

論文内容の要旨

論文題目

エネルギー代謝制御における *Ghitm* の機能に関する研究

氏名 吉田 義

先進各国においては、脂肪分摂取の増大などによる摂取カロリー過剰と運動不足などによる消費カロリーの低下によって引き起こされる肥満および糖尿病、高血圧、高脂血症などの生活習慣病の蔓延が深刻な社会問題となっている。血糖値の調節は主にインスリンによって担われているが、インスリンのシグナル伝達は遺伝的要因、環境要因の双方に影響を受けることが知られており、II型糖尿病において認められるインスリン抵抗性とインスリン分泌不全発症のメカニズムには不明な点が数多く残されている。インスリンのシグナル伝達は他のホルモンによって修飾されることが知られており、例えば成長ホルモン(GH)は脂肪細胞においてインスリンと拮抗的に働くことで脂肪細胞への糖取り込みと脂肪の蓄積を抑制する。

遺伝子改変によってGHシグナルを阻害したマウスにおいては脂肪の分解が抑制されるために脂肪組織の肥大が認められる。この肥大した脂肪組織における遺伝子発現変化を解析したところ、新規の7回膜貫通型タンパク質の発現が低下していることが明らかとなり、*Ghitm* (Growth hormone-inducible transmembrane protein)と命名された。*Ghitm* は既知遺伝子との相同性は低く、膜貫通部位以外の機能ドメイン等も見出されないためにアミノ酸配列から機能を類推することは困難であった。

しかしながら、*Ghitm* は哺乳類のみならず昆虫や線虫にも高度に保存されており、ショウジョウバエ *Ghitm* オルソログは加齢に伴って発現上昇することが知られている。*Ghitm* が脂質代謝および加齢に関与していることから、*Ghitm* は進化的に保存された未知のエネルギー代謝機構に関与していると考えられる。本研究では *Ghitm* が脂肪細胞の機能に果たす役割を解明することを目的とし、脂肪細胞における *Ghitm* の発現解析および *Ghitm* ノックアウトマウスの作製と代謝内分泌系への影響を解析した。

1. 脂肪細胞の栄養状態変化に伴う *Ghitm* の発現変化

まず、*Ghitm* の発現量と脂肪細胞の栄養状態変化との関連に着目して解析を行った。

培養脂肪前駆細胞 3T3-L1 を成熟脂肪細胞へと分化誘導すると、分化に伴って *Ghitm* の発現は上昇した。一方、培養を継続することによって脂肪をさらに蓄積させたところ、*Ghitm* の発現は再び低下した(図 1a)。

次に、GH の過剰発現によってマウス脂肪組織に脂肪分解を引き起こしたところ、Ghitm の発現は低下した (図 1b)。また、レプチンを欠損することによって、もしくは高脂肪食飼料を投与することによって脂肪を過剰に蓄積したマウス脂肪組織においても共に Ghitm の発現は低下していた(図 1c, d)。

以上の結果から、*in vitro* および *in vivo* において共に Ghitm は成熟脂肪細胞において高発現しているが、脂肪細胞が矮小化、もしくは肥大した際にはその発現が抑制されることが示された。すなわち、Ghitm は脂肪細胞の栄養状態変化に応じて発現制御されることで機能すると考えられる。

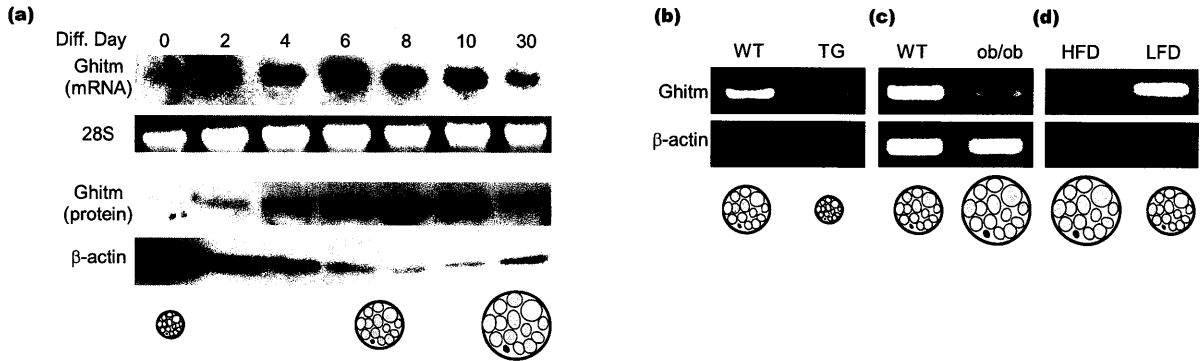


図1 脂肪細胞の栄養状態変化に伴うGhitmの発現変化

(a) 3T3-L1の分化誘導に伴うGhitmの発現

3T3-L1を定法に従って分化誘導し、Ghitmの発現変化をノーザンブロットングおよびウェスタンブロットングによって解析した。Ghitmは分化に伴って発現上昇し、脂肪の過剰蓄積に伴って再び発現低下した。

