

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 4日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591162

研究課題名（和文）果糖応答性転写調節因子群の同定、その分子機構と病態的意義

研究課題名（英文） Newly identification of transcriptional regulators related to fructose-induced hepatic lipogenesis

研究代表者

柏木 厚典（KASHIWAGI ATSUNORI）

滋賀医科大学 医学部 副学長

研究者番号：20127210

研究成果の概要（和文）：果糖摂取により、肝臓内での RNA-binding motif protein on X chromosome (RBMX) が O-結合型糖修飾 (O-GlcNAc) を受けることが、SREBP-1c 遺伝子のプロモーター活性の亢進と関連していた。また、マウス系統間での果糖摂取による肝臓内でのヘキサミン経路や O-GlcNAc 修飾の調節異常が、脂肪肝や糖・脂質代謝異常の遺伝的背景として同定された。

研究成果の概要（英文）：Fructose intake induced O-GlcNAc modification of RNA-binding motif protein on X chromosome (RBMX), which related to the activation of SREBP-1c in the mouse liver. The abnormal regulation of hexosamine-signaling pathway and O-GlcNAc cycling reflected on the genetic susceptibility to hepatic lipogenesis and metabolic disorders induced by high fructose diet.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：脂質代謝異常

1. 研究開始当初の背景

果糖の過剰摂取が、肝臓で脂質合成系遺伝子の転写因子 Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c (SREBP-1c) の発現増加に伴い、脂肪肝やメタボリックシンドロームを誘導することを、我々は動物モデルを用い

て明らかにしてきた。

我々は果糖摂取に関連した SREBP-1c 遺伝子の転写調節に関与する蛋白として、RNA-binding motif protein on X chromosome (RBMX) を同定した。さらにその領域に結合する分子として RBMX、LOC673353 および SAFB1

の3分子を同定し、これら3分子が培養肝細胞において SREBP-1c 遺伝子を活性化することを見いだした。

2. 研究の目的

(1) RBMX、LOC673353 および SAFB1 の、果糖摂取にて誘導される脂質合成調節における *in vivo* での役割を解明する。

(2) 果糖による RBMX を介した SREBP-1c プロモーター活性化調節における O-結合型糖修飾(O-GlcNAc)の重要性を明らかにする。

(3) 果糖摂取による肝臓核内の網羅的解析による蛋白の O-GlcNAc 修飾を介した糖・脂質代謝調節異常の機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Cre-loxP システムを用いて、RBMX 発現アデノベクターを作成し、肝臓に RBMX を過剰発現させた。更に、RBMX 遺伝子に対する shRNA を作成し、肝臓で発現させることで肝臓での RBMX 発現をノックダウンさせる。それぞれの状態における、SREBP-1c プロモーター活性への影響を、LOC673353 および SAFB1 の過剰発現下に検討した。

(2) RBMX 蛋白を SDS-PAGE にて展開し、O-GlcNAc 修飾蛋白抗体を用いて、RBMX の O-GlcNAc 修飾の可能性を検討した。更に、果糖摂取マウスより肝臓核蛋白を抽出し、RBMX 抗体にて RBMX の O-GlcNAc 修飾の有無を検討した。

(3) 高果糖食摂取マウスの肝臓を摘出し、対照食マウスと比較して、肝臓核内での O-GlcNAc 修飾蛋白の発現や O-GlcNAc 修飾調節酵素遺伝子 (OGT:O-GlcNAc transferase、OGA:O-GlcNAcase) 発現などに差を認めるかを検討した、また、これらの変化がマウス系統間での果糖による反応と同様のものかを検討した。

4. 研究成果

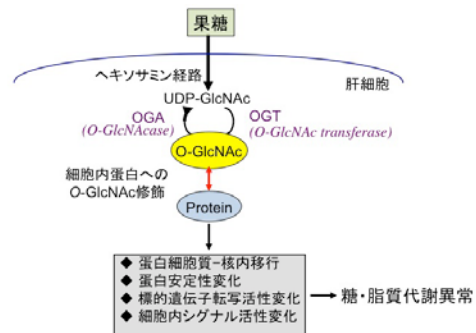
(1) RBMX 過剰発現によりマウス肝臓において著明な脂肪肝が誘導され、胆汁のうっ滞、炎症性遺伝子の発現誘導を認めた。これらの現象は Cre 発現ベクターのおよび対照ベクターでは生じなかった。しかしながら、RBMX 過剰発現による SREBP-1c 遺伝子の発現誘導は生じなかった。したがって、*in vivo* では SREBP-1c 遺伝子の発現誘導には内因性に発現している RBMX の量で十分で、むしろ RBMX の活性化が重要な役割をしていることが示唆された。一方、2種類の shRNA を発現するアデノベクターを作成し、培養肝細胞での RBMX 遺伝子発現の抑制を確認できた。

(2) ウサギ網状赤血球内で作成した RBMX 蛋白は O-GlcNAc 修飾を受けることを証明した。また、Cre-loxP システムにて RBMX 発現アデノベクターを用いて培養肝細胞に RBMX を過剰発現させた検討にても、RBMX 蛋白は O-GlcNAc 修飾を受けていた。さらに、高果糖食摂取マウスの肝臓では、対照食摂取マウスと比較して RBMX 蛋白の O-GlcNAc 修飾が増加した。

(3) ①高果糖食摂取マウスは対照食摂取マウスと比較して、肝臓内中性脂肪含量の増加を認め、SREBP-1c の遺伝子発現、標的遺伝子 FAS の発現の亢進や耐糖能の低下が認められた。②対照食摂取マウスよりも高果糖食マウスにおいて、O-GlcNAc 修飾を受けている蛋白の種類や発現量が増加していた。また、高果糖食マウスでは O-GlcNAc 修飾転移酵素 (OGT) の遺伝子発現が亢進した。

③果糖により SREBP-1c 発現の上昇を認める CBA/JN マウスではこれらの変化が顕著であったが、果糖により SREBP-1c 発現や脂質代謝異常を認めにくい DBA/2N マウスでは、これらの変化は減弱していた。また、O-GlcNAc 修飾の基質となる UDP-N-アセチルグルコサミンへと代謝されるヘキササミン経路の律速酵素 GFAT (glutamine:fructose6P aminotransferase) の発現は、DBA/2N マウスにおいて低下していた。

以上のことより、①果糖摂取により肝臓において RBMX 蛋白が O-GlcNAc 修飾を受けることで SREBP-1c の転写活性を調節しうるということが示唆された。②マウス系統間での果糖摂取による肝臓内でのヘキササミン経路や O-GlcNAc 修飾の調節異常の変化が、脂肪肝や糖・脂質代謝異常の遺伝的背景となることが同定された (論文投稿予定)。



今後の展望として、果糖による肝臓での糖・脂質代謝異常に対する蛋白へのO-GlcNAc修飾の意義を明らかにするためには、
①肝臓核蛋白内にて、果糖摂取により発現が増強するO-GlcNAc修飾蛋白を同定する。
②O-GlcNAc修飾転移酵素（O-GlcNAc transferase: OGT）の肝臓特異的ノックアウトマウスを作成させ、高果糖食負荷による脂肪肝や肝臓での脂質合成系遺伝子発現の変化などを検討していく。

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8件）

① Omura Y, Nishio Y, Takemoto T, Ikeuchi C, Sekine O, Maeno Y, Obata T, Ugi S, Maegawa H, Kimura H, Kashiwagi A. SAFB1, an RBMX-Binding Protein, is a Newly Identified Regulator of Hepatic SREBP-1c Gene. BMB reports. 2009, 42, 232-237 (査読有)

〔学会発表〕（計1件）

関根 理、柏木 厚典、他 高果糖摂取による肝臓内核蛋白のO-結合型糖修飾の増強
第54回日本糖尿病学会年次学術集会 2011年

○取得状況（計1件）

名称：転写制御シスエレメント及びそれに結合する転写調節因子並びにそれらの用途
発明者：西尾善彦、前川聡、柏木厚典
権利者：同上
種類：特許
番号：特許第4451158号
取得年月日：22年2月5日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柏木 厚典 (KASHIWAGI ATSUNORI)
滋賀医科大学・医学部・副学長
研究者番号：20127210

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：