

- H., Hoshino, K., Kaisho, T., Kuwata, H., Takeuchi, O., Takeshige, K., Saitoh, T., Yamaoka, S., Yamamoto, N., Yamamoto, S., Muta, T., Takeda, K., & Akira, S. (2004) *Nature*, 430, 218–222.
- 10) Yamazaki, S., Muta, T., Matsuo, S., & Takeshige, K. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 1678–1687.
- 11) Motoyama, M., Yamazaki, S., Eto-Kimura, A., Takeshige, K., & Muta, T. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 7444–7451.
- 12) Matsuo, S., Yamazaki, S., Takeshige, K., & Muta, T. (2007) *Biochem. J.*, 405, 605–615.
- 13) Kayama, H., Ramirez-Carrozzi, V.R., Yamamoto, M., Mizutani, T., Kuwata, H., Iba, H., Matsumoto, M., Honda, K., Smale, S. T., & Takeda, K. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 12468–12477.
- 14) Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T.T., Cominelli, F., & Kollias, G. (1999) *Immunity*, 10, 387–398.
- 15) Cheng, J.D., Ryseck, R.P., Attar, R.M., Dambach, D., & Bravo, R. (1998) *J. Exp. Med.*, 188, 1055–1062.

山崎 創

(九州大学大学院医学研究院分子細胞生化学分野)

Regulation of inflammatory genes by the nuclear protein IκB-ζ
Soh Yamazaki (Department of Molecular and Cellular Biochemistry, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan)

脂肪酸の質の違いがもたらすインスリン抵抗性への影響—長鎖脂肪酸伸長酵素 Elovl-6 の解析から—

1. インスリン抵抗性研究の背景

多くの疫学エビデンスから、インスリン抵抗性は、2型糖尿病の病態のみならず動脈硬化症すなわち心血管疾患の発症リスクとして早期からの管理が求められている。脂肪毒性仮説とも呼ばれるが、細胞、組織内に脂質が蓄積することとインスリン作用障害の関連が注目されている。脂質蓄積に伴う種々の細胞内ストレス（活性酸素などの酸化ストレス、ER ストレス、ミトコンドリアストレス等）の視点から、その病態機序の解析が進んでいる。しかし多くの場合脂質蓄積の量的変動が主たる問題で、蓄積している脂質の質の違いには今まであまり関心が払われていなかった。ところが最近我々は組織脂質の量だけでなく質の変化がインスリン抵抗性に重要な影響を与えることを観察した¹⁾。

2. 内因性脂肪酸合成：sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1c の生理と病態

細胞内における内因性脂肪酸合成は、SREBP-1c が制御しており、生体のエネルギー貯蔵システムの主要な役割を果たしている^{2,3)}。細胞内において飽和脂肪酸はSREBP-1c を活性化し脂肪酸合成には feedback が掛からない。一方、多価不飽和脂肪酸はこれを抑制することにより内因性脂肪酸合成や血中トリグリセリドを低下させる。我々はエネルギー代謝の破綻に伴うこの転写因子の活性化が、組織の脂質蓄積とその機能異常特にインスリン作用の障害を来すことを観察してきたが⁴⁻⁸⁾、細胞内脂肪酸の不飽和度は、その合成制御や病態に深く関与している^{9,10)}。一方、脂肪酸の鎖長による影響については、その多くが未だ不明であった。

