

脂肪酸合成酵素遺伝子の新規発現調節機構に関する研究

白川 仁
東北大学大学院農学研究科 准教授

緒言

肥満は糖尿病をはじめとした代謝異常疾患の原因のひとつであるが、我が国において、成人男性の3人に1人、成人女性の5人に1人が肥満者（BMIが25以上）である（平成21年度国民健康・栄養調査結果より）。肥満者数の増加は先進国だけではなく、発展途上国においても見られ、世界的な社会問題となっている。増加の原因は、それぞれの国によって異なっているが、我が国では、ライフスタイルの変化が主因と考えられている。つまり、食事の質の変化と、運動量の低下によるとされている。近年の健康ブームで、積極的に運動を行う人が増えてきているにもかかわらず、肥満者が減少していない。また、1日あたりの摂取カロリーが昭和25年以降増加していないにもかかわらず、男性の肥満者は、30年前（昭和55年）に比べ、1.5倍以上に増加し、平成13年以降、成人男性肥満者は30%前後で推移している。食事の質の変化については、「食の欧米化が原因」とされてきたが、動物性の脂質摂取量は、1日あたり26グラムであり、昭和55年の摂取量と同水準であることから、必ずしも、動物性の脂質の摂取によって肥満者が増加している訳ではない。以上のことから、肥満者数の増加の根本的な原因は未だ明らかではなく、解決すべき問題として残っており、脂質以外の食事成分（糖質、タンパク質など）や食事の摂取タイミング（欠食など）が肥満を促進させている可能性が考えられる。

脂肪酸合成酵素（FASN）は、エネルギー代謝中間体である acetyl-CoA と malonyl-CoA からパルミチン酸を合成し、余剰のエネルギーを脂肪酸へと変換させることから、脂肪量の増大（肥満）にも大きな影響を与えている。本酵素活性は、食事やホルモンの影響を受けることが多くの研究で明らかにされている。すなわち、グルコースやインスリンは、FASNの酵素活性を上昇させるとともに、その mRNA 量を増大させる。グルコースやインスリンに依存した転写活性化については、ステロール応

答配列結合タンパク質 1c（SREBP1c）、炭水化物応答配列結合タンパク質（ChREBP）、肝臓 X 受容体 α （LXR α ）などの転写調節因子の関与が明らかにされている。細胞中の mRNA 量は、転写と分解により決定されるが、FASN mRNA の分解、特に近年明らかになった RNA 分解に関わる低分子 RNA（miRNA）との関連については、ほとんど解析が行われていない。そこで本研究では、FASN の遺伝子発現制御、特に摂食後増大した mRNA が急速に低下する現象（転写後制御）に着目して、新しい制御機構の検索を行った。

実験方法

1. 動物実験

実験動物は、SD 系ラット（雄6週齢）を使用した。ラットを24時間絶食させた後、高炭水化物無脂肪食を2時間給餌した。その後、再び絶食させた。給餌前（絶食群）、給餌後2時間（摂食群）、6時間（摂食6時間群）、10時間（摂食10時間群）に解剖し、血清および肝臓を採取した。

2. 血清マーカーの測定

血清グルコース濃度は、酵素発色法により測定した。また、血清インスリン、コルチゾール濃度は、ELISA法により測定した。

3. 脂肪酸合成酵素、ならびに関連因子の mRNA 量の測定

肝臓から定法に従い、トータル RNA を精製した。吸光度、電気泳動により、得られた RNA の質、量を確認した後、これを鋳型として cDNA を合成した。cDNA を便宜希釈し、定量 RT-PCR 法で各 mRNA の発現量を測定した。なお、各 mRNA 量は、真核生物伸長因子 1 $\alpha 1$ mRNA 量を内部標準として、相対発現量で表した。

4. 転写因子のタンパク質量の測定

肝臓の全抽出液、または肝臓核画分の抽出液を調製し、ウエスタンブロット法で FASN の発現制御に関わる転写調節因子のタンパク質量を測定した。なお、各タンパク質量は、 α -チューブリン（全抽出液の場合）、ラミン A/C（核抽出液の場合）を内部標準として、相対発現量で表した。

