

平成11年度厚生科学研究費補助金
(長寿科学総合研究事業)

研 究 報 告 書

トランスジェニックマウスを用いた老化関連
代謝疾患の成因解明と、予防法に関する研究

主任研究者 江崎 治
山田信博
山本徳男
門脇 孝

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
（総括）研究報告書

トランスジェニックマウスを用いた老化関連代謝疾患の成因解明と、予防法に関する研究

（主任）研究者 江崎 治 国立健康・栄養研究所臨床栄養部長

老化に伴い骨格筋量が減少し、内臓性脂肪が蓄積してくる。これに伴い、インスリン抵抗性が発症し、糖尿病、肥満、高脂血症、動脈硬化症といった疾患が増加する。この成因と予防法を明らかにするため、糖質／脂質代謝に影響を与える遺伝子を導入したトランスジェニックマウスやノックアウトマウスを作成し、どの組織のどの遺伝子異常が個体レベルで糖脂質代謝にどのような影響を与えているか調べた。

〔研究組織〕

江崎 治（国立健康・栄養研究所 臨床栄養部 部長）
山田信博（筑波大学臨床医学系内科代謝内分泌学講座 教授）
山本徳男（東北大学遺伝子実験施設 教授）
門脇 孝（東京大学医学部糖尿病・代謝内科 講師）

クアウトマウスを作成し、どの組織のどの遺伝子異常が個体レベルで糖脂質代謝にどのような影響を与えているか明らかにする。これらの結果を基に、老化に多く認められる疾患の成因や予防法を明らかにする。インスリン抵抗性発症遺伝子に関する研究について山田が、インスリン抵抗性の新しい治療法に関して江崎が、肥満とエネルギー代謝に関しては門脇と江崎が、高脂血症に関しては山本が、担当した。

A. 研究目的

高齢者になると骨格筋量が減少し、そのかわりに脂肪量が増加してくる。80代になると、30代の時に比べ、筋肉量が30～40%減少する。さらに悪いことに、脂肪の中でもたちの悪い内臓脂肪が増加することが知られていて、生活習慣病（糖尿病・高脂血症・高血圧症・動脈硬化症等）の主要な発症原因になっている。

本研究では、これらの成因を明らかにするため、糖質／脂質代謝に影響を与える遺伝子を導入したトランスジェニックマウスやノッ

B. 研究方法

1) 糖尿病

高齢者による耐糖能悪化の成因の1つにインスリン抵抗性の発症が知られている。本態性高血圧症のモデル動物として知られ、同時に高インスリン血症、耐糖能異常、高中性脂肪血症や内臓脂肪蓄積を呈し危険因子重複症候群のモデル動物でもあるSpontaneously Hypertensive Rats(SHR)のインスリン抵抗性

原因遺伝子を同定する。このためQLT解析、cDNA subtraction法、Differential Display法、Radiation hybrid mappingによるcDNAクローンの染色体上での局在決定、及び、変異の有無を調べる目的でcDNAの塩基配列を調べ、SHRとWKYラット間で比較する。次いで、単離された原因遺伝子について遺伝子ターゲティングを行い新たな病態モデル動物を作製し、虚血性心疾患の危険因子が重複する分子病態を解析する。

筋肉、脂肪組織 (WAT、BAT) に特異的に発現している糖輸送体 (GLUT4) は、末梢組織での糖代謝の律速段階になっていて、この量の変化は、個体でのインスリン感受性に直接影響を与える。実際、高脂肪食による糖尿病の発症が糖輸送体 (GLUT4) の筋肉組織での2倍程度の過剰発現により完全に防止できるため、GLUT4蛋白の発現機序が明らかになり、GLUT4量を増加させることができれば寝たきり老人や、高齢者にとり、非常に有益である。運動 (筋肉) や、T3処理 (筋肉) により、GLUT4mRNAは増加し、高脂肪食 (WAT)、絶食 (WAT)、糖尿病 (筋肉、WAT)、除神経 (筋肉) ではGLUT4mRNAが減少する。江崎らは、各種ミニジーンGLUT4欠失ミュータントを持つ、トランスジェニックマウス (-7396, -3238, -2001, -1001, -701, -551, -442, -423) を作成し、運動や高脂肪食に反応するシスエレメントや組織特異的発現調節エレメントを推定した。又、ゲルシフト、フットプリント法を用いて今年度はより細かい分析を行った。

2) 肥満/エネルギー代謝

転写因子で核内受容体であるPPAR γ は脂肪細胞の分化に必須の役割を担っている。インスリン抵抗性改善薬のチアゾリジン誘導体はPPAR γ の活性を亢進させ、脂肪細胞の分化が

促進し小型の脂肪細胞が増加することにより、インスリン抵抗性が改善することを先に明らかにしている。しかしながら、分化が活発には生じていないと考えられる成人の脂肪組織が高脂肪食などの環境因子により肥大しインスリン抵抗性が惹起される際PPAR γ がどのような役割を担っているかは不明であった。脂肪細胞の肥大化やそれに伴うインスリン抵抗性の惹起におけるPPAR γ の役割を明らかにするため、PPAR γ 欠損マウスを作製し表現型を解析するとともに新規化合物HX531の糖代謝に対する作用を検討した。

(1) 発生工学的手法を用いてPPAR γ 欠損マウスを作製しその表現型を解析した。

(2) 核内受容体に結合する新規化合物であるHX531のPPAR γ 転写活性に対する作用を検討するとともにKKAYマウスに投与し、体重や糖代謝に対する生理的作用を検討した。

脱共役蛋白質 (UCP) は脂肪酸の化学的エネルギーを熱として放散し、脂肪蓄積量を減少させる可能性が示唆される。江崎は、この遺伝子を脂肪組織特異的なエンハンサー (aP2エンハンサー) をそれぞれに組み入れたコンストラクトを作成し、トランスジェニックマウスを得た後、全身及び各組織の糖質・脂質代謝への影響を検討した。

3) 動脈硬化/高脂血症

山本は、アポEを結合する特異的なレセプターを2つ同定した。1つはVLDLレセプター、もう一つはアポEレセプター2と名付け、これらのダブルノックアウトマウスを作成し、その機序を明らかにした。

(倫理面への配慮)

