

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 6 日現在

機関番号：14401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23791048
 研究課題名（和文） 新規な糖・脂質・コレステロール・胆汁酸代謝調節因子としての SIK の機能解析
 研究課題名（英文） Analysis of SIK3, newly regulator of glucose, lipid, cholesterol, and bile acid.
 研究代表者
 上尾 達也（UEBI TASTUYA）
 大阪大学・大学院生命機能研究科・招へい研究員
 研究者番号：80513803

研究成果の概要（和文）：抗肥満薬の開発を目指し SIK3-KO マウスが太らないが肝機能が悪化する原因を調べた。SIK3-KO マウスは胆汁酸耐性がなく、より肝機能を悪化させるが、遺伝子発現量解析の結果からコレステロール・胆汁酸関連遺伝子の発現に広く異常をきたしていたので SIK3 はそれらの上位制御因子だと示唆された。またその標的蛋白質を探索したところ 2 種の標的候補タンパク質が見いだされた。脂肪を蓄積できない原因としてエネルギー漏出を想定しているが、その経路は脂肪酸ではなかった。

研究成果の概要（英文）：SIK3-KO mice do not get fat, but were caused liver dysfunction. In order to develop the anti-obesity drug, in this study, a function of SIK3 was analyzed. SIK3-KO mice were high sensitive to bile acid, and the high bile acid level induced serious liver dysfunction. By analysis of gene expression level, it was found that SIK-KO mice lost the regulation of expression of gene related to cholesterol and bile acid responding a diet. It was suggested that SIK3 was master regulator of cholesterol and bile acid homeostasis. By mass spectrometry analysis of phosphorylated proteins, two candidate target proteins of SIK3 were found. Since there was no difference in the fatty acid composition between SIK3-KO and wild type, it was suggested that fatty acid do not relate to energy reflux.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：代謝シグナル

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：メタボリックシンドローム、肥満

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームとは、肥満、糖尿病、脂質異常症、高血圧など複数の要因が複雑に絡み合う病態の総称である。うち、肥満そのものは病気ではないが、病態悪化の有用なバロメーターとして考えられている。肥満を改善するには運動と食事制限が最も有効であるが、ストレスの蔓延および余裕の無い現代社会において肥満を改善することは必ずしも容易ではなく、将来の医療費の圧迫の最大の要因となることが不安視されている。これまで、摂食抑制剤や消化吸収阻害剤

等も提案されているが、残念ながら顕著な効果を示さないため、新たな改善法の開発が期待されている。

AMPK ファミリーは細胞内 AMP 濃度に応じて糖、脂質代謝を制御し飢餓シグナルとして働いていることが知られている。AMPK ファミリーに属する塩誘導性キナーゼのうち、高脂肪、高コレステロール条件下で誘導されるサブタイプ SIK3 について遺伝子欠損マウスを作製したところ、そのマウスは摂食量は野生型と変化しないにも関わらず、通常の半分の体重までにしか成長せず、まった

く内臓脂肪を蓄積しないという顕著な表現形を示した。血液生化学的な分析では血糖、血中コレステロールが低値を示し、低血糖時でも高いインスリン感受性を示した。多くのパラメーターがメタボリックシンドロームを改善する方向に変化していたため創薬標的として有用かと思われた。

2. 研究の目的

創薬標的として有用かと思われた **SIK3** であったが **KO** マウスのその後の解析の結果、血中胆汁酸濃度は著しく上昇しており、肝機能が悪化していたため直接の創薬標的とするには難しいことがわかった。しかしながら **SIK3-KO** マウスは高脂肪食摂食時に特徴的な表現形が見られた。高脂肪食で野生型マウスは肥満を引き起こし脂肪肝を発症したが、**SIK3-KO** マウスでは普通食の場合と同じく内臓脂肪、肝臓での脂肪の蓄積は全く見られなかった。しかし血中胆汁酸濃度は普通食よりも減少し、肝機能は改善していたからこの **SIK3-KO** マウスは高脂肪食摂取に適応した体質をもっているものと予想された。本研究ではこれらの特異な性質をもつ **SIK3-KO** マウスを用いて **SIK3** による胆汁酸、コレステロール、脂質代謝の制御機構を同定し、それが高脂肪食など摂食した栄養に応じてどのように修飾されているかを明らかにすることを目的としていた。そこから得られる結果は現在の脂質過多な食生活に対応した、脂質を浪費して排出する抗肥満薬の開発に向けた足がかりとして利用できるのではないかと考えた。

