

博士論文

小胞体ストレス応答因子による
代謝制御機構

東京大学大学院 農学生命科学研究科

応用生命化学専攻 食品生化学研究室

平成 25 年度進学 丸山 竜人

指導教員 佐藤 隆一郎

目次

略称	3
序論	8
第一章 小胞体ストレス応答因子 ATF6 α によるコレステロール代謝制御	
第一節 ATF6 α による脂質合成調節機能の検証	22
第二節 ATF6 α によるコレステロール合成の制御機構の解析	46
第二章 ストレス刺激における線維芽細胞増殖因子 FGF21 の機能解析	
第一節 小胞体ストレスにおける FGF21 の発現機構解析	62
第二節 小胞体ストレスにおける FGF21 の機能解析	80
第三節 ATF4 活性化刺激における FGF21 の発現解析	98
第三章 メチオニン・コリン欠乏食による FGF21 の機能解析	
第一節 メチオニン・コリン欠乏食摂取による FGF21 の機能解析	111
第二節 FGF21 によるアミノ酸代謝制御	131
第四章 ATF4 新規標的遺伝子の探索	145
第五章 総合討論	160
引用文献	166
要旨	187
謝辞	191

略称

25HC	25-Hydroxy Cholesterol
AACS	Acetoacetyl-CoA synthetase
AARE	Amino acid response element
ABCA1	ATP-binding cassette transporter 1
ABCG5	ATP-binding cassette transporter G5
ABCG8	ATP-binding cassette transporter G8
ACAT2	Acetyl-CoA acetyltransferase 2
ACC	Acetyl-CoA carboxylase
ACLY	ATP-citrate lyase
ACSS2	Acetyl-CoA synthetase
ADRP	Adipose differentiation-related protein
Ala	alanine
ALLN	N-Acetyl-Leu-Leu-Norleu-al
Ar	Sodium arsenite
AREG	amphiregulin
Arg	arginine
Asn	asparagine
ASNS	Asparagine synthetase
Asp	Asparatic acid
ATF3	Activating transcription factor 3
ATF4	Activating transcription factor 4
ATF6	Activating transcription factor 6
ATGL	Adipose triglyceride lipase
ATP	Adenosine triphosphate
bHLH-ZiP	Basic helix-loop-helix leucine zipper
BiP	Immunoglobulin heavy chain-binding protein
BPB	Bromo phenol blue
BSA	Bovine serum albumin
β TrCP2	F-box and WD repeat domain containing 11
bZiP	Basic leucine zipper
C12orf39	Chromosome 12 open reading frame 39
CALCB	Calcitonin-related polypeptide beta
CD36	Cluster of differentiation 36

C/EBP	CCAAT / enhancer-binding protein
CHKA	Choline kinase A
CHKB	Choline kinase B
Chol	Cholesterol
CHOP	C/EBP homologous protein
ChREBP	Carbohydrate-responsive element-binding protein
CMV	Cytomegalovirus
COPII	Coatomer protein II
CPT1 α	Carnitine palmitoyltransferase 1 α
CRE	cAMP-response element
CREB	Cyclic AMP response element binding protein
CREBH	Cyclic AMP response element binding protein 3-like 3
CRTC2	Transducer of regulated CREB activity 2
CSTA	Cystatin A
CYP51A1	Lanosterol 14 α -demethylase
Cys	Cysteine
del	deletion
DHCR7	7-Dehydrocholesterol reductase
DHCR24	Desmosterol reductase
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DTT	Dithiothreitol
EBP	3 β -hydroxysteroid- Δ^8,Δ^7 -isomerase
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
eIF2 α	Eukaryotic initiation factor 2 α
Eif4ebp1	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein
ER	Endoplasmic reticulum
ERAD	ER-associated degradation
ERSE	ER stress response element
FASN	Fatty acid synthase
FBS	Fetal bovine serum
FGF	Fibroblast growth factor
FPPS	Farnesyl diphosphate synthetase
Fsp27	Fat-specific protein 27
G6Pase	Glucose 6-phosphatase
GCN2	General control non-derepressible
Gln	glutamine

Glu	Glutamic acid
GLUT1	Glucose transporter 1
HBSS	Hank's balanced salt solution
HDL	High-density lipoprotein
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
His	histidine
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
HMGCR	HMG-CoA reductase
HMGCS	HMG-CoA synthase
HO1	Heme oxygenase 1
HRI	Heme-regulated eIF2 α kinase
HRP	Horse radish peroxidase
HSD17B7	17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase-7
IDI1	Isopentenyl diphosphate- Δ -isomerase
Ile	isoleucine
IRE1	Inositol-requiring enzyme 1
IgG	Immunoglobulin G
Insig	Insulin-induced gene
JNK	c-jun N-terminal kinase
LDL	Low-density lipoprotein
LDLR	Low-density lipoprotein receptor
Leu	leucine
LPL	Lipoprotein lipase
LSS	Lanosterol cyclase
luc	luciferase
Lys	lysine
MCD	Methionine choline deficient
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MEM	Minimum essential medium
Met	methionine
MVD	Mevalonate pyrophosphate decarboxylase
MVK	Mevalonate kinase
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
NF-Y	Nuclear transcription factor Y
NSDHL	NAD(P)H steroid dehydrogenase-like
OASIS	Old astrocyte specifically induced substance

ONPG	O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside
P/St	Penicillin / streptomycin
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBA	4-phenyl butyric acid
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PERK	PKR (protein kinase RNA)-like endoplasmic reticulum kinase
PGC-1 α	PPAR γ coactivator-1 α
PIC	Protease inhibitor cocktail
PKR	Double strand RNA-activated protein kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PMVK	Phosphomevalonate kinase
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
Pro	proline
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RMA	Robust multi-array average
RT	Reverse transcription
S1P	Site-1 protease
S2P	Site-2 protease
SC4MOL	Sterol C4-methyl oxidase
SC5DL	Sterol C5-desaturase
SCAP	SREBP cleavage-activating protein
SCD	Stearoyl-CoA desaturase
SDS	Sodium dodecyl sulfate / Threonine deaminase
Ser	serine
SHP	Small heterodimer partner
shRNA	small hairpin RNA
SNP	Single nucleotide polymorphism
SQLE	Squalene epoxidase
SQS	Squalene synthase
SRE	Sterol regulatory element
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein
TAD	Transactivation domain
Tdh	Threonine dehydrogenase
TG	triglyceride

Tg	thapsigargin
Tha	Threonine aldolase
Thr	threonine
Tm	tunicamycin
TM7SF2	Sterol C14-reductase-like
TRAF2	Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2
TRB3	Tribbles-related protein 3
Trp	tryptophan
TUDCA	Taurine-conjugated ursodeoxycholic acid
Tyr	tyrosine
UPR	Unfolded protein response
UPRE	Unfolded protein response element
Val	valine
WAD	Weighted average difference
WSF1	Wolfram syndrome 1
WT	Wild type
XBP1	X-box binding protein 1
ZiP	Leucine zipper domain

序論

・メタボリックシンドローム

食の欧米化や慢性的な運動不足に伴い肥満人口は過去 40 年間で 3 倍となっている。肥満には皮下脂肪型肥満と内臓脂肪型肥満があり、内臓脂肪型肥満は糖尿病、高血圧、脂質異常症といった生活習慣病を引き起こしやすいことが統計学的に知られている。これらの疾患が合併した場合の心血管疾患危険率は、疾患を持たない場合の 30 倍以上に達するともいわれている。このように内臓脂肪型の肥満によって複数の疾患が個人に集積した状態は、メタボリックシンドロームと呼ばれる(1)。

近年、人間ドック全国集計成績では肝機能異常を有する成人が急増しており、これには内臓脂肪型肥満者の増加が大きく関わっていると推測されている。肝機能異常の中でも脂肪肝は代表的な症状であり、患者数は国民の約 3 割にも達して年々増加している(2)。脂肪肝は中性脂肪が肝臓に過剰に蓄積した状態であり、放置すると肝炎から肝硬変に進展し、肝臓がんへと重篤な症状につながる。さらに、糖尿病などの糖代謝異常も併発するため、早期の改善が求められる。現在、脂肪肝や NASH (Non-alcoholic steatohepatitis) に対する治療法には食事療法や運動療法に加えチアゾリジン誘導体やフィブレート系薬剤などの薬物療法が用いられているが確立されていないのが現状である。よって、適切な予防・治療法の確立のためにも、肝臓の脂質代謝機構の解明は重要な課題となっている。

・小胞体ストレス

小胞体は全ての真核生物に存在する細胞小器官であり、脂質合成や分泌タンパク質などの正常なフォールディングに重要な役割を担っている。分泌タンパク質や膜タンパク質の高次構造の形成や糖鎖付加などが正常に起こらず、異常な立体構造をしたタンパク質が蓄積することによって生じることを小胞体ストレスと呼ぶ(3)。この現象は、過剰な飽和脂肪酸によっても引き起こされることも知られている(4)。

小胞体ストレスが生じた細胞は小胞体ストレス応答(UPR : unfolded protein response)と呼ばれる応答経路により対処する(5)(図 A)。すなわち、①タンパク質の翻訳抑制による小胞体内の負荷の軽減、②小胞体内の分子シャペロンタンパク質やフォールディング酵素の発現誘導③異常タンパク質のユビキチン・プロテアソーム系による分解、除去(小胞体関連タンパク質分解機構[ER-associated

degradation ; ERAD])反応が起こり小胞体ストレスを軽減する。そして、これらの応答でも異常が回復されない場合にはアポトーシスによる細胞死を誘導する。この小胞体ストレス依存性のアポトーシスに關与する転写因子として CHOP(C/EBP homologous protein)が明らかにされた(6)。CHOP は、C/EBP ファミリーのダイマー形成を抑制するドミナントネガティブ体として働くほか、CHOP 欠損マウスの MEF (mouse embryonic fibroblast)を用いた実験から、C/EBP β をダイマーパートナーとして標的遺伝子のプロモーター領域に存在する CHOP 結合部位に結合することでその転写活性を調節しアポトーシスを誘発することが知られている(7,8)。

小胞体ストレス応答因子は、小胞体膜タンパク質 ATF6 (activating transcription factor 6)、IRE1 (inositol-requiring enzyme 1)、PERK (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase)の3つが知られている。これらのタンパク質はユビキタスに発現しており、小胞体ストレスが生じていない場合、シャペロンタンパク質である BiP (immunoglobulin heavy chain-binding protein)と相互作用し、小胞体膜で不活性化状態となっている(9)。

ATF6

<ATF6 の活性化機構>

ATF6 はシャペロンタンパク質である BiP や GRP94 (glucose-regulated protein 94)遺伝子のプロモーター領域の 5'上流配列の解析から同定された ERSE 配列 (ER stress response element ; 5'-CCAATN₉CCACG-3')に結合するタンパク質としてクローニングされた bZip(basic leucine zipper)型転写因子である(10)。ATF6 は CREB (cAMP response element binding protein) / ATF ファミリーに属しホモダイマー、XBP1 とのヘテロダイマー(11)もしくは転写因子 NF-Y(nuclear transcription factor Y)と複合体を形成することが報告されている(12,13)。BiP などのシャペロンタンパク質以外にも、ERAD 関連の遺伝子が ATF6 の標的として報告されている(14,15,16)。

ATF6 は通常 BiP と結合して小胞体膜上に局在している。しかし、小胞体ストレスが生じると、BiP が小胞体の恒常性維持のためミスフォールディングタンパク質に結合し、ATF6 は解離する(17)。解離した ATF6 は COPII (coatamer protein II) 小胞によってゴルジ体へ移行し(18)、セリンプロテアーゼである S1P (site-1 protease)、メタロプロテアーゼである S2P (site-2 protease) の2つのプロテアーゼによる2段階のプロセッシングを受ける(19)。その結果、N末端の核内型 ATF6 が核に移行し、標的遺伝子のプロモーター上に存在する ERSE や UPRE(unfolded protein response element)に結合しシャペロンタンパク質やフォールディング酵素の発現を誘導する(20)(図 B)。また、ATF6 は XBP1 の発現も誘導し、複合的に分

子シャペロンなどの発現を誘導する(11)。

ATF6 には ATF6 α と ATF6 β の2つのサブタイプが存在する(13)。ATF6 α はシャペロンタンパク質などの遺伝子制御などを行い、小胞体ストレス応答で重要な役割を担っている。一方、ATF6 β は ATF6 α と同様の機構で活性化する。しかし、ATF6 β は ATF6 α の活性を抑制する報告(21)や ATF6 α 、ATF6 β の単独欠損マウスは正常に発生・成長するが、ATF6 α/β のダブル欠損マウスでは胎生致死になることから ATF6 α に対して相補的な機能があることが示唆されるなど(15)相反した結果が出ており、統一した見解は得られていない。

<ATF6 の脂質代謝における機能>

これまでに、ATF6 の脂質代謝での機能がいくつか報告されている。核内型 ATF6 はコレステロール代謝のマスターレギュレーターである転写因子 SREBP2 (sterol regulatory element binding protein 2) の転写活性化能を阻害し脂質合成を抑制すること(22)やマクロファージ細胞においては、酸化 LDL による ATF6 の活性化が CHOP の発現亢進を促しアポトーシスを誘導する報告がある(23)。また、ATF6 と類似した機構で活性化する転写因子 CREBH (cyclic AMP response element binding protein 3-like 3) と相互作用し、炎症系遺伝子の転写活性化を亢進する報告もなされている(24)。他のエネルギー代謝関連として、ATF6 が転写因子 CREB (cyclic AMP response element binding protein) のコアクチベーターである CRTC2 (transducer of regulated CREB activity 2) との相互作用の阻害により CREB の DNA 結合能を阻害し糖新生関連の遺伝子発現を抑制する(25,26)。また、膵 β 細胞において、ATF6 が Cyp7a1 (cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1) の発現を抑制する核内受容体 SHP (small heterodimer partner) の発現上昇を介してインスリンの遺伝子発現を低下させる(27)。骨格筋においては核内型 ATF6 と転写因子 PGC-1 α (PPAR γ coactivator-1 α) の相互作用が運動による小胞体ストレスを改善する(28)。

ATF6 α 欠損マウスは、小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン投与により脂肪肝を呈する(15,16)。ATF6 α の欠損により小胞体ストレスが過剰に持続し、C/EBP α の発現が抑制されることが原因と考えられている(29)。また、他の報告では小胞体ストレスによる脂肪酸酸化関連遺伝子の発現低下、脂肪滴コートタンパク質 ADRP (adipocyte differentiation-related protein) の発現亢進、apoB タンパク質の低下が原因であると示されている(30)。

臨床レベルにおいても ATF6 の一塩基多型(single nucleotide polymorphism ; SNP) は II 型糖尿病患者(31)や高コレステロール血症の患者に多く見られる。SNP の 1 つである M67V は ATF6 の転写活性化能が亢進し血中 LDL コレステロール及び ApoB 分泌の増加が報告されている(32)。これらのことから、ATF6 と脂質代謝

間のクロストークが考えられる。

IRE1

IRE1 は RNase 活性を持つキナーゼであり、小胞体ストレスによって BiP から解離すると、自己リン酸化し二量体を形成して活性化する。活性化した IRE1 は転写因子である XBP1 (X-box binding protein 1) の mRNA の特異的なスプライシングを引き起こす(33,34)。XBP1 は C 末端に転写活性化領域を持つ転写因子である。通常状態では 26 bp のイントロンが存在するためフレームシフトが起こり、不活性型のタンパク質を発現する。一方、小胞体ストレス下では IRE1 によるスプライシングによって転写活性化領域を持つタンパク質が産生され、標的遺伝子である BiP などの発現を誘導する。IRE1 は TRAF2 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 2) を介して炎症に関与する JNK (c-jun N-terminal kinase) を活性化することも知られている(35)。

PERK

PERK は小胞体膜リン酸化酵素であり、小胞体ストレスにより自己リン酸化し二量体もしくは多量体を形成して活性化する。活性化した PERK は翻訳開始因子の一つである eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2 α) をリン酸化し全般的な翻訳を抑制し小胞体の負荷を軽減する(36)。一方、リン酸化された eIF2 α は転写因子 ATF4 (activating transcription factor 4) の翻訳を選択的に活性化し抗酸化に関与する酵素の発現や CHOP の発現を誘導する(37,38)。

ATF4

ATF4 は ATF/CREB (activating transcription factor / cyclic AMP response element binding domain) ファミリーに属する塩基性ロイシンジッパー型転写因子である。脂肪組織や肝臓など様々な組織で広く発現しており(39)、小胞体ストレス、オートファジー、アミノ酸代謝、糖代謝などにおいて重要な役割を担っている(40)。ATF4 は標的遺伝子のプロモーター領域に存在する cAMP-response element (CRE) や Amino acid response element (AARE) に結合する(41)。ATF4 の活性は主に翻訳開始因子 eIF2 α のリン酸化を介した翻訳促進による制御を受ける。eIF2 α はアミノ酸枯渇では GCN2 (General control non-depressible 2)、小胞体ストレスでは PERK (PKR-like ER kinase)、ヘム欠乏や酸化ストレスでは HRI (Heme regulated eIF2 α kinase)、そしてウイルス感染時などに増加する double strand RNA では PKR (double-stranded RNA-activated protein kinase) の 4 つのキナーゼにより活性化される(42)(図 C)。ATF4 には複数の ORF が存在し通常時では翻訳が抑制されているが eIF2 α の活性化により特異的に翻訳亢進する(42)。ATF4 の標的遺伝子と

してはアポトーシス誘導因子である CHOP(43)、TRB3 (Tribbles-related protein 3) (44)や ATF3 (activating transcription factor 3) (45)、アスパラギン酸合成酵素である ASNS (Asparagine synthetase) (46,47)などがあげられる。また ATF4 は糖・脂質代謝と関連があることも報告されている。糖代謝においては ATF4 の標的遺伝子である Eif4ebp1 (Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein) は糖尿病におけるβ細胞の恒常性に寄与することが知られている(48)。脂質代謝においては ATF4 欠損マウスを用いた実験により脂肪分解や脂肪酸β酸化関連遺伝子発現の増加、高炭水化物食摂取による脂肪肝抑制が報告されている(49,50,51)。一方、ATF4 はリン酸化修飾を受けた後βTrCP2 (F-box and WD repeat domain containing 11)を介したユビキチン経路による分解制御も知られている(52)。

また、これら以外にも骨に高発現している OASIS (old astrocyte specifically induced substance)と呼ばれる転写因子が ATF6 と類似した機構で小胞体ストレスにより活性化し、小胞体ストレスを軽減させる機能を持つことが分かっている(53)。さらに、この ATF6 や OASIS と構造が酷似しているタンパク質が他にも複数存在することから、OASIS のように小胞体ストレスにより活性化する転写因子の新たな機能解明が期待されている。

・ コレステロールの生合成

コレステロール

コレステロールはリン脂質とともに細胞膜の主要構成成分であり、ビタミンD、胆汁酸、ステロイドホルモンの前駆体としても重要である。体内のコレステロールの多くが細胞膜に非エステル型として存在する。一方、副腎などのステロイドホルモン産生組織では脂肪酸を結合したエステル型がホルモン前駆体として貯蔵されている。この他に、コレステロールはヘッジホッグと呼ばれる分泌タンパク質の修飾分子であることが知られており、体形成に関与していることが報告されている。

SREBP

<SREBP の機能>

コレステロールは水に不溶であり過剰なコレステロールは毒性を有するため、細胞内のコレステロール量は厳密に調節されている。この調節に関与する重要な転写因子として SREBP (sterol regulatory element binding protein)が知られている。SREBP は LDLR (low density lipoprotein receptor)や HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A) synthase 遺伝子のプロモーターに存在する SRE 配列

(sterol regulatory element ; 5'-TCACNCCAC-3')に結合するタンパク質で bHLH-ZiP (basic helix-loop-helix leucine zipper)型の転写因子である(54,55)。SREBP にはそれぞれ異なる遺伝子から合成される SREBP-1 と SREBP-2 が存在する(56,57)。さらに、SREBP-1 には選択的スプライシングにより合成される SREBP-1a と SREBP-1c のアイソフォームが存在する。SREBP-1c は脂質代謝が活発な肝臓や白色脂肪組織で発現が高く、SREBP-1a、SREBP-2 は全身に発現している(56,57,58)。SREBP-1c は主に FASN (fatty acid synthase)や SCD1 (stearoyl-CoA desaturase 1)、ACC1 (acetyl-CoA carboxylase 1)など脂肪酸合成に関わる遺伝子群(59)、SREBP-2 は SQS (squalene synthase)や HMG-CoA reductase、HMG-CoA synthase、LDLR などのコレステロール代謝に関わる遺伝子群(60)、SREBP-1a は両群の発現制御に関与する(61)。

<SREBP の活性化機構>

SREBP は 2 回膜貫通型タンパク質で、小胞体膜タンパク質として合成される(62)。細胞内にコレステロールが十分量存在するときはコレステロールセンサーである SCAP(SREBP cleavage-activating protein)、SREBP の活性を負に制御する Insig (insulin-induced gene)と複合体を形成し小胞体膜上にとどまっている。一方、細胞内のコレステロール濃度が低下すると SCAP の構造変化が生じ、Insig と解離して COPII 被膜小胞によりゴルジ体へと輸送される。ゴルジ体へ輸送された SREBP は S1P、S2P による二段階の切断を受け、膜結合領域を失った N 末端側約 500 アミノ酸残基が切り出され、核内へ移行する(プロセッシング)(図 B)。核内型 SREBP はホモダイマーを形成して SRE 配列あるいは E-box 配列(5'-CANNTG-3')に結合する転写因子として機能する(63,64)。

コレステロール生合成酵素

コレステロールは、全ての細胞においてアセチル CoA を原料に約 30 段階の酵素反応を介して合成される。細胞内でのコレステロール合成経路の概略を図 D に示す。アセチル CoA から HMG-CoA までの合成は細胞質で行われ、その後小胞体膜に局在する HMG-CoA reductase によりメバロン酸が合成される。ラノステロール以降の合成は全て小胞体膜上で行われていると考えられている。コレステロール合成経路の中で HMG-CoA reductase は律速酵素であり、この阻害剤であるプラバスタチン等のスタチン系薬剤は高コレステロール血症の治療薬として世界中で多用されている。この他に HMG-CoA synthase 阻害剤や Squalene synthase 阻害剤などが発見され臨床への応用が期待されている。また、コレステロール合成酵素である NSDHL (NAD(P)H steroid dehydrogenase-like)遺伝子を欠損した患者では CHILD 症候群という皮膚疾患が見られる報告もある。

・小胞体ストレスと脂質代謝

小胞体ストレスとメタボリックシンドロームや脂質代謝とのクロストークに関する論文がいくつか報告されている。PERK 欠損マウスは膵β細胞が恒常的な小胞体ストレスによりアポトーシスを起こし I 型糖尿病の症状を呈する(65)。また、常染色体劣性遺伝の疾患で糖尿病、尿崩症などの代謝異常が見られる Wolfram Syndrome の原因遺伝子である WFS1 (Wolfram Syndrome 1)の SNP が II 型糖尿病の危険因子であることが知られている。WFS1 は小胞体膜に局在し、膵β細胞を用いた実験により小胞体ストレスを負に制御する(66,67)。また、マウスやヒトにおいて肥満により肝臓や脂肪組織に小胞体ストレスが生じることが報告されている(68,69,70,71)。高脂肪食負荷やレプチン欠損マウスなどの研究から、肥満状態では肝臓や脂肪組織での BiP の発現や eIF2αのリン酸化が亢進し、慢性的に小胞体ストレスが誘導され、インスリン抵抗性を惹起する(68)。肥満による小胞体ストレスはインスリンのみではなく、視床下部においてレプチン抵抗性を惹起するという報告もある(72,73)。小胞体ストレスは、ケミカルシャペロンである PBA (4-phenyl butyric acid)や TUDCA (taurine-conjugated ursodeoxycholic acid) の投与により軽減することが知られており、この薬剤の投与により、肥満状態におけるインスリン感受性が改善する報告(74,75)がある。そのため、小胞体ストレスと生活習慣病との強い関連が示唆されている。

肥満によって小胞体ストレスが誘導される原因として過栄養状態によるタンパク質合成の亢進、肥満によって増加したトリグリセリドや遊離脂肪酸、及び肥満により発生した酸化ストレスや炎症性サイトカインなどが複合的に働いていると考えられている(76,77,78,79)。さらに、肥満時の肝臓の小胞体膜ではリン脂質の質が変化するためにカルシウムイオンの輸送が阻害され、小胞体ストレスが生じること(80)、及び肥満によるオートファジーの減少が肥満に伴う小胞体ストレスの原因であることが報告されている(81)。

コレステロール量の低下で活性化される SREBP は小胞体ストレスによってもプロセシングが亢進する(82)。このプロセシング亢進の原因は小胞体ストレスによるタンパク質の合成が抑制された結果、SREBP のプロセシングに対して抑制的に働く Insig や BiP のタンパク質量が減少(83,84)及び caspase-3 であると考えられている(85)。この小胞体ストレスによる SREBP の活性化は腎近位尿細管細胞における脂質代謝を阻害しアポトーシスを誘発すること(86)、脂質合成を促進するが、BiP の過剰発現により SREBP 標的遺伝子の発現が低下し、肥満マウスの肝臓の脂質蓄積を抑制することが示されている(84,87)。

その他に、小胞体ストレス応答因子と脂質代謝の関与として、<1>肝臓特異的

XBP1 欠損マウスの肝臓における新規脂質合成が低下(88)、<2>CHOP 欠損によりβ細胞でのアポトーシス低下を介した I 型糖尿病の軽減(89)、<3>酸化ストレスや過酸化脂質の低減によるβ細胞の機能亢進(90)、<4>CHOP 欠損マウスの肝臓における PPARαなどの脂質代謝関連遺伝子発現の抑制不全(91)、<5>IRE1-XBP1 経路が脂肪細胞分化に必須である(92)などの報告がなされており、小胞体ストレスの脂質代謝における重要性が考えられる。

FGF21

<FGF21 の発現制御>

FGF(Fibroblast Growth Factor)は繊維芽細胞の増殖因子として精製・同定された(93)。FGF ファミリーは 22 種類存在し、FGF15/19、FGF21、FGF23 が FGF19 サブファミリーに属する。FGF15 はヒト FGF19 のげっ歯類のオルソログである(93)。FGF21 は肝臓や脂肪組織、膵臓、骨格筋などで発現している(94)。FGF21 と FGF19 のシグナル伝達にはβ-klotho が必須であり FGF 受容体と複合体形成することでシグナルが伝達される(95)。FGF 受容体には様々なアイソフォームが存在し、白色脂肪組織では FGFR1c、肝臓では FGFR4 の発現が高い(96)。脂肪組織で FGF21 は FGFR1c を介して脂質分解を亢進する(97)。肝臓において FGF21 は絶食時活性化される脂肪酸受容体 PPARα (peroxisome proliferator-activated receptor α) により誘導される(98)(図 E)。また絶食や小胞体ストレスで活性化する転写因子 CREBH やグルコース応答性転写因子 ChREBP (carbohydrate-responsive element-binding protein) も FGF21 の発現を制御することが知られている(99,100,101)。

<FGF21 の機能>

組み換えタンパク質を用いた研究から FGF21 は食事性肥満モデルマウスにおける体重増加の抑制や耐糖能改善、脂質合成関連遺伝子の発現低下(102,103,104)、ヒトやサルでは抗糖尿病効果が報告されている(105,106)。FGF21 トランスジェニックマウスでは STAT5 (Signal Transducer and Activator of Transcription 5)のリン酸化抑制による成長抑制(107)、寿命延長効果(108)、肝臓での CPT1α (carnitine palmitoyltransferase 1α)、HMGCS2 (HMG-CoA synthase 2) の発現亢進を介したケトン体合成亢進(98)が見られ、一方、FGF21 ノックダウンにより高脂肪低炭水化物食による肝臓トリグリセリドの蓄積が亢進する報告がある(109)。FGF21 欠損マウスでは白色脂肪組織での脂質分解が低下し肥満を呈する(110)。また FGF21 は PGC1α の発現亢進を介して G6Pase (glucose 6-phosphatase) や PEPCCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) の遺伝子発現を亢進し糖代謝を制御する(111)。脂肪組織では FGF21 の発現は PPARγにより亢進し、逆に FGF21 は PPARγ

の SUMO 化抑制を介して PPAR γ を活性化する(112)。さらに、FGF21 は GLUT1 (glucose transporter 1) やアディポネクチンの発現亢進に寄与し(103,113)、脂肪組織で発現した FGF21 も脂質代謝・糖代謝改善効果を有する。以上のことより、FGF21 が糖代謝、脂質代謝の重要な制御因子であると考えられ生活習慣病の創薬標的として期待されている。

・本研究の目的

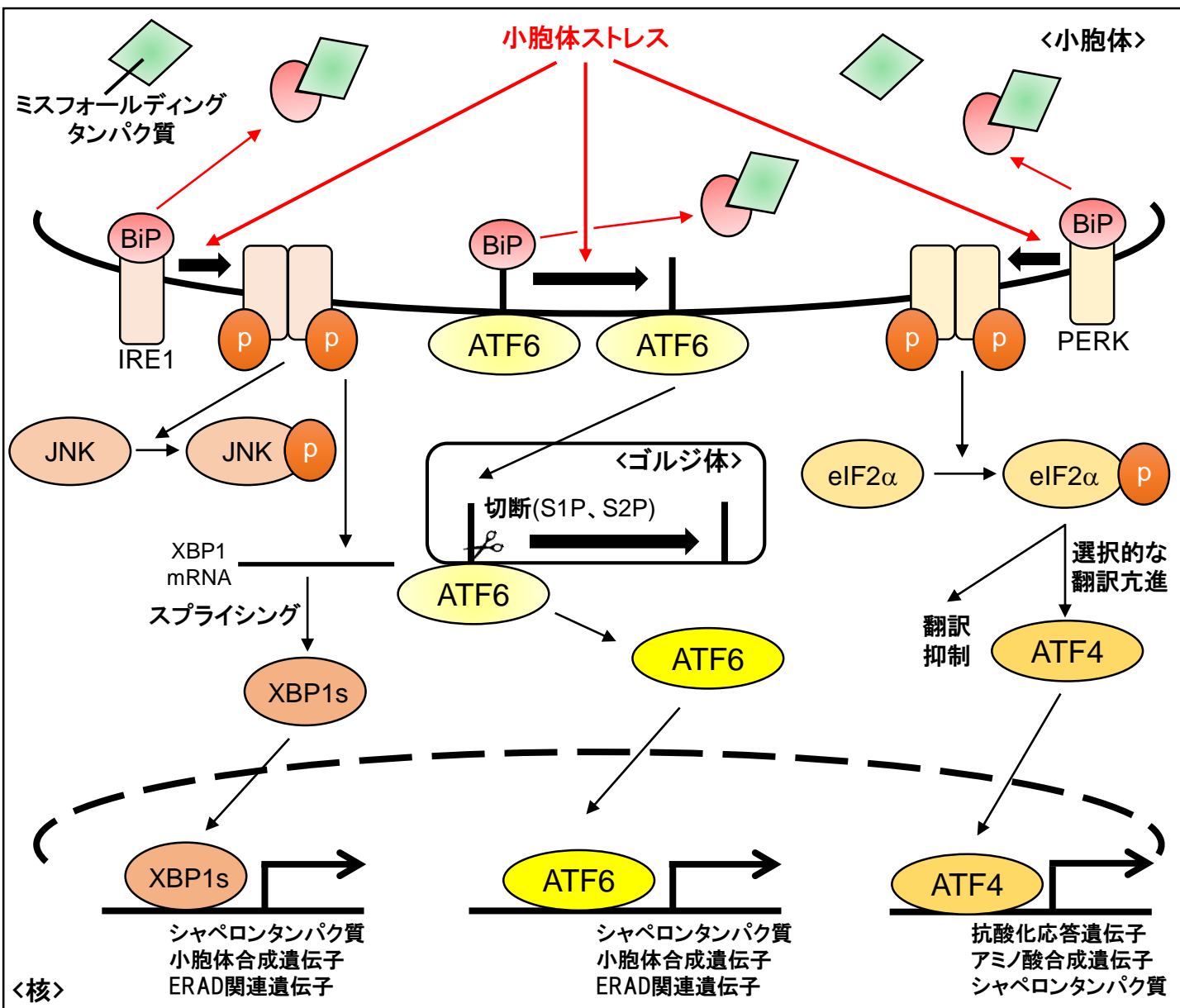
これまでに、肥満や糖尿病が小胞体ストレスを引き起こすこと、小胞体ストレスがインスリン抵抗性などを惹起する要因の一つであること、FGF21 が肥満や糖尿病に有用な因子であることが報告されている。

小胞体ストレス応答因子 ATF6 はコレステロール代謝のマスターレギュレーターである SREBP2 と活性化機構が類似している。また、ATF6 α 欠損マウスは小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンにより脂肪肝を呈する(15,16)。さらに、ATF6 は SREBP2 と相互作用すること(22)や、ATF6 の SNP の 1 つである M67V は、転写活性化能が増強し、血中 LDL コレステロール及び ApoB 分泌を増加する(32)など ATF6 と脂質代謝との関連性が示唆される。

さらに、我々は、FGF21 と同じサブファミリーに属する FGF19 の発現が小胞体ストレスにより亢進することを報告している(115)。このことより、FGF21 と小胞体ストレスの関係性が考えられ、小胞体ストレスと脂質代謝との新たなクロストークが推察される。

そこで、本研究では、ATF6 α の脂質代謝制御への関与や FGF21 の小胞体ストレスへの関与を詳細に調べ、小胞体ストレス応答因子の生理的な機能探索を目的とし、培養細胞及びマウス個体レベルでの実験系により制御機構及び生理的意義の検討を行った。

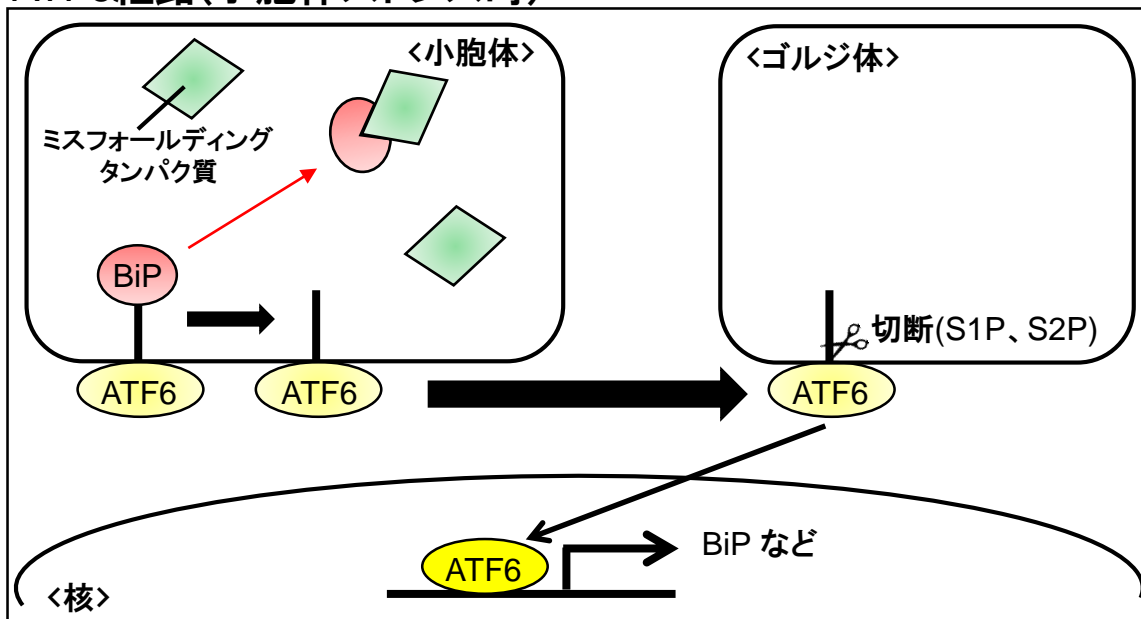
小胞体ストレス応答



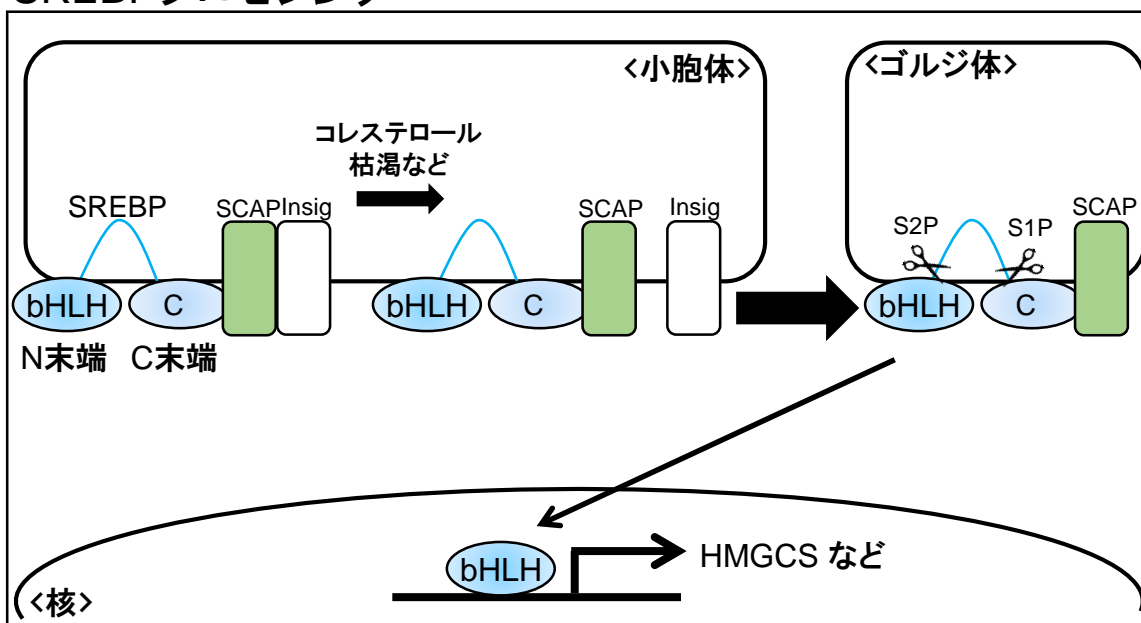
図A 小胞体ストレス応答の概略図

小胞体ストレスにより、ATF6、IRE1、PERKの3つの因子が活性化される。通常、BiPと相互作用することで小胞体膜に局在し不活性化状態となっている。ATF6は活性化するとBiPやXBP1、異常タンパク質を細胞質にて分解する小胞体関連タンパク質分解(ERAD)関連遺伝子の発現を亢進する。IRE1活性化はXBP1スプライシング(XBP1s)を引き起こし、下流遺伝子の発現を調節する。PERKはeIF2αをリン酸化することで全般的な翻訳を抑制する。リン酸化されたeIF2αはATF4の翻訳を亢進し、様々な遺伝子の発現を誘導する。

ATF6経路(小胞体ストレス時)

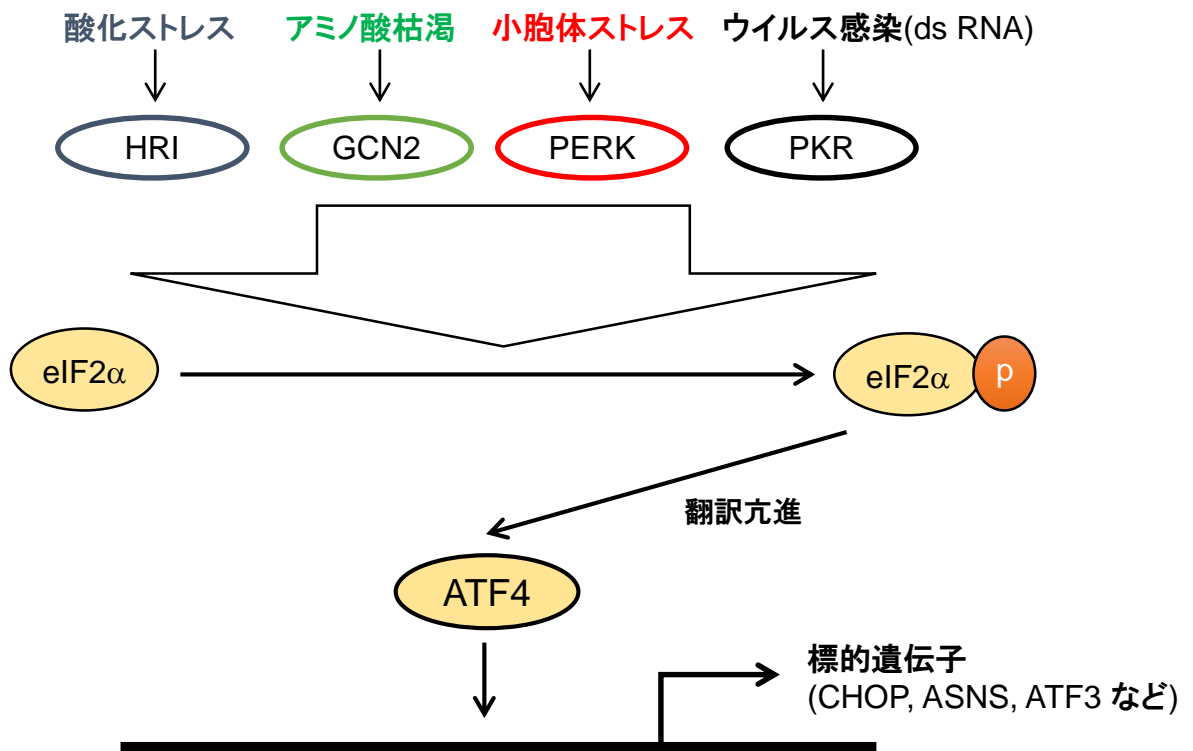


SREBPプロセッシング



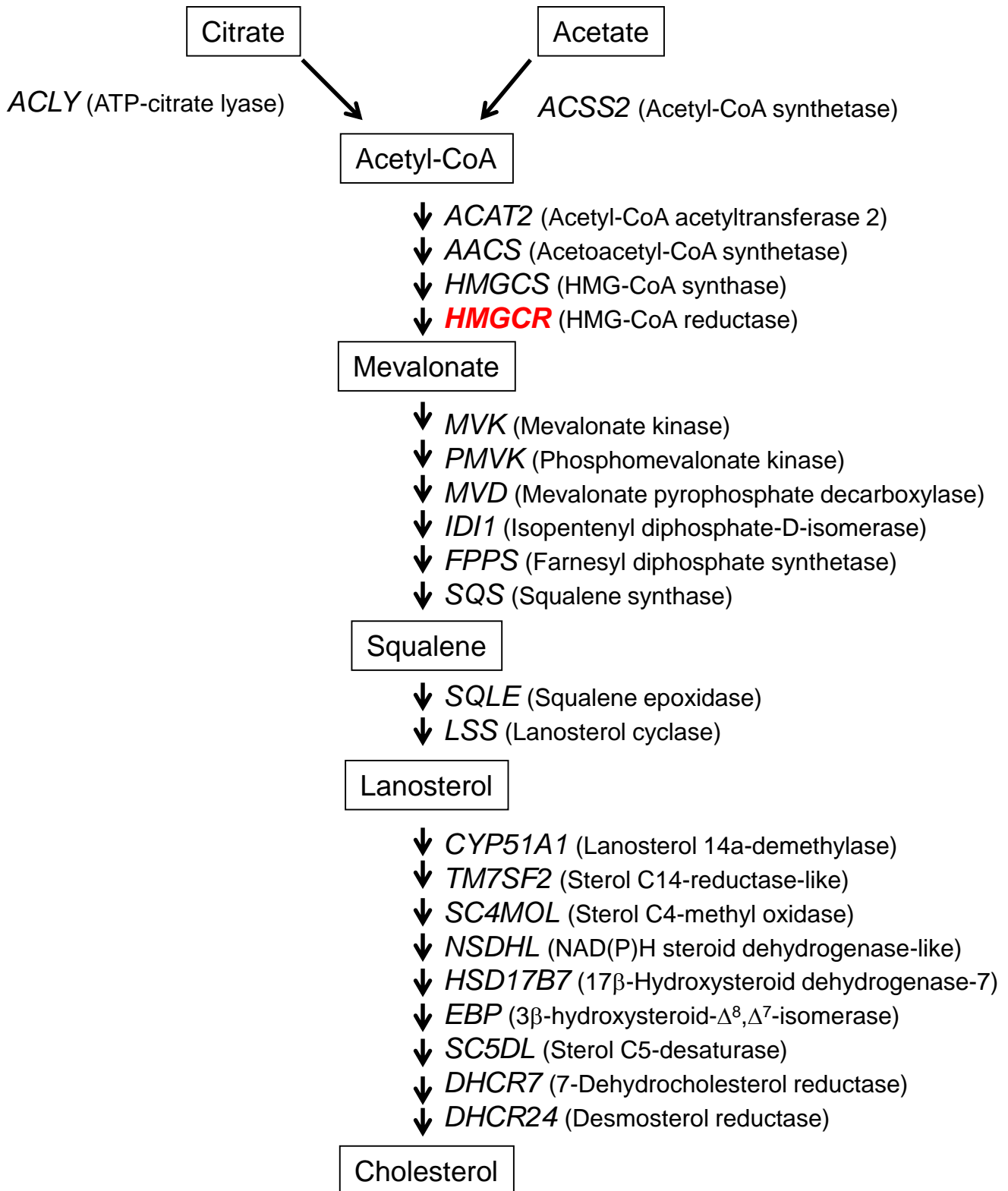
図B ATF6及びSREBPのプロセッシング機構

小胞体ストレスを感知すると、小胞体膜上のATF6はゴルジ体に移行し、2つのプロテアーゼ(S1P、S2P)により転写活性化領域を含む部分が切断され、核内へ移行する。一方、SREBPは細胞内のコレステロール量の低下によってInsigと解離しゴルジ体へ移行し2つのプロテアーゼ(S1P、S2P)により膜結合領域を失ったN末端側(bHLH; basic helix-loop-helix leucine zipper)約500アミノ酸残基が切り出され、核内へと移行する。このように、ATF6とSREBPプロセッシングの機構は類似している。



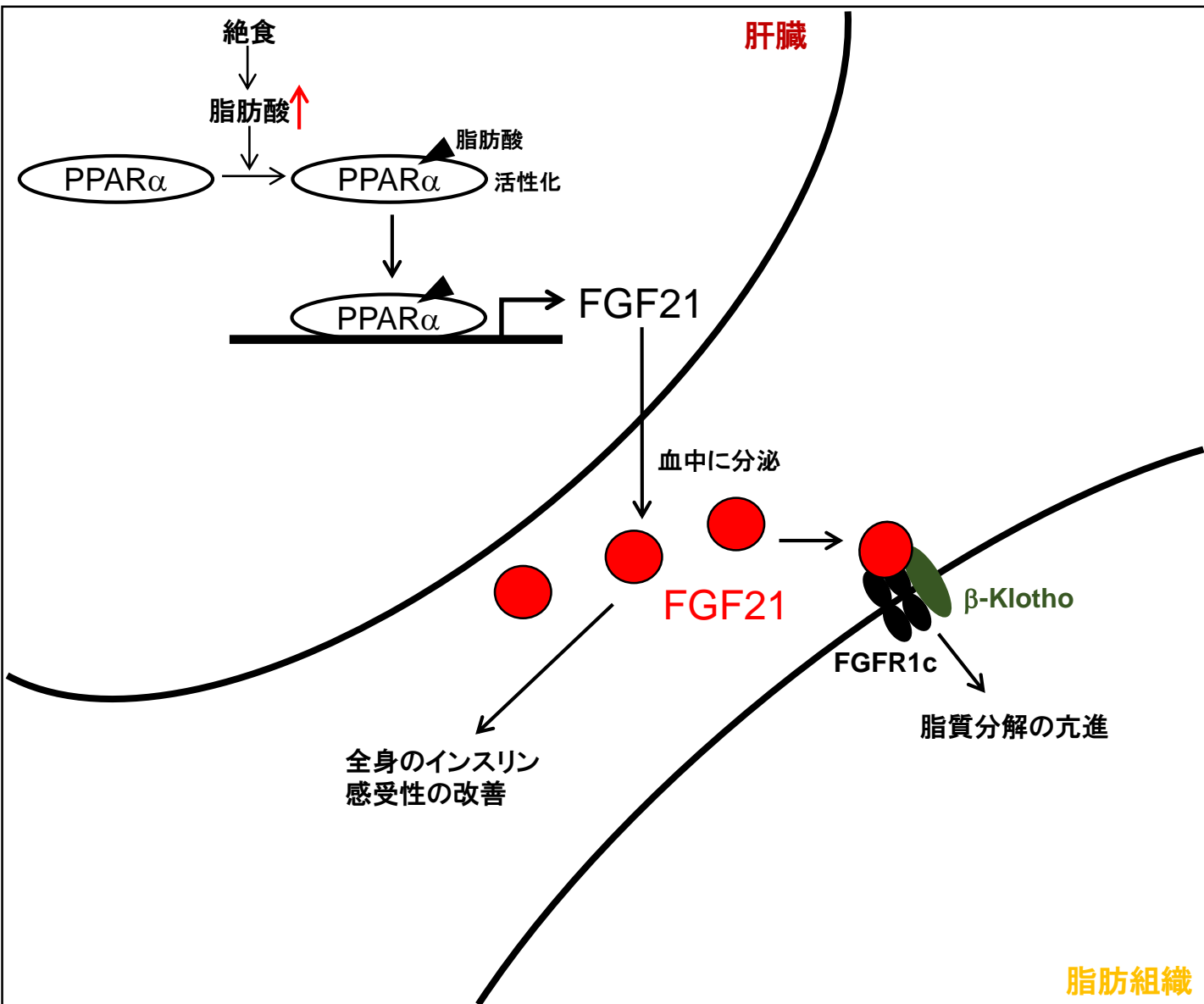
図C ATF4活性化の概略図

ATF4は塩基性ロイシンジッパー型転写因子である。様々な組織で広く発現しており、小胞体ストレスやアミノ酸代謝などにおいて重要な役割を担っている。ATF4はアミノ酸枯渇、小胞体ストレス、酸化ストレスそしてウイルス感染時などにeIF2 α による翻訳亢進を介して活性化される(42)。



図D コレステロール合成経路の遺伝子概略図

アセチルCoAを原料に約30段階の酵素反応を介してコレステロールを合成する(114)。HMG-CoA reductaseはコレステロール合成経路の律速酵素である。



図E FGF21発現の概略図

FGF21は内分泌性線維芽細胞増殖因子である。肝臓では絶食時などにより核内受容体であるPPAR α を介して発現亢進し血中へと分泌される(98)。分泌されたFGF21はFGF受容体及び β -Klothoとの複合体形成によりシグナルが伝達される。脂肪組織では脂質分解の亢進、肝臓ではケトン体合成の亢進、また全身のインスリン感受性の改善への効果が知られている。組織によりFGF受容体のアイソフォームの発現分布が異なる。

第一章

第一節

ATF6 α による脂質合成調節機能の検証

緒言

小胞体ストレスはミスフォールディングタンパク質が小胞体内に蓄積することによって生じる。また、小胞体ストレスは肥満や糖尿病においても見られ小胞体ストレスの軽減により肥満時のインスリン感受性が改善されることが報告されている。

ATF6 α は小胞体ストレスによって活性化する膜貫通型転写因子である。ATF6 α はコレステロール代謝のマスターレギュレーターである SREBP2 の活性を阻害し脂質合成を抑制する。また、II型糖尿病患者や高コレステロール血症患者における ATF6 α の SNP (M67V)は転写活性化能の亢進、血中 LDL コレステロール及び ApoB 分泌の増加が報告され、ATF6 α によるコレステロール代謝が示唆されている。これらの結果から、本節では ATF6 α が脂質代謝に与える影響について、肝細胞を用いた培養細胞の系を用いて詳細な解析を行った。

実験方法

- ・大腸菌の形質転換(トランスフォーメーション)

[形質転換用試薬]

- ・TFB1 (pH 5.8)

30 mM CH₃COOK、100 mM RbCl₂、10 mM CaCl₂、50 mM MnCl₂、15 % グリセロール

- ・TFB2 (pH 6.5)

10 mM MOPS (3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid)、75 mM CaCl₂、10 mM RbCl₂

[コンピテントセルの作成]

コンピテントセルは大腸菌株である TG1 (Zymo Research)及び Stbl3(invitrogen)を使用した。アデノウイルスベクターを増殖させる際には Stbl3 を、それ以外の場合には TG1 を用いた。原液のコンピテントセル 10 μ L を 3 mL の LB 培地で 37 $^{\circ}$ C、12 時間(TG1)~16 時間(Stbl3)振盪培養した(前培養液)。前培養液 1.5 mL を 250 mL の LB 培地で OD550 が 0.6 程度になるまで 37 $^{\circ}$ C で数時間培養後、氷上に 15 分程度放置して 4 $^{\circ}$ C で遠心した。上清を除き菌体に培養液の 1/10 量の TFB1 を加え丁寧に懸濁した。氷上に 5 分間放置した後、4 $^{\circ}$ C で遠心した。上清を除き、菌体に培養液の 1/25 量の TFB2 を加え丁寧に懸濁し、氷上に 15 分間放置した。1.5 mL チューブに 110 μ L ずつ分注し、液体窒素により急速冷凍した。

[大腸菌培養培地]

- ・LB 培地

LB Broth (SIGMA)を 1 L あたり 20 g となるように溶解し、オートクレーブ滅菌した。クリーンベンチ内で 50 mL チューブに小分けして 4 $^{\circ}$ C で保存した。

- ・アンピシリン

アンピシリン (SIGMA)の粉末を滅菌水で 100 mg/mL となるように調製し、0.45 μ m フィルター(Advantec)で濾過滅菌した後、1.5 mL チューブに分注し、-20 $^{\circ}$ C で保存した。

- ・カナマイシン

カナマイシン (SIGMA)の粉末を滅菌水で 20 mg/mL となるように調製し、0.45 μ m フィルター(Advantec)で濾過滅菌した後、1.5 mL チューブに分注し、-20 $^{\circ}$ C で保存した。

- ・アガロースゲル電気泳動

1×TAE(40 mM Tris-HCl (pH 7.5)、40 mM CH₃COOH、1 mM EDTA(ethylene diamine tetraacetic acid))にアガロース S(Wako)を加えて電子レンジで沸騰させ、アガロースを溶かした。ある程度冷めたところで SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen)を 1/10000 量加え、セットしたゲル作製のホルダーに注ぎ、コームを差して固めた。1×TAE を張った泳動槽にゲルを置き、DNA サンプルに 6×loading dye を加えてアプライした。マーカーは 1 kb DNA Ladder あるいは 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs)を用いた。泳動槽は Mupid-2plus (Advance)を用い、100 V で 30 分間通電することで電気泳動した。泳動が終了したゲルを Safe Imager (Invitrogen)にかざし、バンドを検出した。

・アガロースゲルからの DNA 断片回収

[GENECLEAN III KIT (MP Biomedicals)を用いた回収法]

目的の DNA 断片を含むアガロースゲルをメスで切り取り、1.5 mL チューブに移して NaI 溶液をアガロースの 3 倍量加え、55 °C でゲルを溶解した。EZ-GLASSMILK を 10 µL 加えて室温で 5 分静置した後、遠心して上清を除いた。沈殿を洗浄バッファー(New WASH 1.4 mL、エタノール 28 mL、滅菌水 31 mL)を 500 µL 加え 11000 rpm で 30 秒遠心し、上清を除いた。この洗浄操作は 2 回繰り返した。十分に風乾した後、沈殿に滅菌水を加え、5 分間静置した。15000 rpm で 2 分間遠心した後、上清を回収し、DNA 溶液とした。

・制限酵素処理

制限酵素は TaKaRa、TOYOBO、New England Biolabs より購入した。添付された適正なバッファーを用い、37 °C で一晩反応を行った。

・ライゲーション

vector : insert DNA = 1 : 3~1 : 10 のモル比となるように調製した DNA 溶液に ligation High (TOYOBO)を等量加え、16 °C で 2~3 時間反応を行った。

[形質転換]

DNA 溶液をコンピテントセル 50 µL に加え、氷上で 30 分間放置した。42 °C で 45 秒間ヒートショックを与えた後、氷上で 3 分間以上放置した。LB 培地 150 µL を加え 37 °C で 1 時間培養した後、ガスバーナーの近くでコーンラージ棒を用い、アンピシリンプレートに播いた。

・プラスミドミニプレップ(粗精製)

[プラスミド DNA 調製用試薬]

- Solution I (4 °C保存)

10 mM EDTA (pH 8.0)、25 mM Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM glucose

- Solution II (常温保存)

1 % SDS (sodium dodecyl sulfate)、0.2 M NaOH

- Solution III (4 °C保存)

3 M KOAc/Acetate

- TE (pH 8.0)

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA (pH 8.0)

- RNaseA

SIGMA から購入した。10 mg/mL となるように超純水を加えて溶かし、-20 °Cで保存した。

コロニーを 2 mL の 100 µg/mL アンピシリンまたは 20 µg/mL カナマイシンを含む LB 培地で 37 °C、6 時間振盪培養し、13000 rpm、4 °C で 1 分間遠心した。回収した菌体に Solution I 溶液を 100 µL 加え十分に懸濁した。Solution II 溶液を 200 µL 加え 10 回転倒混和し、Solution III を 150 µL 加え懸濁した。13000 rpm、4 °C で 3 分間遠心後上清を回収した。100 % エタノール 1 mL 加え混合後、13000 rpm、4 °C で 3 分間遠心後上清を除き、500 µL の 70 % エタノールを加え混合後 13000 rpm、4 °C で 1 分間遠心した。十分に風乾した後、沈殿を TE 溶液 50 µL に溶解した。得られたプラスミド DNA 溶液に 10 µg/mL の RNaseA を加え 37 °C で 30 分間処理した後、5 µL を制限酵素処理しアガロースゲル電気泳動を行うことでインサートの確認をした。

- プラスミドラージプレップ(細胞内遺伝子導入用)

Plasmid Midi Kit (QIAGEN)を用いて行った。以下に方法を示す。

コロニーを 100 mL の 100 µg/mL アンピシリンまたは 20 µg/mL カナマイシンを含む LB 培地で 37 °C、12 時間(TG1)~16 時間(Stbl3)振盪培養した。6000 rpm、4 °C で 5 分間遠心して菌体を回収し、Buffer P1(+100µg/mL RNaseA)を 4 mL 加え十分に懸濁した。Buffer P2 を 4 mL 加え 4~6 回転倒混合した後、3 分間室温でインキュベートした。冷却した Buffer P3 を 4 mL 加え 4~6 回激しく転倒混合し、15 分間氷上でインキュベートした。11000 rpm、4 °C、30 分間遠心後濾紙を用いて上清を濾過した。得られた上清は Buffer QBT を 4 mL 加え平衡化した QIAGEN-tip 100 に添加し自然落下により樹脂に浸透させた。Buffer QC を 10 mL 加えて QIAGEN-tip を洗浄し(2 回)、Buffer QF を 5 mL 加え溶出した。溶出した DNA 液に 3.5 mL のイソプロピルアルコールを加え混合後、11000 rpm、4 °C で 30 分間遠心した。上清を除き、70 % エタノール溶液 2 mL を加え、10000 rpm、4 °C で

