

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：17401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791037
 研究課題名（和文） CREB 転写共役因子 CRT3 の脂肪細胞分化・肥大化における役割の検討
 研究課題名（英文） Role of cAMP response element binding (CREB) coactivator CRT3 on adipogenesis
 研究代表者
 井形 元維 (IGATA MOTYUKI)
 熊本大学・医学部附属病院・特任助教
 研究者番号：40599099

研究成果の概要（和文）：

cAMP-CREB シグナルは脂肪細胞分化や脂肪分解における役割が知られているが、CREB 転写共役因子 CRT3 の脂肪細胞における役割に関しては知られていない。脂肪組織に豊富に発現している CRT3 を中心にその発現制御および脂肪細胞分化に対する影響を検討した。3T3L1 細胞で CRT3 をノックダウンすると脂肪細胞の分化が抑制された。またプロモーター解析では CRT3 は CREB 結合領域を持ち、CRT3 自身で正に制御されていることが示された。

研究成果の概要（英文）：

It is known that cAMP-CREB signal has a role in adipocyte differentiation and lipolysis. We studied the role of CREB co-activator CRT3 in adipocyte, especially on adipogenesis. In this project, we showed that adipocyte differentiation was inhibited by knockdown of CRT3 in 3T3L1 cells. In the promoter analysis of CRT3 gene, CRT3 promoter has a cAMP responsive element (CRE) and is regulated positively by itself through the CRE.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |

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：メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

肥満とは脂肪組織が過剰となった状態を指し、糖尿病、脂質異常症、高血圧症を主徴とするメタボリックシンドロームの原因となり、現在世界中で大きな社会問題となっている。肥満は、脂肪細胞の増加と脂肪細胞の

肥大化によって規定されているため、前駆脂肪細胞の増殖や分化、脂肪細胞の肥大化、アポトーシス等の機構による生体からの排除といった脂肪細胞のライフサイクルを理解することは肥満の病態解明に不可欠である。

セカンドメッセンジャーである cAMP は脂

肪組織において前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化やホルモン感受性リパーゼを介しての脂肪分解を促進させる。cAMP シグナルは PKA を活性化、PKA は転写因子 CREB のセリン 133 をリン酸化し CBP (CREB binding protein)との結合を促進させ、下流の遺伝子発現をオンにする。その後、CREB の KID domain のリン酸化とは独立して CRE 依存性転写を活性化させる新規分子 CRTC (CREB regulated transcriptional coactivator) が報告された (Michael D. Conkright et al, Molecular Cell, 2003)。CRTC には 3 つのホモログが存在し、これまで CRTC2 を中心に肝での役割が報告されてきた。CREB は肝糖新生を制御する重要な転写因子のひとつであるが、CRTC2 は CREB の転写因子としての活性を調節し糖新生を制御している主要な分子であることが報告された (SH Koo et al, Nature, 2005)。

2. 研究の目的

食生活の欧米化や運動量の減少等により肥満症患者が増加している現在、脂肪細胞の分化・脂肪細胞代謝制御のメカニズムを解明することは肥満症の予防・治療の観点から重要といえる。cAMP-CREB シグナルは脂肪細胞分化や脂肪分解において重要な役割を果たすことが知られているが、CRTC の脂肪細胞における役割に関しては知られていない。申請者らは CRTC3 が脂肪細胞に強く発現していることを明らかにし、CRTC3 ノックアウトマウスが高脂肪食による肥満に抵抗性であることを見出した。そこで本研究では脂肪細胞における CRTC3 の役割を、特に脂肪細胞の分化に対して、さらに CRTC3 の発現制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脂肪細胞分化過程における CRTC3 発現変化および CRTC3 の細胞内局在を調べる

マウス由来培養前駆脂肪細胞株 3T3L1 細胞分化過程における CRTC3 の発現をウェスタ

ンブロット法および QPCR 法を用い検討する。また免疫染色法にて CRTC3 の細胞内局在を調べる。さらに細胞質・核分画に分けて蛋白を回収、ウェスタンブロット法にて CRTC3 の細胞内局在を調べる。

(2) レンチウイルス作製、標的細胞への感染

CRTC3 shRNA 又は cDNA を組み込んだレンチウイルスベクター及びウイルス構造遺伝子をもつ helper plasmid (gag-pol, REV, VSVG) を HEK293T 細胞に同時にトランスフェクションする。培養上清を回収しウイルス液とし 3T3L1 細胞に感染させる。

(3) 3T3L1 脂肪細胞分化における CRTC3 ノックダウンの影響の解析

CRTC3 をノックダウンした 3T3L1 前駆脂肪細胞の分化を誘導。脂肪細胞分化マーカーの継時的発現変化を検討する。また Oil Red O 染色にて細胞内脂肪蓄積を評価する。さらに CRTC2 もノックダウンを行い、同様に解析を行う。

(4) CRTC3 発現制御の解析

CRTC3 promoter を単離し、pGL3-Luci-vector に組み込む。転写因子結合領域の検索、deletion mutant や mutagenesis により CRTC3 の転写制御機構を解明する。

