

## 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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22590995  
 研究課題名（和文） 翻訳リボソーム親和精製法による弓状核におけるインスリンシグナルの標的遺伝子の同定  
 研究課題名（英文） Identification of target genes in insulin signaling of arcuate nucleus by Translating Ribosome Affinity Purification (TRAP)  
 研究代表者  
 中江 淳 (NAKAE JUN)  
 慶應義塾大学・医学部・特任准教授  
 研究者番号：00344573

研究成果の概要（和文）：本研究では、視床下部弓状核の AGRP ニューロン特異的な遺伝子発現解析に、Translating Ribosome Affinity Purification (TRAP)法を利用し、EGFP と large-subunit ribosomal protein L10a の N 末端との融合蛋白を特異的に発現させるトランスジェニックマウスの作製を試みた。2 ラインの陽性マウスを得、このマウスとニューロン特異的 Cre recombinase 発現トランスジェニックマウスを掛け合わせ、ニューロン特異的の遺伝子発現解析を行う。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to analyze gene expression profiling in a neuron-specific manner. We tried to establish Translating Ribosome Affinity Purification (TRAP) method. We tried to generate transgenic mice, in which the fusion protein of EGFP and N-terminal portion of large-subunit ribosomal protein L10a was expressed in a Cre recombinase-dependent manner (*CAG-CAT-EGFP-L10a*). AGRP neuron-specific EGFP-L10a expression is accomplished by crossing *CAG-CAT-EGFP-L10a* with AGRP neuron-specific Cre recombinase transgenic mice. Now we have several lines that have transgene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー・糖質代謝異常・AGRP ニューロン

1. 研究開始当初の背景

肥満はエネルギー摂取とエネルギー消費の正のバランスの結果生ずると考えられている。視床下部は、エネルギー代謝調節において重要な役割を果たしている。特に視床下部弓状核は中心的役割を担っている。なぜならば、解剖学的にこの領域のニューロンは比較的 blood-brain-barrier が弱く、末梢組織から

の血液を介したシグナルが入りやすいためである。弓状核には、摂食を亢進する AgRP ニューロンと摂食を抑制する POMC ニューロンが存在し、エネルギー代謝調節に重要な役割を担っている。近年両ニューロンにおける様々な分子が遺伝子改変マウスを用いた実験により、ノックアウトまたは過剰発現させることにより、それらの生理的な役割につ

いて明らかにされつつある。我々は、これまで AGRP ニューロン特異的 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) ノックアウトマウス (*AgRPPdk1<sup>-/-</sup>*) を作製解析し、*AgRPPdk1<sup>-/-</sup>* マウスが、摂食量の低下、体重の減少、酸素消費量および行動量の増加を呈し、AGRP ニューロン特異的に転写活性抑制型 FoxO1 ( $\Delta 256$ FoxO1) 過剰発現させる ( $\Delta 256$ FoxO1<sup>AgRPPdk1<sup>-/-</sup></sup>) と *AgRPPdk1<sup>-/-</sup>* マウスの上記の表現型が正常化することを見いだした。さらに、単離 AGRP ニューロンでは、コントロールマウスではグレリン誘導性の Ca<sup>2+</sup> 流入がレプチンにより抑制されるが、*AgRPPdk1<sup>-/-</sup>* マウスでは、抑制されず、さらに興味深いことに、 $\Delta 256$ FoxO1<sup>AgRPPdk1<sup>-/-</sup></sup> マウスでは、正常化することを見いだした (*PLoS ONE* 2011; 6: e18324. doi:10.1371/journal.pone.0018324)。以上の研究結果は、AGRP ニューロンにおいて、PDK1-FoxO1 経路を介した遺伝子発現調節が同ニューロンの機能を調節する上で重要な働きを有していることを示唆する。しかしながら、視床下部弓状核領域の RNA を使用し、マイクロアレイ解析を施行したが、PDK1-FoxO1 経路の標的遺伝子候補見いだすには至らなかった。

