

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007~2008

課題番号：19580158

研究課題名（和文）糖新生酵素遺伝子発現抑制に関わる新規転写因子の生体機能解析

研究課題名（英文）Biological analysis of a novel transcription factor involved in the gluconeogenesis

研究代表者

山内 淳(YAMAUCHI JUN)

(独)国立健康・栄養研究所 栄養疫学プログラム・生体指標プロジェクト 上級研究員

研究者番号:80312297

研究成果の概要：

栄養素の一つであるグルコースは、生体内において最も重要なエネルギー源であり、その血中濃度は一定に保たれている。これは、インスリンにより、食事由来グルコースの末梢組織での取込みと肝臓でのグルコース産生（糖新生）が厳密に調節されるためである。しかしインスリン抵抗性を示す糖尿病では、末梢組織におけるグルコース取込み量の低下、および糖新生系酵素の制御不能によるグルコース産生の亢進から、血糖値の更なる上昇がおこる。このようにインスリンは血糖値調節に重要な役割を果たすが、様々な要因で誘発されるインスリン抵抗性の病態では、インスリンに依存しないシグナル伝達経路が血糖値の制御において重要になると考えられる。糖新生制御において鍵酵素である phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) 遺伝子発現は、インスリンやグルカゴン、グルココルチコイドのような複数のホルモンによって転写レベルで調節されている。それぞれのホルモンは、PEPCK 遺伝子プロモーター領域内の各ホルモン応答配列を介してその効果を発揮する。これらの配列は複数の転写因子により認識され、さらに共役転写因子も調節に関与していることが知られている。一方、グルコース利用性に応じた糖代謝調節機構は、酵母においてよく研究されており、タンパク質リン酸化酵素の一つである sucrose-non fermenting 1 (SNF1) 複合体が、主に転写因子群を直接リン酸化することで、糖代謝に関与する遺伝子の発現量を調節し、グルコース利用に応じた細胞内糖代謝の制御を行う。細胞内エネルギーセンサーとして糖・脂質代謝酵素をリン酸化することにより活性を調節している AMP-activated protein kinase (AMPK) は酵母 SNF1 の哺乳類におけるホモログである。近年 AMPK が転写調節に関与する核内タンパクをリン酸化し、転写活性を調節するという報告もあり、すなわち AMPK が酵素活性のみならず遺伝子発現を制御することによって糖・脂質代謝に関与する可能性を示す。しかしながら AMPK シグナル伝達系を介した糖新生制御の詳細な分子メカニズムは明らかにされていない。そこで本研究では、AMPK シグナル伝達が転写因子のリン酸化を介して PEPCK 遺伝子発現を抑制するとの作業仮説をたて、この調節に関与する転写因子の検索および機能解析を行った。さらに同定した転写因子の過剰発現マウスを作製し、生体における糖新生反応への効果を検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,400,000	420,000	2,220,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,690,000

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：栄養生化学

1. 研究開始当初の背景

食品中に存在する栄養素には、主に体を構成するものの他にビタミン、ミネラル、糖質、脂肪酸など低分子成分による生体の恒常性調節・維持機能を持つものが知られている。特に脂溶性ビタミンであるビタミン A や D、鉄、亜鉛などは細胞内の特異的タンパク質に結合し、遺伝子の発現を転写レベルおよび転写後レベルで制御していることが明らかになっている。これらの成果は生体における栄養素の重要性を証明するにとどまらず、創薬、さらには生命科学全般に対しても極めて重要な知見を与えた。これまでも様々な栄養素が遺伝子発現に関与すると考えられる報告が蓄積しているが、系統的な研究に乏しく詳細に理解されているとは言えない。そこで本研究では栄養素の新規な生理活性、特に重要な栄養成分であるグルコース代謝に関連した遺伝子発現制御機構について明らかにしたい。

