

令和 2 年 4 月 28 日現在

機関番号：33604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00891

研究課題名(和文) インスリン誘導性転写因子の作用機序と食餌と病態による遺伝子発現制御

研究課題名(英文) Action mechanism of the insulin-inducible transcription factor and control of their gene expressions by diets and disease

研究代表者

山田 一哉 (YAMADA, KAZUYA)

松本大学・大学院 健康科学研究科・教授

研究者番号：20263238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：SHARPファミリー遺伝子には、S1とS2の遺伝子が存在する。これらは時計遺伝子であり、肝では、インスリンにより発現が誘導される。

本研究では、3T3-L1脂肪細胞では、インスリンによりS2遺伝子のみ発現が濃度依存的に誘導されること、および、AICARによりSHARPファミリー遺伝子の発現が濃度依存的に誘導されること、膵細胞株であるMIN6細胞の培養液中のグルコース濃度を上昇させた場合に、S2遺伝子の発現が誘導されることを明らかにした。また、糖新生において相反的発現調節に関わるSHARPファミリー遺伝子と長寿遺伝子サーチュインの間で、肝臓での発現において負の相関関係にあることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体のインスリンによる血糖低下機構について、インスリン分泌組織である膵細胞とインスリン応答性組織である肝・筋・脂肪組織との臓器連関について、インスリン誘導性時計遺伝子であるSHARPsという全く新しい視点から詳細を明らかにできる。また、SHARPs遺伝子と長寿遺伝子サーチュインとの発現相関を解析することで、インスリンの健康長寿に対する影響を分子レベルで明らかにすることができる。

以上より、糖尿病の予防や治療薬の開発等にも貢献することができる。

研究成果の概要(英文)：The SHARP family has two genes, SHARP-1 and SHARP-2, respectively. These encode clock genes, and their expressions are induced by insulin in the liver.

In this study, we showed that insulin induced expression of the SHARP-2 gene in a concentration-dependent manner in 3T3-L1 adipocytes, and AICAR induced expression of the SHARP family gene in a concentration-dependent manner in the same cells. It was also shown that the expression of the SHARP-2 gene was induced when the glucose concentration in the culture medium in MIN6 cells was elevated from 5 mM to 25 mM. In addition, it was revealed that there is a negative correlation in the expression in the liver between the SHARP family gene and the longevity gene, sirtuin, which are involved in reciprocal regulation in gluconeogenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：SHARP 時計遺伝子 転写因子 インスリン サーチュイン 血糖調節 寿命

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

私どもは、ラット肝において、高炭水化物食摂取後に誘導される転写因子として、basic helix-loop-helix 型転写抑制因子であり、24 時間を刻む時計遺伝子でもある SHARP-2 (BHLHB2 ともいう) を同定した。また、高炭水化物食による SHARP-2 遺伝子の早期の発現誘導が phosphoinositide 3-kinase (PI 3-K)/ atypical PKC - あるいは、PI 3-K/ mTOR- 経路を介したインスリンの直接作用によるものであること、ならびに、SHARP-2 が糖新生系の律速酵素である *phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)* 遺伝子プロモーター活性を低下させることを示した。SHARP-1 は SHARP-2 とともに SHARP family を形成している。私どもは、インスリンによる血糖低下モデル細胞株であるラット H4IIE 肝癌細胞での SHARP-1 遺伝子の発現も SHARP-2 とは異なる経路でインスリンにより誘導され、その標的遺伝子が PEPCK 遺伝子であることを見いだした。したがって、SHARP family が協働してインスリンによる血糖低下に関与する可能性を考えている。

AMP-activated protein kinase (AMPK) は、飢餓時や運動時などエネルギー消費が亢進している時に活性化されるタンパク質リン酸化酵素であり、細胞内の“エネルギーセンサー分子”であるといわれている。脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンや経口糖尿病治療薬であるメトフォルミンも、AMPK を活性化することが報告されている。いずれの場合でも、生体では AMPK の活性化により、筋肉や脂肪細胞での糖の取り込み促進、ならびに肝臓での糖新生系酵素遺伝子の転写抑制により、血糖低下が生じる。

AMPK の活性化剤である 5-Aminoimidazole-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribose (AICAR) で H4IIE 細胞を処理すると、インスリンと同様、2 時間と早期に一過性に SHARP-2 mRNA の発現が誘導されることを見いだした。しかし、この作用は、従来いわれているように AMPK を介した経路ではなく、PI 3-K/ aPKC 経路によることを明らかにした。

