

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25504003

研究課題名(和文) 抗肥満・抗糖尿病・抗酸化性転写因子の機能解析と活性化食品成分の同定

研究課題名(英文) Functional study of anti-obese, anti-diabetes, anti-oxidative transcription factor and identification of functional food factor which activate this transcription factor

研究代表者

清水 誠 (Shimizu, Makoto)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：40409008

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)：申請者らは転写因子ATF4が、抗肥満・抗糖尿病効果を有するホルモンFGF21及びFGF19の新規制御因子であることを見出した。本研究では、培養細胞を用いたスクリーニングによりATF4を活性化する抗肥満性・抗糖尿病性食品成分の同定を試みた。その結果、ATF4を活性化し、FGF21、FGF19の発現を亢進する食品成分を同定した。またマイクロアレイを用いてATF4の新規標的遺伝子の同定を試みた。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that FGF21 and FGF19, anti-obese, anti-diabetes hormones, are novel target genes of transcription factor ATF4. In this study, we performed a screening study using cell line to identify functional food factors which activate ATF4. We found one food-derived molecule activates ATF4, and induces expression of FGF21 and FGF19 genes. Moreover, we attempted to identify novel target genes of ATF4 using microarray analysis.

研究分野：農学

キーワード：ATF4 FGF21 FGF15 FGF19 小胞体ストレス 機能性食品成分

1. 研究開始当初の背景

肥満や糖尿病をはじめとする生活習慣病の患者数は世界的に増加しており、その予防・軽減方法の確立は喫緊の課題である。FGF19 (Fibroblast Growth Factor 19) と FGF21 は抗肥満、抗糖尿病効果を有するホルモン様因子である。FGF19 は小腸で、FGF21 は肝臓でそれぞれ選択的に発現する。FGF19 と FGF21 は血中へ分泌された後に、標的臓器(それぞれ肝臓と白色脂肪組織)に発現する FGF 受容体とそのコファクターである Klotho を介して作用する。特に FGF21 は糖・脂質代謝改善効果が注目されており、そのアナログの開発が報告されるなど研究が活発に行われている。

生活習慣病の予防には、生活スタイル(食生活、運動習慣など)の改善が重要である。しかし、現代社会では運動する時間の確保などが必ずしも容易ではない場合が多く、効率的な予防・軽減の方法が必要と考える。FGF19 と FGF21 は抗肥満、抗糖尿病効果を有することから、食品成分によりこれらの発現が亢進することができれば、より効果的な予防・軽減効果が期待される。我々は、転写因子 ATF4 が FGF19 と FGF21 の新たな制御因子であることを報告した(Shimizu et al. 2013, Biochem. J.)。このことから、ATF4 を活性化する食品成分は FGF19 と FGF21 の発現を亢進し、生活習慣病の予防・軽減へ寄与すると考えた。

2. 研究の目的

- (1) ATF4 の活性化を評価する方法を確立する。ATF4 は翻訳レベル、およびプロモーター活性での制御が報告されていることから、それぞれの制御領域を含むルシフェラーゼプラスミドを構築する。HEK293 細胞を用いて、これらのプラスミドが ATF4 の活性化刺激(小胞体ストレスなど)による制御を受けるか検討する。
- (2) ATF4 を活性化する食品成分のスクリーニングを行う。上記で ATF4 の活性化を検証したプラスミドを HEK293 細胞に導入し、我々が所有する食品成分ライブラリーを添加した後にルシフェラーゼアッセイを行う。さらに、小腸と肝臓の培養細胞を用いて、同定した食品成分が FGF19 と FGF21 の発現を亢進するか検証する。この実験より ATF4 を活性化し、かつ FGF19 と FGF21 の遺伝子発現の亢進する食品由来成分の同定を試みる。
- (3) DNA マイクロアレイ解析を用いて ATF4 の標的遺伝子を網羅的に解析する。ATF4-FGF19/FGF21 経路を介した抗肥満効

