



Title	核内受容体PPAR γ 結合塩基配列の同定と標的遺伝子の探索
Author(s)	奥野, 正顕
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42280
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	おくのまさあき 奥野正顕
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第16148号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科環境生物薬学専攻
学位論文名	核内受容体 PPAR γ 結合塩基配列の同定と標的遺伝子の探索
論文審査委員	(主査) 教授 西原 力 (副査) 教授 前田 正知 教授 真弓 忠範 教授 松田 敏夫

論文内容の要旨

近年、我が国の食生活の欧米化に伴い、糖尿病、高脂血症、動脈硬化などの生活習慣病は深刻な問題となりつつある。肥満は、これらの疾患の危険因子として位置付けられており、エネルギー摂取と消費のアンバランスにより体内に過剰な脂肪組織が蓄積した状態を指す。成人の軽度の肥満では、個々の脂肪細胞の脂肪含量が増加し、細胞が肥大化する。しかし、脂肪細胞の大きさには限界があるため、さらに過剰の食物をとると脂肪細胞の数が増加する。脂肪組織では、細胞周期において休止期のある前駆脂肪細胞が多数存在し、摂食や栄養条件などの影響を受けると、それらはすみやかに脂肪細胞へと分化すると考えられている。この前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化過程に関しては、株化された培養細胞を用いて詳細に検討されており、複数の転写因子がクロストークし、脂肪細胞を特徴付ける遺伝子の発現を調節することが報告されている。そのなかでも、核内受容体型の転写因子である peroxisome-proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) は脂肪分化に必須のマスターレギュレーターとして位置付けられている。

PPAR γ は RXR α とヘテロダイマーを形成して PPAR 応答配列に結合し、抗糖尿病薬チアゾリジン誘導体やプロスタグランジン J_2 誘導体などのリガンド依存的に標的遺伝子の転写を調節することが知られている。近年、PPAR 応答配列のコンセンサス配列が、AGGTCA からなるハーフサイトが1塩基を隔ててタンデムに並んだ DR1 であることに加え、さらにその5'側の配列が AACT であることが判明した。しかしながら、PPAR γ がその他の配列に結合するかどうかについては詳細に検討されていない。

一方、RXR α は PPAR γ に加えて、RAR、TR、VDR などの核内受容体の共通のパートナーとして働いている。従って、発現量の変動などの理由により、これらのレセプターと RXR α の結合が優勢になると、遊離の RXR α が減少することが推定される。しかしながら、現在までに PPAR γ 、RXR α の存在する比率が変わると、DNA への結合性が変化するかどうかについては報告されていない。そこで、PPAR γ と RXR α の存在する比率の違いが結合塩基配列に及ぼす影響について検討するために、ランダムセレクション法およびゲルシフト法を行った。

27塩基の任意の配列と制限酵素認識配列を含む79merのオリゴヌクレオチドとバキュロウイルスにより発現させた PPAR γ および RXR α を用いてランダムセレクションを行った。両タンパク質を等量用いてセレクションを行った結果、選択された全てのオリゴヌクレオチドにおいて完全な DR1 配列が認められた。一方、RXR α に対して30倍量の PPAR γ を用いたところ、選択されたオリゴヌクレオチドの約半数において Pal3 配列が認められた。それに対

して、DR1配列を有するオリゴヌクレオチドは全体の約10%を占めるに過ぎなかった。これらの結果は、PPAR γ とRXR α の存在する比率が変わるとDNAへの結合性が変化することを示唆している。さらに、ゲルシフト法によって、等量のPPAR γ 及びRXR α の存在下、PPAR γ はRXR α とヘテロダイマーを形成してDR1に強く結合するが、PPAR γ が過剰な条件下では、ホモダイマーを形成してPal3に結合することが明らかとなった。従って、何らかの理由でRXR α が減少するかPPAR γ の発現量が増大した場合、相対的に過剰となったPPAR γ がホモダイマーを形成してPal3に結合し、その結果、標的遺伝子が変わる可能性があることが推定された。

培養細胞やノックアウトマウスを用いた解析から、PPAR γ は脂肪分化に必須であることが証明されている。すでに、PPAR γ の発現機構については詳細に検討されており、転写因子であるC/EBP β 、C/EBP δ によって転写レベルで正に制御されることが報告されている。それに対して、PPAR γ の標的遺伝子はいくつか知られているものの、それだけでは脂肪細胞におけるPPAR γ の機能を説明することはできない。そこで次に、PPAR γ によって発現が制御される遺伝子を明らかにすることを試みた。

まず最初に、PPAR γ を強制的に発現させたNIH-3T3繊維芽細胞を構築した。本来は脂肪細胞に分化しないNIH-3T3細胞にPPAR γ を発現させると、リガンドを含む誘導剤に応答して脂肪細胞へと分化することが報告されている。この時、主としてPPAR γ の標的遺伝子の発現が変化し、それらは分化の誘導、維持に関与するものと思われる。PCR-select cDNA サブトラクション法を行った結果、PPAR γ 発現細胞の脂肪細胞への分化過程において、発現量が増加する遺伝子が17クローン、減少する遺伝子が10クローン単離された。PPAR γ によって発現が調整される遺伝子は、通常の前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化過程において、その発現が変化すると考えられる。サブトラクションで単離されたクローンのうち、Ahd-2-like、 $\alpha 3$ (VI) collagen、CRABP1、TSP1は3T3-L1前駆脂肪細胞の分化時においても発現の変化が認められた。さらにPPAR γ 発現細胞にリガンドを添加した時、 $\alpha 3$ (VI) collagen、CRABP1、TSP1の発現が変化することが明らかとなった。従って、これらの遺伝子はPPAR γ によって制御される新たな標的遺伝子の候補であると考えられた。

以上、本研究においてPPAR γ 結合塩基配列の同定と標的遺伝子の探索について検討を行った。これらの成果はPPAR γ の新たな機能の発見につながるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

奥野君は、脂肪細胞分化の分子メカニズムを解明するため、分化過程に重要な役割を果たしている転写因子PPAR γ について分子生物学的に検討し、以下の知見を得た。まずPPAR γ はRXRとヘテロダイマーを形成してDR1配列と結合する以外に過剰量存在する場合にはホモダイマーを形成し、PAL3配列にも結合できることを明らかにするとともに、脂肪細胞分化過程において発現量が増加し、PPAR γ のリガンドに反応したことから3種類のPPAR γ の新規標的遺伝子を検索した。

以上の成果は、肥満防止にもつながる基礎的知見であり、学術的に高く評価され、博士(薬学)学位論文として充分価値あるものと認められる。