

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 週間摂食させた結果、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 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 cholesterogenic 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)