

博 士 論 文

ChREBP アイソフォームによる
糖・脂質代謝関連遺伝子の転写制御機構

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 26 年度 応用生命工学専攻 修了

井上 聖哉

指導教員 佐藤 隆一郎

目次

◆ 略語一覧	1
◆ 第一章 序論	5
◆ 第二章 ChREBP アイソフォームの組織分布と機能	23
● 第一節 ChREBP アイソフォームの組織分布	
● 緒言	24
● 実験方法	25
● 結果	35
● 第二節 ChREBP アイソフォームの転写活性	
● 緒言	45
● 実験方法	46
● 結果	54
● 第三節 ChREBP アイソフォームによる ChREBPβの転写制御	
● 緒言	63
● 実験方法	64
● 結果	68
● 考察	77
◆ 第三章 ChREBPβの発現が脂肪肝の進行に及ぼす影響	
● 緒言	83
● 実験方法	84
● 結果	92
● 考察	114

◆ 第四章 ChREBPβの発現が変動しうる食事内容の探索	118
● 第一節 食事中の糖質・脂質が ChREBPβの発現に与える影響	
● 緒言	119
● 実験方法	120
● 結果	122
● 第二節 フルクトース長期摂取時の肝臓における ChREBPβの発現変動	
● 緒言	138
● 実験方法	140
● 結果	143
● 考察	158
◆ 第五章 総合討論	166
◆ qPCR 用プライマー表 (Table I, II, III)	174
◆ 引用文献	178
◆ 要旨	195
◆ 謝辞	199

略語一覽

略語 (A~E)	正式名称
ACC	Acetyl-CoA Carboxylase
ALT	Alanine Aminotransferase
AMPK	AMP-activated Kinase
AST	Aspartate Aminotransferase
bHLH-zip	Basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper
BSA	Bovine Serum Albumin
CDTA	Trans-1,2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid
CE	Cholesterol Ester
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
ChoRE	Carbohydrate Response Element
ChREBP	Carbohydrate Response Element-Binding Protein
CMV	Cytomegalovirus
CPT1a	Carnitine Palmitoyltransferase 1a
Ct	Threshold Cycle
CT	Computed Tomography
CYP7A1	Cytochrome P450 Family 7 Subfamily A Polypeptide 1
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DR-1	Direct Repeat-1
DTT	Dithiothreitol
E.WAT	Epididymal White Adipose Tissue
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
ELOVL6	Elongation of Very Long Chain Fatty Acids 6

略語 (F~L)	正式名称
FASN	Fatty Acid Synthase
FBS	Fetal Bovine Serum
Fig	Figure
G6PC	Glucose 6 Phosphatase Catalytic Subunit
GK	Glucokinase
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamine
GLUT2	Glucose Transporter 2
GRACE	Glucose Response Activation Conserved Element
H3K9Ac	Acetyled Histone H3 Lysine 9
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HC diet	High-Carbohydrate diet
HFCS	High Fructose Corn Syrup
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-CoA
HMGCR	Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase
HMGCS	Hydroxymethylglutaryl-CoA Synthase
HNF-4 α	Hepatocyte Nuclear Factor-4 α
HPC	Hepatic Parenchymal Cell
HRP	Horseradish Peroxidase
IP	Immunoprecipitation
IPTG	Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside
JSG-NAFLD	Japan Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Study Group
KHK	Ketohexokinase: Fructokinase
LacZ	β -Galactosidase
LID	Low Glucose Inhibitory Domain
LPK	Liver Type Pyruvate Kinase
Luc	Luciferase
LXR	Liver X Receptor

略語 (M~Q)	正式名称
ME	Malic Enzyme
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
MEM	Minimal Essential Medium
MGAM	Maltase-Glucoamylase
MLX	Max-like protein X
MOI	Multiplicity of Infection
MOPS	3-N-Morpholino-Propanesulfonic Acid
MTP	Microsomal Triglyceride Transfer Protein
Mw	Molecular Weight
NAFLD	Non-Alcoholic Fatty Liver Disease
NASH	Non-Alcoholic Steatohepatitis
NEFA	Non-Esterified Fatty Acid
NES	Nuclear Export Signal
NLS	Nuclear Localization Signal
nPCs	Non-Parenchymal Cells
O-GlcNAc	O-linked β -N-Acetylglucosamine
ONPG	O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCI	Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylene Glycol
PFU	Plaque-Forming Unit
PGC1	PPAR γ Coactivator
PKA	Protein Kinase A
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PVDF	Polyvinyliden Difluoride
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction

略語 (R~Z)	正式名称
RNA Pol II	RNA Polymerase II
ROI	Region of Interest
RT	Reverse Transcription
RT-qPCR	Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction
SCD1	Steroyl-CoA Desaturase 1
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SE	Standard Error
SGLT1	Sodium-dependent Glucose Cotransporter 1
SI	Sucrase-Isomaltase
Soy.oil	Soybean oil
SREBP	Sterol Regulatory Element-Binding Protein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylenediamine
TG	Triacylglycerol
THRSP	Thyroid Hormone Responsive Protein (SPOT14)
TR	Thyroid Hormone Receptor
TXNIP	Thioredoxin Interacting Protein
VEGFR2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WAT	White Adipose Tissue
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside
Xu5P	Xylulose-5-Phosphate

第一章 序論

すべての生物は、外部環境の変化に対応して自身の代謝を調節することによりその変化に適応している。このような外部環境の変化の一つに栄養環境の変化が挙げられる。生物の要求する栄養素は常に得られるとは限らないため、生物は代謝調節を行なうことにより、栄養素の貯蔵と利用を繰り返し、外界の栄養環境の変化に対応している。

ヒトを含めた哺乳動物において、栄養素の貯蔵・利用に特に重要な器官は肝臓と脂肪組織である。これらの器官は、栄養が豊富な時にはその栄養素を脂肪という形で蓄えておき、栄養が枯渇した時には蓄えていた脂肪をグルコースなどに変換し血液中に放出することで、他の組織へエネルギーを供給する。この代謝調節機能は、エネルギーを効率良く利用するという点で生物の生命維持に極めて有利に働く。しかし飽食の時代といわれる現代においては、エネルギーの過剰摂取や運動不足などにより、肝臓や脂肪組織に過剰な脂肪が蓄積し、様々な代謝性疾患が引き起こされることが問題となっている。

特に、肝臓に過剰な脂肪が蓄積する脂肪肝は、慢性的な炎症状態を肝臓にもたらすため、肝炎や肝硬変、肝臓がんなどの重篤な肝疾患の原因となる。更に、脂肪肝によって肝臓の代謝機能が低下すると、脂質異常症や糖尿病といった代謝性疾患が惹起される。日本人成人の2~3割が脂肪肝を患っていると考えられており、脂肪肝はわが国の国民病の一つと捉えられている。

ChREBP (Carbohydrate Responsive Element-Binding Protein) は、解糖系・脂質生合成系酵素遺伝子の発現を誘導することで、糖質から脂肪への変換を促進する糖応答性転写因子である。糖質の過剰摂取に伴う脂肪肝の進行には、**ChREBP** を介した糖・脂質代謝の制御が重要な役割を担っていると考えられる。

そこで本研究では、肝臓における **ChREBP** を介した糖・脂質代謝制御機構に焦点を当てた。この機構に関する詳細な検証を行ない、新たな知見を加えることで、脂肪肝の予防・治療法の開発に貢献できると考えられる。

以降では、脂肪肝の成因と肝臓における糖・脂質代謝の概要、ChREBP の機能に関する知見を記した後に、本研究の目的を述べる。

- 脂肪肝の定義と成因

脂肪肝とは、肝臓に過剰な脂肪が蓄積した状態のことを指す。脂肪肝の厳密な定義は無いが、「中性脂肪重量が肝臓湿重量の 10%を超える状態」あるいは「全ての肝小葉の 1/3 の領域にわたって肝細胞に脂肪蓄積が認められる状態」と日本消化器病学会は定めている [1]。脂肪肝の診断基準は医療機関によって様々ではあるが、一般的には血液生化学検査で肝傷害マーカーの AST (Aspartate Aminotransferase) 活性や ALT (Alanine Aminotransferase) 活性が高値であった者に対して、腹部エコーや CT (Computed Tomography) による画像診断を行ない脂肪肝の有無を決定する。肝炎を併発している可能性がある場合には、肝生検により組織学的に脂肪肝と肝炎の重症度の判定を行なう [2]。

近年、先進国において、飲酒習慣が無いにも関わらず脂肪肝を呈する非アルコール性脂肪肝 (NAFLD: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) の患者が増加傾向にある [3,4]。わが国においては、JSG-NAFLD (Japan Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Study Group) が多施設参加大規模臨床疫学調査による NAFLD 研究を進めている。この研究グループが行なった臨床疫学調査によると、2009～2010 年に健康診断を受けた日本人のうちの約 3 割が NAFLD を患っている事が報告されている (Fig.1-1) [5]。NAFLD が進行すると、肝臓の代謝機能が低下することで脂質異常症、高血圧症、糖尿病などが誘発されるとともに、肝細胞の傷害や白血球の浸潤が誘導され、炎症や肝硬変を伴う非アルコール性脂肪肝炎 (NASH: Non-Alcoholic Steatohepatitis) が引き起こされる [6-9]。日本人の死因の大部分が肝疾患を含めた代謝性疾患に起因するため、NAFLD の予防・治療に向けた即急な対策が求められている [10]。

NAFLD の原因の一つは、過食に伴うエネルギーの過剰摂取である。特に、スクロース (砂糖) やフルクトース (果糖) は肝脂肪として蓄積されやすい糖類である [11,12]。我々日本人が食物から摂取するエネルギーの約 6 割は糖質で占められていることから、上記のような「肝脂肪として蓄積しやすい糖類の過剰摂取」が日本人の脂肪肝の一因であると考えられる [13,14]。そのため、糖質摂取に伴う過剰な肝脂肪蓄積を食い止めることが、NAFLD に起因する様々な代謝性疾患の予防に有効である。

続いて、食物から摂取した糖質が肝脂肪として蓄積するまでの一連の工程を概説する。

- 肝臓を構成する細胞とその機能

肝臓は栄養素の代謝調節に重要な役割を果たす消化器官の一つであり、この臓器は多くの種類の細胞で構成されている。通常、肝細胞と呼ばれる細胞は肝実質細胞のことを指す。ヒトやげっ歯類においては、肝臓を占める細胞のおよそ6割は肝実質細胞であり、この細胞が栄養代謝の中核を担う。食物から摂取した糖質を肝脂肪へ変換して備蓄する役割を担っているのは、肝実質細胞である。それ以外の細胞は非実質細胞と呼ばれ、異物処理を担うクッパー細胞や肝類洞（肝細胞索間を走行する血管）を構成する類洞内皮細胞などがこれに含まれる [15,16]。

- 食物から摂取した糖質の体内での流れ

ヒトのエネルギー源として重要な糖質はグルコースとフルクトースである。グルコースは主にデンプンの形で、フルクトースはショ糖（スクロース）や異性化糖（果糖ブドウ糖液糖など）の形で食物として摂取される。これらの糖質は、小腸管腔内で消化酵素（二糖類水解酵素）による分解を受けて単糖に変換され、単糖輸送担体を介して小腸上皮細胞に取り込まれて門脈へ移行する。門脈へ流れた単糖の一部は肝臓に取り込まれ、残りは下大静脈へ合流して末梢組織へと運搬される。各々の組織の細胞に取り込まれた単糖は解糖系やクエン酸回路を経て、エネルギー源あるいは細胞構成物質として利用される。

- 糖質から脂肪が合成されるまで

一連の工程の概略図を Fig.1-2 に記した。肝実質細胞における単糖の取り込みは主に促進拡散型糖輸送担体 GLUT2 (Glucose Transporter 2) を介して行なわれる。グルコースは GK (Glucokinase) によって、フルクトースは KHK (Ketoheokinase、別名：フルクトキナーゼ) によってリン酸化される。リン酸化された単糖の一部はグリコーゲンとして蓄えられるが、残りは幾つかの化学反応を経てホスホエノールピルビン酸に変換され、LPK (Liver Type Pyruvate Kinase) による脱リン酸化を介してピルビン酸となる。ピルビン酸はミトコンドリアへ輸送された後に Acetyl-CoA へ変換され、クエン酸回路に導入されて

ATP 産生に利用される。細胞内に取り込まれた単糖がピルビン酸に変換されるまでの一連の工程を解糖系 (Glycolysis) と呼ぶ。

ATP が過剰な条件下では、Acetyl-CoA は脂質生合成の基質として利用される。解糖系を経由して合成された Acetyl-CoA は ACC (Acetyl-CoA Carboxylase) によってカルボキシ化され、Malonyl-CoA へと変換される。合成された Malonyl-CoA と Acetyl-CoA は、FASN (Fatty Acid Synthase) によって炭素鎖が伸長されて脂肪酸 (Fatty Acid) が合成される。FASN によって合成される脂肪酸は炭素数 16 のパルミチン酸が主であるが、SCD (Steroyl-CoA Desaturase) によって不飽和化されて一価不飽和脂肪酸 (オレイン酸) へ変換されたり、ELOVL6 (Elongation of Very Long Chain Fcids 6) により長鎖化されて炭素数 18 以上の脂肪酸へ変換される。ここまでに記した Acetyl-CoA から脂肪酸が合成される一連の経路を脂質生合成系 (Lipogenesis) と呼ぶ。このようにして合成された脂肪酸は Acyl-CoA に変換された後に、グリセロールを骨格として連結し、TG (Triacylglycerol: 中性脂肪) として細胞質の脂肪滴に蓄えられる。

また、Acetyl-CoA の一部はコレステロール生合成 (Cholesterol Biosynthesis) にも利用される。チオラーゼや HMGCS (Hydroxymethylglutaryl-CoA Synthase) によって Acetyl-CoA が縮合し、HMG-CoA (Hydroxymethylglutaryl-CoA) が合成される。次いで、コレステロール生合成の律速酵素である HMGCR (Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase) によって HMG-CoA が還元されてメバロン酸となる。その後幾つかの化学反応を経て合成されたコレステロールは、CE (Cholesterol Ester: コレステロールエステル) の形で脂肪滴に蓄えられる。

上記の過程で合成された TG や CE の一部は、MTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein) によってアポリポタンパク質 (ApoB) と結合してリポタンパク質となり、VLDL (Very Low Density Lipoprotein) の形で肝臓から分泌されて末梢組織へ届けられる。肝臓における脂肪の異常蓄積は、以上に記した脂肪の合成と排出のバランスが崩れることで引き起こされる。

- 糖・脂質代謝関連遺伝子の制御

肝臓において糖質が脂肪に変換される一連の過程は、上記の解糖系・脂肪酸合成系酵素の発現量を調節することで厳密に制御されている。血糖調節に関連するホルモンや栄養素自身がこれらの酵素の発現制御に関与する。例えば、糖質の摂取により血糖値が上昇すると、速やかに膵β細胞からインスリンが分泌

される。インスリンは肝臓の解糖系・脂質生合成系酵素の発現を誘導し、糖新生に関与する酵素の遺伝子発現を抑制する [17]。

インスリンによる脂質生合成系酵素遺伝子の発現誘導は SREBP-1c (Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c) を介することがこれまでに明らかになっている [18]。SREBP-1c は ACC や FASN 等の脂質生合成系酵素遺伝子を標的とする転写因子であるが、不活性型の Precursor form としてタンパク合成され、プロセッシングを受けて活性型の Mature form になることでこれらの遺伝子の転写を誘導する [19,20]。インスリンはこの SREBP-1c プロセッシングの過程を促進することで肝臓における脂質生合成を誘導する [21]。実際に、肝臓特異的に活性型 SREBP-1c を過剰発現するトランスジェニックマウスでは、肝臓における脂肪酸合成量と TG 蓄積が亢進し脂肪肝が進行する [22]。逆に、SREBP-1c 肝臓特異的欠損マウスでは、肝臓における脂質生合成系酵素の発現減少が見られる [23]。それゆえ、肥満に伴って脂肪肝が進行する過程には、高インスリン血症によって肝臓の SREBP-1c プロセッシングが誘導される一連の経路が関与している。

しかし、糖質摂取に伴う糖・脂質代謝関連遺伝子の誘導は、インスリンのみでなく糖質自身によっても生じうる [24]。例えば、微量のインスリンを含む高グルコース培地中で肝実質細胞を初代培養すると、低グルコース培地中で培養した場合と比較して、ACC1、FASN、SCD1、LPK といった糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量が増大する [25,26]。また、SREBP-1c 欠損マウスに高糖質食を摂取させた際にも、これらの遺伝子の発現は誘導される [23]。これらの点から、糖質摂取に伴う糖・脂質代謝関連遺伝子の発現誘導には「SREBP-1c とは異なる別の制御機構」が関与すると考えられてきた。

上記の糖・脂質代謝関連遺伝子のプロモーターおよびエンハンサー領域には、2つの E-box (CACGTG) 様配列の間に5つの任意の塩基が挟まれたコンセンサス配列 ChoRE (Carbohydrate Responsive Element) が保存されていることが以前から知られていた [27,28]。これを手がかりに、「ChoRE へ結合し、糖刺激によって活性が制御される糖応答性転写因子」として同定されたタンパク質が ChREBP である [29]。

- ChREBP の構造と機能

ChREBP は 864 残基のアミノ酸よりなる bHLH-zip (Basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper) 型の転写因子であり、いくつかの機能ドメインを有している。ChREBP のタンパク質構造と結合タンパク質、翻訳後修飾部位を Fig.1-3 に記した。ChREBP の機能に特に重要なドメインとして、核局在に関与する低グルコース阻害ドメイン LID (Low Glucose Inhibitory Domain) がアミノ末端領域に、ChoRE との結合に関与する bHLH-zip ドメインがカルボキシル末端領域に存在する。このほかに、グルコースシグナルを介した転写活性化に関与する複数の翻訳後修飾部位を有している [30]。

ChREBP はユビキタスに発現するが、特に肝臓、小腸、脂肪組織、骨格筋および腎臓で高発現である [31]。全身性 ChREBP ノックアウトマウスでは通常マウスと比較して、各組織の糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量が低下するとともに、肝臓 TG 量や脂肪組織重量が著しく減少する [31]。また、肥満モデルマウス (ob/ob mouse) において肝臓特異的に ChREBP の発現を欠損すると、脂肪肝が抑制され耐糖能が改善する [32]。一方で、ChREBP を過剰発現させたマウスに高脂肪食を摂取させると、肝臓における脂質生合成系酵素の発現増大に伴って脂肪肝が進行する [33]。これらの点から、ChREBP は過食に伴う脂肪肝の進行に重要な役割を担っていることが想定される。

- ChREBP の標的遺伝子

ChREBP の標的と考えられている糖・脂質代謝関連遺伝子を Table.1-1 に示した。これまでも述べてきたとおり、ChREBP が標的とする遺伝子には糖・脂質代謝に関連する遺伝子が多く含まれている。

その中でもよく研究がされているものは、解糖系律速酵素 LPK [29]、脂質生合成系律速酵素 ACC1 [28]、ならびに FASN [34]である。これらの遺伝子はプロモーターあるいはエンハンサー領域内の ChoRE が同定されており、これらの ChoRE に対する ChREBP の結合が実際の肝臓でも見られることが ChIP assay (クロマチン免疫沈降法) によって確認されている [35]。フルクトース代謝律速酵素 KHK [36]、単糖輸送担体 GLUT2 [31] および GLUT4 [37]、脂肪酸不飽和化酵素 SCD1 [33]、脂肪酸伸長酵素 ELOVL6 [38]、糖新生系律速酵素 G6PC [39] は上記の遺伝子ほど詳細な検証はされていないが、遺伝子上流に ChoRE 様配列が存在し、ChREBP の発現や活性の変動と同調して発現量が変動

することから、ChREBP の標的遺伝子である可能性が高いと考えられている。

以上、代表的な ChREBP の標的遺伝子を挙げたが、これらのラインナップを見ても分かるように、「糖質を利用して脂肪を合成する代謝反応を制御すること」が ChREBP の主な役割である。

- ChREBP の活性制御機構

グルコースシグナルを介した ChREBP の活性制御機構を Fig. 1-4 に記した。ChREBP の転写活性はアミノ酸残基側鎖の翻訳後修飾によって制御される [40]。その中でも特に重要なものが、セリン/スレオニン残基のリン酸化修飾である。細胞内へのグルコースの流入は、ChREBP の脱リン酸化を引き起こすことで ChREBP の活性化をもたらす。そのメカニズムは現在のところ以下のように考えられている。

細胞内のグルコース濃度が低い時、ChREBP はリン酸化された状態で細胞質に存在している。糖質摂取に伴う血中グルコース濃度の上昇により細胞内へ流入したグルコースは、ヘキソキナーゼ (肝臓ではグルコキナーゼ) によるリン酸化を受けて解糖系に入る。その一部は、ペントースリン酸経路を介してキシロース-5-リン酸 (Xu5P: Xylulose-5-Phosphate) に変換され、これが PP2A (Protein Phosphatase 2A) を活性化することで ChREBP の脱リン酸化を引き起こす [29,41]。脱リン酸化された ChREBP は、NLS に核内移行キャリアタンパク Importin が結合して核内へ移行する [42]。それと共に、ChREBP の bHLH-Zip ドメインが MLX (Max-like protein X) と相互作用することで bHLH-zip モチーフを形成し、応答配列である ChoRE へ結合する [43,44]。ChREBP-MLX 複合体はヒストンアセチル化酵素 p300 をリクルートすることで、標的遺伝子周辺のクロマチン構造を弛緩させて転写反応を促進すると考えられる [45]。

一方で、絶食に伴う血糖値の低下により膵 α 細胞から分泌されるグルカゴンは、シグナルの下流に存在する cAMP 依存性プロテインキナーゼ PKA (Protein Kinase A) を活性化することで ChREBP をリン酸化する。リン酸化された ChREBP は、アミノ末端領域の LID に核外移行キャリアタンパク Crm1 (Exportin 1) および 14-3-3 が結合して核外へ運び出され、不活性型として細胞質に局在する [46,47]。実際、高糖質食を再摂食させたマウスの肝細胞では ChREBP が核内に局在するが、これにグルカゴンを投与すると ChREBP のリン酸化が亢進し、核内の ChREBP 存在量が減少する [48]。また、ChREBP のリ

ン酸化は AMPK (AMP-Activated Kinase) によっても引き起こされる [49]。細胞内のエネルギー不足を感知した AMPK が ChREBP をリン酸化を介して、エネルギー物質の同化を抑制するものと考えられる。PKA と AMPK はそれぞれ異なる部位のセリン/スレオニン残基をリン酸化するが、これまでに報告されているリン酸化修飾は概して ChREBP を不活性化し、脱リン酸化は ChREBP を活性化する方向に働く。このほか、詳細なメカニズムや生理的な意義は不明な点が多いが、リジン残基のアセチル化修飾やセリン残基の O-GlcNAc (O-Linked β -N-Acetylglucosamine) 化修飾は ChREBP を活性化することが報告されている [50–52]。

このように、ChREBP の機能と活性制御機序は徐々に解明されつつあるが、ChREBP 遺伝子自身の発現制御機構には未だ不明な点が多い。

- LXR を介した ChREBP 遺伝子の転写制御

グルコース投与により肝臓における ChREBP 自身の遺伝子発現量も増大することが以前から報告されている [53]。このような機構には核内受容体型転写因子 LXR (Liver X Receptor) が関与していると考えられてきた。

LXR は、コレステロール代謝や胆汁酸合成を制御する転写因子である。この転写因子は、コレステロール異化酵素 CYP7A1 (Cytochrome P450 Family 7 Subfamily A Polypeptide 1) や、FASN、ACC などの脂質生合成系酵素の遺伝子発現を誘導する [54]。2007 年になって、ChREBP 遺伝子のプロモーター領域に LXR 結合配列が存在することが判明し、ChREBP は LXR の直接的な標的遺伝子であることが報告された [55]。しかし、LXR ノックアウトマウスに高糖質食を摂食させた際も、肝臓における ChREBP およびその標的遺伝子の発現誘導が認められる [48]。このことから、糖質摂取に伴う ChREBP 遺伝子の発現誘導は、LXR シグナルとは別の機構によって制御されることが示唆された。

最近になって、これらのメカニズムを解き明かす手がかりとなる「ChREBP アイソフォーム」の存在が報告された。

- ChREBP アイソフォーム (ChREBP α / ChREBP β) について

2012 年、Mark A. Herman らは、従来までに報告されてきた ChREBP とは異なるタンパク質構造を有する新規 ChREBP アイソフォームを発見し、これが脂肪組織における糖・脂質代謝に重要な役割を担うことを報告した [56,57]。そ

れ以降、これまでに報告されていた ChREBP アイソフォームは ChREBP α 、新規 ChREBP アイソフォームは ChREBP β と区別して呼ばれるようになった。(したがって、上記まで述べてきた ChREBP に関する知見は、すべて ChREBP α によるものである。これ以降は、ChREBP α と ChREBP β を区別して話を進める)

ChREBP β について明らかになっていることは以下の4点である。

①ChREBP α とは異なる転写開始点から ChREBP β の mRNA が転写される。

マウス白色脂肪組織の cDNA を用いた 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法により、ChREBP β の mRNA 全塩基配列が決定された。それによると、ChREBP α mRNA は ChREBP 遺伝子の既知の第一エクソンである「Exon 1a」から転写が開始されるのに対し、ChREBP β は Exon 1a より 17 kb ほど上流の「Exon 1b」から転写が開始され、Exon 1a をスキップして Exon 2 と連結した形でスプライシングされた上で転写される (Fig.1-5A)。ChREBP α と ChREBP β の mRNA の違いは第一エクソンの配列のみである [56]。

②ChREBP β は ChREBP α と比べて転写活性が極めて高い。

上記のように ChREBP α と ChREBP β の mRNA の違いは第一エクソン配列のみであるが、この僅かな違いが ChREBP アイソフォームの転写活性に劇的な違いをもたらす。「Exon 1a」には開始コドン (ATG) が含まれるが、「Exon 1b」には開始コドンが含まれない。そのため、ChREBP β の mRNA は第四エクソンの中ほど (178 アミノ酸残基) から翻訳が開始される。翻訳された ChREBP β タンパク質はアミノ末端側の低グルコース阻害ドメイン LID を有さず、常時核内に局在するために転写活性が極めて高いと考えられる (Fig.1-5B)。実際に、ACC1-ChoRE タンデム配列を用いたレポーターアッセイにおいて、ChREBP α と比べて ChREBP β は転写活性が極めて高いことが示されている (Fig. 1-6A)。また、ChREBP β は低グルコース下においても核内に局在することが免疫染色法により示されている (Fig.1-6B) [56]。

③ChREBP β mRNA の転写は ChREBP α の活性化によって誘導される。

「Exon 1b」の下端には ChoRE、上流には E-box が存在している。これらの配列を含む ChREBP β プロモーターのレポーターアッセイを行なった結果、高グルコース下で ChREBP α が活性化されるとプロモーター活性が増大し、ChoRE あるいは E-box に変異を入れた場合はこれらの作用がキャンセルされることが示された (Fig.1-7) [56]。以上の結果は、ChREBP β は ChREBP α の標的遺伝子

であることを示しており、前頁で記したグルコースシグナルによる ChREBP 遺伝子の発現増大は「ChREBP α の活性化に伴う ChREBP β の転写誘導」に起因することを示唆する。

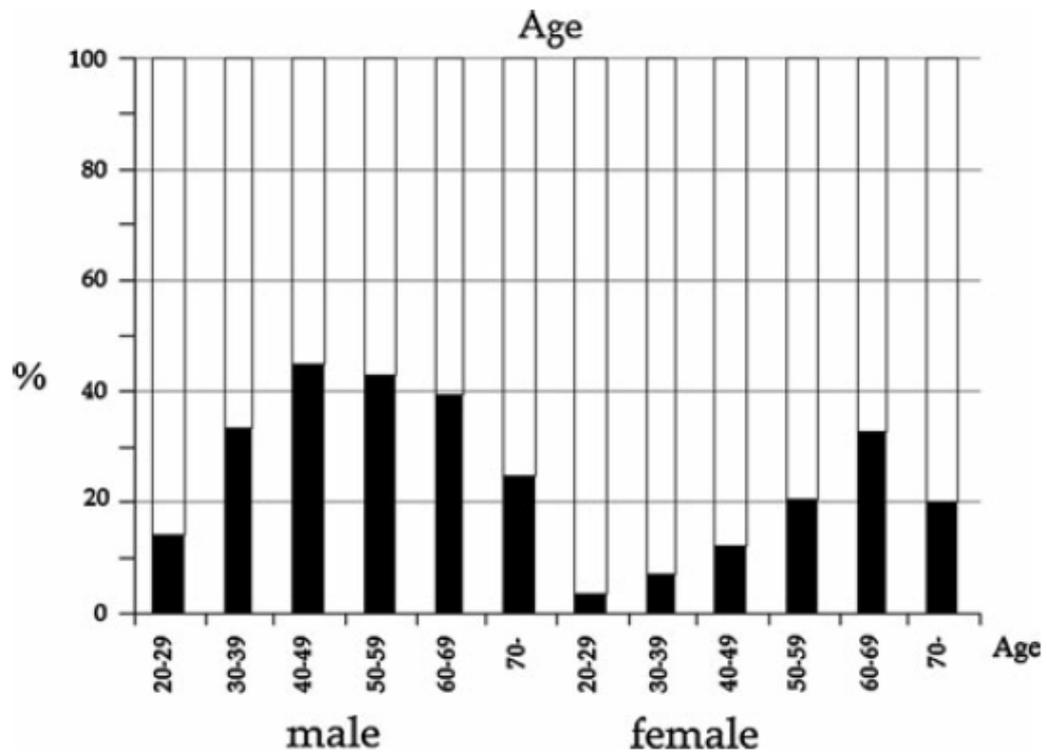
④肥満や糖尿病の進行に伴い、脂肪組織の ChREBP β の発現量が減少する。 高脂肪食を長期間摂取させたマウスおよび糖尿病患者においては、白色脂肪組織における ChREBP β の mRNA 発現量が減少する。脂肪組織における ChREBP β の発現増大は、GLUT4 を介した糖取り込みと FASN や ACC1 による脂質合成を促進することで、個体の血糖調節に一役買っていると考えられる [56,58,59]。一方で、脂肪組織以外の組織における ChREBP β の役割はよく分かっていない。唯一、糖尿病患者の肝臓において ChREBP β と脂質生合成系酵素の発現が増大するという現象が報告されている [60]。

- 本研究の目的と各章の概略

ここまで述べてきたとおり、ChREBP β は糖・脂質代謝の強力なレギュレーターであると考えられるが、脂肪肝の進行にどのような役割を担っているかは不明である。そのため、肝臓における ChREBP β の役割を解明することで、脂肪肝に起因する代謝性疾患の予防や治療法開発に貢献できると考えられる。

そこで本研究では、「肝臓における ChREBP β を介した糖・脂質代謝制御機構の解明」を目的とした。第二章においては、培養細胞を用いたレポーターアッセイや RT-qPCR 法を駆使することで、ChREBP アイソフォームを介した糖・脂質代謝関連遺伝子の転写制御機構に関してより詳細な知見を加えるとともに、ChREBP アイソフォームの組織分布を明らかにした。第三章においては、アデノウイルスを用いた過剰発現系を構築し、肝実質細胞および実験動物の肝臓で ChREBP β を過剰発現させることで、ChREBP β の発現増大が脂肪肝の進行に直結することを示した。第四章では、異なる食事を与えたマウスの組織における ChREBP β の発現量と糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量の相関関係を調べ、生理的条件下での肝臓における ChREBP β の発現変動が糖・脂質代謝の制御に関与することを示した。

これらのそれぞれ異なる視点のアプローチを試みることで、肝臓における ChREBP β を介した糖・脂質代謝制御機構の全貌の解明を目指した。



Prevalence of NAFLD in patients according to age.
The prevalence of NAFLD is higher in males than that in females at all ages, and it gradually increases with age in females.

Fig. 1-1 日本人における年齢別 NAFLD 罹患率

[*J Gastroenterol* (2012) **47(5)**:586-595] Fig.1 を引用

X 軸は年齢、Y 軸は NAFLD の罹患率 (黒塗部分) を示している。

「健康診断受診者 5,075 名のうち 1,509 名 (約 30%) が NAFLD を罹患していた」と本文中に記載されている。

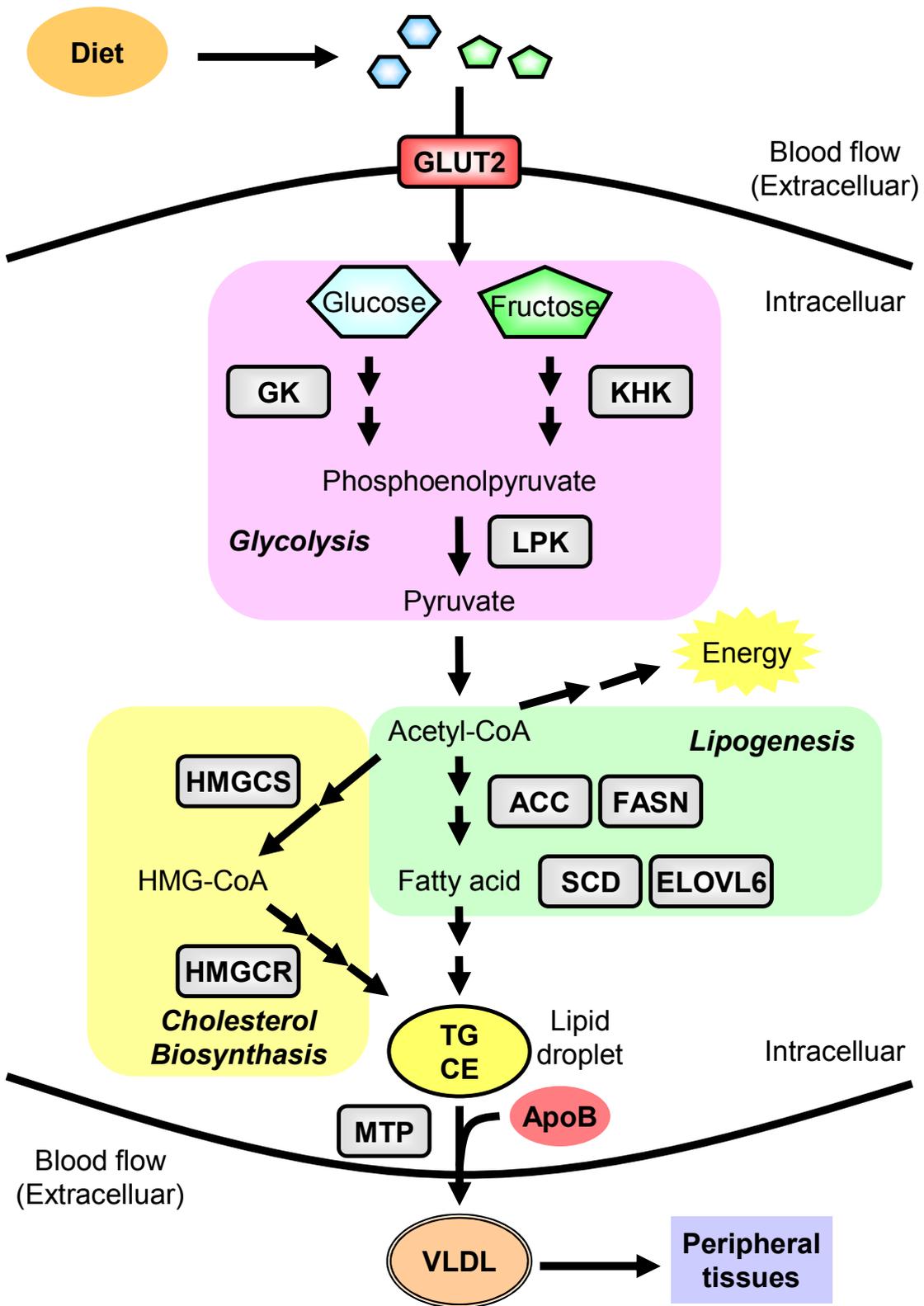


Fig. 1-2 肝実質細胞において食事由来の糖質が脂肪に変換されるまでの工程

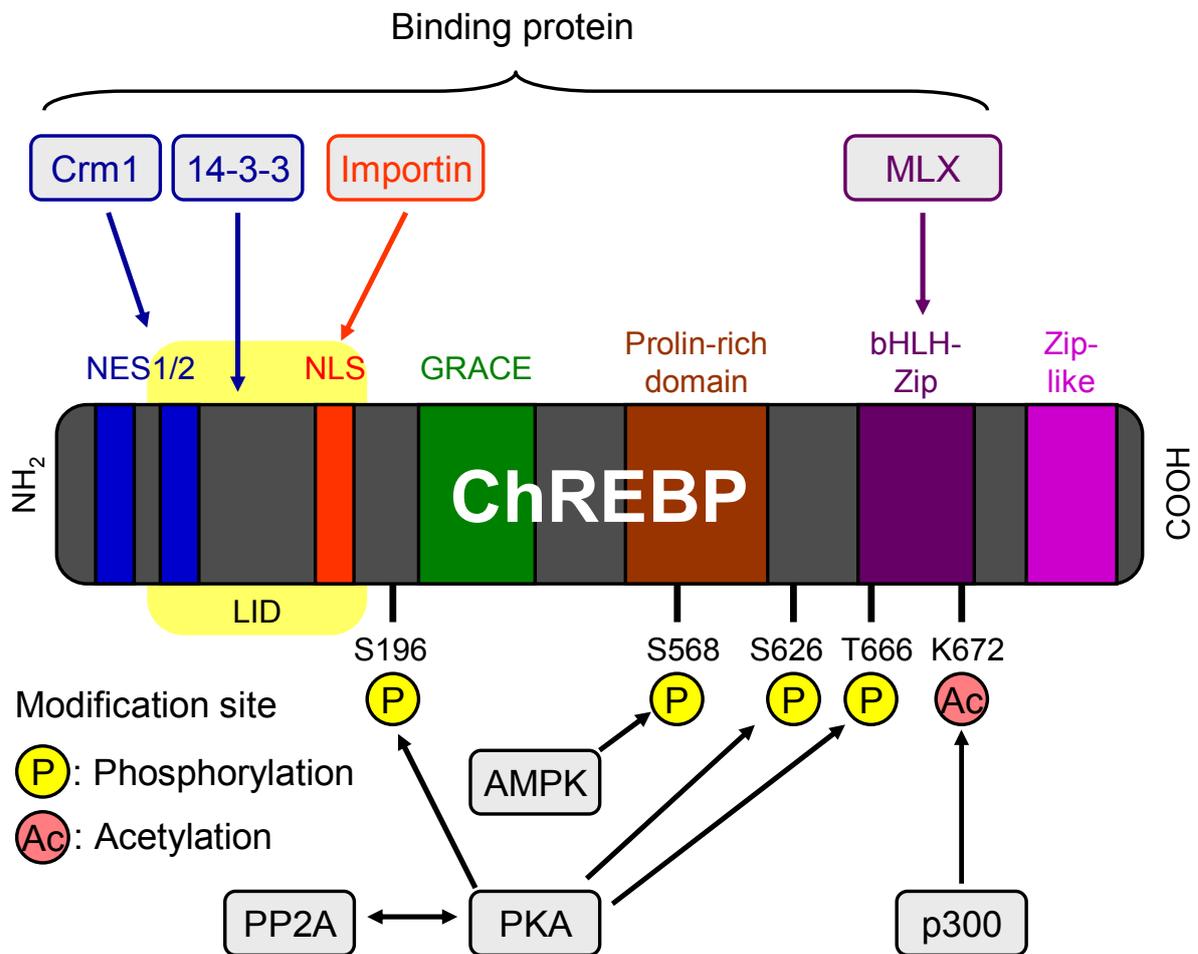


Fig. 1-3 ChREBP のタンパク質構造、結合タンパク質、翻訳後修飾部位

MLX: Max-Like Protein X

NES: Nuclear Export Signal

NLS: Nuclear Localization Signal

GRACE: Glucose Response Activation Conserved Element

bHLH-Zip: Basic Helix-Loop-Helix Leucine Zipper

LID: Low Glucose Inhibitory Domain

PKA: Protein Kinase A

PP2A: Protein Phosphatase 2A

AMPK: AMP-Activated Kinase

Table 1-1 ChREBP の標的と考えられる糖・脂質代謝関連遺伝子の一覧

Pathway	Symbol	Name
Glycolysis	LPK	Liver Type Pyruvate Kinase
	KHK	Ketohexokinase (Fructokinase)
	GLUT2	Glucose Transporter 2
	GLUT4	Glucose Transporter 4
Gluconeogenesis	G6PC	Glucose 6 Phosphatase Catalytic Subunit
Lipogenesis	FASN	Fatty Acid Synthase
	ACC1	Acetyl-CoA Carboxylase 1
	SCD1	Steroyl-CoA Desaturase 1
	ELOVL6	Elongation of Very Long Chain Fatty Acids 6
	ME	Malic Enzyme
Others	PPAR α	Peroxisome Proliferator Activated Receptor α
	TXNIP	Thioredoxin Interacting Protein
	THRSP	Thyroid Hormone Responsive Protein (SPOT14)

[*Endocr J.* (2013) ; **60(5)** : 543-55] Table.1 を改変

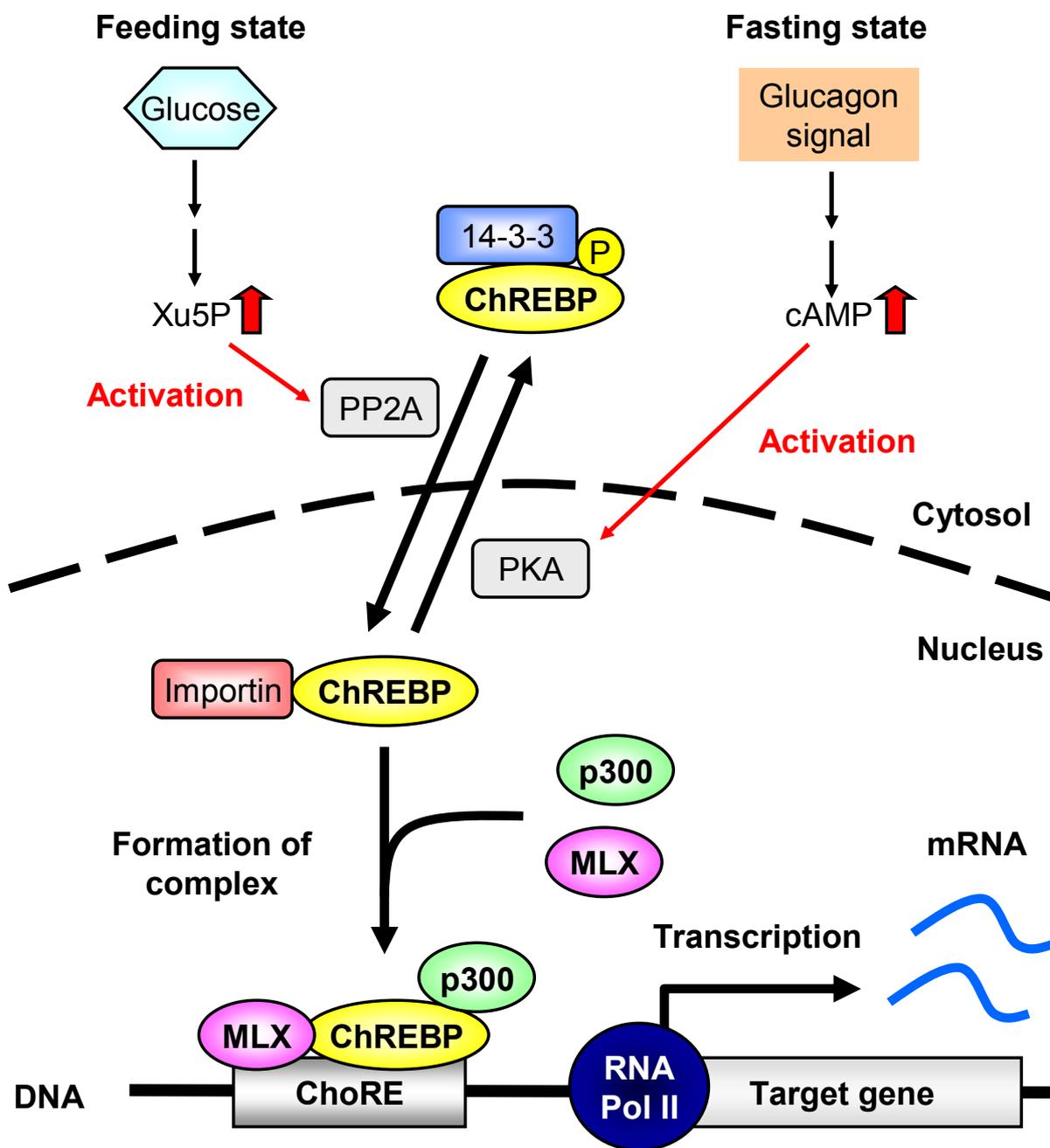
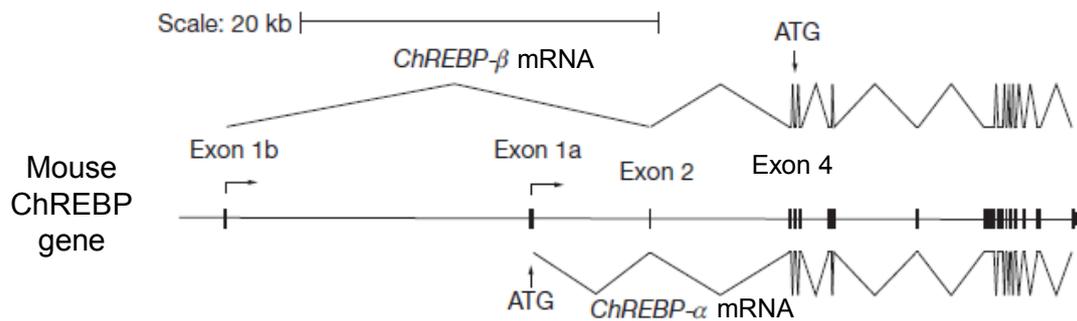


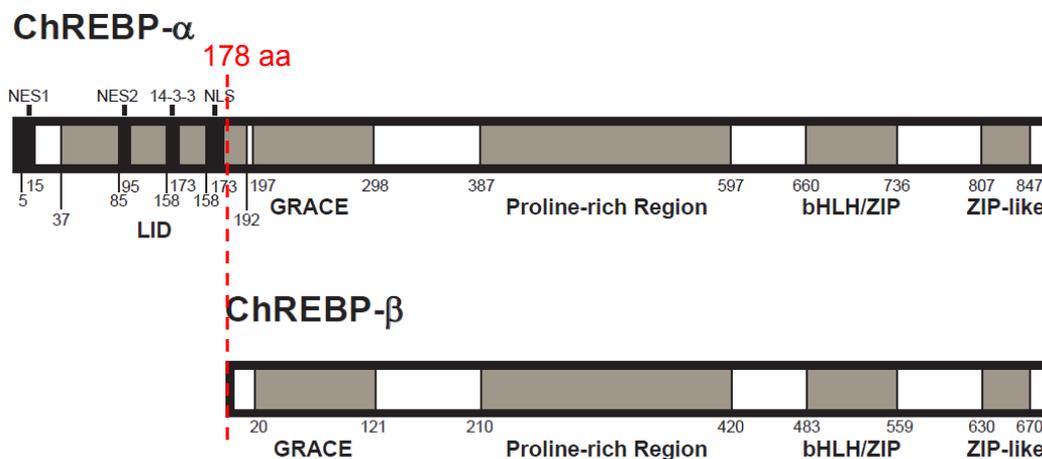
Fig. 1-4 グルコースシグナルを介した ChREBP の活性制御機構



Expression of the novel ChREBP- β isoform is regulated in a glucose- and ChREBP-dependent manner. a, Model of ChREBP- α and ChREBP- β gene structure with indication of splice sites and translational start sites (ATG).

Fig. 1-5A ChREBP アイソフォームの mRNA 配列

[*Nature* (2012) **484** : 333-338] Fig.4a を一部改変



Mouse ChREBP- α (864 amino acids) and ChREBP- β (687 amino acids) protein structure. NES1 and NES2: nuclear export signals 1 and 2. 14-3-3: binding site for 14-3-3 protein. NLS: nuclear localization sequence. LID: low glucose inhibitory domain. GRACE: glucose response conserved element. Proline-rich region. bHLH/ZIP: basic helix-loop-helix-leucine-zipper. ZIP-like: leucine zipper-like domain

Fig. 1-5B ChREBP アイソフォームのタンパク質構造

[*Nature* (2012) **484** : 333-338] Sup.Fig.20 を一部改変

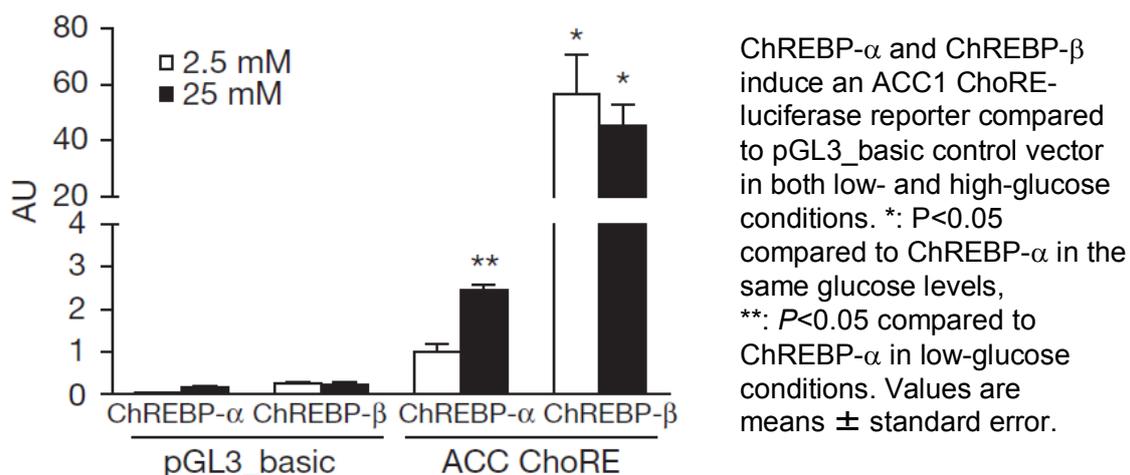
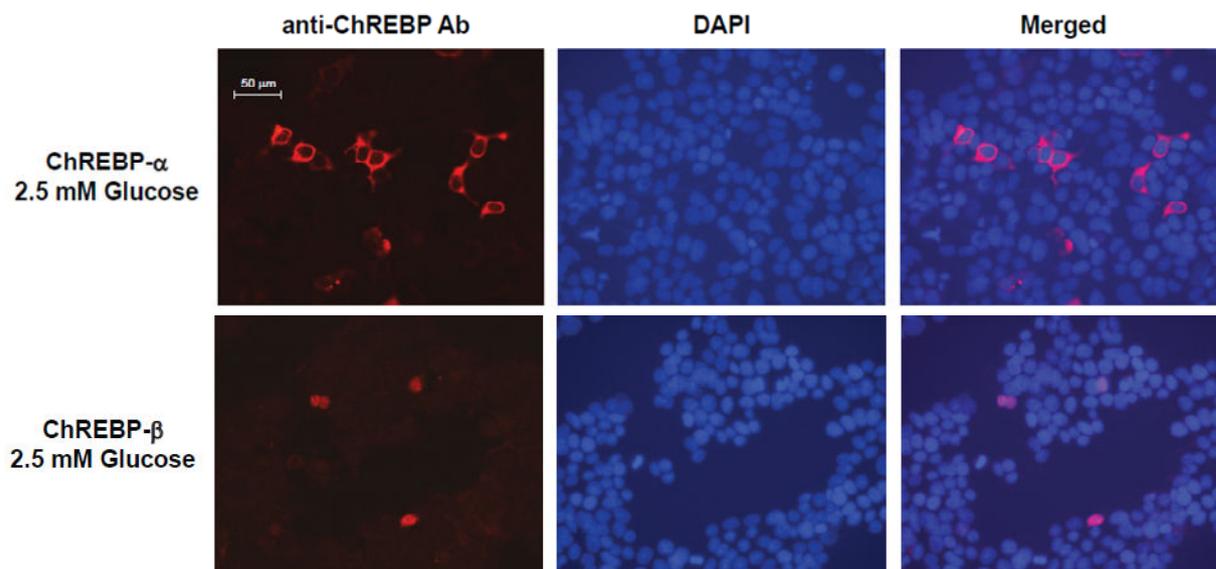
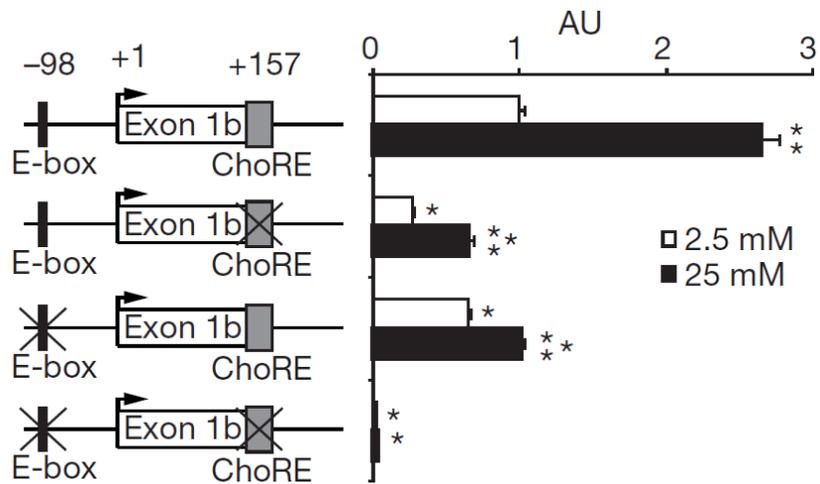


Fig. 1-6A ChoRE タンデム配列を用いたレポーターアッセイ
 [Nature (2012) 484 : 333-338] Fig.4e を引用



ChREBP-α is predominantly localized in the cytoplasm in low and high glucose conditions. In contrast, ChREBP-β is localized in the nucleus in low and high glucose conditions. The panels labeled anti-ChREBP Ab show ChREBP-α or ChREBP-β localization in red. The panels labeled DAPI show nuclei in blue. The panels labeled Merged show the merged images of ChREBP and nuclear staining.

Fig. 1-6B HEK293 細胞に発現させた ChREBPα / β の免疫染色画像
 [Nature (2012) 484 : 333-338] Sup.Fig.21 を一部引用



Glucose regulation of exon 1b promoter-luciferase reporter and indicated ChREBP- β mutants, co-transfected with ChREBP- α and Mix (n=3 per group).

*: $P < 0.05$ compared to nonmutated exon 1b-luciferase construct in the same glucose.

