

から市販されています⁶⁻⁸⁾。この2つを合わせ、さらに細胞上の糖鎖が多くの場合集合化して存在していることをチップ上に模倣したものが著者らの技術です⁹⁻¹⁰⁾。図のように、糖鎖を導入できる多価の反応点と Au-S 結合によって金をコートしたチップに固定化させうる反応点を併せもったリンカー化合物と多検体同時計測型 SPR 機器に基づく技術であり、糖鎖科学の基礎研究での使用は勿論のこと、近い将来にはインフルエンザウイルス株の迅速同定やプリオンタンパク質の検出などの検査・診断に応用可能なものです。リンカー化合物は還元末端さえあればいかなる糖鎖もチップに固定化してリガンド化できるという特徴をもち、既存の糖鎖アレイ技術のように糖鎖をネオグライココンジュゲートとしてはじめから合成する必要はありません。したがって、硫酸基等の官能基が調製途中にはずれてしまうといった問題もなく、また合成が難しい天然由来糖鎖もチップに簡単に固定化できます。また、SPR 法を用いているので、たとえば細胞のライセートなど、対象タンパク質が特定できない場合にも適用できます。現在、著者らの糖鎖チップ（他との差別化のためシュガーチップと称しています）に結合したタンパク質を SPR 測定後、MALDI-TOF/MS やアフィニティークロマトグラフィーなどによって同定する試みも行っています。今後は、糖鎖のライブラリーを増やすことは勿論ですが、数百のサンプルを 15 分程度で解析できるハイスループット型 SPR 装置および 10 サンプル程度を短

時間で解析する簡易型廉価機器の開発も行い、この技術を広く一般に役立てたいと考えています。

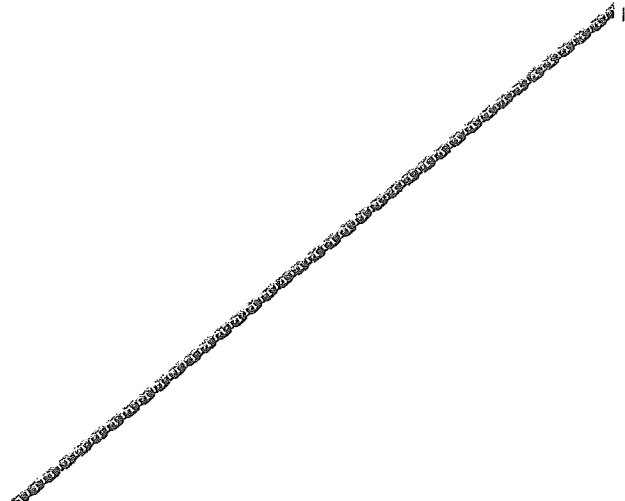
文献

- 1) Park S, Lee M-R, Pyo S-J, Shin I. *J Am Chem Soc* 2002; 126: 4812-4819.
- 2) Houseman BT, Mrksich M. *Chem Biol* 2002; 9: 443-454.
- 3) Fukui S, Feizi T, Galustian C, Lawson AM, Chai W. *Nature Biotech* 2002; 20: 1011-1017.
- 4) Feizi T, Chai W. *Nature Rev* 2004; 5: 582-588.
- 5) Sato T, Fujita S, Kasuya MCZ, Hatanaka K, Yamagata T. *Chem Lett* 2004; 33: 580-581.
- 6) Liedberg B, Nylander C, Lundström I. *Sensors and Actuators* 1983; 4: 299-304.
- 7) Flanagan MT, Pantell RH. *Electronics Lett* 1984; 20: 968-970.
- 8) Matsubara K, Kawata S, Minami S. *Applied Optics* 1988; 27: 1160-1163.
- 9) 特願 2004-041994・隅田泰生・「2鎖または3鎖の炭化水素誘導体鎖からなる多岐構造を有するリガンド、リガンド担持体、および、そのリガンドを用いたタンパク質の分析方法」・科学技術振興機構、鹿児島大学長・平成 16 年 2 月 18 日（出願日）。
- 10) 特願 2003-190568（優先権主張番号：2002-263412）・隅田泰生、荒野明男、楠本正一、マイケル ソベール・「リンカー化合物及びリガンド、並びにそれらの製造方法」・科学技術振興機構、鹿児島大学長・平成 15 年 7 月 2 日（出願日）、PCT 出願 PCT/JP03/11417・2003 年 9 月 8 日（出願日）。

（隅田泰生）

第3章

糖鎖チップ



① はじめに

我々は以前に、止血反応に大きく関与する血小板やフォンビルブランド因子とヘパリンの相互作用には、ヘパリン中の GlcNS6S-IdoA2S と略する特定の硫酸化二糖構造が重要であることを見いだした^{1)~4)}。また、複数の二糖ユニットを有する構造明確な化合物を合成し、この二糖構造のクラスター化の効果を証明した⁵⁾⁶⁾。この際、芳香族アミノ基を有するリンカーと称する化合物を開発し⁷⁾、還元アミノ化反応を効率よく行わせることによって硫酸化二糖構造を簡便に集合化する新規方法を開発した。しかし、合成した集合化糖鎖が十数回のアッセイでなくなってしまうような研究を行ってはいは、非常に効率が悪い。そこで、糖鎖のチップ化を考えた。チップ化すれば、貴重な糖鎖を何回も使えることから、タンパク質と違って構造明確な化合物を確保しにくい糖鎖を効率よく使用でき、量的な問題は解決できる。糖鎖をチップ上に二次元的に固定化することによって、生体内で糖鎖がクラスター化して存在することを模倣することもでき、弱い相互作用を増幅して検出することができると考えた。さらに、そのチップを表面プラズモン共鳴法のセンサーチップとして使用することで、糖鎖に結合するタンパク質などの対象物質を無標識で解析すること、さらに対象が未知のものでも解析できるような技術を開発した。

② 表面プラズモン共鳴法

表面プラズモン共鳴を用いた測定を図1に示す。ガラス上に金薄膜を蒸着させたチップにリガンドである糖鎖を固定化し、その反対側から、レーザー光を全反射する角度で照射すると、金表面に広がるプラズモン波と、それに垂直なエバネッセント波が起こり、レーザー光のある角度でそれらの間に共鳴が起こる。チップ上の糖鎖に結合するタンパク質や細胞(図中アナライトと表記)を流すと、その共鳴状態が変化する。これをプラズモン波の角度変化またはある角度での強度変化をモニターすると左下のようなセンサーグラムが得られる。アナライトを流し始めたときの結合過程と、バッファーに切り替えた後に起こる解離過程を速度論的に解析して、アナライトのリガンドに対する解離定数を求めることができる。また、バッファーで洗った後も結合があれば、その平衡結合量から疑似解離定数を求めることもできる。

③ 糖鎖の固定化

糖鎖の固定化には、今までに三つの方法を試み、最適な方法を確認した。第一に、現在一般にある糖鎖アレイに最も多く用いられている方法である疎水性の表面をもつ金チップに疎水化した糖鎖を疎水性相互作用によって固定化する方法を試みた。しかし、糖鎖結合性タンパク質は、糖鎖に結合するレクチン様ドメインももつが、成長因子(例

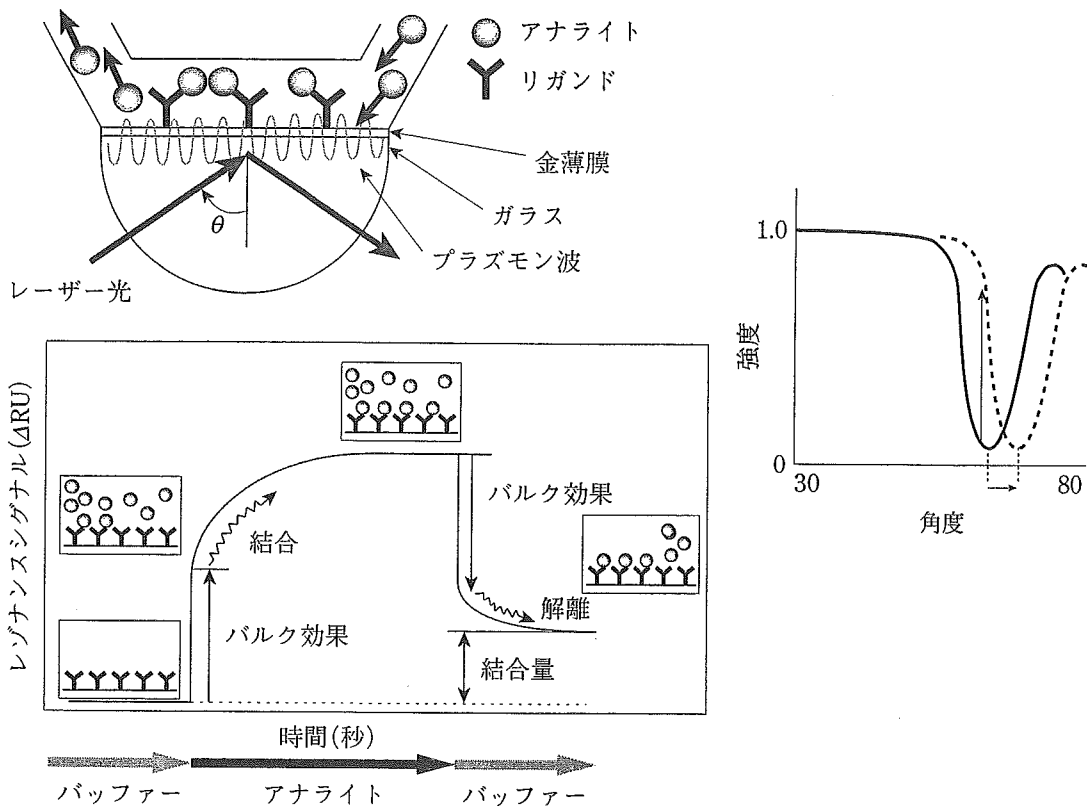


図1 表面プラズモン共鳴法 (surface plasmon resonance : SPR)

