

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16209

研究課題名(和文) 転写伸長促進因子を介した栄養素による小腸消化吸收機能の改善

研究課題名(英文) Enhancement of digestion and absorption function in small intestine by dietary components through transcriptional elongation factor

研究代表者

本間 一江 (HONMA, Kazue)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：80724765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：摂取した栄養素やその代謝産物は、遺伝子発現を調節する情報物質となりうる。本研究では、栄養素によるエピゲノム因子(ヒストン修飾とその関連分子)を介した遺伝子発現調節機構を明らかにする目的で、フルクトースおよび短鎖脂肪酸応答性遺伝子周辺のヒストンアセチル化修飾を調べた。絶食後のラットに酪酸ナトリウムを添加した食餌を再摂食させると、空腸におけるスクラーゼ・イソマルターゼ複合体(Si)のmRNA発現量は、対照食と比較して増大した。また、Si転写領域のヒストンH3のアセチル化レベルとRNAポリメラーゼIIをリン酸化し転写伸長を促進するCDK9の結合量が、酪酸によって高まることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dietary components can lead to epigenetic alterations, which affect gene expression in the cells. In this study, we focused on the transcriptional regulation of the genes related with nutrient metabolism through epigenetic alterations and investigated histone acetylations around the fructose- and/or short chain fatty acid-responsive genes. Re-feeding a diet containing sodium butyrate for 12 h after starvation in rats led to an increase in the mRNA levels of Si in the jejunum compared with the animals refed a control diet. We have also demonstrated that the acetylation level of histone H3 and the binding of CDK9, which phosphorylates RNA polymerase II, were enhanced in the rats refed a diet containing sodium butyrate at transcription regions of Si gene, which suggests a promotion of transcriptional elongation.

研究分野：分子栄養

キーワード：ヒストン修飾 フルクトース 酪酸 小腸

1. 研究開始当初の背景

(1) 小腸細胞は、幹細胞から吸収細胞に分化する過程で消化吸収関連の遺伝子を発現し、流入する栄養素の消化吸収に対応している。しかしながら、常時栄養素を摂取していないと消化管の消化吸収能は低下し、特に、術後や摂食嚥下障害などで中心静脈栄養を受けている患者では問題となっている。

(2) 研究代表者は、摂取する糖質の種類や量によって、小腸の糖質消化吸収関連遺伝子の発現とそれら遺伝子周辺のヒストン修飾が調節されることを発見してきた。ラットを用いた3日間絶食モデルにおいて、空腸の二糖類水解酵素や糖輸送担体の遺伝子発現は低下し、再摂食によって回復したが、その遺伝子発現の増大時にも、ヒストン H3 のアセチル化修飾が関与していた。

2. 研究の目的

消化吸収能の低下した消化管を回復させることや、摂食嚥下障害者の低栄養状態を改善させるためには、小腸吸収細胞のエピゲノム調節が有効であるという仮説のもと、以下の研究を行うこととした。

エピゲノム因子(ヒストン修飾とその関連分子)による栄養素応答性遺伝子の発現調節機構の解明

低栄養によって機能が低下した消化管のエピゲノムを回復させる栄養素の探索

3. 研究の方法

(1) 小腸のフルクトース輸送担体は、フルクトースによって誘導される。その発現誘導には転写領域におけるヒストンのアセチル化修飾が変動し、その変動にはアセチル化ヒストン結合タンパク質であるプロモドメインタンパク bromodomain4 (BRD4) が関与していることが示唆されている。フルクトースは、解糖系の中間代謝産物に直接代謝されてエネルギーに変換されるため、肝臓ではグルコースよりも急速に脂肪合成を促進させる。そこで本研究では、フルクトースによる肝臓脂肪合成関連遺伝子の発現変動にBRD4が関与するかを検討した。

C57BL/6J マウスに低糖質・高脂質食を与えて1週間飼育し、4時間の絶食後、グルコースもしくは、フルクトースを水溶液として経口投与した。また、それぞれの水溶液にBRD4特異的阻害剤であるJQ1を添加(0.74 µg/100 g BW)した群を設定した。経口投与と開始6時間後に肝臓を摘出し、マイクロアレイおよびリアルタイム RT-PCR 法にて遺伝子発現を解析した。

(2) ラットでは、絶食によって小腸の消化吸収関連遺伝子の発現が低下し、再摂食に伴ってそれらの回復が見られるが、その発現誘導には遺伝子周辺のヒストンアセチル化が関与していることが報告されている。本研究で

