

## 論文内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 23 年度博士課程進学  
氏 名 鴨志田 祐己  
指導教員名 秋山 徹

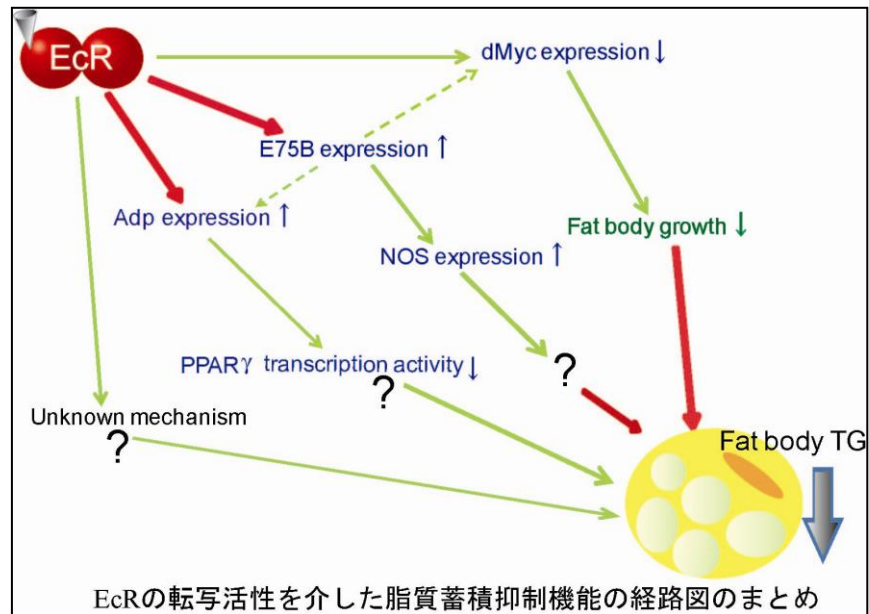
論文題目 モデル生物を用いた新規脂質代謝制御因子の探索・高次機能解析

食の欧米化が進む現代日本において、生活習慣病を発端とした疾病群が死因の多くを占めており、治療法の確立が急務である。そのためには生活習慣病の分子機構を明らかにすることが必須となる。本研究では、ショウジョウバエとマウスという 2 種類のモデル生物を用いて、脂質代謝制御に関わる新規因子の探索系の構築および動物個体における高次機能の分子機構の解明を試みた。

### ○第一章 ショウジョウバエ核内受容体 EcR をモデルとした新規脂質代謝制御因子群の探索の試み

脂肪組織は、脂質を蓄積する重要な器官である。哺乳類から昆虫までの多くの生物が脂質の蓄積・消費を行うことで代謝を制御している。特に昆虫の蛹化において、幼虫期では盛んに合成し、脂肪組織に蓄積させていた脂質を蛹期ではエネルギー源として酸化・消費する、という脂質代謝の反転が生じる。この反転の際には変態ホルモン・エクダイソンが分泌されることから、受容体であるエクダイソンレセプター (EcR) による発現制御を介した生理作用があると考えられるが、EcR を介した脂質代謝制御の報告はほとんどなされておらず、その分子機構は不明である。本研

究では、ショウジョウバエの脂肪組織 Fat body に着目し、EcR が転写依存的に Fat body での脂質蓄積を抑制することを明らかにした。さらに、EcR は Fat body において、E75B, adp, dMyc の転写制御を一部組織特異的に行い、それらの発現制御を介して脂質蓄積を抑制することを示した。この報告は、EcR による脂質代謝制御機構を明



らかにしただけでなく、今後の EcR による転写制御機構の解明や組織特異的な発現制御機構の解明の一助となると期待される。

さらに、EcR が転写依存的に脂質蓄積を抑制しているという結果は、脂質蓄積量を指標とした、新規 EcR 転写制御因子の同定のためのスクリーニングが行えることを示唆している。そこで、本研究では、ショウジョウバエ分子遺伝学を利用し、EcR の転写制御を介して脂質代謝制御を行う新規因子の探索系の構築を試みた。具体的には、一次スクリーニングとして、各遺伝子をノックダウンした際の *in vivo* の脂質蓄積量を、二次スクリーニングとして、E75B, adp, dMyc のプロモーターを用いた *in vivo* Luciferase assay を、三次スクリーニングには各因子の mRNA 量を指標としたスクリーニングを実施することとした。

また、EcR の哺乳類ホモログとして、核内受容体 LXR, FXR が存在する。LXR, FXR は哺乳類において脂質代謝・生活習慣病を制御すると報告されている。今回のスクリーニング系を利用し、新規 EcR 転写制御因子を同定することで、同定因子の哺乳類ホモログを LXR, FXR の新規転写制御因子として見出し、抗生活習慣病の新規標的因子として提示できるのではないかと考えている。