** : $P < 0.05$ compared to the same construct in low glucose..

Fig. 1-7 ChREBP β プロモーターを用いたレポーターアッセイ

[*Nature* (2012) **484** : 333-338] Fig.4d を引用

第二章

ChREBP アイソフォームの 組織分布と機能

ChREBP β は糖・脂質代謝の強力なレギュレーターであるため、脂肪肝の進行に重要な役割を担っている可能性が高い。しかし、「ChREBP β はChREBP α と比べて転写活性が極めて高い」と「ChREBP β の発現はChREBP α の活性化によって誘導される」という報告については検証不十分な点がある。また、現在まで行なわれてきたChREBP β の研究は脂肪組織を対象としたものであるため、肝臓でも上記の特徴が当てはまるかは不明である。さらに、どの組織でChREBP β が発現しているかも不明である。肝臓におけるChREBPアイソフォームの機能を解析するにあたり、これらの疑問を明らかにしておく必要がある。

そこで本章の第一節では、ChREBPアイソフォーム遺伝子発現絶対定量系を構築し、ChREBPアイソフォームの組織分布を調べた。第二節では、レポーターアッセイ系を構築し、ChREBPアイソフォームの転写活性を詳細に比較した。第三節では、ChREBPアイソフォームによるChREBP β の転写誘導が実際の肝臓でも認められるか検証した。

第一節

ChREBP アイソフォームの 組織分布

緒言

ChREBP アイソフォームの遺伝子発現量は、各々の ChREBP アイソフォームに特異的なプライマーを用いた RT-qPCR (Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction) 法により定量される。この手法により、脂肪組織と肝臓で ChREBPβの発現が見られることが報告されている [56,58,60]。しかし、これらの報告は単一の組織を解析した結果であり、組織間での比較解析は行われていないため、どの組織で ChREBPβが高発現であるか分かっていない。また、どちらの ChREBP アイソフォームがドミナントに発現しているかも不明である。

そこで本節では、遺伝子間で発現量を比較することが可能な RT-qPCR 絶対定量法を採用した [61,62]。ChREBP アイソフォーム遺伝子発現絶対定量系を構築し、これを用いて組織間での比較解析を行なうことで、ChREBP アイソフォームの組織分布を調べた。また、肝臓は肝実質細胞と非実質細胞で構成されているため、どちらの細胞で ChREBP アイソフォームが発現しているか検証した。

実験方法

◆ 動物実験

- 実験動物 –マウス組織の遺伝子発現量・cDNA ライブラリー作成用–
実験動物として、C57BL/6J マウス 6 週齢、雄 (日本クレア) を 4 匹購入した。通常食として MR ラボストック (日本農産工業) を自由摂食させて飼育した。10 週齢になった時点で解剖し、血液や組織を採取した。

以降に記す動物実験は全て、給水ビンによる自由給水、室温 24°C、明暗調整 9~21 時で個別飼育し、東京大学の動物実験倫理規定に則り行なった。

- 実験動物 –肥満モデルマウス–

野生型 (WT) マウスとして 6 週齢の C57BL/6J 雄マウス、肥満モデルマウスとして 6 週齢の C57BL/db/db 雄マウスをそれぞれ 7 匹ずつ日本クレアから購入した。通常食として MR ラボストックを自由摂食させて飼育した。10 週齢になった時点で解剖し、組織を採取した。

- 組織の採取

飼育期間終了日に麻酔 (ソムノペンチル) を腹腔内投与した後に解剖した。血液は 21 G 注射針と 1 mL シリンジ (テルモ) を使用して下大静脈から採血した。肝臓や小腸などの組織は採取後に PBS (Phosphate Buffered Saline) で洗浄し、液体窒素を用いて凍結した。それぞれのサンプルは解析するまで -80°C で保存した。

◆ 細胞実験

- 肝実質細胞・非実質細胞の採取

10 週齢、雄の C57BL/6J マウスから肝実質細胞 (HPC: Hepatic Parenchymal Cell) と非実質細胞 (nPCs: non-Parenchymal Cells) をコラゲナーゼ灌流法により単離した [15,16,63]。以下にその詳細を記す。

麻酔下でマウスを開腹し、門脈から HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, SIGMA) + 1 mM EGTA (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid) を灌流した。肝臓や血管から血液が抜けたら、0.2% コラゲナーゼ溶液を 5 分間灌流した。肝臓の皮膜を破いて MEM (Minimal Essential Medium, SIGMA) に細胞を懸濁した。これ以降の操作は氷上で行なった。細胞懸濁液を滅菌ガーゼで濾し、チューブに移して 50

×g で 1 分間遠心した。この操作でチューブの底に落ちてきた細胞を粗肝実質画分とし、上清を粗非実質細胞画分とした。

粗肝実質細胞画分を MEM に懸濁し、滅菌ガーゼで濾した後に 50 ×g で 1 分間遠心した。上清を除いて MEM に懸濁し、等量の Isotonic Percoll (GE Healthcare) を加えて穏やかに混和した。これを 70 ×g で 10 分間遠心し、チューブの底に落ちてきた細胞を肝実質細胞 (HPC)とした。

粗非実質細胞画分 (上清) を 50 ×g で 2 分間遠心し、上清を別チューブに移した。これを繰り返して、遠心後に沈殿が見られなくなったら、上清の 1/3 量の Isotonic Percoll を加え、400 ×g で 20 分間遠心した。上層 (上半分) を除き、下層に等量の MEM を加えた。800 ×g で 20 分間遠心後、チューブの底に落ちてきた細胞を非肝実質細胞 (nPCs)とした。

- 細胞培養

肝実質細胞および非実質細胞を 10% FBS (Fetal Bovine Serum)、10 nM Dexamethasone、10 nM Insulin、2 mM L-Glutamine、100 units/mL Penicillin、100 μg/mL Streptomycin を含む William's Medium E (SIGMA) に懸濁し、 2×10^5 cell/well となるように 12-well コラーゲンコートディッシュ (Becton Dickinson) に播いた。6 時間培養した後に、培地交換して生着しなかった死細胞を除き、実験に用いた。

- ◆ RT-qPCR (Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction)

- RNA 抽出

RNA 抽出用試薬 ISOGEN (ニッポンジーン) のプロトコールに従って RNA 抽出を行なった。以下にその方法を示す。

組織 100 mg あたり 1 mL の ISOGEN を加えてポリトロンホモジナイザー (QIAGEN) で粉砕した。血液の場合は、3 倍量の ISOGEN-LS (ニッポンジーン) を加えてポリトロンホモジナイザーで攪拌した。培養細胞の場合は、1 well あたり ISOGEN: 0.5 mL を加えてから、チップの先で細胞を掻き取った。懸濁液 1 mL につき 200 μL の Chloroform を加え、ボルテックスで 10 秒間攪拌し、20 分間最大速度で遠心した。上清に 0.8 倍量の Isopropanol を加え、転倒混和した後、室温で 10 分間放置した。最大速度で 20 分間遠心して RNA をペレットにした。(グリコーゲンなどの夾雑物が多い組織は、DEPC 処理水: 300 μL を加えてペレッ

トを溶解した後、10 M LiCl: 100 μ L を加えた。4°C で2 時間以上インキュベートした後、最大速度で20 分間遠心してペレットにした。沈殿を70% Ethanol: 0.8 mL で洗浄し、最大速度で10 分間遠心した。得られた沈殿をペーパータオル上で10 分間空気乾燥し、適当量の DEPC 処理水に溶解した。

- 核酸濃度の測定

NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) の核酸測定モードによりサンプル中の核酸濃度を測定した。260 nm における吸光度を基にサンプル中の核酸濃度を算出した。260/280 nm 値および260/230 nm 値が1.8 よりも低いサンプルはタンパク質やグアニジン塩のコンタミが考えられる。それらのサンプルはエタノール沈殿により精製し、核酸濃度の測定を再度行なった。

- アガロースゲル電気泳動 (RNA の品質チェック)

TAE (40 mM Tris-HCl pH 7.5、40 mM CH₃COOH、1 mM EDTA [Ethylenediaminetetraacetic Acid]) に1 ~ 1.5% (W/V) の Agarose ME (ナカライテスク) 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適量の SYBR Safe (Life Technologies) を加え、セットしたゲル作製用のホルダーに注ぎ、コームを挿して固めた。TAE を張った泳動槽にゲルを置き、RNA サンプルに10×Loading Dye (TaKaRa) 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) を使い、100 V で30 分程度通電した。泳動が終了したゲルをUV Transilluminator (BIO RAD) にかざしバンドを検出した。

28S、18S、5S rRNA のバンドがシャープであり、DNA などのコンタミが認められなかった RNA サンプルを次の逆転写反応に用いた。

- 逆転写反応 (RT: Reverse Transcription)

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

10×RT Buffer: 2.0 μ L、25×dNTP Mix (100 mM): 0.8 μ L、10×RT Random Primers: 2.0 μ L、MultiScribe™ Reverse Transcriptase: 1.0 μ L、Nuclease-free H₂O: 4.2 μ L を混合し、2×RT master mix を調製した。PCR チューブに2×PCR master mix: 10 μ L と10 μ L の RNA サンプル (RNA 量 1 μ g) をピペッティングにより混合し、スピン

ダウンを行なった。25°C / 10 分、37°C / 120 分で逆転写反応を行なった後、85°C で 5 分間処理して逆転写酵素を失活した。反応後の cDNA 溶液は RNA 相当量 12.5 ng/uL となるように DEPC 処理水で希釈した。

◆ 5'-mChREBP α / β プラスミドのクローニング

ChREBPアイソフォームの mRNA 発現量を絶対定量する際のテンプレートとなる 5'-mChREBP α / β プラスミドのデザインを Fig. 2-1 に記した。ChREBP アイソフォーム mRNA 配列の唯一の違いは 5'末端側の第一エクソンである。そのため、qPCR 用プライマーについては、ChREBP α は Exon 1a に、ChREBP β は Exon 1b に相補的な配列で Forward プライマーを作成した (mChREBP α / β 特異的 qPCR 用プライマー)。Reverse プライマーは Exon 2 に相補的な配列で作成した。それぞれのプライマーがアニールする位置は Fig. 2-1 の赤矢印、青矢印で記した。

テンプレートとなる 5'-mChREBP α / β プラスミドはこれらの増幅配列を pGEM-T Easy vector (Promega) へ組み込んでクローニングした。以下は詳細な実験方法である。

- プライマーのデザイン

- 5'-mChREBP α プラスミド

マウス ChREBP α mRNA 配列 (Accession No.: NM_021455.4) の 7~545 bp の配列が増幅産物となるように、配列に相補的な Forward プライマーと Reverse プライマーを設計した。

Forward: 5'- CGACACTCACCCACCTCTTC -3'

Reverse: 5'- GCTTCCAGTAATTACCCTCCAG -3'

- 5'-mChREBP β プラスミド

マウス ChREBP β mRNA 配列 ([56]を参考にした) の 149~392 bp が増幅産物となるように、配列に相補的な Forward プライマーと Reverse プライマーを設計した。

Forward: 5'- TCTGCAGATCGCGTGGAG -3'

Reverse: 5'- GCTTCCAGTAATTACCCTCCAG -3'

デザインしたプライマーは Eurofin Genomics 社のオリゴ DNA 合成サービスを利用して合成した。

- マウス組織からの cDNA ライブラリーの作成 –逆転写反応–

5'-mChREBP α / β をクローニングするために、PCR の鋳型となるマウス組織 cDNA ライブラリーを作成した。SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) のプロトコルに準じて逆転写反応を行なった。以下にその方法を示す。

0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Oligo dT (12-18 b) Primer (Invitrogen) : 1 μL 、10 mM dNTP Mix (Invitrogen)、組織 RNA サンプル: 1 μg 、DEPC 処理水を PCR チューブに加えて液量を 13 μL とした。これを 65°C で 5 分間加温し、直ちに氷上へ移した。続いて、このサンプル溶液に 5 \times First strand buffer: 4 μL 、0.1 M DTT (Dithiothreitol) : 1 μL 、40 unit/ μL RNaseOUT (Invitrogen) : 1 μL 、200 unit/ μL SuperScript III RT: 1 μL を加えてピペッティングにより混合した。25°C で 5 分、55°C で 60 分インキュベートして逆転写反応を行なった後、70°C で 15 分間加温して逆転写酵素を失活した。さらに、10 mg/mL RNase A solution (ナカライ) : 0.1 μL を加えて 37°C で 30 分間インキュベートし、サンプル中に含まれる RNA を分解した。これを組織 cDNA ライブラリーとした。

- DNA 断片の増幅 (PCR 法; Ampli Taq Gold)

PCR 反応は上記で作成したマウス肝臓 cDNA ライブラリー、プライマーおよび Ampli Taq GoldTM (Roche) を用いた。PCR 反応溶液の組成と方法を以下に示す。

- 10 \times PCR Gold Buffer: 5 μL
- 25 mM MgCl₂: 4 μL
- 2 mM dNTP mix: 5 μL
- 10 μM Forward Primer: 5 μL
- 10 μM Reverse Primer: 5 μL
- 組織 cDNA ライブラリー: 100 ng (RNA 相当量)
- 250 unit/ μL Ampli Taq GoldTM: 0.25 μL
- 滅菌超純水: up to 50 μL

PCR 反応装置は PCR Thermo Cycler Personal (TaKaRa) を使用した。調製した PCR 反応液を 95°C で 10 分間加温した後、「熱変性を 94°C で 30 秒、アニーリングを 60°C で 30 秒、伸長反応を 72°C で 70 秒」のサイクルを 40 回行なった。PCR 後のサンプルはアガロースゲル電気泳動により目的の配列が増幅されていることを確認した。

- アガロースゲルからの DNA 断片回収

GENECLEAN III KIT (BIO 101) のプロトコルに従って、アガロースゲルからの DNA 断片回収を行なった。以下に詳細な方法を記す。

目的の DNA 断片を含むアガロースゲルをカッターで切り取り、1.5 mL チューブに移した。これに NaI 溶液: 500 μ L 加え、55°C で加温してゲルを溶解した。EZ-GLASSMILK: 10 μ L 加えて室温で 10 分間ゆっくり転倒混合した後、遠心して上清を除いた。沈殿に洗浄バッファー: 1 mL を加え、最大速度で 1 分間遠心し、上清を除いた。この洗浄操作は計 3 回行なった。十分に風乾した後、沈殿に滅菌超純水を加え、55°C で 5 分間放置した。最大速度で 1 分間遠心した後、上清を回収し、DNA 溶液 (Insert DNA) とした。

- ライゲーション

Vector DNA : 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 30 分以上反応を行なった。

- 大腸菌への形質転換 (トランスフォーメーション)

- 薬剤添加プレートの作製

LB 培地 (LB Broth [SIGMA] : 20 g/L) に 1.5% (w/v) となるように寒天 (ナカライ) を加え、オートクレーブ滅菌した。50°C まで冷めたところでアンピシリン (終濃度: 100 μ g/mL) 、カナマイシン (終濃度: 20 μ g/mL) を加え、10 cm プレートに 10 ~ 15 mL ずつ流し込み、室温に戻るまで放置した。作製したプレートは 4°C で保存した。

ブルー・ホワイトセレクションを行なう場合は、使用直前のプレートに 50 mg/mL X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside): 20 μ L、100 mM IPTG (Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside): 100 μ L を塗布し、30 分間静置してプレート表面を乾燥させた後に使用した。

- 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) を使用した。菌体を LB 培地へ投入し、37°C で振とう培養した。培地の OD₅₅₀ が 0.6 程度になった時点で、氷上に 15 分程度放置して 4°C で遠心した。上清を除き菌体に培養液の 1/10 量の TFB1 (30 mM CH₃COOK、100 mM RbCl₂、10 mM CaCl₂、50 mM MnCl₂、

15% Glycerol、pH 5.8) を加えて懸濁し、氷上に 5 分間放置した後、4°C で遠心した。この操作をもう一度繰り返した。上清を除いた後、菌体に培養液の 1/25 量の TFB2 (10 mM MOPS (3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid)、75 mM CaCl₂、10 mM RbCl₂、pH 6.5) を加えて懸濁し、氷上に 15 分間放置した。1.5 mL チューブに 110 μL ずつ分注し、液体窒素に入れて急速冷凍した。

- 形質転換 (トランスフォーメーション)

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 に温めた恒温槽で 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: 1 mL を加え 37°C で 1 時間培養した大腸菌を、ガスバーナーの近くでコーンラージ棒を用いて薬剤添加プレートに播いた。

- プラスミド DNA の回収 (少量調製)

ポジティブコロニー (ブルー・ホワイトセレクションでは白コロニー) をピックアップし、2 mL の 100 μg/mL アンピシリンを含む LB 培地で 12 時間振盪培養した。これを最大速度で 3 分間遠心し、上清を除いて菌体を回収した。菌体に Solution I (10 mM EDTA [pH 8.0]、25 mM Tris-HCl) : 200 μL を加え、十分に懸濁した。Solution II (1% SDS [Sodium Dodecyl Sulfate]、0.2 M NaOH) : 200 μL を加え 5~6 回転倒混和し、5 分間室温でインキュベートした。Solution III (3 M CH₃COONa、pH 5.2) : 200 μL を加え 5~6 回転倒混和し、氷上で 5 分間インキュベートした。最大速度で 30 分間遠心後、上清を回収した。上清と等量の Isopropanol を加え、-20°C で 1 時間インキュベートした後、最大速度で 20 分間遠心した。上清を除き、TE (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 8.0) : 98 μL と 10 mg/mL RNase A solution: 2 μL を加えて溶解し、37°C で 1 時間インキュベートした。これに 5 M NaCl: 30 μL と 30% PEG solution (30% Polyethylene Glycol -8000、2 M NaCl) : 32.5 μL を加えて、4°C で 1 時間以上インキュベートした。これを最大速度で 30 分間遠心し、上清を除いた。ペレットを TE (pH 8.0): 200 μL で溶解し、PCI (TE pH 8.0 saturated-Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol =25 : 24 : 1) : 200 μL を加えて激しく攪拌した。最大速度で 20 分間遠心し、上清を回収した。上清の 1/10 量の 3 M CH₃COONa、2.5 倍量の 100% Ethanol を加えて-20°C で 1 時間以上インキュベートした。これを最大速度で 30 分間遠心し、上清を除いた。さらに、70% Ethanol: 1 mL を加え、最大速度で遠心して上清を十分に除いた。

自然乾燥を 10 分間行ない、沈殿を適量の滅菌超純水もしくは TE (pH 8.0) に溶解してプラスミド DNA 溶液を得た。

- プラスミド DNA の回収 (多量調製)

Plasmid Midi Kit (QIAGEN) を用いて、プロトコルに示された方法に従って行なった。詳細な方法を以下に記す。

ポジティブコロニーを 2 mL の 100 µg/mL アンピシリンを含む LB 培地で 8 時間前培養を行なった。上記の大腸菌培養液: 100 µL を 100 µg/mL アンピシリンを含む LB 培地: 50 mL へ添加し、37°C、12 時間振盪培養した。最大速度で 10 分間遠心して菌体を回収し、Buffer P1 (+100 µg/mL RNase A): 4 mL 加え十分に懸濁した。Buffer P2 を 4 mL 加え 5~6 回転倒混和し、5 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 5~6 回激しく転倒混和し、15 分間氷上でインキュベートした。30 分間遠心後、濾紙を用いて上清を濾過した。Buffer QBT を 4 mL 加え平衡化した QIAGEN-tip 100 に得られた上清を添加し、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 加えてプラスミド DNA を溶出した。溶出した DNA 液に 3.5 mL の Isopropanol を加え混合した後、30 分間遠心した。上清を除き、70% Ethanol: 2 mL を加え、10 分間遠心した。上清を除去し、70% Ethanol リンスを 2 回行なった。その後、DNA 沈殿を室温で 5 分間風乾させた後、滅菌超純水に溶解した。

- 制限酵素処理によるインサートチェック

制限酵素は New England BioLabs より購入した。プラスミド DNA、制限酵素、制限酵素用バッファーを混合し、37°C で 2 時間以上インキュベートした。処理後 DNA をアガロースゲル電気泳動に供し、ポジティブクロンのバンドパターンが見られることを確認した。

- シーケンス

作製したプラスミドは、Eurofin Genomics 社の DNA シーケンス受託解析サービスを利用して、目的の配列が存在することを確認した。

- ・ シーケンス機器: ABI 3730xl Sanger Sequencer (Applied Biosystems)
- ・ 配列解析ソフト: Sequence Scanner volume 1.0 (Applied Biosystems)

◆ ChREBP α / β mRNA 発現量の絶対定量

- 5'-mChREBP α / β プラスミドの段階希釈

得られた 5'-mChREBP α / β プラスミドはアガロースゲル電気泳動により RNA や大腸菌由来 DNA のコンタミが無いことを確認した。このプラスミドを制限酵素 *NotI* で処理して直鎖状にした。アガロースゲル電気泳動により、直鎖状プラスミド DNA のみをゲルから回収し、NanoDrop 1000 により DNA 濃度を測定した。

5'-mChREBP α プラスミドは 3,554 bp (Mw: 2.35 MDa)、5'-mChREBP β プラスミドは 3,259 bp (Mw: 2.15 MDa) である。これを元に、溶液中のプラスミド分子数を算出した。プラスミド原液を 50 ng/ μ L Yeast t-RNA solution で段階希釈することで、 $10^9 \sim 10^1$ molecule/ μ L の希釈系列を作製した。

- 定量的 PCR (qPCR) による遺伝子発現量解析 (SYBR Green 法)

FastStart Universal SYBR Green Master (Roche) と標的遺伝子の mRNA 配列に相補的なプライマーを用い、SYBR Green 法によりサンプル中の遺伝子発現量を測定した。各々の遺伝子の解析に用いた RT-qPCR 用プライマーの配列は Table I に記した。反応液の組成は以下に記す。

- FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) : 5 μ L
- 10 mM Sense Primer: 0.2 μ L
- 10 mM Antisense Primer: 0.2 μ L
- Template cDNA: 2 μ L (25 ng RNA 相当量)
- 滅菌超純水: 2.6 μ L (up to 10 μ L)

MicroAmpTM Fast 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems) へ反応液をアプライし、スピンドウンを行なった後、ABI StepOnePlus (Applied Biosystems) を用いて反応および定量を行なった。反応条件は、95°C で 10 分間の加温後、「95°C で 15 秒間の熱変性と 60°C で 1 分間のアニーリング+伸長反応」を 40 サイクル行なった。遺伝子発現量の解析は、「StepOnePlus software vol.2.2.2」を用いて行なった。各々のサンプルの Ct (Threshold Cycle) 値は同ソフトウェアの自動解析システムにより算出した。

絶対定量の際は、分子数既知の 5'-mChREBP α / β プラスミド希釈系列で検量線を作成することで、RNA 1 μ g 相当量に含まれる mRNA の分子数を算出した。相対定量の際は、任意のサンプル希釈系列で検量線を作成することで、対照群

を 1 とした場合の遺伝子発現量を算出した。それぞれの遺伝子発現量は 18S rRNA 発現量で除することで補正した。18S rRNA 発現量が異常に高値あるいは低値であるサンプルは、遺伝子発現量を正確に測定できていない可能性が考えられる (原因としては、サンプル調製中に RNA が分解されてしまった、夾雑物のコンタミにより RT に失敗した、正確に RNA 量を定量できなかったなどの可能性が考えられる)。その場合は、有意水準 0.05 で Thompson 棄却検定を行ない、18S rRNA 発現量が異常値であると認められたサンプルは解析から除外した。また、PCR 反応の後に融解曲線解析を行ない、標的とする遺伝子の増幅配列のみが増幅されていることを確認した。

- 定量的 PCR による遺伝子発現量解析 (TaqMan probe 法)

各々の遺伝子に特異的な TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) を用い、TaqMan probe 法により遺伝子発現量を測定した。各々の遺伝子の解析に用いたプローブナンバーを Table II に記した。反応液の組成は以下に記す。

- TaqMan Gene Expression Master Mix (2×) : 5 μ L
- TaqMan Gene Expression Assays: 0.5 μ L
- Template cDNA: 2 μ L (25 ng RNA 相当量)
- 滅菌超純水: 2.5 μ L (up to 10 μ L)

MicroAmp™ Fast 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems) へ反応液をアプ
ライシ、スピンドウンを行なった後、ABI StepOnePlus (Applied Biosystems) を用
いて反応および定量を行なった。反応条件は、50°C で 2 分間、95°C で 10 分間
の加温後、「95°C で 15 秒間の熱変性と 60°C で 1 分間のアニーリング+伸長反
応」を 40 サイクル行なった。検量線の作成や解析に関しては前項の SYBR Green
法と同様に行なった。

- ◆ 統計処理

統計処理には、StatView ver.5.0 (SAS Institute Inc.) あるいは JSTAT ver.11.1 (NANKODO) を用いた。図中の棒グラフは平均値±標準誤差 (Mean ± SE) で示した。2 群間の差の検定は、Student's *t*-test により行ない、*P*-value が 0.05 以下のものを「群間で有意な差が認められる」とした。多群間の差の検定は、分散分析により *P*-value が 0.05 以下、かつ多重比較検定 (Tukey-Kramer test) により *P*-value が 0.05 以下であったものを「群間で有意な差が認められる」とした。

結果

◆ ChREBP アイソフォーム遺伝子発現絶対定量系を構築した。

本節では、ChREBP アイソフォームの組織分布と ChREBP アイソフォームの発現量比を調べるために、ChREBP アイソフォーム遺伝子発現絶対定量系の構築した。まずは、この系を構築するにあたって必要な物である、mChREBP α あるいは mChREBP β の cDNA 配列を特異的に増幅できる「mChREBP α / β 特異的 qPCR 用プライマー」、および上記のプライマーで検量線を作成する際のテンプレートとなる「5'-mChREBP α / β プラスミド」を作成した。これらのデザインは Fig. 2-1 に記した。

作成した qPCR 用プライマーやテンプレートの品質は、これらを用いて作成した検量線の決定係数や増幅効率で判定できる。検量線の傾きが-3.3、決定係数が 1.0、増幅効率が 100%の理想値に近いものほど、正確に標的配列の分子数を定量できていると考えられる。今回作成した系で ChREBP アイソフォームの発現量を正確に定量できているか調べるために、5'-mChREBP α / β プラスミド (テンプレート) の希釈系列を用いて検量線を作成した。作成した検量線のグラフを Fig. 2-2 に、決定係数や増幅効率は Table 2-1 に記した。

まずは、mChREBP α / β 特異的 qPCR 用プライマーが標的配列を増幅できること、5'-mChREBP α / β プラスミドがスタンダードとして使用できることを確認するため、標的配列を含むテンプレートを用いて検量線 (a), (b) を作成した。これらの検量線はプラスミド分子数依存的であり、上記の指標も理想値に極めて近いものであった。そのため、これらの qPCR 用プライマーとプラスミドをペアで用いることで、mChREBP α / β の絶対定量用検量線を作成可能であることが確認できた。

続いて、mChREBP α / β 特異的 qPCR 用プライマーがそれぞれの ChREBP アイソフォームを区別して標的配列を検出できているか調べるため、標的配列とは異なる配列を含むテンプレートを用いて検量線 (c), (d) を作成した。これらの検量線はプラスミド分子数に非依存的であり、上記の指標も理想値から大きく外れたものであった。そのため、mChREBP α / β 特異的 qPCR 用プライマーはそれぞれの ChREBP アイソフォームを区別して検出できていると考えられる。

今回作成した mChREBP α / β 特異的 qPCR 用プライマーの Reverse 配列は、mChREBP α および mChREBP β mRNA の共通配列で作成している。両方の

ChREBP アイソフォームが存在するような cDNA サンプルでは、Reverse プライマーが標的とは別の ChREBP アイソフォームと競合的に結合することで、標的遺伝子の正確な発現量を定量できない可能性が考えられる。そこで、標的配列を含むテンプレートの希釈系列に別の 5'-mChREBP プラスミドを 10^6 molecule/ μ L ずつ加えた検量線 (e), (f) を作成した。その結果、検量線 (e) は (a) と、(f) は (b) とほぼ同様の検量線を作成することができた。したがって、今回作成した mChREBP α / β 特異的 qPCR 用プライマーは、他方の ChREBP アイソフォームの発現量に影響を受けることなく、標的とする ChREBP アイソフォームの発現量を定量できることが示された。

◆ 構築した ChREBP アイソフォーム遺伝子発現絶対定量系は組織の遺伝子発現解析にも使用可能である。

肥満や糖尿病が進行すると白色脂肪組織における ChREBP β およびその標的である脂質生合成系酵素の発現量が減少することは既に報告されている [56,60]。今回構築した絶対定量系でもそれらの現象を捉えられるか確認するため、過食により極度の肥満と糖尿病を呈する db/db マウスの白色脂肪組織を採取し、ChREBP アイソフォームと脂質生合成系酵素の遺伝子発現量を絶対定量した (Fig. 2-3)。

ChREBP α の発現量は両群で違いが認められなかったが ($P=0.295$)、ChREBP β および FASN、ACC1 の発現量は WT (野生型) マウスと比較して db/db マウスで有意に減少した。これらの結果は従来までの知見と一致するため、今回作成した ChREBP アイソフォーム遺伝子発現絶対定量系は、組織の遺伝子発現解析にも使用可能であると考えられる。

◆ ChREBP β は脂肪組織、肝臓、空腸で発現している。

構築した絶対定量系を用いて、組織における ChREBP アイソフォームの発現分布を調べた。解析対象として、通常食を摂取させた 10 週齢、雄マウスの精巣上体白色脂肪組織 (E.WAT: Epididymal White Adipose Tissue)、肝臓、筋肉 (腓腹筋)、空腸、血液を用いた。

ChREBP α は肝臓、精巣上体白色脂肪組織、筋肉、空腸で発現していたが、血液ではほとんど発現していなかった (Fig. 2-4 A, 肝臓 平均 Ct 値: 23.9, 精巣上体白色脂肪組織 Ct: 25.8, 筋肉 Ct: 27.4, 空腸 Ct: 25.5, 血液 Ct: 33.3)。一方、ChREBP β

は肝臓、精巣上体白色脂肪組織、空腸で発現していたが、筋肉と血液ではほとんど発現が認められなかった (Fig. 2-4 B, 肝臓 平均 Ct 値: 28.7, 精巣上体白色脂肪組織 Ct: 28.1, 筋肉 Ct: 34.7, 空腸 Ct: 26.3, 血液 Ct: >37.2)。ChREBP とヘテロダイマーを形成する転写因子 MLX はユビキタスな発現が認められた (Fig. 2-4 D, 精巣上体白色脂肪組織 Ct: 26.3, 肝臓 Ct: 25.8, 筋肉 Ct: 27.7, 空腸 Ct: 24.3, 血液 Ct: 29.6)。

◆ いずれの組織でも ChREBPβは ChREBPαと比べて発現量が少ない。

上記の実験では、組織 RNA 1 μg 相当量に含まれる ChREBP アイソフォームの分子数を絶対定量法により算出した。これをもとに ChREBPαと ChREBPβの分子数を合わせたグラフが Fig. 2-4 C である。

いずれの組織においても ChREBPαと比べて ChREBPβは発現量が少ないことが確認された。ChREBPαの分子数を 100 とした場合の ChREBPβの分子数は、肝臓: 5 (1/20)、精巣上体脂肪組織: 20 (1/5)、筋肉: 1 (1/100)、空腸: 52 (1/2)、血液: 1 (1/100) である。

◆ 肝臓における ChREBP アイソフォームの発現は肝実質細胞に由来する。

肝臓は肝実質細胞 (HPC: Hepatic Parenchymal Cell) と非実質細胞 (nPCs: non-Parenchymal cells) で構成されているが、どちらの細胞でどの ChREBP アイソフォームが発現しているか検証した例は無い。そこで、10 週齢、雄マウスの肝臓より単離した肝実質細胞と非実質細胞 (Fig. 2-5 A) から RNA を抽出し、ChREBP アイソフォームの遺伝子発現量を測定した (Fig. 2-5B)。

肝実質細胞マーカー遺伝子である Albumin は HPC で高発現であり、非実質細胞マーカー遺伝子である F4/80 (クッパー細胞で高発現 [64])、および VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2; 類洞内皮細胞で高発現 [65]) は nPCs で高発現であるため、細胞分画は問題無くできている。ChREBPα、ChREBPβはともに HPC で高発現であるのに対し (ChREBPα Ct: 25.7, ChREBPβ Ct: 25.0)、nPCs ではほとんど発現が認められなかった (ChREBPα Ct: 33.5, ChREBPβ Ct: > 35)。これと同調して、解糖系酵素 LPK、KHK、および脂質生合成系酵素 FASN は HPC で高発現であった。以上の知見から、肝臓における ChREBP や解糖系・脂質生合成系酵素の遺伝子発現は肝実質細胞に由来すると考えられた。

また、他の培養細胞においても ChREBP アイソフォームの遺伝子発現量を測定した。ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 や、分化前後のマウス筋芽細胞株 C2C12、マウス線維芽細胞株 3T3-L1 においては、ChREBP β の mRNA 発現は認められなかった (Ct > 35, Data not shown)。マウス胚性線維芽細胞 (MEF: Mouse Embryonic Fibroblast) は分化前後で多少の違いがあるものの、ChREBP β の mRNA 発現量は 2,000 ~ 5,000 molecule/ μ g RNA 程度であった (Ct: 29.5 ~ 30.7, Data not shown)。

本研究で調べた限り、ChREBP β の mRNA が高発現量で保たれている培養細胞は、初代培養した肝実質細胞のみである。

Construction of 5'-mChREBP α / β plasmid

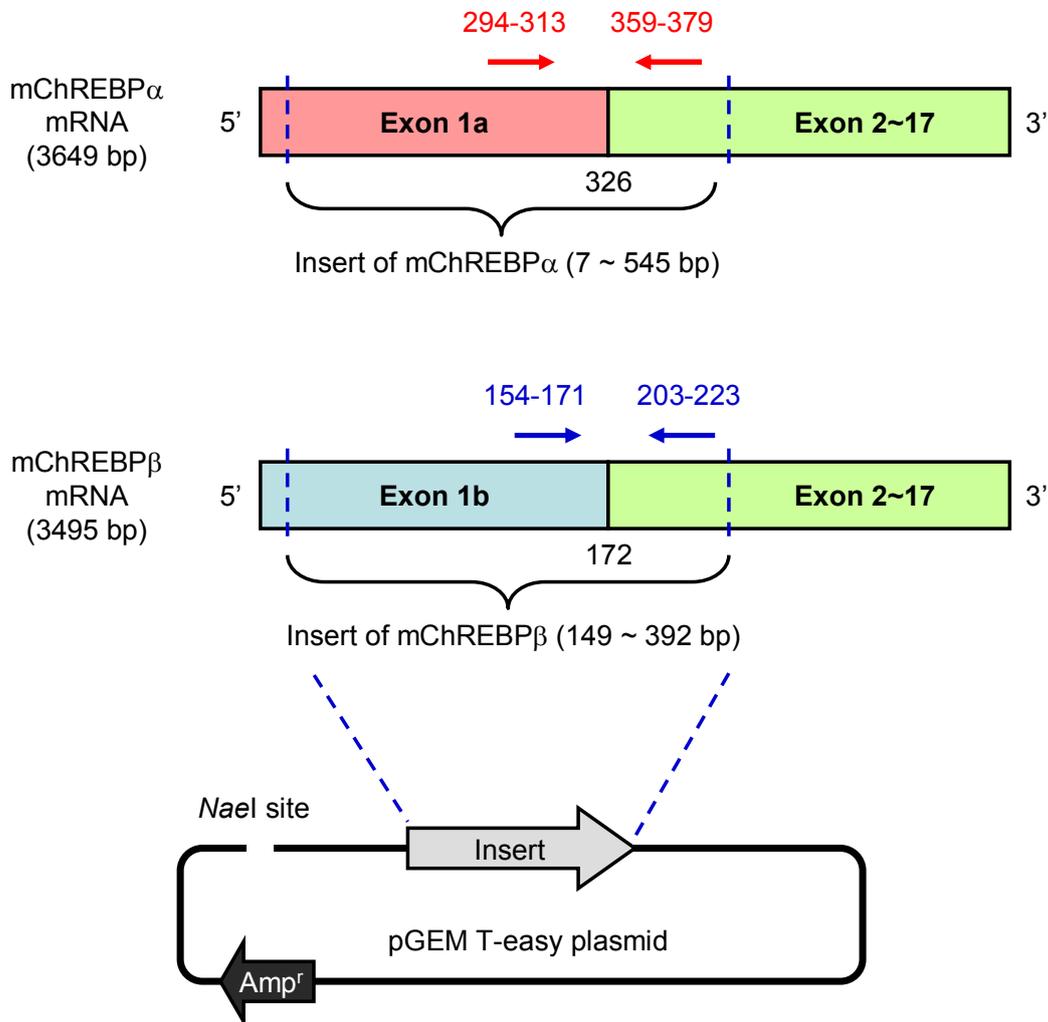


Fig. 2-1 5'-mChREBP α / β プラスミドのデザイン

mChREBP α あるいは mChREBP β mRNA の 5'末端側配列を pGEM T-easy プラスミドへ挿入し、5'-mChREBP α / β プラスミドとした。図中の赤矢印は mChREBP α 特異的 qPCR プライマー、青矢印は mChREBP β 特異的 qPCR プライマーがアニールする位置を示している。プラスミドを *NaeI* サイトで切断し直鎖状 DNA にしてから、qPCR 絶対定量のテンプレートとして用いた。

Amp^r: アンピシリン耐性遺伝子

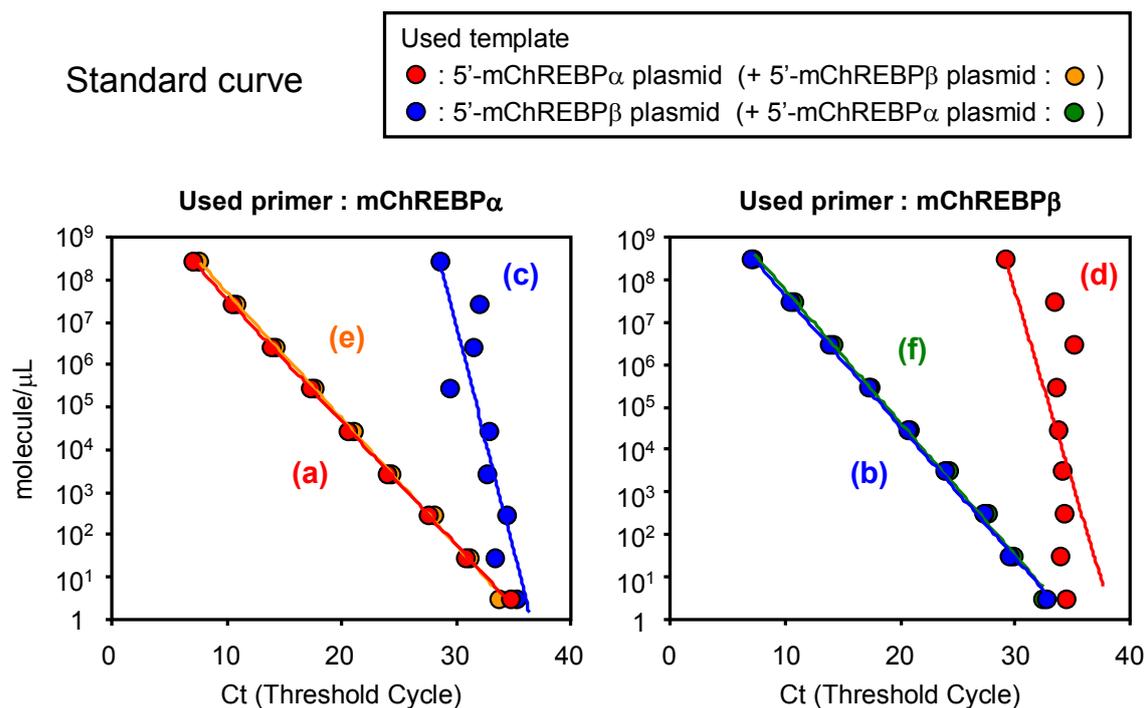


Fig. 2-2 各テンプレートを用いて作成した検量線のグラフ

qPCRにより作成した検量線のグラフ。X軸はCt値、Y軸は使用したサンプル中に含まれるプラスミドの分子数を示す。

Table 2-1 各テンプレートを用いて作成した検量線のパラメーター

検量線	プライマー	テンプレート	傾き	決定係数 R^2	増幅効率 (%)
a	ChREBP α	ChREBP α	-3.48	1.00	95
b	ChREBP β	ChREBP β	-3.24	1.00	104
c	ChREBP α	ChREBP β	-0.67	0.71	3063
d	ChREBP β	ChREBP α	-0.36	0.32	62590
e	ChREBP α	ChREBP $\alpha+\beta$	-3.36	1.00	99
f	ChREBP β	ChREBP $\beta+\alpha$	-3.19	1.00	106

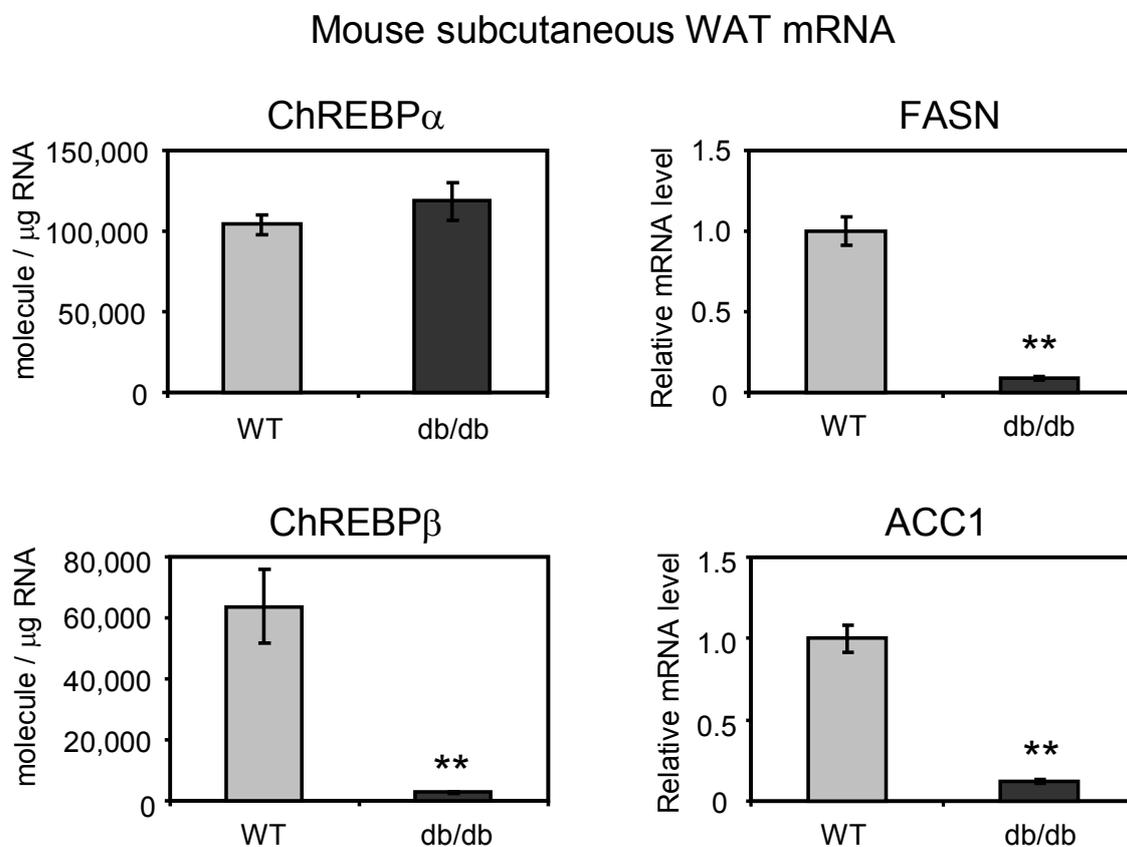


Fig. 2-3 肥満モデルマウスの皮下白色脂肪組織における
ChREBP アイソフォーム mRNA 分子数

通常食で飼育した 10 週齢の WT (野生型) マウスと db/db マウスの皮下白色脂肪組織を採取し、RT-qPCR 法により ChREBP アイソフォームと脂質生合成系酵素の mRNA 発現量を測定した。分子数既知のプラスミド希釈系列で検量線を作成することで、組織 RNA 1 μg 相当量の ChREBP アイソフォーム mRNA 分子数を算出した (絶対定量法)。FASN と ACC1 は任意のサンプル希釈系列で検量線を作成し、WT 群を 1 とした場合の相対的な遺伝子発現量を算出した (相対定量法)。各遺伝子の発現量は、S17 Ribosomal Protein の発現量で補正した。グラフは平均 \pm 標準誤差で示し、Student's *t*-test により平均値の差の検定を行なった。

(** : $P < 0.01$, $n=7$)

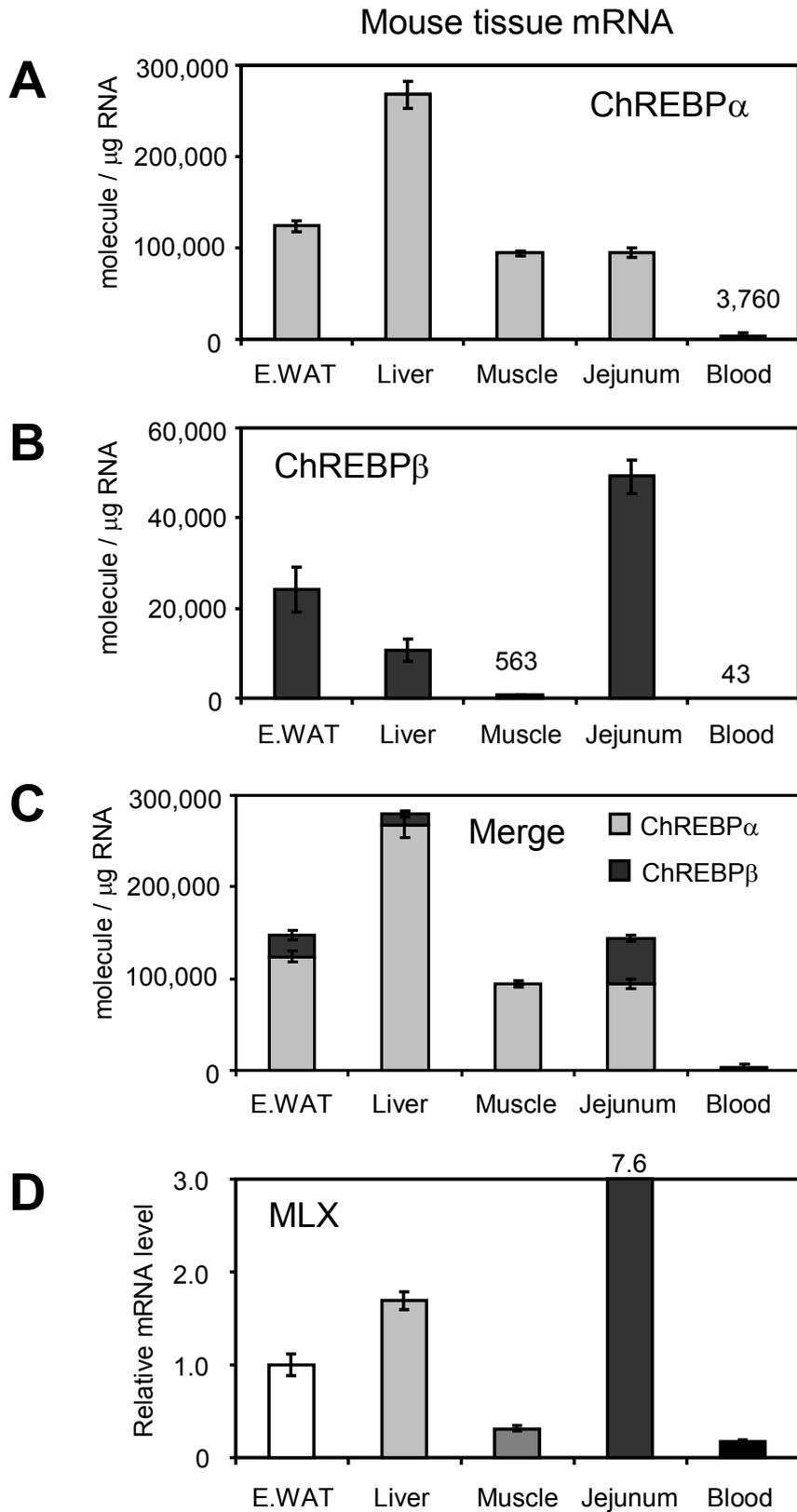


Fig. 2-4 マウス組織における ChREBP アイソフォーム mRNA 発現量 (Fig. legend は次頁に記載する。)

Fig. 2-4 マウス組織における ChREBP アイソフォーム mRNA 発現量

通常食で飼育した 10 週齢の WT マウスの精巣上体白色脂肪組織 (E.WAT)、肝臓、筋肉、空腸、血液を採取し、RT-qPCR 法により mRNA 発現量を測定した。
(A, B): 分子数既知のプラスミド希釈系列で検量線を作成することで、cDNA 合成に用いた組織 RNA 1 μ g 相当量の ChREBP アイソフォーム mRNA 分子数を算出した。

(C): ChREBP α と ChREBP β mRNA 分子数を合わせたグラフ。

(D): 任意のサンプル希釈系列で検量線を作成し、精巣上体白色脂肪組織を 1 とした場合の相対的な MLX の遺伝子発現量を算出した。

各遺伝子の発現量は 18S rRNA の発現量で補正した。

グラフは平均 \pm 標準誤差で示した。(n=4)

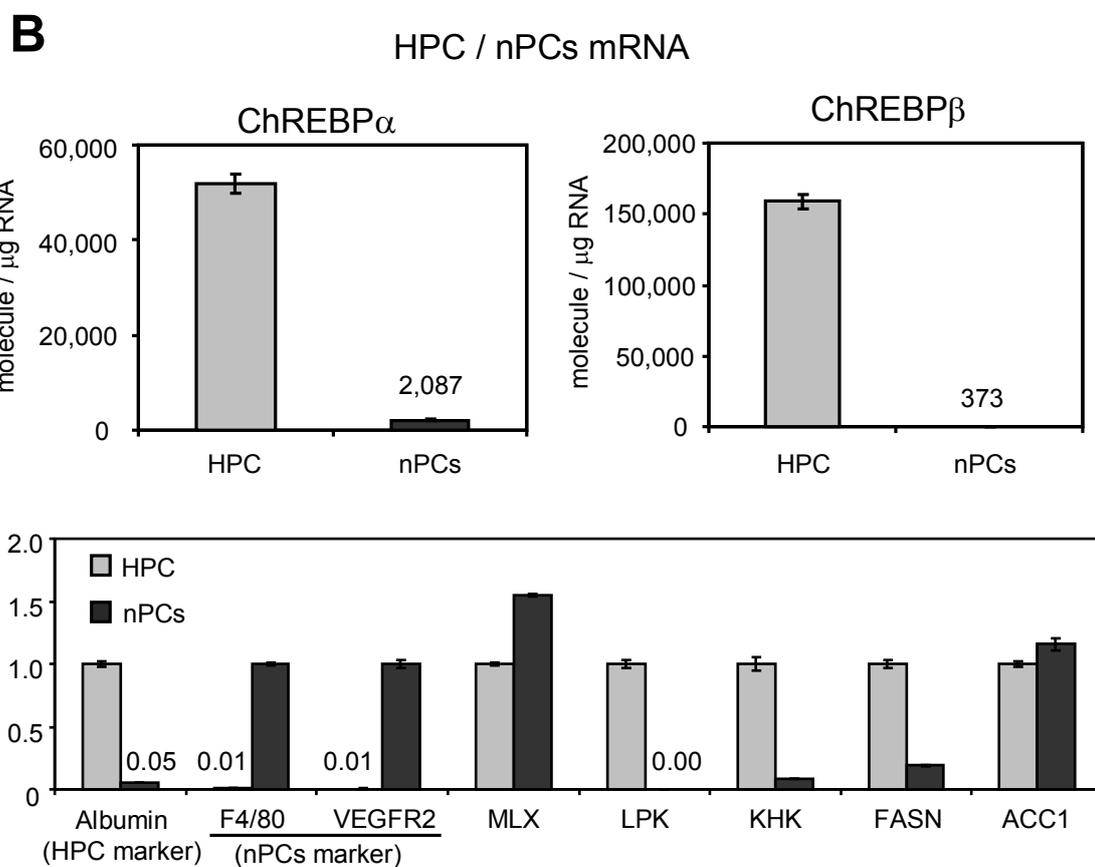
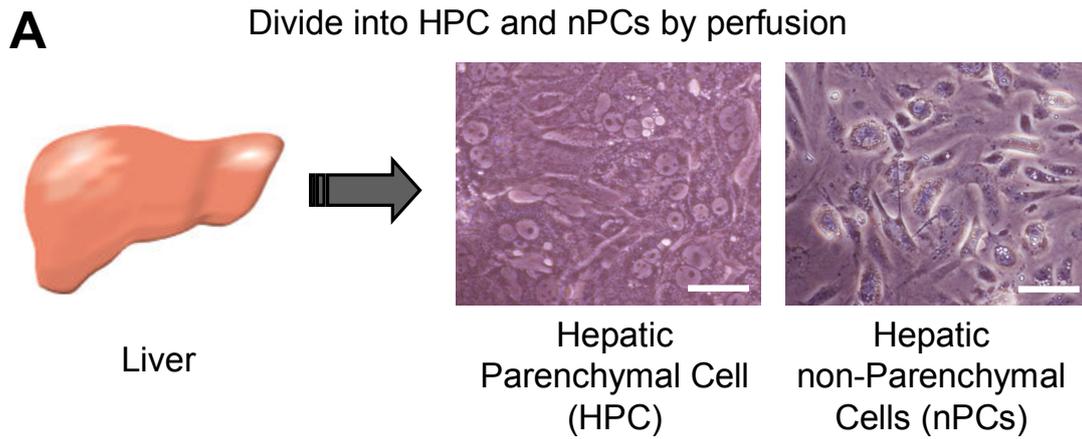


Fig. 2-5 マウス肝実質細胞 (HPC) / 非実質細胞 (nPCs) における遺伝子発現量

10 週齢の WT マウスの肝臓から HPC と nPCs を単離した。(A): 単離した細胞の顕微鏡画像。スケールバー: 50 μ m (B): 単離した HPC と nPCs から RNA を回収し、RT-qPCR 法により mRNA 発現量を測定した。F4/80 と VEGFR2 は nPCs の発現量を 1 とした場合の相対的な遺伝子発現量で示した。それ以外の遺伝子は HPC を 1 とした場合の相対的な遺伝子発現量で示した。各遺伝子の発現量は 18S rRNA の発現量で補正した。グラフは平均 \pm 標準誤差で示した。(n=3)

第二節

ChREBP アイソフォームの 転写活性

緒言

ChREBP β は核外移行に必須な LID が欠損しており核内に局在するため、ChREBP α と比べて転写活性が高いと考えられている。実際、Mark A. Herman らは ChoRE タンデム配列を遺伝子上流へ組み込んだレポーターアッセイにより、ChREBP β を発現させた HEK293T 細胞でプロモーター活性が劇的に増大することを示している ([56], Fig. 1-6A)。

この実験は ChoRE に対する ChREBP アイソフォームの転写活性を定量的に示しているため、ChREBP β が極めて転写活性が高いアイソフォームであることを示す一つの根拠になりうる。しかし、生体における ChREBP β の機能を考察する上では、以下の 4 点について検証を行なう必要がある。

- ①生体に存在する ChREBP 標的遺伝子プロモーターに対しても、
ChREBP β は高い転写活性を示すか？
- ②実際のタンパク質発現量と比較して、ChREBP β は ChREBP α よりも
転写活性が高いか？
- ③リン酸化や O-GlcNAc 化により ChREBP β の転写活性は変動するか？
- ④肝臓系細胞においても ChREBP β は高い転写活性を示すか？

そこで本節では、生体に存在しうる ChREBP 標的遺伝子プロモーターを用いたレポーターアッセイ系を構築し、これまでの知見と一致する現象が捉えられるか検証した。また、この時に導入した ChREBP アイソフォームのタンパク質発現量を定量し、ChREBP アイソフォームの比転写活性 (タンパク質発現量あたりの転写活性) を測定した。さらに、ChREBP β のリン酸化を促進、あるいは O-GlcNAc 化を抑制した場合に転写活性に変動が見られるか検証した。最後に、ChREBP β の高い転写活性化能がヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞でも認められるか検証した。

実験方法

◆ 発現用プラスミドの作成

レポーターアッセイに用いる発現用プラスミドのデザインを Fig. 2-6A に記した。クローニングの手技は本章第一節に準じて行なった。

● pCMV-3×Flag-mChREBP α

マウス肝臓 cDNA ライブラリーを鋳型として、5'末端側に *NotI*、3'端に *SalI* 制限酵素サイトを付加したプライマーで PCR を行ない、mChREBP α 翻訳領域 (Accession No.: NM_021455.4, 35~2627 bp, 開始コドンを除く) を増幅した。これを 3×Flag- pCMV7 plasmid (SIGMA) に組み込んだ。

Forward: 5'- GTTATGCGGCCGCGGCGCGCGCTGGCGGATCTATCCGTG -3'

Reverse: 5'- TAGCAGTCGACTTATAATGGTCTCCCCAGGGTGCCCTC -3'

● pCMV-3×Flag-mChREBP β

マウス肝臓 cDNA ライブラリーを鋳型として、5'末端側に *NotI*、3'端に *SalI* 制限酵素サイトを付加したプライマーで PCR を行ない、mChREBP β 翻訳領域 ([56]を参考にした, 412~2473 bp, 開始コドンを除く) を増幅した。これを 3×Flag- pCMV7 plasmid (SIGMA) に組み込んだ。

Forward: 5'- TCAAAGCGGCCGCGCGCGAATACCACAAGTGGAGAATCTAC -3'

Reverse: 5'- AGAACGTCGACTTATAATGGTCTCCCCAGGGTGCCCTCTG -3'

● pCMV-mMLX β

マウス肝臓 cDNA ライブラリーを鋳型として、5'末端側に *EcoRI*、3'端に *SalI* 制限酵素サイトを付加したプライマーで PCR を行ない、mMLX β 翻訳領域 (Accession No.: NM_001159385.1, 37~771 bp) を増幅した。これを pCMV5 plasmid (SIGMA) に組み込んだ。

Forward: 5'- AGTATGAATTCATGACGGAGCCGGGCGCCTCTCCGGAGGAC -3'

Reverse: 5'- CGTGCGTCGACTCAGTAGAGTTGGTTTTTCAACTGATGAAG -3'

◆ レポータープラスミドの作成

レポーターアッセイに用いるレポータープラスミドのデザインを Fig. 2-6B に記した。

● マウス組織 DNA (ゲノムライブラリー) の調製

C57BL/6J 雄マウス (10 週齢) から組織を回収した。組織 100 mg あたりに 1% SDS-TBE buffer (10 mM Tris pH 8.0, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA): 1 mL を加え、ポリトロンホモジナイザーにより攪拌した。終濃度が 100 µg/mL になるように Proteinase K (Roche) を加え、50°C で 4 時間インキュベートした。等量の PCI を加えて激しく攪拌し、最高速度で 30 分間遠心した。上清を回収し、1/10 量の 3M CH₃COONa、2.5 倍量の 100% Ethanol を加えて、-20°C で 2 時間以上インキュベートした。最高速度で 30 分間遠心し、上清を除くことでペレットを回収した。続いて、このペレットを滅菌超純水で溶解し、適量の RNase A solution を加え、37°C で 2 時間インキュベートした。その後は、上記の PCI 抽出、エタノール沈殿、70%エタノールリンス×3 回を行ない、回収した DNA ペレットを滅菌超純水に溶解した。

この組織 DNA 溶液は Nano Drop1000 で核酸定量し、十分量の DNA が得られていること、タンパク質のコンタミが見られないことを確認した。さらに、アガロースゲル電気泳動に供し、10 kbp 以上の位置に DNA のバンドが認められ、rRNA のバンドが認められないことを確認した。これをマウス組織ゲノムライブラリーとして以降のクローニングに用いた。

● pGL4-mACC1 promoter

マウス肝臓ゲノムライブラリーを鋳型として、5'末端側に *Kpn*I、3'端に *Nco*I 制限酵素サイトを付加したプライマーで PCR を行ない、ChoRE を含む mACC1 プロモーター (-514~+6 / *Mus musculus* GRCm38.p2 C57BL/6J gene position: 84172761~84173305) を増幅した。これを pGL4 plasmid (Promega) に組み込んだ。

Forward: 5'- AGGTGGTACCGTAAAGCAGAGTAGCACAAGGTCAGAATC -3'

Reverse: 5'- TGGTCCATGGATAAGGTCAGAAAATCTCCTCAGGGAGGC -3'

● pGL4-mLPK promoter

マウス肝臓ゲノムライブラリーを鋳型として、5'末端側に *Kpn*I、3'端に *Nco*I

制限酵素サイトを付加したプライマーで PCR を行ない、ChoRE を含む mLPK プロモーター (-206~+9 / *Mus musculus* GRCm38.p2 C57BL/6J gene position: 89136417~89136631) を増幅した。これを pGL4 plasmid に組み込んだ。

Forward: 5'- TAGTTGGTACCGCAGACAGGCCAAAGGGGATCCGGCAGCC -3'

Reverse: 5'- CGATACCATGGTACTGCTGCGTACCTGCTGTGTCTGTGG 3'

- pEF-β-gal

以前に当研究室で作成したものを用いた。安定したβ-gal 発現が認められることから、レポータープラスミドとともに導入して補正に用いた。

◆ 細胞実験

- 細胞培養

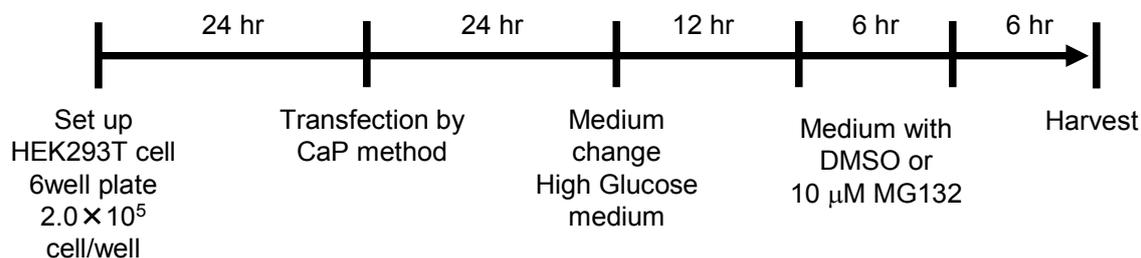
- HEK293T 細胞

HEK293T 細胞はヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞に SV40 ウイルス由来 T-large 抗原遺伝子を組み込んだ細胞株である。10% FBS (Fetal Bovine Serum)、100 unit/mL Penicillin、100 μg/mL Streptomycin を含む DMEM-high glucose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Wako) を基本培地として、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養し、1×10⁶ cell/100 mm dish の割合で継代を行なった。

ルシフェラーゼアッセイに用いる場合、トリプシン処理によってディッシュから剥がした細胞を 12-well プラスチックプレート (Becton Dickinson) に 1×10⁵ cell/well の割合で播いた。その 24 時間後にリン酸カルシウム法により遺伝子導入した。遺伝子導入から 24 時間後に、低グルコース培地 (10% FBS-DMEM-low glucose; 5.5 mM Glucose) あるいは高グルコース培地 (10% FBS-DMEM-high glucose; 25 mM Glucose) へ交換した。Forskolin (SIGMA, 終濃度: 20 μM, 溶媒: DMSO) や Azaserine (Santa Cruz Biotechnology, 終濃度: 5 μM, 溶媒: H₂O) などの薬剤は上記の培地に添加した。それから 24 時間後の培養を行なった後に、ルシフェラーゼアッセイのサンプルとして回収した。



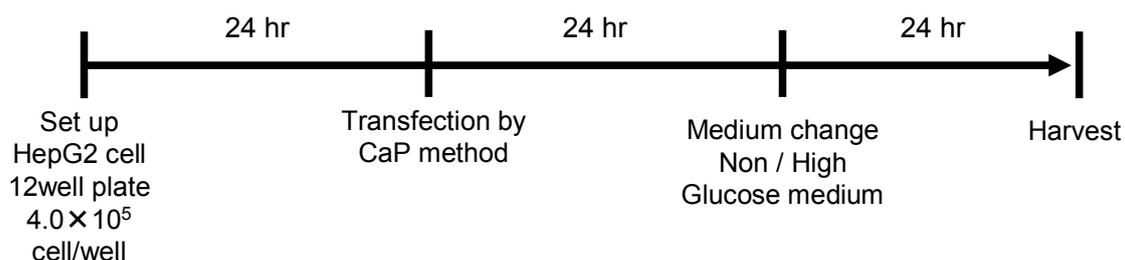
ウエスタンブロッティングに用いる場合、トリプシン処理によってディッシュから剥がした細胞を、6-well プラスチックプレート (Becton Dickinson) に 2×10^5 cell/well の割合で播いた。その 24 時間後にリン酸カルシウム法により遺伝子導入した。遺伝子導入から 24 時間後に高グルコース培地へ交換した。それから 24 時間後の培養を行なった後に回収した。プロテアソーム阻害剤 MG132 (SIGMA) を投与する場合は、回収の 6, 12 時間前に MG132 を添加した高グルコース培地に交換した。対照群 (0 hr) は MG132 の溶媒として用いた DMSO (Dimethyl Sulfoxide) を添加した高グルコース培地に交換した。



- HepG2 細胞

HepG2 細胞はヒト肝癌由来細胞株である。10% FBS、100 units/mL Penicillin、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin を含む DMEM-high glucose (Wako) を基本培地として、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養し、 2×10^6 cell/100 mm dish の割合で継代を行なった。

ルシフェラーゼアッセイに用いる場合、トリプシン処理によってディッシュから剥がした細胞を、12-well プラスチックプレート (Becton Dickinson) に 4×10^5 cell/well の割合で播いた。その 24 時間後にリン酸カルシウム法により遺伝子導入した。遺伝子導入から 24 時間後に、無グルコース培地 (10% FBS-DMEM-non glucose; 0 mM Glucose) あるいは高グルコース培地 (10% FBS-DMEM-high glucose; 25 mM Glucose) へ交換した。それから 24 時間後に回収した。



◆ レポーターアッセイ

- 遺伝子導入 (トランスフェクション; リン酸カルシウム法)

プラスミド DNA: total 800~1300 ng、2.5 M CaCl₂: 5 μL を含む溶液に滅菌超純水を加えて合計 50 μL とした。この溶液を 2×HBSS (0.28 M NaCl、10 mM KCl、1.38 mM NaH₂PO₄、11.1 mM Glucose、42 mM HEPES、pH 7.05): 50 μL へ一滴ずつ加え、10 回ピペティングした。室温で 20 分間インキュベートした後、この溶液を細胞へ一滴ずつ滴下し、37°C、5% CO₂ のインキュベーター内で 24 時間培養した。遺伝子導入に用いたプラスミド量は以下のとおりである。

