

## 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24年 5月 21日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780112

研究課題名（和文）

抗肥満を目指した新規摂食遺伝子の機能解析

研究課題名（英文）

Functional analysis of novel feeding response gene that directed at anti-obesity

研究代表者

井上 順（INOUE JUN）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・講師

研究者番号：70323962

研究成果の概要（和文）：MIG12 遺伝子発現が摂食により転写レベルで活性化すること、またその活性化は LXR および ChREBP が直接的に MIG12 遺伝子プロモーター領域に結合し、転写を亢進することを明らかにした。さらに、MIG12 が脂肪酸合成およびトリグリセリド蓄積を亢進させることを明らかにした。これらの成果により、生体における脂肪酸合成の新たな制御機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Liver X receptor (LXR)  $\alpha$  and LXR  $\beta$  belong to the nuclear receptor superfamily and play central roles in the transcriptional control of lipid metabolism. We describe a novel LXR target, midline-1-interacting G12-like protein (MIG12), which has been recently identified as an acetyl-coenzyme A carboxylase-binding protein. The binding causes the induction of *de novo* fatty acid (FA) synthesis through the activation of acetyl-coenzyme A carboxylase (a rate-limiting enzyme for *de novo* FA synthesis). Luciferase reporter gene assays using the *MIG12* gene promoter revealed the existence of a LXR-responsive element (LXRE) and carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP)-responsive element named LXRE3 and carbohydrate response element 1, respectively. Deletion and mutation of LXRE3 and carbohydrate response element 1 abolished LXR and ChREBP responsiveness, respectively. Electrophoretic mobility shift assays demonstrated that the LXR/retinoid X receptor  $\alpha$  complex was bound to LXRE3. Treatment with high glucose concentration, which leads ChREBP activation, or LXR activator stimulated MIG12 expression in rat primary hepatocytes, and combined treatment further stimulated MIG12 expression. Furthermore, hepatic expression of MIG12 in mice was induced by refeeding. Overexpression of MIG12 stimulated and knockdown of MIG12 attenuated LXR ligand-stimulated *de novo* FA synthesis and triacylglycerol accumulation. These results indicate that MIG12 is a mediator for stimulation of lipogenesis by LXR activation in the liver.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計			

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：抗肥満・脂肪酸合成・脂肪肝

1. 研究開始当初の背景

生物は外界から栄養を摂取することにより生命を維持しているが、生体には摂取したエネルギーを一時的にグリコーゲンや TG として体内に蓄え、栄養が不足した際に利用する巧妙な機構が存在する。摂食による TG 合成（貯蔵）の活性化は主に転写因子 SREBP-1 や LXR により担われている。それぞれの転写因子は血中インスリン濃度および酸化コレステロールの上昇により活性化し、脂肪酸合成系の酵素群の転写を上昇させる。これにより、摂食時における余剰エネルギーの効率的な貯蔵が行われる。

一方、脂肪細胞への過剰な TG 蓄積は肥満へと直結し、脂肪細胞からのアディポサイトカインの分泌異常を引き起こすことにより、動脈硬化等の生活習慣病のリスクを高めると考えられている。また、肝臓への TG の蓄積いわゆる脂肪肝はインスリン抵抗性を惹起し、糖尿病のリスクを高めることが知られている。生体にとって、余剰エネルギーの脂肪としての貯蔵は、効率的なエネルギーの利用のために必須であることは疑いの余地はないが、過剰な蓄積は全身における脂質・糖質代謝恒常性の破綻へとつながると考えられる。

核内受容体 LXR は摂食時の脂肪蓄積以外にも多様な機能を有することが知られている。LXR の活性化は末梢からのコレステロール逆輸送を促進し、さらに動脈硬化巣での炎症を抑制することにより動脈硬化抑制作用を示す。また、LXR 合成リガンドの糖尿病モデルマウスへの投与は、末梢組織でのグルコース取り込みを上昇させ、さらに肝臓での糖新生を抑制することにより血糖値を低下させることが知られている。

