

## 論文審査の結果の要旨

氏名 高橋 明 格

本論文は Tob/BTG 増殖抑制蛋白質ファミリーに属する **Tob2** が脂肪細胞分化を阻害し、白色脂肪組織形成を抑制制御することを新たに明らかにしたものである。

論文提出者は、高脂肪食および通常食を負荷したマウスの白色脂肪組織における遺伝子発現プロファイルを解析している中で、Tob/BTG ファミリーの構成因子のうち3つの遺伝子 (*tob*, *tob2*, *ana/btg3*) の発現量が、高脂肪食負荷マウスにおいて、25~50% 減少していることを見いだした。このデータを検証するため、通常食および高脂肪食を負荷したマウスの白色脂肪組織における Tob/BTG ファミリーの発現量を定量的リアルタイム PCR 法とウェスタンブロッティング法により調べた。この結果、高脂肪食を負荷したマウスの白色脂肪組織において、**Tob2** の発現量が顕著に減少していた。これらの結果は、**Tob2** の機能と肥満との関連性を示唆する。そこで、*tob2* 欠損マウスを用いて、白色脂肪組織形成・肥満・エネルギー恒常性における **Tob2** の役割を調べた。その結果、興味深いことに、高脂肪食負荷条件下において、体重・インスリン感受性・グルコース耐性・血中グルコース濃度は *tob2* 欠損マウスと野生型マウスで差がなかったが、*tob2* 欠損マウスでは脂肪肝の誘導抑制ならびに白色脂肪組織の肥大化がみられた。また、この *tob2* 欠損マウスの肥大化した白色脂肪組織では、脂肪細胞の面積の増加がみられ、脂肪細胞分化制御に重要な転写因子 **Pparg1** と **Pparg2** の発現の上昇がみられた。さらに、**PPAR $\gamma$**  の標的遺伝子であり、成熟脂肪細胞の機能に必須である遺伝子群 **Fabp4**, **Lpl**, **Fasn**, **Adipoq**, **Retn**, **Lep** の発現の増加がみられた。これらの結果より、*tob2* 欠損マウスの白色脂肪組織において、脂肪細胞分化が亢進していることが強く示唆された。

そこで、脂肪前駆細胞を用いた成熟脂肪細胞への分化誘導モデルを用いて、**Tob2** の脂肪細胞分化への関与を調べた。野生型マウスおよび *tob2* 欠損マウスより単離した初代培養白色脂肪前駆細胞を **BMP2** を含む脂肪細胞分化誘導培地で刺激し、分化誘導を行った。この結果、*tob2* 欠損細胞において脂肪蓄積の亢進がみられ、**PPAR $\gamma$ 2** の発現が転写レベルで増加していた。反対に、**Tob2** 過剰発現 3T3-L1 脂肪前駆細胞株では、脂肪蓄積の低下がみられ、**PPAR $\gamma$ 2** の発現が転写レベルで減少していた。以上より、**Tob2** は **PPAR $\gamma$ 2** の発現を転写レベルで抑制することにより脂肪細胞分化を負に制御するこ

とが示された。

続いて、論文提出者は *Tob2* による *PPAR $\gamma$ 2* の転写抑制の分子機構の解明に着手している。*Tob2* は *Smad1, 4, 5, 6, 7, 8* と結合し、脂肪細胞分化誘導後、*tob2* ノックダウン 3T3-L1 細胞株では、BMP2 刺激により誘導される *Smad1/5* のリン酸化が亢進していた。また、高脂肪食負荷条件下、*tob2* 欠損マウスの白色脂肪組織では、BMP 受容体遺伝子 *Bmpr1a* の発現量の増加が見られた。さらに、*Tob2* は抑制型 *Smad6* と相乗的に *PPAR $\gamma$ 2* の転写活性を阻害していることをルシフェラーゼアッセイにより明らかにした。以上より、脂肪細胞分化過程において、*Tob2* は BMP/*Smad* シグナル経路を *Smad6* と協調的に阻害していることが示された。さらに、*Tob2* は *C/EBP $\alpha$*  と結合し、核内で共局在しており、クロマチン免疫沈降法を用いた解析の結果、*tob2* 欠損細胞において、*C/EBP $\alpha$*  の *PPAR $\gamma$ 2* プロモーターへの結合の増加がみられ、反対に、*tob2* 過剰発現 3T3-L1 細胞株では、*C/EBP $\alpha$*  の *PPAR $\gamma$ 2* プロモーターへの結合の減少していた。つまり、*Tob2* は *C/EBP $\alpha$*  の *PPAR $\gamma$ 2* プロモーター上への結合も阻害することが明らかになった。以上より、*Tob2* は、BMP/*Smad* シグナル経路と *C/EBP $\alpha$*  による *PPAR $\gamma$ 2* の転写活性化の阻害を介して、*PPAR $\gamma$ 2* の発現を抑制することにより、脂肪細胞分化を負に調節する制御因子であることが示された。

本研究は *Tob2* が栄養状態を感知して白色脂肪組織形成・脂肪細胞分化を抑制し、ホメオスタシスの維持に関与することを示唆するものであり、肥満症の治療薬への応用に繋がると考えられ、大変意義深い。

なお、本論文は、森田斉弘博士、横山一剛博士、鈴木亨博士、山本雅博士との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。