- HEK293T 細胞

pCMV-3×Flag-mChREBPα: 250 ng, pCMV-3×Flag-mChREBPβ: 250 ng,
pCMV-mMLXβ: 250 ng, pGL4-mACCC1 promoter: 250 ng, pEF-β-gal: 50 ng

- HepG2 細胞

pCMV-3×Flag-mChREBPα: 250 ng, pCMV-3×Flag-mChREBPβ: 250 ng,
pCMV-mMLXβ: 250 ng, pGL4-mACCC1 promoter: 500 ng,
pGL4-mLPK promoter: 100 ng, pEF-β-gal: 300ng

なお、空ベクター (pCMV7-3×Flag) を添加することで、導入される DNA 量がサンプル間で等しくなるようにした。

- ルシフェラーゼアッセイ

培地を除いた後の細胞に、1×Luciferase Lysis Buffer (25 mM Tris-phosphate [pH 7.8]、2 mM DTT、10% Glycerol、1% TritonX-100、2 mM CDTA [Trans-1,2-Diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid]) を 100 μL 加え、ディッシュを揺らしながら 4°C で 20 分間インキュベートした。Cell lysate を 1.5 mL チューブへ移し、ボルテックスにより十分に攪拌した。最高速度で 5 分間遠心した後の上清を回収した。アシストチューブ (SARSTEDT) 中で、この上清と 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) を混合し、Mini Lumat LB9506 (Berthold) によりルシフェラーゼ活性を測定した。

なお、使用した Cell lysate は HEK293T 細胞の場合は 5 μL、HepG2 細胞の場合

合は 20 μL である。Mini Lumat LB9506 の露光時間は、HEK293T 細胞の場合は 2~3 秒間、HepG2 細胞の場合は 10 秒間に設定した。

- β -galactosidase (β -gal) アッセイ

100 \times Mg Solution (1 M MgCl_2 : 20 μL 、2- Mercaptoethanol: 63 μL 、滅菌超純水: 117 μL): 1 μL 、1 M NaP buffer (0.2 M Na_2HPO_4 : 0.2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 = 41: 9$): 67 μL 、4 mg/mL ONPG (O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside): 22 μL 、の割合で混合し、 β -gal Substrate Reagent とした。96 well plate 中で β -gal Substrate Reagent: 100 μL と Cell lysate を混合し、37 $^\circ\text{C}$ でインキュベートした。着色が確認したところで、主波長 415 nm / 副波長 655nm の吸光度を測定した。

ルシフェラーゼ活性の値を β -galactosidase 活性の値で徐することで、補正後ルシフェラーゼ活性値とした。なお、使用した Cell lysate は HEK293T 細胞の場合は 1 μL 、HepG2 細胞の場合は 20 μL である。

◆ ウェスタンブロッティング

- 細胞からのタンパク質抽出

使用直前に RIPA buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0]、150 mM NaCl、1% TritonX-100、0.5% Sodium deoxycholate、0.1% SDS) に、液量の 1/100 量の Protease inhibitor cocktail (Nakarai Tesque)、1/100 量の Phosphatase inhibitor cocktail 3 (SIGMA)、1/1000 量の 1 M DTT、1/1000 量の 10mM MG132 を添加して Lysis buffer とした。

6-well plate で培養した細胞 PBS で洗浄した後、Lysis buffer を 1 well あたり 100 μL ずつ加えた。スクレイパーで掻き取った細胞懸濁液を 1.5 mL チューブへ移し、25 G シリンジを用いて 10 回ホモジナイズした。これらの操作はすべて氷上で行なった。最高速度で 20 分間遠心した後、適量の上清を 1.5 mL チューブに移した。このタンパク溶液は Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) によりタンパク質濃度を測定した。

タンパク溶液を適量の滅菌超純水で希釈して、全てのサンプルのタンパク質濃度を一定に合わせた。これに、1/5 量の 6 \times Laemmli Sample Buffer (1 M Tris-HCl [pH 6.8]: 2.8 mL、Glycerol: 3 mL、SDS: 1.0 g、DTT: 0.93 g、Bromo phenol blue: a few) を加え、65 $^\circ\text{C}$ で 30 分間加熱処理した。処理後はすぐに氷上へ移して 2 分間以上インキュベートし、使用時まで-20 $^\circ\text{C}$ で冷凍保存した。

- SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

ミニゲル一枚あたり、30% Acrylamide-bis (29: 1) solution: 1.88 mL、1 M Tris-HCl (pH 8.8): 2.81 mL、滅菌超純水: 2.66 mL、10% SDS: 75 μ L、TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine): 3.75 μ L、10% Ammonium persulfate 75 μ L を混合し、7.5% 分離ゲル溶液とした (濃度の異なるゲルの作成時は Acrylamide-bis solution と超純水の比を変えて調節した)。これをセットしたゲル板に流し込み、適量の水飽和 *n*-Buthanol を重層し、1 時間室温で放置した。

ミニゲル一枚あたり、30% Acrylamide-bis (29:1) solution: 0.38 mL、1 M Tris-HCl (pH 6.8): 0.44 mL、滅菌超純水: 1.98 mL、10% SDS: 30 μ L、TEMED: 3.1 μ L、10% Ammonium persulfate 50 μ L を混合し、濃縮ゲル溶液とした。分離ゲルに重層した水飽和 *n*-Buthanol を除き、分離ゲルの上に濃縮ゲル溶液を流し込んだ。コームをすばやく挿し、そのまま室温で 30 分間放置した。

ゲルボックスに泳動バッファー (25 mM Tris、192 mM Glycine、0.1% 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 10~20 μ L (Protein: 5~20 μ g) アプライして 80V (濃縮ゲル泳動時)、120 V (分離ゲル泳動時) 定電圧で電気泳動を行なった。なおマーカーには Prestained XL-Ladder (APRO science)を用いた。

- ブロットティング

セミドライ式ブロットティング装置 (Bio craft) を用いてブロットティングを行なった。PVDF メンブレン (Polyvinylidene difluoride membrane, Immobilon, Millipore) を Methanol に 1 分間浸した後、トランスファーバッファー (100 mM Tris、192 mM Glycine、5% Methanol) に 10 分間浸した。

泳動後のゲルをゲル板からはがし、トランスファーバッファーに浸した後、下側から濾紙 3 枚、ゲル、メンブレン、濾紙 3 枚の順にブロットティング装置にセットした。メンブレン 1 cm²あたり 2 mA の定電流を 1 時間流してブロットティングした。

- 抗体反応と検出

メンブレンをブロッキング溶液 (5% Skim milk or 5% BSA [Bovine Serum Albumin], 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1% Tween-20, pH 7.5) に浸し、室温で 1 時間以上振盪することでブロッキングした。一次抗体をブロッキング溶液で希釈し、メンブレンをこれに浸して室温で 1 時間以上、あるいは 4°C で 12 時間以上インキュベートした。T-TBS (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1% Tween-20, pH 7.5) で 2 回すすいだのち、メンブレンを T-TBS に浸して 5 分間振盪した。この洗浄操作を計 5 回繰り返した。

続いて、HRP (HorseRadish Peroxidase) 標識二次抗体をブロッキング溶液に希釈し、メンブレンをこれに浸して室温で 1 時間インキュベートした。上記と同様の洗浄操作を行なった後、発色試薬 ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare)、もしくは Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) にメンブレンを浸した。シグナル検出にはルミノイメージアナライザー-LAS-4000 mini (GE Healthcare)を用い、画像解析には ImageQuant TL (GE Healthcare)ソフトウェアを用いた。なお、標的タンパク質の発光が弱い場合は、Signal Enhancer HIKARI for Western Blotting and ELISA (Nakarai Tesque)を抗体希釈溶液として用いた。使用した抗体は以下に記したとおりである。

<一次抗体>

- anti-Flag mouse monoclonal antibody (SIGMA)
- anti-ChREBP (M-300) rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz)

この抗体は ChREBP の Exon 5 以降のアミノ配列をエピトープとしているため、ChREBP α と ChREBP β の両タンパク質を認識可能である。

- anti- β -actin mouse monoclonal antibody (SIGMA)

<二次抗体>

- HRP-anti-Rabbit IgG monoclonal antibody (Jackson ImmunoResearch)
- HRP-anti-Mouse IgG monoclonal antibody (Jackson ImmunoResearch)

◆ 統計処理

本章第一節に記載の方法で行なった。

結果

- ◆ mChREBP β は生体に存在する mACC1 プロモーターに対しても強力な転写活性を示す。

一つ目の検証項目は「①生体に存在する ChREBP 標的遺伝子プロモーターに対しても ChREBP β は高い転写活性を示すか？」である。これを検証するために、マウスゲノムライブラリーを鋳型として mACC1 プロモーター配列を増幅した。これをレポーター遺伝子上流に組み込んでレポータープラスミド pGL4-mACC1 promoter を作成した (Fig. 2-6B)。これを mChREBP α / β 発現用プラスミドとともに HEK293T 細胞へ遺伝子導入し、高/低グルコース下における mACC1 プロモーター活性を測定した (Fig. 2-7)。

mChREBP α を発現させた細胞では、培地中グルコース濃度に依存して mACC1 プロモーター活性の増大が認められた。一方で、mChREBP β を発現させた細胞では、培地中グルコース濃度に依存することなく、顕著な活性の増大が認められた。これらの変化は ChoRE を含まないレポータープラスミド (pGL4-Basic) では認められないため、mACC1 プロモーター活性は ChREBP アイソフォームの転写活性を正確に反映しているものと考えられる。

これらの結果は、Mark A. Herman らが行なった ChoRE タンデム配列を用いたレポーターアッセイの結果と概ね一致しており、生体に存在する mACC1 プロモーターにおいても ChREBP β は高い転写活性を示すことを確認した。

- ◆ mChREBP β の比転写活性は mChREBP α の 50 倍以上高い。

続いて、「②実際のタンパク質発現量と比較して、ChREBP β は ChREBP α よりも転写活性が高いか？」を調べるために、レポーターアッセイと同条件で回収した細胞 (高グルコース下) からタンパク質を抽出した。これをウエスタンブロッティングに供することで、遺伝子導入した ChREBP アイソフォームのタンパク質発現量を定量した。

Fig. 2-8 に見られるように、導入した ChREBP アイソフォームのタンパク質は Flag 抗体、および ChREBP 抗体を用いたウエスタンブロットにより検出することができた (赤矢印のバンド: 3×Flag-mChREBP α , 青矢印のバンド: 3×Flag-mChREBP β)。ChREBP α には 2 本のバンドが見られるが、上側のバンドはリン酸化された ChREBP α 、下側のバンドはリン酸化されていない ChREBP α

であると考えられる。ChREBP 抗体によって検出された ChREBP アイソフォームのタンパク質を定量し、これを β -actin タンパク質発現量で除すことで補正 ChREBP アイソフォームタンパク質発現量を算出した (Table 2-2, Expression)。その結果、mChREBP α タンパク質発現量を 1 とした場合に、mChREBP β タンパク質発現量は 0.08 であった。遺伝子導入に用いたプラスミドはともに 250 ng/well であり、プラスミドコピー数もほぼ等しいが (pCMV-3 \times Flag-mChREBP α : 3.14×10^{10} copy、pCMV-3 \times Flag-mChREBP β : 3.38×10^{10} copy)、実際のタンパク質発現量は ChREBP β の方が圧倒的に少ないことが判明した。

さらに、Fig. 2-7 の mACC1 プロモーター活性を補正 ChREBP アイソフォームタンパク質発現量で除した値を比転写活性 (タンパク質発現量あたりの転写活性) とした (Table 2-2, Relative activity)。mChREBP β の比転写活性は mChREBP α と比較して 50 倍以上高い値であった。

◆ mChREBP β タンパク質はプロテアソームによる分解を受けやすい。

mChREBP β のタンパク質発現量が mChREBP α と比べて極端に少ない原因は不明である。mChREBP アイソフォームの発現に用いたプラスミドは、インサート配列以外は同様の配列であるため、遺伝子導入や転写の段階でこの違いが生じたとは考えづらい。

しかし、遺伝子導入後の細胞をプロテアソーム阻害剤 MG132 で処理したところ、処理時間依存的に mChREBP β タンパク質発現量が増加する傾向が見られた (Fig. 2-9, 青矢印のバンド)。このような傾向は mChREBP α には見られなかった (Fig. 2-9, 赤矢印のバンド)。この結果は、mChREBP β のタンパク質はプロテアソームによる分解を受けやすいために発現量が少ないことを示唆する。

◆ Forskolin を投与しても ChREBP β の高い転写活性は維持される。

次に、「③リン酸化や O-GlcNAc 化により ChREBP β の転写活性は変動するか？」を調べるために、Fig. 2-7 の実験に Forskolin 投与群と Azaserine 投与群を加えて、mACC1 プロモーター活性を測定した。

Forskolin を投与した培養細胞では、ChREBP α のリン酸化が亢進するとともに ChREBP 標的遺伝子の発現量が減少することが報告されている [66,67]。本研究ではこれに倣って、遺伝子導入後の HEK293T 細胞を 20 μ M Forskolin で 24 時間処理した (Fig. 2-10A)。mChREBP α を発現させた細胞では、高グルコース下で認

められるプロモーター活性の増大が Forskolin の投与により完全にキャンセルされており、従来までの知見と一致する結果が得られた。一方、mChREBP β を発現させた細胞では、グルコースの有無に関わらず、Forskolin の投与によりプロモーター活性が減少することが確認された。ただし、Forskolin 投与により高グルコース下での活性化が完全にキャンセルされた mChREBP α とは異なり、Forskolin 投与時も mChREBP β の高い転写活性は保たれたままであった。

Azaserine は GlcNAc (N-acetylglucosamine) 合成を阻害することでタンパク質の O-GlcNAc 化を抑制する化合物である [68]。O-GlcNAc 化を阻害した状態では、グルコースシグナルによる ChREBP α の活性化がキャンセルされることが報告されている [52,69]。本研究では、遺伝子導入後の HEK293T 細胞を 5 μ M Azaserine で 24 時間処理した (Fig. 2-10B)。mChREBP α を発現させた細胞では、高グルコース下で認められるプロモーター活性の増大が Azaserine の投与によりキャンセルされた。一方、mChREBP β を発現させた細胞では、Azaserine 投与によるプロモーター活性の低下は認められなかった。

◆ 肝細胞でも mChREBP β は高い転写活性を示す。

最後に、「④肝臓の細胞においても ChREBP β は高い転写活性を示すか？」を検証するため、ヒト肝臓由来細胞 HepG2 を用いて ChREBP アイソフォームのレポーターアッセイを行なった。HEK293T 細胞実験との操作上の違いは以下の 3 点である。

- ・低グルコース培地 (5.5 mM Glucose) でも mChREBP α の活性化が認められたので無グルコース培地 (0 mM Glucose) を用いた。
- ・HepG2 細胞は遺伝子導入効率が悪いので使用するプラスミド DNA 量を増やした。
- ・肝臓系細胞で応答が見られる mLPK プロモーター活性も検証した。

mACC1 プロモーターでは、mChREBP β の発現による顕著なプロモーター活性の増大が認められ、HEK293 細胞での検証 (Fig. 2-7) とほぼ同等の結果を得られた (Fig. 2-11A)。mLPK プロモーターでは、高グルコース下での mChREBP α によるプロモーター活性増大と、mChREBP β による顕著なプロモーター活性の増大が認められた (Fig. 2-11B)。

以上の結果により、肝臓の細胞においても、mChREBP β は糖・脂質代謝関連遺伝子の転写を強力に誘導するレギュレーターとして機能することが示された。

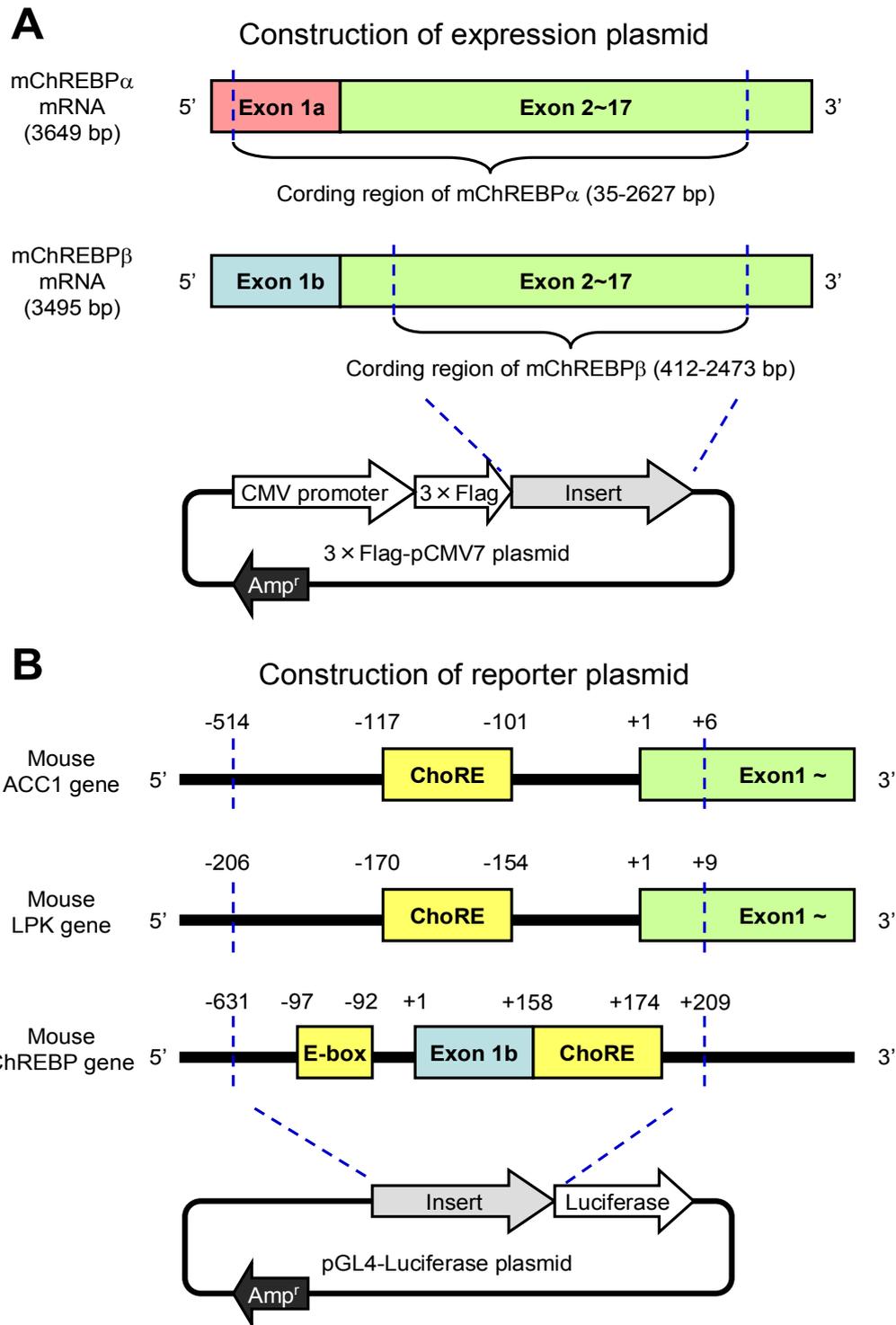


Fig. 2-6 レポーターアッセイに用いたプラスミドのデザイン

(A): mChREBP アイソフォーム発現用プラスミドのデザイン (mMLX β 発現用プラスミドは未掲載)。(B): ChREBP 標的遺伝子のプロモーター領域を挿入したレポータープラスミドのデザイン。遺伝子上の数字は、転写開始点の+1 とした場合の位置を示している。Amp^r: アンピシリン耐性遺伝子

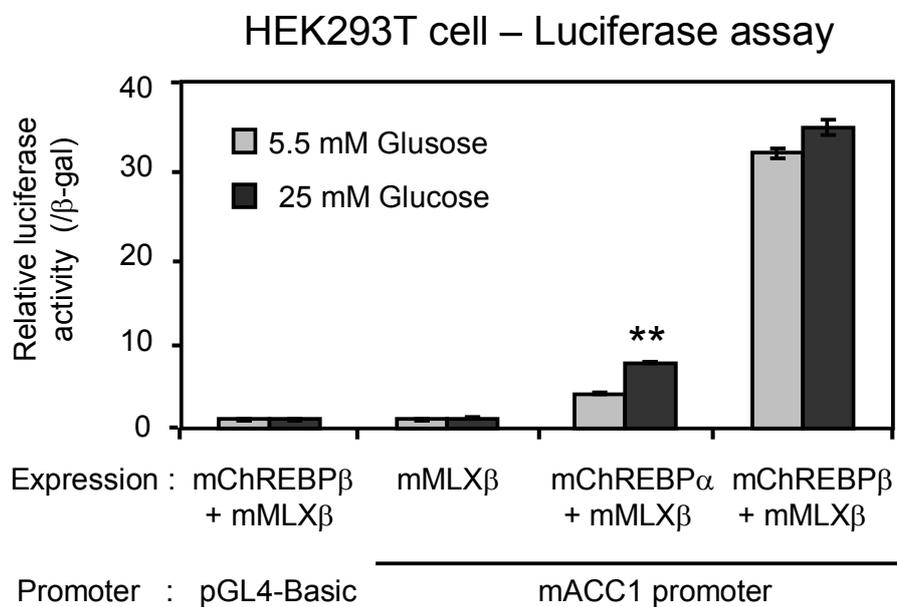


Fig. 2-7 mChREBP アイソフォームを発現させた HEK293T 細胞における mACC1 プロモーター活性

遺伝子導入後の HEK293T 細胞をグルコース濃度の異なる培地で 24 時間培養し、ルシフェラーゼアッセイにより mACC1 プロモーター活性を測定した。プロモーター活性を β -gal 活性で補正し、pGL4-Basic (mACC1 プロモーター未挿入のレポータープラスミド) 発現群を 1 とした場合の相対値を算出した。グラフは平均 \pm 標準誤差で示した。5.5 mM / 25 mM Glucose 群間のプロモーター活性の差を Student's *t*-test により検定した。(**: $P < 0.01$, $n=3$)

HEK293T cell – Protein

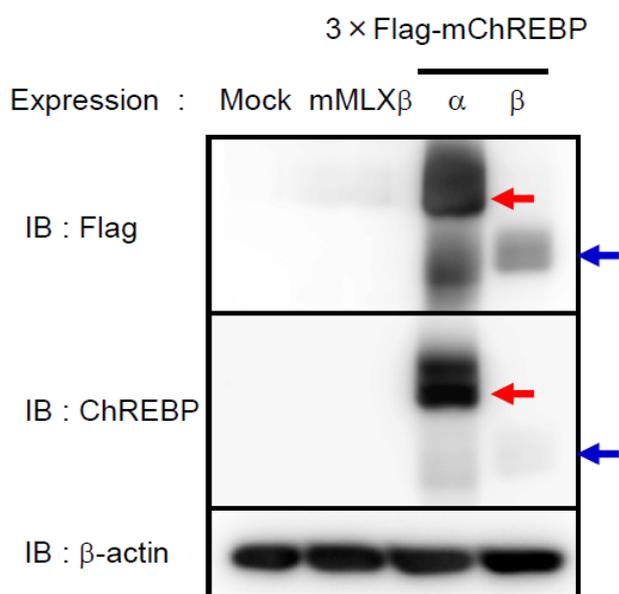


Fig. 2-8 HEK293T 細胞における 3×Flag-mChREBPα / β のタンパク質発現量

遺伝子導入後の HEK293T 細胞を高グルコース培地で 24 時間培養し、これら細胞から得られたタンパク質をウエスタンブロッティングに供した。赤矢印は 3×Flag-mChREBPα (Mw: 98 kDa)、青矢印は 3×Flag-mChREBPβ (Mw: 78 kDa) のタンパク質バンドの位置を示している。

Table 2-2 mChREBP アイソフォームのタンパク質発現量と比転写活性

Parameter	mChREBPα	mChREBPβ
Relative Luc.	1.00	4.58
ChREBP Protein	1.00	0.08
β-actin Protein	1.00	1.04
Expression (ChREBP / β-actin)	1.00	0.08
Relative activity (R.Luc. / Expression)	1.00	57.08

Relative Luc: mChREBPα + mMLXβもしくは mChREBPβ + mMLXβを発現させた HEK293T 細胞を高グルコース培地で 24 時間培養した際の mACC1 プロモーター活性 (Fig. 2-7)。Expression: 「ChREBP Protein」を「β-actin Protein」で除した補正 ChREBP アイソフォームタンパク質発現量。Relative activity: 「Relative Luc.」を「Expression」で除した ChREBP アイソフォームの比転写活性。全ての値は mChREBPαを発現させた細胞を 1 とした場合の相対値で示した。

HEK293T cell – Protein

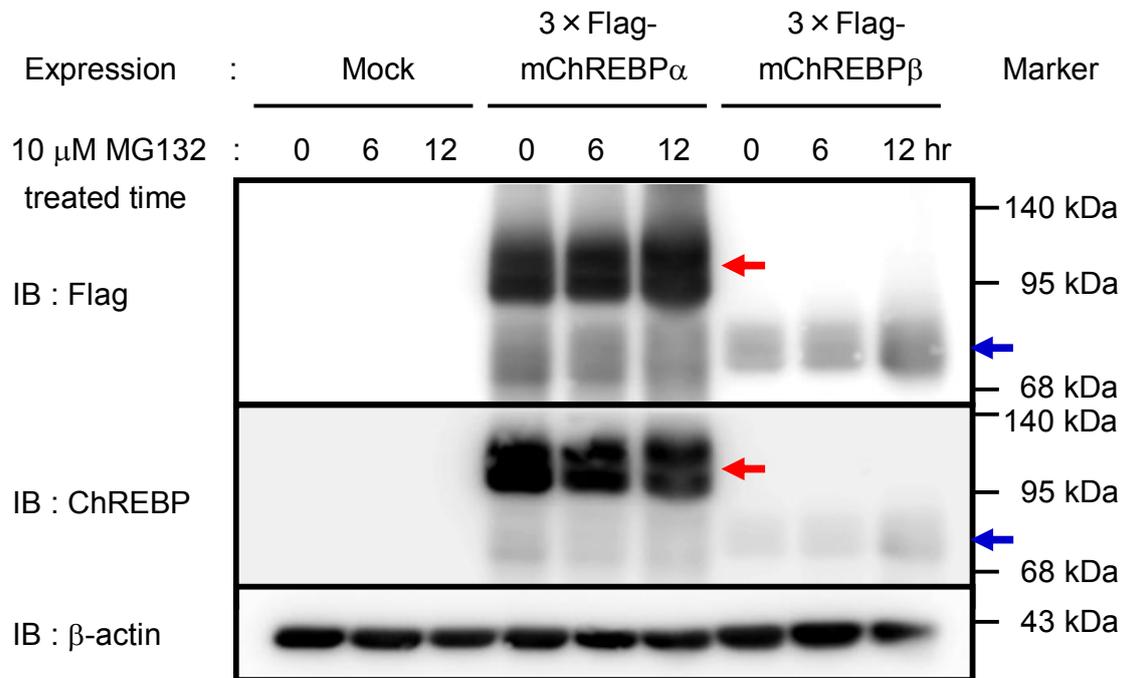


Fig. 2-9 MG132 で処理した際の 3×Flag-mChREBP α / β のタンパク質発現量

遺伝子導入後の HEK293T 細胞を高グルコース培地で 24 時間培養した。回収の 6 時間あるいは 12 時間前に 10 μ M MG132 (プロテアソーム阻害剤) を培地に添加した。これら細胞から得られたタンパク質をウエスタンブロッティングに供した。赤矢印は 3×Flag-mChREBP α (Mw: 98 kDa)、青矢印は 3×Flag-mChREBP β (Mw: 78 kDa) のタンパク質バンドの位置を示している。

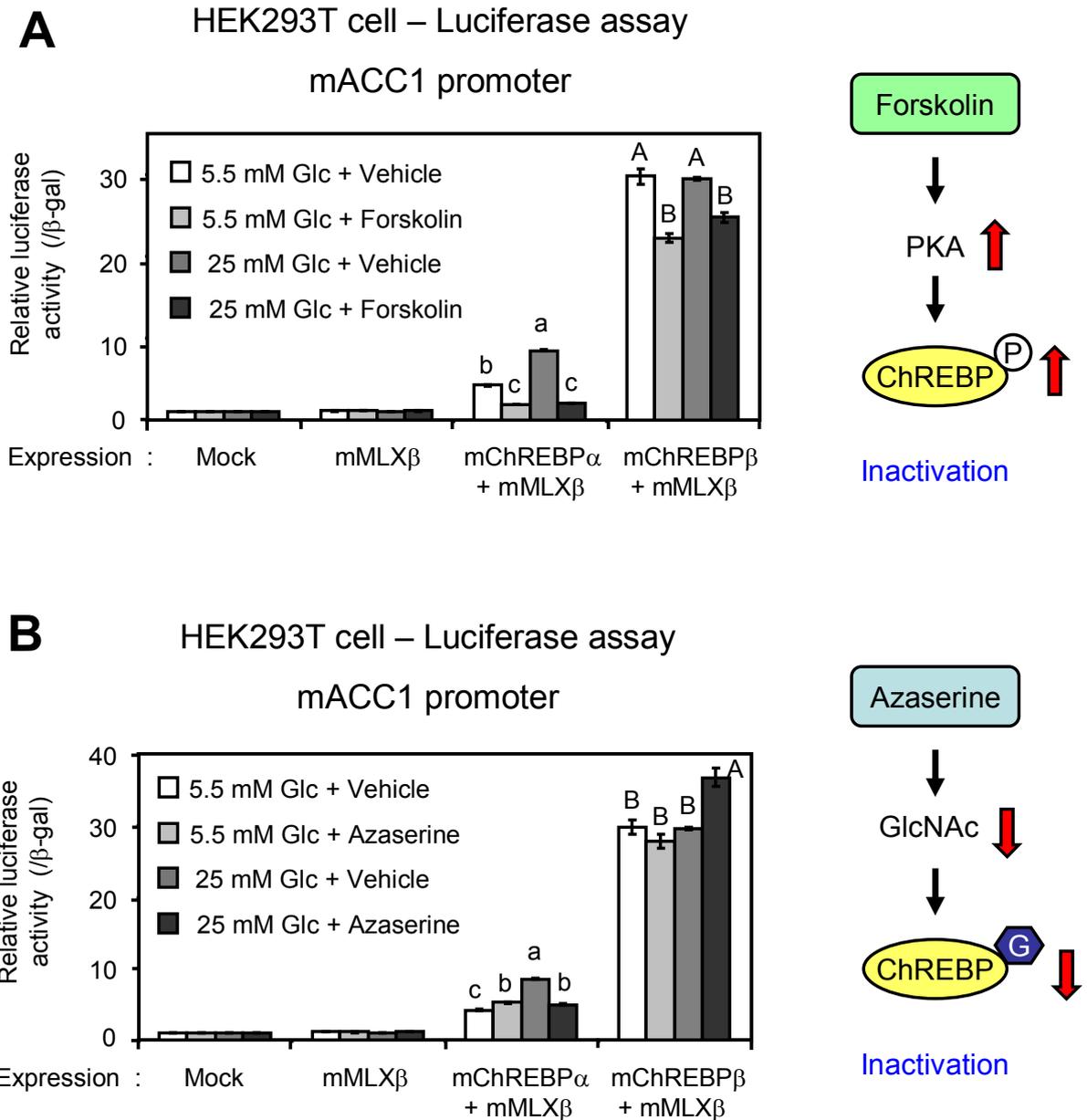


Fig. 2-10 リン酸化 / O-GlcNAc 化抑制による mChREBPβの転写活性の変動

遺伝子導入後の HEK293T 細胞を 20 μ M Forskolin、あるいは 5 μ M Azaserine を添加した培地で 24 時間培養し、ルシフェラーゼアッセイにより mACC1 プロモーター活性を測定した。プロモーター活性を β -gal 活性で補正した上で、Mock を 1 とした場合の相対値を算出した。グラフは平均 \pm 標準誤差で示した。遺伝子導入条件が同じもののうち、培地条件の異なる群の間で多重比較検定 (Tukey-Kramer test) を行なった。

(アルファベット文字の異なるものは $P < 0.05$ で有意差が認められる。n=3)

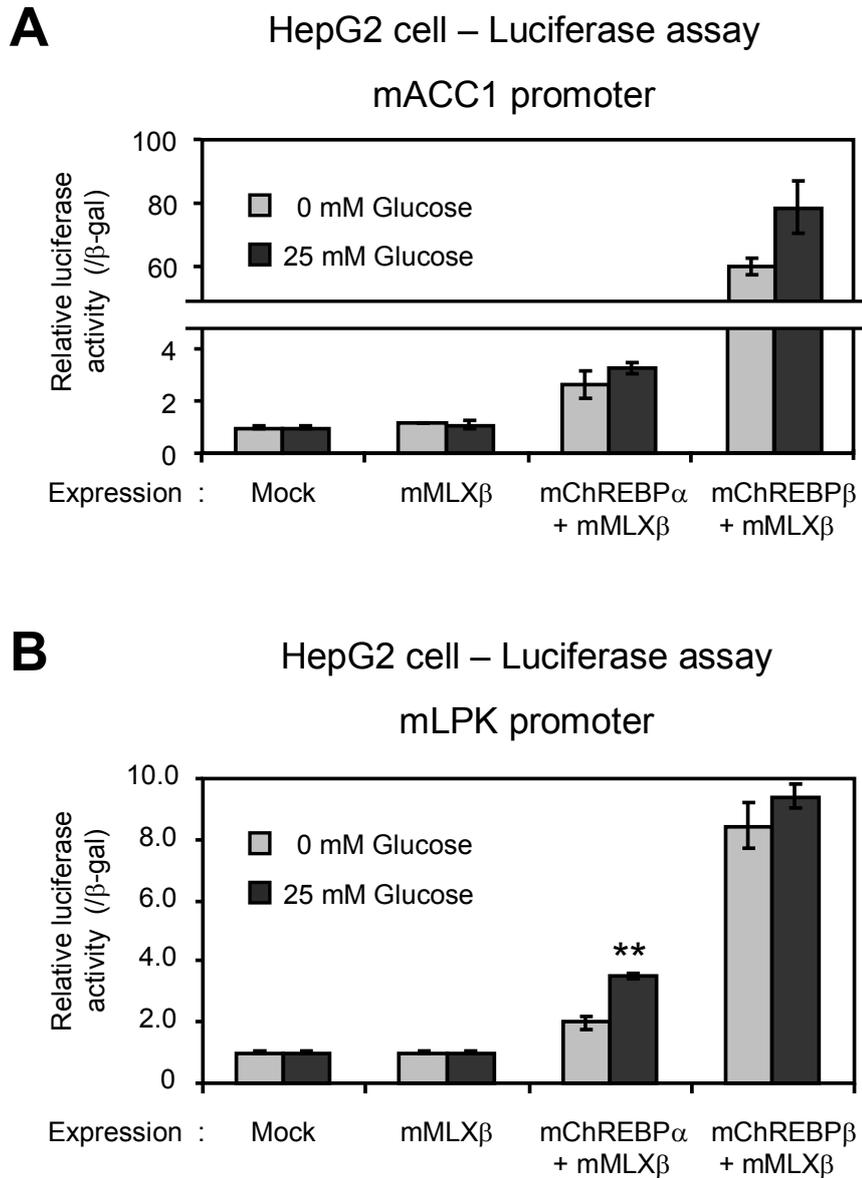


Fig. 2-11 mChREBP アイソフォームを発現させた HepG2 細胞における mACC1 / mLPK プロモーター活性

遺伝子導入後の HepG2 細胞をグルコース濃度の異なる培地で 24 時間培養し、ルシフェラーゼアッセイにより (A): mACC1、あるいは (B): mLPK プロモーター活性を測定した。プロモーター活性を β -gal 活性で補正した上で、Mock を 1 とした場合の相対値を算出した。グラフは平均 \pm 標準誤差で示した。

0 mM / 25 mM Glucose 群間のプロモーター活性の差を Student's *t*-test により検定した。(**: $P < 0.01$, $n=3$)

第三節

ChREBP アイソフォームによる ChREBP β の転写制御

緒言

Mark A. Herman らの検証により、「白色脂肪組織における ChREBP β の転写は ChREBP α の活性により制御される」ということが報告されている。しかし、これらの検証はいずれも脂肪組織を対象としたものであるため、肝臓の細胞においても同様の現象が認められるかは不明である。また、レポーターアッセイによる検証しかされていないため、「ChREBP α の活性化に伴う ChREBP β の発現誘導」が生体の肝臓でも起こりうる現象かどうかは疑問が残る。

本節においては、まず HepG2 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイにより、ChREBP アイソフォームを介した ChREBP β プロモーター活性の増大が認められるか検証した。さらに、高糖質食を再摂食させたマウスの肝臓では ChREBP α の活性化が見られるため [29,51]、このマウス肝臓を用いて生体の肝臓でも「ChREBP α の活性化に伴う ChREBP β の発現誘導」が見られるか検証した。

実験方法

◆ レポータープラスミドの作成

- pGL4-mChREBPβ promoter

マウス肝臓ゲノムライブラリーを鋳型として、5'末端側に *KpnI*、3'端に *NcoI* 制限酵素サイトを付加したプライマーで PCR を行ない、ChoRE を含む mChREBPβ プロモーター (-631~+209 / *Mus musculus* GRCm38.p2 C57BL/6J gene position: 135089259~135090096) を増幅した。これを pGL4 plasmid に組み込んだ。プラスミドのデザインを Fig. 2-5 B に記した。

Forward: 5'- TTCATGGTACCAGGGTGAGTTCCAGGACAGCCAGGGCTAC -3'

Reverse: 5'- GCGCACCATGGCTATGTCCCTCTGATAACTGAAGATCTTTC -3'

以下のプラスミドは、本章第二節で作成したものをを用いた。

- pCMV-3×Flag-mChREBPα
- pCMV-3×Flag-mChREBPβ
- pCMV-mMLXβ
- pEF-β-gal

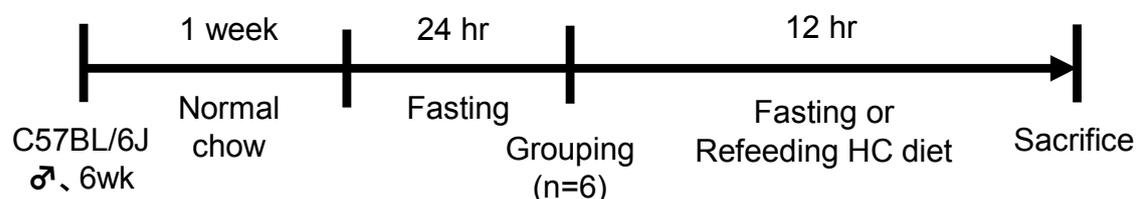
◆ 細胞実験

HEK293T 細胞、HepG2 細胞ともに、細胞の培養条件、遺伝子導入の方法、レポーターアッセイの手技は本章第二節に記したとおりに行なった。遺伝子導入時に使用した pGL4-mChREBPβ promoter の DNA 量は HEK293T 細胞: 250 ng、HepG2 細胞: 100 ng である。

◆ 動物実験

- 実験動物 ー絶食・再摂食マウスー

実験動物は、C57BL/6J マウス 6 週齢、雄 (日本クレア) を 12 匹購入した。搬入後の 1 週間は馴化のために、MR ラボストック (Normal chow) を自由摂食させて飼育した。24 時間絶食させた後、体重の平均値 (17.1 ± 0.3 g) が等しくなるように、6 匹ずつの 2 群に分けた。絶食群は絶食を 12 時間継続し、再摂食群は高糖質食 (HC [High-Carbohydrate] diet; 組成は Table 2-3) を与えて 12 時間飼育した後、肝臓を採取した。



◆ RT-qPCR

本章第二節に記載の方法に準じて行なった。

◆ in vivo ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) assay

● ホルマリン固定

解剖時に得られた肝臓 (> 1.0 g) をカミソリで細切し、これを SSC/Tris buffer (10mM Tris [pH8.0], 150 mM NaCl, 15 mM Sodium Citrate): 20 mL で 2 回洗浄した。液体窒素で急凍し、次の操作へ移るまで -80°C で冷凍保存した。

解凍した肝臓に 1% Formaldehyde-PBS: 20 mL を加え、室温で揺らしながら 10 分間インキュベートした。その後、2.5M Glycine: 1 mL を加え、再び 5 分間インキュベートした。遠心して上清を除き、1% BSA-PBS で洗浄した。

● 核抽出

得られた沈殿物に対し、Hypotonic solution (10 mM HEPES [pH 7.9], 50 μM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.2% NP-40, 0.2 mM Sodium orthovanadate, 1 mM EDTA, 5% Sucrose, 1 mM DTT, 1/100 Protease inhibitor cocktail): 5 mL を加え、Dounce tissue grinder (WHEATON) を用いて 15 回破砕を行なった。破砕のサンプルに Cushion buffer (10 mM Tris [pH 7.5], 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 10% Sucrose, 1 mM DTT, 1/100 Protease inhibitor cocktail) を加え 5000 rpm で 1 分間の遠心して上清を捨てた。

● ソニケーション

得られた沈殿を 1% BSA-PBS で洗浄し、Sonication buffer (50 mM Tris [pH 8.0], 1 mM EDTA, 0.75% SDS, 1 mM DTT, 1/100 Protease inhibitor cocktail): 3 mL 加え、

氷上で 10 分間放置した。この組織溶解液をソニケーター (TOMY SEIKO CO.LTD) を用い、氷上で超音波破碎した (Power : 7.5, 30 秒 ON / OFF のサイクルを 10 サイクル)。このサンプルを最大速度で 10 分間遠心し、上清を回収した。上清のタンパク質濃度は Pierce BCA Protein Assay Kit で測定した。各サンプルのタンパク質濃度が 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ になるように Dilution buffer (20 mM Tris [pH 8.0], 1 mM EDTA, 20 mM NaCl, 1% TritonX-100, 0.1% Sodium deoxycholate, 1 mM DTT, 1/100 Protease inhibitor cocktail) で希釈した。

- 免疫沈降 (IP: Immunoprecipitation)

免疫沈降を行なう直前に 50% Slurry Protein A agarose beads / Salmon sperm DNA (MILLIPORE) のバッファーを 1% BSA - Dilution buffer へ置換し、4°C で 1 時間以上攪拌した。これにより、ビーズの平衡化とブロッキングを行なった (以降はこのビーズを Protein A beads と記載する。使用時に 50% Slurry にした)。

得られた組織溶解液: 1 mL に対して、Protein A beads: 50 μL 加え、4°C で 3 時間穏やかに攪拌した。これを遠心して得られた上清を回収した。上清: 500 μL (Protein: 500 μg) に対して、anti-ChREBP (M-300) rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz)、ポジティブコントロールとして anti-Acetylated lysine 9 histone H3 (H3K9Ac) polyclonal rabbit antibody (MILLIPORE), ネガティブコントロールとして Normal rabbit IgG (MILLIPORE) を 3 μg ずつ加え、4°C で 18 時間穏やかに攪拌した。さらに、Protein A beads: 20 μL を加え、4°C で 2 時間穏やかに攪拌した。Input サンプルには Protein A beads を加えずに 4°C で保存した。

続いて、Low salt buffer (0.1% SDS, 1% TritonX-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris, 150 mM NaCl) で 1 回、High salt buffer (Low salt buffer の NaCl 濃度を 500 mM にしたもの) で 2 回、LiCl wash buffer (0.25 M LiCl, 1% TritonX-100, 1 mM EDTA, 10 mM Tris [pH 8.0], 1% Sodium deoxycholate) で 2 回、TE で 2 回の洗浄を行なった。

- DNA 溶出と精製

沈殿したビーズへ ChIP direct elution buffer (0.5% SDS, 300 mM NaCl, 1 M Tris [pH 8.0], 0.5 mM EDTA): 400 μL を加えた。Input サンプルには液量が 400 μL になるように ChIP direct elution buffer (IP サンプルと NaCl 濃度が等しくなるように調節したもの) を加えた。これを 65°C で 12 時間以上加温することで溶液中に DNA を溶出した。

この溶液に 10 µg/µL RNase A solution: 4 µL 加えて 37°C で 1 時間インキュベートして RNA を分解した。さらに、5 µg/µL Proteinase K solution: 4 µL を加えて 55°C で 2 時間加温してタンパク質を分解した。これを最大速度で遠心し、上清を回収した。

続いて、回収した上清と等量の PCI を加え、激しく攪拌した後に最大速度で 20 分間遠心した。この上清を回収し、1/10 量の 3 M CH₃COONa (pH 8.0)、2.5 倍量の 100% Ethanol、20 µg/µL Glycogen を加えて攪拌し、-20°C で 12 時間以上インキュベートした。最大速度で 20 分間遠心して、上清を除去した後、70% エタノールリンスを 2 回行なった。風乾により上清を完全に除去した後、IP サンプルには 40 µL、Input には 80 µL の滅菌超純水を加えて DNA サンプルとした。

- qPCR による ChIP シグナルの定量

この DNA サンプルを鋳型として qPCR を行なうことで、標的遺伝子に対する ChREBP や H3K9Ac の結合量を定量した。この qPCR で用いた ChIP 用プライマーの配列は Table III に記した。% of Input 値は以下のように計算した。

$\% \text{ of Input} = \text{ChIP signal} / \text{Input signal} \times 100$

× (Input に使用したタンパク量 / ChIP に使用したタンパク量)

× (ChIP サンプル DNA の希釈量 / IP サンプル DNA の希釈量)

本節では、*in vivo* ChIP assay を 2 回行なっている。1 回目は、絶食／再摂食マウス (各群 6 匹) から採取した肝臓を細切、洗浄後、各群ごとに肝臓を一つのチューブにまとめてホルマリン固定以降の操作を行なった (Fig. 2-14, 2-15: Pooled mouse liver sample, n=1)。2 回目は、再摂食群の中で肝臓 ChREBPβ mRNA 発現量が最も高い／低いマウスを除いた 4 匹の肝臓をそれぞれ別々に調製し、ChIP シグナルを検出した (Fig. 2-16: Refed mouse liver sample, n=4)。

- ◆ 統計処理

本章第一節に記載した方法で行なった。

結果

◆ mChREBP β の転写はChREBPアイソフォームの発現と活性により制御される。

本節ではまず、Mark A. Herman らの検証の再現を取るため、pGL4-mChREBP β promoter を作成し、mChREBP β プロモーターのレポーターアッセイ系を構築した。Mark A. Herman らの検証では、これを mChREBP α 発現用プラスミドとともに HEK293T 細胞へ導入し、高/低グルコース下における mChREBP β プロモーター活性を測定した。本研究では、この条件に Forskolin 投与群と Azaserine 投与群を加えることでより詳細な検証を行なった (Fig. 2-12)。

mChREBP α を発現させた細胞では、高グルコース下で mChREBP β プロモーター活性が増大しており、これまでの報告と一致する結果を得た。さらに、Forskolin や Azaserine を投与した場合は高グルコース下でのプロモーター活性の増大がキャンセルされた。Forskolin や Azaserine は高グルコース下での ChREBP の活性化を抑制する働きがあるので、これらの結果は ChREBP β が ChREBP α の標的であるという報告を支持する結果である。

本研究ではさらに、ChREBP β が自身の発現を制御する (セルフレギュレーション) 可能性を考えて、mChREBP β 発現用プラスミドを導入して同様の検証を行なった。その結果、mChREBP β の発現によりグルコース濃度非依存的な mChREBP β プロモーター活性の増大が認められた。また、Forskolin を投与した場合には、mChREBP β による mChREBP β プロモーター活性増大の程度が減弱する傾向が見られた。これらの結果は、mACC1 プロモーターを用いたレポーターアッセイの結果 (Fig. 2-10) とよく一致している。そのため、ChREBP β の転写は ChREBP α のみならず ChREBP β 自身の発現により制御されることが明らかとなった。

◆ 肝臓の細胞でも ChREBP β の転写は ChREBP により制御される。

続いて、肝臓の細胞においても ChREBP β の発現が ChREBP アイソフォームによって制御されるか検証するため、ヒト肝癌由来細胞 HepG2 を用いて ChREBP アイソフォームのレポーターアッセイを行なった (Fig. 2-13)。

mChREBP α を発現させた HepG2 細胞では、高グルコース下で mChREBP β プロモーター活性が増大しており、HEK293T 細胞での検証と一致する結果を得た。一方、mChREBP β を発現させた HepG2 細胞では、顕著なプロモーター活性の増

大が認められた。興味深いことに、このプロモーター活性の増大は高グルコース培地で培養したものの方がより顕著であった。

◆ 高糖質食を再摂食させたマウスの肝臓で ChREBPβ の発現が増大する。

高糖質食を再摂食させたマウスの肝臓で ChREBPα の活性化が見られることは既にいくつも報告されている [29,35,51,70]。そこで本研究では、絶食、あるいは高糖質食を再摂食させたマウスの肝臓を採取し、この時の ChREBPβ の発現量を RT-qPCR 法により測定した。

高糖質食を摂取させたマウスの肝臓では、ACC1 を含めた ChREBP 標的遺伝子の有意な発現増大が認められた (ACC1 の mRNA 発現量は Fig. 2-14A を参照。絶食群での発現量を 1 とした場合の再摂食群での発現量は LPK: 3.7 ± 0.4 、KHK: 3.5 ± 0.3 、FASN: 3.6 ± 0.8 、いずれも $P < 0.05$ で有意差有り)。加えて、ChREBPβ mRNA 発現量も再摂食群で有意な増加が認められた (Fig. 2-15A)。

◆ 再摂食により ChREBPβ プロモーターにおける ChREBP の結合量が増加する。

続いて、再摂食によりプロモーター領域における ChREBP の結合が増大しているか調べるため、プールしたマウス肝臓 (n=1) を用いて *in vivo* ChIP assay を行なった。免疫沈降を行なったタンパク質は ChREBP の他に、アセチル化ヒストン H3K9 (H3K9Ac: Acetylated Histone H3 Lysine 9)、ネガティブコントロールとして Normal rabbit IgG の 3 種類である。H3K9Ac は転写が活発な遺伝子のプロモーターで結合量が増大することがよく知られているので [71,72]、ポジティブコントロールとして用いた。これらのタンパク質結合量を調べた領域は、mACC1 や mChREBPβ 遺伝子プロモーターに存在する ChoRE や E-box である。このほか、ネガティブコントロールとして ChoRE や E-box が存在しない遺伝子外遠位領域 (Distal) におけるタンパク質結合量も定量した (Fig. 2-14B, 2-15B)。

ACC1 遺伝子の Distal 領域では、両群で ChREBP と H3K9Ac の結合量に大きな違いは認められなかった。一方、ChoRE における ChREBP と H3K9Ac の結合量は再摂食群で増加する傾向が認められた (Fig. 2-14C)。ChoRE における ChREBP や H3K9Ac の結合量は、IgG 結合量と比べて遥かに大きな値であったため、これらのタンパク質結合量を特異的に検出できている。

ChREBPβ 遺伝子の Distal 領域では、両群で ChREBP と H3K9Ac の結合量に大きな違いは認められなかった。一方、E-box および ChoRE における ChREBP と

H3K9Ac の結合量は、再摂食群で顕著に増加する傾向が認められた (Fig. 2-15C)。

これは再摂食により肝臓の ChREBPβ の mRNA 発現量が増大したことと一致する。以上の結果から、「プロモーター領域における ChREBP 結合量の増大により肝臓 ChREBPβ の転写が誘導される現象」を *in vivo* で捉えることができたと考えられる。

◆ 肝臓の ChREBPβ プロモーター周辺に ChREBP が結合する。

さらに、ChREBP が ChREBPβ プロモーターへ結合することを統計的に示すために、再摂食マウスの肝臓 (n=4) で *in vivo* ChIP assay を行なった。

ACC1 遺伝子の ChoRE における ChREBP、H3K9Ac の結合量は、同領域の IgG 結合量や Distal の ChREBP 結合量と比較して有意に高かった (Fig. 2-16A)。この結果から、高糖質食を再摂食させたマウス肝臓において、ACC1 遺伝子の ChoRE に ChREBP が結合していることが統計的に示した。

ChREBPβ 遺伝子の E-box における ChREBP 結合量は、同領域の IgG 結合量や Distal の ChREBP 結合量と比較して有意に高かった (Fig. 2-16B)。ChoRE における ChREBP 結合量は有意ではないものの高く検出される傾向が見られた (v.s. IgG signal on ChoRE: $P = 0.09$, ChREBP signal on Distal: $P = 0.17$)。この結果から、高糖質食を再摂食させたマウス肝臓において、ChREBPβ 遺伝子の E-box や ChoRE に ChREBP が結合している可能性を統計的に示した。

Table 2-3 高糖質食の組成

Compound	High-carbohydrate (HC) diet	
	Weight (g/100g)	% of energy
Cornstarch	67.8	72%
Soybean oil	3.3	8%
Casein	18.8	20%
Vitamin mixture (AIN-93)	1.0	
Mineral mixture (AIN-93)	3.5	
L-Cystine	0.3	
Choline Bitartrate	0.3	
Cellulose powder	5.0	
Total	100.0	376 kcal

飼料の組成は AIN-93G を参考にして作成した [73]。

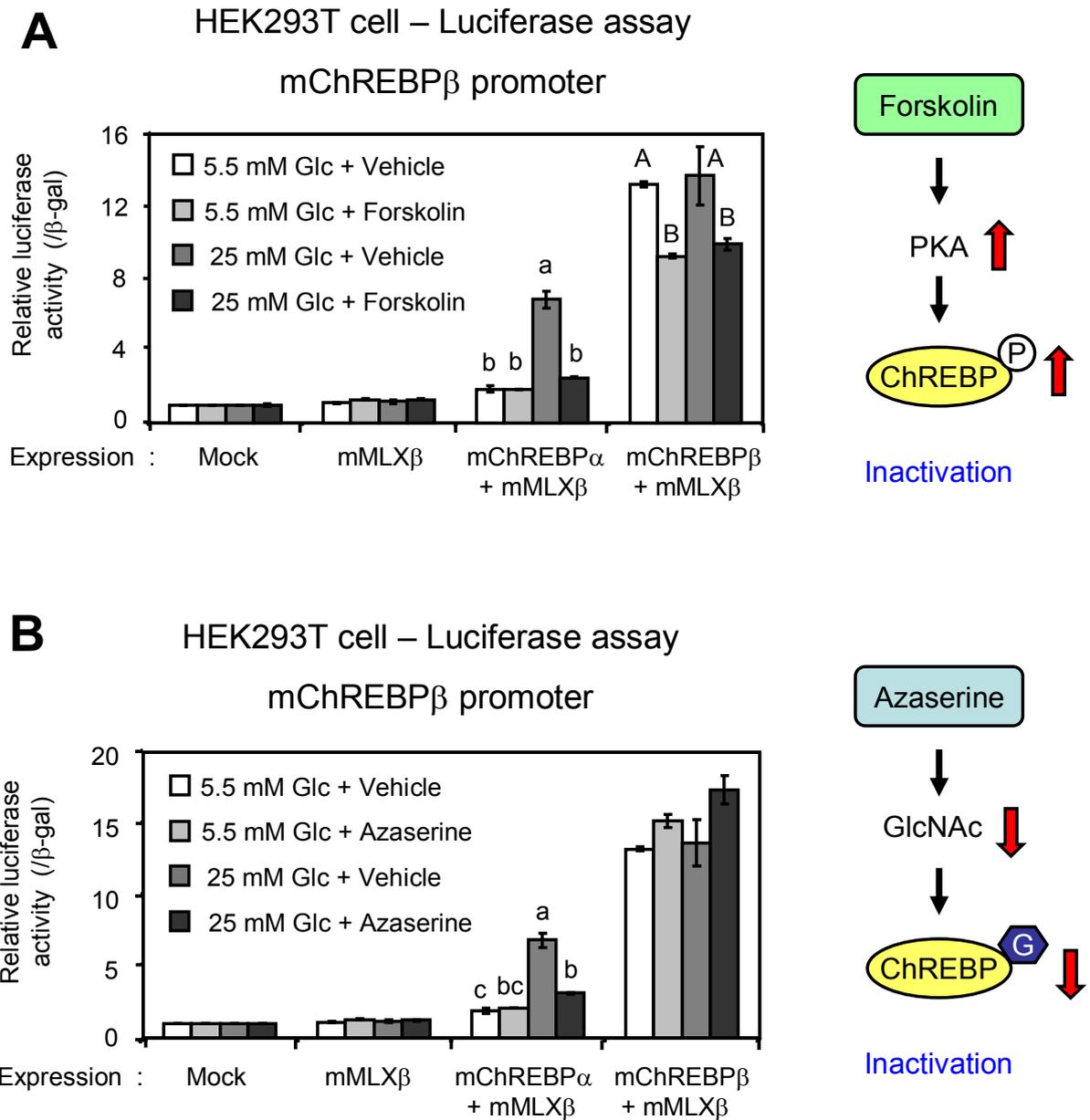


Fig. 2-12 HEK293T 細胞での mChREBP β プロモーターのレポーターアッセイ

遺伝子導入後の HEK293T 細胞を 20 μ M Forskolin、あるいは 5 μ M Azaserine を添加した培地で 24 時間培養し、ルシフェラーゼアッセイにより mChREBP β プロモーター活性を測定した。プロモーター活性を β -gal 活性で補正した上で、Mock を 1 とした場合の相対値を算出した。グラフは平均 \pm 標準誤差で示した。遺伝子導入条件が同じもののうち、培地条件の異なる群の間で多重比較検定 (Tukey-Kramer test) を行なった。

(アルファベット文字の異なるものは $P < 0.05$ で有意差が認められる。n=3)

HepG2 cell – Luciferase assay
mChREBP β promoter

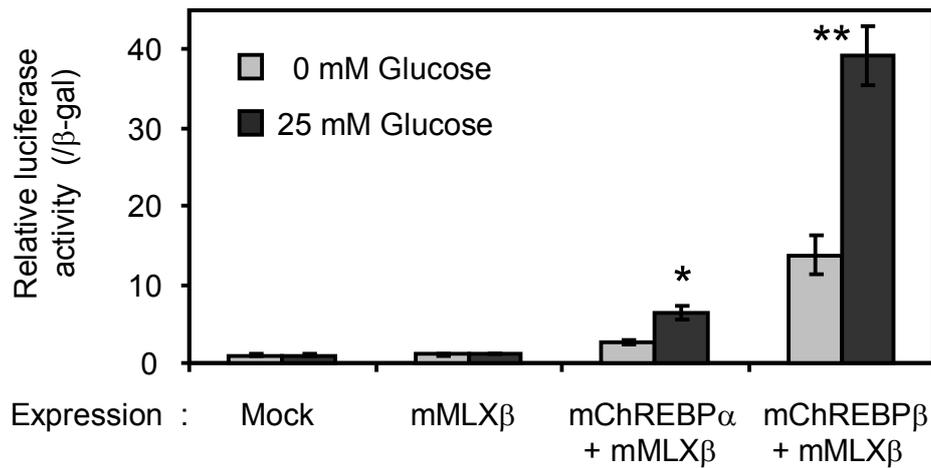


Fig. 2-13 HepG2 細胞における mChREBP β プロモーターのレポーターアッセイ
遺伝子導入後の HepG2 細胞をグルコース濃度の異なる培地で 24 時間培養し、ルシフェラーゼアッセイにより mChREBP β プロモーター活性を測定した。プロモーター活性を β -gal 活性で補正した上で、Mock を 1 とした場合の相対値を算出した。グラフは平均 \pm 標準誤差で示した。0 mM / 25 mM Glucose 群間のプロモーター活性の差を Student's *t*-test により検定した。(*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, $n=3$)

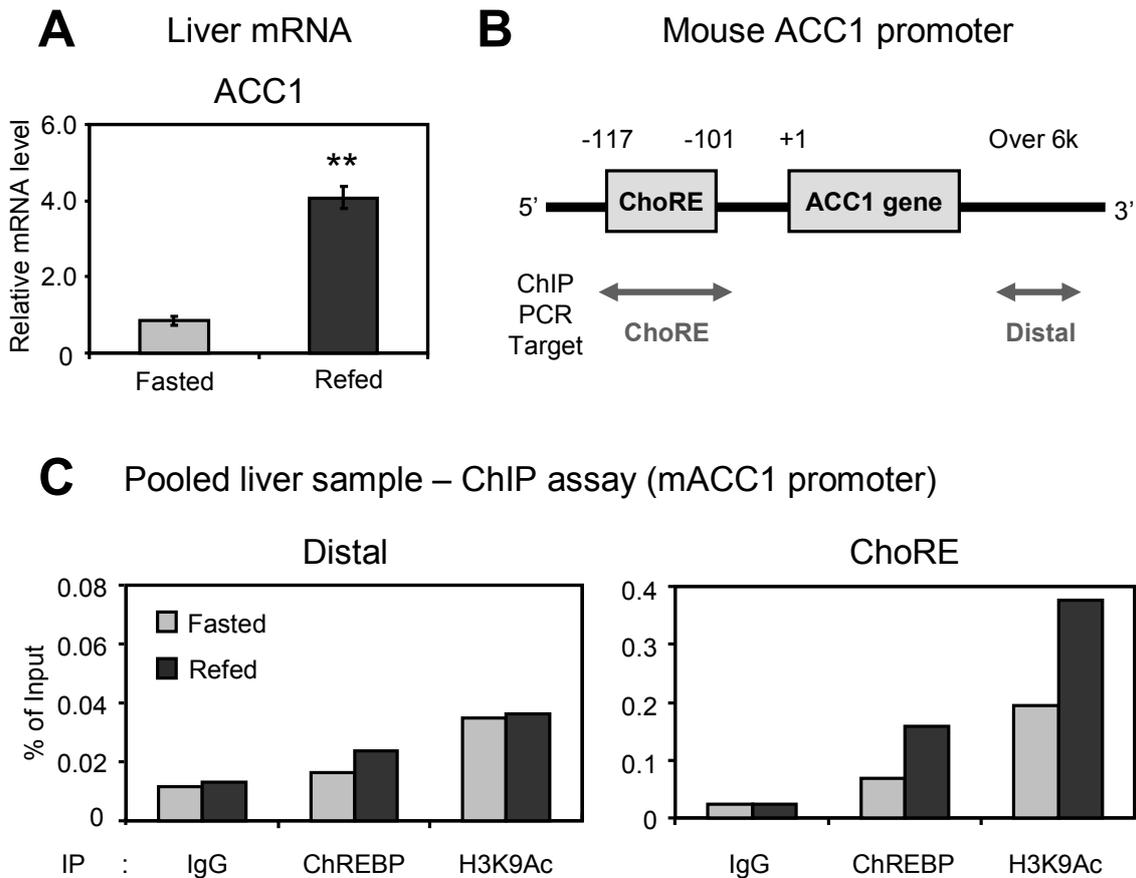


Fig. 2-14 絶食／再摂食マウス肝臓の mACC1 プロモーターにおける ChREBP 結合量

絶食／高糖質食を再摂食させた WT 雄マウスの肝臓を採取し、mACC1 プロモーターにおける ChREBP の結合量を測定した。

(A): mACC1 の mRNA 発現量を RT-qPCR 法により測定した。絶食群を 1 とした場合の相対的な遺伝子発現量を算出した。各遺伝子の発現量は、18S rRNA の発現量で補正した。グラフは平均±標準誤差で示した。群間の発現量の差を Student's *t*-test により検定した。(**: $P < 0.01$, $n=6$)

(B): mACC1 遺伝子周辺の概略図。転写開始点を+1 とした場合に ChoRE は -117 ~ -101 の位置に存在する。グレーの矢印は ChIP 用 qPCR プライマーをデザインした位置を示している。

(C): 絶食／再摂食マウス肝臓を各群ごとにプールしたサンプル ($n=1$) で ChoRE や Distal 領域における ChREBP、H3K9Ac、IgG 結合量を調べた。値は Input シグナルに対する ChIP シグナルの比 (% of Input) で示している。

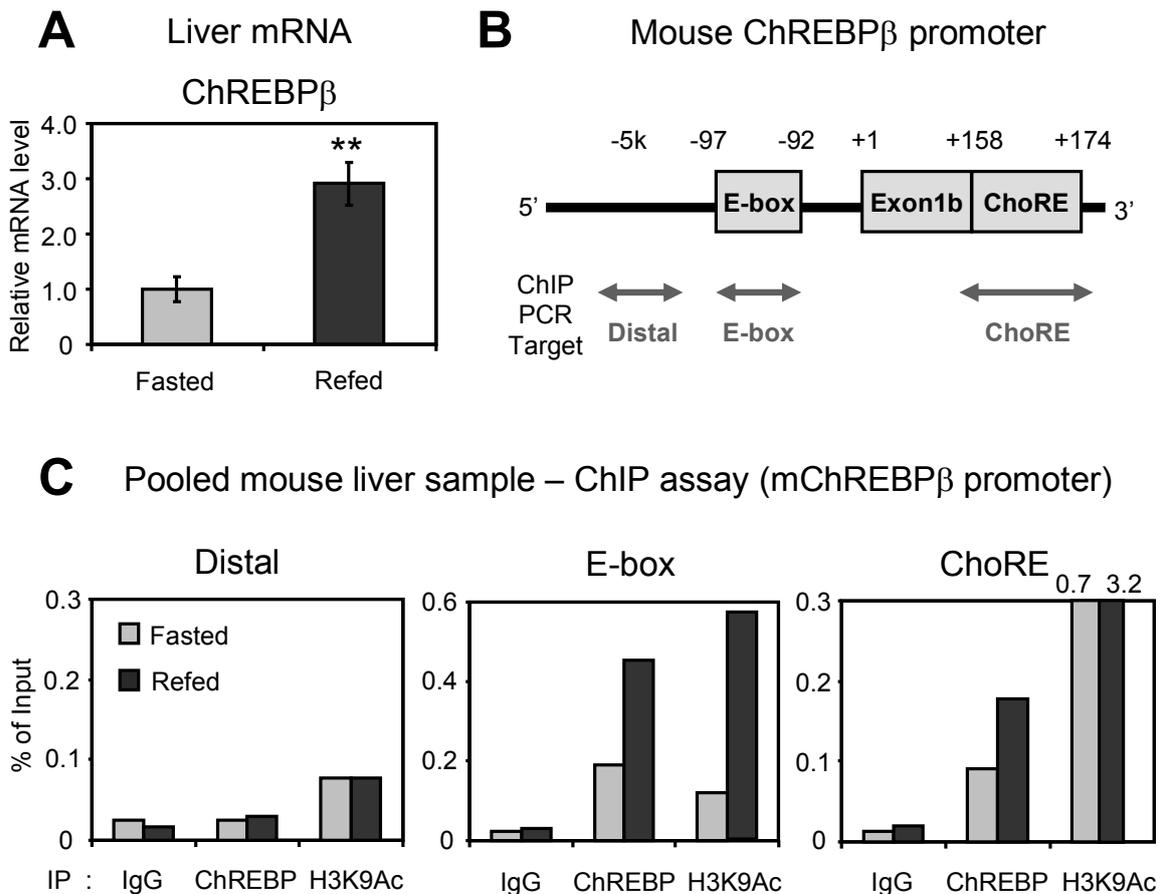


Fig. 2-15 絶食／再摂食マウス肝臓の mChREBPβプロモーター周辺における ChREBP 結合量

絶食／高糖質食を再摂食させた WT 雄マウスの肝臓を採取し、mChREBPβプロモーター周辺における ChREBP の結合量を測定した。

(A): ChREBPβの mRNA 発現量を RT-qPCR 法により測定した。絶食群を 1 とした場合の相対的な遺伝子発現量を算出した。各遺伝子の発現量は、18S rRNA の発現量で補正した。グラフは平均±標準誤差で示した。群間の発現量の差を Student's *t*-test により検定した。(**: $P < 0.01$, $n=6$)

(B): ChREBPβ遺伝子周辺の概略図。転写開始点を+1 とした場合に E-box は-97 ~ -92、ChoRE は+158 ~ +174 の位置に存在する。グレーの矢印は ChIP 用 qPCR プライマーをデザインした位置を示している。

(C): 絶食／再摂食マウス肝臓を各群ごとにプールしたサンプル ($n=1$) で E-box や ChoRE、Distal 領域における ChREBP、H3K9Ac、IgG 結合量を調べた。値は Input シグナルに対する ChIP シグナルの比 (% of Input) で示している。

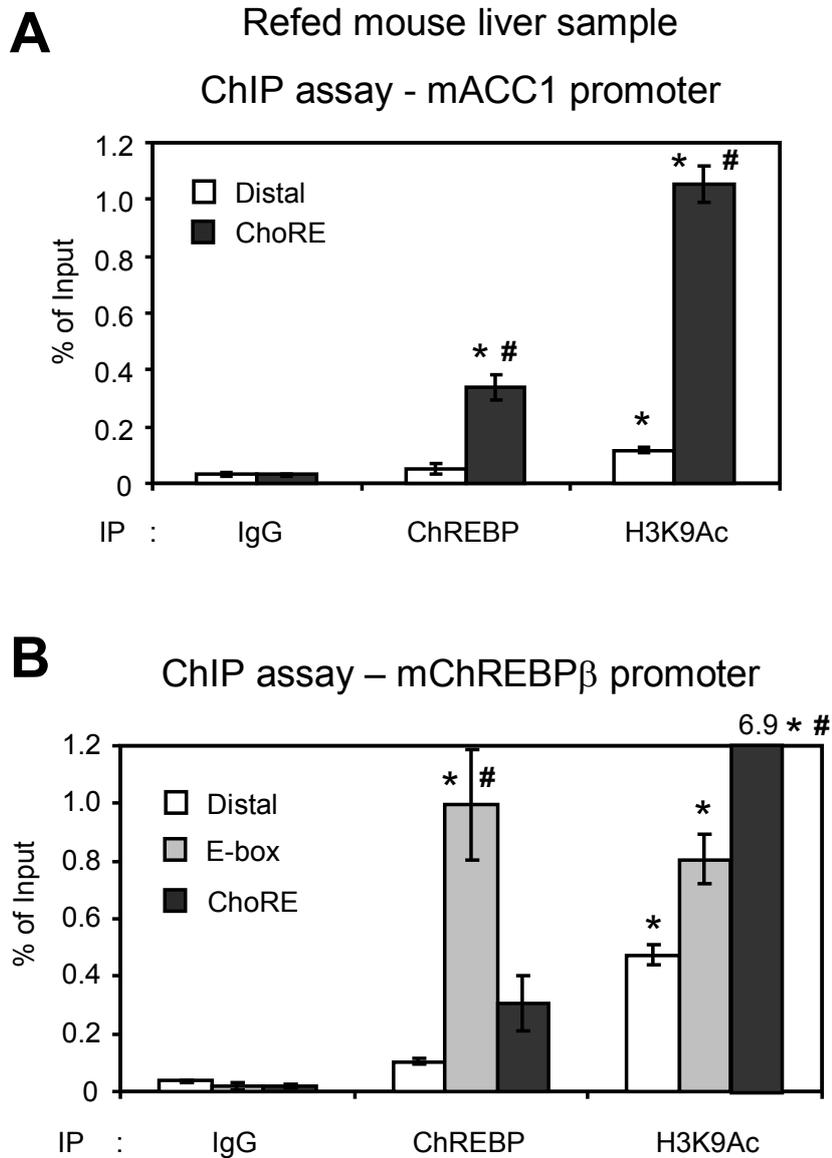


Fig. 2-16 再摂食マウス肝臓の mACC1 / mChREBPβプロモーター周辺における ChREBP 結合量

高糖質食を再摂食させた WT 雄マウスの肝臓 (n=4) を用いて、(A): mACC1 プロモーター、(B): mChREBPβプロモーターの E-box や ChoRE、Distal 領域における ChREBP、H3K9Ac、IgG 結合量を調べた。グラフは平均±標準誤差で示した。群間の結合量の差を多重比較検定 (Tukey-Kramer test) により検定した。(*: 同領域の IgG 結合量と比較して $P<0.05$ で有意差あり、#: Distal 領域における結合量と比較して $P<0.05$ で有意差あり、n=3-4)

第二章 考察

本章の目的は、ChREBP アイソフォームの組織分布を明らかにするとともに、ChREBP アイソフォームを介した糖・脂質代謝関連遺伝子の転写制御機構により詳細な知見を加えることである。本章で明らかにした ChREBP アイソフォームの機能を以下の表にまとめた。

	mChREBP α	mChREBP β	関連 Fig
発現部位	ユビキタス (血液、nPCs を除く)	肝臓 (HPC)、 脂肪組織、空腸	2-4, 2-5
mRNA 分子数	多い	少ない	
タンパク質	分解されにくい	分解されやすい	2-9
比転写活性	低い	高い	2-7, 2-8
活性制御			
グルコース	活性化	不変	2-7, 2-11, 2-13
O-GlcNAc 化	活性化	不変	2-10, 2-12
リン酸化	不活性化	不活性化	

◆ 第一節の検証結果の概略

まずは本研究で着目する肝臓での ChREBP β の機能について考察する。第一節においては、ChREBP アイソフォーム遺伝子発現絶対定量系を構築し、組織における ChREBP アイソフォームの発現分布を明らかにした。

ChREBP α の mRNA 発現がユビキタスに見られることは既に報告されており [29,31]、本研究でもこれらの知見とほぼ一致する結果が得られた (Fig. 2-4A)。一方、ChREBP β の mRNA は、これまで報告のあった白色脂肪組織だけでなく、肝臓や空腸でも発現が見られることを明らかにした (Fig. 2-4B)。また、肝臓における ChREBP β の発現は肝実質細胞に由来しており、これは解糖系・脂肪合成系酵素遺伝子の発現とも一致していた (Fig. 2-5B)。

従来までは、「RT-qPCR 相対定量法」を用いて ChREBP アイソフォームの発現量が測定されてきたため、ChREBP α と ChREBP β の発現量を比較することができなかった。そこで本研究では、「RT-qPCR 絶対定量法」を採用し、各組織における ChREBP アイソフォーム mRNA の分子数を測定した。その結果、各組織で発現している ChREBP β mRNA 発現量は ChREBP α と比べて少ないことが明らかになった (Fig. 2-4)。

◆ 第二節の検証結果の概略

第二節では、mACC1 プロモーターをレポーター遺伝子上流に組み込んだレポーターアッセイにより、ChREBP アイソフォームの転写活性を比較した。その結果、ChREBP β は mACC1 プロモーターに対して高い転写活性を示した (Fig. 2-7A)。これまで、「ChoRE タンデム配列」を用いたレポーターアッセイにより、ChREBP β の転写活性が高いことが示されてきた (Fig. 1-6A)。しかし、「ChoRE タンデム配列」は ChoRE を複数組み込んだ人工的な配列であるため、生体に存在し得るプロモーター配列でも同様の結果が得られるか疑問が残っていた。本研究の結果により、ChREBP β は生体に存在する mACC1 プロモーターにおいても高い転写活性を示すことを明らかにした。

さらに、導入遺伝子のタンパク質発現量を測定して ChREBP アイソフォームの比転写活性 (タンパク質量あたりの転写活性) を比較した。その結果、ChREBP β の比転写活性は高グルコース下で活性化された ChREBP α よりも 50 倍以上高いことが示された (Fig. 2-7, 2-8, Table 2-2)。

このような ChREBP β の高い転写活性は、LID が欠損していることに由来する。しかし、ChREBP β タンパク質は活性制御に関与するリン酸化/O-GlcNAc 化部位がいくつか残存しており、これらの修飾が ChREBP β の転写活性にどのような影響を与えるか不明である。そこで、ChREBP のリン酸化を促進する Forskolin、あるいは O-GlcNAc 化を抑制する Azaserine を投与した際の ChREBP β の転写活性を調べた。その結果、低グルコース環境や Forskolin 投与、Azaserine 投与の条件下でも ChREBP β の高い転写活性は維持されることを明らかにした (Fig. 2-10)。また、このような ChREBP β の高い転写活性は、肝細胞を用いたレポーターアッセイでも認められた (Fig. 2-11)。

以上の結果から、ChREBP β は発現量こそ低いものの、その高い転写活性により、肝臓の糖利用と脂質生合成を強力に誘導する転写因子であると予想された。

◆ 第三節の検証結果の概略

第三節においては、ChREBPβ自身の転写誘導機構について検証した。その結果、HEK293T細胞を用いたレポーターアッセイにより、低グルコース環境、Forskolin投与、Azaserine投与によってChREBPαを不活性化させると、ChREBPβプロモーター活性が顕著に減少することを明らかにした (Fig. 2-12)。また、肝細胞においてもChREBPαの活性化によりChREBPβの発現が誘導されること、ChREBPβはセルフレギュレーションにより自己の発現を誘導することを明らかにした (Fig. 2-13)。

さらに、これらの現象が *in vivo* においても見られるか調べるために、高糖質食を再摂食させたマウスの肝臓を解析した。その結果、再摂食マウスの肝臓ではChREBPβプロモーターにおけるChREBPの結合量が増大し、ChREBPβ mRNAの発現が誘導されることを明らかにした (Fig. 2-14~16)。Mark A. Hermanらは、「通常食を3時間再摂食させたマウスの肝臓ではChREBPβの発現増大は認められなかった」と報告している [56]。本研究で再摂食により肝臓ChREBPβの発現増大が認められた要因は、ChREBPが活性化されやすい高糖質食を飼料とした点、再摂食時間が12時間であったという点である。*in vivo* ChIP assayによりChREBPβプロモーターにおけるChREBPの結合を検証した報告はこれまでに無い。以上の検証により、生理的なレベルでもChREBPアイソフォームの発現や活性によりChREBPβの発現が制御されることを明らかにした。

以上の知見を総じて考察すると、肝臓におけるChREBPβの役割は、「ChREBPαの活性化に伴う解糖系・脂質生合成系酵素遺伝子の発現誘導を劇的に増幅すること」であると考えられる (Fig. 2-17)。また、ChREBPβは転写活性が極めて高いため、わずかに発現が誘導されただけでも劇的に脂肪肝が振興してしまう可能性が考えられた。

◆ Forskolinを投与してもChREBPβの転写活性が高く維持されるメカニズム

ChREBPαタンパク質のアミノ酸末端から196番目のセリン残基 (S196)、626番目のセリン残基 (S626)、666番目のスレオニン残基 (T666) は、PKAによるリン酸化修飾を受ける (Fig. 1-3)。S196がリン酸化されたChREBPは、LIDにおける14-3-3との結合が促進されて核外移行し、転写活性が見られなくなる [42,46,47,74]。一方、DNA結合領域 (bHLH-Zip) に近傍に存在するS626とT666がリン酸化されると、リン酸基が物理的障害となってDNAとの結合が妨げられ

るため、ChREBP の転写活性が低下する [75]。

ChREBP β mRNA は ChREBP α の 178 番目のアミノ酸残基に相当する位置が翻訳開始点であるため LID は含まないが、上記のリン酸化修飾部位を全て有した形で翻訳される。Fig. 2-10, 2-12 の実験で Forskolin 投与した際に ChREBP β の転写活性がわずかに低下したのは、S626 と T666 がリン酸化されて DNA との結合が障害されるためであると推察される。ただし、この転写活性の低下は ChREBP α ほど劇的なものではなかった。これは、ChREBP β は LID が欠損しており、S196 がリン酸化されても 14-3-3 と結合ができず、核外移行を伴わないために高い転写活性が維持されるものと考えられる。

また、O-GlcNAc 化された ChREBP α は核内に局在する [51,52]。Azaserine を投与した場合に ChREBP α の転写活性が低下するのは、グルコースシグナルを介した ChREBP α の O-GlcNAc 化が抑制されるためである。一方、ChREBP β は O-GlcNAc 化の有無に関わらず常に核内に局在するため、Azaserine 投与による影響が見られなかったと推察される。

ChREBP β の高い転写活性は LID 欠損による核局在に由来するが、その詳細なメカニズムとして「PKA リン酸化シグナルの影響を受けにくい」と「O-GlcNAc 化の有無に関わらず核内に存在する」の 2 つの可能性を示すことができた。

◆ プロテアソームによる ChREBP β タンパク質の分解

ユビキチン・プロテアソーム系は生体に備わるタンパク質分解システムの一つである。ユビキチン化されたタンパク質をプロテアソームが認識して分解するため、選択的なタンパク質分解機構としてとらえられている [76]。Fig. 2-9 の実験結果は ChREBP β タンパク質がプロテアソームによる分解を受けている可能性を示すものであるが、ChREBP β はおろか ChREBP α のタンパク質がどのように分解を受けるか、これまでに検証された例が無い。

しかし、プロテアソームの濃度は細胞質よりも核質の方が圧倒的に多いため [77,78]、常時核内に存在する ChREBP β がプロテアソームによる分解を受けやすい可能性は十分に考えられる。実際、ChREBP と同様に脂質生合成の制御を担う転写因子 SREBP-1 は Mature form となって核内に局在すると、ユビキチン・プロテアソーム系により速やかに分解されることが報告されている [79]。ChREBP β がこれと同様の機構でタンパク質分解を受けるかどうか調べるために、ChREBP β がユビキチン化修飾を受けるか検証を進めていく必要がある。

◆ 筋肉で ChREBPβの発現が認められなかった点について

ChREBPβは ChREBPαによって転写が誘導されることから、これらの ChREBP アイソフォームは共存しているものと考えられる。しかし、筋肉では ChREBPαの発現は認められるが、ChREBPβの発現はほとんど認められなかった (Fig. 2-4)。グルコース水を投与したマウスの骨格筋では、核内 ChREBP タンパク質量の増大が見られることから [80]、「骨格筋では ChREBPαが活性化されないために ChREBPβが発現できない」という可能性は考えづらい。

この原因の一つとして考えられたのは、DNA のメチル化である。プロモーター領域内 CpG アイランド (CG 配列が豊富な領域) 中のシトシンがメチル化された遺伝子は、転写活性化因子の存在の如何に関わらず転写反応が抑制されることが知られている [81-83]。ChREBPβのプロモーターにも CpG アイランドが認められるため、「筋肉の ChREBPβプロモーター領域における DNA のメチル化が ChREBPβの発現に抑制的に働いている可能性」が考えられた。そこで、バイサルファイトシーケンス法 [84,85] により、筋肉、小腸、肝臓 DNA の ChREBPβプロモーター領域におけるメチル化 DNA 量を調べた。しかし予想に反して、いずれの組織 DNA においても、ChREBPβプロモーター領域の DNA はメチル化されておらず、メチル化 DNA 量に違いは認められなかった (unpublished data)。したがって、「筋肉の ChREBPβプロモーター領域における DNA のメチル化が ChREBPβの発現に抑制的に働いている可能性」は棄却された。

現在のところ、「ChREBPβの発現には ChREBPαの他に別の転写因子の存在が必須である」という可能性を考えている。ChREBPβの転写開始点の近くには ChoRE の他に、HNF-4α (Hepatocyte Nuclear Factor -4α) の標的配列として知られる DR-1 (Direct Repeat-1) 配列が存在する。ChREBP 標的遺伝子である LPK や FASN 遺伝子にもこの配列が存在しており、ChREBP と HNF-4αが協調的に働くことでこれらの遺伝子の転写が誘導される [66,86]。筋肉には HNF-4αが発現していないため、ChREBPβが発現できない可能性が考えられる。この点については、肝実質細胞での HNF-4αノックダウン実験などにより詳細な検証を進めていく必要がある。

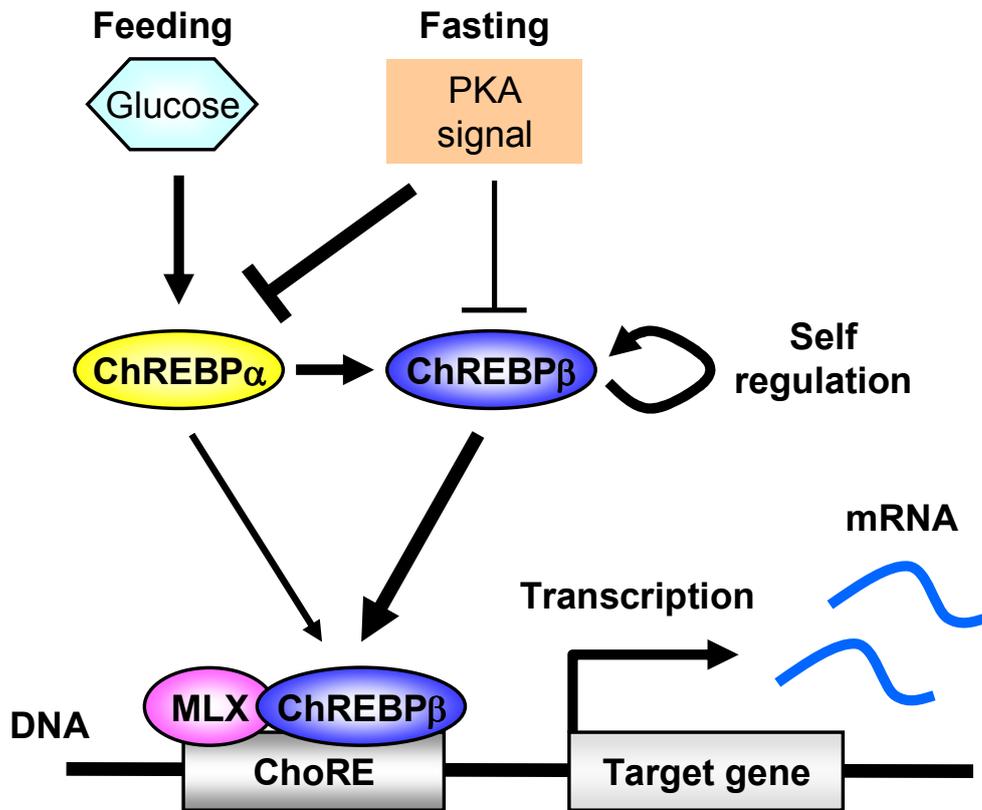


Fig. 2-17 第二章の実験結果により想定された肝臓における ChREBPβの役割

ChREBPβはグルコースの有無に関わらず核内に局在し、PKA リン酸化シグナルによる不活性化の影響を受けづらい。肝臓における ChREBPβの役割は「ChREBPαの活性化に伴う解糖系・脂質生合成系酵素遺伝子の発現誘導を増幅すること」であると考えられる。

第三章

ChREBP β の発現が 脂肪肝の進行に及ぼす影響

緒言

第二章において、ChREBP β は肝実質細胞で比較的高発現であり、極めて活性が高い転写因子であることを明らかにした。この結果は、肝実質細胞におけるChREBP β の発現増大が脂肪肝の進行に関与することを示唆する。

本章では、「ChREBP β の発現増大が脂肪肝を進行させる」という直接的な証拠を得るため、マウス肝実質細胞、あるいはマウス肝臓にChREBP β を過剰発現させ、糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量と脂肪蓄積量にどのような変化が生じるか調べた。

実験方法

◆ アデノウイルス用ベクターの作成

マウス肝実質細胞やマウス個体への遺伝子導入にはアデノウイルス法を採用した。組換えアデノウイルスは、高い導入効率と強力な遺伝子発現によって、培養細胞や動物個体を用いた遺伝子導入に広く用いられている。導入遺伝子の発現は一過性であるが、休止期の細胞への遺伝子導入を行なうことが可能である。今回用いたアデノウイルスは HEK293 細胞内でしか増殖できないように設計されているため、ウイルス増殖に伴う細胞死は肝実質細胞や動物個体内では起こらない。そのため、動物個体へ投与して *in vivo* での検証も可能である。

アデノウイルス用プラスミドのデザインは Fig. 3-1 に記した。以下に組換えアデノウイルスの作成方法を記す。

● エントリーベクターへの組み込み

アデノウイルス用ベクターは非常に大きいため、インサート配列の挿入には Gateway® cloning system (Invitrogen) を利用し、既存の発現用プラスミドをもとにエントリーベクターへインサート配列を組み込んだ。

● pENTR1A-3×Flag-mChREBP α / β

pCMV-3×Flag-mChREBP α / β を鋳型として、5'末端側に *Sal*I、3'末端側に *Xho*I 制限酵素サイトを付加したプライマーで PCR を行ない、3×Flag-mChREBP α / β 翻訳領域を増幅した。インサートは *Sal*I 制限酵素処理して 5'末端のみ付着末端とし、3'末端は平滑末端のまま T4 Polynucleotide kinase (Takara) を用いてリン酸基を付加した。pENTR1A (Invitrogen) の 5'末端側は *Sal*I (付着末端)、3'末端側は *Eco*RV (平滑末端) で処理し、これにインサートを組み込んだ。

Forward: 5'- GATCTGTCGACATGGACTACAAAGACCATGACGG -3'

Reverse: 5'- AGCTACTCGAGTTATAATGGTCTCCCCAGGGTG -3'

● pENTR1A-mMLX β

pCMV- mMLX β を鋳型として、5'末端側に *Sal*I、3'末端側に *Xho*I 制限酵素サイトを付加したプライマーで PCR を行ない、mMLX β 翻訳領域を増幅した。上記と同様の操作により、この配列を pENTR1A へ組み込んだ。

Forward: 5'- TAGAAGTCGACATGACGGAGCCGGGCGCCTCTC -3'

Reverse: 5'- TGGTCCTCGAGTCAGTAGAGTTGGTTTTTCAACTG -3'

- クロナーゼ処理

Gateway® LR-cloning (Invitrogen) により、pENTR1A へ組み込んだインサート配列を pAd/CMV/V5-DEST (Invitrogen) へ組み換えた。以下に手技を記す。

pENTR1A (with insert): 80 ng、pAd/CMV/V5-DEST: 300 ng、Gateway Gateway® LR-clonase Enzyme Mix: 2 μ L、TE (pH 8.0): up to 10 μ L を PCR チューブに混合し、25°C で 2 時間インキュベートした。続いて、これに 2 μ g/ μ L Proteinase K: 1 μ L を添加して 50°C で 1 時間インキュベートした。第二章に記した手法に準じて、組換え DNA を大腸菌へ形質転換し、アンピシリンプレートに播いてシングルコロニーを得た。ここからプラスミド DNA を回収し、シーケンスによりインサート配列を確認した。これをアデノウイルス用プラスミド (pAd/CMV/V5-DEST-3 \times Flag-mChREBP α / β / mMLX β) とした。

なおこれ以降の操作は、コントロールとして用いる pAd/CMV/V5-GW/LacZ (β -Galactosidase, Invitrogen) も加えて進めた。

◆ アデノウイルス粒子の調製

アデノウイルスの取り扱いや濃縮・精製法は 「組換えアデノウイルス作製マニュアル ～完全長ゲノム導入法～ (独立行政法人理化学研究所 バイオリソースセンター 遺伝子材料開発室: www.brc.riken.jp/lab/dna/ja/) 」や [87] の文献を参考にした。

- HEK293A 細胞

HEK293A 細胞 (Invitrogen) はディッシュへの付着能力を増強したアデノウイルス宿主用細胞株である。10% FBS、100 units/mL Penicillin、100 μ g/mL Streptomycin を含む DMEM-high glucose を基本培地として、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養し、1 \times 10⁶ cell / 100 mm dish の割合で継代を行なった。

- トランスフェクション (リポフェクション法)

トランスフェクション前日に HEK293A 細胞を 6-well プレートへ 5 \times 10⁵ cell/well の割合で播いた。アデノウイルス用プラスミド DNA: 1 ~ 1.5 μ g, Plus

reagent (Invitrogen): 5 μ L, Opti-MEM (GIBCO): up to 240 μ L を混合し DNA mix とした。Lipofectamine LTX (Invitrogen): 3 μ L, Opti-MEM: 247 μ L を混合して Lipo mix とした。DNA mix を Lipo mix へ 1 滴ずつ滴下し、ピペッティングによって混合した後に室温で 30 分間静置した。HEK293A 細胞の培地を Opti-MEM: 1.5 mL に置換し、そこへ DNA/Lipo mix を 1 滴ずつ滴下した。CO₂ インキュベーター内で 6 時間インキュベートし、基本培地へ置換した。

- ウイルス粒子の回収 (P1: Passage 1)

トランスフェクションの翌日に細胞をトリプシン処理して 100 mm dish へ播き直した。その後、2~3 日おきに培地を交換して細胞を培養した。プラークが形成されて細胞が半分以上剥がれてきたら、培地ごと細胞を回収した。この細胞懸濁液は凍結、融解を 3 回以上繰り返し、細胞からウイルスを放出させた。これを遠心して得られた上清を P1 ウイルス液とした。

- アデノウイルスの継代

トランスフェクション前日に HEK293A 細胞を 100 mm dish へ 1×10^6 cell/dish の割合で播いた。P1 ウイルス液: 100 μ L を 5% FBS-DEME: 4.9 mL に希釈し、HEK293A 細胞の培地と置換した。1 ~ 2 時間インキュベートした後、5% FBS-DMDM に置換して細胞を培養した。翌々日頃に剥がれてきた細胞を培地ごと回収し、凍結、融解後に上清を回収して P2 ウイルス液とした。これ以降の継代は、必要なウイルス力価や液量に応じて感染させる細胞数・ウイルス液量を調整した。

- 力価測定

96-well コラーゲンコートプレート (Becton Dickinson) へ段階希釈したウイルス液を 50 μ L ずつアプライした (ウイルス液の希釈倍率は継代数により調節した)。これに 5% FBS-DMEM に懸濁した 293A 細胞 (1×10^6 cell/plate) を播いて培養した。培養 3, 7 日目に 10% FBS-DMEM を適量加えた。培養 12 日後に顕微鏡で細胞変性の終末点 (50% 細胞変性が認められるウイルス希釈濃度) を確認し、ウイルス力価 (PFU: Plaque-Forming Unit) を算出した。

- 濃縮・精製法

ウイルス感染の前日、150 mm dish (Becton Dickinson) : 20 枚に 6×10^6 cell/dish となるように HEK293A 細胞を播いた。HEK293A 細胞の培地を P4 ウイルス液希釈液へ置換して 1~2 時間インキュベート後、10% FBS-DMDM に置換して細胞を培養した。細胞が 50%程度剥がれてきたところで培地ごと細胞を回収した。これを遠心して上清を捨て、12 mL 以下の 5% FBS-DMEM に懸濁した。凍結、融解を 5 回繰り返して、これを遠心して得られた上清を高力価ウイルス液とした。

この高力価ウイルス液を塩化セシウム密度勾配遠心法 [87] に供することで、不要タンパク質を除去した。さらに、この溶液を Slide-A-Lyzer Gamma Irradiate Dialysis Cassette Extra-Strength (Thermo Scientific) に注入し、等張ウイルス用バッファー (10 mM Tris, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10% Glycerol, pH 7.4): 1 L を外液として、1 時間以上透析した。その後、新しい外液: 1 L に置換して、さらに 1 時間以上透析した。回収した精製ウイルス液は使用するまで -80°C で保存した。

このようにして、4 種類のアデノウイルスを作成した。

- ・ 3×Flag-LacZ 過剰発現アデノウイルス (LacZ, コントロール)
- ・ 3×Flag-mChREBP α 過剰発現アデノウイルス (ChREBP α)
- ・ 3×Flag-mChREBP β 過剰発現アデノウイルス (ChREBP β)
- ・ mMLX β 過剰発現アデノウイルス (MLX)

◆ 細胞実験

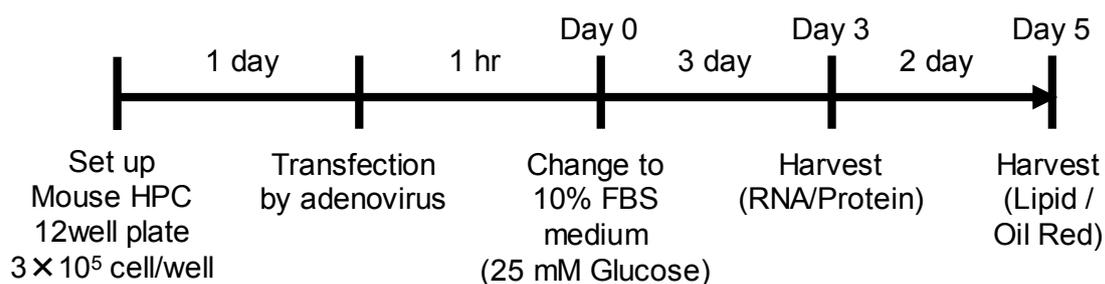
- 肝実質細胞の採取

第二章第一節に記載の方法に準じて行なった。

- 過剰発現実験

ウイルス感染の前日に、肝実質細胞を 3×10^5 cell/well の割合で、コラーゲンコート 12-well プレート (Becton Dickinson) に播いた。作成したウイルス液を 5% FBS-William's medium E で希釈し、任意の MOI (Multiplicity of Infection = ウイルス力価 PFU / 感染細胞数) の希釈ウイルス液: 0.5 mL/well を調製した。基本培地を除いて、希釈ウイルス液を加え、1 時間インキュベートした。その後、10% FBS-William's medium E (25 mM Glucose) へ交換し、2 日ごとに培地交換しながら培養を続けた。

ウイルス感染 3 日後の細胞を回収し、RNA 用サンプル、タンパク質用サンプルとした。RNA 抽出や RT-qPCR は第二章第一節に記載の方法で行なった。タンパク質抽出やウエスタンブロッティングの手技は第二章第二節に記載の方法で行なった。ACC タンパク質の検出には、anti-ACC C83B10 rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling) を用いた。ウイルス感染 5 日後の細胞を回収し、オイルレッド染色と細胞内脂質量測定用のサンプルとした。



- qPCR 用プライマーによって検出される ChREBP mRNA について
 - mChREBP qPCR プライマー (Fig. 3-1 の緑矢印):
内因性 ChREBP α / β 、および 3 \times Flag-mChREBP α / β (外因性) の mRNA を検出する。
 - mChREBP α 特異的 qPCR プライマー (Fig. 3-1 の赤矢印):
内因性 ChREBP α 、および 3 \times Flag-mChREBP α (外因性) の mRNA を検出する。
 - mChREBP β 特異的 qPCR プライマー (Fig. 3-1 の青矢印):
内因性 ChREBP β の mRNA のみ検出する。(3 \times Flag-mChREBP β には含まれない 5'末端側の非翻訳領域で作成しているため)

- オイルレッド O 染色

12-well plate で培養した細胞の 1 well 分の染色を行なう場合のプロトコルを記す。培地 1 mL のうち 0.5 mL を除き、氷冷 4% Paraformaldehyde / PBS 溶液を 0.5 mL 加え、室温で 20 分間放置した。培地を除き、氷冷 4% Paraformaldehyde / PBS 溶液を 1 mL を加え、室温で 1 時間放置した。超純水で 3 回洗浄し、Oil Red O 染色溶液 (1% Oil Red O, Isopropanol : Distilled water = 3 : 2) を 1 mL 加え、室温で一晩放置した。これを超純水で 3 回洗浄し、PBS: 1 mL を満たした細胞を位相差顕微鏡で撮影した。

- 細胞内脂質量の測定

12-well plate で培養した細胞の 1 well 分の脂質抽出を行なう場合のプロトコルを記す。培養した細胞を PBS で 2 回洗浄後、Hexane : Isopropanol (3 : 2, v/v): 200 μ L を加えた。氷上で 10 分間インキュベートした後、上清を 1.5 mL チューブに回収した。この操作をもう一度繰り返し、上清を計 400 μ L 回収した。これを、吸引遠心機を用いて溶媒がなくなるまで乾燥させた (37°C、1 時間以上)。チューブ底に固着した脂質を Isopropanol: 20 μ L に溶解し、脂質抽出サンプルとした。

TG の定量には、トリグリセライド E-テストワコー (Wako) を用いた。96 well plate 内で発色液: 150 μ L と脂質抽出サンプル: 2 μ L を混合し、着色が観察されるまで 37°C でインキュベートした。マイクロプレートリーダー Model 680 (Bio-Rad) により 595 nm における吸光度を測定した。これをもとに 1 well あたりの TG 量を定量した。

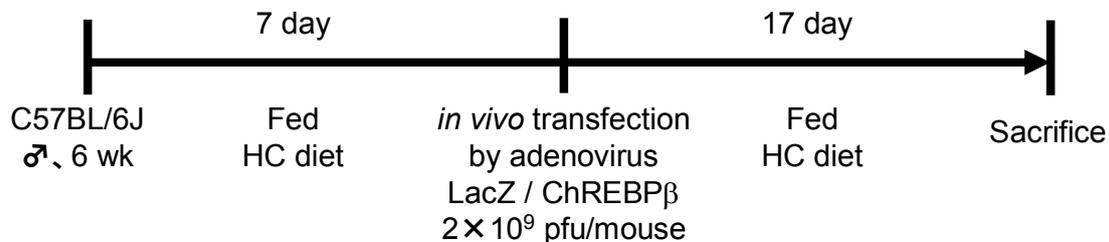
総コレステロールの定量には、コレステロール E-テストワコー (Wako) を用いた。96 well plate 内で発色液: 150 μ L と脂質抽出サンプル: 10 μ L を混合し、着色が観察されるまで 37°C でインキュベートした。マイクロプレートリーダーにより 595 nm における吸光度を測定した。これをもとに 1 well あたりの総コレステロール量を定量した。

◆ 動物実験

● 過剰発現実験

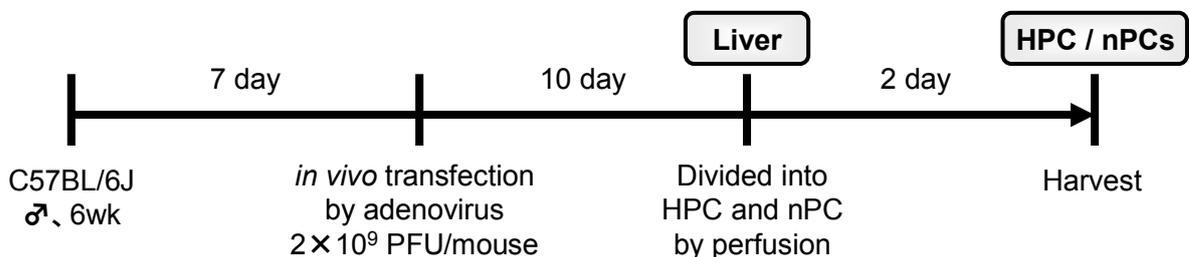
実験動物は、6 週齢、雄の C57BL/6J マウスを日本クレアから購入した。搬入後の 1 週間は馴化のために、高糖質食 (HC diet; 組成は Table 2-3) を自由摂食させて飼育した。体重が等しくなるように 2 群に分け、精製ウイルス液 (3×Flag-LacZ 過剰発現アデノウイルス、もしくは 3×Flag-mChREBPβ 過剰発現アデノウイルス) を尾静脈から注射し、ウイルスを感染させた (2×10^9 PFU/mouse)。その後、高糖質食を自由摂食させて、ウイルス感染から 17 日後に組織や血液を採取した。血清や組織は解析するまで -80°C で冷凍保存した。

なお事前に行なった発現確認実験では、ウイルス感染量を 1×10^8 / 1×10^9 / 5×10^9 PFU/mouse に調節して上記と同様の操作を行なった。



● 肝実質細胞・非実質細胞における遺伝子発現量測定

実験動物、ウイルス感染、飼育条件は上記と同様である。ウイルス感染から 10 日後に、マウス肝臓をコラゲナーゼ灌流した。灌流直後の肝臓片を切り出し、RNA を抽出した (Liver)。残った肝臓片から肝実質細胞、非実質細胞に単離した (第二章第一節に記載の方法と同様)。培養 2 日目の肝実質細胞 (HPC)、非実質細胞 (nPCs) から RNA を抽出して遺伝子発現量を測定した。



● 血中パラメーターの測定

解剖時にマウスから採取した血清をサンプルとして、以下のキットを用いて血中パラメーターを測定した。方法はメーカープロトコルに準じた。

- グルコース濃度: グルコース CII-テストワコー (Wako)
- TG 濃度: トリグリセライド E テストワコー (Wako)
- 総コレステロール濃度: コレステロール E テストワコー (Wako)
- 遊離脂肪酸濃度 (NEFA: Nonesterified Fatty Acid):
NEFA C-テストワコー (Wako)
- AST・ALT 活性: トランスアミナーゼ CII-テストワコー (Wako)

- 肝脂質抽出・定量

マウス肝臓片: < 0.2 g をガラス製キャップ付き試験管へ移し、Chroloform / Methanol (2 : 1, v/v): 4 mL を加え、ポリトロンホモジナイザーにより破砕した。これを常温で 30 分間振とうした後、50 mM NaCl: 1 mL を加え、ボルテックスによる混合後、1500 ×g で 30 分間遠心した。パスツールピペットを用いて下層 (有機層) を全量取り出し、別の試験管へ移した。そこへ 0.36 M CaCl₂ / Methanol (1:1, v/v): 1 mL を加え、ボルテックスで混合後、1500 ×g で 1 分間遠心し、上層 (水層) を除いた。この操作はもう一度繰り返した。下層 (Chroloform 層) をメスフラスコに移し、Chroloform で 5 mL にメスアップした。これをマウス肝脂質抽出液とした。

マウス肝脂質抽出液: 100 ~ 200 μL、Triton-X 100 Solution (50% Triton-X 100 in Chroloform): 10 μL をガラスチューブ内で混合した。これをドラフト内に静置し、Chroloform を完全に気化させた。その後、このガラスチューブへトリグリセライド E-テストワコー発色液: 500 μL、コレステロール E-テストワコー発色液: 500 μL を加え、37°C でインキュベートした。遠心により上清を回収し、595nm における吸光度を測定した。使用した肝臓片重量で測定値を除すことで、肝臓重量あたりの脂質量を算出した。

◆ 統計処理

統計処理には、StatView ver.5.0 (SAS Institute Inc.) あるいは JSTAT ver.11.1 (NANKODO) を用いた。図中の棒グラフは平均値±標準誤差 (Mean ± SE) で示した。2 群間の差の検定は、Student's *t*-test により行ない、*P*-value が 0.05 以下のものを「群間で有意な差が認められる」とした。多群間の差の検定は、分散分析により *P*-value が 0.05 以下、かつ多重比較検定 (Tukey-Kramer test) により *P*-value が 0.05 以下であったものを「群間で有意な差が認められる」とした。

結果

◆ 肝実質細胞における導入遺伝子の発現を確認した。

過剰発現用アデノウイルスの感染により、肝実質細胞で導入遺伝子の発現が見られるか確認した。各々のアデノウイルスを MOI: 1, 10, 100 になるように肝実質細胞に感染させ、感染 3 日目の細胞タンパク質を回収した。Flag 抗体を用いてタンパク質をウエスタンブロットしたところ、ウイルス感染量依存的な導入遺伝子の発現が認められた (Fig. 3-2A)。ChREBP 抗体でウエスタンブロットした場合もこれと同じ位置に 3×Flag-mChREBP α / β のバンドが認められた。また、ChREBP β を過剰発現させた細胞でのみ ACC タンパク質の発現増大が認められた。以上の点により、今回作成したアデノウイルスを感染させることで、肝実質細胞で ChREBP α / β タンパク質を過剰発現できることを確認した。

◆ ChREBP β の過剰発現により、解糖系・脂質生合成系酵素の発現が増大する。

高グルコース下で ChREBP α 、もしくは ChREBP β を MLX と共発現させた肝実質細胞の mRNA 発現量を測定した。これらの細胞でも導入遺伝子 (ChREBP / MLX) の mRNA 発現量が増大することを確認した (Fig. 3-2B)。Noninfection (ウイルス非感染) や LacZ、MLX を発現させた細胞と比べて、ChREBP β を過剰発現させた細胞では、脂質生合成系酵素遺伝子 (Fig. 3-3: ACC1、FASN、SCD1、ELOVL6)、解糖系酵素遺伝子 (Fig. 3-4: LPK、KHK) の mRNA 発現量が有意に増大した。ChREBP β /MLX を共発現させた細胞では、これらの発現増大はより顕著に見られた。

ChREBP α /MLX を共発現させたものでは、一部の遺伝子の発現量が有意な差ではないが増加する傾向が見られた (Noninfection を 1 とした場合の発現量は ACC1: 2.83、KHK: 3.29、LPK: 1.57、SCD1: 4.31)。なお、低グルコース下で培養した細胞では上記の現象が認められなかった (Noninfection を 1 とした場合の ChREBP α /MLX [MOI: 100] 過剰発現細胞における発現量は、ACC1: 2.09, KHK: 1.50, LPK: 0.90, SCD1: no data)。

また、ChREBP β /MLX を共発現させた細胞で、内因性 ChREBP β の mRNA 発現量が有意に増大した (Fig. 3-4)。ChREBP β を単独発現、ChREBP α /MLX を共発現させた細胞では、有意ではないものの内因性 ChREBP β mRNA 発現量が増加する傾向が見られた。

◆ ChREBPβの過剰発現により肝実質細胞の脂肪蓄積が亢進する。

ChREBPβの過剰発現により脂肪蓄積が亢進するか調べるため、ウイルス感染後の細胞をオイルレッド染色した (Fig. 3-5)。Noninfection や LacZ、MLX、ChREBPαを過剰発現させた細胞では脂肪滴の蓄積が見られなかったが、ChREBPβを過剰発現させた細胞では脂肪滴が見られた。ChREBPβ/MLX を共発現させた細胞では、より顕著な脂肪滴の蓄積が認められた。

さらに、細胞内脂質量を測定したところ、ChREBPβ/MLX を共発現させた細胞では TG 量、総コレステロール量の有意な増加が認められた (Fig. 3-6)。これらの変化は、LacZ、MLX、ChREBPαを過剰発現させた細胞には認められなかった。

以上の結果から、肝実質細胞における ChREBPβの発現増大は、解糖系・脂質合成系酵素遺伝子の発現誘導を介して脂肪蓄積を亢進することが示唆された。

◆ マウス肝臓における導入遺伝子の発現を確認した。

ChREBPβの過剰発現により *in vivo* でも脂肪肝の進行が見られるか検証するため、3×Flag-LacZ、および 3×Flag-mChREBPβ過剰発現アデノウイルスの精製ウイルス液を調製した。各々のアデノウイルスを 1×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 PFU/mouse となるようにマウスに感染させた。ウイルス投与後から高糖質食を摂取させ、感染から 2 週間後にマウスを解剖した。採取した肝臓からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロットに供した (Fig. 3-7)。

Flag 抗体によりウエスタンブロットを行なったところ、3×Flag-LacZ (図中の緑矢印)、3×Flag-mChREBPβ (図中の青矢印) とともにウイルス感染量依存的なタンパク質発現を確認することができた。ChREBP 抗体でウエスタンブロットした場合も、3×Flag-mChREBPβタンパク質の発現を確認することができた。また、3×Flag-mChREBPβアデノウイルスを 1×10^9 , 5×10^9 PFU/mouse 投与したマウスの肝臓 (右側の 2 レーン) では、ACC タンパク質の発現増大が認められた。

したがって、精製ウイルスを投与することで、マウスの肝臓で標的遺伝子を過剰発現できることが確認された。ただし、ウイルスを 5×10^9 PFU 投与したマウスでは摂餌量、体重の減少が見られたため (摂食量 Non-infection: 3.5 ± 0.1 g/day, LacZ: 2.8 ± 0.3 g/day, ChREBPβ: 1.9 ± 0.2 g/day, 解剖時体重 Non-infection: 24.9 ± 0.2 g, LacZ: 23.3 ± 0.3 g, ChREBPβ: 18.3 ± 1.8 g)、感染ウイルス量を減らして次の実験を行なった。

◆ ChREBPβの過剰発現により脂肪肝が進行する。

ウイルス感染量を 2×10^9 PFU/mouse に固定し、上記と同様の試験を行なった。3×Flag-LacZ を過剰発現させたマウス (LacZ 群) と 3×Flag-mChREBPβ を過剰させたマウス (ChREBPβ 群) では、摂食量と体重に違いが認められなかった (Table 3-1)。一方、ChREBPβ 群において肝臓の肥大と精巣上体白色組織の萎縮が認められた (Fig. 3-8, 3-9A)。肝臓脂質量を測定したところ、ChREBPβ 群の肝臓で TG 量と総コレステロール量の有意な増加が認められた (Fig. 3-9B)。解剖時に得た血液を解析したところ、血中 TG 濃度、AST 活性、ALT 活性、遊離脂肪酸濃度が ChREBPβ 群で有意に上昇することが確認された (Table 3-1)。

以上の結果により、ChREBPβ の過剰発現により、脂肪肝の進行とそれに伴う肝障害、脂質異常症が進行することが確認された。

◆ ChREBPβの過剰発現により脂質生合成系酵素の発現増大が認められた。

ChREBPβ の過剰発現による脂肪肝の進行が、糖・脂質代謝関連遺伝子の発現誘導を介するか検証するために、採取した肝臓から RNA を抽出し、ChREBP 標的遺伝子の mRNA 発現量を測定した (Fig. 3-10)。

ChREBPβ の過剰発現により発現量が有意に増大した遺伝子は、内因性 ChREBPβ、LPK、G6PC、FASN、ACC1、SCD1、ELOVL6 であった。逆に、発現量が減少した遺伝子は ChREBPα であった。ChREBP mRNA 発現量 (内因性 mChREBPα/β、3×Flag-mChREBPβ のすべてを含む発現量) は増加する傾向が見られた ($P=0.057$)。

さらに、その他の脂質代謝関連転写因子 (Fig. 3-11A)、コレステロール代謝関連遺伝子 (Fig. 3-11B)、脂肪分解関連遺伝子 (Fig. 3-11C)、マクロファージマーカー (Fig. 3-11D) の遺伝子発現量を測定した。ChREBPβ の過剰発現により発現量が有意に増大した遺伝子は、SREBP1a、MTP、F4/80、CD11b、CD68 であった。逆に、発現量が減少した遺伝子は、PPARα、CPT1a であった。

全体としては、ChREBPβ の過剰発現により、脂質生合成系酵素遺伝子やマクロファージマーカーの発現が増大し、脂肪分解関連遺伝子の発現が減少する傾向が見られた。

◆ ChREBPβ群の肝実質細胞では脂肪滴の蓄積が認められた。

ChREBPβの過剰発現による脂肪肝の進行が肝実質細胞の脂肪蓄積に由来することを確認するため、ウイルス感染 10 日目のマウスから肝実質細胞 (HPC) と非実質細胞 (nPCs) を単離した。

コラゲナーゼ灌流前に開腹したマウスの画像を Fig. 3-12A に掲載した。感染 17 日目のマウス (Fig. 3-8) と同様に、ChREBPβ群では肝臓の肥大化と精巢上体白色脂肪組織の萎縮が認められた。肝臓から HPC と nPCs を単離し、培養 2 日目の細胞の顕微鏡画像を Fig. 3-12B に掲載した。LacZ 群の HPC には脂肪滴がほとんど見られなかったが、ChREBPβ群の HPC では脂肪滴の蓄積が観察された。また、ChREBPβ群の nPCs では、マクロファージ様 (クッパー) 細胞が多く見られた。

◆ ChREBPβによる脂質生合成系酵素の発現増大は肝実質細胞に由来する。

ChREBPβ群の肝臓で見られた脂質生合成系酵素の発現増大が肝実質細胞に由来するか調べるため、コラゲナーゼ灌流直後の肝臓 (Liver) と、上記の実験から得た HPC、nPCs から RNA を抽出し、RT-qPCR 法により mRNA 発現量を測定した。

ChREBPβ群では、Liver、HPC、nPCs のいずれのサンプルにおいても ChREBP の mRNA 発現量が有意に増大していた (Fig. 3-13)。このため、ウイルス感染によって HPC と nPCs のどちらでも ChREBPβが過剰発現していると考えられる。しかし、nPCs よりも HPC の方が ChREBP の発現量は圧倒的に多かった。F4/80 の mRNA 発現量は、ChREBPβ群の Liver と nPCs で有意に増大した。

内因性 ChREBPβと脂質生合成系酵素遺伝子 (FASN、ACC1、SCD1、ELOVL6) の発現は ChREBPβ群の HPC において有意に増大した (Fig. 3-13, 3-14)。このような変化は nPCs ではほとんど認められなかった。SCD1 は ChREBPβ群の nPCs でも有意に増大していたが、HPC と比べるとその発現量は圧倒的に少なかった。

以上の結果は、ChREBPβの過剰発現によって肝臓で見られた脂質生合成系酵素の発現増大は肝実質細胞に由来することを示唆する。

Construction of overexpressional adenovirus plasmid

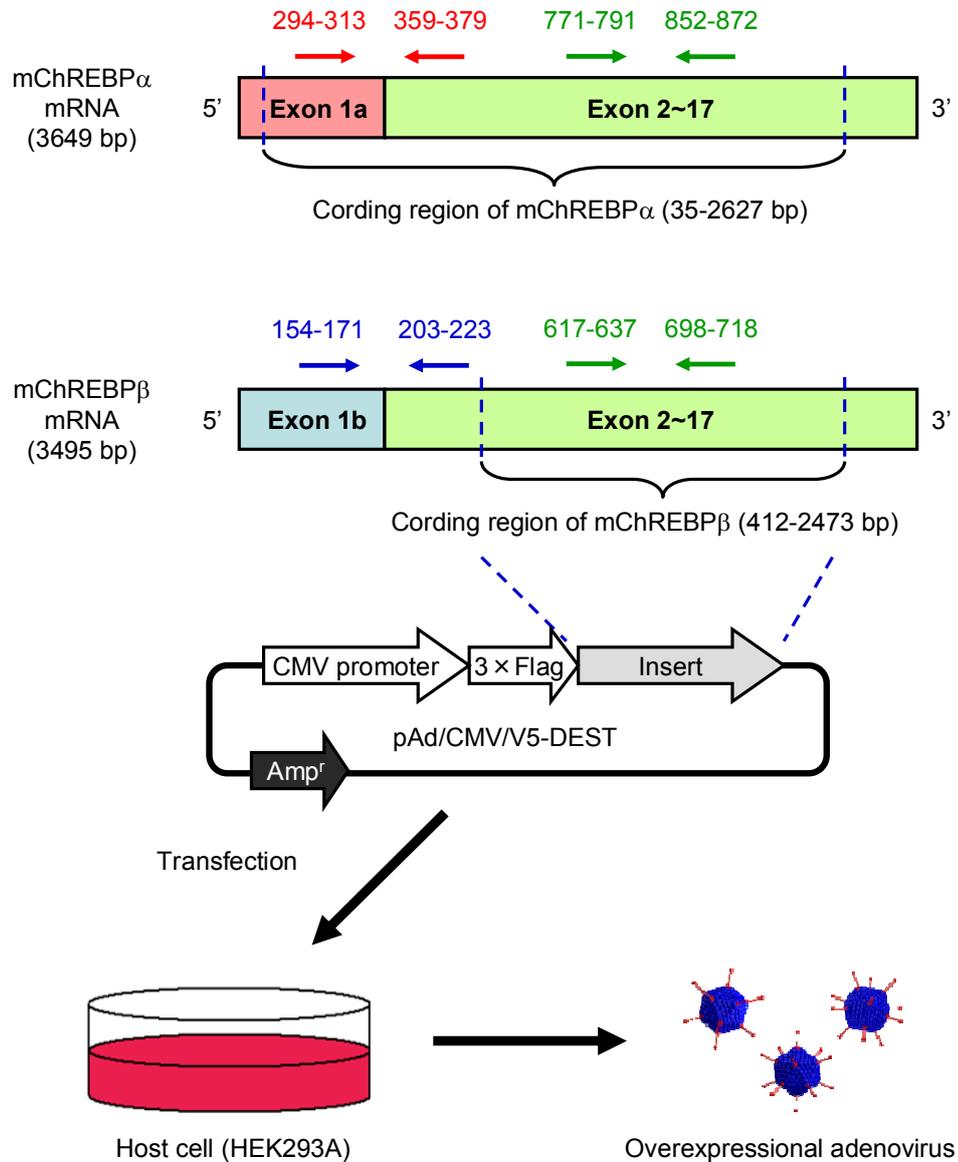


Fig. 3-1 過剰発現用アデノウイルスプラスミドのデザイン

3×Flag-mChREBP α/β 過剰発現用アデノウイルスプラスミドのデザイン (mMLX β 発現用プラスミドは未掲載)。図中の赤矢印は mChREBP α 特異的 qPCR プライマー、青矢印は mChREBP β 特異的 qPCR プライマー、緑矢印は mChREBP qPCR プライマー (内因性、外因性、アイソフォーム関係無く全ての ChREBP mRNA 発現を検出可能) がアニールする位置を示している。