10 分間遠心した。上清 1 mL 捨て、残りの上清を DNA 沈殿とともに 1.5 mL チューブに移し、15000 rpm、4 °C で 10 分間遠心した。上清を除去し、DNA 沈殿を風乾させた後、滅菌水に溶解した。

プラスミド

[pCMV-EGFP-ATF6 α]

[pGL3-BiP-luc]

京都大学大学院理学研究科の森和俊教授からご供与いただいた。

[pGL3-LDLR-luc]

[pGL3-SQS-luc]

[pGL3-HMGC α Syn-luc]

[pGL3-HMGC α Red-luc]

以前、当研究室で作製されたものを用いた。

[pCMV-3 \times FLAG-7.1]

SIGMA から購入した

[pENTR-1A]

[pAd-CMV-V5-DEST]

[pAd-CMV-V5-GW/lacZ]

invitrogen から購入した

[pCMV-3 \times FLAG-ATF6 α]

京都大学大学院理学研究科の森和俊教授からご供与いただいた pCMV-EGFP-ATF6 α を鋳型として 5' 末端に *Bgl*III、3' 末端に *Xba*I の制限酵素サイトを付加したプライマーを用いて PCR 反応により増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製し、*Bgl*III/*Xba*I 処理後、pCMV-3 \times FLAG7.1 の *Bgl*III/*Xba*I サイトに挿入した。

[pCMV-3 \times FLAG-ATF6 α (N)WT]

上記で作製した pCMV-3 \times FLAG-ATF6 α を鋳型として、ATF6 α 中の 1-373 のアミノ酸部位をコードする領域を増幅し、pCMV-3 \times FLAG-ATF6 α と同様の方法で作製した。

[pAd-CMV-3 \times FLAG-ATF6 α (N)WT]

pCMV-3×FLAG-ATF6α(N)WT を鋳型として、5'末端側に *Bg*III、3'末端側に *Not*I の制限酵素サイトを付加したプライマーを用いて、PCR 反応により 3×FLAG-ATF6α(N)WT を増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製し、*Bg*III/*Not*I 処理後、pENTR-1A の *Bg*III/*Not*I サイトに挿入した。このベクターと pAd-CMV-V5-DEST を Gateway LR Clonase (Invitrogen)反応により組み換えることで、目的のアデノウイルスベクターを得た。

・細胞培養

細胞培養試薬

ダルベッコ変法イーグル培地(Dulbecco's modified eagle's medium ; DMEM)は WAKO から購入した。Penicillin-Streptomycin 溶液(P/St)は(株)明治から購入した。ウシ胎児血清(fetal bovine serum ; FBS)は Benchmark から購入した。トリプシン粉末は Difco から購入した。コラーゲンコートディッシュは BD から購入した。25-Hydroxy Cholesterol (25HC)は SIGMA から購入した。

その他、特に指定のない実験試薬類は、Wako、ナカライテスク、SIGMA の特級、生化学実験用のものを用いた。

HuH7 細胞

HuH7 細胞は DMEM(High Glucose)、10 % FBS、P/St を用い、37 °C、5 % CO₂ インキュベーター内で培養し、2 × 10⁶ cells / dish の割合で継代を行った。

HEK293A 細胞

アデノウイルス作製に用いた HEK293A 細胞は DMEM(High Glucose)、10 % FBS、P/St を用い、37 °C、5 % CO₂ インキュベーター内で培養し、1 × 10⁶ cells / dish の割合で継代を行った。

HEK293 細胞

HEK293 細胞は DMEM(High Glucose)、10 % FBS、P/St を用い、37 °C、5 % CO₂ インキュベーター内で培養し、1 × 10⁶ cells / dish の割合で継代を行った。

・細胞培養試薬の調製

PBS(-)溶液

137 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na₂HPO₄、1.76 mM KH₂PO₄ を超純水で溶解し、オートクレーブした。

ウシ胎児血清(FBS)

-20 °C で凍結した血清の入った容器を 37 °C の温浴中で溶解した後、56 °C で 30 分間インキュベートし、補体成分の非働化を行った。50 mL チューブに分注し、-20 °C で保存した。

トリプシン溶液

トリプシン粉末を 0.5 % (w/v) になるように 0.02 % EDTA を含む PBS(-) に溶解し、0.02 μm フィルター (Millipore) で濾過滅菌したものを分注して -20°C で保存した。使用時に PBS(-) で 10 倍希釈して使用した。

ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (P/St)

500 μL ずつ分注し、 -20°C で保存した。使用時に培地 1/1000 量 (終濃度 100 units / mL ペニシリン、100 μg / mL ストレプトマイシン) 加えた。

25HC

エタノールで 1 mg / mL に調整し、 -20°C で保存した。

・細胞の継代

100 mm dish で培養した細胞を PBS(-) で洗浄した後、トリプシン溶液を 1 mL 加え、 37°C 、5 % CO_2 インキュベーター内で 5 分間インキュベートした。顕微鏡観察により細胞がはがれたのを確認した後、通常培養時に用いる培地 1 mL を加えてトリプシンを失活させ、15 mL チューブに回収した。800 rpm で 3 分間遠心後上清を除去し、培地を適量加え、ピペッティングにより懸濁した。ヘモサイトメーターを用いて細胞を計数し、必要な細胞数を含む一部の懸濁液を新たなディッシュに播いた。

・リン酸カルシウム法を用いた遺伝子導入

2.5 mM CaCl_2

超純水で 2.5 M に調製し、オートクレーブ滅菌して -20°C で保存した。

2 \times HBSS (pH 7.05)

0.28 M NaCl、10 mM KCl、1.38 mM NaH_2PO_4 、11.1 mM グルコース、42 mM HEPES

1 N NaOH で pH を 7.05 に合わせ、0.22 μm フィルター (Millipore) を用いて濾過滅菌した後、クリーンベンチ内で 1.5 mL チューブに小分けして、 -20°C で保存した。

リン酸カルシウム法による遺伝子導入は HEK293 細胞の場合に用いた。以下に 100 mm dish を用いた場合の遺伝子導入法を示す。

遺伝子導入を行う前日、遺伝子導入時に 60-70 % confluent の状態となるように細胞をセットアップした。プラスミド DNA : 10 μg 、2.5 mM CaCl_2 : 30 μL を含む溶液に滅菌水を加えて合計 300 μL とした。この溶液に 2 \times HBSS (pH 7.05) : 300 μL を一滴ずつ加え、20 回 bubbling を行い、室温で 20 分間インキュベートした。細胞にまんべんなく一滴ずつ添加し、 37°C 、5 % CO_2 のインキュベーター内で

培養し、5 時間後に培地交換を行った。

・ルシフェラーゼアッセイ

HEK293 細胞を 12 well plate に 1×10^5 cells / well となるように播種し、DMEM (High Glucose)、10 % FBS、P/St で培養した。翌日、リン酸カルシウム法を用いたトランスフェクションを行った。

遺伝子導入から 36 時間後に細胞を回収し、500 μ L の PBS(-)で洗浄した。1 \times Luciferase Lysis Buffer (25 mM Tris-phosphate (pH 7.8)、2 mM DTT、2 mM CDCA (trans-1,2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid)、10 % glycerol、1 % Triton x 100)を 100 μ L 加え、20 分間氷上で揺らしながらインキュベートした。

[ホタルルシフェラーゼアッセイ]

・Luciferase Substrate Reagent

20 mM Tricine、1.07 mM (MgCO₃)₄Mg(OH)₂·5H₂O、2.67 mM MgSO₄、0.1 mM EDTA、0.53 mM ATP(adenosine triphosphate)、33.3 mM DTT、0.27 mM coenzyme A、0.47 mM luciferin (Promega)を混合し、1 mL ずつ分注して、-20 °Cで遮光保存した。

アシストチューブ(SARSTEDT)中で Luciferase Substrate Reagent : 50 μ L に cell lysate : 5 μ L 加え、ホタルルシフェラーゼ活性を mini Lumat LB9506 (Berthold)により 1 秒間測定した。

[β -galactosidase (β -gal)アッセイ]

・0.1 M リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.5)

0.2 M Na₂HPO₄ : 0.2 M NaH₂PO₄ = 41 : 9 で混合し(混合するだけで pH 7.5 になる)、室温で保存した。

・100 \times Mg Solution

1 M MgCl₂ : 20 μ L、2-メルカプトエタノール(2-ME) : 63 μ L、滅菌水 : 117 μ L を混合した。4 °C保存。

・ONPG(*o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside)

0.1 M リン酸ナトリウムバッファーで 4 mg / mL に調製し、-20 °Cで遮光保存した。

氷冷した 96 well plate 上で β -gal Substrate Reagent : 90 μ L(100 \times Mg Solution : 1 μ L、ONPG : 22 μ L、0.1 M リン酸ナトリウムバッファー : 67 μ L)に cell lysate を 10 μ L 混合し、37 °Cでインキュベートした。発色が肉眼により確認されたところで、

405 nm (reference : 655 nm)の吸光度を測定した。

ホタルルシフェラーゼ活性の値を β -galactosidase 活性の値で除することでルシフェラーゼ活性の値とした。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定にはスチューデントのt検定を用いた。

・リポフェクタミン法を用いた遺伝子導入

リポフェクタミン法による遺伝子導入は HEK293A 細胞を用いた場合に行った。以下に 6 well plate を用いた場合の遺伝子導入法を示す。

プラスミド DNA : 1.5 μ g、PLUSTM Reagents(invitrogen) : 5 μ L を含む溶液に Opti-MEM(GIBCO)を加えて合計 250 μ L の DNA Mix を調製し、室温で5分間静置した。一方で 3 μ L の LipofectamineTM LTX(invitrogen)を 247 μ L の Opti-MEM に加えて優しく混和し LipofectamineTM LTX Mix を調製した。DNA Mix と LipofectamineTM LTX Mix を混和し、室温で20分間インキュベートした。得られた DNA complex の溶液 500 μ L を P/St を除いた培地 1.5 mL で培養している細胞にまんべんなく行き渡るように加えた。37 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ インキュベーターで培養し、6時間後に基本培地に培地交換した。

・アデノウイルスベクターによる遺伝子導入

[粗精製アデノウイルスの作製]

HEK293A 細胞を 6 well plate に 5×10^5 cells / well となるように播種し、翌日リポフェクタミン法により遺伝子導入した。目的の遺伝子を発現するアデノウイルスベクターは *PacI* で digestion させ、カラム精製したプラスミドを用いた。以下、遺伝子導入後から目的細胞へのインフェクションまでの操作は P2 レベルで行った。

遺伝子導入から6時間後に DMEM 培地(10 % FBS、P/St)で培地交換を行い、さらに48時間後に HEK293A 細胞を 100 mm dish へとトリプシンを用いて継代を行った。2~3日ごとに培地交換を行い、HEK293A 細胞群内に十分にプラークが形成されたら(約8~10日)、細胞と培地を回収し、-80 $^{\circ}$ Cで30分間静置後、すぐに37 $^{\circ}$ Cの湯浴内に移し15分間加温する作業を2回繰り返したあと、室温で3000 rpm、15分間遠心し、上清を回収することで粗精製アデノウイルスを得た(-80 $^{\circ}$ C保存)

[アデノウイルスの精製]

HEK293A 細胞を 100 mm dish に 3×10^6 cells / dish となるように播種し、翌日これまでに作製した粗精製アデノウイルスをインフェクションした。CO₂ インキュベーター内で2~3日間培養し、大部分の細胞が丸みを帯びる、あるいは浮かび

あがっていることを確認できたら細胞と培地を回収し、-80 °Cで 30 分間静置後、すぐに 37 °Cの湯浴内に移し 15 分間加温する作業を 2 回繰り返したあと、室温で 3000 rpm、15 分間遠心し、上清を回収することで精製アデノウイルスを得た (-80 °C保存)。

[アデノウイルスのタイターの検討]

HEK293A 細胞を 6 well plate に 1×10^5 cells / well となるように播種し、翌日目的の遺伝子を発現する精製アデノウイルス溶液を 10^{-3} ~ 10^{-8} の濃度で希釈し、それぞれを各 well にアプライし、一晚培養した。翌日、培地を除き、agarose overlay solution (2 mL DMEM (2 % FBS、P/St)、0.2 mL 4 % agarose)を加え、agarose が固まったら CO₂ インキュベーターに戻した。2 日後、さらに 1 mL の agarose overlay solution を重層し、さらに培養を続けた。およそ 10 日後、それぞれの well で形成されたプラークの数を計数することで各アデノウイルスのタイターを決定した。

・ RNA 抽出

6 well plate で培養した細胞の培地を除き、ISOGEN(ニッポンジーン)を 500 μ L / well ずつ加え、室温で 5~10 分間振盪したのち 1.5 mL チューブに移した。100 μ L のクロロホルムを加え、15 秒間ボルテックスした後、15000 rpm、4 °Cで 15 分間遠心した。上層を新しい 1.5 mL チューブに移し 250 μ L のイソプロパノールを加えボルテックスした後、15000 rpm、4 °Cで 20 分間遠心した。上清を除去し、1 mL の 70%エタノールを加え転倒混和後、15000 rpm、4 °Cで 10 分間遠心した。上清を除き、沈殿を風乾後 30 μ L の DPEC 処理水に溶解し RNA 溶液を得た。得られた RNA 溶液は分光光度計(NANO DROP1000)を用いて濃度測定後、DNase 処理を行い逆転写反応に供した。なお、RNA 溶液は-80 °Cで保存した。

・ DNase 処理

RNA サンプル 2 μ g、1/30 DNase I 溶液 4 μ L を含む溶液に DPEC 処理水を加えて合計 20 μ L の溶液を作製し 37 °Cで 30 分間、75 °Cで 10 分間反応を行った。

・ 逆転写反応(Reverse Transcription ; RT)

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems)を用いて RT を行った。以下にその方法を示す。

10 \times RT Buffer : 4 μ L

25 \times dNTP Mix (100 mM) : 1.6 μ L

10 \times RT Random Primers : 4 μ L

MultiScribe™ Reverse Transcriptase(200 U / μ L) : 1 μ L

DPEC 処理水 : 9.4 μ L

上記の試薬を混合し、master mix を調製した。PCR チューブに 20 μ L の DNase 処理したサンプル(2 μ g)と 20 μ L の master mix をピペッティングにより混合し、スピンドウンを行った。25 $^{\circ}$ C で 10 分間、37 $^{\circ}$ C で 120 分間逆転写反応を行った後、85 $^{\circ}$ C で 5 分間処理して逆転写反応を不活化した。

• Real-time PCR

モニタリング試薬として Taq[®]Man probe (Applied Biosystems) と SYBR Green (Roche)を用いて各遺伝子の発現量を定量した。基本的な反応液の組成を以下に示す

Taq[®]Man probe

Taq[®]Man Universal PCR Master Mix, NO Amp Erase UNG (2X)² : 5 μ L

20 \times Assay on Demand[™] Gene Expression Assay Mix : 0.5 μ L

滅菌水: 2.5 μ L

Template cDNA : 2 μ L

SYBR Green

Power SYBR Green PCR Master Mix : 5 μ L

10 μ M forward primer : 0.2 μ L

10 μ M reverse primer : 0.2 μ L

滅菌水 : 2.6 μ L

Template cDNA : 2 μ L

MicroAmp[™] Optical 96-well Reaction Plate (Applied Biosystems)中で上記の反応液を混合し、スピンドウンを行った後、ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems)を用いて反応及び定量を行った。それぞれの遺伝子発現は 36B4 の発現量で除することで補正した。また、1 回の試行につき 3 連のサンプルを用い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定にはスチューデントの t 検定を用いた。

SYBR Green で用いた各 primer を以下に示す。以下に記載していない遺伝子は全て Taq[®]Man probe で測定した。

h36B4 (116)	sense	5'-TGCATCAGTACCCATTCTATCA-3'
	antisense	5'-AAGGTGTAATCCGTCTCCACAGA-3'
hAACS	sense	5'-GCCACGCCCAATGTG-3'
	antisense	5'-CCAGGACAGTGATGCCTATCC-3'
hACAT2	sense	5'-GAGACTTACCCTAGGACGCC-3'

	antisense	5'-AGTTCTTGGCCACATAATTCCAC-3'
hACC	sense	5'-TGGGCCTCAAGAGGATTTGT-3'
	antisense	5'-TCCACTGTTGGCTGATACATAGATG-3'
hBiP(115)	sense	5'-GACCTGGGGACCCACTACTC-3'
	antisense	5'-TTCAGGAGTGAAGGCGACAT-3'
hCHKA	sense	5'-GGTTCTGGAGAGCGTTATGTTTG-3'
	antisense	5'-CCATAGAGTTTTGGCCCAAGTG-3'
hCHKB	sense	5'-AGCAGTTGCATTTTATTCGTCATTA-3'
	antisense	5'-TTGGGAGAGGGTCTCACCTTT-3'
hCYP51A1	sense	5'-TGCAGCCTGGCTCTTACCA-3'
	antisense	5'-AGCTCTGTCCCTGCGTCTGA-3'
hDHCR24	sense	5'-GCTGGACTCTCCCCGTGTT-3'
	antisense	5'-TGATCAAGCCCCCACTGT-3'
hDHCR7	sense	5'-GCAACCCAACATTCCCAAAG-3'
	antisense	5'-TGAGATGCGGTTCTGTCATTG-3'
hEBP	sense	5'-GGGTCTTAGTCGTGACCACATG-3'
	antisense	5'-CGCCAAGTCCCCAATGG-3'
hFASN (*)	sense	5'-GCAAATTCGACCTTCTCCAGAA-3'
	antisense	5'-GTAGGACCCCGTGGAATGTC-3'
hFPPS (*)	sense	5'-GCCCCAGCCGTCTTT-3'
	antisense	5'-CCTTGCAATCTCTAGGTCACCTTCT-3'
hHMGR	sense	5'-TACCATGTCAGGGGTACGTC-3'
	antisense	5'-CAAGCCTAGAGACATAATCATC-3'
hHMGRS (*)	sense	5'-GACTTGTGCATTCAAACATAGCAA-3'
	antisense	5'-GCTGTAGCAGGGAGTCTTGGTACT-3'
hHSD17B7	sense	5'-TGGCCATTTTATCCTGATTCG-3'
	antisense	5'-GCTGAGATGGATTGTCACTGTGA-3'
hIDI1	sense	5'-TTTCCAGGTTGTTTTACGAATACG-3'
	antisense	5'-TCCTCAAGCTCGGCTGGAT-3'
hLDLR (*)	sense	5'-CAGAGGCAGAGCCTGAGTCA-3'
	antisense	5'-CGGGTGTCTCAGGCACTTAA-3'
hLSS	sense	5'-TGAGGATAAGTCCACCGTGTGTTG-3'
	antisense	5'-GGCCCAACACCCAGAATTCT-3'
hMVD	sense	5'-GGGCAAGCGCGATGAA-3'
	antisense	5'-GACGCTCAGGGAGGAGTTGA-3'
hMVK	sense	5'-TGGACCTCAGCTTACCCAACA-3'

hNSDHL	antisense	5'-GACTGAAGCCTGGCCACATC-3'
	sense	5'-AGAATCAGGCCAAGAGATGCA-3'
hPMVK	antisense	5'-TGTGCTGCCCCAGGAATC-3'
	sense	5'-AAATCCGGGAAGGACTTCGT-3'
hSC4MOL	antisense	5'-GCACAGACATCAGCTCCAAGTCT-3'
	sense	5'-GAAAAGCCGGCACCAAGA-3'
hSC5DL	antisense	5'-TCAAAGAGAGAATCAGCTCAAAGTCT-3'
	sense	5'-TTCACCTTGTGGGATAGGATTGG-3'
hSQLE	antisense	5'-CCCTTCCCCTCAAAGGATGA-3'
	sense	5'-AGAAAGGTGACAGTCATTGAGAGAGA-3'
hSQS (*)	antisense	5'-CCCGGCTGCAGGAATTC-3'
	sense	5'-ATGACCATCAGTGTGGAAAAGAAG-3'
hTM7SF2	antisense	5'-CCGCCAGTCTGGTTGGTAA-3'
	sense	5'-GCCACCCTCACCGCTTT-3'
	antisense	5'-GCTACCTGCGCCTTCATGTAG-3'

* : David Mangelsdorf 教授、Steven Kliewer 教授(テキサス大学サウスウエスタン
メディカルセンター 米国)よりプライマー配列情報をいただいた

・ ウエスタンブロッティング

RIPA buffer

50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 % NP-40、0.25 %
deoxycholate

4 °Cで保存し、使用時に protease inhibitor cocktail (PIC) (SIGMA) を全体の 1/100
量、25 mM カルパイン阻害剤(N-acetyl-Leu-Leu-Norleu-al ; ALLN) (Nacalai Tesque)
を 1/500 量、100 mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)(SIGMA)を 1/100 量とな
るように加えた。

6 × Laemmli Sample Buffer

1 M Tris-HCl (pH 6.8) : 2.8 mL、glycerol : 3 mL、SDS(Sodium dodecyl sulfate) : 1
g、DTT : 0.93 g、BPB (bromo phenol blue) : a few (色がつく程度) / 10 mL

-20 °Cで保存し、使用時に 95 °Cで5分間の処理をした。

6 well plate で培養した細胞を回収し、PBS(-)で洗浄した後、RIPA buffer を 200
μL / well 加えた。スクレイパーで掻きとって 1.5 mL チューブに回収し、氷上で
30 分間静置した。3000 rpm、4 °Cで5分間遠心し、適量の上清を 1.5 mL チュー
ブに移し、1/5 量の 6 × Laemmli Sample buffer を加え、37 °Cで30分間処理した。

これをタンパク質サンプルとしてポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に供した。

[SDS-PAGE]

・30 % (w/v) Acrylamide bis (29 : 1)

アクリルアミド(モノマー)と N,N'-メチレンビスアクリルアミドを 29 : 1 (w/w) の割合で、合わせて 30 % (w/v)となるように超純水に溶解し、4 °Cで保存した。

・分離ゲル(10 % ミニゲル 1 枚)

1 M Tris-HCl (pH 8.8) : 2.25 mL、30 % Acrylamide-bis (29:1) : 2 mL、超純水 : 2.19 mL を混合した後、10 % (w/v) 過硫酸アンモニウム(Ammonium persulfate ; APS) : 60 μ L、TEMED(N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine) : 3 μ L を加えた。ボルテックで激しく攪拌し、5 mL をセットしたゲル板に流し込んだ。1 mL の超純水をすばやく重層し、1 時間室温で放置した。なお、濃度の異なるゲルの作成時は Acrylamide-bis (29 : 1) と超純水の比を変えて調節した。

・濃縮ゲル(3 %)

1 M Tris-HCl (pH 6.8) : 0.7 mL、30 % Acrylamide-bis (29:1) : 0.6 mL、超純水 : 3.3 mL を混合した後、10 % APS : 40 μ L、TEMED : 2.5 μ L を加えた。ボルテックで激しく攪拌し、重層した超純水を除いた分離ゲルの上に流し込んだ。コームをすばやく挿し、30 分間室温で放置した。

ゲルボックスに泳動バッファー(25 mM Tris、192 mM Glycine、0.1 % (w/v) SDS)を入れ、ゲル板の下部に泡が入らないように注意しながらゲル板をセットした。さらにゲル板の内側にも泳動バッファーをウェルよりも高い位置まで満たした。コームをゆっくりと抜き、サンプルを 5~25 μ L(15 μ g)アプライして、100 V 定電圧で電気泳動を行った。なおマーカーには All Blue Precision marker (BioLabs)を用いた。

[ブロットイング]

セミドライ式ブロットイング装置(Bio craft)を用いてブロットイングを行った。

PVDF(polyvinyliden difluoride)メンブレン(Immobilon ; Millipore)を 5.5 cm \times 9 cm の大きさに切り、メタノールに 1 分間浸したあと、ブロットイングバッファー(100 mM Tris、192 mM Glycine、5 % メタノール)に 10 分間浸した。濾紙は 6 cm \times 10 cm の大きさに切りブロットイングバッファーに浸した。

泳動後のゲルをゲル板から外し、ブロットイングバッファーに浸した後、下側から濾紙 2 枚、ゲル、メンブレン、濾紙 2 枚の順にブロットイング装置にセットした。ブロットイングはメンブレン 1 枚につき 120 mA の定電流で 60 分間行った。

[抗体反応]

抗体

抗 β -actin 抗体(1:1000)は Chemicon から購入した。HRP(horse radish peroxidase) 標識抗 mouseIgG 抗体(1:2000)は JacksonImmunoResearch から購入した。抗 FLAG 抗体(M2)(1:5000)は SIGMA から購入した。ウエスタンブロッティングを行う際に、抗体は 5 %スキムミルク/PBS-T(Phosphate-buffered saline-Tween20)溶液で括弧内の濃度に希釈して使用した。

・ PBS-T

ポリオキシエチレン(20) ソルビタンモノラウレート(Wako、ICI 社商標 Tween20 相当)を終濃度 0.1 % となるように PBS(-)に加え、混合した。

・ ブロッキング溶液

5 % (w/v)の濃度になるようにスキムミルク粉末(Wako)を PBS-T で溶解した。

メンブレンをブロッキング溶液に浸し、室温で 1 時間もしくは 4 °C で一晩ゆっくり振盪することでブロッキングした。適当な濃度に希釈した一次抗体溶液にメンブレンを浸し、室温で 1 時間インキュベートした。十分量の PBS-T にメンブレンを浸し 10 分間激しく振盪することで 3 回洗浄した。HRP 標識二次抗体をブロッキング溶液で適当な濃度に希釈し、室温で 30 分間インキュベートした。十分量の PBS-T にメンブレンを浸し 10 分間激しく振盪することで 3 回洗浄した。

ECL もしくは Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)にメンブレンを 1~2 分間浸し、検出試薬を除去した。シグナルはルミノイメーリア ナライザー-LAS-1000 mini (FUJIFILM)で検出し、ImageGauge ソフトウェアで解析を行った。

・ 脂肪酸、コレステロールの新規合成量の定量

6 well plate で培養した HuH7 細胞を DMEM(10 % FBS、P/St)、0.5 μ Ci [1 - 14 C]-Acetic acid を含む培地で 6 時間培養し、PBS(-)で 2 回洗浄して、500 μ L の PBS(-)で細胞を回収した。5000 g で 5 分間遠心し上清を除き、100 μ L の滅菌水で懸濁した。懸濁液を、400 μ L の 10 N KOH を入れたねじ口試験管に加えた後、等量(500 μ L) の 100 % エタノールを加え、100 °C で 2 時間加熱し、鹼化を行った。試験管を常温に戻し、等量の石油エーテルを加えて、10 秒間ボルテックス後スピンドウンし、上清の有機層を回収した。この操作を再度行いコレステロール画分とした。コレステロール画分回収後の水層に半量(0.5 mL)の 12 N HCl を加えボルテックスし、弱酸遊離反応により脂肪酸の塩を遊離した。反応熱が十分に引いたら、等

量(1.5 mL)の石油エーテルを加えて、10 秒間ボルテックス後スピンドウンし、上清の有機層を回収した。この操作を再度行い脂肪酸画分とした。得られたコレステロール画分及び脂肪酸画分はドラフト内にて 80 °Cのヒートブロックを用い乾固した。乾固したサンプルに $\text{CH}_3\text{Cl} : \text{MeOH} = 2 : 1(\text{v/v})$ を 120 μL 加え 5 秒間ボルテックスし脂質成分を融解させ、パスツールピペットを用いて全量を TLC プレート(MERCK)にスポットし、移動相(ヘキサン:ジエチルエーテル:酢酸 = 70:30:1)を用いて展開した。検出は FLA-5000 (FUJIFILM)を用いて行い、コレステロール及び脂肪酸のバンドを定量した。

実験結果

コレステロール合成関連遺伝子の発現は ATF6 α により亢進する

小胞体ストレスにより ATF6 α の N 末端の 373 アミノ酸が切断され核内型となる(図 1-1)。まず、ヒト肝癌由来細胞である HuH7 細胞にアデノウイルスを用いて N 末端に FLAG タグを付加した核内型 ATF6[3 \times FLAG-ATF6 α (N)] (以後 ATF6 α) を過剰発現させ肝臓における ATF6 α によるコレステロール生合成関連遺伝子の発現変動を検討した。ウイルス感染から 15 時間後に培地交換し、その後 48 時間後に RNA を回収した。リアルタイム PCR による発現解析の結果、ATF6 α の標的遺伝子である BiP とコレステロール合成関連遺伝子である HMG-CoA Synthase(HMGCS)、HMG-CoA Reductase(HMGCR)、Squalene Synthase(SQS)及び LDLR の遺伝子発現を解析した。その結果、ATF6 α の過剰発現により既知の標的遺伝子である BiP と同様に、HMGCS、HMGCR、SQS の発現が亢進し(図 1-1)、LDLR の発現は減少していた(図 1-1)。他のコレステロール合成経路に関与する酵素(21 種類)の遺伝子発現変動を調べたところ、NSDHL や HSD17B7 などの発現亢進が見られた(表 1)。また、25-Hydroxycholesterol (25HC)を添加し、SREBP の活性を抑制した場合も同様の結果が得られた(表 1)。

ATF6 α はコレステロール合成関連遺伝子のプロモーターを活性化する

次に ATF6 α による発現制御のメカニズム解明のため、ルシフェラーゼアッセイを用いて ATF6 α によるコレステロール合成関連遺伝子のプロモーター活性を検討した。HEK293 細胞に HMGCS(117)、HMGCR、SQS(117)のヒトのプロモーター配列を組み込んだルシフェラーゼベクターと N 末端に FLAG タグを付加した核内型 ATF6 α [3 \times FLAG-ATF6 α (N)]をトランスフェクションしルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、ATF6 α により既知の標的遺伝子である BiP のプロモーター活性と同様に HMGCS、HMGCR、SQS のプロモーター活性の有意な上昇が見られた(図 1-2)。一方、ATF6 α による LDLR プロモーターの活性上昇は見られなかった(図 1-2)。これらの結果は遺伝子発現変動の結果(図 1-1)と一致していた。

ATF6 α は新規コレステロール合成を亢進する

ATF6 α によるコレステロール合成を検討するためにラジオアイソトープを用

いた新規コレステロール合成の定量実験を行った。この実験系では 25-Hydroxycholesterol (25HC)を添加して行った。これは、コレステロール合成では SREBP2 による制御が大きく、その効果を排除するために 25HC の添加により SREBP2 のプロセッシングを抑制した。HuH7 細胞にアデノウイルスを用いて核内型 ATF6 α を過剰発現させ、ウイルス感染から 15 時間後に 1 μ g / mL 25HC を添加、その 48 時間後に 14 C でラベルされた[1- 14 C]酢酸を 120 kBq/well となるよう添加し、6 時間後に回収した後にコレステロール及び脂肪酸合成の定量を行った。過剰発現により ATF6 α のタンパク質量の増加が確認できた(図 1-3A)。また、リアルタイム PCR による発現解析から ATF6 α により HMGCS などの遺伝子発現亢進も確認された(図 1-3B)。新規脂質合成定量の結果、ATF6 α の過剰発現により新規のコレステロール合成の亢進、新規脂肪酸合成の減少(図 1-3C)が見られた。この現象は 25HC 非添加の時にも確認された(data not shown)。

考察

本節では、小胞体ストレス応答因子 ATF6 α が肝細胞における脂質合成調節機能について検討を行った。核内型 ATF6 α を用いた実験の結果、ATF6 α の過剰発現によってコレステロール合成関連の遺伝子発現(図 1-1、表 1、図 1-3B)が亢進しFASNなどの脂肪酸合成関連の遺伝子発現の変動は見られなかった(図 1-3B)。これは、Zeng らが報告していた核内型 ATF6 α による脂質合成抑制効果(22)と相反する結果であった。Zeng らはヒト肝癌由来細胞である HepG2 細胞を用いているが、本研究では HuH7 細胞を用いたため細胞種の違いによって生じた可能性がある。このコレステロール合成機構の詳細を調べるためコレステロール合成関連遺伝子である HMGCS、HMGCR、SQS の ATF6 α によるプロモーター領域を解析した結果、ATF6 α によってこれらの遺伝子のプロモーター活性の上昇が見られ(図 1-2)、またラジオアイソトープを用いた実験により ATF6 α の過剰発現による新規コレステロールの合成亢進(図 1-3C)、新規脂肪酸合成は抑制することが示された(図 1-3C)。高脂肪食を与えた ATF6 α ノックアウトマウスの膵 β 細胞では脂質蓄積が亢進している報告(118)もあり、ATF6 α はコレステロールと脂肪酸合成で異なる機能を有している可能性も考えられる。また、25HC を添加し SREBP のプロセッシングを抑制した条件下では ATF6 α によるコレステロール合成が通常状態よりも顕著に見られた(data not shown)。原因として、SREBP2 によるコレステロール合成の制御がなくなったため、通常状態では SREBP2 の影響が大きく ATF6 α によるコレステロール合成亢進は寄与率が低い可能性がある。本節では、ATF6 α はコレステロール合成関連遺伝子の発現を亢進してコレステロール合成を促すことが明らかとなった。

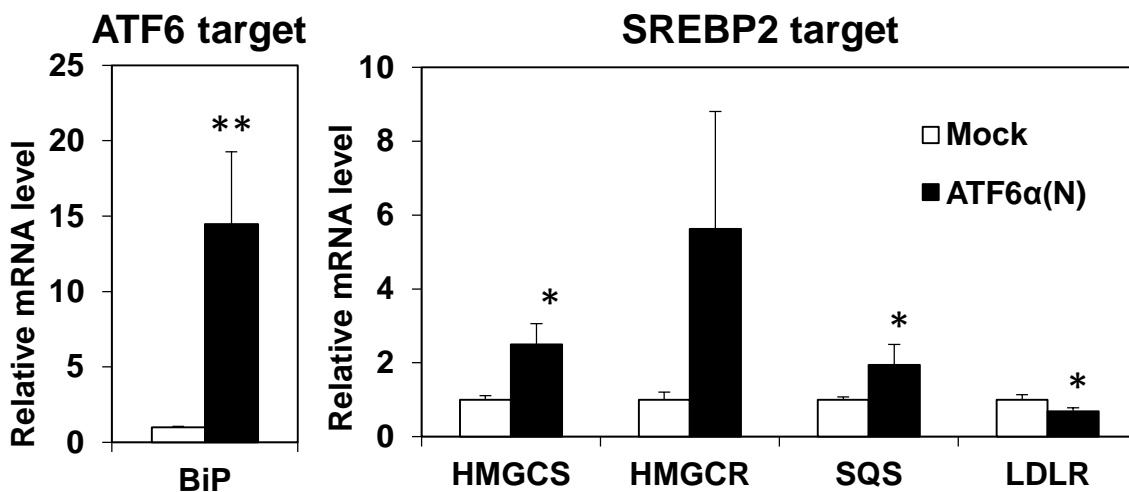
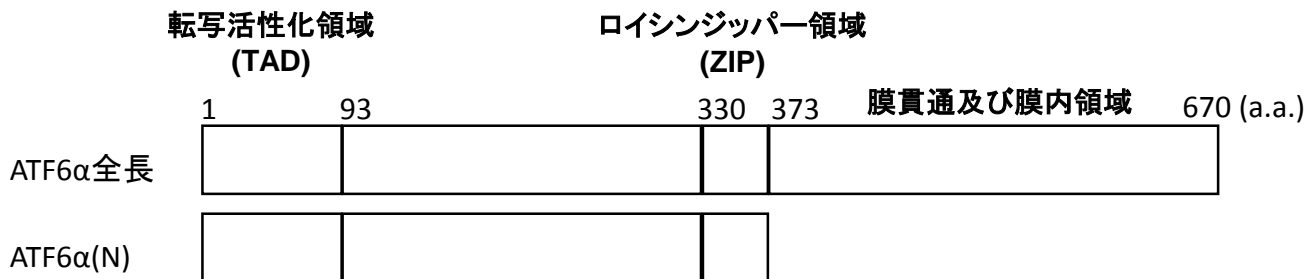


図1-1 核内型ATF6αによるコレステロール合成関連遺伝子の発現変動

HuH7細胞にアデノウイルスであるAd-LacZ及びAd-FLAG-ATF6α(N)をMOI=10で感染させた。感染後15時間後に培地交換し、その48時間後にRNAを回収しリアルタイムPCRを用いた発現解析を行った。それぞれの遺伝子の発現量は36B4の発現量で除することで補正した。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定にはスチューデントのt検定を用いた。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

Cholesterol biosynthesis

	Gene	Vehicle		25HC		
		Fold change	Pvalue	Fold change	Pvalue	
Acetyl-CoA ↓	ACAT2	0.76	*	0.24	**	
	AACS	1.72	*	1.49	*	
	HMGCS	2.50	*	5.86	**	
	HMGCR	5.62		7.46	*	
Mevalonate ↓	MVK	1.27	*	1.69	**	
	PMVK	1.26	*	0.73	*	
	MVD	2.38	**	8.63	**	
	IDI1	2.54	*	4.69	**	
	FPPS	0.99		1.24	**	
	SQS	1.95	*	2.38	**	
	SQLE	1.55	*	2.18	**	
Squalene ↓	LSS	1.37		0.99		
	CYP51A1	1.25	*	1.24		
Lanosterol ↓	TM7SF2	1.31		1.69	*	
	SC4MOL	1.39	**	4.59	**	
	NSDHL	3.35	*	9.55	**	
	HSD17B7	2.15	**	6.84	**	
	EBP	1.18		0.59	**	
	SC5DL	1.34	*	1.62	*	
	DHCR7	1.41		1.66	**	
	DHCR24	0.97		0.63	**	
	Cholesterol ↓	LDLR	0.69	*	0.77	*
		ABCA1	1.40		0.76	*
ABCG5		0.84		0.30	*	
Cholesterol uptake	ABCG8	0.94		0.28	**	
	CHKA	1.38	*	1.50	**	
Cholesterol efflux	CHKB	1.20		0.83	*	
Phospholipid biosynthesis						

表1 核内型ATF6αによるコレステロール合成関連遺伝子の発現変動

HuH7細胞にアデノウイルスをMOI=10で感染させた。感染後15時間後に1 μg / mL となるよう25HCを添加した。添加48時間後にRNAを回収しリアルタイムPCRを用いた発現解析を行った。それぞれの遺伝子の発現量は36B4の発現量で除することで補正した。1回の試行につき3連で行い、平均値を算出した。有意差検定にはスチューデントのt検定を用いた。
*:p<0.05,**:p<0.01

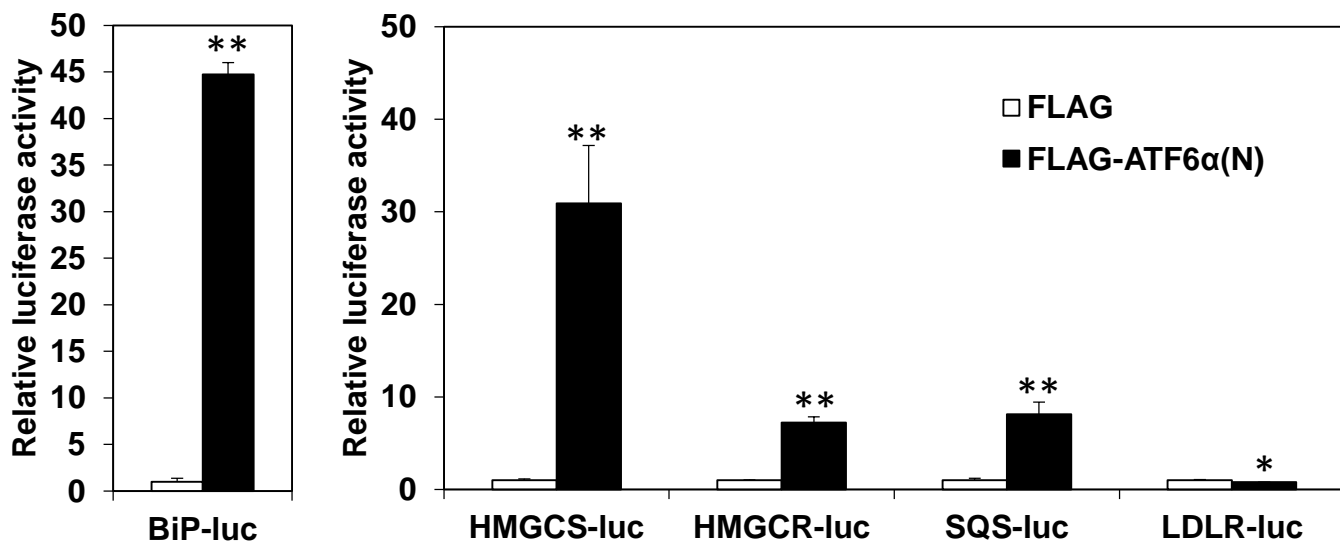
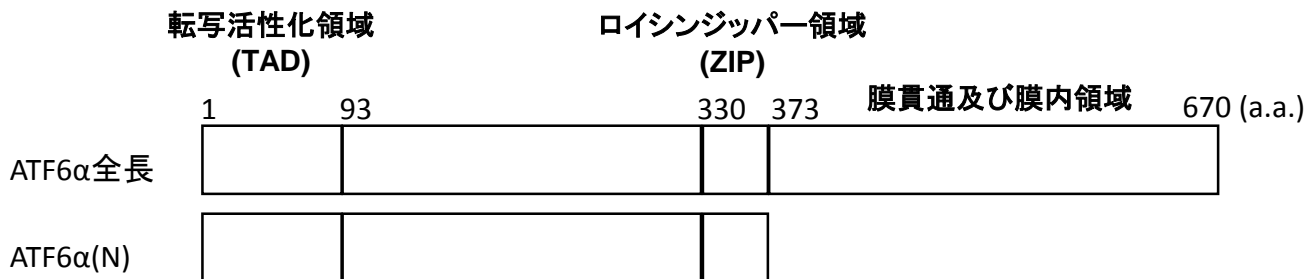
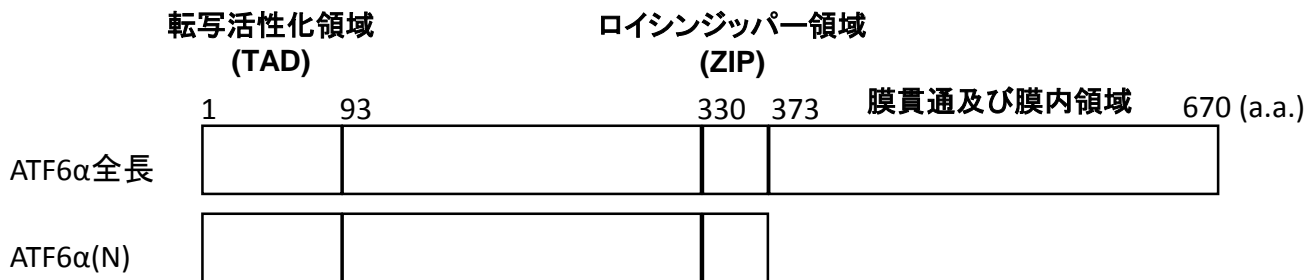
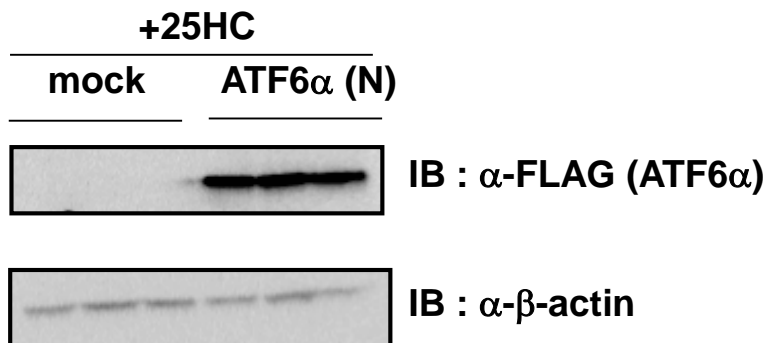


図1-2 核内型ATF6αによりコレステロール合成関連遺伝子のプロモーター活性が上昇する
HEK293細胞に発現ベクターであるFLAG-ATF6α(N)およびHMGCS,HMGCR,SQS,LDLR
のプロモーター領域を含むルシフェラーゼプラスミド、β-galactosidaseの発現プラスミドをト
ランスフェクションした。トランスフェクションから48時間後にルシフェラーゼアッセイに供し、ホタ
ルルシフェラーゼ活性の値をβ-galactosidase活性の値で除することでルシフェラーゼ活性の
値とした。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定にはス
チューデントのt検定を用いた。*:p<0.05,**:p<0.01



A



B

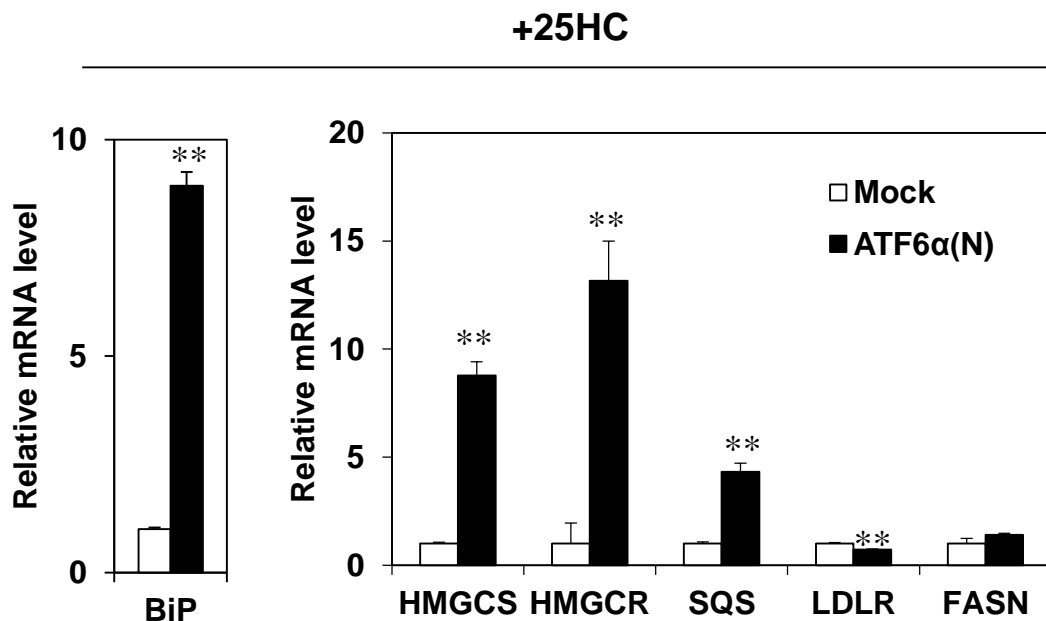
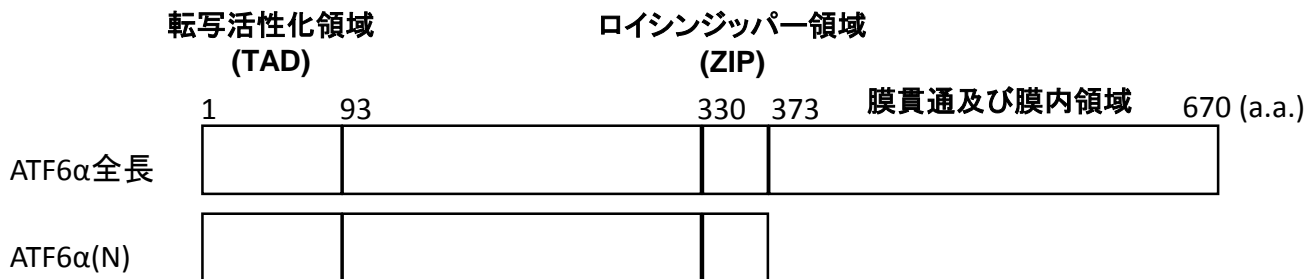


図1-3 核内型ATF6αによる新規脂肪酸及びコレステロール合成の定量

HuH7細胞にアデノウイルスをMOI=10で感染させた。感染後15時間後に1 μg / mL となるよう25HCを添加した。添加48時間後に¹⁴Cでラベルされた酢酸を添加し6時間後に回収した。A:核内型ATF6αの発現をウエスタンブロットにて確認した。B:RNAを回収しリアルタイムPCRを用いた発現解析を行った。それぞれの遺伝子の発現量は36B4の発現量で除することで補正した。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定にはスチューデントのt検定を用いた。**:p<0.01



C

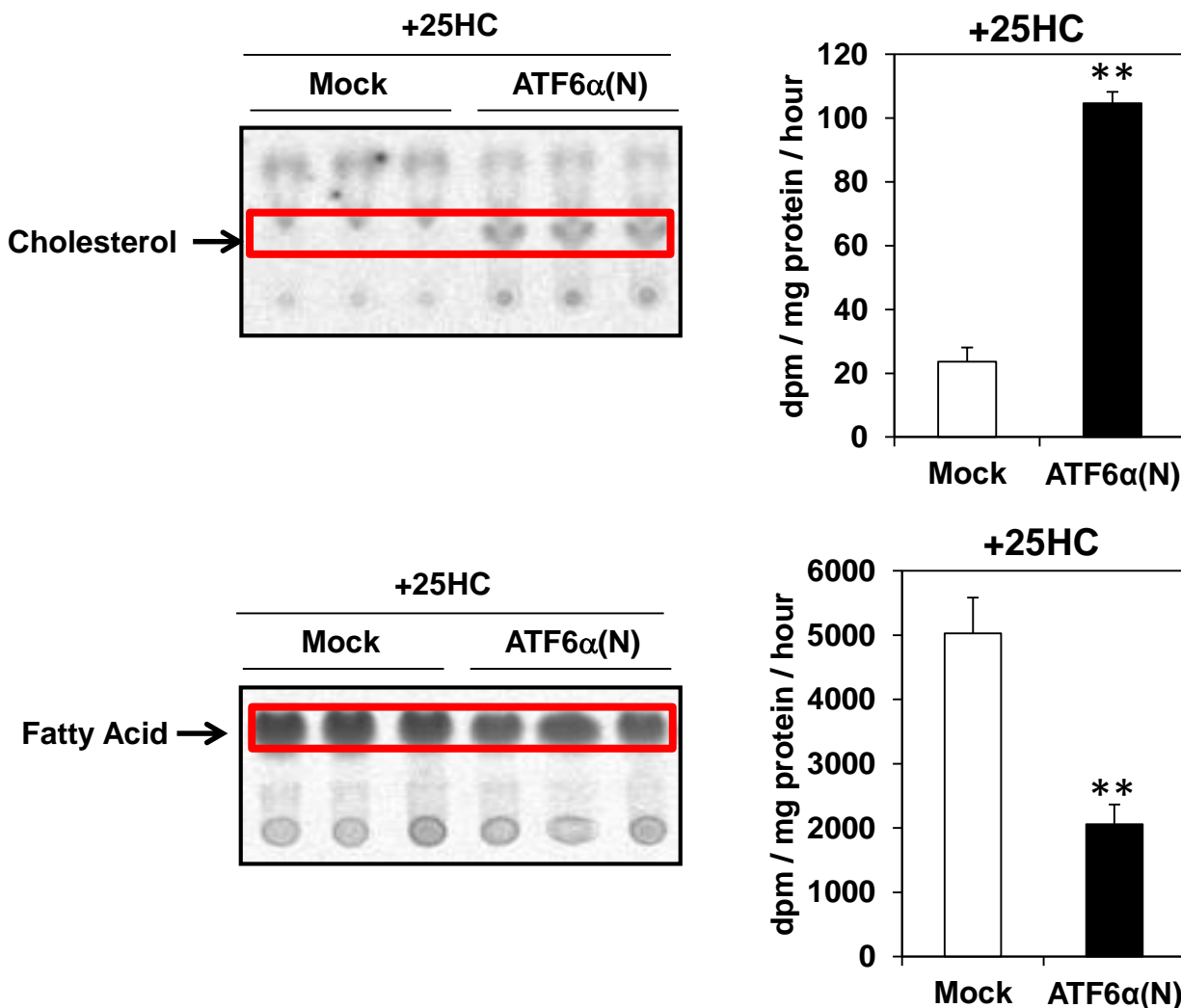


図1-3 核内型ATF6αによる新規脂肪酸及びコレステロール合成の定量

HuH7細胞にアデノウイルスをMOI=10で感染させた。感染後15時間後に1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ となるよう25HCを添加した。添加48時間後に ^{14}C でラベルされた酢酸を添加し6時間後に回収した。C:新規脂肪酸及びコレステロールの定量(右図は定量化したグラフ)。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定にはスチューデントのt検定を用いた。**: $p < 0.01$

第一章

第二節

ATF6 α によるコレステロール合成の制御機構の 解析

緒言

第一節において核内型 ATF6 α がコレステロール合成関連遺伝子の発現及びプロモーター活性を制御し、コレステロール合成を亢進させることが示された。本節では、ATF6 α によるコレステロール合成促進の作用機序について検討を行った。

実験方法

- ・大腸菌の形質転換(トランスフォーメーション)
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・アガロースゲル電気泳動
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・アガロースゲルからの DNA 断片回収
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・制限酵素処理
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・ライゲーション
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・プラスミドミニプレップ(粗精製)
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・プラスミドラージプレップ(細胞内遺伝子導入用)
第一章第一節実験方法の項に準じた。

プラスミド

第一章第一節実験方法の項に準じた。

第一節に記載のないプラスミドは以下の通りである。

[pCMV-3×FLAG-ATF6 α (N) Δ ZiP]

pCMV-3×FLAG-ATF6 α を鋳型として、ATF6 α 中の 1-330 のアミノ酸部位をコードする領域を増幅し、pCMV-3×FLAG-ATF6 α と同様の方法で作製した。

[pAd-CMV-3×FLAG-ATF6 α (N) Δ ZiP]

pCMV-3×FLAG-ATF6 α (N) Δ ZiP を鋳型として、5'末端側に *Bgl*III、3'末端側に *Not*I の制限酵素サイトを付加したプライマーを用いて、PCR 反応により 3×FLAG-ATF6 α (N) Δ ZiP を増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製し、

*Bgl*III/*Not*I 処理後、pENTR-1A の *Bgl*III/*Not*I サイトに挿入した。このベクターと pAd-CMV-V5-DEST を Gateway LR Clonase (Invitrogen)反応により組み換えることで、目的のアデノウイルスベクターを得た。

[pGL3-HMGC_oA Syn CB1 del-luc]

[pGL3-HMGC_oA Syn SRE1 del-luc]

[pCMV-3×FLAG-SREBP2(N)]

[pM-SREBP2 (N)]

[pGL3-5×UAS-luc]

以前、当研究室で作製されたものを用いた。

[pGL3-HMGC_oA Syn Sp1 del-luc]

[pGL3-HMGC_oA Syn CB2 del-luc]

[pGL3-HMGC_oA Syn CB3 del-luc]

pGL3-HMGC_oA Syn-luc を鋳型として、5'末端側に *Bgl*III、3'末端側に *Hind*III の制限酵素サイトを付加したプライマーを用いて、PCR 反応によりそれぞれヒト HMG CoA Syntase のプロモーター領域の-334 bp から-87 bp、-276 bp から-87 bp、-162 bp から-87 bp の領域を増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製し、*Bgl*III/*Hind*III 処理後、pGL3 luciferase vector の *Bgl*III/*Hind*III サイトに挿入し、目的のプラスミドを得た。

- ・細胞培養試薬の調製
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・細胞培養
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・細胞の継代
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・リン酸カルシウム法を用いた遺伝子導入
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・ルシフェラーゼアッセイ
第一章第一節実験方法の項に準じた。

- リポフェクタミン法を用いた遺伝子導入
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- アデノウイルスベクターによる遺伝子導入
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- RNA 抽出
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- DNase 処理
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- 逆転写反応(Reverse Transcription ; RT)
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- Real-time PCR
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ウェスタンブロッティング
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- 脂肪酸、コレステロールの新規合成量の定量
第一章第一節実験方法の項に準じた。

- クロマチン免疫沈降法

ChIP assay kit (Millipore)の方法に基づいて行った。具体的には、100 mm dish で培養した HuH7 細胞に 37 %ホルムアルデヒドを 270 μ L 加えすぐに攪拌し、37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートし細胞を固定した。細胞を氷冷した PBS(-)で 2 回洗浄後、スクレイパーで細胞をかきとり回収した。8000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心後上清を捨て、SDS Lysis buffer / PIC を 400 μ L / dish 加え、沈殿を懸濁した。氷上で 10 分間インキュベートしたのち DNA を 300-500 bp 程度になるよう超音波破砕を行った。15000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心後、上清 400 μ L を ChIP-dilution buffer / PIC 3.6 mL で希釈し、Protein G Agarose (upstate)を 60 μ L 加え、4 $^{\circ}$ C で 1 時間転倒させながらインキュベートした。3000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心し、上清に 5-10 μ g 抗体を加え 4 $^{\circ}$ C で一晩転倒させながらインキュベートした。Protein G Agarose 30 μ L を加え 4 $^{\circ}$ C で 1 時間転倒させながらインキュベートし、3000 rpm、

