

学位論文題名

マウスペリリピン遺伝子の転写調節因子の解析

学位論文内容の要旨

哺乳動物の脂肪組織は、脂肪細胞の細胞質内に存在する脂肪滴に過剰なエネルギーを貯蔵する役割を有している。perilipin (ペリリピン) は細胞質内の脂肪滴周囲に存在するリン酸化蛋白であり、脂肪組織とステロイド産生臓器に特異的に発現し、脂肪滴の肥大化に関与している。脂肪細胞において、ホルモン感受性リパーゼ (HSL) による脂肪滴内のトリアシルグリセロールの加水分解は、リン酸化ペリリピンが促進的に働き、反対に非リン酸化ペリリピンは脂肪分解から脂肪滴を防御する働きがある。肥満を基礎とした生活習慣病の集積はインスリン抵抗性症候群やメタボリックシンドロームと称され、動脈硬化症や心血管系疾患の発症と強い関連性が示唆されている。肥満患者の脂肪組織では、形態学的に脂肪細胞の肥大化が認められ、肥大した脂肪細胞からは TNF- α や遊離脂肪酸 (FFA)、レジスチンなどのインスリン抵抗性惹起物質が産生される。チアゾリジン誘導体は、核内受容体である peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ の活性化を介して小型脂肪細胞の数を増加させ、インスリン抵抗性を改善する。PPAR γ が脂肪細胞の大きさをどのように調節しているかは不明な点が多いが、脂肪細胞の大きさがインスリン抵抗性の病態に重要と考えられる。

本研究では、肥満やインスリン抵抗性の病態に、脂肪滴の大きさの変化が重要であるという観点に立ち、3T3-L1 細胞を用いて、マウスペリリピン遺伝子の転写開始点を同定し、さらに転写開始点上流のプロモーター領域を解析することにより、遺伝子発現に関する転写調節因子の同定を行った。

ヒトおよびラットのペリリピン遺伝子翻訳開始点近傍と相同性を有する cDNA クローンの検索を mouse expressed sequence tag database (dEST) を用いて行い、検出されたクローンの配列をもとにアンチセンスプライマーを作成した。マウス脂肪組織から抽出した polyA⁺ RNA から cDNA を作成し、5'-rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE) 法を行い、得られた DNA 断片に ³²P で標識し、129SV/J マウス由来のゲノムライブラリーからマウスペリリピン遺伝子 5'側上流ゲノム DNA を単離した。つぎに脂肪細胞分化誘導後 4 日目の 3T3-L1 細胞から total RNA を抽出し、キャップ構造を有する完全長の mRNA のみから cDNA を増幅する方法である RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends (RLM-RACE) 法を施行し、得られた DNA 断片の塩基配列決定により 11 箇所の異なる転写開始点の存在を確認した。5'側の最上流の転写開始点を +1 としたが、既報の転写開始点よりも 7bp 上流に位置していた。最上流の転写開始点であることを確認するために、転写開始点 +1 の上流と下流にセンスプライマーを設定し、RT-PCR を行ったところ上流のセンスプライマーでは PCR による増幅が得られなかった。このことから RLM-RACE 法にて同定した転写開始点が最上流であることが確認された。多数の転写開始点の存在の理由と

しては、転写開始点上流近傍に TATA-, CAAT-, GC-box などのプロモーター構造を認めないことが考えられた。

次に得られた 5'側上流ゲノム DNA 約 2.4kb をルシフェラーゼ発現ベクターである pGL3 basic vector に連結し pGL3-2.4 を作成した。pGL3-2.4 をもとに 5'側を順に短縮した pGL3-2.0, pGL3-1.8, pGL3-1.4, pGL3-*HincII*, pGL3-*SacI*, pGL3-*PvuII* を作成し、分化誘導後 2 日目の 3T3-L1 細胞に遺伝子導入し、48 時間培養後ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、pGL3-1.8 と pGL3-1.4 の間に活性の顕著な差を認めた。この間の欠失した約 200bp の領域に転写因子結合部位が存在する可能性が高いと考え、転写開始点上流-2008bp から-1802bp を含む DNA 断片を最長に種々の長さの DNA 断片を SV40 プロモーターを含む pGL3 promoter vector の上流に連結したルシフェラーゼ発現ベクター pGL3pr-2008, pGL3pr-1957, pGL3pr-1933, pGL3pr-1858 を作成し、エンハンサー活性を検討した。その結果 pGL3pr-2008 のみ明らかなルシフェラーゼ活性上昇を認め、pGL3pr-2008 と pGL3pr-1957 の差である 51bp の領域が、エンハンサー領域であることが示された。

このエンハンサー領域には-1980bp から-1968bp に peroxisome proliferator-activated receptor responsive element (PPRE) コンセンサス配列と高い相同性をもつ配列を認めた。転写調節に PPAR γ が関与しているかどうかを検討するために、NIH-3T3 細胞にピオグリタゾン存在下で mPPAR γ 2 発現ベクターとともに pGL3-2.4 を遺伝子導入したところ mPPAR γ 2 ベクター容量依存性にルシフェラーゼ活性の上昇を認め、転写調節に PPAR γ が関与している可能性が示された。

PPRE と推測される領域を標識した野生型プローブおよび変異型プローブを作成しゲルシフトアッセイを行った。その結果、標識野生型プローブではシフトバンドを検出し、過剰な非標識野生型プローブを加えるとそのバンドは消失し、標識野生型プローブに抗 PPAR γ 抗体を加えるとスーパーシフトバンドを検出した。また、pGL3pr-2008 の PPRE 部位変異ベクターを作成し、NIH-3T3 細胞に導入したところ、野生型ベクターでは、ピオグリタゾンと mPPAR γ 2 発現ベクターを同時に投与した場合はルシフェラーゼ活性が上昇し、3T3-L1 細胞では、脂肪分化後の細胞に導入した場合で活性上昇を認めたが、変異ベクターではいずれの場合も有意な活性上昇は認めなかった。これらの結果から、この PPRE は PPAR γ と結合し、さらに機能性を有する PPRE であることが示された。

最後に、3T3-L1 脂肪細胞にピオグリタゾンとともに pGL3-2.4 を遺伝子導入したところ、pGL3-2.4 のルシフェラーゼ活性はピオグリタゾン容量依存性に上昇し、ピオグリタゾンが同定した PPRE を介して 3T3-L1 脂肪細胞におけるペリリピン遺伝子の発現を調節していることが明らかとなった。

このように脂肪滴の増大に深く関与しているペリリピンは、本研究で PPAR γ の調節を直接受けていることが明らかとなった。本研究では、ゲルシフトアッセイで同定した PPRE に別の核内受容体が結合する可能性も示唆されており、ペリリピンの転写調節を標的とする肥満治療は今後更なる検討が必要と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫
副 査 教 授 石 橋 輝 雄
副 査 教 授 浅 香 正 博

学 位 論 文 題 名

マウスペリリピン遺伝子の転写調節因子の解析

脂肪組織は、脂肪細胞の細胞質内に存在する脂肪滴に過剰なエネルギーを貯蔵する役割を有している。ペリリピンは細胞質内の脂肪滴周囲に存在するリン酸化蛋白であり、脂肪滴の肥大に関与する。また、ホルモン感受性リパーゼによる脂肪の加水分解は、リン酸化ペリリピンが促進的に働き、反対に非リン酸化ペリリピンは脂肪分解から脂肪滴を防御する働きがある。肥満は、生活習慣病やインスリン抵抗性症候群との強い関連性が示唆されている。肥満患者の脂肪組織では、形態学的に脂肪細胞の肥大化が認められ、肥大した脂肪細胞からはインスリン抵抗性惹起物質が産生される。このことから脂肪細胞の大きさがインスリン抵抗性の病態に重要と考えられる。本研究では、肥満やインスリン抵抗性の病態に、脂肪滴の大きさの変化が重要であるという観点に立ち、3T3-L1 細胞を用いて、マウスペリリピン遺伝子の転写開始点を同定し、さらに転写開始点上流のプロモーター領域を解析することにより、遺伝子発現に関与する転写調節因子の同定を行った。3T3-L1 脂肪細胞から総 RNA を抽出し、キャップ構造を有する完全長の mRNA のみから cDNA を増幅する方法である RLM-RACE 法を施行し、得られた DNA 断片の塩基配列決定により 11 箇所の異なる転写開始点の存在を確認した。また、3 種の選択的スプライシングを認めた。5'側の最上流の転写開始点を+1 としたが、既報の転写開始点よりも 7bp 上流に位置していた。転写開始点+1 の上流と下流にセンスプライマーを設定し、RT-PCR を行ったところ上流のセンスプライマーでは PCR による増幅が得られなかった。このことから本研究で同定した転写開始点が最上流であることが確認された。また、転写開始点上流近傍に TATA-, CAAT-, GC-box などのプロモーター構造を認めなかった。

次に転写開始点上流のプロモーター領域約 2.4kb を pGL3 basic vector に連結して pGL3-2.4 を作成し、さらにそれをもとに種々の長さのプロモーター領域を結合したルシフェラーゼ発現ベクターを作成した。3T3-L1 細胞に遺伝子導入しルシフェラーゼアッセイを行ったところ、転写開始点上流約 2.0kb から約 1.8kb の間に活性の顕著な差を認めた。この間の短縮した約 200bp の領域を SV40 プロモーターを含む pGL3 promoter vector の上流に連結したルシフェラーゼ発現ベクターを作成し同様に活性値を測定したところ、-2008bp と-1957bp の間に転写因子結合領域が存在することが示唆された。この領域内に転写因子 PPAR γ の結合する配列である PPRE と高い相同性をもつ配列を認めた。PPAR γ を発現していない NIH-3T3 細胞にピオグリタゾン存在下で PPAR γ 発現ベクターとともに pGL3-2.4 を遺伝子導入したところ PPAR γ 発現ベク

ター容量依存性にルシフェラーゼ活性の上昇を認め、転写調節に PPAR γ が関与している可能性が示された。PPRE と推測される領域を標識した野生型プローブおよび変異型プローブを作成しゲルシフトアッセイを行ったところ、標識野生型プローブではシフトバンドを検出し、過剰な非標識野生型プローブを加えるとそのバンドは消失し、抗 PPAR γ 抗体を加えるとスーパーシフトバンドを検出した。また、PPRE 部位変異ベクターを作成し、ピオグリタゾンと PPAR γ 発現ベクターを投与した NIH-3T3 細胞と 3T3-L1 脂肪細胞に導入したが、活性の上昇を認めなかった。これらの結果から、本研究で同定した PPRE は PPAR γ と結合する機能性 PPRE であることが証明された。最後に、3T3-L1 脂肪細胞にピオグリタゾンとともに pGL3-2.4 を遺伝子導入したところ、活性はピオグリタゾン容量依存性に上昇した。以上より、PPAR γ は同定した PPRE を介して 3T3-L1 脂肪細胞においてペリリピン遺伝子の発現を直接調節していることが明らかとなった。質疑応答では、副査石橋教授から、転写開始点が既報の結果と異なる理由について、ペリリピン蛋白の脂肪滴へ移動のメカニズムと受容体の存在について、脂肪細胞の大きさとペリリピン量との関係について、他の PPAR も転写調節に関与するかについての質問があった。次いで副査浅香教授から、PPAR γ の抑制と脂肪細胞の大きさについて、ペリリピン遺伝子制御の臨床応用について、ペリリピンの活性と動脈硬化・糖尿病との関係についての質問があった。次いで主査小池教授から、PPAR family 以外の転写因子の関与の可能性について、ピオグリタゾンを vivo に投与した場合のペリリピンの発現について、研究成果を踏まえて今後の臨床応用への展望についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は概ね適切に回答した。

この論文は、脂肪細胞の分化に関与する因子 PPAR γ の新たなターゲット遺伝子にペリリピンが加わることを初めて明らかにした点で高く評価され、本論文の成果から今後の肥満の病態解明と新しい治療開発が期待される。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、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)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。