脂肪細胞分化初期の分子機構及び新規分化制御因子の有する多彩な生理機能に関する研究

今川 正良

Molecular Mechanisms of Early-stage Adipocyte Differentiation and Multi-functional Roles of Newly Isolated Adipogenic Factors

Masayoshi Imagawa

Department of Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University; 3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan.

(Received September 16, 2015)

Obesity is a major risk factor for diabetes, hypertension, hyperlipidemia, and arteriosclerosis. Although the middle and late stages of adipocyte differentiation are well characterized, the earliest step in the differentiation process has remained largely unknown. We isolated 102 genes expressed at the beginning of the differentiation of a mouse preadipocyte cell line, 3T3-L1 cells. Because approximately half of these genes were unknown, we named them *factor for adipocyte differentiation (fad)* genes. I first show how these genes regulate the early stage of adipocyte differentiation. We next generated *fad104*-deficient mice, and demonstrated that *fad104*-deficient mice died due to cyanosis-associated lung dysplasia with atelectasis. We also found that *fad104* positively regulated adipocyte differentiation and negatively regulated osteoblast differentiation. We then demonstrated that *fad24*-knockdown inhibited mitotic clonal expansion (MCE) and that FAD24 contributed to the regulation of DNA replication by recruiting histone acetyltransferase binding to ORC1 (HBO1) to DNA replication origins. *In vitro* culture experiments revealed that *fad24*-null embryos developed normally to the morula stage, but acquired growth defects in subsequent stages. These results strongly suggest that *fad24* is essential for pre-implantation in embryonic development, particularly for progression to the blastocyst stage. These findings together indicate that both *fad104* and *fad24* contribute not only to adipogenesis but also to other physiological events. The multi-functional roles of these genes are discussed.

Key words—adipocyte differentiation; obesity; DNA replication; lung maturation; osteoblast differentiation; embryonic development

1. はじめに

肥満は、糖尿病、脂質代謝異常症、高血圧症などの主要なリスクファクターであり、¹⁻⁴⁾ 肥満の分子機構解明は、健康科学を考える上で、わが国だけでなく世界的にも最重要課題の1つである。⁵⁻⁷⁾ 肥満形成には、脂肪細胞の肥大化が大きく寄与していることが古くから知られていた。実際、肥大化した成熟脂肪細胞では、過剰なエネルギーを蓄積した脂肪滴が形成され、種々の生理活性物質の分泌量が変わるという質的な変化が起こる。一方、脂肪細胞の肥大化に加え、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化による脂肪細胞の数の増加、すなわち量的な変化も肥

満形成の大きな要因であることが明らかとなり、脂肪細胞分化の解析を通じた肥満の分子機構が急速に明らかにされてきた。⁸⁾

脂肪細胞は、筋や軟骨などの前駆細胞と同じ起源を持つ中胚葉系幹細胞より発生し、前駆脂肪細胞を経て成熟脂肪細胞へと分化する。脂肪細胞分化の研究には、マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞が汎用されている。この細胞は、コンフレント（培養皿の中で細胞がいっぱいに増殖した状態）に達した後、インスリンなどの分化誘導剤を添加すると mitotic clonal expansion (MCE)（詳細は後述する）という1-2回の細胞分裂を経て成熟脂肪細胞へと分化する。誘導6日目以降には脂肪滴が観察されるようになり、10日程度で成熟脂肪細胞となる（Fig. 1）。細胞レベル及び分子レベルでの多くの研究により、peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), CCAAT/enhancer-binding protein α (C/

名古屋市立大学大学院薬学研究科分子生物薬学分野
(〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通 3-1)

e-mail: imagawa@phar.nagoya-cu.ac.jp

本総説は、平成27年度日本薬学会学術貢献賞の受賞を記念して記述したものである。

Fig. 1. Signaling Network in Adipocyte Differentiation

EBP α), C/EBP β , C/EBP δ 及び sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) が脂肪細胞分化を制御する転写因子として重要な役割を果たしていることが明らかにされた.^{9,10)} 現在では, 脂肪細胞は PPAR γ を介する唯一の経路を通じて分化することが明らかとなっている. 一方, C/EBP α は脂肪細胞のインスリン感受性を制御すると考えられている.¹¹⁾

なお, 1990 年代は, 脂肪細胞分化の成熟過程を含め日単位での検討がなされていた. したがって, 上記の因子群はすべて脂肪細胞初期に発現すると記された当時の論文も多い. しかし実際には, PPAR γ , C/EBP α , SREBP1 の発現が上昇するのは脂肪細胞分化誘導後 2-4 日目以降であった. また, C/EBP β と C/EBP δ は C/EBP α よりも早く発現するものの, それ以前, すなわち脂肪細胞分化の最も初期における遺伝子群の変化については不明な点が多く残されていた. 1992 年に Sadowski らは, 3T3-L1 細胞を用いて, その分化初期に発現が変動するタンパク質が多数存在することを二次元電気泳動で明らかにした. そのうち, 100 種類以上のタンパク質が分化誘導 5 時間以内に発現が変動した.¹²⁾ しかし当時は詳細な解析はなされていなかった. そこでわれわれは, 脂肪細胞分化初期の分子メカニズムを解明するために, マウス前駆脂肪細胞株 3T3-

L1 細胞の分化誘導 3 時間後に発現が増加する遺伝子を多数単離した. 本総説では, これら単離した遺伝子群の中で特に重要と思われる遺伝子の脂肪細胞分化における役割について概説する. 新規遺伝子については, 脂肪細胞分化以外についても多彩な機能を有することを明らかにしたので合わせて紹介する.

