

インスリンシグナル伝達を制御する転写因子 EPAS1

和田 平

Transcription Factor EPAS1 Regulates Insulin Signaling Pathway

Taira WADA

*Research Unit of Health Science, College of Pharmacy, Nihon University,
7-7-1 Narashinodai, Funabashi City 274-8555, Japan*

(Received August 10, 2006)

Obesity, which results from adipose differentiation and adipocyte hypertrophy, is a primary risk factor of these life-style-diseases. Obesity, is primary risk factor of these life-style-diseases, results from adipose differentiation and adipocyte hypertrophy. Adipose differentiation is regulated by several transcriptional factors, and we have focused here on the roles played by endothelial PAS domain protein1 (EPAS1) in adipogenesis. EPAS1 was identified as a factor responsible for hypoxia responses, such as angiogenesis, here we demonstrated that EPAS1 is highly induced during adipose differentiation *in vivo* and *in vitro*. We then analyzed EPAS1 promoter activity during adipose differentiation in 3T3-L1 cells. We showed that the sequence -478/-445 is responsible for the up-regulation of EPAS1 expression during adipose differentiation and that the activity of this region is controlled by Sp1 and Sp3. To examine whether EPAS1 exerts an influence on adipogenesis, we overexpressed dominant negative form of EPAS1 in 3T3-L1 cells. The expression of EPAS1 (1-485) allowed cells to accumulate only a minimum amount of lipid droplets. Therefore, induction of EPAS1 expression is necessary for execution of adipose differentiation program. The mechanism involves the direct transcriptional regulation of Glut1, Glut4 and IRS3 genes by EPAS1. These results also confirmed that the protein level of EPAS1 was increased by insulin stimulation in adipocytes. Taken together, this result also indicated that EPAS1 plays a role in the part of insulin action. Therefore, these results suggest that the quantitative and functional alteration of EPAS1 are involved in metabolic syndrome occurrence.

Key words—adipocytes; adipose differentiation; insulin sensitivity

1. はじめに

近年、わが国においてもライフスタイルの変化に伴い、糖尿病、高血圧あるいは高脂血症などのいわゆる生活習慣病の病態を呈する人口が増加し、深刻な社会問題となっている。これらの生活習慣病は、それぞれ単独においては軽度であっても集積することにより動脈硬化など心疾患イベントのリスクを著しく増大させ、現在ではそのような状態に腹部周囲径を考慮したものを“メタボリックシンドローム”と定義している。メタボリックシンドローム発症の

背景には過栄養や運動不足による肥満、すなわち脂肪組織における脂肪細胞の増加並びに肥大化が存在する。脂肪組織は従来、受動的なエネルギー貯蔵臓器と認識されてきたが、近年、分子生物学的なアプローチによりレプチン、アディポネクチン、Tumor necrosis factor- α 、Plasminogen activator inhibitor-1、などの内分泌因子(アディポサイトカイン)を分泌する臓器でもあることが明らかにされている。^{1,2)} これらのアディポサイトカインは食欲、エネルギー代謝の制御に加え、糖代謝並びに脂質代謝の恒常性に係わっているが、肥満時においては、その産生・分泌が過剰あるいは過少となり、このバランスの破綻がメタボリックシンドロームの発症に深く係わっている。^{3,4)} また脂肪細胞が病的に肥大化する肥満及び脂肪細胞が極端に減少する脂肪萎縮症のいずれにおいてもインスリン抵抗性が誘発され、このことがメタボリックシンドローム発症の原因となる

日本大学薬学部衛生化学研究室 (〒274-8555 船橋市習志野台 7-7-1)

Present address: Center for Pharmacogenetics, University of Pittsburgh, 659 Salk Hall, 3501 Terrace Street, Pittsburgh, PA 15261, U.S.A.

e-mail: taw20@pitt.edu

本総説は、日本薬学会第126年会シンポジウムGS2で発表したものを中心に記述したものである。

ことから、正常な機能を有する脂肪細胞が適切な量で存在することが代謝の恒常性維持に重要であることが示唆されている。^{5,6)}したがってメタボリックシンドロームの主因である肥満に係わる脂肪細胞の成り立ちを解明し、それに立脚した根本的な予防法や治療法の確立が極めて重要である。

肥満の発症には遺伝的素因に加え、生活環境の変化が重要な因子となる。例えば、わが国において戦後の窮乏期を経て、近年肥満者数は急増しており、その原因の1つとして食生活の欧米化による摂食・栄養状態の変化あるいは運動不足が挙げられる。これらのライフスタイル、すなわち環境因子の変化に伴う肥満者数の増加を細胞並びに分子レベルで考慮すると、環境応答に関与する転写因子による脂肪細胞分化の制御が推測される。そのためわれわれは、環境応答に関与する転写因子群である bHLH/PAS ファミリーに着目し、脂肪細胞分化過程に伴うそれら転写因子群の発現量の変化を検討した。本稿では、これまでのわれわれの研究結果を中心に、脂肪細胞分化過程における bHLH/PAS ファミリーの役割及びインスリン感受性への関与について概説したい。

