

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82613

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23617038

研究課題名(和文) インスリン抵抗性とビタミンA代謝のクロストーク

研究課題名(英文) Cross talk of insulin resistance and vitamin A metabolism

研究代表者

山内 淳(YAMAUCHI, Jun)

独立行政法人国立健康・栄養研究所・食品栄養・表示研究室・室長

研究者番号：80312297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン抵抗性が進行すると脂肪細胞のグルコース輸送体(GLUT4)遺伝子発現が抑制される。我々はGLUT4ノックダウン3T3-L1細胞を用いて、転写を活性化する配列をRBP4遺伝子プロモーター上に見出し、そこに結合して転写を活性化するPSMB1を同定した。PSMB1は149番目のアミノ酸であるチロシンがリン酸化されることが分かった。この149番目のチロシンをリン酸化を受けないフェニルアラニン変異体(Y149F)を作成し細胞内局在性を観察したところ、Y149Fは核に局在した。よってリン酸化されないPSMB1は核にとどまり続けることが示唆された。またY149Fの転写活性化能は有意に高かった。

研究成果の概要(英文)：Retinol binding protein 4 (RBP4) is the transport protein that carries retinol in blood. Mice lacking glucose transporter 4 (GLUT4) in adipocytes have enhanced Rbp4 gene expression; however, the molecular mechanism is unknown. We found a G4KA (GLUT4 knockdown-dependent transcriptional activation) element located 1.3 kb upstream of the Rbp4 promoter. In a yeast one-hybrid screen of a G4KD-L1 (GLUT4 knockdown 3T3-L1) adipocyte cell cDNA library, using the G4KA element as bait, we identified subunit of the 20 S proteasome, PSMB1. PSMB1 was tightly bound to G4KA. PSMB1 RNA interference inhibited Rbp4 transcription. Nuclear transportation of PSMB1 was increased in G4KD-L1 cells. The putative tyrosine phosphorylation site in PSMB1 was mutated to phenylalanine (Y149F). Y149F PSMB1 displayed increased nuclear translocation, resulting in activation of transcription in adipocytes. We propose that modulation of PSMB1 nuclear localization can be influenced by the phosphorylation status of PSMB1.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：統合栄養科学

キーワード：ビタミンA インスリン抵抗性 RBP4 脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

肥満状態ではインスリン抵抗性をきたすという知見から、脂肪細胞から全身のインスリン感受性を調節する生理活性物質が分泌されることが知られている。脂肪細胞から分泌される生理活性を持つ分子群はアディポカインと総称され、これには TNF- α やレプチン、アディポネクチン、レジスチンなどの分子が含まれる。これらアディポカインは肥満すなわち脂肪細胞に過剰な中性脂肪が蓄積された状態ではその発現量や分泌量に変化が生じ、各インスリン標的組織のインスリン感受性に影響を与える。GLUT4 (Glucose Transporter 4) は骨格筋、心筋、脂肪細胞に特異的に発現するグルコース輸送体であり、インスリン依存的に細胞質から膜表面へと移行することからインスリン依存的にグルコース取り込みを行う。一般的に肥満や2型糖尿病患者においては、脂肪細胞の GLUT4 の発現は減少するが骨格筋における発現は変わらない。インスリン依存性のグルコース取り込みが主に骨格筋で行われることから、肥満や2型糖尿病患者に認められる耐糖能異常において、脂肪細胞における GLUT4 発現低下がどのように関与しているのかは不明であった。そこで Yang らはインスリン抵抗性を発症する脂肪細胞特異的 GLUT4 欠損マウスの脂肪組織より、このマウスのインスリン抵抗性の原因遺伝子が、血中におけるビタミン A の輸送タンパクとして知られている RBP4 (Retinol Binding Protein 4)であることを示した。さらにヒトの解析においても血中 RBP4 レベルはインスリン抵抗性と相関し、肥満や血中中性脂肪レベル、血圧などとも関連していた。すなわち RBP4 は生体におけるビタミン A 輸送という従来から知られていた機能のみならずインスリン抵抗性と密接に関連した新しいアディポカインである可能性がある。しかしながら、なぜ脂肪細胞で GLUT4 の発現が減少すると RBP4 の発現が増加するのか、RBP4 がアディポカインとしていかなる生理活性を持つのか、あるいは生体におけるビタミン A 状態と RBP4 の役割がどのように関連するかは全く不明であった。そこで我々は、脂肪細胞特異的 GLUT4 欠損マウスの細胞モデル系を作成し、RBP4 遺伝子発現調節機構を明らかにしようと試みた。その結果、RBP4 遺伝子プロモーター上に GLUT4 ノックダウン依存的な転写活性化配列(G4KA)を見出し、そこに結合する因子として 20S プロテオソームサブユニットの一つ PSMB1 を同定した(Inoue, et al., J. Biol. Chem. 2010; 285(33): 25545-25553.)。PSMB1 は GLUT4 ノックダウン依存的に DNA 結合が強くなるが、これは PSMB1 自身の細胞質から核への移行が促進したことによることを明らかにすることができた。