研究所内での動物取り扱い基準に従って、動物実験を行っている。又、動物に痛みを与えないようにネンブタール麻酔を行ってから、

屠殺している。

C. 研究結果

1) 糖尿病

インスリン抵抗性の原因遺伝子の探索

SHRの脂肪細胞でのインスリン刺激後の糖取り込みを指標として、SHRのインスリン抵抗性の原因遺伝子座を第4および第12番染色体上にマッピングした。SHRで特異的に発現に変化を生じているmRNAを上記方法にてスクリーニングし、Northern blot法による解析の結果、120のクローンに関して発現量の差異が確認できた。データベース(GenBank Blast Search)にない、新規のクローンとして68クローンが得られた。

マウスやヒト染色体とのsyntenyあるいはradiation hybrid mappingの結果、4番染色体の当該領域にはインターロイキン6(IL-6)、内皮由来一酸化窒素合成酵素(eNOS)、L型カルシウムチャンネル(Cchl-2a)、脂肪酸輸送担体(Cd36/FAT)遺伝子が、また12番染色体の当該領域には、インスリン受容体(INS-R)、インスリン受容体基質-3(IRS-3)遺伝子の局在が明らかとなった。Cd36遺伝子を除き、SHRとWKYラット間でcDNAの塩基配列に有意な差異は認められなかった。

Cd36遺伝子にSHRに見られるインスリン抵抗性の主要な原因ではないものと結論された。

GLUT4を介したインスリン抵抗性解除法の開発

ミニジーンGLUT4の発現の組織特異性を検討した。-7396、-3238、-2001、-1001、-701、-551のトランスジェニックマウスでは、内因性と同様に、骨格筋・脂肪組織(白色・褐色)・心筋において発現が認められた。しかし、-442、-423のトランスジェニックマウス

では、骨格筋・脂肪組織(白色)・心筋においては発現が認められたが、褐色脂肪組織での発現が認められなかった。よって、-551と-442の間に褐色脂肪組織に特異的なエンハンサーが存在することがわかった。-423では、筋肉における発現に必要であるとされるMEF2を含まないにも関わらず、筋肉での発現が認められた。

次に、運動に反応するシスエレメントの同定を行った。トランスジェニックマウス(各コンストラクト2系統づつ)にスイミング(30分間、4回/日)を約2週間行わせ、腓腹筋におけるミニジーン発現への運動の効果を、RNase protection法にて、ミニジーンGLUT4mRNAと内因性GLUT4mRNAとの比較により検討した。-7396、-3238、-2001、-1001、-701、-551のトランスジェニックマウスでは、内因性GLUT4mRNA、ミニジーンGLUT4mRNAの両方の増加が認められた。しかし、-442、-423のトランスジェニックマウスでは内因性GLUT4mRNA量は運動によって増加したが、ミニジーンGLUT4mRNA量は増加しなかった。さらに、この領域内で、F1:-551~-527、F2:-531~-502、F3:-506~-470、F4:-476~-438の4つのフラグメントを作成し、マウスの筋肉から抽出した核蛋白を用いてゲルシフト・競合アッセイを行った。その結果、F1とF2では弱いですが、F3とF4には強く結合する特異的な蛋白質が存在することが分かった。

又、これらのトランスジェニックマウスを用いて、高脂肪食に反応するシスエレメントの同定を行った。各トランスジェニックマウスをそれぞれ2群に分けて、高炭水化物食(脂肪エネルギー比10%)、高脂肪食(サフラワー油、脂肪エネルギー比60%)で3カ月間飼育し、ミニジーンGLUT4mRNAと内因性GLUT4

mRNAを別々に定量した。脂肪組織におけるGLUT4mRNA量の低下は、-7396、-3238、-2001、-1001、-701のトランスジェニックマウスでは、内因性GLUT4mRNA、ミニジーンGLUT4mRNAともに認められた。しかし、-551、-442のトランスジェニックマウスでは、内因性GLUT4mRNA量が低下していたにも関わらず、ミニジーンGLUT4mRNA量は低下しなかった。よって、高脂肪食に反応するシスエレメントが-701と-551の間に存在することがわかった。次に、高脂肪食に反応するシスエレメントが存在している-700~-442の領域内で、F1：-750~-551 (200bp) とF2：-593~-394 (200bp) の2つのフラグメントを作成し、マウスの脂肪組織から抽出した核蛋白を用いてフットプリントを行ったところ、F1のWF1：-706~-681とWF2：-675~-653に蛋白質の結合領域が認められた。

一方、運動のシスエレメントと比較するため、腓腹筋における除神経に反応するシスエレメントを検討した。作成したトランスジェニックマウスの片足の座骨神経を切除し、もう片足をコントロールとした。-7396、-3238、-1001、-701、-551、-442、-423のミニジーンについて除神経を行ったところ、全てのトランスジェニックマウスにおいて、内因性、ミニジーンGLUT4mRNA量ともに低下していた。よって、除神経によるGLUT4発現低下に関与するシスエレメントは、運動に反応するシスエレメントとは異なり、-423より下流に存在することがわかった。内因性と外来性GLUT4mRNAレベルの和は、Non-Tgマウス、及び-701、-442、-423のいずれのTgマウスの骨格筋においても、T3投与群で約1.3倍に有意に増加した一方、外来性GLUT4の遺伝子発現は、-701Tgマウスの骨格筋でのみT3投与によって約1.5

倍に有意に増加したが、-442、-423Tgマウスの骨格筋ではT3投与による影響を受けなかった。

2) 肥満/エネルギー代謝

PPAR γ ノックアウトマウスの作成

PPAR γ ホモ欠損マウスは胎生致死であった。PPAR γ ヘテロ欠損マウスは普通食下では異常を認めなかったが、高脂肪食下での脂肪の蓄積と脂肪細胞の肥大化が抑制されており、インスリン抵抗性を来しにくい傾向にあった。PPAR γ ヘテロ欠損マウスは高脂肪食下では野生型に比べ摂食量の減少と直腸温の上昇が認められた。PPAR γ ヘテロ欠損マウスは野生型に比べ脂肪細胞が小型で白色脂肪組織重量が少ないにも関わらず脂肪細胞でのレプチンの発現や血中レプチン濃度の上昇が認められた。

RXR antagonistの作用

HX531はチアゾリジン誘導体によるPPAR γ RXRヘテロダイマー転写活性上昇作用を抑制し、RXRのantagonistとして働くことが分かった。HX531tはKKAyマウスにおいて高脂肪食下での体重増加と脂肪細胞の肥大化、インスリン抵抗性の惹起を抑制した。HX531は脂肪細胞におけるlipoprotein lipaseの発現を抑制し、エネルギー消費量を増大させることが分かった。

