

Title	脂質代謝の制御を担う転写因子SREBPに関する研究
Author(s)	井上, 順
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3169327
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

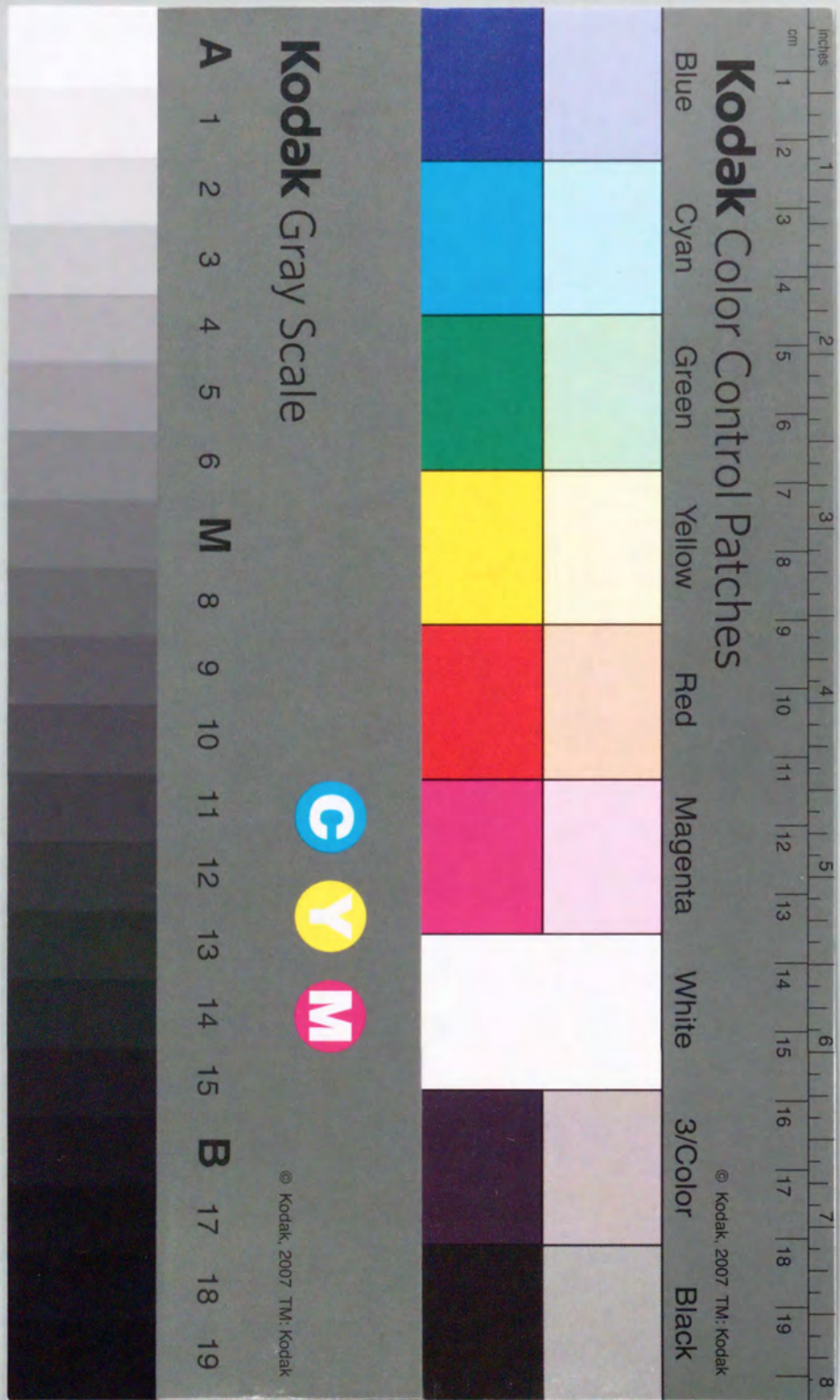
<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

脂質代謝の制御を担う転写因子 SREBP に関する研究

2000年

井上 順



脂質代謝の制御を担う転写因子 SREBP に関する研究

1. 脂質代謝の重要性	1
2. SREBP の発見と機能	5
3. SREBP の発現調節	10
4. SREBP と疾患	15
5. SREBP の治療的ターゲット	20
6. 結論	25
参考文献	30
謝辞	35
著者略歴	40

2000年

井上 順

目次

緒論	1
本論	4
第一章 SREBP-2 遺伝子のSREBPによる転写調節	4
第一節 SREBP-2 遺伝子の細胞内コレステロール量に応じた転写変動	4
第二節 コレステロールに対する応答に必須なプロモーター領域の同定	5
第三節 SREBP-2 遺伝子プロモーター領域における SRE-1 および CCAAT Box に結合するタンパク質の同定	11
第四節 考察および小括	14
第二章 スクアレン合成酵素および HMG-CoA 合成酵素遺伝子の SREBP による 転写調節	15
第一節 コレステロールに対する応答に必須なプロモーター領域の同定	15
第二節 スクアレン合成酵素および HMG-CoA 合成酵素遺伝子プロモーター 領域の CCAAT Box に結合するタンパク質の同定	20
第三節 SRE-1 と CCAAT Box の間隔が SREBP による転写活性化 におよぼす影響	21
第四節 考察および小括	23
第三章 SREBP が転写を亢進する新規遺伝子の探索	25
第一節 SREBP-1a 発現細胞株の樹立	25
第二節 SREBP-1a によって転写が亢進する遺伝子のクローニング	27
第三節 細胞内コレステロールレベルに応じた転写変動	29
第四節 考察および小括	30
第四章 脂肪細胞分化過程における SREBP の発現	32
第一節 脂肪細胞分化過程における SREBP-1、SREBP-2 の転写レベルでの発現	32
第二節 脂肪細胞分化過程における SREBP-1、SREBP-2 のタンパク質 レベルでの発現	34
第三節 考察および小括	35
総括	37
結論	38
謝辞	39
参考文献	40

Abbreviations

ACC	: acetyl-CoA carboxylase
ACL	: ATP citrate-lyase
BCA	: bicinchoninic acid
CB	: CCAAT Box
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
FAS	: fatty acid synthase
FPP	: farnesyl diphosphate
GAPDH	: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HEK	: human embryonic kidney
HMG	: 3-hydroxy-3-methylglutaryl
LDL	: low density lipoprotein
LPDS	: lipoprotein-deficient serum
MNO	: malate NADP ⁺ oxidoreductase
NF-Y	: nuclear factor Y
PAGE	: polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	: phosphate-buffered saline
PCR	: polymerase chain reaction
PPAR	: peroxisome proliferator-activated receptor
RACE	: rapid amplification of cDNA ends
S1P	: site 1 protease
S2P	: site 2 protease
SCAP	: SREBP cleavage-activating protein
SDS	: sodium dodecyl sulfate
Sp1	: specificity protein 1
SRE	: sterol regulatory element
SREBP	: sterol regulatory element-binding protein
SCD	: stearoyl-CoA desaturase

緒 論

コレステロールは動物界に広く分布し、特に脳神経組織や副腎に多く含まれるが、その他の臓器にも普遍的に存在する。細胞膜、オルガネラ膜、ミエリン鞘などの構成成分をなすとともに、胆汁、性腺ホルモン、副腎皮質ホルモン、ビタミンDなどの前駆体となる重要な脂質である。生体は、アセチルCoAを基質として、20段階以上の酵素反応を介してコレステロールを産生する(1)と同時に、細胞表面のLDLレセプターを介したLDL粒子のエンドサイトーシス(2)によりコレステロールを取り込んでいる(Fig. 1)。

動脈硬化を抑制する抗高脂血症治療薬として広く用いられているプラバスタチンは、コレステロール生合成経路の律速酵素であるHMG-CoA還元酵素の阻害剤である。この薬は、コレステロール生合成を阻害することにより、肝臓から血漿中に分配されるコレステロールを減らし、またLDLレセプターを誘導して血中からのコレステロールの取り込みを増やすことにより、血中コレステロール量を抑制する(3)。細胞内コレステロールの欠乏によるLDLレセプターの誘導は主に転写レベルで行われている。LDLレセプター遺伝子以外にも、コレステロール代謝経路において、HMG-CoA合成酵素遺伝子、HMG-CoA還元酵素遺伝子の転写が細胞内コレステロールの欠乏によって促進されることが明らかになっている(4)。すなわち、細胞内コレステロール量が過剰になると、コレステロール合成とLDLの取り込みが減少し、逆に細胞内コレステロール量が欠乏すると、コレステロール合成とLDLの取り込みが増加する。

LDLレセプター遺伝子のプロモーター領域の詳細な解析の結果、ステロールによって特異的に調節を受ける塩基配列(sterol regulatory element 1、以下SRE-1と略す)が見いだされた(5, 6)。さらにSRE-1に特異的に結合するタンパク質が同定および精製され、SREBP(sterol regulatory element binding protein)と名付けられた(7)。SREBPは少なくとも2種類(SREBP-1とSREBP-2)が存在しており、それらはアミノ酸レベルで約47%の相同性を持ち、いずれもSRE-1に結合することによってLDLレセプター遺伝子などの転写を活性化する(8, 9)。SREBPはそのDNA結合ドメインから、bHLH-ZIP(ベーシック-ヘリックス・ループ・ヘリックス・ロイジンジッパー)ファミリーに分類される(8, 9)。SREBP-1にはmRNAの5'および3'末端側スプライシングの違いによるものと思われる1a, 1b, 1cが存在する(8)。SREBP-1のmRNAはLDLレセプターが多く発現している肝臓や副腎において高い発現が見られる。一方、SREBP-2のmRNAは肝臓や副腎、SREBP-1の発現量の少ない心臓、脳、肺においても大量に発現している(8, 9)。現在のところSREBP-1はfatty acid synthase (FAS)(10, 11)やacetyl-CoA carboxylase (ACC)(12)など主に脂肪酸代謝関連遺伝子を、SREBP-2は主にコレステロール代謝関連遺伝子の転写を調節すると考えられている。

SREBPによる転写調節の概要を次に示した(Fig. 2)。SREBPは合成後、2ヶ所の膜貫通領域を介して核膜又は小胞体膜に約1150アミノ酸残基からなる前駆体として局在する(13, 14)。N末端側の約500アミノ酸残基はサイトソル側に位置し、2ヶ所の膜貫通領域の間、すなわち小胞体内腔には約30アミノ酸残基が位置する。そしてC末端側の

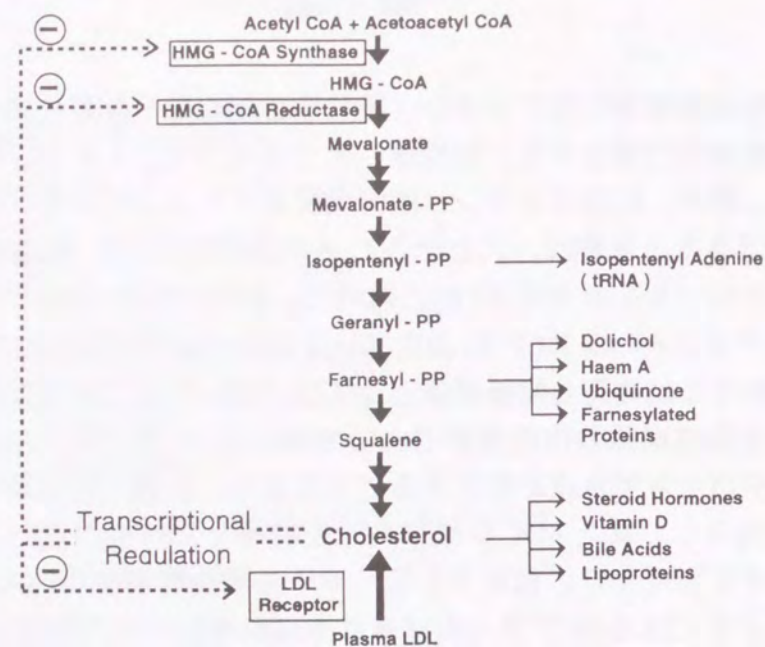


Fig. 1. Metabolic regulation of cholesterol biosynthesis pathway; (1) endogenously, by synthesis from acetyl-CoA through mevalonate; and (2) exogenously, from receptor-mediated uptake of plasma LDL.

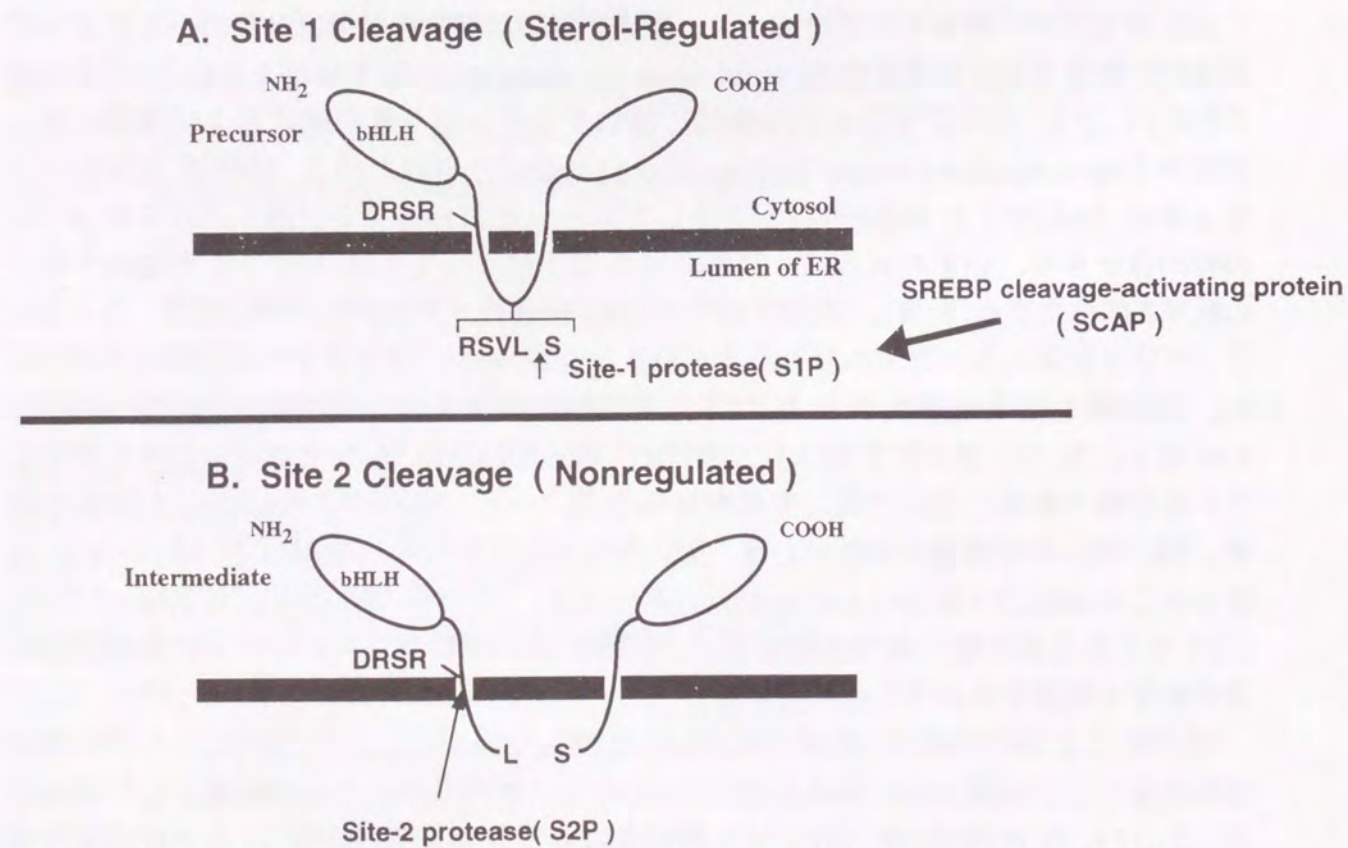


Fig. 2. Model for two-site proteolytic cleavage of membrane bound SREBPs.

