

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：34439

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11570

研究課題名(和文) 転写因子ChREBPの活性化阻害によるメタボリックシンドロームの改善に向けて

研究課題名(英文) Improvement of metabolic syndrome by inhibiting activation of ChREBP

研究代表者

崎山 晴彦(sakiyama, haruhiko)

千里金蘭大学・生活科学部・准教授

研究者番号：30508958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ChREBP KOマウスの脂肪組織、特に褐色脂肪組織を用いた検討を実施し成果報告を行った。ChREBP KOマウスの褐色脂肪組織ではミトコンドリアのクリステ形成が不十分であることが分かった。クリステの形成にはカルジオリピン(CL)というリン脂質が深く関与していることが知られており、ChREBP KOマウスではCLの合成量が低下していることが質量分析の結果判明した。CL自体の構造には脂肪酸を含んでおり、ChREBPが脂肪酸合成に関わっていることから脂肪酸合成が低下することがCL量低下の直接的な原因であると予想する。今後は動物での解析と平行して阻害剤の探索をさらに進めていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はChREBP KOマウスの解析より、褐色脂肪組織において、ミトコンドリアの形成不全を起していることを見出した。この結果はエネルギー産生の観点からすればChREBP阻害はミトコンドリア機能を低下させるという事になり、必ずしも生体にとっては喜ばしい結果ではない。しかし、先行研究により、ショ糖の小腸での分解・吸収抑制により、抗肥満作用があることを報告した。よってChREBP活性化の阻害は肥満や糖尿病予防を考慮すれば、糖類の吸収抑制という結果であり、社会的意義は大きい。よって、どの程度ChREBPを抑制すれば、エネルギー産生障害がでるのかを検討し、両者のバランスをとることが重要だと考える。

研究成果の概要(英文)：We performed a study using adipose tissue, especially brown adipose tissue, of ChREBP KO mice. ChREBP KO mice showed insufficient mitochondrial cristae formation in brown adipose tissue. A phospholipid called cardiolipin (CL) is known to be deeply involved in the formation of cristae, and mass spectrometric analysis revealed that the amount of CL synthesized was decreased in ChREBP KO mice. Since the structure of CL itself contains fatty acids and ChREBP is involved in fatty acid synthesis, we speculate that the decrease in fatty acid synthesis is the direct cause of the decrease in CL levels. In the future, we plan to further search for inhibitors in parallel with animal analysis.

研究分野：分子生物学

キーワード：エネルギー代謝 ChREBP 転写因子 メタボリックシンドローム 肥満

1. 研究開始当初の背景

摂取された糖質は速やかに単糖類に消化され解糖系を経て脂肪酸や中性脂肪に変換、蓄積される。糖質から脂肪酸合成経路には、多岐にわたる酵素群が関与しておりこれらの経路を担う酵素群は、翻訳後修飾や、ホルモン合成、分泌、栄養摂取などにより制御されている。

ChREBP(Carbohydrate Response Element binding Protein)は糖・脂質代謝に関連する酵素群の発現を調節するグルコース応答性の転写因子である。つまり ChREBP が活性化されれば解糖や脂肪酸合成経路が亢進することになる。同様の機能を持つ SREBP1c (Sterol-response element binding protein) に比べて、ChREBP には不明な点が多く、特に ChREBP 自体の調節メカニズムがよく分かっていなかった。これまでに我々は、14-3-3 タンパク質が ChREBP の N-末端側に結合し、グルコースに応答した核内への移行に深く関与することを明らかにしてきた (Sakiyama et al., *J. Biol. Chem.*, 2008)。さらに、ChREBP のタンパク質修飾を検討したところ、高グルコース濃度により強く O-グリコシレーション修飾(O-GlcNAc 化)を受けることが明らかとなり、O-GlcNAc 化も ChREBP の転写活性に関与することを報告してきた (Sakiyama et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010)。

今回我々は、新たに ChREBP KO マウスが高ショ糖食下で体重と血糖値の増加が野生型 (WT) マウスと比べて抑制されることを見出した。さらにそのメカニズムとして、2 糖類であるショ糖の分解抑制と糖の吸収抑制であることを突き止めた。具体的には、小腸においてショ糖を分解するスクラーゼの発現量が KO マウスで著しく低下していたことに起因する。

