

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：33604

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20129

研究課題名(和文)概日リズム調節因子・メラトニンは血糖上昇ホルモンとして肝臓に作用するか？

研究課題名(英文) Melatonin stimulates transcription of the rat phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in hepatic cells

研究代表者

浅野 公介 (ASANO, KOSUKE)

松本大学・人間健康学部・助手

研究者番号：70508449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1)メラトニンは H4IIE 細胞および初代培養肝細胞において、Erk1/2 の活性化を介して PEPCK 遺伝子の発現を誘導する、2) その誘導は遺伝子の転写レベルで生じ、またその誘導には新規タンパク質の合成を必要とする、3) ラット PEPCK 遺伝子プロモーター領域にはメラトニンに応答する正の転写調節領域が存在する、などを明らかにした。ゆえに、本研究により肝糖代謝におけるメラトニンの新たな役割が解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓の糖新生は、血糖の維持に重要な役割を果たす。睡眠に関与するホルモンで知られるメラトニンが、この糖新生に与える影響についてはこれまで明らかにされていなかった。本研究では、肝臓の培養細胞を用いた実験により、メラトニンが転写レベルで糖新生系酵素遺伝子の発現を誘導することを初めて明らかにし、メラトニンが血糖上昇に関与する可能性を示した。したがって、さらにこの研究が進めば、その知見が過剰摂取による血糖上昇リスクの根拠となり、適正な摂取基準の設定につながる事が期待できる。さらに、メラトニンやその経路分子を標的として血糖を調節するという糖尿病治療への応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined whether melatonin affects gene expression of the key gluconeogenic enzyme, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK). We found that melatonin treatment increased PEPCK mRNA levels in rat highly differentiated hepatoma (H4IIE) cells and primary cultured hepatocytes. We also report that the effect of melatonin was blocked by inhibitors of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase (MAPK/ERK), RNA polymerase II, and protein synthesis. Furthermore, the phosphorylated (active) forms of ERK1 and ERK2 (ERK1/2) increased 15 min after melatonin treatment. We performed luciferase reporter assays to show that melatonin specifically stimulated promoter activity of the PEPCK gene. Thus, we conclude that melatonin induces PEPCK gene expression via the ERK1/2 pathway at the transcriptional level, and that induction requires de novo protein synthesis.

研究分野：分子栄養学、生化学、分子生物学

キーワード：糖新生 PEPCK メラトニン H4IIE 細胞 転写調節 インスリン デキサメタゾン

## 1. 研究開始当初の背景

肝の糖新生は、血糖の維持および上昇に重要な役割を果たし、血糖上昇ホルモンによる糖新生系酵素遺伝子の転写促進により亢進される。一方、概日リズム調節ホルモンであるメラトニンが血糖調節、特に糖新生系に与える影響については、不明な点が多い。私どもは、予備実験で、ラット肝モデル細胞株である H4IIE 細胞を用い、メラトニンが転写レベルで糖新生系酵素ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (*phosphoenolpyruvate carboxykinase; PEPCK*) 遺伝子の発現を誘導することを見出した。これは、肝において、メラトニンが血糖上昇に関与する可能性が示唆するものである。

## 2. 研究の目的

本研究では、メラトニンが血糖上昇に関与するかどうかを明らかにするため、肝におけるメラトニンによる糖新生系酵素遺伝子の発現調節機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) メラトニンによる糖新生系酵素遺伝子の発現条件解析

メラトニンが *PEPCK* 遺伝子をどの濃度、時間で誘導するかを明らかにするために、H4IIE 細胞やラット初代培養肝細胞を、様々な濃度、時間でメラトニン処理を行い、これら細胞における *PEPCK* 遺伝子の mRNA の発現変化を解析した。

### (2) メラトニンによる糖新生系酵素遺伝子の発現調節機構の解析

メラトニンによる *PEPCK* 遺伝子の発現誘導に転写および翻訳が関与するかを、転写阻害剤もしくは翻訳阻害剤を用い検討した。また、メラトニンにより *PEPCK* 遺伝子の転写が促進されるかを、レポーターアッセイにより検討した。さらに、メラトニン応答配列を決定するため、デリベーションアッセイを行った。次に、メラトニンによる糖新生系酵素遺伝子の発現誘導がどのようなシグナル伝達分子が関与するのかを検討するため、シグナル伝達分子に対する各種阻害剤を用い検討した。さらに、候補シグナル伝達分子がメラトニンにより実際に活性化するかをウェスタンブロット法により解析した。

