

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成24年度博士課程 入学
氏名 井上 聖哉
指導教員名 佐藤 隆一郎

論文題目

ChREBP アイソフォームによる糖・脂質代謝関連遺伝子の転写制御機構

第一章 序論

肝臓におけるエネルギーの貯蔵・利用は、生物の生命維持に極めて重要な機能である。しかし、飽食の時代といわれる現代においては、エネルギーの過剰摂取や運動不足などにより、肝臓に過剰な脂肪が蓄積し(脂肪肝)、様々な代謝性疾患が引き起こされることが問題となっている。日本人成人の2~3割が脂肪肝を患っていると報告されており、脂肪肝の成因の機構解明・予防法の確立は急務の課題である。

ChREBP (Carbohydrate Response Element-Binding Protein) は、糖の刺激に応答して糖・脂質代謝関連遺伝子の発現を誘導する転写因子である。最近になって、脂肪組織において ChREBP α と ChREBP β の2つのアイソフォームが存在することが報告された。転写活性が極めて高いとされる ChREBP β の発現は、脂肪組織のインスリン感受性と強く相関することが報告されているが、他の組織における役割は不明である。肝臓における ChREBP β の役割を解明することで、脂肪肝に起因する代謝性疾患の予防や治療法開発に貢献できると考えられる。そこで本研究では、肝臓における ChREBP β の機能に焦点を当て、その生理的な役割について検証した。

第二章 ChREBP アイソフォームの組織分布と機能

これまでに報告のある ChREBP β の研究は、いずれも脂肪組織を対象としたものである。そのため、「肝臓でも ChREBP β は発現しているか」、「これまで報告されてきた ChREBP β の機能 (高い転写活性など) は肝臓でも認められるか」は不明である。本章では、肝臓における ChREBP アイソフォームの機能を解析するにあたって、これらの疑問を明らかにした。

これまでに組織間で ChREBP β の発現を比較した例は無い。そこで、マウス組織における ChREBP アイソフォームの mRNA 発現量を比較解析したところ、ChREBP β は脂肪組織のみならず、肝臓や小腸でも発現が見られることを確認した。また、すべての組織において ChREBP β mRNA 発現量は ChREBP α と比べて少ないことが判明した。

続いて、レポーターアッセイ系を構築し、ChREBP アイソフォームの転写活性を比較したところ、ChREBP β は ChREBP α と比べて転写活性が 50 倍以上も高いことを明らかにした。さらに、この系を用いて詳細な検証を行なったところ、ChREBP β は ChREBP の不活性化に繋がるような PKA リン酸化シグナルの影響を受けづらいことが分かった。このような ChREBP β の高い転写活性は、肝細胞を用いたレポーターアッセイでも認められた。そのため、ChREBP β は発現量こそ低いものの、その高い転写活性により、肝臓の糖利用と脂質合成を強力に誘導する転写因子であることが示唆された。

肝細胞を用いて ChREBP β の転写制御機構について検証したところ、ChREBP α の活性化や ChREBP β 自身の発現増大により ChREBP β の転写が誘導されることが明らかになった。

これらの現象は *in vivo* でも認められたため、肝臓における ChREBP β の役割は「ChREBP α の活性化に伴う糖・脂質代謝関連遺伝子の発現誘導を増強すること」であると考えられた (Fig. 1)。

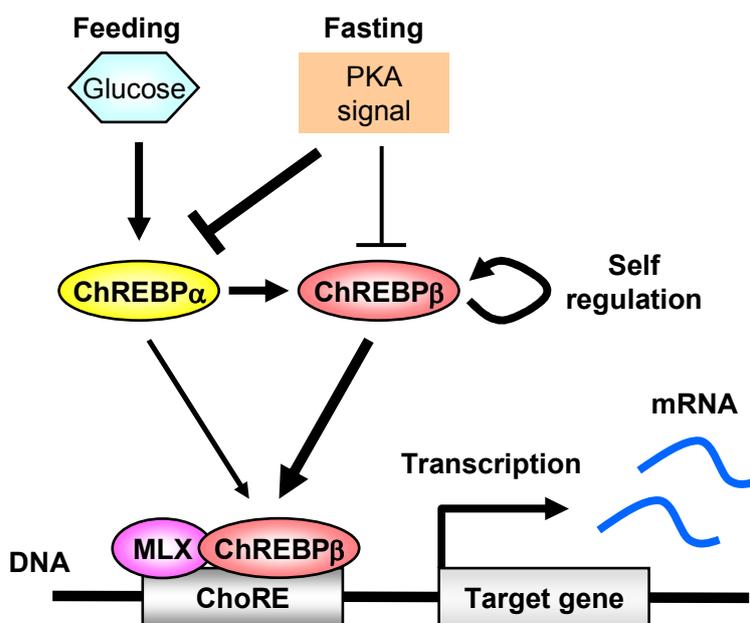


Fig. 1 第二章の結果により想定された肝臓における ChREBP β の役割

(MLX: ChREBP とヘテロダイマーを形成する転写因子)

第三章 ChREBPβの発現が脂肪肝の進行に及ぼす影響

第二章により、ChREBPβの発現増大は肝臓の糖利用と脂質生合成を強力に誘導する可能性が示唆された。本章では、「ChREBPβの発現増大が脂肪肝を進行させる」という直接的な証拠を得るため、マウス肝実質細胞、あるいはマウス肝臓に ChREBPβを過剰発現させた場合に、糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量と脂肪蓄積量にどのような変化が生じるか調べた。遺伝子導入にはアデノウイルス法を採用した。