2. 脂肪細胞分化過程における bHLH/PAS ファミリー

Basic helix-loop-helix (bHLH) 及び Per-Arnt-Sim (PAS) ドメインを持つ転写因子群は生理学的・発生的などの過程において様々な遺伝子の発現調節を担っていることが明らかになってきた。bHLH ドメインは塩基性に富んだ DNA 結合領域と二量体形成に必要な HLH ドメインからなる。そして PAS ドメインは約 50 個のアミノ酸からなる PAS1, PAS2 からなる領域で、進化上非常によく保存されている。bHLH-PAS 型転写因子は、PAS ドメインを介してそれぞれ特異的なヘテロ二量体を形成し、特定の DNA 塩基配列に結合し、様々な遺伝子の転写を制御している。最初に bHLH-PAS 型転写因子として同定された Aryl hydrocarbon Receptor (AhR) は、ダイオキシンなどの外来性のリガンドと結合したのち、Aryl hydrocarbon receptor nuclear factor (ARNT) とヘテロ二量体を形成して CYP1A1, glutathione-S-transferase などの薬物代謝酵素遺伝子の発現を誘導する。われわれの研究室では AhR の発現量が脂肪細胞分化に伴い減少するこ

と、さらに AhR が脂肪細胞分化初期の clonal expansion の過程で重要な役割を担っている Rb タンパク質のリン酸化を阻害していること並びに Rb タンパクのファミリーである p107 の発現減少を阻害することにより、脂肪細胞分化を負に制御していることを明らかにした。^{7,8)}

またわれわれの研究室では体内時計の調節を司る転写因子である Brain-Muscle Arnt like factor (BMAL1) の発現が脂肪細胞分化に伴い増加することに加え、脂質代謝を制御する転写因子である Peroxisome proliferator activated receptor γ 1 (PPAR γ 1), PPAR α , Sterol regulatory-element binding protein-1a の発現を誘導すること、さらにはそれらの標的遺伝子である脂質代謝系の酵素群を制御していることを明らかにした。⁹⁾ また脂肪組織においてそれらの遺伝子の発現に日内リズムが認められ、BMAL1 の標的遺伝子として知られる albumin D-site binding protein (DBP) 遺伝子の発現リズムとほぼ一致することを見い出している。さらに現在トランスジェニックマウスやノックアウトマウスを用いた解析を行っており、脂肪細胞並びにインスリン抵抗性発症に関与する組織などにおける BMAL1 の役割が明らかにされると思われる。

また BMAL1 とヘテロダイマーを形成し、日内リズムを制御していることが知られている Clock 遺伝子は、視床下部視交叉上核のペースメーカーニューロン内に含まれている分子概日時計の鍵となる構成成分である。Clock 変異マウスでは、昼行性摂食リズムが非常に減弱しており、食欲過剰により肥満を呈し、さらに高レプチン血症、高脂血症、脂肪肝、高血糖及び低インスリン血症という代謝症候群が発症することが報告されている。¹⁰⁾ これらの結果から、時計遺伝子のネットワークは、哺乳類の代謝メカニズムにおいて重要な役割を果たしていることが示唆される。

Single-minded (Sim) は中枢神経系発達に重要な機能を持つことが知られている。Sim1 遺伝子のヘテロ変異マウスは、幼児期に摂食行動を制御する視床下部室傍核の作用が減少し、摂食量の増加に基づいて肥満を呈することが確認されている。¹¹⁾

Hypoxia inducible Factor-1 α (HIF-1 α), EPAS1 (HIF-2 α) は低酸素状態で活性化され、核内に入り ARNT とヘテロ二量体を形成してエリスロポエチ

ンや解答系の酵素の発現誘導を行うとともに, vascular endothelial growth factor (VEGF) 等の発現調節を介して血管新生にも関与している. これまで HIF-1 α 及び EPAS1 は構造上類似していることから同様の機能を有していると考えられていたが, 近年ノックアウトマウスを用いた研究を始めとした様々なアプローチにより, 発現組織並びに機能特性も異なることが明らかにされつつある.^{12,13)} マウス前駆脂肪細胞である 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化過程において HIF-1 α は分化誘導初期段階で発現が誘導されるが, 分化過程の進行に伴い発現量が減少するのに対し, EPAS1 は脂肪細胞分化に伴い発現量の増加が観察された (Fig. 1). Yun らは HIF-1 α が脂肪細胞分化を抑制する方向に働くことを明らかにしている.¹⁴⁾ Yun らはそのメカニズムとして HIF-1 α が DEC1 / Stra13 の発現誘導を介して PPAR γ 2 遺伝子の発現を抑制することを明らかにしている. それに対してわれわれは脂肪細胞分化に伴い発現量が増加する EPAS1 が脂肪細胞分化を促

進することを明らかにした.¹⁵⁾ 本総説では EPAS1 の脂肪細胞分化における役割と脂肪細胞における機能特性について筆者らの検討結果を中心に述べたいと思う.

3. 脂肪細胞分化過程における EPAS1 の発現変化

まず始めにマウス脂肪組織を脂肪細胞画分及び前駆脂肪細胞を含む Stromal-vascular 画分に分画したのち, 各画分における EPAS1 mRNA の発現量を測定した. Stromal-vascular 画分に比較して脂肪細胞画分において EPAS1 mRNA の高い発現量が認められた (Fig. 1(A)). ついで脂肪細胞数の増加並びに肥大化が EPAS1 の発現量に与える影響を, 高脂肪食給餌により作製した肥満マウスの脂肪組織における EPAS1 mRNA の発現量の変化から検討した (Fig. 1(B)). 肥満マウスの脂肪組織における EPAS1 mRNA は, 通常食を与えたマウスに比較して高い発現量を示した (Fig. 1(B)). また, 脂肪細胞における EPAS1 の発現量は, 高発現が知られて

