

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658105

研究課題名(和文) グルコース、インスリンに依存しない脂肪酸合成酵素の発現調節機構に関する研究

研究課題名(英文) The study of novel regulatory mechanism for the expression of fatty acid synthase gene in re-feeding state of rat liver

研究代表者

白川 仁 (SHIRAKAWA, Hitoshi)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40206280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：絶食 - 再給餌後の脂肪酸合成酵素 (FASN) の肝臓での新規発現調節機構について動物個体を用いて明らかにすることを目的とした。再給餌後の核内ChREBP量はFASN mRNA量と相関が見られ、再給餌後早期のFASN mRNA上昇はChREBPにより制御されることが示唆された。FASN mRNAを標的とするmiRNAが再給餌により変化し、FASN mRNA量の制御に關与する可能性が示唆された。摂食後の消化管からの求心性シグナルが肝臓へ伝達される可能性を推定し、消化管から脳へ至る自立神経を切断したラットを用いて無脂肪食を給餌し、FASN mRNA量を測定したところ、増加傾向であった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to identify the novel regulatory mechanism for the gene expression of fatty acid synthase (FASN) which is essential for de novel long chain fatty acid synthesis from acetyl-CoA and malonyl-CoA in re-feeding state of rat liver. The amount of nuclear ChREBP, one of crucial transcription factor for FASN gene, was correlated with FASN mRNA in re-feeding liver. Some miRNA expression that is possible to involved in FASN mRNA expression was enhanced in re-feeding state, suggested that FASN expression may be partly regulated by these miRNA. In case of vagotomy from intestine to brain, operated rats showed enhancement of FASN mRNA expression after re-feeding. These results suggested that afferent nerve is not involved in the enhanced expression of FASN gene after re-feeding.

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：脂肪酸合成酵素 遺伝子発現 転写因子 mRNA安定性

## 1. 研究開始当初の背景

脂肪酸合成酵素 (fatty acid synthase, 以下 FASN と略) は、NADPH 依存的に、acetyl-CoA と malonyl-CoA から長鎖脂肪酸を合成する酵素である。食餌などの環境因子やホルモンが FAS 遺伝子の発現や酵素活性に影響を与える。転写においてはステロール制御配列結合因子 (SREBP1c) とグルコース応答配列結合タンパク質 (ChREBP) が鍵因子であり、それぞれ、インスリン、グルコースによって活性化される。我々は通常ラットにおいて摂食 - 再給餌後の肝臓 FASN mRNA 量を経時的に観察したところ、血糖値やインスリン値が僅かに上昇した時間において、FAS mRNA 量はピークを迎え、血糖値、インスリン値や FAS 以外のインスリン応答性遺伝子の発現がピークのときには、FAS mRNA 量は減少に転じていることを発見した。このことは、従来知られている機構とは異なった、FASN の転写制御機構の存在を示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究では、再給餌直後の、血中インスリン、グルコースに依存しない FASN 遺伝子の新規転写調節機構について動物個体を用いて明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

SD 系ラット (雄 6 週齢) を 24 時間絶食させた後、高スクロース無脂肪食を 2 時間給餌した。その後、再び絶食させた。給餌前 (絶食群)、給餌後 2 時間 (摂食群)、6 時間 (摂食 6 時間群)、10 時間 (摂食 10 時間群) に解剖し、血清および肝臓を採取した。

血清グルコース濃度は、酵素発色法により測定した。また、血清インスリン、コルチゾール濃度は、ELISA 法により測定した。

肝臓からトータル RNA を調製し、これを鋳型として cDNA を合成した。cDNA を便宜希釈し、定量 RT-PCR 法で各 mRNA の発現量を測定した。なお、各 mRNA 量は、真核生物伸長因子 1 mRNA 量を内部標準として、相対発現量で表した。

肝臓の全抽出液、または肝臓核画分の抽出液を調製し、ウエスタンブロット法で FASN

の発現制御に関わる転写調節因子のタンパク質量を測定した。なお、各タンパク質量は、  
- チューブリン (全抽出液の場合)、ラミン A/C (核抽出液の場合) を内部標準として、相対発現量で表した。

