

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月7日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09436

研究課題名(和文) 甲状腺ホルモンはいかにしてエネルギー代謝を亢進させるか

研究課題名(英文) Effects of thyroid hormone on energy metabolism-related gene transcription

研究代表者

岩崎 泰正 (Iwasaki, Yasumasa)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：30303613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：T3がエネルギー代謝全般を促進する分子機序解明のため、T3応答遺伝子の網羅的解析を行った。その結果解糖系/PPP(GK,PFK2,G6PD)、ミトコンドリア(POLG1,NRF2,Tfam,CYC1,UCPs,ANTs)、FFA合成(CS,ACLY,ACC,FAS,SCD)、TG代謝(ME,THRP,GPD1,GPAT3,HSL)を同定した。特に新規標的遺伝子GPAT3を詳細に解析し、プロモーター上のTRE(DR4,-447/-432bp)を介したT3の直接効果を変異解析およびEMSAで確認した。T3は糖脂質ミトコンドリア代謝関連遺伝子を幅広く誘導しエネルギー代謝を促進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have tried to elucidate the molecular mechanism of thyroid hormone (T3)-induced energy metabolism by comprehensive analysis of T3-target genes. Among the carbohydrate, lipid, and mitochondria-related genes, we have identified T3-inducible genes as follows: glycolysis/PPP(GK,PFK2,G6PD), mitochondria (POLG1,NRF2,Tfam,CYC1,UCPs,ANTs), FFA synthesis (CS,ACLY,ACC,FAS,SCD), TG synthesis/catabolism (ME,THRP,GPD1,GPAT3, HSL). Then we have focused on the de novo T3-target gene GPAT3 and further examined the mechanism of T3 effect on GPAT3 gene transcription. We identified a TRE on its promoter (DR4 type,-447/-432bp) and confirmed its role by deletion analysis and gel shift assay. Overall, T3 induces a variety of metabolic genes, and facilitate both anabolic and catabolic facets of energy metabolism.

研究分野：内分泌代謝

キーワード：甲状腺ホルモン 糖代謝 脂質代謝 エネルギー代謝 遺伝子転写調節

### 1. 研究開始当初の背景

甲状腺ホルモンは糖・脂質代謝全般を亢進させることによりエネルギー代謝を活性化することが知られている。しかし核内受容体に属する甲状腺ホルモン受容体 (TR、TR1) は全身に存在し、その活性化による遺伝子転写制御効果も多岐に亘るため、甲状腺ホルモンがいかなる標的遺伝子の転写を促進して全身的な代謝効果を発揮しているのか、その分子機序の詳細は未だ明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

甲状腺ホルモン標的遺伝子を網羅的に解析することにより甲状腺ホルモン作用の全体像を把握する目的で、解糖系遺伝子、酸化的リン酸化 (oxphos) 関連遺伝子、ペントースリン酸系 (PPP) 関連遺伝子、脂肪酸合成関連遺伝子、中性脂肪合成・分解関連遺伝子、およびミトコンドリア機能に関連する遺伝子など、栄養・エネルギー代謝関連遺伝子をほぼ網羅する数百の遺伝子を対象として、甲状腺ホルモンが直接標的とする遺伝子の同定を試みた。

### 3. 研究の方法

上述した数百種類のヒト遺伝子転写調節領域 (各 2kb、遺伝子によっては複数のプロモーターあり) をクローニングしてレポータープラスミドに組み込んだコンストラクトを作成し、ヒト肝細胞株 (HepG2, HuH7) に遺伝子導入したのち、甲状腺ホルモン (TH) (T3, 10 nM) が各遺伝子の転写活性におよぼす効果を、レポーターアッセイにより解析した。一部の遺伝子では、変異プロモーターコンストラクト; deletion mutants, site-directed mutagenesis) を作成して詳細な検討を行い、甲状腺ホルモン受容体の直接的な結合部位の同定を試みた。

