

機関番号：12301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591076
 研究課題名（和文）PPARの転写共役因子PDIP1KOマウスにおける脂質代謝異常の分子病態解析
 研究課題名（英文）Molecular analyses of the metabolic phenotype of PDIP1 knockout mice
 研究代表者
 佐藤 哲郎（SATO TETSURO）
 群馬大学・医学部・助教
 研究者番号：40302484

研究成果の概要（和文）：

近年私達は、核内受容体 PPAR γ の転写共役因子として PDIP1 を単離した。その生体内機能を同定する目的で、PDIP1 ノックアウト (KO) マウスを樹立し、代謝解析を行った。PDIP1KO マウスは、高脂肪食誘導性肥満ならびに脂肪肝発症に抵抗性を示し、その原因として肝臓における脂質合成の低下、および脂肪酸酸化亢進が関与することが明らかとなった。PDIP1 はメタボリック症候群の新たな治療標的になりうる。

研究成果の概要（英文）：

We recently isolated PDIP1 as a transcriptional cofactor of PPAR γ . To elucidate its physiological function, we generated PDIP1 knockout (KO) mice and analyzed their metabolic phenotypes. KO mice revealed resistance to high-fat diet induced obesity and hepatosteatosis due to reduced lipogenesis and enhanced fatty acid oxidation in the liver. PDIP1 might be a therapeutic target of metabolic syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：核内受容体、転写共役因子、ノックアウトマウス、脂質代謝異常、肥満、脂肪肝、メタボリック症候群

1. 研究開始当初の背景

ペルオキシソーム増殖剤活性化型受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor: PPAR) には、異なる遺伝子により

コードされる PPAR α 、PPAR δ/β ならび PPAR γ という3種のアイソタイプが存在し、それぞれ生体内で特異的な臓器発現様式を示し、異なるリガンドにより生理作用を発揮する。2型糖尿病治療薬として広く臨床応用されている

るチアズリジン系薬剤は、PPAR γ の合成リガンドとして作用することが判明しており、*in vivo*ならびに *in vitro*においてインスリン抵抗性改善作用、脂肪細胞分化促進作用、抗動脈硬化作用、抗炎症作用および腫瘍細胞アポトーシス増強作用など多彩な作用を惹起する。PPAR γ のリガンド結合領域 (ligand-binding domain: LBD)に位置する activation function2 (AF2)に結合する転写共役因子として、thyroid hormone receptor-associating protein (TRAP)220/PPAR γ -binding protein、steroid receptor coactivator-1、transcriptional intermediary factor 2、CREB-binding protein-binding protein (CBP)/p300、および PPAR γ -interacting protein が同定され、近年それぞれの共役因子ノックアウト (KO)マウスが樹立され、PPAR γ の生体内機能におけるこれら転写共役因子の果たす役割が解析されている。

一方、核内受容体の DNA 結合ドメイン (DNA-binding domain: DBD)はプロモーター上のホルモン応答領域への結合に必須であるばかりでなく、他の転写因子との直接的な蛋白-蛋白結合領域として機能することも知られている。PPAR γ の DBD に結合する転写共役因子として褐色脂肪組織に高発現を示す PPAR γ -interacting protein-1 (PGC-1) α が同定され、KO マウスの解析からその生体内機能が明らかとなっている。PGC-1 α は褐色脂肪組織以外に、肝臓、心臓ならびに横紋筋といった限られた臓器発現を示すが、PPAR γ の多彩な生体内機能を考えると PGC-1 α 以外にも PPAR γ の DBD に結合する共役因子が存在する可能性が考えられた。そこで私たちは、ヒト PPAR γ の DBD からヒンジ領域の一部をバイトとし、酵母ツーハイブリッド法を用いて HeLa 細胞 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、陽性

