

審査の結果の要旨

氏名 大関 敦子

本研究は転写因子 ARID5B がアディポネクチンの発現制御に寄与しているという仮説をたて、3T3-L1 細胞の系を用いてそのメカニズムの解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化の過程において、ARID5B アイソフォーム $\alpha \cdot \beta$ ともに未分化の段階から発現しており、ARID5B α のみ分化 day4 をピークに発現が上昇した。これはアディポネクチンの発現上昇に先立つものであった。また、レトロウイルスを用いて 3T3-L1 細胞で ARID5B α を過剰発現させると、コントロールと比較しアディポネクチンの発現が数倍に上昇した。これより、ARID5B α がアディポネクチン発現調節に寄与する可能性が示された。
2. アディポネクチンプロモーター転写調節のシスエレメントを解析するため、ルシフェラーゼ活性を指標としたレポーターアッセイを行った。3T3-L1 細胞で ARID5B α 単独ではアディポネクチンプロモーター活性は上昇しなかったが、PPAR γ 2、RXR α を共発現させ、さらに PPAR γ 2 リガンドのロシグリタゾンを追加した条件でさらに ARID5B α を発現させるとプロモーター活性の上昇を認めた。プロモーターの deletion assay、mutation assay の結果より PPRE(peroxisome proliferator responsive element)が ARID5B α がアディポネクチンの発現制御をする上で重要であることが示された。
3. ARID5B と相互作用する蛋白の検索のため、IP が可能な抗 ARID5B 抗体を作製するとともに、mammalian two-hybrid assay で検討した。PPRE では PPAR γ 2/RXR α ヘテロダイマーに多数の抑制因子・活性化因子が働くことにより転写の調節が行われる。これらの因子と ARID5B α の相互作用を評価したところ three-hybrid assay で ARID5B α は抑制因子のひとつである SMRT を介して PPAR γ 2 と結合していることが示唆された。ARID5B α はリガンド非存在下では抑制因子群のひとつに含まれると考えられた。
4. 抑制因子群 N-CoR/SMRT corepressor complex はユビキチン・プロテアソーム系により制御されることが知られており、ARID5B α と相互作用する蛋白として ubiquitin conjugating/19S proteasome complex をリクルートする TBL1/TBLR1 に着目した。Mammalian two-hybrid assay では TBL1 と ARID5B α の結合が示され、さらにビオチン-

トレプトバジン系のタンパク複合体精製法を利用した Co-IP assay を行い結合を確認した。この解析によりアディポネクチンの転写の過程において、リガンド非存在下では ARID5B α は抑制因子複合体の 1 つとして TBL1 と結合していることが示された。リガンドが PPAR γ 2 に結合すると、ARID5B α は TBL1 の ubiquitin conjugating/19S proteasome complex リクルート作用をサポートしたり、ユビキチン化を促進したりなどして、抑制因子を排除し、活性化因子が転写活性を上昇させ、アディポネクチンの血中濃度を上昇させる可能性が示された。

5. In vivo については、ARID5B ノックアウトマウスの表現型を確認した。これまでの報告どおりホモノックアウトマウスは胎生致死率が高く、産まれてきた場合でも発育の異常により体格が小さいことが確認できた。ヘテロノックアウトマウスは通常食下ではワイルドタイプと同様の体重であったが、高脂肪食下ではワイルドタイプは著明な体重増加を示すのに対し、ヘテロノックアウトマウスは体重増加が抑制された。また、ヘテロノックアウトマウスではワイルドタイプに比して脂肪細胞の径が小さく、高脂肪食下で惹起される脂肪細胞の肥大化が抑制されていると考えられた。この表現型は PPAR γ ヘテロノックアウトマウスの表現型と非常に類似しており、ARID5B が PPAR γ 2 の活性化を調節している可能性が示唆された。

以上、本論文は転写因子 ARID5B α がリガンド非存在下で PPAR γ 2/RXR α ヘテロダイマー抑制因子複合体に含まれ、ubiquitin conjugating/19S proteasome complex をリクルートする TBL1 と結合していることを明らかにした。この結果より ARID5B α が抑制因子と活性化因子の交換や PPAR γ 2 の活性化において重要な役割を果たし、アディポネクチン転写活性を上昇させ、血中濃度を上昇させる可能性が示された。本研究より、ARID5B は動脈硬化・糖尿病発症抑制に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。