自作した min VP16) におけるルシフェラーゼ値を比較した (Fig. 41)。SCAP 共発現により、ルシフェラーゼ値

は、VP16 で 4.0 倍、min VP16 で 5.1 倍に上昇したが、この変化率は両者で有意差を認めなかった (P=0.76 by t-test)。しかし、VP16 に比較して、min VP16 ではルシフェラーゼ値そのものの値が高いことが判明した (SCAP 非共発現時で 26.0 倍、SCAP 共発現時で 28.8 倍の差が認められた)。

**Fig.41** 培養細胞における SCAPの共発現の有無によるルシフェラーゼ値の変化の確認  
2種類の転写促進因子 (VP16とminVP16)における比較

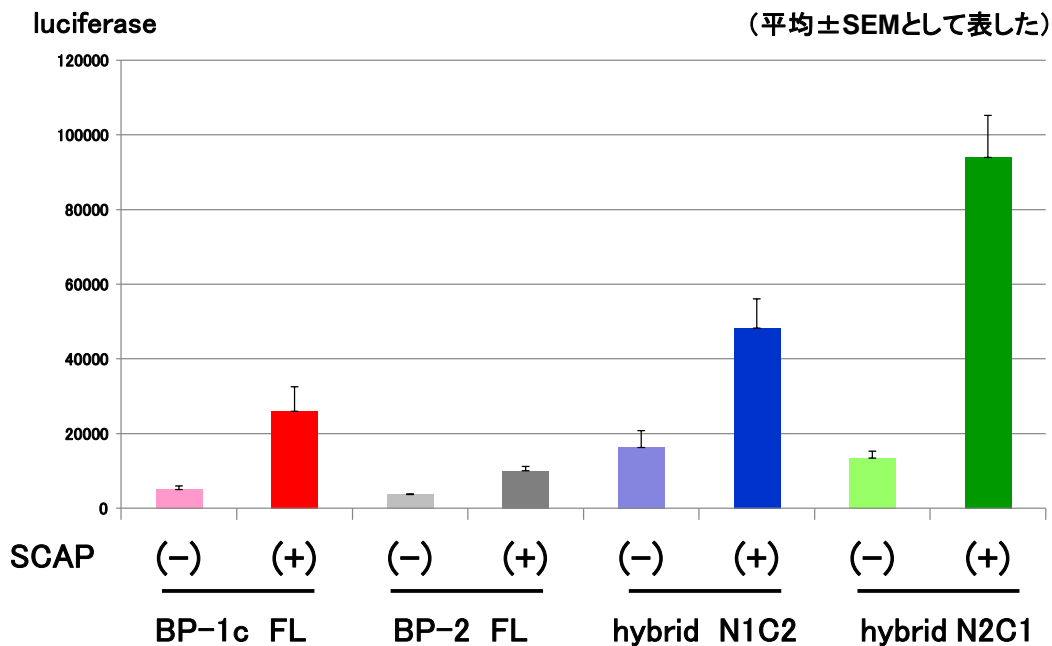


次に、転写活性化因子min VP16を有する、SREBP配列を改変した各種コンストラクトについて、培養細胞におけるルシフェラーゼ値を検討した。まず、SREBP-1c FLおよびSREBP-2 FLを比較した (Fig. 42) (参考 (Fig. 26))。SCAP非共発現時、両者でルシフェラーゼ値に差は認めず (P=0.238 by t-test)、ほぼ同程度であった。SCAP共発現時は、それぞれSCAP非共発現時に比較して5.2倍、2.7倍の上昇を認めた。

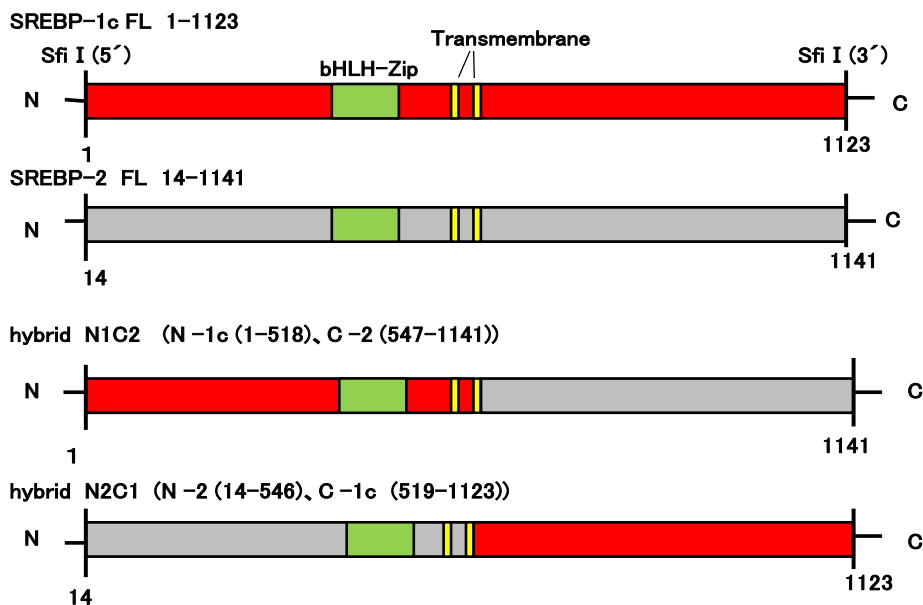
また、SREBP-1c FLおよびSREBP-2 FLを組み合わせた2種類のhybrid分子 (hybridN1C2、

hybridN2C1) に関して調べた (Fig. 42) (参考 (Fig. 26) )。hybridは生体内に存在しない人工的な配列であるが、FLと同様に、SCAP共発現時にルシフェラーゼ値の上昇を認めた (hybridN1C2で3.0倍、hybridN2C1で7.0倍の上昇であった)。

**Fig.42 培養細胞における SCAPの共発現の有無によるルシフェラーゼ値の変化の確認 (FL及びhybrid)**



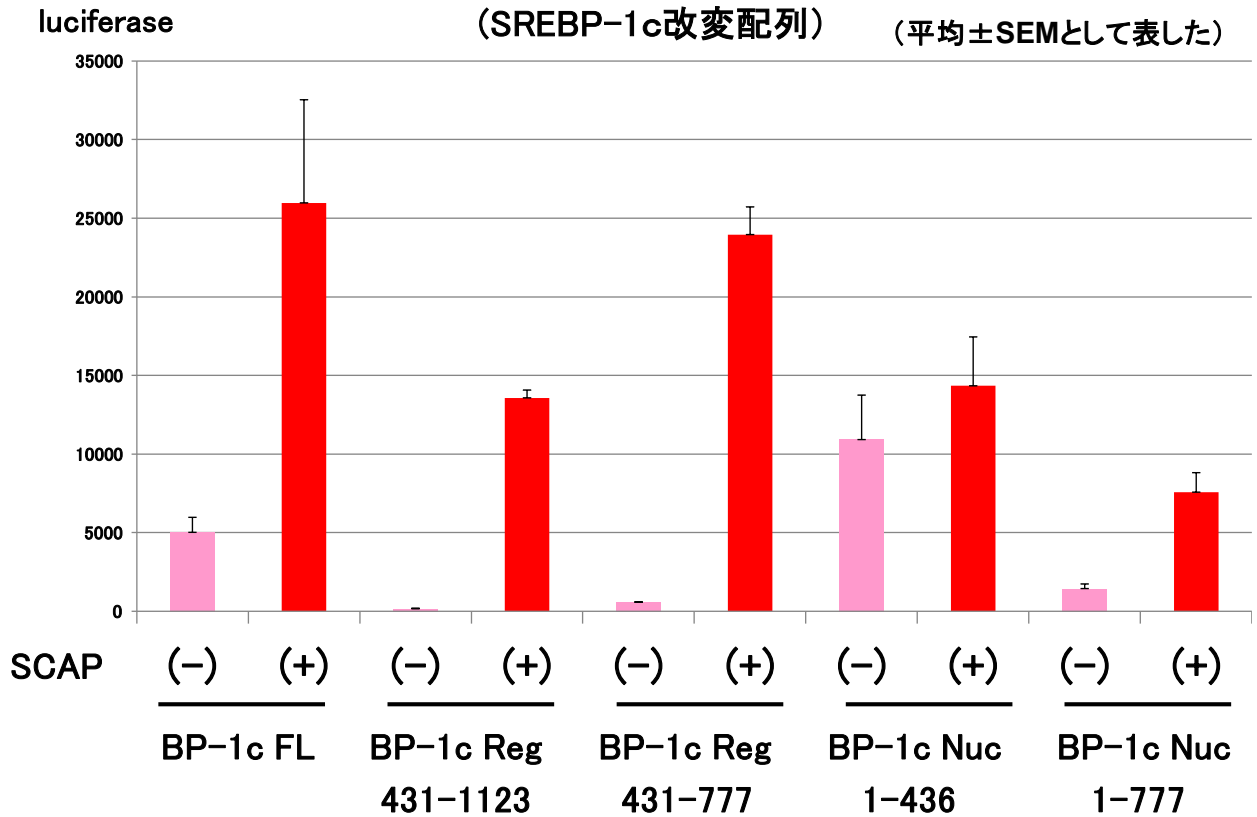
参考 Fig.26 SREBP配列を改変した各種DNA配列 (hybridの配列)



更に、SREBPのNH<sub>2</sub>末端部の一部を削除した分子である4種類のReg (SREBP-1c Reg 431-1123、SREBP-1c Reg 431-777、SREBP-2 Reg 450-1141、SREBP-2 Reg 450-796) に関して調べた (Fig. 43) および (Fig. 44) (参考 (Fig. 28) および (Fig. 29) )。SCAP非共発現時のルシフェラーゼ値は、4種類いずれもFLに比して低値であった(0.03~0.1倍)。しかしSCAP共発現時は4種類いずれもルシフェラーゼ値が変化し、SCAP非共発現時と比して、SREBP-1c Reg 431-1123が90.8倍、SREBP-1c Reg 431-777が42.5倍、SREBP-2 Reg 450-1141が26.6倍、SREBP-2 Reg 450-796が21.4倍の上昇を認めた。

SREBPのCOOH末端部の一部を削除した分子である4種類のNucに関しては、2パターンの動態を示した (Fig. 43) および (Fig. 44) (参考 (Fig. 28) および (Fig. 29) )。SREBP-1c Nuc 1-436およびSREBP-2 Nuc 14-460においては、ルシフェラーゼ値がSCAP非共発現時で既に高く、FLに比してそれぞれ2.2倍、6.0倍高い値であった。また、この2つに関しては、SCAP共発現時もルシフェラーゼ値の変化率はそれぞれ1.3倍、1.0倍に留まった。一方で、SREBP-1c Nuc 1-777およびSREBP-2 Nuc 14-796においては、SCAP非共発現時のルシフェラーゼ値はFLに比して低いが、SCAP共発現時のルシフェラーゼ値の変化率はそれぞれ5.2倍、5.8倍であった。