クローンを得た。このうちの1クローン (2,681 base pair)は、当時機能未知であった expression sequence tag KIAA1769 のカルボキシ末端部と100%相同性を示し、この蛋白を PPAR γ -DBD-interacting protein1 (PDIP1)と命名した。ヒト PDIP1 遺伝子は20番染色体短腕に位置し、種々のヒト由来培養細胞においてスプライシングの違いによりアミノ末端構造が異なる PDIP1 α (2,080 アミノ酸、231 キロダルトン [kDa])と PDIP1 β (2,649 アミノ酸、295 kDa)という2つのアイソフォームが存在する。構造上 PDIP1 には ATP 結合部位、RNase B (RNB)ドメイン、および2カ所の DNA ヘリケースドメインが存在し、PDIP1 mRNA はヒトにおいてユビキタスな発現を認めたが、特に肝臓、心臓、膵臓、ならびに横紋筋といった全身の代謝制御臓器に高発現していた。また PDIP1 は、3T3-L1 脂肪細胞およびマクロファージに分化する THP-1 細胞において、CBP や TRAP220 同様に分化の過程を通してほぼ一定の発現を認めた。更に培養細胞系を用いた検討において、PDIP1 が PPAR γ のみならず複数の NR の転写活性型共役因子として機能することを明らかとした (Endocrinology, 2006)。興味あることに、PDIP1 は米国の Reddy らのグループによって生化学的手法を用いて精製されたリガンド依存性に全長 PPAR α に会合するラット肝臓核蛋白複合体中の 285 kilo-dalton (kDa)の分子量を示す PPAR α -interacting complex 285 (PRIC285)のヒトオルソログであることも判明した。Reddy らは近年、同じ蛋白複合体中の PRIC320 の機能解析を行い、培養細胞系において PRIC320 が PPAR family の中で PPAR α 優位の転写活性型共役因子として機能することを報告した。以上の成績より PDIP1/PRIC285 ならびに PRIC320 は、共に DNA ヘリケースドメインを有する蛋白で、新たな

転写共役因子ファミリーに属することが示唆された。

2. 研究の目的

生体内における PDIP1 の機能を明らかにする目的で、相同遺伝子組み換え法を用いて PDIP1KO マウスを樹立し、標準餌下および高脂肪食負荷時におけるそのエネルギー代謝調節機構異常について分子病態解析を行う。

3. 研究の方法

KO マウス作成を開始した当時、マウス PDIP1 全長 cDNA 塩基配列はデータベースに未登録であったため、分化誘導した 3T3L1 脂肪細胞より long RT-PCR を用いてマウス PDIP1 cDNA をクローニングし、その全塩基配列を決定し (accession no. AB201714)、更にマウスゲノムデータベースとの比較によりマウス PDIP1 遺伝子構造を明らかとした。マウス PDIP1 蛋白は 2,947 アミノ酸 (331kDa) からなり、アミノ酸レベルでヒト PDIP1 β と 71% のホモロジーを有し、ヒト PDIP1 同様の位置に ATP 結合部位、RNB ドメインおよび DNA ヘリケースモチーフが保存されていた。マウスにおいては横紋筋を除き、ヒト同様に肝臓、心臓、および脂肪組織に PDIP1 mRNA の高発現を認め、培養細胞系においてマウス PDIP1 も PPAR γ のリガンド依存性転写活性化を容量依存的に増強することを確認した。マウスではアミノ末端構造の異なる PDIP1 アイソフォームの存在を RT-PCR 法にて確認できなかったが、その存在も危惧して、アミノ末端を大きく欠失させるように PDIP1 遺伝子の開始コドンを含むエキソン 2-エキソン 7 をネオマイシンカセットに置き換えるターゲットベクターを構築した。相同遺伝子組み換え法を用いてキメラマウスを作製し、