2. 脂肪細胞分化初期に発現が上昇する遺伝子群の単離

前述のように, マウス前駆脂肪細胞株である 3T3-L1 細胞は, 分化誘導剤を添加すると 1 週間ほどで脂肪滴を含む脂肪細胞へと分化する. われわれは分化誘導前と分化誘導 3 時間後の細胞を用いて PCR-サブトラクション法により誘導 3 時間後に発現が上昇する遺伝子群を単離した (Fig. 1). その結果, 単離した計 310 クロンのうち 228 クロンが independent クロンであったため, これら全クロンの ³²P 標識プローブを用いてノザンブロット

今川正良

1975 年千葉大学薬学部卒業. 1980 年大阪大学大学院薬学研究科博士課程修了. 宮崎医科大学助手, 大阪大学薬学部助手, 東京大学医学部助手, 大阪大学薬学部助教授を経て, 2000 年名古屋市立大学薬学部教授. この間, 1985 年より 1987 年まで, カリフォルニア大学などに留学. 2006 年より 2014 年まで名古屋市立大学理事・副学長.

解析を行い、分化誘導 3 時間後に発現が上昇する遺伝子群として最終的に 102 クローンを単離した。¹³⁻¹⁶⁾ 単離した遺伝子リストについては、文献^{15,16)}を参照されたい。

ここで余談を 1 つ記す。mRNA の定量は現在ではリアルタイム PCR が主であり、ノザンブロット解析を知らない学生も増えている。ノザンブロット解析では通常 ³²P 標識プローブを使用するが、その作製の際には未反応の [α -³²P]dCTP をスピニングなどで取り除く必要がある。プローブの数の多さに見かねて市販のスピニングを購入するように学生に勧めたところ、それほど大変な作業ではない、市販品は高いといいながら、1 mL のシリンジにガラスウール、ついで Sephadex-G50 を詰め、32 種類の標識プローブを一気にかつ淡々と低速遠心機 (8 × 4 の 32 本架け) にかける姿をみて唖然としたことを今でも覚えている。原理をしっかりと理解して実験しているのでトラブルも少なく、問題が生じたときの対応も素早い。最近の分子生物学実験ではキットが溢れているが、原理を理解せず使用するためトラブルにも対処できない。キットを使う前に一度は手製で行うことを研究室で推奨しているが、今後益々このような問題が増えると思われる。

話を元に戻す。次に単離した 102 クローンの中のうち、より重要と思われる遺伝子の選別を行った。当時はゲノム配列情報、cDNA 配列情報が不十分であったことに加え、PCR-サブトラクション法では数百塩基の DNA 断片しか得られないことから、102 クローンのうち 46 クローンは未知遺伝子であった。そこで、未知遺伝子については、全長 cDNA 取得を目指した。残りの既知遺伝子 56 クローンについては、1) マウス遺伝子とヒト遺伝子の比較、2) 発現変化の顕著な遺伝子、3) 細胞の増殖時と非増殖時の発現変化の違いを検討した。3) の検討では、前述の 3T3-L1 マウス前駆脂肪細胞株と同じ線維芽細胞で、通常は脂肪細胞に分化しない NIH-3T3 細胞も対照として用いた。3T3-L1 細胞を脂肪細胞に分化させるには、前述のように一旦細胞をコンフレントにして増殖を停止させることが必須である。そこでこれら 2 種類の細胞の増殖時、非増殖時に分化誘導剤を添加し、発現変化を観察した。3T3-L1 細胞の非増殖時のみ顕著な発現上昇を示した遺伝子をより重要な遺伝子として選択した。¹⁶⁾ そ

の後、発現抑制系及び強制発現系による脂肪細胞への分化の影響を検討することにより、重要な遺伝子をさらに絞り込んだ。

これらの検討により、regulator of G-protein signaling family 2 (RGS2),¹⁷⁾ p68 RNA helicase,¹⁸⁾ 低分子量 GTP タンパク質 Rho ファミリーに属する TC-10-like/TC10 β Long (TCL/TC10 β L),¹⁹⁾ Maf ファミリーとヘテロダイマーを形成し転写因子として働く BTB and CNC homology 1 (Bach1),¹⁵⁾ PPAR γ のコアクチベーターとして機能する androgen receptor associated protein 70 (ARA70)¹⁵⁾ などが、脂肪細胞分化初期に一過性に発現上昇するとともに、脂肪細胞分化に重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、未知遺伝子の全長 cDNA クローニングの結果、クローン 10 が Peg10,²⁰⁾ クローン 28 が cyclin D2²¹⁾ として同定された。一方、遺伝子の情報がなかったクローンについては、factor for adipocyte differentiation (fad) と名付けクローン番号で表した。その結果、*fad158*,²²⁾ *fad104*,²³⁾ *fad24*,²⁴⁾ *fad123* (SLS39A14 と同一),²⁵⁾ *fad49*²⁶⁾ が新規遺伝子として同定され、*Peg10* 及び *cyclin D2* とともにこれらの遺伝子も脂肪細胞分化初期に深く関わっていることを報告した (Fig. 1)。

