



Role of Kruppel-like factor 15 in PEPCK gene expression in the liver

勅使川原, 匡

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2005-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3395

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003395>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 1 1 】

氏 名・（本 籍） 勅使川原 匡 （ 富山県 ）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博い第1664号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成17年3月31日

【 学位論文題目 】

Role of Krüppel-like factor 15 in PEPCK gene expression
in the liver
(肝におけるPEPCK遺伝子発現に対する Krüppel-like
factor 15 の役割)

審 査 委 員

主 査 教 授 中村 俊一
教 授 山村 博平
教 授 米澤 一仁

【 目 的 】

肝におけるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) やグルコース 6 リン酸脱リン酸化酵素 (G6Pase) などの糖新生律速酵素の遺伝子発現は、インスリンによって抑制され、インスリン拮抗ホルモンであるグルカゴンやグルココルチコイドなどによって誘導される。多くの糖尿病モデル動物では糖新生律速酵素の発現が増強しており、また、肝特異的に PEPCK や G6Pase を過剰発現させると個体レベルでの耐糖能障害を生じる。これらの知見から肝臓における糖新生律速酵素の発現の障害は糖尿病の病態形成に関わる重要な要素の一つと考えられているが、その制御機構には未だ不明な点も多い。

Krüppel-like factor 15 (KLF15) は、腎臓、肝臓、心臓に強発現し、また脂肪、骨格筋など多くの組織においても発現している C2-H2 zinc finger 型転写調節因子である。近年、脂肪細胞の分化や骨格筋での 2 型 acetyl-CoA 合成酵素遺伝子の発現を制御する転写調節因子として報告されているが、本転写因子の肝における機能についての報告は全くない。そこで、今回、肝の糖代謝関連遺伝子の発現制御における KLF15 の役割について検討した。

【 結 果 】

ノザンプロット解析の結果、肝臓はマウスの主要臓器中で KLF15 を最も高発現する臓器であることが明らかとなった。マウス肝における KLF15 の遺伝子発現は随時摂食時に比べて 24 時間絶食後に約 2 倍に増加し、絶食後再摂食を行うと 6 時間以内に随時摂食時以下のレベルにまで低下した。摂食によって肝細胞は、高濃度のインスリンやグルコースに暴露される。そこで、肝での KLF15 の遺伝子発現におけるインスリンの役割を検討するために、マウスに高インスリン正常血糖クランプ(インスリン輸注速度:2.5mU/kg/分、血糖:100~120mg/dl に維持)を行った。その結果、クランプ開始後 120 分以内に肝の KLF15 の遺伝子発現は対照の 60%程度に低下し、インスリンは肝における KLF15 の遺伝子発現を抑制することが明らかとなった。また、インスリン抵抗性モデルマウスである db/db マウスの肝において、KLF15 の遺伝子発現は増加していた。

フォスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3-K) は、インスリンの代謝調節作用の主要なエフェクター分子である。アデノウイルスベクターを用いて優位抑制型 PI3-K (AxCΔp85) をマウス肝に導入すると、インスリン受容体基質 (IRS-1、IRS-2) への結合画分にて検討したインスリン依存性の PI3-K の活性化はほぼ完全に抑制される。AxCΔp85 を投与したマウス肝では、KLF15 遺伝子の発現は約 2.5 倍に増加していた。

ラット初代培養肝細胞をグルカゴンのセカンドメッセンジャーである cAMP や合成グルココルチコイドであるデキサメサゾンによって処理すると、KLF15 の発

現は各々の薬剤により 1.5 倍～2 倍に増加した。また、両薬剤の同時処理により KLF15 の遺伝子発現は約 3 倍に増加した。この KLF15 の経時的発現変化は、PEPCK や G6Pase の遺伝子発現の変化と類似していた。

インスリンは cAMP やデキサメサゾン依存性の KLF15 の発現誘導を約 50% 抑制し、このインスリンの効果は PI3-K の薬理的阻害剤 LY294002 により抑制された。また、アデノウイルスベクターを用いて恒常的活性型 PI3-K を過剰発現させると cAMP やデキサメサゾンによって誘導される KLF15 の遺伝子発現は抑制された。以上より肝における KLF15 の遺伝子発現は、インスリン拮抗ホルモンにより正の制御を、PI3-K を介したインスリンシグナルにより負の制御を受けることが明らかとなった。

アデノウイルスベクターを用いて KLF15 をラット初代培養肝細胞に強制発現させると、PEPCK の遺伝子発現がウイルス量依存性に増加した。このとき、G6Pase 遺伝子の発現誘導はみられなかった。さらに、KLF15 を強制発現させた細胞では、cAMP やデキサメサゾンによる PEPCK 遺伝子の発現誘導は増強された。

PEPCK プロモーター領域の下流にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子を組み込んだプラスミドを導入したラット株化肝細胞を用いて KLF15 による PEPCK プロモーターの活性を解析したところ、KLF15 の発現量依存的に PEPCK プロモーターの活性化がみられた。以上の結果より、KLF15 は肝において PEPCK プロモーターを活性化することにより、PEPCK 遺伝子の発現を誘導することが示唆された。

【 考 察 】

マウス肝において、KLF15 の遺伝子発現は絶食によって誘導され、摂食によって抑制された。種々の検討からインスリン及びその拮抗ホルモンが KLF15 の遺伝子発現の変動を制御すると考えられた。肝臓におけるホルモン依存性の遺伝子発現制御は生体におけるエネルギー代謝の重要な制御因子であり、本研究成績は KLF15 のエネルギー代謝制御への関与を示唆するものと考えられた。