## ○第二章 新規 RNA 結合タンパク質 D8 による寿命・代謝制御機構の解明

D8 は RNA 結合タンパク質であるが、成熟した動物個体内におけるその機能は未知である。本研究において、D8 は p53, TGFβ の新規標的因子として同定され、D8 欠損マウスの作出・解析が行われてきた。その過程で、D8 欠損マウスは有意に寿命が延長し、老化の表現型が改善することを見出した。さらに、この D8 欠損による寿命延長効果は、雄特異的な現象であった。

寿命を延長させる著名な方法として、摂取カロリーの制限がある。このカロリー制限による寿命延長効果に寄与すると報告されている遺伝子が Sirt6 であり、Sirt6 トランスジェニックマウスは雄特異的に寿命が延長するという、D8 欠損マウスと類似した表現型を呈することが報告されている。そこで、D8 も代謝制御を介して寿命延長を制御している、と仮定し、D8 が代謝制御に与える影響を検討した。

まず、D8 欠損マウスの表現系の解析を行った。その結果、D8 欠損マウスは加齢に伴う肥満に抵抗性で、脂肪組織量の顕著な減少が確認された。D8 はマウス、ヒトにおいて、全身にユビキタ

スに発現しているが、絶食・再摂食刺激や肥満負荷による D8 の遺伝子発現量の変化は、脂肪組織において顕著に認められた。以上の結果から、D8 の代謝機能臓器を脂肪組織であると考え、さらなる解析を行った。

まずは、*in vitro*における脂肪細胞分化誘導実験を、D8 をノックダウンさせた 3T3-L1 細胞、および D8 欠損マウス由来の MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) を用いて行った。その結果、D8 のノックダウン・欠損は、脂肪細胞分化の主要調整因子である PPAR $\gamma$ シグナルを抑制し、脂肪細胞分化誘導を抑制することが明らかになった。この結果は、*in vivo*の D8 欠損雄マウスの内臓脂肪組織において PPAR $\gamma$ シグナルが減弱していたことと一致した。以上の結果から、D8 は PPAR $\gamma$ シグナルの制御を介して脂肪細胞分化を制御することが明らかになった。

続いて、D8 欠損マウスの表現型の詳細な解析に移った。血液成分の解析の結果、糖尿病マーカーとして用いられているヘモグロビン A1c (HbA1c) が D8 欠損雄マウスで低下していたことから、D8 欠損雄マウスではインスリン感受性が亢進している可能性が示唆された。そこで、D8 欠損雄マウスにおけるインスリン感受性を検討するために、GTT (Glucose Tolerance Test)、ITT (Insulin Tolerance Test) を行った。その結果、D8 欠損老齢雄マウスはインスリン感受性が亢進していることが明らかになった。一方で、D8 欠損老齢雌マウスではインスリン感受性に差は認められず、寿命延長効果と関連した結果が得られたことから、寿命とインスリン感受性のクロストークが示唆された。続いて、D8 欠損雄マウスの脂肪組織におけるインスリン感受性の亢進を分子レベルで確認した。その結果、D8 欠損雄マウスの脂肪組織ではインスリン刺激によって、インスリンシグナルが強く活性化されていたことから、D8 欠損雄マウスはインスリン感受性が亢進していることが示された。さらに、このインスリンシグナル活性化の促進は、D8 欠損マウス由来の MEF に対するインスリン刺激においても確認された。以上の結果より、D8 欠損マウスではインスリン感受性が亢進していることが明らかになった。

続いて、D8 によるインスリン感受性の制御機構の検討を行った。近年、肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージの浸潤・炎症系サイトカインの分泌と小胞体ストレスの惹起がインスリン抵抗性の原因である、と考えられている。しかしながら、種々の実験結果から、D8 欠損マウスにおけるインスリン感受性亢進の原因が、マクロファージ・炎症系サイトカインにある可能性は低いことが示唆された。また、D8 欠損マウスにおいて、小胞体ストレスが軽減している傾向は得られたものの、D8 が直接小胞体ストレスシグナルを制御していることを示唆する結果は得られなかった。