は、酪酸のヒストン脱アセチル化酵素阻害作用に着目し、絶食 - 再摂食に伴う小腸の二糖類水解酵素の発現誘導における酪酸摂取の影響を検討した。

SD 系雄ラットを3日間絶食させた後、高スクロース食(対照食)または酪酸ナトリウムを5%添加した高スクロース食(酪酸添加食)を再摂食させ、12時間または24時間後に解剖して空腸を採取した。二糖類水解酵素の酵素活性の測定とリアルタイム RT-PCR 法による糖質消化吸収関連遺伝子の mRNA 発現量の測定を行った。また、スクラーゼ・イソマルターゼ遺伝子(Si)周辺のヒストンアセチル化量とアセチル化ヒストン結合タンパク質 BRD4 および転写伸長因子 P-TEFb (CDK9 および CyclinT1) の結合量を、クロマチン免疫沈降法により測定した。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイ解析の結果より、フルクトースの経口投与によって発現増大した37遺伝子について、qRT-PCRにて mRNA 発現量を確認したところ、27遺伝子の mRNA 発現量はグルコースと比較してフルクトースで有意に増大していた。また、そのうち10遺伝子(*Cyp8b1*, *Dak*, *Plin5*, *Acly*, *Eif2ak3*, *Atp2b2*, *Ddhd2*, *Rab4a*, *Slc30a10*, *Slc35e3*)の mRNA 発現量は、BRD4 阻害剤 JQ1 によって有意に抑制された。

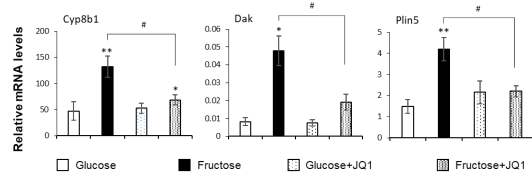
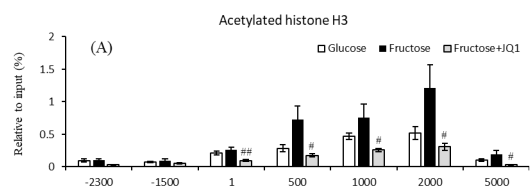


Fig. 1 mRNA levels of genes upregulated by fructose and suppressed by (+)-JQ1 in livers of mice force-fed with glucose or fructose, with or without (+)-JQ1. Quantification of mRNA levels was performed by normalization against the expression of *TF2b* (n=6). Data are expressed as means ± SEM. Statistical analyses were performed by Student's t-test. *Significantly different from mice force-fed with glucose (*P < 0.05, **P < 0.01). #Significantly different from mice force-fed without (+)-JQ1 (#P < 0.05).

フルクトースによって誘導された *Cyp8b1*, *Dak* および *Plin5* は脂質代謝に関連する遺伝子であり、当該遺伝子周辺のヒストン H3 および H4 アセチル化は、フルクトースの投与によって増大した。JQ1 処理は、これらの遺伝子周辺へのBRD4の結合量を減少させるだけでなく、フルクトース誘導性のヒストンアセチル化と mRNA 発現量を抑制した。



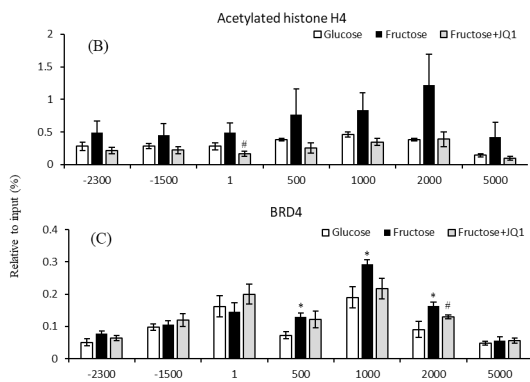


Fig. 3 Binding of acetylated histone and BRD4 around *Cyp8b1* in the liver of mice. ChIP assay for (A) Acetylated histone H3. (B) Acetylated histone H4. (C) BRD4 around the *Cyp8b1* gene in mice force-fed with glucose, fructose and fructose with (+)-JQ1. Data are expressed as means \pm SEM. Statistical analyses were performed by Student's t-test. *Significantly different from mice force-fed with glucose ($*P < 0.05$). #Significantly different from mice force-fed without (+)-JQ1 ($#P < 0.05$, $##P < 0.01$).