Amp^r: アンピシリン耐性遺伝子

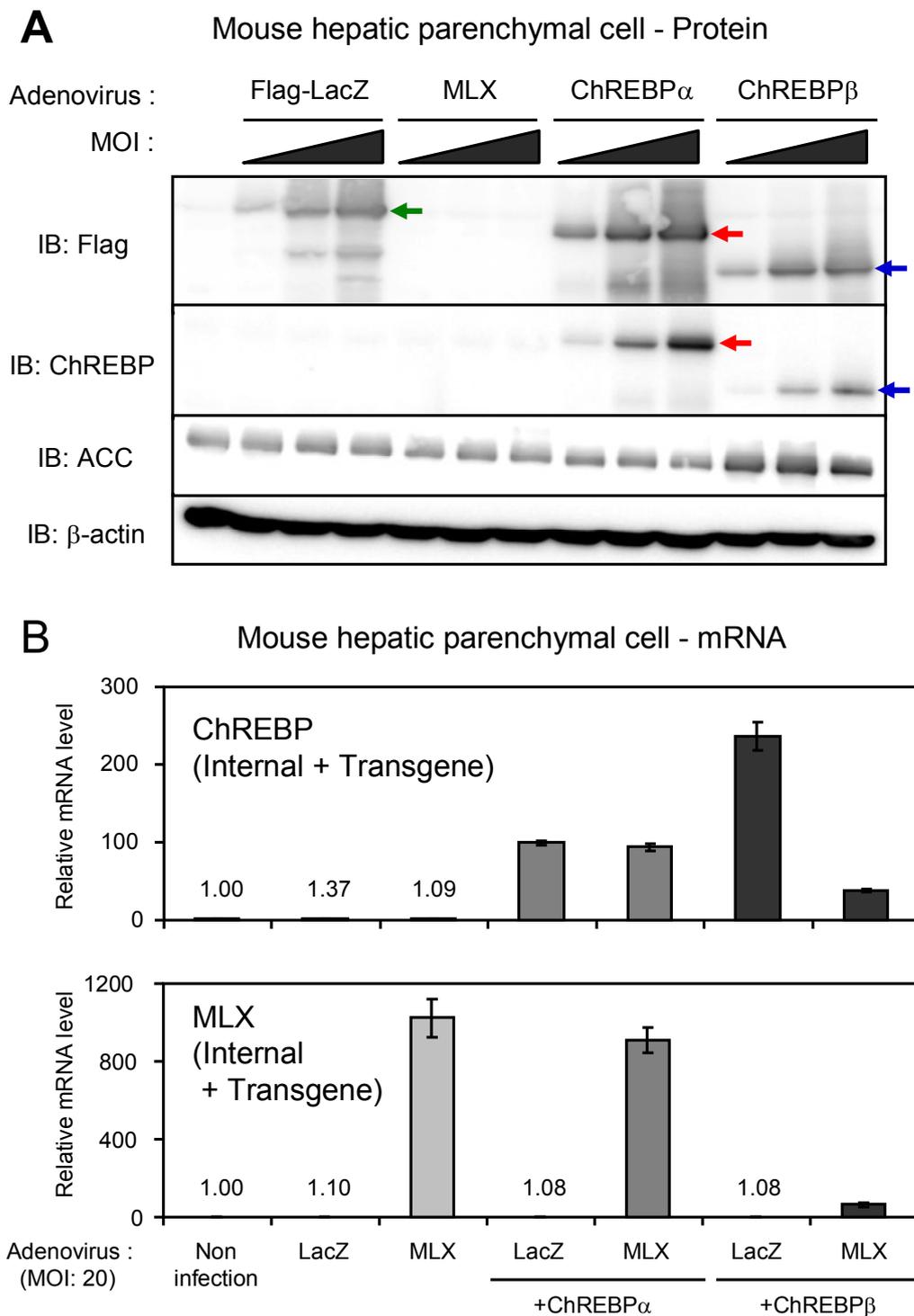


Fig. 3-2 肝実質細胞における導入遺伝子の発現確認

(A): アデノウイルスを MOI: 1, 10, 100 で感染させた肝実質細胞における導入遺伝子のタンパク質発現量 (緑矢印: 3×Flag-LacZ 116 kDa, 赤矢印: 3×Flag-mChREBP α 98 kDa, 青矢印: 3×Flag-mChREBP β 78 kDa)。次頁に続く。

(B): トータルの MOI が 20 になるようにアデノウイルスを感染させたマウス肝実質細胞の mRNA 発現量。ChREBP 単独発現の場合は、ChREBP アデノウイルスを MOI: 10、LacZ アデノウイルスを MOI: 10 ずつ感染させた。ChREBP/MLX 共発現の場合は、ChREBP ウイルスと MLX ウイルスを MOI: 10 ずつ感染させることで、トータルの MOI が 20 になるようにした。Noninfection 群を 1 とした場合の相対的な遺伝子発現量で示した。各遺伝子の発現量は、18S rRNA の発現量で補正した。グラフは平均±標準誤差で示し、多重比較検定 (Tukey-Kramer test) を行なった。(アルファベット文字の異なるものは $P < 0.05$ で有意差が認められる。n=3)

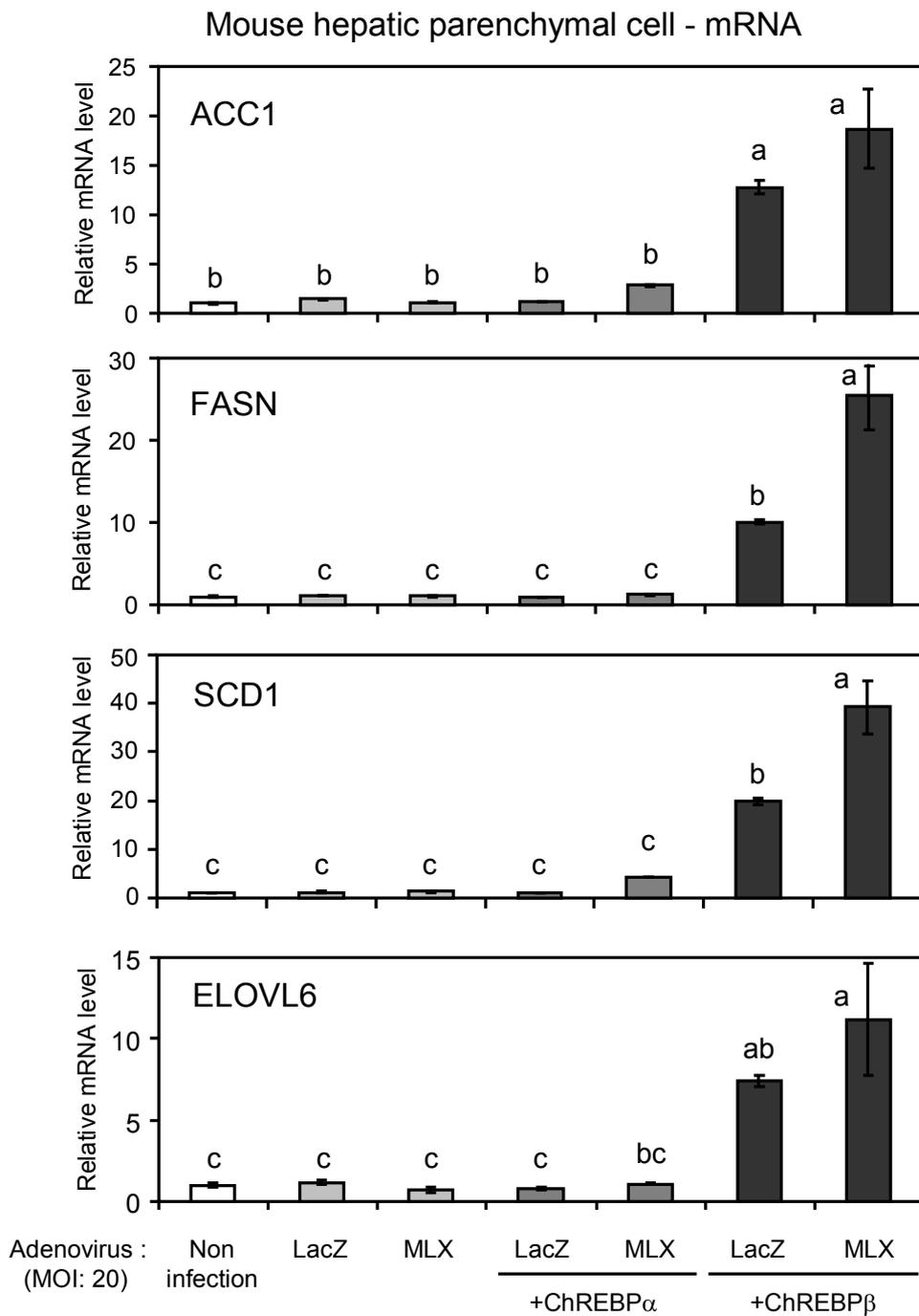


Fig. 3-3 ChREBP アイソフォームを過剰発現させた肝実質細胞における脂質生合成系酵素遺伝子の mRNA 発現量

トータルの MOI が 20 になるようにマウス肝実質細胞にアデノウイルスを感染させた。Noninfection 群を 1 とした場合の相対的な遺伝子発現量で示した。各遺伝子の発現量は、18S rRNA の発現量で補正した。グラフは平均±標準誤差で示し、多重比較検定 (Tukey-Kramer test) を行なった。(アルファベット文字の異なるものは $P < 0.05$ で有意差が認められる。n=3)

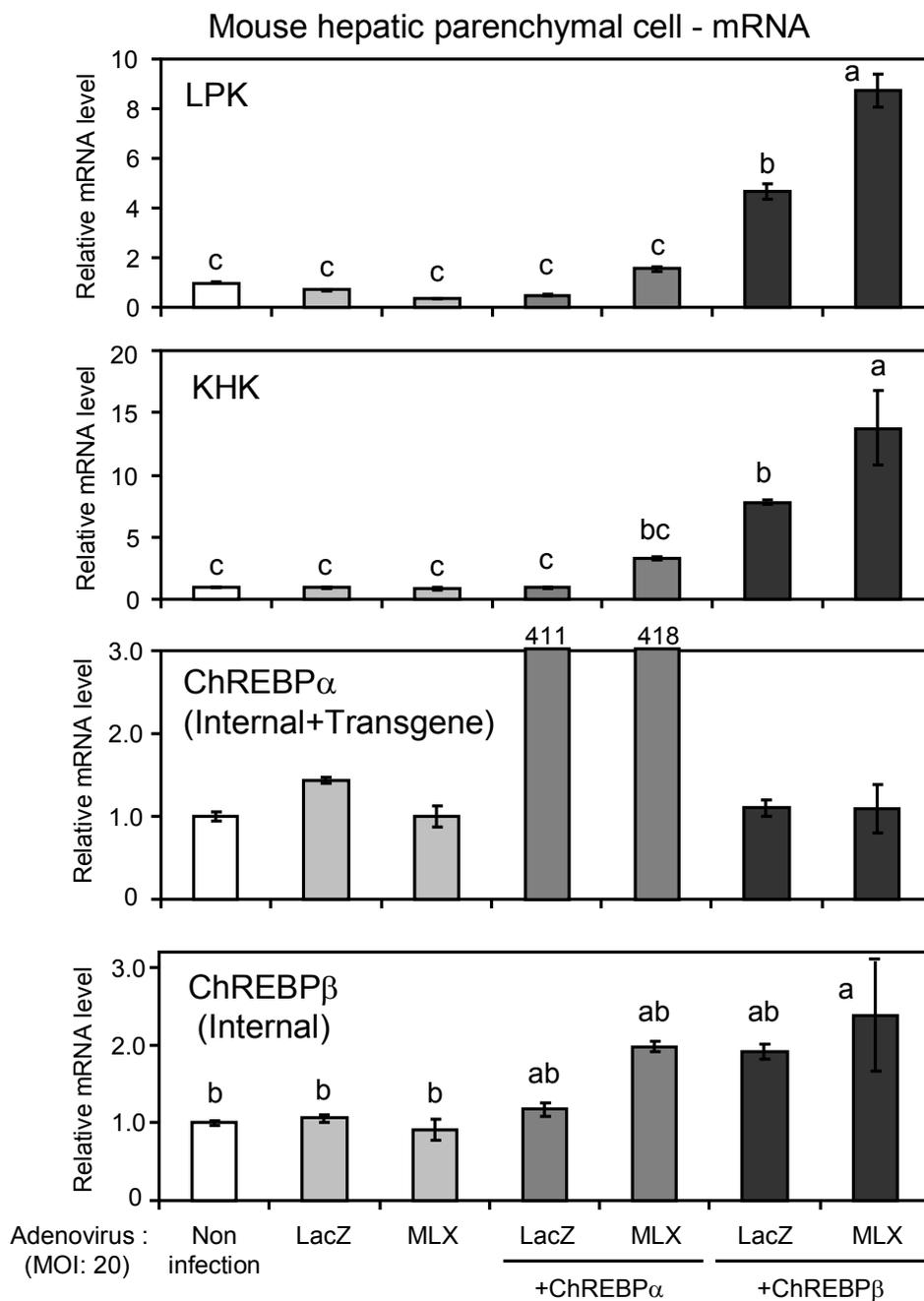
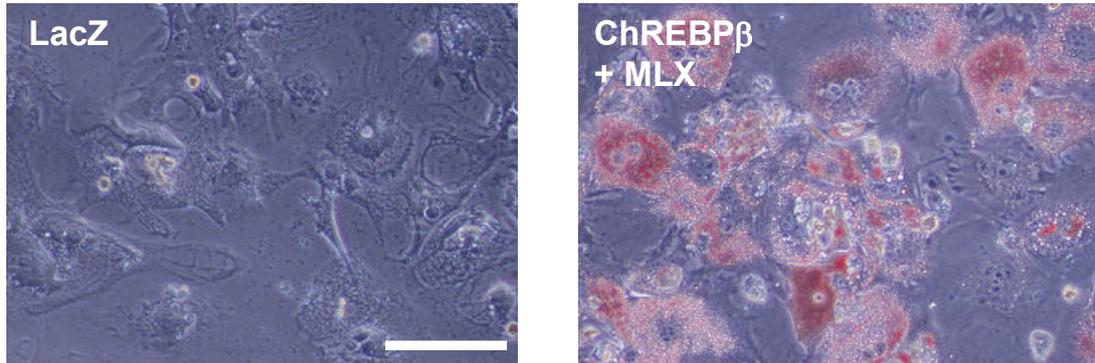


Fig. 3-4 ChREBP アイソフォームを過剰発現させた肝実質細胞における
 解糖系酵素遺伝子・内因性 ChREBP β の mRNA 発現量

トータルの MOI が 20 になるようにマウス肝実質細胞にアデノウイルスを感染させた。Noninfection 群を 1 とした場合の相対的な遺伝子発現量で示した。各遺伝子の発現量は、18S rRNA の発現量で補正した。グラフは平均 \pm 標準誤差で示し、多重比較検定 (Tukey-Kramer test) を行なった。(アルファベット文字の異なるものは $P < 0.05$ で有意差が認められる。n=3)

A Mouse hepatic parenchymal cell – Oil red O stain



B Magnified image

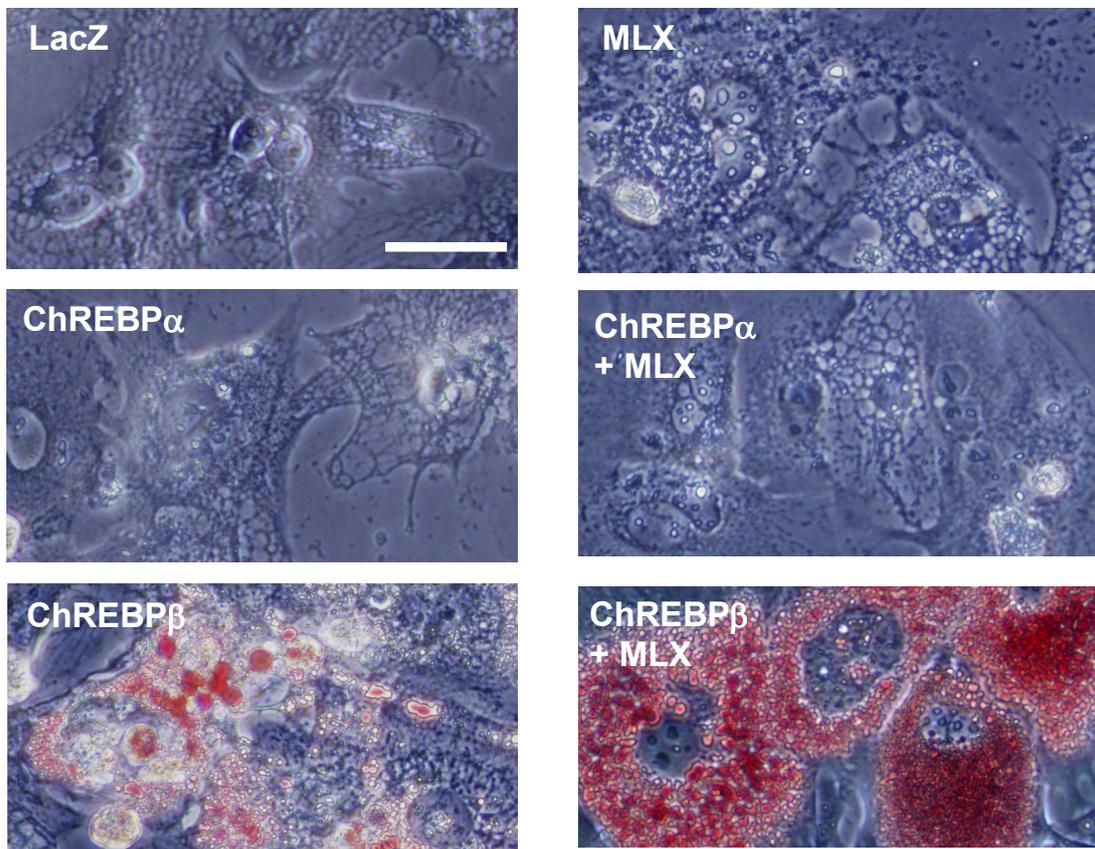


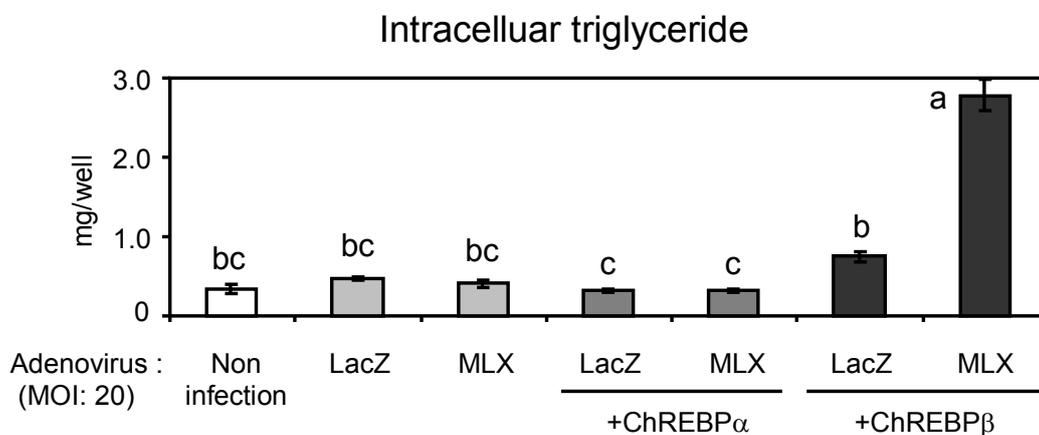
Fig. 3-5 ChREBP アイソフォームを過剰発現させた肝実質細胞の
オイルレッド染色画像

トータルの MOI が 20 になるようにマウス肝実質細胞にアデノウイルスを感
染させた。感染から 5 日目の細胞をオイルレッド染色した。

(A) LacZ、あるいは ChREBPβ/MLX を過剰発現させた細胞の低倍率画像。

スケールバー = 200 μm。 (B): 高倍率画像。スケールバー = 50 μm。

A Mouse hepatic parenchymal cell – Intracellular lipid



B Intracellular total-cholesterol

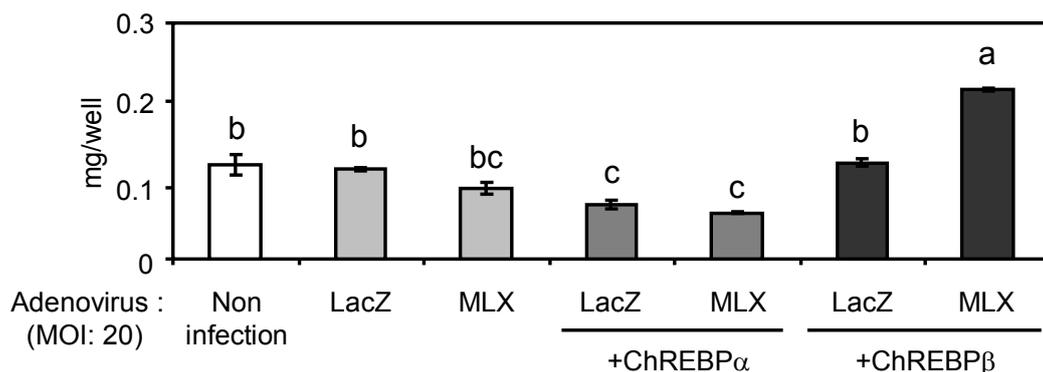


Fig. 3-6 ChREBP アイソフォームを過剰発現させた肝実質細胞の細胞内脂質量

トータルの MOI が 20 になるようにマウス肝実質細胞にアデノウイルスを感染させた。感染から 5 日目の細胞を回収し、(A): TG 量、および (B): 総コレステロール量を測定した。グラフは平均 \pm 標準誤差で示し、多重比較検定 (Tukey-Kramer test) を行なった。(アルファベット文字の異なるものは $P < 0.05$ で有意差が認められる。n=3)

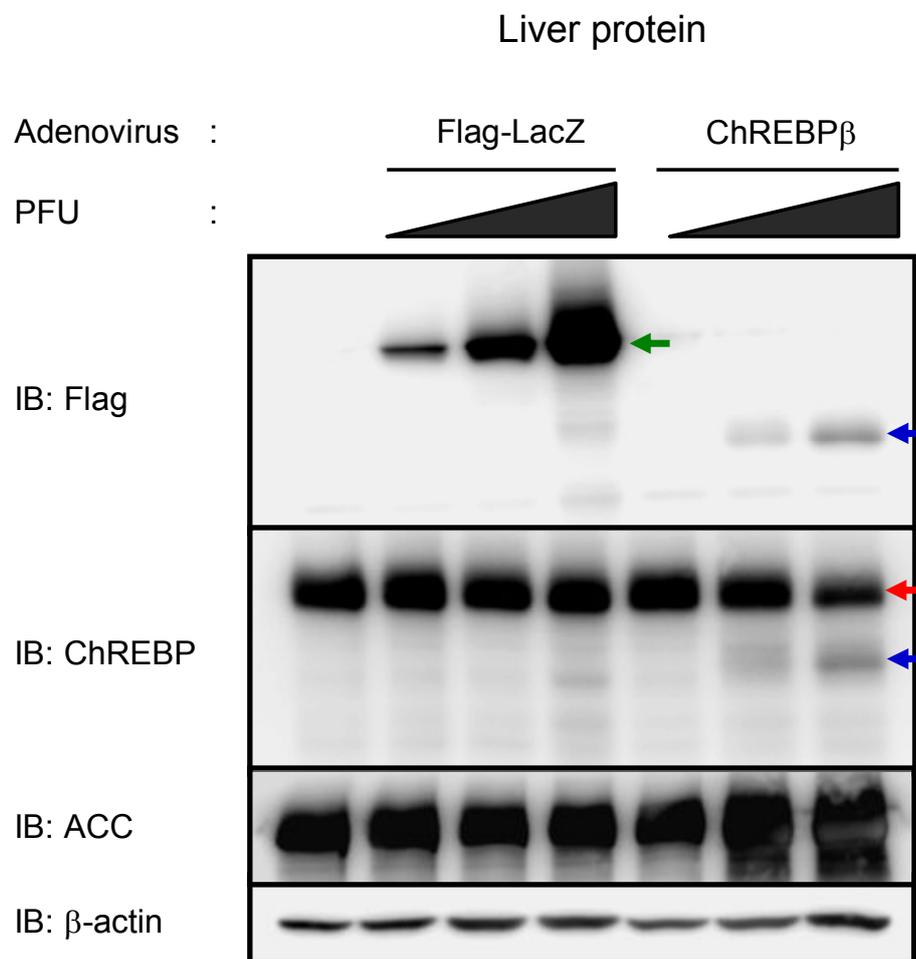


Fig. 3-7 マウス肝臓における導入遺伝子の発現確認

3×Flag-LacZ、および 3×Flag-mChREBP β 過剰発現アデノウイルスを 1×10^8 , 1×10^9 , 5×10^9 PFU/mouse となるように感染させたマウス肝臓における導入遺伝子のタンパク質発現量 (緑矢印: 3×Flag-LacZ 116 kDa, 赤矢印: mChREBP α 95 kDa, 青矢印: 3×Flag-mChREBP β 78 kDa)。一番左のレーンはウイルスを感染させていないマウスの肝臓タンパク質。

Table 3-1 3×Flag-LacZ、および3×Flag-mChREBPβ過剰発現アデノウイルスを投与したマウスの身体測定指標と血中パラメーター

Parameters	LacZ	ChREBPβ	P value
Food intake (g/day)	3.07 ± 0.11	3.03 ± 0.11	0.809
Initial body weight (g, Fed state)	23.2 ± 0.2	23.4 ± 0.1	0.558
Final body weight (g, Fed state)	25.0 ± 0.3	25.3 ± 0.3	0.399
Body weight gain (g/17day)	1.8 ± 0.2	2.0 ± 0.2	0.389
Fed blood parameters (17day)			
Glucose (mg/dL)	191 ± 6	209 ± 8	0.081
Triglyceride (mg/dL)	96 ± 6	121 ± 6	** 0.010
Total-cholesterol (mg/dL)	130 ± 4	122 ± 5	0.222
AST activity (IU/L)	198 ± 12	428 ± 37	*** < 0.001
ALT activity (IU/L)	49 ± 5	106 ± 10	*** < 0.001
Non-esterified fatty acids (mmol/L)	0.90 ± 0.03	1.20 ± 0.04	*** < 0.001

3×Flag-LacZ (LacZ)、および3×Flag-mChREBPβ (ChREBPβ) 過剰発現アデノウイルスを 2×10^9 PFU 投与したマウスを高糖質食を与えて17日間飼育した。

血中パラメーターは解剖時に得られた摂食時血液である。

数値は平均±標準誤差で示した。

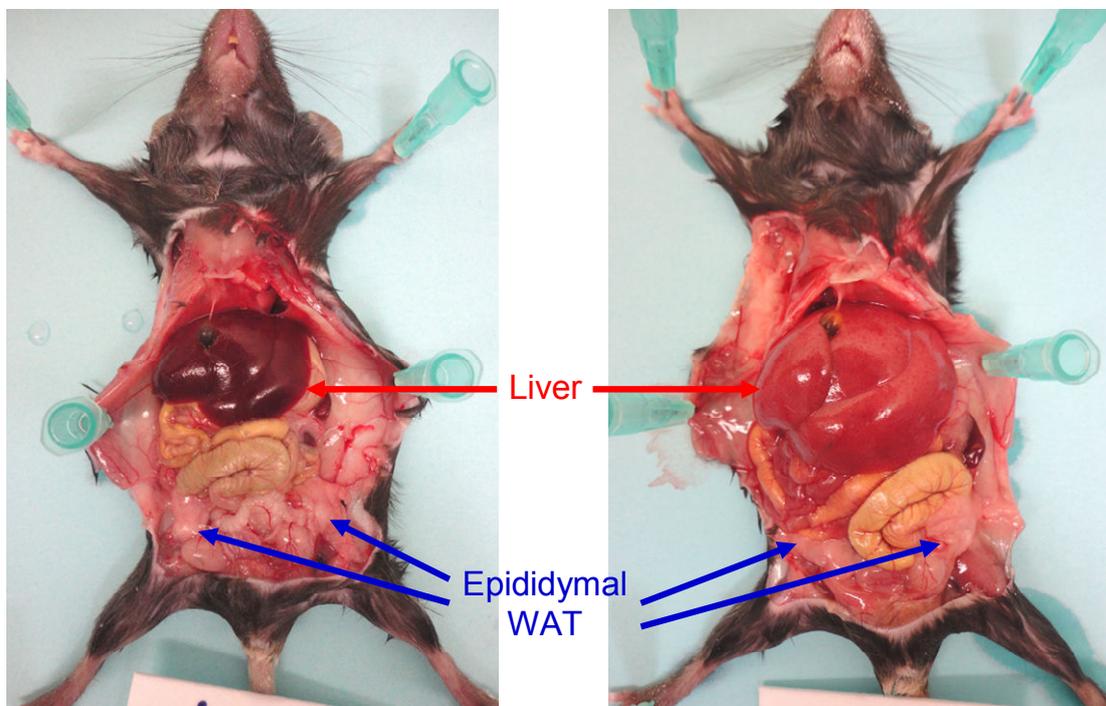
群間の差を Student's *t*-test により検定した。

(n=8, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$)

A

LacZ expressed

ChREBP β expressed



B

Liver

Epididymal WAT

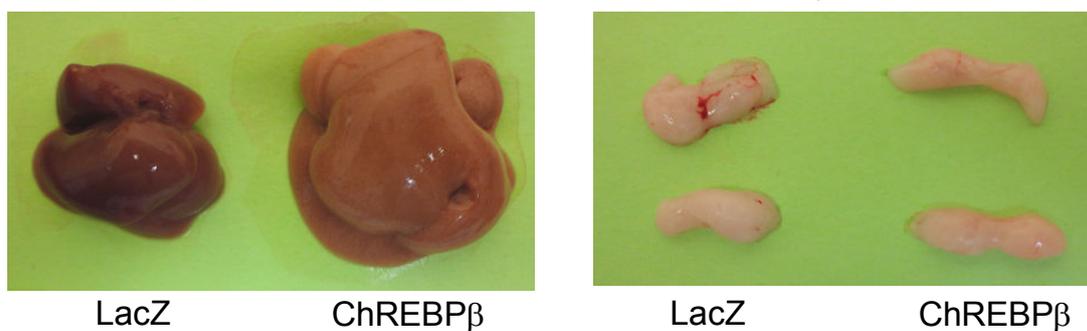


Fig. 3-8 アデノウイルス感染マウスの開腹画像

3×Flag-LacZ (LacZ)、および 3×Flag-mChREBP β (ChREBP β) 過剰発現アデノウイルスを 2×10^9 PFU 投与したマウスを開腹し、組織を取り出した。

(A) 開腹画像 (B) 肝臓と精巣上体白色脂肪組織の画像

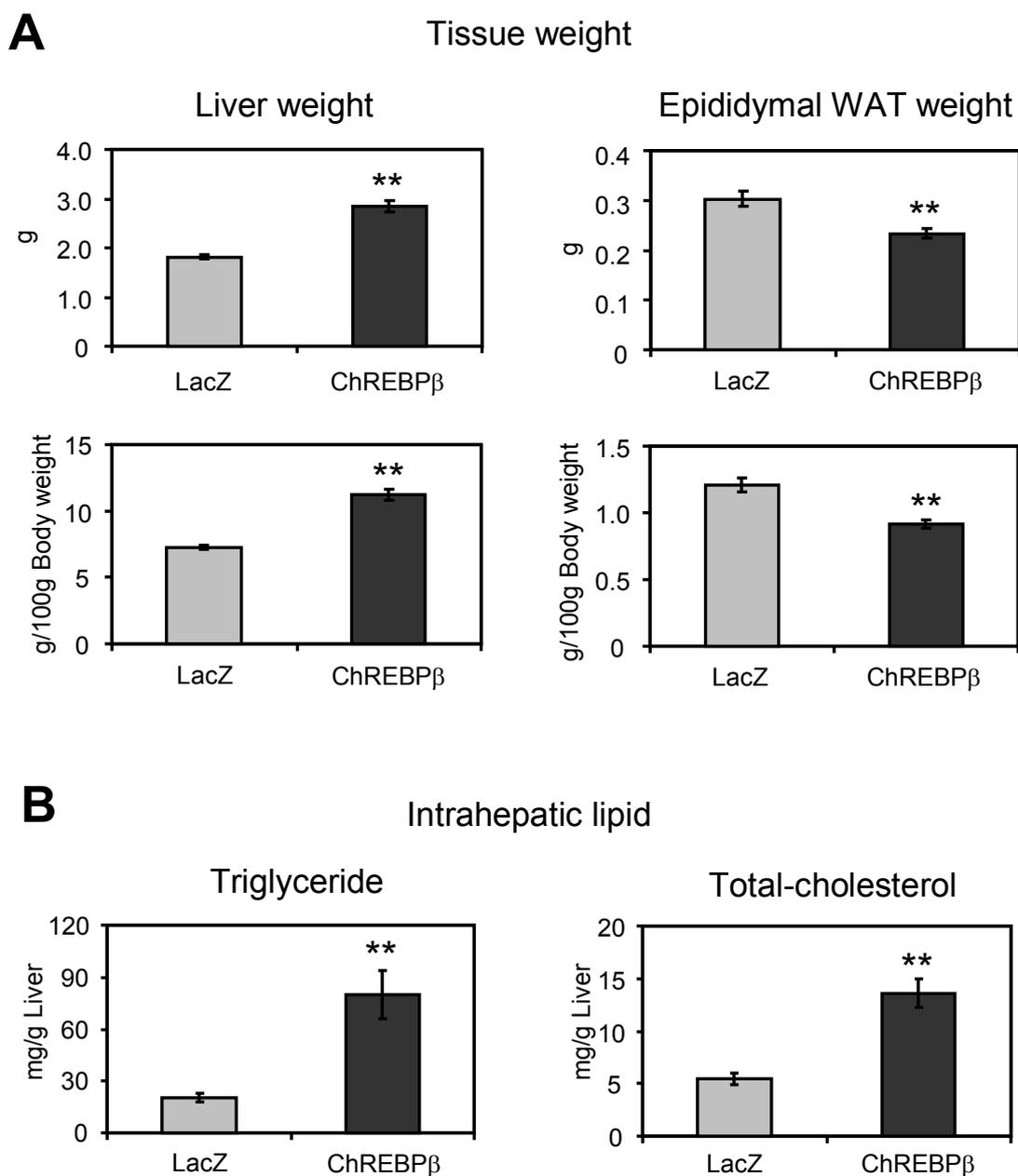


Fig. 3-9 アデノウイルス感染マウスの組織重量と肝臓脂質量

3×Flag-LacZ (LacZ)、および 3×Flag-mChREBPβ (ChREBPβ) 過剰発現アデノウイルスを 2×10^9 PFU 投与したマウスに高糖質食を与えて 17 日間飼育した。

(A) 解剖時に肝臓、および精巣上体白色脂肪組織の重量を測定した。

上図は重量の生値、下図は体重 100 g あたりの重量で示した。

(B) 肝臓中 TG 量、総コレステロール量を肝臓 1 g あたりの量で示した。

数値は平均±標準誤差で示した。

群間の差を Student's *t*-test により検定した。(**: $P < 0.01$, $n = 8$)

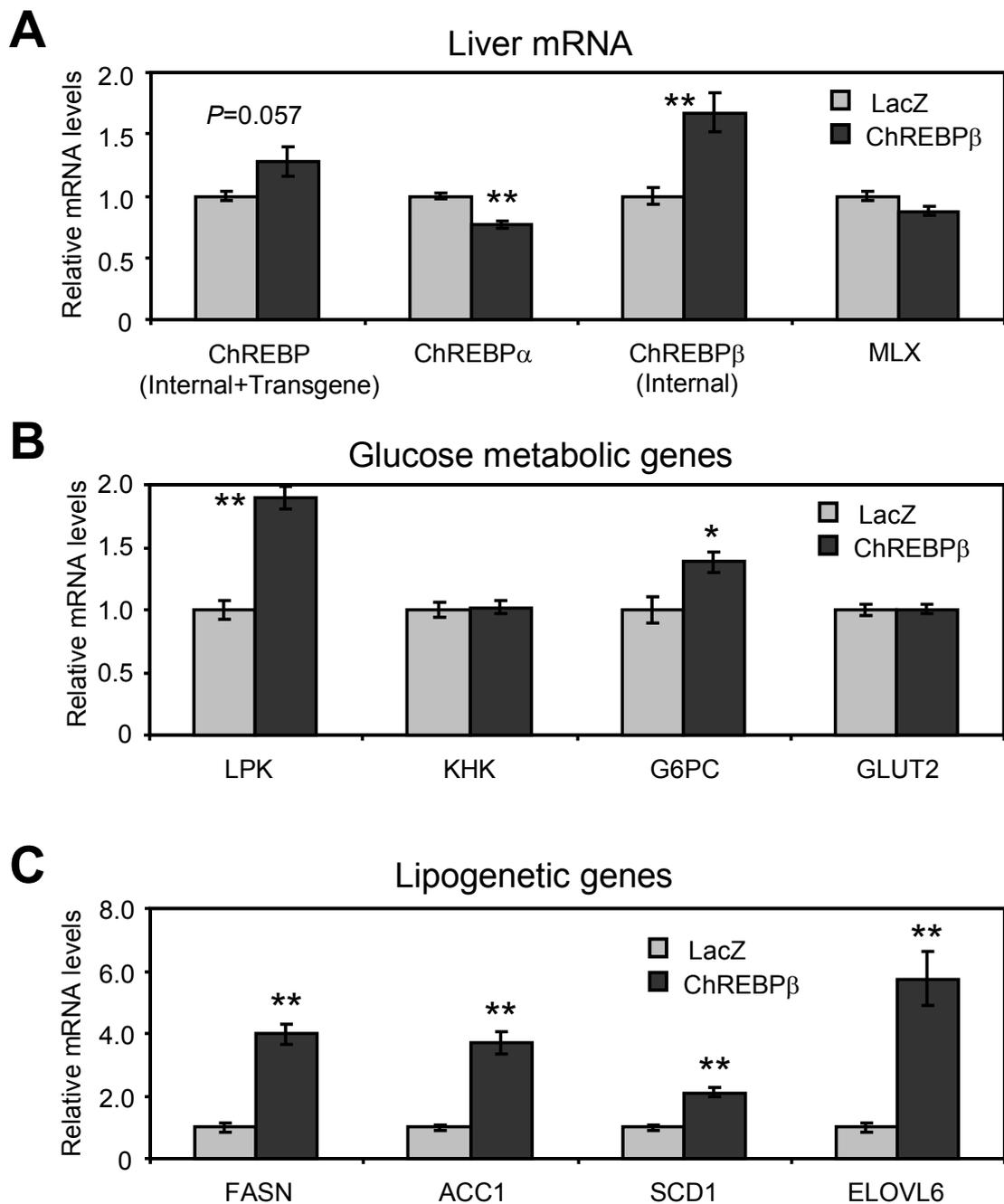


Fig. 3-10 アデノウイルス感染マウスの肝臓における遺伝子発現量①

3×Flag-LacZ (LacZ)、および3×Flag-mChREBP β (ChREBP β) 過剰発現アデノウイルスを 2×10^9 PFU 投与したマウスに高糖質食を与えて17日間飼育した。採取した肝臓からRNAを抽出し、RT-qPCR法によりmRNA発現量を測定した。

(A) ChREBP、MLX、(B) 糖代謝関連遺伝子、(C) 脂質合成系酵素遺伝子のmRNA発現量をLacZ群を1とした場合の相対的な値で示した。数値は平均±標準誤差で示した。群間の差をStudent's *t*-testにより検定した。(**: $P < 0.01$, $n=8$)

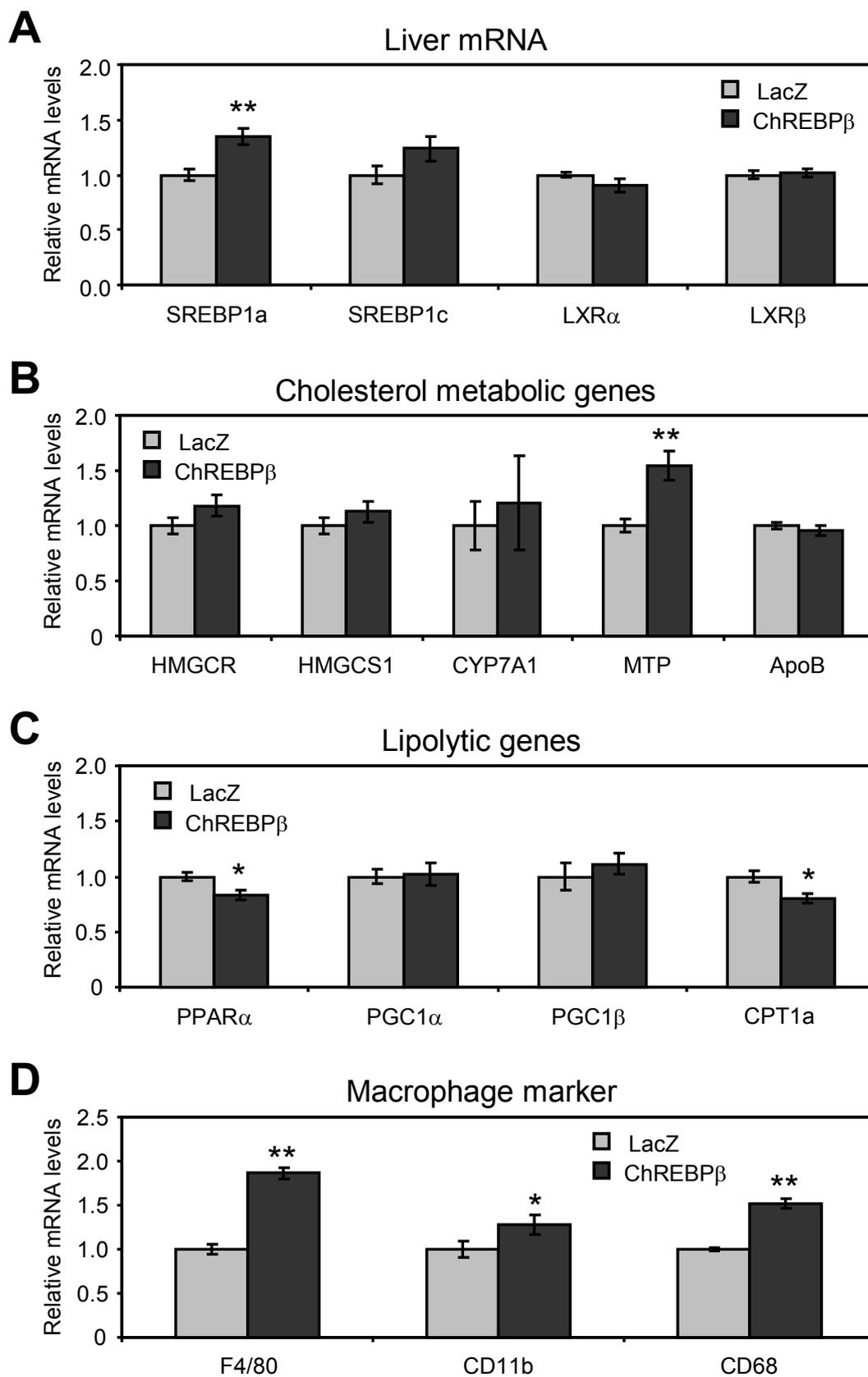


Fig. 3-11 アデノウイルス感染マウスの肝臓における遺伝子発現量②
(Fig. legend は次頁に記載する。)

Fig. 3-11 アデノウイルス感染マウスの肝臓における遺伝子発現量②

3×Flag-LacZ (LacZ)、および 3×Flag-mChREBPβ (ChREBPβ) 過剰発現アデノウイルスを 2×10^9 PFU 投与したマウスに高糖質食を与えて 17 日間飼育した。採取した肝臓から RNA を抽出し、RT-qPCR 法により mRNA 発現量を測定した。

(A) 脂質代謝関連転写因子、(B) コレステロール代謝関連遺伝子、(C) 脂質分解関連遺伝子、(D) マクロファージマーカーの mRNA 発現量。LacZ 群を 1 とした場合の相対的な値で示した。各遺伝子の発現量は、18S rRNA の発現量で補正した。数値は平均±標準誤差で示した。群間の差を Student's *t*-test により検定した。
(*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, $n=8$)

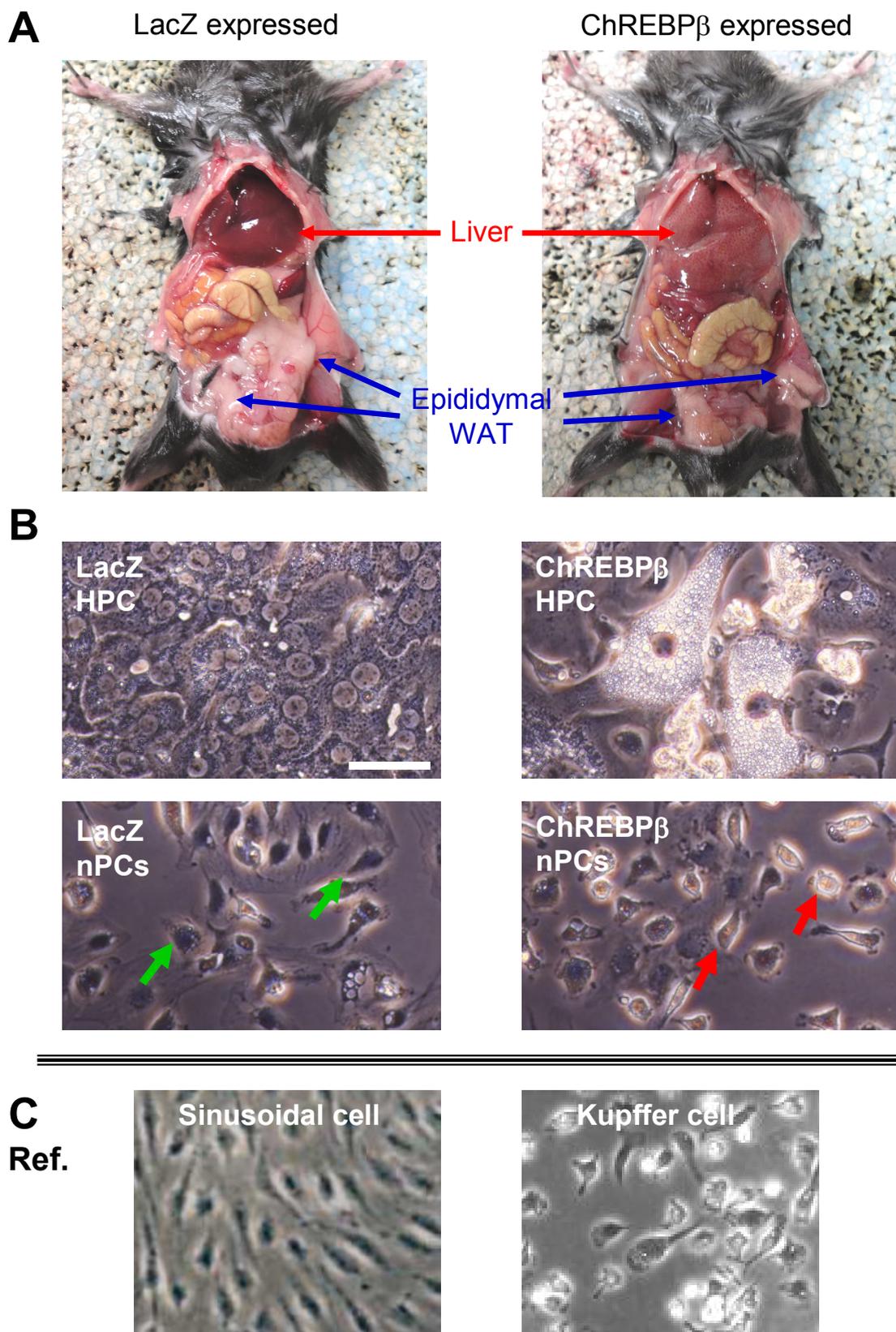


Fig. 3-12 アデノウイルス感染マウスの肝実質細胞・非実質細胞 顕微鏡画像 (Fig. legend は次頁に記載する。)

Fig. 3-12 アデノウイルス感染マウスの肝実質細胞・非実質細胞 顕微鏡画像

(A) 3×Flag-LacZ (LacZ)、および 3×Flag-mChREBPβ (ChREBPβ) 過剰発現アデノウイルスを感染させて10日目のマウスの開腹画像。

(B) 肝実質細胞 (HPC) と非実質細胞 (nPCs) を単離し、培養2日目に撮影した細胞の顕微鏡画像。緑矢印: 類洞内皮細胞、赤矢印: マクロファージ様 (クッパー) 細胞。スケールバー = 50 μm。

(C) 類洞内皮細胞 (Sinusoidal cell, [*J Hepatol.* (2002) **36(6)** : 725-33, Fig. 5C] [88] より引用)、クッパー細胞 (Kupffer cell, [*J Immunol Methods.* (2010) **360 (1-2)** : 47-55, Fig. 3B] [89] より引用) の顕微鏡写真。比較のために掲載した。

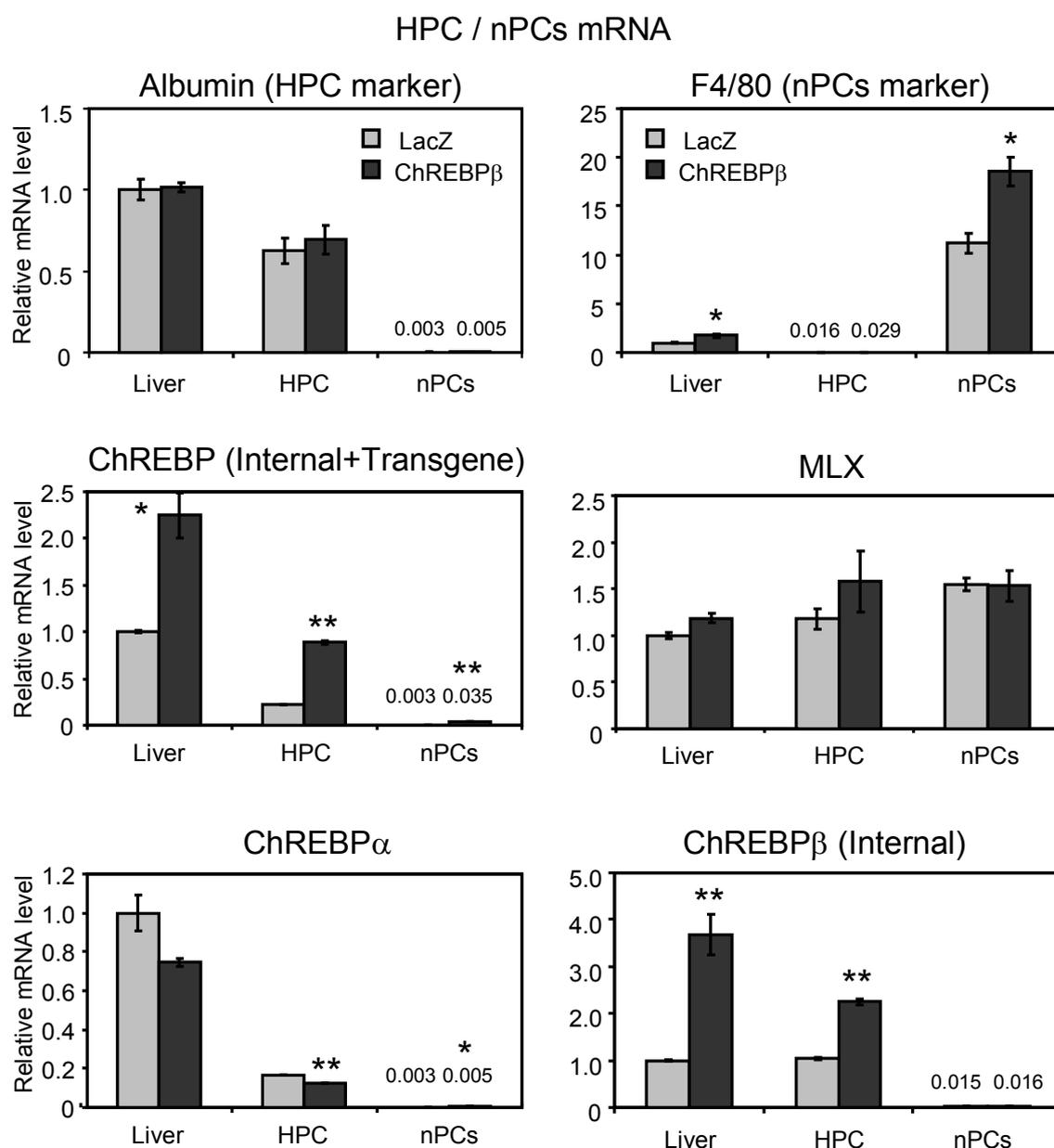


Fig. 3-13 アデノウイルス感染マウスの肝実質細胞・非実質細胞における遺伝子発現量①

3×Flag-LacZ (LacZ)、および3×Flag-mChREBPβ (ChREBPβ) 過剰発現アデノウイルスを感染させて10日目のマウスの肝臓 (Liver)、肝実質細胞 (HPC)、非実質細胞 (nPCs) における遺伝子発現量。LacZ 群の Liver における発現量を 1 とした場合の相対的な値で示した。数値は平均±標準誤差で示した。各遺伝子の発現量は、18S rRNA の発現量で補正した。LacZ 群と ChREBPβ群の発現量の差を Student's *t*-test により検定した。(*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, $n = 3$)

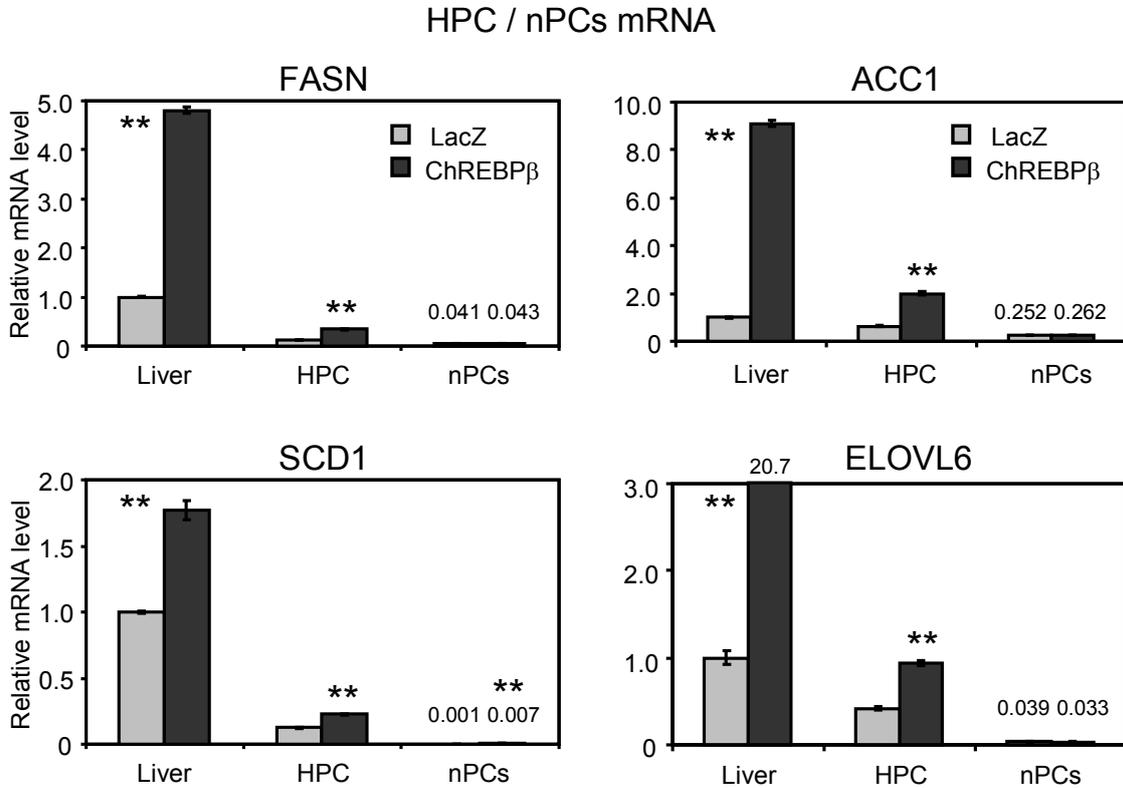


Fig. 3-14 アデノウイルス感染マウスの肝実質細胞・非実質細胞における遺伝子発現量②

3×Flag-LacZ (LacZ)、および 3×Flag-mChREBPβ (ChREBPβ) 過剰発現アデノウイルスを感染させて10日目のマウスの肝臓 (Liver)、肝実質細胞 (HPC)、非実質細胞 (nPCs) における遺伝子発現量。LacZ 群の Liver における発現量を 1 とした場合の相対的な値で示した。数値は平均±標準誤差で示した。各遺伝子の発現量は、18S rRNA の発現量で補正した。LacZ 群と ChREBPβ群の差を Student's *t*-test により検定した。(*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, $n=3$)

第三章 考察

◆ 実験結果の概略

本章ではアデノウイルスによる ChREBP β の過剰発現系を構築し、これを用いて ChREBP β を過剰発現させた際に脂肪肝の進行が認められるか調べた。遺伝子導入にはアデノウイルス法を採用し、ChREBP アイソフォーム過剰発現用アデノウイルスを作成した (Fig. 3-1)。

肝臓における ChREBP β とその標的遺伝子の発現は肝実質細胞に由来するため (Fig. 2-5B)、肝実質細胞における ChREBP β の発現増大が脂肪肝の進行に関する予想した。そこで、肝実質細胞に ChREBP β を過剰発現させたところ、脂質生合成系酵素、解糖系酵素の発現が誘導された (Fig. 3-3, 3-4)。これと同調して、ChREBP β を過剰発現させた肝実質細胞では、脂肪滴の蓄積と細胞内脂質量の増加が認められた (Fig. 3-5, 3-6)。以上の結果より、肝実質細胞における ChREBP β の発現増大は脂質生合成系酵素、解糖系酵素の発現誘導を介して脂肪の蓄積を亢進することを明らかにした。

次に、より直接的な方法として、マウス個体にウイルスを投与することで、肝臓に ChREBP β を過剰発現させた際に脂肪肝が進行するか検証した。ChREBP β を過剰発現させたマウスでは、肝臓重量、肝脂質量、血中 TG 濃度、肝傷害マーカーの増大が認められ、典型的な脂肪肝の表現型を捉えることができた (Table 3-1, Fig. 3-8, 3-9)。このマウスの肝臓を解析したところ、脂質生合成系酵素の発現が顕著に増大していることを確認した (Fig. 3-10)。

さらに、ChREBP β 過剰発現による脂肪肝の進行が「HPC における脂質生合成系酵素の発現増大とそれに伴う脂肪蓄積」に由来するか調べるため、ChREBP β を過剰発現させたマウスの肝臓から HPC と nPCs を単離して遺伝子発現量を測定した。アデノウイルスによる ChREBP β の発現増大は HPC と nPCs の双方に認められたが、脂質生合成系酵素の発現増大が認められたのは HPC のみであった (Fig. 3-13, 3-14)。また、ChREBP β を過剰発現させたマウスの HPC では脂肪滴の蓄積が認められた (Fig. 3-12)。以上の結果により、肝実質細胞における ChREBP β の発現増大が脂肪肝をもたらしたと結論付けた。

本章の検証により、「ChREBP β の発現増大が脂肪肝を進行させる」という直

接的な証拠を示すことができた。ChREBP β を過剰発現させたマウスで脂肪組織重量が低下したのは、肝臓での糖利用・脂肪合成が促進された結果、脂肪組織への糖質の流入が減少したためであると予測される。

◆ これまでの報告との比較

これまでも、遺伝子ノックアウト法により肝臓の ChREBP の機能が調べられている。この研究で用いられた ChREBP ノックアウトマウスは、ChREBP 遺伝子のエクソン 11~12 間にネオマイシン耐性遺伝子を挿入しているため、ChREBP α と ChREBP β の双方の発現が欠損している。このマウスの肝臓では、解糖系・脂質合成系酵素遺伝子の発現が抑制され、肝脂肪量が減少する [31,35]。本研究では、ChREBP β を過剰発現させたマウス肝実質細胞と肝臓で、ChREBP ノックアウトマウスと相反する表現型を捉えることができた。

これまでもマウス個体を用いた ChREBP 過剰発現実験は報告があるが、その研究では生体に存在しない ChREBP 変異体 (ChREBP α タンパク質のリン酸化修飾部位に変異を入れて常時活性型にしたもの) を過剰発現させている [33]。生体に存在する ChREBP β の発現増大が脂肪肝の進行に直結することを示したのは本研究が初めてである。

以上のように、これまでの ChREBP 研究はアイソフォームの区別がされていなかった。本章では ChREBP アイソフォームを区別して糖・脂質代謝関連遺伝子の発現に対する影響を調べることで、肝臓 ChREBP β の発現量の変化が脂肪肝の進行に関与することを示した。

◆ ChREBP β を過剰発現させたマウスの表現型について

健常者と比べて NAFLD 患者では血中 TG 濃度、遊離脂肪酸濃度、AST 活性、ALT 活性が上昇すること [5]、肝炎の重症度に応じて AST 活性、ALT 活性、遊離脂肪酸濃度が上昇することが報告されている [8]。ChREBP β を過剰発現させたマウス (ChREBP β 群) でもこれらの血中パラメーターが上昇していたので、脂肪肝の進行に伴って、肝障害と脂質異常症が惹起されている可能性が考えられる。

これを支持する結果として、ChREBP β 群の肝臓におけるマクロファージマーカー mRNA 発現量の増大が挙げられる (Fig. 3-11D)。重度の脂肪肝では、肝臓内へのマクロファージ (クッパー細胞) の浸潤が亢進し、F4/80、CD11b、CD68 などのマクロファージマーカーの発現が増大する [64,90]。組織内に浸潤したマ