約 500 アミノ酸残基がサイトソル側に位置する(15)。SREBP は、細胞内コレステロールレベルの低下に伴いプロセッシングを受け、N 末端側が核内へと移行し転写調節因子として機能する。SREBP のプロセッシングは 2 段階の切断により行われている。1 段階目の切断がコレステロールによる制御を受け、2 段階目の切断は、1 段階目の切断が引きがねとなり、それと連続して切断される。現在までにそれぞれの切断を担うプロテアーゼ S1P (Site 1 Protease)(16)と S2P (Site 2 Protease)(17)がクローニングされている。また、1 段階目の切断のコレステロールによる制御を担う因子として SCAP (SREBP Cleavage-activating protein)(18)が同定されている。しかしながらコレステロールがどのようなメカニズムによって SREBP の切断を制御しているのかは明らかになっていない。

ハムスターに血中コレステロール低下薬物を含む餌を与え、肝臓における各種 mRNA の変動を追跡した実験によると、HMG-CoA 合成酵素遺伝子 mRNA は約 40 倍に、LDL レセプターならびに SREBP-2 遺伝子 mRNA は約 3 倍に増加するが、SREBP-1 遺伝子 mRNA では変動が見られないことが報告されている(19)。そこで第一章においては SREBP-2 遺伝子の転写が、細胞レベルでコレステロール量に応じて調節されるかどうかについて調べ、さらに SREBP-2 遺伝子の転写調節機構を明らかにするために、本遺伝子の 5' 上流領域の解析を行った。次に、スクアレン合成酵素と HMG-CoA 合成酵素は細胞内コレステロールレベルが低下することによって、転写が亢進することが報告されている。そこで第二章ではその転写活性化機構の詳細を明らかにすることを行った。第三章では SREBP によって転写調節を受ける新規遺伝子を探索した。

SREBP-1 は脂肪細胞分化過程において転写レベルで発現が亢進することが報告されている(20)。そこで第四章ではタンパク質レベルの変動を検討し、コレステロールを蓄積した脂肪細胞内での SREBP のプロセッシングについて考察した。

本 論

第一章 SREBP-2 遺伝子の SREBP による転写調節

ハムスターに血中コレステロール低下薬物を含む餌を与えることにより、SREBP-2 遺伝子の転写レベルは約 3 倍に上昇した(19)。この事実が、細胞内コレステロール量の減少により SREBP-2 遺伝子の転写が亢進した結果なのかどうかを明らかにする目的で、ヒト子宮けいがん細胞由来の HeLa 細胞(21, 22)を、コレステロール過剰または欠乏した培地で培養した際に、SREBP-2 遺伝子の転写レベルが変動するかどうかを検討し、さらにその転写活性化機構の詳細を解析した。

第一節 SREBP-2 遺伝子の細胞内コレステロール量に応じた転写変動

(1) 実験材料および実験方法

・ HeLa 細胞からの総 RNA の回収

細胞培養:

1) 細胞

ヒト子宮けいがん細胞由来の HeLa 細胞

2) 培地

DMEM (GIBCO BRL) + 7% 牛胎児血清(GIBCO BRL)

3) 培養条件

37°C、CO₂ 濃度 5% で培養した。

細胞の調製:

細胞を 100 mm dish に 80% コンプレントにまで培養する。その後 PBS で 1 回洗浄し、5% LPDS (Sigma) を含む DMEM 培地に 10 μg/ml コレステロール(半井化学薬品)と 1 μg/ml 25-ヒドロキシコレステロール(Sigma)を加えた培地(S)または 50 μM メバロン酸ラクトン(Sigma)と 50 μM プラバスタチン(三共)を加えた培地(I)で 2 日間培養した。25-ヒドロキシコレステロールはコレステロール自動酸化の生成物であり(23)、オキシステロールの中でも HMG-CoA 還元酵素抑制作用が強い。プラバスタチンは HMG-CoA 還元酵素阻害剤であり(3)、培地に添加することによりコレステロールの生合成反応を初期の段階で阻害することになる(Fig. 1)。これにより、HMG-CoA 還元酵素以降の産物からの枝分かれにより合成されるドリコール、ヘム A、ユビキノンなどの非ステロール産物が欠乏し、細胞は致命的になる。この状況を回避するためにメバロン酸を加えた。

総 RNA の回収:

グアニジンチオシアネート-フェノール-クロロホルム抽出法(24)により調製した。

・ RNase Protection Assay

リポプローブの作製:

東京大学先端研教授、児玉龍彦博士より御供与していただいた、プローブ作製の cDNA を用いて Riboprobe Gemini kit (Promega) および放射性同位元素 [α -³²P] UTP (800Ci/mmol) により作製した(25)。それぞれのプローブは、翻訳開始コドン ATG の A を +1 としたとき、GAPDH では 963 - 1245 (283 nt)、LDL レセプターでは 1218 - 1515

(298 nt)、SREBP-2 では 1955 - 2274 (320 nt) に対応する。

RNase Protection Assay:

RNase Protection Assay は RPA II kit (Ambion) を用いて行った(26)。またレーン間の RNA 量を補正する目的で GAPDH を用いた。得られたシグナルは BAS 2000 (Fuji film) を用いて定量化した。

(2) 実験結果

HeLa 細胞をコレステロール過剰または欠乏培地で培養した際の LDL レセプター遺伝子と SREBP-2 遺伝子ならびに GAPDH 遺伝子の転写レベルを、RNase Protection Assay により解析した結果を Fig. 3A に示した。また Fig. 3B には Fig. 3A の結果を BAS 2000 (Fuji film) を用いて定量化し、GAPDH のシグナルで補正した結果を示した。その結果、細胞内コレステロール量に応じて転写が制御されるポジティブコントロールとして用いた LDL レセプター遺伝子では、コレステロール欠乏により転写レベルが約 6 倍に上昇した。また SREBP-2 遺伝子では約 2 倍に上昇した。この結果は、先に述べたハムスターを用いた動物実験で得られた知見と一致している。

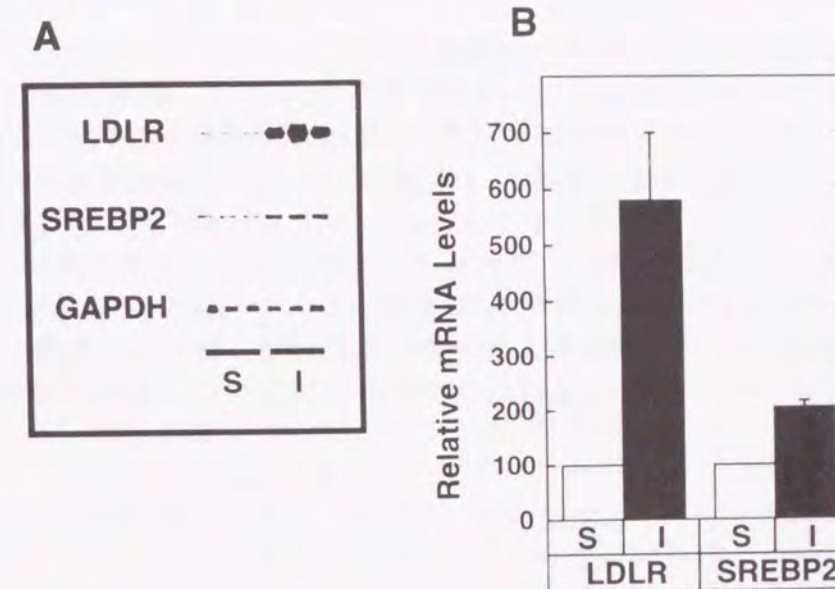


Fig. 3. SREBP-2 mRNA expression is regulated by cellular sterol levels. Total RNA was prepared from HeLa cells cultured in the presence of either sterols (S, suppressing conditions) or a HMG CoA reductase inhibitor, pravastatin (I, inducing conditions). A, 5 μg aliquots of RNA were analyzed for the LDL receptor (LDLR) and SREBP-2 mRNA and 2 μg aliquots of RNA for GAPDH mRNA by ribonuclease protection assay. B, the intensity of the bands was measured with a BAS 2000 (Fuji Film). The relative mRNA levels were normalized to 100 for each mRNA under suppressing conditions. Data are the mean ± SD of three samples. In three separate experiments the same relative mRNA levels were obtained.

第二節 コレステロールに対する応答に必要なプロモーター領域の同定

(1) 実験材料および実験方法

・ ヒト SREBP-2 遺伝子のプロモーター領域のクローニングと塩基配列の決定

一般的な遺伝子操作は Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. に従った。PCR ゲノムウォーキング (Takara Biomedicals) によりクローニングを行なった。ヒト胃粘膜のゲノム DNA を *Pst*I で切断し、合成した *Pst*I カセットを ligation したものをテンプレートとして用いた。PCR には LA PCR Kit Ver.2 (Takara) および GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) を用いた。50 μ l の反応液中で熱変性 (94 $^{\circ}$ C, 0.5 分)、アニーリング (55 $^{\circ}$ C または 57 $^{\circ}$ C, 1 分)、ポリメラーゼ反応 (72 $^{\circ}$ C, 4 分) を 30 サイクル繰り返した (45, 46)。1st PCR はカセットの 5' 側半分に対応した C1 プライマーと、ヒト SREBP-2 cDNA の 11 番目のコドンから始まるアンチセンスプライマーである S1 プライマーを用い、アニーリング温度を 55 $^{\circ}$ C で行った。次に、この反応液から 1 μ l を取り、これをテンプレートにして 2nd PCR を行った。2nd PCR はカセットの 3' 側半分に対応した C2 プライマーと、ヒト SREBP-2 cDNA の 5 番目のコドンから始まるアンチセンスプライマーである S2 プライマーを用い、アニーリング温度を 57 $^{\circ}$ C で行った。反応液を 0.5 % のアガロースゲルで電気泳動し、増幅の有無を調べた。2nd PCR により生じた約 1.6 Kb の PCR 産物を The GeneClean III Kit (Bio 101) を用いて回収し、TA ベクター (Invitrogen) に DNA Ligation Kit (Takara) を用いてライゲーションした (17 $^{\circ}$ C, 1 時間)。そしてこのフラグメントの塩基配列を Silver Sequence DNA Sequencing System (Promega) を用いて決定した。

・ヒト SREBP-2 遺伝子の転写開始点の決定

5' RACE System (Life Technologies) (27) を用いた。ヒト肝ガン細胞由来の HepG2 細胞よりグアニジンチオシアネート-フェノール-クロロホルム抽出法 (24) により総 RNA を調製した。SREBP-2 遺伝子の 200 から 205 番目のコドンに対応するアンチセンスプライマーである S3 プライマーを用いて 1st strand cDNA を作製した。さらに TdT を用いて 3' 端にオリゴ dC テールを付加し、これをテンプレートにして S1 プライマーとオリゴ dG テールをもつプライマーを用いて PCR を行った。この後、反応液を 1.0 % のアガロースゲルで電気泳動し、増幅の有無を調べた。その結果、最も長く増幅した約 240 bp の PCR 産物を TA ベクター (Invitrogen) にサブクローニングし、それらの塩基配列を決定した。

・SREBP-2 遺伝子プロモーター領域のコレステロール応答に必要な領域の同定

細胞培養:

1) 細胞

ヒト腎臓由来の HEK293 細胞 (28)

2) 培地と培養条件

第一章 第一節に準じた。

遺伝子導入、ルシフェラーゼアッセイ:

培養細胞への遺伝子導入は、リン酸カルシウム法 (29) により行った。1 μ g のレポータープラスミドと 2 μ g のサケ精子 DNA または 0.3 μ g の pME-SREBP2 (1-481) または pME-18S と 1.7 μ g のサケ精子 DNA を導入した。トランスフェクション後の培地は、第一章 第一節で用いたコレステロール過剰条件の (S) 培地またはコレステロールが欠乏した (I) 培地を使用し、2 日間培養した。pME-SREBP2 (1-481) または pME-18S をレポータープラスミドと同時に導入したものは 7 % FCS を含む DMEM 培地を使用し、2 日間培養した。ルシフェラーゼの活性はピッカジーン (東洋インキ製造株式会社) を用いて測定した。またトランスフェクションの際に、細胞数の違いにより生じるルシフェラーゼ

活性の差をタンパク量で補正した。タンパク定量は BCA Protein Assay Reagent (Pierce) により測定した。

プラスミド構築:

pGV-B の *Bgl* II - *Hind* III 部位にヒト SREBP-2 遺伝子の翻訳開始コドンである +172 から -1400、-624、-140、-91 を挿入したプラスミド p1400-Luc、p624-Luc、p140-Luc、p91-Luc を PCR 法を用いて構築した。さらに PCR 法を用いて p140-Luc の SRE-1 に変異を加えたプラスミド pSREKO-Luc と、CCAAT Box の逆配列に変異を加えたプラスミド pNF-YKO-Luc を構築した。

pLDLR-CAT 1563 (30) より切り出した LDL レセプター遺伝子上流配列 [-1563 ~ -58 (翻訳開始コドンのアデニン塩基が +1)] を pGV-B の *Hind* III 部位に挿入したプラスミド pLDLR を構築した。

(2) 実験結果

*Pst*I 切断したゲノムライブラリーを用いて PCR ゲノムウォーキングを行った結果、

1st PCR では特異的な増幅産物は見られなかったが、2nd PCR によって約 1.6 Kb の DNA 断片が増幅した。この約 1.6 Kb の DNA 断片の塩基配列を決定した結果、5' 側にはカセットプライマー C2、3' 側には S2 プライマーの配列が見られた。また S2 プライマーに続く cDNA の 5' 末端までの配列も確認された (S2 プライマーの 5' 末端から cDNA の 5' 末端の間には、114 塩基が存在する)。この結果からここで増幅した約 1.6 Kb の DNA 断片は、ヒト SREBP-2 遺伝子の 5' 上流領域であると結論した。翻訳開始コドンから上流の塩基配列を Fig. 4A に示した。主な転写因子のコンセンサス配列を二重下線で示した。

次に、5' RACE 法を用いて転写開始点の決定を行った。得られた 20 クローンの始まる位置を Fig. 4B に示した。× で示した位置がそれぞれのクローンの始まる位置である。この解析法では、cDNA の 3' 末端にオリゴ dC テールをつけるため G/C、G/T、G/C の 3ヶ所は正確に決定することができない。これらのクローンのうちで、最も 5' 上流の翻訳開始コドンから上流 172 bp のシトシン塩基 (C) を +1 とし、転写開始点とした。またこれらのクローンの始まる位置がまたがる +1 から +32 の領域を転写開始領域として下線で示した (Fig. 4A)。

Fig. 5A に示したように、SRE-1 と CCAAT Box の逆配列を含むレポータージーンプラスミドである p1400-Luc、p624-Luc、p140-Luc ではコレステロールが欠乏することにより、約 2 倍の転写活性化が見られた。しかし SRE-1 と CCAAT Box を欠如した p91-Luc では、細胞内コレステロールの欠乏による転写活性化は見られなくなった。さらに、Fig. 5B に示したように、SRE-1 と CCAAT Box を含む p1400-Luc、p624-Luc、p140-Luc では SREBP-2 を発現する条件下 (+) において数倍から約 10 倍の転写活性化が起こった。しかし SRE-1 と CCAAT Box を欠如した p91-Luc では、SREBP-2 を発現させることによる転写活性化は起こらなかった。また、ポジティブコントロールで用いた LDL レセプター遺伝子のプロモーターでは、約 10 倍の転写活性化が見られた。

A

CTGGCGTGGTTTTTCAGGTCTCAGTGGTTCCGAGGTGCCAGAGATTGAGGACCACTGGAG -601

Sp1 Sp1

TAAGCGCGAGGTACCGCGGGTGCAAAGCAGAAGACGTAAATCCTGACCGCCCTGGGAC -541

Sp1

AATCTGCAACCTTGTCAGCCTCCGTGCGCCCTTTGTAAGGAGGCTGGGAGAAGCGGGA -481

CTTGATGACCGGACTCCCGTCCCGAGCGCTGGGGTCCAGGTTTGACTCCGCTGGCTTT -421

Sp1 Sp1 E-box

CTCAGCGCGGCAGGGCGGGGTAGGCAGCTGGAAGATGACGTAATGTGCTCCCAGCCAG -361

E-box

GCCTGGAGGCGCCAGCGGTGCAGGTGGAGGGTGGCCTGTTAACCCTTCAACTCCCAGG -301

CCAGTGGACGGACTTGCCTGTGGCGCAGATCCAACGAGAAAGGCAGCGGCTCCTTTAAAC -241

AAGGCGGAGAAGGTTAAGATGATGACCGGACGGCTACTCCAGGCATTCGCTCCGAGGCCG -181

SRE-1

CGGGGGGAGGAACCTCACTATGCAAATCTGAGCTGCTGATCGATGACGCGCCATCACCCC -121

CCAAT Box

ACGCACCGCTTCGCTCGCCATTGGCTGAGATGAGCCTGGTCCCATTGACAACAACAGG -61

Sp1 Sp1

GGGCGCGCGCCCTGGAGCGGGCCGACGGGGCGCGGGCTGGGGCGGGGAATCCCGC -1

CCCGCCCTTTCTGTGCGCGCCCGGGCGCAACGCAAACATGGCGCGGGTGGCACCCGTC +60

GGTGAGGCGGTGCCGGCGGGGGTGTCTCGGGTGTATGGGCGGTGGCGACGGCACCGCCC +120

CCGCGTCTCCCTGAGCGGGACGGCAGGGGGGGCTTCTGCGCTGAGCCGGGCGATG +175

Met

B

```

             X
             X
      X      X X X X
    X X X X X X
  
```

CCGC CCCGCCCTTT CTGTGCGGGCG CCCGGGCGCA ACGCAA

-1 +1 +10 +20 +30

Fig. 4. Nucleotide sequence of the 5'-flanking region of the human SREBP-2 gene. A, the 5'-flanking region was cloned and its nucleotide sequence determined. The nucleotide sequence from -660 to +175 (the third letter of the initiation codon) is shown. Transcription initiation sites are localized in the region underlined (see in B). Putative regulatory cis-elements [Sp1 binding site (Sp1), E-box, NF-Y binding site (NF-Y) and SRE-1] are double underlined. B, 5' RACE analysis of the SREBP-2 mRNA was performed and the 5' end of each clone is shown as X on the SREBP-2 gene sequence. The 5' end of the longest clone is numbered "+1". In this analysis the 3' end of the cDNA was dC-tailed to generate the anchor site. Therefore, the initiation sites are not determined exactly in the three sites, G/C, G/T and G/C.

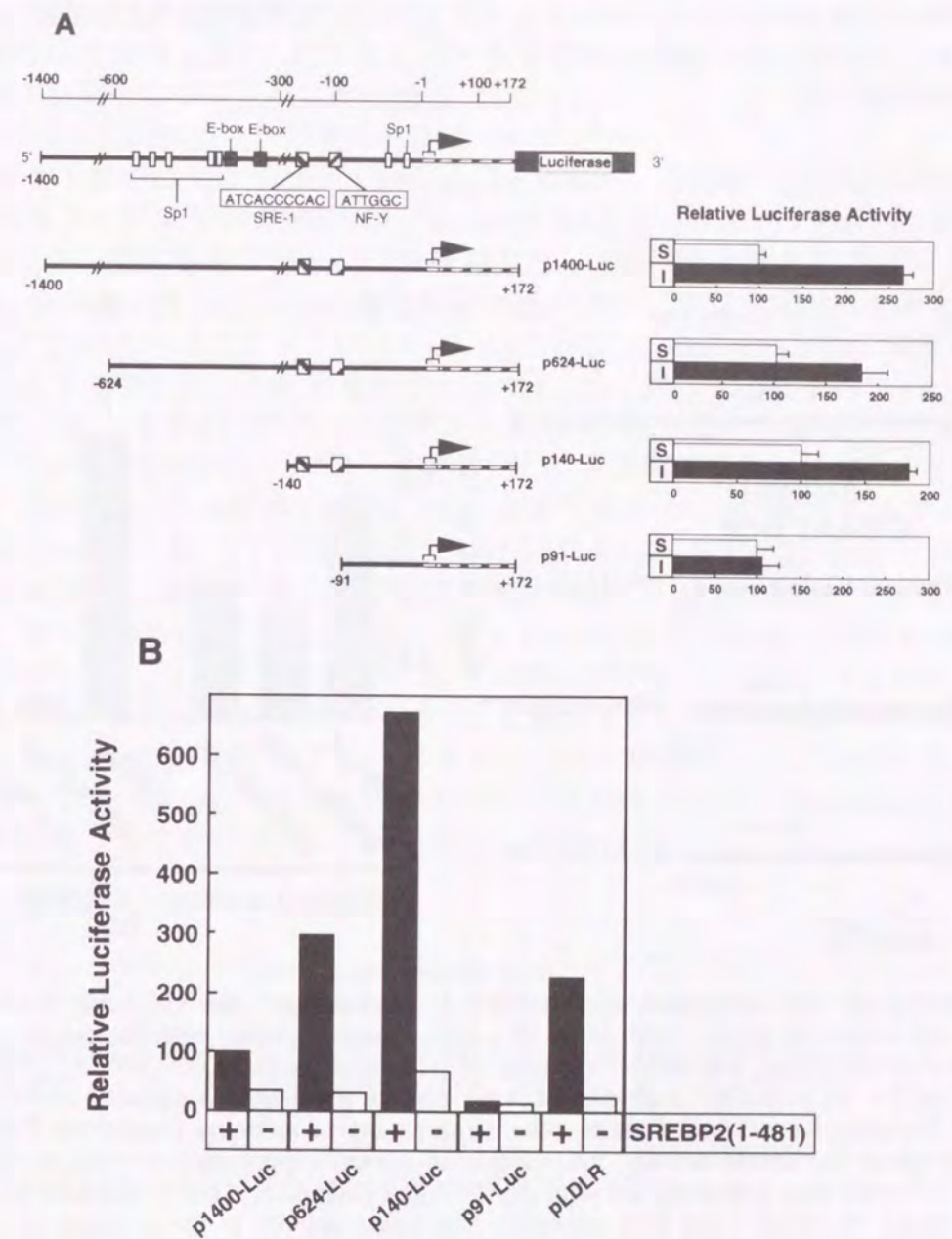


Fig. 5. Regulation of SREBP-2 promoter by sterols and identification of the sterol regulatory region activated by SREBP-2. A, Putative regulatory elements are indicated in marked boxes. The sequences of the SRE-1 element and the NF-Y binding site are boxed. The cluster of transcription initiation sites is indicated by an arrow. Relative luciferase activities are determined as a ratio of relative light units measured by a luminometer to the protein contents in the cell lysate and are normalized to 100 for each reporter gene in the presence of sterols (S, suppressing conditions). Data are the mean \pm SD of three dishes. B, HEK 293 cells were cotransfected with the indicated plasmid and either pSREBP-2(1-481) encoding the active form of SREBP-2 (+) or the vector without the insert (-). The cells were incubated in the medium containing 7% FCS. The relative luciferase activities were normalized by the value obtained from cells cotransfected with p1400-Luc and pSREBP2(1-481). The luciferase activities obtained by the reporter genes used in (A) under suppressing conditions and (B) without the active SREBP-2 were in the range of about 1,000 to 2,500 relative light units/ μ g protein.

次に、SRE-1 に変異を導入した pSREKO-Luc と、CCAAT Box に変異を導入した pCATKO-Luc を用いてレポーターアッセイを行った (Fig. 6)。その結果、いずれの場合にもコレステロールおよび SREBP-2 による応答が消失した。これらの結果より、SREBP-2 遺伝子の細胞内コレステロールレベルに応じた転写調節には SREBP が関与しており、さらにプロモーター領域に存在する SRE-1 と CCAAT Box の双方が必要であることが明らかになった。

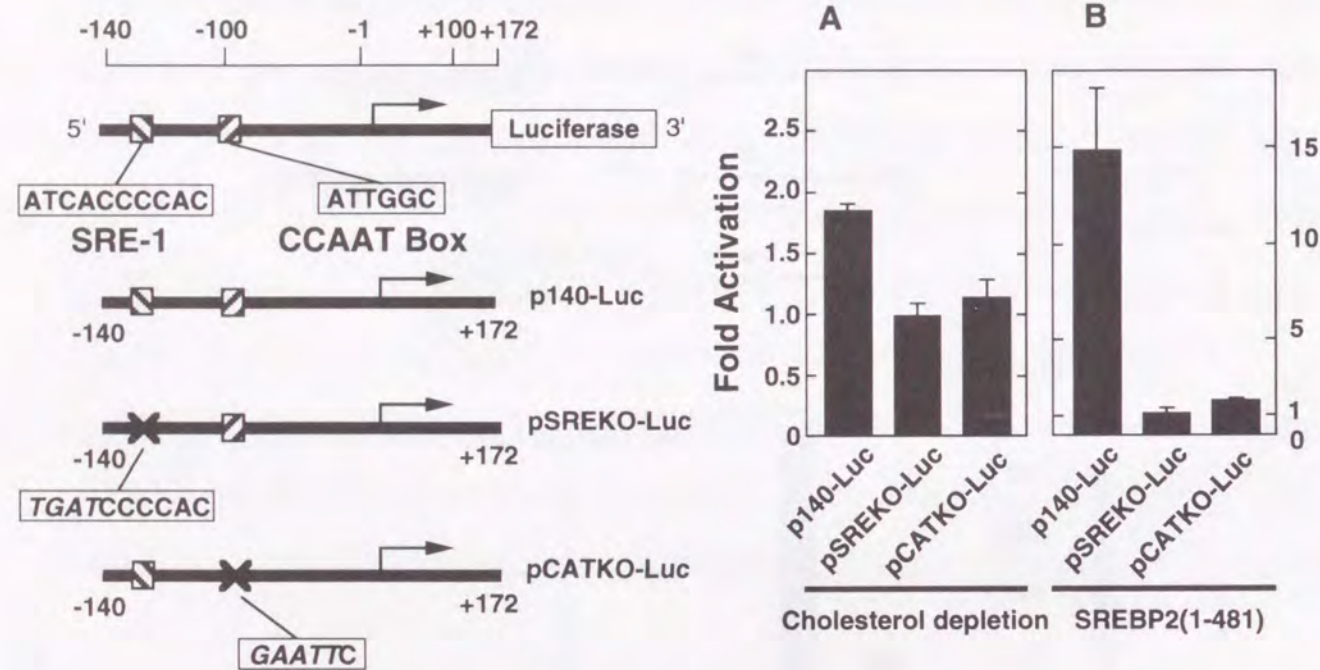


Fig. 6. Effect of the mutation in the SRE-1 element or the CCAAT Box on the expression of reporter gene. Left, HEK 293 cells were transfected with the indicated reporter plasmid. In pSREKO-Luc, the SRE-1 element of p140-Luc is replaced (ATCACCCCAC → TGATCCCCAC). In pCATKO-Luc, the CCAAT Box of p140-Luc is replaced (ATTGGC → GAATTC). The cells were cultured under either suppressing or inducing conditions. The number of fold of activation (luciferase activity under inducing versus suppressing conditions) is shown. Right, HEK 293 cells were cotransfected with the indicated plasmid and either pSREBP2(1-481) or the vector without the insert. The fold activation (luciferase activity in the presence of the active form of SREBP-2 versus in the absence) is shown. Data are the mean ± SD of three dishes. The luciferase activities obtained by the reporter genes used in (A) under suppressing conditions and (B) without the active SREBP-2 were in the range of about 1,000 to 4,000 relative light units/μg protein.

第三節 SREBP-2 遺伝子プロモーター領域における SRE-1 および CCAAT Box に結合するタンパク質の同定

(1) 実験材料および実験方法

・SRE-1 に結合するタンパク質の同定

大腸菌における SREBP-2 の発現と精製:

SREBP-2 の発現は pET System (Novagen) を用いた。SREBP-2 タンパク質の 1 ~ 481 アミノ酸をコードする DNA 断片が pBluescript II SK (+) の Not I - Xho I 部位に挿入されたプラスミド pBSK-SEP-2 (1~481) を使用した。このプラスミドの Not I - Xho I 断片を pET-28b (Novagen) の Not I - Sal I 部位に組み込んだ。このプラスミドを導入した大腸菌 BL 21 (DE 3) 株をカナマイシン (25 μg/ml) を含む 50 ml の LB 培地に植菌し、37 °C で一夜、振とう培養した。この培養液をカナマイシン (25 μg/ml) を含む 450 ml の LB 培地に加え、OD₆₀₀ が 0.6 程度になるまで約 1 時間 37 °C で振とう培養した。最終濃度が 0.2 mM になるように IPTG を加え、さらに 37 °C で 5 時間培養して融合タンパク質を誘導した。4,000 x g 20 分間遠心をおこない集菌したのち、15 ml のバッファー A (6 M guanidine hydrochloride, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris, pH を NaOH で 8.0 に調節) で懸濁し (5 ml / 菌体の乾燥重量) 室温で 1 時間回転撹拌した。10,000 x g 4 °C 15 分間遠心をおこない、その上清を回収した。8 ml の 50 % (v/v) Ni-NTP resin と混合し室温で 45 分間回転撹拌した。10 倍容バッファー A で 5 回、5 倍容バッファー B (8 M urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris, pH を NaOH で 8.0 に調節) で 2 回、5 倍容バッファー C (8 M urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris, pH を HCl で 6.3 に調節) で 3 回洗浄した。最終的にバッファー D (8 M urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris, 250 mM imidazole, pH を HCl で 6.3 に調節) によって目的タンパク質を溶出した。

プローブの作製:

DIG ゲルシフトキット (Boehringer Mannheim) を用いた。プローブとしては、SREBP-2 遺伝子のプロモーターの -138 から -115 の領域 (SRE-1 を含む) の 2 本鎖 DNA を合成した (upper strand のみを以下に示した。下線は SRE-1 配列)。DIG ゲルシフトキットのプロトコールに従い、3' 末端を DIG-11-ddUTP で標識した。これをプローブとして用い、SRE24 と名付けた。

SRE24 5' -ATGACGCGCCATCACCCCACGCAC-3'

ゲルシフト反応:

精製した His tag 融合タンパク質 10 ng とプローブ 30 fmol を 20 mM Hepes-KOH (pH 7.6)、1 mM EDTA、10 mM (NH₄)₂SO₄、1 mM DTT、0.2 % (v/v) Tween 20、30 mM KCl を含み、液量が 20 μl になるように氷上で混合し室温で 20 分間放置した。その後、スーパーシフトを行うものは抗血清 (SREBP-2 の N 末を認識する、第四章 第二節参照) を 0.1 μl 加え氷上で 30 分間放置した。その後、サンプルバッファー [TBE バッファー (33.5 mM Tris, 0.6 mM EDTA · 2Na, 11 mM ほう酸): グリセロール = 6:4 (v/v)] を 5 μl 加え、6 % (w/v) アクリルアミドゲル上 80 V で約 45 分泳動した。その後の化学発光の検出は DIG ゲルシフトキットのプロトコールに従った。

・ CCAAT Box に結合するタンパク質の同定

核抽出液の調製:

HepG2 細胞を 100 mm dish 3 枚に 第一章 第一節に準じた条件でコンフレントになるまで培養した。PBS で洗浄し、ラバーポリスマンを用いて 1 ml PBS 中に細胞を回収した。1,500 rpm 4 °C 3 分間遠心[卓上遠心機 MC-150 (Tomy)]した後、1 ml の試薬 A (10 mM Hepes-KOH (pH 7.6)、1 mM EDTA、1.5 mM MgCl₂、10 mM KCl) で懸濁し 25 G 針で 10 ~ 15 回シエアリングする。1,000 x g で 10 分間遠心し、沈殿を 300 μl の試薬 B (20 mM Hepes-KOH (pH 7.6)、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1.5 mM MgCl₂、0.5 mM NaCl、25 % (v/v) グリセロール) で再懸濁後、4 °C で 30 分間回転攪拌した。1,500 rpm で 10 分間遠心後の上清を核抽出液とした。

プローブの作製:

p140-Luc をテンプレートにして PCR 法をおこない、CCAAT Box を含む約 300 bp の DNA 断片を増幅した。これを BssH II 処理し、約 80 bp の DNA 断片 (-140 ~ -57) を切り出した。DIG ゲルシフトキットのプロトコールに従い、3' 末端を DIG-11-ddUTP で標識したものをプローブとして用い、SRE80 と名付けた。また競合 DNA は、p140-Luc と pNF-YKO-Luc をテンプレートにして PCR 法をおこない、増幅した約 300 bp の DNA フラグメントを用いた。前者を WT、後者を NFYKO と名付けた。

ゲルシフト反応:

核抽出液 6 μg とプローブ 30 fmol さらにすべての群に競合 DNA (NFYKO) を 30 pmol 加えた。競合 DNA (NFYKO) を加えることによって、CAATT Box に結合する因子だけを検出することができる。コンペティターとして未標識の DNA 断片を加える群には、競合 DNA (WT) を 30 pmol 加えた。スーパーシフトをおこなうものは抗 NF-YB 抗体 (Mantovani 博士より供与) を 500 ng 加えた。ゲルシフト反応は第二章 第三節に準じた。

(2) 実験結果

ゲルシフトアッセイにおいて (Fig. 7)、SRE24 に結合する因子によるシフトしたバンドが確認された。さらにそのバンドは、SREBP-2 の N 末を認識する抗血清を 0.1 μl 加えることによってスーパーシフトしたが、免疫前の血清を加えてもスーパーシフトしなかった。これらの結果より、プローブの領域に SREBP が結合する配列が存在することが明らかになった。

ゲルシフトアッセイにおいて (Fig. 8)、CCAAT Box の逆配列に結合する因子によるシフトしたバンドが確認された。このバンドは、競合 DNA である 1000 倍過剰の WT により消失した。一方、シフトしたバンドは、抗 LDL レセプター抗体ではスーパーシフトしなかったが、NF-Y の B サブユニットに対する抗体である抗 NF-YB 抗体によってスーパーシフトした。これによりこの CCAAT Box には NF-Y が結合することが示された。

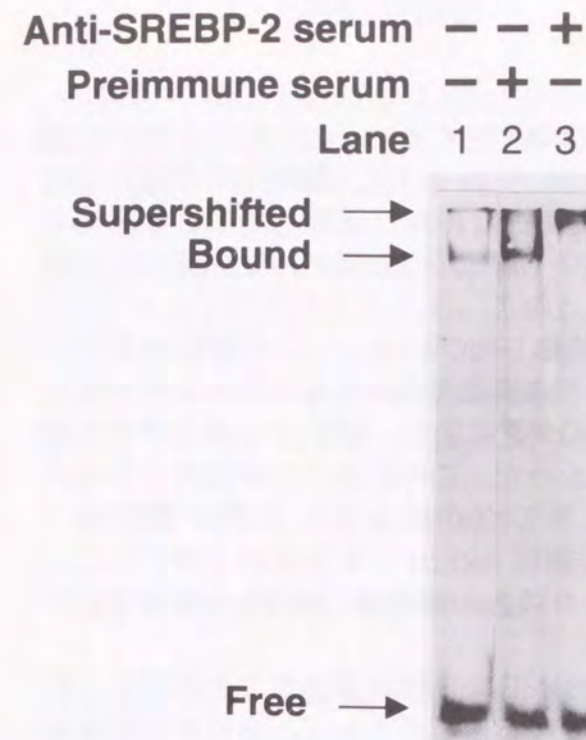


Fig. 7. SREBP-2 binds to the SRE-1 sequence in the SREBP-2 promoter.

Double-stranded DNA corresponding to nucleotides -138 to -115 of the SREBP-2 promoter was 3' end-labeled with Digoxigenin 11-ddUTP and used in gel shift studies in the presence of 10 ng of bacterially expressed SREBP-2. Following the addition of preimmune serum and antiserum of SREBP-2, the reaction mixture was placed on ice for 30 min (lanes 2 and 3).