5. ラット FASN mRNA の 3'-非翻訳領域を有するレポーター遺伝子の作成

ルシフェラーゼ遺伝子を有するレポータープラスミド pGL4.12 のルシフェラーゼ遺伝子上流に、サイトメガロウイルス初期プロモーター/エンハンサー（pCI プラスミド由来）を、また下流に、ラット FASN mRNA 3'-非翻訳領域（7493～9009 塩基領域）を挿入した。構築したプラスミドをラット肝癌由来 Fao 細胞へカチオンリポソーム法で導入した。24 時間後にグルコース濃度の異なる培地へ交換し、2.5 時間培養した。その後、細胞を回収し、細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性をルシフェリン発光法で測定した。なお、各ルシフェラーゼ活性は、レポータープラスミドとともに共導入した pCH110 プラスミド由来の β -ガラクトシダーゼ活性により標準化し、相対活性で表した。

結 果

1. 血清生化学マーカーの解析

解剖時に得られた血清を用いて、グルコース、インスリン、コルチゾール濃度を測定した。その結果、グルコース値、インスリン値、ともに、絶食群に比べ摂食群で有意に上昇し、ここをピークとして減少した（表 1）。また、コルチゾール濃度は、摂食群で絶食群に比べ、有意に上昇し、摂食 6 時間群、摂食 10 時間群で、有意に減少していた。

2. FASN および脂質合成関連遺伝子 mRNA の発現変化

FASN mRNA は、絶食群に比べ、摂食群で 11 倍に上昇し、さらに摂食 6 時間群でピークを迎えた（絶食

群の約 90 倍）（図 1A）。また、FASN 遺伝子と同様の制御を受けると考えられている SREBP1c、Stearyl-CoA desaturase-1 (SCD-1) mRNA も、摂食群で有意に上昇し、摂食 6 時間群でピークとなった（図 1B）。

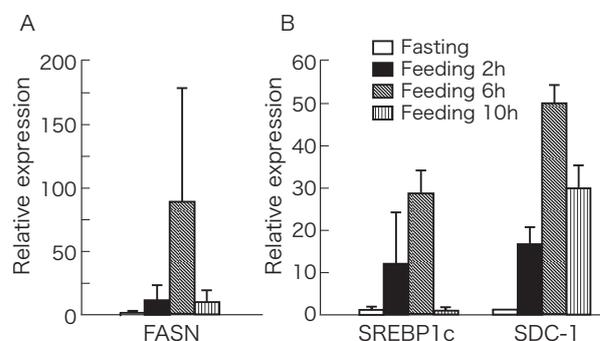


図 1 Postprandial enhancement of mRNA levels of FASN (A), SREBP1c and SCD-1 (B) in rat liver.

SREBP1c mRNA は摂食 10 時間群で、絶食時と同程度まで低下するのに対して、FASN および SCD-1 mRNA では、摂食群と同程度までの低下であった。このことから、SREBP1c の発現は、FASN、SCD-1 に比べ、摂食後、より短い時間内で制御されることが示唆された。

FASN の転写制御に関わる転写調節因子の発現量をウエスタンブロットで測定した結果を図 2 に示した。成熟型の SREBP1c は、摂食 6 時間群で絶食群に比べ、有意に上昇していた（図 2A）。このことは、FASN、SREBP1c、SCD-1 の mRNA 発現量の上昇と相関していた。また、核内のグルココルチコイドレセプター (GR) は、摂食 6 時間、10 時間群で有意に低下しており（図 2B）、血清コルチゾール濃度の低下と相関していた。有意な差ではないが、ChREBP、LXR α 量が摂食群で上昇傾向であった。

3. FASN mRNA の不安定化部位の推定

FASN mRNA の分解に関わる mRNA 上の部位をプライマー伸長法によって検索した。肝臓から得られたトータル RNA から cDNA を合成する際に、FASN

表 1 Serum levels of glucose, insulin and cortisol before and after feeding of the diet.

	Fasting	Feeding (2h)	Feeding (6h)	Feeding (10h)
Glucose (mg/dl)	116.5 \pm 7.0	172.3 \pm 10*	167.0 \pm 3.0*	154.7 \pm 7.0*
Insulin (ng/ml)	0.18 \pm 0.03	0.65 \pm 0.06*	0.41 \pm 0.05	0.55 \pm 0.06*
Cortisol (ng/ml)	24.1 \pm 1.1	36.4 \pm 0.4*	13.7 \pm 1.1*	6.16 \pm 0.2*

Values are means SE. (n = 4) * P < 0.05 vs fasting group.