Fig.43 培養細胞における  
SCAPの共発現の有無によるルシフェラーゼ値の変化の確認  
(SREBP-1c改変配列) (平均±SEMとして表した)



参考 Fig.28 SREBP配列を改変した各種DNA配列 (SREBP-1cの改変)

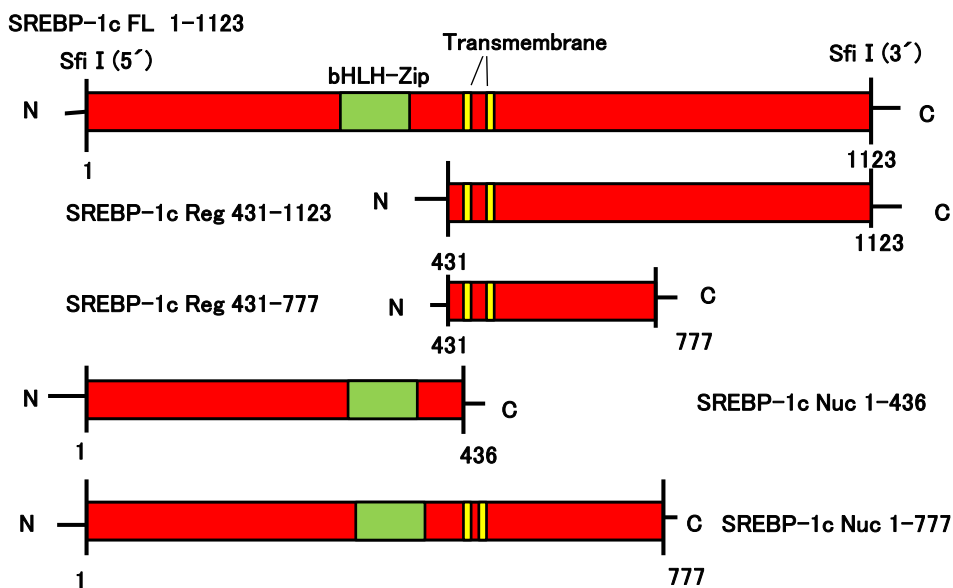
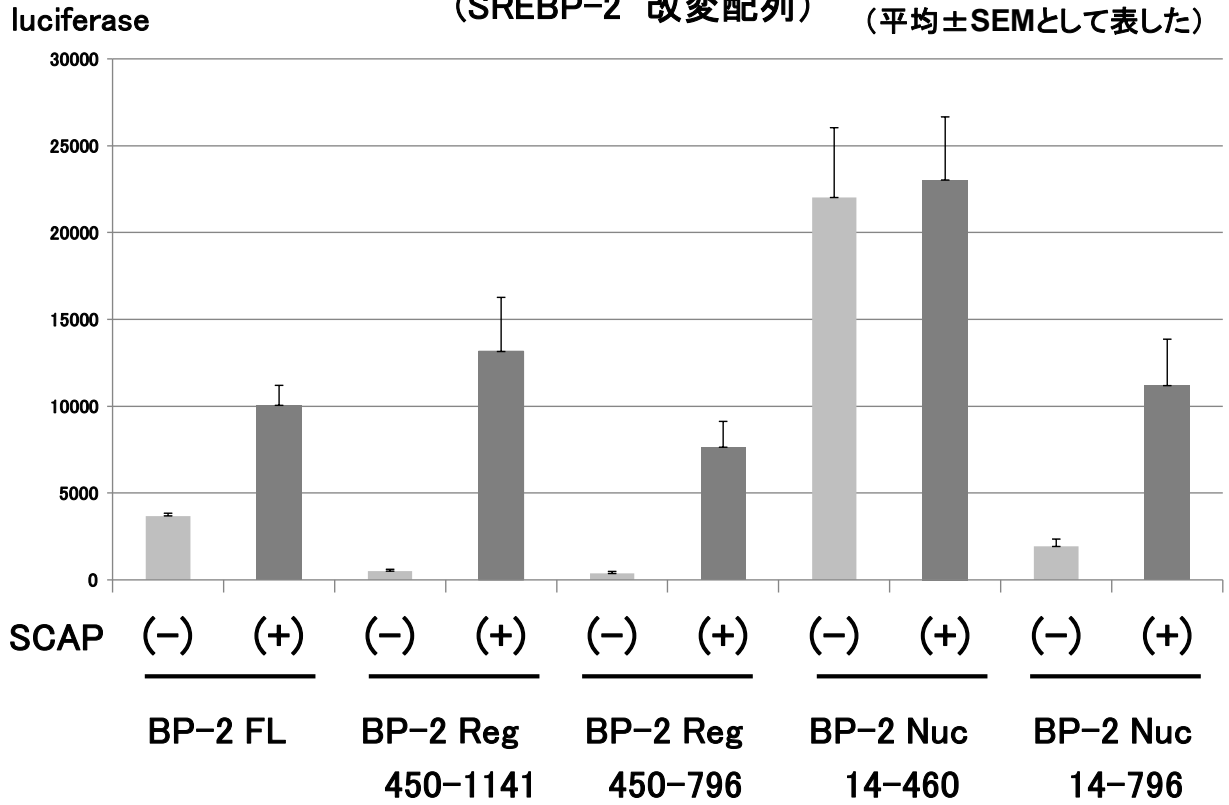
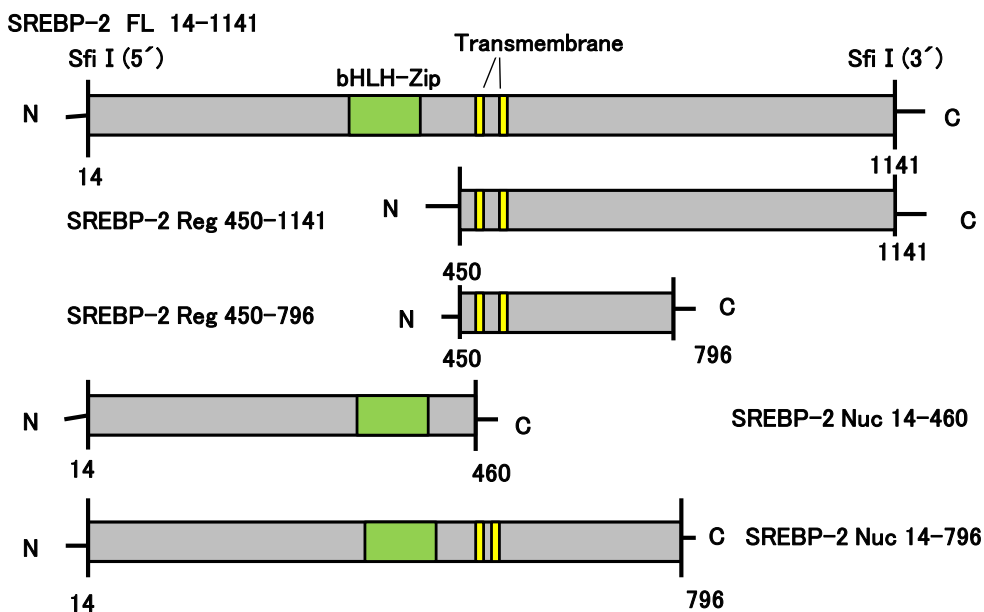


Fig.44 培養細胞における  
SCAPの共発現の有無によるルシフェラーゼ値の変化の確認  
(SREBP-2 改変配列) (平均±SEMとして表した)



参考 Fig.29 SREBP配列を改変した各種DNA配列 (SREBP-2の改変)



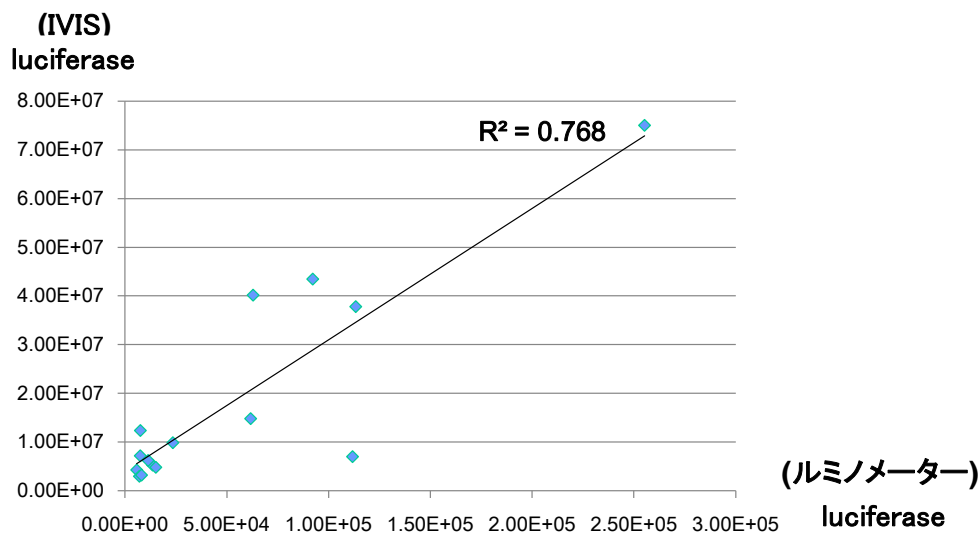
### (3) IVISで測定した生体（マウス肝臓）におけるルシフェラーゼ値と

#### 肝臓採取後にルミノメーターで測定したルシフェラーゼ値の相関の検討

day4におけるIVIS測定後、実験方法（10）に準じて速やかに肝臓を採取し、ルミノメーターを用いてルシフェラーゼ値を測定した。用いたマウスは、Ad-GAL4-minVP16-SREBP1c FLを注射した5匹（CTRL群3匹、EPA群2匹）、Ad-GAL4-minVP16-SREBP2 FLを注射した3匹（CTRL群2匹、EPA群1匹）、Ad-GAL4-minVP16-hybridN1C2を注射した7匹（全てEPA群）の計15匹であった。

IVISで測定した生体におけるルシフェラーゼ値と、肝臓採取後にルミノメーターで測定したルシフェラーゼ値の相関を調べたところ、 $R^2=0.768$ であった（Fig. 45）。

