

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580175

研究課題名(和文)新規摂食応答遺伝子による脂肪酸合成制御機構の解析と抗肥満への応用

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of fatty acid synthesis regulation by a novel feeding response gene and its application in anti-obesity therapy

研究代表者

井上 順 (Inoue, Jun)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：70323962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：新規摂食応答遺伝子MIG12が脂肪酸合成系酵素であるACCの機能を亢進することを示した。MIG12がACCのポリマー化を促進することでその酵素活性を上昇させること、その活性上昇にはMIG12のC末端側のロイシンジッパードメインが重要な役割を担っていることを示した。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)：We demonstrated that MIG12, a novel feeding response gene, stimulates the activity of ACC by accelerating ACC polymer formation. We also showed that leucine zipper domains located at the C-terminal of MIG12 contribute to the regulation of ACC. These results indicate that MIG12 is a novel modulator of lipogenesis.

研究分野：食品生化学

キーワード：脂肪酸合成 脂肪肝 LXR ACC

## 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、さらに動脈硬化薬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 の発現が小腸特異的に亢進すること (Inoue, J. *et al.* (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **371**, 675-678)、および MIG12 が LXR 標的遺伝子であり、LXR 活性化時の脂肪酸合成亢進に寄与することを明らかにしてきた (Inoue, J. *et al.* (2011) *Mol. Endocrinol.* **25**, 995-1005)。その後、MIG12 による脂肪酸合成亢進の作用点を検討したところ、脂肪酸合成の律速酵素である ACC の活性化に寄与することを発見した。時を同じくして、MIG12 が ACC の活性化に寄与することが報告された (Kim, C. W. *et al.* (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 9626-9631)。ACC は脂肪酸合成の初発酵素であり、アセチル CoA からマロニル CoA の生成を行う。休止

状態の ACC は二量体であり、その二量体がフィラメント状に重合することで活性化する (ポリマー化と呼ばれている)。このポリマー化は ACC のリン酸化等の翻訳後修飾や細胞内のクエン酸濃度によって制御されていると考えられているが、実際には不明な点が多く残されている。

型糖尿病においては肝臓での脂肪酸合成・トリグリセリド合成が活性化しており、ACC や DGAT2 等の脂肪酸・トリグリセリド合成系の酵素発現を抑制することにより、インスリン抵抗性が改善する (Savage, D. B. *et al.* (2006) *J. Clin. Invest.* **116**, 817-824, Yu, X. X. *et al.* (2005) *Hepatology* **42**, 362-371)。そこで本申請研究では、MIG12 発現抑制によりインスリン抵抗性が改善するかどうかを検証する。予備的な検討として、型糖尿病モデルマウス (ob/ob マウスおよび高脂肪食を 20 週間負荷したマウス) の肝臓における MIG12 遺伝子の発現レベルを mRNA レベルで検証したところ、約 2 倍の発現上昇が確認された。これは、型糖尿病における脂肪酸合成亢進には MIG12 の発現上昇が寄与している可能性を示している。

## 2. 研究の目的

MIG12 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が発見した遺伝子であり、肝臓において摂食時に発現上昇し、新規脂肪酸合成の促進に関与することを報告してきた。本申請研究では、MIG12 による脂肪酸合成促進機構について、特に脂肪酸合成の律速酵素である ACC の活性調節機構に焦点を絞り解析を行った。

また、MIG12 活性制御による II 型糖尿病の治療・予防の可能性を検討することを目的として、II 型糖尿病モデルマウス肝臓における MIG12 発現を抑制し、脂肪肝およびインスリン抵抗性の改善効果が得られるかを検討した。

## 3. 研究の方法

(1) MIG12 による ACC 活性制御機構の解析  
予備的な検討により、MIG12 が ACC とタンパク質レベルで結合していること、MIG12 がホモダイマーを形成すること、および MIG12 が S14 (MIG12 とタンパク質レベルで約 32% の相同性) とヘテロダイマーを形成していることを明らかにしている。そこで、それら三者の結合と ACC 活性化の関連について解析する。各因子の Deletion およびアミノ酸置換体等の変異体を用いて解析を行う。さらに MIG12 のリン酸化等の翻訳後修飾と ACC 活性化能との関連についてもあわせて検討する。

(2) MIG12 活性制御による 型糖尿病の治療・予防の可能性の検証  
型糖尿病モデルマウスを用いる。肝臓での MIG12 発現を抑制し、脂肪肝およびインスリン抵抗性の改善効果が得られるかどうかを検証する。肝臓で