C57BL/6 マウスと交配して F1 ヘテロ PDIP1KO マウスを得た。更に、ヘテロ KO マウス同士の交配により PDIP1 ホモ KO マウスを樹立した。予測どおりに相同遺伝子組み換えがおこなっていることを KO マウスのゲノム DNA を用いたサザンブロット法にて確認し、肝臓 PDIP1 mRNA の消失をノーザンブロット法にて確認した。PPAR γ や CBP、あるいは TRAP220 ホモ欠失マウスは胎生致死となることが報告されているが、PDIP1 ヘテロ・ホモ欠失マウスはほぼメンデルの法則に従って出生したことから、胎生期の PPAR γ 機能において PDIP1 は必須ではないことが推察された。

その後 C57BL/6 マウスとバッククロスを繰り返して、全ての表現型解析は F6 以降の KO マウスを用いて行った。

4. 研究成果

標準餌飼育下でホモ KO マウスは、同胞の野生型 (WT) マウスに比べ軽度のやせ傾向を呈したが、解剖学的に明らかな異常を認めず、雌雄ともに妊孕性を有し、摂食量、運動量、耐糖能あるいはインスリン感受性に有意差を認めなかった。また脂肪重量も WT マウスと有意差を認めず、血清インスリン、レプチン、およびアディポネクチン濃度にも有意差を認めなかった。しかしながら興味あることに、血清総コレステロールと HDL コレステロール値は正常であったが、中性脂肪 (triacylglycerol: TG) の有意な低下を認めたことから、KO マウスにおいて何らかの脂質代謝異常が存在する可能性が示唆された。そこで高脂肪食 (high-fat diet: HFD) 負荷を行ったところ、PDIP1 ホモ KO マウスは WT マウスに比べ、摂食量や運動量に有意差を認めなかったが、15 週齢以降有意な肥満抵抗性、脂肪肝抵抗性、良好な耐糖能ならびにインスリン感受性を示した。HFD 下においても KO マウ

スは、有意な低 TG 血症を呈し、白色脂肪重量と大型白色脂肪細胞数の減少を認めた。HFD 投与により、WT において肝臓 PDIP1 mRNA 発現は増加することも明らかとなった。HFD 下で、KO マウス肝臓では、TG 合成系酵素群の発現低下に加え、脂肪酸酸化に關与する遺伝子群発現の増加を認め、実際に肝臓における AMP-activated protein kinase (AMPK) 活性化と脂肪酸酸化亢進を認めた。一方、KO マウスの褐色脂肪組織における適応熱産生に關与する遺伝子発現、および骨格筋における AMPK 活性化は WT マウスと差を認めなかった。

以上の結果より、全身性 PDIP1 欠失は肝臓特異的に AMPK を活性化し、TG 合成低下および脂肪酸酸化亢進をきたして、HFD 誘導性肥満に対し抵抗性を惹起することが明らかとなった。生体内で PDIP1 は高脂肪食摂取による肥満増悪性転写共役因子として機能し、メタボリック症候群の新たな治療標的になる可能性が示唆された。

研究代表者は、これらの研究成果発表をシンポジストとして 14th International Congress of Endocrinology 2010 Official Satellite Symposium、および 2010 年第 31 回日本肥満学会において行い、現在 revised version 論文を投稿中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件)

① Hashimoto K, Matsumoto S, Ishida E, Miura A, Horiguchi K, Ozawa A, Shibusawa N, **Satoh T**, Yamada M, Yamada S, Mori M. Liver X receptor- α/β expression ratio is increased in ACTH-secreting pituitary adenomas. *Neurosci Lett*. 査読有, Vol. 494, 2011, pp34-37

② **佐藤哲郎**、吉野 聡、森 昌朋. 転写共役因子とアディポサイエンス. *Adiposcience*, 査読無, Vol. 26, 2010, pp. 134-141

③ **佐藤哲郎**、登丸琢也、吉野 聡、片野明子、森 昌朋. 新たな転写共役因子 PDIP1 と疾患. *ホルモンと臨床*, 査読無, Vol. 58, 2010, pp. 149-156

