

博士論文

論文題目 モデル生物を用いた
新規脂質代謝制御因子の探索・高次機能解析

氏名 鴨志田 祐己

目次

略称	3
序論	6
第一章 ショウジョウバエ核内受容体 EcR をモデルとした新規脂質代謝制御因子群の探索の試み	
第一節 緒言	25
第二節 実験方法	26
第三節 実験結果	34
第四節 考察	48
第二章 新規 RNA 結合タンパク質 D8 による寿命・代謝制御機構の解明	
第一節 緒言	53
第二節 実験方法	54
第三節 実験結果	76
第四節 考察	126
参考資料	137
引用文献	138
要旨	154
謝辞	158

略称

adp	adipose
AMPK	AMP-activated protein kinase
AP	Alkaline phosphatase
aP2	Adipocyte P2, fatty acid binding protein 4
APS	Ammonium persulfate
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATF6	Activating transcription factor 6
ATP	Adenosine triphosphate
BAT	Brown adipose tissue
BiP	Immunoglobulin heavy chain-binding protein
BPB	Bromo phenol blue
BSA	Bovine serum albumin
C/EBP	CCAAT / enhancer-binding protein
cAMP	Cyclic AMP
CBP	CREB binding protein
CHOP	C/EBP homologous protein
CMV	Cytomegalovirus
CREB	Cyclic AMP response element binding protein
db	diabetes
DBD	DNA binding domain
Dex	Dexamethazone
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dMyc	drosophila Myc
DTT	Dithiothreitol
EcR	Ecdysone receptor
EcRE	Ecrysone Response element
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
epi	Epididymal fat
ER	Endoplasmic reticulum
ERAD	ER-associated degradation
ERSE	ER stress response element
FAS	Fatty acid synthase
FB	Fat body

FBS	Fetal bovine serum
FFA	Free fatty acid
FL	Flag
Foxo1	Forkhead box O 1
FXR	Farnesoid X receptor
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
GR	Glucocorticoid receptor
GTT	Glucose tolerance test
HDL	High-density lipoprotein
Het	Hetero mouse(mice)
HFD	High fat diet
HRP	Horse radish peroxidase
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthine
IGF1	Insulin-like growth factor 1
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
IR	Inverted repeat
IRE1	Inositol-requiring enzyme 1
IRES	Internal ribosomal entry site
IRS	Insulin receptor substrate
ITT	Insulin tolerance test
JNK	C-jun N-terminal kinase
KH	K homology
KO	Knock out mouse(mice)
LBD	Ligand binding domain
LDL	Low-density lipoprotein
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MEF	Mouse embryonic fibroblast
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MurA	Muristerone A
N-CoA	Nuclear receptor corepressor
NEFA	Non-esterified fatty acid
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
P/St	Penicillin / streptomycin
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis

PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEI	Polyethylenimine
PERK	PKR (protein kinase R)-like endoplasmic reticulum kinase
PGC-1 α	PPAR γ coactivator-1 α
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PPRE	PPAR response element
PVDF	Polyvinyliden difluoride
RING	Really Interesting New Gene
RT	Reverse transcription
SDS	Sodium dodecyl sulfate
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
SNP	Single nucleotide polymorphism
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein
Sub	Subcuneou fat
SVC	Stromal-vascular cells
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl- ethylenediamine
TG	Triacylglycerol, triglyceride
Tg	Thapsigargin
TGF- β	Transforming growth factor- β
Tk-B	Total ketone bodies concentration
Tm	Tunicamycin
TNF α	Tumor necrosis factor α
TRAP	thyroid hormone receptor-associated protein
UAS	Upstream Activating Sequence
UCP1	Uncoupling protein 1
UPR	Unfolded protein response
WAT	White adipose tissue
WT	Wild type mouse(mice)
XBP1	X-box binding protein 1

序論

・ メタボリックシンドローム (metabolic syndrome)

過剰な内臓脂肪蓄積によってもたらされる肥満症は、糖尿病、高血圧、脂質異常症といった生活習慣病を引き起こしやすいことが統計学的に知られている。これらの疾患が一個人に 3 個以上集積した場合の心血管疾患危険率は、疾患を持たない場合の 30 倍以上に達するとも言われている。このように内臓脂肪型の肥満によって複数の疾患が個人に集積した状態は、メタボリックシンドロームと呼ばれる概念で近年定着している (1)。2005 年、厚生労働省はメタボリックシンドロームの診断基準を発表し、効率よくリスクの高い対象者を抽出することで効果的な生活習慣病改善支援を行う上での重要な概念を提示した。その診断基準を下に記載するが、その診断基準（特に①の腹囲に関して）の科学的根拠が不足していることに対して、近年大きな議論を呼んでいる。

- ① 腹囲（ウエストサイズ）：男性 85 cm 以上、女性 90 cm 以上
- ② 血圧：上が 130 mmHg 以上または下が 85 mmHg 以上
- ③ 血糖値：空腹時血糖値 110 mg / dL 以上
- ④ 血中脂質：中性脂肪 150 mg / dL 以上

または HDL (high-density lipoprotein) コレステロール 40 mg /dL 未満

厚生労働省の平成 24 年人口動態統計では、動脈硬化性疾患が全死亡原因のうち、がんに匹敵する約 30%（心疾患 19.9%、脳血管疾患 12.1%）を占め、2007 年国民健康・栄養調査では、40～74 歳の中老年男性において実に 2 人に 1 人もの割合でメタボリックシンドロームおよびその予備軍であると報告されている。さらに、肥満は腎疾患や免疫応答の活性化による炎症発症を引き起こし、全身の代謝異常に影響を及ぼすことが知られている。食の欧米化、高齢化が進行している現代社会において肥満症を頂点とした生活習慣病が今後ますます増加することはもはや避けられない状況であり、それら疾患の予防および治療の目的とした機能性食品の創製や新薬の開発のため、脂質代謝の分子機構を解明することは急務となっている。

・ 脂肪細胞の種類および機能

ヒトの生体内で占める脂肪組織の重量比は健常者で約 20%、肥満患者では 30-40%にも達することが分かっている。全身の脂肪細胞の数は、約 300 億個程

度であると考えられている。脂肪細胞には褐色脂肪細胞 (brown adipose tissue; BAT)・白色脂肪細胞 (white adipose tissue; WAT) という形態・機能の異なる二種類の細胞が存在する。褐色脂肪細胞は腎周囲や肩甲間に存在し、遊離した脂肪酸を自らの細胞内で酸化分解して脱共役タンパク質 (uncoupling protein 1; UCP1) を介してエネルギーを消費するという生理機能を持つ (2, 3)。これまで、褐色脂肪細胞はヒトの成人には存在しないと考えられてきたが、寒冷刺激など褐色脂肪細胞が活性化する条件下において成人でも存在が認められ、肥満治療・予防のためのターゲットとして位置づけられている (4)。

一方、白色脂肪細胞は皮下脂肪組織と内臓脂肪組織に多く存在し、余剰のエネルギーをトリアシルグリセロール (triacylglycerol; TG) を主成分とする中性脂質として脂肪滴の形で蓄積し、必要に応じてそれを分解して遊離脂肪酸 (free fatty acid; FFA) を血中に放出するという役割を果たす。またレプチンやアディポネクチンなどの液性因子を介してエネルギー代謝を制御する役割も担っており、適正な量および質の脂肪組織の存在は、生体内でのエネルギーバランスの恒常性を保つためには必要不可欠である (5, 6)。

一般に、肥満とは脂肪細胞の数の増加・肥大化による脂肪組織の過剰蓄積状態と定義される。特に内臓脂肪型の肥満では健康障害を起こしやすく、肥満者の内臓脂肪組織中の白色脂肪細胞は、インスリン受容体やその下流に位置する IRS-1 (insulin receptor substrate-1) の発現量および感受性が低いことによるインスリン抵抗性が認められ、 β アドレナリン受容体の高発現やカテコールアミン系シグナル伝達による脂肪分解活性が亢進していることが報告されている (1)。複数の代謝異常を合併した内臓脂肪型の超肥満者ではわずか数キログラムの減量が種々の代謝パラメーターを劇的に改善すること (7) から、内臓脂肪組織が全身の代謝異常に及ぼす影響の大きさが窺える。

・脂肪細胞分化のマスターレギュレーター：PPAR γ

脂肪細胞の形成は、中胚葉系の多能性幹細胞が前駆脂肪細胞へ決定される過程を経た後、前駆脂肪細胞が増殖を終え G₀/G₁ 期で細胞周期が停止した後に分化誘導因子で刺激されることで、クローン増殖 (clonal expansion) と呼ばれる数回の細胞増殖段階を経て成熟脂肪細胞へと分化すると考えられている (8)。脂肪細胞分化を制御する分子・シグナル伝達機構には、IGF1 (insulin-like growth factor 1) / インスリンによる PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) 経路 (9, 10)、p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 経路 (11)、PG (prostaglandin) I₂ による cAMP (cyclic AMP) / PKA (protein kinase A) 経路 (12, 13)、Dexamethazone による GR (glucocorticoid receptor) を介した経路 (14) などが存在し、これらのシグナルが複雑に絡み合っ

因子カスケードを形成しているというモデルが提唱されている。マウス前駆脂肪細胞である 3T3-L1 細胞は脂肪細胞分化のモデルとして広く用いられている株化細胞であり、その分化誘導はインスリン、GR の合成アゴニストであるデキサメタゾン、および PDE (phosphodiesterase) の活性を抑制することで細胞内 cAMP 濃度を増加させる IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine) がそれぞれ用いられる (8)。IBMX の代わりに forskolin などアデニル酸シクラーゼの活性化剤を用いて細胞内 cAMP 濃度を増加させても、分化は誘導される。PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) は脂肪細胞分化の転写カスケードの中心に位置すると考えられており、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターと呼ばれている (15)。PPAR γ は核内受容体型の転写因子であり、同じく核内受容体型の転写因子、RXR α (retinoid X receptor α) とヘテロダイマーを形成し、DR-1 (direct repeat-1) 配列 (コンセンサス配列: 5'-AGGTCANAGGTC A-3') である PPAR 応答配列 (PPAR response element ; PPRE) に結合することで転写を制御する (16)。PPAR サブファミリーには α , δ , γ の三種類が知られているが、PPAR γ のみが脂肪組織で高発現している (17)。PPAR γ を線維芽細胞に強制発現させると脂肪細胞分化が誘導され (16)、PPAR γ ノックアウトマウス由来胚性線維芽由来細胞では脂肪細胞分化が誘導されない (18)。また PPAR γ には二種類のスプライシングバリエーションが存在し、PPAR γ 2 は脂肪組織特異的に発現するのに対し、PPAR γ 2 よりも N 末端の 30 個のアミノ酸が短く、その転写活性化能も弱い PPAR γ 1 は脂肪組織以外にも小腸、肝臓、マクロファージ、副腎などでも発現している (19)。PPAR γ 標的遺伝子には aP2 (adipocyte P2) (15)、LPL (lipoprotein lipase) (20)、FATP (fatty acid transporter protein) (21)、adiponectin (22)、perilipin (23)、Fsp27 (fat-specific protein of 27 kDa) (24) などが報告されている。また PPAR γ を転写レベルで誘導する上流の因子には C/EBP (CCAAT / enhancer-binding protein) ファミリー (C/EBP β , C/EBP δ , C/EBP α) (25) や LXR α (liver X receptor α) (26)、KLF5 (krüppel-like factor 5) (27) などが知られている。これらの分子も PPAR γ と同様に脂肪細胞特異的な遺伝子群の発現を誘導するため、脂肪細胞分化を制御するための重要な因子であるとされている (Fig. A)。C/EBP ファミリーのうち、CHOP (C/EBP homologous protein) (C/EBP ζ) と C/EBP γ は他の C/EBP ファミリーのドミナントネガティブ体として働き、C/EBP β の機能を抑制する (28, 29)。上記以外にも脂肪細胞分化を促進する転写因子は様々に報告されており、STAT5 (signal transducers and activators of transcription 5) (30) や KROX20 (krüppel box 20) (31)、KLF15 (32)、概日リズムを制御する BMAL1 (brain and muscle arnt-like protein-1) (33) などが挙げられる。PPAR γ のリガンドには、合成リガンドである pioglitazone などのチアゾリジン誘導体や (34)、内因性リガンド

である 15d-PGJ₂ (35)、酸化 LDL 中に含まれる hydroxyocta-decadienoic acid (9-HODE、13-HODE) (34, 36) などが知られている。チアゾリジン誘導体は II 型糖尿病治療薬として臨床的に用いられており、その作用機序は、PPAR γ の活性を高め、脂肪細胞への分化を促進することで小型脂肪細胞の数を増やし、一方で肥大化した成熟脂肪細胞にアポトーシスを誘導することで大型化した成熟脂肪細胞を小型脂肪細胞へと置き換えるというものであり、その結果、肥大化した脂肪細胞からの FFA や TNF α (tumor necrosis factor α) の産生が抑制され、インスリン抵抗性が改善されると考えられている (37)。さらにその後、インスリン抵抗性を改善する他の作用機序として、グリセロールキナーゼの発現を脂肪細胞に誘導することで、TG の合成に必須なグリセロール-3-リン酸がグリセロールから合成されるのを促進し、そのため一度分解された TG の再合成が起こりやすくなるために血中への FFA の放出が抑制されるという説も述べられた (38)。また、PPAR γ は PGC-1 (PPAR γ coactivator-1) α/β (39, 40) や CBP (CREB (cAMP response element binding protein) binding protein) (41)、p300 (42) などを転写共役因子とすることや、転写共役因子複合体の構成分子である TRAP (thyroid hormone receptor-associated protein) 220 / DRIP (vitamin D3 receptor interacting protein) 205 (43) が PPAR γ 2 の転写活性を高めることが報告されている。また PPAR γ の転写活性や発現誘導を抑制する因子には、clonal expansion 時に活性化して細胞周期を制御する転写因子である E2F4 (44) やサイクリン D1 (45)、GATA (globin transcription factor) -2, 3 (46)、Pref-1 (preadipocyte factor-1) (47)、KLF2 (48) が知られている。

また、PPAR γ は NF- κ B や AP-1 など、他の転写因子の活性を DNA 非依存的な方法で抑制することで炎症反応性遺伝子群の転写を抑制することが知られている。この現象は PPAR γ のリガンド依存的に起こることから、チアゾリジン誘導体による抗炎症反応作用を説明するものと考えられている。この分子メカニズムについてはまだ十分に解明されていないものの、近年、リガンド依存的に PPAR γ の LBD (ligand binding domain) が SUMO (small ubiquitin-like modifier) 化を受ける報告がなされ (49)、SUMO 化を受けた PPAR γ は iNOS (inducible nitric-oxide synthase) プロモーターのコリプレッサー複合体を安定化させることでその発現を抑制することから、PPAR γ による転写活性抑制効果を説明しうるものではないかと期待されている。

・インスリンシグナル

インスリンは分子の質量が約 5.8 kDa のタンパク質であり、生体のエネルギー貯蔵、供給システムの制御を司り、血糖値の恒常性維持に重要な役割を果たすホルモンである。インスリン作用システムの破綻はインスリン抵抗性と呼ば

れ、糖尿病の病態を最も特徴づける要素の一つとなる。インスリンのエネルギー代謝調節作用は、主にインスリン感受性臓器である肝臓や脂肪組織、骨格筋に発現しているインスリン受容体を介して発揮される。インスリンがインスリン受容体の α サブユニットに結合すると、受容体のチロシン残基の自己リン酸化を生じ、受容体のキナーゼ活性が亢進する (50)。活性型となったインスリン受容体は IRS の PH (plekstrin homology) ドメイン、PTB (phosphotyrosine binding) ドメインを介して IRS と結合し、さらに PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) がリン酸化 IRS に結合することで活性化する (51)。一方、活性型となったインスリン受容体は Shc (*src* homology 2 domain containing) のリン酸化を誘導し、Grb2 (growth factor receptor bound protein 2) /Sos (son of sevenless) の複合体が Ras (rat sarcoma viral oncogene) の活性化から MAPK (mitogen-activated protein kinase) の活性化を惹起する (52)。MAPK ファミリー分子には古典的 MAPK、JNK (c-jun N-terminal kinase) /SAPK (stress-activated protein kinase)、p38、ERK5 (extracellular signal-regulated kinase 5) /BMK1 (big mitogen-activated protein kinase 1) の 4 種類が存在するが、脂肪細胞分化に関しては、インスリンは p38 MAPK を活性化し、増強作用を持つことが報告されている (53)。一方、インスリンは PI3K 経路も活性化して、脂肪細胞分化や代謝調節を制御する。PI3K は分子量 110 kDa の触媒サブユニットと分子量 50~85 kDa の調節サブユニットからなる脂質リン酸化酵素であり、ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸のイノシトール環の D3 位をリン酸化し、ホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸を生成する (54)。産生されたホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸は PDK1 (3-phosphoinositide dependent protein kinase 1) を活性化させ、さらに下流の Akt (55) や p70S6K (70 kDa ribosomal protein S6 kinase) (56)、atypical PKC (protein kinase C) (57)、mTOR (mammalian target of rapamycin) (58) といったエフェクタータンパク質の活性化が惹起される。これらの分子はタンパク質合成や細胞増殖に関わることが知られ、発癌との関連性も高い (59)。また、Forkhead 型の転写因子である Foxo1 は肝臓において PGC-1 α をコアクチベーターとして PEPCCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) や G6Pase (glucose-6-phosphatase) などの糖新生酵素の発現誘導に関わっているが (60)、Foxo1 が活性型 Akt によるリン酸化を受けると核から細胞質へと移行するとともに (61) PGC-1 α との相互作用が消失し (60)、その結果、糖新生系の遺伝子発現が抑制される。また PGC-1 α も自身のプロモーターに Foxo1 結合領域を持つため、Foxo1 の核外移行によって正に調節されていた発現が負に調節される (62)。従って、インスリンにより Foxo1、PGC-1 α の両者の活性が低下すると、肝臓における糖新生は著しく抑制される。加えて近年、CREB のコアクチベ

ターである TORC2 (transducer of regulated CREB activity 2) (63) が糖新生を担う重要な制御因子として着目されており、インスリンは SIK2 (salt-induced kinase 2) の活性化を介した TORC2 の 171 番目のセリン残基をリン酸化することでその活性を抑制し、その結果、糖新生は負に制御されることが報告されている (64)。

また、インスリンは肝臓において脂肪酸合成を促進する。これは、インスリン刺激によって活性化した PKC λ および Akt が、脂肪酸合成に関わる多くの酵素の発現を調節する転写因子、SREBP-1c の発現を亢進することによる (65, 66)。実際に、肝臓特異的な PKC λ の欠損マウスでは SREBP-1c の発現が低下し、肝臓の中性脂肪含量が低下することが報告されている (65)。また近年、Akt は SREBP-1c をリン酸化することでそのプロセッシングを亢進することが明らかにされた (67)。

脂肪細胞において、インスリンシグナルは Glut4 の細胞膜移行による糖取り込みの促進 (68)、中性脂肪の合成促進・分解抑制 (69)、および脂肪細胞の分化促進 (9, 10) といった機能を持つ。脂肪細胞中に取り込まれた糖は中性脂肪の合成に使用されるため、糖取り込みの促進は中性脂肪の合成につながる。また、中性脂肪の分解は、 β アドレナリン受容体刺激により cAMP 依存性キナーゼ (PKA) が活性化され、ホルモン感受性リパーゼ (HSL) が活性化されることで生じるが、インスリンはインスリン刺激により活性化した Akt が cAMP 分解酵素である PDE3B を活性化し、PKA の活性を阻害することによって中性脂肪の分解を抑制する (70)。脂肪細胞分化の促進効果については、恒常的活性型 Akt を 3T3-L1 細胞に発現させると PPAR γ および C/EBP α の発現が誘導され分化が進行すること (71)、mTOR の阻害剤である rapamycin を処理すると分化が阻害されること (72)、活性型 Foxo1 を強制発現すると脂肪細胞分化が抑制されること (73)、などが報告されている。

骨格筋においても、インスリンは脂肪細胞と同様に Glut4 を介して糖取り込みを促進する (74)。取り込まれた糖は肝臓と同様の機構でグリコーゲンに合成されるが、骨格筋ではグルコース-6-リン酸のグルコースへの転換を触媒するグルコース-6-リン酸脱リン酸化酵素を発現していないため、分解されたグリコーゲンは循環中にグルコースとして放出されずに、主に骨格筋自身のエネルギー源として使用される。またインスリンは多くの細胞でタンパク質合成を促進する作用を持ち、飢餓や糖尿病によってインスリン作用が低下した状態では、タンパク質合成の低下とタンパク質分解の促進により血中へのアミノ酸放出が増加する (75)。骨格筋は生体で最大のアミノ酸供給臓器としての作用を持ち、インスリン抵抗性状態における肝糖新生の増加は、アラニンやグルタミンなどの糖新生基質の増加も原因の一つになっていると考えられている (75)。

また一方、従来インスリンの標的臓器とは認識されていなかった臓器でもインスリン受容体は広く発現しており、これらの臓器におけるインスリンの役割とインスリンシグナルの重要性が解明されてきている。一例として、中枢神経系においてインスリンはレプチンによるシグナル経路を共有して摂食抑制を促す (76, 77)。また循環系に対しては腎尿細管に作用して水/ Na^+ の再吸収の促進や (78)、血管内皮においては血管新生の促進を行う (79)。

・カロリー制限、インスリンシグナルと寿命

摂取カロリーの制限を行うことによって寿命が延長されることが、線虫 (80) やハエ (81)、マウス (82) など広い生物種においてこれまでに見出されている。また、霊長目においても、多少論争は存在するものの寿命の延長が報告されている (83, 84)。過剰なエネルギーの摂取は酸化ストレスを増大し、これが細胞死を誘導し、寿命の短縮につながっていると考えられている (85)。一方で、摂取カロリーの制限により、細胞内のエネルギーが減少されると脱アセチル化酵素である Sirt /Sir family の活性が増加し、FOXO などの転写因子の脱アセチル化を介して転写活性を誘導し、寿命を延長させていると考えられている (86, 87)。このカロリー制限による寿命の延長に対して強く関与するのがインスリンシグナルである。インスリンシグナルは、線虫やハエの変異体を用いた実験から、寿命を短縮させる効果があると考えられてきた (88, 89)。しかしながら、ヒト・マウスにおいては、インスリンシグナルに対する同様の変異は重篤な糖尿病を惹起し、往々にして短命ないしは胎生致死を呈する (90)。この時の死因は、多くの場合はケトーシスによるものであると考えられる (91)。一方で IGF-1 受容体のヘテロ欠損マウスは、耐糖能の異常が認められながらも、寿命の延長が認められた (92)。これらのことから、インスリン・IGF-1 シグナルは哺乳類においても老化を促進し、寿命を短縮すると考えられている。また、脂肪組織特異的インスリン受容体のノックアウトマウスは肥満に対して抵抗性を有し、インスリン感受性の亢進・寿命の延長が認められた (93)。この場合、脂肪細胞におけるインスリンシグナルの抑制により寿命が延長されたか、耐糖能の改善のため血中インスリン量が減少したためか、もしくは、やせ型そのもののために寿命が延長しているのかは不明である。

肥満・メタボリックシンドローム状態において、インスリン抵抗性すなわちインスリンシグナルの減弱が認められる。このことは、一見個体の寿命を正に制御するかのように思えるが、実際は肥満状態において老化は促進され、寿命が短縮している。この矛盾は、肥満状態においては高インスリン血症状態にあるため、一部臓器・シグナル伝達経路においてインスリンシグナルが増強しているためではないかと考えられている。実際、肥満モデルマウスである db/db

マウスにおいて、肝臓では IRS-1 や IRS-2 などのインスリンシグナル伝達分子の発現やリン酸化は減少しているのに対して、網膜では、そのような低下は認められず、むしろ Erk や p38 MAPK の活性は増加していることが認められた (94)。また、肥満そのものによって増加する炎症系アディポカインや酸化ストレスが寿命を負に制御している可能性も考えられる (95-98)。また、近年、小胞体ストレス (99) や、ミトコンドリアストレス (100) も寿命ないしはカロリー制限に伴う寿命延長を制御していると報告されている。

・マクロファージと脂質代謝

マクロファージは白血球の一種であり、死んだ細胞やウイルスなどを食作用により取り込み消化する機能を持つ。近年、肥満状態における脂肪組織では、マクロファージの浸潤が増加していること、そして脂肪細胞に浸潤したマクロファージは炎症系サイトカインである $\text{TNF}\alpha$ や IL-6, IL-1 β などを分泌することが報告されている (101、102)。すなわち、肥満状態の脂肪組織は軽い炎症状態にあると考えられている。 $\text{TNF}\alpha$ の量は、肥満度やインスリン抵抗性と相関を持っており (103)、 $\text{TNF}\alpha$ に対する中和抗体はインスリン受容体の基質である IRS のセリンリン酸化の抑制を介してチロシンリン酸化を亢進させ、インスリン感受性を増加させることがわかっている (104)。この $\text{TNF}\alpha$ による IRS セリンリン酸化の分子機構には、 $\text{TNF}\alpha$ によって活性化される JNK や IKK- β (IkB kinase β) が関わっていると考えられている。一方で、 $\text{TNF}\alpha$ は SOCS-1, SOCS-3 を介して IRS のタンパク質量を減少させることによって、インスリンシグナルを抑制することが報告されている。

脂肪細胞へと浸潤してくるマクロファージは、元々は骨髄由来であると考えられており、肥満によって脂肪細胞で発現が増加した MCP-1 を中心としたケモカインがマクロファージを脂肪組織へと呼び込んでいるものと考えられている (105-107)。これまでのところ、なぜ肥満によって脂肪細胞でケモカインの発現が増加するのか、正確なところは分かっていないが、その可能性の一つとして、脂肪細胞の肥大化に伴って生じる酸化ストレス (108) や小胞体ストレス (109)、あるいは低酸素状態 (110) が原因ではないかと考えられている。肥満状態にある脂肪組織内のマクロファージは、非活性型 (M2) マクロファージよりも活性化型 (M1) マクロファージの存在量が多く (111)、このことがさらにインスリン抵抗性の獲得に寄与している。また、脂肪細胞から分泌される遊離飽和脂肪酸はマクロファージにおける炎症性変化を増大させ、 $\text{TNF}\alpha$ の分泌を行うことがマクロファージと脂肪細胞の共培養系の結果から示されている (112)。さらに、分泌された $\text{TNF}\alpha$ は脂肪細胞からの脂肪酸の分泌を促進することで、相互的に炎症性応答を高めあう、悪循環を形成していると考えられている (112)。

また、この悪循環には、転写因子 NF- κ B が関わっていることも報告されている (113)。

・小胞体ストレスと脂質代謝

小胞体はすべての真核生物において存在が認められ、脂質やタンパク質の合成を司る細胞内小器官である。分泌タンパク質や膜タンパク質の高次構造の形成や糖鎖付加などが正常に起こらず、異常な構造を持ったタンパク質が小胞体に蓄積すると、小胞体ストレスと呼ばれる負荷が小胞体にかかる (114)。小胞体ストレスが生じる生理的な要因は主に 3 種類に分類される。一つ目は、低酸素、酸化ストレス、飢餓、虚血などの環境ストレス、すなわち外的要因により小胞体の機能が低下した場合である。二つ目は、摂食時、ウィルス感染時、インスリン分泌時、抗体産生時などの内的ストレス、すなわち小胞体の機能は正常であるが、この処理能力以上のタンパク質の産生が要求される場合である。そして三つ目はアルツハイマー病、パーキンソン病、ポリグルタミン病などで見られるように、遺伝子変異により本来正常に折り畳まれ得ないタンパク質が産生される場合である。

小胞体ストレスが生じた場合、細胞は主に次の 4 種類の応答 (unfolded protein response; UPR) によってストレスに対応する (**Fig.B**) (115)。①まず、小胞体内の異常タンパク質を減少させるため、小胞体内の分子シャペロンやフォールディング酵素を転写レベルで誘導し、タンパク質のフォールディング容量の増加を図る。②次に、小胞体内に新たな異常タンパク質が産生されるのを防ぐため、タンパク質全般にわたる翻訳を抑制する。③さらに、小胞体から異常タンパク質を細胞質へ輸送し、ユビキチン・プロテアソーム系により積極的に分解、除去する。この反応は小胞体関連タンパク質分解機構 (ER-associated degradation; ERAD) と呼ばれる。④そしてこれらの応答でも異常が回復されない場合、細胞はアポトーシスを誘導して細胞死が行われる。しかし、どの程度ストレスがかかった場合にアポトーシスが誘導されるのかなど、どのタイミングで次の応答が起こるのかの詳細なメカニズムは、未だに分かっていない。

小胞体ストレスが誘導された場合に中心的な役割を果たすのが、小胞体膜タンパク質として知られる ATF6 (activating transcription factor 6)、IRE1 (inositol-requiring enzyme 1)、PERK (protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase) である (**Fig.B**) (115)。ATF6、IRE1、PERK はいずれも、小胞体ストレスが生じていない場合は、BiP (immunoglobulin heavy chain-binding protein) と呼ばれる分子シャペロンとタンパク質相互作用することで小胞体膜に局在し、不活性化状態を維持している (116)。これらのタンパク質は全身でユビキタスに発現することが分かっている。

現在、研究室レベルで使用されている小胞体ストレス誘導剤として、N 型糖鎖付加を阻害することで、タンパク質の正常な折りたたみを阻害する Tunicamycin や、ジスルフィド結合を阻害する DTT (dithiothreitol)、カルシウムトランスポーターを阻害することで小胞体内のカルシウムバランスを崩す Thapsigargin などがよく用いられている。逆に、小胞体ストレスを緩和する化学シャペロンとしては、4-phenyl butyric acid (PBA) や、taurine-conjugated ursodeoxycholic acid (TUDCA) などを用いることが多い。

また、臨床レベルで使用されている製薬の中にも小胞体ストレスをターゲットとしているものがある。例としてあげると、抗ガン剤である Thiazolidione は eIF2 α のリン酸化を亢進させることでタンパク質の翻訳を抑制し、細胞増殖を抑制させることで抗ガン剤としての機能を発揮している (117)。また、Salicylate は、PERK のリン酸化を介して eIF2 α をリン酸化し、タンパク質の翻訳を抑制させることで抗炎症作用をもたらしていることが判明した (118)。さらに、Salubrinal は eIF2 α の脱リン酸化を行うことで細胞内のウィルス増殖の抑制を図っている (119)。

小胞体ストレスと脂質代謝を結びつける報告は数年前までは多くはなされていなかった。確かに PERK KO マウスは強い糖尿病を呈するが、これはインスリンを分泌する膵 β 細胞が恒常的な小胞体ストレスによってアポトーシスを起こしたために、インスリン分泌が正常に行われなくなった結果の現象 (120) であり、直接的な作用ではなかった。しかし近年になり、マウス個体においてもヒトの臨床レベルにおいても肥満により肝臓や脂肪組織に小胞体ストレスがかかること (109,121-123)、この小胞体ストレスが、JNK のリン酸化を介して、IRS のセリン残基のリン酸化を誘導し、インスリン抵抗性をもたらすこと (124)、さらにこの肥満による小胞体ストレスを改善してやることで肥満によるインスリン抵抗性が改善することなどが報告され (124, 125)、小胞体ストレスと脂質代謝の関連を強く示唆されている (126)。また、肥満による小胞体ストレスはインスリンのみではなく、視床下部においてレプチン抵抗性を惹起するという報告もあり、その影響力の強さがうかがえる (127, 128)。

肥満によって小胞体ストレスが誘導される原因として、富栄養状態によるタンパク質合成の亢進、肥満によって増加した TG や遊離脂肪酸などの物質 (129, 130)、および肥満により発生した酸化ストレスや炎症性サイトカイン (131, 132) などが複合的に働いていると考えられている。また近年、肥満によりオートファージが減少することが肥満に伴って小胞体ストレスが発生する原因であることを提唱する報告もなされた (133)。

脂質代謝を行うタンパク質の中で、小胞体ストレスによって活性が制御されているもので最も有名なものが SREBP である。SREBP は、プロセッシングによ

って活性化を受けるが、小胞体ストレスにより、プロセシングが亢進されるという報告がなされた (134)。このプロセシング亢進の原因は、小胞体ストレスによってタンパク質の合成が抑制されたために、SREBP のプロセシングに対して抑制的に働く Insig タンパク質量が減少したため (135)、およびアポトーシスの際に生じた caspase のため (136) であると考えられている。しかし、小胞体ストレスによって、SREBP が活性化する生理的な意義、およびその寄与の大きさは未だ不明である。

その他に、UPR を構成するタンパク質が脂質代謝に対して与える機能も遺伝子改変技術の進歩とともに、少しずつ判明している。これまでに報告があったもので主なものを上げれば、XBP-1 が肝臓における脂質代謝を正に制御すること (137)、CHOP ノックアウトマウスが肥満を呈すること (138)、IRE1 β が MTP の mRNA を選択的に分解することによりカイロミクロン産生を阻害すること (139)、IRE1-XBP-1 経路が脂肪細胞分化には必須であること (140) などが次々と報告され、現在小胞体ストレスと脂質代謝のつながりは大きな注目を集めている。

・ Senescence と脂質代謝

テロメアの短縮や、酸化ストレス、DNA ストレスなどにより、細胞が正常に分裂を行えない状況に陥ったとき、細胞は Senescence と呼ばれる状態になり、細胞増殖を止める (141、142)。この応答は主に癌抑制遺伝子 p53 により制御されている。p53 は ATM によってリン酸化されることで活性化し、Senescence 応答遺伝子の転写を誘導する (143、144)。Senescence を起こした細胞は、細胞周期の G₁ 期で停止する。この細胞周期停止の分子機構は、Senescence によりサイクリン依存的キナーゼ (Cyclin dependent kinase: CDK) の阻害剤である CDK inhibitor が誘導されるためである。この CDK inhibitor が p16, p19 ARF であり、Senescence のマーカー遺伝子として用いられている (145)。Senescence は一般的には、癌に抑制に対して機能していると考えられてきたが、Senescence が誘導された細胞を選択的に除去すると、個体レベルの老化が抑制されることが報告され (146)、細胞レベルの Senescence が動物個体の老化・寿命に対して影響を与えることが示された。

近年、肥満によって内臓脂肪で p53 依存的に Senescence が誘導され、この Senescence がインスリン感受性の原因であると提唱する論文が報告された (147)。また、p53 family の一員で、Senescence を抑制する機能を持つ TAp63 (148、149) の欠損マウスは肥満の表現系を呈していた (150)。一方で、p53 は Malic enzyme の発現を抑制することで NADPH の合成を阻害し、脂肪の合成を抑制することが報告された (151)。また、p53 は褐色脂肪細胞の分化に必

須であり、肥満を抑制する機能があることが報告された (152)。このように、p53 そのものは肥満を誘導する方向に働くのか、抑制的に働くのかは未だ確かではない。しかしながら、少なくとも脂肪組織において、p53 によって誘導された Senescence はインスリン感受性の悪化を導くことが先の Minamino らの論文において主張されている (147)。

また、肥満が肝臓癌を誘発する機構は、肥満により腸内細菌の群性が変化し、肥満時の腸内細菌が分泌する Senescence 誘導物質による、と報告している論文もあり (153)、代謝と Senescence、癌のクロストークが注目されている。

・ D8 (Mex-3B)

D8 (Mex-3B) は Mex-3 family に属するタンパク質で、N 末端側に RNA 結合能を持つ KH domain を 2 つ、C 末端側にタンパク質複合体形成・ユビキチン化に関わる Ring domain を持ったタンパク質である。Mex-3 family は線虫からヒトまで強く保存されており、特に KH domain と Ring domain における相同性は極めて高い。ヒト、マウスにおいては Mex-3 family には Mex-3A から Mex-3D の計 4 種類が存在しており、それぞれ共通の KH domain, Ring domain を持ち、別々の遺伝子座よりコードされている。

D8 (Mex-3B) は当研究室において、p53, TGF β の新規標的因子として同定されてきた経緯を持つ。これまで D8 の機能として、Ago や 14-3-3 と結合を介して生殖細胞における極性の調節を行っていることが報告されている (154, 155) が、成熟した動物個体における機能はほとんど分かっていない。当研究室において、D8 はアポトーシス誘導因子 Bim の mRNA の 3'UTR に結合することで Bim mRNA を安定化させ、アポトーシスを誘導することを見出している (小田博士論文)。

他の Mex-3 family の中では、Mex-3C の研究が一番進んでいる。Mex-3C の欠損マウスは、IGF-1 の発現が低下しており、顕著な成長遅延が認められることが報告された (156)。また、熱産生が増加しているため、脂質蓄積量の減少が認められることも報告されていた (157) が、その分子機構は未知である。また、Mex-3A のノックダウンは近年、ヒトの胃がん細胞において、siRNA を阻害することで細胞の Proliferation や Migration を抑制することが示された (158)。また、Mex-3A は homeobox 遺伝子である CDX2 の 3' UTR に結合することで転写後調節を行い、小腸細胞内の幹細胞性や分化・増殖に寄与することも報告された (159)。

・ 核内受容体:エクダイソンレセプターとショウジョウバエ分子遺伝学

ショウジョウバエの核内受容体は約 20 種類単離されており、それらのほとん

どが脊椎動物においてホモログが存在している (160)。ショウジョウバエ核内受容体の代表例がエクダイソンレセプター (Ecdysone receptor, EcR) である。EcR はショウジョウバエの発生・分化の主要調整因子であるエクダイソンをリガンドとする核内受容体であり、同じく核内受容体である USP (Ultraspiracle) とヘテロダイマーを形成し、エクダイソン応答配列 (Ecdysone response element: EcRE) と呼ばれる DNA 配列を認識し、転写制御を行う (161)。EcR の代表的な標的遺伝子として、E74, E75 および BR-C などが知られている。EcR の哺乳類のホモログは、LXR および FXR (Farnesoid X receptor) であると考えられている (Fig. C)。EcR は DBD (DNA binding domain) と LBD (Ligand binding domain) において、LXR と FXR に対して高い相同性を持っており、それぞれに対して、DBD では、64%, 72%、LBD では 37 %, 28% の相同性を有している (161)。

リガンドと未結合状態における EcR/USP は、NCoR (Nuclear receptor co-repressor) /SMRT (Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor) のショウジョウバエホモログ、SMRTER (SMRT-related ecdysone receptor-interacting factor) と結合し、Sin3 (Switch independent 3) /HDAC (Histone deacetylase) 複合体をリクルートして、転写抑制状態を維持している (162)。エクダイソンが EcR に受容されると、EcR/USP は構造変化を起こし、p160 ファミリー、AIB1 (Amplified in breast cancer-1) のショウジョウバエホモログ taiman と結合し、dCBP (drosophila CREB-binding protein) /NEJ (Nejire) とともに HAT (Histone acetyltransferase) 活性により、転写を活性化する (163, 164)。また、TRAP80 (Thyroid hormone receptor-associated protein 80 kDa) などのショウジョウバエホモログは、EcR の転写制御において、メディエーターとして機能することが報告されている (165)。その他、Nurf (Nucleosome-remodeling factor) complex はその名の通り、クロマチンのリモデリングを介して EcR の転写を正に制御することが報告されている (166, 167)。

ショウジョウバエを研究材料として用いる有用性として最も挙げられるのが、分子遺伝学の発達である。特に、バランス遺伝子のおかげでショウジョウバエの分子遺伝学は著しい発展を遂げている。バランス遺伝子は、導入したい遺伝子の対立遺伝子側に用い、その特殊な立体構造により、相同組み換えを抑制する働きをもつ。それだけでなく、バランス遺伝子は、簡単な観察のみで、バランス遺伝子の有無が判断できるほか、多くのものが劣性致死を示すので、目的の遺伝子を保持したショウジョウバエを、Genotyping などによる遺伝子型の判別をすることなく見分けることが出来る。

このショウジョウバエ分子遺伝学を利用した例が、GAL4-IR (Inverted

repeats)を用いた RNAi による目的遺伝子のノックダウン法である (**Fig. D**)。GAL4-UAS システムを利用し、GAL4 line と UAS-IR line がかけ合わさった第一世代において、目的因子に対する RNAi が発現し、ノックダウンが行える。さらに、用いる GAL4 のプロモーターを変更するだけで、組織・時期特異的なノックダウンが行えるため、簡便に複数遺伝子をノックダウンする方法として適している。

・本研究の目的

生活習慣病の治療法の確立のためには、その分子機構を明らかにすることが必須である。また、生活習慣病研究においては、表現型を含めた動物個体レベルでの解析が極めて重要である。本研究では、ショウジョウバエとマウスという、2 種類のモデル生物を用いて、新規脂質代謝制御因子の探索系の構築と、機能未知因子が動物個体の代謝制御に与える影響を検討し、その分子機構の解明を目指した。

第一章では、ショウジョウバエの蛹化時における代謝の反転に着目した (**Fig. E**)。蛹化時には、これまで幼虫期では積極的に合成していた脂肪の酸化・消費を行う、という脂質代謝の反転が生じる。この蛹化を制御するのが、変態ホルモン・エクダイソンとその受容体 EcR である (161)。このことから、EcR はショウジョウバエにおいて脂質代謝制御を行うことが疑われるが、その分子機構は分かっていない。そこで、本研究では、ショウジョウバエの脂肪組織である Fat body に着目し、EcR による脂質代謝制御の分子機構を明らかにすることを目指した。さらに、この EcR をモデルとして、核内受容体の転写制御を介して脂質代謝の調節を行っている新規因子の探索用の、ショウジョウバエ分子遺伝学を利用した RNAi スクリーニング系の構築を試みた。

第二章では、RNA 結合タンパク質 D8 による代謝制御機構の解明を試みた。近年、miR などの non-coding RNA が代謝・寿命を制御すること (168、169)、ならびに RNA 結合タンパク質が結合 RNA の制御を介して代謝・寿命制御を行っていること (170、171) が数多く報告されており、大きな注目を浴びている。RNA 結合タンパク質の機能は、結合 RNA の安定性の調節、翻訳制御、核内/核外輸送、スプライシングの調節など、多岐に渡っている。本研究では、RNA 結合タンパク質 D8 の欠損雄マウスが寿命延長していることの発見を発端として、D8 欠損マウスは肥満抵抗性を有すること、ならびに D8 はインスリン感受性を制御することを見出し、その分子機構の解明を目指した。さらに、カロリー制限による寿命延長に対する D8 の寄与を検討すると同時に、D8 が肥満・糖尿病の治療の標的になりうるか否かの検討を試みた。

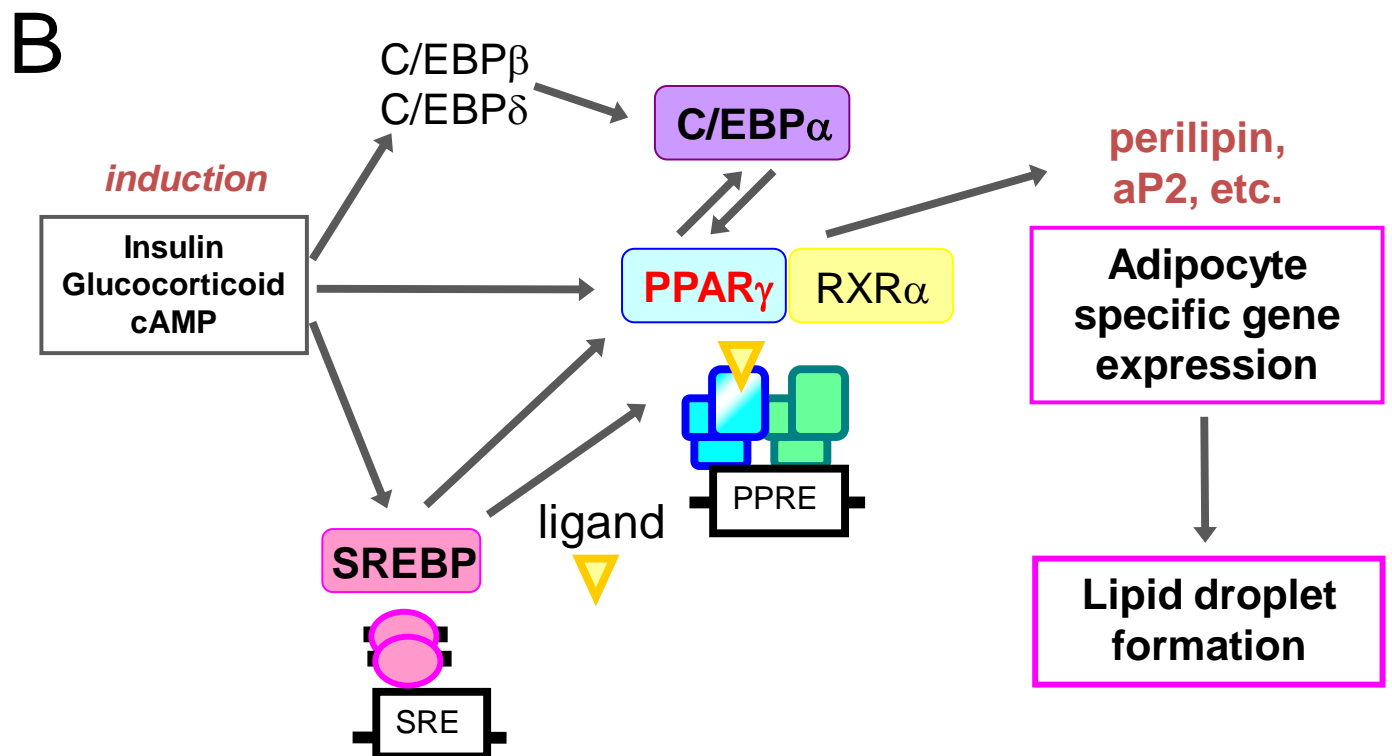
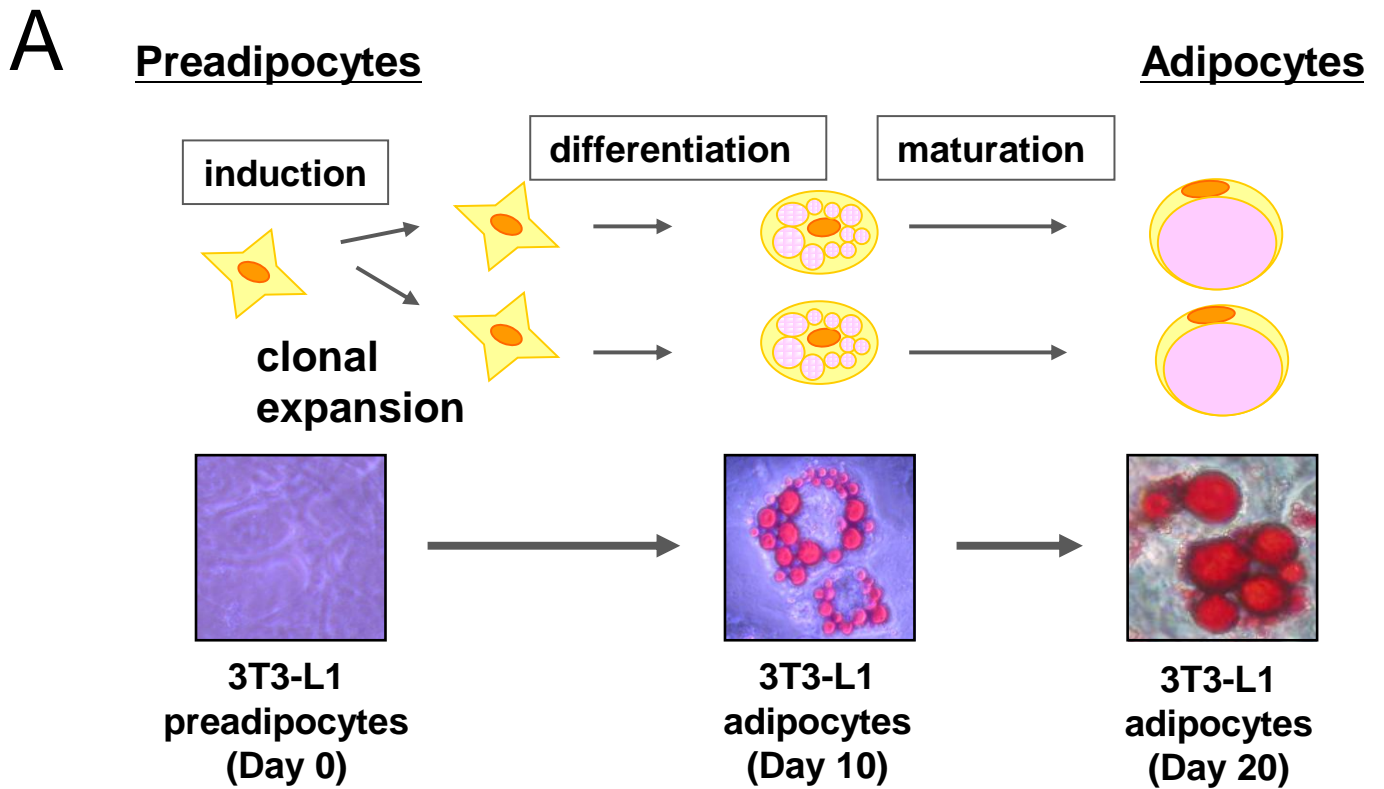


Figure. A. Schematic of the cascade for adipocyte differentiation.

A, 脂肪細胞分化の簡略図

B, 脂肪細胞分化を制御する主要な転写因子のまとめ図

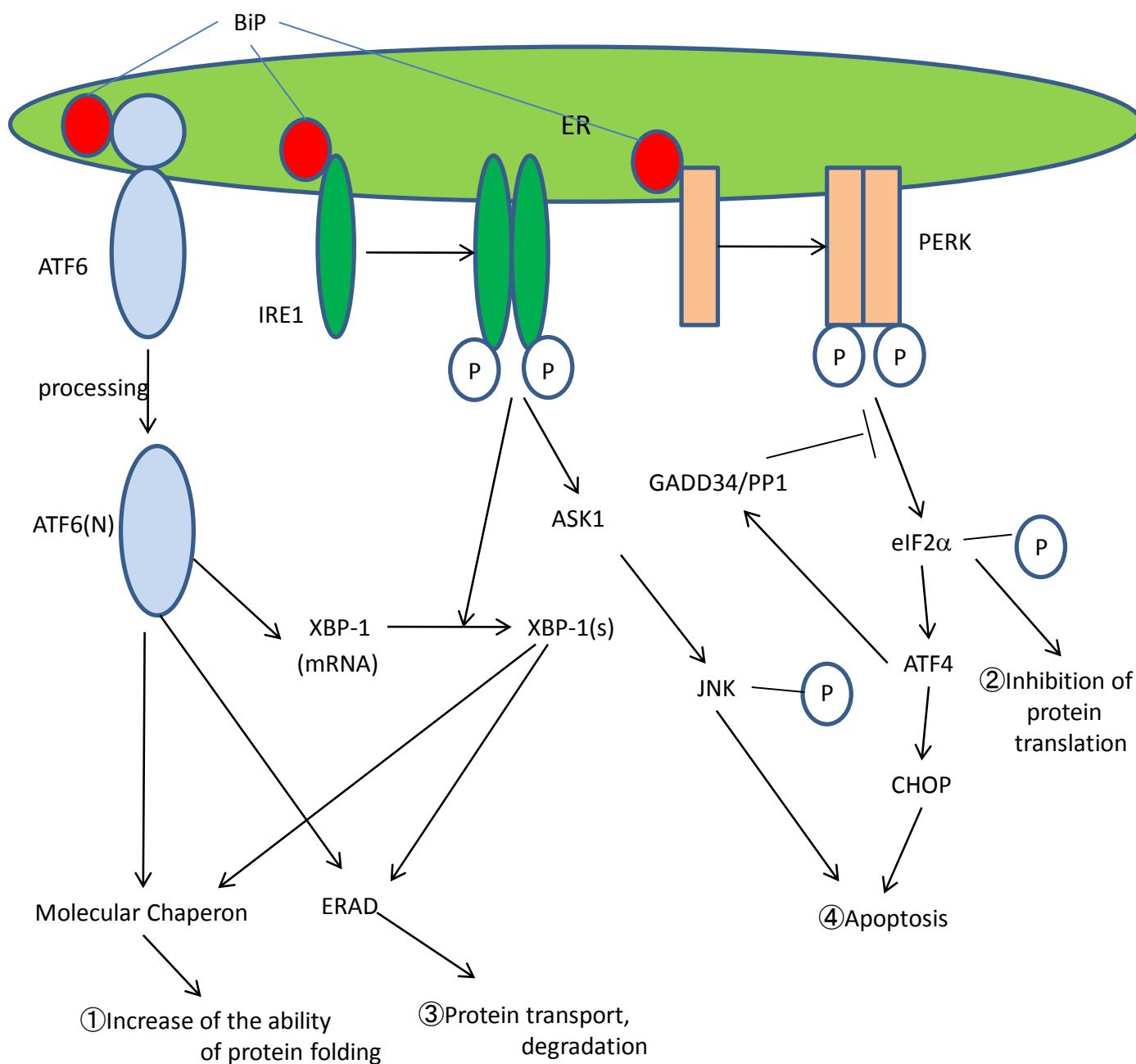


Figure B. Unfolded protein response (UPR) シグナルの簡略図

UPRはATF6, IRE1, PERKと呼ばれる3つの膜蛋白質によって制御されている。小胞体ストレス誘導の初期段階では、分子シャペロンの転写レベルの誘導によって、タンパク質のフォールディングを誘導すると同時に、eIF2αのリン酸化を介して、新規タンパク質の翻訳・合成を抑制する。中期段階では、ERADと呼ばれるタンパク質の積極的輸送・分解が促進される。最終段階では、JNKを介して細胞死が誘導される。

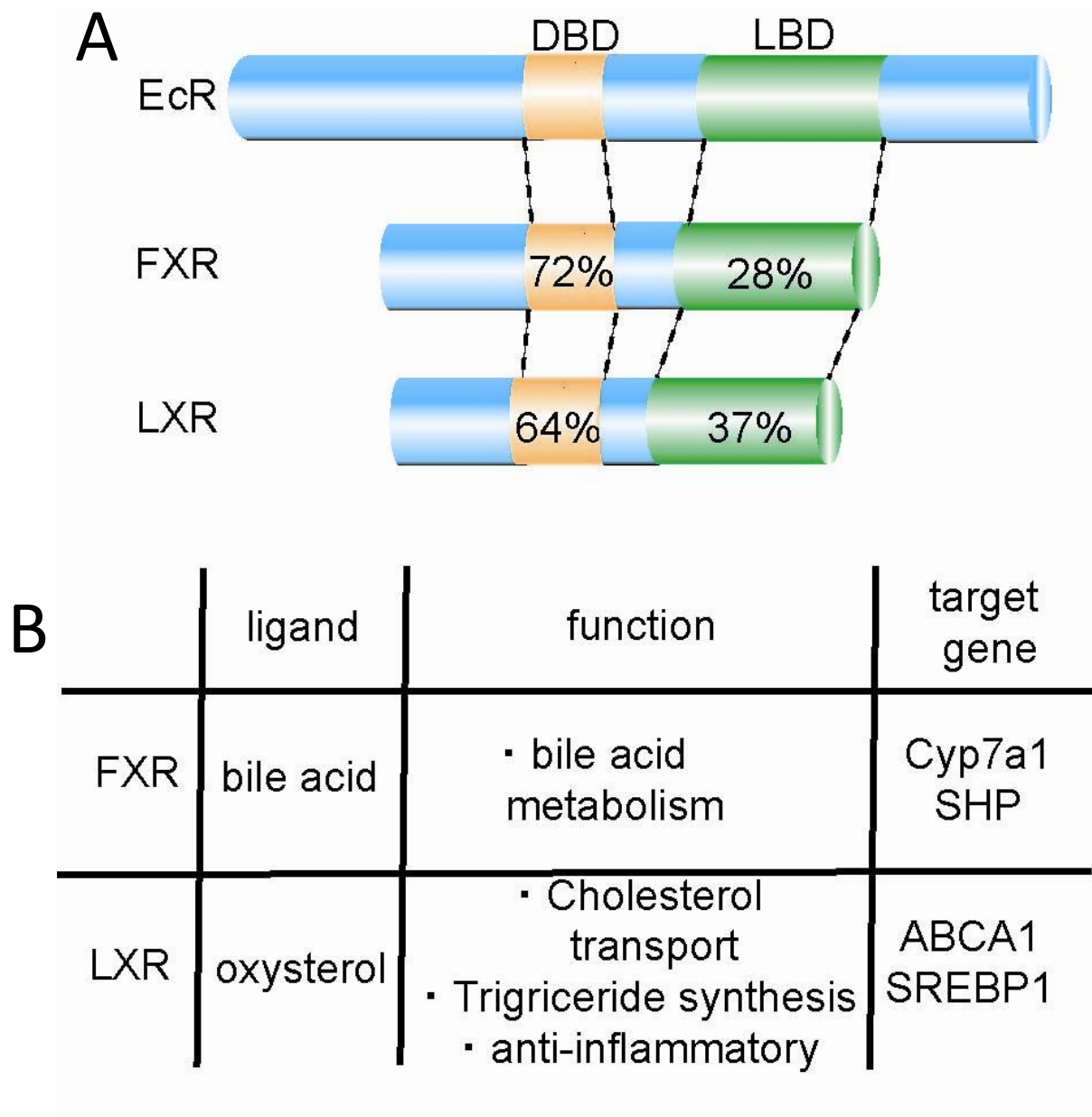


Figure C. EcRはLXR, FXRのショウジョウバエホモログである

- A. EcR, LXRとFXRの簡便な模式図を示した。
 B. FXRとLXRの機能を簡便にまとめた。

♀ GAL4 expression line ♂ UAS-Inverted repeat(IR) expression lines

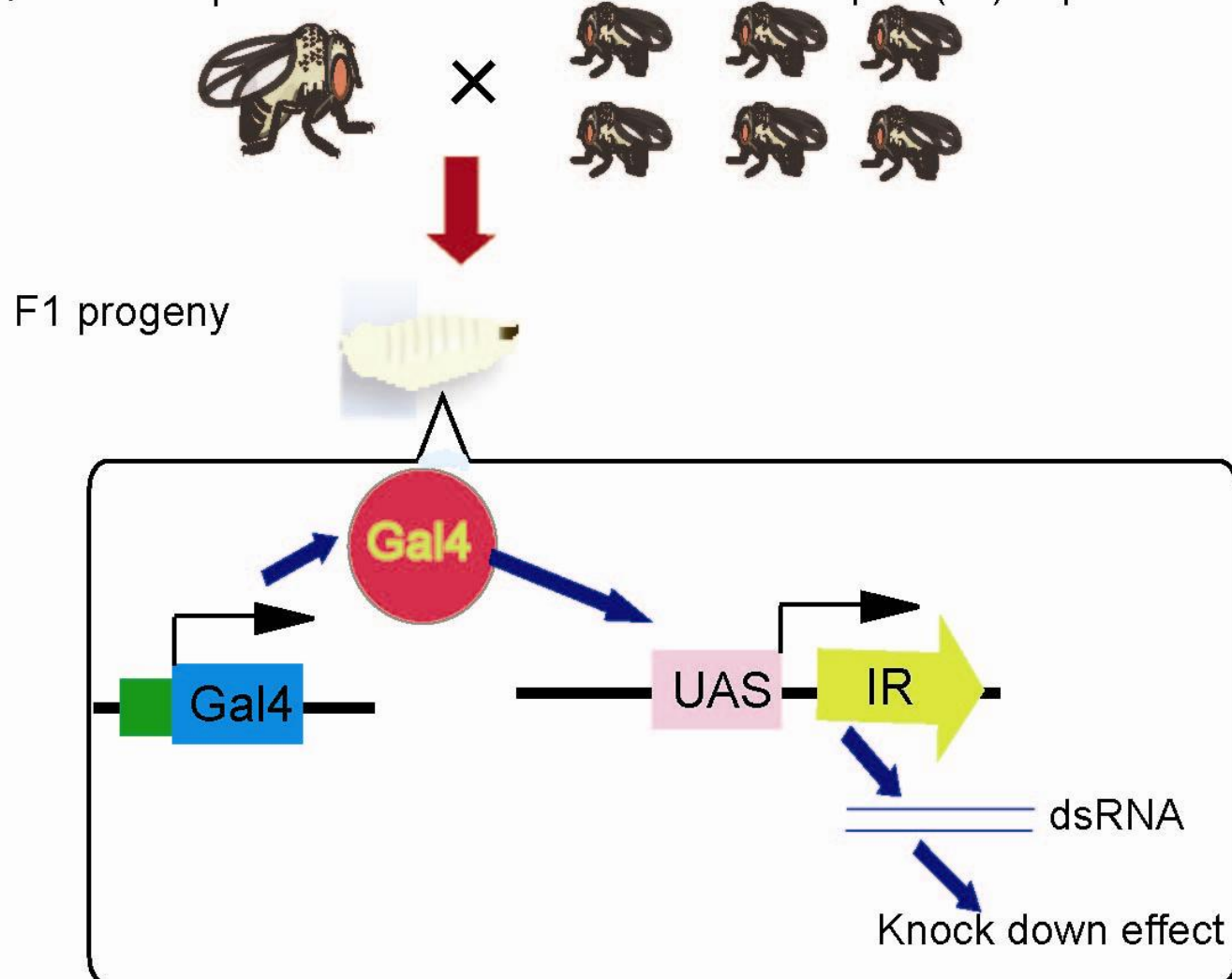


Figure D. ショウジョウバエ分子遺伝学を利用した、GAL4-IRによるノックダウン法の模式図

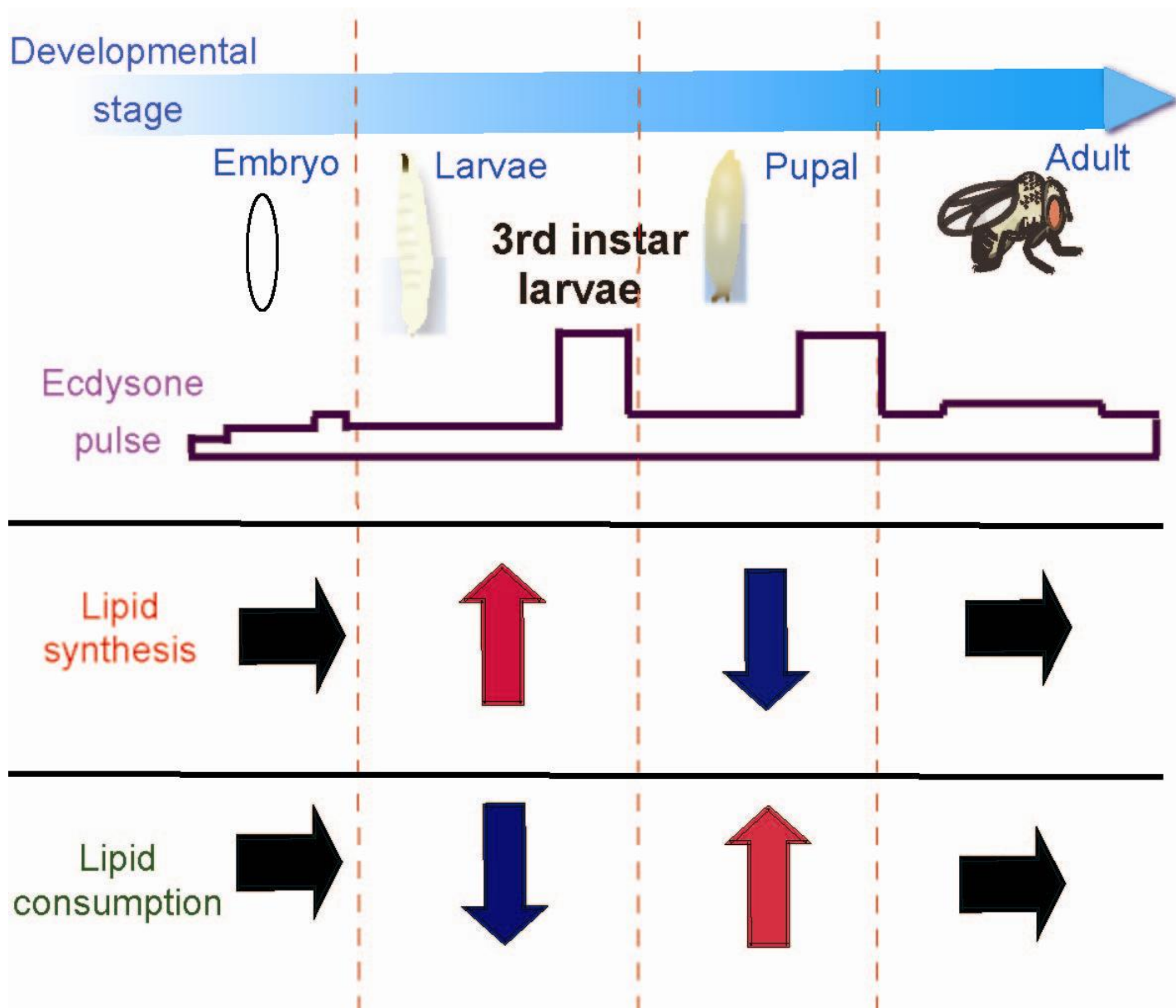


Figure E. ショウジョウバエのエクダイソン分泌時における脂質代謝の変化のまとめ図

第一章

ショウジョウバエ核内受容体 EcR を モデルとした新規脂質代謝制御因子群の 探索の試み

第一節 緒言

昆虫は、食事摂取量の変化に従い、幼虫期では盛んに脂質を合成・蓄積し、蛹期では脂質をエネルギー源として積極的に消費する、という脂質代謝の反転を起こす。蛹化の際に分泌され、蛹化を誘導するのが変態ホルモン・エクダイソンである。エクダイソンは核内受容体エクダイソンレセプター (EcR) により受容され、転写制御を介して生理作用を発揮する (161)。蛹化や羽化の際に分泌されたエクダイソンにより活性化された EcR は、遺伝子発現調節を通じて変態・発達・分化など幅広い生理現象に寄与することが報告されているが、これまで EcR が脂質代謝を制御するという報告はほとんどなされていない。そこで我々は、EcR が発現しており、分子遺伝学が利用できるショウジョウバエを実験材料として用いて、ショウジョウバエにおける脂肪組織である Fat body に着目し、EcR が転写制御を介して脂質代謝の制御を行うのではないかと考えた。この下、EcR による脂質代謝制御機構の解明を目指した。さらに、EcR をモデルとした、核内受容体転写制御を介して脂質代謝制御を行う新規因子を同定するスクリーニング系の構築を試みた。

第二節 実験方法

・ 実験材料

ショウジョウバエ stock

野生型ショウジョウバエとして、*yw*^{67C}を用いた。Fat body 特異的な Gal4 発現ラインである *FB-Gal4* ラインは Dr. Kühnlein からご供与いただいた。*UAS-taiman IR* expression ラインは上田博士よりご供与いただいた。*UAS-EcR IR* expression ラインは Bloomington *Drosophila* stock Center より購入した。その他の *IR(Inverted Repeats)* expression ラインは、Fly Stocks of National Institute for Genetics (NIG Fly) もしくは Vienna *Drosophila* RNAi Center (VDRC) から購入した。その他のショウジョウバエ、およびバランサーラインは、当研究室にて飼育・管理していたものを使用した。全てのショウジョウバエはコーンミールと酵母、Agar を混ぜた培地を用いて、25°Cで維持・交配をさせた。

プラスミド

[pW8-E75B pro-Luc]

[pW8-adp pro-Luc]

[pW8-dMyc pro-Luc]

E75B、adp、dMyc の転写開始点からそれぞれ上流 2.5 kbp、下流 0.5 kbp を PCR にて増幅し、各遺伝子のプロモーター領域とした。それらの PCR 産物を、当研究室で所有していた [pGL3-Basic vector] に対して挿入し、Luciferase vector を作製した。さらにそれぞれの Luciferase vector を、プロモーター部位と Luciferase を含む領域で切り出し、[pW8 vector] に載せ替えることで、In vivo Luciferase Assay 用のトランスジェニックショウジョウバエ作製のプラスミドを構築した。

[pW8-actin pro-Renilla Luc]

当研究室で所有していたプラスミドを利用した。

・ ショウジョウバエの交配および3齢幼虫の取得

ショウジョウバエの麻酔には二酸化炭素を用いた。

二酸化炭素により眠らせたショウジョウバエから未交配の雌を取り出し、新しいバイアルにつき3~4匹ずつ移し、同じく二酸化炭素で眠らせた別ラインの雄を同バイアルに飼育することでショウジョウバエの交配を行った。

雌としては、Gal4 ラインやバランサーラインを、雄には IR expression ラインや Luciferase ラインを用いた。

交配後、卵が孵化して 3 日目になると蛹化のため培地からバイアルの上部へ這い出てくるため、それらの個体を 3 齢幼虫として回収し、実験に供した。

- ・ ショウジョウバエの Fat body 特異的ノックダウン法

Fat body 特異的に Gal4 が発現するようなトランスジェニックショウジョウバエである FB-Gal4 ラインを二酸化炭素で眠らせ、未交配雌を取り出し、新しいバイアルにつき 3~4 匹ずつ移した。そこに、Gal4 によって、Inverted Repeat が発現されるように調節されたトランスジェニックショウジョウバエである IR expression ラインの雄を入れ、交配させることで、Fat body 特異的に目的遺伝子がノックダウンされた幼虫を得た。

- ・ アガロースゲル電気泳動

1×TAE (40 mM Tris-HCl (pH 7.5)、40 mM 酢酸、1 mM EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid)) にアガロース S (Wako) を加えて電子レンジで沸騰させ、アガロースを溶かした。ある程度冷めたところで (約 50℃)、セットしたゲル作製用のホルダーに注ぎ、コームを挿して固めた。1×TAE を張った泳動槽にゲルを置き、DNA サンプルに 10×loading dye (TaKaRa) を加えてアプライした。マーカーは λ DNA を EcoR I/Hind III で処理した、 λ DNA マーカーを用いた。泳動槽は Mupid-2plus (Advance) を使い、100 V で 30 分間通電することで電気泳動した。泳動が終了したゲルを、エチジウムブロマイド (ナカライタスク) を 1/10000 量含んだ 1×TAE の中に加え、15~30 分間静置することで、DNA の染色を行った。染色を行ったゲルは UV ランプにかざすことで、バンドを検出した。

- ・ アガロースゲルからの DNA 断片回収

〔Gel/PCR Extraction kit (日本ジェネティックス) を用いた回収法〕

目的の DNA 断片を含むアガロースゲルをカッターで切り取り、1.5 mL チューブに移して GB1 溶液を 600 μ L 加え、55 °C でゲルを溶解した。溶液をキットに付随したカラムに全量アプライし、室温にて 12,000 rpm で 30 秒間遠心させた。下に溜まった廃液を捨て、GB2 溶液を 600 μ L カラムにアプライして室温にて 12,000 rpm で 30 秒間遠心させることでカラムの洗浄を行った。その後、再び 12,000 rpm で 2 分間遠心させたカラムに 30 μ L の滅菌水を加え、1 分間放置した。カラムを新しい 1.5 mL チューブ上に移し、12,000 rpm で 1 分間遠心させ、溶出された液体を DNA 溶液とした。

- ・ 制限酵素処理

制限酵素は TaKaRa、TOYOBO、New England BioLabs より購入した。添付された適正なバッファーを用い、37℃で 2 時間～一晩反応を行った。

- ・ CIAP 処理

制限酵素処理後のベクターを以下の組成の反応溶液を調製し、37℃で 30 分間インキュベートした。

ベクタープラスミド溶液: 1~20 pmol

Caif Intestinal Alkaline Phosphatase (TakaRa) : 2 μL

10×Alkaline Phosphatase Buffer (TaKaRa) : 5 μL

滅菌 milliQ 水: up to 50 μL

反応後、2 回のフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行い、DNA の精製を行った。

- ・ ライゲーション

vector: insert DNA = 1: 3~1: 10 のモル比となるように調製した DNA 溶液に 2 ×Ligation Mix (日本ジェネティックス) を等量加え、16 °C で 30 分以上反応を行った。

- ・ 大腸菌の形質転換 (トランスフォーメーション)

〔形質転換用試薬〕

- ・ TFB1 (pH 5.8)

30 mM CH₃COOK、100 mM RbCl₂、10 mM CaCl₂、50 mM MnCl₂、15% グリセロール

- ・ TFB2 (pH 6.5)

10 mM MOPS (3-[N-Morpholino]propanesulfonic acid)、75 mM CaCl₂、10 mM RbCl₂

〔大腸菌培養培地〕

- ・ LB 培地

LB Broth (SIGMA) を 1 L あたり 20 g となるように溶解し、オートクレーブ滅菌した。クリーンベンチ内で 50 mL チューブに小分けして室温で保存した。

- ・ アンピシリン

アンピシリン (SIGMA) の粉末を滅菌 milliQ 水で 100 mg/mL となるように調製し、0.45 μm フィルター (Advantec) で濾過滅菌した後、1.5 mL チューブ

に分注して-20℃で保存した。

- カナマイシン

カナマイシン (SIGMA) の粉末を滅菌 milliQ 水で 20 mg/mL となるように調製し、0.45 μm フィルターで濾過滅菌した後、1.5 mL チューブに分注して-20℃で保存した。

- アンピシリンプレート、カナマイシンプレート

LB 培地に 1.5% (w/v) となるように寒天を加え、オートクレーブ滅菌した。約 50℃まで冷めたところでアンピシリン (終濃度: 100 μg/mL)、カナマイシン (終濃度: 20 μg/mL) を加え、10 cm プレートに 10~15 mL ずつ流し込み、室温に戻るまで放置した。作製したプレートは 4℃で保存した。

[コンピテントセルの作成]

コンピテントセルは大腸菌株である DH5αを使用した。LB 寒天培地に播いて得られたコロニーをピックアップし、OD₅₅₀ が 0.6 程度になるまで 37℃で数時間培養後、氷上に 15 分程度放置して 4℃で遠心した。上清を除き菌体に培養液の 1/10 量の TFB1 を加え丁寧に懸濁した。氷上に 5 分間放置した後、4℃で遠心した。上清を除き菌体に培養液の 1/25 量の TFB2 を加え丁寧に懸濁し、氷上に 15 分間放置した。1.5 mL チューブに 105 μL ずつ分注し、-80℃に冷やしたエタノールボックスに入れて急速冷凍した。

[形質転換]

DNA 溶液をコンピテントセル: 50 μL に加え、氷上で 30 分間放置した。42℃で 60 秒間ヒートショックを与えた後、氷上で 3 分間以上放置した。LB 培地 400 μL を加え 37℃で 1 時間培養した後、ガスバーナーの近くでコーンラージ棒を用い、アンピシリンプレートに播いた。

- プラスミドミニプレップ (粗精製)

[プラスミド DNA 調製用試薬]

- Solution I (4℃保存)

10 mM EDTA (pH 8.0)、25 mM Tris-HCl (pH 8.0)

- Solution II (常温保存)

1% SDS (sodium dodecyl sulfate)、0.2 M NaOH

- Solution III (4℃保存)

3 M CH₃COONa (pH 5.2)

- TE (pH 8.0)

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA (pH 8.0)

・ RNase A

SIGMA から購入した。10 mg/mL となるように milliQ 水を加えて溶かし、-20℃で保存した。

コロニーを 3 mL の 100 µg/mL アンピシリンか 20 µg/mL カナマイシンを含む LB 培地で 12-15 時間振盪培養し、15,000 rpm、4℃で 3 分間遠心した。回収した菌体に 100 µg/mL の RNase A を含む Solution I 溶液を 200 µL 加え、十分に懸濁した。Solution II 溶液を 200 µL 加え 5~6 回転倒混和し、5 分間室温でインキュベートした。Solution III 溶液を 200 µL 加え 5~6 回転倒混和し、氷上で 5 分間インキュベートした。15,000 rpm、4℃で遠心後、上清を回収した (2 回)。750 µL の 99.5%エタノールを加え、激しく攪拌した後、15,000 rpm で 15 分間遠心した。上清を除き、1 mL の 70%エタノールを加え、15,000 rpm で遠心して上清を十分に除いた。10 分間風乾させた後、沈殿を滅菌 milliQ 水もしくは TE: 30 µL に溶解してプラスミド DNA 溶液を得た。このプラスミド DNA 溶液 5 µL を制限酵素処理した後、アガロースゲル電気泳動を行うことでインサートの確認をした。

・ プラスミドラージプレップ (細胞内遺伝子導入用)

Plasmid Midi Kit もしくは Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) を用いて、プロトコルに示された方法に従って行った。例として、以下に Plasmid Midi Kit を用いた場合の精製法を示す。

コロニーを 5 mL の 100 µg/mL アンピシリンか 30 µg/mL カナマイシンを含む LB 培地で 8 時間前培養を行った後、うち 100 µL を 100 mL の 100 µg/mL アンピシリンか 30 µg/mL カナマイシンを含む LB 培地で 37℃、15 時間~18 時間振盪培養した。6,000 rpm、4℃で 10 分間遠心して菌体を回収し、Buffer P1 (+100 µg/mL RNase A) を 4 mL 加え十分に懸濁した。Buffer P2 を 4 mL 加え 4~6 回転倒混和することで混合し、5 分間室温でインキュベートした。冷却した Buffer P3 を 4 mL 加え 4~6 回激しく転倒混和することで混合し、15 分間氷上でインキュベートした。11,000 rpm、4℃で 30 分間遠心後、濾紙を用いて上清を濾過した。得られた上清は Buffer QBT を 4 mL 加え平衡化した QIAGEN-tip 100 に添加し自然落下により樹脂に浸透させた。Buffer QC を 10 mL 加えて QIAGEN-tip を洗浄し (2 回)、Buffer QF を 5 mL 加え溶出した。溶出した DNA 液に 3.5 mL のイソプロピルアルコールを加え混合した後、11,000 rpm、4℃で 30 分間遠心した。上清を除き、70%エタノール溶液 2 mL を加え、11,000 rpm、4℃で 10 分間遠心した。上清を除去し、DNA 沈殿を室温で 5 分間風乾させた後、

滅菌 milliQ 水に溶解した。

- ・ 組織培養試薬の調製

- ・ PBS(-) 溶液

137 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na₂HPO₄、1.76 mM KH₂PO₄ を MilliQ 水で溶解し、オートクレーブした。

- ・ 組織培養

ショウジョウバエ 3 齢幼虫を PBS の入った 2 穴スライドガラス上に数匹取り、PBS で 2 回 Wash 後に、顕鏡しながら解剖を行い、Fat body もしくは Gut を分取した。分取した組織は Schneider medium (GIBCO) を用いて Muristerone A (Wako) 存在下/非存在下で、室温で培養した。

- ・ RNA 抽出

- (ショウジョウバエ Fat body からの RNA 抽出)

Isogen (Nippon gene) を用いた。以下にその方法を記す。

2 穴スライドガラス上で組織培養していた Fat body および Gut から、Schneider medium を除き、Isogen を 0.5 mL 添加してよくピペッティングで組織を溶解させた後、1.5 mL チューブに移した。さらに数回ピペッティングして組織塊を均一にした後、クロロホルム: 100 µL を加えボルテックスで 10 秒間攪拌し、15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心した。上清を新たな 1.5 mL チューブに回収し、イソプロピルアルコール: 250 µL を加えて転倒混和した後、室温で 10 分間放置した。15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心して RNA をペレットにした。沈殿を 75% エタノール: 0.5 mL で洗浄し、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心した。得られた沈殿をペーパータオル上で 10 分間空気乾燥させ、適当量の DEPC 処理水 (Nippon gene) に溶解した。

- ・ 逆転写反応 (Reverse Transcription; RT)

Primescript RT Master Mix (Takara) を用いて RT を行った。以下にその方法を示す。

5×PrimeScript RT Master Mix: 2.0 µL と RNA サンプル (500 ng) + RNase-Free dH₂O: 8.0 µL を PCR チューブ内でピペッティングにより混合し、スピンドウンを行った。37°C、15 分で逆転写反応を行った後、85°C で 5 秒間処理して逆転写酵素を不活化した。

- Real-time PCR

モニタリング試薬として、KAPA Fast SYBR qPCR kit (KAPA BioScience) を用いて各遺伝子の mRNA 発現量を定量した。基本的な反応液の組成を以下に記す。

KAPA SYBR Fast qPCR kit

KAPA SYBR Fast qPCR Master Mix: 5 μ L

10 μ M forward primer: 0.4 μ L

10 μ M reverse priemer: 0.4 μ L

滅菌 milliQ 水: 1.2 μ L

Template cDNA: 3 μ L

MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems) 中で上記の反応液を混合し、スピンドウンを行った後、Thermal Cycler TP800 (Takara) を用いて反応および定量を行った。それぞれの遺伝子の mRNA 量は、rp49 の mRNA 量で除することで補正した。また 1 回の試行につき 3 連のサンプルを用い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定にはスチューデントの t 検定を用いた。

本研究において使用した各 primer を以下に記す。

rp49	f	5'- ATGACCATCCGCCCAGCATAC -3'
	r	5'- CTGCATGAGCAGGACCTCCAG -3'
E75B	f	5'- GCAGCAGCAGATCGGAATACTC -3'
	r	5'- CCGACTCAATGCCCCGAATCC -3'
adp	f	5'- ATCAACGACCCGAACGAGAC -3'
	r	5'- TCTAGCTGCAGGATGCAACC -3'
dMyc	f	5'- GAGCAACAACAGGCCATCGATATAG -3'
	r	5'- CCTTCAGACTGGATCGTTTGCG -3'

- 3 齢幼虫内 Triacylglycerol (TG) 定量

培地からバイアル上部に這い出てきた 3 齢幼虫を約 20 匹程度回収し、氷冷した PBS (-) で 2 回洗浄後、Lysis buffer (1.37 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 0.5% Tween 20) を 100 μ L 加え、すりつぶすことでホモジェナイズした。さらに、この破砕液を 70℃で 5 分間加温することで、幼虫内の酵素を失活させた。常温に戻した破砕液を、4 °C、12,000 rpm で 3 分

間遠心し、上清を得た。回収した破碎液上清 10 μ L をトリグリセライド E-テストワコー (Wako) 発色液: 250 μ L に加え、肉眼で色 (青色) が観察されるまで 37°C でインキュベートし、595 nm における吸光度を、Gene Quant 100 (GEヘルスケア) を用いて測定した。また、同じ破碎液上清 10 μ L に BCA Protein Assay (PIERCE) 反応液 (A 液と B 液を 50:1 で混合) 250 μ L を加えた。65°C で 30 分間インキュベートした後、570 nm の吸光度を、同じく Gene Quant 100 を用いて測定することでタンパク量を測定した。検量線には BSA 溶液を希釈したサンプルを用いた。1 回の試行につき 3 連で行い、TG 量をタンパク量で除した値を真の TG 値とし、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定にはスチューデントの t 検定を用いた。

- ・ 3 齢幼虫内 Fat body の Nile red 染色

培地からバイアル上部に這い出てきた 3 齢幼虫を回収し、氷冷した PBS (-) で 2 回洗浄後、氷冷した PBS (-) 内で満たした 2 穴スライドガラスの中で、顕鏡しながらピンセットを用いて解剖し、Fat body を摘出した。摘出した Fat body は、終濃度 0.00005 % となるように PBS (-) で希釈された Nile red (SIGMA) に浸され、室温で 10 分間静置された。その後、PBS (-) で 3 回洗浄後、プレパレート上へ移され、Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratory) を用いて封入した。作製されたスライドガラスは、Zeiss 510 laser confocal microscope (Zeiss) を用いて観察を行った。

第三節 実験結果

- ・ エクダイソンレセプター (EcR) はショウジョウバエの脂肪組織 Fat body において、脂質蓄積量を制御する

まず、EcR の Fat body における脂質代謝制御作用の検証のため、Fat body 特異的に発現する Gal4 driver である FB-Gal4 を用いて、UAS-EcR IR 発現ラインのハエとかけ合わせることで、EcR を Fat body 特異的にノックダウンを行った。その時、3 齢幼虫における Triglyceride (TG) 蓄積量を定量したところ、EcR のノックダウンにより、TG 蓄積量が増加することが示された (Fig. 1-1A)。さらに、3 齢幼虫から Fat body を摘出し、Nile red により中性脂質を染色した結果、EcR のノックダウンラインでは Fat body における脂肪滴の拡張が確認でき、脂質蓄積の増加が認められた (Fig. 1-1B)。以上のことから、EcR は Fat body において脂質蓄積を抑制する機能があることが示唆された。

- ・ エクダイソンレセプター (EcR) は転写制御依存的に Fat body において、脂質蓄積量を制御する

続いて、EcR による脂質蓄積抑制効果が転写依存的に行われているのか否かを検討するため、EcR の co-activator である taiman (164)、および Chromatin remodeler として EcR 転写活性に寄与すると報告された (166, 167) Nurf complex の構成因子である dNurf, E (bx), caf-1, Iswi をそれぞれ Fat body 特異的にノックダウンした 3 齢幼虫における脂質蓄積量を、TG 定量 (Fig. 1-1A) した。その結果、どの転写活性化因子のノックダウンによっても、TG 蓄積量の増加が確認され、その中でも顕著な増加がみられた taiman, Iswi ノックダウンラインの Fat body を Nile red 染色 (Fig. 1-1B) で染色し、脂質蓄積が亢進していることを確認した。以上の結果から、taiman や Nurf complex のノックダウンにより、Fat body における脂質蓄積が増加することが示された。

以上のことより、EcR は、少なくとも一部は、転写依存的に Fat body において脂質蓄積抑制効果を発揮することが示唆された。

- ・ エクダイソンレセプター (EcR) は、E75B、adp、dMyc の発現制御を介して Fat body における脂質蓄積量を制御する

続いて、EcR の Fat body における脂質蓄積抑制機能の分子メカニズムを解析するために、脂質蓄積抑制能に寄与する EcR の標的遺伝子の探索を行った。EcR を Fat body 特異的にノックダウンしたライン、およびそのコントロールラインから Fat body と Gut を摘出し、EcR の合成リガンドである MuristeronA (MurA)

の存在/非存在条件において3時間組織培養を行い、それぞれ Real time RT-PCR により mRNA 発現量を検討した (Fig.1-2A)。この時、EcR の既知の標的遺伝子である E75B が MurA 処理により、Fat body と Gut の両方で発現上昇していること、ならびにこの上昇が EcR のノックダウンにより消失したことから、適切に EcR のリガンド処理とノックダウンがなされていること、ならびに EcR が Fat body においても転写調節能を保持していることが確認できた。さらに、哺乳類において PPAR γ の転写活性抑制を介して脂質合成を阻害していると報告された adp (172) の発現を確認したところ、E75B の結果と類似の結果が得られたことから adp は EcR によって発現が誘導される標的遺伝子であることが示唆された。また、Delanoue らが報告したよう (173) に、Fat body において EcR は成長促進因子 dMyc の発現を抑制させることが示され、さらにこの効果は Gut においては認められなかったことから、dMyc は Fat body 特異的に EcR により発現抑制を受ける標的遺伝子であることが示唆された。今回、上記に挙げた因子以外にも、哺乳類において脂質代謝の律速酵素であり、ショウジョウバエにおいて保存されている遺伝子 (bmm など) や、脂質代謝制御系の酵素群の転写制御を行う転写制御因子 (dSREBP など)、ならびに近年ショウジョウバエにおいて脂質代謝制御を行うと報告があった因子 (Lsp2 など) の発現変動の比較も行った。しかしながら、E75B, adp および dMyc のような EcR による転写制御下に存在する可能性を示唆する発現変動を呈する因子を見出すことは出来なかった (Data not shown)。

加えて、EcR の co-activator である taiman や Nurf complex の構成因子である Iswi をノックダウンした Fat body における E75B、adp、dMyc の発現を検討した (Fig. 1-2B)。その結果、taiman や Iswi のノックダウンにより、MurA 処理による E75B や adp の発現誘導は減弱していることが確認された。一方で、dMyc に関しては、taiman や Iswi のノックダウンによつては EcR のノックダウンほど、MurA 処理による dMyc 発現抑制は減弱されなかった。このことは、taiman や Nurf complex が転写の抑制ではなく活性化に強く寄与していることを示唆している。

以上の結果より、E75、adp、dMyc は Fat body における EcR の標的遺伝子であることが示唆された。

続いて、EcR による E75、adp、dMyc の発現制御が、Fat body への脂質蓄積抑制効果に対して寄与しているか否かを検討するため、Fat body 特異的にそれら3つの EcR 標的遺伝子をそれぞれノックダウンした3齢幼虫における脂質蓄積量を TG 定量 (Fig. 1-3A) および Nile red による中性脂質染色 (Fig. 3B) により検討した。その結果、E75B, adp のノックダウンにより TG 蓄積が増加し、このことは Nile red 染色によつても認めることが出来た。一方で、dMyc

のノックダウンにより、TG 蓄積量は低下し、Nile red 染色においては、Fat body 内の細胞の小型化が認められた。以上のことから、EcR は E75、adb、dMyc の発現制御を介して Fat body への脂質蓄積を抑制する効果を発揮することが示唆された。

・ 脂質蓄積量を指標とした、新規エクダイソンレセプター転写制御因子の探索系の構築

これまでの結果より、EcR は少なくとも一部は E75B, adb, dMyc の遺伝子発現制御を介して、Fat body における脂質蓄積量を制御していることが明らかになった。このことはすなわち、Fat body における脂質蓄積量を指標とすることで、EcR の転写制御を行う新規因子の探索を行うことが出来ることを示唆している。この考えは、実際に既知の EcR 転写制御因子として報告されている taiman らの遺伝子発現量をノックダウンしてやると、EcR の転写活性依存的に Fat body における脂質蓄積量が変化したことからも支持されている(Fig. 1-1)。そこで、EcR の新規転写制御の同定を目的とし、脂質蓄積量を指標とした *in vivo* スクリーニング系の構築を目指した (Fig.1-5)。

まず、第一スクリーニングとして、脂質蓄積量を指標とした *in vivo* の表現型スクリーニングを行った。具体的には、以下の工程を行った。

まずは、ノックダウンする遺伝子の選別として、ヒト・マウスの両種で保存されている全遺伝子を抽出した (174) (約 5000 遺伝子)。さらに、FlyAtlas: the *Drosophila* gene expression atlas (<http://130.209.54.32/atlas/atlas.cgi>) を用いて、3 齢幼虫の Fat body における各遺伝子の発現量を調べ、Fat body 特異的に発現している遺伝子および全身にユビキタスに発現している遺伝子を抽出した (約 3000 遺伝子)。抽出した全遺伝子の中に対する RNAi expression ショウジョウバエラインを可能な限り購入し (約 2000 遺伝子)、FB-Gal4 ラインとかけ合わせることで、Fat body 特異的に各遺伝子をノックダウンさせ、その時の脂質蓄積量を定量することを一次スクリーニングとし、脂質蓄積量に変化したものを二次スクリーニング以降に回すこととした。

第二次スクリーニングとして、*in vivo* で EcR の転写活性変動を検討する実験系を構築することを目指した。その具体的方法として、以下の 3 種類を考案した。

①EcRE もしくは Fat body における EcR の標的遺伝子と同定した E75B, adb, dMyc のプロモーターの下流に GFP を発現させるトランスジェニックショウジョウバエを作製・利用して、各遺伝子ノックダウン時における GFP 蛍光強度の変化を検出する。

②EcRE もしくは Fat body における EcR の標的遺伝子と同定した E75B, adb,

dMyc のプロモーターの下流に Luciferase を発現するトランスジェニックショウジョウバエを作製・利用して、各遺伝子ノックダウン時におけるプロモーター活性の変化を *in vivo* Luciferase assay で検出する。コントロールとして、actin プロモーターを用いた Renila Luc を利用し、Renila Luc で割り込んだ値を真の Luciferase 活性値とする。

③各遺伝子ノックダウン時の Fat body における E75B, adp, dMyc の mRNA 変動を Real-time RT PCR で検討する。

今回は大規模なスクリーニングのため、ハイスループットなアッセイ系が必要なため、③の手法は二次スクリーニングとしては不適切であると判断し、③の方法は 3 次スクリーニングに回すこととした。

また、①の中で登場する EcRE-GFP transgenic ショウジョウバエは当研究室において所有していたため、アッセイ系の検討のために、このラインのショウジョウバエの Fat body に対して、EcR の合成リガンドである MurA を処理した時の GFP 蛍光の変化を検討したが、脂肪による自家蛍光などもあり、定量的な測定は極めて困難であると判断した。

以上のことから、今回は 2 次スクリーニングとしては、ある程度ハイスループットで実験でき、定量的な検討が可能な②の *in vivo* Luciferase assay 系を採用することとし、実験系の構築を目指した。

まずは、スクリーニング系に用いる *in vivo* luciferase transgenic ショウジョウバエの作出を行った。具体的には、Fat body における EcR の標的遺伝子と同等した E75B, adp, dMyc の転写開始点から上流 2.5 kbp, 下流 0.5 kbp を各遺伝子のプロモーター領域とし、Luciferase 遺伝子上流につなぎ、トランスジェニックショウジョウバエ作出用の pW8 ベクターに対して挿入することで、目的の *in vivo* luciferase transgenic ショウジョウバエ作製のプラスミドを作出した。なお、この時クローニングしたプロモーター領域に、EcR の結合配列として報告されている EcRE (EcR Response Element) が 80%以上の相同性で、各プロモーターにつき、一カ所以上存在していることを確認している (Data not shown)。作出したプラスミドをショウジョウバエ胚に導入し、*in vivo* Luc 用の複数のトランスジェニックショウジョウバエを作製した。

そして、第 3 次スクリーニングには、上記に述べたとおり、実際に各 EcR の応答遺伝子が発現変動していることを Real time RT-PCR で確認することとした。

今回、構築を行ったスクリーニング系のうち、一次スクリーニングが実際に有効であるか否かの検討を行った。ショウジョウバエにおいて、ヒストンアセチル化能を持ち、転写活性化因子として考えられている因子 (CBP, GCN5, Tip60, MOF) および、ヒストン脱アセチル化能を持ち、転写抑制を行うとされ

ている HDAC family および sir2 をそれぞれノックダウンした時の脂質蓄積量を検討した。その結果、CBP のノックダウンにより脂質蓄積量は有意に増加し (Fig.1-6A)、HDAC2, HDAC4 のノックダウンにより、逆に脂質蓄積量の減少が確認された (Fig.1-6B)。この時、Fat body における EcR の標的遺伝子 E75B, adp および dMyc の mRNA 発現変動を MurA 存在下/非存在下で検討した。その結果、CBP のノックダウンにより、MurA による E75B, adp の発現誘導は減弱され、HDAC2, HDAC4 のノックダウンにより dMyc の発現抑制は緩和する傾向が認められた (Fig.1-7)。以上の結果より、一次スクリーニングとして脂質蓄積量を評価する系の妥当性が証明でき、Fat body における EcR の転写制御因子として、CBP ならびに HDAC2/ HDAC4 が示された。

今回行った脂質蓄積量を指標とした一次スクリーニングの結果の一部を示す (Fig.1-8)。既知の代謝酵素や電子伝達系の遺伝子をノックダウンしたときに脂質蓄積量は変化していることが確認できた。しかしながら、それ以外の数多くの機能未知な因子や、転写制御を行うとされている因子を Fat body においてノックダウンすることにより、脂質蓄積量が増加することが明らかになった (Fig.1-9)。

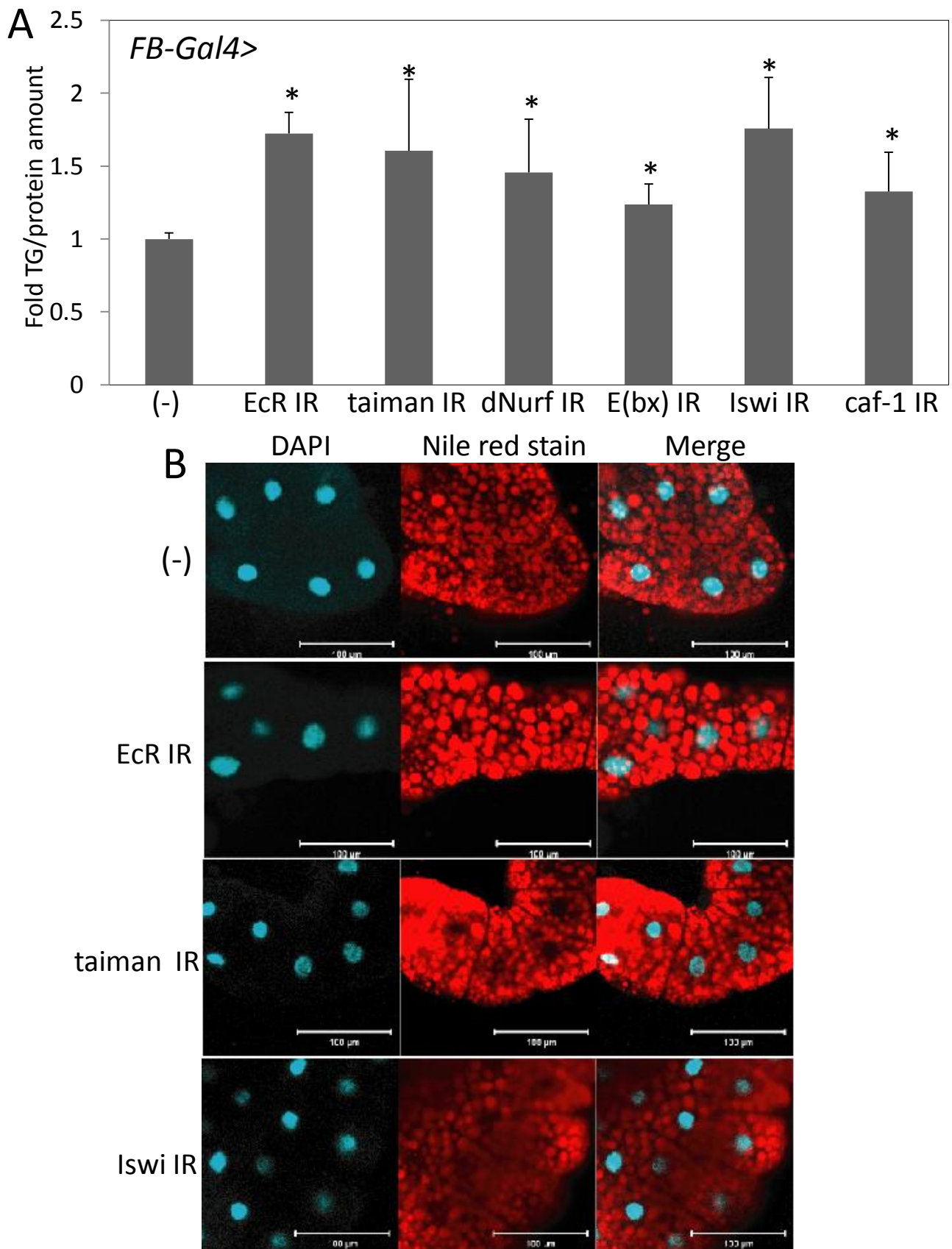


Figure 1-1. ショウジョウバエのFat bodyにおいて、EcRの活性化は脂質蓄積を抑制するFat body特異的にEcRおよびEcRのco-activatorであるtaiman, dNurf E(bx), Iswi, caf-1をそれぞれノックダウンしたショウジョウバエ3齢幼虫における脂質蓄積量の定量(A)および、中性脂質のNile red染色(B)を行った。(n=3, *p<0.05)

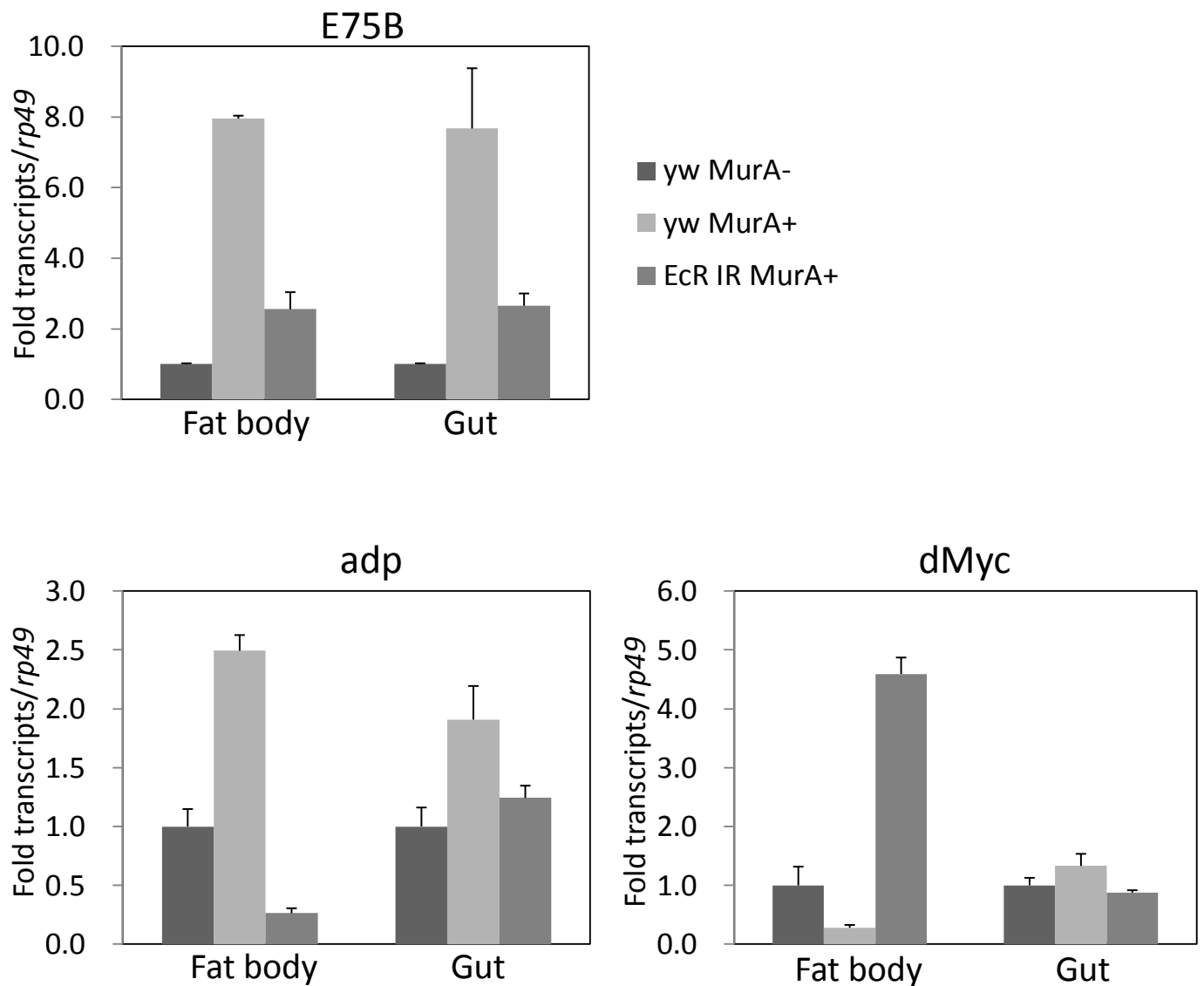


Figure 1-2 E75B、adpおよびdMycはFat bodyにおけるEcRの標的遺伝子である野生型 (yw) およびFat body特異的にEcRをノックダウンした (EcR IR) ショウジョウバエ3齢幼虫からFat body、Gutをそれぞれ分取し、EcRの合成リガンドであるMuristerone A (MurA) 存在下/非存在下で3時間組織培養したときのE75B, adp, dMycのmRNA変動をReal time RT-PCRで定量した。(n=3)

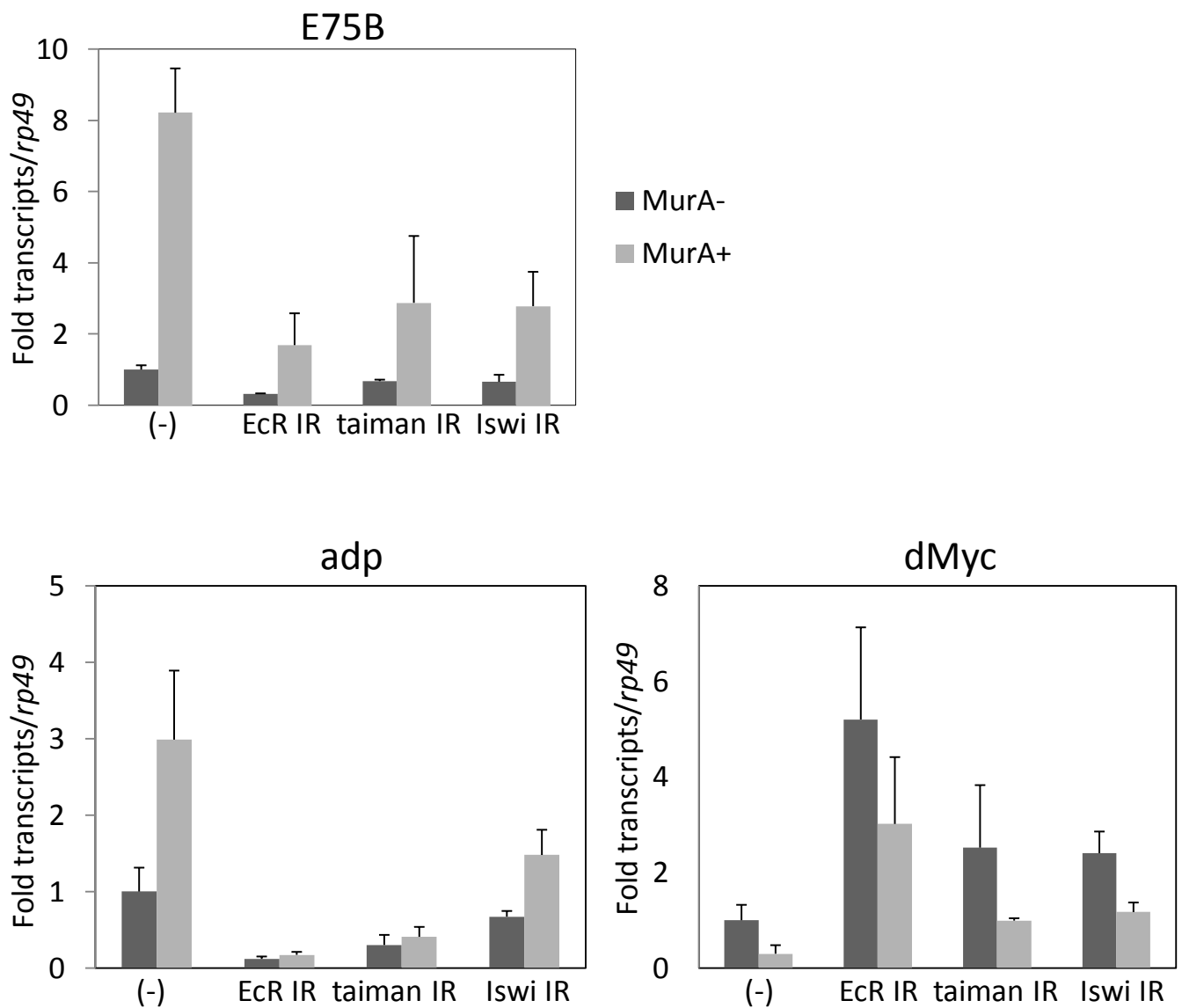


Figure 1-3. E75B、adpおよびdMycはEcRの転写活性依存的に制御されている
 野生型 (yw) およびFat body特異的にEcRおよびEcRのco-activatorであるtaiman、Iswiをノックダウンした (EcR IR、taiman IR、Iswi IR) ショウジョウバエ3齢幼虫からFat body分取し、Muristerone A (MurA) 存在下/非存在下で3時間組織培養したときのE75B、adp、dMycのmRNA変動をReal time RT-PCRで定量した。(n=3)

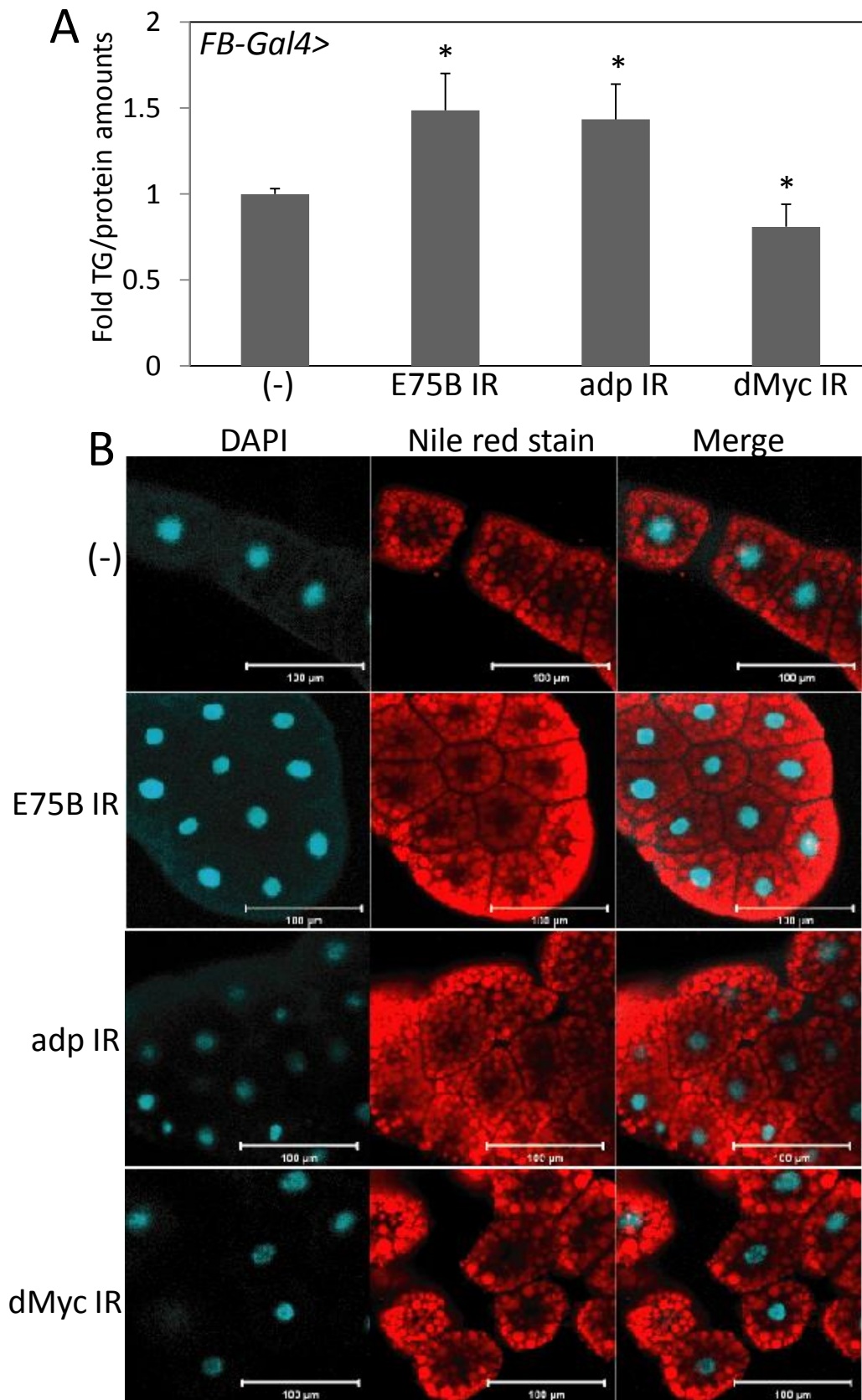


Figure 1-4. 同定した標的因子は、EcRの脂質蓄積抑制機能に寄与している
Fat body特異的にE75B, adp, dMycをそれぞれノックダウンしたショウジョウバエ3齢幼虫内の脂質蓄積量の定量(A)および、中性脂質のNile red染色(B)を行った。(n=3, *p<0.05)

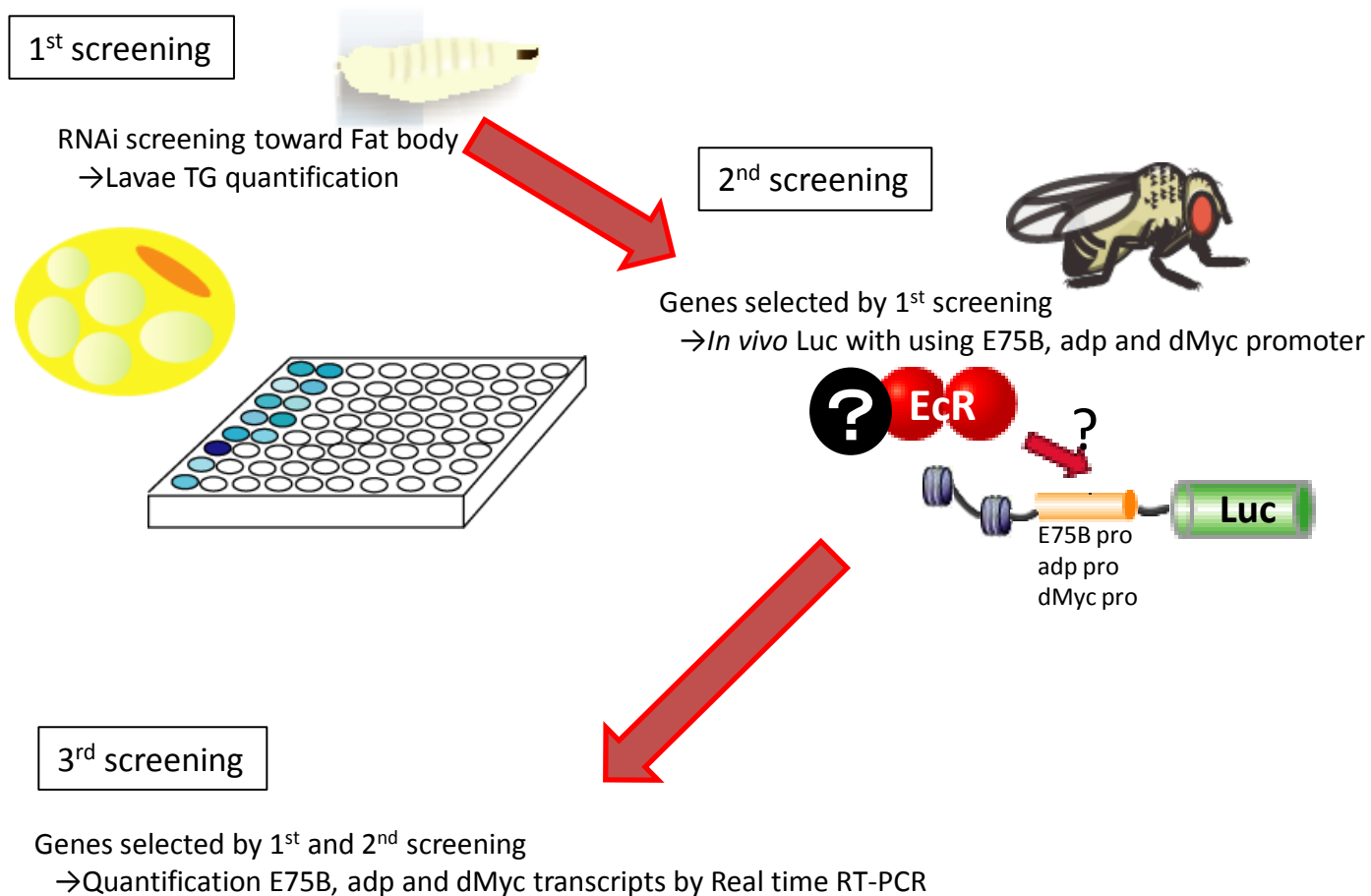


Figure 1-5. ショウジョウバエ分子遺伝学を利用した、新規EcR転写制御因子同定のためのスクリーニングの簡略図

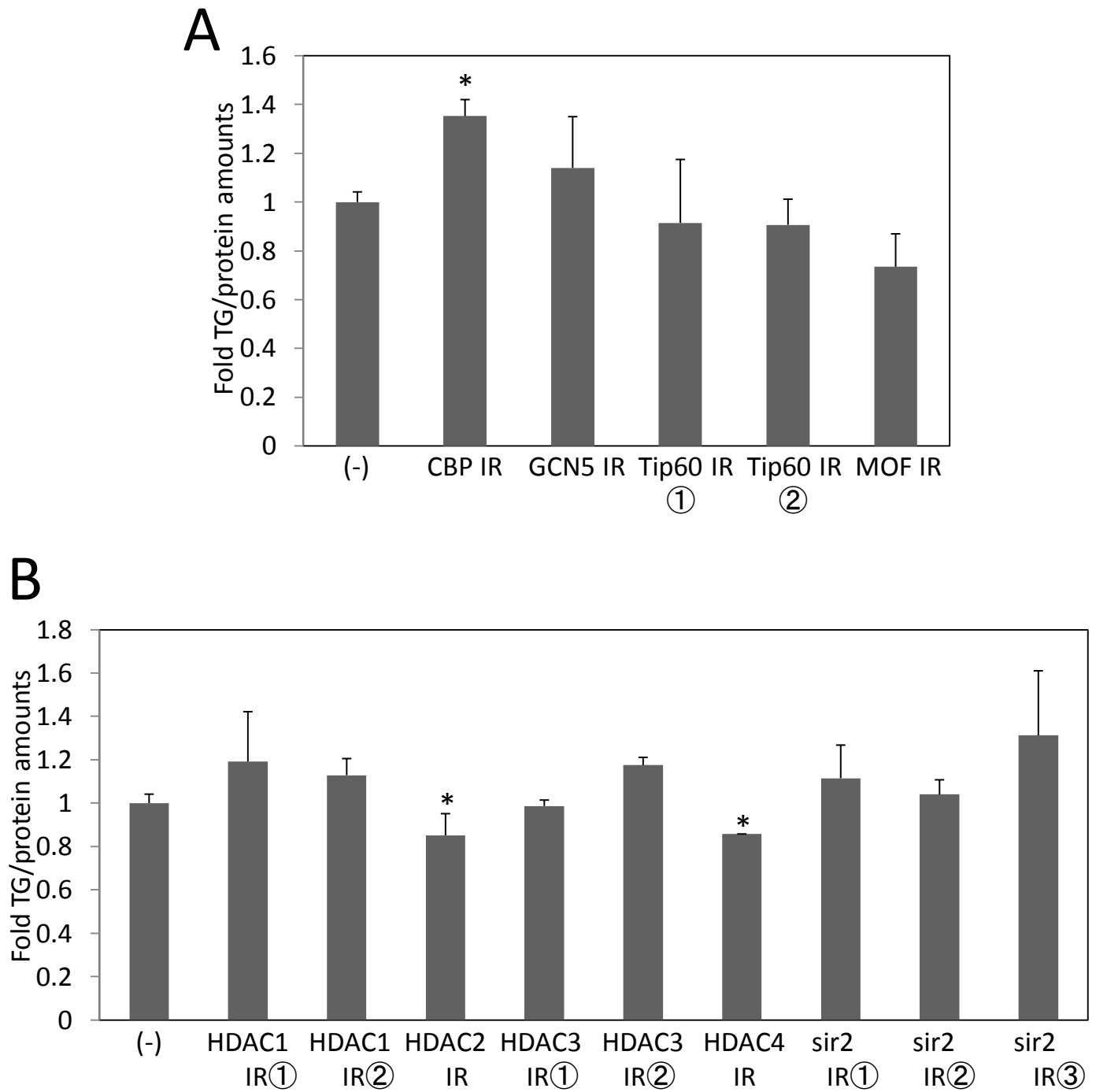


Figure 1-6. 既知のアセチル化・脱アセチル化を介した転写制御因子のノックダウンにより、脂質蓄積量が変化する
 HAT活性を持つ因子(A)およびHDAC活性を持つ因子(B)をそれぞれFat body特異的にノックダウンしたショウジョウバエ3齢幼虫における脂質蓄積量を定量した。(n=3, *p<0.05)

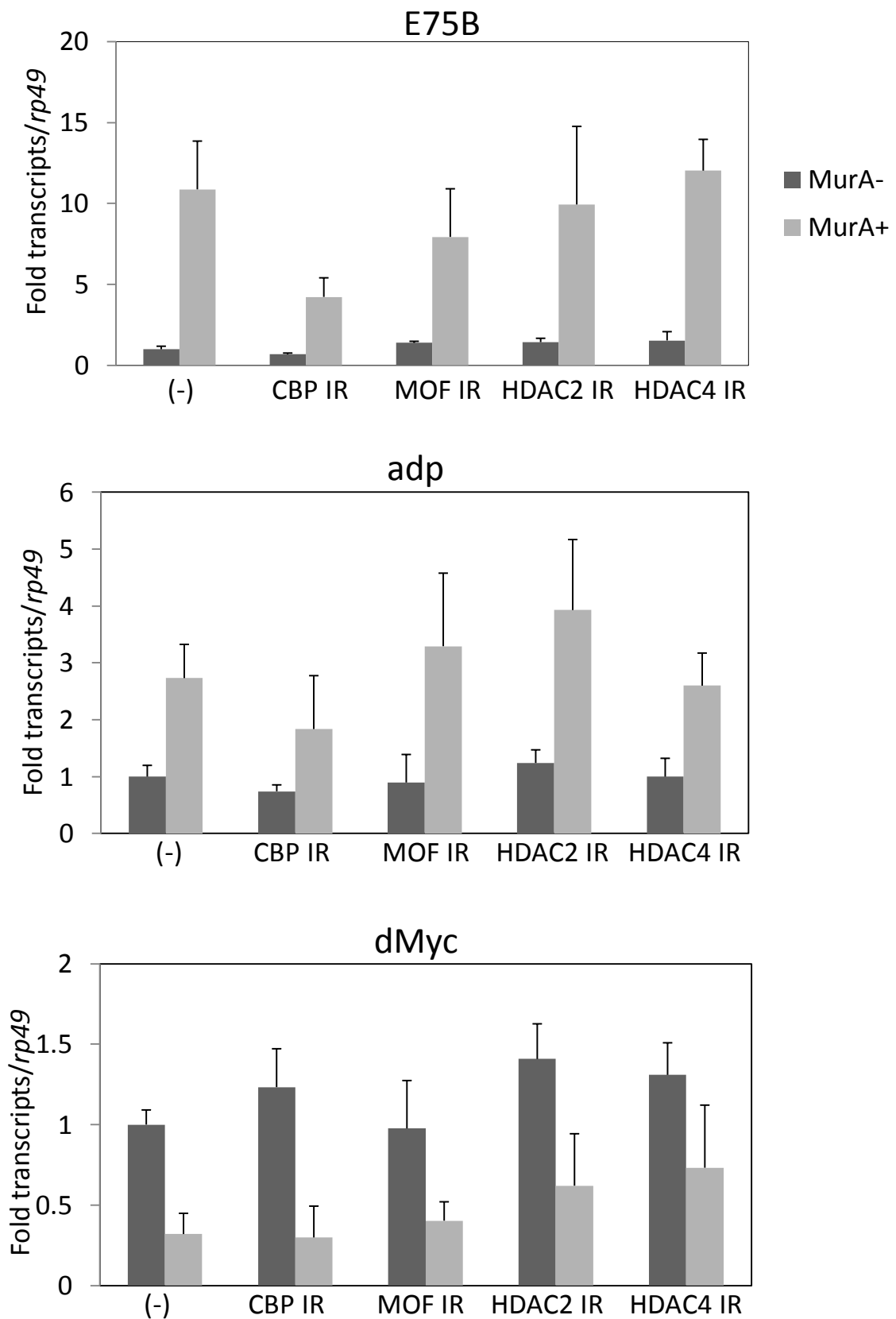


Figure 1-7. CBPおよびHDAC2, HDAC4はEcR転写制御を介して脂質蓄積を制御する
CBP, MOF, HDAC2, HDAC4をそれぞれFat body特異的にノックダウンしたショウジョウバエ3齢幼虫から
Fat bodyを分取し、Muristerone A存在下/非存在下で3時間培養したときのE75B, adpおよびdMycの
mRNA発現変動をReal time RT-PCRで定量した。(n=3)

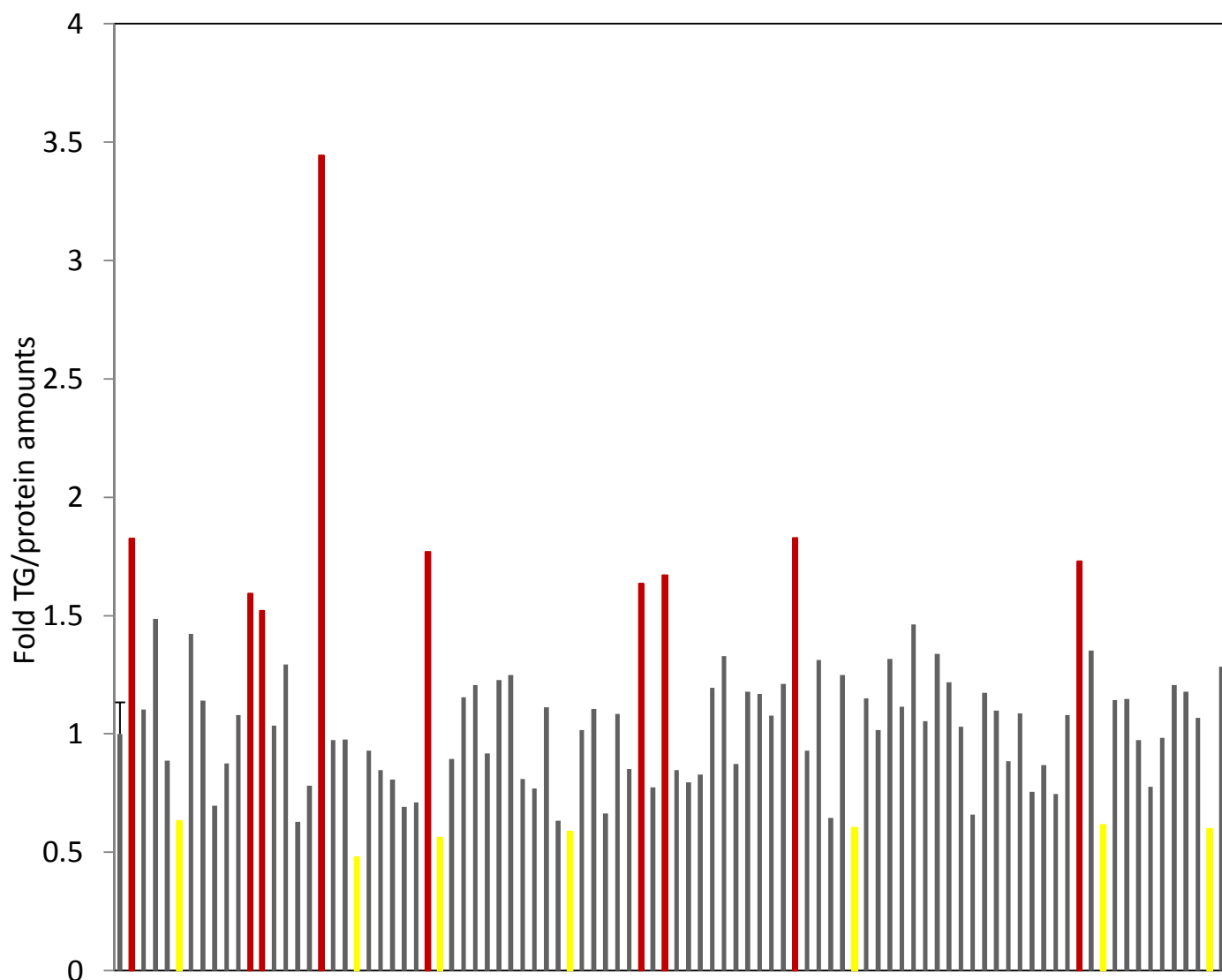
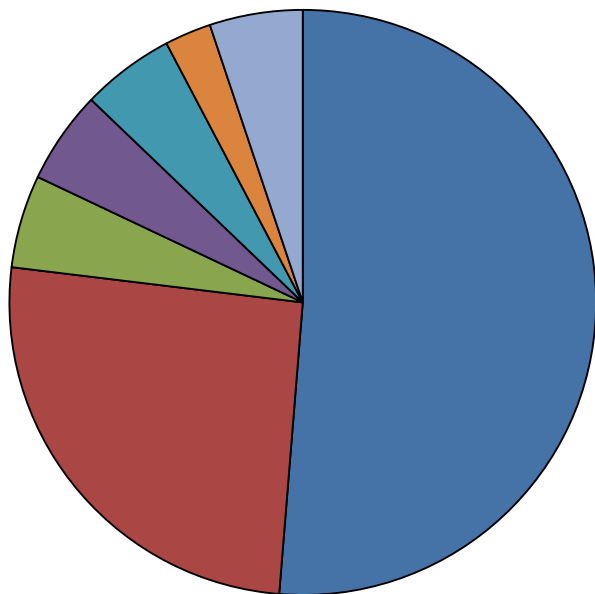


Figure 1-8. 第一次スクリーニングの一例

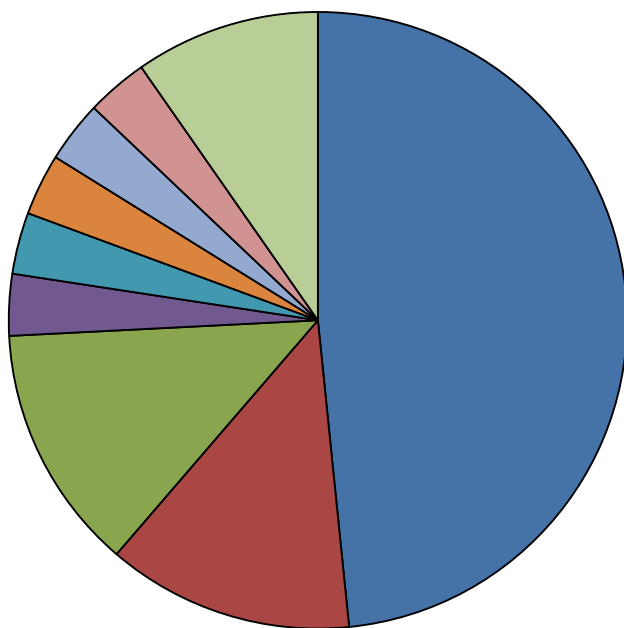
Fat body特異的に、網羅的に遺伝子をノックダウンした時の脂質蓄積量の変化を検討した。コントロールと比べて、ノックダウンにより1.5倍以上増加した遺伝子を赤色、0.66倍以下に減少した遺伝子を黄色の棒グラフで表示した。

TG increase group



unknown	21
metabolism	10
transcription	2
transporter	2
electron carrier	2
protein modifier	1
others	2

TG decrease group



unknown	15
metabolism	4
transporter	4
histone methylation	1
electron carrier	1
regulation of signal transduction	1
adipokinetic hormone receptor activity	1
protein modifier	1
others	3

Figure 1-9. 多くの機能未知因子や転写制御因子のノックダウンにより、脂質蓄積量が増加する
 脂質蓄積量が増加する
 第一次スクリーニングにおいて、脂質蓄積量が1.5倍以上になった因子 (TG increase group) および、0.66
 倍以下になった因子を選択し、機能別に分類を行った。

第四節 考察

本章では、核内受容体の転写制御を介して脂質代謝制御を行う新規因子の同定法の構築を目指し、ショウジョウバエの核内受容体 **EcR** をモデルとした分子遺伝学的手法を用いた *in vivo* スクリーニング系の構築を目指した。

まず、本研究の結果から、**EcR** を介したエクダイソンのシグナルはショウジョウバエ **Fat body** における脂質蓄積の抑制に対して重要であることが示された。**EcR** は蛹化や羽化の際に分泌される変態ホルモン・エクダイソンをリガンドとし、転写制御を介して生理作用を発揮する核内受容体である。蛹化、羽化の際における脂質代謝の反転現象は、昆虫が正常に羽化を行うためのエネルギーを得るためには必須であると考えられる。確かに、**Fat body** 特異的な **EcR** のノックダウンした個体は、3 齢幼虫までは正常に発達を行うが、羽化する前の蛹の状態で死亡してしまうことが認められており (**Data not shown**)、**EcR** による脂質代謝制御の重要性を示唆している。**Gauhar** らにより、ゲノムワイドな **EcR** の標的遺伝子の同定を *Drosophila* 由来の培養細胞を用いて行われたが、20-hydroxyecdysone(20-HE)処理によって発現変動が生じた遺伝子の中に、脂質代謝に関与するものはほとんど存在しなかった (175)。加えて、**Wang** らは、20-HE の投与は、摂食抑制を誘導し、摂食抑制を介して *Brummer* などの **Lipase** 発現が惹起され、脂質分解が誘導されることで脂質蓄積を抑制すると報告していた (176, 177)。しかしながら、これまで **EcR** の直接の標的遺伝子が脂質代謝制御を行っているという報告はなされていなかった。

今回の報告において我々は、**EcR** が自身の転写調節能を介して **Fat body** における脂質蓄積を抑制する効果があることを初めて示し(**Fig. 1-1A,B**)、さらに **Fat body** における標的遺伝子として、**E75B**、**adp**、**dMyc** があること (**Fig. 1-2, 3**)、そしてそれらの遺伝子発現制御を介して **EcR** が **Fat body** への脂質蓄積抑制効果を発揮することが明らかになった (**Figure 1-4A,B**)。

今回、**Fat body** において **EcR** が誘導することを見出した **E75B** は核内受容体であり、その標的遺伝子の一つとして、**NO synthase (NOS)** が知られている (178)。**Caceres** らの論文 (178) において、前胸腺特異的な **NOS** のノックダウンにより **Fat body** 内の脂質蓄積が増加し、過剰発現では逆に抑制されたことから、前胸腺における **NOS** 発現は **Fat body** への脂質蓄積を抑制する機能があることが示唆された。今回、**E75B** の **Fat body** 特異的なノックダウンによっても、**Fat body** での脂質蓄積が増加したこと(**Fig. 1-4A, B**)から考えると、**E75B** には前胸腺のみならず、直接的に **Fat body** において、**NOS** 発現制御を介した脂質蓄積抑制機能があることが疑われる。また、同じく **EcR** が誘導する **adp** の

哺乳類ホモログはマウスにおいて、HDACのリクルートを介してPPAR γ の転写抑制を行い、脂質合成を抑制することが報告されている(179)。また、*adp mutant*のショウジョウバエの表現型の解析からも、*Drosophila*においても*adp*は脂質蓄積を負に制御することは明らかである(172)。実際に我々の研究においても、*adp*のノックダウンにより脂質蓄積が増加しており(Fig. 1-4 A, B)、先の*mutant*の報告と一致していた。*Drosophila*において、PPAR γ のホモログは未だ確定しておらず、その最有力候補とされているE75B(160)においては、今回の研究においてはPPAR γ と真逆に、脂質蓄積を負に制御することが示唆された。従って、*adp*がショウジョウバエにおいてどのような分子メカニズムで脂質蓄積を抑制するのかは未だ不明であり、今後のさらなる研究が望まれる。また、dMycはEcRにより発現が抑制され、dMycのノックダウンで脂質蓄積量が抑制されることが認められた。dMycは成長促進因子であるMycのショウジョウバエホモログであるため、dMycのノックダウンによりFat body内の脂肪細胞の増殖・成長の抑制を通じて脂質蓄積を抑制することが示唆された。実際に、我々の結果でもdMycのノックダウンによりFat body内の細胞の縮小が認められ、それにより脂質蓄積抑制効果が現れたと考えられた。加えて、EcRによるdMyc発現抑制効果はFat body特異的な機能であることが示唆されたことから、EcRには組織特異的な制御機構があることが示唆された。今後、このEcRによるdMyc発現制御機構を解析することで、組織特異的な発現制御機構のモデルを提唱することが期待できる。

本研究結果から導き出した、Fat bodyでのEcRによる脂質代謝制御機構の模式図を(Fig. ①)に示した。

本研究の結果、EcRは自身の転写活性依存的に脂質蓄積を抑制することが示された。この結果から、ショウジョウバエのRNAiライブラリーを利用して脂質蓄積量を指標としたスクリーニング系を構築することにより、EcRの転写活性制御を行う新規転写活性調節因子の同定が期待される。実際に、既知のヒストンアセチル化酵素、およびヒストン脱アセチル化酵素の中で、CBPとHDAC2、HDAC4のノックダウンにより、ショウジョウバエ3齢幼虫における脂質蓄積が変化しており、この時Fat bodyにおいてEcRの応答遺伝子の発現が変動していることが示された(Fig.1-6A, B, 7)。CBPはエクダイソンの添加によってtaimanとともにEcRと複合体を形成し、HAT活性を有することが報告されている(163)、本研究の結果と一致していた。

○ショウジョウバエを用いた*in vivo*スクリーニングの利点・問題点

これまで、核内受容体・転写因子の転写制御を行う因子の同定としては、主に過剰発現した目的因子に対する結合タンパク質を生化学的な手法により、*in*

vitro で同定していた。しかしながら、この生化学的手法には複数の問題点が存在していると考えられる。以下にその問題点を列挙してみた。

①近年の質量分析器などの革新的な発達により、生化学的な手腕が未熟な人でも結合タンパク質が比較的の簡便に同定できてしまい、新規に新しい因子を取得することが困難である。

②過剰発現の *in vitro* の系で同定が出来る因子には限界がある。

③同定因子の結合は *in vitro* における結合であり、実際に *in vivo* で結合している保証がない。

④実際に結合因子が同定できたとして、どの程度生命現象に寄与しているのかは、遺伝子欠損マウスなどを作出してみないと検討できない。

しかしながら、今回の *in vivo* スクリーニングを用いることで、上記の問題点はほとんど解消することが出来る。なぜならば、同定した因子は内因性の *in vivo* で EcR の転写制御に寄与し、脂質代謝制御を行っていることが確実な因子だからである。さらに、この *in vivo* スクリーニング系は標的する臓器を変更することで、組織特異的な転写制御因子複合体の同定も期待できるのも、*in vitro* の培養細胞を用いた手法とは大きく異なる点である。また、ショウジョウバエの RNAi ラインは非常に安価であることも、スクリーニングを実施する上では大事なポイントである。これまでに、ショウジョウバエの分子遺伝学を利用した *in vivo* スクリーニングを実施した研究は、数は少ないものの報告されており、それらは大きなインパクトを持って社会に受け入れられている。

in vivo スクリーニングの難点としては、かかる手間の多さと時間が挙げられる。しかしながら、今回のスクリーニング系は、一次スクリーニングでは各遺伝子をノックダウンした幼虫をつぶして、脂質蓄積量とタンパク質量を測定するのみ、二次スクリーニングでは Fat body を Luciferase assay に供するのみである。すなわち、利用する Luciferase transgenic ショウジョウバエさえ作製してしまえば比較的ハイスループットに実施できるスクリーニング系になっていると考えられる。

○本研究の更なる展望

本研究の展望として、哺乳類への応用を考えている。

さらに、EcR 哺乳類ホモログとして、核内受容体 LXR、FXR がある (160)。LXR は SREBP1c の発現制御を介して脂肪酸の生合成を制御する一方で、ABC トランスポーターの発現制御を介してコレステロール輸送を制御する (180)。他方、FXR は、Cyp7a1 などの発現制御を介して、コレステロールの唯一の異化経路である胆汁酸の生合成経路を制御することが知られている (180)。すなわち、LXR, FXR の両方が転写活性制御を介してヒトの脂質代謝を制御するこ

とが報告されており、生活習慣病に深く寄与している。すなわち、**EcR** 転写活性調節因子の哺乳類ホモログは、ヒトにおいて **LXR**、**FXR** の転写活性調節を担うことが期待され、メタボリックシンドローム等に対する創薬の新たなターゲットの同定が期待でき、今後のさらなる研究が望まれる。

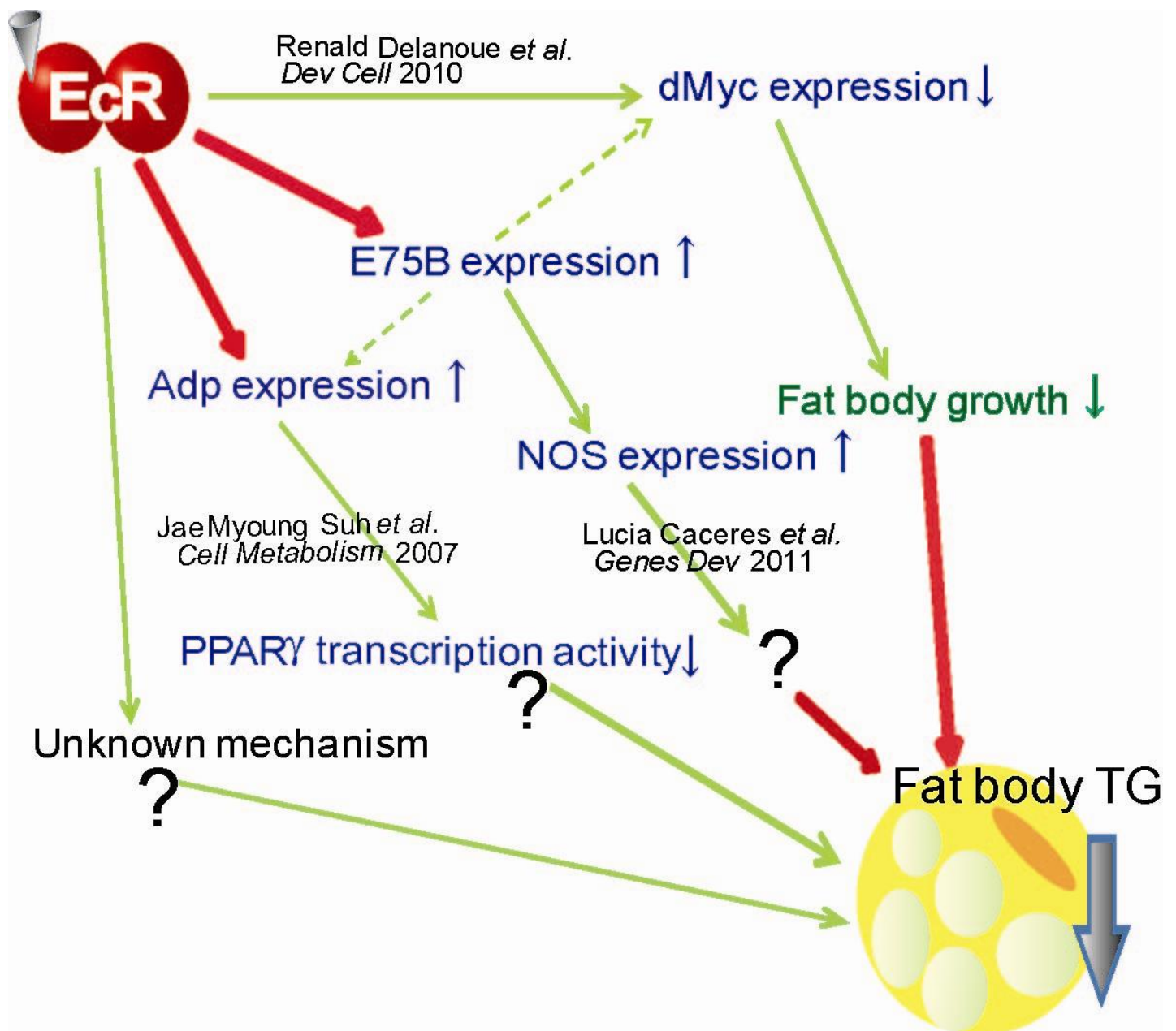


Figure ①. 蛹化時のFat bodyにおける、EcRによる脂質代謝制御機構のまとめ図
 エクダイソンによって活性化したEcRは、E75B, adpの転写誘導、dMycの転写抑制を介して、Fat bodyにおける脂質合成・細胞増殖を制御し、脂質の蓄積を抑制する

第二章

新規 RNA 結合タンパク質 D8 による 寿命・代謝制御機構の解明

第一節 緒言

肥満は動脈硬化や冠動脈疾患などといった重篤な生活習慣病の根源となっている。一方で恒常的なカロリー制限は多くの生物種において寿命を延長させることが報告されている。これらの事実から、生物個体の寿命と脂質代謝との間には密接なクロストークが存在していることが考えられる。本研究では、生体内において機能未知である D8 遺伝子の欠損マウスの寿命が雄マウスで有意に延長しているのを発見したことをきっかけとし、RNA 結合タンパク質 D8 による寿命・代謝制御機構の解明を目指した。

第二節 実験方法

・ 実験材料

細胞培養試薬

粉末ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified eagle's medium; DMEM) は日水製薬から購入した。Penicillin および Streptomycin (P/St) は (株) 明治製菓から購入した。ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS) は Biowest から購入した。トリプシン粉末は GIBCO から購入した。コラーゲンコートディッシュは BD から購入した。Insulin、Dexametazon、3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)、forskolin、Isopreterenol、ポリブレン (hexadimethrine bromide)、Troglitazone、Tunicamycin、Thapsigargin は SIGMA から購入した。

その他、特に指定のない実験試薬類は、Wako、ナカライテスク、SIGMA の特級、生化学実験用のものを用いた。

抗体

抗 Akt 抗体 (1: 1000)、抗 Phospho-Akt (Thr308) 抗体 (1 : 1000)、抗 Phospho-Akt (Ser473) (1 : 1000) 抗体は Cell Signaling から購入した。HRP (horse radish peroxidase) 標識抗 mouse IgG 抗体 (1: 4000)、HRP 標識抗 rabbit IgG 抗体 (1: 3000) は GE Healthcare から購入した。抗 Flag 抗体 (M2) (1: 1000)、抗 actin 抗体 (1: 5000) は SIGMA から購入した。抗 D8(Mex-3B) 抗体 (1: 1000) は Atlas より購入した。抗 GAPDH 抗体は Millipore より購入した。抗体はウエスタンブロッティングを行う際に、抗血清および抗体は 5% スキムミルク/TBS-T (Tris-buffered saline-Tween20) 溶液で括弧内の濃度に希釈して使用した。ただし、リン酸化抗体に関しては、5% BSA/TBS-T 溶液に希釈して使用した。

プラスミド

[pCMV-Flag-D8]

当研究室で所有していた[pcDNA-D8]を 5'末端側に EcoRI、3'末端側に XhoI の制限酵素サイトを用いて切断した。切断産物はアガロースゲル電気泳動により精製を行い、CIAP 処理後の pCMV-Flag vector の EcoRI / XhoI サイトに挿入した。

[pMt-Flag-D8(Puro)]

上で作製した pCMV-Flag-D8 を 5'末端側に BamHI, 3'末端側に XhoI の制限酵素サイトを用いて切断し、Flag-D8 をコードする DNA 領域を切り出した。切断産物はアガロースゲル電気泳動により精製を行い、CIAP 処理後の pMt (Puro) の BamHI / XhoI サイトに挿入した。

[pMt-Flag-D8 Δ R(Puro)]

[pMt-FlagD8 Δ KH(Puro)]

上で作製した pCMV-Flag-D8 を鋳型として、D8 中の Δ R は 1-525、 Δ KH は 233-576 のアミノ酸部位をコードする領域をそれぞれ増幅し、pMt-Flag-D8(Puro)と同様の方法で作製した。

[pCS-sh D8]

[pCS-sh Luciferase]

以下に示したオリゴヌクレオチド (カートリッジ精製) を pENTR4-H1 の *Bgl* II / *Xba* I サイトに挿入した。標的配列には、当研究室において、ヒト由来の培養細胞において、ノックダウンが確認できた配列をマウスに変更したものを用いた。また、コントロールとなる [pCS sh Luciferase] は、当研究室で所有していたものを用いた。

・ sh D8

Top strand

5'-GATCCCCCGGCGACATTCTAGTAATGATAGACGTGTGCTGTCCGTCTA
TCATTACTAGAATGTGCGCCGTTTTTGGAAT-3'

Bottom strand

5'-CTAGATTTCCAAAAACGGCGACATTCTAGTAATGATAGACGGACAGCA
CACGTCTATCATTACTAGAATGTGCGCCGGG-3'

クローニングは以下のように行った。

上記の Top strand、Bottom strand のオリゴヌクレオチドを 1 μ g/ μ L となるよう milliQ 水 (Millipore) で調製し、それぞれ 2 μ L ずつ採取して Oligo Annealing Buffer (100 mM CH₃COOK、2 mM (CH₃COO)₂Mg、30 mM HEPES-KOH (pH 7.4)): 46 μ L と混合した。ヒートブロックを用いて 90°C、3 分間処理を行い、その後ヒートブロックの電源を切り、室温に戻るまで放置することでアニーリングを行った。このようにして得られた double strand DNA

(末端が *Bgl* II / *Xba* I の粘着末端) を pENTR4-H1 の *Bgl* II / *Xba* I サイトにクローニングした。このベクターと pCS-RfA-EG を Gateway LR Clonase (Invitrogen) 反応により組み換えることで、目的のレンチウイルスベクターを得た。

PCR 反応は、Invitrogen のカスタムプライマー合成サービスを利用して設計したプライマー、および KOD -Plus- DNA polymerase (TOYOBO) を用いて、以下に示した組成の反応溶液を調製して行った。

10×PCR buffer: 5 µL
2 mM dNTP mix: 5 µL
10 µM Sense Primer: 5 µL
10 µM Antisense Primer: 5 µL
Template DNA: 10 pg~200 ng
KOD -Plus- DNA polymerase: 1 µL
滅菌 milliQ 水: up to 50 µL

PCR 反応装置は Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystem) を使用した。反応条件は、94℃、3 分の反応後、熱変性を 94℃、30 秒、アニーリングを 55~60℃、30 秒、伸長反応を 72℃、増幅する断片の長さ (kbp) ×60 秒のサイクルを 30~35 回行い、最後に 68℃で 5 分間の処理をした。

また、PCR を用いて作製したプラスミドは、すべて (株) オペロンの遺伝子受託解析サービスを利用してシーケンスの確認を行った。

- ・ アガロースゲル電気泳動

アガロースとして、アガロース RE (ナカライタスク) を用いた。泳動槽には、ニサブマリン泳動槽 BE-560 (BIO CRAFT) を用いた。また、核酸の染色として、Midori Green (日本ジェネティックス) を 1/10000 量加えた TAE で後染めを行った。バンドの検出には、LED イルミネーター (BIO CRAFT) を用いた。その他の手法などは、第一章、第二節に準じた。

- ・ アガロースゲルからの DNA 断片回収

第一章、第二節に準じた。

- ・ 制限酵素処理

第一章、第二節に準じた。

- ・ CIAP 処理

第一章、第二節に準じた。

- ・ ライゲーション

第一章、第二節に準じた。

- ・ 大腸菌の形質転換（トランスフォーメーション）

〔形質転換用試薬〕

第一章、第二節に準じた。

〔大腸菌培養培地〕

- ・ LB 培地

LB Broth（関東化学）を 1 L あたり 25 g となるように溶解し、オートクレーブ滅菌した。4℃で保存した。

- ・ アンピシリン

アンピシリン（明治製菓）の粉末を滅菌 milliQ 水で 100 mg/mL となるように調製し、0.45 μm フィルター（Advantec）で濾過滅菌した後、1.5 mL チューブに分注して-20℃で保存した。

- ・ カナマイシン

カナマイシン（SIGMA）の粉末を滅菌 milliQ 水で 20 mg/mL となるように調製し、0.45 μm フィルターで濾過滅菌した後、1.5 mL チューブに分注して-20℃で保存した。

- ・ アンピシリンプレート、カナマイシンプレート

第一章第二節に準じた。

〔コンピテントセルの作製〕

コンピテントセルは大腸菌株である DH5αおよび Stbl3（Invitrogen）を使用した。レンチウイルスベクター、レトロウイルスベクターを増殖させる際には Stbl3 を、それ以外の場合には DH5αを用いた。その他の手法は第一章第二節に準じた。

〔形質転換〕

第一章第二節に準じた。

- ・ プラスミドミニプレップ（粗精製）

[Plasmid mini kit (日本ジェネティックス) を用いた回収法]

コロニーを 2 mL の 100 µg/mL アンピシリン、もしくは 20 µg/mL カナマイシンを含む LB 培地で 12-15 時間振盪培養し、8,000 rpm、4℃で 3 分間遠心した。回収した菌体に mP1 溶液を 200 µL 加え、十分に懸濁した。mP2 溶液を 200 µL 加え 5~6 回転倒混和し、2 分間室温でインキュベートした。mP3 溶液を 300 µL 加え 5~6 回転倒混和し、13,000 rpm で 2 分間遠心後、上清を付属のカラムに回収した。溶液の入ったカラムを 13,000 rpm で 30 秒間遠心後、400 µL の mP4 溶液を加え、13,000 rpm で 30 秒間遠心した。廃液を除き、600 µL の mP5 溶液を加え、再び 13,000 rpm で 30 秒間遠心することでカラムの洗浄を行った。最後に、13,000 rpm で 2 分間の遠心の後に滅菌水を 50 µL 加え 2 分間の静置後に 13,000 rpm で 2 分間遠心することでプラスミド DNA 溶液を得た。このプラスミド DNA 溶液 5 µL を制限酵素処理した後、アガロースゲル電気泳動を行うことでインサートの確認をした。

- ・ プラスミドラジブレップ (細胞内遺伝子導入用)

NucleoBond Xtra Midi (MARCHERY-NAGEL) を用いて、プロトコルに示された方法に従って行った。以下にその精製法を示す。

コロニーを 5 mL の 100 µg/mL アンピシリンか 20 µg/mL カナマイシンを含む LB 培地で 6 時間前培養を行った後、うち 100 µL を 100 µg/mL アンピシリン、もしくは 20 µg/mL カナマイシンを含む 200 mL の LB 培地で 37℃、15~18 時間振盪培養した。6,000 rpm、4℃で 10 分間遠心して菌体を回収し、Suspension Buffer (+100 µg/mL RNase A) を 8 mL 加え十分に懸濁した。懸濁後、Lysis Buffer を 8 mL 加え 4~6 回転倒混和することで混合し、5 分間室温でインキュベートした。そこに Neutralization Buffer を 8 mL 加え 4~6 回激しく転倒混和することで混合した。この懸濁液を、あらかじめ 12 mL の Equilibration Buffer で平衡化しておいたカラムに添加し自然落下により樹脂に浸透させた。Equilibration Buffer を 8 mL 加えてカラムを洗浄し、紙製フィルター廃棄後に Wash Buffer を 8 mL 加え再び洗浄した。その後、Elution Buffer を 5 mL 加え、プラスミド DNA を溶出させた。溶出した DNA 液に 3.5 mL のイソプロピルアルコールを加え混合した後、11,000 rpm、4℃で 30 分間遠心した。上清を除き、70%エタノール溶液 2 mL を加え、11,000 rpm、4℃で 10 分間遠心した。上清を除去し、DNA 沈殿を室温で 5 分間風乾させた後、滅菌 milliQ 水に溶解した。

- ・ 細胞培養試薬の調製

- ・ PBS(-) 溶液

137 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM Na₂HPO₄、1.76 mM KH₂PO₄ となるように、各試薬を MilliQ 水で溶解し、オートクレーブした。常温保存。

- 200 mM L-Glutamine

200 mM になるように、MilliQ で溶解させた後、フィルター滅菌を行った。4℃ 保存した。

- 10 % NaHCO₃

MilliQ 水に溶解させ、オートクレーブした。4℃ 保存。

- 20 % Glucose

MilliQ 水に溶解させ、フィルター滅菌を行った。4℃ 保存。

- DMEM (High Glucose)

4.75 g の粉末の DMEM を 500 mL の milliQ に溶解し、30 分間攪拌後にオートクレーブした。そこに 200 mM L-Glutamine を 10 mL、20 % Glucose を 8.75 mL を加えた。さらに 10 % NaHCO₃ 溶液を培地が赤色に変化するまで、適量加えたものを DMEM (High Glucose) として用いた。

- ウシ胎児血清 (FBS)

-20℃で凍結した血清の入った容器を 37℃の温浴中で溶解した後、56℃で 30 分間インキュベートし、補体成分の非働化を行った。

- ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (P/St)

500 μL ずつ分注し、-20℃で保存した。使用時に、培地に 1/1000 量（終濃度 100 units / mL ペニシリン、100 μg / mL ストレプトマイシン）加えた。

- Tunicamycin

DMSO で溶解し、4 mg/ml ストックを作製して-20℃で保存した。

- Thapsigargin

DMSO で溶解し、500 μM ストックを作製して-20℃で遮光保存した。

- デキサメタゾン (dexamethazone : Dex)

エタノールで溶解し、1 mM ストックを作製して-20℃で保存した。

- Troglitazone

DMSO で溶解し、10 mM ストックを作製して-20℃で遮光保存した。

- IBMX

DMSO で溶解し、0.5 M ストックを作製して-20℃で保存した。

- Forskolin

DMSO で 100 mM に調製し、-20℃で保存した。

- ポリブレン (hexadimethrine bromide)

milliQ 水で 10 mg/ml に調整し、0.20 μm フィルターでろ過滅菌を行った（用事調整）

野生型, D8 欠損マウスの飼育

D8 欠損マウスは当研究室で作製し、飼育・繁殖を行った。マウスは 12 時間毎の明暗サイクルの照明下で SPI 条件下において飼育され、固形飼料 CE-2 (CLEA) と水 (オートクレーブした蒸留水) は自由摂取とした。床敷は乾熱滅菌されたソフトチップを使用し、ケージは夏目製作所、飲水ボトルは日本クリアよりそれぞれ購入したものを用いた。D8 欠損マウスの BALB マウスライン、C57BL6J マウスラインはともに 8 回以上の野生型とのバッククロスを行った。全ての実験は D8 ヘテロ欠損マウス雌雄のかけ合わせから得られた同腹子を用いて行われた。また、全ての動物実験は東京大学動物実験実施規則に基づいて行った。

・ Genotyping

個体標識には耳パンチ法を用いた。手術用はさみを用いて 4 週齢程度のマウスより尻尾を約 2 mm 切り取り、1.5 mL チューブに採取した。600 μ L の 50 mM NaOH を加え、90 $^{\circ}$ C のヒートブロックで 30 分間処理した。熱処理後、10 秒間ボルテックスを行い、溶液を十分に攪拌した後、1 M Tris-HCl (pH=8.0) を 50 μ L 加え、再びよくボルテックスした。その後、15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心を行ったものの上清を、以下の PCR 反応における Template genome DNA solution として用いた。PCR 反応溶液の組成、および野生型、D8 KO のそれぞれのアリルを特異的に認識するプライマーを以下に示す。

10 \times NH₄ Reaction Buffer: 2 μ L

50 mM MgCl₂: 0.8 μ L

2 mM dNTP mix: 2 μ L

5 μ M Primer Mixture: 1 μ L

Template genome DNA solution: 1 μ L

BIOTAQ DNA Polymerase: 0.2 μ L

滅菌 milliQ 水: up to 20 μ L

[D8 (wild-type allele)]

Sense: 5'- GTTGGTTTTTGTGTGCGGCGCGCCGTTTAA -3'

[knockout allele]

Sense: 5'- GTGTTCTAGAACGAGCGCTGTAGGAACCCA -3'

[common allele (Reverse)]

Antisense: 5'- GTCACTCAGGCCATCCGCATTTTTTCCTGA -3'

PCR 反応装置は Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystem) を使用した。反応条件は、94℃、2 分の反応後、熱変性を 94℃、30 秒、アニーリングを 55℃、30 秒、伸長反応を 72℃、30 秒のサイクルを 35 回行った。PCR 反応後、10 μ L の溶液を、2%のアガロースゲルを用いたアガロースゲル電気泳動に供した。

- ・ マウス胚性幹細胞 (MEF) の調製
- ・ トリプシン溶液

トリプシン粉末 (GIBCO) を 0.25% (w/v) となるように PBS (-) に溶かし、0.45 μ m フィルター (Advantec) に通して濾過滅菌した (用事調製)。

交配をかけた日から 13.5 日後、C57BL6J 雌マウスの全身を 70%エタノールでアルコール消毒し、開腹後に胎児の入った子宮を取り出した。臍帯の付け根をはさみで切断後、子宮から胎児を一匹ずつ取り出して PBS (-) に浸した。胎児から頭、内臓、手足、尻尾を除いた後、氷冷したトリプシン溶液 1 mL に移し、鋭利なはさみを用いて 2~3 mm にミンスした。15 mL チューブに移し、トリプシン溶液で液量を胎児 1 匹あたり 5 mL に合わせ、37℃で 60~100 cycle / min で消化具合を見ながら 10 分間振盪した。トリプシンの反応を止めるため、FBS を 1 mL 加えてよく懸濁し、さらに細胞塊を除くためこれを 100 μ m セルストレーナー (Falcon) のメッシュを用いて濾した。濾過された細胞懸濁液を遠心 (280 \times g、5 分間、4℃) 後、上清を除き、得られた沈殿を基本培地 (DMEM (High Glucose), 10% FBS, P/St) で懸濁して 100 mm dish に胎児 1 匹当たり 1 well の割合で播いた。翌日、培地交換を行い、トリプシン処理により播き直して実験に用いた。

- ・ 初代前駆脂肪細胞 (primary preadipocytes) の調製
- ・ コラゲナーゼ溶液

Collagenase, Type II (SIGMA) を DMEM (High Glucose) に 1 mg/mL となるよう溶かし、これを 0.45 μ m フィルター (Advantec) に通して濾過滅菌した。(用事調製)

C57BL6 雄マウスの全身をアルコール消毒した後、開腹後に下腹部皮下白色脂肪組織を取り出した。DMEM で洗浄後、1 mL のコラゲナーゼ溶液中で 1~2 mm 大にまでミンスした。これに組織 1 g あたり 4 mL のコラゲナーゼ溶液を加

え、15 mL チューブに移し、37°C、60~100 cycle / min で消化具合を見ながら 60 分間振盪した。これを 100 μ m セルストレーナー (Falcon) のメッシュを用いて濾した。濾過された液 (細胞を含む) を 15 mL チューブに移し、遠心 (280 \times g、5 分間、4°C) した。上清を除き、沈殿を DMEM (High Glucose) で 3 回洗浄後、コラーゲンコートされた 6 well plate に 1 匹当たり 1 well の割合で播き、基本培地 (DMEM (High Glucose), 10% FBS, P/St) で培養した。翌日、培地交換を行い、8 割程度まで増殖させ、これをトリプシン処理により複数の well に撒きなおして解析に用いた。

細胞培養

<3T3-L1 細胞>

・分化誘導培地

DMEM (High Glucose), 10% FBS, P/St, 10 μ g/mL insulin, 0.5 mM IBMX, 1 μ M Dex (dexamethazone) , 10 μ M Troglitazone

・分化促進培地

DMEM (High Glucose), 10% FBS, P/St, 10 μ g/mL insulin

3T3-L1 細胞は東京大学分子細胞生物学研究所旧核内情報研究分野からご供与いただいた。3T3-L1 細胞の培地は、基本培地 (DMEM (High Glucose), 10% FBS, P/St) を用い、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。継代は 2 \times 10⁵ cells / dish (100 mm dish) の割合で行った。脂肪細胞に分化させる際、コラーゲンコートディッシュを用い、基本培地で培養した。コンフルエントに達してから 2 日後、分化誘導培地に交換し、さらに 48 時間後に分化促進培地に交換した。その後 2 日ごとに分化促進培地を交換し、実験に用いた。

<HEK293-FT 細胞>

HEK293F 細胞に SV40 (Simian virus 40) ウイルス由来 T-large 抗原遺伝子を組み込んだ HEK293-FT 細胞は、DMEM (High Glucose), 10% FBS, P/St を用い、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養し、1 \times 10⁶ cells / dish の割合で継代を行った。

<Plat-E 細胞>

Plat-E 細胞は、DMEM (High Glucose), 10% FBS, P/St を用い、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養し、1 \times 10⁶ cells / dish の割合で継代を行った。

<MEF>

- ・ 分化誘導培地

DMEM (High Glucose), 10% FBS, P/St, 10 µg/mL insulin, 0.5 mM IBMX, 1 µM Dex, 10 µM Troglitazone

- ・ 分化促進培地

DMEM (High Glucose), 10% FBS, P/St, 10 µg/mL insulin

MEF は、基本培地 (DMEM (High Glucose), 10% FBS, P/St) を用い、37℃、5% CO₂ のインキュベーター内で培養した。脂肪細胞に分化させる際には、passage: 2 ですべての実験を行い、3T3-L1 細胞と同様にコラーゲンコートディッシュを用い、基本培地で培養した。コンフルエントに達してから 2 日後、分化誘導培地に交換し、48 時間後に分化促進培地に交換した。その後 2 日ごとに分化促進培地を交換し、実験に用いた。

< 初代前駆脂肪細胞・SVC >

- ・ 分化誘導培地

DMEM (High Glucose), 10% FBS, P/St, 10 µg/mL insulin, 0.5 mM IBMX, 1 µM Dex, 10 µM Troglitazone

- ・ 分化促進培地

DMEM (High Glucose), 10% FBS, P/St, 10 µg/mL insulin

初代前駆脂肪細胞は、基本培地 (DMEM (High Glucose), 10% FBS, P/St) を用い、37℃、5% CO₂ インキュベーター内で培養して、passage: 2 ですべての実験を行った。脂肪細胞に分化させる際は、3T3-L1 細胞と同様にコラーゲンコートディッシュを用い、基本培地で培養した。コンフルエントに達してから 2 日後、分化誘導培地に交換し、48 時間後に分化促進培地に交換した。その後 2 日ごとに分化促進培地を交換し、実験に用いた。

< RAW264.7 細胞 >

RAW264.7 細胞は、東京大学分子細胞生物学研究所・発生再生分野よりご供与いただいた。RAW264.7 細胞は DMEM (High Glucose), 10% FBS, P/St を用い、37℃、5% CO₂ インキュベーター内で培養し、2×10⁶ cells / dish の割合で継代を行った。

- ・ 細胞の継代

(○RAW264.7 細胞以外の培養細胞の継代)

100 mm dish で培養した細胞を PBS (-) で洗浄した後、トリプシン溶液を 1.5

mL 加え、37℃、5% CO₂ インキュベーター内で 5 分間インキュベートした。顕微鏡観察により細胞が剥がれたのを確認した後、通常培養時に用いる培地 4 mL を加えてトリプシンを失活させ、50 mL チューブに回収した。190×g で 5 分間遠心後上清を除去し、培地を適量加え、ピペッティングにより懸濁した。ヘモサイトメーターを用いて細胞数を計測し、必要な細胞数を含む一部の懸濁液を新たな dish に播いた。

(○RAW264.7 細胞の継代)

100 mm dish で培養した細胞を PBS (-) で洗浄した後、新しい DMEM/FBS 培地を加え、滅菌したセルスクレイパーで穏やかに細胞を dish からはがし、50 mL チューブに回収した。ピペッティングした後、ヘモサイトメーターを用いて細胞数を計測し、必要な細胞数を含む一部の懸濁液を新たな dish に播いた。

・RNA 抽出

<細胞からの抽出>

6 well plate で培養した細胞を PBS (-) で洗浄した後、TRIsure (日本ジェネティックス) を 0.5 mL 添加してセルスクレイパーで掻きとり、1.5 mL チューブに移した。数回ピペッティングして細胞塊を均一にした後、クロロホルム: 100 μL を加えボルテックスで 10 秒間攪拌し、15,000 rpm、4℃で 15 分間遠心した。上清を新たな 1.5 mL チューブに回収し、イソプロピルアルコール: 250 μL を加えて転倒混和した後、室温で 10 分間放置した。15,000 rpm、4℃で 15 分間遠心して RNA をペレットにした。沈殿を 75% エタノール: 0.5 mL で洗浄し、15,000 rpm、4℃で 10 分間遠心した。得られた沈殿をペーパータオル上で 10 分間空気乾燥させ、適量の MilliQ 水に溶解した。

<組織からの抽出>

マウスから回収した各組織は PBS (-) で洗浄後に、直ちに液体窒素にて瞬間凍結を行った。その後、各組織は、氷上にて融解後、氷冷した PBS (-) で洗浄した後、100 mg あたり 1 mL の TRIsure (日本ジェネティックス) を加えてポリtron ホモジナイザー (KINEMATICA) で粉碎した。さらに、組織懸濁液を 21G シリンジで 10~12 回通した。続いて、組織懸濁液 1 mL につき 200 μL のクロロホルムを加え、ボルテックスで 10 秒間攪拌し、15,000 rpm、4℃で 15 分間遠心した。上清にイソプロピルアルコール: 500 μL を加え、転倒混和した後、室温で 10 分間放置した。15,000 rpm、4℃で 15 分間遠心して RNA をペレットにした。沈殿を 75% エタノール: 1 mL で洗浄し、15,000 rpm、4℃で 10 分間遠心した。得られた沈殿をペーパータオル上で 10 分間空気乾燥させ、適当

量の MilliQ 水に溶解した。

- ・ 逆転写反応 (Reverse Transcription; RT)

第一章第二節に準じた

- ・ Real-time PCR

モニタリング試薬として、SYBR Green (Roche) を用いて各遺伝子の mRNA 発現量を定量した。基本的な反応液の組成を以下に記す。

Power SYBR Green PCR Master Mix: 5 μ L

5 μ M forward primer: 1 μ L

5 μ M reverse priemer: 1 μ L

Template cDNA: 3 μ L

Light Cycler 480 Multiple plate 96, white (Roche) 中で上記の反応液を混合し、スピンドウンを行った後、Light Cycler 480 (Roche) を用いて反応および定量を行った。定量には Δ CT 法を用いた。それぞれの遺伝子の mRNA 量は、 β -actin もしくは S-17 の mRNA 量で除することで補正した。また 1 回の試行につき 3 連のサンプルを用い、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定にはスチューデントの t 検定を用いた。

以下に、本研究にて用いた各 primer 配列を記す。

s-17	f	5'- ATTCAGAGAGGGCCTGTGAG -3'
	r	5'- CGGGATCCACCTCAATGAT -3'
β -actin	f	5'- GGATGCAGAAGGAGATTACTGC -3'
	r	5'- CCACCGATCCACACAGAGCA -3'
D8(Mouse)	f	5'- AGATCGTAGGGAGGCAAGG -3'
	r	5'- GCCCGTCACAACAAAGACA -3'
PPAR γ	f	5'- AGGCCGAGAAGGAGAAGCTGTTG -3'
	r	5'- TGGCCACCTCTTTGCTCTGCTC -3'
Perilipin	f	5'- AACGTGGTAGACACTGTGGTACA -3'
	r	5'- TCTCGGAATTCGCTCTCG -3'
C/EBP α	f	5'- TGGCAAGAACAGCAACGAG -3'
	r	5'- TCACTGGTCAACTCCAGCAC -3'
PEPCK	f	5'- GGAGTACCCATTGAGGGTATCAT -3'

F4/80	r	5'- GCTGAGGGCTTCATAGACAAG -3'
	f	5'- CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC -3'
TNF α	r	5'- GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG -3'
	f	5'- AAGCCTGTAGCCCACGTCGTA -3'
IL-6	r	5'- GGCACCACTAGTTGGTTGTCTTTG -3'
	f	5'- GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA -3'
IL-1 β	r	5'- CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA -3'
	f	5'- TCCAGGATGAGGACATGAGCAC -3'
MCP-1	r	5'- GAACGTCACACACCAGCAGGTTA -3'
	f	5'- CCACTCACCTGCTGCTACTCAT -3'
adiponectin	r	5'- TGGTGATCCTCTTAGCTCTCC -3'
	f	5'- ATGGCAGAGATGGCACTCCT -3'
BiP	r	5'- CCTTCAGCTCCTGTCATTCCA -3'
	f	5'- CGTGGAGATCATAGCCAACG -3'
CHOP	r	5'- ATACGCCTCAGCAGTCTCCT -3'
	f	5'- AGCCTGGTATGAGGATCTGC -3'
p16	r	5'- CTCCTGCTCCTTCTCCTTCA -3'
	f	5'- AATCTCCGCGAGGAAAGC -3'
p19 ARF	r	5'- GTCTGCAGCGGACTCCAT -3'
	f	5'- AATCTCCGCGAGGAAAGC -3'
p21	r	5'- GTCTGCAGCGGACTCCAT -3'
	f	5'- TCCACAGCGATATCCAGACA -3'
Mex-3A	r	5'- GGACATCACCAGGATTGGAC -3'
	f	5'- TGGGAGAGAAGTCTGGAGAGTG -3'
Mex-3C	r	5'- CCGTCTCAAACCTGATTCTTTGG -3'
	f	5'- CAGTGGGTCCCAGAGCCTA -3'
Mex-3D	r	5'- GGCAGCACTGGAAGTGTCA -3'
	f	5'- CCCAACACACACTCCCTTTT -3'
D8(Human)	r	5'- TACCCTCCCATTACCCTCCT -3'
	f	5'- CCCAGTTCTGAGCATGTCTG -3'
GAPDH(Human)	r	5'- GCCCGTCACAACAAAGACA -3'(マウスと共通)
	f	5'- GCACCGTCAAGGCTGAGAAC -3'
	r	5'- TGGTGAAGACGCCAGTGGA -3'

・ ヒト臓器由来 cDNA を用いた Real time RT-PCR

ヒト臓器由来の cDNA として、Human multiple tissue cDNA panel I & II (Clontech) を用いた。その他の Real time RT-PCR の手法は上記に準じた。

・ RT-PCR による XBP-1 splicing の検出

XBP-1 mRNA の splicing を検出するために以下の試薬を混合し、PCR 反応を行った。PCR 反応溶液の組成およびプライマーを以下に示す。

10×NH₄ Reaction Buffer: 2 μL
50 mM MgCl₂: 0.8 μL
2 mM dNTP mix: 2 μL
10 μM Sense Primer: 1 μL
10 μM Antisense Primer: 1 μL
cDNA: 10 倍希釈した RT 溶液: 1 μL
BIOTAQ DNA Polymerase: 0.2 μL
滅菌 milliQ 水: up to 20 μL

Sense: 5'- TTACGGGAGAAAACCTCACGGC-3'
Antisense: 5'- GGGTCCAACCTTGTCAGAAATGC -3'

PCR 反応装置は Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystem) を使用した。反応条件は、94℃、10 分の反応後、熱変性を 94℃、30 秒、アニーリングを 58℃、30 秒、伸長反応を 72℃、30 秒のサイクルを 35 回行った。PCR 反応後、15 μL の溶液を 2.5% のアガロースゲルを用いたアガロースゲル電気泳動に供した。

・ ウエスタンブロッティング

・ TNE buffer

10 mM Tris-HCl(pH 7.5)、150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40
4℃で保存し、使用時に protease inhibitor cocktail (PIC) [5 mg/mL aprotinin (SIGMA) , 5 mg/mL chymostatin (ナカライタスク) , 5 mg/mL leupeptin (ナカライタスク) , 5 mg/mL PepstatinA (SIGMA)] を 1/1000 量となるように加えた。また、リン酸化タンパク質を検出したい場合は、これに加えて脱リン酸化阻害剤 1 M Na₃VO₄ を 1/1000 量加えた。

・ 6×Laemmli Sample Buffer

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)/ SDS 0.4 %: 7 mL、glycerol: 3.6 mL、SDS (sodium dodecyl sulfate): 1.0 g、DTT: 0.93 g、BPB (bromo phenol blue): a few (色が

つく程度)

1 mL ずつ 1.5 mL チューブに分注し、ストックは-80℃で、使用中のものは-20℃で保存した。

<培養細胞からのタンパク質の抽出>

6 well plate で培養した細胞を回収し、PBS (-)で洗浄した後、TNE buffer を 200 μ L / well 加えた。スクレイパーで掻きとって 1.5 mL チューブに回収し、25G シリンジを用いて 10~12 回ホモジナイズした。これらの操作はすべて氷上で行った。15,000 rpm、4℃で 5 分間遠心した後、適量の上清を 1.5 mL チューブに移し、1/5 量の 6×Laemmli Sample Buffer を加え、95℃、5 分間加熱処理した。これをタンパク質サンプルとしてポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供した。

<マウス組織からのタンパク質の抽出>

凍結保存したマウスの組織を、氷冷した TNE Buffer につけ、氷上でポリトロンホモジナイザーを用いて破碎した。それらを 4℃、11000 rpm で 10 分間遠心し、沈殿と上清に浮かんだ脂質を取らないようにシリンジで透明な上清を取り、タンパク定量を行って、タンパク量を合わせたものに、1/5 量の 6×Laemmli Sample Buffer を加え、95℃で 5 分間加熱処理した。これをタンパク質サンプルとしてポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供した。

[SDS-PAGE]

・分離ゲル (10%ミニゲル 2 枚量)

1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) / SDS 0.4%: 4.5 mL、30% Acrylamide-bis (37.5: 1): 6 mL、milliQ 水: 7.5 mL を混合した後、10% (w/v) 過硫酸アンモニウム (Ammonium persulfate; APS): 120 μ L、TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine): 12 μ L を加えた。ボルテックスで激しく攪拌し、セットしたゲル板に流し込んだ。1 mL の 99.5%エタノールをすばやく重曹し、1 時間室温で放置した。なお、濃度の異なるゲルの作成時は Acrylamide-bis (37.5: 1) と milliQ 水の比を変えて調節した。

・濃縮ゲル (3%) (ミニゲル 2 枚量)

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8): 1.5 mL、30% Acrylamide-bis (37.5:1): 0.9 mL、milliQ 水: 3.6 mL を混合した後、10% APS: 40 μ L、TEMED: 6 μ L を加えた。ボルテックスで激しく攪拌し、重曹した milliQ 水をよく除いた分離ゲルの上に流し込んだ。コームをすばやく挿し、そのまま室温で 30 分間放置した。

ゲルボックスに泳動バッファー (25 mM Tris、192 mM Glycine、0.1% (w/v) SDS) を入れ、ゲル板の下部に泡が入らないように注意しながらゲル板をセットした。さらにゲル板の内側にも泳動バッファーをウェルよりも高い位置まで満たした。コームをゆっくりと抜き、サンプルを 5~25 μ L アプライして、ミニゲル一枚当たり 25 mA 定電圧で電気泳動を行った。なおマーカーには Bluestar Prestained Protein Marker (日本ジェネティックス) を用いた。

〔ブロッティング〕

セミドライ式ブロッティング装置 (Bio craft) を用いてブロッティングを行った。PVDF (polyvinyliden difluoride) メンブレン (Immobilon; Millipore) を 5.5 cm \times 9 cm の大きさに切り、メタノールに 2 分間浸した後、ブロッティングバッファー (25 mM Tris、192 mM グリシン、20% メタノール) に 10 分間浸した。濾紙は 6 cm \times 9 cm の大きさに切りブロッティングバッファーに浸した。

泳動後のゲルをゲル板からはがし、ブロッティングバッファーに浸した後、下側から濾紙 2 枚、ゲル、メンブレン、濾紙 2 枚の順にブロッティング装置にセットした。ブロッティングはミニゲルのメンブレン 1 枚につき 81 mA の定電流で 65 分間行った。

〔抗体反応〕

・ TBS-T

ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート (Wako, ICI 社商標 Tween 20 相当) を終濃度 0.1% となるように TBS (-) に加え、混合した。

・ ブロッキング溶液

5% (w/v) の濃度になるようにスキムミルク粉末 (Wako) を TBS-T に希釈した。リン酸化タンパク質を検出する場合は、5% (w/v) の濃度になるように BSA (Wako) を TBS-T に希釈したものを用いた。

メンブレンをブロッキング溶液に浸し、室温で 1 時間もしくは 4 $^{\circ}$ C で一晩ゆっくり振盪することでブロッキングした。適当な濃度に希釈した一次抗体溶液にメンブレンを浸し、ハイブリ・バック (コスモバイオ) パッケージした状態で 4 $^{\circ}$ C にて一晩以上インキュベートした。少量の TBS-T で 3 回すすいだのち、十分量の TBS-T にメンブレンを浸し 10 分間激しく振盪することで 3 回洗浄した。HRP 標識二次抗体をブロッキング溶液で適当な濃度に希釈し、室温で 30~45 分間メンブレンをインキュベートした。少量の TBS-T で 3 回すすいだのち、たっぷりの TBS-T にメンブレンを浸し 10 分間激しく振盪することで 3 回洗浄した。

LuminataTM Forte Western HRP Substrate (Millipore) にメンブレンを 1

～2 分間浸し、検出試薬を除去した。シグナルはルミノイメージアナライザー LAS-400 mini (FUJIFILM) で検出し、MultiGauge ソフトウェアで解析を行った。

- ・ PEI を用いた遺伝子導入

PEI による遺伝子導入は HEK293FT 細胞、Plat-E 細胞を用いた場合に行った。以下に 6 well plate を用いた場合の遺伝子導入法を示す。

4 μ g のプラスミド DNA を Opti-MEM (GIBCO) : 250 μ L に加えて優しく混和し、DNA Mix を調製した。一方で 10 μ L の PEI を 250 μ L の Opti-MEM に加えて優しく混和し、PEI Mix を調製した。5 分後、DNA Mix と PEI Mix を混和し、20 分間室温でインキュベートした。得られた DNA complex の溶液 500 μ L を P/St を除いた培地 2 mL で培養している細胞にまんべんなく行き渡るように加えた。37°C、5% CO₂ のインキュベーターで培養し、12 時間後、基本培地に培地交換した。

- ・ レトロウイルスベクターによる遺伝子導入

トランスフェクションの前日、HEK293-T 細胞由来のウイルスパッケージング細胞である Plat-E 細胞を、100 mm dish に 2×10^6 cells / dish となるように播種した。翌日、レトロウイルスベクターをそれぞれ 30 μ g ずつ、PEI を用いて遺伝子導入した。以下、遺伝子導入後から 3T3-L1 細胞へのインフェクションまでの操作は P2 レベルで行った。

遺伝子導入から 12 時間後に DMEM 培地 (10% FBS, P/St) で培地交換 (10 mL / dish) を行い、さらに 24～36 時間後に培養上清を回収した。得られた培養上清を 0.45 μ m フィルター (Advantec) を通すことで濾過滅菌し、レトロウイルスストック液とした (-80°C 保存)。それらに、用事調製した 10 mg/mL ポリブレン溶液を終濃度 10 μ g/mL となるように加え、レトロウイルス溶液とした。

インフェクションする前日、3T3-L1 細胞を 6 well plate に 2×10^5 cells / well となるように播種した。翌日、レトロウイルス溶液を 2 mL / well となるように加え、1,370 \times g (PlateSpin II (Kubota) で 3,500 rpm)、室温で 90 分間遠心した。37°C、5% CO₂ のインキュベーター内で 8 時間培養後、培地を基本培地に交換してその後の実験に用いた。

- ・ レンチウイルスベクターによる遺伝子導入

トランスフェクションの前日、HEK293-FT 細胞を 100 mm dish に 2×10^6 cells / dish となるように播種した。翌日、目的の遺伝子を発現するレンチウイ

ルスベクターを 10 μ g、pCAG-HIVgp を 4 μ g、pCMV-VSV-G-RSV-Rev を 4 μ g ずつ PEI を用いて遺伝子導入した。以下、遺伝子導入後から 3T3-L1 細胞へのインフェクションまでの操作は P2 レベルで行った。

遺伝子導入から 12 時間後に 10 μ M forskolin を含む DMEM 培地 (10% FBS, P/St) で培地交換 (10 mL / dish) を行い、さらに 24~48 時間後に培養上清を回収した。得られた培養上清を 0.45 μ m フィルター (Advantec) を通すことで濾過滅菌し、レンチウイルスストック液とした (-80°C 保存)。インフェクション後に GFP の蛍光強度がコントロールとほぼ同じになるように適量の基本培地 (DMEM, 10% FBS, P/St) を加え、さらに用事調製した 10 mg/mL ポリブレン溶液を終濃度 10 μ g/mL となるように添加して、レンチウイルス溶液とした。

インフェクションの前日、3T3-L1 細胞を 6 well plate に 2×10^5 cells / well となるように播種した。翌日、レンチウイルス溶液を 2 mL / well となるように加え、1,370 \times g、室温で 90 分間遠心した。基本培地で 2 回 wash した後、37°C、5% CO₂ のインキュベーター内で培養し、実験に用いた。

・ Lipofectamin RNAi MAX を用いたノックダウン法

Lipofectamin RNAi MAX (Invitrogen) による特定遺伝子のノックダウンは 3T3-L1 細胞を用いた場合に行った。以下に 6 well plate を用いた場合の遺伝子導入法を示す。

100 pmol の siRNA (Invitrogen) を Opti-MEM (GIBCO) : 250 μ L に加えて優しく混和し、RNA Mix を調製した。一方で 5 μ L の Lipofectamin RNAi MAX を 250 μ L の Opti-MEM に加えて優しく混和し、Lipofectamin Mix を調製した。5 分後、RNA Mix と Lipofectamin Mix を混和し、20 分間室温でインキュベートした。得られた RNA complex の溶液 500 μ L を P/St を除いた培地 2 mL で培養している細胞にまんべんなく行き渡るように加えた。37°C、5% CO₂ のインキュベーターで培養し、12 時間後、基本培地に培地交換した。

・ Oil Red O 染色

Oil Red O 染色溶液は 0.5% Oil Red O / 2-プロパノール: milliQ 水を 3: 2 の割合で混ぜ、室温で 10 分間放置し、濾紙で濾過することにより調製した。染色溶液は使用ごとに要事調整した。

6 well plate 上で脂肪細胞分化させた細胞を回収し、2 mL (/ well) の培地のうち 1 mL を除いて氷冷した 4% paraformaldehyde / PBS (-) 溶液を 1 mL 加え、室温で 20 分間放置した。培地を除き、氷冷した 4% paraformaldehyde / PBS (-) 溶液を 2 mL / well の割合で加え、室温で 1 時間放置した。蒸留水で 2~3 回洗

浄し、Oil Red O 染色溶液を 2 mL / well の割合で加え、室温で 1 時間放置した。蒸留水で 2~3 回洗浄した後、位相差顕微鏡で観察した。ウェル全体の写真は蒸留水を除いて風乾させた後に EasyShare C340 (Kodak) を用いて撮影した。

・ 細胞内 Triacylglycerol (TG) 定量

6 well plate で培養した細胞を PBS (-) で 2 回洗浄後、ヘキサン-イソプロピルアルコール溶液 (3: 2 (v/v)) を 300 μ L / well 加えた。氷上で 10 分間インキュベートした後、溶液を 1.5 mL チューブに回収した。この抽出操作を 2 回繰り返した後、吸引遠心機を用いて溶媒がなくなるまで乾燥させた (37°C、1 時間以上)。イソプロピルアルコール: 30 μ L に再溶解し、脂質抽出サンプルとした。96 well plate 上でサンプル: 5 μ L に TG 定量の場合はトリグリセライド E-テストワコー (Wako) 発色液: 150 μ L、コレステロールの場合は総コレステロール E テストワコー (Wako) 発色液 150 μ L をそれぞれ加え、肉眼で色 (青色) が観察されるまで 37°C でインキュベートし、595 nm における吸光度を測定した。また一方、脂質抽出後のウェルに Tris-HCl Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% Triton X-100) : 500 μ L を加え、スクレイパーで掻きとって細胞を回収した。25G シリンジで 10~12 回ホモジナイズ後、15,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心してタンパク質サンプルとした。96 well plate 上でサンプル: 5~10 μ L に BCA Protein Assay (PIERCE) 反応液 (A 液と B 液を 50: 1 で混合) : 150 μ L を加えた。65°C で 30 分間インキュベートした後、570 nm の吸光度を測定することでタンパク量を測定した。検量線には BSA 溶液を希釈したサンプルを用いた。1 回の試行につき 3 連で行い、TG 量をタンパク量で除した値を真の TG 値とし、平均値と標準偏差を算出した。有意差検定にはスチューデントの t 検定を用いた。

・ マウスの解剖

マウスの解剖は、頸椎脱臼による安楽死後、もしくはジエチルエーテル麻酔下で解剖を行った。麻酔を用いた場合は、解剖後に直ちに心臓を切断し、安楽死させた。

肝臓や脂肪組織などの各臓器は氷冷した PBS で洗うことで血液や毛を除いた後に、直ちに液体窒素で凍結し、その後は実験に用いるまで -80°C で保管した。組織切片の観察に用いる場合は、10%ホルマリン/PBS に移し、固定させた。

・ マウス血清の調整および血清成分の測定

マウスの血液は、麻酔中にシリンジと 23G 注射針を用いて下大静脈から採血した。採血後、血液は 1.5 mL チューブに移し、転倒攪拌後、常温で 1 時間静置

した。その後に、4℃、3000 rpm で 30 分間遠心し、上清をとることで血清を得た。ヘモグロビン A1c を測定するための全血は、マウス血液 30 μ L を 10 mM の EDTA 5 μ L を混合させたものを用いた。

マウスの血液成分の測定は長浜ライフサイエンスラボラトリーに解析を委託した。有意差検定にはスチューデントの t 検定を用いた。

・ マウスの寿命測定実験

野生型および D8 ヘテロ欠損、ホモ欠損マウスは SPF 環境下において、自由摂食させ、同腹子は同一ケージにて飼育させた。死亡した日を記録し、100 日以内に死亡した個体は記録より除去した。得られた記録より生存曲線の作製ならびに平均寿命を求めた。生存曲線に対する有意差検定には Logrank 検定を用い、平均寿命に対する有意差検定にはスチューデントの t 検定を用いた。

・ 糖負荷実験：Glucose Tolerance Test (GTT)

単独飼育条件下で 17 時間絶食にかけた野生型および D8 KO マウスに対して、2 g/kg となるように、Glucose(+) (Wako) を腹腔内投与した。その後、0, 15, 30, 60, 90, 120 分と経時的に尾静脈における血糖値を、アセンシアブリーズ 2 (バイエル薬品株式会社) を用いて測定した。有意差検定にはスチューデントの t 検定を用いた。

・ インスリン負荷実験：Insulin Tolerance Test (ITT)

単独飼育条件下で 4 時間絶食にかけた野生型および D8 KO マウスに対して、1 IU (International Unit) / kg となるように、PBS で希釈した Human recombinant Insulin (Invitrogen) を腹腔内投与した。その後、0, 15, 30, 60, 90, 120 分と経時的に尾静脈における血糖値を、アセンシアブリーズ 2 (バイエル薬品株式会社) を用いて測定した。有意差検定にはスチューデントの t 検定を用いた。

・ マウスの絶食・再摂食実験

7~9 週齢雄の野生型マウスを体重ごとに群分けしたうえで、単独飼育し、自由摂食、24 時間絶食、24 時間絶食後に給餌を行って 24 時間再摂食させた後、屠殺した。

・ db/db マウスの飼育・解剖

肥満モデルマウスである db/db マウス (BKS Cg. db/db) は日本クレアより購入した。対照群として、db/db マウスのコントロールマウス (BKS Cg. m+/m+) を飼育した。

を同じく日本クレアから購入し、実験に用いた。それぞれのマウスは単独飼育条件下で 15 週齢まで飼育し、6 時間絶食にかけた後に、屠殺し、各臓器を回収した。

・ マウスへの摂取カロリー制限実験

日本クレアより購入した C57BL6J ラインの雄マウスを体重が均等になるように 2 群に群分けし、単独飼育した。一つの群には自由摂食群として、十分量の餌を与えた状態で、自由に食餌させ、週当たりの摂食量を記録した。もう一方の群は、摂取カロリー制限して、自由摂食群が摂食した 60%の重量の餌になるように週 3 回に分けて給餌した。各群のともに経時的に体重を計測し、210 日間飼育した。屠殺前には、2 時間の軽い絶食をかけ、臓器を回収した。

・ マウスへの高脂肪食負荷実験

7 - 9 週齢雄の野生型マウス, D8 欠損マウス 13-18 匹を体重ごとに群分けしたうえで、単独飼育し、通常食(10 kcal%Fat, Normal Diet:ND)、高脂肪食 (60 kcal%Fat, High Fat Diet:HFD)(Research diets)を給餌し、13 週間それぞれ体重と摂食量を測定した。6 時間絶食をさせて屠殺した。体重および組織重量の有意差検定にはスチューデントの t 検定を用いた。

・ マウス内臓脂肪組織のパラフィン固定および切片作製

600 日齢の野生型ならびに D8 欠損雄マウスから内臓脂肪組織を回収し、PBS で洗浄後に 10 %ホルマリン/ PBS に浸し、一晩放置することで固定させた。固定した脂肪組織は、固定・包埋用カセット (Tissus-Tek) に移し、Hypercenter XP (Shandon) を用いてパラフィン置換を行った。パラフィン置換された組織は、ディスペンシングコンソール IV (Tissue-Tek) を用いて、Histplast Pellestised Paraffin Wax (Thermo Scientific) で包埋し、一晩冷却した。パラフィン固定された脂肪組織は、半自動回転式マイクロソーム RM2145 (Leica) を用いて 4 μ m の切片に切り出し、水をのせたスライドガラス上に移した。水は恒温板 HI1220 (Leica) に一晩静置することで完全に蒸発させた。スライドガラスに張り付けさせた切片は、キシレン槽 5 分間×3、99.5 %エタノール槽 3 分間×3、70 %エタノール槽 3 分間×3、50 %エタノール槽 3 分間×3 にそれぞれつけることで、脱パラフィンを行った。その後、水道水、蒸留水、MilliQ の順で十分な洗浄を行った。

・ マウス内臓脂肪組織の F4/80 染色

作製した組織切片がのったスライドガラスを 3 % H₂O₂/PBS に 15 分間浸した。

その後、MilliQ、PBS の順で洗浄し、濾紙で完全に水気を吸い取った後に 10 % Goat Serum (Dako) / PBS を切片上に垂らして、30 分間ブロッキングを行った。ブロッキング後、ブロッキング液を吸い取り、F4/80 抗体 (1/400, AbD serotec) / PBS を 4℃で一晩反応させた。一次抗体処理後、TBS-T で 5 分間洗浄することを 3 回繰り返した後に、PBS で軽くゆすいだ。その後、rabbit anti-rat IgG-biotin-conjugate (1/200, Vector) /PBS をスライドグラス上に滴下し、室温で 30 分間静置することで二次抗体反応を行った。二次抗体処理後、再び TBS-T で 5 分間洗浄することを 3 回繰り返した後に、PBS で軽くゆすいだ。そこに VECTASTAIN Elite ABC Reagent (Vector) をスライドグラスに滴下し、室温で 30 分間反応後、TBS-T で 5 分間洗浄することを 3 回繰り返し、PBS で軽くゆすいだ。そこにさらに ImmPACT DAB 溶液 (Vector) を滴下し、室温で 5 分間反応後、MilliQ でゆすいだ後にヘマトキシリン (MERCK) が入ったガラスケースに一瞬浸した。その後、直ちにスライドグラスを取り出し、水道水を用いて 10 分間の流水洗浄を行った。流水洗浄後、MilliQ、50 %エタノール、75 %エタノール、95 %エタノール、99.5 %エタノールの順で 2 分ずつ浸し、最後に、キシレンに 3 分間×3 回浸すことで脱水を行った。その後、Permount (Fisher scientific) を切片上に滴下し、カバーガラスをかけることで、顕鏡用の F4/80 切片の作製を行った。切片は実体顕微鏡 AX-70 (OLYMPUS) を用いて観察・撮影を行った。

第三節 実験結果

・ D8 欠損マウスは雄特異的に寿命が延長している。

D8 欠損マウスは当研究室において作製・維持されてきた。

これまでの造腫瘍性を中心とした D8 欠損マウスの表現型を解析する過程で、D8 欠損雄マウスは寿命が有意に延長していることが生存曲線ならびに平均寿命を算出することで明らかになり、さらに D8 ヘテロ欠損雄マウスは野生型雄マウスと D8 欠損雄マウスの間程度の寿命を示した (Fig. 2-1A)。さらにこの D8 欠損による寿命の延長効果は雌の D8 欠損マウスでは認められず、雄特異的な現象であった (Fig. 2-1B)。

以上の結果より、D8 欠損マウスは雄特異的に寿命延長の表現型を呈することが明らかになった。

・ D8 欠損マウスは雄マウス特異的に加齢に伴う表現型が軽減されている。

続いて、D8 欠損雄マウスが寿命延長を呈していることを明確にするため、野生型および D8 欠損マウスに見られる加齢による表現型を比較することにした。今回は、老化の表現型として、目周辺のただれおよび背骨の屈曲具合を観察した。その結果、600 日齢の老齢 D8 欠損雄マウスでは、野生型の老齢雄マウスにおいて多くの個体で認められた目周辺のただれや背骨の著しい屈曲といった老化の表現型を呈する個体数が減少していることが明らかになった (Fig. 2-2A)。さらに、この D8 欠損による老化の表現型の軽減は、雄マウス特異的であり、D8 欠損老齢雌マウスにおいては、野生型と比べて、老化の表現型が明らかに軽減されている個体が多く認められることはなかった (Fig. 2-2B)。

以上の結果より、D8 欠損マウスは雄マウス特異的に寿命が延長しており、このことは目周囲のただれや背骨の屈曲の悪化という老化の表現型が、雄マウス特異的に軽減されていることから支持された。

・ D8 欠損マウスは加齢に伴う肥満に対して抵抗性をもつ。

D8 は生殖細胞における極性の制御を行っていることなどはこれまで報告されている (154、155) が、個体レベルにおける機能は報告されていない。そこで、D8 欠損マウスの表現型を観察することとした。

まず当研究室にて飼育している各遺伝子型の BALB, C57B6J の 2 ラインの全マウスの体重を測定し、加齢に伴う体重の変化を検討した。その結果、D8 欠損マウスは BALB, C57B6J 両ラインで雌雄ともに野生型マウスに比べて体重が軽くなっていることが明らかになり (Fig. 2-3)、特にこの体重差はマウスの体重

がピークを迎える時期に最も大きくなっていた。さらに、マウスを解剖し、各臓器重量を測定したところ、顕著に脂肪組織の重量が D8 欠損マウスでは減少していることが示された (Fig. 2-4)。

以上の結果より、加齢に伴う肥満に対して D8 欠損マウスは抵抗性を持っていることが示され、RNA 結合タンパク質 D8 が代謝制御を担っている可能性が示唆された。

・ D8 は全身にユビキタスに発現している。

そこで、まずは D8 の発現分布を確認するために、8 週齢の野生型雄マウスの全身の臓器から RNA を回収し、Real time RT-PCR 法を用いて、D8 の発現分布を検討した。その結果、D8 は精巣と脳に強く発現が認められるほか、全臓器においてユビキタスに発現していることが示された (Fig. 2-5A)。また、代謝制御を主に担っていると考えられる、肝臓、内臓脂肪組織、皮下脂肪組織、褐色脂肪組織、骨格筋の中では、肝臓で D8 の発現は低く、内臓脂肪組織、皮下脂肪組織などの白色脂肪組織において、比較的発現が高いことが明らかになった。

さらに、ヒトの各組織より調整した cDNA を用いて、同様に各組織における D8 の発現を検討した。その結果、やはり精巣で極めて高発現しており、他にも胸腺などで発現が高いほか、全身でユビキタスに発現していることが明らかになった (Fig. 2-5B)。

以上の結果より、D8 遺伝子はマウス・ヒト共に全身にユビキタスに発現していること、ならびにマウスにおいては代謝制御を主に担う臓器の中では、比較的白色脂肪組織において発現が高いことが示された。

・ D8 はマウス脂肪組織において、代謝変化に応じて発現変動を受ける。

続いて、これらの代謝を担う臓器において D8 の発現が代謝変動に伴って変動するのかを検討するため、生理的かつ大きな代謝変動を生じることが分かっている絶食・再摂食負荷を 8 週齢の野生型雄マウスにかけ、代謝を主に担う各臓器における D8 の mRNA の発現変動を Real time RT-PCR を用いて検討した。その結果、脂肪組織を中心に、D8 の発現は 24 時間の絶食によって誘導を受け、さらにその誘導は再摂食を行うことにより消失されることが明らかになった (Fig. 2-6)。

以上の結果より、D8 遺伝子は代謝制御を主に担う臓器において、代謝変動に応じて発現変動することが示された。

・ D8 は肥満によって、皮下脂肪組織・骨格筋で mRNA 発現量が減少するのに対して、内臓脂肪組織では mRNA・タンパク質レベルで増加傾向を呈

する。

これまでの結果から、D8 が代謝制御を担う可能性が示唆された。

これまで、カロリー制限によって寿命が延長される一方で、逆に肥満は様々なメカニズムを介して寿命を短縮させる効果を持つことが報告されている。D8 欠損マウスは、やせ型の表現型を呈し、寿命が延長していることを踏まえると、逆に肥満によって D8 の発現が増加する臓器が D8 の代謝制御機能を発揮している臓器である可能性が高いことが考えられた。そこで、肥満モデルマウスである db/db マウスを用いることとした。db/db マウスは食欲抑制ホルモンであるレプチンの受容体が欠損しており、確かに肥満の表現系を示していることが確認された (Fig. 2-7A)。また、このマウスが肥満の状態にあることは、体重の増加以外にも、皮下脂肪組織において PPAR γ とその標的遺伝子 Perilipin の mRNA 発現量の増加からも確認できた (Fig. 2-7B)。この時、db/db マウスおよびその対照群マウスの全身の組織における D8 の mRNA 発現量を Real time RT-PCR を用いて検討した。その結果、皮下脂肪組織、骨格筋などの一部の代謝臓器において、肥満によって D8 の mRNA 発現は有意に抑制されているのに対して、内臓脂肪組織である精巣上体脂肪組織では D8 の mRNA 発現は増加傾向にあることが明らかになった (Fig. 2-7C)。さらに、肥満モデルマウスである db/db マウスの内臓脂肪組織において、D8 のタンパク質量の変化を Western blotting によって検討した。その結果、mRNA 発現変動と一致して、db/db マウスの内臓脂肪組織では増加傾向にあることが示された (Fig. 2-7D)。

以上の結果より、白色脂肪組織、特に内臓脂肪組織を D8 が代謝制御を行う第一候補の臓器であると推定し、白色脂肪組織における D8 の代謝制御機構の分子機構の解明を行うこととした。

・ D8 は脂肪細胞分化誘導時に発現抑制を受ける。

そこでまず、白色脂肪細胞における D8 の機能を検討するため、*in vitro* での脂肪細胞の培養系の構築を目指し、マウス線維芽由来の培養細胞株である 3T3-L1 細胞を用いた脂肪細胞分化誘導実験を行った。なお、正常に脂肪細胞分化誘導が行われていることを、中性脂質を染色する Oil red O 染色 (Fig. 2-8A)、および脂肪細胞分化の主要制御因子である核内受容体 PPAR γ (15)、PPAR γ の標的遺伝子である Perilipin (23) ならびに PPAR γ の上流にあると報告されている C/EBP α (25) の発現が脂肪細胞分化刺激によって上昇することから確認した (Fig. 2-8B)。この時、D8 の mRNA 発現変動を Real time RT-PCR 法を用いて検討したところ、分化依存的に D8 の発現は抑制されることが明らかとなった (Fig. 2-8B)。さらに Western blotting を用いて脂肪細胞分化誘導時のタンパク質発現変動を検討したところ、PPAR γ タンパク質は増加しているのに相反

して、D8 のタンパク質は分化依存的に減少している傾向にあり、mRNA 発現の結果と一致していた (Fig. 2-8C)。

さらに、この脂肪細胞分化誘導時における D8 の発現抑制が、他の細胞種においても存在されているかを検討するため、マウス胎児より調整した MEF (Mouse embryonic fibroblast) を用いた脂肪細胞分化誘導実験を行った。この時、3T3-L1 と同じく正常に脂肪細胞分化誘導が行われていることを、Oil red O 染色 (Fig. 2-9A)、PPAR γ 、Perilipin mRNA 発現 (Fig. 2-9B) と PPAR γ のタンパク質量 (Fig. 2-9C) が脂肪細胞分化刺激によって上昇していること確認した。この時 D8 の mRNA 発現量を検討したところ、3T3-L1 と同様に分化依存的に発現抑制を受けていることが明らかになった (Fig. 2-9B)。また、Western blotting を用いて D8 タンパク質を検出したところ、D8 は MEF においてタンパク質レベルでも脂肪細胞分化によって著しい発現抑制を受けることが明らかになった (Fig. 2-9C)。

MEF を用いた脂肪細胞分化誘導実験に加えて、マウス SVC (Stromal vascular cells) より調整した前駆脂肪細胞を用いた脂肪細胞分化誘導時における D8 の mRNA 発現変動も検討した。その結果、やはりマウス個体より調整した前駆脂肪細胞においても脂肪細胞分化により D8 の発現は抑制されることが明らかになった (Fig. 2-10)。

D8 は RING domain と KH domain を持つ Mex-3 family に所属している。そこで、D8 (Mex-3B) 以外の Mex-3 family も D8 のように脂肪細胞分化誘導時に発現変動を生じているのか否かを検討するため、3T3-L1 および MEF の脂肪細胞分化誘導時における Mex-3 family の mRNA 発現変動を Real time RT-PCR で検討した (Fig. 2-11A, B)。その結果、Mex-3A は D8 と非常に似た発現変動を呈し、Mex-3C は全く異なる変動を示していた。Mex-3D は 3T3-L1 においては脂肪細胞分化誘導時に D8 と同じく発現抑制を受けていることが認められたが、MEF ではこの発現抑制はほとんど認められなかった。よって、D8 以外の Mex-3 family の中では、特に Mex-3A が脂肪細胞分化・脂質代謝制御に寄与している可能性があることが示唆された。

以上の結果より、D8 の発現は、脂肪細胞分化誘導時に抑制を受けることが明らかになり、さらにこの発現抑制機構は広く細胞種で保存されていることが判明した。

・ D8 の過剰発現は、KH domain 依存的に脂肪細胞分化を抑制する。

これまでに、D8 は脂肪細胞分化誘導時に発現抑制を受けることが明らかになった。そこで、レトロウイルスを用いて 3T3-L1 細胞に Flag-tag を付加した D8 を過剰発現させ、脂肪細胞分化誘導を検討した。この時、D8 が過剰発現されて

いることを、D8 mRNA の発現量の増加 ([Fig. 2-12A](#))、ならびに Flag-D8 タンパク質の検出 ([Fig. 2-12B](#)) から確認している。その検討の結果、D8 の過剰発現によって、脂肪細胞分化が抑制されることが Oil red O 染色 ([Fig. 2-11C](#)) ならびに PPAR γ とその標的遺伝子 Perilipin の mRNA 発現量の減少 ([Fig. 2-12A](#)) から示された。

D8 の N 末端側には RNA との結合を行う KH domain が、C 末端側にはタンパク質との結合・複合体形成を行い、ユビキチン化に関与する RING domain が存在する。続いて、D8 過剰発現時における脂肪細胞分化の抑制効果に D8 のどちらの domain が寄与しているのかを検討するため、KH domain 以前の N 末端を欠損させた D8 Δ KH および RING domain 以降の C 末端を欠損させた D8 Δ R を発現させるレトロウイルスを 3T3-L1 細胞に対して感染させ、脂肪細胞分化誘導を行った ([Fig. 2-13A](#))。この時、正常に D8 の野生型ならびに変異型 D8 の強制発現が行われていることが Western blotting にて確認している ([Fig. 2-13B](#))。その結果、D8 の野生型、ならびに Δ R を発現させた 3T3-L1 細胞においては、脂肪細胞分化の抑制効果が認められたが、D8 Δ KH を発現させた細胞においては、脂肪細胞分化の抑制は見られないことが、Oil red O 染色 ([Fig. 2-13C](#)) ならびに PPAR γ と Perilipin の mRNA 発現量の定量 ([Fig. 2-13D](#)) から示された。

以上の結果より、D8 の過剰発現は KH domain 依存的に脂肪細胞分化を抑制することが示された。

・ D8 欠損は C/EBP α /PPAR γ の発現抑制を介して脂肪細胞分化を制御している。

これまでの結果から、脂肪細胞分化誘導時に D8 の発現は抑制を受けること ([Fig. 2-8, 9, 10](#))、ならびに D8 の過剰発現は脂肪細胞分化を KH domain を介して抑制することが示された ([Fig. 2-12-13](#))。しかしながら、これらの結果は D8 欠損マウスにおいて、脂肪組織重量が減少していることとは相反している。そこで、D8 に対する shRNA を発現するレンチウイルスを用いて 3T3-L1 細胞において D8 をノックダウンし、脂肪細胞分化誘導を行った。この時の D8 のノックダウンが行われていることを Real time RT-PCR を用いて確認された ([Fig. 2-14A](#))。その結果、D8 のノックダウンにより、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化は抑制されることが Oil red O 染色による中性脂肪の染色量の減少 ([Fig. 2-14B](#))、細胞内 Triglyceride 量の減少 ([Fig. 2-14C](#))、ならびに PPAR γ と Perilipin 遺伝子の mRNA 発現量が減少していること ([Fig. 2-14D](#)) から示された。

続いて、今回の D8 のノックダウンによる脂肪細胞分化の抑制効果が shRNA によるオフターゲット効果や、ウイルスの毒性などによるものではないことを

示すために、D8 欠損ヘテロマウスの雌雄の交配から得た同腹子の野生型、D8 ヘテロ欠損、ホモ欠損の胎児から調整した MEF を用いて、脂肪細胞分化誘導実験を行った。その結果、D8 ホモ欠損マウス由来の MEF は脂肪細胞分化が野生型と比べて抑制されていることが、Oil red O 染色 (Fig. 2-15A)、PPAR γ と Perilipin の mRNA 発現量の減少 (Fig. 2-15B)、ならびに PPAR γ タンパク質の発現低下 (Fig. 2-15C) より確認された。

脂肪細胞分化の主要制御因子である PPAR γ の上流には C/EBP family が存在すると報告されている (25)。そこで、D8 の欠損による PPAR γ の発現抑制ならびに脂肪細胞分化の抑制に C/EBP family の発現制御が関わっているか否かを検討するため、D8 欠損ヘテロマウスの雌雄の交配から得た同腹子の野生型、D8 ヘテロ欠損、ホモ欠損マウス胎児より調整した MEF を用いて、脂肪細胞分化誘導したときの C/EBP family の mRNA 発現量を検討した。その結果、C/EBP family の中で、C/EBP α 遺伝子のみが顕著に D8 の欠損により、発現抑制されていることが明らかになった (Fig. 2-15B, Data not shown)。

脂肪細胞分化誘導時に、脂肪細胞は Clonal expansion と呼ばれる数回のクローン増殖を行った後に脂肪細胞分化を行うことが報告されており (8)、この Clonal expansion が行われることが脂肪細胞分化には必須であると考えられている。D8 は生殖細胞における極性の調節を行っていることが報告されていること (154,155)、および D8 が高発現していると判明した精巣や胸腺、小腸 (Fig. 2-5A, B) ではそれぞれ精子形成や T 細胞、小腸上皮細胞の増殖など細胞の増殖・分裂が盛んに行われていることから、D8 の欠損による脂肪細胞分化の抑制は、分化誘導時の Clonal expansion が抑制されているためではないかと仮説を立てた。そこで、レンチウイルスを用いて D8 をノックダウンした 3T3-L1 細胞に対して脂肪細胞分化誘導したときの細胞増殖をカウントすることで、D8 が前駆脂肪細胞の Clonal expansion に与える影響を検討した (Fig. 2-16)。その結果、脂肪細胞分化誘導によって Clonal expansion が生じていることは確認されたものの、仮説とは異なり、D8 のノックダウンによって脂肪細胞分化誘導時の Clonal expansion は抑制されず、逆に細胞増殖が増加する傾向にあることが示された (Fig. 2-16)。以上の結果より、D8 欠損による脂肪細胞分化抑制の原因として、Clonal expansion の抑制が寄与している可能性は否定された。

ここまでの *in vitro* の脂肪細胞において確認された、D8 の欠損による PPAR γ シグナルの減弱が、*in vivo* の脂肪組織において確認できるか否かを検討するため、野生型および D8 欠損マウス雌雄の内臓脂肪組織における PPAR γ シグナルの mRNA 発現量を検討した。その結果、D8 欠損マウスの脂肪組織では、PPAR γ とその応答遺伝子である Perilipin ならびに PPAR γ の上流である C/EBP α の発現が有意に減少していることが明らかとなり、*in vitro* の結果と一致していた (Fig.

2-17)。

以上の結果より、脂肪細胞分化過程における D8 の欠損は、C/EBP α /PPAR γ の発現抑制を介して脂肪細胞分化誘導を抑制していることが明らかになり、それにより脂肪組織量が減少していることが示唆された。

・ 若齢 D8 欠損雄マウスの血液において、一部の糖尿病マーカーが減少している。

続いて、D8 の *in vivo* における代謝制御能を検討するため、D8 欠損マウスの代謝に関する表現型を詳細に解析した。最も体重に差が生じている中齢のマウスを用いると、加齢による肥満によって生じた表現型なのか、それとも元々の D8 の欠損により生じた表現系なのかの判別が困難になると考えた。そのため、今回は D8 欠損マウスにおいて著しい肥満の軽減が現れる以前の若齢雄マウス (12 週齢) における体重、摂食量、ならびに血液中の各種パラメーターを定量した。体重は、若齢期においても D8 欠損マウスでは、有意な体重の減少が確認されたが (Fig. 2-18A)、この時週当たりの摂食量には有意差は認められなかった (Fig. 2-18B)。加えて、この摂食量を体重で割りこんだ体重当たりの摂食量を求めたところ、D8 欠損マウスでは体重当たりの摂食量が有意に増加していた (Fig. 2-18C)。そのため、摂食量の減少が D8 欠損マウスでやせ型を示す原因である可能性は低いことが考えられた。今回、摂食量に有意差が認められないことは、食欲抑制ホルモンであるレプチンの血中量に有意な差がないことと一致していた (Fig. 2-19)。また、その他の血液パラメーターにはほとんど有意な変化は認められなかったが、その中で糖尿病の血中マーカーとして近年臨床現場でも用いられている HbA1c (ヘモグロビン A1c) の値が、D8 欠損マウスで有意に減少していることが明らかになった (Fig. 2-19)。

以上の結果より、血液パラメーターの解析を通じて D8 欠損マウスは糖尿病が改善している可能性が示唆された。

・ D8 欠損マウスは雄マウス特異的にインスリン感受性が亢進している。

血液パラメーターの中で糖尿病のマーカーの値が D8 欠損マウスで減少していること (Fig. 2-19)、ならびに Kanfi らの報告した雄特異的な寿命延長効果が認められた Sirt6 のトランスジェニックマウスにおいて、インスリン感受性が変化していたこと (181) から、続いては D8 欠損マウスにおけるインスリン感受性を Glucose tolerance test (GTT) で検討した。その結果、若齢の D8 欠損雄マウスでは、わずかではあるものの Glucose の取り込みが亢進していることが明らかになった (Fig. 2-20A)。さらに、Insulin tolerance test (ITT) においても、D8 欠損雄マウスはインスリン投与により野生型マウスよりもすみやかな血

液 Glucose 値の低下が認められた (**Fig. 2-20B**) ため、インスリンの分泌量ではなく、インスリン感受性そのものが D8 欠損マウスで亢進していることが明らかになった。さらに、この D8 欠損雄マウスにおけるインスリン感受性の亢進は、600 日齢の老齢マウスにおいては顕著に認められることが、600 日齢の雄の野生型および D8 欠損マウスを用いた GTT (**Fig. 2-21A**) , ITT (**Fig. 2-21B**) の結果から明らかになった。しかしながら、雄マウスにおいて顕著な変化が認められた老齢期において、雌の D8 欠損マウスではインスリン感受性の亢進は、ほとんど認められなかった (**Fig. 2-22A, B**)

以上の結果より、D8 欠損マウスはインスリン感受性が亢進しており、この効果は老齢マウスで顕著に認められた。さらにこの効果は、寿命延長効果が認められた雄マウス特異的であったため、寿命延長効果とインスリン感受性の亢進には密接なクロストークがあることが示唆された。

・D8 欠損雄マウスはインスリンによって、インスリンシグナルが強く亢進される。

ここまでの実験において確認された、D8 欠損雄マウスにおけるインスリン感受性の亢進という現象を分子レベルで確認するために、*in vivo* の脂肪組織におけるインスリンシグナルを野生型および D8 欠損雄マウスで検討した。具体的には、各マウスを体重ごとに群分けし、各群に対して、自由摂食、絶食もしくは絶食後にインスリンの投与を行った。その後、内臓脂肪組織、皮下脂肪組織からタンパク質を抽出し、インスリンシグナルの活性を Akt の 2 種類のリン酸化フォームを Western blotting で検出することで検討した (**Fig. 2-23A, B**)。この時、野生型マウスにおいて、インスリン投与によって速やかに Akt がリン酸化されることが認められたが、D8 欠損マウスにおいてはより強く Akt がリン酸化されていることが明らかになり、D8 欠損マウスではインスリン感受性が亢進していることが示された。

さらに、今回確認された、D8 欠損によるインスリン感受性の亢進が *in vitro* の系に還元できるか否かを検討するため、野生型および同腹子の D8 ヘテロ欠損、ホモ欠損マウス胎児から MEF を調整し、脂肪細胞へ未分化状態においてインスリン感受性の変化を検討した (**Fig. 2-24**)。その結果、D8 ホモ欠損マウス由来の MEF において、インスリン刺激下における Akt のリン酸化量が増加していたことから、MEF レベルにおいても、D8 の欠損に伴ってインスリン感受性が亢進していることが示された。

・D8 によるインスリン感受性制御に、脂肪組織におけるマクロファージが寄与する可能性は低い。

D8 欠損マウスにおいて、インスリン感受性が亢進し、そのためにインスリン刺激によってインスリンシグナルが強く活性化されることがこれまでに明らかになった。さらにこの効果は、脂肪細胞へ未分化状態の MEF においても認められた。今回、脂肪蓄積がほとんど認められない未分化の MEF においても、D8 の欠損によるインスリンシグナル感受性の亢進が認められる、という結果は、脂質蓄積量の変化以外のなんらかの機構によって D8 がインスリン感受性を亢進させている、ということを示唆している。そこで、D8 がインスリン感受性を亢進させる分子機構の解明を目指した。

近年、インスリン抵抗性の原因の一つとして肥満によって誘導される脂肪組織へのマクロファージの浸潤と、それに伴う炎症系サイトカインの分泌誘導が報告されている (101,102)。D8 KO マウスにおいて、インスリン感受性が亢進していた原因として、まずは脂肪組織におけるマクロファージの炎症系サイトカインの分泌が抑制されている可能性を考え、検討を行った。

まず、今回の研究において脂肪細胞として用いた 3T3-L1 細胞、MEF、SVC と、マクロファージ由来の培養細胞である RAW264.7 細胞との間で D8 の発現量を比較した。その結果、D8 の発現は RAW264.7 細胞においてほとんど認められなかった (Fig. 2-25A)。また、このことは、培養細胞株である RAW264.7 細胞のみならず、LPS 刺激によりマウスの腹腔より回収したマクロファージの初代培養においても、D8 の発現がほとんど認められなかったことから示された (**Data not shown**)。これらの結果より、D8 がマクロファージ自身の機能を制御し、それにより炎症系サイトカインの分泌が変動している可能性は低いことが示唆された。

そこで、D8 は脂肪組織において機能し、マクロファージを呼び込む MCP-1/CCR2 (105-107) のような因子の機能を制御している可能性を考えた。先ほどインスリン感受性の顕著な亢進が GTT、ITT において確認された老齢の D8 欠損マウス (Fig. 2-21A, B) の内臓脂肪組織の切片を作製し、マクロファージマーカーである F4/80 染色に供することで、脂肪組織へのマクロファージの浸潤の変化を検討した。その結果、老齢 D8 KO 雄マウスの脂肪組織へのマクロファージの浸潤は野生型マウスと比較して大きな変化は認められなかった (Fig. 2-25B)。さらに、若齢・老齢の雌雄マウスの脂肪組織におけるマクロファージマーカーである F4/80、炎症系サイトカインである TNF α や IL-1 β 、IL-6、炎症系サイトカインである Adiponectin、および脂肪組織へのマクロファージのリクルートに関わると報告のある MCP-1 の mRNA 発現量を Real time RT-PCR 法を用いて検討した。その結果、いずれの因子も D8 の欠損によって有意な発現変動をしていることは見出せなかった (Fig. 2-26)。

以上の結果より、D8 が脂肪組織におけるマクロファージの浸潤およびサイト

カインの分泌を制御し、それによりインスリン感受性を制御している可能性は低いことが示唆された。

・ 老齢 D8 欠損マウスでは、脂肪組織における小胞体ストレスが軽減されている。

続いて、インスリン抵抗性の原因として、近年マクロファージによる炎症系サイトカインの分泌と並んで提唱されている小胞体ストレス (126) の検討を行った。まず、若齢・老齢の D8 KO マウスおよび野生型マウスの脂肪組織、肝臓における小胞体ストレスのマーカー遺伝子である BiP、CHOP の mRNA 発現量を Real time RT-PCR で検討した。その結果、脂肪組織特異的に、老齢 D8 KO マウスの雌雄で小胞体ストレスが抑制されていることが確認できた (Fig. 2-27)。そこで、D8 が小胞体ストレスの制御に直接関与するか否かを検討するために、siRNA を用いて D8 をノックダウンした 3T3-L1 細胞に対して、小胞体ストレス誘導剤である Tunicamycin (Tm) を投与し、その時の小胞体ストレスの変化を小胞体ストレスのマーカー遺伝子である BiP、CHOP の発現変動を定量することで検討した。その結果、D8 のノックダウンによって小胞体ストレスのマーカー遺伝子の発現量には変化が認められなかった (Fig. 2-28)。また、D8 欠損マウス胎児より調整した MEF およびその同腹子の野生型 MEF に対して同じく小胞体ストレス誘導剤である Tunicamycin、Thapsigargin (Tg) を処理した時の小胞体ストレスマーカー遺伝子の mRNA 発現量 (Fig. 2-29B)、および小胞体ストレスによって生じる XBP-1 mRNA のスプライシングの変化を検討した (Fig. 2-29C) が、D8 欠損マウス由来の MEF における小胞体ストレスの軽減は認められなかった。

以上の結果から、老齢の D8 欠損マウスの内臓脂肪組織では小胞体ストレスが軽減していることが示唆された。しかしながら、D8 が直接小胞体ストレスを制御しているか否かは不明瞭であった。

・ 老齢 D8 欠損マウスでは、脂肪組織における Senescence が抑制されている。

近年、炎症系サイトカインや小胞体ストレス以外のインスリン抵抗性の原因として、脂肪細胞の Senescence を示唆している論文が少数ではあるが報告されている (147)。そこで、D8 欠損マウスにおいてインスリン感受性が亢進している原因として、Senescence が関与しているのではないかと考えた。まず、老齢の D8 欠損マウスの雌雄ならびに若齢の D8 欠損雄マウスならびに各々の野生型マウスの内臓脂肪組織から RNA を回収し、Real time RT-PCR を用いて Senescence のマーカー遺伝子である p16, p19 ARF, p21 の mRNA 発現量を検

討した。この結果、内臓脂肪組織において、若齢の野生型マウスに比べて老齢野生型マウスでは顕著に p16, p19ARF の mRNA 発現が亢進していたことから、脂肪組織は加齢に伴う Senescence に対して敏感な組織であると考えられた (Fig. 2-30)。この時、老齢の D8 欠損雄マウスにおいては、有意に内臓脂肪組織における p16, p19ARF の mRNA 発現量が野生型マウスと比べて低下していたことから、老齢の D8 欠損雄マウスの脂肪組織において加齢に伴う Senescence が抑制されていることが明らかになった (Fig. 2-30)。また、Senescence マーカー遺伝子の発現は、老齢の D8 欠損雌マウスにおいても、個体数が少ないために有意差はつかなかったものの、同様の傾向が認められた。

続いて、先ほど *in vivo* の内臓脂肪組織において確認された D8 欠損マウスにおける Senescence の抑制が、*in vitro* の実験系においても確認できるかを検討するため、D8 欠損マウスおよび同腹子の野生型マウス胎児から調整した MEF に対して継代操作を続けた時に生じる Senescence を検討した。その結果、D8 欠損マウス由来の MEF は、継代操作を継続し続けた時に生じる Senescence マーカー p16, p19ARF の発現誘導が野生型よりも減弱していることが明らかになった (Fig. 2-31)。

以上の結果より、D8 欠損マウスにおいて、*in vitro*, *in vivo* の両面で Senescence が軽減していることが示された。

・ D8 欠損マウス由来の MEF は Senescence に伴うインスリン感受性の悪化が緩和されている。

続いて、上記の実験から確認された、D8 欠損マウスにおける Senescence の軽減が、インスリン感受性の亢進に寄与しているのか否かを検討するため、Passage 初期と Passage 後期の同腹子の野生型および D8 欠損マウス由来の MEF におけるインスリン感受性を検討した。その結果、野生型マウス由来の MEF では Late passage においてインスリン処理による Akt のリン酸化が減弱していることが認められたが、D8 欠損マウス由来の MEF ではその減弱が緩和されていることが明らかになった (Fig. 2-32)。

以上の結果より、Senescence によってインスリン感受性が悪化すること、ならびに D8 欠損マウスの内臓脂肪組織では Senescence の誘導が緩和されているために、インスリン感受性が亢進している可能性があることが示唆された。

・ D8 はカロリー制限によって、mRNA・タンパク質レベルで抑制される。

これまで、多くの生物種において、摂取カロリーの制限によって寿命が延長することが報告されている (80-83)。ここまでの結果、D8 欠損マウスは、加齢に伴う肥満に抵抗性があることが示された (Fig. 2-3,4)。また、Sirt6 のトラン

スジェニックマウスは D8 欠損マウスと類似した、雄特異的な寿命の延長、インスリン感受性の亢進という表現系を呈することが報告されている (181)。Sirt6 はカロリー制限に伴う寿命延長に深く寄与していると考えられている。そこで、D8 も Sirt6 と同じくカロリー制限に伴う寿命延長に寄与しており、D8 欠損マウスはカロリー制限を模倣して寿命が延長しているのではないかと、仮説を立て、検証を行うこととした。

そこで、C57BL6J 雄マウスに対して 210 日間 40%のカロリー制限を行い、この時の各代謝制御を担う臓器における D8 の mRNA 発現変動を検討した。この時、確かにカロリー制限が出来ていることを体重増加の抑制 (Fig. 2-33A)、ならびに脂肪組織において糖新生酵素である PEPCK の mRNA 発現が増加していることから確認した (Fig. 2-33B)。各組織における D8 の発現を検討した結果、内臓脂肪組織、褐色脂肪組織、骨格筋においてカロリー制限によって有意に D8 の mRNA 発現量は減少していることが明らかになった (Fig. 2-33C)。また、内臓脂肪組織において、カロリー制限によって D8 の発現はタンパク質レベルでも減少していることが認められた (Fig. 2-33D)。さらに、この時、D8 の欠損マウスの内臓脂肪組織で確認された小胞体ストレスや Senescence の緩和 (Fig. 2-27, 30) が、カロリー制限を行ったマウスにおいて認められるか否かを検討するため、小胞体ストレスマーカーおよび Senescence マーカー遺伝子の mRNA 発現量を検討した。その結果、カロリー制限したマウスの内臓脂肪組織において、小胞体ストレスマーカーならびに Senescence マーカー遺伝子の mRNA 発現が減弱していることが認められ、D8 欠損マウスと一致した結果が得られた (Fig. 2-34)。

以上の結果より、D8 欠損マウスはカロリー制限を模倣して寿命を延長していることが示唆されると同時に、カロリー制限に伴う寿命延長に D8 が寄与している可能性が示唆された。

・ D8 欠損マウスは高脂肪食負荷に伴う肥満・インスリン抵抗性が軽減される。

これまでの結果より、D8 欠損雄マウスは PPAR γ シグナルの抑制を介した脂肪細胞分化の抑制 (Fig. 2-14,15, 17)、ならびに内臓脂肪組織における小胞体ストレスや Senescence を抑制する (Fig. 2-27, 30) ことでインスリン感受性が亢進していること (Fig. 2-19, 20, 21, 23) が示唆された。そして、インスリン感受性が亢進しているために加齢に伴う肥満に対して抵抗性を持ち (Fig. 2-3,4)、その結果として寿命延長を呈している (Fig. 2-1, 2) 可能性が示された。

そこで、D8 は実際に肥満・糖尿病の治療への標的となりうるのか否かを検討するため、続いては D8 欠損マウスに対する高脂肪食負荷を行うこととした。体

重を経時的に測定した結果、野生型マウスは高脂肪食負荷に伴って著しい体重の増加が認められたが、D8 欠損マウスでは高脂肪食負荷に伴う体重の増加がある程度抑制されることが示された (**Fig. 2-35A**)。そして、インスリン感受性を検討するために ITT を行ったところ、野生型マウスでは高脂肪食負荷に伴ってインスリン感受性が悪化しているのが確認されたが、D8 欠損マウスでは高脂肪食負荷によるインスリン抵抗性の獲得はほとんど認められなかった (**Fig. 2-35B**)。また、この時、内臓脂肪組織・皮下脂肪組織の両方で D8 欠損マウスでは、高脂肪食負荷に伴う脂肪組織量の増加が抑制されていた (**Fig. 2-36**)。さらに、血液成分を解析した結果、高脂肪負荷・肥満に伴って野生型では血糖値・総コレステロール値が有意に増加していることが認められたが、D8 欠損マウスへの高脂肪食負荷群では有意な変化は認められなかった (**Fig. 2-37**)。また ITT の結果と一致して、野生型マウスでは糖尿病の指標である HbA1c やグリコアルブミンが高脂肪食負荷に伴って増加しており、インスリン抵抗性が惹起されていることが示唆されたが、D8 欠損マウスでは、高脂肪食負荷に伴うそれらのパラメーターの悪化が緩和されていることが示された (**Fig. 2-37**)。なお、このとき、通常食において、これまで D8 欠損マウスで認められた体重の有意な増加は認められず (**Fig. 2-35A**)、ITT においてもインスリン感受性にほとんど変化は認められなかった (**Fig. 2-35B**)。

以上の結果より、D8 欠損雄マウスは高脂肪食負荷に伴う肥満・インスリン抵抗性の惹起に対して抵抗性を有することが明らかとなり、肥満・糖尿病の治療の新規標的因子として D8 が期待できることが示された。

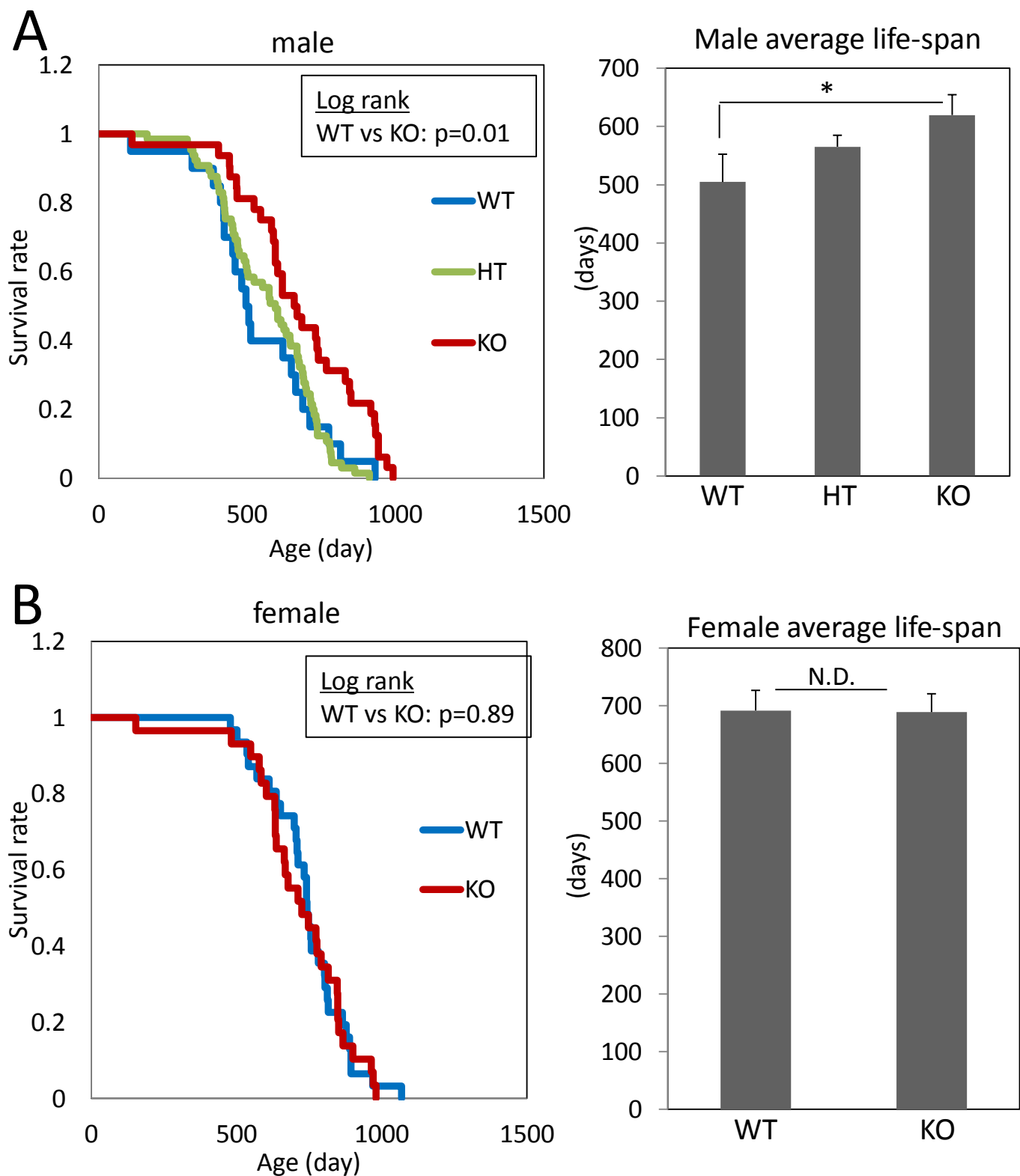
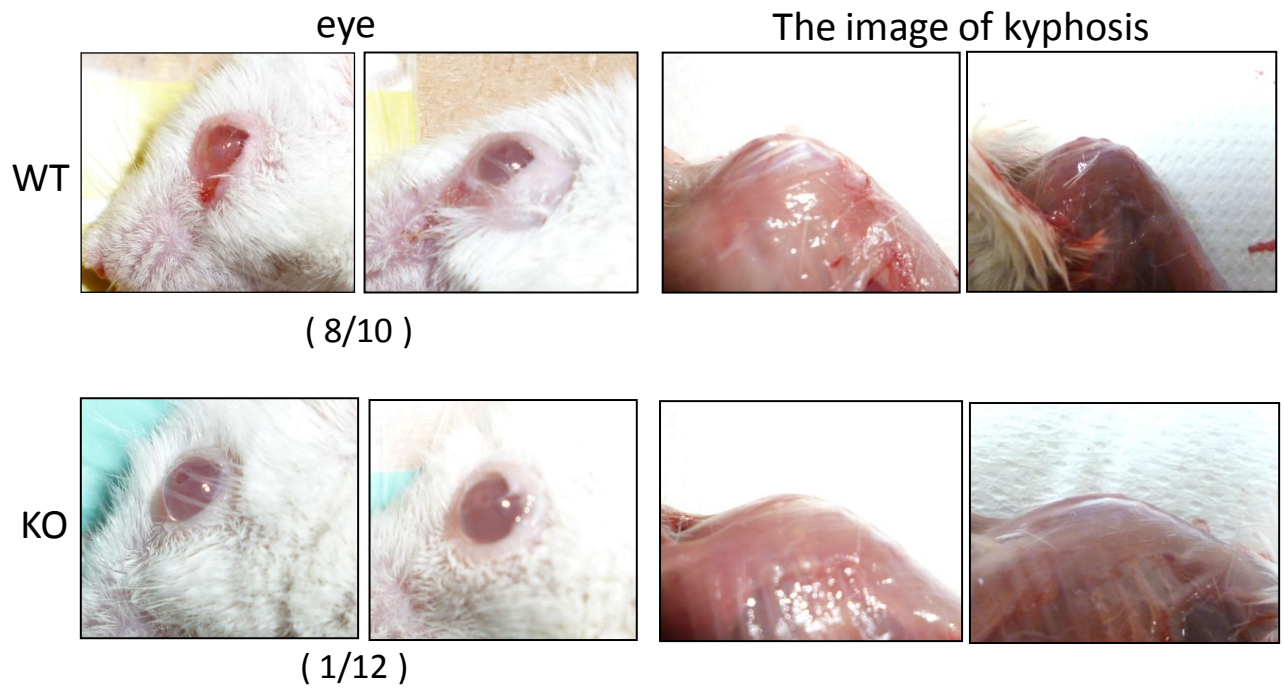


Figure 2-1. D8欠損マウスは雄特異的に寿命が延長する
BALBの野生型(WT)、D8ヘテロ欠損マウス(HT)、ホモ欠損マウス(KO)の雄(A)、雌(B)における生存曲線(左図)および平均寿命(右図)を表示した。(* $p<0.05$, male WT $n=20$, male HT $n=65$, male KO $n=32$, female WT $n=31$, female KO $n=29$)

A Male



B Female

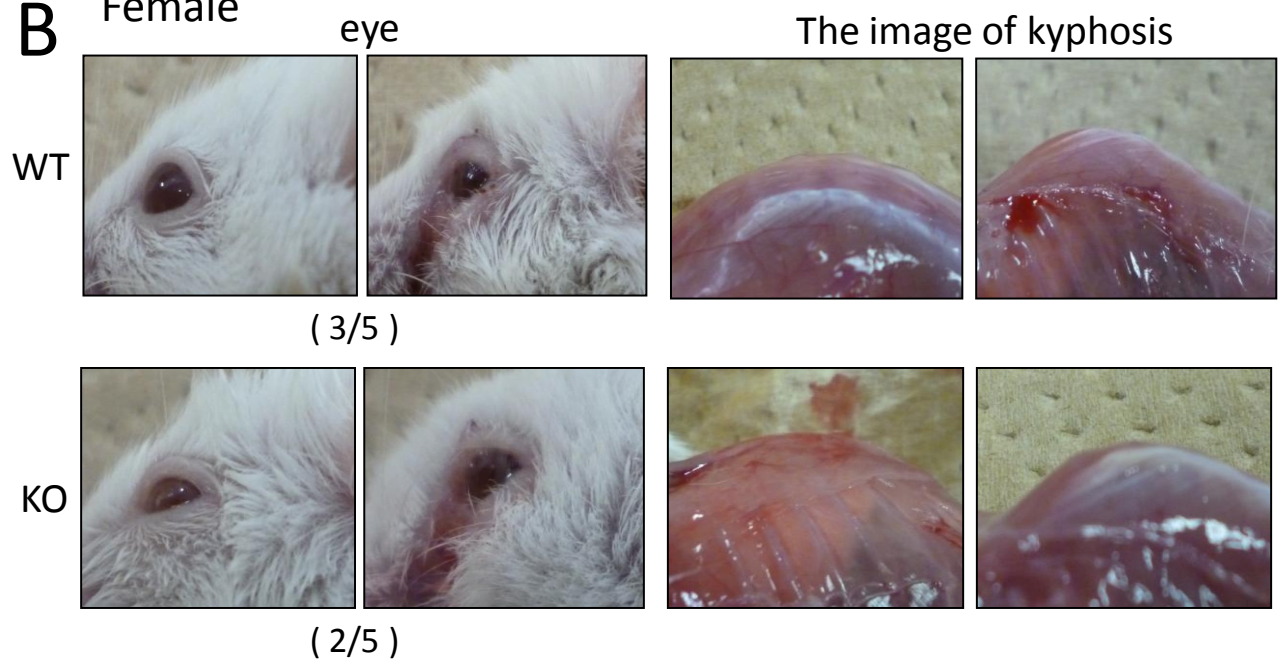


Figure 2-2. D8欠損マウスは雄特異的に老化の表現型が軽減している

BALBの600日齢の老齢野生型マウス(WT)およびD8欠損マウス(KO)の雄(A)、雌(B)において、目付近のただれ(炎症)、および背骨の屈曲を観察した。目の周りにただれが生じている個体数をカウントしたものを写真下に表記した。

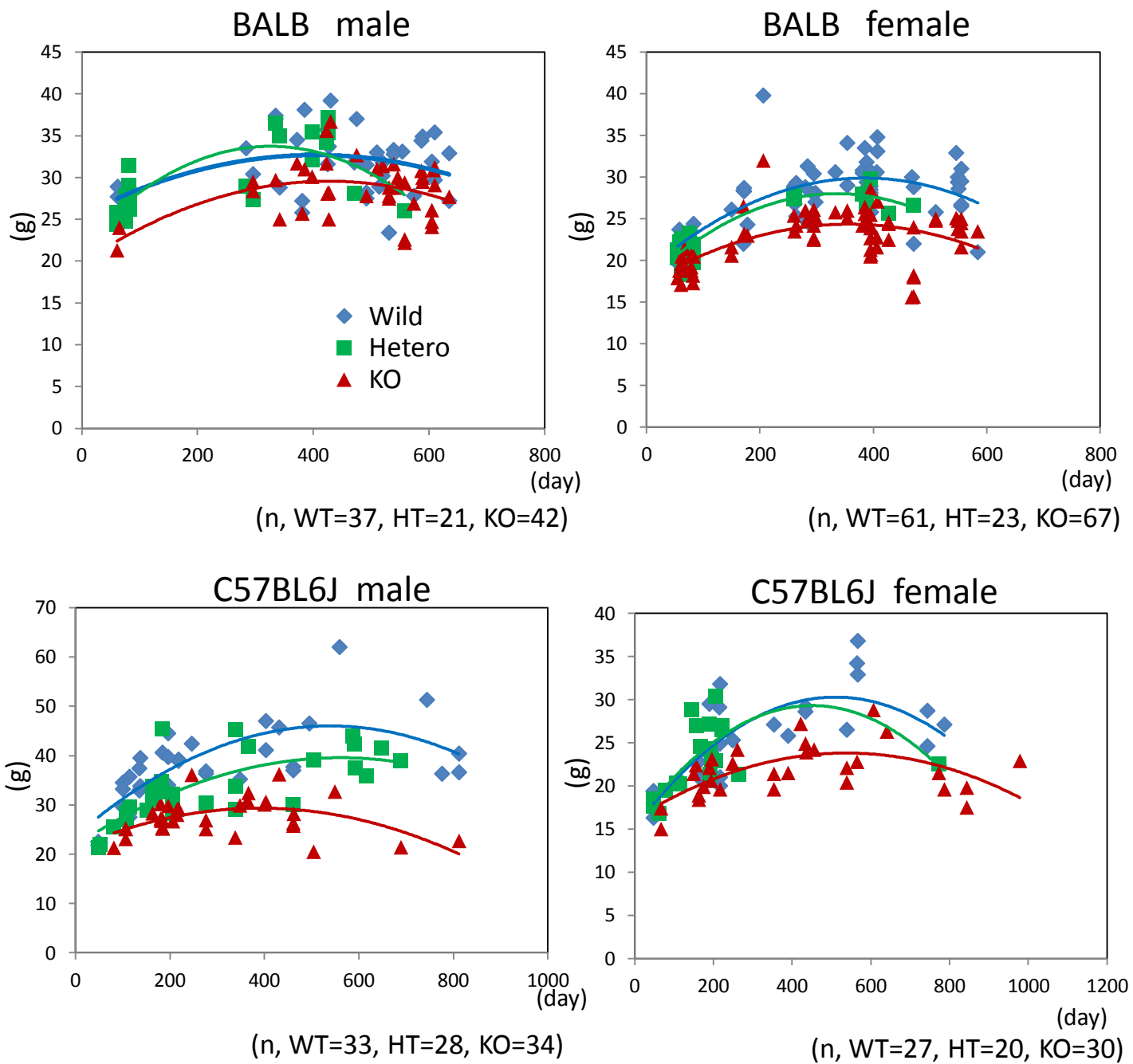


Figure 2-3. D8欠損マウスは加齢に伴う体重増加が抑制されている

BALB, C57BL6Jの2ラインのマウスにおいて、体重を測定した。各マウスは雌雄および野生型(WT)、D8ヘテロ欠損(Hetero)およびホモ欠損(KO)に群分けし、日齢を横軸とした体重増加曲線を2次関数グラフで表した。

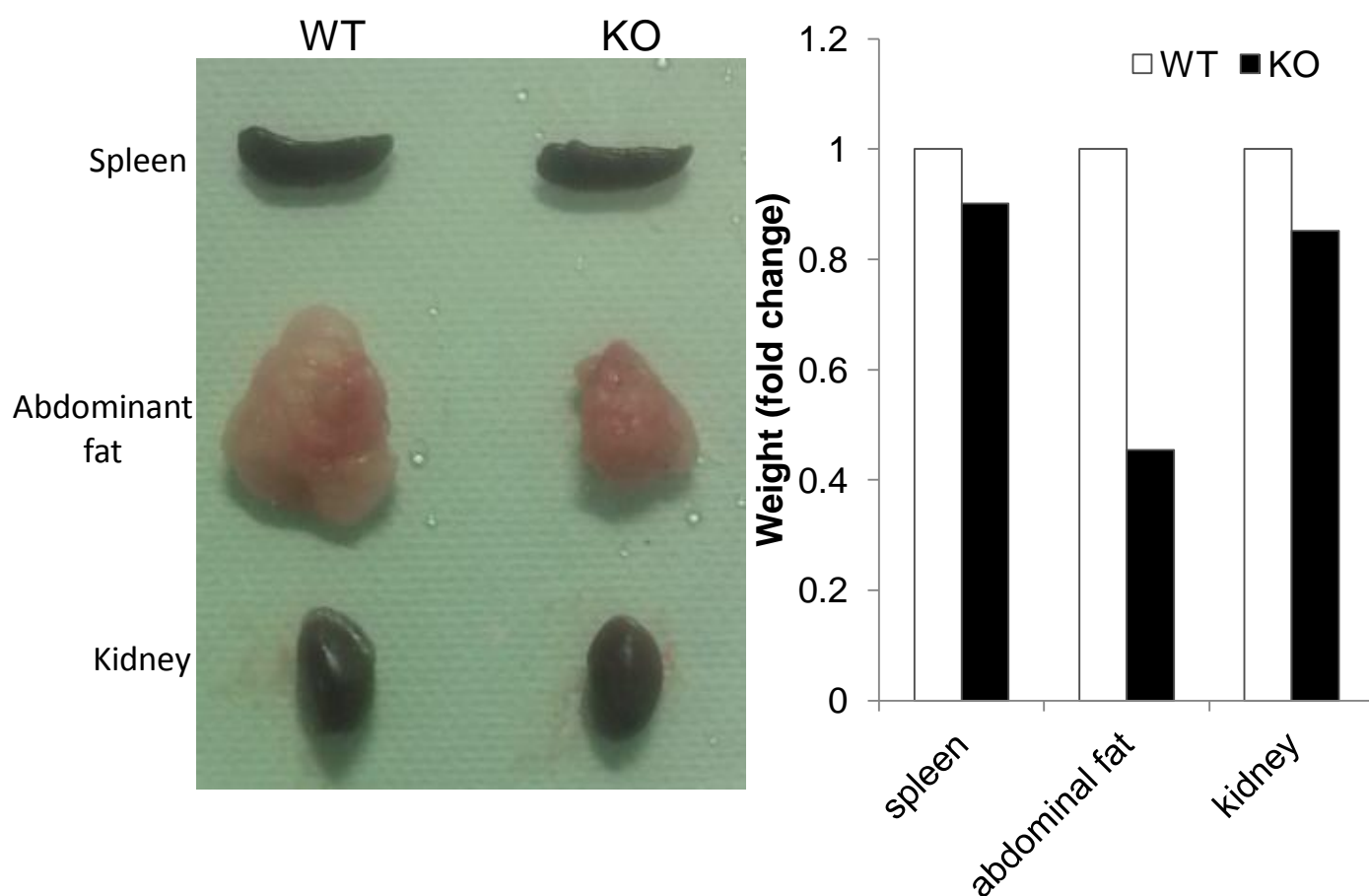


Figure 2-4. D8欠損マウスは脂肪組織重量が減少している

400日齢の C57B6Jラインの野生型 (WT) およびD8欠損マウス (KO) を解剖し、各臓器の重量を測定した。各組織重量は野生型マウスの組織重量を1.0として、D8欠損マウスの相対組織重量を示した。

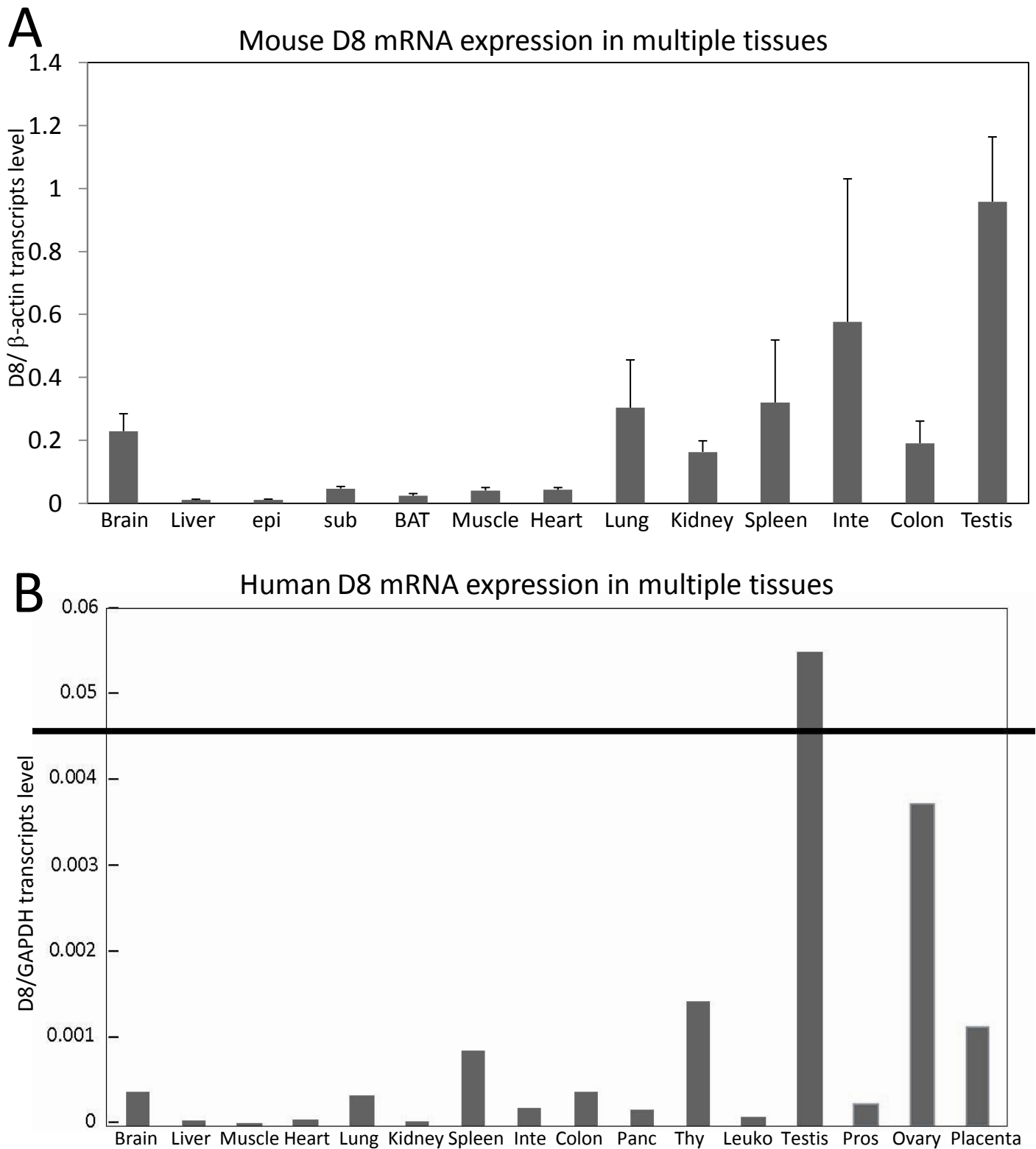


Figure 2-5 D8はマウス・ヒトにユビキタスに発現している

A. BKS Cg m+/m+雄マウスの各組織からRNAを抽出し、Real time RT-PCRを用いてD8のmRNA発現を定量した。epi(epididymal fat): 精巣上体脂肪組織、sub(subcutaneous fat):皮下脂肪組織、BAT (Brown adipocyte tissue): 褐色脂肪組織 Inte(Intestine): 小腸 (n=4) B. ヒトの各臓器におけるD8の発現をReal time RT-PCRを用いて定量した。Inte(Intestine): 小腸, Panc(Pancreas): 膵臓 Thy(Thymus): 胸腺、Leuko(Leukocyte): 白血球 Pros(Prostate): 前立腺

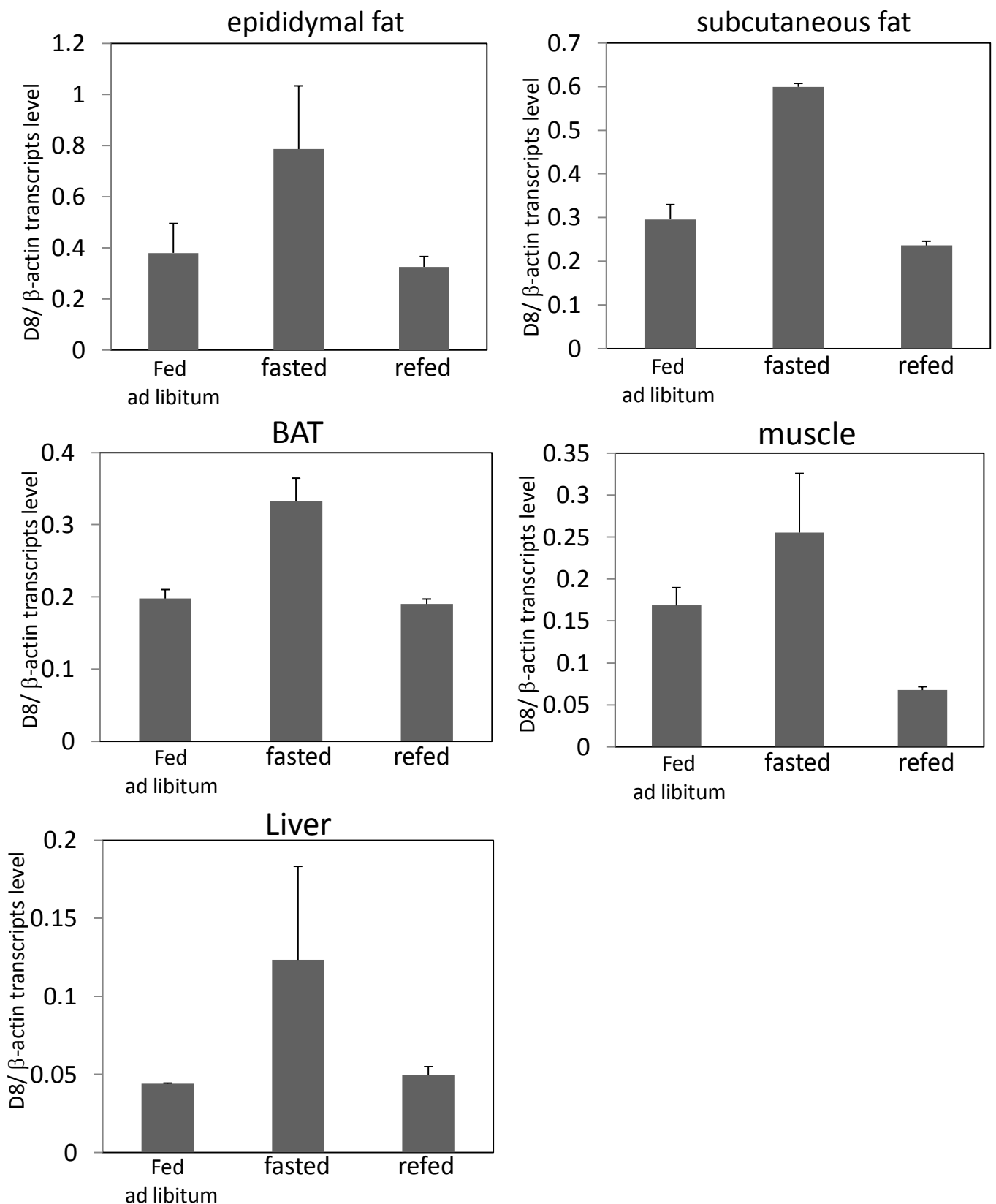


Figure 2-6. 代謝制御を担う臓器において、D8の発現は絶食により誘導される。
 C57B6J雄マウスに対して自由摂食 (Fed ad libitum)、24時間の絶食、24時間の絶食後24時間再摂食をそれぞれ行わせた後、屠殺した。各マウスの精巢上体脂肪組織、皮下脂肪組織、褐色脂肪組織 (BAT)、骨格筋、肝臓からRNAを抽出し、Real time RT-PCRを用いてD8のmRNA発現量を定量した。
 (Fed ad libitum n=2, fasted n=4, refed n=4)

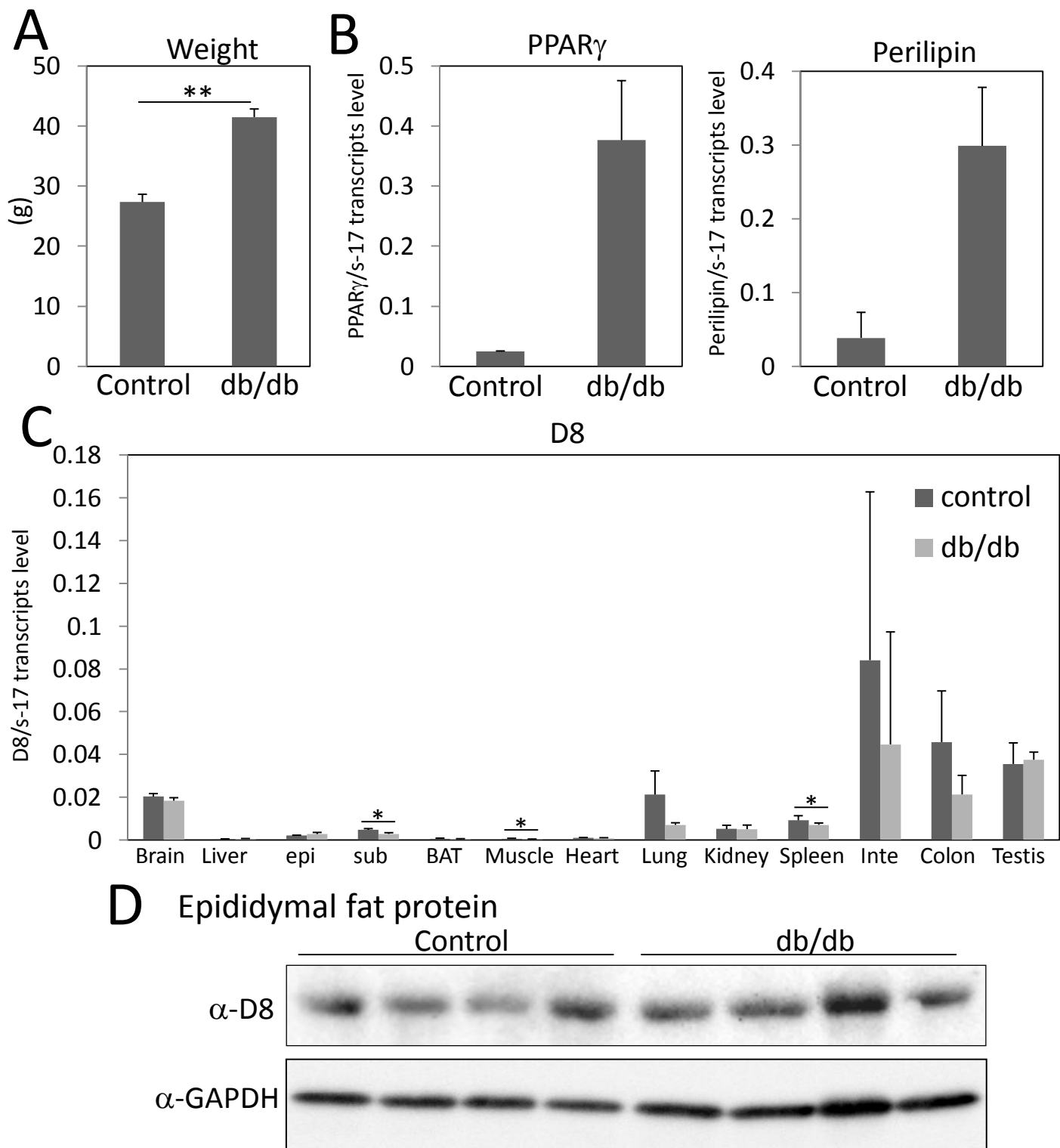


Figure 2-7. 肥満モデルマウスにおいて、一部の代謝臓器ではD8の発現が減少しているが、内臓脂肪組織では増加傾向を呈する

肥満モデルマウスであるCKS-Cg db/db、および対照群(CKS-Cg m+/m+)の15週齢雄マウスを用いた(n=4 *p<0.05, **p<0.01) A. 各マウスの体重測定を行った。B,C. 皮下脂肪組織におけるPPAR γ とPerilipinのmRNA発現量(B)ならびに全身の組織におけるD8のmRNA発現量(C)をReal time RT-PCRで検討した。D. 内臓脂肪組織におけるD8のタンパク質発現量をWestern blottingで検討した。Loading controlとして、GAPDHを用いた。

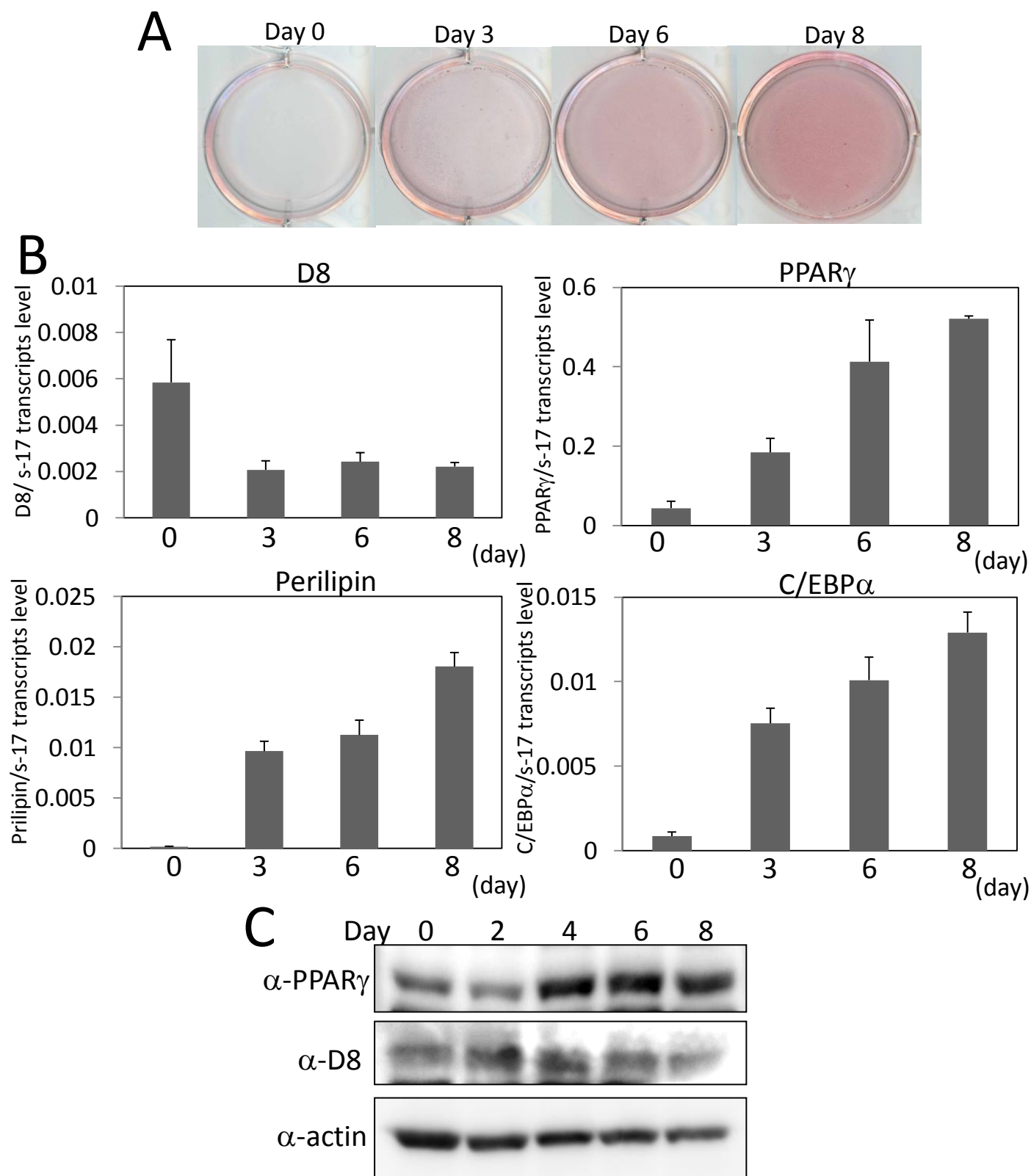


Figure 2-8. 3T3-L1脂肪細胞の脂肪細胞分化過程において、D8は発現抑制を受ける
脂肪細胞分化誘導して0, 3, 6, 8日目の3T3-L1細胞を用いてOil red O染色(A)、Real time RT-PCRによるD8, PPAR γ , PerilipinおよびC/EBP α mRNA発現の定量(B)、Western blottingによるPPAR γ , D8タンパク質の検出(C)をそれぞれ行った。(n=3)

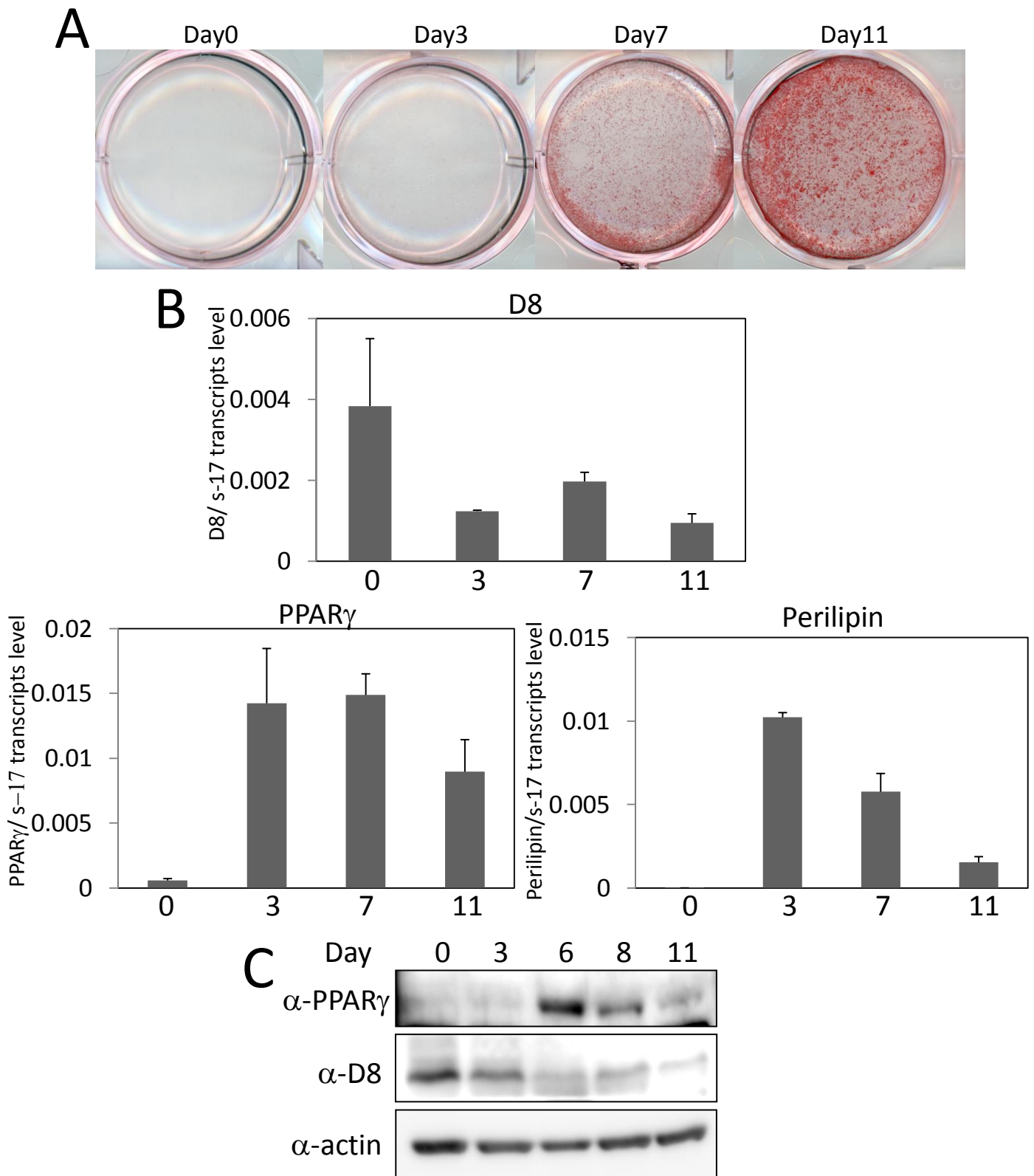


Figure 2-9. MEF(Mouse embryonic fibroblast)の脂肪細胞分化過程において、D8は発現抑制を受ける
 脂肪細胞分化誘導して0, 3, 7, 11日目のMEFを用いて、Oil red O染色(A)、Real time RT-PCRによるD8, PPAR γ , Perilipin mRNA発現の定量(B)、Western blottingによるPPAR γ , D8タンパク質の検出(C)をそれぞれ行った。(n=3)

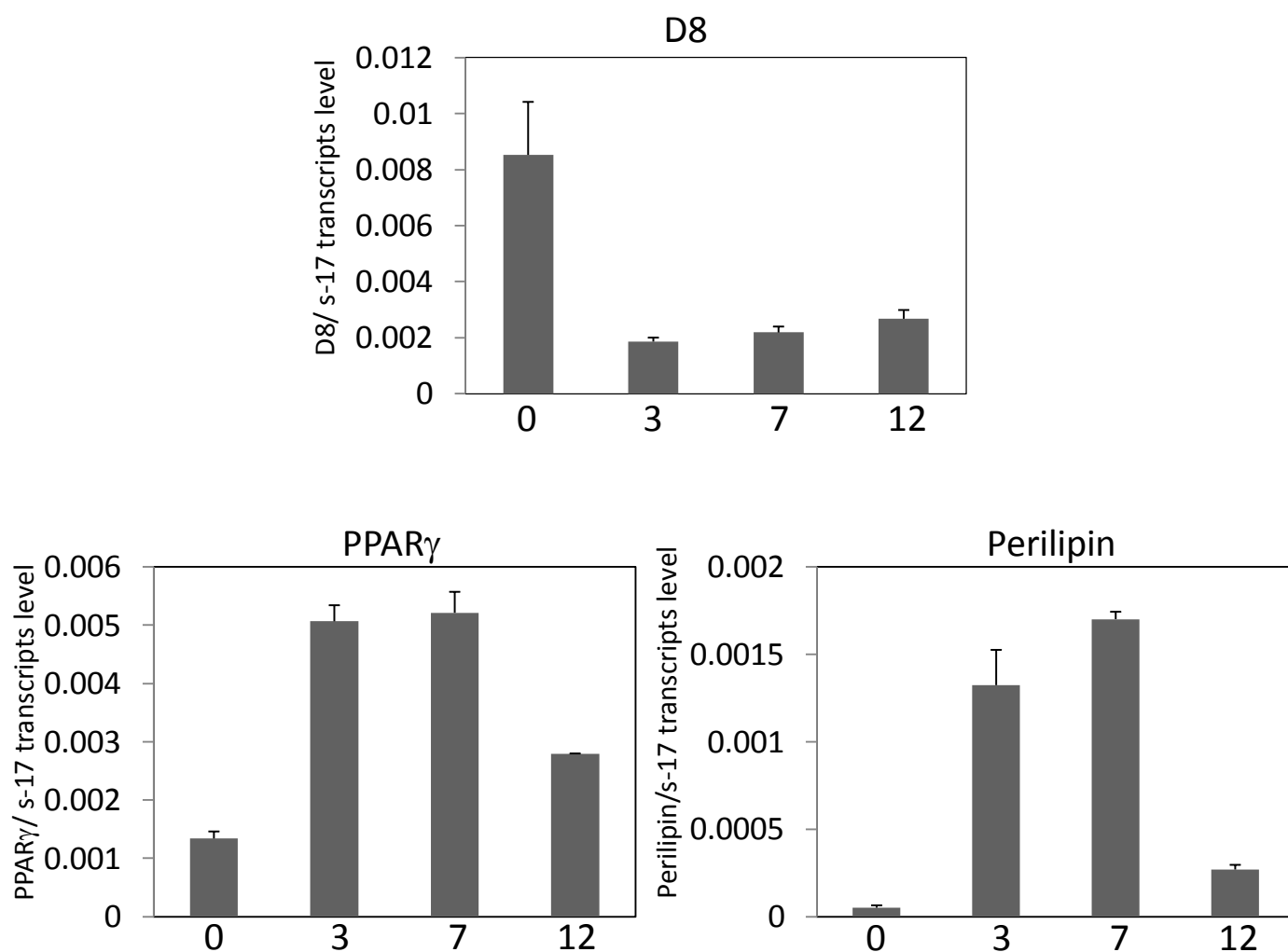


Figure 2-10. SVC (Stromal vascular cells) の脂肪細胞分化過程において、D8は発現抑制を受ける

脂肪細胞分化誘導して0, 3, 7, 12日目のSVCより抽出したRNAを用いてReal time RT-PCRを行い、D8, PPAR γ , Perilipin mRNA発現の定量を行った。(n=3)

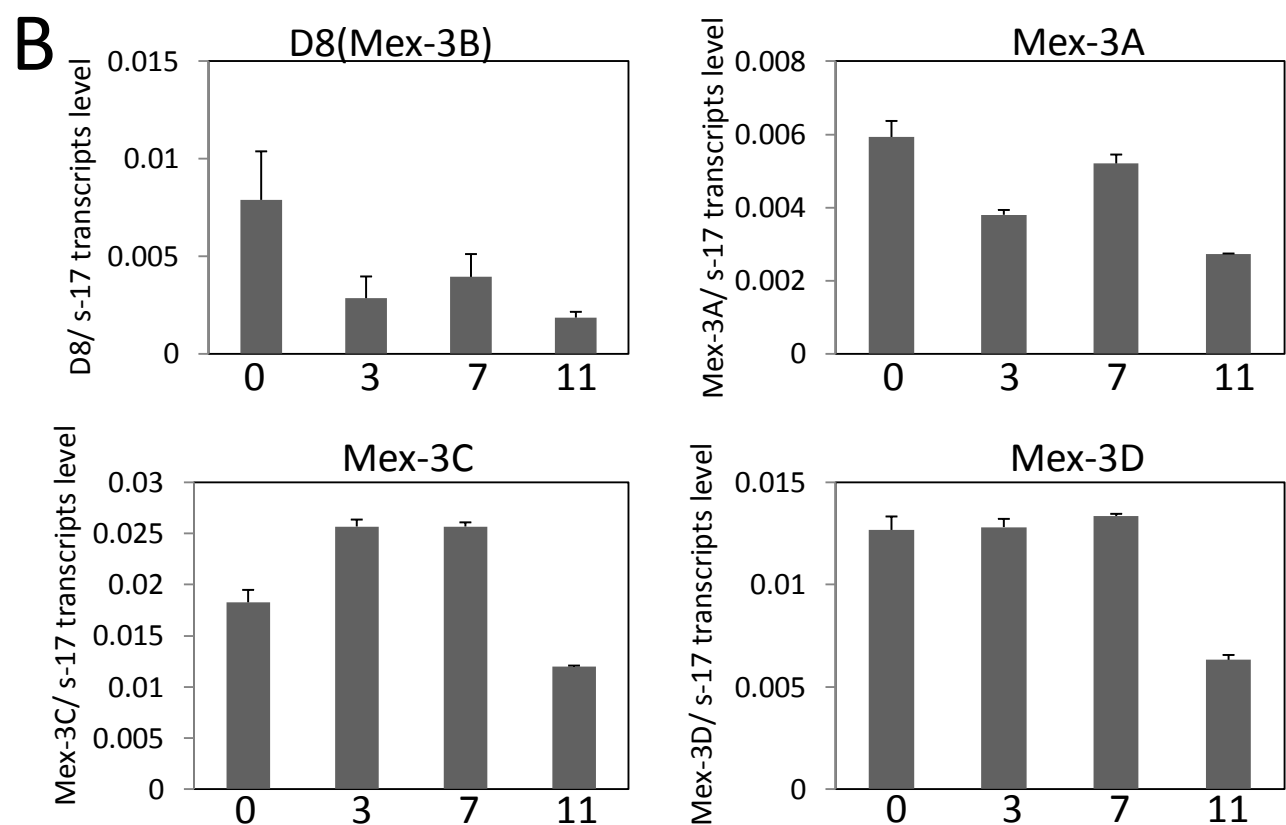
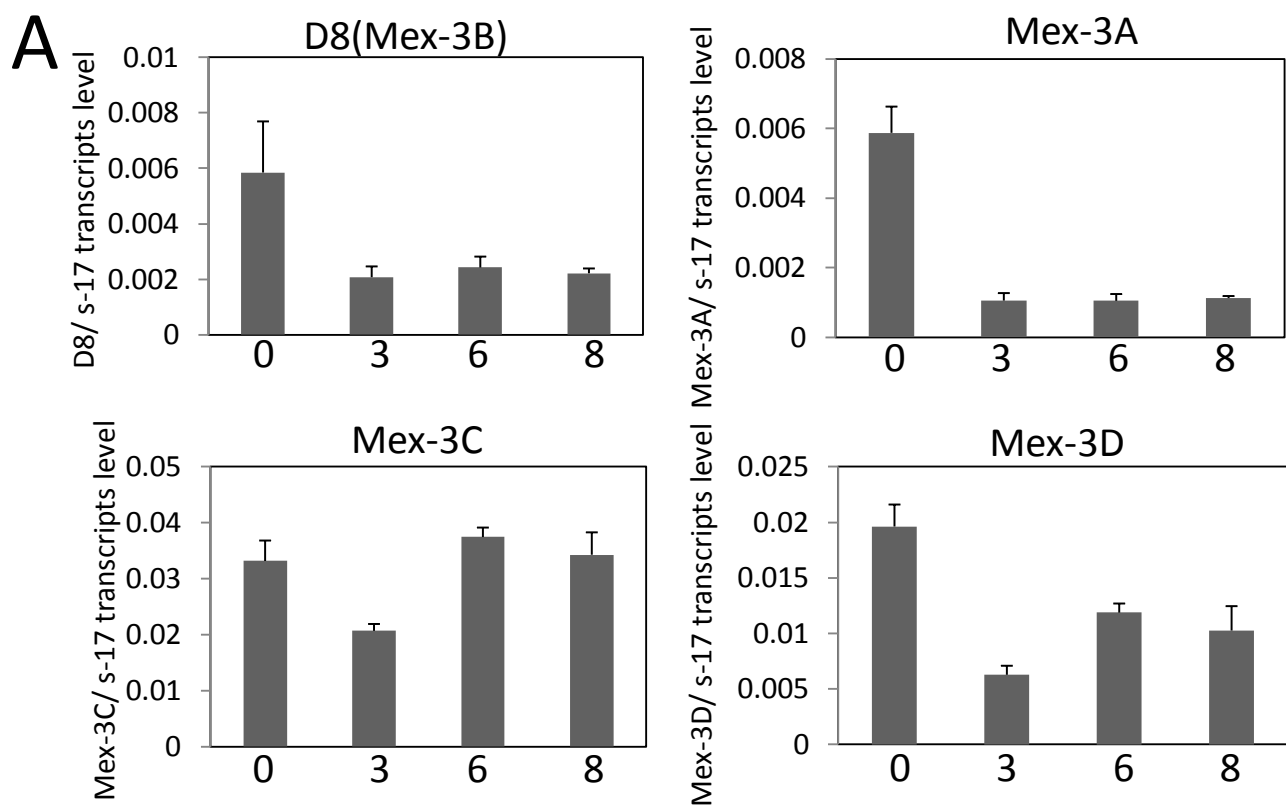


Figure 2-11. 脂肪細胞分化過程において、Mex-3AはD8と類似した発現変動を呈する脂肪細胞分化誘導した3T3-L1細胞(A)およびMEF(B)から経時的にRNAを抽出し、Real time RT-PCRを行うことでMex-3 familyの mRNA発現の定量を行った。(n=3)

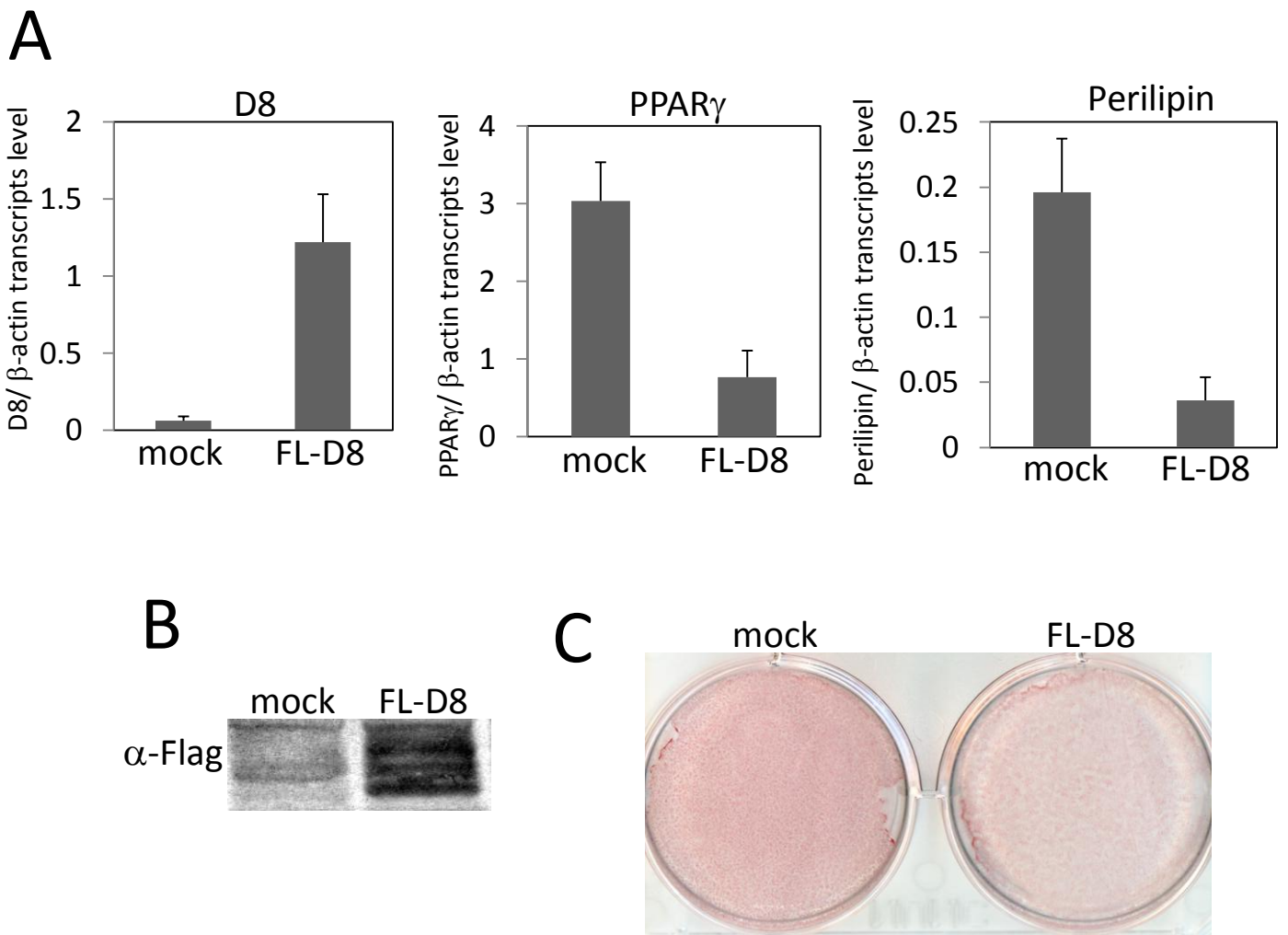


Figure 2-12. D8の過剰発現は脂肪細胞分化を抑制する

レトロウイルスを用いてFlagタグを付加したD8を3T3-L1細胞に対して過剰発現し、脂肪細胞分化誘導を行った。A. 分化誘導8日目に細胞からRNAを抽出し、Real time RT-PCRを行うことでD8, PPAR γ , PerilipinのmRNA発現の定量を行った。(n=3) B. Western blottingでFL-D8の検出を行った。C. 分化8日目の細胞のOil red O染色を行った。

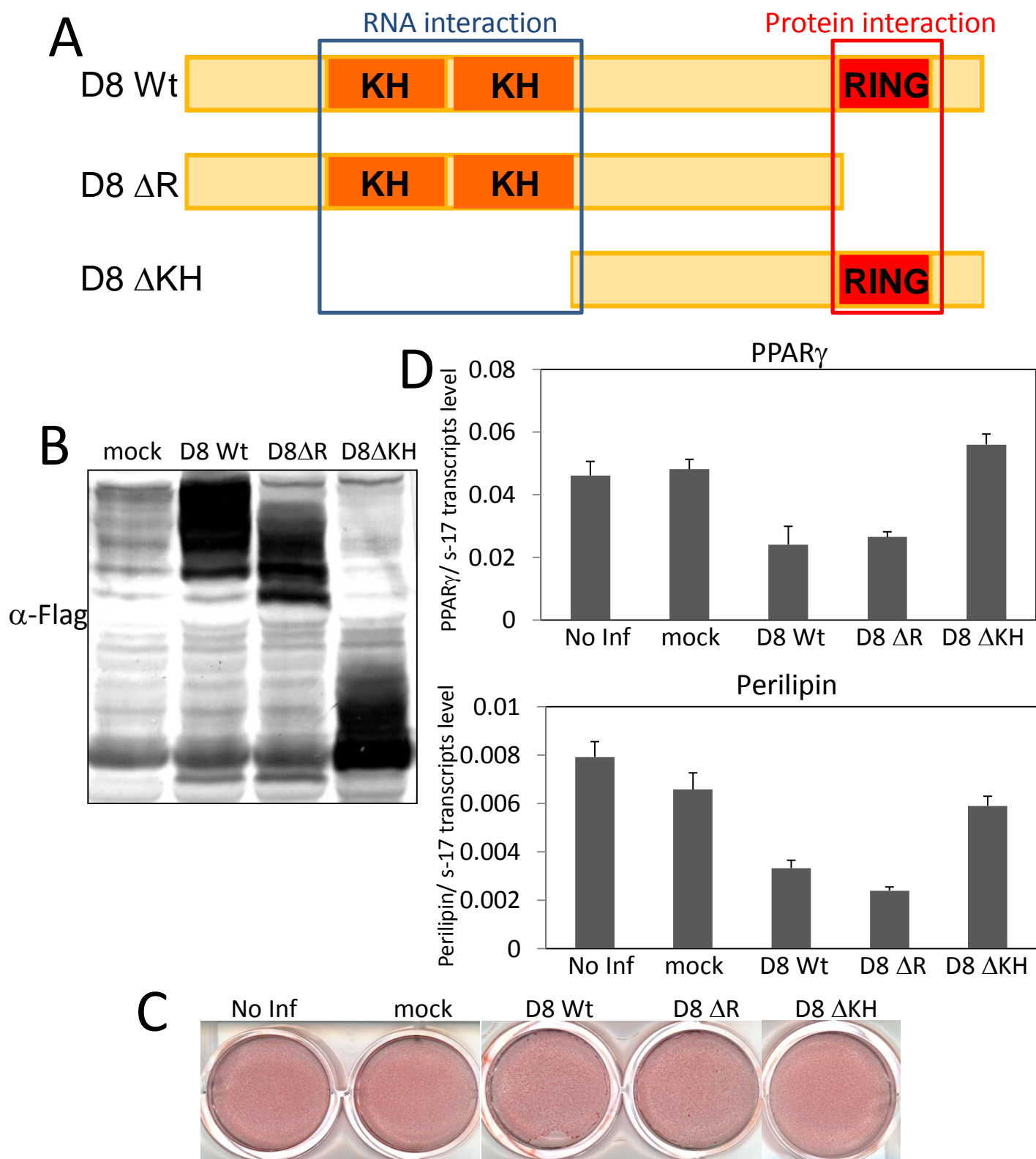


Figure 2-13. D8過剰発現による脂肪細胞分化の抑制効果はKH domain依存式的である
レトロウイルスを用いてFlagタグを付加した野生型D8 (D8 Wt)、Ring domain以降のC末端を除去したD8 ΔR およびKH domain以前のN末端を除去したD8 ΔKH を3T3-L1細胞に対して過剰発現し、脂肪細胞分化誘導を行った。No Inf: No Infection A. D8 deletion mutantの模式図 B. Western blottingでFL-D8, D8 ΔR およびD8 ΔKH の検出を行った。C. 分化8日目の細胞のOil red O染色を行った。D. 分化誘導8日目に細胞からRNAを抽出し、Real time RT-PCRを行うことでD8, PPAR γ , PerilipinのmRNA発現の定量を行った。(n=3)

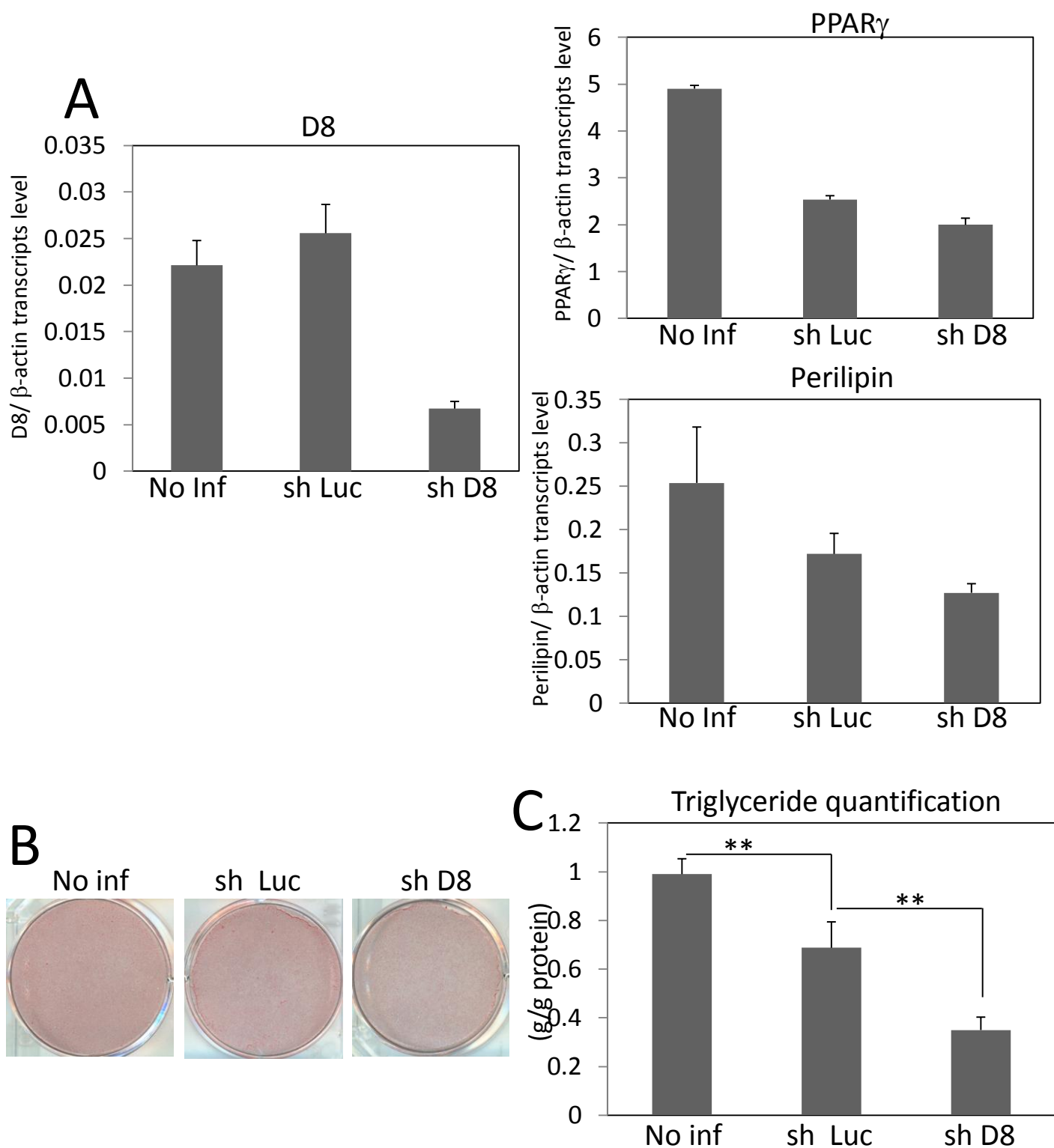


Figure 2-14. D8のノックダウンは脂肪細胞分化を抑制する

レンチウイルスを用いてD8に対するshRNAを3T3-L1細胞に対して導入し、脂肪細胞分化誘導を行った。コントロールとして、未感染群、およびLuciferase遺伝子に対するshRNAを発現するウイルスを感染させた細胞を用いた。A.分化誘導8日目に細胞からRNAを抽出し、Real time RT-PCRを行うことでD8, PPAR γ , PerilipinのmRNA発現の定量を行った。B. 分化8日目の細胞のOil red O染色を行った。C.細胞からTriglycerideを抽出・定量し、総タンパク質量で割り込むことで細胞内脂質蓄積量を求めた。(n=3, ** p <0.01)

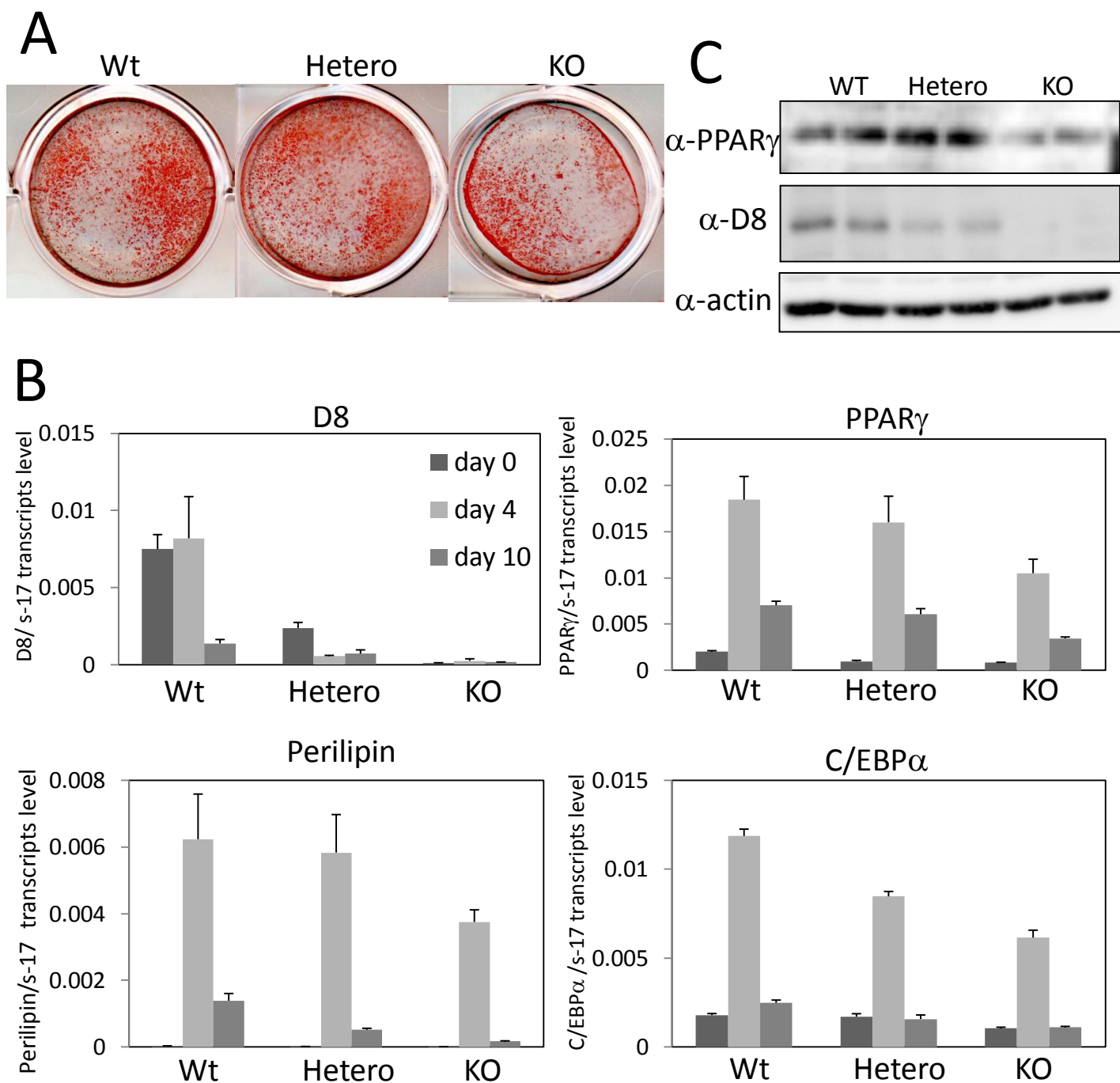


Figure 2-15. D8の欠損は脂肪細胞分化を抑制する

同腹子の野生型 (Wt)、D8ヘテロ欠損、ホモ欠損マウス胎児よりMEFを調整し、脂肪細胞分化誘導を行った。A. 分化10日目の細胞のOil red O染色を行った。B. 分化誘導0, 4, 10日目に細胞からRNAを抽出し、Real time RT-PCRを行うことでD8, PPAR γ , Perilipin, C/EBP α のmRNA発現の定量を行った。C. 分化誘導10日目の細胞からタンパク質を抽出し、Western blottingを用いて、PPAR γ , D8およびactinのタンパク質を検出した。(n=3)

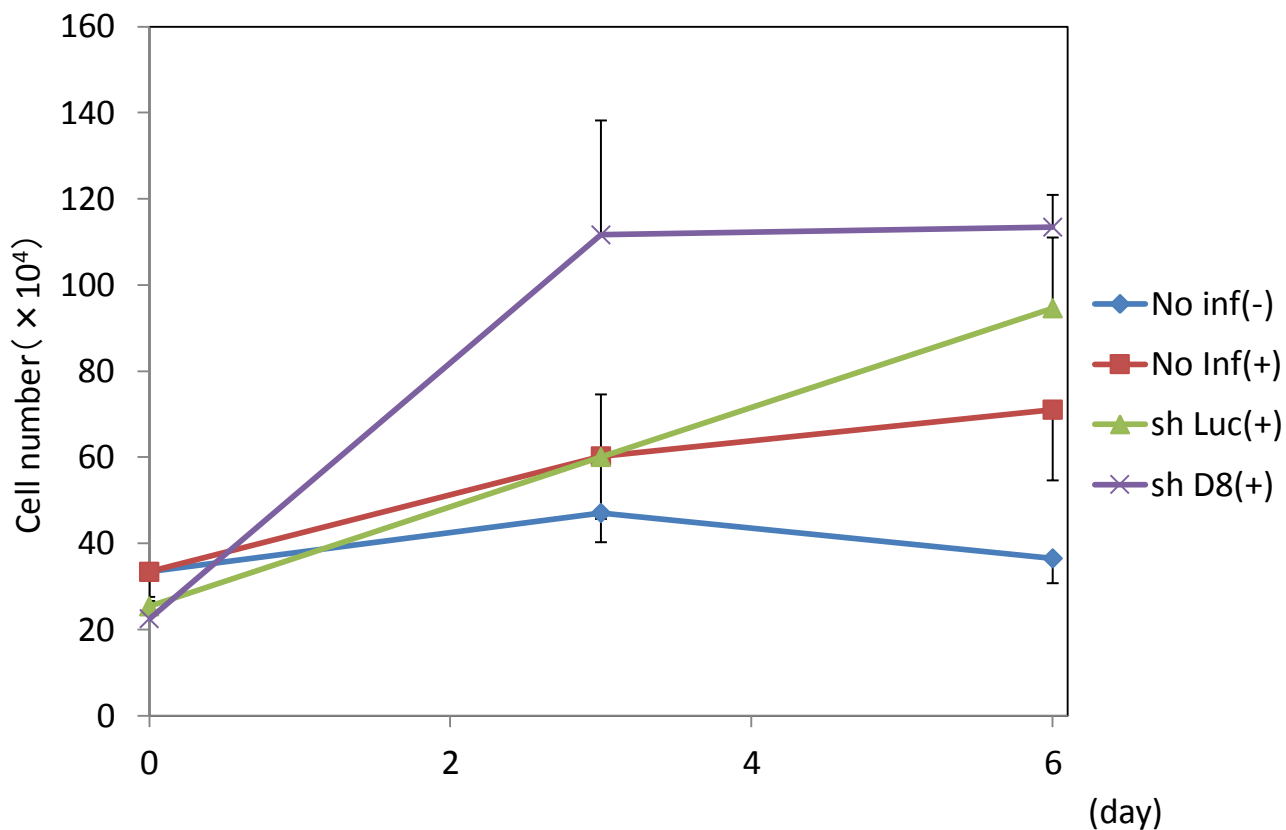


Figure 2-16. D8のノックダウンによって、脂肪細胞のClonal expansionは抑制されない
 レンチウイルスを用いてD8に対するshRNAを3T3-L1細胞に対して導入し、脂肪細胞分化誘導を行った。
 コントロールとして、未感染群 (No Inf)、およびLuciferase遺伝子に対するshRNAを発現するウイルスを
 感染させた細胞 (sh Luc) を用いた。分化未誘導 (-) ないしは分化誘導後 (+)、0, 3, 6日目にトリプシンを
 用いて細胞をはがし、血球計数板で細胞数の計測を行った。(n=4)

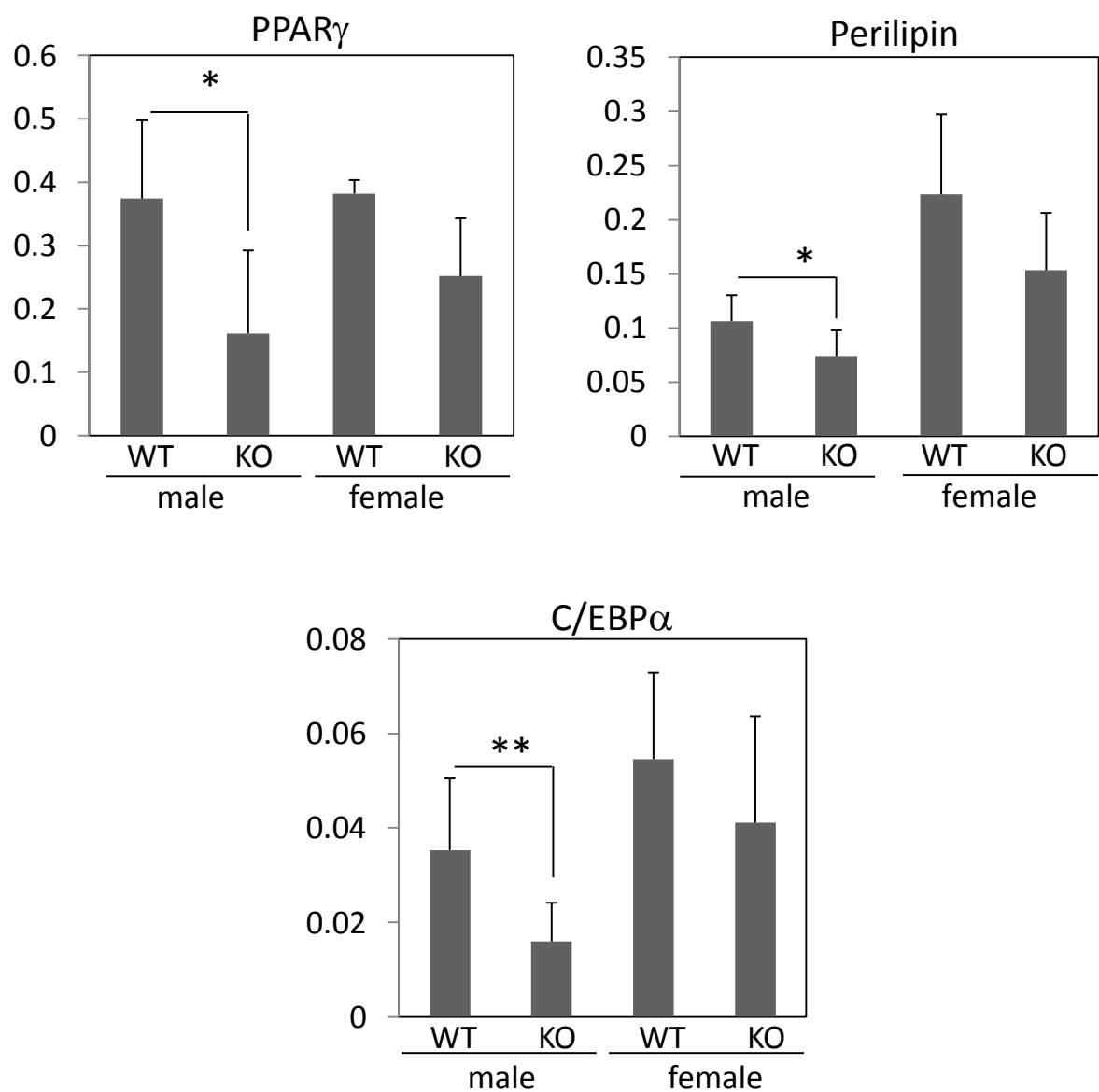


Figure 2-17. D8欠損マウスの脂肪組織では、PPAR γ シグナルの発現が減弱している
BALBライン600日齢の野生型(WT)およびD8欠損マウス(KO)の雌雄の内臓脂肪組織からRNAを抽出し、Real time RT-PCRを行うことでD8, PPAR γ , Perilipin, C/EBP α のmRNA発現の定量を行った。(WT male n=4, KO male n=11, WT female n=3, KO female n=5 * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$)

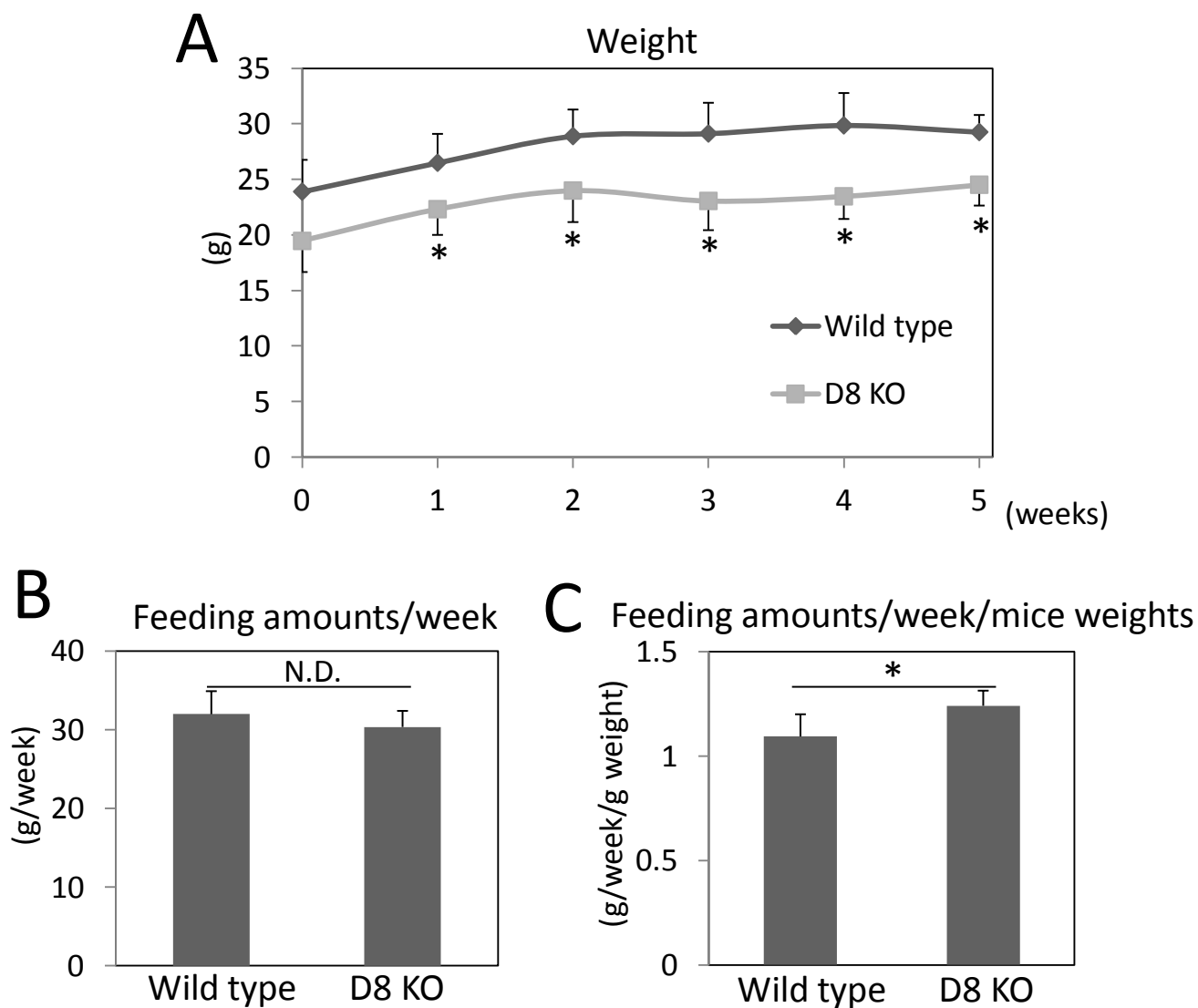


Figure 2-18. D8欠損マウスは体重が減少しているが、摂食量に有意な変化は見られない

BALBラインの野生型およびD8欠損マウスの雄を8週齢から13週齢まで単独飼育し、経時的に体重 (A) および週当たりの摂食量 (B) を測定した。また、週当たりの摂食量を体重で割り込むことで、体重当たりの摂食量 (C) を求めた。(Wild type n=3, D8 KO n=5 * $p<0.05$)

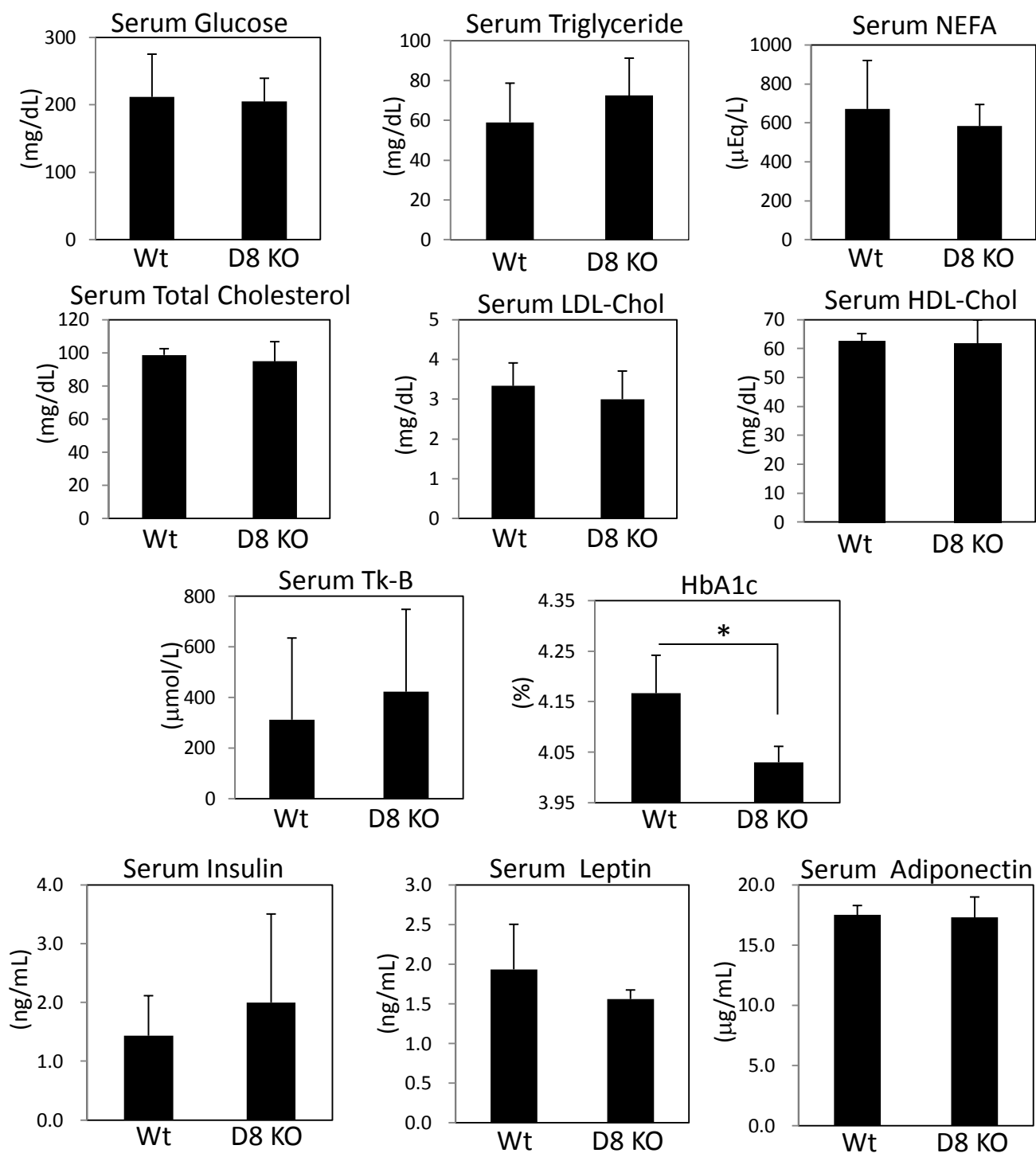


Figure 2-19. D8欠損雄マウスの血液成分において、糖尿病マーカーであるHbA1c(ヘモグロビンA1c)が減少している

BALBラインの野生型(Wt)およびD8欠損マウス(KO)の雄13週齢を6時間絶食後に屠殺し、血液を回収し、血清を調整後、血液成分の解析を行った。NEFA: Non-esterified Fatty acid, Tk-B: Total ketone bodies, HbA1c: ヘモグロビンA1c (Wild type n=3, D8 KO n=5 * p <0.05)

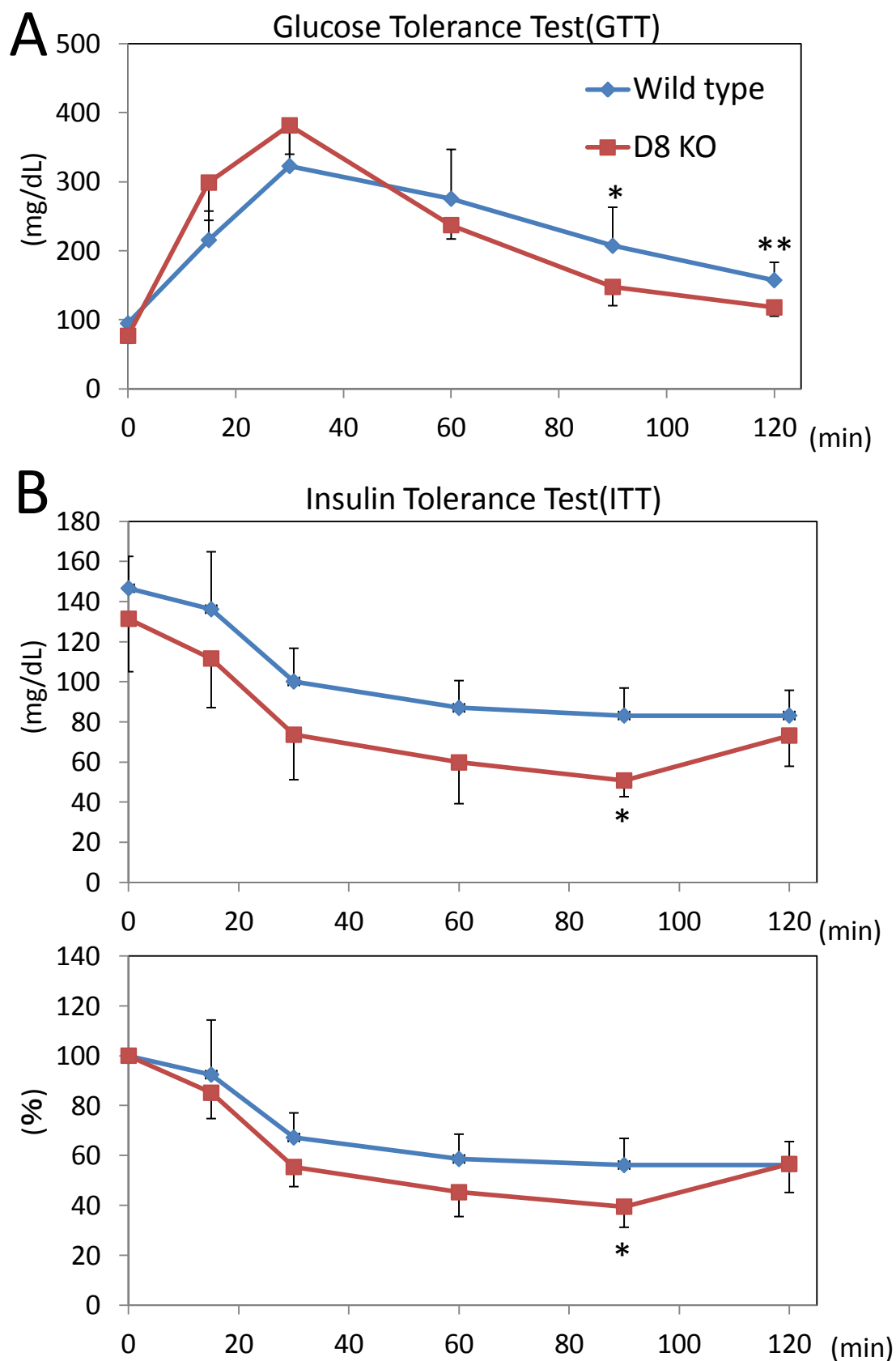


Figure 2-20. 若齢D8欠損雄マウスはインスリン感受性がわずかに亢進している
BALBラインの野生型およびD8欠損雄マウス8週齢に対してGTT(A)およびITT(B)を行った。ITTの下段の
パネルは、野生型、D8欠損マウスのそれぞれの血糖値の変化を相対値で表示した。(n=5, * $p < 0.05$)

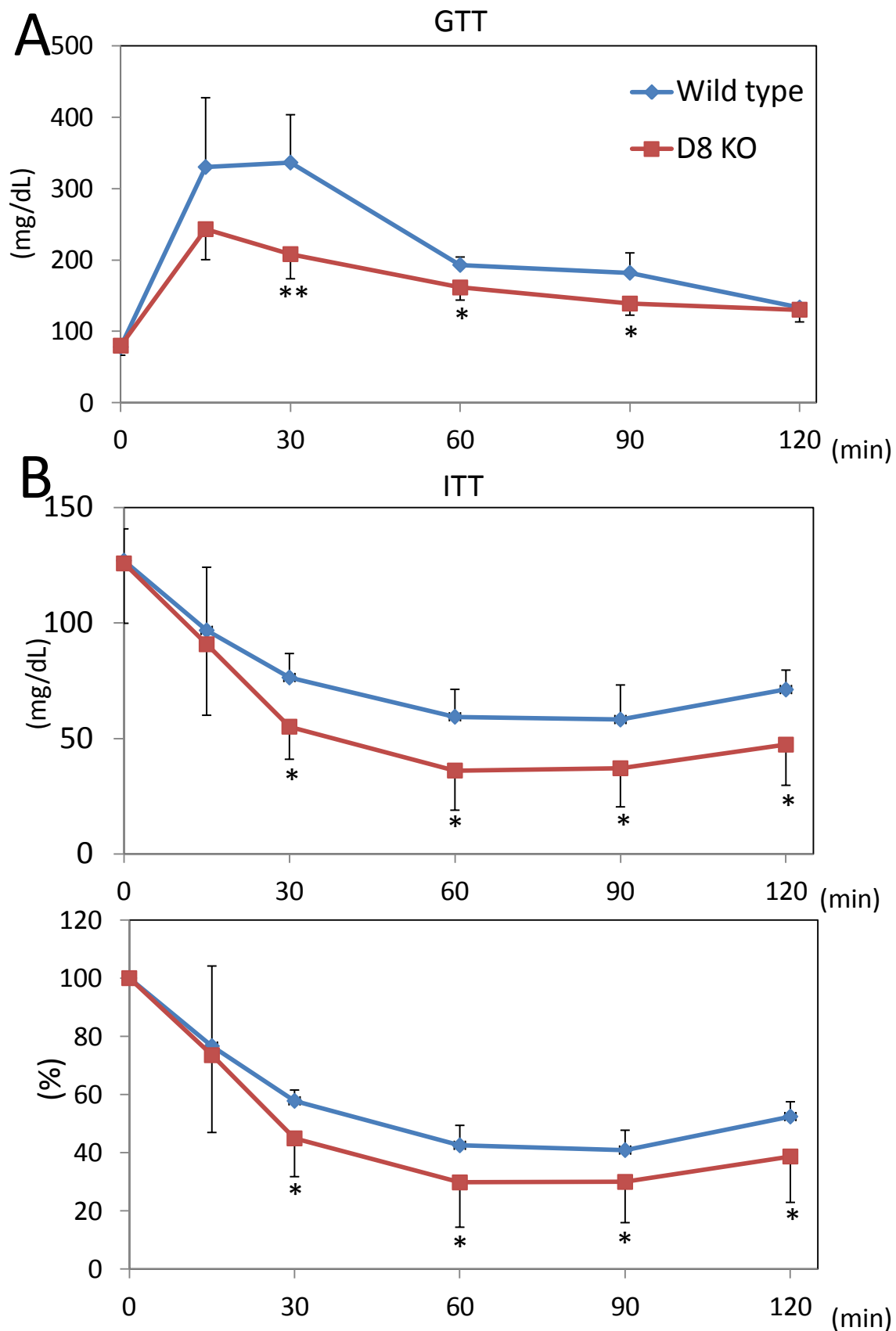


Figure 2-21. 老齡D8欠損雄マウスはインスリン感受性が顕著に亢進している
BALBラインの野生型(WT)およびD8欠損雄マウス600日齢に対してGTT(A)およびITT(B)を行った。ITTの下段のパネルは、野生型、D8欠損マウスのそれぞれの血糖値の変化を相対値で表示した。(Wild type n=5, D8 KO n=9 * $p<0.05$, ** $p<0.01$)

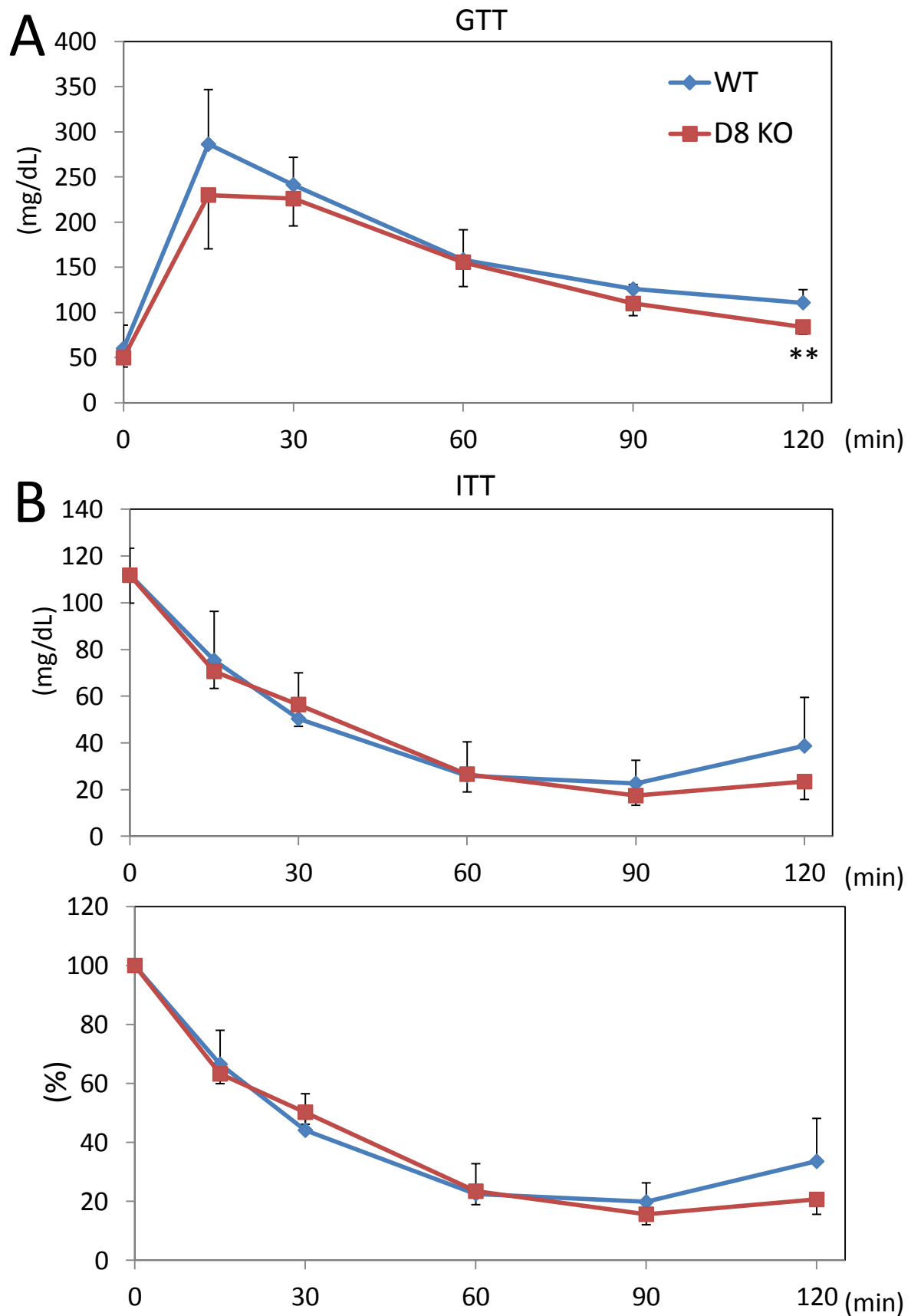


Figure 2-22. 老齡D8欠損雌マウスにおいて、インスリン感受性に差は認められない
BALBラインの野生型およびD8欠損雌マウス600日齢に対してGTT(A)およびITT(B)を行った。ITTの下段のパネルは、野生型、D8欠損マウスのそれぞれの血糖値の変化を相対値で表示した。(Wild type n=3, D8 KO n=6 ** $p < 0.01$)

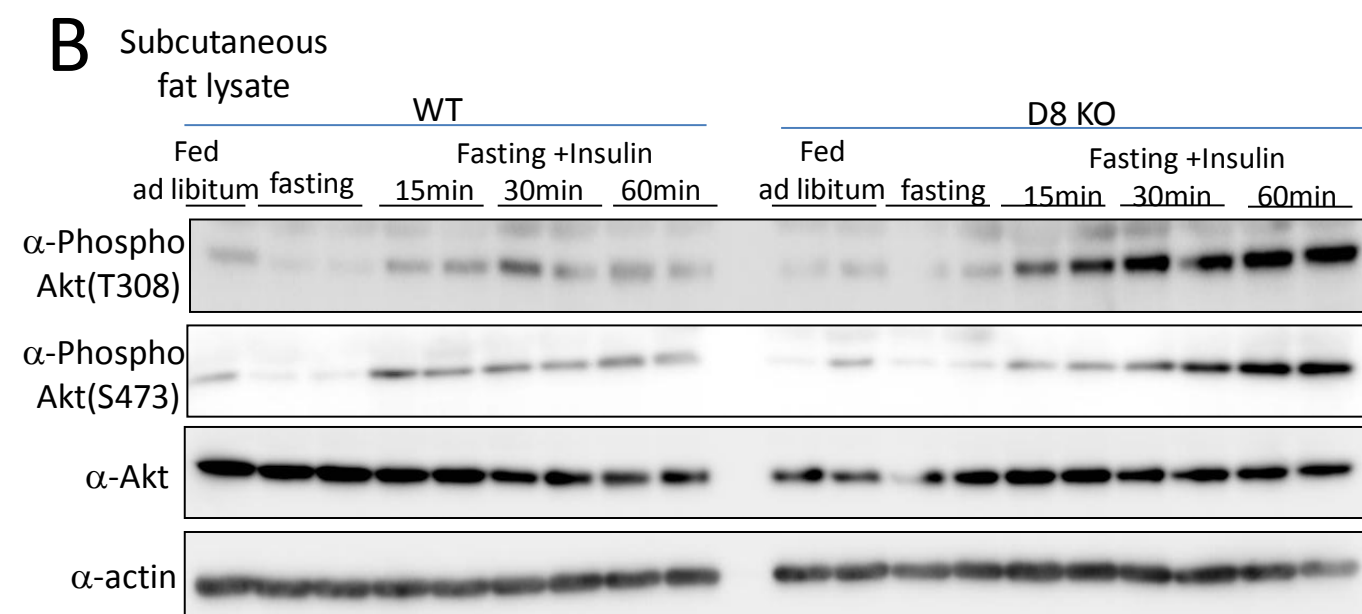
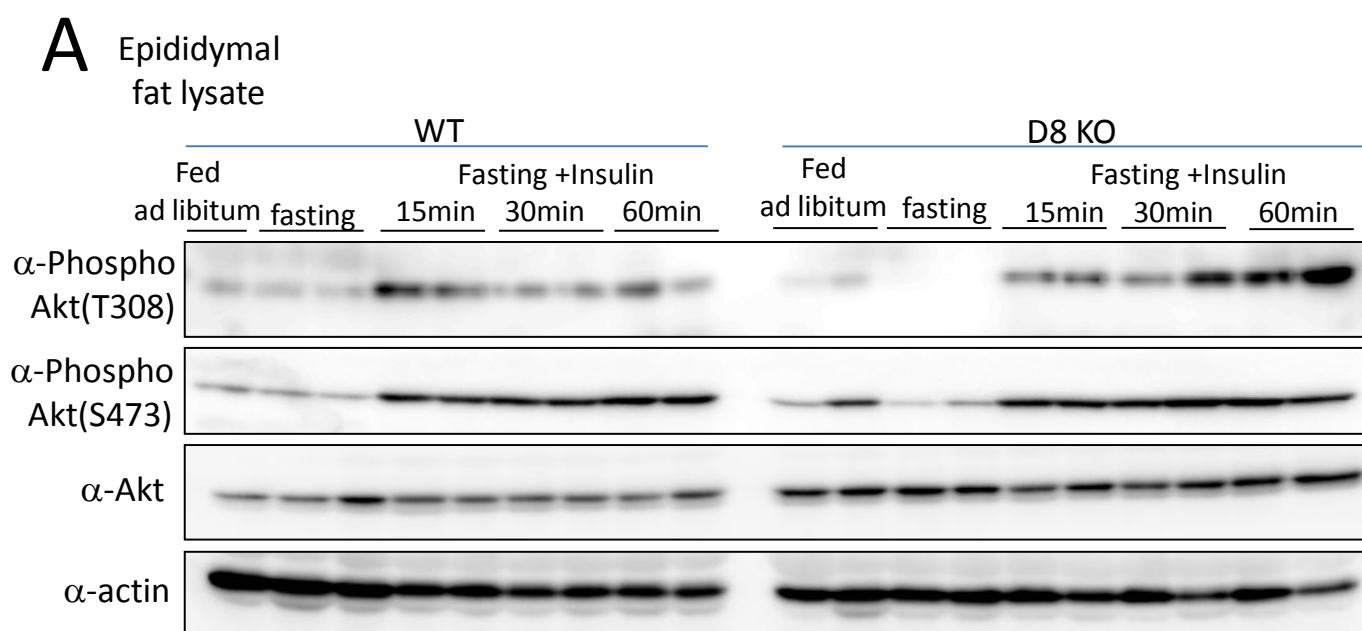


Figure 2-23. D8欠損雄マウスはインスリン刺激によるインスリンシグナルの活性化が、増強している
BALBラインの野生型およびD8欠損雄マウス12週齢を自由摂食(Fed ad libitum)もしくは24時間絶食させた後、2 IU/kgのインスリンを投与し、15、30、60分後に精巣上体脂肪組織(A)および皮下脂肪組織(B)からタンパク質を回収した。得られたサンプルを用いて、Aktのスレオニン、セリンリン酸化、およびAkt、actinの各タンパク質をWestern blottingで検出した。各レーンはそれぞれマウス一頭を示す。

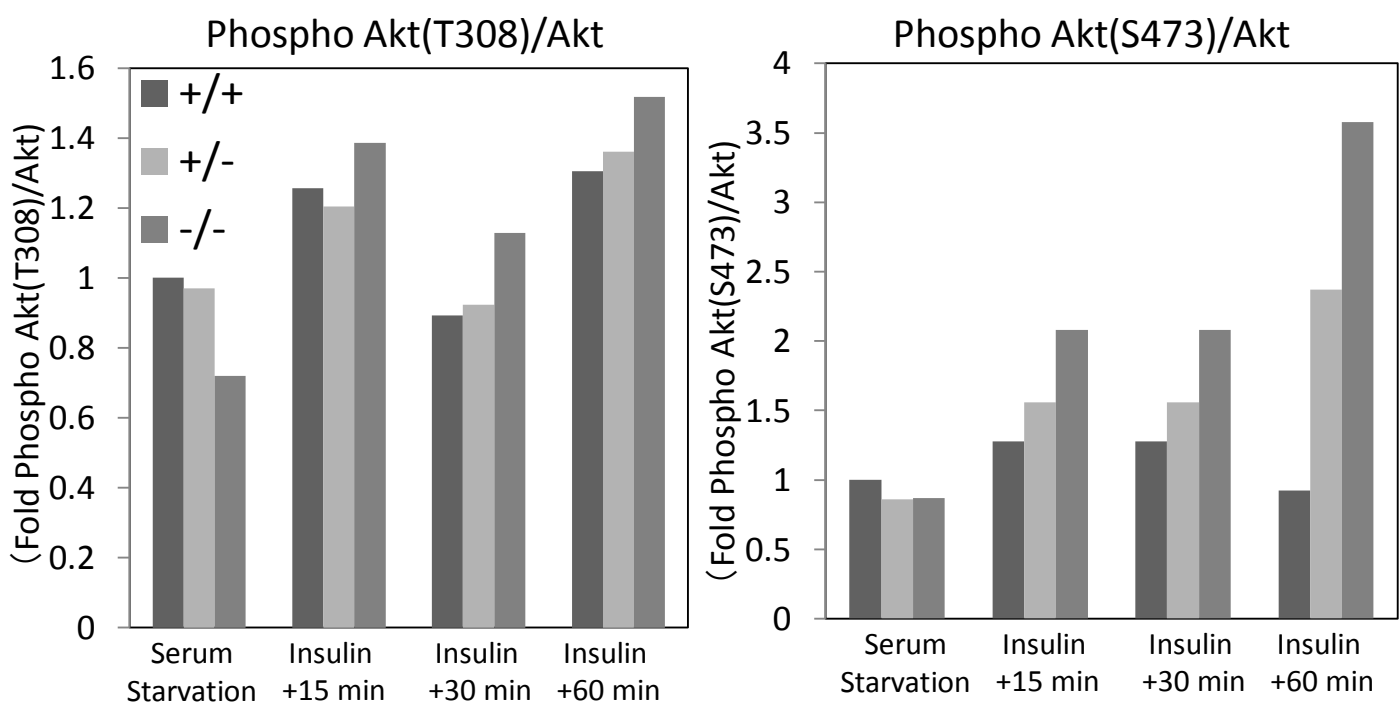
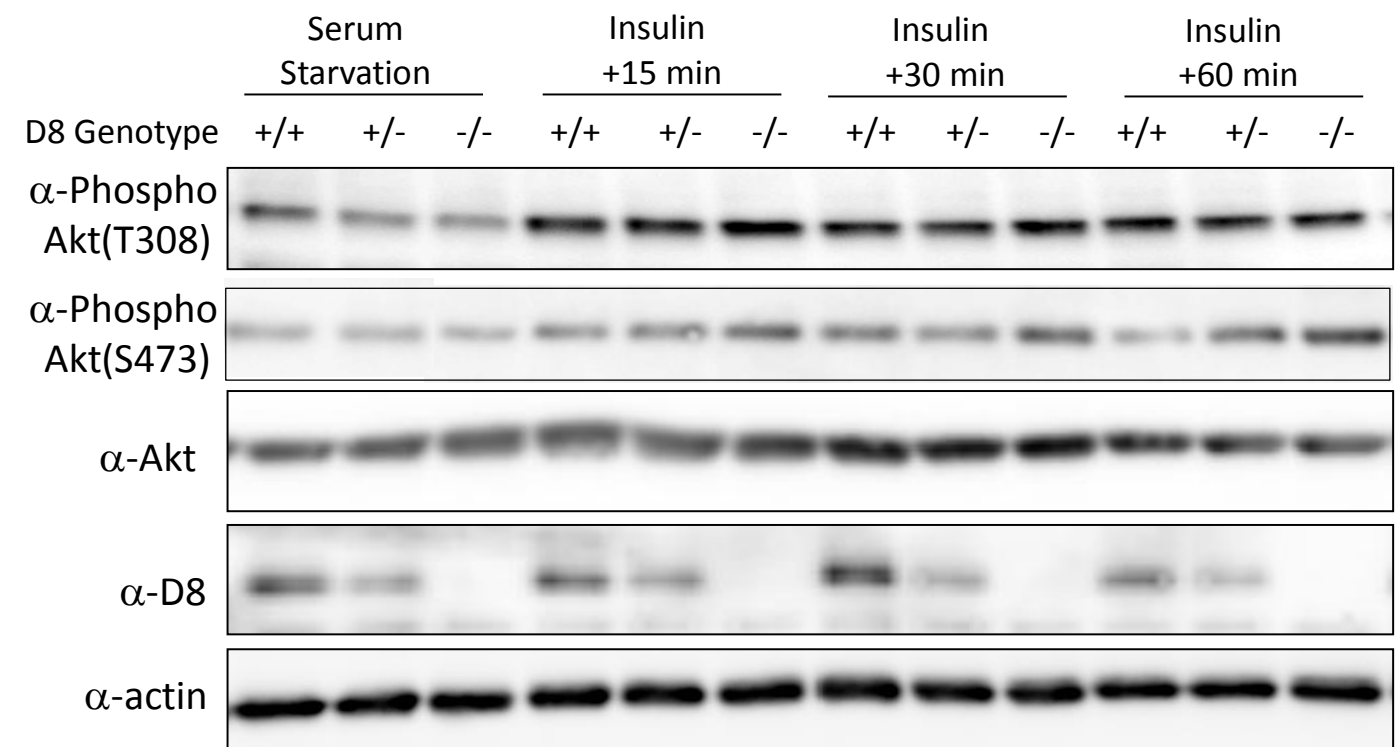
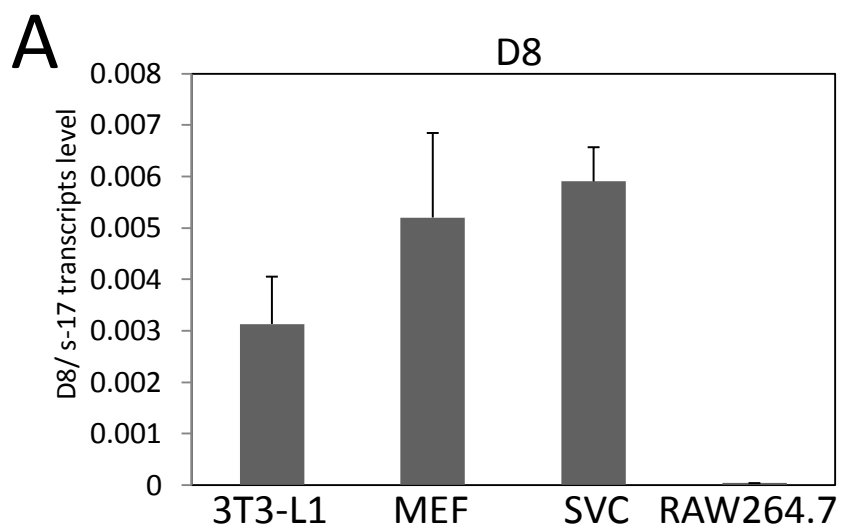


Figure 2-24. D8欠損マウス由来のMEFはインスリン刺激によるインスリンシグナルの活性化が、増強している

同腹子の野生型(+/+)およびD8ヘテロ欠損(+/-)、ホモ欠損(-/-)マウス胎児より調整したMEFを24時間血清飢餓状態にした後、1 μ g/mLのインスリンを投与し、15、30、60分後においてタンパク質を回収した。回収したタンパク質サンプルを用いて、Aktのスレオニン、セリンリン酸化、およびAkt、D8、actinの各タンパク質をWestern blottingで検出した。下段は、それぞれのバンドを定量化したグラフである。



B

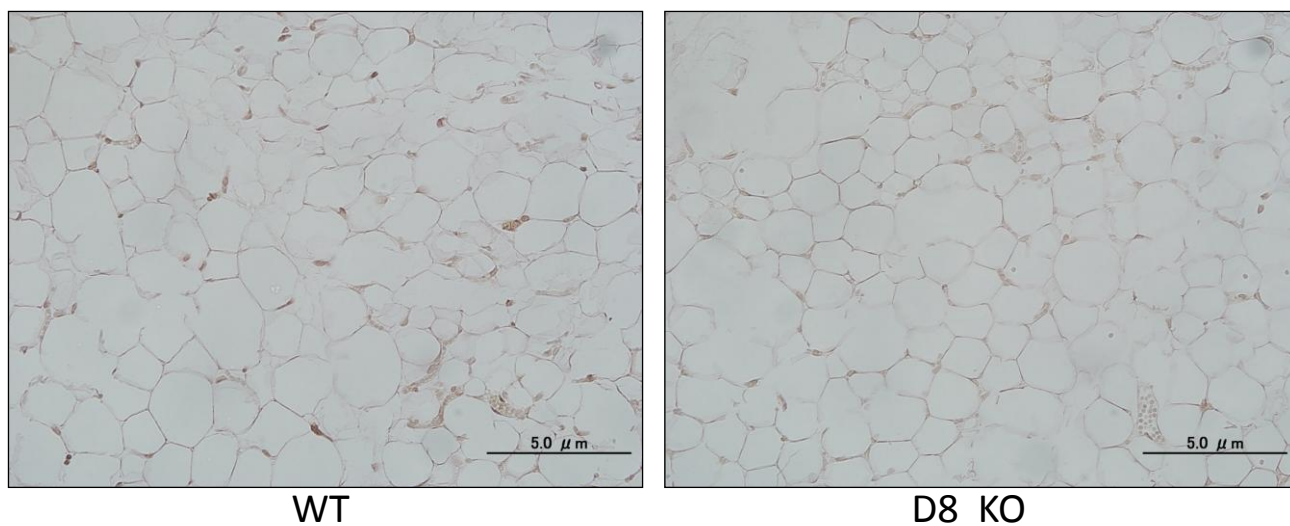


Figure 2-25. マクロファージにおいて、D8が機能している可能性は低い

A. 未分化状態の3T3-L1細胞、野生型マウス胎児より調整したMEF、および野生型マウスより調整したSVCとマクロファージ由来細胞であるRAW264.7細胞におけるD8のmRNA発現量をReal time RT-PCRで検討した。(n=3) B. BALBラインの野生型およびD8欠損雄マウス600日齢の内臓脂肪組織をパラフィン固定後、F4/80でマクロファージの染色を行った。

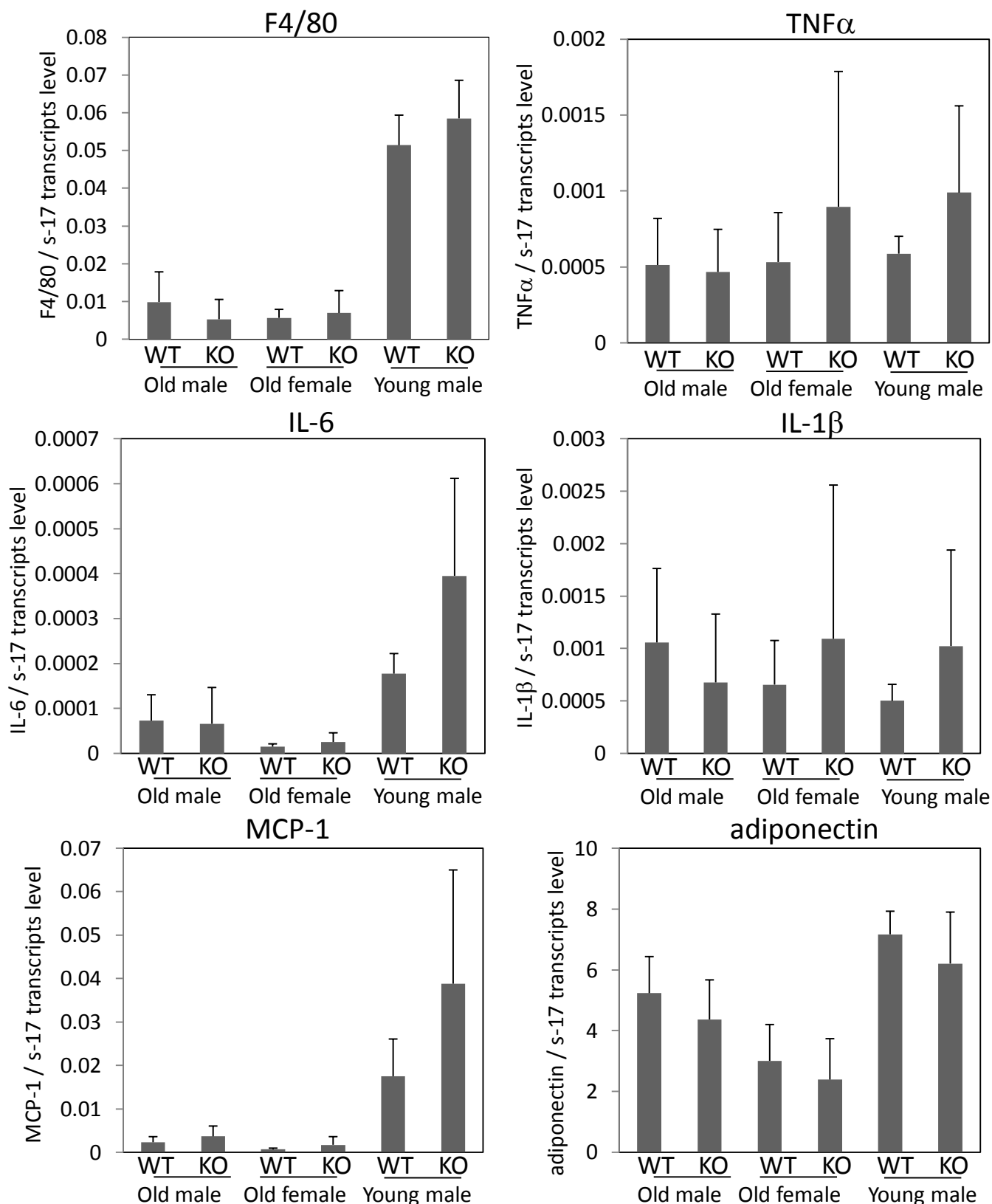


Figure 2-26. D8欠損マウスの脂肪組織において、マクロファージ関連および炎症系サイトカインの発現量に変化はない

BALBラインの野生型ならびにD8欠損マウスの600日齢の雌雄および13週齢の雄の内臓脂肪組織からRNAを回収し、F4/80, TNFα, IL-6, IL-1β, MCP-1およびadiponectinのmRNA発現量をReal time RT-PCRを用いて定量した。(Old WT male n=4, Old KO male n=11, Old WT female n=3, Old KO female n=5, Young WT male n=3, Young KO male n=3)

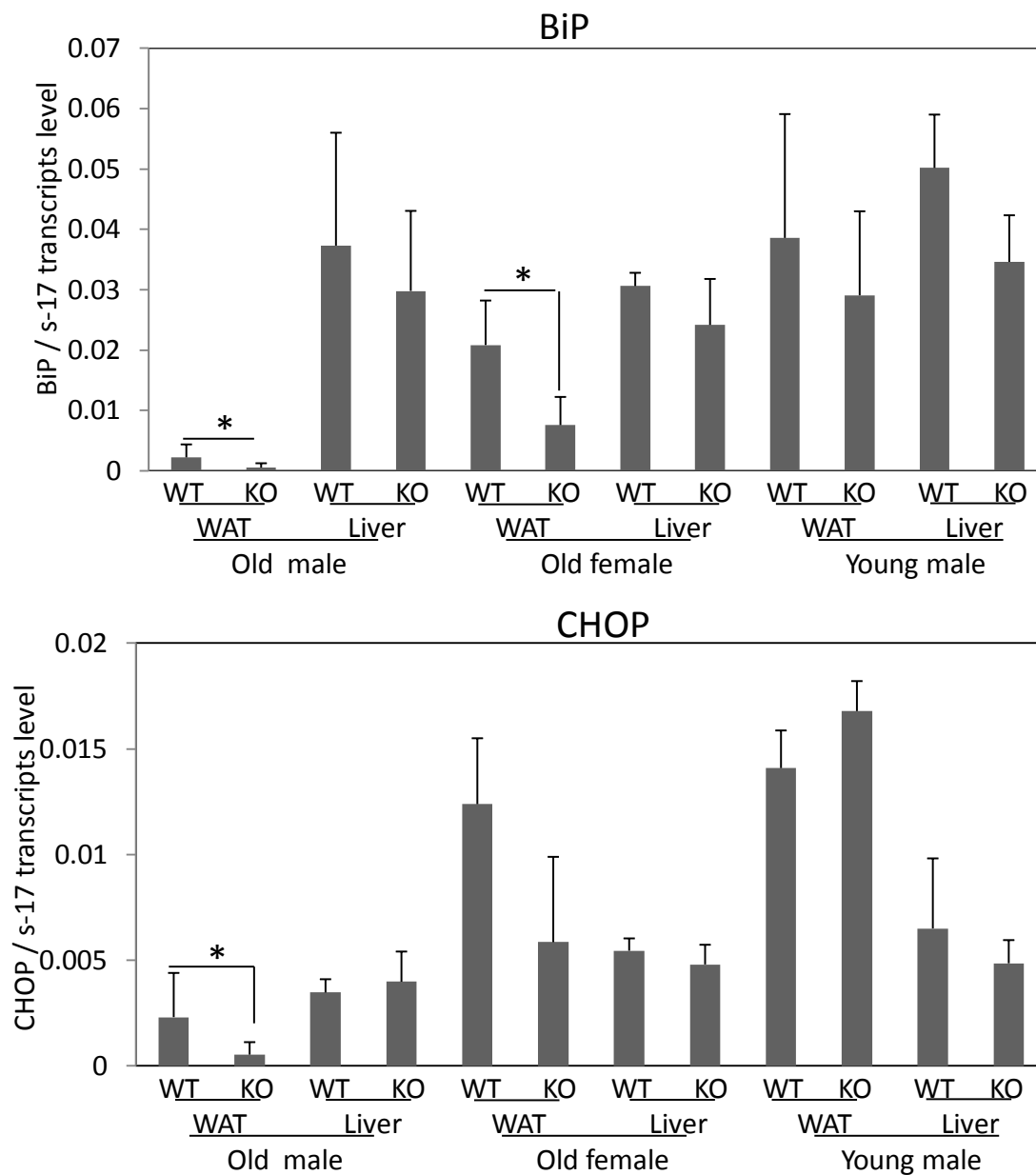


Figure 2-27. D8欠損老齢マウスに脂肪組織において、小胞体ストレスマーカーのmRNA発現量が減少している

BALBラインの野生型ならびにD8欠損マウスの600日齢の雌雄および13週齢の雄の内臓脂肪組織と肝臓からRNAを回収し、BiPとCHOPのmRNA発現量をReal time RT-PCRを用いて定量した。(Old WT male n=4, Old KO male n=11, Old WT female n=3, Old KO female n=5, Young WT male n=3, Young KO male n=3 * $p<0.05$)

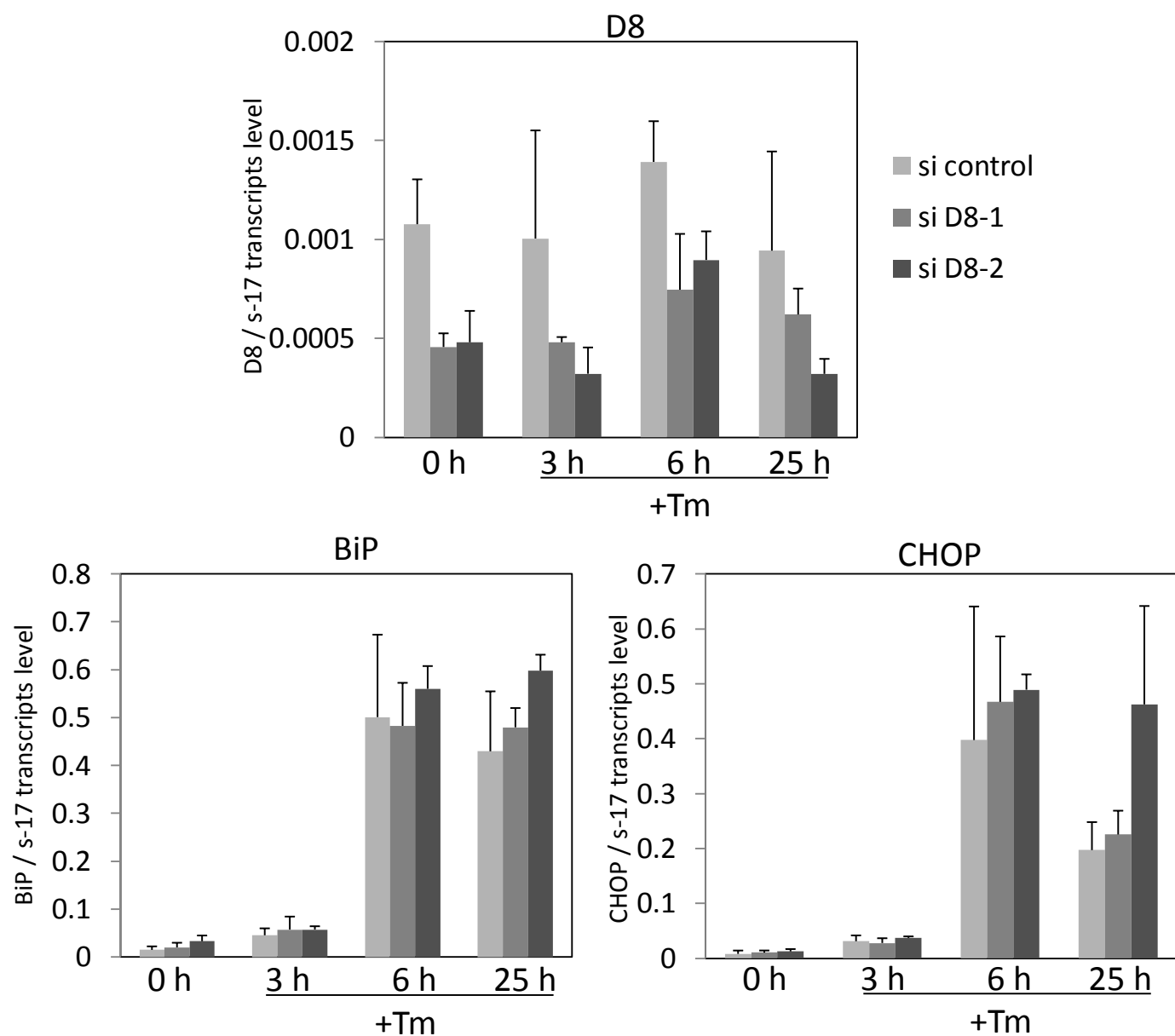


Figure 2-28. D8のノックダウンによって、小胞体ストレスは軽減されない

siRNAを用いてD8をノックダウンした3T3-L1細胞とコントロールのsiRNAを導入した細胞に対して、小胞体ストレス誘導剤であるTunicamycin (Tm)を1 μ g/mLの濃度で0, 3, 6, 25時間処理した後、RNAを回収し、BiPとCHOPのmRNA発現量をReal time RT-PCRを用いて定量した。(n=3)

