

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790906

研究課題名(和文)核内受容体転写共役因子PDIP1の脂肪細胞における役割の解明

研究課題名(英文)Roles of PDIP1, a cofactor for PPAR γ , in adipocytes

研究代表者

登丸 琢也(Tomaru, Takuya)

群馬大学・医学部附属病院・その他

研究者番号：70594399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：肥満症は糖尿病、高血圧、脂質異常症を合併し、最終的に心筋梗塞や脳梗塞などの致命的な病態へと至る。脂肪細胞分化を主に調節するのはPPAR γ であるが、近年我々はその作用を助ける遺伝子PDIP1を見出した。本研究ではRNA干渉法を用いて脂肪細胞の前駆細胞でPDIP1遺伝子の発現を特異的に抑えると中性脂肪の蓄積が減少し、脂肪細胞特異的遺伝子の発現が減少したことから、PDIP1は脂肪細胞の分化を助ける働きがあることが判明した。またPDIP1遺伝子を人工的に欠失させたマウスの白色脂肪組織と野生型マウスの白色脂肪組織の全遺伝子の発現を比較し、PDIP1により制御される遺伝子を網羅的に同定した。

研究成果の概要(英文)：Obesity increases risk of developing diabetes mellitus, hypertension and dyslipidemia, which finally leads to life-threatening disease such as myocardial or cerebral infarction. PPAR γ has been shown to a master regulator of adipogenesis. We recently identified PDIP1 as a cofactor for PPAR γ . In this study we made PDIP1-depleted preadipocytes using RNA interfering method, and subjected them to differentiation. PDIP1-depleted adipocytes had less lipid droplets, and lower adipocyte-specific gene expression compared to control cells. These results suggest that PDIP1 is required for adipogenesis. We also compared the gene expression profile of fat tissue of PDIP1-depleted mice and that of wild type mice in genome-wide manner, and identified PDIP1-regulated genes.

研究分野：代謝学

科研費の分科・細目：メタボリックシンドローム

キーワード：脂肪細胞 PPAR γ 転写共役因子 PDIP1

1. 研究開始当初の背景

肥満を基礎にインスリン抵抗性を生じ、2型糖尿病、高血圧、脂質異常症の合併へと至るメタボリックシンドロームは現代社会における大きな医療問題となっている、従って脂肪細胞の分化とその機能の解明し、インスリン抵抗性とそれに引き続くメタボリックシンドロームの発症機構を解明することは極めて重要と考えられる。

核内受容体ファミリーの一員である PPAR γ は脂肪細胞分化に必要十分であり、脂肪細胞分化のマスター転写因子と考えられている (Tontonoz P et al. *Cell*, 1994)。またインスリン抵抗性改善薬として臨床的に使用されていたチアゾリジン系薬剤が PPAR γ のリガンドであることも明らかとなり (Lehmann JM et al., *JBC*, 1995)、PPAR γ は薬理学的にも重要な標的としても注目されてきた。PPAR γ の作用の発現には転写共役因子が必須であると考えられている。近年我々は酵母ツーハイブリッド法を用いて、PPAR γ の DNA 結合ドメインに結合する機能未知の蛋白質、PPAR γ DBD interacting protein 1 (PDIP1) をクローニングした (Tomaru et al., *Endocrinology* 2006)。培養細胞を用いたレポーターアッセイでは PDIP1 は PPAR γ の転写共役因子として機能することが明らかになっている。また我々は遺伝子の相同性を元にマウス PDIP1 遺伝子をクローニングした。更に PDIP1 の生体内での機能を解明するため、我々は PDIP1 遺伝子欠損 (-/-) マウスを樹立した。PDIP1 -/- マウスは正常に成育し、標準餌下では明らかな解剖学的異常を認めなかった。白色脂肪組織の重量も野生型と変化はなかった。しかし高脂肪食負荷時に、PDIP1 -/- マウスは野生型マウスに比べ明らかな肥満抵抗性、脂肪肝抵抗性を示し、血清中性脂肪濃度は低下し、良好な耐糖能を示した。PDIP1 -/- マウスでは野生型に比べ白色脂肪組織の重量は著明に低下していた。PDIP1 -/- マウスでは肝臓で AMP-activated kinase 活性化と脂肪酸酸化の亢進が認められ、酸素消費量が増大しており、これらの結果は PDIP1 -/- の表現系に合致すると考えられる (Yoshino et al., paper in review)。しかし、PPAR γ の主要な作用部位であり、また PDIP1 遺伝子が比較的強く発現している脂肪組織での PDIP1 の役割やその標的遺伝子については十分に検討されていない。またこれまでに PDIP1 のクロマチン上での結合部位、つまり直接の標的遺伝子は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では PDIP1 の脂肪細胞での役割を解明することを目的とするが、具体的には (1) PDIP1 が脂肪細胞分化に与える影響を、形態学的に、また脂肪細胞特異的遺伝子の発現を指標に検討する。(2) DNA マイクロアレイを用いて PDIP1 の標的遺伝子群を網羅的に

