

喜多篤志 論文内容の要旨

主 論 文

ヒトアディポネクチン遺伝子転写に必要なプロモーター領域の同定：
CCAAT/エンハンサー結合蛋白 β (C/EBP- β) と腫瘍壊死因子 α (TNF- α) との関係

喜多篤志、山崎浩則、桑原宏永、森内昭江、福島慶子、
古林正和、福島徹也、高橋亮子、阿比留教生、
魚谷茂雄、川崎英二、江口勝美

(Biochemical and Biophysical Research Communications)
331(2):484-490, 2005 年

〔長崎大学大学院医学研究科内科系専攻
(指導教授：江口 勝美)〕

緒 言

アディポネクチン(Adp)は脂肪細胞特異的に発現、分泌されるタンパクとして1996年に同定された。Adpにインスリン抵抗性改善作用と抗動脈硬化進展作用が存在することがAdpノックアウトマウスやAdp高発現マウスで証明されている。さらに、インスリン抵抗性をもつ肥満マウスや肥満者においては血清Adp値が低値であることが臨床的に問題である。Adpの発現はPPAR- γ アゴニストであるチアゾリジン誘導体で増強される。一方でこの発現はTNF- α で抑制され、このことがインスリン抵抗性の原因のひとつと考えられている。低Adp血症の治療においてAdp転写調節機構を解明することは重要である。そこで、ヒトAdp遺伝子プロモーターの中で転写活性に必要な領域を同定すること、そして、TNF- α による抑制の機序の解明することを研究目的とした。

材料と方法

3T3-L1 脂肪細胞 (3T3-L1) の分化誘導：3T3-L1 前駆脂肪細胞を分化用培地 (200 nM インスリン, 0.5 mM isobutylmethylxanthine, 0.25 μ M dexamethasone 含有 10%FCS 入り DMEM) で 48 時間培養後, 200 nM インスリン含有 10%FCS 入り DMEM で 48 時間培養後, 10%FCS 入り DMEM で培養することで脂肪滴を豊富に含む成熟脂肪細胞を得た。
ルシフェラーゼベクターの作製：2.1kb のヒト Adp 遺伝子プロモーター領域を PCR で得, pGL3-basic ベクターに挿入 (pAdp-2125-LUC)。制限酵素切断部位を利用して, 5

種類の deletion ベクターを作製した (pAdp-1574-LUC , -1182-LUC , -676-LUC , -416-LUC , -214-LUC). 予想される SREBP 反応領域と C/EBP 反応領域の内部に変異を挿入したベクターも作製した (pAdp-mtSREBP-LUC , pAdp-mtC/EBP-LUC). C/EBP-β発現アデノウィルス: 坂上浩先生 (神戸大学) より供与いただいた . 一過性遺伝子導入: Superfect Transfection Reagent (キアゲン社) を用いて , 3T3-L1 に遺伝子導入し , 24 時間後に細胞質蛋白を抽出し , ルシフェラーゼ活性を測定し , それを内部コントロールで除して標準化した . electrophoretic mobility shift assay (EMSA アッセイ): C/EBP 反応領域を含むオリゴヌクレオチド (-258 / -199) をビオチンラベルして , 3T3-L1 抽出核タンパクと DNA の特異的結合を解析した .

結 果

プロモーターの deletion 解析によってヒト Adp 遺伝子の -676 から +41 までの領域が基礎転写活性に必要であった。 変異解析によって SREBP 反応領域 (-431 ~ -423) ならびに C/EBP-β反応領域 (-230 ~ -224) のいずれもが , 基礎転写活性に必要であった。 恒常活性型 C/EBP-β を過剰発現させると転写活性が 3 倍に増強した。 EMSA 解析によって , -258 から -199 の領域に特異的結合する 3T3-L1 核内蛋白が存在した。 さらに , TNF-α の前処置によってその蛋白の DNA 結合活性は完全に消失した。

考 察

この研究において , 初めて , ヒト Adp 遺伝子プロモーター領域の中の -230 ~ -224 が基礎転写活性に必須であることが明らかとなった。 さらに , この領域が C/EBP-β の推定反応領域であること , この領域を含む -258 ~ -199 と結合する核内蛋白の DNA 結合活性を TNF-α は強力に抑制すること , そして C/EBP-β の活性上昇は転写を促進したことより , TNF-α は C/EBP-β の活性を抑制するメカニズムを通じて , ヒト Adp 転写を抑制していると考えられた。 C/EBP-β の活性調節が低 Adp 血症の改善 , メタボリックシンドロームの治療に役立つと考えられる。