

平成15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

目 次

課題番号

20030895A KH21009	リン脂質代謝・機能の解明とその抗微生物薬開発への応用	西島正弘 …… 1
896A KH21010	低酸素センサーを介する虚血性および変性性神経疾患の機序解明と新規治療薬開発	芝崎 太 …… 6
897A KH21011	細胞内情報伝達分子を標的とした抗ウイルス剤および抗癌剤の開発	松田道行 …… 19
898A KH21012	抗動脈硬化性リポ蛋白質HDLの代謝制御機構	新井洋由 …… 25
899A KH21013	ゲノム修復と細胞分裂に関連する因子の構造機能解析と応用に関する研究	葛西正孝 …… 33
900A KH21014	難治性疼痛に関与するATP受容体の機能解析と医療への応用	井上和秀 …… 39
901A KH21015	動脈硬化症進展阻止のための血管内皮細胞特異的発現EDG受容体作働薬・拮抗薬の開発	望月直樹 …… 47
902A KH21016	天然物由来シグナル伝達制御物質の探索と創薬への応用に関する研究	上原至雅 …… 51
903A KH21017	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	江崎 治 …… 55
904A KH21018	ゲノム情報にもとづいた移植免疫抑制にかかわる遺伝子の検索と創薬への応用に関する研究	絵野沢 伸 …… 59
905A KH21019	神経・免疫・内分泌相関による生体防御機構の解明と創薬	田平 武 …… 62
906A KH21020	レクチン機能を利用した血管における生体防御システムの解明と創薬への応用	若宮伸隆 …… 67
907A KH21021	感染症に関連した免疫異常の解析と新規制御物質の開発	鈴木和男 …… 74
908A KH21022	自己免疫性膵炎発症に関連するIgG 4型抗体の認識する自己抗原の検索、ならびに特異的診断システムの開発	川 茂幸 …… 84
909A KH21024	動物細胞におけるラフト等の脂質膜ドメインを介した生体機能調節機構の解析と疾病関連因子探索への応用	北川隆之 …… 89
910A KH21025	新規サイトカインの炎症性疾患における役割の解析と創薬への応用	山越 智 …… 95
911A KH21026	マイクロアレイDNAチップを用いた各種病態関連発現遺伝子の解析	辻本豪三 …… 104
912A KH21027	細胞死をもたらすストレスシグナル伝達機構の解析および生体防御機構の解明	桃井 隆 …… 111
913A KH22071	ウイルスの侵入および発芽過程を標的とした次世代抗インフルエンザ薬の開発	鈴木康夫 …… 118
914A KH22072	サイトカインシグナル制御分子による慢性関節リウマチの治療薬の開発	吉村昭彦 …… 121
915A KH22073	T細胞の活性化およびヘルパーT細胞サブセットの分化を特異的に制御する手法の樹立	宮武昌一郎 …… 125
916A KH22082	変異型HB-EGFノックインマウスによる循環器疾患の解析	目加田英輔 …… 133

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

研究要旨：適度の運動や魚の摂取は、生活習慣病を予防する。これらの機序を明らかにし、創薬のターゲットとなる遺伝子の同定を試みた。

分担研究者

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

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。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。インスリンは、筋肉／脂肪組織において糖の取り込みの律速段階となっている糖輸送体蛋白 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に取り込み、血糖値を低下させる。インスリン抵抗性の状態では、インスリンによる糖代謝亢進がおこらず、高血糖をもたらす糖尿病を引き起こす。高脂肪食に起因するインスリン抵抗性の原因として、筋肉に蓄積した中性脂肪によるインスリン受容体以降の情報伝達経路の障害が考えられている。筋肉における糖の取込みおよび脂質代謝を盛んにする有力な方法として運動があげられる。運動負荷は筋肉における血中からの糖の取り込みを増加させること、さらにミトコンドリアにおける β 酸化を促進し、脂質代謝を亢進することが知られている。転写共役因子である PGC-1 は運動によるこれら作用に深く関与していることが考えられている。そこで本研究では、筋肉組織特異的に PGC-1 α を過剰発現させたマウスを作成し、表現型の変化を調べた。また、PGC-1 を骨格筋特異的に過剰発現したトランスジェニックマウスの遺伝子発現変化のプロファイルを Gene Chip を用いて検討した。次に、骨格筋での PGC-1 蛋白質の機能制御を担う分子群の探索を目的として、PGC-1 に結合するタンパク質を酵母 2-Hybrid System により検討し

た。

また、運動による糖／脂質クリアランスの上昇機構を解明する一つの手がかりとして AMP-kinase 経路があげられる。筋肉組織における AMP-kinase は運動負荷により活性化され、GLUT4 の形質膜への移動を促進する。さらに、AMP-kinase はミトコンドリアでの β 酸化を促進する。本研究では、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、活性型ヒト骨格筋特異的アクチンプロモーターを用いて筋肉特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製した。