UCP2トランスジェニックマウスの作成

UCP2トランスジェニックマウスでは、子宮周囲白色脂肪、後腹膜白色脂肪、および肩甲間褐色脂肪組織で外因性UCP2 mRNAが発現していた(内因性の約1.5倍~2倍)。高炭水化物食の摂取では、トランスジェニックマウスとノントランスジェニックマウスの間に有意な変化は認められなかった。一方、高脂肪食摂取下ではノントランスジェニックマウスで肥満が認められたのに対し、UCP2過剰発現トラ

ンスジェニックマウスでは体重増加の抑制が認められた。以上の結果から、UCP2はin vivoにおいてもエネルギー消費亢進に寄与している可能性が強く示唆された。UCP2はヒトでの発現が認められていることから、UCP2を増加させることはヒトの肥満・糖尿病発症の予防および治療に有効であると考えられる。

3) 動脈硬化/高脂血症

アポEレセプター2及びVLDLレセプターのダブルノックアウトマウスの作成

アポEレセプター2の単独欠損はマウスの表現型に大きな影響を与えないが、VLDLレセプターとアポEレセプター2が共に欠損するダブルノックアウトマウスは大きく異なっている。2つのレセプターが欠損したマウスはまともに歩けず常に左にこけたり、右にこけるといふよたつた足取りを取ることが明らかになった。このような表現系はリーラーとかよたりマウスと呼ばれるミュータントと同じで、解剖学的にもこれらの3つのマウスの脳は、共に大脳皮質の発生に異常が認められた。これらの結果から、リポタンパクレセプターと脳のシグナル伝達系との関連が初めて示された。

D. 考察

世界的に現在、糖尿病や高血圧症などの多因子性疾患の原因遺伝子の解明が大きな課題となっており、またインスリン抵抗性の亢進がこれらの疾患発症とその結果生ずる虚血性心疾患発症への関与で特に危険因子重複症候群として注目されている。しかし現在迄の所、所謂candidate gene approachを用いたこれらの多因子性疾患の原因遺伝子の探索は成功しておらず、新たな手法の導入が必要とされている。今回、QTL解析によりSHRの脂肪細胞におけるインスリン抵抗性のQTLを4番および1

2番染色体上に同定し、特にその4番染色体領域にはSHRにおける危険因子重複症候群様症状の主たる原因遺伝子(群)が存在することが示唆され、この領域の原因遺伝子の同定および単離が、危険因子重複症候群の遺伝的成因を考える上で重要な手掛かりを与えるものと考えられた。

GLUT4の研究から、-423ミニジーンGLUT4の中に、筋肉及び白色脂肪組織特異的なシスエレメントが存在することがわかった。褐色脂肪組織特異的なエンハンサーが-551と-442の間に存在することがわかり、白色脂肪や筋肉特異的なエレメントと分離できた。高脂肪食に反応するシスエレメントが-701と-551の間に存在した。運動に反応するエレメントが-551と-442の間に存在することがわかり、転写因子を同定するためのシスエレメントをin vivoにおいて同定できることが明らかになった。又、運動によるGLUT4発現増加のシスエレメントと除神経に反応するシスエレメントが異なったことから、運動によるGLUT4発現増加への神経性因子の関与は否定的であると考えられた。T3応答にはマウスGLUT4プロモーターの-442間での領域だけでは十分でなく、-701~-442の領域が必須であることが示された。

高脂肪食下でヘテロ欠損マウスでは脂肪細胞の肥大化やインスリン抵抗性の出現が野生型に比べ抑制されていたことから、野生型PPAR γ は高脂肪食での脂肪細胞肥大化やインスリン抵抗性を媒介しており、儉約遺伝子(thrifty gene)と考えられた。PPAR γ 活性を低下させる薬剤は新たなインスリン抵抗性改善薬として用いることが出来る可能性が示唆された。

脱共役蛋白質UCP2もUCP1と同じように熱消

費を亢進し、抗肥満作用を示すことが明らかにされた。UCP2は脂肪組織を中心にいろいろな組織で発現しているため、UCP2の発現量を亢進させることは人に対する抗肥満の新しい治療法として注目される。

VLDLレセプターとアポEレセプター2のダブルノックアウトマウスは、*reln* (*reelin*)や*dab1* (*mammalian disabled-1*)をそれぞれ欠損するリーラマウスやよたりマウスと同一の表現型を示すことが明らかとなった。リーラマウスの異常はリーリンと呼ばれる細胞接着因子が異常で、よたりマウスはDabと呼ばれるリン酸化タンパクに異常がある。大脳皮質の発達過程で、脳室層 (*ventricular zone*) より分化したニューロンは*radial glia*と呼ばれるグリア細胞に従って遊走し、脳の皮質層へ移動し、Cajal-Ratzius細胞の分泌するリーリンにより安定し、高度に組織化された皮質の層構造ができると考えられている。リーリンやDabの異常や、VLDLレセプターとアポEレセプター2のダブルノックアウトマウスではこの過程に異常があるためにニューロンが正しく配置できず、スクランブルエッグ) のようになってしまう。さらに、VLDLRと apoER2はアポEとともにリーリンも結合し、細胞内に取り込むこと。VLDLRと apoER2の細胞質ドメインのNPXY配列はDabと結合することより、VLDLRと apoER2はリーリンを結合し、その結果、Dabのリン酸化が起こり、リーリン・Dabシグナル系を動かし、ニューロンの遊走移動と配置を調節する可能性が示された。さらに、リーラマウスやダブルノックアウトマウスではタウの過リン酸化が起こることが示され、アルツハイマーとのリンケージの可能性がでてきた。

E. 結論

今年度は、発生工学的手法を用いて、高齢者の代謝異常の解明、治療法の開発に関し、顕著な進歩が認められた。SHRラットのインスリン抵抗性原因遺伝子の探索、インスリン抵抗性の予防に関してGLUT4発現調節領域の分析、PPAR γ のノックアウトマウスの作成、脳に発現するアポEレセプター2とVLDLレセプターのダブルノックアウトマウスの作成など多くの進展があった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Nobuyo Tsunoda, Kayo Maruyama, David W. Cooke, Daniel M. Lane, and Osamu Ezaki. Localization of exercise- and denervation-responsive elements in the mouse GLUT4 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000 267:744-751.

