

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792290

研究課題名(和文) D-ドーパクロムトートメラーゼの脂肪細胞における発現調節機構に関する研究

研究課題名(英文) Studies on transcriptional regulation of D-dopachrome tautomerase in adipocytes

研究代表者

石本 恭子 (ISHIMOTO, Kyoko)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：60579952

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)：肥満によるインスリン抵抗性改善作用を有するアディポカインであるD-dopachrome tautomerase (DDT) の転写調節領域がDDT翻訳開始点の上流200 bpから下流23 bpの間にあることを示した。DDT転写活性は過酸化水素処理による酸化ストレス、無血清培地による低栄養ストレスを与えた前駆脂肪細胞で上昇した。さらに、その転写調節におけるcAMP-activated protein kinase(AMPK)の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Promoter region of gene encoding D-dopachrome tautomerase (DDT), an adipokine which improves obesity-induced insulin resistance, was found to be located between 200 bp upstream and 23 bp downstream of the first methionine codon. The transcriptional activity of DDT gene was induced by oxidative stress or serum starvation in preadipocytes. Furthermore, cAMP-activated protein kinase (AMPK) was found to be involved in the transcription.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：D-dopachrome tautomerase 脂肪細胞 転写調節 AMPK

## 1. 研究開始当初の背景

肥満は脂肪組織が過剰に蓄積する疾患であり、様々な全身性代謝疾患と関連する。健康者の脂肪細胞からはインスリン感受性を高めるアディポカインであるアディポネクチンやレプチンが分泌される。一方、肥満の脂肪組織からはTNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインの分泌が認められ、アディポネクチンやレプチンの分泌は低下する。これらのアディポカインの分泌プロファイリングの変化が肥満の病態と深く関連すると考えられている。

我々はヒトから単離した前駆脂肪細胞を分化させた脂肪細胞が分泌するタンパク質の網羅的プロテオーム解析により、21種類の新規アディポカイン候補を同定した。このうち脂肪細胞での遺伝子発現量と肥満臨床パラメーター間で負の相関を示した D-dopachrome tautomerase (DDT)に着目し、ヒト前駆脂肪細胞株である SGBS 細胞および SGBS 細胞由来分化脂肪細胞を用いた DDT の機能解析により、以下のことを明らかにした。

- ・DDT は脂肪細胞への分化に伴い発現が増加し、脂肪滴の肥大に伴い発現が低下する。
- ・DDT 発現抑制脂肪細胞では脂肪蓄積量が増加する。
- ・DDT 発現抑制脂肪細胞では脂肪代謝に関連する遺伝子の発現が高い。
- ・DDT 発現抑制脂肪細胞では脂質代謝を制御する cAMP-activated protein kinase (AMPK) の不活性化が認められる。
- ・DDT 発現抑制脂肪細胞ではインスリン抵抗性の惹起因子である Fatty acid binding protein 4 (FABP4, aP2) の発現が高い。
- ・DDT は脂肪細胞への分化を抑制する。

さらに肥満モデルである db/db マウスに組換え DDT タンパク質を投与した際にインスリン抵抗性の改善が認められたことから、

DDT はインスリン抵抗性を改善する抗肥満作用を有するアディポカインであることが示唆された。

## 2. 研究の目的

抗肥満作用を有する DDT の脂肪細胞での発現低下が肥満の発症および肥満によるインスリン抵抗性の発症に関与している可能性がある。そこで DDT の脂肪細胞での転写調節機序の解明を目指し、DDT 遺伝子のプロモータ領域を同定および、DDT の発現に影響を与える環境および因子について検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) DDT 遺伝子プロモータ領域の同定

DDT 遺伝子の最初のメチオニンコドンの上流2903 bpから下流135 bpのDNA (-2903/+135) をPCRにより増幅し、ルシフェラーゼレポーターベクター-pGL4.10 (プロメガ社) にサブクローニングした。同様に-2903/-2000、-750/-272、-272/+135、-272/+23、-200/+135、-200/+23、-150/+23領域のレポーターベクターを作製した。