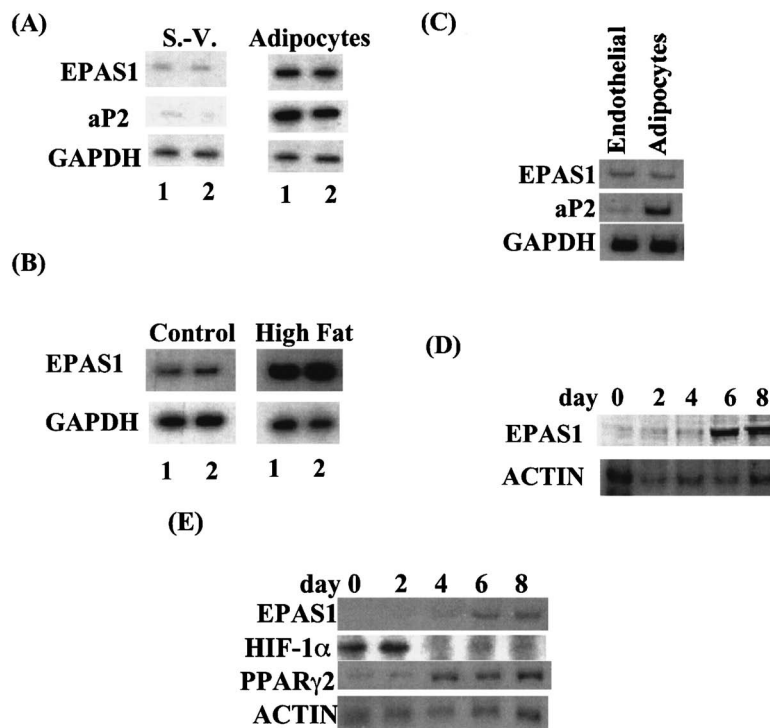


Fig. 1. Expression of EPAS1 during Adipose Differentiation

(A) White adipose tissue was excised from two male C57BL/6J mice (6 weeks old), and the tissue was fractionated into adipocytes and a stromal-vascular (S.-V.) fraction. Total RNA was isolated, and the expression of EPAS1 mRNA was determined by Northern blot analysis. Lanes 1 and 2 were run using samples from two distinct mice, respectively. (B) Obese C57BL/6J mice were generated by feeding the mice a high-fat diet for 4 weeks. White adipose tissue was excised from control mice and obese mice, and the expression of EPAS1 mRNA was determined by Northern blot analysis. (C) Expression of EPAS1 mRNA in human venous endothelial cells and white adipose cells was determined by Northern blot analysis. (D) 3T3-L1 cells were induced to differentiate by the standard protocol. Western blot analysis of EPAS1 and actin was performed on whole cell extracts (10 μ g for EPAS1 and 5 μ g for actin). (E) Expression of EPAS1 mRNA during adipose differentiation in 3T3-L1 cells was determined by Northern blot analysis.

いる血管内皮細胞の発現量とほぼ同程度であった (Fig. 1 (C)). さらにマウス前駆脂肪細胞である 3T3-L1 細胞を用いて脂肪細胞分化過程における EPAS1 タンパク質及び mRNA の発現量を検討したところ, EPAS1 の発現はタンパク質レベル並びに mRNA レベルのいずれにおいても分化の進行に伴い増加することが認められた (Figs. 1 (D), (E)). それに対して EPAS1 のホモログである HIF-1 α mRNA は脂肪細胞分化に伴い減少することが明らかになった (Fig. 1 (E)). さらにこの EPAS1 の脂肪細胞分化過程における発現パターンは, 脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPAR γ 2 のそれと類似していた. これらの結果より, 脂肪細胞分化過程における EPAS1 の増加は脂肪細胞分化のプログラムの進行に関連していることが示唆された.

4. 脂肪細胞分化過程における EPAS1 の転写調節機構

転写因子 EPAS1 は低酸素状態に応答して血管新生及び酸素を必要としないエネルギー産生経路である解糖系の酵素群の発現を調節する.^{16,17)} そのため, EPAS1 遺伝子の発現調節及び機能解析についての

報告は低酸素条件下によるものが多くなされている.^{18,19)} 低酸素時における EPAS1 遺伝子の発現は, EPAS1 タンパク質の翻訳並びに安定化の段階において制御を受けるためそれらに関する多くの知見が報告されているが,^{20,21)} その反面, 転写調節機構については不明な点が多い. しかしながら, 本研究において見出されたように脂肪細胞分化に伴い EPAS1 mRNA 及びタンパク質が協調して増加したこと, さらにはこれらの現象が通常酸素濃度下において観察されたことから, 脂肪細胞分化時において低酸素時とは異なる EPAS1 の発現制御メカニズム並びに生理機能の存在が推測される. そこでわれわれは, 脂肪細胞分化過程における EPAS1 の転写調節機構を解析した.²²⁾ まず始めに EPAS1 遺伝子のプロモーター解析を行うために段階的に 5' 上流を欠損させたりポーター遺伝子を作製し, 脂肪細胞分化に伴うそれらの活性変化を検討した. その結果, -478/-445 領域が脂肪細胞分化に伴う EPAS1 の転写活性化に重要であることが明らかになった (Fig. 2). そこで脂肪細胞分化過程においてこの -478/-445 領域に結合する核内因子の存在を Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) に