多くの転写因子が他のタンパク質との相互作用を介して作用することから、SHARP-2 がどのような転写因子ネットワークを利用して標的遺伝子の転写抑制を行っているかを検討するために、yeast two-hybrid system を用いてラット肝 cDNA library をスクリーニングした。その結果、転写因子の Sex-determining region-Y-box 6 (Sox6) をクローニングした(未発表)。Sox6 は、膵細胞においてインスリン遺伝子の PDX1 による転写促進を抑制することから注目されている。

一方、近年、食品成分の機能性に注目が集まっており、緑茶ポリフェノールの (-) epigallocatechin-3-gallate (EGCG) や大豆イソフラボンの genistein などは血糖低下活性を有することが報告されている。私どもは、EGCG や genistein で H4IIE 細胞を処理した場合、インスリンと同様、非常に早期に SHARP family 遺伝子の発現が誘導されることを明らかにした。また、腸内細菌叢が生体の健康に及ぼす影響も注目されているが、大豆イソフラボンの daidzein の腸内細菌代謝産物である (S)-Equol も SHARP-2 遺伝子の発現を誘導することも報告してきた。したがって、インスリンによる血糖調節について、SHARP family の遺伝子発現やその機能解析の観点から分子・細胞・個体レベルで包括的に基礎研究を行うとともに、糖尿病などインスリンが直接作用しにくい病態でも、食品成分等により SHARP family 遺伝子の発現を促進させることで、これらの病態を改善しうる可能性を検討する応用研究を行うことも重要であると考えている。

## 2. 研究の目的

本研究では、

(1) 筋・脂肪細胞・膵細胞でのインスリンや AICAR による SHARP family 遺伝子の発現制御機構

(2) 膵細胞でのインスリン遺伝子の転写を SHARP family が抑制するかどうか

(3) SHARP family 遺伝子と長寿遺伝子サーチュイン (SIRT1) との間で、どのような発現関係が認められるのか

を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 筋、脂肪細胞、膵細胞でのインスリンや AICAR による SHARP family 遺伝子の発現制御機構

インスリンや AICAR 処理を行ったマウス 3T3-L1 脂肪細胞やマウス C2C12 筋管細胞において、リアルタイム PCR 法を用いて、SHARP family 遺伝子の発現について検討した。また、培養液中のグルコース濃度を 5 mM から 25 mM へと上昇させた膵細胞株である mouse insulinoma 6 $\beta$  (MIN6 $\beta$ ) 細胞において、リアルタイム PCR 法を用いて、各種遺伝子の発現について検討した。

(2) 膵細胞でのインスリン遺伝子の転写を SHARP family が抑制するかどうか

ラットインスリン遺伝子のプロモーター活性に対する SHARP-2 と Sox6 の機能的相互作用を検討するために、インスリン遺伝子のプロモーター領域を含むルシフェラーゼリポータープラスミドと SHARP-2 や Sox6 の発現ベクターを MIN6 $\beta$  細胞にコトランスフェクションした。

(3) SHARP family 遺伝子と長寿遺伝子サーチュイン (SIRT1) との間で、どのような発現

関係が認められるのか

高分化型肝癌細胞株である H4IIE 細胞を SIRT1 阻害剤の Sirtinol や活性化剤の  $\beta$ -nicotinamide nucleotide (NMN) で処理を行い、リアルタイム PCR 法を用いて、*SHARP family* 遺伝子の発現について検討した。次に、転写抑制因子である SHARP-1 が *SIRT1* 遺伝子のプロモーター活性に与える影響について検討した。ヒト *SIRT1* 遺伝子の転写制御領域の -831 から -1 まで塩基配列をルシフェラーゼレポータープラスミドに挿入し、SHARP-1 発現プラスミドとともに、H4IIE 細胞にトランスフェクションした。その後、各種 5'-欠失ミュータントや塩基配列に突然変異を導入したプラスミドを用いて解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1)筋、脂肪細胞、膵 細胞でのインスリンや AICAR による *SHARP family* 遺伝子の発現制御機構

脂肪細胞では、インスリンにより *SHARP-2* 遺伝子の発現が濃度依存的に誘導されること、および、AICAR により *SHARP family* 遺伝子の発現が濃度依存的に誘導されることが明らかになった。一方、筋管細胞では、両処理は、*SHARP family* 遺伝子発現には影響しなかった。また、MIN6 $\beta$  細胞の培養液中のグルコース濃度を 5 mM から 25 mM へと上昇させたところ、24 時間で、*SHARP-2* 遺伝子の発現が誘導されることが明らかになった。また、興味深いことに、同様に 24 時間で、インスリン遺伝子の発現も誘導されることが明らかになった。