## 2. 研究の目的

これまで、臓器特異的遺伝子改変マウスの作製・解析が頻繁に行われるようになってきたが、中枢神経系の特定ニューロン特異的な遺伝子解析はマイクロアレイなどの網羅的な解析が可能になったにもかかわらず、困難である。中枢神経系のニューロンは数百のタイプがあり、それぞれのニューロンは、heterogeneous であり、混在している。これまで、特定ニューロン特異的な遺伝子発現解析を行うのに、laser-capture microdissection (LCM)、fluorescence-activated cell sorting (FACS) 法などを用いてきているが、これらの方法では、神経細胞を単離する際に、細胞間接着が失われることによる遺伝子発現変化が混在し、また、固定した組織から RNA を抽出する際の技術上の問題などが指摘されている。今回我々は、直接に標的ニューロンの遺伝子発現解析を可能にする方法として、Translating Ribosome Affinity Purification (TRAP) 法を利用することを選択した。この方法は、ポリソームに結合している mRNA を単離してくる方法で、EGFP と large-subunit ribosomal protein L10a の N 末端との融合蛋白を特定ニューロン特異的に発現させ、抗 EGFP 抗体を用いた、免疫沈降法により、EGFP-L10a 蛋白に結合している RNA すなわち mRNA を抽出させ、解析に使用する方

法である。我々は既に、Cre recombinase 依存性に、EGFP-L10a を発現させるトランスジェニックマウスの作製を開始した。マウス L10a CDNA を EGFP 発現ベクターにサブクローンし、EGFP-L10a が既報と同じく polysome と思われる部位に集積していることを確認した。さらに、EGFP-L10a CDNA を大阪大学大学院医学系研究科病態制御医学専攻 分子治療学講座幹細胞制御学分野の宮崎純一先生より分与された CAG-CAT ベクターにサブクローンし、HEK293 細胞において、Cre recombinase 存在下で、EGFP-L10a が発現することを確認した。現在、transgene のインジェクションを終え、founder マウスを待つ段階である。当該研究の目的は、AGRP ニューロンにおける PDK1-FoxO1 経路の標的遺伝子を TRAP 法を用いて同定することである。当該研究は、生活習慣病の主要原因病態である肥満を治療する上での新たな標的分子を視床下部 AGRP ニューロン特異的に同定しようとする試みであり、肥満の基本病態である摂食調節に、新たなメカニズムを提唱しようとするものであり、治療薬開発にもつながりうると考えられる。

## 3. 研究の方法

平成 22 年度

(1) *CAG-CAT-EGFP-L10a* トランスジェニックマウスの作製 (中江担当)

① 前述したようにマウスの transgene のインジェクションを終え、現在 Founder マウスを待つ段階である。得られた Founder マウスは既に当大学動物実験施設にて飼育中である *AgRP Cre* トランスジェニックマウス (Stanford 大学、Gregory S. Barsh 先生より寄与) と掛け合わせ、*CAG-CAT-EGFP-L10a-AgRP* マウスのいくつかのラインを得る。

② AGRP ニューロンにおける EGFP-L10a 蛋白の発現の確認

得られた F1 マウスである

*CAG-CAT-EGFP-L10a-AgRP* マウスの 6 週齢前後での AGRP ニューロンにおける EGFP-L10a 蛋白の発現を抗 AGRP 抗体 (anti-goat) と抗 EGFP 抗体 (anti-rabbit) により、二重染色を行い、共発現しているラインをいくつか確立する。

(2) *AgRPPdk1<sup>-/-</sup>-CAG-CAT-EGFP-L10a* および

$\Delta 256$ FoxO1<sup>AgRPPdk1<sup>-/-</sup></sup> *CAG-CAT-EGFP-L10a* マウスの作製 (川野担当)

