

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23700850

研究課題名（和文） 転写因子 ChREBP を標的とした生活習慣病病態の解析

 研究課題名（英文） ChREBP in the lifestyle related disease
- The novel mechanism of ChREBP activation-

研究代表者

崎山 晴彦 (SAKIYAMA HARUHIKO)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：30508958

研究成果の概要（和文）：肥満、高脂血症、糖尿病および高血圧といったメタボリックシンドロームを呈する人が増加している。これら肥満を中心とした発症機序には糖・脂質代謝の異常が深く関与していることが知られている。糖・脂質代謝には複数の酵素が互いに関連しあって調節がなされており、なかでも重要な酵素の発現調節を促進する転写因子が ChREBP である。本課題では ChREBP の活性化メカニズムを解明し、肥満予防や治療薬の開発を目指した。

抗 *O*-GlcNAc 抗体を用いた解析により ChREBP は、*O*-GlcNAc で修飾されていることが明らかとなった。また阻害剤を用いた実験より、*O*-GlcNAc 化が促進すれば ChREBP の核内への局在も増え、転写活性が増強されることが判明した。しかし、*O*-GlcNAc 修飾のリン酸化部位への影響は見られなかった。

現在、*O*-GlcNAc の修飾部位を特定し、転写因子のさらなる核内移行へのメカニズムおよびグルコース応答の反応機構の解明を進めている。

研究成果の概要（英文）： The number of people who suffer from metabolic syndromes, such as overweight, hyperlipemia, diabetes, and high blood pressure. It is known that the abnormalities of sugar and lipid metabolism are participating in the pathogenic mechanism centering on these overweight. Two or more enzyme relate to these metabolism mutually and the transcription factor which promotes the expression of important enzyme especially is ChREBP. In this study, we challenged to solve the activation mechanism of ChREBP and aimed at overweight prevention and development of a curative medicine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：生活習慣病、ChREBP

1. 研究開始当初の背景

肥満等による生活習慣病は近年増加の一途をたどり、大きな社会問題となっている。過剰に摂取された炭水化物は速やかに単糖

類に消化され、解糖系を経て脂肪酸や中性脂肪に変換、蓄積される。糖質から脂肪酸合成には多岐に渡る酵素群が関与しており、この経路を担う酵素群は、翻訳後修飾やホルモン、

栄養摂取などにより調節されている。

炭水化物の消化により、血中グルコース濃度が上昇し、 β 細胞からインスリンが分泌される。このインスリン分泌が肝臓において脂肪酸合成の各種酵素の転写活性を上昇させると考えられてきたが、これは sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) を介するものであると判明した (Horton et al. J. Clin. Invest. 109, 1125-1131, 2002)。

さらに後年になり、インスリンを介さない脂肪酸合成経路が見い出され、特に acetyl CoA carboxylase (ACC)、fatty acid synthase (FAS)、liver type pyruvate kinase (L-PK) の発現を促進する転写因子として carbohydrate response element binding protein (ChREBP) が発見された (Yamashita et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 9116-9121, 2001)。

当初は、この ChREBP の転写活性化としてペントースリン酸回路において生じたキシルロース-5-リン酸により活性化された脱リン酸酵素 PP2A の作用により ChREBP の核内への移行、および ChRE 結合能の獲得の 2 ステップからなると報告された。しかし、これだけでは説明がつかない場合があり、新規活性化機構あるいはリン酸化・脱リン酸化に付随するその他の因子 (翻訳後修飾など) の可能性が考えられた。

近年になり 14-3-3 タンパクが ChREBP に結合するという報告がなされ、我々がさらに詳細に検討した結果、ChREBP の N 末部分に結合することが判明し、14-3-3 との結合が核移行に重要な役割を果たすことを見出した (sakiyama et al. J. Biol. Chem, 283, 24899-24908, 2008)。

さらに ChREBP が糖鎖修飾 (O-GlcNAc 化) を受けていることも発見し、転写活性に影響を与えることを世界に先駆け報告した。

2. 研究の目的

(1) 我々は ChREBP の転写活性に糖鎖修飾が影響を及ぼすことを見出したが、その修飾部位や詳細な構造に関しては不明なままであった。そこでまず修飾部位と構造決定の為に、部位欠損の変異体を作成することにした。

(2) 修飾部位の決定の為に、抗体が必要である。しかしながら、市販の抗体では非特異的に ChREBP を認識してしまい、実験に適

さないことが判明した。そこで、ウサギを使用して新たなポリクローナル抗体の作製を行うことにした。

(3) 現在まで、ChREBP はグルコース濃度に応答し核内へと移行することが知られているが、その他の活性化因子が存在するのか探索する。同時に、その新規活性化機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 糖鎖修飾を受けることの意義と修飾部位の同定とその構造解析

ChREBP の活性化にはリン酸化・脱リン酸化以外に糖鎖修飾の可能性のあることを見出していた。

①糖鎖修飾の構造決定

構造決定の為に、Tag を付けた ChREBP を培養細胞に発現し、Tag 抗体で免疫沈降を行う。電気泳動をおこなったあと、ChREBP に対応するバンドを切り出し Mass により構造および部位を決定する。

②糖鎖修飾の意義の検討

修飾による ChREBP の活性化に対する影響を、糖転移酵素の阻害剤や RNAi による手法によりノックダウンし、核内への移行および転写活性の両面から比較検討する。

