

氏 名 (本 籍) 長 田 良 子 (兵庫 県)

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博 士 第 4 8 4 号

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 6 年 9 月 8 日

学 位 論 文 題 目 Single nucleotide polymorphism (-468 G to A) at the promoter region of SREBP-1c associates with genetic defect of fructose-induced hepatic lipogenesis

(果糖による肝臓の脂質合成系の遺伝的差異は SREBP-1c 遺伝子プロモーター領域の-468 塩基の多型と関連する)

審 査 委 員 主 査 教 授 木 村 博

副 査 教 授 堀 池 喜 八 郎

副 査 教 授 鳥 居 隆 三

## 論文内容要旨

*整理番号	<b>487</b>	(ふりがな) 氏名	ながた りょうこ 長田 良子
学位論文題目	Single nucleotide polymorphism (-468 G to A) at the promoter region of SREBP-1c associates with genetic defect of fructose-induced hepatic lipogenesis (果糖による肝臓の脂質合成系の遺伝的差異は SREBP-1c 遺伝子プロモーター領域の-468 塩基の多型と関連する)		
[背景と目的] 高果糖食がメタボリックシンドロームを誘導すると報告されている。高果糖食は肝臓において、脂質合成系酵素の発現を誘導する転写因子 sterol regulatory element binding protein-1 (以下 SREBP-1) の発現を増強し、脂質分解系酵素を誘導する転写因子 peroxisome proliferator activated receptor $\alpha$ (以下 PPAR $\alpha$ ) の発現を抑制する。そこで、食事に対するこれら転写因子の反応性の遺伝的差異を明らかにする目的で、近交系マウスを用いてメタボリックシンドローム発症の系統差をスクリーニングし、肝臓における SREBP-1、PPAR $\alpha$ 発現との関連を検討した。			
[方法] 1) 5 週齢の近交系マウス 10 系統を、コントロール食群と果糖をカロリー比 67%含む高果糖食群に分け 2 ヶ月間 pair-fed した。さらにそれぞれの群を実験前日より 18 時間絶食する Fasting 群及び 12 時間の絶食後 2 時間摂食させ、さらに 4 時間絶食する Postprandial 群の 2 群に分けた。Control-Fasting 群、Control-Postprandial 群、Fructose-Fasting 群、Fructose-Postprandial 群の計 4 群における体重、脂肪重量、血清脂質を系統別に比較検討した。2) 各系統の脂質合成分解系の転写因子の mRNA 発現についてノザンプロット法で検討した。3) DBA/2N(以下 D2) 及び CBA/JN(以下 CBA) について、初代肝細胞を用い、果糖およびインスリンによる脂質合成分解系の転写因子の mRNA 発現についてノザンプロット法で検討した。4) 各系統の SREBP-1c プロモーター領域の塩基配列を比較した。5) CBA または D2-type のプロモーターを組みこんだベクターと CBA および D2 の 初代肝細胞を用い、ルシフェラーゼアッセイにて果糖及びインスリンによる SREBP-1c 活性化を測定した。6) D2 および CBA の肝臓の核蛋白を用いて SREBP-1c プロモーター領域への蛋白-DNA 結合をゲルシフト法で検討した。			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

## 【結果】

1) いずれの系統および系統間においてコントロール食群と高果糖食群の摂餌量には差がなかった。体重、血清脂質ではコントロール食群と高果糖食群間で有意差がない系統 (C57BL/6N, C57BL/6J, DBA/1JN, D2) と、高果糖食群で増加する系統 (C3H/He, C3H/HeN, C3H/HeJ, C3H/HeJ, BALB/cCr, CBA) に分かれた。

2) PPAR $\alpha$  の肝での mRNA 発現に系統差はなかった。SREBP-1 の肝での mRNA 発現は C3H/He, C3H/HeN, C3H/HeJ, C3H/HeJ, BALB/cCr, CBA において Fructose-Postprandial 群で Control-Postprandial 群に比し有意な増加が見られたのに対し、C57BL/6N, C57BL/6J, DBA/1JN, D2 では差を認めなかった。果糖食に対する反応性の異なる典型的な系統として D2 及び CBA を選択し、以後の検討に用いた。3) D2 及び CBA の初代培養肝細胞を用いた実験では、高果糖刺激に対して CBA では有意な SREBP-1 mRNA 発現の上昇をみたが、D2 では無反応であった。インスリン刺激に対しては、双方とも SREBP-1 mRNA の有意な上昇をみたが D2 では CBA に比べ反応が低下していた。4) SREBP-1c のプロモーター領域を比較すると、転写開始点より-468bp の塩基が、C3H/He, C3H/HeN, C3H/He, C3H/HeJ, BALB/cCr, CBA はグアニンであったのに対し、C57BL/6N, C57BL/6J, DBA/1JN, D2 ではアデニンであった。5) CBA 由来の肝細胞では CBA 型 SREBP-1c プロモーター活性が果糖刺激により上昇したが、D2 型プロモーター活性の増加はみられなかった。一方、D2 由来の初代肝細胞では、D2 及び CBA 型のどちらのプロモーター活性も、果糖刺激により上昇しなかった。インスリン刺激では D2 及び CBA 型のどちらのプロモーター活性も有意に上昇した。しかし CBA 由来肝細胞では D2 由来の肝細胞に比べて活性増加の程度が大きかった。6) CBA 由来の肝細胞より抽出した核蛋白を用いたゲルシフトアッセイより、SREBP-1c 遺伝子の-468 塩基の塩基多型を認識し、-468A (D2 型) に比し、-468G (CBA 型) により結合親和性の高い核蛋白の存在が明らかになった。転写因子データベースの検索から、この塩基多型の存在する領域には転写因子 AP4 が結合することが示唆されたが、抗体および AP4 コンセンサス配列ヌクレオチドにより結合が阻害されないことから、AP4 以外の核蛋白の結合と考えられ、また D2 由来の核蛋白ではその結合量は CBA に比較して低下していた。

## 【考案】

高果糖食によって誘導される代謝異常が、肝での SREBP-1 発現と関連することが示唆された。マウス系統間の SREBP-1 の mRNA 発現の差は、従来より指摘されているインスリンの効果に加えて、果糖による直接作用が考えられた。リポーターアッセイの結果より CBA と D2 の果糖に対する反応性の差は、SREBP-1c プロモーターの塩基多型に起因することが示されたが、インスリンに対する反応性には関連しないと考えられた。ゲルシフトアッセイの結果より、この塩基多型を認識して結合する AP4 以外の核蛋白の存在が示唆され、D2 由来の肝細胞では塩基多型による結合の低下に加え、蛋白の結合活性の低下の可能性も考えられた。

## 【結語】

多系統の近交系マウスを用いた本研究により、果糖に対する肝臓での脂質合成の遺伝的感受性の決定に SREBP-1c 遺伝子のプロモーター領域の塩基多型が関与していることが示された。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	487	氏名	長田良子
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>本研究は、複数の近交系マウスを用いて果糖によるメタボリックシンドローム誘導性の遺伝的差異を検討したものである。その結果、以下のことが解明された。</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. 近交系マウスは、高果糖食にて代謝異常をきたす系統 (CBA、C3H、Balb/B) と誘導されにくい系統 (DBA/2N、C57BL、DBA/1JN) に二別された。</li><li>2. 肝臓における Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1 (以下 SREBP-1) の mRNA 発現に、代謝異常に一致した系統差があった。</li><li>3. SREBP-1c のプロモーター領域を比較すると DBA/2N で -468 塩基部位に G から A への変異が認められ、果糖に対するプロモーター活性の反応が消失していた。A 変異には結合しない、結合蛋白の存在も確認された。</li></ol> <p>このように本論文はマウスの SREBP-1c プロモーター領域に果糖反応性の転写調節部位が存在することを明らかにしたものであり、博士 (医学) の学位論文に値する。</p> <p>なお、本学位授与申請者は平成 16 年 8 月 25 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められた。</p>			
(平成 16 年 9 月 / 日)			