

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780307

研究課題名（和文）

A T-h o o k 型因子 H M G A 1 の糖新生新規フィードバック制御の解明

研究課題名（英文）

The role of HMGA1 for the G6Pase gene transcription

研究代表者

廣田 恵子（HIROTA KEIKO）

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：00375370

研究成果の概要（和文）：

糖新生律速酵素 G6Pase 遺伝子の発現は、インスリンやグルカゴン等のホルモンによって、転写レベルで厳密に制御されている。本課題においては、G6Pase 遺伝子の転写調節機構について解析を行い、転写活性を抑制する新たな因子として、HMGA1（High Mobility Group A1）を見出した。HMGA1 は、絶食時に発現が亢進し、FOXO1 による転写活性化を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Gluconeogenesis, an extremely important metabolic pathway in the regulation of blood glucose levels under fasting conditions, is activated by glucagon and suppressed by insulin. The rate of gluconeogenesis is modulated by the levels of rate-limiting enzymes such as glucose-6-phosphatase (G6Pase). In this study, I analyzed the mechanism of the G6Pase gene expression and revealed that HMGA1 repressed the FOXO1-dependent G6Pase gene activation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	107,845	32,353	140,198
2011年度	1,192,155	357,646	1,549,801
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,049,999	4,549,999

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：糖代謝、転写制御、HMGA、インスリン、glucose-6-phosphatase、In vivo LUC、線虫、FOXO

1. 研究開始当初の背景
インスリン伝達経路は、血糖値の維持に中心的な役割を果たしている。インスリンは摂食後の血糖値の上昇に伴って膵臓から分泌され、標的臓器に作用し、血糖を低下させる。肝臓はインスリンの主要な標的臓器であり、絶食などの低血糖時には、アミノ酸などから糖を合成する経路、すなわち糖新生経路を活性

化し、血中に糖を放出して血糖値を上昇させる。一方、食後の高血糖時には、インスリン刺激によって糖新生を抑制することで血糖を維持する。2型糖尿病患者において肝糖新生の恒常的な亢進が観察されることから、インスリンなどのホルモンに応答した糖新生の適正なON・OFFは、血糖値恒常性の維持、ひいては糖尿病の発症機序解明に重要である。

糖新生律速酵素G6Pase 遺伝子の発現は、インスリンやグルカゴン等のホルモンによって、転写レベルで厳密に制御されている。FOXO1はインスリンシグナルによって負の制御を受ける転写因子であり、G6Pase 遺伝子発現におけるインスリンによる転写抑制に主要な役割を果たしている。本課題においては、G6Pase 遺伝子の転写調節機構の解明を目的に研究を行った。

2. 研究の目的

HMGA1 (High Mobility Group A1) は、DNA結合ドメインであるAT-hook を3カ所持つ、約20kDa のタンパク質である。これまでに培養細胞実験によって、インスリン受容体の転写を活性化することが報告されている。また、HMGA1 遺伝子欠損マウスでは、表現型のひとつとしてインスリン受容体発現低下によるインスリンシグナルの低下が惹起されること、さらには、HMGA1 遺伝子変異に起因する糖尿病家系も報告されている (*Nat. Med.* Foti D. et. al. 2005)。しかしながら、このHMGA1 遺伝子欠損マウスでは、インスリンシグナル伝達の低下が起きているにもかかわらず、むしろ、インスリン感受性が上昇しているなど、インスリン受容体の発現低下だけでは説明できない表現型が多く惹起されており、その原因は不明のままである。そこで、本課題では、HMGA1 の糖代謝における機能について、FOXO1 との相互作用を中心に明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HMGA1 によるFoxo1 抑制メカニズムの解明

FOXO1 はインスリンシグナル依存的にリン酸化されて、その活性を負に制御される。上述したように、HMGA1 はインスリン受容体の発現を増加させるため、HMGA1 の過剰発現は、インスリンシグナル伝達の亢進と、それに伴ったリン酸化によるFOXO1 活性の抑制化を引き起こすことが予想される。このFOXO1に対する抑制メカニズムについて、培養細胞を用いて検証し、作用機序を解明する。