2. 研究の目的

我々はすでに、脂肪細胞におけるレチノー

ル結合タンパク質(RBP4)遺伝子発現の分子メカニズムの一部を明らかにした。その結果、20S プロテオソームサブユニットの一つである PSMB1 が、インスリン抵抗性の脂肪細胞における RBP4 遺伝子発現に重要な役割を担う可能性が示唆された。このことは、新規アディポカインとして同定された RBP の重要な役割を示唆している。そこで、本研究はこれをさらに展開させ、インスリン抵抗性発症メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

PSMB1 の転写活性化に關与する機構を明らかにする。特に GFP-PSMB1 発現ベクターを用いた GLUT4 ノックダウン依存的な核移行のメカニズムおよび標的配列への結合活性の調節機構について調べる。

(1) PSMB1 の GLUT4 ノックダウン依存的な核移行のメカニズム

プロテオソームサブユニットはリン酸化を介して核膜孔と相互作用し、核内移行が制御されていることが知られている。PSMB1 分子内には複数のリン酸化コンセンサスアミノ酸配列が存在することから、野生型 GFP-PSMB1 発現ベクターおよび変異体発現ベクターを細胞内に導入し、細胞内局在性を観察する系を確立する。これを用いて細胞内局在性とインスリン抵抗性との関連を解析する。

(2) PSMB1 の GLUT4 ノックダウン依存的な転写活性化のメカニズム

PSMB1 がプロモーターに特異的に結合し、転写因子として機能することは証明した。しかしながら分子内に典型的な転写活性化モチーフは見出されていない。このことは PSMB1 単独ではなく共役因子が存在する可能性を示唆している。よって、PSMB1 と相互作用して転写活性化に關与する因子を検索する。PSMB1 はプロテオソームサブユニットであることから、その他のサブユニットの関与を中心に検索する。

(3) GLUT4 ノックダウン 3T3-L1 細胞の解析

脂肪細胞特異的 GLUT4 欠損マウスの細胞モデル系として作成した GLUT4 ノックダウン 3T3-L1 細胞はインスリン抵抗性の発症メカニズムを明らかにする上で優れた細胞株であると考えられる。そこで、マイクロアレイ等を用いて遺伝子発現様式を網羅的に解析する。

(4) インスリン抵抗性とビタミン A 代謝

本研究は、インスリン抵抗性とビタミン A 代謝という一見無関係に見える代謝系のクロストークの可能性に端を発する。よってこの関係を直接解析する必要がある。そのため、高脂肪食等によって肥満を誘導したマウス、あるいは2型糖尿病モデルマウスを用いてビタミン A 代謝とインスリン抵抗性の関係について調べる。特に血中 RBP4 の変化や血中

レチノール量に着目して調べる。

4. 研究成果

PSMB1 のアミノ酸配列を調べたところ、149 番目のアミノ酸のチロシンがリン酸化されることが分かった。そこで、この 149 番目のチロシンをフェニルアラニンに置き換えた変異体(Y149F)を作成した。野生型(WT)PSMB1 と Y149F を、GFP 融合タンパク質発現ベクターに連結し、これらの発現ベクターを脂肪細胞に強制発現させて、蛍光顕微鏡で観察した。その結果 WT は核にも細胞質にも存在していた。一方 Y149F は核に局在し、細胞質にはほとんど存在しなかった。これらのことから 149 番目のチロシン残基がリン酸化されない状態の PSMB1 は核にとどまり続けることが示唆された。実際、Y149F は WT に比べて転写活性化能は有意に高かった。

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 5 件)

