

論文概要

脂質合成転写因子 **SREBP-1a** は、サイクリン依存性キナーゼインヒビターを介して細胞増殖を抑制する

目的

哺乳類の細胞では細胞分裂に伴って、娘細胞の細胞膜や細胞内小器官を形成するため、また細胞周期に応じた核膜の消失や再構成のため、秩序だった脂質の供給が必要である。しかしながら細胞周期と脂質合成との関連性については十分な解明はされていない。

脂質合成を促す転写因子 **SREBP-1a** は、細胞増殖の盛んな細胞や組織で高い発現を示し、細胞増殖との関連が指摘されている。本研究では、**SREBP-1a** を発現させた細胞または遺伝子改変マウスを用いて **SREBP-1a** と細胞増殖の関連性を検討した。

SREBP は、膜結合型の転写因子であり **SREBP cleavage activating protein (SCAP)** や小胞体膜蛋白質の **Insig-1** と結合した状態で小胞体上に存在する。細胞や生体が脂質不足の環境に曝されると、**SREBP/SCAP** 複合体は、ゴルジ体へ移行し2種の蛋白分解酵素 (**Site-1 protease**、**Site-2 protease**) によって切断される。切断された N 末端フラグメントが、核へ移行し転写活性を発揮する。**SREBP** には、**SREBP-2**、**SREBP-1c**、**SREBP-1a** の3つのサブタイプがある。**SREBP-2** はコレステロール生合成や **LDL** 受容体を制御し、また **SREBP-1c** は主に脂肪酸合成を制御する転写因子である。これに対して **SREBP-1a** は、脾臓、胸腺などのリンパ組織や培養細胞など分裂、増殖の盛んな細胞で主に発現している。**SREBP-1a** は **SREBP-1c** に比し強い転写能を有し、コレステロール、中性脂肪合成系に加えてリン脂質合成系の遺伝子の転写を活性化する。

これまで **SREBP-1a** は、細胞分裂に伴って細胞膜を構成するリン脂質、コレステロール、脂肪酸を供給するものと考えられてきた。しかしながら我々の研究室にて **SREBP-1a** トランスジェニック (以下 **tg**) マウスの肝臓 DNA チップ解析をもとにして、**SREBP-1a** がサイクリン依存性キナーゼ (以下 **cdk**) インヒビター **p21** 遺伝子のプロモーターに結合し、その遺伝子発現を活性化することを見出した。このことは **SREBP-1a** が、細胞増殖に脂質供給面からでなく、その制御機構に積極的に関わる可能性を示唆するものであった。そこで、本研究にて活性型 **SREBP-1a** を培養細胞に発現させて細胞増殖への影響を検討した。

対象と方法

I. **SREBP-1a** の細胞増殖への影響:

(1) **SREBP** 遺伝子発現誘導型の **stable CHO** 細胞株を用いた解析

誘導剤 **IPTG** で活性型 **SREBP** 蛋白を発現する **stable CHO** 細胞株を作成して、**SREBP-1a** の細胞増殖、細胞周期関連因子への影響を検討した。

脂質合成転写因子 SREBP-1a は、サイクリン依存性キナーゼインヒビターを介して細胞増殖を抑制する

概要

哺乳類の細胞では細胞分裂に伴って、娘細胞の細胞膜や細胞内小器官を形成するため、また細胞周期に応じた核膜の消失や再構成のため、秩序だった脂質の供給が必要である。しかしながら細胞周期と脂質合成との関連性については十分な解明はされていない。

脂質合成を促す転写因子 SREBP-1a は、細胞増殖の盛んな細胞や組織で高い発現を示し、細胞増殖との関連が指摘されている。本研究では、SREBP-1a を発現させた細胞または遺伝子改変マウスを用いて SREBP-1a と細胞増殖の関連性を検討した。

SREBP は、膜結合型の転写因子であり細胞内コレステロール量をセンスする SREBP cleavage activating protein (SCAP) や小胞体膜蛋白質である Insig-1 と結合した状態で小胞体上に存在する。細胞や生体が脂質不足の環境に曝されると、SREBP/SCAP 複合体は Insig-1 から乖離してゴルジ体へ移行する。ゴルジ体にて SREBP は、2 種の蛋白分解酵素 (Site-1 protease、Site-2 protease) によって切断されて、その N 末端フラグメントが膜から遊離し核へ移行する。移行した N 末端フラグメントは、活性型 SREBP として脂質合成系の酵素群の転写を活性化する。SREBP には、SREBP-2、SREBP-1c、SREBP-1a の 3 つのサブタイプがある。SREBP-2 はコレステロール生合成や LDL 受容体を制御し、また SREBP-1c は主に脂肪酸合成を制御する転写因子である。これに対して SREBP-1a は、脾臓、胸腺などのリンパ組織や培養細胞など分裂、増殖の盛んな細胞で主に発現している。SREBP-1a は SREBP-1c に比し強い転写能を有し、コレステロール、中性脂肪合成系に加えてリン脂質合成系の遺伝子の転写を活性化する。

これまで SREBP-1a は、細胞分裂に伴って細胞膜を構成するリン脂質、コレステロール、脂肪酸を供給するものと考えられてきた。しかしながら我々の研究室にて SREBP-1a トランスジェニック (以下 tg) マウスの肝臓 DNA チップ解析をもとにして、SREBP-1a がサイクリン依存性キナーゼ (以下 cdk) インヒビター p21 遺伝子のプロモーターに結合し、その遺伝子発現を活性化することを見出した。このことは SREBP-1a が、細胞増殖に脂質供給面からでなく、その制御機構に積極的に関わる可能性を示唆するものであった。そこで、本研究にて活性型 SREBP-1a を培養細胞に発現させて細胞増殖への影響を検討した。

活性型 SREBP-1a は、CHO 細胞、HEK293 細胞、Swiss-3T3 線維芽細胞、または p53 を欠損した Saos-2 細胞において、顕著な細胞増殖の抑制、DNA 合成の抑制、及び細胞周期 G₁ 期停止作用を示した。この細胞増殖抑制作用は、転写機能や DNA 結合能を失活させた変異型 SREBP-1a では認められず、SREBP-1a の転写活性化能に依存するものであった。

SREBP-1a は脂質合成系酵素の発現を促して、組織中の脂質含量を増大させるため、阻害剤を用いて脂質蓄積と増殖抑制の関係を検討したが、コレステロール合成阻害剤や脂肪酸合成阻害剤は SREBP-1a の増殖抑制作用に影響を及ぼさず、そこに脂質蓄積は関与しないものと考え

られた。

SREBP-1a と細胞周期制御因子との関連においては、SREBP-1a を発現させた細胞中に cdk インヒビターの p27KIP 1、p21(Waf1/Cip1)、p16INK4A 遺伝子発現の亢進を認め、p27 と p21 はその蛋白量の亢進をも確認した。また、サイクリン依存性キナーゼ cdk 2 及び cdk 4 の活性は低下し、サイクリン依存性キナーゼの標的蛋白である Rb 蛋白質の脱リン酸化が亢進していた。

cdk インヒビターのプロモーターへの SREBP-1a の影響をレポーターアッセイにて評価した結果、SREBP-1a は p21(Waf1/Cip1)、p16INK4A プロモーターを活性化し、これらの cdk インヒビターを転写レベルで活性化することが示された。p27 においては、その分解を司る SCF ユビキチンリガーゼの基質認識コンポーネント Skp2 やユビキチンリガーゼ KPC1 の発現が低下していた。p27 は、細胞周期の進行において蛋白量の変動によってそのインヒビター活性が制御されると言われており、SREBP-1a はこれらの p27 の制御因子群を介して p27 蛋白量を増大させているものと考えられた。

今回の解析で興味深いのは、SREBP-1a を発現させた細胞中に SREBP-1a の分解を促すユビキチンリガーゼ Fbw7/CDC4 蛋白が亢進していたことである。Fbw7 は以前からサイクリン D、c-Jun、c-Myc の分解を促して細胞増殖を抑制する腫瘍抑制因子として捉えられており、SREBP-1a による Fbw7 蛋白量の増加は、今回認められた細胞増殖抑制に関与する可能性も想定される。

SREBP-1a tg マウスでは、部分肝切除術後の肝再生が障害されており、培養細胞のみならず生体の臓器においても SREBP-1a の細胞増殖抑制作用が確認された。

内在性の SREBP は脂質欠乏時に活性化されることが知られている。培養液から脂質画分を除いて HeLa 細胞や Swiss-3T3 細胞に脂質欠乏を誘発すると、内在性 SREBP-1 の活性化に伴って、細胞増殖抑制と G₁ 期の停止を生じた。単価不飽和脂肪酸のオレイン酸は、脂質欠乏による SREBP-1 活性化を抑制するとともに細胞増殖抑制を回復させた。

SREBP-1a は従来、細胞分裂に伴って発現し、細胞に脂質を供給して増殖を促す転写因子と捉えられてきた。しかし、今回の研究にて SREBP-1a は、cdk インヒビターを誘導して細胞増殖を停止、遅延させることが明らかになった。我々は、この SREBP-1a の増殖抑制作用は、細胞がその増殖に応じた脂質を供給できない環境においては、SREBP-1a が増殖を一旦 G₁ 期に留め、同時に次の細胞分裂に対して十分な脂質を供給するためと考えている。

緒言（文献的考察，当該研究の目的を含む）

SREBP は、コレステロールや脂肪酸合成に司る酵素群の発現を制御する転写因子である[1, 2]。SREBP は、転写されて蛋白に翻訳されると一旦、小胞体や核膜上に移行して、細胞内コレステロール量をセンスする SREBP cleavage activating protein (SCAP)や小胞体膜蛋白質のひとつである Insig-1 と結合した状態で存在する[3]。SREBP が転写因子として核に移行して働くためには、SREBP-1 蛋白質の分子内で切断を受けることが必要である。細胞内のコレステロールが枯渇した状態では、小胞体上の SREBP/SCAP 複合体は Insig-1 から離れてゴルジ体へ移行する。ゴルジ体にて SREBP は、2 種の蛋白分解酵素（Site-1 protease、Site-2 protease）によって分子内の 2 箇所が切断を受ける。切断された N-末端の SREBP フラグメントが活性型 SREBP として核内へ移行し、標的遺伝子のプロモーター上の SRE 配列に結合してその転写を活性化する[1]。SREBP には、SREBP-1a、SREBP-1c、SREBP-2 の 3 つのサブタイプが存在する。SREBP-2 は、全身に発現し、コレステロール合成系の酵素群や LDL 受容体の発現を促す。SREBP-1c は、主に肝臓や脂肪組織に発現し、脂肪酸合成系の酵素群を制御する[4, 5]。これに対して、SREBP-1a は、精巣、胸腺、脾臓などの細胞増殖の盛んな臓器や多くの培養株細胞で高度に発現している[6]。SREBP-1a の標的遺伝子には、コレステロール合成系、脂肪酸合成系に加えて、細胞膜の成分となるホスファチジルコリンなどのリン脂質合成系の酵素群も含まれる[7]。核中の SREBP-1a レベルは、細胞内の脂質含量の変化に応じて、また外的環境からの脂質供給量の変化に応じて変動し、コレステロール、リン脂質、脂肪酸の合成を制御する。そのため SREBP-1a は、増殖中の細胞増殖において、脂質供給因子として考えられてきた。しかしながら SREBP-1a の細胞増殖機構への影響については十分な解析は為されていない。最近、我々は、SREBP-1a がサイクリン依存性キナーゼ（以下 cdk）インヒビターである p21 のプロモーターに結合して、その発現を誘導することを見出した[8]。このことは SREBP が、細胞増殖機構に対して、脂質供給の面からだけでなく、積極的にその制御に関わる可能性を示唆したものであった。本研究では、培養細胞に活性型 SREBP-1a 蛋白を誘導し、細胞増殖および細胞周期関与因子群への影響を検討した。

対象及び方法

SREBP-1a の細胞増殖への影響：

I SREBP 遺伝子発現誘導型の stable CHO 細胞株を用いた解析

チャイニーズハムスター卵巣由来 CHO 細胞に Lac switch inducible mammalian expressing system を用いて活性型 SREBP 遺伝子を導入し、SREBP 誘導型の stable 細胞株 CHO-BP-1a と CHO-BP-2 を作成した[9, 10]。この細胞株は、それぞれヒトの活性型 SREBP-1a（アミノ酸 1-487）とヒト活

性型 SREBP-2 (アミノ酸 1-481) をゲノム内に有しており、誘導剤イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) によって活性型 SREBP 蛋白の発現が誘導されるシステムである(8,9)。誘導剤である IPTG 濃度は 100 μ M とした。

細胞の培養には、10%の牛胎児血清と 100 U/mL のペニシリン及び 100 μ g/mL のストレプトマイシンを含むダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)を用い、95%空気-5%CO₂の37°Cの培養用恒温槽で培養した。細胞数の計数では、まず細胞を 100 mm の組織培養用シャーレに 100,000 細胞/シャーレで播種し、翌日に IPTG を所定の濃度で添加した。一定期間培養後に細胞を回収して、細胞数を血球計数盤にて計数した。さらに DNA 合成の指標として BrdU 取り込み量の評価を行った。細胞を 96 穴プレートに 1500 個/穴の割合で播種し、1 日培養後に IPTG を添加した。さらに 1 日培養し、BrdU 10 μ M を添加してさらに 4 時間培養した。BrdU の取り込み量は、BrdU Labeling and Detection kit (Roche Diagnostics) または Cell proliferation ELISA, BrdU (Roche Applied Science) を用いて評価した。細胞周期の解析は、細胞をトリプシンで剥がしてから 0.1% Triton X-100、0.1 mg/mL RNase 及び 25 μ g/mL のプロピジウムアイオダイド (PI, Sigma) を含む PBS に懸濁して DNA を染色し、フローサイトメーター (FACScaliver Becton, Dickinson and Company) にて行った。用いた細胞試料は、全てコンフルエント前の細胞増殖期にあることを顕微鏡にて確認した。