**Fig.45** IVISで測定した生体(マウス肝臓)におけるルシフェラーゼ値と肝臓採取後にルミノメーターで測定したルシフェラーゼ値の相関



アデノウイルスを注射し、6日後(day4)にIVISを用いてルシフェラーゼ値を測定。その後、速やかに肝臓を採取し、ルミノメーターを用いてルシフェラーゼ値を測定した(n=15)。

この結果から、IVISで得られるルシフェラーゼ値は、実際に生体（マウス肝臓）に発現しているルシフェラーゼ値を適切に反映していると判断した。

#### (4)生体（マウス肝臓）におけるルシフェラーゼ値の比較（2 種類の転写活性化因子の検討）

先行研究（19）で使用された VP16 を有するアデノウイルス

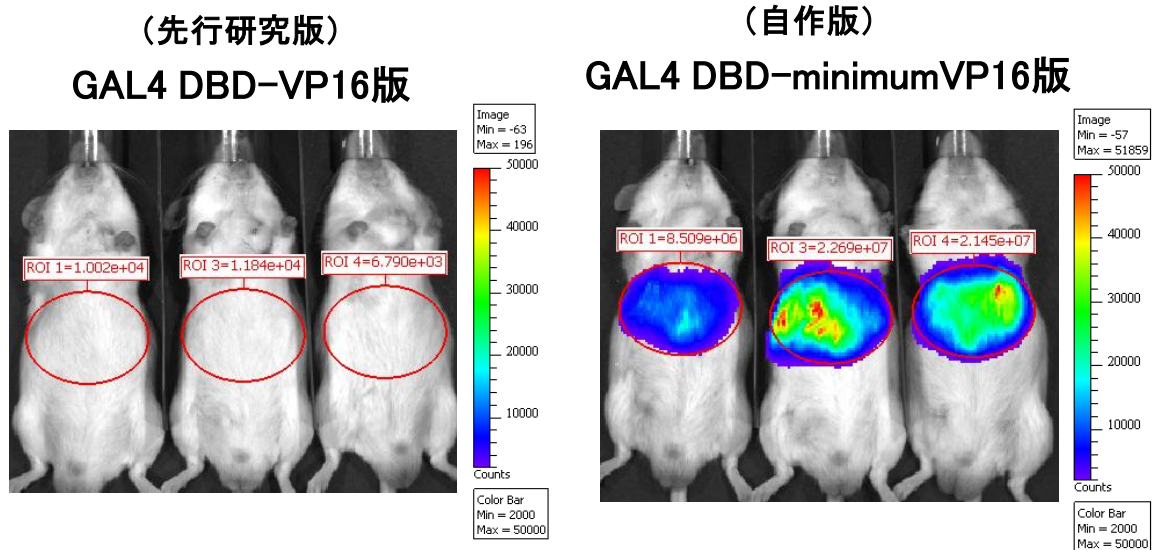
Ad-GAL4-VP16-SREBP1c（FL）と、今回自作した Ad-GAL4-minVP16-SREBP1c（FL）を、それぞれマウスに頸静脈投与し、IVIS を用いてルシフェラーゼ値を測定した。

まず実験方法（1）に準じ、ICR マウス（オス、7 週齢）に High-Sucrose fat-free diet を与え、飼育環境に順応させた。アデノウイルスはあらかじめ力値を測定し、全てのマウスに  $3.8 \times 10^8$  pfu/body の Ad-GAL4-RE-Luciferase を注射した。VP16 群(n=3)に  $1.0 \times 10^8$  pfu/body の Ad-GAL4-VP16-SREBP1c（FL）、min VP16 群(n=3)にも  $1.0 \times 10^8$  pfu/body の Ad-GAL4-minVP16-SREBP1c（FL）を注射した（n=3）。実験方法（9）に準じ、注射投与 48 時間後に、IVIS を用いて肝臓におけるルシフェラーゼ値を測定した。

結果、ルシフェラーゼ値は、VP16 群で  $1.002 \times 10^4$ 、 $1.184 \times 10^4$ 、 $6.790 \times 10^3$  の値である一方、min VP16 群では  $8.509 \times 10^6$ 、 $2.269 \times 10^7$ 、 $2.145 \times 10^7$  であった (Fig. 46)。等力価のアデノウイルスを注射したにも関わらず、ルシフェラーゼ値は、VP16 群に比して min VP16 群では約  $3 \times 10^3$  倍も高い値であった（ $P=0.018$  by t-test）。



Fig46 IVISで測定した生体(マウス肝臓)におけるルシフェラーゼ値  
2種類の転写促進因子(VP16とminVP16)における比較



同力価(※)のアデノウイルスを投与し、  
48時間後にIVISを用いてルシフェラーゼ値を測定した。(n=3)  
(※) Ad-GAL4-RE-Luc ( $3.8 \times 10^8$  pfu/body) + Ad-GAL4-SREBP1c-FL ( $1.0 \times 10^8$  pfu/body)。

(5) 生体 (マウス肝臓) におけるルシフェラーゼ値の比較

(各種コンストラクトの検討)

実験方法 (9) に準じ、Ad-GAL4-minVP16-SREBP1c FL、Ad-GAL4-minVP16-SREBP2 FL、Ad-GAL4-minVP16-hybridN1C2、Ad-GAL4-minVP16-hybridN2C1、SREBP-1c Nuc 1-436、SREBP-1c Nuc 1-777 の 6 種類に関して、IVIS を用いて肝臓におけるルシフェラーゼ値を測定した。

なお day0 の測定の段階で、background を差し引いたルシフェラーゼ値が  $1.0 \times 10^5$  未満、 $2.0 \times 10^7$  以上のマウスに関しては評価から外した。除外基準を設けた理由としては、アデノウイルスを注射して十分な時間 (本実験では 48~72 時間) を経過して

もルシフェラーゼ値が  $1.0 \times 10^5$  未満のマウスは、アデノウイルスが肝臓で十分に感染出来ない要因があると考えられ、PUFA (EPA) による抑制効果を経時的に判定するには不適切として除外した。また、 $2.0 \times 10^7$  以上のマウスに関しては、PUFA の抑制効果を一定期間評価するためには、day0 におけるルシフェラーゼ値が高い状態は適切と思われたが、ルシフェラーゼ値が急峻に低下する傾向が見られたため（アデノウイルス感染に対するマウスの免疫活性賦活による機序が関与しているか）、除外した。

検討数であるが、Ad-GAL4-minVP16-SREBP1c FL を注射したマウスは、CTRL 群 13 匹、EPA 群 16 匹。Ad-GAL4-minVP16-SREBP2 FL を注射したマウスは、CTRL 群 8 匹、EPA 群 10 匹。Ad-GAL4-minVP16-hybridN1C2 を注射したマウスは、CTRL 群 6 匹、EPA 群 9 匹。Ad-GAL4-minVP16-hybridN2C1 を注射したマウスは、CTRL 群 9 匹、EPA 群 10 匹。Ad-GAL4-minVP16-SREBP-1c Nuc 1-436 を注射したマウスは、CTRL 群 3 匹、EPA 群 5 匹。Ad-GAL4-minVP16-SREBP-1c Nuc 1-777 を注射したマウスは、CTRL 群 6 匹、EPA 群 6 匹であった。実験方法 (9) に準じ、day0 における IVIS にてルシフェラーゼ値を測定し、同日より PUFA 投与を開始した。4 日間連日に渡る PUFA 投与を終え、day4 におけるルシフェラーゼ値を測定した（それぞれのコンストラクトについて、day0 から day4 にかけての変化を追った写真の一例を、(Fig. 47)～(Fig. 50)、(Fig. 52)、(Fig. 53) に示した）。day0 および day4 におけるルシフェラーゼ値の平均を取り、day0 に対する day4 のルシフェラーゼ値の変化率を表した結果、(Fig. 51) および (Fig. 54) のよう

なグラフが得られた(つまり、day0における平均ルシフェラーゼ値を「1」とした時に、day4における平均ルシフェラーゼ値を求め、各種コンストラクト毎に比較したグラフである)。具体的には、Ad-GAL4-minVP16-SREBP1c FLを注射したマウスにおける平均ルシフェラーゼ値の変化率は、CTRL群を1とした時、EPA群で0.465であった

( $P=0.0449$  by t-test)。同様にAd-GAL4-minVP16-SREBP2 FLを注射したマウスは、CTRL群を1とした時、EPA群で1.421 ( $P=0.525$  by t-test)。

Ad-GAL4-minVP16-hybridN1C2を注射したマウスは、CTRL群を1とした時、EPA群で3.894 ( $P=0.301$  by t-test)。Ad-GAL4-minVP16-hybridN2C1を注射したマウスは、CTRL群を1とした時、EPA群で0.422 ( $P=0.014$  by t-test)であった。

Ad-GAL4-minVP16-SREBP-1c Nuc 1-436を注射したマウスは、CTRL群を1とした時、EPA群で3.34 ( $P=0.165$  by t-test)。Ad-GAL4-minVP16-SREBP-1c Nuc 1-777を注射したマウスは、CTRL群を1とした時、EPA群で10.40 ( $P=0.096$  by t-test)であった。

