

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高 裕

肥満、特に内臓脂肪型の肥満は、糖尿病、脂質異常症、高血圧といった生活習慣病を引き起こしやすいことが統計学的に示されており、これらの疾患が一個人に集積した状態は近年、メタボリックシンドロームと呼ばれる概念で定着している。メタボリックシンドロームは冠動脈疾患や脳血管疾患の引き金となるため、その予防と治療は臨床的見地から考えて非常に重要な課題である。

肥満は脂肪細胞が過度のエネルギーを蓄積した結果であるため、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と脂肪滴の形成機構のメカニズムを解明することは、生活習慣病の予防や治療法の確立に大きく貢献することが期待される。そこで本研究では、脂肪細胞分化と脂肪滴の形成を制御する因子に着目し、特に脂肪細胞分化過程において重要であると考えられている転写レベルにおける制御に焦点を当て、その解析を試みた。

まず初めに、肝臓においてインスリンシグナルを抑制すると報告されている偽キナーゼ、TRB3 の脂肪細胞分化に与える影響について解析を行った。TRB3 の遺伝子発現は、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の分化後期において強い誘導が認められた。続いて、レトロウイルスを用いて TRB3 を 3T3-L1 細胞に強制発現したところ、細胞内中性脂質蓄積量や脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPAR $\gamma$  の標的遺伝子の発現量が一律に減少し、一方、レンチウイルスによるノックダウンを行ったところ、細胞内中性脂質蓄積量と PPAR $\gamma$  標的遺伝子の発現量は増加することが判明した。従って、TRB3 は脂肪細胞分化を抑制する因子として作用していることが明らかとなった。次に PPAR $\gamma$  標的遺伝子のプロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイを行ったところ、TRB3 の強制発現により PPAR $\gamma$  によるプロモーターの活性化が抑制されることから、TRB3 は PPAR $\gamma$  の転写活性を抑制することが示された。また、TRB3 と PPAR $\gamma$  はタンパク質相互作用することが免疫沈降法により判明し、PPAR $\gamma$  とタンパク質相互作用しない変異体 TRB3 は、PPAR $\gamma$  の転写活性も脂肪細胞分化も抑制できなかった。さらに、レンチウイルスを用いて PPAR $\gamma$  を強制発現させることで PPAR $\gamma$  依存的に脂肪細胞へと分化する細胞においても、TRB3 の共発現によって分化は抑制されることが見出された。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 の発現は脂肪細胞分化の後期に誘導されることから、TRB3 は脂肪細胞分化を終結の方向へと導く役割を果たすことが考えられる。また近年、脂肪組織における TRB3 の発現は絶食時に誘導されるとの報告がなされ、この報告と本研究により得られた結果を併せて考えると、TRB3 は絶食時に脂肪細胞内にエネルギーを溜め込まず、骨格筋などのエネルギー消費器官において効率的にエネルギーを消費できるように調節する役割を果たしていることが推察される。

続いて、小胞体膜結合型の転写因子 SREBP の脂肪細胞分化過程における活性化機構について解析を行った。SREBP は SREBP-1 と SREBP-2 の 2 種類の異なるアイソフォームの

存在が知られており、脂肪細胞においてはエネルギー源となる脂肪酸の合成を司る SREBP-1 が重要な役割を果たすと考えられている。SREBP は不活性型の前駆体として小胞体膜にタンパク質合成された後、様々な刺激に応じてゴルジ体へと輸送され、二種類のプロテアーゼ (S1P, S2P) により転写活性領域を含む N 末端側が切り出され、核内へと移行して転写因子として機能する。この一連の SREBP の活性化機構はプロセッシングと呼ばれている。従って、SREBP が機能を発揮するためにはプロセッシングという活性化の過程を経る必要があるが、脂肪細胞分化過程において SREBP がどのように活性化を受けるのかについては未だ明らかになっていない。そこで本研究では、脂肪細胞分化過程における SREBP-1 の活性化機構に焦点を当て、その解析を試みた。

3T3-L1 細胞、マウス胎児より調製した MEF、マウス個体の皮下白色脂肪組織より調製した初代前駆脂肪細胞の脂肪細胞分化過程において、核内型 SREBP-1 タンパク質量と SREBP-1 標的遺伝子の mRNA 発現量が増加することが見出された。また GFP を付加した前駆体 SREBP-1 タンパク質を強制発現させ、脂肪細胞へと分化させた場合に核内型タンパク質量が増加することから、脂肪細胞分化過程で誘導される核内型 SREBP-1 タンパク質量の増加はプロセッシングの亢進によるものであると考えられた。さらに、PPAR $\gamma$  アゴニストを処理することで脂肪細胞分化を促進させた場合に核内型 SREBP-1 タンパク質量が増加すること、また、PPAR $\gamma$  を強制発現させた場合の PPAR $\gamma$  依存的な脂肪細胞分化過程において、核内型 SREBP-1 タンパク質量、SREBP-1 標的遺伝子の mRNA 発現量は脂肪滴形成の度合いに依存して増加することが判明した。

そこで次に、脂肪細胞分化過程における脂肪滴の形成が SREBP-1 の活性化に寄与するかどうかを検証するため、脂肪滴の形成を正に制御する perilipin のノックアウトマウスを用いた解析を行った。その結果、perilipin ノックアウトマウス由来の MEF を脂肪細胞へと分化させると、野生型マウス由来の MEF を脂肪細胞へと分化させたときに比べ脂肪滴の形成が抑制され、PPAR $\gamma$  標的遺伝子の発現量には大きな変化は認められないものの、核内型 SREBP-1 タンパク質量と SREBP-1 標的遺伝子の発現量の減少が認められた。従って、脂肪滴の形成そのものが SREBP-1 の活性化を促進する引き金となることが判明した。

また、S1P の活性化を阻害する AEBSF を脂肪細胞に処理すると核内型 SREBP-1 タンパク質量は減少することから、脂肪細胞分化過程において SREBP-1 は S1P/S2P を介したプロセッシングを受けることが示された。

以上の結果より、脂肪細胞が分化する過程において脂肪滴の形成が促進されると、前駆体 SREBP-1 タンパク質はプロセッシングを受け、SREBP-1 は脂肪酸合成酵素の発現を誘導するため、脂肪滴の形成はさらに促進される、という正のフィードバック機構が働くと考えられる。この機構は、脂肪細胞が余剰エネルギーを速やかに、かつ効率良く細胞内に蓄積するために有用であるものと推察される。

本研究により、脂肪細胞分化、脂肪滴形成の過程において重要な役割を果たす転写因子 PPAR $\gamma$  および SREBP-1 の新たな分子機構の一端が明らかとなった。本研究で得られた成果は、脂肪細胞のホメオスタシス維持の理解となるだけでなく、肥満など脂肪細胞の異常に起因して起こる病態の分子機構の解明と、それを治療するための応用研究に結びつくことが期待される。

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。