同定する。さらに pathway 解析、gene ontology 解析などを行い標的遺伝子群の機能的 pathway を統計学的に明らかにする。(3) クロマチン免疫沈降法と次世代シーケンスを組み合わせた方法 (ChIP-seq 法) を用いて PDIP1 の脂肪細胞における全遺伝子上の結合部位を明らかにする。これらの結合部位を PPAR γ の結合部位 (Lefterova et al., *Gene and Dev*, 2008) や種々のヒストン修飾部位 (Steger et al., *Gene and Dev*, 2010) と比較する。さらに PDIP1 結合部位に濃縮されている転写因子の結合配列をコンピュータプログラムで解析することにより、脂肪細胞内で PDIP1 が結合する転写因子を明らかにする。

3. 研究の方法

1) PDIP1 の脂肪細胞分化に及ぼす影響 3T3-L1 前駆脂肪細胞にコントロールもしくは PDIP1 特異的な siRNA を electroporation 法にて導入する。siRNA を導入した前駆脂肪細胞は翌日に confluent になるように培養プレートに蒔き、2日後に標準的な方法で脂肪細胞に分化させる。またこの時に、PDIP1 が knock down されていることを定量的 PCR 法で確認する。分化 8 日後にコントロールと PDIP1 特異的 knock down を行った細胞の脂肪細胞へ分化能を比較する。具体的には顕微鏡による脂肪的の形成など形態学的変化の比較、oil red O 染色による中性脂肪含有量の比較を行う。さらに RNA 及び蛋白質を抽出し、定量的 PCR 法やウェスタンブロット法で脂肪細胞特異的な遺伝子の発現変化を検討する。

2) 脂肪細胞において PDIP1 で制御される遺伝子の網羅的同定

実験には標準餌または高脂肪食負荷した 20 週齢の野生型または PDIP1 -/- 雄マウスを準備する (各 N=5)。マウスを安楽死させた後、精巣上体周囲の白色脂肪組織から RNA を抽出する。それぞれの群の RNA を混合したのち、マイクロアレイ解析を行い、両群において遺伝子発現に相違があるか検討する。その結果得られた PDIP1 により制御される遺伝子群の機能を Gene ontology 解析や pathway 解析などの統計学的手法を用いて解析する。発現に優位な変化を認めた遺伝子に関しては定量的 PCR にて遺伝子発現の変化を確認する。さらにこれらの中に、これまでに既知の PPAR γ の標的遺伝子があるか調べ、PDIP1 遺伝子欠損で脂肪組織内の PPAR γ 転写機能が変化を受けていないか検討する。

3) 脂肪細胞における PDIP1 結合部位の網羅的同定

3T3-L1 脂肪細胞から標準的な方法を用いてクロマチンを抽出し、PDIP1 特異的な抗体を用いて免疫沈降を行う。免疫沈降で得られたクロマチンに脱クロスリンク処理し DNA を

精製後、次世代シーケンサーで配列解析を行う。STARなどのコンピュータプログラムによる解析により、全遺伝子上のPDIP1結合部位の配列を得る(Steger DJ et al., *Genes and Dev* 2008)。次にChIP-qPCR法で、PDIP1の結合を確認する。実際に得られた結合部位に一番近い遺伝子を抽出し、Gene ontology解析を行うことによりPDIP1標的遺伝子群の機能を推定する。更に得られた配列をAsap等のプログラムで解析し(Marstrand et al., *Prostate* 2008)得られたPDIP1配列に共通の転写因子結合配列を抽出し、PPAR γ 結合配列があるか、また他の核内受容体や転写因子の配列があるか等を検討する。更に得られたデータをPPAR γ や種々のクロマチン修飾のChIP-seqのデータベースと比較検討する。

4. 研究成果

1) PDIP1の脂肪細胞分化に及ぼす影響

マウスPDIP1に特異的なsiRNAとコントロールsiRNAを2種類作製し、エレクトロポレーション法にて3T3-L1前駆脂肪細胞に導入した。2日後にRNAを抽出し、定量的PCR法にてPDIP1をノックダウンした3T3-L1前駆脂肪細胞ではコントロールに比べPDIP1 mRNAが約50-60%ノックダウンされていることを確認した。次にPDIP1をノックダウンした3T3-L1前駆脂肪細胞を標準的な方法で脂肪細胞へ分化誘導を行った。分化誘導後6日後にoil red O染色を行ったところ、PDIP1をノックダウンした細胞ではコントロールに比べ脂肪滴の含有量が有意に低下していた。また定量的PCR法でPDIP1ノックダウンした3T3-L1脂肪細胞ではコントロールに比べ*Fabp4*, *Adipoq*, *Retn*, *Pparg*などの脂肪細胞特異的遺伝子の発現がそれぞれ約40-50%、30-40%、25-50%、約20-50%低下していた。以上のことからPDIP1は脂肪細胞分化を促進的に制御する可能性が示唆された。

2) 脂肪細胞においてPDIP1で制御される遺伝子群の網羅的同定

雄の野生型マウス及びPDIP1欠失マウスに標準餌または高脂肪食を負荷した(n=5)。20週齢でマウスを安楽死させた後、精巢上体周囲の白色脂肪組織からRNAを抽出した。それぞれの群のRNAを混和した後、DNAマイクロアレイ解析を行った。2倍以上または1/2以下を有意な変動とすると、標準餌では1362個、高脂肪食負荷では1626個のPDIP1で制御する可能性がある遺伝子を同定した。さらにこれらの遺伝子群に対してGene ontology解析とPathway解析を行い、PDIP1の機能的pathwayを統計学的に明らかにした。

3) 脂肪細胞におけるPDIP1結合部位の網羅的同定

PDIP1に対するポリクローナル抗体を作製した。ChIP assayでPDIP1が*Fabp4*プロモータ

ーのPPAR γ 結合部位にリクルートすることを確認した(Katano-Toki et al., *Mol Endo* 2013)。現在、ChIP-seq法によるPDIP1結合部位の網羅的同定を試みている。

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 5件)

Katano-Toki A, Satoh T, Tomaru T, Yoshino S, Ishizuka T, Ishii S, Ozawa A, Shibusawa N, Tsuchiya T, Saito T, Shimizu H, Hashimoto K, Okada S, Yamada M, Mori M. THRAP3 interacts with HELZ2 and plays a novel role in adipocyte differentiation. *Mol Endocrinol.*, 査読あり, 27(5), 2013, 769-80.
doi: 10.1210/me.2012-1332.