しかし、通常食では WT、KO マウスとも同様な体重増加が観察されることや、KO マウスの小腸以外の肥満に関係する組織における解析が不十分であることから、脂肪組織における ChREBP の生理的な役割を検討することは意義深いことである。

2. 研究の目的

ChREBP は糖・脂質代謝に関連する酵素群の発現を調節するグルコース応答性の転写因子である。上で述べたように我々は、ChREBP KO マウスが高ショ糖食下で、体重と血糖値の増加が野生型マウスに比べて抑制されることを見出した。またそのメカニズムは、2 糖類であるショ糖の分解抑制と糖の吸収抑制であることを突き止め、さらに脂肪組織において、蓄積した中性脂肪も積極的に消化されている可能性を示唆する知見を得た。従って、ChREBP の阻害剤は、糖類の消化・吸収抑制と脂肪燃焼とを合わせ持つ新たなメカニズムのメタボリックシンドローム治療薬となりうると思う。本研究の目的は、既に得られた結果をもとにさらに脂肪組織での抗肥満効果の詳細なメカニズムの解明を行うとともに、ChREBP 活性化阻害を示す化合物のスクリーニングを実施することである。

3. 研究の方法

本研究では、ChREBP 活性化の阻害 / 抑制がもたらす抗肥満効果の解明と阻害剤のスクリーニングを行う。そのために、脂肪燃焼に深く関与する UCP1 の発現量が KO マウスで増加するメカニズムを明らかにするとともに、ChREBP がミトコンドリアのエネルギー代謝に与える影響の検討、さらに ChREBP の活性化を阻害 / 抑制する化合物の探索、を行い ChREBP 活性化阻害という作用点を持つ阻害剤 (化合物) の開発を目指す。

UCP1 の増加メカニズムの解明

- a) UCP1 の発現に ChREBP が直接関与している可能性を探るために、マウス褐色脂肪組織より UCP1 のプロモーター領域をクローニングし、解析を行う。例えば、レポータージェンアッセイを行い、ChREBP の有無により転写活性に違いが出るかどうかの検討を行う。
- b) ChREBP による直接の影響がない場合、その他転写因子や核内受容体(例えば LXR や TR など)の発現量に差がないか、mRNA やタンパクレベルで解析する。
- c) さらにリガンドである甲状腺ホルモンやレチノイン酸、ノルアドレナリンなどの濃度に違いがあるかを検討する。

ChREBP とミトコンドリアについて

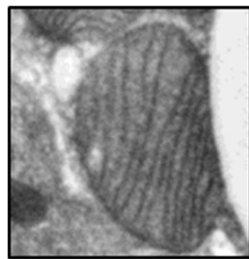
- a) ミトコンドリア内で発現する電子伝達系複合体の発現量をウエスタンブロットで確認する。
- b) ミトコンドリアの形態に違いがあるので、融合・分裂に関するタンパク質 (Opa1、MFN、 Drp など) の発現量を検討する。
- c) 機能評価をする為に、ATP 合成能を解析する。

ChREBP 活性化阻害剤のスクリーニング

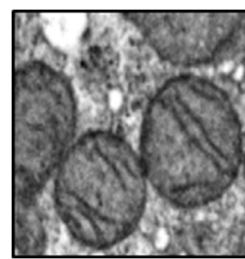
- a) 化合物ライブラリーより、ChREBP 活性化を阻害する化合物のスクリーニングを実施する。この時、ChREBP の核移行を阻害する化合物をスクリーニングする。
- b) リード化合物がいくつか見つかったら、培養細胞系でルシフェラーゼアッセイにより転写活性を阻害する化合物をさらに絞り込む。
- c) 化合物を小動物に投与し、実際に抗肥満効果があるのかを評価する。

4 . 研究成果

我々は以前より、ChREBP KO マウスが高シヨ糖食下で、体重と血糖値の増加が野生型マウスに比べて抑制されることを見出していた。今回、さらに解析を進め、KO マウスの褐色脂肪組織において脱共役タンパク質である UCP1 の発現量の増加を認めるとともに、電子顕微鏡画像より、ミトコンドリアの形成が異常であることを見つけた。