果を提唱する上で、ATF4 の機能の全体像を把握することは重要である。肝臓、小腸細胞にアデノウイルスを用いて ATF4 を過剰発現し、調整した RNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行う。この実験より ATF4 の標的遺伝子を網羅的に解析すると共に、ATF4 の新規標的遺伝子の同定を試みる。

3. 研究の方法

(1) ATF4 の評価系の構築

転写因子 ATF4 は小胞体ストレスなど様々な刺激により翻訳やプロモーター活性が制御されることが報告されている。このことより、ATF4 の翻訳制御領域(5' 非翻訳領域)を含むルシフェラーゼプラスミド(ATF4-ORF-luc)及び ATF4 のプロモーター領域を含むルシフェラーゼプラスミド(ATF4-promoter-luc)を構築する。これらのプラスミドを HEK293 細胞に導入し、既知の活性化剤である小胞体ストレス誘導剤(サブシガルジン)を添加しルシフェラーゼアッセイを行う。この実験より、ATF4 の活性化が評価できるプラスミドを選定し、スクリーニングに使用する。

(2) 培養細胞を用いた ATF4 活性化成分のスクリーニング

上記の実験で ATF4 の活性化が認められたレポータープラスミドを HEK293 細胞に導入し、我々が所有する食品成分ライブラリー(168 種)を添加し、細胞抽出液を調製する。ルシフェラーゼ活性を測定することにより、ATF4 の活性化を評価する。ATF4 の活性化が認められた食品成分に関しては、小腸と肝臓の培養細胞を用いてウェスタンブロットによる内在性の ATF4 の活性化(翻訳の亢進)及びリアルタイム PCR による標的遺伝子(FGF19 と FGF21)の発現変動を解析する。

(3) DNA マイクロアレイ解析を用いた ATF4 の標的遺伝子の探索

ATF4 を発現するアデノウイルス(Ad-ATF4)を構築し、ヒト肝ガン細胞である HuH7 細胞に処理する。ウェスタンブロットを用いた解析により、Ad-ATF4 による ATF4 タンパク質発現、およびリアルタイム PCR を用いて既知の ATF4 標的遺伝子(FGF21 など)の発現変動を確認する。また、Ad-ATF4 を感染させた細胞より RNA を回収し、カラムを用いて精製を行う。この RNA を用いて DNA マイクロアレイ解析(Affymetrix 社製)を行う。

4. 研究成果

(1) ATF4 の評価系の構築

ATF4 の翻訳 (ATF4-ORF-luc) またはプロモーター活性 (ATF4-promoter-luc) を既知の ATF4 活性化剤であるサブシガルジン (小胞体ストレス誘導剤) を用いて検討した。上記のレポータープラスミドを HEK293 細胞に導入し、サブシガルジンを添加した後、細胞抽出液を調整しルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、いずれのプラスミドでも ATF4 の活性化が確認されたが、ATF4-ORF-luc において、特に強い活性化を認めた。また、ATF4 の活性化は主に翻訳レベルであることが報告されていることから、ATF4-ORF-luc をスクリーニングに使用することとした。

(2) 培養細胞を用いた ATF4 活性化成分のスクリーニング

上記の ATF4-ORF-luc を HEK293 細胞に導入し、我々が保有する食品成分ライブラリー (168 種) を添加し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、ATF4-ORF-luc を活性化する複数の食品成分を同定した。次に内在性の ATF4 を活性化するか検討するため、同定した食品成分を処理した細胞よりタンパク質抽出液を調製しウェスタンブロットに供した。その結果、食品成分 A の添加でのみ ATF4 タンパク質の増加が認められた。さらにリアルタイム PCR を用いて食品成分 A による FGF19 と FGF21 の遺伝子発現変動を検討した。FGF21 が内在性に発現する肝細胞 (HepG2 細胞) に食品成分 A を添加した結果、FGF21 の著名な発現誘導が見られた。一方、FGF19 が発現する小腸細胞 (Caco-2 細胞) で同様の実験を行った結果、食品成分 A による FGF19 の有意な発現増加が見られた。以上の結果から、食品成分 A は ATF4 を活性化し、標的遺伝子である FGF19 と FGF21 の発現を亢進することが示された。