① *Pdk1<sup>fllox/+</sup>* マウスと

*CAG-CAT-EGFP-L10a* マウスを掛け合わせ、*Pdk1<sup>fllox/+</sup>-CAG-CAT-EGFP-L10a* マウスを得る。

② *AgRPPdk1<sup>+/-</sup>* および

$\Delta 256FoxO1^{AgRP}Pdk1^{+/+}$ マウスを  
 $Pdk1^{lox/+}-CAG-CAT-EGFP-L10a$  マウスと掛  
け合わせ、  
 $AgRPPdk1^{+/+}-CAG-CAT-EGFP-L10a$  および  
 $\Delta 256FoxO1^{AgRP}Pdk1^{+/+}-CAG-CAT-EGFP-L1$   
 $0a$  マウスを得る。

平成 23 年度

(1)AGRP ニューロン特異的 mRNA の単離  
(中江、川野担当)

$AgRPPdk1^{+/+}-CAG-CAT-EGFP-L10a$  およ  
び  $\Delta 256FoxO1^{AgRP}Pdk1^{+/+}-CAG-CAT-$   
 $EGFP-L10a$  マウス視床下部弓状核領域組織  
溶解液を抗 EGFP 抗体で免疫沈降した後、既  
存の方法で RNA を抽出する。同様に  $CAG-$   
 $CAT-EGFP-L10a$  マウスについても行う。

(2)マイクロアレイ解析による AGRP ニュー  
ロンにおける PDK1-FoxO1 経路の標的遺伝  
子の同定 (中江担当)

① 上記で得られた  $CAG-CAT-EGFP-L10a$ ,  
 $AgRPPdk1^{+/+}-CAG-CAT-EGFP-L10a$ ,  
 $\Delta 256FoxO1^{AgRP}Pdk1^{+/+}-CAG-CAT-EGFP-L1$   
 $0a$  マウスの RNA を用いて、マイクロアレイ  
解析を行う。その中で、 $CAG-CAT-EGFP-$   
 $L10a$  マウスに比べ、 $AgRPPdk1^{+/+}-CAG-$   
 $CAT-EGFP-L10a$  マウスで有意に変化し、さ  
らに、 $\Delta 256FoxO1^{AgRP}Pdk1^{+/+}-CAG-CAT-$   
 $EGFP-L10a$  マウスにおいて、 $CAG-CAT-$   
 $EGFP-L10a$  マウスのレベルに戻る遺伝子を  
候補として次の解析を行う。

② 上記で得られた候補遺伝子をそれぞれの  
サンプルを用いて、Real-time PCR 解析を行  
い、マイクロアレイ解析で得られた結果に一  
致するものを候補遺伝子として次の解析を  
行う。

③ 可能であれば、上記で得られた候補遺伝  
子の immunohistochemistry をそれぞれの抗  
体を用いて、コントロールマウスおよび各変  
異マウスの AGRP ニューロンでの発現量  
の変化を検討し、遺伝子レベルの発現と一致  
するものを選択する。

④ また、コントロールマウスである  
 $CAG-CAT-EGFP-L10a$  マウスにおいて、摂  
食、絶食時、さらに高脂肪食負荷時での候補  
遺伝子の発現量を、Real-time PCR により解  
析し、可能であれば immunohistochemistry  
により、蛋白レベルでの解析も行う。その際  
、二重染色により、AGRP ニューロンにおけ  
る蛋白発現量も比較検討する。

⑤ 今回の PDK1-FoxO1 経路の標的遺伝子は、  
転写活性抑制型変異体である  $D256FoxO1$  に  
よりその転写レベルが調節されており、  
FoxO1 の標的遺伝子である可能性が高い。そ  
のため、候補標的遺伝子の promoter 領域を  
解析し、実際に、FoxO ファミリー結合コン  
センサス配列(gtaaac/ta)の有無を検討し、さ  
らに、その配列が、ヒト、ラットなど種を超

えて保存されているかの検討を加え、候補遺  
伝子の絞り込みに役立てる。

(3)候補遺伝子の FoxO1 による転写調節の解  
析 (中江担当)

