

インスリンによる *FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA の発現制御に関する研究

松尾 康平

福岡大学薬学部衛生化学教室 〒814-0180 福岡市城南区七隈8-19-1

Regulation of *FSP27-1a* mRNA and *FSP27-1b* mRNA Expression by Insulin

Kohei Matsuo

Hygienic Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Science,
Fukuoka University, 8 - 19 - 1 Nanakuma, Johnan-ku, Fukuoka 814 - 0180, Japan

Abstract

The *fat-specific protein 27 (FSP27)* gene belongs to the cell death-inducing DNA fragmentation factor 45-like effector family. *FSP27* is highly expressed in adipose tissue as well as the fatty liver of *ob/ob* mice. *FSP27* is directly regulated by the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in livers of genetically obese leptin deficient *ob/ob* mice. *FSP27* was recently reported to produce two transcript variants, *FSP27-1a* and *FSP27-1b* mRNAs. In the present study, *FSP27-1a* and *FSP27-1b* mRNAs were markedly induced by 24h fasting in genetically normal mouse livers and repressed by refeeding a high sucrose diet. In contrast with the liver, expression of *FSP27-1a* and *FSP27-1b* mRNAs were decreased in adipose tissue by fasting and increased by refeeding. Interestingly, fasting-induced expression of both *FSP27-1a* and *FSP27-1b* mRNAs in the liver were independent of PPAR γ . Moreover, expression of *FSP27-1a* and *FSP27-1b* mRNAs were induced in the insulin-depleted livers of streptozotocin-treated mice. Finally, expression of *FSP27-1a* and *FSP27-1b* mRNAs were repressed by direct injection of insulin in fasting mice. These results suggest that insulin represses expression of *FSP27-1a* and *FSP27-1b* mRNAs in the fasting liver.

Keywords: peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), fatty liver, fat-specific protein 27 (FSP27), insulin

【緒言/目的】

近年、高脂肪食品への食生活の変化や運動不足等の生活習慣の乱れに伴い、肝臓に過剰な脂肪が蓄積する非アルコール性脂肪肝の患者が急増している。しかし、肝実質細胞への脂肪蓄積の詳細な分子メカニズムについては明らかにされていない。これまで当研究室では、肝実質細胞に脂肪蓄積が引き起こされる分子メカニズムについて一連の研究を行ってきた。その中で、転写因子である peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) により発現制御される fat-specific protein 27 (FSP27) が、肝細胞におけるトリグリセリド (TG) の蓄積を促し、肥満モデルである *ob/ob* マウスの脂肪肝形成に関与していることを明らかにしている [1]。

FSP27 は、cell death-inducing DNA fragmentation factor 45-like effector (CIDE) ファミリーの一員であり、このファミリーには 3 種類のアイソフォーム CIDEA, CIDEB 及び CIDEA/FSP27 (CIDEA はマウス FSP27 のヒトホモログ) の存在が知られている [2, 3]。FSP27 遺伝子の転写産物には、エキソン 1 の異な

る2種のバリエント (*FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA) が存在し、それらバリエントの発現は、異なる転写因子により制御されていることが、近年報告された [4]。FSP27 は、白色及び褐色脂肪組織で高発現しており、脂肪細胞の脂肪滴に局在し [5]、脂肪滴関連タンパク質である *perilipin 1* と協働して脂肪滴を肥大化することが明らかになっている [6]。

FSP27 の発現は、上述の *ob/ob* マウスの脂肪肝だけではなく、高脂肪食、メチオニン・コリン欠損食 [7]、アルコール [8] により形成された脂肪肝で増加していた。しかし、これらの脂肪肝における *FSP27* の発現は *PPAR γ* の発現パターンと必ずしも一致しておらず、*FSP27* の発現制御メカニズムは脂肪肝の成因によって異なることが示唆された。これらの結果は、肝臓の *FSP27* 発現が、栄養状態やホルモン等の複数の因子によって調節されることを示唆している。近年、*FSP27* の発現は、正常マウスの絶食肝臓で誘導されることが明らかになった [9-11]。

また、当研究室では、肝臓において絶食により誘導された *FSP27* の発現が、再摂食により低下するのに対し、白色脂肪組織における *FSP27* の発現は、絶食により抑制され、再摂食により誘導されることを明らかにした [12]。しかし、絶食及び再摂食によって引き起こされる *FSP27* の発現変動メカニズムは明らかにできていない。そこで、本研究では、絶食及び再摂食条件下で *FSP27* 遺伝子のバリエント (*FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA) の発現を支配する制御因子の同定を試みた。