3. 研究の方法

胆汁酸負荷を与えたときの **SIK3-KO** マウスの表現形

野生型、**SIK3-KO** マウスに対して 0.2% コール酸を含む飼料を一か月間与えたのち、血液生化学のパラメーターや肝臓等の臓器に対する影響を比較した。

脂質、コレステロール関連遺伝子の発現量変化の解析

野生型、野生型および **SIK3-KO** マウスに普通食、高脂肪食、高コレステロール食、高胆汁酸食を与えた後、肝臓中の脂質、コレステロール関連遺伝子の mRNA 量を定量的 RT-PCR により測定した。

SIK3 標的蛋白質の同定

野生型および **SIK3-KO** マウス胎児皮膚から初代培養した胎児繊維芽細胞 (MEF) に対してアデノウイルスベクターにより活性化型、非活性化型の **SIK3** をそれぞれ導入した。それら細胞からリン酸化タンパク質をアフィニティカラムにより濃縮、精製し、二次元

電気泳動により分離した。活性化型 **SIK3** によりリン酸化が更新したとみられるタンパク質について質量分析を行いそれらタンパク質を同定した。

SIK3-KO マウスの脂肪酸組成の分析

野生型および **SIK3-KO** マウスから摘出した内臓脂肪、採取した血液から脂質を抽出し脂肪酸をメチル化した。その後メチル化脂肪酸をガスクロマトグラフィーによって分析し、その脂肪酸組成を比較した。

4. 研究成果

胆汁酸負荷を与えたときの **SIK3-KO** マウスの表現形

野生型、**SIK3-KO** マウスのそれぞれに胆汁酸を含む餌を与えた。野生型は胆汁酸負荷に対して耐性があり血中胆汁酸、コレステロール、中性脂肪などの血液生化学のパラメーターは普通食と変わらず、内臓に関しても影響はほとんど見られなかった。しかし **KO** マウスは血中胆汁酸濃度が普通食摂食時に比べてより強烈に上昇し、肝機能がさらに悪化していた。同時に肝臓や胆のうへの胆汁の蓄積もみられ、胆のうが極度に肥大化していた。しかし血中コレステロール値については上昇し野生型と同程度まで改善していた。(図 1, 2, 3) また野生型の一部については通常時にはこれといった表現形は見られないものの、胆汁酸を与えると **SIK3-KO** マウスと同様に血中胆汁酸濃度が著しく上昇し肝機能の悪化がみられ、血中コレステロール濃度も上昇していた。このような野生型マウスは作製した **SIK3-KO** マウスの系統だけではなく他の系統でも見られたが、交配実験の結果これが遺伝的形質である証拠は得られなかった。

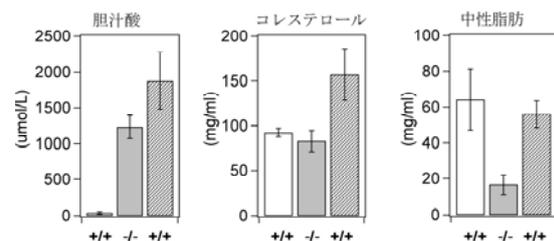


図1 胆汁酸負荷時の血中濃度



図2 胆汁酸負荷時の肝臓

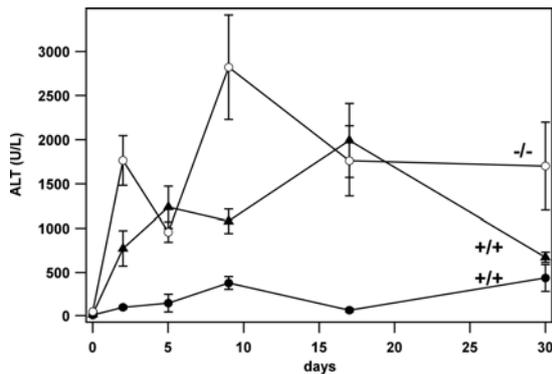


図3 胆汁酸による肝機能の悪化

脂質、コレステロール関連遺伝子の発現量変化の解析

野生型、SIK3-KO マウスに各種の餌を与えたときの遺伝子発現量を測定した。野生型ではコレステロール排出にかかわる ABCG5、Abca1、胆汁酸合成にかかわる Shp、胆汁酸排出にかかわる Bsep といった遺伝子の発現量が餌の種類に応じて変化しているが、SIK3-KO マウスでは餌の種類による発現量の差が見られなかった。(図4)ここから SIK3 はコレステロール、胆汁酸の排出を制御する上位のタンパク質であることが示唆された。しかしながら胆汁酸合成酵素である Cyp7a に関しては高胆汁酸により発現が低下しており SIK3 によらない制御を受けている可能性が考えられた。高脂肪食条件下で胆汁酸濃度が減少し肝機能が改善する形質について、それを引き起こすような発現量の変化は見いだされなかった。

