

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24248023

研究課題名(和文) 肝臓脂肪蓄積とSREBP-1活性化の分子基盤解明と活性化抑制食品成分探索

研究課題名(英文) Study on hepatic liver accumulation and SREBP-1 activation, and function of food factors

研究代表者

佐藤 隆一郎 (Sato, Ryuichiro)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：50187259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,500,000円

研究成果の概要(和文)：ChREBP / の発現量を絶対値定量する測定法を確立した。脂肪組織、肝臓、小腸でChREBP / の発現が認められたが、骨格筋ではChREBP / の発現のみが検出された。ChREBP / それぞれを培養肝細胞に過剰発現させたところ、脂肪酸合成関連遺伝子発現はChREBP / により有意に上昇した。マウス肝臓にChREBP / を過剰発現させると顕著な脂肪肝発症が認められた。マウスに果糖食を4週間投与するとChREBP / の顕著な上昇が認められ、肝臓脂肪量の有意な増加が見られた。SREBP-1cに変動は認められず、ChREBP / が誘発する脂肪蓄積にSREBP-1cは関与しないことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The evaluation system for measuring absolute value of ChREBPalpha/beta expression was established. ChREBPalpha/beta expression was observed in adipose tissues, liver, and small intestine, whereas only ChREBPalpha expression was detected in skeletal muscle. When ChREBPalpha/beta were overexpressed in cultured hepatocytes, lipogenic gene expression was significantly increased by ChREBPbeta. Mice overexpressing ChREBPbeta in the liver developed fatty liver. Four week feeding of a fructose-containing diet to mice resulted in a significant increase in hepatic ChREBPbeta expression and liver lipid accumulation. No alteration of hepatic SREBP-1c indicates that SREBP-1c was not involved in lipid accumulation induced by ChREBPbeta.

研究分野：食品生化学

キーワード：SREBP-1 ChREBP 脂肪肝 スプライシング 果糖

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームは腹部肥満に起因する疾患と定義され、診断基準の必須項目は、腹部肥満の指標としてのウエスト長である。つまり、男性で85cm、女性で90cmのウエスト長を超えない人は、血糖値、血圧、血中脂質値が異常であっても、メタボリックシンドロームと診断されない。このように脂肪組織への脂肪蓄積が種々の疾病を引き起こすことが知られているが、こうした腹部肥満という表現型と平行して、我々の体の中では、脂肪組織のみならず肝臓にも多量の脂肪が蓄積し、脂肪肝を発症する。同時に、骨格筋にも脂肪の蓄積が観察され、これらを総称して「異所性脂肪蓄積」とも呼んでいる。これらの脂肪蓄積が、インスリンの効きを悪くする「インスリン抵抗性」を惹起し、これがメタボリックシンドローム発症の起点となることが知られている。また脂肪肝は、肥満を伴うものとは限らず、若年女性が過度のダイエットでエネルギー供給制限をすると、エネルギー産生のための脂肪合成が亢進し、脂肪肝が高頻度で認められる。

肝臓に脂肪が蓄積した状態では、エネルギーが供給過剰にも関わらず、脂肪合成の亢進することが知られている。その主たる原因として、脂肪酸合成酵素遺伝子群の発現を制御する転写因子SREBP-1cの活性亢進が挙げられ、応答遺伝子群の発現、結果として、脂肪酸、トリグリセリド(TG)合成が上昇する(Mol Cell 6, 77-86, 2000)。SREBP-1cの活性化はインスリンにより正に制御されており、脂肪蓄積の認められる肝臓においてはインスリン抵抗性が生じ、本来であれば不活性化が起こってもおかしくない。しかしその異常活性化の分子機構は依然として不明である。こうしてインスリン抵抗性状況下で、肝臓でSREBP-1c活性化の進行することが、メタボリックシンドロームへの発症を促進させている。従って、肥満状況下で、肝臓のSREBP-1c活性をいかに抑制するかが問われている。

2. 研究の目的

申請者は、テキサス大学においてSREBPの発見に従事し(Cell 77, 53-62, 1994, JBC 269, 17267-17273, 1994)、その後これまでの十数年間、SREBPの機能解析研究を行ってきた。転写因子SREBPには脂肪酸・TG代謝関連遺伝子を主に制御するSREBP-1cとコレステロール代謝関連遺伝子を制御するSREBP-2のサブタイプが存在する。SREBP-1cとSREBP-2では活性化機構に差異があり、その詳細な分子機構を明らかにすべく研究を進めてきた(JBC 284, 28995-29004, 2009)。また、平成23年度まで継続してきた基盤研究