4. 研究成果

Expression of TORC2 and TORC3 protein during 3T3L1 cells differentiation

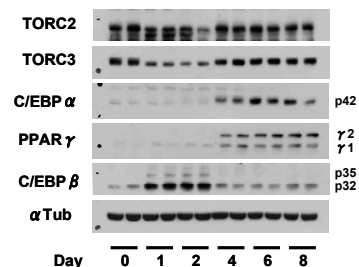


図 1. 脂肪細胞分化過程における CRTC3 発現変化

3T3L1 脂肪細胞分化開始後 1-2 日後では、

CRTC3 は脱リン酸化を受けバンドの下方シフトを認め、また蛋白量も減少していた。CRTC2 も 3T3L1 細胞に発現しており、脂肪細胞分化過程において CRTC3 と同様の発現変化を認めた。

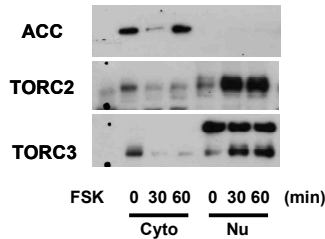


図 2. 3T3L1 脂肪前駆細胞における CRTC3 の細胞内局在変化

CRTC3 は Ser162 がリン酸化されていることで通常状態においては細胞質内に存在している。図 2 で示すように Forskolin 刺激で CRTC3 は脱リン酸化を受け細胞質から核内に移行する。CRTC2 も同様の細胞内移行を示す。免疫染色法では CRTC2 は Forskolin 刺激で細胞質から核内への移行を明らかに観察することができた。一方で CRTC3 に関しては Forskolin 刺激前より核に強く染まり、刺激後でも明らかな移動を認めなかった。

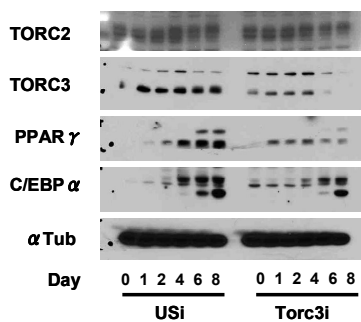


図 3. CRTC3 ノックダウンによる脂肪分化マーカーへの影響

まずレンチウイルスベクターを用いた CRTC3 の発現抑制を確認した。CRTC3 をノックダウンした 3T3L1 脂肪細胞に分化誘導をかけたところ、図 3 に示すように C/EBPα、PPARγ の発現が低下していた。Oil Red O 染色により脂肪蓄積の減少も確認した。さらに CRTC2 においても同様の検討を行った。その結果、

CRTC2 をノックダウンした脂肪細胞においてはコントロールの細胞と比較し分化の程度に差を認めなかった。今後 CRTC2 と CRTC3 の脂肪細胞における役割の差異について明らかにしていくつもりである。

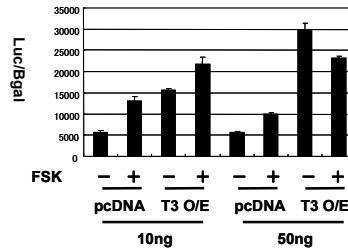


図 4. FSK 刺激、CRTC3 過剰発現による CRTC3 promoter 活性の上昇

human CRTC3 promoter は cAMP responsive element (CRE) を同定。forskolin 刺激によりプロモーター活性は 2-3 倍に上昇、CRTC3 の過剰発現により更なる活性上昇を認めたことより、CRTC3 は自身により正に制御されている可能性が示唆された。また CRE 領域前後で deletion mutant を作成、CRE 領域を欠失したルシフェラーゼベクターでは、forskolin による活性上昇、CRTC3 過剰発現による活性上昇は失われた。現在他の転写因子の結合配列も同定しており、更なる CRTC3 の転写制御機構解明を進める。

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 2 件)

- ① Kawasaki S, Motoshima H, Hanatani S, Takaki Y, Igata M, Tsutsumi A, Matsumura T, Kondo T, Senokuchi T, Ishii N, Kinoshita H, Fukuda K, Kawashima J, Shimoda S, Nishikawa T, Araki E. Regulation of TNFα converting enzyme activity in visceral adipose tissue of obese mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 430:1189-94, 2013 (査読あり)

② Tsutsumi A, Motoshima H, Kondo T, Kawasaki S, Matsumura T, Hanatani S, Igata M, Ishii N, Kinoshita H, Kawashima J, Taketa K, Furukawa N, Tsuruzoe K, Nishikawa T, Araki E. Caroric restriction decreases ER stress in liver and adipose tissue in ob/ob mice. Biochem Biophys Res Commun. 404: 339-344, 2011 (査読あり)

〔学会発表〕(計2件)

① 井形元維、本島寛之、川崎修二、花谷聡子、高木優樹、水流添覚、西川武志、荒木栄一. DPP-4 阻害薬による尿中アルブミン増加阻止 -直接的な腎保護作用の可能性-. 第56回日本糖尿病学会年次学術集会. 2013/5/16-18. メルパルク熊本(熊本市)

② 井形元維、本島寛之、湯浅智之、近藤龍也、河島淳司、松村剛、前田貴子、川崎修二、花谷聡子、石井規夫、下田誠也、古川昇、西川武志、蛭名洋介、荒木栄一. 悪性腫瘍合併糖尿病患者における血糖コントロール指標としての血中可溶性インスリン受容体の意義. 第55回日本糖尿病学会年次学術集会. 2012/5/17-19. パシフィコ横浜(横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井形 元維 (IGATA MOTOYUKI)

熊本大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：40599099