

平成 21 年 6 月 2 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780247
 研究課題名 (和文) 肝臓でのインスリン応答性転写制御における HNF4 の基幹的役割の解析
 研究課題名 (英文) Analysis for HNF-4-mediated transcriptional regulation in response to insulin stimulation in the liver
 研究代表者
 廣田 恵子 (HIROTA KEIKO)
 筑波大学・大学院生命環境科学研究科・研究員
 研究者番号：00375370

研究成果の概要：

解糖系酵素・Glucokinase 遺伝子の転写はインスリン存在下で活性化され、糖新生酵素・G6Pase 遺伝子の転写はインスリン非存在下で活性化される。これまでに HNF4 がこれら 2 つの遺伝子の転写を活性化することが報告されていた。本研究においては、これら遺伝子のインスリン応答性転写制御における HNF4 の役割を明らかにすることを目的に解析を行った。その結果、FOXO1 と HNF4 とのコンビネーションが、遺伝子依存的に相反する機能を発揮し、インスリン応答性転写制御に重要であることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：転写制御

1. 研究開始当初の背景

肝臓は多数の複雑な酵素系を持ち、2000 種類にも及ぶ化学反応を短時間で行う臓器である。しばしば「生体化学コンビナート」に喩えられ、生体の様々な環境シグナルに応じて反応を制御し、恒常性の維持に重要な役割を果たしている。

HNF4 (Hepatocyte Nuclear Factor-4)

は、1990年に肝臓特異的に発現する核内受容体型転写因子としてクローニングされた (*Genes Dev.* FM Sladek et. al. 1990)。HNF4の機能としては、肝細胞の分化維持に必須だけでなく、糖代謝 (*Nature* Yamagata K. et. al. 1996)、血圧制御 (*JBC* Hirota K. et. al. 1999)、脂質代謝 (*MCB* Hayhurst GP. et. al. 2001)、毒物代謝 (*Nat. Med.* Tirona RG.

et. al. 2003) に関わる遺伝子など、その標的遺伝子は非常に多岐にわたる事が知られている。さらに興味深い事に、肝臓で活性化されている遺伝子の40%以上(約1300遺伝子)にHNF4が結合していることが報告され (Science DT Odem et. al. 2004)、HNF4の転写制御機構の解明は、肝臓の代謝制御解明に大きな意味を持つと注目されている。しかしながら、HNF4が上述した複数の代謝に関連する遺伝子群をそれぞれのシグナルに応じていかに制御しているのかは全く不明である。

2. 研究の目的

糖代謝に着目すると、Glucose-6-phosphatase (G6Pase), Glucokinase (GK) という2つの遺伝子の転写を HNF4 が活性化することが応答者を含む別々のグループから報告されている (Int. J. Mol. Med. Hirota K. et. al. 2005 他)。これら2つの酵素は、解糖系 (糖分解経路) と糖新生 (糖生合成経路) という2つの全くの逆経路の律速酵素である。解糖系の律速酵素・GK 遺伝子の転写はインスリン存在下で活性化され、糖新生の律速酵素・G6Pase 遺伝子の転写はインスリン非存在下で活性化される。従って、G6Pase と GK の転写は、同時に活性化されることがない。「一つの転写因子 (HNF4) が同時に活性化されることのない2つの遺伝子を活性化する」事は一見矛盾している。そこで申請者はこの制御機構を明らかにし、HNF4 を中心とした糖代謝機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

我々はこれまでに、HNF4 と FOXO1 が結合すること、また FOXO1 が HNF4 の転写活性を遺伝子依存的に制御することを見出していた。そこで、以下の2つの点に焦点を絞り解析を行うこととした。

(1) HNF4-Foxo1 の活性化・抑制化決定機構の解析

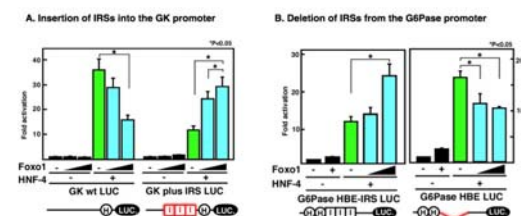
Foxo1 は G6Pase、GK 遺伝子の HNF4 転写活性をそれぞれ活性化・抑制化している。この Foxo1 の HNF4 に対する相反する機能は Promoter 依存的である。そこで Promoter のどの配列が Foxo1 の HNF4 への機能を決定しているのかを解析し、どのように活性化・抑制化の使い分けが行われているのかを明らかにする。

(2) G6Pase、GK 遺伝子発現における絶食・摂食応答性への HNF4 の役割

上記モデルに依れば、インスリン刺激による Foxo1 の核-細胞質間移行が G6Pase、GK 遺伝子発現の絶食・摂食応答に必要であり、さらに Foxo1 の機能発現に HNF4 が必須である。これは、HNF4 が絶食・摂食応答に必須であることを意味している。そこでこれを、マウス個体のイメージング法である「*in vivo* LUC 法」を用いて検証する。