クロファージが炎症反応を起こすことで、肝障害が進行する [91]。肝臓での炎症は脂質分解を誘導する転写因子 PPAR α の発現を抑制することで、脂肪肝の進行と脂質異常症を惹起することが報告されている [92,93]。実際、ChREBP β 群のnPCsではマクロファージ様細胞が多く見られ (Fig. 3-12B)、F4/80 の mRNA 発現量も増大し (Fig. 3-13)、肝臓の PPAR α の発現減少も認められた (Fig. 3-11C)。また、マクロファージ系細胞は SREBP-1a が極めて高発現であることが知られている [94]。ChREBP β 群の肝臓で SREBP-1a mRNA 発現量の増大が認められたが (Fig. 3-11A)、これはマクロファージの浸潤が亢進したことに由来すると考えられる。

したがって、肝臓における ChREBP β の発現増大は脂肪肝を進行させ、マクロファージの浸潤に伴う肝障害や脂質異常症を惹起する可能性が考えられる。ChREBP β 群の肝臓やnPCsで炎症性サイトカイン (TNF α やIL-1 β など) の発現増大が実際に見られるか、nPCsにおける ChREBP β の発現増大が炎症反応にどのような影響を及ぼすかは今後の検討課題である。

◆ ChREBP β の過剰発現による転写誘導が見られなかった KHK、GLUT2

本研究では、ChREBP β 群の肝臓において脂質生合成系酵素遺伝子の発現増大が顕著に見られたが、KHK と GLUT2 の発現量に変動が見られなかった (Fig. 3-10B)。KHK と GLUT2 は、ChREBP ノックアウトマウスの肝臓で mRNA 発現量が低下するため ChREBP の標的遺伝子であると考えられている [31]。しかし、KHK 遺伝子はプロモータ上に ChoRE が存在することは報告されているが [36]、ChREBP の過剰発現によって肝臓の KHK 発現が誘導されるという報告はこれまでに無い。また、GLUT2 遺伝子は ChoRE が同定されていない。そのため、これらの遺伝子が ChREBP の直接的な標的遺伝子であるかは不明である。

また、ChREBP β によって発現が誘導された遺伝子の発現量は LacZ 群の肝臓でそれほど多くはなかったが (ex. ACC1 Ct: 23.9, ELOVL6 Ct: 26.0)、KHK や GLUT2 は LacZ 群でも高発現であった (KHK Ct: 20.2, GLUT2 Ct: 20.3)。KHK と GLUT2 遺伝子は通常状態でも転写活性化状態にあるため、ChREBP β を過剰発現させてもそれ以上の発現誘導が見られなかった可能性も考えられる。

高糖質食を摂取させたマウス肝臓で KHK、GLUT2 の発現が増大し、その際にプロモーター領域での ChREBP 結合量が増大するか調べ、生理的条件下でもこれらの遺伝子が ChREBP の制御を受けるか検証を進めていく必要がある。

◆ ChREBPβ過剰発現に伴う ChREBP アイソフォームの発現変動

ChREBPβ/MLX を共発現させた肝実質細胞と ChREBPβを過剰発現させたマウスの肝臓において、内因性 ChREBPβ mRNA 発現量の増加が認められた (Fig. 3-4, 3-10A, 3-13)。前章では ChREBPβがセルフレギュレーションする可能性をレポーターアッセイ系を用いて示したが、本章では *in vivo* でも ChREBPβが自己の発現を誘導することを示すことができた。

一方、ChREBPα mRNA 発現量は ChREBPβを過剰発現させたマウスの肝臓で有意に減少した (Fig. 3-10A)。この現象は、肝実質細胞に ChREBPβを過剰発現させた場合には見られなかった (Fig. 3-4)。そのため、ChREBPβが直接的に ChREBPα遺伝子に作用しているのではなく、組織間のクロストークを介した二次的な制御により ChREBPαの発現が抑制された可能性が考えられる。

現在、ChREBPαの発現を誘導する転写因子としては、LXR や TR (Thyroid Hormone Receptor) が報告されている [55,95,96]。ChREBPβ群の肝臓では、CYP7A1 や SREBP-1c (ともに LXR の標的遺伝子) の発現に変動が見られなかったため、LXR を介して ChREBPαの発現が制御されたとは考えづらい。TR は甲状腺ホルモンをリガンドとする核内受容体で、肝臓ではエネルギーの異化・同化の両方に働く [96]。NAFLD 患者では血中甲状腺ホルモン濃度が低下することが報告されている [97]。本研究では血中甲状腺ホルモン濃度は測定していないが、ChREBPβ群の肝臓で CPT1a (Carnitine Palmitoyltransferase 1a, TR の標的遺伝子 [98]) の発現減少が認められた (Fig. 3-11C)。そのため、ChREBPβの発現増大に伴う ChREBPαの発現抑制は、甲状腺ホルモンを介した二次的な機構でもたらされた可能性が考えられる。

第四章

ChREBP β の発現が変動しうる 食事内容の探索

ここまでの検証で、ChREBP β は糖・脂質代謝の強力なレギュレーターであり、肝臓における ChREBP β の発現増大は脂肪肝の進行に繋がることを示した。2型糖尿病患者では脂肪組織や肝臓における ChREBP β 発現量が変動することが報告されており [60]、ChREBP β の発現変動をもたらす食事の継続的な摂取は、脂肪肝を含めた代謝性疾患の発症進展に関与する可能性が考えられる。しかし、どのような食事がどの組織で ChREBP β の発現を変動させるか分かっていない。

そこで、本章の第一節では、異なる糖質・脂質の食事を与えたマウスの組織を解析することで、各組織で ChREBP β の発現が変動しうる食事内容を探索した。第二節では、フルクトースを長期摂取させたマウスの肝臓を解析し、フルクトースの過剰摂取に伴う脂肪肝 (フルクトース誘導性脂肪肝) と ChREBP β との関連について調べた。

第一節

食事中の糖質・脂質が ChREBP β の発現に与える影響

緒言

第二章で再摂食により肝臓 ChREBP β の発現が増大することを示したが、どのような栄養素がどの組織で ChREBP β の発現を変動させるかは不明である。「糖利用と脂肪合成を強力に誘導する転写因子」という特徴を踏まえると、「脂肪として蓄積しやすい栄養素は ChREBP β の発現を誘導する可能性が高い」と考えられる。フルクトースは肝脂肪として蓄積しやすい糖質であり [99,100]、動物性脂肪 (飽和脂肪酸) は内臓脂肪として蓄積しやすい脂質である [101]。そのため、これらの栄養素が ChREBP β の発現を誘導する可能性が考えられる。

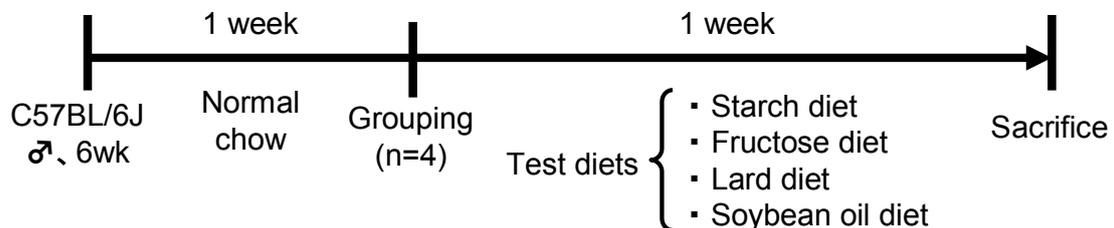
そこで本節では、高糖質食として「スターチ食」もしくは「フルクトース食」、高脂肪食として「ラード食」もしくは「大豆油食」を与えたマウスの組織を解析し、これらの食事によって組織の ChREBP β の発現が変動するか調べた。さらに、各組織の ChREBP β の発現量と ChREBP 標的遺伝子の発現量を相関分析し、ChREBP β によって発現が誘導される遺伝子を調べることで、各々の組織における ChREBP β の役割を予測した。また、各組織の ChREBP α の発現量と糖・脂質代謝関連遺伝子の相関分析も同様に行なった。

実験方法

◆ 動物実験

実験動物は、6週齢、雄の C57BL/6J マウスを日本クレアから購入した。搬入後の1週間は馴化のために、MR ラボストックを自由摂食させて飼育した。体重が等しくなるように4群 (n=4) に分け、スターチ食、フルクトース食、ラード食、大豆油食を自由摂食させて飼育した。飼料の組成は Table 4-1 に記した。すべての飼料は重量あたりのエネルギー量が 376 kcal/100 g となるように調製した。試験食を与えて1週間後に解剖を行なった。

肝臓や精巣上体白色脂肪組織は重量を測定してから液体窒素を用いて冷凍した。小腸は、胃幽門部からトライツ靭帯に繋がった腸管部位までを「十二指腸」とした。十二指腸より下から盲腸入口までの腸管を取り出して2分割した。十二指腸側の腸管を「空腸」、盲腸側の腸管を「回腸」とした。取り出した腸管は、生理食塩水でフラッシュして内容物を除いた後に縦に裂き、粘膜を剥がして冷凍した。組織は解析するまで-80°C で保存した。



◆ RT-qPCR

第二章第一節に記載の方法に準じて行なった。

第二章第一節の検証により、ChREBPβは肝臓、精巣上体白色脂肪組織、空腸で発現していること確認したため、この3つの組織に焦点を絞った。

◆ 統計処理

統計処理には、StatView ver.5.0 (SAS Institute Inc.) あるいは JSTAT ver.11.1 (NANKODO)、エクセル統計 2010 (Social Survey Research Information Co.) を用いた。棒グラフは平均値±標準誤差 (Mean ± SE) で示した。多群間の差の検定は、分散分析により *P*-value が 0.05 以下、かつ多重比較検定 (Tukey-Kramer test) により *P*-value が 0.05 以下であったものを「群間で有意な差が認められる」とした。

相関分析には「スピアマン順位相関分析」を用いた。算出したスピアマン相関係数 (ρ で示す) は無相関検定により有意性を検定した。検定の結果、*P-value* が 0.05 以下であったものを「有意な相関が認められる」とした。 ρ が正の値である変数同士は正の相関、 ρ が負の値である変数同士は負の相関がある。一般的には、 $|\rho|$ が1に近いほど相関が強く、「 $0.4 \leq |\rho| < 0.7$: 相関がある」、 $0.7 \leq |\rho| \leq 1.0$: 強い相関がある」とされている。

結果

◆ フルクトース食の摂取により肝臓重量が増加、脂肪組織重量が減少した。

試験食を自由摂食させて一週間飼育した結果、高脂肪食を摂取させたマウス (ラード群および大豆油群) は、高糖質食を摂取させたマウス (スターチ群およびフルクトース群) と比べて、体重が増加する傾向が見られた (Table 4-2)。これは、高脂肪食を摂取させたマウスの方が摂取エネルギー量 (各試験食の kcal/g は等しい) が多かったため、体重増加に繋がったと考えられる。

解剖時に組織重量を測定したところ、フルクトース群のみ有意に肝臓重量の増加が認められた。精巢上体白色脂肪組織重量は、フルクトース群で有意に減少、ラード群で有意に増加した。スターチ群とフルクトース群、もしくはラード群と大豆油群でそれぞれ摂取エネルギー量が等しい点を加味すると、フルクトースは肝臓重量を増加しやすい糖質であり、ラードは内臓脂肪重量を増加しやすい脂質であると考えられる。

◆ フルクトースの摂取により肝臓 ChREBPβの発現が増大する。

どの食餌が肝臓の ChREBPβの発現を誘導するか調べるために、肝臓の遺伝子発現量を測定した。

全ての群で ChREBPαと MLX の発現量に違いが認められなかったが、ChREBPβはフルクトース群で発現量が有意に増大した (Fig. 4-1A)。これと同調して、糖代謝関連遺伝子 (Fig. 4-1B: LPK, KHK, G6PC)、脂質生合成系酵素遺伝子 (Fig. 4-1C: FASN, ACC1, SCD1, ELOVL6) の発現はフルクトース群の肝臓で有意に増加した。スターチ群はラード群や大豆油群と比べて、有意な差では無いものの ChREBPβの発現が増加する傾向が見られ、LPK、KHK、SCD1 の発現は有意に増加した。ラード群と大豆油群の間で各遺伝子の発現量に違いが認められなかった。

以上の結果から、フルクトースは肝臓の ChREBPβの発現を誘導する作用が強い糖質であることが示唆された。

◆ 肝臓における ChREBPβの発現量は糖代謝関連遺伝子、脂質生合成系酵素遺伝子の発現量と正相関する。

前頁では与えた食事でグループ分けして遺伝子発現量を比較した。続いて、個々のマウス肝臓における ChREBP アイソフォームの発現量と ChREBP 標的遺伝子の発現量を相関分析した。これにより、肝臓において ChREBPβにより発現が誘導される ChREBP 標的遺伝子を推定した。

ChREBPα mRNA 発現量は、いずれの ChREBP 標的遺伝子 mRNA 発現量とも有意な相関関係が認められなかった (Fig. 4-2A)。一方、ChREBPβ mRNA 発現量は LPK、KHK、G6PC、FASN、ACC1、SCD1、ELOVL6 mRNA 発現量と強い正の相関関係が認められた (Fig. 4-2B, Table 4-3)。

以上の結果は、肝臓における ChREBPβの発現増大は糖代謝関連遺伝子および脂質生合成系酵素遺伝子の発現誘導をもたらす可能性を示す。

◆ スターチの摂取により白色脂肪組織 ChREBPβの発現が増大する。

どの食餌が白色脂肪組織の ChREBPβの発現を誘導するか調べるために、マウス精巢上体白色脂肪組織の遺伝子発現量を測定した。

全ての群で ChREBPαと MLX の発現量に違いが認められなかったが、ChREBPβはスターチ群で発現量が有意に増大した (Fig. 4-3A)。これと同調して、GLUT4 (Fig. 4-3B)、脂質生合成系酵素遺伝子 (Fig. 4-3C: FASN, ACC1, SCD1, ELOVL6) の発現はスターチ群の肝臓で有意に増加した。フルクトース群はラード群や大豆油群と比べて、有意な差では無いものの ChREBPβの発現が増加する傾向が見られ、ACC1 の発現は有意に増加した。LPK、KHK の遺伝子発現量は各群で違いが認められなかった。ラード群と大豆油群の間でほとんどの遺伝子の発現量に違いが認められなかった。

以上の結果から、スターチは白色脂肪組織の ChREBPβの発現を誘導する作用が強い糖質であることが示唆された。

◆ 白色脂肪組織における ChREBP アイソフォームの発現量は GLUT4、脂質生合成系酵素遺伝子の発現量と正相関する。

個々のマウス精巢上体白色脂肪組織における ChREBP アイソフォームの発現量と ChREBP 標的遺伝子の発現量を相関分析した。これにより、白色脂肪組織において ChREBPβによって発現が誘導される ChREBP 標的遺伝子を推定した。

ChREBP α mRNA 発現量は、GLUT4、FASN、ACC1、SCD1、ELOVL6 の mRNA 発現量と正の相関関係が認められた (Fig. 4-4A)。一方、ChREBP β mRNA 発現量は GLUT4、FASN、ACC1、SCD1、ELOVL6 の mRNA 発現量と強い正の相関関係が認められた (Fig. 4-4B, Table 4-4)。

以上の結果は、白色脂肪組織における ChREBP アイソフォームの発現増大は GLUT4 および脂質生合成系酵素遺伝子の発現誘導をもたらす可能性を示す。

◆ 糖質の摂取により小腸 ChREBP β の発現が増大する。

どの食餌が小腸の ChREBP β の発現を誘導するか調べるために、マウスの十二指腸 (Duodenum)、空腸 (Jejunum)、回腸 (Ileum) の粘膜から RNA を抽出し、RT-qPCR 法により遺伝子発現量を測定した。

全ての群で小腸の ChREBP α の発現量に違いが認められなかった。一方、ChREBP β の発現量はスターチ群およびフルクトース群で有意に増大した (Fig. 4-5A)。十二指腸、空腸、回腸の順に ChREBP β の発現量が高かった。

糖質の消化・吸収は主に空腸で行なわれており [102,103]、この部位で ChREBP が機能している可能性が高いと考えられた。そのため、空腸に焦点を絞って ChREBP 標的遺伝子の発現量を測定した。既知の ChREBP 標的遺伝子である KHK、GLUT2 はフルクトース群で有意な発現増大が認められた (Fig. 4-5B)。単糖輸送担体 SGLT1 (Sodium-dependent Glucose Cotransporter 1)、二糖類水解酵素 SI (Sucrase-Isomaltase)、MGAM (Maltase-Glucoamylase) はスターチ群およびフルクトース群で発現量が増大した (Fig. 4-5C)。ラード群と大豆油群の間では各遺伝子の発現量に違いが認められなかった。

以上の結果から、糖質は小腸の ChREBP β の発現を誘導する作用が強い栄養素であることが示唆された。

◆ 空腸における ChREBP β の発現量は KHK、糖輸送担体、二糖類水解酵素の発現量と正相関する。

個々のマウス空腸における ChREBP アイソフォームの発現量と ChREBP 標的遺伝子の発現量を相関分析した。これにより、空腸において ChREBP β によって発現が誘導される ChREBP 標的遺伝子を推定した。

ChREBP α mRNA 発現量は、脂質生合成系酵素 (FASN、ACC1) の mRNA 発現量と正の相関関係が認められた (Fig. 4-6A)。一方、ChREBP β mRNA 発現量は

KHK、糖質消化吸収関連遺伝子 (GLUT2, SGLT1, SI, MGAM) の mRNA 発現量と強い正の相関関係が認められた (Fig. 4-6B, Table 4-5)。

以上の結果から、小腸における ChREBP α の発現増大は脂質生合成系酵素遺伝子の発現誘導をもたらし、ChREBP β の発現増大は糖質消化吸収関連遺伝子の発現誘導をもたらす可能性が考えられた。

Table 4-1 スターチ食、フルクトース食、ラード食、大豆油食の組成

Compound	High-carbohydrate diet						High-fat diet		
	Starch diet		Fructose diet		Lard diet		Soybean oil diet		
	g/100g	% of energy	g/100g	% of energy	g/100g	% of energy	g/100g	% of energy	
Cornstarch	67.8	72%			7.5	8%	7.5	8%	8%
Fructose			67.8	72%					
Lard					26.8	64%			
Soybean oil	3.3	8%	3.3	8%	3.3	8%	30.1	8%	72%
Casein	18.8	20%	18.8	20%	18.8	20%	18.8	20%	20%
Vitamin mixture (AIN-93)	1.0		1.0		1.0		1.0		
Mineral mixture (AIN-93)	3.5		3.5		3.5		3.5		
L-Cystine	0.3		0.3		0.3		0.3		
Choline Bitartrate	0.3		0.3		0.3		0.3		
Cellulose powder	2.5		2.5		2.5		2.5		
Agarose	2.5		2.5		2.5		2.5		
Water	0.0		0.0		33.5		33.5		
Total	100.0	376 kcal	100.0	376 kcal	100.0	376 kcal	100.0	376 kcal	376 kcal
Percentage of energy in diets									
Carbohydrate		72%		72%		8%		8%	8%
Fat		8%		8%		72%		72%	72%
Protein		20%		20%		20%		20%	20%

Table 4-2 スターチ食、フルクトース食、ラード食、大豆油食を食べさせたマウスの身体計測指標

Parameters	Starch	Fructose	Lard	Soybean oil
Food intake (g/day)	4.39 ± 0.17 ^b	4.60 ± 0.22 ^b	6.03 ± 0.23 ^a	6.27 ± 0.14 ^a
Energy intake (kcal/day)	16.5 ± 0.6 ^b	17.3 ± 0.8 ^b	22.7 ± 0.9 ^a	23.6 ± 0.5 ^a
Initial body weight (g)	19.4 ± 0.5	19.5 ± 0.5	19.4 ± 0.4	19.4 ± 0.4
Final body weight (g)	24.6 ± 0.5	24.2 ± 0.4	25.2 ± 0.6	25.2 ± 0.7
Body weight gain (g/7day)	5.2 ± 0.2 ^{ab}	4.8 ± 0.2 ^b	6.2 ± 0.4 ^a	5.7 ± 0.4 ^{ab}
Liver weight (g)	1.30 ± 0.02	1.51 ± 0.08	1.27 ± 0.06	1.27 ± 0.07
Liver weight (g/100g BW)	5.29 ± 0.13 ^b	6.24 ± 0.26 ^a	4.94 ± 0.14 ^b	5.04 ± 0.16 ^b
Intrahepatic TG (mg/g Liver)	60 ± 14 ^b	103 ± 8 ^a	106 ± 3 ^a	91 ± 11 ^{ab}
Intrahepatic T-Ch (mg/g Liver)	7.1 ± 1.1 ^b	13.4 ± 1.7 ^a	7.8 ± 0.8 ^b	9.1 ± 0.5 ^{ab}
Epi WAT weight (g)	0.34 ± 0.02 ^b	0.25 ± 0.02 ^c	0.46 ± 0.02 ^a	0.36 ± 0.02 ^b
Epi WAT weight (g/100g BW)	1.39 ± 0.08 ^b	1.04 ± 0.05 ^c	1.79 ± 0.05 ^a	1.41 ± 0.06 ^b

表中の数値は平均±標準誤差で示した。群間の差を Tukey-Kramer test により検定した。

アルファベット文字の異なる群間には有意な差が認められる。(P<0.05, n=4) TG: Triglyceride, T-Ch: Total-Cholesterol

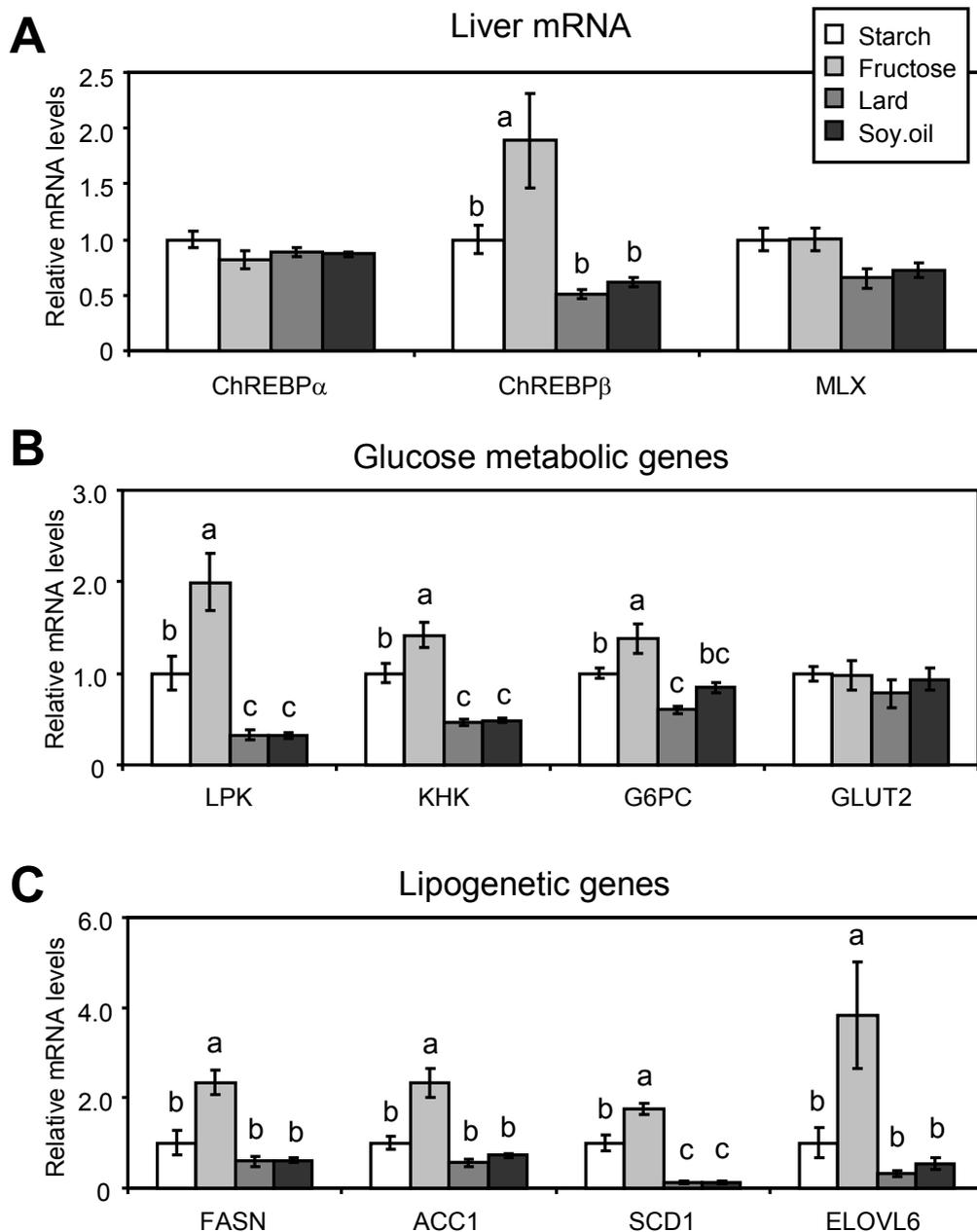


Fig. 4-1 マウス肝臓における ChREBP アイソフォーム、標的遺伝子の発現量

マウスにスターチ食 (Starch)、フルクトース食 (Fructose)、ラード食 (Lard)、大豆油食 (Soy.oil) を自由摂食させて 1 週間飼育した。採取した肝臓から RNA を抽出し、RT-qPCR 法により mRNA 発現量を測定した。

(A): ChREBP、MLX、(B): 糖代謝関連遺伝子、(C): 脂質生合成系酵素遺伝子の mRNA 発現量を Starch 群を 1 とした場合の相対的な値で示した。各遺伝子の発現量は 18S rRNA の発現量で補正した。数値は平均 \pm 標準誤差で示した。

群間の差を Tukey-Kramer test により検定した。

アルファベット文字の異なる群間に有意な差が認められる ($P < 0.05$, $n = 3 \sim 4$)。

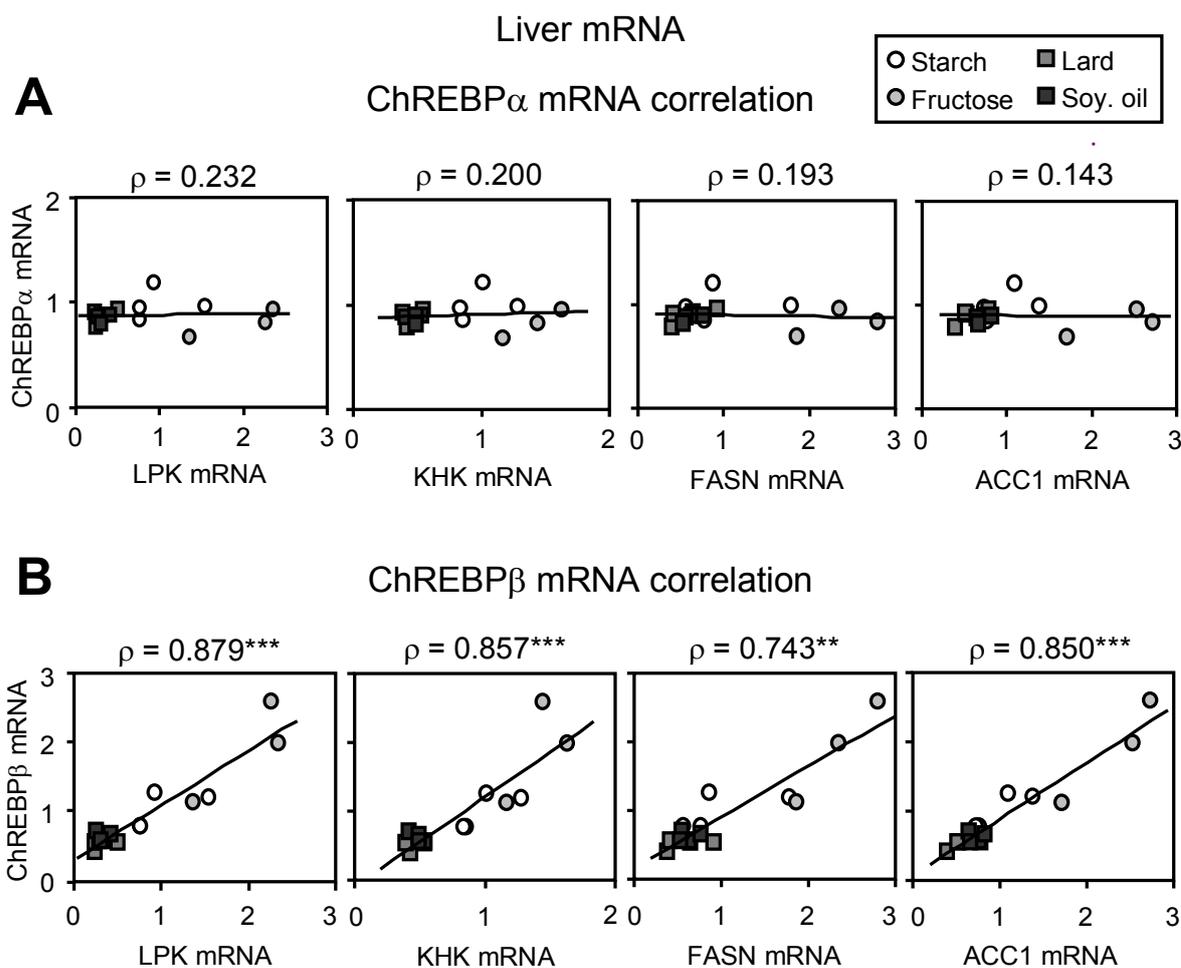


Fig. 4-2 マウス肝臓における ChREBP アイソフォームの発現量と ChREBP 標的遺伝子の発現量の相関

マウスにスターチ食 (Starch)、フルクトース食 (Fructose)、ラード食 (Lard)、大豆油食 (Soy.oil) を自由摂食させて 1 週間飼育した。採取した肝臓から RNA を抽出し、RT-qPCR 法により mRNA 発現量を測定した。各遺伝子の mRNA 発現量を Starch 群を 1 とした場合の相対的な値で示した。各遺伝子の発現量は 18S rRNA の発現量で補正した。

X 軸に ChREBP 標的遺伝子 (肝臓の解糖系・脂質生合成系酵素遺伝子として代表的なものを掲載) の mRNA 発現量、Y 軸に (A): ChREBP α mRNA 発現量、(B): ChREBP β mRNA 発現量をとった散布図で示した。

ρ : スピアマン順位相関係数。無相関検定により、相関係数の有意性を検定した (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, $n = 14-16$)。

Table 4-3 マウス肝臓における ChREBP アイソフォームの発現量と
ChREBP 標的遺伝子の発現量の相関

Liver mRNA Expression	ChREBP α		ChREBP β	
	ρ	<i>P</i> value	ρ	<i>P</i> value
LPK	0.232	0.405	0.879	*** <0.001
KHK	0.200	0.475	0.857	*** <0.001
G6PC	0.157	0.576	0.964	*** <0.001
GLUT2	0.461	0.084	0.489	0.064
FASN	0.193	0.491	0.743	** 0.002
ACC1	0.143	0.612	0.850	*** <0.001
SCD1	0.261	0.348	0.850	*** <0.001
ELOVL6	0.161	0.567	0.914	*** <0.001
ChREBP α			0.175	0.533
ChREBP β	0.175	0.533		
MLX	0.393	0.147	0.607	* 0.016

ρ : スピアマン順位相関係数。無相関検定により相関の有意性を検定した
(*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, $n = 14-16$)。

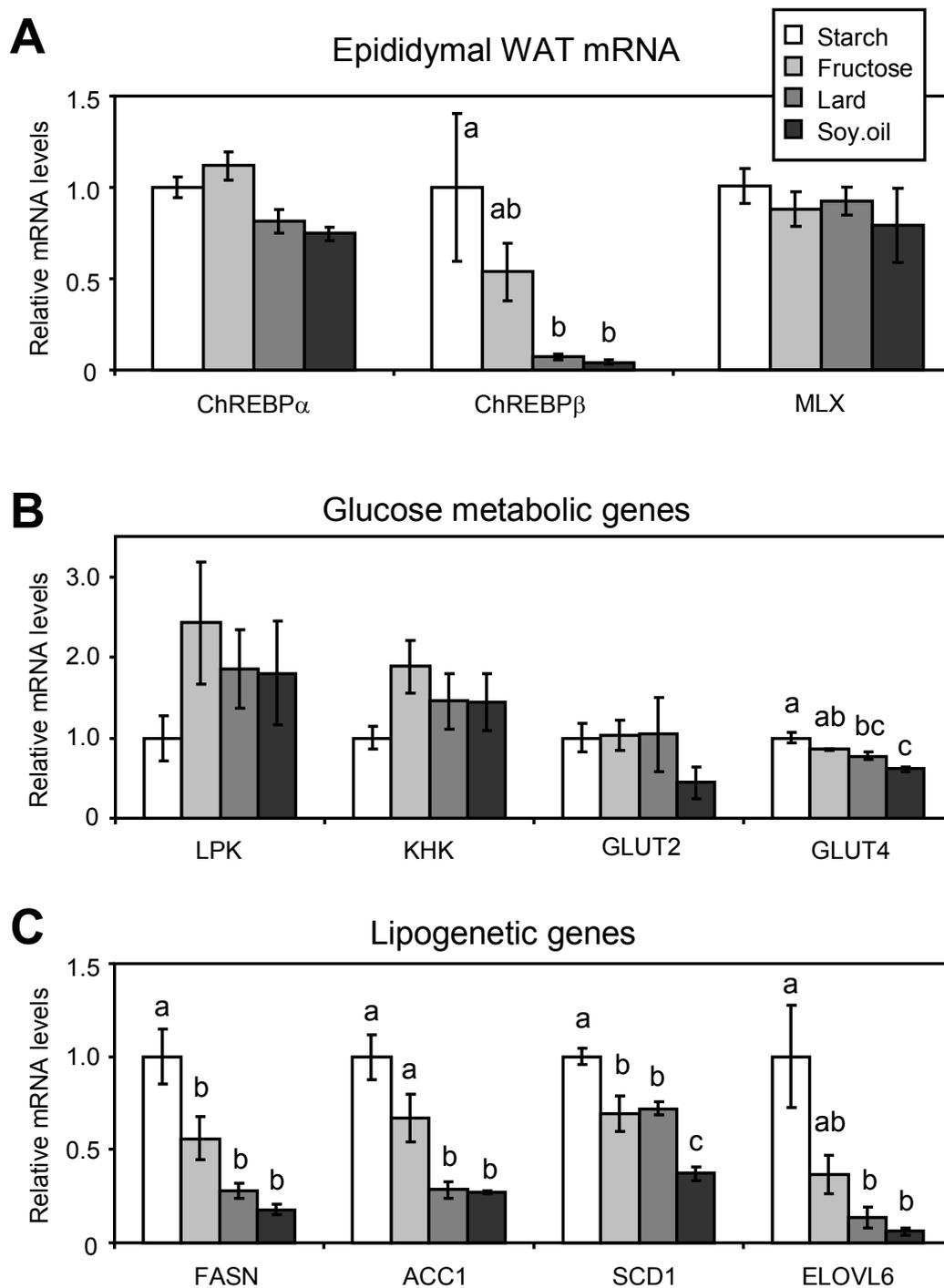


Fig. 4-3 マウス精巣上体白色脂肪組織における ChREBP と標的遺伝子の発現量

RT-qPCR 法により精巣上体白色脂肪組織の mRNA 発現量を測定した。

(A): ChREBP、MLX、(B): 糖代謝関連遺伝子、(C): 脂質生合成系酵素遺伝子の mRNA 発現量を Starch 群を 1 とした場合の相対的な値で示した。各遺伝子の発現量は 18S rRNA の発現量で補正した。数値は平均 \pm 標準誤差で示した。

群間の差を Tukey-Kramer test により検定した。($P < 0.05$, $n = 4$)

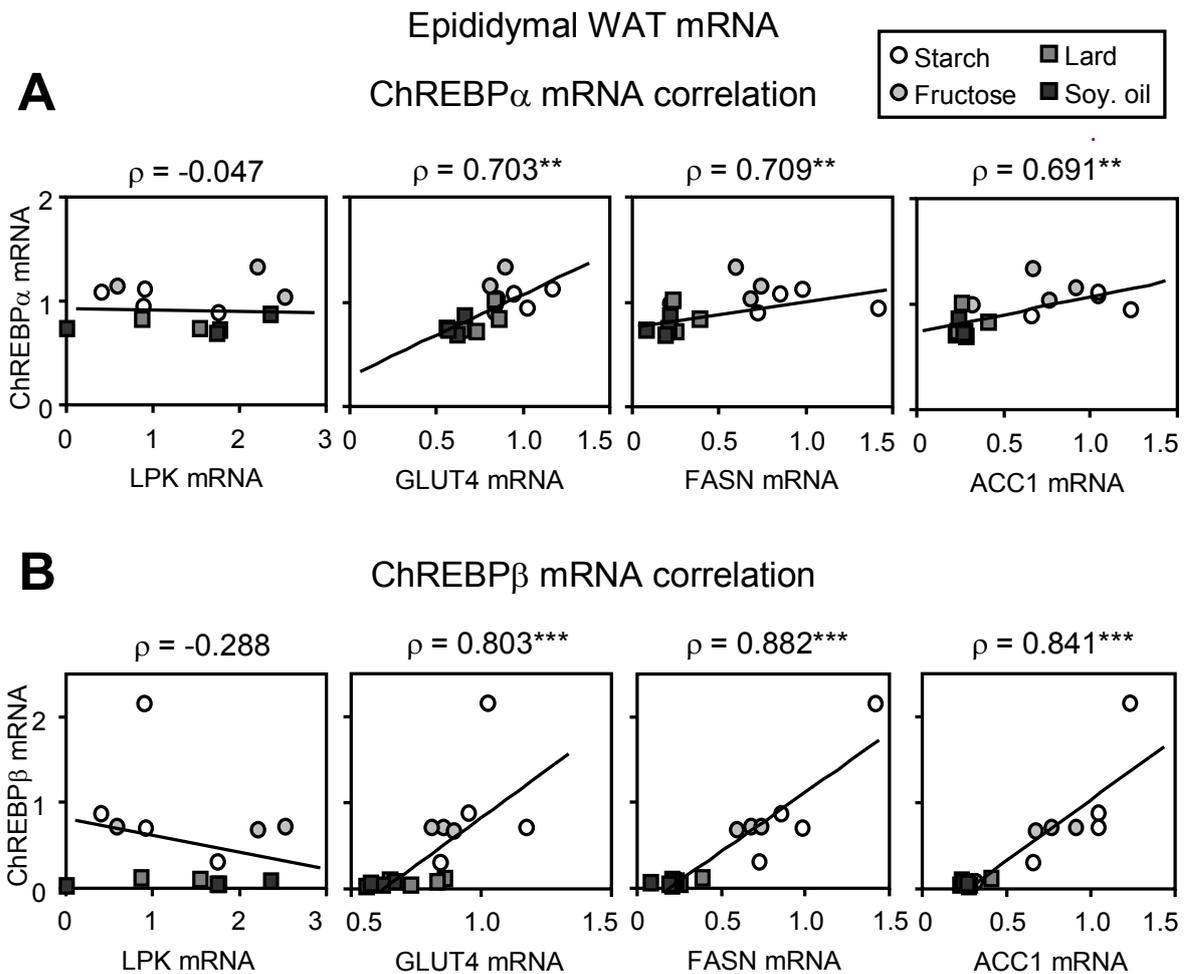


Fig. 4-4 マウス精巢上体白色脂肪組織における ChREBP アイソフォームの発現量と ChREBP 標的遺伝子の発現量の相関

マウスにスターチ食 (Starch)、フルクトース食 (Fructose)、ラード食 (Lard)、大豆油食 (Soy.oil) を自由摂食させて 1 週間飼育した。採取した精巢上体白色脂肪組織から RNA を抽出し、RT-qPCR 法により mRNA 発現量を測定した。各遺伝子の mRNA 発現量を Starch 群を 1 とした場合の相対的な値で示した。各遺伝子の発現量は 18S rRNA の発現量で補正した。

X 軸に ChREBP 標的遺伝子 (解糖系・脂質生合成系酵素および糖輸送担体 GLUT4 を掲載) の mRNA 発現量、Y 軸に (A): ChREBP α mRNA 発現量、(B): ChREBP β mRNA 発現量をとった散布図で示した。

ρ : スピアマン順位相関係数。無相関検定により、相関係数の有意性を検定した (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, $n = 16$)。

Table 4-4 マウス精巣上体白色脂肪組織における

ChREBP アイソフォームの発現量と ChREBP 標的遺伝子の発現量の相関

Epi. WAT Expression	ChREBP α		ChREBP β	
	ρ	<i>P</i> value	ρ	<i>P</i> value
LPK	-0.047	0.863	-0.288	0.279
KHK	0.032	0.905	-0.306	0.249
GLUT2	0.212	0.431	0.344	0.192
GLUT4	0.703	** 0.002	0.803	*** <0.001
FASN	0.709	** 0.002	0.882	*** <0.001
ACC1	0.691	** 0.003	0.841	*** <0.001
SCD1	0.550	* 0.027	0.818	*** <0.001
ELOVL6	0.679	** 0.004	0.921	*** <0.001
ChREBP α	/		0.738	** 0.001
ChREBP β	0.738	** 0.001	/	
MLX	0.247	0.356	0.218	0.418

ρ : スピアマン順位相関係数。無相関検定により相関の有意性を検定した (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, $n = 16$)。

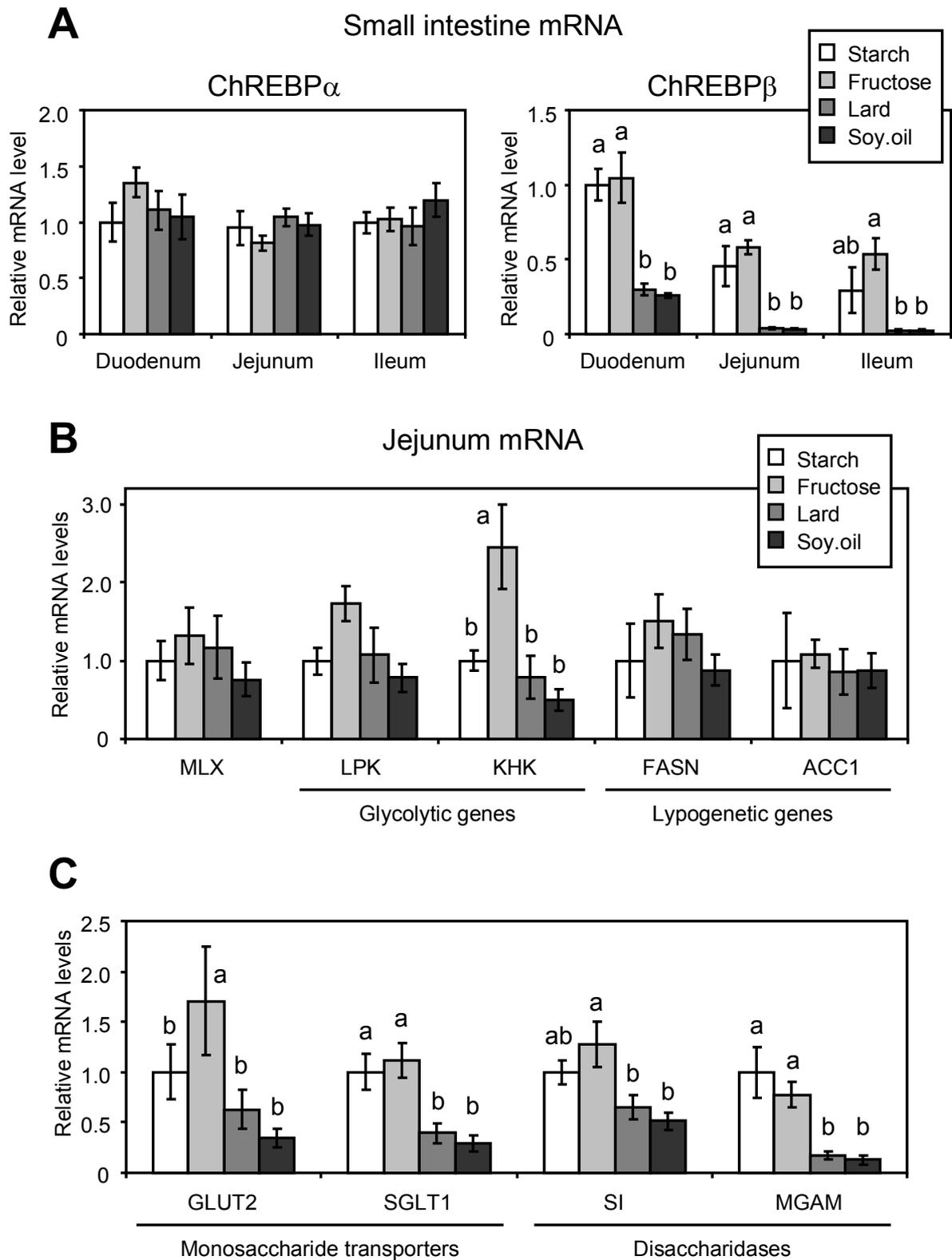


Fig. 4-5 マウス小腸における ChREBP アイソフォーム、ChREBP 標的遺伝子、糖質消化吸収関連遺伝子の発現量 (Fig. legend は次頁に記載する。)

Fig. 4-5 マウス小腸における ChREBP アイソフォーム、ChREBP 標的遺伝子、糖質消化吸收関連遺伝子の発現量

マウスにスターチ食 (Starch)、フルクトース食 (Fructose)、ラード食 (Lard)、大豆油食 (Soy.oil) を自由摂食させて 1 週間飼育した。採取した小腸から RNA を抽出し、RT-qPCR 法により mRNA 発現量を測定した。

(A): 十二指腸 (Duodenum)、空腸 (Jejunum)、回腸 (Ileum) における ChREBP アイソフォームの遺伝子発現量。十二指腸の Starch 群を 1 とした場合の相対的な値で示した。各遺伝子の発現量は 18S rRNA の発現量で補正した。

空腸における (B): ChREBP 標的遺伝子、(C): 糖質消化吸收関連遺伝子 (単糖輸送担体、二糖類水解酵素) の mRNA 発現量を Starch 群を 1 とした場合の相対的な値で示した。

数値は平均±標準誤差で示した。群間の差を Tukey-Kramer test により検定した。アルファベット文字の異なる群間に有意な差が認められる ($P < 0.05$, $n = 3-4$)

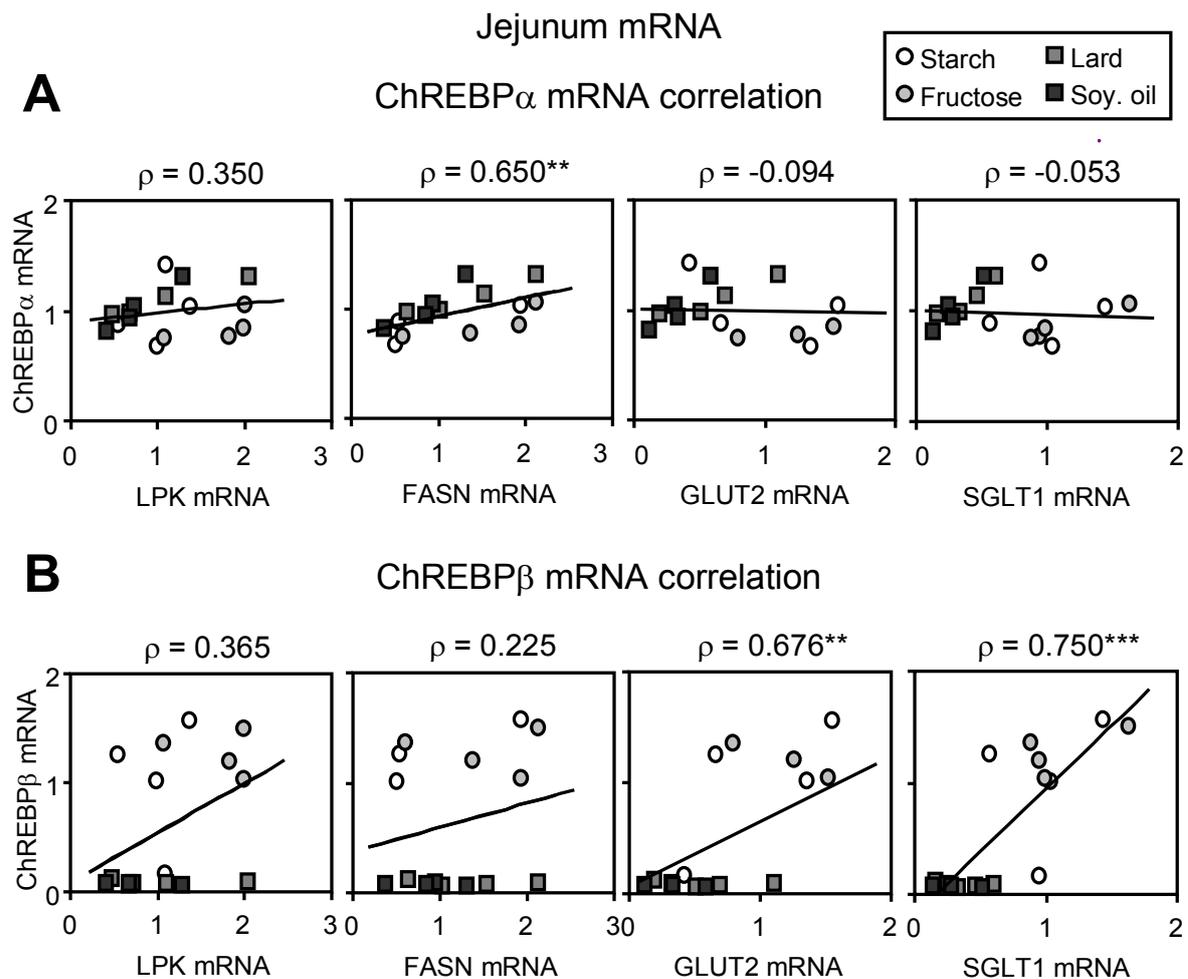


Fig. 4-6 マウス空腸における ChREBP アイソフォームの発現量と ChREBP 標的遺伝子、糖質消化吸収関連遺伝子の発現量の相関

マウスにスターチ食 (Starch)、フルクトース食 (Fructose)、ラード食 (Lard)、大豆油食 (Soy.oil) を自由摂食させて 1 週間飼育した。採取した空腸から RNA を抽出し、RT-qPCR 法により mRNA 発現量を測定した。各遺伝子の mRNA 発現量を Starch 群を 1 とした場合の相対的な値で示した。各遺伝子の発現量は 18S rRNA の発現量で補正した。

X 軸に ChREBP 標的遺伝子 (解糖系酵素 LPK および脂質生合成系酵素 FASN のみ掲載)、および糖質消化吸収関連遺伝子 (糖輸送担体 GLUT2 および SGLT1 のみ掲載) の mRNA 発現量、Y 軸に (A): ChREBP α mRNA 発現量、(B): ChREBP β mRNA 発現量をとった散布図で示した。 ρ : スピアマン順位相関係数。無相関検定により、相関係数の有意性を検定した (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, $n = 14 \sim 16$)。

Table 4-5 マウス空腸における ChREBP アイソフォームの発現量と
ChREBP 標的遺伝子、糖質消化吸収関連遺伝子の発現量の相関

Jejunum Expression	ChREBP α		ChREBP β	
	ρ	<i>P</i> value	ρ	<i>P</i> value
LPK	0.350	0.184	0.365	0.165
KHK	0.041	0.880	0.638	** 0.008
FASN	0.650	** 0.009	0.225	0.420
ACC1	0.671	** 0.006	0.254	0.362
GLUT2	-0.094	0.729	0.676	** 0.004
SGLT1	-0.053	0.846	0.750	*** <0.001
SI	0.050	0.854	0.703	** 0.002
MGAM	0.059	0.829	0.715	** 0.002
ChREBP α	/	/	-0.291	0.274
ChREBP β	-0.291	0.274	/	/
MLX	0.504	0.056	0.211	0.451

ρ : スピアマン順位相関係数。無相関検定により相関の有意性を検定した
(*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, $n = 14 \sim 16$)。

第二節

フルクトース長期摂取時の 肝臓における ChREBP β の発現変動

緒言

前節の結果により、フルクトースは肝臓の ChREBP β の発現を誘導しやすい糖質であることを明らかにした。これは解糖系・脂質生合成系酵素の発現増大と肝臓重量の増加を伴っていたため、フルクトース摂取に伴う肝臓の ChREBP β 発現増大は脂肪肝の進行に繋がる可能性が考えられる。

フルクトース (果糖) は、我々が日常的に摂取している単糖の一つである。果物や蜂蜜などの天然物にも含まれるが、清涼飲料水中の果糖ブドウ糖液糖 (HFCS: High Fructose Corn Syrup) やショ糖 (Sucrose: グルコースとフルクトースがグリコシド結合で繋がった二糖) の形で摂取することが多い。

日本国内では、フルクトース摂取と脂肪肝の進行に関する臨床疫学調査はほとんど行なわれていない。これは、各食品中に含まれるフルクトース含有量が測定されておらず、個々人のフルクトース摂取量を正確に見積もることが困難なためである。一方、欧米では HFCS を多く含む清涼飲料水の摂取量と脂肪肝の関連について、いくつかの臨床疫学調査がなされている [12]。横断的疫学調査の結果、健常者と比べて NAFLD 患者は、全摂取エネルギー量を占める清涼飲料水由来のエネルギー量の割合が多いことが明らかになっている [104,105]。また、HFCS の摂取量が多い NAFLD 患者の肝臓では、KHK や FASN の発現量が高いことが報告されている [106]。さらに、NAFLD の重症度と HFCS 摂取量には正の相関関係が認められている [107]。以上の知見から、フルクトースの過剰摂取は脂肪肝の一因と考えられている。これを裏付けるように、フルクトース食を長期的に摂取させたマウス・ラットでは脂肪肝が進行することが報告されているが [108,109]、ChREBP β との因果関係は明らかになっていない。

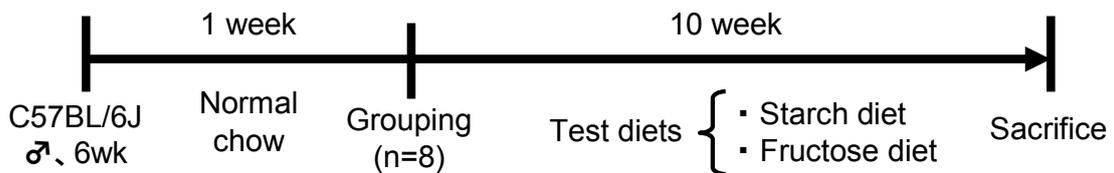
そこで本節では、フルクトース誘導性脂肪肝と ChREBP β の関連を調べるため、フルクトースを長期摂取させたマウスの肝臓を解析し、ChREBP β の発現と脂肪肝関連指標 (肝臓 TG 量、肝脂肪率、血中 AST 活性 etc.) に相関が見られるか調べた。

実験方法

◆ 動物実験

- 実験動物

実験動物は、6 週齢、雄の C57BL/6J マウスを日本クレアから購入した。搬入後の 1 週間は馴化のために、MR ラボストックを自由摂食させて飼育した。群分け前日に CT スキャンを用いてマウスの腹囲脂肪率、肝脂肪率を測定した。それから 12 時間絶食させて、マウスの絶食時体重、血糖値を測定した。これらの数値が等しくなるように 2 群 (n=8) に分け、スターチ食、もしくはフルクトース食を摂食させて 10 週間飼育した。飼料の組成は Table 4-6 に記した。スターチ食とフルクトース食のエネルギー量はともに 376 kcal/100 g である。



- 飼育スケジュール

- ペアフィーディング

飼育 1 週目の段階でスターチ群よりもフルクトース群の摂食量が少ない傾向が見られたので、飼育 2 週目から解剖までペアフィーディングを行ない、摂食量を一致させた。

- CT スキャン解析

飼育 0, 1, 5, 9 週目に CT スキャン解析を行ない、腹囲脂肪率と肝脂肪率を測定した。解析方法の詳細は次頁に記す。

- 空腹時血液の採取

飼育 9 週目にマウスを 12 時間絶食させ、尾静脈から血液を採取した。遠心により得た血清は、使用するまで -80°C で保存した。

- 解剖・組織の採取

飼育 10 週目に解剖を行なった。肝臓や精巣上体白色脂肪組織は重量を測定してから液体窒素を用いて冷凍した。21G 注射針とシリンジを用いて下大動脈から血液を採取し、遠心により血清を得た。血清や組織は解析するまで-80°C で保存した。

- ◆ 血中パラメーターの測定

飼育 9 週目に採取した血清を「空腹時血清」、飼育 10 週目 (解剖時) に採取した血清を「摂食時血清」として、第三章に記載の方法で測定した。なお、血清インスリン濃度はレビス マウス インスリン-T キット (シバヤギ) を用いて測定した。測定方法はメーカープロトコールに従った。

- ◆ CT スキャンによる腹囲脂肪率、肝脂肪率の測定

LaTheta Laboratory CT Lite (ALOKA) を用いて腹囲脂肪率、肝脂肪率を測定した。Isoflurane (Wako) によって全身麻酔したマウスを、仰臥位で寝かせてから CT 画像を撮影した。実験操作は東京大学環境安全本部の完全密閉式 X 線装置の取り扱い方法に従って行なった。

- 腹囲脂肪率の測定

第 12 肋骨から恥骨最下端まで測定範囲として (Fig. 4-7A の破線で挟まれた範囲)、スライス長: 2 mm の間隔で腹囲 CT 画像を得た。腹囲 CT 画像を「脂肪率計測モード」で解析し、測定した腹囲体積を占める脂肪組織体積の割合として腹囲脂肪率を算出した。ROI (Region of Interest) が誤判定されている場合は、修正してから腹囲脂肪率を算出した。

- 肝脂肪率の測定

第 13 肋骨から椎骨 2 本分を範囲として、スライス長: 0.1 mm の間隔で肝臓 CT 画像を得た。「脂肪肝計測モード」に設定した上で、4 枚以上の肝臓 CT 画像から、ROI を設定して肝臓 CT 値を算出した。「脾臓 CT 値-肝臓 CT 値」を「脾臓 CT 値-脂肪組織 CT 値」で除した値を肝脂肪率として算出した (算出方法と CT スキャンによる肝脂肪率推定の妥当性は [110] の文献を参照のこと)。

◆ RT-qPCR

第二章第一節に記載の方法に準じて行なった。

◆ タンパク質抽出・ウエスタンブロッティング

第二章第二節に記載の方法に準じて行なった。

なお、SREBP-1 タンパク質の検出には、anti-SREBP-1 (H-160) rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz) を用いた。

◆ 統計処理

二群間の差の検定は第二章第一節に記載の方法で行なった。図中の棒グラフは平均値±標準誤差 (Mean ± SE) で示した。相関分析は本章第一節に記載の方法で行なった。

結果

◆ フルクトースの摂取により血中コレステロール濃度と AST 活性が上昇した。

摂食量、最終体重、体重増加量は群間で差が認められなかった (Table 4-7)。飼育 9 週目に採取した絶食時血液では、総コレステロール濃度と AST 活性がフルクトース群で有意に高かった。飼育 10 週目 (解剖時) に採取した摂食時血液では、グルコース濃度と総コレステロール濃度がフルクトース群で有意に高かった。

◆ フルクトースの摂取により脂肪肝が進行した。

脂肪肝の進行を経時的に観察するため、CT スキャンにより肝脂肪率や腹囲脂肪率を測定した。飼育 1 週目の段階でフルクトース群の肝脂肪率が有意に上昇し、その後も肝脂肪率は上昇し続けた (Fig. 4-7B)。一方、飼育 1 週目と 9 週目における腹囲脂肪率 (肝脂肪を含まない皮下脂肪と内臓脂肪の総量) は、スターチ群よりもフルクトース群の方が有意に低かった。

飼育 10 週目にマウスを解剖し、組織重量を測定した。スターチ群と比較して、フルクトース群の肝臓重量は有意に増加し、精巣上体白色脂肪組織重量は有意に減少した (Fig. 4-8A)。肝臓中 TG 量 (中性脂肪量) および肝臓中総コレステロール量はフルクトース群で有意に増加した (Fig. 4-8B)。

以上の結果により、フルクトース群の肝臓で脂肪肝が進行していることを確認した。

◆ フルクトース群の肝臓では ChREBPβ、SREBP-1c の発現が増大する。

フルクトースの摂取により肝臓 ChREBPβ の発現が誘導されるか調べるため、肝臓の遺伝子発現量を測定した。

フルクトース群の肝臓では ChREBPβ の mRNA 発現量が有意に増大した (Fig. 4-9A)。これと同調して、糖代謝関連遺伝子 (Fig. 4-9B: LPK, KHK, G6PC)、脂質生合成系酵素遺伝子 (Fig. 4-9C: FASN, ACC1, SCD1, ELOVL6) の発現量もフルクトース群の肝臓に有意に増大した。脂質代謝関連転写因子の SREBP-1a、SREBP-1c の発現量もフルクトース群で有意に増大した (Fig. 4-9D)。

