

平成 22 年 4 月 12 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790496  
 研究課題名(和文) 肝臓の脂質合成を促進する新たな転写プログラムの同定と制御機構解明  
 研究課題名(英文) Identification and characterization of novel transcription programs required for lipid synthesis in the liver  
 研究代表者  
 原田 永勝 (HARADA NAGAKATSU)  
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教  
 研究者番号：40359914

研究成果の概要(和文)：グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (GPAT)は生体内における脂質合成反応の律速酵素である。GPAT 遺伝子の発現制御機構の解明は肥満や非アルコール性脂肪肝の発症予防あるいは治療手段の開発に大きく貢献するものと期待されている。本研究では、培養細胞および実験動物(マウス)を用いて、摂食や肥満によって誘導される肝臓の GPAT 遺伝子発現亢進メカニズムの一端を解明した。

研究成果の概要(英文)：Glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) acts as a rate limiting enzyme in *de novo* lipid synthesis. GPAT is now a candidate for targeted treatment of the excess lipid accumulation that is associated with obesity and Non-alcoholic Fatty Liver Disease. In the present study, I clarified mechanisms of enhanced GPAT gene expression induced by feeding or obesity using cultured cells and mice.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：代謝栄養学・分子生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：脂質合成, 遺伝子, 転写, マウス, 脂肪肝, mRNA バリエント, プロモーター

## 1. 研究開始当初の背景

飽食の時代を迎えたわが国で最も大きな健康障害の一つに挙げられるものが非アルコール性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) である。成人の 10 人に 1 人が NAFLD、また、NAFLD の 10 人に 1 人は予後不良の非アルコール性脂肪肝炎

(nonalcoholic steatohepatitis: NASH) と推定され、肝硬変や肝不全への移行を防ぐためにも肝脂質蓄積の予防法・治療法の確立は急務である。肝臓における脂質蓄積の亢進は肥満やインスリン抵抗性など栄養状態と密接に関わっているが、その機序および制御機構については未だ不明な点が多い。



肝臓において、中性脂肪を含むグリセロ(リン)脂質の合成には数多くのタンパク質が機能している。中でも律速段階を司る酵素がグリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (GPAT)であり、体内グリセロ(リン)脂質合成の最初のステップであるグリセロール-3-リン酸と脂肪酸アシル CoA のエステル結合を触媒する。これまで、ミトコンドリア型 mtGPAT1 が細胞の全 GPAT 活性の 10~50%を担うと考えられてきたが、残りの GPAT 活性を担う GPAT アイソフォームは不明であった。このような中、申請者は新しい GPAT アイソフォームとして xGPAT1 をクローニングし報告した (Harada N et al. *Mol Cell Biochem.* 297: 41-51, 2007.)。現在までに、mtGPAT1、xGPAT1 とともに肝臓や脂肪組織など脂質合成の盛んな臓器に発現していること、また、遺伝子組み換え技術を用いた GPAT 遺伝子の発現抑制により肝臓脂質合成量が低下することが明らかとなっている。このため GPAT 遺伝子の発現制御機構の解明は、NAFLD の予防あるいは治療手段の開発に大きく貢献するものと考えられてきた。しかし、GPAT の遺伝子発現メカニズムは長らく明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

先行研究において、申請者は mtGPAT1 および新規 xGPAT1 の転写開始点を決定し両遺伝子のプロモーターDNA 配列を同定することに成功した。さらに、肝臓において基礎転写活性に必須の DNA 領域を同定し、転写制御因子が結合する可能性の高い配列モチーフも数多くピックアップした。これを踏まえ本研究では、肝臓において mtGPAT1 および新規 xGPAT1 遺伝子のプロモーター装置を活性化する転写制御因子を同定し、肝臓の脂質合成を促進する GPAT 遺伝子発現亢進プログラムを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) GPAT 遺伝子プロモーターDNA 配列に結合する転写制御因子の同定  
同定した mtGPAT1 および新規 xGPAT1 の発現プロモーター配列について、転写制御因子結合部位のコンピューター解析を行った。また、DNA-タンパク質相互作用の分子生物学的解析と併せ検討することで、両 GPAT 遺伝子のプロモーターに共通に作用する転写因子を検索・同定した。検索・同定した転写制御因子について、GPAT プロモーターDNA への結合をゲルシフト法により確認・検定した。

