

AMPK 関連酵素 SNARK による核内受容体 PPAR の機能調節の解析

2009 年 3 月修了

先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野

学生証番号 76523 氏名 齊藤万里江

指導教員 江角浩安教授

キーワード メタボリックシンドローム SNARK AMPK PPAR

【背景と目的】

SNF-1/AMPK-related kinase (SNARK) は AMP-activated protein kinase (AMPK) 関連キナーゼに分類されるセリン/スレオニンタンパク質キナーゼである。AMPK は細胞内において AMP:ATP 比を感知し、エネルギー不足になると異化作用を促進し、同化作用に関わる酵素を阻害する。また AMPK は体内においては個体のエネルギー代謝の調節にも深く関わっており、骨格筋では運動によるエネルギー消費の亢進を、肝臓では低血糖などによる栄養供給の減少などのストレスに応答して活性化し、個体のエネルギーバランスを調節することが知られている。SNARK は AMPK と同様に細胞内の栄養不足によって活性化することから、個体レベルの代謝調節に関与する可能性が考えられる。

Snark ヘテロ接合体欠損マウス(以下 *Snark*^{+/-} マウス)は 4 ヶ月齢から体重増加、内臓脂肪、皮下脂肪の増加、高脂血症などヒトのメタボリックシンドロームに類似した病態を示した。一方培養細胞の実験では SNARK が核内に局在し、遺伝子発現を調節する可能性が示唆された。これらのことから SNARK は代謝に関わる酵素を直接制御するのではなく、核内において遺伝子発現調節に関連することで、個体での脂質代謝の制御に関わるのではないかと考えた。そこで本研究では脂質代謝に大きな役割を持つ核内受容体 Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) に着目し、PPAR と SNARK の関連を探索することで、SNARK の脂質代謝における役割を明らかにすることを目的とした。

【結果と考察】

1 ヶ月齢 *Snark* ノックアウトマウスの各種臓器での脂肪酸代謝関連遺伝子発現の解析

体重の増加が見られる以前の 1 ヶ月齢の *Snark*^{+/+}マウス、*Snark*^{+/-}マウス、*Snark*^{-/-}マウスの肝臓、白色脂肪組織、褐色脂肪組織、筋肉において PPAR α と PPAR γ が転写を誘導する脂質代謝関連遺伝子の mRNA 量を定量 PCR で比較した。その結果、SNARK ノックアウトマウスの肝臓、骨格筋、白色脂肪組織において PPAR α 、PPAR γ の遺伝子発現が増加していた。また PPAR α によって転写が誘導される脂肪酸結合タンパク質 Adipose fatty acid binding protein (Afp2) または脂肪酸合成酵素 Fatty acid synthase (FAS) 遺伝子発現が増加していた。さらに肝臓においては脂肪分解酵素 Hormone sensitive lipase (HSL) 遺伝子が野生型と比較し、顕著に減少するという特徴が見られた。また臓器ごとに遺伝子発現パターンの違いが見られた。

以上の結果からマウス生体内において SNARK によって PPAR α 、PPAR γ およびその下流の脂質代謝関連遺伝子の発現量が制御されている可能性が示唆された。また *Snark* ノックアウトマウスの生体内において脂質蓄積と合成を促進する分子の遺伝子発現が出生後早期から増加していることから、SNARK の加齢に伴う肥満は SNARK 欠損による遺伝子の発現異常がもたらす代謝異常の蓄積が一因であると考えられた。

Snark ノックアウト胚性線維芽細胞 (MEF) を用いたリガンドの効果の検討

Snark ノックアウトマウスの臓器の遺伝子発現の解析結果から、SNARK が PPAR の転写活性を調節している可能性が示された。そこで細胞内において PPAR を介した遺伝子発現の変化が生じるか検討した。*Snark*^{+/+}、*Snark*^{+/-}、*Snark*^{-/-}の各遺伝子型の胎仔各 3 匹より分離した mouse embryonic fibroblast (MEF) を PPAR α リガンドおよび PPAR γ リガンドで処理し、内在性の PPAR を活性化した際、*Snark* 欠損によって下流の遺伝子発現が変化するか定量 PCR を用いて検討した。その結果、*Snark* ノックアウト MEF でリガンド依存的に PPAR 遺伝子発現量および PPAR 標的遺伝子である aP2 発現量が増加した。このことから SNARK は PPAR の活性を調節し、その下流の遺伝子の発現を制御している可能性が示された。

ヒト肝がん細胞を用いた SNARK の aP2 発現への影響の解析

MEF を用いた実験の結果から SNARK が PPAR の転写活性を阻害することで下流の遺伝子発現を抑制している可能性が示された。またこの現象はマウス特異的なものであるか確かめる必要がある。そこでヒト肝がん細胞 Huh-7 において PPAR γ と SNARK を共発現させ、PPAR γ 下流遺伝子である aP2 の発現量が SNARK によって制御されるか定量 PCR を用いて解析を行った。その結果、PPAR γ 強制発現によってコントロールと比較し、約 3 倍に増加した aP2 の mRNA 量が SNARK を共発現させることでコントロールの aP2 の mRNA 量と同程度まで減少した (図 1)。また SNARK のキナーゼ不活型変異体を共発現させた細胞においても aP2 遺伝子発現抑制は野生型 SNARK を共発現させた時と同程度に aP2 の mRNA 量の減少が見られた。一方 *Snark* ノックアウトマウス肝臓および *Snark* ノックアウト MEF で見られた HSL の mRNA 量の増加は見られず、むしろ Huh-7 細胞において SNARK を過剰発現した際には HSL 遺伝子の発現を抑制する傾向が見られた。

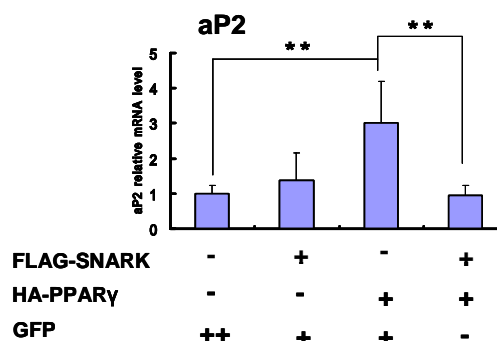


Fig.1 SNARKを強制発現させたHuh-7細胞におけるPPAR下流遺伝子発現量の解析

【まとめ】

以上の結果から SNARK は PPAR の転写活性化能を制御してその下流の脂質代謝関連遺伝子の発現を制御する可能性が示唆された。また aP2、HSL の発現パターンが臓器もしくは細胞種によって異なることから、SNARK による遺伝子発現の制御は正に働く場合と負に働く場合があることが示唆される。今後は SNARK と PPAR 転写共役因子との相互作用の解析によってより詳細な分子機構を明らかにし、PPAR 下流遺伝子制御の選択性や臓器特異性の原因を追究する必要がある。