Yamada M, Nakajima Y, Taguchi R, Okamura T, Ishii S, Tomaru T, Ozawa A, Shibusawa N, Yoshino S, Toki A, Ishida E, Ozawa A, Hashimoto K, Satoh T, Mori M. KCNJ5 mutations in aldosterone- and cortisol-co-secreting adrenal adenomas. *Endocr J.*, 査読あり, 59(8), 2013, 735-41.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/59/8/59_EJ12-0247/_article

Nakajima Y, Yamada M, Taguchi R, Shibusawa N, Ozawa A, Tomaru T, Hashimoto K, Saito T, Tsuchiya T, Okada S, Satoh T, Mori M. NR4A1 (Nur77) mediates thyrotropin-releasing hormone-induced stimulation of transcription of the thyrotropin beta gene: analysis of TRH knockout mice. *PLoS One*, 査読あり, 7(7), 2013, e40437.
doi: 10.1371/journal.pone.0040437.

Mullican SE, Tomaru T, Gaddis CA, Peed LC, Sundaram A, Lazar MA. A novel adipose-specific gene deletion model demonstrates potential pitfalls of existing methods. *Mol Endocrinol.*, 査読あり, 27(1), 2013, 127-34.
doi: 10.1210/me.2012-1267

Shimoda Y, Satoh T, Takahashi H, Katano-Toki A, Ozawa A, Tomaru T, Horiguchi K, Kaira K, Nishioka M, Shibusawa N, Hashimoto K, Wakino S, Mori M, Yamada M. A case of thyroid storm with markedly elevated level of circulating soluble interleukin-2 receptor complicated by multiple organ failure and disseminated intravascular coagulation syndrome. *Endocr J.*, 査読あり, 2014, Epub ahead of print.

〔学会発表〕(計 6件)

Takuya Tomaru, Tetsuro Satoh, Satoshi Yoshino, Akiko Katano-Toki, Takahiro Ishizuka, Yasuyo Nakajima, Sumiyasu Ishii, Atsushi Ozawa, Nobuyuki Shibusawa, Koshi Hashimoto, Shuichi Okada, Masanobu Yamada, Masatomo Mori. Roles of Helz2, helicase with zinc finger 2, in the maturation of white adipocytes. Cold Spring Harbor Laboratory meeting, Metabolic Signaling & Disease: From Cell to Organism, Long Island, NY, 2013

Satoshi Yoshino, Tetsuro Satoh, Masanobu Yamada, Takuya Tomaru, Akiko Katano-Toki, Satoru Kakizaki, Hayato Ikota, munemasa Mori, Koshi Hashimoto, Atsushi Ozawa, Shuichi Okada, Yoichi Nakazato, Takashi Matozaki, Tsutomu Sasaki, Tadahiro Kitamura, Masatomo Mori. Protection against high-fat diet induced obesity in Helz2-deficient mice by enhancing hepatic leptin sensitivity, despite central leptin resistance. Cold Spring Harbor Laboratory meeting, Metabolic Signaling & Disease: From Cell to Organism, Long Island, NY, 2013

登丸 琢也、佐藤 哲郎、片野 明子、吉野 聡、石塚 高広、中島 康代、石井 角保、小澤 厚志、渋沢 信行、橋本 貢土、山田 正信、森 昌朋、核内受容体転写共役因子 PDIP1 は脂肪細胞分化を制御する、2013年4月、仙台市

登丸 琢也、佐藤 哲郎、吉野 聡、片野 明子、石井角保、小澤 厚志、渋沢 信行、橋本 貢土、山田 正信、森 昌朋、レプチン受容体 isoform における選択的スプライシング機構の解明、日本肥満学会、2012年10月、京都市

登丸 琢也、佐藤 哲郎、吉野 聡、片野 明子、小澤 厚志、渋沢 信行、橋本 貢土、山田 正信、森 昌朋、マウスレジスチン遺伝子のスプライスフォームに関する検討、日本糖尿病学会年次学術総会、2012年5月、横浜市

登丸 琢也、佐藤 哲郎、吉野 聡、片野 明子、小澤 厚志、渋沢 信行、橋本 貢土、山田 正信、森 昌朋、マウスレジスチン遺伝子のスプライスフォームに関する検討、日本内分泌学会学術総会、2012年4月、名古屋市

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

登丸 琢也 (TOMARU TAKUYA)
群馬大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：70594399

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