【実験方法】

絶食処理 (Fasting) マウスは、10 週齢の C57BL/6J 雄性マウスを 24 時間絶食することにより作製した。再摂食処理 (Refeeding) マウスは、24 時間絶食後、high sucrose diet (CE-2 飼料 : sucrose = 1 : 1 で混合) を 24 時間給餌することにより作製した。絶食マウスのインスリン処理は、インスリン (投与量 : 8 munits/g body weight) をマウス腹腔内に投与することにより行った。1 型糖尿病モデル (STZ 処理) マウスは、8 週齢の C57BL/6J 雄性マウスを 4 時間絶食後、1 日 1 回 50 mg/kg streptozotocin / クエン酸溶液を連続的に 5 日間腹腔内投与することにより作製した。mRNA の発現は、各マウスの肝臓から cDNA を調製し、リアルタイム PCR 法により解析した。なお、*FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA 発現測定に使用する PCR プライマーは、Xu らの報告 [4] に基づいて作製した (Fig. 1)。

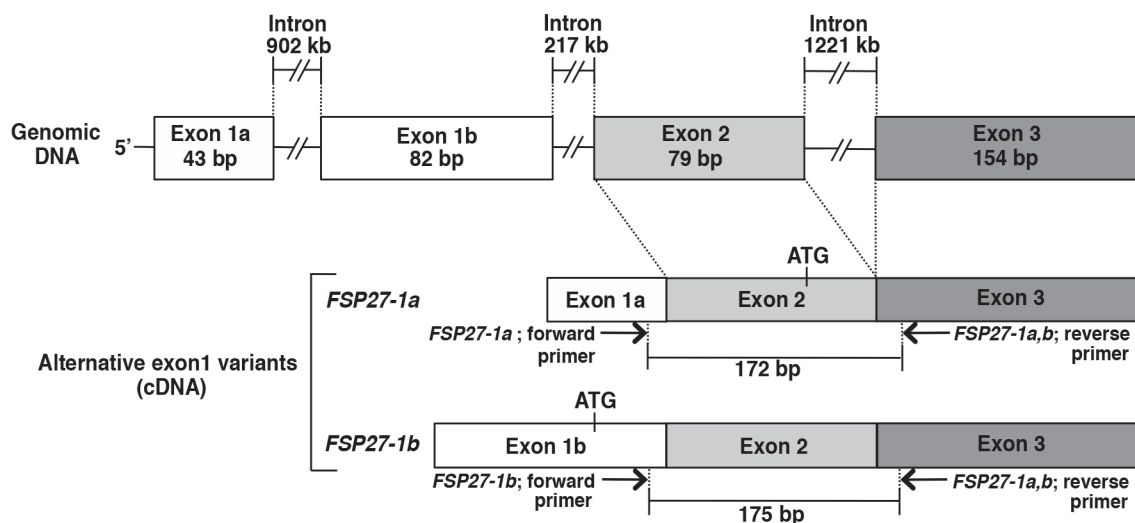


Fig.1 Structures of mouse *FSP27* gene, *FSP27-1a* mRNA and *FSP27-1b* mRNA, and location of primer pairs to analysis the expression of two mRNAs.

【結果/考察】

絶食、再摂食マウスにおける *FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA の発現

当研究室での研究は、バリエーションを考慮していない *FSP27* 遺伝子としての結果であり、2種のバリエーション (*FSP27-1a* 及び *FSP27-1b* mRNA) の発現を個々に調べていない。よって、絶食 (Fasting) 及び再摂食 (Refeeding) マウスの肝臓と白色脂肪組織 (WAT) における *FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA の発現を調べた。絶食肝臓における両 mRNA の発現は、それぞれコントロール (通常食) の約 7 倍及び 53 倍の著しい誘導が認められたが、再摂食処理によりいずれもコントロールと同程度まで低下した (Fig. 2A and B)。一方、絶食白色脂肪組織における *FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA の発現は、いずれもコントロールに比べて有意な低下が認められたが、再摂食処理により、いずれもコントロールと同程度まで回復した (Fig. 2C and D)。以上の結果より、肝臓における *FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA の発現は、白色脂肪組織における発現とは相反し、絶食処理により著しく誘導され、再摂食処理により低下することが明らかになった。

