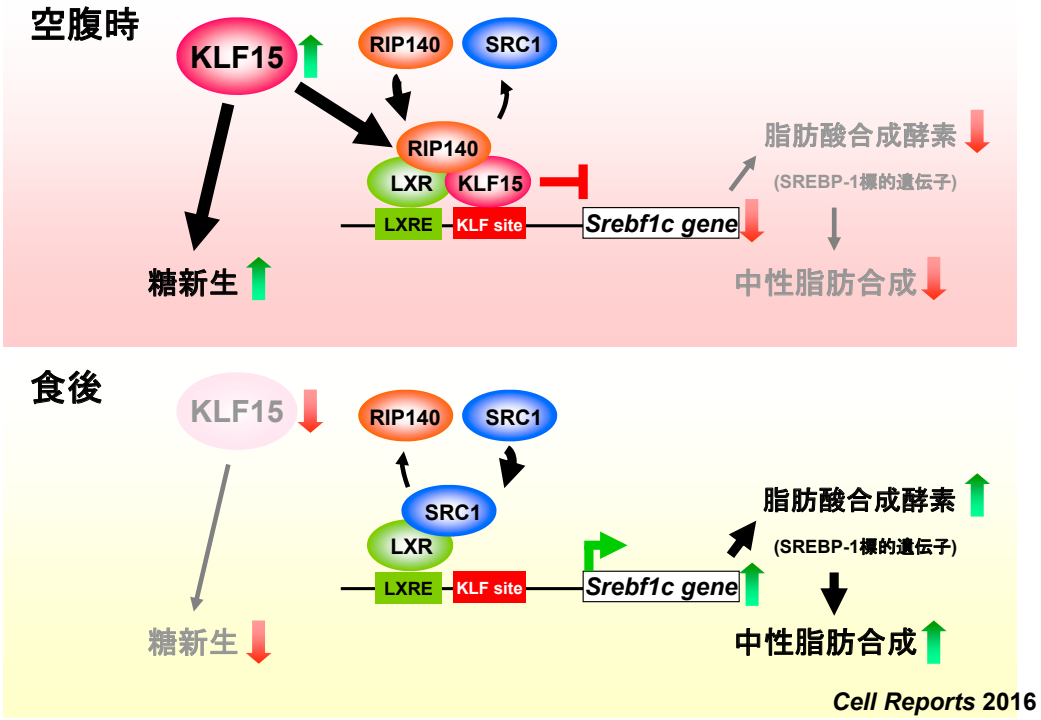
85　エネルギー代謝制御を担う核内情報処理機構の解明	矢作　直也

【目的】多様なエネルギー代謝制御シグナルの核内への情報伝達を時間的・空間的に分解し、エネルギー代謝制御を担う未知の核内情報処理機構を明らかにしていく。特に体内の貯蔵エネルギーの大半を占める中性脂肪に関し、その摂食・絶食による合成経路の ON・OFF 機構を解明する。

【方法】*in vivo* Ad-luc 解析法とは、我々が独自に確立してきた、生体内臓器で直接にゲノム上の cis 因子解析を行うレポーターアッセイシステムであり、TFEL（Transcription Factor Expression Library）scan 法とは、転写因子複合体解明のための技術基盤として我々が数年がかりで独自に開発してきた、転写因子を網羅する発現プラスミドライブラリのことである。本研究では、これら独自開発の *in vivo* Ad-luc 解析法と TFEL scan 法を用い、エネルギー代謝制御シグナルの核内への情報伝達を時間的・空間的に分解することを試みた。

【結果】SREBP-1 の上流の制御因子として我々が最近同定した、糖代謝と脂質代謝を繋ぐ重要な転写因子 KLF15 の上流経路において、いくつかの新規転写調節因子の関与が明らかになった。

脂肪合成の ON・OFF 機構



85. エネルギー代謝制御を担う核内情報処理機構の解明

矢作　直也

筑波大学 医学医療系 内分泌代謝・糖尿病内科

Key words：エネルギー代謝，転写因子，中性脂肪合成，糖新生

緒　言

中性脂肪（トリグリセリド）は体内の貯蔵エネルギーの大半を占める。食事から過剰に摂取された炭水化物は、体内での合成（de novo lipogenesis）によってエネルギー貯蔵物質である中性脂肪に変えられ、脂肪組織などに蓄えられる。過食に伴い体内の中性脂肪が過剰になる状態は肥満といわれ、糖尿病・高血圧・脂質異常症を併発しやすいことが知られている。これらはまた、動脈硬化の危険因子であり、肥満に伴ってこれらの危険因子が集積する病態がいわゆるメタボリックシンドロームで、医学的にも社会的にも大きな問題となっている。