(b-d) 脂肪蓄積量を変化させた際のマウス脂肪組織におけるGhitm発現量

GH過剰発現(脂肪分解, b)、レプチン欠損ob/ob(脂肪過剰蓄積, c)、高脂肪食負荷(脂肪過剰蓄積, d)のマウス脂肪組織におけるGhitmの発現をRT-PCRによって解析した。

各脂肪細胞における脂肪蓄積量を模式的に示した。

2. Ghitm の細胞内局在部位の同定

Ghitm の機能部位を同定する目的で培養細胞内での Ghitm 局在部位を解析した。その結果、Ghitm はペルオキシソームに特異的に局在することを明らかにした(図 2)。ペルオキシソームは脂肪酸のβ酸化やプラスマローゲンなどのエーテルリン脂質の合成、胆汁酸の生合成など、多くの代謝系に関与する細胞内小器官であり、ペルオキシソームと肥満、糖尿病とは密接に関連している。

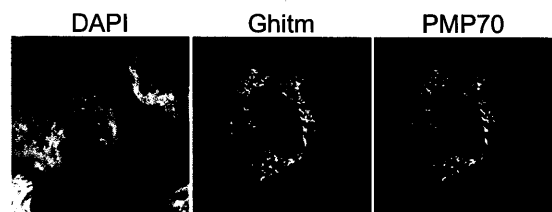


図2 Ghitmのペルオキシソームへの局在
CHO細胞にGhitmおよび70 kDaペルオキシソーム膜タンパク質(PMP70)を発現させ、免疫染色を行った。

実験結果 1 および 2 の事実は、Ghitm がペルオキシソームにおいて栄養状態変化に応じて発現を変動させることで脂質の代謝に関与していることを強く示唆している。

3. Ghitm 遺伝子ノックアウトマウスの作製

Ghitm の機能をさらに解析するため、Ghitm ノックアウトマウス(GhitmKO)を作製した。Ghitm 遺伝子上において開始メチオニン及び第 1~第 3 膜貫通領域を含むエクソン 2~4 を欠失するようにターゲティングベクターを作製し、ES 細胞に導入することで相同組み換えを行った。定法に従ってキメラマウス、ヘテロ組み換えマウスを得た後、生殖細胞系列で Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスと交配することで、GhitmKO を作製した。

GhitmKO はメンデル則に従って生まれ、剖検による組織異常は認められなかった。

4. Ghitm ノックアウトマウスの代謝内分泌経路の解析

野生型マウス(WT)と GhitmKO の脂肪組織間で脂肪細胞機能に関わる遺伝子群の発現比較を行ったところ、脂肪組織の種類によって異なる遺伝子群に発現変動が認められた。例えば、肩胛骨間白色脂肪(intrascapular white adipose tissue, iWAT)および褐色脂肪組織(intrascapular brown adipose tissue, iBAT)においては ucp(uncoupling protein)、 β アドレナリン受容体 (type3)、PGC1 α といった遺伝子で発現の低下が見られたのに対し、精巣上体白色脂肪組織(epididimal WAT, eWAT)においてはこれらの発現低下は認められなかった。この結果は、Ghitm が血糖値や遊離脂肪酸を初めとした代謝内分泌経路に関与しており、その機能は脂肪組織間で異なることを示唆している。

そこで、Ghitm 遺伝子欠失による脂質代謝内分泌系への影響を解析するため、野生型及び GhitmKO に高脂肪飼料を投与し、体重変化、血糖値、血中遊離脂肪酸およびトリグリセリド量の測定を行った。

この結果、高脂肪飼料を与えた際には GhitmKO は WT と比べて有意に体重増加が認められたのに対し、通常飼料下では体重は逆に減少した(図 3)。また、高脂肪食下では GhitmKO は高血糖、低遊離脂肪酸となった(図 4)。

