



Title	脂肪細胞分化初期に発現が変動する遺伝子群の単離および機能解析
Author(s)	西塚, 誠
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44140">https://hdl.handle.net/11094/44140</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">〈a href="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">〈/a〉</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	にし か塚 まこと
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 7 7 8 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻
学 位 論 文 名	脂肪細胞分化初期に発現が変動する遺伝子群の単離および機能解析
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 西 原 力 (副査) 教 授 山 元 弘 教 授 土 井 健 史 教 授 花 岡 文 雄

#### 論 文 内 容 の 要 旨

糖尿病、高脂血症、動脈硬化症などの生活習慣病の主要な危険因子としての肥満の重要性が注目されている。肥満とは、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である。これまで、肥満の形成には脂肪組織内の成熟脂肪細胞の肥大化が主な要因と考えられてきたが、近年になり、前駆脂肪細胞が成熟脂肪細胞へと分化し、その数が増えることも重要であることがわかってきた。すなわち、肥満およびそれに起因する疾病の治療や創薬開発には、脂肪細胞の肥大化やインスリン抵抗性メカニズムの解明とならび、脂肪細胞分化のメカニズムの解明も最重要課題の一つと考えられる。

脂肪細胞の分化については、PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) や C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) ファミリー、SREBP-1 (sterol regulatory element-binding protein 1) が重要な役割を担っていることが明らかにされているが、いずれも分化中期以降に発現が増加する因子であり、脂肪細胞分化初期の分子メカニズムはほとんど解明されていない。

我々の研究室ではこれまでに、PCR-サブトラクション法を用いて分化誘導開始3時間後に発現が増加する遺伝子の単離を行ってきた。単離した遺伝子群の一部はすでに塩基配列が決定されており、単離された遺伝子群には independent なクローンが非常に多く含まれていることが明らかにされている。この結果より、サブトラクションされた遺伝子の母集団がかなり大きいことが予想された。

そこで本研究では、サブトラクションされた遺伝子群の未解析の一部を解析することにより、さらに多くの分化誘導3時間後に発現が増加するクローンを単離することを試みた。さらに単離された遺伝子群の脂肪細胞分化過程における役割ならびに機能について検討を行うことにより、脂肪細胞分化初期の分子メカニズムの解明を試みた。

まず、サブトラクションされた cDNA のプールの一部をサブクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、新たに分化誘導3時間後に発現が増加する因子を44クローン単離した。単離された遺伝子群の中で特に、TCL/TC10 $\beta$ L (TC10-like/TC10 $\beta$  Long)、RGS2 (regulator of G-protein signaling 2)、Bach1、ARA70 (androgen receptor associated protein 70) の4つの遺伝子に注目し、分化過程における発現について詳しく検討を行った。その結果、いずれの遺伝子も分化誘導後1~6時間に発現が最大となり、その後すみやかに減少すること、さらに、これら4つの遺伝子の発現が脂肪細胞分化時に特に大きいことを明らかにした。これらの結果から、この4つの因子が脂肪細胞分化初期において機能していることが示唆された。

そこで、特に TCL/TC10 $\beta$ L と RGS2 に注目し、アンチセンス mRNA 発現系とセンス mRNA 発現系を用いて、両遺伝子の脂肪細胞分化における役割についてさらに検討を行った。TCL/TC10 $\beta$ L のアンチセンス mRNA を発現する stable transformant に分化誘導剤を添加した結果、脂肪滴の蓄積が阻害された。また、この分化過程において PPAR $\gamma$ 、SREBP-1、C/EBP $\alpha$  の発現も減少した。これらの結果より、TCL/TC10 $\beta$ L の発現を抑制することにより、脂肪細胞の分化が阻害されることが明らかとなった。