アルコール、正確にはエタノールは数世紀にわたりワイン、ビール、さらに近年は清酒として消費されてきた嗜好飲料である。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。しかし一方で、アルコールの過剰消費は肝硬変、脂肪肝、または低血糖などの代謝障害を起こす。アルコール摂取が健康に及ぼす影響を検討することを目的として、アルコール摂取が臓器の重量の変化、及びインスリン感受性の変化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。更に、体重への影響を詳しく検討するため、ラットを用いてヒトが日常摂取する条件（食事といっしょに、適量摂取）で、アルコールの体重増加作用の評価を試みた。

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 酸化の亢進は転写因子、PPAR α の活性化により、中性脂肪合成能の低下は成熟型 SREBP-1c 量の減少による。本研究では、魚油摂取による SREBP-1c 遺伝子転写調節に転写因子 LXR が関わっているのか明らかにするため、魚油食（60 en%）を摂取させたマウスの肝臓より精製した核タンパク質を用いて SREBP1-c プロモーター領域（LXR 応答配列）への結合量を gel shift 法により検討を行った。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た場合の抗肥満効果を確認しているが、その効果は魚油による抗肥満効果によるものなのか、またはサフラワー油摂取量減少のためなのか確認実験を行った。

B. 研究方法

1) マウス腓腹筋、cDNA を鋳型に PGC-1 の蛋白質コード領域の完全長 cDNA を PCR 法により増幅後、ヒト骨格筋特異的のアクチンプロモーターを含んだ pEH114 plasmid にクローニングした。トランスジェニックマウスを作製した。

2) 同一週齢の♂トランスジェニックマウスおよび野生型マウス各2匹のより腓腹筋を摘出し、mRNA 精製後、アフメトリクス社ジーンチップ Mouse Expression Set 430 を用いて遺伝子の発現を解析した。

3) 酵母 2-Hybrid System を用いたヒト骨格筋 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。

4) AMP-kinase $\alpha 1$ subunit の cDNA の 172 番目の Thr が Asp になるように QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて変異を入れた。この cDNA をヒト骨格筋特異的のアクチンプロモーターを含んだ pEH114 plasmid にクローニングし、トランスジェニックマウスを作製した。

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。食餌、飲料水ともに自由摂取させ、15 週間飼育した。

6) アルコール投与群とシヨ糖投与群から 1 匹ずつ選んでほぼ体重の等しい 9 組のペアを作り、アルコール摂取量を毎日測定して、摂取カロリーをエタノール 1 g = 7 kcal で算出し、それらに相当するシヨ糖を翌日の給餌でペアを組んでいるシヨ糖投与群の飼料に添加して、等カロリー摂取条件下の体重増加作用を評価した。

7) 魚油食 (60 en%) を摂取させた C57BL/6J マウスの肝臓より精製した核タンパク質を用いて SREBP1-c プロモーター領域 (LXR 応答配列) への結合量を gel shift 法により確認を行った。

8) 魚油を 10 または 30 en% と一定にし、サフラワー油摂取量を変化させ、体重や %FAT、脂肪酸合成酵素や脂肪酸 β 酸化関連酵素の発現量を Northern blot により定量した。

(倫理面への考慮)

研究所の動物管理規約に従い研究を行なっている。また、動物に苦痛を与えないため、ネンプータル麻酔下で解剖を行なった。

C. 研究結果

1) 骨格筋特異的 PGC-1 過剰発現マウスでは、骨格筋における PGC-1 の mRNA 量の過剰な発現が認められた。しかし、内因性の PGC-1 発現量の著明な低下と GLUT4 mRNA 量の減少が認められた。

2) 糖・脂質代謝に関連する遺伝子の発現量変化を調べたところ、トランスジェニックマウスでは、解糖系に関わる遺伝子の発現が著しく抑制され、脂肪酸酸化系や TCA 回路、電子伝達系に関わるの遺伝子の発現増加が著明であった。また、脂肪酸合成系の遺伝子発現は抑制されていた。

3) 7x10E5 クローンから PGC-1 の 172-797 アミノ酸領域に結合する延べ 38 クローンを取得した。それぞれのクローンに関して塩基配列を確認したところ、約半数が筋肉特異的に発現する機能不明蛋白質 A、3 クローンが核内受容体 ERR α 、2 種類のリン酸化酵素キナーゼ B とキナーゼ C が 2 クローンずつ、筋肉特異的転写因子 MEF2 が 1 クローン、その他機能未知のクローンが数種類得られた。

4) 骨格筋特異的活性型 AMP-kinase 過剰発現マウスの骨格筋における活性型 AMP-kinase の mRNA および蛋白質量を測定したところ、mRNA および蛋白質ともにトランスジェニックマウスで過剰な発現が認められた。しかし、AMP-kinase の基質である ACC のリン酸化は認められず、過剰発現させた活性型 AMP-kinase が目的とするような活性を示していないことが明らかになった。

5) アルコールの摂取により食餌の摂取量は減少傾向を示したが、アルコール由来のエネルギーを加えた総エネルギー摂取量は各群間で違いはなかった。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にもかかわらず、高魚油食とアルコールを同時に摂取した場合にインスリン抵抗性が発症した。

6) アルコール投与群で摂食行動に異常の見られた個体の体重増加が鈍かった。これらの個体を含む 2 ペアを除いた 7 ペア中 6 ペアでは、特に直近の 4 日間 (day 9-13) でアルコール投与個体の体重増加量がシヨ糖投与個体のそれを上回っていた。

7) 魚油摂取により、LXR-RXR 結合量の低下は認められなかった。また、コントロールとして用いた絶食時 (SREBP-1c mRNA 量減少する) においては結合量の減少がみられ、re-fed. で結合量は回復した。

8) 魚油添加量を一定にすると、体重、%FAT は一定量に減少した。

D. 考察

1) 骨格筋特異的 PGC-1 過剰発現マウスでは、GLUT4

発現量は低下し、インスリン抵抗性が認められた。今後、PGC-1 を標的にした糖尿病治療薬などの開発が行われることが予想されるが、PGC-1 を増加させる時間と量については慎重に検討していく必要があることが、今回の実験から示された。

2) AMP-kinaseによって発現が促進されるPGC-1の糖・脂質代謝への影響を検討したが、このモデルではPGC-1の大過剰かつ長期間にわたる発現による種々の影響が出現し、AMP-kinase活性化によって発現促進される生理的な発現量や発現期間でのPGC-1の影響は異なることが予想された。

3) 酵母 2-Hybrid Systemを用いて、筋細胞内でPGC-1蛋白質に結合するタンパク群を解析した。既に報告されている分子のいくつかは(e.g. ERR α , MEF2)、本系でもその結合を認めた。さらに本研究により、複数の機能未知クローンを見出すことができた。

4) $\alpha 1$ subunit (T172D)を骨格筋に過剰発現させてみたが、目的とするようなAMP-kinaseの活性化は認められなかった。

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。しかし、魚油とアルコールを同時に摂取する事により、インスリン抵抗性が発症した。

6) アルコール摂取にともなう肝臓での中性脂肪合成の亢進により、血中中性脂肪量の増加傾向が認められ、同時に骨格筋中の中性脂肪蓄積量が増加傾向を示した。

7) 魚油による SREBP-1 mRNA 減少原因には、LXR 以外の転写因子もしくは SREBP-1c mRNA の安定性の低下が関与している可能性が考えられた。

8) 魚油の抗肥満効果、脂肪合成能の低下、脂肪分解能の増加は、サフラワー油との割合ではなく、魚油そのものに抗肥満効果があることを明らかにした。

E. 結 論

1) 骨格筋特異的に PGC-1 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作出したところ、GLUT4 発現量の低下とそれに伴うインスリン抵抗性を認めた。

2) PGC-1 トランスジェニックマウスでは、解糖系遺伝子の発現が著しく抑制され、脂肪酸酸化系や TCA 回路、電子伝達系の遺伝子の発現増加が著明であった。また、脂肪酸合成系の遺伝子発現は抑制されていた。

3) これら PGC-1 転写活性化能を有する分子群の、筋細胞における生理的な役割について、*in*

vitro/vivo レベルでの解析、検証を進める必要がある。

4) 骨格筋特異的に活性型 AMP-kinase を過剰発現するトランスジェニックマウスを作出したが、目的とするような AMP-kinase の骨格筋における活性化は認められなかった。

5) 10%程度のアルコール摂取は大きな健康障害を生じないが、同時に摂取する食事によりインスリン抵抗性を生じる可能性が考えられた。

6) 自動給餌・給水装置を用いて等カロリー摂取条件下で給餌量と給餌・給水時間を揃えたペア飼育実験を行い、アルコールとショ糖の体重増加作用を比較検討した。アルコールの体重増加作用は等カロリーのショ糖と同等もしくは小さいということがいえた。

7) 高濃度魚油摂取 (40~60 en%) における SREBP-1c mRNA 量低下作用は、LXR-RXR 結合量の減少によるものではないことを明らかにした。

8) 魚油の遺伝子発現変動は、魚油自体によるものであった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Miura S, Tsunoda N, Ikeda S, Kai Y, Ono M, Maruyama K, Takahashi M, Mochida K, Matsuda J, Lane MD, **Ezaki O.** (2003) Regulatory sequence elements of mouse GLUT4 gene expression in adipose tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Dec 12;312(2):277-284.

2. Miura S, Kai Y, Ono M, **Ezaki O.** (2003) Overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) down-regulates GLUT4 mRNA in skeletal muscles. *J Biol Chem.* 278(33): 31385-31390.

3. 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.

4. 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.

2. 学会発表

1) 笠岡 (坪山) 宣代, 笠岡誠一 (2003) 熱産生における運動と栄養. 第10回日本健康体力栄養研究会 (シンポジウム), 東京, 1月.

2) 矢島宏昭, 柳原恵美子, 近藤恵二, 笠岡 (坪山) 宜代, 江崎治, 及川眞一 (2003) ビール苦味成分の肥満抑制効果. 第 57 回日本栄養食糧学会, 福岡, 5 月.

3) 笠岡 (坪山) 宜代, 江崎治 (2003) 肥満に対する共役リノール酸 (CLA) の効果的な摂取条件に関する検討. 第 50 回日本栄養改善学会, 岡山, 9 月.

G. 知的財産権の出願・登録状況

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

平成15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16年9月30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