Fig.47 IVISで測定した生体(マウス肝臓)におけるルシフェラーゼ値  
自作のコンストラクト毎におけるday0とday4の画像の変化

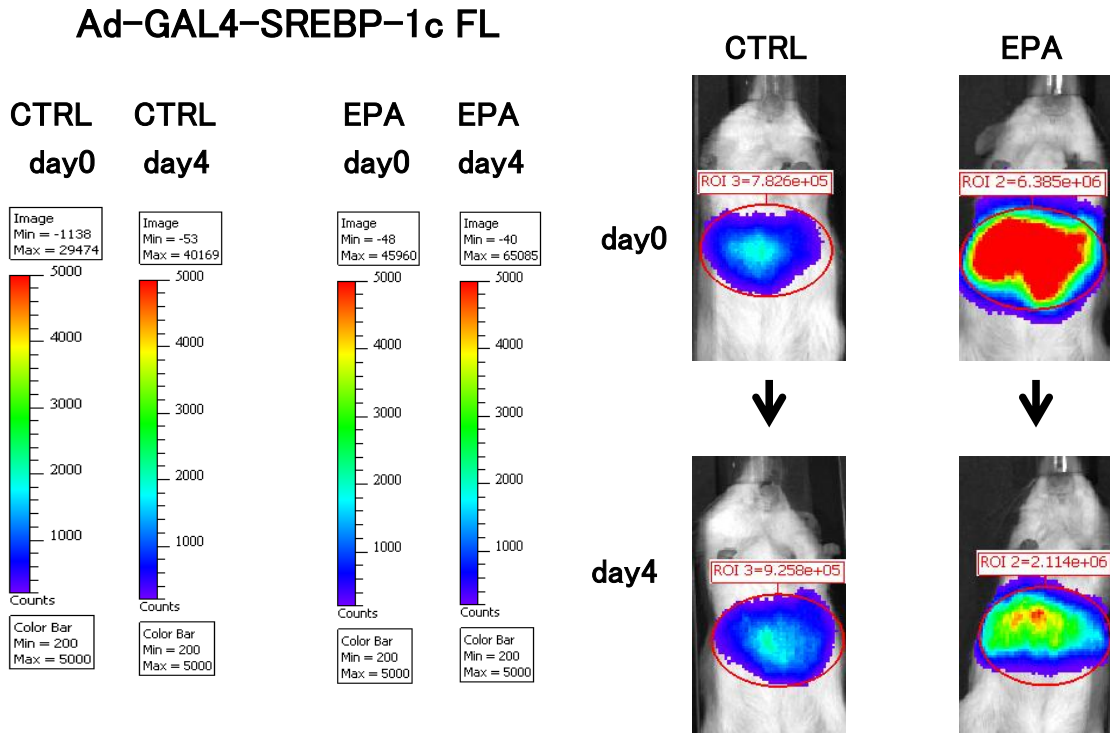


Fig.48 IVISで測定した生体(マウス肝臓)におけるルシフェラーゼ値  
自作のコンストラクト毎におけるday0とday4の画像の変化

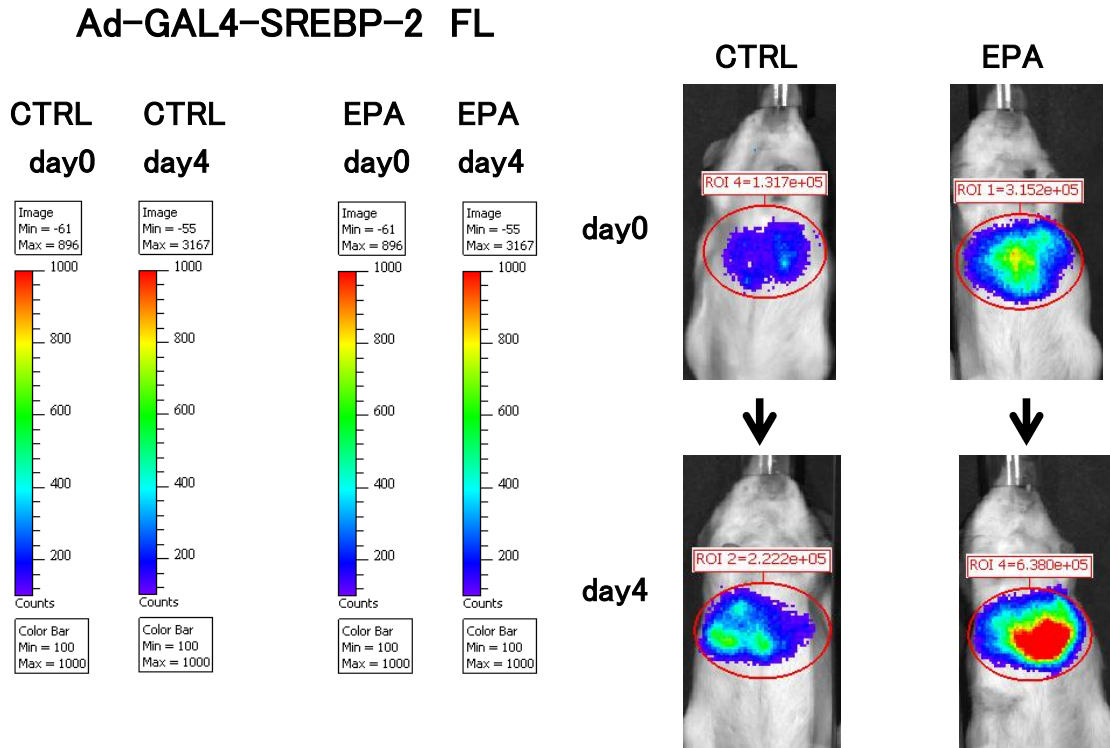


Fig.49 IVISで測定した生体(マウス肝臓)におけるルシフェラーゼ値  
自作のコンストラクト毎におけるday0とday4の画像の変化

Ad-GAL4-hybrid N1C2

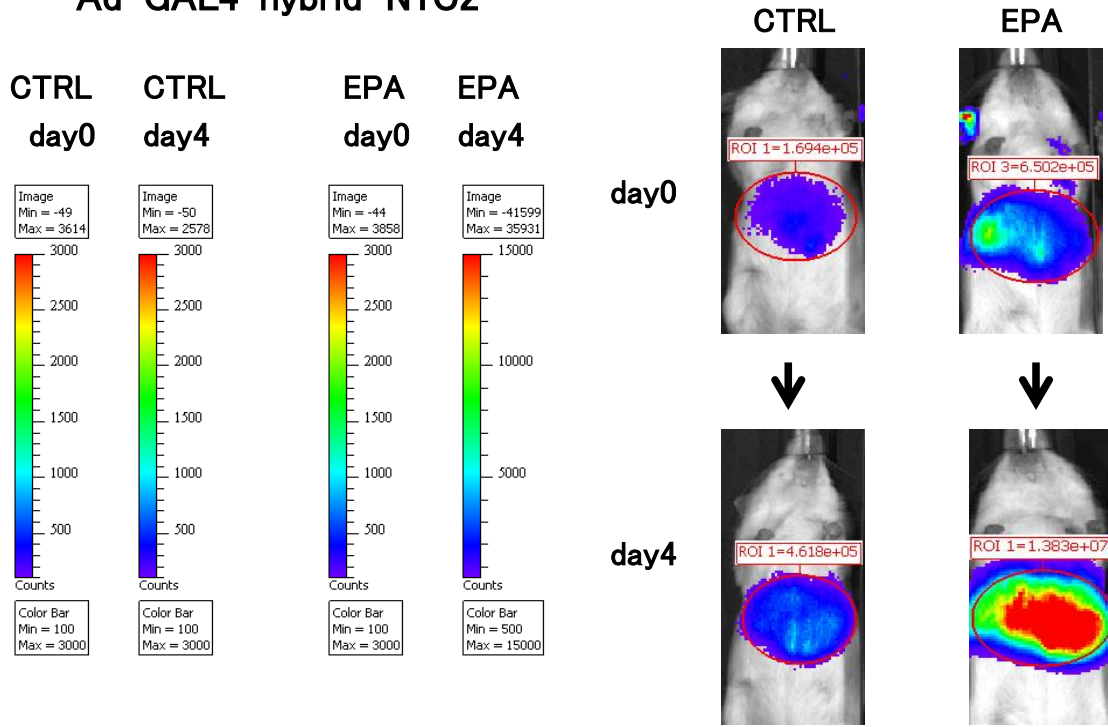


Fig.50 IVISで測定した生体(マウス肝臓)におけるルシフェラーゼ値  
自作のコンストラクト毎におけるday0とday4の画像の変化

Ad-GAL4-hybrid N2C1

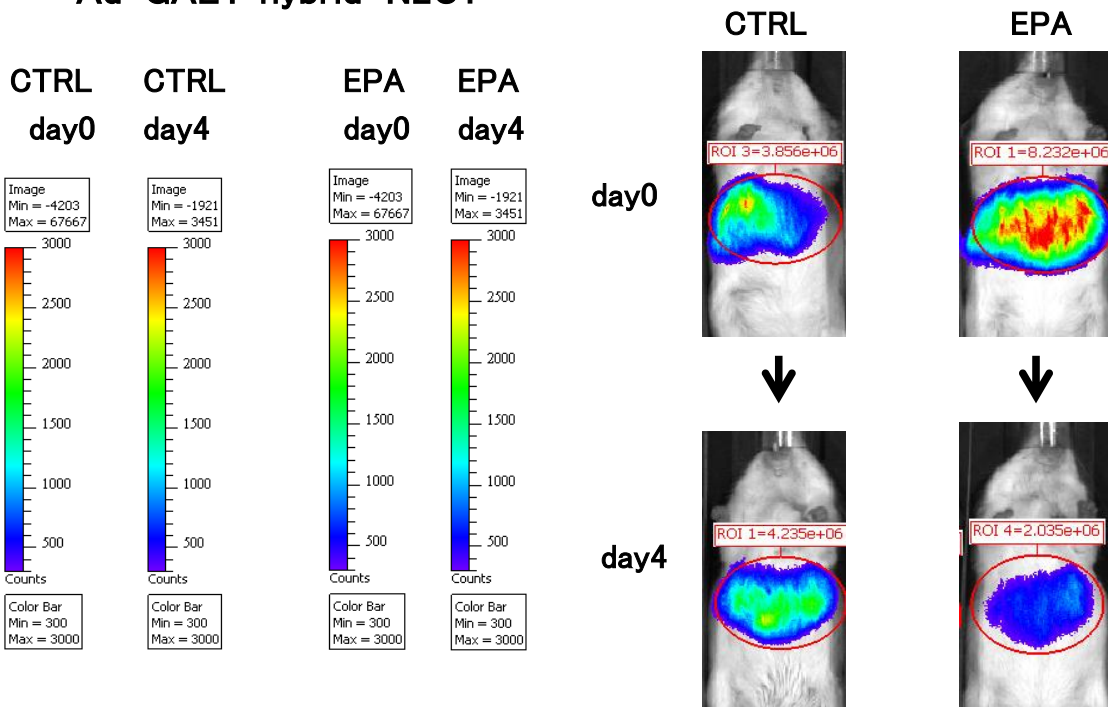


