

VLDLレセプターを欠損するノックアウトマウスでは、リポ蛋白プロファイルや血中コレステロール、中性脂肪濃度、繁殖はすべて、正常と変わらないが、脂肪細胞の脂質含量の顕著に減少し、脂肪組織重量も半減して、VLDLレセプターが脂肪細胞への脂質の取り込みを担っている可能性が示されている。また、脳に特異的なアポEレセプター2は脳の中樞神経系におけるコレステロール輸送を担うことが示唆されている。本研究では2つのアポEレセプターの個体レベルの役割を明らかにすることを目的としている。

B. 実験方法

Sambrookらの常法に従ってcDNAと遺伝子を単離し、解析した。レセプター活性はLDLレセプター欠損ldlA-7細胞にcDNAを発現し、 ^{125}I 、もしくは蛍光DiI標識リポタンパクを用いて解析した。総RNAはGTC/CsCl法を用いて調製し、mRNA量はノザンプロットイングにより解析した。PCRは常法に従い、反応産物はアガロースゲルを用いた電気泳動により解析した。免疫化学的方法は常法に従った。

C. 結果

2つのアポEレセプターの機能

まず、アポEレセプター2の役割を明らか

かにするために、ノックアウトマウスを作製した。マウス遺伝子を単離し、ターゲティング・ベクターを作製し、ES細胞に導入したのちにアポEレセプター2遺伝子を部分欠損するES細胞を得、これを用いてキメラマウスを作製し、最終的にアポEレセプター2遺伝子を部分欠損するノックアウトマウスを作製し、確立することに成功した。アポEレセプター2の欠損はマウスの発生や成長、行動、外観、繁殖は変わらず、血中脂質もあまり変化しないことが示された。

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、右にこけるといっ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3つのマウス脳は同じで、共に大脳皮質の発生に異常がある。これらの結果は全く意外で、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

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ー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。リーラー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、リーラー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

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

VLDLレセプターとアポEレセプター2の二重欠損は、*reln* (*reelin*) や*dab1* (*mammalian disabled-1*)の欠損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。

F. 研究発表

1. Kim, D. H., Magoori, K., Inoue, T. R., Mao, C. C., Kim, H. J., Suzuki, H., Fujita, T., Endo, Y., Saeki, S., and Yamamoto, T. T. (1997). Exon/intron organization, chromosome localization, alternative splicing, and transcription units of the human apolipoprotein E receptor 2 gene. *J Biol Chem* 272, 8498-504.
2. Kang, M. J., Fujino, T., Sasano, H., Minekura, H., Yabuki, N., Nagura, H., Iijima, H., and Yamamoto, T. T. (1997). A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2880-4.
3. Fujino, T., Man-Jong, K., Minekura, H., Suzuki, H., and Yamamoto, T. T. (1997). Alternative translation initiation generates acyl-CoA synthetase 3 isoforms with heterogeneous amino termini. *J Biochem* 122, 212-6.

4. Minekura, H., Fujino, T., Kang, M. J., Fujita, T., Endo, Y., and Yamamoto, T. T. (1997). Human acyl-coenzyme A synthetase 3 cDNA and localization of its gene (ACS3) to chromosome band 2q34-q35. *Genomics* 42, 180-1.
5. Kim, Hyoun-Ju. et al. Evolution of the Apolipoprotein E Receptor 2 Gene by Exon Loss. *J. Biochem.*124.451-456(1998)
6. Iijima, Hiroaki. et al. Expression and Characterization of a Very Low Density Lipoprotein Receptor Variant Lacking the O-Linked Sugar Region Generated by Alternative Splicing. *J. Biochem.*124.747-755(1998)
7. Tomita, Yasuhiro. et al. A Novel Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein with Type II Membrane Protein -Like Structure Is Abundant in Heart. *J. Biochem.*124.784-789(1998)
8. Oikawa, Eisaku. et al. A Novel Acyl-CoA Synthetase, ACS5, Expressed in Intestinal Epithelial Cells and Proliferating Preadipocytes. *J. Biochem.*124.679-685(1998)
9. Kim, Dong-Ho. et al. A New Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein, LRP5, Is Expressed in Hepatocytes and Adrenal Cortex, and Recognizes Apolipoprotein E. *J. Biochem.*124.1072-1076(1998)
10. Ishii, Hirofumi. et al. cDNA Cloning of a New Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein and Mapping of Its Gene (LRP3) to Chromosome Bands 19q12-q13.2. *GENOMICS.*51.132-135(1998)
11. 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.
12. 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.