例えば、線維芽細胞成長因子、FGF)のように、膜に結合するドメイン、すなわち疎水性領域も併せもつことが多く、疎水性相互作用による非特異的吸着が大きく、この方法は断念した。そして、解離定数が 10^{-15} M (fM) という非常に強い相互作用があるアビジン-ビオチン結合を利用して固定化する方法⁸⁾と、合成と精製が容易である新しいリンカー化合物を開発し、直接金チップへ結合させる方法^{9)~11)}の二つを検討した。

3.1 アビジン-ビオチン結合の利用

ビオチンと複数の芳香族アミノ基を有するリンカー化合物を合成し、そのアミノ基に糖を導入して糖鎖リガンド複合体を調製した。マルトースを導入し、 α -グルコピラノースを4単位有するリガンド複合体(4-Mal)、またグルコースを導入することによって、糖鎖構造はもたないが4単位のグルシトール単位を有するコントロールとして用いる複合体(4-Glc)を調製した(図2参照)。これらのリガンド複合体の金チップへの固定化方法を図3に示す。まず定法によって γ メルカプト酪酸を Au-S 結合によって金表面に固定化する。逆末端のカルボン酸を活性化した後、ニュートロアビジンを加え固定する。次に、リガンド複合体を加え、ビオチン-アビジンの強い結合親和性によってリガンド複合体を固定化させる。未反応の活性エステルは、エタノールアミンを加えてクエンチし、表面には水酸基か糖分子のみがあるという環境を作る。しかし、この場合は固定化に3ステップが必要であり操作が煩雑であるうえ、糖鎖と比べて大きな分子であるアビジンタンパク質が固定化されているので、分析対象物との非特異的結合が生じる可

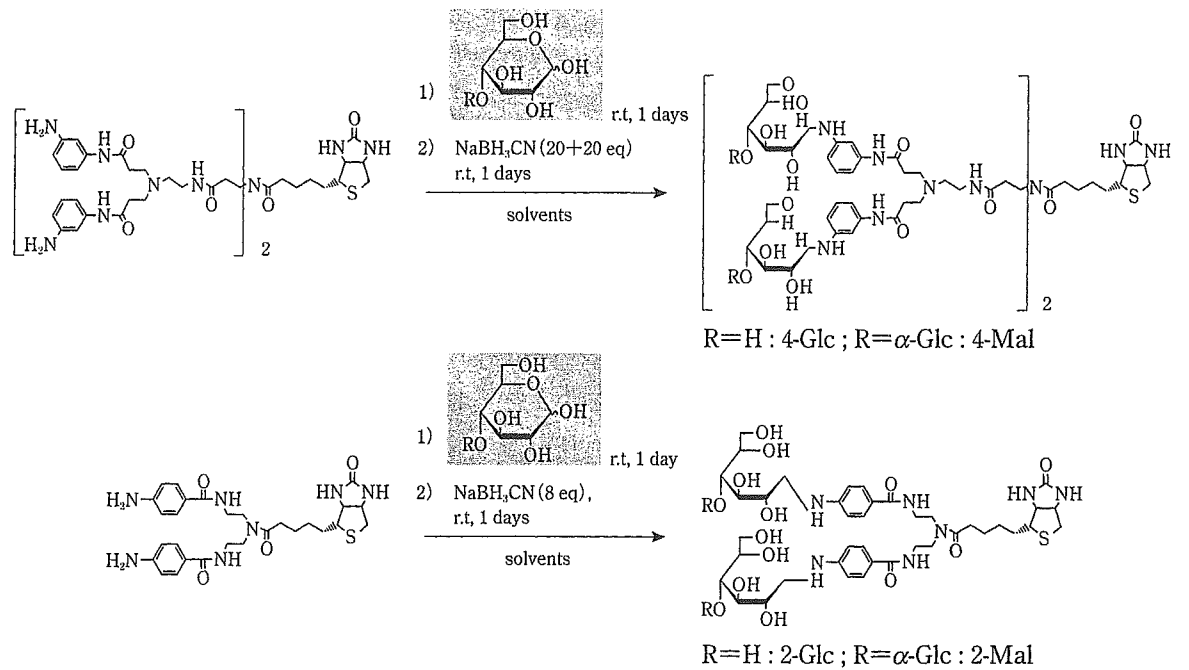


図2 ビチオンを有する糖鎖リガンド複合体(上: 4単位集合型、下: 2単位集合型)