Fig.51 IVISで測定した生体(マウス肝臓)におけるルシフェラーゼ値  
各コンストラクト毎におけるCTRL群およびEPA群の比較

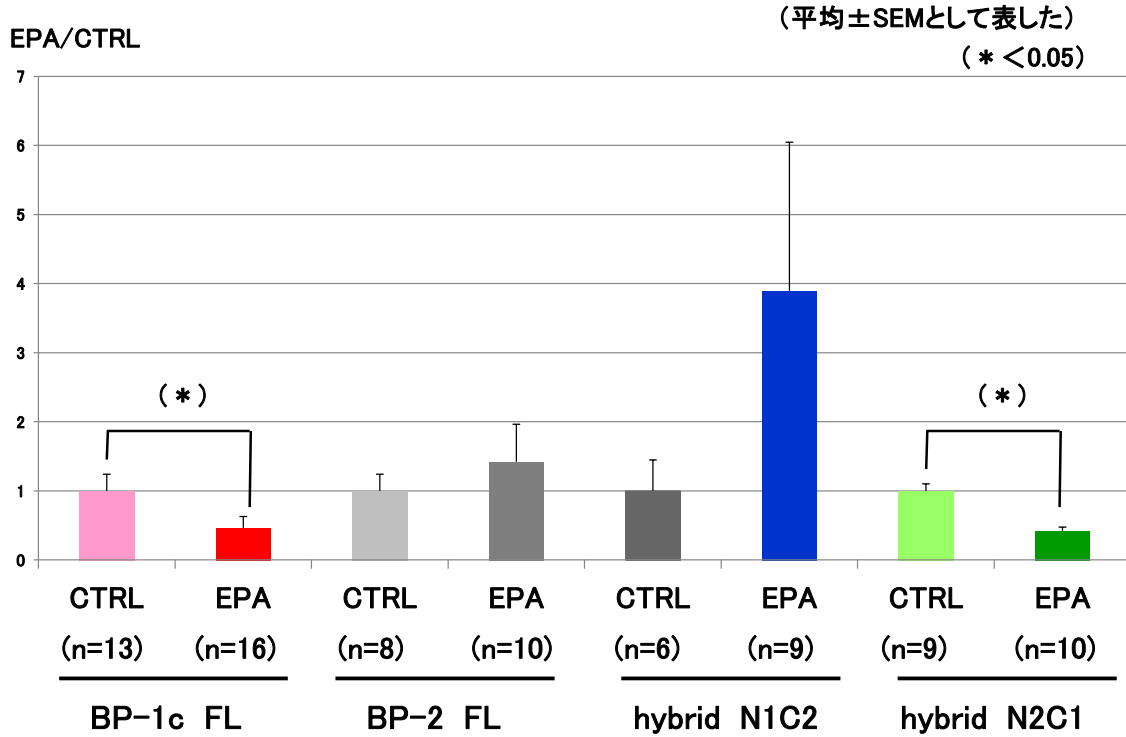


Fig.52 IVISで測定した生体(マウス肝臓)におけるルシフェラーゼ値  
自作のコンストラクト毎におけるday0とday4の画像の変化

Ad-GAL4-SREBP-1c Nuc1-436

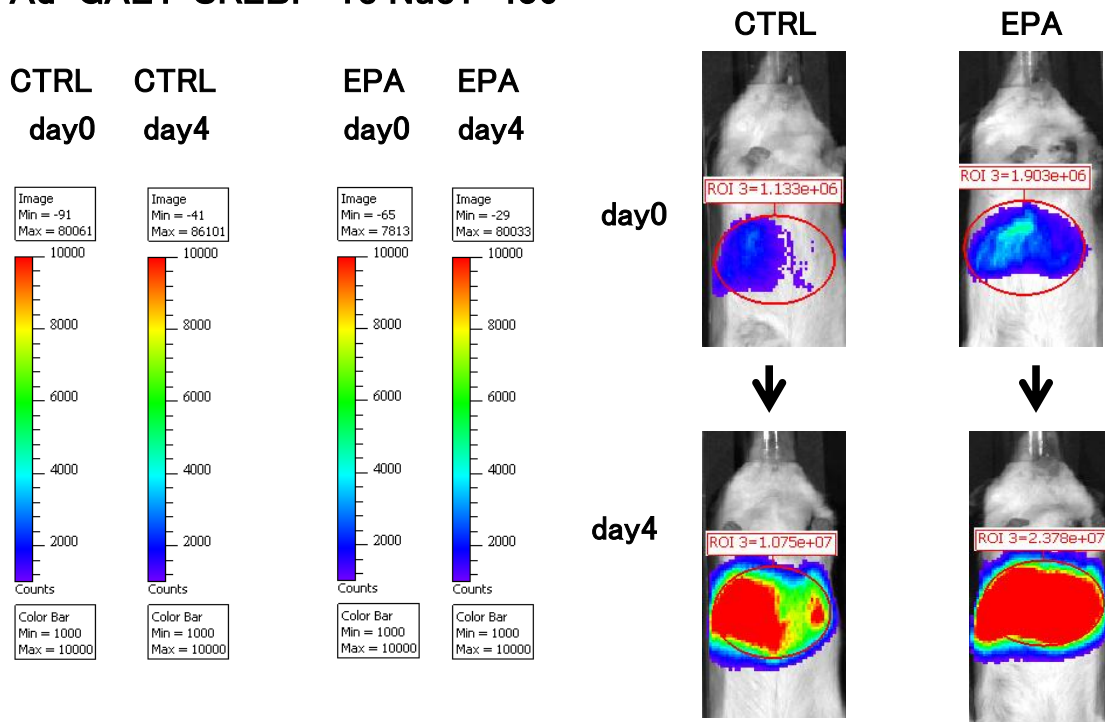


Fig.53 IVISで測定した生体(マウス肝臓)におけるルシフェラーゼ値  
自作のコンストラクト毎におけるday0とday4の画像の変化

Ad-GAL4-SREBP-1c Nuc1-777

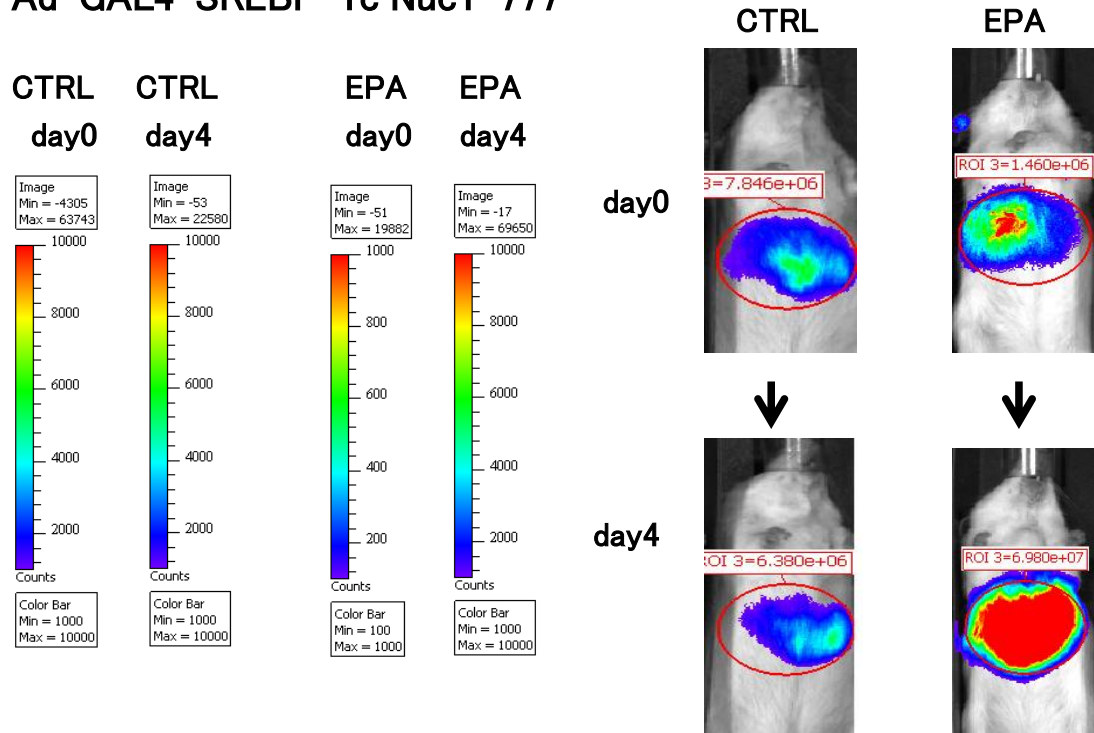
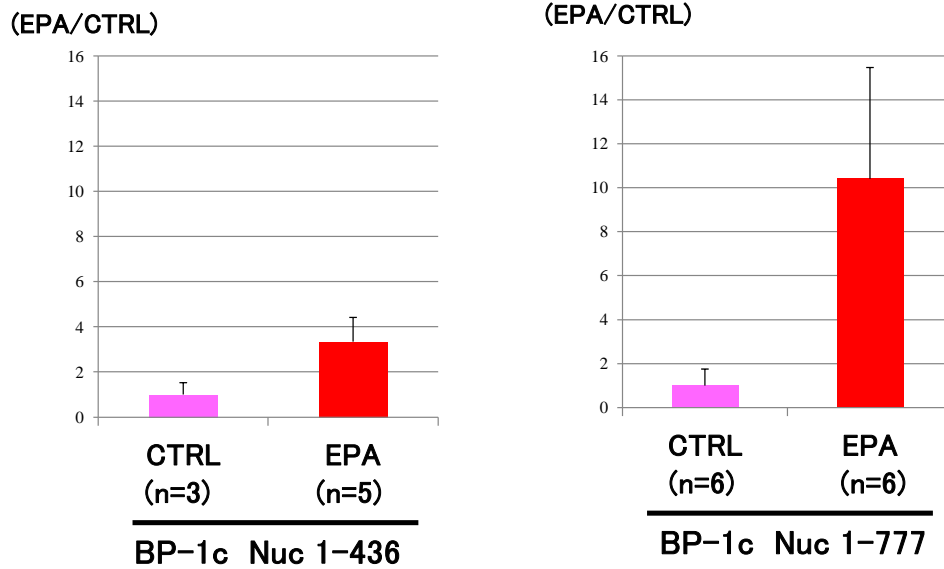


Fig.54 IVISで測定した生体(マウス肝臓)におけるルシフェラーゼ値  
CTRL群およびEPA群の比較

(平均±SEMとして表した)



