

平成 26 年度 博士学位論文

論題 脂肪肝に特異的に発現する
新規 PPAR γ 標的遺伝子に関する研究

Characterization of novel PPAR γ -target genes that are
specifically expressed in fatty liver

指導教授 山野 茂

福岡大学大学院 薬学研究科

薬学専攻

生体機能解析学専修

氏名 藍原 大甫

Daisuke Aibara

目次

緒論	5
第一章 成因の異なる脂肪肝における <i>FSP27</i> 遺伝子の発現解析	
第一節 概要	8
第二節 各脂肪肝モデルマウスの肝臓における <i>FSP27</i> の発現性	8
第三節 インスリンによる <i>FSP27</i> の発現制御	13
第四節 考察	20
第二章 <i>PPARγ</i> によって制御される <i>LPD1</i> 遺伝子の発現解析	
第一節 概要	24
第二節 <i>PPARγ</i> 欠損マウスの肝臓における <i>LPD1</i> の発現性	24
第三節 各脂肪肝モデルマウスの肝臓における <i>LPD1</i> の発現性	26
第四節 2 型糖尿病モデルマウスの各組織における <i>LPD1</i> の発現性	32
第五節 成熟脂肪細胞における <i>LPD1</i> の発現性	32
第六節 考察	34
第三章 <i>LPD1</i> タンパクの発現及び局在解析	
第一節 概要	38
第二節 <i>PPARγ</i> 欠損マウスの肝臓及び成熟脂肪細胞における <i>LPD1</i> タンパクの発現性	38
第三節 <i>LPD1</i> タンパクの細胞内局在性	43
第四節 <i>LPD1</i> タンパクにおける Triton X-100 不溶性ドメインの決定	50
第五節 考察	52

第四章 成熟脂肪細胞における LPD1 タンパクの機能解析

第一節 概要	56
第二節 LPD1 タンパクの強制発現が成熟脂肪細胞の分化誘導に与える影響	56
第三節 LPD1 タンパクのノックダウンが成熟脂肪細胞の分化誘導に与える影響	57
第四節 LPD1 タンパクのノックダウンが成熟脂肪細胞における 糖の取り込みに与える影響	64
第五節 考察	66
総括	71

【実験の部】

1. 試薬	73
2. 実験動物	73
3. 培養細胞	74
4. 3T3-L1 前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化誘導	74
5. トリグリセリドの測定	74
6. AST 及び ALT の測定	75
7. インスリン及びグルコースの投与による血糖値の測定	75
8. タンパクの定量	75
9. 細胞内への 2DG 取り込み量の定量	75
10. Western blot 及び Dot blot	76
11. Total RNA の抽出	78
12. cDNA の合成	78
13. Real-time PCR	79

14. LPD1b-EGFP 融合タンパクを用いた局在解析	79
15. 内在性 LPD1 タンパクの免疫蛍光染色	79
16. 細胞分画 (1% Triton X-100 不溶性画分、脂質ラフト/カベオラ画分)	80
17. LPD1b-HA デリレーションタンパク発現ベクターの作製	81
18. Triton X-100 不溶性画分の局在ドメイン解析	81
19. LPD1b 発現レトロウイルス及び LPD1-shRNA 発現レンチウイルスの作製	82
20. レトロウイルス及びレンチウイルスの感染	82
21. GLUT4 の膜への移行	82
22. オリゴ DNA 配列合成	83
23. 統計解析	83
引用文献	84
謝辞	88

本文においては、以下の略語を用いた。なお、遺伝子及び mRNA はイタリック、タンパクは標準スタイルで表記した。

PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor γ
RXR: retinoid X receptor
FSP27: fat-specific protein 27
CIDE: cell death-inducing DNA fragmentation factor 45-like effector
LPD1: liver PPAR γ -dependent 1
TG: triglyceride
AST: aspartate transaminase
ALT: alanine transaminase
36B4: acidic ribosomal phosphoprotein P0
aP2: adipocyte fatty acid-binding protein
CD36: cluster of differentiation 36
FAS: fatty acid synthase
SREBP1c: sterol regulatory element-binding transcription factor 1c
PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase
STZ: streptozotocin
RGZ: rosiglitazone
G6Pase: glucose 6-phosphatase
WAT: white adipose tissue
BAT: brown adipose tissue
LacZ: β -galactosidase
Nuc: nucleolus
Mt: mitochondria
Ms: microsome
Cyt: cytosol
COXIV: cytochrome oxidase subunit IV
Cal: calreticulin
GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Vim: Vimentin
Cav1: caveolin 1
GM1: GM1 ganglioside receptor
shRNA: short hairpin RNA
2DG: 2-deoxy-D-glucose
Wort: wortmannin
PM: plasma membrane
AKT/PKB: v-akt murine thymoma viral oncogene/protein kinase-B
MOI: Multiplicity of Infection

緒 論

Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) は、核内受容体であり、リガンド応答性の転写因子である。PPAR γ が属する PPAR ファミリーには現在までに α 、 β (δ) 及び γ の 3 種のサブタイプの存在が明らかにされている。いずれのサブタイプも、同様に核内受容体である retinoid X receptor とヘテロダイマーを形成し、標的遺伝子のプロモーター領域に存在する PPAR 応答配列に特異的に結合することで転写を制御する (1-3)。

PPAR γ は、脂肪組織に最も高発現しているが、大腸、腎臓及びマクロファージ等にも発現が認められる (1-4)。PPAR γ の生理機能に関する解析から、PPAR γ は脂肪細胞において分化誘導に必須な因子であること (5, 6)、脂肪細胞においてインスリン感受性亢進ホルモンであるアディポネクチンの産生を促進すること (7)、大腸癌の発症を抑制すること (8, 9) (但し、相反する論文 (10, 11) も存在)、腎臓において Na^+ の再吸収を促し浮腫のリスクを高めること (4) 及びマクロファージにおいてコレステロールの排出を促進すること (12) 等が明らかにされている。また、インスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾン (武田薬品) あるいはロジグリタゾン (グラクソスミスクライン) 等のチアゾリジン誘導体は、PPAR γ の高親和性リガンドとして知られている (13)。

通常、PPAR γ は正常マウスの肝臓ではほとんど発現していない (14)。しかしながら、興味深いことに 2 型糖尿病モデルである *ob/ob* マウスの肝臓では、PPAR γ の発現が正常マウスの肝臓に比べて著しく上昇していることが示された (15, 16)。*Ob/ob* マウスはレプチン遺伝子に変異があり、食欲抑制等の機能を有するレプチンを産生できない。そのため、*ob/ob* マウスは過食による肥満、高血糖、高脂血症あるいはインスリン抵抗性等の病態を有し、特に肝臓では、肝実質細胞への多量のトリグリセリドの蓄積により重篤な脂肪肝が形成されている。松末ら (17) は、*ob/ob* マウスの脂肪肝に高発現する PPAR γ の生理機能を明らかにするために、*cre/loxP* システムにより肝臓特異的に PPAR γ が欠損した *ob/ob* マウスを作製した。PPAR γ を欠損させた *ob/ob* マウスの肝臓では、PPAR γ 野生型 *ob/ob* マウスに認められる重篤な脂肪肝が劇的に改善された。この PPAR γ の欠損による

脂肪肝の改善は、PPAR γ の脂肪肝形成への関与を強く推測させるものであった。しかし、転写因子である PPAR γ が直接脂肪肝形成に関与しているとは考え難く、PPAR γ により発現制御される脂肪肝形成を促すエフェクター因子の存在が予想された。

松末らは、このエフェクター因子を単離するために PPAR γ 野生型及び PPAR γ 欠損型 *ob/ob* マウスの肝 mRNA を用いたサブストラクショナルスクリーニングを行った。その結果、PPAR γ 野生型 *ob/ob* マウスの脂肪肝において高発現しているが、PPAR γ 欠損型 *ob/ob* マウスの肝臓では発現していない脂肪肝特異的な遺伝子として *fat-specific protein 27* (*FSP27*) 遺伝子の単離に成功した (18)。現在、FSP27 タンパクは cell death-inducing DNA fragmentation factor 45-like effector (CIDE) ファミリーの一員であり、このファミリーには 3 種類のアリソフォーム CIDEA、CIDEB 及び CIDEF/FSP27 (CIDEF はマウス FSP27 のヒトホモログ) の存在が知られている。*FSP27* 遺伝子は、脂肪細胞特異的に発現する遺伝子として早くから発見されていたが、当時はその生理機能は明らかではなかった (19)。

近年、脂肪細胞に発現している FSP27 は、脂肪滴の膜に局在し、脂肪滴の肥大化を促進していることが報告された (20, 21)。さらに、FSP27 の個体レベルの生理機能を解明するために、FSP27 欠損マウスが作製された。FSP27 欠損マウスでは、白色脂肪組織の重量が著しく減少し、細胞内脂肪滴が小型化することで多房性の脂肪滴が形成されることが報告された (22, 23)。一方、松末らは *FSP27* が肝で発現している PPAR γ の直接的な標的遺伝子であり、FSP27 タンパクが肝細胞におけるトリグリセリドの蓄積を促し、脂肪滴の増加、肥大化を促すことを明らかにした (18)。これらの知見は、FSP27 タンパクが PPAR γ 依存的な脂肪肝形成におけるエフェクター因子として重要な役割を担っていることを示唆するものである。

脂肪肝における *FSP27* 遺伝子発現の発見は、未解明な脂肪蓄積シグナルが肝臓に存在していることを示唆するものである。しかし、このシグナルは *FSP27* のみで形成されているものではなく、多様な因子が複雑に関与する複合的なものと推測された。そこで当研究室では、他の肝脂肪蓄積シグナルに関与する遺伝子を単離するため、PPAR γ 欠損型 *ob/ob* マウスの肝臓を用いた GeneChip による網羅的遺伝子解析を行なった。その結果、

ob/ob マウスの肝臓に発現している PPAR γ は、典型的な脂質関連遺伝子のみならず、機能が十分に解明されていない多くの機能未知遺伝子の発現を制御していることが明らかになった。現在、当研究室ではそれら機能未知遺伝子の中でも PPAR γ により著しく発現が促進される *liver PPAR γ -dependent 1 (LPD1)* 遺伝子に着目し一連の研究を行っている。

本研究は、脂肪肝特異的な遺伝子として単離された *FSP27* 及び GeneChip により新たに単離された *LPD1* 遺伝子にフォーカスし、1) 脂肪肝発症の成因の違いが *FSP27* の発現に影響するかを明らかにすること (第一章)、2) *LPD1* 遺伝子の発現性及び *LPD1* タンパクの生理機能を解明すること (第二、三、四章) を目的とするものである。以下、これらの二つの目的に対する研究成績について順次論述する。

第一章 成因の異なる脂肪肝における *FSP27* 遺伝子の発現解析

第一節 概要

緒論で述べたように、当研究室ではすでに *FSP27* の発現が、肥満モデルである *ob/ob* マウスの脂肪肝において $\text{PPAR}\gamma$ 依存的に誘導されることを明らかにしている。しかしながら、*ob/ob* マウス以外の成因の異なる脂肪肝における *FSP27* の発現はこれまで明らかにされていない。そこで、本章では、成因の異なる脂肪肝における *FSP27* の発現を解析し（第二節）、さらにインスリンによる *FSP27* の発現制御を明らかにすること（第三節）を目的とした。

第二節 各脂肪肝モデルマウスの肝臓における *FSP27* の発現性

まず、*ob/ob* マウスの脂肪肝における *FSP27* の発現が、 $\text{PPAR}\gamma$ 及び脂肪肝依存的であることをリアルタイム PCR 法により確かめた。本実験では、以下の 4 種類のマウスを用いた。正常マウスの $\text{PPAR}\gamma$ 野生型 (*OB/OB-PPAR γ WT*) 及び肝臓特異的 $\text{PPAR}\gamma$ 欠損型 (*OB/OB-PPAR γ KO*)、*ob/ob* マウスの $\text{PPAR}\gamma$ 野生型 (*ob/ob-PPAR γ WT*) 及び肝臓特異的 $\text{PPAR}\gamma$ 欠損型 (*ob/ob-PPAR γ KO*) である。その結果、*FSP27* の発現は、脂肪肝を形成している *ob/ob-PPAR γ WT* の肝臓において、*OB/OB-PPAR γ WT* の肝臓に比べて 5 倍以上の誘導が認められたが、脂肪肝が改善された *ob/ob-PPAR γ KO* の肝臓では低レベルを示した (Figure 1A)。一方、*ob/ob-PPAR γ WT* の肝臓における $\text{PPAR}\gamma$ の発現は、*FSP27* の発現を裏付けるように *OB/OB-PPAR γ WT* の肝臓に比べて約 3.5 倍の誘導が認められ、その発現は、*ob/ob-PPAR γ KO* において著しい低下が認められた (Figure 1B)。

次に、*ob/ob* マウスとは成因の異なる脂肪肝モデルマウスを作製し、これらの脂肪肝における *FSP27* の発現をリアルタイム PCR 法にて解析した。脂肪肝モデルマウスは、肥満モデル (*db/db*)、高脂肪食処理 (HF)、アルコール処理 (AL)、メチオニン・

コリン欠損食処理 (MCD) 及び絶食処理 (Fasting) マウスである。なお、*db/db* マウスはレプチン受容体に変異があり、正常なレプチン受容体が産生されないため、過食により脂肪肝を発症している。また、HF マウスは高脂肪飼料の給餌、AL マウスはアルコール性脂肪肝モデルとしてエタノールを含む飼料の給餌、MCD マウスは炎症を伴う脂肪肝 (NASH) モデルとしてメチオニン・コリン欠損食の給餌、絶食マウスは 24 時間の絶食により、いずれも脂肪肝を発症することが明らかになっている。本実験では、これらのマウスが脂肪肝を発症していることを確認するために、肝臓のトリグリセリド (TG) 含量を調べた。その結果、いずれのモデルマウスも、TG 含量がコントロールの 2 倍以上であり、脂肪肝が形成されていることを確認した (Table 1)。また、MCD マウスは、肝炎マーカーであるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) がコントロールに比べて有意に高値であった (Table 1)。

これらの脂肪肝モデルマウスの肝臓における *FSP27*、*PPAR γ* 及び代表的な *PPAR γ* 標的遺伝子として知られている *adipocyte fatty acid-binding protein (aP2)* 及び *cluster of differentiation 36 (CD36)* 遺伝子の発現をコントロールマウスと比較した。その結果、*FSP27* の発現はコントロールと比べて、*db/db*; 約 13 倍、HF; 約 6 倍、MCD; 約 7 倍及び絶食; 80 倍以上の著しい誘導が認められた (Figure 2A, B, D and E)。一方、AL マウスの脂肪肝における *FSP27* の発現誘導は認められず、コントロールと比べて有意に低下した (Figure 2C)。*PPAR γ* の発現は、*db/db*、HF 及び AL マウスの脂肪肝においてコントロールに比べていずれも有意な誘導が認められた (Figure 2A-C)。一方、MCD 及び絶食脂肪肝における *PPAR γ* の発現誘導は認められず、コントロールと比べて有意に低下した (Figure 2D and E)。*aP2* 及び *CD36* の発現は、*db/db*、HF、AL 及び絶食脂肪肝において、コントロールと比べて有意な誘導が認められたが、MCD 脂肪肝では誘導されなかった (Figure 2A-E)。

FSP27 の発現は、MCD 及び絶食脂肪肝において *PPAR γ* の発現と正の相関を示さないことが明らかになった。そこで、これらの脂肪肝における *FSP27* の発現に、*PPAR γ* が関与しているか否かを肝特異的 *PPAR γ* 欠損型正常マウス (*OB/OB-PPAR γ KO*) を用いて検討した。前述のように *FSP27* の発現は *MCD-OB/OB-PPAR γ WT* において

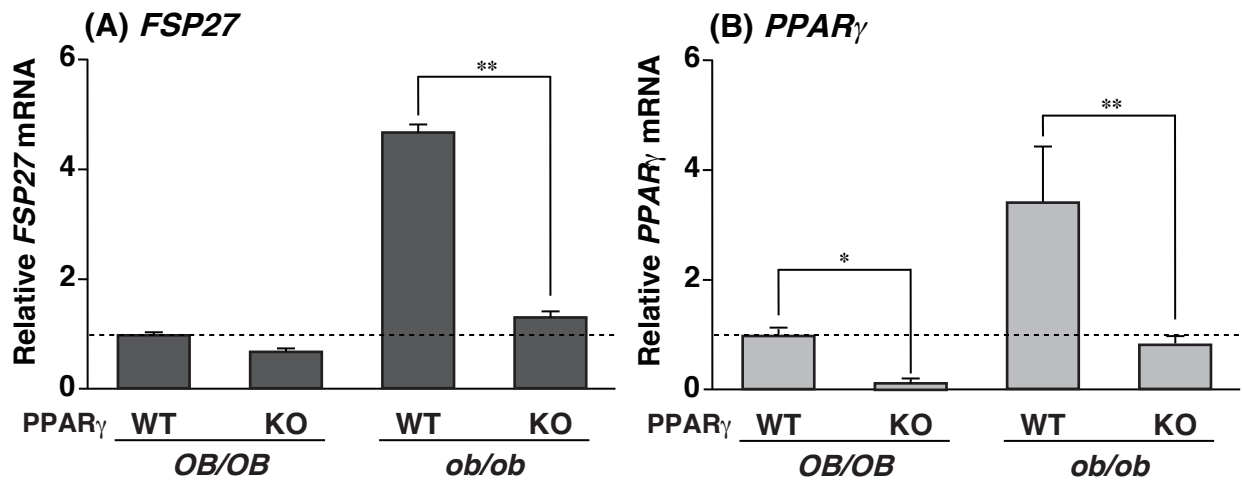


Figure 1. The expression of *FSP27* mRNA depends on the hepatic PPAR γ expression and fatty liver formation.

QPCR analyses of (A) *FSP27* and (B) *PPAR γ* mRNAs were performed using liver samples from each genotyped mouse. Expression was normalized to *36B4* mRNA, and each bar represents the average \pm S.E.M. of 3 individual experiments. *OB/OB*, normal genetic background mice; *ob/ob*, leptin-deficient mice; WT, PPAR γ wild-type mice liver; KO, PPAR γ KO mice liver; FSP27, fat-specific protein 27; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor γ . Note: *ob/ob*-PPAR γ WT mice have fatty liver, whereas *ob/ob*-PPAR γ KO mice are normal or have much less fat. Significant differences from PPAR γ WT liver: * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$.

Table 1. Biochemical parameters of each fatty liver model mouse.

Parameters	Cont (<i>db/db</i>)	<i>db/db</i>	Cont (HF)	HF	Cont (AL)	AL	Cont (MCD)	MCD	Cont (Fasting)	Fasting
Body weight (g)	23±0.1	55±0.8 ^{***}	22±0.3	38±3.3 [*]	30±0.3	24±1.5 [*]	21±0.7	13±0.0 ^{***}	25±2.1	22±1.4
Liver weight (g)	1.1±0.0	2.7±0.1 ^{**}	0.98±0.0	1.4±0.2	1.1±0.0	1.2±0.1	0.87±0.0	0.38±0.0 ^{***}	1.2±0.1	1.0±0.0 [*]
Liver TG (mg/g liver)	2.4±0.1	6.0±0.9 [*]	6.6±0.7	14±2.0 [*]	11±1.0	22±5.1 [*]	4.0±0.2	11±2.1 [*]	6.3±0.1	12±0.3 ^{**}
AST (IU/L)	55±3.9	70±12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	29±0.7	48±6.1 [*]	N.D.	N.D.
ALT (IU/L)	14±4.2	24±1.3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.9±0.3	8.2±1.1 ^{**}	N.D.	N.D.

Each group contains 3-4 mice. Cont, *db/m* mice for *db/db* or the diet of cont groups except *db/db* were described in Materials and methods; TG, triglyceride; AST, aspartate aminotransferase activity; ALT, alanine aminotransferase activity; N.D., not determined. Each value represents the average ± S.E.M. Significant differences from Cont:

^{*}*p* < 0.05, ^{**}*p* < 0.01, ^{***}*p* < 0.001.

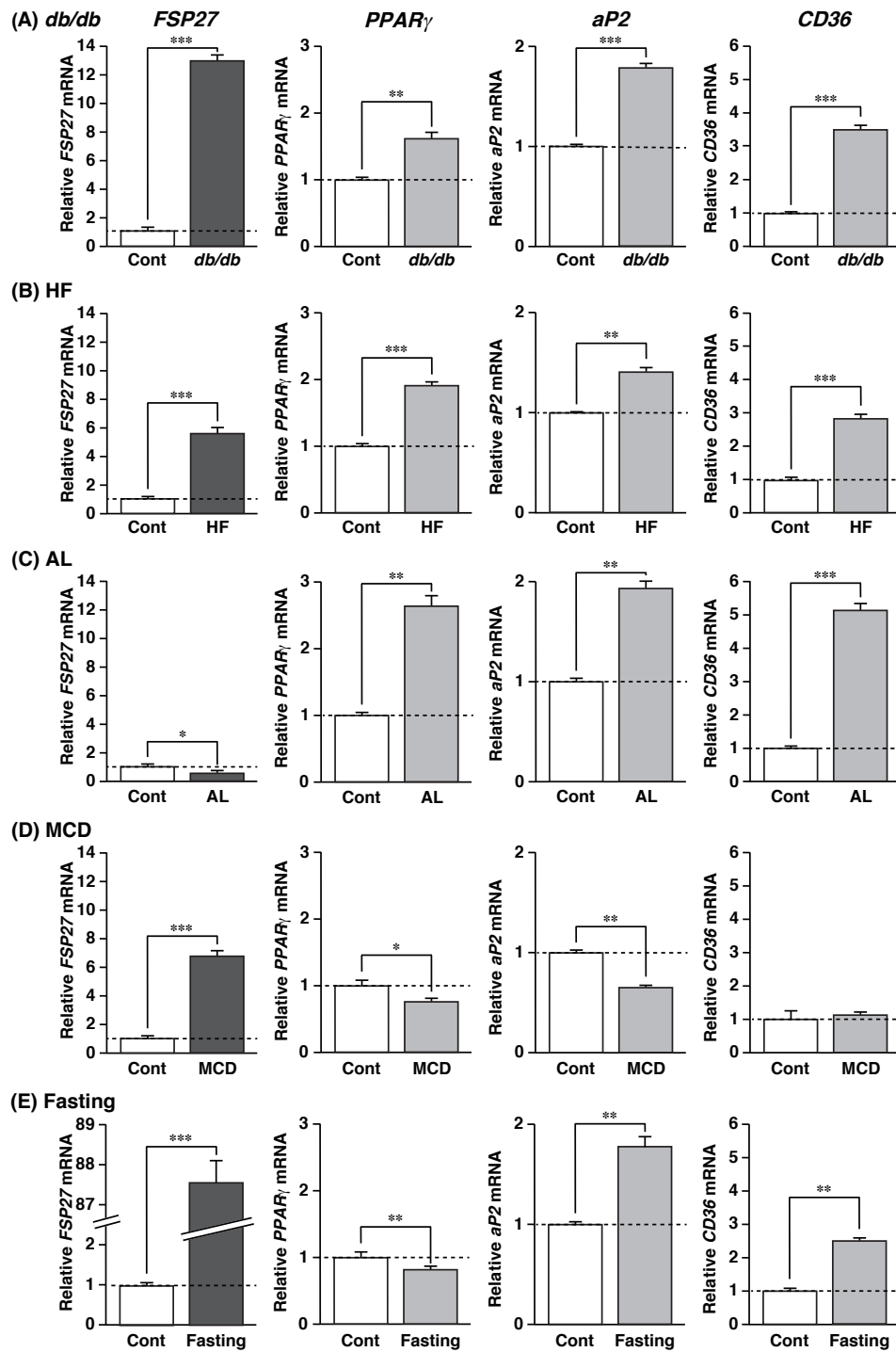


Figure 2. *FSP27* mRNA expression in fatty liver developed by different methods.

QPCR analyses of *FSP27*, *PPAR_γ*, *aP2* and *CD36* mRNAs were performed using liver samples from each group. Expression of each mRNA was examined in (A) genetically modified leptin receptor-mutated mice (*db/db*), as well as (B) high fat diet (HF), (C) alcohol diet (AL), (D) lacking methionine and choline diet (MCD) and (E) 24 hr-fasted mice (Fasting). Expression was normalized to *36B4* mRNA, and each bar represents the average \pm S.E.M. of 3 individual experiments. Cont, *db/m* mice for *db/db* or the diet of cont groups except *db/db* were described in Material and methods; aP2, adipocyte fatty acid-binding protein; CD36, cluster of differentiation 36. Significant differences from Cont: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

著しく誘導されるが、その発現は MCD-*OB/OB*-PPAR γ KO において有意な低下が認められた (Figure 3A)。一方、絶食脂肪肝において誘導された *FSP27* の発現は、Fasting-*OB/OB*-PPAR γ KO において、発現低下が認められなかった (Figure 3B)。

MCD 及び絶食脂肪肝において PPAR γ -*FSP27* シグナルが、脂肪蓄積にどの程度寄与しているか明らかにするため、MCD 及び絶食処理した PPAR γ 欠損マウスの肝 TG 含量を調べた。その結果、両処理脂肪肝において誘導された TG 含量は、*OB/OB*-PPAR γ WT 及び *OB/OB*-PPAR γ KO の間でほとんど差が認められなかった (Figure 4A and B)。さらに MCD 脂肪肝においては、脂質及び糖代謝に関与する *fatty acid synthase (FAS)*、*sterol regulatory element-binding transcription factor 1c (SREBP1c)*、*aP2* 及び *phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)* 遺伝子の発現を調べた。MCD 脂肪肝における *FAS* の発現は、MCD-*OB/OB*-PPAR γ KO において、MCD-*OB/OB*-PPAR γ WT と比べて有意に低下したものの、*SREBP1c*、*CD36* 及び *PEPCK* の発現は、両マウス間でほとんど差がなかった (Figure 5)。

以上の結果より、*FSP27* は、*ob/ob*、*db/db*、HF、MCD 及び絶食脂肪肝において特異的に誘導されるが、AL 脂肪肝では誘導されないことが明らかになった。また、PPAR γ 欠損マウスでの結果より、MCD 脂肪肝における *FSP27* の発現誘導は PPAR γ 依存的であったが、絶食脂肪肝においては PPAR γ 非依存的であることが明らかになった。

第三節 インスリンによる *FSP27* の発現制御

前節の結果から、絶食脂肪肝における *FSP27* の発現誘導には、PPAR γ が関与していないことが明らかになった。絶食マウスは、低インスリン状態であることから、*FSP27* の発現制御にインスリンの関与が推測された。そこで本節では、*FSP27* がインスリンにより発現制御されるか否かについて検討した。

まず、絶食または再摂食処理 (Refeeding) マウスの肝臓及び白色脂肪組織を用いて *FSP27* の発現を解析した。なお、絶食処理マウスは 24 時間の絶食をさせることで、

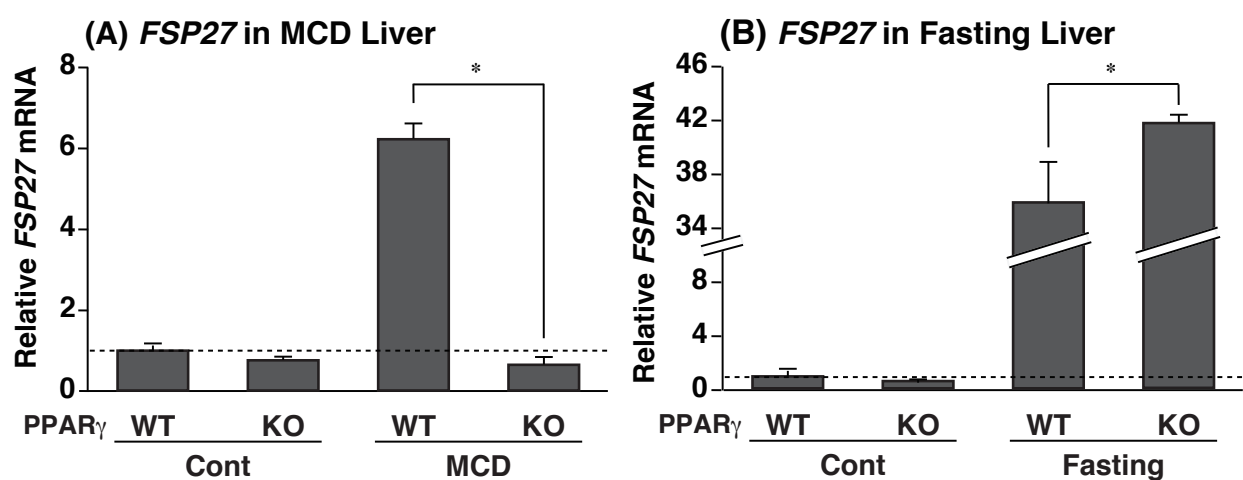


Figure 3. Induction of *FSP27* mRNA in MCD fatty liver is potentially regulated by hepatic PPAR γ but not Fasting fatty liver.

QPCR analysis of *FSP27* mRNA was performed using liver samples from each genotyped mouse. Expression of each mRNA was examined in (A) MCD and (B) Fasting. Cont, normal diet. Expression was normalized to *36B4* mRNA, and each bar represents the average \pm S.E.M. of 3 individual experiments. Significant differences from PPAR γ WT liver: * $p < 0.001$.

