

## 肝グリコーゲン量の変化による脂肪酸合成酵素発現調節

三浦進司

静岡県立大学食品栄養科学部栄養生命科学科 准教授

### 緒言

食事のリズムは「絶食と再摂食」が繰り返されることで形成され、生体は栄養素の代謝動態を変化させることにより恒常性を維持している。肝臓は糖質代謝において中心的な役割を果たし、絶食時には糖新生を促進し、摂食時には得られた糖質をエネルギーとして利用後、エネルギーが充足するとグリコーゲンとして蓄積し、残りの糖質を脂肪に変換している。これらの代謝にはホルモンによる制御が関与し、グルカゴンは絶食時の、インスリンは摂食時の代謝を促進する<sup>1,2)</sup>。インスリンはグリコーゲン合成酵素を活性化することによりグリコーゲン蓄積を促進し、さらに転写因子 sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c を活性化することで脂肪酸生合成系遺伝子の発現量を増加させて糖質からの脂肪酸生合成を促進する<sup>3)</sup>。しかし、生体にとって糖質源の確保は最優先事項であるため、摂食後のインスリン刺激により「グリコーゲン貯蔵を充満させる」と並行して「グルコースから脂肪酸の生合成を行う」ことは目的ではなく、摂食後に余剰の糖質が生じてから SREBP-1c や脂肪酸生合成系遺伝子発現が増加するような、インスリン非依存的機序が存在する可能性が考えられる。

我々は、絶食後に再摂食させたマウス肝臓での糖質代謝および脂肪酸生合成系遺伝子発現の経時変化を追跡したところ、再摂食後の SREBP-1c や脂肪酸生合成系遺伝子の発現増加は、血中インスリン濃度増加とは時間的に一致せず、グリコーゲン貯蔵が充満された後に認められるという新知見を得た。SREBP-1c の発現は転写因子 liver X receptor (LXR) によって促進されるが、インスリンは LXR の転写活性化能を増加させる<sup>4)</sup>。最近インスリン作用の他に、LXR の O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) 化がその転写活性化能に影響することが明らかにされ、摂食時の SREBP-1c 発現増加には LXR の O-GlcNAc 化が関与することも示唆されている<sup>5)</sup>。しかし、LXR の O-GlcNAc 化がどのタイミングで、どのような機序で促進されるのかは不明である。タンパク質の

O-GlcNAc 化は、O-GlcNAc transferase (OGT) により UDP-GlcNAc を用いて行われる。UDP-GlcNAc の生合成の律速段階はフルクトース-6-リン酸とグルタミンからグルコサミン-6-リン酸を合成する段階である。フルクトース-6-リン酸の供給量は、肝細胞内のエネルギーおよびグリコーゲン貯蔵の充満に伴って増加することが予測されるため、UDP-GlcNAc 量が肝グリコーゲン貯蔵の充満を反映する分子となる可能性が考えられる。

以上の背景から、本研究では「摂食後の肝臓においてグリコーゲン貯蔵が充満されるとフルクトース-6-リン酸供給量が増加し、UDP-GlcNAc 合成とそれに伴う LXR の O-GlcNAc 化が促進し、SREBP-1c の発現増加を引き起こすことにより脂肪酸の生合成が促進される」という仮説(図1)を検証する。本研究の成果は、肝臓におけるインスリン非依存的な糖質代謝経路の存在の証明や、脂肪肝や肥満などの発症機序解明と、新たな治療標的を見出すための重要な情報となる。

### 方法

#### 1. マウス飼育・解剖

実験動物は8週齢の雄性 C57BL/6J マウス(日本クレア)を使用した。マウスの飼育環境は、12時間の明暗サイクル、室温 23±1℃ を維持し、エサおよび水を自由

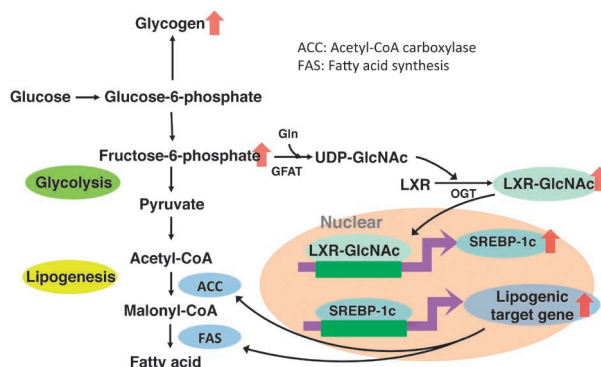


図1 グリコーゲン貯蔵の充満が脂肪酸生合成系酵素の発現量を制御する機序(仮説)