各ルシフェラーゼレポーターベクターおよびウミシイタケルシフェラーゼベクター (pGL4.74: プロメガ社) をヒト前駆脂肪細胞株SGBS細胞にエレクトロポレーション法を用いて導入した。脂肪細胞分化誘導後、3日目のホタル及びウミシイタケのルシフェラーゼ活性をマイクロプレートリーダー (Mithras: Berthold) により測定し、ホタルルシフェラーゼ活性値をウミシイタケルシフェラーゼ活性値で補正した。

### (2) 各ストレスの DDT 発現に与える影響

DDTプロモータ領域 (-200/+23) のルシフェラーゼレポーターベクターをSGBS細胞に導入し、500  $\mu$ M過酸化水素添加による酸化ストレス、1%酸素条件下で培養することによる低酸素ストレス、無血清培地によ

る低栄養ストレスをそれぞれ与え、24時間培養後にルシフェラーゼ活性を測定した。

(3) AICAR の DDT 発現に与える影響  
DDT プロモーター領域 (-200/+23) のルシフェラーゼレポーターベクターを SGBS 細胞に導入し、AMPK 活性化剤である 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide (AICAR) を最終濃度 1mM で 5 日間作用させ、ルシフェラーゼ活性を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) DDT プロモーター領域の同定

DDT 遺伝子の各プロモーター候補領域の下流にルシフェラーゼを組み込んだレポーターベクターを SGBS 細胞に導入し、脂肪細胞へ分化誘導後 3 日目のルシフェラーゼ活性を測定した。(-2903/+135)、(-272/+135)、(-200/+135)、(-200/+23)、(-272/+23) の各領域は脂肪分化誘導に伴い、ルシフェラーゼ活性の上昇を認めたが、(-2903/-2000)、(-750/-272) の (-150/+23) 領域はルシフェラーゼ活性の上昇を示さなかった。また (-200/+23) 領域で最も高値を示したことから、この領域が DDT の転写活性調節領域であることが示唆された。

##### (2) 各ストレスの DDT 発現に及ぼす影響

脂肪細胞は酸化ストレス、低酸素ストレス、低栄養ストレスに曝されていると考えられる。そこでこれらのストレスが DDT 発現に及ぼす影響について検討した。DDT (-200/+23) 領域を挿入したルシフェラーベクターを導入した SGBS 細胞に過酸化水素による酸化ストレスを加えたところ、ルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。また無血清培地で培養した SGBS 細胞でもルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。一方、1% 酸素条件下で培養した SGBS 細胞ではルシフェラーゼ活性の変動は認められなかった。これらの結果から、脂肪細胞での酸化ストレス、低栄養

ストレスが DDT の発現を上昇させることが示唆された。

##### (3) DDT 発現への AMPK の関与

低栄養に曝された脂肪細胞では AMPK の活性化が認められる。そこで AMPK が DDT 発現に関与するか否かを検討するため、AMPK 活性化剤である AICAR を (-200/+23) 領域のルシフェラーレポーターベクターを導入した SGBS 細胞に作用させ、ルシフェラーゼ活性を測定した。AICAR を作用させた SGBS 細胞では有意にルシフェラーゼ活性が上昇していたことから、AMPK が DDT の転写活性調節に関与することが示唆された。

#### 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)

Iwata T, Taniguchi H, Kuwajima M, Taniguchi T, Okuda Y, Sukeno A, Ishimoto K, Mizusawa N, Yoshimoto K.: The action of D-dopachrome tautomerase as an adipokine in adipocyte lipid metabolism, PLoS One, 査読あり, 2012;7(3):e33402.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0033402.

Kyoko Ishimoto, Takeo Iwata, Hisaaki Taniguchi, Noriko Mizusawa, Eiji Tanaka, Katsuhiko Yoshimoto, D-Dopachrome tautomerase promotes IL-6 expression and inhibits adipogenesis in preadipocytes, Cytokine, 査読あり, 2012;60 (3):772-777  
DOI: 10.1016/j.cyto.2012.07.037.

##### [学会発表](計 1 件)

岩田武男、石本恭子、水澤典子、吉本勝彦、D-dopachrome tautomerase のインスリン抵抗性改善機序に関連する分子の探索、第 55 回歯科基礎医学会学術大会、2013.9.20-22、

岡山コンベンションセンター(岡山県)

( )

〔図書〕(計 0 件)

研究者番号：

〔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 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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石本 恭子 (ISHIMOTO Kyoko)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：60579952

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者