(2) 同定した転写制御因子の GPAT 遺伝子発現に与える影響の解析  
同定した転写制御因子の発現プラスミドを作成した。作成したプラスミドおよび GPAT プロモーター挿入ホタルルシフェラーゼ発現プラスミドを培養細胞に遺伝子導入しルシフェラーゼレポーターアッセイにより GPAT 転写活性を検討した。また、RNA 干渉法により同定した因子を抑制したときの GPAT 遺伝子発現量を定量的リアルタイム RT-PCR 法により解析した。

(3) 同定した転写制御因子を介した肝臓の GPAT 遺伝子発現亢進メカニズムの解析  
肥満/NAFLD モデルマウスとして db/db マウスを、対照マウスとして db/m+マウスを用いた (図 1)。マウスを絶食下あるいは摂食下で解剖し、肝臓における GPAT および転写制御因子の発現量 (定量的リアルタイム RT-PCR 法)、核内存在量 (ウエスタンブロット法) および GPAT プロモーターDNA への結合量 (クロマチン免疫沈降法) を検討した。

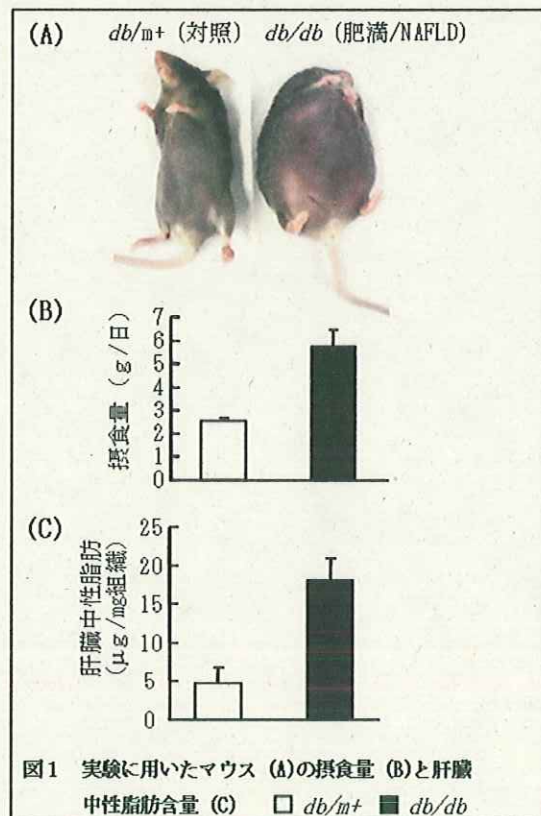


図1 実験に用いたマウス (A)の摂食量 (B)と肝臓中性脂肪含量 (C) □ db/m+ ■ db/db

## 4. 研究成果

GPAT 遺伝子プロモーターDNA 配列に結合する転写制御因子を検討した結果、mtGPAT1 および xGPAT1 の遺伝子発現プロモーターに共通に結合する転写制御因子として SREBP1,



USF1 を得た。ゲルシフト法により、SREBP1 は GPAT プロモーター上の sterol regulatory element および E-box に、USF1 は E-box および estrogen receptor response element 様配列に結合することが明らかとなった。申請者の先行研究では、mtGPAT1、xGPAT1 遺伝子ともに、2つのプロモーター領域（それぞれ 1a および 1b）を有していることがわかって いる (図 2)。

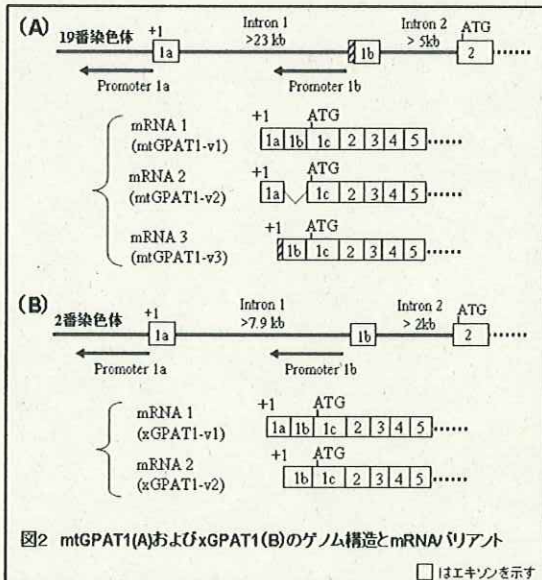


図2 mtGPAT1(A)およびxGPAT1(B)のゲノム構造とmRNAバリエーション

今回、mtGPAT1 遺伝子では 1a プロモーターが、xGPAT1 遺伝子では 1b プロモーターが、SREBP1 により正に調節されることがわかった (図 3)。一方、USF1 は mtGPAT1 遺伝子では 1a および 1b プロモーターに、xGPAT1 遺伝子では 1b プロモーターに作用することが明らかとなった。

