

Differential Expression of *c-maf* during Adipocyte and Muscle Cell Differentiation

(脂肪細胞および筋肉細胞分化過程における *c-maf* 遺伝子の発現)

学位論文内容の要旨

Maf はトリ肉腫ウイルス、AS42 が持つ癌遺伝子として見いだされた、bZip 構造を DNA 結合ドメインとして持つ転写因子である。この遺伝子は目の水晶体、軟骨、脊髄、筋肉、腎臓などの発生、分化の段階に特異的に発現している。Maf ファミリーには多くの、転写因子、*c-Maf*, MafB, MafA (L-Maf), Nrl が含まれ、さらに、DNA 結合領域のみを持ち転写活性化ドメインを持たない Small Maf がいくつか知られている。それぞれが発生、分化に関わる重要な機能を持っていると考えられているが、*c-Maf* は目の水晶体分化、ヘルパー T 細胞の Th1, Th2 への分化、軟骨分化に働くことなどが報告されている。

本研究はどちらも間葉系線維芽細胞から分化する脂肪細胞と筋肉細胞において、それらの分化過程での *c-maf* 遺伝子の発現変化を調べ、脂肪細胞分化では抑制され、逆に筋肉分化過程では活性化されることを見いだした。さらに、これらの遺伝子発現の変化がどのような機構によるものかを分子レベルで明らかにした。

前脂肪細胞培養株、3T3L1 をインスリン、グルココルチコイドなどを含む培養液で処理すると脂肪細胞へ分化する。この過程で *c-maf* mRNA の発現を調べたところ分化処理後 58 時間から *c-maf* mRNA が低下し、72 時間後にはほとんど検出できなくなった。この mRNA 合成の低下は分化させるための培養液のためでなく、細胞分化に伴ったものであることは、線維芽細胞 NIH3T3 細胞では低下しないことや脂肪細胞分化のマスタ転写因子である PPAR γ 2 が発現した直後に見られることなどより明らかである。mRNA と同様に *c-Maf* 蛋白質も低下することをウエスタンブロッティング法で確認した。PPAR γ 2 発現と *c-maf* 発現が逆に相関していることから PPAR γ 2 と *c-maf* 発現の関係を調べた。*c-maf* 遺伝子 5' 上流領域をレポーター遺伝子につなぎ、PPAR γ 2 の発現ベクターと共に線維芽細胞株 C3H10T1/2 細胞に導入した結果、PPAR γ 2 は *c-maf* の発現を抑制した。しかし、*c-maf* 遺伝子の転写制御領域に PPAR γ 結合部位が存在しないことか

ら、PPAR γ による c-maf の転写抑制は DNA 結合を介さないものと考えられた。我々は転写因子 Pax6、c-Jun、c-Maf が c-maf 遺伝子上流領域に結合し、転写を活性化することを報告したが、PPAR γ 2 による c-maf 遺伝子発現抑制はそれらの c-maf 遺伝子を活性化する転写因子を阻害するためではないかと考え、レポーター分析による解析を行った。その結果、PPAR γ 2 は Pax6 による c-maf 遺伝子の転写活性化を抑制した。PPAR γ 2 は Pax6 や c-Jun などの転写因子の活性を阻害することが報告されている。以上のことから、c-maf の脂肪細胞分化過程での発現抑制は PPAR γ 2 が c-maf 遺伝子発現を活性化する転写因子を阻害するためであると考えられた。この機構は転写補助因子、CBPなどをこれらの転写因子が競合するためではないかと推定される。

一方、筋肉細胞分化過程での c-maf 発現は、in vitro で筋肉細胞に分化する筋肉芽細胞株 C2C12 を用いて行った。C2C12 細胞が筋肉細胞に分化する過程での c-maf mRNA の発現を解析した結果、分化誘導 2 日後に c-maf の増加が見られた。筋肉細胞分化のマスター転写因子である MyoD は c-maf 発現の直前に活性化される。c-maf 遺伝子の 5' 上流には 2 つの典型的な MyoD 結合配列、E-box (CAGCTG) が 5 塩基隔てて存在し、この領域に MyoD が結合して c-maf 遺伝子の発現を活性化していることが予想された。このことを明らかにするため、ゲルシフト分析、DNaseI フットプリント分析を行い MyoD がこの領域に直接結合することを確認した。さらに、c-maf 遺伝子の 5' 上流領域を持つレポーター遺伝子と MyoD 発現ベクターを導入したレポーター分析によって、c-maf 遺伝子が E-box 依存的に MyoD によって活性化されることを明らかにした。これらの結果から筋肉分化過程では MyoD の発現によって c-maf 遺伝子も活性化されることが明らかになった。

以上の結果から同じ間葉系線維芽細胞から分化する脂肪細胞と筋肉細胞では c-maf の発現が全く異なることが明らかとなった。同じように間葉系細胞から分化する軟骨細胞も分化の最終段階である肥大軟骨細胞で特異的に発現されており、間葉系細胞からの分化過程には c-maf の発現変化が伴うことが示唆された。これらの細胞分化の過程で c-maf がどのような標的遺伝子を制御し、どのような働きをしているかが今後の課題である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 信 三
副 査 教 授 渡 辺 雅 彦
副 査 教 授 石 橋 輝 雄
副 査 助 教 授 酒 井 正 春

学 位 論 文 題 名

Differential Expression of *c-maf* during Adipocyte and Muscle Cell Differentiation

(脂肪細胞および筋肉細胞分化過程における *c-maf* 遺伝子の発現)