さらに、脂肪細胞への分化能を持っていない NIH-3T3 細胞に TCL/TC10 $\beta$ L のセンス mRNA を発現させた stable transformant を樹立し、その分化能を検討した。insulin、IBMX、Dex、FBS に加えて PPAR $\gamma$  のリガンドである BRL49653 を添加した結果、脂肪滴の蓄積が観察され、aP2、LPL の発現量が分化に伴い増加していることが明らかになった。また、この分化過程において、PPAR $\gamma$ 、SREBP-1 の発現量が分化に伴い増加した。以上の結果より、PPAR $\gamma$  のリガンド存在下、TCL/TC10 $\beta$ L センス mRNA 発現細胞は脂肪細胞へ分化することが明らかとなった。RGS2 のセンス mRNA 発現細胞についても TCL/TC10 $\beta$ L センス mRNA 発現細胞同様の結果が得られた。すなわち、RGS2 センス mRNA 発現細胞も PPAR $\gamma$  のリガンド存在下、脂肪細胞へ分化すること、さらに PPAR $\gamma$ 、SREBP-1 の発現量が増加することを明らかにした。これらの結果より、脂肪分化初期に TCL/TC10 $\beta$ L ならびに RGS2 が、PPAR $\gamma$  のリガンドに依存して PPAR $\gamma$ 、SREBP-1 をより強く誘導することにより、脂肪細胞分化を正に制御していることが強く示唆された。

次に、両遺伝子の脂肪細胞分化過程における機能の解析を試みた。TCL/TC10 $\beta$ L については PCR・サブトラクション法、RGS2 については DNA チップ解析を用いて、両遺伝子により発現が制御される因子の単離を試みた。単離された遺伝子群には、転写因子やシグナル伝達に関与する遺伝子が多数見られ、さらに、単離された遺伝子の多くが TCL/TC10 $\beta$ L および RGS2 と同様、3T3-L1 細胞の分化初期過程において発現が変動していた。また、RGS2 の Flag 融合タンパク質を作製し、3T3-L1 細胞分化誘導 24 時間後の核抽出液との pull down assay および質量分析計を用いた検討により、RGS2 と相互作用する因子として bridging integrator 3 ならびに A-kinase anchoring protein 4 を同定した。これらの結果より、TCL/TC10 $\beta$ L および RGS2 は脂肪細胞分化過程において様々な因子の発現を調節し、さらに他のタンパク質と相互作用することにより脂肪細胞分化を制御している可能性が示唆された。

本研究において脂肪細胞分化初期に発現が増加する遺伝子群を新たに 44 クローン単離し、TCL/TC10 $\beta$ L および RGS2 が PPAR $\gamma$  のリガンド存在下に、脂肪細胞分化を誘導することを明らかとした。また、両遺伝子が脂肪細胞分化過程において多くの遺伝子群の発現を制御していること、他の因子と相互作用している可能性も示唆された。脂肪細胞分化は、複雑なメカニズムによって制御されていると思われるが、本研究はそのメカニズムの一端を明らかにしたものであり、今後の更なる解析につながることを期待される。

## 論文審査の結果の要旨

西塚君は、肥満につながる脂肪細胞の分化機構について、分子遺伝学的手法を駆使し、分化初期に変動する遺伝子を新たに 44 クローンを単離・検討した。特に、分化誘導 3 時間後に発現が増加する遺伝子群のうち、TCL/TC10 $\beta$ L、RGS2、Bach1、ARA70 の 4 遺伝子群について詳細に解析し、これらの因子が脂肪分化初期に機能している可能性を示した。さらに前 2 因子のアンチセンスおよびセンス mRNA を発現する stable transformant 細胞を作成し、分化誘導剤の添加と脂肪滴の蓄積、PPAR $\gamma$ 、SREBP-1、C/EBP $\alpha$  の発現との関係を検討し、両因子がリガンドに依存して PPAR $\gamma$  と SREBP-1 を強く誘導することを明らかにした。さらに両因子の機能について PCR・サブストラクション法や DNA チップ解析を用いて検討し、脂肪細胞分化過程において多くの因子の発現調節と他タンパク質との相互作用により、分化を正に制御している可能性を示した。

以上の成果は、学術的に重要な新知見をみいだしただけでなく、肥満防止につながる有益な知見であり、学術的にも社会的にも高く評価され、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。