

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29日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22780190

研究課題名（和文）

魚類に特徴的な脂質蓄積に関与する転写因子 Foxo1 および PPAR γ の機能解析

研究課題名（英文）

Functional analysis of Foxo1 and PPAR γ possibly involved in the species-specific lipid accumulation of fish

研究代表者

金子 元 (KANEKO GEN) 東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：30466809

研究成果の概要（和文）：

トラフグから Foxo1 遺伝子の全翻訳領域をクローニングし、その転写産物が様々な組織で発現することを示した。また、トラフグ Foxo1 タンパク質は哺乳類の相同分子と同様にインスリン様成長因子-I (IGF-I) 依存的に核から細胞質に移行することを明らかにし、さらに *in vitro* でトラフグ PPAR γ と結合することを示した。一方、脂質蓄積部位が異なるトラフグおよびマダイでは、脂質含量の高い組織で PPAR γ およびその標的遺伝子であるリポタンパク質リパーゼ (LPL) の mRNA 量が多かった。以上の結果は、PPAR γ が魚類で組織特異的に脂質蓄積を促進すること、また Foxo1 が IGF-I 依存的にそれを抑制することを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

We cloned the full open reading frame of Foxo1 from torafugu. The transcripts were widely distributed in various tissues. Like the mammalian orthologues, torafugu Foxo1 protein was excluded from nucleus in a insulin-like growth factor I (IGF-I)-dependent manner, and bound to peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) *in vitro*. On the other hand, the mRNA levels of PPAR γ and its putative target, lipoprotein lipase (LPL), showed a good correlation with the lipid content of liver and muscle in torafugu and red seabream. These results suggest that PPAR γ promotes the species-specific lipid accumulation in fish, and Foxo1 functions as an IGF-dependent inhibitor of PPAR γ .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：代謝・酵素，脂質蓄積

1. 研究開始当初の背景

脂質は生体の主要な構成成分の一つで、エネルギーの貯蔵や細胞内シグナル伝達など

多くの生命現象に関わっている。魚類の主要な脂質蓄積部位は肝臓および筋肉であるが、両組織における脂質の存在比は魚種ごとに

大きく異なっており、マダイのように主に筋肉に脂肪を蓄える魚種と、トラフグのように主に肝臓に脂肪を蓄える魚種に大別される。筋肉の脂質含量は魚肉の味や食感、貯蔵特性、加工適性などに大きな影響を及ぼす。そのため、組織特異的な脂質蓄積の機構を明らかにすることは基礎的にも応用的にも大きな意義がある。

Foxo1 および PPAR γ (peroxisome-proliferator activated receptor gamma) は、それぞれ哺乳類の脂質蓄積を抑制および促進する転写因子である。低血糖状態では Foxo1 は核内に局在し、p21 などの転写を活性化するとともに、PPAR γ に結合しその転写活性を阻害して脂質蓄積に抑制的に働く。一方、高血糖状態では Foxo1 はインスリンシグナル伝達経路の Akt キナーゼによりリン酸化され、細胞質へ移行する。PPAR γ は、Foxo1 と解離した後、細胞内へ脂質を取り込むリポタンパク質リパーゼ (LPL) などの転写を活性化するとともに、PPAR γ の転写も促進するポジティブフィードバックを引き起こし、その結果、細胞内の脂質蓄積が促進される。p21 や LPL のほか、最近でも新規の Foxo1 および PPAR γ 標的遺伝子が相次いで同定されている。魚類では、これら分子に関する知見は限られており、上述した組織特異的な脂質蓄積に果たす役割も不明である。

2. 研究の目的

申請者は、マダイおよびトラフグの組織特異的な脂質分布の要因を探る研究を進めており、両魚種で組織の脂質含量と LPL 遺伝子の mRNA 量が相関することを明らかにしている。本研究では、LPL の転写を制御する PPAR γ の機能解析を行うとともに、その調節因子である Foxo1 の機能も明らかにし、両分子が魚類の組織特異的な脂質蓄積に果たす役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

トラフグから Foxo1 遺伝子をクローニングし、組織分布や局在制御機構を明らかにする。また、トラフグ Foxo1 および PPAR γ の結合実験を行う。さらに、両分子およびそれらの下流遺伝子の発現様式をトラフグとマダイで比較し、Foxo1 と PPAR γ が組織特異的な脂質蓄積に果たす役割を考察する。

4. 研究成果

既報のゼブラフィッシュ Foxo1 (NP_001070725) の塩基配列をプローブにトラフグゲノムデータベースをスクリーニングした。得られた配列を参考にプライマーを設計し、常法によりトラフグ Foxo1 をクローニングした。本遺伝子の組織分布を RT-PCR で調べたところ、調べた全ての組織で転写産

