

氏 名 (本 籍)	竹 本 忠 司 (大阪府)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士(論)第343号
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 授 与 年 月 日	平成19年 3月26日
学 位 論 文 題 目	RBMX is a novel hepatic transcriptional regulator of SREBP-1c gene response to high-fructose diet  (X染色体連鎖 RNA 結合モチーフ蛋白質は高果糖食に応答するステロール調節エレメント結合蛋白質-1c 遺伝子の新規肝転写調節因子である)
審 査 委 員	主査 教授 藤 山 佳 秀 副査 教授 鳥 居 隆 三 副査 教授 佐 藤 浩

## 論文内容要旨

*整理番号	347	(ふりがな) 氏 名	たけもと ただし 竹本 忠司
学位論文題目	RBMX is a novel hepatic transcriptional regulator of SREBP-1c gene response to high-fructose diet (X染色体連鎖RNA結合モチーフ蛋白質は高果糖食に応答するステロール調節エレメント結合蛋白質-1c 遺伝子の新規肝転写調節因子である)		
<p><b>【目的】</b></p> <p>げっ歯類では高果糖食でメタボリックシンドロームに似た代謝異常が誘導されることが知られており、モデル動物として用いられている。我々はこれまでにマウスには高果糖食でメタボリックシンドロームとなる系統(G型, CBA系統)とならない系統(A型, DBA系統)が存在し、前者では高果糖食によりステロール調節エレメント結合蛋白質-1c (Sterol Regulatory Element-binding Protein-1c, SREBP-1c) mRNAの発現量が著しく増大するが、後者ではこの増加は見られないこと、またこの差異がSREBP-1cのプロモーター内の-468の位置におけるG(CBA系統)/A(DBA系統)の一塩基変異多型(SNP)に起因することを示した。またこの領域の塩基配列に特異的に結合する未同定の核蛋白質がマウスの肝臓に存在し、高果糖食への応答について重要な役割を果たしているであろうことを示唆してきた。そこで本研究では、飛行時間型質量分析装置(MALDI-TOF MASS)によりこの核蛋白質を同定し、その機能解析をすることを目的とした。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p>CBA型及びDBA型のSREBP-1cのプロモーター内の-468 SNP周辺のオリゴヌクレオチドを合成し、レジンに結合させて固相化オリゴヌクレオチドプローブを作成した。マウスの肝臓核蛋白質をこれらのプローブに対するアフィニティーにより精製し、SDS-PAGE及び銀染色法により、CBA型プローブには強く結合するがDBA型プローブにはほとんど結合しない分子を検索した。得られたバンドをゲルから抽出し、MALDI-TOF MASSにより分子種を同定した。この分子がプロモーターに結合しているか確認するため抗体及びsiRNAを用いてゲルシフトアッセイ (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)を行った。また同分子の全長cDNAを哺乳類細胞で高発現をさせるため、pCDNA3.1発現ベクターにクローニングしリポフェクション法により培養肝細胞 (Fao細胞)に導入した。レポーターベクターとしてCBAおよびDBA系統由来のSREBP-1cプロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を結合したものを同時に細胞に導入した。また同分子に対するsiRNAを用いて同遺伝子の発現抑制を行い、SREBP-1cプロモーター活性に与える影響を調べた。</p>			

- (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】**

CBA 型及び DBA 型の SREBP-1c のプロモーター内の -468 SNP 周辺のオリゴヌクレオチドをプローブとして EMSA を行ったところ、高果糖食により誘導され CBA 型プローブに強く結合するバンドが検出できた。この結果を踏まえて、マウス肝臓核蛋白質から CBA 型プローブには強く結合するが DBA 型プローブにはあまり結合しない分子を検索し、MALDI-TOF MASS により分子種を同定した結果、X 染色体連鎖 RNA 結合モチーフ蛋白質 (X-chromosome-linked RNA binding protein, RBMX) であることがわかった。抗 RBMX 抗体及び RBMX 遺伝子に対する siRNA は EMSA 法において上記のバンドを消失させ、このバンドに RBMX 分子が含まれていることを強く示唆した。また RBMX の全長 cDNA を発現ベクターにクローニングし培養肝細胞内で過剰発現させたところ、CBA 型の SREBP-1c プロモーターの転写活性を著しく増大させることがわかった。一方、siRNA による RBMX 遺伝子の発現抑制により、SREBP-1c プロモーターの転写活性が減少することがわかった。また、siRNA 処理により RBMX 遺伝子の発現が特異的に抑制されていることをノザンブロット法およびウエスタンブロット法により確認した。

**【考察】**

本研究において、高果糖食に対する応答に関与している SREBP-1c プロモーター内の SNP 領域を認識する分子として RBMX を同定した。また、抗 RBMX 抗体及び RBMX に対する siRNA を用いた EMSA により同プロモーターへの RBMX の結合が確認された。しかし、RBMX には DNA 結合ドメインは存在しないので、この結合が直接的なものかどうかは今後の課題である。RBMX は他の蛋白質と相互作用をすることが知られており、DNA 結合性蛋白質を介して SREBP-1c プロモーターに結合し、活性を調節しているのかもしれない。また、培養細胞系において SREBP-1c プロモーター活性は RBMX の過剰発現により増加し、発現抑制により減少することがわかった。一方、in vivo では、高果糖食により RBMX 分子の SREBP-1c プロモーターへの結合量が増加するが、RBMX mRNA の著しい増加は認められなかった。高果糖食により RBMX の量的な変化というよりは機能的な活性化が起こっている可能性が考えられる。RBMX の C 末は糖化を受ける領域があることが知られており、糖化による RBMX の活性化が起こっているのかもしれない。

**【結論】**

我々は SREBP-1c 遺伝子プロモーター内の -468 SNP 領域に結合して高果糖食に対する応答性を調節している新規肝転写調節因子として RBMX 分子を同定した。また、培養細胞系を用いて RBMX 遺伝子の過剰発現及び発現抑制が SREBP-1c 遺伝子プロモーターからの転写活性に影響を与えることを示した。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	347	氏名	竹本 忠司
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>本研究は、高果糖食による代謝異常の誘導に重要な働きをしているSREBP-1c遺伝子のプロモーター領域に見つかったSNP領域に結合している蛋白質の同定と機能解析を行っている。SNP領域に対するアフィニティーの差を利用してこの領域への結合性蛋白質を検出し、MALDI-TOF MASS解析によりRBMXであると同定した。抗RBMX抗体およびRBMXに対するsiRNAを用いたEMSAにより、同領域へのRBMXの結合を実証した。また、培養細胞系においてRBMXの過剰発現によりSREBP-1cプロモーターの転写活性の誘導が見られること、反対にRBMXに対するsiRNAにより内因性のRBMXを抑制した場合にはSREBP-1cプロモーターの転写活性の抑制が見られることを示した。このことから、RBMXが新規肝転写調節因子として働くことで、高果糖食によるSREBP-1c遺伝子の転写を促進し、代謝異常が誘導することがわかった。</p> <p>本研究は、高果糖食による代謝異常の誘導において、糖化蛋白質であるRBMXによるSREBP-1c遺伝子の転写調節が重要であることを初めて実証したもので、臨床的にも示唆に富むものである。従って、博士(医学)の学位授与に値するものと判定した。</p>			
(平成19年2月2日)			