(3) DNA マイクロアレイ解析を用いた ATF4 の新規標的遺伝子の探索

ATF4 を発現するアデノウイルス (Ad-ATF4) を調整し、ヒト肝がん細胞である HuH7 細胞に添加した。その結果、ウェスタンブロットにより ATF4 タンパク質の増加、およびリアルタイム PCR により標的遺伝子である FGF21 などの発現増加が認められた。この細胞より調整した RNA を精製し、DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、ATF4 の既知及び複数の新規標的候補遺伝子を同定した。いくつかの候補遺伝子に関してプロモーター解析を

行った結果、ATF4 の標的配列である AARE (amino acid-response element) を同定した。また小胞体ストレス誘導剤 (サブシガルジン) を用いて内在性の ATF4 を活性化した結果、遺伝子発現の有意な増加が認められた。現在、ATF4 のノックダウン実験により ATF4 依存的な発現制御か、マウスを用いた実験より個体レベルでの制御か検証を進めている。

以上の結果より、ATF4 の評価系を構築し、ATF4-FGF19/FGF21 経路を活性化する食品成分 A の同定に成功した。今後は、食品成分 A の詳細な作用メカニズム、および個体レベルでの食品成分 A による ATF4-FGF19/FGF21 経路の活性化を検討する。さらに食品成分 A による抗肥満効果を高脂肪食負荷マウスや ob/ob マウス (レプチン欠損マウス) などの肥満モデルマウスを用いて検討する。DNA マイクロアレイ解析より同定した ATF4 の新規標的遺伝子に関しては、その詳細な制御メカニズムおよび機能解析を行う予定である。

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)

[雑誌論文](計 3 件)

Shimizu M, Morimoto H, Maruyama R, Inoue J, Sato R. Selective Regulation of FGF19 and FGF21 Expression by Cellular and Nutritional Stress. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2015. 61(2):154-60. 査読有り

Maruyama R, Shimizu M, Ishijima T, Nakai Y, Inoue J, Sato R. Searching for novel ATF4 target genes in human hepatoma cells by microarray analysis. Biosci Biotechnol Biochem. 2016. 80(6):1149-54. 査読有り

Maruyama R, Shimizu M, Li J, Inoue J, Sato R. Fibroblast growth factor 21 induction by activating transcription factor 4 is regulated through three amino acid response elements in its promoter region. Biosci Biotechnol Biochem. 2016. 80(5):929-34. 査読有り

[学会発表](計 5 件)

清水 誠, 丸山 竜人, 李 娟, 森本ひとみ, 井上 順, 佐藤 隆一郎 「ストレスに応答する FGF : FGF15/19 と FGF21」第 86 回日本生化学会大会、2013.9.12. 横浜

丸山 竜人、清水 誠、井上 順、伊藤 信行、佐藤 隆一郎 「ストレス刺激により発現上昇する FGF21 の機能解析」 日本農芸化学会 2014 年度大会、2014.3.28. 東京

森本 ひとみ、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎 「様々なストレス刺激における FGF19 の発現調節」 日本農芸化学会 2014 年度大会、2014.3.28. 東京

清水 誠、丸山 竜人、森本 ひとみ、井上 順、伊藤 信行、佐藤 隆一郎 「酸化ストレスやアミノ酸インバランスによる FGF19・FGF21 の発現制御とその機能解析」 第 68 回日本栄養・食糧学会大会、2014.5.31. 札幌

清水 誠、丸山 竜人、森本 ひとみ、井上 順、伊藤 信行、佐藤 隆一郎 「ストレス刺激下における FGF19、FGF21 の機能解析」 第 87 回 日本生化学会大会、2014.10.16. 京都

〔図書〕(計 0 件)

〔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
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/food-biochem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

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