申請者は LXR の機能の網羅的な解析を目的

として、新規応答遺伝子の探索を行ってきた。LXR 合成リガンドをマウスへ投与し、DNA マイクロアレイを用いて解析を行い、複数の新規な LXR 応答遺伝子を見出すことに成功している。これまでに LXR 活性化により核内受容体 PPAR $\alpha$  の発現が小腸特異的に亢進することを報告している (Inoue, J. *et al.* (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

371. 675-678)。この結果は LXR 活性が小腸における脂肪酸の  $\beta$  酸化に関与している可能性を示しており、LXR の機能のさらなる多様性を明らかにした。本研究で解析する Mid1ip1 (MIG12) は上記の研究により見出した新規な LXR 応答遺伝子である。Mid1 と結合する 20KDa からなるタンパク質であること以外の情報は現在のところ明らかにされていない。Mid1 とは Opitz シンドロームの原因遺伝子として同定されているが、脂質・糖質代謝への関連については明らかにされていない。生物は外界から栄養を摂取することにより生命を維持しているが、生体には摂取したエネルギーを一時的にグリコーゲンや TG として体内に蓄え、栄養が不足した際に利用する巧妙な機構が存在する。摂食による TG 合成（貯蔵）の活性化は主に転写因子 SREBP-1 や LXR により担われている。

2. 研究の目的

本研究は、核内受容体 LXR により発現誘導を受ける新規遺伝子として、申請者らが発見した MIG12 について、生体の摂食応答における役割を明らかにすることを目的とする。特に、余剰エネルギーの蓄積すなわち脂肪酸およびトリグリセリド (TG) 合成への関与について、分子レベルおよび動物個体レベルでの解明を目指す。これにより生体における精巧なエネルギー代謝調節機構の一端を明らかにするとともに、肥満を起因とする生活習慣病との関連について解析を行う。

### 3. 研究の方法

(1) MIG12 遺伝子の摂食による発現誘導機構解明 → 摂食時に活性化する転写因子 (SREBP-1、ChREBP、LXR) の関与を中心に検討する。レポーターアッセイ、EMSA、ChIP アッセイ等によりプロモーター内の応答領域を明らかにする。

(2) 脂肪酸合成に対する MIG12 の機能 → MIG12 の過剰発現 (アデノウイルスベクター) またはノックダウン (siRNA) を行い、脂肪酸合成への影響を検討する。ラット初代培養肝細胞を用いる。研究目的に示したように、これまでに siRNA を用いた検討を行っているが、一種類の siRNA ではオフターゲット効果の可能性があるため、複数の siRNA を用いて検討する。

(3) 生活習慣病と MIG12 遺伝子との関連 → 肥満と MIG12 発現との関連を検討する。具体的には、マウスへの高脂肪食および高炭水化物食摂取による発現変動を解析する。

### 4. 研究成果

(1) ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイ、EMSA、ChIP アッセイ等により解析を行ったところ、摂食時に活性化することが知られている転写因子である LXR (図 1) および ChREBP (図 2) が直接的に MIG12 遺伝子プロモーター領域に結合し、転写を亢進することが明らかになった。

```
QuickTimey C²  
TIFFAiiOækAj êLíEVeçÉOÉáÉÄ  
Ç™Ç±ÇÄÉsÉNÉ'ÉÉÇ%â@ÇÉÇZÇ%Ç...ÇÖiKóvÇ-ÇÄB
```

```
QuickTimey C²  
TIFFAiiOækAj êLíEVeçÉOÉáÉÄ  
Ç™Ç±ÇÄÉsÉNÉ'ÉÉÇ%â@ÇÉÇZÇ%Ç...ÇÖiKóvÇ-ÇÄB
```

図 1 LXR は LXRE3 配列を介して MIG12 遺伝子発現を調節する

(2) MIG12 タンパク質の機能について解析を行った。マウス初代培養肝細胞に MIG12 タン

パク質についてアデノウイルスを用いて過剰発現およびノックダウンさせ、脂肪酸合成に対する MIG12 の機能解析を行ったところ、LXR 活性化による脂肪酸合成亢進において MIG12 が重要な役割を果たすことが明らかになった (図 3)。すなわち、MIG12 発現を抑制することにより、LXR 活性化による脂肪酸合成亢進が抑制され、一方で MIG12 過剰発現により LXR 活性化による脂肪酸合成亢進がさらに上昇した。これらの結果は MIG12 が LXR 活性化による脂肪肝に関与している可能性を示している。また、MIG12 抗体の作製に成功し、現在、各種臓器における MIG12 タンパク質の発現レベルを解析中である。

```
QuickTimey C²  
TIFFAiiOækAj êLíEVeçÉOÉáÉÄ  
Ç™Ç±ÇÄÉsÉNÉ'ÉÉÇ%â@ÇÉÇZÇ%Ç...ÇÖiKóvÇ-ÇÄB
```

```
QuickTimey C²  
TIFFAiiOækAj êLíEVeçÉOÉáÉÄ  
Ç™Ç±ÇÄÉsÉNÉ'ÉÉÇ%â@ÇÉÇZÇ%Ç...ÇÖiKóvÇ-ÇÄB
```

図 2 ChREBP は ChoRE1 配列を介して MIG12 遺伝子発現を調節する

```
QuickTimey C²  
TIFFAiiOækAj êLíEVeçÉOÉáÉÄ  
Ç™Ç±ÇÄÉsÉNÉ'ÉÉÇ%â@ÇÉÇZÇ%Ç...ÇÖiKóvÇ-ÇÄB
```

図 3 ラット初代培養肝細胞への MIG12 の過剰発現および発現抑制は細胞内 TG 蓄積および新規脂肪酸合成を変動させる。

(3) 摂食によりマウス肝臓で MIG12 の発現が上昇した (図 4)。II 型糖尿病モデルマウス肝臓での MIG12 mRNA 発現レベルを検証した

ところ、db/db マウスならびに高脂肪食負荷マウスで約2倍に上昇していた。これらのモデルマウスでは脂肪肝が発症しており、脂肪肝発症にMIG12発現の上昇が関与する可能性が考えられた。今後、MIG12の発現上昇が脂肪肝発症に関与するかどうかについて解析する予定である。

③池内 江美奈、山崎 康平、宮田 慎吾、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎  
<LXR 新規標的遺伝子 MIG12 の同定と新たな機能の解明>  
日本農芸化学会 2010 年度大会 / 京都 2011. 3. 26-28

[その他]

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/food-biochem/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

井上 順 (INOUE JUN)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・講師

研究者番号：70323962

Figure 4  
Time 0  
TFFA 100 100 100 100 100 100 100 100 100 100  
C 2 C 2 C 2 C 2 C 2 C 2 C 2 C 2 C 2

図4 マウスを24時間絶食後、24時間再摂食させ、肝臓におけるMIG12 mRNAレベルをリアルタイムPCRにより検討した。

## 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1件)

Inoue, J., Yamasaki, K., Ikeuchi, E., Satoh, S., Fujiwara, Y., Nishimaki-Mogami, T., Shimizu, M., and Sato, R. (2011)  
Identification of MIG12 as a mediator for stimulation of lipogenesis by LXR activation.  
*Mol. Endocrinol.* **25**, 995-1005.

[学会発表] (計3件)

①宮田 慎吾、池内 江美奈、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎  
<MIG12による脂肪酸合成制御機構の解明>  
日本農芸化学会 2011 年度大会 / 京都 2012. 3. 23-25

②井上 順、山崎 康平、池内 江美奈、宮田 慎吾、佐藤 伸一、清水 誠、佐藤 隆一郎  
<新規 LXR 応答遺伝子の探索と機能解析>  
第84回日本生化学会大会 / 京都 2011. 9. 21-24