### (3) 血糖調節ホルモンがメラトニンによる糖新生系酵素遺伝子発現調節に与える影響を解析する。

メラトニンによる *PEPCK* 遺伝子の発現誘導がインスリンやグルココルチコイドであるデキサメタゾンにより調節されるかを検討した。

## 4. 研究成果

(1) H4IIE 細胞を用い、メラトニンが *PEPCK* 遺伝子の発現を誘導するかを検討した。様々な濃度、時間でメラトニン処理した結果、*PEPCK* mRNA 量が濃度依存的かつ経時的に増加した。また、初代培養肝細胞を用い、メラトニンが *PEPCK* 遺伝子の発現を誘導するかを検討した。その結果、メラトニン処理後 2 時間で *PEPCK* mRNA 量が増加した。次に、その発現誘導に転写および翻訳が関与するかを、転写阻害剤 actinomycin D もしくは翻訳阻害剤 cycloheximide を用い検討した。その結果、その誘導は両者により完全に阻害された。

(2) メラトニンにより *PEPCK* 遺伝子の転写が促進されるかを、レポーターアッセイにより検討した。その結果、ラット *PEPCK* 遺伝子の -467 ~ +69 までのプロモーター領域を含むレポータープラスミドではメラトニンによりプロモーター活性が上昇した。さらに、このメラトニン応答領域を解析するため、この領域を 5' 側から -397、-224、-128 までそれぞれ欠失させたコンストラクトを用いレポーターアッセイを行った。その結果、いずれもメラトニンにより活性上昇がみられたが、その活性値は -467 までの領域と比べ、いずれも低下した。

(3) メラトニンによる *PEPCK* 遺伝子の発現誘導に関わるシグナル伝達経路について、各種シグナル伝達分子阻害剤を用い検討した。その結果、mitogen-activated protein kinase (MAPK) の阻害剤である PD98059 のみ、その誘導が抑制された。次に、メラトニンが MAPK に属する Erk1/2 を活性化するかをウェスタンブロット法により解析した。その結果、非リン酸化型 Erk1/2 量は変化せず、リン酸化型 Erk1/2 がメラトニン処理 15 分後に検出された。

(4) メラトニンによる発現誘導がインスリンやグルココルチコイドであるデキサメタゾンにより調節されるかを検討した。デキサメタゾン処理した H4IIE 細胞では *PEPCK* mRNA が誘導され、この誘導はメラトニンでさらに促進された。これに対し、インスリン処理では、メラトニンの存在に関わらず *PEPCK* mRNA 量が低下した。デキサメタゾンおよびメラトニンが相乗的に *PEPCK* 遺伝子の発現を誘導し、さらにインスリンはメラトニン存在下において *PEPCK* 遺伝子の発現を優位に抑制することが示された。

以上より、本研究結果として以下 4 点を結論づける。

- 1) メラトニンは H4IIE 細胞および初代培養肝細胞において、Erk1/2 の活性化を介して *PEPCK* 遺伝子の発現を誘導する。
- 2) その誘導は遺伝子の転写レベルで生じ、またその誘導には新規タンパク質の合成を必要とする。

- 3) グルココルチコイドであるデキサメタゾンおよびメラトニンが相乗的に *PEPCK* 遺伝子の発現を誘導し、さらにインスリンはメラトニン存在下において *PEPCK* 遺伝子の発現を優位に抑制する。
- 4) ラット *PEPCK* 遺伝子プロモーターの -467 ~ -397 および -128 ~ +69 の領域にはメラトニンに応答する正の転写調節領域が存在する。

これらは、これまで報告されていなかった知見であることから、本研究により肝糖代謝におけるメラトニンの新たな役割が解明されたといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Asano Kosuke, Tsukada Akiko, Yanagisawa Yuki, Higuchi Mariko, Takagi Katsuhiro, Ono Moe, Tanaka Takashi, Tomita Koji, Yamada Kazuya	4. 巻 10
2. 論文標題 Melatonin stimulates transcription of the ratphosphoenolpyruvate carboxykinasegene in hepatic cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 2712 ~ 2721
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13007	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1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、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93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------