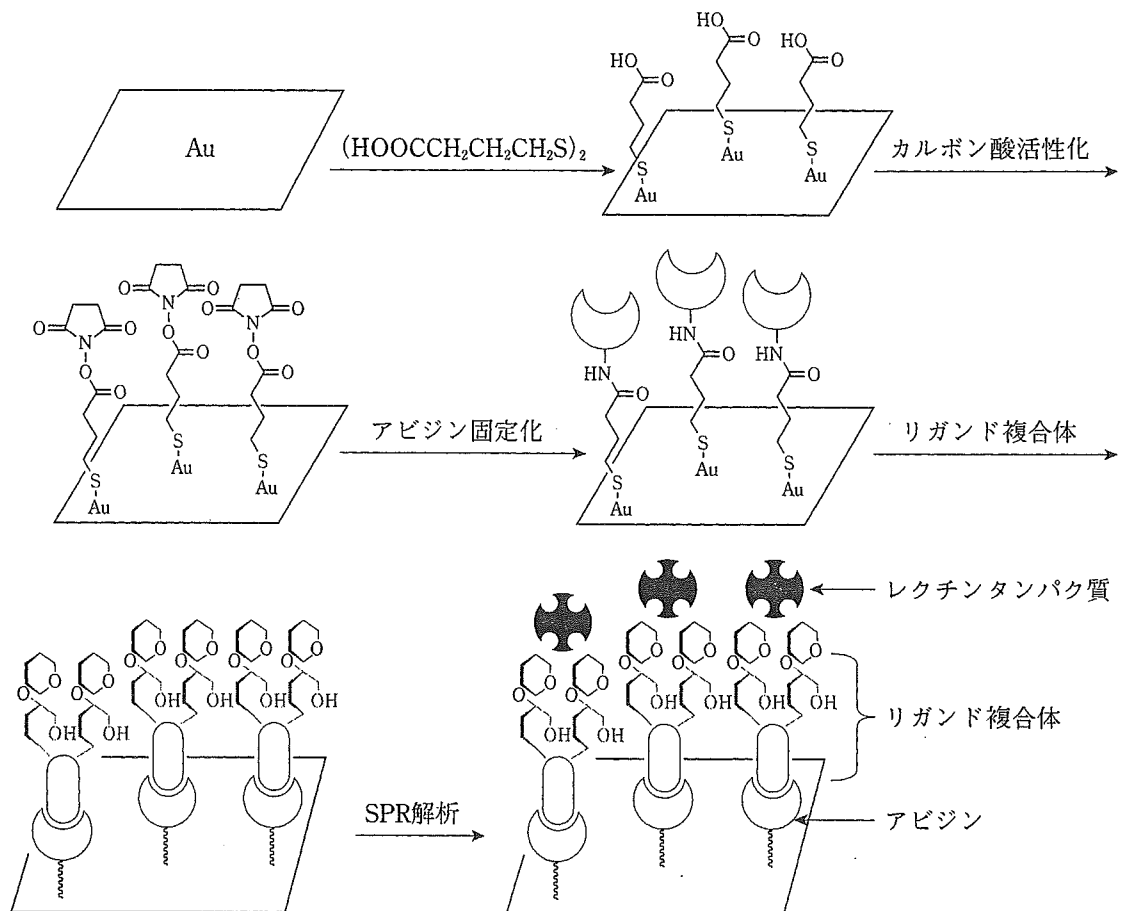


図3 アビジン-ビオチン結合を利用した糖鎖のチップへの固定化

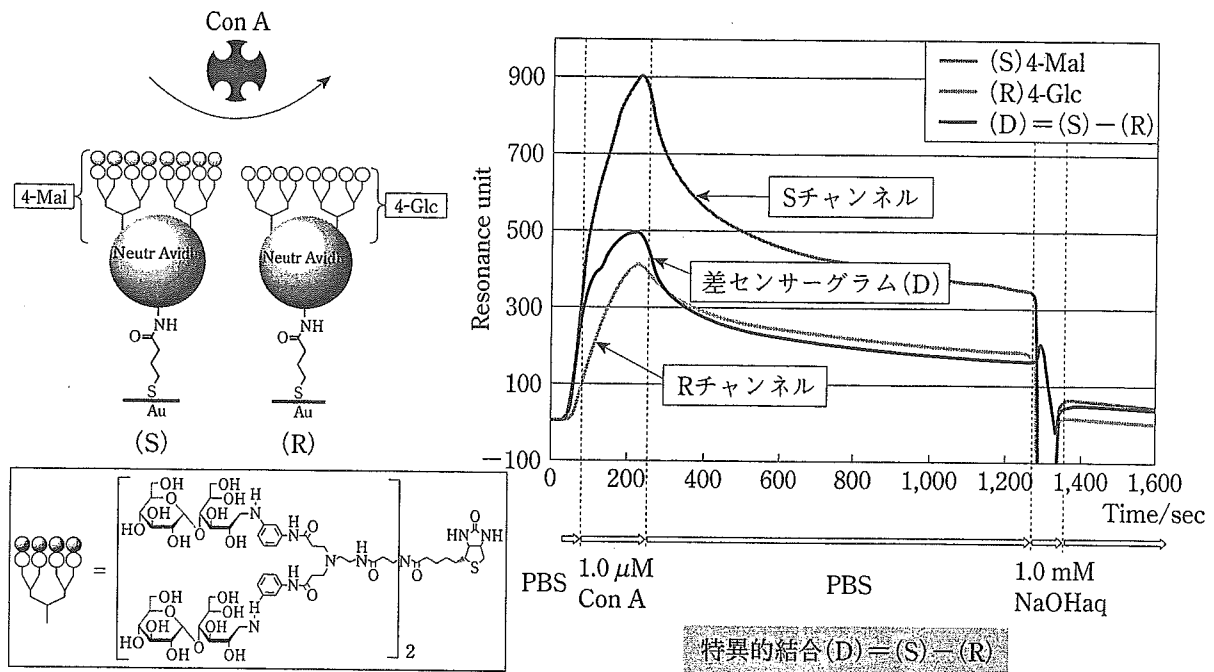


図4 Con A (1 μM) の結合挙動の SPR 解析

能性が残る。

このチップを用いて、 α -グルコピラノース結合性のコンカナバリン A (Con A) の結合挙動を SPR で調べた。用いた SPR 機器は日本レーザー電子社 (現、モリテックス社) の SPR670 である。この機器は測定部 (チャンネル) が二つあり、同時並列で測定ができ、また用いるチップがスライドガラス様なので、リガンドの固定化は容易である。4-Mal を二つあるチャンネルのうち一つ (S チャンネル) に固定化したチップに Con A 溶液を流すと、図 4 に示すセンサーグラムが得られ、結合があることはわかった。しかし、別のチャンネル (R チャンネル) に 4-Glc を固定化し、同時に Con A 溶液を流してみると、結合が観測された。センサーグラムの形からビオチンへの非特異的な吸着が起こっていると考えられる。この二つの差をとれば、特異的結合挙動が観測されることになる。この差をとる方法によって、 α -グルコピラノースが 4 単位集合化されたリガンドに対する Con A の解離定数 K_D を 590 ± 60 nM と決定することができた。

結合特異性を調べたところ、図 5 のようにこのチップに結合するのは Con A だけであることがわかった。とくに、グルコース結合レクチンといわれている PSA がこのチップに全く結合しなかったのは興味深い。報告されている糖親和性は、一般にクロマトグラフィーでの阻害実験によって決定していることが多いが、糖鎖を固定化して、直接の結合性を測定することによって、レクチンの糖鎖への親和性をより正確に決定できたことを示唆している。PSA は α -グルコピラノースが数単位連結したオリゴ糖が真のリガンドなのであろう。

また、集合化の与える影響について検討するために、2 単位集合化したりガンド複合体 (2-Mal, 2-Glc) を調製 (図 2 参照) し、同様の実験を行って比較した。2 単位集合化チップは 4 単位集合化チップに比べて、解離定数が約 2 倍 (960 ± 50 nM) であり、結合親和

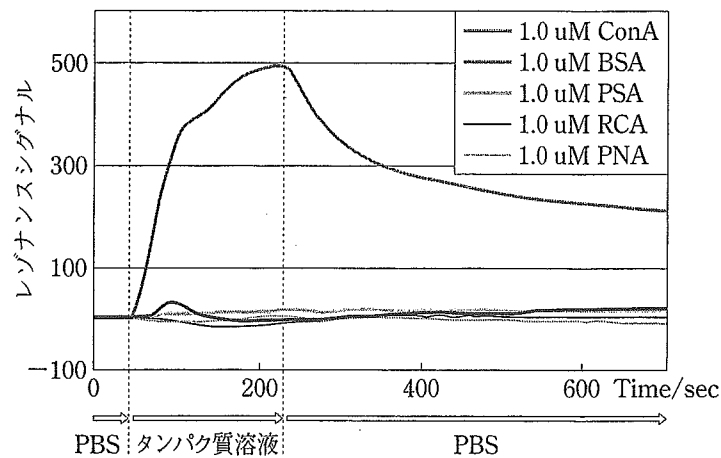


図5 α -Glcを固定化した糖鎖チップへの種々のタンパク質の結合挙動

性は低いことがわかった。詳細に解析すると、結合速度定数には大きな違いはないが、解離速度定数が2単位の場合、4単位と比べて2倍早かった。すなわち、このチップ上では、結合過程はリガンドの数に関係なく起こるが、解離過程は集合化の影響を受けることがわかった。

3.2 直接結合型

このように、アビジン-ビオチンの相互作用を利用した糖鎖のチップ化は可能であることが明らかになった。しかし、固定化には3ステップも必要であり、操作が煩雑、また実験がうまく進行しないときはチェック項目が多く、最良の方法とはいえない。そこで、金チップへの直接固定化法を考案した。

分子内に環状のS-S結合を含むチオクト酸と芳香族アミノ基を有するリンカー化合物を新たに開発した。このリンカー化合物にグルコースを導入した複合体(Mono-Glc、構造は図6参照)を金チップに固定化して、高濃度のBSAを流したところ、全く結合が起こらなかった。これは、疎水性結合を利用して糖鎖をチップに固定化したときに比べて大きく異なり、非特異的吸着が起こりにくいシステムであることがわかった。そこで、このリンカーに以前の研究¹²⁾で明らかとなっている血小板やフォンビルブランド因子へ特異的に結合するヘパリン部分二糖構造を導入したリガンド複合体(Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc、構造は図6参照)を調製し、フォンビルブランド因子中のヘパリン結合ドメインの合成ペプチド(vWF-Peptide)の結合挙動を観測した。図7のように、結合を示すセンサーグラムが得られ、BSAとは大きな違いを示した。BSAは非特異的にヘパリンに結合することが別の実験結果からわかっていたが、高濃度のBSAでも図7程度の結合しか起こっていないことから、非特異吸着はほとんど無視できると考えられた。

vWF-Peptideの濃度を変え、平衡結合量から解離定数を見積もったところ、210 nMという値が算出された。この値は、未分画の市販ヘパリンを用いて、競合阻害実験によってこのペプチドに対して算出された値(370 \pm 100 nM)¹³⁾とほぼ同等であった。また、リガンド複合体にMono-Glcを用いた場合は、vWF-Peptideは全く結合せず、非特

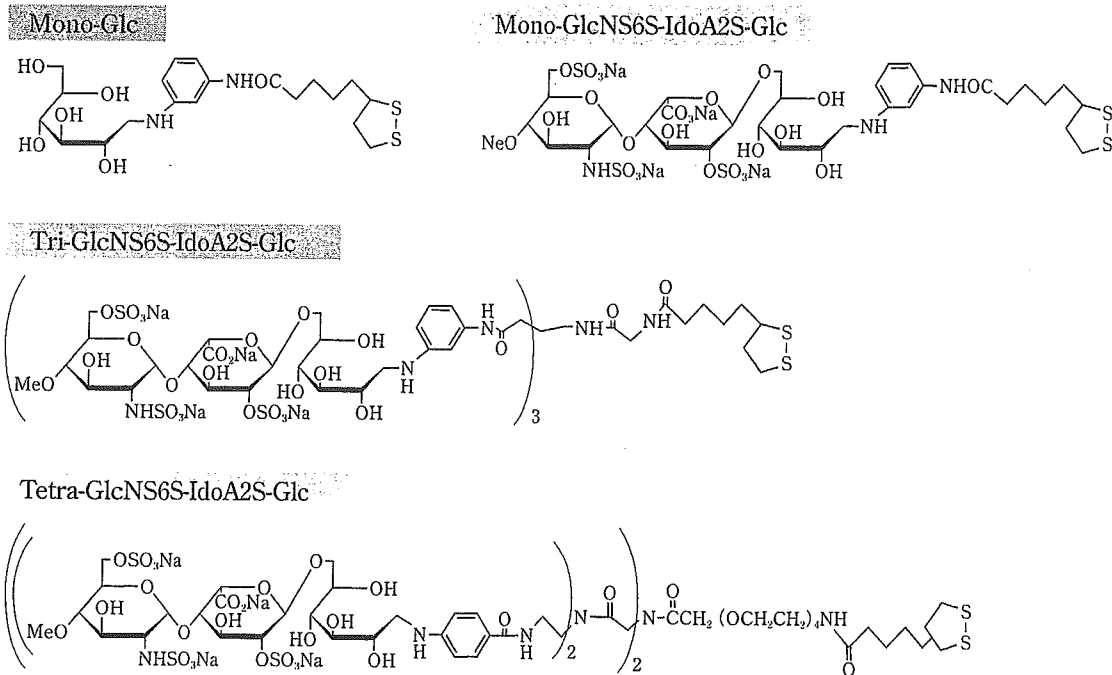


図6 直接結合型のリガンド複合体

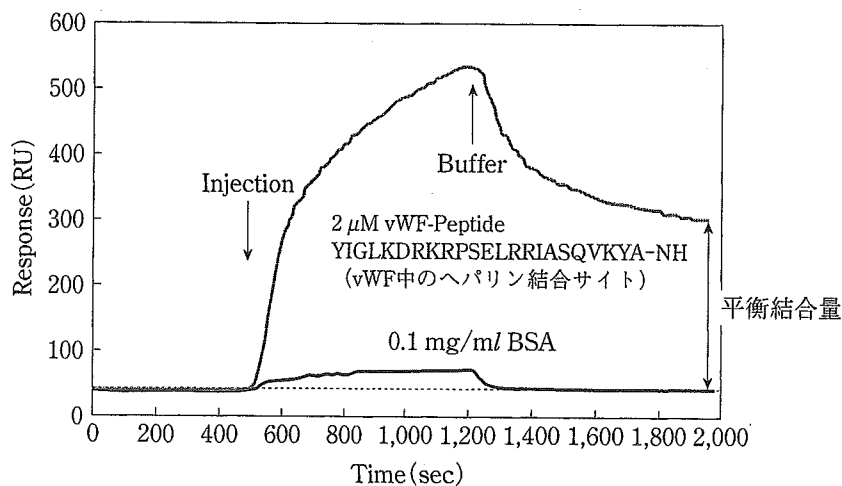


図7 GlcNS6S-IdoA2S を固定化した糖鎖チップへの vWF-Peptide および BSA の結合挙動 (SPR 解析)