なお、*fad123* については余談がある。*fad123* は全長クローニングの結果、亜鉛トランスポーターとして知られる Zrt/Irt-like protein (ZIP) トランスポーターに属する LIV-1 subfamily of ZIP transporters) (LZT) サブファミリーの 1 つである SLC39A14 と同一であることがわかった。この SLC39A14 は他の亜鉛トランスポーターと基本骨格は共通であるものの、亜鉛結合に必要なモチーフの一アミノ酸に変異があることから、亜鉛取り込み能を持たないと言われていた。²⁷⁾ しかし、実際には蛍光標識法による亜鉛吸着能を利用した間接的な検討しかされていなかったことから、われわれは ⁶⁵ZnCl₂ を用いた直接的な方法により、SLC39A14 が亜鉛トランスポーターとして機能することを報告した。²⁵⁾ しかしわれわれが専門外であることも一因かもしれないが論文は簡単には受理されなかった。四苦八苦してやっと掲載が決定した頃、亜鉛トランスポーター能を持たないと言っていたグループが亜鉛トランスポーター能をわれわれより先に報告し

た.²⁸⁾ このグループは海外のいわゆる大御所といわれるグループであり、論文の received の日付を調べたところ、われわれが最初に投稿したときよりもかなり遅い日付であった。確証のない話なのでこれ以上は述べないが、その後 SLC39A14 は、亜鉛トランスポーターとしての機能が広く認められることになった。²⁹⁾ わざわざ $^{65}\text{ZnCl}_2$ を用いて実験を行った甲斐があり、多少は亜鉛トランスポーター研究に貢献できたものと思っている。

3. 単離した遺伝子群の脂肪細胞分化初期における機能

前駆脂肪細胞が成熟脂肪細胞に分化する際、MCE という過程が必須と言われている (Fig. 1).³⁰⁾ 既に述べたように、脂肪細胞の分化研究によく使用されるマウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞を分化させるには、まず細胞をコンプレントにしてから分化誘導剤を添加する。すると G0 期の細胞が G1 期に入り、1-2 回ほど細胞分裂を起こしその後分化に向かうと言われている。³¹⁾ 脂肪細胞分化における MCE の必要性については異論もあったが、現時点ではクロマチンの再構成を経て終末分化に向かうのに必須と考えられている。³²⁾ その際、C/EBP β が最も重要な働きをしていることが報告された。³¹⁾ C/EBP δ は C/EBP β とほぼ同時期に発現が上昇することから、C/EBP δ が MCE に与える影響について検討したところ、C/EBP δ も MCE に必須であることがわかった。³³⁾ その際、C/EBP δ ノックダウンにより、*fad49* の発現が抑制されることも明らかになった。次に *fad49* をノックダウンすると、C/EBP β 並びに C/EBP δ の発現を抑制し MCE も抑制した。さらに次のステージに発現する C/EBP α , PPAR γ , SREBP-1 などの転写因子の発現もすべて抑制された。²⁶⁾ したがって、C/EBP δ と *fad49* は脂肪細胞分化初期にお互いに発現を制御しながら MCE に係わっているものと思われた。

このように MCE に関与する遺伝子が得られたこともあり、単離した遺伝子群のうちどの遺伝子が MCE に係わっているか次に検討した。上記 2. で単離した遺伝子群のうち、TCL/TC10 β L, RGS2, *fad104* 及び *fad158* の 4 つの遺伝子をそれぞれノックダウンし MCE に対する影響を検討した。³⁴⁾ その結果、TCL/TC10 β L は MCE に深く関与し、RGS2 と *fad104* はわずかな影響を有し、*fad158* は全く影

響を与えないことが明らかとなった。*fad158* はほかの 3 つの遺伝子よりもわずかに遅れて発現することが影響しなかった要因かもしれない。TCL/TC10 β L は、Rho ファミリーに属する低分子 G タンパク質であるが、TCL/TC10 β L により制御される遺伝子群の探索を並行して検討していた。その中にアクチンフィラメント形成に係わる遺伝子の gelsolin が含まれていた。¹⁹⁾ そこで MCE への影響を調べたところ、gelsolin を発現抑制することにより MCE が阻害された。このとき、C/EBP α , PPAR γ の発現も抑制されたが、C/EBP β と C/EBP δ の発現は影響を受けなかった。³⁵⁾ これらの結果は、gelsolin が C/EBP β と C/EBP δ より遅れて機能していることを示している。また共同研究の過程で得られた potassium channel, subfamily K, member 10 (KCNK10) も MCE を正に制御することを見い出した。³⁶⁾

上記の因子群はすべて脂肪細胞分化初期において分化を正に制御しているが、それらの一部は MCE への関与を介して分化を制御していることが明らかとなった。MCE については、*fad24* の関与を後述するが、複数の因子が複雑に制御しあっており、全容解明には更なる検討が必要と思われる。

