

論文の内容の要旨

モチーフ解析で同定された小腸と肝臓に発現する新規エステラーゼの
生理機能の解析-遺伝子欠損マウスの作製-

指導教官 門脇孝教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

李勇学

ホルモン感受性リパーゼ (HSL) は、脂肪組織、筋肉、精巣、肝臓などさまざまな組織において、トリアシルグリセロール (TG)、ジアシルグリセロール (DG)、コレステロールエステル (CE) の水解に触媒として働くことが知られている。我々の研究室ではこれまでに、HSL 欠損マウスを作成し、解析を進めてきた。HSL 欠損マウスには HSL とは異なる未知の TG リパーゼ活性が残存していることが判明した。当研究室では、既知のリパーゼに共通なモチーフ (α/β hydrolase fold, GXSXG active serine motif, HG dipeptide motif) をもつ遺伝子について、データベースによりスクリーニングを行い、53 個の遺伝子が同定した。マウスカルボキシエステラーゼ 5 (Ces5) がその中の一つである。マウス Ces5 が 559 アミノ酸から成る蛋白 (N_766347) であり、マウスの肝臓でピレスロイド (殺虫

薬成分)を加水分解する蛋白として知られている。マウス *Ces5* のヒト相同遺伝子はヒトカルボキシエステラーゼ 2 (hCES2) であり、主に小腸に発現してマウス *Ces5* アミノ酸配列と 70%の相同性が知られている。hCES2 は分解基質として、イリノテカン(CPT-11)、PNPB など短鎖エステル体の薬剤が知られている。

当研究室これまでに、HEK293 細胞にマウス *Ces5* をトランスフェクションして、TG リパーゼ酵素活性はないが、HSL と同等の酪酸 p-ニトロフェニル (PNPB) 酵素活性であることを確認した。マウス *Ces5* 蛋白は主に小腸、肝臓、腎臓に発現し、mRNA は主に小腸に発現し、肝臓、腎臓にも低レベルで発現していることが判明した。肝臓の免疫染色において、*Ces5* は中心静脈につながる周囲脈管に分布し、小腸の免疫染色においては、*Ces5* は空腸の絨毛組織に存在していた。また、空腸から回腸までを 5 つのセグメントに分け、ノーザンブロット解析を行うと、*Ces5* の mRNA は主に小腸上部に発現し、*Ces5* の蛋白は小腸上部において、ミクロソーム分画に多く認められることが判明した。マウス *Ces5* が主に小腸、肝臓に存在すること、および HSL と同等の PNPB 活性を持つことから、糖脂質代謝に何らかの影響を与える可能性が想定される。本研究では、この *Ces5* の生理的な意義を検討する目的で、*ces5* 欠損マウスを作製することにした。

Ces5 の lipid-binding domain の HG 活性中心はエクソン 4 の第 17 塩基からであり、それを欠損させる目的により完成したターゲティングベクターを ES 細胞に導入し、マイクロインジェクションによりキメラマウスの作製に成功した。。組み換え ES 細胞を計 308 個の受精卵にマイクロインジェクションし、50% 以上のキメラマウスは 17 匹生まれ、マイクロインジェクションの成功率は約 5.5%であった。キメラマウスを C57B6/J マウスと交配して F1 ヘテロマウスを得た。F1 ヘテロマウス同士の交配により得られた F2 マウスのゲノム DNA を回

収し、サザンブロット法により解析して、ヘテロマウスとホモ(ノックアウト)マウスが得られたことを確認した。ノーザンブロット解析により mRNA レベル、ウエスタンブロット解析により蛋白レベルとも、F2 欠損マウスの小腸、肝臓および腎臓組織で *Ces5* の発現は消失していることと、小腸における PNPB 酵素活性は 40%まで低下したことにより、*Ces5* の生理的意義を検討できる欠損モデルの樹立に成功した。F2 欠損マウスは外見的には正常で、妊娠能も保たれていた。戻し交配が終了していない段階での preliminary な欠損マウスを使用して検討した。

12 週齢から 14 週齢までの雄マウス (n=6) に対して、4 時間絶食後に体重測定を行った。雄 *ces5* 欠損マウスの体重が有意 ($p=0.0014$) に減少されたことが認められた。雄 *ces5* 欠損マウス (n=6) の解剖結果では肝臓、腎臓、精巣周囲白色脂肪組織いずれにおいても、野生型マウスと比較して重量減少が見られたが、体重で補正した結果で、変化はないことが判明した。雌マウス (n=6) の体重は遺伝子型による有意差を認めなかった。*Ces5* の欠損によって、雄マウスの体重は有意に 15%減少する可能性が示された。

マウスの血清総コレステロール値は雄、雌 *ces5* 欠損マウス (雄 n=5, 雌 n=6) とも野生型マウスと比較し、低下傾向を示した ($p=0.12$, $p=0.17$)。雄、雌 *ces5* 欠損マウス (雄 n=3, 雌 n=6) 血清 HDL-コレステロール値も低下傾向を示した ($p<0.01$, $p=0.13$)。雄 *ces5* 欠損マウス (n=6) が野生型マウスと比較し、4 時間絶食後に、血糖値が有意 ($p=0.014$) に 25%増加したことを示した。雌マウス (n=6) においては、有意差を認めなかったが、増加傾向を示した。雄と雌 *ces5* 欠損マウス (n=6 ずつ) の血清中性脂肪 (TG) 値および血清遊離脂肪酸 (FFA) 値の有差が見られなかったが、*ces5* 欠損マウスの血清遊離脂肪酸値が若干低下傾向を示した。

ces5 欠損マウスの体重差については、Ces5 欠損によって雄マウスの体が小さく、成長障害の可能性が考えられる。摂食量の比較では3匹ずつで2週間観察したところ、有意差を認めなかったが、戻し交配終了後、体重差と摂食量について再度確認する予定である。そのほか、エネルギー消費量、活動量、 β 酸化なども評価する予定である。また、高脂肪食などの食餌負荷による体重の変化も評価する予定である。

ces5 欠損マウスの血清総コレステロール値および HDL-コレステロール値が低下した原因については、戻し交配終了後に小腸における脂肪代謝に関わる胆汁酸、膵液リパーゼ、アシル CoA・コレステロールアシルトランスフェラーゼ (ACAT) 酵素、ATP 結合輸送膜蛋白 (ABCA1)、Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) 蛋白などについて検討する予定である。雄 ces5 欠損マウスの血糖値が有意に増加した原因には小腸上段にあるグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (GIP)、グリコキナーゼ (GK) および膵臓などについて検討する予定である。血清の中性脂肪値と血清遊離脂肪酸値については、高脂肪食や高コレステロール食による検討を行い、Ces5 の欠損により、小腸における脂肪代謝に関わる HSL やミクロゾームトリグリセリド転送蛋白 (MTP) 活性などについて評価する予定である。また、糖代謝、脂質代謝と蛋白質代謝の重要な臓器である肝臓において、Ces5 の欠損により脂肪代謝経路に関わる蛋白について検討する予定である。

今回使用した ES 細胞は 129 マウス系統由来のため、c57B6/J マウスでの解析には9世代以上の戻し交配が必要となる。現段階では4世代目の戻し交配を行っている。ノーザンブロット解析により mRNA 発現量、ウエスタンブロット解析により蛋白発現量とも、Ces5 の発現が消失していることから、Ces5 の生理的意義を検討できる欠損モデルの樹立に成功した。