これらの結果から、フルクトースを経口投与されたマウスの肝臓における脂質蓄積に関連する遺伝子の急性誘導は、これらの遺伝子周辺のヒストンアセチル化およびBRD4結合が関与していると示唆された。

(2) 空腸の湿重量は、対照食では絶食と比べて再摂食 12 時間そして 24 時間と増大し、酪酸添加群でも再摂食 12 時間から有意に増大していた。一方、回腸の湿重量は、対照食が酪酸添加食に関わらず再摂食 24 時間後に有意に増大した。空腸におけるスクラーゼ、イソマルターゼおよびラクターゼの比活性は、絶食群と比較して対照食が酪酸添加食に関わらず再摂食 12 時間で有意に増大した。*Si* の mRNA 発現量は、対照食の再摂食では有意な変動はみられなかったが、酪酸を添加した場合には、再摂食 12 時間後と 24 時間後において増大する傾向があり、再摂食 24 時間後には対照群と比較して有意に高値であった。*Lph* の mRNA 発現量は、対照食の再摂食で変動はみられなかったが、酪酸を添加した場合には、再摂食 12 時間後で増大する傾向があり、再摂食 24 時間後には有意に増大し、対照群と比較して有意に高値であった。

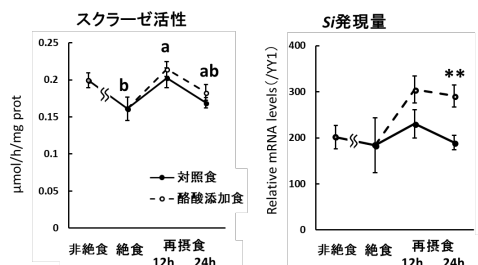


Fig. 2 Effects of starvation and re-feeding a control diet or a diet containing sodium butyrate on the sucrase activity and the *Si* mRNA level in rat jejunum. Data are expressed as means \pm SEM. (n=6) Statistical analyses were performed by Student's t-test. *: Significantly

different from control rat ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$). a-c: Values not sharing a common superscript in the starved animals and those fed the same dietary regimen are significantly different from one another ($P < 0.05$)

Si 転写領域のヒストン H3 のアセチル化量は、再摂食 12 時間後に対照食群と比べて酪酸添加食群で有意に増大した。一方、ヒストン H4 のアセチル化量は、絶食によって *Si* 遺伝子周辺で有意に減少し、特に、転写領域ヒストン H4 のアセチル化量は再摂食 24 時間後でも低いままだった。

Si 遺伝子周辺の BRD4 および CDK9 の結合量は、再摂食 24 時間後に対照食群と比べて酪酸添加食群で有意に高かった。

これらの結果から、再摂食時の酪酸の摂取は、*Si* 遺伝子周辺のヒストン H3 のアセチル化および転写共役因子の結合を増大させ、mRNA の転写伸長と関連していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Yamauchi H, Honma K, Mochizuki K, Goda T: Regulation of the circadian rhythmic expression of *Sglt1* in the mouse small intestine through histone acetylation and the mRNA elongation factor, BRD4-P-TEFb. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 査読有 (2018)

DOI: 10.1080/09168451.2018.1451743

Honma K, Kamikubo, K, Mochizuki K, Goda T: Insulin-induced inhibition of gluconeogenesis genes, including glutamic pyruvic transaminase 2, is associated with reduced histone acetylation in a human liver cell line. *Metabolism* 査読有 71, 118-124 (2017)

DOI: 10.1016/j.metabol.2017.03.009

Yamada A, Honma K, Mochizuki K, Goda T: BRD4 regulates fructose-inducible lipid accumulation-related genes in the mouse liver. *Metabolism* 査読有 65, 1478-1488 (2016)

DOI: 10.1016/j.metabol.2016.07.001

〔学会発表〕(計 5 件)

松本氣寧子、本間一江、合田敏尚：胎児期低栄養は出生後の小腸における糖質消化吸収関連遺伝子の発現を低減させる、第 46 回日本消化吸収学会総会、2015 年 11 月 27 日(千葉)

山田有紀、本間一江、望月和樹、久保田健夫、合田敏尚：フルクトース誘導性の肝臓代謝関連遺伝子の Brd4 を介した発現調節機構、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同学会、2015 年 12 月 1 日(兵庫)

松本氣寧子、本間一江、合田敏尚：胎児期低栄養が哺乳-離乳期の小腸消化吸收関連遺伝子発現に及ぼす影響、第 70 回日本栄養・食糧学会大会、2016 年 5 月 14 日（兵庫）

本間一江、鈴木友莉、山田有紀、望月和樹、合田敏尚：ヒストンアセチル化を介した小腸消化吸收関連遺伝子の転写制御、第 70 回日本栄養・食糧学会大会、2016 年 5 月 15 日（兵庫）

本間一江、鈴木彩花、合田敏尚：酪酸摂取による小腸糖質消化吸收関連遺伝子の発現変動、第 71 回日本栄養・食糧学会大会、2017 年 5 月 20 日（沖縄）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://dfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/labs/nutrphys/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間 一江 (HONMA, Kazue)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：8 0 7 2 4 7 6 5

(2) 連携研究者

合田 敏尚 (GODA, Toshinao)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：7 0 1 9 5 9 2 3

望月 和樹 (MOCHIZUKI, Kazuki)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：8 0 4 2 3 8 3 8