### 4. 研究成果

1) ミトコンドリア関連遺伝子の中では、oxphos 関連遺伝子 CYP1 のほか、POLG1, NRF2, Tfam などゲノムにコードされたミトコンドリア構成蛋白遺伝子の発現を調節する転写因子の遺伝子自体が T3 により誘導された。この事実は TH がミトコンドリア新生および機能維持に中枢的な役割を果たしていることを示している。

2) ミトコンドリアで産生された ATP は ANT1-4 のトランスポーターを通過して細胞質内に輸送される。TH は特に ANT1 遺伝子の転写を強く誘導した。TH はミトコンドリアで産生された ATP の細胞質内への輸送を促進するものと推察される。

3) 糖は解糖系 (GK, PFK2 など) を経

てピルビン酸に変換され、ミトコンドリア内の TCA 回路に入って酸化的リン酸化を経て ATP 産生源になると同時に、余剰の糖は脂肪酸合成系 (CS, ACLY, CS, ACC1/2, FAS, SCD1 などが関与) に流入し、NADPH 供給 (PPP 系の G6PD, リンゴ酸代謝系の MDH, ME などが関与) を介した還元力のもとに長鎖脂肪酸に変換される。今回の検討において、TH は、上記遺伝子群の転写活性を軒並み増加させた。

4) 合成された脂肪酸は、G3P に組み込まれて中性脂肪 (TG) に変換され、細胞内の貯蔵エネルギーとして蓄積される。このプロセスに関与する TG 合成系遺伝子のうち、T3 は G3P をリソフォスファチジン酸に変換する酵素のアイソフォームの一つである GPAT3 遺伝子の転写を強力に誘導した。そこで本遺伝子を対象として詳細に検討したところ、プロモーター上の TRE を介した T3 の直接効果が、変異遺伝子を用いた解析、およびゲルシフトアッセイにより確認された (図 1 に、GPAT3 の変異遺伝子解析の結果を、図 2 に GPAT3 の TRE に対する TR /RXR の結合を示すゲルシフトアッセイの結果を示す)。すなわち、ヒト GPAT3 遺伝子の proximal promoter 上に存在し、甲状腺ホルモン応答エレメントの一つである direct repeat (DR4) と強い類似性を有する塩基配列 (-447/-432 bp, AGGTGG-ggcg-AGGGCA) に焦点を当てて解析した結果、その部位を消去すると T3 に対する応答性が消失することが *in vitro* の変異解析により明らかとなった (図 1)。またこの部位への TR/RXR の直接結合を証明する目的でゲルシフトアッセイを施行したところ、図 2 に示す如く、TR と RXR の両者を発現した条件下で明確なバンド形成が認められ (lane 5, 9)、TR に対する抗体で supershift すること (lane 6, 10) から、上記の TRE に TR /RXR のヘテロダイマーが実際に結合していることが確認された。

図 1 : ヒト GPAT3 遺伝子 TRE (DR4) の位置と変異導入による T3 効果の消失

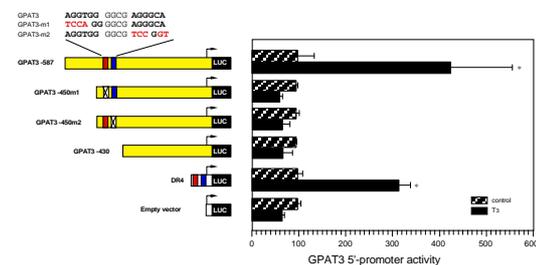
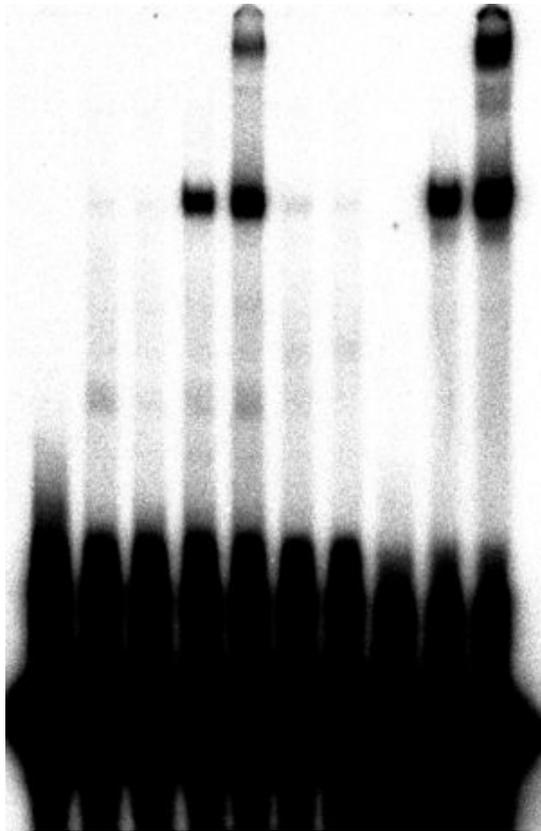


図 2 : ゲルシフトアッセイ解析 (lane 5, 9 が TR/RXR の結合を、lane 6, 10 が抗体による supershift を示す)



4) TH は UCP1,3,5 遺伝子の転写活性を増加させた(熱産生増加作用)。ミトコンドリア由来 ATP 産生の増加は前述の ANT を介して細胞質内に輸送され、cAMP/PKA 系・ホルモン感受性リパーゼ (HSL) を活性化することにより、細胞内脂肪分解を促進する。遊離した脂肪酸はミトコンドリアで酸化分解され、一部は UCP を介して熱源となる。すなわち TH は脂質合成と HSL を介した分解の両者を促進することにより、脂質代謝全般の代謝回転を促進している可能性が示唆される。

以上の結果を総合すると、TH は、細胞内に取り込まれた糖をピルビン酸に変換する解糖系 (GK, PFK2)、ミトコンドリア内の TCA 回路における酸化的リン酸化 (CYC1) および熱産生 (UCP1,3,5) ミトコンドリアで産生された ATP の細胞質への輸送 (ANTs) ミトコンドリア自体の新生 (POLG1, NRF2, Tfam) エネルギー源としてのアミノ酸代謝 (GLUD1)、脂肪酸合成系 (CS, ACLY, ACC1, FAS, SCD1) およびそれに必要な還元力の供給 (G6PD, MDH, ME, THRP) TG 合成・分解系 (GPD1, GPAT3, HSL) など、糖・脂質代謝を中心としたエネルギー代謝系酵素および関連蛋白の遺伝子を広範に誘導し、糖質異化や脂質同化・異化、ならびにミトコンドリアにおける ATP と熱産生を促進することにより、生体のエネルギー代謝全体を下支えしているものと考えられる。すなわち今回の研究によ

り、これまで曖昧であった「甲状腺ホルモンによるエネルギー代謝調節」作用の分子機序、すなわち TH が糖脂質代謝全般において代謝回転を活性化する作用の具体的な標的遺伝子の少なくとも一部を同定し、TH による統合的なエネルギー代謝調節機構の一端を明らかにすることが出来た。

以上の結果から、TH 欠乏時に上述と逆の現象が生じることも推察される。甲状腺ホルモン受容体はリガンド欠乏時に co-repressor と共役して遺伝子転写を抑制することが知られている。すなわち、飢餓や冬眠などエネルギー供給が途絶した際には、中枢性の甲状腺機能抑制を介して前述のエネルギー代謝関連蛋白全般の発現を低下させ、無駄なカロリー消費を抑えて個体保存を図る生存戦略の存在が示唆される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)  
準備中

〔学会発表〕(計0件)

研究会による予備的な発表のみ(論文発表後に予定)

〔図書〕(計0件)  
なし

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)  
なし

取得状況(計0件)  
なし

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

岩崎 泰正

高知大学・医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：30303613

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし