

## 研究テーマ

### 転写調節因子KLF15の糖新生制御における役割

#### 1. はじめに

肝臓は代謝恒常性の維持に中心的な役割を果たす臓器であり、肝臓の代謝関連遺伝子の発現制御機構の破綻は、糖尿病、脂質異常症、脂肪肝といった多くの代謝異常症の発症原因となる。すなわち、肝臓の糖新生系遺伝子の発現が亢進すれば糖尿病や耐糖能障害が惹起され、脂肪酸合成系遺伝子の発現増加や脂肪酸酸化系遺伝子の発現低下は高脂血症や脂肪肝を誘導する。転写調節因子であるPPAR $\alpha$ のリガンドが高脂血症治療薬として、またPPAR $\gamma$ のリガンドが糖尿病治療薬として臨床応用されていることから、代謝関連遺伝子発現調節機構の研究は臨床応用に繋がる可能性が高いと考えられる。しかし、インスリンをはじめとしたホルモンや栄養状態の変化に対応して、どのような機構で肝臓の代謝関連遺伝子の発現が制御されるかについては、未だ不明な点が多いのが実情である。メトホルミンは世界で最も広く処方されている抗糖尿病薬である。メトホルミンは肝糖新生を抑制することにより、血糖降下作用を発揮すると考えられているが、その詳細なメカニズムは明らかではない。我々は、最近、転写調節因子KLF15が糖新生系酵素の遺伝子発現制御に重要な機能を果たす可能性を見出している<sup>1)</sup>。そこで、本研究では転写調節因子KLF15の肝糖代謝制御に対する生理機能の解析を進めるとともに、抗糖尿病薬メトホルミンの作用発現に対するKLF15の役割について検討した。

#### 2. 方法

ラット初代培養肝細胞にアデウイルスベクターを用いてKLF15やKLF15に対するshRNAを導入し、各種の遺伝子発現への影響を検討した。またアデウイルスベクターを用いてKLF15やKLF15に対するshRNAをマウス肝臓に導入し、代謝変化に及ぼす影響を検討した。またKLF15を過剰発現した。

#### 3. 結果 研究成果

ラット初代培養肝細胞にアデウイルスベクターを用いてKLF15を過剰発現すると、糖新生系酵素の律速酵素の一つであるPhosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)の遺伝子発現が増強し、shRNAによりKLF15の発現を抑制した細胞ではcAMP依存性のPEPCKの発現が抑制された。また、糖新生の基質の産生に重要な役割を担うアミノ酸異化系酵素である4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPD)の遺伝子発現もKLF15の過剰発現により刺激され、KLF15のshRNAにより抑制された。また糖新生の制御に関わることが知られている転写コアクチベーターPGC1 $\alpha$ をラット初代培養肝細胞に過剰発現すると、PEPCKやHPDの遺伝子発現は増強したが、shRNAによりKLF15の発現を抑制した細胞ではPGC1 $\alpha$ のこのような効果は著しく減弱した。また、KLF15とPGC1 $\alpha$ は共沈することも明らかとなった。以上の結果から、KLF15はPGC1 $\alpha$ と協調して、PEPCKのような糖新生自体を触媒する酵素遺伝子や糖申請の基質の産生を制御するアミノ酸異化系酵素遺伝子の発現を調節することにより糖新生の制御に関わると考えられた。

次にマウス肝臓にKLF15のshRNAを導入することにより肝臓特異的にKLF15の発現を抑制したマウスを作成しその代謝変化を検討した。C57BL6マウスにおいて肝臓特異的にKLF15の発現を抑制すると

PEPCKやglucose-6-phosphatase (G6Pase)などの糖新生系酵素遺伝子とともに、HPDに加えてalanine aminotransferase 1 (ALT1), proline dehydrogenase (ProDH), tryptophan 2, 3-dioxygenase (TD02)などのアミノ酸異化系酵素の遺伝子発現も低下した。このようなマウスでは糖新生の程度を反映するビルビン酸負荷後の血糖上昇が抑制され、KLF15はマウス個体レベルでも糖新生系酵素遺伝子及びアミノ酸異化系酵素遺伝子の発現調節を通じて糖新生の制御に関わると考えられた。肥満2型糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスの肝臓ではKLF15の発現が亢進していた。shRNAによりdb/dbマウス肝臓のKLF15の発現を抑制すると、糖新生系酵素及びアミノ酸異化系酵素遺伝子の発現は低下し、高血糖も著しく改善した。以上の結果から、KLF15はdb/dbマウスの高血糖の発症に重要な役割を担うと考えられた。

培養肝細胞をメトホルミンで処理するとPEPCKやG6Paseなどの糖新生系酵素遺伝子の発現は低下したが、この時KLF15やHPDの発現も低下した。アデノウイルスを用いてKLF15を過剰発現した細胞ではメトホルミンによるPEPCKやHPDの発現低下作用が減弱した。このことから、メトホルミンの糖新生系酵素遺伝子やアミノ酸異化系酵素遺伝子の発現低下作用の発現にはKLF15が重要な役割を担うことが示唆された。また、メトホルミンはKLF15のmRNAの発現を抑制するだけでなく、KLF15蛋白の分解を促進することにより、蛋白レベルでの発現も低下させることが明らかとなった。また、メトホルミンによるKLF15蛋白の分解亢進にはKLF15のユビキチン化が関与することも示された。

マウスにメトホルミンを持続静注すると肝臓の糖新生系酵素遺伝子やアミノ酸異化系酵素遺伝子の発現低下が低下し、グルコースクランプ法にて測定した肝糖産生が抑制された。アデノウイルスを用いて肝臓のKLF15の発現を増加させたマウスではメトホルミンによる糖新生系酵素遺伝子やアミノ酸異化系酵素遺伝子の発現低下作用や肝糖産生抑制作用が減弱した。以上の結果から、メトホルミンの血糖降下作用発現にはKLF15が重要な役割を担うことが個体レベルでも示された。

#### 4. 考察 まとめ

本研究によってKLF15が糖新生系酵素遺伝子やアミノ酸異化系酵素遺伝子の発現制御を介して糖新生の制御に関わること、肝臓におけるKLF15の発現亢進がインスリン抵抗性糖尿病の病態に深く関与することが明らかとなった。メトホルミンは従来PEPCKなどの糖新生系酵素の発現を抑制することにより、抗糖尿病作用を発揮すると考えられていたが、今回の結果からアミノ酸異化系酵素の発現抑制もメトホルミン作用の発現に重要な機能を担う可能性が示された。また、メトホルミンはKLF15のユビキチン化を促進することが明らかとなったが、今までにメトホルミンによってユビキチン化が刺激される蛋白の存在は全く知られていない。今後、KLF15のユビキチン化に関わる分子機構を明らかにできれば、メトホルミン作用機構のさらなる理解につながるものと考えられる。

#### 5. 発表論文および参考論文

- 1) Teshigawara K, Ogawa W, Mori T, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Inoue H, Miyake K, Sakaue H and Kasuga M: Role of Kruppel-like factor 15 in PEPCK gene expression in the liver. *Biochem Biophys Res Commun* 327:920-926, 2005
- 2) Takashima M, Ogawa W, Hayashi K, Inoue H, Kinoshita S, Okamoto Y, Sakaue H, Wataoka Y, Emi A, Senga Y, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Kasuga M: Role of KLF15 in regulation of hepatic gluconeogenesis and metformin action. *Diabetes in press.*