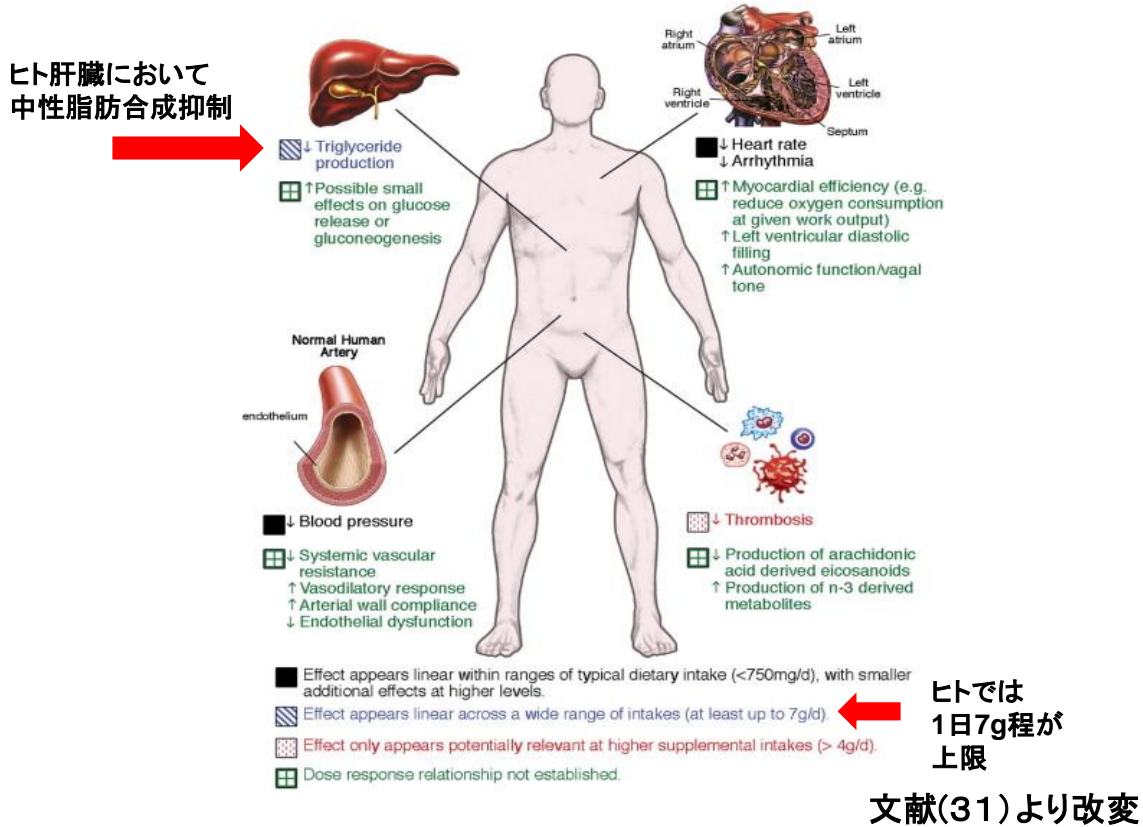
## 考 察

本研究において、マウス肝臓において多価不飽和脂肪酸(PUFA)は核型 SREBP-1c の発現を抑制し、核型 SREBP-2 に関しては影響を与えないという先行研究の結果に矛盾することなく、SREBP-1c に対する PUFA の特異的な作用ドメインが COOH 末端側にある可能性を示した。SREBP 上の PUFA の作用点に関しては未解明の部分が多いが、今回の結果には解明への糸口があると考え、ここに報告する。我々の仮説としては、SREBP-1 に特異的な何らかの未知のアダプタータンパクが切断・活性化のプロセスに実は関与しているのではないかということ想定しているため、今回その作用ドメインが COOH 末端側にある可能性を示したことにより、今後は COOH 末端側の構造の解明を中心に、更なる検討を続けていく予定である。

最初に我々は、PUFA によりマウス肝臓の核型 SREBP-1c タンパク質量が低下することをイムノブロッティングで示した (結果 (1)) (Fig. 39) (Fig. 40)。経口摂取された PUFA は小腸から吸収され、triglyceride の一部として末梢に運ばれ、リン脂質に変換され細胞膜の構成成分となり、細胞膜上のタンパク質が変化することで多彩な生理活性が発揮される (Fig. 55) (31)。



Fig.55 ヒトにおけるPUFAの多彩な生理活性とその必要量



ヒトにおいて動脈硬化性疾患に対する様々な作用（抗不整脈、中性脂肪低下、心拍数低下、血圧低下、抗血栓等）が発生に要するまでの時間はそれぞれ異なっており（32）、赤血球膜や心筋細胞膜の EPA や DHA 濃度が安定するまで 30~60 日かかる（33）ことを考えると、(Fig. 39) で示した様に PUFA によるマウス肝臓の核型 SREBP-1c タンパク質量の低下が2日間という比較的短期間のうちに速やかに認められたことは興味深い。ただし、現在本邦でヒトに臨床応用されている EPA 投与量の上限は 1.8g~2.7g/day であり、我々がマウスに投与した PUFA は 7.5g/kg/day である。この量を仮にヒト（体重 60kg）に投与すると 450g/day に相当する。つまり、ヒトに許容されるよりも高用量の PUFA をマウスに投与する計算になるが、マウス肝臓において PUFA

の核型 SREBP-1c 抑制効果は dose-dependent に認められるため (20)、今回我々は PUFA 投与量を 7.5g/kg/day に統一して全ての実験を行った。

次に、2 種類の PUFA (EPA 単剤、EPA+DHA の混合製剤) を 4 日間投与した結果、両者同等にマウス肝臓における核型 SREBP-1c 抑制が認められた (Fig. 40)。肝臓における EPA や DHA の脂質代謝への影響は様々な分子メカニズムが想定されている (2) が、現段階では EPA と DHA のどちらが有意に肝臓における核型 SREBP-1c を抑制するかについて、動物実験を含めて確定的な報告はまだ無い。DHA (22:6n-3) は、EPA (20:5n-3) からエロンガーゼにより DPA (docosapentaenoic acid) に変換され、後に不飽和化酵素により DHA に変換されることは知られているが (Fig. 2) (2)、両者の差異はまだ明確でないため、今回我々は主に EPA 単剤を用いて実験を進めた。

次に、自作した転写活性化因子 GAL4-minVP16 に関して考察した。まず、培養細胞における結果 (2) (Fig. 41) では、VP16 版よりも minVP16 版の方でルシフェラーゼ値が大幅に高く、培養細胞において minVP16 版の方がより多くの reporter gene product を合成したことが分かった。また生体 (マウス肝臓) における IVIS 結果 (4) (Fig. 46) でも、minVP16 版の方でルシフェラーゼ値が大幅に高かった。この 2 つの結果からは、VP16 版よりも minVP16 版の方がより強いレポーター活性を有すると考えられた。

我々が用いた IVIS は、SREBP が 2 段階の切断を受け NH2 末端部が核内に移行し、UAS (upstream activation site) と結合すると、reporter gene product であるルシフ

ェラーゼが合成され、その値を評価するアッセイ系である (Fig. 38) 。 IVIS 結果 (4) (Fig. 46) で示した様に、VP16 版を用いた先行研究 (20) では、マウスにおけるレポーター活性が弱く、得られるルシフェラーゼ値が低いことから、SREBP 上の PUFA 応答性ドメインの絞り込みを行うために十分な期間、安定して IVIS の評価を継続することが困難であった。そのため、レポーター活性を強めるための工夫として、実験方法 (5)-①で検討したように minVP16 版に改変したところ、今回の結果のように十分な高いルシフェラーゼ値を得たため、改善がなされたと判断した。そこで、我々は転写活性化因子として、GAL4-minVP16 を用いて実験を進めた。

今回、我々はSREBP配列を改変した様々なDNA配列を作成したが、まず培養細胞において各種コンストラクトの性質を評価した (結果 (2)) (Fig. 42) ~ (Fig. 44) 。

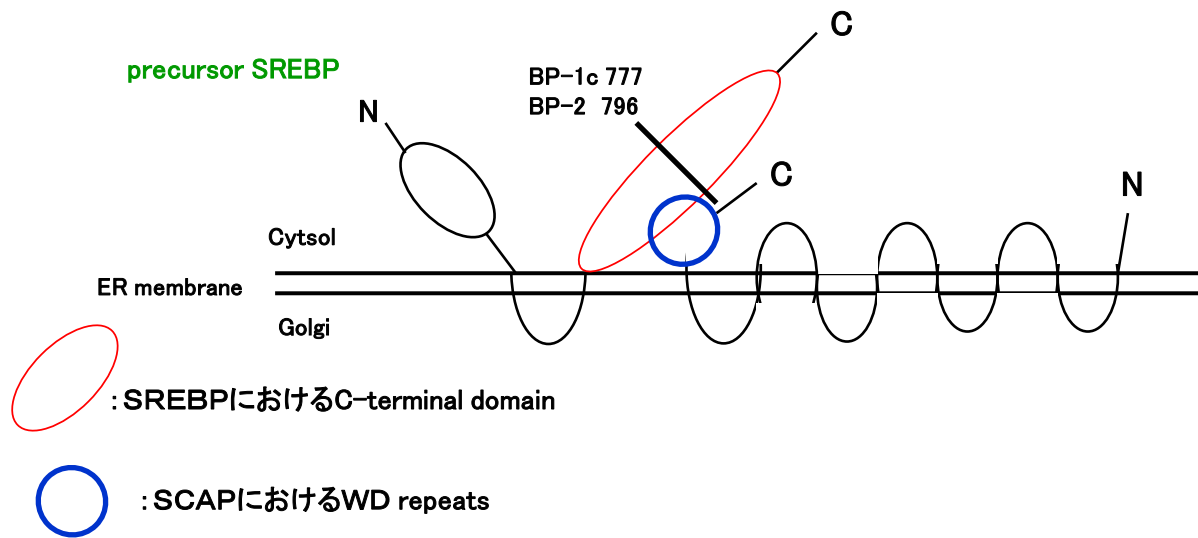
SREBP-1c Nuc 1-436およびSREBP-2 Nuc 14-460を除く全てのコンストラクトでは、SCAP共発現に伴い、ルシフェラーゼ値の上昇を認めた。一方で、SREBP-1c Nuc 1-436およびSREBP-2 Nuc 14-460の2種類のコンストラクトに関しては、SCAP共発現に伴ったルシフェラーゼ値の変化を認めなかった。

序論で前述したように、小胞体膜に存在するSREBPはCOOH末端同士でSCAPと結合し、Cop II と共にゴルジ体へ輸送され (13)、ゴルジ体でS1P、S2Pによって2か所の切断を受け、遊離したNH2末端側が核内へ移行する。酒井らの既報 (34) では、SREBP-2のCOOH末端部を削除していくと、S1P及びS2Pによる切断が徐々に低下し消失したこと

や、SCAP/SREBP複合体複合体の形成も同様に消失したことから、このSCAP/SREBP複合体がS1P及びS2Pの切断に必須であると決定付けた。

我々の作成したコンストラクトのうち、SCAPとの結合部位であるCOOH末端部を削除したコンストラクトは、SREBP-1c Nuc 1-436およびSREBP-2 Nuc 14-460、SREBP-1c Nuc 1-777およびSREBP-2 Nuc 14-796の4種類である。このうち前2者は、SCAPを共発現しても切断が生じなかったことから、膜結合部位を持たずそのまま核へ移行する活性型として存在していると考えられた。一方後2者は、COOH末端を有する他のコンストラクトと同様に、SCAP共発現に伴い切断による活性化が起きたことから、SCAPとinteract出来る構造を保持していると考えられた。SCAPと結合するSREBPのC-terminal regulatory domainの具体的な部位の詳細は未解明であるが、今回の結果から、SCAPとの相互作用部位が、transmembraneからSREBP-1c 777、SREBP-2 796の間にある可能性が示唆された (Fig. 56)。