SIK3 標的蛋白質の同定

SIK3 の標的蛋白質を同定するため SIK3-KO マウスから肝細胞を初代培養し、そこに SIK3 を導入することで SIK3 によりリン酸化されるタンパク質を得ることを試みたが KO マウスからの初代培養がうまくいかなかった。SIK3 は主に肝臓で発現しているものの全身での発現が見られるため容易に初代培養できる MEF を使用した。野生型および SIK3-KO から得られた MEF に活性型、非活性型 SIK3 を導入したものについてリン酸化タンパク質量を比較したところ、活性型 SIK3 を導入したもの、あるいは野生型でのみでみられたスポットが9個見いだされた。うち5つのスポットについて質量分析による同定を行ったところ、1つは分子量は異なっているものの myristoylated alanine-rich C-kinase substrate の配列と極めて高い相同性を示した。またもう1つは機能未知のタンパク質と相同性を示した。(図5)よってこの二種のタンパク質は以上のものとして推定された。残る3つについては相同性が高いものが見いだ

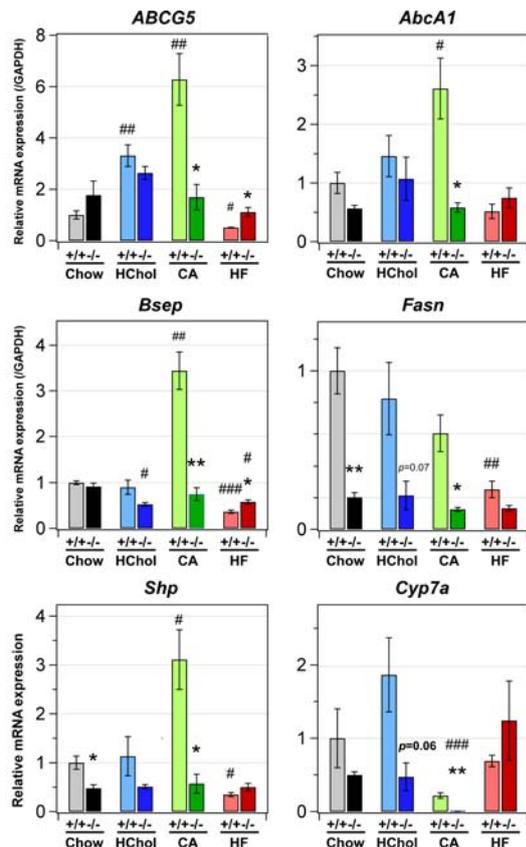
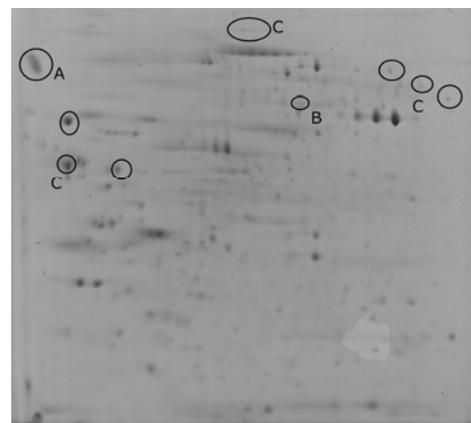


図4 各種の餌を与えたときの遺伝子発現量の変化



A: myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
B: unnamed protein product C: 解析不能

図5 SIK3の標的候補タンパク質

されず同定することができなかった。

SIK3-KO マウスの脂肪酸組成の分析

SIK3-KO マウスに高脂肪食を与えた場合の酸素消費量解析の結果、脂肪の利用率が低いにも関わらず脂肪の蓄積が見られないことから、脂肪酸代謝に異常が生じエネルギー漏出が起きているのではないかと推定した。それにより KO マウスで脂肪酸の蓄積や組成の変化が見られるのではないかと考え、脂肪組織、および血中の脂肪酸組成について分析した。その結果、普通食を与えたものには脂肪酸組