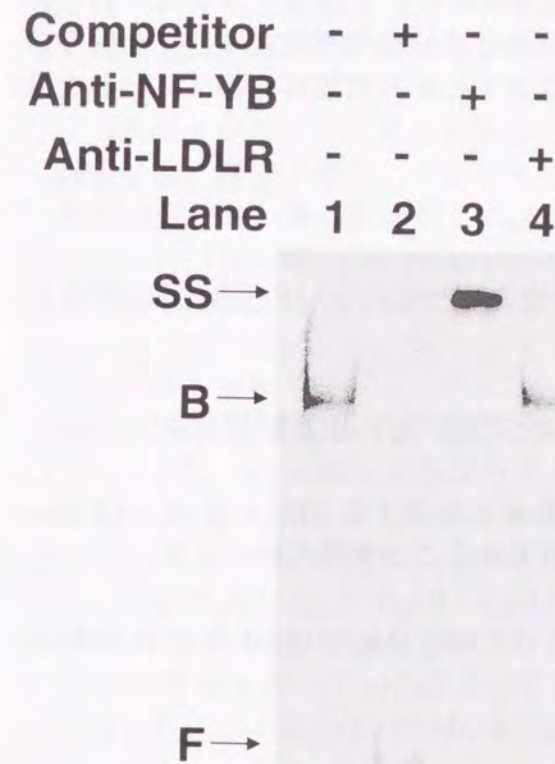


Fig. 8. NF-Y binds to the ATTGGC sequence in the SREBP-2 promoter.

Double-stranded DNA corresponding to nucleotides -140 to -57 of the SREBP-2 promoter was 3' end-labeled with Digoxigenin 11-ddUTP and used in gel shift studies in the presence of 6 μg of Hep G2 nuclear extract. In lane 2, a 1,000-fold molar excess of competitor (an unlabeled WT) was added to the reaction. Following the addition of 0.5 μg of antibodies to NF-YB and the LDL receptor, the reaction mixture was placed on ice for 30 min (lanes 3 and 4). The bound (B) and supershifted (SS) probes are indicated. The free (F) probe runs at the bottom of the gel.

第四節 考察および小括

(1) 考察

ヒト培養細胞においても細胞内コレステロール量が欠乏することにより、SREBP-2 遺伝子の転写が活性化することを明らかにした。さらにプロモーター領域の解析を行ったところ、その活性化には SREBP および NF-Y の協調的な作用が必須であることを明らかにした。またデータには示していないが、SREBP-1 遺伝子は細胞内コレステロール量に応じた転写変動は見られなかった。

SREBP-1 と -2 は共に細胞内コレステロール量に応じたプロセッシング調節を受けて成熟体になり、核内に移行して転写調節因子としての機能を発揮する。しかしそれぞれの遺伝子の転写レベルは細胞内コレステロール量の欠乏により、SREBP-2 遺伝子では約 2 倍に上昇したが、SREBP-1 遺伝子では変動しなかった。この結果より細胞内コレステロール量が欠乏した際には SREBP のプロセッシングが促進されるだけでなく、SREBP-2 遺伝子の転写が上昇することにより、前駆体 SREBP-2 の発現が上昇することが明らかになった。この 2 つの相乗的な作用により核内の成熟体 SREBP の量が増加すると考えられる。

SREBP-1 遺伝子の mRNA はラット脂肪細胞において高発現していることが報告されている(20)。また SREBP を介して転写活性化を受ける遺伝子として、脂肪酸代謝関連遺伝子である FAS (10, 11) と ACC (12) が報告されている。さらに SREBP-1 と SREBP-2 で転写活性化能を比較したところ、SREBP-1 が脂肪酸代謝関連遺伝子、SREBP-2 がコレステロール代謝関連遺伝子の転写を効率良く活性化することも報告されている(31, 32)。以上のことを考え合わせると、SREBP-1 と -2 は共にコレステロール代謝関連遺伝子の転写を促進し得るが、SREBP-1 は特に脂肪酸代謝関連遺伝子の転写の制御を、SREBP-2 は特にコレステロール代謝関連遺伝子の転写の制御を担っていると推察することができる。

(2) 小括

1. HeLa 細胞においてコレステロールを枯渇させることにより、SREBP-2 の発現が転写レベルで上昇することを明らかにした。
2. SREBP-2 遺伝子 5' 上流領域約 1.6 Kb をクローニングし、塩基配列を決定した。
3. レポーターアッセイの結果、プロモーター領域に存在する SRE-1 と CCAAT Box がコレステロールに応じた転写変動には必須であることを明らかにした。
4. ゲルシフトにより、SRE-1 配列に SREBP が、CCAAT Box には NF-Y が結合することを明らかにした。

第二章 スクアレン合成酵素および HMG-CoA 合成酵素遺伝子の SREBP による転写調節

SREBP-2 遺伝子の転写は SREBP と NF-Y の協調的な作用によって活性化されることを明らかにした。スクアレン合成酵素および HMG-CoA 合成酵素遺伝子はコレステロール量の欠乏により転写レベルで活性化されることが報告されているが(33, 34)、プロモーター領域の詳細な解析は十分に進んでいない。この 2 つの遺伝子のプロモーター領域には SRE 様配列の近傍に CCAAT Box が存在し、SREBP と NF-Y が協調的に転写を活性化している可能性が考えられる。この点に注目し、スクアレン合成酵素および HMG-CoA 合成酵素遺伝子のコレステロール量に応じた転写変動について解析した。さらに SREBP と NF-Y の結合領域の間隔が、その協調的な転写活性化に影響を及ぼすことを明らかにした。

第一節 コレステロールに対する応答に必須なプロモーター領域の同定

(1) 実験材料および実験方法

・スクアレン合成酵素および HMG-CoA 合成酵素遺伝子のプロモーター領域のクローニング

スクアレン合成酵素遺伝子のプロモーター領域は、すでに報告されている配列(35)をもとにプライマーを作成し、ヒト胃粘膜のゲノム DNA をテンプレートとして PCR 法を用いてクローニングした。HMG-CoA 合成酵素遺伝子のプロモーター領域はハムスターの配列(34)をもとにプライマーを作成し、ヒト胃粘膜のゲノム DNA をテンプレートとして PCR 法を用いてホモロジークローニングを行った。

・コレステロールに対する応答に必須なプロモーター領域の同定

細胞培養、遺伝子導入、ルシフェラーゼアッセイ:

方法は第一章 第二節に準じた。0.2 μ g のレポータープラスミドと 2.8 μ g のサケ精子 DNA または 0.03 μ g の pME-SREBP2 (1-481) または pME-18S と 2.77 μ g のサケ精子 DNA を導入した。トランスフェクション後の培地は第一章 第二節に準じた。

プラスミド構築:

pGV-B2 の Bgl II - Hind III 部位にスクアレン合成酵素遺伝子のプロモーター領域の +67 から -200、-90 を挿入したプラスミド pSS200、pSS90 を PCR 法を用いて構築した。さらに PCR 法を用いて pSS200 の SRE-1、2 または CB1 に変異を加えたプラスミド pSS-SRE1KO、pSS-SRE2KO、pSS-SRE1·2KO、pSS-CB1KO、pSS-CB1·SRE2KO を構築した。同様に pGV-B2 の Bgl II - Hind III 部位に HMG-CoA 合成酵素遺伝子のプロモーター領域の -87 から -497 を挿入したプラスミド pHMG S-WT を PCR 法を用いて構築した。さらに PCR 法を用いて pHMG S-WT の SRE-1、2、CB1 または Sp1 に変異を加えたプラスミド pHMG S-CB1KO、pHMG S-SRE1KO、pHMG S-SRE2KO、pHMG S-Sp1KO を構築した。

(2) 実験結果

ヒト スクアレン合成酵素遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を Fig.9 に示した。報

告されていた配列と比較すると -110 番目の 1 塩基が一致しなかったが(C→T)、SREBP による転写調節には影響がないと思われる。

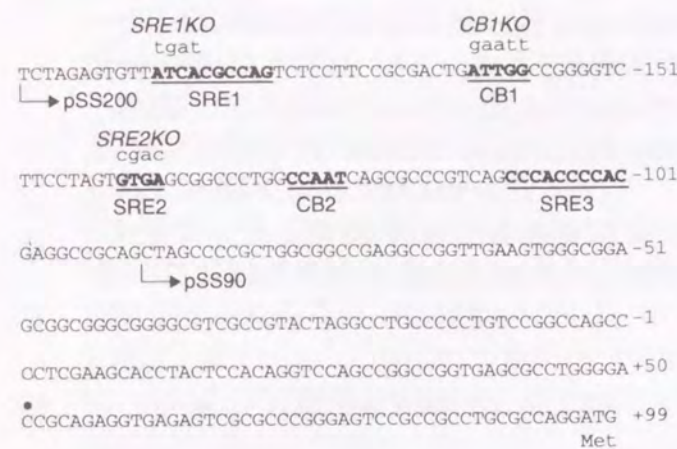


Fig. 9. Sequences of the human squalene synthase promoter and its mutant derivatives. The nucleotide sequence from -200 to +99 (the third letter of the initiation codon) is shown. The site of transcription initiation (*) is indicated. Potential regulatory elements are underlined. The sites used for preparation of truncated reporter gene constructs are indicated by the arrows. Compared with the previously published sequence (35), a mismatch nucleotide in SRE3 (5'-cCCACCCAC-3', a thymidine reported substituted for the underlined cytidine) was found. The mutant sequences for reporter gene constructs are shown by italic letters above the individual original sequence.

ヒト HMG-CoA 合成酵素遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、すでに報告されているhamster HMG-CoA 合成酵素遺伝子のプロモーター領域(34)と比較した結果を Fig.10 に示した。CB1 および 5' 側の Sp1 は完全に保存されており、SRE1 は 8/10、SRE2 は 9/10 が保存されていた。3' 側の Sp1 はhamster では見られず、ヒトにおいてのみ見られた。

レポーターアッセイの結果、スクアレン合成酵素では Fig.11 に示したように 3ヶ所の SRE 様配列と 2ヶ所の CCAAT Box すべてを含む pSS200 では、コレステロールを欠乏させることによって約 6 倍の活性化が見られたが、5つのエレメントすべてを欠失した pSS90 ではそのような活性化は見られなくなった。また、SRE1 に変異を導入した pSS200-SRE1KO では約 2 倍、SRE2 に変異を導入した pSS200-SRE2KO では約 3 倍の活性化が見られた。一方 CB1 または SRE1 と SRE2 の両方に変異を導入した場合は活性化が見られなくなった。このことから細胞内コレステロール量に応じた転写調節には SRE1、SRE2 と CB1 が必要であり、SRE1 と CB1、さらに SRE2 と CB1 が協調的に作用することにより、pSS200 で見られる約 6 倍という高いレベルの活性化が起こると考えられることができる。

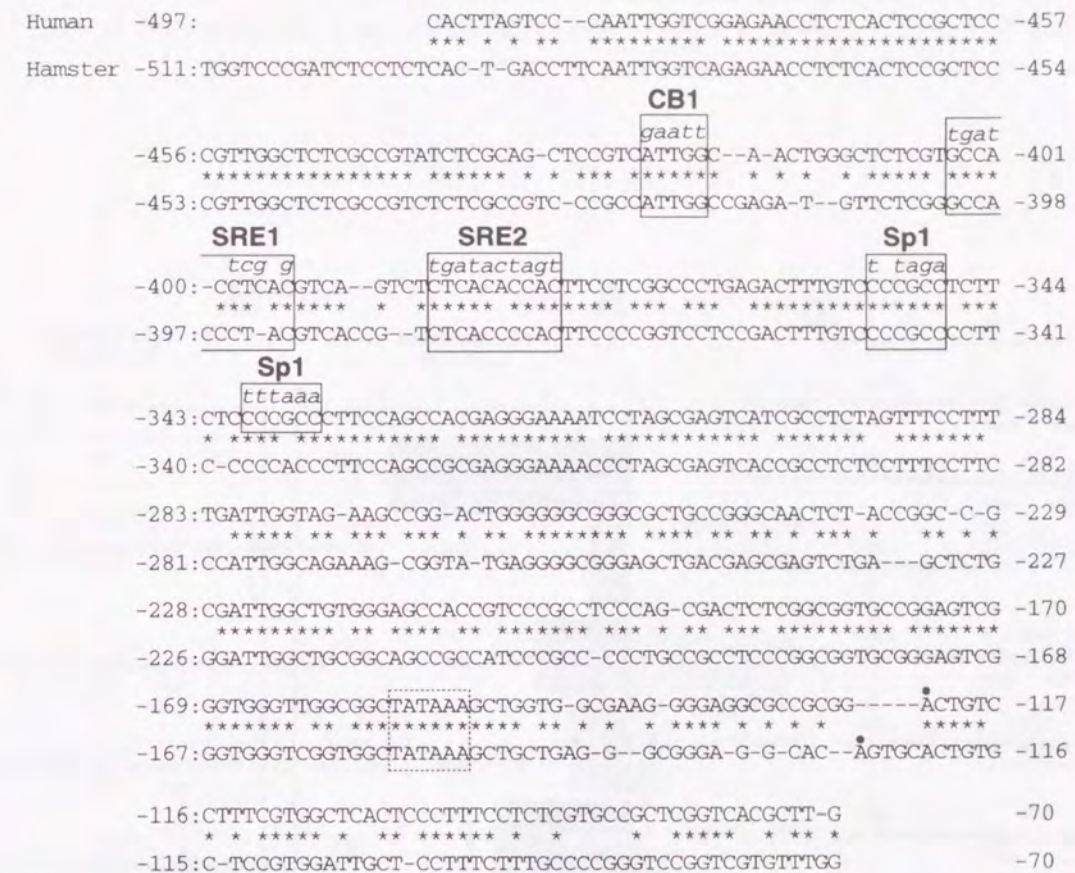


Fig. 10. Conservation of DNA sequences of the human and hamster HMG CoA synthase promoter region. The promoter region sequences for the human and hamster HMG CoA synthase (34) were aligned for determination of homology. Asterisks denote identical nucleotides. Position +1 is assigned to the A of the ATG codon specifying the initiator methionine; negative numbers refer to the 5'-untranslated sequence. The sites of transcription initiation are indicated by dots (*). The dashed box denotes a possible TATA box. The potential regulatory elements are boxed. The arrows indicate the primers used for the cloning. The mutant sequences for reporter gene constructs used in the following experiments are shown by italic letters above the individual original sequence.

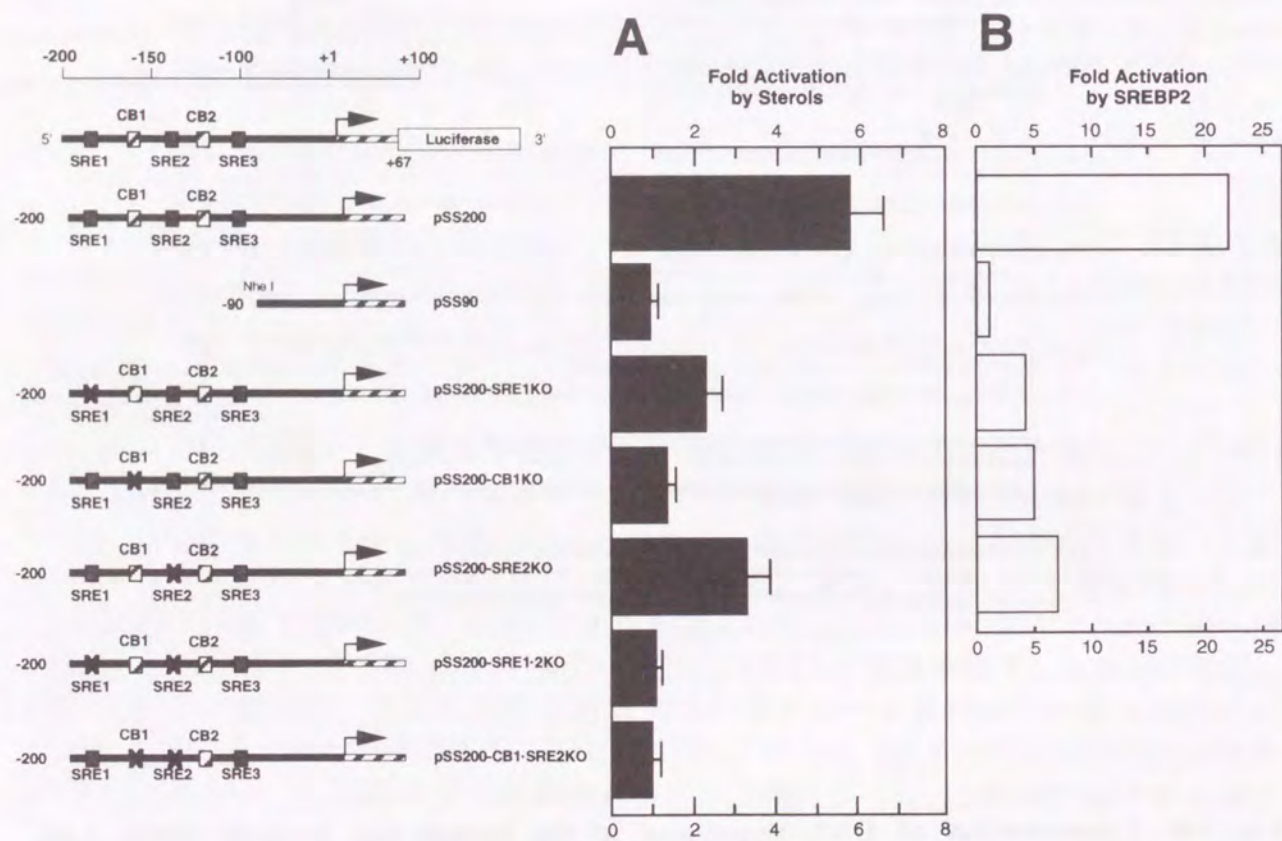


Fig. 11. Sterol-mediated regulation of reporter genes containing the squalene synthase promoter in transfected HEK293 cells. Reporter gene constructs are shown together with the scale on the top. Potential regulatory elements are indicated in marked boxes. The site of transcription initiation is indicated by an arrow. A, HEK 293 cells were transfected with one of the reporter constructs (200 ng) and cultured under either suppressing or inducing conditions. The fold activation (luciferase activity under inducing versus suppressing conditions) is shown. The luciferase activity was normalized by the protein content of cell extracts. Data are the mean \pm S.D. of 8 - 12 independent transfection experiments. B, HEK 293 cells were transfected the indicated reporter constructs and either an expression plasmid for the active form of SREBP-2 or the vector without the insert. The cells were incubated in the medium containing 7% FCS. The fold activation (luciferase activity with the active SREBP-2 versus without it) is shown. Data are the mean of 3 independent transfection experiments. The luciferase activities obtained by the reporter genes used in (A) under suppressing conditions and (B) without the active SREBP-2 were in the range of about 7,000 to 24,000 relative light units/ μ g protein.