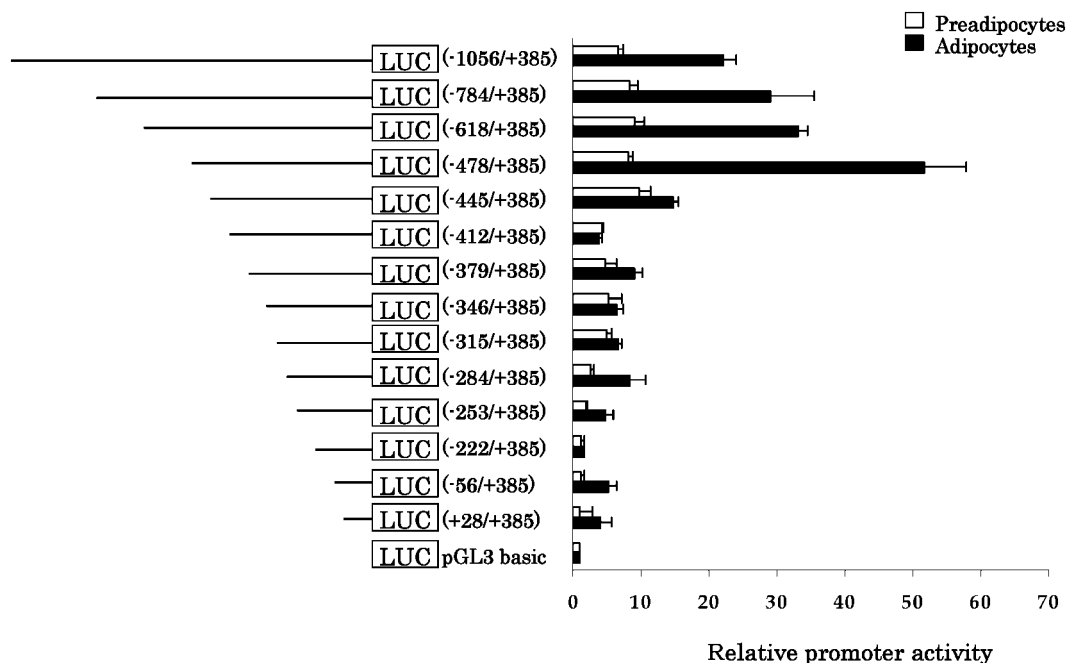


Fig. 2. Comparison of the EPAS1 Promoter Activity in 3T3-L1 Preadipocytes and Adipocytes

3T3-L1 preadipocytes and adipocytes were transiently transfected with EPAS1 promoter construct. For all constructs, pRL-SV40 vector was co-transfected to correct for differences in transfection efficiency. Constructs carrying various lengths of EPAS1 promoter were cloned into pGL3 basic vector, and their activity was determined. The number in parenthesis indicates the position of the mouse EPAS1 gene inserted into the vector. The normalized activity in cells transfected with pGL3 basic vector was arbitrarily assigned a value of 1. The averages of three independent experiments are shown.

より検討したところ、前駆脂肪細胞並びに脂肪細胞のいずれの核タンパク質もこの領域に対する結合性を有していたが、脂肪細胞核タンパク質における活性は前駆脂肪細胞の核タンパク質に比較して著しく低いものであった。これらの結果から、脂肪細胞分化に伴う EPAS1 の発現調節において抑制因子並びに活性化因子のいずれもが存在することが考えられた。われわれは -478/-445 領域に対する結合因子を検索する目的で、Transcription Element Search System を用いて本領域を解析した。その結果、この配列内にいくつかの Sp1/Sp3 結合部位が存在することが認められた。Sp1 は様々な標的遺伝子の転写活性化に関与している DNA 結合タンパク質であり、それに対して Sp3 は Sp1 と同様の DNA 結合性を有しているがその構造上の特徴のため Sp1 と競合することにより Sp1 依存的転写活性を抑制する性質を有している。^{23,24)} そこでこの -478/-445 領域における Sp1 及び Sp3 の機能解析を reporter gene を用いて検討したところ、Sp1 は活性化因子、そして Sp3 は抑制因子として作用することが明らかになった。さらに Sp1 及び Sp3 の脂肪細胞分化に伴う発現量の変化並びに結合量の変化を Western blot 法と ChIP assay によりそれぞれ検討した。その結果、脂肪細胞分化に伴う Sp3 発現量の減少に依存して -478/-445 領域上の Sp1/Sp3 存在比の増加が認められた。したがって EPAS1 の転写調節機構として前駆脂肪細胞では -478/-445 領

域上に抑制因子である Sp3 が優位に結合しているが、分化の進行に伴い Sp3 自身の発現量が減少し、活性化因子である Sp1 が Sp3 に対して量的優位となり EPAS1 の発現が誘導されることを明らかにした (Fig. 3).²²⁾

5. 脂肪細胞分化における EPAS1 の役割

1) *In vivo* 並びに *in vitro* のいずれにおいても脂肪細胞分化に伴い EPAS1 の発現量が増加すること、2) その EPAS1 の転写調節機構が脂肪細胞分化に密接に連動していること、3) 脂肪細胞は高い糖・脂質代謝活性を示すが、これらの代謝系の構成する酵素群の一部が EPAS1 に制御されていることから、EPAS1 の脂肪細胞分化における重要性が示唆される。そこで 3T3-L1 前駆脂肪細胞に EPAS1 の変異体を過剰発現させ、そのドミナントネガティブ効果より脂肪細胞分化における EPAS1 の役割を検討した。まず転写活性化領域を欠いた EPAS1 (EPAS1 (1-485)) cDNA を Ponasteron.A (Pon.A) によって誘導される誘導型発現ベクターにサブクローニングした。そしてこれを 3T3-L1 細胞に導入し、誘導型 EPAS1 (1-485) 発現ベクター導入細胞を樹立した。脂肪細胞分化に対する EPAS1 (1-485) の影響を検討したところ、EPAS1 (1-485) 導入細胞は Pon.A 未添加時には脂肪細胞へと分化したものの、Pon.A 添加によりすなわち EPAS1 (1-485) の発現により脂肪細胞への分化が著しく阻害された (Fig. 4)。それらに対して Vector 導入細胞は