2) Ezaki O., Takahashi M., Shigematsu T., Shimamura K., Kimura J., Ezaki H., and Gotoh T. Long-term effects of dietary α -linolenic acid from perilla oil on serum fatty acids composition and on the risk factors of coronary heart disease in Japanese elderly subjects. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 1999 45:759-772.

3) Takahashi M., Ikemoto S., Ezaki O. Effect of fat /carbohydrate ratio in the diet on obesity and oral glucose tolerance in C57BL/6J mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 1999 45:583-593.

4) Kubota N., Terauchi Y., Miki H.,

- Teramoto H., Yamauchi T., Komeda K., Satoh S., Nakano R., Ishii C., Sugiyama T., Eto K., Tsubamoto Y., Okuno A., Murakami K., Sekihara H., Hasegawa G., Naito M., Toyoshima Y., Tanaka S., Shiota K., Kitamura T., Fijita T., Ezaki O., Aizawa S., Nagai R., Tobe K., Kimura S., Kadowaki T. PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Molecular Cell*, 1999 4:597-609.
- 5) Kim H., Takahashi M., and Ezaki O. Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down regulation of SREBP-1C mRNA in mouse liver; A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs. *J. Biol. Chem.* 1999 274:25892-25898.
- 6) Tsuboyama-Kasaoka N., Tsunoda N., Maruyama K., Takahashi M., Kim H., Cooke DW., Lane MD, Ezaki O. Overexpression of GLUT4 in mice caused up-regulation of UCP3 mRNA in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999 258:187-193.
- 7) Tsuboyama-Kasaoka N., Takahashi M., Kim H., and Ezaki O. Up-regulation of liver uncoupling protein-2 mRNA by either fish oil feeding or fibrate administration in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999 253:879-885.
- 8) Gotoda T, Lizuka Y, Kato N, Osuga J, Bihoreau MT, Murakami T, Yamori Y, Shimano H, Ishibashi S, Yamada N. Absence of Cd36 mutation in the original spontaneously hypertensive rats with insulin resistance. *Nat Genet* 22, 226-8, 1999
- 9) Tozawa R, S Ishibashi, J Osuga, H Yagyu, T Oka, Z Chen, K Ohashi, S Perrey F Shionoiri, N Yahagi, K Harada, T Gotoda, Y Yazaki, and N Yamada. Embryonic Lethality and Defective Neural Tube Closure in Mice Lacking Squalene Synthase. *J Biol Chem* 274, 30843-30848, 1999.
- 10) Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Osuga J, Harada K, Ohashi K, Shionoiri F, Iizuka Y, Tamura Y, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. Sterol Regulatory Element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem* 274, 35832-35839, 1999
- 11) Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N. A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 274, 35840-35844, 1999

- 12) Osuga J-I, Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A, Shionoiri F, Yahagi N, Kraemer FB, Tsutsumi O, Yamada N. Targeted disruption of hormone sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obeisty. Proc. Natl. Acad. Sci. U SA. 97, 787-92, 2000.
- 13) Sato, A., Shimada, Y., Herz, J., Yamamoto, T and Jingami, H. (1999) 39-kDa receptor-associated protein (RAP) facilitates secretion and ligand binding of extracellular region of very-low-density-lipoprotein receptor: implication for a distinct pathway from low-density lipoprotein receptor. Biochem. J., 341. 377-383.
- 14) Motoi, Y., Iwasaki, T., Hattori, H., Aizawa, T., Haga, S., Nakamura, S., Wakabayashi, K., Takahashi, H., Yamamoto, T., and Ikeda, K. (1999) Neuronal apolipoprotein E receptor 2 immunoreactivity in Alzheimer's disease. Alzheimer's Reports 2 87-91.
- 15) Ogata, N., Chikazu, D., Kubota, N., Terauchi, Y., Tobe, K., Azuma, Y., Ohta, T., Kadowaki, T., Nakamura, K., and Kawaguchi, H. : Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover. J.Clin. Invest., in press, 2000
- 16) Ravier, M.A., Eto, K., Jonkers, F.C., Nenquin, M., Kadowaki, T., and Henquin, J.C. : The oscillatory behaviour of pancreatic islets from mice with mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase knockout. J.Biol. Chem. 275: 1578-1584, 2000
- 17) Terauchi, Y., Kubota, N., Tamemoto, H., Sakura, H., Nagai, R., Akanuma, Y., Kimura, S., and Kadowaki, T. : Insulin effect during embryogenesis determines fetal growth. : a possible molecular link between birth weight and susceptibility to type 2 diabetes. Diabetes 40: 82-86, 2000
- 18) Kadowaki, T., Kubota, N., Terauchi, Y., Miki, H., Tamemoto, H., Yamauchi, T., Komeda, K., Tobe, K., and Kimura, S. : Role of PPAR γ in high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. Common Disease - Genetic and Pathogenic Aspects of Multifactorial Diseases Uehara Memorial Foundation Symposium-1999, 79-89, 1999
- 19) Eto, K., Suga, S., Wakui, M., Tsubamoto, Y., Terauchi, Y., Akanuma, Y., Aizawa, S., Noda, M., Kimura, S., Kasai, H., and Kadowaki, T. : NADH shuttle system regulates KATP channel-dependent pathway and steps distal to [Ca²⁺]_i elevation in glucose-induced insulin secretion. J.Biol.Chem., 274: 25386-25392, 1999

20) Suzuki, H., Terauchi, Y., Fujiwara,
M., Aizawa, S., Yazaki, Y., Kadowaki, T.
and Koyasu, S.: Xid-like
immunodeficiency in mice with disruption
of the p85a subunit of phosphoinositide
3-kinase. Science 283: 390-392, 1999

トランスジェニックマウスを用いたGLUT4発現調節の解明と、糖尿病予防法に関する研究

（主任）研究者 江崎 治 国立健康・栄養研究所臨床栄養部長

GLUT4（糖輸送体）の発現調節機序を明らかにするため、5'領域の長さの異なる8種類のトランスジェニックマウスを作成し、運動、甲状腺ホルモン、除神経、高脂肪食に反応するシスエレメントのゲノム上の位置を推定した。aP2プロモーターを用いてUCP2を脂肪組織特異的に過剰発現するトランスジェニックマウスを作成し、UCP2の過剰発現が抗肥満作用を示すことを明らかにした。