の MIG12 遺伝子発現抑制には Antisense Oligonucleotide(ASO)法を使用する。

#### 4. 研究成果

##### (1) MIG12 による ACC 活性制御機構の解析

MIG12 のロイシンジッパードメインに変異を入れると、タンパク質発現量が低下する

MIG12 は C 末端にロイシンジッパードメインを有している。ロイシンジッパードメインは、7 アミノ酸ごとにロイシンが配列し、タンパク質の二量体形成に重要な領域である。MIG12 による ACC ポリマー化亢進に、この領域が重要であるか検討するために、3 つのロイシンをアラニンに置換した変異体を作製し、C 末端に 3×FLAG タグを付加した(以降、3LA-3FL と示す)。変異体のタンパク質発現量は、野生型 MIG12-3FL に比べて、非常に低く、MIG12-3FL のプラスミドを 1/10 量にまで減らすと発現が同程度になった。また、MIG12-3FL はダブルバンドで検出されるのに対し、3LA-3FL はシングルバンドで検出された。以上より、ロイシンジッパードメインは、MIG12 のタンパク質発現あるいは安定性に重要であることが示唆された。

MIG12 はロイシンジッパードメインを介して二量体を形成する

ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞に、3LA-3FL と野生型 MIG12-RGS-His を共発現させた。発現量を揃えるために、3LA-3FL は 5  $\mu$ g/dish、それ以外は 0.5  $\mu$ g/dish のプラスミドをトランスフェクションした。48 時間後に細胞を回収し、FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行い、Western Blotting に供した。FLAG 抗体、RGS-His 抗体により、input において各種タンパク質が同程度発現していることを確認した。FLAG 抗体で免疫沈降し、RGS-His 抗体で検出した時に、MIG12-RGS-His 過剰発現群では、28k Da の位置に MIG12-RGS-His のバンドが検出されないが、MIG12-3FL と共発現させると検出された。ゆえに、MIG12 が二量体を形成することが確認された。一方、MIG12-RGS-His と 3LA-3FL を共発現させると、28 kDa の位置にシグナルは検出されたが野生型に比べると弱く、3LA-3FL では二量体形成が抑制されたことが示された。以上から、MIG12 はロイシンジッパードメインを介して二量体を形成することが示され、3LA-3FL 変異体では二量体形成能が低下することが明らかとなった。

MIG12 の二量体形成は ACC との結合に重要であり、ACC ポリマー化亢進に必要な可能性がある

続いて、ACC ポリマー化亢進における MIG12 のロイシンジッパードメインの重要性を検討した。ヒト肝がん由来 HepG2 細胞に、MIG12-3FL または 3LA-3FL 発現プラスミドをそれぞれ 0.5  $\mu$ g/dish、5  $\mu$ g/dish 量ト

ランスフェクションした。BN-PAGE 後、Western Blotting に供し、ACC 抗体を用いてポリマー化 ACC を検出した。その結果、MIG12-3FL 過剰発現群ではこれまでと同様、mock 群に比べ ACC のポリマー化亢進が見られたが、3LA-3FL を過剰発現させてもポリマー化亢進は見られなかった。またこの時、同様のサンプルを FLAG 抗体で検出すると、ポリマー-ACC と同位置に MIG12-3FL のシグナルが検出されたが、3LA-3FL 群では見られなかった。しかし、SDS-PAGE で用いたサンプルと同様のものを SDS 処理し、SDS-PAGE に供したところ、3LA-3FL の発現量は野生型に比べやや低かったことから、今回は変異を入れたことによりポリマー化が抑制されたのか、発現量が低いため抑制されたのか、判別はできなかった。

次に、3LA 変異体の MIG12 と ACC の結合へ及ぼす影響について検討した。HEK293 細胞に MIG12-3FL または 3LA-3FL を過剰発現させ、FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行い、Western Blotting に供した。FLAG 抗体により免疫沈降が十分なされていることを確認した。FLAG 抗体で免疫沈降し、ACC 抗体で Western Blotting したところ、MIG12-3FL 過剰発現群で 265 kDa の位置に ACC のバンドが検出された。よって、MIG12 は ACC と結合することが示された。一方、3LA-3FL 過剰発現群では、この結合は減弱した。以上から、MIG12 のロイシンジッパードメインは、ACC との結合に重要であることが明らかとなり、ACC のポリマー化亢進に重要であることが示唆された。

MIG12 の 106 番目から 135 番目のアミノ酸領域 (MB 領域) は ACC のポリマー化亢進に重要な領域の 1 つである

MIG12 と Spot14 はアミノ酸レベルで 34% という高い相同性を持っており、Spot14 も MIG12 と同様、脂肪酸合成に関与することが知られているが、MIG12 とは異なり、ACC のポリマー化は亢進しない。また、MIG12 と Spot14 のアミノ酸配列を比較すると、相同性の高い領域と低い領域に分かれている。そこで、ACC の活性制御における 2 つのタンパク質の作用の違いは、相同性の低い領域の差によるものなのではないかと考え、それらの領域を組み替えることで MIG12 における ACC のポリマー化亢進に重要な領域の同定を試みることにした。