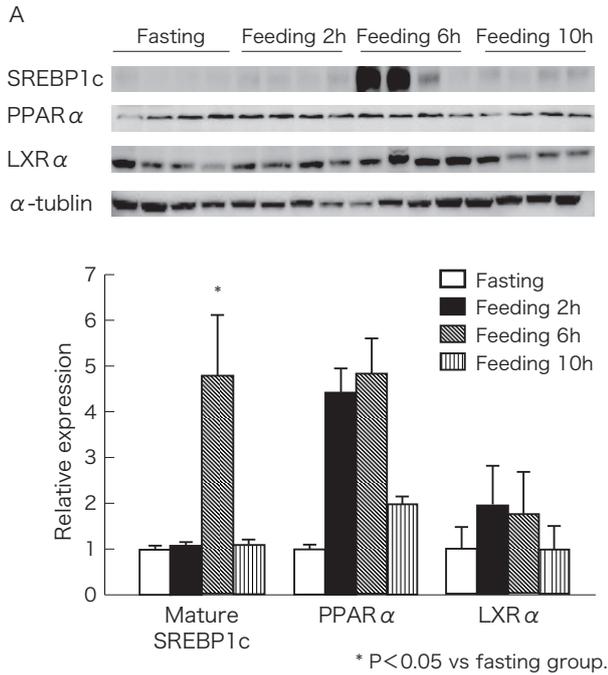


図2 Measurement of transcription factors involved in lipid metabolism in liver before and after feeding of diet.

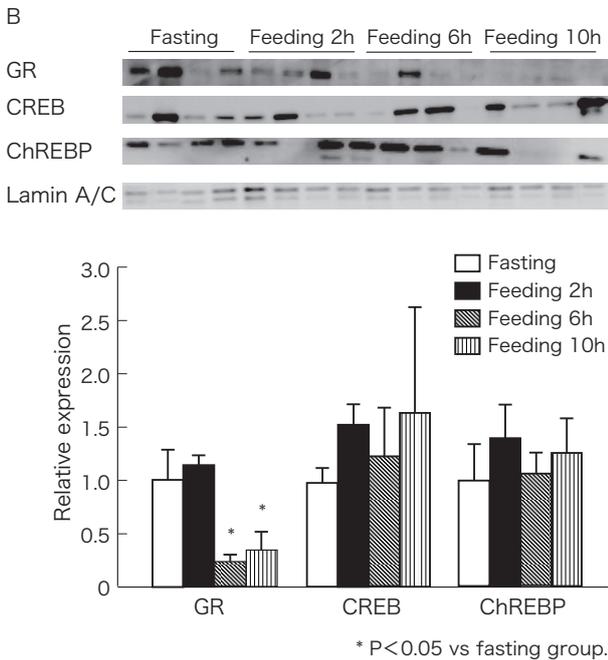


図2 Measurement of transcription factors involved in lipid metabolism in liver before and after feeding of diet.

mRNA に特異的なプライマーを用いた。本 cDNA を鋳型として、FASN mRNA の各部位を PCR 法で検出した (図 3 上)。その結果、プライマー対⑥、⑦、⑧で増幅した PCR 産物量に大きな差は見られなかったが、

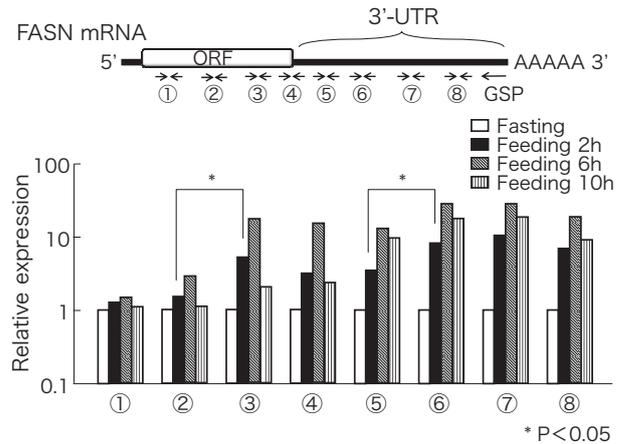


図3 Prediction of RNA degrading point of FASN mRNA by RT-PCR.

