

審査の結果の要旨

氏名 大石 由美子

本研究は、脂肪細胞の分化過程における転写因子 KLF5 の役割を *in vitro* のデータおよび *in vivo* の解析から明らかにしようと試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. KLF5 ヘテロノックアウトマウスでは生直後の脂肪組織の形成が遅延していることを見出した。脂肪細胞の初期分化の過程で、転写因子 KLF5 は一過性に発現上昇することを *in vitro* 脂肪細胞分化系を用いて証明した。KLF5 の発現は C/EBP δ , β の発現に引き続いて起こり、KLF5 の発現を追うように PPAR γ_2 の発現が亢進していた。
2. KLF5 が脂肪細胞分化に必要であることを明らかにした。KLF5 のドミナントネガティブ体を強制発現させた 3T3-L1 細胞では脂肪細胞への分化が著しく抑制されるだけでなく、PPAR γ_2 の発現も抑制された。同様に、3T3-L1 細胞に KLF5 に対する特異的な siRNA を強制発現させた場合や、KLF5 のノックアウトマウス由来の胎児線維芽細胞を分化誘導した場合にも、脂肪細胞への分化および PPAR γ_2 の発現が抑制された。
3. KLF5 を恒常的に強制発現させた 3T3-L1 細胞では、分化誘導刺激なしに脂肪細胞へ分化してゆくことから、KLF5 は脂肪細胞分化に必須の因子であることを示した。
4. KLF5 は PPAR γ_2 遺伝子の発現を転写レベルで直接制御することを明らかにした。PPAR γ_2 のプロモーター領域には C/EBP の結合配列に近接して KLF の結合配列が存在した。Electrophoretic mobility shift assay(EMSA)によって、KLF5 が *in vitro* でこの配列に結合しうることを示した。レポーターアッセイでは、KLF5 と C/EBP とを共発現させるとプロモーターは相乗的に活性化された。さらに、免疫沈降法において、KLF5 は C/EBP β あるいは C/EBP δ と直接結合しうることを示された。これらのことより、KLF5 は PPAR γ_2 遺伝子のプロモーター領域に直接結合し、C/EBP とコンプレックスを形成しながら協調して PPAR γ_2 の転写活性を正に調節していると考えられた。
5. 脂肪細胞分化において、C/EBP β および C/EBP δ が KLF5 の発現を直接制御していることを Electrophoretic mobility shift assay(EMSA)法、およびレポーターアッセイによ

って示した。

6. 内因性の *PPAR γ 2* 遺伝子における C/EBP や KLF5 の結合をクロマチン免疫沈降法(ChIP assay)を用いて確認した。分化誘導刺激前、*PPAR γ 2* 遺伝子のプロモーター領域には C/EBP や KLF5 の結合を認めないが、分化初期には C/EBP β , δ , および KLF5 の結合が観察された。分化後期にはいると C/EBP β / δ , KLF5 の結合は減弱し、代わりに C/EBP α の結合が優位となっていた。これは、分化誘導初期と分化後期において、*PPAR γ 2* 遺伝子上に異なる転写因子が結合していることを明確に示すものである。

以上、本論文は *in vitro*, *in vivo* の脂肪細胞の分化過程で KLF5 が必須であること、C/EBP β , δ によって発現誘導された KLF5 が C/EBP と相互作用してエンハンソソームを形成し、*PPAR γ 2*プロモーター上に直接結合して *PPAR γ 2*の転写活性を直接制御していることを明らかにした。本研究は、脂肪組織の転写ネットワークの分子機構を明らかにしただけでなく、分化の各段階において同一遺伝子上に異なる転写因子を含むエンハンソソームが形成されていることを *in vivo* で初めて示したものとして意義が深い。よって、学位の授与に値するものと考えられる。