細胞内の主要な脂肪酸である炭素数 16–18 の脂肪酸はほ乳類動物細胞における内因性脂肪酸合成の主要産物であり、エネルギー代謝、生体膜の流動性の調節、細胞膜やホルモンの構成材料等として細胞の生命活動に重要である。長鎖脂肪酸合成はいくつかの酵素によるステップからなる。なかでも細胞質に存在する脂肪酸合成酵素 (fatty acid synthase; FAS) は脂肪酸合成において主要な役割を担うが、この FAS によって合成される脂肪酸はパルミチン酸 (16:0) までである。主要な最終産物オレイン酸 (18:1n-9) やバクセン酸 (18:1n-7) は炭素数 18 であり、16 から 18 への鎖長伸長を別の酵素が担うはずである (図 1)。Stearoyl-CoA desaturase (SCD) は飽和脂肪酸ステアリン酸 (18:0) およびパルミチン酸 (16:0) に二重結合を導入し、オレイン酸 (18:1n-9) およびパルミトオレイン酸 (16:1n-7) を産生する。以前よりパルミチン酸およびパルミトオレイン酸にマロニル CoA から 2 個の炭素を付加してステアリン酸 (18:0) およびバクセン酸を合成する酵素活性が ER 分画に確認されていたものの、その遺伝子の同定はなされていなかった。FAS は細胞質で反応する一方、それ以降の鎖長伸長や不飽和化をつかさどる酵素は小胞体膜上に存在する。FAS とは異なる酵素が異なる場所で作用することから、炭素数 16 から 18 への伸長反応に特異的な機能や意義があることが示唆される。

3. 脂肪酸伸長酵素 Elovl-6 の同定

我々は SREBP-1a トランスジェニックマウスの肝臓の DNA マイクロアレイ解析により、新規 SREBP 標的遺伝子を探した。その結果、野生型と比較して SREBP-1a トラ

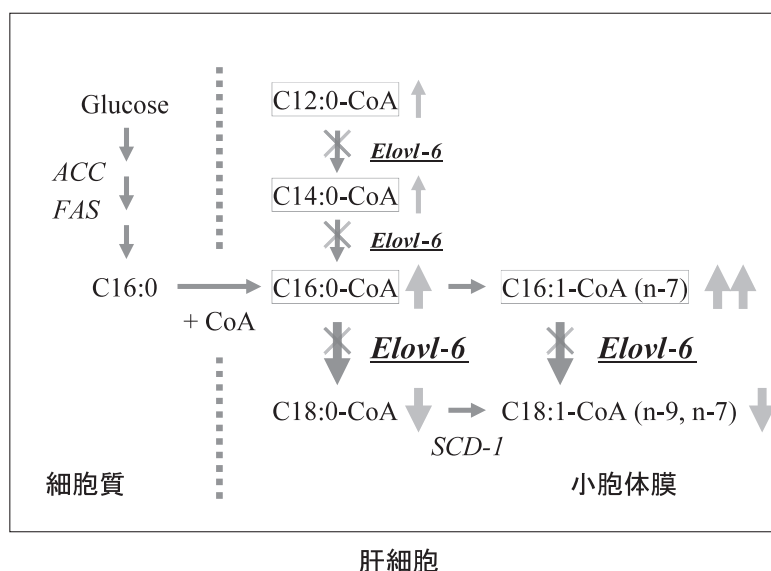


図1 脂肪酸合成系における長鎖脂肪酸伸長酵素 Elovl-6 の役割と Elovl-6 欠損マウスにおける脂肪酸組成の変化 (文献1より改変)

シスジェニックマウスの肝臓で 20 倍発現増加している新規遺伝子を見出した¹¹⁾。全長クローニングの結果、この新規遺伝子の配列から予想されるタンパク質は 267 アミノ酸よりなり、5 箇所膜貫通領域、小胞体の電子伝達系に特徴的な HXXHH モチーフ、小胞体膜タンパク質に特徴的な C 末端の KKXX-like モチーフを持っていた。これらは脂肪酸伸長酵素ファミリーに認められる特徴であり、細菌などの既知の脂肪酸伸長酵素のアミノ酸配列とは 30-40% の相同性を示した。ほ乳類における新規脂肪酸伸長酵素である可能性が高いことから、過剰発現細胞を用いて酵素活性を解析したところ、炭素数 16 を中心に、C12-16 の飽和および一価不飽和脂肪酸 (12:0, 14:0, 16:0, 16:1n-7) の伸長活性を有することが明らかとなり、fatty acyl-CoA elongase と名づけた。ほぼ同時期に複数のグループから同じ酵素のクローニングが報告され^{12,13)}、現在データベースでは Elovl-6 という名前で統一されている)。したがって、Elovl-6 が未同定の 16:0→18:0 の脂肪酸伸長酵素である可能性が期待された。図 1 に示すように、細胞質で FAS により合成された 16:0 が小胞体膜へ輸送され、そこで Elovl-6 と SCD-1 が連続的に反応して脂肪酸合成の主要な産物である 18:1 の合成が行なわれると考えられる。

4. Elovl-6 の発現調節機構^{11, 14)}

マウスの全身組織で Elov1-6 の発現を検討したところ、肝臓、白色・褐色脂肪組織、脳、副腎、精巣、皮膚などの

脂質合成の活発な組織で高発現が認められた。トランスジェニックマウスの解析によればすべての SREBP アイソフォームが肝臓の Elovl-6 発現を活性化させる。また栄養条件による Elovl-6 発現の変化を野生型および SREBP-1 欠損マウスで検討したところ、肝臓および脂肪組織の Elovl-6 発現は絶食により減少して再摂食により著増すること、SREBP-1 欠損マウスでは再摂食時の発現が抑制されることが明らかとなった。また肝臓のリポジェニック酵素の発現および活性が多価不飽和脂肪酸 (PUFA) により抑制されることが多くの研究で示されているが、Elovl-6 発現も PUFA の摂取により抑制された。したがってリポジェニック組織における Elovl-6 発現は栄養状態により調節され、SREBP-1 により制御されることが示唆された。最近我々は、マウス Elovl-6 プロモーター解析を行い、-140bp, -400bp 近傍に SREBP 結合部位 (SRE) を 2 箇所見だし、近傍の SRE が主なシスエレメントであり、Elovl-6 が SREBP の直接の標的であることを確認している^[14]。

5. Elovl-6 欠損マウスの解析¹⁾

Elavl-6 の持つ脂肪酸伸長活性, SREBP による活性化, 再摂食による発現増加, および多価不飽和脂肪酸による発現抑制などから, Elavl-6 は SREBP-1 により制御される新規リポジェニック酵素であり, 生体内における長鎖脂肪酸合成に重要な役割を果たしていることが予想される. Elavl-6 が生体における 16:0→18:0 の脂肪酸伸長酵素で

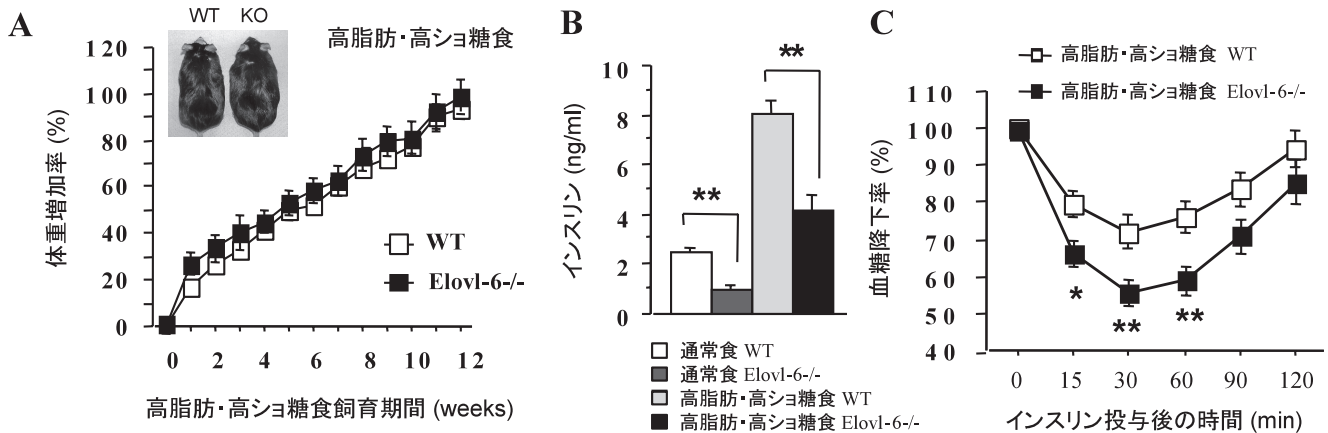


図2 Elovl-6 欠損マウスの表現型

(A)高脂肪・高シヨ糖食による体重増加率. (B)血清インスリン値. (C)インスリン負荷試験. Elovl-6 欠損マウスは高脂肪・高シヨ糖食負荷により肥満になるが、インスリン抵抗性を惹起しない. (文献1より改変)

あることの確認の目的と、その生理、病態意義を検討するため、Elovl-6 欠損マウスを作製した。

Elovl-6 欠損マウスの2/3は胎生致死であった。生まれてきた Elovl-6 欠損マウスは野生型マウスと比較して著明な異常は観察されないが、生後より一貫して体重がやや軽く、脂肪組織重量の低下、血中インスリンおよびレプチン値が低下していた。血清脂質含量、肝臓脂質含量にも差は認められなかった。

この欠損マウスの肝臓ミクロソーム分画における16:0→18:0反応は、95%が抑制されており、Elovl-6がこの脂肪酸伸長を担う責任酵素であることが確認された。通常食または肝臓の脂肪酸 *de novo* 合成を活性化する高シヨ糖・無脂肪食を与えて肝臓より抽出した総脂質の主要脂肪酸分画を測定したところ、予想どおり生体内においても Elovl-6 が炭素数16から18への鎖長伸長（パルミチン酸（16:0）からステアリン酸（18:0）、パルミトオレイン酸（16:1n-7）からバクセン酸（18:1n-7））を担っていることが確認され、またこれに伴い炭素数16脂肪酸（16:0, 16:1）の増加、炭素数18脂肪酸（18:0, 18:1）の減少、不飽和/飽和脂肪酸比（16:1/16:0）の増加など、様々な興味深い脂肪酸組成の変動が認められた（図1）。Elovl-6の欠損がエネルギー代謝や肥満に及ぼす影響を検討するため、野生型および Elovl-6 欠損マウスに高エネルギー食である高脂肪・高シヨ糖食を負荷し、糖脂質代謝、生活習慣病病態への影響を解析した。既に知られているように高脂肪・高シヨ糖食により野生型マウスの体重は急速に増加し、肥満、脂肪肝、高血糖、血中インスリン・レプチンの上昇といった生活習慣病病態を認めた（図2A, B）。Elovl-

6 欠損マウスも野生型マウスとほぼ同様の体重増加率を示し、肥満、脂肪肝を呈したが、野生型と比較して絶食および自由摂食時のインスリン値の有意な低下が見られた。糖負荷試験では、通常食では野生型マウスと Elovl-6 欠損マウスに差は認められないが、高脂肪・高シヨ糖食飼育下では、Elovl-6 欠損マウスのインスリン値は有意に低値を示し、通常食野生型マウスとほぼ同様の低値であった。インスリン負荷試験では、通常食では野生型マウスと Elovl-6 欠損マウスに差は認められなかったが、高脂肪・高シヨ糖食負荷により野生型マウスで認められる血糖降下率の減弱すなわちインスリン抵抗性が、Elovl-6 欠損マウスでは普通食時レベルまで改善しており、インスリン感受性が保たれていた（図2C）。また高脂肪・高シヨ糖食飼育下の野生型マウスに認められる膵ランゲルハンス氏島の肥大・増殖が Elovl-6 欠損マウスでは認められず、そのサイズは通常食飼育下のマウスとほぼ同様であった。このことから、高脂肪・高シヨ糖食下での Elovl-6 欠損による末梢インスリン抵抗性の改善が示唆された。

肝臓、白色脂肪組織、骨格筋といったインスリン感受性組織におけるインスリンシグナルを解析し、いずれの組織でのインスリン感受性が保持されているかを検討した。インスリン刺激による Akt タンパク質のリン酸化を調べた結果、高脂肪・高シヨ糖食負荷により野生型マウスの肝臓、脂肪、骨格筋における Akt のリン酸化は抑制されたが、Elovl-6 欠損マウスでは肝臓における Akt のリン酸化が、高脂肪・高シヨ糖食負荷によっても通常食の場合とほぼ同レベルに保たれていた（図3A）。一方、骨格筋、脂肪組織では Elovl-6 欠損マウスでも野生型マウスと同様に高脂

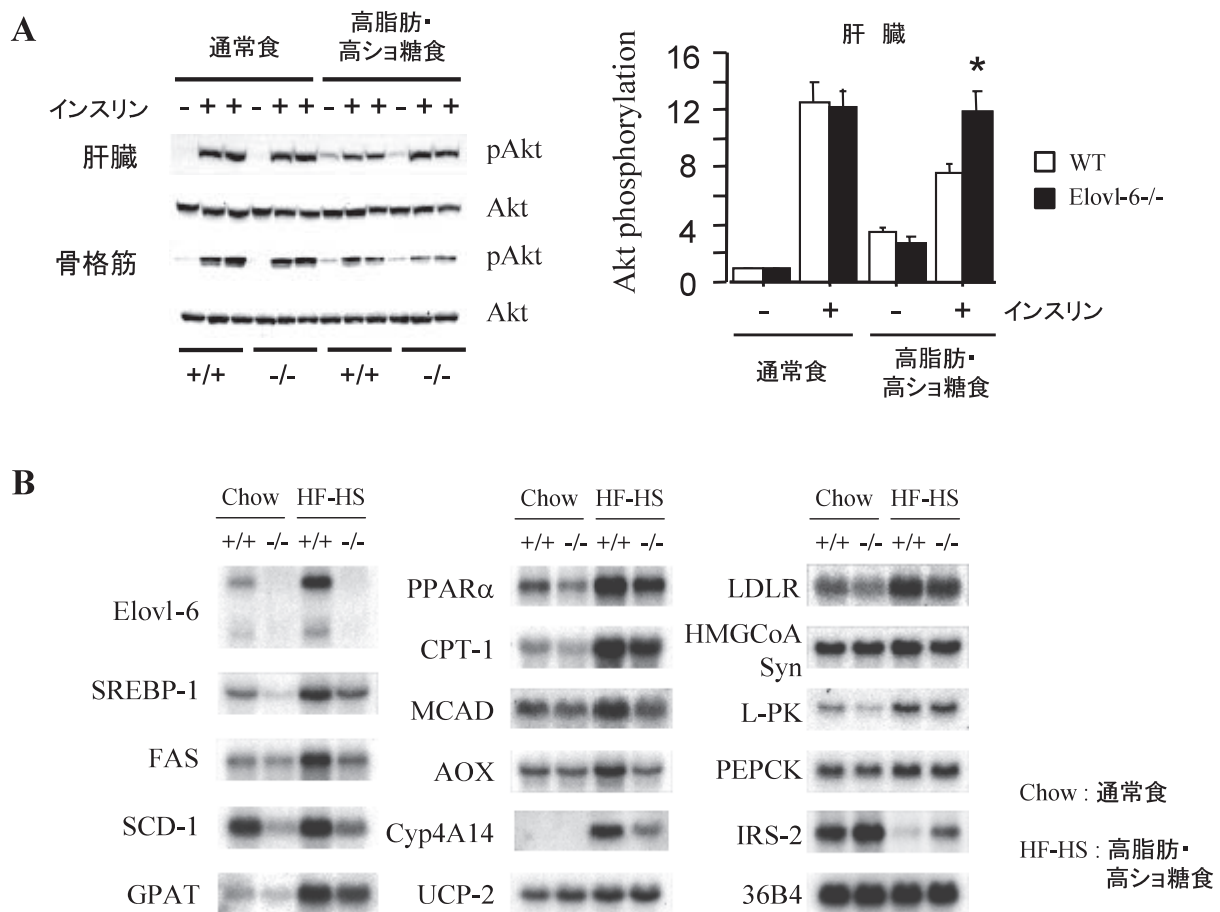


図3 Elovl-6 欠損マウスの肝臓におけるインスリン感受性, エネルギー代謝関連遺伝子発現

(A) 肝臓および骨格筋におけるインスリンシグナルの検討。(B) 肝臓における糖・脂質代謝関連遺伝子発現。Elovl-6 欠損マウスの肝臓では脂肪酸組成の変化の結果, エネルギー代謝関連遺伝子の発現が変化し, インスリン感受性が維持される。(文献1より改変)

肪・高シヨ糖食負荷によって Akt のリン酸化は抑制された。したがって, 高脂肪・高シヨ糖食下での Elovl-6 欠損マウスの末梢インスリン感受性の亢進は, 肝臓におけるインスリンシグナルの保持によるものと考えられる。このことは, Elovl-6 欠損マウスの各組織における脂肪酸組成について肝臓での変化が最も顕著であり, 骨格筋や脂肪組織では変化が少なかったことも一致しており, Elovl-6 欠損による脂肪酸組成の変化が肝臓のインスリン感受性に影響を及ぼしているものと考えられる。

Elovl-6 欠損マウスの肝臓におけるインスリン感受性亢進メカニズムのヒントを得るため, 通常食および高脂肪・高シヨ糖食による野生型および Elovl-6 欠損マウスの肝臓におけるエネルギー代謝関連遺伝子の発現を解析した (図3B)。高脂肪・高シヨ糖食によって野生型マウスでは

SREBP-1, FAS, SCD-1 などの脂肪酸合成系遺伝子の発現が増加したが, Elovl-6 欠損マウスではその発現増加が抑制されていた。特に SCD-1 の発現は通常食, 高脂肪・高シヨ糖食とともに顕著に低下した。また peroxisome proliferators activated receptor (PPAR) α, acyl-CoA oxidase (AOX) などの脂肪酸 β 酸化系遺伝子の発現も Elovl-6 欠損マウスで低下した。実際に Elovl-6 欠損マウスの肝細胞では脂肪酸合成, 脂肪酸酸化がともに低下していた。さらに興味深いことに, 肝臓における主要なインスリンシグナルメディエーターである IRS-2 発現が通常食, 高脂肪・高シヨ糖食とともに Elovl-6 欠損マウスで増加しており, 肝臓のインスリン感受性亢進に関与していると考えられた。Elovl-6 欠損マウスにおける IRS-2 発現亢進のメカニズムとして, SREBP-1 の発現低下が考えられる。以前報告し

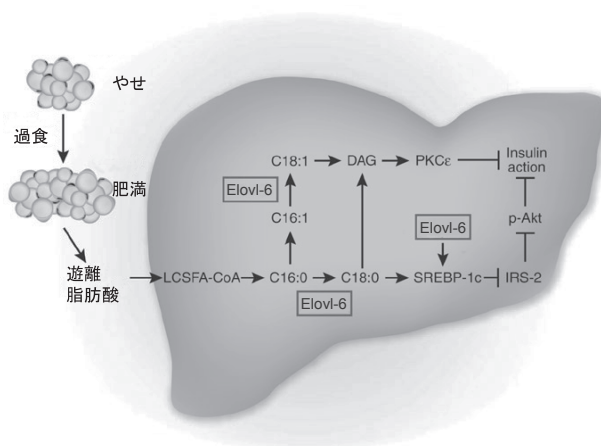


図4 Elovl-6欠損マウスの肝臓におけるインスリン感受性亢進メカニズム（文献9より改変）

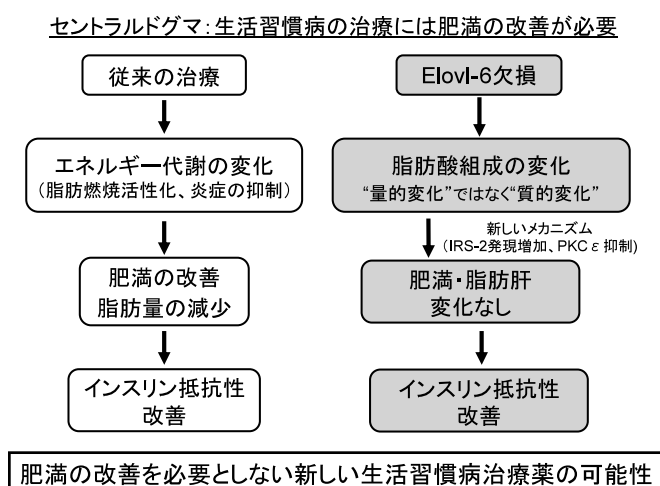


図5 インスリン抵抗性の新しい治療戦略コンセプト

たように肝臓において、SREBP-1はIRS-2プロモーター上に存在するSRE配列に直接結合し、IRS-2の発現を転写レベルで抑制する⁵⁾。したがって、Elovl-6欠損マウスの肝臓では、脂肪酸組成の変動の結果エネルギー代謝関連遺伝子の発現が変化し、SREBP-1の抑制、IRS-2の増加などが生じる結果、IRS-2/Aktシグナルが改善し、高脂肪・高シヨ糖食によるインスリン抵抗性を回避していると考えられる。また最近脂肪肝におけるインスリン抵抗性の機序として報告されているprotein kinase C (PKC) ϵ の関与を検討したところ高脂肪・高シヨ糖食による肝臓のdiacylglycerol (DAG) 含量の増加とPKC ϵ の活性化がElovl-6欠損マウスの肝臓では抑制されており、インスリン感受性維持のひとつのメカニズムと考えられた(図4¹⁵⁾)。このようにElovl-6欠損マウスの解析から、Elovl-6による脂肪酸組成の変化

がエネルギー代謝遺伝子発現の重要な決定因子であり、生活習慣病発症の鍵を握ることが明らかとなった。

6. おわりに

これまで身体組織に脂質が蓄積することが肥満、糖尿病、高脂血症などの生活習慣病発症メカニズムと推測され、特に動物性脂肪の過剰摂取がその主因として考えられてきた。しかしながら、Elovl-6欠損マウスの解析結果から、脂肪酸組成など脂質の質的内容もエネルギーバランスに重要であり、そのコントロールが生活習慣病の新しい治療になることが期待される(図5)。またElovl-6KOマウスが肥満、脂肪肝を呈するにも関わらず生活習慣病を発症しにくいということは、この伸長酵素の阻害は肥満が持続した状態においてもインスリン抵抗性、糖尿病、心血管リ

スクを改善する新たな治療法となる可能性がある。さらに内因性脂肪酸合成システムの脂質合成のみならずエネルギー代謝全体に影響を与えることは、ACC, FAS, SCDの阻害剤開発の経緯からも明らかである。しかし、その一角を担う Elovl-6 の作用点は、その制御が脂肪酸燃焼系に影響を与える他の酵素とは明らかに質が異なる。最近の解析では、肝臓における本酵素の活性化は、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 病態と関連が深いようである。本酵素の今後のさらなる解析が興味深い。