摂取させた。1週間の馴化期間の後、解剖前日の17:00から絶食群、再摂食群の餌を抜き16時間絶食させ、再摂食群は翌日9:00に再摂食を行った(図2)。絶食群は絶食16時間後に、再摂食群は再摂食開始から一定時間後にそれぞれ解剖を行った。コントロールとしてad libで摂食した群を用意した。

眼底静脈よりEDTA存在下で血液を採取し、頸椎脱臼をした後に肝臓を採取し素早く液体窒素を用いて凍結した。NIH実験動物の管理と使用に関する指針と本大学のガイドラインに従った。

## 2. 血中インスリン濃度、肝臓グリコーゲン量およびmRNA発現量の測定

### (1) 血中インスリン濃度の測定

眼底採血により採取した血液を遠心分離し、上清を採取、インスリン測定キット(Morinaga)を用いて血中インスリン濃度を測定した。

### (2) 肝臓グリコーゲン量の測定

過塩素酸に凍結肝臓1片を入れ、テフロンホモジナイザーでホモジナイズし、塩酸分解によってグリコーゲンをグルコースへと分解した。得られたグルコースをグルコースC II-テストキット(Wako)で測定し、グリコーゲン量とした。

### (3) mRNA発現量の測定

TRIzol(Invitrogen)中に肝臓1片を入れ、ポリトロンホモジナイザーで即座にホモジナイズした。遠心分離で上清を採取し、クロロホルムを添加した。攪拌後に遠心分離を行い、上層を回収、2-プロパノールを加えて遠心分離でmRNAを沈殿させた。mRNAを75%エタノールで数回洗浄し、DEPC水で溶解してmRNA量を測定した。mRNAを一定量に合わせ、逆転写酵素(TAKARA)を用いてcDNAを作製した。作製した

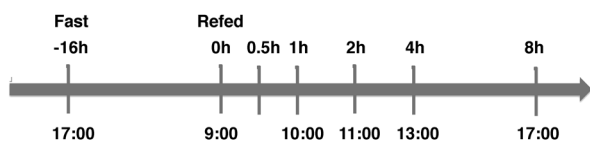


図2 絶食・再摂食タイムコース

cDNAと標的遺伝子のプライマーを用いて定量RT-PCR法で遺伝子発現量を測定した。

## 3. 免疫沈降-ウェスタンブロッティング

組織片をLysis buffer中でホモジネートし、アガロースビーズおよび抗LXR抗体を添加し、一晚4℃で転倒混和した。その後、遠心分離と洗浄を数回繰り返す、サンプルバッファーに溶解した。アクリルアミドゲルにローディングして電気泳動を行い、泳動後メンブレンに転写し、LXRおよびO-GlcNAcタンパク量を測定した。

## 4. 肝臓中UDP-GlcNAc量の測定

液体窒素で凍結した肝臓を乳鉢で粉状にすりつぶし、メタノール/水(3:1)を添加した。攪拌後、遠心分離で上清を採取した。ろ過フィルターで遠心濾過を行い、適当な濃度に希釈した後にLC/MSで肝臓中および標準品のUDP-GlcNAc量を測定した。

## 5. 1型糖尿病モデルマウスの作製

20 mgのストレプトゾトシン(STZ)をクエン酸1 mlに溶解し、1匹に0.1 mlのSTZ溶液を腹腔内投与した。後日、血糖を測定し、血糖値が300 mg/dl以下の個体には再び同量のSTZを腹腔内投与した。投与から1週間後に解剖を行い、血液、肝臓を採取した。

## 結果・考察

### 1. インスリン非依存的な脂肪酸合成mRNAの発現増加

血中のインスリン濃度は絶食により大幅に低下、再摂食によって増加し(図3)、再摂食2h後に血中インスリン濃度はピークを示した。肝臓のグリコーゲン量は絶食により大幅に減少したが、再摂食の時間経過とともに徐々に増加し、再摂食2~4h後にかけて摂食群と同等量まで増加した。脂肪酸合成酵素の転写因子であるSREBP-1cのmRNA発現量の変化は血中インスリン濃度の変化とは一致せず、肝臓グリコーゲン量の変化と同様に絶食時には低値を示し、再摂食とともに徐々に増加した(図4)。SREBP-1cの標的である、fatty acid synthase