LacZ をコントロールとして、マウス肝実質細胞に ChREBP アイソフォームを過剰発現させたところ、ChREBPβを過剰発現させた細胞で脂肪滴の蓄積が認められた。これと同調して、ChREBPβを過剰発現させた細胞で解糖系・脂質生合成系酵素遺伝子の発現増大が認められた。このような変化は、ChREBPαを過剰発現させた細胞では認められなかった。

続いて、アデノウイルスを尾静脈注射することにより、マウスの肝臓で LacZ、あるいは ChREBPβを過剰発現させた。これらのマウスは高糖質食を自由摂食させて2週間飼育した。ChREBPβを過剰発現させたマウスでは、肝臓重量、肝臓脂質量、血中中性脂肪量、肝傷害マーカーが増加し、脂肪肝の進行が認められた (Fig. 2、右)。肝臓の遺伝子発現を解析した結果、ChREBPβを過剰発現させたマウスの肝臓では、脂質生合成系酵素の発現が顕著に増大していた。

さらに、上記のマウス肝臓で見られた脂肪蓄積が肝実質細胞に由来するか調べるため、ChREBPβを過剰発現させたマウスの肝臓から肝実質細胞と非実質細胞を単離した。ChREBPβを過剰発現させたマウスから得られた肝実質細胞には脂肪滴を蓄積しているものが多く見られた。また、アデノウイルスによる ChREBPβの発現増大は肝実質細胞と非実質細胞の双方に認められたが、脂質生合成系酵素の発現増大が認められたのは肝実質細胞のみであった。以上の結果により、肝実質細胞における ChREBPβの発現増大が脂質生合成系酵素の発現誘導を介して脂肪肝をもたらしたと結論付けた。

本章では、肝臓 (肝実質細胞) における ChREBPβの発現増大は脂肪肝の進行に直結し、それに伴って肝障害を含む代謝性疾患を惹起することを示した。

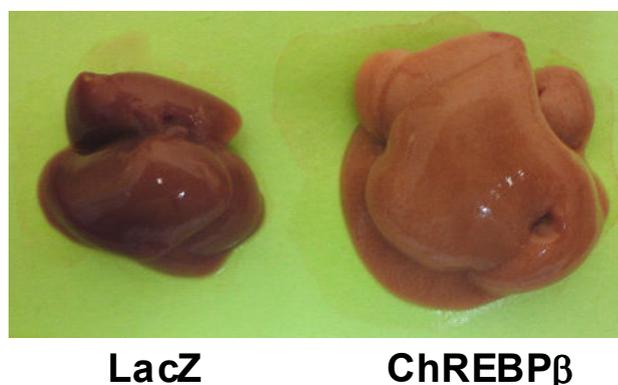


Fig. 2 ChREBPβを過剰発現させたマウスの肝臓 (右画像)

第四章 ChREBPβの発現が変動しうる食事内容の探索

再摂食により肝臓 ChREBPβの発現が増大することを示したが (第二章)、どのような食品がどの組織の ChREBPβの発現誘導をもたらすかは分かっていない。そこで、様々な食事を与えたマウス組織の遺伝子発現量を解析することで、ChREBPβの生理的な役割を調べた。

マウスに与えた食事は、高糖質食として「スターチ食」および「フルクトース食」、高脂肪食として「ラード食」および「大豆油食」の 4 種類である。これらの食事を一週間与えたマウスの組織を解析した結果、高脂肪食を与えたマウスと比較して、高糖質食を与えたマウスの肝臓、白色脂肪組織、小腸で ChREBPβの発現増大が認められた。これと同調して、肝臓と白色脂肪組織では解糖系・脂肪生合成系酵素遺伝子、小腸では糖質消化吸収関連遺伝子の発現増大が認められた。

また、スターチ食を摂取させたマウスと比較して、フルクトース食を摂取させたマウスの肝臓では、ChREBPβと解糖系・脂肪合成系酵素の発現が顕著に増大し、脂肪肝の進行が認められた。このマウスの表現型は、アデノウイルスにより ChREBPβを過剰発現させたマウス (第3章) と類似していた。

以上の検証により、食事として摂取した糖質の利用と貯蔵を促進することが ChREBPβの役割であるが、継続的なフルクトース摂取により肝臓 ChREBPβの働きが過剰になると脂肪肝が引き起こされる可能性が示唆された。

第五章 総合討論

本研究では、第二章: ChREBPβは肝臓における糖・脂質代謝の強力なレギュレーターとして機能すること、第三章: 肝臓における ChREBPβの発現増大が脂肪肝の進行に直結すること、第四章: フルクトース誘導性脂肪肝の進行に ChREBPβの発現増大が関与する可能性を示した。

本研究により、肝臓における ChREBPβの機能を明らかにしたことで、「糖類の過剰摂取に伴って脂肪肝が進行する分子機構」の一端を示すことができた。この研究から得られた知見を手がかりにして、ChREBPβの発現や活性を制御する方法が見つければ、脂肪肝の予防や治療法の開発に繋がられると期待される。