炭水化物による遺伝子発現制御 II. ピルビン酸キナーゼと インスリン遺伝子について*

山田一哉, 野口民夫*

(福井医科大学学生化学第 2, *現: 名古屋大学大学院生命農学研究科)

Key words: pyruvate kinase; insulin; gene expression; carbohydrates

高等動物の多くの細胞では、グルコースはグルコーストランスポーターにより細胞内に取り込まれて解糖系で代謝され、細胞が種々の生命現象を営むために必要なエネルギー分子である ATP に変換される。しかしながら、生体の血糖維持に重要な役割を果たしている組織である肝臓、膵臓などを構成している細胞では、グルコースは単にエネルギーに変換されるだけでなく、血糖調節ホルモンや糖質および脂質代謝に関わる酵素遺伝子の発現を正または負に制御することにより個体の恒常性の維持に寄与している。

一般的に、遺伝子の発現は 1) 転写レベル 2) 転写後レベル 3) 翻訳レベル 4) 翻訳後レベルで調節されるが、グルコースを含む炭水化物も種々のレベルでの調節に関与していることが示唆されている。

ここでは、おもに解糖系の酵素であり肝および膵β細胞で発現が認められるラット L 型ピルビン酸キナーゼアイソザイム (LPK) 遺伝子と膵β細胞で発現が認められるラットインスリン I 遺伝子について、グルコースによる転写促進機構について論じてみたい。

1. LPK 遺伝子発現

高グルコース食を投与したラットでは肝における LPKmRNA 量の著明な増加が観察される⁽¹⁾が、この効果は血中インスリンレベルに依存することおよび LPK 遺伝子の転写促進に起因することが明らかになっている^(1,2)。初代培養肝細胞にインスリンとグルコースを添加すると *in vivo* と同様 LPKmRNA 量の増加が認められるが、グルコース単独では認められな

い。また、インスリン存在下で非代謝性グルコース誘導体の 2-deoxyglucose を添加した場合には LPK-mRNA の増加は見られなくなることから、この転写促進にはグルコースが代謝される必要がある⁽³⁾と考えられる。また、ペントースリン酸側路で代謝されるキシリトールを初代培養肝細胞に添加すると、グルコースと同様の作用を示す⁽⁴⁾ことが報告されている。これらのグルコースによる効果を伝達するシグナル分子については、ヘキサースのグルコース-6-リン酸⁽⁵⁾、キシリトール代謝産物であるキシロコース-5-リン酸⁽⁴⁾、ならびにトリオースの 3-ホスホグリセリン酸やホスホエノールピルビン酸である⁽⁶⁾と報告されているが、測定条件などにより差異があり議論の余地がある。

ラット LPK 遺伝子の転写制御に関わる領域は転写開始点上流 170 bp 以内に TATA ボックスに加えて、PKL-I, -II, および -III の三つのポジティブエレメントと Nuclear factor (NF)-1 結合部位のネガティブエレメントから構成されていることが、トランスジェニックマウス^(7,8)や DNA トランスフェクション⁽⁹⁾による解析から明らかにされている (図 1)。これらのエレメントは互いに相乗的に作用することにより一つのユニットとして組織特異的遺伝子発現に寄与している⁽⁹⁾。これらのうち、L-III は 2 コピーの不完全な Ebox (CANNTG) 様配列が 5 bp 離れて存在している。このエレメントは単独ではヘテロなプロモーターに炭水化物応答能を伝達できないが、L-III を複数コピー連結するか⁽¹⁰⁾または L-II が共存することによりグルコースによる転写応答を伝達できるようになる⁽¹¹⁾ことから、L-III はそれ自身グルコース応答性エレメントであるが、アクセサリエレメントとして L-II を要求すると考えられている。

L-I には Hepatocyte nuclear factor (HNF)1⁽⁹⁾が、L-II には Nuclear factor (NF)-1 ファミリーと HNF

* Regulation of Gene Expression by Carbohydrates II: Pyruvate Kinase and Insulin Genes
Kazuya YAMADA and Tamio NOGUCHI (Department of Biochemistry, Fukui Medical University)