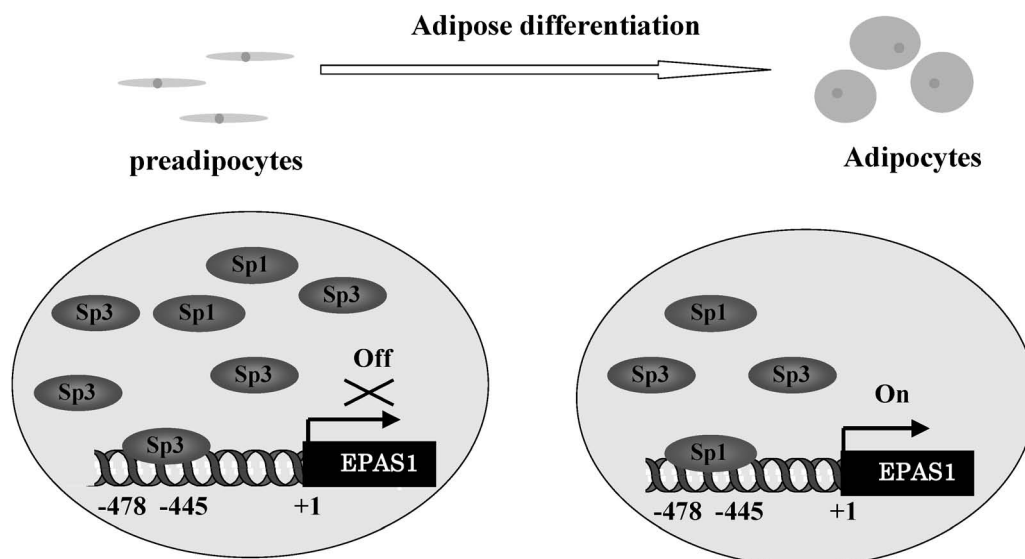


Fig. 3. A Schematic Model of Transcriptional Regulation of EPAS1 Gene during Adipose Differentiation

Pon.Aの有無に係わらず、脂肪細胞への分化が認められた。そこでこれらの細胞における脂肪細胞分化関連遺伝子の発現を検討したところ、EPAS1 (1-485) 発現細胞において PPAR γ 2 や adipocyte fat-

ty-acid protein2 (aP2) などの発現量の減少が認められた。さらに脂肪細胞分化プログラムの進行に重要な役割を有していることが知られている CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) α , β 並びに δ などの発現量は EPAS1 (1-485) 発現細胞において著しい減少が認められた。さらに EPAS1 それ自身が脂肪細胞分化誘導能を有しているか否かを通常の条件下では脂肪細胞分化能を有しない NIH 3T3 細胞を用いて検討した。野生型 NIH3T3 細胞及びベクター導入細胞は脂肪細胞への分化能を有しなかったが、EPAS1 過剰発現 NIH3T3 細胞は形態的にも脂肪細胞分化マーカー遺伝子の発現に関しても脂肪細胞への分化が認められた (Fig. 5)。これらの結果より EPAS1 が脂肪細胞分化の正の制御因子であることが示された。

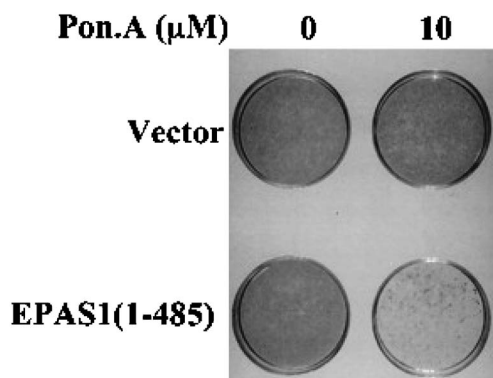


Fig. 4. Dominant Negative Effects of EPAS1 (1-485) on Adipose Differentiation in 3T3-L1 Cells

3T3-L1 preadipocytes stably transfected with inducible EPAS1 (1-485) or empty vector (*Vector*) were induced to differentiate for 7 days in the presence or absence of Pon.A. Cells were fixed and stained with Oil Red O. Similar results were obtained with three independent clones.