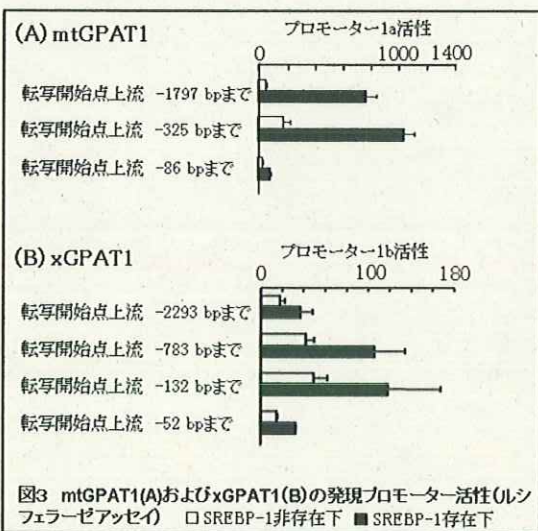


図3 mtGPAT1(A)およびxGPAT1(B)の発現プロモーター活性(シフトアッセイ) □ SREBP-1非存在下 ■ SREBP-1存在下

マウス肝臓において、mtGPAT1 遺伝子の 1a プロモーターおよび xGPAT1 遺伝子の 1b プロ

モーターに制御される mRNA バリエーションの発現は絶食により低下し、摂食後に増加した。一方、xGPAT1 遺伝子の 1a プロモーターに制御される mRNA バリエーションの発現は NAFLD モデルマウスである db/db マウスの肝臓で高値を示した (図 4 にマウス肝臓における GPAT 遺伝子の mRNA 発現量を示した)。

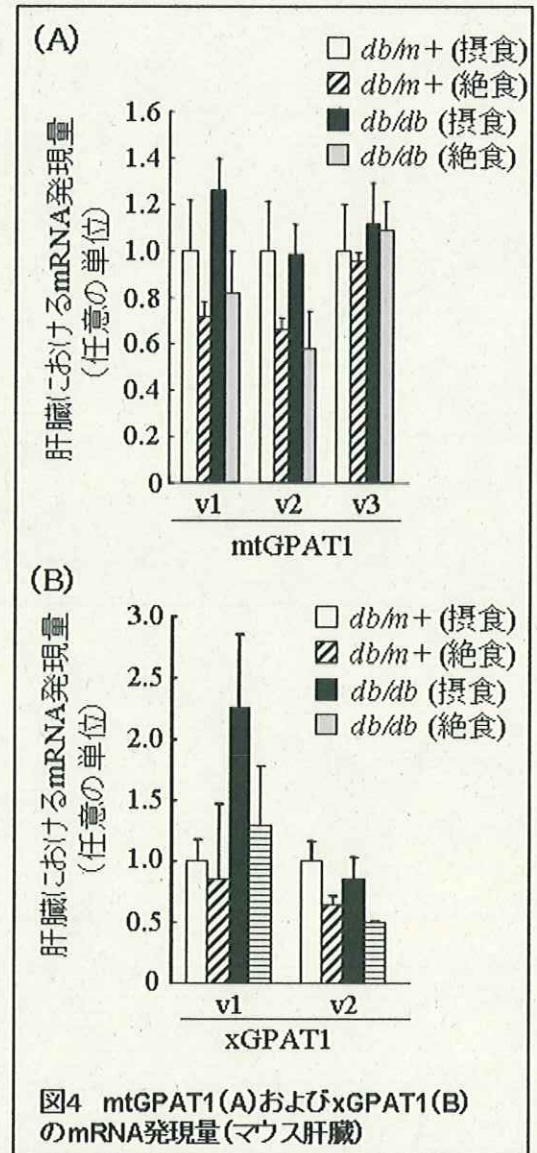


図4 mtGPAT1(A)およびxGPAT1(B)のmRNA発現量(マウス肝臓)

マウス肝臓において、SREBP1 の mRNA 量、核内タンパク質量および GPAT 遺伝子発現プロモーターへの結合量は絶食により低下し摂食により増加した (図 5 にマウス肝臓における SREBP1 mRNA 量および核内 SREBP1 タンパク質発現量を、図 6 に mtGPAT1 遺伝子発現プロモーター 1a への SREBP1 結合量を示した)。マウス肝臓における USF1 の核内量および GPAT 遺伝子発現プロモーターへの結合は絶食/摂食あるいは NAFLD によって影響されなかったが、培養細胞における RNA 干渉法を用