(2) モデル動物を用いた HMGA1 の機能解明

マウスを用いて HMGA1 の生理的機能を解明する。それと共に、HMGA1 と FOXO1 を中心とした糖新生律速酵素群の発現調節機構を個体レベルで解明したいと考えている。また、HMGA1 欠損マウスでは、恒常的な肝糖新生の活性化が惹起されているが、原因は不明であった。この HMGA1 を介したフィードバックの破綻が、糖尿病発症に重要である可

能性も考えられ、HMGA1 と糖尿病発症・進展との関連解明も視野に入れ解析を行う。

4. 研究成果

はじめに、HMGA1過剰発現によるインスリン伝達経路の活性化とFOXO1リン酸化状態について、培養細胞を用いて検討を行った。その結果、予想に反して、FOXO1のリン酸化状態に変化は見られなかった。次に培養細胞でレポーターアッセイを行ったところ、HMGA1の過剰発現によって、Foxo1野生型 (WT) の転写は抑制された。さらに、FOXO13A 変異体 (3A mut: Akt リン酸化残基3カ所をアラニンに置換した変異体) の転写も野生型とほぼ同程度に抑制した (図1)。これはインスリンシグナル伝達を介さないHMGA1 のFOXO1新規抑制機構が存在することを示唆しており、HMGA1 によるインスリン経路非依存的な新規Foxo1 抑制メカニズムの存在が明らかとなった。

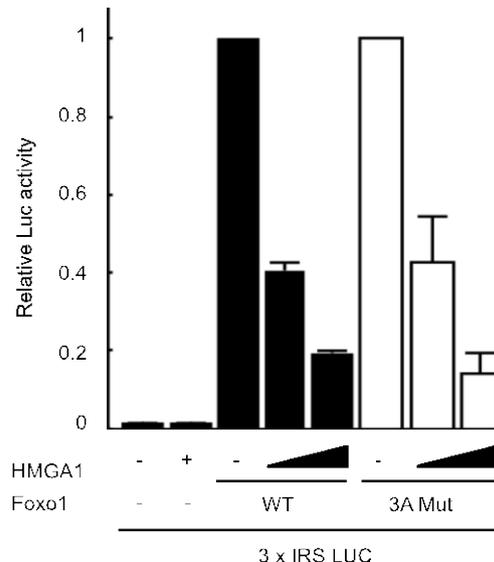


図1. HMGA1はインスリンシグナル非依存的にFOXO1の転写活性を抑制する

さらに、*in vivo*, *in vitro*での結合解析を行い、FOXO1とHMGA1が直接結合することを明らかにした。また、Gal4DBD-FOXO1を用いた解析から、HMGA1はDNA上にリクルートされたFOXO1に作用することが示唆された。

(2) マウス個体でのHMGA1の機能について明らかにするため、マウス肝臓のHMGA1発現量を解析した。解析の結果、摂食時に対して絶食時に多く発現していることが明らかとなった。絶食時にHMGA1 の発現が亢進し、G6Pase 遺伝子発現を抑制するという知見は、一見矛盾しているが、絶食時のHMGA1 の発

現亢進は糖新生のネガティブフィードバック機構として機能している事が考えられた。

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3件)

1. Takahashi Y, Daitoku H, Hirota, K., Tamiya H, Yokoyama A, Kako K, Nagashima Y, Nakamura A, Watanabe S, Yamagata K, Yasuda K, Ishii N, and Fukamizu A. Asymmetric arginine dimethylation determines lifespan in *C. elegans* by regulating forkhead transcription factor DAF-16. *Cell Metab.* 13, 505-516 (2011) 査読有り

2. Hirota, K. and Fukamizu, A. Transcriptional regulation of energy metabolism in the liver. *J. Recept. Signal Transduct. review* 30, 403-409 (2010) 査読無し

3. Oishi, T., Date, S., Shimamoto, Y., Saito, T., Hirota, K., Sugaya, T., Kon, Y., Fukamizu, A., and Tanimoto, K. A nuclear receptor, hepatocyte nuclear factor 4, differently contributes to the human and mouse angiotensinogen promoter activities. *J. Recept. Signal Transduct.* 30, 484-492 (2010) 査読有り

[学会発表] (計11件)

1. 高橋悠太、大徳浩照、廣田恵子、安田佳代、石井直明、深水昭吉
C.elegans におけるアルギニンメチル化酵素 PRMT-1 の寿命制御機構の解明
新学術領域研究「転写代謝システム」若手ワークショップ, 2012年2月9日, 静岡

2. 田宮寛子、廣田恵子、高橋悠太、大徳浩照、石井直明、深水昭吉
線虫 *S*-adenosylmethionine synthetase-1 の産卵数制御機構の解析
第34回日本分子生物学会, 2011年12月13日, 神奈川

3. 飯塚慧、廣田恵子、大徳浩照、深水昭吉
S-adenosyl-L-methionine 量の変化に伴ったヒストンメチル化の解析
第34回日本分子生物学会, 2011年12月13日, 神奈川

4. 萩原彩乃、廣田恵子、高橋悠太、田宮寛

子、渡辺哲史、大徳浩照、深水昭吉
線虫の *S*-adenosylmethionine 合成酵素遺伝子欠損変異体における熱耐性に関する研究
第34回日本分子生物学会, 2011年12月13日, 神奈川

5. 高橋悠太、大徳浩照、廣田恵子、安田佳代、石井直明、深水昭吉
C. elegans におけるアルギニンメチル化酵素 PRMT-1 の寿命制御機構の解明
第15回 日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 2011年11月25日, 大阪

6. Hiroko Tamiya, Keiko Hirota, Yuta Takahashi, Hiroaki Daitoku, Naoaki Ishii, Akiyoshi Fukamizu
S-adenosylmethionine synthetase SAMS-1 regulates brood size in *C. elegans*
18th International *C. elegans* Meeting, 2011年6月23日, カリフォルニア州, (米国)

7. Yuta Takahashi, Hiroaki Daitoku, Keiko Hirota, Hiroko Tamiya, Atsuko Yokoyama, Kayo Yasuda, Naoaki Ishii, and Akiyoshi Fukamizu
Asymmetric Arginine Dimethylation Determines Lifespan in *C. elegans* by Regulating Forkhead Transcription Factor DAF-16
18th International *C. elegans* Meeting, 2011年6月23日, カリフォルニア州, (米国)

8. 田宮寛子、廣田恵子、高橋悠太、渡辺哲史、大徳浩照、石井直明、深水昭吉
線虫の *S*-adenosylmethionine 合成酵素 *sams-1* の機能解析
日本分子生物学会・生化学学会合同大会, 2010年12月7日, 兵庫

9. 廣田恵子、石田純治、坂巻純一、深水昭吉
糖代謝遺伝子のインスリン応答性転写制御機構の解析
日本生化学会関東支部例会「若手が担う次世代型生化学研究」, 2009年6月20日, 茨城

10. 堺井陽香里、廣田恵子、大徳浩照、深水昭吉
HMGA1 による転写因子 Foxo1 を介した G6Pase 遺伝子発現制御機構の解明
日本生化学会関東支部例会「若手が担う次世代型生化学研究」, 2009年6月20日, 茨城

11. 高橋悠太、大徳浩照、山形一行、廣田

恵子、深水昭吉

Caenorhabditis elegans における転写因子
DAF-16 のアルギニンメチル化酵素による制
御機構の解明

日本生化学会関東支部例会「若手が担う次世
代型生化学研究」, 2009年6月20日, 茨城

[その他]

ホームページ等

<http://akif2.tara.tsukuba.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣田 恵子 (HIROTA KEIKO)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：00375370