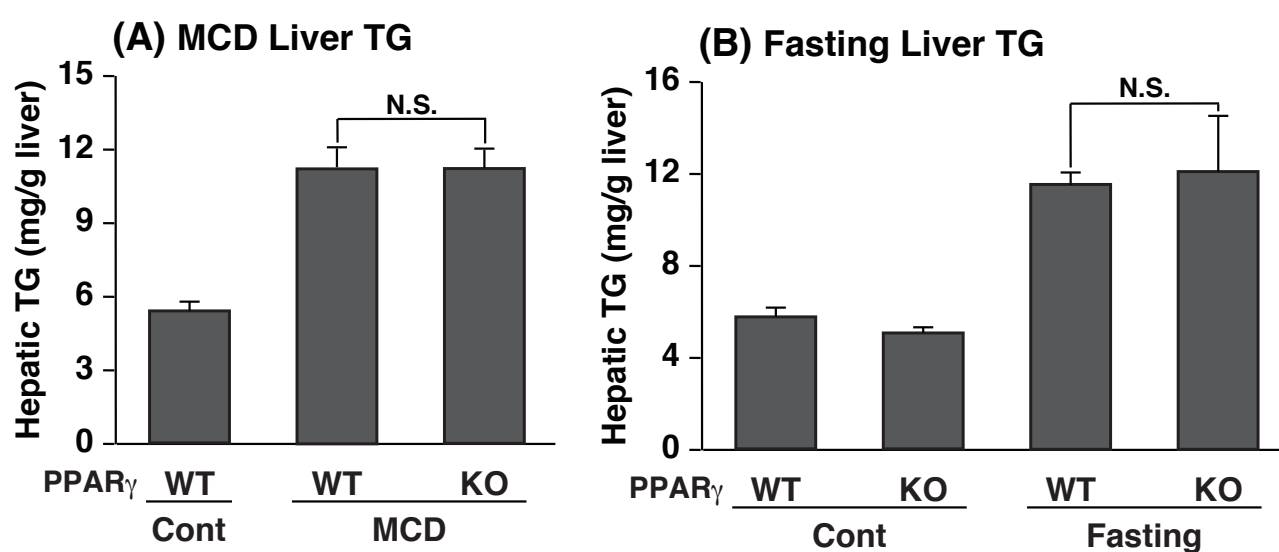


Figure 4. Hepatic TG content in MCD and Fasting fatty liver is independent of PPAR γ levels. Hepatic triglyceride (TG) content in PPAR γ WT and PPAR γ KO mice by (A) a MCD diet (B) Fasting. Each bar represents the average \pm S.E.M. of 3 individual experiments. N.S., not significant.

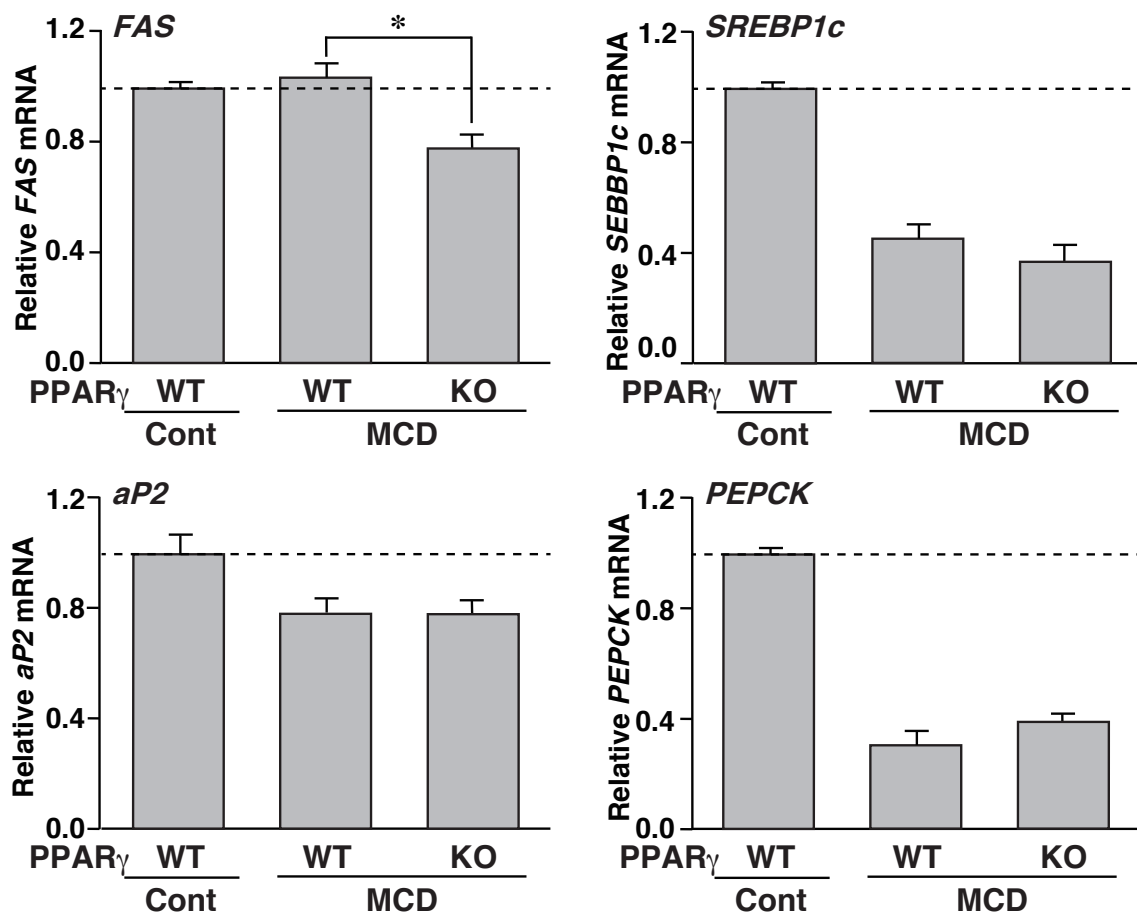


Figure 5. Effects of PPAR γ deficiency on hepatic gene expression in MCD fatty liver. QPCR analyses of *FAS*, *SREBP1c*, *aP2*, and *PEPCCK* mRNAs were performed using liver samples for each genotyped mouse. Expression was normalized to *36B4* mRNA, and each bar represents the average \pm S.E.M. of 3 individual experiments. FAS, fatty acid synthase; SREBP1c, sterol regulatory element-binding transcription factor 1c; PEPCCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase. Significant differences from PPAR γ WT liver (MCD): * $p < 0.05$.

再摂食処理マウスは 24 時間の絶食後、さらに高スクロース食を 24 時間給餌させることで作製した (24)。絶食肝臓における *FSP27* の発現は、コントロールの 20 倍以上の著しい誘導が認められ、この発現は再摂食処理によりコントロールと同程度まで低下した (Figure 6A)。一方、絶食白色脂肪組織における *FSP27* の発現は、コントロールと比べて有意な発現低下が認められ、この低下した発現は再摂食処理によりコントロールと同程度まで回復した (Figure 6B)。また、絶食肝臓における *PPAR γ* 遺伝子の発現は、コントロールと比べて有意な発現低下が認められ、その発現は再摂食マウスの肝臓と比べてほとんど変わらなかった (Figure 6A)。絶食白色脂肪組織における *PPAR γ* の発現は、コントロールと比べて有意な発現低下が認められ、その発現は再摂食によりコントロールと同程度まで回復した (Figure 6B)。コントロール遺伝子として用いた *FAS* の発現は、すでに報告されている結果と同様に、絶食肝臓及び白色脂肪組織においてコントロールに比べて有意に低下し、再摂食処理により有意な誘導が認められた (Figure 6A and B)。

肝臓の *FSP27* の発現は、低インスリン状態である絶食マウスの肝臓で誘導され、高インスリン状態である再摂食マウスの肝臓で有意に低下した。そこで、血中インスリンレベルの著しい低下を引き起こす 1 型糖尿病モデル streptozotocic 処理 (STZ) マウスの肝臓における *FSP27* の発現を、リアルタイム PCR 法により確かめた。なお、予め STZ マウスの血糖値がコントロールマウスに比べて著しく上昇していることを確認している (data not shown)。STZ 肝臓における *FSP27* の発現は、コントロールの 5 倍以上の著しい誘導が認められた (Figure 7A)。しかしながら、STZ 肝臓における *PPAR γ* の発現は、*FSP27* の発現とは異なり、コントロールとほとんど変わらなかった (Figure 7B)。

FSP27 の発現は、絶食及び STZ 肝臓 (低インスリン状態) において高レベルであったことから、その発現はインスリンにより抑制されている可能性がある。そこで、絶食処理により誘導された *FSP27* の発現が、インスリン投与、またグルコース投与によるインスリンレベルの増加により低下するか否かについて検討した。本実験では、24 時間絶食させたマウスに対してインスリン、またはグルコースを腹腔内に投与し、10 分、30 分、1 時間、8 時間及び 24 時間後における *FSP27* 及び *FAS* の発現を解析した。絶食肝臓に

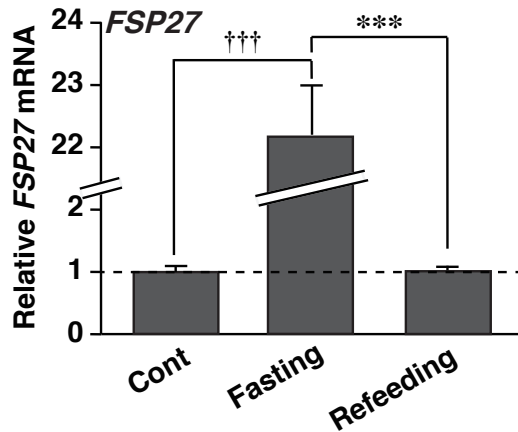
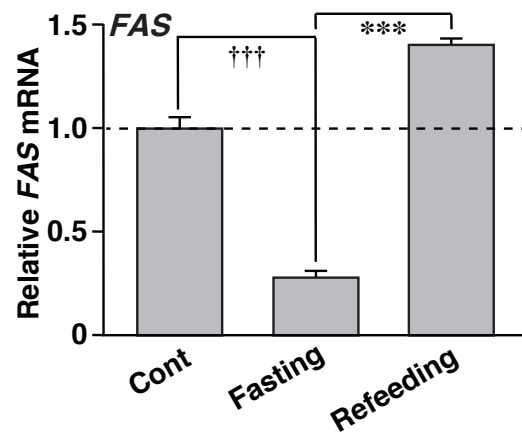
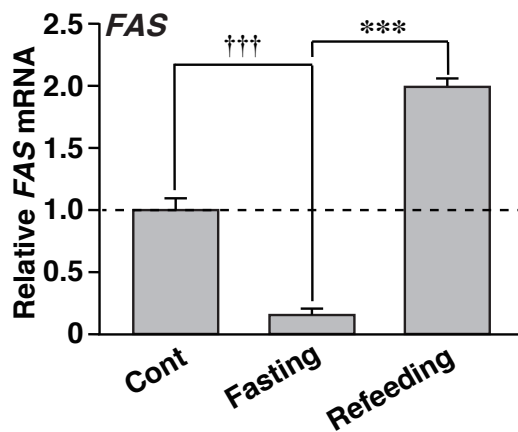
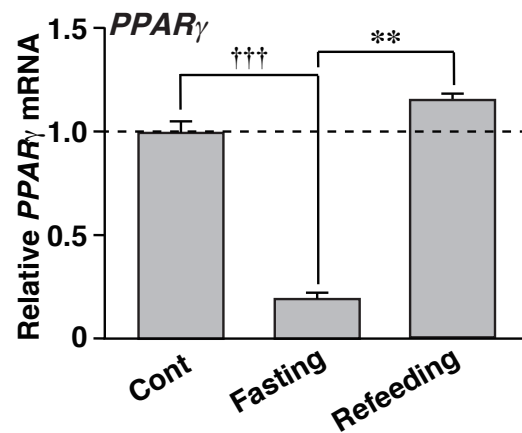
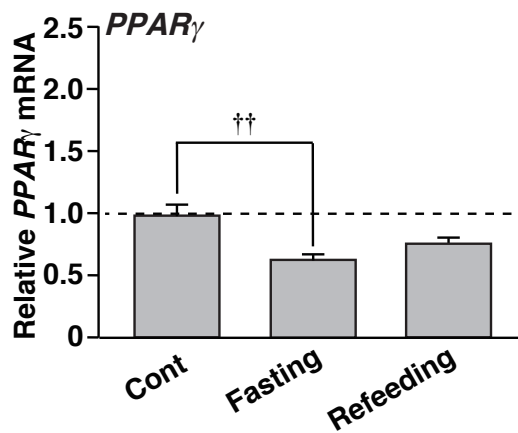
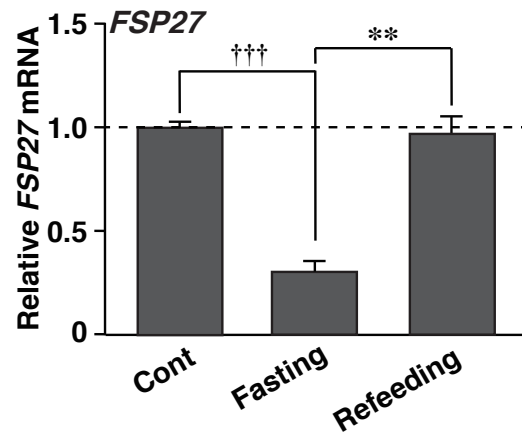
(A) Liver**(B) WAT**

Figure 6. Induction of *FSP27* mRNA in fasting liver is suppressed by refeeding.

QPCR analyses of *FSP27*, *PPAR γ* and *FAS* mRNAs were performed using (A) liver or (B) WAT samples from each treated mouse. Expression was normalized to *36B4* mRNA, and each bar represents the average \pm S.E.M. of 3 individual experiments. Cont, ad libitum-fed mice; Fasting, 24 hr-fasted mice; Refeeding, refed mice after 24 hr-fasting. Significant differences from Cont: $\dagger p < 0.05$, $\dagger\dagger p < 0.01$. Significant differences from Fasting: $* p < 0.05$, $** p < 0.01$, $*** p < 0.001$.

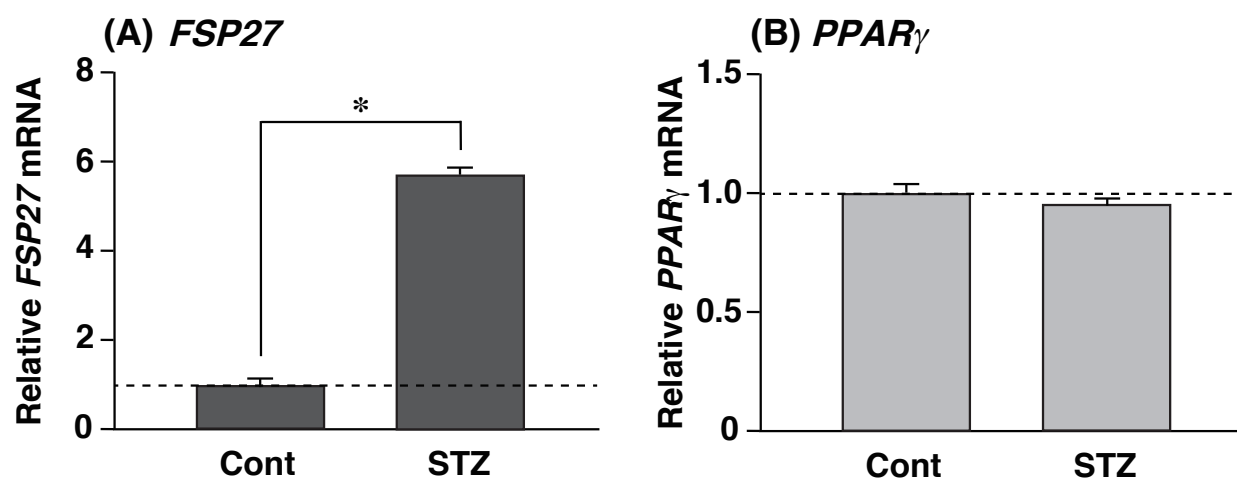


Figure 7. Hepatic expression of *FSP27* mRNA is induced by STZ treatment.

QPCR analyses of (A) *FSP27* and (B) *PPAR*_γ mRNAs were performed using liver samples from non-treated mice (Cont) and streptozotocin-injected mice (STZ). Expression was normalized to *36B4* mRNA, and each bar represents the average \pm S.E.M. of 3 individual experiments. Significant differences from Cont: * $p < 0.001$.

における *FSP27* の発現は、インスリン投与 30 分及び 1 時間後において有意な発現レベルの低下が認められ、24 時間後においてはインスリン投与前の発現レベルと同程度であった (Figure 8A)。一方、グルコースを投与した絶食肝臓における *FSP27* の発現は、投与 30 分以降において時間経過に伴う発現レベルの低下が認められた (Figure 8B)。すでに報告されているように、*FAS* はインスリンまたはグルコースの投与により、時間経過に伴う発現レベルの上昇が認められた (Figure 8A and B)。以上の結果から、肝臓における *FSP27* の発現はインスリンによって発現抑制されていることが示唆された。以上の結果から、*FSP27* は脂肪肝発症の成因の違いにより、その発現性が大きく異なることが明らかになった。また、肝臓における *FSP27* 発現の新たな制御因子として、インスリンによる発現抑制が示唆された。

第四節 考察

本章において、*FSP27* は *ob/ob*、*db/db*、HF、MCD 及び 絶食マウスの脂肪肝において特異的に誘導されることが明らかになった (第二節)。また、絶食マウスの脂肪肝において誘導される *FSP27* はインスリンによって抑制されることが明らかになった (第三節)。

当研究室ではすでに、肥満モデルである *ob/ob* マウスの脂肪肝における *FSP27* の発現が、PPAR γ 依存的であることを明らかにしている (18)。絶食肝臓における *FSP27* の発現誘導は、PPAR γ の発現量と正に相関しておらず (Figure 2E)、PPAR γ 欠損マウスの実験から PPAR γ 非依存的な誘導であった (Figure 3B)。その結果は、本脂肪肝における *FSP27* の発現制御に PPAR γ 以外の因子が関与していることを意味している。近年、絶食時の肝臓において *FSP27* の発現を制御する転写因子として cAMP response element binding protein (CREB) が報告された (25)。*FSP27* のプロモーター領域には機能的な CREB 結合配列が存在する (25)。それゆえ、絶食マウスの脂肪肝における *FSP27* の発現誘導には、PPAR γ ではなく CREB の関与が考えられる。

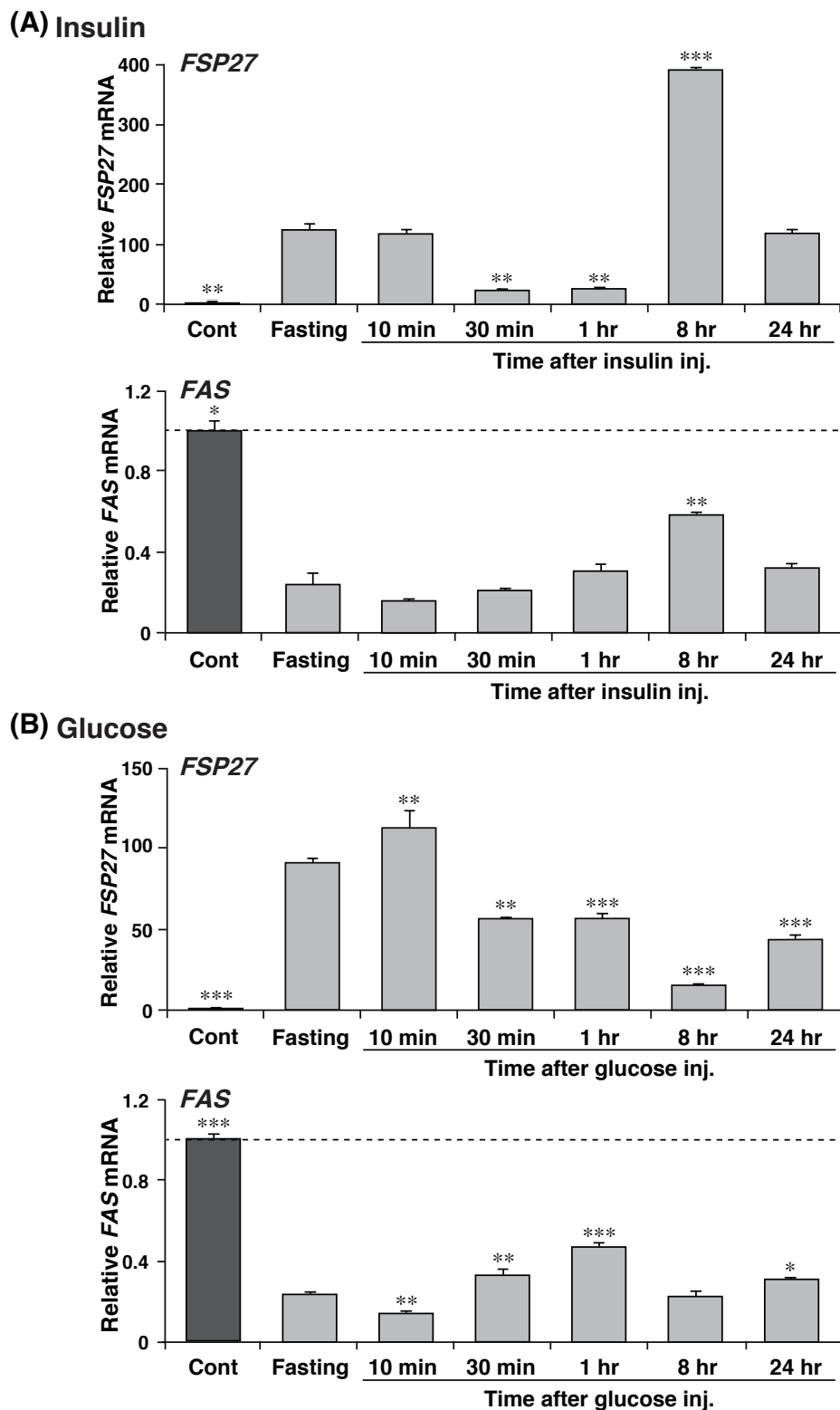


Figure 8. Induction of *FSP27* mRNA in fasting liver is suppressed by insulin or glucose injection. QPCR analyses of *FSP27* and *FAS* mRNAs were performed using liver samples from (A) insulin- or (B) glucose-treated mouse. Expression was normalized to *36B4* mRNA, and each bar represents the average \pm S.E.M. of 3 individual experiments. 24 hr-fasted mice (Fasting) were sacrificed 10 min, 30 min, 1 hr, 8 hr and 24 hr after intraperitoneal injection with insulin (8 munits/g of body weight) or glucose (5 mg/g of body weight). Cont, ad libitum-fed mice. Significant differences from Fasting: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

CREB による絶食・再摂食時の標的遺伝子の活性化・不活性化はインスリン及びグルカゴンが大きく関与しており、以下の様なメカニズムが報告されている (26)。1) 絶食時において、血中インスリンレベルが低下し、グルカゴン有意になると protein kinase A が活性化され CREB をリン酸化する。2) 転写コアアクチベーターである CREB-binding protein (CBP) や CREB-regulated transcription coactivator 2 (CRTC2) が、リン酸化 CREB に結合して標的遺伝子の転写を促進する。3) 再摂食時において、血中インスリンレベルが急激に上昇すると salt-inducible kinase 2 は、CBP や CRTC2 をリン酸化する。4) リン酸化 CBP や CRTC2 は、CREB との相互作用が弱まり、CREB から離脱し転写促進が停止する。これらのメカニズムは、本章で述べた PPAR γ 非依存的な絶食肝臓における *FSP27* の発現誘導、及び再摂食の発現抑制を説明するものである。興味深いことに、白色脂肪組織における絶食時の *FSP27* の発現は、肝臓とは異なり低下した (Figure 6B)。よって上記のメカニズムは肝臓特異的である可能性が高い。なお、絶食処理した *FSP27* の発現は、インスリン投与 8 時間後において例外的に著しい誘導が認められたが (Figure 8A)、この原因については明らかではなく再実験が必要と考えている。

MCD 及び AL マウスの結果は、相反するものであった (Figure 2C and D)。すなわち、*FSP27* 発現は、PPAR γ が誘導されている AL マウスにおいては誘導されなかったが、PPAR γ の誘導が認められない MCD においては誘導された。一方、PPAR γ の標的遺伝子として知られる *aP2* 及び *CD36* の発現は、PPAR γ の誘導と一致して AL マウスにおいては誘導され、MCD においては誘導されなかった。これらの相反する結果のメカニズムは現状では未解明である。*FSP27* の発現は、おそらく上述した CREB のように PPAR γ 以外にも多くの因子により制御されており、他の典型的な PPAR γ 標的遺伝子の発現制御とは異なることが予想される。

Ob/ob マウスの脂肪肝における *FSP27* ノックダウンは、脂肪肝の改善をもたらした (18)。しかしながら、MCD 脂肪肝における PPAR γ の欠損により、*FSP27* の発現は有意に低下したものの、肝 TG 含量は、コントロールとほとんど変わらなかった (Figures 3A and 4A)。近年の *FSP27* の機能に関する報告によると、*FSP27* は脂肪蓄積に関連する以外にも

アポトーシスの誘導 (27) あるいは転写制御 (28) 等があり、これらの機能を含め MCD 脂肪肝における FSP27 の機能については今後の課題である。

第二章 PPAR γ によって制御される *LPD1* 遺伝子の発現解析

第一節 概要

当研究室では、*ob/ob* マウスの脂肪肝から機能未知である *LPD1* 遺伝子の単離に成功した。本遺伝子はその発見の経緯から PPAR γ による脂肪肝発症に関与している可能性が高い。本章では、*LPD1* 遺伝子の発現が PPAR γ 依存的であることを確かめ、さらに *LPD1* タンパクの生理機能を類推するために、マウス各組織をはじめとする様々なサンプルに対して詳細な *LPD1* mRNA の発現解析を行った。

第二節 PPAR γ 欠損マウスの肝臓における *LPD1* の発現性

すでに行われていた転写開始点の決定の結果 (29) 及びデータベース NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) による解析から、*LPD1* にはエキソン 1 の異なる 3 つのバリエーションの存在が明らかになった。これらのバリエーションはそれぞれ *LPD1a*、*1b* 及び *1c* と命名された (Figure 9)。*LPD1b* 及び *1c* の推定上の翻訳開始及び終始点は全く同一であり、おそらく翻訳産物は同一と思われる (後述)。マウス *LPD1a*、*1b* 及び *1c* は、10 番染色体 C2 領域にコードされており、マウス *LPD1a* に相当するヒト *hLPD1* は、12 番染色体 q22 領域にコードされている。

LPD1 の 3 つのバリエーションが各ジェノタイプマウスの脂肪肝においてどのような発現パターンを示すかリアルタイム PCR 法により確かめた。本実験では、Figure 1 で用いた 4 種類のマウスに加え、PPAR γ の特異的なリガンドであるロジグリタゾン処理群も解析した。その結果、*ob/ob*-PPAR γ WT の肝臓における *LPD1a* の発現は、未処理及びロジグリタゾン処理群のいずれにおいても *OB/OB*-PPAR γ WT の肝臓に比べて約 2 倍の誘導が認められ、それらの発現は、PPAR γ の欠損により有意に低下した (Figure 10B)。未処理の *ob/ob*-PPAR γ WT の肝臓における *LPD1b* は、*OB/OB*-PPAR γ WT の肝臓に比べて

LPD1 genome structure

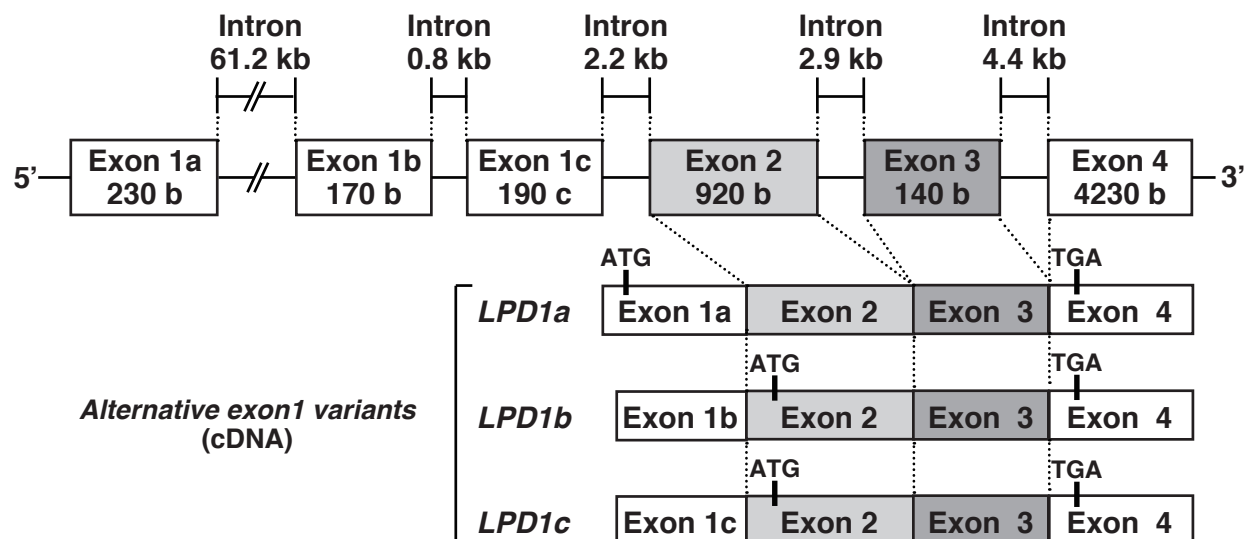


Figure 9. Genomic structure of the liver PPAR γ -dependent gene 1 (*LPD1*) gene in mouse.