各種プラスミドをヒト肝がん由来 HepG2 細胞に過剰発現させ、ACC のポリマー化状態を BN-PAGE 法を用いて検証した。その結果、MIG12 の 106 番目から 135 番目のアミノ酸領域 (MB 領域) を Spot14 の相同領域に組み替えた場合に、MIG12 による ACC ポリマー化亢進効果が減弱したことから、MIG12 の MB 領域が ACC ポリマー化亢進に重要である可能性が示された。

Spot14 との組み換えは、MIG12 の二量体形成能には影響しない

ヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞に、C 末端に 3×FLAG タグを付加した各種キメラタンパク質発現プラスミドと C 末端に RGS-His タグを付加した MIG12-RGS-His 発現プラスミドを共発現させた。48 時間後に細胞を回収し、FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行い、Western Blotting に供した。FLAG 抗体、RGS-His 抗体により、input において各種タンパク質が同程度発現していることを確認した。FLAG 抗体で免疫沈降し、RGS-His 抗体で検出すると、上記 MIG12 の MB 領域を Spot14 に組み替えた全てのキメラタンパク質発現群において、28k Da の位置に MIG12-RGS-His のバンドが野生型 MIG12-3FLAG 発現群と同程度で検出された。以上から、MB の領域は MIG12 の二量体形成に関与しないことが示された。

ACC のポリマー化レベルは、キメラタンパク質の ACC との結合能と相関する

続いて、キメラタンパク質と ACC との結合能を検討した。HEK293 細胞に、C 末端に 3×FLAG タグを付加した各種キメラタンパク質発現プラスミドを過剰発現させた。48 時間後に細胞を回収し、FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行い、Western Blotting に供した。FLAG 抗体により免疫沈降が十分なされていることを確認した。FLAG 抗体で免疫沈降し、ACC 抗体で Western Blotting したところ、MIG12-3FL 群で 265 kDa の位置に ACC のバンドが検出された。この時、上記 MIG12 の MB 領域を Spot14 に組み替えた全てのキメラタンパク質では野生型よりも弱いシグナルが検出され、ACC との結合能が低下したことが示唆された。

(2) MIG12 活性制御による 2 型糖尿病の治療・予防の可能性の検証

#### ASO 配列の決定

マウス肝臓での MIG12 発現を抑制するために ASO 法を用いた。予備検討として、培養細胞を用いた ASO 配列の決定を行い、MIG12 遺伝子に相補的な 20 塩基の一本鎖 RNA 配列を決定した。

#### マウスを用いた検討

マウス個体肝臓での MIG12 の機能の検討を行った (各群 n=6)。マウス体重 1kg あたり 10mg の ASO を Day1 および Day4 に 2 回にわたり腹腔内投与したところ、Day6 において MIG12 mRNA レベルの低下および ACC のポリマー化の抑制が観察された。

#### II 型糖尿病モデルマウスを用いた検討

次に II 型糖尿病モデルである ob/ob マウスに MIG12 ASO を投与し、MIG12 発現抑制の糖尿病に対する効果の検証を試みた (各群 n=8)。マウス体重 1kg あたり 10mg の ASO を一週間に 2 回腹腔内投与し、これを 8 週間継続した。しかしながら、長期間の ASO 処理に

より、肝臓における MIG12 発現の抑制が観察できず、MIG12 の効果の検証を行うことは出来なかった。現在、CRISPER/Cas システムを用いた MIG12 遺伝子欠損マウスの作製に着手している。

#### 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 1 件)

1. Shimizu, M., Li, J., Inoue, J., and Sato, R. (2015)

Quercetin represses apolipoprotein B expression by inhibiting the transcriptional activity of C/EBP $\beta$ . PLoS ONE **10**, e0121784 査読有

[学会発表](計 4 件)

1. 清水 誠、李 娟、井上 順、佐藤 隆一郎

<ケルセチンによる apoB 遺伝子の発現調節機構>

日本農芸化学会 2015 年度大会 / 2015. 3. 27. / 岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市)

2. 井上 順、佐藤隆一郎

<ポリフェノール類による転写制御を介した代謝改善効果>

第 68 回日本栄養・食糧学会大会 / 2014. 5. 31 / 酪農学園大学 (北海道・札幌市)

3. 和泉 彬子、池内 江美奈、宮田 慎吾、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎

<MIG12 による ACC ポリマー化亢進機構の解明>

日本農芸化学会 2014 年度大会 / 2014.3. 28 / 明治大学生田キャンパス (神奈川県・川崎市)

4. 和泉 彬子、宮田 慎吾、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎

<MIG12 によるトリグリセリド合成促進作用の解析>

日本農芸化学会 2013 年度大会 / 2013.3. 26 / 東北大学川内北キャンパス (宮城県・仙台市)

#### 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・准教授

研究者番号 : 70323962