

氏 名	大 村 寧
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 8 6 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 2 1 年 3 月 2 5 日
学 位 論 文 題 目	SAFB1, an RBMX-Binding Protein, is a Newly Identified Regulator of Hepatic SREBP-1c Gene  (肝ステロール調節エレメント結合蛋白質-1cの新規転写調節因子としての、RBMX結合蛋白質：SAFB1の同定)
審 査 委 員	主 査 教 授 田 中 俊 宏  副 査 教 授 佐 藤 浩  副 査 教 授 大 久 保 岩 男

## 論文内容要旨

※整理番号	591	氏名 (ふりがな)	おむら やし 大村 寧
学位論文題目	SAFB1, an RBMX-Binding Protein, is a Newly Identified Regulator of Hepatic SREBP-1c Gene (肝ステロール調節エレメント結合蛋白質-1c の新規転写調節因子としての、RBMX 結合蛋白質: SAFB1 の同定)		
<p><b>【目的】</b> 我々はマウスには高果糖食で代謝異常が誘導される系統(CBA)と誘導されない系統(DBA)が存在し、CBA では果糖食により脂肪合成系酵素群の転写因子である sterol regulatory element-binding protein 1c(SREBP-1c)の肝臓での発現が著しく亢進していることを報告した。また、CBA、DBA 間で SREBP-1c のプロモーター領域の塩基配列を比較すると、一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism:SNP, -468 G to A)が存在し、その領域を認識し DNA- 蛋白質複合体を形成する核蛋白質として、RBMX (RNA binding motif on the X chromosome)が同定できた。RBMX の過剰発現により SREBP-1c のプロモーター活性が約5倍上昇し、knock down では50%以下に低下したが、RBMX は直接 SREBP-1c のプロモーター領域に結合しないことが明らかになった。また RBMX には他のタンパク質との相互作用が知られているものの、DNA 結合領域の存在や、転写活性化因子としての報告はない。そこで、RBMX が何らかの結合蛋白を介した間接的な作用により、SREBP-1c 遺伝子転写活性に影響を与えているのではないかと考え、その候補蛋白の検索を行った。</p> <p><b>【方法】</b> 1) RBMXと相互作用する蛋白質を検索するために、酵母two-hybrid assayを用いて、RBMXをbaitとしてCBAマウスの肝臓から作成したcDNA libraryをスクリーニングした。さらに同定した蛋白質とSREBP-1c遺伝子上流域との直接的な結合を酵母one-hybrid assayにて検討した。 2)RBMX および同定した蛋白質の、SREBP-1c遺伝子上流域とのin vivoでのDNA-蛋白質結合を、クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) にて確認した。 3) RBMXと同定した蛋白質との直接的な結合を、免疫沈降法にて確認した。 4) Fao (ラット肝腫瘍) 細胞において、同定した蛋白質に対する siRNA を用いて同遺伝子の発現抑制を行い、SREBP-1c の mRNA に与える影響を遺伝子発現定量法 (real-time PCR 法) で、また SREBP-1c プロモーター活性に与える影響をレポーターアッセイ (ルシフェラーゼ法) により解析した。 5) 同定した蛋白質の全長 cDNA を pcDNA3.1 発現ベクターにクローニングし、Fao 細胞に導入し高発現させた。その条件下において SREBP-1c プロモーター活性に与える影響を、レポーターアッセイにより解析した。 同定した蛋白質の RNAi 法による特異的な発現抑制および過剰発現の効果は、細胞内蛋白発現量 (イムノブロット法) により確認した。</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】**

- 1) 酵母two-hybrid assayを用いて、Scaffold attachment factor B1 (SAFB1)をRBMXと相互作用する蛋白質の候補として同定した。しかし、酵母one-hybrid assay で、SAFB1はSREBP-1c遺伝子上流-468番塩基領域に直接結合しないことがわかった。
- 2) ChIP assayにて、抗SAFB1抗体、抗RBMX抗体によりともにCBAマウスの肝臓においてSREBP-1c遺伝子上流-468番塩基領域のDNAが沈降し、SAFB1およびRBMXと同DNA領域との結合を確認した。
- 3) 免疫沈降法により、CBAマウスの肝臓においてSAFB1およびRBMXが結合していることを確認した。
- 4) SAFB1のsiRNAによりSREBP-1c mRNA発現およびプロモーター活性が約50%にまで抑制され、RBMX過剰発現により上昇したSREBP-1cプロモーター活性も約70%抑制された。
- 5) SAFB1単独の過剰発現では、SREBP-1cプロモーター活性化に有意な変化が見られなかったが、RBMX過剰発現下にSAFB1を過剰発現させたところ、有意な活性化が見られた。

**【考察】**

本研究により、酵母two-hybrid法を用いて、RBMXと結合し肝臓でのSREBP-1c遺伝子転写調節に関与する分子として、新たにSAFB1を同定した。またRNAi法による内在性のSAFB1発現抑制およびSAFB1過剰発現の結果より、RBMXによるSREBP-1cの転写調節にSAFB1が関わっていることが予測できた。

SAFB1は肝臓においてSREBP-1cを活性化するのに十分な量が存在し、RBMXがその律速段階となっていると考えられる。一方、RBMXが過剰発現された条件下では、十分なSREBP-1c活性化のためには更なるSAFB1の発現が必要と推測される。SAFB1はSREBP-1c遺伝子上流-468番塩基領域と直接結合してはいないが、RBMXのcoactivatorとして肝におけるSREBP-1c転写活性に働いている可能性が示唆された。

しかし本研究では、RBMXおよびSAFB1がSREBP-1c遺伝子上流領域に直接結合する機構を証明できておらず、今後さらなる解析が必要である。

**【結論】**

RBMXによる肝臓でのSREBP-1c遺伝子転写調節に関与する分子として、新たにSAFB1を同定した。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	591	氏名	大村 寧
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>本研究は、酵母 two-hybrid assay を用いて、高果糖食による肝臓での SREBP-1c の転写を調節する蛋白質 RBMX と結合する蛋白質 SAFB1 を同定し、その転写調節機構について解析したものである。</p> <p>免疫沈降法にて SAFB1 および RBMX が結合すること、ChIP assay にて SAFB1・RBMX ともに SREBP-1c 遺伝子上流領域に結合することを実証した。また培養細胞系を用いて、遺伝子過剰発現および発現抑制により SREBP-1c 遺伝子転写活性を調節しうることを示した。以上より肝臓において SAFB1 は RBMX と複合体を形成し、SREBP-1c 遺伝子転写調節に関与すると考えられた。</p> <p>本論文は高果糖食の代謝異常の誘導において、SAFB1 による SREBP-1c 遺伝子転写調節が重要であることを実証したものであり、臨床的にも示唆に富むものである。よって博士（医学）の学位を授与するに値すると評価された。</p> <p>なお、本学位授与申請者は 2009 年 2 月 4 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 21 年 2 月 4 日)			