約 10 倍の著しい誘導が認められた。その発現はロジグリタゾン処理により約 9 倍の付加的な誘導が認められ、PPAR γ の欠損により有意な低下が認められた (Figure 10C)。LPD1c の発現は、LPD1b の発現パターンと類似していたが、LPD1b に比べ未処理の ob/ob-PPAR γ WT の肝臓において低レベルであることが特徴的であった (Figure 10D)。以上の結果より、LPD1 の 3 つのバリエントはいずれも ob/ob マウスの肝臓において PPAR γ 依存的な発現を示すことが明らかになった。

第三節 各脂肪肝モデルマウスの肝臓における LPD1 遺伝子の発現性

前節の結果より、ob/ob マウスの脂肪肝における 3 種の LPD1 バリエントは、いずれもその発現制御に PPAR γ が関与していることが示唆され、それらの発現は脂肪肝形成と正の相関を示すことが明らかになった。そこで、本節では、ob/ob マウス以外の各脂肪肝モデルマウスの肝臓における LPD1a、1b 及び 1c の発現性を解析した。なお、用いたサンプルは、Figure 2 で調製されたものを使用した。

LPD1a の発現は、コントロールマウスの肝臓に比べ、アルコール処理 (AL) 脂肪肝において約 1.7 倍の有意な誘導が認められた (Figure 11B)。LPD1b の発現は、メチオニン・コリン欠損食処理 (MCD) 脂肪肝において約 2 倍、及び絶食処理 (Fasting) 脂肪肝において約 3 倍の有意な誘導が認められた (Figure 11C and D)。LPD1c の発現は、AL 脂肪肝において約 1.2 倍、絶食処理脂肪肝において約 2.7 倍の有意な誘導が認められた (Figure 11B and D)。これらの結果より、LPD1 バリエントは脂肪肝発症の成因の違いにより、その発現性が大きく異なることが明らかになった。また、LPD1b 及び 1c の発現パターンは各脂肪肝モデル間で類似しており、LPD1a のパターンとは異なった。

LPD1b 及び 1c は、絶食処理脂肪肝において誘導された。そこで、絶食処理脂肪肝における LPD1b 及び 1c の発現に PPAR γ が関与しているか否かを明らかにするために、Figure 5 で用いた PPAR γ 欠損マウスを使用した。なお、本実験では、絶食時の肝臓において誘導されることが報告されている糖新生の律速酵素である

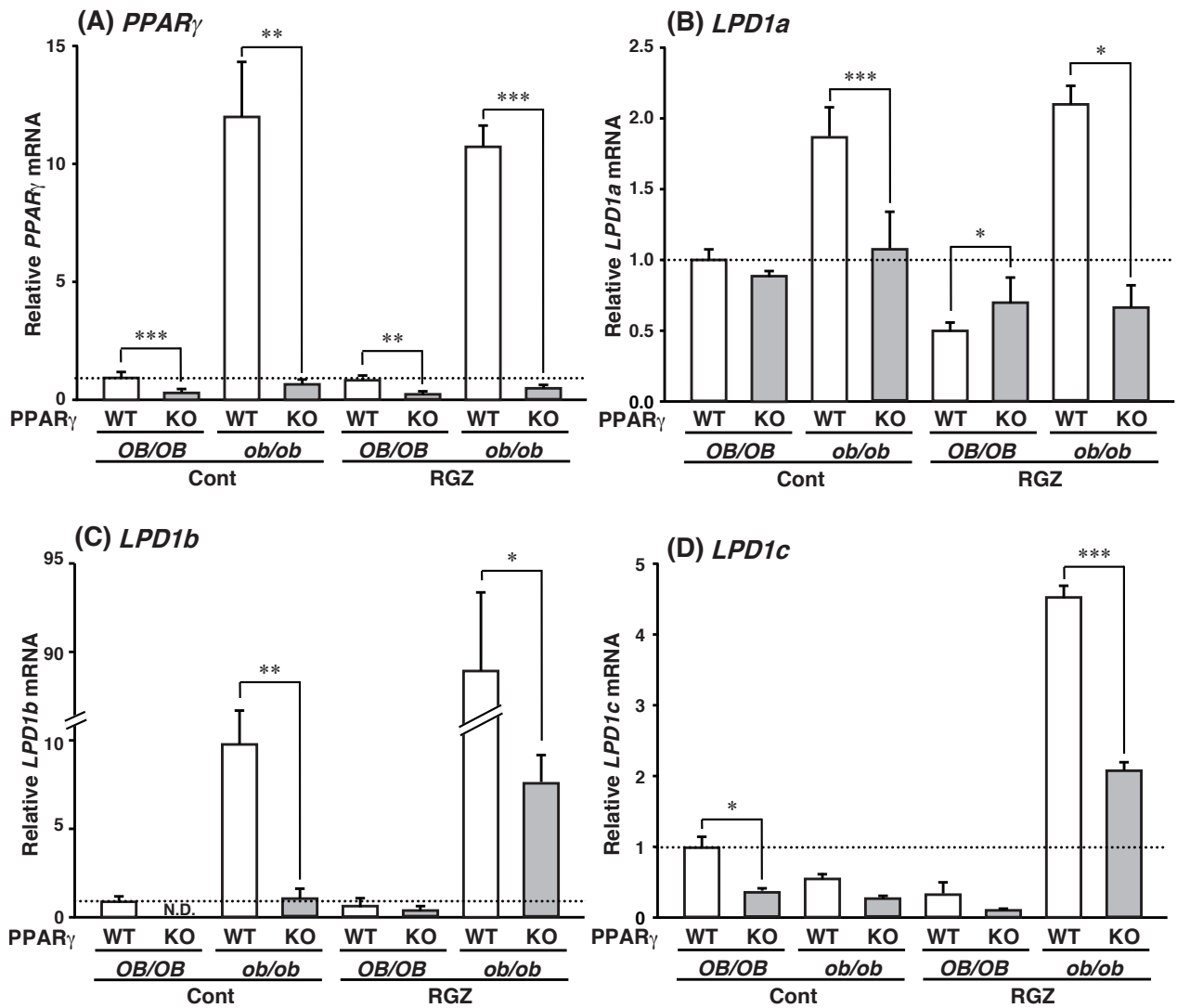


Figure 10. The expression of $LPD1$ mRNA depends on the hepatic $PPAR_{\gamma}$ expression and fatty liver formation.

QPCR analyses of (A) $PPAR_{\gamma}$, (B) $LPD1a$, (C) $1b$ and (D) $1c$ mRNAs were performed using liver samples from each genotyped mouse. Expression was normalized to $36B4$ mRNA, and each bar represents the average \pm S.E.M. of 3 individual experiments. Cont, diet without rosiglitazone; RGZ, diet containing rosiglitazone; N.D., not detected. Significant differences from $PPAR_{\gamma}$ WT liver: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

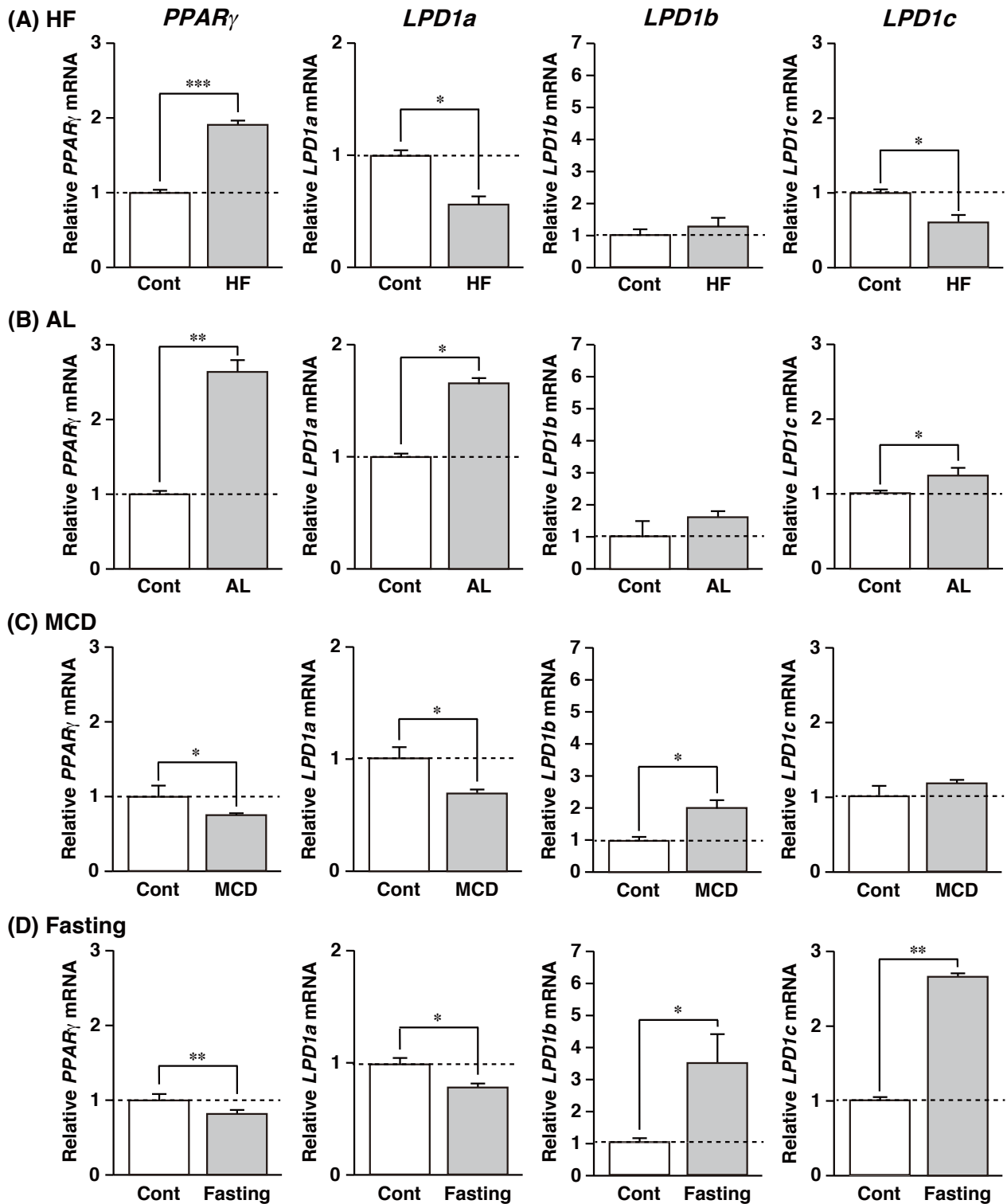


Figure 11. *LPD1a*, *1b* and *1c* gene expression in fatty livers developed by different methods.

QPCR analyses of *PPAR γ* , *LPD1a*, *1b* and *1c* mRNAs were performed using liver samples from each group. Expression of each mRNA was examined in (A) high fat diet (HF), as well as (B) alcohol diet (AL), (C) lacking methionine and choline diet (MCD) and (D) 24 hr-fasted mice (Fasting). Expression was normalized to *36B4* mRNA, and each bar represents the average \pm S.E.M. of 3 individual experiments. Significant differences from Cont: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

phosphoenolpyruvate carboxykinase (*PEPCK*) 及び *glucose 6-phosphatase* (*G6Pase*) をポジティブコントロール遺伝子として用いた (30)。すでに報告されているように、PPAR γ WT マウスにおける *PEPCK* 及び *G6Pase* の発現は、絶食処理によりコントロール肝臓に比べて有意な誘導が認められた (Figure 12A and B)。また、PPAR γ WT マウスの肝臓における *PEPCK* 発現は、PPAR γ の欠損においても変化が認められなかったが、興味深いことに、*G6Pase* においては有意な低下が認められた。PPAR γ WT マウスにおける *LPD1a* の発現は絶食処理により誘導が認められず、さらに PPAR γ の欠損においても変化しなかった (Figure 12C)。一方、PPAR γ WT マウスにおける *LPD1b* 及び *1c* の発現は、いずれも絶食処理によりコントロール肝臓に比べて有意な誘導が認められ、両遺伝子の発現誘導は PPAR γ の欠損により有意な低下が認められた (Figure 12D and E)。以上の結果より、絶食処理マウスの脂肪肝における *LPD1b* 及び *1c* の発現誘導には、肝 PPAR γ が関与していることが明らかになった。

LPD1b 及び *1c* 発現は、低インスリン状態である絶食処理肝臓において著しく誘導された。それゆえ、これらの遺伝子の発現には *FSP27* と同様にインスリンの関与が考えられた。そこで、再摂食 (高インスリン) 及び STZ 処理 (低インスリン) マウスの肝臓 (Figures 6 and 7) における *LPD1b* 及び *1c* の発現を確認した。再摂食及び STZ 処理肝臓における PPAR γ の発現は、いずれもコントロールマウスの肝臓とほとんど変わらなかった。*LPD1a* の発現は再摂食処理によりコントロール肝臓に比べて有意な低下が認められ、STZ 処理肝臓においては、有意な上昇が認められた (Figure 13A and B)。*LPD1b* の発現は、*LPD1a* と類似しており再摂食処理により検出不可能な程の著しい発現低下が認められ、STZ 処理においては上昇傾向であった。*LPD1c* の発現は、再摂食処理及び STZ 処理によりいずれも有意な低下が認められた (Figure 13A and B)。以上の結果から、*LPD1a* 及び *1b* の発現は *FSP27* と同様にインスリンにより抑制されていることが示唆された。

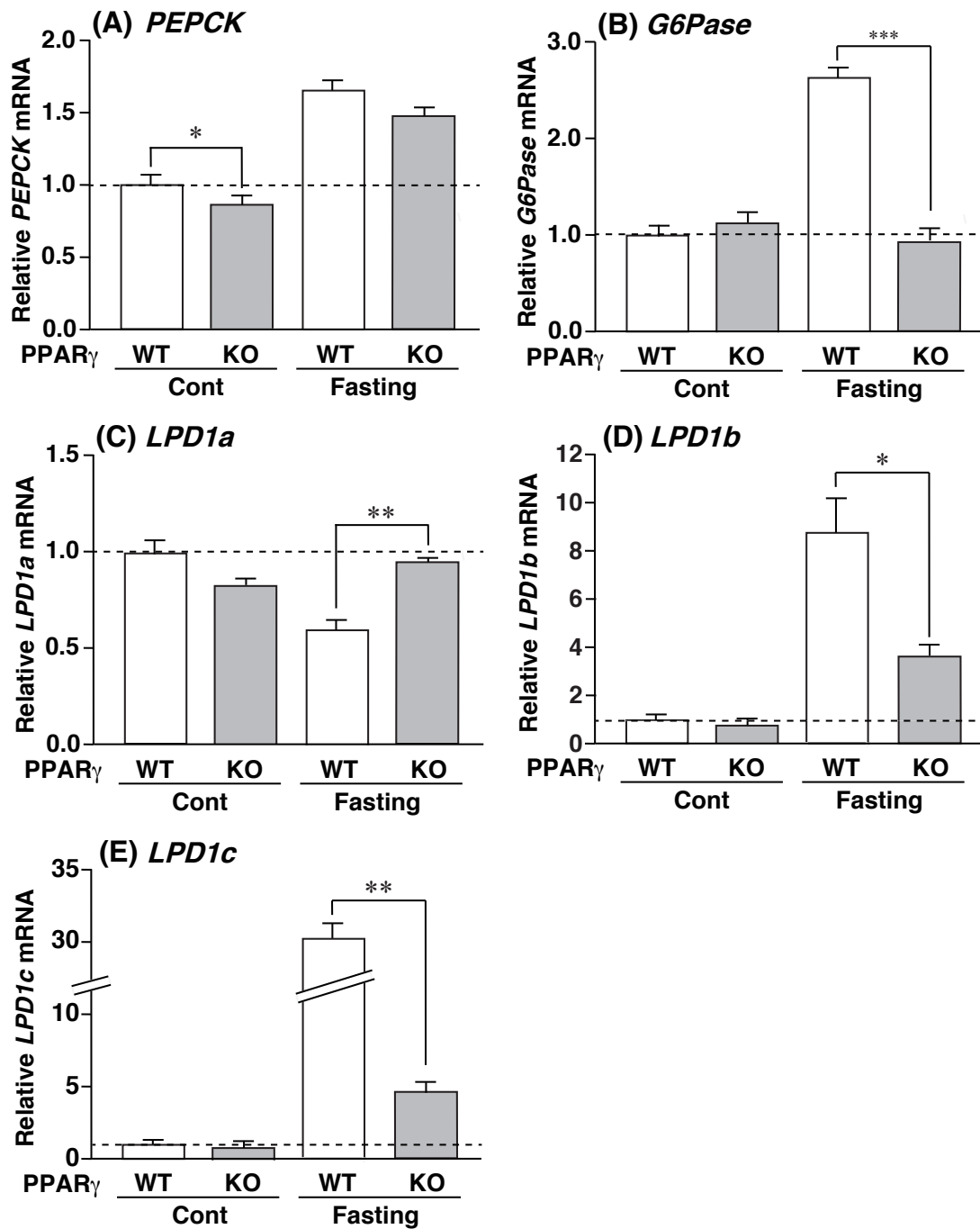


Figure 12. Induction of *LPD1b* and *1c* mRNAs in fasting liver is regulated by hepatic PPAR γ . QPCR analyses of (A) *PEPCK*, (B) *G6Pase*, (C) *LPD1a*, (D) *1b* and (E) *1c* mRNAs were performed using liver samples from each genotyped mouse. Expression was normalized to *36B4* mRNA, and each bar represents the average \pm S.E.M. of 3 individual experiments. Cont, ad libitum-fed mice; Fasting, 24 hr-fasted mice; G6Pase, glucose 6-phosphatase. Significant differences from PPAR γ WT liver: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

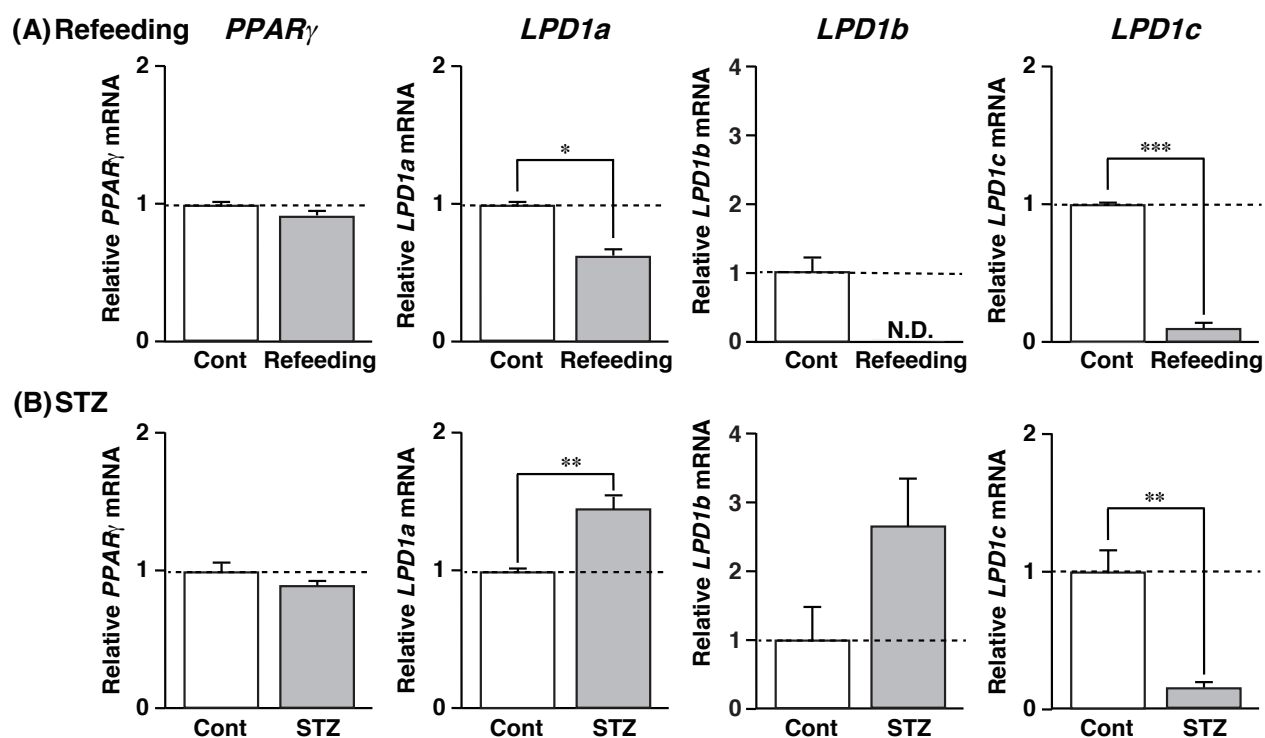


Figure 13. Effect of higher or lower serum insulin on the expression of *LPD1* mRNAs in liver. QPCR analyses of *PPAR γ* , *LPD1a*, *1b* and *1c* mRNAs were performed using liver samples from each group. Expression of each mRNA was examined in (A) refed mice after 24 hr-fasting (Refeeding) as higher insulin condition and (B) streptozotocin-injected mice (STZ) as lower insulin condition. Expression was normalized to *36B4* mRNA, and each bar represents the average \pm S.E.M. of 3 individual experiments. N.D., not detected. Significant differences from Cont: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

第四節 2 型糖尿病モデルマウスにおける *LPD1* の組織発現性

これまでの検討はすべて肝臓を用いたものであり、*LPD1* バリエントの発現が、*ob/ob* マウスの脂肪肝以外の組織で発現しているかについては明らかではない。そこで、本節では *ob/ob* マウスの各組織における *LPD1a*、*1b* 及び *1c* の発現を解析した。用いたサンプルは、肝臓、脳、心臓、大腸、筋肉、白色及び褐色脂肪組織である。すでに報告されているように *PPAR γ* の発現は、白色及び褐色脂肪組織において高レベルであった (Figure 14A) (31)。*LPD1* バリエントにおいて肝臓よりも有意な高発現が認められた組織は、*LPD1a*: 脳、心臓、白色及び褐色脂肪組織、*LPD1b*: 脳、心臓、大腸、白色及び褐色脂肪組織、*LPD1c*: 心臓、大腸、白色及び褐色脂肪組織であった (Figure 14B-D)。いずれも白色及び褐色脂肪組織において高発現しており、*PPAR γ* の発現と正に相関していた。興味深いことに *LPD1* バリエントの発現は、*PPAR γ* がほとんど発現していない脳や心臓においても肝臓以上に発現していることが明らかになった。

第五節 成熟脂肪細胞における *LPD1* の発現性

LPD1b 及び *1c* は、*LPD1a* に比べ脂肪肝よりも脂肪組織において顕著に高発現していることが明らかになった。*PPAR γ* は、3T3-L1 成熟脂肪細胞においても高発現している (32)。3T3-L1 前駆脂肪細胞は本来繊維芽細胞様の細胞であるが、分化誘導剤 IDX (インスリン + デキサメタゾン + 3-イソブチルメチルキサンチン) により成熟脂肪細胞へ分化することが知られている (16)。*PPAR γ* はこの分化において必須な因子であり、分化に伴い発現が誘導されることが知られている (32)。本節では、3T3-L1 前駆脂肪細胞、成熟脂肪細胞及びロジグリタゾン処理した成熟脂肪細胞における *LPD1a*、*1b* 及び *1c* の発現を解析した (Figure 15)。なお、本実験では、3T3L-1 前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化に伴う誘導が報告されている *PPAR γ* 及び前章の *FSP27* をポジティブコントロール遺伝子として使用した (19)。

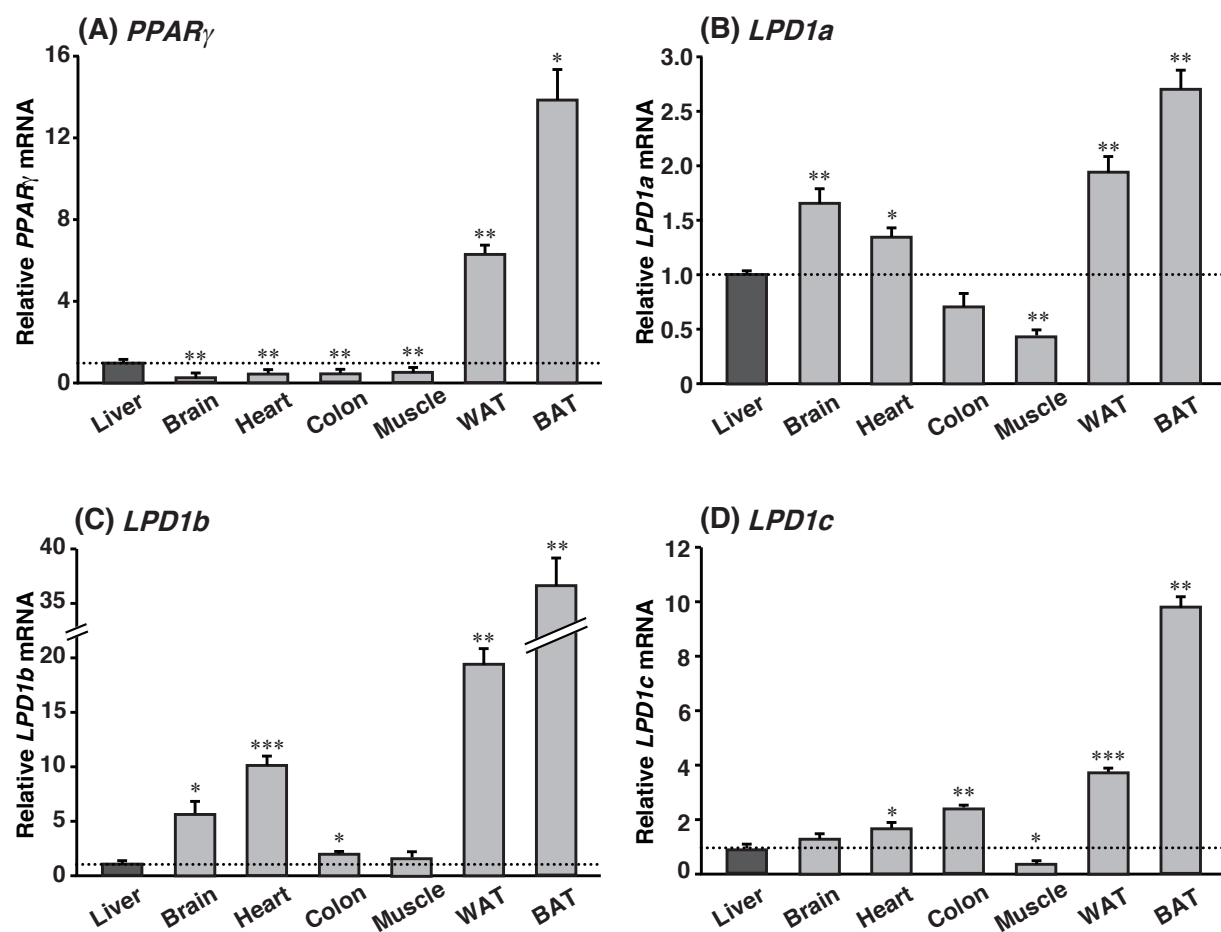


Figure 14. Tissue distribution of *LPD1a*, *1b* and *1c* mRNAs in *ob/ob* mice.

QPCR analyses of (A) *PPAR γ* , (B) *LPD1a*, (C) *1b* and (D) *1c* mRNAs were performed using each tissue samples from *ob/ob* mouse. Expression was normalized to *36B4* mRNA, and each bar represents the average \pm S.E.M. of 3 individual experiments. WAT, white adipose tissue; BAT, brown adipose tissue. Significant differences from liver: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

ポジティブコントロールである両遺伝子の発現は、報告されている結果と同様であり (16)、用いた分化誘導システムが適切に機能していることが確認された (Figure 15)。LPD1b 及び 1c の発現は、前駆脂肪細胞において検出不可能なほど低レベルであったが、成熟脂肪細胞への分化に伴い誘導され、さらに、ロジグリタゾン処理により付加的に著しく誘導されることが明らかになった (Figure 15)。一方、LPD1a は、LPD1b 及び 1c の発現と比較すると、前駆脂肪細胞においても明らかな発現が認められ、成熟脂肪細胞への分化によりその発現が上昇するものの、ロジグリタゾン処理による発現誘導は低かった (Figure 15)。以上の結果より、LPD1a、1b 及び 1c の発現は、いずれも脂肪細胞の分化に伴い上昇することが明らかになった。また、LPD1b 及び 1c の発現は LPD1a より、FSP27 の発現パターンに類似していた。

第六節 考察

本章において、LPD1a、1b 及び 1c は ob/ob マウスの脂肪肝において PPAR γ 依存的な発現を示し、このうち LPD1b 及び 1c は、LPD1a に比べ PPAR γ による発現誘導率が高いことが明らかになった (第二節)。LPD1b 及び 1c の発現は、MCD 及び絶食処理脂肪肝において ob/ob マウスの脂肪肝とよく似た誘導パターンを示すことが明らかになった。一方、LPD1a は、AL 脂肪肝に誘導され明らかに他の 2 つのバリエーションとは異なった (第三節)。LPD1a、1b 及び 1c の発現は、いずれも脂肪組織において高発現していること、3T3-L1 成熟脂肪細胞への分化に伴い誘導されることも明らかになった (第四、五節)。

PPAR γ は、ob/ob マウスの脂肪肝形成に必須な因子である (17)。しかしながら、PPAR γ 自身は転写因子であるため、PPAR γ により発現制御され脂肪肝形成に直接関与するエフェクタータンパクが存在しているはずである。その一つとして、当研究室ではすでに前章の FSP27 を報告している (18)。LPD1a、1b 及び 1c もまたそのエフェクタータンパクとして機能しているならば、まずはこれらの遺伝子が PPAR γ の標的遺伝子であることを証明する必要がある。

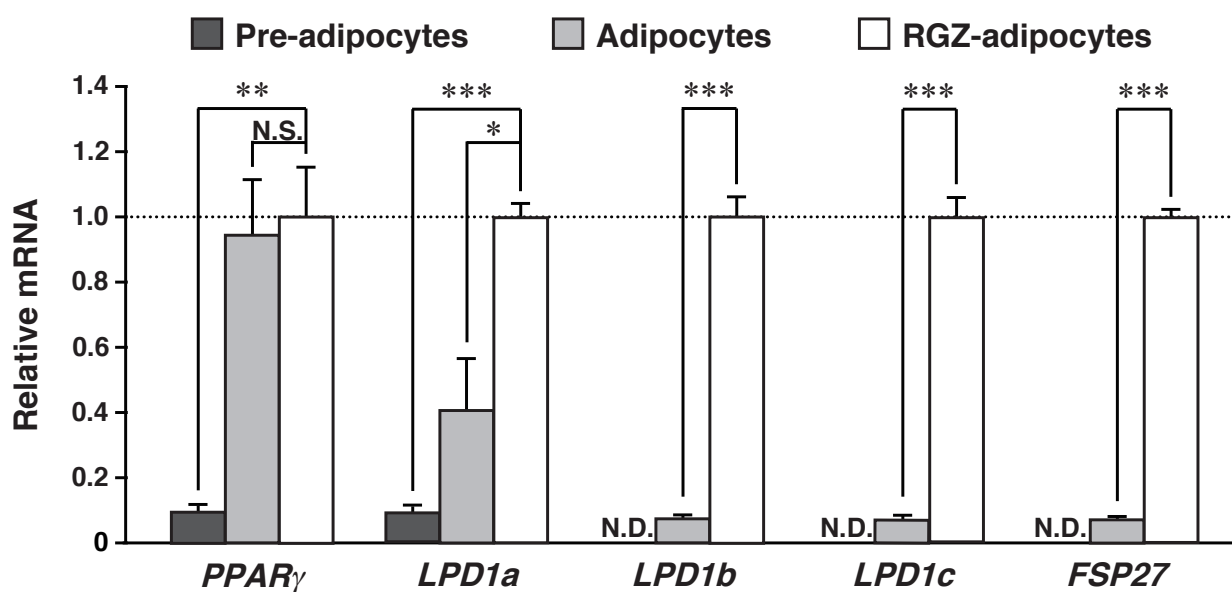


Figure 15. Expression of *LPD1a*, *1b* and *1c* mRNAs is markedly induced by full differentiation and RGZ treatment.

QPCR analyses of *PPAR γ* , *LPD1a*, *1b*, *1c* and *FSP27* mRNAs were performed using total RNA from each cell sample. Expression was normalized to *36B4* mRNA, and each bar represents the average \pm S.E.M. of 3 individual experiments. The experimental conditions for differentiation to adipocytes were described in Materials and methods. Pre-adipocytes, 3T3-L1 cells before differentiation treatment; Adipocytes, fully differentiated 3T3-L1 adipocytes; RGZ-adipocytes, differentiated 3T3-L1 adipocytes treated by 1 μ M rosiglitazone; N.S, not significant; N.D., not detected. Significant differences from RGZ-adipocytes: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

本章において、*LPD1a*、*1b* 及び *1c* の発現は、いずれも肝臓において $\text{PPAR}\gamma$ の欠損により低下し (Figure 10)、それらの発現は、 $\text{PPAR}\gamma$ の特異的なリガンドであるロジグリタゾンにより誘導された。これら *in vivo* の検討により *LPD1* バリエントはいずれもその発現に $\text{PPAR}\gamma$ が関与していることが明らかである。当研究室ではすでに *LPD1b* のプロモーター解析を行っており、本遺伝子のプロモーターには機能的な PPAR 結合配列 (PPRE) が存在していることを証明している (未公開データ)。それゆえ、当研究室では *LPD1* バリエントうち、少なくとも *LPD1b* は、そのプロモーター領域の PPRE に $\text{PPAR}\gamma$ が結合することで発現が促進される直接的な $\text{PPAR}\gamma$ の標的遺伝子であると確信している。但し、各 *LPD1* バリエントへの $\text{PPAR}\gamma$ の関与の程度は、それぞれのバリエントにより異なること、また $\text{PPAR}\gamma$ が低レベルな脳や心臓に発現していること等から、いずれのバリエントにおいても $\text{PPAR}\gamma$ 以外の因子による発現制御メカニズムの存在は否定できない。

LPD1b の発現は絶食及び STZ 処理により上昇し、再摂食処理で低下した。この発現パターンは、前章の *FSP27* と類似したものであり、本遺伝子もまたインスリンにより発現抑制されている可能性が高い。*FSP27* と異なる点として絶食処理による *LPD1b* の発現誘導は、肝 $\text{PPAR}\gamma$ の寄与が大きかった (Figure 3B vs Figure 12)。絶食処理による低インスリン下で $\text{PPAR}\gamma$ を介し、どのようなメカニズムで *LPD1b* の発現誘導が生じるのかについては非常に興味深いものの、現状では明らかではない。また、*LPD1b* 及び *1c* の発現パターンは、各サンプルにおいて非常に類似したものであった。しかしながら、*LPD1b* 及び *1c* の翻訳産物は同一であるが、それぞれプロモーター領域は異なるため、両遺伝子の発現制御は異なるはずである (未公開データ)。事実、STZ 処理マウスにおける両遺伝子の発現性は、*LPD1b* の発現が上昇、*LPD1c* が低下として唯一相反する発現パターンを示した (Figure 13B)。

いずれの *LPD1* バリエントも脂肪組織に高発現していることは、 $\text{PPAR}\gamma$ が脂肪組織に高発現していることと一致している。*LPD1* バリエントが高発現している主要な組織、培養細胞は、脂肪肝を含めいずれも細胞内に脂肪を蓄積していることが共通の特徴である。興味深いことに、一般的に $\text{PPAR}\gamma$ の発現が低い脳及び心臓においても、いずれの *LPD1* バ

リアントの発現が認められており、その結果からも PPAR γ 非依存的な発現制御機構の存在が示唆される。但し、近年脊髄、脳幹、視床下部のニューロンに発現する PPAR γ は肥満やインスリン感受性に関与しているとの結果が報告された (33)。この報告のように組織全体としての発現量は低くても (低比含量)、組織を構成する細胞特異的に発現している PPAR γ により *LPDI* バリエントの発現が促進されている可能性がある。

第三章 LPD1 タンパクの発現及び局在解析

第一節 概要

前章の結果より、*LPD1* バリエントは、いずれも脂肪が過剰に蓄積した組織や細胞において高レベルであったことから、*LPD1* タンパクの生理機能として脂質代謝への関与が示唆される。しかしながら、*LPD1* タンパクの生理機能は現状では全くの未解明であり、当研究室では本タンパクの生理機能の解明を最終目的としている。本章では、*LPD1* タンパクの生理機能を解明するために、まず *LPD1* タンパクの発現解析 (第一節) 及び細胞内局在性の解析 (第二、三節) を行った。

第二節 PPAR γ 欠損マウスの肝臓及び 3T3-L1 脂肪細胞における

LPD1 タンパクの発現性

第二章の Figure 9 にて示したように、*LPD1* 遺伝子にはエクソン 1 の異なる 3 つのバリエントが存在する。Figure 16 は、*LPD1* タンパクの構造及び *LPD1* 抗体の作製に用いた合成ペプチドの設計領域を示したものである。*LPD1a* cDNA の推定上の開始コドン (ATG) はエクソン 1 に存在するが、*LPD1b* 及び *1c* cDNA の ATG は共にエクソン 2 に存在すると推測された (Figure 16)。また、終始コドン (TGA) は、いずれのバリエントもエクソン 4 に存在していた (Figure 16)。よって *LPD1b* 及び *1c* cDNA は同一のタンパクをコードしており、*LPD1a* タンパクは、*LPD1b* 及び *1c* タンパクの N 末端に 31 アミノ酸が付加されたタンパクと推測される。3 つの *LPD1* バリエントのアミノ酸から推定される分子量は、*LPD1a*; 54 kDa、*LPD1b* 及び *1c*; 50 kDa である。*LPD1* タンパクのアミノ酸配列において抗原性の高いアミノ酸配列を類推し、全てのバリエントを認識できるように N 末端部分のペプチドを合成し (Figure 16)、抗体を作製した。作製した *LPD1* 抗体は、ヒト胎児腎臓細胞株 HEK293A に強制発現させた *LPD1a*、*1b* 及び *1c* タンパクを

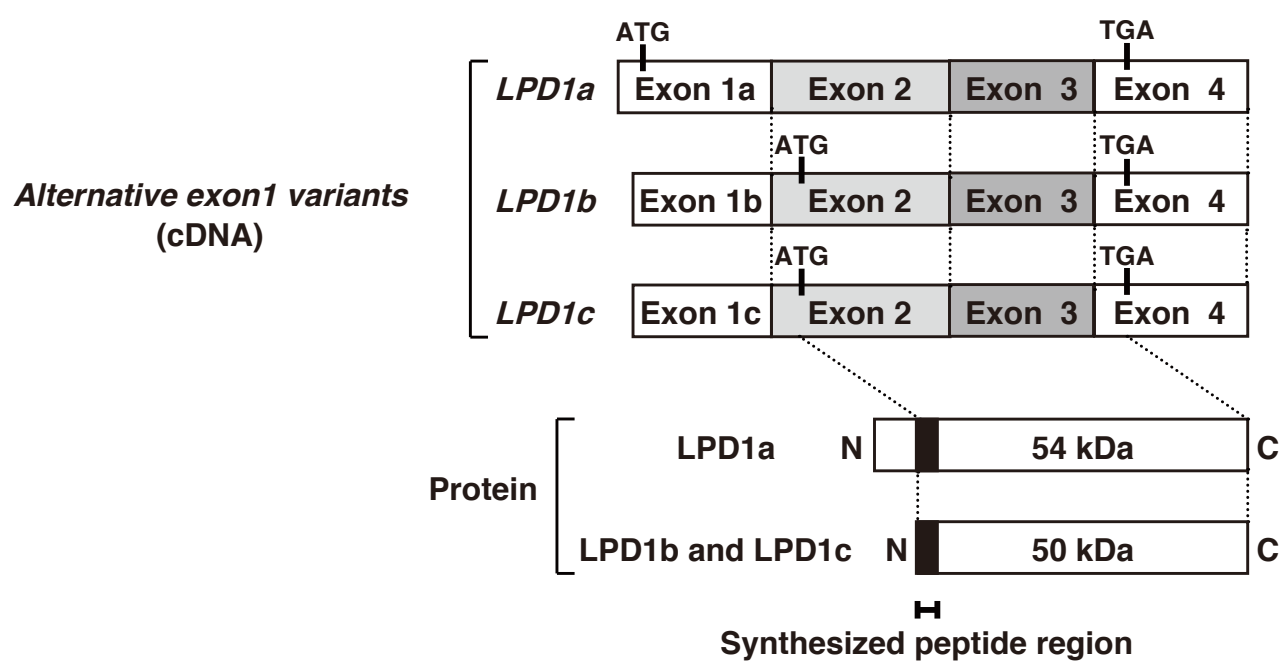


Figure 16. Synthesized peptide region for preparing antibody against mouse LPD1.

抗原として特異的に認識することをウエスタンブロット法で確認した (data not shown)。

Table 2 に各生物種における LPD1 バリエントタンパク間のアミノ酸配列の相同性を示す。マウス LPD1a は、ヒト:95%、ラット:98%、ゼブラフィッシュ:66% 及びアフリカツメガエル:59% の相同性を示したことから、LPD1a のアミノ酸配列は種間を超えて高く保持されていることが明らかになった。上述したようにマウス LPD1b 及び 1c のアミノ酸配列は、マウス LPD1a の N 末端 31 アミノ酸を欠いたものであり、以下の配列は全く同一である。また、データベースによる検索からは、他の生物種においてマウス LPD1b 及び 1c に相当するタンパクを見出すことはできなかった。

第二章の結果より、LPD1 バリエント遺伝子の発現は、いずれもロジグリタゾン処理 *ob/ob* マウスの脂肪肝において高発現していた。作製した抗体が内在性の LPD1 タンパクを検出できるか否か確かめるために、LPD1 抗体を用いたウエスタンブロット法により、ロジグリタゾン処理 *ob/ob* マウス肝ホモジネートにおける LPD1 バリエントの検出を試みた。その結果、肝ホモジネート (whole) を用いたウエスタンブロットでは、LPD1 バリエントを検出できなかった (data not shown)。そこで、Figure 17 に示す方法で、核/ミトコンドリア画分 (Nuc/Mt)、ミクロソーム画分 (Ms) 及び細胞質画分 (Cyt) の 3 つの画分を調製した。これらの画分を用いて LPD1 バリエントタンパクの発現を確かめたところ、主にミクロソーム画分において推定される分子量の位置に 2 本のバンドが認められた (Figure 18A)。なお、LPD1a は、LPD1b 及び 1c に比べて N 末端側に 31 アミノ酸が付加されたものであるため、検出された 2 本のバンドのうち高分子側 (上) が LPD1a 、低分子側 (下) が LPD1b 及び 1c である (Figure 18A)。この画分においては小胞体マーカー calreticulin のバンドが認められているものの、ミトコンドリアマーカー cytochrome oxidase subunit IV (COXIV) 及び細胞質マーカー glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のバンドも認められた。第二章で用いた *OB/OB*-PPAR γ WT、ロジグリタゾン未処理と処理の *ob/ob*-PPAR γ WT 及び *ob/ob*-PPAR γ KO の 5 種類のマウス肝からミクロソーム画分を調製し、それぞれのミクロソーム画分における LPD1 バリエントの発現を確かめた (Figure 18B)。その結果、LPD1b 及び 1c の発現は *OB/OB*-PPAR γ WT 及び

Table 2. Characteristics of LPD1 proteins.

Specis	Proteins	Number of amino acid	Protein molecular Weights (kDa)	Amino acid homology (%) [*]
Mouse	LPD1a,	477	54	100
	LPD1b, LPD1c	446	50	-
Human	hLPD1a	477	54	95
Rat	rLPD1a	477	54	98
Zebra fish	zLPD1a	476	53	66
African clawed frog	aLPD1a	509	57	59

* Amino acid homology was shown as percentage (%) against mouse LPD1a. The amino acid sequence of LPD1b and LPD1c, which are equally lacking N-terminal 31 amino acid residues of LPD1a are completely the same.

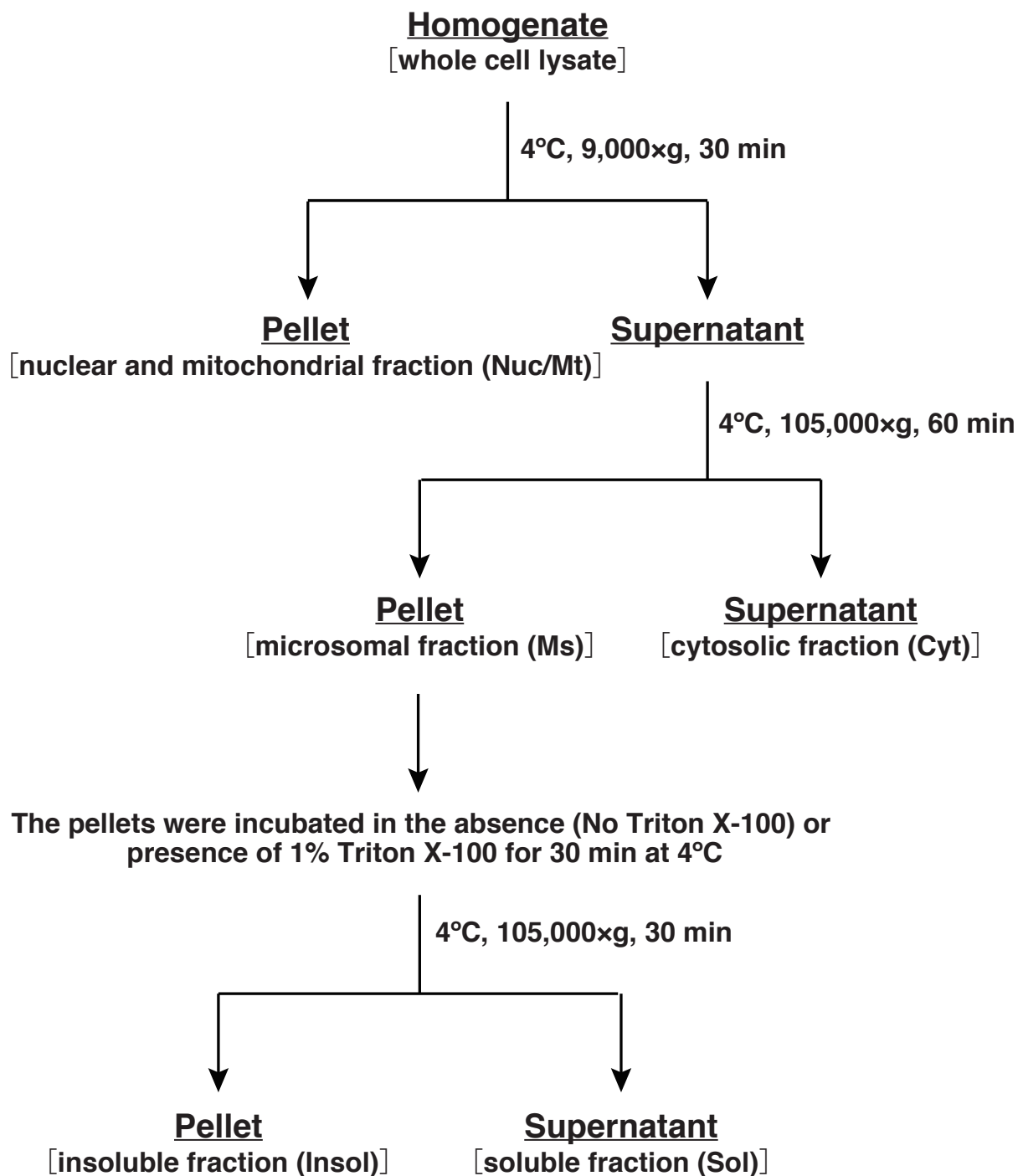


Figure 17. Scheme to prepare each organelle fraction.

ob/ob-PPAR γ WT の肝臓における未処理肝臓には殆ど認められないものの、ロジグリタゾン処理により著しく誘導され、PPAR γ の欠損によりほぼ完全に消失した (Figure 18B)。また、*ob/ob*-PPAR γ WT の肝臓における LPD1a の発現は、ロジグリタゾン未処理で認められ、ロジグリタゾン処理によって僅かに誘導された (Figure 18B)。これらの LPD1a、1b 及び 1c の発現パターンは、いずれも Figure 10 における *LPD1a*、*1b* 及び *1c* mRNA の発現パターンと類似した。以上の結果より、作製した LPD1 抗体はミクロソーム画分で内在性の LPD1 バリエントを検出でき、以後の実験に使用可能であることが確認された。

次に、第二章で用いた 3T3-L1 脂肪細胞における LPD1 バリエントの発現を確かめた。LPD1b 及び 1c の発現は、前駆脂肪細胞では認められず、成熟脂肪細胞への分化に伴い誘導され、この発現はロジグリタゾン処理により更なる誘導が認められた (Figure 18C)。一方、LPD1a の発現も成熟脂肪細胞及びロジグリタゾン処理細胞で認められ、前駆脂肪細胞にも僅かに発現している点が LPD1b 及び 1c とは異なっていた。これらの LPD1a、1b 及び 1c の発現パターンは、いずれも Figure 15 における *LPD1a*、*1b* 及び *1c* mRNA の発現パターンと類似した。3T3-L1 成熟脂肪細胞における LPD1 バリエントの発現は *ob/ob* マウスの肝臓とは異なり、ミクロソームへの分画を必要とせず全細胞溶解液で検出可能であった。3T3-L1 成熟脂肪細胞の LPD1 バリエントもミクロソーム画分に発現するかを確かめたところ、*ob/ob* 脂肪肝の結果と同様にミクロソーム画分に主要なバンドが検出できた (Figure 18D)。

第三節 LPD1 タンパクの細胞内局在性

作製された LPD1 抗体を評価した前節において、内在性の LPD1 バリエントは、主にミクロソーム画分に存在することが明らかになった。そこで本節では、LPD1 バリエントの細胞内局在性について、LPD1b EGFP 融合タンパク強制発現細胞及び 3T3-L1 成熟脂肪細胞における LPD1 の発現を免疫蛍光染色で更に詳細に検討した。

Figure 19A は、LPD1b と EGFP の融合タンパクをマウス肝由来細胞株 AML-12 に

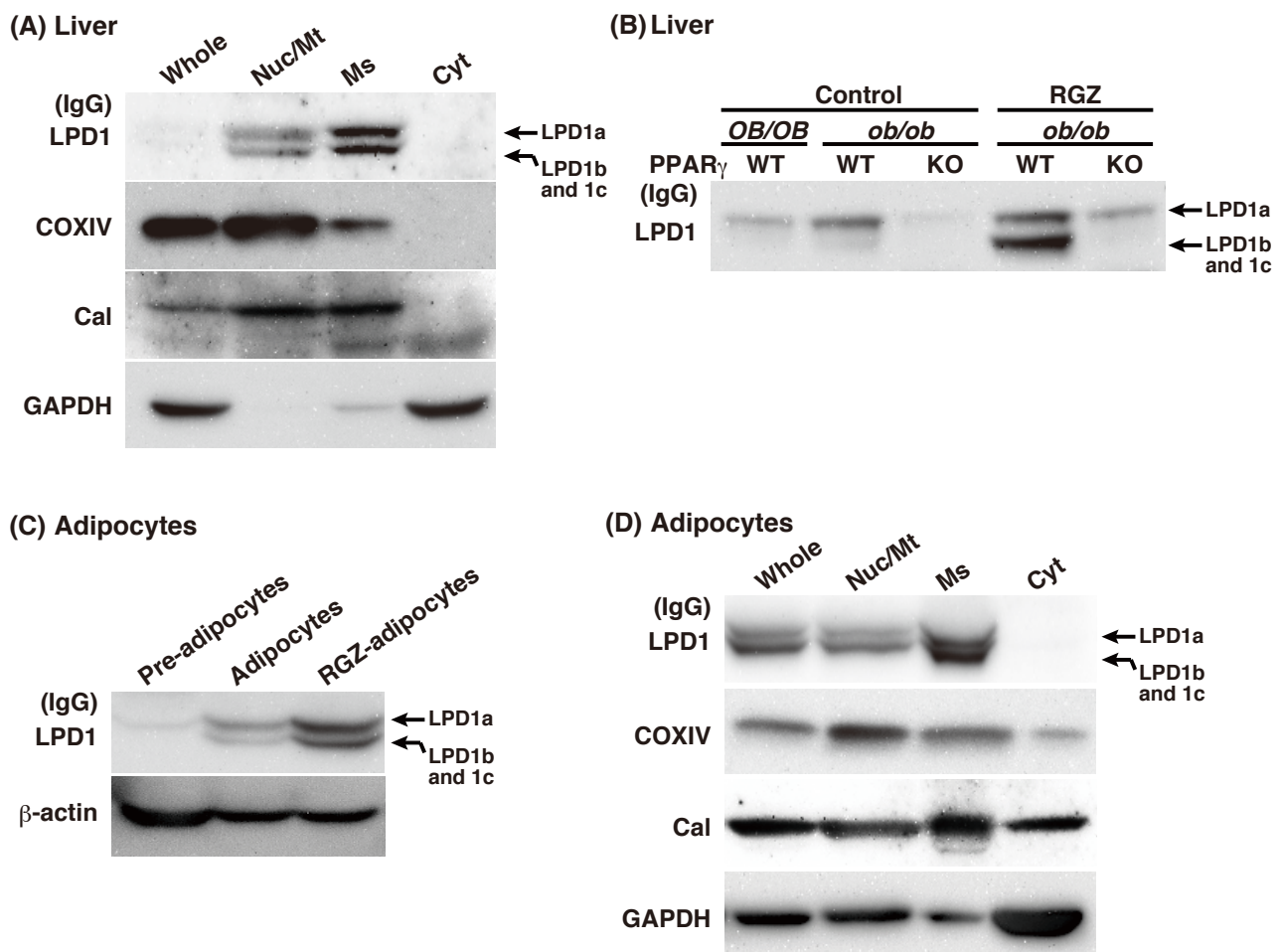


Figure 18. Determination of subcellular localization of LPD1 using crude organelle fraction.

(A) LPD1a, 1b and 1c proteins are mainly localized in the microsomal fraction of RGZ-treated *ob/ob* mouse liver. Preparation of three organelle fractions is shown in Figure 17. The three fractions were analyzed by Western blotting using anti-LPD1 or organelle-marker protein IgGs. The IgGs for each organelle-marker protein were as followed; COXIV, cytochrome oxidase subunit IV as mitochondrial marker; Cal, Calreticulin as endoplasmic reticulum marker; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as cytosolic marker. (B) The expression of LPD1a, 1b and 1c proteins in each genotyped mouse liver microsomal fractions were analyzed by Western blotting using anti-LPD1 IgG. (C) The expression of LPD1a, 1b and 1c proteins in 3T3-L1 pre-adipocytes, mature adipocytes and RGZ-treated adipocytes were analyzed by Western blotting using anti-LPD1 and anti-β-actin IgGs. The expression of β-actin was shown as loading control. (D) LPD1a, 1b and 1c proteins are localized in the microsomal fraction of 3T3-L1 adipocytes.

強制発現させ、共焦点レーザー顕微鏡により検鏡した結果である。核は、Hoechst 33342 により青色に染色した。LPD1b-EGFP 融合タンパクを示す緑の蛍光は、核の周りから細胞膜にかけて広く点在しているような細胞像が観察された。Figure 19B は、3T3-L1 成熟脂肪細胞に発現している内在性 LPD1 バリエントを免疫蛍光染色した結果である。1 次抗体として LPD1 抗体、2 次抗体として CY3 標識 (赤色) 抗 rabbit IgG 抗体を用いた。3T3-L1 成熟脂肪細胞が有する脂肪滴は Lipid Tox Green により緑色に染色した。内在性 LPD1 バリエントを示す赤色の蛍光は、核及び脂肪滴を除く細胞全体に認められた (Figure 19B)。これらの結果より、LPD1 バリエントは、少なくとも核、脂肪滴及び細胞膜を除くオルガネラに局在することが示唆された。

前節 Figure 18 の結果から、LPD1 はミクロソーム画分に主要に局在していたが、ミクロソーム画分には小胞体、細胞膜、細胞骨格そして後述する脂質ラフト/カベオラ等が集積されている。一般的な方法として、ミクロソーム画分を非イオン性界面活性剤 1% Triton X-100 で処理すると膜オルガネラは可溶化され、細胞骨格や脂質ラフト/カベオラ等のオルガネラは不溶性で遠心後に沈殿する。そこで、1% Triton X-100 で処理後の LPD1 の局在を検討するために、*ob/ob* マウスの脂肪肝及び 3T3-L1 成熟脂肪細胞のミクロソーム画分を Figure 17 に従って 1% Triton X-100 可溶性画分 (Sol) 及び不溶性画分 (Insol) に分画した。小胞体マーカー calreticulin は、Triton X-100 未処理 (No Triton X-100) においては不溶性画分に認められたが、1% Triton X-100 処理により小胞体膜が可溶化され可溶性画分へ移行した (Figure 20A)。Ob/ob マウスの肝臓における LPD1 バリエントは、1% Triton X-100 未処理及び処理のいずれにおいても不溶性画分に認められた (Figure 20A)。また、3T3-L1 成熟脂肪細胞でも、肝臓の結果と同様に LPD1 バリエントは 1% Triton X-100 不溶性画分に認められた。さらに、この画分における各細胞骨格構成タンパクについても確かめたところ、1% Triton X-100 不溶性画分には中間径フィラメントの構成タンパクである vimentin の局在が認められた (Figure 20B)。

LPD1 バリエントが認められた 1% Triton X-100 不溶性画分には、細胞骨格のみならず脂質ラフト/カベオラが存在する。脂質ラフト/カベオラは膜ミクロドメインの一種で、

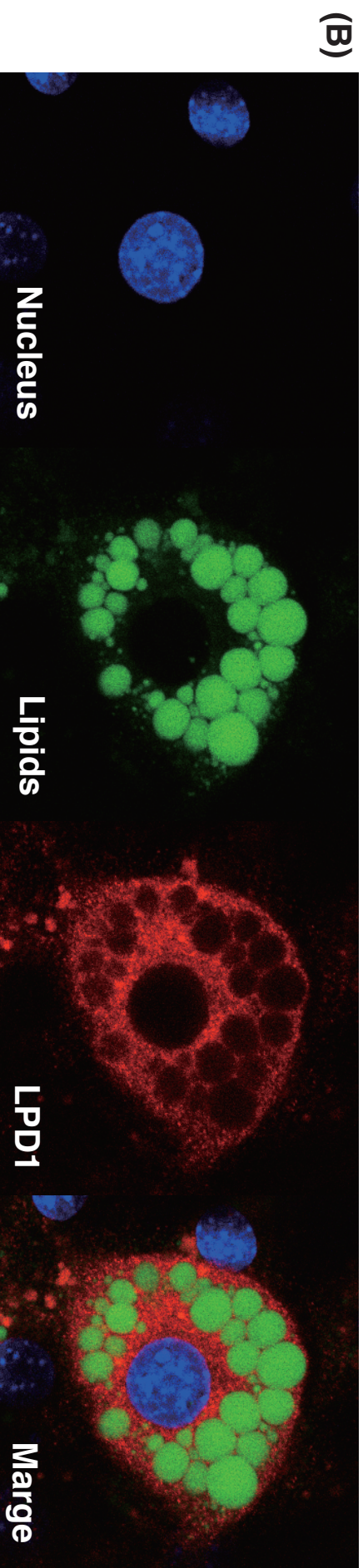
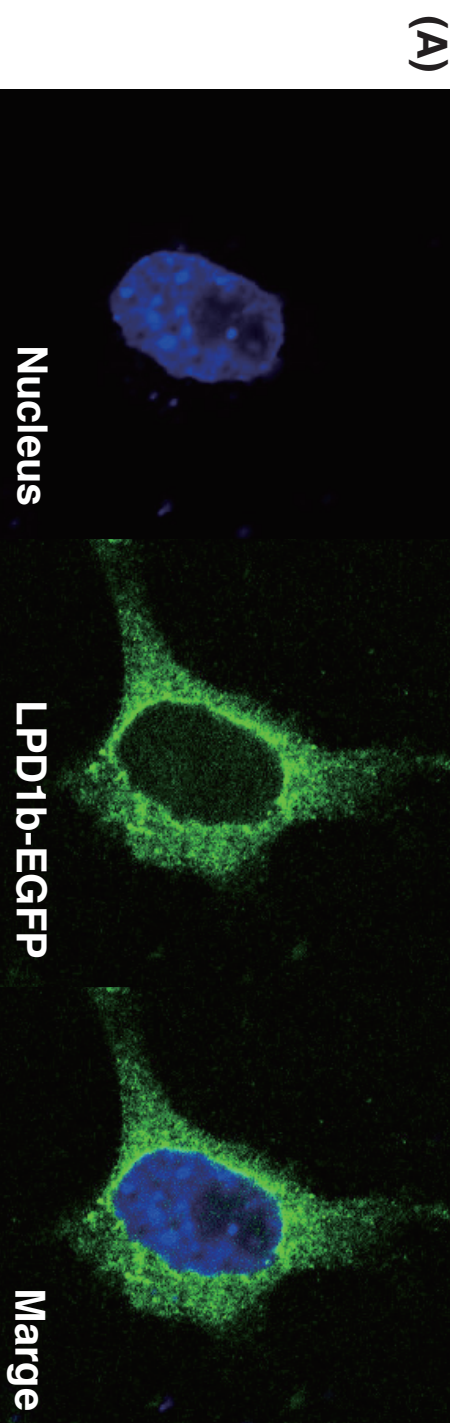


Figure 19. Determination of subcellular localization of LPD1 protein by fluorescence imaging.

