

氏名(本籍)	なかくき まさ のり 中久木 正 則 (三重県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 乙 第 2404 号		
学位授与年月日	平成 20 年 10 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	脂質合成転写因子 SREBP-1a は、サイクリン依存性キナーゼを介して細胞増殖を抑制する		
主 査	筑波大学教授	医学博士	川 上 康
副 査	筑波大学教授	医学博士	大河内 信 弘
副 査	筑波大学教授	医学博士	高 橋 智
副 査	筑波大学准教授	薬学博士	伊 東 進
副 査	筑波大学准教授	博士(医学)	松 本 功

論 文 の 内 容 の 要 旨

(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。

SREBP は、脂質合成を促す転写因子であり SREBP-2, SREBP-1c, SREBP-1a の 3 つのサブタイプが知られている。SREBP-2 はコレステロール生合成や LDL 受容体を制御し、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、増殖の盛んな培養細胞に発現し、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、本研究は活性型 SREBP-1a を培養細胞などに発現させて SREBP-1a と細胞増殖の関連性を検討することを目的とした。

(対象と方法)

1. 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 細胞株を用いて、SREBP-1a の細胞増殖、細胞周期関連因子への影響を検討した。

(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 遺伝子を導入，発現させて細胞周期に及ぼす影響を検討した。

2. cdk インヒビターのプロモーターの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 cdk インヒビター遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。

3. 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。

4. SREBP-1 欠損マウス胎児由来の初代培養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。

5. 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)

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した。

SREBP-1a と細胞周期制御因子との関連においては，SREBP-1a による 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 cdk2 及び cdk4 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。

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。

(考察)

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。

審査の結果の要旨

本研究は，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いた脂質合成転写因子 SREBP-

1aが、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した。これらの結果からSREBP-1aは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として位置づけることができる。細胞周期と細胞内エネルギー代謝を考察する上で興味深い結果であり、価値ある論文と判断する。

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。