

論文概要 (Thesis Abstract)

○ 論文題目

in vivo Ad-luc と TFEL scan を用いた
脂質代謝関連遺伝子の転写調節機構の解明

○ 指導教員

人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻

島野 仁 教授

筑波大学大学院人間総合科学研究科

疾患制御医学専攻

志鎌明人

目的：

近年、全世界的に生活習慣病が増加の一途をたどっており、これらは動脈硬化性疾患とも深く関連し、その根源には内臓脂肪中心の肥満があると考えられている。我々の研究室では、以前より体内での中性脂肪合成系の調節機構の研究を続け、肝臓における中性脂肪合成系の調節に SREBP-1 と呼ばれる転写因子が重要な働きをしていることを明らかにしてきた。

一方で、肝臓における SREBP-1c の活性は、mRNA の発現量により調節されており、摂食時に顕著な発現上昇が見られるが、摂食という生体特有の現象を *in vitro* の系で解析するのは困難であった。そこで我々の研究室では、摂食での転写調節メカニズムを生きたマウスを用いて詳しく解析するため、*in vivo* Ad-luc 法というプロモーター解析手法を確立し、生体における転写調節メカニズムの詳細な解析を可能にした。この解析技術と、マウスの転写因子発現プラスミドライブラリーTFEL (Transcription Factor Expression Library) を用いて、様々な糖・脂質代謝関連遺伝子の転写調節メカニズムの解析を進めている。

Malic enzyme 1 (ME1) はリンゴ酸をピルビン酸に変換する酵素であり、脂肪酸伸長反応に必要な NADPH 産生を担っており、*de novo* lipogenesis において重要な遺伝子である。

本研究では、我々独自の手法として *in vivo* Ad-luc 法と TFEL scan 法を用いた摂食による Malic enzyme 1 遺伝子の転写調節機構の解析を行った。

対象と方法：

転写因子発現プラスミドライブラリーTFEL とは、我々が独自に開発したマウスのゲノム上に存在する転写因子の大多数を集めた発現プラスミドライブラリーである。TFEL を用いた trans 因子発現クローニング法 (TFEL scan 法) により、ME1 遺伝子プロモーター活性化因子の探索を行った。その活性化因子に対して、ルシフェラーゼレポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイを用いて、発現誘導を制御する DNA 配列の解析を行い、また *in vivo* Ad-luc 法を用いて、摂食による ME1 遺伝子の転写調節機構の解析を行った。

結果：

TFEL scan 法により、転写因子 Nrf2 及び SREBP-1 が ME1 遺伝子のプロモーターを活性化することを見出した。また、ルシフェラーゼレポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイ、*in vivo* Ad-luc 法を用いた解析にて Nrf2, SREBP-1 が ME1 プロモーターにそれぞれ結合すること、更に摂食での ME1 遺伝子発現制御にその 2 者が関与することを明らかにし、その中で SREBP-1 が Nrf2 を正に制御する可能性を見出した。

考察：

本研究において、TFEL scan 法により、転写因子 Nrf2 及び SREBP-1 が ME1 遺伝子のプロモーターを活性化することを見出した。また、ルシフェラーゼレポーターアッセイ、ゲルシフトアッセイ、*in vivo* Ad-luc 法を用いた解析にて Nrf2, SREBP-1 が ME1 プロモーター領域に結合すること、更に摂食での ME1 遺伝子発現制御にその 2 者が関与することを明らかにした。また Hep3B 細胞における LXR アゴニスト T0901317 添加にて Nrf2 核タンパク質及び Nrf2 ターゲット遺伝子群の発現上昇を来す機序に関しては、その機序に関して未解明の部分が多いが、今回の結果には栄養制御のキーレギュレーターである SREBP-1 と酸化ストレス防御のキーレギュレーターである Nrf2 の相互関係を解明する糸口があると考えた。SREBP-1 が Nrf2 を正に制御するメカニズムに対する、我々の作業仮説としては、SREBP-1 が SQSTM1/p62 エンハンサー領域に結合し、p62 の転写活性の上昇を介して、Nrf2 のオートファジー経路による分解が抑制され、Nrf2 が核内へ移行、蓄積出来るようになるプロセスを想定している。今後は SQSTM1/p62 エンハンサー領域の制御機構の解明を含め、更なる検討を続けていく予定である。

結論：

TFEL scan 法により、Nrf2, SREBP1 が ME1 プロモーターに結合すること、更に *in vivo* Ad-luc 法を用いた解析にて、その 2 者が摂食での ME1 遺伝子発現制御に関与することを明らかにした。