HMG-CoA 合成酵素遺伝子では Fig.12 に示したように、CB1、SRE1、SRE2、Sp1 をすべて含む pHMG S-WT では、コレステロールを欠乏させることにより約 3.5 倍の転写活性化がみられたが、CB1 または SRE1 のいずれか 1 つを変異させた pHMG S-CB1KO、pHMG S-SRE1KO では活性化は消失した。また SRE2 または Sp1 のいずれかを変異させても CB1、SRE1 が保存される限り約 2 倍の転写活性化が見られた。このことから細胞内コレステロール量に応じた転写調節には CB1 と SRE1 が必須であり、さらにこれら 2 つの配列による転写活性化を補助する形で SRE2 と Sp1 が作用していると考えられた。

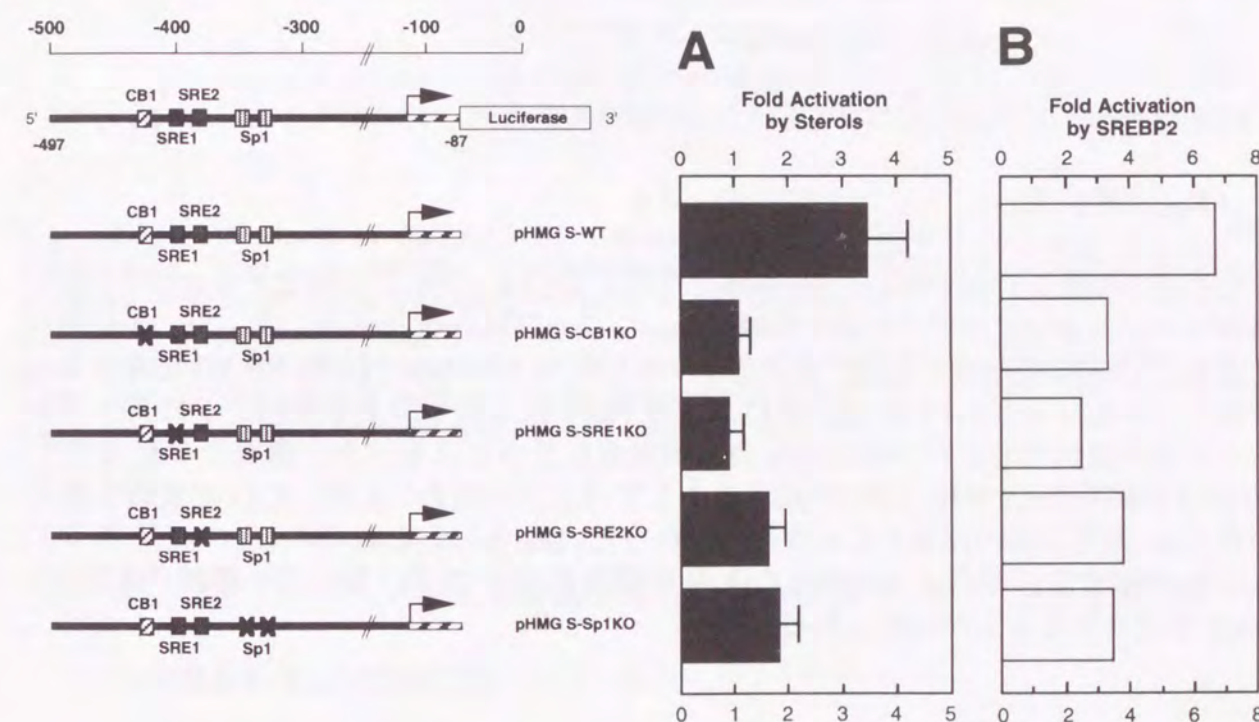


Fig. 12. Sterol-mediated regulation of reporter genes containing the HMG CoA synthase promoter in transfected HEK293 cells. Reporter gene constructs are shown together with the scale on the top. Potential regulatory elements are indicated in marked boxes. The site of transcription initiation is indicated by an arrow. A, HEK293 cells were transfected and cultured as described in the legend to Fig. 11. Data are the mean \pm S.D. of 9 independent transfection experiments. B, Cells were cotransfected with the indicated reporter gene constructs and either an expression plasmid for the active form of SREBP-2 or the vector without the insert, and cultured as described in the legend to Fig. 11. Data are the mean of 3 independent transfection experiments. The luciferase activities obtained by the reporter genes used in (A) under suppressing conditions and (B) without the active SREBP-2 were in the range of about 2,000 to 4,000 relative light units/ μ g protein.

第二節 スクアレン合成酵素およびHMG-CoA合成酵素遺伝子プロモーター領域の CCAAT Box に結合するタンパク質の同定

(1) 実験材料および実験方法

・CCAAT Box に結合するタンパク質の同定

核抽出液の調製およびプローブの作製:

核抽出液の調製は第一章 第三節に準じ、細胞は HEK293 細胞を用いた。プローブは第一章 第三節で作製した SRE24 を用いた。

ゲルシフト反応:

方法は第一章 第三節に準じた。

コンペティターとしてそれぞれの遺伝子の CB1 を含む 24 塩基の 2 本鎖 DNA、および CB1 に変異を導入 (GAATT→ATTGG) した 24 塩基の 2 本鎖 DNA を合成し (upper strand のみを以下に示した)、一レーンにつき 30 pmol 加えた。

SS WT 5' -CCGCGACTGATTGGCCGGGGTCTT-3'
 SS Mut 5' -CCGCGACTGGAATTCGGGGTCTT-3'
 HMG S WT 5' -AGCTCCGTCATTGGCAACTGGGCT-3'
 HMG S Mut 5' -AGCTCCGTCGAATTCAACTGGGCT-3'

(2) 実験結果

それぞれの遺伝子のプロモーター領域に存在する CB1 に NF-Y が結合するかどうかを、コンペティションアッセイによって調べた。プローブは SRE24 を用いた。Fig.13 に示したように SRE24 に結合する因子によるシフトしたバンド (lane 1) が抗 NF-YB 抗体によってスーパーシフトした (lane 2)。次に、この NF-Y によりシフトしたバンドにスクアレン合成酵素遺伝子および HMG-CoA 合成酵素遺伝子のプロモーター領域の CB1 を含む 1000 倍過剰の DNA 断片 (WT) を加えることでバンドは消失したが、CB1 に変異を導入した DNA 断片 (Mut) を加えても変化しなかった (lane 3-6)。これらのことから、スクアレン合成酵素遺伝子および HMG-CoA 合成酵素遺伝子のプロモーター領域の CB1 に NF-Y が結合することが示唆される。

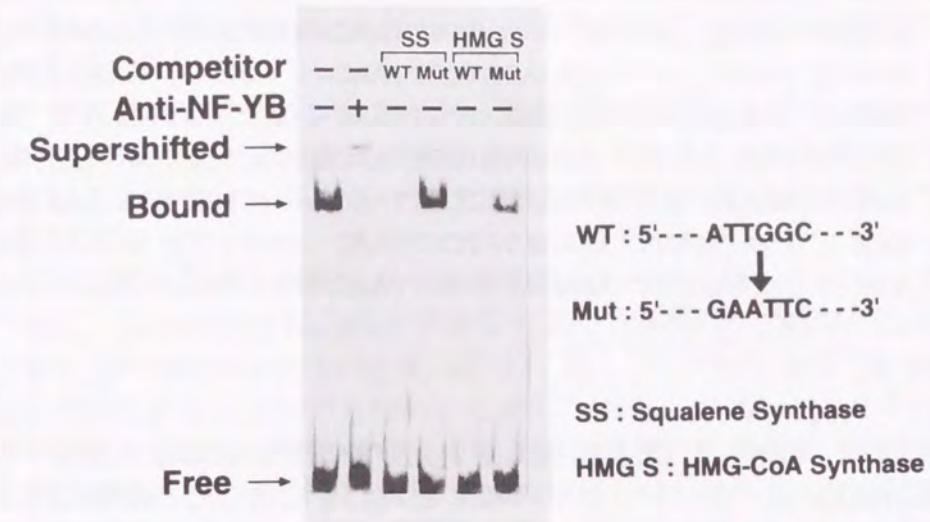


Fig. 13. NF-Y binds to the ATTGG sequence in the Squalene synthase (SS) and HMG CoA synthase (HMG S) promoter. Double-stranded DNA corresponding to nucleotide -140 to -57 of the SREBP-2 promoter was 3' end-labeled with Digoxigenin 11-ddUTP and used in the presence of 6 µg of HEK293 nuclear extract (lane 1). Following the addition of 0.5 µg of antibody to NF-YB, the reaction mixture was placed on ice for 30 min (lane 2). In lane 3-6, a 1,000-fold excess amount of unlabeled 24-bp fragment was added to the reaction (WT, a wild type fragment; Mut, a mutant fragment with GAATT instead of ATTGG).

第三節 SRE-1 と CCAAT Box の間隔が SREBP による転写活性化におよぼす影響

(1) 実験材料および実験方法

細胞培養、遺伝子導入、ルシフェラーゼアッセイ:

方法は第一章 第二節に準じた。0.2 µg のレポータープラスミドと 0.3 µg の pME-SREBP2 (1-481) または pME-18S と 2.5 µg のサケ精子 DNA を導入した。トランスフェクション後の培地は、7% FCS を含む DMEM 培地を使用した。

プラスミド構築:

ヒト SREBP-2 遺伝子のプロモーター領域の +172 から -140 の領域を pGV-B2 の Bgl II - Hind III 部位に挿入したプラスミドを構築した。さらに PCR 法を用いて SRE-1 と CCAAT Box の距離を 8 から 32 まで 2 塩基ずつ変化させたプラスミドを構築した。またその距離が 15 塩基のものも作成した。ここで作成したプラスミドの SRE-1 と CCAAT Box の間の塩基配列を次に示した。

- 8 塩基 : (SRE-1) GAT-----CCTCC (CCAAT Box)
 10 塩基 : (SRE-1) GATA-----AC----CTCC (CCAAT Box)
 12 塩基 : (SRE-1) GATA-----AC--GCCTCC (CCAAT Box)
 14 塩基 : (SRE-1) GATA-----ACAGGCCTCC (CCAAT Box)
 15 塩基 : (SRE-1) GATA-----TCGTTAAC----TCC (CCAAT Box)
 16 塩基 : (SRE-1) GATA-----TCGTTAAC----CTCC (CCAAT Box)
 18 塩基 : (SRE-1) GATA-----TCGTTAAC--GCCTCC (CCAAT Box)
 20 塩基 : (SRE-1) GATA-----TCGTTAACAGGCCTCC (CCAAT Box)
 22 塩基 : (SRE-1) GATA-----AAGATATCGTTAAC----CTCC (CCAAT Box)
 24 塩基 : (SRE-1) GATA-----AAGATATCGTTAAC--GCCTCC (CCAAT Box)
 26 塩基 : (SRE-1) GATA-----AAGATATCGTTAACAGGCCTCC (CCAAT Box)
 28 塩基 : (SRE-1) GATACTTTTAAAGATATCGTTAAC----CTCC (CCAAT Box)
 30 塩基 : (SRE-1) GATACTTTTAAAGATATCGTTAAC--GCCTCC (CCAAT Box)
 32 塩基 : (SRE-1) GATACTTTTAAAGATATCGTTAACAGGCCTCC (CCAAT Box)

(2) 実験結果

本実験においては、SRE-1 と CCAAT Box を 1ヶ所ずつ持つ SREBP-2 遺伝子のプロモーター領域を用いた。レポーターアッセイの結果を Fig.14 に示した。縦軸には、SREBP-2 を同時に発現したときに、転写活性が何倍に上昇したかを示した。その結果 15 から 20 塩基のところに、1つの大きなピークが見られた。

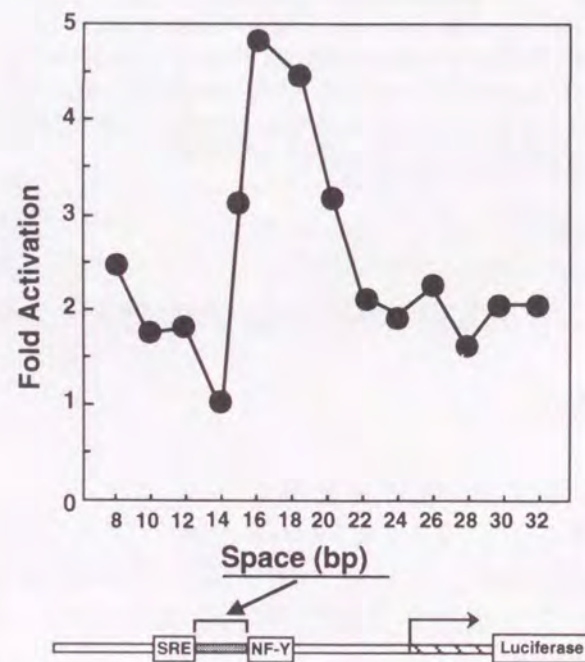


Fig. 14. Effect of lengths of the spacing between the SRE motif and the inverted CCAAT box on activation of the SREBP-2 promoter by SREBP-2. The diagram at the bottom depicts the relevant features of the plasmids used in the study. The horizontal axis shows the lengths of the spacing between the SRE motif (SRE) and the inverted CCAAT box (NF-Y). HEK293 cells were cotransfected with the indicated plasmid (200 ng) and either pSREBP2(1-481) or the vector without the insert (300 ng), and cultured with a medium containing 7% fetal calf serum for 2 days. The fold activation (luciferase activity in the presence of the active form of SREBP-2 versus that in the absence) is shown. The luciferase activities obtained by the reporter plasmids in the absence of the active form of SREBP-2 were in the range of about 1,400 to 3,600 relative light units/ μ g protein.

第四節 考察および小括

(1) 考察

SREBP-2、スクアレン合成酵素および HMG-CoA 合成酵素遺伝子はコレステロールの欠乏により転写レベルで発現が亢進する。これらの活性化には SREBP と NF-Y が協調的に作用していることを明らかにした。この他にもコレステロール生合成に関する Farnesyl diphosphate 合成酵素 (FPPS) が SREBP と NF-Y によって活性化されることが報告されている (36)。

スクアレン合成酵素遺伝子のプロモーター領域においては、NF-Y の両側に SREBP が位置しており、レポーターアッセイの結果から考えると NF-Y は両側の SREBP と協調的に作用していると推察される。NF-Y と SREBP がどのように相互作用しているのかは非常に興味深い。

コレステロールの欠乏により転写レベルで発現が亢進する遺伝子のなかでも、LDL レセプター、ACC、FAS 遺伝子は NF-Y ではなく Sp1 が SREBP と協調的に作用して転写を活性化することが報告されている (5, 10, 11, 12)。いずれの場合でも、SREBP は単独では転写を活性化することはできない。しかしながら、NF-Y、Sp1 のいずれにしてもコレステロールによる転写活性化能の変化などは確認されておらず、またいずれもユビキタスな転写因子であることから、細胞内コレステロールレベルの変動に伴った転写調節は、SREBP のプロセッシングの段階で制御されていると考えられる。また、CBP (CREB-binding protein) が SREBP のコアクチベーターとして機能していることが報告されており (37) SREBP による転写活性化機構の全貌が徐々に明らかになりつつある。

FPPS 遺伝子のプロモーター領域および LDL レセプター遺伝子のプロモーター領域をプローブとしてゲルシフトアッセイを行うと、SREBP を単独で加えるよりも、NF-Y または Sp1 を同時に加えた方が SREBP のプローブへの結合が増すことが報告されている (38, 39, 40)。最近になって SREBP の bHLH-ZIP 領域 (320~420A.A.) と NF-Y が直接結合することが報告された (41)。しかしながら NF-Y のどの領域が SREBP と結合しているのかは明らかにされていない。NF-Y と Sp1 を比較すると、どちらにも転写活性化ドメインとしてグルタミンリッチな領域が存在する (42, 43)。このことから NF-Y または Sp1 のグルタミンリッチな領域が SREBP との協調的作用に深く関与している可能性が考えられる。