プライマー対⑥と⑤で有意な差が見られた。また、プライマー対③と②の間でも有意な減少が観察された。

このことから、プライマー対⑤⑥間 (8194 ~ 8352 塩基)、および、プライマー対②③間 (7184 ~ 7441 塩基) で、FASN mRNA が分解される可能性が示唆された。

一方、同様の解析を、SREBP1c、SCD-1 mRNA について行ったが、FASN mRNA で見られた cDNA の消失部位は検出できなかった。

FASN mRNA の 8194 ~ 8352 塩基領域を標的とする miRNA の発現量を定量 RT-PCR 法で測定した。その結果、摂食後に発現量が変化する miRNA が数種あり、これらの miRNA を通じて FASN mRNA 量が制御される可能性が考えられた (図 4)。

4. レポーター遺伝子解析

ラット FASN mRNA の 3'-非翻訳領域を有するプラスミド、および含まない対照プラスミドを Fao 細胞に導入し、24 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、対照プラスミドに比べ、非翻訳領域を含むプラスミドを導入した場合、ルシフェラーゼ活性が低下しており、FASN mRNA の 3'-非翻訳領域が RNA の不安定化に関与することが示唆された。

続いて、3'-非翻訳領域を有するプラスミドを細胞へ導入後、培地グルコース濃度を変化させた場合の影響について観察した。その結果、生理的グルコース濃度 (5.5 mM) と比較して、11 mM、25 mM では、ルシフェラーゼ活性の低下傾向、および有意な低下が観察された (図 5)。以上のことから、FASN mRNA の 7493 ~ 9009 塩基の領域には、グルコースに反応して本 mRNA の分解

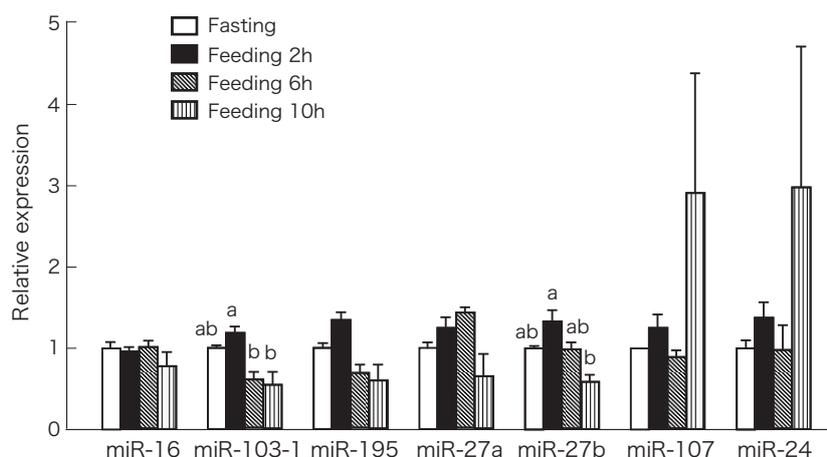


図4 Measurement of microRNA levels in liver before and after feeding of the diet.

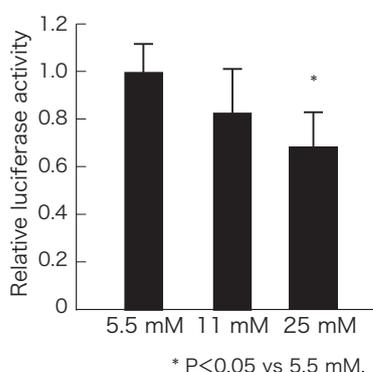


図5 Reporter activity derived from FASN 3'-UTR construct was reduced by high glucose medium in rat hepatoma Fao cells.

に關与する領域を含むことが示唆された。

考 察

肝臓における FASN mRNA 量の発現制御については、本遺伝子の転写反応とこれを活性化する転写調節因子を中心に行われてきた。これまでに、SREBP1c、ChREBP、LXR α などが FASN mRNA の発現上昇に關与していることが数多く報告されている。mRNA 量の制御に關わるもう一方の機構である、RNA の分解、安定化については、培養細胞での試験報告は見られるが、十分に解析が行われていない。本研究では、絶食-摂食-再絶食のサイクルにおける FASN mRNA 量の変化を RNA 分解、特に miRNA に焦点をあて解析を行った。

絶食後に無脂肪食を再給餌すると、FASN や脂肪合成関連因子の mRNA 量は急激に上昇するが、本試験においても、再給餌開始 2 時間後に、FASN、SREBP1c、SCD-1 mRNA は絶食時の 10 倍以上に上昇した。給

