

氏名（本籍）	長谷川 晋也	（東京都）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	乙 第202号	
学位授与年月日	平成25年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当者	
学位論文の題名	アセトアセチルCoA合成酵素の生理的意義に関する研究	
論文審査委員	主査	教授 福井 哲也
	副査	教授 辻 勉
	副査	教授 小林 恒雄

論文内容の要旨

ケトン体は、飢餓や糖尿病などグルコースが利用できない時の代替エネルギー源であると考えられてきた。エネルギー源としてのケトン体の利用には、肝臓以外の組織のミトコンドリア画分に存在する succinyl-CoA:3-oxoacid-CoA transferase (SCOT) が関与することが以前から知られている。一方、近年、SCOT が存在しない肝臓では、ケトン体が脂肪酸やコレステロールに取り込まれること、及びこの反応にはサイトゾルに存在する acetoacetyl-CoA synthetase (AACS) が関与することが明らかとなった。AACS は、ラット肝臓においてコレステロール低下剤の pravastatin (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) 阻害剤) や cholestyramine (陰イオン交換樹脂) によって、コレステロール合成の律速段階を触媒する HMGCR と共に誘導されることから、コレステロール合成系と同様の制御を受ける可能性が示唆されている。また、AACS が脳の神経様細胞において高発現すること、肝臓の成長および脂肪組織の成熟に伴い増加することが明らかとなり、本酵素により活性化されたケトン体が、脂質合成および各臓器の発生・分化過程において重要な役割を果たす可能性があると考えられる。以上のように、AACS の発現が生理状態に依存して多様に変動することが明らかとされているが、その生理的意義および発現調節機構は明らかにされていない。そこで著者は、AACS の発現調節機構およびその機能を解析する目的で、以下の研究を行った。

AACS の mRNA は精巣上体の白色脂肪組織および腎臓で高発現しており、脳および肝臓では中等度の発現であり、SCOT が高発現する骨格筋ではほとんど観察されなかった。AACS の転写調節領域を決定するために、5'-Rapid Amplification of cDNA Ends 法を用いて AACS 遺伝子の 5' 末端領域を解析した結果、AACS は翻訳開始点 (+1) から上流・104 base pairs (bp) の位置に主要転写開始点を持つことが明らかとなった。

AACS は脂肪組織で高発現しており、その分化段階において発現が増加することから、脂肪細胞の分化に重要な役割を果たす可能性が考えられる。そこで、3T3-L1 マウス前駆脂肪細胞を分化誘導剤 (3-isobutyl-1-methyl-xanthine、dexamethasone および insulin) で処理し、分化段階における AACS の遺伝子発現を検討したところ、脂肪滴の蓄積が始まる分化 3 日目から 4 日目にかけて著しく増加した。次に、luciferase assay を用いて分化 4 日目における AACS の転写活性を測定した結果、遺伝子上流領域 -3 bp から -335 bp の領域が転写活性に重要であることが明らかとなった。遺伝子上流 -3bp から -335bp の領域には転写因子結合配列である GC box、および CCAAT/Enhancer binding protein (C/EBP) 結合配列が存在することから、両配列に inverse PCR 法を用いて変異を導入し、転写活性への影響を検討した。その結果、AACS の転写活性がそれぞれ 50%減少したことから、両配列が 3T3-L1 細胞の分化段階における AACS の転写調節に関与する可能性が示唆された。

GC box および C/EBP family 結合配列と核タンパク質の相互作用を検討する目的で、分化開始日 (未分化) および分化 4 日目の 3T3-L1 細胞から抽出した核タンパク質を用いて gel shift assay を行った。その結果、GC box と C/EBP 結合配列は、いずれも核タンパク質の結合が認められた。また、未分化時および分化時の結合量を比較したところ、C/EBP 結合配列と相互作用する核タンパク質が分化 4 日目に増加することが明らかとなり、AACS の転写調節には C/EBP family が重要な役割を果たす可能性が示唆された。脂肪細胞の分化では、C/EBP β が分化開始直後、C/EBP α が分化開始後 3 日目から 4 日目にかけて増加し、それぞれ脂肪細胞の増殖や脂肪滴形成に関与する。supershift assay 及び chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay により両転写因子と AACS promoter 領域の相互作用を検討した結果、C/EBP α との相互作用は 3T3-L1 の分化 4 日目において著しく増加したが、C/EBP β との相互作用は変動しなかった。以上の結果から、脂肪細胞の分化段階において C/EBP α が AACS の発現を調節する可能性が示唆された。