④ Nakajima Y, Yamada M, Horiguchi K, **Satoh T**, Hashimoto K, Tokuhiko E, Onigata K, Mori M. Resistance to thyroid hormone due to a novel thyroid hormone receptor mutant in a patient with hypothyroidism secondary to lingual thyroid and functional characterization of the mutant receptor. *Thyroid*, 査読有, Vol. 20, 2010, pp. 917-26

⑤ Tsuchiya T, Shimizu H, Yamada M, Osaki A, Oh-I S, Ariyama Y, Takahashi H, Okada S, Hashimoto K, **Satoh T**, Kojima M, Mori M. Fasting concentrations of nesfatin-1 are negatively correlated with body mass index in non-obese males. *Clin Endocrinol*, 査読有, Vol. 73, 2010, pp. 484-490

⑥ Yamada M, Horiguchi K, Umezawa R, Hashimoto K, **Satoh T**, Ozawa A, Shibusawa N, Monden T, Okada S, Shimizu H, Mori M. Troglitazone, a ligand of peroxisome proliferator-activated receptor γ , stabilizes NUCB2 (Nesfatin) mRNA by activating the ERK1/2 pathway: isolation and characterization of the human NUCB2 gene.

Endocrinology, 査読有, Vol. 151, 2010, pp. 2494-2503.

⑦ Hashimoto K, Ishida E, Miura A, Ozawa A, Shibusawa N, **Satoh T**, Okada S, Yamada M, Mori M. A liver X receptor (LXR)-beta alternative splicing variant (LXRBSV) is preferentially expressed in the pituitary.

Biochem Biophys Res Commun, 査読有, Vol. 394, 2010, pp. 548-552

⑧ Hashimoto K, Ishida E, Matsumoto S, Shibusawa N, Okada S, Monden T, Satoh T, Yamada M, Mori M. A liver X receptor (LXR)-beta alternative splicing variant (LXRBSV) acts as an RNA co-activator of LXR-beta. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, Vol. 390, 2009, pp. 1260-1265

⑨ Satoh T, Yoshino S, Katano A, Ishizuka T, Tomaru T, Shibusawa N, Hashimoto K, Yamada M, Mori M. Isolation of a novel leptin receptor gene promoter preferentially functioning in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, Vol. 389, 2009, pp. 673-677

⑩ Satoh T, Ishizuka T, Yoshino S, Tomaru T, Nakajima Y, Shibusawa N, Hashimoto K, Yamada M, Mori M. Roles of proteasomal 19S regulatory particles in promoter loading of thyroid hormone receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, Vol. 386, 2009, pp. 697-702

⑪ Satoh T, Ishizuka T, Tomaru T, Yoshino S, Nakajima Y, Hashimoto K, Shibusawa N, Monden T, Yamada M, Mori M. Tat-binding protein-1 (TBP-1), an ATPase of 19S regulatory particles of the 26S proteasome, enhances androgen receptor function in cooperation with TBP-1-interacting protein/Hop2. *Endocrinology*, 査読有, Vol. 150, 2009, pp. 3283-3290

⑫ Hashimoto K, Ishida E, Matsumoto S, Okada S, Yamada M, Satoh T, Monden T, Mori M. Carbohydrate response element binding protein gene expression is positively regulated by thyroid hormone.

Endocrinology, 査読有, Vol. 150, 2009, pp. 3417-3424

⑬ Horiguchi K, Yamada M, Satoh T, Hashimoto K, Hirato J, Tosaka M, Yamada S, Mori M. Transcriptional activation of the mixed lineage leukemia-p27Kip1 pathway by a somatostatin analogue. *Clin Cancer Res*, 査読有, Vol. 15, 2009, pp. 2620-2629

⑭ Umezawa R, Yamada M, Horiguchi K, Ishii S, Hashimoto K, Okada S, Satoh T, Mori M. Aberrant histone modifications at the thyrotropin-releasing hormone gene in resistance to thyroid hormone: analysis of F455S mutant thyroid hormone receptor.

