

氏 名 (本 籍) 池 田 和 弘 (滋 賀 県)
学 位 の 種 類 博 士 (医 学)
学 位 記 番 号 博 士 第 5 4 1 号
学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 9 年 3 月 2 6 日
学 位 論 文 題 目 Transcription Factor Activating Enhancer-binding
Protein-2 : A NEGATIVE REGULATOR OF ADIPONECTIN GENE
EXPRESSION

(転写因子 AP-2 : アディポネクチン遺伝子発現の負の調節
因子)

審 査 委 員 主 査 教 授 田 中 俊 宏
副 査 教 授 大 路 正 人
副 査 教 授 堀 江 稔

論文内容要旨

※整理番号	546	(ふりがな) 氏名	いけだ かずひろ 池田 和弘
学位論文題目	Transcription Factor Activating Enhancer-binding Protein-2 β : A NEGATIVE REGULATOR OF ADIPONECTIN GENE EXPRESSION (転写因子 AP-2 β : アディポネクチン遺伝子発現の負の調節因子)		
<p>【目的】 脂肪組織は、種々のホルモンやサイトカイン（アディポカインと総称される）を分泌する内分泌臓器であり、脂肪細胞の肥大化（サイズ変化）が、アディポカイン分泌の質および量の調節に重要な役割を果たしていることが報告されている。我々は、Single Nucleotide Polymorphism (SNP)解析により 転写因子 AP-2βが肥満 2型糖尿病の発症候補遺伝子であることを同定し、培養マウス 3T3-L1 脂肪細胞を用いた系で AP-2βを過剰発現すると、糖取り込み亢進を介して、細胞が肥大化することを見出した。そこで本研究では、脂肪細胞を肥大化させる転写因子 AP-2βが、脂肪細胞のサイズ依存性のアディポカイン分泌調節に関わる可能性を考え、その仮説を検証した。</p> <p>【方法】 培養 3T3-L1 脂肪細胞に、転写因子 AP-2βを過剰発現させ、2種類のアディポカイン、すなわち、Interleukin 6 (IL-6)とアディポネクチンの遺伝子発現量を mRNA 発現量（定量的 RT-PCR 法）、細胞内蛋白発現量（Western Blot 法）および分泌蛋白量（酵素免疫吸着測定法）で定量した。AP-2βが転写因子として 直接 IL-6 とアディポネクチンのプロモーター領域に作用している可能性を想定し、reporter assay で評価した。過剰発現下だけではなく平常状態でも AP-2βが作用していることを確認するため、AP-2βを RNA 干渉にて knock down させ、内因性 AP-2βの役割を検討した。 次に、アディポネクチン遺伝子のプロモーター領域内に、AP-2β応答領域と consensus 配列が一致する領域を 2箇所認めたため、Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) で <i>in vitro</i>での結合を、クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) で <i>in vivo</i>での結合を確認した。最後に、同定し得た AP-2βの応答領域に対して点突然変異体を作成し、AP-2β過剰発現による影響の違いを reporter assay で確認した。</p> <p>【結果】 培養 3T3-L1 脂肪細胞に転写因子 AP-2βを過剰発現させると、IL-6 の mRNA 発現量、細胞内蛋白量、分泌蛋白量が増加した。一方、アディポネクチン遺伝子については、mRNA 発現量、蛋白発現量とも減少した。これらの現象は脂肪細胞のサイズが変化する以前に、AP-2β</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

遺伝子発現量依存的に認められており、脂肪細胞のサイズが大きくなったことによる二次的な変化でないことが確認できた。一方、reporter assay では IL-6 とアディポネクチン遺伝子の間に差が認められた。すなわち、AP-2 β 発現量依存性にアディポネクチンのプロモーター活性が低下したが、IL-6 プロモーター活性は影響を受けなかった。また、RNA 干渉による AP-2 β の knock down でも、アディポネクチンはその発現量およびプロモーター活性がともに増加したが、IL-6 には影響しなかった。

アディポネクチン遺伝子のプロモーター領域内の AP-2 β 応答候補領域を同定する目的で、2 箇所の候補部位に対応するオリゴヌクレオチドを用いて EMSA を行ったところ、遠位部候補領域には AP-2 β は結合しないことが判明した。一方、近位部候補領域（転写開始点の上流-88~-80 塩基の配列）については、AP-2 β だけでなく既報の転写因子 NF-YA も結合することが判明した。両転写因子は複合体を作ることなく同一配列に対して拮抗的に結合することで、NF-YA は転写活性を正に、AP-2 β は負に調節することが、免疫沈降法および ChIP assay で確認された。同応答領域に点突然変異を導入したアディポネクチンのプロモーター活性は NF-YA 結合能を欠失しているため基礎転写活性が低下したが、AP-2 β 結合能も欠失したため、AP-2 β 過剰発現による転写活性抑制作用も消失した。

【考 察】

本研究により、転写因子 AP-2 β は脂肪細胞のサイズ変化に依存することなくアディポネクチン遺伝子の発現を負に調節することが示された。その調節は、AP-2 β がアディポネクチン遺伝子のプロモーター領域に直接結合することにより、また転写因子 NF-YA の結合を拮抗的に阻害することにより、転写レベルで発現を調節していることが判明した。一方、IL-6 遺伝子の発現調節機構については現時点で不明であり、さらなる解析が必要である。

脂肪細胞におけるアディポカインの質および量的分泌調節に転写因子 AP-2 β が関与していることが示唆された。また、AP-2 β を knock down させ、アディポネクチン分泌量を増加させる治療が可能になれば、低アディポネクチン血症がリスク因子の一つとされる冠動脈疾患などの遺伝子治療に貢献できるものと考えられる。

【結 語・新知見】

転写因子 AP-2 β は、アディポネクチン遺伝子のプロモーター領域に直接結合し、また、同部位に結合する転写因子 NF-YA の結合を拮抗的に阻害することにより、アディポネクチン遺伝子発現を転写レベルで負に調節することを新たに解明した。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	546	氏名	池田 和弘
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>本研究は、転写因子 AP-2β が脂肪細胞におけるアディポネクチン遺伝子の発現調節に関与しているか否かを検討したものである。</p> <p>AP-2β を 3T3-L1 脂肪細胞に過剰発現させると、アディポネクチンの発現は減少し IL-6 の発現は増加した。前者については、そのプロモーター領域に AP-2β が直接結合することで、また応答領域が重複している別の転写因子 NF-YA の結合を拮抗的に阻害することでそのプロモーター活性を低下させ、転写レベルで遺伝子発現を負に調節していることを発見した。肥大化に伴う二次的な現象ではないため、アディポネクチン発現を AP-2β が直接調節している可能性が示唆された。</p> <p>本論文はアディポネクチンの発現調節において新たな分子機構を解明したものであり、低アディポネクチン血症の遺伝子治療が可能となれば冠動脈疾患の予防に貢献できると考えられる。よって博士 (医学) の学位を授与するに値すると評価された。</p> <p>なお、本学位授与申請者は 2007 年 1 月 31 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け合格と認められた。</p>			
(平成 19 年 2 月 6 日)			