A. 研究目的

近年の栄養摂取過剰の傾向により、肥満、糖尿病、高脂血症のいわゆる生活習慣病が増加してきている。この原因として脂肪摂取量の増加が疑われている。今までの研究により、この高脂肪食による糖尿病の発症が糖輸送体（GLUT4）の筋肉組織での2倍程度の過剰発現により完全に防止できることを示した（ProNAS, 1995）。実際、運動がGLUT4の発現量を筋肉組織で増加させ糖尿病を改善することからGLUT4を増加させる重要なトランスエレメントの存在は明白である（ProNAS, 1995）。運動のできない糖尿病患者でも、薬物治療によりGLUT4量を増加することができれば、運動をしなくても運動と同じ効果が得られ、非常に有用と思われる。このため、GLUT4蛋白の発現機序が明らかにし、GLUT4量を増加させる方法を見出すことを試みる。又、甲状腺ホルモンは、GLUT4mRNAを増加することが知られている。この反応に関与するシスエレメントの同定を試みる。

生体膜の主要構成成分である脂質の変化や細胞内の脂質代謝異常は、糖尿病や高脂血症などの生活習慣病の発症に関与することが想定され

ている。褐色脂肪組織に存在するUncoupling protein-1 (UCP1) は、エネルギー消費/熱産生を高め肥満を予防することが知られている。しかし、ヒトでは褐色脂肪組織の存在量が少ないことからその機能が疑問視されてきた。一方、UCP2は広範な組織に発現し、ヒトでも発現が認められていることから注目されているが、未だにin vivoにおける機能は解明されていない。本研究では、in vivoでUCP2の機能を解明するため脂肪組織特異的にUCP2を過剰発現するトランスジェニックマウスを作成し、肥満および糖尿病の発症を防止できるか否か解析する。

B. 研究方法

A) GLUT4遺伝子の運動及び甲状腺ホルモンに反応するシスエレメントと高脂肪食に反応するシスエレメントを明らかにするため、転写開始点より-7396、-3238、-2001、-1001、-701、-551、-442及び-423の8種類のGLUT4ミニジェントランスジェニックマウスを作成した。更に同定された領域のフラグメント（オリゴヌクレオチド）をP³²でラベルし、マウスの筋肉や脂肪

組織より抽出した核蛋白を用いて、フットプリント法にて蛋白の結合する領域を狭め、次にゲルシフト法にてその領域に結合している蛋白質が、運動、高脂肪食により異なるか調べた。

B) UCP2のcDNAを脂肪組織特異的なαP2エンハンサーに組み入れたコンストラクトを作成し、マウスの受精卵にマイクロインジェクションしてトランスジェニックマウスを作成した。外因性UCP2のmRNA発現量はノーザンブロット法を用いて測定した。11週齢のトランスジェニックマウスとその同腹ノントランスジェニックマウスに高脂肪食（脂肪エネルギー比 60%）または、高炭水化物食（脂肪エネルギー比 10%）を与え約6ヵ月間飼育した。飼育期間中、糖負荷試験、インスリン負荷試験を行った。

（倫理面への配慮）

研究所内での動物取り扱い基準に従って、動物実験を行っている。又、動物に痛みを与えないようにネブタール麻酔を行ってから、屠殺している。

C. 研究結果

A) ミニジーンGLUT4の発現の組織特異性を検討した。-7396、-3238、-2001、-1001、-701、-551のトランスジェニックマウスでは、内因性と同様に、骨格筋・脂肪組織（白色・褐色）・心筋において発現が認められた。しかし、-442、-423のトランスジェニックマウスでは、骨格筋・脂肪組織（白色）・心筋においては発現が認められたが、褐色脂肪組織での発現が認められなかった。よって、-551と-442の間に褐色脂肪組織に特異的なエンハンサーが存在することがわかった。-423では、筋肉における発現に必要であるとされるMEF2を含まないにも関わらず、筋肉での発現が認められた。

次に、運動に反応するシスエレメントの同定を行った。トランスジェニックマウス（各コンストラクト2系統づつ）にスイミング（30分間、4回/日）を約2週間行わせ、腓腹筋におけるミニジーン発現への運動の効果を、RNase protection法にて、ミニジーンGLUT4mRNAと内因性GLUT4mRNAとの比較により検討した。-7396、-3238、-2001、-1001、-701、-551のトランスジェニックマウスでは、内因性GLUT4mRNA、ミニジーンGLUT4mRNAの両方の増加が認められた。しかし、-442、-423のトランスジェニックマウスでは内因性GLUT4mRNA量は運動によって増加したが、ミニジーンGLUT4mRNA量は増加しなかった。さらに、この領域内で、F1：-551~-527、F2：-531~-502、F3：-506~-470、F4：-476~-438の4つのフラグメントを作成し、マウスの筋肉から抽出した核蛋白を用いてゲルシフト・競合アッセイを行った。その結果、F1とF2では弱いが、F3とF4には強く結合する特異的な蛋白質が存在することが分かった。

又、これらのトランスジェニックマウスを用いて、高脂肪食に反応するシスエレメントの同定を行った。各トランスジェニックマウスをそれぞれ2群に分けて、高炭水化物食（脂肪エネルギー比10%）、高脂肪食（サフラワー油、脂肪エネルギー比60%）で3ヵ月間飼育し、ミニジーンGLUT4mRNAと内因性GLUT4mRNAを別々に定量した。脂肪組織におけるGLUT4mRNA量の低下は、-7396、-3238、-2001、-1001、-701のトランスジェニックマウスでは、内因性GLUT4mRNA、ミニジーンGLUT4mRNAともに認められた。しかし、-551、-442のトランスジェニックマウスでは、内因性GLUT4mRNA量が低下していたにも関わらず、ミニジーンGLUT4mRNA量は低下しなかった。よって、高脂肪食に反応するシスエレメントが-701と-551の間に存在することがわかった。次

に、高脂肪食に反応するシスエレメントが存在している-700~-442の領域内で、F1：-750~-551 (200bp) とF2：-593~-394 (200bp) の2つのフラグメントを作成し、マウスの脂肪組織から抽出した核蛋白を用いてフットプリントを行ったところ、F1のWF1：-706~-681とWF2：-675~-653に蛋白質の結合領域が認められた。