6. 脂肪細胞分化過程における EPAS1 の機能解析

PPAR γ 2 はリガンド結合型転写因子であり、脂肪細胞分化の制御の一端はこの因子の活性化並びに

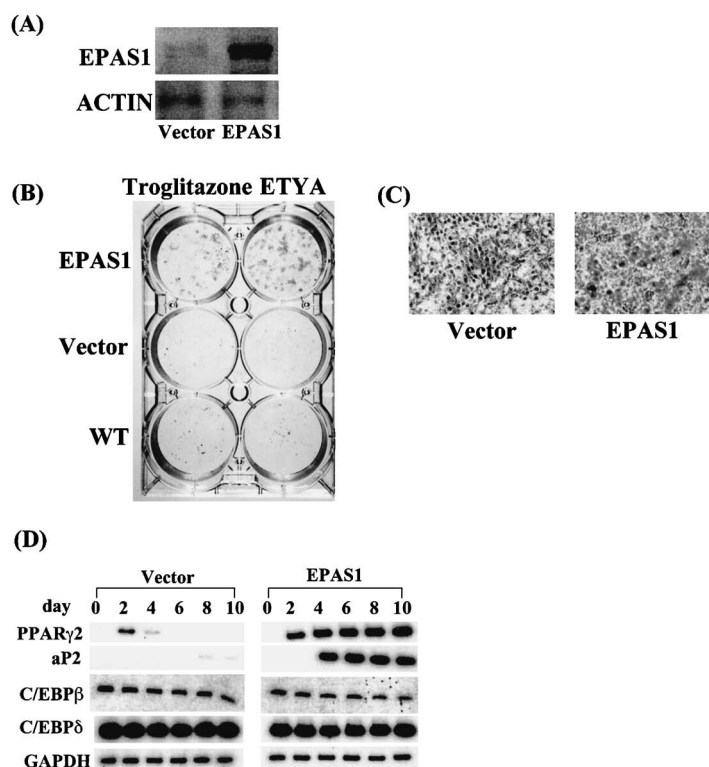


Fig. 5. Ectopic Expression of Full-length EPAS1 in NIH 3T3 Cells Stimulates Adipose Differentiation

(A) NIH 3T3 cells were stably transfected with full-length EPAS1 expression plasmid (EPAS1) or pcDNA 3.1 plasmid (*Vector*). Western blot analysis of EPAS1 and actin was performed on whole cell extracts (10 μ g for EPAS1 and 5 μ g for actin). (B) Cell clones were treated with differentiation medium containing either troglitazone (10 μ M) or ETYA (50 μ M) for 10 days. Cells were fixed and stained with Oil Red O. (C) Microscopic view of dishes shown in (B) at $\times 100$ original magnification. (D) The cell clones were induced to differentiate with differentiation medium containing ETYA. Total RNA was extracted at the indicated time points, and the expression of adipocyte-related genes was determined by Northern blot analysis. The results shown in (A)–(D) are representative of three to five independent clones with similar results.

それに続く脂肪酸合成の調節によって行われる。^{25,26)}そこでEPAS1による脂肪細胞分化の調節機構を検討する目的で、PPAR γ 2の活性化によるEPAS1(1-485)過剰発現細胞の分化能の回復を試みた結果、PPAR γ 2のリガンド添加によりEPAS1(1-485)発現細胞の分化能はコントロール細胞とほぼ同程度にまで回復した。またPPAR γ 2のプロモーター活性にはEPAS1には影響を与えなかったことから、脂肪細胞分化の調節のカスケードにおいてEPAS1は、PPAR γ 2の活性化に先立ってあるいは協調的に作用することが明らかになった。

脂肪細胞の成熟化にはPPAR γ 2による脂肪酸合成とともにインスリン感受性の獲得が必須である。脂肪細胞におけるインスリン感受性は、インスリンシグナル伝達に関与する様々な因子の分化に伴う転写誘導によって獲得される。²⁷⁾興味深いことにEPAS1のホモログであるHIF-1 α は培養肝細胞においてインスリンにより誘導される遺伝子の一部を制御している。²⁸⁾

そこで脂肪細胞内でのインスリンシグナリングにおけるEPAS1の役割を解明するため、まず脂肪細胞におけるEPAS1の発現に及ぼすインスリンの影響を検討した。その結果、EPAS1 mRNAの発現量はインスリンの有無に係わらずほぼ一定であった。しかしながらEPAS1タンパク質量はインスリン濃度依存的に増加することが観察された。このことは、インスリンがその作用の一部をEPAS1による遺伝子発現を介して発現していることを示唆してい

る。そこで、脂肪細胞におけるインスリン作用の1つであるグルコースの取り込み活性を指標にEPAS1のインスリン作用への関与を検討した。われわれは脂肪細胞においてアデノウイルス系によりEPAS1(1-485)を過剰発現させた。興味深いことに、EPAS1(1-485)発現細胞におけるグルコースの取り込み活性がコントロール群と比較して著しく低下していた(Fig. 6)。

そこでインスリンシグナル関連因子の発現調節におけるEPAS1の役割を検討したところ、EPAS1(1-485)発現脂肪細胞においてグルコースの取り込みに関与するグルコーストランスポーターであるGlut1、Glut4及び脂肪細胞特異的インスリン受容体基質であるIRS3の発現量が著しく抑制された。さらにこれらの遺伝子プロモーター活性がEPAS1により増加したことから、EPAS1がこれら因子の転写調節に関与することが明らかになった。これらの因子はいずれも脂肪組織を形成する上で必須な遺伝子であることがノックアウトマウスを用いた検討より明らかにされていることから、これら遺伝子の転写調節がEPAS1による脂肪細胞分化の調節機構の一部であることが明らかになった。²⁹⁻³²⁾またインスリン受容体の下流に位置するAktのリン酸化に対してEPAS1の直接的な関与が認められなかったことから、先にEPAS1の標的遺伝子として同定されたもののうち、特にGlut1並びにGlut4の発現調節がEPAS1によるインスリン感受性獲得機序において重要であることが認められた。以上の結果より

