

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591294

研究課題名 (和文)

肝不全新規治療標的としての肝特異的アミノ酸トランスポーター-SNAT4の機能解析

研究課題名 (英文)

Hepatocyte nuclear factor 4 α promotes protein synthesis through the sodium-coupled neutral amino acid transporter 4 in liver development

研究代表者

近藤 宏樹 (KONDOU HIROKI)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10373515

研究成果の概要 (和文): 肝発生過程における HNF4 α 下流分子のスクリーニングを行い、中性アミノ酸トランスポーター-SNAT4 を同定した。SNAT4 は mRNA レベルにおいて他の SNAT ファミリー分子に比べ優位に発現し、免疫組織化学では出生前の E18.5 日に発現し出生後は全ての肝細胞で発現を認めた。SNAT4 に 3 つの新規の選択的プロモーターを同定し、HNF4 α による直接制御を証明した。初代培養肝芽細胞に SNAT4 過剰発現により *de novo* 蛋白合成が増加し、特にレチノール結合蛋白 (RBP)1 が増加した。その mRNA はむしろ低下していたことから、この増加は翻訳レベルであることが示唆された。

研究成果の概要 (英文): We screened the downstream molecules of HNF4a during liver development, sodium-coupled neutral amino acid transporter (SNAT) 4 was identified. The aim of this study is to investigate the regulation of SNAT4 by HNF4a and to clarify its roles in differentiating hepatocytes. SNAT4 mRNA showed a marked perinatal increase in mRNA levels, and was predominant among system A amino acid transporters. It was first detected in E18.5 liver in immunohistochemistry, and found in most hepatocytes after birth. Three alternative first exons were founding SNAT4 gene. Finally, over-expression experiments demonstrated that SNAT4 facilitated amino acid uptake and *de novo* protein synthesis in primary hepatoblasts.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:小児科学

キーワード:肝細胞, アミノ酸トランスポーター, 肝発生・分化, HNF4 α , 栄養学

1. 研究開始当初の背景

Hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α)は、肝細胞の機能に必須の転写因子ですが、肝臓の発生・肝細胞の分化においても中心的な役割を果たす分子である。しかしながら、HNF4 α がどのようなメカニズムで肝発生を制御するのか、未だ充分には明らかではない。そこで我々は、マウス胎仔肝器官培養系に HNF4 α を過剰発現させ

ることにより、肝発生期における HNF4 α の標的分子をスクリーニングし、発現が増強する分子の中に、solute carrier family 38, member 4 (Slc38a4) が含まれていることを見出した。

Slc38a4 は、ナトリウム依存性中性アミノ酸トランスポーター-SNAT4 をコードされ、ナトリウム依存性に中性アミノ酸を輸送する性質を持つ System A に分類される。この System A アミノ酸トランス

ーター群には、SNAT1、SNAT2、SNAT4 の3つが報告されており、成体においては SNAT1 は神経系に発現し、SNAT2 はユビキタスに発現しています。SNAT4 は、肝臓に多く発現し、その他に胎盤や尿細管などにも発現が見られるが詳細な報告はない。

そこで我々は、SNAT4 は肝発生過程において HNF4 α の制御の下に、何らかの役割を果たしているという仮説をたて、まず肝臓における発現パターンと制御を明らかにし肝細胞分化における機能を明らかにすることを目的として研究を始めました。

2. 研究の目的

SNAT4 は肝発生過程において肝臓における発現パターンと制御を明らかにし肝細胞分化における機能を明らかにすること。

3. 研究の方法

ICR マウス胎生 9.5 日胚より胎仔肝を摘出しアデノウイルス発現ベクターを用いて HNF4 α を導入し、対照として同じく LacZ を導入し 24 時間器官培養後、total RNA を抽出しました。PCR-Select を用いて suppression subtractive hybridization を行い、HNF4 α の過剰発現によって発現量が up-regulate した遺伝子群と down-regulate した遺伝子群を同定した。

各発生段階における肝臓を用い mRNA の定量および蛋白発現を Western Blotting と免疫組織学染色にて解析した。また、マウス初代肝芽細胞分化誘導培養系を用い、*in vitro* の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 肝発生過程における SNAT ファミリー分子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で比較した。SNAT4 の発現は肝発生過程において右肩上がりに増加し、とくに E16.5 日と生後1日目を比較すると 8.2 倍の増加であった。SNAT2 は恒常的に発現しており、SNAT1 は初期に一過性の発現であった。比較すると、ファミリー分子の中で SNAT4 は圧倒的に優位であり、その上昇は内因性 HNF4 α の上昇と平行していた(図1)。

