

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

## 肥満／糖尿病発症予防のためのターゲット遺伝子の同定と制御法の開発

所 属 独立行政法人 国立健康・栄養研究所 生活習慣病研究部  
研究者 江崎 治

### 分担研究者

- |                  |      |
|------------------|------|
| (1) 山之内製薬株式会社    | 下川晃彦 |
| (2) 株式会社ビー・エム・エル | 服部浩明 |
| (3) キリンビール株式会社   | 近藤恵二 |
| (4) 持田製薬株式会社     | 水口 清 |

### 要 旨

運動負荷マウスcDNAライブラリーより、酵母one-hybrid法によりGLUT4運動反応性シス領域に結合するタンパク質の検索を行ったが、転写因子の可能性のあるタンパク質の同定はできなかった。しかし、Gene chipの分析から、運動負荷とAMP-kinase活性化によって変化する数個の有力な転写遺伝子が見つかった。GLUT4が増加する状態ではPGC-1の増加が認められ、PGC-1がGLUT4の発現増加に強く関与していることが示唆された。又、PGC-1によって増減する蛋白質を同定した。

軽度のアルコールの摂取は体重増加には影響を与えないことが示された。又、魚油はPPAR $\alpha$ を介して抗酸化作用を示していることを明らかにし、UCP2の発現増加にはROSが関与していないことも明らかにした。

### 1. 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。実際、高脂肪食により肥満とインスリン抵抗性が生じることはよく知られている。糖輸送体蛋白の1つであるGLUT4は筋肉／脂肪組織に特異的に発現し、筋肉や脂肪組織における糖の取り込みの律速段階となっている。インスリンはGLUT4を細胞内プールから形質膜へ移動させることで、形質膜上のGLUT4量を増加させ、血中のグルコースを細胞内へ入れ、血糖値を低下させる。運動によるGLUT4発現増加に関与するシスエレメントの解析に関する研究として、現在までに運動による発現増加のシスエレメントがGLUT4の転写開始点から-551と-442の間に存在していることを明らかにしている。そこで、このエレメントに結合する転写因子を同定するため、酵母one-hybrid法を用いて骨格筋由来cDNAライブラリーの検索を行った。又、筋細胞のミトコンドリア量や機能（酸素消費）を活性化させる因子として、PGC-1(PPAR $\gamma$  coactivator-1)がクロニングされ、運動により発現量が増加する事が示されている。筋細胞におけるPGC-1制御下流遺伝子群のタンパク質を解析した。

一方、運動によりAMPキナーゼが活性化され、糖／脂質代謝が亢進するという仮説がある。このためマウス骨格筋における運動負荷およびAMP kinase活性化剤AICARを投与した時の遺伝子発現変化のプロファイルをGene chipを用いて検討し、運動負荷とAMP-kinase活性化によって変化する遺伝子群を比較し、AMP-kinase活性化と糖／脂質代謝活性化の因果関係を検討した。筋肉における運動負荷からGLUT4 mRNA発現量増加の情報伝達系の一端を明らかにする目的で、運動負荷時、AMP kinase活性化時におけるGLUT4発現量とPGC-1発現量の相関性を検討した。さらに、赤筋にはミトコンドリア含量が高く、GLUT4発現量の多いため、PGC-1発現量が両筋肉では異なることが想定されたため、筋肉を白筋と赤筋に分け、それぞれにおけるGLUT4発現量とPGC-1発現量の相関性も検討した。

少量のアルコール摂取は冠動脈疾患に対して予防的に作用することが報告されている。しかし、アルコールの摂取は過食をもたらし、それに伴い肥満を生ずる。アルコールの摂取量や摂取期間、同時に摂取する食事成分によって、アルコールの作用が異なることを意味している。適度なアルコール摂取

が体重増加や体脂肪の蓄積を引き起こすかどうか、また同時に摂取する食事の組成によって違いがあるかどうか、マウスとラットを用いて検討した。

n-3系脂肪酸は疫学的研究より虚血性心疾患を防ぐ効果があることが明らかになっており、インスリン抵抗性改善や肥満抑制作用も報告されている。しかし未だにそのメカニズムは明らかでないことや、容易に酸化を受ける性質を持つことから、生じた酸化物による細胞へのダメージが懸念されるなど、生体での有効性については不明なところがある。そこで、どのような遺伝子が魚油摂取により変化するかジーンチップを用いることで、網羅的に遺伝子発現の変化を検討し、魚油の生理作用を推定した。又、魚油は脱共役タンパク質（UCP2）の肝臓での発現を増加させる。肝臓でのUCP2発現には、PPAR $\alpha$ 活性化による経路以外に、TNF $\alpha$ や活性酸素（ROS）の関与も報告されているが、その詳細は明らかにされていない。肝臓でのUCP2発現増加が肝実質細胞、非実質細胞どちらの細胞によるものかどうか明らかにし、UCP2発現増加メカニズムの解明を試みた。

