【258】

氏　名（本籍）	井上訓之（北海道）（いのうえ のりゆき）
学位の種類	博　士（医　学）
学位記番号	博甲第 4398 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	**Lipid Synthetic Transcription Factor SREBP-1a Activates p21$^{WAF1/CIP1}$, a Universal Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor** （脂質合成系転写因子 SREBP-1a はサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p21$^{WAF1/CIP1}$ を活性化する）

主　査	筑波大学教授	医学博士	住田孝之
副　査	筑波大学教授		五十嵐徹也
副　査	筑波大学助教授	博士（医学）	竹越一博
副　査	筑波大学講師	博士（医学）	長谷川雄一

論文の内容の要旨

（目的）

近年，生活習慣病の増加により肥満は大変注目を浴びその制御機構の解明は非常に重要な役割を担う。肥満病変は一般的に脂肪細胞数の増加と細胞自身の肥大化を伴い進展する。このことは過栄養状態が細胞の増殖に関与していることを示唆するがそのメカニズムは明らかになっていない。また，細胞自身の膜成分は多種の脂質であり細胞自身の増殖・分裂の際には多くの脂質を必要とすると考えられる。このように，細胞増殖と脂質代謝は密に関わっていると考えられる。

我々は脂質合成系転写因子 SREBP（Sterol Regulatory Element-Binding Protein）を中心に研究を進めてきた。SREBP は脂質合成を支配的に調節している転写因子で，近年は脂質調節のみならず糖代謝やインスリンシグナルにも直接かかわることが証明され生活習慣病の中心的因子と考えられている。我々の研究において，肝臓特異的活性型 SREBP-1a 過剰発現遺伝子改変（Tg-SREBP-1a）マウスの DNA マイクロアレイ解析の結果，肝臓においてサイクリン依存性キナーゼ阻害因子である p21 遺伝子の発現がコントロールと比較し約 7 倍上昇していることがわかった。本研究は脂質合成系転写因子である SREBP が細胞周期調節因子である p21$^{WAF1/CIP1}$ を直接活性化し細胞周期停止を引き起こすことを見出した。

（対象と方法）

in vitro において SREBP が p21 遺伝子を直接活性化するかを検討する為に p21 プロモーターベクターを構築し，ルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。SREBP 作用部位の特定には deletion assay を行い活性制御部分の特定，ゲルシフトアッセイ（EMSA）にて DNA 結合部位の特定，さらに p21 プロモーター活性候補部位のエンハンサー活性の検討を行った。

また，培養細胞に SREBP を発現させ Northern blotting，Western blotting にて p21mRNA 発現量の変化やタンパク量の変化を検討した。内因性の SREBP による p21 活性化の検討には脂質欠乏培地により

SREBP を活性化させ p21 プロモーター活性やタンパクの量の変化を検討した。さらに SREBP 欠損による p21 発現量の検討には支配的活性抑制型 SREBP-Dominant Negative form（BPDN）を発現させることで検討した。細胞増殖の検討には colony formation assay を行い評価した。

in vivo においては Tg-SREBP-1a マウスの肝臓において p21 mRNA 及びタンパクの発現量変化を Northern blotting，Western blotting により確認した。細胞増殖の検討には Tg-SREBP-1a マウスや Tg-SREBP-1a マウスと p21 Knockout（p21KO）マウスを掛け合わせた（p21KO×Tg-SREBP-1a）マウスの肝細胞を FACS 解析しその細胞状態を検討した。SREBP-1 欠損による p21 発現の確認には SREBP1-Knockout（BPIKO）マウスを用いた。

（結果）

p21 遺伝子は SREBP により p21 プロモーター上－ 100bp 付近に存在する SREBP 反応部位（SRE）配列に直接結合しプロモーター活性を上昇させることで p21 mRNA 量，タンパク発現量を亢進させることがわかった。また，SREBP を発現した細胞は細胞増殖の遅延が確認された。Tg-SREBP-1a マウスの肝臓において p21 mRNA，タンパク量の発現亢進が確認された。また，コントロールマウスと比較し DNA polyploidy が 2n 期（G0/G1）の細胞が多く存在していることが確認された。さらにこの効果は p21KO マウスと掛け合わせることにより約 50％正常化した。脂質欠乏状態により内因性の SREBP を活性化させると p21 プロモーター活性の上昇とタンパク発現量の亢進を認めた。また，この効果は SREBP-DN により解除された。BP1KO マウスの肝臓，脂肪組織において p21 遺伝子の発現が減弱していた。

（考察）

SREBP は p21 プロモーターに作用しその活性上昇を示した。SREBP の転写活性は強力で p21 の上流遺伝子である p53 とほぼ同レベルと思われる。SREBP-1a と -2 の両方とも p21 プロモーターを強力に上昇させるが p21 タンパク発現亢進作用においては SREBP-1a が一貫して強く発現亢進を促した。これにはタンパクの安定化等の転写後調節が関わっている可能性もあり詳細な検討を要する。生理的条件下において SREBP は脂質欠乏状態において活性化する。細胞増殖には膜成分である脂質成分が必要であり，脂質欠乏状態において細胞増殖を起こすことは細胞にとって好ましくない状態である。その際 SREBP は p21 等を介して細胞周期を停止し細胞内脂質合成系を亢進させることにより脂質合成系酵素の活性を上昇させ細胞内脂質を確保し細胞増殖を安全に行えるよう調節しているのではないかと推察される。今回の研究により脂質と細胞増殖の関係の一端を見出せた。

近年，p21 は肥満モデルマウスの脂肪組織においても亢進していることが報告されている。肥満は異常な脂肪細胞の肥大化と増殖を伴う病変である。また，我々のデータにより　p21 は脂肪細胞において脂質の蓄積と肥満形成に関わっていることが示唆されており直接肥満病変に関わっている可能性が考えられる。今回のデータは SREBP と p21 遺伝子の関係を明らかにしてきたが，今後臨床応用に即した研究という観点より，肥満病変と p21 遺伝子の関係を明らかにしたいと考えている。

（結論）

今回，細胞周期制御因子 p21 が新たな SREBP のターゲット遺伝子であることが証明された。栄養バランスと細胞増殖はお互い協調し調整することにより生理的均衡状態を保っていると考えられ，どちらかのバランスが崩れても病変をきたすものと考えられる。細胞は細胞増殖の際に膜成分である脂質（主にコレステロール，リン脂質）を要求する。SREBP-1c は生態において主に中性脂肪の合成に寄与している。SREBP-2 はコレステロールを強力に調節する因子ではあるが中性脂肪などには影響しない。しかし，SREBP-1a に

おいては中性脂肪やコレステロールのみならずリン脂質も調節している。また，細胞増殖の際には遺伝情報源である核酸がむき出しになる状態は生命にとって非常に危険であり早急に核膜や細胞膜を必要とする。SREBP-1a は転写活性能においてもどのアイソフォームよりも強力であることから短時間で脂質要求性に応答できる能力を有していると考えられる。今回の結果においては SREBP-2 も p21 の調節に関わっていることを示唆しているデータも存在する。しかし，どの実験においても一貫して p21 遺伝子の発現に寄与したのは SREBP-1a である点や上記の通り様々な膜成分脂質を早急に供給できる能力を持つのは SREBP-1a だけであることから細胞増殖に関わっているのは SREBP-1a であると推測される。

SREBP が細胞周期調節因子 p21 を直接活性化したことは栄養シグナルと細胞増殖を結びつける新たな発見である。現在，我々は肥満病態に p21 遺伝子が関係することを解明しつつある。過剰なエネルギーを成因とする肥満病変が細胞増殖と関係あることから，栄養状態と細胞増殖の関係を解析することは生活習慣病の新しい治療方法に結びつくと期待される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は，SREBP-1a の機能を明らかにすることを目的として，SREBP-1a トランスジェニックマウスの肝臓において大量に発現していた細胞周期調節因子 p21 に注目した。その結果, SREBP-1a は p21 のプロモーターに結合し p21 の蛋白発現を増強していることを明らかにした。この事実から，栄養シグナルと細胞増殖が関連していることが判明した。本研究は国際誌 Molecular and Cellular Biology に掲載され，世界的にも高く評価されている。

よって，著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。