

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：若手研究 (A)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18689021
 研究課題名 (和文) 脂肪細胞分化における HZF タンパク質の機能解析
 研究課題名 (英文) Role of HZF in adipocyte differentiation
 研究代表者
 杉本 昌隆 (SUGIMOTO MASATAKA)
 国立長寿医療センター (研究所)・老化機構研究部・代謝研究室・室長
 研究者番号：50426491

研究成果の概要：脂肪細胞の分化・成熟には、複数の転写因子から構成される複雑なネットワークの活性化が必要である。我々は HZF と呼ばれる RNA 結合タンパク質が脂肪細胞分化に不可欠である C/EBP α の発現を翻訳レベルで制御していることを見出した。HZF 非存在下では脂肪細胞の分化に異常が見られること、また HZF ノックアウトマウスは著しいインスリン抵抗性を示すことを発見した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
2007年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：代謝学

キーワード：代謝異常学

1. 研究開始当初の背景

脂肪細胞は余剰のエネルギーを貯蔵するだけでなく、アディポカインと総称される生理活性物質を分泌して末梢組織におけるインスリン感受性を決定する生体にとって極めて重要な内分泌器官として機能している。肥満等により脂肪細胞に機能不全が生じると、インスリン抵抗性が惹起され、2型糖尿病の発症へと繋がる。脂肪細胞の分化(成熟)には、複数の転写因子群から構成される複雑なネットワークの活性化が必要であることが知られている。

我々は以前に癌抑制タンパク質 p53 の標的

い因子として、HZF と呼ばれる RNA 結合タンパク質を同定した。生体における HZF の発現部位は限られており、脂肪組織において特に強く発現することを見出した。また培養系における脂肪細胞の分化過程においてもその発現が顕著に上昇した。興味深いことに HZF の発現を RNAi によって抑制すると、脂肪細胞の分化が抑制された。これらのことから、HZF は脂肪細胞の成熟に極めて重要な因子であることが考えられた。

2. 研究の目的

本研究では脂肪細胞分化における HZF の

機能を明らかにすること、および生体において HZF が脂肪組織の機能と関連してどのような役割を持つかについて明らかにすることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

細胞培養系における脂肪分化モデルとして 3T3-L1、およびマウス胎生線維芽細胞を使用した。HZF の発現阻害ノックダウン、および外来タンパク質の発現は全てレトロウイルス発現系を用いて行った。

HZF ノックアウトマウスは Mt.Sini Hospital (カナダ)・Alan Bernstein 博士の許可を得、慶応大学医学部・岡野栄之博士より供与された。

4. 研究成果

(1)脂肪細胞分化における HZF の機能解析

脂肪細胞分化には C/EBP α , β , δ および PPAR γ の転写因子の誘導・活性化が重要である。HZF ノックダウン細胞においてこれらの発現量について調べてみたところ、C/EBP α の発現が著しく低下していた (図 1)。HZF ノックダウン細胞に外来性 C/EBP α を導入すると分化異常は回復することから、この細胞で見られた分化異常は C/EBP α の発現が低下していることに起因することが示唆された。

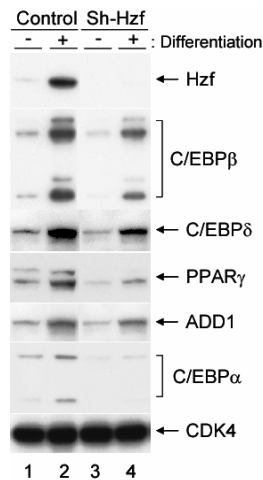


図 1 HZF ノックダウン細胞における脂肪分化因子の発現。

次に HZF が C/EBP α の発現を制御するメカニズムについて解析を行った。C/EBP α は分化刺激によって転写レベルで誘導されることが知られている。HZF ノックダウン細胞では、C/EBP α タンパク質の発現誘導に障害が見られるにもかかわらず、C/EBP α mRNA の発現はコントロール細胞同様に見られた。したがって HZF は転写後調節を介して C/EBP α の発現を制御することが示唆

された。また放射性同位元素標識アミノ酸を用いて細胞を代謝ラベルし、C/EBP α タンパク質の動態について解析したところ、HZF 非存在下においては単位時間当たりの C/EBP α タンパク質の合成量に顕著な低下が認められた (図 2)。

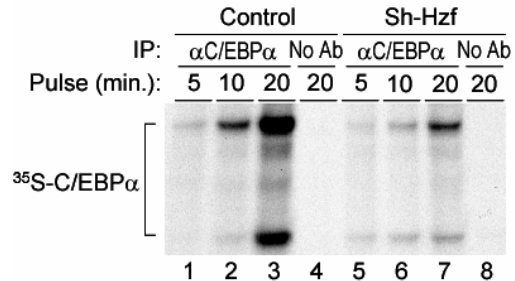


図 2 ^{35}S 標識アミノ酸取り込み実験による単位時間当たりの C/EBP α タンパク質の合成量の評価。

この様な条件下では C/EBP α タンパク質の安定性には変化が認められないことから、HZF は C/EBP α mRNA の翻訳に必要な因子であることが考えられた。この可能性について検証を行うために、コントロール、HZF ノックダウン細胞から細胞質画分を調製し、さらにポリソーム・非ポリソーム画分へと分離し、C/EBP α mRNA の局在について調べた。その結果、コントロール細胞では大部分の C/EBP α mRNA は活発に翻訳が行われているポリソーム画分に含まれるのに対し、HZF ノックダウン細胞では逆に殆どの C/EBP α mRNA は翻訳が不活化されている非ポリソーム画分に存在することが明らかになった (図 3)。以上の結果から、HZF は脂肪細胞分化過程において C/EBP α mRNA の翻訳を特異的に制御する因子であることが強く示唆された。

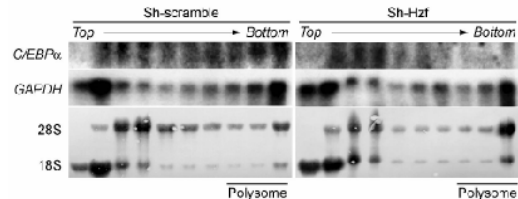


図 3 ポリソーム・非ポリソーム画分における C/EBP α mRNA の分布。

HZF は RNA 結合タンパク質であり、その C 末端付近に存在する C2H2 タイプの Zn フィンガードメインを介して特異的な RNA 配列に結合する。そこで HZF と C/EBP α mRNA との間に相互作用について検討を行った結果、HZF は C/EBP α mRNA の 3'非

翻訳領域 (UTR) に直接結合することが明らかになった (図 4)。

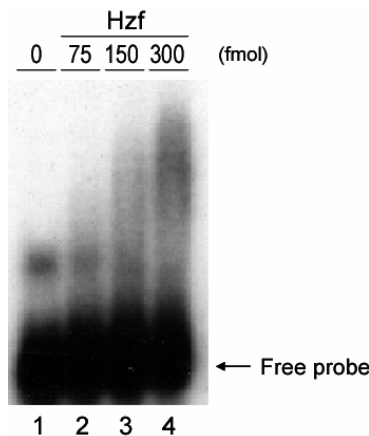


図 4 RNA-ゲルシフトアッセイ。
(プローブ:C/EBP α 3' UTR)

次にこれら分子の結合が mRNA 翻訳に及ぼす影響についてルシフェラーゼレポーターアッセイにより調べた結果、HZF と RNA の結合依存的にルシフェラーゼ mRNA の翻訳が促進されることがわかった。これらの結果から、HZF は脂肪分化過程において C/EBP α mRNA に結合し、その翻訳を正に制御する働きを持つ脂肪分化因子であることが明らかになった。

(2) 生体における HZF タンパク質の役割

生体における HZF の役割について調べるために、HZF ノックアウトマウスの表現型について解析を行った。培養細胞を用いた実験から HZF は脂肪分化に不可欠な役割を持つことが示されたが、成熟個体における白色脂肪組織量に関しては、野生型と HZF ノックアウトマウスの間で差は認められなかった。したがって、生体において HZF は脂肪組織の形成(エネルギー貯蔵)には必ずしも必要ではないことが示された。

生体にとって脂肪組織は極めて重要な内分泌器官として機能している。内分泌器官としての脂肪組織の機能について解析を行うために、血中アディポカイン量を調べたところ、野生型と比較して HZF ノックアウトマウスでは血中レプチン、アディポネクチン共に有意に減少していた (図 5)。したがって HZF は生体において脂肪組織の内分泌器官としての機能が正常に働くために必要であることが示唆された。

脂肪細胞から分泌されるアディポカインは、肝臓や骨格筋などの末梢組織におけるインスリン感受性を決定する働きを持つ。これらアディポカイン分泌に以上が生じると、末梢組織におけるインスリン感受性が惹起されることが知られている。そこで本研究では