ヒトにおける治験から、肥満のみならず、老化も糖尿病の原因になりうるということが示唆されている。また、老化を模倣し、脂肪組織に対して Senescence を誘導させたマウスは、インスリン抵抗性を呈することが報告されている。このことから D8 欠損マウスの脂肪組織では、Senescence が軽減され、その結果、インスリン感受性が亢進していることが考えられた。そこでまず D8 欠損マウスの脂肪組織において Senescence のマーカー遺伝子の発現量を検討した。その結果、加齢に伴う Senescence マーカー遺伝子の発現誘導は、D8 欠損老齢雄マウスにおいて抑制されることが認められた。さらに、MEF に対して継代操作を繰り返すことで誘導される Senescence に対しても、D8 欠損による軽減効果が認められた。続いて、この Senescence の抑制が、インスリン感受性を制御していることを検討するため、Early passage と Late passage の野生型および D8 欠損マウス由来の MEF におけるインスリンシグナルを検討した。その結果、野生型の MEF では Late passage においてインスリンシグナルの減弱が確認されたが、D8 欠損の MEF ではこの減

弱が緩和されていた。以上の結果から、D8 欠損マウスの脂肪組織では Senescence が軽減されており、それによってインスリン感受性が亢進している可能性が示された。

続いて、D8 がカロリー制限による寿命延長に寄与するかを検討するため、野生型マウスに対してカロリー制限を行い、代謝臓器における D8 の発現量を検討した。その結果、D8 の発現は内臓脂肪組織において、mRNA、タンパク質レベルの両方でカロリー制限によって減少することが認められた。さらに、D8 欠損マウスの脂肪組織において認められた小胞体ストレスと Senescence のマーカー遺伝子の発現抑制が、カロリー制限を行ったマウスの脂肪組織においても確認された。以上の結果より、D8 欠損マウスはカロリー制限を模倣して寿命延長効果を発揮するとともに、カロリー制限による寿命延長効果は、D8 の発現抑制を介する可能性が示唆された。

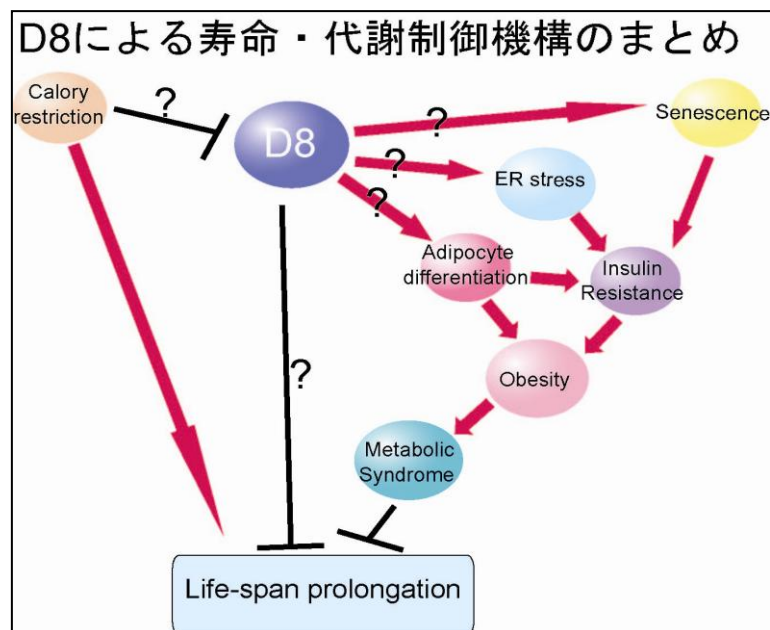
最後に、D8 が実際に抗肥満・糖尿病の治療の標的となりうるのかを検討するため、D8 欠損雄マウスに対して高脂肪食負荷を行い、インスリン感受性を検討した。その結果、D8 欠損雄マウスは高脂肪食負荷に伴う肥満に対して抵抗性を持つとともに、インスリン感受性の悪化が緩和されていることが示された。

以上の結果より、D8 は脂肪組織において

①PPAR $\gamma$ シグナル制御を介した脂肪細胞分化の制御

②小胞体ストレスや Senescence の誘導を介したインスリン抵抗性の惹起

を行うことが示唆された。D8 欠損マウスは上記の D8 の機能がないために、肥満に対して抵抗性を有し、寿命が延長していることが示唆された。今後は、D8 がどのような分子機構で PPAR $\gamma$ シグナルの制御や、小胞体ストレスや Senescence の誘導を行っているのかを、MS や RIP-seq を用いた D8 の結合タンパク質および結合 RNA の同定・解析を通じて明らかにしたいと考えている。今後、さらに研究を重ね、抗肥満・糖尿病の治療の新規標的因子として D8 を提唱していきたいと考えている。



## 発表論文

**Kamoshida Y.**, Fujiyama-Nakamura S., Kimura S., Suzuki E., Lim J., Shiozaki-Sato Y, Kato S. and Takeyama K. *Biochem Biophys Res Commun.* 421:203-7. (2012)