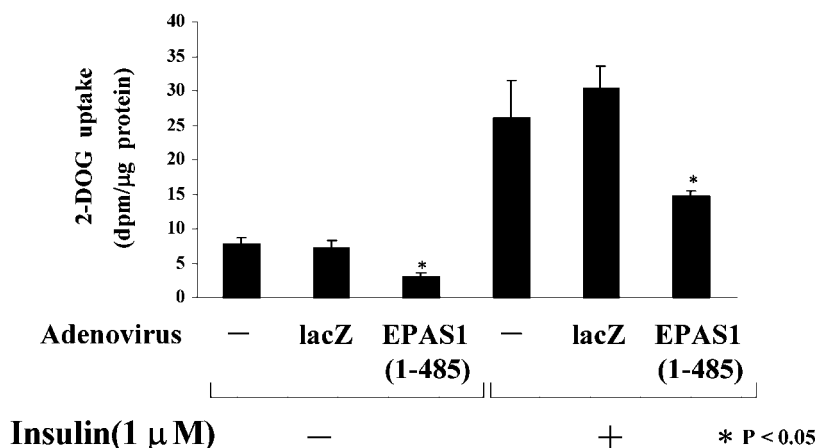


Fig. 6. Dominant Negative Effects of EPAS1 (1-485) on Glucose Transport in 3T3-L1 Adipocytes

3T3-L1 adipocytes were infected with adenovirus carrying EPAS1 (1-485) or LacZ at a multiplicity of infection of \sim 50 for 24 h. The cells were stimulated with 1 μ M insulin in Krebs-Ringer-Hepes buffer for 30 min.

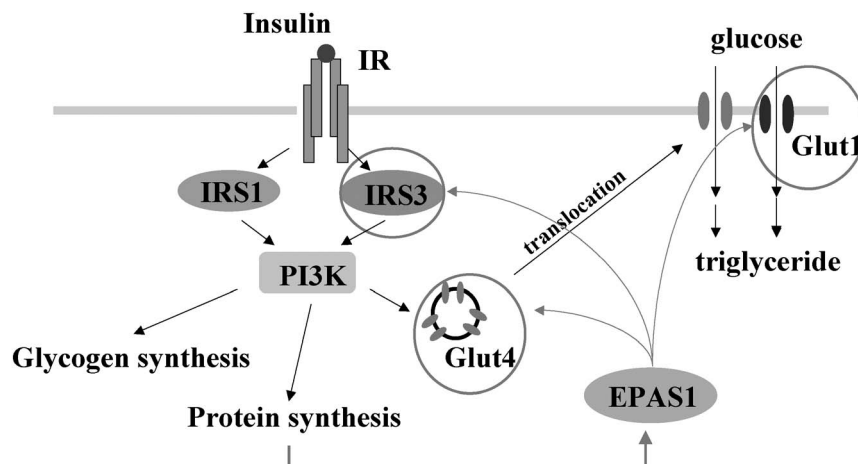


Fig. 7. The Possible Roles of EPAS1 in Insulin Signaling

EPAS1 was increased by insulin in adipocytes. EPAS1 seems to directly regulate Glut1, Glut4 and IRS3 genes, followed by enhanced glucose uptake, may account in part for putative mechanism by which EPAS1 promotes insulin sensitivity.

EPAS1 は、脂肪細胞分化に伴い mRNA レベル並びにタンパク質レベルのいずれにおいても発現量を増加し、その結果 Glut1, Glut4 並びに IRS3 の発現調節を介してインスリン感受性の獲得並びにそれに引き続く脂肪細胞分化の進行を調節することを明らかにした (Fig. 7).

EPAS1 の機能を明らかにする上でノックアウトマウスを用いた検討は有効であると考えられるが、EPAS1 ノックアウトマウスは多くの場合胎生致死であり、わずかに誕生したマウスにおいてもその激しい病理的变化により長期観察は困難である。それに対して本研究で示したように誘導系あるいはアデノウイルス系によるドミナントネガティブ EPAS1 の発現系は、ノックアウトマウスの長所を有するとともに短所を補うものとして有用な手法となる。したがって本研究で示した結果は EPAS1 の脂肪細胞における標的遺伝子並びに調節機構を明らかにしたことにと留まらず、いまだ不明な点が多い EPAS1 の発生・分化における生理機能の解明のための新たな指標となると考えられる。

7. おわりに

以上述べてきたように、筆者は脂肪細胞分化過程において EPAS1 は、転写レベルでの制御に加え、インスリン刺激によりタンパク質量を増加させ、その結果インスリンシグナル伝達関連因子の発現調節を介してインスリン感受性の獲得並びにそれに引き続く脂肪細胞分化を調節することを見出した。その詳細なメカニズムとして EPAS1 は、脂肪細胞分化

に伴い mRNA レベル並びにタンパク質レベルのいずれにおいても発現量を増加し、その結果 Glut1, Glut4 並びに IRS3 の発現調節を介してインスリン感受性の獲得並びにそれに引き続く脂肪細胞分化の進行を調節することを明らかにできた。

本研究では、その生理機能に関して不明な点が多い EPAS1 を、脂肪細胞分化の一端を担う新たな転写因子として捉え、その重要性を見出すとともに脂肪細胞分化における発現調節を明らかにした。本研究で得られた知見は、肥満さらにはインスリン抵抗性に基づいたメタボリックシンドローム発症の予防に有用な新規の戦略を与えるものと期待される。