4. ノックアウトマウスによる解析

当時 (2002 年) は、cDNA 情報もゲノム情報も十分ではなく、前述した *fad* はもちろんのこと、脂肪細胞分化に関与することを明らかにした既知遺伝子でさえ、生体内における機能は不明な点が多く残されていた。そこで次に、大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験センターの岡部 勝研究室との共同研究によりノックアウトマウスの作製を試みた。MCE については、その重要性が認知される前に作製を開始したため、ノックアウトマウスを作製する遺伝子の選択条件にはいれず、下記の観点から 4 つの遺伝子を選んだ。1) *fad24* ; 転写因子 C/EBP ファミリーが有するロイシンジッパーの構造に類似した配列を有することから、転写因子として機能していることを期待した。2) *fad104* ; 非増殖時の 3T3-L1 でのみ特異的に発現が上昇すること、白色脂肪組織において発現が顕著に高いこと、さらにフィブロネクチン type III ドメインを有することなどから面白い機能が見つかることを期待した。3) *fad158* ; N 末端に膜貫通領域、C 末端にロイシン

Fig. 2. Schematic Structures of Mouse FAD24, FAD104 and FAD158

リッチモチーフを有すること、単離した遺伝子群の中では相対的には遅い6時間後に発現がピークになることから、他の因子とは異なる機能を期待した。

4) TCL/TC10 β L; 既知遺伝子ではあるが、非増殖時の3T3-L1でのみ特異的に発現が上昇すること、Rho GTPaseとしての存在が明らかにされたばかりで機能が不明であったことから新しい知見が得られることを期待した。これら4つの遺伝子について、脂肪細胞分化以外の機能も想定し全身性ノックアウトマウスを作製した。*fad24*, *fad104*, *fad158*については、その構造の概略をFig. 2に示した。

TCL/TC10 β Lと*fad158*については比較的スムーズにヘテロ及びホモノックアウトマウスが得られた。続いて*fad158*ノックアウトマウスの肥満形成に与える影響を検討したところ、高脂肪食を与えた際に弱いながらもインスリン抵抗性減弱作用が観察されたが、それ以外では明確な差は得られなかった。³⁷⁾ *fad158*はleucine-rich repeat containing 8c (LRRC8c)と同一であることが現在では知られている。LRRC8ファミリーは少なくとも5種類で構成されているため、ファミリー全体の解析が今後の課題である。³⁸⁾ また、TCL/TC10 β Lホモノックアウトマウスについても高脂肪食摂取実験や糖代謝能の解析を行ったが明確な差は得られなかった(未発表)。Rho GTPaseは8つのサブファミリー、計21種類よりなることが現在では知られているが、TCL/TC10 β Lは、TC10とともにCdc42と同じサブファミリーに属している。脂肪細胞分化過程におけるTCL/TC10 β Lの発現パターンはTC10及びCdc42とは全く異なることを報告しているものの、¹⁹⁾ より詳細な解析が必要である。なお、われわれがTCL/TC10 β Lを単離した当初はRho (TC10)と呼んで

いた。¹³⁾ 単離したマウスクローンのDNA配列がヒトRho (TC10)と97%の類似性があったため、Rho (TC10)のマウスオルソログと判断したが、その後新たに同定されたTCL/TC10 β Lと同一であることが判明した。¹⁹⁾ 現在では、TCL/TC10 β LはRho J, TC10はRho Qと呼ぶことが提唱されている。³⁹⁾

ここで再び余談である。1980年代後半から1990年代前半は、cDNAとしてデータベースに登録されている遺伝子はそれほど多くなく、種々の新規遺伝子が次々と報告・登録されていた。結果として同一遺伝子であることが後で判明することも多かったが、研究者の思い入れもあり独自の名称でそれぞれ論文発表していた。冒頭で登場したC/EBPという遺伝子名の由来は次の通りである。⁴⁰⁾ 最初はラットの核抽出液から見い出されたDNA結合タンパク質であり、その結合配列は一見無関係なCCAATボックスとエンハンサー配列であったことからCCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)と呼ばれた。その後ファミリーを形成していることがわかったため、C/EBP α と命名し直した。C/EBP β は命名されるまで、nuclear factor-IL6 (NF-IL6), liver activator protein (LAP), IL6-induced DNA binding protein (IL6-DBP), alpha-1 acid glycoprotein/enhancer-binding protein (AGP/EBP), C-reactive protein 2 (CRP2)とそれぞれの研究者が独自に名づけていた。さらに複雑なことにC/EBP β は翻訳時の調節により、N末端領域の転写活性化ドメインを欠いた転写抑制因子としても働く、その場合はliver inhibitory protein (LIP), silencer factor B (SF-B)と呼ばれていた。当研究室の文献紹介セミナーで、同一遺伝子であることに気付かず異なる遺

伝子として紹介したため指摘したこともあったが、若い学生たちが古い文献に目を通すときは是非遺伝子の名前には注意を払ってほしいと思う。

余談を飛び越して完全に脱線したが、TCL/TC10 β L と *fad158* についてはこれらのホモノックアウトマウスからは興味ある知見は残念ながらほとんど得られていない。一方、作製が難航した *fad24* 及び *fad104* は全く想定外の表現型が観察された。その詳細については次項の中で記す。

