

審査の結果の要旨

氏名 升田 紫

脂質代謝を制御する転写因子として SREBP (sterol regulatory element-binding protein) が知られる。我々は先行研究において、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、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。そこで本研究では、SREBP-1 上の PUFA 作用ドメインを絞り込むことを試み、下記の結果を得た。

1. IVIS は、SREBP が切断を受け 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、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、十分な期間、安定して評価することが困難であった。本研究では、レポーター活性を強めるために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、GAL4-VP16 よりも GAL4-minVP16 の方がより強いレポーター活性を有することが示された。
2. SREBP-1c 及び SREBP-2 について、それぞれの配列を改変した様々なコンストラクトを設計し、PCR を行いクローニングした。基本となる SREBP FL (full length) に加え、C-terminal **regulatory domain** のみを残した Reg や、N-terminal **nuclear part** のみを残した Nuc、NH2 側と COOH 側で SREBP-1c と SREBP-2 を組み替えた hybrid 等を自作し、培養細胞や IVIS を用いて特性を評価した。培養細胞を用いた実験では SCAP (SREBP cleavage-activating protein) を共発現させ、ルシフェラーゼ値の変化を検討した。SCAP との結合部位である COOH 末端側を削除したコンストラクトのうち、SREBP-1c Nuc 1-436 および SREBP-2 Nuc 14-460 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と考えられた。一方、SREBP-1c Nuc 1-777 および SREBP-2 Nuc 14-796 では、COOH 末端側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。この結果から 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。

3. 各種コンストラクトについて 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、S1P による切断部位の直下で SREBP-1c と SREBP-2 を組み替えた hybrid を評価した結果、COOH 末端側が SREBP-1c の配列を持つ hybrid において PUFA による切断活性の抑制が見られた。この結果から、SREBP-1c に対する PUFA の作用ドメインは 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 hybrid では、PUFA による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強く示唆された。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られた。

PUFA は多彩な生理作用を有するが、SREBP に対する作用点に関しては、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、PUFA の作用が SREBP-1 特異的に起こる分子的基盤はほとんど解明されていない。本論文は、具体的な SREBP 配列をもとに、SREBP-1 上の PUFA 作用ドメインを模索し、COOH 末端側にある可能性を初めて示した。

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ことで、PUFA が 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。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、学位の授与に値するものと考えられる。