

Title	Estrogen Suppresses Transcription of Lipoprotein Lipase Gene EXISTENCE OF A UNIQUE ESTROGEN RESPONSE ELEMENT ON THE LIPOPROTEIN LIPASE PROMOTER
Author(s)	本間, 裕朗
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42695">https://hdl.handle.net/11094/42695</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	ほん ま ひろ あき 本 間 裕 朗
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 5 7 6 4 号
学位授与年月日	平成12年10月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Estrogen Suppresses Transcription of Lipoprotein Lipase Gene EXISTENCE OF A UNIQUE ESTROGEN RESPONSE ELEMENT ON THE LIPOPROTEIN LIPASE PROMOTER (エストロゲンによる Lipoprotein Lipase の転写制覇)
論文審査委員	(主査) 教授 村田 雄二  (副査) 教授 松澤 佑次 教授 遠山 正彌

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [目的]

閉経後女性では肥満、特に内臓が起り易く、エストロゲン補充はこれを抑制するとされている。また、卵巣摘除マウスでも肥満がみられ、これはエストロゲンにより抑制される。これらの事実よりエストロゲンは肥満抑制作用を有すると考えられるが、その機序は必ずしも明らかでない。今回、我々はマウス3T3-L1脂肪細胞に構成的にエストロゲン受容体 (ER) を発現させ、エストロゲンの脂肪合成への影響を観察した。

#### [方法ならびに成績]

1. エストロゲン応答性脂肪細胞の作成 元来 ER を持たない3T3-L1細胞にヒト ER 発現ベクター、またはベクターのみをリポフェクション法により遺伝子導入し、それぞれ3T3-L1-ER と3T3-L1-VC 細胞株を樹立した。ER の発現はウエスタンブロット法にて確認した。これらの細胞を定法に従い脂肪細胞に分化させたところ、親株と同様の分化が観察された。

#### 2. 脂肪蓄積に対するエストロゲンの効果

これらの細胞を $10^{-7}$ Mのエストロゲン添加または非添加のもと4日間培養しオイルレッドO染色を行った。その結果、3T3-L1-ER においてのみエストロゲン添加により脂肪滴の蓄積量の減少が見られ、トリグリセリド量が約3分の1に減少した。さらに同じ細胞より mRNA を抽出し、脂肪合成の律速酵素の1つであるリポプロテインリパーゼ (LPL) のノザンブロット解析を行った結果、エストロゲン添加により LPL mRNA 発現量は約8分の1まで減少した。

3. マウス LPL 遺伝子転写調節領域のエストロゲン応答性 LPL 遺伝子5'上流域-1980bp を CAT レポーター遺伝子に接続し pLPL (-1980) -CAT を作成、ER とともに分化2日目の3T3-L1細胞に遺伝子導入し、エストロゲン添加後 CAT アッセイに供した。その結果 pLPL (-1980) -CAT の活性はエストロゲン添加により非添加時の6分の1まで抑制された。さらに-1980bp の5'上流域を順次短縮し、一連の pLPL (-1980) -CAT の欠変異体を作成しエストロゲン応答エレメントの存在部位を解析した。これにより LPL 遺伝子5'上流域におけるエストロゲン応答部位は、-1856から-1850までの、AP-1 結合配列に類似する、TGAATTC 配列であることが判明した。

4. エストロゲン応答部位に対する結合蛋白の解析 3T3-L1-ER より抽出した核蛋白を用いて-1856から-1850の配列 (TGAATTC) を含む DNA 断片をプローブとし、electromobility shift analysis (EMSA) を行った。その結

果 TGAATTC 配列に特異的に結合する蛋白が検出された。この蛋白は典型的な AP-1 結合配列 (TGACTCA) にも結合するが、c-Jun、c-Fos をはじめとする既知の AP-1ファミリーに属する転写因子、あるいは ER に対するいずれの抗体とも反応せず、AP-1蛋白と機能的に類似はするものの、既知の AP-1ファミリーや ER とは異なった核内因子であることが示唆された。

5. エストロゲンによる LPL 遺伝子転写抑制における CREB binding protein (CBP) 関与の可能性の検討 上記 4 の結果から、EMSA により同定された核内因子はエストロゲンによる LPL 遺伝子の転写抑制に何らかの関与をしていることが示唆された。認識する DNA 結合配列から未知の AP-1関連蛋白と推定されたので、AP-1と核内レセプターファミリー両者に共通の transcriptional integrator とされる CREB binding Protein (CBP) を過剰発現させ、エストロゲンによる転写抑制が解除されるか否かを検討した。その結果、エストロゲンによる LPL 遺伝子の転写抑制は CBP の過剰発現により解除された。従って、LPL 遺伝子のエストロゲン応答性転写抑制エレメント (TGACTCA) に結合する核内因子は既知の物質とは異なる AP-1関連蛋白であることがなお一層強く示唆された。

[総括]

エストロゲンはマウス LPL 遺伝子のプロモーター活性を、転写開始点上流-1856/-1850に存在する AP-1様配列 TGACTCA に応答し転写抑制する。このエストロゲン応答性転写抑制エレメントに結合する核内因子は既知の物質とは異なる AP-1関連蛋白であることが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

急速に進行する高齢化社会にあって、今日我が国でも高齢者の Quality of Life (QOL) の向上が叫ばれており、閉経後女性に増加する動脈硬化と密接に関連する性虚血性心疾患、骨粗鬆症などに対するエストロゲン療法 (Estrogen Replacement Therapy:ERT) が注目されている。ERT の作用がいかんして発揮されるかは今日なお完全に解明されたわけではないが、エストロゲンは脂質代謝に影響を持つことが知られている。一方、マウスにおいては卵巣摘除すると肥満がおこり、エストロゲン補充により肥満が抑制される。このメカニズムとして、脂肪組織での直接のエストロゲンの作用を生化学的あるいは分子生物学的に解析した研究は少ない。

今回、申請者はエストロゲン受容体を安定導入したマウス脂肪細胞系を用いて、脂肪蓄積の律速酵素である lipoprotein lipase (LPL) のエストロゲンによる転写制御を解析することにより、エストロゲンの脂質代謝に対する影響及びその作用機序解明を試みた。その結果、エストロゲンによる LPL 遺伝子の発現抑制には-1856/-1860領域に存在する AP-1 like TGAATTC 塩基配列が重要であることを見いだした。この塩基配列は特異的 DNA-核蛋白複合体を形成した。この複合体は興味深いことに ER、cJun、JunB、JunD などに対する抗体に添加によって影響を受けなかった。またこの塩基配列はフォルボールエステルに反応し、また CREB binding protein (CBP) によりエストロゲンの抑制効果が消失することから、AP-1転写因子に関連したある種の蛋白の関与が明らかとなった。

本論文はエストロゲンの肥満抑制のメカニズムに関与する LPL プロモーター上の塩基配列を同定した点で先進的であり、その内容は学位論文に値すると考えられる。