

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成 19 年度博士課程 進学  
氏 名 高橋 裕  
指導教員名 佐藤 隆一郎

### 論文題目

## 転写調節を介した脂肪細胞分化・脂肪滴形成の分子制御機構

脂肪細胞は、余剰エネルギーをトリアシルグリセロール (Triacylglycerol; TG) として脂肪滴の中に蓄積し、絶食時など、必要に応じて他のエネルギー消費器官に受け渡す役割を果たす。近年、脂肪細胞は様々な生理活性分子 (アディポサイトカイン) を分泌する内分泌器官としての役割も担うことが明らかにされ、肥満に伴う生活習慣病の発症は、脂肪細胞の肥大化 (= 過剰な脂肪滴形成) によって引き起こされるアディポサイトカイン分泌の異常がその原因の一端であると理解されている。そのため、脂肪細胞がその形質を獲得する過程である脂肪細胞分化および脂肪滴形成の分子機構を明らかにすることは、肥満ならびに生活習慣病の予防・治療の手がかりになると期待される。

脂肪細胞分化は前駆脂肪細胞がインスリンなどのホルモン刺激を受けることで開始する。脂肪細胞分化のカスケードは様々な転写因子が絡み合って形成されており、分化過程で数百にもおよぶ遺伝子の発現が誘導される。膨大な研究により蓄積された知見から、分化初期においては KLF ファミリーや C/EBP ファミリーが誘導され、その後、PPAR $\gamma$  が中心的な役割を果たすと考えられている。PPAR $\gamma$  は脂肪細胞の形質獲得に関わる遺伝子の発現を誘導し、その結果、分化は進行する。本論文では脂肪細胞分化と脂肪滴形成の転写レベルに焦点を当て、その分子機構の解明を目指した。

### 第一章 小胞体ストレス誘導分子 TRB3 の脂肪細胞分化過程における機能解析

TRB3 は小胞体ストレスやグルコース枯渇によって発現が誘導され、インスリンシグナルを阻害する偽キナーゼとして 2003 年に初めて報告された。肝臓において TRB3 はセリンスレオニンキナーゼ Akt に結合することでその活性を負に制御し、インスリンによる糖新生抑制を阻害するため、インスリン抵抗性の原因の一つとして考えられている。しかし、肝臓と同様にインスリン感受性臓器である

にも関わらず、脂肪組織における TRB3 の機能は未知であることから、本章では脂肪細胞が成熟する過程である脂肪細胞分化に着目して TRB3 の機能解析を試みた。

マウス前駆脂肪細胞である 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化過程において TRB3 の発現を調べたところ、分化後期にかけて誘導されることが明らかとなり、レトロウイルスを用いて TRB3 を強制発現すると、細胞内に蓄積される TG 量の減少が認められた。このとき脂肪細胞分化に重要な遺伝子を調べたところ、PPAR $\gamma$ よりも上流で働く転写因子 C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$ の発現は TRB3 の強制発現による影響はほとんど認められなかったのに対し、C/EBP $\alpha$ をはじめ PPAR $\gamma$ 標的遺伝子の発現は一様に抑制されていた。このことから TRB3 が PPAR $\gamma$ に働きかける可能性を考え、PPAR $\gamma$ 標的遺伝子である perilipin プロモーターを用いたレポーターアッセイを行った。その結果、TRB3 は PPAR $\gamma$ による perilipin プロモーターの活性化を抑制することが見出され、TRB3 は PPAR $\gamma$ の転写活性を抑制することが示された。さらに PPAR $\gamma$ と TRB3 のタンパク質相互作用を免疫沈降法により調べたところ、両者は細胞内で複合体を形成し、PPAR $\gamma$ と相互作用できない変異体の TRB3 は、PPAR $\gamma$ による perilipin プロモーターの活性化も、脂肪細胞分化も抑制できないことが判明した。以上の結果より、TRB3 は PPAR $\gamma$ の転写活性を抑制することで脂肪細胞分化を負に制御することが明らかとなった。TRB3 は脂肪細胞分化後期に発現が誘導されることから、分化を終結の方向に導くストッパーとして機能していることが推察される。

## **第二章 脂肪細胞分化過程における apoC-III の発現誘導機構**

ApoC-III は主に肝臓、小腸において合成されるアポリポタンパク質であり、50%以上が Very low-density lipoprotein (VLDL) 画分に存在している。その主な機能は TG-rich なリポタンパク質の Lipoprotein lipase (LPL) との結合を阻害し、その代謝を妨げることであり、ノックアウトマウスなどの解析から、血中 apoC-III の増加は高 TG 血症へとつながると考えられている。本章では、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化過程における脂質代謝関連遺伝子の発現変動を調べる過程で、apoC-III の mRNA 発現量が数百倍誘導されることを見出し、その発現誘導機構の解析を行った。

ApoC-III の mRNA 発現量は、マウス個体より調製した胚性肝細胞 (Mouse embryonic fibroblast; MEF) および初代前駆脂肪細胞の脂肪細胞分化過程においても数百倍誘導されることが判明した。また、C57BL/6 マウスの白色脂肪組織よりストローマ細胞画分と成熟脂肪細胞画分を調製し、それぞれの apoC-III mRNA 発現量を定量したところ、成熟脂肪細胞画分で高値を示した。このことから、*in vivo*においても apoC-III は脂肪細胞が成熟するに従い発現が誘導されることが示唆された。

次に apoC-III の発現制御を担う転写因子の同定を目的として、脂肪細胞へと分化させた 3T3-L1 細胞に様々な核内受容体のリガンドを処理したところ、apoC-III の発現は Retinoid X receptor (RXR) のリガンド処理により誘導されることが見出された。また apoC-III プロモーターを用いたレポーターアッセイを行ったところ、RXR $\alpha$ を強制発現し、さらにそのリガンドを処理したときに活性化が認められた。転写開始点より上流 494~504 bp に存在する、RXR $\alpha$ が結合し得る Direct repeat-1 様の配列を欠失させるとプロモーター活性は減少したことから、RXR $\alpha$ はこの領域を介して apoC-III プロモーターを活性化していることが示唆された。実際、クロマチン免疫沈降法を行ったところ、RXR $\alpha$ はこの領域に結合し、また RXR リガンド処理によって結合量が上昇することが示された。また、RXR $\alpha$ は PPAR $\gamma$ と同様、脂肪細胞分化過程においてタンパク質発現が亢進することも判明した。

以上より、脂肪細胞分化に伴う apoC-III の発現は RXR $\alpha$ によって正に制御されていることが示された。3T3-L1 細胞に apoC-III を強制発現しても脂質蓄積に大きな変化は認められず、apoC-III の VLDL

代謝阻害活性を考えると、apoC-III は分泌後に脂肪組織の血管内皮において、成熟した脂肪細胞が血中から過度に遊離脂肪酸を取り込みすぎないように調節する役割を果たしていることが推察される。

### **第三章 脂肪細胞における脂肪滴形成と SREBP 活性化の分子機構**

Sterol regulatory element-binding protein (SREBP) は脂肪酸やコレステロールの生合成に関わる酵素群の遺伝子発現を正に制御する転写因子である。SREBP は不活性型として小胞体膜上に合成された後、様々な刺激に応じてゴルジ体へと輸送され、プロテアーゼによる切断を受ける。その後、切り出された N 末端領域が核内へと移行し、転写因子として機能する。この一連の機構はプロセッシングと呼ばれている。SREBP は非常に数多くの報告がなされているものの、脂肪細胞においてはこれまでにあまり多くは報告されていない。脂肪細胞は生体内において脂質合成が盛んな細胞であり、SREBP が重要な働きを担う場であると考えられるため、本章では脂肪細胞分化における SREBP について、特にその活性化機構に焦点を当て解析を試みた。

脂肪細胞分化過程において SREBP 標的遺伝子の mRNA 発現を調べたところ、主に脂肪酸合成に関与する SREBP-1 標的遺伝子の発現が強く誘導されることが見出された。この結果は 3T3-L1 細胞、MEF、初代前駆脂肪細胞のすべての細胞において同様であったが、SREBP-1 自身の発現は、3T3-L1 細胞では分化誘導後に誘導され、MEF では分化過程を通じてほぼ一定、また初代前駆脂肪細胞では分化誘導後に一旦減少した後に再び亢進するという結果であった。また、脂肪細胞分化過程における SREBP-1 のタンパク質レベルの変化を調べたところ、いずれの細胞においても核内型 SREBP-1 の増加が認められた。さらに分化誘導前の細胞にプロテアソーム阻害剤を処理しても、分化誘導後に誘導されるタンパク質量ほど増加しないことから、脂肪細胞分化過程で核内型 SREBP-1 が増加したのは、タンパク質安定化のためではなく、プロセッシングが亢進したためであると考えられた。

続いてレンチウイルスにより PPAR $\gamma$  を 3T3-L1 細胞および MEF に強制発現させ、PPAR $\gamma$  依存的に分化させたときに SREBP-1 の活性化が起こるかどうかを検証した。通常の脂肪細胞分化ではインスリンなどのホルモンを分化誘導刺激として加えているが、この細胞は刺激を与えずとも分化するため、ホルモンによる様々な経路を介した影響を排除できると考えられた。PPAR $\gamma$  の強制発現後、脂肪滴の形成開始時よりこの細胞を継時回収し、遺伝子発現を調べたところ、PPAR $\gamma$  の標的遺伝子および SREBP-1 の発現は常に一定であったが、SREBP-1 標的遺伝子の発現は一樣に亢進することが判明した。このとき、核内型 SREBP-1 のタンパク質量の増加も認められた。従って、SREBP-1 の活性化は PPAR $\gamma$  を介した脂肪細胞分化シグナルではなく、脂肪滴の形成に依存して起こることが示唆された。

実際に脂肪滴の形成が SREBP-1 の活性化に重要であるかどうかを検証するため、次に脂肪滴表面タンパク質である perilipin のノックアウトマウスを用いた解析を行った。野生型 (Plin+/+) マウスおよび perilipin ノックアウト (Plin-/-) マウスより皮下脂肪組織、精巣上体脂肪組織を単離し、SREBP-1 標的遺伝子の mRNA 発現量および核内型 SREBP-1 のタンパク質量を調べたところ、驚くべきことに Plin-/- マウス由来の脂肪組織において顕著な減少が認められた。また、より直接的に脂肪滴の形成が SREBP-1 の活性化に影響するかどうかを調べるため、MEF を調製して *in vitro* に還元した状態での検討を行ったところ、*in vivo* での結果と同様、Plin-/- MEF において脂肪滴の形成が顕著に抑制され、このとき PPAR $\gamma$  標的遺伝子と SREBP-1 自身の mRNA 発現は Plin+/+, Plin-/- MEF 間で違いが認められなかったものの、SREBP-1 標的遺伝子の発現は Plin-/- MEF で一樣に減少していた。さらに核内型 SREBP-1 のタンパク質量も Plin-/- MEF において減少していることが判明した。また、Plin-/- MEF

にレトロウイルスを用いて **perilipin** をレスキューすると、脂肪滴形成の亢進とともに **SREBP-1** 標的遺伝子の発現、および核内型 **SREBP-1** タンパク質量の増加が認められた。これらの結果より、**perilipin** 欠損による脂肪滴形成の抑制は **SREBP-1** の不活性化を引き起こすことが明らかとなった。