餌 2 時間後に再絶食させたが、mRNA の上昇は摂食開始 6 時間後まで続き、FASN、SREBP1c、SCD-1、それぞれ 88、28、52 倍に上昇した。10 時間後では、いずれの遺伝子の mRNA 量は低下したが、SREBP1c では絶食時と同じレベルまで著しく減少した。成熟型 SREBP1c タンパク質は摂食群ではほとんど変化が見られず、摂食 6 時間群で顕著に増加した。一方、核内 ChREBP 量は摂食群で上昇傾向であったが、群間で大きな変化が見られなかった。また、LXR α 量は摂食後 2 時間、6 時間で上昇傾向にあり、FASN mRNA 量の変化と相関が見られた。LXR α のリガンドとして、グルコースが同定されていることから、血清グルコース濃度の上昇により、LXR α が活性化され、FASN mRNA の発現上昇に繋がったと推定される。以上のことから、摂食 2 時間後に見られる FASN mRNA の上昇は、血清グルコース濃度の上昇に伴う、ChREBP や LXR α の活性化により引き起こされること、また摂食 6 時間後に見られた顕著な増加については、SREBP1c の活性化に寄るものと推定された。今後、これらの転写調節因子の直接的な関与をクロマチン免疫沈降法により示す必要がある。

FASN mRNA 特異的プライマーを使用して cDNA を合成し、FASN cDNA の各部位（特に、3' 末端側半分の領域）を横断的に PCR により増幅することにより、RNA の分解に關わる領域の有無を検索した。その結果、cDNA 上の 7184 ~ 7441 塩基 (ORF 内)、8194 ~ 8352 塩基 (3'-非翻訳領域内) の領域で、cDNA の欠失が見られ、この部位で mRNA 分解が起こる可能性が示唆された。また、FASN mRNA の 3'-非翻訳領域を有するレポーター遺伝子の解析結果からも、3'-非翻訳領

域内に本 mRNA の分解に関わる配列の存在が示唆された。一方、SREBP1c、SCD-1 については、同様の欠失が検出されなかったことから、RNA の安定性、分解において、FASN と SREBP1c、SCD-1 は異なる制御を受けることが示唆された。8194 ~ 8352 塩基領域を標的とした miRNA は、7 種類存在し、そのうち、摂食後に miRNA 量が増加するものが数種存在していた。これらの miRNA の発現変化により、FASN mRNA の分解が促進する可能性が考えられるが、今後、これらの miRNA が直接 FASN mRNA 分解に関与するかどうかについて確認する必要がある。また、7184 ~ 7441 塩基部位についても、miRNA の関与など詳細に確認する必要がある。これまでに、食餌誘導の肥満マウスの miRNA 変化について報告があり、FASN を標的とする miRNA が報告されている (miR-107) が、本試験において、miR-107 量は群間で差が見られなかった。

本研究によって、FASN mRNA 分解に関わる部位が推定され、本遺伝子の新しい制御機構の一部を見出すことができた。今後、詳細な機構解析を行うことによって、II 型糖尿病などインスリン抵抗性下で見られる FASN

の過剰発現の機構解明の一部に寄与できると考える。

謝 辞

本研究は公益法人三島海雲記念財団の平成 23 年度「学術研究助成金」により行われました。研究助成を賜りました公益法人三島海雲記念財団ならびに関係者の皆様に深く御礼を申し上げます。また、研究の遂行にあたり、東北大学大学院農学研究科の我妻紀代恵氏の協力を得ました。ここに、感謝申し上げます。

参考文献

- 1) P Ferré P , F Foufelle: *Diabetes Obes Metab.*, Suppl 2, 83 - 92, 2010.
- 2) M. S. Strable, J. M. Ntambi: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 45, 199 - 214, 2010.
- 3) A. Katsurada, et al. : *Eur. J. Biochem.* 190, 427 - 433, 1990.
- 4) N. Iritani: *Eur. J. Biochem.*, 205, 433 - 442, 1992.
- 5) B. R. Wilfred, et al. : *Mol. Genet. Metab.*, 91, 209 - 217, 2007.
- 6) N. Mitro, et al. : *Nature.* 445, 219 - 223, 2007.
- 7) J. H. Park, et al. : *Mol. Cells.* 31, 33 - 38. 2011.