

論文の内容の要旨

論文題目 Trans-omic analysis reveals differences in glucose-responsive regulation of liver metabolism in obese *ob/ob* and wild-type mice

(野生型マウスと *ob/ob* 肥満マウスの肝代謝糖応答性制御のトランスオミクス比較解析)

氏 名 小鍛治 俊也

1. 背景

人体は、血液栄養状態のダイナミックな変化に対して臓器の代謝システムを適応させることにより、血液中のグルコース量を一定に保つ（血糖値の恒常性）。血糖調節は主に肝臓や筋肉におけるシグナル分子ネットワーク、転写因子ネットワークを介した糖代謝の制御適応によって実現する。糖代謝は、アミノ酸代謝や脂質代謝の影響を受けるため、血糖の維持には広範な生体分子の制御が不可欠である。一方で肥満に伴う2型糖尿病は食事後血糖および空腹時血糖の病的な増大という血糖値の時間的変化の不全を特徴とするので、血糖恒常性を担う代謝制御ネットワーク上の複数の因子が関連していると考えられる。以上より、2型糖尿病の病態の理解には単一の分子ではなく、代謝システム全体を捉えることが重要となる。現在、測定技術の進歩により各種生体分子の大規模な測定が可能となった。これに伴い高血糖を対象とした大規模な遺伝子・分子の測定により、高血糖との関連が数多く報告されている。しかし、血糖の時間変動に対する臓器の代謝システムおよび肥満による代謝システムの変化は大規模には明らかとなっていない。また高血糖との関連が示された遺伝子や分子の多くは、統計的に有意な関連性のみが示され、高血糖に関わる代謝システムの変化における役割は明らかとなっていない。

そこで本研究では、野生型（WT）マウスと肥満モデル（*ob/ob*）マウスに経口糖（グルコース）負荷を行った。この条件下での肝臓を取得し、メタボローム解析・トランスクリプトーム解析により肝臓での162代謝物と14292転写物の応答を測定した。次に転写・代謝経路データベースや転写制御ネットワークの推定と組合せることにより、肝臓内でのWTマウスと *ob/ob* マウスにおける糖応答性の代謝制御トランスオミクスネットワークを同定した。さらにこれらを野生型マウス・肥満モデルマウス間で比較することにより、糖負荷時の代謝制御の共通応答ネットワークと健常または肥満特異的応答ネットワークを分離し、肥満の原因または健康維持に必要な部分ネットワークを明らかにした。

