

44. 脂肪肝候補遺伝子である新規エステラーゼの機能解明

小林 美里

Key words : 脂肪肝, 高脂肪食, エステラーゼ,
モデルマウス, 遺伝解析

名古屋大学 大学院生命農学研究科
応用分子生命科学専攻

緒 言

脂肪肝は食事因子の影響を強く受ける生活習慣病である。近年の脂肪肝患者の増加は各個人の遺伝的素因に栄養状態の変化が加わることで生じる遺伝子-食事因子間の相互作用によるものであり,このような脂肪肝感受性遺伝子を解明する必要がある。しかし, 遺伝的背景と環境因子の制御が困難な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を発症させる遺伝子の解析は困難である。それゆえに, 遺伝因子と食餌因子とを制御できるモデル動物を用いた脂肪肝の遺伝解析が脂肪肝感受性遺伝子の同定に極めて適している。今までに, 我々は高脂肪食(食餌因子)と相互作用して脂肪肝を発症に脂肪肝モデルマウス(SMXA-5)を用いた遺伝解析を行い^{1,2)}, 脂肪肝感受性遺伝子の有力な候補として *Iahl* (isoamyl-acetate hydrolyzing esterase 1) 遺伝子の選抜に成功している。本研究では, 新規脂質代謝関連遺伝子 *Iahl* の機能を明らかにするために, *in vivo* の実験系では, *Iahl* 欠損マウスの作出を行い, *in vitro* では *Iahl* 遺伝子の転写制御機構と, *Iahl* タンパク質の脂質加水分解活性について検討を行った。

方法および結果

1. *Iahl* 遺伝子欠損マウスの作出

マウス全遺伝子のノックアウトプロジェクト(フランス EUCOMM)から遺伝子組換え酵素の標的配列(loxP 配列および FRT 配列)を持つターゲティングマウスの胚を入手し, 全身で Cre 組換え酵素を発現するマウス(CAG-Cre, 理研 BRC より入手)と交配して, 全身 *Iahl* ヘテロ欠損マウスの雌雄を得た。そのヘテロ欠損マウスの雌雄同士を交配することで同腹仔からホモ欠損マウス(KO)と野生型(WT)を得た。

得られた個体の腎臓, 小腸, 肝臓, 膵臓, 肺を摘出し, *Iahl* タンパク質の発現量を Western blot で確認したところ, ホモ KO マウスではタンパク質の発現が消失しており, *Iahl*-全身 KO マウスの作出に成功したことを確認した(図 1 A, B)。

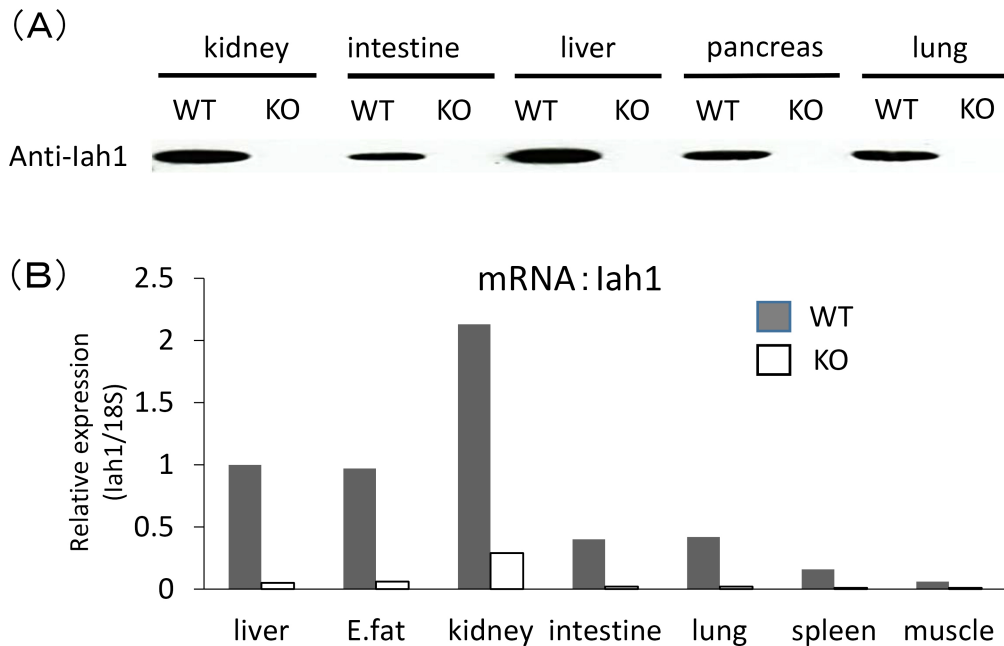


図1. 全身 Iah1 欠損マウスと野生型マウスにおける Iah1 の発現量.