本実験において SREBP と NF-Y の結合領域の間隔が、その協調的な転写活性化に影響を及ぼすかどうかを検討した。SREBP と NF-Y の結合領域の間隔が 15 塩基から 20 塩基の時に転写活性化のピークが見られた。データには示していないが、SREBP-2 遺伝子の NF-Y 結合領域を逆向きにしても SREBP による転写活性化能には変化は見られなかった。これらのことから SREBP と NF-Y が直接結合するのにその方向性は重要でなく、2箇所の間隔が 15 塩基から 20 塩基で最も高い活性化が得られると考えることができる。実際に、現在までに SREBP と NF-Y による転写活性化を受ける遺伝子のそれぞれの結合配列の間隔は (SREBP-2; 18 bp, HMG-CoA 合成酵素; 15 bp, スクアレン合成酵素; 16 bp と 16bp, FPPS; 21 bp) となり、本実験での転写活性化能のピークになる範囲に集まっている。

一方、SREBP と Sp1 の組み合わせによって転写が活性化される遺伝子のそれぞれの結合配列の間隔は (LDL レセプター; 26 bp と 5 bp, ACC; 42 bp と 3 bp, FAS; 10 bp) となり、NF-Y の場合と比較するとばらつきが見られる。さらに LDL レセプター遺伝子において Sp1 結合領域を逆向きにすると転写活性化能が著しく低下することからも (39)、

NF-Y と Sp1 は SREBP と転写を活性化する際に固有の条件を要することが推察される。

(2) 小括

1. ヒト HMG-CoA 合成酵素遺伝子 5' 上流領域約 0.5 Kb のクローニングを行った。
2. レポーターアッセイの結果、コレステロールに応じた転写調節には CB1 と SRE1 が必須であり、さらにこの 2 つの因子の補助として SRE2 と Sp1 が作用していることを明らかにした。
3. ヒト、スクアレン合成酵素遺伝子においては、SRE1 と CB1、さらに SRE2 と CB1 が協調的に作用しており、この作用が合わさることにより高いレベルの活性化が起こることを明らかにした。
4. ゲルシフトアッセイにより、HMG-CoA 合成酵素遺伝子およびスクアレン合成酵素遺伝子の CB1 に NF-Y が結合することを示した。
5. SREBP と NF-Y 結合領域の間隔を 8 から 32 塩基まで変化させたところ、その転写活性化能は、15 から 20 塩基のところには 1 つの大きなピークが見られた。

第三章 SREBP が転写を亢進する新規遺伝子の探索

SREBP はコレステロールによるフィードバックレギュレーションを担う因子として発見されたが、最近になって SREBP-2 はコレステロール代謝関連遺伝子を制御し、SREBP-1 は脂肪酸代謝関連遺伝子の転写を調節すると考えられている。また SREBP-1 は脂肪細胞において高発現していることが確認されており、脂肪細胞分化における SREBP-1 の寄与が明らかにされつつある。そこで広範な標的遺伝子を持つことが予想される SREBP-1 の転写調節のネットワークの全貌を明らかにするため、SREBP-1 によって転写調節される新規遺伝子の探索を行なった。

第一節 SREBP-1a 発現細胞株の樹立

(1) 実験材料および実験方法

LacSwitch™ Inducible Mammalian Expression System (Stratagene) を用いた。

・ IPTG による誘導によって SREBP-1a (1~487A.A.) を発現する細胞株の樹立
プラスミド構築:

ヒト SREBP-1a の 1~487 アミノ酸をコードする領域の DNA 断片を PCR 法によって増幅し、これを pOPI3CAT (Stratagene) の Not I 部位に挿入した。このプラスミドを pOPI3SREBP1 と名付けた。

細胞培養:

- 1) 細胞
チャイニーズハムスター卵巣由来の CHO-K1 細胞
- 2) 培地
DMEM/F12 + 7 % 牛胎児血清
- 3) 培養条件
37 °C、CO₂ 濃度 5 % で培養した。

遺伝子導入と薬物による選択:

CHO-K1 細胞を 60 mm dish に 1.5x10⁵ 個まき (day0)、day1 に 3 μg の p3'SS (Stratagene) をリン酸カルシウム法を用いて導入した。day2 に 100 mm dish にまき直し、day4 に hygromycin (400 μg/ml) を加えた。得られた hygromycin 耐性細胞を CHO-Lac と名付けた。次に CHO-Lac に pOPI3SREBP1 を導入し、hygromycin (400 μg/ml) と G418 (500 μg/ml) を加えた培地で培養し、得られた耐性株を CHO-487 と名付けた。

核抽出液の調製と総 RNA の回収:

CHO-487 と CHO-Lac を 10 μg/ml コレステロールと 1 μg/ml 25-ヒドロキシコレステロール (内因性 SREBP のプロセッシングを抑制する目的で加えた) および 1mM IPTG を含む培地で 19 時間培養した。その後、核抽出液を第一章 第三節に準じて回収した。同様に総 RNA を第一章 第一節に準じて回収した。

ウエスタンブロット法:

20 μg の核抽出液を 10 % SDS-PAGE により分離後、PVDF 膜に転写した。ヒト

SREBP-1 抗血清(第四章 第二節参照)を用いて ECL system (Amersham)により検出した。

ノーザンブロット法:

20 μ g の RNA を 2.2 M ホルムアミドを含む 1% アガロースゲルで分離後、ナイロンメンブレン・プラスチャージ(Boehringer Mannheim)に転写した。cDNA (東京大学先端研教授、児玉龍彦博士より御供与していただいた)を用いて DIG RNA ラベリングキット(Boehringer Mannheim)により DIG ラベルした RNA プロブを調整し、DIG 発光検出キット(Boehringer Mannheim)によりハイブリダイズするバンドを検出した。それぞれのプロブは、翻訳開始コドン ATG の A を +1 としたとき、S17 では 1-370 (370 nt)、HMG-CoA 合成酵素では 576-867 (292 nt)に対応する。

(2) 実験結果

ウエスタンブロットの結果、IPTG での誘導によって約 70 kDa の SREBP-1a が発現することが確認された(Fig.15A)。さらにノーザンブロットの結果、IPTG 処理によって HMG-CoA 合成酵素遺伝子の発現が亢進していることが明らかになった(Fig.15B)。これにより、CHO-487 細胞は IPTG 処理によって SREBP-1a の発現が誘導され、さらにその SREBP-1a は実際に転写活性化能を持つことを示した。

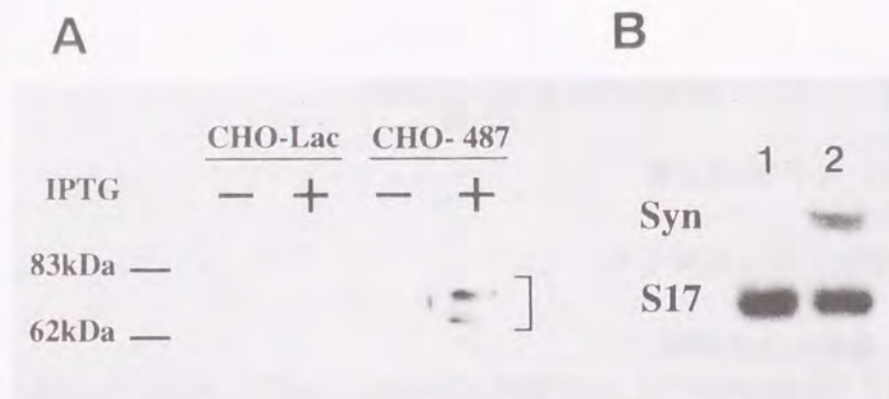


Fig. 15. Western and northern blot analyses of the SREBP-1a protein and HMG-CoA synthase gene in CHO-487 cells. A, CHO-487 and CHO-Lac cells were cultured with medium containing 10 μ g/ml of cholesterol and 1 μ g/ml of 25-hydroxycholesterol for 19 h in the presence or absence of 1mM IPTG. Twenty μ g protein of the nuclear extracts was subjected to Western blot analysis using antiserum directed against the NH₂-terminal 487 amino acids of human SREBP-1a. B, CHO-487 and CHO-Lac cells were cultured with medium containing 10 μ g/ml of cholesterol and 1 μ g/ml of 25-hydroxycholesterol for 19 h in the presence or absence of 1mM IPTG. Twenty μ g total RNA samples were fractionated on 1% agarose gel, transferred to nylon membran, and hybridized with a digoxigenin-labeled riboprobe for either HMG-CoA synthase or S17. Lane 1, CHO-Lac; Lane 2, CHO-487. In three separate experiments, the same results were obtained.

第二節 SREBP-1a によって転写が亢進する遺伝子のクローニング

(1) 実験材料および実験方法

差引きハイブリダイゼーション法:

Wang と Brown の差引きハイブリダイゼーション法(44)に準じた。CHO-487 と CHO-Lac を 10 μ g/ml コレステロールと 1 μ g/ml 25-ヒドロキシコレステロールおよび 1mM IPTG を含む培地で 19 時間培養し、総 RNA を回収した。さらに Oligo (dT) カラム(Pharmacia)を用いてポリ(A) RNA を調製した。さらに cDNA synthesis kit (Invitrogen) を用いて ds-cDNA を作製した。これを制限酵素 *AluI* で切断し、1% アガロースゲルで電気泳動後、約 300 bp の DNA 断片を The GeneClean III Kit (Bio 101)を用いて回収した。これにリンカーをライゲーションした。リンカーの配列は以下に示した(下線は制限酵素 *EcoRI* の認識部位)。リンカー配列を用いて PCR 法により cDNA を増幅した。CHO-487 由来の cDNA を Tracer cDNA とし、CHO-Lac 由来の cDNA を Driver cDNA とした。次に Driver cDNA をビオチン化(170 W のランプで、7 cm、15 min)し、制限酵素 *EcoRI* で切断することによりリンカーを切り離した。2.5 μ g Tracer cDNA と 50 μ g のビオチン化した Driver cDNA をハイブリダイズした(68 $^{\circ}$ C、20 h)(long hybridization)。これにストレプトアビジンを加え、ビオチン化した Driver cDNA およびそれとハイブリダイズした Tracer cDNA を取り除いた。Driver cDNA とハイブリダイズしなかった Tracer cDNA を鋳型にしてリンカー配列を用いて PCR を行い増幅した(+1cDNA)。次に +1cDNA 2.5 μ g と 25 μ g のビオチン化した Driver cDNA をハイブリダイズした(68 $^{\circ}$ C、2 h)(short hybridization)。これにストレプトアビジンを加え、ビオチン化した Driver cDNA およびそれとハイブリダイズした Tracer cDNA を取り除いた。Driver cDNA とハイブリダイズしなかった Tracer cDNA を鋳型にしてリンカー配列を用いて PCR を行い増幅した(+2cDNA)。さらに long hybridization と short hybridization を 2 回ずつ行い、+6cDNA を得た。この cDNA を制限酵素 *EcoRI* で切断し、pBluescript の *EcoRI* 部位にライゲーションした。これにより得られた cDNA をプローブにしてノーザンブロットを行い、CHO-487 において IPTG 処理によって誘導されるかどうかを検討した。

次に実際に誘導されている cDNA の塩基配列を決定し、BLAST による解析を行なった。

5' -CTCTTGCTTGAATTCGGACTA-3'
3' -ACACGAGAACGAACTTAAAGCCTGAT-5'

ノーザンブロット法:

20 μ g の RNA を 2.2 M ホルムアミドを含む 1% アガロースゲルで分離後、Hydond-N⁺ 膜(Amersham)に転写した。差引きハイブリダイゼーション法によって得られた cDNA を鋳型に MegaprimeTM DNA labelling systems (Amersham)および [α -³²P] CTP (6000Ci/mmol)を用いプローブを作製した。得られたシグナルは BAS 2000 (Fuji film)を用いて定量化した。

(2) 実験結果

差引きハイブリダイゼーションの結果、SREBP-1a によって誘導される遺伝子に由来する 10 個の cDNA を得た。それら遺伝子の転写産物は、CHO-487 細胞で確かに増加していた(Fig.16)。増加の程度を定量化した結果および、BLAST による解析でそれぞれの

クローンと90%以上の相同性があるcDNAをTable 1に示した。クローン2と3は現在までに報告されているcDNAと相同性が低く、新規な遺伝子であると思われる。クローン6がFAS、クローン7がSCD2(stearoyl-CoA desaturase-2)、クローン9がHMG-CoA合成酵素と90%以上の相同性が見られ、それぞれはチャイニーズハムスターのオーソログ遺伝子と結論できる。これら3個の遺伝子は現在までにSREBPによる転写の活性化が報告されており(10、11、34、45)、これは本実験が良好に進行していたことを示している。

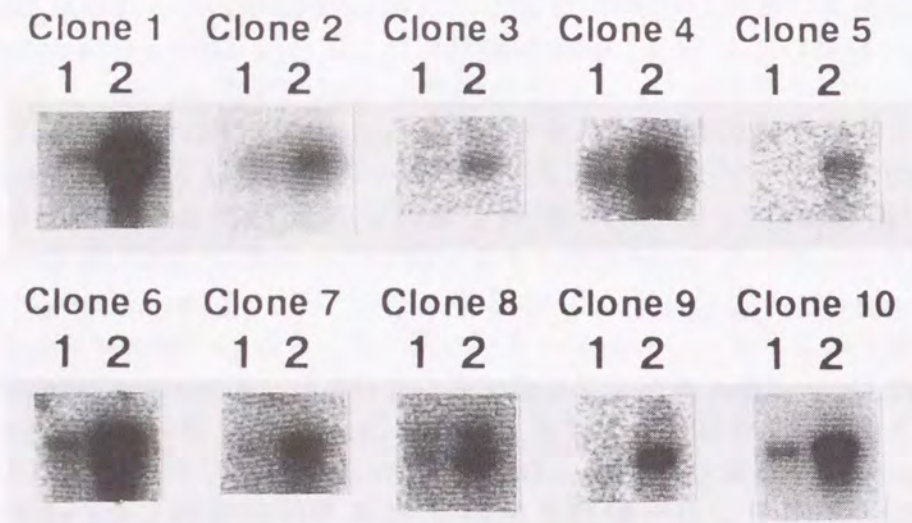


Fig. 16. A comparison of differentially expressed genes in IPTG-treated CHO-487 and CHO-Lac cells by northern blot. CHO-487 and CHO-Lac cells were cultured as described in the legend to Fig. 15B. Twenty- μ g total RNA samples were fractionated on 1% agarose gel, transferred to membran filters, and hybridized with 32 P-labeled probes. Lane 1, CHO-Lac; Lane 2, CHO-487.

Table 1. Summary of genes induced by SREBP-1a

Clone No.	Fold induction	High homology cDNA
1	23	INSIG-1
2	5.8	—————
3	5.8	—————
4	7.5	Ots-8
5	6.9	M-protein
6	8.0	FAS
7	6.3	SCD2
8	5.0	MNO
9	15	HMG-CoA Synthase
10	10	ACL

INSIG-1; insulin-induced growth response protein-1
 FAS; fatty acid synthase
 SCD2; stearoyl-CoA desaturase 2
 MNO; malate NADP⁺ oxidoreductase
 ACL; ATP citrate-lyase

The intensity of the bands (Fig.16) was measured with a BAS 2000 (Fuji Film). The fold induction (CHO-487 versus CHO-Lac) is shown.

第三節 細胞内コレステロールレベルに応じた転写変動

差引きハイブリダイゼーションにより得られた遺伝子のうち、現在までにコレステロール量に応じた転写調節を受けるかどうか明らかでない7個のクローンについて、実際に細胞内コレステロール量に応じて転写が変動するかどうかを検討した。

(1) 実験材料および実験方法

細胞の調製と総RNAの回収:

CHO-K1細胞を第三章 第一節に準じて培養した。さらに第一章 第一節に準じてコレステロール過剰または欠乏条件で2日間培養した。総RNAをグアニジンチオシアネート-フェノール-クロロホルム抽出法(24)により調製した。

ノーザンプロット法:

第三章 第二節に準じた。

(2) 実験結果

結果をFig. 17に示した。クローン1 (INSIG-1)およびクローン2 (unknown)とクローン10 (ACL)はコレステロールを欠乏させることで、1.5から1.7倍の転写活性化が見られた。もともと発現の少ないクローン5 (M-protein)は検出することができなかった(data not shown)。その他のクローンは転写の活性化は見られなかった。

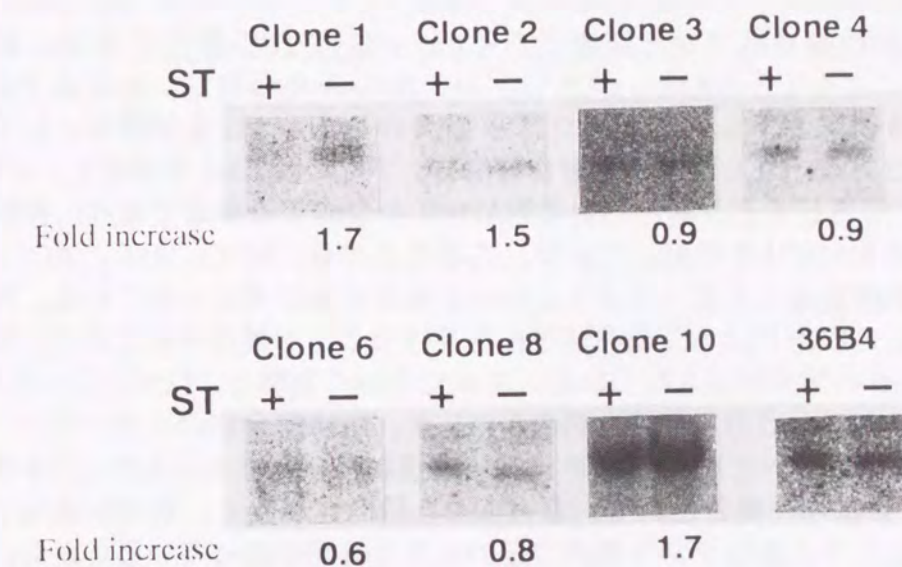


Fig. 17. Amounts of various mRNA in CHO-K1 cells. Total RNA was prepared from CHO-K1 cells cultured in the presence of either sterols (+) or a HMG-CoA reductase inhibitor, pravastatin (-). Ten- μ g total RNA samples were fractionated on 1% agarose gel, transferred to membran filters, and hybridized with 32 P-labeled probes. The intensity of the bands was measured with a BAS 2000 (Fuji Film). In three separate experiments essentially the same relative mRNA levels were obtained.