(2) その他の活性化因子が存在するのか探索する

種々の細胞内ストレスが ChREBP の活性化に影響を与えるのかを GFP を用いた細胞内局在の検討や、レポーター遺伝子を用いた手法により解析する。

4. 研究成果

本研究では、肝臓において脂肪酸合成に係わる acetyl CoA carboxylase (ACC)、fatty acid synthase (FAS)、および解糖系の律速酵素のひとつである liver type pyruvate kinase (L-PK) を制御している転写因子、Carbohydrate response element binding protein (ChREBP) に着目し、その転写活性化機構を解明することで肥満や糖尿病などいわゆる生活習慣病により惹起される病気をコントロールできると期待するものである。ChREBP はグルコース濃度に応じて核内へ移行するが、そのメカニズムはまだ不明な点が多い。本研究においてその活性化のメカニズムを解明することで糖尿病治療薬の新薬開

発につながると予想される。またその他の活性化因子の探索も行った。

我々は、これまで *O*-GlcNAc 修飾が転写活性化に影響を与えることを報告したが、本研究で修飾部位とその構造決定を目指した。しかしながら、変異体を用いた修飾部位の検討などにおいて必須であると考えられる ChREBP 抗体の特異性が低い為、満足する結果が得られなかった。そこで、ChREBP 抗体を作成することを優先させた。

抗原サーチにより決定した部位を含む合成ペプチドを使用し、キャリアタンパクとして KLH を結合させ、ウサギに数回免疫を行った。現段階では、血清ではあるが特異性の高い抗体を産生していることを確認している。引き続き、抗体作製を行っていく予定である。また構造解析については現在、検討中である。

次に、我々はグルコース以外の新規活性化因子の探索を行った。通常、ChREBP はグルコース濃度に応答し、核内へと移行し、L-PK の ChoRE エlement に結合し L-PK の転写をオンにする。解糖系は 3 つの律速酵素により制御がなされていて、肝臓におけるグルコースの取り込みは解糖系による代謝の影響をもろに受けている。糖の代謝に大きな影響を与える要因の一つに、癌化が挙げられる。癌化した細胞では、グルコースの消費が正常細胞にくらべ多く、さらに低酸素の環境にあることが知られている。そこで低酸素状態や酸化ストレスが糖代謝に及ぼす影響を検討するとともに、ChREBP との関わりを検討することにした。

まず酸化ストレスを培養細胞に与え、ChREBP の細胞内動態やレポーター遺伝子を使用した転写活性を測定した。培養細胞に酸化ストレスを与えた結果、ChREBP は核内へと移行し、転写活性が上昇することが確認された。この結果より、ChREBP はグルコースのみならず、酸化ストレスにも応答することが示唆された。

現在、酸化ストレスによる ChREBP の活性化機構の解明と酸化ストレスに応答する生理的意義の検討を行っている最中である。

最後に、今後の展望としては、酸化ストレスのモデルマウスを使用し、より *in vivo* に近い状態における酸化ストレス下の ChREBP 活性化機構、ならびに生理的役割を検討していく予定である。

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)

[学会発表] (計 6 件)

① 崎山晴彦, 藤原範子, 江口裕伸, 吉原大作, 鈴木敬一郎. 糖尿病病態下における転写因子 ChREBP の新規活性化機構の解明. 第 22 回日本メイラード学会年会, 2012, 12. 21-22 東京

② 崎山晴彦, 藤原範子, 江口裕伸, 吉原大作, 鈴木敬一郎. 転写因子 Carbohydrate Response Element-binding Protein (ChREBP) の新規活性化因子の探索. 第 85 回日本生化学会大会, 2012, 12. 14-16 福岡

③ Haruhiko Sakiyama, Noriko Fujiwara, Hironobu Eguchi, Daisaku Yoshihara, and Keiichiro Suzuki. The new insight of transcriptional activation of Carbohydrate Response Element-binding Protein (ChREBP). 13th FAOBMB congress of Biochemistry and molecular Biology, 2012, November. 25-29, Bangkok (Thai).

④ 崎山晴彦, 藤原範子, 江口裕伸, 吉原大作, 鈴木敬一郎. ChREBP のグルコース応答における *O*-GlcNAc 修飾の生理的役割. 第 84 回日本生化学会大会, 2011, 9. 21-24, 京都

⑤ Haruhiko Sakiyama, Noriko Fujiwara, Hironobu Eguchi, Daisaku Yoshihara, and Keiichiro Suzuki. The new insight of transcriptional activation of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP). 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia. 8th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine. 11th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine, 2011, August 31- September 4, Kagoshima

⑥ Haruhiko Sakiyama, Noriko Fujiwara, Takahiro Noguchi, Hironobu Eguchi, Daisaku Yoshihara, and Keiichiro Suzuki.

The role of O-linked GlcNAc modification on the glucose response of ChREBP. 12th International Congress On Amino Acids, Peptides and Proteins, 2011, August 1-5, Beijing (China)

〔図書〕(計 1件)

① 太田博明、メディカルレビュー社、AGEsと老化—糖化制御からみたウェルエイジング—、2013、47-53

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hyo-med.ac.jp/department/bchm/index.htm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

崎山 晴彦 (SAKIYAMA HARUHIKO)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：30508958

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：