4 °Cで1 分間遠心し上清を除き、low salt buffer、high salt buffer、LiCl buffer、TE buffer (pH 8.0) (2 回)の順にビーズを洗浄し、上清を完全に除いた。elution buffer (1 % SDS、0.1 M NaHCO₃、10 mM DTT) 200 μL を加え、ボルテックス後、室温で1 時間転倒させながらインキュベートし、14000 rpm、室温で10 分間遠心後上清を新しいチューブに移し、5 M NaCl を5 μL 加え65 °Cで一晩インキュベートした。RNase 処理後、0.5 M EDTA 2 μL、1 M Tris-HCl (pH 6.5) 4 μL、10 mg / mL Proteinase K 0.26 μL を加え45 °C、1 時間湯浴したのち、2 回のフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行い、DNA の精製を行った。プロモーター上にリクルートされる可能性の配列を挟むプライマーを作製し、リアルタイムPCR により DNA 上への結合を確認した。以下に実験で使用したプライマー配列 (SYBR Green) を示す。

hBiP ERSE (119)	sense	5'-GTGAACGTTAGAAACGAATAGCAGCCA-3'
	antisense	5'-GTCGACCTCACCGTCGCCTA-3'
hBiP upstream	sense	5'-ATGCTGGACTGATGCAAGCCAAAG-3'
	antisense	5'-GAGCCTGTGACTCAGTACTCAAGA-3'
hHMPCR proximal	sense	5'-TTGTTAAGGCGACCGTTCGTGA-3'
	antisense	5'-ACGAGCCTTCGACCAATAAGAGAG-3'
hHMPCR upstream	sense	5'-GCAATCTTTGGGTAGTTCACCCGT-3'
	antisense	5'-GTGAAGTACACACTGTGGTTGGCA-3'
hHMPCS proximal	sense	5'-TCACGTCAGTCTCTCACACCACTT-3'
	antisense	5'-CCAGTCCGGCTTCTACCAATCAAA-3'
hHMPCS upstream	sense	5'-ATTGCAAAGCCACAAGTGTCTCC-3'
	antisense	5'-GAAAGGCCACGTAATTGTCCGCAT-3'
hSQS proximal	sense	5'-TCTTTCTCGGCCTCCAATGAGCTT-3'
	antisense	5'-AGGGCCGCTCACACTAGGAAGA-3'
hSQS upstream	sense	5'-TGGTGGAATGTGAGAGAGGGCAA-3'
	antisense	5'-TTGCTTTCTCTGGCCCTAGGACTT-3'

実験結果

ATF6 α は HMGCS のプロモーター活性を SREBP2 非依存的に調節する

第一節において、ATF6 α は HMGCS のプロモーター活性を亢進することを示した。HMGCS のプロモーター領域には、SREBP2 が結合する SRE 配列や、転写因子 NF-Y が結合する CCAAT box (CB)などが存在している(117)(図 1-4)。しかし、DNA 配列の解析から転写開始点から 500 bp 上流の領域には ATF6 α の結合配列である ERSE 様の配列は存在しなかった。そこで、HMGCS のプロモーター上の ATF6 α の応答領域の探索を行った。HEK293細胞に HMGCS プロモーターの様々な欠失体と 3 \times FLAG-ATF6 α (N)、3 \times FLAG-SREBP2(N)をトランスフェクションシミュレーションシミュレーションを行った。その結果、CB1 の欠失により ATF6 α による HMGCS のプロモーター活性化が低下した(図 1-4)。一方、SREBP2 による HMGCS のプロモーター活性は、CB1、SRE1 を欠失することで低下が見られた(図 1-4)。この結果から、HMGCS のプロモーター活性には ATF6 α は CB1、SREBP2 は CB1、SRE1 が重要でありそれぞれの作用機序が異なることが示唆された。また、GAL4-UAS 系を用いて SREBP2 の転写活性化能に ATF6 α が影響を与えるかを調べた結果、SREBP2 転写活性化に ATF6 α は影響を示さなかった(図 1-5)。さらに、25HC を添加し SREBP2 のプロセッシングを抑制した状況下においても ATF6 α による HMGCS プロモーター活性の上昇が示された(data not shown)。したがって ATF6 α による HMGCS のプロモーター活性上昇は SREBP2 非依存的であることが示唆された。

ATF6 α による HMGCS のプロモーター活性制御には NF-Y の結合配列が重要である

ゲノム DNA の解析の結果、HMGCS のプロモーター配列には ERSE 様配列は見られなかった。一方、CCAAT box に結合する NF-Y は ATF6 と相互作用することが知られ、HMGCS プロモーター上には NF-Y が結合する配列(CB)が存在することが報告されている(119)。そこで、これらの結合配列をそれぞれ欠失したプロモーター配列を組み込んだプラスミドを作製し、HEK293 細胞を用いたレポーターアッセイを行った。その結果、CB1、CB2 を欠失すると ATF6 α による活性化が減少し、CB3 まで削ると完全に活性化が見られなくなった(図 1-6)。この結果から、ATF6 α による HMGCS のプロモーター活性化には NF-Y 結合配列が重要であることが示唆された。また ATF6 α のロイシンジッパー領域の欠失によ

り ATF6 α による HMGCS のプロモーター活性の亢進が著しく低下した(data not shown)。SQS も同様に CB の欠失及び変異により核内型 ATF6 α によるプロモーター活性の低下が見られた(data not shown)。したがって、核内型 ATF6 α による HMGCS、SQS のプロモーター活性の調節には NF-Y 結合配列(CB)が重要であることが示唆された。

ATF6 α による新規コレステロール合成亢進にはロイシンジッパー領域が必要である

核内型 ATF6 α は 373 アミノ酸から構成されており、1-93 アミノ酸部位は転写活性化領域(TAD)、331-373 アミノ酸部位はロイシンジッパー領域(ZiP)であることが知られている(図 1-7)。これらの領域がコレステロール合成に重要な役割を果たしているため、HuH7 細胞にアデノウイルスを用いて 3 \times FLAG-ATF6 α (N)[ATF6 α (N)WT]及びロイシンジッパー領域を欠失[ATF6 α (N) Δ ZiP]した ATF6 α を過剰発現し、新規コレステロール合成の定量及び遺伝子発現の測定を行った。その結果、各 ATF6 α 変異体タンパク質量の増加が確認され(図 1-7A)、ATF6 α のロイシンジッパー領域の欠失によりコレステロール合成関連遺伝子の遺伝子発現亢進(図 1-7B)、新規コレステロール合成の亢進及び新規脂肪酸合成の減少(図 1-7C)は見られなかった。また転写活性化領域の欠失によっても同様の結果が得られた(data not shown)。したがって、ATF6 α による新規コレステロール合成にはロイシンジッパー領域が必要であることが示唆された。

ATF6 α はコレステロール合成関連遺伝子のプロモーター領域にリクルートされる

ATF6 α のロイシンジッパー領域は新規コレステロール合成亢進に重要であることが示された。ATF6 α は NF-Y などとヘテロダイマーを形成する際にはロイシンジッパーが必要である。そこで次に、ATF6 α が NF-Y 結合配列にリクルートされているかを検討するため、クロマチン免疫沈降法を用いて検証した。アデノウイルスを用いて 3 \times FLAG-ATF6 α (N)及び 3 \times FLAG-ATF6 α (N) Δ ZiP を過剰発現させた HuH7 細胞をホルムアルデヒドにより固定、回収後超音波破碎による DNA 断片化を行った。非特異的な結合を防ぐため preclear を行った後、FLAG 抗体を加え 4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートし、免疫沈降を行った。溶出後、DNA を精製しリアルタイム PCR によりプロモーター配列への結合を検証した。PCR 増幅部位は BiP プロモーター領域の ERSE 配列、HMGCS、SQS、HMGCR プロモーター領域の NF-Y 結合配列を含む領域(CB)及び ATF6 α が結合しないと推測されるプ

ロモーター配列の上流-2kb 付近(distal)で行った。その結果、ATF6 α (N)WT は BiP のプロモーター領域の ERSE 配列へのリクルートメントが確認された。一方、HMGCS、SQS、HMGCR のプロモーター領域の NF-Y 結合部位にも同様に ATF6 α (N)のリクルートメントが見られた(図 1-8)。一方、ロイシンジッパー領域を欠失した ATF6 α ではいずれの遺伝子プロモーターへのリクルートメントは見られなかった。以上より、ATF6 α は HMGCS、HMGCR、SQS のプロモーター領域にリクルートされ、それにはロイシンジッパー領域が重要であることが示唆された。

考察

前節で ATF6 α によってコレステロール合成関連遺伝子である HMGCS、HMGCR、SQS のプロモーター活性の上昇が見られ(図 1-2)、これらの遺伝子のプロモーター領域には ATF6 α の結合配列である ERSE 配列(5'-CCAATN₉CCACG-3')は存在しなかった。これらはコレステロール代謝のマスターレギュレーターとして知られる SREBP2 の標的遺伝子である。しかし、他の SREBP2 の標的遺伝子である LDLR の ATF6 α による転写活性化は見られなかった(図 1-2)。ここで、HMGCS、HMGCR、SQS と LDLR の違いはプロモーター領域に転写因子である NF-Y 結合配列の有無である。NF-Y は核内型 ATF6 のロイシンジッパードメインを介してダイマーを形成することが報告されている(23)。このことから、ATF6 α は NF-Y とのダイマー形成を介して HMGCS などのプロモーター領域に作用していると考えられる。この結果をさらに検証する為には RNAi などを用いて内因性の NF-Y をロックダウンし ATF6 α による HMGCS などのプロモーター活性化の検討が必要である。一方で、HMGCS プロモーターの SRE の欠失(図 1-4)や、SREBP2 のプロセッシングを阻害した状態でも ATF6 α による HMGCS のプロモーター活性化が見られた(data not shown)ことから、ATF6 α によるコレステロール生合成遺伝子の発現亢進は SREBP2 非依存的であると考えられる。

最後に、ATF6 α がコレステロール合成関連遺伝子のプロモーター領域へのリクルートをクロマチン免疫沈降法で検討した。その結果、ATF6 α のプロモーター上へのリクルートは確認されたが、ロイシンジッパー領域を欠損しているとリクルートされなかった(図 1-8)。また、ATF6 α のロイシンジッパー領域の欠失体を用いた検討の結果、コレステロール合成関連遺伝子の遺伝子発現及び新規コレステロール合成には ATF6 α のロイシンジッパー領域が重要であることが示された(図 1-7B、図 1-7C)。本実験で示した ATF6 α の標的プロモーター領域には NF-Y 結合配列が含まれていることから、NF-Y 結合配列を介した ATF6 α による発現制御が示唆される。今後、この結果に関して、ゲルシフトアッセイ法を用いて ATF6 α のプロモーター上への直接結合を検証する必要がある。

本節で、ATF6 α が NF-Y を介してコレステロール合成遺伝子の発現を亢進することが示唆されたが、核内型 ATF6 α の過剰発現により発現増加が見られたコレステロール合成関連遺伝子である NSDHL、HSD17B7 のプロモーター領域上にも NF-Y 結合配列が存在したため、同様にリクルートメントを検討した。その結果、両遺伝子のプロモーター領域においても核内型 ATF6 α の結合が見られた(data not shown)。一方、脂肪酸合成遺伝子である FASN や ACC1 のプロモーター領域にも NF-Y 結合配列は存在する。第一節において、核内型 ATF6 α の過剰発

現による FASN や ACC1 など脂肪酸合成遺伝子の発現亢進及び新規脂肪酸合成は見られなかった(図 1-2B、図 1-3B)。また、コレステロール合成関連遺伝子の 1 つである FPPS のプロモーター領域にも NF-Y 結合配列があるにもかかわらず、核内型 ATF6 α の過剰発現による遺伝子発現亢進は見られなかった(表 1)。したがって、今回示された結果は NF-Y 結合配列を持つ全ての遺伝子に共通しているわけではなく HMGCS などの遺伝子に選択的な作用と考えられる。

さらに小胞体ストレス誘発剤であるサプシガルジンを HuH7 細胞に処理すると HMGCS などのコレステロール合成関連遺伝子の発現が亢進したが、新規コレステロール合成亢進は見られなかった(data not shown)。また ATF6 を shRNA によりノックダウンした状況下でも HMGCS などのコレステロール合成関連遺伝子の発現低下は見られなかった(data not shown)。よって、本章で示されたコレステロール合成亢進は核内型 ATF6 α の過剰発現条件下であり、生理的な ATF6 α 活性化条件下で見られるかはさらに解析を行う必要がある。

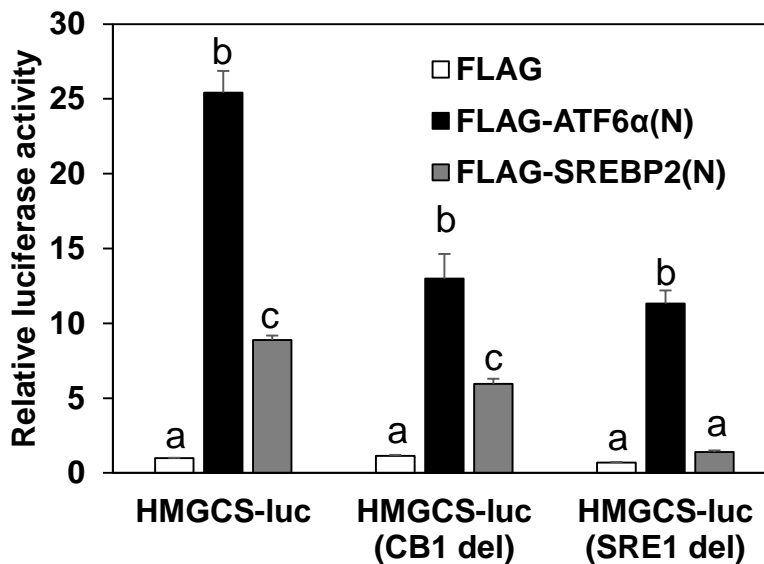
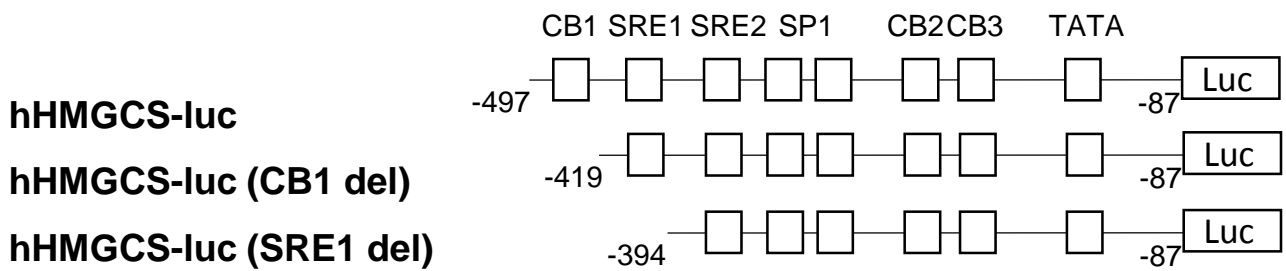


図1-4 核内型ATF6αによるHMGCSプロモーター活性の上昇はSREBP2の機構と異なる

HEK293細胞に発現ベクターであるFLAG-ATF6α(N)、FLAG-SREBP2(N)およびHMGCSのプロモーター領域のCB1、SRE1をそれぞれ欠失したプロモーター領域を含むルシフェラーゼプラスミド、β-galactosidaseの発現プラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクションから48時間後にルシフェラーゼアッセイに供し、ホタルルシフェラーゼ活性の値をβ-galactosidase活性の値で除することでルシフェラーゼ活性の値とした。CB：NF-Y結合領域、SRE：SREBP結合領域。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析 (Bonferroni検定)を用いた。a-c:異なる文字間で有意差あり、 $p < 0.05$

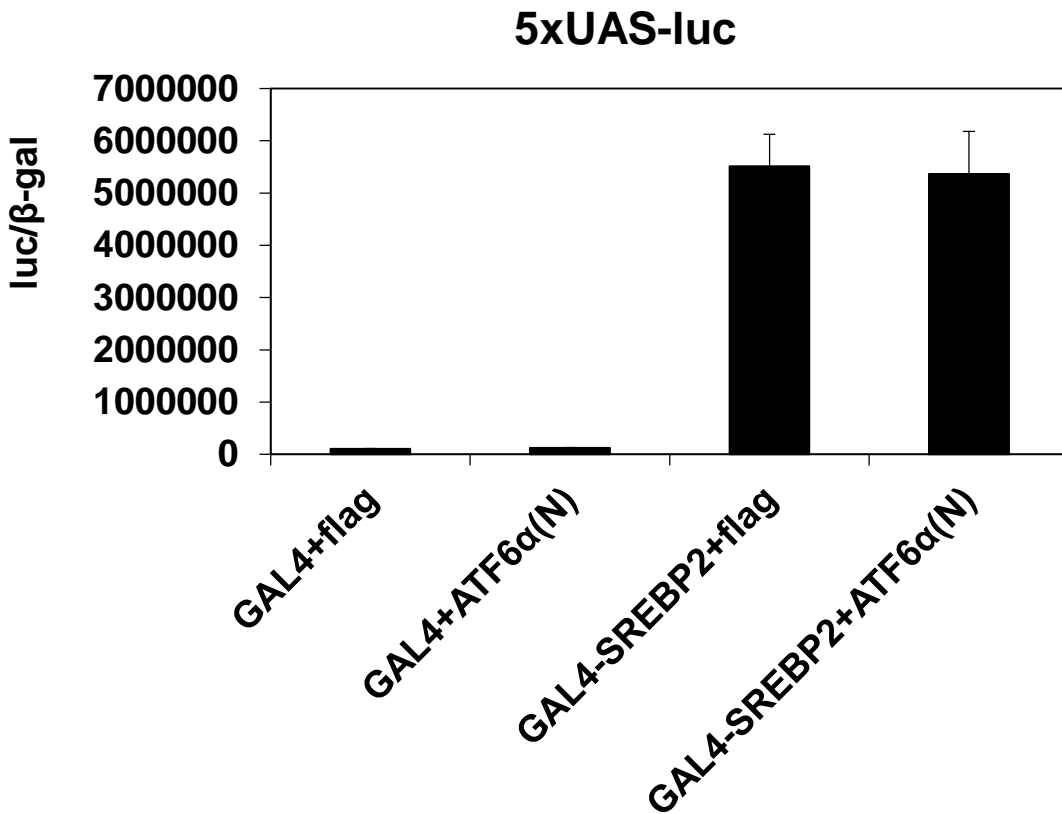


図1-5 SREBP2の転写活性化に核内型ATF6αは影響を与えない

HEK293細胞に発現ベクターであるFLAG-ATF6α(N)とSREBP2(N)とGal4DNA結合領域を組み込んだpM-SREBP2ベクターおよびβ-galactosidaseの発現プラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクションから48時間後にルシフェラーゼアッセイに供し、ホタルルシフェラーゼ活性の値をβ-galactosidase活性の値で除することでルシフェラーゼ活性の値とした。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。

転写活性化領域
(TAD)

ロイシンジッパー領域
(ZIP)

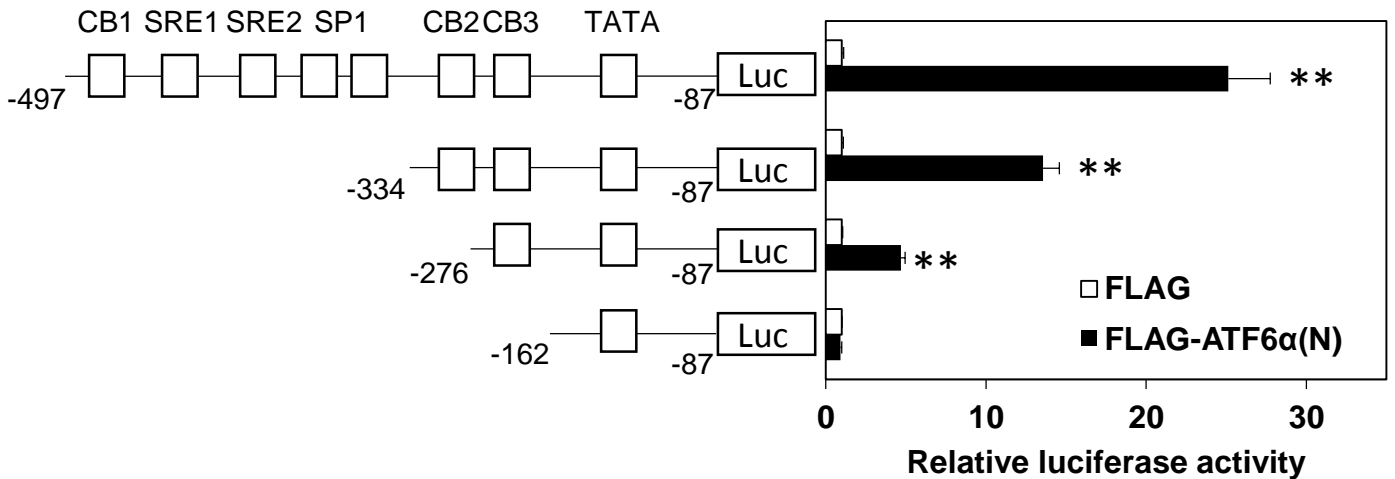
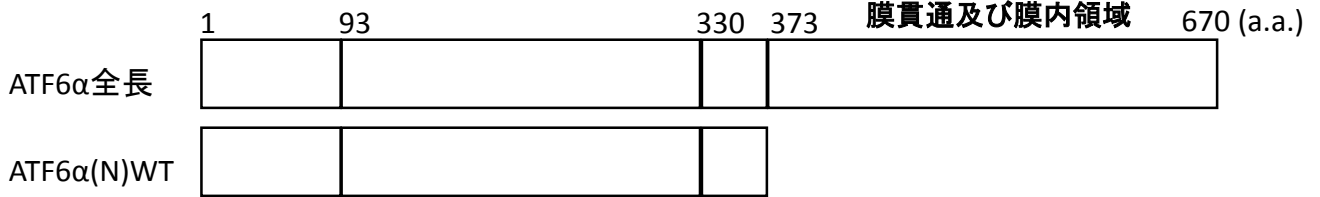
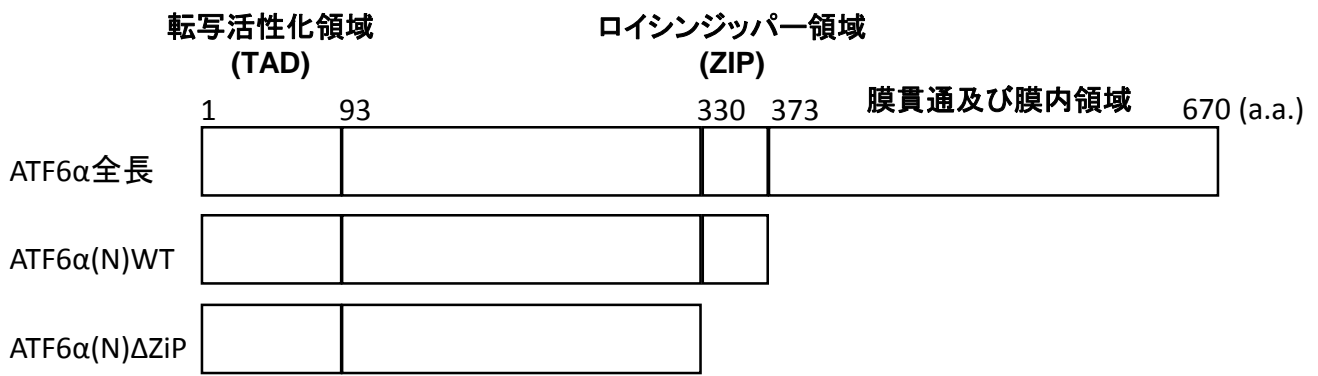
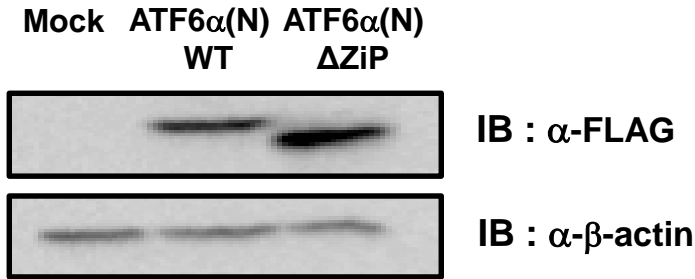


図1-6 核内型ATF6αによるHMGCSプロモーター活性の上昇にはNF-Y結合配列が重要である
 HEK293細胞に発現ベクターであるFLAG-ATF6α(N)及びHMGCSのプロモーター領域に変異を含む各ルシフェラーゼプラスミド、β-galactosidaseの発現プラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクションから48時間後にルシフェラーゼアッセイに供し、ホタルルシフェラーゼ活性の値をβ-galactosidase活性の値で除することでルシフェラーゼ活性の値とした。CB：NF-Y結合領域、SRE：SREBP結合領域。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定にはスチューデントのt検定を用いた。**:p<0.01



A



B

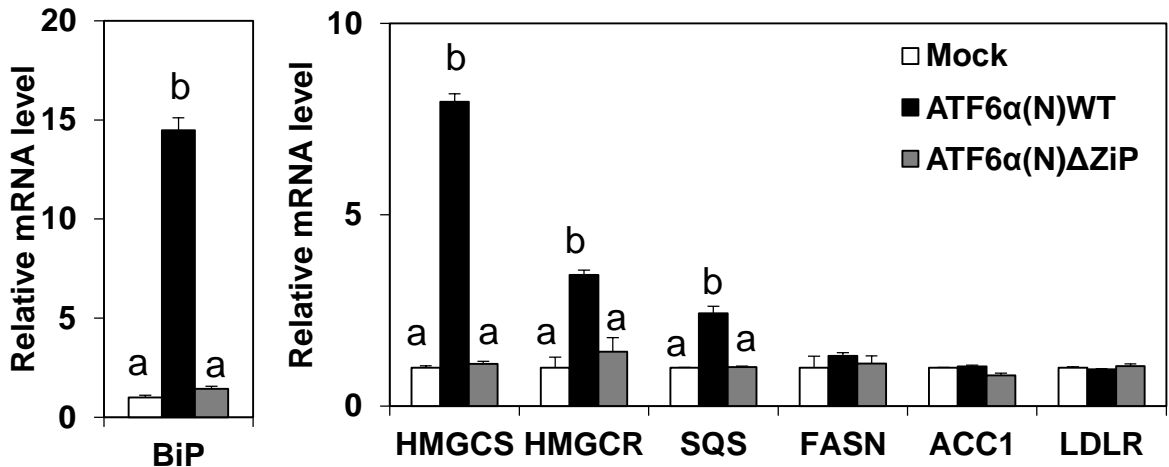
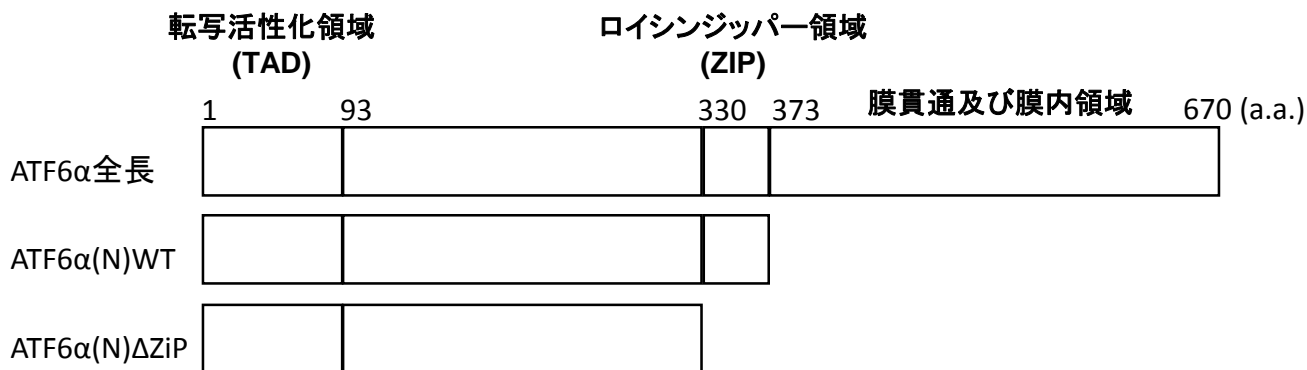


図1-7 変異型核内型ATF6αによる新規脂肪酸及びコレステロール合成の定量

HuH7細胞にアデノウイルスをMOI=10で感染させた。感染後15時間後に1 μg / mL となるよう25HCを添加した。添加48時間後に¹⁴Cでラベルされた酢酸を添加し6時間後に回収した。A:核内型及び変異型ATF6αの発現をウエスタンブロットにて確認した。B:RNAを回収しリアルタイムPCRを用いた発現解析を行った。それぞれの遺伝子の発現量は36B4の発現量で除することで補正した。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析(Bonferroni検定)を用いた。a,b:異なる文字間で有意差あり、p<0.05



C

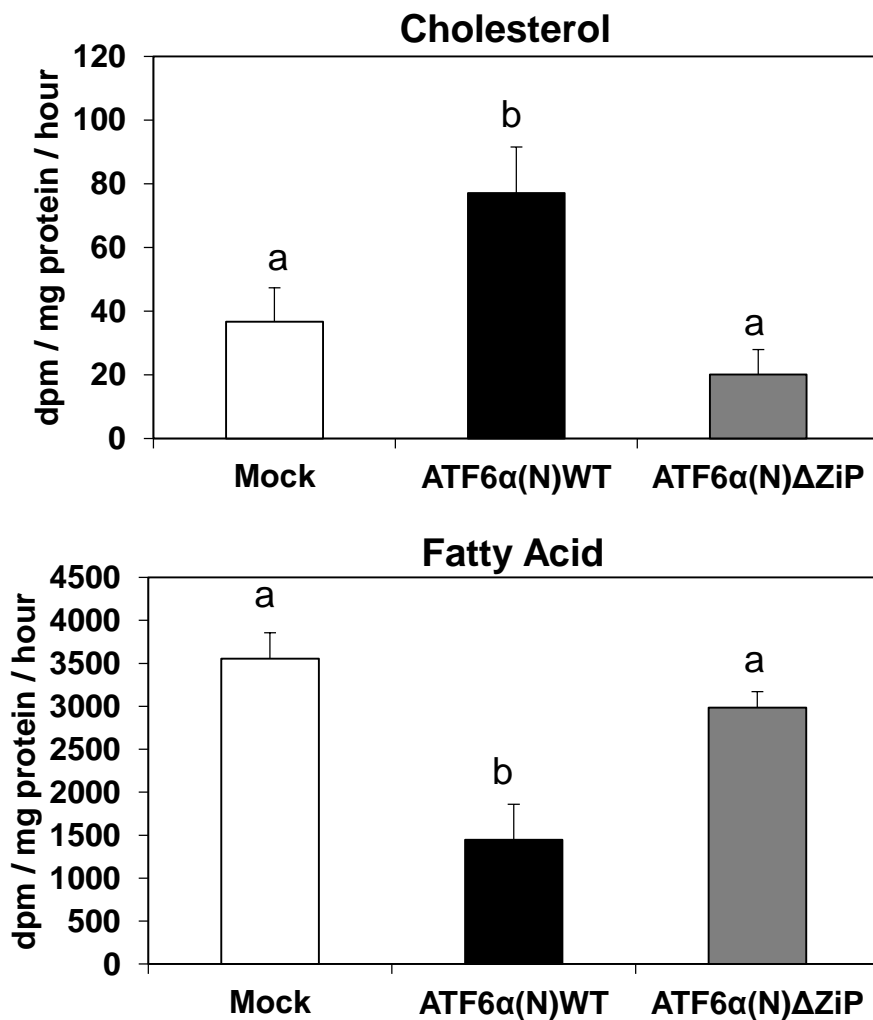


図1-7 変異型核内型ATF6αによる新規脂肪酸及びコレステロール合成の定量

HuH7細胞にアデノウイルスベクターをMOI=10で感染させた。感染後15時間後に1 μg / mL となるよう25HCを添加した。添加48時間後に¹⁴Cでラベルされた酢酸を添加し6時間後に回収した。C:新規脂肪酸及びコレステロールの定量。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。a,b:異なる文字間で有意差あり、p<0.05

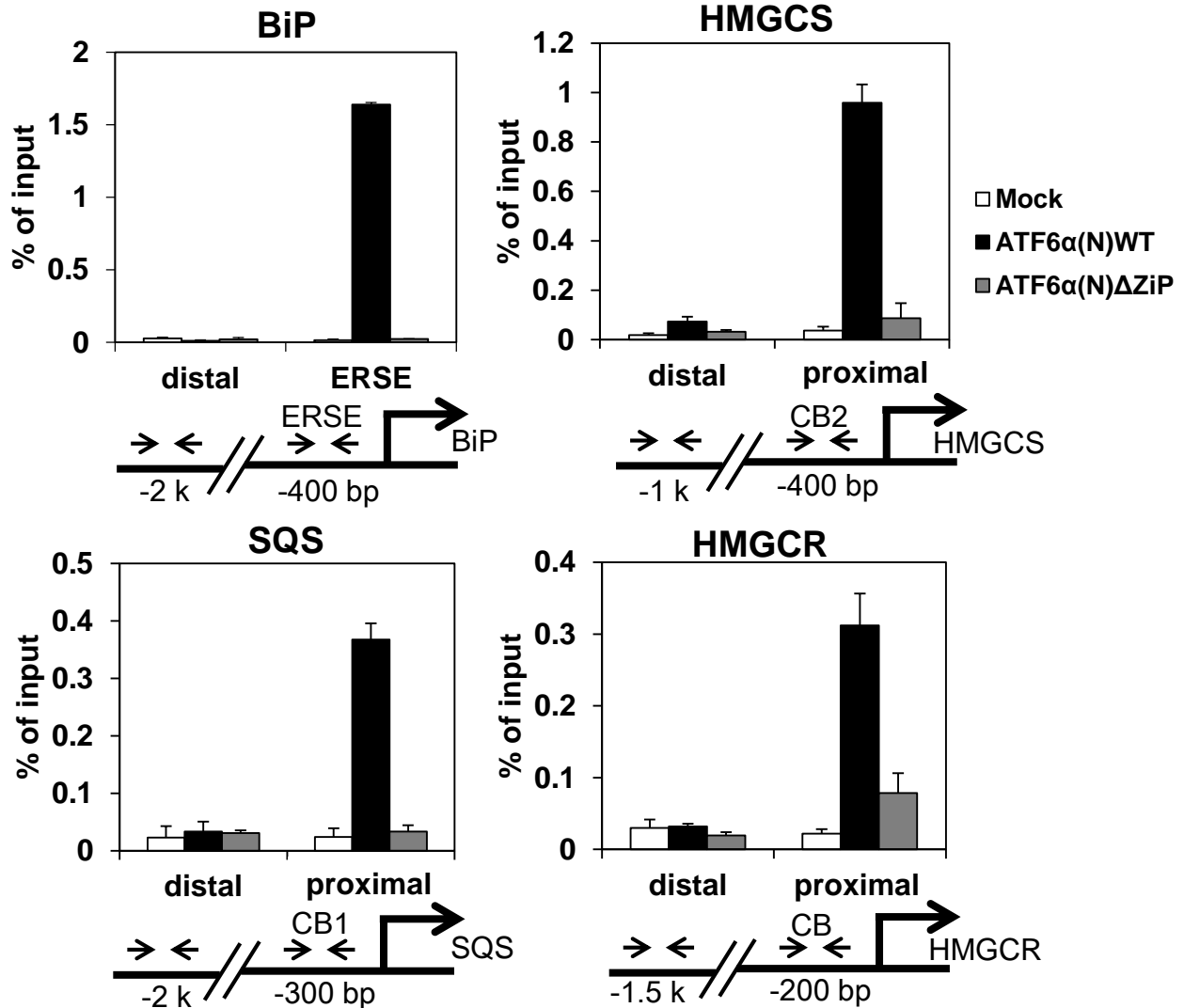
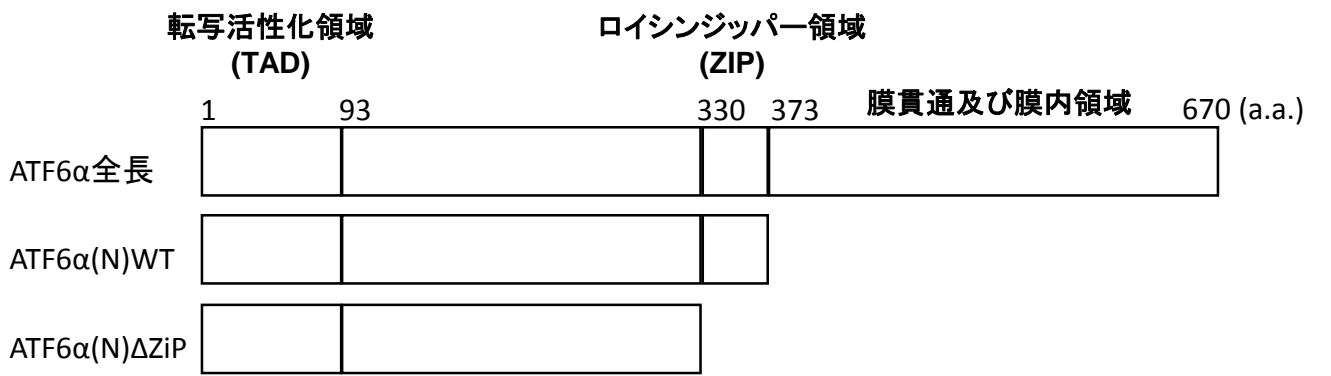


図1-8 核内型ATF6αはHMGCS、HMGCR、SQSのプロモーター領域にリクルートされる

HuH7細胞にアデノウイルスを用いて核内型ATF6αおよびDNA結合領域を欠損した核内型ATF6αを過剰発現させ、クロマチン免疫沈降法によりHMGCS、HMGCR、SQSプロモーター領域へのリクルートメントを検討した。リアルタイムPCRで増幅した各プロモーター領域はhBiP ERSE : -429 bp ~ -216 bp、hBiP upstream : -2421 bp ~ -2246 bp、hHMGCS : -397 bp ~ -261 bp、hHMGCS upstream : -1197 bp ~ -1048 bp、hSQS : -320 bp ~ -227 bp、hSQS upstream : -1809 bp ~ -1661 bp、hHMGCR : -236 bp ~ -129 bp、hHMGCR upstream : -1600 bp ~ -1486 bp(転写開始点を+1とする)。CB : NF-Y結合領域。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。

第二章

第一節

小胞体ストレスにおける FGF21 の発現機構 解析

緒言

FGF21 は肝臓で高発現する内分泌性の線維芽細胞増殖因子である。FGF21 の発現は絶食時に核内受容体 PPAR α によって制御される。また、FGF21 は糖代謝やインスリン抵抗性を改善することから生活習慣病の創薬の標的として注目されている。我々は、FGF21 と同じサブファミリーに属する FGF19 の発現が小胞体ストレスによって亢進すること報告した(115)。これらの背景から、FGF21 と小胞体ストレスの関係性について検討した。

実験方法

- ・大腸菌の形質転換(トランスフォーメーション)
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・アガロースゲル電気泳動
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・アガロースゲルからの DNA 断片回収
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・制限酵素処理
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・ライゲーション
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・プラスミドミニプレップ(粗精製)
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・プラスミドラージプレップ(細胞内遺伝子導入用)
第一章第一節実験方法の項に準じた。

プラスミド

第一章第一節実験方法の項に準じた。
第一節に記載のないプラスミドは以下の通りである。

[pCMV-3×flag-XBP1s]

以前、当研究室で作製されたものを用いた

[pENTR4-HI]

[pAd-PL-DEST]

invitrogen から購入した

[pAd-3×flag-LacZ]

米国テキサス大学サウスウエスタンメディカルセンターの David Mangelsdorf 教授、Steven Kliewer 教授からご供与いただいた

[pCMV-3×flag-ATF4]

Caco2 細胞由来の cDNA を鋳型として 5'末端に *EcoRI*、3'末端に *BamHI* の制限酵素サイトを付加したプライマーを用いて PCR 反応により増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製し、*EcoRI*/*BamHI* 処理後、pCMV-3×flag7.1 の *EcoRI*/*BamHI* サイトに挿入した。

[pAd-CMV-3×flag-ATF4]

pCMV-3×flag-ATF4 を鋳型として、5'末端側に *BglII*、3'末端側に *NotI* の制限酵素サイトを付加したプライマーを用いて、PCR 反応により 3×flag-ATF4 を増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製し、*BglII/NotI* 処理後、pENTR-1A の *BglII/NotI* サイトに挿入した。このベクターと pAd-CMV-V5-DEST を Gateway LR Clonase (Invitrogen)反応により組み換えることで、目的のアデノウイルスベクターを得た。

[pAd-shATF4]

標的配列の shRNA(5'-GTACCTGAAAGATTTGATAGAAGAG-3')を pENTR4-HI の *BglII/XbaI* サイトに挿入した。このベクターと pAd-PL-DEST を Gateway LR Clonase (Invitrogen)反応により組み換えることで、目的のアデノウイルスベクターを得た。

[pGL3-FGF21 2kb-luc]

Human genomic DNA を鋳型として、5'末端側に *BglII*、3'末端側に *HindIII* の制限酵素サイトを付加したプライマーを用いて、PCR 反応によりプロモーター領域の-1850 bp から+148 bp の領域を増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製し、*BglII/HindIII* 処理後、pGL3 luciferase vector の *BglII/HindIII* サイトに挿入し、目的のプラスミドを得た。

[pGL3-FGF21 -920b-luc]

[pGL3-FGF21 -850b-luc]

[pGL3-FGF21 -780b-luc]

[pGL3-FGF21 AARE1 del-luc]

pGL3-FGF21 2kb-luc を鋳型として、5'末端側に *BglII*、3'末端側に *HindIII* の制限酵素サイトを付加したプライマーを用いて、PCR 反応によりそれぞれヒト

FGF21 のプロモーター領域の-770 bp から+148 bp、-705 bp から+148 bp、-630 bp から+148 bp、-560 bp から+148 bp の領域を増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製し、*Bgl*III/*Hind*III 処理後、pGL3 luciferase vector の *Bgl*III/*Hind*III サイトに挿入し、目的のプラスミドを得た。

[pGL3-FGF21 AARE1 mut-luc]

[pGL3-FGF21 AARE3 mut-luc]

[pGL3-FGF21 -634b mut-luc]

[pGL3-FGF21 -630b mut-luc]

pGL3-FGF21 2kb-luc を鋳型として、5'末端側に *Bgl*III、3'末端側に *Hind*III の制限酵素サイトを付加したプライマー及び変異を導入したプライマーを用いて、PCR 反応により FGF21 のプロモーター配列に変異を含むオリゴヌクレオチド (AARE1 mut:5'-ATTGCATCA-3' → 5'-AAGCGCAAC-3'、AARE3 mut: 5'-TGGTGAAAG-3' → 5'-GTTGCGCTG-3'、-634b mut: 5'-TGGTGAAAG-3' → 5'-TGGTCAAAG-3'、-630b mut: 5'-TGGTGAAAG-3' → 5'-TGGTGAATG-3')を作成した。そして PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により精製したのち overlap extension PCR 法によりヒト FGF21 のプロモーター領域の-1850 bp から+148 bp の領域に変異を含んだ DNA 断片を増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製し、*Bgl*III/*Hind*III 処理後、pGL3 luciferase vector の *Bgl*III/*Hind*III サイトに挿入し、目的のプラスミドを得た。

[pGL3-FGF21 AARE1/3 mut-luc]

pGL3-FGF21 AARE1 mut-luc を鋳型として、5'末端側に *Bgl*III、3'末端側に *Hind*III の制限酵素サイトを付加したプライマー及び変異を導入したプライマーを用いて、PCR 反応により目的の変異を含むオリゴヌクレオチド(5'-TGGTGAAAG-3' → 5'-GTTGCGCTG-3')を作成した。そして PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により精製したのち overlap extension PCR 法によりヒト FGF21 のプロモーター領域の-1850 bp から+148 bp の領域に変異を含んだ DNA 断片を増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製し、*Bgl*III/*Hind*III 処理後、pGL3 luciferase vector の *Bgl*III/*Hind*III サイトに挿入し、目的のプラスミドを得た。

・細胞培養試薬の調製

第一章第一節実験方法の項に準じた。

第一節に記載のない試薬は以下の通りである。

サブシガルジン

DMSO を用いて 500 μM に調整し、-20 °C で遮光保存した。

ツニカマイシン

DMSO を用いて 5 mg / mL に調整し、-20 °C で保存した。

DTT

DMSO を用いて 1 M に調整し、-20 °C で保存した。

・細胞培養

第一章第一節実験方法の項に準じた。

第一章に記載のないものは以下の通りである。

マウス初代培養肝細胞

オスの野生型(C57BL/6J)マウスから肝細胞をコラゲナーゼ灌流法により単離した。Percoll 密度勾配遠心により死細胞を除去し、生細胞のみを 35 mm コラーゲンコートディッシュ (BIOCOAT) に 6×10^5 cells / well ずつ播いた。10 % FBS、10 nM デキサメタゾン、2 mM-L-グルタミン、100 units / mL ペニシリン、100 μ g / mL ストレプトマイシンを含む Williams' E Medium (SIGMA) で 5 時間培養したのち、1 \times PBS で洗浄し接着しなかった細胞を除き実験に使用した。

・細胞の継代

第一章第一節実験方法の項に準じた。

・リン酸カルシウム法を用いた遺伝子導入

第一章第一節実験方法の項に準じた。

第一章に記載のないものは以下の通りである。

リン酸カルシウム法による遺伝子導入は HuH7 細胞の場合に用いた。以下に 100 mm dish を用いた場合の遺伝子導入法を示す。

遺伝子導入を行う前日、遺伝子導入時に 60-70 % confluent の状態となるように細胞をセットアップした。プラスミド DNA : 10 μ g、2.5 mM CaCl₂ : 50 μ L を含む溶液に滅菌水を加えて合計 500 μ L とした。この溶液に 2 \times HBSS (pH 7.05) : 500 μ L を一滴ずつ加え、20 回 bubbling を行い、室温で 20 分間インキュベートした。細胞に一滴ずつ添加し、37 °C、5 % CO₂ のインキュベーター内で培養し、5 時間後に培地交換を行った。

・ルシフェラーゼアッセイ

第一章第一節実験方法の項に準じた。

第一章に記載のないものは以下の通りである。

HuH7 細胞を 12 well plate に 1.5×10^5 cells / well となるように播種し、DMEM (High Glucose)、10 % FBS、P/St で培養した。翌日、リン酸カルシウム法を用いたトランスフェクションを行った。

遺伝子導入から 36 時間後に細胞を回収し、500 μ L の PBS(-) で洗浄した。1xLuciferase Lysis Buffer (25 mM Tris-phosphate (pH 7.8)、2 mM DTT、2 mM CDCA (trans-1,2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid)、10 % glycerol、1 % Triton X-100) を 100 μ L 加え、20 分間氷上で揺らしながらインキュベートした。

[ホタルルシフェラーゼアッセイ]

第一章第一節実験方法の項に準じた。

第一章に記載のないものは以下の通りである。

アシストチューブ(SARSTEDT)中で Luciferase Substrate Reagent : 50 μ L に cell lysate : 5 μ L 加え、ホタルルシフェラーゼ活性を mini Lumat LB9506 (Berthold) により 2 秒間測定した。

[β -galactosidase (β -gal)アッセイ]

第一章第一節実験方法の項に準じた。

- リポフェクタミン法を用いた遺伝子導入
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- アデノウイルスベクターによる遺伝子導入
第一章第一節実験方法の項に準じた。

• RNA 抽出

細胞からの抽出は第一章第一節実験方法の項に準じた。

肝臓組織からの抽出は以下に示す。

数 mm 角の肝臓片に ISOGEN(ニッポンジーン)を 800 μ L/sample ずつ加え、ポリトロンホモジナイザー(QIAGEN)を用いて破碎した。160 μ L のクロロホルムを加え、15 秒間ボルテックスした後、12000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心した。上層を新しい 1.5 mL チューブに移し 400 μ L のイソプロパノールを加えボルテックスした後、12000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 20 分間遠心した。上清を除去し、1 mL の 70% エタノールを加え転倒混和後、12000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心した。上清を除き、沈殿を風乾後 150 μ L の DPEC 処理水に溶解し RNA 溶液を得た。得られた RNA

溶液は分光光度計(NANO DROP1000)を用いて濃度測定後、DNase 処理を行い逆転写反応に供した。なお、RNA 溶液は-80 °Cで保存した。

- DNase 処理

第一章第一節実験方法の項に準じた。

- 逆転写反応(Reverse Transcription ; RT)

第一章第一節実験方法の項に準じた。

- Real-time PCR

第一章第一節実験方法の項に準じた。

それぞれの遺伝子発現は 36B4 の発現量で除することで補正した。また、1 回の試行につき 3 連のサンプルを用い、平均値と標準偏差または標準誤差を算出した。有意差検定にはスチューデントの t 検定または一元配置分散分析 (Bonferroni 検定)を用いた。

SYBR Green で用いた各 primer を以下に示す。以下に記載していない遺伝子は全て Taq[®]Man probe で測定した。

hATF4(115)	sense	5'-GGGTTCTCCAGCGACAAGGCTAAG-3'
	antisense	5'-AACAGGGCATCCAAGTCGAAGTC-3'
hFGF21(98)	sense	5'-ACCAGAGCCCCGAAAGTCT-3'
	antisense	5'-CTTGACTCCCAAGATTTGAATAACTC-3'
m36B4(115)	sense	5'-CTGATCATCCAGCAGGTGTT-3'
	antisense	5'-CCAGGAAGGCCTTGACCTTT-3'
mBiP(115)	sense	5'-GAAAGGATGGTTAATGATGCTGAG-3'
	antisense	5'-GTCTTCAATGTCCGCATCCTG-3'
mFGF21(98)	sense	5'-CCTCTAGGTTTCTTTGCCAACAG-3'
	antisense	5'-AAGCTGCAGGCCTCAGGAT-3'

- 動物実験

[実験動物]

マウスは C57BL/6J マウス(日本クレア)を用いた。室温 23 °C、12 時間毎の明暗サイクルの照明下で飼育し固形飼料(ラボ MR ストック、日本農産工業株式会社)及び水(オートクレーブした蒸留水)は自由摂取とした。全ての動物実験は東京大学の動物実験倫理規定に基づいて行った。

[実験条件]

野生型マウス(11週齢、メス)に16時間の絶食をかけたのち、小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを100 mg / mouse(ツニカマイシンは150 mMスクロース溶液で希釈した)となるように経口投与し6時間後に解剖した。血液は0.1 M EDTA で処理したシリンジを使用し、下大静脈から採血した。その後4℃、5000 rpm、30分間の遠心分離を行い血清を分離した。肝臓は採取後にPBSで洗浄し、液体窒素を用いて直ちに凍結し、-80℃で保存した。

・血中 FGF21 濃度測定

血清中 FGF21 濃度測定は Quantikine ELISA Mouse/Rat FGF-21 (R&D Systems) を用いた。測定はプロトコールに従って行った。

実験結果

FGF21 の発現は小胞体ストレスにより亢進する

小胞体ストレスによる FGF21 の発現制御を検討するため、マウス初代培養肝細胞に小胞体ストレス誘導剤であるサプシガルジン処理し、6 時間後に RNA を回収した。リアルタイム PCR による発現解析の結果、小胞体ストレスマーカーである BiP と同様に FGF21 の発現の亢進が見られた(図 2-1A)。この発現亢進は他の小胞体ストレス誘導剤(ツニカマイシンや DTT)処理やヒト肝細胞(HuH7 細胞)によっても確認された(図 2-1B、図 2-1C)。次に、個体レベルの検討として、11 週齢のメスの野生型(C57BL/6J)マウスに小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン(100 mg / mouse)を経口投与する実験を行った。培養細胞と同様、小胞体ストレスにより BiP と同様に FGF21 の発現も亢進していた(図 2-1D)。さらに、ELISA 法を用いた解析から小胞体ストレスにより血中への FGF21 の分泌が亢進していることが示された(図 2-1E)。以上の結果から、FGF21 の発現は FGF19 同様に培養細胞及び個体レベルで小胞体ストレスにより亢進することが示された。

小胞体ストレスによる FGF21 の発現亢進は ATF4 を介している

我々は FGF19 の発現は ATF4 を介して小胞体ストレスにより制御されることを報告している(115)。また、当研究室での ATF4 を介した大豆タンパク質による FGF21 発現制御の知見(橋詰力博士 平成 24 年度博士論文)から、小胞体ストレスによる FGF21 の発現も ATF4 により制御されると考えられた。ヒト肝癌由来細胞である HuH7 細胞にアデノウイルスを用いて ATF4 を過剰発現させたのち RNA を回収しリアルタイム PCR により発現解析を行ったところ、FGF21 の顕著な発現亢進が確認された(図 2-2A)。次に、shRNA を用いた ATF4 ノックダウン実験を行った。ノックダウンにより ATF4 の発現低下が確認された。サプシガルジン処理により ATF4 の発現亢進が見られたが、ATF4 のノックダウンにより FGF21 の遺伝子発現は通常状態及び小胞体ストレス時で低下していた(図 2-2B)。したがって、FGF21 の発現は ATF4 により制御されることが示唆された。次にヒト FGF21 のプロモーター領域の-1850 bp から+147 bp を含むレポータープラスミドを構築しルシフェラーゼアッセイを行った。FGF21 のプロモーター活性は ATF4 のトランスフェクションにより上昇が認められた。一方、他の小胞体ストレス応答因子(ATF6 α や XBP1)による FGF21 のプロモーター活性の変動は見られなかった(図 2-3)。以上の結果より ATF4 は FGF21 の発現をプロモータ

一活性化を介して亢進していることが示唆された。

FGF21 プロモーター領域における ATF4 応答配列の探索

ATF4 応答配列の探索のため FGF21 のプロモーター領域の様々な欠失体を構築しルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、-705 bp から-630 bp の欠失により ATF4 によるプロモーター活性化が低下し-560 bp まで欠失すると活性化はほぼ見られなくなった(図 2-4)。これまでの報告で FGF21 プロモーター領域内には 2 か所の ATF4 結合配列(AARE1; -618 bp から-610 bp、AARE2; -160 bp から-152 bp)が存在することが報告されている(120,121,122,123,124)。したがって、これらの結果から FGF21 プロモーター領域内には ATF4 の新たな制御領域が存在することが示唆された。

FGF21 プロモーターには 3 か所の AARE が存在する

FGF21 のプロモーター配列を解析した結果、-637 bp から-629 bp の間に AARE 様配列(5'-TGGTGAAAG-3', AARE3 と命名)が存在した(図 2-5A)。AARE3 配列に変異を導入したレポータープラスミドを構築しルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、ATF4 によるプロモーター活性化は AARE1 変異と同様に AARE3 の変異により ATF4 によるプロモーター活性化が著しく低下した(図 2-5B)。さらにサブシガルジン処理による内在性の ATF4 を活性化した場合でも同様の結果が得られた(図 2-5C)。また AARE3 に 1 塩基変異を入れたレポータープラスミドを構築し ATF4 の過剰発現及びサブシガルジン処理によるプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイにて測定した結果、変異導入による活性化の低下が確認された(図 2-5D、図 2-5E)。以上の結果から、AARE3 は ATF4 による FGF21 のプロモーター活性化に重要な領域であることが示唆された。

考察

本節では、FGF21 が FGF19 と同様に小胞体ストレスによる発現制御を検討した。実験の結果、培養肝細胞及びマウス肝臓の両者で FGF21 の発現が亢進した(図 2-1)。また、FGF21 の発現が ATF4 によって制御され、FGF21 のプロモーター領域に新たな ATF4 応答配列(AARE3)を同定した(図 2-5)。この結果より ATF4 は 3 つの応答配列を介して FGF21 の活性を強力に制御していることが考えられる。FGF21 は肥満や II 型糖尿病、そのほかの代謝異常の疾患への効果が期待されている因子である(102,103,104)。ヒトやサルを用いた実験から FGF21 のエネルギー代謝改善効果が報告されており(105,106)、FGF21 の活性化は代謝疾患の治療に対する重要性が示唆される。さらに、ATF4 ノックダウン実験により FGF21 の発現が顕著に低下したことから ATF4 が FGF21 主要な発現調節因子であると推測される。我々の結果では ATF4 のみ FGF21 のプロモーター活性上昇が確認されたが他の論文では XBP1 による FGF21 の発現制御が報告されている(125)。FGF21 プロモーターへの XBP1 結合の種間の違いや ATF4 のプロモーター上への結合やコファクターのリクルートなどさらなる検討が必要である。

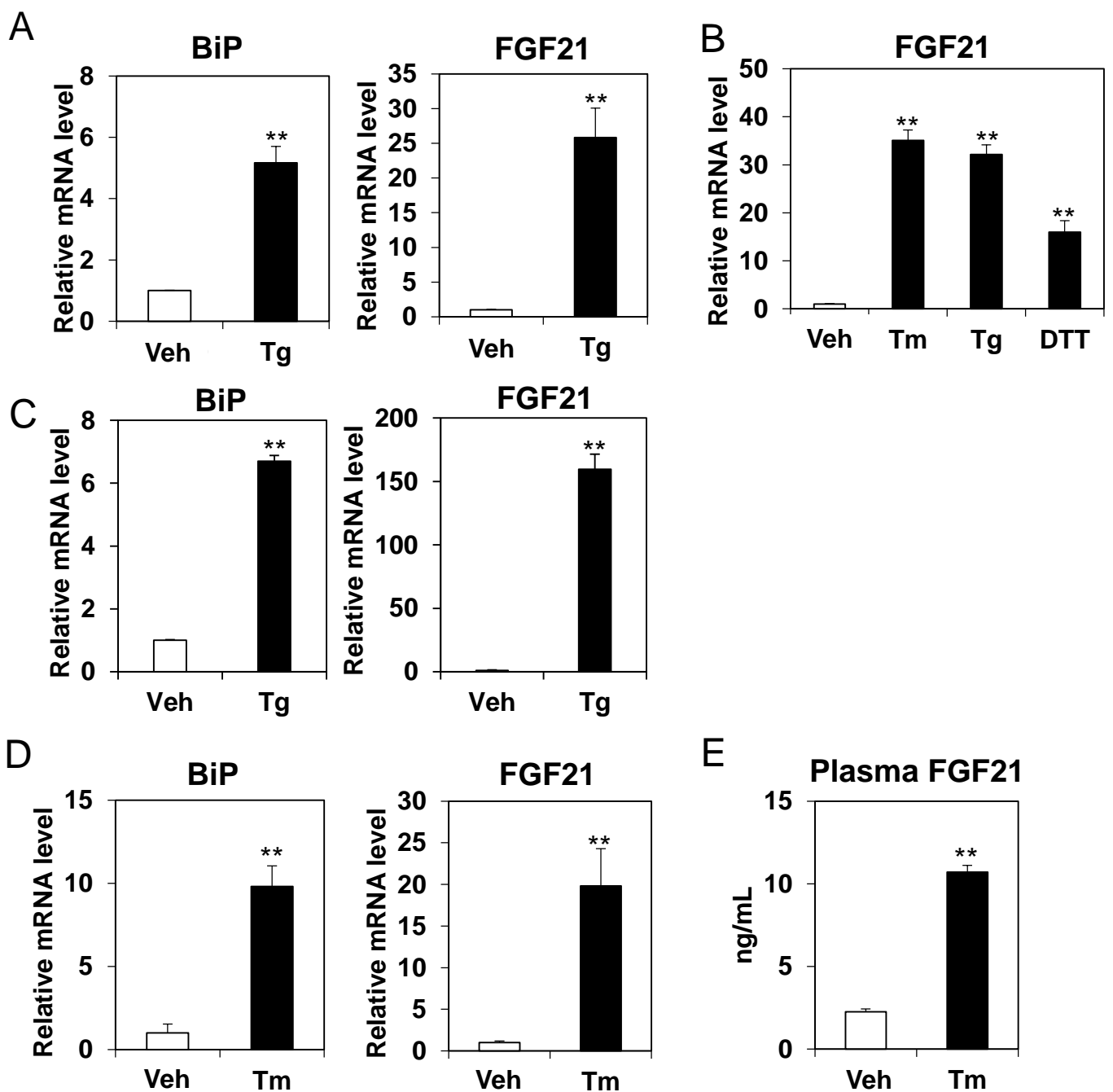


図2-1 FGF21の発現は小胞体ストレスにより亢進する

A,B: マウス初代培養肝細胞に小胞体ストレス誘導剤であるサブシガルジン(300 nM)(A,B)及びツニカマイシン(5 $\mu\text{g} / \text{mL}$)、DTT(1 mM)(B)となるように処理した。6時間後にRNAを回収しリアルタイムPCRにより発現解析を行った。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。C: HuH7細胞に小胞体ストレス誘導剤であるサブシガルジンを250 nMとなるように処理し6時間後にRNAを回収しリアルタイムPCRにより発現解析を行った。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。D,E: 野生型マウスに小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン(100 $\mu\text{g} / \text{mouse}$)を経口投与し6時間後に肝臓及び血液を採取した。肝臓はRNA抽出後リアルタイムPCRにより発現解析を行った。それぞれの遺伝子発現量は36B4の発現量で除することで補正した。血液はELISA法にて血中FGF21分泌量を測定した。1回の試行につき3-5連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定にはスチューデントのt検定を用いた。**: $p < 0.01$

