

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 22 年度博士課程 進学

氏 名 権藤 祐輔

指導教員名 清水 誠

論文題目 腸管上皮細胞におけるタウリンによる TXNIP 発現制御に関する研究

遊離アミノ酸の 1 つであるタウリンは、カルボキシル基の代わりに硫酸基を持つβ-アミノ酸である。魚介類に多く含まれ、主に食品を介して摂取される。生体内に取り込まれたタウリンは、各組織において抗酸化作用・抗炎症作用・浸透圧調節作用といった多彩な生理作用を示すことが報告されている。当研究室においても腸管上皮細胞におけるタウリンの抗炎症作用、タウリンの輸送を担うタウリントランスポーター (TAUT) の発現調節に関する研究がおこなわれてきた。しかしながらタウリンの生理作用に関しては現象論に留まっている研究が多く、その詳細な作用機序については不明な点が多い。さらに遺伝子・分子レベルでの解析も十分になされていないのが現状である。

近年のニュートリゲノミクスの進展に伴い、食品成分が様々な組織における遺伝子発現に及ぼす影響を網羅的に解析することで食品の機能性に関する科学的な根拠を立証する試みがなされるようになった。食品の機能発現において重要な組織である腸管においても、ヒト腸管上皮細胞である Caco-2 細胞を用いて解析がおこなわれている。

そこで本研究ではこの概念をもとに、腸管上皮細胞における遺伝子発現に及ぼす影響について、Caco-2 細胞を用いて検討することにした。すなわち、Caco-2 細胞においてタウリ

ンがどのような遺伝子発現を制御しているのかを網羅的解析によって明らかにすると共に、その制御機構および遺伝子発現変化がもたらす細胞機能への影響を解明することを目的として研究を進めることとした。

## 第1章 タウリンが腸管上皮細胞の遺伝子発現プロファイルに及ぼす影響

タウリンがどのような遺伝子発現を制御するのかについて明らかにするために、DNA マイクロアレイを用いて網羅的な解析をおこなった。

Gene Ontology 解析の結果、タウリンはアミノ酸輸送を主とするトランスポーターに関する遺伝子群やグルコース代謝に関する遺伝子群の発現を抑制する可能性が示された。一方で、具体的な遺伝子としてタウリンは **thioredoxin interacting protein (TXNIP)** の mRNA 発現を顕著に亢進することが見出され、タンパク質レベルにおいてもその亢進は確認された。この誘導はタウリンと構造的、機能的に類似しているアミノ酸であるβ-アラニンやγ-aminobutyric acid (GABA) ではみられず、タウリン特異的であることが明らかとなった。さらに、β-アラニンはタウリンと同様に **TAUT** の基質でありタウリンの細胞内吸収を競合的に阻害するため、タウリンとβ-アラニンを同時に添加しタウリンの細胞内取り込みを阻害したときの TXNIP mRNA 発現に与える影響を調べたところ、β-アラニン存在下においてタウリンによる TXNIP mRNA 発現上昇が抑制された。このことからタウリンによる TXNIP mRNA 発現誘導に TAUT が関与していることが示唆され、細胞内のタウリンが重要である可能性が考えられた。

## 第2章 タウリンによる TXNIP 発現亢進機構の解析

第1章で見出されたタウリンによる TXNIP mRNA 発現誘導に関して、その作用機序の解析をおこなった。タウリンによる TXNIP mRNA 発現亢進機構として、タウリンが TXNIP の mRNA を安定化させているのか、または転写活性を亢進しているのかという2つの可能性が考えられる。mRNA 合成阻害剤であるアクチノマイシン D を用いてタウリンが TXNIP の mRNA 安定性に与える影響を調べたところ、タウリンの有無に関わらずアクチノマイシン D 添加後の TXNIP mRNA の分解速度に違いが見られなかった。このことから、タウリンは mRNA の安定性に影響を与えていないことが考えられた。一方で、タウリンが TXNIP の転写活性に及ぼす影響を検討するために、TXNIP プロモーター領域を含むルシフェラー

ゼベクターを作製しルシフェラーゼアッセイをおこなったところ、タウリンの濃度依存的に TXNIP 転写活性の亢進がみられた。このことからタウリンによる TXNIP mRNA 発現亢進機構として、TXNIP の転写活性に影響を与えていることが明らかとなり、同時に TXNIP のプロモーター領域中にタウリンを認識する遺伝子配列が存在することが示唆された。そのため、その遺伝子配列を同定するためにプロモーター解析を進めた。