Endocrinology, 査読有, Vol. 150, 2009, pp. 3425-3432

⑮ Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, Eguchi H, Kato I, Inoue K, Satoh T, Okada S, Yamada M, Yada T, Mori M. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology*, 査読有, Vol. 150, 2009, pp. 662-671

⑯ Matsumoto S, Hashimoto K, Yamada M, Satoh T, Hirato J, Mori M. Liver X receptor-alpha regulates proopiomelanocortin (POMC) gene transcription in the pituitary.

Mol Endocrinol, 査読有, Vol. 23, 2009, pp. 47-60

⑰ Okamura S, Sawada Y, Satoh T, Sakamoto H, Saito Y, Sumino H, Takizawa T, Kogure T, Chaichantipyuth C, Higuchi Y, Ishikawa T, Sakamaki T. Pueraria mirifica phytoestrogens improve dyslipidemia in postmenopausal women probably by activating estrogen receptor subtypes.

Tohoku J Exp Med, 査読有, Vol. 216, 2008, pp. 341-351

⑱ Hosoya T, Monden T, Fukabori Y, Hashimoto K, **Satoh T**, Kasai K, Yamada M, Mori M. A novel splice variant of the nuclear coactivator p120 functions strongly for androgen receptor: characteristic expression in prostate disease. *Endocr J*, 査読有, Vol. 55, 2008, pp. 657-665

[学会発表] (計 48 件)

- ① **佐藤哲郎**, Energy eloquence の分子基盤と肥満 PDIP1 とエネルギーエロクエンズ、第 31 回日本肥満学会、2010. 10. 1、前橋テルサ (群馬県)、シンポジスト
- ② **佐藤哲郎**, メタボローム解析を用いた PDIP1KO マウスにおける高脂肪食誘導性脂肪肝抵抗性の分子病態解析、第 31 回日本肥満学会、2010. 10. 1、前橋テルサ (群馬県)
- ③ 吉野 聡、PDIP1 ノックアウトマウスは低 TG 血症と高脂肪食誘導性肥満抵抗性と脂肪肝抵抗性を示す、第 31 回日本肥満学会、2010. 10. 1、前橋テルサ (群馬県)
- ④ 片野明子、核内受容体 PPAR γ の転写活性化型共役因子 PDIP1 結合蛋白の同定、第 31 回日本肥満学会、2010. 10. 1、前橋テルサ (群馬県)
- ⑤ 片野明子、マウス PPAR γ -DNA-binding domain-interacting protein1 (PDIP1) のクローニングとその発現および *in vitro* 機能解析、第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会、2010. 5. 28、ホテルグランヴィア岡山 (岡山県)
- ⑥ **Tetsuro Sato**, Masatomo Mori, Deficiency of the transcriptional coregulator PDIP1 prevents high-fat

diet-induced obesity. Obesity and Metabolic Syndrome, 14th International Congress of Endocrinology Official Satellite Symposium, 2010. 3. 31, Shiran Kaikan (Kyoto)、シンポジスト

- ⑦ 吉野 聡、PPAR γ の転写活性化型共役因子 PDIP1 ノックアウトマウスにおける低 TG 血症および肥満抵抗性の分子病態解析、第 82 回日本内分泌学会学術集会、2009. 4. 24、ベイシア文化ホール (群馬県)
- ⑧ **佐藤哲郎**, マウスレプチン受容体遺伝子プロモーター領域の解析、第 82 回日本内分泌学会学術集会、2009. 4. 23、前橋商工会議所 (群馬県)
- ⑨ 吉野 聡、PPAR γ の新規転写活性化型共役因子 PDIP1 ノックアウトマウスにおける低 TG 血症の分子病態解析、第 81 回日本内分泌学会学術総会、2008. 5. 6、弘前グランドホテル (青森県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 哲郎 (SATO TETSURO)
群馬大学・医学部・助教
研究者番号：40302484