第四節 考察および小括

(1) 考察

SREBP-1aにより転写が抗進する遺伝子のうち、クローン6がFAS、クローン7がSCD2、クローン9がHMG-CoA合成酵素であった。これら3個の遺伝子は現在までにSREBPによる転写の活性化が報告されている(10, 11, 34, 45)。

クローン1のinsulin-induced growth response protein-1 (INGIG-1)はインスリン刺激によって誘導される遺伝子としてクローニングされているが(46)、その機能は明らかにされていない。しかし、3T3-L1細胞を脂肪細胞へ分化させることで転写レベルで誘導されることが報告されており(47)、脂質代謝に関連している可能性が考えられる。また脂肪細胞への分化過程においてSREBP-1の発現が亢進していることから、このときの活性化にSREBPが関与していることが推察される。

クローン4のOts-8はTPA刺激によって誘導される遺伝子としてクローニングされているが(48)、その機能は明らかにされていない。

クローン5のmusculus M-proteinはコネクチン結合タンパク質としてクローニングされた(49)。コネクチン(タイチン)とは骨格筋の弾性タンパク質で、全筋原繊維タンパク質中に約10%含まれている(ミオシンとアクチンの含量はそれぞれ44%と20%)。M-proteinはミオシンフィラメントを支えるM線を構成している。この遺伝子はプロモーター領域もクローニングされており(50)、CCAAT BoxおよびE-Boxが多数見られ、SREBPにより直接制御を受けている可能性が高い。SREBPが筋原繊維の構成タンパク質であるM-proteinの発現を転写レベルで亢進することが、どのような生理的意味を持つのかは明らかではない。今後、他の筋原繊維の構成成分の発現がSREBPによって調節を受けているかどうかを検討することで、筋原繊維におけるSREBPの果たす役割が明確になってくると思われる。

クローン8のmalate NADP oxidoreductase (MNO)とクローン10のATP citrate-lyase (ACL)は共に脂肪酸合成に関する酵素である(51, 52)。脂肪酸の生合成の初発段階はACC、とFASによって行われる。ACCはアセチルCoAからマロニルCoAを合成する酵素であり、FASはアセチルCoAとマロニルCoAからNADPHを補酵素として脂肪酸を合成する酵素である。ACLはクエン酸を分解し、アセチルCoAを供給し、MNOはリンゴ酸とNADP⁺からピルビン酸とCO₂とNADPHを合成する酵素であり、脂肪酸合成の際に必要なNADPHを供給している。このことから、MNO、ACL、ACC、FASの4種の酵素は脂肪酸合成のスムーズファミリーを形成すると考えられている。現在までにACCとFASはSREBPによって転写活性化を受けることが報告されており、脂肪酸合成に対するSREBPの関与が示されている。さらに今回の実験で、MNOとACLもSREBPによる転写活性化を受ける可能性を明らかにした。脂肪酸合成のスムーズファミリーを形成する4種の酵素すべてが、SREBPによる直接制御を受けているかどうか興味深い。

クローン2, 3は現在報告されているcDNAと相同性が低く、新規な遺伝子であると考えられる。これらの遺伝子が生体内でどのような機能を担っているのかを、今後の研究で明らかにすることが望まれる。

ここで得られた遺伝子が細胞内コレステロール量に応じて転写調節を受けるかどうかを検討した結果、クローン1 (INSIG-1)およびクローン2 (unknown)とクローン10 (ACL)の転写が調節されていることが明らかになった。他のクローンはSREBP-1aを過剰に発現した場合に転写が活性化されるが、細胞内コレステロール量の低下に伴ったSREBPのプロセッシングの亢進では転写の活性化は見られなかった。またクローン5

のM-proteinは骨格筋のタンパク質であり、CHO-K1細胞では発現が低いため検出することができなかったと考えられる。

クローニングされた10個の遺伝子のうち、4個のクローン[6 (FAS)、7 (SCD2)、9 (HMG-CoA合成酵素)]はSREBPが直接プロモーター領域に結合し、転写を亢進することが明らかにされている。クローン10 (ACL)も、我々のグループがSREBPにより直接調節を受けることを明らかにしている。しかしその他のクローンはSREBP-1a (1~487A.A.)をCHO-K1細胞に発現させることで転写が誘導されるが、これがSREBPが直接それぞれのプロモーター領域に結合することで転写を活性化しているのか、あるいはSREBPが第三の因子の発現を抑制または亢進する副次的な結果によるものであるかどうかは明らかではない。今後、個々の遺伝子の解析が待たれる。

また、Tracer cDNAとDriver cDNAを逆にすることでSREBP-1aによって転写が抑制される遺伝子を探索することもできる。我々はすでにMicrosomal Triglyceride Transfer Protein (MTP)遺伝子がSREBPによって転写が抑制されることを明らかにしており、これはSREBPを介した転写調節の多様性を示している。このことからSREBPによって転写が抑制される遺伝子を本方法によって探索することで、さらに詳細なSREBPによる転写調節のネットワークが明らかになると思われる。

(2) 小括

1. LacSwitch™ Inducible Mammalian Expression System (Stratagene)を用いてIPTG誘導によってSREBP-1a (1~487A.A.)を発現する細胞株CHO-487を樹立した。
2. 差引きハイブリダイゼーション法によってSREBP-1aによって転写が誘導される10個の遺伝子のクローニングに成功した。そのうちの7個のクローンは現在までにSREBPによる転写の活性化は報告されていない。
3. クローン1 (INSIG-1)およびクローン2 (unknown)とクローン10 (ACL)は細胞内コレステロール量を欠乏させることで、転写が活性化された。

第四章 脂肪細胞分化過程における SREBP の発現

SREBP-1 は前駆脂肪細胞である 3T3-L1 細胞が脂肪細胞に分化する過程において、転写レベルで発現が亢進することが報告されている(20)。Spiegelman 等のグループでは 3T3-L1 細胞には SREBP-1c がドミナントに発現し、さらに分化誘導によって SREBP-1c の転写が亢進すると報告している(53)。しかし Brown 等のグループでは SREBP-1a がドミナントであり、分化誘導によって SREBP-1a の転写が亢進すると報告しており(54)、両者の実験結果は異なっている。そこで私は 3T3-L1 細胞に発現している SREBP-1 のアイソフォームを確認した。

SREBP は小胞体膜や核膜に前駆体として局在し、細胞内コレステロール量の低下に伴いプロセッシングを受け、N末端側が核内へと移行し転写因子として機能する。このことから、脂肪細胞への分化過程において SREBP が転写因子としての機能を発揮するためには、コレステロール存在下においてもプロセッシングが起きることが必要になる。すなわち、コレステロールによるプロセッシングの制御とは異なったプロセッシング機構の存在が考えられる。そこでコレステロールによるプロセッシングに関与している S1P、S2P、SCAP 遺伝子および SREBP-2 遺伝子などの転写が脂肪細胞分化過程においてどのような挙動を示すのかも検討した。一方、脂肪細胞への分化過程では SREBP-1 の転写が亢進することは示されているが、タンパク質レベルでの発現は確認されていない。この点に注目し、SREBP-1 のタンパク質レベルでの発現を解析した。

第一節 脂肪細胞分化過程における SREBP-1、SREBP-2 の転写レベルでの発現

(1) 実験材料および実験方法

・3T3-L1 細胞の分化誘導、総 RNA の回収

3T3-L1 細胞の分化誘導は Lane (55) の方法に従った。3T3-L1 細胞を基本培地で培養し、細胞がコンフレントになってから 2 日後を D0 とした。このときから分化誘導培地で培養し、42 時間後に成熟促進培地に交換した。D1 から D6 までと D10 および増殖期の総 RNA を第一章 第一節に準じて回収した。

基本培地 : DMEM + 100 μ M アスコルビン酸 + 10% FCS

分化誘導培地 : 基本培地 + 1 μ M デキサメタゾン

+ 0.5 mM 1-メチル-3-イソブチルキサンチン

+ 10 μ g/ml インスリン

成熟促進培地 : 基本培地 + 5 μ g/ml インスリン

・RT-PCR

3T3-L1 細胞の増殖期および脂肪細胞へ分化誘導後(D10)の RNA およびマウス肝臓由来の RNA より、First-strand cDNA synthesis kit (Pharmacia) を用いて First-strand cDNA を作製した。これをテンプレートにして Fig. 18A に示したプライマー(1a、1c、1ac)を用いて PCR (25 サイクル、94°C 30sec、60°C 30sec、72°C 30sec) を行った。ここで用いたプライマーの塩基配列は以下に示した。反応液を 1.0% アガロースゲルで泳動し、エチジウムブロマイド染色した(Fig. 18B)。PCR 産物を The GeneClean III Kit (Bio 101) により回収し、TA ベクター (Invitrogen) に DNA Ligation Kit (Takara) を用いてライゲーションした(17°C、1時間)。フラグメントの塩基配列は Silver Sequence DNA Sequencing System

(Promega) を用いて決定した。

1a : 5'-ATGGACGAGCTGGCCTTCGG-3'

1c : 5'-CGGACCACGGAGCCATGGAT-3'

1ac : 5'-CTTGGGTCTCCAGGAAGG-3'

・ノーザンブロット

方法は第三章 第二節に準じた。プローブ作製のテンプレートとしては以下に示す DNA 断片を用いた。ハイブリダイゼーションのシグナルは BAS2000 により数値化した。

SREBP-1、SREBP-2、SCAP ではそれぞれのヒトの cDNA をテンプレートにして PCR 法によって増幅した DNA 断片を、S1P、S2P ではそれぞれマウス cDNA をテンプレートにして PCR 法によって増幅した DNA 断片を用いた。それぞれの DNA 断片は、SREBP-1 では 1-630 (630 nt)、SREBP-2 では 1-790 (790 nt)、SCAP では 1-700 (700 nt)、S1P では 501-860 (360 nt)、S2P では 567-909 (343 nt) に対応する。いずれも開始コドンの 1 番目の塩基から数えている。

PPAR γ 2 と 36B4 cDNA は Spiegelman 博士より御供与していただいたものを用いた。プローブとして以下の領域を用いた。

PPAR γ 2 : マウス PPAR γ 2 cDNA を制限酵素 *Eco*RI で切断して得た 0.8Kb の断片

36B4 : マウス 36B4 cDNA を制限酵素 *Pst*I で切断して得た 0.6Kb の断片

(2) 実験結果

Fig.18B に示したように、RT-PCR の結果 3T3-L1 細胞においては SREBP-1a がドミナントに発現していることが明らかになった。また 3T3-L1 細胞を脂肪細胞に分化誘導した D10 においても SREBP-1a がドミナントであり、Brown 等と同様の結果になった。マウス肝臓においては SREBP-1c が高発現していた。

Fig.19 に示したように、脂肪細胞への分化のマーカーである PPAR γ 2 は約 13 倍に誘導された。また SREBP-1 も約 2.3 倍に誘導された。SREBP-2、S1P、S2P、SCAP は発現に大きな変動は認められなかった。

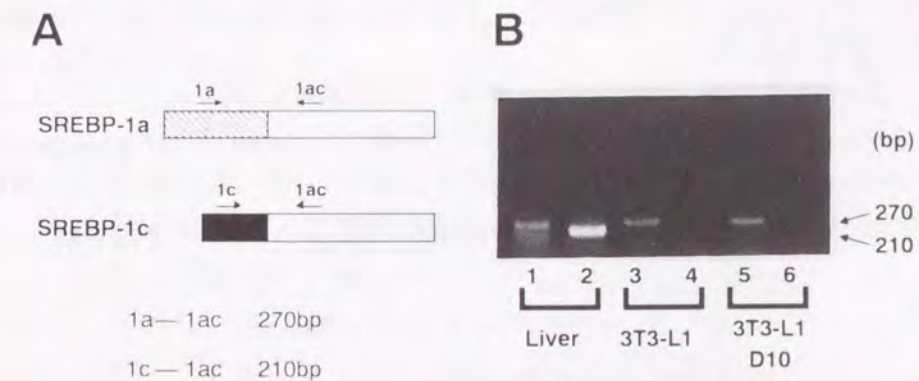


Fig. 18. Expression profile of SREBP-1 splicing variants in 3T3-L1 cells. A, The location of PCR primers and predicted size of the products derived from SREBP-1a and SREBP-1c are shown. B, Gel electrophoretic pattern of PCR products. Template cDNA; Lane 1,2 from mouse liver, Lane 3,4 from 3T3-L1 (proliferation stage), Lane 5,6 from 3T3-L1 (differentiation stage, D10). Primer pairs are 1a and 1ac (Lanes 1,3,5) and 1c and 1ac (Lanes 2,4,6), respectively.

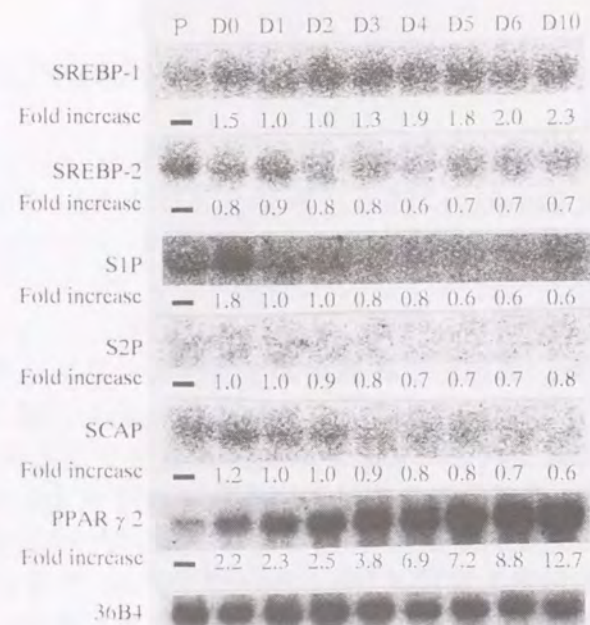


Fig. 19. Induction of SREBP-1a mRNA during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. Twenty- μ g total RNA samples were fractionated on 1% agarose gel, transferred to membrane filters, and hybridized with 32 P-labeled probes. A 36B4 mRNA was used as an internal control to calculate the amounts of mRNAs. P; proliferation.

第二節 脂肪細胞分化過程における SREBP-1、SREBP-2 のタンパク質レベルでの発現変化

(1) 実験材料および実験方法

・抗血清の調製

抗原は pET System (Novagen) を用いて作製した。第一章 第三節で作製したヒト SREBP-2 (1~481A.A.) および、それに準じて作製したマウス SREBP-1a (1~487A.A.) およびヒト SREBP-1a (1~487A.A.) を用いた。発現プラスミドは次のようにして作製した。マウス SREBP-1a タンパク質の 1~487 アミノ酸をコードする DNA 断片が TA ベクター (Invitrogen) に挿入されたプラスミドを制限酵素 *Eco*RI で切断した。この DNA 断片を pET-28c (Novagen) の *Eco*RI 部位に組み込んだ。ヒト SREBP-1a タンパク質の 1~487 アミノ酸をコードする DNA 断片が TA ベクター (Invitrogen) に挿入されたプラスミドを制限酵素 *Eco*RI と *Hind* III で切断した。この DNA 断片を pET-28a (Novagen) の *Eco*RI-*Hind* III 部位に組み込んだ。

精製したヒト SREBP-2 (1~481A.A.) とマウス SREBP-1a (1~487A.A.) およびヒト SREBP-1a (1~487A.A.) (150 μ g/ml) をそれぞれ等量の Freund の complete adjuvant と混合し、Japanese White 雌性ウサギ (約 2 kg) の皮下に投与した。この操作を 2 週間毎に 8 回行い、最終投与から一週間後に耳静脈から血液を採取し、抗血清を得た。

・細胞の回収

3T3-L1 細胞を第四章 第一節に準じて脂肪細胞へ分化させ、第一章 第三節に準じて核抽出液を調製した。

・ウエスタンブロット法

20 μ g の核抽出液を 10% SDS-PAGE により分離後、PVDF 膜に転写した。ヒト

SREBP-2 (1~481A.A.) およびマウス SREBP-1a (1~487A.A.) に対する抗血清および Vista Fluorescence Western blotting kit (Molecular Dynamics) を用いて FluorImager (Molecular Dynamics) により検出した。

(2) 実験結果

3T3-L1 の脂肪細胞への分化過程において、核内の SREBP-1 は約 4 倍に、SREBP-2 は約 3 倍に上昇した (Fig. 20)。

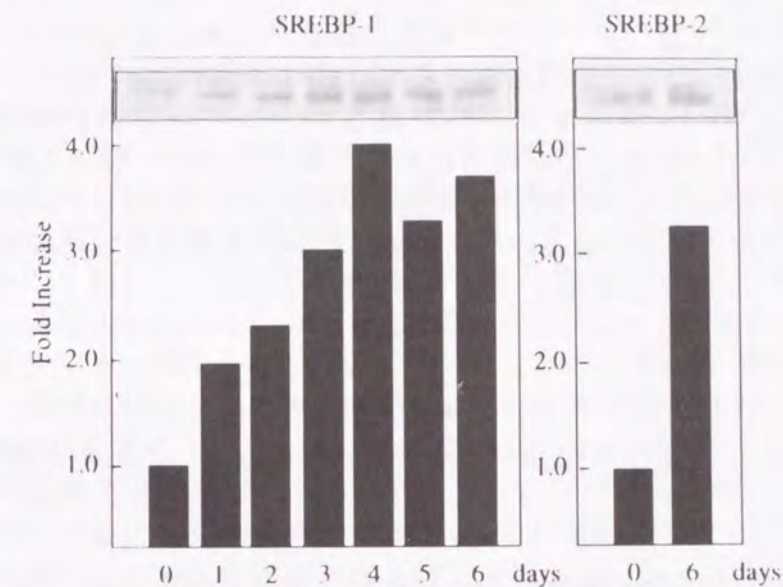


Fig. 20. Increase in the nuclear forms of SREBP-1 and SREBP-2 proteins during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. Twenty- μ g protein of the nuclear extracts was subjected to Western blot analysis using antiserum directed against the NH₂-terminal 487 amino acids of mouse SREBP-1 and NH₂-terminal 481 amino acids of human SREBP-2. The intensity of the bands was measured with a FluorImager (Molecular Dynamics). In three separate experiments essentially the same relative protein levels were obtained.