## 2. 研究方法

1) マウスおよびヒトGLUT4のプロモーター領域の-552~-502（配列A）および-506~-438（配列B）を、それぞれpHISiあるいはpHISi-1プラスミドのマルチプルクローニングサイトに2回繰り返しになるように挿入し、レポーター遺伝子を作成した。酵母genomeへこれらのレポーター遺伝子と運動後の筋肉組織から作成したライブラリーを導入し、ロイシン欠乏培地に播種し、陽性クローンを検出した。次にこれらのクローンからプラスミド調製を行い、DNA配列を解析した。

2) Ad-hPGC-1をmoi100~10,000でラット筋芽細胞L6に感染させ、2D-DIGE(Two Dimensional-Differential Gel Electrophoresis)により、発現タンパク質群の解析を行った。

3) 運動、AICARを腹腔内投与したマウスから腓腹筋を取り出し、RNA精製し、total RNAよりmRNA精製後、アフィメトリックス社ジーンチップMurine Genome U74Aを用いて遺伝子の発現を解析した。

4) マウスに5日間のスイミング、1日のランニング、1回のAICARの腹腔内投与を行い、腓腹筋よりRNAを調整した。又、10週齢のC57/BL6マウスの大腿四頭筋より赤筋および白筋を分離採取した。

5) 8週齢のC57BL/6J雌マウスを3群に分け、コントロール群として高炭水化物食、高脂肪食群として高サフラワー油食、高魚油食を与えた。各食餌群においてアルコールの影響を検討するため、飲料水にエタノールを添加したアルコール摂取群を設定し、対照として水道水を与えた。

6) 7週齢SDラット♂15匹をケージに1匹ずつ収容して、標準粉末飼料(16g)および水分としてアルコール溶液(5~10w/v%エタノール)を3日間自由摂取させた。摂取カロリーをエタノール1g=7kcalで算出し、それらに相当するショ糖を翌日ペアを組んでいるショ糖投与群の飼料に添付して、等カロリー摂取条件として体重増加作用を評価した。

7) 対照群を炭水化物食群（脂肪エネルギー比10%）とし、高脂肪食群（脂肪エネルギー比60%）としてn-6系のサフラワー油食とn-3系の魚油食を7週齢C57BL6Jの雌マウスに24週間自由摂取させた。飼育終了後、肝臓よりmRNAを抽出し、アフィメトリックス社ジーンチップMurine6.5Kを用いて遺伝子の発現を解析した。

8) C57BL/6Jマウス及びSD系ラットに高魚油食（脂肪エネルギー60%）、高炭水化物食（脂肪エネルギー費10%）にフィブレードを添加（0.5%, wt/wt）したフィブレード添加食を2日間摂取させた後、肝実質及び非実質細胞を分離・採取し、mRNAを測定した。

## 3. 研究成果

1) マウスGLUT4(A)配列をおとりとして、運動負荷マウス骨格筋cDNAライブラリー $2.3 \times 10^6$ 独立クローンをスクリーニングし、陽性クローンのDNA配列を解析し、61個の陽性クローンを得た。しかし、転写因子に特有な配列を含んでいるクローンは得られなかった。マウスGLUT4(B)配列をおとりとして、運動負荷マウス骨格筋cDNAライブラリー $4.0 \times 10^5$ 独立クローンをスクリーニングし、39個の陽性クローンを得た。しかし、同様に転写因子に特有な配列を含んでいるクローンは得られなかった。

2) human PGC-1過剰発現によって発現変動するタンパク質群を調べた結果、著しく増加（5倍以上）するものが2個、2倍~5倍に増加するものが22個、著しく減少（1/5以下）するものが1個、1/2~1/5に減少するものが22個見出された。

3)運動負荷群では357遺伝子、AICAR投与群では234遺伝子、GLUT4過剰発現群では157遺伝子が増加していた。運動負荷およびAICAR投与群で増加していたのが46遺伝子であった。この中には多くの転写因子が含まれていた。