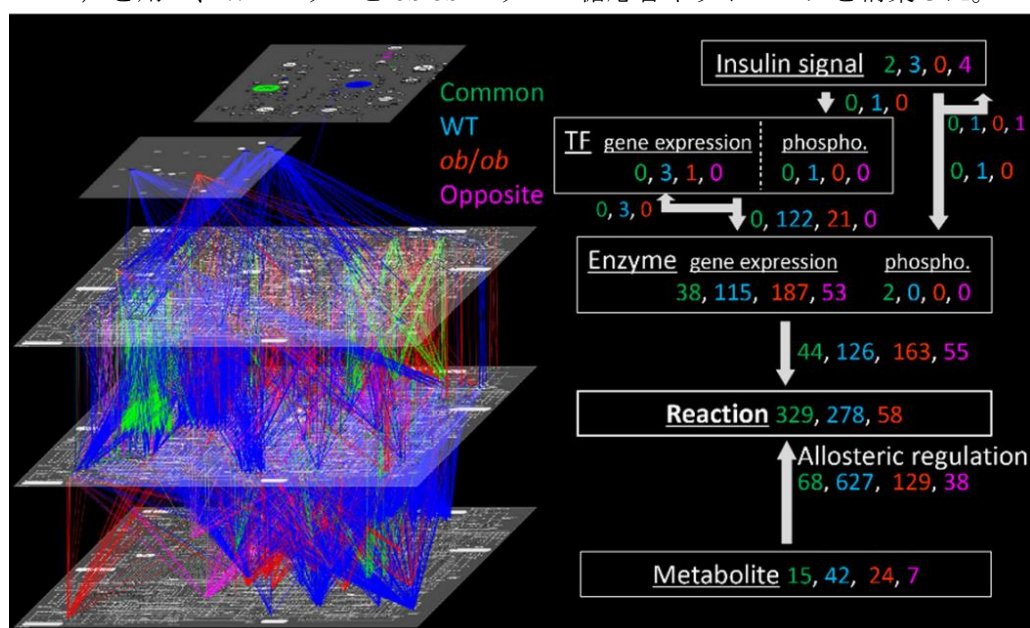
2. 結果：糖応答分子の大規模同定

まず WT マウスと *ob/ob* マウスの糖負荷後の肝臓における代謝物の応答を網羅的に明らかにするために、慶応大・曾我朋義先生及び理化研・池田和貴先生との共同研究により CE-MS と LC-MS/MS を用いたメタボローム測定を行った。さらに各代謝物について、糖負荷前と糖負荷後の各時点の比較を行い、1.5 倍以上の有意な変動を示した代謝物を糖負荷に対する応答代謝物とした。2 時点間の平均の差の検定には Welch の t 検定を用い、Storey らの方法により多重検定補正を行った。これにより WT マウスと *ob/ob* マウスそれぞれにおいて 64 応答代謝物と 46 応答代謝物を同定した。

続いて WT マウスと *ob/ob* マウスの糖負荷後の肝臓における転写量の変動とその制御を網羅的に明らかにするために、東大・鈴木穰先生との共同研究により RNA-seq を用いたトランスクリプトーム解析を行った。メタボローム解析と同様の解析を行い、糖負荷に対する応答遺伝子を定義した。2 時点間の平均の差の検定には CuffDiff を用いた。これにより WT マウスと *ob/ob* マウスそれぞれにおいて 1255 応答転写物と 2511 応答転写物を同定した。またこれらの転写物応答時系列を階層的なクラスタに分け、Enrichment 解析により各クラスタが制御する代謝経路や、各クラスタを制御する転写因子との関連を評価した。これにより転写因子と遺伝子クラスタ間の制御関係を推定した。転写因子モチーフ検索には各遺伝子の転写開始点-300 ~ +100 bp の配列を対象に転写因子データベース TRANSFAC を用いた。

3. 結果：トランスオミクス解析

同定した糖応答分子・推定転写制御ネットワーク・代謝経路データベース（KEGG、BRENDA）を用い、WT マウスと *ob/ob* マウスの糖応答ネットワークを構築した。

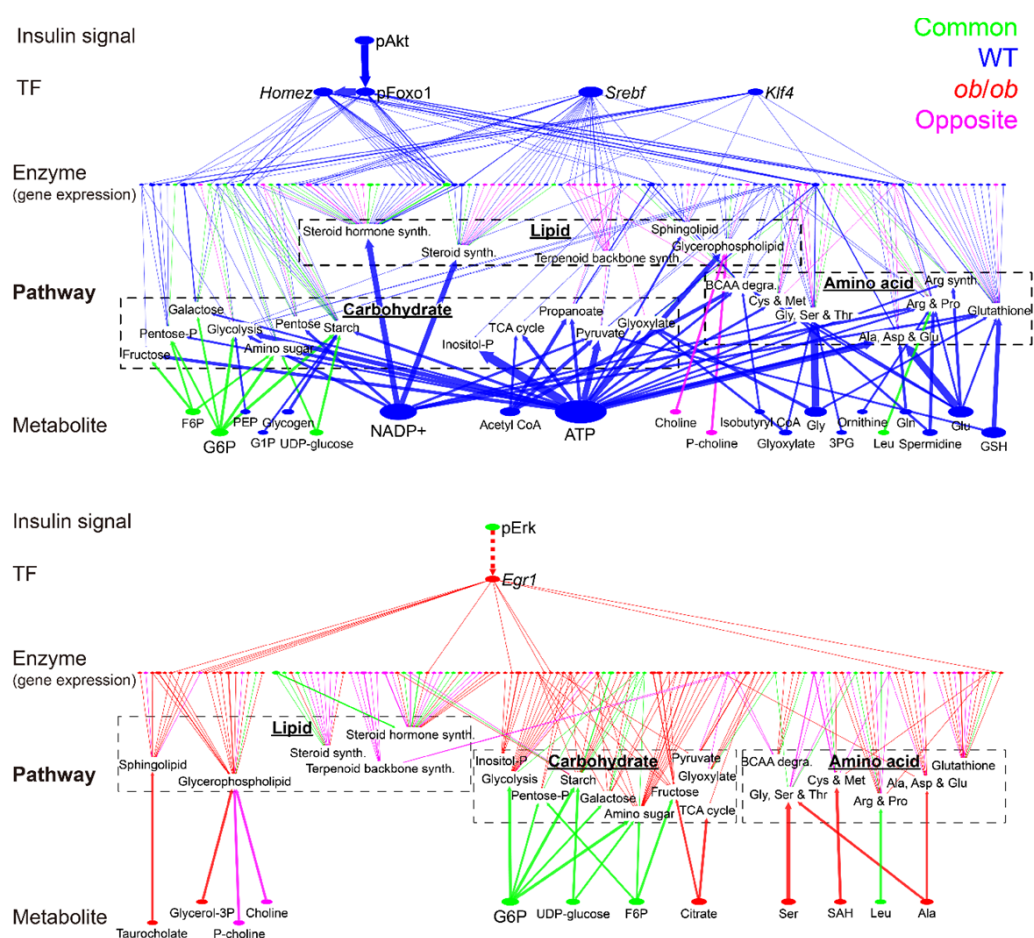


図：WTマウスと *ob/ob* マウスの肝代謝糖応答性制御トランスオミクスネットワーク

WT マウスのトランスオミクス解析により、糖投与後にアロステリック制御（代謝物自身による代謝制御）が広範囲に行われることが示された（WT 特異的制御 6 2 7 + 共通制御 6 8）。一方 *oblob* マウスのトランスオミクス解析からは、WT マウスと比べてアロステリック制御が大幅に減少していることが示された（*oblob* 特異的制御 1 2 9 + 共通制御 6 8）。これは代謝物層において WT マウス特異的な応答を示した分子が多かったことに加え、WT マウス特異的の応答分子に ATP や NADP+ など多くの代謝反応に関わる代謝物が含まれたことによる。また遺伝子発現による代謝制御は、WT マウスと *oblob* マウス間で大きく異なることも示された（*oblob* 特異的制御 1 6 3 > WT 特異的制御 1 2 6 > 共通制御 4 4）。

4. 結果：トランスオミクスネットワークの縮約

巨大で複雑な代謝トランスオミクスネットワークの構造的特徴を捉えるために、代謝経路情報を用いたネットワーク縮約手法を構築した。この縮約手法により、大量の代謝酵素を代謝経路ごとにまとめることで縮約ネットワークを再構築し、各応答制御分子と代謝経路の関係を可視化した。



図：縮約されたWTマウス（上）と *ob/ob* マウス（下）のトランスオミクスネットワーク

縮約された **WT** マウスの糖応答代謝トランスオミクスネットワークの特徴は、インスリンシグナル層においてリン酸化された **Akt** が **Foxo1** リン酸化及び **Foxo1** 制御遺伝子発現を介して代謝経路を広範囲で制御すること、遺伝子発現による代謝制御は炭水化物・アミノ酸代謝経路より脂質代謝経路に多く見られること、**Srebf** 及び **Srebf** 制御遺伝子発現による代謝経路制御はコレステロール合成系（テルペノイド骨格合成＋ステロイド合成）に強くエンリッチしていること、代謝物による制御は広範な代謝経路に関わり、**ATP** や **NADP+** は多くの代謝経路に影響すること、などであった。

一方で縮約された **oblob** マウスの糖応答代謝トランスオミクスネットワークからは、インスリンシグナル層においてリン酸化された **Erk** が転写因子 **Egr1** を介していくつかの代謝経路を制御すること、遺伝子発現による代謝制御が代謝経路全般に及ぶこと、**WT** マウスで見られた代謝物による広範囲な代謝経路制御の多くは失われるが、**G6P** など解糖系上流代謝物による炭水化物代謝制御はマウス間で共通していること、などの特徴を見出した。

5. 考察

本研究で、私達は **WT** マウスと **oblob** マウスに対して経口糖負荷を行い、マルチオミクス解析により肝臓での大規模時系列データを測定し、**WT** マウスと **oblob** マウスにおける糖応答性の代謝制御トランスオミクスネットワークを同定した。**WT** マウスにおいては、負荷直後から **ATP** や **NADP+** などの補酵素を中心とした糖応答代謝物による代謝反応制御や **Akt** 制御下の糖応答遺伝子による代謝制御が行われていた。特に、糖応答代謝物による代謝制御は、糖代謝を含む広範囲の代謝経路を対象としており、糖負荷後の血糖の急激な変化に対する肝臓での代謝制御において中心的な役割を果たしていると考えられる。逆に、**oblob** マウスはこれらの糖応答代謝物による早い糖応答代謝反応制御のほとんどが失われている。これにより、**oblob** マウスの肝臓での代謝物による代謝制御の機能不全が、糖負荷後の高血糖の原因となることが示唆された。