表1 RT-PCRプライマー配列

Target	Sense primer	Antisense primer
18SrRNA	5'-GGGAGCCTGAGAAACGGC-3'	5'-GGGTCGGGAGTGGGTAATTTT-3'
SREBP-1c	5'-CACGGAGCCATGGATTGC-3'	5'-AGTCACTGTCTTGGTTGTTGAG-3'
FAS	5'-GCTGCGGAAACTTCAGGAAAT-3'	5'-AGAGACGTGTCACTCCTGGACTT-3'

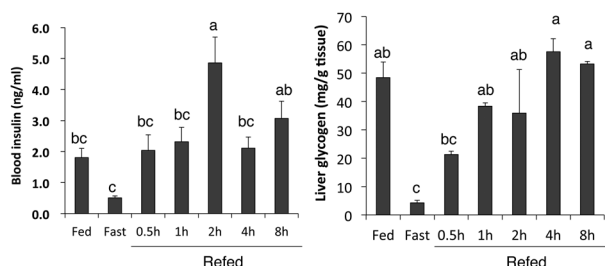


図3 再摂食時の血中インスリン濃度と肝臓グリコーゲン量

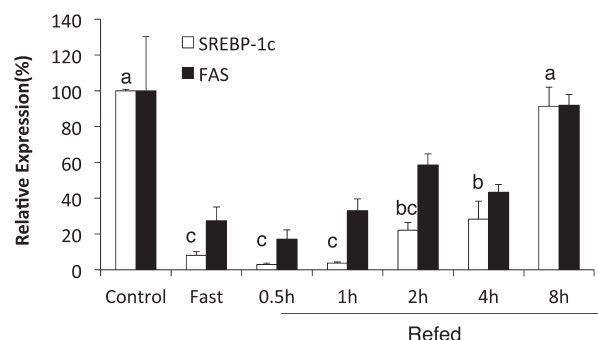


図4 再摂食時のSREBP-1c、FAS mRNA 発現量

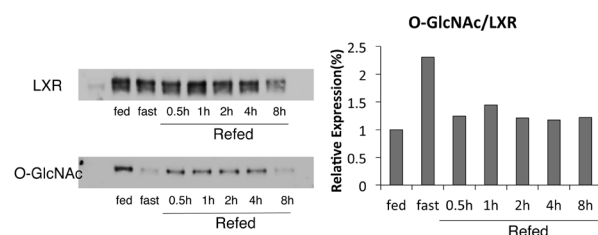


図5 再摂食時のLXRのO-GlcNAc修飾

(FAS) の発現量もSREBP-1cの発現量と同様の変動を示したが有意な差は認められなかった。これらの結果から再摂食後の脂肪酸合成酵素の発現量増加はインスリン非依存的に生じていることが示唆された。さらに、肝臓グリコーゲンが充満した再摂食4h後から急激な増加を示したことから肝臓グリコーゲンの充満の後に脂肪酸合成が促進している可能性が示唆された。

## 2. 再摂食後のLXRのO-GlcNAc化

LXRのタンパク発現量は絶食で減少し、再摂食により絶食時に比べやや増加した(図5)。O-GlcNAc-LXRタンパク質量は絶食時、再摂食時ともに摂食群に比べやや低下した。各サンプルのO-GlcNAcタンパク量をLXRタンパク量で除すことでLXRのO-GlcNAc化修飾を定量した。LXRのO-GlcNAc化量は摂食群と比して絶食時には2.3倍に増加、再摂食開始後からは1.2~1.4

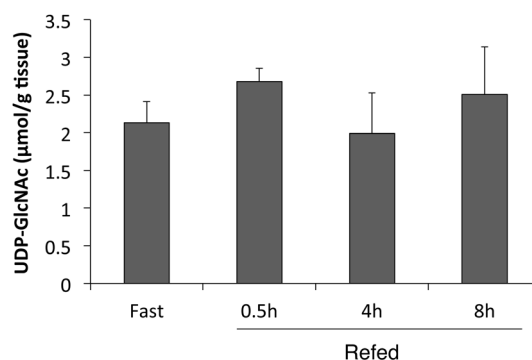


図6 再摂食時の肝臓中UDP-GlcNAc量

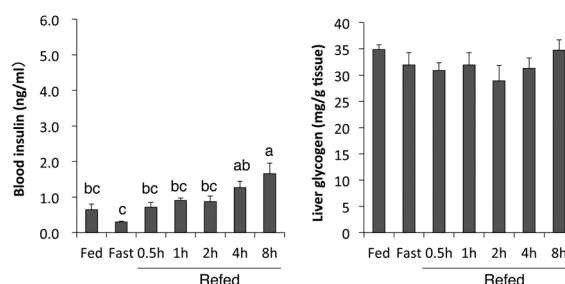


図7 STZ投与マウスの再摂食時の血中インスリン濃度

倍を推移した。

続いて絶食・再摂食時の肝臓中UDP-GlcNAc量をLC-MSを用いて調べたところ、絶食時、再摂食0.5、4、8h時のUDP-GlcNAc量に差はなかった(図6)。