4. 研究成果

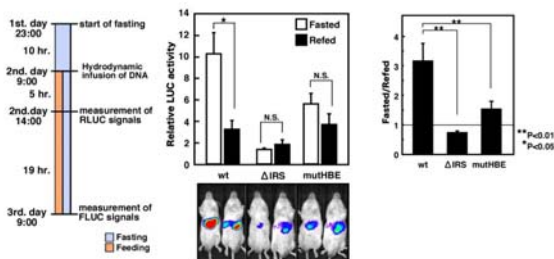
FOXO1結合配列の有無が、FOXO1のHNF4に対する効果を決定している



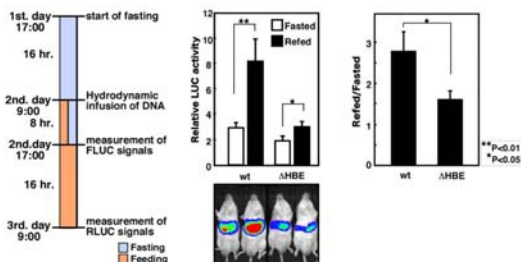
解析の結果、FOXO1 と HNF4 とのコンビネーションが、遺伝子依存的に相反する機能を発揮し、絶食・摂食応答性転写制御に重要であることを明らかにした。次に Foxo1 の HNF4 に対する効果を変化させる要因を探索し、Foxo1 結合配列の有無が遺伝子依存的に Foxo1 の効果を変化させていることを予想した。検証の結果、G6Pase 遺伝子モデルレポーターから Foxo1 結合配列を欠失させると、

HNF4 転写活性に対する Foxo1 の効果が「活性化」から「抑制化」へと変化した。さらに GK 遺伝子に Foxo1 結合配列を挿入すると、HNF4 転写活性に対する Foxo1 の効果が「抑制化」から「活性化」へと変化した。従って、Foxo1 は HNF4・Foxo1 結合配列のコンビネーションを認識してその活性を変化させている可能性が示唆された。

G6Pase遺伝子のHNF4結合配列は、絶食・摂食応答に必須である



GK遺伝子のHNF4結合配列は、絶食・摂食応答に必要である

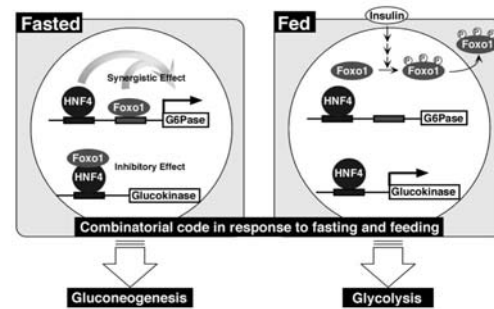


さらに *in vivo* LUC assay を用いて、マウス生体内での G6Pase, Glucokinase 遺伝子プロモーターにおける HNF4 結合配列の役割について解析を行った。

絶食・摂食時の LUC 活性のパターンは G6Pase 遺伝子、GK 遺伝子いずれも内在性の遺伝子発現パターンと一致しており、*in vivo* LUC assay が生体内での栄養状態に応答した遺伝子発現制御をリアルタイムに解析しているのに適していることを実証した。そこで、次に HNF4 結合配列・FOXO1 結合配列に変異を

挿入したレポーターを用いて同様の実験を行った。その結果、G6Pase 遺伝子において Foxo1 結合配列、HNF4 結合配列どちらも絶食・摂食応答性を担っていること、GK 遺伝子の HNF4 結合配列は絶食・摂食応答性に必

Working Model



要であること、が示された。

これらの実験からわれわれは Foxo1、HNF4 を中心とした糖代謝制御モデル提唱し、HNF4・Foxo1 のコンビネーションが糖新生・解糖系という逆方向の代謝を同時に制御しうる分子メカニズムの一端を明らかにした。

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 2 件)

① Hirota, K., Sakamaki, J., Ishida, J., Shimamoto, Y., Nishihara, S., Komada, N., Ohta, K., Yamamoto, M., Tanimoto, K., and Fukamizu, A. A combination of HNF-4 and Foxo1 is required for reciprocal transcriptional regulation of glucokinase and glucose-6-phosphatase genes in response to fasting and feeding. *J. Biol. Chem.* 283, 32432-32441, 2008 査読有

② Hirota, K., Yamagata K, Yoshimochi K, Daitoku H, , Fukamizu A. Bile acid represses the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 promoter activity in a small heterodimer partner-dependent manner. *Int J Mol Med.* 19, 751-756, 2007 査読有

[学会発表] (計 6 件)

① 廣田恵子、深水昭吉

HNF4・FOXO1 における絶食・摂食に応答した糖代謝遺伝子発現制御機構の解析
第1回核内受容体研究会 2009年3月20日, 東京

②堀井陽香里, 廣田恵子, 大徳浩照, 深水昭吉

HMGAl による Foxo1 を介した G6Pase 遺伝子発現調節機構の解明
遺伝情報 DECODE・冬のワークショップ 2009年1月19日, 新潟

③廣田恵子, 石田純治, 坂巻純一, 島本陽子, 西原茂城, 児玉典央, 太田和秀, 山本雅之, 谷本啓司, 深水昭吉

転写因子 HNF4・FOXO1 による糖新生・解糖系律速酵素の転写制御機構の解析
第12回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 2008年11月29日, 熊本

④廣田恵子, 石田純治, 島本陽子, 西原茂城, 児玉典央, 太田和秀, 山本雅之, 谷本啓司, 深水昭吉

A combination of HNF-4 Foxo1 is Required for Reciprocal Transcriptional Regulation of Glucokinase and Glucose-6-phosphatase Genes in Response to fasting and feeding.
THE 21ST NAITO CONERENCE 2008年6月24日, 山梨

⑤廣田恵子, 石田純治, 山本雅之, 谷本啓司, 深水昭吉

A combination of HNF-4 and Foxo1 is required for reciprocal transcriptional regulation of glucokinase and glucose-6-phosphatase genes in response to fasting and feeding.
New Frontier for Lipid and Energy Metabolism 2008年2月18日, 茨城

⑥廣田恵子, 石田純治, 深水昭吉

In vivo LUC assay を用いた糖代謝制御遺伝子発現調節機構の解析
第24回日本疾患モデル学会 2007年8月31日, つくば国際会議場

[その他]

ホームページなど

<http://akif2.tara.tsukuba.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣田 恵子 (HIROTA KEIKO)
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・
研究員

研究者番号: 00375370

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし