

トピックス

# 脂肪細胞分化におけるコアクチベーターCBPの機能解析

生研機構 肥満・脂質代謝制御研究プロジェクト

高橋信之

京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻栄養化学分野

河田照雄, 伏木 亨

## はじめに

ペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体 ( Peroxisome proliferator activated receptor ; PPAR )は生体内での脂質代謝系に重要な役割を担っている核内受容体である<sup>1)</sup>. PPAR は 1, 2, 3の3つのアイソフォームが同定されており, 1は免疫系臓器や消化管など比較的広い範囲で発現しているが, 3は大腸や脂肪組織のみに, 2は脂肪組織に特異的に発現している<sup>2, 3)</sup>. 脂肪細胞分化においてはこのPPAR の発現が重要であり, 繊維芽細胞株NIH3T3にPPAR 遺伝子を導入し過剰発現させることによって, 脂肪細胞様の表現型を示すようになることが報告されている<sup>4)</sup>. またPPAR ノックアウトマウスの解析から, この核内受容体が脂肪細胞分化・成熟過程に必須であることが明らかとなった<sup>5, 7)</sup>.

PPAR は, 高度不飽和脂肪酸やプロスタグランジンD2系列<sup>8, 9)</sup>, インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体などをリガンドとして活性化され, リボプロテインリパーゼや脂肪酸輸送担体( Fatty acid translocase ; FAT )などの標的遺伝子の発現を制御している. このとき共役因子と呼ばれ

る蛋白質が必要であることが最近, 明らかにされてきた<sup>10, 11)</sup>. なかでもコアクチベーターと呼ばれる共役因子はリガンド依存的にPPAR と相互作用し, 基本転写因子などの他の転写調節因子とPPAR とを橋渡しする重要な機能を持っていると考えられている( 図1 ). こうしたコアクチベーターの機能はルシフェラーゼアッセイや yeast two hybridなどの人工的な実験系で示されてきたが<sup>10, 11)</sup>, 実際に細胞内でPPAR の機能を制御し得るかどうかが, さらには細胞分化に直接, 影響を及ぼし得るかどうかについては不明であった. そこでわれわれは脂肪細胞

にも発現し, 複数の核内転写因子を複合体として協調的に機能させる働きを持つインテグレーターとも呼ばれる普遍的コアクチベーターであるCBP ( cAMP response element binding protein( CREB )binding protein )<sup>12)</sup>に着目し, リボザイムという新しい実験手法を用いて脂肪細胞内でのコアクチベーターCBPの機能解析を行った( 論文投稿中 ).

## 1. リボザイムによる特異的遺伝子破壊

リボザイムとはエンドヌクレアーゼ活性を持ったRNA分子の総称で, CoheやAltmanらにより同定され, 当初はリボヌクレアーゼPやテトラヒメナのmRNA自己切断過程など, 生体を持つリボザイムの解析が進められてきた<sup>13, 14)</sup>. しかしリボザイムの酵素活性を持っている部位の両側に特定の配列を持たせることで, その配列と相補的なmRNA分子を特異的に切断させることができるようになった<sup>15)</sup>. この汎用性リボザイムは, 塩基配列を基にしているため, 標的特異性がきわめて高く, アミノ酸レベルで非常に類似した遺伝子間においても数個の塩基配列

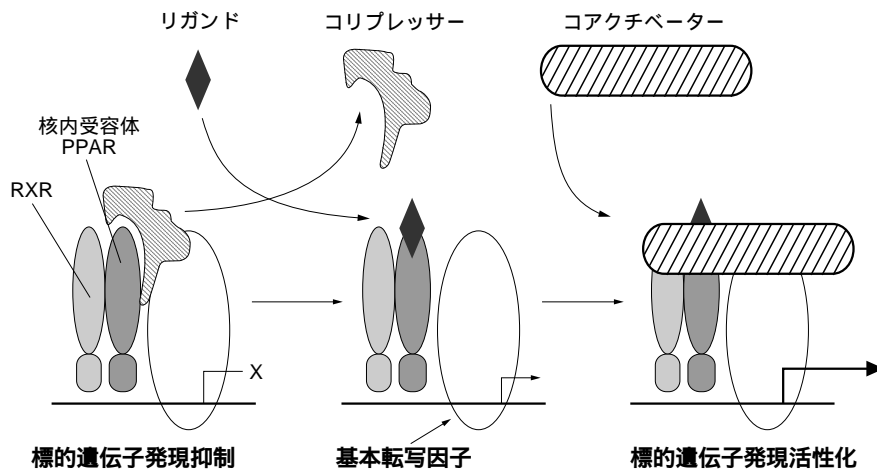


図1 共役因子と核内転写因子との相互作用 ( 亀井康富, 1998年より引用 )

の違いにより、選択的に目的の遺伝子 mRNAのみを切断し、蛋白質レベルでノックダウンすることが可能である。そこでわれわれは多比良和誠教授（東京大学工学研究科）らにより開発されたリボザイム高発現系をもとに、横山一成教授（理化学研究所）らにより作製されたマウスCBPに対するリボザイム<sup>16)</sup>を用いて、脂肪細胞にリボザイムを導入してCBPをノックダウンさせ、その機能解析を行った。

## 2. CBP ノックダウンによる脂肪細胞分化抑制

### (1) 実験系

CBPに対するリボザイム遺伝子 (RzCBP) をレトロウイルス発現ベクターであるpMX-puroに組み替え、リボザイム発現用レトロウイルスを作製した。この組み替えウイルスをマウス前駆脂肪細胞培養株である3T3-L1に感染させ、ピューロマイシンにて薬剤選択してリボザイム安定発現株を作製した(3T3-L1/RzCBP細胞)。ネガティブコントロールとして、リボザイム遺伝子上で酵素活性を持つ部位に点変異を導入した変異型リボザイム遺伝子 (mRzCBP) を用いて同様の操作を行い、変異型リボザイム安定発現株 (3T3-L1/mRzCBP細胞) を作製した。

CBPに対するリボザイムの効果を検討するため、リボザイムを発現させた細胞株を2日間コンフルエントな状態にした後、蛋白質サンプルを調製してウエスタンブロッティングを行った。リボザイム安定発現株3T3-L1/RzCBPでのCBP蛋白質は、コントロールである変異型リボザイム安定発現株3T3-L1/mRzCBPの約1/3程度にノックダウンされていることがわかった。

そこでこれら細胞株に分化誘導をかけ、CBP蛋白質ノックダウンの効果を検討した。6ウェル組織培養プレート

上に培養した細胞株を4日間、コンフルエントな状態にし、デキサメサゾン/IBMX/インスリンを含んだ分化誘導培地で40時間培養して、インスリン含有分化促進培地で2日ごとに培地交換した。分化促進培地で培養5日後に細胞を回収し、各種生化学アッセイならびにRT-PCRのためのサンプルを調製した。脂肪細胞分化の程度を検定する生化学アッセイとしては細胞内トリグリセリド濃度の測定、RT-PCRによる遺伝子発現定量では脂肪細胞の分化マーカーであるとともにPPAR $\alpha$ の標的遺伝子であることが明らかにされている脂肪細胞脂肪酸結合蛋白質(aP2)とリポプロテインリパーゼ(LPL)、腫瘍壊死因子(TNF $\alpha$ )を定量した。またPPAR $\alpha$ そのものの遺伝子発現も同時に定量した。

### (2) 結果と考察

3T3-L1/RzCBPではコントロールである3T3-L1/mRzCBPと比べて、細胞内トリグリセリド量が約1/5以下に低下していた。このことはリボザイム導入によるCBP蛋白質のノックダウンにより、3T3-L1細胞の分化が抑制されることを示している。さらにそれぞれの分化誘導後の細胞をOil-red O染色して細胞内の脂肪滴を染色することでもリボザイム導入による分化抑制効果が確認された。遺伝子発現においても3T3-L1/RzCBP細胞株はaP2、LPLともに約1/2に抑えられていた。これはリボザイムによるCBP蛋白質のノックダウンによってPPAR $\alpha$ の転写活性化能が低下したことを示唆している。またPPAR $\alpha$ そのものの発現も、約1/2に低下していた。PPAR $\alpha$ 遺伝子の発現低下は、PPAR $\alpha$ が自己フィードバックにより自分自身の遺伝子発現を活性化し得ることから、aP2やLPLの発現と同様に、PPAR $\alpha$ の活性低下によ

るものであると考えられる。一方で、TNF $\alpha$ の発現量はきわめて低く、両細胞間で差は認められなかった。TNF $\alpha$ は脂肪細胞の後期分化マーカーと考えられており、3T3-L1のような培養細胞系ではTNF $\alpha$ が発現してくるレベルまで十分に分化が進行していないためと考えられる。

## まとめ

脂肪細胞分化過程にはPPAR $\alpha$ のみならず、CAAT/エンハンサー結合蛋白質(CCAAT/enhancer binding proteins; C/EBPs)も関与していることが知られている。こうした核内転写調節因子のほとんどにCBP/p300がコアクチベーターとして機能することが報告されており<sup>17,18)</sup>、リボザイム導入によるCBP蛋白質のノックダウン効果が、脂肪細胞分化の中心的な役割を果たすPPAR $\alpha$ の活性化を抑えると同時に、脂肪細胞内での転写活性全般を低下させることで分化を抑制している可能性が考えられる。前述のように、これまで脂肪細胞分化に関与するさまざまな核内転写調節因子の機能にコアクチベーターCBPがかかわっていることが、ルシフェラーゼアッセイのような人工的な実験系で報告されてきた。しかしながら、実際にCBPが細胞内でPPAR $\alpha$ の標的遺伝子のプロモーター制御に関与し、細胞分化に影響を与えることがこれまで実証されておらず、そのことを示した実験は本報告が初めてである。今後、脂肪細胞においてPPAR $\alpha$ を中心に他の核内転写調節因子とのクロストークなど、コアクチベーターによる転写制御機構の詳細が明らかにされることが期待される。

参考文献

- 1) Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM : Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR $\gamma$ 2, a ligand-activated transcription factor. *Cell* 1994, 79, 1147-1156.
- 2) Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, et al. : Structural organization of mouse peroxisome proliferator activated receptor gene : Alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92, 7921-7925.
- 3) Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, et al. : Regulation of peroxisome proliferator activated receptor gamma expression by ADD1/SREBP1: Implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol* 1999, 19, 5495-5503.
- 4) Brun RP, Tontonoz P, Forman BM, et al. : Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes Dev* 1996, 10, 974-984.
- 5) Barak Y, Nelson MC, Ong ES, et al. : PPAR $\gamma$  is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 1999, 4, 585-595.
- 6) Kubota N, Terauchi Y, Miki H, et al. : PPAR $\gamma$  mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 1999, 4, 597-609.
- 7) Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, et al. : PPAR $\gamma$  is required for the differentiation of adipose tissue *in vivo* and *in vitro*. *Mol Cell* 1999, 4, 611-617.
- 8) Forman BM, Tontonoz P, Chen J, et al. : 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin  $J_2$  is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR. *Cell* 1995, 83, 803-812.
- 9) Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, et al. : A prostaglandin  $J_2$  metabolite binds PPAR and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 1995, 83, 813-819.
- 10) Mizukami J, Taniguchi T : The antidiabetic agent thiazolidinedione stimulates the interaction between PPAR and CBP. *Biochem Biophys Res Com* 1997, 240, 61-64.
- 11) Gelman L, Zhou G, Fajas L, et al. : p300 interacts with the N- and C-terminal part of PPAR $\gamma$ 2 in a ligand-independent and -dependent manner, respectively. *J Biol Chem* 1999, 274, 7681-7688.
- 12) Kamei Y, Xu L, Heinzl T, et al. : A CBP integrator complex mediates the transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 1996, 85, 403-414.
- 13) Guerrier-Takada C, Gradiner K, Mersh T, et al. : The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 1983, 35, 849-857.
- 14) Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, et al. : Self-splicing RNA : Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena. *Cell* 1982, 31, 147-157.
- 15) Haseloff J, Gerlach WL : Simple RNA enzymes with new and highly specific endonuclease activity. *Nature* 1988, 334, 585-591.
- 16) Kawasaki H, Eckner R, Yao TP, et al. : Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic acid-induced F9-cell differentiation. *Nature* 1998, 393, 284-289.
- 17) Oliner JD, Andresen JM, Hansen SK, et al. : SREBP transcriptional activity is mediated through an interaction with the CREB-binding protein. *Genes Dev* 1996, 10, 2903-2911.
- 18) Erickson RL, Hemati N, Ross SE, et al. : p300 coactivates the adipogenic transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein. *J Biol Chem* 2001, 276, 16348-16355.