(2)膵 細胞でのインスリン遺伝子の転写を *SHARP family* が抑制するかどうか

*SHARP-2* および Sox6 は単独でインスリン遺伝子の転写を上昇させることが明らかになった。さらに、*SHARP-2* と Sox6 を同時に発現させた場合、転写活性は相乗的に上昇することが示された。

(3) *SHARP family* 遺伝子と長寿遺伝子サーチユイン (*SIRT1*) との間で、どのような発現関係が認められるのか

Sirtinol で処理したところ、*SHARP-1*、*SHARP-2* mRNA とともに、処理後 2 時間と早期に濃度依存的な増加が認められたが、NMN では処理後 4 時間で *SHARP-1* mRNA 量のみが低下した。

次に、転写抑制因子である SHARP-1 が *SIRT1* 遺伝子のプロモーター活性に与える影響について検討したところ、SHARP-1 は *SIRT1* 遺伝子特異的にプロモーター活性を抑制した。

*SHARP-1* は *SIRT1* 遺伝子の -183 から -105 の領域に存在する一つの E box 配列 (5'-CACGTG-3') に結合して、*SIRT1* 遺伝子のプロモーター活性を抑制していることが明らかになった。

以上の結果から、糖新生において相反的発現調節に関わる 2 つの遺伝子が、肝臓での発現において負の相関関係にあること、すなわち、自由摂食後にインスリンによって誘導される時計遺伝子の *SHARP-1* が長寿遺伝子の *SIRT1* 遺伝子の転写を抑制し、インスリン分泌量が少ないカロリー制限食では活性化された *SIRT1* が *SHARP-1* 遺伝子の発現を抑制する可能性を示した (*Biochem. Biophys. Rep.* **22**, 1-6 (2020))。

また、これらの結果と周辺領域の研究をまとめて総説として刊行した(*New Food Industry* **59** (12): 1-10 (2017); **62** (5): 1-7 (2020))。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 塚田晃子、高木勝広、山田一哉	4. 巻 62
2. 論文標題 インスリン誘導性 SHARP-1 遺伝子と SIRT1 長寿遺伝子の発現相関	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 New Food Industry	6. 最初と最後の頁 339-345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asano, K., Tsukada, A., Takagi, K., and Yamada, K.	4. 巻 22
2. 論文標題 An insulin-inducible transcription factor, SHARP-1, represses transcription of the SIRT1 longevity gene.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Rep.	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100743.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 塚田晃子、高木勝広、浅野公介、山田一哉	4. 巻 59
2. 論文標題 インスリン誘導性時計遺伝子 SHARP ファミリーの発現調節機構	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 New Food Industry	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asano, K., Tsukada, A., Takagi, K., and Yamada, K.	4. 巻 22
2. 論文標題 An insulin-inducible transcription factor, SHARP-1, represses transcription of the SIRT1 longevity gene.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Rep.	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2020.100743	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浅野公介、樋口万里子、山田一哉
2. 発表標題 Melatonin による糖新生酵素 PEPCK 遺伝子の発現調節機構の解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塚田晃子、山田一哉
2. 発表標題 グルコースによる SHARP-2 遺伝子の発現調節と Sox6 との相互作用
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林桃子、山田一哉
2. 発表標題 レチノイン酸によるインスリン誘導性転写因子遺伝子の発現調節機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青木真人、三島歩美、山田一哉
2. 発表標題 SHARP-2 と ATBF1 の相互作用の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（第90回日本生化学会大会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 樋口万里子、柳澤有希、山田一哉
2. 発表標題 メラトニンによる糖新生酵素 PEPCK 遺伝子の発現調節機構の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（第90回日本生化学会大会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 塚田晃子、浅野公介、山田一哉
2. 発表標題 インスリン誘導性時計遺伝子とヒト SIRT1 遺伝子の発現
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（第90回日本生化学会大会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 浅野公介、花岡由紀奈、塚田晃子、山田一哉
2. 発表標題 インスリン誘導性転写因子 SHARP-2 と Sox6 の相互作用
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（第90回日本生化学会大会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 塚田晃子、山田一哉
2. 発表標題 グルコースによる SHARP-2 遺伝子の発現調節と Sox6 との相互作用 .
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚田晃子、山田一哉
2. 発表標題 インスリン誘導性転写因子 SHARP-2 はインスリン遺伝子の転写を調節するか？
3. 学会等名 日本食品化学学会 第25回総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚田晃子、山田一哉
2. 発表標題 グルコースによる SHARP-2 遺伝子の発現調節と Sox6 との相互作用
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅野公介、花岡由紀奈、山田一哉
2. 発表標題 インスリン誘導性転写因子 SHARP-2 と Sox6 の相互作用解析
3. 学会等名 第90回日本生化学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----