GhitmKO が WT に比べて高脂肪食下で高血糖となったことから、Ghitm 遺伝子が血糖値の調節に関わっていることが示唆された。そこで、血糖値上昇を引き起こした原因をさらに解析するため、グルコース投与時の血糖値およびインスリンの測定(グルコース耐性試験)およびインスリン投与時の血糖値の測定(インスリン耐性試験)を行った。この結果、GhitmKO は高脂肪食下におけるインスリンに対する応答は正常であったのに対し(図 5b)、WT に比べてグルコース投与時の血糖値が有意に上昇した(図 5a)。一方、WT および GhitmKO の初代培養脂肪細胞においてインスリンシグナル伝達経路を解析したところ、インスリン刺激によるインスリン受容体 (IR)、インスリン受容体基質 (IRS)、Akt のリン酸化に差違は認められ

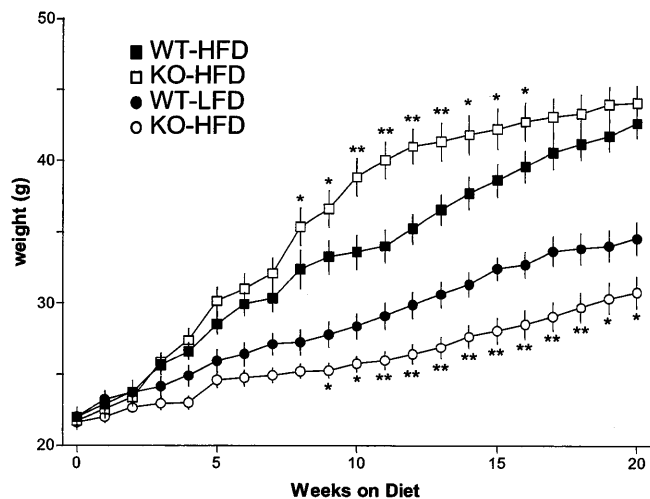


図3 野生型(WT)およびGhitmノックアウト(KO)マウスの体重変化
WTおよびKOマウスに高脂肪食(HFD)および低脂肪食(LFD)を与えてからの体重変化を測定した。N=12-15, mean±SEM. *, p<0.05; **, p<0.01

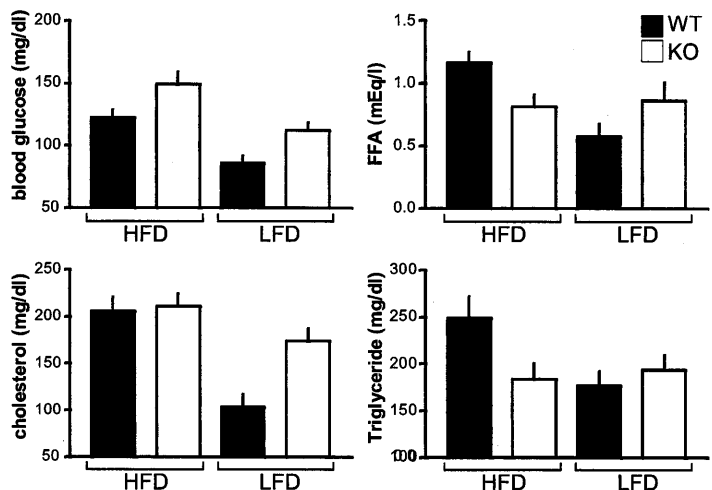


図4 Ghitmノックアウトマウスにおける血糖値、遊離脂肪酸、コレステロール、トリグリセリド量の測定
高脂肪食/低脂肪食負荷(HFD/LFD)後のマウス血清中の血糖値、遊離脂肪酸、コレステロール、トリグリセリド量を測定した。N=5, mean±SEM. *, p<0.05; **, p<0.01

なかった。

インスリン耐性試験およびインスリンシグナル伝達経路の解析から、GhitmKO が示す高血糖はインスリン分泌の不全によるものであることが示唆された。そこで、グルコース耐性試験時のインスリン分泌量を測定した。この結果、GhitmKO は WT に比べてグルコース投与時のインスリン分泌が低下していることが明らかになった(図 5c)。