これらの結果から再摂食8hまでにLXRのO-GlcNAc修飾に大幅な変動はなく、また、肝臓中UDP-GlcNAc量にも変化がないことが明らかになり、再摂食後の脂肪酸合成酵素の発現量増加とLXRのO-GlcNAc化には関連性が見出せなかった。

## 3. STZモデルマウスの再摂食時の肝臓グリコーゲン量と脂肪酸合成酵素

絶食、再摂食時の脂肪酸合成酵素の発現量変化がインスリン非依存的に生じているかを検討するために、マウスにSTZを投与し、膵臓β細胞を破壊した1型糖尿病マウスを作製した。STZ投与マウスの血中インスリン濃度は通常マウス(STZ非投与マウス)に比べ低値を示した(図3,7)。肝臓グリコーゲン量は絶食、再摂食による変動が認められなかった。SREBP-1cおよびFASのmRNA発現量の変化は絶食時には低値を示し、再摂食とともに徐々に増加した(図8)。

STZ投与マウスにおいて再摂食後の脂肪酸合成酵素の発現量が顕著に増加することはこれまでに報告され

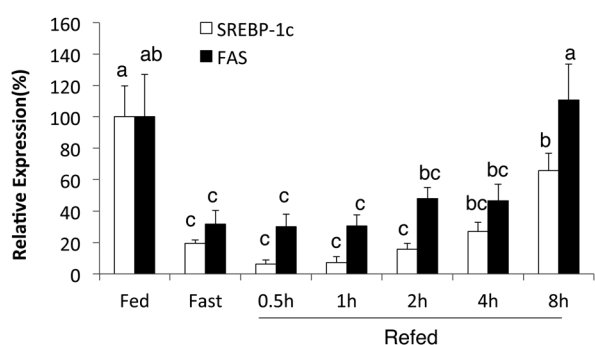


図8 STZ投与マウスの再摂食時のSREBP-1c、FAS mRNA発現量

ており<sup>6)</sup>、本研究におけるSTZ投与マウスの検討からも再摂食後の脂肪酸合成酵素の発現量増加がインスリン非依存的に生じていることが明らかになった。一方で、STZモデルマウスでは絶食・再摂食による肝臓グリコーゲン量の変動が認められなかった。この結果から、再摂食後の脂肪酸合成酵素の発現量増加は肝臓グリコーゲン量の蓄積の影響を受けていないことが示唆された。

## 要約

これまで摂食時における糖・脂質代謝は主にインスリンによって調節されるとされてきたが、生体の糖質源確保が最優先事項であることを説明するには矛盾点が多く存在する。本研究では肝臓グリコーゲン貯蔵の充満が脂肪酸合成促進シグナルを制御するという仮説のもと、関連する転写因子の活性調節機序と、そのタイミン

グを調べた。その結果、摂食後の脂肪酸合成酵素のmRNA発現量はインスリン非依存的に増加することが明らかになった。しかし、脂肪酸合成の活性化機序の一つとして報告されているLXRのO-GlcNAc修飾および基質として利用されるUDP-GlcNAcの肝臓中の濃度は再摂食による変動が認められなかった。また、STZモデルでの検討より絶食、再摂食時の肝臓グリコーゲン量の変化、脂肪酸合成酵素の発現量変化に相関がなかった。これらの結果から、再摂食後の脂肪酸合成酵素の発現量増加はインスリン非依存的に生じていること、しかし、肝臓グリコーゲン貯蔵の充満との関連性は薄いことが明らかになった。

## 謝辞

本研究にご支援賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に深謝申し上げます。なお、本研究で得られた成果につきましては、現在論文執筆、投稿準備中であることを申し添えます。

## 文献

- 1) S. Herzig, et al.: *Nature*, **413**, 179–183, 2001.
- 2) M. Foretz, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12737–12742, 1999.
- 3) J. D. Horton, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5987–5992, 1998.
- 4) G. Chen, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 11245–11250, 2004.
- 5) E. H. Anthonisen, et al.: *J. Biol. Chem.*, **285**, 1607–1615, 2010.
- 6) T. Matsuzaka, et al.: *Diabetes*, **53**, 560–569, 2004.