(S)においては、脂肪細胞での脂肪滴蓄積機構の分子基盤を明らかにする研究を行ってきた。その過程で、脂肪細胞内で脂肪滴が形成されると、小胞体環境(脂肪滴は小胞体膜が遊離する形で形成される)の劇的変化を来し、この変化がSREBP-1活性化を促進する機構を見いだしている。肝臓において過度の脂肪蓄積が認められる中、インスリン抵抗性にも関わらず、SREBP-1cの活性化が進行することは、脂肪滴蓄積過程と強い関連のあることが予想される。申請者は、現在、本来脂肪組織特異的に発現する脂肪滴表面タンパク質Perilipinを肝臓に過剰発現するトランスジェニックマウス樹立を終えようとしている。Perilipinは脂肪滴保護作用が顕著で、肝臓で脂肪滴を覆う表面タンパク質ADRPを押し付け、脂肪滴蓄積を著しく促進することが期待される。このような自作の脂肪肝形成モデルマウスを用い、肝臓における脂肪蓄積とメタボリックシンドローム発症の主要原因であるSREBP-1c過剰活性化機構の関連について、分子レベルの解析を行う。さらには、肥満状態は小胞体ストレスを上昇させ、このことが肝臓での脂肪蓄積、インスリン抵抗性惹起に結びつくことが指摘されており、小胞体ストレスセンサーとして働くATF6のノックアウトマウスを京大理学部より恵与いただき、解析を進めている。さらに、発生工学的なモデルマウスの解析と平行して、肝臓におけるSREBP-1cの活性化を抑制する食品成分を探索する、高感度アッセイ系を樹立し、食品成分による、メタボリックシンドローム発症進展の抑制を目指す。基礎研究から食品成分探索の応用研究へと展開し、再びその成分を用いた基礎研究へと戻ることにより、重層的な食品科学研究を発展させていくことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 脂肪細胞における脂肪蓄積とSREBP-1c活性化の解析

肝臓への脂肪滴蓄積のモデルとして脂肪細胞における脂肪滴形成とSREBP-1c活性化の連関を分子レベルで解析する。具体的には、培養前駆脂肪細胞を成熟脂肪細胞へと分化させる過程において、脂肪滴蓄積とSREBP-1c活性化を計時的に追跡する。

(2) 肝臓の脂肪蓄積時におけるSREBP-1スプライシングアイソフォームの発現制御とDNAメチル化解析

脂肪肝状況でSREBP-1発現が上昇することは知られているが、その際により強力な転写因子であるSREBP-1aがどの程度上昇しているかについて正確な測定はなされていない。そこで、SREBP-1a/1cを

それぞれモル数で絶対値定量する PCR 測定系の構築を試みる。その評価系を用い、各アイソフォームの発現量を定量する。同時に、肝臓のみならず、各種臓器で各アイソフォーム発現量が異なる原因としてプロモーター領域のメチル化が関与している可能性について、バイサルファイト法を用いて、DNA メチル化の程度を評価する。

(3) 脂肪肝発症に關与する転写因子

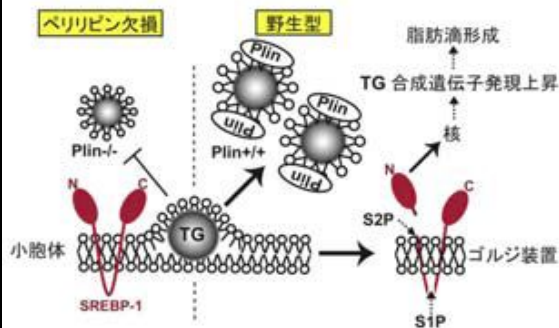
ChREBPのスプライシングアイソフォーム発現制御と脂肪蓄積の解析

ChREBPは糖質摂取により活性化され、脂質合成遺伝子群の発現を上昇させる転写因子である。脂肪組織において新たなアイソフォーム ChREBPβが見出され、その活性はαに比べて高いことが確認されている。脂肪肝形成と、ChREBPβ発現の上昇を肝臓において追跡する。この際に、SREBP-1の時と同じく絶対定量 PCR 評価系の構築を試みる。

4. 研究成果

(1) 肝臓における脂肪蓄積のモデルとして、脂肪細胞における脂肪滴形成と SREBP-1 活性化について解析を進めた。肥満は脂肪細胞への過剰な脂肪滴蓄積状態を意味する。脂肪細胞は前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞へと分化する過程で、PPAR、SREBP-1などの転写因子が活性化され、脂肪酸・トリグリセリド合成が上昇し、それと同時に脂肪滴表面タンパク質 Perilipinが発現亢進し、脂肪滴蓄積増加を伴う。Perilipin KOマウスの皮下、内臓脂肪の脂肪細胞は脂肪滴蓄積が著しく低下し、さらに SREBP-1の活性化も著しく減弱していた。一方、SREBP-2の活性化は変動が無く、脂肪滴蓄積と SREBP-1活性化に相関が認められた。同様の現象は、野生型、KOマウスより調製した MEF を脂肪細胞へと分化させた *in vitro* 培養系でも再現された。前駆、成熟脂肪細胞のそれぞれから小胞体リッチ画分を超速心法にて分離し、そこに含まれる遊離コレステロール量を定量すると、成熟脂肪細胞の小胞体コレステロール量は有意にし、Perilipin KOマウスの皮下脂肪より分離した小胞体では野生型のそれと比較して、コレステロール量が高値であった。すなわち、脂肪滴は小胞体膜から派生する脂質一重膜で覆われており、脂肪滴形成に伴い、小胞体膜環境が著しく変動する事が明らかになった。以上の結果より、脂肪滴形成は、小胞体膜環境変動を介して積極的に SREBP-1 活性化を促し、それに伴い脂肪酸・トリグリセリド合成を上昇させ、さらに脂肪滴形成を進行させるというフィードフォワード制御機構を駆動させている。このスプライ

ルを断ち切る事が、肥満予防、解消の有効な標的となる事が期待される。



(2) 肝臓における脂肪蓄積時の SREBP-1 発現上昇の分子機構を明らかにする目的で、分子生物学的手法により SREBP-1 のスプライシングアイソフォームの定量法を樹立した。転写因子としては活性が10倍程度高い SREBP-1a が微増して、その結果として SREBP-1c 発現を上昇させる機構を想定して解析を進めた。高脂肪食を投与したマウス、肥満を呈するレプチン受容体欠損マウス (db/db mouse) の肝臓を用いた解析を行った結果、野生型マウスの肝臓に比べ、脂肪蓄積肝臓において SREBP-1a mRNA の有意な上昇は認められなかった。一方、SREBP-1c の顕著な上昇は確認された。さらに、SREBP-1c 発現が SREBP-1a に比べ高い肝臓において、SREBP-1a プロモーター領域の CpG 配列のメチル化が亢進し、発現が抑制されている可能性について解析を行った。バイサルファイト法を用い、複数のプライマーを設計し、プロモーター領域のメチル化の程度を解析した。同時に、約14kb離れた SREBP-1c プロモーター領域の解析も行った。その結果、いずれのプロモーター領域もメチル化の程度は極めて低く (数%程度) プロモーター領域のメチル化の程度で発現が制御されていない可能性が示唆された。

以上の知見より、脂肪肝発症過程において、転写因子 SREBP-1c の活性化ならびに発現上昇がトリグリセリド合成を上昇させ、脂肪蓄積を増大させる際に、SREBP-1a の寄与は低く、また、その発現制御にプロモーター領域のメチル化の変動が関与する可能性の低いことが明らかになった。

(3) ChREBPα/β それぞれのアイソフォームの発現量をモル数で絶対値定量する PCR 測定法を確立した。各組織におけるアイソフォーム発現量を測定したところ、脂肪組織、肝臓、小腸で ChREBPα/β の発現が認められたが、骨格筋では ChREBPα の発現のみが検出された。ChREBPβ 発現は ChREBPα により誘発されると理解されているが、各組織においてそれ以外の因子

の関与が示唆された。ChREBP α/β それぞれをアデノウイルスを用いて培養肝細胞に過剰発現させたところ、脂肪酸合成関連応答遺伝子発現はChREBP β により有意に上昇した。同様の手法でマウス肝臓にChREBP β を過剰発現させると顕著な脂肪肝発症が認められた。さらにマウスに果糖を糖質源とする食餌を4週間投与するとChREBP β の顕著な上昇が認められ、肝臓脂肪量の有意な増加が見られた。この時、SREBP-1cの発現、活性化に変動は認められず、ChREBP β が誘発する脂肪蓄積にSREBP-1cは関与しないことが明らかになった。

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)

[雑誌論文] (計8件)