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）

分担研究報告書

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
分担研究者 門脇 孝 東京大学大学院医学系糖尿病・代謝内科 講師

研究要旨

わが国における糖尿病人口は現在690万人と推定され急速な増加を示しておりその原因を究明することが急務となっている。一般の2型糖尿病はインスリン分泌不全やインスリン抵抗性の遺伝因子と肥満や運動不足などの環境因子が重なって発症する多因子病である。我々は発生工学的手法を用いてインスリン分泌・インスリン抵抗性・肥満に関与する遺伝子を欠損モデル動物を作製し、それらをかけ合わせたり、環境因子を負荷することにより、多因子病としての2型糖尿病の分子メカニズムを解析した。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

(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。

(3)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。

（倫理面への配慮）

研究に供した実験動物は適切な環境下で飼育し、実際の実験においては苦痛のないよう速やかな処理を行うなど動物愛護上の配慮を行った。

C. 研究結果

(1)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。

(3)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。HX531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。

D. 考察

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。

E. 結論

PPAR γ 遺伝子は儉約遺伝子と考えられ、その活性や量の部分的低下は高脂肪食による肥満や2型糖尿病の発症を抑制する可能性がありPPAR γ 活性を抑制する薬剤による治療が期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1.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

2.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

3.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

4.**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

5.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 K_{ATP} channel-dependent pathway and steps distal to $[Ca^{2+}]_c$ elevation in glucose-induced insulin secretion.

J.Biol.Chem., 274: 25386-25392, 1999

6.Suzuki, H., Terauchi, Y., Fujiwara, M., Aizawa, S., Yazaki, Y., **Kadowaki, T.** and Koyasu, S.: Xid-like immunodeficiency in mice with disruption of the p85 α subunit of phosphoinositide 3-kinase.

Science 283: 390-392, 1999

2. 学会発表

- (1)窪田直人、寺内康夫、三木啓司、為本浩至、山内敏正、中野亮介、戸辺一之、木村哲、藤田敏郎、門脇 孝 脂肪細胞分化においてPPAR γ は必須である—発生工学的手法を用いて—：第36回日本臨床分子医学会学術総会、1999
- (2)寺内康夫、門脇 孝 糖尿病モデルマウスを用いた2型糖尿病の分子機構の解析：日本人類遺伝学会第44回大会、1999
- (3)Kadowaki, T., Tobe, K., Terauchi, Y., Eto, K., Yamauchi, T., Kubota, N. : Molecular Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus and Obesity in Knockout Mice Models. KEYSTONE SYMPOSIA, 2000
- (4)Kubota, N., Terauchi, Y., Miki, H., Tamemoto, H., Yamauchi, T., Nakano, R., Komeda, K., Eto, K., Tobe, K., Kimura, S., Kadowaki, T. : Pivotal role of PPAR γ in adipocyte differentiation and fat accumulation: analysis of PPAR γ knockout mice. The European Association for the Study of Diabetes, 35th Annual Meeting, 1999
- (5)窪田直人、寺内康夫、為本浩至、三木啓司、中野亮介、江藤一弘、五十川陽洋、赤沼安夫、藤田敏郎、門脇 孝 PPAR γ 欠損マウスの作製及びその解析：Journal of the Japan Diabetes Society, Vol.42, 1999
- (6)Kubota, N., Terauchi, Y., Miki, H., Tamemoto, H., Yamauchi, T., Eto, K., Nakano, R., Tanaka, S., Shiota, K., Tobe, K., Kimura, S., Kadowaki, T. : Pivotal role of PPAR γ in adipocyte differentiation and fat accumulation: analysis of PPAR γ knockout mice. Journal of the American Diabetes Association, 59th Annual Scientific Session, 1999