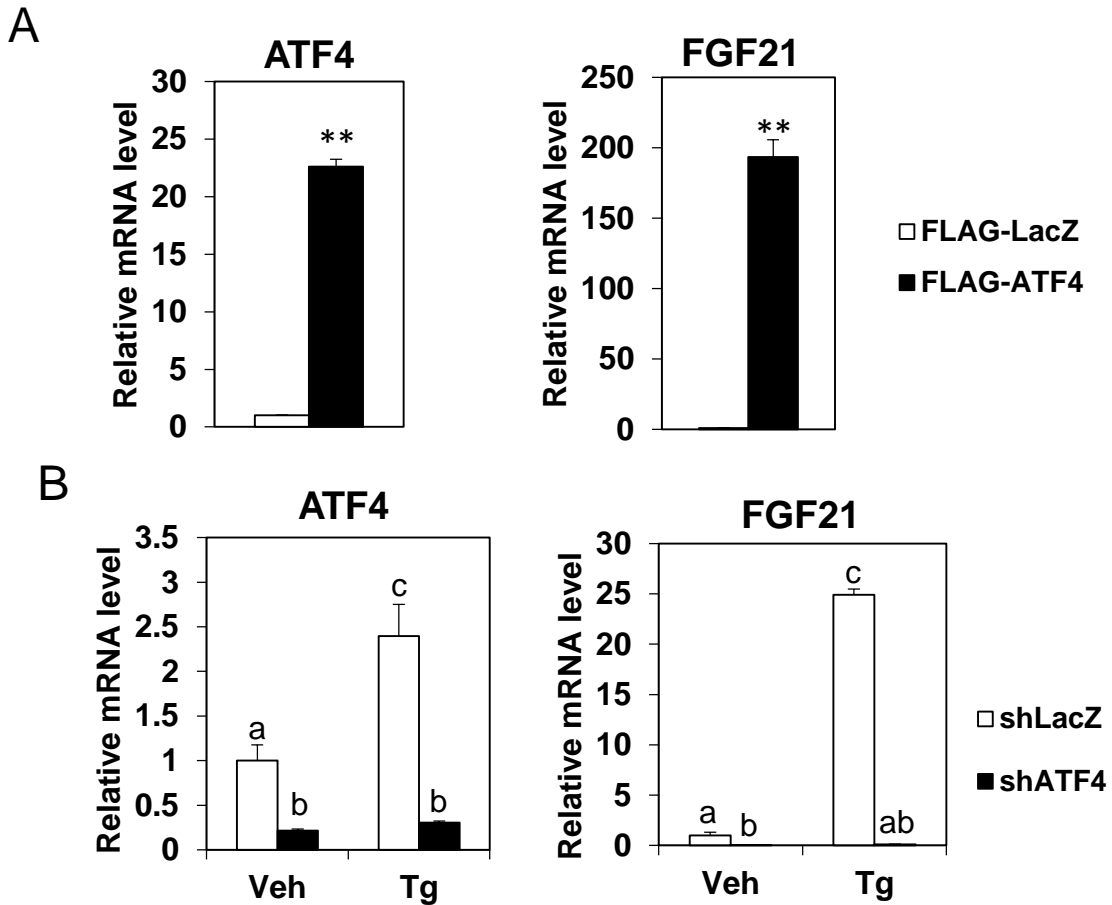


図2-2 FGF21はATF4による発現制御を受ける

A:HuH7細胞にアデノウイルスベクターであるAd-FLAG-LacZ及びAd-FLAG-ATF4をMOI=100で感染させた。感染後15時間後に培地交換し、その48時間後にRNAを回収しリアルタイムPCRにより発現解析を行った。B:HuH7細胞にアデノウイルスベクターであるAd-shLacZ及びAd-shATF4をMOI=100で感染させた。感染後15時間後に培地交換し、その48時間後に小胞体ストレス誘導剤であるサプシガルジン(250 nM)となるように処理した。処理から6時間後にRNAを回収しリアルタイムPCRにより発現解析を行った。それぞれの遺伝子発現量は36B4の発現量で除することで補正した。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定にはスチューデントのt検定または一元配置分散分析(Bonferroni検定)を用いた。**: $p < 0.01$ a-c:異なる文字間で有意差あり、 $p < 0.05$

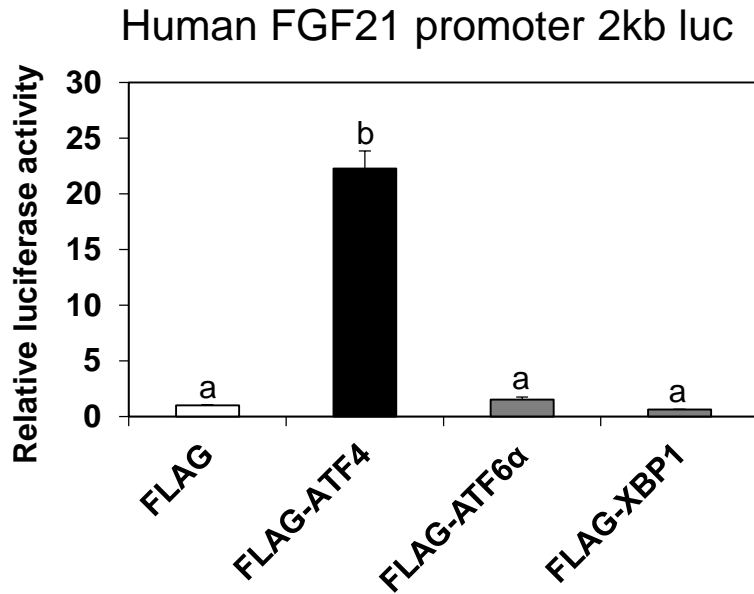


図2-3 ATF4はFGF21プロモーター活性を上昇させる

HuH7細胞に発現ベクターであるFLAG-ATF4、FLAG-ATF6 α (N)、FLAG-XBP1s及びFGF21のレポータープラスミド、CMV- β -galベクターをトランスフェクションした。トランスフェクションから48時間後にルシフェラーゼアッセイに供し、ホタルルシフェラーゼ活性の値を β -galactosidase活性の値で除することでルシフェラーゼ活性の値とした。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析(Bonferroni検定)を用いた。a,b:異なる文字間で有意差あり、 $p < 0.05$

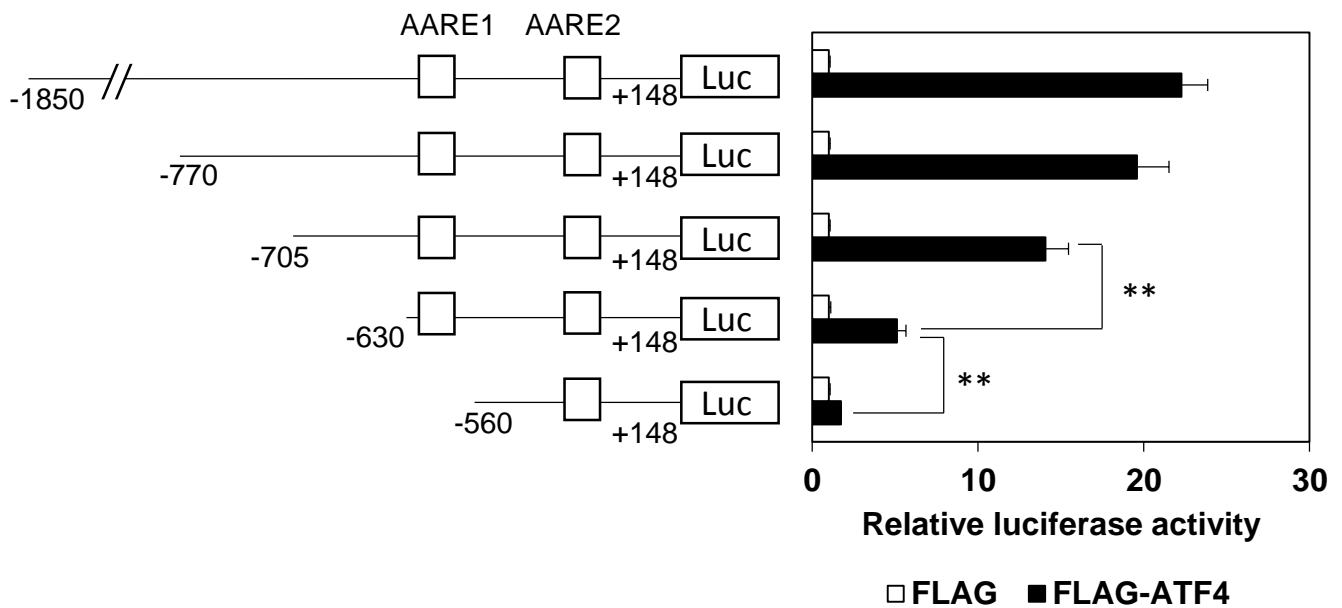


図2-4 ATF4はAARE1及びAARE2に加え新たな制御領域を介してFGF21プロモーター活性を上昇させる

HuH7細胞に発現ベクターであるFLAG-ATF4及びFGF21の各変異型レポータープラスミド、CMV-β-galベクターをトランスフェクションした。トランスフェクションから48時間後にルシフェラーゼアッセイに供し、ホタルルシフェラーゼ活性の値をβ-galactosidase活性の値で除することでルシフェラーゼ活性の値とした。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定にはスチューデントのt検定を用いた。**:p<0.01

A



B

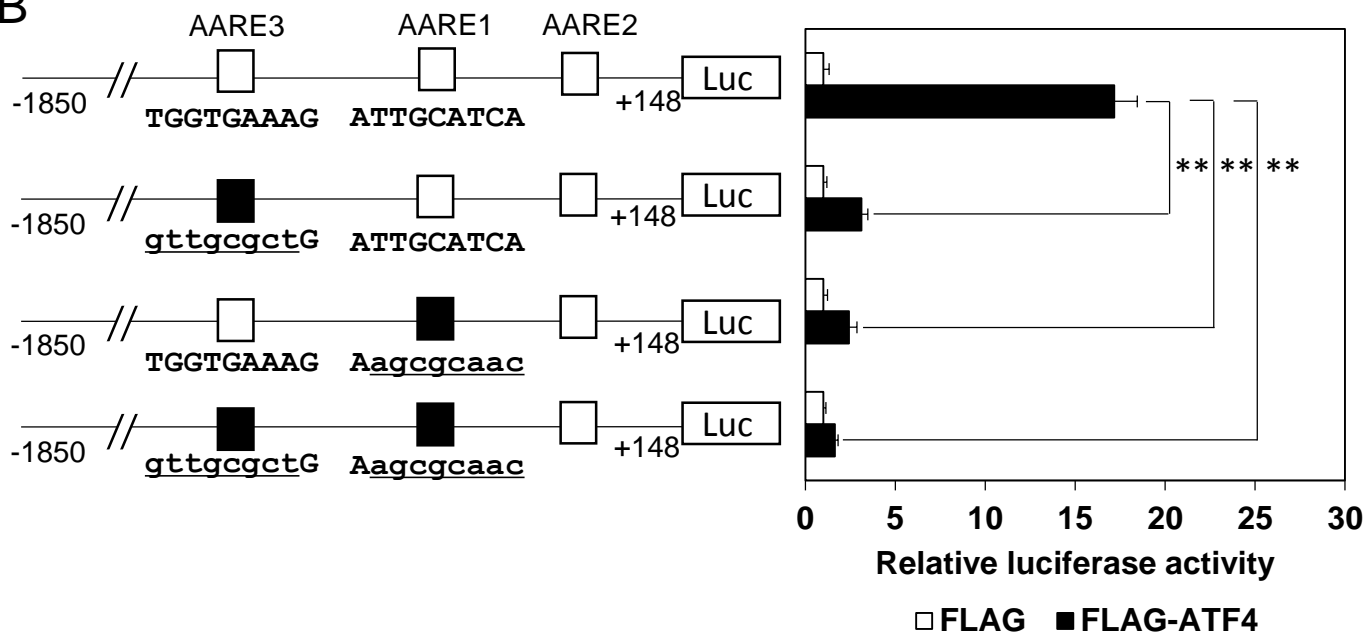


図2-5 FGF21プロモーター領域におけるAARE3の同定

A:ヒト、マウス、ラットのFGF21プロモーター領域内に既知のAAREとは異なるATF4結合配列が保存されている。B:HuH7細胞に発現ベクターであるFLAG-ATF4及びFGF21の各変異型レポータープラスミド、CMV-β-galベクターをトランスフェクションした。トランスフェクションから48時間後にルシフェラーゼアッセイに供し、ホタルルシフェラーゼ活性の値をβ-galactosidase活性の値で除することでルシフェラーゼ活性の値とした。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定にはスチューデントのt検定を用いた。**:p<0.01

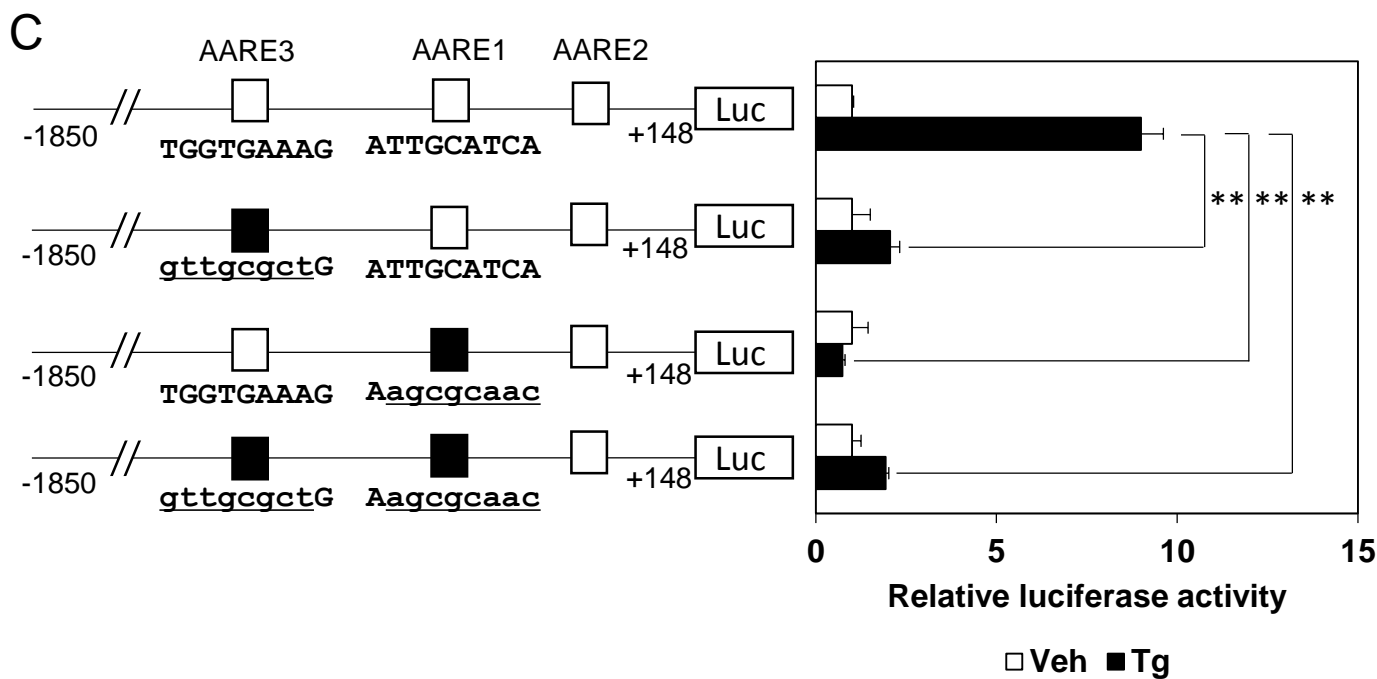
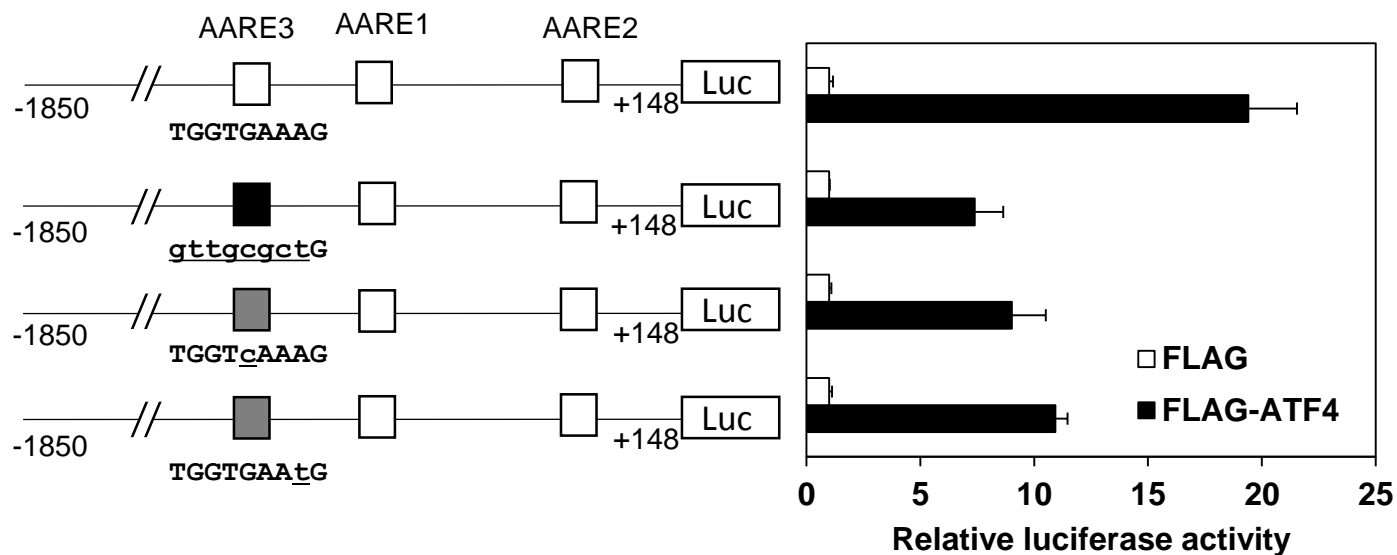


図2-5 FGF21プロモーター領域にAARE3が存在する

C:HuH7細胞にFGF21の各変異型レポータープラスミド、CMV-β-galベクターをトランスフェクションした。トランスフェクションから24時間後に小胞体ストレス誘導剤であるサプシガルジンを250 nMとなるように処理した。処理から24時間後にルシフェラーゼアッセイに供し、ホタルルシフェラーゼ活性の値をβ-galactosidase活性の値で除することでルシフェラーゼ活性の値とした。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定にはスチューデントのt検定を用いた。**:p<0.01

D



E

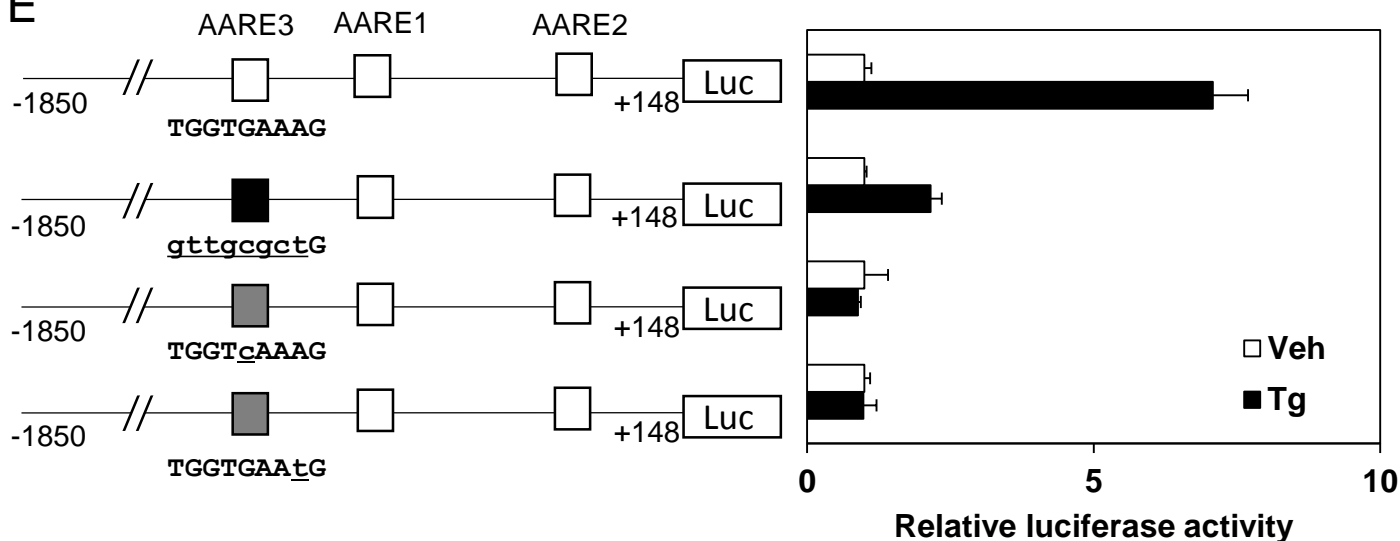


図2-5 FGF21プロモーター領域にAARE3が存在する

D:HuH7細胞に発現ベクターであるFLAG-ATF4及びFGF21の各変異型レポータープラスミド、CMV- β -galベクターをトランスフェクションした。トランスフェクションから48時間後にルシフェラーゼアッセイに供し、ホタルルシフェラーゼ活性の値を β -galactosidase活性の値で除することでルシフェラーゼ活性の値とした。E:HuH7細胞にFGF21の各変異型レポータープラスミド、CMV- β -galベクターをトランスフェクションした。トランスフェクションから24時間後に小胞体ストレス誘導剤であるサプシガルジン₂₅₀を250 nMとなるように処理した。処理から24時間後にルシフェラーゼアッセイに供し、ホタルルシフェラーゼ活性の値を β -galactosidase活性の値で除することでルシフェラーゼ活性の値とした。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定にはスチューデントのt検定を用いた。**: $p < 0.01$

第二章

第二節

小胞体ストレスにおける FGF21 の機能解析

緒言

第一節において小胞体ストレスが ATF4 を介して FGF21 の発現を誘導することを示した。本節では、小胞体ストレスにおける FGF21 の機能について検討した。

実験方法

- ・大腸菌の形質転換(トランスフォーメーション)
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・アガロースゲル電気泳動
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・アガロースゲルからの DNA 断片回収
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・制限酵素処理
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・ライゲーション
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・プラスミドミニプレップ(粗精製)
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・プラスミドラージプレップ(細胞内遺伝子導入用)
第一章第一節実験方法の項に準じた。

プラスミド

第一章第一節実験方法の項に準じた。

第一節に記載のないプラスミドは以下の通りである。

[pEF-FGF21-his]

東京大学先端科学技術研究センター稲垣毅特任准教授からご供与いただいた

[pAd-EF-FGF21-his]

pEF-FGF21-his を鋳型として、5'末端側に *Bgl*III、3'末端側に *Not*I の制限酵素サイトを付加したプライマーを用いて、PCR 反応により FGF21-his を増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製し、*Bgl*III/*Not*I 処理後、pENTR-1A の *Bgl*III/*Not*I サイトに挿入した。このベクターと pAd-CMV-V5-DEST を

Gateway LR Clonase (Invitrogen)反応により組み換えることで、目的のアデノウイルスベクターを得た。

- ・細胞培養試薬の調製
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・細胞培養
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・細胞の継代
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・リポフェクタミン法を用いた遺伝子導入
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・アデノウイルスベクターによる遺伝子導入
第一章第一節実験方法の項に準じた。
第一章に記載のないものは以下のとおりである

[アデノウイルスの濃縮]

HEK293A 細胞を 150 mm dish 40 枚に播種した。細胞がコンフルエント(約 2 日)になったら精製アデノウイルス(約 1×10^9 pfu / mL の P3 ウイルス)を 1 枚の dish あたり 75 μ L 感染させた。CO₂ インキュベーター内で 2~3 日間培養し、大部分の細胞が丸みを帯びていることを確認したら細胞と培地を回収し室温で 2000 rpm、15 分間遠心した。上清を捨て細胞沈殿を 12 mL の培地に懸濁したのち-80 °C で 30 分間静置後、すぐに 37 °C の湯浴内に移し 15 分間加温する作業を 5 回繰り返して再び遠心することにより高力価のアデノウイルスを得た(-80 °C 保存)。そしてこのアデノウイルスを塩化セシウムによる密度勾配遠心法及びセファロースゲルを用いて精製し、得られたウイルス液に終濃度 10 % となるようにグリセロールを加え-80 °C で保存した。なお、超遠心後の精製に関しては Robert D. Gerard 教授 (テキサス大学サウスウエスタンメディカルセンター 米国) よりご指導いただいた。

[アデノウイルスのタイターの検討]

HEK293A 細胞を 6 well plate に 1×10^5 cells / well となるように播種し、翌日目的の遺伝子を発現する精製アデノウイルス溶液を 10^{-7} ~ 10^{-12} の濃度で希釈し、それぞれを各 well にアプライし、一晚培養した。翌日、培地を除き、agarose overlay solution (2 mL DMEM (2 % FBS、P/St)、0.2 mL 4 % agarose)を加え、agarose が固

まったら CO₂ インキュベーターに戻した。2 日後、さらに 1 mL の agarose overlay solution を重層し、さらに培養を続けた。およそ 10 日後、それぞれの well で形成されたプラークの数を計数することで各アデノウイルスのタイターを決定した。

- RNA 抽出

第二章第一節実験方法の項に準じた。

- DNase 処理

第一章第一節実験方法の項に準じた。

- Real-time PCR

第一章第一節実験方法の項に準じた。

それぞれの遺伝子発現は 36B4 の発現量で除することで補正した。また、1 回の試行につき 5-6 連のサンプルを用い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定にはスチューデントの t 検定または一元配置分散分析(Bonferroni 検定)を用いた。

SYBR Green で用いた各 primer を以下に示す。以下に記載していない遺伝子は全て Taq[®]Man probe で測定した。

mCHOP(115)	sense	5'-CTGCCTTTCACCTTGGAGAC-3'
	antisense	5'-TCCTGCTTGAGCCGTTTCATTCTCT-3'
mTRB3	sense	5'-GACTTGTGGCCCTGGGAAT-3'
	antisense	5'-CTCGGCCGTGATCCTCTCT-3'
mXBP1s	sense	5'-GAGTCCGCAGCAGGTG-3'
	antisense	5'-GTGTCAGAGTCCATGGGA-3'

- ウェスタンブロッティング

RIPA buffer

50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 % NP-40、0.25 % deoxycholate

4 °C で保存し、使用時に protease inhibitor cocktail (PIC) (SIGMA) 及び phosphatase inhibitor cocktail (PhIC) (SIGMA) を全体の 1/100 量、25 mM カルパイン阻害剤(N-acetyl-Leu-Leu-Norleu-al ; ALLN) (Nacalai Tesque) を 1/500 量、100 mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)(SIGMA) を 1/100 量となるように加えた。

6 × Laemmli Sample Buffer

1 M Tris-HCl (pH 6.8) : 2.8 mL、 glycerol : 3 mL、 SDS(Sodium dodecyl sulfate) : 1 g、 DTT : 0.93 g、 BPB (bromo phenol blue) : a few (色がつく程度) / 10 mL
-20 °Cで保存し、使用時に 95 °Cで 5 分間の処理をした。

10 mg から 50 mg 程度の肝臓片に RIPA buffer を 1000 μ L / sample 加えポリトロンホモジナイザー(QIAGEN)を用いて破碎した。1.5 mL チューブに回収し、氷上で 30 分間静置した。12000 rpm、4 °Cで 5 分間遠心し、適量の上清を 1.5 mL チューブに移し、1/5 量の 6 x Laemmli Sample buffer を加え、37 °Cで 30 分間処理した。これをタンパク質サンプルとしてポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に供した。

[SDS-PAGE]

第一章第一節実験方法の項に準じた。

[ブロットィング]

第一章第一節実験方法の項に準じた。

[抗体反応]

抗体

第一章第一節実験方法の項に準じた。

第一節に記載のない抗体は以下の通りである。

抗 JNK1/2 抗体(1:1000)、抗 phosphorylated-JNK1/2 抗体(1:1000)、抗 eIF2 α 抗体(1:1000)、抗 phosphorylated-eIF2 α 抗体(1:1000)、抗 CHOP 抗体(1:1000)は Cell signaling から購入した。HRP(horse radish peroxidase)標識抗 rabbitIgG 抗体(1:2000)は JacksonImmunoResearch から購入した。ウエスタンブロットィングを行う際に、抗体は 5 % スキムミルク/PBS-T(Phosphate-buffered saline-Tween20)または 5 % BSA/TBS-T(Tris-buffered saline-Tween20)溶液で括弧内の濃度に希釈して使用した。

・ PBS-T

ポリオキシエチレン(20) ソルビタンモノラウレート(Wako、ICI 社商標 Tween20 相当)を終濃度 0.1 % となるように PBS(-)に加え、混合した。

・ TBS-T

ポリオキシエチレン(20) ソルビタンモノラウレート(Wako、ICI 社商標 Tween20 相当)を終濃度 0.1 % となるように TBS (150 mM NaCl、10 mM Tris-HCl pH 7.5)に加え、混合した。

・ ブロッキング溶液

5 % (w/v)の濃度になるようにスキムミルク粉末(Wako)または BSA (Wako)を PBS-T または TBS-T で溶解した。

メンブレンをブロッキング溶液に浸し、室温で 1 時間もしくは 4 °Cで一晩ゆっ

くり振盪することでブロッキングした。適当な濃度に希釈した一次抗体溶液にメンブレンを浸し、室温で1時間インキュベートした。十分量の PBS-T または TBS-T にメンブレンを浸し10分間激しく振盪することで3回洗浄した。HRP 標識二次抗体をブロッキング溶液で適当な濃度に希釈し、室温で30分間インキュベートした。十分量の PBS-T または TBS-T にメンブレンを浸し10分間激しく振盪することで3回洗浄した。

ECL もしくは Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) にメンブレンを1~2分間浸し、検出試薬を除去した。シグナルはルミノイメージアナライザー LAS-1000 mini (FUJIFILM) で検出し、ImageGauge ソフトウェアで解析を行った。

・動物実験

[実験動物]

第二章第一節実験方法の項に準じた。

FGF21 欠損マウスは京都大学大学院伊藤信行教授からご供与いただいた。

[実験条件]

野生型(C57BL/6J)及び FGF21 欠損マウスへのツニカマイシン処理実験

野生型及び FGF21 欠損マウス(8週齢、オス)に小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを 2.5 µg / g mouse(ツニカマイシンは 150 mM スクロース溶液で希釈した)となるように経口投与し4時間後に解剖した。血液は 0.1 M EDTA で処理したシリンジを使用し、下大静脈から採血した。その後 4 °C、5000 rpm、30 分間の遠心分離を行い血清を分離した。肝臓は採取後に PBS で洗浄し、液体窒素を用いて直ちに凍結し -80 °C で保存した。

野生型及び FGF21 欠損マウスへの絶食再摂食実験

野生型及び FGF21 欠損マウス(7週齢、オス)に17時間の絶食をかけ3時間再摂食(D12450J Research Diet)の後解剖した。血液は 0.1 M EDTA で処理したシリンジを使用し、下大静脈から採血した。その後 4 °C、5000 rpm、30 分間の遠心分離を行い血清を分離した。肝臓は採取後に PBS で洗浄し、液体窒素を用いて直ちに凍結し、-80 °C で保存した。

FGF21 過剰発現マウスへのツニカマイシン処理実験

FGF21 欠損マウス(7-8週齢、オス)にアデノウイルスを用いて 7.5×10^9 pfu / mouse となるように Ad-FGF21-his を過剰発現し、6日後小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを 2.5 µg / g mouse(ツニカマイシンは 150 mM スクロース溶液で

希釈した)となるように経口投与し4時間後に解剖した。血液は0.1 M EDTA で処理したシリンジを使用し、下大静脈から採血した。その後4℃、5000 rpm、30分間の遠心分離を行い血清を分離した。肝臓は採取後に PBS で洗浄し、液体窒素を用いて直ちに凍結し、-80℃で保存した。

FGF21 過剰発現マウスへの絶食再摂食実験

FGF21 欠損マウス(7週齢、オス)にアデノウイルスを用いて 7.5×10^9 pfu / mouse となるように Ad-FGF21-his を過剰発現し、5日後18時間の絶食後3時間再摂食(D12450J Research Diet)させ解剖した。血液は0.1 M EDTA で処理したシリンジを使用し、下大静脈から採血した。その後4℃、5000 rpm、30分間の遠心分離を行い血清を分離した。肝臓は採取後に PBS で洗浄し、液体窒素を用いて直ちに凍結し、-80℃で保存した。

・血中 FGF21 濃度測定

第二章第一節実験方法の項に準じた。

実験結果

小胞体ストレスマーカー遺伝子の発現亢進は FGF21 欠損により増強される

小胞体ストレスによる FGF21 の発現亢進の生理的意義を解明するため、FGF21 欠損マウスを用いた検討を行った。野生型(C57BL/6J)および FGF21 欠損マウスにそれぞれ小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンを経口投与し、4 時間後に肝臓および血液を採取した。ELISA 法により測定した結果、野生型マウスではツニカマイシン投与で血中 FGF21 濃度が有意に増加していた(図 2-6A)。肝臓から RNA を回収しリアルタイム PCR による解析を行った結果、野生型マウスと比較し FGF21 欠損マウスで BiP の遺伝子発現が有意な増加を示した(図 2-6B)。XBP1s や TRB3 など他の小胞体ストレス応答因子は増加傾向であった。絶食後の再摂食により PERK などの小胞体ストレスセンサーが活性化され、シャペロンタンパク質の発現が亢進することが報告されている(126)。次に、野生型及び FGF21 欠損マウスを用いて 3 時間の再摂食実験を行い肝臓および血液を採取した。FGF21 の発現は絶食により亢進し、摂食により低下することが知られている(98)。血中 FGF21 濃度測定の結果、再摂食により血中への FGF21 の分泌量が低下し(図 2-7A)、以前の報告と合致した結果が得られた。また、この時の肝臓における遺伝子発現をリアルタイム PCR により解析した結果、FGF21 欠損により絶食及び再摂食の両方で BiP や XBP1s の発現が増加している傾向が見られた(図 2-7B)。これらの結果から、絶食及び再摂食刺激下では FGF21 欠損により小胞体ストレス応答因子の遺伝子発現亢進が増大する傾向が示された。

FGF21 は小胞体ストレスマーカーの遺伝子発現を抑制する

FGF21 欠損マウスでは薬剤や絶食・再摂食による小胞体ストレスマーカー遺伝子の発現亢進の増加が見られた。小胞体ストレスにおける FGF21 の機能解析のため、FGF21 欠損マウスにアデノウイルスを用いて FGF21 を過剰発現させ、ウイルス感染から 6 日後に小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを経口投与した。投与 4 時間後に解剖を行い、肝臓および血液を採取した。血中 FGF21 濃度を測定した結果、過剰発現群で FGF21 の血中濃度の上昇が認められた(図 2-8A)。次に肝臓における遺伝子発現変動をリアルタイム PCR により解析した結果、ツニカマイシン投与によりコントロールウイルス群(LacZ)では小胞体ストレスマーカーである BiP や XBP1s、TRB3 の遺伝子発現の増加が確認された。一方、FGF21 の過剰発現によりこれらの発現亢進は有意に低下した(図 2-8B、図 2-

8C)。野生型マウスを用いた実験でも同様の遺伝子発現変動が確認された(図 2-9)。以上の結果から、FGF21 は小胞体ストレスを軽減する可能性が考えられた。次に、絶食再摂食実験における FGF21 の機能を検討した。FGF21 欠損マウスにアデノウイルスを用いて FGF21 を過剰発現させ、ウイルス感染 5 日目に絶食再摂食実験を行った。リアルタイム PCR による解析の結果、肝臓の BiP や XBP1s の発現が再摂食刺激により亢進していた。しかし、ツニカマイシンの結果とは異なり FGF21 による遺伝子発現低下は BiP でのみ認められた(図 2-10)。この結果は野生型マウスを用いた実験でも確認された(図 2-11)。以上の結果から、再摂食刺激による小胞体ストレスに関しては BiP の発現に選択的に FGF21 が影響することが示唆された。

FGF21 は小胞体ストレス下での CHOP の発現変動に関与する

FGF21 の過剰発現や欠損マウスを用いた実験から BiP や XBP1s などの小胞体ストレス標的遺伝子の発現変動を示した。次にストレス誘導性のアポトーシスに関与する CHOP の発現変動と炎症に関与する JNK のリン酸化を解析した。その結果、FGF21 過剰発現によりツニカマイシン処理や再摂食刺激による CHOP の発現亢進や JNK のリン酸化が低下し(図 2-12)、FGF21 欠損マウスでは CHOP のタンパク質量が増加していた(図 2-13)。以上の結果から、FGF21 は小胞体ストレス及びストレス誘導性のアポトーシスと炎症を抑制している可能性が考えられる。

考察

本節では、FGF21 が小胞体ストレスにより誘導される生理的意義を解明するため、FGF21 の過剰発現マウスや欠損マウスを用いた実験を行った。その結果、薬剤による小胞体ストレス誘導での BiP や CHOP などの発現亢進が FGF21 過剰発現により抑制され、FGF21 欠損マウスでは逆に増加した。絶食再摂食による生理的な小胞体ストレス刺激によっても BiP など一部遺伝子でツニカマイシン刺激同様の効果が確認された。また、FGF21 は絶食により誘導されるが、絶食時における小胞体ストレス応答因子の発現も FGF21 欠損マウスで亢進していた。これらの事実は FGF21 が小胞体ストレス応答因子の発現制御に関与することを強く示唆している。これまでの報告によると、組み換え FGF21 タンパク質の投与はリン酸化 eIF2 α を低下させ、ツニカマイシンによる小胞体ストレス及び CHOP の発現を抑制し、脂肪肝を軽減させる(125)。本実験では、FGF21 発現による CHOP の発現抑制は確認されたが、FGF21 欠損によるリン酸化 eIF2 α の変動は認められなかった。先行論文と我々の実験方法の違いとして、FGF21 過剰発現の方法、ツニカマイシン刺激の方法及び処理時間があげられる。先行論文とツニカマイシン投与方法を同条件にした実験(腹腔内投与による 1 mg / kg mouse ツニカマイシン 24 時間処理)を行ったが、小胞体ストレス応答マーカーの発現は 24 時間後に基底状態に戻っており(data not shown)、ツニカマイシン処理時間の違いが一因である可能性が考えられる。今回の結果は FGF21 が eIF2 α のリン酸化抑制を介さずに CHOP の発現を制御することを示唆している。

FGF21 の発現は IRE1 経路により亢進すると報告されている(125)が、FGF21 過剰発現による IRE1 経路への効果は確認されていない。第一節において XBP1s による FGF21 のプロモーター活性化は見られなかったが、本節ではツニカマイシン投与による JNK のリン酸化や XBP1s の発現亢進が FGF21 過剰発現により抑制されていた。したがって、薬剤による小胞体ストレスでは FGF21 が小胞体ストレス応答にかかわる 3 つの経路(ATF6 経路、IRE1 経路、PERK 経路)の抑制に作用する可能性がある。さらに、再摂食刺激による BiP の遺伝子発現を FGF21 は抑制していたことから、再摂食による小胞体ストレスでは FGF21 が ATF6 経路及び PERK 経路を抑制していることが推察された。

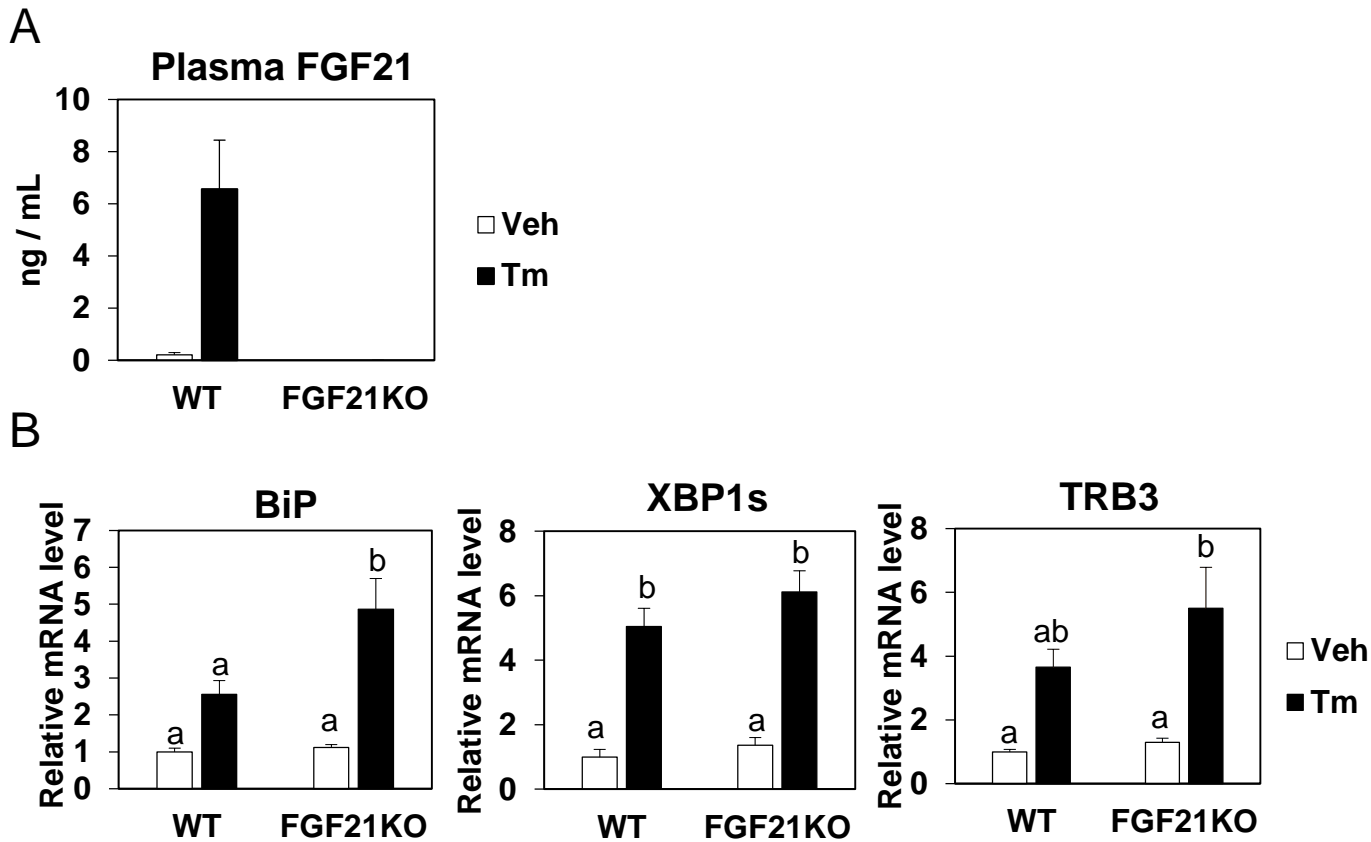
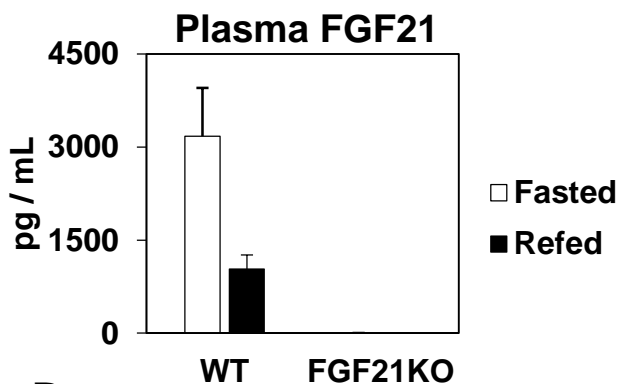


図2-6 FGF21欠損によりツニカマイシンによるBiPの発現亢進が増強される

野生型及びFGF21欠損マウスに小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを2.5 $\mu\text{g} / \text{g}$ mouseとなるように経口投与した。投与4時間後解剖し血液及び肝臓を採取した。A:血液はELISA法にて血中FGF21分泌量を測定した。B:肝臓はRNA抽出後リアルタイムPCRにより発現解析を行った。それぞれの遺伝子発現は36B4の発現量で除することで補正した。1回の試行につき6連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析(Bonferroni検定)を用いた。a,b:異なる文字間で有意差あり、 $p < 0.05$

A



B

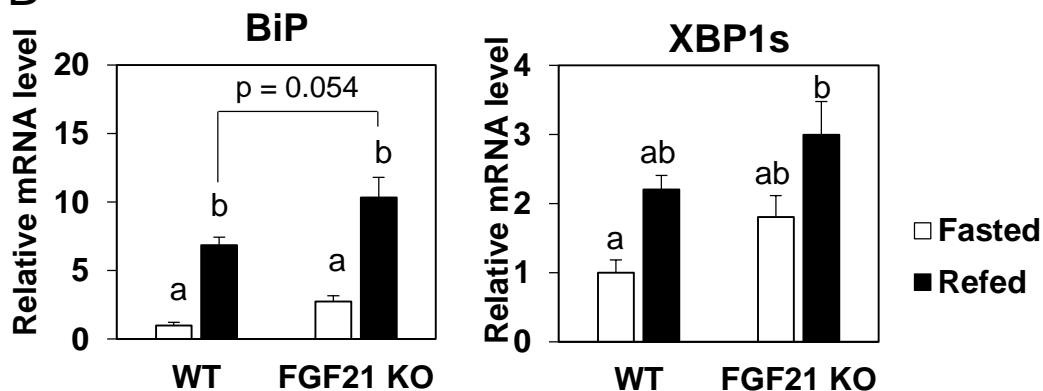


図2-7 FGF21欠損により再摂食によるBiPの発現亢進が増強する傾向がある

野生型及びFGF21欠損マウスに17時間の絶食をかけた後3時間の再摂食(D12450J)の後解剖し、血液及び肝臓を採取した。A:血液はELISA法にて血中FGF21分泌量を測定した。B:肝臓はRNAリアルタイムPCRにより発現解析を行った。それぞれの遺伝子発現は36B4の発現量で除することで補正した。1回の試行につき5連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析(Bonferroni検定)を用いた。a,b:異なる文字間で有意差あり、 $p < 0.05$

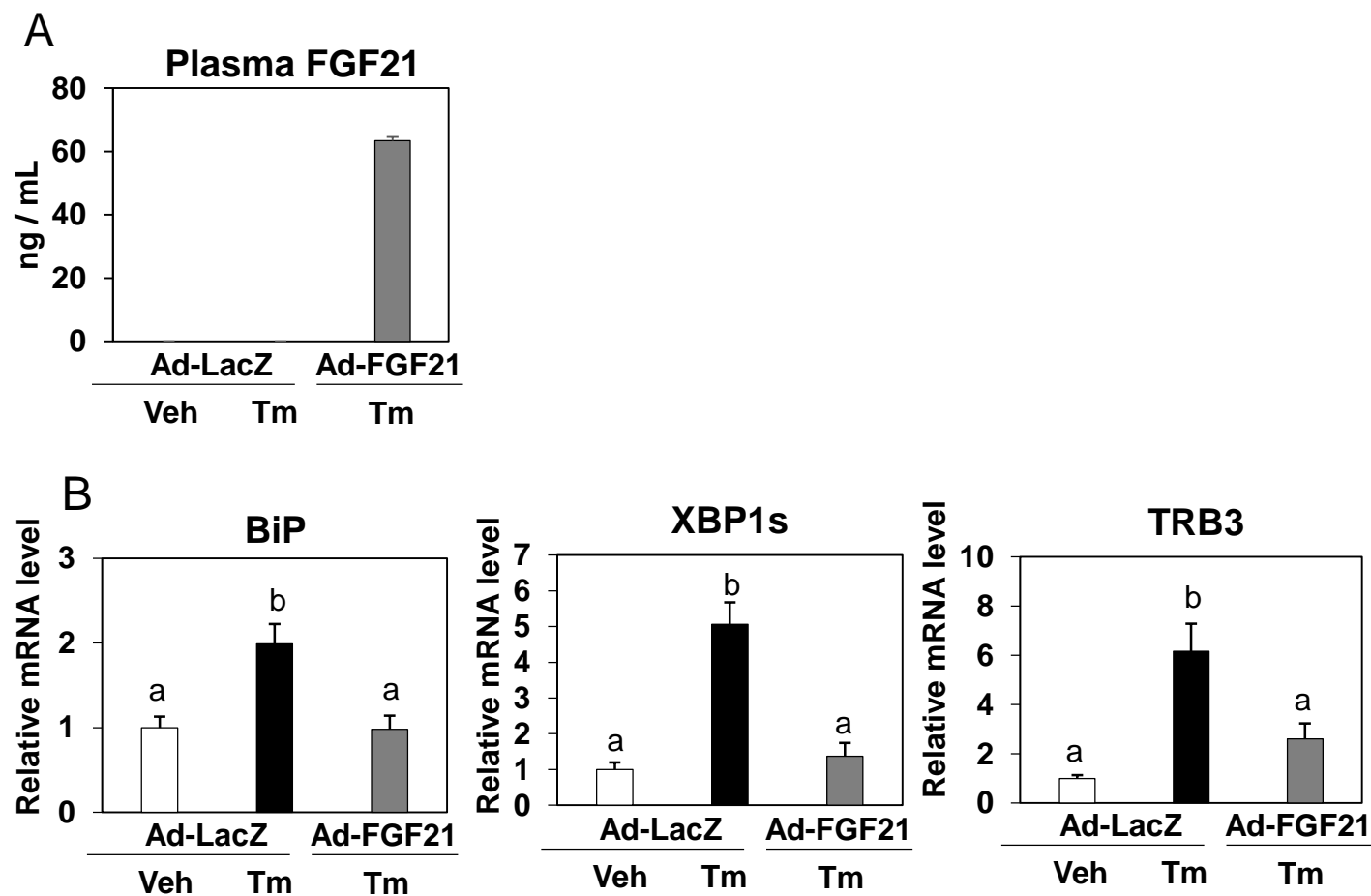


図2-8 FGF21はツニカマイシン投与による小胞体ストレスマーカー遺伝子発現亢進を低下させる
 FGF21欠損マウスにアデノウイルスを用いてFGF21を過剰発現(7.5×10^9 pfu / mouse)させた。ウイルス感染から6日目に小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを $2.5 \mu\text{g} / \text{g mouse}$ となるように経口投与した。投与4時間後解剖し血液及び肝臓を採取した。A,B:肝臓はRNA抽出後リアルタイムPCRにより発現解析を行った。それぞれの遺伝子発現は36B4の発現量で除することで補正した。血液はELISA法にて血中FGF21分泌量を測定した。1回の試行につき5連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析(Bonferroni検定)を用いた。a,b:異なる文字間で有意差あり、 $p < 0.05$

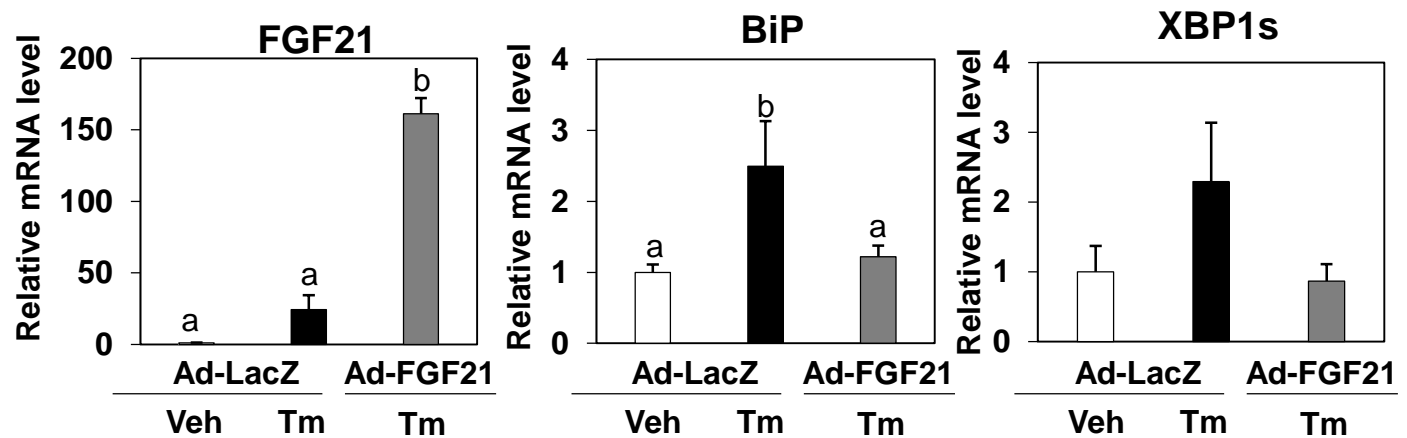


図2-9 FGF21はツニカマイシン投与による小胞体ストレスマーカー遺伝子発現亢進を低下させる
 野生型マウスにアデノウイルスを用いてFGF21を過剰発現(7.5×10^9 pfu / mouse)させた。ウイルス感染から6日目に小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを $2.5 \mu\text{g} / \text{g mouse}$ となるように経口投与した。投与4時間後解剖し血液及び肝臓を採取した。A,B:肝臓はRNA抽出後リアルタイムPCRにより発現解析を行った。それぞれの遺伝子発現は36B4の発現量で除することで補正した。1回の試行につき3-5連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析(Bonferroni検定)を用いた。a,b:異なる文字間で有意差あり、 $p < 0.05$

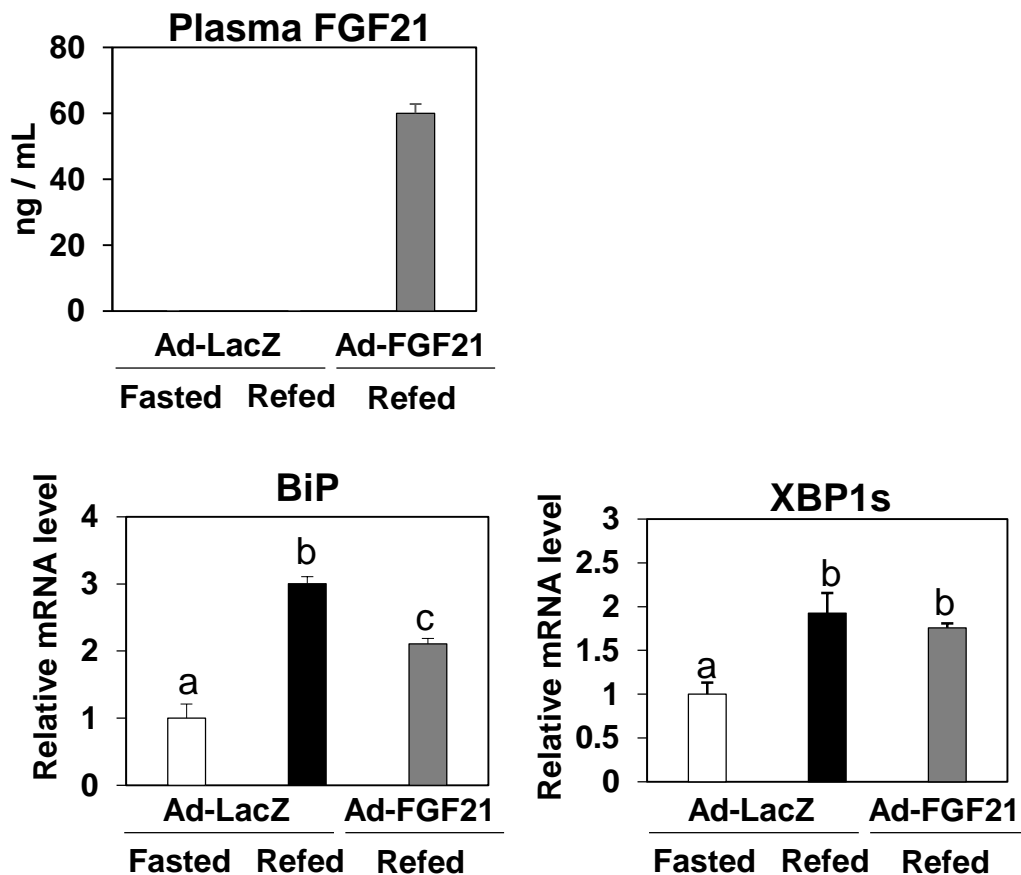


図2-10 FGF21は再摂食によるBiPの発現亢進を低下させる

FGF21欠損マウスにアデノウイルスを用いてFGF21を過剰発現(7.5×10^9 pfu / mouse)させた。ウイルス感染から5日目に18時間の絶食をかけ3時間の再摂食(D12450J)の後解剖し、血液及び肝臓を採取した。肝臓はRNA抽出後リアルタイムPCRにより発現解析を行った。それぞれの遺伝子発現は36B4の発現で除することで補正した。血液はELISA法にて血中FGF21分泌量を測定した。1回の試行につき5連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析(Bonferroni検定)を用いた。a-c:異なる文字間で有意差あり、 $p < 0.05$

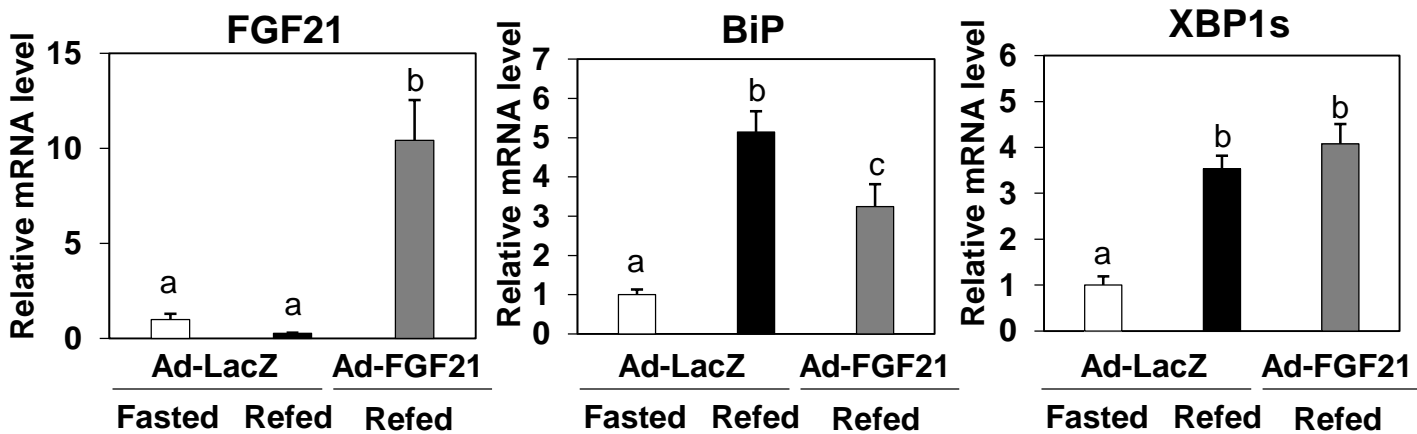


図2-11 FGF21は再摂食によるBiPの発現亢進を低下させる

野生型マウスにアデノウイルスを用いてFGF21を過剰発現(7.5×10^9 pfu / mouse)させた。ウイルス感染から5日目に18時間の絶食をかけ3時間の再摂食(D12450J)の後解剖し、血液及び肝臓を採取した。肝臓はRNA抽出後リアルタイムPCRにより発現解析を行った。それぞれの遺伝子の発現は36B4の発現量で除することで補正した。1回の試行につき5連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析(Bonferroni検定)を用いた。a-c:異なる文字間で有意差あり、 $p < 0.05$

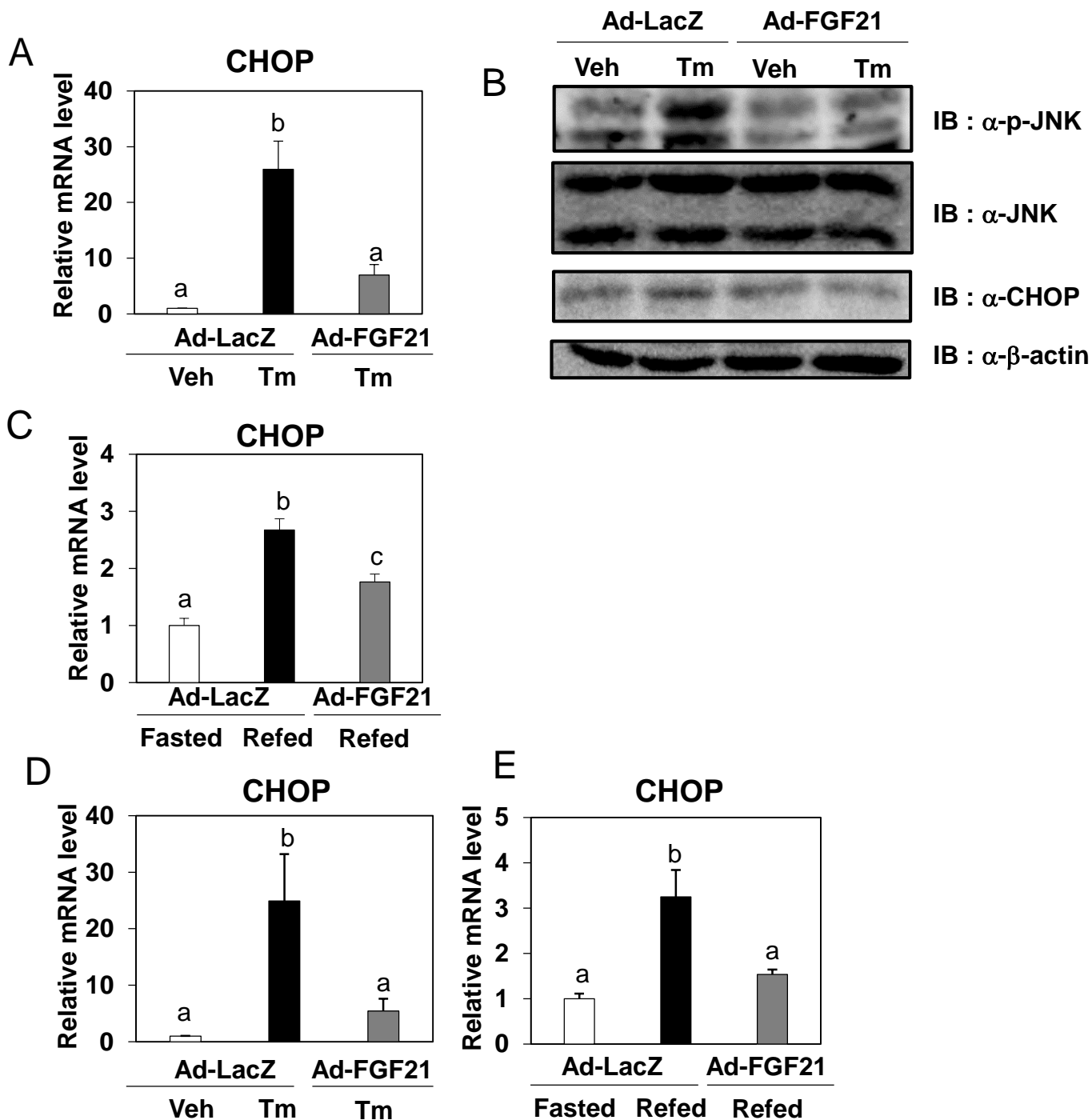


図2-12 FGF21過剰発現により小胞体ストレスによるCHOPの発現亢進が低下する

FGF21欠損マウス(A-C)及び野生型(D,E)にアデノウイルスを用いてFGF21を過剰発現(7.5×10^9 pfu / mouse)させた。ウイルス感染から6日目に小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを $2.5 \mu\text{g} / \text{g mouse}$ となるように経口投与し4時間後解剖し肝臓を採取した(A,B,D)。ウイルス感染から5日目に18時間の絶食をかけ3時間の再摂食(D12450J)の後解剖し、肝臓を採取した(C,E)。(A,C-E)肝臓はRNA抽出後リアルタイムPCRにより発現解析を行った。それぞれの遺伝子発現は36B4の発現量で除することで補正した。1回の試行につき3-5連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析(Bonferroni検定)を用いた。a-c:異なる文字間で有意差あり、 $p < 0.05$ (B):肝臓におけるCHOPの発現及びJNKの活性化変動をウエスタンブロットにて確認した。

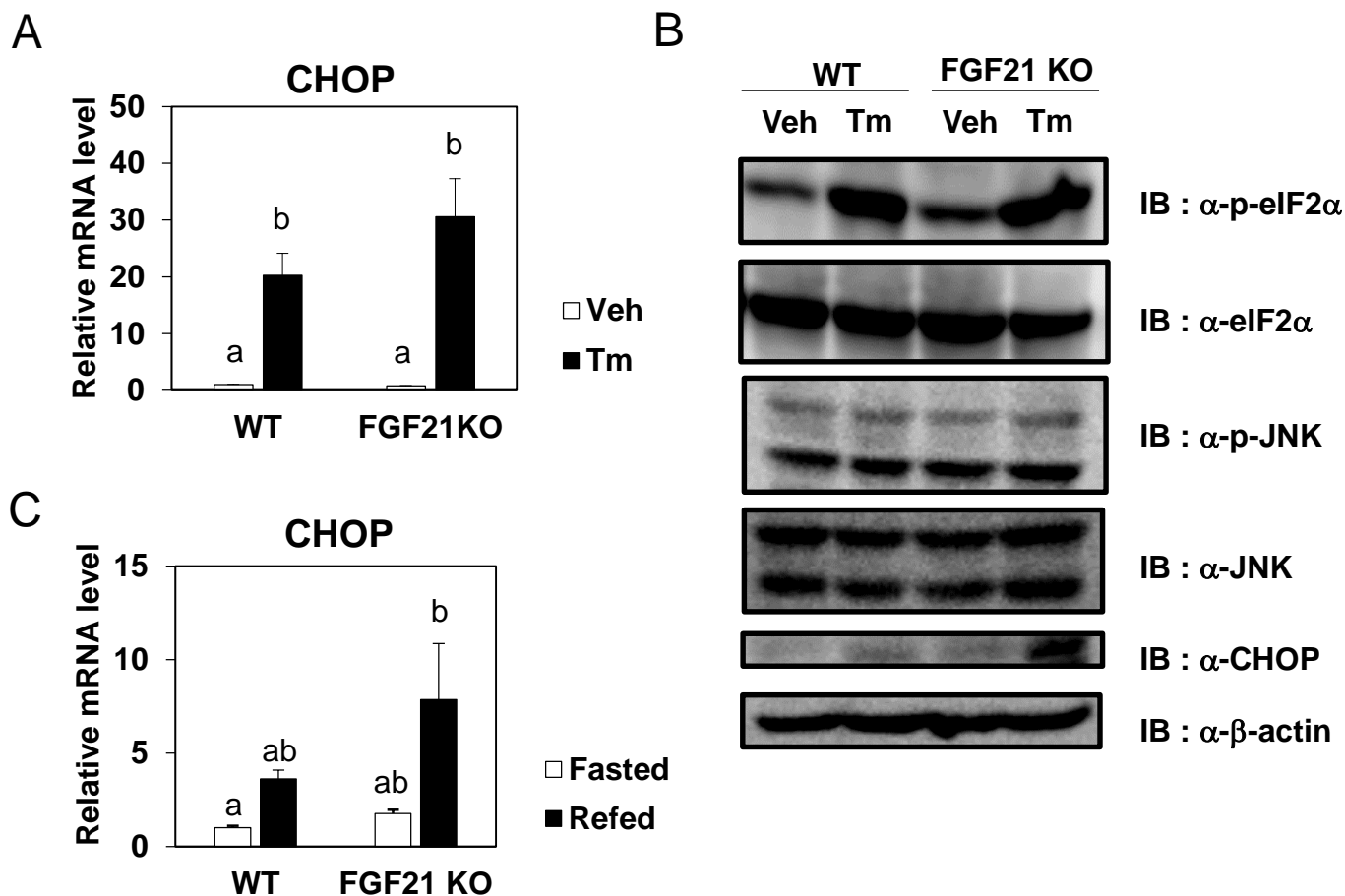


図2-13 FGF21欠損により小胞体ストレスによるCHOPのタンパク質発現が増加する

野生型及びFGF21欠損マウスに小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを2.5 $\mu\text{g} / \text{g mouse}$ となるように経口投与し4時間後解剖し血液及び肝臓を採取した(A,B)、17時間の絶食をかけ3時間の再摂食(D12450J)の後解剖し、肝臓を採取した(C)。(A,C)肝臓はRNA抽出後リアルタイムPCRにより発現解析を行った。それぞれの遺伝子発現は36B4の発現量で除することで補正した。1回の試行につき5-6連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析(Bonferroni検定)を用いた。a,b:異なる文字間で有意差あり、 $p < 0.05$ (B):肝臓におけるCHOPの発現変動及びJNK、eIF2 α のリン酸化をウエスタンブロットにて確認した。

第二章

第三節

ATF4 活性化刺激における FGF21 の発現解析

緒言

第一節、第二節において小胞体ストレスは ATF4 活性化を介し FGF21 の発現を亢進させ、こうして増加した FGF21 は小胞体ストレス軽減作用を有することが示唆された。本節では、小胞体ストレス以外に ATF4 を活性化する刺激における FGF21 の発現変動を検討した。

実験方法

・細胞培養

第二章第一節実験方法の項に準じた。

第一節に記載のないものは以下のとおりである

HepG2 細胞

HepG2 細胞は DMEM(High Glucose)、10 % FBS、P/St を用い、37 °C、5 % CO₂ インキュベーター内で培養し、2 × 10⁶ cells / dish の割合で継代を行った。

ラット初代培養肝細胞

オスの野生型ラットから肝細胞をコラゲナーゼ灌流法により単離した。Percoll 密度勾配遠心により死細胞を除去し、生細胞のみを 35 mm コラーゲンコートディッシュ (BIOCOAT) に 6 × 10⁵ cells / well ずつ播いた。10 % FBS、10 nM デキサメタゾン、2 mM L-グルタミン、100 units / mL ペニシリン、100 µg / mL ストレプトマイシンを含む Williams' E Medium (SIGMA) で 5 時間培養したのち、1 x PBS で洗浄し接着しなかった細胞を除き実験に使用した。

・ RNA 抽出

第二章第一節実験方法の項に準じた。

・ DNase 処理

第一章第一節実験方法の項に準じた。

・ Real-time PCR

第一章第一節実験方法の項に準じた。

それぞれの遺伝子発現量は 36B4 または 18S の発現量で除することで補正した。また、1 回の試行につき 5-6 連のサンプルを用い、平均値と標準偏差または標準誤差を算出した。有意差検定にはスチューデントの t 検定または一元配置分散分析(Bonferroni 検定)を用いた。

SYBR Green で用いた各 primer を以下に示す。以下に記載していない遺伝子は全て Taq[®]Man probe で測定した。

18S(*)	sense	5'-ACCGCAGCTAGGAATAATGGA-3'
	antisense	5'-GCCTCAGTTCCGAAAACCA-3'
hASNS(127)	sense	5'-CTGCACGCCCTCTATGACA-3'
	antisense	5'-TAAAAGGCAGCCAATCCTTCTG-3'

hCHOP(115)	sense	5'-AGGGAGAACCAGGAAACGGAAACA-3'
	antisense	5'-TCCTGCTTGAGCCGTTTCATTCTCT-3'
mASNS	sense	5'-CAAGGAGGCCCAAGTTCAGTAT-3'
	antisense	5'-GGCTGTCCTCCATGCCAAT-3'
mATF3	sense	5'-GCTGCCAAGTGTCGAAACAAG-3'
	antisense	5'-CAGTTTTCCAATGGCTTCAGG-3'
rCHOP	sense	5'-TCCTGTCCTCAGATGAAATTGG-3'
	antisense	5'-GGATGCAGGGTCAAGAGTAGTG-3'
rFGF21	sense	5'-CACCGCAGTCCAGAAAGTCT-3'
	antisense	5'-CATAGAGAGTTCCATCTGGTTGTTG-3'

* : David Mangelsdorf 教授、Steven Kliewer 教授(テキサス大学サウスウエスタン
メディカルセンター 米国)よりプライマー配列情報をいただいた

・動物実験

[実験動物]

第二章第一節及び第二節実験方法の項に準じた。

[実験条件]

野生型(C57BL/6J)及び FGF21 欠損マウスへのアルセナイト処理実験

野生型(C57BL/6J)及び FGF21 欠損マウス(9 週齢、オス)にアルセナイトを 400 µg / g mouse 経口投与し 2 時間後に解剖した。血液は 0.1 M EDTA で処理したシリ
ンジを使用し、下大静脈から採血した。その後 4 °C、5000 rpm、30 分間の遠心
分離を行い血清を分離した。肝臓は採取後に PBS で洗浄し、液体窒素を用いて
直ちに凍結し、-80 °C で保存した。

野生型マウスへのロイシン欠乏食摂食実験

野生型マウス(7 週齢、オス)にロイシン欠乏食(表 2-1)を 1 週間摂取させた後 ZT=1
から解剖した。血液は 0.1 M EDTA で処理したシリンジを使用し、下大静脈から
採血した。その後 4 °C、5000 rpm、30 分間の遠心分離を行い血清を分離した。
肝臓は採取後に PBS で洗浄し、液体窒素を用いて直ちに凍結し、-80 °C で保存
した。

・血中 FGF21 濃度測定

第二章第一節実験方法の項に準じた。

実験結果

FGF21 の発現は酸化ストレスにより亢進する

第一節、第二節において FGF21 の発現は小胞体ストレスにより活性化する ATF4 を介して亢進する結果を示した。ATF4 は主に翻訳開始因子 eIF2 α のリン酸化を介した翻訳促進によってタンパク質発現が増加する。eIF2 α は小胞体ストレス時には PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase)、酸化ストレスやヘム(鉄)欠乏時には HRI (Heme-regulated eIF2 α kinase)、アミノ酸枯渇時には GCN2 (General control non-derepressible 2)、そしてウイルス感染時などに増加する double strand RNA に反応する PKR (double stranded RNA-activated protein kinase) の 4 つのキナーゼによりリン酸化される(42)。これらのことから、小胞体ストレス以外の ATF4 活性化刺激による FGF21 の発現変動を解析した。まず、HRI 活性化を検討するため、酸化ストレスを誘発するアルセナイトをヒト肝癌 HepG2 細胞に処理し 8 時間後に RNA を回収した。リアルタイム PCR による解析の結果、アルセナイト処理により ATF4 やその標的遺伝子である CHOP の遺伝子発現が亢進していたため ATF4 はアルセナイトにより活性化されていることが示された(128)。FGF21 の発現も同様にアルセナイトにより亢進した(図 2-14A)。この発現亢進はラット初代培養肝細胞や他の酸化ストレス誘導剤である過酸化水素によっても確認された(図 2-14B、図 2-14C)。次に個体レベルでの検討を行うため、野生型 (C57BL/6J) マウスにアルセナイトを経口投与した。2 時間後に解剖を行い、肝臓および血液を採取した。血中 FGF21 濃度を測定した結果、アルセナイト処理により FGF21 の血中濃度上昇が確認された(図 2-15A)。次に肝臓における遺伝子発現変動をリアルタイム PCR により解析した結果、アルセナイト投与により ATF4 やその標的遺伝子と同様に、FGF21 の発現の亢進が見られた(図 2-15B)。次に、アルセナイト処理時に発現亢進する FGF21 の機能解析のため、野生型及び FGF21 欠損マウスへのアルセナイト投与実験を実施した。投与 2 時間後に解剖を行い肝臓における遺伝子発現変動をリアルタイム PCR により解析した結果、アルセナイト投与により ATF3 発現が亢進したが FGF21 欠損による発現変動の違いは認められなかった。一方、CHOP の発現亢進は FGF21 欠損マウスで増大していた(図 2-16)。この結果は小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン投与実験と同様の傾向であった。以上の結果から、培養肝細胞およびマウス肝臓において FGF21 の発現は酸化ストレスによっても亢進し、酸化ストレス誘導性のアポトーシスを抑制している可能性が考えられた。

ロイシン欠乏により FGF21 の発現が亢進する

次に GCN2 経路による FGF21 の発現を検討するため、HepG2 細胞をロイシン欠乏培地にて培養し 5 時間後に RNA を回収しリアルタイム PCR により解析した。その結果、ATF4 やその標的遺伝子である ASNS や CHOP の遺伝子発現と同様に FGF21 の発現の亢進が見られた(図 2-17)。個体レベルでの検討のためロイシン欠乏食を野生型マウスに 1 週間与える実験を行った。ロイシン欠乏食摂取により体重と摂食量が低下した(図 2-18)。血中 FGF21 濃度を測定した結果、ロイシン欠乏食により FGF21 の血中濃度上昇が確認された(図 2-19A)。次に肝臓における遺伝子発現変動をリアルタイム PCR により解析した結果、ロイシン欠乏食により ATF4 やその標的遺伝子である ASNS や CHOP と同様に FGF21 の発現亢進が確認された(図 2-19B)。以上の結果から、培養肝細胞およびマウス肝臓において FGF21 の発現はアミノ酸枯渇により亢進することが示された。

考察

本節では、小胞体ストレス以外の ATF4 活性化刺激(酸化ストレス及びアミノ酸欠乏)による FGF21 の発現変動の検討を行った。その結果、いずれの刺激によっても培養細胞及び個体レベルにおいて FGF21 の発現亢進が確認された。当研究室では、同じサブファミリーに属する FGF15/19 もアルセナイト処理やロイシン欠乏食摂取により同様の発現変動を示すか検討した。その結果、培養細胞において酸化ストレスやロイシン欠乏により ATF4 やその標的遺伝子の発現亢進は見られたが FGF15/19 の発現に変動は見られなかった。個体レベルにおいて酸化ストレスにより ATF4 標的遺伝子の発現変動は確認されたが FGF15 に発現亢進は見られず、ロイシン欠乏条件では FGF15 に加え ATF4 の標的遺伝子の発現変動も見られなかった(森本ひとみ修士 平成 25 年度修士論文)。第一節で示したように FGF21 のプロモーター領域には 3 か所の AARE が存在し、FGF19 のプロモーター上には AARE は 1 か所のみである(115)。したがって、FGF15/19 と比較して FGF21 は ATF4 による強い制御を受ける標的遺伝子であり、様々な ATF4 活性化刺激で発現が制御されやすいことが考えられる。FGF21 は肝臓で、FGF15/19 は小腸で高発現しているが、GCN2 は脳、肝臓、マクロファージにおいてアミノ酸枯渇に応答する(129,130,131)。これらの知見から、ATF4 は小腸でも発現しているがアミノ酸枯渇応答に対する活性化は組織選択的であるため GCN2 が機能せず、アミノ酸枯渇応答を示さない可能性が考えられる。FGF21 と FGF15/19 の ATF4 活性化刺激への応答性の違いについては今後の解析が必要である。

野生型及び FGF21 欠損マウスにアルセナイトを投与した実験において CHOP の発現亢進が FGF21 欠損により増加していた。この傾向はツニカマイシン処理時の CHOP の発現変動と類似しており FGF21 が小胞体ストレスだけではなく酸化ストレス軽減にも作用する可能性がある。アルセナイトは酸化ストレス以外にも様々な作用を発揮するため、酸化ストレスは過酸化水素などの他の刺激下での FGF21 過剰発現実験により、小胞体ストレス以外の刺激軽減効果が見られるか今後の検証が必要である。また、double-strand RNA による PKR の活性化によっても FGF21 の発現亢進が見られるか検討も必要である。

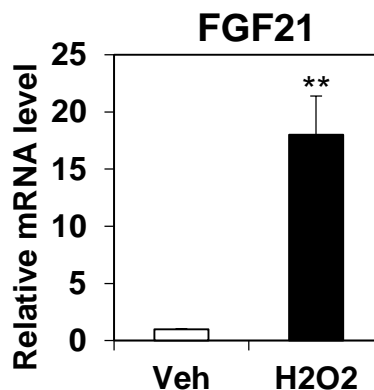
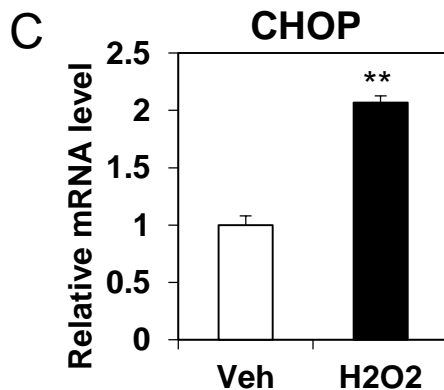
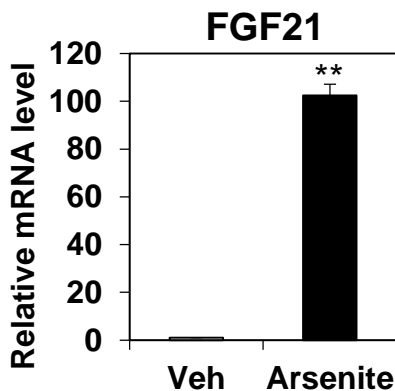
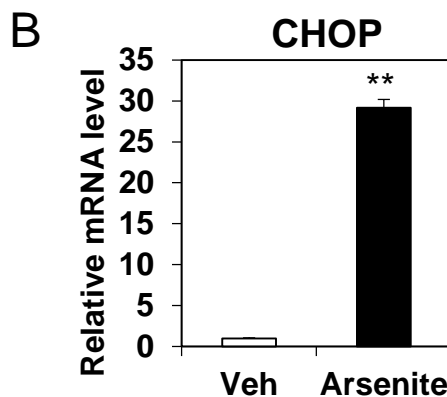
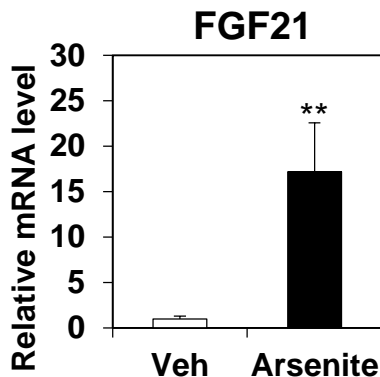
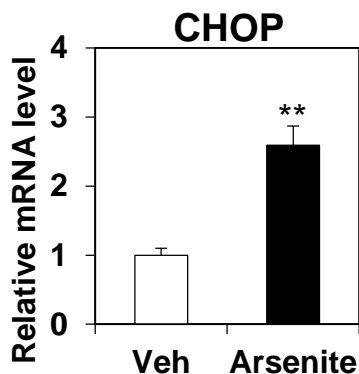
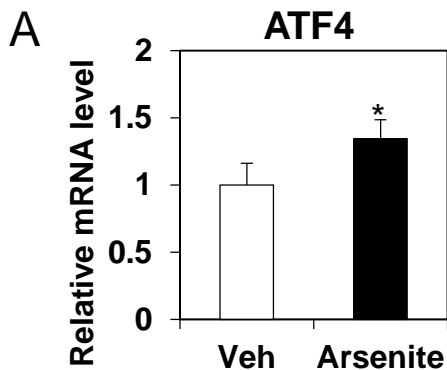
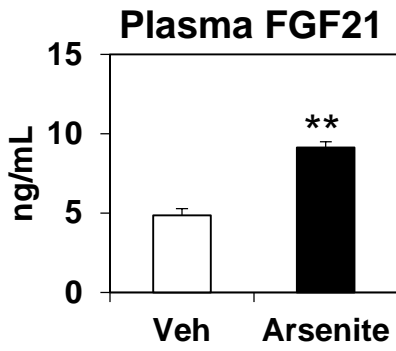


図2-14 FGF21の発現は酸化ストレスにより亢進する

A: HepG2細胞にアルセナイトを30 μ Mとなるように処理し、8時間後にRNAを回収しリアルタイムPCRにより発現解析を行った。B, C: ラット初代培養肝細胞にアルセナイトを30 μ M(A)及び過酸化水素を2 mM(B)となるように処理し、6時間後にRNAを回収しリアルタイムPCRにより発現解析を行った。それぞれの遺伝子のmRNA量は36B4のmRNA量で除することで補正した。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。

*: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

A



B

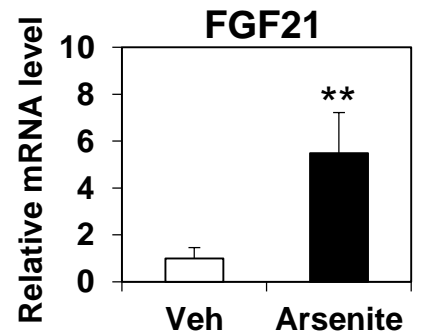
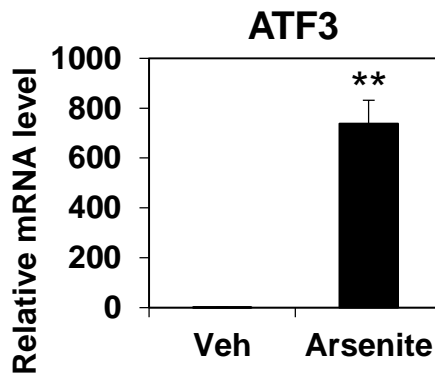
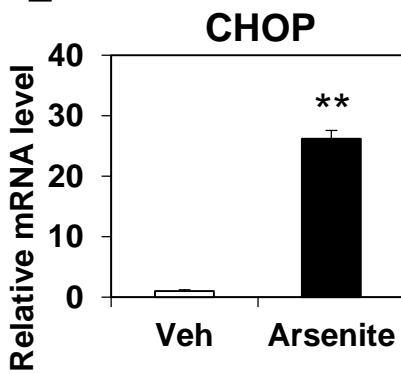
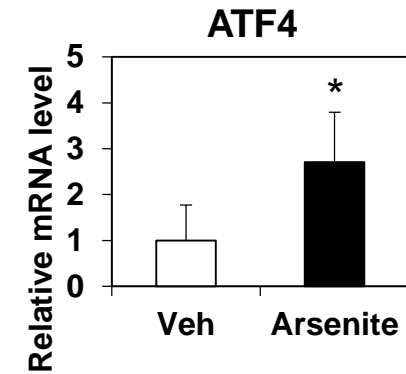


図2-15 アルセナイトの経口投与により肝臓でのFGF21の発現が亢進する

7週齢のオスの野生型マウスに17時間絶食をかけたのちATF4活性化剤であるアルセナイト(400 μ g / mouse)を経口投与した。2時間後肝臓及び血液を採取した。A:血液はELISA法により血中FGF21濃度を測定した。B:肝臓はRNAを回収後、遺伝子発現をリアルタイムPCRにより解析した。それぞれの遺伝子発現は36B4の発現量で除することで補正した。1回の試行につき4連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定にはスチューデントのt検定を用いた。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

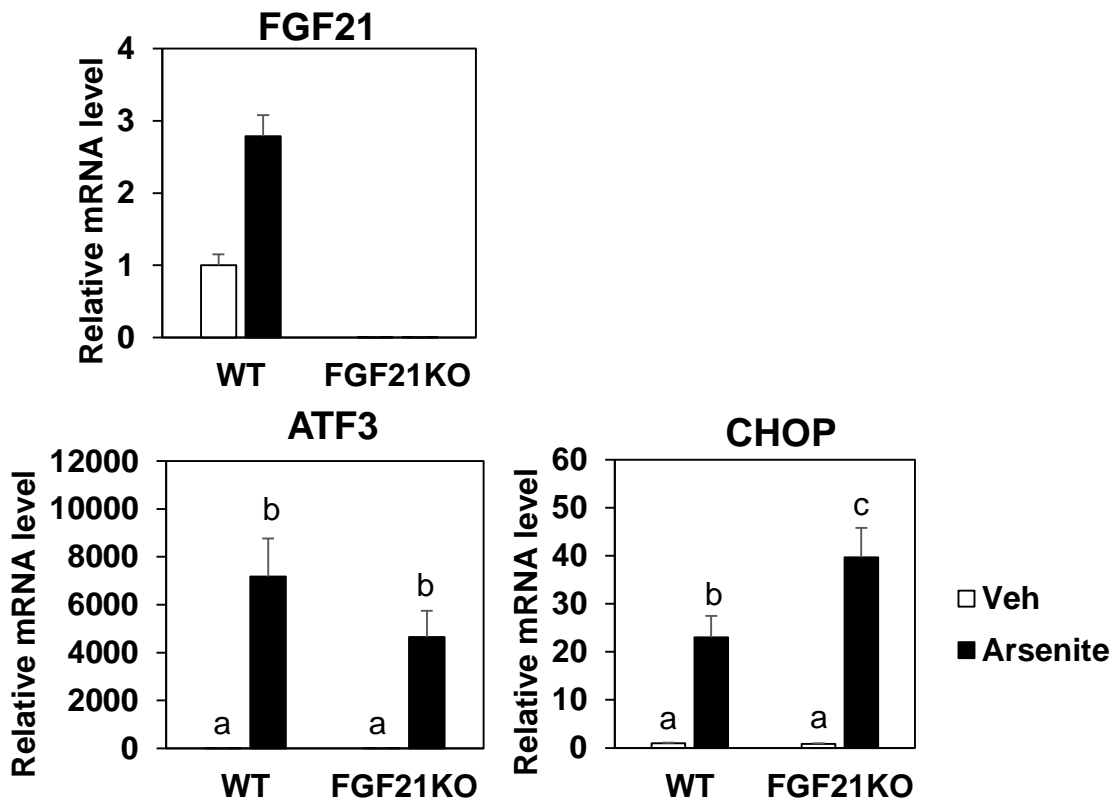


図2-16 FGF21欠損によりアルセナイトによるCHOPの発現亢進が増大する

9週齢のオスの野生型マウス及びFGF21欠損マウスに16時間絶食をかけたのちATF4活性化剤であるアルセナイト(400 μ g / mouse)を経口投与した。2時間後肝臓を採取しRNAを回収後、遺伝子発現をリアルタイムPCRにより解析した。それぞれの遺伝子発現は18Sの発現量で除することで補正した。1回の試行につき5連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析(Bonferroni検定)を用いた。a-c:異なる文字間で有意差あり、 $p < 0.05$

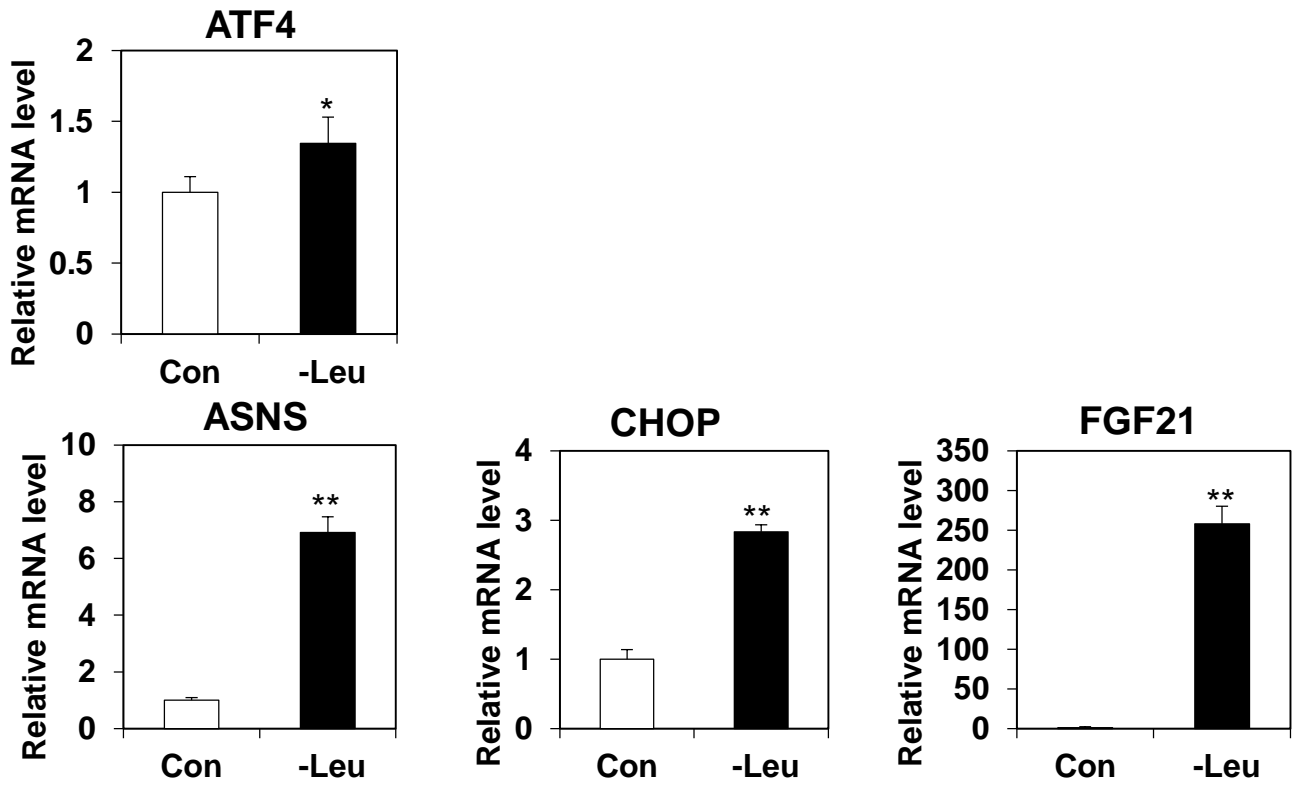


図2-17 FGF21の発現はアミノ酸枯渇により亢進する

HepG2細胞をロイシン欠乏培地で培養し、5時間後にRNAを回収しリアルタイムPCRにより発現解析を行った。それぞれの遺伝子発現は36B4の発現量で除することで補正した。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。*: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

Amino Acid (g/100g)

	Con (%)	-Leu (%)
Asp	6.84	6.84
Asn	4.58	4.58
Ser	4.9	4.9
Glu	10.97	10.97
Gln	5.87	5.87
Pro	4.13	4.13
Gly	2.11	2.11
Tyr	3.48	3.48
Phe	3.61	3.61
Lys	9.74	9.74
His	1.87	1.87
Arg	2.74	2.74
Trp	2.13	2.13
Met	2	2
Cys	2.9	2.9
Leu	12.32	0
Ile	5.03	1.84
Val	4.84	2.2
Ala	4.65	22.8
Thr	5.29	5.29
Total	100	100

Diet components

	g / 100g	kcal
amino acid	20	80
β -cornstarch	40.2	160.8
α -cornstarch	13	52
sucrose	10	40
soybean oil	7	63
fiber	5	
mineral mix (AIN-93)	3.5	
vitamin mix (AIN-93)	1	
choline bitartrate	0.3	
Total	100	395.8

表2-1 ロイシン欠乏食組成

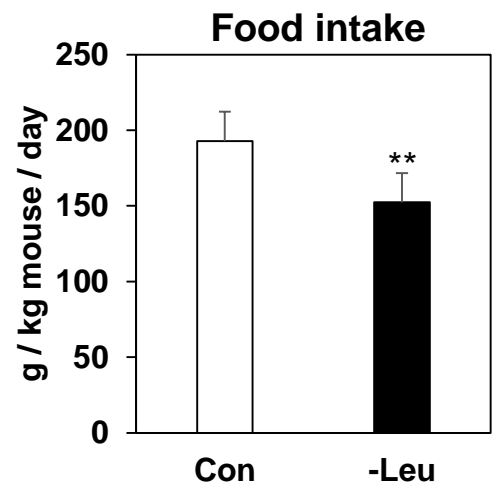
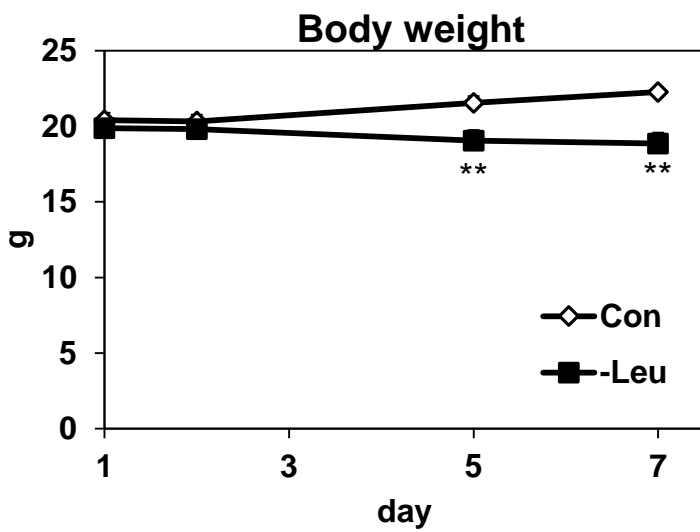


図2-18 野生型マウスへのロイシン欠乏食摂食実験

7週齢のオスの野生型マウスにロイシン欠乏食を一週間摂食させた。体重変化及び摂食量。1回の試行につき5-6連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定にはスチューデントのt検定を用いた。

** : $p < 0.01$

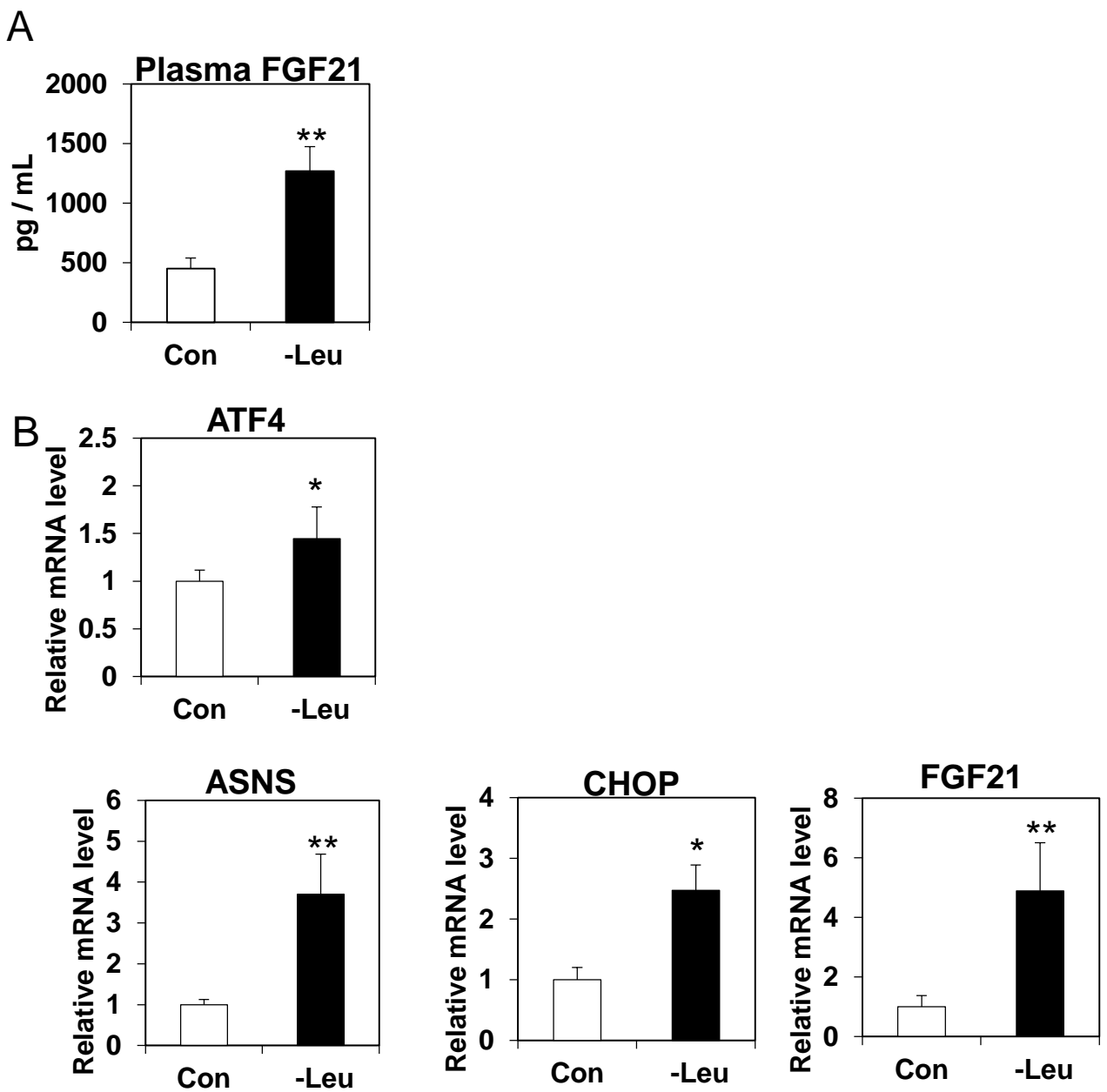


図2-19 ロイシン欠乏食の摂取によりFGF21の発現が亢進する

7週齢のオスの野生型マウスにロイシン欠乏食を1週間摂食させ肝臓及び血液を採取した。A:血液はELISA法により血中FGF21濃度を測定した。B:肝臓はRNAを回収後、遺伝子発現をリアルタイムPCRにより測定した。それぞれの遺伝子発現は18Sの発現量で除することで補正した。1回の試行につき5-6連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定にはスチューデントのt検定を用いた。* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

第三章

第一節

メチオニン・コリン欠乏食摂取による FGF21 の機能解析

緒言

糖尿病や脂肪肝により小胞体ストレスの惹起することが報告されている(68,69,70,71)。第二章において FGF21 の発現が小胞体ストレスやアミノ酸枯渇など ATF4 活性化刺激により亢進することを示した。FGF21 は脂肪酸や糖などのエネルギー代謝に関与する。そこで、本節では FGF21 が脂肪肝による小胞体ストレス応答への関与を検討するため、非アルコール性脂肪肝の誘導食であるメチオニン・コリン欠乏食をマウスに与え FGF21 の発現及びその機能解析を行った。

実験方法

• RNA 抽出

肝臓組織からの抽出は第二章第一節実験方法の項に準じた。

精巣上体脂肪組織からの抽出は以下に示す。

マウス 1 個体の精巣上体脂肪全量を ISOGEN LS(ニッポンジーン)を 1000 μL / sample ずつ加え、ポリトロンホモジナイザー(QIAGEN)を用いて破碎した。15000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間遠心し、中間層を新しいエッペンチューブに 800 μL 移した。160 μL のクロロホルムを加え、15 秒間ボルテックスした後、15000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間遠心した。上層を新しい 1.5 mL チューブに移し 400 μL のイソプロパノールを加えボルテックスした後、15000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分間遠心した。上清を除去し、1 mL の 70%エタノールを加え転倒混和後、15000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間遠心した。上清を除き、沈殿を風乾後 30 μL の DPEC 処理水に溶解し RNA 溶液を得た。得られた RNA 溶液は分光光度計(NANO DROP1000)を用いて濃度測定後、DNase 処理を行い逆転写反応に供した。なお、RNA 溶液は-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

• DNase 処理

第一章第一節実験方法の項に準じた。

• 逆転写反応(Reverse Transcription ; RT)

第一章第一節実験方法の項に準じた。

• Real-time PCR

第一章第一節実験方法の項に準じた。

それぞれの遺伝子発現は 18S の発現量で除することで補正した。また、1 回の試行につき 6 連のサンプルを用い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定にはスチューデントの t 検定または一元配置分散分析(Bonferroni 検定)を用いた。

SYBR Green で用いた各 primer を以下に示す。以下に記載していない遺伝子は全て Taq[®]Man probe で測定した。

mATGL	sense	5'-TGTGGCCTCATTCCCTCCTAC-3'
	antisense	5'-TCGTGGATGTTGGTGGAGCT-3'
mCD36(132)	sense	5'-CTTCCACATTTCCCTACATGCAA-3'

	antisense	5'-ATCCAGTTATGGGTTCACATC-3'
mCollagenI	sense	5'-ATGTTTCAGCTTTGTGGACCTC-3'
	antisense	5'-TCCCTCGACTCCTACATCTTC-3'
mCPT1 α	sense	5'-TGGGCTACTCAGAGGATGG-3'
	antisense	5'-AAGGTGTCAAATGGGAAGG-3'
mFsp27 β (133)	sense	5'-GTGACCACAGCTTGGGTCGGA-3'
	antisense	5'-GGGTCTCCCGGCTGGGCTTA-3'
mIL-1 β	sense	5'-AGTTGACGGACCCCAAAGA-3'
	antisense	5'-GGACAGCCCAGGTCAAAGG-3'
mLPL(132)	sense	5'-CTTCTTGATTTACACGGAGGT-3'
	antisense	5'-ATGGCATTTCACAAACTG-3'
mMCP1	sense	5'-CAGCCAGATGCAGTTAACGC-3'
	antisense	5'-GCCTACTCATTGGGATCATCTTG-3'
mOPN	sense	5'-CAGCCTGCACCCAGATCCTA-3'
	antisense	5'-GCGCAAGGAGATTCTGCTTCT-3'
mPPAR α (132)	sense	5'-CTCGCGTGTGATAAAGC-3'
	antisense	5'-CGATGCTGTCCTCCTTG-3'
mPPAR γ 1(132)	sense	5'-GGACTGTGTGACAGACAAGATTTG-3'
	antisense	5'-CTGAATATCAGTGGTTCACCGC-3'
mPPAR γ 2(132)	sense	5'-CTCTGTTTTATGCTGTTATGGGTGA-3'
	antisense	5'-GGTCAACAGGAGAATCTCCCAG-3'
mSCD1	sense	5'-CCGGAGACCCCTTAGATCGA-3'
	antisense	5'-TAGCCTGTAAAAGATTTCTGCAAACC-3'
mSREBP1c	sense	5'-GAGCCATGGATTGCACATTT-3'
	antisense	5'-CGGGAAGTCACTGTCTTGGT-3'
mTGF β	sense	5'-CCTTCCTGCTCCTCATGGCCA-3'
	antisense	5'-GTCCTTCCTAAAGTCAATGTA-3'
mTNF α	sense	5'-CTGAGGTCAATCTGCCCAAGTAC-3'
	antisense	5'-CTTCACAGAGCAATGACTCCAAAG-3'

Taq[®]Man probe ID

mACC1;Mm01304280_m1

mAdiponectin;Mm00456425_m1

mApoB;Mm01545150_m1

mFASN;Mm00662319_m1

mMTP;Mm00435015_m1

・ウエスタンブロッティング

第二章第一節実験方法の項に準じた。

第二章に記載のない内容は以下の通りである。

抗体

第一章及び第二章実験方法の項に準じた。

第一節及び第二章に記載のない抗体は以下の通りである。

抗 PPAR γ 抗体(H-100)(1:200)は Santa Cruz から購入した。ウエスタンブロッティングを行う際に、抗体は 5 % スキムミルク/PBS-T(Phosphate-buffered saline-Tween20)または 5 % BSA/TBS-T(Tris-buffered saline-Tween20)溶液で括弧内の濃度に希釈して使用した。

・動物実験

[実験動物]

第二章第一節及び第二節実験方法の項に準じた

[実験条件]

野生型(C57BL/6J)及び FGF21 欠損マウスへのメチオニン・コリン欠乏食負荷実験

野生型(C57BL/6J)マウスまたは FGF21 欠損マウス(6-9 週齢、オス)にメチオニン・コリン欠乏食(粉末、表 3-1)を 1 週間または 4 週間与えたのち解剖(ZT=1)した。血液は 0.1 M EDTA で処理したシリンジを使用し、下大静脈から採血した。その後 4 °C、5000 rpm、30 分間の遠心分離を行い血清を分離した。肝臓及び精巣上体脂肪は採取後に PBS で洗浄し、液体窒素を用いて直ちに凍結し、-80 °C で保存した。

FGF21 欠損マウスへの FGF21 過剰発現実験

FGF21 欠損マウス(9 週齢、オス)にアデノウイルスを用いて FGF21 を過剰発現させた。14 日間メチオニン・コリン欠乏食を摂取させた後に解剖し、血液は 0.1 M EDTA で処理したシリンジを使用し、下大静脈から採血した。その後 4 °C、5000 rpm、30 分間の遠心分離を行い血清を分離した。肝臓は採取後に PBS で洗浄し、液体窒素を用いて直ちに凍結し、-80 °C で保存した。

・血中 FGF21 濃度測定

第二章第一節実験方法の項に準じた

- ・血中グルコース濃度測定

血中グルコース濃度測定はムタロターゼ・GOS 法によるグルコースキット(グルコース CII-テストワコー、和光純薬工業(株))を用いて行った。測定はプロトコルに従って行った。

- ・血中トリグリセリド濃度測定

血中トリグリセリド濃度測定は GPO・DAOS 法によるトリグリセリドキット(トリグリセリド E-テストワコー、和光純薬工業(株))を用いて行った。測定はプロトコルに従って行った。

- ・血中総コレステロール濃度測定

血中総コレステロール濃度測定はコレステロールオキシダーゼ・DAOS 法によるコレステロールキット(コレステロール E-テストワコー、和光純薬工業(株))を用いて行った。測定はプロトコルに従って行った。

- ・血中 AST、ALT 濃度測定

血中 AST、ALT 濃度測定は POP・TOOS 法によるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼキット及びアラニンアミノトランスフェラーゼキット(トランスアミナーゼ CII-テストワコー、和光純薬工業(株))を用いて行った。測定はプロトコルに従って行った。

- ・血中総ケトン体濃度測定

血中総ケトン体濃度測定は酵素サイクリング法によるケトン体キット(オートワコー 総ケトン体、和光純薬工業(株))を用いて行った。測定はプロトコルに従って行った。

- ・血中遊離脂肪酸濃度測定

血中遊離脂肪酸濃度測定は ACS・ACOD 法による非エステル結合型脂肪酸キット(NEFA C-テストワコー、和光純薬工業(株))を用いて行った。測定はプロトコルに従って行った。

- ・血中アディポネクチン濃度測定

血清中アディポネクチン濃度測定はマウス・アディポネクチン ELISA キット(CircuLex)を用いた。測定はプロトコルに従って行った。

- ・血中レプチン濃度測定

血清中レプチン濃度測定は Mouse Leptin Assay Kit (IBL)を用いた。測定はプロトコルに従い行った。

・肝臓トリグリセリド量測定

(134)を参考にした。以下に詳細を示す。約 150 mg の肝臓片を 4 mL のクロロホルム / メタノール (2:1,v/v) を入れたガラス製キャップ付き試験管に移し、ポリロンホモジナイザー (QIAGEN)を用いて氷上で破碎した。軽くボルテックスをし室温で 30 分間静置し脂質を抽出した後、1 mL の 50 mM NaCl 溶液を加えボルテックスによる混合後、4 °C、1500 g、30 分間の遠心を行った。遠心後、パスツールピペットを用いて下層の有機層を新しいガラス製試験管に移し 0.36 M CaCl₂ / メタノール (1:1,v/v)を 1 mL 加えボルテックスによる混合後 4 °C、1500 g、10 分間の遠心を行った。再度この操作を行った後、下層をメスフラスコに移しクロロホルムを用いて 5 mL にメスアップした。この溶液を肝臓中脂質抽出液とした(遮光、-20 °C保存)。1 mL のガラスチューブに Triton-X 100 Solution (50 % Triton-X 100 / クロロホルム (v/v))を 10 μL 入れ、そこに脂質抽出液を 200 μL ずつ加えボルテックスによる混合後、クロロホルムを気化した。その後、トリグリセライド E-テストワコー(和光純薬工業(株))の発色液 500 μL を加え 37 °C、5 分間インキュベートし 595 nm における吸光度を測定した。肝臓から抽出されたトリグリセリド量は使用した肝臓片の重量で除することで算出した。

実験結果

FGF21 はメチオニン・コリン欠乏食により発現亢進する

まず、メチオニン・コリン欠乏食摂取による FGF21 の発現を検討するため 7 週齢の野生型(C57BL/6J)マウスにメチオニン・コリン欠乏食を 1 週間与える実験を行った。メチオニン・コリン欠乏食は非アルコール性脂肪肝の誘導食として知られている。メチオニン欠乏によりコリンが生成されず、さらにコリン欠乏は VLDL の合成に重要なフォスファチジルコリン欠乏につながり肝臓からのトリグリセリド分泌不全となる。過去の報告と同様にメチオニン・コリン欠乏食摂取により肝臓中トリグリセリド量の蓄積増大が確認された(図 3-1A)。肝臓の遺伝子発現解析の結果、FGF21 の発現がメチオニン・コリン欠乏食により顕著に増加した(図 3-1B)。また、ELISA 法により血中 FGF21 濃度を測定したところメチオニン・コリン欠乏食摂取による増加が見られた(図 3-1C)。一方、精巣上体脂肪では FGF21 の発現変動は認められなかった(図 3-1D)。

脂肪酸酸化や TG 分解経路は FGF21 欠損により変動しない

次に、FGF21 欠損マウスを用いた実験を行った。その結果、FGF21 欠損マウスの 1 週間のメチオニン・コリン欠乏食による肝臓トリグリセリド量は野生型マウスと比較して増加傾向にあった(図 3-2A、図 3-2B)。脂肪肝による小胞体ストレスの惹起が報告されている(68,69,70,71)ことから、小胞体ストレス応答遺伝子の発現変動を測定したが、FGF21 欠損による有意な変動は確認されなかった(図 3-2C)。次に、メチオニン・コリン欠乏食を 4 週間与える実験を行った。野生型マウスではメチオニン・コリン欠乏食により肝臓トリグリセリド量の増加傾向、血中グルコース、トリグリセリド、総コレステロール、遊離脂肪酸、レプチン濃度の減少傾向、血中 AST、ALT、総ケトン体、アディポネクチン濃度の増加傾向が見られた(図 3-3B、表 3-2)。FGF21 欠損マウスにおいて肝臓トリグリセリド量が有意に増加し(図 3-3B)、小胞体ストレス応答因子や肝線維化マーカー遺伝子の発現が有意に亢進していた(図 3-3C、図 3-4)。また、血中レプチン、AST、ALT 濃度が上昇傾向を示した。血中グルコースおよびアディポネクチン濃度は有意な差が認められた(表 3-2)。血中トリグリセリド濃度などが FGF21 欠損により有意に変動していなかったため、肝臓における脂質合成関連遺伝子を解析した。脂肪酸合成酵素の発現を制御する転写因子 SREBP1c 及びその標的遺伝子である FASN、SCD1、ACC1 を測定した。SREBP1c 及び FASN の発現は野生型マ

ウスではメチオニン・コリン欠乏食による変動は認められなかったが、FGF21 欠損マウスにおいてはメチオニン・コリン欠乏食摂取により発現低下が見られた。SCD1 の発現は過去の報告と同様にメチオニン・コリン欠乏食による発現低下が見られたが、FGF21 欠損による違いは認められなかった。ACC1 の発現はどの群においても変動は見られなかった(図 3-5A)。次に、血中への VLDL 分泌に重要な MTP 及び ApoB の遺伝子発現を測定した。MTP の発現に関してはメチオニン・コリン欠乏食摂取による変動は見られなかったが、FGF21 欠損マウスでは野生型マウスと比較して高発現であった。ApoB の発現はメチオニン・コリン欠乏食摂取により野生型マウスでは発現亢進していたが、FGF21 欠損マウスではそのような変動は見られなかった(図 3-5B)。また、トリグリセリドからジグリセリドへの分解に関与する ATGL (Adipose triglyceride lipase) や脂肪酸酸化に関与する PPAR α や CPT1 α (Carnitine palmitoyltransferase 1 α) についても測定を行った。その結果、メチオニン・コリン欠乏食摂取により ATGL の発現はメチオニン・コリン欠乏食摂取により野生型マウスでは亢進していたが顕著な差ではなく FGF21 欠損マウスにおいては変動しなかった(図 3-5C、図 3-5D)。CPT1 α の発現は FGF21 欠損によらずメチオニン・コリン欠乏食摂取により亢進していた(図 3-5D)。以上の結果から、FGF21 欠損マウスにおける肝臓トリグリセリド量蓄積増加は脂肪酸合成、VLDL 分泌、TG 分解や脂肪酸酸化の変動に起因するものではないことが示唆された。