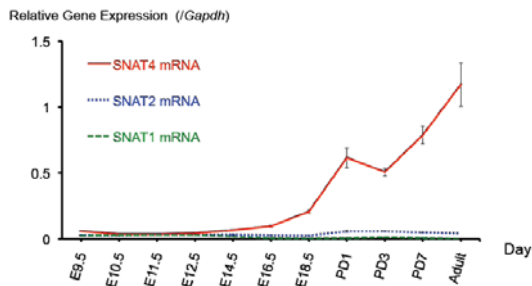


図1:肝発生過程における SNAT ファミリー分子発現の推移

(2) 次に、免疫組織化学にて SNAT4 蛋白の時間的・空間的発現パターンについて調べた。E16.5 日では SNAT4 陽性の細胞を認めず、E18.5 日において陽性細胞を認めた。出生直後には

その発現が十分認められ、形質膜に局在していた。成体肝ではほとんどの肝細胞が陽性で、類洞側を中心に染色を認めた(図2)。

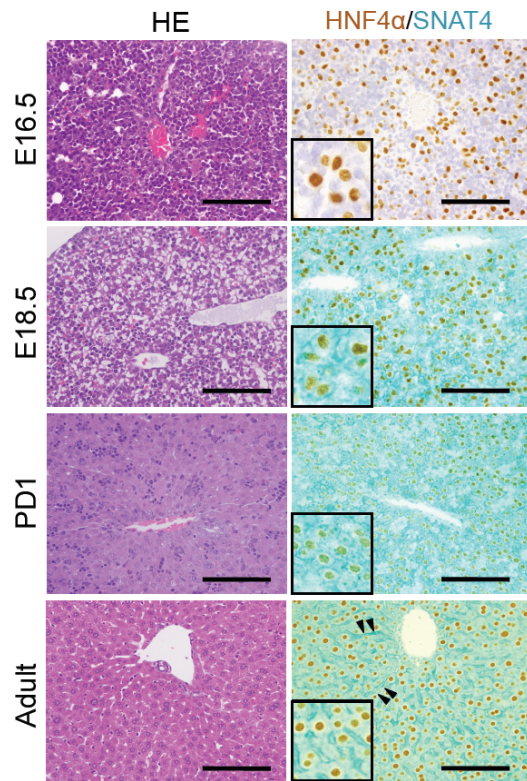


図2:SNAT4 蛋白の時間的・空間的発現分布

(3) SNAT4 の HNF4 α による直接制御を明らかにするために、新生仔肝からRNAを抽出し、5'側を調べたところ、従来報告されていたエクソンの他に、2つの選択的的第一エクソンを見出した。これらをエクソン 1a, 1b, 1cと定義し、それぞれ上流 3kb をクローニングしてレポーターアッセイを行った。エクソン2以降は共通で、翻訳開始点はエクソン2に存在する。内因性に HNF4 α を発現するマウス初代肝芽細胞を用いて、この3つのプロモーターにつきレポーターアッセイを行った。それぞれ逆向きにベクターに挿入したものを対照としており、AP1 と AP2 においてプロモーター活性を検出した。

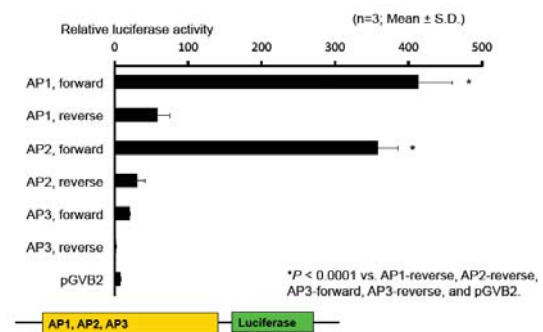


図3:肝芽細胞においては AP1,AP2 が強いプロモーター活性を有した。

(4) インターネット上でエクソン 1a の上流 10kb からイントロン 1 を含む合計 46kb の領域にわたり HNF4 α の結合配列を検索したところ、典型的な結合配列が8カ所見つかり、これらをプローブとして EMSA を行うと、合計6カ所のプローブにおいて、HNF4 α との結合を示すシグナルが確認できた。これらのシグナルは、抗 HNF4 α 抗体添加によりスーパーシフトした。以上の結果より、SNAT4 は HNF4 α により直接的に強く制御される分子であることが示された(図4)。