5. *fad24* の有する多彩な生理機能

5-1. 肥満形成における *fad24* の機能 ノックアウトマウスと異なり、トランスジェニックマウスは比較的短い日数で作製できることから、*fad24* 過剰発現トランスジェニックマウスを作製した。mouse embryonic fibroblast (MEF, マウス胎仔由来線維芽細胞) を用いて脂肪細胞分化を検討すると、*fad24* 過剰発現により脂肪細胞分化が促進された。また、普通食を与えた 23 週齢の *fad24* 過剰発現マウスにおいて、脂肪細胞数の増加、小型成熟脂肪細胞の割合の増加、血清中のアディポネクチンの増加が観察された。さらに、インスリン感受性の増加も観察された。一方、3 週齢より高脂肪食を与えた 15 週齢マウスで検討すると、普通食の場合と同様に脂肪細胞数の増加、小型成熟脂肪細胞の割合の増加が観察されたものの、アディポネクチンの増加はわずかで、インスリン感受性については明確な結果は得られなかった。高脂肪食での効果が小さいことから今後の検討が必要なものの、これらの結果は、*fad24* が *in vivo* においても脂肪細胞分化制御因子として働くとともに、脂肪細胞数及び細胞の大きさにも係わっていることを示している。⁴¹⁾

5-2. MCE における *fad24* の機能 前述のように多くの因子が MCE に係わっているが、*fad24* も MCE を正に制御していることが明らかとなった。FAD24 は、酵母 Noc3p と類似したアミノ酸配列を有しており、Noc3p が複数の DNA 複製因子と相互作用することにより DNA 複製開始を制御していることが報告された。⁴²⁾ そこで、FAD24 が哺乳動物の系でも DNA 複製因子と相互作用するか否か検討したところ、histone acetyltransferase binding to ORC1 (HBO1) と相互作用することが明らかになった。⁴³⁾ 興味あることに、HBO1 も *fad24* と同様に脂肪細胞分化過程における MCE を正に制御している

ことを明らかにした。⁴³⁾ これらの結果は、FAD24 が HBO1 との相互作用を介して MCE 及び脂肪細胞分化を制御していることを示唆している。そこで次に細胞分裂期における FAD24 と HBO1 の局在を調べたところ、分裂終期に共局在することが明らかとなった。さらにクロマチン免疫沈降法により FAD24 及び HBO1 の複製起点への局在を検討した結果、FAD24 は HBO1 を複製起点へとリクルートすることにより DNA 複製を正に制御しその結果 MCE が進行することが明らかとなった。⁴³⁾

5-3. 通常の細胞増殖における *fad24* の機能 上記のように脂肪細胞分化初期の MCE において、*fad24* が DNA 複製制御に関与することが明らかになったが、この機能が脂肪細胞分化に特異的か否か次に検討した。その結果、*fad24* は脂肪細胞分化のみならず、通常の細胞増殖においても DNA 複製を正に制御することが明らかになった。⁴⁴⁾

5-4. 細胞がん化における *fad24* の機能 DNA 複製制御の異常は細胞がん化を引き起こすことが知られている。そこで、細胞がん化の 1 つの指標である足場非依存性増殖能を測定するソフトアガロースアッセイにより、細胞がん化における *fad24* の機能を解析した。その結果、*fad24* 過剰発現はがん遺伝子 *ras* によるトランスフォーム能を抑制することが明らかとなった。さらに、その抑制機構として、*fad24* が転写因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B) の活性を阻害することも明らかにした。⁴⁵⁾

このように、*fad24* は正常細胞、脂肪細胞分化における MCE、細胞がん化など様々な場面において DNA 複製を介して細胞の増殖・分化に深く関わっていることが明らかとなった。

5-5. 初期胚発生における *fad24* の機能 前述したように、*fad24* は単離当時データベースに登録のない未知遺伝子であったため、並行して全身性ノックアウトマウスを作製した。その表現型は、上記 5-2. と 5-3. の結果を反映したものとなった。すなわち、*fad24* が細胞増殖に大きく寄与していることを反映し、*fad24* ホモ欠損マウスは胎生致死であり、胎生 9.5 日齢においても全く存在しないことが明らかとなった。そこで次に、体外受精で得た受精卵を *in vitro* で培養し 2-4 日にかけて詳細に検討したところ、胚盤胞形成過程で *fad24* が重要な役割を果たしていることが明らかとなった (Fig. 3)。⁴⁶⁾ さ

Fig. 3. Disruption of *fad24* Results in Early Embryonic Lethality⁴⁶⁾

Pre-implantation development of *fad24* deficient embryos from the 8-cell to the blastocyst stage. *fad24*-null mutants failed to develop into blastocysts.

らに詳細に検討すると、胚盤胞の1つ前のステージである桑実胚において、細胞の数が少ない、すなわち増殖が不十分であることも明らかとなった。桑実胚形成前のステージである8細胞までは、母親由来の遺伝子産物FAD24が機能している可能性もある。したがって、受精卵から8細胞に至る過程における*fad24*の機能については更なる解析が必要であるものの、新規遺伝子*fad24*は脂肪細胞分化のみならず、生命機能維持の基礎を担う重要な制御因子であることを明らかにした。

6. *fad104* の有する多彩な生理機能

6-1. 肺形成における *fad104* の機能 *fad104* についてもノックアウトマウスを作製した。⁴⁷⁾ その結果、ホモ欠損マウスは、出生はするものの出生1日以内に死亡することがわかった。そこで18.5日目の胎仔を観察したところ、摘出後の呼吸の頻度が低く、30分以内にチアノーゼを起こすことが明らかとなった。⁴⁸⁾ また肺が小さく無気肺の症状を呈することもわかった。そこで肺形成時における*fad104*の機能を解析したところ、肺胞上皮II型細胞の分化・成熟に重要な役割を果たしており、*fad104* ホモ欠損マウスは肺胞上皮II型細胞の未成熟に伴う呼吸不全により死亡することを明らかにした。⁴⁸⁾

