

## 論文の内容の要旨

論文題目 脂肪組織におけるアデノウィルスを用いた*in vivo*プロモーター(*in vivo* Ad-luc)解析手法の確立

指導教員 門脇 孝教授

東京大学大学院医学系研究科 平成19年4月入学

医学博士課程 内科学専攻

氏名 西 真貴子

脂肪酸合成系酵素は 25 の酵素からなっており、活性は転写レベルで調整されていることが知られている。脂肪酸合成系酵素は肝臓・脂肪で発現が高く、摂食時に著明に mRNA が誘導される (=摂食応答)。肝臓においてこれらの酵素は basic helix-loop-helix leucine zipper family に属する転写因子 sterol regulatory element-binding protein (SREBP, gene symbol *srebf*)-1 が転写調節していることが知られていた。SREBP には SREBP-1a、SREBP-1c、SREBP-2 の 3 つのアイソフォームが存在する。SREBP-1 に関しては肝臓と脂肪においては SREBP-1c が 1a よりもはるかに多く存在し、肝臓における中性脂肪合成は主に SREBP-1c が関与する。トランスジェニックマウスおよび遺伝子欠損マウスの解析により、肝臓において SREBP-1 は脂肪酸合成酵素群の mRNA 転写を調節しており、摂食時の SREBP-1 の発現上昇に伴い脂肪酸合成酵素群の発現が上昇することがわかっていった。しかし、SREBP-1 欠損マウスでの脂肪組織における脂肪酸合成酵素の摂食時の発現誘導は野生型マウスと同様であり、脂肪組織において脂肪酸合成系遺伝子発現調節は SREBP-1 には依存しないと考えられた。また、LXR アゴニストである T0901317 の投与で SREBP-1 の発現を誘導した際に、肝臓において脂肪酸合成酵素群の発現はこれに伴って上昇したのに対し、初代培養脂肪細胞では発現に変化はなかった。

Streptozotocin(STZ)投与でインスリンを枯渇させたマウスのモデルを用いた研究で、脂肪酸合成酵素群の摂食応答は肝臓においてインスリンには非依存적であることが示されていたが、脂肪組織ではインスリン依存적であった。

以上のように、脂肪酸合成系酵素の摂食時の転写活性上昇に関して、肝臓では SREBP-1 依存적・インスリン非依存적であるのに対し、脂肪組織では SREBP-1 非依存적・インスリン依存적であり、肝臓と脂肪組織における脂肪酸合成系酵素の発現調節機構には明確な相違がある。今回の研究で脂肪組織に特異的な脂肪酸合成系酵素の転写調節機構解明を試みた。

以前、初代培養脂肪細胞を用いた実験により解明を試みたが、培養液中のインスリン、Glucoseの濃度を変化させても脂肪酸合成系酵素の発現は変化せず、

*in vitro*の実験系では摂食応答という生命現象の観察はできなかった。そこで脂肪組織における摂食応答を*in vivo*の臓器で解析する手法を今回確立した。脂肪酸合成系酵素の中でもMalonyl CoAから炭素数16の飽和脂肪酸を生成する律速酵素で脂肪酸合成において重要な位置を占めているfatty acid synthase(FAS, gene symbol *Fasn*)に着目し、プロモーター解析の対象とした。

当研究室では肝臓における転写因子 SREBP-1c の制御機構解明等を通じて、レポーター遺伝子(ルシフェラーゼ)を含むアデノウィルスを用いた *in vivo* プロモーター解析の方法論(*in vivo* Ad-luc 解析法)を独自に開発し、*in vivo* の系において SREBP-1c プロモーターによるレポーター遺伝子の摂食応答を観察してきた。この方法に改良を加えることで、脂肪組織における *in vivo* Ad-luc 解析法を確立した。

FAS の転写開始点から約 780bp が哺乳類間で種を超えて保存されている DNA 領域が FAS のプロモーターとして働いている可能性が高いと考えられるため、哺乳類間でよく保存されている、転写開始点より 771 塩基上流から転写開始点までをプロモーター候補配列とし、FAS 遺伝子プロモーター候補の DNA 配列によって、その下流に配置した Luciferase レポーター遺伝子を発現させるアデノウィルスを作成した。また、脂肪組織内のアデノ DNA 量の補正に SV40 プロモーターに Renilla (ウミシイタケ)gene を結合させたアデノウィルス (Ad-SV40-Renilla)を用いた。

この Luciferase 活性は絶食時と比較して摂食時に 2 倍程度の上昇していた。短縮型のコンストラクトを作成したところ摂食時における Luciferase 活性上昇は -118 のプロモーターより長いコンストラクトにはみられるも、-81 のプロモーターにはなかった。-118 から-81 の間に摂食応答時の FAS の転写活性上昇に關与する *cis*-element が少なくとも一部は存在することが示唆された。肝臓において-150 の領域の SRE と-65 の領域の E-Box が摂食時の FAS の転写活性上昇に必要であり、-150 の SRE への SREBP-1 の結合と-65 の E-Box への転写因子 Upstream regulatory factor(USF)結合が重要であることが知られていた。-150 の SRE と-65 の E-Box に変異を入れたプロモーターを作成することでこれらの領域の重要性を検討したところ、摂食応答は-150 の SRE 変異のプロモーターでは残存したが、-65 の E-Box/SRE に変異を入れたプロモーターについては摂食応答は消失しており、-150SRE は摂食応答に必要ではなく、-65 の E-Box は必要であることが示された。-118 ~ -81 には転写因子 Sp1 結合領域として知られる領域が-92 にあり、肝臓における FAS の転写調節への關与が報告されていたが、今回の研究で脂肪組織における摂食時の FAS の転写活性上昇に-92 の Sp1 結合領域は關与しないことが示された。以上より、脂肪組織における摂食による FAS の転写活性上昇に