① promoter assay (luciferase assay),  
得られた候補遺伝子のコンセンサス配列を  
含む promoter 領域を luciferase 発現ベクタ  
ーにサブクローンし、HEK293 細胞において、  
promoter assay を施行する。その際、活性型  
および上記の転写活性抑制型 FoxO1 を  
co-transfection し、promoter 活性への影響  
を解析する。また、PI(3)kinase 阻害剤によ  
る影響をも検討する。

② Chromatin immunoprecipitation (ChIP)  
assay

PI(3)kinase および FoxO1 により、その  
promoter 活性が調節される候補遺伝子は、  
実際に、マウス弓状核領域を用いて、抗  
FOXO1 抗体で ChIP assay を施行する。こ  
れにより、弓状核領域の内因性 FoxO1 が候  
補遺伝子 promoter 領域に結合しているかど  
うかを確認する。

③ 以上、②①-②⑤および③①-③②  
の screening を通過した遺伝子を次の最終的  
な解析へ進める。

平成 24 年度

(1) 候補遺伝子の AGRP ニューロン特異的遺  
伝子改変マウスの作製 (川野、中江担当)

候補遺伝子の発現が、 $AgRPPdk1^{+/+}$ マウ  
スでコントロールマウスに比べ、増加してい  
る場合には、AGRP ニューロン特異的なノッ  
クアウトマウスを作製する。逆に、  
 $AgRPPdk1^{+/+}$ マウスでコントロールマウスに  
比べ、低下している場合には、AGRP ニュー  
ロン特異的なトランスジェニックマウスを  
作製し、 $AgRPPdk1^{+/+}$ マウスと掛け合わせる  
ことにより、ダブルミュータントマウスを作  
製し、その表現型を解析する。 $AgRPPdk1^{+/+}$   
マウスの表現型が同定した候補遺伝子の発  
現変化によるものかを確認することにより、  
AGRP ニューロンの機能における  
PDK1-FoxO1 経路の果たす役割の分子メカ  
ニズムを明らかにする。

#### 4. 研究成果

本研究では、視床下部弓状核の AGRP ニュー  
ロンにおける  
3-phosphoinositide-dependent protein  
kinase 1 (PDK1)-Foxo1 経路の標的遺伝子を  
同定することを目的としている。そのための  
ニューロン特異的遺伝子発現解析の方法と  
して、Translating Ribosome Affinity  
Purification (TRAP)法を利用することを選  
択した。すなわち、EGFP と large-subunit  
ribosomal protein L10a の N 末端との融合蛋  
白を AGRP ニューロン特異的に発現させる  
トランスジェニックマウスを作製し、抗

EGFP 抗体による免疫沈降を利用し、AGRP ニューロン特異的な遺伝子発現解析を網羅的に行うことを計画した。HEK293 培養細胞において、EGFP-L10a を一過性発現させ、抗 EGFP 抗体にて免疫沈降することにより、RNA を回収しうることを確認した。現在、EGFP-L10a を組織特異的に発現させる transgene の構築を終了した。さらにこの transgene が、Cre recombinase により、発現が誘導されることを細胞レベルで確認した。並行して、組織特異的 EGFP-L10a 発現トランスジェニックマウスを樹立するため、transgene の injection を行い、2 ラインの陽性マウスを得ることができた。今後、このマウスとニューロン特異的 Cre recombinase 発現トランスジェニックマウスを掛け合わせるにより、実際に TRAP 法を試み、ニューロン特異的の遺伝子発現解析を行う予定である。