ルシフェラーゼ遺伝子を有するレポータープラスミド pGL4.12 のルシフェラーゼ遺伝子上流に、プラスミド pCI 由来のサイトメガロウイルス初期プロモーター/エンハンサーを挿入し、恒常的にルシフェラーゼを発現するプラスミドを構築した。さらに、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に、ラット FASN mRNA 3'-非翻訳領域 (7493 ~ 9009 塩基領域) を挿入した。構築したプラスミドをラット肝癌由来 Fao 細胞へカチオンリポソーム法を用いてトランスフェクションした。24 時間後にグルコース濃度の異なる培地へ交換し、2.5 時間培養した。その後、細胞を回収し、細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を測定した。なお、各ルシフェラーゼ活性は、レポータープラスミドとともに共導入した pCH110 プラスミド由来の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性により標準化し、相対活性で評価した。

## 4. 研究成果

FASN mRNA は、絶食群に比べ、摂食群で 11 倍に上昇し、さらに摂食 6 時間群でピークを迎えた (絶食群の約 90 倍) (図 1)。また、FASN 遺伝子と同様の制御を受けられている SREBP1c、Stearyl-CoA desaturase-1 (SCD-1) mRNA も、摂食群で有意に上昇し、摂食 6 時間群でピークとなった (図 1)。SREBP1c mRNA は摂食 10 時間群で、絶食群と同程度まで低下するのに対して、FASN および SCD-1 mRNA では、摂食群と同程度までの低下であった。このことから、SREBP1c の

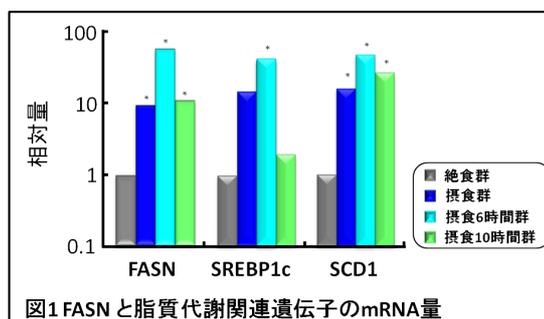


図1 FASNと脂質代謝関連遺伝子のmRNA量

発現は、FASN、SCD-1 に比べ、摂食後、より短い時間内で制御されることが示唆された。

FASN の転写制御に関わる転写調節因子の発現量をウエスタンブロットで測定したところ、成熟型の SREBP1c は、摂食 6 時間群で絶食群に比べ、有意に上昇していた。このことは、FASN、SREBP1c、SCD-1 の mRNA 発現量の上昇と相関していた。また、核内のグルコシルコリドレセプター (GR) は、摂食 6 時間、10 時間群で有意に低下しており、血清コリゾール濃度の低下と相関していた。核内の ChREBP 量は、FASN mRNA 量と相関が見られ、再給餌後早期の FASN mRNA の上昇は、ChREBP により制御されていることが示唆された。

また、絶食時の FASN mRNA 量の低下は、RNA 分解の亢進により起こる可能性があることから、RNA の不安定化部位について、次に示す方法で検索を行った。プライマー伸長法によって検索を行った。肝臓から得られたトータル RNA から cDNA を合成する際に、FASN mRNA に特異的なプライマーを用いた。本 cDNA を鋳型として、FASN mRNA の各部位を PCR 法で検出したところ、ラット FASN mRNA の 7,184 から 7,441 の領域、8194 から 8352 の領域で有意な減少が観察された (図 2)。このことから、この 2 つの領域で FASN mRNA が分解される可能性が示唆された。一方、同様の解析を、SREBP1c、SCD-1 mRNA について行ったが、FASN mRNA で見られた cDNA の消失部位は検出できなかった。