Fig.56 SREBPとSCAPの複合体形成  
(本研究から得られた仮説)



(※) 培養細胞におけるSREBP-1c Nuc 1-777およびSREBP-2 Nuc 14-796は、SCAP添加で切断による活性化が起きており、SCAPとinteract出来る構造を有していると思われた。つまり、SCAPとSREBPの相互作用部位の開始点はtransmembraneからSREBP-1c 777 (SREBP-2では796)の間にある可能性が高いと考えた。

そして、生体（マウス肝臓）において、PUFA が SREBP-1c および SREBP-2 に対して及ぼす影響について、IVIS を用いて検討した（結果（5））。結果、マウス肝臓において PUFA は核型 SREBP-1c の発現を抑制する一方、核型 SREBP-2 に関しては影響を与えないことが判明した（Fig. 51）。これは先行研究（20）に矛盾しない結果であった。

また、hybrid N2C1 に関しては、SREBP-1c と同様、PUFA 投与群において核型 SREBP の核への移行が抑制されていた。一方 hybridN1C2 では、SREBP-2 と同様、PUFA 投与群でも核型 SREBP の核への移行は抑制されないという興味深い結果が得られた。つまり、PUFA 投与下で、SREBP-1c と hybrid N2C1 が類似の動態（核型 SREBP がの発現が

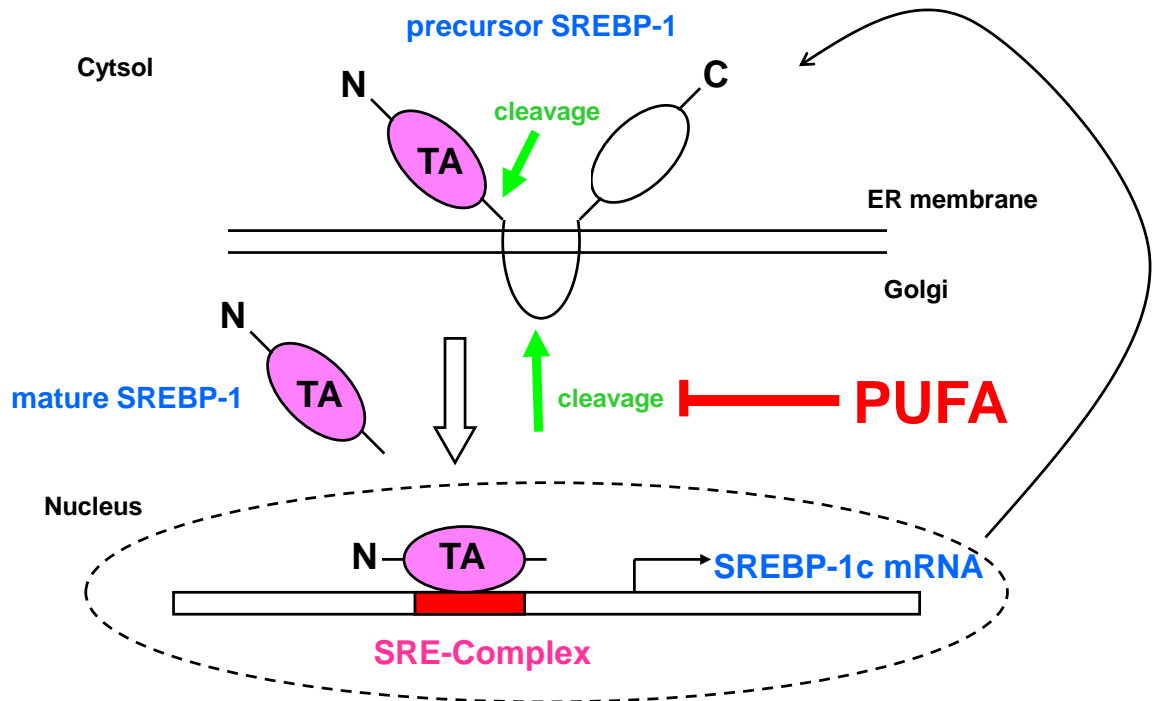
抑制された)を呈し、一方 SREBP-2 と hybridN1C2 が類似の動態 (核型 SREBP の発現が抑制されなかった)を呈した。

今回我々が作成した hybrid (Fig. 26) は、S1P による切断部位の直下で SREBP-1c と SREBP-2 を組み替えた。そのため、COOH 末端側が SREBP-1c の配列を有する hybridN2C1 において PUFA による核型 SREBP の抑制効果が見られた結果 (Fig. 51) から、SREBP-1c に対する PUFA の作用ドメインは、S1P で切断を受ける部分よりも下流である COOH 末端側に存在する可能性があるのではないかと考えた。また、COOH 末端側が SREBP-2 の配列である hybridN1C2 では、PUFA による核型 SREBP の抑制効果が見られなかった結果 (Fig. 51) も併せると、SREBP-1c と SREBP-2 における PUFA の作用ドメインの差異は、COOH 末端側に存在する可能性が強く示唆された (Fig. 57)。

更に、SREBP-1c Nuc 1-436 及び SREBP-1c Nuc 1-777 の配列において、PUFA による核型 SREBP の抑制効果が見られなかった結果 (Fig. 54) からは、SREBP-1c に対する PUFA の特異的な作用ドメインが、SREBP-1c 777 よりも更に COOH 末端側にある可能性もあると考えた。

このように、具体的な SREBP 配列をもとに、SREBP に対する PUFA の作用ドメインを模索し、同定した先行研究がまだ無いため、ここに報告する。

Fig.57 本研究により提唱されたPUFAによるSREBP-1抑制機構



序論で前述したように、SREBP-1 と SREBP-2 は比較的高いアミノ酸相同性を有しているにも関わらず (Fig.9) (14)、我々の行った実験では、PUFA 投与に対する核型タンパク質の発現には、前者が抑制され、後者が抑制されないという点において差異が認められた。他にも、SREBP-1c が摂食刺激により遺伝子発現を亢進させるのに対し、SREBP-2 の遺伝子発現は絶食-摂食サイクルで大きな変動を見せないといった差異や、SREBP-1c が脂肪細胞分化の制御因子としてクローニングされた経緯を持ち、脂肪細胞の分化過程で発現が上昇するが、SREBP-2 は脂肪細胞分化過程で発現に変動を示さない (35) 等といった差異も報告されている。

アミノ酸配列の相同性が高い SREBP-1 と SREBP-2 が、なぜこの様に生体における役

割に差異を有するかに関して、分子メカニズムの観点からの明確な報告はまだ無い。我々の研究グループは、PUFA が SREBP-1 の切断による活性化を抑制すること（一方で SREBP-2 の活性化は抑制しないこと）を先行論文で明らかにした（20）。しかし、PUFA の作用点と考えられる「切断・活性化」のプロセスについては、SCAP による小胞体からゴルジ体への輸送とゴルジ体での S1P 及び S2P による切断しか明らかになっておらず、これらのプロセスについては、SREBP-1 も-2 も全く同様と考えられている。すなわち、SREBP-1 と-2 とで全く同じ活性化機序が働くと考えられているのにも関わらず、PUFA の作用が SREBP-1 特異的となるメカニズムは全く不明であり、本研究の最終目標はこの SREBP-1 特異的な PUFA の作用メカニズムを明らかにすることである。

我々の仮説としては、SREBP-1 に特異的な何らかの未知のアダプタータンパクが切断・活性化のプロセスに実は関与しているのではないかとすることを想定しており、その未知のアダプタータンパクの実体に迫るための手がかりとして、SREBP-1 上の PUFA 作用ドメインを絞り込むことを本研究で目指した。その未知のアダプタータンパクを介して SREBP-1 と SCAP との相互作用に PUFA が影響を及ぼすのではないかと予想している。

ただし、もうひとつ、全く別の仮説として、ゴルジ体から小胞体への逆輸送という経路も SREBP の活性化調節に関して知られるようになってきており（36）、その逆輸送系に PUFA が影響を与えている可能性も理論上は考えられる。すなわち、Cop I と複合体を形成してゴルジ体から小胞体に「戻る」際の動態において SREBP-1 と SREBP-2



との間に PUFA への反応の差異が存在している可能性も考えられる (37)。

最後に、今回我々は EPA 単剤を用いてマウス肝臓における核型 SREBP-1c の抑制効果を検討したが、PUFA の種類によって、SREBP の分子メカニズムにも影響を及ぼすかどうか追究することも、動脈硬化性疾患に対する治療の観点からは意義深い。例えば哺乳動物は n-3 系脂肪酸合成酵素を有さないが、線虫は脂肪酸の n-3 位に二重結合を付加し、アラキドン酸から EPA に変換する n-3 系脂肪酸合成酵素 Fat-1 を持つため、体内で n-3 系脂肪酸を合成することが出来る。この Fat-1 を全身に発現させた遺伝子改変マウス fat-1 マウスの組織では、遺伝学的に n-3 系脂肪酸/n-6 系脂肪酸比が高い状態が維持され (38)、癌の増殖や転移に抵抗性を示し (39)、高脂肪食飼育下で抗動脈硬化作用を呈した報告 (40) がある。

その一方で、PUFA が欠乏すると、知能発達障害、皮膚障害、視覚障害、さらには免疫機能障害から心血管機能障害まで様々な病態や疾患を引き起こすことも知られている (41) (42)。これらの中にはプロスタグランジンなど脂質性メディエーターの欠乏で説明可能なものもあるが、脳神経系の発達等については、アラキドン酸代謝物だけでは説明できず、PUFA が他にも重要な機能を果たしていることが予想できる。しかし、その分子的基盤はほとんど解明されていない。

本研究を通じて、多彩な生理作用を有する PUFA において、SREBP-1 を特異的に抑制する分子機構を明らかにすることができれば、その分子をターゲットとする分子標的薬の開発にも道が開かれるかもしれない。