WT



ChREBP KO

同時に、脂肪酸合成系に關与する FAS(脂肪酸合成酵素)の発現量を確認したところ、その他臓器、肝臓、白色脂肪、腎臓などでは野生型 (WT) マウスと変わらず発現していることから、FAS の発現量低下は褐色脂肪特異的であることが示唆された。このことより、褐色脂肪組織では脂肪酸の合成量が低下していると考えられる。

ミトコンドリアは分裂と融合を常に繰り返しており、種々のタンパク質が関与している。膜融合に関わるのが Opa1 や MFN1 といったタンパク質であるが、興味深いことに KO マウスではこれらの発現量が低下していた。クリステ形成には、Opa1 が重要な働きを行っていることが知られている。この Opa1 はカルジオリピン (CL) により活性化され、その機能を発揮する。CL は、4 つの脂肪酸を構造内に有しており、哺乳類の場合炭素数が 18 のリ

ノール酸を多く含むことなども知られている。

そこで我々は、KO マウスの褐色脂肪での脂肪酸の質量分析を行った結果、KO マウスでは有意に低下していることを突き止めた。その結果、Opa1 を十分に活性化できる CL が合成できないため、クリステ形成が不完全であると結論付けた。

以上まとめると、ChREBP KO マウスでは、小腸からの糖類の吸収抑制の他、褐色脂肪組織での UCP1 による脂肪分解の促進により抗肥満作用を発揮すること、さらにはミトコンドリアの異常(クリステの形成不全)などを見出すことができた。ミトコンドリアの異常は、エネルギー代謝の観点からは、我々生体にとっては不利ではあるが、抗肥満作用を鑑みた場合、どの程度 ChREBP が抑制されればミトコンドリアに形成にどのくらい影響がでるのかを見極めて、両者のバランスを取りながら効率よく ChREBP を抑制する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sakiyama H, Li L, Kuwahara-Otani S, Nakagawa T, Eguchi H, Yoshihara D, Shinohara M, Fujiwara N, Suzuki K.	4. 巻 476
2. 論文標題 A lack of ChREBP inhibits mitochondrial cristae formation in brown adipose tissue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Cell Biochem	6. 最初と最後の頁 3577-3590
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11010-021-04178-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Li L, Sakiyama H, Eguchi H, Yoshihara D, Fujiwara N, Suzuki K	4. 巻 11
2. 論文標題 Activation of the mitogen-activated protein kinase ERK1/2 signaling pathway suppresses the expression of ChREBP and in HepG2 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 2008-2018
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13208	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Jung H, Takeshima T, Nakagawa T, MacMillan KS, Wynn RM, Wang H, Sakiyama H, Wei S, Li Y, Bruick RK, Posner BA, De Brabander JK, Uyeda K.	4. 巻 477
2. 論文標題 The structure of importin alpha and the nuclear localization peptide of ChREBP, and small compound inhibitors of ChREBP-importin alpha interactions.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 3253-3269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BCJ20200520.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 崎山晴彦、Li Lan、江口裕伸、吉原大作、藤原範子、鈴木敬一郎
2. 発表標題 転写因子ChREBPは褐色脂肪組織でカルジオリピン合成に関与する
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 崎山晴彦、Li Lan、江口裕伸、吉原大作、藤原範子、鈴木敬一郎
2. 発表標題 転写因子ChREBPのミトコンドリアのクリステ形成における役割
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 崎山晴彦、Li Ran、中川勉、江口裕伸、吉原大作、藤原範子、鈴木敬一郎
2. 発表標題 転写因子ChREBPの脂肪組織におけるあらたな役割
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	江口 裕伸 (Eguchi Hironobu) (60351798)	兵庫医科大学・医学部・准教授 (34519)	
研究分担者	井原 秀之 (Ihara Hideyuki) (50452834)	佐賀大学・医学部・准教授 (17201)	
研究分担者	吉原 大作 (Daisaku Yoshihara) (00567266)	兵庫医科大学・医学部・助教 (34519)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤原 範子 (Noriko Fujiwara) (10368532)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	
研究分担者	鈴木 敬一郎 (Keiichiro Suzuki) (70221322)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関