#### 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 9 件)

1. Nakae J, Cao Y, Hakuno F, Takemori H, Kawano Y, Sekioka R, Abe T, Kiyonari H, Tanaka T, Sakai J, Takahashi S, Itoh H. Novel repressor regulates insulin sensitivity through interaction with Foxo1. *EMBO J* 2012;31:2275-95(査読有り)
2. Kawano Y, Nakae J, Watanabe N, Fujisaka S, Iskandar K, Sekioka R, Hayashi Y, Tobe K, Kasuga M, Noda T, Yoshimura A, Onodera M, Itoh H. Loss of PDK1-Foxo1 signaling in myeloid Cells predisposes to adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Diabetes* 2012 61:1935-1948(査読有り)
3. Kim HJ, Kobayashi M, Sasaki T, Kikuchi O, Amano K, Kitazumi T, Lee YS, Yokota-Hashimoto H, Susanti VY, Kitamura YI, Nakae J, Kitamura T. Overexpression of FoxO1 in the Hypothalamus and Pancreas Causes Obesity and Glucose Intolerance. *Endocrinology* 2012;153:659-71. (査読有り)
4. Uebi T, Itoh Y, Hatano O, Kumagai A, Sanosaka M, Sasaki T, Sasagawa S, Doi J, Tatsumi K, Mitamura K, Morii E, Aozasa K, Kawamura T, Okumura M, Nakae J, Takikawa H, Fukusato T, Koura M, Nish M, Hamsten A, Silveira A, Bertorello AM, Kitagawa K, Nagaoka Y, Kawahara H, Tomonaga T, Naka T, Ikegawa S, Tsumaki N, Matsuda J, Takemori H. Involvement of SIK3 in Glucose and Lipid Homeostasis in

Mice. *PLoS One*. 2012;7(5):e37803. Epub 2012 May 25. (査読有り)

5. Cao Y, Nakata M, Okamoto S, Takano E, Yada T, Minokoshi Y, Hirata Y, Nakajima K, Iskandar K, Hayashi Y, Ogawa W, Barsh GS, Hosoda H, Kangawa K, Itoh H, Noda T, Kasuga M, Nakae J. PDK1-Foxo1 in Agouti-Related Peptide Neurons Regulates Energy Homeostasis by Modulating Food Intake and Energy Expenditure. *PLoS ONE* 2011; 6: e18324. doi:10.1371/journal.pone.0018324(査読有り)

6. Shimizu N, Yoshikawa N, Ito N, Maruyama T, Suzuki Y, Takeda S, Nakae J, Tagata Y, Nishitani S, Takehana K, Sano M, Fukuda K, Suematsu M, Morimoto C, and Tanaka H. Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. *Cell Metab* 2011; 13:170-82. (査読有り)

7. Hakuno F, Yamauchi Y, Kaneko G, Yoneyama Y, Nakae J, Chida K, Kadowaki T, Yamanouchi K, Nishihara M, Takahashi SI. Constitutive Expression of Insulin Receptor Substrate (IRS)-1 Inhibits Myogenic Differentiation through Nuclear Exclusion of Foxo1 in L6 Myoblasts. *PLoS ONE* 2011; 6(10):e25655. Epub 2011 Oct 3. (査読有り)

8. Iskandar K, Cao Y, Hayashi Y, Nakata M, Takano E, Yada T, Zhang C, Ogawa W M, Oki M, Chua S Jr, Itoh H, Noda T, Kasuga M, Nakae J. PDK1/FoxO1 pathway in POMC neurons regulates Pomc expression and food intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010; 298:E787-98. (査読有り)

9. Hariharan N, Maejima Y, Nakae J, Paik J, Depinho RA, Sadoshima J. Deacetylation of FoxO by Sirt1 plays an essential role in mediating starvation-induced autophagy in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2010;107:1470-82. (査読有り)

[学会発表] (計 16 件)

1. 小谷紀子、中江 淳、川野義長、伊藤 裕. マウス膵 β 細胞における FCoR/Foxo1 CoRepressor はインスリン分泌を調節する. 第 33 回日本肥満学会. 2012 年 10 月 12 日 (京都).
2. 川野義長、中江 淳、伊藤 裕. マウス高脂肪食負荷による肝臓および腸管の慢性炎症に与える影響の検討. 第 33 回日本肥満学会. 2012 年 10 月 12 日 (京都).
3. 中田正範、笹沼秀幸、中江 淳、矢田俊彦. 弓状核 AgRP ニューロン特異的 PDK1 欠損マ

ウスの骨代謝異常. 第 33 回日本肥満学会. 2012 年 10 月 11 日 (京都).