SREBP-1a の細胞周期への影響 :

II SREBP 発現プラスミドを用いた一過性遺伝子導入法による解析

ヒト活性型 SREBP-1a (アミノ酸 1-487)、ヒト活性型 SREBP-2 (アミノ酸 1-481) をコードする cDNA を pcDNA3.1(+) (Invitrogen) に挿入して発現プラスミドを作成した[11, 12]。また変異型 SREBP-1a として、転写調節領域を欠損する SREBP-1 (Δ TA-SREBP-1a) と SRE 結合能を失活した変異型 SREBP-1a (SREBP-1a YR-mutant) も同様に作成した(13,14)。SREBP-1a YR-mutant は、335 番目のチロシン残基をアルギニンに置換した変異体であり、SRE 結合能はないが E-ボックス結合能は有している。SRE-EGFP プラスミドは、ヒト LDL 受容体プロモーターの SRE 配列と SP 1 結合配列[13]を EGFP-1 プラスミド (Clontech) の EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) 遺伝子の 5' 上流に挿入して作成した。SRE-EGFP は、培養細胞中へ導入されると SREBP によって EGFP の転写が活性化されて蛍光を発するプラスミドである。

培養細胞への遺伝子導入では、細胞を 100mm の培養用シャーレに播種し、1 日培養した後に FuGene6 Transfection Reagents (Roche Diagnostics) を用いて SREBP と SRE-EGFP とともに導入した。4 時間後に新鮮な培地に交換し、さらに 1 日培養してから、細胞懸濁液をパラフォルムアルデヒドとエタノールにて固定し、前述の方法にて PI 染色を施した(37)。フローサイトメーターにて EGFP 陽性の細胞集団を選別し SREBP-1a の細胞周期への影響を解析した[14]。

ノザンプロット及びイムノプロット解析

ノザンプロット解析として、細胞から total RNA を Trizol Reagent (Life Technologies) を用い

で抽出精製した。ノザンブロット解析は参考論文[15]に従って施行した。所定の遺伝子のプローブは ^{32}P でラベリングして精製してハイブリダイゼーションに用いた。

イムノブロット解析は、参考論文[16]に従い培養細胞の細胞破砕液を試料とした。また核型 SREBP 蛋白の評価のため、細胞から核蛋白抽出を行った[17]。1次抗体には、それぞれの蛋白に対する抗体を用いた。2次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗 IgG 抗体を処理した後、ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bioscience) で発光させ、目的抗原のシグナルを Hyper-Film (GE Healthcare Bioscience) で検出した。

Cdk インヒビターのプロモーターのクローニングとレポーターアッセイ

プロモーター領域のクローニング：ヒト p16INK4A、ヒト p19INK4D、マウス p27KIP 1 のプロモーターを以下の primer を用いて PCR 法にてゲノム DNA から増幅し、pGL3Basic プラスミド (Promega) のルシフェラーゼの 5' 上流に挿入してクローニングした。すべてのプラスミドは作成後シーケンシングを行い、塩基配列を確認した。マウス p21(Waf1/Cip1)は以前の論文[8]で作成したものをを用いた。

<primer>

p16INK4A

3'primer : 5'-TGCCTGCTCTCCCCCTCTCC-3',

5'primer : 5'-GCCACCGCGTCCTGCTCCAAAG-3'

p19INK4D

3'primer : 5'-ACACTGGCGGCCTGACAAAG-3',

5'primer : 5'-AGCTCGTAGTAAGGGCCAATGAATGTTCT-3',

p27KIP 1

3'primer : 5'-CAAAACCGAACAAGCGAAACGCCA-3'

5'primer : 5'-CAACCCATCCAAATCCAGACAAAAT-3'

レポーターアッセイ：HEK293 細胞を 24 穴プレートに 25000 細胞/穴で播種し、翌日に FuGene6 Transfection Reagents を用いて cdk インヒビターのプロモータールシフェラーゼプラスミド (250 ng/well) と SREBP 発現プラスミド (250ng/well) の遺伝子導入を行った。4 時間後に新鮮な DMEM 培地に交換し、さらに 1 日培養してからルシフェラーゼアッセイを Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて行った。同量の pcDNA3.1(+)プラスミドを対照群とした。また、内部標準として pRL-SV40 プラスミド (Promega) を同時に導入し、cdk インヒビタープロモータープラスミドのルシフェラーゼ活性値を、pRL-SV40 のルシフェラーゼ活性値で補正した。

SREBP-1a のサイクリン依存性キナーゼ cdk 2 及び cdk 4 活性への影響

免疫沈降法により cdk2 及び cdk4 活性測定を行った。SREBP 誘導型 CHO 細胞の破砕液を cdk2 及び cdk4 抗体 (Santa Cruz) とインキュベーションした後、プロテイン G 結合ビーズ (GE

Healthcare Bioscience) を用いて抗原-抗体複合体を回収した。cdk 2 及び cdk 4 の基質としてヒストン H1 蛋白 (Santa Cruz) 及び Rb 蛋白フラグメント (Santa Cruz) を用いた。酵素活性の評価は参考論文[18]に従って行った。

肝部分切除モデルを用いた SREBP-1a の肝再生に及ぼす影響

本研究で行った動物実験は、筑波大学動物実験取り扱い規定に従って行い、筑波大学動物実験倫理委員会により是認されている。マウスは、明期 12 時間、暗期 12 時間の光条件下で飼育し、飼料には通常餌としてオリエンタル MF (オリエンタル酵母) を与え、自由摂取、自由摂水とした。肝臓に活性型 SREBP-1a 蛋白を発現する SREBP-1a トランスジェニック (以下 tg) マウス[19]及び SREBP-1 欠損マウス[20]に、肝部分切除術を施行し肝臓の約 70%を切除した。縫合後、10 日間飼育し、BrdU 取り込みを指標にして、肝細胞の DNA 合成を評価した。BrdU を 60mg/kg の用量でマウス尾静脈内に投与し、2 時間後に麻酔して腹部大動脈から放血致死させた後、肝臓を摘出した。肝臓重量を測定後、速やかにその一部を 10%ホルマリンで固定した。定法にてパラフィン包埋し、薄切してプレパラート標本を作製した。BrdU 取り込みとして、免疫組織染色を行い、BrdU 陽性の細胞核を観察した。核染色として DAPI 染色を同時に行った。また、残りの肝組織を眼科バサミで破碎し、メッシュで濾過して細胞懸濁液を調製した。前述の方法にて PI 染色し、フローサイトメーターで、肝細胞 DNA 量の倍数性を解析した。

SREBP-1 欠損マウス胎児由来の初代線維芽細胞を用いた検討

SREBP-1 欠損マウスを交配し、膣栓確認日から 13 日から 15 日後のマウスを頸椎脱臼して屠殺し開腹して胎児を摘出した。摘出した胎児からトリプシン法により線維芽細胞を分離して、培養系へ移した。胎児線維芽細胞の DNA 合成の評価のため、細胞を 24 穴プレートに 5000 細胞/well で播種した。指定された期間培養後、培地に BrdU を添加して 2 時間インキュベーションしてから BrdU 取り込み量を前述のキットを用いて評価した。

脂質欠乏による内在性 SREBP-1 発現誘導と細胞増殖への影響

マウス Swiss-3T3 線維芽細胞及び HeLa 細胞を用いて、脂質欠乏時の細胞増殖と内在性 SREBP-1 核蛋白量への影響を検討した。脂質除去血清 (delipidated serum 以下 DLS) を培養用の牛胎児血清から参考論文[21]に従って作成した。または血清中からリポ蛋白質を除いたリポ蛋白欠乏牛胎児血清 (以下 LPDS) を Sigma から購入した。HeLa 細胞及び Swiss-3T3 線維芽細胞を、24 穴プレートに 5000 細胞/well で播種し、翌日に DLS 血清を含む DMEM 培地、または LPDS を含む DMEM 培地に交換した。対照として通常の牛胎児血清 (FCS) を含む DMEM 培地を用いた。2 日間培養した後、MTT アッセイを行い細胞数の変化を評価した。また細胞周期解析のため、同日の細胞試料を前述のごとく PI 染色を施行しフローサイトメーターにて解析した。さらに、DLS を含む DMEM 培地へ 100 μ M オレイン酸または 5 μ M コレステロールを添加し、脂質補充の影響を MTT アッセイや細胞周期解析で検討した。また脂質除去

処置を施した HeLa 細胞または Swiss-3T3 細胞の核分画をイムノブロット法にて内在性の核型 SREBP-1 蛋白質の変動を評価した。

MTT アッセイでは、細胞培養液へ 5 mg/mL の MTT 溶液を培地の 1/5 量添加して 37°C で 90 分間インキュベートした。培地を除き 0.25N HCl-イソプロピルアルコールを加えて、形成されたホルマザンを溶出させ、吸光光度計にて測定した。

結果

SREBP-1a は、培養細胞の増殖を抑制し、細胞周期を G₁ 期で停止させる。

IPTG 誘導下で活性型 SREBP-1a 蛋白及び SREBP-2 蛋白を発現する CHO-BP-1a 細胞、CHO-BP-2 細胞を用いて、細胞数および BrdU 取り込み量を評価した。対照として Lac レプレッサーを発現する CHO-Lac 細胞を用いた。CHO-BP-1a 細胞に IPTG を添加した結果、細胞数の増加 (図 1 A) や BrdU の取り込み (図 1 B) は、CHO-Lac 細胞に比べてほぼ完全に抑制された。これに対して SREBP-2 を発現する CHO-BP-2 細胞では細胞増殖はほとんど影響を受けなかった。この細胞周期をフローサイトメーターで解析した結果、CHO-BP-1a 細胞で明確な G₁ 期の細胞頻度の増加、S 期の低下が見出されたが、CHO-BP-2 細胞では、細胞周期の変化は認められなかった (表 1)。CHO-BP-1a 細胞の増殖抑制は IPTG 添加 3 日後までも継続していたが、細胞の培養容器からの剥離はわずかであり、結果には提示していないが IPTG の除去により再度、細胞増殖を再開した。

CHO-BP-1a 細胞における外因性 SREBP-1a の細胞増殖抑制と、内在性の SREBP-1a による細胞増殖抑制作用を比較した。活性型の核 SREBP は、脂質欠乏条件で誘導されることが知られているので [9, 10]、ヒト子宮頸部癌由来培養細胞株 HeLa 細胞を、脂質を除去した牛胎児血清を含む DMEM 培地で培養して、内在性の活性型核 SREBP-1a 蛋白を誘導するとともに、細胞増殖を MTT アッセイで評価した。脂質除去血清を含む DMEM 培地中のトリグリセリド濃度、総コレステロール濃度及び遊離脂肪酸濃度は、通常培地の約 1/10 に低下していることを確認している。本培地で HeLa 細胞を培養した結果、核 SREBP-1a 蛋白質が増加するとともに細胞の増殖は抑制された (図 2 A, B)。CHO-BP-1a 細胞を IPTG の用量を変えて処理し、SREBP-1a の発現量と細胞増殖の抑制程度の関係を検討した結果、CHO-BP-1a 細胞では、IPTG 5 μ M から著明な核 SREBP-1a 蛋白発現増加と細胞増殖抑制を示した。IPTG 5 μ M で誘導される活性型 SREBP-1a 蛋白質量は、脂質除去処理で HeLa 細胞に誘導される活性型 SREBP-1a 蛋白質量とほぼ同程度であった (図 2 A, B)。この SREBP-1a による細胞周期の G₁ 期停止は、HEK293 細胞、マウス Swiss-3T3 繊維芽細胞に活性型 SREBP-1a を一過性に導入して発現させた場合にも認められ、特定の細胞に限定した現象ではなく、普遍的な作用と考えられた (表 2)。また p53 を欠損したヒト骨肉腫由来 Saos-2 細胞 [22, 23] でも SREBP-1a 導入による G₁ 期停止がみられ

(表 2)、そこに p53 の関与はないものと考えている。

SREBP の転写機能と細胞増殖抑制の関係をさらに解析するため、2つの変異型 SREBP-1a の検討を行った。ΔTA-SREBP-1a は、SREBP-1a 分子内の DNA 結合ドメインを残し、転写活性化ドメインを欠損させた SREBP-1a で、SRE 配列には結合するものの標的遺伝子への転写活性化能が消失している[24]。また SREBP-1a YR-mutant は、DNA 結合ドメインのアミノ酸置換により SRE 配列への結合能を失活させた変異体 SREBP-1a である。この変異体はプロモーターの E-ボックスへの結合能は残存している[11, 12]。いずれの変異型 SREBP-1a も、導入された HEK293 細胞の細胞周期進行に、まったく影響を及ぼさず、SREBP-1a の増殖抑制には、SREBP-1a が標的遺伝子プロモーターの SRE エlement に結合してその遺伝子発現を促すことが必要であることが示された (表 3)。

コレステロール合成阻害剤であるスタチン系薬剤は、内在性 SREBP を活性化するとともに、培養細胞の増殖を抑えることが知られている[25]。スタチン系薬物の細胞増殖抑制の原因は、コレステロール合成経路の副産物であるイソプレノイド欠乏によるものとされているため[26]、SREBP-1a の増殖抑制とイソプレノイド欠乏の関連性について検討した。まず、CHO-Lac 細胞にてスタチン系薬剤であるシンバスタチンの細胞増殖抑制作用とイソプレノイドであるゲラニルゲラニルピロフォosphate (GGPP) 及びファルネシルピロフォosphate (FPP) のシンバスタチンの増殖抑制への軽減作用を確認した (図 2 C-左上)。次に SREBP-1a 誘導により細胞増殖を抑制させた CHO-BP-1a 細胞に GGPP と FPP を添加したが、細胞増殖抑制の軽減はまったく認められず、SREBP-1a の細胞増殖抑制にイソプレノイド欠乏は関与しないものと考えられた (図 2 C-右上)。

SREBP-1a は、コレステロール合成や脂肪酸合成を担う酵素群の遺伝子を強く発現させて細胞中のコレステロールや脂肪酸含有量を増加させる[19]。我々の CHO-BP-1a 細胞においても SREBP-1a 誘導により脂肪酸合成酵素 (FAS)、コレステロール合成にメバロン酸経路にある HMG-CoA 合成酵素とファルネシルジピロフォosphate (FPP) 合成酵素の発現亢進が確認された (図 3 A)。SREBP-1a のコレステロール蓄積や脂肪酸蓄積と細胞増殖抑制との関連性について検討するために、CHO-BP-1a 細胞にコレステロール合成酵素の阻害剤シンバスタチン、または脂肪酸合成酵素の阻害剤セルレニンを添加して、SREBP-1a の細胞増殖抑制への影響を検討した。その結果、シンバスタチン、セルレニンともに SREBP-1a のよる細胞増殖停止にはまったく影響を及ぼさず (図 2 C-下)、SREBP-1a の増殖抑制は、過剰なコレステロールや脂肪酸の蓄積によるものではないと考えられた。

SREBP-1a の細胞増殖抑制における cdk インヒビターの関与

cdk インヒビターは細胞周期の進行を制御する重要な因子である。今回、SREBP-1a による細胞増殖抑制と cdk インヒビターの関連性を検討した。我々は、以前に活性型 SREBP-1a を肝臓に発現する SREBP-1a tg マウス肝臓の DNA マイクロアレイ解析から、SREBP-1a が p21 遺伝子発現を誘導することを見出し、そのプロモーター解析から、SREBP-1a が新規な p21 遺伝

子の SRE エlement に結合してその転写を制御することを報告している[8]。今回、SREBP-1a 発現誘導型 CHO-BP-1a 細胞においても、cdk インヒビター-p21 に加えて p16、p27 の mRNA 増大を認めた (図 3 A)。またノイムノブロット解析によって p21、p27 蛋白質の発現亢進を認めた (図 4 B)。さらにこれらの cdk インヒビターにおいては、その遺伝子プロモーターをクローニングして、SREBP-1a の影響についてレポーターアッセイにて検討した。

陽性対照として、LDL 受容体の SRE エlement を 5' 上流に持つシフェラーゼ発現プラスミド (SRE-LUC) を用いた。図 3 B に示したごとく cdk インヒビターのプロモーターに対して、SREBP-1a は p21 と p16 プロモーターを活性化したが、p27 と p19 へのほとんど影響を及ぼさなかった (図 3 B)。また SREBP-2 は、いずれの cdk インヒビターのプロモーター活性も増大させなかった。p27mRNA は CHO-BP-1a 細胞にて SREBP-1a によってその増加を認めたが、レポーター実験では SREBP-1a により p27 プロモーターは活性化されず、その乖離については不明である。

これまでに p27 と細胞周期に関する多くの報告から、細胞周期の過程で p27 蛋白質量の安定性がユビキチン-プロテオーム経路を介して変動するとされている[27]。今回、CHO-BP-1a 細胞では、SREBP-1a によって 2 つの p27 制御因子が変動していた。ひとつは SCF ユビキチンリガーゼの基質認識コンポーネントである Skp2 で、他はユビキチンリガーゼ KPC1 である[28, 29]。両因子ともに細胞周期の G₁ または G₂ 期において p27 蛋白質レベルを低下させることが報告されている。CHO-BP-1a 細胞では SREBP-1a 誘導によって KPC1mRNA、Skp2mRNA はともに低下し (図 4 A)、Skp2 は蛋白質レベルでも低下していた (図 4 D)。これらは、SREBP-1a 誘導時の p27 蛋白質増加の原因と考えている。さらに cdk インヒビターの標的酵素である cdk2、cdk4 活性と Rb 蛋白質のリン酸化を評価した結果、両サイクリン依存性キナーゼは著明に低下し (図 4 C)、Rb 蛋白質のポリアクリルアミド電気泳動の移動度は長くなり高リン酸化型 Rb から低リン酸化型 Rb へ変化したものと考えられた (図 4 D)。またサイクリン D、サイクリン E 蛋白質レベルも低下していた (図 4 D)。いずれの因子の変化も G₁ 期から S 期への細胞周期の進行抑制につながるものと考えられる[30-32]。興味深いのは、今回、SREBP-1a によって癌抑制因子と言われている[33]Fbw7/cdc4 蛋白質レベルが著しく増大していたことである (図 4 D)。この因子は、ユビキチンリガーゼとしてサイクリン D、c-Jun、c-Myc の分解を促して細胞増殖を抑制する因子である[34]。今回の CHO-BP-1a 細胞でも SREBP-1a によってサイクリン D レベルが低下しており、Fbw7 が SREBP-1a の増殖抑制に寄与するものと考えている。

肝部分切除モデルを用いた SREBP-1a の肝再生に及ぼす影響

SREBP-1a の細胞増殖抑制作用を SREBP-1a tg マウスの肝再生実験にて検討した。SREBP-1a tg マウスは、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼのプロモーター制御下にて肝臓に活性型 SREBP-1a を発現するマウスであり、顕著な脂肪肝を呈する[19]。野生型マウスでは、その肝臓の約 70%を摘出すると 10 日後までに肝臓再生が生じ本来の大きさまで回復するが、SREBP-1a tg マウスでは、部分肝臓摘出後、約半数のマウスは死亡し、肝臓の再生も

ほとんど起こらなかった。BrdUの取り込みを指標にして肝再生時のDNA合成を評価した結果、野生型マウスでは肝臓摘出の36-48時間後でDNA合成が起こり細胞周期の進行を示していた。これに対してSREBP-1a tgマウスではBrdU取り込みがほとんど検出されず、肝臓の肝再生障害を裏付ける結果となった(図5A)。SREBP-1a tgマウスの肝細胞のDNAの倍数性は、野生型マウスに比べて4倍体核数が少なく、2倍体核数が多かった(図5B)。肝細胞の2倍体から4倍体化へはDNA合成が必要であり[35]、SREBP-1aによる細胞増殖能の低下が、両群の肝臓核の倍数性の相違に起因するものと考えられた。

内在性 SREBP-1a と細胞増殖との関連性

内在性のSREBP-1aの細胞増殖への影響を検討するために、SREBP-1欠損マウスの胎児より調製した初代線維芽細胞の増殖速度を評価した。SREBP-1欠損マウス由来の線維芽細胞のDNA合成量と細胞数の増加は、野生型マウスに比べて高かった(図5C、D)。またSREBP-1欠損マウスの肝臓再生のBrdU取り込みでは、欠損マウスの方が野生型マウスに比べてDNA合成が高値であり(図5E)、胎児由来線維芽細胞の結果と同様なものとなった。

内在性のSREBPは、脂質を除いた培養血清やコレステロール合成阻害剤によって強く誘導される[36]。HeLa細胞を脂質抜き培地で培養すると内在性SREBP-1aが誘導されるとともに細胞増殖抑制が認められた(図6A)。FACSによる細胞周期解析では、脂質除去によってG₁期の細胞数の増加も認められた(図6C)。この脂質除去による増殖抑制はコレステロールの補充では回復しなかったが、単価不飽和脂肪酸のオレイン酸の補充で回復した。オレイン酸は、HeLa細胞のSREBP-1の活性化を抑制したが、コレステロールはSREBP-1を抑制しなかった。オレイン酸による細胞増殖の回復は、HeLa細胞だけでなくSwiss-3T3線維芽細胞でも観察された(図6B)。このようにSREBP-1aによる細胞抑制作用には、細胞内の脂肪酸レベルが制御因子として重要であると考えられる。

図7にSREBP-1aと細胞増殖抑制の関係をまとめた。

考察

SREBP-1aは、SREBP-2やSREBP-1cとは異なり、増殖の盛んな細胞や組織で高度に発現されており、細胞増殖にも関わる脂質合成転写因子と考えられている[6]。本研究にてSREBP-1aは、細胞膜や細胞内小器官の基質としての脂質供給のみならず、より直接的に細胞周期や細胞増殖関連因子を制御していることを示した。増殖中の細胞における脂質合成は、単に2次的なものではなく秩序だって細胞周期と関連している[37]。興味深い点は、この脂質制御にSREBP-2やSREBP-1cではなく、SREBP-1aが中心にあることである。最近、我々はSREBP-1aが、cdkインヒビターであるp21蛋白の遺伝子プロモーターに結合して、その転写活性を亢進すること

を報告した[8]。このことは SREBP-1a と細胞周期制御を最初に関連づけるものであった。さらに本研究にて、SREBP-1a は p21 に加えて p27 や p16 発現を誘導し、細胞周期の G₁ 停止を起こすことを示した。また SREBP の増殖抑制効果は、SREBP-1a でもっとも強く、SREBP-2 ではそれに比し弱いものであった。それぞれの cdk インヒビターの活性化機構は多様で複雑である。SREBP-1a の G₁ 停止惹起作用は、その転写活性に依存しており、SREBP-1a により発現制御を受ける未知の因子(群)によって cdk インヒビターの遺伝子発現やユビキチン機構の SKP2、KPC-1 が制御されているものと考えられる。SREBP-1a の増殖制御は、細胞種により異なる可能性もあり、SREBP-1a と cdk インヒビターやユビキチン機構との間に介在する因子群へはさらなる検討が必要である。

細胞核内における活性型 SREBP-1a 蛋白量は、SCAP/Insig 系によって制御されており、細胞中のステロールレベルに依存している。これまでの報告では、SREBP-1a の活性化は細胞増殖に必要であるとし、細胞増殖に伴う PI3K 経路の活性化が SREBP-1a の活性化と関連することも報告されている[38-41]。しかしながら本研究で示した SREBP-1a の増殖に対する抑制作用は、以前の報告とは異なるものであった。我々の実験では、SREBP-1a 蛋白の発現レベルは高く、細胞や組織において脂質供給や合成が不足して活性型 SREBP-1 レベルが亢進した状態を模しているものである。脂質欠乏時に活性化された SREBP-1a は、脂質合成系酵素群を亢進させるだけでなく、十分な脂質が供給されるまで細胞増殖を積極的に停止させていると考えている。この観点から言えば、SREBP-1a が増殖中の細胞にリン脂質、脂肪酸やコレステロールを供給し、増殖を支援するとしたこれまでの報告と矛盾しているが、この SREBP-1a の二面的な働きは、その発現量に依存しているかもしれない。我々の用いた SREBP 誘導型 stable CHO 細胞では、誘導剤 IPTG 未添加でも少レベルの SREBP-1a や SREBP-2 が漏洩している。これらの細胞は、対照に用いた CHO-Lac 細胞より増殖速度が速く、IPTG を添加して SREBP-1a 発現を誘導すると増殖が停止した。この解釈は、SREBP-1a 発現量が低い場合では SREBP-1a や SREBP-2 は、細胞増殖に促進的に働き、SREBP-1a レベルが過剰に発現された場合には、増殖抑制的に働くものと考えられる。SREBP-1 欠損マウスの細胞の検討では、欠損マウス胎児線維芽細胞の増殖速度は野生型に比べて早い傾向があった。SREBP-1 欠損マウスでは SREBP-2 が代償的に活性化されていることが知られており[20]、SREBP-2 による脂質供給が増殖に支援的に働く可能性もあるものと考えている。

最近、SREBP-1a が細胞周期の過程において、G₂/M 期でリン酸化を受けてその転写活性が亢進することが報告された[40, 42]。本研究でも SREBP-1a の働きは G₁ 停止のみならず G₂/M 期への影響も示唆されている。SREBP-1a を誘導した培養細胞の細胞周期解析では、S 期の顕著な低下に比べて G₂/M 期の低下はわずかであった。これは SREBP-1a によって G₁ 期停止と同時に G₂/M 期の進行抑制も起きている可能性が考えられる。

SREBP-1a は、細胞内にて核型 SREBP-1a 蛋白の安定性がカルパイン酵素阻害剤である ALLN で亢進することから、ユビキチン-26S プロテオソームによる分解制御を受けるものと考えられている[43]。最近、SCF 型ユビキチンリガーゼ複合体の構成成分である Fbw 7/Cdc4 が

SREBP-1a の GSK-3 によるリン酸化後の SREBP-1a 蛋白の分解に関与することが明らかになった[33]。細胞内の脂質バランスは、SCAP/Insig-1 機構を介して活性型の SREBP-1a 蛋白量を決めると推定されているが、細胞周期の進行に関連しては、Fbw7 を介して核型 SREBP-1a 蛋白の安定性が制御されているものと考えられる。このように SREBP-1a は p27 と同様に SCF 機構を介して細胞周期の中でその活性が制御されている転写因子である。Fbw7 は SREBP-1a 以外に c-Myc、サイクリン E、c-Jun の分解を制御することがすでに明らかとなっている。これらの因子は、細胞増殖を促すばかりでなく、癌化の過程で重要な因子である。これらの因子群を分解する Fbw7 は、腫瘍抑制因子とも考えられている[34]。今回、SREBP-1a の Fbw7 蛋白量を CHO-BP-1a 細胞にて検討した結果、著明な亢進を認め、同時にサイクリン E 蛋白量の軽度な低下を認めた。C-Myc や c-Jun は未解析であるが、SREBP-1a の増殖抑制機序に介在する因子として Fbw7 の可能性も考えられる。今後は、内在性の Fbw7 と脂質代謝との関連性も検討していく必要があると思われる。

このように脂質合成を強く促す転写因子 SREBP-1a と細胞周期や細胞増殖には大きな関連性があり、今後は細胞の癌化や cdk インヒビターと関連が明らかになりつつある細胞老化の点からも解析が望まれる。

結論

脂質合成転写因子 SREBP-1a は、これまで脂質を供給して細胞増殖を促す因子として捉えられてきたが、SREBP-1a は、cdk インヒビターや様々な細胞周期関連因子群に影響を及ぼして細胞増殖を停止、遅延させることが明らかになり、外的環境に応じた細胞周期の変化に積極的に関与する因子であると考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、多大なるご指導及びご助言を賜りました筑波大学附属病院 病院長 山田信博 先生に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行ならびに論文作成にあたり細部に渡りご指導を賜りました筑波大学大学院人間総合科学研究科 内分泌代謝・糖尿病内科 教授 島野仁先生には厚く御礼申し上げます。

最後に、ご指導、ご助言を賜りました自治医科大学さいたま附属医療センター 准教授 豊島秀男先生、お茶の水女子大学生生活科学部 准教授 曾根博仁先生、筑波大学大学院人間総合科学研究科 内分泌代謝・糖尿病内科 鈴木浩明先生、高橋昭光先生 中川嘉先生、横尾友隆先生、松坂賢先生ならびに同研究室の皆様から心から感謝致します。

文献

1. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, 1997. **89**(3): p. 331-40.
2. Brown, M.S., et al., Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*, 2000. **100**(4): p. 391-8.
3. Rawson, R.B., Control of lipid metabolism by regulated intramembrane proteolysis of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs). *Biochem Soc Symp*, 2003(70): p. 221-31.
4. Shimano, H., Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog Lipid Res*, 2001. **40**(6): p. 439-52.
5. Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*, 2002. **109**(9): p. 1125-31.
6. Shimomura, I., et al., Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest*, 1997. **99**(5): p. 838-45.
7. Ridgway, N.D. and T.A. Lagace, Regulation of the CDP-choline pathway by sterol regulatory element binding proteins involves transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Biochem J*, 2003. **372**(Pt 3): p. 811-9.
8. Inoue, N., et al., Lipid synthetic transcription factor SREBP-1a activates p21WAF1/CIP1, a universal cyclin-dependent kinase inhibitor. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(20): p. 8938-47.
9. Hirano, Y., et al., Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*, 2001. **276**(39): p. 36431-7.
10. Sato, R., et al., Transcriptional regulation of the ATP citrate-lyase gene by sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem*, 2000. **275**(17): p. 12497-502.
11. Kim, J.B., et al., Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(5): p. 2582-8.
12. Amemiya-Kudo, M., et al., Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J Lipid Res*, 2002. **43**(8): p. 1220-35.
13. Briggs, M.R., et al., Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. *J Biol Chem*, 1993. **268**(19): p. 14490-6.
14. Chu, Y.W., et al., Analysis with flow cytometry of green fluorescent protein expression in leukemic cells. *Cytometry*, 1999. **36**(4): p. 333-9.

15. Yoshikawa, T., et al., Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(9): p. 2991-3000.
16. Toyoshima, H. and T. Hunter, p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*, 1994. **78**(1): p. 67-74.
17. Wang, X., et al., SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell*, 1994. **77**(1): p. 53-62.
18. Alessandrini, A., D.S. Chiaur, and M. Pagano, Regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 by degradation and phosphorylation. *Leukemia*, 1997. **11**(3): p. 342-5.
19. Shimano, H., et al., Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J Clin Invest*, 1996. **98**(7): p. 1575-84.
20. Shimano, H., et al., Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. *J Clin Invest*, 1997. **100**(8): p. 2115-24.
21. Hannah, V.C., et al., Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J Biol Chem*, 2001. **276**(6): p. 4365-72.
22. Chen, P.L., et al., Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science*, 1990. **250**(4987): p. 1576-80.
23. el-Deiry, W.S., et al., WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 1993. **75**(4): p. 817-25.
24. Shimano, H., et al., Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem*, 1999. **274**(50): p. 35832-9.
25. Keyomarsi, K., et al., Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin. *Cancer Res*, 1991. **51**(13): p. 3602-9.
26. Hirai, A., et al., Geranylgeranylated rho small GTPase(s) are essential for the degradation of p27Kip1 and facilitate the progression from G1 to S phase in growth-stimulated rat FRTL-5 cells. *J Biol Chem*, 1997. **272**(1): p. 13-6.
27. Carrano, A.C., et al., SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol*, 1999. **1**(4): p. 193-9.
28. Kamura, T., et al., Degradation of p57Kip2 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(18): p. 10231-6.
29. Kamura, T., et al., Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Nat Cell Biol*, 2004. **6**(12): p. 1229-35.
30. Sherr, C.J., G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*, 1994. **79**(4): p. 551-5.
31. Koff, A., et al., Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the

- human cell cycle. *Science*, 1992. **257**(5077): p. 1689-94.
32. Weinberg, R.A., The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 1995. **81**(3): p. 323-30.
 33. Sundqvist, A., et al., Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF(Fbw7). *Cell Metab*, 2005. **1**(6): p. 379-91.
 34. Minella, A.C. and B.E. Clurman, Mechanisms of tumor suppression by the SCF(Fbw7). *Cell Cycle*, 2005. **4**(10): p. 1356-9.
 35. Melchiorri, C., et al., Ploidy and nuclearity of rat hepatocytes after compensatory regeneration or mitogen-induced liver growth. *Carcinogenesis*, 1993. **14**(9): p. 1825-30.
 36. Yang, T., et al., Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell*, 2002. **110**(4): p. 489-500.
 37. Chen, H.W., H.J. Heiniger, and A.A. Kandutsch, Relationship between sterol synthesis and DNA synthesis in phytohemagglutinin-stimulated mouse lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. **72**(5): p. 1950-4.
 38. Zhou, R.H., et al., Vascular endothelial growth factor activation of sterol regulatory element binding protein: a potential role in angiogenesis. *Circ Res*, 2004. **95**(5): p. 471-8.
 39. Du, X., et al., Involvement of Akt in ER-to-Golgi transport of SCAP/SREBP: a link between a key cell proliferative pathway and membrane synthesis. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(6): p. 2735-45.
 40. Bengoechea-Alonso, M.T. and J. Ericsson, Cdk1/cyclin B-mediated phosphorylation stabilizes SREBP1 during mitosis. *Cell Cycle*, 2006. **5**(15): p. 1708-18.
 41. Brauweiler, A., et al., RING-dependent tumor suppression and G2/M arrest induced by the TRC8 hereditary kidney cancer gene. *Oncogene*, 2007. **26**(16): p. 2263-71.
 42. Bengoechea-Alonso, M.T., T. Punga, and J. Ericsson, Hyperphosphorylation regulates the activity of SREBP1 during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(33): p. 11681-6.
 43. Kawabe, Y., et al., Characterization of two Chinese hamster ovary cell lines expressing the COOH-terminal domains of sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1. *Cell Struct Funct*, 1998. **23**(4): p. 187-92.

図の説明

図 1

核型 SREBP-1a の細胞増殖の抑制効果

A 核型 SREBP-1a を IPTG 誘導下で発現する CHO 細胞株 (CHO-BP1a 細胞) と核型 SREBP-2 を発現する CHO 細胞株 (CHO-BP-2 株) における SREBP 発現時の細胞増殖の時間経過を示した。対照として Lac レプレッサーのみを発現する CHO 細胞株 (CHO-Lac 細胞) を用いた。各 CHO 細胞株は、播種翌日に IPTG 0.1mM を添加した後、所定の時間培養し、生細胞数を血球計数盤にて計測した。グラフ上の白丸は、IPTG 未添加群、黒丸は IPTG 添加群を示した。

B 同 CHO 細胞株を用いて DNA 合成の指標として 2 時間の BrdU 取り込み量を評価した。グラフの白カラムは IPTG 未添加群を、黒カラムは IPTG 添加群を示した。

図 2

内在性 SREBP-1a と外因性 IPTG 誘導型 SREBP-1a の細胞増殖抑制効果の比較

A B SREBP-1a 発現誘導型 CHO-BP-1a 細胞における IPTG 濃度と細胞増殖抑制の関係と脂質除去による HeLa 細胞の増殖抑制効果を示した。SREBP-1a 発現誘導型 CHO-BP-1a 細胞に IPTG を 1 μ M から 100 μ M まで用量を変えて添加し、イムノブロットによる核型 SREBP-1 蛋白量の評価と MTT アッセイおよび BrdU 取り込みアッセイを行った。HeLa 細胞を脂質除去した牛胎児血清を含む DMEM 培地で 2 日間、または 3 日間培養し、同様に核 SREBP-1 蛋白量の評価と MTT アッセイを行った。

C (上図) SREBP-1a の細胞増殖抑制に及ぼす GGPP、FPP の影響

コレステロール合成阻害剤シンバスタチン 10 μ M 単独、または GGPP 3 μ g/mL、FPP 3 μ g/mL をともに CHO-Lac 細胞 (図 C 左上) と CHO-BP-1a 細胞 (図 C 右上) に添加して培養した。2 日間後に細胞増殖への影響を MTT アッセイにて評価した。

C (下図) SREBP-1a の細胞増殖抑制に及ぼすコレステロール合成阻害剤シンバスタチンと脂肪酸合成酵素阻害剤セルレニンの影響

コレステロール合成阻害剤シンバスタチン 0.3、1 μ M または脂肪酸合成酵素阻害剤セルレニン 0.1、0.3、3 μ M を CHO-Lac 細胞 (図 C 左下) と CHO-BP-1a 細胞 (図 C 右下) に添加して培養した。2 日間後に細胞増殖への影響を MTT アッセイにて評価した。いずれのグラムも白カラムは IPTG 未添加群を、黒カラムは IPTG 0.1mM 添加を示した。MTT アッセイの結果は、平均 \pm SD で示した。

図 3

SREBP 誘導型 stable CHO 細胞における脂質合成系遺伝子および cdk インヒビター発現への評価

A SREBP 誘導型 stable CHO 細胞のノザンブロット解析

SREBP 誘導型 CHO 細胞を用いて、SREBP-1a の脂質合成系の酵素群と cdk インヒビターの遺伝子発現への影響をノザンブロットにて解析した。各 stable CHO 細胞（CHO-Lac 細胞、CHO-BP-1a 細胞、CHO-BP-2 細胞）を IPTG 0.1mM で 1 日処理後、RNA を抽出しノザンブロット解析を行った。FAS：脂肪酸合成酵素、HMG-CoA synthase：HMG-CoA 合成酵素、FPP synthase：ファルネシルジフosphate合成酵素、CT α ：CTP ホスホコリンシチジル転移酵素、内部標準として 36B4 を用いた。

B SREBP の cdk インヒビタープロモーターへの影響

cdk インヒビター p16, p19, p21, p27 のプロモーターをクローニングしてルシフェラーゼ発現プラスミドに挿入し、レポーターアッセイを行った。HEK293 細胞へ SREBP 発現プラスミドと cdk インヒビタープロモータールシフェラーゼプラスミドをともに遺伝子導入し、翌日のルシフェラーゼ活性を測定した。内部標準ルシフェラーゼとして pRL-SV40 プラスミドを補正に用いた。値は、3~4 サンプルの平均 \pm SD で示した。

図 4

SREBP-1a の細胞周期関連因子への影響

SREBP 誘導型 stable CHO 細胞における、(A) p27 分解制御因子 SKP2 と KPC1 遺伝子発現レベル、(B) cdk インヒビター蛋白レベル、(C) cdk2 及び cdk4 キナーゼ活性、(D) cdk2、cdk4、サイクリン D1、サイクリン E、SKP2、Fbw7、Rb 蛋白レベル

それぞれの SREBP 誘導型 stable CHO 細胞（CHO-Lac 細胞、CHO-BP-1a 細胞、CHO-BP-2 細胞）を IPTG 0.1mM で 1 日処理後、RNA を抽出、または細胞破砕液を調製してノザンブロット解析またはイムノブロット解析を行った。 α チューブリンをイムノブロットの内部標準とした。cdk2 及び cdk4 の活性評価では、細胞破砕液 200 μ g に各抗体を加えて免疫沈降した後、基質と 32 P-ATP を加えてインキュベートした。PAGE に展開し、基質の放射活性をラジオオートグラフィにて評価した。

図 5

肝部分摘出後の肝再生に及ぼす SREBP-1a の影響

A SREBP-1a tg マウスの肝再生への影響

SREBP-1a tg マウスとその同腹マウスを高蛋白食/低炭水化物食で 5 日間飼育した後に肝部分摘出術を施した。マウスは摘出術の 6 時間前より絶食とした。指定された日に BrdU を尾静脈より投与し、2 時間後に麻酔して肝臓を摘出した。BrdU の免疫染色と DAPI 染色は実験方法に記載したごとくに行い BrdU 陽性比率を 5A に示した。BrdU 陽性比率は、視野中の BrdU 陽性

細胞核数を DAPI 陽性細胞核数で除した値で表した。ND は BrdU 陽性細胞核を認めなかったことを示す。

B SREBP-1a 肝臓核の DNA 分布：肝部分摘出術前後の比較

肝部分摘出して 9 または 10 日目にマウスを麻酔し肝臓を摘出した。実験方法に従って肝細胞の DNA 倍数性を評価し、2N、4N、8N で表記した。

C SREBP-1 欠損マウス由来初代線維芽細胞 (MEF) の増殖速度

D SREBP-1 欠損マウス由来 MEF 細胞の BrdU 取り込み速度

C, D の結果は、7 実験の平均±SD で表記し Student's *t* 検定で有意差を検定した。

E SREBP-1 欠損マウス肝部分摘出術後の DNA 合成速度の評価

SREBP-1a tg マウスと同様に肝部分摘出術を行い、BrdU 取り込みを評価した。

図 6

内因性 SREBP-1 の細胞増殖への影響

A 培地中の脂質除去の HeLa 細胞の細胞増殖と核 SREBP-1 蛋白レベルに及ぼす影響

B 脂質除去による Swiss-3T3 線維芽細胞の細胞増殖及び SREBP-1 蛋白レベルへの影響

C 脂質欠乏時の HeLa 細胞の細胞周期解析

脂質欠乏には、培地中の牛胎児血清を脂質除去血清に置換した DMEM 培地を用いた。

細胞増殖は、同培地に置換後 2 日目に MTT アッセイを行って評価した。核 SREBP の評価及び細胞周期解析は、実験方法に従って行った。グラフの値は、平均±SD で表した。

FBS : 通常の牛胎児血清を含む DMEM 培地、DLS : 脂質除去血清を含む DMEM 培地、LPDS : リポ蛋白除去血清を含む DMEM 培地

図 7 SREBP-1a による細胞増殖抑制機序

表 1

SREBP-1a 誘導型 stable CHO 細胞 (CHO-BP-1a 細胞) と SREBP-2 誘導型 CHO 細胞 (CHO-BP-2 細胞) の細胞周期解析

各 CHO 細胞株は、細胞播種の翌日に IPTG 0.1mM を添加し、さらに 1 日培養した後、細胞懸濁液を調製した。細胞周期の解析は、細胞懸濁液を 0.1 % Triton X-100、0.1 mg/mL RNase 及び 25µg/mL の PI を含む PBS に懸濁して DNA を染色し、フローサイトメーターにて行った。値は平均±SD で示し、Student's *t* 検定にて、IPTG 未添加群と IPTG 添加群間の相違を検定し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。* * : $p < 0.01$

表 2

SREBP-1a の HEK293 細胞、Swiss-3T3 線維芽細胞及び Saos-2 細胞の細胞周期に及ぼす影響

核型 SREBP-1a を一過性に HEK293 細胞、Swiss-3T3 線維芽細胞及びヒト骨肉種由来 Saos-2 に導入して、細胞周期への影響を検討した。遺伝子導入には SREBP-1a とともに SRE-EGFP プラスミドとともに導入して EGFP 陽性細胞集団の解析を行った。陽性対照として cdk インヒビター-p21 発現プラスミドまたは p27 発現プラスミドを用いた。値は平均±SD で示し、統計検定は、pcDNA3.1(+)群を対照として、ダネットの多重比較検定で行い $p < 0.05$ を有意差ありとした。

表 3

変異型 SREBP-1a の HEK293 細胞の細胞周期への影響

SREBP-1a の転写制御ドメインを欠損させた Δ TA-SREBP-1a 発現プラスミドと SREBP-1a の DNA 結合ドメインの SRE 配列への結合能を失活させた YR-SREBP-1a 発現プラスミドを SRE-EGFP プラスミドとともに HEK293 細胞へ導入して EGFP 陽性細胞集団の細胞周期解析を行った。結果は平均±SD で示し、統計検定は、pcDNA3.1(+)群を対照として、ダネットの多重比較検定で行い $p < 0.05$ を有意差ありとした。* * : $p < 0.01$

- (2) SREBP 発現プラスミドを用いた一過性遺伝子導入法による解析
培養細胞株に活性型 SREBP を導入、発現させて細胞周期に及ぼす影響を検討した。
- (II) Cdk インヒビターのプロモーターのクローニングとレポーターアッセイ
cdk インヒビターのプロモーター領域をクローニングしてレポーターアッセイを行い、SREBP-1a のプロモーター活性に及ぼす影響を検討した。
- (III) 肝部分切除モデルを用いた SREBP-1a の肝再生に及ぼす影響
SREBP-1a tg マウスや SREBP-1 欠損マウスを用いて、肝再生に及ぼす SREBP-1 の影響を検討した。
- (IV) SREBP-1 欠損マウス胎児由来の初代線維芽細胞を用いた検討
SREBP-1 欠損マウスから線維芽細胞を単離し、野生型マウスと増殖速度を比較した。
- (V) 脂質欠乏による内在性 SREBP-1 発現誘導と細胞増殖への影響
培養細胞に脂質欠乏処置を施し、内在性 SREBP を誘導して細胞増殖に及ぼす影響を検討した。

結果及び考察

活性型 SREBP-1a は、CHO 細胞、HEK293 細胞、Swiss-3T3 線維芽細胞、または p53 を欠損した Saos-2 細胞において、顕著な細胞増殖の抑制、DNA 合成の抑制、及び細胞周期 G₁ 期停止作用を示した。この細胞増殖抑制作用は、転写機能や DNA 結合能を失活させた変異型 SREBP-1a では認められず、SREBP-1a の転写活性化能に依存するものであった。

SREBP-1a は脂質合成系酵素の発現を促して、組織中の脂質含量を増大させるため、阻害剤を用いて脂質蓄積と増殖抑制の関係を検討したが、コレステロール合成阻害剤や脂肪酸合成阻害剤は SREBP-1a の増殖抑制作用に影響を及ぼさず、そこに脂質蓄積は関与しないものと考えられた。

SREBP-1a と細胞周期制御因子との関連においては、SREBP-1a を発現させた細胞中に cdk インヒビターの p27KIP1、p21(Waf1/Cip1)、p16INK4A 遺伝子発現の亢進を認め、p27 と p21 はその蛋白量の亢進をも確認した。また、サイクリン依存性キナーゼ cdk 2 及び cdk 4 の活性は低下し、サイクリン依存性キナーゼの標的蛋白である Rb 蛋白質の脱リン酸化が亢進していた。

cdk インヒビターのプロモーターへの SREBP-1a の影響をレポーターアッセイにて評価した結果、SREBP-1a は p21(Waf1/Cip1)、p16INK4A プロモーターを活性化し、これらの cdk インヒビターを転写レベルで活性化することが示された。p27 においては、その分解を司る SCF ユビキチンリガーゼの基質認識コンポーネント Skp2 やユビキチンリガーゼ KPC1 の発現が低下していた。p27 は、細胞周期の進行において蛋白量の変動によってそのインヒビター活性が制御されると言われており、SREBP-1a はこれらの p27 の制御因子群を介して p27 蛋白量を増大させているものと考えられた。

今回の解析で興味深いのは、SREBP-1a を発現させた細胞中に SREBP-1a の分解を促すユビキチンリガーゼ Fbw7/CDC4 蛋白が亢進していたことである。Fbw7 は以前からサイクリ

ン D、c-Jun、c-Myc の分解を促して細胞増殖を抑制する腫瘍抑制因子として捉えられており、SREBP-1a による Fbw7 蛋白量の増加は、今回認められた細胞増殖抑制に関与する可能性も想定される。

SREBP-1a tg マウスでは、部分肝切除術後の肝再生が障害されており、培養細胞のみならず生体の臓器においても SREBP-1a の細胞増殖抑制作用が確認された。

内在性の SREBP は脂質欠乏時に活性化されることが知られている。培養液から脂質画分を除いて HeLa 細胞や Swiss-3T3 細胞に脂質欠乏を誘発すると、内在性 SREBP-1 の活性化に伴って、細胞増殖抑制と G₁ 期の停止を生じた。単価不飽和脂肪酸のオレイン酸は、脂質欠乏による SREBP-1 活性化を抑制するとともに細胞増殖抑制を回復させた。

SREBP-1a は従来、細胞分裂に伴って発現し、細胞に脂質を供給して増殖を促す転写因子と捉えられてきた。しかし、今回の研究にて SREBP-1a は、cdk インヒビターを誘導して細胞増殖を停止、遅延させることが明らかになった。我々は、この SREBP-1a の増殖抑制作用は、細胞がその増殖に応じた脂質を供給できない環境においては、SREBP-1a が増殖を一旦 G₁ 期に留め、同時に次の細胞分裂に対して十分な脂質を供給するためと考えている。

結論

脂質合成転写因子 SREBP-1a は、これまで脂質を供給して細胞増殖を促す因子として捉えられてきたが、SREBP-1a は、cdk インヒビターや様々な細胞周期関連因子群に影響を及ぼして細胞増殖を停止、遅延させることが明らかになり、外的環境に応じた細胞周期の変化に積極的に関与する因子であると考えられる。

図 1

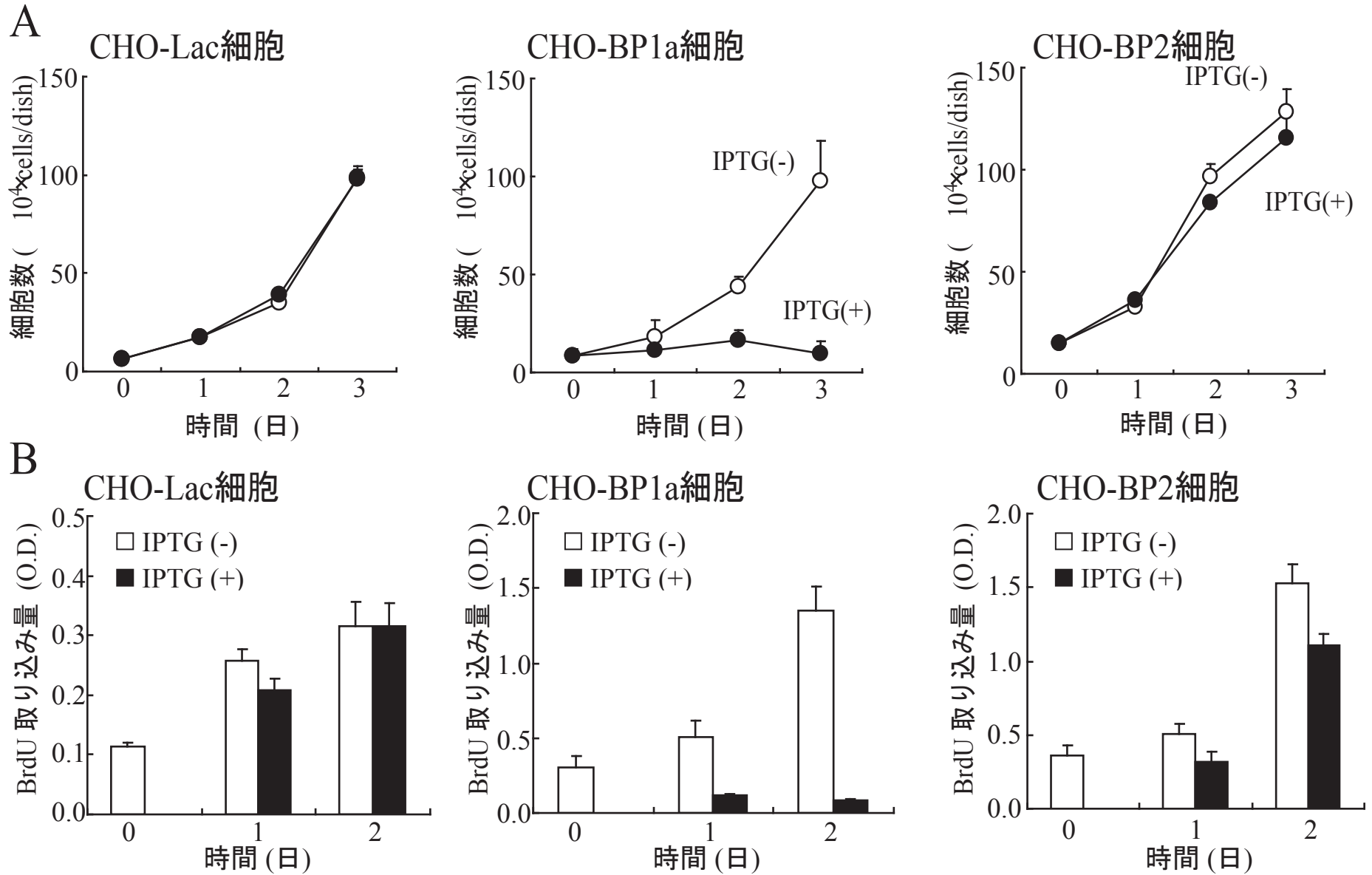


図 2

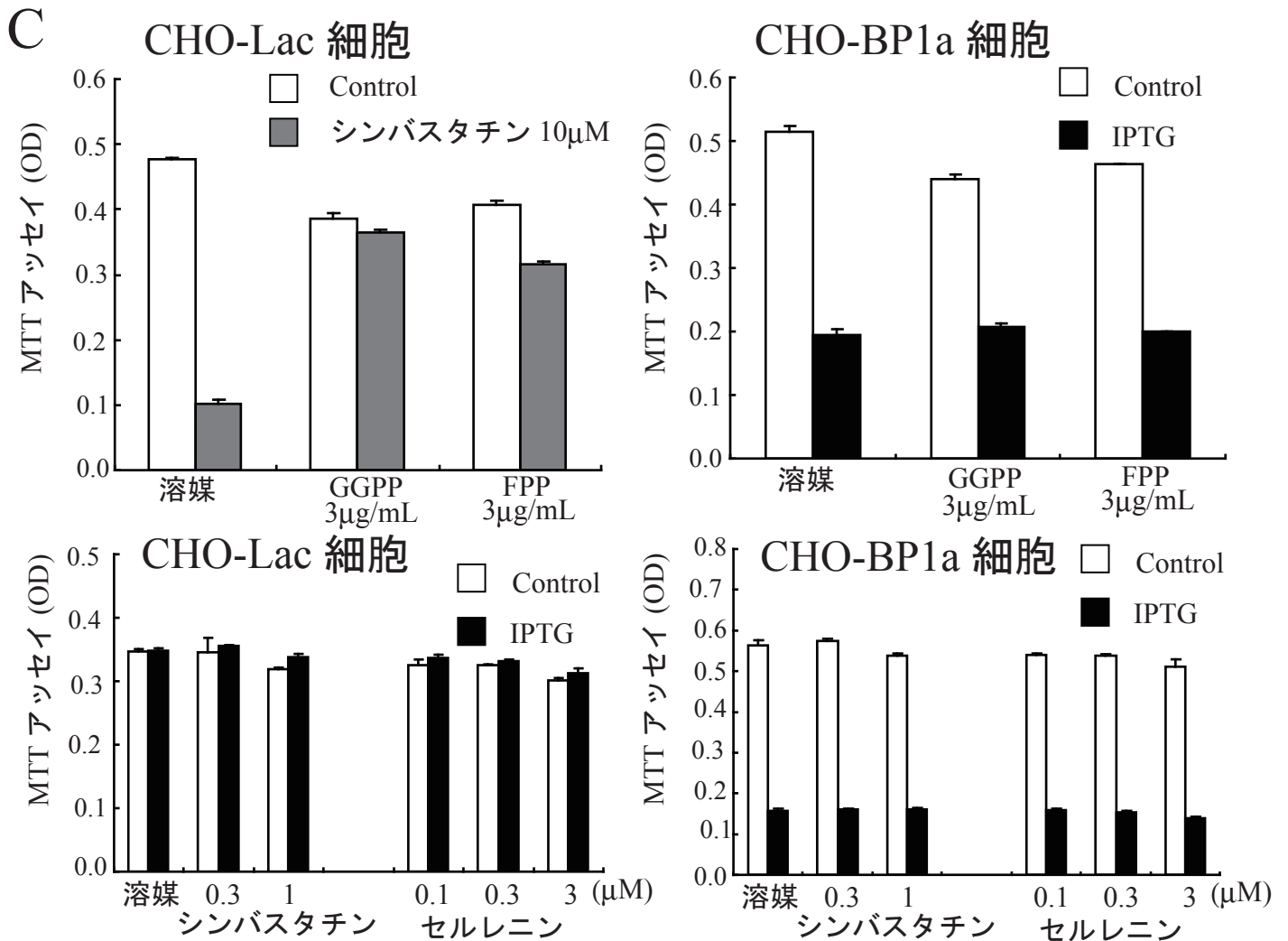
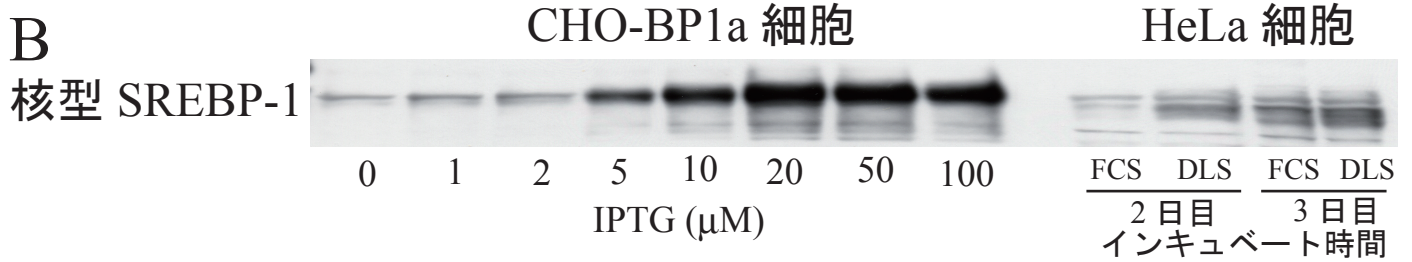
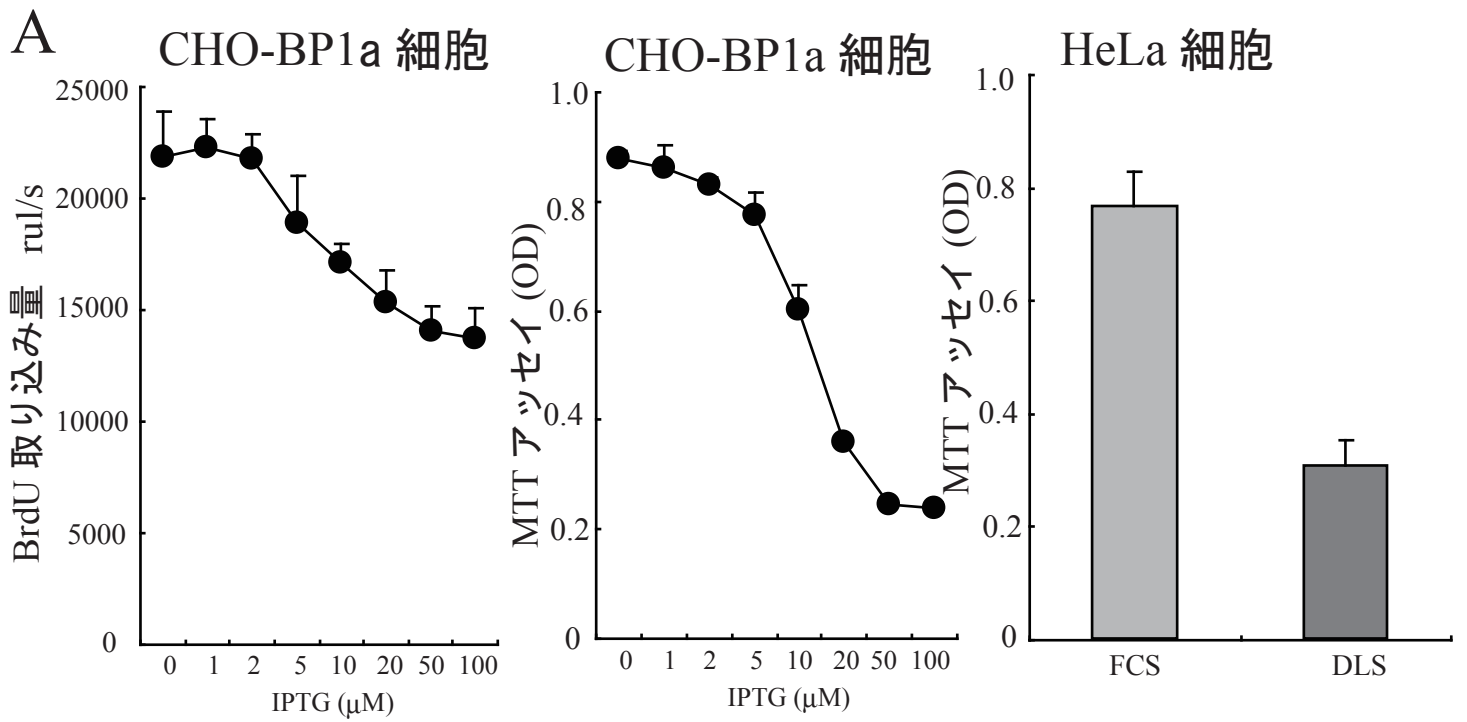
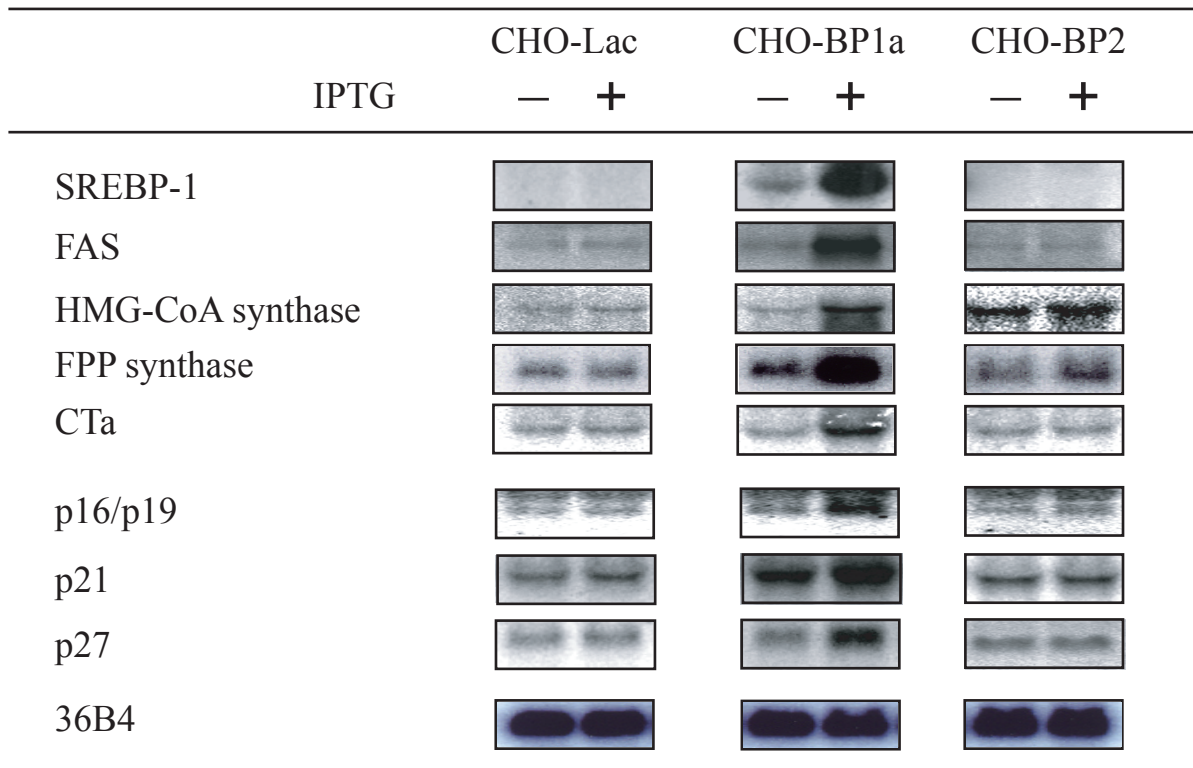