2. 研究の目的

血中グルコース（血糖）は生物にとって最も重要なエネルギー源である。哺乳類は絶食による低血糖や高炭水化物食摂取による急激な血糖上昇などの環境にありながら、血糖値

は極めて狭い範囲で維持されている。これは主として肝臓からの糖新生と、骨格筋や心筋、脂肪などの末梢組織からの糖の取り込みといったグルコース収支のバランスが厳格に調節されているからである。肝臓からのグルコース産生はグリコーゲン分解、及び乳酸やピルビン酸、グリセロール、アラニンなど糖以外の基質からグルコースを合成する糖新生による。グリコーゲン分解は食後数時間のうちに開始されるが、糖新生は長時間絶食において最も重要な血糖値調節機構である。糖新生は phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), fructose-1,6-bisphosphatase および glucose-6-phosphatase などの酵素によって厳格に調節される。特に PEPCK はオキザロ酢酸からフォスフォエノールピルビン酸への不可逆的な反応を触媒する糖新生系の鍵酵素である。PEPCK 遺伝子発現は、グルカゴンやグルココルチコイドなどの複数のホルモンが CREB、GR といった転写因子群を介して転写レベルで活性化されるが、これらの活性化には SRC-1、p300/CBP、PGC-1 などの coactivator が密接に関与することが知られている。一方、PEPCK 遺伝子発現はインスリンによって負の調節を受ける。従って糖尿病の

場合、インスリンレベルの減少あるいはインスリン抵抗性のため糖新生の抑制がかからず血糖値が上昇し、その結果空腹時高血糖及び食後高血糖を呈する。同じ真核生物である酵母は、培地中のグルコース濃度が低下すると、細胞内プロテインキナーゼである SNF1 が活性化される。活性化 SNF1 はその下流の様々な転写因子をリン酸化することで主にヘキソーストランスポーターなどの遺伝子発現を上昇させ、糖の取り込みを促進する。逆に培地中のグルコース濃度が上昇すると SNF1 は不活性化されて糖の取り込みが押さえられる。高等真核生物にも SNF1 と構造的、機能的に類似したプロテインキナーゼ AMP dependent protein kinase (AMPK) が存在する。AMPK は低血糖、運動等による ATP 消費の結果細胞内 AMP/ATP 比が上昇すると活性化され、糖代謝、脂質代謝系酵素活性の調節および遺伝子群の発現調節を行っており、生体におけるエネルギーバランスの制御をつかさどる。このことから、AMPK は糖新生系酵素遺伝子発現にも重要な機能を有することが予想される。事実、AMPK の活性化は、PEPCK 遺伝子発現を抑制することが報告されている。このことは、前述したインスリンとは別の経路で PEPCK 遺伝子発現抑制機構が存在することを示唆しているが、現在のところ詳細な機構は不明である。そこで本研究は、PEPCK 遺伝子発現における AMPK の役割の分子メカニズムを解明したい。申請者はこれまでに AMPK によって直接リン酸化される新規の転写因子である AICAR Responsive Element Binding Protein (AREBP) と名づけた新規転写因子の同定に成功している。AREBP はリン酸化依存的に PEPCK 遺伝子発現を負に調節することを明らかにした。これをさらに発展させ本研究期間内に AREBP の遺伝子改変動物を用いた個体レベルの解析を中心

とした研究を推進したい。現在糖尿病治療薬として使われているメトフォルミンはこれまで作用機序が不明であったが、最近 AMPK の活性化を伴うことが報告された。AMPK 下流のシグナル伝達系を解明すること、すなわち AREBP の生体機能の詳細な解析は、わが国の最も深刻な生活習慣病の一つである糖尿病の発症の予防、治療に貢献できる可能性がある。

3. 研究の方法

これまでに、AICAR Responsive Element Binding Protein (AREBP) と名づけた新規転写因子の同定に成功している。これまでの *in vitro* における研究成果により、AREBP の性状は以下に要約される。

- 1) AREBP は、糖新生系の鍵酵素遺伝子である PEPCK 遺伝子プロモーター上に結合する。
- 2) AREBP は N 末端領域に核移行シグナル、中央部にグルタミン酸に富む領域、C 末端領域に Zn-finger を持つ新規の因子である。
- 3) 470 番目のセリンが AMP-activated protein kinase (AMPK) によって特異的にリン酸化される。
- 4) AREBP はリン酸化に伴う DNA 結合能の消失が観察されたが、リン酸化を受けない人工変異体 (AREBP_{S470A}) は結合能を維持する。
- 5) AREBP は AMPK でリン酸化されることによって PEPCK 遺伝子の転写を負に制御する。