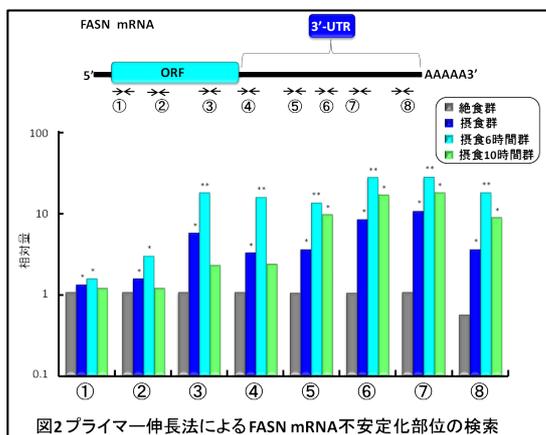


図2 プライマー伸長法による FASN mRNA 不安定化部位の検索

FASN mRNA の 8194 ~ 8352 塩基領域を標

的とする miRNA の発現量を定量 RT-PCR 法で測定した。その結果、摂食後に発現量が変化する miRNA が数種有り、これらの miRNA を通じて FASN mRNA 量が制御される可能性が考えられた。

ラット FASN mRNA の 3'-非翻訳領域を有するレポータープラスミド、および含まない対照プラスミドを Fao 細胞に導入し、24 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、対照プラスミドに比べ、非翻訳領域を含むプラスミドを導入した場合、ルシフェラーゼ活性が低下しており、FASN mRNA の 3'-非翻訳領域が RNA の不安定化に関与することが示唆された。次に、3'-非翻訳領域を有するプラスミドを細胞へ導入後、培地グルコース濃度を变化させた場合の影響について観察した。その結果、生理的グルコース濃度 (5.5 mM) と比較して、高濃度のグルコース (11 mM、25 mM) を含む培地では、ルシフェラーゼ活性は、低下傾向、および有意に低下した。このことから、FASN mRNA の 3'-非翻訳領域には、グルコースに反応して本 mRNA の分解に関与する領域を含むことが示唆された。

摂食後の消化管から刺激が脳を介して肝臓へ伝達され、FASN 遺伝子の転写を上昇させると推定し、消化管から脳へ至る求心性の自立神経を切断したラットを作成した。本動物に高スクロース無脂肪食を給餌し、2 時間後に FASN および関連遺伝子の発現量を測定した。その結果、FASN mRNA 量は偽手術を行ったラットよりも増加傾向であり、SREBP1c については有意に上昇していた。このことは当初、推定していた結果と異なり、消化管からの脳への求心性のシグナルは、FASN の遺伝子発現を抑制することに寄与していると考えられた。

飼料組成の異なる試験食を給餌後の FASN および関連遺伝子の mRNA 量を測定したところ、高スクロース無脂肪食群、高スクロース大豆油食群、コーンスターチ大豆油食群の順で、FASN mRNA の顕著な誘導が見られた。DNA マイクロアレイによって mRNA 量を網羅的に解析したところ、それぞれの試験食によって変化する遺伝子に特徴があることが

明らかになった。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

我妻紀代恵, 白川仁, 駒井三千夫 飼料組成の異なる試験食を給餌した後の脂肪酸合成酵素 mRNA 量の変化 第 67 回日本栄養・食糧学会大会 2013 年 5 月 25 日 名古屋

我妻紀代恵, 白川仁, 駒井三千夫 飼料組成の異なる試験食給餌後のラット肝臓での脂肪酸合成酵素 mRNA 量の変化 日本農芸化学会 2013 年度大会 2013 年 3 月 26 日 仙台

我妻紀代恵, 白川仁, 駒井三千夫 摂食後のラット肝臓での脂肪酸合成酵素 mRNA 量への給餌飼料組成の影響 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 15 日 福岡

我妻紀代恵, 白川仁, 駒井三千夫 ラット肝臓における脂肪酸合成酵素遺伝子の転写後調節機構の解析 日本農芸化学会東北支部第 147 回大会 2012 年 10 月 6 日 弘前

我妻紀代恵, 白川仁, 駒井三千夫 ラット肝臓での脂肪酸合成酵素遺伝子の転写後調節機構の解析 第 66 回日本栄養・食糧学会大会 2012 年 5 月 19 日 仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔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

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

白川 仁 (SHIRAKAWA, HITOSHI)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号: 40206280

(2)研究分担者

後藤 知子 (GOTO, TOMOKO)  
東北大学・大学院農学研究科・助教  
研究者番号: 00342783

(3)連携研究者

( )

研究者番号: