

エネルギー代謝調節鍵酵素 PDK4 の正常時及び病態時における発現調節

荒木 信, 野崎由佳, 本島清人*

Transcriptional Regulation of Metabolic Switching PDK4 Gene under Various Physiological Conditions

Makoto ARAKI, Yuka NOZAKI, and Kiyoto MOTOJIMA*

Department of Biochemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1 Noshio, Kiyose City, Tokyo 204-8588, Japan

(Received August 1, 2006)

Pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) phosphorylates and inactivates the pyruvate dehydrogenase complex to respond to physiologic conditions. This response switches the energy source from glucose to fatty acids to maintain blood glucose levels. Transcription of the PDK4 gene is activated by fasting or by the administration of a peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) ligand in a tissue-specific manner. However, the two mechanisms to induce PDK4 mRNA as well as the relationship between the two have not been studied in detail. In this study, we show that the two mechanisms are independent, at least in the mouse skeletal muscle, and that estrogen-related receptor α (ERR α) is directly involved in the PPAR α -independent transcriptional activation of the PDK4 gene with peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α (PGC-1 α) as a specific partner. The latter conclusion is based on the following evidence: 1) Deletion and point mutation analyses of the cloned mouse PDK4 gene promoter sequence identified an exact possible ERR α -binding motif as the PGC-1 α responsive element. 2) The overexpression of ERR α by cotransfection enhanced, and the knocking down of it by specific shRNAs diminished, the PGC-1 α -dependent activation. 3) Specific binding of ERR α to the identified PGC-1 α -responsive sequence of the mouse PDK4 promoter was confirmed in the electrophoresis mobility shift assay using anti-ERR α antibodies. These results suggest that PGC-1 α plays an essential role not only in regulating the amounts of energy creating enzymes, but also at the step of metabolic switching with unevenly distributed tissue transcription factors such as ERR α in the skeletal muscle, thus harmonizing tissue-specific functions and energy metabolism.

Key words—pyruvate dehydrogenase kinase; estrogen-related receptor α ; skeletal muscle; peroxisome proliferator-activated receptor α ; peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α

1. はじめに

近年、わが国で深刻な社会問題となっている高脂血症、糖尿病、動脈硬化といった生活習慣病は、肥満の増加が原因の1つであるとされている。この肥満は脂質代謝、糖代謝の調節異常によって引き起こされることから、これら代謝調節とその破綻のメカニズムを解明することは、生活習慣病の治療や予防に非常に重要であると考えられる。

脂質代謝や糖代謝は、摂食や絶食、運動などの生体のおかれたエネルギー環境に応じて厳密に調節さ

れている。^{1,2)} これまではその主たるものとして、インスリンなどのホルモンによる、糖輸送体での輸送の促進や、代謝酵素の活性化など翻訳後の調節が考えられてきた。^{3,4)} しかし最近では、ホルモンによる脂質代謝や糖代謝の鍵酵素の調節は、その遺伝子の発現量の調節も重要であることが明らかになってきた。^{5,6)} そのため、このような代謝調節の鍵酵素の発現機構を解析することは、糖尿病や高脂血症などの代謝異常症の発症メカニズムの解明につながると考えた。

脂質、糖代謝調節の鍵酵素として知られている pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) は、ピルビン酸からアセチル CoA への合成を阻害することで、細胞内でのエネルギー源を糖質から脂質へと変換し代謝を調節する (Fig. 1)。^{7,8)} この PDK4 遺伝

明治薬科大学大学院薬学研究所生化学教室 (〒204-8588 東京都清瀬市野塩 2-522-1)

*e-mail: motojima@my-pharm.ac.jp

本総説は、日本薬学会第126年会シンポジウムGS2で発表したものを中心に記述したものである。

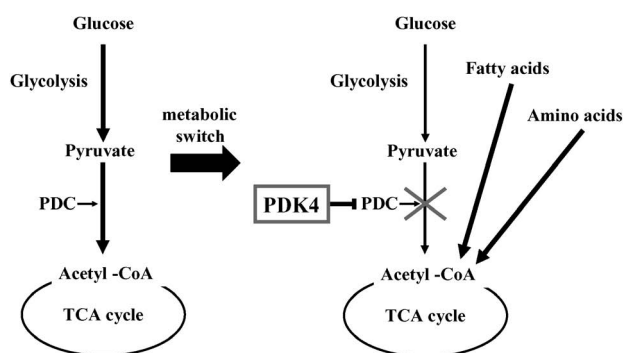


Fig. 1. Schematic Diagram of Metabolic Switching by PDK4

子は、絶食によって様々な組織で誘導され、特に骨格筋で顕著に確認される。^{9,10} この PDK4 遺伝子の誘導は、血糖値の確保のために働いていると考えられている。脳では β 酸化系酵素群が発現しておらず、脂質をエネルギーとして利用できないので糖（グルコース）とケトン体をエネルギーとして利用する。この脳のエネルギー源確保のために PDK4 が誘導されて、骨格筋や肝臓の解糖系を抑制して糖の利用を抑えていると考えられている。また絶食時の肝臓では、PDK4 遺伝子が誘導されて解糖系が抑制され、糖新生を促進して糖の供給を行う。ほかに β 酸化からケトン体を合成して、様々な組織のエネルギー源とする役割もある。

また PDK4 遺伝子は、核内受容体型転写因子 peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) のリガンドを投与することでも、転写レベルで活性化される。¹¹ 当研究室のこれまでの研究では、マウスに絶食処置や PPAR α のリガンドである Bezafibrate を投与すると、PDK4 遺伝子が様々な組織で脂肪酸 β 酸化系酵素群の誘導に先立って、転写活性化されることが明らかにされていた。¹² Bezafibrate は高脂血症治療薬であり、早期に起こる PDK4 遺伝子の誘導によってエネルギー源を糖質から脂質へと変換することが、高脂血症治療薬の初期の血清 TG 低下を起こしていると考えている。

このように PDK4 遺伝子の発現調節による代謝調節は、生体のエネルギー維持や代謝異常症の重要なポイントであり、PDK4 遺伝子の誘導機構を明らかにすることによって、フィブレート系薬物の初期の作用機序の解明や、高脂血症や糖尿病などの代謝異常症の発症メカニズムの解明と、新たな薬物標的の同定につながると考えた。

2. PDK4 遺伝子の PPAR α 依存的、非依存的な転写活性化

筆者らは、マウスに絶食処置や PPAR α のリガンドを投与すると、PDK4 遺伝子が様々な組織で脂肪酸 β 酸化系酵素群の誘導に先立って、転写活性化されることを明らかにしていた。¹² Wu らも、マウスに絶食処置や PPAR α のリガンドを投与すると PDK4 が誘導されることを報告していた。^{10,11} さらに当研究室では、これらの転写活性化における PPAR α の役割を知る目的で、野生型マウスと PPAR α ノックアウトマウスに Bezafibrate 投与を行い、各組織の PDK4 mRNA の発現量を比較した (Fig. 2(A)). すると野生型マウスの骨格筋では、Bezafibrate 投与で PDK4 mRNA が誘導された。それに対して PPAR α ノックアウトマウスの骨格筋では、Bezafibrate による誘導が確認されなかった。そのため、Bezafibrate による PDK4 mRNA の誘導は、PPAR α に依存すると考えられた。一方、これまでに他のグループから、PDK4 mRNA が PPAR δ のリガンドによって誘導されるという報告があった。¹³ そこで、PDK4 mRNA の骨格筋での誘導に対する、PPAR δ の関与についてマウス個体と培養細胞を用いて検討した。まず、マウス個体に PPAR δ のリガンドである GW501516 を投与して、PDK4 mRNA の発現量について検討した (Fig. 2(A)). その結果、骨格筋での PDK4 mRNA は、野生型マウス、PPAR α ノックアウトマウスともに、わずかな誘導しか確認されなかった。次に、培養細胞を用いて検討した。ここでは、マウス骨格筋由来 C2C12 細胞とヒト横紋筋肉腫由来 A204 細胞を用いた (Fig. 2(B)). その結果、分化前 C2C12 細胞では、PDK4 mRNA の PPAR α リガンドである Wy14,643 による誘導は、GW501516 による誘導よりも弱かった。一方で分化後 C2C12 細胞では、Wy14,643 によって GW501516 よりも顕著に誘導された。また、A204 細胞では、Wy14,643 で顕著に誘導され、GW501516 では誘導されなかった (data not shown)。これらの結果からわれわれは、骨格筋細胞における PDK4 遺伝子の転写活性化に働く PPAR は、PPAR α が主で、PPAR δ は補助的なものであると考えている。C2C12 細胞の分化前後による応答性の差については、分化に伴って mRNA 量は変わらないものの PPAR α タンパク質が安定化

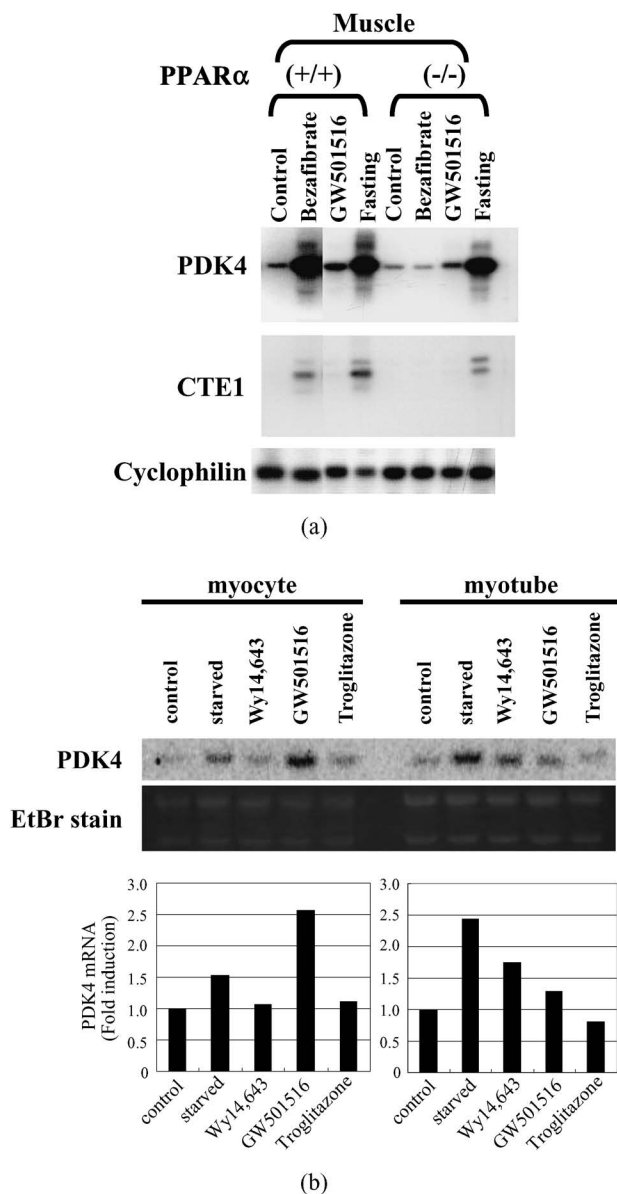


Fig. 2. Transcriptional Activation of the Mouse PDK4 Gene Is Induced in PPAR α -dependent and -independent Manners

(A) Fasting induced mouse PDK4 mRNA in the skeletal muscles of both wild-type and PPAR α knockout mice. Wild-type and PPAR α knockout mice were fed control diet, containing 0.2% bezafibrate (PPAR α ligand) or 0.05% GW501516 (PPAR δ ligand), or were fasted for 2 days. Total RNA from skeletal muscle was analyzed by northern blotting. (B) PPAR α ligand, Wy14,643 induced PDK4 mRNA in the differentiated C2C12 cells. Undifferentiated and differentiated C2C12 cells were cultured in a normal medium (control) or that containing Wy14,643 (50 μ M), GW501516 (300 μ M) or Troglitazone (10 μ M) for 24 h, or Hanks' Balanced Salt Solution medium (starved) for 2 h.