前述したように、C/EBP α は脂肪細胞分化の調節因子であり、その転写因子によって調節される AACS は脂肪細胞の分化に関与する可能性が考えられる。そこで、AACS が脂肪細胞分化に及ぼす影響を検討するため、以下の実験を行った。分化段階の 3T3-L1 細胞における AACS のタンパク質発現は、分化 4 日目以降に著しく増加した。脂肪滴を Nile red、核を propidium iodide により染色して AACS の局在と比較した結果、AACS は主に細胞質、特に核周辺部に局在することが明らかとなった。次に、脂肪細胞における AACS の役割を検討するために、short hairpin (sh) RNA を用いた knockdown 実験を行った。real-time PCR 法を用いて解析した結果、AACS に対する shRNA (shAACS) を処理した細胞では AACS の mRNA 量が有意に減少した。また、

oil red O 染色で測定した脂肪滴の蓄積量は、AACS を knockdown した細胞において顕著に減少した。脂肪細胞マーカーである PPAR γ と C/EBP α の遺伝子発現は、shAACS を処理した 3T3-L1 細胞で著しく減少した。以上の結果から、脂肪細胞の分化において AACS が重要な役割を担うことが明らかとなった。

肝臓では、AACS の活性はコレステロール濃度の影響を受け、さらに、ケトン体はコレステロールや脂肪酸の合成に利用されるが、コレステロール恒常性に対する AACS の発現変動の影響は明らかではない。そこで、肝臓における AACS の生理的役割と転写調節機構を検討した。マウスにコレステロール低下剤 (0.4% pravastatin + 4% cholestyramine) を 3 日間給餌すると AACS の発現が約 5 倍増加したことから、コレステロールの減少により AACS の転写が誘導される可能性が示唆された。次に、AACS の転写調節に関わると考えられる転写因子の発現を検討した。脂質合成を制御する SREBPs の遺伝子発現を検討した結果、コレステロール低下剤投与による SREBP-1a の変動は認められなかった。しかしながら、脂肪酸合成系を司る SREBP-1c の発現は有意に減少し、コレステロール合成系を調節する SREBP-2 の発現は有意に増加した。また、コレステロール低下剤投与により SREBP-1 の核移行活性型の量は減少したが、SREBP-2 の活性型は著しく増加した。以上の結果から、AACS の転写調節には SREBP-2 が関与する可能性が示唆された。次に、in vitro における AACS の発現に対するコレステロール枯渇の影響を検討するため、初代培養肝細胞を LPDS (リポタンパク質欠乏血清) を含有する培地で培養した。その結果、AACS の遺伝子発現は、HMGCR と同様に LPDS 処理により有意に増加した。以上の結果から、AACS は細胞内コレステロールの枯渇により、その遺伝子発現が誘導されることが明らかとなった。

次に、AACS の調節に関わる転写因子の同定を試みた。マウスの肝臓を用いて ChIP assay を行った結果、AACS の遺伝子の promoter 領域と SREBP-2 の相互作用が、コレステロール低下剤の投与により増加することが明らかとなった。また、SREBP-2 に対する small interfering RNA を肝細胞に導入すると、AACS の mRNA 量は HMGCR と共に有意に減少した。以上の結果から、AACS が SREBP-2 によって調節されることが明らかとなった。

SREBP-2 はコレステロール合成系を制御する転写因子であり、SREBP-2 によって調節される AACS の発現変動は、コレステロールの恒常性に影響を与える可能性が考えられる。そこで、shAACS を hydrodynamics 法によりマウス個体に導入し、肝臓における AACS の発現を抑制した。その結果、血清中のコレステロールが 28% 減少したことから、AACS の発現が SREBP-2 により調節され、その発現量の変化がコレステロール恒常性に影響を与えることが明らかとなった。

