

## 論文内容要旨

報告番号	甲 栄 第 261 号	氏名	香川 知博
題 目	Sterol regulatory element binding protein 1 trans-activates 25-hydroxy vitamin D <sub>3</sub> 24-hydroxylase gene expression in renal proximal tubular cells (ステロール応答領域結合タンパク質1は腎近位尿細管細胞において25-水酸化ビタミンD <sub>3</sub> 24-水酸化酵素遺伝子の転写を活性化する)		
<p><b>【背景】</b> 活性型ビタミンD(1,25(OH)<sub>2</sub>D)の血中濃度は、25-水酸化ビタミンD<sub>3</sub>-1<math>\alpha</math>-水酸化酵素(CYP27B1) および25-水酸化ビタミンD<sub>3</sub>-24水酸化酵素(CYP24A1)により厳密に調節されている。また、古くから甲状腺疾患患者においてビタミンD代謝異常生じることが報告されている。CYP27B1遺伝子に着目した先行研究では、3,3',5-tri-iodothyronine (T<sub>3</sub>)及び甲状腺ホルモン受容体は、CYP27B1遺伝子プロモーター上の負のT<sub>3</sub>応答領域(1<math>\alpha</math>-nTRE)を介して転写レベルでその発現を抑制すること、更に1<math>\alpha</math>-nTREは、ステロール応答領域結合タンパク(SREBP)によるCYP27B1遺伝子の転写活性化に必須なステロール応答エレメント(1<math>\alpha</math>-SRE)と重複しており、CYP27B1はSREBP1によって正の転写制御を受けることを明らかにした。一方、腎臓でのCYP24A1のmRNA発現は、血中1,25(OH)<sub>2</sub>D濃度の低下がみられるT<sub>3</sub>投与動物において有意に低下することを併せて見出した。しかしながら、CYP24A1の発現調節に対するSREBP1の関与は不明であり、本研究ではCYP24A1遺伝子を対象としたSREBP1による転写制御機構について検討した。</p> <p><b>【方法・結果】</b> フクロネズミ腎近位尿細管細胞株(OK-P)に対し、CYP24A1プロモーター配列を組込んだ用いたルシフェラーゼレポータープラスミドを導入した。その結果、SREBP1アイソフォーム(1cおよび1c)はともにマウスおよびヒトCYP24A1プロモーター活性を強力に誘導した。また、1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>を添加することにより、SREBP1cによる転写活性の誘導は相加的に増加した。次に、OK-Pにプロモーターの長さが異なるレポータープラスミドをそれぞれ導入し転写活性を測定した実験において、SREBP1cによるCYP24A1の転写活性誘導は転写開始点上流-217bと-122bの領域の欠失により著明に低下した。この領域において、SRE応答配列と推定されるエレメントを複数同定した(pSRE1~3)。これらの配列をそれぞれ<math>\gamma</math>-32Pによりラベルしゲルシフトアッセイにより検討した結果、1つのSRE応答配列においてSREBP1が特異的に結合することを確認した。このSRE配列に変異を施したレポータープラスミドでは、SREBP1cによる転写活性の誘導は明らかに低下した。ヒト近位尿細管上皮細胞株(HKC-8)にSREBP1特異的siRNAを作用させるによりSREBP1cおよびSREBP1aの発現をノックダウンした場合、リアルタイムPCR法により測定されるCYP24A1のmRNA発現は同様に低下した。さらに、T<sub>3</sub>を投与したマウスにおいては用量依存的に腎臓のSREBP1cの遺伝子発現は低下するが、同時にCYP24A1の発現も用量依存的に抑制されることが明らかとなった。</p> <p><b>【結論】</b> SREBP1は腎近位尿細管細胞においてCYP24A1遺伝子の転写を活性化し、CYP27B1同様にそのプロモーター領域に存在するSRE応答配列を介した転写調節が行われることが明らかとなった。また、甲状腺ホルモンによるビタミンD代謝の制御には、腎臓における直接的なCYP27B1遺伝子発現制御と、SREBP1の発現調節を介したCYP24A1遺伝子の間接的な制御が関与しており、両酵素の発現調節によって血中1,25(OH)<sub>2</sub>D濃度が規定されることが考えられた。</p>			

報告番号	甲 栄 第 261 号	氏名	香川 知博
審査委員	主査 宮本 賢一 副査 二川 健 副査 阪上 浩		
題目	Sterol regulatory element binding protein 1 trans-activates 25-hydroxy vitamin D <sub>3</sub> 24-hydroxylase gene expression in renal proximal tubular cells (ステロール応答領域結合タンパク質1は腎近位尿細管細胞において25-水酸化ビタミンD <sub>3</sub> 24-水酸化酵素遺伝子の転写を活性化する)		
著者	Tomohiro Kagawa, Mina Kozai, Masashi Masuda, Nagakatsu Harada, Otoki Nakahashi, Mari Tajiri, Ryohei Yoshikawa, Mari Nakao, Yuichiro Takei, Masayuki Iwano, Eiji Takeda, Yutaka Taketani, Hironori Yamamoto		
	平成 30 年 6 月発行 Biochemical and Biophysical Research Communications 第 500 巻第 2 号 275~282ページに発表済		
要旨	<p>本研究は、活性型ビタミンD代謝酵素である25-水酸化ビタミンD<sub>3</sub>-24-水酸化酵素(CYP24A1)の遺伝子発現調節機構についてステロール応答領域結合タンパク質1(SREBP1)を介した転写活性化機構を明らかにしたものである。CYP24A1は、ビタミンDの24位に水酸基を導入する酵素であり、活性型ビタミンDを不活性型に代謝し、血中の活性型ビタミンD濃度を厳密に調節する上で重要な働きを持つ。本研究では、CYP24A1遺伝子プロモーター上にあるステロール応答領域(SRE)を同定するとともに、SREBP1を介した転写活性調節機構について検討を行った。フクロネズミ腎近位尿細管細胞株(OK-P)に対し、マウスおよびヒトCYP24A1プロモーターを組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドとともにSREBP1aおよびSREBP1cを導入したところ、いずれのSREBPもCYP24A1プロモーターを強力に活性化した。次いで、プロモーターのデリーション解析により3つのSREの候補配列SRE1、SRE2、SRE3を見い出した。ゲルシフトアッセイにより解析したところこれらのうちの1つであるSRE1に対してSREBP1が特異的に結合することを明らかにした。また、ヒト近位尿細管上皮細胞株(HKC-8)を用い、SREBP1aおよびSREBP1cの発現を同時にノックダウンできる特異的なsiRNAを導入させたところ、CYP24A1の遺伝子発現が抑制された。さらに、マウスに甲状腺ホルモンを投与すると用量依存的にSREBP1cのmRNA発現が低下するとともにCYP24A1のmRNA発現が低下することを見い出した。以上のことから、SREBP1は、CYP24A1の遺伝子発現を活性化することが明らかとなった。</p> <p>本研究は、SREBP1がCYP24A1遺伝子の転写を活性化する機構として、プロモーター上にSREを同定し、実際にSREBP1が結合することにより転写が活性化することを明らかにした研究である。血中の活性型ビタミンD濃度は、様々な栄養素やホルモンにより調節されており、脂質代謝調節に関わるSREBP1によるCYP24A1の発現調節機序を明らかにすることは、生体内のビタミンDの役割を理解する上で重要な意義があることから、博士(栄養学)の学位授与に値すると判定した。</p>		