され、転写複合体に組み込まれる量が増える、という結果を得ている。この結果から、PDK4 遺伝子の骨格筋での応答は、分化した C2C12 細胞に対応していると考えている。

次に、マウス絶食時の PDK4 mRNA の誘導に対

する、PPAR α の関与を検討するために、野生型マウスと PPAR α ノックアウトマウスに 2 日間の絶食処置を行った (Fig. 2(A)). その結果、絶食による誘導は Bezafibrate による誘導とは異なり、野生型マウス、PPAR α ノックアウトマウスともに、PDK4 mRNA の骨格筋での誘導が確認された。以上の結果から、マウス骨格筋での PDK4 mRNA の誘導には、PPAR α 依存的な経路と非依存的で絶食による経路が存在すると考えた。

3. PDK4 遺伝子の PGC-1 α 依存的な活性化

この PDK4 遺伝子の転写活性化機構を明らかにするために、PDK4 遺伝子の転写開始点上流 2.3 kb までのプロモーター領域をマウスゲノム DNA よりクローニングし、アフリカミドリザル腎由来 CV-1 細胞を用いてルシフェラーゼアッセイを行った (Fig. 3). その結果、PDK4 遺伝子プロモーターの basal な活性は確認された。そこで、PPAR α /retinoid X receptor α (RXR α) の共発現下で、PPAR α のリガンドに対する応答性を検討したところ、ポジティブコントロールとなる AOx PPRE では、¹⁴⁾ PPAR α のリガンド依存的な活性化が確認されたが、PDK4 遺伝子プロモーターでは、PPAR α リガンド依存的な活性化は確認されなかった。そのため、PPAR α 、PPAR α のリガンド以外の因子も必要である可能性を考え、PPAR α を始めとする何種類かの転写因子のコアクチベーターとして働く PPAR γ coactivator-1 α (PGC-1 α)¹⁵⁾ を共発現させ活性化を検討した。その結果、PPAR α のリガンドに対する顕著な活性化は確認されなかったが、コアクチベーターである PGC-1 α を共発現することで、PDK4 遺伝子プロモーターが活性化された。また、この PGC-1 α 依存的な活性化は、PPAR α /RXR α を共発現させない状況においても確認された。このことから、PGC-1 α 依存的な PDK4 遺伝子プロモーターの活性化は、PPAR α /RXR α 依存的ではなく、CV-1 細胞内在性のほかの転写因子を介して起きていると考えた。CV-1 細胞でのレポーターアッセイから、PDK4 遺伝子プロモーターの活性化への関与が示唆された PGC-1 α は、絶食時などに誘導され、糖代謝関連遺伝子の glucose-6-phosphatase, phosphoenolpyruvate carboxykinase などの発現を調節していることが報告されている。¹⁵⁻¹⁷⁾ そこで筆者らは、レポーターアッセイで明らかとなった PGC-

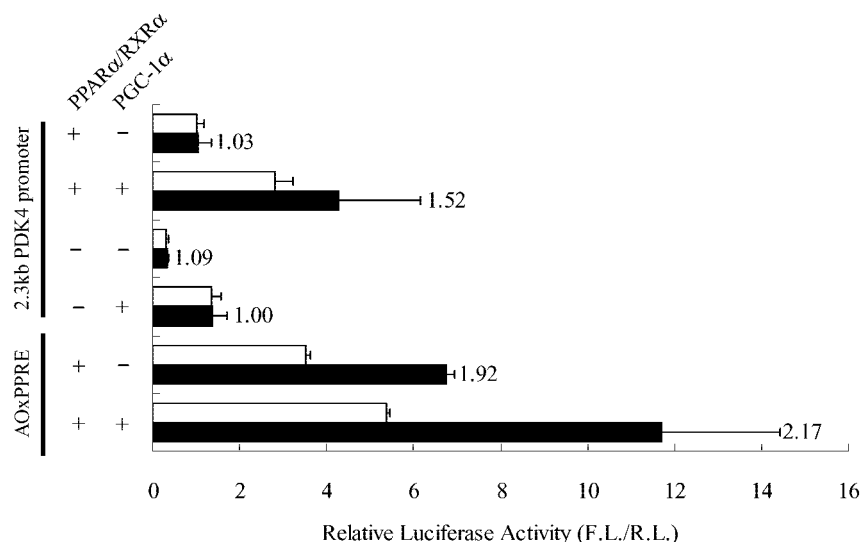


Fig. 3. PGC-1 α Activates the Mouse PDK4 Gene Promoter in the Absence of PPAR α /RXR α in CV-1 Cells

The 2.3 kb mouse PDK4 gene promoter activity was assayed in CV-1 cells with or without expression plasmids of PPAR α , RXR α and PGC-1 α . The AOxPPRE promoter was a positive control for PPAR α ligand responsiveness. The transfected cells were cultured with (closed bar) or without (open bar) the PPAR α ligand Wy14,643 for 48 h.

1 α によるマウス PDK4 遺伝子の転写活性化が、生体での PPAR α 非依存的な絶食による転写活性化に対応すると考え、PGC-1 α による PDK4 遺伝子プロモーターの活性化機構の解析を行った。

4. PDK4 遺伝子プロモーターの PGC-1 α 依存的領域の同定

まず、PDK4 遺伝子プロモーターの PGC-1 α 依存的な活性化に必要な領域を同定するために、転写開始点上流 2.3 kb までの PDK4 遺伝子プロモーター領域を上流から欠失させたコンストラクトを作成し、各プロモーター領域の PGC-1 α による活性化について CV-1 細胞を用いて検討した (Fig. 4 (A)). その結果、転写開始点上流 391~386bp を欠失させたときに PDK4 遺伝子プロモーターの PGC-1 α による活性化が減少した。また、転写因子は複合体として機能するため、ほかに PDK4 遺伝子プロモーターの活性化に必要な領域が存在する可能性が考えられた。そこで、内部を欠失させたレポータープラスミドを作製し、他領域の PGC-1 α 依存的な活性化への関与を検討した (Fig. 4 (B)). その結果、-434~-370 と -370~-300 の領域が PGC-1 α による PDK4 遺伝子プロモーターの活性化に関与することが示された。

5. 転写因子結合予測領域への変異導入による PDK4 プロモーターの応答

PDK4 遺伝子プロモーターの PGC-1 α による活性

化に重要であった -434~-300 の領域の DNA 配列をマウス、ヒト、ラット¹⁸⁾で比較すると高度に保存されていた (Fig. 5 (A)). さらに、この領域に結合が予測される転写因子をデータベースで検索した結果、PGC-1 α 依存的な活性化に必要であった領域の内、-391~-386 の配列には、転写因子 estrogen related receptor α (ERR α)¹⁹⁾の結合が予測された。その他に、-360 bp 近傍には、forkhead box class O1 (FOXO1)の結合が予測された。この予測された FOXO1 の結合領域は、以前に Furuyama らによって PDK4 遺伝子の転写への関与が報告されていた。²⁰⁾ また、ERR α と FOXO1 はいずれも、PGC-1 α をコアクチベーターとして活性化を起こすことが知られている。²¹⁻²³⁾ そこで、PGC-1 α と相互作用する転写因子の結合領域を同定するために、まず、以前に活性化への関与が報告されている FOXO1 に着目した。

転写開始点上流 391 bp まで含んだ PDK4 遺伝子プロモーター領域の FOXO1 結合領域へ、その結合ができなくなる変異を導入し、PGC-1 α 依存的な PDK4 遺伝子プロモーターの活性化を検討した (Fig. 5 (B)). その結果、PGC-1 α 依存的な活性化は変異の影響を受けなかった。このことから FOXO1 は、PGC-1 α による PDK4 遺伝子プロモーター活性化への関与は小さいと考えられた。次に ERR α の結合が予測された領域に、ERR α の結合で

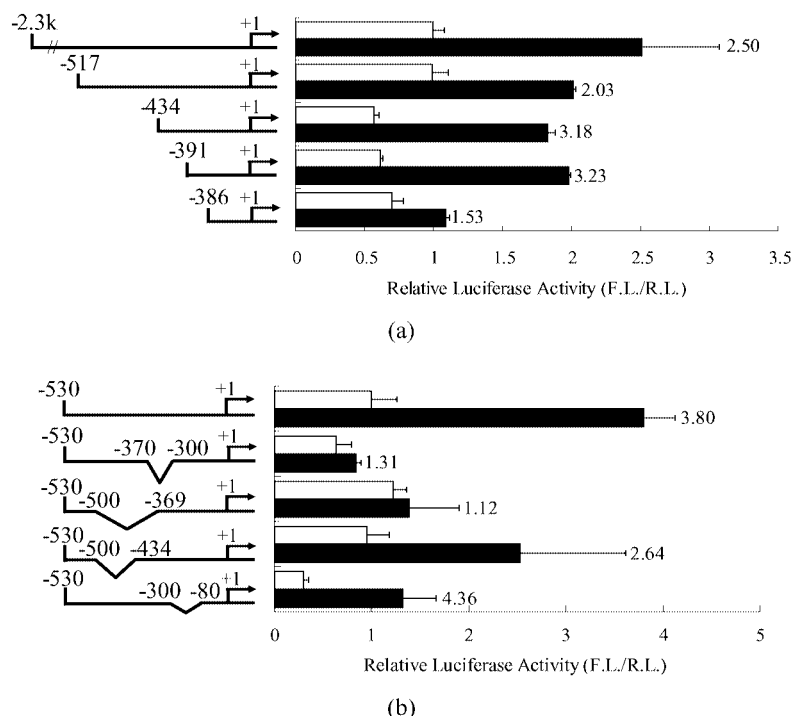


Fig. 4. Localization of the Region for PGC-1 α Responsiveness in the 2.3 kb Promoter of the Mouse PDK4 Gene

(A) 5'-Upstream deletions. Transient transfections performed with a series of 5' deletions of 2.3 kb mouse PDK4 promoter. Their responsiveness to PGC-1 α was examined by co-transfection with (closed bar) or without (open bar) PGC-1 α . (B) Internal deletions. The 530 bp mouse PDK4 gene promoters with various internal deletions were constructed and their responsiveness to PGC-1 α was examined as in (A).

きなくなる 2 種類の変異を導入して、レポーターアッセイを行った (Fig. 5(C)). その結果, mut1, mut2 とともに PGC-1 α による PDK4 遺伝子プロモーターの活性化が消失した. また, 転写開始点上流 2.3 kb まで含んだ PDK4 遺伝子プロモーターに対しても同様の変異を導入したところ, PGC-1 α による活性化が消失することが確認された (data not shown). これらの結合領域への変異導入実験の結果から, PGC-1 α 依存的な PDK4 遺伝子プロモーターの活性化には, FOXO1 の結合領域ではなく, ERR α の結合が予測される領域が必要であることが分かった.

6. PDK4 遺伝子プロモーターの PGC-1 α による活性化に対する ERR α の関与

次に, PDK4 遺伝子プロモーターへの結合が予測された ERR α が, 培養細胞の系で実際に PGC-1 α による PDK4 遺伝子プロモーターの活性化に関与するのかを明らかにするために, ERR α の over-expression と ERR α 特異的 shRNA による knock down を行った.

まず, 分化前の C2C12 細胞で, 転写開始点上流 530 bp までを含んだ PDK4 遺伝子プロモーターを

用いてアッセイを行った (Fig. 6(A)). 分化前の C2C12 細胞は, 本研究の過程で PGC-1 α のみを共発現させたときに, 転写開始点上流 530 bp までを含んだ PDK4 遺伝子プロモーターを活性化しないことが確認されていた. その分化前の C2C12 細胞に ERR α を over-expression してアッセイを行った結果, PGC-1 α 依存的な活性化が確認された. しかし, さらに過剰に ERR α を発現させると, PGC-1 α による活性化は減少した. 一方で, CV-1 細胞を用いて同様のアッセイを行ったときには, ERR α を発現させていくと PGC-1 α 依存的な活性化が抑制された (data not shown). また, 分化前の C2C12 細胞と同様に, PGC-1 α のみを共発現しただけでは PDK4 遺伝子プロモーターを活性化しないラット肝がん由来 Fao 細胞を用いて, ERR α の over-expression を行ったが, PGC-1 α 依存的な活性化は確認されなかった (data not shown). CV-1, C2C12, Fao 細胞の ERR α の発現量は, それぞれの細胞で異なることが確認された.

次に, ERR α 特異的な shRNA による ERR α の knock down の影響について, CV-1 細胞を用いてアッセイを行った (Fig. 6(B)). その結果, 3 種類

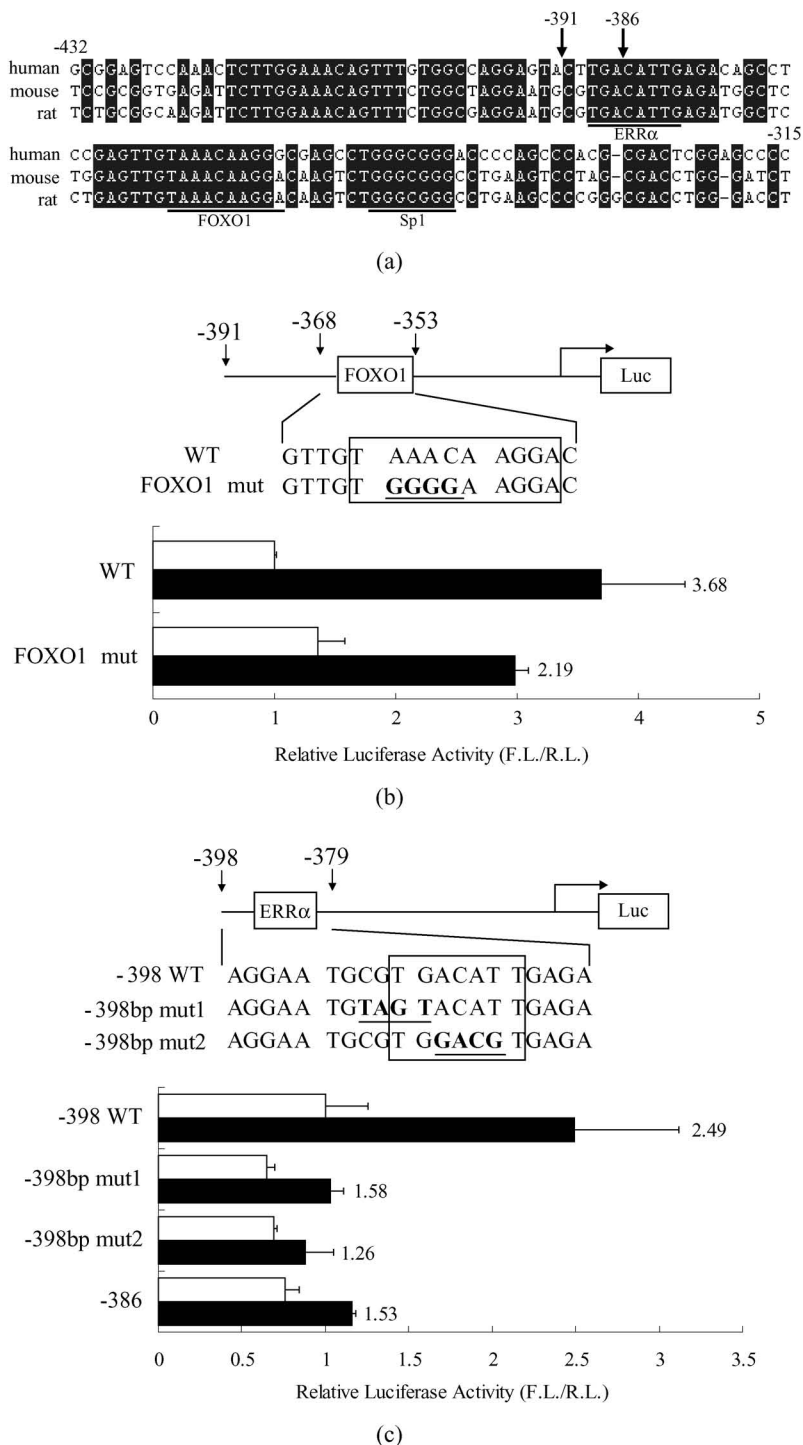


Fig. 5. The ERR α Binding Site in the Mouse PDK4 Gene Promoter Is Required for the Responsiveness to PGC-1 α

(A) Alignment of the promoter sequences of the PDK4 genes of humans, mice and rats. The possible binding sites for ERR α , FOXO1 and Sp1 are underlined. (B) Effect of mutations in the FOXO1 binding site on the responsiveness to PGC-1 α . These mutations were constructed according to Ref. 20). Their effects on the responsiveness were examined by the luciferase reporter assay with (closed bar) or without (open bar) PGC-1 α in CV-1 cells. (C) Effects of mutations in the ERR α binding site on the responsiveness to PGC-1 α were examined as in (B).

の shRNA を共発現させたときに、PGC-1 α による PDK4 プロモーターの活性化が抑制された。この 3 種類の shRNA をトランスフェクションした細胞の核抽出液を調製し、ウェスタンブロットで ERR α

の産生量を比較したところ、shRNA によって ERR α のタンパク量が実際に減少していることを確認した。以上の結果から、PDK4 プロモーターの PGC-1 α による活性化には、PDK4 プロモーターの

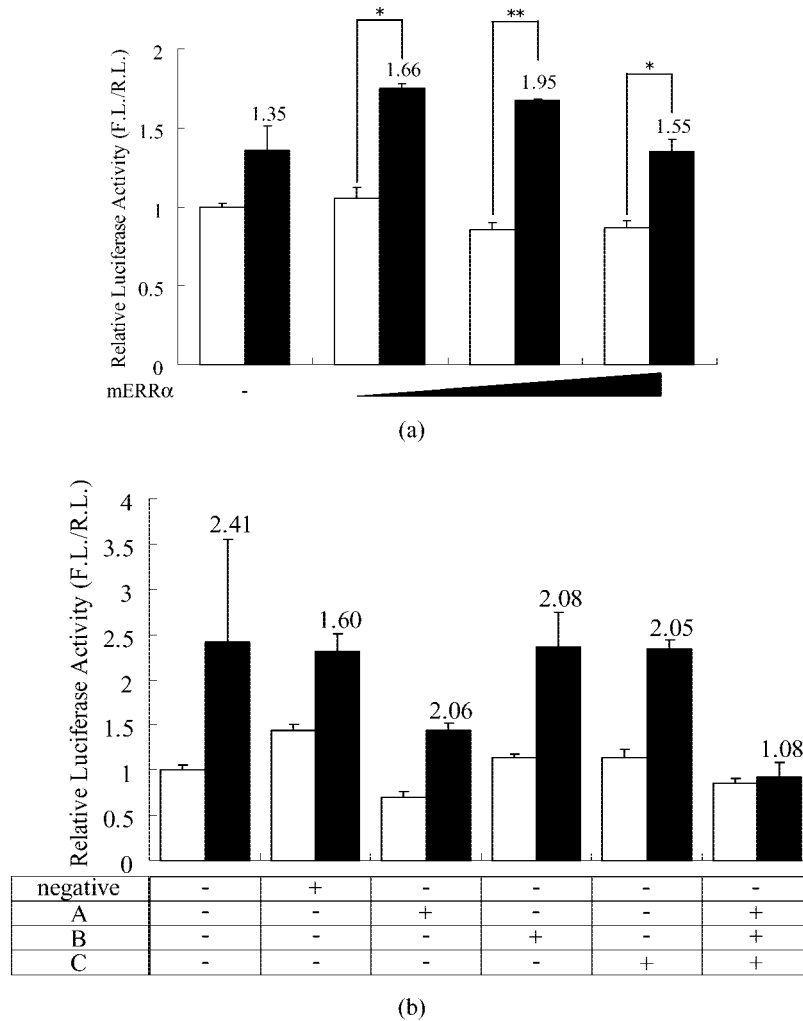


Fig. 6. Modulation of the Expression Levels of $ERR\alpha$ Influences the Responsiveness of the PDK4 Gene Promoter to PGC-1 α

(A) Effect of the over-expression of $ERR\alpha$ on the responsiveness in undifferentiated C2C12 cells. Increasing amounts (0.001, 0.01 and 0.1 $\mu\text{g}/\text{well}$) of mouse $ERR\alpha$ expression plasmid were transfected and the responsiveness to PGC-1 α was examined by co-transfection with (closed bar) or without (open bar) PGC-1 α (* p -values<0.05, ** p -values<0.01, t test). (B) Effect of knock down of $ERR\alpha$ by shRNA in the CV-1 cells. The CV-1 cells were transfected with one or the mixture of three $ERR\alpha$ -specific shRNA (A, B and C), and responsiveness to PGC-1 α was examined with (closed bar) or without (open bar) PGC-1 α .

転写開始点上流 391~386 の領域が必要で、転写因子 $ERR\alpha$ が PDK4 遺伝子プロモーターの活性化に必要であることが分かった。

7. PDK4 プロモーターの PGC-1 α 応答配列に対する $ERR\alpha$ の結合

次に、PDK4 プロモーターの PGC-1 α 応答配列に $ERR\alpha$ が直接結合することを確認するためにゲルシフトアッセイを行った。プローブは PGC-1 α による活性化に必要な領域を含む転写開始点上流 396~366 の領域を用いた。mut1 と mut2 は $ERR\alpha$ binding site に変異を導入したものと同様の配列である。タンパク質は CV-1 細胞の核抽出液を用いて行った (Figs. 7(A), 7(B)). その結果、Wild-type (WT) の配列では特異的な結合が確認されたが、

$ERR\alpha$ が結合しない配列である mut1, mut2 のプロンプでは、特異的な結合が確認されなかった。また、結合の確認された WT のバンドシフトに対して競合実験を行ったところ、WT の競合物では結合が抑制されたが、mut1, mut2 では抑制の程度が減少した。このことから転写開始点上流 396~366 には CV-1 核抽出液中のタンパク質が結合することが確認できた。この結合したタンパク質が $ERR\alpha$ であることを確認するために、 $ERR\alpha$ 特異的抗体を用いて $ERR\alpha$ の PDK4 プロモーターへの結合性を確認した (Fig. 7(C)). その結果、 $ERR\alpha$ 特異的抗体を作用させると、配列特異的な結合が抑制された。以上の結果から $ERR\alpha$ は、PDK4 プロモーターの転写開始点上流 396~366 の領域に配列特異的に結

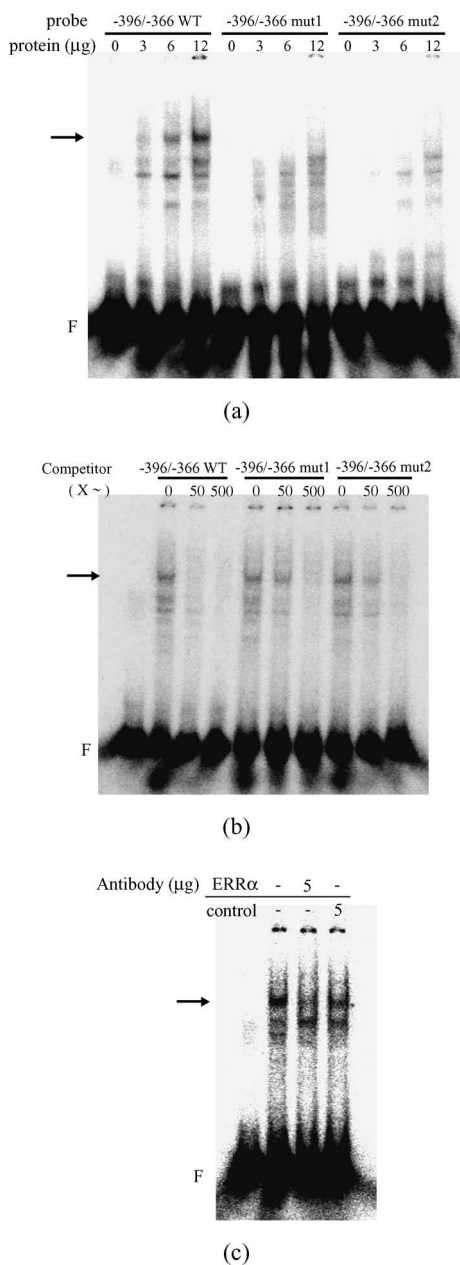


Fig. 7. $ERR\alpha$ Is Bound to the Sequence -396 to -366 of the PDK4 Promoter in Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

The double stranded oligonucleotides corresponding to the DNA sequence of the PDK4 promoter region -396 to -366 was used as the wild type (WT) probe in EMSA. (A) WT and mutant probes (see Fig. 3(C)) were labeled with $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ and incubated with the nuclear extract prepared from CV-1 cells. The arrow indicates the specific band of interest and the F indicates free probes. (B) Cold competition assay using excess amounts of cold WT and mutant oligonucleotides. Competition was performed at 50-fold and 500-fold molar excess of WT or mutant oligonucleotides, as indicated above the appropriate lanes. The arrow indicates the specific band of interest and the F indicates free probes. (C) EMSA assay with WT probe was performed in the presence of specific anti- $ERR\alpha$ IgG (5 μg) or control rabbit IgG (5 μg). The arrow indicates the specific band of interest and the F indicates free probes.

合することが明らかになった。

8. 総括

マウス個体を用いた解析から、マウス骨格筋での PDK4 遺伝子の転写活性化には、PPAR α 依存的な経路と PPAR α 非依存的で絶食による経路の 2 つの経路があることを明らかにし、培養細胞系を用いたレポーターアッセイの系からは、PDK4 遺伝子プロモーターは PPAR α 非依存的に PGC-1 α によって活性化されることを明らかにした。この PGC-1 α による PDK4 遺伝子プロモーターの活性化には、転写開始点上流 391~386 が必要で、この領域には $ERR\alpha$ の結合が予測された。この結合することが予測された $ERR\alpha$ が実際に活性化に関与していることは、over-expression と shRNA による knock down によって確認した。またゲルシフトアッセイの結果からは、 $ERR\alpha$ が PGC-1 α 依存的な活性化に必要な配列に結合することが確認された。

そこでわれわれは次のような PDK4 遺伝子転写活性化機構のモデルを考えている (Fig. 8)。骨格筋では、絶食や運動により PGC-1 α の発現が誘導される。さらにこの PGC-1 α が $ERR\alpha$ の発現を誘導する。¹⁷⁾ この誘導された PGC-1 α と $ERR\alpha$ が相互作用して PDK4 遺伝子の発現誘導を起こすと考えている。一方、肝臓では $ERR\alpha$ の発現量が低いために、²⁴⁾ 本研究で明らかにした PGC-1 α / $ERR\alpha$ の機構では PDK4 の誘導は起こらずに、PGC-1 α は別の転写因子と相互作用して PDK4 の発現誘導を起こすと考えている。これに関して、肝臓特異的転写因子 hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) によって転写活性化されることが報告されているが、¹⁸⁾ HNF4 は PGC-1 α が PDK4 遺伝子の転写活性化を起こすために直接相互作用する転写因子ではないとされている。肝臓での PGC-1 α のパートナーについては、今のところ不明である。絶食時の肝臓での PGC-1 α のターゲットは、主に糖新生系の酵素遺伝子であるのに対して、^{15,16)} 骨格筋では糖新生はほとんど起こらない。このような組織特異的な発現誘導を起こすために、PGC-1 α には組織特異的なパートナーが存在すると考えている。

筆者らは、PDK4 遺伝子プロモーターが $ERR\alpha$ / $PGC-1\alpha$ によって活性化されることを明らかにしたが、Fao 細胞では、 $ERR\alpha$ 、PGC-1 α を共発現させても PDK4 遺伝子プロモーターの活性化が確認さ

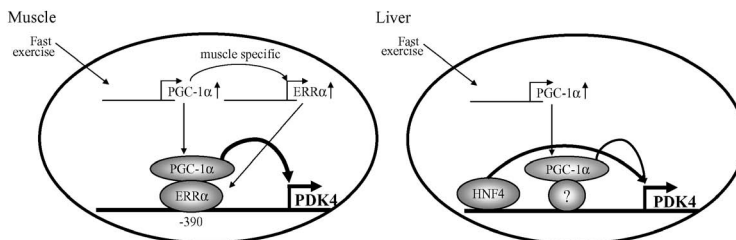


Fig. 8. Schematic Comparison of the Cell Type-specific Responses of the PDK4 Promoter to PGC-1 α in the Skeletal Muscle and Liver (The skeletal muscle-specific pathway is the summary of our work described and taken from Ref. 17). The liver-specific pathways are taken from Ref. 18).

れなかった。この結果から、PDK4 遺伝子プロモーターは、ERR α /PGC-1 α だけでは活性化されず、Fao 細胞には発現していないほかの因子が必要であるか、ERR α /PGC-1 α による転写活性化を抑制する因子が存在することが予想される。²⁵⁾ 今後は、ERR α /PGC-1 α 以外の PDK4 遺伝子プロモーターの活性化に関与する因子について検討していく必要がある。

筆者らは、分化前の C2C12, CV-1, Fao 細胞を用いて、ERR α の over-expression による PDK4 遺伝子プロモーターの PGC-1 α による活性化について検討した。その結果、1) 分化前の C2C12 細胞では活性化されたが、過剰に発現させるとわずかに活性化が減少した。2) CV-1 細胞では、ERR α を over-expression させると PGC-1 α による活性化が抑制された。3) Fao 細胞では、ERR α を over-expression させても PGC-1 α による活性化は確認されなかった。以上の結果から、PDK4 遺伝子プロモーターが PGC-1 α /ERR α 依存的に活性化されるには、ERR α の発現量は転写因子複合体を形成するために適当な発現量があり、それぞれの転写因子の発現量比が PGC-1 α 依存的な PDK4 遺伝子プロモーターの活性化に影響を与えることが示唆された。

本研究から、PDK4 遺伝子には組織特異的な発現誘導機構が存在し厳密な代謝調節を行っていることが考えられた。²⁶⁾ この発現調節機構が異常をきたし、骨格筋での恒常的な誘導を起こすと糖利用の抑制から高血糖を起こし、さらにはインスリン抵抗性の原因となるということも考えられる。そうすると、PPAR α アゴニストは PDK4 を発現誘導するので血糖値を上げ、糖尿病を招くのか、ということが考えられるが、そういったことはない。実際に、フィブレート系薬物は血糖値を上げないことが確認されている。²⁷⁾ これは、フィブレートによる PDK4 遺伝子

の発現誘導が β 酸化系の酵素群とは異なり、持続した誘導ではないので血糖の上昇が起こらないためと考えられる。¹²⁾ また、糖尿病は慢性疾患であり長期に渡って血糖の上昇を起こしているのも、この原因となるような持続して PDK4 遺伝子を発現誘導する別の転写活性化機構が存在することも考えられる。

今後は、本研究で明らかにした PDK4 遺伝子の PGC-1 α /ERR α 系による転写活性化機構が、²⁸⁾ マウス個体や培養細胞の飢餓状態で働いていることを確認する必要がある。また、糖尿病など病態時において PDK4 遺伝子の ERR α /PGC-1 α による転写活性化機構が、どのように関与しているのかを明らかにしていき、PDK4 遺伝子の組織特異的な転写活性化に関与する、PGC-1 α /ERR α の創薬ターゲットとしての可能性のある分子の存在を検討していきたいと考えている。

謝辞 本研究をまとめるにあたり、有益なるご助言をいただきました、明治薬科大学生化学教室、浦辺宏明講師に深く感謝申し上げます。また本研究は、明薬オープンリサーチセンターのサポートの下に行われたものであり、ここに感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Reed L. J., Hackert M. L., *J. Biol. Chem.*, **265**, 8971–8974 (1990).
- 2) Sugden M. C., Bulmer K., Holness M. J., *Biochem. Soc. Trans.*, **29**, 272–278 (2001).
- 3) Watson R. T., Pessin J. E., *Recent Prog. Horm. Res.*, **56**, 175–193 (2001).
- 4) Kondo T., Kahn C. R., *J. Biol. Chem.*, **279**, 37997–38006 (2004).
- 5) Huang B., Wu P., Bowker-Kinley M. M., Harris R. A., *Diabetes*, **51**, 276–283 (2002).

- 6) Puigserver P., Rhee J., Donovan J., Walkey C. J., Yoon J. C., Oriente F., Kitamura Y., Altomonte J., Dong H., Accili D., Spiegelman B. M., *Nature*, **423**, 550–555 (2003).
- 7) Sugden M. C., Holness M. J., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **284**, E855–862 (2003).
- 8) Wu P., Sato J., Zhao Y., Jaskiewicz J., Popov K. M., Harris R. A., *Biochem. J.*, **329** (Pt 1), 197–201 (1998).
- 9) Bowker-Kinley M. M., Davis W. I., Wu P., Harris R. A., Popov K. M., *Biochem. J.*, **329** (Pt 1), 191–196 (1998).
- 10) Wu P., Blair P. V., Sato J., Jaskiewicz J., Popov K. M., Harris R. A., *Arch. Biochem. Biophys.*, **381**, 1–7 (2000).
- 11) Wu P., Inskip K., Bowker-Kinley M. M., Popov K. M., Harris R. A., *Diabetes*, **48**, 1593–1599 (1999).
- 12) Motojima K., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1509–1511 (2002).
- 13) Tanaka T., Yamamoto J., Iwasaki S., Asaba H., Hamura H., Ikeda Y., Watanabe M., Magoori K., Ioka R. X., Tachibana K., Watanabe Y., Uchiyama Y., Sumi K., Iguchi H., Ito S., Doi T., Hamakubo T., Naito M., Auwerx J., Yanagisawa M., Kodama T., Sakai J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 15924–15929 (2003).
- 14) Kawabe K., Saegusa H., Seto K., Urabe H., Motojima K., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **37**, 1534–1546 (2005).
- 15) Lin J., Handschin C., Spiegelman B. M., *Cell Metab.*, **1**, 361–370 (2005).
- 16) Herzig S., Long F., Jhala U. S., Hedrick S., Quinn R., Bauer A., Rudolph D., Schutz G., Yoon C., Puigserver P., Spiegelman B., Montminy M., *Nature*, **413**, 179–183 (2001).
- 17) Mootha V. K., Handschin C., Arlow D., Xie X., St. Pierre J., Sihag S., Yang W., Altshuler D., Puigserver P., Patterson N., Willy P. J., Schulman I. G., Heyman R. A., Lander E. S., Spiegelman B. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 6570–6575 (2004).
- 18) Ma K., Zhang Y., Elam M. B., Cook G. A., Park E. A., *J. Biol. Chem.*, **280**, 29525–29532 (2005).
- 19) Xie X., Lu J., Kulbokas E. J., Golub T. R., Mootha V., Lindblad-Toh K., Lander E. S., Kellis M., *Nature*, **434**, 338–345 (2005).
- 20) Furuyama T., Kitayama K., Yamashita H., Mori N., *Biochem. J.*, **375**, 365–371 (2003).
- 21) Huss J. M., Kopp R. P., Kelly D. P., *J. Biol. Chem.*, **277**, 40265–40274 (2002).
- 22) Soriano F. X., Liesa M., Bach D., Chan D. C., Palacin M., Zorzano A., *Diabetes*, **55**, 1783–1791 (2006).
- 23) Puigserver P., Rhee J., Donovan J., Walkey C. J., Yoon J. C., Oriente F., Kitamura Y., Altomonte J., Dong H., Accili D., Spiegelman B. M., *Nature*, **423**, 550–555 (2003).
- 24) Ichida M., Nemoto S., Finkel T., *J. Biol. Chem.*, **277**, 50991–50995 (2002).
- 25) Nielsen R., Grontved L., Stunnenberg H. G., Mandrup S., *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 5698–5714 (2006).
- 26) Sano M., Schneider M. D., *Cell Metab.*, **1**, 216–218 (2005).
- 27) Winegar D. A., Brown P. J., Wilkison W. O., Lewis M. C., Ott R. J., Tong W. Q., Brown H. R., Lehmann J. M., Kliewer S. A., Plunket K. D., Way J. M., Bodkin N. L., Hansen B. C., *J. Lipid Res.*, **42**, 1543–1551 (2001).
- 28) Araki M., Motojima K., *FEBS J.*, **273**, 1669–1680 (2006).