## 総 括

1. マウス肝臓において多価不飽和脂肪酸(PUFA)は核型 SREBP-1c の発現を抑制し、核型 SREBP-2 に関しては影響を与えないという先行研究の結果に矛盾することなく、SREBP-1c に対する PUFA の特異的な作用ドメインが COOH 末端側にあることを示した。またその作用ドメインは具体的に、SREBP-1c 777 よりも更に COOH 末端側にある可能性も示した。
2. 転写活性化因子を GAL4 DBD-VP16 から GAL4 DBD-minimumVP16 に変更することで、レポーター活性を上昇させることが出来た。
3. SREBP と SCAP の相互作用部位が、transmembrane から SREBP-1c 777 および SREBP-2 796 の間にある可能性を示した。

以上のような脂質代謝を制御する SREBP の分子メカニズムの解明は、

動脈硬化性疾患のみならず種々の病態の解明や治療に役立つことが期待される。

## 謝 辞

研究のテーマを御提供いただき、御鞭撻を賜りました筑波大学医学医療系内分泌代謝・糖尿病内科 矢作直也准教授に謹んで御礼申し上げます。幅広い視野から、懇切なる御指導を誠にありがとうございました。

いつも心強い御指導と温かな励ましを賜りました筑波大学医学医療系内分泌代謝・糖尿病内科 武内謙憲先生に心より感謝申し上げます。これからも先生の真摯な姿勢を深く尊敬申し上げます。

御指導ならびに御協力をいただきました東京大学医学部糖尿病・代謝内科（旧第3内科）2・11研究室 岡崎啓明先生、飯塚陽子先生、泉田欣彦先生、高瀬暁先生、高梨幹生先生、岡崎佐智子先生、久保田みどり先生、高三佳子様にも心より感謝申し上げます。日々明るく支えてくださってありがとうございました。大学院への進学を導いて下さった関谷元博先生にも心より感謝申し上げます。

私達大学院生のために豊かな研究環境を守ってくださり、日々の御指導をくださいました東京大学大学院医学系研究科 代謝・栄養病態学 門脇孝教授に心より御礼と感謝を申し上げます。長きに渡り御指導を誠にありがとうございました。

## 引用文献

- (1) Haim Shapiro, Miryam Theilla, Joelle Attal-Singer & Pierre Singer. Effects of polyunsaturated fatty acid consumption in diabetic nephropathy. *Nature Reviews Nephrology* 7:110-121. 2011
- (2) Harris WS, Miller M, Tighe AP, Davidson MH, Schaefer EJ. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: Clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis* 197(1):12-24. 2008
- (3) Allmann DW, Gibson DM. Fatty acid synthesis during early linoleic acid deficiency in the mouse. *Journal of Lipid Research* 6:51-62. 1965
- (4) Blackburn H, Taylor HL, Keys A. Coronary heart disease in seven countries. *Circulation* 41(4Suppl):154-161. 1970
- (5) Dyerberg J, Bang HO, Stoffersen E, Moncada S, Vane JR. Eicosapentanoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? *Lancet*;2(8081):117-119. 1978
- (6) Yasushi Saito, Mitsuhiro Yokoyama, Hideki Origasa, Masunori Matsuzaki, Yuji Matsuzawa, Yuichi Ishikawa, Shinichi Oikawa, Jun Sasaki, Hitoshi Hishida, Hiroshige Itakura, Toru Kita, Akira Kitabatake, Noriaki Nakaya, Toshiie Sakata, Kazuyuki Shimada, Kunio Shirato. Effects of EPA on coronary artery disease in hypercholesterolemic patients with multiple risk factors: Sub-analysis of primary prevention cases from the Japan EPA Lipid Intervention

Study(JELIS). *Atherosclerosis* 200(1):135-140. 2008

(7) Jay D. Horton, Joseph L. Goldstein and Michael S. Brown. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of Clinical Investigation* 109(9):1125-1131. 2002

(8) Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL, Brown MS. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* 75(1):187-197. 1993

(9) Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, Brown MS, Goldstein JL, Wang X. SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(24):11603-11607. 1993

(10) Hua X, Nohturfft A, Goldstein JL, Brown MS. Sterol Resistance in CHO Cells Traced to Point Mutation in SREBP Cleavage-Activating Protein. *Cell* 87(3):415-426. 1996

(11) Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(20):11041-11048. 1999

(12) Radhakrishnan A, Goldstein JL, McDonald JG, Brown MS. Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance. *Cell Metabolism* 8(6):512-521. 2008

(13) Sun LP, Li L, Goldstein JL, Brown MS. Insig Required for Sterol-mediated Inhibition of Scap/SREBP Binding to COP II Proteins in Vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 280(28):26483-26490. 2005

(14) Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89(3):331-340. 1997

(15) Eberlé D, Hegarty B, Bossard P, Ferré P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86(11):839-848. 2004

(16) Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells.

*Journal of Clinical Investigation* 99(5):838-845. 1997

(17) Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hastay AH, Osuga J, Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *The Journal of Biological*

Chemistry 274(50):35832–35839. 1999

(18) Yahagi N, Shimano H, Hastay AH, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N. A Crucial Role of Sterol Regulatory Element-binding Protein-1 in the Regulation of Lipogenic Gene Expression by Polyunsaturated Fatty Acids. The Journal of Biological Chemistry 274(50):35840–35844. 1999

(19) Yoshikawa T, Shimano H, Yahagi N, Ide T, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, Nakakuki M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Takahashi A, Sone H, Osuga J, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. The Journal of Biological Chemistry 277(3):1705–1711. 2002

(20) Takeuchi Y, Yahagi N, Izumida Y, Nishi M, Kubota M, Teraoka Y, Yamamoto T, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Sekiya M, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Gotoda T, Ishibashi S, Itaka K, Kataoka K, Nagai R, Yamada N, Kadowaki T, Shimano H. Polyunsaturated fatty acids selectively suppress sterol regulatory element-binding protein-1 through proteolytic processing and autoloop regulatory circuit.

The Journal of Biological Chemistry 285(15):11681–11691. 2010

( 2 1 ) Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, Takeuchi Y, Nakagawa Y, Takahashi H, Okazaki H, Iizuka Y, Ohashi K, Gotoda T, Ishibashi S, Nagai R, Yamazaki T, Kadowaki T, Yamada N, Osuga J, Shimano H. SREBP-1-independent regulation of lipogenic gene expression in adipocytes. *Journal of Lipid Research* 48(7):1581-1591. 2007

( 2 2 ) Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, Najima Y, Nakakuki M, Nagai R, Ishibashi S, Osuga J, Yamada N, Shimano H. Polyunsaturated Fatty Acids Ameliorate hepatic steatosis in Obese Mice by SREBP-1 Supression. *Hepatology* 38(6):1529-1539. 2003

( 2 3 ) Berger SL, Cress WD, Cress A, Triezenberg SJ, Guarente L. Selective inhibition of activated but not basal transcription by the acidic activation domain of VP16: evidence for transcriptional adaptors. *Cell* 61(7):1199-1208. 1990

( 2 4 ) Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, Ptashne M. GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* 335(6190):563-564. 1988

( 2 5 ) Seipel K, Georgiev O, Schaffner W. Different activation domains stimulate transcription from remote( ^ enhancer ^ )and proximal( ^ promoter ^ )positions. *The EMBO Journal* 11(13):4961-4968. 1992

( 2 6 ) Baron U, Gossen M, Bujard H. Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Research* 25(14):2723-2729. 1997



- ( 2 7 ) Sakai J, Duncan EA, Rawson RB, Hua X, Brown MS, Goldstein JL. Sterol-Regulated release of SREBP-2 from Cell Membrane Requires Two Sequential Cleavages, One Within a Transmembrane Segment. *Cell* 85(7):1037-1046. 1996
- ( 2 8 ) Sato R. Sterol metabolism and SREBP activation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 501(2):177-181. 2010
- ( 2 9 ) Hua X, Sakai J, Brown MS, Goldstein JL. Regulated Cleavage of Sterol Regulatory Element-binding Proteins Requires Sequences on Both Sides of the Endoplasmic Reticulum Membrane. *The Journal of Biological Chemistry* 271(17):10379-10384. 1996
- ( 3 0 ) Yanagi Y, Suzawa M, Kawabata M, Miyazono K, Yanagisawa J, Kato S. Positive and Negative Modulation of Vitamin D Receptor Function by Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling through Smad Proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 274(19):12971-12974. 1999
- ( 3 1 ) Mozaffarian D, Wu JH. Omega-3 fatty acids and cardiovascular diseases. Effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *Journal of the American College of Cardiology* 58(20):2047-2067. 2011
- ( 3 2 ) Lavie CJ, Milani RV, Mehra MR, Ventura HO. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *Journal of the American College of Cardiology*

54(7):585-594. 2009

(33) Metcalf RG, James MJ, Gibson RA, Edwards JR, Stubberfield J, Stuklis R, Roberts-Thomson K, Young GD, Cleland LG. Effects of fish-oil supplementation on myocardial fatty acids in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 85(5):1222-1228. 2007

(34) Sakai J, Nohturfft A, Cheng D, Ho YK, Brown MS, Goldstein JL. Identification of Complexes between the COOH-terminal Domains of Sterol Regulatory Element-binding Proteins (SREBPs) and SREBP Cleavage-Activating Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 272(32):20213-20221. 1997

(35) Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR $\gamma$ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes & Development* 8(10):1224-1234. 1994

(36) Takashima K. Regulation of Lipid Biosynthesis by Golgi-to-ER Retrograde Traffic via COP I-coated Vesicles. (平成 25 年 京都大学 博士 (薬学) 学位論文)

(37) Brandizzi F, Barlowe C. Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nature* 454(7202):382-392. 2003

(38) Kang JX, Wang J, Wu L, Kang ZB. Transgenic mice: fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids. *Nature* 427(6974):504. 2004

(39) Kang JX. Fat-1 transgenic mice: a new model for omega-3 research.

Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 77(5-6):263-267. 2007

(40) Wan JB, Huang LL, Rong R, Tan R, Wang J, Kang JX. Endogenously decreasing tissue n-6/n-3 fatty acid ratio reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice by inhibiting systemic and vascular inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 30(12):2487-2494. 2010

(41) Umemura K, Kato I, Hirashima Y, Ishii Y, Inoue T, Aoki J, Kono N, Oya T, Hayashi N, Hamada H, Endo S, Oda M, Arai H, Kinouchi H, Hiraga K. Neuroprotective role of transgenic PAF-acetylhydrolase II in mouse models of focal cerebral ischemia. *Stroke* 38(3):1063-1068. 2007

(42) Orr SK, Palumbo S, Bosetti F, Mount HT, Kang JX, Greenwood CE, Ma DW, Serhan CN, Bazinet RP. Unesterified docosahexaenoic acid is protective in neuroinflammation. *Journal of Neurochemistry* 127(3):378-393. 2013