(A) Subcellular localization of the LPD1b-EGFP fusion protein in AML-12 cell. The AML-12 cells were transfected with pLPD1b-EGFP vector. Nucleus was stained with Hoechst 33342 (Blue). (B) Subcellular localization of the constitutive LPD1 protein in 3T3-L1 adipocytes. The LPD1 isoform was reacted with anti-LPD1 IgG followed by CY3-conjugated secondary antibody (Red). Lipid droplets in adipocytes were stained with Lipid Tox Green (Green).

スフィンゴ脂質とコレステロールに富む細胞膜上の特定の領域である。この領域は膜タンパク質あるいは膜へと移行するタンパク質を集積し、膜を介したシグナル伝達、細菌やウイルスの感染、細胞接着あるいは細胞内小胞輸送、さらに細胞内極性等に重要な役割を有するものとして知られている (34, 35)。一般的に脂質ラフト/カベオラは、Opti-Prep を用いた密度勾配遠心法により分画できることが知られている (36)。LPD1 バリエントが 1% Triton X-100 不溶性画分における脂質ラフト/カベオラに局在しているかを確かめるため、3T3-L1 成熟脂肪細胞から脂質ラフト/カベオラの分離を試みた。

本実験では、最終濃度 1% Triton X-100 処理した 3T3-L1 成熟脂肪細胞の全細胞溶解液に対して、Figure 21 に示す方法に従って Opti-prep による密度勾配遠心を行い、最終的に 9 フラクションに分画した。これらのフラクションにおける LPD1 バリエントと脂質ラフト/カベオラのマーカー caveolin 1 (Cav1) 及び GM1 ganglioside receptor (GM1) の局在を比較した。脂質ラフト/カベオラのマーカーは、主に低密度フラクション 3、4 及び 5 において強いバンドが認められた。小胞体マーカー calreticulin は、主にフラクション 8 及び 9 において認められた。LPD1 バリエントは Cav1 及び GM1 とは異なり、より高密度フラクション 7 において強いバンドが認められた (Figure 22A)。

上述したように脂質ラフト/カベオラは 1% Triton X-100 に対しては不溶性であるが、saponin により、脂質ラフト/カベオラ構成成分のコレステロールを除去することで可溶化できる。仮に LPD1 バリエントが脂質ラフト/カベオラに局在するならば、saponin 処理により caveolin 1 及び GM1 と同様の局在変化が認められるはずである。5% saponin 処理を行ったサンプル (5% saponin) を用いて、LPD1 の局在を調べたところ、小胞体マーカー calreticulin は、主にフラクション 8 及び 9 において認められ未処理サンプルと同様であった。脂質ラフト/カベオラマーカー Cav1 及び GM1 は、未処理サンプルに比べ高密度フラクション 5 及び 6 画分にシフトした。Saponin 処理サンプルにおける LPD1 バリエントは、未処理のサンプルと同様にフラクション 7 において強いバンドが認められた (Figure 22B)。LPD1 タンパクが検出される画分は、Cav1 及び GM1 と一致しなかったこと、及び saponin 処理により Cav1 及び GM1 は高密度側に移動したのに対し

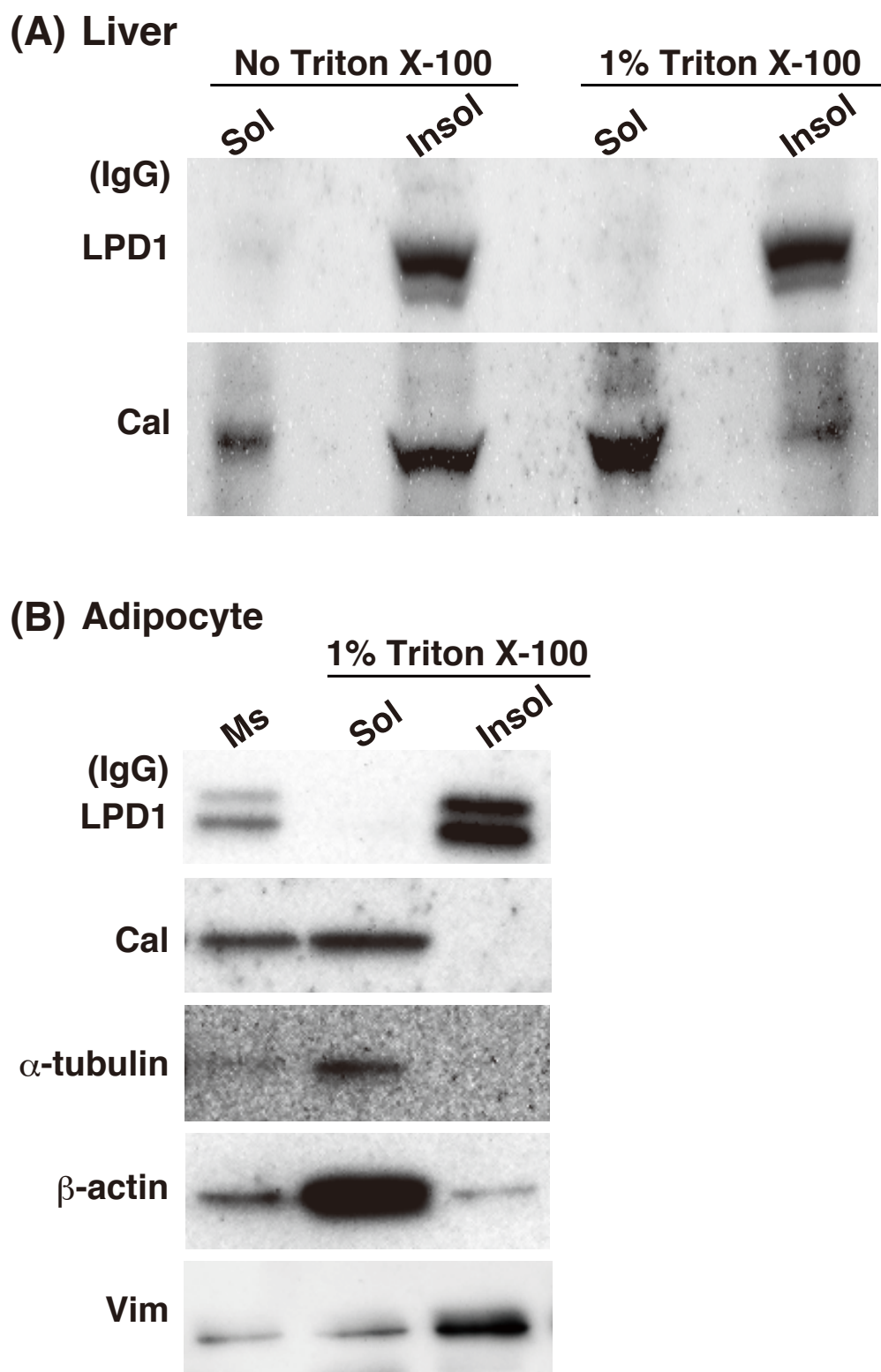


Figure 20. LPD1 is localized in the Triton X-100 insoluble fraction.

Microsomal fraction (Ms) was prepared from (A) the liver of *ob/ob* mouse treated with RGZ or (B) RGZ-adipocytes. The Ms pellets were incubated for 30 min at 4°C in the absence (No Triton X-100) or presence of 1% Triton X-100 and centrifuged at $105,000 \times g$. After centrifugation, the contents in tube were separated as soluble (Sol) and insoluble (Insol) fractions. The detail experimental procedure was described in the legend of Figure 17. Vim, Vimentin.

(Concentration of Opti-prep)

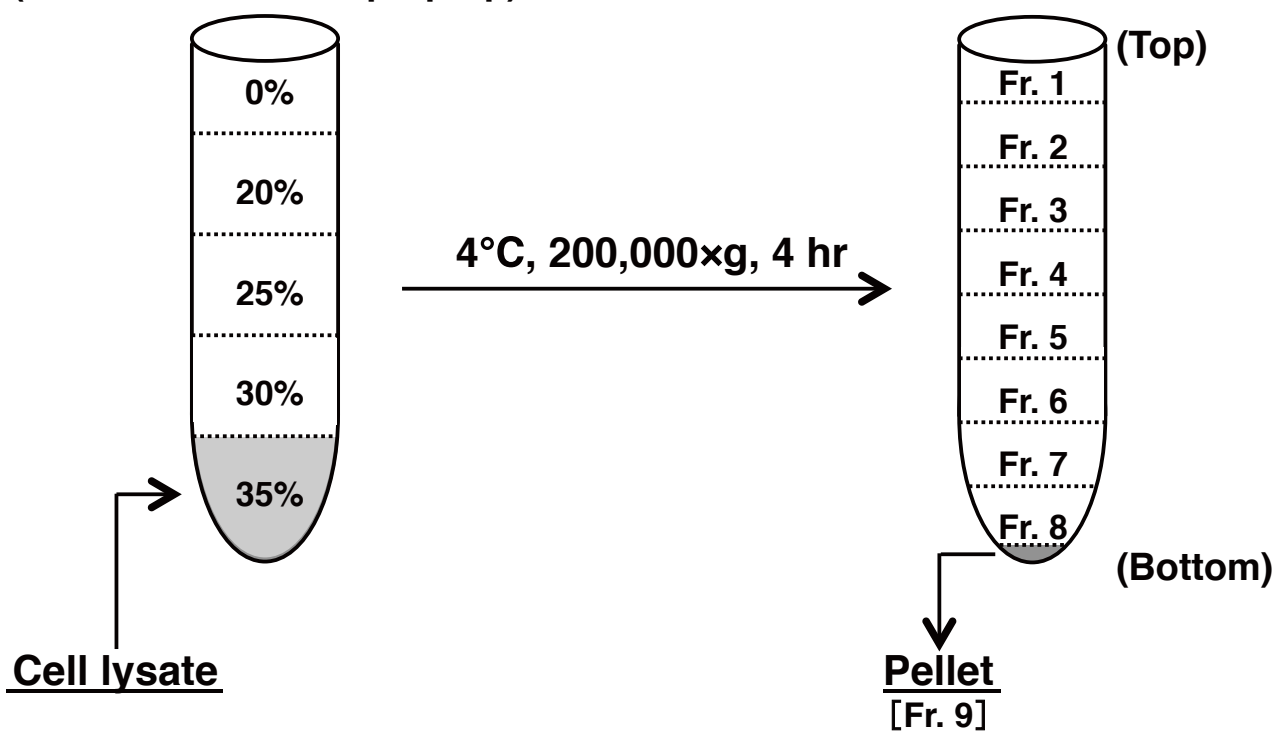


Figure 21. Opti-prep (Iodixanol) density gradient centrifugation to prepare lipid raft/caveolae fractions. The detail experimental condition was described in Materials and methods.

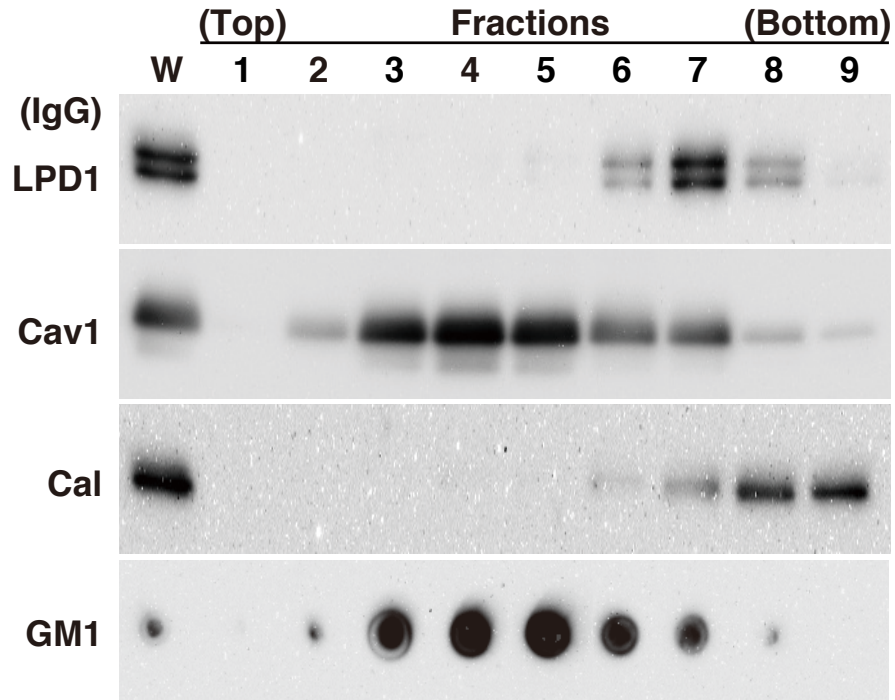
LPD1 タンパクは変化しなかったことから、LPD1 は脂質ラフト/カベオラには局在していないことが明らかになった。

第四節 LPD1 タンパクの Triton X-100 不溶性ドメインの決定

前節の結果から、*ob/ob* マウスの脂肪肝及び 3T3-L1 成熟脂肪細胞における LPD1 バリエーションは、1% Triton X-100 不溶性画分に局在することが明らかになった。本節では、LPD1 バリエーションのアミノ酸配列中に存在が予想される Triton X-100 不溶性画分への局在ドメインの決定を試みた。本実験では、LPD1b-HA デリレーション発現ベクターをヒト胎児腎臓細胞株 HEK293FT にトランスフェクションし、その細胞溶解液を 1% Triton X-100 処理後、Figure 17 に従って 1% Triton X-100 不溶性及び可溶性画分を調製した。さらに、これらの画分に対し HA 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行い、LPD1b-HA デリレーションタンパクの局在を確かめた。作製した LPD1b-HA デリレーションタンパクは、LPD1b アミノ酸配列の N 末端側から欠損させた N1、N2 及び N3、C 末端側から欠損させた C1、C2、C3、C4 及び C5、さらに両末端を欠損させた NC1 である (Figure 23B)。

HEK293FT 細胞に強制発現させた各 LPD1b-HA デリレーションタンパクは、いずれもアミノ酸配列から推定される分子量とほぼ一致した (Figure 23A)。LPD1b の全長を有する LPD1b-HA Full は、これまでの結果と同様に 1% Triton X-100 不溶性画分に認められた。LPD1b-HA デリレーションタンパクのうち N1 と N2 間、また C4 と C5 タンパク間で不溶性画分から可溶性画分への移行率に差が認められた (Figure 23B, right)。また、LPD1b-HA Full タンパクとの比較において、C1 は僅かに不溶性画分から可溶性画分への局在変化が認められた (Figure 23B, right)。よって、LPD1b-HA タンパクにおける Triton X-100 不溶性画分への局在ドメインは、少なくともアミノ酸 95-139 (黒色の表示; Insol 1) 及び 360-446 (灰色の表示; Insol 2) に存在していることが示唆された。決定された Insol 1 及び 2 の配列に対してデータベース (<http://pfam.xfam.org/search>) によるドメイン検索を行ったが、特徴的な既知のドメインは検出されなかった。興味深いことに、Insol 1 のみで構成される

(A) No saponin



(B) 5% saponin

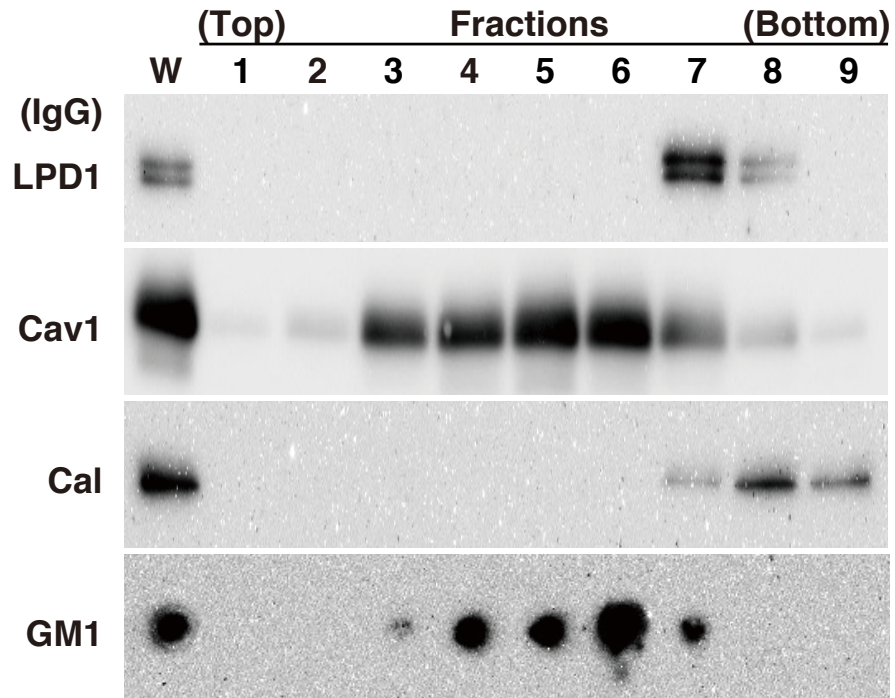


Figure 22. LPD1 does not localize in lipid raft/caveolae fraction of 3T3-L1 adipocytes. 3T3-L1 adipocytes were incubated in 1% Triton X-100 lysis buffer (A) without (No saponin) or (B) with 5% saponin. The lysates were fractionated by Opti-Prep density gradient centrifugation as described in Figure 21. Nine fractions were collected from the top of the gradient tube and analyzed by Western blotting or dot blot (GM1 protein). W, whole cell lysate; Cav1, caveolin 1.

NC1 は Triton X-100 不溶性画分に局在すると予想したが、主に可溶性画分に局在した (Figure 23B, right)。

第五節 考察

本章における成果として、*ob/ob* マウスの脂肪肝及び 3T3-L1 成熟脂肪細胞における LPD1a、1b 及び 1c の発現は、mRNA のみならずタンパクにおいてもロジグリタゾン処理により著しく誘導され、脂肪肝においては PPAR γ の欠損により低下することが明らかになった (第二節)。また、LPD1a、1b 及び 1c は、脂質ラフト/カベオラではない 1% Triton X-100 不溶性画分に局在すること (第三節)、及び LPD1b には Triton X-100 不溶性画分への局在ドメインが少なくとも 2 ヶ所存在することも明らかになった (第四節)。

本章では、前章の LPD1 バリエント遺伝子の転写レベルの発現実験とは異なり、LPD1 バリエントのタンパクレベルの発現性にフォーカスした。LPD1 タンパクの発現実験を遂行するするためには本タンパクに対する抗体の作製は必須の課題であった。そのため当研究室では、初めに LPD1 バリエントに対するペプチド抗体を作製した。当初は LPD1a と LPD1b/1c を個別に認識する抗体作製を計画していたが、それぞれのタンパクに対して抗原性の高い最適なアミノ酸配列を見出すことができなかった。作製された抗体は肝ホモジネートにおいて LPD1 バリエントを検出できなかったが、ミクロソーム画分において、ほぼ LPD1a と LPD1b/1c の 2 バンドのみを検出し、他の非特異的なバンドが殆ど認められなかった。また、本抗体は本章にて示されたように免疫蛍光染色においても使用可能であり、本章の目的の 1 つであった LPD1 バリエントの細胞内局在の決定に十分使用可能なものであった。

機能未知タンパクの細胞内局在の決定は、その生理機能を類推する上で極めて重要である。LPD1 バリエントは、*ob/ob* マウスの脂肪肝及び 3T3-L1 成熟脂肪細胞においてミクロソーム画分に主に発現していた。ミクロソーム画分は小胞体、細胞膜、脂質ラフト/カベオラ等の膜画分及び細胞骨格が集積している画分である。そのうち

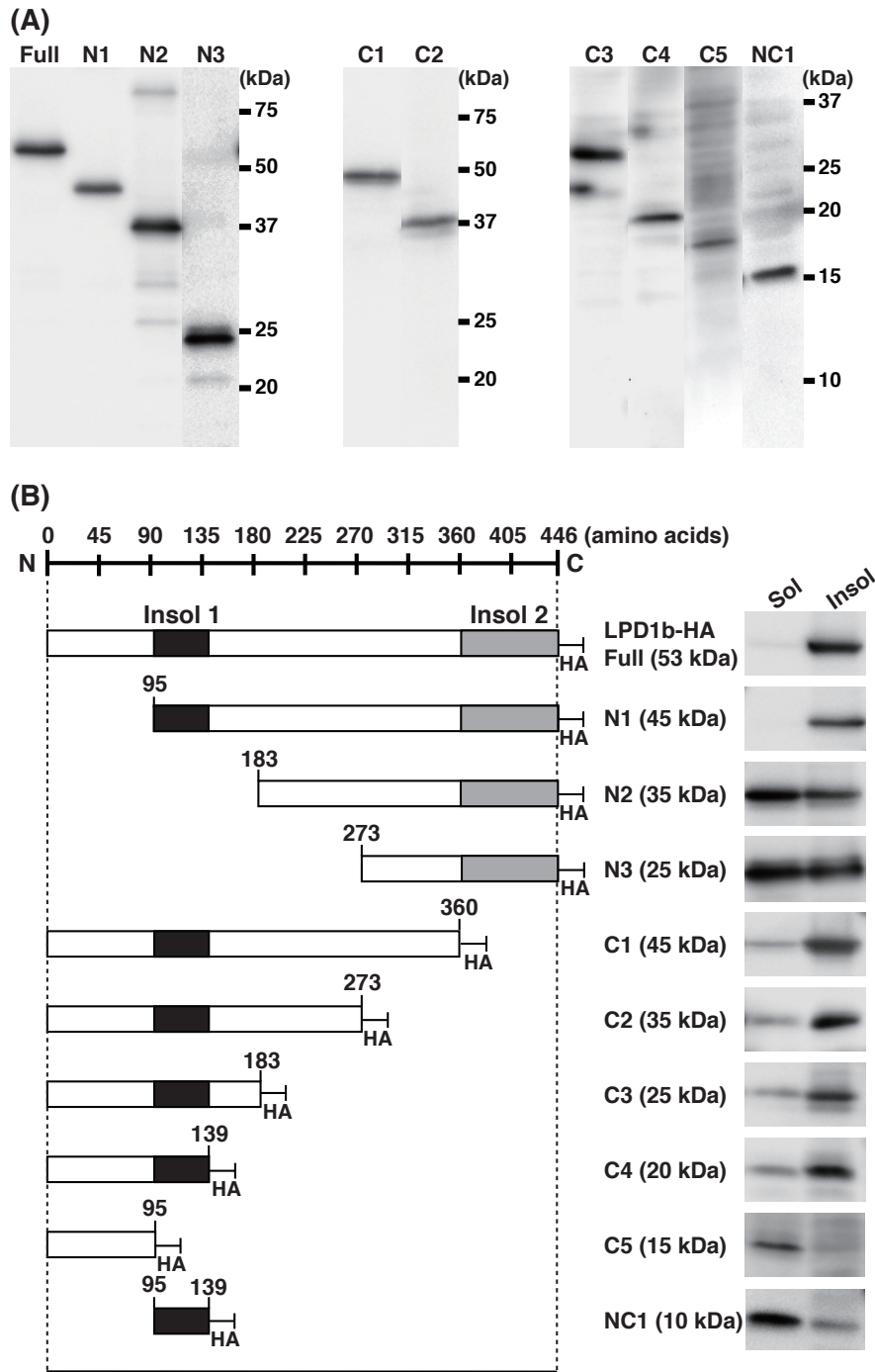


Figure 23. Determination of domain of LPD1 localized in Triton X-100 insoluble fraction.

(A) Preparation of deletion mutants of LPD1. The LPD1b-HA full length protein (Full), LPD1b-HA N-terminal deletion proteins (N1, N2 and N3), LPD1b-HA C-terminal deletion proteins (C1, C2, C3, C4 and C5) and both terminal deletion protein (NC1) vectors were transfected into HEK293FT cells. At 24 hr after transfection, the expression of each deleted protein were confirmed by Western blotting using anti-HA antibody. (B-left figure) Schematic representation of full and different truncated forms of LPD1-HA. The predicted Triton X-100-insoluble localization domains are indicated as aa 95-139 (Insol 1) and aa 273-446 (Insol 2). (B-right figure) Localization to Triton X-100 insoluble fraction of each deletion mutant. The Triton X-100 insoluble localization of each deleted protein was confirmed by Western blotting using anti-HA IgG. aa, amino acids.

脂質ラフト/カベオラ領域を除く小胞体、細胞膜等の膜画分は Triton X-100 処理により可溶化され、不溶性の脂質ラフト/カベオラや細胞骨格等と分離できる。Triton X-100 処理ミクロソーム画分において、LPD1 バリエントは不溶性画分に検出された。また、密度勾配遠心法を用いて LPD1 バリエントが脂質ラフト/カベオラ領域には局在していないことを証明した。それゆえ、LPD1 バリエントは主に細胞骨格を多く含有する画分に局在していることが示唆される。本研究では、最終的に LPD1 タンパクが不溶性画分のどのようなオルガネラに局在しているのか明らかにできなかったが、この分画に主要に含まれる細胞骨格系のタンパクと相互作用しているかもしれない。また、この不溶性画分には insulin receptor substrate 1 (IRS-1) 等のタンパクも局在していることが報告されており (37)、これら細胞骨格とは無関係のタンパクとの相互作用、あるいは微量に混在している他のオルガネラに局在している可能性も否定できない。本タンパクの局在オルガネラについてはさらなる詳細な検討が必要である。なお、データベースによるモチーフ検索により、LPD1 タンパク自身が細胞骨格の構成タンパクである可能性はないと推察される。

近年、タンパクの細胞内局在を決定する方法として目的タンパクと GFP タンパクとの融合タンパクの使用、あるいは抗体を用いた免疫蛍光染色法が多用されている。本研究においても両方法を使用して LPD1 タンパクの局在決定を試みたが、明確な結果が得られなかった。一般的に指摘されるように GFP 融合タンパクの強制発現系は、細胞内で GFP 融合タンパクの凝集が生じやすいこと、あるいは GFP と目的タンパクの融合により目的タンパクの本来の局在性が変化してしまうこと等の問題点がある。本章ではこれらの問題点を排除するため、3T3-L1 成熟脂肪細胞における内在性 LPD1 タンパクの免疫蛍光染色も行ったが、細胞内の巨大な脂肪滴等の妨害により信頼性のある結果が得られなかった。今回の検討においては、両方法からは LPD1 タンパクの局在オルガネラを明確に決定できなかったものの、少なくとも LPD1 バリエントは顕鏡により明らかに判断可能な脂肪滴、核あるいは細胞膜に局在していない事が証明できた。

LPD1b/1c は、Triton X-100 不溶性画分への局在ドメイン Insol 1 及び 2 を有していることが明らかになった。本実験では、LPD1b/1c のデリーションタンパクを用いたが、両ド

メインは LPD1a においても存在しており、同様の局在ドメインとして機能していると思われる。各デリーションタンパクの 1% Triton X-100 不溶性画分から可溶性画分への移行率の比較から、Insol 1 が主要な不溶性画分への局在ドメインと思われる。同定された Insol 1 及び 2 に対して、データベースによるドメインの検索を行ったが、既知の特徴的なドメインは検出できなかった。その結果は LPD1 タンパクが特定のオルガネラへの局在ドメインを持たず、Insol 1 及び 2 を介して Triton X-100 不溶性画分の他のタンパク等と相互作用していることを意味しているかもしれない。本実験において、Insol 1 領域のみ (NC1) を発現させたところ、予想に反して可溶性画分に局在した。この理由は、Insol 1 領域が不溶性画分への局在ドメインとして機能するためには、Insol 2 領域を初めとする他の領域を含めた立体構造が必要なためと予想している。

第四章 成熟脂肪細胞における LPD1 タンパクの機能解析

第一節 概要

第三章の結果から、LPD1 タンパクは、*ob/ob* マウスの脂肪肝以外にも 3T3-L1 前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化の過程において著しく誘導されることが明らかになった。LPD1 タンパクの生理機能を脂肪肝において *in vivo* レベルで明らかにすることは本研究の最終的な目的であるが、まずは遺伝子導入や試薬添加等が容易である *in vitro* 細胞系での機能解析が有利と考えた。本章では、LPD1b タンパクの強制発現が 3T3-L1 成熟脂肪細胞への分化誘導に与える影響 (第二節)、LPD1 タンパクのノックダウンが 3T3-L1 成熟脂肪細胞への分化誘導に与える影響 (第三節)、及び LPD1 タンパクのノックダウンが 3T3-L1 成熟脂肪細胞の糖の取り込みに与える影響 (第四節) について検討した。

第二節 LPD1 タンパクの強制発現が成熟脂肪細胞の分化誘導に与える影響

第三章の Figure 18 の結果から、LPD1a、1b 及び 1c バリエントの発現は、いずれも 3T3-L1 前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化の過程において誘導されることが明らかになった。よって各 LPD1 バリエントは、成熟脂肪細胞への分化過程において機能している可能性が高い。本節では、3T3-L1 前駆脂肪細胞にあらかじめ強制発現させた LPD1b タンパクが、成熟脂肪細胞への分化誘導に与える影響を確かめた。

まず、3T3-L1 前駆脂肪細胞に LPD1b 発現レトロウイルスあるいはコントロールとして humanized renilla green fluorescent protein (hrGFP) 発現レトロウイルスを感染後、7 日目に分化誘導処理、さらに分化誘導処理後 10 日目に成熟脂肪細胞に対して各種蛍光染色を行い共焦点顕微鏡にて顕鏡した (Figure 24)。なお、核は、Hoechst 33342 によって青色に、脂肪滴は Lipid Tox Red により赤色に染色した。その結果、両細胞の形態的な相違として LPD1b 発現細胞は、コントロール細胞に比べて分化の進んだ球形細胞が多く、大

型で肥大化した単房性の脂肪滴を含む細胞が多数認められた (Figure 24)。次に、LPD1b 発現細胞における脂肪細胞の分化マーカー遺伝子 *CCAAT-enhancer-binding protein β* (*C/EBP β*)、*C/EBP α* 、*PPAR γ* 、*aP2*、*FSP27*、*perilipin1* 及び *FAS* の発現をリアルタイム PCR 法により確かめた (Figure 25)。LPD1b 発現細胞における各遺伝子の発現は、分化誘導後 3 日目以降、いずれもコントロール細胞と比べて有意な上昇が認められた (Figure 25A-G)。これらの結果より、LPD1b タンパクは前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化誘導及びそれに伴い脂肪滴の肥大化の促進に関与していることが示唆された。

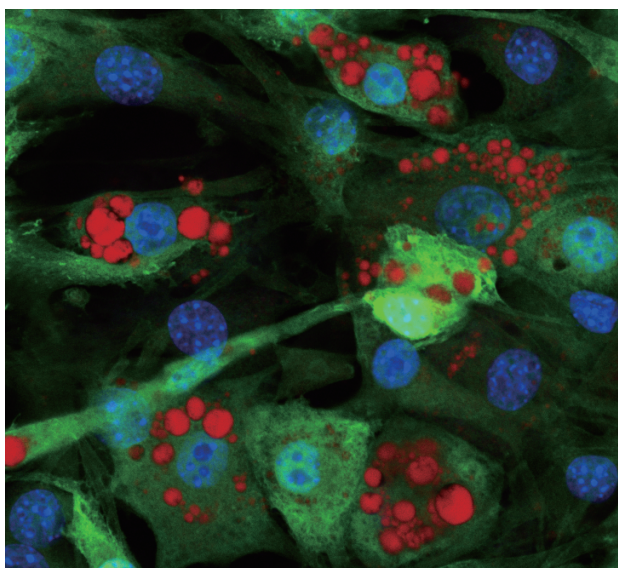
第三節 LPD1 タンパクのノックダウンが成熟脂肪細胞の分化誘導に与える影響

前章で用いた目的タンパクの強制発現システムと共にノックダウンシステムは、機能解析に頻用される手段である。本節では、LPD1 タンパクのノックダウンシステムを構築し、LPD1 ノックダウンが 3T3-L1 脂肪細胞の分化誘導に与える影響を検討した。

LPD1 遺伝子に対する shRNA 配列は、*LPD1a*、*1b* 及び *1c* mRNA に共通するエキソンを標的として、データベース (<https://rnaidesigner.lifetechnologies.com/rnaiexpress/>) により LPD1-shRNA1、LPD1-shRNA2 及び LPD1-shRNA3 の 3 種類を設計した (Figure 26A)。LPD1-shRNA1、2、3 またはネガティブコントロールとして scram-shRNA (*LPD1* 遺伝子配列を含まない配列) 発現ベクターを LPD1b-HA 発現ベクターと同時に HEK293FT 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に細胞を回収した。回収した細胞の懸濁液に対して LPD1 または HA 抗体を用いたウェスタンブロットを行い、LPD1-shRNA1、2 及び 3 配列による LPD1 タンパク発現の抑制効果を比較した。その結果、3 種類の shRNA 配列のうち、LPD1-shRNA1 配列が最も効果的に LPD1 タンパクの発現を抑制したため、以後の実験では本配列を使用した (Figure 26B)。

レンチウイルスベクターは、3T3-L1 成熟脂肪細胞に対して効率的に遺伝子導入できることが報告されている (38)。本実験では、3T3-L1 前駆脂肪細胞に LPD1-shRNA 発現レンチウイルスあるいはネガティブコントロールとして LacZ-shRNA 発現レンチウイルスを

hrGFP



LPD1b

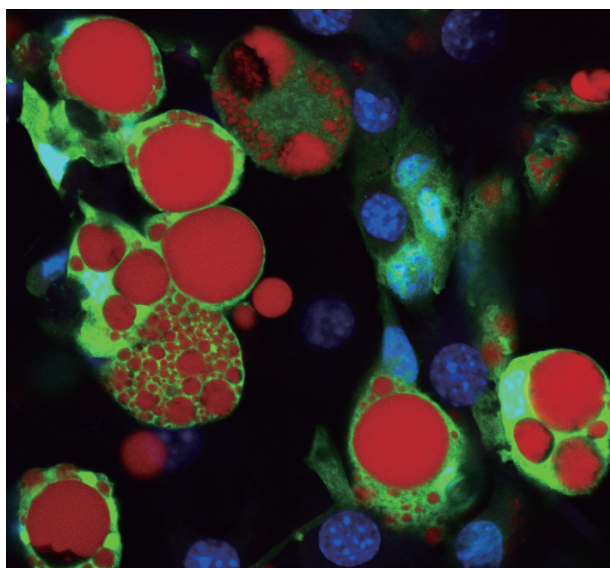


Figure 24. Overexpressed LPD1b induces lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes.

Pre-adipocytes were infected with recombinant retrovirus expressing hrGFP or LPD1b. At 7 days after infection, the cells were differentiated into mature adipocytes. The cells were fixed and permeabilized, and the lipids were stained with Lipid Tox Red (Red). Nucleus were stained with Hoechst 33342 (Blue).

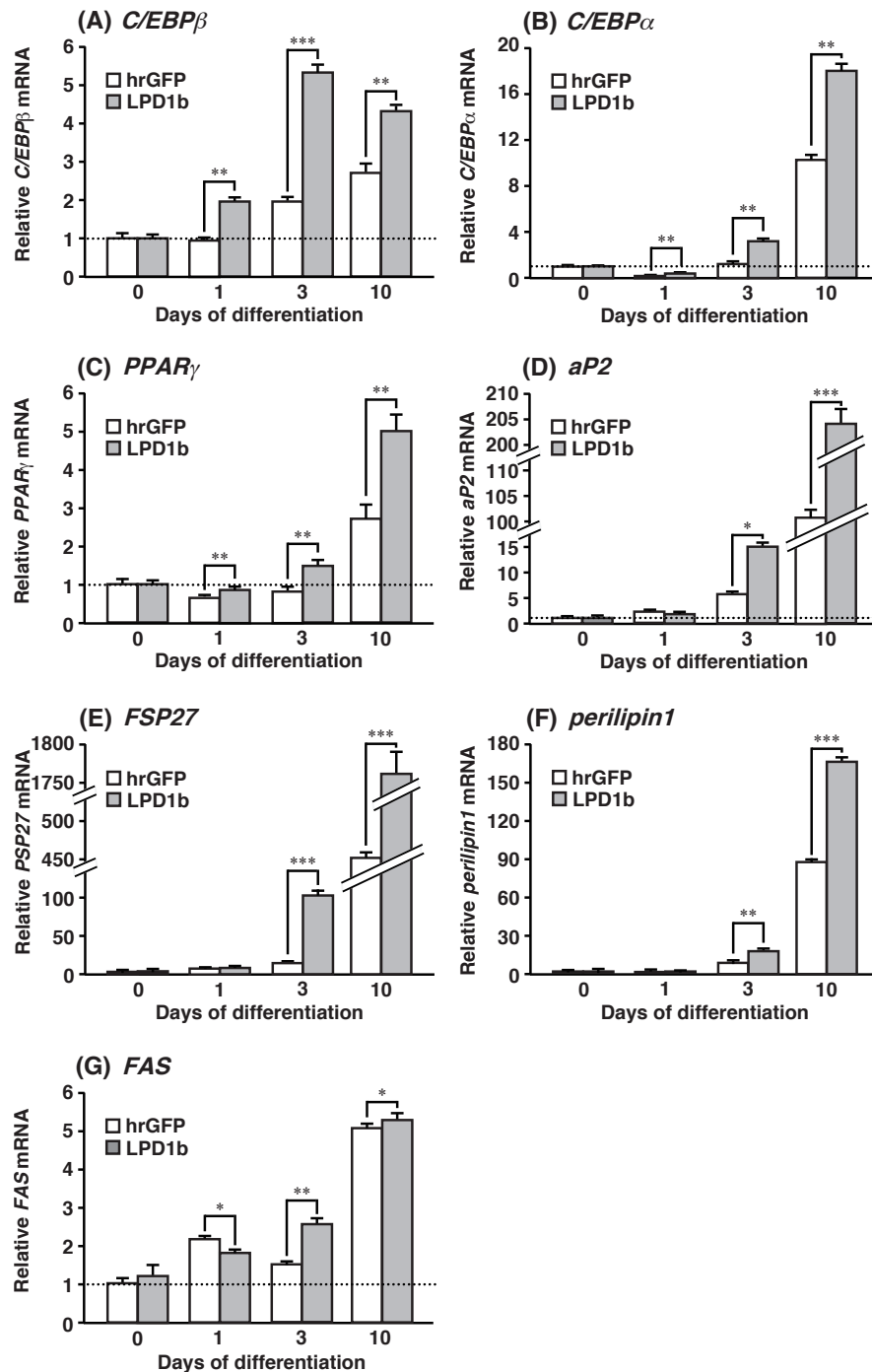


Figure 25. Overexpressed LPD1b induces the expression of adipocyte-specific genes during differentiation of 3T3-L1 adipocytes.

Pre-adipocytes were infected with recombinant retrovirus expressing hrGFP or LPD1b. At 7 days after infection, the cells were differentiated into mature adipocytes for 0, 1, 3, or 10 days. QPCR analyses of (A) *C/EBPβ*, (B) *C/EBPα*, (C) *PPARγ*, (D) *aP2*, (E) *FSP27*, (F) *perilipin1* and (G) *FAS* mRNAs were performed by using total RNA from each cell sample. Expression was normalized to *36B4* mRNA, and each bar represents the average \pm S.E.M. of 3 individual experiments. *C/EBPβ* and α , CCAAT-enhancer-binding protein β and α . Significant differences from hrGFP: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

感染後、4 日目に分化誘導処理を行った。次に、分化誘導処理後 0、3、7、10 及び 13 日目 QPCR による *LPD1* mRNA の発現及びにウエスタンブロットにより LPD1 タンパクの発現を解析した。その結果、LPD1-shRNA 発現細胞における *LPD1* 遺伝子の発現は、いずれもコントロール細胞と比べて分化誘導後 0 日目から約 80% 以上の抑制効果が認められ、この LPD1-shRNA による抑制効果は少なくとも調べられた分化誘導後 13 日目まで持続した (Figure 27A-C)。また、LPD1-shRNA 発現細胞においては、分化に伴い誘導される LPD1 タンパクの発現がほぼ完全に抑制された (Figure 27D)。なお、本実験においてはネガティブコントロールとして LacZ-shRNA を用いたが、scram-shRNA を用いても LacZ-shRNA の場合と同様の結果であることを確認している (data not shown)。

作製した LPD1-shRNA 発現レンチウイルスによる LPD1 ノックダウン細胞は、コントロール細胞と比べて、分化誘導処理後 3 日目においては明確な細胞の形態変化が認められなかったが、14 日目においては顕鏡により脂肪滴の縮小及び脂肪滴を有する細胞数が少ないように見えた (data not shown)。そこで、抽象的な顕鏡ではなく定量的に脂肪滴の増減の程度を見積もるために、3T3-L1 成熟脂肪細胞の脂肪滴に局在し、細胞内脂肪滴の量を見積もる際に頻用される *FSP27* 及び *perilipin1* 遺伝子の発現を解析した。分化誘導処理後 3 及び 14 日目の LPD1-shRNA 発現細胞における *LPD1b* 遺伝子の発現は、コントロール細胞に比べて 80% 以上の顕著な抑制効果が認められた (Figure 28A and B)。分化誘導処理後 3 日目の LPD1-shRNA 発現細胞における *FSP27* 及び *perilipin1* の発現は、コントロール細胞とほとんど変わらなかったものの、分化誘導処理後 14 日目の *FSP27* 及び *perilipin1* の発現は、コントロール細胞に比べて有意な低下が認められた (Figure 28B)。

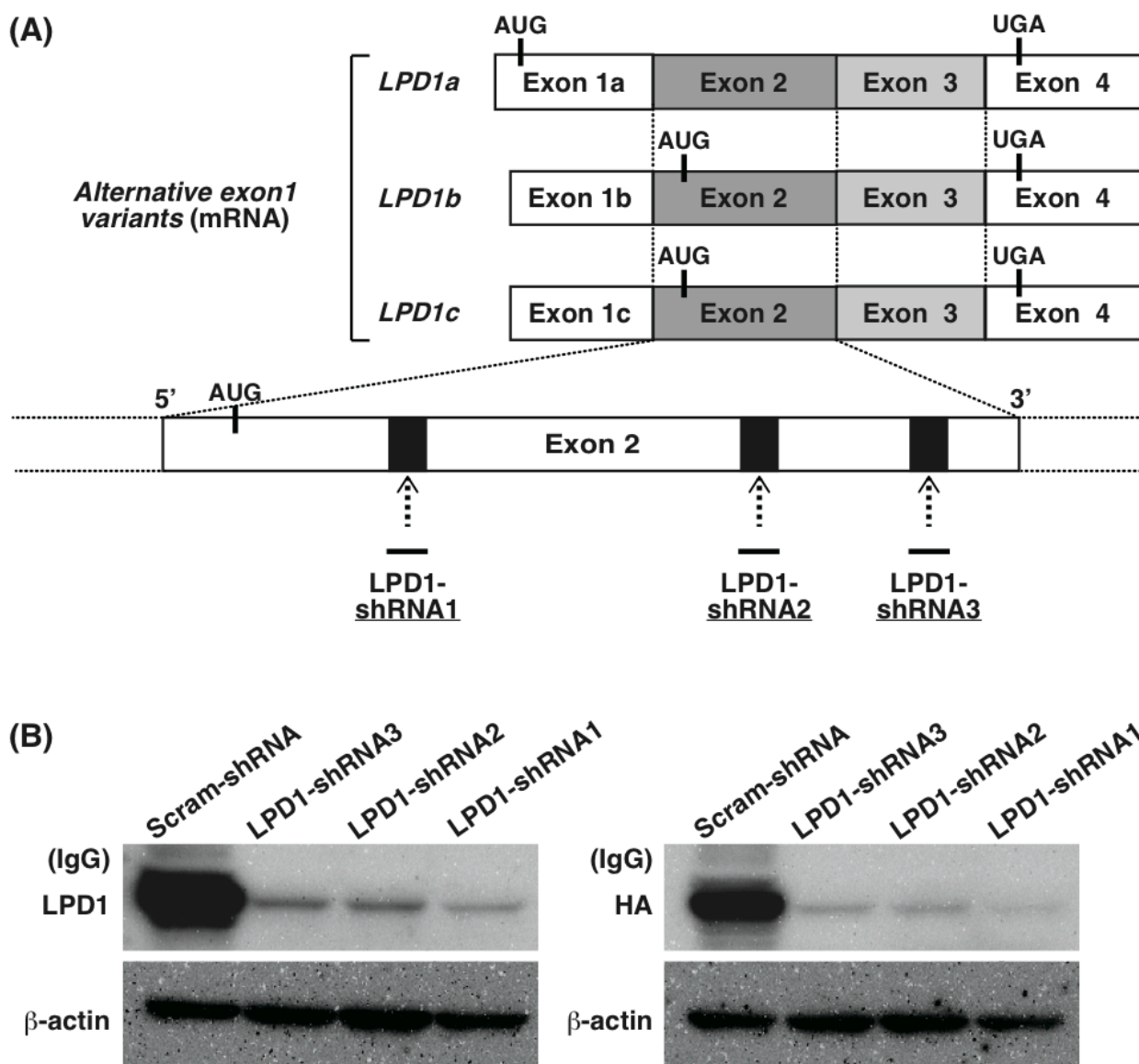


Figure 26. Determination of LPD1-shRNA sequence for efficient knockdown of LPD1.

(A) Target regions for LPD1-shRNAs. (B) Knockdown of forced LPD1 expression by LPD1-shRNA1, 2 and 3 vectors. LPD1-shRNA1, 2, 3 and scram-shRNA expression vectors were co-transfected with LPD1b-HA expression vector into HEK293FT cells. At 48 hr after transfection, Western blotting was performed on cell lysates using anti-LPD1, anti-HA or anti-β-actin IgG. The expression of β-actin was shown as loading control.

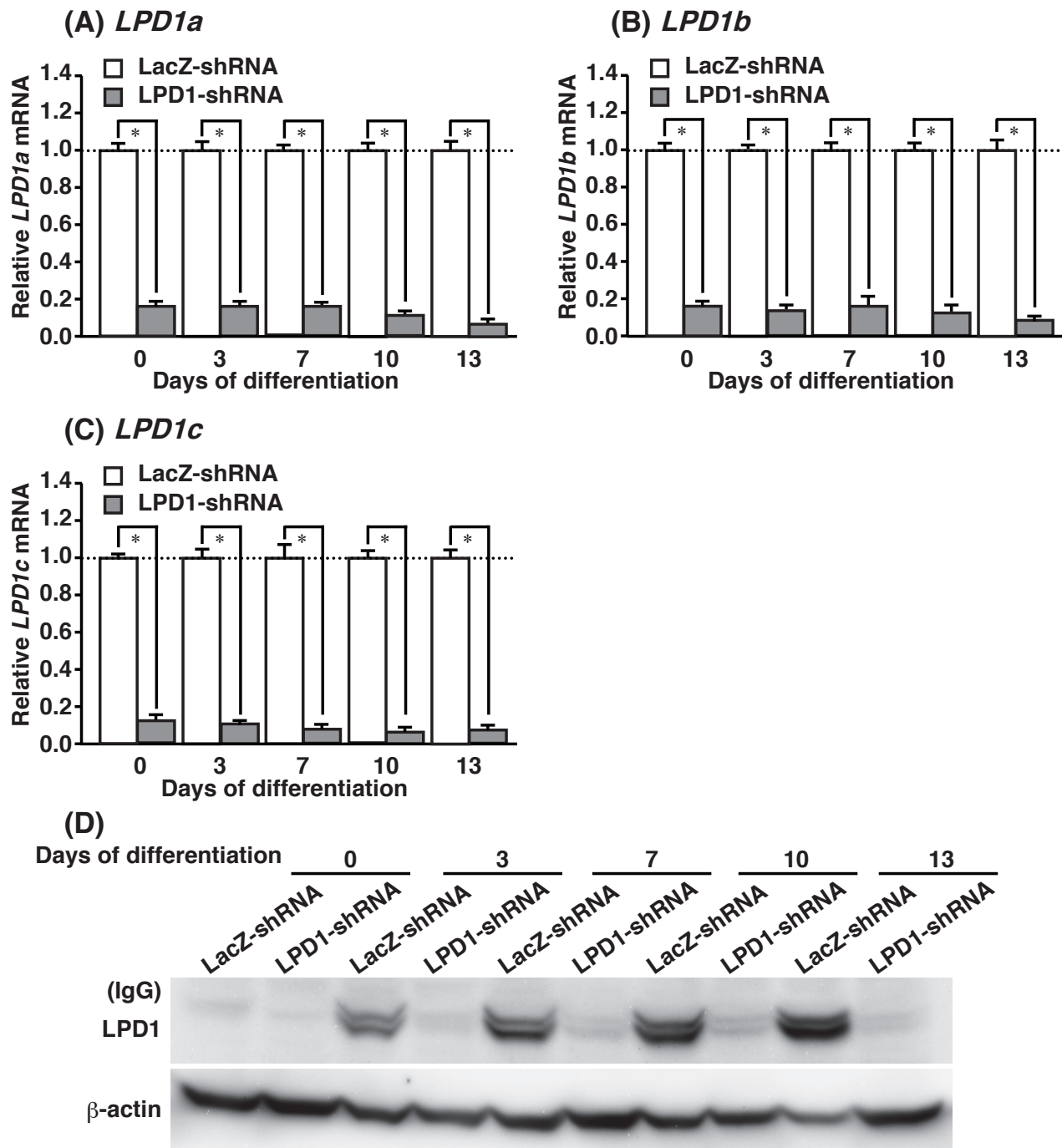


Figure 27. Knockdown of constitutive LPD1a, 1b and 1c by LPD1-shRNA.

Pre-adipocytes were infected with recombinant lentivirus expressing LacZ-shRNA or LPD1-shRNA. At 4 days after infection, the cells were differentiated into mature adipocytes. QPCR analyses of (A) *LPD1a*, (B) *1b* and (C) *1c* mRNAs were performed using total RNA from 3T3-L1 adipocytes. Expression was normalized to *36B4* mRNA, and each bar represents the average \pm S.E.M. of 3 individual experiments. Significant differences from LacZ-shRNA: * $p < 0.001$. (D) Western blotting was performed on cell lysates using anti-LPD1 or anti- β -actin IgG.

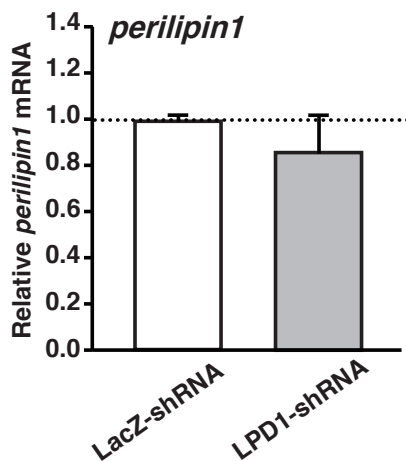
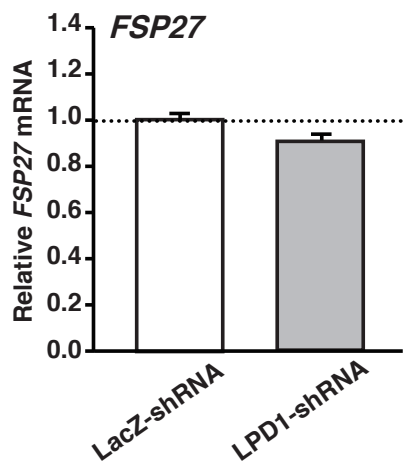
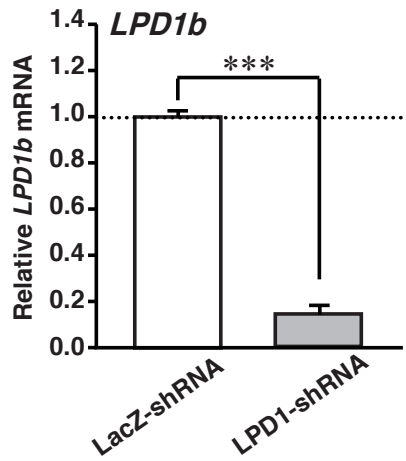
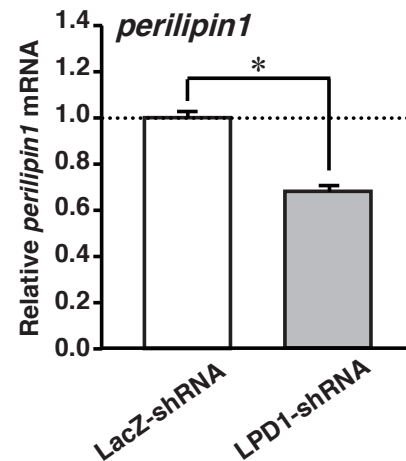
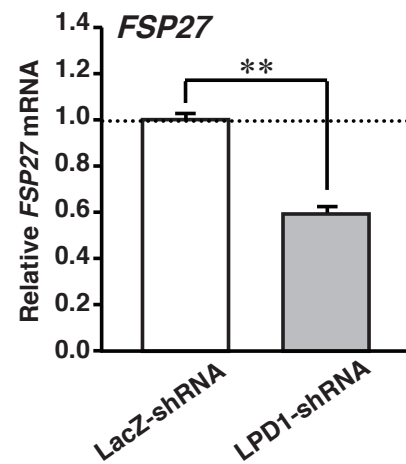
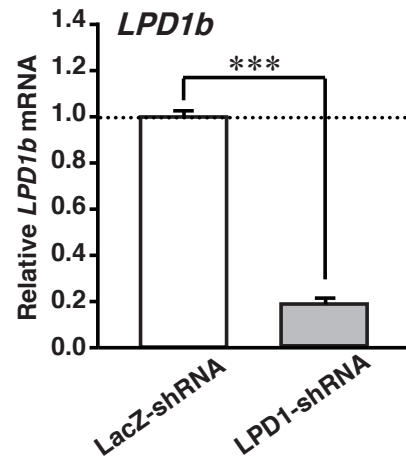
(A) 3 days of differentiation**(B) 14 days of differentiation**

Figure 28. Effect of LPD1 knockdown on the expression of lipid droplet-localized *FSP27* and *perilipin1* genes in 3T3-L1 adipocytes.

Pre-adipocytes were infected with recombinant lentivirus expressing LacZ-shRNA or LPD1-shRNA. At 4 days after infection, the cells were differentiated into mature adipocytes for (A) 3 or (B) 14 days. QPCR analyses of *LPD1b*, *FSP27* and *perilipin1* mRNAs were performed using total RNA from 3T3-L1 adipocytes. Expression was normalized to *36B4* mRNA, and each bar represents the average \pm S.E.M. of 3 individual experiments. Significant differences from LacZ-shRNA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

第四節 LPD1 タンパクのノックダウンが成熟脂肪細胞における

糖の取り込みに与える影響

前節で構築した 3T3-L1 成熟脂肪細胞における LPD1 ノックダウンシステムを用いて、当研究室ではこれまでに脂肪細胞に特徴的なタンパクの発現や酵素活性等への LPD1 バリエントの関与を検討し、予備的検討の段階で LPD1 バリエントと糖の取り込みとの関連性を予想させる結果が得られた。そこで、本節では、LPD1 ノックダウンによる 3T3-L1 成熟脂肪細胞の糖の取り込みに与える影響を検討した。

本実験では、LPD1 ノックダウン 3T3-L1 成熟脂肪細胞における 2-deoxy-D-glucose (2DG) の取り込みについて、2DG 処理のみ、2DG + インスリン処理、及び 2DG + インスリン + フロレチン (グルコーストランスポーター阻害剤) 処理細胞で解析した。一般的に脂肪細胞においては、インスリン依存的にグルコーストランスポーター 4 (GLUT4) により糖が取り込まれることが知られている (39)。それゆえ、インスリン処理により糖の取り込みは上昇し、そのインスリン依存的な糖の取り込みはフロレチン処理により減少するはずである。なお、LPD1 ノックダウン細胞における LPD1 の発現は、コントロール細胞に比べて明らかに抑制されていることを予め確認した (Figure 29)。ロジグリタゾン未添加 (No RGZ) 及び添加 (RGD) 培地での LPD1 ノックダウン (LPD1-shRNA) 細胞における 2DG の取り込みに対するインスリン処理の影響について調べた。その結果、ロジグリタゾン未添加培地では、インスリン処理しても両細胞間での 2DG の取り込み量にほとんど差が見られなかったが (Figure 29A)、ロジグリタゾン添加培地では LPD1 ノックダウン細胞の 2DG 取り込み量は、コントロール細胞 (LacZ-shRNA) に比べて有意に減少した (Figure 29B)。

脂肪細胞におけるインスリン依存的な糖の取り込みは、一般的にインスリン → インスリン受容体 → insulin receptor substrate → phosphoinositide 3-kinase (PI3K) → 3-phosphoinositide-dependent kinase 1 → protein kinase B (AKT/PKB) のリン酸化カスケードを介して、GLUT4 が細胞膜に移行することで生じることが知られている (40)。

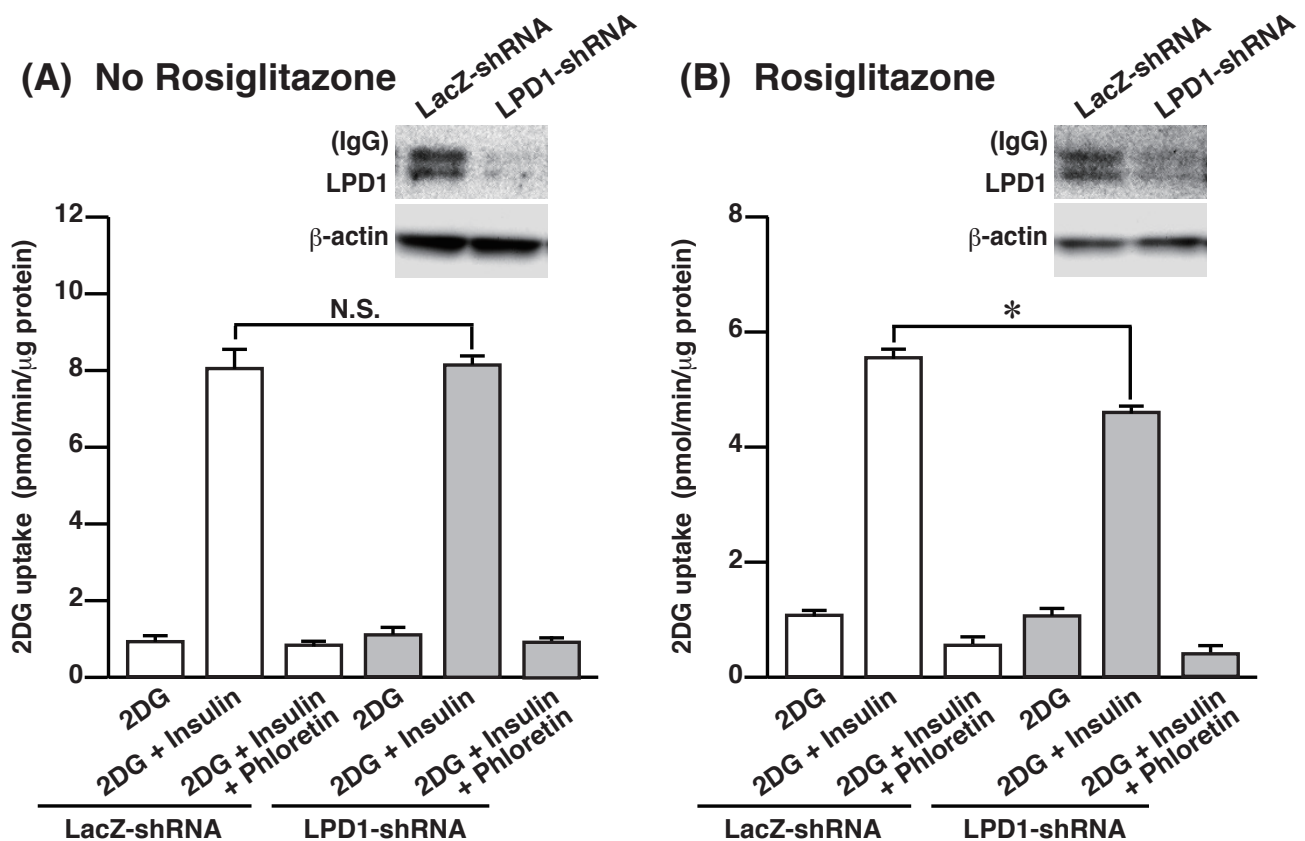


Figure 29. Effect of LPD1 knockdown on glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes.

Pre-adipocytes were infected with recombinant lentivirus expressing LacZ-shRNA or LPD1-shRNA. At 4 days after infection, the cells were differentiated into adipocytes for 14 days. The condition of glucose uptake assay was described in Materials and methods. Each bar represents the average \pm S.E.M. of 3 individual experiments. N.S, not significant. Significant differences from 2DG + insulin (LacZ-shRNA): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

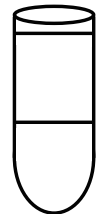
LPD1 ノックダウンにより糖の取り込み量が減少するメカニズムを明らかにするために、LPD1 ノックダウン細胞における GLUT4 の膜への移行及び AKT/PKB Ser473 のリン酸化を解析した。

分化誘導処理後 14 日目の LPD1 ノックダウン細胞に対して、Figure 30 に従って細胞膜画分 (PM 画分) を調製し、ウエスタンブロットを行った。検出されたバンドの濃さは AlphaImager Systems を用いて定量化し、 β -actin にて補正した後、未処理を 1 としたときの相対値で示した。コントロール (LacZ-shRNA) 及び LPD1 ノックダウン細胞 (LPD1-shRNA) における GLUT4 の膜への移行は、未処理に比べインスリン処理により、それぞれ 1.6 及び 2.1 倍誘導され、AKT/PKB Ser473 のリン酸化においてはそれぞれ 5.7 及び 8.4 倍誘導された (Figure 31)。なお、両細胞におけるインスリンの効果 (GLUT4 の膜への移行及び AKT/PKB Ser473 のリン酸化の増加) は、それらの上流に位置する PI3K の阻害剤であるウオルトマンニン (Wort) で完全に抑制されることを確認した (Figure 31)。以上の結果からは、LPD1 ノックダウン細胞における GLUT4 の膜への移行及び AKT/PKB Ser473 の程度がコントロール細胞と比べ増加傾向であり、Figure 29 の LPD1 ノックダウン細胞において糖の取り込み量が減少する結果を説明できなかった。一方、注目すべき点として LPD1 ノックダウン細胞における細胞膜上の GLUT4 発現量は、コントロール細胞に比べ著しく低下した。

第五節 考察

本章において、LPD1b タンパクを強制発現させた 3T3-L1 成熟脂肪細胞は、分化誘導 10 日目において分化マーカーである *C/EBP β* 、*C/EBP α* 、*PPAR γ* 、*aP2*、*FSP27* 及び *perilipin1* 遺伝子の発現が誘導され、脂肪滴の肥大化が認められた (第二節)。また、LPD1 ノックダウン細胞における *FSP27* 及び *perilipin1* 遺伝子の発現は、分化誘導 14 日目において有意に抑制された (第三節)。さらに、LPD1 ノックダウン細胞は、細胞膜上の GLUT4 量が抑制され、細胞内への糖取り込み量が抑制された (第四節)。

LPD1b を前駆脂肪細胞に強制発現させたのみの細胞は、脂肪滴の形成が認められなか



67

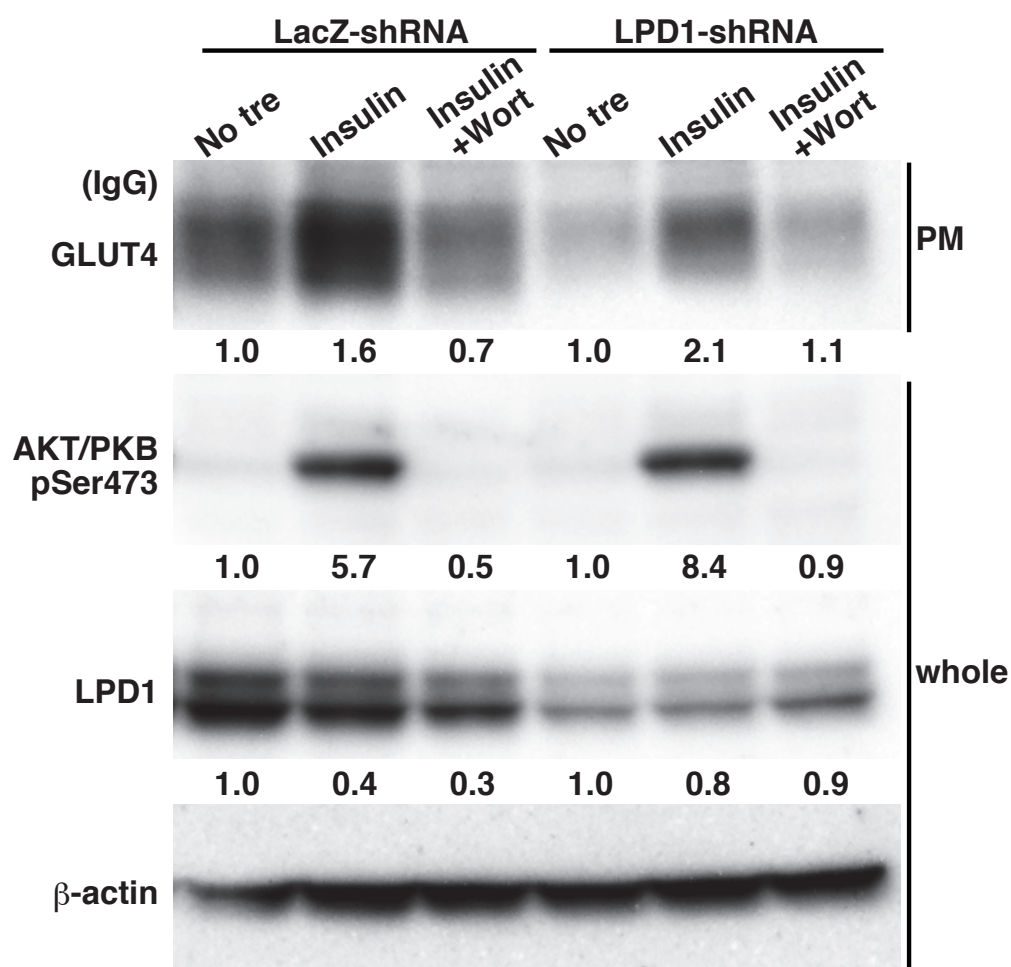


Figure 31. Effect of LPD1 knockdown on GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. Pre-adipocytes were infected with recombinant lentivirus expressing LacZ-shRNA or LPD1-shRNA. At 4 days after infection, the cells were differentiated into adipocytes for 14 days. The cells were maintained in serum-free DMEM for 24 hr and then stimulated by 1 μ M insulin alone, or 1 μ M insulin and 1 μ M wortmannin (Wort) for 20 min. The cells were homogenized and fractionated by ultracentrifugation into whole cell lysate and PM fractions as described in Figure 30. Western blotting was performed on each fraction using anti-GLUT4, anti-AKT/PKB pSer473, anti-LPD1 and anti- β -actin IgGs. No tre, No treatment; GLUT4; glucose transporter type 4, AKT/PKB, v-akt murine thymoma viral oncogene/protein kinase-B. Quantitation of the bands was performed using the AlphaImager Systems and are expressed as the fold change, after correction for β -actin levels, relative to No tre.

った (date not shown)。一方、LPD1b を前駆脂肪細胞にあらかじめ強制発現させ、分化誘導させた細胞はコントロール細胞に比べて脂肪滴の肥大化及び分化マーカー遺伝子の発現上昇が認められたことから (Figures 24 and 25)、LPD1b は脂肪細胞分化を促進する機能を有することが示唆された。分化マーカーである *perilipin1* 及び *FSP27* は、いずれも脂肪滴に局在し、脂肪滴の肥大化及び中性脂肪の蓄積に関与していることが知られている (21, 22, 41)。それゆえ、LPD1b 発現細胞における脂肪滴の肥大化は、*perilipin1* 及び *FSP27* 遺伝子の発現レベルの上昇に起因していることが考えられる (Figures 24 and 25)。また、LPD1 をノックダウンさせた細胞における *FSP27* 及び *perilipin1* 遺伝子の発現は、コントロール細胞に比べて分化誘導 14 日目において抑制されたが、分化誘導 3 日目においては抑制されなかった (Figure 28)。その結果から、LPD1 は、分化の早期である 3 日目においては脂肪細胞分化の促進にはほとんど関与しておらず、主に分化の後期において脂肪細胞の成熟化に関与していると考えられる。現状では、LPD1 がどのようなメカニズムで脂肪細胞分化を促進しているかは明らかではないが、少なくとも LPD1 は核には局在していないことから、分化マーカー遺伝子の発現を直接的に制御する転写因子ではないことが予想される (Figure 19)。

LPD1 ノックダウン細胞 (LPD1-shRNA) は、コントロール細胞 (LacZ-shRNA) に比べて細胞膜上の GLUT4 量が低下し、細胞内への糖取り込みが抑制された (Figures 29 and 31)。その結果から、LPD1 タンパクは、細胞膜上の GLUT4 量を上昇させることで、細胞内への糖取り込みを促すことが示唆された。現状では、LPD1 による細胞膜上 GLUT4 量の上昇が、GLUT4 の膜への移行量の上昇によるものか、または GLUT4 の細胞レベルでの発現量の上昇によるものかについては不明である。この不明点を明らかにするために、LPD1 ノックダウン細胞の全細胞溶解液における GLUT4 タンパクの発現量、あるいは *GLUT4* mRNA の発現量をコントロール細胞と比較する必要がある。また、GLUT4 は、脂肪細胞の分化に関与する転写因子である Krüppel-like factor 15 (KLF15) によって発現制御され、KLF15 と共に分化の過程において誘導されることが報告されている (42)。LPD1 が分化過程における KLF15 の発現誘導に関与しているかは明らかではないが、今回見出した

LPD1 による分化促進作用により、KLF15 及び GLUT4 の発現はいずれも誘導されている可能性がある。

ロジグリタゾン添加培地で培養した LPD1 ノックダウン細胞とコントロール細胞との間では、インスリン処理による糖取り込み量に有意な差が認められたが、ロジグリタゾン未添加培地で培養した両細胞間においては、有意な差が認められなかった (Figure 29)。この原因として、ロジグリタゾン処理による LPD1 の発現上昇により、LPD1 ノックダウン細胞とコントロール細胞との間の LPD1 発現量に差が開き、その結果として糖取り込み量に有意な差が生じたと考えられる (Figures 18C and 29B)。

細胞内へ取り込まれた糖は、細胞のエネルギー源として利用されるが、余剰の糖は、脂肪に変換され脂肪滴に蓄えられることが知られている。ゆえに、LPD1 による糖取り込みの促進は、LPD1b 発現細胞において認められた脂肪滴の肥大化に大きく寄与していることが示唆される (Figures 24 and 29)。また、脂肪細胞における細胞内への糖取り込みは、主にインスリン依存的に細胞膜へ移行する GLUT4 によって制御されるが、肝細胞内への糖取り込みは、主にインスリン非依存的に細胞膜に常在する GLUT2 によって制御されることが知られている。しかし、*ob/ob* マウスの肝臓においては、低レベルではあるが GLUT4 が発現しているとの報告があるため (43)、LPD1 による細胞膜上の GLUT4 量の上昇により糖取り込みが促進されていると考えられる。

Ob/ob マウスの肝細胞は、あたかも脂肪細胞のように多くの脂肪滴を蓄え、脂肪細胞の分化マーカーとして知られる *PPAR γ* 、*aP2* 及び *FSP27* などの遺伝子発現が誘導されることが報告されている (17)。従って、本研究において認められた LPD1 による脂肪細胞分化を促す機能は、何らかのかたちで肝細胞における脂肪蓄積に関与していると考えられる。また、今回明らかにした LPD1 による脂肪滴の肥大化は、LPD1 と脂肪肝形成との関連性を裏付ける結果として大変興味深い。今後、LPD1 の脂肪肝形成への直接的な関与を明らかにするため、更なる詳細な機能解析を行なう必要がある。

第五章 総括

本研究においては、脂肪肝に特異的に発現する新規 PPAR γ 標的遺伝子の諸性質の解析を行った。初めに、脂肪肝特異的な遺伝子として単離された *FSP27* 遺伝子が成因の異なる脂肪肝においてどのような発現性を示すか解析した。次に、GeneChip により新たに単離された機能未知である *LPD1* 遺伝子の発現性及び *LPD1* タンパクの機能解析を行った。以下に、本研究で得られた結果を要約して示す。

- 1) *FSP27* 遺伝子の発現は、各脂肪肝モデルのうち、*ob/ob*、*db/db*、高脂肪食、メチオニン・コリン欠損食及び絶食マウスの脂肪肝において特異的に誘導されるが、アルコール処理マウスの脂肪肝では誘導されなかった。
- 2) *FSP27* 遺伝子の新たな発現抑制因子として、インスリンを見出した。
- 3) *LPD1* 遺伝子には、エキソン 1 の異なる 3 つのバリエント *LPD1a*、*1b* 及び *1c* 遺伝子が存在し、それらの遺伝子及びタンパクの発現は、いずれも *ob/ob* マウスの脂肪肝及び 3T3-L1 成熟脂肪細胞において PPAR γ 依存的であった。
- 4) *LPD1* バリエント遺伝子は、脂肪肝以外にいずれも白色、褐色脂肪組織において高発現していた。
- 5) *LPD1* バリエントタンパクは、主に細胞骨格を主要に含む Triton X-100 不溶性画分に局在していた。
- 6) *LPD1b* の強制発現は成熟脂肪細胞への分化誘導を促進し、細胞内の脂肪蓄積を促した。
- 7) *LPD1* バリエントタンパクのノックダウンは、細胞膜上の GLUT4 量を低下させ、細胞内への糖の取り込み量を減少させた。

以上の結果から、*FSP27* 遺伝子は脂肪肝発症の成因の違いにより、その発現性が大きく異なることが明らかになった。また、*LPD1* バリエント遺伝子は、いずれも新規 PPAR γ 標的遺伝子であることが明らかになった。さらに、*LPD1* バリエントタンパクの生理機能

として、脂肪細胞の脂肪蓄積及び糖の取り込み促進作用が示唆された。両機能の関連性は今後の課題であるが、少なくとも LPD1 バリエントタンパクによる脂肪蓄積の促進は、FSP27 と同様に PPAR γ 依存的な脂肪肝形成に強く関与している可能性が高い。

現在、生活習慣病の有病者数は、世界各国で増加しており、今後も増加の一途を辿ることが予想される。それゆえ、生活習慣病に併発する様々な病態に対する有効的な治療薬の開発は急務の課題である。本研究の更なる発展は、脂肪肝を含む生活習慣病の創薬開発に多大な貢献をもたらすことが期待される。

【実験の部】

1. 試薬

特記する以外の試薬は、ナカライテスク株式会社あるいは和光純薬工業株式会社から購入した特級品を使用し、またマウスは、九動株式会社から購入した。試薬の調製には Elix 3 純水装置システム (Millipore) による逆浸透膜水を使用した。

2. 実験動物

レプチン正常 (*OB/OB*) 及び欠損 (*ob/ob*) の遺伝背景をもった肝臓特異的な *PPAR γ* 欠損マウスは、松末ら (17) によって作製されたものを使用した。なお、本マウスは、*PPAR γ* 遺伝子のエキソン 2 を loxP 配列で挟んだ遺伝子座を持ち、また肝臓特異的なアルブミンプロモーターを持つ CRE リコンビナーゼを発現する。

肥満モデルである *db/db* マウスは、8 週齢 C57BL/KsJ-leprdb 雌性マウス (日本クレア) を用いた。また、コントロールマウスである *db/m* は、*db* ヘテロ C57BL/6J 雌性マウス (日本クレア) を用いた。

高脂肪食処理 (HF) マウスは、高脂肪飼料 F2HFD2 (オリエンタル酵母) を 8 週齢の C57BL/6J 雌性マウス (九動株式会社) に 2 ヶ月間給餌することにより作製した。コントロールマウスには、一般的な MF 飼料 (オリエンタル酵母株式会社) を同期間給餌した。

アルコール処理 (AL) マウスは、F2LEW 飼料 (オリエンタル酵母株式会社) に 50 g の 99% エタノールを添加し、全量を滅菌水で 1000 ml とした液体飼料を 8 週齢の C57BL/6J 雌性マウスに 2 ヶ月間給餌することにより作製した。コントロールマウスは、F2LEW 飼料 (オリエンタル酵母) に滅菌水のみを混合した液体飼料で同期間給餌した。

メチオニン・コリン欠損食 (MCD) マウスは、メチオニン・コリン欠損食飼料 F2MCDD (オリエンタル酵母) を 8 週齢の C57BL/6J 雌性マウスに 1 ヶ月間給餌することにより作製した。コントロールマウスには一般的な CE-2 飼料 (日本クレア) を同期間給餌した。

絶食処理 (Fasting) マウスは、10 週齢 C57BL/6J 雄性マウスを 24 時間絶食することにより作製した。再摂食処理 (Refeeding) マウスは、24 時間絶食後、high sucrose diet (CE-2 飼料 : sucrose = 1 : 1 で混合) を 24 時間給餌することにより作製した。コントロールマウスは CE-2 飼料を 48 時間給餌した。

1 型糖尿病モデル (STZ 処理) マウスは、8 週齢の C57BL/6J 雄性マウスを 4 時間絶食後、1 日 1 回 50 mg/kg streptozotocin (Sigma-Aldrich)/クエン酸溶液を腹腔内投与する処理を連続的に 5 日間行うことにより作製した。コントロールマウスは、溶媒として用いたク

エン酸溶液のみを同様に投与した。実験期間中、両群のマウスは MF 飼料を給餌した。

ロジグリタゾン処理は、ロジグリタゾン (Enzo Life Sciences) を飼料中に 0.02% (w/w) の濃度で混和し 2 週間給餌した。

3. 培養細胞

マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 及びヒト胎児腎由細胞株 HEK293FT は、10% ウシ胎児血清 (FBS; BioWest) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Life Technologies) 培地に、antibiotic-antimycotic solution (Life Technologies) を 100 倍希釈になるように加え、5% CO₂、37°C の条件下で培養した。

マウス肝由来細胞株 AML-12 は、10% FBS を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium nutrient mixture F-12 ham (DMEM/F-12; Life Technologies) 培地に、antibiotic-antimycotic solution 及び insulin-transferrin-selenium A (Life Technologies) をそれぞれ 100 倍希釈となるように加え、さらに最終濃度 0.1 µM になるようにデキサメサゾン (Sigma-Aldrich) を加え、5% CO₂、37°C の条件下で培養した。

4. 3T3-L1 前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞への分化誘導

特記する以外は、90% コンフルエントの 3T3-L1 前駆脂肪細胞に、分化誘導剤として最終濃度 10 µg/ml インスリン (Life Technologies)、1 µM デキサメタゾン (Sigma-Aldrich)、0.5 mM 3-イソブチルメチルキサンチン (Sigma-Aldrich) 及び 1 µM ロジグリタゾン (Enzo Life Sciences) を 10% FBS 含有 DMEM 培地に添加し、3 日間培養した。その後、細胞は最終濃度 10 µg/ml インスリンを添加した 10% FBS 含有 DMEM 培地にて、少なくとも 10 日間培養した。

5. トリグリセリドの測定

マウスの肝臓からの脂質の抽出には、Bligh-Dyer 法 (44) を用いた。肝臓 0.1 g に 0.1 M KCl 1 ml を加え、室温にてホモジネートした。この懸濁液 50 µl に、0.1 M KCl 50 µl を加えて混和し、全サンプル 100 µl を以下の脂質抽出に用いた。このサンプル (100 µl) に、クロロホルム/メタノール (混合比 1:2) 375 µl を加え、室温で 3 分間インキュベートした。インキュベート後の溶液に、クロロホルム 125 µl 及び水 125 µl を加え、室温にて 12,000 rpm で 10 分間遠心分離し、その下層 (クロロホルム層) を別のチューブに分取した。下層分取後の上層に、再びクロロホルム 100 µl を加え、室温にて 12,000 rpm で 10 分間遠心分離した後、下層を分取し、先に分取したクロロホルム層と合わせた。有機層をエバポレーター (SAVANT) にて乾固し、残渣にイソプロパノール 200 µl を加え、ソニケーションにより完全に懸濁させた。このうちの 2 µl を、トリグリセリド濃度の測定用サンプルと

して使用した。なお、トリグリセリド濃度の測定にはクオリジェント TG (積水メディカル株式会社) を用いた。

6. AST 及び ALT の測定

マウス血清中の AST 及び ALT の測定には、トランスアミナーゼ CII-テストコーワ (和光純薬) を用いた。まず、96 well plate の 2 つの well に 水 (blank) 2 μ l、AST 基準液 2 μ l と 4 μ l または ALT 基準液 2 μ l と 4 μ l を加え、3 つの well には血清 (sample) 2 μ l を加えた。さらに、sample と blank の well に AST 及び ALT 用基質酵素液を 50 μ l ずつ加え、37°C で 5 分間インキュベート後、well に発色液を 50 μ l ずつ加えた。AST または ALT の基準液が入った well には、それぞれ AST または ALT 用基質酵素液を 50 μ l ずつ加え、37°C で 20 分間インキュベートした。その後、試料の入った全ての well に反応停止液 150 μ l ずつ加え、540 nm の波長で吸光度を測定した。

7. インスリン及びグルコースの投与による血糖値の測定

インスリン (8 munits/g body weight) またはグルコース (5 mg/g body weight) を含むように調整した PBS 400 μ l をマウス腹腔内に投与した。またインスリンの効果は、投与 10 分、30 分、1 時間、8 時間及び 24 時間後に血糖値を測定することにより評価した。血糖値の測定は、マウスの尾部から採取した血液 5 μ l を測定用サンプルとし、グルテストセンサー (三和化学研究所) を用いて行った。

8. タンパクの定量

タンパク濃度の測定には、PIERCE BCA Protein Assay Kit (Bio-Rad) を用いた。まず、Kit 中の Reagent A、Reagent B を 50 : 1 の割合で混合し、working reagent を作製した。次に、BSA (1.37 mg/ml、Bio-Rad) から、1.5 ml チューブに原液、2 倍希釈液、4 倍希釈液を作製し、タンパク標準液とした。なお、測定するサンプルは水で 10 倍希釈したものを使用した。96 well plate に 3 つのタンパク標準液及び水 (対照) いずれについても、2 つの well に 10 μ l ずつ加えた。希釈サンプルについては、3 つの well に 10 μ l ずつ加えた。タンパク標準液、対照及び希釈サンプルを加えた well に working reagent 200 μ l 加え、37°C で 30 分インキュベートした。その後、562 nm の波長で吸光度を測定した。

9. 細胞内への 2DG 取り込み量の定量

細胞内への 2-deoxy-D-glucose (2DG; Sigma-Aldrich) 取り込み量の定量は、Saito ら (45) の方法を一部改変した方法により行った。

<2DG の取り込み>

各種処理を行う 24 時間前に、24 well plate に用意した 3T3-L1 成熟脂肪細胞を、PBS 500 μ l で 3 回洗浄した後、無血清 DMEM 培地 500 μ l に交換した。23 時間後、細胞を PBS 500 μ l で 3 回洗浄し、2% BSA-KRPH buffer (20 mM Hepes pH 7.4, 5 mM KH_2PO_4 , 1 mM MgSO_4 , 1 mM CaCl_2 , 136 mM NaCl, 4.7 mM KCl) 250 μ l を加え、37°C で 40 分間インキュベートした。その後、最終濃度 1 μ M インスリンを含む 2% BSA-KRPH buffer 250 μ l に交換し、37°Cにて 20 分間インスリン刺激を行った。なお、フロレチン (Sigma-Aldrich) を処理する場合には、最終濃度 1 mM で行った。インスリン処理あるいはインスリンとフロレチン処理 20 分後、1 mM 2DG 含有 2% BSA-KRPH buffer 250 μ l を加え、さらに 20 分間インキュベートした。最後に、200 μ M フロレチンを含む PBS 500 μ l で 3 回細胞を洗浄することで反応を停止した。細胞は 10 mM Tris-HCl (pH 8.1) 500 μ l を用いて回収した。

<2DG 取り込み量の測定>

各種処理後回収した細胞は、凍結融解を 3 回繰り返すことで細胞を破壊した。次に、80°C で 15 分間インキュベートし、4°C、15,000 rpm、20 分間遠心した後、上清を別のチューブに移した。この上清 2 μ l に 10 mM Tris-HCl (pH 8.1) 43 μ l を加え混和し、さらに mix A [10 mM Tris-HCl pH 8.1, 315 μ M nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+), 2.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1.8 U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), 2.1 U/ μ l phosphoglucose] 40 μ l を加え、37°C で 1 時間インキュベートした。この溶液に 1 M HCl 5 μ l を加えて、37°C で 1 時間インキュベートすることで反応を停止した。さらに 50 mM Tris-HCl/1M NaOH 5 μ l を加えて中性に戻し、mix B [10 mM Tris-HCl pH 8.1, 200 μ M nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP^+), 40 mM EDTA, 860 U/ml G6PDH] 5 μ l を添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。この溶液に、1.5 M NaOH 5 μ l を加え、70°C で 1 時間インキュベートすることでタンパクを溶解した後、50 mM Tris-HCl pH 8.1/1.5 M HCl 5 μ l を加えて中性にした。

チューブ内の溶液を 96 well plate に移し、室温で 10 分間放置し、cyclin reagent [10 mM Tris-HCl pH 8.1, 20 mM glucose-6-phosphate (G6P), 40 μ M L-glutathione oxidized (GSSG; Sigma-Aldrich), 4 mM EDTA, 80 U/ml G6PDH, 1U/ μ l glutathione reductase (GR), 5 mM 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB; Sigma-Aldrich)] 90 μ l を加え、37°C で 40 分間インキュベート後、420 nm の波長で吸光度を測定した。また、検量線作成のためのスタンダードは、2-deoxy-D-glucose 6-phosphate sodium salt (2-DG6P; BioVision) を使用した。

10. Western blot 及び Dot blot

< Western blot >

HEK293FT 細胞は、urea cell lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5、6 M urea、1% Triton

X-100、5 mM EDTA、プロテアーゼ阻害剤カクテル) で可容化した。3T3-L1 成熟脂肪細胞は、RIPA buffer (20 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 1% Na-deoxycholate, 0.1% SDS, プロテアーゼ阻害剤カクテル) で可容化した。なお、細胞及びマウス肝臓の細胞分画には、TES buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 254 mM sucrose) を用いた。各サンプルは、タンパク量を一定にあわせて SDS ポリアクリルアミドゲルにアプライし、150 V の定電圧で電気泳動を行った。このゲルからタンパクを PVDF メンブレン (MILLIPORE) に転写した後、5% (w/v) スキムミルク/0.1% TBST (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1% Tween20) 中にて室温にて 1 時間ブロッキングを行った。

一次及び二次抗体の希釈倍率及び反応条件を以下に記す。

一次抗体として、抗 LPD1 rabbit IgG (Medical&Biological Laboratories)、抗 COXIV rabbit IgG (Cell signaling)、抗 calreticulin rabbit IgG (Cell signaling)、抗 caveolin-1 rabbit IgG (Sigma-Aldrich)、抗 PKBpSer473 rabbit IgG (Sigma-Aldrich) を用いた場合は、0.1% TBST で 10,000 倍希釈し、4℃ で 24 時間インキュベートした。二次抗体反応には、peroxidase-labeled 抗 rabbit IgG 抗体 (Santa Cruz) を 0.1% TBST で 10,000 倍に希釈したものをを用い、4℃ で 12 時間インキュベートした。

一次抗体として、抗 GAPDH mouse IgG (Sigma-Aldrich)、抗 β -actin mouse IgG (Sigma-Aldrich)、抗 HA-7 mouse IgG (Sigma-Aldrich)、抗 GLUT4 mouse IgG (Cell signaling)、を用いた場合は、0.1% TBST で 5,000 倍希釈し、4℃ で 12 時間インキュベートした。二次抗体反応には peroxidase-labeled 抗 mouse IgG 抗体 (GE Healthcare) を 0.1% TBST で 5,000 倍に希釈したものをを用い、室温で 1 時間インキュベートした。

一次抗体として、抗 vimentin chicken IgG (Novus) を用いた場合は、0.1% TBST で 10,000 倍希釈し、室温で 1 時間インキュベートした。また、二次抗体反応には peroxidase-labeled 抗 chicken IgG 抗体 (Novus) を 0.1% TBST で 20,000 倍に希釈したものをを用い、室温で 1 時間放置した。

化学発光の基質には、SuperSignal west dura extended duration substrate (PIERCE) を用いた。

< Dot blot >

Dot blot 用に抽出したサンプル 1 μ l を、ニトロセルロースメンブレン (MILLIPORE) に滴下した後、風乾させた。なお、dot blot 用のサンプル調整法は、“**16. 細胞分画 (1% Triton X-100 不溶性画分、脂質ラフト/カベオラ画分)**”に記載している。

化学発光の基質には、SuperSignal west dura extended duration substrate (PIERCE) を用いた。

11. Total RNA の抽出

< 白色脂肪組織 >

白色脂肪組織からの total RNA の抽出は、RNeasy Lipid Tissue Midi Kit (QIAGEN) を使用して行った。白色脂肪組織を QIAzol Lysis Reagent 5 ml で溶解し、クロロホルム 1 mL を加え、4℃、5,000×g で 15 分間遠心分離した。上清を別のチューブに分取し、70% エタノール 3 ml と混和後、RNA easy Midi spin カラムに添加し、5,000×g で 5 分間遠心した。遠心後のカラムに Buffer RW1 4 ml を加え、5,000×g で 5 分間遠心した。遠心後、さらにこのカラムに Buffer RPE 2.5 ml を加え、5,000×g で 5 分間遠心し、この操作をもう一度繰り返した後、カラムを別のチューブに移し、RNase free water (GE Healthcare) 100 µl を加え、20℃、5,000×g で 1 分間遠心することで total RNA を溶出した。

< 白色脂肪組織以外の組織 >

白色脂肪組織以外の組織及び細胞からの total RNA の抽出は、illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare) のマニュアルに記載されている方法を一部変更して行った。組織または細胞を TRIzol (Life Technologies) 1 ml で溶解し、クロロホルム 300 µl を加え、4℃、15,000×g で 15 分間遠心分離した。上清を別のチューブに分取し、70% エタノール 500 µl と混和後、RNAspin Mini カラム (GE Healthcare) に添加し、4℃、8,000×g で 30 秒間遠心した。遠心後のカラムに Buffer MDB (GE Healthcare) 350 µl を加え、4℃、11,000×g で 1 分間遠心した。このカラムに DNA Working Solutions (GE Healthcare) 10 µl と DNase reaction buffer 90 µl の混合液 95 µl を加え、15 分間インキュベート後、さらに Buffer RA2 (GE Healthcare) 200 µl を加え、4℃、11,000×g で 1 分間遠心した。遠心後のカラムに、Buffer RA3 (GE Healthcare) 600 µl を加え、4℃、11,000×g で 1 分間遠心した。再び Buffer RA3 250 µl をカラムに加え、4℃、11,000×g で 2 分間遠心した。カラムを別のチューブに移し、RNase free water (GE Healthcare) 100 µl を加え、4℃、11,000×g で 1 分間遠心することで total RNA を溶出した。

12. cDNA の合成

< 白色脂肪組織 >

白色脂肪組織からの cDNA の抽出には、QuantiTect Reverse Transcription (QIAGEN) を用いた。7×gDNA Wipeout Buffer 2 µl 及び 1 µg の total RNA を混合後、RNase-free water で全量を 14 µl に調製したものを反応液 A とした。この反応液 A を 42℃ で 2 分間インキュベートし、さらに Quantiscript Reverse Transcriptase 1 µl、5×Quantiscript RT Buffer 4 µl、RT Primer Mix 1 µl を加えて反応液 B (全量 20 µl) を調製した。この反応液 B を 42℃ で 15 分間、さらに 95℃ で 3 分間インキュベートすることにより cDNA を合成した。

＜白色脂肪組織以外の組織＞

白色脂肪組織以外からの cDNA の合成は、AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies) のマニュアルに記載されている方法を一部変更して行った。反応液は、cDNA Synthesis Master Mix 10 μ l、AffinityScript RT/RNase Block Enzyme Mixture 1 μ l、Oligo (dT) primer 1.7 μ l、Random primers 0.4 μ l 及び 1 μ g の total RNA を混合後、RNase-free H₂O で全量を 20 μ l に調製した。この反応液を 25°C で 5 分間、42°C で 15 分間、さらに、95°C で 5 分間インキュベートすることにより cDNA を合成した。

13. Real-time PCR

Real-time PCR は検量線を用いた相対的定量法により行った。まず、PCR 反応液は、2×Brilliant III Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies) 5 μ l、1 mM reference dye (Agilent Technologies) 0.001 μ l、5 μ M 各遺伝子特異的なプライマーペア 0.8 μ l、及び cDNA 1 μ l を混和し、水で全量を 10 μ l に調製した。次に、この反応液を Mx3005P QPCR System (Agilent Technologies) を用いて 95°C で 3 分間インキュベートした後、95°C で 15 秒間、55°C で 15 秒間、72°C で 30 秒間のサイクルを 40 回繰り返す、蛍光強度を測定した。また、検量線作成のためのスタンダードは、マウス肝ゲノム DNA を増幅した PCR 産物を使用した。なお、各プライマーの塩基配列は、“22. オリゴ DNA 配列合成”に記載している。

14. LPD1-EGFP 融合タンパクを用いた局在解析

LPD1-EGFP 発現ベクター 1 μ g と 150 mM NaCl 50 μ l をチューブに加え混合した。別に、JetPEI DNA in vitro transfection reagent (polyplus-transfection) 2 μ l と 150 mM NaCl 50 μ l をチューブに加え混合し、先の DNA の入ったチューブに合わせた。室温で 30 分間放置後、この混合液を 4 well chamber slide (DB Falcon) にて培養した AML-12 細胞に加えた。24 時間後、細胞を PBS 500 μ l で 3 回洗浄した後、4% パラホルムアルデヒド/PBS 溶液 250 μ l を加え、室温で 10 分間、固定した。この固定した細胞を 10 mM glycine/PBS 溶液 500 μ l で 3 回洗浄した後、Hoechst 33342 溶液 (PBS で 200 倍希釈) 250 μ l を加え、暗所にて室温で 30 分間インキュベートした。暗所にて細胞を PBS 500 μ l で 3 回洗浄した後、細胞に ProLong Gold antifade reagent (Life Technologies) 1 滴添加し、封入した。冷暗所で 24 時間放置後、共焦点レーザースキャン顕微鏡 (ZEISS) にて検鏡した。

15. 内在性 LPD1 タンパクの蛍光免疫染色

4 well chamber slide で培養した 3T3-L1 成熟脂肪細胞を、PBS 500 μ l で 3 回洗浄した後、4% パラホルムアルデヒド/PBS 溶液 250 μ l を加え、室温で 10 分間、固定した。次

に、固定した細胞を 10 mM glycine/PBS 溶液 500 μ l で 3 回洗浄した後、0.1% BSA を含む 0.1% saponin/PBS 溶液 250 μ l を加え、室温で 1 時間ブロッキングした。さらに、細胞を 0.1% BSA/PBS 溶液 500 μ l で 3 回洗浄した後、抗 LPD1 rabbit IgG (0.1% BSA/PBS で 1000 倍希釈) 250 μ l を加え、室温で 1 時間、一次抗体反応を行なった。この細胞を 0.1% BSA/PBS 溶液 500 μ l で 3 回洗浄した後、CY3 labeled 抗 rabbit IgG 抗体 (Sigma-Aldrich) (0.1% BSA/PBS で 1000 倍希釈) 250 μ l を加え、暗所にて室温で 1 時間、二次抗体反応を行なった。暗所にて細胞を PBS 500 μ l で 3 回洗浄した後、Lipid TOX Green (Life Technologies) 溶液 (PBS で 200 倍希釈) 250 μ l を加え、30 分間インキュベートすることで脂肪滴を染色した。さらに、暗所にて細胞を PBS 500 μ l で 3 回洗浄した後、Hoechst 33342 溶液 (PBS で 200 倍希釈) 250 μ l を加え、30 分間インキュベートすることで核を染色した。暗所にて細胞を PBS 500 ml で 3 回洗浄した後、細胞に ProLong Gold antifade reagent を 1 滴添加し、封入した。冷暗所で 24 時間放置後、共焦点レーザースキャン顕微鏡にて検鏡した。

16. 細胞分画 (1% Triton X-100 不溶性画分、脂質ラフト/カベオラ画分)

<1% TritonX-100 不溶性画分の調製>

Ob/ob マウスから摘出した肝臓 0.25 g を、プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む TES buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 254 mM sucrose) 1200 μ l に加え、ポッター型ホモジナイザー (MS-STIRRER, Tokyo Rikakikai) により肝ホモジネートを作製した。また、成熟脂肪細胞についても同様に操作し、ホモジネートを作製した。肝臓または細胞のホモジネートを超遠心法 (Figure 17) により、核・ミトコンドリア画分 (Nuc/Mt)、ミクロソーム画分 (Ms) 及び細胞質画分 (Cyt) に分画した。核・ミトコンドリア画分及びミクロソーム画分のペレットは、プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む TES buffer 500 μ l に懸濁した。ミクロソーム画分については、最終濃度が 1% となるように Triton X-100 を加えた後、必要に応じて最終濃度が 5% となるように saponin を加えた。Triton X-100 処理ミクロソーム画分は、4°C、30 分間インキュベートした。インキュベート後のミクロソーム画分を超遠心分離することにより、可溶性画分 (Sol) と不溶性画分 (Insol) に分画した (Figure 17)。不溶性画分は、プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む TES buffer 100 μ l に懸濁した。

<脂質ラフト/カベオラ画分の調製>

脂質ラフト/カベオラ画分の調製は、Caveolae/Rafts Isolation Kit (Sigma-Aldrich) を一部改変した方法により行なった。Western blot 用と Dot blot 用のサンプルの調製方法を以下に示す。

= Western blot 用サンプルの調製 =

10 cm dish に培養した 3T3-L1 成熟脂肪細胞の培地を、1 μ M ロジグリタゾン、10 μ g/ml インスリン、1% antibiotic-antimycotic solution 及び 10% FBS を含む DMEM 培地 4 ml に交換 24 時間後、細胞を PBS 5 ml で 3 回洗浄した。洗浄後の細胞にプロテアーゼ阻害剤カクテルを含む 1% Triton X-100 lysis buffer 300 μ l に懸濁させた。さらに、必要に応じて最終濃度が 5% となるように 10% saponin を含む lysis buffer を加え、4 $^{\circ}$ C、30 分間インキュベートした。次に、Kit のマニュアルに従って Opti-prep 密度勾配層を作製し、密度勾配遠心を行なった (Figure 17 参照)。遠心後、チューブの上から順に、420 μ l ずつをフラクション 1 ~ 8 として回収し、沈殿はプロテアーゼ阻害剤カクテルを含む 1% Triton X-100 lysis buffer 210 μ l に懸濁した。

= Dot blot 用サンプルの調製 =

Western blot 用サンプルの調製の場合と同様に、10 cm dish に培養した 3T3-L1 成熟脂肪細胞の培地交換 24 時間後、細胞を PBS 5 ml で 3 回洗浄し、PBS で 1000 倍希釈した CTB-HRP 溶液を 5 ml 加え、4 $^{\circ}$ C、1 時間インキュベートした。インキュベート後、細胞を PBS 5 ml で 3 回洗浄し、プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む 1% Triton X-100 lysis buffer 300 μ l に懸濁させた。さらに、必要に応じて最終濃度が 5% となるように 10% saponin を含む lysis buffer を加え、4 $^{\circ}$ C、30 分間インキュベートした。次に、Western blot 用のサンプルの場合と同様に Opti-prep を用いた密度勾配遠心法を行いフラクション 1 ~ 8 と沈殿を得た。プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む 1% Triton X-100 lysis buffer 210 μ l に懸濁し、回収した。

17. LPD1b-HA デリションタンパク発現ベクターの作製

本実験で用いた各 LPD1b-HA デリションベクターは、国立病院機構九州がんセンター瀧口総一博士より供与された。

18. Triton X-100 不溶性画分の局在ドメイン解析

コラーゲンコートされた 60 mm dish に HEK293FT 細胞を 2×10^6 cells の細胞数で播種し、12 時間培養した細胞を用いた。

LPD1 デリションタンパク発現ベクター 5 μ g 及び 150 mM NaCl 250 μ l をチューブに混合した。別に、jetPEI DNA in vitro transfection reagent (polyplus-transfection) 10 μ l と 150 mM NaCl 250 μ l をチューブで混合し、先の DNA の入ったチューブに合わせた。室温にて 30 分間放置後、この混合液を細胞に添加した。添加 24 時間後、細胞を PBS 1 ml で 3 回洗浄し、プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む TES buffer 450 μ l で回収した。回収した細胞懸濁液は、10% Triton X-100 50 μ l を加え、4 $^{\circ}$ C で 30 分間攪拌した後、4 $^{\circ}$ C、105,000 \times g で

1 時間遠心した。得られた上清を 1% Triton X-100 可溶性画分 (Sol) し、沈殿は 1% Triton X-100 不溶性画分 (Insol) とし、いずれも 1% Triton X-100 とプロテアーゼ阻害剤カクテルを含む TES buffer 100 μ l に懸濁した。

19. LPD1b 発現レトロウイルス及び LPD1-shRNA 発現レンチウイルスの作製

本実験で用いた LPD1b 発現レトロウイルス及び LPD1-shRNA 発現レンチウイルスは、国立病院機構九州がんセンター瀧口総一博士より供与された。

20. レトロウイルス及びレンチウイルスの感染

＜レトロウイルスの感染＞

4 well chamber slide あるいは 24 well plate に、3T3-L1 細胞を well あたり 2.5×10^4 cells で播種し、12 時間培養後、各 well でのポリブレン (Sigma-Aldrich) 濃度が 8 μ g/ml になるように調製したレトロウイルス液 200 μ l を加え、さらに 11 時間培養した。培養後、全量が 500 μ l になるように 10% FBS 含有 DMEM 培地を加え実験に使用した。

＜レンチウイルスの感染＞

24 well plate に、3T3-L1 細胞を well あたり 0.5×10^5 cells で播種し、12 時間培養後、well でのポリブレン濃度が 8 μ g/ml になるように調整した 100 MOI/ml DMEM (10% BSA 含有) のレンチウイルス液 200 μ l を加え、1 時間培養した。その後、11 時間培養後に well の全量が 500 μ l になるように 10% FBS 含有の DMEM 培地を加え実験に使用した。なお、遺伝子の発現解析及び GLUT4 の膜への移行量解析は、10 cm dish を用いて行った。10 cm dish の場合は、3T3-L1 細胞を dish あたり 3×10^6 cells/dish で播種し、以下の操作は、24 well plate の場合と同様に行った。

21. GLUT4 の膜への移行

10 cm dish で培養した 3T3-L1 成熟脂肪細胞は、PBS 5 ml で 3 回洗浄した後、無血清 DMEM 4 ml 培地に交換した。培地交換 23 時間後、細胞を PBS 500 μ l で 3 回洗浄し、2% BSA-KRPH buffer 4 ml を加え、40 分間培養した。なお、ウォルトマンニン (Sigma-Aldrich) を用いる場合は、2% BSA-KRPH buffer に 1 μ M ウォルトマンニンを加えた。40 分後、最終濃度 1 μ M インスリン及び 1 μ M インスリン + 1 μ M ウォルトマンニンをそれぞれ含む 2% BSA-KRPH buffer 5 ml に交換し、20 分間放置した。4°C に冷やした PBS 5 ml にて細胞を 3 回洗浄し、プロテアーゼ及びフォスファターゼ阻害剤カクテルを含む TES buffer 500 μ l に懸濁させた。この懸濁させた細胞は、直ちにポッター型ホモジナイザーにより破碎し、ショ糖密度勾配遠心法 (Figure 30) を行い細胞膜 (PM) 画分を調製した。なお、密度勾配遠心法の最下層として Sucrose Cushion buffer (1.12 M sucrose, 20 mM

Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA) を用いた。

22. オリゴ DNA 配列合成

本研究においては、グライナージャパンで合成されたプライマーを使用した。その塩基配列は以下に示すとおりである。

<Real-time PCR>

FSP27-forward: 5'-ATGAAGTCTCTCAGCCTCCTG-3'

FSP27-reverse: 5'-AAGCTGTGAGCCATGATGC-3'

PPAR γ -forward: 5'-ACATCCCCACAGCAAGGCAC-3'

PPAR γ -reverse: 5'-CATGGCCATTGAGTGCCGAGT-3'

aP2-forward: 5'-GATGCCTTTGTGGGAACCTG-3'

aP2-reverse: 5'-GAATTCCACGCCAGTTTGA-3'

CD36-forward: 5'-GATGACGTGGCAAAGAACAG-3'

CD36-reverse: 5'-TCCTCGGGGTCCTGAGTTAT-3'

FAS-forward: 5'-GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT-3'

FAS-reverse: 5'-TGGGTAATCCATAGAGCCCAG-3'

SREBP1c-forward: 5'-GGAGGTGGTGATAGCCGGTAT-3'

SREBP1c-reverse: 5'-ACTGTCTTGGTTGTTGATGAGCTGGAGCAT-3'

PEPCK-forward: 5'-CATATGCTGATCCTGGGCATAAC-3'

PEPCK-reverse: 5'-CAAACCTTCATCCAGGCAATGTC-3'

G6Pase-forward: 5'-AACGCCTTCTATGTCCTCTTTC-3'

G6Pase -reverse: 5'-GTTGCTGTAGTAGTCGGTGTCC-3'

perilipin1-forward: 5'- TGCTGGATGGAGACCTC-3'

perilipin1-reverse: 5'- ACCGGCTCCATGCTCCA-3'

36B4-forward: 5'-AAACTGCTGCCTCACATCCG-3'

36B4-reverse: 5'-TGGTGCCTCTGGAGATTTTCG-3'

23. 統計解析

独立 2 群間の比較には student's t-test を用い、有意水準 5% 以下を有意な差とした。

引用文献

1. Green S, and Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: finding the orphan a home. *Mol Cell Endocrinol.* 1994;100(1-2):149-53.
2. Hihi AK, Michalik L, and Wahli W. PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(5):790-8.
3. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, and Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 1995;83(6):835-9.
4. Endo Y, Suzuki M, Yamada H, Horita S, Kunimi M, Yamazaki O, Shirai A, Nakamura M, Iso ON, Li Y, Hara M, Tsukamoto K, Moriyama N, Kudo A, Kawakami H, Yamauchi T, Kubota N, Kadowaki T, Kume H, Enomoto Y, Homma Y, Seki G, and Fujita T. Thiazolidinediones enhance sodium-coupled bicarbonate absorption from renal proximal tubules via PPARgamma-dependent nongenomic signaling. *Cell Metab.* 2011;13(5):550-61.
5. Rosen ED. The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005;73(1):31-4.
6. Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, and Spiegelman BM. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev.* 2002;16(1):22-6.
7. Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, and Shimomura I. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes.* 2003;52(7):1655-63.
8. Cesario RM, Stone J, Yen WC, Bissonnette RP, and Lamph WW. Differentiation and growth inhibition mediated via the RXR:PPARgamma heterodimer in colon cancer. *Cancer Lett.* 2006;240(2):225-33.
9. Sarraf P, Mueller E, Jones D, King FJ, DeAngelo DJ, Partridge JB, Holden SA, Chen LB, Singer S, Fletcher C, and Spiegelman BM. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat Med.* 1998;4(9):1046-52.
10. Lefebvre AM, Chen I, Desreumaux P, Najib J, Fruchart JC, Geboes K, Briggs M, Heyman R, and Auwerx J. Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nat Med.* 1998;4(9):1053-7.
11. Yang K, Fan KH, Lamprecht SA, Edelmann W, Kopelovich L, Kucherlapati R, and Lipkin M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist troglitazone induces colon tumors in normal C57BL/6J mice and enhances colonic carcinogenesis in Apc1638 N/+ Mlh1+/- double mutant mice. *Int J Cancer.* 2005;116(4):495-9.
12. Akiyama TE, Sakai S, Lambert G, Nicol CJ, Matsusue K, Pimprale S, Lee YH, Ricote M, Glass CK, Brewer HB, Jr., and Gonzalez FJ. Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1,

- ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Mol Cell Biol.* 2002;22(8):2607-19.
13. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, and Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem.* 1995;270(22):12953-6.
 14. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, and Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 1994;8(10):1224-34.
 15. Memon RA, Tecott LH, Nonogaki K, Beigneux A, Moser AH, Grunfeld C, and Feingold KR. Up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR-alpha) and PPAR-gamma messenger ribonucleic acid expression in the liver in murine obesity: troglitazone induces expression of PPAR-gamma-responsive adipose tissue-specific genes in the liver of obese diabetic mice. *Endocrinology.* 2000;141(11):4021-31.
 16. Rubin CS, Hirsch A, Fung C, and Rosen OM. Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J Biol Chem.* 1978;253(20):7570-8.
 17. Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, Yim SH, Gavrilova O, Ward JM, Brewer B, Jr., Reitman ML, and Gonzalez FJ. Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest.* 2003;111(5):737-47.
 18. Matsusue K, Kusakabe T, Noguchi T, Takiguchi S, Suzuki T, Yamano S, and Gonzalez FJ. Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPARgamma target gene Fsp27. *Cell Metab.* 2008;7(4):302-11.
 19. Danesch U, Hoeck W, and Ringold GM. Cloning and transcriptional regulation of a novel adipocyte-specific gene, FSP27. CAAT-enhancer-binding protein (C/EBP) and C/EBP-like proteins interact with sequences required for differentiation-dependent expression. *J Biol Chem.* 1992;267(10):7185-93.
 20. Keller P, Petrie JT, De Rose P, Gerin I, Wright WS, Chiang SH, Nielsen AR, Fischer CP, Pedersen BK, and MacDougald OA. Fat-specific protein 27 regulates storage of triacylglycerol. *J Biol Chem.* 2008;283(21):14355-65.
 21. Puri V, Konda S, Ranjit S, Aouadi M, Chawla A, Chouinard M, Chakladar A, and Czech MP. Fat-specific protein 27, a novel lipid droplet protein that enhances triglyceride storage. *J Biol Chem.* 2007;282(47):34213-8.
 22. Nishino N, Tamori Y, Tateya S, Kawaguchi T, Shibakusa T, Mizunoya W, Inoue K, Kitazawa R, Kitazawa S, Matsuki Y, Hiramatsu R, Masubuchi S, Omachi A, Kimura K, Saito M, Amo T, Ohta S, Yamaguchi T, Osumi T, Cheng J, Fujimoto T, Nakao H, Nakao K, Aiba A, Okamura H, Fushiki T, and Kasuga M. FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets. *J Clin Invest.* 2008;118(8):2808-21.
 23. Toh SY, Gong J, Du G, Li JZ, Yang S, Ye J, Yao H, Zhang Y, Xue B, Li Q, Yang H, Wen Z, and Li P. Up-regulation of mitochondrial activity and acquirement of brown adipose

tissue-like property in the white adipose tissue of fsp27 deficient mice. *PLoS One*. 2008;3(8):e2890.

24. Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Osuga J, Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Ishibashi S, and Yamada N. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem*. 1999;274(50):35832-9.
25. Vila-Brau A, De Sousa-Coelho AL, Goncalves JF, Haro D, and Marrero PF. Fsp27/CIDEA is a CREB target gene induced during early fasting in liver and regulated by FA oxidation rate. *J Lipid Res*. 2013;54(3):592-601.
26. He L, Sabet A, Djedjos S, Miller R, Sun X, Hussain MA, Radovick S, and Wondisford FE. Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein. *Cell*. 2009;137(4):635-46.
27. Kim JY, Liu K, Zhou S, Tillison K, Wu Y, and Smas CM. Assessment of fat-specific protein 27 in the adipocyte lineage suggests a dual role for FSP27 in adipocyte metabolism and cell death. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;294(4):E654-67.
28. Singh M, Kaur R, Lee MJ, Pickering RT, Sharma VM, Puri V, and Kandror KV. Fat-specific protein 27 inhibits lipolysis by facilitating the inhibitory effect of transcription factor Egr1 on transcription of adipose triglyceride lipase. *J Biol Chem*. 2014;289(21):14481-7.
29. Yamanaka K. 2008:Article of master degree.
30. Zhang EE, Liu Y, Dentin R, Pongsawakul PY, Liu AC, Hirota T, Nusinow DA, Sun X, Landais S, Kodama Y, Brenner DA, Montminy M, and Kay SA. Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nat Med*. 2010;16(10):1152-6.
31. Virtue S, Masoodi M, Velagapudi V, Tan CY, Dale M, Suorti T, Slawik M, Blount M, Burling K, Campbell M, Eguchi N, Medina-Gomez G, Sethi JK, Oresic M, Urade Y, Griffin JL, and Vidal-Puig A. Lipocalin prostaglandin D synthase and PPARgamma2 coordinate to regulate carbohydrate and lipid metabolism in vivo. *PLoS One*. 2012;7(7):e39512.
32. Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, and Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology*. 1994;135(2):798-800.
33. Lu M, Sarruf DA, Talukdar S, Sharma S, Li P, Bandyopadhyay G, Nalbandian S, Fan W, Gayen JR, Mahata SK, Webster NJ, Schwartz MW, and Olefsky JM. Brain PPAR-gamma promotes obesity and is required for the insulin-sensitizing effect of thiazolidinediones. *Nat Med*. 2011;17(5):618-22.
34. Simons K, and Gerl MJ. Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(10):688-99.
35. Simons K, and Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. 1997;387(6633):569-72.
36. Graham JM. Purification of lipid rafts from cultured cells. *ScientificWorldJournal*.

2002;2:1662-6.

37. VanRenterghem B, Morin M, Czech MP, and Heller-Harrison RA. Interaction of insulin receptor substrate-1 with the sigma3A subunit of the adaptor protein complex-3 in cultured adipocytes. *J Biol Chem.* 1998;273(45):29942-9.
38. Carlotti F, Bazuine M, Kekarainen T, Seppen J, Pognonec P, Maassen JA, and Hoeben RC. Lentiviral vectors efficiently transduce quiescent mature 3T3-L1 adipocytes. *Mol Ther.* 2004;9(2):209-17.
39. Leto D, and Saltiel AR. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(6):383-96.
40. Watson RT, and Pessin JE. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. *Recent Prog Horm Res.* 2001;56:175-93.
41. Brasaemle DL, Rubin B, Harten IA, Gruia-Gray J, Kimmel AR, and Londos C. Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem.* 2000;275(49):38486-93.
42. Gray S, Feinberg MW, Hull S, Kuo CT, Watanabe M, Sen-Banerjee S, DePina A, Haspel R, and Jain MK. The Kruppel-like factor KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. *J Biol Chem.* 2002;277(37):34322-8.
43. Kim S, Jung J, Kim H, Heo RW, Yi CO, Lee JE, Jeon BT, Kim WH, Hahm JR, and Roh GS. Exendin-4 Improves Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Regulating Glucose Transporter 4 Expression in ob/ob Mice. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2014;18(4):333-9.
44. Bligh EG, and Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959;37(8):911-7.
45. Saito K, Lee S, Shiuchi T, Toda C, Kamijo M, Inagaki-Ohara K, Okamoto S, and Minokoshi Y. An enzymatic photometric assay for 2-deoxyglucose uptake in insulin-responsive tissues and 3T3-L1 adipocytes. *Anal Biochem.* 2011;412(1):9-17.

謝辞

本研究は、福岡大学薬学部衛生化学教室 山野 茂 教授の終始変わらざる暖かい御指導と御鞭撻のもとに行われました。謹んで感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、終始御懇篤な御指導と激励を賜りました福岡大学薬学部衛生化学教室 松末 公彦 准教授に深甚なる謝意を表します。

御多忙の中、本論文を御閲いただきました福岡大学薬学部生化学教室 本田 伸一郎 准教授に深く感謝致します。

本研究にあたり多くの有益な御助言と御協力を頂きました国立病院機構九州がんセンター臨床研究部癌分子治療研究室 瀧口 総一 室長に深く感謝致します。また、折にふれ、研究上の示唆を与えてくださいました福岡大学薬学部衛生化学教室 喜多 秀樹 助教に深く感謝致します。また、本研究室大学院生 松尾 康平 氏をはじめとする衛生化学教室の学生諸子及び本研究を行うにあたりご協力いただきました全ての方々に深く感謝致します。

そして最後に、これまで私を温かく見守り、励ましてくれた家族に心より御礼申し上げます。