異的な吸着は起こっていないことが確認された。さらに、vWF 中のヘパリン結合ドメインを含む vWF 部分構造のリコンビナントタンパク質 (rhvWF-A1) に対しても解析は可能であり、平衡結合量から算出した解離定数は $1.2 \mu\text{M}$ であった。

次に直接結合型で多価リガンドを検討した。すなわち、図8に3単位の硫酸化二糖を集合化した化合物の動力学計算によるモデリングの結果を示すが、集合化することで数 nm 以内に複数のオリゴ糖が常に存在しており、クラスター効果によって相互作用がより明確になること、そして弱い相互作用も観測することができるようになると期待された。

新たに、トリバalent型およびテトラバalent型のリンカーを合成し、同じ硫酸化二

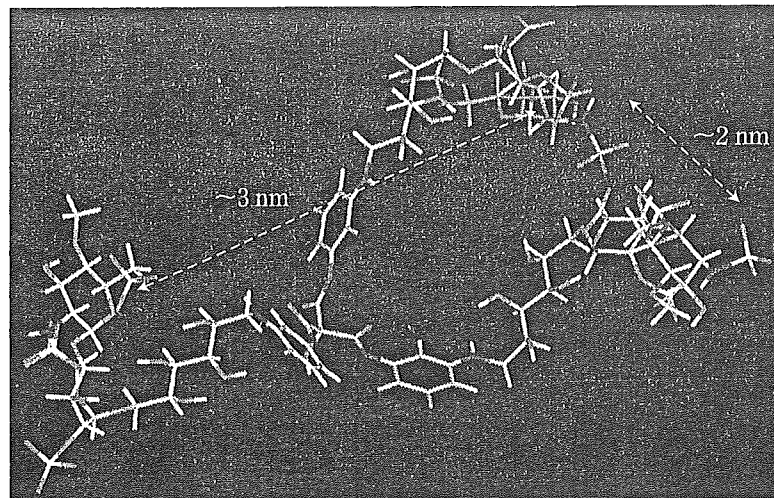


図8 GlcNS6S-IdoA2Sを3単位集合化した化合物の安定コンホメーション

表1 固定化したGlcNS6S-IdoA2SとrhvWF-A1との相互作用

チップ作成時のリガンド複合体組成比	K_D (μM)	k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1} \times 10^3$)	k_d ($\text{s}^{-1} \times 10^{-3}$)
Mono-GlcNS6S-IdoA2S-Glc	2.60	8.38	21.9
/ Mono-Glc	50 / 50	3.79	14.6
Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc	1.20	6.60	8.05
/ Mono-Glc	50 / 50	1.50	4.52
Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc	0.99	6.50	6.44
/ Mono-Glc	50 / 50	1.00	5.24

K_D (k_d/k_a): 解離定数、 k_a : 結合速度定数、 k_d : 解離速度定数

糖を導入して、Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc, Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glcを調製し、それを用いてチップを作製した(構造は図6参照)。これらのチップを用いて、rhvWF-A1の結合能を測定し、表1に結果をまとめた。モノバレント型のMono-GlcNS6S-IdoA2S-Glcを用いて硫酸化二糖を固定化したチップの場合は、トリバレント型(Tri-GlcNS6S-IdoA2S-Glc)およびテトラバレント型(Tetra-GlcNS6S-IdoA2S-Glc)を用いて作製したチップに比べて、解離定数は2倍以上となり、親和性は低くなった。また、チップ上の硫酸化二糖の相対密度をMono-Glcを混ぜてチップを作製することによって小さくすると、解離定数の値はさらに高くなった。一方、トリバレント型およびテトラバレント型で固定化したチップでは、糖鎖の相対密度を下げても解離定数はほとんど変わらなかった。なお、チップ上の糖鎖密度は、作製したチップ上の硫酸基をATR-FT-IRを測定して定量することによって決定できるが、チップを作製するときのそれぞれのリガンド複合体の混合比によって調整可能であった。

より詳細にデータを解析すると、モノバレント型を固定化したチップの場合はトリおよびテトラバレント型を固定化したチップと比べて1桁高い解離速度定数(k_d)を示していた。このことは、トリおよびテトラバレント型は分子内でオリゴ糖鎖間距離が制御された糖鎖クラスター構造を有しているため、チップ上の糖鎖の固定化密度を低下させてもその影響を受けなかったことを強く示唆している。すなわち、完全に解離する際に、

集合化して数 nm の範囲に他のリガンドがあれば、そことまた再び結合するという、糖鎖リガンドとタンパク質のリガンド結合部との間で動的な結合平衡が存在することを示している。弱い糖鎖の結合を評価するには適したツールと考えられる。

以上の結果から、クラスター効果を利用すれば糖鎖とタンパク質間の相互作用を、チップ作成時のばらつきをなくして再現性良く解析できることが明らかとなった。なお、我々は、より再現性の高いデータを得るため、リガンド複合体の溶液に多数の金チップを数時間浸漬、振盪してリガンド複合体を固定化することで、固定化の条件を揃えている。

④ まとめ

以上、多価リガンド複合体は単価リガンド複合体に比べて、チップ表面の糖鎖リガンドの固定化率に依存しないことから優れていると結論できる。また、直接結合型は、非特異吸着がほぼ無視できることから、アビジン-ビオチン結合を利用したチップに比べて、より簡便に使用できる。一方、ビオチン型のリガンド複合体はプローブやアフィニティクロマトグラフィーにもそのまま転用できるというメリットも有している。現在、直接結合型で糖鎖を固定した約 30 種類の糖鎖チップを有しており、糖鎖結合性タンパク質の糖鎖リガンドの探索や、特定の糖鎖へ結合する未知タンパク質の発見、質量分析 (MALDI-TOF/MS) やビオチン型のリガンド複合体を組み合わせたタンパク質の同定を行っている。今後は、糖鎖チップのライブラリー化を進めると同時に、特定の糖鎖チップを検査・診断分野に応用すべく研究を進めていく予定である。

【参考・引用文献】

- 1) Y. Suda et al.: *Polymer Preprints, Japan, Eng. Ed.*, **41** (1), 474 (1992).
- 2) Y. Suda et al.: *Thromb. Res.*, **69**, 501 (1993).
- 3) Y. Suda et al.: *Circulation*, **90** (4), 1397 (1994).
- 4) Y. Suda et al.: *Tetrahedron Lett.*, **37**, 1053 (1996).
- 5) S. Koshida et al.: *Tetrahedron Lett.*, **40**, 5725 (1999).
- 6) S. Koshida et al.: *Tetrahedron Lett.*, **42**, 1289 (2001).
- 7) S. Koshida et al.: *Tetrahedron Lett.*, **42**, 1293 (2001).
- 8) 隅田泰生, 他 4 名: 特開 2004-155762、PCT/JP2003/009973.
- 9) 隅田泰生, 他 3 名: 特開 2004-157108、PCT/JP2003/011417.
- 10) 隅田泰生, 他 4 名: 特願 2004-029562、PCT/JP2005/001726.
- 11) 隅田泰生: 特願 2004-041994、PCT/JP2005/003220.
- 12) L. F. Poletti et al.: *Thromb. Vasc. Biol.*, **17**, 925 (1997).
- 13) M. Sobel et al.: *J. Biol. Chem.*, **267**, 8857 (1992).