- (1) Koitaya N, Sekiguchi M, Tousen Y, Nishide Y, Morita A, Yamauchi J, Gando Y, Miyachi M, Aoki M, Komatsu M, Watanabe F, Morishita K, Ishimi Y. Low-dose vitamin K2 (MK-4) supplementation for 12 months improves bone metabolism and prevents forearm bone loss in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Metab.* 2014;32(2):142-50.
 - (2) Yamauchi J* Sekiguchi M, Shirai T, Yamada M, Ishimi Y. (*corresponding author) Role of nuclear localization of PSMB1 in transcriptional activation. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013;77(8):1785-7.
 - (3) Yoshida M, Kikunaga S, Yamauchi J, T.Utsugi M, Kodama H, Morita A, Esashi T, Dietary Reference Intakes for Japanese 2010: Microminerals *J Nutr Sci Vitaminol* 2013; 59; S91-S102.
 - (4) Yamauchi J* Sekiguchi M, Shirai T, Ishimi Y. (*corresponding author) Vitamin D receptor is not essential for extracellular signal-related kinase phosphorylation by vitamin D(3) in human Caco-2/TC7 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2012;76(8):1588-90.
 - (5) Shirai T, Inoue E, Ishimi Y, Yamauchi J* (*corresponding author) AICAR response element binding protein (AREBP), a key modulator of hepatic glucose production regulated by AMPK in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011: 414(2):287-91.
- 〔学会発表〕(計 10 件)
- (1) 山内淳 食品表示について 第 17 回日本病態栄養学会年次学術集会, 2014.1.12, 大阪国際会議場
 - (2) Koitaya N, Sekiguchi, Tousen Y, Nishide N, Morita A, Yamauchi J, Gando Y, Miyachi M, Aoki M, Komatsu M, Watanabe F, Morishita K, Ishimi Y. Low-dose vitamin K2 (MK-4) supplementation for 12 months improves bone metabolism and prevents forearm bone loss in postmenopausal Japanese women The 2nd Joint Meeting of International Bone Mineral Society and Japanese Society for Bone and Mineral Research, 2013.6.1, Kobe
 - (3) 関口真理子, 白井智美, 石見佳子, 山内淳 ビタミン D による MAP キナーゼ活性化のメカニズム 第 67 回日本栄養・食糧学会大会, 2013.5.25, 名古屋
 - (4) 小坂谷典子, 東泉裕子, 西出依子, 森田明美, 山内淳, 青木麻実, 石見佳子 1 年間のビタミン K2 (MK-4) 補給摂取が閉経後女性の骨代謝に及ぼす影響 第 59 回日本栄養改善学会, 2012.9.13, 名古屋
 - (5) 白井智美, 白鳥明日香, 石見佳子, 山内淳 BCMO1 遺伝子のレチノイン酸による発現制御機構の解析 第 67 回日本栄養・食糧学会大会, 2013.5.25, 名古屋
 - (6) 白井智美, 石見佳子, 山内淳 糖新生系酵素遺伝子発現を制御する新規転写因子 AREBP の生体機能 第 66 回日本栄養・食糧学会大会, 2012.5.20, 仙台
 - (7) 石見佳子, 小坂谷典子, 東泉裕子, 西出依子, 森田明美, 山内淳, 青木麻実 1 年間のビタミン K2 (メナキノン-4) 補給摂取が閉経後女性の骨代謝に及ぼす影響 第 59 回日本栄養改善学会, 2011.9.13, 名古屋
 - (8) 山内淳, 白鳥明日香, 石見佳子 β -カロテン開裂酵素 BCMO1 のレチノイン酸による遺伝子発現制御機構の解析 日本ビタミン学会第 63 回大会, 2011.6.4, 広島
 - (9) 白鳥明日香, 小林謙一, 山本祐司, 田所忠弘, 山内淳 β カロテンからレチノールへの変換に関わる酵素 BCMO1 のレチノイン酸による遺伝子発現制御機構の解析 第 65 回日本栄養・食糧学会大会, 2011.5.15, 東京
 - (10) 関口真理子, 山内淳 ビタミン D の MAP キナーゼを介した作用発現メカニズム

の解析 第65回日本栄養・食糧学会大会 ,
2011.5.15 , 東京

〔図書〕(計3件)

- (1) 山内淳 トコトリエノール研究: 過去から現在へ 栄養学レビュー(翻訳); 21(3) 2013
- (2) 山内淳 食品保健制度の現状と課題 特に食品表示について 日本食生活学会誌; 24(1); 3-6 2013
- (3) 山内淳 特別企画 基礎から制度改革まで 「食品表示」をおさえる 月刊 糖尿病ライフ さかえ(公社)日本糖尿病協会; 53(8); 17-23 2013

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www0.nih.go.jp/eiken/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 淳 (YAMAUCHI Jun)

独立行政法人国立健康栄養研究所 食品
保健機能研究部 食品栄養・表示研究室
室長

研究者番号: 80312297

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし