



Title	Adipose expression of catalase is regulated via a novel remote PPAR $\gamma$ -responsive region
Author(s)	奥野, 陽亮
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/48964">https://hdl.handle.net/11094/48964</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=" <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>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	奥野陽亮
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第21812号
学位授与年月日	平成20年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Adipose expression of catalase is regulated via a novel remote PPAR $\gamma$ -responsive region (脂肪組織におけるカタラーゼの発現は新規遠位 PPAR $\gamma$ 応答領域を介して制御される)
論文審査委員	(主査) 教授 下村伊一郎 (副査) 教授 大薗 恵一 教授 堀 正二

## 論文内容の要旨

## 〔目的〕

肥大した脂肪組織では抗酸化酵素の発現低下と共に酸化ストレスが上昇し、これが肥満に伴うインスリン抵抗性の病態に関与している事が報告されている。今回の実験では、主要な抗酸化酵素の一つであるカタラーゼの、脂肪細胞における発現調節を解明する事を目的とした。

## 〔方法ならびに成績〕

C57BL/6J マウスを用い、各組織におけるカタラーゼ mRNA 量を調べたところ、肝臓、腎臓に並び、白色脂肪組織、褐色脂肪組織において発現が高かった。また、3T3-L1 前駆脂肪細胞を脂肪細胞に分化誘導すると、カタラーゼ mRNA は上昇した。3T3-L1 成熟脂肪細胞に対し、インスリン抵抗性惹起因子である TNF  $\alpha$  を処理するとカタラーゼ mRNA は減少した。これらの変化は核内受容体 PPAR  $\gamma$  の発現変化に一致していたので、PPAR  $\gamma$  作動薬であるピオグリタゾンによる発現制御を検討した。肥満糖尿病モデルマウス KKAY 及び対照マウス KK にピオグリタゾンを 6 日間投与したところ、白色脂肪組織におけるカタラーゼ mRNA は上昇した。このような変化は脂肪細胞特異的であり肝臓では見られなかった。3T3-L1 脂肪細胞においてもピオグリタゾンはカタラーゼ mRNA 及び活性を上昇させた。次に、マウスカタラーゼのプロモーター領域を bacterial artificial chromosome (BAC) recombination 法を用いてクローニングし、ルシフェラーゼアッセイを行った。3T3-L1 成熟脂肪細胞において 10.4 kb 長のプロモーターはピオグリタゾンによって活性が顕著に上昇したが、-9054 bp から -9024 bp、-8934 bp から -8911 bp を持たないプロモーターはピオグリタゾンによる応答性が著しく減弱した。また、-9054 bp から -8911 bp の配列をウイルスプロモーター SV40 に接続したもの (-9054/-8911-SV40) はピオグリタゾンに対する応答性を獲得した。COS-1 細胞において mammalian two hybrid を行ったところ、-9054/-8911-SV40 は PPAR  $\gamma$  とその相補因子である RXR  $\alpha$  の恒常活性体である VP16-PPAR  $\gamma$  及び VP16-RXR  $\alpha$  に応答した。-9054/-8911 には PPAR  $\gamma$  応答配列 (PPRE) 様のコンセンサス配列 (PPRE1, PPRE2) が二つ存在したので、これらの配列に点突然変異を加えたところ、mammalian two hybrid における -9054/-8911-SV40 の VP16-PPAR  $\gamma$ /VP16-RXR  $\alpha$  に対する応答性は減弱した。さらに、9054

bp 長のプロモーターに対して PPRE に点突然変異を加えたところ、ピオグリタゾンに対する応答性は減弱した。

次に、PPRE と PPAR $\gamma$  の結合をゲルシフト法によって評価した。PPRE をアイソトープで標識し、3T3-L1 成熟脂肪細胞の核抽出物を加え、in vitro でインキュベートした後に電気泳動で展開したところ、明確なバンドが出現した。このバンドは PPAR $\gamma$  に対する抗体によって高分子領域にシフトした事から、これは PPAR $\gamma$  と PPRE が結合したものであった。さらに、3T3-L1 成熟脂肪細胞においてクロマチン免疫沈降法を用い、PPAR $\gamma$  と PPRE の in vivo における結合を評価した。PPAR $\gamma$  に対する抗体で 3T3-L1 成熟脂肪細胞の核抽出物を免疫沈降して得られたクロマチンに対して PCR をかけると、カタラーゼの PPRE の増幅が見られ、in vivo においても PPAR $\gamma$  はカタラーゼの PPRE に結合している事が明らかとなった。

#### [総括]

本研究により、脂肪細胞におけるカタラーゼの発現は他臓器に比べて高く、TNF $\alpha$  によって負に制御される事が明らかとなった。また、カタラーゼのプロモーターの遠位には 2 つの PPAR $\gamma$  応答配列が存在し、カタラーゼの発現は PPAR $\gamma$  によって直接正に制御されている事が明らかとなった。PPAR $\gamma$  は脂肪組織で発現が高く、肥満脂肪組織や TNF $\alpha$  によりインスリン抵抗性状態となった脂肪細胞では発現が低下する事が知られており、これらの状態でカタラーゼの発現が低下するのは PPAR $\gamma$  による制御が低下している可能性が示唆される。また、ピオグリタゾンは臨床的に抗糖尿病薬として用いられており、酸化ストレスを減弱させる作用があることも知られているが、これらの効果がカタラーゼの発現誘導を介している可能性も示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、脂肪組織の酸化ストレスに重要な働きを持つカタラーゼの遺伝子発現変化を詳細に解析したものである。カタラーゼの発現は脂肪組織で高く、脂肪細胞の分化で誘導され、TNF $\alpha$  処理によって減弱した。さらにマウスカタラーゼプロモーターを詳細に解析した結果、転写開始点より 9 kb 上流という非常に遠位な位置に PPAR $\gamma$  応答配列二つを含む領域を同定した。PPAR $\gamma$  が応答配列に結合する証明としては、Mammalian One Hybrid 法、ゲルシフト法、クロマチン免疫沈降法を組み合わせており、信頼性の高い実験結果となっている。今回の実験結果により、病態における脂肪組織カタラーゼの発現変化のメカニズムのみならず、抗糖尿病薬である PPAR $\gamma$  作動薬が直接カタラーゼの発現を誘導して脂肪細胞の酸化ストレスを除去する可能性が示唆され、学術的な意義は高く、学位の授与に値すると考えられる。