第三節 考察および小括

(1) 考察

3T3-L1 の脂肪細胞への分化過程において SREBP-1a の転写レベルが上昇することを明らかにした。しかし、タンパク質レベルでは SREBP-1a と SREBP-2 の両方とも核内の成熟体量が増加しており、脂肪細胞への分化過程において SREBP のプロセッシングが亢進していることが示唆された。これは脂質を蓄積した脂肪細胞におけるプロセッシングの亢進であり、現在までに明らかにされている細胞内コレステロール量の減少に伴うプロセッシングとは異なった機構により SREBP のプロセッシングが制御されている可能性が考えられる。さらに S1P、S2P、SCAP などの、コレステロール量に応じたプロセッシングに参与するタンパク質の発現が転写レベルで大きな変動を示さないことから、脂肪細胞への分化過程において SREBP の新規なプロセッシング機構の存在が考えられ

る。

データには示していないが、分化誘導の際に核内に増加する SREBP-2 の成熟体と、3T3-L1 細胞をコレステロール欠乏培地で培養した際に核内に増加する SREBP-2 の成熟体との分子量を比較すると、ウエスタンブロットのレベルではほとんど違いが見られなかった。このことから、脂肪細胞における SREBP のプロセッシングは、コレステロールに応じたプロセッシングの切断部位と同一、またはその近傍であると推察される。

脂肪細胞において SREBP はどのような役割を果たしているのだろうか。3T3-L1 細胞に SREBP-1 の dominant-negative form (多量体は形成するが DNA には結合しない) を発現させることにより内因性の SREBP の機能を欠失させると、脂肪細胞への分化が抑制されることが報告されている(20)。また、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであると考えられている PPAR γ のリガンド量を、SREBP が増加させるという報告もある(56)。しかし SREBP-1 のノックアウトマウスでは脂肪細胞が正常に見られることも報告されており(57)、脂肪細胞への分化過程における SREBP の役割は明らかではない。また、3T3-L1 細胞では SREBP-1a がドミナントであるが、マウスの脂肪細胞においては SREBP-1c がドミナントであることが報告されている(53, 58)。従って脂肪細胞分化のモデル細胞として多用されている 3T3-L1 細胞での知見が、SREBP-1 の機能に関する限り、どこまで *in vivo* を反映しているのか、更に比較検討を進めていく必要があると思われる。

(2) 小括

1. 3T3-L1 において、SREBP-1a がドミナントに発現していることを RT-PCR 法により示した。
2. 3T3-L1 細胞における脂肪細胞への分化過程において SREBP-1a の転写レベルが亢進することを示した。また SREBP-2 遺伝子およびコレステロールにตอบสนองした SREBP のプロセッシングに参与している S1P、S2P、SCAP の発現が、転写レベルで大きく変動していないことを示した。
3. 3T3-L1 細胞における脂肪細胞への分化過程において、SREBP-1a および SREBP-2 の成熟体が核内に増加することを示した。

総括

コレステロールは生体にとって必要不可欠な成分であるが、その摂取量が多すぎると動脈硬化などの原因のひとつになる。そのために生体は細胞内のコレステロール量が過剰になると、コレステロールの合成および血中からの取り込みを転写レベルで制御している。その制御を担う転写調節因子として SREBP が発見された。

SREBP は合成後小胞体膜および核膜に前駆体として局在し、細胞内コレステロールレベルの低下に伴って 2 段階のプロセッシングを受け、N 末端側が切り離され、これが核内へと移行して転写因子として働く。コレステロールによる SREBP の制御は、プロセッシングの段階でのみ行われていると考えられていた。しかし本研究により SREBP-2 遺伝子の転写を SREBP 自身が活性化することを示したことで、コレステロールによる SREBP の制御はプロセッシングの段階だけではなく、SREBP-2 の前駆体量を増加させることによってより効率的に行われるという、新たな機構の存在を示した。

SREBP による転写活性化は、NF-Y または Sp1 といったコピキタスに発現している転写因子と協調的に作用することが必須であると考えられている。本研究により SREBP-2、スクアレン合成酵素、HMG-CoA 合成酵素遺伝子の転写活性化には、SREBP と NF-Y の協調的な作用が必須であることが明らかになった。さらにその転写活性化は、プロモーター上で SREBP と NF-Y の結合配列が 15 塩基から 20 塩基のとき最大になることを示した。現在のところ SREBP は 5' -C/T A C C/T-3' 配列に、NF-Y は CCAAT Box に Sp1 は GC Box に結合すると考えられている。このことから、SREBP はかなり多くの遺伝子のプロモーター領域に結合すると考えられる。しかし転写を活性化するためにはその 15 から 20 塩基離れた位置に、CCAAT Box (または GC Box) が必要であり、これにより特異的な遺伝子を活性化することができると思われる。すなわち SREBP は細胞内のコレステロールレベルのセンサーであり、NF-Y および Sp1 は特異的な遺伝子を活性化するために機能していると推察することができる。

また本研究において SREBP によって転写が活性化される新規な遺伝子のクローニングを行なった。その結果とこれまでの知見を考え合わせると、脂肪酸合成を担うスモールファミリーである MNO、ACL、FAS、ACC の 4 種の遺伝子すべてが、SREBP によって転写調節を受けることが示された。また骨格筋に含まれる M-protein が SREBP によって活性化を受けることが明らかになった。現在のところ、なぜ細胞内のコレステロールレベルに応じて、脂肪酸合成や骨格筋に含まれるタンパク質をコードする遺伝子の転写が調節されるのかは不明である。

最近の報告によると、インスリンにより SREBP-1c の転写およびプロセッシングが亢進し(53)、Fish Oil に含まれるアラキドン酸やリノール酸などの多価不飽和脂肪酸がこれを阻害することが明かにされた(59, 60, 61)。このことから考えると、細胞内コレステロールレベルに応じて脂肪酸合成が調節されるのではなく、それを担う因子が SREBP であるため、コレステロールの低下によって SREBP が活性化されると、その結果として脂肪酸合成に関する遺伝子までもが活性化されると考えることが妥当と思われる。

さらに脂肪細胞への分化過程において、SREBP のプロセッシングが亢進していることを示した。これはコレステロール存在下におけるプロセッシングの亢進であり、新たなプロセッシング機構の存在を示している。このことから SREBP がコレステロール代謝だけでなく、脂肪酸代謝など多岐にわたる機能の調節を担っていると考えられる。

SREBP による転写調節の全貌は未だ明らかになっていない。私は、SREBP-2 遺伝子の自己制御機構を明らかにし、さらに SREBP がコレステロール代謝のみならず、脂質代謝全般を調節することを明らかにした。今回の研究成果は、SREBP の多岐にわたる生理作用の解明に大きく貢献したと考えられる。

結 論

1. SREBP-2 遺伝子の転写が SREBP と NF-Y による協調的な作用によって活性化されることを示した。これによって SREBP-2 遺伝子の転写の自己制御機構を明らかにした。
2. HMG-CoA 合成酵素遺伝子およびスクアレン合成酵素遺伝子の転写が、SREBP と NF-Y による協調的な作用によって活性化されることを示した。また SREBP と NF-Y 結合領域の間隔が 15 から 20 塩基のときその活性化は最大となることを明らかにした。
3. SREBP-1a (1~487A.A.) を発現する細胞株 CHO-487 を用いて、差引きハイブリダイゼーション法を行なった。その結果、SREBP-1a によって転写が誘導される 10 個の遺伝子のクローニングに成功した。
4. 3T3-L1 細胞における脂肪細胞への分化過程において SREBP-1a の転写レベルが亢進し、SREBP-2 の転写レベルが大きく変動しないことを示した。またそのとき、SREBP-1 および SREBP-2 の成熟体が核内に増加することを示した。これにより脂肪細胞への分化過程において SREBP の新規なプロセッシング機構の存在を示した。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始に互ってご指導とご鞭撻を賜りました、大阪大学薬学部教授、恩師 前田 正知 先生に篤く御礼申し上げます。

研究途上、有益なご助言とご配慮をいただきました、東京大学農学部助教授、佐藤隆一郎 先生に深く感謝いたします。

また、本研究にあたり、種々ご指導を頂きました大阪大学薬学部助手、寺田 知行 先生に感謝の意を表すと共に、実験に熱心に御協力頂きました、大阪大学薬学部、坂井祐子修士、宮本 亘修士、岡本 章裕修士、安倍 紀学士、林崎 由佳学士さらに討論に参加して頂きました大阪大学薬学部分子生物学講座の皆様に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり御協力を頂きました、東京大学農学部教授、清水 誠 先生に深く感謝いたします。

RNase Protection Assay を行うにあたり、御協力いただきました東京大学先端研教授、児玉龍彦博士、並びに川辺良樹博士に深く感謝いたします。

NF-YB 抗体を御供与いただきましたミラノ大学、Mantovani, R. 博士に深く感謝します。

差引きハイブリダイゼーション法を行うにあたり、ご指導いただきました神戸大学医学部教授、江本憲昭博士に深く感謝します。

最後に、在学中の経済的支援を賜りました、日本育英会ならびに日本学術振興会に感謝いたします。

引用文献

1. Bloch, K. (1965) *Science* **150**, 19-28
2. Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1986) *Science* **232**, 34-47
3. Bilheimer, D.W., Grundy, S.M., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 4124-4128
4. Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1990) *Nature* **343**, 425-430
5. Briggs, M.R., Yokoyama, C., Wang, X., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 14490-14496
6. Smith, J.R., Osborne, T.F., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Gil, G. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 18480-18487
7. Wang, X., Briggs, M.R., Hua, X., Yokoyama, C., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 14497-14504
8. Yokoyama, C., Wang, X., Briggs, M.R., Admon, A., Wu, J., Hua, X., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1993) *Cell* **75**, 187-197
9. Hua, X., Yokoyama, C., Wu, J., Briggs, M.R., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11603-11607
10. Bennett, M.K., Lopez, J.M., Sanchez, H.B., and Osborne, T.F. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 25578-25583
11. Kawabe, Y., Sato, R., Matsumoto, A., Honda, M., Wada, Y., Yazaki, Y., Endo, A., Takano, T., Itakura, H., and Kodama, T. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **219**, 515-520
12. Lopez, J.M., Bennett, M.K., Sanchez, H.B., Rosenfeld, J.M., and Osborne, T.F. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 1049-1053
13. Wang, X., Sato, R., Brown, M.S., Hua, X., and Goldstein, J.L. (1994) *Cell* **77**, 53-62
14. Sato, R., Yang, J., Wang, X., Evans, M.J., Ho, Y.K., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 17267-17273
15. Hua, X., Sakai, J., Ho, Y.K., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 29422-29427
16. Sakai, J., Rawson, R.B., Espenshade, P.J., Cheng, D., Seegmiller, A.C., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1998) *Mol. Cell* **2**, 505-514
17. Rawson, R.B., Zelenski, N.G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M.T., Chang, T.Y., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1997) *Mol. Cell* **1**, 47-57
18. Hua, X., Nothurfft, A., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1996) *Cell* **87**, 415-426
19. Sheng, Z., Otani, H., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 935-938
20. Kim, J.B. and Spiegelman, B.M. (1996) *Genes & Dev.* **10**, 1096-1107
21. Gey, G.O., Coffman, W.D., and Kubicek, M.T. (1952) *Cancer Res.* **12**, 264-265
22. Scherer, W.F., Syverton, J.T., and Gey, G.O. (1953) *J. Exp. Med.* **97**, 695-710
23. Johnson, K.A., Morrow, C.J., Knight, G.D., and Scallen, T.J. (1994) *J. Lipid Res.* **35**, 2241-2253
24. Chomczynski, P. (1993) *BioTechniques* **15**, 532-537
25. Kawabe, Y., Shimokawa, T., Matsumoto, A., Honda, M., Wada, Y., Yazaki, Y., Endo, A., Itakura, H., and Kodama, T. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**, 405-411
26. Kawabe, Y., Honda, M., Wada, Y., Yazaki, Y., Suzuki, T., Ohba, Y., Nabata, H., Endo, A., Matsumoto, A., Itakura, H., and Kodama, T. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 1460-1467
27. Frohman, M.A., Dush, M.K., and Martin, G.R. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8998-9002
28. Lund, E. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**, 5813-5826
29. Chen, C. and Okayama, H. (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2745-2752
30. Sudhof, T.C., van der Westhuyzen, D.R., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Russell, D.W. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 10773-10779
31. Shimano, H., Horton, J.D., Shimomura, I., Hammer, R.E., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1997) *J. Clin. Invest.* **99**, 846-854
32. Horton, J.D., Shimomura, I., Brown, M.S., Hammer, R.E., Goldstein, J.L. and Shimano, H. (1998) *J. Clin. Invest.* **101**, 2331-2339
33. Jiang, G., McKenzie, T.L., Conrad, D.G. and Shechter, I. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 12818-12824
34. Gil, G., Smith, J.R., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1863-1866
35. Guan, G., Jiang, G., Koch, R.L. and Shechter, I. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 21958-21965
36. Ericsson, J., Jackson, S.M., Lee, B.C., and Edwards, P.A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 945-950
37. Dooley, K.A., Bennett, M.K. and Osborne, T.F. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 5285-5291
38. Ericsson, J., Jackson, S.M., and Edwards, P.A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 24359-24364
39. Sanchez, H.B., Yieh, Lynn., and Osborne, T.F. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 1161-1169
40. Yieh, L., Sanchez, H.B., and Osborne, T.F. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6102-6106
41. Dooley, K.A., Millinder, S. and Osborne, T.F. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 1349-1356
42. Courey, A.J., and Tjian, R. (1988) *Cell* **55**, 887-898
43. Li, X.-Y., van Huijsduijnen, D.A., Mantovani, R., Benoist, C., and Mathis, D. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 8984-8990
44. Wang, Z. and Brown, D.D. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 11505-11509
45. Tabor, D.E., Kim, J.B., Spiegelman, B.M. and Edwards, P.A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 20603-20610
46. Diamond, R.H., Du, K., Lee, V. M., Mohn, K.L., Haber, B.A. Tewari, D.S. and Taub, R. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 15185-15192
47. Peng, Y., Schwarz, E.J., Lazar, M.A., Genin, A., Spinner, N.B. and Taub R. (1997) *Genomics* **43**, 278-284
48. Nose, K., Saito, H. and Kuroki, T. (1990) *Cell Growth Differ.* **268**, 15185-15192
49. Vinkemeier, U., Obermann, W., Weber, K. and Furst, D. O. (1993) *J. Cell. Sci.* **106**, 319-330
50. Steiner, F., Weber, K. and Furst, D. O. (1998) *Genomics* **49**, 83-95
51. Bagchi, S., Wise, L. S., Brown, M.L., Bregman, D., Sul, H.S. and Rubin, C.S. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 1558-1565
52. Elshourbagy, N.A., Near, J.C., Kmetz, P.J., Sathe, G.M., Southan, C., Strickler, J.E., Gross, M., Young, J.F., Wells, T. N.C. and Groot, P.H.G. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 1430-1435
53. Kim, J.B., Sarraf, P., Wright, M., Yao, K.M., Mueller, E., Solanes, G., Lowell, B.B. and Spiegelman, B.M. (1998) *J. Clin. Invest.* **101**, 1-9
54. Shimomura, I., Bashmakov, Y., Shimano, H., Horton, J.D., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12354-12359
55. Lin, F.T. and Lane, M.D. (1992) *Genes & Dev.* **6**, 533-544
56. Kim, J.B., Wright, H.M., Wright, M. and Spiegelman, B.M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 4333-4337
57. Shimano, H., Shimomura, I., Hammer, R.E., Herz, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S. and Horton, J.D. (1997) *J. Clin. Invest.* **100**, 2115-2124
58. Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J.D., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1997) *J. Clin. Invest.* **99**, 838-845
59. Worgall, T.S., Sturley, S.L., Seo, T., Osborne, T.F. and Deckelbaum, R.J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 25537-25540
60. Kim, H.-J., Takahashi, M. and Ezaki, O. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 25892-25898
61. Xu, J., Nakamura, M.T., Cho, H.P. and Clarke, S.D. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 23577-23583