FGF21 欠損マウスでは PPAR γ の発現が増加する

PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ) は白色脂肪細胞の分化に重要で脂肪組織における脂質代謝の重要な制御因子である。一方、脂肪肝などでは肝臓で PPAR γ 発現が上昇することが報告されている(135,136)。そのため、PPAR γ の発現に着目し発現解析を行った。FGF21 欠損マウスではメチオニン・コリン欠乏食摂取により PPAR γ の発現の亢進が見られた。またウェスタンブロットの結果、PPAR γ 2 のタンパク質量の増加が見られた(図 3-6A、図 3-6B)。PPAR γ の標的遺伝子である LPL (lipoprotein lipase) や Fsp27 β (fat specific protein 27 β) の発現が FGF21 欠損マウスにおいて亢進した。同じく標的遺伝子である CD36 (cluster of differentiation 36) の発現についてもメチオニン・コリン欠乏食摂取により野生型マウス及び FGF21 欠損マウスで亢進していたが、野生型マウスと比較して FGF21 欠損マウスでより誘導された(図 3-6C)。以上の結果から、FGF21 欠損マウスでは PPAR γ の発現の増加により肝臓トリグリセリドの蓄積につながることを示唆された。PPAR γ が高発現する脂肪組織でも検討した結果、FGF21 の発現は肝臓とは異なりメチオニン・コリン欠乏食摂取により低下していた。また、

PPAR γ 2 の発現に関しても肝臓とは異なりメチオニン・コリン欠乏食摂取時に FGF21 欠損により野生型マウスと比較して発現が低下した(図 3-7)。以上の結果から、メチオニン・コリン欠乏食摂取による PPAR γ 発現増加は肝臓選択的であると考えられる。

考察

本節では、非アルコール性脂肪肝のモデル食であるメチオニン・コリン欠乏食を野生型及び FGF21 欠損マウスに与える実験を行った。メチオニン・コリン欠乏食により血中脂質などの低下が見られ、他の報告(137,138)と同様の結果が得られた。血中アディポネクチン濃度に関しては、野生型マウスではメチオニン・コリン欠乏食により増加していたが、FGF21 欠損マウスではそのような違いは認められなかった。FGF21 は脂肪組織でのアディポネクチンの発現及び分泌を亢進することが知られており(113)、メチオニン・コリン欠乏食による FGF21 発現亢進の影響が FGF21 欠損マウスではなかったためであると思われる。

メチオニン・コリン欠乏食による肝臓トリグリセリド蓄積量が FGF21 欠損マウスでは野生型マウスと比較してより増加していた。脂肪酸合成やVLDL分泌、脂肪分解に関係する遺伝子発現変動を調べた結果、メチオニン・コリン欠乏食により脂肪酸合成関連遺伝子 SREBP1c 及びその標的遺伝子である FASN の発現が野生型マウスでは変化はなかったが、FGF21 欠損マウスでは低下していた。他の報告では野生型マウスで同様の現象を確認している(139)が、我々の実験結果では FGF21 欠損においてのみ認められた。血中に分泌されたアディポネクチンは肝臓での脂肪合成抑制や β 酸化亢進効果があり、FGF21 欠損マウスでは野生型マウスで見られた血中アディポネクチン濃度の上昇が認められなかったことから肝臓へのトリグリセリド蓄積にアディポネクチンの関与が考えられる。

上記以外の脂質代謝関連遺伝子としてPPAR γ 1と γ 2の発現を調べたところ、FGF21欠損マウスではその遺伝子発現が亢進し、標的遺伝子の発現も亢進していた。脂肪組織においてFGF21はSUMO化の抑制によりPPAR γ を活性化することが知られている(112)。精巣上体脂肪においてメチオニン・コリン欠乏食摂取によるFGF21やPPAR γ 遺伝子発現変動は見られなかったことからメチオニン・コリン欠乏食によるPPAR γ の発現変動は肝臓選択的の可能性がある。野生型マウスにおいてもメチオニン・コリン欠乏食により肝臓TG蓄積亢進が見られたが、PPAR γ の発現は変動していなかった。これまで、<1>肝臓においてPPAR γ 2を過剰発現すると肝臓トリグリセリド量が増加する(140)、<2>PPAR γ は食事誘導性肥満で発現亢進する(135,136)、<3>PPAR γ 2欠損マウスは肥満を呈さない(141)、<4>PPAR γ の主要な発現臓器である脂肪組織欠損マウスではPPAR γ のアゴニスト処理による脂肪肝抑制効果が見られない(142)、<5>FGF21過剰発現により肝臓でのPPAR γ 2の遺伝子発現が低下する(143)、<6>組み換えFGF21タンパク質を投与するとHFDによる脂肪肝抑制やPPAR γ 遺伝子発現抑制する(102,103,104)ことが報告されている。したがって、FGF21はメチオニン・コリン欠乏食摂取によって引き起こさ

れるPPAR γ の発現上昇を抑制しているため、FGF21欠損マウスではこの抑制が効かず、その結果として肝臓のトリグリセリド蓄積量が増加することが考えられる。今後の解析によりさらに詳細な作用機序を明らかにする必要がある。PPAR γ の標的遺伝子であるFsp27 β は脂肪滴形成を促進する作用を有することからPPAR γ 依存性脂肪肝の制御に関与し、過剰発現によりトリグリセリド量蓄積亢進が知られる(144)。メチオニン・コリン欠乏食摂取によりFsp27 β の遺伝子発現が亢進する傾向にあり、FGF21欠損マウスでは野生型マウスと比較して有意に増大していた。この遺伝子発現結果はメチオニン・コリン欠乏食摂取による肝臓トリグリセリド定量の結果(図3-3B)と相関していた。野生型マウスではFsp27 β 発現上昇を介して肝臓トリグリセリドが蓄積亢進するが、FGF21欠損マウスではPPAR γ の発現亢進によりFsp27 β の発現がさらに増大したため、野生型マウスと比較して肝臓のトリグリセリド量がより増加した可能性が考えられる。FGF21欠損マウスでのメチオニン・コリン欠乏食による肝臓のトリグリセリド量の増加がPPAR γ の発現を介するかはPPAR γ の阻害剤を投与する実験等により検討する必要がある。

他の論文では FGF21 欠損マウスでの肝臓トリグリセリド蓄積の増加が報告されており、ACSL (acyl CoA synthetase) 活性の低下による肝臓中の長鎖脂肪酸の減少及び脂肪酸 β 酸化の抑制を原因に挙げている(139)。メチオニン・コリン欠乏食を 4 週間処理した我々の結果では、脂肪酸 β 酸化に関与する PPAR α の遺伝子発現は野生型マウスでのみ亢進しており、FGF21 欠損マウスでは違いが見られなかった。また CPT1 α の発現はマウス間で差は認められなかった。これより 8 週間処理の際には長期投与の結果、 β 酸化がより抑制されていた可能性がある。

本節において FGF21 欠損マウスではメチオニン・コリン欠乏食による肝臓トリグリセリドの蓄積量増加が見られた。FGF21 欠損マウスでは PPAR γ の発現が亢進し肝臓トリグリセリド蓄積量が増加したものと考えられる。肝臓における FGF21 による PPAR γ 発現の制御機構については不明な点が多く残っており、FGF21 の過剰発現による PPAR γ 制御因子の発現変動等の更なる解析が必要である。

Amino Acid (g/100g)			Diet components				
	Control	MCD	Control		MCD		
			g / 100g	kcal	g / 100g	kcal	
Asp	0.35	0.35	amino acid	17.44	69.76	17.14	68.56
Asn	0.6	0.6	β -cornstarch	40.2	160.8	40.2	160.8
Ser	0.35	0.35	α -cornstarch	13	52	13	52
Glu	4	4	sucrose	12.56	50.24	13.16	52.64
Gln	0	0	soybean oil	7	63	7	63
Pro	0.35	0.35	fiber	5		5	
Gly	2.33	2.33	mineral mix (AIN-93)	3.5		3.5	
Tyr	0.5	0.5	vitamin mix (AIN-93)	1		1	
Phe	0.75	0.75	choline bitartrate	0.3		0	
Lys	1.8	1.8	Total	100	395.8	100	397
His	0.45	0.45					
Arg	1.21	1.21					
Trp	0.18	0.18					
Met	0.3	0					
Cys	0.35	0.35					
Leu	1.11	1.11					
Ile	0.82	0.82					
Val	0.82	0.82					
Ala	0.35	0.35					
Thr	0.82	0.82					
Total	17.44	17.14					

表3-1 メチオニン・コリン欠乏食の組成

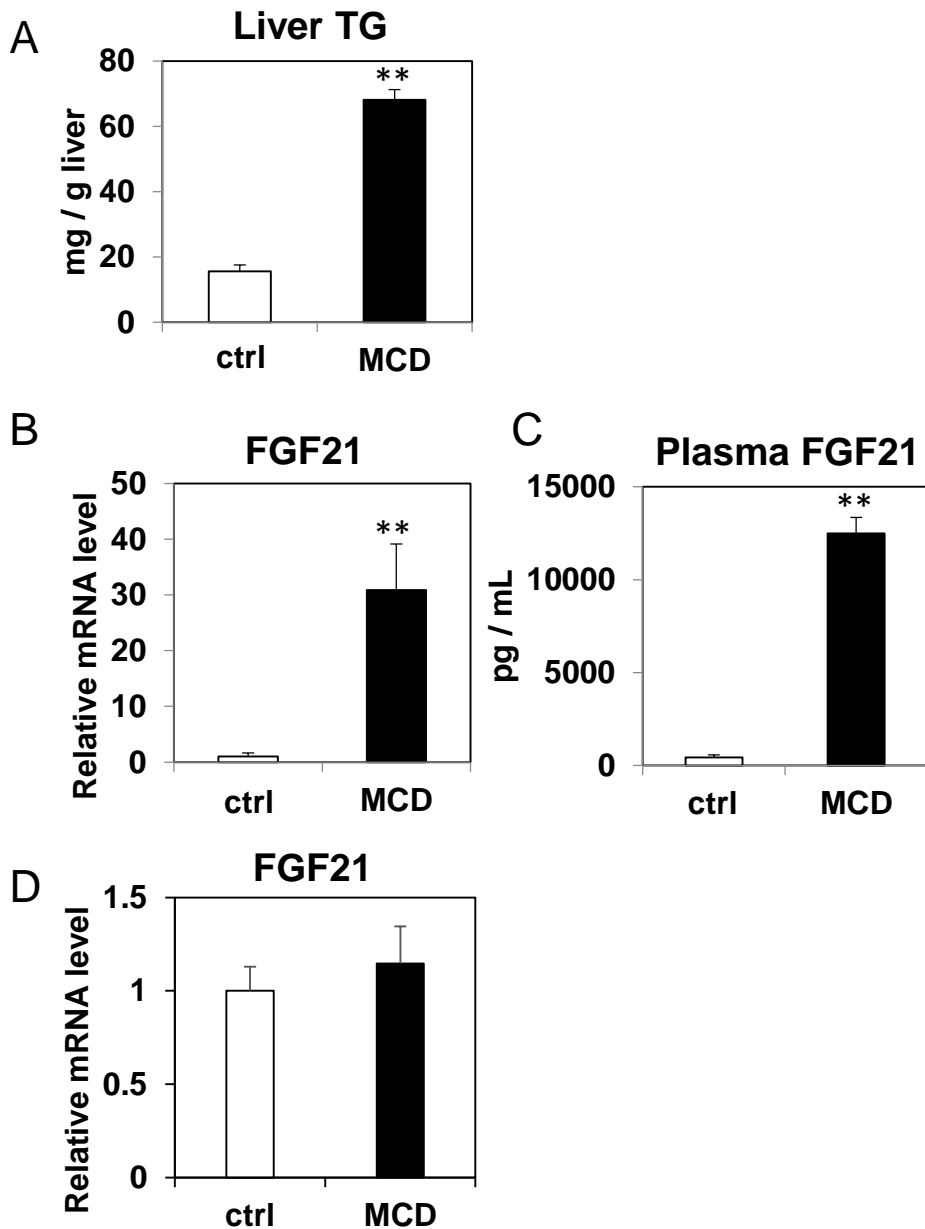


図3-1 FGF21の発現はメチオニン・コリン欠乏食摂取により亢進する

野生型マウスにメチオニン・コリン欠乏食を1週間与えた後に肝臓、精巣上体脂肪及び血液を採取した。A,B;肝臓はRNA抽出後、肝臓トリグリセリド量(A)及びFGF21の遺伝子発現量(B)の測定を行った。C:血液はELISA法にて血中FGF21分泌量を測定した。D:精巣上体脂肪はRNA抽出後リアルタイムPCRによる解析にてFGF21の発現を測定した。遺伝子発現は18Sの発現量で除することで補正した。1回の試行につき6-7連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定にはスチューデントのt検定を用いた。**:p<0.01

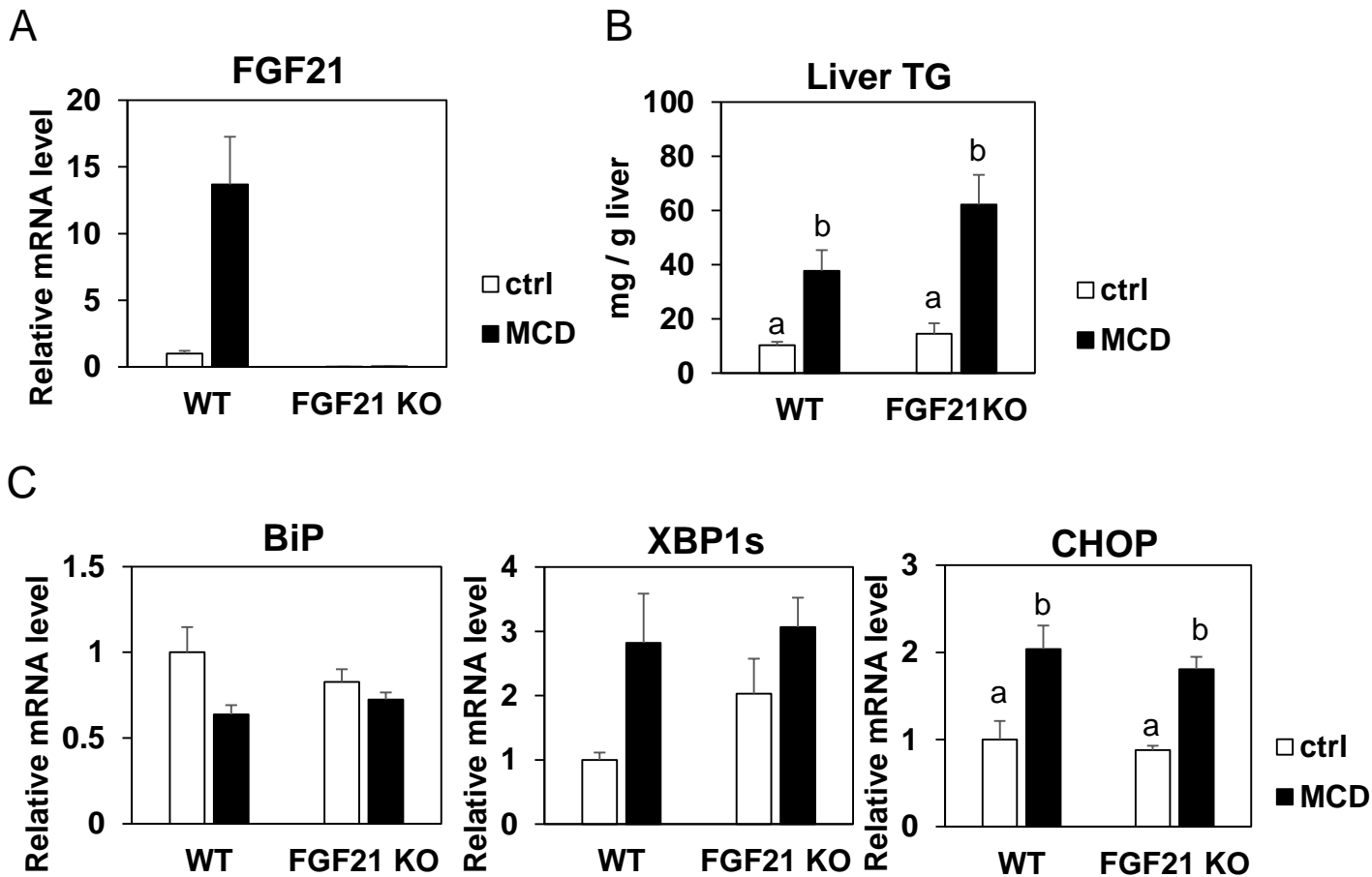


図3-2 メチオニン・コリン欠乏食を1週間摂取した野生型及びFGF21欠損マウスの肝臓における遺伝子発現変動及び肝臓トリグリセリド量測定

野生型マウス及びFGF21欠損マウスにメチオニン・コリン欠乏食を1週間与えた後に肝臓を採取し、遺伝子発現(A,C)及び肝臓トリグリセリド量の測定(B)を行った。遺伝子発現は18Sの発現量で除することで補正した。1回の試行につき6連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析(Bonferroni検定)を行った。a,b:異なる文字間で有意差あり、 $p < 0.05$

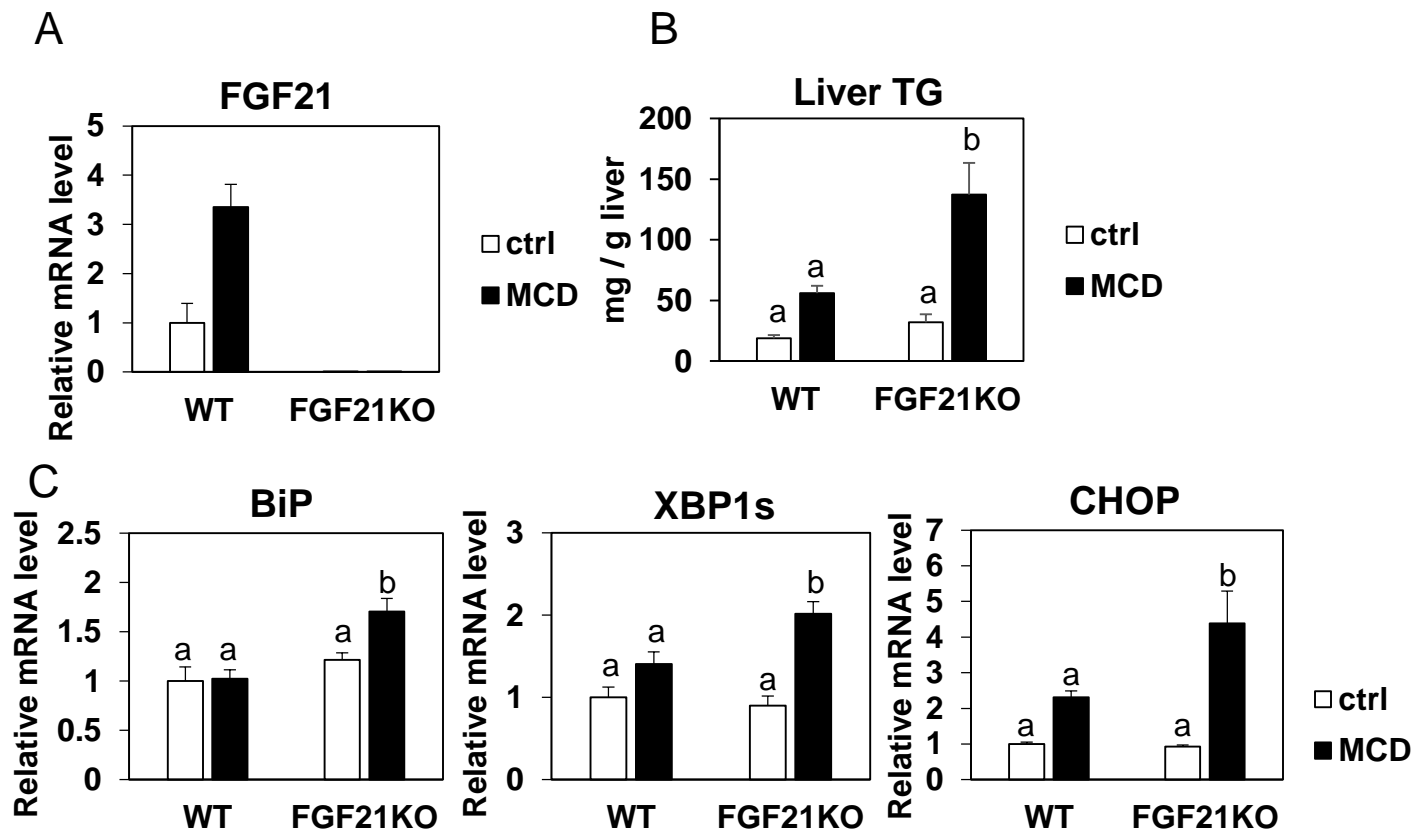


図3-3 メチオニン・コリン欠乏食を4週間摂取した野生型及びFGF21欠損マウスの肝臓における遺伝子発現変動及び肝臓トリグリセリド量測定

9週齢のオスの野生型マウス及びFGF21欠損マウスにメチオニン・コリン欠乏食を4週間与えた後に肝臓を採取し、遺伝子発現(A,C)及び肝臓トリグリセリド量の測定(B)を行った。遺伝子発現は18Sの発現で除することで補正した。1回の試行につき6連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定には二元分散分析を用いた。二元分散分析で有意差があったものに関して一元配置分散分析(Bonferroni検定)を行った。a,b:異なる文字間で有意差あり、 $p < 0.05$

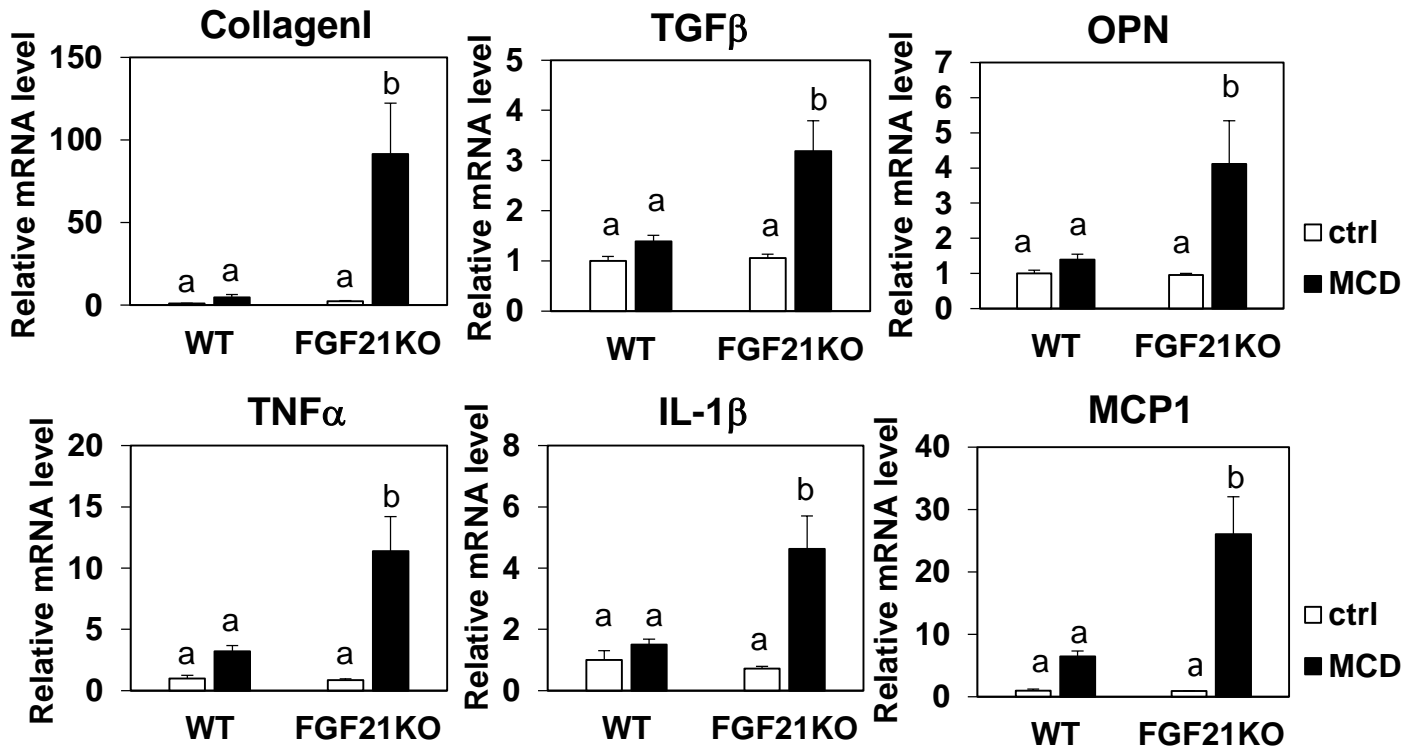


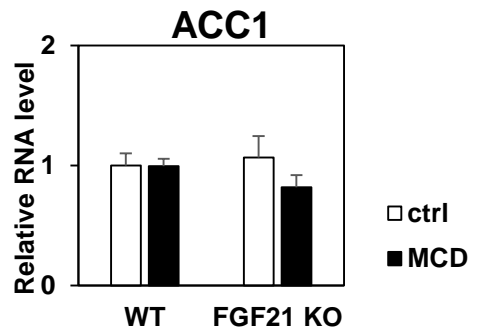
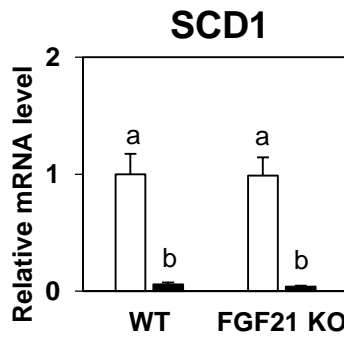
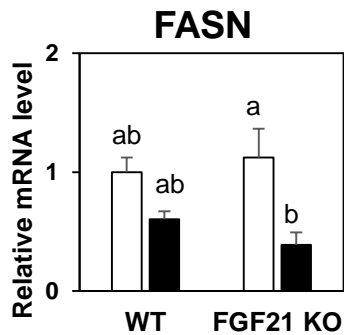
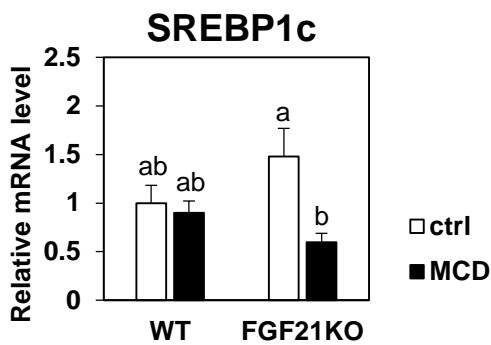
図3-4 メチオニン・コリン欠乏食を4週間摂取した野生型及びFGF21欠損マウス肝臓における線維化マーカー遺伝子発現変動

9週齢のオスの野生型マウス及びFGF21欠損マウスにメチオニン・コリン欠乏食を4週間与えた後に肝臓を採取した。RNAを回収後、遺伝子発現変動をリアルタイムPCRにより解析した。それぞれの遺伝子発現は18Sの発現量で除することで補正した。1回の試行につき6連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析(Bonferroni検定)を用いた。a,b:異なる文字間で有意差あり、 $p < 0.05$

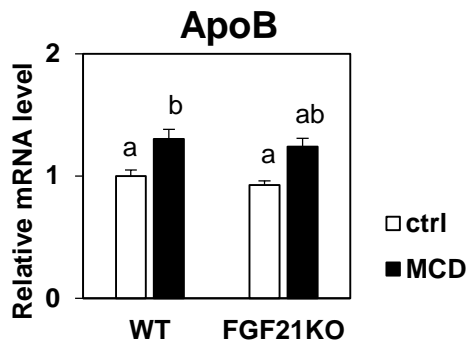
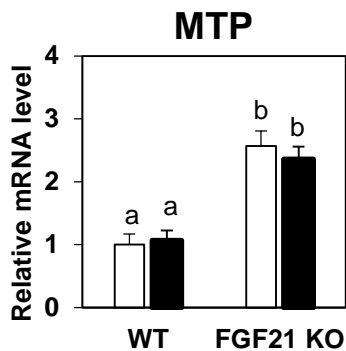
Parameters	WT mouse		FGF21 KO mouse		Pvalue		
	ctrl diet	MCD diet	ctrl diet	MCD diet	Mouse	Diet	Mouse x diet
Baseline body weight (g)	24.0±0.39	23.9±0.38	21.0±0.84	21.4±0.72	p<0.001	N.S.	N.S.
Final body weight (g)	26.1±0.53	18.2±0.17	23.9±1.15	18.5±0.68	N.S.	p<0.001	N.S.
Food consumption (g / kg mouse / day)	125.9±5.1	133.8±8.5	111.2±5.7	102.4±4.9	p<0.01	N.S.	N.S.
liver weight / body weight (%)	5.3±0.56	4.4±0.04	5.4±0.11	5.7±0.25	N.S.	N.S.	N.S.
Plasma glucose (mg / dL)	209±15 ^a	164±5 ^b	249±9 ^a	131±8 ^b	N.S.	p<0.001	p<0.01
Plasma triglyceride (mg / dL)	344±68	93±22	368±33	123±36	N.S.	p<0.001	N.S.
Plasma total cholesterol (mg / dL)	188±15	127±23	228±35	121±18	N.S.	p<0.01	N.S.
Plasma AST (IU / L)	6.1±1.4	74.5±15.9	7.0±0.6	161.2±67.5	N.S.	p<0.01	N.S.
Plasma ALT (IU / L)	4.7±1.0	44.6±6.3	2.8±0.6	103.9±46.5	N.S.	p<0.01	N.S.
Plasma 3-Hydroxybutyrate (μmol / L)	35±10	70±13	46±8	97±16	N.S.	p<0.01	N.S.
Plasma NEFA(mEq / L)	0.33±0.049	0.25±0.03	0.36±0.046	0.25±0.045	N.S.	p<0.05	N.S.
Plasma Adiponectin (μg / mL)	19.4±1.33 ^a	32.1±2.0 ^b	25.3±1.31 ^{ab}	27.2±2.85 ^{ab}	N.S.	p<0.01	p<0.05
plasma leptin (pg / mL)	2129±222	635±122	3764±978	1756±485	p<0.05	p<0.01	N.S.
Plasma FGF21	2202±772	8327±837	-	-	-	p<0.01	-

表3-2 メチオニン・コリン欠乏食を4週間摂取した野生型及びFGF21欠損マウスにおける各種パラメーター
9週齢のオスの野生型マウス及びFGF21欠損マウスにメチオニン・コリン欠乏食を4週間与えた後に肝臓及び血液を採取し、各種パラメーターを測定した。1回の試行につき6連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定には二元分散分析を用いた。二元分散分析で有意差があったものに関して一元配置分散分析(Bonferroni検定)を行った。a,b:異なる文字間で有意差あり、p<0.05

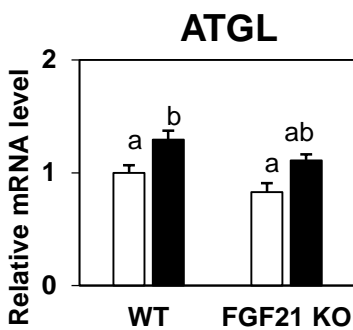
A



B



C



D

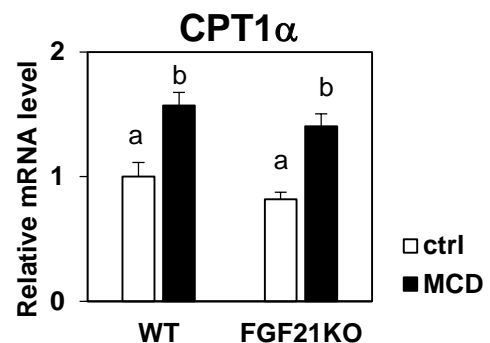
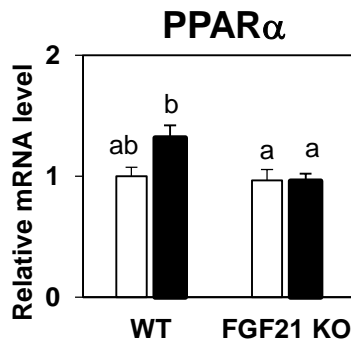


図3-5 メチオニン・コリン欠乏食を4週間摂取した野生型及びFGF21欠損マウス肝臓における遺伝子発現変動
9週齢のオスの野生型マウス及びFGF21欠損マウスにメチオニン・コリン欠乏食を4週間与えた後に肝臓を採取した。RNAを回収後、脂肪酸合成(A)、VLDL分泌に關与する遺伝子(B)、TG分解(C)及び脂肪酸 β 酸化に關与する遺伝子(D)の発現をリアルタイムPCRにより解析した。それぞれの遺伝子発現量は18Sの発現量で除することで補正した。1回の試行につき6連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析(Bonferroni検定)を用いた。a,b:異なる文字間で有意差あり、 $p < 0.05$

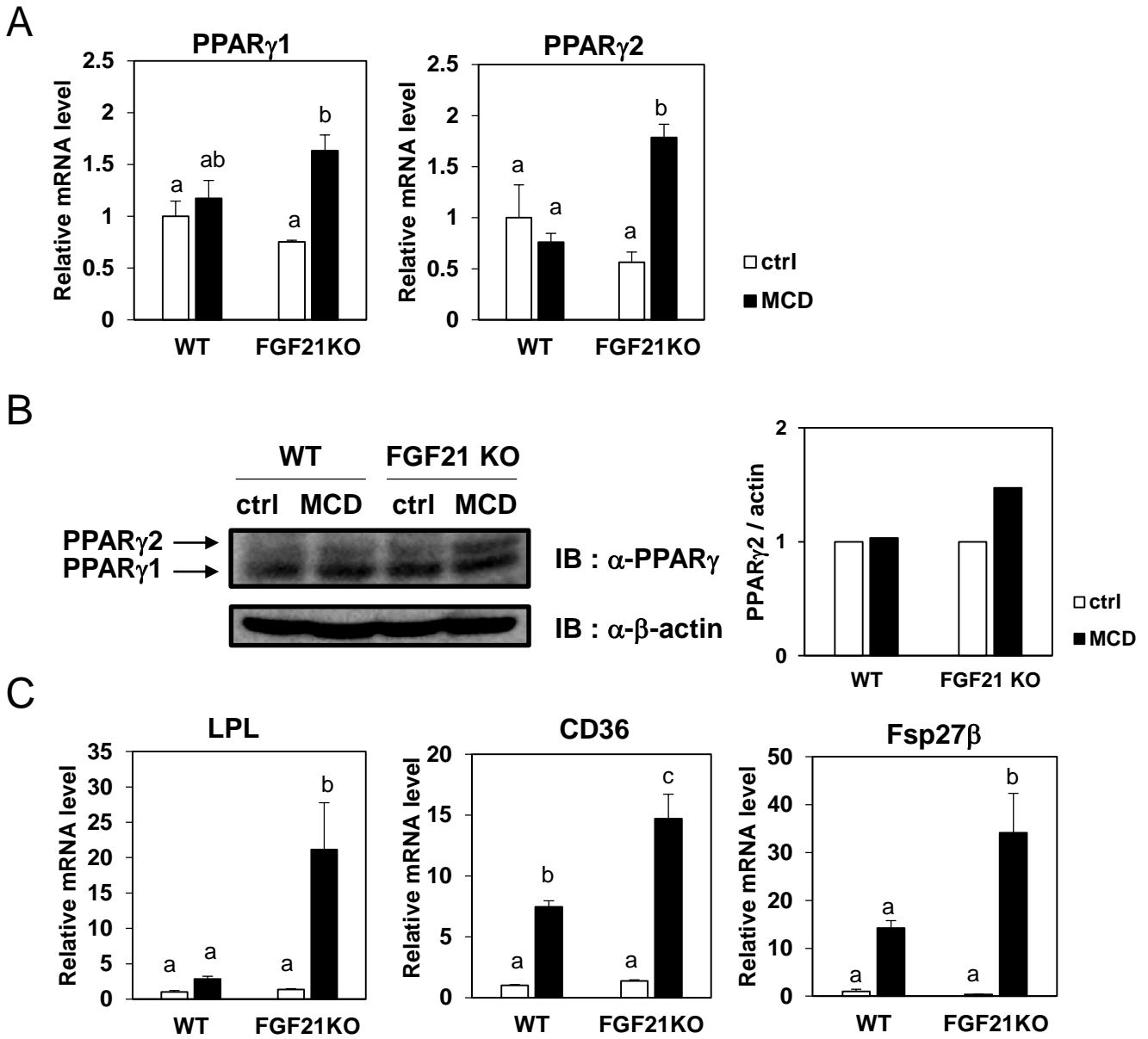


図3-6 メチオニン・コリン欠乏食を4週間摂取した野生型及びFGF21欠損マウス肝臓におけるPPAR γ 発現変動

9週齢のオスの野生型マウス及びFGF21欠損マウスにメチオニン・コリン欠乏食を4週間与えた後に肝臓を採取した。A,C:RNAを回収後PPAR γ 及びその標的遺伝子の発現をリアルタイムPCRにより解析した。それぞれの遺伝子発現は18Sの発現量で除することで補正した。1回の試行につき6連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析(Bonferroni検定)を用いた。a-c:異なる文字間で有意差あり、 $p < 0.05$ B: PPAR γ のタンパク質発現をウエスタンブロットにより解析した

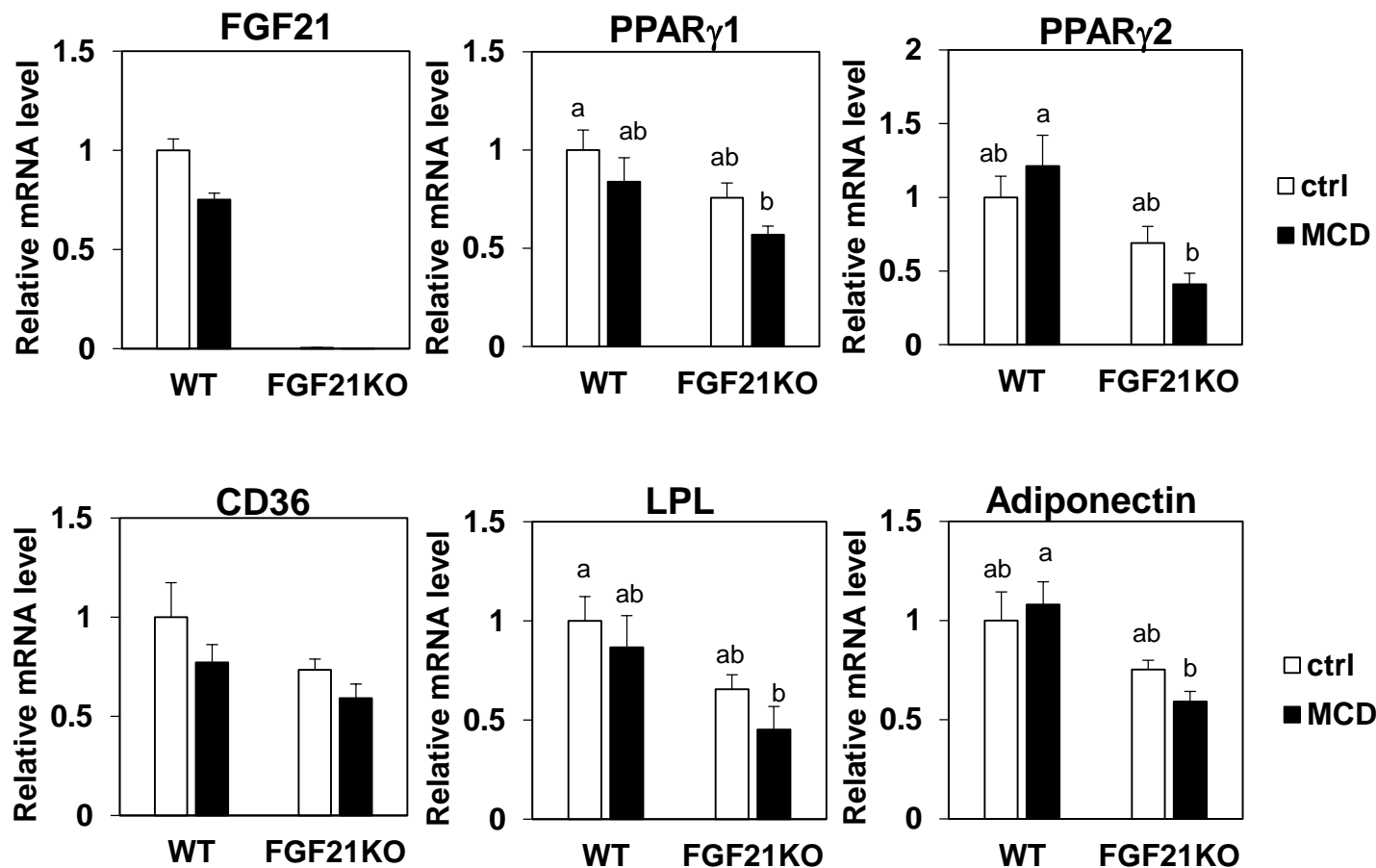


図3-7 メチオニン・コリン欠乏食を4週間摂取した野生型及びFGF21欠損マウス精巢上体脂肪における遺伝子発現変動

9週齢のオスの野生型マウス及びFGF21欠損マウスにメチオニン・コリン欠乏食を4週間与えた後に精巢上体脂肪を採取した。RNAを回収後、脂肪細胞分化に関与するPPAR γ 遺伝子やその標的遺伝子の発現をリアルタイムPCRにより解析した。それぞれの遺伝子の発現は18Sの発現量で除することで補正した。1回の試行につき4連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析 (Bonferroni検定)を用いた。a,b:異なる文字間で有意差あり、 $p < 0.05$

第三章

第二節

FGF21 によるアミノ酸代謝制御

緒言

アミノ酸、特にメチオニンの低下は脂肪肝につながる。そのためメチオニン及びビリコリンの欠乏により体内のアミノ酸濃度に変動が見られるか、また FGF21 がアミノ酸代謝に影響を与えるかを検討した。

実験方法

- ・大腸菌の形質転換(トランスフォーメーション)
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・アガロースゲル電気泳動
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・アガロースゲルからの DNA 断片回収
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・制限酵素処理
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・ライゲーション
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・プラスミドミニプレップ(粗精製)
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・プラスミドラージプレップ(細胞内遺伝子導入用)
第一章第一節実験方法の項に準じた。

プラスミド

第一章及び第二節実験方法の項に準じた。

- ・細胞培養試薬の調製
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・細胞培養
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・細胞の継代
第一章第一節実験方法の項に準じた。

- ・リポフェクタミン法を用いた遺伝子導入
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・アデノウイルスベクターによる遺伝子導入
第一章及び第二章実験方法の項に準じた。
- ・RNA 抽出
第一章及び第二章実験方法の項に準じた。
- ・DNase 処理
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・逆転写反応(Reverse Transcription ; RT)
第一章第一節実験方法の項に準じた。

- ・ Real-time PCR

第一章第一節実験方法の項に準じた。

それぞれの遺伝子発現は 18S の発現量で除することで補正した。また、1 回の試行につき 4-6 連のサンプルを用い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定にはスチューデントの t 検定または一元配置分散分析(Bonferroni 検定)を用いた。

SYBR Green で用いた各 primer を以下に示す。以下に記載していない遺伝子は全て Taq[®]Man probe で測定した。

mTha	sense	5'-ACCTTGGACCTGAATGAGCTA-3'
	antisense	5'-CAGGTACACGAGCTCACAGAC-3'
mSDS	sense	5'-CAGTTGAAGTGGTGGGAGAGA-3'
	antisense	5'-CCAGATGAGAGGGTCATCAAA-3'

- ・動物実験

[実験動物]

第二章第一節及び第二節実験方法の項に準じた。

[実験条件]

第三章第一節実験方法の項に準じた。

第一節に記載のない方法は以下の通りである。

FGF21 欠損マウスへの FGF21 過剰発現実験

FGF21 欠損マウス(9 週齢、オス)にアデノウイルスを用いて FGF21 を過剰発現させた。7 日後に解剖し、血液は 0.1 MEDTA で処理したシリンジを使用し、下大静脈から採血した。その後 4 °C、5000 rpm、30 分間の遠心分離を行い血清を分離した。肝臓は採取後に PBS で洗浄し、液体窒素を用いて直ちに凍結し、-80 °C で保存した。

野生型及び FGF21 欠損マウスへの FGF21 過剰発現実験

野生型および FGF21 欠損マウス(9 週齢、オス)にメチオニン・コリン欠乏食及びメチオニン・コリン欠乏食にスレオニンを添加(メチオニン・コリン欠乏食に含まれるスレオニン含有量の 0.3 倍量を余分に添加)した食餌を 14 日間与えた後に解剖し、血液は 0.1 MEDTA で処理したシリンジを使用し、下大静脈から採血した。その後 4 °C、5000 rpm、30 分間の遠心分離を行い血清を分離した。肝臓は採取後に PBS で洗浄し、液体窒素を用いて直ちに凍結し、-80 °C で保存した。

・血中 FGF21 濃度測定

第二章第一節実験方法の項に準じた。

・アミノ酸分析

血液サンプル調製

血清 25 μ L を滅菌水で 3 倍希釈し、3 % TCA 溶液を 150 μ L 添加した。5400 g、4 °C で 15 分間遠心し、上清をフィルター(Syringe Driven Filter Unit, 0.22 μ m, MILLIPORE)に通した。

肝臓サンプル調製

肝臓 100 mg に対し 3 % TCA 溶液を 1 mL 添加しホモジナイズした。10000 g、4 °C で 10 分間遠心し、上清をフィルター(Syringe Driven Filter Unit, 0.22 μ m, MILLIPORE)に通した。

サンプルはバイアルにセットし日立高速アミノ酸分析計 L-8900 に供した

・細胞内トリグリセリド定量

6-well plate に 4×10^5 cells / well となるように播種した HuH7 細胞にヘキサン:イソプロパノール = 3:2 で混合した溶液を 250 μ L 加え 10 分間氷上でインキュベートした。この抽出操作を 2 回行い溶液(計 500 μ L)をバキューム遠心で気化

させた。乾燥後、イソプロパノール 20 μ L に溶解しトリグリセライド E-テスト
ワコー(和光純薬工業(株))を用いて定量した。

実験結果

メチオニン・コリン欠乏食により血中メチオニン濃度が低下する

第一節において、野生型及び FGF21 欠損マウスにメチオニン・コリン欠乏食を 4 週間与える実験を行い肝臓のトリグリセリド定量などを行った。メチオニン欠乏による体内のアミノ酸濃度の変動を検討するため、血中及び肝臓中のアミノ酸濃度を高速アミノ酸分析計 L-8900(日立)により測定した。メチオニン・コリン欠乏食により VLDL 分泌に重要なメチオニンなどの含硫アミノ酸の血中濃度は低下していたが、肝臓では変動しなかった(図 3-8、図 3-9)。また、血中アスパラギン酸、セリン、グルタミン酸、グリシン、アラニン、プロリン濃度の増加、アルギニン濃度の低下が見られた(図 3-8)。肝臓中アスパラギン酸、ヒスチジン濃度は低下、セリン、グルタミン酸、グリシン、プロリン濃度は増加していた(図 3-9)。

FGF21 欠損マウスの肝臓および血液中でスレオニン濃度が低下している

野生型と FGF21 欠損マウスの血中及び肝臓中のアミノ酸濃度を検討した。Two-way ANOVA による検定を行った結果、血中スレオニン、メチオニン濃度は FGF21 欠損により低下し、一方、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、チロシン濃度は増加した(図 3-8)。肝臓中アミノ酸濃度を測定した結果 Two-way ANOVA による検定にて有意な変動を示したアミノ酸は存在せず、スレオニン、セリン濃度が FGF21 欠損により低下した(図 3-9)。この結果から、血中及び肝臓中においてセリン、グルタミン酸、グリシン、プロリン濃度がメチオニン・コリン欠乏食によって上昇し、スレオニン濃度は FGF21 欠損によって低下していることが示唆された。

FGF21 欠損によるスレオニン量の低下はスレオニン代謝酵素の発現以外の制御を受ける

第一節において、FGF21 欠損マウスは野生型マウスに比べ肝臓トリグリセリド量が増加していた。また、ラットを用いた実験でスレオニン添加が脂肪肝を改善することが報告されている(145,146)。FGF21 欠損マウスにおける体内のスレオニン濃度の低下が脂肪肝の原因であると考え、スレオニンに着目した。スレオニンは必須アミノ酸でありスレオニンアルドラーゼ(Tha)、スレオニンデヒドロ

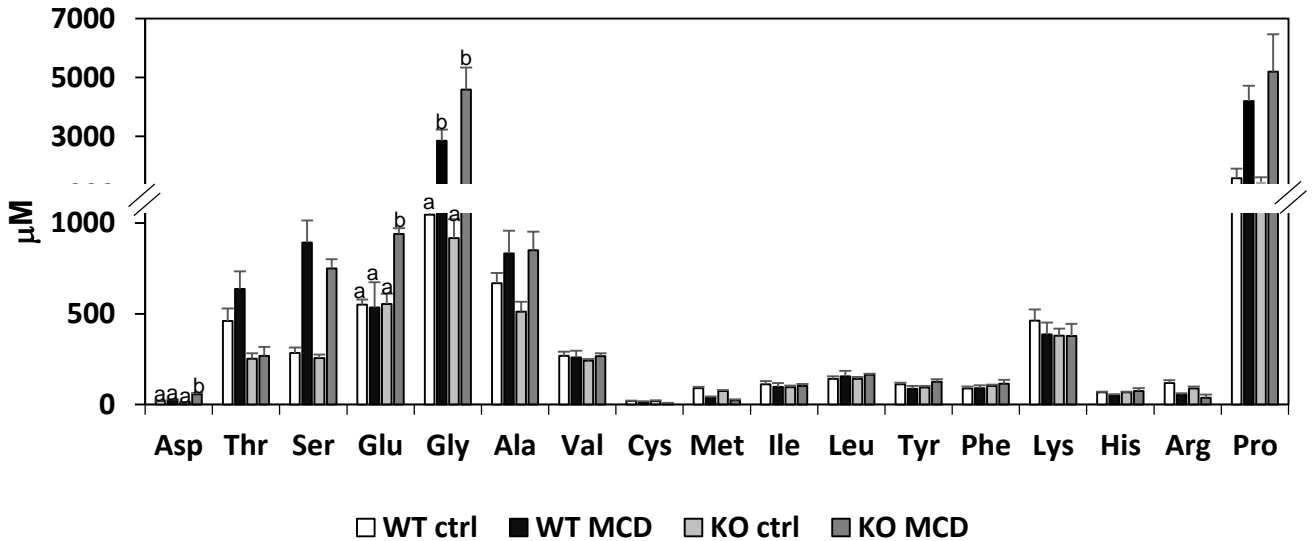
ゲナーゼ(Tdh)、スレオニンデアミナーゼ(SDS)により代謝される(図 3-10A)。まず、スレオニン代謝に FGF21 が関与しているかを検討するため、野生型マウス及び FGF21 欠損マウスにメチオニン・コリン欠乏食を 4 週間摂取させたマウス肝臓におけるスレオニン代謝酵素の発現変動を測定した。その結果、Tha の発現はメチオニン・コリン欠乏食により上昇したが、マウス間での差は認められなかった。SDS はメチオニン・コリン欠乏食摂取時に FGF21 欠損マウスで低い発現であることが確認された(図 3-10B)。また Tdh の発現は低発現のため検出ができなかった。これらの結果は、肝臓スレオニン濃度の変動と一致していなかった。次に、FGF21 欠損マウスにアデノウイルスを用いて FGF21 を過剰発現させ血中及び肝臓中アミノ酸濃度測定を行った。その結果、FGF21 の過剰発現により血中及び肝臓のスレオニンが増加し、さらにグルタミン、チロシン濃度の増加も見られた(図 3-11A、図 3-11B)。この時の肝臓におけるスレオニン代謝酵素の発現変動をリアルタイム PCR により解析した結果、変動は見られなかった(図 3-11C)。これらの結果から、FGF21 はスレオニン量を増加させるが、スレオニン代謝酵素の発現変動を介さないことが示唆された。

スレオニンの抗脂肪肝効果を検証するためメチオニン・コリン欠乏食にスレオニンを添加(メチオニン・コリン欠乏食に含まれるスレオニン含有量の 0.3 倍量を追加)した食事を 14 日間与えた実験を実施し、肝臓トリグリセリド定量を行った。その結果、メチオニン・コリン欠乏食によって増加した肝臓トリグリセリドの蓄積がスレオニンによって低下しなかった(図 3-12)。この結果から、メチオニン・コリン欠乏食による脂肪肝にはスレオニンは関与しないことが示唆された。

考察

本節では、メチオニン・コリン欠乏食摂取において FGF21 の欠損によりアミノ酸濃度が変動するか検討した。実験の結果、メチオニン・コリン欠乏食によりメチオニンの血中濃度が低下し、FGF21 欠損によりさらに低下していたが肝臓では変動しなかった(図 3-8、図 3-9)。血中アミノ酸濃度は食事内容により変動しやすいが、肝臓では骨格筋などの他臓器からの分解を介してアミノ酸濃度を一定に保つ可能性が考えられる。FGF21 欠損マウスでは野生型マウスに比べ血中及び肝臓中スレオニン濃度が低下し、FGF21 の過剰発現により血中及び肝臓中のスレオニン濃度の上昇が見られた(図 3-8、図 3-9、図 3-11)。しかし、スレオニン代謝酵素の発現は FGF21 による変動を受けないことが示唆された(図 3-10、図 3-11)。SDS はスレオニンによって誘導されることが知られ、絶食時において重要であるといわれている。本実験ではスレオニン代謝酵素発現変動のみを解析したが、各種酵素の活性が FGF21 の作用により変動している(例えばリン酸化などを介して)可能性も否定できない。FGF21 の制御因子である PPAR α のアゴニスト WY14663 を高脂肪食負荷ラットに 4 週間投与する実験では血中スレオニン濃度の上昇が見られており(147)、本研究と一致する結果が報告されている。これより、PPAR α 活性化によるスレオニン濃度上昇には FGF21 が関与していることが考えられる。メチオニン・コリン欠乏食にスレオニンを添加した食事を与える実験を実施したが、我々の結果では脂肪肝抑制効果は確認されなかった(図 3-12)。過去の報告ではスレオニンがラットに低タンパク質(9%カゼイン)食を投与して生じる脂肪肝発症を抑制した(145)。一方、オレイン酸処理により脂肪滴を形成させた HuH7 細胞をスレオニン添加培地で培養した結果、細胞中トリグリセリド量の減少が見られた(図 3-13)ことからスレオニンが脂肪蓄積抑制に関与していることが示唆される。メチオニン・コリン欠乏食以外の食餌性誘導肥満におけるスレオニンの機能について検証を行う必要があり、FGF21 の発現への影響など FGF21 によるスレオニン代謝制御の解明には今後の解析が必要である。

Amino acid concentration (Plasma)

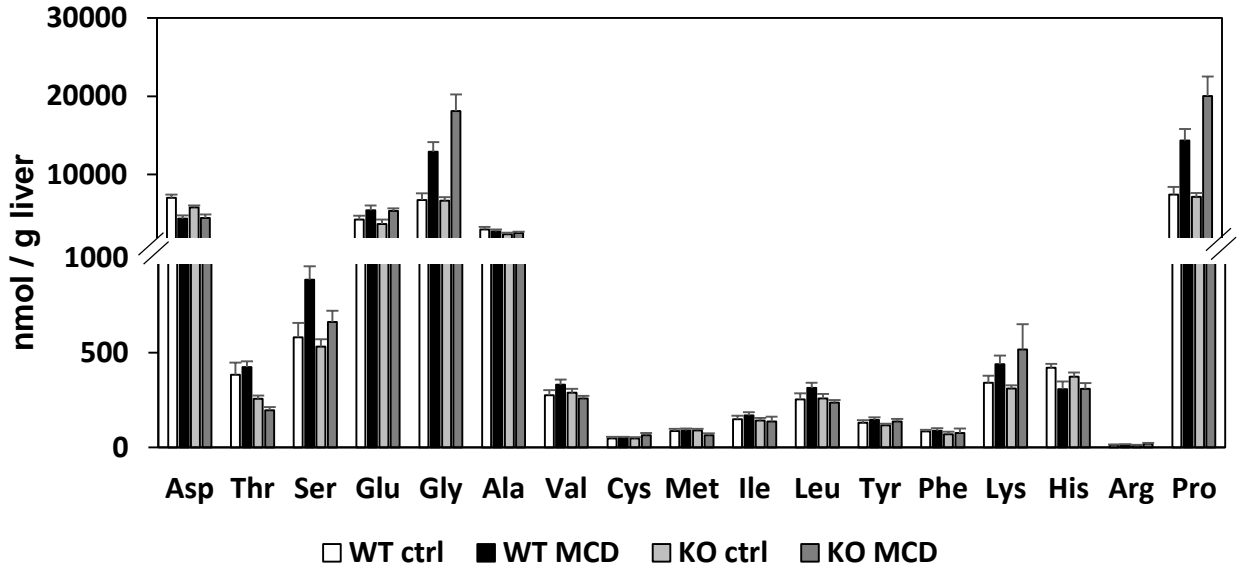


	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Cys	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Pro
mouse	*	***		*					**								
diet	***		***	*	***	*		*	***							***	***
mouse x diet	**			*	*							*					

図3-8 メチオニン・コリン欠乏食を4週間摂取した野生型及びFGF21欠損マウスにおける血中アミノ酸濃度測定

9週齢のオスの野生型マウス及びFGF21欠損マウスにメチオニン・コリン欠乏食を4週間与えた後に血液を採取し、アミノ酸分析に供した。1回の試行につき6連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定には二元分散分析を用いた。二元分散分析で有意差があったものに関して一元配置分散分析(Bonferroni検定)を行った。* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ a,b:異なる文字間で有意差あり、 $p < 0.05$

Amino acid concentration (Liver)