図1 ラットピルビン酸キナーゼL遺伝子の発現制御領域と転写因子

図2 ラットインスリンI遺伝子の発現制御領域と転写因子

文献16より改変。

4⁽¹²⁾ が, L-III には Upstream stimulating factor (USF)⁽¹⁰⁾ および未知の転写因子^(9, 13) が結合する。

また, 肝および脂肪細胞で発現しており脂肪酸代謝に関与していると思われるが生理的機能は明らかでないラット Spot14(S₁₄) 遺伝子のプロモーターにも二つの不完全な Ebox が 5 bp 離れて存在している。このエレメントも炭水化物応答性エレメント (ChoRE) であり⁽¹¹⁾, グルコースに対する完全な応答には L 型 PK 同様近接した L-II 類似配列を必要とする。ChoRE には USF および未知の因子が⁽¹³⁾, L-II 類似配列には NF-1 ファミリー⁽¹²⁾ が結合する。したがって, 炭水化物応答性転写因子は USF または未知の因子であり, アクセサリファクターは NF-1 ファミリーであると考えられる。

USF は 43 kDa の USF1 および 44 kDa の USF2 が各々ホモあるいはヘテロダイマーとして DNA に結合する basic helix-loop-helix (bHLH) タンパク質である。USF2 ノックアウトマウスの解析によりグルコ

ース応答性の遅延が報告されている⁽¹⁴⁾。また USF は NF-1 とのタンパク質間相互作用が認められているが, あらゆる組織に発現しておりその結合部位も炭水化物に応答しない数多くの遺伝子のプロモーター領域にも存在するため USF 自身では炭水化物応答性を説明できない。また, bHLH タンパク質である c-Myc を肝臓で過剰発現させた糖尿病トランスジェニックマウスにおいてもグルコース応答能の改善が報告されている⁽¹⁵⁾ ため, 少なくとも bHLH タンパク質は, 見かけ上グルコース応答性を模倣できるようである。

2. ラットインスリンI遺伝子発現

膵β細胞におけるインスリンの合成および分泌も, 血中グルコース濃度により調節されている。

ラットインスリン遺伝子にはイントロンを有さないもの (I) と有するもの (II) の二つがあるが, このうち詳細に検討されている I 遺伝子のプロモーター領域について, 図2に示した⁽¹⁶⁾。

I 遺伝子では, -350 bp 内に膵β細胞における発現

に必要なすべてのエレメントが含まれていることが、トランスジェニックマウスやトランスフェクションの結果から示されている⁽¹⁶⁾。この領域には、TATAbox, GAGAbox, cAMP 応答性配列 (CRE), Ebox (Nir および Far), TAATbox (Flat および P1) が存在し、それぞれ図に示したようなタンパク質が結合する。これらのうち、最も重要なのは Ebox と TAATbox である。これらのエレメントは各々単独では機能しないが共存すると機能するようになる。このうち Far と Flat が相乗的に作用して組織特異的発現に寄与することから特に FFmini-enhancer と名づけられている⁽¹⁶⁾。グルコース応答性エレメントの報告は、利用する細胞によって Far あるいは Flat と違いがあるが FFmini-enhancer 内にマップされている⁽¹⁷⁾。

Far には IEF-1 が結合し、Flat には IPF-1, Isl 1, Imx-1, cdx-3, HNF1a などのホメオタンパク質群が結合する⁽¹⁶⁾。このうち IPF-1 の DNA への結合はグルコース刺激によりリン酸化に依存して速やかに誘導される⁽¹⁸⁾。

IEF-1 は、bHLH タンパク質である E47 と β -cell E-box transcriptional activator (BETA)-2 のヘテロダイマーである⁽¹⁹⁾が、E47 は Flat に結合する Imx1 との機能的相互作用が知られている⁽²⁰⁾。

膵におけるインスリン遺伝子の発現には PI3-キナーゼや stress-activated MAP キナーゼ経路の阻害剤処理を行った細胞では IPF-1 の DNA 結合能が低下しているという報告がある⁽²¹⁾。

3. おわりに

以上 L 型 PK とインスリン遺伝子について述べてきたけれども、これ以外にも脂肪細胞におけるアセチル CoA カルボキシラーゼ遺伝子のグルコースによる転写促進に GC ボックス結合タンパク質である Sp1 が関与していることが報告されている⁽²²⁾。