〈隅田 泰生〉

II. α ヘルペスウイルス—単純ヘルペスウイルス (HSV) と水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV)—

α ヘルペスウイルスの分子生物学

VZVの遺伝子とその産物

The varicella-zoster virus genome and the genes

奥野壽臣

Key words : 水痘・帯状疱疹ウイルス, 遺伝子, 潜伏感染, 分子疫学, 水痘ワクチン

はじめに

水痘・帯状疱疹ウイルス (varicella-zoster virus: VZV) は, 単純疱疹ウイルス (herpes simplex virus: HSV) とともに α ヘルペスウイルス亜科に属す。どちらのウイルスも宿主域は広く, 増殖速度は比較的速く, 知覚神経節に潜伏する。VZVのDNAは1986年, 全塩基配列が決定されたが¹⁾, HSVのDNAとは根本的な相違が見いだされなかった。in vitro, in vivoにおける両ウイルスの性質の違いを考えると, 遺伝子のわずかな差が生物学的性質に大きな差を生じること驚きを禁じ得ない。

VZVには日本製の世界で唯一の弱毒生ワクチンがあり各国で使用され, 数多くの幼い命を救ってきたが, 帯状疱疹の発症予防にも効果のあることが最近示された²⁾。このようなワクチンの絶大な効果を考えるとき, その弱毒化の機構を分子レベルで理解したいと思うのが人情であり, その方面の研究が盛んに行われている。それらも含め, これまでに判明している遺伝子とその産物の機能について概説した。

1. VZVゲノムの構造とその特徴

VZVゲノムはヒトヘルペスウイルスの中で最も小さく, サイトメガロウイルスの約半分の

125,000塩基対の線状二本鎖DNAである。遺伝子の基本構造を図1に示す。両端を繰り返し配列のterminal repeat long (TRL) と internal repeat long (IRL) に囲まれた unique long (UL) (TRL, IRL, ULを合わせてL領域), terminal repeat short (TRS) と internal repeat short (IRS) に囲まれた unique short (US) (TRS, IRS, USを合わせてS領域) からなる。TRLとIRL, TRSとIRSは同じ配列が逆向きになっている。TRLとIRLはそれぞれ88.5bpの長さを持ち, HSVのそれ(9.2kbp)の1%以下である。また, HSVのULとUSの両端に存在し, DNAのカプシドへのパッケージングに必要なa配列がVZVには欠けている。TRSとIRSはHSVと同様に長く(7.3kbp), USには複製開始点が存在する。感染細胞内ではL領域とS領域がそれぞれ順方向と逆方向を向いて結合したウイルスゲノムが作られるが, ULが一方向を向きUSが両方向を向いた2種類のDNAがそれぞれ47%ずつ存在し, ULが反対方向を向いたものは6%しか存在しない。

2. 遺伝子とその産物

遺伝子をコードするORF (open reading frame) はゲノムの左端より71番目まで通し番号が付けられ(図2), ORF9A, ORF33.5, ORF5/Lを加えると74種類となるが, 42と45はイントロ

Toshiomi Okuno: Department of Microbiology, Hyogo College of Medicine 兵庫医科大学 病原微生物学

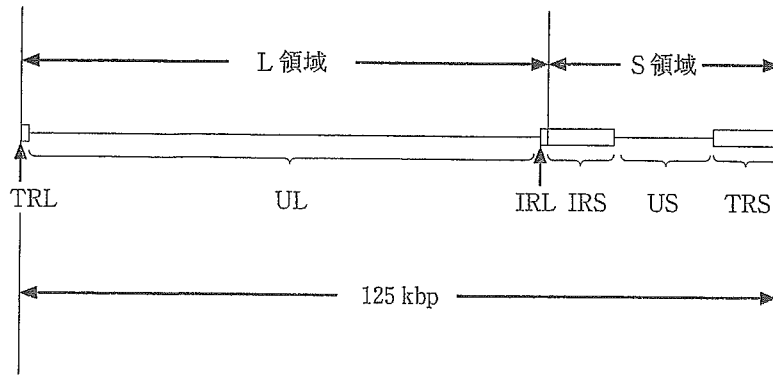


図1 VZVゲノムの基本構造

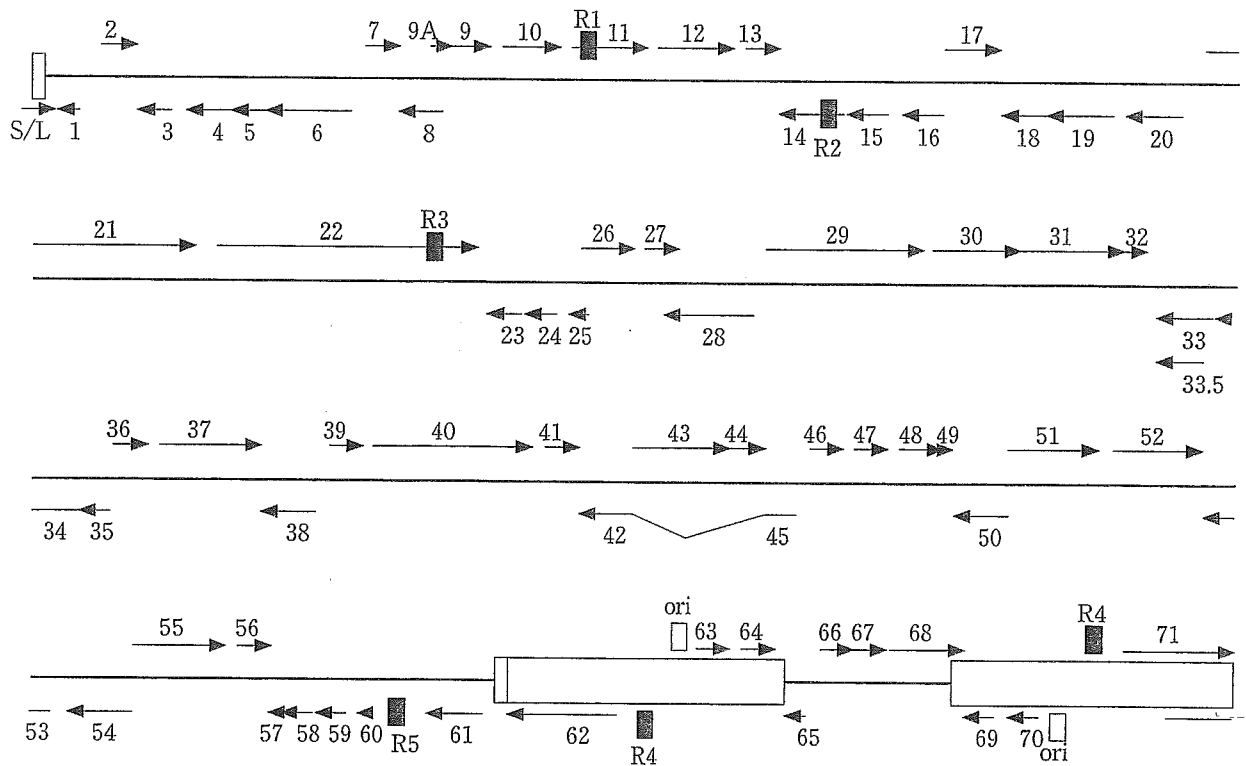


図2 VZVの遺伝子

R1-5: direct sequence repeat, ori: DNA複製開始点.

ンを間に含む1つの遺伝子, ORF62, 63, 64はそれぞれORF71, 70, 69と同じ遺伝子であるので, 結局ORFは70種類あることになる. そのうち64種類がHSV-1の相同遺伝子で, VZVに固有な6種の遺伝子のうち5種はすべてULに存在する. ORFS/Lは環状になったDNAの結合部分を越えてS領域の右端からL領域の左端に及ぶORFである. ULにはR1, R2, R3という短い繰り返し配列(direct sequence repeat)がそれぞれORF11, 14, 22の中に存在してい

る. R4はIRSとTRSのORF62, ORF63の間に, R5はORF60, ORF61の間に存在している. これらのdirect sequence repeatは株によってその繰り返し数が異なるので, 株間の異同の判定に用いられている. VZVの遺伝子の中で他の7種のヒトヘルペスウイルスにも共通に保存されているものは少なくとも40種以上あり, それらはすべてULに存在する.

表1に各遺伝子の情報をまとめた. これからもわかるように, VZVの各遺伝子の機能の解明

表1 VZV各遺伝子のまとめ

VZV 遺伝子	産物の 存在場所	遺伝子の 発現時期	ウイルス 増殖での 必要性	潜伏 感染時 の発現	HSV-1の 相同遺伝子	産物の機能
1	感染細胞膜		なし		なし	潜伏感染に必要ない
2	感染細胞膜		なし		なし	リン酸化蛋白, 潜伏感染に必要ない
3	粒子にはなし				UL55	
4	テグメント はじめ核, のち細 胞質(溶解感染) 細胞質(潜伏感染) 核(再活性時)	IE	必要	あり	UL54(ICP27)	転写活性化, リン酸化蛋白 潜伏感染に必要
5	ウイルス粒子 細胞質		必要		UL53	gK
6					UL52 (helicase-primase complex)	
7					UL51	
8		E	なし		UL50	deoxyuridine triphosphatase
9	テグメント	L			UL49	リン酸化蛋白
9A	ウイルス粒子		なし		UL49A	合胞体形成
10	テグメント	L	なし		UL48(VP16)	転写活性化, 潜伏感染に必要ない 皮膚での感染に関与
11					UL47	
12					UL46	
13			なし		なし	thymidylate synthetase 潜伏感染に必要ない
14	粒子にはなし	L	なし		UL44	gC, 潜伏感染に必要ない 皮膚での感染に関与
15					UL43	
16					UL42	
17	粒子にはなし	L			UL41	細胞の蛋白合成阻害, 37°Cの増殖に 必要 潜伏感染に必要ない
18	粒子にはなし	E			UL40	ribonucleotide reductase (small subunit)
19	粒子にはなし	E	なし		UL39	ribonucleotide reductase (large subunit)
20	ウイルス粒子	L			UL38	
21	カプシド 核, 細胞質	L	必要	あり	UL37	潜伏感染に必要ない
22					UL36	
23					UL35	
24					UL34	
25					UL33	
26					UL32	
27					UL31	
28	粒子にはなし	E			UL30	DNA polymerase

(表 1 つづき)