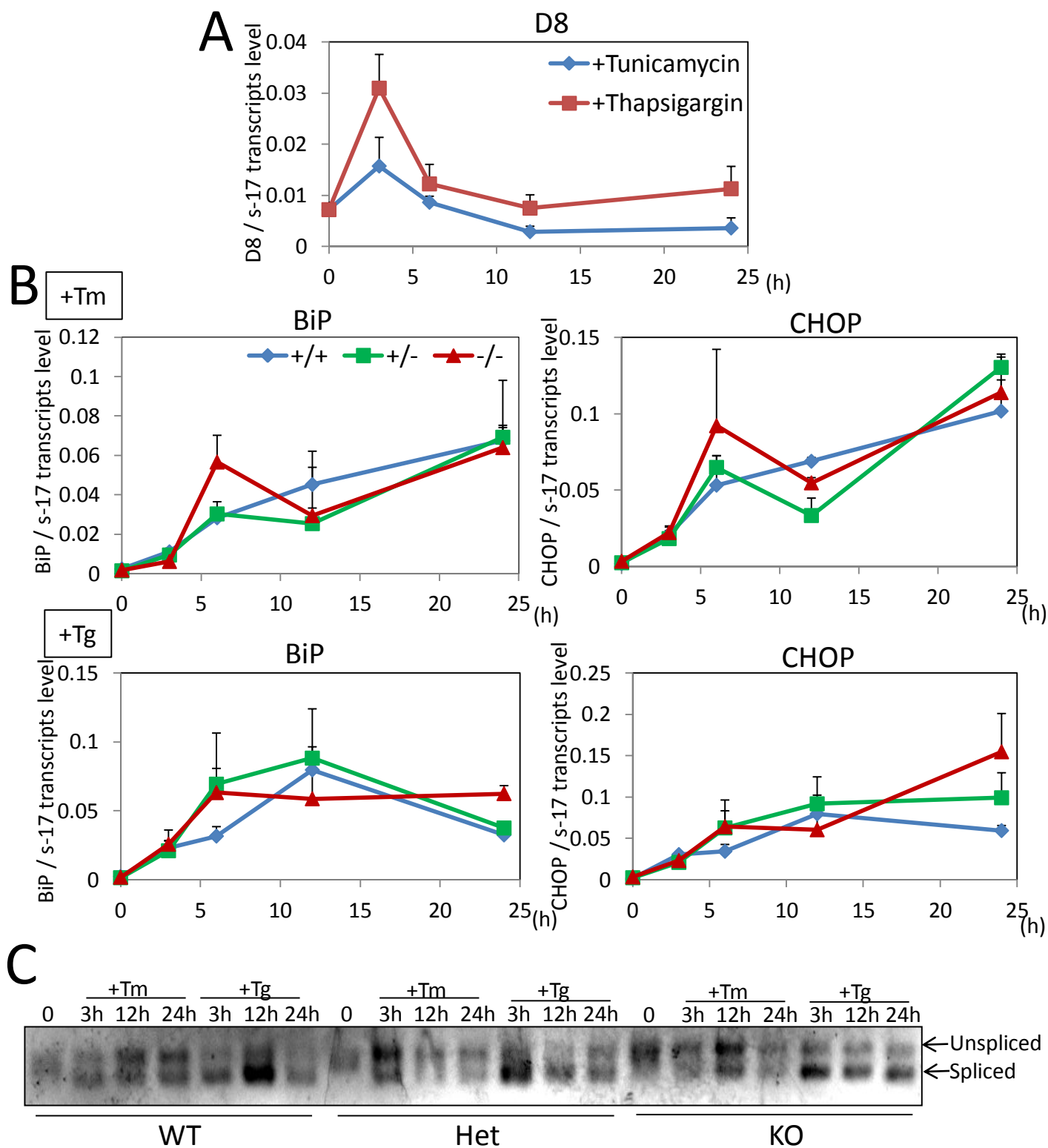


Figure 2-29. D8欠損マウス由来のMEFにおいて、小胞体ストレスは軽減されない。同腹子の野生型(+/+)およびD8ヘテロ欠損(+/-)、ホモ欠損(-/-)マウス胎児より調整したMEFに対して、小胞体ストレス誘導剤である1 μ g/mL Tunicamycin(Tm)もしくは500 nM Thapsigargin(Tg)を0, 3, 12, 24時間処理した後、RNAを回収した。A. 野生型マウス由来のMEFにおけるD8のmRNA発現変動をReal time RT-PCRで定量した。B. 各MEFにおけるBiP、CHOPのmRNA発現変動をReal time RT-PCRで定量した。上段パネルはTunicamycin処理、下段パネルはThapsigargin処理をした際の各遺伝子の発現変動を示す。C. 各MEFにおけるXBP-1 mRNAのSplicingをRT-PCRで検討した。(n=3)

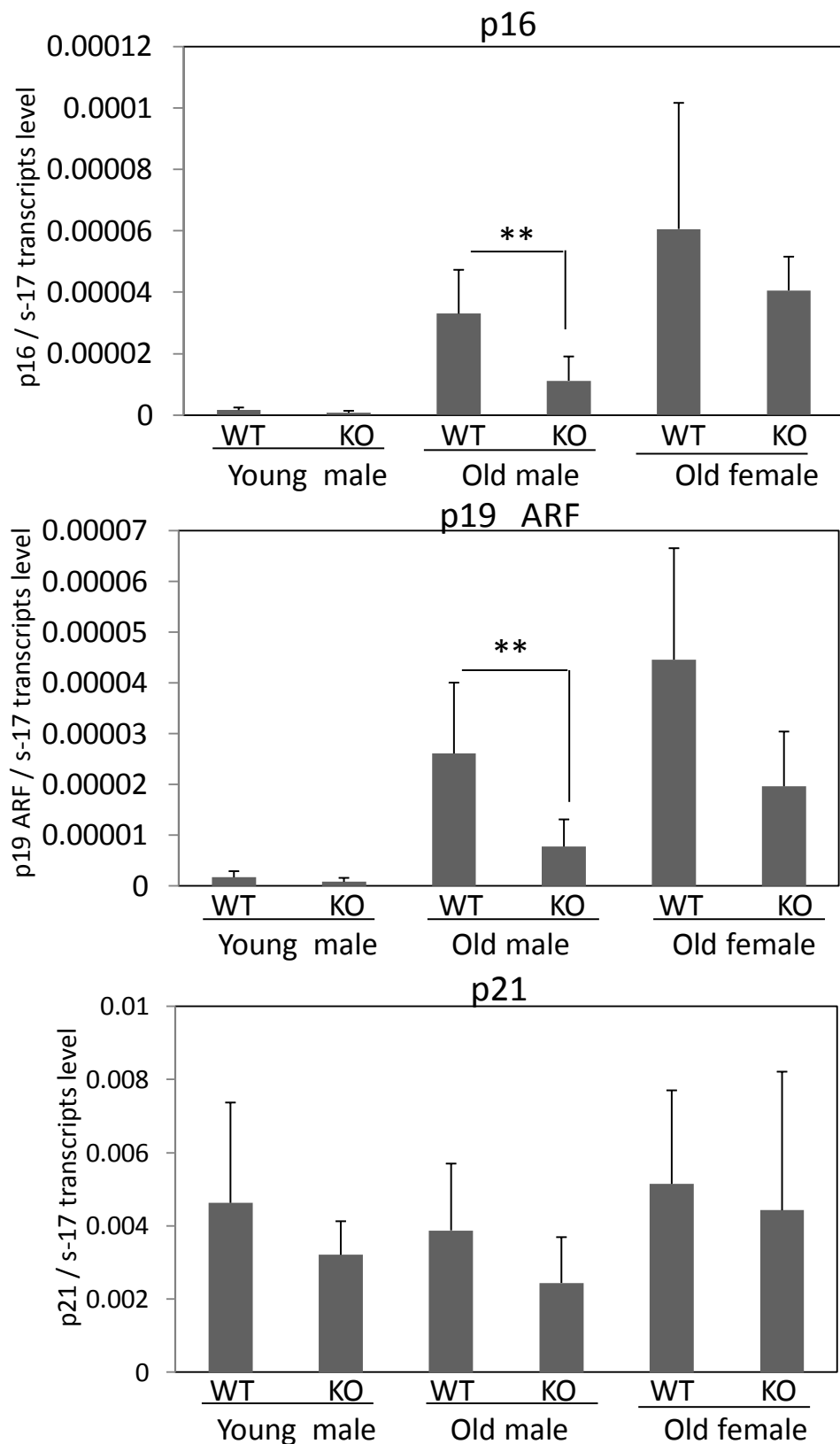


Figure 2-30. D8欠損老齡雄マウスの脂肪組織において、SenescenceマーカーmRNA発現が減少している

BALBラインの野生型ならびにD8欠損マウスの600日齢の雌雄および13週齢の雄の内臓脂肪組織からRNAを回収し、p16, p19 ARF, p21のmRNA発現量をReal time RT-PCRを用いて定量した。(Old WT male n=4, Old KO male n=11, Old WT female n=3, Old KO female n=5, Young WT male n=3, Young KO male n=3 ** $p < 0.01$)

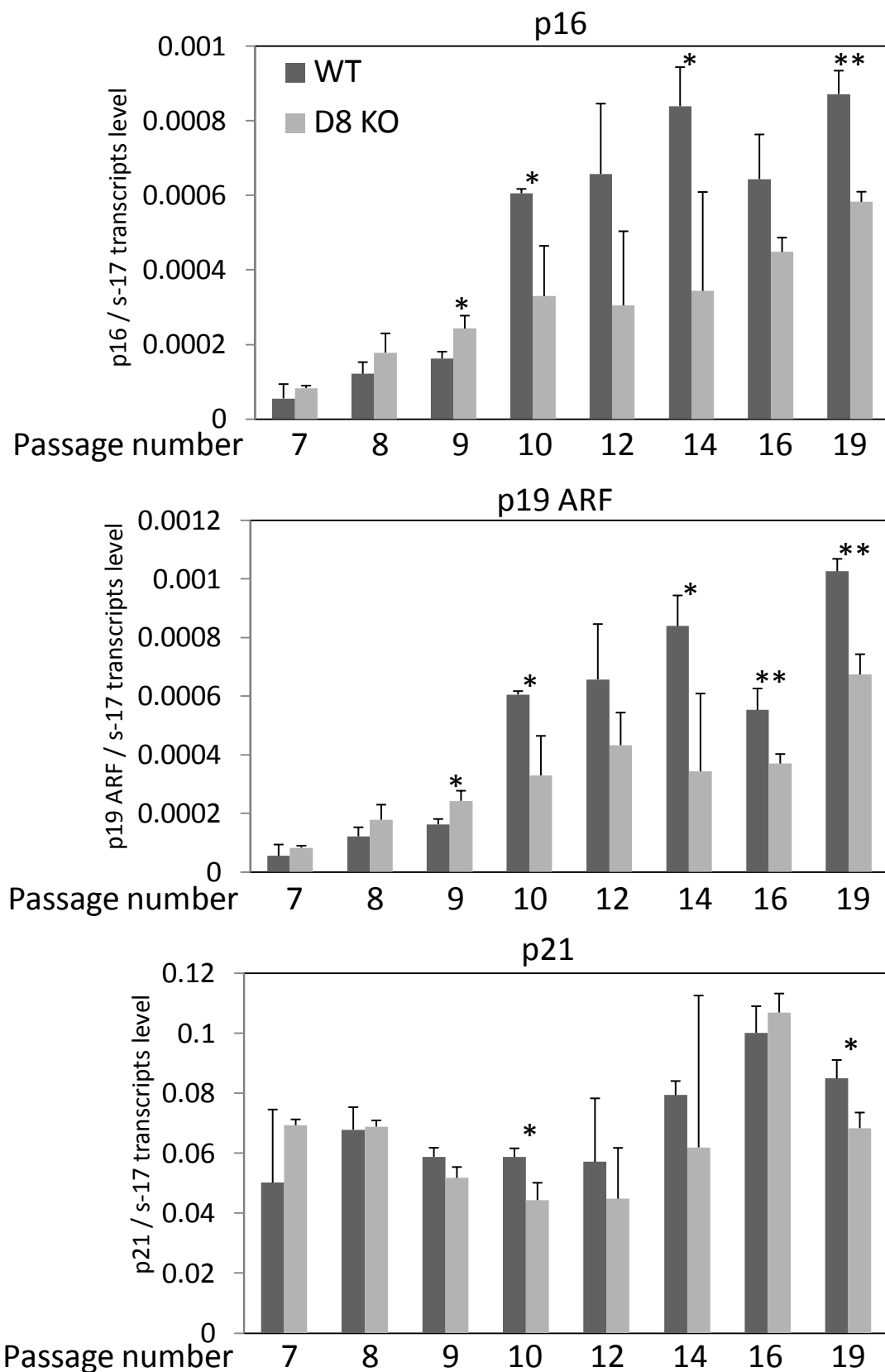


Figure 2-31. D8欠損マウス由来のMEFにおいて、反復した継代に伴うSenescenceマーカー遺伝子のmRNA発現増加が抑制されている。

同腹子の野生型およびD8ホモ欠損マウス胎児より調整したMEFに対して、3日に一度のPassageを繰り返し、Passage19に至るまで経時的にRNAを回収した。その後、各MEFにおけるp16, p19 ARF, およびp21のmRNA発現変動をReal time RT-PCRで定量した。(n=3 ** $p<0.01$, * $p<0.05$)

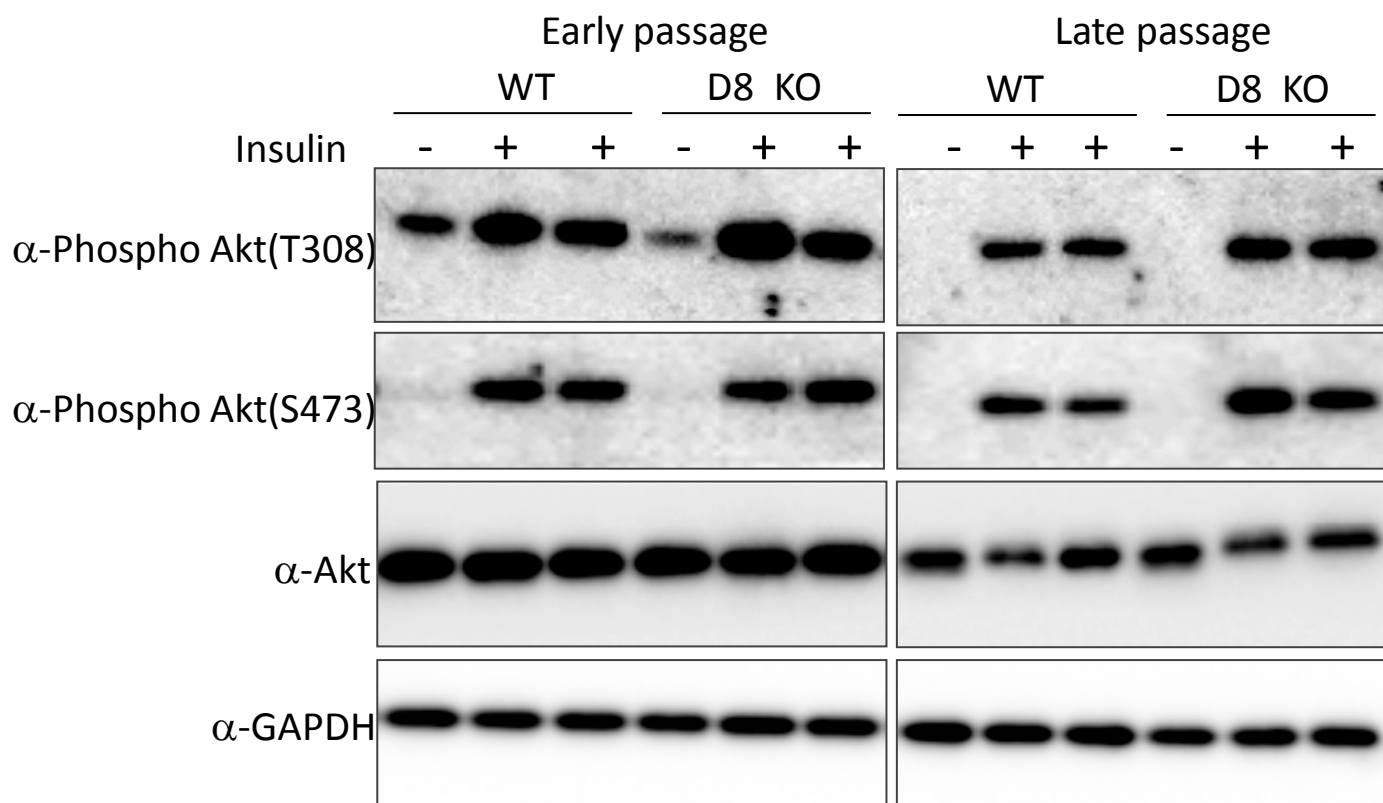


Figure 2-32. D8欠損マウス由来のMEFでは、Passage後期におけるインスリン感受性の悪化が緩和されている。

同腹子の野生型およびD8ホモ欠損マウス胎児より調整したMEFに対して、3日に一度のPassageをPassage7(Early passage)とPassage18(Late passage)に至るまで繰り返した。それぞれのMEFに対して、24時間血清飢餓状態にした後、1 μ g/mLのインスリンを投与し、30、60分後にタンパク質を回収した。得られたタンパク質サンプルを用いて、Aktのスレオニン、セリンリン酸化、およびAkt、GAPDHの各タンパク質をWestern blottingで検出した。

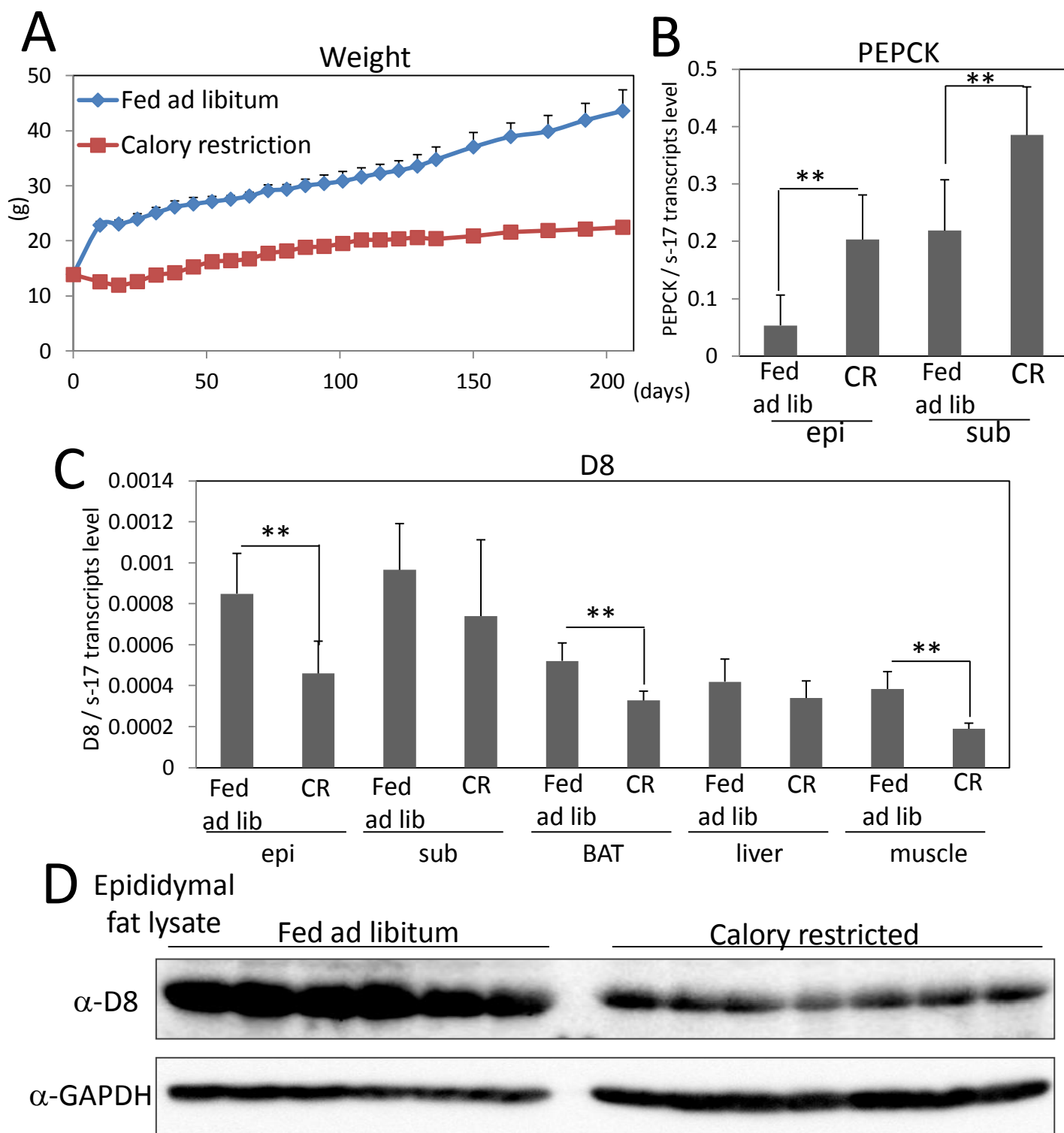


Figure 2-33. カロリー制限したマウスの内臓脂肪組織において、D8の発現は減少する。C57B6Jマウスの雄5週齢を210日間40%の摂取カロリーの制限実験を行った。A. コントロールの自由摂食群 (Fed ad libitum: Fed ad lib) とカロリー制限群 (Calory restricted: CR) における体重を経時的に測定した。B. 各群の精巣上体脂肪組織 (epididymal fat: epi) および皮下脂肪組織 (Subcutaneous fat: sub) からRNAを抽出し、PEPCKのmRNA発現をReal time RT-PCRで検討した。C. 各群の精巣上体脂肪組織 (epi)、皮下脂肪組織 (sub)、褐色脂肪組織 (BAT)、肝臓、骨格筋からRNAを回収し、Real time RT-PCRでD8のmRNA発現量を定量した。D. 各群の精巣上体脂肪組織におけるD8タンパク質をWestern blottingで検出した。各レーンは、マウス1匹ずつを示している。(Fed ad libitum n=6, Calory restriction, CR n=7 ** $p < 0.01$)

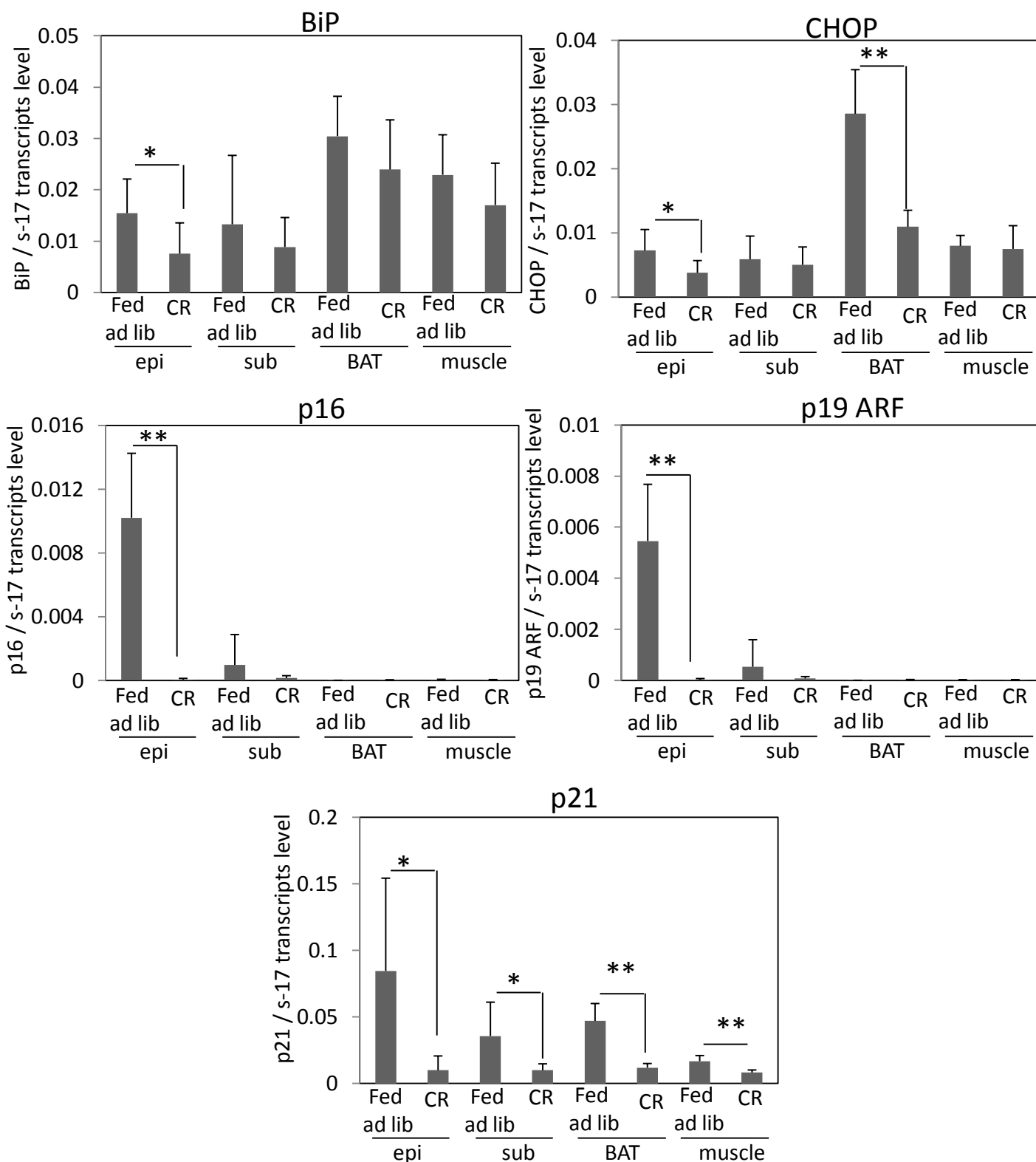


Figure 2-34. カロリー制限したマウスの内臓脂肪組織において、小胞体ストレスと Senescence のマーカー遺伝子の mRNA 発現量が減少している。

C57B6J マウスの雄 5 週齢を 210 日間 40% の摂取カロリーの制限実験を行った。コントロールの自由摂食群 (Fed ad libitum: Fed ad lib) とカロリー制限群 (Calory restreicted: CR) の精巢上体脂肪組織 (epi)、皮下脂肪組織 (sub)、褐色脂肪組織 (BAT)、骨格筋から RNA を回収し、Real time RT-PCR で BiP, CHOP, p16, p19 ARF, p21 の mRNA 発現量を定量した。(Fed ad libitum n=6, Calory restriction, CR n=7 ** $p<0.01$)

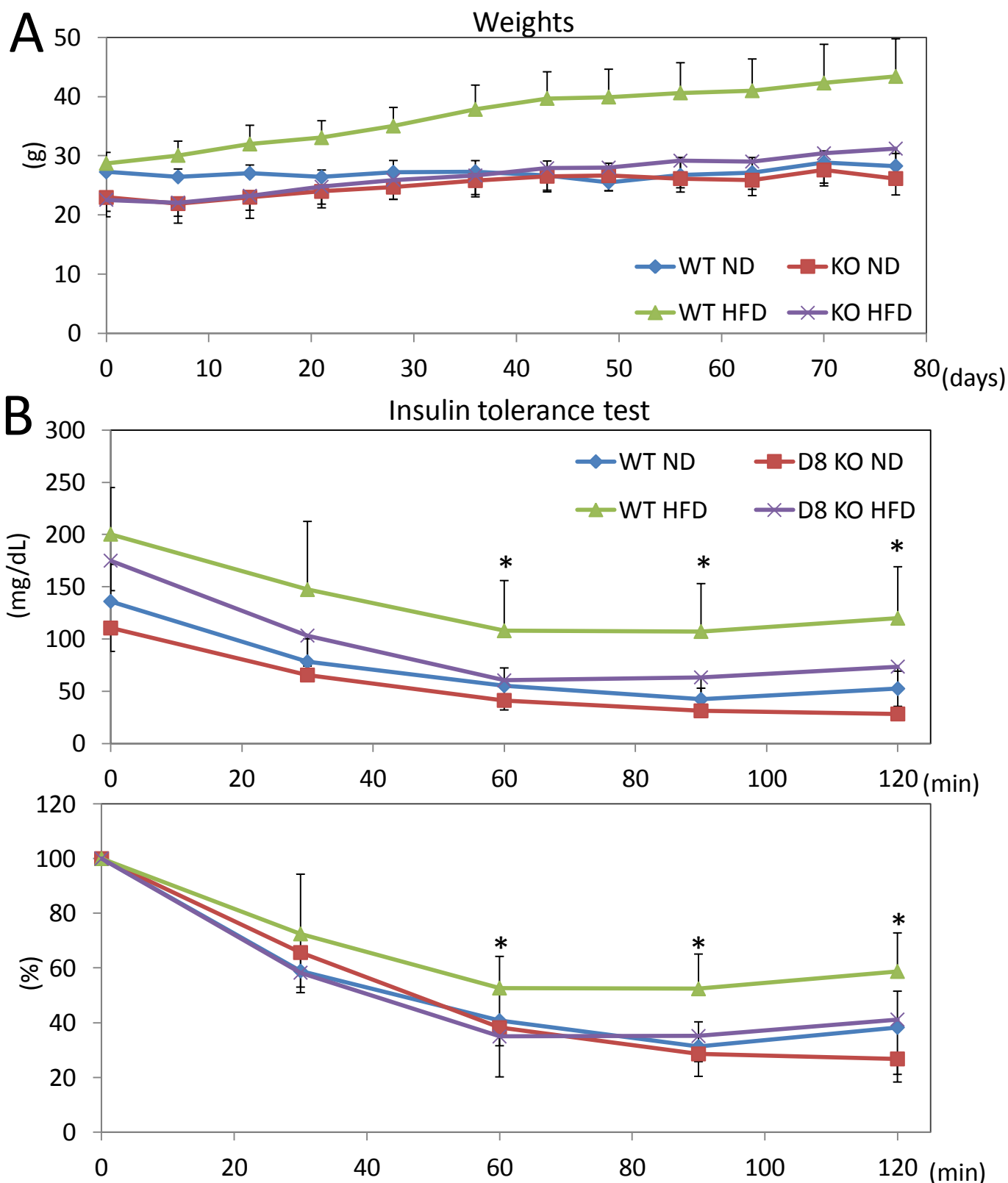


Figure 2-35. D8欠損雄マウスは高脂肪食負荷に伴う肥満・インスリン感受性の悪化が緩和されている

BALBラインの野生型およびD8欠損雄マウス8週齢に11週間通常食 (Normal diet:ND) もしくは高脂肪食 (High fat diet:HFD) を投与した。A. 各群における体重の変化を経時的に測定した。B. ITTを行った。下段のパネルは、各群の開始時点の血糖値を100%とした時の変化量を示した。有意差検定は、高脂肪食負荷を与えた野生型マウスとD8欠損マウス間のみで検定したもののみを表記した。(WT ND n=6, KO ND n=4, WT HFD n=9, KO HFD n=9 * $p<0.05$)

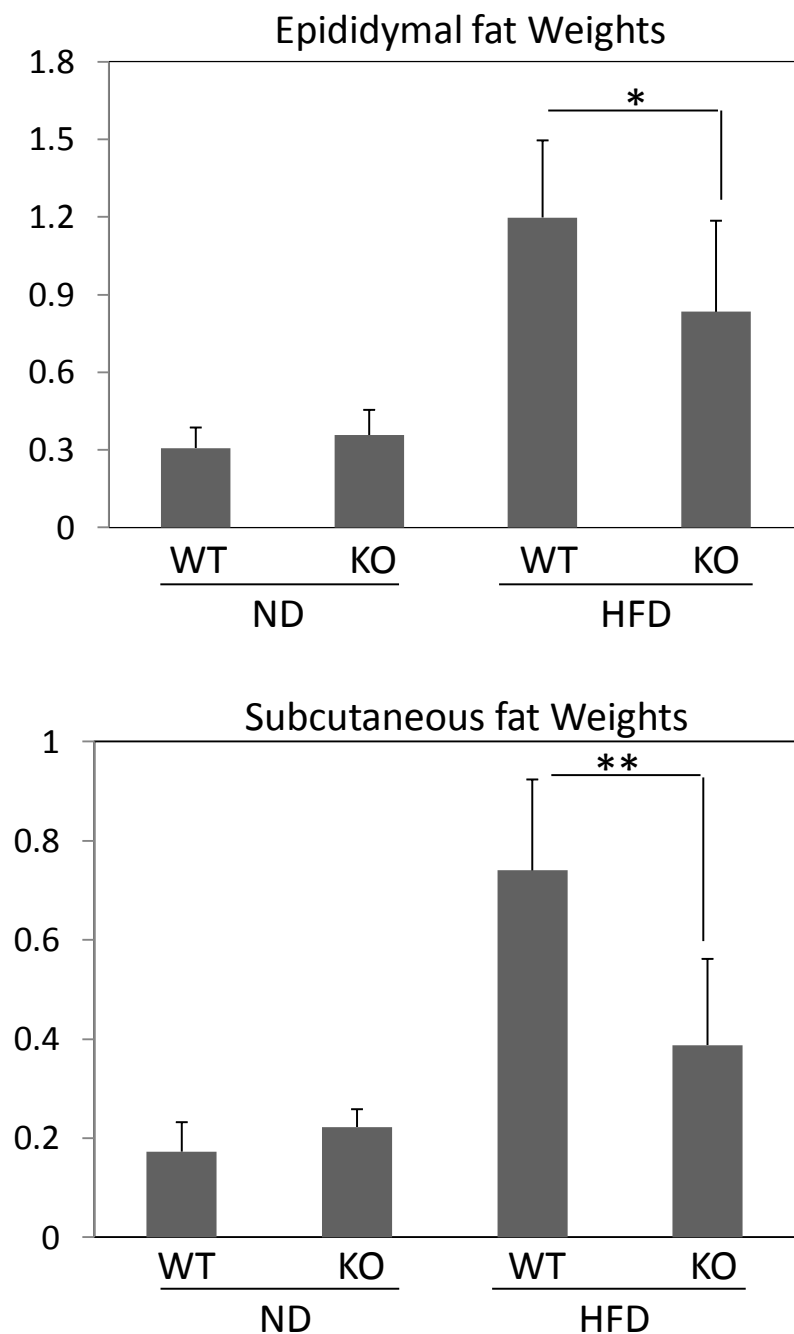


Figure 2-36. D8欠損雄マウスは高脂肪食負荷に伴う脂肪組織の増加が緩和されている
BALBラインの野生型およびD8欠損雄マウス8週齢に12週間通常食 (Normal diet:ND) もしくは高脂肪食 (High fat diet:HFD) を投与した。各群における精巣上体脂肪組織重量、皮下脂肪組織重量を測定した。有意差検定は、高脂肪食負荷を与えた野生型マウスとD8欠損マウス間の中で検定したもののみを表記した。(WT ND n=7, KO ND n=4, WT HFD n=10, KO HFD n=9 * $p<0.05$)

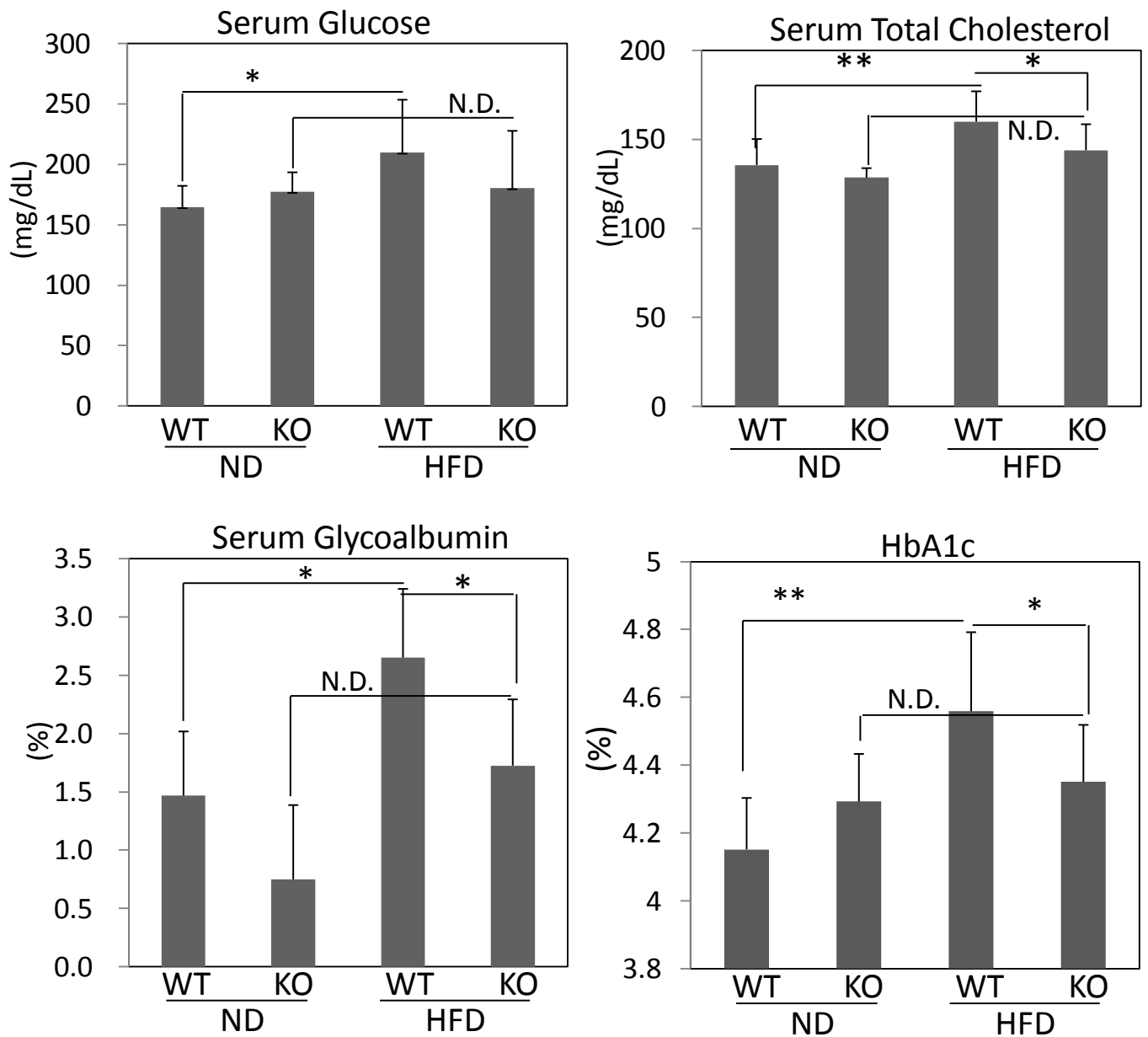


Figure 2-37. D8欠損雄マウスは高脂肪食負荷に伴う血糖値、血清中コレステロール値、ならびに糖尿病マーカーの増加が抑制されている

BALBラインの野生型およびD8欠損雄マウス8週齢に12週間通常食 (Normal diet:ND) もしくは高脂肪食 (High fat diet:HFD) を投与した。各群のマウスから血液を解析し、血清中のGlucose, 総コレステロール、グルコアルブミン、ならびにヘモグロビンA1cの値を測定した。(WT ND n=7, KO ND n=4, WT HFD n=10, KO HFD n=9 * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$)

第四節 考察

本章では、RNA 結合タンパク質 D8 の欠損マウスの寿命が雄マウス特異的に延長していることを見出した (**Fig. 2-1, 2**) ことを発端として、研究を開始した。D8 欠損マウスは加齢に伴う肥満に対して抵抗性を有するとともに (**Fig. 2-3**)、脂肪組織量の顕著な減少が確認された (**Fig. 2-4**)。カロリー制限によって寿命が延長されることは、マウスを含めた広い生物種において報告されていることから、D8 欠損マウスはカロリー制限を模倣して寿命が延長している可能性が考えられた。すなわち、D8 は代謝制御を行い、代謝制御を介して寿命を制御する可能性が示唆された。そこで、D8 が代謝制御を行っている可能性を検証したところ、まず D8 はヒト・マウスで共に代謝制御臓器を含めた全身でユビキタスに発現していることが確認された (**Fig. 2-5**)。続いて、代謝臓器である白色脂肪組織、褐色脂肪組織、骨格筋、肝臓において、絶食刺激によって D8 の mRNA 発現は誘導されることを見出した (**Fig. 2-6**)。以上の結果より、D8 は代謝制御に関与している可能性が示唆された。

さらに、D8 がいずれの組織において代謝制御を行っているのかを検討するために、肥満モデルマウスである db/db マウスにおいて、各臓器における D8 の発現を検討したところ、代謝臓器の中では皮下脂肪組織と骨格筋において D8 の mRNA 発現は肥満によって有意に抑制されていたのに対して、内臓脂肪組織では有意差は得られなかったものの増加傾向にあり (**Fig. 2-7C**)、このことは内臓脂肪組織において db/db マウスでは D8 のタンパク質量が増加している傾向にあることと一致していた (**Fig. 2-7D**)。D8 欠損マウスはやせ型を呈することから、肥満によって D8 の発現が増加する臓器が D8 の代謝制御を行っている可能性が高いと考え、内臓脂肪組織に本研究では着目し、研究を進めてきた。一方で、カロリー制限によって、D8 の発現は内臓脂肪組織において、mRNA およびタンパク質レベルの両方で抑制されることが認められた (**Fig. 2-33C, D**)。さらに、D8 をノックダウンした 3T3-L1 細胞や D8 欠損マウス由来の MEF において認められた PPAR γ シグナルの抑制が *in vivo* の D8 欠損マウスの内臓脂肪組織においても認められたこと、ならびに D8 欠損マウスの内臓脂肪組織において小胞体ストレス・Senescence マーカー遺伝子の発現抑制が認められたこと (**Fig. 2-27, 30**) から、少なくとも、内臓脂肪組織において D8 が代謝制御に関与していることはほぼ間違いはなく、仮説は正しかったと考えられる。

○脂肪組織以外で脂質代謝制御を主に行っている臓器における、D8 の機能解析の展望

カロリー制限実験において、脂肪組織以外に褐色脂肪組織や骨格筋においても D8 の mRNA 発現は抑制されることが認められた (Fig. 2-33C)。褐色脂肪組織、骨格筋は共に脂質の分解、エネルギーの消費を行う主な器官である。褐色脂肪組織は体温の調節、骨格筋は運動を行うことによって、それぞれエネルギーの消費を行っている。今回、D8 欠損雄マウスの血液パラメーターにおいて、脂質分解量を反映する Tk-B (総ケトン体) の量は、通常状態ならびに高脂肪食負荷とともに野生型マウスと比較して有意な差は認められなかったことから (Fig. 2-19, Data not shown)、脂質分解量には D8 欠損マウスで差はないと推定できる。今後、この 2 つの臓器における D8 の機能を検証するには、D8 欠損マウス由来の 2 つの臓器における代謝系酵素の遺伝子発現を検討するとともに、D8 欠損マウスの運動量や呼吸商、体温などのパラメーターを測定する必要があると考えられる。もし、変化が認められた場合は、*in vitro* の系に還元し、骨格筋分化や褐色脂肪細胞分化に対して D8 が与える影響の検討を行うべきであると考えている。また、脂肪組織における D8 の機能が、今回示した D8 欠損マウスの表現型に対して極めて重要であることをより明確に証明するには、脂肪組織特異的な D8 欠損マウスを作製し、解析を行う必要があると考えられる。

○脂肪細胞分化過程における D8 の機能の考察

本研究において、D8 の発現は脂肪細胞分化過程で抑制を受けること (Fig. 2-8, 9,10)、および D8 の過剰発現は脂肪細胞分化を KH domain 依存的に抑制することが示された (Fig. 2-12, 13)。しかしながら、D8 のノックダウンおよび D8 の欠損もまた脂肪細胞分化を抑制することが明らかになった (Fig. 2-14, 15)。過剰発現の結果が Artifact な減少を見てしまっている可能性を否定はできないが、一方で脂肪細胞分化過程において D8 の発現は正常に制御される必要があり、強制的に過剰に発現を誘導したり、発現を抑制すると脂肪細胞分化が抑制されてしまう、という可能性も考えられる。また、D8 が分化初期と後期で機能が異なっており、D8 の過剰発現は脂肪細胞分化後期で、D8 のノックダウン・欠損は分化初期でそれぞれ脂肪細胞分化を抑制してしまっている可能性もある。このことは、今後、時期特異的な過剰発現・ノックダウンを Tet-ON/OFF システムなどを用いることで行えば、検証が出来るのではないかと期待している。

○マクロファージの浸潤・炎症系サイトカインの分泌に対する D8 が与える影響

近年、インスリン抵抗性の原因としては、肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージの浸潤および炎症系サイトカインの分泌と、小胞体ストレスの 2 つが強く主張されている。D8 がマクロファージの浸潤・サイトカインの分泌を制御す

る可能性としては、下記の 3 つの可能性が考えられる。

- ①D8 がマクロファージにおいて機能し、脂肪組織内のマクロファージが炎症系サイトカインを分泌する能力を制御している、もしくは脂肪組織への浸潤能を制御している。
- ②D8 が脂肪組織において機能しており、CCR2 のようなマクロファージを誘引する機能を制御している
- ③D8 が脂肪組織において機能しており、マクロファージが炎症系サイトカインの分泌を誘導するような分子（遊離脂肪酸など）の分泌を制御している。

しかしながら、マクロファージ由来の培養細胞である RAW264.7 や LPS 刺激により回収した腹腔内マクロファージの初代培養において、ほとんど D8 は発現していない (**Fig. 2-25A**, Data not shown) ことから、①の可能性は極めて低いと考えられる。脂肪組織に浸潤してくるマクロファージは血管を介して骨髓から移動してくると考えられる (101, 102) ため、骨髓内マクロファージにおける D8 の発現・機能を検討することで、①の可能性をより綿密な検証が行えると考えられる。②の可能性であるが、顕著なインスリン感受性の亢進が認められた老齢の雄マウスの内臓脂肪組織においてマクロファージの浸潤量に変化が認められないことは、脂肪組織切片を用いたマクロファージマーカーである F4/80 染色 (**Fig. 2-25B**)、および F4/80 遺伝子発現量 (**Fig. 2-26**) に変化が認められないことから否定できると考えられる。しかしながら、この老齢期の内臓脂肪組織には、若齢期と比べて、脂質の蓄積が少なく、マクロファージの量も減少していることが組織切片の F4/80 染色ならびに F4/80 発現量の減少から確認された。そのため、最も肥満状態が著しい中年期の脂肪組織の脂肪組織におけるマクロファージの量を検討するか、*in vitro* に還元し、野生型と D8 を欠損させた脂肪細胞に対する RAW264.7 の Migration を検討すればより直接的な証明ができると考えられる。③の可能性であるが、顕著なインスリン感受性の亢進が認められた老齢の雄マウスの内臓脂肪組織において炎症系サイトカインである TNF α や IL-6、IL-1 β の発現は野生型マウスと比べて顕著な変化は認められなかった (**Fig. 2-26**) ため、この可能性も低いと考えられる。しかしながら、先ほどと同じく、老齢期ではすでに肥満状態のピークが過ぎているためにこのような結果が現れている可能性は否定できない。そのため、中年期の脂肪組織における炎症系サイトカインの発現量や、血中炎症系サイトカインの量、ならびに *in vitro* のマクロファージと脂肪細胞の co-culture 実験において、脂肪細胞における D8 発現の有無によって、マクロファージからの炎症系サイトカインの分泌量に変化が生じるかの検討を行えばよいと考えられる。しかしながら、今回はマウス個体を用いた GTT, ITT (**Fig. 20, 21**) や、*in vivo* の脂肪組織におけるインスリンシグナル (**Fig. 2-23**) のみならず、単離された MEF レベルでも、D8

の欠損によるインスリンシグナルの亢進がある程度は観察されたこと (Fig. 2-24) を踏まえると、やはりマクロファージのみでは、D8 欠損マウスにおけるインスリン感受性の亢進の原因として説明するには不十分であると考えられる。

○小胞体ストレス制御に対して D8 が与える影響

また、小胞体ストレスのマーカー遺伝子である BiP および CHOP の発現は老齢の D8 欠損マウスの雌雄において有意に減少していることが示された (Fig. 2-27)。この結果から、D8 は小胞体ストレスを誘導ないしは維持するような機能があり、D8 欠損マウスではそのような D8 の機能がないために小胞体ストレスが緩和され、結果的にインスリン感受性が亢進している可能性が示唆された。しかしながら、脂肪組織と同じく小胞体ストレスによってインスリン感受性に大きな影響を与えることが知られている肝臓においては、老齢 D8 欠損マウスの雌雄で小胞体ストレスのマーカー遺伝子に大きな差は認められなかった (Fig. 2-27)。また、D8 をノックダウンした 3T3-L1 細胞や D8 欠損マウス由来の MEF に対して小胞体ストレスを誘導した時の、小胞体ストレスマーカー遺伝子の発現変動に大きな変化は認められず (Fig. 2-28, 29)、D8 が直接小胞体ストレスの誘導・維持に関与していることを示唆するデータを得ることは叶わなかった。この原因として、考えられる可能性の一つに、D8 が小胞体ストレスの制御を行う臓器には臓器特異性がある、というものが挙げられる。その仮説を踏まえれば、今回は肝臓や MEF において D8 の有無によって、小胞体ストレスのマーカー遺伝子の発現に差が認められないのは納得できる。しかしながら、小胞体ストレスの緩和能に差が認められない MEF においても、D8 の欠損によるインスリンシグナルの亢進がある程度は観察されたこと (Fig. 2-24) を考えると、小胞体ストレスが D8 欠損マウスにおけるインスリン感受性の亢進に与える影響の大きさには疑問が残る。今後は、個体レベルで小胞体ストレスを誘導した時に、脂肪組織における小胞体ストレスマーカー遺伝子の発現量を野生型と D8 欠損マウスで比較する必要があると考えられる。また、小胞体ストレスの変化が D8 欠損によるインスリン感受性の変化にどの程度寄与しているのかを検討するため、野生型および D8 欠損マウス由来の MEF に対して小胞体ストレス誘導剤ないしは緩和剤を処理した状態でインスリン刺激を与え、インスリンシグナルの活性変化を検討する必要があると考えられる。また、今回用いた小胞体ストレス誘導剤があまりに強い薬剤であったために非生理的な条件になってしまい、*in vitro* で D8 欠損による小胞体ストレスの緩和する能力が発揮できなかった可能性も否定はできない。よって、摂食によるタンパク質合成の増加など、生理的な刺激によって小胞体ストレスを誘導した状態において、D8 の有無による小胞体ストレスのマーカー遺伝子の発現変動を検討すれば、D8 が小胞体スト

レスの誘導・維持に与える影響を見出すことが出来る可能性があると考えている。

○Senescence 制御に対して D8 が与える影響

今回、D8 欠損マウスにおけるインスリン感受性の亢進に最も寄与しているのではないかと期待しているのが脂肪細胞（特に内臓脂肪組織）における Senescence である。若齢の D8 欠損雄マウスにおいて、ITT ではあまり大きなインスリン感受性の差は認められなかったのに対して、老齢の雄マウス間では顕著な差が認められたこと（[Fig. 2-20, 21](#)）は、老化によって誘導される Senescence が D8 欠損マウスでは緩和されている（[Fig. 2-30](#)）ためにインスリン感受性が亢進していると考察できる。このことは D8 欠損による Senescence の変化がインスリン感受性の差を惹起したという仮説を支持している。さらに、この D8 欠損による Senescence の緩和は、*in vitro* の MEF においても確認できたこと（[Fig. 2-31](#)）は、MEF においても D8 の欠損によるインスリンシグナルの亢進がある程度は観察されたこと（[Fig. 2-24](#)）と一致している。さらに、内臓脂肪組織における Senescence のマーカー遺伝子は、インスリン感受性が高まっている状態であるカロリー制限によって著しい発現減少を呈していることが確認できた（[Fig. 2-34](#)）一方で、肥満モデルマウスである db/db マウスにおいては、有意差はないものの増加傾向にあった（Data not shown）。また、野生型の MEF に対して、過酸化水素によって人工的に Senescence を誘導した時、インスリン感受性が悪化したことも確認できた（Data not shown）。先行研究において、脂肪組織における p53 の活性化が Senescence を誘導し、インスリン感受性を惹起している、と提唱されていた（147）。この考えに則れば、D8 欠損マウス由来の MEF に対して p53 の阻害剤を処理して Senescence の誘導を阻害した条件でインスリン刺激を与えた時に、野生型と D8 欠損 MEF 間のインスリンシグナル活性がどのような差が生じるのを検討すれば、Senescence がインスリン感受性に与える影響について検証が可能であると考えられる。もし、D8 が p53 のタンパク質量に影響を与えていたならば、KH domain を介した翻訳制御もしくは Ring domain を介したタンパク質分解制御機構が疑われる。一方、p53 のリン酸化量の変化を介して p53 の転写活性が変化していたならば、p53 の Kinase である ATM, ATR の量、Kinase 活性に対して D8 が与える影響を検討する必要があると考えられる。以上の解析を行えば、D8 が p53 の制御を介して Senescence の制御を行い、その結果インスリン感受性の調節を行っている、という分子機構が解明できると期待している。

以上の考えの下、本研究結果から導かれた D8 による、寿命・代謝制御機構の

模式図を (Fig. ②) に示した。

○脂肪組織におけるインスリン感受性の変化が、全身のインスリン感受性を変化していることに対する考察

過去に、脂肪組織特異的にインスリン受容体を欠損させたマウスにおいて、インスリン感受性の悪化が認められないこと (182) から、全身のインスリン感受性に対して脂肪組織が与える影響は少ないことが示唆された。しかしながら、その後の研究で、脂肪組織特異的なインスリン感受性の悪化は全身のインスリン感受性を弱める報告がいくつもなされている。全身の臓器の中で、糖を主に取り込むのは肝臓と骨格筋であるため、脂肪組織におけるインスリン抵抗性の獲得は、アディポカインなどの物質やシグナル伝達を送られることによって全身のインスリン抵抗性を惹起している可能性があることが示唆される。

○D8 欠損マウスにおいて、寿命延長が雄特異的に認められた原因の考察

今回、D8 欠損マウスの雄では寿命の延長効果が認められた一方で、雌においては寿命の延長は認められず (Fig. 2-1)、このことは、老化の表現系の観察からも確認できた (Fig. 2-2)。さらに、老齢の D8 欠損マウスは雄特異的にインスリン感受性が亢進しており (Fig. 2-21, 22)、寿命の結果と関連した結果が得られた。今回、D8 欠損マウスが寿命延長している原因として、D8 欠損マウスはやせ型を呈しており、カロリー制限を模倣しているためであると考えている。確かに、体重に有意差が認められなかった高脂肪食負荷実験における通常食群において (Fig. 2-35A)、インスリン感受性に大きな変化は認められず (Fig. 2-35B)、血液パラメーター中の糖尿病マーカーにも通常食群間で有意な差は認められなかった (Fig. 2-37)。このことから、体重の低下は、D8 欠損マウスにおいてインスリン感受性が亢進するために必須条件であると考えられる。しかしながら、D8 欠損マウスは雌雄とともに野生型よりも体重が軽減していることは確認されている (Fig. 2-3)。さらに、D8 欠損マウスで肥満・インスリン抵抗性が緩和している原因として、脂肪組織における PPAR γ シグナルの抑制 (Fig. 2-17)、小胞体ストレスの軽減 (Fig. 2-27)、Senescence の緩和 (Fig. 2-30) が考えられたが、どの遺伝子発現も、個体数の差が原因で有意差こそついていないものが多いものの、雌の D8 欠損マウスにおいても、ほぼ雄と同様の傾向を呈していた。今回、D8 欠損マウスにおいて、雄特異的な寿命延長が確認された可能性として以下の 3 点が考えられる。

①雄マウスの方が雌マウスと比べて肥満になりやすいため、寿命延長の表現型が出やすかったため

②D8 は雄マウスで特異的に働くシグナル、すなわちアンドロゲンおよび AR:ア

ンドロゲンレセプター下流の遺伝子、もしくは Y 染色体上の遺伝子を制御し、インスリン感受性・寿命を制御している。

③D8 は雄雌ともに機能している。すなわち、D8 欠損マウスは雌雄ともに寿命が延長する機構は備わっているが、雌でのみエストロゲンおよび ER:エストロゲンレセプターの働きにより、野生型でのインスリン感受性の悪化が緩和されてしまい、D8 欠損によるインスリン感受性亢進の効果が判別しづらくなっている。

先ほどあげた、脂肪組織における PPAR γ シグナルの抑制、小胞体ストレスの軽減、Senescence の緩和がどれも D8 欠損雌マウスにおいて、雄とほぼ同じ傾向を呈していることは、③の仮説の可能性が高いことを示唆している。本研究結果に加えて、ヒトの臨床レベルの知見において、男性は肥満のピークが 40-50 代にあるのに対して、女性は閉経を迎える 50 代以降に肥満者が急増し、糖尿病患者も増加している、という結果が得られており（参考資料①）、女性ホルモンがインスリン感受性を正に制御していることを示唆している。また、基礎研究レベルでも、卵巣除去は肥満・インスリン抵抗性を誘導し、卵巣摘出したマウスに対してエストロゲンを投与するとインスリン感受性が増加することが報告されている（183）。本研究において、GTT や ITT でインスリン感受性の差が認められた BALB ラインのマウスでは C57B6J ラインのマウスと比べて雌雄で肥満具合に大きな差は認められなかった（Fig. 2-3）ことから、①の可能性は低い。さらに、老齢の野生型マウスと D8 欠損マウスの脂肪組織から回収した RNA を用いてマイクロアレイに供し、発現変動している遺伝子を探索したが、AR シグナル経路の遺伝子を特段に多く見出すことは出来なかった（Data not shown）ことから、②の仮説を主張することは現段階ではできない。今後、③の仮説の裏付けをとるには、D8 欠損雌マウスに対して卵巣除去手術を行い、女性ホルモンの分泌が行えない状態にしたときのインスリン感受性を GTT, ITT で検討を行えばよいと考えられる。

○カロリー制限時における寿命延長に対する D8 の機能解析の展望

今回、カロリー制限によって、内臓脂肪組織において D8 の発現が mRNA、タンパク質レベルの両方で減少し（Fig.2-33）、また D8 欠損マウスと同じく小胞体ストレスや Senescence のマーカー遺伝子の発現が抑制される（Fig. 2-34）結果が得られた。この結果から、D8 はカロリー制限を模倣して寿命延長を行っているとともに、カロリー制限に伴う寿命延長効果には D8 の発現抑制を介している可能性が示唆された。今後、D8 の抑制がカロリー制限による寿命延長に重要であることの確証を増すためには、D8 欠損マウスに対してカロリー制限を行っても、野生型マウスほどの寿命延長が認められないことを示す必要があると

考えられる。しかしながら、この実験を実際に行うには 2 年以上の実験が必要となるため、代替法として、線虫を用いた実験を考えている。D8 は線虫においても保存されており、線虫は簡便にノックダウンが行え、また寿命もおおよそ 3 週間程度と短い。また、線虫においても、カロリー制限によって寿命が延長することが既に報告されている。よって、D8 ホモログをノックダウンした線虫で寿命が延長していること、ならびに D8 ホモログのノックダウンによって、カロリー制限による寿命の延長が弱まることなどを、線虫を用いて示すことができるのではないかと期待している。

○D8 が進化的に保存されている意義の考察

今回、高脂肪食負荷によって誘導される肥満およびインスリン抵抗性が D8 欠損雄マウスでは緩和されることが示されたが、この時、通常食群間では、これまで認められた D8 欠損雄マウスにおける体重の減少ならびにインスリン感受性の亢進が見られなかった (**Fig. 2-35A, B**)。この可能性として、通常食として用いた餌の影響が考えられる。今回、通常食として用いた餌は 10 % Fat/ Calory という、低脂肪タイプのもので通常の飼育・繁殖用に用いている餌よりも低カロリーである。その結果、野生型マウスでは、通常食を与えた時、一時的な体重の減少が認められた (**Fig. 2-35A**)。一方で、D8 欠損マウスではこのような体重の減少は認められず、体重は単調に増加し、結果として野生型マウスと体重差はほとんど認められなくなり、インスリン感受性にもほとんど差が認められなくなった。このことはすなわち、D8 欠損マウスにおいて体重の減少というのは、インスリン感受性を亢進させるには必要条件であるということを示唆している。さらに、D8 欠損マウスは低カロリー食による体重減少の抑制や、高脂肪食による肥満の抑制が見られたことから、D8 は栄養条件に応答して、体重すなわち細胞増殖量やタンパク質合成量、および脂肪合成量を調節する機能を持っている可能性があることが考えられる。

