

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 有村 直人

脂肪細胞は生体内のエネルギー源として中性脂肪を貯蔵する細胞である。脂肪細胞の形態的特徴である脂肪滴はトリアシルグリセロールを核とし、リン脂質やコレステロールで構成される脂質一重層、さらに数種類のタンパク質により覆われている。その中で発現量が多いPerilipinは、脂肪細胞やステロイド産生細胞特異的に発現するタンパク質であり、脂肪滴の形成に必須であると考えられている。前駆脂肪細胞はホルモンなどにより刺激されると、転写因子PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ)、SREBP (sterol regulatory element-binding protein)などが活性化され、脂肪細胞へ分化する。近年、コレステロールや脂肪酸代謝体などの細胞内脂質が核内受容体のリガンドとして機能したり、転写因子の活性を制御したりすることが明らかになりつつある。従って、脂肪細胞における脂肪滴の形成は中性脂肪を貯蔵する機能の他に、機能的な細胞内脂質の濃度や種類を調節することで脂肪細胞分化を制御している可能性が考えられる。そこで、本論文では、脂肪細胞における脂肪滴形成と脂肪細胞分化の制御機構の一端を明らかにすることを目的とし、脂肪細胞分化過程におけるPerilipinの発現制御機構の解析、さらに脂肪細胞分化時の脂肪滴形成による転写因子SREBP活性化の検討が行われた。

第一章では、脂肪細胞分化および脂肪滴形成機構に関する知見と、それを調節する核内受容体、転写因子に関する近年の研究について概説している。

第二章では、脂肪細胞分化におけるPerilipin遺伝子の発現制御機構の解析が行われた。Perilipinは脂肪細胞分化に伴い発現量が上昇するが、制御機構についてはまだ明らかにされてはいない。そこで、脂肪細胞分化におけるPerilipin遺伝子の発現制御機構を明らかにすることを目的として、解析が行われた。脂肪細胞分化を制御する主要な転写因子であるPPAR γ の合成リガンドをマウス3T3-L1脂肪細胞に添加することにより、Perilipin発現量は上昇した。また、脂肪細胞分化誘導培地にPPAR γ 合成リガンドを添加したところ、脂肪細胞分化初期段階でPerilipin発現および脂肪滴形成が認められた。PPAR γ がPerilipin遺伝子の転写を直接制御するか検討する目的で、マウスPerilipin遺伝子5'上流域約2.0kb以下様々な領域を含むレポーター遺伝子を作成し、ルシフェラーゼアッセイにより解析を行った。3T3-L1脂肪細胞にPPAR γ 合成リガンドを添加したところ、5'上流域約2.0kbを含むレポーター遺伝子では活性の上昇が認められたが、5'上流域約1.9kb以下を含むレポーター遺伝子では認められなかった。また、3T3-L1前駆脂肪細胞にPPAR γ 発現プラスミドを遺伝子導入したところ、5'上流域約2.0kbを含むレポーター遺伝子では活性の上昇が認められたが、5'上流域約1.9kb以下を含むレポーター遺伝子では顕著な活性の上昇は認められなかった。以上からPerilipin遺伝子5'上流域約2.0kb-1.9kbの約100bp間にPPAR γ 応答配列 (PPRE)の存在が示唆され、検討したところ、相同性が高い配列が1ヶ所存在した。この配列に変異を入れたレポーター遺伝子ではPPAR γ による顕著な活性の上昇は認められず、ゲルシフトア

ッセイおよびChIPアッセイにより解析したところPerilipin遺伝子プロモーター領域上のPPREとPPAR γ の複合体が検出された。以上からPerilipin遺伝子はPPAR γ により直接転写が制御されることが明らかにされた。

第三章では、脂肪滴形成によるSREBP活性化機構の解析が行われた。主に脂質代謝に関わる遺伝子の発現を制御するSREBPは、細胞内のコレステロール濃度が減少すると、プロセシング酵素によりN末端側が切り出され、活性型になる。脂肪細胞分化におけるSREBPの機能については、脂質代謝を制御する遺伝子群の発現を上昇させることで脂肪細胞分化を促進することが知られているが、脂質が過剰に蓄積した状態である脂肪細胞におけるSREBP活性化機構の詳細については明らかにされてはいない。そこで、脂肪細胞分化過程におけるSREBP活性化機構を明らかにすることを目的として、解析が行われた。3T3-L1前駆脂肪細胞を分化誘導したところ、核内活性型SREBP-1、SREBP-2ともに上昇した。SREBP活性化機構を明らかにする目的で、SREBPプロセシングに関与する因子の発現を検討したが、発現量に変動は認められなかった。脂肪細胞分化におけるSREBPの活性化機構を明らかにしていく上で、脂肪滴の形成に着目した。脂肪滴は小胞体膜から分離して形成されるが、脂肪滴形成時に小胞体膜上のコレステロールが脂肪滴膜に取り込まれ、結果的に小胞体膜のコレステロール濃度が減少し、SREBPのプロセシングが亢進される機構が考えられた。脂肪滴形成によるSREBP活性化を検討する目的で、NIH-3T3細胞にPerilipinを過剰発現させた細胞株を樹立し、脂肪滴形成を誘導したところ、Perilipin過剰発現細胞株において脂肪滴形成の誘導によりSREBP応答遺伝子の発現量および核内活性型SREBP-2量は上昇した。また、脂肪滴形成の誘導により脂肪滴を除いた膜面分のコレステロール量は減少した。以上から、脂肪滴の形成による小胞体膜のコレステロール量の変動がSREBP活性化を制御していることが示唆された。さらに、脂肪細胞分化における脂肪滴形成の抑制によるSREBP活性化への影響を検討する目的で、Perilipinの発現を抑制させた3T3-L1脂肪細胞株を樹立した。この細胞株を脂肪細胞分化誘導したところ、核内活性型SREBP-2は上昇せず、SREBP応答遺伝子、PPAR γ およびその応答遺伝子の発現量は上昇しなかった。この細胞株にSREBP-2を過剰発現させると脂肪滴の形成が認められ、PPAR γ などの発現量が上昇した。以上から脂肪滴形成が抑制されることで細胞内脂質の量や組成などが変動し、SREBP活性化の抑制や脂肪細胞分化を制御する遺伝子群の発現が変動し、脂肪細胞分化を負に制御する可能性が考えられた。

以上本論文は、PPAR γ により Perilipin 遺伝子の転写が制御されること、及び、脂肪滴形成による SREBP 活性化、脂肪細胞分化機構の新たなメカニズムを明らかにしており、学術上、応用上貢献することが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。