VZV 遺伝子	産物の存在場所	遺伝子の発現時期	ウイルス増殖での必要性	潜伏感染時の発現	HSV-1 の相同遺伝子	産物の機能
29	核(溶解感染) 細胞質(潜伏感染) 核(再活性時)			あり	UL29(ICP8)	一本鎖 DNA 結合蛋白
30					UL28	
31	ウイルス粒子	L			UL27	gB, heparan sulfate との結合 エンベロープと膜との融合 (gE と共同)
32			なし	なし		リン酸化蛋白 潜伏感染に必要な
33	カプシド	L			UL26	蛋白分解酵素
33.5					UL26.5	アッセンブリー蛋白
34	ウイルス粒子	L			UL25	
35	核				UL24	皮膚感染に必要
36	粒子にはなし	E	なし		UL23	チミジンキナーゼ
37	ウイルス粒子	L			UL22	gH, エンベロープと膜との融合
38					UL21	
39					UL20	
40	カプシド	L			UL19	主要カプシド蛋白
41					UL18	
42/45					UL15	
43					UL17	
44					UL16	
46					UL14	
47	テグメント	E	なし		UL13	プロテインキナーゼ, リン酸化 蛋白 皮膚, T細胞での増殖に必要 潜伏感染に必要な
48	粒子にはなし				UL12 (deoxyribonuclease)	
49					UL11	
50					UL10(gM)	
51	粒子にはなし	E			UL9	複製開始点結合蛋白
52	粒子にはなし	E			UL8(helicase- primase complex)	
53					UL7	
54	ウイルス粒子	L			UL6	
55	粒子にはなし				UL5(helicase- primase complex)	
56					UL4	
57	細胞質		なし		なし	潜伏感染に必要な
58					UL3	
59			なし		UL2	ウラシル DNA グリコシラーゼ
60					UL1	gL(gH のシャペロン)
61	粒子にはなし		なし		ICP0	転写活性化と抑制化, リン酸化 蛋白 潜伏感染に必要な

(表1つづき)

VZV 遺伝子	産物の存在場所	遺伝子の発現時期	ウイルス増殖での必要性	潜伏感染時の発現	HSV-1の相同遺伝子	産物の機能
62, 71	テグメント核 (ORF4 蛋白と) 細胞質 (ORF66 蛋白と)	IE	必要	あり	ICP4	転写活性化, 皮膚での増殖に必要なリン酸化蛋白
63, 70	テグメント核 (溶解感染) 細胞質 (潜伏感染) 核と細胞質 (再活性化時)	IE	必要	あり	US1 (ICP22)	リン酸化蛋白, 潜伏感染に必要な皮膚, T細胞での増殖に必要な転写活性化, 抑制化
64, 69	ウイルス粒子	L	なし		US10	皮膚, T細胞での増殖に必要な
65	ウイルス粒子	L	なし		US9	皮膚, T細胞での増殖に必要な
66	ウイルス粒子		なし	あり	US3	プロテインキナーゼ, リン酸化蛋白 潜伏感染に必要な 皮膚での増殖に必要な T細胞での増殖に必要な
67	ウイルス粒子	L	なし		US7	gI, リン酸化蛋白 皮膚, T細胞での増殖に必要な gE と heterodimer で Fc レセプター gE の成熟に必要な 潜伏感染に必要な
68	ウイルス粒子	L	必要		US8	gE, リン酸化蛋白 エンベロープと膜との融合 (gB と共同) gI と heterodimer で Fc レセプター
S/L	細胞質		なし		なし	

は HSV に比べて遅れていたが, これは VZV が細胞依存性が強く高力価のウイルスを得るのが困難だったことと動物モデルが存在しなかったことに起因していた。しかしここ数年来の分子生物学的解析の進歩や, それを利用して生み出された各遺伝子の欠損ウイルス^{3,4)}および新たなモデル動物⁵⁾を用い, VZV の感染病理, 潜伏感染や再活性化機構, ワクチンの弱毒化機構の解明が急速に進んでいる。

3. 潜伏感染機構

VZV は脊髄後根神経節に潜伏感染しているが, ウイルスが潜伏感染を成立, 維持, 更には再活性化する機構はわかっていない。潜伏時には ORF4, 21, 29, 62, 63, 66 の蛋白が発現しているが, 欠損ウイルスを用いた実験から, ORF4 と 63 は潜伏に必要で ORF21 と 66 は必要

ではないことが判明している。ORF4, 63 そして ORF29 のすべての蛋白は溶解感染のときには核内に存在するが, 潜伏時には細胞質内に局在し, 再活性化に伴って再び核内に局在するようになるので, これらの蛋白の潜伏感染機構における役割の解明が待たれる。

4. 分子疫学

VZV にはヒトヘルペスウイルスの中で唯一弱毒生ワクチンが開発され世界での使用が広がっているが, ワクチン接種後に水痘, 帯状疱疹を発症することがあり, それがワクチン株によるのか野生株によるのかを判別することがますます重要になってくる。そのため, 株間の DNA の塩基配列の差を検出する分子疫学が様々試みられている。direct sequence repeat の繰り返し数を判定に用いようとしたが, 野生株にもワク

チン株と同数のものがあり、使用には不十分であった。ORF38やORF54をPCR増幅の後それぞれPst1とBgl1で切断する方法があり、ワクチン株と欧米の野生株の判別は可能であった。しかし、ワクチン株と日本の野生株とを分けることはできなかった。その両方を組み合わせた方法⁶⁾や、R2のSSCP(single-strand conformational polymorphism)を加えた方法⁷⁾などが行われて判別の精度が向上した。2002年、五味らは、ワクチン株とその親株のDNAの全塩基配列を解読し比較した⁸⁾。その結果、42カ所の塩基置換があり、そのうち15カ所がORF62に集中していることが判明した。そしてORF6の1カ所とORF62の6カ所の制限酵素切断パターンから、ワクチン株と親株も含めたその他の株とを完全に判別できることを示した。また、制限酵素切断部位のSNP(single nucleotide polymorphism)を解析して、ワクチン株と野生株の判別に有用な制限酵素を決定したことが報告されている⁹⁾。

5. 水痘生ワクチンの弱毒化機構

ワクチンの弱毒を論じるとき、ウイルスのい

かなる生物学的変化が毒力の低下をもたらしているのかを同定することは非常に困難である。現在使用されているワクチンには複数の株が混在していることがわかっており^{8,10)}、話を更に複雑にしている。ORF62は前初期、初期、後期の遺伝子の転写を強く活性化するが、ワクチン株では親株からの変異がこの部分に集中し転写活性化が弱くなっているため、弱毒化に重要な役割を果たしているという指摘がある⁸⁾。ヒトの皮膚の*in vivo*モデル動物を用いた解析では、ORF47, gE, gIプロモーターそれぞれの単独の変異と弱毒との関連が示唆された¹¹⁻¹³⁾。しかし、弱毒化における複数遺伝子の関与の可能性が同じ研究グループから最近報告されている¹⁴⁾。

おわりに

第30回国際ヘルペスウイルスワークショップ(2005年)でVZVのレセプター発見の発表がなされ、gEと結合してウイルスの中和や細胞間の感染の広がりを抑制する分子としてinsulin degrading enzymeという蛋白が同定された¹⁵⁾。HSV同様、VZVにおいてもこれから分子レベルの解析がより一層進んでいくものと思われる。

参考文献

- 1) Davison AJ, Scott J: The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. *J Gen Virol* 67: 1759-1816, 1986.
- 2) Oxman MN, et al: A vaccine to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults. *N Engl J Med* 352: 2271-2284, 2005.
- 3) Cohen JI, Seidel KE: Generation of varicella-zoster virus (VZV) and viral mutants from cosmid DNAs: VZV thymidylate synthetase is not essential for replication in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7376-7380, 1993.
- 4) Nagaike K, et al: Cloning of the varicella-zoster virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli*. *Vaccine* 22: 4069-4074, 2004.
- 5) Moffat JF, et al: Tropism of varicella-zoster virus for human CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and epidermal cells in SCID-hu mice. *J Virol* 69: 5236-5242, 1995.
- 6) Hawrami K, Breuer J: Analysis of United Kingdom wild-type strains of varicella-zoster virus. *J Med Virol* 53: 60-62, 1997.
- 7) Mori C, et al: Identification of the Oka strain of the live attenuated varicella vaccine from other clinical isolates by molecular epidemiologic analysis. *J Infect Dis* 178: 35-38, 1998.
- 8) Gomi Y, et al: Comparison of the complete DNA sequences of the Oka varicella vaccine and its parental virus. *J Virol* 76: 11447-11459, 2002.
- 9) Quinlivan M, et al: An evaluation of single nucleotide polymorphisms used to differentiate vaccine and wild type strains of varicella-zoster virus. *J Med Virol* 75: 174-180, 2005.
- 10) Quinlivan ML, et al: Rashes occurring after immunization with a mixture of viruses in the Oka vaccine are derived from a single clone of virus. *J Infect Dis* 190: 793-796, 2004.

- 11) Besser J, et al: Differentiation of varicella-zoster virus ORF47 protein kinase and IE62 protein binding domains and their contributions to replication in human skin xenografts in the SCID-hu mouse. *J Virol* **77**: 5964-5974, 2003.
- 12) Moffat J, et al: Functions of the C-terminal domain of varicella-zoster virus glycoprotein E in viral replication in vitro and skin and T cell tropism in vivo. *J Virol* **78**: 12406-12415, 2004.
- 13) Moffat J, et al: Glycoprotein I of varicella-zoster virus is required for viral replication in skin and T cells. *J Virol* **76**: 8468-8471, 2002.
- 14) Zerboni L, et al: Analysis of varicella-zoster virus attenuation by evaluation of chimeric parent Oka/vaccine Oka recombinant viruses in skin xenografts in the SCIDhu mouse model. *Virology* **332**: 337-346, 2005.
- 15) Li Q, Cohen JI: Identification of a cellular receptor for varicella-zoster virus infection and cell-to-cell spread of virus. 30th International Herpesvirus Workshop: abstract 2.3, 2005.