○他の *Mex-3 family* 遺伝子による代謝制御の考察

D8 の他、マウスの *Mex-3 family* にはそれぞれ異なる遺伝子座からコードされる 3 つのタンパク質が存在する。これまで、D8 を含めた *Mex-3 family* に関する研究はあまり行われておらず、代謝に関する報告はほとんどなされていない。唯一、*Mex-3C* の欠損マウスがやせ型を呈することのみ報告されている (157) が、その分子機構は未知のままである。この *Mex-3C* の欠損マウスの表現型は、D8 欠損マウスと類似しているため、*Mex-3 family*、特に *Mex-3B* と *Mex-3C* は、同じ機能を有し、互いに相補的な機能を持つ可能性が考えられる。今後、D8 欠損マウスにおける他の *Mex-3 family* の発現量を検討すれば、その可能性を検証

することが出来ると考えられる。また、相補的な機能があるとしたら、D8 と Mex-3C をダブルノックアウトすれば、より顕著なやせ型を示すことが考えられる。一方で、本研究において、Mex-3 family の中で Mex-3A のみが脂肪細胞分化過程において D8 と同じく発現抑制を受けることが認められた (Fig. 2-11)。この結果から、D8 と Mex-3C は異なる因子によって発現制御を受けていることが示されると同時に、Mex-3A も代謝制御に寄与している可能性が示唆された。今後、Mex-3A の欠損マウスの作出・解析も含めた、Mex-3 family による代謝制御の研究が進展することが望まれる。

○Sirt6 と D8 との関係性の考察

Sirt6 のトランスジェニックマウスでは雄特異的にインスリン感受性が亢進し、寿命が延長している、と報告されており、本研究室で示した D8 欠損マウスの表現型と類似している。しかしながら、D8 欠損マウスでは Sirt6 の発現は脂肪組織、肝臓で共に変化が認められず、また Sirt6 トランスジェニックマウスにおいて雄特異的に変化が認められ、寿命が延長する原因遺伝子と報告していた Igfbp1 や G0S2 などの mRNA 発現量も D8 欠損雄マウスでは変化が認められなかった (Data not shown)。以上のことから、Sirt6 トランスジェニック雄マウスと D8 欠損雄マウスは異なる分子機構により、インスリン感受性の亢進、という表現系を呈し、その結果として寿命が延長している可能性が高いことが考えられた。

○今後の展望

今後は、D8 がどのような分子機構で Senescence や小胞体ストレスの制御を行っているのかを明らかにするため、D8 の結合タンパク質を質量分析器で、結合 RNA を RIP-seq や CLIP (Crosslinking and Immunoprecipitation) 法を用いて明らかにしたいと考えている。現在、一番疑わしいと考えているのはやはり p53 である。D8 が p53 の発現制御、もしくは転写活性を制御していると仮定すれば、D8 欠損マウスで p16, p19 ARF の発現が抑制されていることが納得できる。また、p53 はリン酸化を介して活性化されるので、ATM などの Kinase の活性を D8 が制御している可能性も考えられる。

さらに、D8 の上流の解析も有効であると考えられる。D8 の発現はカロリー制限により内臓脂肪組織において mRNA レベルで抑制されていることが確認されたが (Fig. 2-33)、一過的な絶食負荷では D8 の発現は抑制されないため、単純な CREB などの絶食シグナルのみで制御されているとは考えづらい。肥満によって、皮下脂肪組織においては D8 の発現は抑制されるのに対して、内臓脂肪組織では D8 の発現が増加傾向にあること (Fig. 2-7C) は、D8 の上流因子を採

索するうえで、良い一助になると考えている。今後、内臓脂肪組織で D8 の発現制御機構の解明を行えば、抗肥満・糖尿病の製薬の標的としてよい因子になりうると考えられる。

D8 の発現が精巣で特に高いことを反映し、D8 欠損雄マウスは寿命延長のほか、生殖能力の減弱していることが経験的に認められた。寿命延長の表現型として、産仔数の減少も報告されている (184) ため、今後 D8 欠損マウスが寿命延長していることを示すデータをサポートする資料として取得する必要があると考えられる。一方でこのことは製薬の標的として D8 を考える上では重要なことである。すなわち、D8 の阻害は内臓脂肪組織において PPAR γ シグナルや Senescence、小胞体ストレスの抑制を通じて抗肥満・糖尿病の効果を発揮する半面、生殖能力が減少するという副作用を持つ恐れがある。D8 のシグナルの阻害作用を製薬として応用するためには、内臓脂肪組織特異的に効果を発揮するように工夫するか、生殖能力を抑制する機構には影響を与えないような標的シグナルの同定、もしくは今後生殖を考えない高齢者に対して処方することが必要になると考えられる。

今後、D8 による脂質代謝・インスリン感受性制御機構の解明を進め、抗肥満・糖尿病の治療の新規標的として提唱することを期待している。

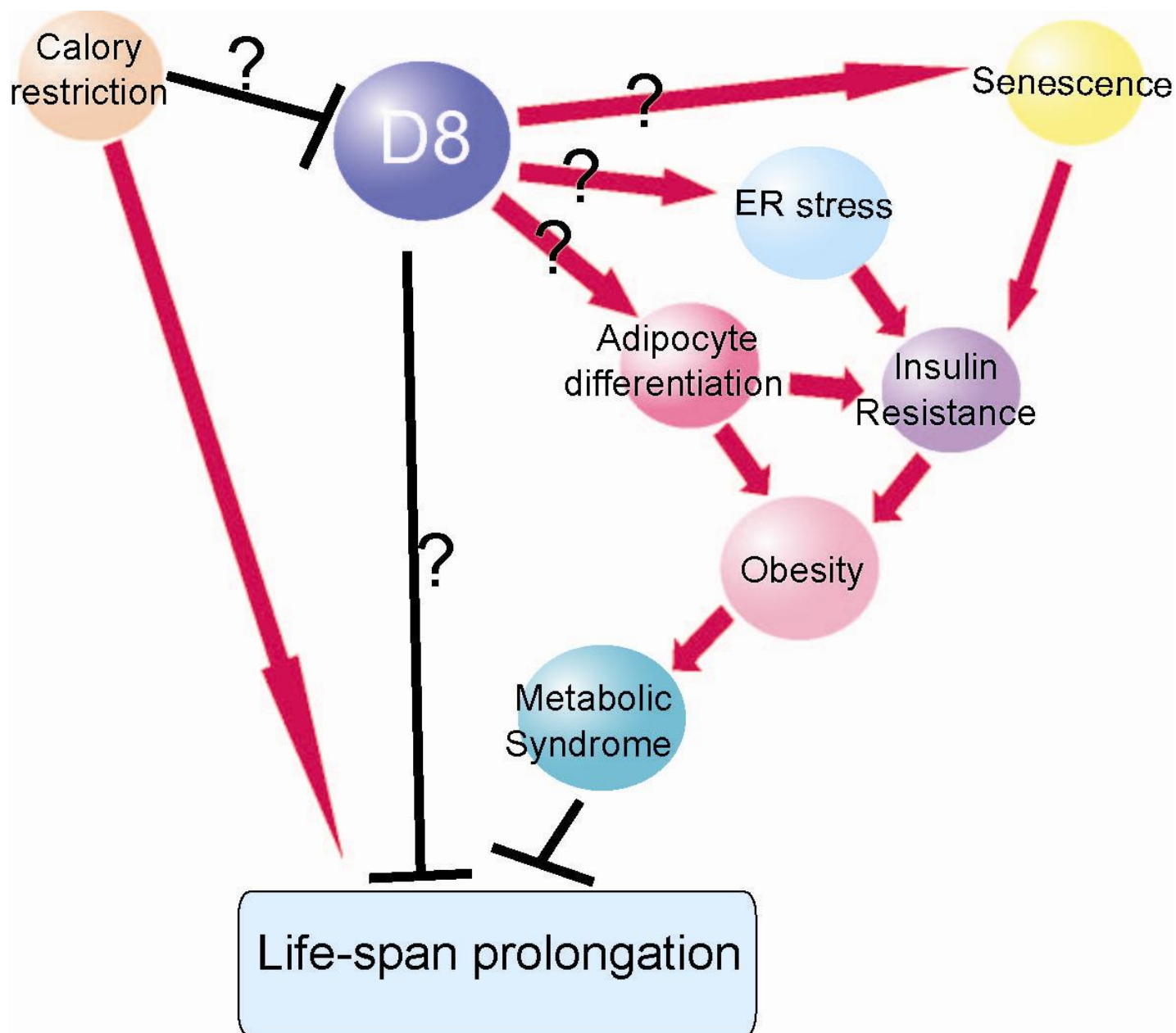
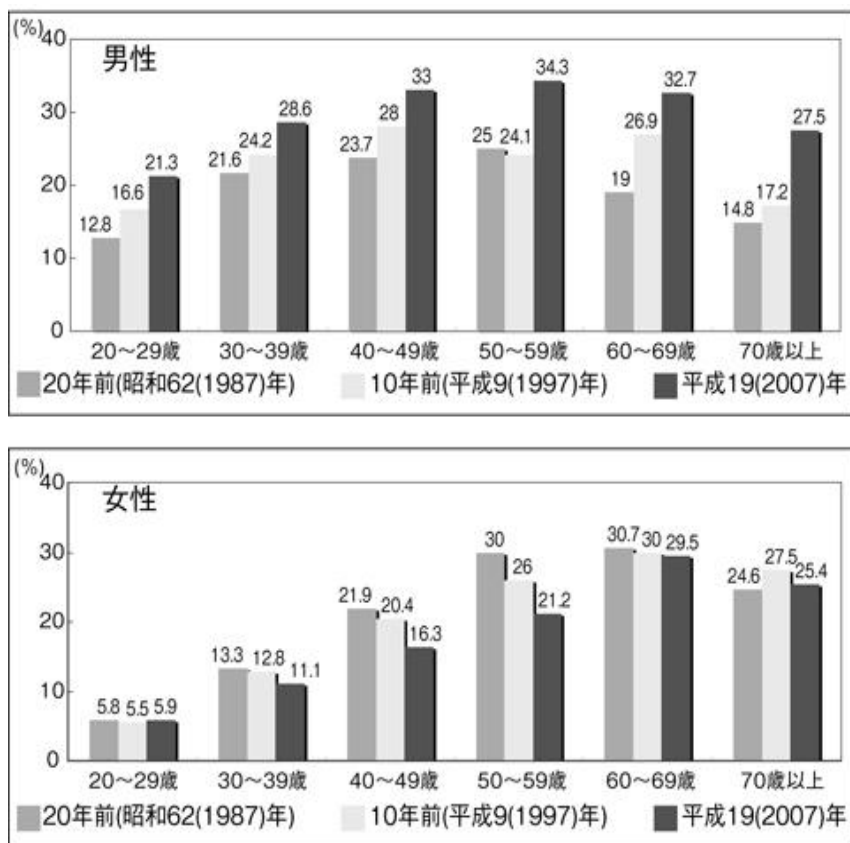


Figure ②. 内臓脂肪組織における、D8の寿命・代謝制御機構のまとめ図

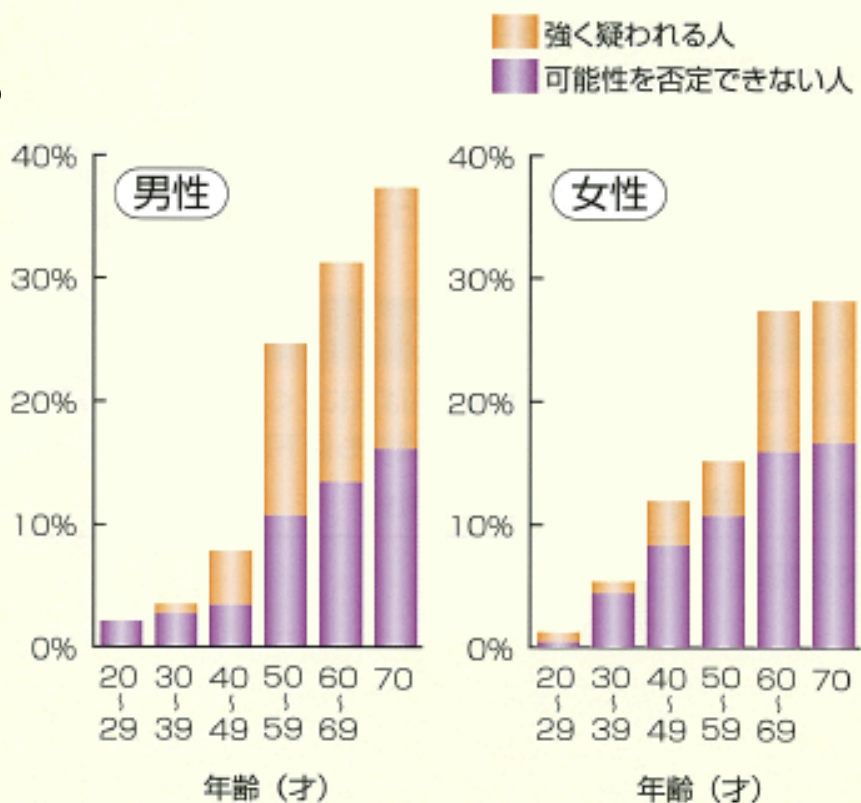
カロリー制限によって抑制されたD8は、脂肪細胞分化の抑制を介して脂肪量の減少を促す。また、小胞体ストレスやSenescenceの抑制を介してインスリン感受性を高める。脂肪細胞分化が抑制され、インスリン感受性が増したマウスは肥満・糖尿病に対して抵抗性を有し、生活習慣病の改善・血中インスリン量の低下により、寿命が延長すると考えられる。

A



(厚生労働省策定：平成 19(2007)年国民健康・栄養調査結果の概要より一部改変)

B



(厚生労働省「糖尿病実態調査」2002年10月実施)

参考資料. 日本人の各年代別における肥満率(A)および糖尿病患者数(B)

引用文献

1. Wajchenberg BL. (2000) Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* **21**, 697-738.
2. Sell H, Deshaies Y, Richard D. (2004) The brown adipocyte: update on its metabolic role. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 2098-104.
3. Breen EP, Gouin SG, Murphy AF, Haines LR, Jackson AM, Pearson TW, Murphy PV, Porter RK. (2006) On the mechanism of mitochondrial uncoupling protein 1 function. *J Biol Chem* **281**, 2114-9.
4. Cinti S. (2006) The role of brown adipose tissue in human obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* **16**, 596-574.
5. Shimomura I, Bashmakov Y, Ikemoto S, Horton JD, Brown MS, Goldstein JL. (1999) Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 13656-61.
6. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* **7**, 941-6.
7. Busetto L. Visceral obesity and the metabolic syndrome: Effect of weight loss. (2001) *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **11**, 195-204.
8. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. (1998) Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* **78**, 783-809.
9. Miki H, Yamauchi T, Suzuki R, Komeda K, Tsuchida A, Kubota N, Terauchi Y, Kamon J, Kaburagi Y, Matsui J, Akanuma Y, Nagai R, Kimura S, Tobe K, Kadowaki T. (2001) Essential role of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* **21**, 2521-32.
10. Sakaue H, Ogawa W, Matsumoto M, Kuroda S, Takata M, Sugimoto T, Spiegelman BM, Kasuga M. (1998) Posttranscriptional control of adipocyte differentiation through activation of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* **273**, 28945-52.
11. Engelman JA, Lisanti MP, Scherer PE. (1998) Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem* **273**, 32111-20.
12. Cao Z, Umek RM, McKnight SL. (1991) Regulated expression of three C/EBP

- isoforms during adipocytes conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* **5**, 1538-52.
13. Reusch JE, Colton LA, Klemm DJ. (2000) CREB activation induces adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Mol Cell Biol* **20**, 1008-20.
 14. Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R. (1992) Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* **12**, 207-33.
 15. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. (1994) mPPAR gamma2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* **8**, 1224-34.
 16. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* **79**, 1147-56.
 17. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, Umesono K, Evans RM. (1994) Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 7355-9.
 18. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Nagai R, Tobe K, Kimura S, Kadowaki T. (1999) PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* **4**, 597-609.
 19. Sundvold H, Brzozowska A, Lien S. Characterisation of bovine peroxisome proliferator-activated receptors γ 1 and γ 2: genetic mapping and differential expression of the two isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* **239**, 857-61.
 20. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J. (1996) PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *Embo J* **15**, 5336-48.
 21. Frohnert BI, Hui TY, Bernlohr DA. (1999) Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene. *J Biol Chem* **274**, 3970-7.
 22. Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, Shimomura I. (2003) Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* **52**, 1655-63.
 23. Arimura N, Horiba T, Imagawa M, Shimizu M, Sato R. (2004) The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the perilipin gene in adipocytes. *J Biol Chem* **279**, 10070-6.

24. Matsusue K, Kusakabe T, Noguchi T, Takiguchi S, Suzuki T, Yamano S, Gonzalez FJ. (2008) Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPARgamma target gene Fsp27. *Cell Metab* **7**, 302-11.
25. Lin FT and Lane MD. (1994) CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 8757-61.
26. Ross SE, Erickson RL, Gerin I, DeRose PM, Bajnok L, Longo KA, Misek DE, Kuick R, Hanash SM, Atkins KB, Andresen SM, Nebb HI, Madsen L, Kristiansen K, MacDougald OA. (2002) Microarray analyses during adipogenesis: understanding the effects of Wnt signaling on adipogenesis and the roles of liver X receptor alpha in adipocyte metabolism. *Mol Cell Biol* **22**, 5989-99.
27. Oishi Y, Manabe I, Tobe K, Tsushima K, Shindo T, Fujiu K, Nishimura G, Maemura K, Yamauchi T, Kubota N, Suzuki R, Kitamura T, Akira S, Kadowaki T, Nagai R. (2005) Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metab* **1**, 27-39.
28. Tang QQ and Lane MD. (2000) Role of C/EBP homologous protein (CHOP-10) in the programmed activation of CCAAT/enhancer-binding protein-beta during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 12446-50.
29. Parkin SE, Baer M, Copeland TD, Schwartz RC, Johnson PF. (2002) Regulation of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) activator proteins by heterodimerization with C/EBPgamma (Ig/EBP). *J Biol Chem* **277**, 23563-72.
30. Stephens JM, Morrison RF, Pilch PF. (1996) The expression and regulation of STATs during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem* **271**, 10441-4.
31. Chen Z, Torrens JI, Anand A, Spiegelman BM, Friedman JM. (2005) Krox20 stimulates adipogenesis via C/EBPbeta-dependent and -independent mechanisms. *Cell Metab* **1**, 93-106.
32. Mori T, Sakaue H, Iguchi H, Gomi H, Okada Y, Takashima Y, Nakamura K, Nakamura T, Yamauchi T, Kubota N, Kadowaki T, Matsuki Y, Ogawa W, Hiramatsu R, Kasuga M. (2005) Role of Krüppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis. *J Biol Chem* **280**, 12867-75.
33. Shimba S, Ishii N, Ohta Y, Ohno T, Watabe Y, Hayashi M, Wada T, Aoyagi T, Tezuka M. (2005) Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 12071-6.
34. Kliewer SA, Xu HE, Lambert MH, Willson TM. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res* **56**, 239-63.

35. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. (1995) A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* **83**, 813-9.
36. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. (2001) Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* **93**, 93229-40.
37. Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T. (1998) Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest* **101**, 1354-1361.
38. Guan HP, Li Y, Jensen MV, Newgard CB, Steppan CM, Lazar MA. (2002) A futile metabolic cycle activated in adipocytes by antidiabetic agents. *Nat Med* **8**, 1122-8.
39. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829-39.
40. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. (2005) Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* **1**, 361-70.
41. Mizukami J and Taniguchi T. (1997) The antidiabetic agent thiazolidinedione stimulates the interaction between PPAR γ and CBP. *Biochem Biophys Res Commun* **240**, 61-4.
42. Wallberg AE, Yamamura S, Malik S, Spiegelman BM, Roeder RG. (2003) Coordination of p300-mediated chromatin remodeling and TRAP/mediator function through coactivator PGC-1 α . *Mol Cell* **12**, 1137-49.
43. Ge K, Guermah M, Yuan CX, Ito M, Wallberg AE, Spiegelman BM, Roeder RG. (2002) Transcription coactivator TRAP220 is required for PPAR gamma 2-stimulated adipogenesis. *Nature* **417**, 563-7.
44. Fajas L, Landsberg RL, Huss-Garcia Y, Sardet C, Lees JA, Auwerx J. (2002) E2Fs regulate adipocyte differentiation. *Dev Cell* **3**, 39-49.
45. Fu M, Rao M, Bouras T, Wang C, Wu K, Zhang X, Li Z, Yao TP, Pestell RG. (2005) Cyclin D1 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated adipogenesis through histone deacetylase recruitment. *J Biol Chem* **280**, 16934-41.
46. Tong Q, Dalgin G, Xu H, Ting CN, Leiden JM, Hotamisligil GS. (2000) Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science* **290**, 134-8.
47. Smas CM, Chen L, Zhao L, Latasa MJ, Sul HS. (1999) Transcription repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocytes differentiation. *J Biol Chem*

274, 12632-41.

48. Banerjee SS, Feinberg MW, Watanabe M, Gray S, Haspel RL, Denkinger DJ, Kawahara R, Hauner H, Jain MK. (2002) The Krüppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis. *J Biol Chem* **278**, 2581-4.
49. Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, Rose DW, Willson TM, Rosenfeld MG, Glass CK. (2005) SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* **437**, 759-63.
50. Marino-Buslje C, Martin-Martinez M, Mizuguchi K, Siddle K, Blundell TL. (1999) The insulin receptor: from protein sequence to structure. *Biochem Soc Trans* **27**, 715-26.
51. White MF. (1998) The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* **182**, 3-11.
52. Schaeffer HJ, Weber MJ. (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* **19**, 2435-44.
53. Engelman JA, Lisanti MP, Scherer PE. (1998) Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem* **273**, 32111-20.
54. Koyasu S. (2003) The role of PI3K in immune cells. *Nature Immunol* **4**, 313-9.
55. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B alpha. *Curr Biol* **7**, 261-9.
56. Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, Thomas G. (1998) Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science* **279**, 707-10.
57. Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ. (1998) Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* **281**, 2042-5.
58. Brunn GJ, Hudson CC, Sekulić A, Williams JM, Hosoi H, Houghton PJ, Lawrence JC Jr, Abraham RT. (1997) Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* **277**, 99-101.
59. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. (2009) Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 627-44.
60. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM. (2003) Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* **423**, 550-5.

61. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-68.
62. Daitoku H, Yamagata K, Matsuzaki H, Hatta M, Fukamizu A. (2003) Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. *Diabetes* **52**, 642-9.
63. Koo SH, Flechner L, Qi L, Zhang X, Screatton RA, Jeffries S, Hedrick S, Xu W, Boussouar F, Brindle P, Takemori H, Montminy M. (2005) The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* **437**, 1109-11.
64. Dentin R, Liu Y, Koo SH, Hedrick S, Vargas T, Heredia J, Yates J 3rd, Montminy M. (2007) Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2. *Nature* **449**, 366-9.
65. Matsumoto M, Ogawa W, Akimoto K, Inoue H, Miyake K, Furukawa K, Hayashi Y, Iguchi H, Matsuki Y, Hiramatsu R, Shimano H, Yamada N, Ohno S, Kasuga M, Noda T. (2003) PKC λ in liver mediates insulin-induced SREBP-1c expression and determines both hepatic lipid content and overall insulin sensitivity. *J Clin Invest* **112**, 935-44.
66. Fleischmann M, Iynedjian PB. (2000) Regulation of sterol regulatory-element binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAkt. *Biochem J* **349**, 13-7.
67. Yellaturu CR, Deng X, Cagen LM, Wilcox HG, Mansbach CM 2nd, Siddiqi SA, Park EA, Raghov R, Elam MB. (2009) Insulin enhances post-translational processing of nascent SREBP-1c by promoting its phosphorylation and association with COPII vesicles. *J Biol Chem* **284**, 7518-32.
68. Holman GD, Kasuga M. (1997) From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport. *Diabetologia* **40**, 991-1003.
69. Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Adler-Wailes DC, Levin DM, Kimmel AR, Rondinone CM. (1999) On the control of lipolysis in adipocytes. *Ann NY Acad Sci* **892**, 155-68.
70. Kitamura T, Kitamura Y, Kuroda S, Hino Y, Ando M, Kotani K, Konishi H, Matsuzaki H, Kikkawa U, Ogawa W, Kasuga M. (1999) Insulin-induced phosphorylation and activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3B by the serine-threonine kinase Akt. *Mol Cell Biol* **19**, 6286-96.
71. Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA (1996) Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem* **271**, 31372-8.

72. Calkhoven CF, Müller C, Leutz A. (2000) Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression. *Genes Dev* **14**, 1920-32.
73. Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WH 3rd, Arden KC, Accili D. (2003) The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell* **4**, 119-29.
74. DeFronzo RA, Prato SD. (1996) Insulin resistance and diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* **10**, 243-5.
75. Kimball SR, Farrell PA, Jefferson LS. (2002) Invited Review: Role of insulin in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by amino acids or exercise. *J Appl Physiol* **93**, 1168-80.
76. Burks DJ, Font de Mora J, Schubert M, Withers DJ, Myers MG, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF. (2000) IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature* **407**, 377-82.
77. Zhao AZ, Huan JN, Gupta S, Pal R, Sahu A. (2002) A phosphatidylinositol 3-kinase phosphodiesterase 3B-cyclic AMP pathway in hypothalamic action of leptin on feeding. *Nat Neurosci* **5**, 727-8.
78. Feraille E, Doucet A. (2001) Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol Rev* **81**, 345-418.
79. Kondo T, Vicent D, Suzuma K, Yanagisawa M, King GL, Holzenberger M, Kahn CR. (2003) Knockout of insulin and IGF-1 receptors on vascular endothelial cells protects against retinal neovascularization. *J Clin Invest* **111**, 1835-42.
80. Yuan Y, Kadiyala CS, Ching TT, Hakimi P, Saha S, Xu H, Yuan C, Mullangi V, Wang L, Fivenson E, Hanson RW, Ewing R, Hsu AL, Miyagi M, Feng Z. (2012) Enhanced energy metabolism contributes to the extended life span of calorie-restricted *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **287**, 31414-26.
81. Rogina B, Helfand SL. (2004) Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101** 15998-6003
82. Swindell WR. (2012) Dietary restriction in rats and mice: a meta-analysis and review of the evidence for genotype-dependent effects on lifespan. *Ageing Res Rev* **11** 254-70
83. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, Weindruch R. (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* **325** 201-4
84. Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert RL, Longo DL, Allison DB, Young JE, Bryant M, Barnard D, Ward WF, Qi W, Ingram DK, de

- Cabo R. (2012) Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* **489** 318-21
85. Gredilla R, Barja G.(2005) the role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. *Endocrinology*. **146** 3713-7.
 86. Kenyon C(2005)The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* **120** 449-60.
 87. Bordone L, Guarente L. (2005) Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **6** 298-305.
 88. Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. (1997) daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **277** 942-6
 89. Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, Oldham S, Stocker H, Hafen E, Leevers SJ, Partridge L. (2001) Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science*. **292** 104-6.
 90. Nandi A, Kitamura Y, Kahn CR, Accili D. (2004) Mouse models of insulin resistance. *Physiol Rev*. **84** 623-47
 91. Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, José PA, Taylor SI, Westphal H. (1996) Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet*. **12** 106-9.
 92. Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Gélouin A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y. (2003) IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature*. **421** 182-7.
 93. Blüher M, Kahn BB, Kahn CR. (2003) Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science*. **299** 572-4
 94. Kondo T, Kahn CR.(2004) Altered insulin signaling in retinal tissue in diabetic states. *J Biol Chem* **279** 37997-80
 95. Caruso C, Lio D, Cavallone L, Franceschi C. (2004) Aging, longevity, inflammation, and cancer. *Ann NY Acad Sci*. **1028** 1-13
 96. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T.(2002)Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. **8** 1288-95.
 97. Apfeld J, O'Connor G, McDonagh T, DiStefano PS, Curtis R. (2004) The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes Dev*. **18** 3004-9.

98. Kapahi P, Zid BM, Harper T, Koslover D, Sapin V, Benzer S. (2004) Regulation of lifespan in *Drosophila* by modulation of genes in the TOR signaling pathway. *Curr Biol*. **14** 885-90
99. Taylor RC, Dillin A (2013) XBP-1 is a cell-nonautonomous regulator of stress resistance and longevity. *Cell*. **153** 1435-47
100. Finley LW, Lee J, Souza A, Desquiret-Dumas V, Bullock K, Rowe GC, Procaccio V, Clish CB, Arany Z, Haigis MC. (2012) Skeletal muscle transcriptional coactivator PGC-1 α mediates mitochondrial, but not metabolic, changes during calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci USA*. **109** 2931-6.
101. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. **112** 1796-808
102. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. **112** 1821-30.
103. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. **95** 2409-15.
104. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. **259** :87-91
105. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW Jr. (2006) CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest*. **116** 115-24.
106. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. (2006) MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest*. **116** 1494-505
107. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kawatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T. (2006) Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem*. **281** 26602-14.
108. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. **114** 1752-61.

- 109.Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. (2004) Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. **306** 457-61.
- 110.Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I. (2007) Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*. **56** 901-11.
- 111.Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR.(2007)Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. **117** 175-84
- 112.Suganami T, Nishida J, Ogawa Y.(2005)A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **25** 2062-8.
- 113.Suganami T, Tanimoto-Koyama K, Nishida J, Itoh M, Yuan X, Mizuarai S, Kotani H, Yamaoka S, Miyake K, Aoe S, Kamei Y, Ogawa Y.(2007)Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **27** 84-91.
- 114.Schröder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. (2005) *Mutat Res* **569**, 29-63.
- 115.Ron D and Walter P. (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 519-29.
- 116.Lee AS. (2005) The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* **35**, 373-81.
- 117.Palakurthi SS, Aktas H, Grubisich LM, Mortensen RM, Halperin JA.[2001] Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res*. **15**, 6213-8.
- 118.Silva AM, Wang D, Komar AA, Castilho BA, Williams BR.(2007) Salicylates trigger protein synthesis inhibition in a protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase-dependent manner. *J Biol Chem*. **6**, 10164-71
- 119.Boyce M, Bryant KF, Jousse C, Long K, Harding HP, Scheuner D, Kaufman RJ, Ma D, Coen DM, Ron D, Yuan J.(2005) A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science*. **11**, 935-9
- 120.Harding HP, Zeng H, Zhang Y, Jungries R, Chung P, Plesken H, Sabatini DD, Ron D. (2001)Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell*. **7**, 1153-1163

121. Boden G, Duan X, Homko C, Molina EJ, Song W, Perez O, Cheung P, Merali S.(2008) Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes*. **57**, 2438-44
122. Sharma NK, Das SK, Mondal AK, Hackney OG, Chu WS, Kern PA, Rasouli N, Spencer HJ, Yao-Borengasser A, Elbein SC.(2008) Endoplasmic reticulum stress markers are associated with obesity in nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. **93**, 4532-41.
123. Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, Mohammed BS, Eagon JC, Hotamisligil GS, Klein S. Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes*. **58**, 693-700
124. Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka TA, Ozawa K, Ogawa S, Hori M, Yamasaki Y, Matsuhisa M.(2005) Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem*. **7**, 847-51
125. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, Görgün CZ, Hotamisligil GS. (2006) Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*. **25**, 1137-40.
126. Gregor MF, Hotamisligil GS.(2007) Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res*. **48**, 1905-14
127. Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, Myers MG Jr, Ozcan U.(2009) Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab*. **7**, 35-51.
128. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*. **3**, 61-73.
129. Kim DS, Jeong SK, Kim HR, Kim DS, Chae SW, Chae HJ.(2007) Effects of triglyceride on ER stress and insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun*. **9**, 140-5
130. Jakobsen CH, Størvold GL, Bremseth H, Follestad T, Sand K, Mack M, Olsen KS, Lundemo AG, Iversen JG, Krokan HE, Schønberg SA.(2008) DHA induces ER stress and growth arrest in human colon cancer cells: associations with cholesterol and calcium homeostasis. *J Lipid Res*. **49**, 2089-100.
131. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I.(2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. **114**, 1752-61.

- 132.Xue X, Piao JH, Nakajima A, Sakon-Komazawa S, Kojima Y, Mori K, Yagita H, Okumura K, Harding H, Nakano H. Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) induces the unfolded protein response (UPR) in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion, and the UPR counteracts ROS accumulation by TNFalpha. *J Biol Chem.* **7**, 33917-25
- 133.Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab.* **9**, 467-78.
- 134.Colgan SM, Tang D, Werstuck GH, Austin RC. (2007) Endoplasmic reticulum stress causes the activation of sterol regulatory element binding protein-2. *Int J Biochem Cell Biol.* **39**, 1843-51.
- 135.Lee JN, Ye J.(2004) Proteolytic activation of sterol regulatory element-binding protein induced by cellular stress through depletion of Insig-1. *J Biol Chem.* **22**, 45257-65.
- 136.Higgins ME, Ioannou YA.(2001) Apoptosis-induced release of mature sterol regulatory element-binding proteins activates sterol-responsive genes. *J Lipid Res.* **42**, 1939-46.
- 137.Lee AH, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH.(2008) Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science.* **13**, 1492-6.
- 138.Song B, Scheuner D, Ron D, Pennathur S, Kaufman RJ. (2008) Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J Clin Invest* **118**, 3378-89.
- 139.Iqbal J, Dai K, Seimon T, Jungreis R, Oyadomari M, Kuriakose G, Ron D, Tabas I, Hussain MM.(2008) IRE1beta inhibits chylomicron production by selectively degrading MTP mRNA. *Cell Metab.* **7**, 445-55.
- 140.Sha H, He Y, Chen H, Wang C, Zenno A, Shi H, Yang X, Zhang X, Qi L. (2009) The IRE1alpha-XBP1 pathway of the unfolded protein response is required for adipogenesis. *Cell Metab.* **9**, 556-64.
- 141.Stewart SA, Weinberg RA. (2006) Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **22** 531-57
- 142.Bautista LE, Herrán OF, Serrano C.(2001) Effects of palm oil and dietary cholesterol on plasma lipoproteins: results from a dietary crossover trial in free-living subjects. *Eur J Clin Nutr.* **55** 748-54.
- 143.Itahana K, Dimri GP, Hara E, Itahana Y, Zou Y, Desprez PY, Campisi J.(2002) A role for p53 in maintaining and establishing the quiescence growth arrest in human cells. *J Biol Chem.* **277** 18206-14
- 144.Itahana K, Dimri G, Campisi J (2001) Regulation of cellular senescence by p53. *Eur*

J Biochem. **268** 2784-91.

145. Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G. (1996) Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol.* **16** 859-67.
146. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonian T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, Kirkland JL, van Deursen JM. (2011) Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature.* **479** 232-6.
147. Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, Nojima A, Nabetani A, Oike Y, Matsubara H, Ishikawa F, Komuro I. (2009) A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med.* **15** 1082-7.
148. Guo X, Keyes WM, Papazoglu C, Zuber J, Li W, Lowe SW, Vogel H, Mills AA. (2009) TAp63 induces senescence and suppresses tumorigenesis in vivo. *Nat Cell Biol.* **11** 1451-7.
149. Su X, Paris M, Gi YJ, Tsai KY, Cho MS, Lin YL, Biernaskie JA, Sinha S, Prives C, Pevny LH, Miller FD, Flores ER (2009) TAp63 prevents premature aging by promoting adult stem cell maintenance. *Cell Stem Cell.* **5** 64-75.
150. Su X, Gi YJ, Chakravarti D, Chan IL, Zhang A, Xia X, Tsai KY, Flores ER. (2012) TAp63 is a master transcriptional regulator of lipid and glucose metabolism. *Cell Metab.* **16** 511-25.
151. Jiang P, Du W, Mancuso A, Wellen KE, Yang X. (2013) Reciprocal regulation of p53 and malic enzymes modulates metabolism and senescence. *Nature.* **493** 689-93.
152. Molchadsky A, Ezra O, Amendola PG, Krantz D, Kogan-Sakin I, Buganim Y, Rivlin N, Goldfinger N, Folgiero V, Falcioni R, Sarig R, Rotter V. (2013) p53 is required for brown adipogenic differentiation and has a protective role against diet-induced obesity. *Cell Death Differ.* **20** 774-83
153. Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, Iwakura Y, Oshima K, Morita H, Hattori M, Honda K, Ishikawa Y, Hara E, Ohtani N. (2013) Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature.* **499** 97-101.
154. Buchet-Poyau K, Courchet J, Le Hir H, Séraphin B, Scoazec JY, Duret L, Domon-Dell C, Freund JN, Billaud M. (2007) Identification and characterization of human Mex-3 proteins, a novel family of evolutionarily conserved RNA-binding proteins differentially localized to processing bodies. *Nucleic Acids Res.* **35** 1289-300.
155. Courchet J, Buchet-Poyau K, Potemski A, Brès A, Jariel-Encontre I, Billaud M. (2008) Interaction with 14-3-3 adaptors regulates the sorting of hMex-3B

- RNA-binding protein to distinct classes of RNA granules. *J Biol Chem.* **283** 32131-42.
156. Jiao Y, Bishop CE, Lu B. (2012) Mex3c regulates insulin-like growth factor 1 (IGF1) expression and promotes postnatal growth. *Mol Biol Cell.* **23** 1404-13.
 157. Jiao Y, George SK, Zhao Q, Hulver MW, Hutson SM, Bishop CE, Lu B. (2012) Mex3c mutation reduces adiposity and increases energy expenditure. *Mol Cell Biol.* **32** 4350-62.
 158. Jiang H, Zhang X, Luo J, Dong C, Xue J, Wei W, Chen J, Zhou J, Gao Y, Yang C. Knockdown of hMex-3A by small RNA interference suppresses cell proliferation and migration in human gastric cancer cells. *Mol Med Rep.* **6** 575-80.
 159. Pereira B, Sousa S, Barros R, Carreto L, Oliveira P, Oliveira C, Chartier NT, Plateroti M, Rouault JP, Freund JN, Billaud M, Almeida R (2013) CDX2 regulation by the RNA-binding protein MEX3A: impact on intestinal differentiation and stemness *Nucleic Acids Res.* **41** 3986–3999.
 160. King-Jones K, Thummel CS. (2005) Nuclear receptors--a perspective from *Drosophila*. *Nat Rev Genet.* **6** 311-23.
 161. Thummel CS. (1996) Flies on steroids--*Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. *Trends Genet.* **12** 306-10.
 162. Tsai CC, Kao HY, Yao TP, McKeown M, Evans RM. (1999) SMRTER, a *Drosophila* nuclear receptor coregulator, reveals that EcR-mediated repression is critical for development. *Mol Cell.* **4** 175-86.
 163. Akimaru H, Chen Y, Dai P, Hou DX, Nonaka M, Smolik SM, Armstrong S, Goodman RH, Ishii S. (1997) *Drosophila* CBP is a co-activator of cubitus interruptus in hedgehog signalling. *Nature.* **386** 735-8.
 164. Bai J, Uehara Y, Montell DJ. (2000) Regulation of invasive cell behavior by taiman, a *Drosophila* protein related to AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast cancer. *Cell.* **103** 1047-58.
 165. Park JM, Gim BS, Kim JM, Yoon JH, Kim HS, Kang JG, Kim YJ. (2001) *Drosophila* Mediator complex is broadly utilized by diverse gene-specific transcription factors at different types of core promoters. *Mol Cell Biol.* **21** 2312-23.
 166. Gdula DA, Sandaltzopoulos R, Tsukiyama T, Ossipow V, Wu C. (1998) Inorganic pyrophosphatase is a component of the *Drosophila* nucleosome remodeling factor complex. *Genes Dev.* **12** 3206-16.
 167. Badenhorst P, Xiao H, Cherbas L, Kwon SY, Voas M, Rebay I, Cherbas P, Wu C. (2005) The *Drosophila* nucleosome remodeling factor NURF is required for Ecdysteroid signaling and metamorphosis. *Genes Dev.* **19** 2540-5.

168. Kornfeld JW, Baitzel C, Könnner AC, Nicholls HT, Vogt MC, Herrmanns K, Scheja L, Haumaitre C, Wolf AM, Knippschild U, Seibler J, Cereghini S, Heeren J, Stoffel M, Brüning JC. (2013) Obesity-induced overexpression of miR-802 impairs glucose metabolism through silencing of Hnf1b. *Nature*. **494** 111-5.
169. Mori MA, Raghavan P, Thomou T, Boucher J, Robida-Stubbs S, Macotela Y, Russell SJ, Kirkland JL, Blackwell TK, Kahn CR. (2012) Role of microRNA processing in adipose tissue in stress defense and longevity. *Cell Metab*. **16** 336-47.
170. Lee EK, Kim W, Tominaga K, Martindale JL, Yang X, Subaran SS, Carlson OD, Mercken EM, Kulkarni RN, Akamatsu W, Okano H, Perrone-Bizzozero NI, de Cabo R, Egan JM, Gorospe M. (2012) RNA-binding protein HuD controls insulin translation. *Mol Cell*. **45** 826-35.
171. Kawagishi H, Hashimoto M, Nakamura H, Tsugawa T, Watanabe A, Kontoyiannis DL, Sugimoto M. (2013) HuR maintains a replicative life span by repressing the ARF tumor suppressor. *Mol Cell Biol*. **33** 1886-900.
172. Teague BD, Clark AG, Doane WW. (1986) Developmental analysis of lipids from wild-type and adipose60 mutants of *Drosophila melanogaster*. *J Exp Zool*. **240** 95-104.
173. Delanoue R, Slaidina M, Léopold P. (2010) The steroid hormone ecdysone controls systemic growth by repressing dMyc function in *Drosophila* fat cells. *Dev Cell*. **18** 1012-21.
174. Neely GG, Kuba K, Cammarato A, Isobe K, Amann S, Zhang L, Murata M, Elmén L, Gupta V, Arora S, Sarangi R, Dan D, Fujisawa S, Usami T, Xia CP, Keene AC, Alayari NN, Yamakawa H, Elling U, Berger C, Novatchkova M, Kogelgruber R, Fukuda K, Nishina H, Isobe M, Pospisilik JA, Imai Y, Pfeufer A, Hicks AA, Pramstaller PP, Subramaniam S, Kimura A, Ocorr K, Bodmer R, Penninger JM. (2010) A global in vivo *Drosophila* RNAi screen identifies NOT3 as a conserved regulator of heart function. *Cell*. **141** 142-53.
175. Gauhar Z, Sun LV, Hua S, Mason CE, Fuchs F, Li TR, Boutros M, White KP. (2009) Genomic mapping of binding regions for the Ecdysone receptor protein complex. *Genome Res*. **19** 1006-13.
176. Wang S, Liu S, Liu H, Wang J, Zhou S, Jiang RJ, Bendena WG, Li S. (2011) 20-hydroxyecdysone reduces insect food consumption resulting in fat body lipolysis during molting and pupation *J Mol Cell Biol*. **2** 128-38.
177. Grönke S, Mildner A, Fellert S, Tennagels N, Petry S, Müller G, Jäckle H, Kühnlein RP. (2005) Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell Metab*. **1** 323-30.

178. Cáceres L, Necakov AS, Schwartz C, Kimber S, Roberts IJ, Krause HM.(2011) Nitric oxide coordinates metabolism, growth, and development via the nuclear receptor E75. *Genes Dev*. **25** 1476-85.
179. Suh JM, Zeve D, McKay R, Seo J, Salo Z, Li R, Wang M, Graff JM.(2007) Adipose is a conserved dosage-sensitive antiobesity gene. *Cell Metab*. **6** 195-207.
180. Calkin AC, Tontonoz P, (2012) Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **13** 213-24
181. Kanfi Y, Naiman S, Amir G, Peshti V, Zinman G, Nahum L, Bar-Joseph Z, Cohen HY. (2012) The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature*. **483** 218-21.
182. Blüher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, Kahn CR. (2002) Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell*. **3** 25-38.
183. Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. (2012) *Diabetes Obes Metab*. **14** 58-66.
184. Streeper RS, Grueter CA, Salomonis N, Cases S, Levin MC, Koliwad SK, Zhou P, Hirschey MD, Verdin E, Farese RV Jr. (2012) Deficiency of the lipid synthesis enzyme, DGAT1, extends longevity in mice. *Aging (Albany NY)*. **4** 13-27.

論文内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 23 年度博士課程進学
氏 名 鴨志田 祐己
指導教員名 秋山 徹

論文題目 モデル生物を用いた新規脂質代謝制御因子の探索・高次機能解析

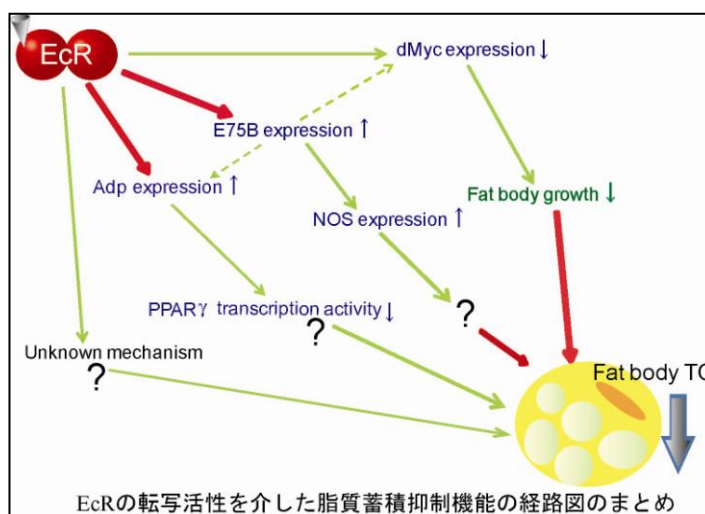
食の欧米化が進む現代日本において、生活習慣病を発端とした疾病群が死因の多くを占めており、治療法の確立が急務である。そのためには生活習慣病の分子機構を明らかにすることが必須となる。本研究では、ショウジョウバエとマウスという 2 種類のモデル生物を用いて、脂質代謝制御に関わる新規因子の探索系の構築および動物個体における高次機能の分子機構の解明を試みた。

○第一章 ショウジョウバエ核内受容体 EcR をモデルとした新規脂質代謝制御因子群の探索の試み

脂肪組織は、脂質を蓄積する重要な器官である。哺乳類から昆虫までの多くの生物が脂質の蓄積・消費を行うことで代謝を制御している。特に昆虫の蛹化において、幼虫期では盛んに合成し、脂肪組織に蓄積させていた脂質を蛹期ではエネルギー源として酸化・消費する、という脂質代謝の反転が生じる。この反転の際には変態ホルモン・エクダイソンが分泌されることから、受容体であるエクダイソンレセプター (EcR) による発現制御を介した生理作用があると考えられるが、EcR を介した脂質代謝制御の報告はほとんどなされておらず、その分子機構は不明である。本研究では、ショウジョウバエの脂肪組織 Fat body に着目し、EcR が転写依存的に Fat body での脂質蓄積を抑制することを明らかにした。さらに、EcR は Fat body において、E75B, adp, dMyc の転写制御を一部組織特異的にを行い、それらの発現制御を介して脂質蓄積を抑制することを示した。この報告は、EcR による脂質代謝制御機構を明らかにしただけでなく、今後の EcR による転写制御機構の解明や組織特異的な発現制御機構の解明の一助となると期待される。

さらに、EcR が転写依存的に脂質蓄積を抑制しているという結果は、脂質蓄積量を指標とした、新規 EcR 転写制御因子の同定のためのスクリーニングが行えることを示唆している。そこで、本研究では、ショウジョウバエ分子遺伝学を利用し、EcR の転写制御を介し

て脂質代謝制御を行う新規因子の探索系の構築を試みた。具体的には、一次スクリーニングとして、各遺伝子をノックダウンした際の *in vivo* の脂質蓄積量を、二次スクリーニングとして、E75B, adp, dMyc のプロモーターを用いた *in vivo* Luciferase assay を、三次スクリーニングには各因子の mRNA 量を指標としたスクリーニングを実施することとした。



また、EcR の哺乳類ホモログとして、核内受容体 LXR, FXR が存在する。LXR, FXR は哺乳類において脂質代謝・生活習慣病を制御すると報告されている。今回のスクリーニング系を利用し、新規 EcR 転写制御因子を同定することで、同定因子の哺乳類ホモログを LXR, FXR の新規転写制御因子として見出し、抗生活習慣病の新規標的因子として提示できるのではないかと考えている。

○第二章 新規 RNA 結合タンパク質 D8 による寿命・代謝制御機構の解明

D8 は RNA 結合タンパク質であるが、成熟した動物個体内におけるその機能は未知である。本研究室において、D8 は p53、TGFβ の新規標的因子として同定され、D8 欠損マウスの作出・解析が行われてきた。その過程で、D8 欠損マウスは有意に寿命が延長し、老化の表現型が改善することを見出した。さらに、この D8 欠損による寿命延長効果は、雄特異的な現象であった。

寿命を延長させる著名な方法として、摂取カロリーの制限がある。このカロリー制限による寿命延長効果に寄与すると報告されている遺伝子が Sirt6 であり、Sirt6 トランスジェニックマウスは雄特異的に寿命が延長するという、D8 欠損マウスと類似した表現型を呈することが報告されている。そこで、D8 も代謝制御を介して寿命延長を制御している、と仮定し、D8 が代謝制御に与える影響を検討した。

まず、D8 欠損マウスの表現系の解析を行った。その結果、D8 欠損マウスは加齢に伴う肥満に抵抗性で、脂肪組織量の顕著な減少が確認された。D8 はマウス、ヒトにおいて、全身にユビキタスに発現しているが、絶食・再摂食刺激や肥満負荷による D8 の遺伝子発現量の変化は、脂肪組織において顕著に認められた。以上の結果から、D8 の代謝機能臓器を脂肪組織であると考え、さらなる解析を行った。

まずは、*in vitro* における脂肪細胞分化誘導実験を、D8 をノックダウンさせた 3T3-L1 細胞、および D8 欠損マウス由来の MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) を用いて行った。

その結果、D8 のノックダウン・欠損は、脂肪細胞分化の主要調整因子である PPAR γ シグナルを抑制し、脂肪細胞分化誘導を抑制することが明らかになった。この結果は、*in vivo* の D8 欠損雄マウスの内臓脂肪組織において PPAR γ シグナルが減弱していたことと一致した。以上の結果から、D8 は PPAR γ シグナルの制御を介して脂肪細胞分化を制御することが明らかになった。

続いて、D8 欠損マウスの表現型の詳細な解析に移った。血液成分の解析の結果、糖尿病マーカーとして用いられているヘモグロビン A1c (HbA1c) が D8 欠損雄マウスで低下していたことから、D8 欠損雄マウスではインスリン感受性が亢進している可能性が示唆された。そこで、D8 欠損雄マウスにおけるインスリン感受性を検討するために、GTT (Glucose Tolerance Test)、ITT (Insulin Tolerance Test) を行った。その結果、D8 欠損老齢雄マウスはインスリン感受性が亢進していることが明らかになった。一方で、D8 欠損老齢雌マウスではインスリン感受性に差は認められず、寿命延長効果と関連した結果が得られたことから、寿命とインスリン感受性のクロストークが示唆された。続いて、D8 欠損雄マウスの脂肪組織におけるインスリン感受性の亢進を分子レベルで確認した。その結果、D8 欠損雄マウスの脂肪組織ではインスリン刺激によって、インスリンシグナルが強く活性化されていたことから、D8 欠損雄マウスはインスリン感受性が亢進していることが示された。さらに、このインスリンシグナル活性化の促進は、D8 欠損マウス由来の MEF に対するインスリン刺激においても確認された。以上の結果より、D8 欠損マウスではインスリン感受性が亢進していることが明らかになった。

続いて、D8 によるインスリン感受性の制御機構の検討を行った。近年、肥満に伴う脂肪組織へのマクロファージの浸潤・炎症系サイトカインの分泌と小胞体ストレスの惹起がインスリン抵抗性の原因である、と考えられている。しかしながら、種々の実験結果から、D8 欠損マウスにおけるインスリン感受性亢進の原因が、マクロファージ・炎症系サイトカインにある可能性は低いことが示唆された。また、D8 欠損マウスにおいて、小胞体ストレスが軽減している傾向は得られたものの、D8 が直接小胞体ストレスシグナルを制御していることを示唆する結果は得られなかった。

ヒトにおける治験から、肥満のみならず、老化も糖尿病の原因になりうることを示唆されている。また、老化を模倣し、脂肪組織に対して Senescence を誘導させたマウスは、インスリン抵抗性を呈することが報告されている。このことから D8 欠損マウスの脂肪組織では、Senescence が軽減され、その結果、インスリン感受性が亢進していることが考えられた。そこでまず D8 欠損マウスの脂肪組織において Senescence のマーカー遺伝子の発現量を検討した。その結果、加齢に伴う Senescence マーカー遺伝子の発現誘導は、D8 欠損老齢雄マウスにおいて抑制されることが認められた。さらに、MEF に対して継代操作を繰り返すことで誘導される Senescence に対しても、D8 欠損による軽減効果が認められた。続いて、この Senescence の抑制が、インスリン感受性を制御していることを検討するため、Early passage と Late passage の野生型および D8 欠損マウス由来の MEF におけるインスリン

シグナルを検討した。その結果、野生型の MEF では Late passage においてインスリンシグナルの減弱が確認されたが、D8 欠損の MEF ではこの減弱が緩和されていた。以上の結果から、D8 欠損マウスの脂肪組織では Senescence が軽減されており、それによってインスリン感受性が亢進している可能性が示された。

続いて、D8 がカロリー制限による寿命延長に寄与するかを検討するため、野生型マウスに対してカロリー制限を行い、代謝臓器における D8 の発現量を検討した。その結果、D8 の発現は内臓脂肪組織において、mRNA、タンパク質レベルの両方でカロリー制限によって減少することが認められた。さらに、D8 欠損マウスの脂肪組織において認められた小胞体ストレスと Senescence のマーカー遺伝子の発現抑制が、カロリー制限を行ったマウスの脂肪組織においても確認された。以上の結果より、D8 欠損マウスはカロリー制限を模倣して寿命延長効果を発揮するとともに、カロリー制限による寿命延長効果は、D8 の発現抑制を介する可能性が示唆された。

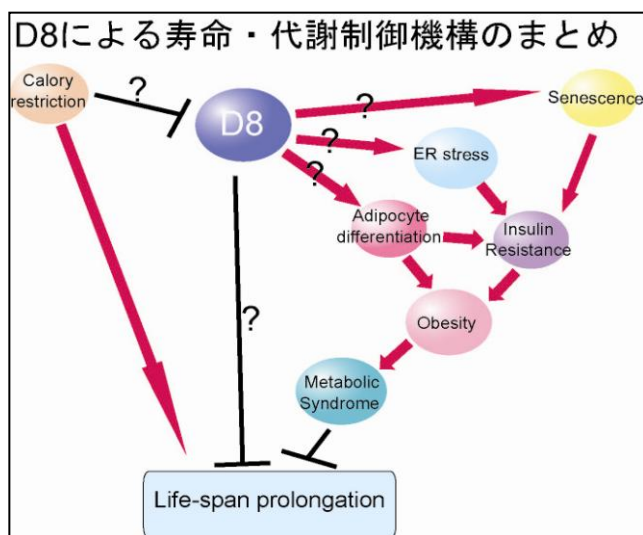
最後に、D8 が実際に抗肥満・糖尿病の治療の標的となりうるのかを検討するため、D8 欠損雄マウスに対して高脂肪食負荷を行い、インスリン感受性を検討した。その結果、D8 欠損雄マウスは高脂肪食負荷に伴う肥満に対して抵抗性を持つとともに、インスリン感受性の悪化が緩和されていることが示された。

以上の結果より、D8 は脂肪組織において

①PPAR γ シグナル制御を介した脂肪細胞分化の制御

②小胞体ストレスや Senescence の誘導を介したインスリン抵抗性の惹起

を行うことが示唆された。D8 欠損マウスは上記の D8 の機能がないために、肥満に対して抵抗性を有し、寿命が延長していることが示唆された。今後は、D8 がどのような分子機構で PPAR γ シグナルの制御や、小胞体ストレスや Senescence の誘導を行っているのかを、MS や RIP-seq を用いた D8 の結合タンパク質および結合 RNA の同定・解析を通じて明らかにしたいと考えている。今後、さらに研究を重ね、抗肥満・糖尿病の治療の新規標的因子として D8 を提唱していきたいと考えている。



発表論文

Kamoshida Y., Fujiyama-Nakamura S., Kimura S., Suzuki E., Lim J., Shiozaki-Sato Y, Kato S. and Takeyama K. *Biochem Biophys Res Commun.* 421:203-7. (2012)

謝辞

本研究の第一章は、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻・分子細胞生物学的研究所旧核内情報研究分野、第二章は東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻・分子細胞生物学的研究所分子情報研究分野にて行われたものです。

本研究を遂行するにあたり、博士 2 年次の途中から移籍してきたという異例な境遇の自分に対しても、豊富な知識と長年の第一線の研究者としての経験の下、熱心に御指導・御鞭撻下さり、研究者として目指すべき姿勢を常々熱く説いて下さった東京大学分子細胞生物学的研究所・秋山徹教授に深く感謝するとともに、厚く御礼申し上げます。

第一章の研究を遂行するにあたり、初めての筆頭著者として論文を執筆する際に、自分の未熟さを改めて認識させると同時に、研究者として生きる上で大切なことを熱心にご指導くださった旧核内情報研究分野加藤茂明様に厚く御礼申し上げます。

第一章の研究を遂行するにあたり、ショウジョウバエについて全くの不慣れであった自分に対して懇切丁寧にご指導くださり、研究を適切な方向へ導いて下さった旧核内情報研究分野武山健一様およびハエチームの方々に深く感謝いたします。

第一章の研究を遂行するにあたり、ショウジョウバエ飼育用の培地作製をはじめ、我々が研究に専念できるよう、サポートして下さった鈴木徹様に感謝いたします。

第二章の研究を遂行するにあたり、共同研究者として、豊富な知識量と、研究者としてあるべき研究に臨む態度を背中を示して下さい、また、私が困った時には懇切丁寧に相談に乗ってくださった東京大学分子細胞生物学的研究所博士研究員、小田健昭博士、山角祐介博士に厚く御礼申し上げます。

第二章の研究を遂行するにあたり、共同研究者として日頃の討論を通じて、研究の進展につながるようなひらめきを生み出すきっかけを下さり、時には研究のサポートもしてくれた東京大学分子細胞生物学的研究所・渡邊紘介修士、宮

澤亜衣さんに感謝します。

第二章の研究を遂行するにあたり、共同研究者として日頃の研究のサポートをして下さり、自分の気持ちが落ち込んでいた時には叱咤激励して下さった佐藤裕美様、須山早紀様に感謝の念を捧げます。

第二章の研究を遂行するにあたり、マウスの世話をサポートしてくださり、われわれ研究者が研究に専念できるよう御助力くださった JAC の方々および吉永様、戸塚様に感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、多くの御指導、御助力、御激励下さり、私の研究室生活を有意義かつ楽しみに溢れたものにしてくださった、諸先輩方を含めた分子情報研究分野、および旧核内情報研究分野の皆様に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたって、犠牲になってくれたマウスとショウジョウバエたちに感謝と追悼の念を捧げます。

そして何よりも、影から私の大学院生活・研究生生活を見守り、支え、応援して下さいった家族に対して最大級の感謝を申し上げます。

2013 年 12 月