脂質は細胞膜の重要な構成成分であり、発生・分化過程に重要な役割を果た

している。特に脂質は脳・神経組織に高濃度で存在しており、神経細胞の形成や機能の維持に関与すると考えられている。そこで神経細胞における AACS の機能を検討するために、マウス神経芽細胞腫 Neuro-2a 細胞の神経突起伸長段階における、AACS の発現変動を検討した。その結果、AACS の遺伝子およびタンパク質の発現は、HMGCR の発現と同様に神経突起の伸長に伴い顕著に増加した。蛍光免疫染色法を用いて検討した結果、AACS は核近傍の細胞質および growth cone に局在することが明らかとなった。以上の結果から、神経突起伸長においては、コレステロール合成系にケトン体が利用される可能性が示唆された。

次に ChIP assay および RNA 干渉により、AACS の転写調節因子を検討した結果、神経突起伸長時において、AACS の発現が SREBP-2 によって調節されることが明らかとなった。神経発生過程の AACS 発現を検討する目的で、マウス胎生期の脳における AACS の発現変動を検討した結果、AACS の発現は胎生期 16.5 日 (E16.5) から E18.5 にかけて顕著に増加した。また、HMGCR の発現は、AACS の発現変動と同様に胎生後期にかけて著しく増加した。神経マーカーでは、neuronal nuclei (NeuN) と microtubule-associated protein 2 (MAP-2) の発現が E18.5 において増加した。さらに、spine apparatus の主要構成タンパク質である synaptopodin の発現が E18.5 において増加した。以上の結果から AACS を介したケトン体からのコレステロール合成が、神経発生、特に樹状突起伸長において重要な役割を果たす可能性が示唆された。

神経細胞における AACS の役割を検討するために、初代培養神経細胞において AACS の発現を抑制し、神経マーカーの発現への影響を検討した。shAACS を処理した細胞では AACS の発現が著しく抑制されており、NeuN および MAP-2 の発現がコントロール群と比較して低下していた。また、synaptopodin の発現も減少することが明らかとなった。

以上の結果から、AACS を介したケトン体利用経路が、生体内の脂質合成および細胞の分化・機能維持において重要な役割を果たすことが明らかとなった。本研究は、細胞の形態形成の理解および脂質代謝異常の治療に重要な知見を与えると考えられる。

論文審査の結果の要旨

ケトン体は、飢餓や糖尿病などグルコースが利用できない時に脂肪酸の分解によって生じ、脳や筋肉などで利用される代替エネルギー源であると考えられてきた。エネルギー源としてのケトン体の利用は、肝外組織のミトコンドリア画分に存在する succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA transferase (SCOT) が担っているため、SCOT が存在しない肝臓は長らくケトン体の合成専用臓器と見なされてきた。しかし近年、その肝臓においてケトン体が脂肪酸やコレステロールなどの重要な生体成分の合成に利用されることが明らかとなり、それにはサイトゾルに存在する acetoacetyl-CoA synthetase (AACS) が関わっていることが示された。この酵素の遺伝子は、申請者の所属する教室において初めてクローニングされ、本酵素がケトン体であるアセト酢酸を CoA エステルへと変換し生体内基質として供給する、ケトン体活性化酵素であることが明らかとなった。実際、AACS は脂肪組織や肝臓そして脳など脂質代謝が盛んな組織に高発現しており、肝臓の成長および脂肪組織の成熟に伴い増加することが明らかになっている。また、ラット肝臓においてはコレステロール低下剤の投与によって、コレステロール合成の律速段階を触媒する HMGCR と共に誘導されることから、コレステロール合成系と連動した制御を受ける可能性が示唆されている。このように、AACS は生理状態に依存して多様に変動しており、本酵素により活性化されたケトン体が、脂質合成および各臓器の発生・分化過程における生合成基質の供給に関わる可能性が示唆されるが、その生理的意義の詳細は未だ不明なままであった。そこで申請者は、AACS の発現が細胞の機能および同化作用に重要な役割を果たすと予想される、脂肪細胞・肝臓・神経細胞における AACS の転写調節および生理的意義の解明を試み、以下の結果を得た。

まず、3T3-L1 マウス前駆脂肪細胞の分化段階における AACS の発現を検討し、脂肪滴の蓄積が始まる分化3日目から4日目にかけてその発現が著しく増加することを明らかにした。また、luciferase assay、gel shift assay および chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay を用いて AACS の転写調節因子を検討した結果、脂肪細胞の分化誘導因子である CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α) が、AACS の転写を正に調節することを見いだした。さらに、3T3-L1 細胞に short hairpin RNA (shRNA) を導入し AACS の発現を抑制したところ、脂肪滴の蓄積量が顕著に減少すること、脂肪細胞マーカーである peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) と C/EBP α の遺

伝子発現が有意に減少することを明らかにし、C/EBP α によって調節される AACCS が、脂肪細胞の分化・脂肪滴蓄積において重要な役割を担うことを示した。

次に申請者は、肝臓において AACCS がコレステロール濃度によって調節されるという知見に基づき、肝臓における AACCS の転写調節機構、および AACCS 発現抑制のコレステロール恒常性に対する影響を検討した。その結果、real-time PCR 法により、マウスにコレステロール低下剤 (pravastatin + cholestyramine) を給餌すると AACCS の遺伝子発現が増加すること、ChIP assay および RNA 干渉法により、コレステロール合成系を調節する転写因子である sterol response element binding protein-2 (SREBP-2) が、AACCS の発現を調節することを明らかにした。また、shRNA を hydrodynamic 法によりマウス個体に導入し、肝臓における AACCS の発現を抑制した結果、血清中のコレステロールが約 28% 減少することを示し、AACCS の発現が SREBP-2 により調節され、その変動がコレステロール恒常性に影響を与えることを明らかにした。脂質は細胞膜の構成成分であり、発生・分化過程に重要な役割を果たしている。特にコレステロールは脳・神経組織に高濃度で存在し、神経細胞の形成や機能の維持に関与すると考えられている。そこで申請者は、神経細胞における AACCS の機能を検討するために、マウス神経芽細胞腫 Neuro-2a 細胞の神経突起伸長過程における、AACCS の発現変動および転写調節機構を検討した。AACCS の発現は、HMGCR と同様に神経突起の伸長に伴い顕著に増加し、その発現は SREBP-2 によって誘導されることを明らかにした。また、神経発生過程であるマウス胎生期の脳における脂質代謝酵素の発現変動を検討し、AACCS の発現が HMGCR と同様に胎生期中期から後期にかけて顕著に増加することを見いだした。さらに、神経マーカーの neuronal nuclei (NeuN)、microtubule-associated protein 2 (MAP-2) および spine apparatus の主要構成タンパク質である synaptopodin の発現が、同様に胎生後期において増加することを明らかにした。そして、初代培養神経細胞において AACCS の発現を抑制し、神経マーカーの発現への影響を検討した結果、NeuN、MAP-2 および synaptopodin の発現が顕著に減少することを示した。

以上の結果より、AACCS が脂肪細胞においては C/EBP α によって調節されること、神経細胞および肝臓においては SREBP-2 によって調節されることが明らかとなった。また、AACCS を介したケトン体利用経路が、生体内の脂質合成および細胞の分化・機能維持において極めて重要な役割を果たすことも

示された。本研究の結果は、代替エネルギーとして知られていたケトン体の新たな生理的意義を示唆するとともに、コレステロール合成に対するケトン体の量的関与の可能性、および生活習慣病や神経変性疾患などの治療や診断におけるターゲットとしての AACCS の可能性を明らかにするものである。以上の結果は、従来の脂質代謝経路の概念を塗り替え、細胞の形態形成の理解および脂質代謝異常の治療に関する重要な知見を含んでいると考えられる。よって博士(薬学)の学位に相応しいものと判断した。