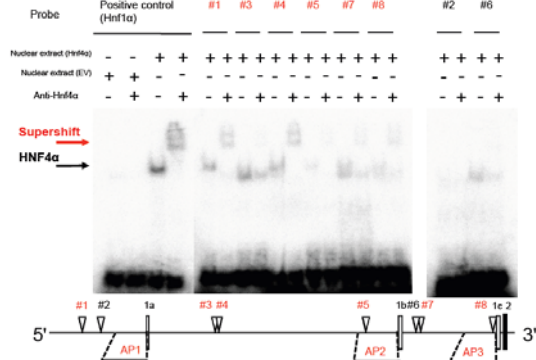


図4: SNAT4 の選択的プロモーターに HNF4 α の結合配列を同定した。

(5) 次にマウス初代肝芽細胞分化誘導培養系と SNAT4 のアデノウイルス発現ベクターを用い、SNAT4 を過剰発現させ、mRNA レベルと、蛋白レベルで SNAT4 の過剰発現を確認した(図5)。

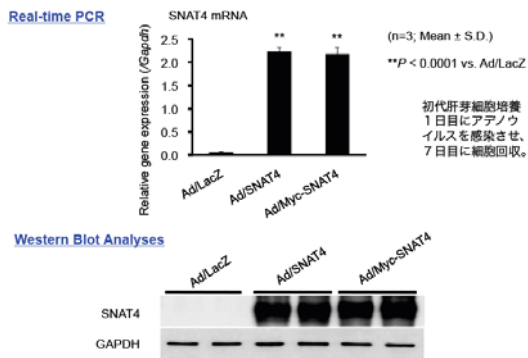


図5: 初代肝芽細胞における SNAT4 過剰発現系の確立

(6) 次に、SNAT ファミリー共通の輸送基質 MeAIB を ^{14}C で標識したものの取り込み能で機能を評価した。MeAIB の取り込みが約 2.5 倍と有意に増加しており、過剰発現させた SNAT4 がアミノ酸トランスポーターとして機能していることを確認できた(図6)。

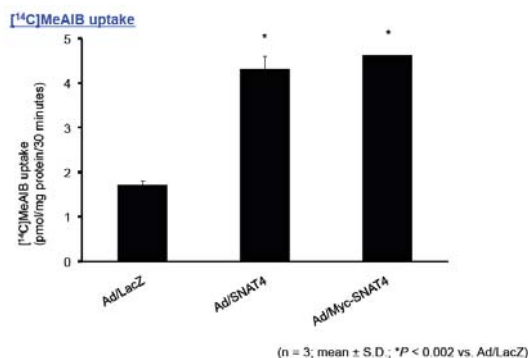
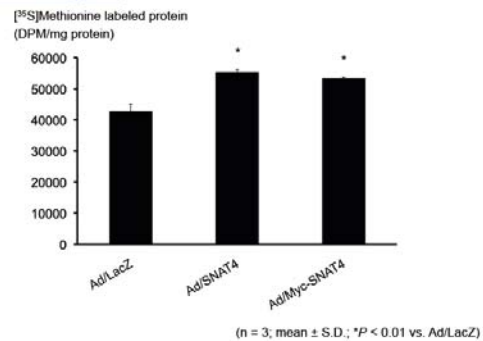


図6: SNAT4 過剰発現により MeAIB 取り込みが増加した。

(7) この系を用いて SNAT4 の生体における機能の証明の為に、 ^{35}S メチオニンを用いたメタボリック・ラベリング実験を行った。4時間取り込ませた後、コールドのメチオニンでフリーの ^{35}S メチオニンを追い出し、16時間後に細胞を回収して新規の蛋白合成を見ると約 1.3 倍で蛋白合成が増加していた(図7)。