は-65 の E-Box/SRE も FAS の摂食応答には必要であるが、それだけでは不十分であり、-118 ~ -81 の領域の一部と協調して働く可能性が考えられた。

今後は FAS の摂食 - 絶食応答に必要な領域のさらなる絞り込み、および、当研究室で開発したゲノムワイド転写因子発現ライブラリを活用する発現クローニング法により、その部位に結合する転写因子の同定を試みる予定としている。

同時に、今回は脂肪組織における肥満に伴うレプチンの転写の増加のメカニズムについても解析を試みた。*in vitro* でのレプチン遺伝子のプロモーター解析は 1998 年に行われており、転写開始点より 50 塩基上流に結合する C/EBP $\alpha$  がレプチンの転写を正に制御することが報告されていた。しかし、C/EBP $\alpha$  は肥満によって発現が上昇しないことよりレプチンの肥満に伴う発現上昇は C/EBP $\alpha$  のみでは説明困難である。培養細胞を用いた *in vitro* の系で脂肪細胞の肥大モデルを構築することは難しく、「脂肪量を感知する」仕組みには迫ることはできず、*in vitro* の系の実験ではその報告以上の探索は困難と考えられた。脂肪のサイズがダイナミックに変化する肥満モデルマウス作成においてその *in vivo* プロモーター解析の手法を適用することにより、培養細胞系において解決しえなかった「脂肪細胞のサイズとレプチンの転写はいかにして相関するか」という問題を解決できると考えられたため、今回実験することとした。哺乳類間で種を超えて保存されている DNA 領域がレプチンのプロモーターおよびエンハンサーとして働いている可能性が高いと考えられるため、哺乳類間でよく保存されている、転写開始点より 700 塩基上流から転写開始点までをプロモーター候補配列とし、また、転写開始点より上流 30000 塩基 ~ 下流 40000 塩基において 500 塩基程度にわたり哺乳類間で保存されている領域をエンハンサー候補配列とした。レプチン遺伝子プロモーターおよびエンハンサー候補の DNA 配列によって、その下流に配置した Lucifefase レポーター遺伝子を発現させるアデノウィルスを作成し、高脂肪食および遺伝的な肥満モデルマウスの脂肪組織に打ちこむ実験系により探索を行った。

計 8 種類エンハンサー候補配列に SV40-luc を結合させたアデノウィルスを投与したが、肥満モデルにおいて活性が上昇するものはなく、エンハンサー同定には至らなかった。

ゲノム上において CTCF (insulator-binding protein) に挟まれた領域内にエンハンサーが存在することが知られていたことから、転写開始点より上流 30000 塩基 ~ 下流 40000 塩基において 500 塩基程度にわたり哺乳類間で保存されている領域をエンハンサー候補配列としたが、哺乳類間で保存されていることがエンハンサーとして働くために必要条件ではなく、この時点で適切にエンハンサー候補配列が選出出来ていなかった可能性は考えられる。そうであればエンハンサー選出には、より特異度の高い選出方法が必要なのかもしれない。

H3K4me1(ヒストン 3-リジン 4 のモノメチル化)がエンハンサー領域に一致することが知られており、脂肪組織の核抽出産物に対する H3K4me1 による ChIP シークエンスによる解析など、エンハンサー選出方法も検討の余地がある。また、別の可能性として、今回はエンハンサー候補とした領域を SV40-luc に結合するコンストラクトを作成したが、エンハンサー領域とプロモーター領域との間で協調的に働く必要性がある可能性も考えられ、エンハンサーとして選んだ領域が正しかったとしてもプロモーターが SV40 ではなく、Leptin プロモーターでないと機能しなかった可能性も否定できない。その他の可能性としては、Leptin プロモーターのルシフェラーゼ活性値が小さかったためエンハンサーが存在する可能性が高いと考えたものの、そもそもエンハンサー自体が存在しなかったということも十分ありえる。

また、700 塩基のプロモーター上に肥満でプロモーター活性上昇に関与する塩基配列があるか探索するべく、80kb まで短縮させた 5'欠損の短縮型プロモーターを作成および C/EBP 結合部位に変異を入れたが、ルシフェラーゼ活性は肥満モデルにおいて同様に上昇しており、プロモーター上に Leptin の肥満における転写上昇に関与する部位が存在するかおよび C/EBP 結合部位は肥満での Leptin 転写上昇に関与するか否かの判断ができなかった。-80 より転写開始点近くで C/EBP でない部位に肥満における Leptin 転写上昇に関与する部位がある可能性、肥満モデルにおいてどのようなプロモーターであったとしても非特異的にルシフェラーゼ活性が上昇しており、探索した範囲内には Leptin の肥満での上昇に関与する部位はないか範囲内にあったとしてもこの系では検出できていない可能性が考えられた。前者であれば、-80 よりさらに短いプロモーターで解析する必要がある。肥満モデルの脂肪組織においてルシフェラーゼが非特異的に上昇している可能性があることに関してはレポーター遺伝子の Luc2 などへの変更により改善を試みる予定である。

補正に用いる Ad-SV40-Renilla による Renilla 活性自体が高脂肪食負荷肥満モデル、*ob/ob* の両肥満モデルマウスにおいて 2 倍程度上昇していた。コントロールのアデノウィルスのレポーター活性上昇がプロモーター領域同定に難渋した原因である可能性も考えられた。