Maf はトリ肉腫ウイルス、AS42 が持つ癌遺伝子として見いだされた、bZip 構造を DNA 結合ドメインとして持つ転写因子である。この遺伝子は目の水晶体、軟骨、脊髄、筋肉、腎臓などの発生、分化の段階に特異的に発現している。Mafファミリーには多くの、転写因子、*c-Maf*, *MafB*, *MafA* (*L-Maf*), *Nr1*が含まれ、さらに、DNA 結合領域のみを持ち転写活性化ドメインを持たない Small Maf がいくつか知られている。それぞれが発生、分化に関わる重要な機能を持っていると考えられているが、*c-Maf* は目の水晶体分化、ヘルパーT細胞の Th1, Th2 への分化、軟骨分化に働くことなどが報告されている。本研究はどちらも間葉系線維芽細胞から分化する脂肪細胞と筋肉細胞において、それらの分化過程での *c-maf* 遺伝子の発現変化を調べ、脂肪細胞分化では抑制され、逆に筋肉分化過程では活性化されることを見いだした。さらに、これらの遺伝子発現の変化がどのような機構によるものかを分子レベルで明らかにした。前脂肪細胞培養株 3T3L1 をインスリン、グルココルチコイドを含む培養液で処理すると脂肪細胞へ分化する。この過程で *c-maf* mRNA の発現を調べたところ分化処理後 58 時間から *c-maf* mRNA が低下し、72 時間後にはほとんど検出できなくなった。この mRNA 合成の低下は分化させるための培養液のためでなく、細胞分化に伴ったものであることは、線維芽細胞 NIH3T3 細胞では低下しないことや脂肪細胞分化のマスター転写因子である PPAR γ 2 が発現した直後に見られることなどより明らかである。mRNA と同様に *c-Maf* 蛋白質も低下することをウエスタンブロッティング法で確認した。PPAR γ 2 発現と *c-maf* 発現が逆に相関していることから PPAR γ 2 と *c-maf* 発現の関係を調べた。*c-maf* 遺伝子 5' 上流領域をレポーター遺伝子につなぎ、PPAR γ 2 の発現ベクターと共に線維芽細胞株 C3H10T1/2 細胞に導入した結果、PPAR γ 2 は *c-maf* の発現を抑制した。し

かし、c-maf 遺伝子の転写制御領域に PPAR γ 結合部位が存在しないことから、PPAR γ による c-maf の転写抑制は DNA 結合を介さないものと考えられた。申請者らは転写因子 Pax6、c-Jun、c-Maf が c-maf 遺伝子の上流領域に結合し、転写を活性化することを報告したが、PPAR γ 2 による c-maf 遺伝子発現抑制はそれらの c-maf 遺伝子を活性化する転写因子を阻害するためではないかと考え、レポーター分析による解析を行った。その結果、PPAR γ 2 は Pax6 による c-maf 遺伝子の転写活性化を抑制した。PPAR γ 2 は Pax6 や c-Jun などの転写因子の活性を阻害することが報告されている。以上のことから、c-maf の脂肪細胞分化過程での発現抑制は PPAR γ 2 が c-maf 遺伝子発現を活性化する転写因子を阻害するためであると考えられた。この機構は転写補助因子 CBP などをこれらの転写因子が競合するためではないかと推定される。一方、筋肉細胞分化過程での c-maf 発現は、in vitro で筋肉細胞に分化する筋肉芽細胞株 C2C12 を用いて行った。C2C12 細胞が筋肉細胞に分化する過程での c-maf mRNA の発現を解析した結果、分化誘導2日後に c-maf の増加が見られた。筋肉細胞分化のマスター転写因子である MyoD は c-maf 発現の直前に活性化される。c-maf 遺伝子の 5' 上流には2つの典型的な MyoD 結合配列、E-box (CAGCTG)が 5 塩基隔てて存在し、この領域に MyoD が結合して c-maf 遺伝子の発現を活性化していることが予想された。このことを明らかにするため、ゲルシフト分析、DNaseI フットプリント分析を行い MyoD がこの領域に直接結合することを確認した。さらに、c-maf 遺伝子の 5' 上流領域を持つレポーター遺伝子と MyoD 発現ベクターを導入したレポーター分析によって、c-maf 遺伝子が E-box 依存的に MyoD によって活性化されることを明らかにした。これらの結果から筋肉分化過程では MyoD の発現によって c-maf 遺伝子も活性化されることが明らかになった。申請者の発表後、渡辺雅彦教授から細胞分化に伴って発現が変化する c-maf の標的遺伝子は何か、c-maf 欠損マウスの表現型とその脂肪組織や筋組織の発達について質問があり、申請者は L7 遺伝子(小脳プルキンエ細胞)、クリスタリン遺伝子(水晶体)、グルカゴン(膵臓)、インターロイキン遺伝子(T 細胞)などが標的遺伝子であること、c-maf 欠損マウスの90%が胎児死亡となり、生存するものは水晶体形成異常の報告があるが、脂肪組織、筋組織の発達での異常は報告されていないと回答した。ついで石橋輝雄教授から c-maf の Partner 分子として何が予測されるか質問があり、申請者は b-Zip domain を持つ c-Jun, c-Fos, ATF 等の可能性があると回答した。さらに酒井正春助教授から脂肪細胞、筋肉細胞分化過程での c-maf の機能を調べるためには、今後どのような研究が必要か、c-maf 欠損マウスで筋肉分化は正常と大きな変化はない理由について質問があった。申請者は c-maf 欠損マウス胎児細胞が脂肪や筋肉に分化されるか、またその過程での標的遺伝子の探索を進める必要があること、c-maf の結合配列は関連遺伝子、mafB, c-jun なども結合できる配列であり、これらの関連遺伝子などが c-maf の機能を相補していることが考えられると回答した。審査員一同は、これらの研究成果を評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受ける資格を有するものと判定した。