4. 中江 淳. 糖・エネルギー代謝調節における NEWCOMERS. 第 46 回日本小児内分泌学会学術集会 教育セミナー(招待講演). 2012 年 09 月 28 日(大阪)

5. Kawano Y, Nakae J, Itoh H. 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1 (Pdk1) Regulates Macrophage Migration, Polarization, and Insulin Sensitivity. 72nd Scientific Sessions, American Diabetes Association. 2012 年 06 月 11 日 (Philadelphia, PA, USA)

6. 中江 淳, 小谷紀子, 川野義長, 伊藤 裕. 新規 Foxo1 CoRepressor (FCoR/P13)は膵α細胞において、インスリン分泌を調節しうる. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2012 年 05 月 17 日(横浜).

7. 川野義長, 中江 淳, 春日雅人, 伊藤 裕. マクロファージにおける 3-phosphoinositide dependent protein kinase 1 (Pdk1)は生体内の糖代謝調節 に重要である. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2012 年 05 月 17 日(横浜).

8. 川野義長, 中江 淳, 春日雅人, 伊藤 裕. 脂肪組織マクロファージにおける 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (Pdk1)の生理的役割の検討. 第 85 回日本内分泌学会学術総会. 2012 年 04 月 19 日 (名古屋)

9. Kawano Y, Sekioka R, Itoh H, Nakae J. oxo1 in Adipose Tissue Macrophages Induces *Ccr2* Expression and Insulin Resistance. 71st Scientific Sessions, American Diabetes Association. June 24. 2011 (San Diego, CA, USA)

10. 川野義長, 関岡理沙, 藤坂志帆, 戸辺一之, 伊藤 裕, 中江 淳. マクロファージにおける Foxo1 は *Ccr2* 発現を誘導しインスリン抵抗性を惹起する. 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2011 年 5 月 21 日 (札幌、ロイトン札幌)

11. 関岡理沙, 川野義長, 伊藤 裕, 中江 淳. 脂肪組織における Foxo1 の過剰発現の糖・エネルギー代謝への影響の検討. 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2011 年 5 月 19 日 (札幌、ロイトン札幌)

12. 川野義長, 関岡理沙, 藤坂志帆, 戸辺一之, 伊藤 裕, 中江 淳. 脂肪組織浸潤マクロファージにおける Foxo1 の役割の検討. 第 84 回日本内分泌学会学術総会. 2011 年 4 月 22 日 (神戸、神戸国際会議場)

13. 関岡理沙, 川野義長, 伊藤 裕, 中江 淳. 脂肪組織における Foxo1 の過剰発現は耐糖能悪化を惹起する. 第 84 回日本内分泌学会学術総会. 2011 年 4 月 22 日(神戸、神戸国際会議場)

14. 川野 義長, 関岡 理沙, 藤坂 志帆, 戸辺 一之, 伊藤 裕, 中江 淳. マクロファージにおける FoxO1 は *Ccr2* 発現を誘導しインスリン抵抗性を惹起しうる. 第 31 回日本肥満学会. 2010 年 10 月 2 日 (前橋).

15. 川野 義長, 関岡 理沙, 藤坂 志帆, 戸辺 一之, 伊藤 裕, 中江 淳. 脂肪組織マクロファージにおける FoxO1 の機能解析. 第 15 回アディポサイエンス研究会シンポジウム. 2010 年 8 月 21 日 (大阪)

16. 中江 淳, 川野 義長, 関岡 理沙, 伊藤 裕. ノックアウトマウスを用いた FoxO1 結合蛋白 P13 の生理作用の検討. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2010 年 5 月 27 日 (岡山)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中江 淳 (NAKAE JUN)

慶應義塾大学 医学部 特任准教授

研究者番号 : 00344573

(2) 研究分担者

川野義長 (KAWANO YOSHINAGA)

慶應義塾大学 医学部 助教

研究者番号 : 80571463

(3) 連携研究者

該当無し ( )

研究者番号 :