物がみられた (図 1)。

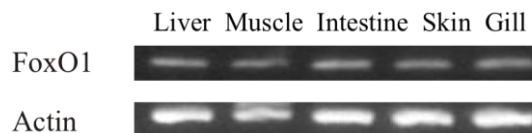


図 1. トラフグ Foxo1 転写産物の組織分布. 内部標準にはアクチン遺伝子を用いた。

次に、トラフグ Foxo1 の局在制御機構を調べた。野生型トラフグ Foxo1 を Flag タグとの融合タンパク質としてラット L6 筋芽細胞に強制発現させた。抗 Flag タグ抗体を用いた免疫染色の結果、トラフグ Foxo1 は無血清状態では核に局在すること、培地にヒトインスリン様成長因子 (IGF-I) を添加すると細胞質へ移行することが明らかとなった (図 2)。

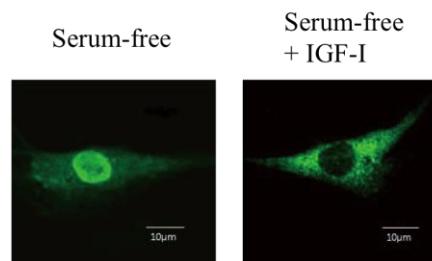


図 2. IGF-I によるトラフグ Foxo1 の局在制御。

哺乳類 Foxo1 のリン酸化部位に相当する 3 つのアミノ酸残基をアラニンに置換したトラフグ Foxo1 変異体では、IGF-I による細胞質への移行が阻害された。これらの結果から、トラフグ Foxo1 の局在は、哺乳類の相同分子と同様に IGF-I 依存的なリン酸化によって制御されることが示唆された。

また、野生型トラフグ Foxo1 が同魚種の PPAR γ に結合するかどうかを大腸菌発現系を用いて検討した。両タンパク質をそれぞれ GST および His タグとの融合タンパク質として大腸菌で発現させ、抗 GST 抗体を用いたプルダウンアッセイに供した。抗 His タグ抗体を用いたウエスタンブロットにより、両タンパク質が特異的に結合することが示された。

さらに、トラフグおよびマダイの肝臓および筋肉と、マダイの脂肪組織につき、PPAR γ および LPL の mRNA 量をリアルタイム PCR で調べた。その結果、両分子の mRNA 量は、脂質含量とほぼ相関することが明らかとなった。すなわち、マダイでは肝臓、筋肉および脂肪組織で PPAR γ および LPL の mRNA が検出されたが、トラフグ筋肉では PPAR γ は検出されず、LPL の mRNA 量も極めて少なかった。

た(図3)。

マダイ筋肉中には、筋細胞以外に大きな油滴をもつ脂肪細胞が存在し、筋肉脂質の大部分はこの細胞に蓄積していると考えられている。そこで、マダイ筋肉を対象に PPAR γ および LPL の *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。PPAR γ の mRNA は検出されなかったが、LPL の転写産物は、脂肪細胞に蓄積していることが明らかになった。この結果は、魚類筋肉は筋細胞および脂肪細胞が混合した組織であり、遺伝子発現解析の際には両者を区別して考える必要があることを示している。

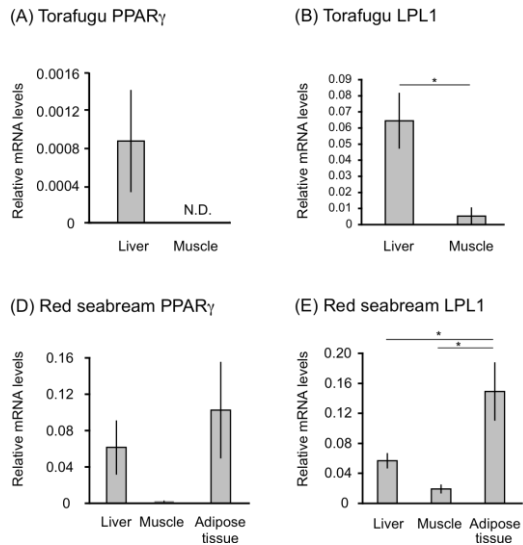


図 3. トラフグおよびマダイの各組織における PPAR γ および LPL mRNA 量の比較。

以上の結果は、PPAR γ および LPL が魚類の組織特異的に脂質蓄積に関与すること、さらに Foxo1 が IGF-I 依存的に PPAR γ を阻害し、脂質蓄積の調節因子として働くことを示唆している。

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 5 件)

1. Kaneko G*, Furukawa S*, Kurosu Y, Yamada T, Takeshima H, Nishida M, Mitsuboshi T, Otaka T, Shirasu K, Koda T, Takemasa Y, Aki S, Mochizuki T, Fukushima H, Fukuda Y, Kinoshita S, Asakawa S, Watabe S. Correlation with larval body size of mRNA levels of growth hormone, growth hormone receptor I and insulin-like growth factor I in larval torafugu *Takifugu rubripes*. J. Fish Biol. 79, 854-874, 2011. *Equally contributed.

2. Hirano Y, Kaneko G, Koyama H, Ushio H, Watabe S. cDNA cloning of two types of growth hormone receptor in torafugu *Takifugu rubripes*: tissue distribution is possibly correlated to lipid accumulation patterns. Fish. Sci. 77, 855-865, 2011.

3. Kondo H, Suga R, Suda S, Hirono I, Nagasaka R, Kaneko G, Ushio H, Watabe S. EST analysis on adipose tissue of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and tissue distribution of adiponectin. Gene 485, 40-45, 2011.

4. 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, 6, e25655, 2011.

5. Ikeguchi K, Kaneko G, Watabe S. cDNA cloning and primary structure analysis of transglutaminase from bluefin tuna *Thunnus orientalis*. Fish Sci, 78, 667-674, 2012.

[学会発表] (計 9 件)

1. Kaneko G. Studies on the species-specific lipid accumulation in torafugu and red seabream. The International Symposium on Muscle Biochemistry, Tokyo, Japan. October 27-29, 2011.

2. Kaneko G, Kondo H, Hirono I, Nagasaka R, Satoh S, Ushio H, Watabe S. Expressed sequence tag analysis of liver and fast muscle from red seabream *Pagrus major* in relation to lipid metabolism. 9th International Marine Biotechnology Symposium, Qingdao, China. October 8-12, 2010.

3. Kondo H, Suda S, Kawana Y, Hirono I, Nagasaka R, Kaneko G, Ushio H, Watabe S. Effects of feed restriction on gene expression profiles of adiponectin and related signal transduction molecules associated with energy metabolism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* muscle. Genomics in Aquaculture International Symposium, Crete, Greece, September 14-17, 2011.

4. Hakuno F, Kaneko G, Yamauchi Y, Chida K, Nakae J, Takahashi SI. Continuous activation of IGF signaling inhibits myogenic differentiation of L6 myoblasts. 5th International Congress of the GRS and the IGF Society, New York, NY, USA. October 3-7, 2010.

5. 金子元, 白神裕人, 潮秀樹, 渡部終五. マダイ 14 kDa アポリポタンパク質の cDNA クローニングおよび血漿成分の電気泳動分析. 平成 24 年度日本水産学会春季大会, 2012 年 3 月 26 日-30 日, 東京.

6. 金子元, 近藤秀裕, 廣野育生, 長阪玲子, 佐藤秀一, 潮秀樹, 渡部終五. 発現配列タグ (EST) を利用したトラフグおよびマダイのアポリポタンパク質の発現様式の比較. 平成 23 年度日本水産学会秋季大会, 2011 年 9 月 28 日-10 月 2 日, 長崎.

7. 金子元, 渡部終五. 環境馴致による魚類筋肉の生化学的変化. 日本水産学会シンポジウム企画委員会主催シンポジウム 漁獲物の蓄養による品質向上技術, 2011 年 9 月 28 日, 長崎.

8. 金子元, 山田敏弘, 平野雪, 白神裕人, 潮秀樹, 渡部終五. トラフグおよびマダイの脂質分布とリポタンパク質リパーゼ遺伝子の発現様式. 平成 23 年度日本水産学会春季大会, 2011 年 3 月, 東京 (東日本大震災のため口頭発表中止).

9. Zhang W, Kaneko G, Ushio H, Watabe S. Molecular characterization of forkhead transcription factor O1 (FoxO1) from torafugu *Takifugu rubripes* in relation to lipid metabolism. 2010 (平成 22) 年度日本水産学会秋季大会, 2010 年 9 月 23 日, 京都.

[図書] (計 1 件)

1. 金子元, 潮秀樹, 渡部終五. 魚類のエネルギー代謝に及ぼす水温および飢餓の影響. 福田裕・渡部終五編 沿岸漁獲物の高品質化, 恒星社厚生閣 (水産学シリーズ 172), 25-34, 2012.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :

種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
金子元 (KANEKO GEN)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号 : 30466809