培養肝細胞における KLF15 の強制発現は、PEPCK のプロモーターを活性化するとともに PEPCK の遺伝子発現を誘導した。しかし、KLF15 の強制発現による PEPCK 遺伝子の発現誘導は、cAMP やデキサメサゾンなどの薬剤による誘導刺激と比べると、その程度は弱いものであった。ホルモン依存性の PEPCK の遺伝子発現誘導には、HNF4 α 、グルココルチコイド受容体、CEBP β 、FoxO1、CREB といった多くの転写調節因子が関与することが知られている。PEPCK の遺伝子発現は多くの転写因子の協調作用によって誘導されるため、KLF15 を単独で強制発現させても、cAMP やデキサメサゾンによる効果を完全には代替し得ないのかも知れない。今後、肝臓特異的な KLF15 遺伝子欠損マウスの作成などを通じて、本転写因子の肝臓における生理的機能の詳細が明らかになるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第1653号	氏 名	勅使川原 匡
論文題目	Role of Krüppel-like factor 15 in PEPCK gene expression in the liver 肝における PEPCK 遺伝子発現に対する Krüppel-like factor 15 の役割		
審査委員	主 査 中村 俊一 副 査 山下 昭平 副 査 米澤 一仁		
審査終了日	平成 17 年 2 月 21 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【はじめに】

肝臓に於けるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) やグルコース 6 磷酸脱磷酸化酵素 (G6Pase) 等の糖新生律速酵素の遺伝子発現は、インスリンにより抑制され、インスリン拮抗ホルモンであるグルカゴンやグルココルチコイド等により誘導されることが知られる。また、これらの糖新生の律速酵素の遺伝子発現の異常が糖尿病の病態形成に関わる重要な要素の一つと考えられるが、その詳細は不明である。

Krüppel-like factor 15 (KLF15) は腎臓や肝臓などに発現する C2-H2 zinc finger 型転写調節因子で、2 型 acetyl-CoA 合成酵素遺伝子の発現を制御することが知られるが、本転写因子の肝臓に於ける機能については不明である。今回、肝臓の糖代謝関連遺伝子の発現調節に於ける KLF15 の役割について検討した。

【方法】

PCR 反応により KLF15 の cDNA を増幅し、アデノウィルス発現キットを用いて KLF15 遺伝子を含むアデノウィルスを作成した。肝臓に於ける遺伝子発現の実験では、8～9 週齢の雄 C57BL/6 マウスを随時摂食或いは 24 時間絶食後肝臓を摘出し、全 mRNA を抽出し、遺伝子発現解析を行った。

【結果】

ノザンプロット解析の結果、肝臓はマウスの主要臓器中で KLF15 を最も高発現する臓器であることが明らかとなった。マウス肝臓に於ける KLF15 の遺伝子発現は随時摂食時に比べ 24 時間絶食後に約 2 倍に増加し、絶食後再摂食を行うと 6 時間以内に随時摂食時以下のレベルにまで低下した。次に、マウスに高インスリン正常血糖クランプ (インスリン輸注速度 2.5 mU/kg/分、血糖 100～120 mg/dl に維持) を行った。その結果、クランプ開始後 120 分以内に肝臓の KLF15 の遺伝子発現は対照の 60% 程度に低下し、インスリンは肝臓に於ける KLF15 の遺伝子発現を抑制することが明らかとなった。

次に、アデノウィルスベクターを用いて優位抑制型フォスファチジ

ルイノシトール 3-キナーゼ (PI3-K) をマウスの肝臓に導入すると、インスリン受容体基質への結合画分にて検討したインスリン依存性の PI3-K の活性化はほぼ完全に抑制されるが、この時 KLF15 遺伝子の発現は約 2.5 倍に増加していた。また、8CPT-cAMP やデキサメサゾンでラット初代培養肝細胞を処理すると、KLF15 の遺伝子発現は約 1.5~2 倍に増加した。更に、インスリンは 8CPT-cAMP やデキサメサゾン依存性の KLF15 の発現誘導を約 60% 抑制し、このインスリン効果は PI3-K の阻害剤 LY294002 により抑制された。一方、アデノウィルスベクターを用いて KLF15 をラット初代培養肝細胞に強制発現させると、PEPCK の遺伝子発現がウィルス量依存性に増加したが、G6Pase 遺伝子の発現誘導は認められなかった。最後に、PEPCK プロモーター領域の下流にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子を組み込んだプラスミドを導入したラット株化肝細胞を用いて KLF15 による PEPCK プロモーターの活性を解析したところ、KLF15 の発現量依存性に PEPCK プロモーターの活性化がみられた。

【考察】

培養肝細胞に於ける KLF15 の強制発現は、PEPCK のプロモーターを活性化すると共に、PEPCK の遺伝子発現を誘導した。しかし、KLF15 の強制発現による PEPCK 遺伝子の発現誘導は、8CPT-cAMP やデキサメサゾンなどの薬剤による誘導刺激と比べると、その程度は弱いものであった。今後肝臓特異的な KLF15 遺伝子欠損マウスの作成などを通して、本転写因子の肝臓に於ける生理的機能の詳細が明らかになるものと期待される。

本研究は、インスリンにより転写因子 KLF15 の遺伝子発現が抑制され、KLF15 により糖新生に関わる律速酵素の遺伝子発現が亢進することを初めて明らかにしたもので、耐糖能障害の病態を理解する上で重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。