(A) 腎臓, 小腸, 肝臓, 膵臓, 肺から抽出したタンパク質を SDS-PAGE で電気泳動し, 抗マウス Iah1 抗体で western blot した. 全身 Iah1 欠損マウス (KO), 野生型マウス (WT). (B) 肝臓, 精巣上体脂肪組織, 腎臓, 小腸, 肺, 脾臓, 骨格筋から全 RNA を抽出し, リアルタイム RT-PCR により Iah1 の mRNA レベルを定量した.

また, 肝臓での Iah1 の機能解析を行うためにまず FRT カセットを除去する目的で, 全身で Flp 組換え酵素を発現するマウス (CAG-Flp, 理研 BRC より入手) を交配した. 現在, 肝臓特異的に Cre 組換え酵素を発現するマウス (Alb-Cre, 神戸大学医学系研究科より供与) との交配を行っており, 肝臓特異的 Iah1 ホモ欠損マウスについては作製中である.

2. *Iah1* 遺伝子の転写制御機構

Iah1 プロモーター領域の 119 塩基が欠失している脂肪肝感受性の A/J マウスでは, 欠失がなく脂肪肝抵抗性である SM/J マウスと比較して, 肝臓での *Iah1* の mRNA レベルは低い. 我々はこの 119 塩基の欠失が *Iah1* の発現量を調節しており, *Iah1* の発現量の低下が脂肪肝感受性に寄与しているのではないかと予想した. そこで欠失箇所を含む *Iah1* 遺伝子の 5'上流約 300 塩基から転写開始点までの DNA 配列をルシフェラーゼ発現ベクターにクローニングし, プロモーターアッセイを行った. しかし, 119 塩基の欠失はプロモーター活性を低下させなかったことから, A/J マウスの *Iah1* の発現レベルの低下はプロモーター領域の 119 塩基の欠失変異に起因しないことが明らかとなった. そこで, さらに *Iah1* 遺伝子の 5'上流領域の塩基配列を決定したところ, 新たに約 400 塩基の挿入変異を見出した.

3. *Iah1* タンパク質のエステラーゼ活性の検討

Iah1 タンパク質は酵母においてエステラーゼ活性を有することが報告³⁾されているが, 哺乳動物ではその機能についての報告が存在しない. そこで, His-tag を融合した酵母とマウスの *Iah1* 組み換えタンパク質を大腸菌にて大量精製した. 基質として炭素数の異なる脂肪酸とパラニトロフェノールとのエステル, あるいは炭素数の異なるアルコールと酢酸とのエステルを用いた. 精製した *Iah1* 組み換えタンパク質のエステラーゼ活性測定は, 酵素反応によって遊離したパラニトロフェノールあるいは酢酸を定量することで行った. パラニトロフェニルエステルに対しては, 酵母とマウス *Iah1* タンパク質の反応性は非常に低く炭素数 2 の基質にのみ活性を示したが (図 2 A), アルコールと酢酸とのエステルに対しては反応性が高く, マウスの *Iah1* タンパク質においてもエステラーゼ活性を確認することができた. しかし, 炭素数が 10 以上のアルコールと酢酸とのエステル結合には作用せず, 低級アルコールの中でも炭素数が 4 のイソブチル酢酸を基質とした場合に最もエステラーゼ活性が高いことが明らかとなった (図 2 B).