さらに、脂肪滴形成に伴う **SREBP-1** 活性化のメカニズムを検証する過程で、分化した脂肪細胞では分化前の細胞に比べ、小胞体膜上の遊離コレステロール量が減少していることが見出された。脂肪滴は小胞体で合成された **TG** を核として小胞体膜から分離して形成されると考えられており、この際、小胞体膜上の遊離コレステロールも脂肪滴へと移行したことが推察される。実際、脂肪滴画分における遊離コレステロール量は脂肪細胞分化誘導後に飛躍的に増加していた。そしてこの小胞体膜における遊離コレステロールの減少が **SREBP-1** の活性化に寄与しているのではないかと考えられる。

以上の結果より、脂肪滴の形成そのものが **SREBP-1** の活性化を引き起こすという新たな分子機構が明らかとなった (図1)。活性化した **SREBP-1** は脂肪酸合成を介して脂肪滴形成のさらなる亢進を引き起こすと考えられるため、肥満によりいったん脂肪滴の形成が促進すると、脂質蓄積がポジティブフィードバック的にさらに助長されるという悪循環に陥ることが予想される。しかし逆に考えると、脂肪滴形成のいずれかのステップを遮断することで、**TG** 蓄積は大幅に改善されることが期待できる。

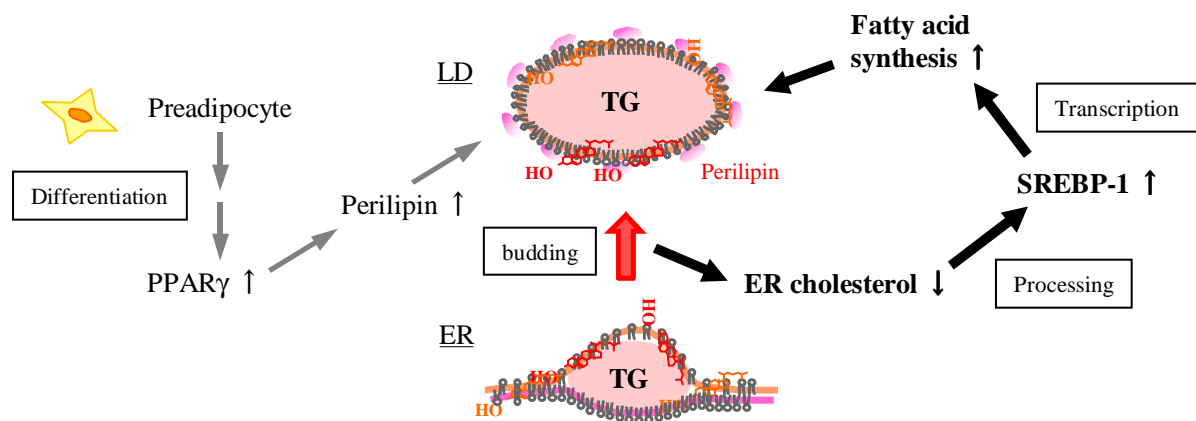


図1 脂肪細胞における**SREBP-1**活性化機構のモデル

## まとめ

**TRB3**, **apoC-III**, **SREBP-1** という分子の解析を通じて、脂肪細胞分化および脂肪滴形成における分子機構の一端を明らかにすることができた。脂肪細胞分化はその進行の過程で誘導される数百もの分子が互いに関わり合って進行すると考えられるため、こうした一つ一つの分子機能や他の分子とのクロストークを発見、解明することで、徐々にその全貌が明らかになると予測できる。また脂肪細胞において得られた知見は、同じく脂質代謝を司る肝臓や骨格筋などにおいても応用できる可能性があり、ひいては生体内における脂質代謝の全体像の解明と、新薬や機能性食品開発のための原動力につながることを期待される。

## 参考文献

- 1) **Takahashi, Y.**, Ohoka, N., Hayashi, H. and Sato, R. *J. Lipid. Res.* **49**: 880-892. (2008)
- 2) **Takahashi, Y.**, Inoue, J., Kagechika, H. and Sato, R. *FEBS Lett.* **582**: 493-497. (2009)