炭水化物から中性脂肪への合成・変換は食後に顕著に増加し、逆に空腹時にはOFFとなる。この経路が食事摂取状況に応じてどのように調節されているのかという課題は、基礎医学のみならず、生活習慣病対策の観点からも大いに注目され、機序解明が待たれていた。

炭水化物から中性脂肪へと合成される経路では約25種類の酵素（lipogenic enzymes）が協調的に働くことが明らかにされている。これらの酵素は摂食によって発現が誘導され、その発現誘導に中心的な役割を果たす転写因子はsterol regulatory element-binding protein-1（SREBP-1）であることもわかってきた［1］。さらに、SREBP-1は摂食により肝臓でmRNA発現が誘導されるが、しかしながら、この誘導メカニズムについては長年に渡り未知のままであった。

最近我々は、この調節機構の主体が、KLF15-LXR/RXR-RIP140転写複合体であるという新たな知見を見いだし、報告した［2］。KLF15が絶食時に誘導されると、KLF15とLXR/RXRはSREBP-1遺伝子プロモーター上で複合体を形成すること、この複合体は転写抑制因子RIP140を呼び込むことでSREBP-1遺伝子の転写をOFFにすることが判明した。また、食後には逆に、KLF15の発現が低下し、この複合体から消失することで、転写抑制因子RIP140が転写促進因子SRC1と入れ替わり、SREBP-1遺伝子の転写がONになるという新たなメカニズムが明らかになった（図1）。またその過程で、*in vivo* Ad-luc解析法とTFEL scan法という独自の核内情報解析手法を完成させた。

実はこのKLF15は、糖新生系遺伝子の転写調節にも関与していることが知られており、絶食・摂食応答の中で糖新生系と中性脂肪合成系とが逆向きの調節を受ける機序の一つが解明された。

そこで、本研究においては、同様に*in vivo* Ad-luc解析法とTFEL scan法という独自の核内情報解析手法を駆使することによって、KLF15の発現調節機構の解明を試み、SREBP-1のさらに上流のエネルギー代謝制御機構の実体に迫ることとした。

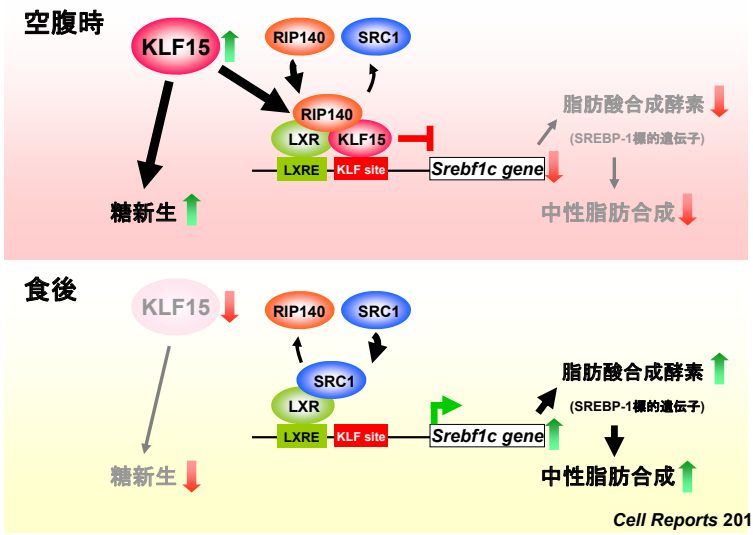


図 1. 脂肪合成の ON・OFF 機構

KLF15 が空腹時に誘導されると、KLF15-LXR/RXR-RIP140（転写共役因子で転写抑制に働く）複合体が SREBP-1 プロモーター上に形成され、SREBP-1 遺伝子の転写を抑制する。逆に摂食後には KLF15 が減少することにより、RIP140 が複合体から離れ、転写促進因子の SRC1 と入れ替わることで SREBP-1 遺伝子の転写が促進される。

方　法

in vivo Ad-luc 解析法とは、我々が独自に確立してきた、生体内臓器で直接にゲノム上の cis 因子解析を行うレポーターアッセイシステムである［3］。*in vivo* イメージングを活用することで、生きたままのマウスの臓器内であらゆる遺伝子周辺 DNA 配列の発現制御活性を細かく、しかも動的に定量することが可能となった（図 2）。