図7: SNAT4 は分化誘導肝細胞において de

Metabolic labeling assay



novo 蛋白合成を促進した。

(8) 次に、肝細胞でよく産生されている、rapid turnover protein であるレチノール結合蛋白、他、 α フェトプロテイン、アルブミンに着目して、蛋白レベルで解析した。RBP1 は再現性をもって増加し、AFP も有意差はなかったものの増加傾向を示した。これらのうち、RBP1 蛋白は SNAT4 により再現性をもって増加し mRNA はむしろ減少していたことから、RBP1 蛋白の増加は mRNA の増加の為にではなく、翻訳レベルであることが推測された(図8)。最後に、その他、分化マーカーである HNF4 α や TAT、CPS1、Cyclin D1 に関しては有意な変化を認めなかった。

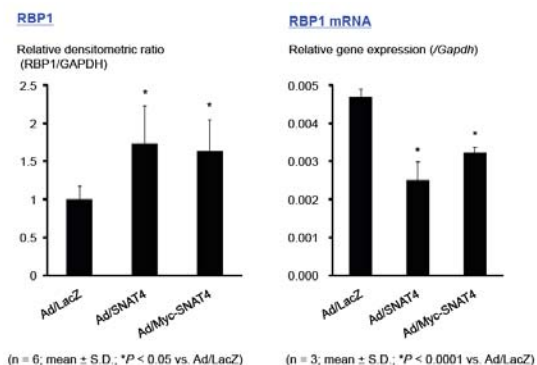


図8: SNAT4 は RBP1 を蛋白レベルで増加させた。

まとめ

- ①マウス胎仔肝において HNF4 α の過剰発現により発現が上昇した分子群を同定し、この分子群に SNAT4 が含まれていた。
- ②SNAT4 mRNA の発現は、System A ファミリー分子の中で優位であり、その増加は、内因性

HNF4 α mRNA の増加と平行していた。

③免疫組織化学では SNAT4 陽性細胞は発生過程において徐々に増加し、生後7日で全ての肝細胞が陽性となった。

④マウス新生仔肝において3つの転写開始点を同定した。

⑤HNF4 α を有する肝芽細胞では AP1 と AP2 が強いプロモーター活性を有した。HNF4 α を有しない HeLa 細胞では AP2 が HNF4 α により強く活性化した。また、SNAT4 の制御領域内に少なくとも6カ所の HNF4 α 結合領域を同定した。

⑥初代培養肝芽細胞に SNAT4 を過剰発現させることにより、肝細胞において MeAIB の取り込みが増加し、*de novo* 蛋白合成が増加した。

⑦特定の蛋白としては、レチノール結合蛋白 (RBP) 1 が増加した。その mRNA はむしろ低下していたことから、この増加は翻訳レベルであることが示唆された。

結語

肝発生過程において SNAT4 が、HNF4 α の下流で働く分子であることを同定した。SNAT4 は、周産期以降の肝細胞においてアミノ酸取り込みや蛋白合成促進といった機能を介して肝細胞分化に寄与することが示唆された。

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)

[学会発表] (計3件)

① 近藤宏樹

肝発生過程において転写因子 HNF4 α はナトリウム依存性中性アミノ酸トランスポーターSNAT4 を介して蛋白合成を促進する, 第 46 回日本肝臓学会総会, 10.05.28, 山形市

② 近藤宏樹

肝特異的アミノ酸トランスポーターSNAT4 の肝発生過程における発現制御と機能解析, 第 16 回肝細胞研究会, 09.06.27, 山形市

③ Hiroki Kondou, Kanako Tachikawa, Masayo Yamagata, Akihito Kimoto, Masahiro Nakayama, Toshimi Michigami
The Sodium-coupled Neutral Amino Acid Transporter (SNAT) 4 Is Expressed in Developing Mouse Liver and Regulated by Hepatocyte Nuclear Factor (Hnf) 4 α
FASEB Summer Research Conference 2008, 08.08.06, Snowmass Village, CO, USA

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤 宏樹 (KONDOU HIROKI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号:10373515

(2)研究分担者

道上 敏美 (MICHIGAMI TOSHIMI)
大阪府立母子保健総合医療センター研究所・環境影響部門・部長

研究者番号:00301804
(H21 まで分担者として参画)

(3)連携研究者

虫明 聡太郎 (MUSHIAKE SOTARO)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号:90291947
(H21 まで分担者として参画)