

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月11日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590296

研究課題名（和文）ヘパラン硫酸によるエネルギー代謝制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism involved in energy metabolic regulation by heparan sulfate

研究代表者

永井 尚子 (NAGAI NAOKO)

愛知医科大学・分子医科学研究所・助教

研究者番号：00367799

研究成果の概要（和文）：

本研究では細胞外に存在する糖鎖分子、ヘパラン硫酸（HS）を修飾する酵素の *Hs6st2* ノックアウトマウスにおいてエネルギー代謝が低下し、老齢マウスで脂肪が蓄積していることを示した。よって HS の組成変化が生体のエネルギー代謝を制御し、メタボリックシンドロームの発症に関わる可能性を強く示唆する。エネルギー代謝の制御に関わる褐色脂肪組織では HS の組成変化が観察された。さらに褐色脂肪組織では抗肥満作用を持つタンパク質 FGF21 のシグナル活性が低下しており、全身的には甲状腺機能低下の状態も観察された。

研究成果の概要（英文）：

Heparan sulfate (HS) is a glycosaminoglycan chain which localizes extracellularly where it plays important roles in various biological processes. Heparan sulfate 6-*O*-sulfotransferase-2 (*Hs6st2*) is one of the enzymes that add sulfate groups to HS. Here we report that male *Hs6st2* knockout mice showed reduced energy metabolism. Thus, 6-*O*-sulfation in HS seems to play an important role in mediating energy metabolism and alteration of the HS composition may result in metabolic syndrome phenotypes. Heparan sulfate 6-*O*-sulfation was reduced in brown adipose tissue, a major tissue regulating energy metabolism. When cultures of brown adipocytes from wild type and *Hs6st2* knockout mice isolated and differentiated *in vitro* were treated with FGF21, downstream signaling was reduced. The serum level of thyroid stimulating hormone was significantly higher, and that of thyroxine was lower in the knockout mice, suggesting hypothyroid phenotype.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：構造生物学

キーワード：糖鎖生物学・代謝

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞表面や細胞外に広く存在するヘパラン硫酸 (HS) は種々の増殖因子や血管新生に関わるタンパク質、形態形成に関与するタンパク質など様々なタンパク質と相互作用する性質を持っており、HS は、細胞増殖、細胞分化、細胞移動、器官形成、細胞内への分子の取り込みなどの色々な生命現象を修飾している。HS と HS 結合性タンパク質との相互作用、及び機能調節に 6-O-を含む硫酸化は非常に重要な役割を果たしている。

(2) 我々の研究室ではヘパラン硫酸 6-O-硫酸基転移酵素 (Hs6st) を世界で初めて単離・精製し、3つのアイソフォーム遺伝子を世界に先駆けてクローニングしてきた。さらに *Hs6st1* ノックアウトマウスを作製・解析し、*Hs6st1* ノックアウトマウスでは VEGF-A、Wnt2 シグナルの低下により胎盤血管網の形成不全が起こり、ほぼ耐性致死となることを明らかにした。

(3) さらにヘパラン硫酸基転移酵素 *Hs6st2* ノックアウトマウスの作製・解析を行ったところ、加齢に伴う体重増加 (1日あたりの食餌量は同等)、加齢に伴う耐糖能異常とインスリン抵抗性の出現といった表現型が明らかとなった。

## 2. 研究の目的

(1) 1. (3)より *Hs6st2* ノックアウトマウスはエネルギー代謝の低下が加齢に伴う肥満の原因となると推察された。また、肥満に従いインスリン抵抗性が増大し、インスリン分泌増加で代償できなくなると生体レベルでのインスリン抵抗性が出現してくると考察した。本研究では *Hs6st2* ノックアウトマウスで実際にエネルギー代謝が低下していることを証明し、HS の構造変化が生体におけるエネルギー代謝の低下およびインスリン感受性低下を引き起こす分子機構を解明することを目的として行った。

## 3. 研究の方法

(1) *Hs6st2* ノックアウトマウスでのエネルギー代謝低下の定量的解析

*Hs6st2* ノックアウトマウスではエネルギー代謝が低下しているという我々の仮説を分

子生物学的に証明するために骨格筋、褐色脂肪組織を用いてエネルギー代謝に関与すると考えられている遺伝子 (*Ucp1*, 2, 3, *Pgc1 $\alpha$* ,  $\beta$ , *Ppara $\alpha$* ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ) の定量的 PCR を行った。