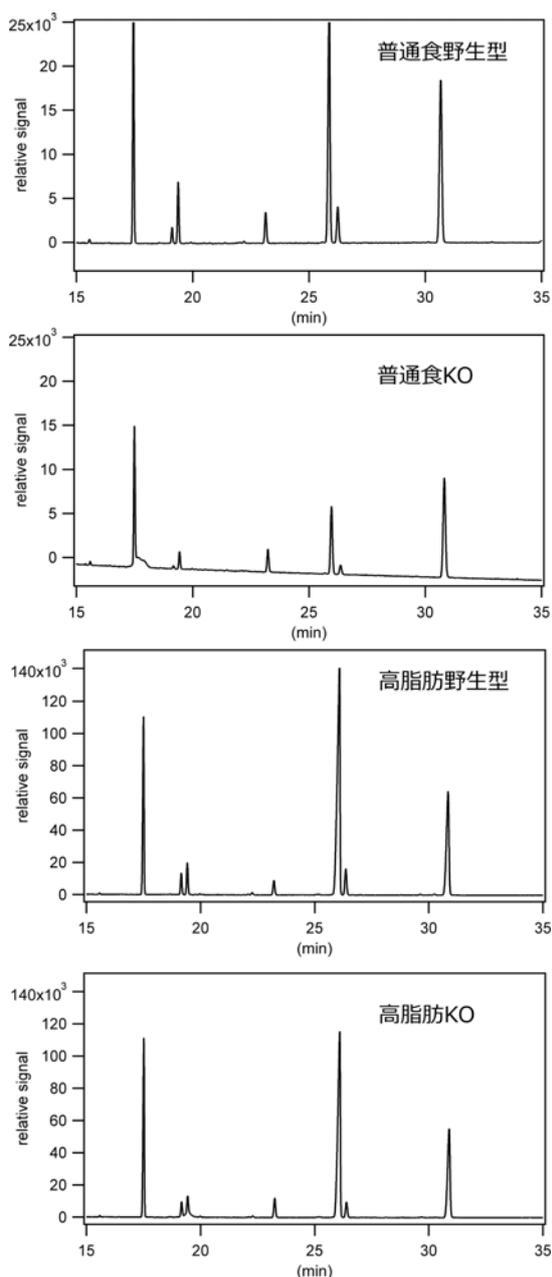


図6 脂肪組織中の脂肪酸分析

成の変化は見られなかった。高脂肪食、高コレステロール食についてもパターンは野生型と KO マウスで同様であり、脂肪酸としてエネルギー漏出が起こってはいないことが示唆された。(図 6)

SIK3-KO マウスは一見生活習慣病に対する耐性を持っているように見えながら実は肝機能が低下しているという表現形を持っているが、その肝機能の悪化は胆汁酸代謝能力の低下によるものであることがコレステロールおよび胆汁酸負荷実験、そしてその時の遺伝子発現量変化から示唆された。

標的蛋白質候補として見いだされた myristoylated alanine-rich C-kinase substrate は膜輸送、分泌等に関与すること

が知られているため、表現形解析の結果と合わせると SIK3 は myristoylated alanine-rich C-kinase substrate を介しても胆汁酸の排出制御に関与する可能性が考えられた。また SIK3-KO マウスで見られる多様な表現形を理解するためにはもう一つ見いだされた機能未知の標的候補タンパク質について解析を進めていく必要がある。

本研究では当初の目的であった高脂肪食下で有用な抗肥満薬の開発に十分は SIK3 経路の解析はできなかった。その目的に向けては SIK3 の下流につながる経路のさらなる解析と共に、今回偶然見いだされた胆汁酸負荷に弱い野生型マウスにおいて、通常とどのような部分が異なっているのかを解析する必要があると考えている。その経路を特定することで SIK3 の不活性化により起こると予想される重篤な肝臓に対する副作用を低減することが可能になると期待される。

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 2 件)

1. Involvement of SIK3 in Glucose and Lipid Homeostasis in Mice.

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.

PLoS One. 2012;7(5):e37803.

査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0037803.

2. SIK3 is essential for chondrocyte hypertrophy during skeletal development in mice.

Sasagawa S, Takemori H, Uebi T, Ikegami D, Hiramatsu K, Ikegawa S, Yoshikawa H, Tsumaki N.

Development. 2012 Mar;139(6):1153-63.

査読有

[学会発表] (計 1 件)

1. SIK3 はコレステロール、胆汁酸代謝の制御因子である。第 34 回日本分子生物学会大会 2011.12.16 上尾達也、伊東祐美、熊谷彩子、竹森洋、パンフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上尾 達也 (UEBI TATSUYA)

大阪大学・大学院生命機能研究科・招へい
研究員

研究者番号：80513803

(2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者

無