図.3

A



B

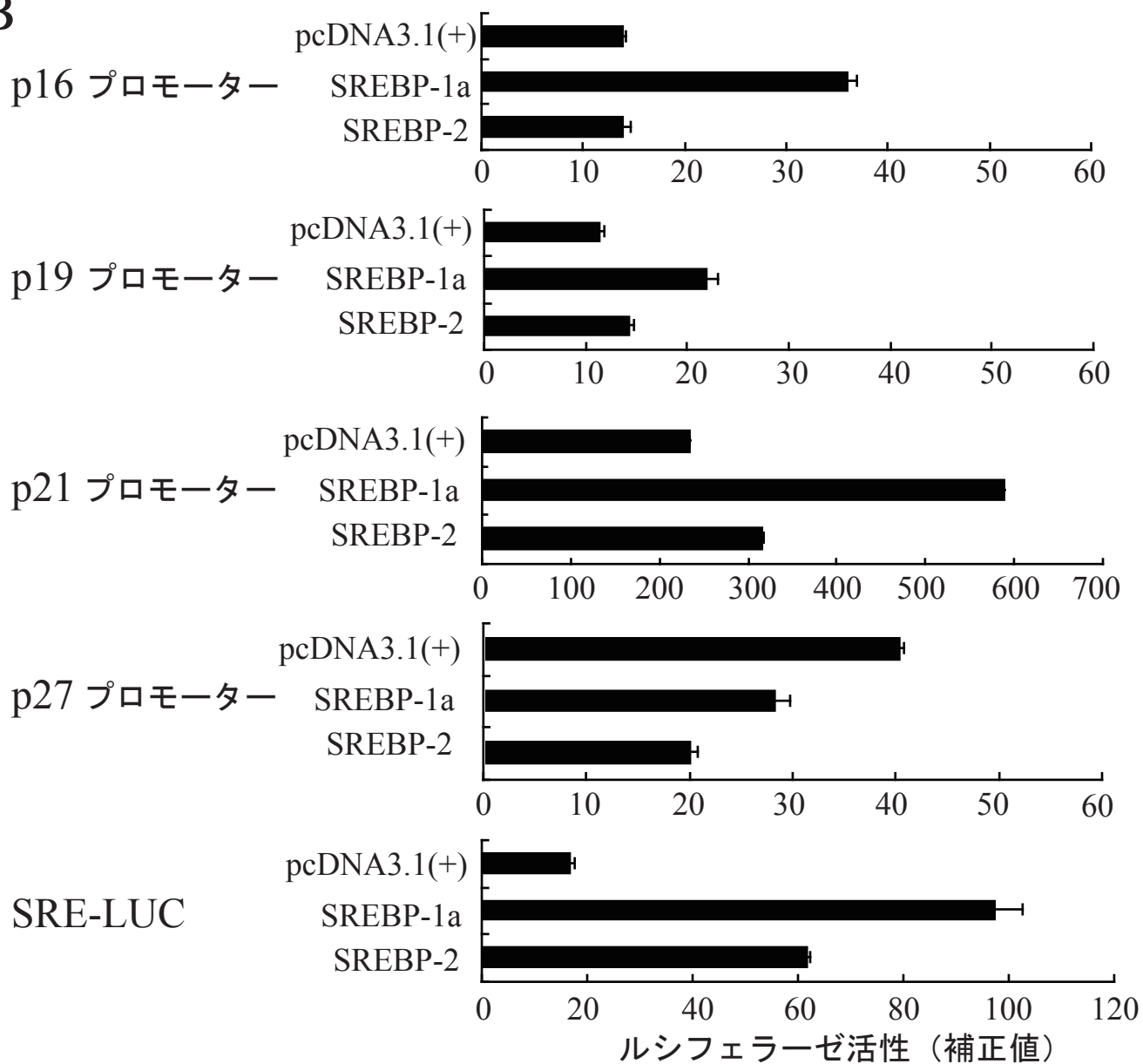
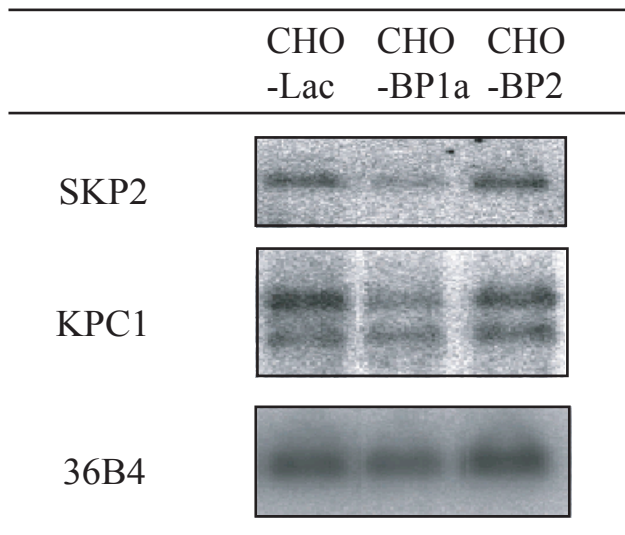
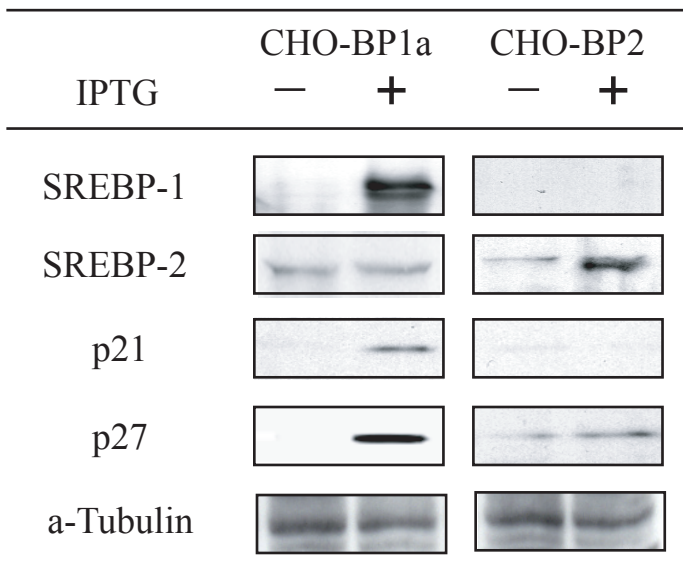


图.4

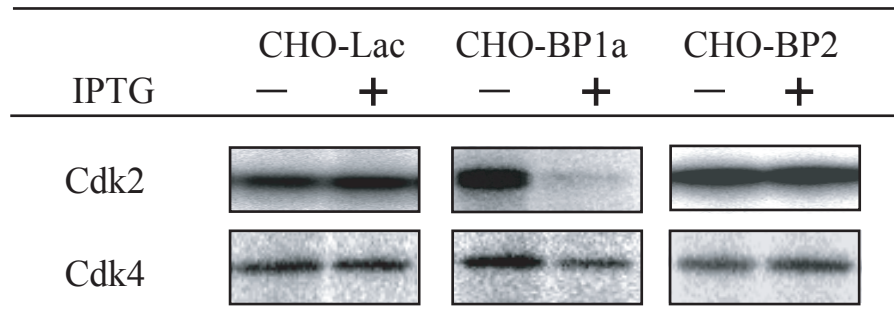
A



B



C



D

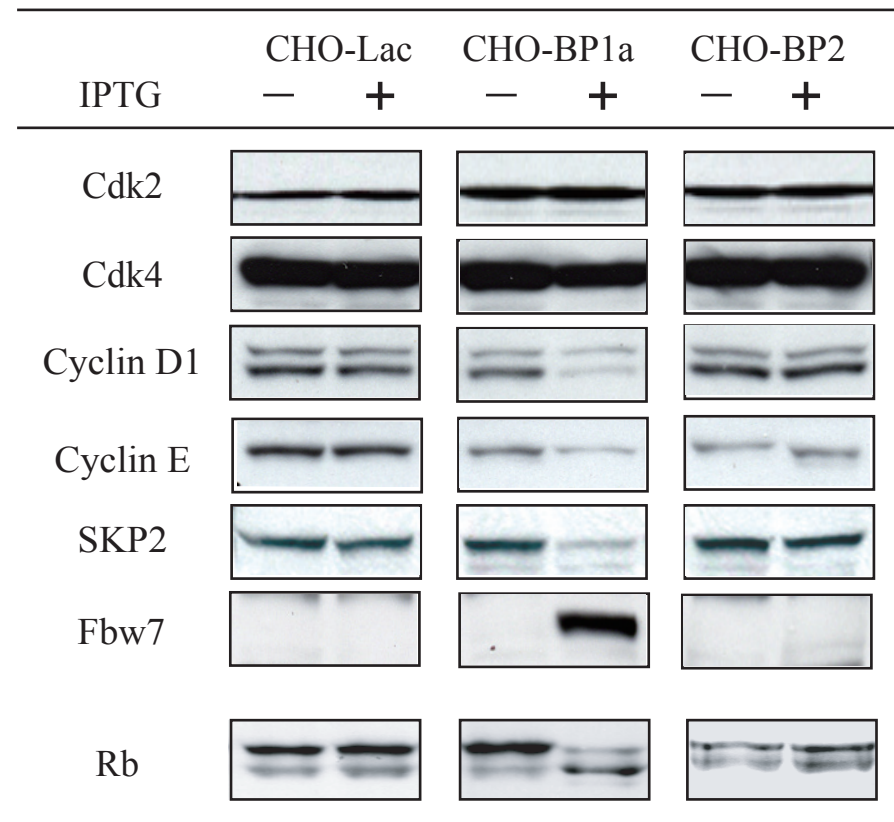


図.5

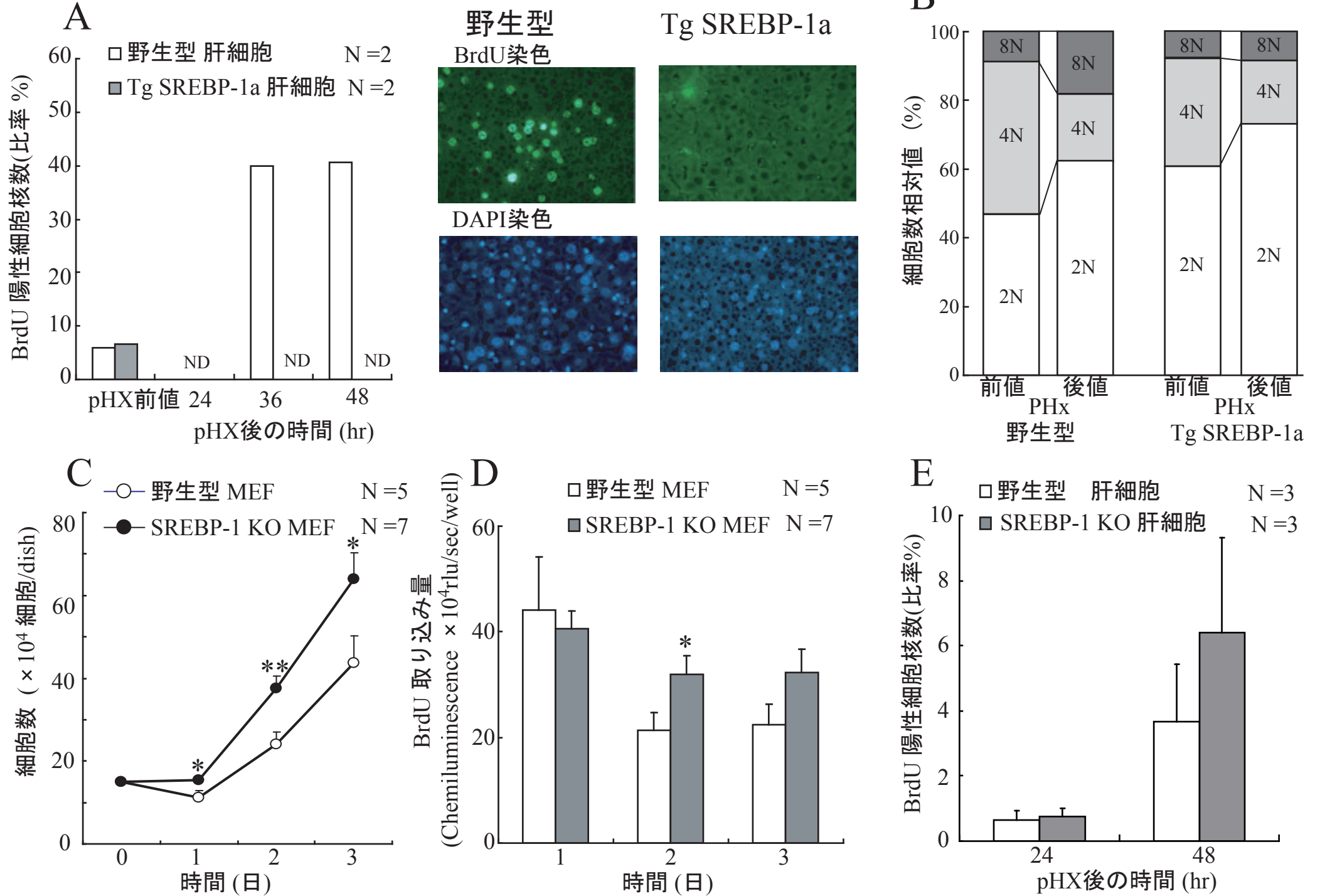


図.6

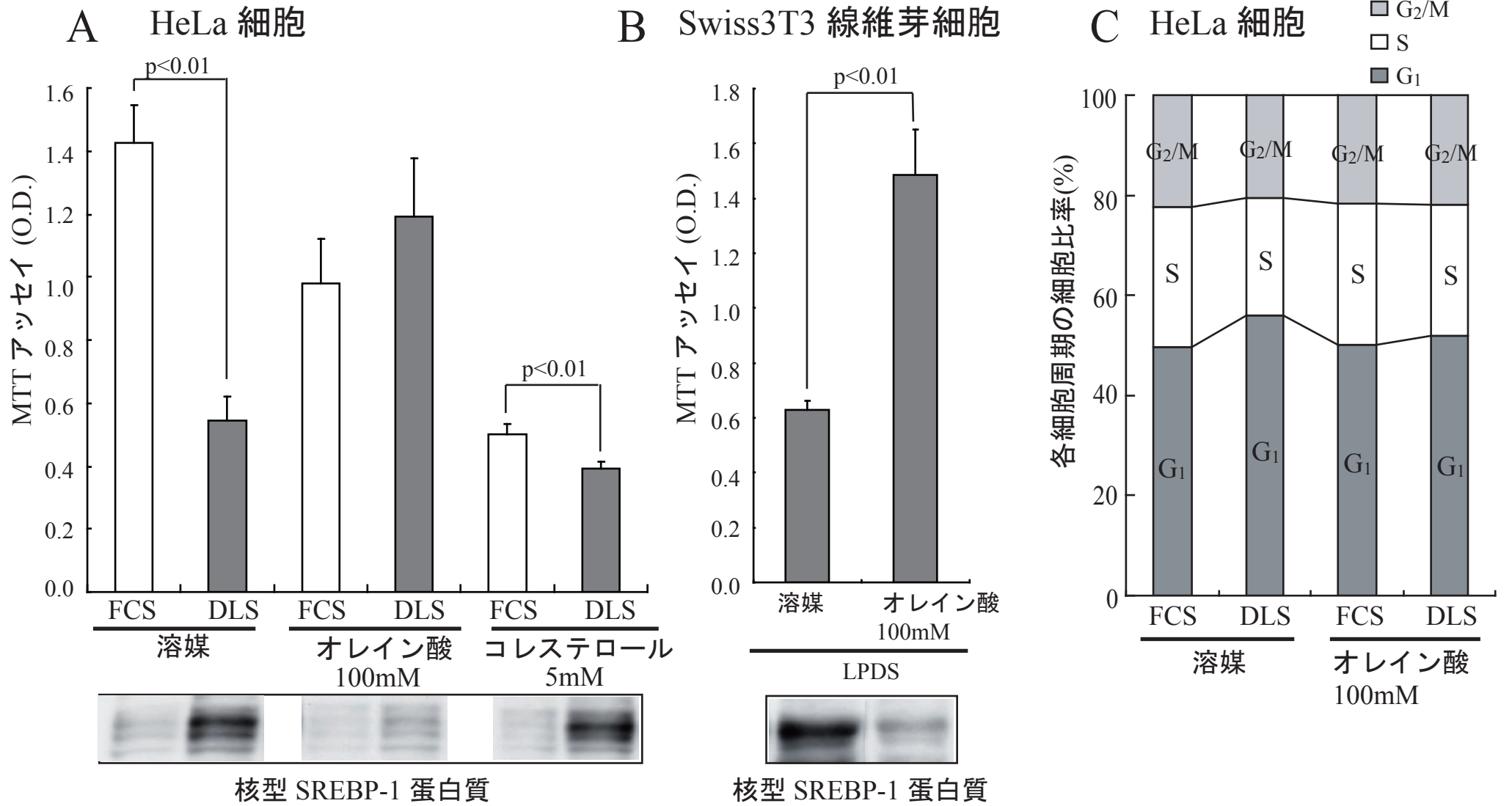


図.7

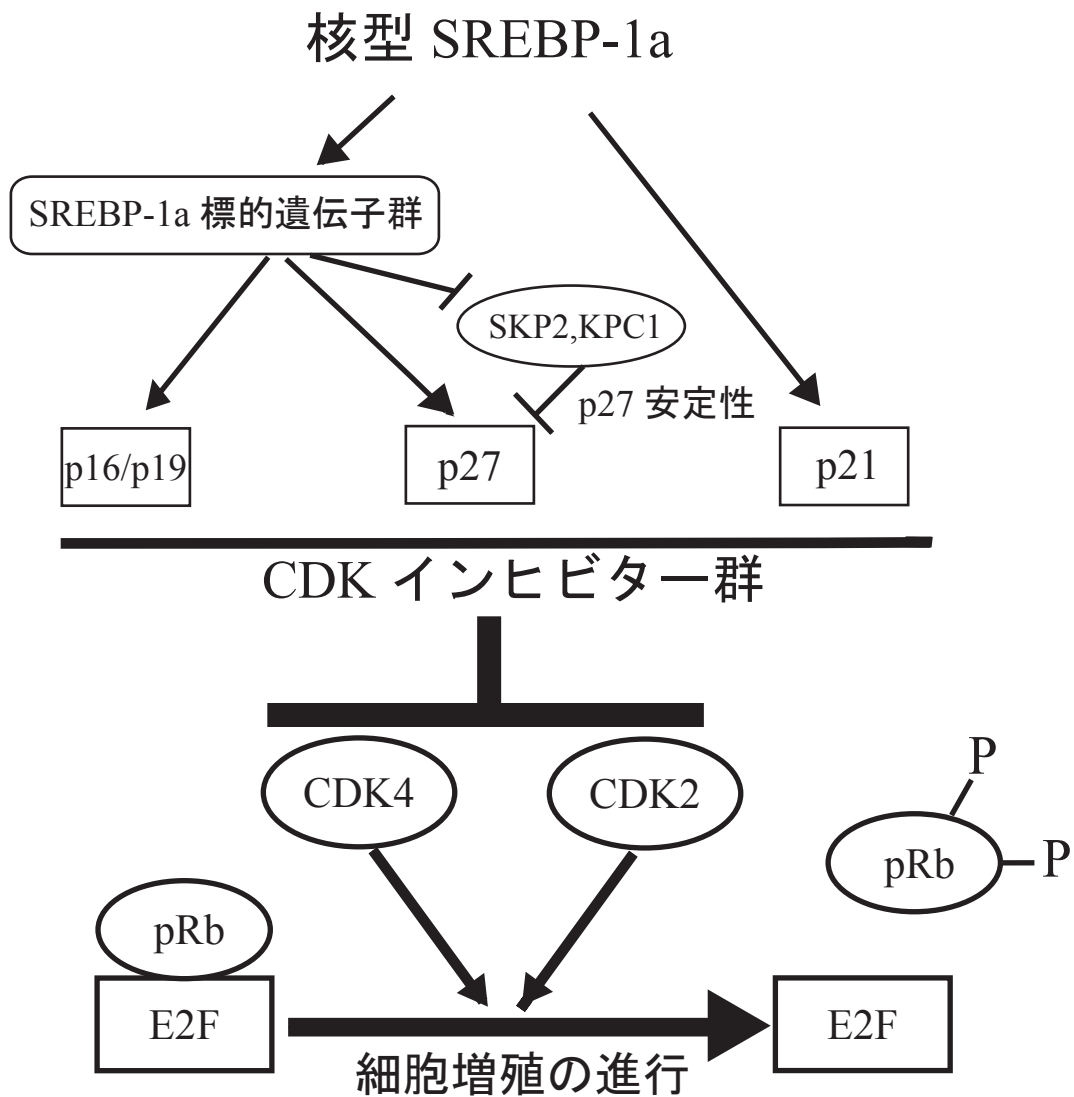
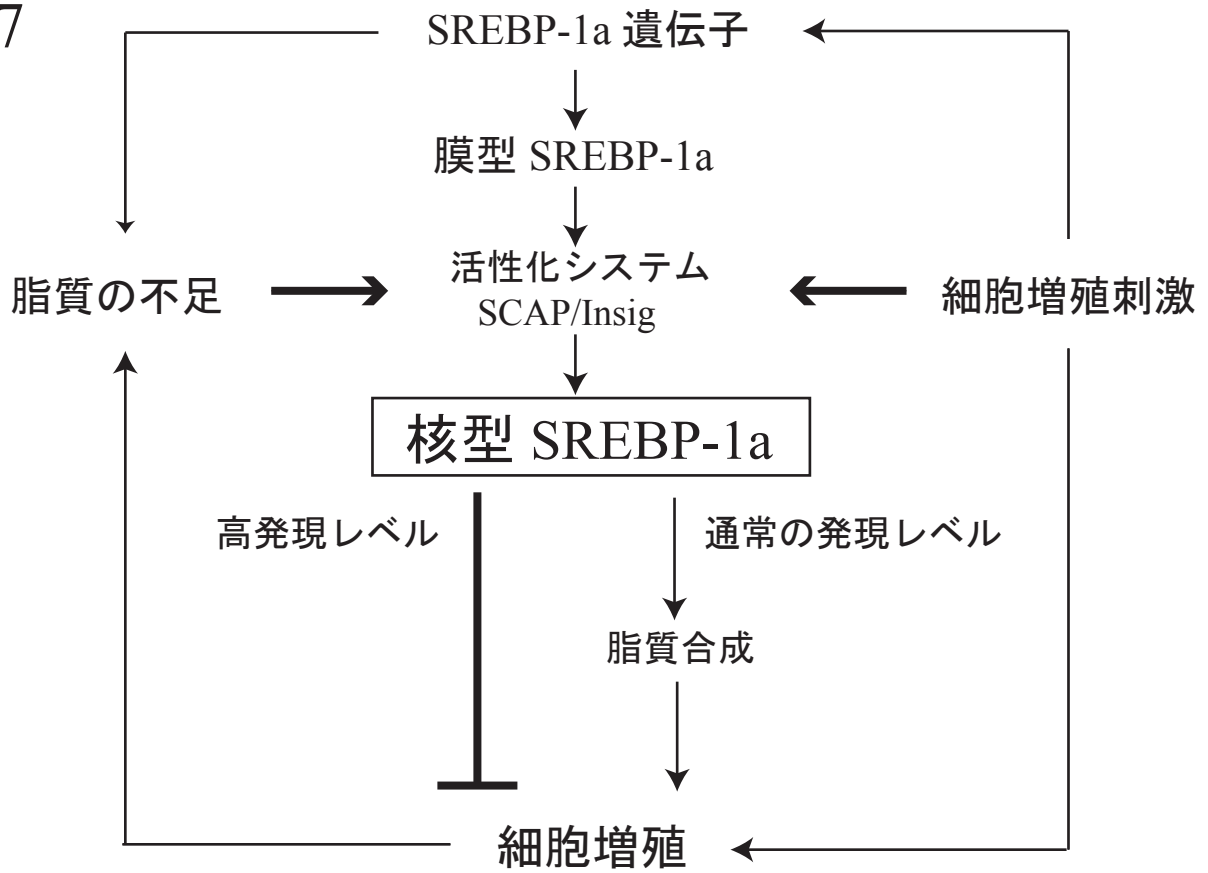


表1 SREBP-1a 誘導型 stable CHO 細胞 (CHO-BP-1a 細胞) と SREBP-2 誘導型 CHO 細胞 (CHO-BP-2 細胞) の細胞周期解析

細胞	IPTG	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
CHO-Lac 細胞	-	40.7 ± 1.3	37.5 ± 1.6	21.8 ± 2.0
	+	40.4 ± 3.1	38.8 ± 1.9	20.8 ± 3.2
CHO-BP1a 細胞	-	49.4 ± 1.5	22.7 ± 3.8	27.9 ± 5.3
	+	73.7 ± 0.6**	6.6 ± 1.0**	19.6 ± 0.9
CHO-BP-2 細胞	-	34.7 ± 1.4	43.8 ± 4.0	21.6 ± 2.5
	+	33.2 ± 1.5	41.5 ± 0.6	25.3 ± 1.5

各 CHO 細胞株は、細胞播種の翌日に IPTG 0.1mM を添加し、さらに 1 日培養した後、細胞懸濁液を調製した。細胞周期の解析は、細胞懸濁液を 0.1 % Triton X-100、0.1 mg/mL RNase 及び 25 μg/mL の PI を含む PBS に懸濁して DNA を染色し、フローサイトメーターにて行った。値は平均±SD で示し、Student's *t* 検定にて、IPTG 未添加群と IPTG 添加群間の相違を検定し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。** : $p < 0.01$

表2 SREBP-1a の HEK293 細胞、Swiss-3T3 線維芽細胞及び Saos-2 細胞の細胞周期に及ぼす影響

細胞	群	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
HEK293 細胞	pcDNA3.1(+)	38.5 ± 2.9	21.2 ± 3.3	40.2 ± 2.4
	SREBP-1a	50.4 ± 2.0**	13.8 ± 0.1**	35.7 ± 2.1
	p21	55.6 ± 0.4**	22.3 ± 1.5	22.1 ± 1.2**
	p27	81.9 ± 1.5**	5.8 ± 0.5**	12.2 ± 1.8
Swiss-3T 線維芽細胞	pcDNA3.1(+)	49.7 ± 1.1	18.7 ± 0.6	32.0 ± 1.3
	SREBP-1a	59.5 ± 1.6**	12.0 ± 1.1**	28.5 ± 2.6
Saos-2 細胞	pcDNA3.1(+)	45.4 ± 2.0	15.1 ± 2.8	39.6 ± 3.3
	SREBP-1a	53.2 ± 5.0*	10.3 ± 2.2*	36.5 ± 4.7

核型 SREBP-1a を HEK293 細胞、Swiss-3T3 線維芽細胞及びヒト骨肉種由来 Saos-2 細胞に一過性に導入して、細胞周期への影響を検討した。遺伝子導入には SREBP-1a 発現プラスミドを SRE-EGFP プラスミドとともに導入して EGFP 陽性細胞集団の解析を行った。陽性対照として cdk インヒビター p21 発現プラスミドまたは p27 発現プラスミドを用いた。値は平均±SD で示し、統計検定は、pcDNA3.1(+)群を対照として、ダネットの多重比較検定で行い $p < 0.05$ を有意差ありとした。** : $p < 0.01$ 、* : $p < 0.05$

表3 変異型 SREBP-1a の HEK293 細胞の細胞周期への影響

細胞	群	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
HEK293	pcDNA3.1(+)	40.8 ± 2.9	20.4 ± 2.4	38.8 ± 3.6
	ΔTA-SREBP-1a	37.2 ± 2.6	23.0 ± 2.6	39.8 ± 1.2
	YR-SREBP-1a	40.8 ± 6.2	19.6 ± 3.5	39.7 ± 8.2
	SREBP-1a	51.7 ± 2.6**	15.0 ± 3.7	33.3 ± 2.7

SREBP-1a の転写制御ドメインを欠損させた Δ TA-SREBP-1a 発現プラスミドと SREBP-1a の DNA 結合ドメインの SRE 配列への結合能を失活させた YR-SREBP-1a 発現プラスミドを SRE-EGFP プラスミドとともに HEK293 細胞へ導入して EGFP 陽性細胞集団の細胞周期解析を行った。結果は平均±SD で示し、統計検定は、pcDNA3.1(+)群を対照として、ダネットの多重比較検定で行い p<0.05 を有意差ありとした。** : p<0.01