炭水化物による遺伝子の促進機構の研究は、おもにグルコース応答性塩基配列の同定、それに結合する因子の同定、および鍵となるシグナル伝達分子の同定という方向で進んできた。現在までに細胞や応答する遺伝子により関与する転写因子に違いがあることが明らかになっている。

いずれの系においても炭水化物に応答するためには一つの因子では不十分で複数の因子の相互作用が必要であるためユニットとして機能していると考えられ

る。グルコース刺激による個々の因子のリン酸化や脱リン酸化による質的調節の可能性とともにこれら複数の因子と直接作用する第 3 の炭水化物応答性転写調節因子の存在の可能性も否定できない。

また、基本転写因子やシグナル伝達系酵素との関わりについてはいまなお明らかになっていないことが多く、今後の研究の進展が興味深い。

- (1) T. Noguchi, H. Inoue, and T. Tanaka: *J. Biol. Chem.*, **260**, 14393-14397 (1985).
- (2) T. Matsuda, T. Noguchi, M. Takenaka, K. Yamada, and T. Tanaka: *J. Biochem.*, **107**, 655-660 (1990).
- (3) T. Matsuda, T. Noguchi, K. Yamada, M. Takenaka, and T. Tanaka: *J. Biochem.*, **108**, 778-784 (1990).
- (4) B. Doiron, M.-H. Cuif, R. Chen, and A. Kahn: *J. Biol. Chem.*, **271**, 5321-5324 (1996).
- (5) F. Mourrieras, F. Foulle, M. Forentz, J. Morin, S. Bouche, and P. Ferre: *Biochem. J.*, **326**, 345-349 (1997).
- (6) R. Kang, K. Yamada, T. Tanaka, T. Liu, and T. Noguchi: *J. Biochem.*, **119**, 162-166 (1996).
- (7) T. Noguchi, M. Okabe, Z. Wang, K. Yamada, E. Imai, and T. Tanaka: *FEBS Lett.*, **318**, 269-272 (1993).
- (8) M.-H. Cuif, A. Porteu, A. Kahn, and S. Vaulont: *J. Biol. Chem.*, **268**, 13769-13772 (1993).
- (9) K. Yamada, T. Noguchi, T. Matsuda, M. Takenaka, P. Monaci, A. Nicosia, and T. Tanaka: *J. Biol. Chem.*, **265**, 19885-19891 (1990).
- (10) M.-O. Bergot, M.-J. M. Diaz-Guerra, N. Puzenat, M. Raymondian, and A. Kahn: *Nucl. Acids Res.*, **20**, 1871-1878 (1992).
- (11) H.-M. Shih, Z. Liu, and H. C. Towle: *J. Biol. Chem.*, **270**, 21991-21997 (1995).
- (12) K. Yamada, T. Tanaka, and T. Noguchi: *Biochem. J.*, **324**, 917-925 (1997).
- (13) E. N. Kaytor, H. -M. S., and H. C. Towle: *J. Biol. Chem.*, **272**, 7525-7531 (1997).
- (14) V. S. Vallet, A. A. Henrion, D. Bucchini, M. Casado, M. Raymondjean, A. Kahn, and S. Vaulont: *J. Biol. Chem.*, **272**, 21944-21949 (1997).
- (15) E. Riu, F. Bosch, and A. Valera: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 2198-2202 (1996).
- (16) K. Docherty and A. R. Clark: *FASEB J.*, **8**, 20-27 (1994).
- (17) M. S. German and J. Wang: *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 4067-4075 (1994).
- (18) W. M. MacFarlane, M. L. Read, M. Gilligan, I. Bujalska, and K. Docherty: *Biochem. J.*, **303**, 626-631 (1994).

- (19) F. J. Naya, C. M. M. Stellrecht, and M.-J. Tsai:
Genes & Dev., **9**, 1009-1019 (1995).
 - (20) M. S. German, L. G. Moss, J. Wang, and W. J.
Rutter: *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 1777-1788 (1992).
 - (21) K. Docherty, W. M. Macfarlane, M. L. Read, S. B.
Smith, M. E. Wilson, I. Bujalska, and M. Gilligan:
Biochem. Soc. Trans., **24**, 368-372 (1996).
 - (22) S. Daniel and K.-H. Kim: *J. Biol. Chem.*, **271**, 1385-
1392 (1996).
-