6-2. 骨形成における *fad104* の機能 上記の*fad104* ホモ欠損マウスからMEFを調製し脂肪細胞への分化を検討したところ、予想通りその分化は抑制された。次にこのMEFをヌードマウス皮下に移植し、3週間後の移植片を摘出し観察した。その結

Fig. 4. Disruption of *fad104* Causes Skeletal Deformities in the Anterior Fontanel⁵⁰⁾

A superior view of the stained calvaria in wild-type and *fad104*-deficient mice at E18.5.

果、野生型MEFでは脂肪細胞への分化と中性脂肪の蓄積が観察されたのに対して、*fad104* ホモ欠損マウスMEFでは脂肪細胞は見い出されなかった。⁴⁹⁾ この結果は、*in vivo* においても*fad104*が脂肪細胞分化に深く関わっていることを示している。興味あることに、*fad104* ホモ欠損マウスMEF由来の移植片では脂肪細胞の代わりに骨様細胞が観察されたことより、*fad104*が骨分化に負に関わっていることが強く示唆された。

そこで次に*fad104*欠損がMEFの骨形成に与える影響について検討した。その結果、*fad104*欠損により骨分化が促進することが明らかとなった。またこのとき、骨細胞への運命を決定し、骨分化のマスターレギュレーターと言われているrunx2の発現を検討すると、*fad104*欠損により上昇することも明らかとなった。⁴⁹⁾

以上の結果は、*fad104*欠損により骨分化が促進することを示している。そこで18.5日目の*fad104*ホモ欠損胎仔を注意深く観察すると、野生型と比較して頭部が高く盛り上がっているように見えた。次に頭部骨格標本作製比較したところ、*fad104*ホモ欠損マウスの頭蓋は、野生型と比較して後頭部から鼻先までが短く横幅も短いことが明らかになった。さらに、*fad104*ホモ欠損マウスの大泉門は骨化が進み過ぎており、早期に閉鎖されていることも

Fig. 5. Over-expression of FAD104 Suppresses Metastasis of B16F10 Cells⁵¹⁾

Appearance of murine lungs 15 d after injection of FAD104 over-expressing cells and control cells through the tail vein of 6-week-old mice.

明らかになった (Fig. 4).⁵⁰⁾ この表現型は新生児の頭蓋縫合早期癒合症 (Craniosynostosis) によく似ていることから、今後の詳細な解析が待たれる。

次に初代培養 calvaria (頭蓋冠) 細胞を用いて骨分化過程における *fad104* の関与について検討した。その結果、*fad104* 欠損により calvaria 細胞の骨分化能は亢進した。さらにそのとき、bone morphogenetic protein/SMAD (BMP/SMAD) シグナルも *fad104* 欠損により増強されることが明らかとなった。以上の結果より、*fad104* は BMP/SMAD シグナルを介して骨分化を負に制御していることが明らかとなった。⁵⁰⁾

6-3. 正常細胞の増殖、接着、伸展、移動に与える *fad104* の影響 *fad104* ホモ欠損マウスから MEF を調製し、細胞の増殖能、接着能、伸展能、移動能について野生型 MEF と比較したところ、*fad104* 欠損はいずれにおいても抑制的に働いた。また、細胞のストレスファイバー形成も抑制した。⁴⁷⁾

6-4. がん細胞の浸潤、転移に *fad104* が与える影響 前述の細胞の接着、移動は、がん細胞の浸潤、転移にも深く関係している。そこで次のがん細胞を用いてその浸潤、転移能に及ぼす *fad104* の影響について検討した。まずはじめにヒトメラノーマ由来の高転移性及び低転移性細胞における *fad104* の発現量を検討したところ、高転移性細胞の方が *fad104* の発現量が低いことがわかった。そこで、低転移性細胞には *fad104* 抑制系を、高転移性細胞には *fad104* 過剰発現系を導入したところ、いずれの場合もがん細胞の浸潤を *fad104* が抑制することを見出した。⁵¹⁾ 次に、*fad104* 過剰発現メラノーマ細胞をマウス尾静脈に投与し、肺へのがん細胞の転移能を検討したところ、*fad104* 過剰発現により肺

への転移が抑制された (Fig. 5)。また、signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) に *fad104* が結合しリン酸化を阻害することにより STAT3 シグナルを抑制することも見出した。これらの結果より、*fad104* が STAT3 シグナルを介してがん細胞の浸潤及び転移を抑制することが明らかとなった。⁵¹⁾