4)腓腹筋におけるGLUT4発現量は対照群に比べ、スイミング群およびランニング群でそれぞれ1.5倍づつ増加していた。PGC-1発現量もそれぞれ1.2および1.6倍に増加していた。ミトコンドリア量のマーカーとしてcytochrome C oxidase (COX) IV発現量を測定したところ、発現量はPGC-1の発現量に伴い、スイミング群およびランニング群でそれぞれ対照群に比べ約1.4倍増加した。AICAR投与によりAMP kinaseを活性化させるとGLUT4は1.9倍、PGC-1は3.2倍増加した。COX IV発現量には有意な変化は認められなかった。赤筋は白筋に比べGLUT4含量が1.8倍、PGC-1の発現量が1.5倍、COX IV発現量が2.0倍であった。

5)高炭水化物食に比べ高サフラワー油食の摂取は、有意な体重増加を引き起こした。また、高魚油食を摂取させると体重の増加が完全に抑えられた。この時、アルコールの摂取は体重の増減に全く影響を及ぼさなかった。

6)14g投与の場合、実験終了時の体重増加量は、アルコール投与群の方がショ糖投与群よりも有意に( $p < 0.01$ )多かった。16g投与の場合、実験終了時の体重増加量は、対照群アルコール投与群およびショ糖投与群であり、すべての群間で有意差( $p < 0.05$ )があった。

7)魚油食により発現増加していた遺伝子を機能別に分類すると、免疫反応、脂質代謝、抗酸化関連の遺伝子が著しく増加していた。抗酸化関連ではUCP2, glutathione transferase, manganese superoxide dismutaseの遺伝子が増加していた。抗酸化関連の遺伝子についてはフィブレート食でも増加したことより、PPAR $\alpha$ の活性化を介した調節が行われていることが示された。SREBPにより転写調節を受けるとされている遺伝子が減少した。その他にhydroxysteroid sulfotransferase (SULT)、cytochrome P-450 17-alpha hydroxylase/C17-20 lyase (P450c17)の減少が著しかった。

8)魚油食により、UCP2の発現はマウスで5.8倍、ラットでは1.5倍の増加が肝実質細胞でみられた。フィブレート添加食では、マウスにおいて18倍、ラットで5倍肝実質細胞で増加した。培養肝細胞に、PPAR $\alpha$  activatorであるWY14,643 (50 nM)を添加すると、UCP2発現はマウス、ラット共に増加したが、ROS産生の有意な増加はみられなかった。WY14,643によるUCP2発現増加は $\alpha$ -amanitin (ポリメラーゼII抑制剤)の添加により抑制され、cycloheximide (タンパク合成阻害剤)添加でも抑制された。マウスに魚油食、フィブレート添加食与えると肝臓TNF $\alpha$ 発現が増加するが、PDTC(TNF $\alpha$ 抑制剤)の腹腔内投与によりTNF $\alpha$ の発現を抑えた状態にした場合においても、魚油、フィブレート添加食によるUCP2の発現増加は抑制されなかった。

#### 4. 考 察

1)今回のOne-hybrid法では有用な転写因子が得られなかったため、今後、比較的バックグラウンドの低いヒト由来のおとりDNA配列を用いて、運動負荷をかけていないヒト骨格筋由来cDNAライブラリーをスクリーニングする必要がある。

2)2D-DIGEによるPGC-1下流因子の検出系を検討し、解析条件に関する詳細な検討の余地を残すものの、検出は可能であることが判明した。再現性も含め今後の検討課題として継続実施し、評価検討を進める。

3)運動やAICARに反応する遺伝子群の中で、変化の割合が大きかった遺伝子のなかに、糖/脂質代謝酵素の遺伝子は含まれなかった。しかし、転写/翻訳に関連する遺伝子やインスリン情報伝達系に関連する遺伝子の変化が認められたことから、これらの変化を介して運動負荷またはAMPキナーゼ活性化による糖/脂質代謝亢進がおこることが考えられた。これらの制御遺伝子の生理的役割を分析する予定である。

4)運動刺激によってPGC-1発現量が増加し、COX IVの発現量の増加が認められ、ミトコンドリア生合成の亢進が示された。しかしながら、AICAR投与によるAMPキナーゼ活性化によってPGC-1発現量が増加するものの、COX IVの発現量に有意な変化が認められなかった。このことは、運動刺激によるPGC-1発現増加を介した作用と、AICAR投与によるPGC-1発現増加を介した作用との間に何らかの相違があることが示唆された。赤筋はミトコンドリアを多く含む。本研究においても赤筋におけるCOX IVの発現量は白筋よりも多く、PGC-1およびGLUT4発現量も多かった。これも、PGC-1がGLUT4発現およびミト