これらのことから、AREBP は AMPK シグナル伝達系の下流に位置し、糖新生を調節する新規転写因子として機能する可能性が示唆された。

そこで本研究は主として AREBP の個体レベルにおける機能解析を行い PEPCK 遺伝子発

現における AMPK の役割の分子メカニズムの解析を行う。

4. 研究成果

本研究により、AMPK 活性化を介した糖新生制御における分子メカニズムの一端を明らかにすることができた。糖新生は血糖値の恒常的維持に必要であるが、一方で糖尿病における血糖上昇の要因ともなる。アブノーマルな解糖や糖新生による過剰なグルコース産生とインスリン抵抗性によって引き起こされる糖取り込みの低下は典型的な糖尿病の症状である。運動、アディポネクチン、レプチンや、経口血糖降下薬として長年使われているメトホルミンは AMPK の活性化を介して糖新生を抑制することが知られている。すなわち、AMPK 依存的な AREBP の機能がこれらの分子メカニズムの一端を担う可能性がある。本研究が、転写因子 AREBP の転写抑制における他の因子との相互作用や AREBP 遺伝子の発現調節機構など、AMPK シグナル伝達による PEPCK 遺伝子発現調節を介した糖新生制御のより詳細な分子メカニズムの解明への端緒となるものと考ええる。

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)

Koitaya, N. Ezaki, J. Nishimuta, M. Yamauchi, J. Hashizume, E. Morishita, K. Miyachi, M. Sasaki, S. and Ishimi, Y. Effect of Low Dose Vitamin K2 (MK-4) Supplementation on Bio-Indices in Postmenopausal Japanese Women. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2009;55: 15-21.

Inoue, E. Ishimi, Y. and Yamauchi, J. * (* corresponding author) Differential Regulation of Extracellular Signal-related Kinase Phosphorylation by Vitamin D₃ Analogs. *Biosci.*

Biotechnol. Biochem. 2008; 72(1): 246-249.

Inoue, E. and Yamauchi, J. * (* corresponding author) AMP-Activated Protein Kinase Regulates PEPCK Gene Expression by Direct Phosphorylation of a Novel Zinc Finger Transcription Factor.

Biochem Biophys Res Commun. 2006;351: 793-799.

Yamauchi, J. * (* corresponding author)

The establishment of a HeLa cell-line demonstrating rapid mitogen-activated protein kinase phosphorylation in response to 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ by stable transfection of chick skeletal muscle cDNA library.

Biosci. Biotechnol. Biochem. 2006; 70(1):312-315.

[学会発表] (計 3 件)

Yamauchi, J. Inoue, E.

AMP-activated protein kinase regulates PEPCK gene expression by direct phosphorylation of a novel Zn-finger transcription factor.

20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress 2006 June (Kyoto)

山内淳、井上絵里奈

AMP 活性化プロテインキナーゼによってリン酸化される新規転写調節因子の解析
第 59 回日本栄養・食糧学会大会シンポジウム「分子栄養学の最前線」2005.5.14 東京農業大学 (東京)

山内淳

糖新生系酵素遺伝子発現を調節する新規転写因子の解析第 307 回脂溶性ビタミン総合研究委員会 : 2005.3.4 お茶の水女子大学 (東京)

〔図書〕（計1件）

AMP活性化プロテインキナーゼシグナル伝達による糖新生酵素遺伝子発現調節機構
2007山内淳 ILSI japan 89: 10-19

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

発明者 山内淳 出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

発明の名称：AMP プロテインキナーゼによってリン酸化される新規転写因子とその遺伝子 特許番号：2004-344163. 2004.11.29

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 淳(YAMAUCHI JUN)

(独)国立健康・栄養研究所 栄養疫学プログラム・生体指標プロジェクト 上級研究員

研究者番号:80312297

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし