

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450166

研究課題名(和文)食餌誘導性脂肪肝マウスに由来する新規な脂質代謝関連遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of a novel lipid metabolism-related gene derived from high-fat diet induced fatty liver mouse.

研究代表者

小林 美里 (Kobayashi, Misato)

名古屋大学・生命農学研究科・講師

研究者番号：20456586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：高脂肪食摂取によって著明な脂肪肝を呈するモデルマウス(SMXA-5)を用いた遺伝解析により脂肪肝感受性遺伝子座(FI1sa)を第12番染色体に見出し、その候補遺伝子として機能未知なlah1に注目した。lah1遺伝子と脂肪肝形成との関係性を明らかにするために、全身性lah1遺伝子欠損マウスの作製を行って高脂肪食を負荷したところ、lah1遺伝子発現量の低下が脂肪肝発症に関与することが示唆された。また、lah1遺伝子の上流領域に約100 bpの欠失、約400bpの挿入変異をもつマウス系統では、lah1発現レベルが低いことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We previously identified fatty liver susceptible locus (FI1sa) on mouse chromosome 12 in SMXA-5 mice, a model of high-fat induced fatty liver. We selected lah1 gene as a candidate gene for FI1sa. To clarify the relation between lah1 gene and fatty liver, we constructed the lah1 gene knockout mice. Liver lipids contents in lah1 gene knockout mice were lower than that in WT mice. This study suggested that the low expression level of lah1 led to the accumulation of lipids in liver. In addition, we found that mice having the large insertion/deletion in upstream of lah1 gene showed low level of lah1 gene expression.

研究分野：栄養生化学

キーワード：脂肪肝 高脂肪食 ノックアウト 遺伝解析 脂質代謝

## 1. 研究開始当初の背景

脂肪肝の形成は食事因子の影響を強く受け、実験動物ではコリン欠乏やメチオニン制限食により発症し、ヒトでは糖質および脂質の過剰摂取により発症する。その一方で、遺伝因子によっても脂肪肝感受性は決定されている。しかし、遺伝的背景と環境因子の制御が困難であるヒトでの研究においては、栄養条件と相互作用して脂肪肝発症を規定する遺伝子の解析は困難である。

我々は高脂肪食(食餌因子)と相互作用して脂肪肝を発症する独自の脂肪肝モデルマウス SMXA-5 を用いてきた。このマウスは高脂肪食摂取によって著明な脂肪肝を呈し、そのゲノムは SM/J マウスと A/J マウスのゲノムから構成されている。このモデルを用いた遺伝解析を行ったところ、A/J マウス由来の脂肪肝感受性遺伝子座(*F11sa*)を第 12 番染色体に見出した(*J Lipid Res.* 48:2039, 2007)。

続いて、脂肪肝感受性の A/J マウスに脂肪肝抵抗性の SM/J マウスの第 12 番染色体のみを導入置換したコンソミックマウスにおいて、肝脂肪量の有意な低下を確認した。これにより、第 12 番染色体上の脂肪肝感受性遺伝子の存在を証明した。そして、網羅的な遺伝子発現量解析によって、第 12 番染色体に存在する遺伝子の中で唯一、*lah1* [isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1, homologue (*S. cerevisiae*)]遺伝子の発現が A/J において顕著に低下している事を見出した。酵母のエステラーゼホモログ(相同遺伝子)である *lah1* 遺伝子は哺乳類をはじめとする動物にも存在し発現しているが、その機能は全く明らかにされていない。

また、*lah1* の mRNA およびタンパク質レベルの低い A/J マウスのプロモーター領域に、119 塩基の欠失を見出した。*lah1* 遺伝子上流のこの欠失が mRNA レベルの低下に寄与していると推測された。

本研究において、動物での機能が全く明らかになっていない *lah1* という新規遺伝子の機能が解明されれば、脂肪肝発症に関する新たなメカニズムの発見に繋がる。

## 2. 研究の目的

本研究では、*in vitro* および *in vivo* において、マウス *lah1* の機能を初めて解明し、肝臓脂質代謝における *lah1* 遺伝子と栄養因子との相互作用を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、*in vitro* の実験系において *lah1* タンパク質の脂質代謝に関する機能解析を行った。また、*lah1* 遺伝子の発現制御機構を解明するために、A/J マウスに見られる

*lah1* 遺伝子のプロモーター領域の欠失による転写制御機構についても探求した。また、*in vivo* の実験系では、*lah1* 欠損マウスを用いて高脂肪食下での脂質代謝特性を肝臓とそれ以外の組織に分けて解析した。

以下の研究項目を順次進めた。

(1) *lah1* タンパク質の機能解析 (*in vitro*)

酵母エステラーゼホモログ遺伝子である *lah1* の機能を明らかにするために、マウス *lah1* の cDNA を His タグ付きのベクターに導入し、大腸菌で過剰発現させ、*lah1* 組換えタンパク質を His タグによって大量に回収した。この組換え *lah1* タンパク質を酵母 IAH1 タンパク質で報告されている基質(C2, C4, C5, C6, C10 のアルコールと酢酸とのエステル)と反応させて、エステラーゼ活性を測定した。

(2) *lah1* 遺伝子の転写調節領域の同定(*in vitro*)

欠失系統(A/J)と正常系統(SM/J)の *lah1* 遺伝子上流約 800 塩基から転写開始点までの DNA 配列を決定した。また、他のマウス系統(C57BL/6J, DBA/2, DBA/1, C3H/HeN, MSM, NSY, NOD, AKR)についてもダイレクトシークエンシングを行って、DNA 配列を決定した。これらの配列を比較解析し、遺伝子発現量に関与すると推定する変異を抽出した。この配列をルシフェラーゼ発現ベクターにクローニングし、ルシフェラーゼアッセイを行った。

(3) *lah1* 遺伝子欠損による脂肪肝形成の証明(*in vivo*)

全身性 *lah1* 遺伝子欠損マウスの作出

IKMC(International Knockout Mouse Consortium: IKMC project)より *Iah1* 遺伝子のターゲティングマウスの凍結胚を入手し、全身で Cre 組換え酵素を発現するマウス(CAG-Cre)と交配することにより、全身性 *Iah1* 遺伝子欠損マウスを作出した。*Iah1* が全身で欠損していることを確認するために、欠損マウスの肝臓、腎臓、脂肪組織、小腸、肺、褐色脂肪組織、筋肉から mRNA およびタンパク質を抽出して、リアルタイム PCR とウェスタンブロットにより発現レベルで測定した。

肝臓特異的 *lah1* 遺伝子欠損マウスの作出

*Iah1* 遺伝子のターゲティングマウスと全身で Flp 組換え酵素を発現するマウス(理化学研究所 BRC より入手)とを交配した後、アルブミンプロモーター下で Cre 組換え酵素を肝臓特異的に発現するマウスと交配することにより、肝臓特異的 *Iah1* 遺伝子欠損マウスを作出した。

*lah1* 遺伝子と脂肪肝誘導食との相互作用の解析

作出した全身性 *Iah1* 遺伝子欠損マウスを用いて、このマウスに 6 週齢から通常食と脂肪肝誘導食（高脂肪食）摂取させ、体重、摂食量、肥満度、各組織重量、肝臓脂質量を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) *Iah1* タンパク質の機能解析 (*in vitro*)

マウス *Iah1* 組換えタンパク質を大腸菌で発現させ精製した。酵母 IAH1 でエステラーゼ活性が確認されている短鎖アルコールと酢酸とのエステル化合物の基質 (C2, C4, C5, C6, C10) に対して、組換え *Iah1* タンパク質を反応させてエステラーゼ活性を測定した。結果、C4 のイソブチル酢酸に対するエステラーゼ活性が最も高く、中鎖の C10 に対しては全く酵素活性を示さないことがわかった。このマウス *Iah1* の基質特異性は酵母 IAH1 タンパク質と同様であることを明らかにした。

##### (2) *Iah1* 遺伝子の転写調節領域の同定 (*in vitro*)

A/J と SM/J 間の *Iah1* 塩基配列の比較を行った結果、A/J の 5' 上流領域に約 100 bp の欠失に加えて、さらにその上流には約 400bp の挿入変異を見出した。

*Iah1* 発現量の低い A/J マウスで欠失と挿入変異が発現量に及ぼす影響を検討するために、遺伝子上流部を導入したルシフェラーゼベクターの作製を行った。変異を持たない C57BL/6J および SM/J に比べて A/J の配列でルシフェラーゼ活性が低下すると予想したが、結果は有意な差を示さなかった。そのため、現時点ではこれらの大きな変異が発現量調節に影響しているとは考えにくく、他の要因が関与していると示唆された。

##### (3) *Iah1* 遺伝子欠損による脂肪肝形成の証明 (*in vivo*)

全身性 *Iah1* 遺伝子欠損マウスの作製を行って、タンパク質および mRNA レベルで全身性に *Iah1* が発現していないことを確認した。その発現は腎臓で最も高く、肝臓、脂肪組織でも高い発現が認められた。

この全身性 *Iah1* 欠損マウスに高脂肪食を負荷したところ、肝臓総脂質量、肝臓トリグリセリド含量が野生型マウスに比べて高値を示し、*Iah1* の脂肪肝への関与が示唆された。

#### 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 2 件)

Suzuki M, Kobayashi M, Ohno T, Kanamori S, Tateishi S, Murai A, Horio F. Genetic dissection of the fatty liver QTL *Fli1sa* by using congenic mice and identification of candidate genes in the liver and epididymal fat. **BMC Genet.** 査読有 17(1):145. (2016)

Kobayashi M, Suzuki M, Ohno T, Tsuzuki K, Taguchi C, Tateishi S, Kawada T, Kim YI, Murai A, Horio F. Detection of differentially expressed candidate genes for a fatty liver QTL on mouse chromosome 12. **BMC Genet.** 査読有 17(1):73. (2016) doi: 10.1186/s12863-016-0385-2.

[学会発表](計 6 件)

金森深作、小林美里、鈴木京、村井篤嗣、堀尾文彦  
SMXA5 マウスの食餌誘導性脂肪肝の形成機構の解析  
日本農芸化学会 2017 年大会、京都女子大、2017 年 3 月 18 日

金森深作、小林美里、鈴木京、村井篤嗣、堀尾文彦  
脂肪肝モデル：SMXA-5 マウスの脂質代謝・炎症関連遺伝子の発現特性  
第 71 回日本栄養・食糧学会中部支部大会、岐阜大学、2016 年 11 月 19 日

鈴木京、小林美里、大野民生、辻村絢子、村井篤嗣、堀尾文彦  
脂肪肝感受性遺伝子座 *Fli1sa* の候補遺伝子の選抜とその機能解析  
第 70 回日本栄養・食糧学会大会、兵庫、2016 年 5 月 15 日

Miyako Suzuki, Misato Kobayashi, Tamio Ohno, Junko Tsujimura, Hiroaki Oda, Atsushi Murai, Fumihiko Horio  
Analysis of genomic region controlling the development of high-fat diet-induced fatty liver using congenic mice.  
12<sup>th</sup> Asian Congress of Nutrition、横浜、2015 年 5 月 15 日

鈴木京、小林美里、大野民生、辻村絢子、村井篤嗣、堀尾文彦  
コンジェニックマウスを用いた食餌誘導性脂肪肝感受性遺伝子の存在領域の解析  
日本農芸化学会 2015 年大会、岡山、2015 年 3 月 27 日

鈴木京、小林美里、大野民生、辻村絢子、小田裕昭、村井篤嗣、堀尾文彦  
脂肪肝感受性遺伝子座 (*Fli1sa*) の候補遺伝子の発現制御機構の解析とコンジェニック

マウスによる責任遺伝子の探索  
第 68 回日本栄養・食糧学会大会、札幌、2014  
年 5 月 31 日

〔その他〕

ホームページ情報

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~anutr/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 美里 (KOBAYASHI MISATO)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・講師

研究者番号：20456586

### (2) 連携研究者

堀尾 文彦 (HORIO FUMIHIKO)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授

研究者番号：20165591

村井 篤嗣 (MURAI ATSUSHI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：25450407

小田 裕昭 (ODA HIROAKI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：20204208

大野 民生 (OHNO TAMIO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90293620