Perspectives in Diabetes

Dissipating Excess Energy Stored in the Liver Is a Potential Treatment Strategy for Diabetes Associated With Obesity

Yasushi Ishigaki,¹ Hideki Katagiri,² Tetsuya Yamada,¹ Takehide Ogihara,² Junta Imai,^{1,2} Kenji Uno,^{1,2} Yutaka Hasegawa,^{1,2} Junhong Gao,^{1,2} Hisamitsu Ishihara,¹ Tooru Shimosegawa,³ Hideyuki Sakoda,⁴ Tomoichiro Asano,⁴ and Yoshitomo Oka¹

For examining whether dissipating excess energy in the liver is a possible therapeutic approach to high-fat diet-induced metabolic disorders, uncoupling protein-1 (UCP1) was expressed in murine liver using adenoviral vectors in mice with high-fat diet-induced diabetes and obesity, and in standard diet-fed lean mice. Once diabetes with obesity developed, hepatic UCP1 expression increased energy expenditure, decreased body weight, and reduced fat in the liver and adipose tissues, resulting in markedly improved insulin resistance and, thus, diabetes and dyslipidemia. Decreased expressions of enzymes for lipid synthesis and glucose production and activation of AMP-activated kinase in the liver seem to contribute to these improvements. Hepatic UCP1 expression also reversed high-fat diet-induced hyperphagia and hypothalamic leptin resistance, as well as insulin resistance in muscle. In contrast, intriguingly, in standard diet-fed lean mice, hepatic UCP1 expression did not significantly affect energy expenditure or hepatic ATP contents. Furthermore, no alterations in blood glucose levels, body weight, or adiposity were observed. These findings suggest that ectopic UCP1 in the liver dissipates surplus energy without affecting required energy and exerts minimal metabolic effects in lean mice. Thus, enhanced UCP expression in the liver is a new potential therapeutic target for the metabolic syndrome. *Diabetes* 54:322-332, 2005

From the ¹Division of Molecular Metabolism and Diabetes, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan; the ²Division of Advanced Therapeutics for Metabolic Diseases, Center for Translational and Advanced Animal Research, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan; the ³Division of Gastroenterology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan; and the ⁴Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

Address correspondence and reprint requests to Hideki Katagiri, MD, PhD, Division of Advanced Therapeutics for Metabolic Diseases, Center for Translational and Advanced Animal Research, Tohoku University Graduate School of Medicine, 2-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan. E-mail: katagiri-tky@umin.ac.jp.

Received for publication 19 April 2004 and accepted in revised form 13 October 2004.

Y.I., H.K., and T.Y. contributed equally to this work.

ACCl, acetyl-CoA carboxylase 1; AMPK, AMP-activated protein kinase; CPT1, carnitine palmitoyltransferase 1; IRS1, insulin receptor substrate 1; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; SREBP, sterol regulatory element binding protein; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; UCP, uncoupling protein.

© 2005 by the American Diabetes Association.

An explosive increase in the number of diabetic patients, which has become a major public health concern in most industrialized countries in recent decades (1), is mainly the result of excess energy intake and physical inactivity. When food intake chronically exceeds metabolic needs, efficient metabolism causes excess energy storage and results in obesity, a common condition associated with diabetes, hyperlipidemia, and premature heart disease. Excess energy in cells lowers the response to insulin, namely insulin resistance. However, the major treatment modalities for diabetes, including insulin injection and oral sulfonylureas, aim at lowering blood glucose levels by driving glucose into cells in peripheral tissues such as muscle and fat. This further exacerbates insulin resistance when energy intake is in excess, resulting in a vicious cycle. Therefore, novel therapies that promote increased energy expenditure are needed.

Inefficient metabolism, such as the generation of heat instead of ATP, is a potential treatment strategy for type 2 diabetes associated with obesity. Uncoupling proteins (UCPs) were discovered members of the mitochondrial inner membrane carrier family. These proteins leak protons into the mitochondrial matrix, dissipating energy as heat rather than allowing it to be captured in ATP (2). UCP1 (thermogenin) was originally identified in brown adipose tissue and demonstrated to mediate nonshivering thermogenesis. UCP1 plays an important role in mediating cold exposure-induced thermogenesis (3) and is also a likely regulator of diet-induced thermogenesis (4).

Several laboratories have reported overexpression of UCPs, using the transgenic approach, in mice (5-8). These reports indicate that overexpression of UCPs in white adipose tissue and skeletal muscle has preventive effects on development of genetic and dietary obesity and the resultant insulin resistance. However, it is still unclear whether ectopic UCP1 expression exerts therapeutic effects after the development of diabetes associated with obesity.

The liver is one of the major metabolic organs involved in glucose and lipid metabolism and insulin action. In addition, the liver can store and release abundant fat

TABLE 1
Sequences of quantitative RT-PCR primers

Probe	Primer 1	Primer 2
FAS	5'-tgctcccagctgcaggc-3'	5'-gcccgtagctctgggtgta-3'
SCD-1	5'-tgggttgctgcttg-3'	5'-gctgggagcagatgaag-3'
SREBP1c	5'-catggattgcacattgaag-3'	5'-cctgtgtcccctgtctca-3'
FAT	5'-tggctaaatgagactgggacc-3'	5'-acatcaccactccaatccaag-3'
MCAD	5'-tcgaaagcggctcacaagcag-3'	5'-caccgcagcttccggaatg-3'
UCP2	5'-cattctgaccatggtgcgtactga-3'	5'-gttcatgtatctcgtctgaccac-3'
PPAR- α	5'-ggatgtcacacaatgcaattgc-3'	5'-tcacagaacggcttctcaggt-3'
PEPCK	5'-agcggatatggtgggaac-3'	5'-ggctccactcctgtgttc-3'
G6Pase	5'-aaagagactgtgggcatcaatc-3'	5'-aatgcctgacaagactccagcc-3'
GAPDH	5'-accacagtcctgcatcac-3'	5'-tcaccaccctgtgtgta-3'

FAS, fatty acid synthase; SCD1, stearoyl-CoA desaturase 1; FAT, fatty acid transporter; MCAD, medium-chain acyl-CoA dehydrogenase; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxylase; G6Pase, glucose-6-phosphatase; GAPDH, glyceraldehyde-3-dehydrogenase.

dynamically, in response to the energy balance. We reported that hepatic AKT activation resulted in marked alterations in glucose and lipid metabolism (9), suggesting that the liver is a potential site of ectopic expression. We herein expressed UCP1 protein in the liver, before or after diabetes associated with dietary obesity had developed. We found that hepatic UCP1 expression improved diabetes and obesity under high-fat diet conditions through local effects in the liver as well as remote effects in adipose tissues, muscle, and the hypothalamus. However, in standard diet-fed lean mice, effects on glucose and lipid metabolism were minimal. Using gene transduction after disease development, as in this study, provides useful information allowing analysis of therapeutic, rather than preventive, effects that would be difficult to examine using congenitally gene-engineered animal models.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Preparation of recombinant adenovirus. Murine UCP1 cDNA (10) was provided by Professor Leslie P. Kozak (Pennington Biomedical Research Center). Murine liver carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1a) cDNA was obtained by RT-PCR with liver total RNA and primers designed from the reported sequence (GenBank accession no. NM_013495). Recombinant adenovirus, containing murine UCP1 (11) or CPT1a cDNA under the CAG promoter, was prepared as described previously (12). A recombinant adenovirus bearing the bacterial β -galactosidase gene (*Adex1CALacZ*) (13) was used as a control.

Animals. Animal studies were conducted under protocols in accordance with the institutional guidelines for animal experiments at Tohoku University. Male C57BL/6N mice were housed individually and divided into high-fat diet (32% safflower oil, 33.1% casein, 17.6% sucrose, and 5.6% cellulose [14]) and standard diet (65% carbohydrate, 4% fat, and 24% protein) groups at 5 weeks of age, when body weights were 21.2 ± 0.25 g (means \pm SE). Four weeks after separation, body weight-matched mice for each group received an injection of adenovirus via the tail vein. Viruses were administered intravenously at a dose of 2×10^8 plaque-forming units. For pair-feeding experiments, after 4 weeks of high-fat diet, mice were allotted into three groups. Two groups of mice received an injection of UCP1 or LacZ adenovirus. After 24 h, mice in the third group received an injection of LacZ adenovirus. The latter LacZ mice were given their daily food allotments on the basis of the previous day's consumption by UCP1 mice.

Antibodies. UCP1, acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC 1), and insulin receptor antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The α -subunit of AMP-activated protein kinase (AMPK), phospho-AMPK (Thr172), and phospho-ACC (Ser79) antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Affinity-purified antibody against insulin receptor substrate 1 (IRS1) was prepared as described previously (15).

Immunoblotting. Tissue samples were prepared as previously described (9), and tissue protein extracts (250 μ g of total protein) were boiled in Laemmli buffer that contained 10 mmol/l dithiothreitol and subjected to SDS-PAGE. The immunoblots were visualized with an enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham, Buckinghamshire, U.K.).

Triglyceride content of the liver. Frozen livers were homogenized, and triglycerides were extracted with CHCl_3 : CH_2OH (2:1, vol:vol), dried, and resuspended in 2-propanol (16). Triglyceride contents were measured using Lipidos liquid (TOYOBO, Osaka, Japan).

Oxygen consumption. Oxygen consumption was measured with an O_2/CO_2 metabolism measuring system (model MK-5000RQ; Muromachikikai, Tokyo, Japan). Each mouse was kept unrestrained in a sealed chamber with an air flow of 0.5 l/min for 5 h at 25°C without food or water during the light cycle. Air was sampled every 3 min, and the consumed oxygen concentration (V_{O_2}) was calculated.

Histological analysis. Livers as well as epididymal fat (white adipose tissue) and brown adipose tissues were removed and fixed with 10% formalin and embedded in paraffin. Tissue sections were stained with hematoxylin and eosin. Total adipocyte areas were traced manually and analyzed. Brown and white adipocyte areas were measured in 100 or more cells per mouse in each group.

Measurement of body temperature. Rectal temperature was measured with a Thermalert TH-5 (Physitemp, Clifton, NJ).

Measurement of ATP. The ATP levels in liver homogenates were measured with a luciferase-luciferin system (17) by using an ATP determination kit (Molecular Probes, Eugene, OR).

Measurement of AMPK activity. Livers were homogenized, and aliquots of supernatant were incubated with anti-AMPK α -subunit antibody. AMPK activity in the immunoprecipitates was assessed as a function of SAMS peptide phosphorylation, as previously described (18).

Tyrosine phosphorylation of insulin receptor and IRS1. Mice that were fasted for 16 h received an injection of 100 μ l of normal saline (0.9% NaCl), with or without 10 units/kg body wt insulin, via the tail vein. Hindlimb muscles were removed 300 s later and immediately homogenized. After centrifugation, the resultant supernatants were used for immunoprecipitation with anti-insulin receptor or anti-IRS1 antibody. Immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE and then immunoblotted using anti-phosphotyrosine antibody (4G10) or individual antibodies as described previously (15).

Blood analysis. Blood glucose was assayed with Antsense II (Horiba Industry, Kyoto, Japan). Serum insulin and leptin were determined with ELISA kits (Morinaga Institute of Biological Science, Yokohama, Japan). Serum adiponectin and tumor necrosis factor- α (TNF- α) concentrations were measured with an ELISA kit (Ohtsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan) and a TNF- α assay kit (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), respectively. Serum total cholesterol, triglyceride, and free fatty acid concentrations were determined with a Cholescolor liquid, Lipidos liquid (TOYOBO), and NEFA C (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) kits, respectively.

Glucose, insulin, and leptin tolerance tests. Glucose tolerance tests were performed on fasted (10 h) mice. Mice were given oral glucose (2 g/kg body wt), and blood glucose was assayed immediately before and at 15, 30, 60, and 120 min after administration. Insulin tolerance tests were performed on fed mice. Mice received an injection of human regular insulin (0.75 units/kg body wt; Eli Lilly, Kobe, Japan) into the intraperitoneal space, and blood glucose was assayed immediately before and at 20, 40, 60, and 80 min after injection. Leptin tolerance tests were performed as reported previously (19) with slight modification. Fasted (12 h) mice received an injection of mouse leptin (7.2 mg/kg body wt; R&D Systems) into the intraperitoneal space, and food intake amounts for 12 h thereafter were determined. Ratios of food intake amounts to those of vehicle-injected mice were calculated.

Quantitative RT-PCR-based gene expression. Total RNA was isolated from 0.1 g of mouse hepatic tissue with ISOGEN (Wako Pure Chemical), and

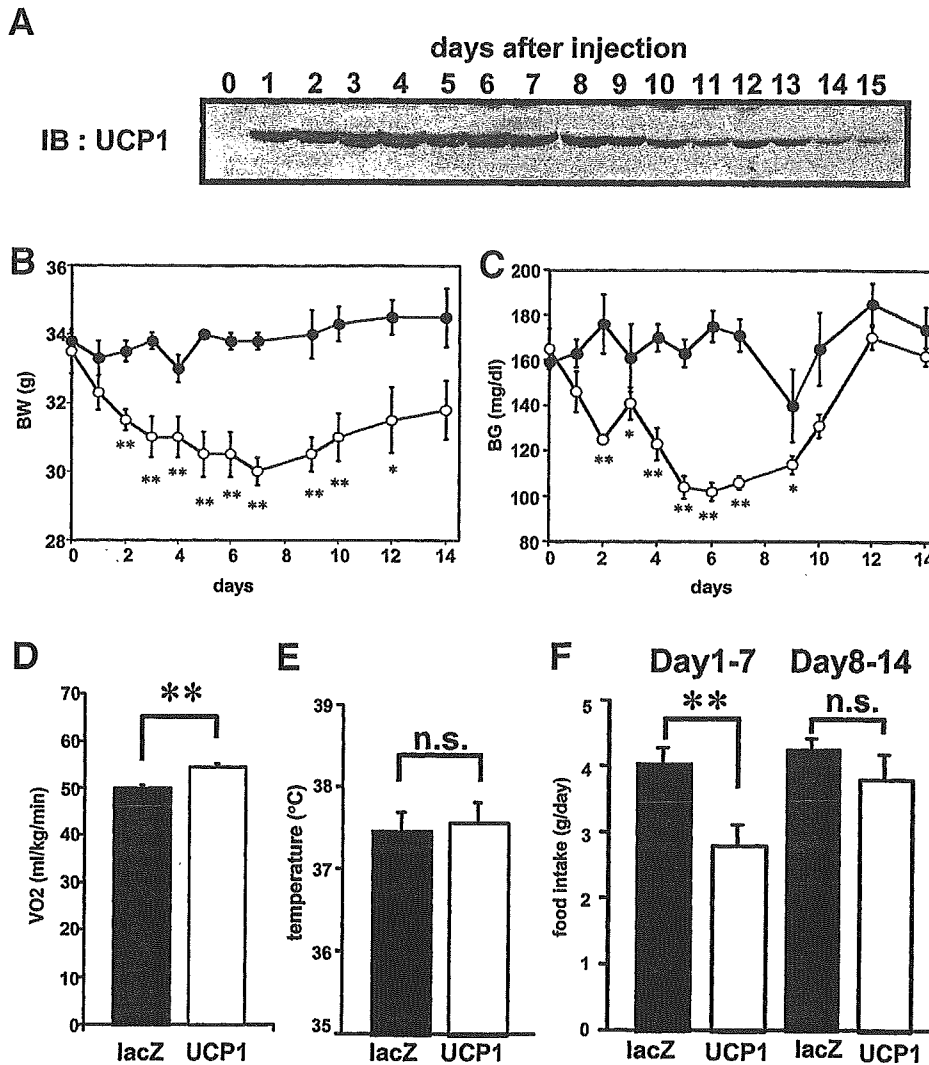


FIG. 1. Hepatic UCP1 expression reduced body weight and blood glucose levels. **A:** Ectopic UCP1 expression in the liver in high-fat-fed mice was detected by immunoblotting of hepatic extracts (250 μ g total protein/lane). Liver samples were collected at different times after adenovirus injection. **B** and **C:** Body weights (**B**) and blood glucose levels (**C**) in the ad libitum-fed state after adenoviral administration in control (LacZ) mice (●) and UCP1 mice (○; $n = 4$ per group). **D:** Resting $\dot{V}O_2$ was measured on day 3 after adenoviral injection with open-circuit indirect calorimetry. All mice were kept in a cage for ~5 h in the daytime without food or water ($n = 5$ per group). **E:** Rectal temperature was measured in the ad libitum-fed state on day 7 after adenoviral injection ($n = 6$ per group). **F:** Average daily food intake amounts over the first and the second weeks after adenoviral administration are presented. Regarding all panels, similar results were obtained from 10 or more experiments, and representative results are presented as means \pm SE. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ assessed by unpaired t test.

cDNA synthesis was performed with a Cloned AMV First Strand Synthesis Kit (Invitrogen, Rockville, MD) using 5 μ g of total RNA. cDNA synthesized from total RNA was evaluated in a real-time PCR quantitative system (Light Cycler Quick System 350S; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The relative amount of mRNA was calculated with glyceraldehyde-3-dehydrogenase mRNA as the invariant control. The primers used are described in Table 1.

All data were expressed as means \pm SE. The statistical significance of differences was assessed by the unpaired t test and one-factor ANOVA.

RESULTS

Hepatic UCP1 expression increased energy expenditure and reduced body weight and blood glucose levels in mice that had high-fat diet-induced obesity and diabetes. C57BL/6 mice were on a high-fat diet for 4 weeks, resulting in diabetes associated with obesity. The UCP1 adenovirus vector (11) was then administered intravenously (UCP1 mice). Mice that were given the LacZ adenovirus were used as a control (LacZ mice). No significant alterations were observed in body weights (Fig. 1B), blood glucose

levels (Fig. 1C), food intake amounts, body temperature, or plasma lipid parameters (data not shown) before versus after LacZ adenovirus administration. Systemic infusion of recombinant adenoviruses into mice through the tail vein primarily resulted in expression of transgenes in the liver, with no detectable expression in peripheral tissues such as muscle, fat, kidney, or brain (data not shown), as reported previously (20). As shown in Fig. 1A, immunoblotting revealed that ectopic UCP1 expression in the liver peaked on day 3. Maximal expression was maintained through day 8. After day 9, hepatic expression of UCP1 decreased, and very small amounts of UCP1 protein were detected on day 14 (Fig. 1A).

In UCP1 mice, body weight and blood glucose levels were markedly decreased (Fig. 1B and C) concomitantly with hepatic expression levels of UCP1. On day 7, body weights of UCP1 mice were significantly lower, by 13%, than those of control mice. After day 9, body weight and