- 1) Matsuzaka, T., Shimano, H., Yahagi, N., Kato, T., Atsumi, A., Yamamoto, T., Inoue, N., Ishikawa, M., Okada, S., Ishigaki, N., Iwasaki, H., Iwasaki, Y., Karasawa, T., Kumadaki, S., Matsui, T., Sekiya, M., Ohashi, K., Hasty, A.H., Nakagawa, Y., Takahashi, A., Suzuki, H., Yatoh, S., Sone, H., Toyoshima, H., Osuga, J., & Yamada, N. (2007) *Nat. Med.*, **13**, 1193–1202.
- 2) Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Hasty, A.H., Osuga, J., Tamura, Y., Shionoiri, F., Iizuka, Y., Ohashi, K., Harada, K., Gotoda, T., Ishibashi, S., & Yamada, N. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 35832–35839.
- 3) Shimano, H. (2001) *Prog. Lipid Res.*, **40**, 439–452.
- 4) Shimano, H. (2007) *J. Mol. Med.*, **85** (5), 437–444.
- 5) Ide, T., Shimano, H., Yahagi, N., Matsuzaka, T., Nakakuki, M., Yamamoto, T., Nakagawa, Y., Takahashi, A., Suzuki, H., Sone, H., Toyoshima, H., Fukamizu, A., & Yamada, N. (2004) *Nat. Cell Biol.*, **6**, 351–357.
- 6) Yahagi, N., Shimano, H., Hasty, A.H., Matsuzaka, T., Ide, T., Yoshikawa, T., Amemiya-Kudo, M., Tomita, S., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J., Harada, K., Gotoda, T., Nagai, R., Ishibashi, S., & Yamada, N. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 19353–19357.
- 7) Takahashi, A., Motomura, K., Kato, T., Yoshikawa, T., Nakagawa, Y., Yahagi, N., Sone, H., Suzuki, H., Toyoshima, H., Yamada, N., & Shimano, H. (2005) *Diabetes*, **54**, 492–499.
- 8) Kato, T., Shimano, H., Yamamoto, T., Yokoo, T., Endo, Y., Ishikawa, M., Matsuzaka, T., Nakagawa, Y., Kumadaki, S., Yahagi, N., Takahashi, A., Sone, H., Suzuki, H., Toyoshima, H., Hasty, A.H., Takahashi, S., Gomi, H., Izumi, T., & Yamada, N. (2006) *Cell Metab.*, **4** (2): 143–154.
- 9) Yahagi, N., Shimano, H., Hasty, A.H., Amemiya-Kudo, M., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Shionoiri, F., Ohashi, K., Osuga, J., Harada, K., Gotoda, T., Nagai, R., Ishibashi, S., & Yamada, N. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 35840–35844.
- 10) Sekiya, M., Yahagi, N., Matsuzaka, T., Najima, Y., Nakakuki, M., Tomita, S., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Nagai, R., Osuga, J., Yamada, N., & Shimano, H., (2003) *Hepatology*, **38** (6), 1529–1539.
- 11) Matsuzaka, T., Shimano, H., Yahagi, N., Yoshikawa, T., Amemiya-Kudo, M., Hasty, A.H., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Osuga, J., Takahashi, A., Yato, S., Sone, H., Ishibashi, S., & Yamada, N. (2002) *J. Lipid Res.*, **43**, 911–920.
- 12) Moon, Y.A., Shah, N.A., Mohapatra, S., Warrington, J.A., & Horton, J.D. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 45358–45366.
- 13) Nagarajan, R., Le, N., Mahoney, H., Araki, T., & Milbrandt, J. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 8998–9003.
- 14) Kumadaki, S., Matsuzaka, T., Kato, T., Yahagi, N., Yamamoto, T., Okada, S., Kobayashi, K., Takahashi, A., Yatoh, S., Suzuki, H., Yamada, N., & Shimano, H. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **368** (2), 261–266.
- 15) Bruce, C.R. & Febbraio, M.A. (2007) *Nat. Med.*, **13**, 1137–1138.

島野 仁

(筑波大学大学院人間総合科学研究科
内分泌代謝・糖尿病内科)

Quality aspect of lipid accumulation in insulin resistance—A lesson from long fatty acid elongase, Elovl-6—
Hitoshi Shimano (Department of Internal Medicine (Endocrinology and Metabolism), Advanced Biomedical Applications, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, Center for Tsukuba Advanced Research Alliance, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba-City, Ibaraki 305-8575, Japan)