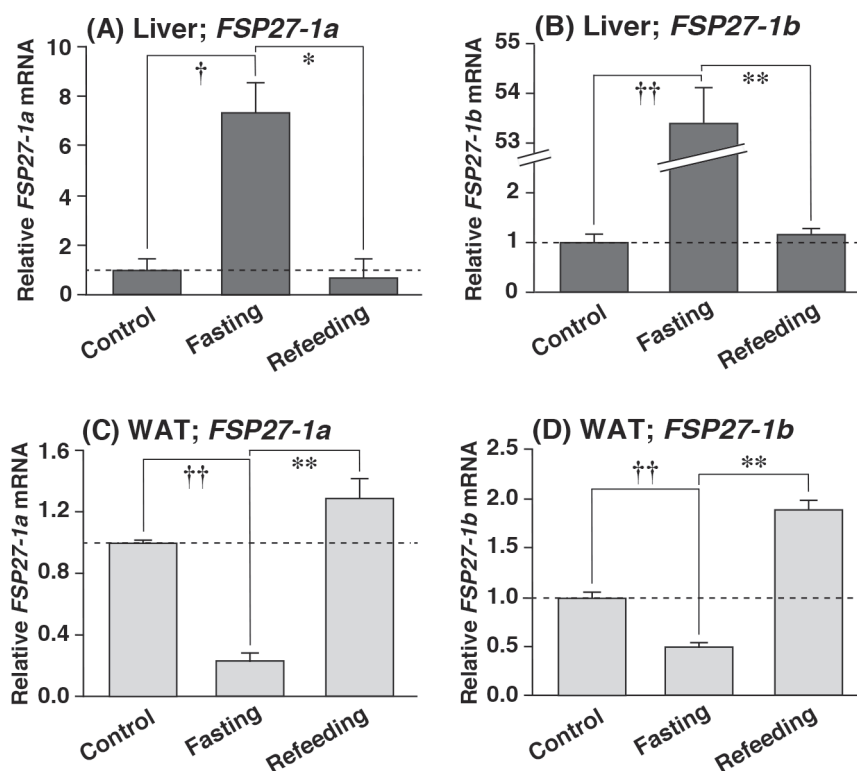


Fig.2 *FSP27* mRNAs in the liver are induced by fasting but decreased by refeeding.

当研究室では、*ob/ob* マウス脂肪肝における *FSP27* 遺伝子の発現が $PPAR\gamma$ 依存的に誘導されることを明らかにしている [1]。しかし、絶食による肝臓での *FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA 発現誘導が、 $PPAR\gamma$ 依存的か否かは明らかではない。そこで、 $PPAR\gamma$ 野生型マウス ($PPAR\gamma^{WT}$) 及び肝臓特異的 $PPAR\gamma$ 欠損型マウス ($PPAR\gamma^{KO}$) の両マウスについて、通常食群 (Control) 及び絶食群 (Fasting) の肝臓における $PPAR\gamma$, *FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA の発現を調べることにした。その結果、Fasting- $PPAR\gamma^{WT}$ の肝臓における *FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA の発現量は、Control- $PPAR\gamma^{WT}$ 肝臓に比べ、それぞれ約 14 倍及び 21 倍の値を示した (Fig. 3B-D)。Fasting- $PPAR\gamma^{KO}$ 肝臓に

における *FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA の発現は、Fasting-PPAR γ WT の肝臓と比べ、いずれも上昇し (Fig. 3B and C), PPAR γ 欠損によって低下することはなかった。PPAR γ KO の肝臓における PPAR γ 遺伝子の発現は、当然ではあるが、いずれのマウスでも極めて少ないことが確認された (Fig. 3A)。興味深いことに、Control-PPAR γ KO の肝臓における *FSP27-1a* mRNA の発現は、*FSP27-1b* mRNA の発現とは異なり PPAR γ の欠損により、著しく上昇した (Fig. 3B)。

PPAR γ は、FSP27 を介して *ob/ob* マウスの肝 TG の蓄積を促進する [1]。また、絶食肝臓でも、FSP27 は TG の蓄積を引き起こすことが明らかになっている [9, 10]。しかし、Fasting-PPAR γ WT の肝臓における TG 含量は、*FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA の発現と同様に PPAR γ 欠損によって低下することはなかった (Fig. 3D)。以上の結果より、絶食肝臓における *FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA の発現誘導は、いずれも PPAR γ に依存していないことが明らかになった。