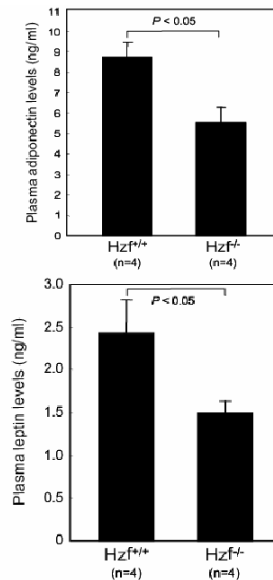


図 5 野生型・HZF ノックアウトマウスにおける血中アディポネクチン (上) およびレプチン (下) 量。

次に HZF ノックアウトマウスの糖代謝機能について調べた。グルコーステストの結果から、HZF ノックアウトマウスは明らかな糖代謝異常を示すことがわかった (図 6)。また、このマウスはインスリンに対する感受性が低下していることも示された。

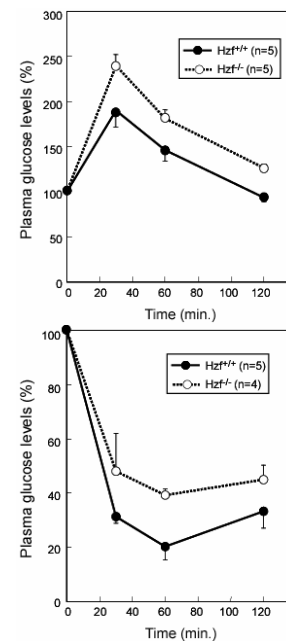


図 6 野生型・HZF ノックアウトマウスにおけるグルコーステスト (上) およびインスリンテスト (下) の結果。

(3) 結論・考察・展望

以上の実験結果から、HZF は脂肪細胞の機能が正常に発揮されるために必要な因子であることが示された。HZF ノックアウトマウスは明らかなインスリン抵抗性と糖代謝異常を示しているが、この表現型はヒトにおける2型糖尿病の症状と酷似しており、この病態の発症と関与する可能性が考えられる。また、複数の連鎖解析の結果から、HZF 遺伝子座を含む領域が2型糖尿病の発症と関連することが示唆されている。

近年、p53 経路を含む複数の癌抑制経路に関わる因子が2型糖尿病などの代謝系疾患に関与することが報告されているが、そのメカニズムに関しては不明である。HZF は癌抑制タンパク質 p53 の標的であることから、HZF が癌抑制経路と代謝系疾患を繋ぐ可能性が考えられる。

また、HZF は mRNA に結合して翻訳を制御することが示されたが、その詳細なメカニズムに関しては不明である。これについて解明するために、HZF タンパク質複合体を精製し、HZF と相互作用をするタンパク質を調べたところ、複数の RNA 結合タンパク質が HZF と同一複合対中に含まれることが明らかになった (未発表)。

今後は HZF を含む癌抑制経路と代謝系疾患の関連、および HZF 相互作用する分子が HZF の機能に対してどの様な機能を持つのかを明らかにすることを課題とする。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Hiroyuki Kawagishi, Takeshi Wakoh, Hatsume Uno, Mitsuo Maruyama, Ayako Moriya, Satoru Morikawa, Hideyuki Okano, Charles J. Sherr, Masatoshi Takagi, Masataka Sugimoto、Hzf regulates adipogenesis through translational control of C/EBP α , The EMBO Journal、27(10)、1481-1490、2008、査読有
(Featured in Cell、133(4)、557、2008)

[学会発表] (計7件)

- ① Masataka Sugimoto、Hzf collaborates with HuR to regulate adipogenesis、BMB2008、2008年12月14日、神戸
- ② Hideaki Nakamura、Physical and functional interactions of RNA-binding proteins Hzf and HuR、BMB2008、2008年12月12日、神戸

- ③ 杉本昌隆、Role of Hzf in adipocyte differentiation、第一回 FANTASY、2008年2月2日、東京
- ④ Masataka Sugimoto、Hzf regulates the translation of C/EBP α mRNA during adipocyte differentiation、BMB2007、2007年12月12日、横浜
- ⑤ Masataka Sugimoto、Hzf regulates the translation of CEBP α mRNA during adipocyte differentiation、The 7th MBSJ Spring Symposium、2007年4月23日、兵庫
- ⑥ Masataka Sugimoto、Role of Hzf in adipocyte differentiation、The 11th Adiposcience Symposium、2006年8月19日、大阪
- ⑦ Takeshi Wakoh、Role of HZF in adipocyte differentiation、20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、2006年6月22日、京都

[その他]

ホームページ

<http://www.nils.go.jp/department/dma/ee.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 昌隆 (SUGIMOTO MASATAKA)

国立長寿医療センター (研究所)・老化機構研究部・代謝研究室・室長

研究者番号：50426491