

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 | 吉岡正陽 |
| (4) 持田製薬株式会社 | 水口 清 |

要 旨

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転写遺伝子を見出し、SREBP-1cが運動後の筋肉での脂肪の蓄積に関与をすることを示唆した。魚油はPPAR α を介して抗酸化作用と抗肥満作用を示し、肝実質細胞でのUCP2の発現亢進はPPAR α 活性化を介していること、ROSは関与していないことを見出した。生理的魚油摂取量では肝でのSREBP-1の蛋白分解による活性化を抑制し、脂肪の合成を減少させている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、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。

筋肉組織内での脂肪の蓄積はインスリン抵抗性を生じる。インスリン抵抗性があると、インスリンが効かなくなり、血液中のブドウ糖が筋肉中に入らなくなり、血糖が上昇し、糖尿病が発症する。一方、運動選手の筋肉組織はインスリンの感受性が亢進しているにもかかわらず脂肪の蓄積が多い。その生理的理由として「運動中は筋肉中のエネルギー貯蔵物質であるグリコーゲンや脂肪をATP合成のため使用するが、運動後はこれらを逆に蓄積し、運動選手は次の運動に備える必要があり、より多くのグリコーゲンや脂肪を蓄積する」ためと考えられてきた。何故このようなことが生じるのか明らかにするため、2週間の運動後での脂肪合成亢進の機序を調べた。

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はないことや、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。

脱共役蛋白質 (UCPs) は、ミトコンドリアでの熱の産生に関与し、抗肥満、抗酸化作用を持つのではないかと考えられている。転写因子PPAR α の活性化剤であるフィブレート、魚油は、肝臓でUCP2の発現を増加させる。本研究では、PPAR α 活性化剤の肝細胞でのUCP2の発現増加の機序を推定した。

魚油には、血中中性脂肪値を低下させる効果が有り、その主成分である EPA は虚血性心疾患や高中性脂肪血症患者の治療薬として用いられている。魚油の血中中性脂肪値低下作用は肝臓での脂肪酸 β 酸化 (脂肪酸の分解) の亢進と中性脂肪合成能の低下による。脂肪酸 β 酸化の亢進は PPAR α 活性化により、中性脂肪合成能の低下は SREBP-1c の完成型の量の減少による。(高紅花油食では肥満を生じるが、高魚油食では肥満を生じない。) 本研究では魚油の摂取量を 10—60 en% (脂肪エネルギー比) に変えてマウスに摂取させ、日常の魚油摂取量でもこのような変化が認められるか調べるとともに、その機序を推定した。

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 回繰り返すように挿入し、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) 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、アフィメトリク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。
- 3) 各種のタイプの運動後、マウス腓腹筋から RNA を抽出し、ノーザンブロット法を用いて SREBP-1c 及びそのターゲット遺伝子の発現量を調べた。
- 4) 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其々の群に対して設定し、対照として水道水を与えた。
- 5) 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 C57BL/6J 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、アフィメトリクックス社ジーンチップ Murine 6.5K を用いて遺伝子の発現を解析した。
- 6) 単離肝細胞を用いて魚油、PPAR α 活性化剤による UCP2 発現増加機序を明らかにした。
- 7) マウスに魚油を 10-60en% で 1~13 週間摂取させ、フェノタイプの変化及び遺伝子の発現量との相関を調べた。

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 x 10⁶ 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 x 10⁵ 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) 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。
- 3) 肝臓でよく研究されている脂肪合成に関与する、acetyl-CoA carboxylase-1 (ACC-1)、stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1)、acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase-1 (DGAT-1) と呼ばれている遺伝子の mRNA が運動後増加することを見出した。また、これらの遺伝子の発現を制御している転写因子 SREBP-1c の発現量の増加も認められ、肝臓と同じように SREBP-1c の増加が、筋肉でも脂肪の合成をコントロールしていることが示唆された。尚、これらの脂肪合成関連遺伝子の発現の増加は、1 回の運動では認められず、長期間の持続した運動が必要であることも示された。すなわち、転写因子 SREBP-1c の発