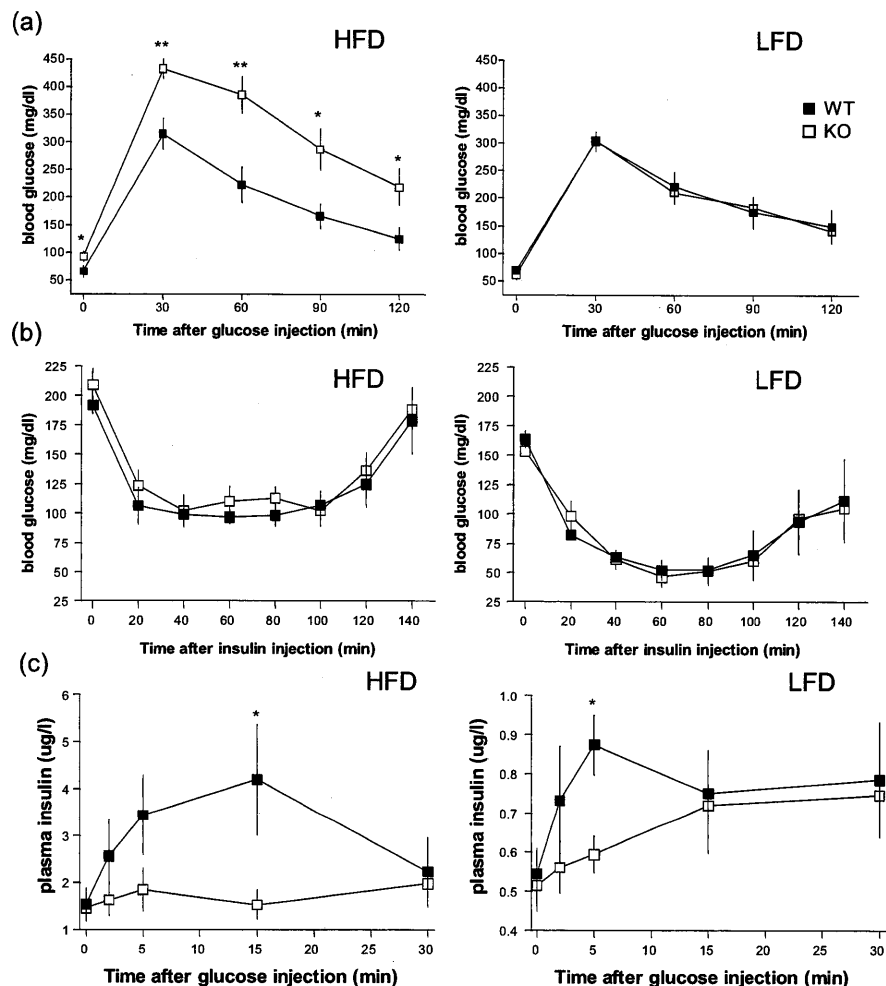


図 5 グルコース耐性試験およびインスリン耐性試験

(a) 24時間絶食後マウスに1.5 mg/body weightのglucoseを腹腔内注射した後の血糖値変化。N=5, mean±SEM

(b) 自由摂食下マウスに0.75 mU/body weightのinsulinを腹腔内注射した後の血糖値変化。N=5, mean±SEM

(c) 24時間絶食後マウスに1.5 mg/body weightのglucoseを腹腔内注射した後のインスリン量変化。N=6, mean±SEM. *, p<0.05; **, p<0.01; HFD, high-fat diet; LFD, low-fat diet

【結論】

GH の抑制時及びレプチン欠損時、高脂肪食負荷時には脂肪の蓄積が、

GH の過剰発現時には脂肪の分解が引き起こされるが、Ghitm はいずれの場合にもその発現が抑制された。脂肪前駆細胞である 3T3-L1 は分化に伴って脂肪を蓄積するが、この分化時に Ghitm は一旦発現上昇した後に発現が抑制された。これらの結果より、*in vivo* および *in vitro* において共に Ghitm は成熟脂肪細胞に発現していること、脂肪を過剰蓄積、もしくは分解した際には発現が抑制されることを明らかにした。また、GhitmKO は脂肪細胞において複数の脂肪細胞機能関連遺伝子に発現変化が認められた。GhitmKO は高血糖となったが、これはインスリンシグナルが阻害されたことによるものではなく、インスリンの分泌不全によるものであることを明らかにした。また、Ghitm がペルオキシソームに局在していることは、Ghitm が脂肪細胞のペルオキシソームにおいて脂質の代謝経路を制御することを強く示唆している。今後 Ghitm の分子生物学的機能が明らかになることで、生物種間で保存された未知のエネルギー代謝機構が明らかになることが期待される。