(2) *Hs6st2* ノックアウトマウスでの HS 組成解析

野生型マウス、*Hs6st2* ノックアウトマウスより甲状腺、骨格筋、褐色脂肪組織、白色脂肪組織、肝臓を採取し、糖鎖画分を精製した後に HS 分解酵素で 2 糖単位に分解し、HPLC を用いて HS 組成を同定した。

(3) 褐色脂肪組織での FGF21 シグナル伝達

野生型マウス、*Hs6st2* ノックアウトマウス褐色脂肪組織より褐色脂肪細胞を単離・培養し、FGF21 を添加して p42/p44 MAPK の活性化 (リン酸化) をウエスタンブロッティングで調べた。また、*Ucp1* タンパク質をウエスタンブロッティングにより定量した。

(4) *Hs6st2* ノックアウトマウス血中甲状腺ホルモン濃度の測定

野生型マウス、*Hs6st2* ノックアウトマウスより血清を採取し、ELISA 法によって甲状腺ホルモン刺激ホルモン (TSH)、総チロキシン (total T4)、遊離チロキシン (fT4)、サイログロブリン (Tg) の血清濃度を決定した。

(5) *Hs6st2* ノックアウトマウスの組織学的解析

通常食を 5 ヶ月、あるいは高脂肪食を 12 週間食べさせた野生型マウス、*Hs6st2* ノックアウトマウスより肝臓、白色脂肪組織 (精巣上体周囲)、褐色脂肪組織、筋組織 (大腿四頭筋) を採取し、ホルマリン固定・パラフィン切片作製の後、ヘマトキシリン・エオシン染色を行った。また、白色脂肪組織の細胞サイズを ImageJ ソフトウェアを用いて解析した。

## 4. 研究成果

(1) *Hs6st2* ノックアウトマウスでのエネルギー代謝低下の定量的解析

褐色脂肪組織を用い、定量的 RT-PCR を行

ったところ、*Ucp1*, *Ucp3* の発現は *Hs6st2* ノックアウトマウスで優位に低下していた (図 1)。一方、骨格筋組織では *Ucp2*, *Ucp3* の発現は野生型マウスと同等であり、*Ppara $\alpha$* ,  $\delta$  の発現の増加が観察された。この結果により、*Hs6st2* ノックアウトマウスにおいてエネルギー代謝が低下していることを分子生物学的に示すことができた。

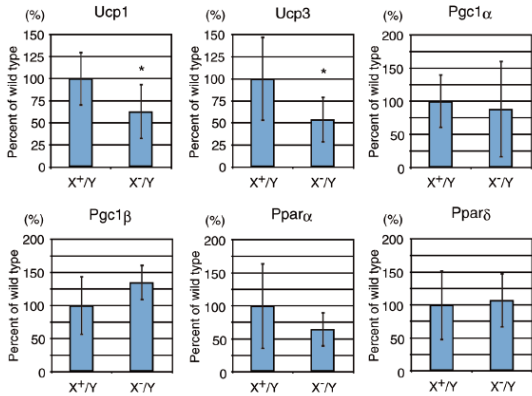


図 1 褐色脂肪組織でのエネルギー代謝関連遺伝子の発現。X+/Y は野生型マウス、X-/Y は *Hs6st2* ノックアウトマウスを示す。

## (2) *Hs6st2* ノックアウトマウスでの HS 組成解析

甲状腺と肝臓の HS 組成は野生型マウスと *Hs6st2* ノックアウトマウスの間で有意差は観察されなかったが、脂肪組織では 6-O-硫酸基を含む構造が減少しており、特に褐色脂肪組織では N-, 2-O-, 6-O-硫酸基を含む triS 構造が大きく減少していた (表 1)。褐色脂肪組織はエネルギー代謝に関わる組織である点からも、HS の組成変化が大きいことは非常に興味深い結果であった。

		$\Delta$ Di-6S (%)	$\Delta$ Di-NS (%)	$\Delta$ Di-6S (%)	$\Delta$ Di-(N,6)S (%)	$\Delta$ Di-(N,U)MS (%)	$\Delta$ Di-(N,6,2)MS (%)
Thyroid	X+/Y (n=6)	49.54 ± 0.92	19.57 ± 0.35	11.23 ± 0.22	5.48 ± 0.22	10.33 ± 1.17	3.85 ± 0.94
	X-/Y (n=7)	52.60 ± 1.61	18.20 ± 0.26	10.87 ± 0.75	4.83 ± 0.19	10.55 ± 1.75	2.86 ± 0.44
Skeletal muscle	X+/Y (n=6)	58.22 ± 4.37	18.24 ± 1.36	3.96 ± 0.36	4.29 ± 1.17**	8.53 ± 0.93*	5.49 ± 3.31
	X-/Y (n=6)	55.76 ± 7.57	19.66 ± 2.15	5.55 ± 0.51	2.60 ± 0.77**	11.18 ± 2.97*	3.18 ± 1.69
Brown fat pad	X+/Y (n=3)	51.15 ± 0.52	16.32 ± 0.17	4.25 ± 0.46	6.62 ± 1.11**	10.62 ± 2.50	14.22 ± 4.59*
	X-/Y (n=4)	57.48 ± 4.15	17.88 ± 0.81	4.24 ± 0.94	3.01 ± 0.42**	13.96 ± 5.80	7.99 ± 0.77*
Epididymal fat pad	X+/Y (n=6)	42.06 ± 2.04	22.64 ± 2.09	6.99 ± 1.16	6.60 ± 0.75**	7.91 ± 0.87	13.86 ± 3.09**
	X-/Y (n=6)	47.14 ± 5.91	23.56 ± 0.86	6.34 ± 0.33	3.91 ± 0.49**	12.57 ± 3.64	6.48 ± 1.59**
Liver	X+/Y (n=4)	43.29 ± 1.93	18.50 ± 1.80	15.27 ± 0.85	8.01 ± 1.28	5.64 ± 0.87	9.29 ± 0.68
	X-/Y (n=3)	39.98 ± 2.60	18.87 ± 1.50	17.85 ± 0.67	7.29 ± 0.64	5.06 ± 0.31	10.95 ± 2.46

表 1 各種組織での HS 組成の比較

## (3) 褐色脂肪組織での FGF21 シグナル伝達

野生型マウス由来の褐色脂肪細胞に比べ、*Hs6st2* ノックアウトマウス由来の褐色脂肪細胞では FGF21 の下流シグナル活性化が抑制されていた (図 2)。また、*Ucp1* タンパク質量の低下も観察された。

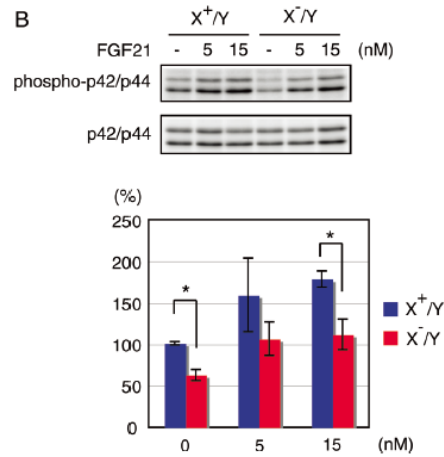


図 2 褐色脂肪細胞における FGF21 シグナリングの比較。X+/Y は野生型マウス、X-/Y は *Hs6st2* ノックアウトマウスを示す。

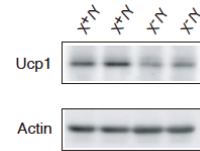


図 3 褐色脂肪細胞における *Ucp1* の発現。X+/Y は野生型マウス、X-/Y は *Hs6st2* ノックアウトマウスを示す。

## (4) *Hs6st2* ノックアウトマウス血中甲状腺ホルモン濃度の測定

野生型マウスと比べ、*Hs6st2* ノックアウトマウスでは血清 TSH 濃度が高く、totalT4 と fT4 濃度が低かった (図 4)。このことから、*Hs6st2* ノックアウトマウスでは甲状腺機能が低下していることが明らかとなった。

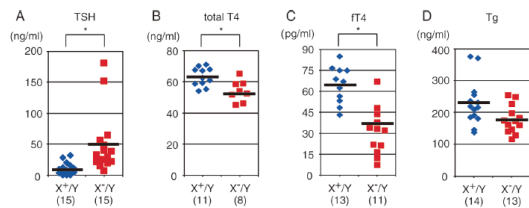


図 4 甲状腺ホルモン血清濃度の比較。X+/Y は野生型マウス、X-/Y は *Hs6st2* ノックアウトマウスを示す。

## (5) *Hs6st2* ノックアウトマウスの組織学的解析

通常食を 5 ヶ月食べさせたマウスでは白色脂肪組織の細胞サイズの増加が観察された。また、高脂肪食を 12 週間食べさせたマウスでは肝臓への脂肪の蓄積、白色脂肪組織への炎症細胞浸潤が観察された (図 5)。

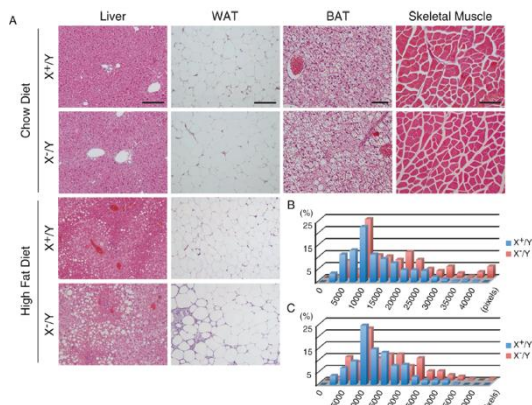


図5 (A)肝臓、白色脂肪、褐色脂肪、筋組織のヘマトキシリン・エオシン染色および(B)白色脂肪細胞サイズのヒストグラム。X+/Yは野生型マウス、X-/Yは *Hs6st2* ノックアウトマウスを示す。

(6) 本研究では *Hs6st2* ノックアウトマウスでのエネルギー代謝の低下を分子生物学的に証明し、老齢マウスで脂肪が蓄積していることを示した。これらの表現型は HS の組成変化が生体のエネルギー代謝を制御し、メタボリックシンドロームの発症に関わる可能性を強く示唆する。褐色脂肪組織や筋肉が主にエネルギー代謝の制御に関わる組織であるが、*Hs6st2* ノックアウトマウスでは褐色脂肪組織の HS 組成変化、特に *N*-, 2-*O*-, 6-*O*-硫酸基を含む triS 構造の低下が観察された。さらに褐色脂肪組織ではエネルギー代謝に関わる FGF21 のシグナル活性が低下しており、全身的には甲状腺機能低下の状態も観察された。今後褐色脂肪組織で FGF21 のシグナル活性が低下するメカニズムを詳細に解析することにより、新たな作用点を持つ抗肥満薬剤の開発につなげることができると考えている。

#### 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4件)

(1) Nagai N, Habuchi H, Sugaya N, Nakamura M, Imamura T, Watanabe H, Kimata K.

Involvement of heparan sulfate 6-O-sulfation in regulation of energy metabolism and alteration of thyroid hormone levels in male mice.

Glycobiology

査読有

epub ahead of print

10.1093/glycob/cwt037

(2) Anower-E-Khuda MF, Habuchi H, Nagai N, Habuchi O, Yokochi T, Kimata K.

Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase isoform-dependent regulatory effects of heparin on the activities of various proteases in mast cells and the biosynthesis of 6-O-sulfated heparin.

The Journal of Biological Chemistry

査読有

288

2013

p3705-3717

10.1074/jbc.M112.416651

(3) Nakamura M, Uehara Y, Asada M, Honda E, Nagai N, Kimata K, Suzuki M, Imamura T

Sulfated glycosaminoglycans are required for specific and sensitive fibroblast growth factor (FGF) 19 signaling via FGF receptor 4 and betaKlotho

The Journal of Biological Chemistry

査読有

286

2011

p26418-26423

10.1074/jbc.M111.251140

(4) Shimokawa K, Kimura-Yoshida C, Nagai N, Mukai K, Matsubara K, Watanabe H, Matsuda Y, Mochida K, Matsuo I

Cell surface heparan sulfate chains regulate local reception of FGF signaling in the mouse embryo.

Developmental Cell

査読有

21

2011

p257-272

10.1016/j.devcel.2011.06.027

[学会発表] (計2件)

(1) 永井 尚子

Increased body weight in heparan sulfate 6-O-sulfotransferase (*Hs6st2*) knockout mice

第71回岡崎コンファレンス

2011年10月13日

岡崎コンファレンスセンター (愛知)

(2) 永井 尚子

Altered Energy Expenditure in Heparan Sulfate

6-O-sulfotransferase-2 knockout mice

第 28 回内藤コンファレンス

2010 年 7 月 28 日

湘南国際村センター（神奈川県）

〔図書〕（計 1 件）

永井 尚子、木全 弘治

株式会社 エル・アイ・シー

生物機能モデルと新しいリソース・リサーチ  
ツール

2011

p384-387

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.aichi-med-u.ac.jp/su10/su1009/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永井 尚子 (NAOKO NAGAI)

愛知医科大学・分子医科学研究所・助教

研究者番号：00367799

### (2) 研究分担者

木全 弘治 (KIMATA KOJI)

愛知医科大学・名誉教授

研究者番号：10022641

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：