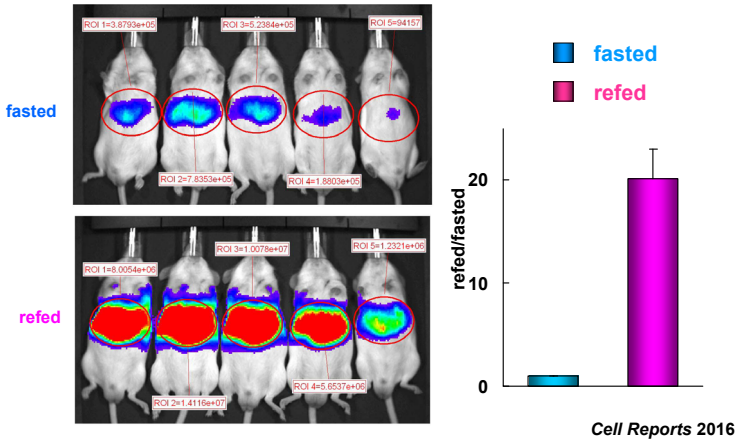


図 2. *in vivo* Ad-luc 解析法

SREBP-1 遺伝子プロモーター領域の *in vivo* Ad-luc 解析データの 1 例。

TFEL（Transcription Factor Expression Library）とは、転写因子複合体解明のための技術基盤として我々が数年がかりで独自に開発してきた、転写因子を網羅する発現プラスミドライブラリのことである（論文投稿中）。理研のマウス完全長 cDNA プロジェクトの成果産物である FANTOM-1/2/3 ライブラリから転写因子ファミリーと予想された 1,588 クローンの供給を受け、pcDNA3.1 発現ベクターへ 1 つ 1 つ手作業で載せ換えて、発現プラスミドライブラリを構築した。哺乳類での転写因子発現ライブラリとして世界唯一のライブラリであり、このライブラリを活用した発現クローニング手法(TFEL scan 法)により、転写複合体の構成因子の分子同定を効率よく行えるようになった（図 3)。

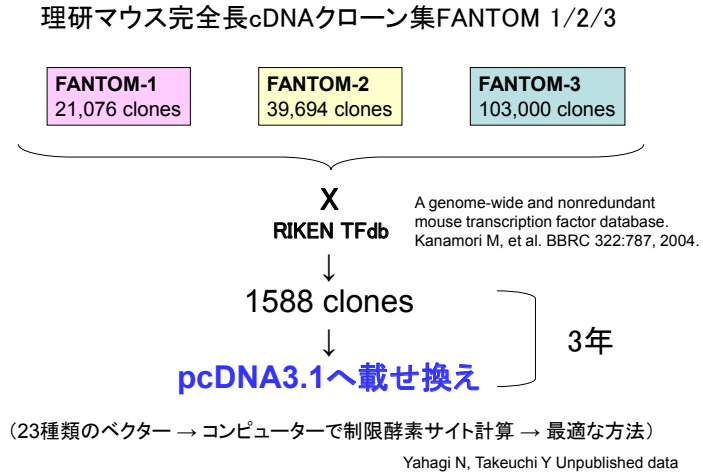


図 3. TFEL scan 法

網羅的転写因子発現ライブラリ TFEL は、FANTOM1/2/3 クローンから構築された。

上記の *in vivo* Ad-luc 解析法（＝網羅的 cis 因子解析/時間的・空間的分解）と TFEL scan 法（＝網羅的 trans 因子解析/分子的分解・同定）というニュートリゲノミクスの新手法を組み合わせることにより、多様な代謝制御シグナルを核内情報としてキャッチし、cis 因子に分解後、それぞれの element 上の trans 因子群を高精度に同定可能である。

本研究では、*in vivo* Ad-luc 解析法と TFEL scan 法を組み合わせ、KLF15 遺伝子の周辺配列の解析に着手した。

結　果

KLF15 遺伝子は初代培養細胞として培養皿に肝細胞を移すだけで数時間以内に発現がほぼ消失してしまい、*in vivo* での解析が不可欠であった。

そこで我々はまず始めに、KLF15 遺伝子周辺領域に着目し、転写開始点上流の領域をクローニングした（図 4)。その領域をルシフェラーゼレポーター遺伝子の上流に配置し、さらにアデノウイルス化を行って、KLF15 遺伝子プロモーターの *in vivo* Ad-luc 解析を行った。