いた検討により、USF1の細胞内における基礎レベルがGPAT遺伝子の発現に重要であることがわかった。

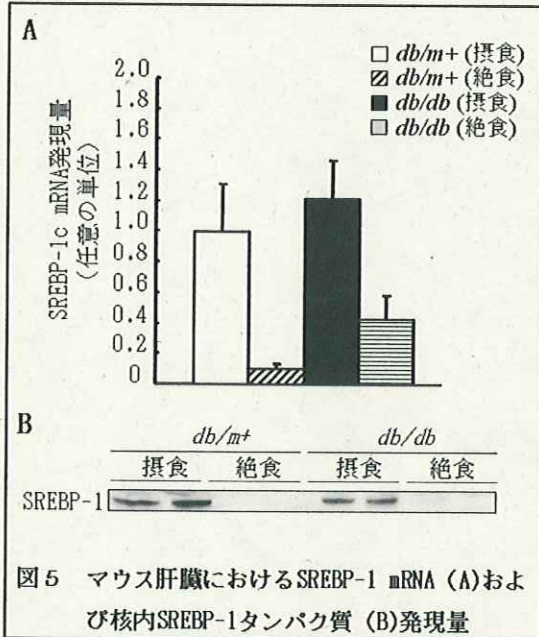


図5 マウス肝臓におけるSREBP-1 mRNA (A)および核内SREBP-1タンパク質 (B)発現量

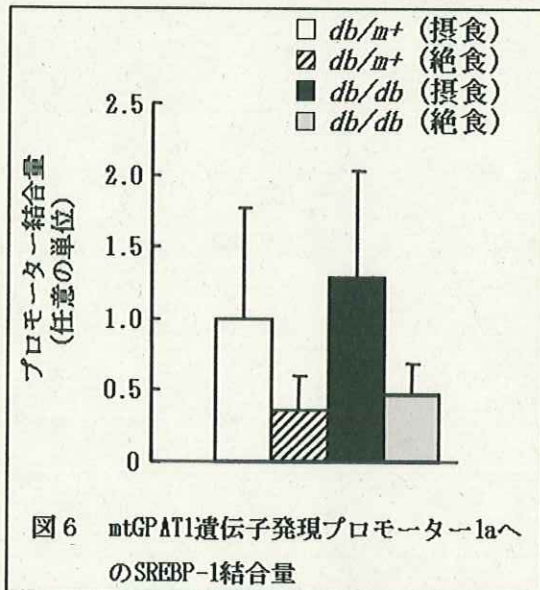


図6 mtGPAT1遺伝子発現プロモーター1aへのSREBP-1結合量

以上の結果から、mtGPAT1とxGPAT1のmRNAバリエーションの中には、摂食により発現が亢進するものやNAFLD特異的に発現が亢進するものがあり、摂食（量や回数）の増加がSREBP1/USF1依存性あるいは非依存性に肝臓のGPAT発現を活性化して脂肪蓄積を引き起こす可能性が示唆された。

これまで、GPATの遺伝子発現機構の詳細は解明されていなかったが、本研究によってその一端が明らかとなった。GPATは現在、肥満やNAFLD治療における新しい分子標的として注目されている。本研究で得られる成果は、肥満やNAFLDの新たな栄養学的、薬理的治療

手段の開発基盤の開拓につながるものと期待される。

## 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2件)

① Masaki Yoshida, Nagakatsu Harada, Keiko Yoshida, Tadahiko Nakagawa, Takaaki Shimohata, Kazuaki Mawatari, Akira Takahashi, Hiroshi Sakaue, Yutaka Nakaya. High Density Lipoprotein inhibits the activation of sterol regulatory element-binding protein-1 in cultured cells. FEBS Lett vol. 584: pp.1217-1222, 2010 査読有

② Masaki Yoshida, Nagakatsu Harada, Hironori Yamamoto, Yutaka Taketani, Tadahiko Nakagawa, Yunjie Yin, Atsushi Hattori, Tomoe Zenitani, Sayuri Hara, Haruka Yonemoto, Aki Nakamura, Masayuki Nakano, Kazuaki Mawatari, Kiyoshi Teshigawara, Hidekazu Arai, Toshio Hosaka, Akira Takahashi, Katsuhiko Yoshimoto, Yutaka Nakaya. Identification of cis-acting promoter sequences required for expression of the glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 gene in mice. Biochim Biophys Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids vol. 1791: pp. 39-52, 2009 査読有

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原田 永勝 (HARADA NAGAKATSU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：40359914