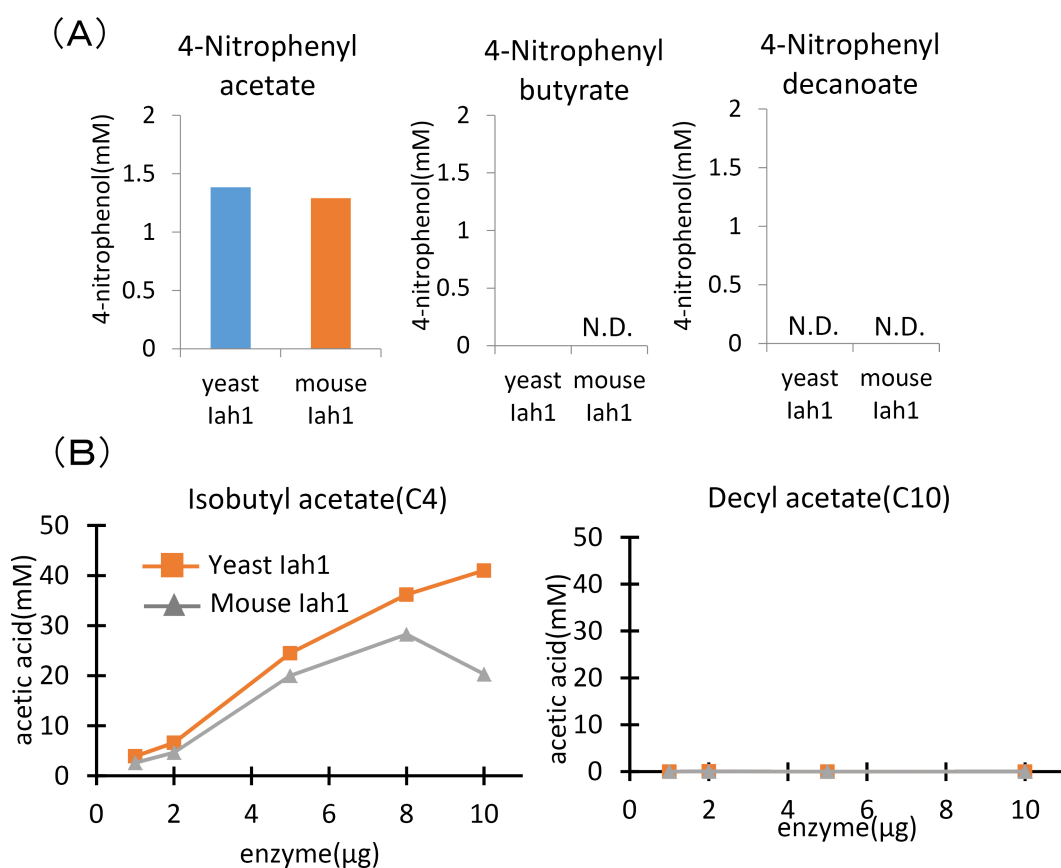


図2. 酵母とマウスの *Iah1* 組み換えタンパク質を用いたエステラーゼ活性の測定.

(A) 基質として炭素数の異なる脂肪酸とパラニトロフェノールとのエステル類である 4-nitrophenyl acetate, 4-nitrophenyl butyrate, 4-nitrophenyl decanoate を用いた結果を示す. (B) 基質として炭素数の異なるエタノールと酢酸とのエステル類であるイソブチル酢酸とデシル酢酸を用いた結果を示す.

考 察

我々が独自に開発した食餌誘導性脂肪肝モデルマウスの遺伝解析の結果から見出した脂肪肝疾患感受性の候補遺伝子 *Iah1* 遺伝子の機能は不明であった. 本研究で幅広い組織分布を示す *Iah1* を全身で欠損したマウスの作出に成功したことから, 致死性の遺伝子ではないことが判明した. 今後, *Iah1* 欠損マウスに高脂肪食を負荷し, 脂肪肝形成への影響を検討する. 一方, 肝外組織 (腎臓, 脂肪組織, 肺など) においても *Iah1* 遺伝子が高レベルで発現している (図1). そのため, 全身 *Iah1* 欠損マウスは肝臓における脂質代謝のみならず, 肝外組織での *Iah1* の新たな機能の発見にも寄与できる. 肝臓特異的 *Iah1* 欠損マウスの作出が完了した時点で, 全身での *Iah1* 欠損マウスとの表現型を比較することにより, *Iah1* の肝臓脂質代謝への影響が肝外組織における *Iah1* 作用を介した二次的なものか否かを明らかにする必要がある.

また, *Iah1* の転写調節領域内の 119 塩基の欠失変異が発現量に影響を与えていないことを明らかにした. さらに新たな挿入変異を見出したことから, この変異についてもプロモーター活性を検討し, *Iah1* の転写制御機構を明らかにすることで食餌因子による *Iah1* 遺伝子の発現制御を可能にしたい.

マウスだけでなく酵母から脊椎動物まで広く保存されている *Iah1* 遺伝子の機能解析に挑み, 初めてアルコールと酢酸とのエステル結合を切断するエステラーゼ活性を確認した. しかし, *Iah1* のマウス生体内での基質については明らかではないため, 今後はリパーゼ活性の有無についても検討していく予定である.

共同研究者

本研究の共同研究者は、名古屋大学大学院生命農学研究科の堀尾文彦、村井篤嗣、名古屋大学大学院医学系研究科の大野民生である。最後に本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Kobayashi, M., Io, F., Kawai, T., Nishimura, M., Ohno, T. & Horio, F. : SMXA-5 mouse as a diabetic model susceptible to feeding a high-fat diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68** : 226-230, 2004.
- 2) Kumazawa, M., Kobayashi, M., Io, F., Kawai, T., Nishimura, M., Ohno, T. & Horio, F. : Searching for genetic factors of fatty liver in SMXA-5 mice by quantitative trait loci analysis under a high-fat diet. *J. Lipid Res.*, **48** : 2039-2046, 2007.
- 3) Fukuda, K., Kiyokawa, Y., Yanagiuchi, T., Wakai, Y., Kitamoto, K., Inoue, Y. & Kimura, A. : Purification and characterization of isoamyl acetate-hydrolyzing esterase encoded by the *IAHI* gene of *Saccharomyces cerevisiae* from a recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53** : 596-600, 2000.