この結果、絶食時に活性化される、いくつかの機能性 cis-element を同定することができた。

さらにその cis 配列に対して、TFEL scan 法を用いることにより、trans-activator の同定を試みたところ、いくつかの新規転写調節因子の関与が明らかになった。

現在、さらに shRNA によるノックダウン実験等を通じて、それらの転写調節因子の機能解析を行っている。

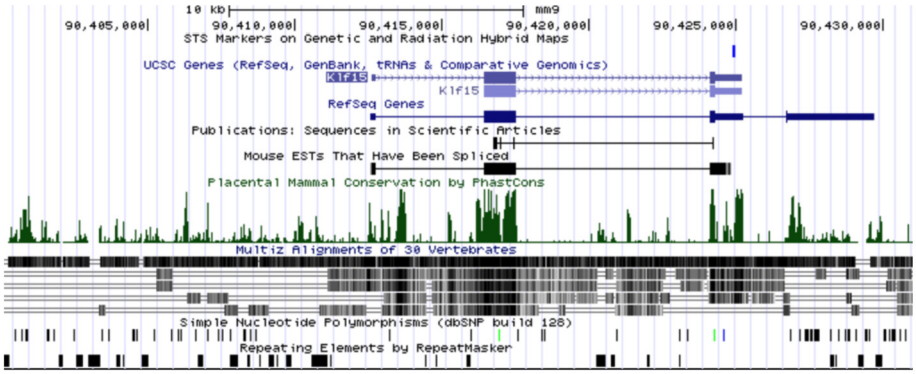


図 4. マウス KLF15 遺伝子の構造

マウス KLF15 遺伝子の構造を示す。転写開始点上流のプロモーター領域においても哺乳類間で種を越えた高い保存性が見られる。

考　察

我々は肝臓における SREBP-1 発現の摂食による調節メカニズムを次のように考えている。絶食時には KLF15 発現が誘導されて SREBP-1 遺伝子プロモーター上に結合するとともに、その近傍に位置する LXR/RXR と相互作用し、さらに RIP140 とも複合体を形成することで LXR/RXR の転写活性を抑制し、SREBP-1 の転写が抑制される。逆に、摂食時には KLF15 発現が低下し、LXR/RXR-KLF15-RIP140 複合体が解消されることで SREBP-1 遺伝子の転写が促進される。

なお、TFEL scan 法は、SNP に結合する転写因子の解析にも活用できることがわかり［4］、さらに応用範囲が広がっている。

in vivo Ad-luc 解析法と TFEL scan 法という一連の新手法により、エネルギー貯蔵系の転写調節カスケードの全体像を明らかにしていきたいと考えている。

文　献

1) Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Osuga J, Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. J Biol Chem. 274:35832-9, 1999. PMID:10585467.

2) Takeuchi Y, Yahagi N, Aita Y, Murayama Y, Sawada Y, Piao X, Toya N, Oya Y, Shikama A, Takarada A, Masuda Y, Nishi M, Kubota M, Izumida Y, Yamamoto T, Sekiya M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Urayama O, Kawakami Y, Iizuka Y, Gotoda T, Itaka K, Kataoka K, Nagai R, Kadowaki T, Yamada N, Lu Y, Jain MK, Shimano H. KLF15 Enables Rapid Switching between Lipogenesis and Gluconeogenesis during Fasting. Cell Rep. 16:2373-86, 2016. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.07.069.

3) Takeuchi Y, Yahagi N, Izumida Y, Nishi M, Kubota M, Teraoka Y, Yamamoto T, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Sekiya M, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga JI, Gotoda T, Ishibashi S, Itaka K, Kataoka K, Nagai R, Yamada N, Kadowaki T, Shimano H. Polyunsaturated fatty acids selectively suppress sterol regulatory element-binding protein-1 through proteolytic processing and autoloop regulatory circuit. J Biol Chem 285:11681-91, 2010. DOI: 10.1074/jbc.M109.096107

4) Piao X, Yahagi N, Takeuchi Y, Aita Y, Murayama Y, Sawada Y, Shikama A, Masuda Y, Nishi-Tatsumi M, Kubota M, Izumida Y, Sekiya M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Sugano Y, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Suzuki H, Yagyu H, Kawakami Y, Shimano H. A candidate functional SNP rs7074440 in TCF7L2 alters gene expression through C-FOS in hepatocytes. FEBS Lett. 592:422-433, 2018. DOI: 10.1002/1873-3468.12975.