一方、運動のシスエレメントと比較するため、腓腹筋における除神経に反応するシスエレメントを検討した。作成したトランスジェニックマウスの片足の座骨神経を切除し、もう片足をコントロールとした。-7396、-3238、-1001、-701、-551、-442、-423のミニジーンについて除神経を行ったところ、全てのトランスジェニックマウスにおいて、内因性、ミニジーンGLUT4_m RNA量ともに低下していた。よって、除神経によるGLUT4発現低下に関与するシスエレメントは、運動に反応するシスエレメントとは異なり、-423より下流に存在することがわかった。内因性と外来性GLUT4_m RNAレベルの和は、Non-Tgマウス、及び-701、-442、-423のいずれのTgマウスの骨格筋においても、T3投与群で約1.3倍に有意に増加した一方、外来性GLUT4の遺伝子発現は、-700Tgマウスの骨格筋でのみT3投与によって約1.5倍に有意に増加したが、-442、-423Tgマウスの骨格筋ではT3投与による影響を受けなかった。

B) UCP2トランスジェニックマウスでは、子宮周囲白色脂肪、後腹膜白色脂肪、および肩甲間褐色脂肪組織で外因性UCP2 mRNAが発現していた（内因性の約1.5倍~2倍）。高炭水化物食の摂取では、トランスジェニックマウスとノントランスジェニックマウスの間に有意な変化は認められなかった。一方、高脂肪食摂取下ではノントランスジェニックマウスで肥満が認められたのに対し、UCP2過剰発現ト

ランスジェニックマウスでは体重増加の抑制が認められた。以上の結果から、UCP2は*in vivo*においてもエネルギー消費亢進に寄与している可能性が強く示唆された。UCP2はヒトでの発現が認められていることから、UCP2を増加させることはヒトの肥満・糖尿病発症の予防および治療に有効であると考えられる。

D. 考察

GLUT4の研究から、-423ミニジーンGLUT4の中に、筋肉及び白色脂肪組織特異的なシスエレメントが存在することがわかった。褐色脂肪組織特異的なエンハンサーが-551と-442の間に存在することがわかり、白色脂肪や筋肉特異的なエレメントと分離できた。高脂肪食に反応するシスエレメントが-701と-551の間に存在した。運動に反応するエレメントが-551と-442の間に存在することがわかり、転写因子を同定するためのシスエレメントを*in vivo*において同定することが明らかになった。又、運動によるGLUT4発現増加のシスエレメントと除神経に反応するシスエレメントが異なったことから、運動によるGLUT4発現増加への神経性因子の関与は否定的であると考えられた。これらの結果より、T3応答にはマウスGLUT4プロモーターの-442間での領域だけでは十分でなく、-701~-442の領域が必須であることが示された。-701~-442の領域にはTREのhalf-siteが3カ所とEボックスが存在することから、これらの配列がT3の応答に関わっていることが推定された。TRのホモダイマー、あるいはTR-RXRのヘテロダイマーは、TREのhalf-siteが、間に4bpのスペースをあけて2個並んだダイレトリピート (DR4) に結合することが知られており、-488~-473に位置するTREは特にT3の応答に関わっている可能性が高い。

脱共役蛋白質UCP2もUCP1と同じように熱消費を亢進し、抗肥満作用を示すことが明らかにされた。UCP2は脂肪組織を中心にいろいろな組織で発現しているため、UCP2の発現量を亢進させることは人に対する抗肥満の新しい治療法として注目される。

E. 結論

GLUT4の発現調節領域が狭められ、ゲルシフト、フットプリント法により運動、高脂肪食、交感神経、及びT3に反応するシスエレメントの分析が進んだ。

各組織別の脂肪蓄積への全身への影響を調べるため、脂肪蓄積を防ぐと思われる脱共役蛋白質(UCP2)を脂肪組織特異的に過剰発現させるトランスジェニックマウスを作成した。この結果、脱共役蛋白質(UCP2)が肥満防止に関与している結果を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Nobuyo Tsunoda, Kayo Maruyama, David W. Cooke, Daniel M. Lane, and Osamu Ezaki. Localization of exercise- and denervation-responsive elements in the mouse GLUT4 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000 267:744-751.

2) Ezaki O., Takahashi M., Shigematsu T., Shimamura K., Kimura J., Ezaki H., and Gotoh T. Long-term effects of dietary α -linolenic acid from perilla oil on serum fatty acids composition and on the risk factors of coronary heart disease in Japanese elderly subjects. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 1999 45:759-772.

3) Takahashi M., Ikemoto S., Ezaki O. Effect of fat /carbohydrate ratio in the diet on obesity and oral glucose tolerance in C57BL/6J mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 1999 45:583-593.

4) Kubota N., Terauchi Y., Miki H., Teramoto H., Yamauchi T., Komeda K., Satoh S., Nakano R., Ishii C., Sugiyama T., Eto K., Tsubamoto Y., Okuno A., Murakami K., Sekihara H., Hasegawa G., Naito M., Toyoshima Y., Tanaka S., Shiota K., Kitamura T., Fijita T., Ezaki O., Aizawa S., Nagai R., Tobe K., Kimura S., Kadowaki T. PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Molecular Cell*, 1999 4:597-609.

5) Kim H., Takahashi M., and Ezaki O. Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down regulation of SREBP-1C mRNA in mouse liver; A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs. *J. Biol. Chem.* 1999 274:25892-25898.

6) Tsuboyama-Kasaoka N., Tsunoda N., Maruyama K., Takahashi M., Kim H., Cooke DW., Lane MD, Ezaki O. Overexpression of GLUT4 in mice caused up-regulation of UCP3 mRNA in skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999 258:187-193.

7) Tsuboyama-Kasaoka N., Takahashi M., Kim H., and Ezaki O. Up-regulation of liver uncoupling protein-2 mRNA by either fish oil feeding or fibrate administration in mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999 253:879-885.