Shimizu, M., Li, J., Inoue, J., and Sato, R. (2015) Quercetin represses apolipoprotein B expression by inhibiting the transcriptional activity of C/EBP β . *PLoS ONE* 10, e0121784 doi: 10.1371/journal.pone.0121784 (査読有)

Shimizu, M., Morimoto, H., Maruyama, R., Inoue, J., and Sato, R. (2015) Selective regulation of FGF19 and FGF21 expression by cellular and nutritional stress. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 61,154-160. (査読有)

Sasaki, T., Nakata, R., Inoue, H., Shimizu, M., Inoue, J., and Sato, R. (2014) The role of AMPK and PPAR γ 1 in exercise-induced lipoprotein lipase in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 306, E1085-E1092. doi: 10.1152/ajpendo.00691. (査読有)

Takahashi, Y., Shinoda, A., Furuya, N., Harada, E., Arimura, N., Ichi, I., Fujiwara, Y., Inoue, J. and Sato, R. (2013) Perilipin-Mediated Lipid Droplet Formation in Adipocytes Promotes Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1 Processing and Triacylglyceride Accumulation *PLoS ONE* 8, e64605 doi: 10.1371/journal.pone.0064605. (査読有)

Fujiki, K., Shinoda, A., Kano, F., Sato, R., Shirahige, K. and Murata, M. (2013) PPAR-Induced PARylation Promotes Local DNA Demethylation by Production of 5-Hydroxymethylcytosine *Nature Communications* 4, 2262

doi: 10.1038/ncomms3262. (査読有)

Maruyama, R., Kamoshida, Y., Shimizu, M., Inoue J, and Sato R. (2013) ATF6 stimulates cholesterologenic gene expression and de novo cholesterol synthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 1734-1738. https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/77/8/7_130295/_article (査読有)

Shimizu M., Li J, Maruyama R, Inoue J, and Sato R. (2013) FGF19 (fibroblast growth factor 19) as a novel target gene for activating transcription factor 4 in response to endoplasmic reticulum stress. *Biochem J.* 450, 221-229. doi: 10.1042/BJ20121393. (査読有)

Yashiro T, Nanmoku M, Shimizu M., Inoue J, Sato R. (2013) 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside stabilizes low density lipoprotein receptor mRNA in hepatocytes via ERK-dependent HuR binding to an AU-rich element. *Atherosclerosis* 226, 95-101. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.09.033. (査読有)

[学会発表] (計8件)

井上聖哉、井上順、清水誠、佐藤隆一郎 ChREBPアイソフォームを介した糖・脂質代謝関連遺伝子の転写制御機構 日本農芸化学会2015年度大会 2015.3.26-29 岡山

佐藤隆一郎 脂肪細胞分化過程における脂肪滴形成の分子基盤 日本農芸化学会2014年度大会 2014.3.27-30 東京

井上聖哉、井上順、清水誠、佐藤隆一郎 ChREBPの組織における発現分布と機能の解析 日本農芸化学会2014年度大会 2014.3.27-30 東京

佐藤隆一郎 脂質代謝制御の分子食品科学研究 第67回日本栄養・食糧学会大会 2013.5.24-26 名古屋

宮田慎吾、井上順、清水誠、佐藤隆一郎 SREBP活性を抑制する食品成分の探索・解析 第67回日本栄養・食糧学会大会 2013.5.24-26 名古屋

篠田旭弘、鎌田春彦、清水誠、井上順、佐藤隆一郎 脂肪細胞滴局在タンパク質ADRPの翻訳後修飾 日本農芸化学会2013

年度大会 2013.3.25-27 仙台

清水誠、李娟、丸山竜人、井上順、佐藤隆一郎 小胞体ストレスによる FGF19 及び FGF21 の発現調節機構 第85回生化学会大会 2012.12.14-16 福岡

井上順、篠田旭弘、高橋裕、清水誠、佐藤隆一郎 脂肪細胞分化過程における SREBP-1 プロセッシング亢進の分子機構 第33回日本肥満学会 2012.10.12 京都

〔図書〕（計2件）

佐藤隆一郎 日本栄養・食糧学会誌（2013）脂質代謝制御の分子食品科学 Vol.66 No.6 279-285

佐藤隆一郎 FOOD STYLE（2013）抗肥満・脂質代謝と機能性食品 21 Vol.17 No.9 42-44

〔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

<http://webpark1213.sakura.ne.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 隆一郎 (SATO, Ryuichiro)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：50187259

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

清水 誠 (SHIMIZU, Makoto)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号：40409008