

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 研究開発領域：革新的先端研究開発支援事業「画期的医薬品等の創出をめざす脂質の生理活性と機能の解明」
2. 研究開発課題名：新規エネルギー代謝センサー分子によって制御される脂質代謝経路の解明と医療応用
3. 研究開発代表者： 関谷 元博（筑波大学 医学医療系）
4. 研究開発の成果：

申請書記載の通り、メタボリックシンドローム発症の病態に重要な代謝産物センサー分子とその代謝制御機構のアウトラインを同定したが、分子基盤の詳細は脂質合成系など明らかでない部分が多々残されており、また肝臓での解析が先行しているものの、その他の臓器・細胞での検証はこれからである。採用から本年度終了までに以下のような研究を遂行した。

1) 本代謝制御機構の脂質合成系制御機構の詳細な分子基盤を明らかにする必要があるが、*in vivo*, *in vitro* の肝臓・肝細胞での過剰発現、ノックダウンの実験系で本代謝システムが脂質合成系を制御するのに最も重要であると思われる転写因子を絞り込むことができた。またその主軸となる転写因子の発現を本代謝システムが制御する分子基盤として *in silico* 解析から上記センサー分子に結合する転写因子を同定し、共沈降実験で実際の結合を確認した。今後、本システムの脂質合成系調節機構がこうした結合蛋白によって説明されるのか、どの程度説明されるのか、どのような分子基盤に基づいているのかさらに検証していく。

2) 本申請研究で対象としているセンサー分子は 2 つのアイソフォームがあるが、両アイソフォームにつき組織特異的遺伝子欠損マウスと過剰発現マウスを作成中である。遺伝子欠損マウスに関しては片方のアイソフォームにおいて *germline transmission* を確認し、もう一方は作成中である。過剰発現マウスについては ROSA26-loxP-stop-loxP の形式で両アイソフォームについてコンストラクトを作成した。今後 CRE による誘導性過剰発現を培養細胞レベルで確認の後、マウス作成に着手する。

3) 本分子の活性化が肝臓での糖新生機構に重要な役割を果たしていることは、その分子基盤や生体内での表現型ともに十分に解析されてきたが (Sekiya M et al. manuscript in preparation)、ピルビン酸負荷試験によって糖新生系に特異的な解析を行うことで、こうした効果・表現型をさらに確認することができた。

4) 本センサー分子は脂肪酸誘導体を認識、その活性が調節されるが、その脂肪酸誘導体の組織・細胞内含有量の測定系は従来、質量分析器によるものだけであった。本研究を遂行する上で簡易に、かつ高感度で本脂肪酸誘導体を量的に測定するシステムは必須であり、生化学的手法を用いて 100pmol レベルの感度で含有量を測定可能なアッセイ系を確立した。本アッセイによって少なくとも細胞核分画レベルでの本脂肪酸誘導体の含有量が測定可能となった。

また本アッセイ系は脂肪酸の鎖長や不飽和度などを区別できないので、共同研究の形で質量分析器による解析の条件検討を開始した。本邦での質量分析器による当該脂肪酸誘導体の解析は非常に限られており、今後の遺伝子欠損マウスの臓器での解析などを考え、質量分析器による詳細な検討をすべく、解析系を立ち上げていく。