◆ 肝臓 ChREBPβの発現量は脂肪肝関連指標と正に相関する。

続いて、肝臓 ChREBPβ、SREBP-1c の発現量が脂肪肝の進行に関連するか調べるために、脂肪肝関連指標との相関分析を行なった。

肝臓における ChREBPβ mRNA 発現量は、肝臓重量、肝脂肪率、肝臓 TG 量、血中コレステロール濃度、血中 AST 活性と正の相関が認められ、精巢上体白色脂肪組織重量とは負の相関が認められた (Fig. 4-10A, Table 4-8)。SREBP-1c mRNA 発現量は、肝臓重量、肝臓 TG 量、肝臓コレステロール量、血中コレステロール濃度と正の相関が認められた (Fig. 4-10B, Table 4-8)。

さらに、糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量との相関分析を行なった。ChREBPβ mRNA 発現量は、糖代謝関連遺伝子 (LPK, KHK, G6PC) や脂質生合成系酵素遺伝子 (FASN, ACC1, SCD1, ELOVL6) の発現量と強い正の相関が認められた (Fig. 4-11A, Table 4-8)。一方、SREBP-1c mRNA 発現量は LPK、KHK、FASN、SCD1、ELOVL6 の発現量と正に相関したが、ChREBPβほど強い相関は見られなかった (Fig. 4-11B, Table 4-8)。

また、ChREBPα mRNA 発現量は上記のパラメーターとの相関が認められなかった。SREBP-1a mRNA 発現量は肝臓 TG 量との相関が認められなかった。肝臓 TG 量は、肝臓重量、血中 AST 活性、解糖系・脂質生合成系酵素の発現量と正の相関が認められた (Table 4-9)。

◆ フルクトースの摂取は SREBP-1 タンパク質のプロセッシングを促進しない。

SREBP-1 mRNA は不活性型 SREBP-1 (Precursor) タンパク質として翻訳された後に、プロセッシングを受けて活性型 (Mature) になることで脂質生合成系酵素遺伝子の転写を誘導する。この経路がフルクトース摂取による肝脂肪合成に関与するか調べるため、肝臓からタンパク質を抽出し、活性型 SREBP-1 タンパク質の発現量を調べた。

フルクトース群の肝臓において、不活性型 SREBP-1 (Precursor) タンパク量の増加が認められた (Fig. 4-13A)。これは、フルクトース群の肝臓で SREBP-1a, SREBP-1c mRNA 発現量が増大していた結果とも一致する (Fig. 4-9D)。しかし、活性型 SREBP-1 (Mature) タンパク質量は両群で違いが認められなかった。

したがって、フルクトースは肝臓の SREBP-1a, SREBP-1c mRNA や不活性型 SREBP-1 タンパク質の発現量を増加させるが、活性型 SREBP-1 (Mature) タンパク質発現量には影響を与えないと考えられる。

◆ フルクトースの摂取はコレステロール代謝関連遺伝子の発現を変動させない。

フルクトース群の肝臓や血液ではコレステロール量の増加が認められた (Table 4-7, Fig. 4-8)。これがコレステロール生合成酵素 (HMGCR, HMGCS) やコレステロール異化酵素 (CYP7A1) の発現変動によるものか調べるため、これらの遺伝子の mRNA 発現量を測定した。その結果、両群の HMGCR, HMGCS1, CYP7A1 の発現量に差は認められなかった (Fig. 4-13B)。一方、肝臓からの VLDL 分泌に参与する遺伝子の発現量を測定したところ、フルクトース群の肝臓で MTP の mRNA 発現量が有意に増加した。

◆ フルクトースの摂取は白色脂肪組織における糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量を変動させない。

スターチ群と比べて、フルクトース群の精巣上体白色脂肪組織重量は軽かった (Fig. 4-8A)。これが脂肪組織の ChREBP アイソフォーム、SREBP-1、解糖系・脂質生合成系酵素の発現変動に起因するものか調べるため、精巣上体白色脂肪組織の遺伝子発現量を測定した。

その結果、スターチ群とフルクトース群の間で ChREBP アイソフォーム、SREBP-1、解糖系・脂質生合成系酵素の遺伝子発現量に有意な差は認められなかった (Fig. 4-14)。

Table 4-6 スターチ食とフルクトース食の組成

Compound	Starch diet		Fructose diet	
	g/100g	% of energy	g/100g	% of energy
Cornstarch	67.8	72%		
Fructose			67.8	72%
Soybean oil	3.3	8%	3.3	8%
Casein	18.8	20%	18.8	20%
Vitamin mixture (AIN-93)	1.0		1.0	
Mineral mixture (AIN-93)	3.5		3.5	
L-Cystine	0.3		0.3	
Choline Bitartrate	0.3		0.3	
Cellulose powder	5.0		5.0	
Total	100.0	376 kcal	100.0	376 kcal

Percentage of energy in diets (%)

Carbohydrate	72%	72%
Fat	8%	8%
Protein	20%	20%

飼料の組成は AIN-93G を参考にして作成した [73]。

Table 4-7 フルクトース長期摂取マウスの身体指標と血中パラメーター

Parameters	Starch	Fructose	<i>P</i> value
Initial fasted body weight (g)	17.6 ± 0.2	17.6 ± 0.2	0.922
Initial fasted blood glucose (mg/dL)	115 ± 4	113 ± 7	0.888
Food intake (g/day)	3.6 ± 0.1	3.6 ± 0.1	0.959
Initial fed body weight (g)	21.4 ± 0.3	21.3 ± 0.3	0.921
Final fed body weight (g)	28.8 ± 0.4	28.0 ± 0.5	0.242
Body weight gain (g/10week, Fed)	7.5 ± 0.2	6.7 ± 0.4	0.135
12 hr fasted blood parameters (9 week)			
Glucose (mg/dL)	92 ± 6	88 ± 2	0.495
Triglyceride (mg/dL)	89.4 ± 9.1	72.1 ± 7.2	0.158
Total-cholesterol (mg/dL)	89.1 ± 2.4	121.6 ± 4.1	*** < 0.001
NEFA (mmol/L)	1.17 ± 0.06	1.16 ± 0.07	0.947
Insulin (ng/mL)	0.18 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.429
AST activity (IU/L)	30.2 ± 1.8	40.3 ± 2.8	** 0.010
ALT activity (IU/L)	4.2 ± 0.2	4.1 ± 0.2	0.758
Fed blood parameters (10 week)			
Glucose (mg/dL)	279 ± 17	334 ± 10	* 0.016
Triglyceride (mg/dL)	113 ± 12	150 ± 20	0.137
Total-cholesterol (mg/dL)	86 ± 3	127 ± 4	*** < 0.001
NEFA (mmol/L)	0.43 ± 0.03	0.41 ± 0.04	0.670
Insulin (ng/mL)	2.04 ± 0.54	1.17 ± 0.29	0.188

C57BL/6J 雄マウスにスターチ食 (Starch)、もしくはフルクトース食 (Fructose) を 10 週間与えて飼育した。絶食時血液は飼育 9 週目に、摂食時血液は飼育 10 週目 (解剖時) に採取したものを測定した。NEFA: Non-Esterified Fatty Acids
 数値は平均±標準誤差で示した。群間の差を Student's *t*-test により検定した。
 (n=8, *: *P*<0.05, **: *P*<0.01, ***: *P*<0.001)

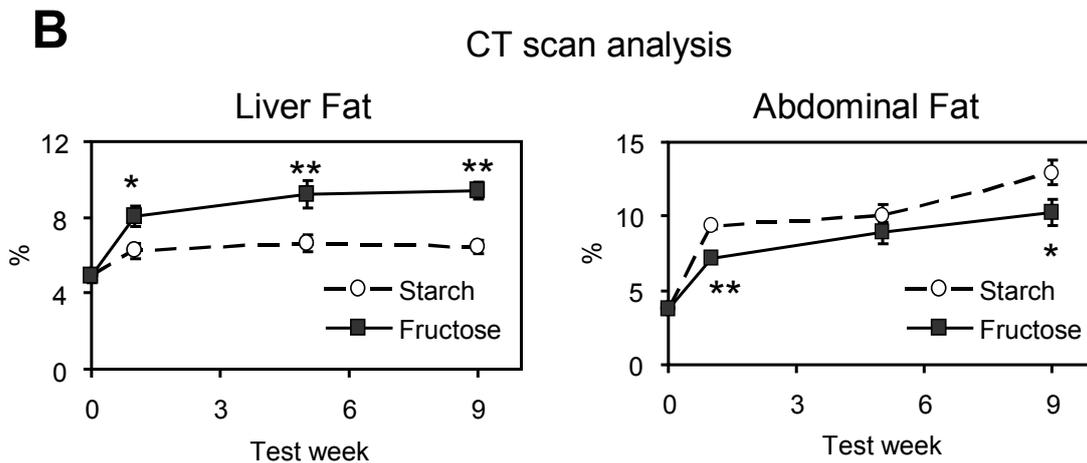
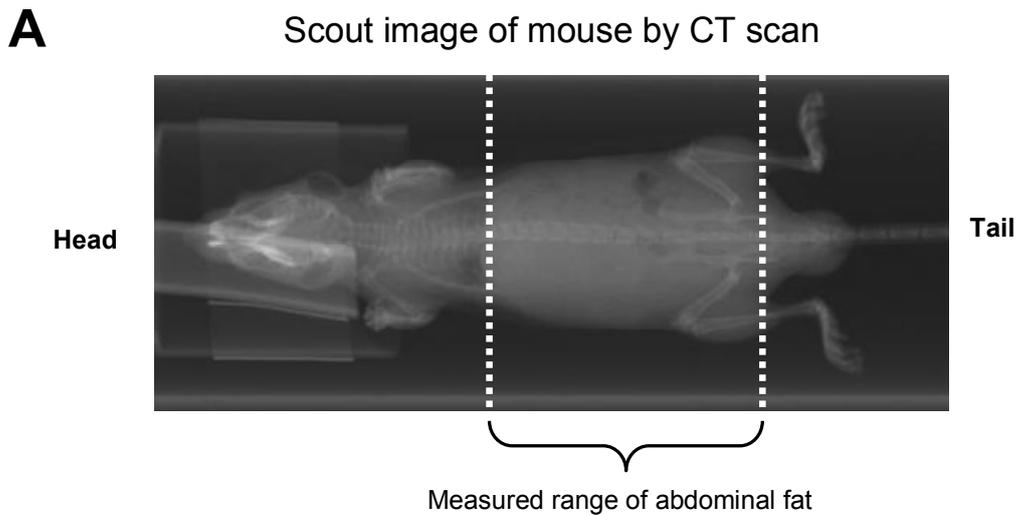


Fig. 4-7 フルクトース長期摂取マウスの腹囲脂肪率、肝脂肪率の経時的変化

C57BL/6J 雄マウスにスターチ食 (Starch)、もしくはフルクトース食 (Fructose) を与えて飼育した。飼育 0, 1, 5, 9 週目に CT スキャン画像解析し、腹囲脂肪率と肝脂肪率を算出した。

(A): マウス (仰臥位) の CT スカウト画像。左が頭部、右が尾部。破線で挟まれた範囲を腹囲脂肪の測定範囲とした。

(B): 肝脂肪率 (左図) と腹囲脂肪率 (右図) の経時的変化。

グラフは平均±標準誤差で示した。

群間の差を Student's *t*-test により検定した。(n=8, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$)

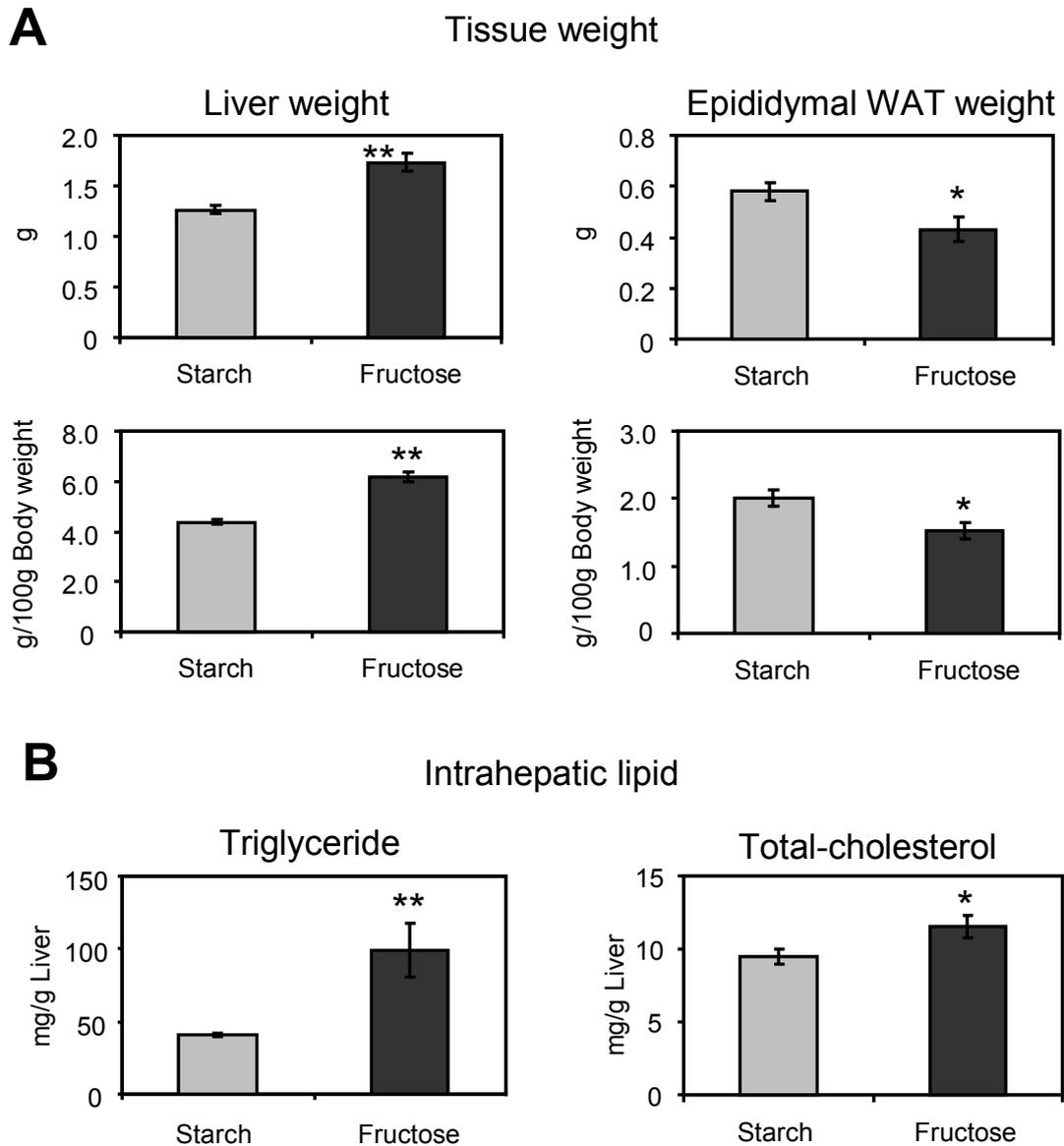


Fig. 4-8 フルクトース長期摂取マウスの組織重量と肝脂肪量

C57BL/6J 雄マウスにスターチ食 (Starch)、もしくはフルクトース食 (Fructose) を 10 週間与えて飼育した。飼育 10 週目に解剖を行ない、組織重量を測定した。

(A): 上図は組織重量の生値、下図は体重 100 g あたりの組織重量で示した。

(B): 得られた肝臓より脂質を抽出し、肝臓 1 g あたりの TG 量、および総コレステロール量を定量した。グラフは平均±標準誤差で示した。

群間の差を Student's t-test により検定した。(n=8, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$)

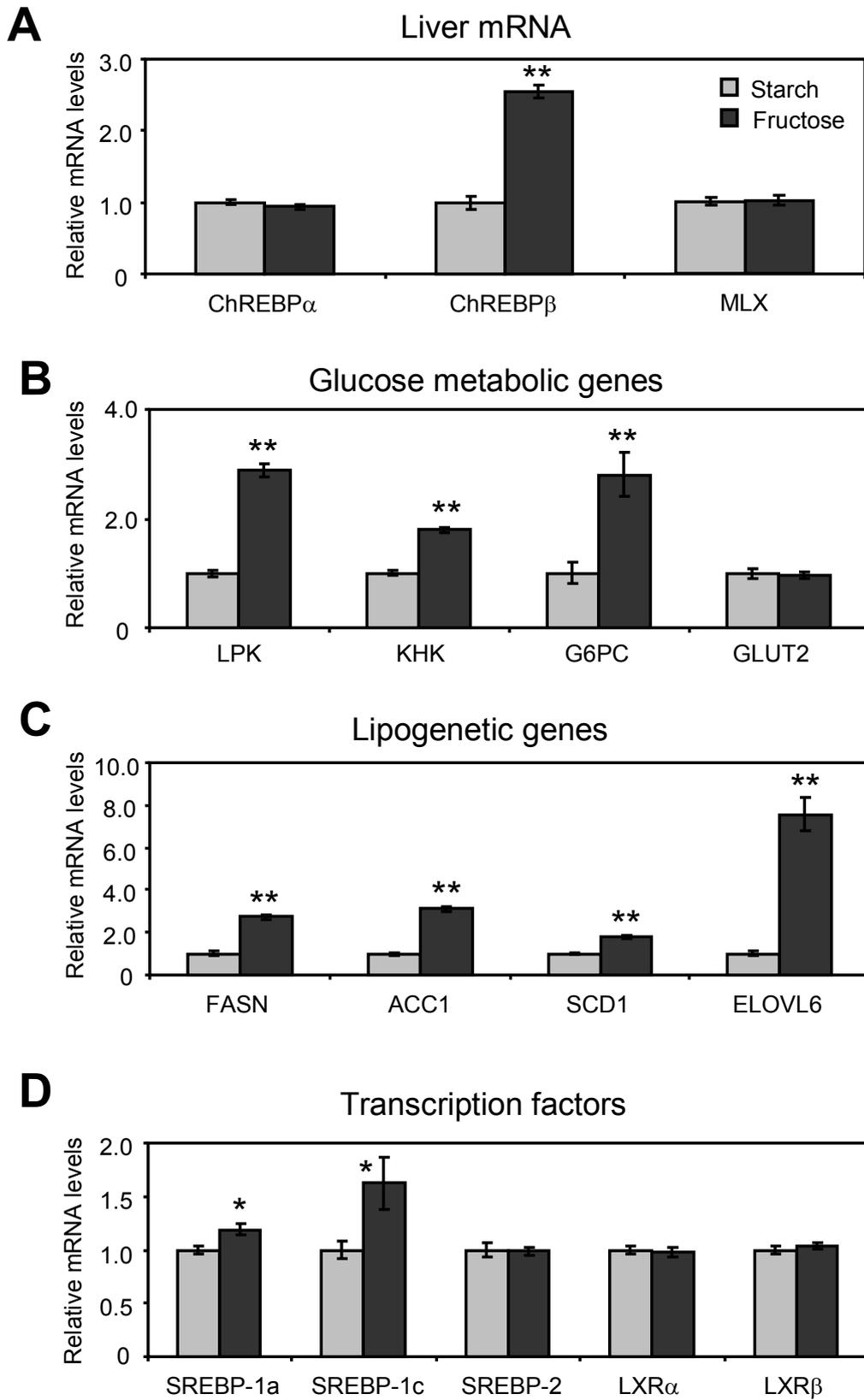


Fig. 4-9 フルクトース長期摂取マウスの肝臓における ChREBP アイソフォーム、糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量 (Fig. legend は次頁に記載する。)

Fig. 4-9 フルクトース長期摂取マウスの肝臓における ChREBP アイソフォーム、糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量

C57BL/6J 雄マウスにスターチ食 (Starch)、もしくはフルクトース食 (Fructose) を 10 週間与えて飼育した。採取した肝臓から RNA を抽出し、RT-qPCR 法により mRNA 発現量を測定した。

(A): ChREBP、MLX、(B): 糖代謝関連遺伝子、(C): 脂質生合成系酵素遺伝子、(D): 脂質代謝関連転写因子の mRNA 発現量を Starch 群を 1 とした場合の相対的な値で示した。各遺伝子の発現量は 18S rRNA の発現量で補正した。

数値は平均±標準誤差で示した。

群間の差を Student's *t*-test により検定した。(n=8, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$)

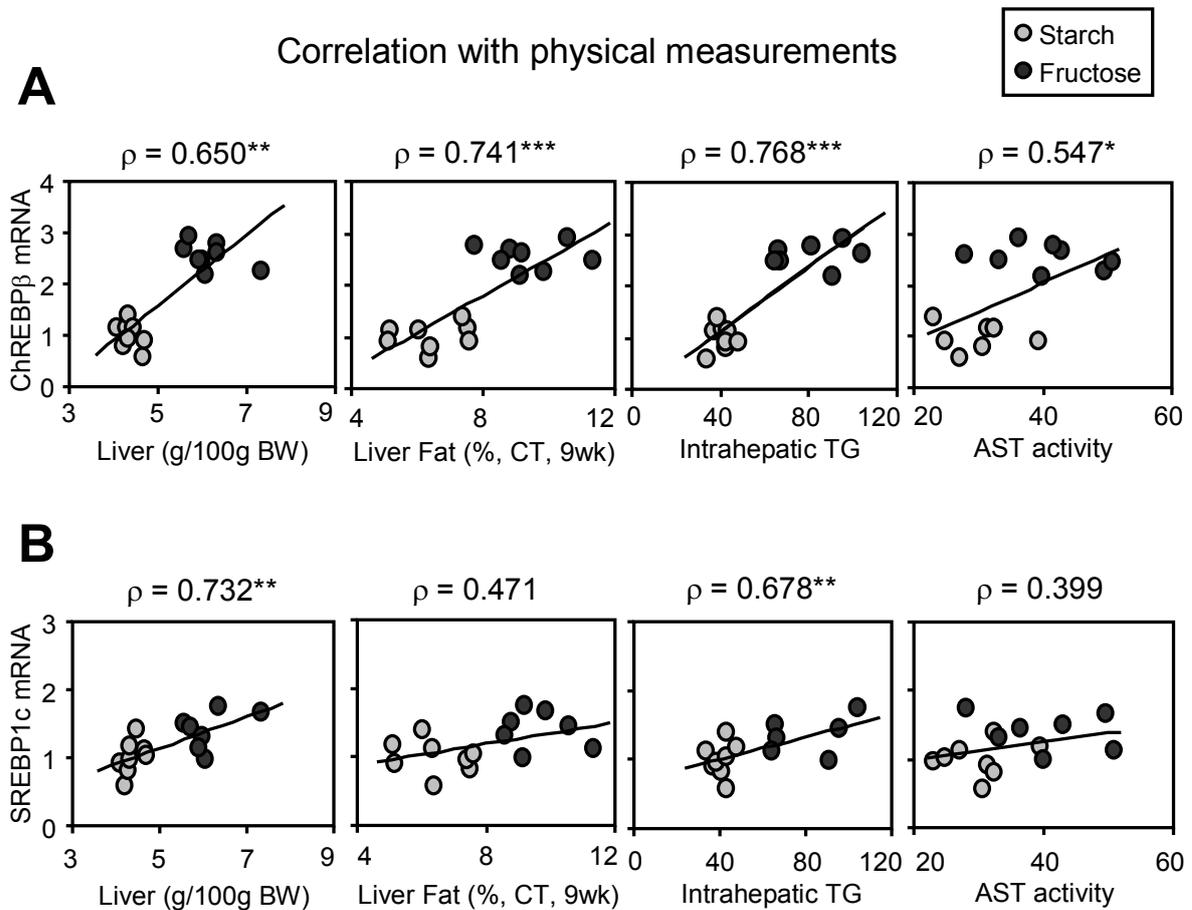


Fig. 4-10 フルクトース長期摂取マウスの肝臓における ChREBPβ、SREBP-1c の発現量と脂肪肝関連指標との相関

C57BL/6J 雄マウスにスターチ食 (Starch)、もしくはフルクトース食 (Fructose) を 10 週間与えて飼育した。採取した肝臓から RNA を抽出し、RT-qPCR 法により mRNA 発現量を測定した。各遺伝子の mRNA 発現量を Starch 群を 1 とした場合の相対的な値で示した。各遺伝子の発現量は 18S rRNA の発現量で補正した。

X 軸に脂肪肝関連指標 (肝臓重量、肝脂肪率、肝臓 TG 量、血中 AST 活性)、Y 軸に (A): ChREBPβ mRNA 発現量、(B):SREBP-1c mRNA 発現量をとった散布図で示した。

ρ: スピアマン順位相関係数。無相関検定により相関係数の有意性を検定した (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, $n = 14-16$)。

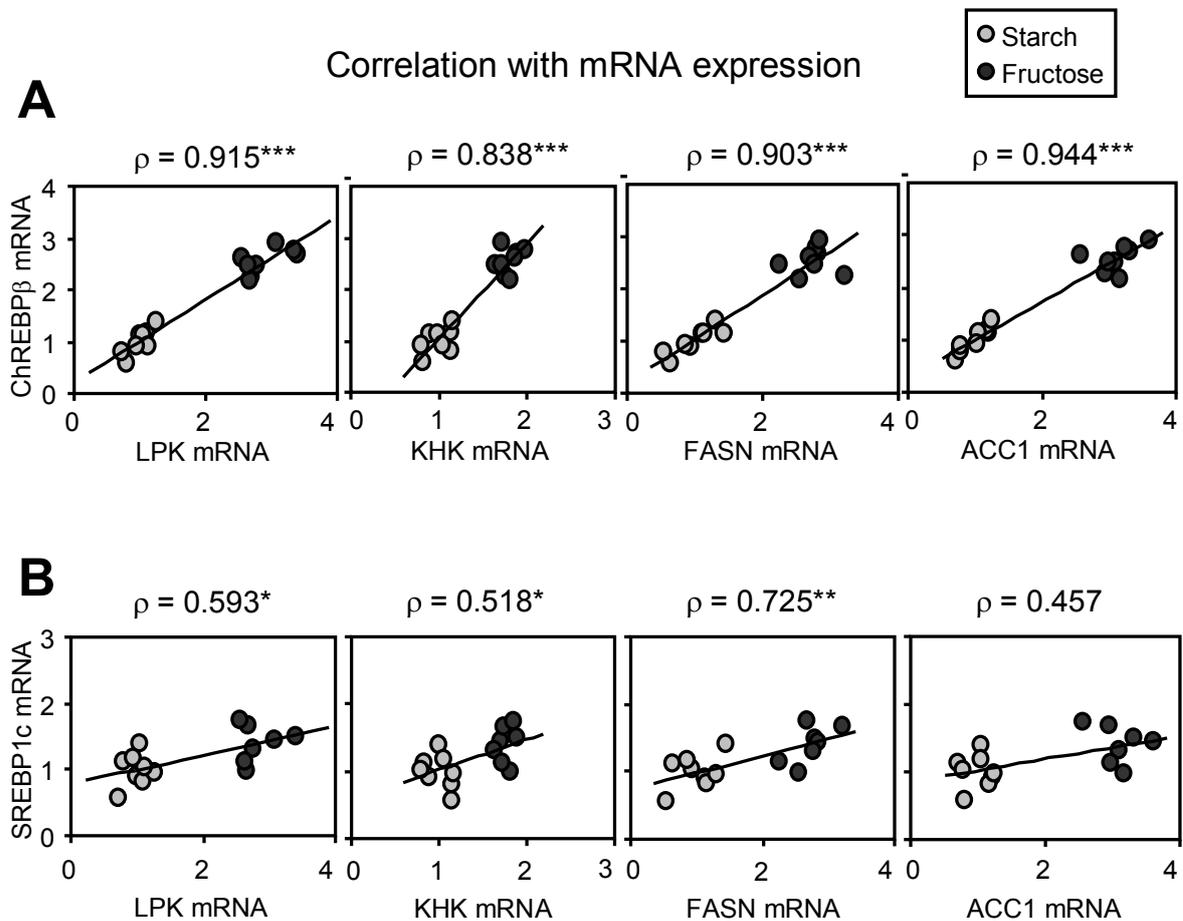


Fig. 4-11 フルクトース長期摂取マウスの肝臓における ChREBPβ、SREBP-1c の発現量と糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量との相関

C57BL/6J 雄マウスにスターチ食 (Starch)、もしくはフルクトース食 (Fructose) を 10 週間与えて飼育した。採取した肝臓から RNA を抽出し、RT-qPCR 法により mRNA 発現量を測定した。各遺伝子の mRNA 発現量を Starch 群を 1 とした場合の相対的な値で示した。各遺伝子の発現量は 18S rRNA の発現量で補正した。

X 軸に解糖系・脂質生合成系酵素の発現量、Y 軸に (A): ChREBPβ mRNA 発現量、(B): SREBP-1c mRNA 発現量をとった散布図で示した。

ρ: スピアマン順位相関係数。無相関検定により相関係数の有意性を検定した (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, $n = 14-16$)。

Table 4-8 肝臓 ChREBPβ、SREBP-1c mRNA 発現量との相関分析表

Parameters	ChREBPβ		SREBP-1c	
	ρ	P value	ρ	P value
Physical measurements				
Food intake	-0.071	0.795	0.274	0.324
Body weight	-0.575	* 0.020	0.047	0.869
Liver (g/100 BW)	0.650	** 0.006	0.732	** 0.002
eWAT (g/100g BW)	-0.550	* 0.027	-0.196	0.483
Liver Fat (% , CT, 9wk)	0.741	*** <0.001	0.471	0.076
Abdominal Fat (% , CT, 9wk)	-0.459	0.074	-0.182	0.516
Intrahepatic TG	0.768	*** <0.001	0.679	** 0.008
Intrahepatic Cholesterol	0.279	0.295	0.596	* 0.019
Fasted blood parameters				
Glucose	-0.136	0.614	-0.159	0.572
TG	-0.537	* 0.032	-0.079	0.778
Total-Cholesterol	0.778	*** <0.001	0.584	* 0.022
AST activity	0.547	* 0.028	0.399	0.141
Insulin (Fed state)	-0.165	0.542	-0.300	0.277
Liver mRNA expression				
LPK	0.915	*** <0.001	0.593	* 0.020
KHK	0.838	*** <0.001	0.518	* 0.048
G6PC	0.732	** 0.001	0.282	0.308
FASN	0.903	*** <0.001	0.725	** 0.002
ACC1	0.944	*** <0.001	0.457	0.087
SCD1	0.809	*** <0.001	0.611	* 0.016
ELOVL6	0.856	*** <0.001	0.661	** 0.007
ChREBPα	-0.041	0.880	-0.264	0.341
ChREBPβ	/		0.614	* 0.015
MLX	0.247	0.356	-0.021	0.940
SREBP-1a	0.679	** 0.004	0.336	0.221
SREBP-1c	0.614	* 0.015	/	

Table 4-9 肝臓 ChREBP α mRNA 発現量、肝臓 TG 量との相関分析表

Parameters	ChREBP α		Intrahepatic TG	
	ρ	<i>P</i> value	ρ	<i>P</i> value
Physical measurements				
Food intake	0.022	0.935	0.052	0.854
Body weight	0.068	0.803	-0.358	0.190
Liver (g/100 BW)	-0.232	0.387	0.821	*** <0.001
eWAT (g/100g BW)	0.141	0.594	-0.621	* 0.013
Liver Fat (% , CT, 9wk)	-0.259	0.485	0.725	** 0.002
Abdominal Fat (% , CT, 9wk)	0.135	0.617	-0.471	0.076
Intrahepatic TG	0.125	0.657	/	/
Intrahepatic Cholesterol	-0.068	0.803	0.561	* 0.030
Fasted blood parameters				
Glucose	-0.264	0.323	-0.215	0.441
TG	-0.105	0.698	-0.377	0.166
Total-Cholesterol	-0.450	0.081	0.747	** 0.001
AST activity	-0.263	0.324	0.552	* 0.033
Insulin (Fed state)	-0.171	0.528	-0.571	* 0.026
Liver mRNA expression				
LPK	-0.226	0.399	0.707	** 0.003
KHK	-0.024	0.931	0.786	*** <0.001
G6PC	-0.053	0.846	0.671	** 0.006
FASN	-0.241	0.368	0.775	*** <0.001
ACC1	-0.179	0.506	0.736	** 0.002
SCD1	-0.282	0.289	0.818	*** <0.001
ELOVL6	-0.309	0.244	0.789	*** <0.001
ChREBP α	/	/	0.125	0.657
ChREBP β	-0.041	0.880	0.768	*** <0.001
MLX	0.279	0.295	-0.014	0.960
SREBP-1a	0.126	0.641	0.475	0.074
SREBP-1c	-0.264	0.341	0.679	** 0.008

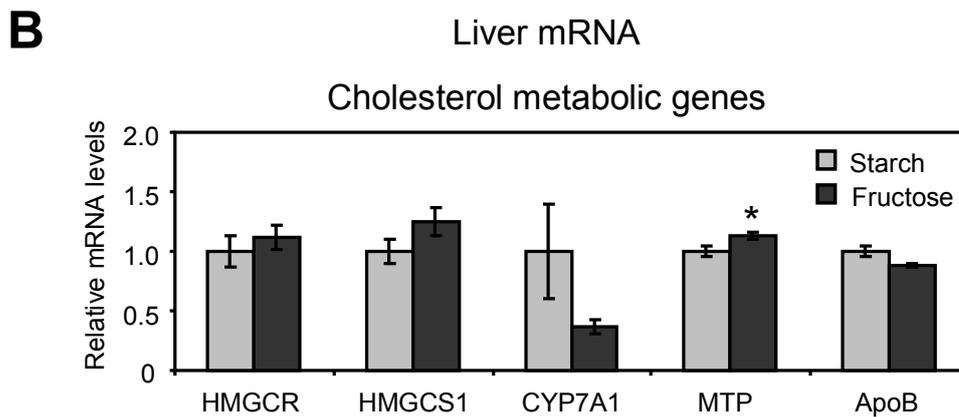
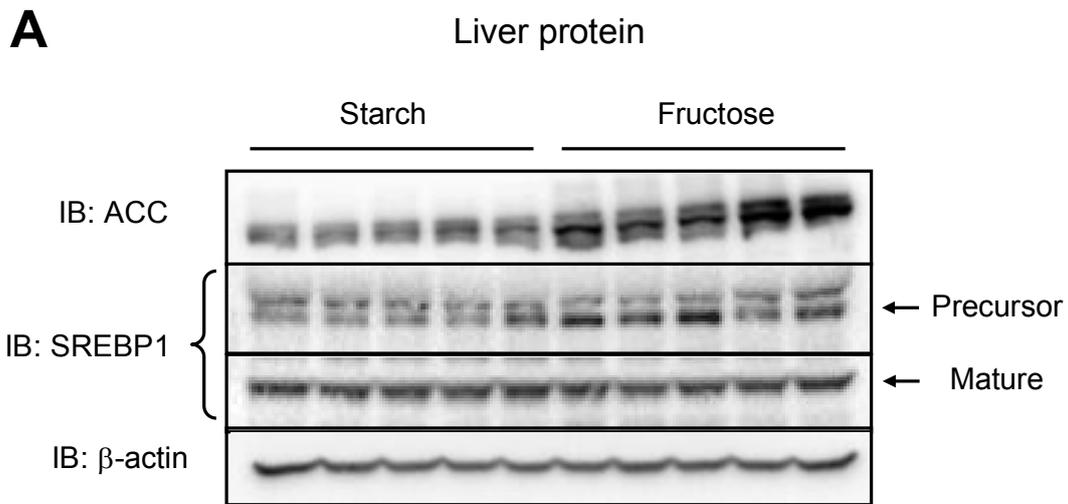


Fig. 4-13 フルクトース長期摂取マウスの肝臓における SREBP-1 タンパク質発現量、およびコレステロール代謝関連遺伝子の mRNA 発現量

C57BL/6J 雄マウスにスターチ食 (Starch)、もしくはフルクトース食 (Fructose) を 10 週間与えて飼育した。

(A): 採取した肝臓からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティングによりタンパク質発現量を測定した。各タンパク質の分子量は ACC: 280 kDa, SREBP-1 Precursor form: 125 kDa, Mature form: 68 kDa, β -actin: 42 kDa (n=5)

(B): コレステロール代謝関連遺伝子の mRNA 発現量を Starch 群を 1 とした場合の相対的な値で示した。各遺伝子の発現量は 18S rRNA の発現量で補正した。

数値は平均 \pm 標準誤差で示した。

群間の差を Student's *t*-test により検定した。(n=8, *: $P < 0.05$)

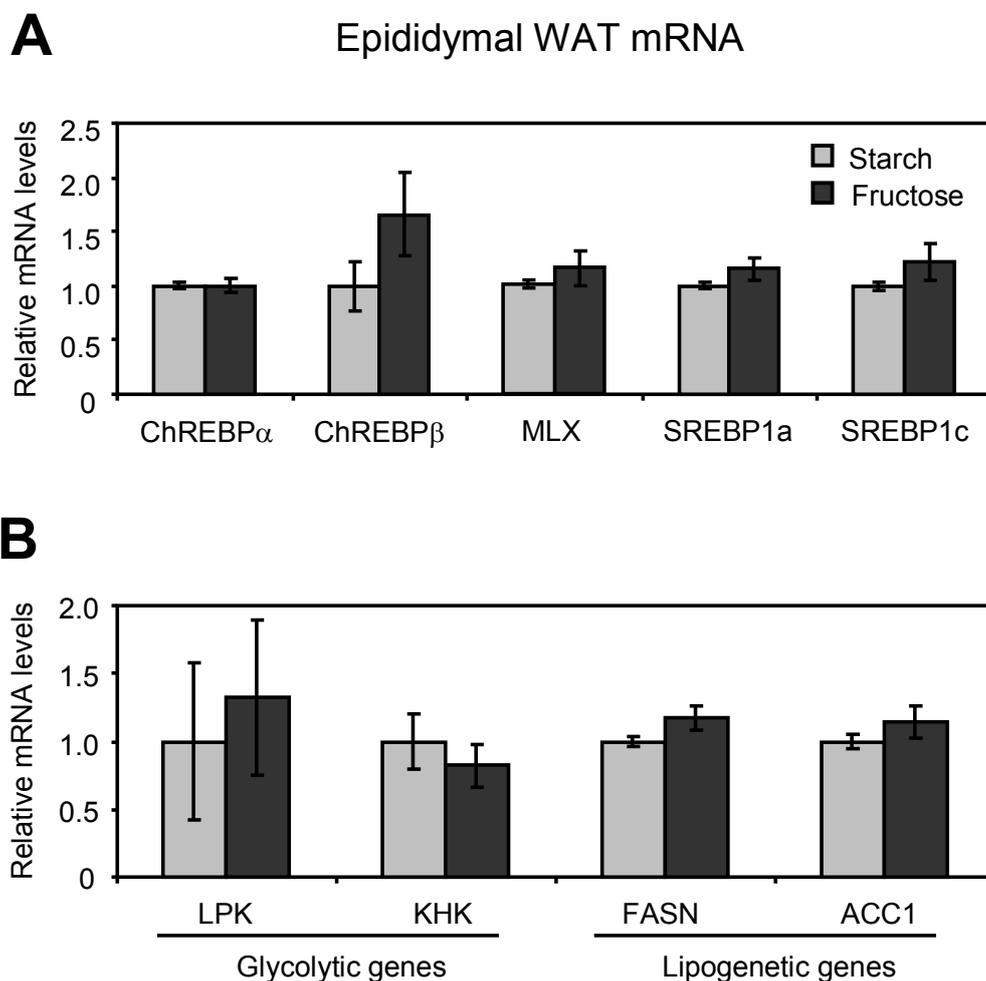


Fig. 4-14 フルクトース長期摂取マウスの精巣上体白色脂肪組織における ChREBP アイソフォーム、SREBP-1、糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量

C57BL/6J 雄マウスにスターチ食 (Starch)、もしくはフルクトース食 (Fructose) を 10 週間与えて飼育した。採取した精巣上体白色脂肪組織から RNA を抽出し、RT-qPCR 法により mRNA 発現量を測定した。

(A): ChREBP、MLX、SREBP-1、(B): 糖代謝関連遺伝子、脂質生合成系酵素遺伝子の mRNA 発現量を Starch 群を 1 とした場合の相対的な値で示した。各遺伝子の発現量は 18S rRNA の発現量で補正した。

数値は平均 \pm 標準誤差で示した。

群間の差を Student's *t*-test により検定した。(n=8)

第四章 考察

第一節では、様々な食事 (スターチ食、フルクトース食、ラード食、大豆油食) を与えたマウスの組織を解析することで、各組織の ChREBP β の発現を変動させる栄養素を探索した。また、ChREBP β と ChREBP 標的遺伝子の発現量の相関を調べることで、各組織の ChREBP β の役割を明らかにした。

◆ 肝臓における ChREBP β の機能: フルクトースにより発現が誘導され、
解糖・脂質生合成を促進する。

肝臓で ChREBP β の発現を最も増大させた栄養素はフルクトースであった (Fig. 4-1A)。これと同調して、解糖系・脂質生合成酵素遺伝子の発現量がフルクトース摂取により有意に増大した (Fig. 4-1B, C)。高脂肪食と比べて、スターチもこれらの遺伝子の発現を誘導する傾向は見られたが、フルクトースほど顕著な誘導は認められなかった。

また、ChREBP β の発現量は解糖系・脂質生合成系酵素遺伝子の発現量と強い正の相関が認められた (Fig. 4-2B, Table 4-3)。これらの現象は、ChREBP β 過剰発現実験 (第三章) により導き出された「ChREBP β の発現増大が肝臓の糖利用・脂肪合成を促進する」という結果を支持するものである。

以上を踏まえると、フルクトースの摂取は、ChREBP β の発現誘導を介した解糖・脂質生合成を促進することで肝脂肪蓄積を促すと考えられる。

◆ 脂肪組織における ChREBP β の機能: スターチ (グルコース) により発現が
誘導され、糖の取り込み・脂質生合成を促進する。

精巢上体白色脂肪組織で ChREBP β の発現を最も増大させた栄養素はスターチであった (Fig. 4-3A)。これと同調して、GLUT4、脂質生合成酵素遺伝子の発現量がスターチ摂取により有意に増大した (Fig. 4-3B, C)。高脂肪食と比べて、フルクトースもこれらの遺伝子の発現を誘導する傾向は見られたが、スターチほど顕著な誘導は認められなかった。スターチは消化管で分解されて、グルコースの形で体内に取り込まれて脂肪組織に届けられるため、これらの現象を引き起こしている栄養素はグルコースである。

また、ChREBP β の発現量は GLUT4・脂質生合成系酵素遺伝子の発現と強い正の相関が認められた (Fig. 4-4B, Table 4-4)。これまでも、白色脂肪組織における ChREBP β の発現量とインスリン感受性が正に相関することが報告されている [56,60]。そのため、脂肪組織における ChREBP β の役割は「糖取り込みと脂肪合成を誘導すること」であると考えられる。

以上の知見をまとめると、スターチ (グルコース) の摂取により ChREBP β の発現誘導を介して糖取り込み・脂質生合成が促進されることで脂肪組織に脂肪が蓄積すると考えられる。

◆ 空腸における ChREBP β の機能: 糖質により発現が誘導され、糖質の消化・吸収を促進する可能性が考えられる。

空腸ではスターチやフルクトースの摂取により ChREBP β の発現が増大した (Fig. 4-5A)。しかし、フルクトース摂取により KHK や GLUT2 の発現増大は見られたものの、他の ChREBP 標的遺伝子 (LPK, FASN, ACC1) の発現量に違いは見られなかった (Fig. 4-5B, C)。これまでに、空腸の Spot14 (ChREBP 標的遺伝子) の発現に ChREBP が関与することが報告されている [111]。しかし、これ以外に小腸の ChREBP 標的遺伝子は同定されておらず、小腸における ChREBP の機能は十分に分かっていない。

小腸の ChREBP 標的遺伝子を探索するために ChREBP アイソフォームの発現量と相関の見られる遺伝子を調べたところ、KHK、GLUT2、SGLT1、SI、MGAM の発現量は ChREBP β の発現量と正に相関していた (Fig. 4-6B, Table 4-5)。これらの遺伝子のプロモーター領域を調べてみたところ、ヒトおよびマウスの SGLT1、MGAM 遺伝子のプロモーター領域には ChoRE 様配列が存在することを確認した (次頁参照)。

ChoRE
(Carbohydrate Response Element) :

CACGTG NNNNN CACGTG

E-box E-box

2つのE-boxの間に5つの任意の配列が
挟まれたコンセンサス配列

より厳密には、(Y=C or T, R=G or A)

CAYGNG NNNNN CNCRTG

[*J Biol Chem.* 2006 **281**(39):28721-30]

<Human SGLT1 gene promoter>
-1043 AATGGGGAAGACCTGTG -1026
ChoRE CAYGNGNNNNNCNCRTG
***** **

<Mouse SGLT1 gene promoter>
-141 CACGTGGGACTC-CGTG -124
ChoRE CAYGTGNNNNNCNCRTG
***** **

<Human Mgam gene promoter>
-695 CATGAGAACAGCATGGG -678
ChoRE CAYGNGNNNNNCNCRTG
***** * *

<Mouse Mgam gene promoter>
-816 CTTGGGACAAACACGTA -799
ChoRE CAYGNGNNNNNCNCRTG
* *****

DDBJ (DNA Data Bank of Japan) の
ClustalWによりアラインメントを行なった。

ChREBP はヒストンアセチル化酵素を標的遺伝子上にリクルートすることで転写を誘導すること [45]、糖質摂取時に MGAM や SGLT1 遺伝子プロモーター周辺のヒストンアセチル化量が増大すること [112-114]、糖質摂取時に Spot14 遺伝子プロモーターにおける ChREBP の結合量が増大すること [111] が報告されている。

これらの知見を総じて考察すると、糖質摂取に伴う小腸の SGLT1、MGAM の転写誘導は ChREBP によって制御されている可能性が考えられる。実際、ヒト結腸癌細胞株 Caco2 に ChREBPβ を過剰発現させたところ、分化後の細胞において SGLT1 mRNA 発現量の増大が認められた (Unpublished data)。SGLT1 や MGAM のプロモーター配列を用いたレポーターアッセイにより、これらの遺伝子が ChREBP の標的遺伝子であるか検証を進めていく必要がある。

以上、小腸における ChREBP の機能は不明な点が多いが、本研究の結果により、糖質は空腸の ChREBPβ の発現誘導を介して糖質の消化吸收を促進する可能性が示唆された。

第一節の実験結果により想定された各組織における ChREBPβの機能を以下にまとめた。

組織	肝臓	脂肪組織	小腸
誘導物質	フルクトース	スターチ (グルコース)	スターチ フルクトース
標的遺伝子 () 内は候補	LPK, KHK, G6PC, FASN, ACC1, SCD1, ELOVL6	GLUT4, FASN, SCD1, ELOVL6	KHK, GLUT2, (SGLT1, MGAM)
機能	糖利用 脂肪合成	糖取り込み 脂肪合成	糖質の消化吸収？

これらの知見から、「食事として摂取した糖質の利用と貯蔵を促進すること」が ChREBPβの役割であると考えられる。摂取する糖の質によって組織に対する応答が異なることは興味深い点である。

◆ ChREBPαと糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量との相関関係について

これまでChREBPアイソフォームを区別した遺伝子発現解析が行なわれてこなかったため、各組織の ChREBPαの発現量が ChREBP 標的遺伝子の発現量と相関するか不明であった。本研究では、ChREBPβに加えて ChREBPαと糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量との相関も調べた。

肝臓における ChREBPαの発現量は、解糖系・脂質生合成系酵素遺伝子の発現量との相関関係が認められなかった (Fig. 4-2A, Table 4-3)。これは、ChREBPαを過剰発現させたマウス肝実質細胞において解糖系・脂質生合成系酵素の発現誘導がほとんど認められなかった第三章の結果とも一致する (Fig. 3-3, 3-4)。これまでの検証結果と総じて考察すると、肝臓における ChREBPαを介した糖・脂質代謝制御は、「ChREBPαの発現量」ではなく、「ChREBPαの転写活性」により調節されることが推察される。

精巢上体白色脂肪組織においては、ChREBPαの発現量は GLUT4・脂質生合成系酵素遺伝子の発現量と正の相関が認められた (Fig. 4-4A)。また、ChREBPαと ChREBPβの発現量にも強い正相関 (Table 4-4: $\rho=0.738^{**}$) が見られるため、ChREBPαの発現によって ChREBPβの転写が制御されている可能性が考えられ

る。ChREBP β のみならず ChREBP α の発現も、脂肪組織における糖取り込みと脂肪合成を制御しうる要因になることが示唆された。

空腸において、ChREBP α の発現と相関が見られた遺伝子は FASN と ACC1 であった (Fig. 4-6A, Table 4-5)。小腸細胞における脂質生合成系酵素の発現増大は、脂肪合成を促進し、キロミクロン中の TG 量やコレステロール量を増加させる [70]。小腸の脂質生合成系酵素の発現は SREBP によって制御されることが報告されているが [115–117]、FASN、ACC1 の発現と相関が認められた ChREBP α の発現もこの経路に関与する可能性が考えられる。食事内容によって ChREBP α の発現は変動しないため、ChREBP α 遺伝子ノックダウンにより小腸上皮細胞の脂肪合成が抑えられるか検証を進めていく必要がある。

本章第一節の結果により、フルクトースは肝臓の ChREBP β の発現を誘導しやすい糖質であることを明らかにした。ChREBP β の発現増大は脂肪肝の進行に直結することから (第三章の結果より)、フルクトース誘導性脂肪肝の進行に ChREBP β の発現に関与する可能性が考えられる。そこで本章第二節では、フルクトースを長期摂取させてフルクトース誘導性脂肪肝を惹起させたマウスの肝臓における ChREBP β の発現と脂肪肝指標との相関を解析した。

◆ フルクトース摂取に伴う肝臓 ChREBP β の発現増大は脂肪肝の進行と強く相関する。

糖の質が異なる食事として、スターチ食とフルクトース食をマウスに 10 週間与えて飼育した。CT スキャンを用いて肝脂肪率を経時的に測定したところ、飼育 1 週目の段階からフルクトース摂取による脂肪肝の進行が認められた (Fig. 4-7B)。飼育 9 週目の段階でフルクトース摂取に伴う肝脂肪率の上昇がプラトーに達したため、飼育 10 週目にマウスの解剖を行なった。

フルクトース群では、肝臓重量、肝脂肪率、肝臓脂質量、血中 AST 活性の増大しており、脂肪肝の進行が認められた (Table 4-7, Fig. 4-7, 4-8)。さらに、フルクトース群の肝臓では ChREBP β 、解糖系・脂質生合成系酵素遺伝子の発現増大が認められた (Fig. 4-9)。

NAFLD 患者の肝臓では FASN、ACC1、KHK の発現増大が見られる [106,118]。この報告と一致して、本研究においても、肝臓における解糖系・脂質生合成系

の遺伝子発現量と肝臓 TG 量との間に強い正の相関が認められた (Table 4-9)。さらに、肝臓における ChREBPβ の遺伝子発現量は、これらの解糖系・脂質合成系の遺伝子発現量、および脂肪肝関連指標と強い正の相関関係が認められた (Fig. 4-10A, 4-11A, Table 4-8)。これは第三章の結果とも一致しているため、フルクトース摂取に伴う ChREBPβ の発現増大が肝臓の解糖・脂質合成を促進し、脂肪肝を進行させると考えられる (Fig. 4-15)。

◆ フルクトース摂取は肝臓の SREBP-1 mRNA の転写を誘導するが、SREBP-1 タンパク質のプロセッシングは亢進しない。

フルクトース誘導性脂肪肝に関与するもう一つの転写因子として SREBP-1c が挙げられる。フルクトースの摂取により SREBP-1c mRNA の転写が誘導される分子機構が明らかになっており、フルクトース誘導性脂肪肝との関与が疑われている [119-121]。

本研究においても、フルクトース群の肝臓で SREBP-1a、SREBP-1c mRNA 発現量が増大することを確認した (Fig. 4-9D)。しかし、脂質合成系酵素の転写誘導に直接関与する活性型 SREBP-1 タンパク質の発現量はフルクトース摂取による変動が見られなかった (Fig. 4-13A)。また、SREBP-1a mRNA 発現量は肝臓 TG 量と相関関係が認められなかった (Table 4-9)。SREBP-1c mRNA 発現量は肝脂肪率や血中 AST 活性、ACC1 の発現量とは有意な相関関係が認められなかった。肝臓 TG 量や一部の脂質合成系酵素の発現量とは相関していたが、ChREBPβ の発現量ほど強い相関は見られなかった (Fig. 4-10A, 4-11A, Table 4-8)。

したがって、本実験によってもたらされたフルクトース誘導性脂肪肝に対する SREBP-1 の寄与は小さいものと推察される。ただし、フルクトース摂取により肝臓の SREBP-1 mRNA、不活性型 SREBP-1 タンパク質の発現量は増大していたので、SREBP-1 プロセッシングが亢進されるような条件下 (過食に伴う高インスリン血症など) では、SREBP-1 による脂質合成酵素の転写誘導が ChREBPβ と相乗的に働いて、劇的に脂肪肝を進行させる可能性が考えられる。

本実験では、スターチ群とフルクトース群をペアフィーディングさせたので、過食に伴う血中インスリン濃度の上昇は見られなかった (Table 4-7)。過食モデルマウスにフルクトース食を摂食させたり、フルクトース水を飲水させてエネルギー過多の条件で飼育したマウスの肝臓を解析することで、フルクトース誘導性脂肪肝と SREBP-1 との関係を明らかにできると予想される。

◆ フルクトース摂取により肝臓や血中コレステロール量が増加、
脂肪組織重量が減少した点に関する考察

フルクトースを摂取させたマウスの肝臓や血液ではコレステロール量が増加し、脂肪組織重量の減少が認められた (Table 4-7, Fig. 4-8)。これらの現象は本研究以外にも報告されているが [36,70,122]、その分子機構は分かっていない。

肝臓におけるコレステロール代謝はコレステロール合成律速酵素 HMGCR、HMGCS やコレステロール異化酵素 CYP7A1 の発現によって制御されている [123]。肝臓におけるこれらの遺伝子の発現量を測定したが、いずれもフルクトース摂取による変動は認められなかった (Fig. 4-13)。また、精巣上体白色脂肪組織における糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量に変動は認められなかった (Fig. 4-14)。以上の点から、フルクトースは肝臓のコレステロール合成や脂肪組織の脂質合成を遺伝子発現レベルで制御している訳ではないと考えられる。

グルコースと比べて、フルクトースは肝臓に取り込まれやすい糖質であることが知られており [124]、フルクトースを摂食させたラットの肝臓では Acetyl-CoA 量が増大することが報告されている [125]。Acetyl-CoA はコレステロール合成の基質となるが、これ自身がコレステロール合成酵素の活性を増大する [126]。これらの知見から、スターチとフルクトースを等量摂取させた本実験では、フルクトースは脂肪組織へ取り込まれる絶対量が少なかったため、フルクトース群の脂肪組織重量がコントロール群と比べて相対的に少なくなったと考えられる。また、フルクトース摂取に伴う肝臓内 Acetyl-CoA 量の増加がコレステロール合成を促し、過剰なコレステロールは MTP を介して VLDL に取り込まれて血中に分泌されたため、フルクトース群の血中コレステロール濃度が上昇したと予測される。

本章の結果は、フルクトース誘導性脂肪肝の進行に ChREBPβ が関与することを強く示唆するものである。しかし、ChREBPβ がフルクトース脂肪肝の進行にどの程度寄与しているかは不明である。そのため、ChREBP 遺伝子の Exon 1b を欠損させた ChREBPβ ノックダウンマウスを作製し、フルクトース摂取時の肝脂肪の蓄積が抑制されるか検証するなどの解析が必要であろう。

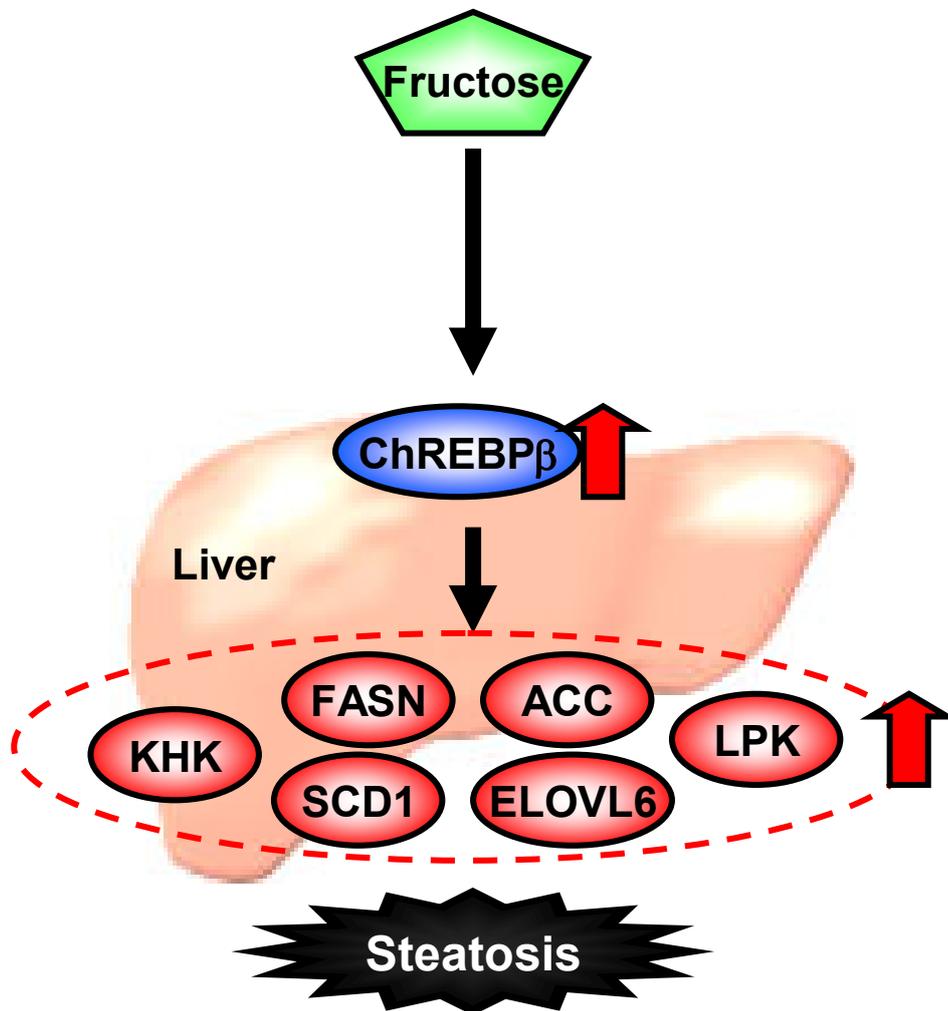


Fig. 4-15 第四章の結果により想定された
 フルクトース誘導性脂肪肝における ChREBPβ の役割

フルクトース摂取に伴う ChREBPβ の発現増大が肝臓の解糖・脂質生合成を促進し、脂肪肝を進行させる。

第五章

総合討論

食の欧米化に伴い、脂肪肝患者の増加が社会的な問題となっている。脂肪肝が進行すると肝障害を含む様々な代謝性疾患が惹起されるため、その機構解明と予防法の確立は急務の課題である。本研究では、肝臓における ChREBP β の機能を検証することで、糖質摂取に伴う脂肪肝進行の機構解明を試みた。以下では各章の検証概要をまとめ、今後の課題や展望などを考察する

◆ 各章の概略

第二章第一節においては、マウス組織の ChREBP アイソフォーム mRNA 発現量を比較解析し、肝臓、脂肪組織、小腸で ChREBP β の発現が認められることを明らかにした。第二節では、培養細胞を用いたレポーターアッセイにより、肝細胞において ChREBP β は糖利用と脂質生合成を強力に誘導する転写因子として機能することを示した。第三節では、ChREBP β プロモーターのレポーターアッセイにより、肝臓における ChREBP β の機能は「ChREBP α の活性化に伴う糖・脂質代謝関連遺伝子の発現誘導を増強すること」であることを示した。

第三章では、ChREBP β の発現が肝臓に与える影響を調べるために、アデノウイルスを用いた ChREBP アイソフォーム過剰発現系を構築した。ChREBP β を過剰発現させた肝実質細胞や肝臓では顕著な脂肪蓄積が認められたことから、ChREBP β の発現増大は脂肪肝の進行に直結することを明らかにした。