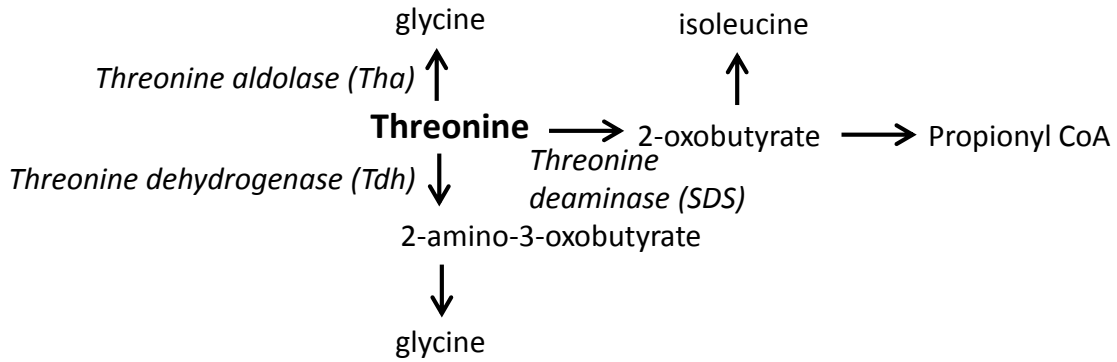


	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Cys	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Pro
mouse		***	*														
diet	***		**	**	***										**		***
mouse x diet																	

図3-9 メチオニン・コリン欠乏食を4週間摂取した野生型及びFGF21欠損マウスにおける肝臓中アミノ酸濃度測定

9週齢のオスの野生型マウス及びFGF21欠損マウスにメチオニン・コリン欠乏食を4週間与えた後に肝臓を採取し、アミノ酸分析に供した。1回の試行につき6連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定には二元分散分析を用いた。* : p<0.05, ** : p<0.01, *** : p<0.001

A



B

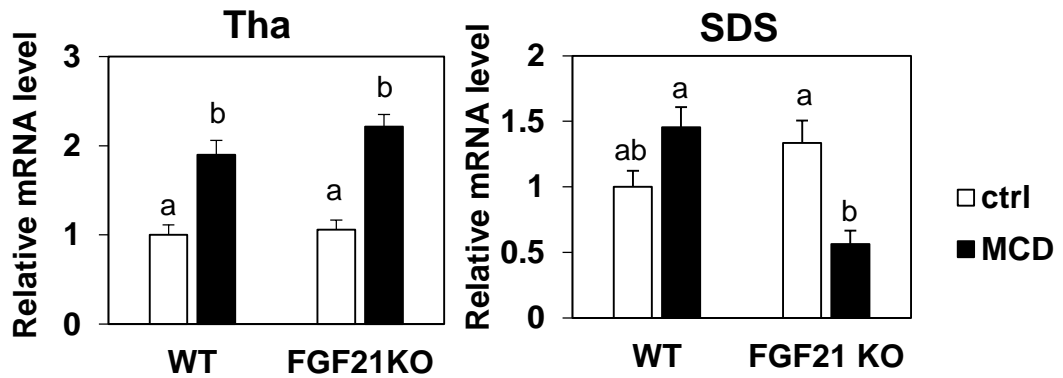
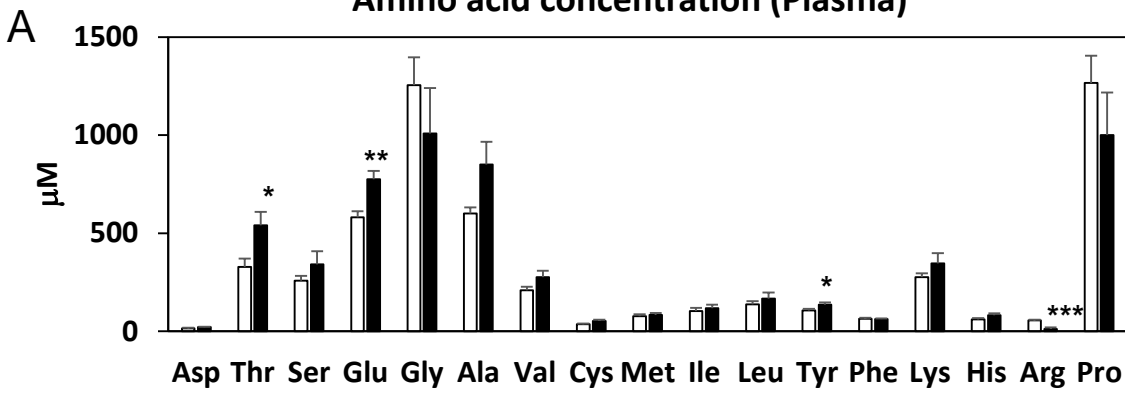


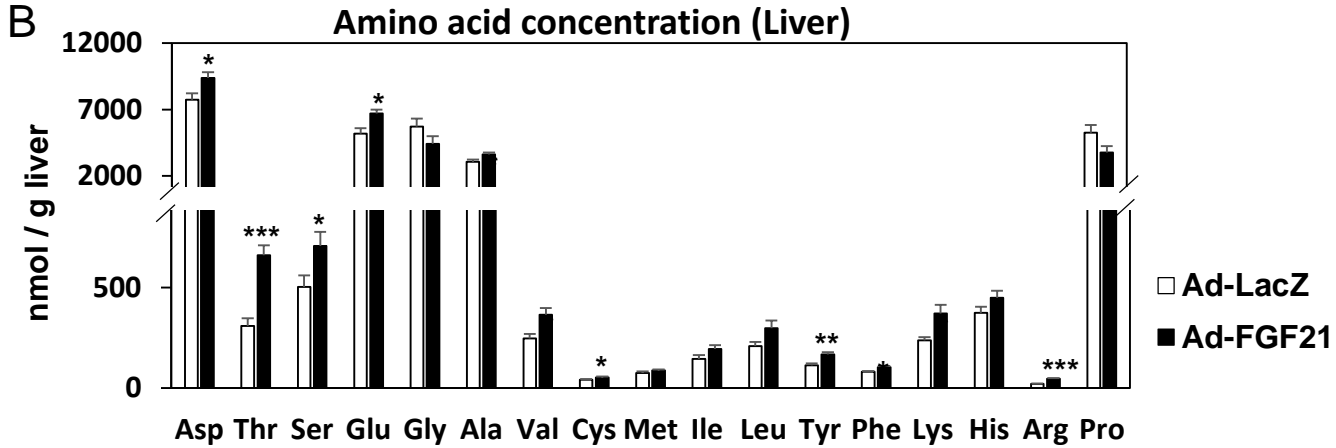
図3-10 メチオニン・コリン欠乏食を4週間摂取した野生型及びFGF21欠損マウス肝臓における遺伝子発現変動

A:スレオニン代謝経路。B:9週齢のオスの野生型マウス及びFGF21欠損マウスにメチオニン・コリン欠乏食を4週間与えた後に肝臓を採取した。RNAを回収後、スレオニン代謝に関する遺伝子発現をリアルタイムPCRにより解析した。それぞれの遺伝子発現は18Sの発現量で除することで補正した。1回の試行につき6連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析(Bonferroni検定)を用いた。a,b:異なる文字間で有意差あり、 $p < 0.05$

Amino acid concentration (Plasma)



Amino acid concentration (Liver)



C

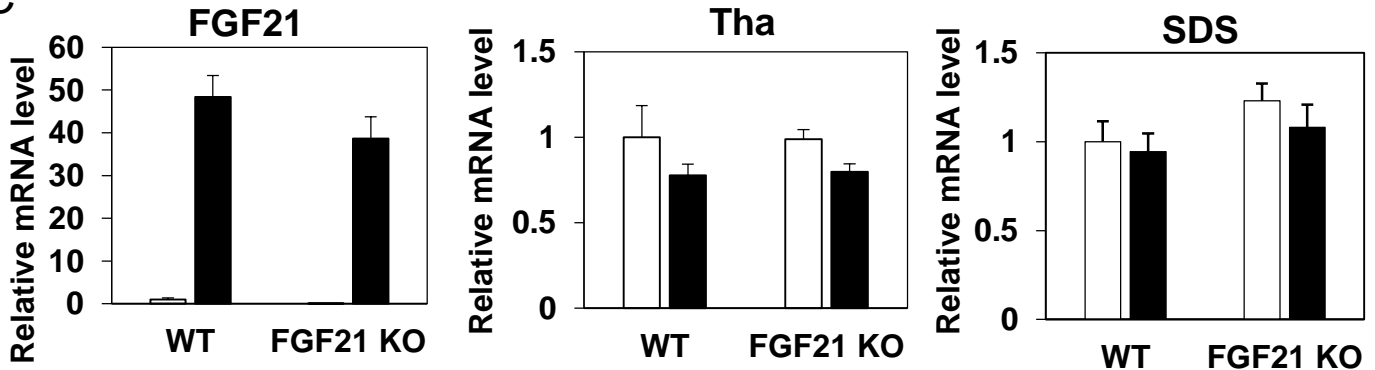


図3-11 FGF21欠損マウスへのFGF21過剰発現における血中及び肝臓中アミノ酸濃度測定

9週齢のオスのFGF21欠損マウスにアデノウイルスを用いてFGF21を過剰発現し7日後に血液(A)及び肝臓(B)を採取し、アミノ酸分析に供した。1回の試行につき6連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定にはスチューデントのt検定を用いた。* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ C:肝臓はRNAを回収後、FGF21及びスレオニン代謝に関与する遺伝子発現をリアルタイムPCRにより解析した。それぞれの遺伝子発現は18Sの発現量で除することで補正した。1回の試行につき6連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析(Bonferroni検定)を用いた。

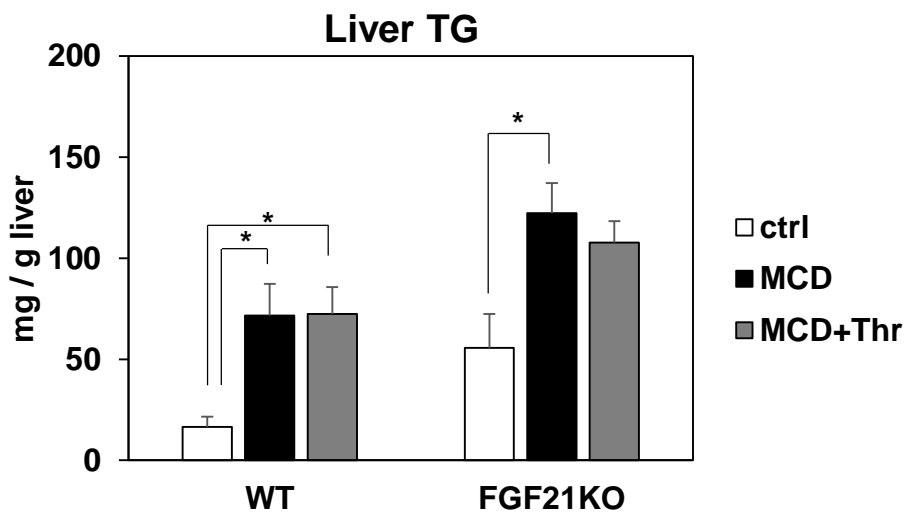


図3-12 野生型及びFGF21欠損マウスへのスレオニンを添加したメチオニン・コリン欠乏食摂食時の肝臓トリグリセリド量

9週齢のオスの野生型マウス及びFGF21欠損マウスにメチオニン・コリン欠乏食及びスレオニンを添加したメチオニン・コリン欠乏食を14日間与えた後に肝臓を採取し肝臓トリグリセリド量の測定を行った。1回の試行につき6連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析 (Bonferroni検定)を用いた。* : $p < 0.05$

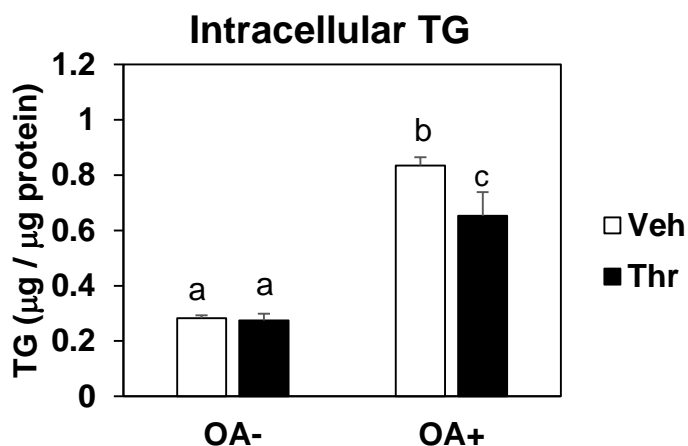


図3-13 オレイン酸処理を施したHuH7細胞へのスレオニン処理による細胞内トリグリセリド定量
 HuH7細胞を500 µMのオレイン酸を含む培地で60時間培養した後200 µMのスレオニンを含む培地で6時間処理し細胞内トリグリセリド量を定量した。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析(Bonferroni検定)を用いた。p<0.05

第四章

ATF4 新規標的遺伝子の探索

緒言

ATF4は小胞体ストレスやアミノ酸枯渇などにより活性化される転写因子である。第二章において ATF4 により脂肪酸代謝に関与する FGF21 の発現制御機構を明らかにし ATF4 が脂質代謝に関与する可能性が示唆された。本節ではマイクロアレイ法により ATF4 新規標的遺伝子の探索を実施した。

実験方法

- ・大腸菌の形質転換(トランスフォーメーション)
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・アガロースゲル電気泳動
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・アガロースゲルからの DNA 断片回収
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・制限酵素処理
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・ライゲーション
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・プラスミドミニプレップ(粗精製)
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・プラスミドラージプレップ(細胞内遺伝子導入用)
第一章第一節実験方法の項に準じた。

プラスミド

第一章第一節実験方法の項に準じた。

第一節に記載のないプラスミドは以下の通りである。

[pGL3-C12orf39-luc]

Human genomic DNA を鋳型として、5'末端側に *Bgl*III、3'末端側に *Hind*III の制限酵素サイトを付加したプライマーを用いて、PCR 反応によりプロモーター領域の-601 bp から+167 bp の領域を増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製し、*Bgl*III/*Hind*III 処理後、pGL3 luciferase vector の *Bgl*III/*Hind*III サイトに挿入し、目的のプラスミドを得た。

[pGL3-C12orf39 del-luc]

pGL3-C12orf39-luc を鋳型として、5'末端側に *Bgl*III、3'末端側に *Hind*III の制限酵素サイトを付加したプライマーを用いて、PCR 反応によりそれぞれヒト C12orf39 のプロモーター領域の-85 bp から+167 bp の領域を増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製し、*Bgl*III/*Hind*III 処理後、pGL3 luciferase vector の *Bgl*III/*Hind*III サイトに挿入し、目的のプラスミドを得た。

[pGL3-C12orf39 mut-luc]

pGL3-C12orf39-luc を鋳型として、5'末端側に *Bgl*III、3'末端側に *Hind*III の制限酵素サイトを付加したプライマー及び変異を導入したプライマーを用いて、PCR 反応により C12orf39 のプロモーター配列に変異を含むオリゴヌクレオチド(5'-TGATGCAAT-3'→5'-GTTGCGCTT-3')を作成した。そして PCR 産物をアガロースゲル電気泳動により精製したのち overlap extension PCR 法によりヒト C12orf39 のプロモーター領域の-601 bp から+167 bp の領域に変異を含んだ DNA 断片を増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により精製し、*Bgl*III/*Hind*III 処理後、pGL3 luciferase vector の *Bgl*III/*Hind*III サイトに挿入し、目的のプラスミドを得た。

- ・細胞培養試薬の調製
第一章及び第二章実験方法の項に準じた。
- ・細胞培養
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・細胞の継代
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・リン酸カルシウム法を用いた遺伝子導入
第二章第一節実験方法の項に準じた。
- ・ルシフェラーゼアッセイ
第二章第一節実験方法の項に準じた。
- ・リポフェクタミン法を用いた遺伝子導入
第一章第一節実験方法の項に準じた。
- ・アデノウイルスベクターによる遺伝子導入
第一章第一節実験方法の項に準じた。

- RNA 抽出

第一章第一節実験方法の項に準じた。

- DNase 処理

第一章第一節実験方法の項に準じた。

- 逆転写反応(Reverse Transcription ; RT)

第一章第一節実験方法の項に準じた。

- Real-time PCR

第一章第一節実験方法の項に準じた。

それぞれの遺伝子発現は 36B4 の発現量で除することで補正した。また、1 回の試行につき 3-4 連のサンプルを用い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定にはスチューデントの t 検定を用いた。

SYBR Green で用いた各 primer を以下に示す。以下に記載していない遺伝子は全て Taq[®]Man probe で測定した。

hAREG	sense	5'-GCTGTCGCTCTTGATACTCG-3'
	antisense	5'-AGAAAATGGTTCACGCTTCC-3'
hCALCB	sense	5'-AGAAGAGAGCCTGCAACACTG-3'
	antisense	5'-CACGAAGTTGCTCTTCACCA-3'
hCSTA	sense	5'-GAGGCTTATCTGAGGCCAAA-3'
	antisense	5'-TGTTCCAGCAACAACCTTGAG-3'
hC12orf39	sense	5'-AGGTGCCCTTAACACCAAGAT-3'
	antisense	5'-CTGAGTCCCTTCATGTTCTGC-3'
hS100P(148)	sense	5'-GATGCCGTGGATAAATTGCT-3'
	antisense	5'-ACTTGTGACAGGCAGACGTG-3'
mAREG	sense	5'-TTGCTGCTGGTCTTAGGCTC-3'
	antisense	5'-TGGTCCCCAGAAAGCGATTC-3'
mNpq	sense	5'-GGACTCCCCAAGCTATGCTC-3'
	antisense	5'-CAAGCTCCTTCCTACGGCTC-3'

- マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析は弘前大学中井雄治先生にご協力いただいた。

アデノウイルスを用いて ATF4 を過剰発現した HuH7 細胞から ISOGEN を用

いて抽出した RNA を RNeasy mini kit (QIAGEN)を用いて精製した。その後 Gene Chip 3'IVT Express kit (Affymetrix, Inc)により調製しマイクロアレイに供した。以下にプロトコルを示す。

1. First-strand cDNA Synthesis

First-Strand Buffer Mix : 4 μ L

First-Strand Enzyme Mix : 1 μ L

上記の試薬と 100 ng / 5 μ L となるように希釈した RNA を混合し、42 $^{\circ}$ C で 120 分間反応させた。

2. Second-strand cDNA Synthesis

Second-Strand Buffer Mix : 5 μ L

Second-Strand Enzyme Mix : 2 μ L

Nuclease-free Water : 13 μ L

上記の試薬と 1 のサンプルを混合し、16 $^{\circ}$ C で 60 分間反応させたのち 65 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させた。

3. In Vitro Transcription to Synthesize Labeled aRNA

IVT Biotin Label : 4 μ L

IVT Labeling Buffer : 20 μ L

IVT Enzyme Mix : 6 μ L

上記の試薬と 2 のサンプルを混合し、40 $^{\circ}$ C で 16 時間反応させた。

4. aRNA Purification

RNA Binding Beads : 10 μ L

aRNA Binding Buffer Concentrate : 50 μ L

上記の試薬と 3 のサンプルを混合し、U-Bottom Plate に移し数回ピペッティングした。次に 100 % エタノールを 120 μ L 加えピペッティングにより混合し Plate Shaker (IKA MS3 digital + Microtiter attachment)を用いて 500 rpm で 2 分間 shake した。そして、プレートをマグネットスタンド(Ambion magnetic Stand-96)におき 5 分間静置後、上清をピペットマンを用いて除いた。ビーズに対し、100 μ L の aRNA Wash Solution を加え Plate Shaker により 800 rpm で 1 分間 Shake しプレートをマグネットスタンドにおき 5 分間静置することで RNA Binding Beads を吸着させた後、上清をピペットマンを用いて除いた。同様の洗浄操作を 2 回行った後 Plate Shaker により 1000 rpm で 1 分間 Shake しビーズを乾燥させた。そこへ 60 $^{\circ}$ C に温めておいた aRNA Elution Solution を 50 μ L 加え Plate Shaker により 1000 rpm で 3 分間 Shake した。その後プレートをマグネットスタンドにおき上清を回収することで aRNA を得た。

5. Fragmentation

aRNA : 15 μ g

5 × Array Fragmentation Buffer : 8 μL

Nuclease-free Water : up to 40 μL

94 °C、35 分間反応後 1 μL をアガロース電気泳動に供し Fragmentation の確認を行った。

6. Hybridization

チップは Gene Chip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix)を使用した。チップは Hybridization 前に室温に戻し Pro-Hybridization Mix を 200 μL 加え Hybridization Oven にて 45 °C で 10 分以上インキュベートした。5 で得られたサンプルはそれぞれ 12.5 μg の Fragmented aRNA に対し Control Oligonucleotide B2 (3 nM) : 4.2 μL、20 × Hybridization Controls (bioB、bioC、bioD、cre) : 12.5 μL、2 × Hybridization Mix : 125 μL、DMSO : 25 μL、Nuclease-free Water : 50 μL を加え Hybridization cocktail とした。この Hybridization Cocktail を 99 °C、5 分間インキュベートした後、45 °C、5 分間インキュベートした。そして室温、15000 rpm、5 分間遠心し上清を Pre-Hybridization cocktail を除いたチップに 200 μL 加え Hybridization Oven で 45 °C、60 rpm、16 時間インキュベートした。16 時間後、Hybridization cocktail を除き Wash Buffer A でアレイ内を満たし、これらのチップを Affymetrix GeneChip Command Console を用いて解析した。Hybridization には Hybridization Oven 640 (Affymetrix)、染色には Fluidics Station 450、チップの読み取りに関しては GCS300 Scanner を使用した。

・動物実験

第二章第二節実験方法の項に準じた。

実験結果

ヒト肝癌細胞を用いた ATF4 新規標的遺伝子の探索

ATF4 の新規標的遺伝子の探索のため、アデノウイルスを用いて ATF4 を過剰発現させたヒト肝癌細胞(HuH7 細胞)の RNA を回収し、リアルタイム PCR による解析を行った。その結果、ATF4 及びその標的遺伝子である TRB3 も ATF4 過剰発現により発現亢進した(図 4-1A)。ATF4 の過剰発現を確認したサンプルをマイクロアレイに供し、得られた結果を RMA 法により正規化し WAD 法(log 比を基本としつつ、全体的にシグナル強度の高い遺伝子が上位に来るように重みかけた統計量)(149)によりランク付けした(図 4-1B)。その結果、ATF4 によって最も誘導される 6 つの遺伝子(C12orf39 [Chromosome 12 open reading frame 39]、CSTA [Cystatin A]、ASNS [Asparagine synthetase]、CALCB [Calcitonin-related polypeptide beta]、S100P [S100 calcium binding protein P]、AREG [amphiregulin]) が得られた。ATF4 の既知の標的遺伝子(ASNS、S100P)(46,47,148)が含まれていたため、マイクロアレイ解析が信頼できる結果であることが示された。次に、リアルタイム PCR によりそれらの遺伝子の発現を検証した結果、これらすべての遺伝子の発現がマイクロアレイの結果同様に ATF4 過剰発現により亢進していた(図 4-1C)。

ATF4 新規標的遺伝子の発現は小胞体ストレスにより誘導される

小胞体ストレスは ATF4 を活性化する。そのため ATF4 新規標的遺伝子の小胞体ストレスによる発現変動を検討した。HuH7 細胞に小胞体ストレス誘導剤であるサブシガルジン进行处理した結果、ATF4 と同様に ATF4 新規標的遺伝子の発現もサブシガルジンにより誘導された(図 4-2A、図 4-2B)。以上の結果より、これらの遺伝子発現は ATF4 過剰発現と同様に小胞体ストレスによっても亢進することが示唆された。

小胞体ストレスは ATF4 を介して新規標的遺伝子の発現を誘導する

小胞体ストレスによる遺伝子発現亢進が ATF4 依存的であるかを検証するため、アデノウイルスを用いて shRNA による ATF4 のノックダウン実験を行った。ATF4 の発現はコントロールウイルス(shLacZ)ではサブシガルジンにより誘導されたがノックダウンにより ATF4 の発現は低下し、小胞体ストレスによる変動

は見られなかった。(図 4-3A)。次に新規標的遺伝子の発現を解析した結果、C12orf39、CSTA、CALCB 遺伝子はコントロールウイルスではサプシガルジンにより発現が亢進したが、ATF4 のノックダウンにより変動が見られなくなった(図 4-3B)。一方、AREG 遺伝子は ATF4 のノックダウンによっても小胞体ストレスにより増加した(図 4-3B)。次に、小胞体ストレスと同様に ATF4 を活性化する酸化ストレスに関して ATF4 ノックダウン実験を行った。その結果、小胞体ストレスと同様に酸化ストレス誘導剤アルセナイトによって ATF4 新規標的遺伝子の発現が亢進し、ATF4 ノックダウンによる低下が見られた。(図 4-4A,B)。CALCB 遺伝子の発現は ATF4 ノックダウンにかかわらずアルセナイトにより亢進していた。以上より、C12orf39、CSTA、CALCB 遺伝子が ATF4 の新規標的遺伝子であることが示唆された。

ATF4 はヒト C12orf39 遺伝子のプロモーター活性をプロモーター領域内の AARE を介して上昇させる

C12orf39、CSTA、CALCB 遺伝子のプロモーター領域に ATF4 結合様配列が存在した(図 4-5A)。C12orf39 はマイクロアレイで最も ATF4 によって誘導される遺伝子であり脂質代謝との関連が示唆される因子であったためこの遺伝子に着目した。C12orf39 のプロモーター領域を含むレポータープラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、ATF4 により C12orf39 プロモーター領域(-601 bp から-167 bp)が活性化された。一方、-85 bp までプロモーター領域を欠失すると活性化は見られなくなったことから、-601 bp から-85 bp の間に ATF4 応答領域が含まれることが示唆された(図 4-5B)。次に AARE 様配列に変異を導入すると ATF4 によるプロモーター活性化が見られなくなった(図 4-5B)。以上の結果より、ATF4 が AARE を介して C12orf39 遺伝子のプロモーター領域を活性化することが示唆された。これらの標的遺伝子の発現変動が個体レベルにおいても確認されるかを小胞体ストレスを与えたマウス肝臓を用いて検討した。その結果、C12orf39 のマウスホモログである Npq の発現は培養細胞とは異なり、小胞体ストレスにより亢進しなかった(図 4-5C)。CSTA 及び CALCB 遺伝子はマウス肝臓では低発現であった。一方、マイクロアレイで応答が見られた AREG の発現は培養細胞と同様小胞体ストレスにより亢進した。以上の結果から、ATF4 による C12orf39 の発現制御はヒト培養細胞に過剰に ATF4 を発現させた際に顕著に応答する遺伝子であることが示唆された。

考察

今回マイクロアレイ法により ATF4 によって誘導される遺伝子探索を行い、上位 6 つの遺伝子を同定した。いずれの遺伝子も肝細胞において ATF4 過剰発現や小胞体ストレス刺激により遺伝子発現亢進が確認された(図 4-1、図 4-2)。C12orf39 や CSTA の発現は ATF4 活性化刺激により亢進し、ATF4 ノックダウンによりその変動が見られなくなった(図 4-3、図 4-4)ことから ATF4 を介した発現制御が示唆された。CALCB に関してはサプシガルジン刺激時に ATF4 をノックダウンするとその発現亢進が見られなくなり、アルセナイト処理時には一部発現が抑制されていた(図 4-3、図 4-4)。この結果から CALCB の発現はサプシガルジン処理とアルセナイト処理時で ATF4 の寄与が異なることが示唆される。CALCB が ATF4 以外にアルセナイトによって活性化される因子によっても制御を受けることを考慮するとサプシガルジンやアルセナイトが別の転写因子を活性化する可能性がある。AREG に関しては ATF4 ノックダウンの有無にかかわらず小胞体ストレスや酸化ストレスにより発現亢進が確認された(図 4-3、図 4-4)ことから ATF4 は主要な制御因子ではないと推察された。また、アデノウイルスによって ATF4 を過剰発現させた場合において AREG の遺伝子発現亢進が見られた(図 4-1)ことから ATF4 が AREG を活性化する能力を持つことが示唆される。

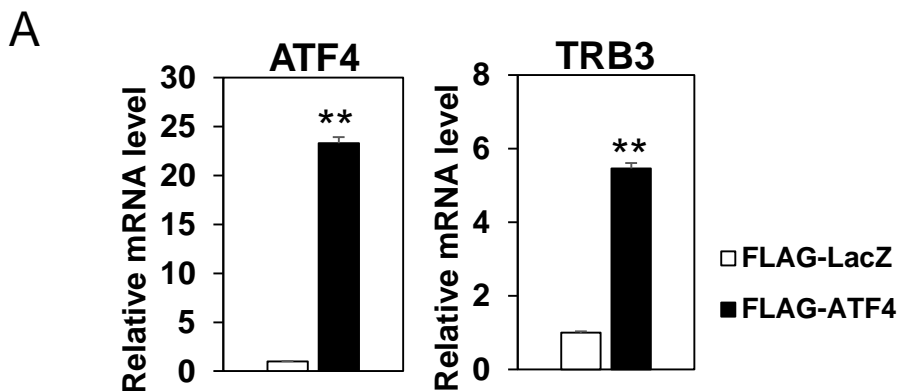
C12orf39 は Spexin と呼ばれるペプチドホルモンをコードする。肥満患者の脂肪組織では C12orf39 の発現が低下し、食事誘導性肥満マウスへの Spexin 投与により脂肪細胞への長鎖脂肪酸取り込みが抑制されるなど脂質代謝との関連が示唆される因子である(150)。また第二章及び第三章を考慮するとアミノ酸枯渇のような生理的な条件下においても、C12orf39 が FGF21 同様に ATF4 を介して発現亢進し協調的に作用することで脂質異常症の軽減に寄与する可能性があり、今後の検討が必要である。

CSTA はシステインプロテアーゼ阻害剤であり、ラット肝癌細胞においてシステインプロテアーゼ cathepsin B を抑制し、胆汁酸塩によるアポトーシスを抑制することが知られている(151)。胆汁うっ滞性肝疾患における小胞体ストレスが報告されている(152,153)ため ATF4 が CSTA の発現を介して肝障害抑制に関与している可能性がある。胆汁酸塩による小胞体ストレスを介した ATF4 活性化が胆汁うっ滞性疾患にどのように作用するかについては今後さらなる検討が必要である。また、CSTA 遺伝子プロモーター領域内に ATF4 結合様配列(-268 bp から-260 bp)が存在しているため、今後ルシフェラーゼアッセイにより解析する必要がある。

マウス肝臓における ATF4 新規標的遺伝子の小胞体ストレス発現変動を調べ

たが C12orf39 ホモログである Npq の発現亢進は認められなかった。ヒトとマウスのプロモーター配列を比較したところ相動性は認められず ATF4 配列が種間で保存されていないことが原因と考えられる。また、AREG の発現はマウス肝臓においても小胞体ストレスにより亢進したことから小胞体ストレス誘導性因子であることが示唆された。したがって、ATF4 による C12orf39 の発現亢進はヒト選択的な現象であることが示唆された。

本実験から、C12orf39、CSTA、CALCB 遺伝子が ATF4 の新規標的遺伝子であることが示唆され、ATF4 が AARE を介して C12orf39 遺伝子プロモーター活性を増加させることを示した。



B LacZ < ATF4

WAD rank	Gene Symbol	Gene Title	Fold change
1	C12orf39	chromosome 12 open reading frame 39	27.2
2	CSTA	cystatin A (stefin A)	52.1
3	ASNS	asparagine synthetase (glutamine-hydrolyzing)	7.0
4	CALCB	calcitonin-related polypeptide beta	51.3
5	S100P	S100 calcium binding protein P	5.1
6	AREG	amphiregulin	7.3

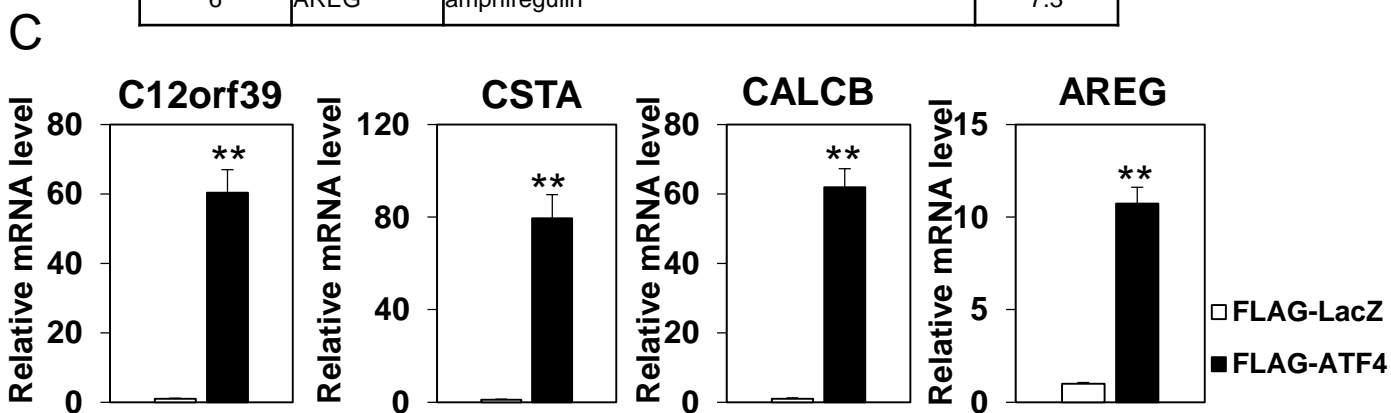


図4-1 ATF4過剰発現による遺伝子発現変動

A:HuH7細胞にアデノウイルスを用いてATF4遺伝子を過剰発現しマイクロアレイに用いるRNAサンプルのATF4及び標的遺伝子の発現確認。B:HuH7細胞にアデノウイルスを用いてATF4遺伝子を過剰発現しRNAを回収後マイクロアレイに供した。RMAにより正規化後WADによるランク付けを行いATF4による誘導を受ける上位6つの遺伝子を示した。C:マイクロアレイの結果をリアルタイムPCRによる解析にて検証した。それぞれの遺伝子発現量は36B4の発現量で除することで補正した。1回の試行につき4連で行い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定にはスチューデントのt検定を用いた。 **: p<0.01

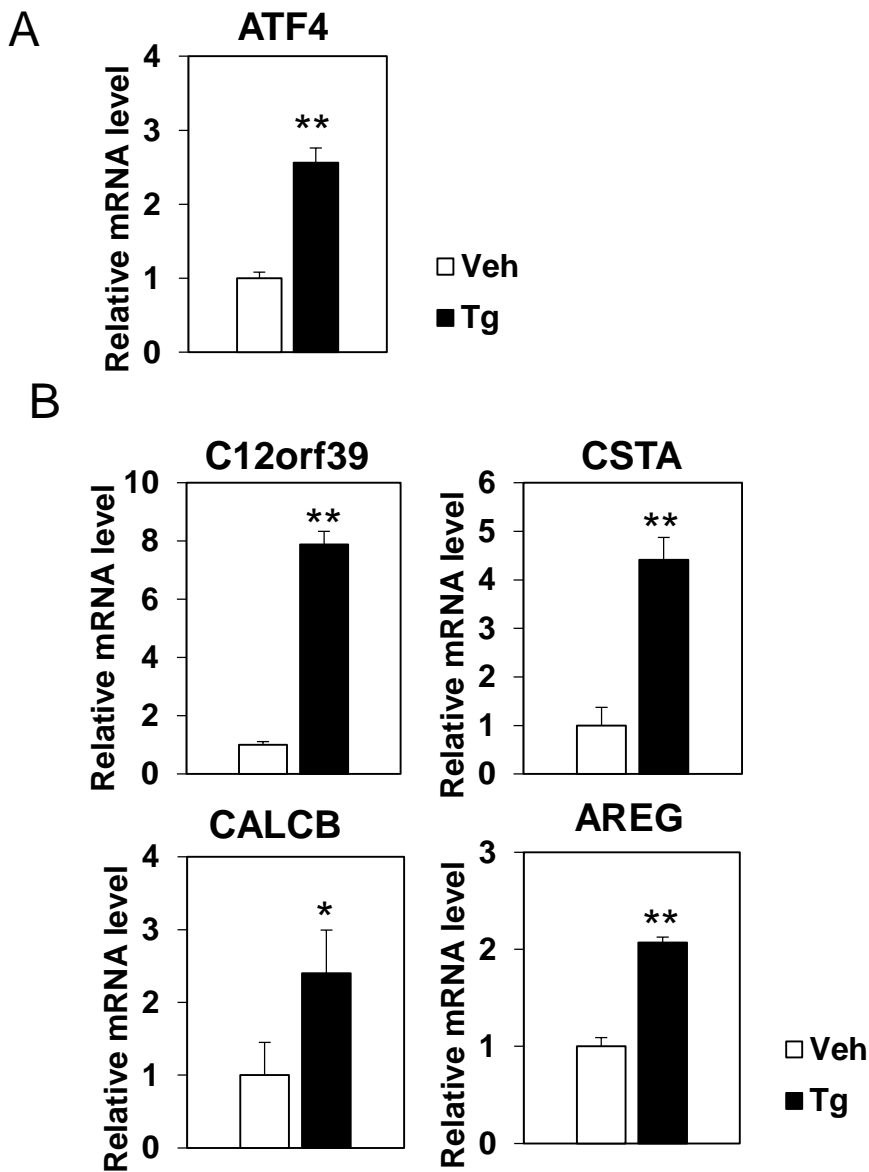


図4-2 小胞体ストレスによりATF4新規標的遺伝子の発現が誘導される

HuH7細胞に小胞体ストレス誘導剤であるサプシガルジンを250 nMとなるように処理した。6時間後にRNAを回収しATF4(A)及びATF4新規標的遺伝子(B)の遺伝子発現量をリアルタイムPCRにより解析した。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定にはスチューデントのt検定を用いた。* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

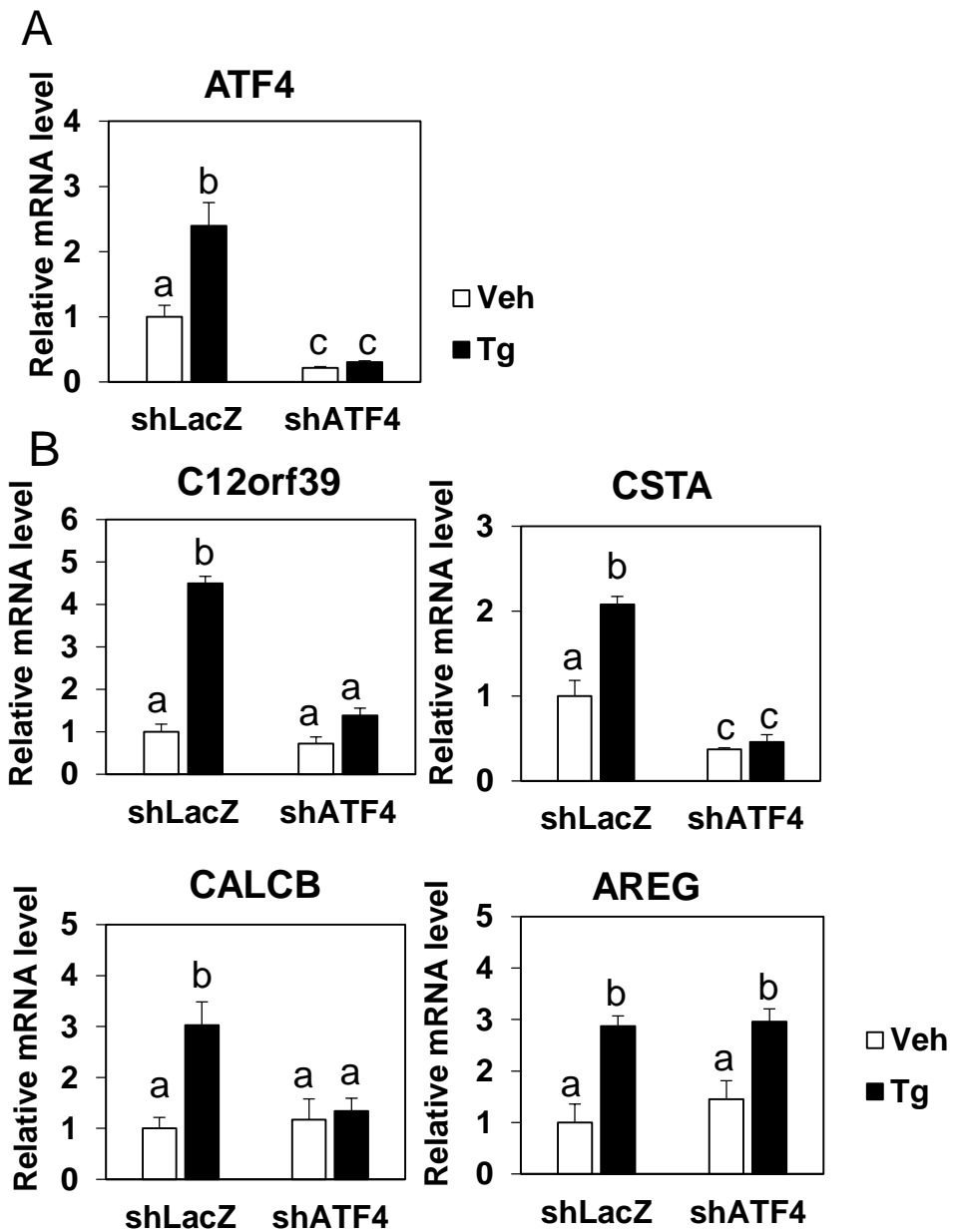


図4-3 ATF4ノックダウンによりサブシガルジンによるATF4新規標的候補遺伝子の発現が低下する
 HuH7細胞にアデノウイルスであるAd-shLacZ及びAd-shATF4をMOI=100で感染させた。感染後15時間後に培地交換し、その48時間後に小胞体ストレス誘導剤であるサブシガルジンを250 nMとなるように処理した。処理から6時間後にRNAを回収しATF4(A)及びATF4新規標的遺伝子(B)の遺伝子発現量をリアルタイムPCRにより解析した。それぞれの遺伝子発現は36B4の発現量で除することで補正した。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析(Bonferroni検定)を用いた。a-c:異なる文字間で有意差あり、 $p < 0.05$

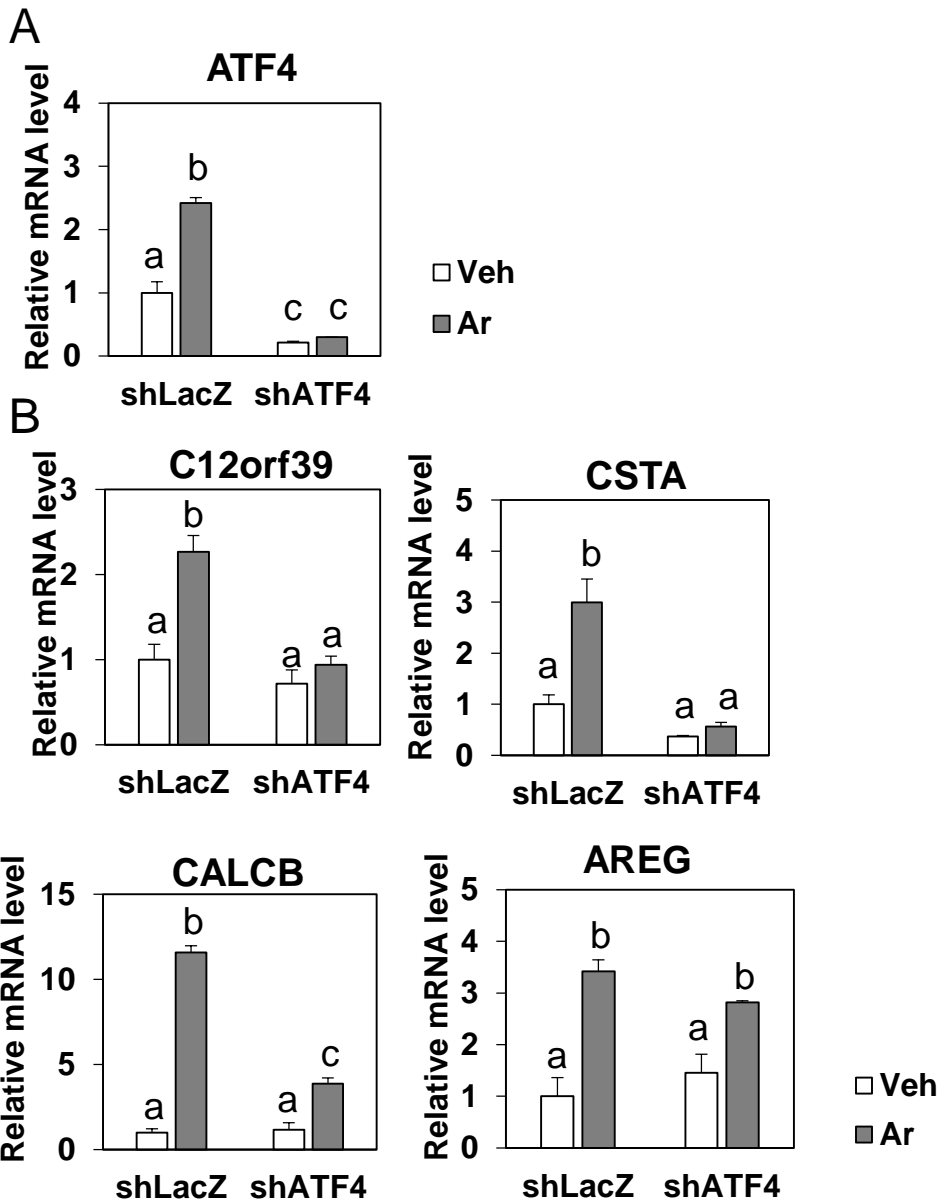


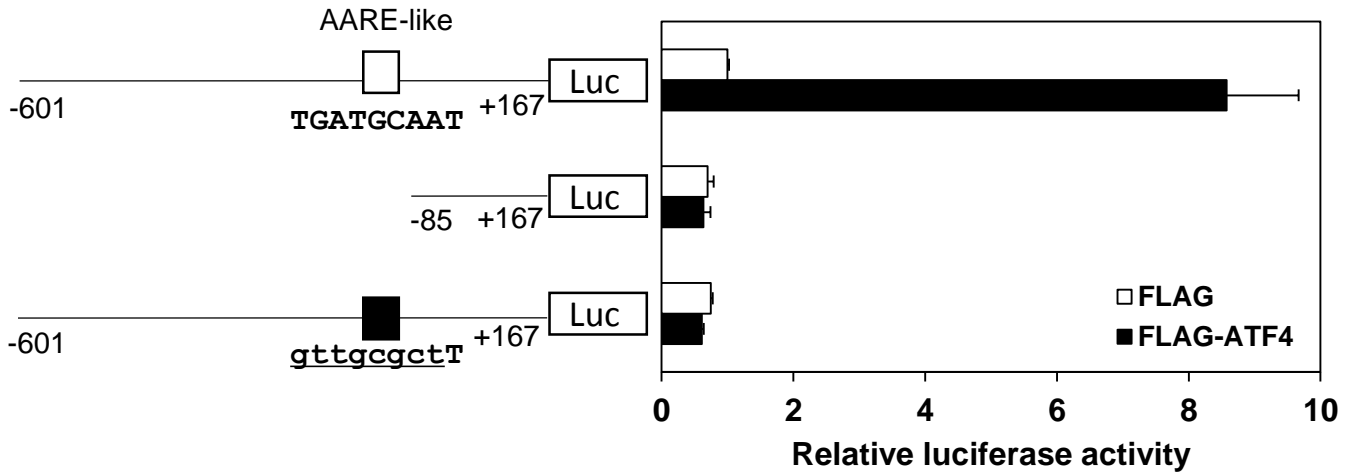
図4-4 ATF4ノックダウンによりアルセナイトによるATF4新規標的候補遺伝子の発現が低下する
 HuH7細胞にアデノウイルスであるAd-shLacZ及びAd-shATF4をMOI=100で感染させた。感染後15時間後に培地交換し、その48時間後に酸化ストレス誘導剤であるアルセナイトを30 μ Mとなるように処理した。処理から6時間後にRNAを回収しATF4(A)及びATF4新規標的遺伝子(B)の遺伝子発現量をリアルタイムPCRにより解析した。それぞれの遺伝子発現は36B4の発現量で除することで補正した。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定には一元配置分散分析(Bonferroni検定)を用いた。a-c:異なる文字間で有意差あり、 $p < 0.05$

A

AAREconsensus		RTTRCATCA	
hC12ORF39	-85	ATTGCATCA	-93
hCSTA	-260	GTTGCATCA	-268
hCALCB	-315	ATTGCACCA	-307

B

Human C12orf39 promoter



C

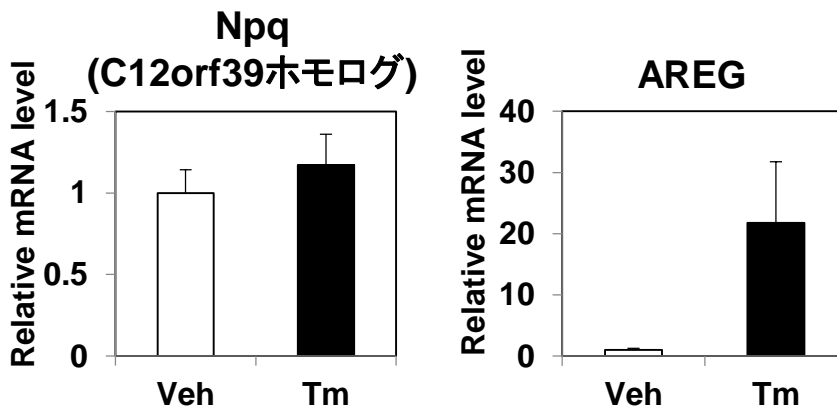


図4-5 C12orf39プロモーター活性はAAREを介してATF4により活性化される

A: C12orf39、CSTA、CALCB遺伝子のプロモーター領域内に存在するAARE様配列。B: HuH7細胞に発現ベクターであるFLAG-ATF4及びC12orf39の各変異型レポータープラスミド、CMV- β -galベクターをトランスフェクションした。トランスフェクションから48時間後にルシフェラーゼアッセイに供し、ホタルルシフェラーゼ活性の値を β -galactosidase活性の値で除することでルシフェラーゼ活性の値とした。1回の試行につき3連で行い、平均値と標準偏差を算出した。C: 野生型マウスに小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを2.5 μ g / g mouseとなるように経口投与し4時間後解剖し肝臓を採取した。肝臓はRNA抽出後 遺伝子発現をリアルタイムPCRにより解析した。それぞれの遺伝子発現は36B4の発現量で除することで補正した。1回の試行につき4連で行い、平均値と標準誤差を算出した。有意差検定にはスチューデントのt検定を用いた。

第五章 総合討論

本研究では第一章において、小胞体ストレス応答因子 ATF6 α による新規なコレステロール合成制御について、第二章では ATF4 による線維芽細胞増殖因子 FGF21 の発現制御及び FGF21 によるストレス軽減効果、第三章では FGF21 による脂肪肝抑制効果、第四章では ATF4 新規標的遺伝子の探索を行った。本章ではストレスにより誘導される各因子の生理的機能について考察する。

第一章では、小胞体ストレス応答因子 ATF6 に着目し、脂質代謝への作用とその分子メカニズムの解析を行った。第一節では、核内型 ATF6 α の過剰発現により、HMGCS などのコレステロール合成関連遺伝子の発現(図 1-1、表 1)、プロモーター活性化(図 1-2)及び新規コレステロール合成の亢進(図 1-3C)が示された。第二節では、ATF6 α による HMGCS の転写活性化調節には NF-Y 結合配列が重要であることが示唆され(図 1-6)、ATF6 α のロイシンジッパー領域がこのコレステロール合成亢進に重要であることが示された(図 1-7B、図 1-7C)。さらに、クロマチン免疫沈降法により、ATF6 α が NF-Y 結合配列にリクルートされていることが示唆された(図 1-8)。近年、II 型糖尿病患者や高コレステロール血症患者において ATF6 の SNP (M67V)が報告されている(31,32)。この M67V は機能獲得型の SNP であり、標的遺伝子である BiP の遺伝子発現が増加していることが報告されている(32)。本研究の結果から、ATF6 機能獲得型 SNP による高コレステロール血症の一因として、肝臓におけるコレステロール生合成の亢進が関与する可能性を示した。

小胞体膜はコレステロールやリン脂質等で構成され、小胞体ストレスによる小胞体の肥大化が知られている。一方、培養細胞を用いた実験から ATF6 α がリン脂質合成関連遺伝子の発現を亢進することが報告されている(154)。今回得られた ATF6 α によるコレステロール合成亢進の結果と合わせて考察すると、ATF6 α は小胞体の肥大化に伴う小胞体膜形成の促進に必要なコレステロール供給に重要な役割を担っていることが推測される。

第二章ではまず第一節において、ATF4 による FGF21 の発現制御の検討を行い、FGF21 のプロモーター上に 3 か所の ATF4 応答配列が存在することを明らかにした(図 2-4、図 2-5)。第二節では小胞体ストレスによる発現制御を受ける FGF21 の生理的意義について検討を行い、FGF21 が小胞体ストレスの軽減効果を有することを示した(図 2-6-図 2-11)。さらに第三節ではアミノ酸枯渇など小胞体ストレス以外の ATF4 活性化刺激による FGF21 の発現亢進を示した(図 2-12-図 2-15)。小胞体ストレスは小胞体内のミスフォールディングタンパク質の蓄積

によって生じることが知られている。一方、高脂肪食負荷実験などにより慢性的な小胞体ストレスが誘導され、JNK のリン酸化を介してインスリン抵抗性を惹起することが報告されている(68)。本実験において FGF21 が小胞体ストレスによる BiP の発現や JNK のリン酸化を抑制することを示した。アセトアミノフェンをマウスに投与した報告では、肝臓における FGF21 の発現が亢進し、肝障害に伴う JNK の活性化が抑制されるが、FGF21 欠損マウスではこの抑制が効かず、組み換え FGF21 タンパク質投与により回復する(155)ことから、FGF21 による JNK 制御が示唆されている。FGF21 は肥満や II 型糖尿病など様々な代謝疾患に有益であり(105,106)、肥満と JNK の活性化を介した炎症応答の関係性を考慮すると、FGF21 による JNK 活性化の抑制は小胞体ストレス軽減だけではなく抗炎症につながる可能性がある。小胞体ストレスを軽減するケミカルシャペロンである PBA や TUDCA の投与により肥満によるインスリン抵抗性の改善が報告されている(74,75)。したがって、FGF21 はこれらのケミカルシャペロンと同様の効果が期待できる。FGF21 は脂肪酸によって活性化される核内受容体 PPAR α による発現制御を受ける。フィブレート系薬剤は PPAR α を活性化し、抗脂質異常症薬として広く使われている(156)。PPAR α と ATF4 の FGF21 プロモーター上の結合配列は別々に存在しているので ATF4 と PPAR α の両方の活性化による生活習慣病の改善が今後期待される。

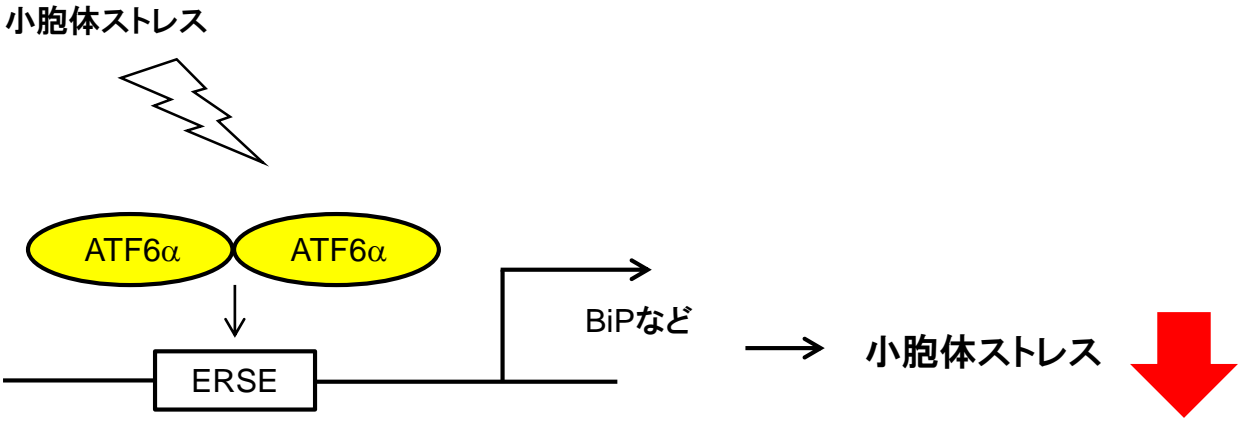
また、本実験ではマウスへの FGF21 過剰発現により小胞体ストレスによる CHOP の発現亢進が減弱し(図 2-10)、FGF21 欠損マウスでは増大していた(図 2-11、図 2-13)。CHOP は小胞体ストレス下においてストレス状態に対処できない場合にアポトーシスを誘導することで小胞体の恒常性を保つことが知られている。ATF6 α 欠損マウスはツニカマイシンの投与により CHOP の発現亢進が持続し死亡する(15,16,29)。アセトアミノフェンを CHOP 欠損マウスに投与した報告では肝障害や JNK 活性化が抑制されることから(157)、今回の結果から FGF21 によるストレス軽減効果の一部は CHOP の発現低下を介したものであると示唆される。CHOP 欠損マウス初代培養肝細胞では小胞体ストレスによる FGF21 の発現誘導が低く、CHOP による FGF21 のプロモーター活性制御が報告されている(158)。CHOP は ATF4 を介しても発現が亢進するためストレス応答のアポトーシス経路以外に ATF4 を介さず直接 FGF21 の発現誘導によってもストレス対処に機能している可能性もある。一方、CHOP は小胞体ストレス時において PPAR α の発現を抑制する(91)。FGF21 は PPAR α の標的遺伝子であるため CHOP が PPAR α を介して FGF21 を制御する可能性がある。小胞体ストレスによる CHOP の発現亢進が引き起こす脂肪肝を FGF21 が抑制する報告もあり(125)、FGF21 と CHOP の関係についてはさらなる解析が必要である。