コンドリア生合成に関与していることを示唆するものである。

5) アルコールの摂取は高炭水化物食、高脂肪食どちらにおいても過食をもたらすことなかった。また、体重、体脂肪重量、肝臓重量にもアルコール摂取の影響は認められなかったことから、10%程度のアルコール飲料の摂取は肥満、脂肪肝などの極端な健康障害を招く可能性は少ないことが示唆された。

6) 予想外にも投与した飼料の量が少ない(14g)場合の方が、アルコール投与群の体重増加量がシヨ糖投与群よりも多かった。アルコールの体重増加作用は摂取パターン(アルコールと食事由来の他のエネルギー源(主に糖質および脂質)との摂取量のバランス)に強く依存しているように思われる。従ってアルコールの体重増加作用を正しく評価するには、摂取カロリーを揃えるだけでなく摂食パターンも出来るだけ揃えて、評価する必要があると思われた。

7) 魚油食は長鎖脂肪酸を多く含むことや、PPAR $\alpha$ の活性化のためペルオキシゾームでの $\beta$ 酸化が活発になり活性酸素の生成も上昇すると考えられるが、これに対しては抗酸化関連遺伝子の発現を増加させることで生体を酸化から防御すると考えられた。すなわち生活習慣病の予防に有効であり、生体にとっても安全性が期待できるものであると考えられた。

8) マウス、ラット両者において魚油食、フィブレート添加食によるUCP2 mRNA発現量の増加は肝実質細胞でのPPAR $\alpha$ を介したものであることが示された。また、初代培養肝細胞へのフィブレート添加によりUCP2発現の増加がみられたことから、非実質細胞を介したのではなく、肝細胞ダイレクトにPPAR $\alpha$  activatorが作用していることが示された。PPAR $\alpha$ を介した肝細胞でのUCP2 mRNA増加はmRNAの安定化によるものではなく転写レベルでの制御によること。又、UCP2発現誘導にはROSやTNF $\alpha$ の若干の関与はみられたが、PPAR $\alpha$ を介する経路にはこれらの関与は見られなかったことを明らかにした。

## 5. まとめ

運動負荷マウスcDNAライブラリーより、酵母one-hybrid法によりGLUT4運動反応性シス領域に結合するタンパク質の検索を行ったが、転写因子の可能性のあるタンパク質の同定はできなかった。しかし、Gene chipの分析から、運動負荷とAMP-kinase活性化によって変化する数個の有力な転写遺伝子が見つかった。GLUT4が増加する状態ではPGC-1の増加が認められ、PGC-1がGLUT4の発現増加に強く関与していることが示唆された。又、PGC-1によって増減する蛋白質を同定した。

軽度のアルコールの摂取は体重増加には影響を与えないことが示された。又、魚油はPPAR $\alpha$ を介して抗酸化作用を示していることを明らかにし、UCP2の発現増加にはROSが関与していないことも明らかにした。

## 6. 研究発表

1) Nakatani T, Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Miura S, **Ezaki O**. (2002) Mechanism for PPAR $\alpha$  activators-induced up-regulation of UCP2 mRNA in rodent hepatocytes. *J Biol Chem*, 277:9562-9569.

2) Takahashi M, Tsuboyama-Kasaoka N, Nakatani T, Ishii M, Tsutsumi S, Aburatani H, and **Ezaki O**. (2002) Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPAR $\alpha$  activation and ROS production. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282:G338-G348.

3) Yamauchi T, Waki H, Kamon J, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Miki H, Kubota N, Terauchi Y, Tsuchida A, Tsuboyama-Kasaoka N, Yamauchi N, Ide T, Hori W, Kato S, Fukayama M, Akanuma Y, **Ezaki O**, Itai A, Nagai R, Kimura S, Tobe K, Kagechika H, Shudo K, Kadowaki T. (2001) Inhibition of RXR and PPAR $\gamma$  ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J Clin Invest*. Oct;108(7):1001-13.

4) Terada S, Takizawa M, Yamamoto S, **Ezaki O**, Itakura H, Akagawa KS. (2001) Suppressive mechanisms of EPA on human T cell proliferation. *Microbiol Immunol*. ;45(6):473-81.

- 5) Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. Nat Med. Aug;7(8):941-6.
- 6) Terada S, Yokozeki T, Kawanaka K, Ogawa K, Higuchi M, Ezaki O, Tabata I. (2001) Effects of high-intensity swimming training on GLUT-4 and glucose transport activity in rat skeletal muscle. J Appl Physiol. Jun;90(6):2019-24.
- 7) Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O. (2001) Mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) in skeletal muscle. Front Biosci. 2001 Mar 1;6:D570-D574.

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社