

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 升田 紫

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。

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トングで示し、マウスへの PUFA 投与量を 7.5g/kg/day に統一し実験を行うことを決めた。また 2 種類の PUFA (EPA 単剤、EPA+DHA の混合製剤) を投与し、両者同等にマウス肝臓における核型 SREBP-1c 抑制を認めた。しかし現段階で EPA と DHA のどちらが有意に肝臓における核型 SREBP-1c を抑制するか確定的な報告が無いため、我々は EPA 単剤を用いて実験を進めることとした。

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。先行研究では、マウスにおけるレポーター活性が弱く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、複数の既報を参考に転写活性化因子を GAL4-VP16 から GAL4-minVP16 に改変したところ、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を得ることが出来た。この結果から、先行研究で用いた GAL4-VP16 よりも GAL4-minVP16 の方が強いレポーター活性を有すると考えられ、我々は自作の GAL4-minVP16 を用いて実験を行った。

次に我々は、SREBP-1 上の PUFA 作用ドメインを絞り込むために、SREBP 配列を改変した様々な DNA 配列を設計した。基本的な配列となる 2 種類の SREBP FL (full length) バージョン「SREBP-1c FL 1-1123」・「SREBP-2 FL 14-1141」に加え、C-terminal regulatory domain を残し N-terminal nuclear part を削除した 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」や、N-terminal nuclear part を残し C-terminal regulatory domain を削除した 4 種類の Nuc「SREBP-1c Nuc 1-436」・「SREBP-1c Nuc 1-777」・「SREBP-2 Nuc 14-460」・「SREBP-2 Nuc 14-796」を作成した。他にも、2 種類の hybrid (N-terminal nuclear part が SREBP-1c (1-518) で C-terminal regulatory domain が SREBP-2 (547-1141) である hybrid N1C2 と、N-terminal nuclear part が SREBP-2 (14-546) で C-terminal regulatory domain が SREBP-1c (519-1123) である hybrid N2C1) を設計した。これらは PCR を行いクローニングし、pCDNA3.1(+)-GAL4-minVP16 や pENTR4-GAL4-minVP16 内に挿入した。

まず培養細胞において、自作した各種コンストラクトの性質を評価した。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、SREBP-1c Nuc 1-436 および SREBP-2 Nuc 14-460 の 2 種類に関しては、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。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、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が、この SCAP/SREBP 複合体は S1P の切断に必須であることが知られている。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すると考えられた。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、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

が強く示唆された。

次に、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、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。これは我々のグループの先行研究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。我々が作成した hybrid は、S1P による切断部位の直下で SREBP-1c と SREBP-2 を組み替えており、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 の抑制が見られた結果から、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 の抑制が見られなかった結果も併せ、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示唆された。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 の抑制が見られなかった結果からは、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。

本研究の他にも、アミノ酸配列の相同性が比較的高い SREBP-1 と SREBP-2 が生体において異なった役割を担っている既報はあるが、その理由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。また、SREBP に対する 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いうこと想定しており、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。

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、癌の増殖や転移に抵抗性を示し、高脂肪食飼育下で抗動脈硬化作用を呈した報告がある。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。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。今回の我々の実験の結果をもとに、今後も 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。