TXNIP プロモーター領域を部分的に欠損させたベクターを数種類作製し、それぞれにおいてタウリンによる転写活性への影響を検討したところ、TXNIP プロモーター領域の +142/+256 を欠損させた場合にタウリンによる転写活性の亢進がみられなくなった。さらに、その領域の中でも+162/+218 のみを含むルシフェラーゼベクターをトランスフェクションさせた細胞において、タウリンがその転写活性を亢進したため、タウリンを認識する遺伝子配列がこの領域内に存在することが示された。この領域についてイン・シリコ解析によりタウリン応答配列の候補を分析したところ、哺乳類における遺伝子配列の保存度が高いものが2つ、および転写因子 Tst-1 の応答配列が存在しており、これらの配列が候補として考えられた。

並行して、タウリンがどのようなシグナル伝達経路を介して TXNIP 発現を亢進しているかについて明らかにするために、様々なシグナル伝達経路阻害剤を用いて検討をおこなった。その結果、mitogen-activated protein kinases (MAPKs) の3種類の経路のうち、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路の阻害剤である PD98059 添加によって、タウリンによる TXNIP mRNA 発現量の増加が抑制された。また、その抑制は mRNA だけでなく転写活性レベルにおいてもみられた。さらに、タウリンによる ERK1/2 の活性化が確認されたため、タウリンは ERK-MAPK シグナル伝達経路を介して TXNIP mRNA 発現を亢進していることが示唆された。

### 第3章 タウリンによる TXNIP 発現誘導が腸管上皮細胞に及ぼす影響

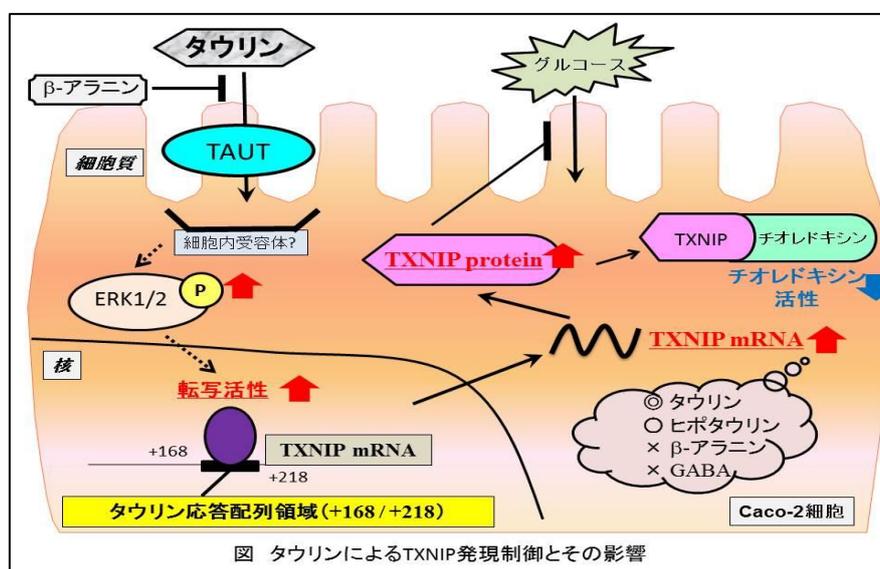
第1章で見出されたタウリンによる TXNIP 発現誘導が、細胞機能にどのような影響を及ぼすのかについて検討した。TXNIP はグルコースの吸収抑制に関与していることが報告されているため、タウリンによるグルコース取り込みに与える影響を検討したところ、タウリンの濃度依存的なグルコース取り込み量の低下がみられた。さらに、TXNIP のノックダウンを誘導することによりその低下が解除する結果が得られた。このことから、タウリン

が TXNIP の誘導を介してグルコースの吸収を抑制することが示された。

また、TXNIP はチオレドキシシンと相互作用して、その抗酸化活性 (チオレドキシシン活性) を負に制御し、活性酸素 (ROS) の増加につながるということが知られている。そのため、タウリンがチオレドキシシン活性に与える影響を検討したところ、その活性の低下がみられた。このことから、タウリンはチオレドキシシンの抗酸化作用を低下させ、それにより ROS を増加させる可能性が考えられた。

## 総括

本研究ではニュートリゲノミクスの概念に基づき、タウリンが細胞に与える作用の遺伝子・分子レベルでの解析に取り組んだ。その結果として見出されたタウリン応答性分子 TXNIP に着目し、その解析を進めた結果、TXNIP 発現制御を介したタウリンの生理機能を見出すことができた。TXNIP は redox 制御以外にも抗炎症作用をはじめとする様々な生理機能を有することが報告されており、タウリンの多彩な生理作用を司る制御因子としての可能性も考えられる。未だ不明な点が多いタウリンの作用機序の解析において本研究がその一助となり、タウリンの機能性食品成分としての理解が深まることを期待したい。



発表論文

Gondo Y., Satsu H., Ishimoto Y., Iwamoto T., Shimizu M. (2012)

Effect of taurine on mRNA expression of thioredoxin interacting protein in Caco-2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 426(3), 433-437