

[研究区分： 科研費獲得支援]

研究テーマ： 新規リン脂質結合タンパク質欠損マウスの雄肥満原因の解明と抗男性肥満薬開発への応用	
研究代表者： 生命環境学部 生命科学科 教授・小西博昭	連絡先： hkonishi@pu-hiroshima.ac.jp
共同研究者：	
【研究概要】 新規リン脂質結合タンパク質 CLPABP をノックアウト (KO) したマウスは正常に発生・発育する。しかし、生後 6 ヶ月を過ぎたマウスのオスは野生型のオスマウスに比較し肥満傾向にあった。CLPABP は精巣で高い発現を示すことを見出し、さらに生後間もない精巣での発現は低く、週令が高い方が発現が増えるというユニークな特徴をもつことがわかった。このことはオス KO マウスの表現型が週令の高い個体にもみられることの原因であると示唆され、今後 CLPABP の役割についてさらに詳細な解析を行う予定である。	

【背景・目的】

CLPABP (Cardiolipin (CL) and Phosphatidic acid (PA)-binding protein) は上皮細胞増殖因子 (EGF) 刺激によりチロシンリン酸化されるタンパク質の網羅的解析から見出された 611 個のアミノ酸からなるタンパク質であり、アミノ末端側に 2 つのプレックストリン相同 (PH) 領域を持つ。PH 領域は様々なリン脂質に結合する部位であることが知られており、CLPABP の PH 領域にはカルジオリピン (CL) とホスファチジン酸 (PA) が特異的に結合した。これまでの解析により、EGF や酸化ストレス刺激により 305 及び 456 番目のチロシンがリン酸化されることを明らかにしている。CLPABP はアミノ末端側に 2 つの PH 領域を持つが、培養細胞内におけるその局在は微小管及びミトコンドリア表面に局在した。一般的に PH 領域は細胞膜に存在する様々なリン脂質に結合し、それを有するタンパク質は細胞増殖因子刺激などに応じて細胞膜へ移行することが知られているが、CLPABP の局在はそれと大きく異なった。このタンパク質の生理機能を解析するために CLPABP のコンディショナル KO マウスを作製した。1p36 に存在するヒト CLPABP ゲノム遺伝子は、マウスでは第 4 染色体に存在し、16 のエクソンからなる。マウス CLPABP 染色体遺伝子中のエクソン 2 と 8 付近に *IoxP* 配列を挿入した ES 細胞を相同組換えにより樹立した。キメラマウス産出後、フリッパーゼ発現トランスジェニック (Tg) マウスとの交配により、KO ベクター由来のネオマイシン遺伝子を除去した。さらに、マウス中のどの臓器でも発現可能である CAG プロモーター下流で Cre リコンビナーゼを発現する Tg マウスとの交配を行い、結果的に全身で CLPABP が発現できないマウスを産出した。また、10 世代までの戻し交配も終了している。本研究では、CLPABP ノックアウト (KO) マウスおよび野生型 (WT) マウスおよびそれらの胎児から得た細胞 (MEF) を用いて、マウス個体および培養細胞レベルにおいて CLPABP の有無により生じる差異を見出し、その結果から CLPABP の生理機能を明らかにすることを目的として行った。

【主な方法】

MEF は胎生 13.5 日目の胚から作製し、10% 血清入り DMEM 培地で培養した。その細胞からの total RNA の抽出は RNeasy キット (QIAGEN) を用いた。得られた RNA による DNA マイクロアレイ (酸化ストレス関連遺伝子 219 種) はクラボウ (株) に委託し行った。酸化ストレスは *tert*-Butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH) 暴露により行い、それによる死細胞はトリ

パンブルー染色した後、生細胞数を計測した。マイクロアレイの結果から両 MEF 間で発現量の差が見られたいくつかの候補遺伝子について RT-PCR による転写産物量の解析を行い、必要に応じてリアルタイム PCR で定量した。RNA の安定性は細胞にアクチノマイシン D を添加した後、経時的に RNA を抽出し、その時点で細胞内の目的遺伝子の転写産物を RT-PCR により検出することで解析した。

【結果】

この KO マウスは正常に生まれ、半年後も外見上の異常は見られず、繁殖能に関しても正常であった。しかし、雄 KO マウスの体重（平均 34 g 前後（24 週齢））は同週齢のヘテロ KO および野生型マウス雄（ともに約 27 g 前後）と比較して重いことが明らかとなった。肥満状態の雄 KO マウスの白色脂肪重量はヘテロ KO マウスの 4 倍に増え、肝臓重量が約 1.7 倍に肥大し、しかも脂肪肝気味に白色化していることを見出した。また、精嚢が大きく肥大することもわかった。しかし、これらの現象が比較的週令の遅いオスのみに見られることから、精嚢における経時的な CLPABP の転写量を RT-PCR で調べたところ、産後間もない個体よりも生後数ヶ月経った個体の方が発現が明らかに多いことがわかった。

一方で、MEF 細胞を用いた解析では、マイクロアレイ解析の結果、いくつかの遺伝子の転写量が WT-MEF に比較して KO-MEF において増加した。その中には細胞増殖因子やストレス耐性獲得因子などが含まれていた。CLPABP の過剰発現細胞はアポトーシスになることをこれまでの解析で見出しているが、CLPABP を持たない KO-MEF は WT-MEF よりも *t*-BuOOH による酸化ストレスに強いことが明らかとなった。また、リアルタイム PCR の結果から、KO-MEF での転写量が WT-MEF の約 8 倍であった IL-6 の mRNA について、その理由を転写レベルおよび転写後の安定性の両面から検討した。その結果、KO-MEF 中の IL-6 の mRNA は WT-MEF 中よりも安定性が高いことが示唆された。

【今後の予定と展望】

今後は、雄の CLPABP KO マウスの高齢時の生殖機能を精子形成や、精嚢の形態や機能および男性ホルモン産生能などに着目して解析していく予定である。

これまでの解析より、CLPABP は精嚢において RNA の安定性に関与し、精嚢の形成や雄特異的ホルモン生産に関与していることが示唆された。ヒト男性においてメタボリック症候群は大きな問題であり、原因は生活習慣を含む様々な要因が考えられる。CLPABP はマウスにおいて中年から高年時に発現が増える特徴を持ち、それが作られないマウスは肥満や、生殖器関連に異常が出るというメタボリック症候群や、男性更年期に見られる疾病に似た症状を示す。本研究をさらに発展させ、その原因の詳細を明らかにすることで、ヒトメタボリック症候群のモデルマウスになる可能性がある。また、ヒト生体内での CLPABP の機能は全くと言ってよいほど不明である。もしかしたら、中年時に CLPABP の機能が落ちやすい体質の場合は、様々な中年特異的な病態につながるのかもしれない。それが本当であれば、メタボリック症候群の診断薬や治療薬の開発に寄与できることが期待される。