7. おわりに

当研究室における 18 年間の研究成果を中心に概説した。途中で大きく展開し、脂肪細胞分化だけでなく、骨形成、肺形成、胚形成及び細胞がん化の方向にも進んだ。しかし、この展開は予期していなかったわけではない。脂肪細胞分化初期の分子機構解明を新たなテーマとして始めたのは、C/EBP ファミリーの存在が大きい。その頃当研究室では、腫瘍マーカー遺伝子の発現制御機構解明に力を入れており、C/EBP ファミリーが遺伝子発現を負に制御するサイレンサーとして機能することを明らかにしたところであった。⁵²⁾ もともと C/EBP α は肝臓におけるアルブミンの発現に、C/EBP β と C/EBP δ は炎症に関与する転写因子として同定された。⁴⁰⁾ 一方、前述のように C/EBP ファミリーは脂肪細胞分化に深く関わっていた。⁸⁻¹¹⁾ また、アメフラシを用いた研究で記憶に係わるとの報告がなされた。⁵³⁾ このように、肝臓での恒常的作用、炎症時の特異的作用、脂肪細胞分化、記憶そしてサイレンサー作用というように一見関係のない事象が特定の転写因子によって制御されていることに驚くとともにその作用機構についていろいろと議論したことを今でもよく覚えている。そこで、脂肪細胞分化初期に働く遺伝子を新たに見出すことができれば、それらは多彩な機能を有しているはずであると予想して研究を開始した。

その頃は、少なくとも 10 万種類の遺伝子をヒトは持っているだろうと言われていた時代であったが、ヒトゲノム解析の進展とともに、ヒトの有する遺伝子の数は 10 万種類よりもはるかに少ないと推定されるようになった。実際、2001 年のゲノム概略版発表の際には 34000 程度となり、2004 年の詳細版では約 22000 となった。並行して、転写後調節、翻訳前後の調節機構に関して新たな知見が次々と見い出されるとともに、マイクロ RNA など non-coding RNA (ncRNA) の登場により、遺伝子発現のセントラルドグマが大きく塗り替えられたのはご承知の通りである。現在は、いろいろな分野でハイスループットの網打尽にする戦略がよく用いられている。しかし、結果として個々の遺伝子の機能解析が遅れている、若しくは見逃されているのも事実である。家内工業的ではあるが、個々の遺伝子を丹念に解析することも極めて重要であると私自身は考えている。その意味では、*fad24* や *fad104* が多彩な生理機能を有していることを部分的にせよ明らかにできたことは嬉しい限りである。今後様々なアプローチにより、芸術的とも言えるヒト個体の生命維持機構が明らかにされ、各種疾患の原因解明や新たな治療薬の開発に結びつくことを願っている。

謝辞 本研究は、平成 9 年に大阪大学薬学部環境代謝化学講座（平成 10 年大学院改組により薬学研究科微生物動態学分野）において、西原 力教授のご指導の下新たに立ち上げ今に至ったものです。この場をお借りして恩師西原先生に篤く御礼申し上げます。平成 12 年に名古屋市立大学薬学部微生物薬品学講座（平成 14 年大学院改組により薬学研究科分子生物薬学分野）に移動後、研究は大きく進展しましたが、本研究は両大学の多くの学生さん及び多くの他研究室の共同研究者の皆様とともに行ったものです。特にプロジェクト立ち上げ 2 年目から現在まで一緒に研究を行っている名古屋市立大学西塚誠講師、また私が大学本部における管理運営のため、研究室を留守にすることが多かった丸 9 年もの長い間、ご自身のプロジェクトに加えて「肥満グループ」の面倒を見て下さった長田茂宏准教授に深謝するとともに、本研究の推進に真摯に取り組んで下さった多くの学生・院生の皆様及び多大なご協力を賜りました共同研究者の皆様心より感謝申し上げます。

げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Kahn S. E., Hull R. L., Utzschneider K. M., *Nature*, **444**, 840–846 (2006).
- 2) Rosen E. D., Spiegelman B. M., *Nature*, **444**, 847–853 (2006).
- 3) Boden G., *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, **18**, 139–143 (2011).
- 4) Wang Z. V., Li D. L., Hill J. A., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **63**, 302–313 (2014).
- 5) Friedman J. M., *Nature*, **459**, 340–342 (2009).
- 6) Rosen E. D., Spiegelman B. M., *Cell*, **156**, 20–44 (2014).
- 7) Frood S., Johnston L. M., Matteson C. L., Finegood D. T., *Curr. Obes. Rep.*, **2**, 320–326 (2013).
- 8) Mandrup S., Lane M. D., *J. Biol. Chem.*, **272**, 5367–5370 (1997).
- 9) Rosen E. D., Walkey C. J., Puigserver P., Spiegelman B. M., *Genes Dev.*, **14**, 1293–1307 (2000).
- 10) Farmer S. R., *Cell Metab.*, **4**, 263–273 (2006).
- 11) Rosen E. D., Hsu C. H., Wang X., Sakai S., Freeman M. W., Gonzalez F. J., Spiegelman B. M., *Genes Dev.*, **16**, 22–26 (2002).
- 12) Sadowski H. B., Wheeler T. T., Young D. A., *J. Biol. Chem.*, **267**, 4722–4731 (1992).
- 13) Imagawa M., Tsuchiya T., Nishihara T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **254**, 299–305 (1999).
- 14) Imagawa M., *Farumashia*, **36**, 780–784 (2000).
- 15) Nishizuka M., Tsuchiya T., Nishihara T., Imagawa M., *Biochem. J.*, **361**, 629–633 (2002).
- 16) Nishizuka M., *Yakugaku Zasshi*, **123**, 949–956 (2003).
- 17) Nishizuka M., Honda K., Tsuchiya T., Nishihara T., Imagawa M., *J. Biol. Chem.*, **276**, 29625–29627 (2001).
- 18) Kitamura A., Nishizuka M., Tominaga K., Tsuchiya T., Nishihara T., Imagawa M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **287**, 435–439 (2001).
- 19) Nishizuka M., Arimoto E., Tsuchiya T., Nishihara T., Imagawa M., *J. Biol. Chem.*,

- 278, 15279–15284 (2003).
- 20) Hishida T., Naito K., Osada S., Nishizuka M., Imagawa M., *FEBS Lett.*, **581**, 4272–4278 (2007).
- 21) Hishida T., Naito K., Osada S., Nishizuka M., Imagawa M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **370**, 289–294 (2008).
- 22) Tominaga K., Kondo C., Kagata T., Hishida T., Nishizuka M., Imagawa M., *J. Biol. Chem.*, **279**, 34840–34848 (2004).
- 23) Tominaga K., Kondo C., Johmura Y., Nishizuka M., Imagawa M., *FEBS Lett.*, **577**, 49–54 (2004).
- 24) Tominaga K., Johmura Y., Nishizuka M., Imagawa M., *J. Cell Sci.*, **117**, 6217–6226 (2004).
- 25) Tominaga K., Kagata T., Johmura Y., Hishida T., Nishizuka M., Imagawa M., *FEBS J.*, **272**, 1590–1599 (2005).
- 26) Hishida T., Eguchi T., Osada S., Nishizuka M., Imagawa M., *FEBS J.*, **275**, 5576–5588 (2008).
- 27) Taylor K. M., Nicholson R. I., *Biochim. Biophys. Acta*, **1611**, 16–30 (2003).
- 28) Taylor K. M., Morgan H. E., Johnson A., Nicholson R. I., *FEBS Lett.*, **579**, 427–432 (2005).
- 29) Eide D. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **1763**, 711–722 (2006).
- 30) Tang Q. Q., Otto T. C., Lane M. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 44–49 (2003).
- 31) Tang Q. Q., Otto T. C., Lane M. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 850–855 (2003).
- 32) Guo L., Li X., Tang Q. Q., *J. Biol. Chem.*, **290**, 755–761 (2015).
- 33) Hishida T., Nishizuka M., Osada S., Imagawa M., *Biochimie*, **91**, 654–657 (2009).
- 34) Kawaji A., Nishizuka M., Osada S., Imagawa M., *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 404–409 (2010).
- 35) Kawaji A., Ohnaka Y., Osada S., Nishizuka M., Imagawa M., *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 773–779 (2010).
- 36) Nishizuka M., Hayashi T., Asano M., Osada S., Imagawa M., *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 22743–22756 (2014).
- 37) Hayashi T., Nozaki Y., Nishizuka M., Ikawa M., Osada S., Imagawa M., *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 1257–1263 (2011).
- 38) Abascal F., Zardoya R., *Bioessays*, **34**, 551–560 (2012).
- 39) Visvikis O., Maddugoda M. P., Lemichez E., *Biol. Cell*, **102**, 377–389 (2010).
- 40) Imagawa M., *Seikagaku*, **65**, 120–125 (1993).
- 41) Johmura Y., Watanabe K., Kishimoto K., Ueda T., Shimada S., Osada S., Nishizuka M., Imagawa M., *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 1656–1664 (2009).
- 42) Zhang Y., Yu Z., Fu X., Liang C., *Cell*, **109**, 849–860 (2002).
- 43) Johmura Y., Osada S., Nishizuka M., Imagawa M., *J. Biol. Chem.*, **283**, 2265–2274 (2008).
- 44) Johmura Y., Osada S., Nishizuka M., Imagawa M., *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 1092–1095 (2008).
- 45) Johmura Y., Suzuki M., Osada S., Nishizuka M., Imagawa M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **369**, 464–470 (2008).
- 46) Ochiai N., Nishizuka M., Miyamoto T., Miyoshi I., Ikawa M., Osada S., Imagawa M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **438**, 301–305 (2013).
- 47) Nishizuka M., Kishimoto K., Kato A., Ikawa M., Okabe M., Sato R., Niida H., Nakanishi M., Osada S., Imagawa M., *Exp. Cell Res.*, **315**, 809–819 (2009).
- 48) Kishimoto K., Nishizuka M., Ueda T., Kajita K., Ugawa S., Shimada S., Osada S., Imagawa M., *Exp. Cell Res.*, **317**, 2110–2123 (2011).
- 49) Kishimoto K., Kato A., Osada S., Nishizuka M., Imagawa M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **397**, 187–191 (2010).
- 50) Kishimoto K., Nishizuka M., Katoh D., Kato A., Osada S., Imagawa M., *J. Biol. Chem.*, **288**, 31772–31783 (2013).
- 51) Katoh D., Nishizuka M., Osada S., Imagawa M., *Plos One*, **10**, e0117197 (2015).
- 52) Osada S., Takano K., Nishihara T., Suzuki T., Muramatsu M., Imagawa M., *J. Biol. Chem.*, **270**, 31288–31293 (1995).
- 53) Alberini C. M., Ghirardi M., Metz R., Kandel E. R., *Cell*, **76**, 1099–1114 (1994).