第四章第一節では、糖や脂肪の質が異なる食餌を与えたマウスの組織を解析し、肝臓、脂肪組織、小腸における糖質の利用と脂質の貯蔵を ChREBP β が制御している可能性を示した。第二節では、フルクトースを長期摂取させたマウスの肝臓を解析し、フルクトース誘導性脂肪肝の進行に ChREBP β の発現増大が関与することを示した。

以上の検証により、「食事として摂取した糖質の利用と脂質の貯蔵を促進すること」が ChREBP β の役割ではあるが、肝臓における ChREBP β の働きが過剰になると脂肪肝が引き起こされることを示した。

◆ ChREBPβ過剰発現マウス、フルクトース長期摂取マウス、
ChREBP ノックアウトマウスが示す表現型の比較

個体レベル (マウス) で肝臓 ChREBPβの発現を変動させて、その機能を検証した実験は大きく 3 つに分けることができる。

一つ目は ChREBP ノックアウトマウスの実験である [31,35]。このマウスは、ChREBP 遺伝子の発現が完全損なわれているため、ChREBP が肝臓の糖・脂質代謝制御にどの程度寄与しているか調べることができる。さらに、ChREBP の発現が必須な標的遺伝子の同定も容易である。ただし、ChREBP アイソフォームの区別無くノックアウトするようにデザインされているため、ChREBPβ単独の機能を捉えることはできない。また、コンディショナルノックアウトマウスではないので、全身で ChREBP を欠損している点を加味しなければならないし、一過的な遺伝子発現変動の影響を見ることはできない。

二つ目は第三章で行なった ChREBPβ過剰発現マウスの実験である。この実験では、通常マウスにアデノウイルスを投与して ChREBPβを過剰発現させたため、一過的な ChREBPβ発現増大の影響を観察することができる。さらに、アデノウイルスで導入した遺伝子は主に肝臓で発現するため、ChREBPβの発現増大が肝臓に与える影響をダイレクトに捉えることができる。ただし、ウイルスを感染させるので、その影響 (病原性、免疫反応) を加味する必要がある。また、導入遺伝子を過剰に発現させるため、生理的な ChREBPβの機能から逸脱した現象を捉えてしまう可能性がある。

三つ目は第四章第二節で行なったフルクトース長期摂取マウスの実験である。この実験では肝臓で ChREBPβの発現を誘導するフルクトースをマウスに摂取させるだけなので、内因性 ChREBPβの発現によって起こりうる生理的な現象を捉えることができる。ただし、フルクトース摂取によって発現が変動する遺伝子は ChREBPβだけではないため、肝臓に生じる変化は ChREBPβ発現増大以外の要因も含むことを加味する必要がある。

上記のように、これらの検証方法はどれも一長一短であるが、それぞれのマウスの表現型を比較することで、肝臓における ChREBPβの機能や標的遺伝子をより正確に推定することができる。Table 5-1 (次頁) にそれぞれの実験で得られたマウスの表現型を列記した。なお、ChREBP ノックアウトマウスのデータは、スターチ食 (Starch: 60% 重量比) を一週間食べさせた 9 週齢 雄マウスの摂食状態の身体測定指標、肝臓の遺伝子発現量を引用した [31]。

Table 5-1 ChREBPβの発現を変動させたマウスの表現型

対照群と比較して、↑: 増加、↓: 減少、→: 不変

実験系	ChREBP ノックアウト マウス	ChREBPβ 過剰発現 マウス	フルクトース 長期摂取 マウス
対照群	WT マウス	LacZ 過剰発現 マウス	スターチ 長期摂取 マウス
引用	[31]	第三章	第四章
身体測定指標			
体重	→	→	→
肝臓重量	↑	↑	↑
肝臓 TG 量	↓	↑	↑
白色脂肪重量	→	↓	↓
肝臓での発現			
ChREBPβ	↓	↑	↑
LPK	↓	↑	↑
KHK	↓	→	↑
GLUT2	↓	→	→
FASN	↓	↑	↑
ACC1	↓	↑	↑
SCD1	↓	↑	↑
ELOVL6	↓	↑	↑

身体測定指標に関しては、ChREBPβ過剰発現とフルクトース長期摂取により肝臓重量、肝臓 TG 量が増加、ChREBP ノックアウトにより肝臓 TG 量が低下するという点で一致している。ChREBP ノックアウトマウスは肝臓重量の増加が見られるが、これは肝臓中のグリコーゲン量が増加したことによる。

ChREBPβ過剰発現とフルクトース長期摂取により脂肪組織重量の減少が見られるのは、肝臓に取り込まれる糖質の量が増加した分、脂肪組織へ流入する

糖質の絶対量が減少したことが原因であると推察される。ChREBP ノックアウトマウスでは、肝臓で TG 合成が行なわれなくても糖質がグリコーゲン合成に用いられたため、脂肪組織重量に変化が見られなかったと考えられる。多少の差異はあるものの、全てのマウスの表現型は「ChREBPβの発現は肝臓の脂肪蓄積を亢進する」という点で一致している。

肝臓における LPK、FASN、ACC1、ELOVL6 の発現量は、ChREBPβ過剰発現とフルクトース長期摂取によって増加し、ChREBP ノックアウトにより減少している。これは、これらの遺伝子の発現が ChREBPβの発現によって厳密にコントロールされていることを示唆する。実際、肝臓におけるこれらの遺伝子の発現量は ChREBPβの発現量と強く相関することが確認されている (Table 4-3, 4-8)。

一方、GLUT2 は ChREBP ノックアウトにより発現が減少するが、ChREBPβ過剰発現やフルクトース摂取による変動は見られなかった。GLUT2 は肝臓で高発現量であることを加味すると、GLUT2 の発現には ChREBP が必須であるが、ChREBPβの発現増大に伴う上方制御は受けないものと考えられる。実際、肝臓における GLUT2 と ChREBP アイソフォームの発現量に有意な相関関係は認められない (Table 4-3, 4-8)。一方、小腸では GLUT2 と ChREBPβの発現量に正の相関が認められており、ChREBP を介した GLUT2 の転写制御は組織によって差異が見られる (Fig. 4-5C, 4-6B, Table 4-5)。

KHK は ChREBP ノックアウトにより発現が減少し、フルクトース長期摂取により発現が増大したが、ChREBPβ過剰発現による変動は見られなかった。最近、フルクトースが代謝される際の副産物として生成する尿酸が、ChREBP を介した KHK の転写誘導に必要であることが報告された [36]。そのため、KHK の発現には ChREBP が必須であるが、「フルクトース摂取」と「ChREBPβの発現増大」の2つの条件が揃った時に発現が誘導されると考えられる。

以上、3つの実験系を比較することで、ChREBPβはマウス個体の肝臓でも糖・脂質代謝のレギュレーターとして機能すること、ChREBPβの発現増大だけで転写が誘導される遺伝子は LPK、ACC1、FASN、SCD1、ELOVL6 であることを示した。

◆ フルクトース摂取による肝臓 ChREBPβの転写誘導機構について

第四章では、フルクトース摂取により肝臓の ChREBPβ mRNA 発現量の増大が認められた (Fig. 4-1A, 4-9A)。考察では特に触れなかったが、ここではフルク

トースの摂取によって肝臓の ChREBP β の発現が誘導された機構について考察する。この機構に関してはまだ検討の余地があるが、「フルクトースは肝臓の ChREBP α を過剰に活性化し、ChREBP β の発現を誘導する」という機構を考えている。その理由を以下に記す。

第二章第三節の実験では、ChREBP α による ChREBP β の転写制御機構を検証した。高グルコース下では ChREBP α の活性化を介して ChREBP β プロモーター活性が増大し、PKA リン酸化シグナル (Forskolin 投与) や O-GlcNAc 化抑制 (Azaserine 投与) によって、この働きがキャンセルされることを示した (Fig. 2-12, 2-13)。このような ChREBP α の活性化 (脱リン酸化や O-GlcNAc 化) は、糖質の流入に伴う糖代謝産物の増加によって引き起こされる [29,41,51]。そのため、肝臓に取り込まれる糖質の絶対量の増加が ChREBP α を活性化し、ChREBP β の発現を誘導すると考えられる。

フルクトースは肝臓に取り込まれやすい糖質である。実際、C¹⁴を用いたフルクトースの取り込み実験では、ラット肝臓へフルクトースが取り込まれる量はグルコースの5倍以上多いことが示されている [124]。また、ヒトにおいても、フルクトースを経口摂取した際の末梢血中フルクトース濃度はグルコース濃度ほど高くはならない [127]。そのため、食事として摂取したフルクトースは門脈から肝臓に流れ込んだ後、そのほとんどが肝細胞に取り込まれると考えられる。

HepG2 細胞を用いたレポーターアッセイを行なったところ、フルクトースの投与により ChREBP α が活性化されることを確認した (unpublished data)。また、フルクトースを摂取したマウス・ラットの肝臓では核内の ChREBP α タンパク質量が増加することが報告されている [36,70,128]。

以上の点を総じて考察すると、グルコースと比べてフルクトースは肝臓に取り込まれる絶対量が多いために、肝臓内の糖代謝産物量が増加し、これによって ChREBP α が過剰に活性化されることで、ChREBP β の発現が誘導されると予想される。ChREBP β は ChREBP α 活性化に伴う解糖系・脂質生合成系酵素の発現誘導を増強することで、脂肪肝の進行に寄与するものと考えられる (Fig. 5-1)。

フルクトースによる ChREBP β 転写誘導機構の詳細を解明するために、フルクトース摂取時の肝臓 ChREBP α の翻訳後修飾、ChREBP β プロモーター上の ChREBP 結合量を検証するなどの解析が必要である。また、ChREBP β 遺伝子の転写開始点の近くには HNF-4 α や PPAR の標的配列である DR-1 配列が存在することから、ChREBP α 以外の転写因子によって ChREBP β の発現が制御される可

能性も考えられる。そのため、上記の転写因子の関与も含めて、フルクトース摂取に伴う ChREBP β 転写誘導機構の詳細を調べていく必要がある。

◆ 機能性食品開発や創薬の標的として ChREBP β の可能性について

ChREBP アイソフォームの発現や活性を抑制することができれば、脂肪肝の進行を遅延することができると思われ。これまでは ChREBP アイソフォームの存在が知られていなかったため、ChREBP α と ChREBP β の両方の発現を抑制する形で検証がなされてきた。

例えば、ChREBP アンチセンスオリゴ DNA により ChREBP の発現を抑制したマウスでは、フルクトース誘導性脂肪肝が抑制されることが報告されている [129]。また、ChREBP ノックアウトマウスに高糖質食を摂食させた場合も、肝臓の脂肪蓄積が抑制される [31]。しかし、これらのマウスでは ChREBP を介した糖代謝機能が大きく損なわれるため、耐糖能異常を引き起こす。これらの点から、ChREBP α と ChREBP β の両方の機能が完全に損われるような条件では、個体の生命維持に不都合な事象を引き起こされると考えられる。

一方、ショウガやベルベリン (漢方薬に含まれる植物性アルカロイドの一種) を摂取させたラットでは、肝臓の ChREBP と脂質生合成系酵素の発現が減少して脂肪肝の進行が抑制されるが、耐糖能異常は認められない [130,131]。これらのマウス肝臓では ChREBP の発現は減少するが、ChREBP の機能が完全に損なわれている訳ではない。そのため、適度に ChREBP の機能を抑えることで、耐糖能異常を引き起こすことなく脂肪肝の進行を遅延できると考えられる。

本論文の検証により、ChREBP β の過剰発現は脂肪蓄積を引き起こすが、ChREBP α の過剰発現は肝脂肪蓄積を引き起こさないことを示した (Fig. 3-3~3-6)。そのため、肝臓で ChREBP α が発現していても、ChREBP β の発現を抑えれば、脂肪肝の進行を遅延できる可能性が考えられる。ChREBP β の発現のみを選択的に抑制するシステムを構築すれば、ChREBP α の発現は維持されたままなので、個体の耐糖能を損なうことなく脂肪肝の進行を抑えられることが予想される。

また、ChREBP β は小腸における糖質の消化・吸収や、白色脂肪組織の脂肪蓄積に関与する可能性を示した (Fig. 4-3~4-6)。これらの組織で ChREBP β の発現を抑制することができれば、過剰な糖質の消化・吸収を抑え、肥満の進行を遅延できる可能性が考えられる。

本研究により肝臓における ChREBP β の機能を明らかにしたことで、「脂肪肝が進行する分子機構」の一端を示すことができた。この研究から得られた知見を手がかりにして、ChREBP β の発現や活性を制御する方法が見つければ、脂肪肝の予防や治療法の開発に繋がられると期待される。

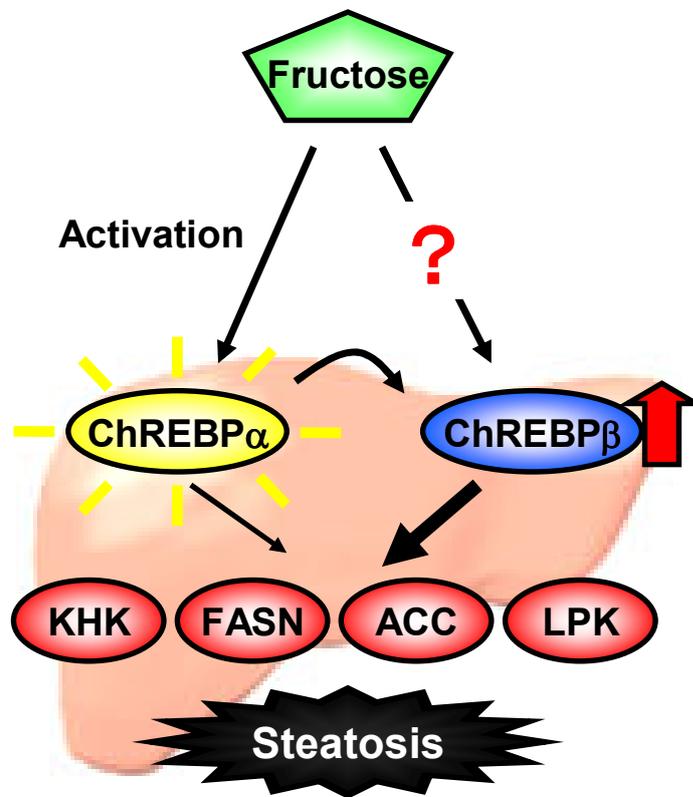


Fig. 5-1 本研究により想定された ChREBP β を介したフルクトース誘導性脂肪肝の分子機構

フルクトースが肝臓に取り込まれることで、肝臓内の糖代謝産物量が増加し、ChREBP α が活性化する。これによって発現が誘導された ChREBP β は、解糖系・脂質合成系酵素の発現を誘導することで脂肪肝の進行に寄与する。

qPCR 用プライマー表

Table I マウス mRNA RT-qPCR 用プライマー配列 –SYBR Green 法–

Gene name	5'- Sequence -3'
	(Upper: Forward, Lower: Reverse)
Transcription factors	
ChREBP	TGCTTCTTGTCCGATATCTCC GTCAGCATTGCCAACATAAGC
ChREBP α	CACCTCTTCGAGTGCTTGAG CATAGCAACTTGAGGCCTTTG
ChREBP β	AGATCGCGTGGAGCTCAGT TAGCAACTTGAGGCCTTTGAA
MLX	GAAGGCACATCAGGACAACC AGAGGCGTTGAAAGACTGGA
SREBP-1a	GAACAGACACTGGCCGAGAT GGGAAGTCACTGTCTTGGTTG
SREBP-1c	GAGCCATGGATTGCACATTT CGGGAAGTCACTGTCTTGGT
LXR α	AGGAGTGTCGACTTCGCAA CTCTTCTTGCCGCTTCAGTTT
LXR β	AAGCAGGTGCCAGGGTTCT TGCATTCTGTCTCGTGGTTGT
PPAR α	CTCGCGTGTGATAAAGC CGATGCTGTCCTCCTTG
Glucose metabolic genes	
LPK	CTTGCTCTACCGTGAGCCTC ACCACAATCACCAGATCACC
KHK	GACACCTTCAATGCCTCTGTC CCTCTCACACAATGCCATCAA

G6PC	ACACCGACTACTACAGCAACAG CCTCGAAAGATAGCAAGAGTAG
GLUT2	GAAGAGGAAGTCAGGGCAAAGA GTAATTGGCATCCGTGAAGAGC
GLUT4	GAGCTGAAGGATGAGAAACGGA CATTGATGCCTGAGAGCTGTTG
SGLT1	AGTTTGCCTATGGAAGTGGGA GATGACGCTGATGACGAAGAG
SI	AACATTTGCTGGTTCGGGAC CGAACTCCAGCATTCCAGTG
MGAM	TACTCTGAACCACCCTCCCTA AGGATCTGCTCACTCTCCATG
Lipid metabolic genes	
SCD1	CCGGAGACCCCTTAGATCGA TAGCCTGTAAAAGATTTCTGCAAACC
ELOVL6	CGGGCTGCGGGTTTC GTGATCTGGGACAAGGTGATGA
PGC1 α	AAGGATGCGCTCTCGTTCA GGAATATGGTGATCGGGAACA
PGC1 β	AGTCAGCGGCCTTGTGTCAA ACTCTGGGACAGGGCAGCA
CPT1a	TGGGCTACTCAGAGGATGG AAGGTGTCAAATGGGAAGG
HMGR	CCGGCAACAACAAGATCTGTG ATGTACAGGATGGCGATGCA
CYP7A1	GGATCCTGAAATCTACCCAGAC GGACACTTGGTGTGGCTCTCT
MTP	GAGAAGTAACCTGAACATCTT TCAATAGCTAGACCACCCTG
ApoB	ATGGGAAGAAACAGGCTTGA TTCTGTCCCACGAATTGACA

Others	
Albumin	CTCAGGTGTCAACCCCAA TCCACACAAGGCAGTCTC
F4/80	CTTGGCTATCATCATGGCTTC TATGGCCAAGGCAAGACATAC
CD11b	ACTTCACGGCTTCAGAGATGA TTGATCTGAACAGGGATCCAG
CD68	CGCAGAATTCATCTCTTCGAG CAAGGTGAACAGCTGGAGAAA
VEGFR2	GAATACACCTGTGTAGCGTCCA GATTTTCATCCCCTACCGAAAG
18S	ACCGCAGCTAGGAATAATGGA GCCTCAGTTCCGAAAACCA

Table II マウス mRNA RT-qPCR 用プローブナンバー –TaqMan probe 法–
TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems)

Gene name	Probe Number
FASN	Mm00662319_m1
ACC1	Mm01304280_m1
HMGCS1	Mm00524111_m1
SREBP2	Mm01306283_m1
S17	Mm00651890_m1

Table III マウス ChIP assay 用 qPCR プライマー配列

Region	5'- Sequence -3' (Upper: Forward, Lower: Reverse)
Mouse ACC1 gene	
ChoRE (-157 ~ -48)	TGCCATGTGAAAACCCATAGC TCGAAAGGCAAGATCCCATTG
Distal (Over 5796 ~ 5913)	ATCCACACAGCAAGGACTGTA CTGGGATTTGAACTCCGGAAC
Mouse ChREBPβ gene	
E-box (-181 ~ -77)	AGAAGGTGATTGGCAGGCTC CTCCTTCTCTCCTTAGCACGT
ChoRE (+112 ~ +258)	ACCCGAGGTCCCAGGATC ACTGGAAACTGAGGTCTGGC
Distal (-5057 ~ -4959)	GTTAGAGATGGTTGTGAGCCG CTTTGGACGATGAAGCTGGAG

() 内は転写開始点を+1 とした場合の増幅配列の位置を示した。
Over は遺伝子 3'末端を 0 とした場合の下流 (3'側) の位置を示す。

引用文献

- 1 橋本悦子、徳重克年 (2010) 肥満と関係のある消化器疾患 肥満と NAFLD・NASH, 肥満と消化器疾患. 日本消化器病学会編 金原出版, 134–148.
- 2 American Gastroenterological Association (2002) American Gastroenterological Association Medical Position Statement: Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **123**, 1702–1704.
- 3 Brent A. Neuschwander-Tetri (2005) Nonalcoholic Steatohepatitis and the Metabolic Syndrome. *Am. J. Med. Sci.* **330**, 326–335.
- 4 Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM & Hobbs HH (2004) Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* **40**, 1387–95.
- 5 Eguchi Y, Hyogo H, Ono M, Mizuta T, Ono N, Fujimoto K, Chayama K & Saibara T (2012) Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver disease in the general population from 2009 to 2010 in Japan: a multicenter large retrospective study. *J. Gastroenterol.* **47**, 586–95.
- 6 Cohen JC, Horton JD & Hobbs HH (2011) Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* **332**, 1519–23.
- 7 Haas JT & Biddinger SB (2010) Dissecting the Role of Insulin Resistance in the Metabolic Syndrome. *NIH Public Access* **20**, 206–210.
- 8 Nakahara T, Hyogo H, Yoneda M, Sumida Y, Eguchi Y, Fujii H, Ono M, Kawaguchi T, Imajo K, Aikata H, Tanaka S, Kanemasa K, Fujimoto K, Anzai K, Saibara T, Sata M, Nakajima A, Itoh Y, Chayama K & Okanoue T (2014) Type 2 diabetes mellitus is associated with the fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty

- liver disease in a large retrospective cohort of Japanese patients. *J. Gastroenterol.* **49**, 1477–84.
- 9 Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, Mccullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N & Ospe- A (2001) Nonalcoholic Fatty Liver Disease A Feature of the Metabolic Syndrome. *Diabetes* **50**, 1844–1850.
- 10 厚生労働省 (2014) 第 6 表 性別にみた死因順位別 死亡数・死亡率 (人口 10 万対) ・構成割合. 平成 25 年(2013) 人口動態調査, 15.
- 11 Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz J-M & Lustig RH (2010) The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **7**, 251–64.
- 12 Tappy L & Lê K-A (2010) Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol. Rev.* **90**, 23–46.
- 13 厚生労働省 (2014) 第 54 表 栄養素等摂取の年次推移. 平成 24 年 国民健康栄養調査 報告書, 168.
- 14 Vos MB & Lavine JE (2013) Dietary fructose in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **57**, 2525–31.
- 15 Biomedical T (1985) Preparation of Pure Hepatocytes and Reticuloendothelial Cells in High Yield From a Single Rat Liver by Means of Percoll Centrifugation and Selective Adherence. *J. Leukoc. Biol.* **38**, 213–230.
- 16 Page DT & Garvey JS (1979) Isolation And Characterization of Hepatocytes and Kupffer Cells. *J. of Immunological Methods* **27**, 159–173.
- 17 Perry RJ, Samuel VT, Petersen KF & Shulman GI (2014) The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* **510**, 84–91.

- 18 Fabienne F & Pascal F (2002) New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose : a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem. J* **366**, 377–391.
- 19 Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hasty a. H, Osuga J -i., Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Ishibashi S & Yamada N (1999) Sterol Regulatory Element-binding Protein-1 as a Key Transcription Factor for Nutritional Induction of Lipogenic Enzyme Genes. *J. Biol. Chem.* **274**, 35832–35839.
- 20 Sato R (2010) Sterol metabolism and SREBP activation. *Arch. Biochem. Biophys.* **501**, 177–81.
- 21 Yellaturu CR, Deng X, Cagen LM, Wilcox HG, Mansbach CM, Siddiqi S a, Park E a, Raghov R & Elam MB (2009) Insulin enhances post-translational processing of nascent SREBP-1c by promoting its phosphorylation and association with COPII vesicles. *J. Biol. Chem.* **284**, 7518–32.
- 22 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.
- 23 Liang G, Yang J, Horton JD, Hammer RE, Goldstein JL & Brown MS (2002) Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J. Biol. Chem.* **277**, 9520–8.
- 24 Koo SH, Dutcher a K & Towle HC (2001) Glucose and insulin function through two distinct transcription factors to stimulate expression of lipogenic enzyme genes in liver. *J. Biol. Chem.* **276**, 9437–45.

- 25 Decauxs J, Antoine B & Kahn A (1989) Regulation of the Expression of the L-type Pyruvate Kinase Gene in Adult Rat Hepatocytes in Primary Culture. *J. Biol. Chem.* **264**, 11584–11590.
- 26 Prip-Buus C, Perdereau D, Foufelle F, Maury J, Ferre P & Girard J (1995) Induction of Fatty-Acid-Synthase Gene Expression by Glucose in Primary Culture of Rat Hepatocytes. Dependency upon Glucokinase Activity. *Eur. J. Biochem.* **230**, 309–315.
- 27 Girard J, Cnrs UPR, Hetzel J & Ferr P (1997) Mechanisms by Which Carbohydrates Regulate Expression of Genes for Glycolytic and Lipogenic Enzymes. *Annu. Rev. Nutr.* **17**, 325–52.
- 28 O’Callaghan BL, Koo SH, Wu Y, Freake HC & Towle HC (2001) Glucose regulation of the acetyl-CoA carboxylase promoter PI in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **276**, 16033–9.
- 29 Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, Arnot D & Uyeda K (2001) A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9116–21.
- 30 Poupeau A & Postic C (2011) Cross-regulation of hepatic glucose metabolism via ChREBP and nuclear receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1812**, 995–1006.
- 31 Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD & Uyeda K (2004) Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 7281–6.
- 32 Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Foufelle F, Dyck JRB, Girard J & Postic C (2006) Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes* **55**, 2159–70.

- 33 Benhamed F, Denechaud P-D, Lemoine M, Robichon C, Moldes M, Bertrand-Michel J, Ratziu V, Serfaty L, Housset C, Capeau J, Girard J, Guillou H & Postic C (2012) The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *J. Clin. Invest.* **122**, 2176–94.
- 34 Rufo C, Teran-Garcia M, Nakamura MT, Koo SH, Towle HC & Clarke SD (2001) Involvement of a unique carbohydrate-responsive factor in the glucose regulation of rat liver fatty-acid synthase gene transcription. *J. Biol. Chem.* **276**, 21969–75.
- 35 Ishii S, Iizuka K, Miller BC & Uyeda K (2004) Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 15597–602.
- 36 Lanasa M a, Sanchez-Lozada LG, Cicerchi C, Li N, Roncal-Jimenez C a, Ishimoto T, Le M, Garcia GE, Thomas JB, Rivard CJ, Andres-Hernando A, Hunter B, Schreiner G, Rodriguez-Iturbe B, Sautin YY & Johnson RJ (2012) Uric acid stimulates fructokinase and accelerates fructose metabolism in the development of fatty liver. *PLoS One* **7**, e47948.
- 37 Ma L, Robinson LN & Towle HC (2006) ChREBP Mlx is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver. *J. Biol. Chem.* **281**, 28721–30.
- 38 Sun H, Jiang T, Wang S, He B, Zhang Y, Piao D, Yu C, Wu N & Han P (2013) The effect of LXR α , ChREBP and Elovl6 in liver and white adipose tissue on medium- and long-chain fatty acid diet-induced insulin resistance. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **102**, 183–92.
- 39 Pedersen KB, Zhang P, Doumen C, Charbonnet M, Lu D, Newgard CB, Haycock JW, Lange AJ, Scott DK, Cb N, Jw H, Aj L & Dk S (2007) The promoter for the gene encoding the catalytic subunit of rat glucose- 6-phosphatase contains two distinct glucose-responsive regions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**, 788–801.
- 40 Filhoulaud G, Guilmeau S, Dentin R, Girard J & Postic C (2013) Novel insights into ChREBP regulation and function. *Trends Endocrinol. Metab.* **24**, 257–68.

- 41 Kabashima T, Kawaguchi T, Wadzinski BE & Uyeda K (2003) Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5107–12.
- 42 Ge Q, Nakagawa T, Wynn RM, Chook YM, Miller BC & Uyeda K (2011) Importin-alpha protein binding to a nuclear localization signal of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP). *J. Biol. Chem.* **286**, 28119–27.
- 43 Stoeckman AK, Ma L & Towle HC (2004) Mlx is the functional heteromeric partner of the carbohydrate response element-binding protein in glucose regulation of lipogenic enzyme genes. *J. Biol. Chem.* **279**, 15662–9.
- 44 Ma L, Sham YY, Walters KJ & Towle HC (2007) A critical role for the loop region of the basic helix-loop-helix/leucine zipper protein Mlx in DNA binding and glucose-regulated transcription. *Nucleic Acids Res.* **35**, 35–44.
- 45 Cha-Molstad H, Saxena G, Chen J & Shalev A (2009) Glucose-stimulated expression of Txnip is mediated by carbohydrate response element-binding protein, p300, and histone H4 acetylation in pancreatic beta cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 16898–905.
- 46 Sakiyama H, Wynn RM, Lee W-R, Fukasawa M, Mizuguchi H, Gardner KH, Repa JJ & Uyeda K (2008) Regulation of nuclear import/export of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP): interaction of an alpha-helix of ChREBP with the 14-3-3 proteins and regulation by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **283**, 24899–908.
- 47 Merla G, Howald C, Antonarakis SE & Reymond A (2004) The subcellular localization of the ChoRE-binding protein, encoded by the Williams-Beuren syndrome critical region gene 14, is regulated by 14-3-3. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 1505–14.

- 48 Denechaud P, Bossard P, Lobaccaro JA, Millatt L, Staels B, Girard J & Postic C (2008) ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J. Clin. Invest.* **118**, 956–964.
- 49 Kawaguchi T, Osatomi K, Yamashita H, Kabashima T & Uyeda K (2002) Mechanism for fatty acid “sparing” effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **277**, 3829–35.
- 50 Bricambert J, Miranda J, Benhamed F, Girard J, Postic C & Dentin R (2010) Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 4316–31.
- 51 Guinez C, Filhoulaud G, Rayah-Benhamed F, Marmier S, Dubuquoy C, Dentin R, Moldes M, Burnol A-F, Yang X, Lefebvre T, Girard J & Postic C (2011) O-GlcNAcylation increases ChREBP protein content and transcriptional activity in the liver. *Diabetes* **60**, 1399–413.
- 52 Sakiyama H, Fujiwara N, Noguchi T, Eguchi H, Yoshihara D, Uyeda K & Suzuki K (2010) The role of O-linked GlcNAc modification on the glucose response of ChREBP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **402**, 784–9.
- 53 Dentin R, Pégrier J-P, Benhamed F, Fougelle F, Ferré P, Fauveau V, Magnuson M a, Girard J & Postic C (2004) Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression. *J. Biol. Chem.* **279**, 20314–26.
- 54 Zelcer N & Tontonoz P (2006) Review series Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J. Clin. Invest.* **116**, 607–614.
- 55 Cha J-Y & Repa JJ (2007) The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J. Biol. Chem.* **282**, 743–51.

- 56 Herman M a, Peroni OD, Villoria J, Schön MR, Abumrad N a, Blüher M, Klein S & Kahn BB (2012) A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature* **484**, 333–8.
- 57 Dentin R, Langin D & Postic C (2012) Hidden variant of ChREBP in fat links lipogenesis to insulin sensitivity. *Cell Metab.* **15**, 795–7.
- 58 Kursawe R, Caprio S, Giannini C, Narayan D, Lin A, D’Adamo E, Shaw M, Pierpont B, Cushman SW & Shulman GI (2013) Decreased transcription of ChREBP- α/β isoforms in abdominal subcutaneous adipose tissue of obese adolescents with prediabetes or early type 2 diabetes: associations with insulin resistance and hyperglycemia. *Diabetes* **62**, 837–44.
- 59 Iizuka K, Wu W, Horikawa Y, Saito M & Takeda J (2013) Feedback looping between ChREBP and PPAR α in the regulation of lipid metabolism in brown adipose tissues. *Endocr. J.* **60**, 1145–1153.
- 60 Eissing L, Scherer T, Tödter K, Knippschild U, Greve JW, Buurman W a, Pinnschmidt HO, Rensen SS, Wolf AM, Bartelt A, Heeren J, Buettner C & Scheja L (2013) De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP- β and metabolic health. *Nat. Commun.* **4**, DOI: 10.1038/ncomms2537.
- 61 Schmittgen TD (2001) Real-time quantitative PCR. *Methods* **25**, 383–5.
- 62 Peng J, Sarkar S & Chang SL (2012) Opioid receptor expression in human brain and peripheral tissues using absolute quantitative real-time RT-PCR. *Drug Alcohol Depend.* **124**, 223–8.
- 63 Gad MZ (1994) The Distribution of Non-Specific Carboxylesterases and Glutathione S-Transferases in Different Rat Liver Cells. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 139–144.
- 64 Lopez BG, Tsai MS, Baratta JL, Longmuir KJ & Robertson RT (2011) Characterization of Kupffer cells in livers of developing mice. *Comp. Hepatol.* **10**, 1–10.

- 65 Maharaj ASR, Saint-Geniez M, Maldonado AE & D'Amore P a (2006) Vascular endothelial growth factor localization in the adult. *Am. J. Pathol.* **168**, 639–48.
- 66 Burke SJ, Collier JJ & Scott DK (2009) cAMP opposes the glucose-mediated induction of the L-PK gene by preventing the recruitment of a complex containing ChREBP, HNF4alpha, and CBP. *FASEB J.* **23**, 2855–65.
- 67 Tang W & Hurley JH (1998) Catalytic Mechanism and Regulation of Mammalian Adenylyl Cyclases. *Mol. Pharmacol.* **240**, 231–240.
- 68 Liu J, Marchase RB & Chatham JC (2007) Glutamine-induced protection of isolated rat heart from ischemia/reperfusion injury is mediated via the hexosamine biosynthesis pathway and increased protein O-GlcNAc levels. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **42**, 177–85.
- 69 Park M-J, Kim D-I, Lim S-K, Choi J-H, Han H-J, Yoon K-C & Park S-H (2014) High glucose-induced O-GlcNAcylated carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) mediates mesangial cell lipogenesis and fibrosis: the possible role in the development of diabetic nephropathy. *J. Biol. Chem.* **289**, 13519–30.
- 70 Ushio M, Nishio Y, Sekine O, Nagai Y, Maeno Y, Ugi S, Yoshizaki T, Morino K, Kume S, Kashiwagi A & Maegawa H (2013) Ezetimibe prevents hepatic steatosis induced by a high-fat but not a high-fructose diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **305**, E293–304.
- 71 Schübeler D, MacAlpine DM, Scalzo D, Wirbelauer C, Kooperberg C, van Leeuwen F, Gottschling DE, O'Neill LP, Turner BM, Delrow J, Bell SP & Groudine M (2004) The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev.* **18**, 1263–71.
- 72 Strahl BD & Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41–45.

- 73 Philip G. Reeves, Forrest H. Nielsen AND George C. Fahey J (1993) Committee Report AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents : Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J. Nutr.* **123**, 1939–1951.
- 74 Nakagawa T, Ge Q, Pawlosky R, Wynn RM, Veech RL & Uyeda K (2013) Metabolite regulation of nucleo-cytosolic trafficking of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP): role of ketone bodies. *J. Biol. Chem.* **288**, 28358–67.
- 75 Kawaguchi T, Takenoshita M, Kabashima T & Uyeda K (2001) Glucose and cAMP regulate the L-type pyruvate kinase gene by phosphorylation dephosphorylation of the carbohydrate response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**, 13710–13715.
- 76 Muratani M & Tansey WP (2003) How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 192–201.
- 77 Pack C-G, Yukii H, Toh-e A, Kudo T, Tsuchiya H, Kaiho A, Sakata E, Murata S, Yokosawa H, Sako Y, Baumeister W, Tanaka K & Saeki Y (2014) Quantitative live-cell imaging reveals spatio-temporal dynamics and cytoplasmic assembly of the 26S proteasome. *Nat. Commun.* **5**, 3396.
- 78 Frankes WW & Kleinschmidtfl JA (1994) Distinct 19 S and 20 S Subcomplexes of the 26 S Proteasome and Their Distribution in the Nucleus and the Cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **269**, 7709–7718.
- 79 Hirano Y, Yoshida M, Shimizu M & Sato R (2001) Direct demonstration of rapid degradation of nuclear sterol regulatory element-binding proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 36431–7.
- 80 Bonala S, Lokireddy S, McFarlane C, Patnam S, Sharma M & Kambadur R (2014) Myostatin induces insulin resistance via Casitas B-lineage lymphoma b

- (Cblb)-mediated degradation of insulin receptor substrate 1 (IRS1) protein in response to high calorie diet intake. *J. Biol. Chem.* **289**, 7654–70.
- 81 Fujita N, Watanabe S, Ichimura T, Tsuruzoe S, Shinkai Y, Tachibana M, Chiba T & Nakao M (2003) Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* **278**, 24132–8.
- 82 Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SW-L, Chen H, Henderson IR, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen SE & Ecker JR (2006) Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis. *Cell* **126**, 1189–201.
- 83 Ushijima T (2005) Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nature* **5**, 3–11.
- 84 Shiraishi M & Hayatsu H (2004) High-Speed Conversion of Cytosine to Uracil in Bisulfite Genomic Sequencing Analysis of DNA Methylation. *DNA Res.* **11**, 409–415.
- 85 Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collist CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL & Paul CL (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1827–1831.
- 86 Adamson AW, Suchankova G, Rufo C, Nakamura MT, Teran-Garcia M, Clarke SD & Gettys TW (2006) Hepatocyte nuclear factor-4alpha contributes to carbohydrate-induced transcriptional activation of hepatic fatty acid synthase. *Biochem. J.* **399**, 285–95.
- 87 Ugai H, Yamasaki T, Hirose M, Inabe K, Kujime Y, Terashima M, Liu B, Tang H, Zhao M, Murata T, Kimura M, Pan J, Obata Y, Hamada H & Yokoyama KK (2005) Purification of infectious adenovirus in two hours by ultracentrifugation and tangential flow filtration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 1053–60.

- 88 Tokairin T, Nishikawa Y, Doi Y, Watanabe H, Yoshioka T, Su M, Omori Y & Enomoto K (2002) A highly specific isolation of rat sinusoidal endothelial cells by the immunomagnetic bead method using SE-1 monoclonal antibody. *J. Hepatol.* **36**, 725–733.
- 89 Kitani H, Takenouchi T, Sato M, Yoshioka M & Yamanaka N (2010) A novel isolation method for macrophage-like cells from mixed primary cultures of adult rat liver cells. *J. Immunol. Methods* **360**, 47–55.
- 90 Morán-Salvador E, López-Parra M, García-Alonso V, Titos E, Martínez-Clemente M, González-Pérez A, López-Vicario C, Barak Y, Arroyo V & Clària J (2011) Role for PPAR γ in obesity-induced hepatic steatosis as determined by hepatocyte- and macrophage-specific conditional knockouts. *FASEB J.* **25**, 2538–50.
- 91 Bieghs V, Verheyen F, van Gorp PJ, Hendriks T, Wouters K, Lütjohann D, Gijbels MJJ, Febbraio M, Binder CJ, Hofker MH & Shiri-Sverdlov R (2012) Internalization of modified lipids by CD36 and SR-A leads to hepatic inflammation and lysosomal cholesterol storage in Kupffer cells. *PLoS One* **7**, e34378.
- 92 Stienstra R, Saudale F, Duval C, Keshtkar S, Groener JEM, van Rooijen N, Staels B, Kersten S & Müller M (2010) Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1 β -dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity. *Hepatology* **51**, 511–22.
- 93 Huang W, Metlakunta A, Dedousis N, Zhang P, Sipula I, Dube JJ, Scott DK & Doherty RMO (2010) Depletion of Liver Kupffer Cells Prevents the Development of Diet-Induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. *Diabetes* **59**, 347–357.
- 94 Im S-S, Yousef L, Blaschitz C, Liu JZ, Edwards R a, Young SG, Raffatellu M & Osborne TF (2011) Linking lipid metabolism to the innate immune response in macrophages through sterol regulatory element binding protein-1a. *Cell Metab.* **13**, 540–9.

- 95 Gauthier K, Billon C, Bissler M, Beylot M, Lobaccaro J-M, Vanacker J-M & Samarut J (2010) Thyroid hormone receptor beta (TRbeta) and liver X receptor (LXR) regulate carbohydrate-response element-binding protein (ChREBP) expression in a tissue-selective manner. *J. Biol. Chem.* **285**, 28156–63.
- 96 Hashimoto K, Ishida E, Matsumoto S, Okada S, Yamada M, Satoh T, Monden T & Mori M (2009) Carbohydrate response element binding protein gene expression is positively regulated by thyroid hormone. *Endocrinology* **150**, 3417–24.
- 97 Xu C, Xu L, Yu C, Miao M & Li Y (2011) Association between thyroid function and nonalcoholic fatty liver disease in euthyroid elderly Chinese. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **75**, 240–6.
- 98 Thakran S, Sharma P, Attia RR, Hori RT, Deng X, Elam MB & Park E a (2013) Role of sirtuin 1 in the regulation of hepatic gene expression by thyroid hormone. *J. Biol. Chem.* **288**, 807–18.
- 99 Stanhope KL & Havel PJ (2010) Fructose consumption: recent results and their potential implications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1190**, 15–24.
- 100 Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, Hatcher B, Cox CL, Dyachenko A, Zhang W, Mcgahan JP, Seibert A, Krauss RM & Chiu S (2009) Consuming fructose-sweetened , not glucose- sweetened , beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight / obese humans. *J. Clin. Invest.* **119**, 1322–1334.
- 101 Yamazaki T, Shiraishi S, Kishimoto K, Miura S & Ezaki O (2011) An increase in liver PPAR γ 2 is an initial event to induce fatty liver in response to a diet high in butter: PPAR γ 2 knockdown improves fatty liver induced by high-saturated fat. *J. Nutr. Biochem.* **22**, 543–53.
- 102 Goda T, Yasutake H, Tanaka T & Takase S (1999) Biochemical and Molecular Action of Nutrients Lactase-Phlorizin Hydrolase and Sucrase-Isomaltase Genes

- Are Expressed Differently Along the Villus-Crypt Axis of Rat Jejunum. *J. Nutr.* **129**, 1107–1113.
- 103 Kellett GL, Brot-Laroche E, Mace OJ & Leturque A (2008) Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annu. Rev. Nutr.* **28**, 35–54.
- 104 Assy N, Nasser G, Kamayse I & Nseir W (2008) Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors. *Can J Gastroenterol* **22**, 811–816.
- 105 Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Goldsmith R, Webb M, Blendis L, Halpern Z & Oren R (2007) Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study. *J. Hepatol.* **47**, 711–7.
- 106 Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Diehl AM, Johnson RJ & Abdelmalek MF (2008) Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **48**, 993–9.
- 107 Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, Unalp-Arida A, Colvin R, Johnson RJ & Diehl AM (2010) Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **51**, 1961–71.
- 108 Steatos H, Kawasaki T, Igarashi K, Koeda T, Sugimoto K, Nakagawa K, Hayashi S, Yamaji R, Inui H, Fukusato T & Yamanouchi T (2009) Rats Fed Fructose-Enriched Diets Have Characteristics of Nonalcoholic Hepatic Steatosis. *J. Nutr.* **139**, 2067–2071.
- 109 Sánchez-Lozada LG, Mu W, Roncal C, Sautin YY, Abdelmalek M, Reungjui S, Le M, Nakagawa T, Lan HY, Yu X & Johnson RJ (2010) Comparison of free fructose and glucose to sucrose in the ability to cause fatty liver. *Eur. J. Nutr.* **49**, 1–9.
- 110 Lubura M, Hesse D, Neumann N, Scherneck S, Wiedmer P & Schu A (2012) Non-Invasive Quantification of White and Brown Adipose Tissues and Liver Fat Content by Computed Tomography in Mice. *PLoS One* **7**, e37026.

- 111 Shimada M, Mochizuki K & Goda T (2011) Feeding Rats Dietary Resistant Starch Reduces both the Binding of ChREBP and the Acetylation of Histones on the Thrsp Gene in the Jejunum. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 1464–1469.
- 112 Mochizuki K, Honma K, Shimada M & Goda T (2010) The regulation of jejunal induction of the maltase-glucoamylase gene by a high-starch/low-fat diet in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**, 1445–51.
- 113 Inoue S, Mochizuki K & Goda T (2011) Jejunal induction of SI and SGLT1 genes in rats by high-starch/low-fat diet is associated with histone acetylation and binding of GCN5 on the genes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. **57**, 162–169.
- 114 Honma K, Mochizuki K & Goda T (2009) Inductions of histone H3 acetylation at lysine 9 on SGLT1 gene and its expression by feeding mice a high carbohydrate/fat ratio diet. *Nutrition* **25**, 40–4.
- 115 Hernández Vallejo SJ, Alqub M, Luquet S, Cruciani-Guglielmacci C, Delerive P, Lobaccaro J-M, Kalopissis A-D, Chambaz J, Rousset M & Lacorte J-M (2009) Short-term adaptation of postprandial lipoprotein secretion and intestinal gene expression to a high-fat diet. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **296**, G782–92.
- 116 Field FJ, Born E & Mathur SN (2003) Fatty acid flux suppresses fatty acid synthesis in hamster intestine independently of SREBP-1 expression. *J. Lipid Res.* **44**, 1199–208.
- 117 Field FJ, Born E, Murthy S & Mathur SN (2001) Regulation of sterol regulatory element-binding proteins in hamster intestine by changes in cholesterol flux. *J. Biol. Chem.* **276**, 17576–83.
- 118 Higuchi N, Kato M, Shundo Y, Tajiri H, Tanaka M, Yamashita N, Kohjima M, Kotoh K, Nakamuta M, Takayanagi R & Enjoji M (2008) Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol. Res.* **38**, 1122–9.

- 119 Takemoto T, Nishio Y, Sekine O, Ikeuchi C, Nagai Y, Maeno Y, Maegawa H, Kimura H & Kashiwagi A (2007) RBMX is a novel hepatic transcriptional regulator of SREBP-1c gene response to high-fructose diet. *FEBS Lett.* **581**, 218–22.
- 120 Omura Y, Nishio Y, Takemoto T, Ikeuchi C, Sekine O, Morino K, Maeno Y, Obata T, Ugi S, Maegawa H, Kimura H & Kashiwagi A (2009) SAFB1, an RBMX-binding protein, is a newly identified regulator of hepatic SREBP-1c gene. *BMB Rep.* **42**, 232–237.
- 121 Nagai Y, Yonemitsu S, Erion DM, Iwasaki T, Stark R, Weismann D, Dong J, Zhang D, Jurczak MJ, Löffler MG, Cresswell J, Yu XX, Murray SF, Bhanot S, Monia BP, Bogan JS, Samuel V & Shulman GI (2009) The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 beta in the pathogenesis of fructose-induced insulin resistance. *Cell Metab.* **9**, 252–64.
- 122 Li J-M, Li Y-C, Kong L-D & Hu Q-H (2010) Curcumin inhibits hepatic protein-tyrosine phosphatase 1B and prevents hypertriglyceridemia and hepatic steatosis in fructose-fed rats. *Hepatology* **51**, 1555–66.
- 123 Van der Wulp MYM, Verkade HJ & Groen AK (2013) Regulation of cholesterol homeostasis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **368**, 1–16.
- 124 H. Bar-On YS (1967) Effect of Glucose and Fructose Administration on Lipid Metabolism in the Rat. *J. Nutr.* **94**, 95–105.
- 125 Griffaton G, Rozen R, Dupuy F LR (1973) Effect of ethanol and fructose on the concentration of acetyl coenzyme A in rat liver. *Arch Int Physiol Biochim* **81(3)**, 409–19.
- 126 Walid H. Salam, Lauren M. Cagen and MH (1988) Regulation of Hepatic Cholesterol Biosynthesis by Fatty Acids: Effect of Feeding Olive Oil on Cytoplasmic Acetoacetyl-Coenzyme A Thiolase,

beta-hydroxy-beta-methylglutaryl-CoA Synthase, and Acetoacetyl-Coenzyme A Ligase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**, 422–427.

- 127 Chong MF, Fielding BA & Frayn KN (2007) Mechanisms for the acute effect of fructose on postprandial lipemia. *Am J Clin Nutr* **85**, 1511–1520.
- 128 Janevski M, Ratnayake S, Siljanovski S, McGlynn M a, Cameron-Smith D & Lewandowski P (2012) Fructose containing sugars modulate mRNA of lipogenic genes ACC and FAS and protein levels of transcription factors ChREBP and SREBP1c with no effect on body weight or liver fat. *Food Funct.* **3**, 141–9.
- 129 Erion DM, Popov V, Hsiao JJ, Vatner D, Mitchell K, Yonemitsu S, Nagai Y, Kahn M, Gillum MP, Dong J, Murray SF, Manchem VP, Bhanot S, Cline GW, Shulman GI & Samuel VT (2013) The role of the carbohydrate response element-binding protein in male fructose-fed rats. *Endocrinology* **154**, 36–44.
- 130 Gao H, Guan T, Li C, Zuo G, Yamahara J, Wang J & Li Y (2012) Treatment with ginger ameliorates fructose-induced Fatty liver and hypertriglyceridemia in rats: modulation of the hepatic carbohydrate response element-binding protein-mediated pathway. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2012**, Article ID: 570948 (doi: 10.1155).
- 131 Xia X, Yan J, Shen Y, Tang K, Yin J, Zhang Y, Yang D, Liang H, Ye J & Weng J (2011) Berberine improves glucose metabolism in diabetic rats by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *PLoS One* **6**, e16556.

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成24年度博士課程 入学
氏名 井上 聖哉
指導教員名 佐藤 隆一郎

論文題目

ChREBP アイソフォームによる糖・脂質代謝関連遺伝子の転写制御機構

第一章 序論

肝臓におけるエネルギーの貯蔵・利用は、生物の生命維持に極めて重要な機能である。しかし、飽食の時代といわれる現代においては、エネルギーの過剰摂取や運動不足などにより、肝臓に過剰な脂肪が蓄積し(脂肪肝)、様々な代謝性疾患が引き起こされることが問題となっている。日本人成人の2~3割が脂肪肝を患っていると報告されており、脂肪肝の成因の機構解明・予防法の確立は急務の課題である。

ChREBP (Carbohydrate Response Element-Binding Protein) は、糖の刺激に応答して糖・脂質代謝関連遺伝子の発現を誘導する転写因子である。最近になって、脂肪組織において ChREBP α と ChREBP β の2つのアイソフォームが存在することが報告された。転写活性が極めて高いとされる ChREBP β の発現は、脂肪組織のインスリン感受性と強く関連することが報告されているが、他の組織における役割は不明である。肝臓における ChREBP β の役割を解明することで、脂肪肝に起因する代謝性疾患の予防や治療法開発に貢献できると考えられる。そこで本研究では、肝臓における ChREBP β の機能に焦点を当て、その生理的な役割について検証した。

第二章 ChREBP アイソフォームの組織分布と機能

これまでに報告のある ChREBP β の研究は、いずれも脂肪組織を対象としたものである。そのため、「肝臓でも ChREBP β は発現しているか」、「これまで報告されてきた ChREBP β の機能 (高い転写活性など) は肝臓でも認められるか」は不明である。本章では、肝臓における ChREBP アイソフォームの機能を解析するにあたって、これらの疑問を明らかにした。

これまでに組織間で ChREBP β の発現を比較した例は無い。そこで、マウス組織における ChREBP アイソフォームの mRNA 発現量を比較解析したところ、ChREBP β は脂肪組織のみならず、肝臓や小腸でも発現が見られることを確認した。また、すべての組織において ChREBP β mRNA 発現量は ChREBP α と比べて少ないことが判明した。

続いて、レポーターアッセイ系を構築し、ChREBP アイソフォームの転写活性を比較したところ、ChREBP β は ChREBP α と比べて転写活性が 50 倍以上も高いことを明らかにした。さらに、この系を用いて詳細な検証を行なったところ、ChREBP β は ChREBP の不活性化に繋がるような PKA リン酸化シグナルの影響を受けづらいことが分かった。このような ChREBP β の高い転写活性は、肝細胞を用いたレポーターアッセイでも認められた。そのため、ChREBP β は発現量こそ低いものの、その高い転写活性により、肝臓の糖利用と脂質合成を強力に誘導する転写因子であることが示唆された。

肝細胞を用いて ChREBP β の転写制御機構について検証したところ、ChREBP α の活性化や ChREBP β 自身の発現増大により ChREBP β の転写が誘導されることが明らかになった。これらの現象は *in vivo* でも認められたため、肝臓における ChREBP β の役割は「ChREBP α の活性化に伴う糖・脂質代謝関連遺伝子の発現誘導を増強すること」であると考えられた (Fig. 1)。

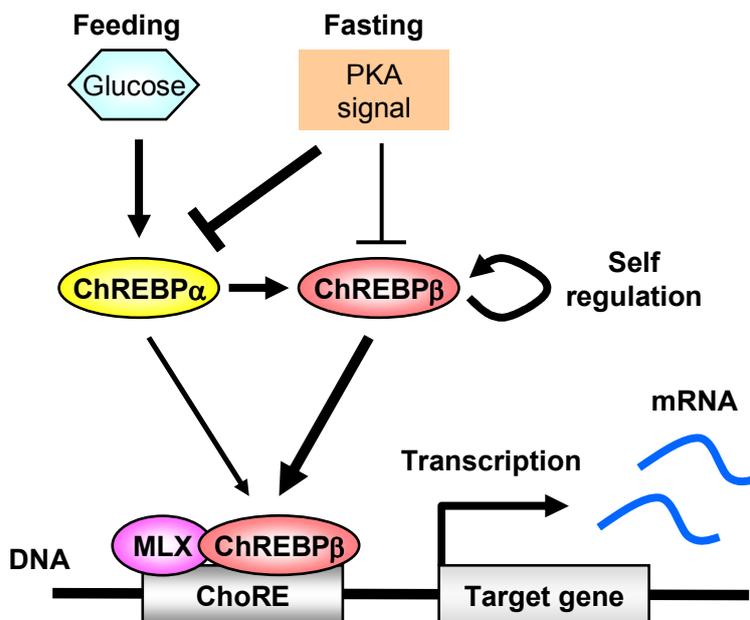


Fig. 1 第二章の結果により想定された肝臓における ChREBP β の役割 (MLX: ChREBP とヘテロダイマーを形成する転写因子)

第三章 ChREBPβの発現が脂肪肝の進行に及ぼす影響

第二章により、ChREBPβの発現増大は肝臓の糖利用と脂質合成を強力に誘導する可能性が示唆された。本章では、「ChREBPβの発現増大が脂肪肝を進行させる」という直接的な証拠を得るため、マウス肝実質細胞、あるいはマウス肝臓に ChREBPβを過剰発現させた場合に、糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量と脂肪蓄積量にどのような変化が生じるか調べた。遺伝子導入にはアデノウイルス法を採用した。

LacZ をコントロールとして、マウス肝実質細胞に ChREBP アイソフォームを過剰発現させたところ、ChREBPβを過剰発現させた細胞で脂肪滴の蓄積が認められた。これと同調して、ChREBPβを過剰発現させた細胞で解糖系・脂質合成系酵素遺伝子の発現増大が認められた。このような変化は、ChREBPαを過剰発現させた細胞では認められなかった。

続いて、アデノウイルスを尾静脈注射することにより、マウスの肝臓で LacZ、あるいは ChREBPβを過剰発現させた。これらのマウスは高糖質食を自由摂食させて2週間飼育した。ChREBPβを過剰発現させたマウスでは、肝臓重量、肝臓脂質量、血中中性脂肪量、肝傷害マーカーが増加し、脂肪肝の進行が認められた (Fig. 2、右)。肝臓の遺伝子発現を解析した結果、ChREBPβを過剰発現させたマウスの肝臓では、脂質合成系酵素の発現が顕著に増大していた。

さらに、上記のマウス肝臓で見られた脂肪蓄積が肝実質細胞に由来するか調べるため、ChREBPβを過剰発現させたマウスの肝臓から肝実質細胞と非実質細胞を単離した。ChREBPβを過剰発現させたマウスから得られた肝実質細胞には脂肪滴を蓄積しているものが多く見られた。また、アデノウイルスによる ChREBPβの発現増大は肝実質細胞と非実質細胞の双方に認められたが、脂質合成系酵素の発現増大が認められたのは肝実質細胞のみであった。以上の結果により、肝実質細胞における ChREBPβの発現増大が脂質合成系酵素の発現誘導を介して脂肪肝をもたらしたと結論付けた。

本章では、肝臓 (肝実質細胞) における ChREBPβの発現増大は脂肪肝の進行に直結し、それに伴って肝障害を含む代謝性疾患を惹起することを示した。

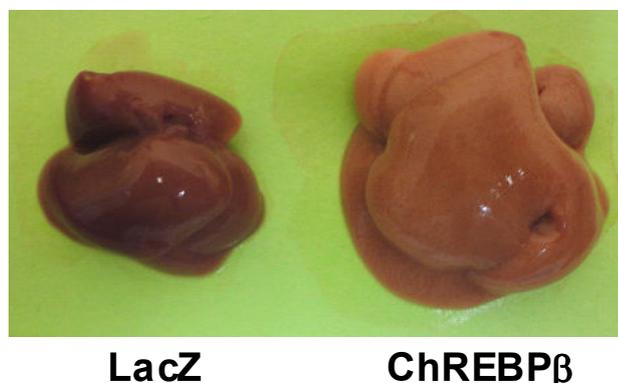


Fig. 2 ChREBPβを過剰発現させたマウスの肝臓 (右画像)

第四章 ChREBPβの発現が変動しうる食事内容の探索

再摂食により肝臓 ChREBPβの発現が増大することを示したが (第二章)、どのような食品がどの組織の ChREBPβの発現誘導をもたらすかは分かっていない。そこで、様々な食事を与えたマウス組織の遺伝子発現量を解析することで、ChREBPβの生理的な役割を調べた。

マウスに与えた食事は、高糖質食として「スターチ食」および「フルクトース食」、高脂肪食として「ラード食」および「大豆油食」の 4 種類である。これらの食事を一週間与えたマウスの組織を解析した結果、高脂肪食を与えたマウスと比較して、高糖質食を与えたマウスの肝臓、白色脂肪組織、小腸で ChREBPβの発現増大が認められた。これと同調して、肝臓と白色脂肪組織では解糖系・脂肪合成系酵素遺伝子、小腸では糖質消化吸収関連遺伝子の発現増大が認められた。

また、スターチ食を摂取させたマウスと比較して、フルクトース食を摂取させたマウスの肝臓では、ChREBPβと解糖系・脂肪合成系酵素の発現が顕著に増大し、脂肪肝の進行が認められた。このマウスの表現型は、アデノウイルスにより ChREBPβを過剰発現させたマウス (第 3 章) と類似していた。

以上の検証により、食事として摂取した糖質の利用と貯蔵を促進することが ChREBPβの役割であるが、継続的なフルクトース摂取により肝臓 ChREBPβの働きが過剰になると脂肪肝が引き起こされる可能性が示された。

第五章 総合討論

本研究では、第二章: ChREBPβは肝臓における糖・脂質代謝の強力なレギュレーターとして機能すること、第三章: 肝臓における ChREBPβの発現増大が脂肪肝の進行に直結すること、第四章: フルクトース誘導性脂肪肝の進行に ChREBPβの発現増大が関与する可能性を示した。

本研究により、肝臓における ChREBPβの機能を明らかにしたことで、「糖類の過剰摂取に伴って脂肪肝が進行する分子機構」の一端を示すことができた。この研究から得られた知見を手がかりにして、ChREBPβの発現や活性を制御する方法が見つければ、脂肪肝の予防や治療法の開発に繋がられると期待される。

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なわれたものです。本研究を行なうにあたり、多くの方々にご協力頂きました。

本研究を遂行するにあたり、始終熱心なご指導と有益なご助言を賜り、日々のディスカッションを通じて研究者としての姿勢をご教授くださいました、食品生化学研究室 佐藤隆一郎教授に心より感謝致しますとともに、厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、ディスカッションを通じて論理的な考え方をお示しいただき、本研究を在るべき方向へ導いて下さいました、食品生化学研究室 井上順准教授に心より感謝致しますとともに、厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、適切にご指導、ご助言を賜るとともに、研究に没頭できる環境を整えて下さいました、食品生化学研究室 清水誠助教に心より感謝致しますとともに、厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、実験や研究の進め方を丁寧にご指導頂き、正しく導いて下さいました、東京大学高齢社会総合研究機構リーディング大学院 橋詰力特任助教に心より感謝致しますとともに、厚く御礼申し上げます。

第四章の研究を遂行するにあたり、研究用 X 線装置の使用・遵守事項に関してご指導賜りました、東京大学総括プロジェクト機構 総括寄付講座「食と生命」研究室 加藤久典教授、大谷りら博士に心より感謝申し上げます。

食品生化学研究室の皆様には公私共に様々な面で支えていただきました。篠田旭弘博士、李娟博士には、実験方法や研究の進め方に関してアドバイスを賜りました。同期の佐々木崇修士とは、ともに学び、ともに協力し合い、数多くの場面で支えていただきました。研究室の皆様にご心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、経済面でご支援賜りました、日本学術振興会に感謝申し上げます。

最後に、東京大学での 3 年間の研究生生活を送る上で支えていただいた恩師、友人、そして、多大なご支援と温かい励ましの言葉をいつも送り続けてくれた両親にご心より感謝申し上げます。

2015 年 3 月 24 日

井上 聖哉