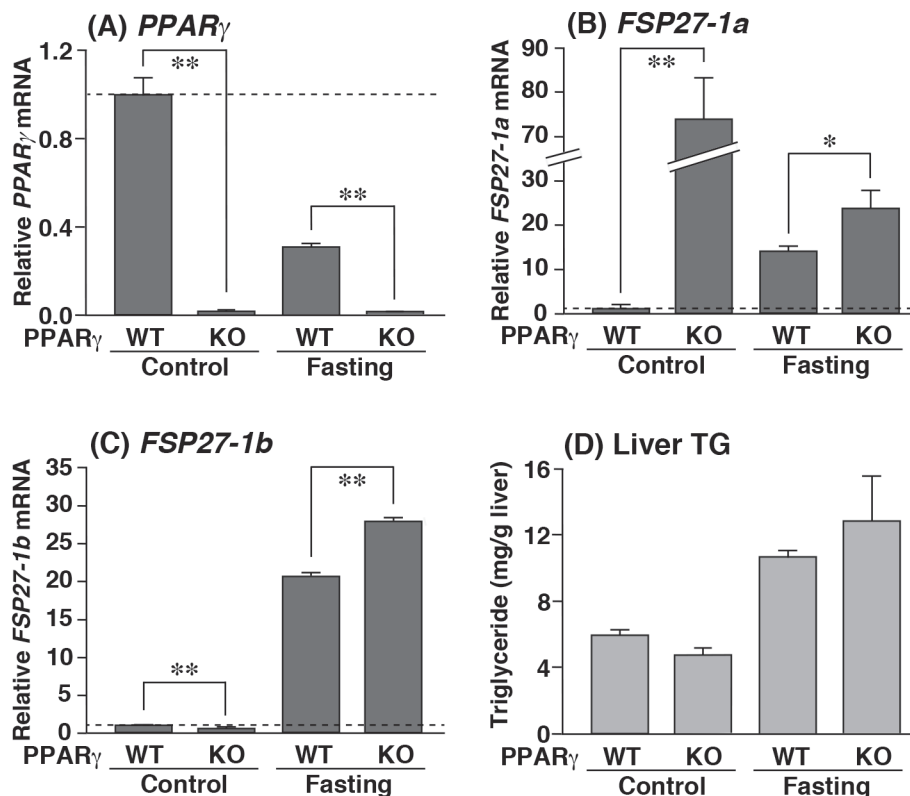


Fig.3 The induction of *FSP27* mRNAs by fasting are independent of PPAR γ .

Streptozotocin 投与マウスにおける *FSP27-1a* 及び *FSP27-1b* mRNA の発現

FSP27-1a mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA の発現は、低インスリン状態である絶食肝臓で誘導され、高インスリン状態である再摂食肝臓で著しく低下することが明らかになった。このことから、絶食・再摂食肝臓における両 mRNA の発現制御にインスリンの関与が推測された。

そこでまず、1型糖尿病モデル動物の作製に用いられている streptozotocin (STZ) 処理マウスの肝臓における PPAR γ , *FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA の発現を調べた。なお、STZ は、不可逆的・選択的に膵 β 細胞を破壊し、血中インスリンレベルの著しい低下を引き起こす [13]。STZ 処理マウスの肝臓における PPAR γ の発現は、ほとんど変化しなかったが、*FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA の

発現は、いずれもコントロールの約4倍の誘導が認められた (Fig. 4A-C)。

次に、インスリン投与によりインスリンレベルを増加させることで、絶食肝臓において誘導された *FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA の発現が低下するか否かについて検討した。絶食肝臓で誘導された両 mRNA の発現は、インスリン投与1時間後にいずれも有意に低下していた (Fig. 5A and B)。以上の結果から、*FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA の発現は、インスリンにより抑制されることが示唆された。