2. 学会発表

1) N. Tsunoda, K. Maruyama, M. Takahashi, D. W. Cooke, M. D. Lane, and O. Ezaki Possible high-fat diet-responsible element(s) in mouse GLUT4 gene. 8th Asian Congress of Nutrition 1999

2) N. Tsuboyama-Kasaoka, M. Takahashi, H-J. Kim, and O. Ezaki Up-regulation of liver uncoupling protein-2 (UCP-2) mRNA by either fish oil feeding or fibrate administration in mice. 8th Asian Congress of Nutrition 1999

3) 角田伸代、坪山宜代、江崎治 トランスジェニックマウスを用いた運動によるGLUT4遺伝子発現増加機序の解析 第42回日本糖尿病学会年次学術集会 1999

4) 高橋真由美、池本真二、江崎治 食事中のn-6系油脂含量が肥満及び耐糖能に及ぼす影響 : C57BL/6Jマウスを用いた検討 第53回日本栄養・食糧学会大会 1999

5) 江崎治、高橋真由美 高齢者に於ける α -リノレン酸、少量(3g/日)長期投与(10ヶ月)の生体への影響 第53回日本栄養・食糧学会大会 1999

6) 角田伸代、丸山佳代、江崎治 運動によるGLUT4(糖輸送体)遺伝子発現調節機序の解析 第53回日本栄養・食糧学会大会 1999

7) 木下直子、坪山宜代、高橋真由美、川野因、江崎治 トレッドミル運動による骨格筋UCP3の発現調節 第53回日本栄養・食糧学会大会 1999

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

インスリン抵抗性の原因遺伝子の探索 ：SHR ラットを用いた解析

山田信博（筑波大学臨床医学系内科教授）

高脂血症や高血圧、肥満、糖尿病は、遺伝素因のある個体にライフスタイルの悪化という環境要因が加わり発症し、しばしば重複することにより動脈硬化性疾患の原因となっている。これを危険因子重複症候群と呼ぶが、その背景にはインスリン抵抗性が関与していると考えられている。インスリン抵抗性の新たな病態モデル動物の作製を最終的な目的とするが、本年度は本態性高血圧症のモデル動物でありインスリン抵抗性も呈する Spontaneously Hypertensive Rats(SHR)に関する解析を行った。

キーワード：冠危険因子、インスリン抵抗性

A. 研究目的

危険因子重複症候群を呈する新たな病態モデル動物の作製を目的とし、分子遺伝学的手法を用いてその背景にあるインスリン抵抗性の原因遺伝子の単離・同定を行う。具体的には、本態性高血圧症のモデル動物として知られ、同時に高インスリン血症、耐糖能異常、高中性脂肪血症や内臓脂肪蓄積を呈し危険因子重複症候群のモデル動物でもある Spontaneously Hypertensive Rats(SHR)のインスリン抵抗性原因遺伝子を同定する。次いで、単離された原因遺伝子について遺伝子ターゲティングを行い新たな病態モデル動物を作製し、虚血性心疾患の危険因子が重複する分子病態を解析する。

B. 研究方法

QTL 解析：SHRとその対照のWKYラットを交配し F1 世代を得た後、F1 同士の交配により F2 群を、また SHR への戻し交配により Back Cross(BC)群を得、これら全てのラットより後腹膜脂肪細胞を単離し、in vitro でのインスリン添加後のグルコースの取り込みを調べた。これらの値に有意な連鎖を示す遺伝子座(QTL: Quantitative Trait Loci)をマイクロサテライトマーカーを用いた全ゲノムのスクリーニングにより調べた。

cDNA subtraction 法と Differential Display 法による検討：SHRとその対照のWKYラットより後腹膜脂肪組織を単離後 in vitro で脂肪細胞を

培養し、インスリン添加の前後で脂肪細胞より RNA を単離し、SHR とWKY の間でインスリン添加の後で特異的に発現に変化を生じる mRNA を cDNA subtraction 法と Differential Display 法を用いてクローニングした。実際の発現量の差異は、Northern blot 法により確認した。

Radiation hybrid mapping による cDNA クローンの染色体上での局在決定：上記の方法によりクローニングされた多数の既知および新規 cDNA クローンの染色体上での局在を、マウスやヒト染色体との synteny あるいは Goodfellow らによる radiation hybrid panel を用い決定した。

候補遺伝子の cDNA 塩基配列の解析：染色体上での局在から原因遺伝子の候補と考えられた幾つかの遺伝子に関して、変異の有無を調べる目的で cDNA の塩基配列を調べ、SHR とWKY ラット間で比較した。

C. 研究結果

1. SHR の脂肪細胞でのインスリン刺激後の糖取り込みを指標として、SHR のインスリン抵抗性の原因遺伝子座を第 4 および第 12 番染色体上にマッピングした。特に第 4 染色体の当該領域には他にも、平均動脈血圧、血中中性脂肪および HDL コレステロール値、そしてカテコールアミン刺激後の脂肪分解に連鎖する QTL も局在することが明らかとなった。

2. SHR で特異的に発現に変化を生じている mRNA を上記方法にてスクリーニングし、800 以上の独立した cDNA クローンが得られ、そのうち約 60% が新規のクローンであった。Northern blot 法による解析の結果、120 のクローンに関

して発現量の差異が確認できた。それらの内、既知のものとしては、stearoyl-CoA desaturase、fibronectin、Cd36/ FAT などの cDNA 断片を含む 52 クローンが得られた。データベース (GenBank Blast Search) にない、新規のクローンとして 68 クローンが得られた。

3. マウスやヒト染色体との synteny あるいは radiation hybrid mapping の結果、4 番染色体の当該領域にはインターロイキン 6 (IL-6)、内皮由来一酸化窒素合成酵素 (eNOS)、L 型カルシウムチャンネル (Cchl-2a)、脂肪酸輸送担体 (Cd36/FAT) 遺伝子が、また 12 番染色体の当該領域には、インスリン受容体 (INS-R)、インスリン受容体基質-3 (IRS-3) 遺伝子の局在が明らかとなった。Cd36 遺伝子を除き、SHR とWKY ラット間で cDNA の塩基配列に有意な差異は認められなかった。

4. Cd36 遺伝子は、4 番染色体の当該領域近傍に位置し、その mRNA の発現量が Charles River 社由来の SHR では特異的に低下していることより、当初は原因遺伝子の有力な候補と考えられた。実際に、この SHR strain の Cd36 遺伝子には mRNA のスプライシング異常につながる大きな欠失変異も認められた。しかし、Charles River 社由来の SHR と同等、あるいはむしろより強いインスリン抵抗性を呈する日本のオリジナルの SHR strain (SHR/Izm) にはそのような Cd36 遺伝子変異は認められず、4 番染色体の当該領域の詳細な比較により、本変異は米国に供与された SHR が NIH での繁殖中に自然発生的に生じた欠失変異であり、SHR に見られるインスリン抵抗性の主要な原因ではないものと結論