現量増加が運動後の脂肪蓄積を生じていることが示唆された。

- 4) 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。
- 5) 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 (Mn-SOD)の遺伝子が増加していた。抗酸化関連の遺伝子はフィブレート食でも増加したことより、PPAR α の活性化を介した調節が行われていることが示された。又、PPAR α 依存性にhydroxysteroid sulfotransferase (SULT)、cytochrome P-450 17-alpha hydroxylase/C17-20 lyase (P450c17)が減少した。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。
- 6) PPAR α 活性化剤は実質肝細胞に於いて、UCP2の発現を増加させた。これは転写レベルでの亢進によるものであり、又、直接PPREに結合して作用を示すのではなく、他の蛋白質を介することを示した。又、その発現量の増加の原因として、活性酸素(ROS)は関与していなかった。
- 7) 魚油の投与量に比例してPPAR α のターゲット遺伝子の発現量の増加とSREBP-1c mRNAの減少が認められ、脂肪組織量の低下との間に強い相関を示した。しかし、10%の低い濃度の摂取時においては、SREBP-1のmRNA発現量の減少は認められなかったが、SREBP-1の活性型タンパク質の低下、又、SREBP-1のターゲット遺伝子である脂肪合成酵素(FAS、SCD-1等)のmRNA発現量の低下が認められた。

4. 考察・まとめ

- 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予定である。
- 2) 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。
- 3) 最近、糖尿病患者の筋肉でのSREBP-1cの発現量がコントロールの悪い患者ほど減少することが報告されている。これらの結果から、SREBP-1cが筋肉での糖/脂質代謝のマーカー(高いほど代謝状態が良い)となる可能性があり、今後の研究が期待される。
- 4) 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。
- 5) 魚油食は長鎖脂肪酸を多く含むことや、PPAR α の活性化のためペルオキシゾームでの β 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。
- 6) PPAR α 活性化剤による脂肪の β 酸化とUCP2の発現増加は、PPAR α を介して生じ、協調して生じる現象であることが示唆された。
- 7) 日常の魚油摂取可能量すなわち、低い魚油濃度では、肝臓でのSREBP-1の蛋白分解による活性化を抑制し、脂肪の合成を減少させていることが推定された。又、魚油の抗肥満効果はPPAR α の活性化を介して生じ、魚油の摂取量に依存する事が推定された。

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。運動後の筋肉での脂肪の蓄積にSREBP-1cが関与していることを示した。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。魚油はPPAR α を介して抗酸化作用と抗肥満作用を示していることを明らかにした。肝における魚油によるUCP2の発現亢進は肝実質細胞でのPPAR α 活性化を介していること、ROSは関与していないことを明らかにした。生理的魚油摂取量では肝でのSREBP-1の蛋白分解による活性化を抑制し、脂肪の合成を減少させていることが示された。

6. 研究発表

1) Nobuyo Tsuboyama-Kasaoka, Hiromi Miyazaki, Seiichi Kasaoka and Osamu Ezaki. (2003) Increasing the amount of fat in a conjugated linoleic acid-supplemented diet reduces lipodystrophy in mice. *J. Nutr.*, in press.

2) Kamei Y, Mizukami J, Miura S, Suzuki M, Takahashi N, Kawada T, Taniguchi T, Ezaki O. (2003) A forkhead transcription factor FKHR up-regulates lipoprotein lipase expression in skeletal muscle. *FEBS Letters*. Feb 11;536(1-3):232-236.

3) Nakatani T, Kim H-J, Kaburagi Y, Yasuda K, Ezaki O. (2003) A low fish oil inhibits SREBP-1 proteolytic cascade, while a high-fish-oil feeding decreases SREBP-1 mRNA in mice liver: relationship to anti-obesity. *J. Lipid. Res.* 44(2): 369-379.

4) Ikeda S, Miyazaki H, Nakatani T, Kai Y, Kamei Y, Miura S, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O. (2002) Up-regulation of SREBP-1c and lipogenic genes in skeletal muscles after exercise training. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296(2):395-400.

5) Terada S, Takizawa M, Yamamoto S, Ezaki O, Itakura H, Akagawa KS. (2002) Eicosapentaenoic acid inhibits CSF-induced human monocyte survival and maturation into macrophage through the stimulation of H₂O₂ production. *J. Leukoc. Biol.* 71(6):981-6.

6) 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 α activation and ROS production. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 282: G338-G348.

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

6. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|------|
| 1) 特許取得 | 該当なし |
| 2) 実用新案登録 | 該当なし |
| 3) その他 | 該当なし |