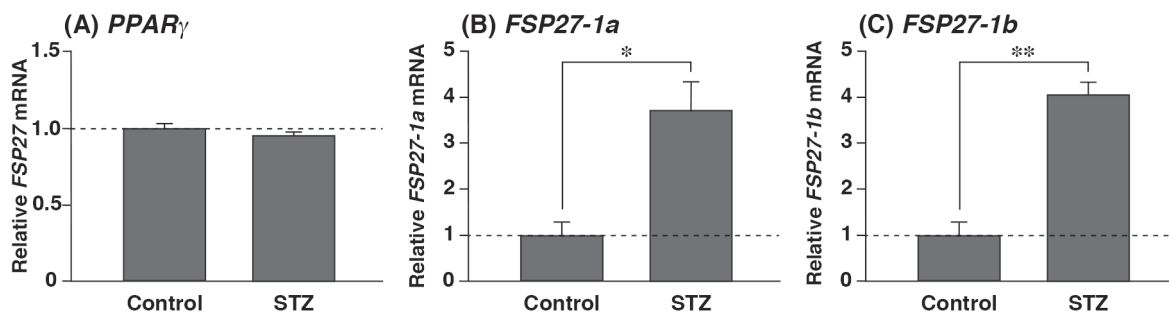


Fig.4 The expression of *FSP27* mRNAs is induced by STZ administration.

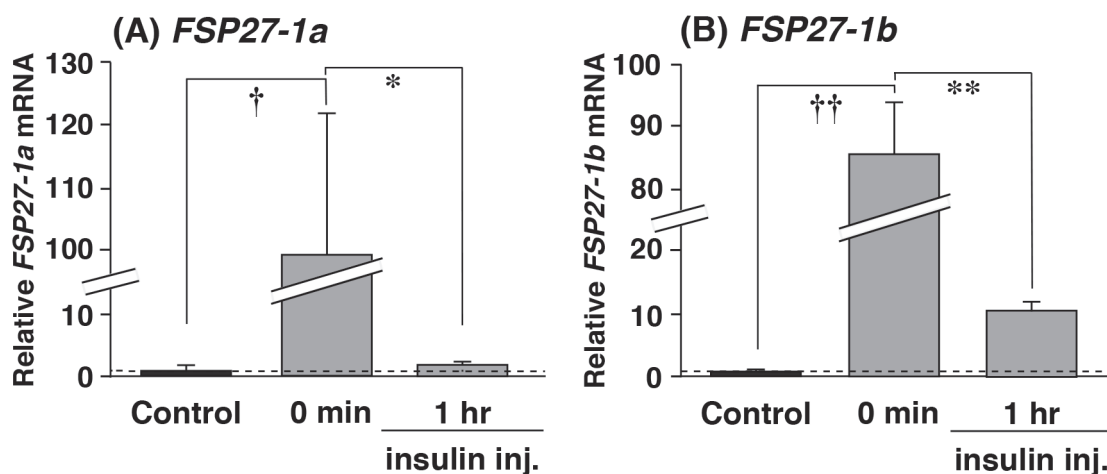


Fig.5 Fasting-induced *FSP27-1a* and *FSP27-1b* mRNAs in liver are suppressed by insulin.

【総括】

本研究において、絶食肝臓で誘導された *FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA の発現が、再摂食により劇的に抑制された。また、絶食肝臓での両 mRNA の発現誘導は、*PPAR*_γ が関与していないことも明らかになった。STZ 処理によるインスリンの枯渇は、*FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA 発現を誘導した。また、絶食により誘導された両 mRNA は、インスリンの投与により抑制された。したがって、本研究は、インスリンが、肝 *FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA 発現における負の制御因子であることを実証した。

本研究により、絶食肝臓における *FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA の発現が、インスリンによ

り制御されていることを明らかにしたことは、肝 *FSP27* 遺伝子の発現制御に、PPAR γ 以外の因子の関与を強く示唆するものである。近年、*FSP27-1a* mRNA の発現は PPAR γ によって制御されているのに対し、*FSP27-1b* mRNA の発現は、cAMP response element binding protein H (CREBH) によって制御されていることが報告された [4]。しかしながら、本研究では、PPAR γ 欠損マウスの絶食肝臓で *FSP27-1a* mRNA の発現誘導が認められた。このような異なる結果が得られた理由については、現状では明らかではない。また、インスリンがどのようなメカニズムで、*FSP27-1a* mRNA 及び *FSP27-1b* mRNA の発現を抑制しているのかについては解明できていない。

CREBH は、主に肝臓に高発現している転写因子であり [14]、肝臓における本遺伝子の発現は *FSP27* 遺伝子の発現と同様に絶食処理で上昇し、再摂食処理で低下する [15]。また、CREBH は、cAMP response element binding protein (CREB)/CREB-regulated transcriptional coactivator 2 (CRTC2) と相互作用し、標的遺伝子の転写を促進することが報告されている [15]。さらに、インスリンは salt-inducible kinase 2 の活性化を介して、転写コアクチベーター CRTC2 とそのパートナー転写因子との解離を促進することが明らかになっている [16]。これらのことから、インスリンによる *FSP27-1b* mRNA の発現抑制メカニズムとして、インスリンは CREBH と CRTC2 との解離の促進することで、CREBH 転写活性を低下させていることが考えられる。また、インスリンにより誘導される転写コリプレッサー small heterodimer partner-interacting leucine zipper protein (SMILE) が CREBH の転写活性を阻害することが報告されている [17]。よって、インスリンにより誘導された SMILE が CREBH の転写活性を阻害することで *FSP27-1b* mRNA の発現を抑制していることも考えられる。一方、インスリンによる *FSP27-1a* mRNA の発現抑制メカニズムについては、CREBH の関与も推測されるが、その詳細なメカニズムについては、今後の検討課題である。

インスリンは、脂肪合成を強力に刺激することが報告されている [18]。このことから、インスリンは、肝 *FSP27* 発現を抑制することで、脂肪蓄積から脂肪合成に切り替えるような役割を果たしている可能性がある。インスリンが絶食により誘導された *FSP27* をどのように抑制しているのか、また栄養状態及び他のホルモンが肝 *FSP27* の発現制御に関与しているかを明らかにすることで、脂肪肝を含めた生活習慣病の創薬開発に大きく貢献できるものと考えられる。

【参考文献】

1. Matsusue K, Kusakabe T, Noguchi T, Takiguchi S, Suzuki T, Yamano S, Gonzalez FJ., *Cell Metab.*, **7** 302-311 (2008).
2. Matsusue K., *Biol Pharm Bull.*, **33**, 346-350 (2010).
3. Liang L, Zhao M, Xu Z, Yokoyama KK, Li T., *Biochem., J.*, **370** 195-203 (2003).
4. Xu X, Park JG, So JS, Lee AH., *Hepatology.*, **61** 857-869 (2015).
5. Puri V, Konda S, Ranjit S, Aouadi M, Chawla A, Chouinard M, Chakladar A, Czech MP., *J. Biol. Chem.*, **282** 34213-34218 (2007).
6. Sun Z, Gong J, Wu H, Xu W, Wu L, Xu D, Gao J, Wu JW, Yang H, Yang M, Li P., *Nat Commun.*, **4**, 1594 (2013).
7. Aibara D, Matsusue K, Matsuo K, Takiguchi S, Gonzalez FJ, Yamano S., *Biol Pharm Bull.*, **36** 1766-1772 (2013).
8. Xu MJ, Cai Y, Wang H, Altamirano J, Chang B, Bertola A, Odena G, Lu J, Tanaka N, Matsusue K, Matsubara T, Mukhopadhyay P, Kimura S, Pacher P, Gonzalez FJ, Bataller R, Gao B., *Gastroenterology.*, **149** 1030-1041 (2015).

9. Lee JH, Giannikopoulos P, Duncan SA, Wang J, Johansen CT, Brown JD, Plutzky J, Hegele RA, Glimcher LH, Lee AH., *Nat Med.*, **17** 812–815 (2011).
10. Langhi C, Baldán Á., *Hepatology.*, **61** 1227–1238 (2015).
11. Vila-Brau A, De Sousa-Coelho AL, Goncalves JF, Haro D, Marrero PF., *J Lipid Res.*, **54** 592–601 (2013).
12. Aibara D., PhD Thesis. Fukuoka University., (2014).
13. Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE., *J Clin Invest.*, **48** 2129–2139 (1969).
14. Omori Y, Imai J, Watanabe M, Komatsu T, Suzuki Y, Kataoka K, Watanabe S, Tanigami A, Sugano S., *Nucl Acids Res.*, **29** 2154–2162 (2001).
15. Lee MW, Chanda D, Yang J, Oh H, Kim SS, Yoon YS, Hong S, Park KG, Lee IK, Choi CS, Hanson RW, Choi HS, Koo SH., *Cell Metab.* **11** 331 - 339 (2010).
16. He L, Sabet A, Djedjos S, Miller R, Sun X, Hussain MA, Radovick S, Wondisford FE., *Cell.*, **137** 635–646 (2009).
17. Lee JM, Seo WY, Han HS, Oh KJ, Lee YS, Kim DK, Choi S, Choi BH, Harris RA, Lee CH, Koo SH, Choi HS., *Diabetes.*, **65** 62–73 (2016).
18. Kersten S., *EMBO Rep.*, **2** 282–286 (2001).