された。

5. 染色体の局在の上から 4 番と 12 番染色体のインスリン抵抗性の QTL の原因とは明らかに異なるが、SHR で他に報告されている高血圧などの QTL 領域に位置する複数の新規 cDNA クローンが得られている。

D. 考察及び結論

世界的に現在、糖尿病や高血圧症などの多因子性疾患の原因遺伝子の解明が大きな課題となっており、またインスリン抵抗性の亢進がこれらの疾患発症とその結果生ずる虚血性心疾患発症への関与で特に危険因子重複症候群として注目されている。しかし現在迄の所、所謂 candidate gene approach を用いたこれらの多因子性疾患の原因遺伝子の探索は成功しておらず、新たな手法の導入が必要とされている。今回、QTL 解析により SHR の脂肪細胞におけるインスリン抵抗性の QTL を 4 番および 12 番染色体上に同定し、特にその 4 番染色体領域には SHR における危険因子重複症候群様症状の主たる原因遺伝子(群)が存在することが示唆され、この領域の原因遺伝子の同定および単離が、危険因子重複症候群の遺伝的成因を考える上で重要な手掛かりを与えるものと考えられた。

cDNA subtraction と radiation hybrid mapping を中心とした解析により、一時 Cd36 遺伝子が 4 番染色体 QTL の有力な原因候補遺伝子と考えられたが、Cd36 遺伝子変異をもつ SHR/Ncrj は変異をもたない SHR/Izm よりもむしろ糖の取り込みは有意に亢進し、血中インスリン値も低い傾向が見られ、この Cd36 遺伝子変異は SHR に見られるインスリン抵抗性の主要な原因ではないものと考えられた。恐らくは、4 番染色体

の Cd36 遺伝子の近傍に SHR/Ncrj と SHR/Izm に共通な別の原因遺伝子が存在していることが予想された。

他に報告されている QTL 領域に位置する幾つかの新規 cDNA クローンは得られているが、4 番と 12 番染色体の SHR のインスリン抵抗性の QTL 領域には、残念ながらまだ有力な新規 cDNA クローンは同定されていない。また、染色体の synteny により知られている幾つかの既知の候補遺伝子の cDNA の塩基配列にも異常は見つかっていない。

E. 研究発表

1. 論文発表

- ① Gotoda T, Lizuka Y, Kato N, Osuga J, Bihoreau MT, Murakami T, Yamori Y, Shimano H, Ishibashi S, Yamada N. Absence of Cd36 mutation in the the original spontaneously hypertensive rats with insulin resistance. *Nat Genet* 22, 226-8, 1999.
- ② Tozawa R, S Ishibashi, J Osuga, H Yagyu, T Oka, Z Chen, K Ohashi, S Perrey, F Shionoiri, N Yahagi, K Harada, T Gotoda, Y Yazaki, and N Yamada. Embryonic Lethality and Defective Neural Tube Closure in Mice Lacking Squalene Synthase. *J Biol Chem* 274, 30843-30848, 1999.
- ③ Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Osuga J, Harada K, Ohashi K, Shionoiri F, Iizuka Y, Tamura Y, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. Sterol Regulatory Element-binding protein-1 as a

key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes.

J Biol Chem 274, 35832–35839, 1999.

④ Yahagi N, Shimano H, Hastay AH, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N. A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 274, 35840–35844, 1999.

⑤ Osuga J-I, Ishibashi S, Oka T, Yagyu H, Tozawa R, Fujimoto A, Shionoiri F, Yahagi N, Kraemer FB, Tsutsumi O, Yamada N. Targeted disruption of hormone sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97, 787–92, 2000.

脂質代謝疾患に関係する遺伝子のクローニング及びアポEリポタンパクレセプターノックアウトマウスの作製

(分担) 研究者 山本徳男 東北大学遺伝子実験施設 教授

要 旨

アポリポタンパクE (アポE) に特異的な超低密度リポタンパク質 (VLDL) レセプターとアポEレセプター2は人類で最も頻度の高い家族性高コレステロール血症の原因遺伝子であるLDLレセプターとほぼ同一の構造を持ち、VLDLレセプターは筋肉細胞や脂肪細胞に高く発現するのに対し、アポEレセプター2は脳特異的で、共にLDLレセプターの発現する肝臓には発現しない。VLDLレセプターとアポEレセプター2が共に欠損すると、*reln* (*reelin*) や *dabl* (*mammalian disabled-1*) をそれぞれ欠損するリーラーマウスやよたりにマウスと同一の表現型を示すことが示され、脳の発達に重要な機能を持つことが明らかになった。

A. 研究目的

リポタンパクは血中の脂質の輸送担体で、特異的なレセプターにより結合され、細胞内に脂質が輸送され、代謝される。コレステロール輸送を担う低密度リポタンパク (LDL) はLDLレセプターにより、結合されて、細胞内に取り込まれ代謝され、LDLレセプターの異常は人類で最も頻度の高い遺伝病の一つである家族性高コレステロール血症の原因で、動脈硬化を伴っている。LDLレセプターにより取り込まれたコレステロールは細胞膜合成やステロイドホルモン、胆汁酸の合成に利用される他、体内のコレステロール調節を制御する。

アポEはリポタンパクの主要アポタンパクで、肝臓と脳に高く発現し、体内のコレステロールと中性脂肪の輸送担体である。アポEはLDLレセプターにも結合されるが、家族性高コレステロール血症の解析から、アポE特異的レセプターの存在が示唆され、

超低密度リポタンパク質 (VLDL) レセプターとアポEレセプター2がcDNAクローニングにより明らかにされた。2つのアポEレセプターの遺伝子構造はLDLレセプターとほぼ同一で、共通の祖先から由来したことが予測されている。また、ほ乳動物ではVLDLレセプターは筋肉細胞や脂肪細胞に、アポEレセプター2は脳に最も高く発現するが、2つのレセプターは共に肝臓に発現しない。

鳥類ではVLDLレセプターは主として卵巣の卵母細胞に検出され、肝臓で合成分泌される卵黄前駆体の取り込みを担うことがミュータントの解析により明らかにされた。このニワトリミュータントは、ヒトの家族性高コレステロール血症同様に、重篤な高脂血症を引き起こすことも明らかにされた。さらに、VLDLレセプターは昆虫にも存在し、飛翔に必要なエネルギー代謝に重要であることが示された。