第三章ではまず第一節において、FGF21 欠損マウスでは野生型マウスに比べ

メチオニン・コリン欠乏食による肝臓のトリグリセリド量の蓄積が増加することが示された(図 3-3B)。第二節ではメチオニン・コリン欠乏食による体内のアミノ酸濃度変動を検討し、FGF21 欠損マウスでは血中及び肝臓中スレオニン濃度が低く(図 3-8、図 3-9)、FGF21 過剰発現により増加することを示した(図 3-11)。ラットを用いた実験でスレオニン添加が脂肪肝を改善すること(145,146)、スレオニン欠乏食は脂肪肝を誘発することが報告されている(159)。食事由来のスレオニン含有量が体内のスレオニン濃度に影響を及ぼし、肝臓のトリグリセリド量に反映された結果であると仮定すると、FGF21 による脂肪肝改善効果の一部は体内のスレオニン量を介した可能性が考えられる。また、第二章で示した結果や他のグループが報告したロイシン欠乏食による FGF21 発現亢進(121,122)やメチオニン制限食による FGF21 誘導(160)、骨格筋特異的グルココルチコイド受容体欠損マウスのアラニンによる FGF21 発現上昇(161)を総合的に考察すると、FGF21 とアミノ酸代謝の関係性が予想され、今後詳細な解析が必要である。4 週間のメチオニン・コリン欠乏食摂食実験の結果、肝臓での CHOP の発現が FGF21 欠損で増加していた(図 3-3C)。我々の結果では 1 週間のメチオニン・コリン欠乏食摂取では FGF21 欠損による小胞体ストレスマーカー遺伝子の発現変動は認められなかった(図 3-2C)が、他の報告では FGF21 欠損マウスにおける 1 週間摂取での BiP や CHOP の発現亢進を確認している(162)。この報告(162)では、PPAR α の遺伝子発現は野生型マウス及び FGF21 欠損マウスで変動していなかった。我々の結果ではメチオニン・コリン欠乏食を 4 週間摂取させた野生型マウスでは PPAR α の発現が亢進しており(図 3-5D)、他の報告において PPAR α 欠損マウスではメチオニン・コリン欠乏食による肝臓トリグリセリド量の増加が確認されている(163)。このことから、メチオニン・コリン欠乏食は小胞体ストレス誘導によりまず FGF21 の発現を亢進し、次に PPAR α を介した FGF21 の発現により脂肪肝抑制だけではなくストレス軽減及び脂肪酸 β 酸化亢進することが考えられる。また、JNK1 を欠損した肥満マウスでは耐糖能などの代謝改善が見られ(164)、メチオニン・コリン欠乏食による肝臓トリグリセリド蓄積亢進が JNK1 欠損マウスでは見られず、血中アディポネクチン濃度上昇が報告されている(165)。第二章で得られた FGF21 過剰発現による JNK のリン酸化減少やアディポネクチンの抗肥満効果を考えるとメチオニン・コリン欠乏食による FGF21 欠損マウスでの肝臓トリグリセリド量の増加は PPAR γ 以外に JNK の活性化を介した可能性が考えられる。さらに、ケミカルシャペロンである TUDCA はメチオニン・コリン欠乏食による小胞体ストレスを抑制するが肝臓のトリグリセリド量や TNF α などの炎症系遺伝子の発現には影響しない報告がある(166)ため、FGF21 はストレス応答だけではなく、抗肥満抗炎症効果を有するため、より効率の良い脂肪肝抑制効果を発揮する因子であると期待される。

現在の知見では小胞体ストレスにより PERK、IRE1、ATF6 α の3つの小胞体膜タンパク質は活性化され、PERKはeIF2 α のリン酸化を介して全般的な翻訳抑制とCHOPによるアポトーシス誘導を招く。IRE1はXBP1のスプライシング亢進を引き起こしBiPなどの発現亢進およびJNKの活性化によるアポトーシス誘導を引き起こすことでストレスに対処する。ATF6 α はBiPなどの発現を亢進することでミスフォールディングタンパク質の折畳みを正常にする。今回新たにATF6 α によるコレステロール合成制御を明らかにし、ATF6が小胞体の肥大化に必要な小胞体膜のコレステロール合成に関与する可能性及びPERK下流因子ATF4がFGF21の発現を誘導しストレス軽減効果を有することを示唆した。肥満と小胞体ストレスの関係性も考慮するとFGF21が抗生活習慣病因子としてだけでなく新たな小胞体ストレス制御因子として機能することが考えられる。小胞体の恒常性の異常はコレステロールやトリグリセリドの合成に支障をきたし、糖尿病などの代謝性疾患や動脈硬化性疾患の発症につながるため小胞体ストレス軽減の作用機序の解明は重要である。また、FGF21はヒトへの応用も進んでいる抗生活習慣病因子であることから、今後ATF6とコレステロール代謝及びFGF21とストレス応答のさらなる研究の進展及びこれらの知見が脂質代謝異常症の改善に貢献することを期待する。

これまでの知見



第一章で得られた結果

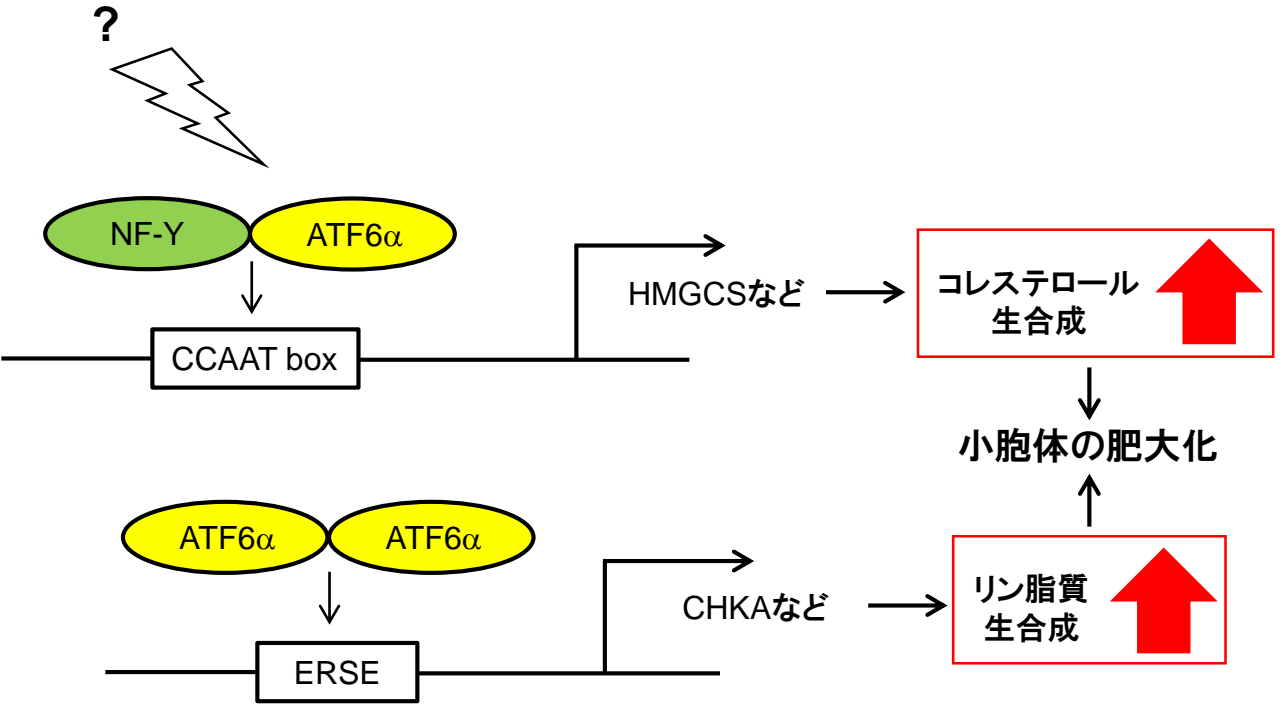


図5-1 ATF6αによるコレステロール合成制御機構の予想図

これまでの知見ではATF6αはヘテロダイマーを形成し結合領域であるERSE配列にリクルートされシャペロンタンパク質であるBiPなどの発現亢進を介して小胞体ストレスを軽減することが知られている。本実験においてATF6αは転写因子NF-Yを介してHMGCSなどの発現を亢進しコレステロールを合成することを示した。ATF6αによるリン脂質合成関連遺伝子の発現亢進の報告もあることから、ATF6αはシャペロンタンパク質の発現亢進以外にコレステロール合成及びリン脂質合成亢進を介した小胞体膜形成の促進による小胞体の肥大化により折りたたみ異常のタンパク質を多く取り込むことで小胞体ストレスに対処していると考えられる。

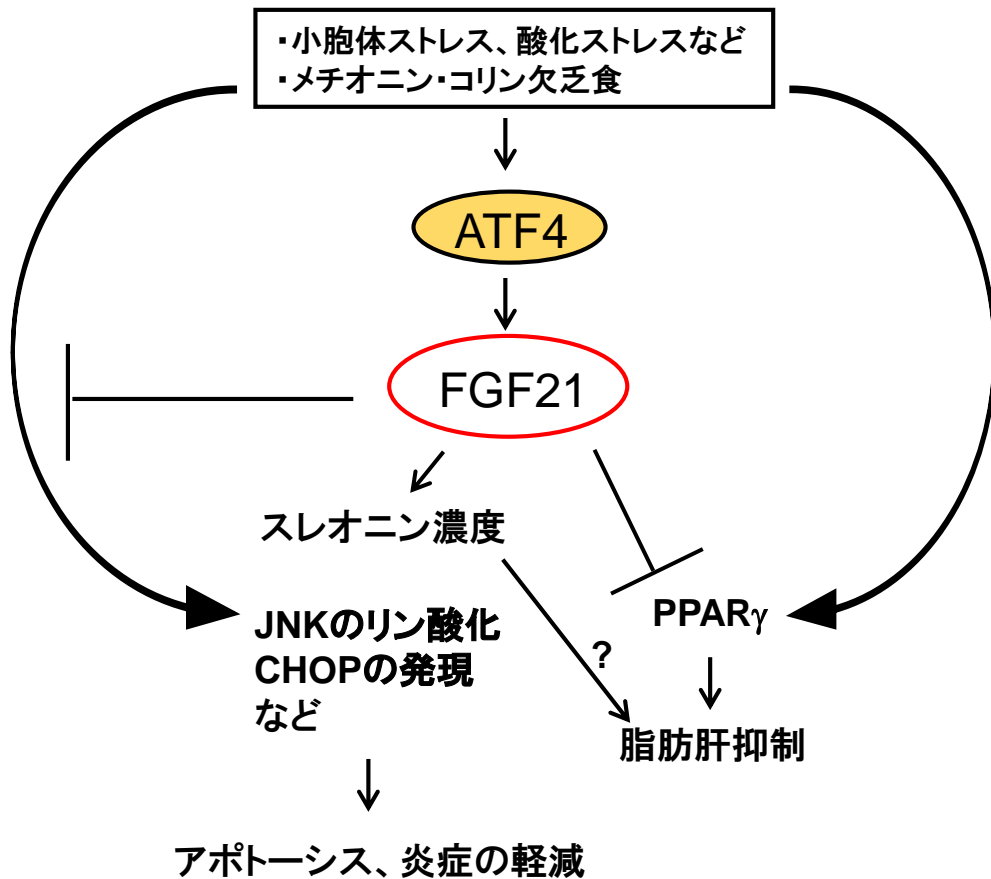


図5-2 FGF21によるストレス軽減効果および脂肪肝抑制機構の予想図

本実験においてFGF21は小胞体ストレスによりATF4を介して発現亢進することを示し、アポトーシス関連因子であるCHOPの発現やJNKのリン酸化抑制により小胞体ストレス誘導性のアポトーシスや炎症を軽減することが考えられる。また、FGF21はメチオニンコリン欠乏食摂取時に誘導されるPPAR γ の発現上昇を抑制し、脂肪肝予防に寄与している可能性が考えられる。

引用文献

1. Wajchenberg BL. (2000) Subcutaneous and visceral adipose tissue : their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* **21**, 697-738
2. Kojima S, Watanabe N, Numata M, Ogawa T, Matsuzaki S. (2003) Increase in the prevalence of fatty liver in Japan over the past 12 years: analysis of clinical background. *Journal of gastroenterology* **38**, 954-961
3. Schröder M, Kaufman RJ. (2005) ER stress and the unfolded protein response. *Mutat res* **569**, 29-63
4. Wei Y, Wang D, Topczewski F, Paqliassotti MJ. (2006) Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**, 275-281
5. Ron D and Walter P. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 519-29
6. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. (1998) CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* **12**, 982-95
7. Ron D, Habener JF. (1992) CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev* **6**, 439-53
8. Ubeda M, Wang XZ, Zinszner H, Wu I, Habener JF, Ron D. (1996) Stress-induced binding of the transcriptional factor CHOP to a novel DNA control element. *Mol Cell Biol* **16**, 1479-89
9. Lee AS. (2005) The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* **35**, 373-81
10. Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. (1998) Identification of the cis-

acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* **273**, 33741-9

11. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**, 881-91
12. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K. (2000) ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* **20**, 6755-67
13. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, Mori K (2001) Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta. *Mol Cell Biol* **21**, 1239-48
14. Adachi Y, Yamamoto K, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K. (2008) ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell Struct Funct* **33**, 75-89
15. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K. (2007) Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell* **13**, 365-76
16. Wu J, Rutkowski DT, Dubois M, Swathirajan J, Saunders T, Wang J, Song B, Yau GD, Kaufman RJ (2007) ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Dev Cell* **13**, 351-64
17. Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. (2002) ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell* **3**, 99-111
18. Schindler AJ, Schekman R. (2009) In vitro reconstitution of ER-stress induced

ATF6 transport in COPII vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17775-80.

19. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL. (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* **6**, 1355-64
20. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. (1999) Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* **10**, 3787-99
21. Thuerlauf DJ, Marcinko M, Belmont PJ, Glembotski CC. (2007) Effects of the isoform-specific characteristics of ATF6 alpha and ATF6 beta on endoplasmic reticulum stress response gene expression and cell viability. *J Biol Chem* **282**, 22865-78
22. Zeng L, Lu M, Mori K, Luo S, Lee AS, Zhu Y, Shyy JY. (2004) ATF6 modulates SREBP2-mediated lipogenesis. *EMBO J* **23**, 950-8
23. Yao S, Zong C, Zhang Y, Sang H, Yang M, Jiao P, Fang Y, Yang N, Song G, Qin S. (2013) Activating Transcription Factor 6 Mediates Oxidized LDL-Induced Cholesterol Accumulation and Apoptosis in Macrophages by Up-Regulating CHOP Expression. *J Atheroscler Thromb* **20**, 94-107
24. Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, Back SH, Kaufman RJ. (2006) Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* **124**, 587-99
25. Seo HY, Kim MK, Min AK, Kim HS, Ryu SY, Kim NK, Lee KM, Kim HJ, Choi HS, Lee KU, Park KG, Lee IK. (2010) Endoplasmic reticulum stress-induced activation of activating transcription factor 6 decreases cAMP-stimulated hepatic gluconeogenesis via inhibition of CREB. *Endocrinology* **151**, 561-8
26. Wang Y, Vera L, Fischer WH, Montminy M. (2009) The CREB coactivator CRT2 links hepatic ER stress and fasting gluconeogenesis. *Nature* **460**, 534-7
27. Seo HY, Kim YD, Lee KM, Min AK, Kim MK, Kim HS, Won KC, Park JY, Lee

- KU, Choi HS, Park KG, Lee IK. (2008) Endoplasmic reticulum stress-induced activation of activating transcription factor 6 decreases insulin gene expression via up-regulation of orphan nuclear receptor small heterodimer partner. *Endocrinology* **149**, 3832-41
28. Wu J, Ruas JL, Estall JL, Rasbach KA, Choi JH, Ye L, Boström P, Tyra HM, Crawford RW, Campbell KP, Rutkowski DT, Kaufman RJ, Spiegelman BM. (2011) The unfolded protein response mediates adaptation to exercise in skeletal muscle through a PGC-1 α /ATF6 α complex. *Cell Metab* **13**, 160-9
29. Rutkowski DT, Wu J, Back SH, Callaghan MU, Ferris SP, Iqbal J, Clark R, Miao H, Hassler JR, Fornek J, Katze MG, Hussain MM, Song B, Swathirajan J, Wang J, Yau GD, Kaufman RJ. (2008) UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators. *Dev Cell* **15**, 829-40
30. Yamamoto K, Takahara K, Oyadomari S, Okada T, Sato T, Harada A, Mori K. (2010) Induction of liver steatosis and lipid droplet formation in ATF6 α -knockout mice burdened with pharmacological endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* **21**, 2975-86
31. Chu WS, Das SK, Wang H, Chan JC, Deloukas P, Froguel P, Baier LJ, Jia W, McCarthy MI, Ng MC, Damcott C, Shuldiner AR, Zeggini E, Elbein SC. (2007) Activating transcription factor 6 (ATF6) sequence polymorphisms in type 2 diabetes and pre-diabetic traits. *Diabetes* **56**, 856-62
32. Meex SJ, Weissglas-Volkov D, van der Kallen CJ, Thuerlauf DJ, van Greevenbroek MM, Schalkwijk CG, Stehouwer CD, Feskens EJ, Heldens L, Ayoubi TA, Hofker MH, Wouters BG, Vlietinck R, Sinsheimer JS, Taskinen MR, Kuusisto J, Laakso M, de Bruin TW, Pajukanta P, Glembotski CC. (2009) The ATF6-Met[67]Val substitution is associated with increased plasma cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 1322-7
33. Yoshida H. (2007) Unconventional splicing of XBP-1 mRNA in the unfolded protein response. *Antioxid Redox Signal* **9**, 2323-33

34. Calton M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D. (2002) IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**, 92-6
35. Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H. (2002) ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* **16**, 1345-55
36. Harding HP, Zhang Y, Ron D. (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **21**,271-4
37. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D. (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* **6**, 1099-108
38. Wang XZ, Lawson B, Brewer JW, Zinszner H, Sanjay A, Mi LJ, Boorstein R, Kreibich G, Hendershot LM, Ron D. (1996) Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol Cell Biol* **16**, 4273-80
39. Mamady H, and Storey KB. (2008) Coping with the stress: expression of ATF4, ATF6, and downstream targets in organs of hibernating ground squirrels. *Arch Biochem Biophys* **477**, 77-85
40. Wang C, and Guo F. (2012) Effects of activating transcription factor 4 deficiency on carbohydrate and lipid metabolism in mammals. *IUBMB Life* **64**, 226-30
41. Bruhat A, Chérasse Y, Chaveroux C, Maurin AC, Jousse C, and Fafournoux P. (2009) Amino acids as regulators of gene expression in mammals: molecular mechanisms. *Biofactors*.**35**, 249-57
42. Kilberg MS, Shan J, and Su N. (2009) ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends Endocrinol Metab* **20**, 436-43
43. Averous J, Bruhat A, Jousse C, Carraro V, Thiel G, and Fafournoux P. (2004)

- Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation. *J Biol Chem* **279**, 5288-5297
44. V. Carraro, A.C. Maurin, S. Lambert-Langlais, J. Averous, C. Chaveroux, L. Parry, C. Jousse, D. Ord, T. Ord, P. Fafournoux, A. Bruhat. (2010) Amino acid availability controls TRB3 transcription in liver through the GCN2/eIF2 α /ATF4 pathway. *PLoS One* **5**, e15716
 45. Pan YX, Chen H, Thiaville MM, and Kilberg MS. (2007) Activation of the ATF3 gene through a co-ordinated amino acid-sensing response programme that controls transcriptional regulation of responsive genes following amino acid limitation. *Biochem J* **401**, 299-307.
 46. Chen H, Pan YX, Dudenhausen EE, and Kilberg MS. (2004) Amino acid deprivation induces the transcription rate of the human asparagine synthetase gene through a timed program of expression and promoter binding of nutrient-responsive basic region/leucine zipper transcription factors as well as localized histone acetylation. *J Biol Chem* **279**, 50829-50839
 47. Siu F, Bain PJ, LeBlanc-Chaffin R, Chen H, and Kilberg MS. (2002) ATF4 is a mediator of the nutrient-sensing response pathway that activates the human asparagine synthetase gene. *J Biol Chem* **277**, 24120-24127
 48. Yamaguchi S, Ishihara H, Yamada T, Tamura A, Usui M, Tominaga R, Munakata Y, Satake C, Katagiri H, Tashiro F, Aburatani H, Tsukiyama-Kohara K, Miyazaki J, Sonenberg N, and Oka Y. (2008) ATF4-mediated induction of 4E-BP1 contributes to pancreatic beta cell survival under endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab* **7**, 269-76
 49. Wang C, Huang Z, Du Y, Cheng Y, Chen S, and Guo F. (2010) ATF4 regulates lipid metabolism and thermogenesis. *Cell Res* **20**, 174-84
 50. Seo J, Fortunato ES, Suh JM, Stenesen D, Tang W, Parks EJ, Adams CM, Townes T, and Graff JM. (2009) Atf4 regulates obesity, glucose homeostasis, and energy expenditure. *Diabetes* **58**, 2565-73.

51. Li H, Meng Q, Xiao F, Chen S, Du Y, Yu J, Wang C, and Guo F. (2011) ATF4 deficiency protects mice from high-carbohydrate-diet-induced liver steatosis. *Biochem J* **438**, 283-9.
52. Lassot I, Segéral E, Berlioz-Torrent C, Durand H, Groussin L, Hai T, Benarous R, Margottin-Goguet F. (2001) ATF4 degradation relies on a phosphorylation-dependent interaction with the SCF(betaTrCP) ubiquitin ligase. *Molecular and cellular biology* **21**, 2192-2202
53. Murakami T, Kondo S, Ogata M, Kanemoto S, Saito A, Wanaka A, Imaizumi K. (2006) Cleavage of the membrane-bound transcription factor OASIS in response to endoplasmic reticulum stress. *J Neurochem* **96**, 1090-100
54. Briggs MR, Yokoyama C, Wang X, Brown MS, Goldstein JL. (1993) Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. *J Biol Chem* **268**, 14490-6
55. Wang X, Briggs MR, Hua X, Yokoyama C, Goldstein JL, Brown MS. (1993) Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. II. Purification and characterization. *J Biol Chem* **268**, 14497-504
56. Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL, Brown MS. (1993) SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *cell* **75**, 187-197
57. Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, Brown MS, Goldstein JL, Wang X. (1993) SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 11603-7
58. Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. (1997) Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest* **99**,

59. Shimano H, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL. (1997) Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J Clin Invest* **99**, 846-54
60. Horton JD, Shimomura I, Brown MS, Hammer RE, Goldstein JL, Shimano H. (1998) Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin invest* **101**, 2331-9
61. Shimano H, Horton JD, Hammer RE, Shimomura I, Brown MS, Goldstein JL. (1996) Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J Clin Invest* **98**, 1575-84
62. Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X, Goldstein JL. (1994) SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell* **77**, 53-62
63. Shimano H. (2001) Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) : transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog Lipid Res* **40**, 439-52
64. Sato R, Sakai J. (2004) [SREBP controls cholesterol homeostasis] *Seikagaku* **76**, 503-8
65. Harding HP, Zeng H, Zhang Y, Jungries R, Chung P, Plesken H, Sabatini DD, Ron D. (2001) Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell* **7**, 1153-63
66. Fonseca SG, Fukuma M, Lipson KL, Nguyen LX, Allen JR, Oka Y, Urano F. (2005) WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **280**, 39609-15

67. Fonseca SG, Ishigaki S, Osowski CM, Lu S, Lipson KL, Ghosh R, Hayashi E, Ishihara H, Oka Y, Permutt MA, Urano F. (2010) Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest* **120**, 744-55
68. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306**, 457-61
69. Boden G, Duan X, Homko C, Molina EJ, Song W, Perez O, Cheung P, Merali S. (2008) Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes* **57**, 2438-44
70. Sharma NK, Das SK, Mondal AK, Hackney OG, Chu WS, Kern PA, Rasouli N, Spencer HJ, Yao-Borengasser A, Elbein SC. (2008) Endoplasmic reticulum stress markers are associated with obesity in nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 4532-41
71. Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, Mohammed BS, Eagon JC, Hotamisligil GS, Klein S. (2009) Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes* **58**, 693-700
72. Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, Myers MG Jr, Ozcan U. (2009) Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* **9**, 35-51
73. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. (2008) Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* **3**, 61-73
74. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Görgün CZ, Hotamisligil GS. (2006) Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* **25**, 1137-40
75. Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka TA, Ozawa K, Ogawa S, Hori M, Yamasaki Y, Matsuhisa M. (2005) Involvement of

endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem* **7**, 847-51

76. Kim DS, Jeong SK, Kim HR, Kim DS, Chae SW, Chae HJ. (2007) Effects of triglyceride on ER stress and insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun.* **9**, 140-5
77. Jakobsen CH, Størvold GL, Bremseth H, Follestad T, Sand K, Mack M, Olsen KS, Lundemo AG, Iversen JG, Krokan HE, Schønberg SA. (2008) DHA induces ER stress and growth arrest in human colon cancer cells: associations with cholesterol and calcium homeostasis. *J Lipid Res* **49**, 2089-100
78. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* **114**, 1752-61
79. Xue X, Piao JH, Nakajima A, Sakon-Komazawa S, Kojima Y, Mori K, Yagita H, Okumura K, Harding H, Nakano H. (2005) Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNFalpha. *J Biol Chem* **280**, 33917-25
80. Fu S, Yang L, Li P, Hofmann O, Dicker L, Hide W, Lin X, Watkins SM, Ivanov AR, Hotamisligil GS. (2011) Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature* **473**, 528-31
81. Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. (2010) Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance *Cell Metab* **9**, 467-78
82. Colgan SM, Tang D, Werstuck GH, Austin RC. (2007) Endoplasmic reticulum stress causes the activation of sterol regulatory element binding protein-2. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 1843-51
83. Lee JN, Ye J. (2004) Proteolytic activation of sterol regulatory element-binding protein induced by cellular stress through depletion of Insig-1. *J Biol Chem* **22**, 45257-65

84. Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, Luquet S, Magnan C, Koike T, Ferré P, Foufelle F. (2009) GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest* **119**, 1201-15
85. Higgins ME, Ioannou YA. (2001) Apoptosis-induced release of mature sterol regulatory element-binding proteins activates sterol-responsive genes. *J Lipid Res* **42**, 1939-46
86. Lhoták S, Sood S, Brimble E, Carlisle RE, Colgan SM, Mazzetti A, Dickhout JG, Ingram AJ, Austin RC. (2012) ER stress contributes to renal proximal tubule injury by increasing SREBP-2-mediated lipid accumulation and apoptotic cell death. *Am J Physiol Renal Physiol* **303**, 266-78
87. Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, Zhou J, Maeda N, Krisans SK, Malinow MR, Austin RC. (2001) Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest* **107**, 1263-73
88. Lee AH, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH. (2008) Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* **320**, 1492-6
89. Oyadomari S, Koizumi A, Takeda K, Gotoh T, Akira S, Araki E, Mori M. (2002) Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest* **109**, 525-32
90. Song B, Scheuner D, Ron D, Pennathur S, Kaufman RJ. (2008) Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J Clin Invest* **118**, 3378-89
91. Chikka MR, McCabe DD, Tyra HM, Rutkowski DT. (2013) C/EBP Homologous Protein (CHOP) Contributes to Suppression of Metabolic Genes During ER Stress in the Liver. *J Biol Chem* **288**, 4405-15
92. Sha H, He Y, Chen H, Wang C, Zenno A, Shi H, Yang X, Zhang X, Qi L. (2009)

The IRE1alpha-XBP1 pathway of the unfolded protein response is required for adipogenesis. *Cell Metab* **9**, 556-64

93. Itoh N, and Ornitz DM. (2011) Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J Biochem* **149**, 121-30.
94. Izumiya Y, Bina HA, Ouchi N, Akasaki Y, Kharitononkov A, and Walsh K. (2008) FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett* **582**, 3805-10
95. Ogawa Y, Kurosu H, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Goetz R, Eliseenkova AV, Mohammadi M, and Kuro-o M. (2007) BetaKlotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 7432-7
96. Kurosu H, Choi M, Ogawa Y, Dickson AS, Goetz R, Eliseenkova AV, Mohammadi M, Rosenblatt KP, Kliewer SA, and Kuro-o M. (2007) Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J Biol Chem* **282**, 26687-95
97. Yang C, Jin C, Li X, Wang F, McKeenan WL, and Luo Y. (2012) Differential specificity of endocrine FGF19 and FGF21 to FGFR1 and FGFR4 in complex with KLB. *PLoS One* **7**, e33870
98. Inagaki T, Dutchak P, Zhao G, Ding X, Gautron L, Parameswara V, Li Y, Goetz R, Mohammadi M, Esser V, Elmquist JK, Gerard RD, Burgess SC, Hammer RE, Mangelsdorf DJ, and Kliewer SA. (2007) Endocrine regulation of the fasting response by PPARalpha-mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metab* **5**, 415-25
99. Kim H, Mendez R, Zheng Z, Chang L, Cai J, Zhang R, and Zhang K. (2014) Liver-enriched transcription factor CREBH interacts with peroxisome proliferator-activated receptor α to regulate metabolic hormone FGF21. *Endocrinology* **155**, 769-82
100. Iizuka K, Takeda J, and Horikawa Y. (2009) Glucose induces FGF21 mRNA expression through ChREBP activation in rat hepatocytes. *FEBS Lett* **583**, 2882-6

101. Uebanso T, Taketani Y, Yamamoto H, Amo K, Ominami H, Arai H, Takei Y, Masuda M, Tanimura A, Harada N, Yamanaka-Okumura H, and Takeda E. (2011) Paradoxical regulation of human FGF21 by both fasting and feeding signals: is FGF21 a nutritional adaptation factor? *PLoS One* **6**, e22976
102. Xu J, Lloyd DJ, Hale C, Stanislaus S, Chen M, Sivits G, Vonderfecht S, Hecht R, Li YS, Lindberg RA, Chen JL, Jung DY, Zhang Z, Ko HJ, Kim JK, and Véniant MM. (2009) Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes* **58**, 250-9
103. Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ, Sandusky GE, Hammond LJ, Moyers JS, Owens RA, Gromada J, Brozinick JT, Hawkins ED, Wroblewski VJ, Li DS, Mehrbod F, Jaskunas SR, and Shanafelt AB. (2005) FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* **115**, 1627-35
104. Coskun T, Bina HA, Schneider MA, Dunbar JD, Hu CC, Chen Y, Moller DE, and Kharitonov A. (2008) Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* **149**, 6018-27
105. Gaich G, Chien JY, Fu H, Glass LC, Deeg MA, Holland WL, Kharitonov A, Bumol T, Schilske HK, and Moller DE. (2013) The effects of LY2405319, an FGF21 analog, in obese human subjects with type 2 diabetes. *Cell Metab* **18**, 333-40
106. Kharitonov A, Wroblewski VJ, Koester A, Chen YF, Clutinger CK, Tigno XT, Hansen BC, Shanafelt AB, and Etgen GJ. (2007) The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21. *Endocrinology* **148**, 774-81
107. Inagaki T, Lin VY, Goetz R, Mohammadi M, Mangelsdorf DJ, and Kliewer SA. (2008) Inhibition of growth hormone signaling by the fasting-induced hormone FGF21. *Cell Metab* **8**, 77-83
108. Zhang Y, Xie Y, Berglund ED, Coate KC, He TT, Katafuchi T, Xiao G, Potthoff MJ, Wei W, Wan Y, Yu RT, Evans RM, Kliewer SA, and Mangelsdorf DJ. (2012)

The starvation hormone, fibroblast growth factor-21, extends lifespan in mice. *Elife* **1**, e00065

109. Badman MK, Pissios P, Kennedy AR, Koukos G, Flier JS, and Maratos-Flier E. (2007) Hepatic fibroblast growth factor 21 is regulated by PPARalpha and is a key mediator of hepatic lipid metabolism in ketotic states. *Cell Metab* **5**, 426-37
110. Hotta Y, Nakamura H, Konishi M, Murata Y, Takagi H, Matsumura S, Inoue K, Fushiki T, and Itoh N. (2009) Fibroblast growth factor 21 regulates lipolysis in white adipose tissue but is not required for ketogenesis and triglyceride clearance in liver. *Endocrinology* **150**, 4625-33
111. Potthoff MJ, Inagaki T, Satapati S, Ding X, He T, Goetz R, Mohammadi M, Finck BN, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA, and Burgess SC. (2009) FGF21 induces PGC-1alpha and regulates carbohydrate and fatty acid metabolism during the adaptive starvation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 10853-8
112. Dutchak PA, Katafuchi T, Bookout AL, Choi JH, Yu RT, Mangelsdorf DJ, and Kliewer SA. (2012) Fibroblast growth factor-21 regulates PPARgamma activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell* **148**, 556-67
113. Lin Z, Tian H, Lam KS, Lin S, Hoo RC, Konishi M, Itoh N, Wang Y, Bornstein SR, Xu A, and Li X. (2013) Adiponectin mediates the metabolic effects of FGF21 on glucose homeostasis and insulin sensitivity in mice. *Cell Metab* **17**, 779-89
114. Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, Goldstein JL. (2003) Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12027-32
115. Shimizu M, Li J, Maruyama R, Inoue J, and Sato R. (2013) FGF19 (fibroblast growth factor 19) as a novel target gene for activating transcription factor 4 in response to endoplasmic reticulum stress. *Biochem J* **450**, 221-9
116. Sever N, Song BL, Yabe D, Goldstein JL, Brown MS, DeBose-Boyd RA. (2003)

- Insig-dependent ubiquitination and degradation of mammalian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase stimulated by sterols and geranylgeraniol. *J Biol Chem* **278**, 2479-90
117. Inoue J, Sato R, Maeda M. (1998) Multiple DNA elements for sterol regulatory element-binding protein and NF- κ B are responsible for sterol-regulated transcription of the genes for human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase and squalene synthase. *J Biochem* **123**, 1191-8
118. Usui M, Yamaguchi S, Tanji Y, Tominaga R, Ishigaki Y, Fukumoto M, Katagiri H, Mori K, Oka Y, Ishihara H. (2012) Atf6 α -null mice are glucose intolerant due to pancreatic β -cell failure on a high-fat diet but partially resistant to diet-induced insulin resistance. *Metabolism* **61**, 1118-28
119. Baumeister P, Luo S, Skarnes WC, Sui G, Seto E, Shi Y, Lee AS. (2005) Endoplasmic reticulum stress induction of the Grp78/BiP promoter: activating mechanisms mediated by YY1 and its interactive chromatin modifiers. *Mol Cell Biol* **25**, 4529-40
120. Schaap FG, Kremer AE, Lamers WH, Jansen PL, and Gaemers IC. (2013) Fibroblast growth factor 21 is induced by endoplasmic reticulum stress. *Biochimie* **95**, 692-699
121. Kim KH, Jeong YT, Oh H, Kim SH, Cho JM, Kim YN, Kim SS, Kim do H, Hur KY, Kim HK, Ko T, Han J, Kim HL, Kim J, Back SH, Komatsu M, Chen H, Chan DC, Konishi M, Itoh N, Choi CD, Lee MS. (2013) Autophagy deficiency leads to protection from obesity and insulin resistance by inducing Fgf21 as a mitokine. *Nat Med* **19**, 83-92
122. De Sousa-Coelho AL, Marrero PF, Haro D. (2012) Activating transcription factor 4-dependent induction of FGF21 during amino acid deprivation. *Biochem J* **443**, 165-71
123. Kim KH, Jeong YT, Kim SH, Jung HS, Park KS, Lee HY, and Lee MS. (2013) Metformin-induced inhibition of the mitochondrial respiratory chain increases FGF21 expression via ATF4 activation. *Biochem Biophys Res Commun* **440**, 76-

81.

124. Kim SH, Kim KH, Kim HK, Kim MJ, Back SH, Konishi M, Itoh N, and Lee MS. (2015) Fibroblast growth factor 21 participates in adaptation to endoplasmic reticulum stress and attenuates obesity-induced hepatic metabolic stress. *Diabetologia* **58**, 809-818.
125. Jiang S, Yan C, Fang QC, Shao ML, Zhang YL, Liu Y, Deng YP, Shan B, Liu JQ, Li HT, Yang L, Zhou J, Dai Z, and Jia WP. (2014) Fibroblast growth factor 21 is regulated by the IRE1 α -XBP1 branch of the unfolded protein response and counteracts endoplasmic reticulum stress-induced hepatic steatosis. *J Biol Chem* **289**, 29751-29765
126. Oyadomari S, Harding HP, Zhang Y, Oyadomari M, Ron D. (2008) Dephosphorylation of translation initiation factor 2 α enhances glucose tolerance and attenuates hepatosteatosis in mice. *Cell Metab* **7**, 520-532
127. Cui H, Darmanin S, Natsuisaka M, Kondo T, Asaka M, Shindoh M, Higashino F, Hamuro J, Okada F, Kobayashi M, Nakagawa K, and Koide H. (2007) Enhanced expression of asparagine synthetase under glucose-deprived conditions protects pancreatic cancer cells from apoptosis induced by glucose deprivation and cisplatin. *Cancer Res* **67**, 3345-55
128. Dey S, Baird TD, Zhou D, Palam LR, Spandau DF, Wek RC. (2010) Both transcriptional regulation and translational control of ATF4 are central to the integrated stress response. *J Biol Chem* **285**, 33165-74
129. Maurin AC, Jousse C, Averous J, Parry L, Bruhat A, Cherasse Y, Zeng H, Zhang Y, Harding HP, Ron D, Fafournoux P. (2005) The GCN2 kinase biases feeding behavior to maintain amino acid homeostasis in omnivores. *Cell Metab* **1**, 273-7
130. Anthony TG, McDaniel BJ, Byerley RL, McGrath BC, Cavener DR, McNurlan MA, Wek RC. (2004) Preservation of liver protein synthesis during dietary leucine deprivation occurs at the expense of skeletal muscle mass in mice deleted for eIF2 kinase GCN2. *J Biol Chem* **279**, 36553-61

131. Liu H, Huang L, Bradley J, Liu K, Bardhan K, Ron D, Mellor AL, Munn DH, McGaha TL. (2014) *Mol Cell Biol* **34**, 428-38
132. Sasaki T, Nakata R, Inoue H, Shimizu M, Inoue J, Sato R. (2014) Role of AMPK and PPAR γ 1 in exercise-induced lipoprotein lipase in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **306**, E1085-92
133. Xu X, Park JG, So JS, Lee AH. (2015) Transcriptional activation of Fsp27 by the liver-enriched transcription factor CREBH promotes lipid droplet growth and hepatic steatosis. *Hepatology* **61**, 857-69
134. Kalaany NY, Gauthier KC, Zavacki AM, Mammen PP, Kitazume T, Peterson JA, Horton JD, Garry DJ, Bianco AC, Mangelsdorf DJ. (2005) LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation. *Cell Metab* **4**, 231-44
135. Vidal-Puig A, Jimenez-linan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman B, Flier JS, Moller DE. (1996) Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest* **97**, 2553-61
136. Gavrilova O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, Nicol CJ, Vinson C, Gonzalez FJ, Reitman ML. (2003) Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem* **278**, 34268-76
137. Rizki G, Arnaboldi L, Gabrielli B, Yan J, Lee GS, Nq RK, Turner SM, Badger TM, Pitas RE, Maher JJ. (2006) Mice fed a lipogenic methionine-choline-deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1. *J Lipid Res* **47**, 2280-90
138. Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, Fu T, Borensztajn J, Green RM. (2008) Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J lipid Res* **49**, 1063-76
139. Fisher FM, Chui PC, Nasser IA, Popov Y, Cunniff JC, Lundasen T, Kharitonov A, Schuppan D, Flier JS, Maratos-Flier E. (2014) Fibroblast

- growth factor 21 limits lipotoxicity by promoting hepatic fatty acid activation in mice on methionine and choline-deficient diets. *Gastroenterology* **147**, 1073-83
140. Uno K, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Ogihara T, Imai J, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko K, Iwasaki H, Ishihara H, Sasano H, Inukai K, Mizuguchi H, Asano T, Shiota M, Nakazato M, Oka Y. (2006) Neuronal pathway from liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity. *Science* **312**, 1656-9
 141. Medina-Gomez G, Gray SL, Yetukuri L, Shimomura K, Virtue S, Campbell M, Curtis RK, Jimenez-Linan M, Blount M, Yeo GS, Lopez M, Seppanen-Laakso T, Ashcroft FM, Oresic M, Vidal-Puig A. (2007) PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism. *PLoS Genet* **3**, e64
 142. Chao L, Marcus-Samuels B, Mason MM, Moitra J, Vinson C, Arioglu E, Gavrilova O, Reitman ML. (2000) Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J Clin Invest* **106**, 1221-8
 143. Gao M, Ma Y, Cui R, Liu D. (2014) Hydrodynamic delivery of FGF21 gene alleviates obesity and fatty liver in mice fed a high-fat diet. *J Control Release* **185**, 1-11
 144. Matsusue K, Kusakabe T, Noguchi T, Takiguchi S, Suzuki T, Yamano S, Gonzalez FJ. (2008) Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPARgamma target gene *Fsp27*. *Cell Metab* **7**, 302-11
 145. Arata D, Harper AE, Svenneby G, Williams JN Jr, Elvehjem CA. (1954) Some effects of dietary threonine, tryptophan, and choline on liver enzymes and fat. *Proc Soc Exp Biol Med* **87**, 544-9
 146. Nino-Herrera H, Harper AE, Elvehjem CA. (1954) Histological differentiation of fatty livers produced by threonine or choline deficiency. *J Nutr* **53**, 469-80
 147. Ericsson A, Turner N, Hansson GI, Wallenius K, Oakes ND. (2014) Pharmacological PPAR α activation markedly alters plasma turnover of the

amino acids glycine, serine and arginine in the rat. *PLoS One* **9**, e113328

148. Namba T, Homan T, Nishimura T, Mima S, Hoshino T, and Mizushima T. (2009) Up-regulation of S100P expression by non-steroidal anti-inflammatory drugs and its role in anti-tumorigenic effects. *J Biol Chem* **284**,4158-67
149. Kadota K, Nakai Y, and Shimizu K. (2008) A weighted average difference method for detecting differentially expressed genes from microarray data. *Algorithms Mol Biol* **3**, 8
150. Walewski JL, Ge F, Lobdell H, Levin N, Schwartz GJ, Vasselli JR, Pomp A, Dakin G, and Berk PD. (2014) Spexin is a novel human peptide that reduces adipocyte uptake of long chain fatty acids and causes weight loss in rodents with diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring)* **22**, 1643-52
151. Jones B, Roberts PJ, Faubion WA, Kominami E, and Gores GJ. (1998) Cystatin A expression reduces bile salt-induced apoptosis in a rat hepatoma cell line. *Am J Physiol* **275**, G723-30
152. Mencin A, Seki E, Osawa Y, Kodama Y, De Minicis S, Knowles M, and Brenner DA. (2007) Alpha-1 antitrypsin Z protein (PiZ) increases hepatic fibrosis in a murine model of cholestasis. *Hepatology* **46**, 1443-52
153. Bochkis IM, Rubins NE, White P, Furth EE, Friedman JR, and Kaestner KH. (2008) Hepatocyte-specific ablation of Foxa2 alters bile acid homeostasis and results in endoplasmic reticulum stress. *Nat Med* **14**, 828-36
154. Bommasamy H, Back SH, Fagone P, Lee K, Meshinchi S, Vink E, Sriburi R, Frank M, Jackowski S, Kaufman RJ, Brewer JW (2009) ATF6alpha induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* **122**, 1626-36
155. Ye D, Wang Y, Li H, Man K, Lo CM, Wang Y, Lam KS, Xu A. (2014) Fibroblast growth factor 21 protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity by potentiating peroxisome proliferator-activated receptor coactivator protein-1a-mediated antioxidant capacity in mice. *Hepatology* **60**, 977-89

156. Contreras AV, Torres N, and Tovar AR. (2013) PPAR- α as a key nutritional and environmental sensor for metabolic adaptation. *Adv Nutr* **4**, 439-452.
157. Uzi D, Barda L, Scaiewicz V, Mills M, Mueller T, Gonzalez-Rodriguez A, Valverde AM, Iwawaki T, Nahmias Y, Xavier R, Chung RT, Tirosh B, Shibolet O. (2013) CHOP is a critical regulator of acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J Hepatol* **59**, 495-503
158. Wan XS, Lu XH, Xiao YC, Lin Y, Zhu H, Ding T, Yang Y, Huang Y, Zhang Y, Liu YL, Xu ZM, Xiao J, Li XK. (2014) ATF4- and CHOP-dependent induction of FGF21 through endoplasmic reticulum stress. *Biomed Res Int* **2014**, 807874
159. Aoyama Y, Kondo H, Ashida K. (1975) Lipid metabolism in the fatty liver of rats fed a threonine-deficient diet. *Agr Biol Chem* **39**, 215-221
160. Lees EK, Kroi E, Grant L, Shearer K, Wyse C, Moncur E, Bykowska AS, Mody N, Gettys TW, Delibegovic M. (2014) Methionine restriction restores a younger metabolic phenotype in adult mice with alteration in fibroblast growth factor 21. *Aging Cell* **13**, 817-27
161. Shimizu N, Maruyama T, Yoshikawa N, Matsumiya R, Ma Y, Ito N, Tasaka Y, Kuribara-Souta A, Miyata K, Oike Y, Berger S, Schutz G, Takeda S, Tanaka H. (2015) A muscle-liver-fat signaling axis is essential for central control of adaptive adipose remodeling. *Nat Commun* **6**, 6693
162. Tanaka N, Takahashi S, Zhang Y, Krausz KW, Smith PB, Patterson AD, Gonzalez FJ. (2015) Role of fibroblast growth factor 21 in the early stage of NASH induced by methionine- and choline-deficient diet. *Biochim Biophys Acta* **1852**, 1242-52
163. Kashireddy PV, Rao MS. (2004) Lack of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mice enhances methionine and choline deficient diet-induced steatohepatitis. *Hepatol Res* **30**, 104-110
164. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M,

Hotamisiligi GS. (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* **420**, 333-6

165. Schattenberg JM, Singh R, Wang Y, Lefkowitz JH, Rigoli RM, Scherer PE, Czaja MJ. (2006) JNK1 but not JNK2 promotes the development of steatohepatitis in mice. *Hepatology* **43**, 163-72
166. Henkel AS, Dewey AM, Anderson KA, Olivares S, Green RM. (2012) Reducing endoplasmic reticulum stress does not improve steatohepatitis in mice fed a methionine- and choline-deficient diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **303**, G54-9

第一章図 1-1 から図 1-8 及び第五章図 5-1 は平成 24 年度修士論文より一部引用した。

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 25 年度博士課程進学
氏名 丸山 竜人
指導教員 佐藤隆一郎

論文題目

小胞体ストレス応答因子による代謝制御機構

序論

食の欧米化や慢性的な運動不足に伴い肥満人口は過去 40 年間で 3 倍となっている。肥満には皮下脂肪型肥満と内臓脂肪型肥満があり過剰な内臓脂肪蓄積による肥満は糖尿病や動脈硬化などの生活習慣病の危険因子であることが知られている。

小胞体ストレスは、小胞体内に異常な立体構造をしたタンパク質が蓄積することで発生する。小胞体ストレスが起こると、ATF6(Activating Transcription Factor 6)、IRE1(Inositol-requiring enzyme 1)、PERK(PKR-like endoplasmic reticulum kinase)の 3 つの小胞体膜上の因子が活性化され、翻訳阻害や分子シャペロンの発現亢進を促し小胞体ストレスを軽減する。高脂肪食やレプチン欠損マウスなどの研究から肥満が慢性的な小胞体ストレスを誘導し、その結果インスリン抵抗性を惹起することが報告されている。また、ケミカルシャペロン投与により小胞体ストレスが軽減すると、肥満によるインスリン抵抗性の改善も報告され小胞体ストレスと生活習慣病との関連が考えられている。

ATF6 α は小胞体ストレスによって活性化される転写因子である。小胞体ストレスが起こると ATF6 α は小胞体膜上からゴルジ体に移行し、転写活性化領域を含む領域が切断され、核内へ移行する(プロセッシング)。さらに、ATF6 α の活性化は血中 LDL コレステロール及び ApoB 分泌を増加させる報告がされている。

FGF21(Fibroblast Growth Factor 21)は主に肝臓で発現する内分泌性の線維芽細胞増殖因子である。絶食時に FGF21 の発現は核内受容体 PPAR α により増加し、脂肪酸代謝の活性化やインスリ

ン抵抗性を改善する。我々は、FGF21 と同じサブファミリーに属する FGF19 の発現が小胞体ストレスにより亢進することを報告している。

これらの結果から、小胞体ストレス応答因子である ATF6 α と脂質代謝及び抗生活習慣病因子 FGF21 と小胞体ストレスとの関連性に着目し、制御機構及び生理的意義の検討を行った。

第一章 小胞体ストレス応答因子 ATF6 α によるコレステロール代謝制御

II 型糖尿病患者や高コレステロール血症患者における ATF6 α の SNP (M67V)は転写活性化能が亢進し、血中 LDL コレステロール及び ApoB 分泌が増加すると報告されている。ATF6 α によるコレステロール生合成遺伝子の発現制御を検討するため、ヒト肝癌由来 Huh7 細胞にアデノウイルスを用いて核内型 ATF6 α を過剰発現し RNA 解析を行った。その結果、ATF6 α の標的遺伝子である BiP と同様にコレステロール合成に重要な HMG-CoA Synthase(HMGCS)、HMG-CoA Reductase(HMGCR)、Squalene Synthase(SQS)などの mRNA の増加が見られた。

次に、ATF6 α による発現制御機構を検証するためコレステロール生合成遺伝子のプロモーター解析を行った。HEK293 細胞にヒトの HMGCS、HMGCR、SQS のプロモーター配列を含むルシフェラーゼプラスミドと核内型 ATF6 α をトランスフェクションルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、ATF6 α によるこれら遺伝子のプロモーター活性の有意な上昇が見られた。

さらに、ATF6 α によるコレステロール合成を検討するため、Huh7 細胞にアデノウイルスを用いて核内型 ATF6 α を過剰発現させ、放射性ラベルされた酢酸を用いて新規コレステロール合成量を測定した。その結果、ATF6 α がコレステロールの新規合成を亢進することが示された。

DNA 配列の解析からコレステロール合成遺伝子のプロモーター領域には ATF6 α の標的配列 (ERSE 配列)は確認されなかったが転写因子 NF-Y の結合配列(CCAAT 配列)が存在した。ATF6 α は NF-Y とヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子の発現を制御することが報告されている。ルシフェラーゼアッセイの結果、HMGCS プロモーター領域上の NF-Y 結合配列の欠失により ATF6 α による転写活性化が見られなくなった。さらにクロマチン免疫沈降法を用いた検討の結果、核内型 ATF6 α は HMGCS、SQS、HMGCR のプロモーター領域の NF-Y 結合部位にリクルートされることが示された。一方、DNA 結合領域を欠失した ATF6 α による HMGCS の遺伝子発現亢進、コレステロール新規合成の亢進、HMGCS のプロモーター領域への結合は見られなかった。以上の結果から、ATF6 α はコレステロール合成遺伝子の発現制御を介してコレステロール合成を促進することが示された⁽¹⁾。

第二章 ストレス刺激における線維芽細胞増殖因子 FGF21 機能解析

小胞体ストレスによる FGF21 の発現を検討するため、マウス初代培養肝細胞に小胞体ストレス誘導剤を処理し mRNA 発現解析を行った。その結果、小胞体ストレスマーカーである BiP と同様に FGF21 の発現が顕著に増加した。また、マウス肝臓においても小胞体ストレスによる FGF21 の誘導が確認された。FGF19 が ATF4 を介して小胞体ストレスにより制御されることや当研究室において見出された大豆タンパク質が ATF4 を介して FGF21 を制御する知見(橋詰力博

士 平成 24 年度博士論文)から小胞体ストレスによる FGF21 発現も ATF4 を介した制御を受けると考えられた。ATF4 の過剰発現やノックダウン、FGF21 プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイの結果 FGF19 と同様に FGF21 は ATF4 を介して発現亢進することを示した。さらに FGF21 プロモーター上には ATF4 結合領域である AARE 配列を 3 か所同定し、FGF21 が ATF4 高感受性因子であることが示唆された⁽²⁾。

次に、FGF21 欠損マウスを用いて FGF21 の小胞体ストレスにおける機能について検討した。野生型(C57BL/6J)及び FGF21 欠損マウスに小胞体ストレス誘導剤を投与したところ、BiP などの小胞体ストレスマーカーの遺伝子発現が野生型マウスと比較して FGF21 欠損において増加していた。またアデノウイルスを用いて FGF21 を過剰発現させたマウスにおいては、小胞体ストレスマーカーの発現低下が見られた。さらに、ストレス誘導性アポトーシス関連因子である CHOP の発現や JNK の活性化が FGF21 によって変動していたことから FGF21 が小胞体ストレス及びストレス誘導性アポトーシスを抑制している可能性が考えられる。

第三章 メチオニン・コリン欠乏食による FGF21 の機能解析

糖尿病や脂肪肝による小胞体ストレスの報告があることから、FGF21 がこれらの病態に関与するかを検討した。非アルコール性脂肪肝誘導食であるメチオニン・コリン欠乏食をマウスに与えた結果、肝臓での FGF21 遺伝子発現及び血中レベルの増加が確認された。またメチオニン・コリン欠乏食を FGF21 欠損マウスに 4 週間摂取させた結果、野生型マウスと比較して肝臓トリグリセリド量の増加が確認された。また、脂質蓄積に関与する PPAR γ 及びその標的遺伝子の肝臓での発現が野生型と比較して FGF21 欠損マウスでは増加した。以上の結果から、FGF21 が PPAR γ を介して肝臓の脂質蓄積に関与することが示唆された。次に、血中及び肝臓のアミノ酸濃度を解析した結果 FGF21 欠損マウスでは野生型マウスと比較してスレオニン濃度が低下していた。スレオニンは抗脂肪肝効果が報告されているため FGF21 とスレオニンの関係性に着目した。アデノウイルスを用いて FGF21 を過剰発現させた FGF21 欠損マウスでは対照群と比較して血中及び肝臓のスレオニン濃度の上昇が見られた。しかし、メチオニン・コリン欠乏食にスレオニン添加した食餌による肝臓のトリグリセリド量の変動は見られなかった。

第四章 ATF4 新規標的遺伝子の探索

第二章で示したように、小胞体ストレス応答因子 ATF4 が FGF21 を標的遺伝子としていることから脂質代謝との関連が示唆された。このため、マイクロアレイ法による ATF4 の新規標的遺伝子の網羅的な探索を行った。マイクロアレイの結果から ATF4 による誘導を受ける上位の遺伝子について ATF4 過剰発現やノックダウン実験等を用いて検証した。その結果、C12orf39、CSTA、CALCB 遺伝子が ATF4 の新規標的遺伝子であることが示唆された。これらの遺伝子のプロモーター領域には ATF4 結合配列である AARE 様配列が存在した。プロモーター解析の結果、ATF4 が C12orf39 プロモーター活性を活性化することが示された。さらに、C12orf39 プロモーター領域の AARE 様配列の欠失や変異によりそのプロモーター活性化が抑制された。以上の結果から、

C12orf39、CSTA、CALCB 遺伝子は ATF4 の新規標的遺伝子であることが示唆され、C12orf39 のプロモーター活性は AARE を介して ATF4 により発現制御を受けることが示された。

第五章 総合討論

本研究において、ATF6 α は NF-Y とヘテロダイマーを形成し、HMGCS などのプロモーター領域にリクルートされ、発現を亢進することでコレステロール合成を増加させることが示唆された。小胞体膜はコレステロールやリン脂質等で構成されており、小胞体ストレスによる小胞体の肥大化が報告されている。今回の研究結果から、ATF6 α は小胞体ストレスに伴う小胞体の肥大化に必要なコレステロール供給に重要な役割を担っていることが推測される。

FGF21 が小胞体ストレスによる BiP の発現抑制や JNK のリン酸化抑制によりストレスを軽減することを示した。小胞体ストレスは脂質代謝とのクロストークが知られ、肥満に伴う JNK の活性化を介した炎症応答を考慮すると、FGF21 が肥満による炎症を抑制している可能性が考えられる。他の FGF21 制御因子である PPAR α のリガンドであるフィブレート系薬剤は抗脂質異常症治療に広く用いられている。FGF21 は ATF4 によっても発現制御を受けるため ATF4 及び PPAR α の活性化による協調的な代謝改善効果が考えられる。

本研究では①小胞体ストレス応答因子 ATF6 α によるコレステロール生合成遺伝子の発現制御を介したコレステロール合成の活性化、②小胞体ストレスによる FGF21 の発現制御、③FGF21 によるストレス軽減効果を示唆した。今後の ATF6 とコレステロール代謝及び FGF21 とストレス応答のさらなる研究の進展及びこれらの知見が脂質代謝異常症の予防治療の改善に貢献することが望まれる。

発表論文

- (1) Maruyama R., Kamoshida Y., Shimizu M., Inoue J., and Sato R.

ATF6 α stimulates cholesterologenic gene expression and de novo cholesterol synthesis.

Biosci. Biotechnol. Biochem. (2013) **77**, 1734-1738.

- (2) Maruyama R., Shimizu M., Li J., Inoue J., and Sato R.

Fibroblast growth factor 21 induction by activating transcription factor 4 is regulated through three amino acid response elements in its promoter region.

Biosci. Biotechnol. Biochem. in press (2016)

謝辞

本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻食品生化学研究室にて行われたものです。

本研究を遂行するにあたり、毎週にわたるディスカッション等におきまして、豊富な知識と長年の研究者としての経験の下、熱心に御指導・御鞭撻下さり、研究者としての姿勢を日々説いて下さった東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻佐藤隆一郎教授に深く感謝するとともに、厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、研究の進捗状況から次に目指す方向性などのアドバイスや本研究に関連のある学術論文の紹介、また学術論文投稿の際にサポートして下さった東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻井上順准教授に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、第一線の研究者としての豊富な知識量から、本研究における実験手法等を指導下さり、また結果に対する考察などあらゆる面で相談に乗って下さった東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻清水誠助教に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、修士課程在籍時から実験手法の指導や実験補助、得られた結果の考察を一緒にして頂くだけではなく実験以外のことにも親身になって相談に乗って下さった東京大学高齢社会総合研究機構橋詰力特任助教に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、小胞体ストレスに関わるプラスミドなどをご供与下さった京都大学大学院理学研究科生物科学専攻森和俊教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、FGF21 欠損マウスをご供与下さった京都大学大学院薬学研究科生命薬科学専攻伊藤信行教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、FGF21 の発現プラスミドをご供与下さった東京大学先端科学技術研究センター稲垣毅特任准教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、マイクロアレイ解析を遂行するにあたりご協力頂きました弘前大学食料科学研究所中井雄治教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、アデノウイルス作成のコントロールウイルス作成に関わるプラスミドをご供与下さった米国テキサス大学サウスウエスタンメディカルセンターの David Mangelsdorf 教授、Steven Kliewer 教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、基礎的な分子生物学的実験手法から経験に基づくアドバイス、考察の仕方など研究を行うに当たって重要なことを教えていただき、研究者として目指す姿を示して下さった佐々木崇研究員、井上聖哉博士に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、修士課程からの 5 年間、様々な面で協力して下さいました宮田慎吾修士、並びに研究を行う上での多くの御指導、御助力、御激励下さり、私の研究室生活を充実したものにして下さった食品生化学研究室の諸先輩後輩方を含めた皆様に感謝いたします。

そして、何よりも影から私の大学院生活・研究生生活を見守り、支え、応援して下さいました家族に対して最大級の感謝を申し上げます。

2015 年 12 月