謝辞 本研究は、日本大学薬学部衛生化学研究室・手塚雅勝教授の下で行われたものであり、先生には、終始寛容な御指導と御鞭撻を賜りましたことを心より感謝いたします。また、本研究の遂行にあたり、御指導、御助言を賜りました日本大学薬学部衛生化学研究室・榛葉繁紀助教授に心より感謝いたします。本研究にご協力頂いた日本大学薬学部衛生化学研究室内の大学院生並びに卒業研究生の皆様にも深く感謝いたします。最後に、本研究を行うにあたり、EPAS1 plasmid を提供していただきました昭和大学薬学部の原 俊太郎助教授にこの場をお借りして御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Kissebah A. H., Vydellingum N., Murray R.,

- Hartz A. J., Kalkhof R. K., Adams P. W., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **54**, 254–260 (1982).
- 2) Fujioka S., Matsuzawa Y., Tokunaga K., Tarui S., *Metabolism*, **36**, 549 (1987).
- 3) Shimomura I., Funahashi T., Takahashi M., Maeda K., Kotani K., Nakamura T., Yamamoto S., Miura M., Fukuda Y., Takemura K., Tokunaga K., Matsuzawa Y., *Nat. Med.*, **2**, 800–803 (1996).
- 4) Arita Y., Kihara S., Ouchi N., Takahashi M., Maeda K., Miyagawa J., Shimomura I., Nakamura T., Miyaoka K., Kuriyama H., Nishida M., Yamashita S., Okubo K., Matsubara K., Muraguchi M., Ohmoto Y., Funahashi T., Matsuzawa Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **257**, 79–83 (1999).
- 5) Meyer L., Hadjadj S., Guerci B., Delbachian I., Ziegler O., Drouin P., *Diabetes Metab.*, **24**, 544–546 (1998).
- 6) Rajala M. W., Scherer P. E., *Endocrinology*, **144**, 3765–3773 (2003).
- 7) Shimba S., Wada T., Tezuka M., *J. Cell Sci.*, **114**, 2809–2817 (2001).
- 8) Shimba S., Hayashi M., Ohno T., Tezuka M., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1266–1271 (2003).
- 9) Shimba S., Ishii N., Ohta Y., Ohno T., Watabe Y., Hayashi M., Wada T., Aoyagi T., Tezuka M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 12071–12076 (2005).
- 10) Turek F. W., Joshu C., Kohsaka A., Ivanova G., McDearmon E., Laposky A., Losee-Olson S., Easton A., Jensen D. R., Eckel R. H., Takahashi J. S., Bass J., *Science*, **308**, 1043–1045 (2005).
- 11) Holder Jr. J. L., Butte N. F., Zinn A. R., *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 101–108 (2000).
- 12) Scortegagna M., Morris M. A., Oktay Y., Bennett M. J., Garcia J. A., *Blood*, **102**, 1634–1640 (2003).
- 13) Scortegagna M., Ding K., Oktay Y., Gaur A., Thurmond F., Yan L.-J., Marck B. T., Matsumoto A. M., Shelton J. M., Richardson J. A., Bennett M. J., Garcia J. A., *Nat. Genet.*, **35**, 331–340 (2003).
- 14) Yun Z., Maecker H. L., Johnson R. S., Giacchia A. J., *Dev. Cell*, **2**, 331–341 (2002).
- 15) Shimba S., Wada T., Hara S., Tezuka M., *J. Biol. Chem.*, **279**, 40946–40953 (2004).
- 16) Zhu Y., Qi C., Korenberg J. R., Chen X. N., Noya D., Rao M. S., Reddy J. K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 7921–7925 (1995).
- 17) Bryick R. K., McKnight S. L., *Genes Dev.*, **15**, 2497–2502 (2001).
- 18) Forsythe J. A., Jiang B. H., Iyer N. V., Agani F., Leung S. W., Koos R. D., Semenza G. L., *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 4604–4613 (1996).
- 19) Semenza G. L., Jiang B. H., Leung S. W., Passantino R., Concordet J. P., *J. Biol. Chem.*, **271**, 32529–32537 (1996).
- 20) Bryick R. K., McKnight S. L., *Genes Dev.*, **15**, 2497–2502 (2001).
- 21) Elson D. A., Thurston G., Huang L. E., Ginzinger D. G., McDonald D. M., Johnson R. S., Arbeit J. M., *Genes Dev.*, **15**, 2520–2532 (2001).
- 22) Wada T., Shimba S., Tezuka M., *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 49–54 (2006).
- 23) Dennig J., Beato M., Suske G., *EMBO J.*, **15**, 5659–5667 (1996).
- 24) Majello B., De Luca P., Hagen G., Suske G., Lania L., *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4914–4921 (1994).
- 25) Tontonoz P., Hu E., Spiegelman B. M., *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **5**, 571–576 (1995).
- 26) Hu E., Tontonoz P., Spiegelman B. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 9856–9860 (1995).
- 27) Wu Z., Rosen E. D., Brun R., Hauser S., Adelmant G., Troy A. E., McKeon C., Darlington G. J., Spiegelman B. M., *Mol. Cell*, **3**, 151–158 (1999).
- 28) Zelzer E., Levy Y., Kahana C., Shilo B.-Z., Rubinstein M., Cohen B., *EMBO J.*, **17**, 5085–5094 (1998).
- 29) Katz E. B., Stenbit A. E., Hatton K., DePinho R., Charron M. J., *Nature*, **377**, 151–155 (1995).
- 30) Joost H. G., Steinfelder H. J., *Mol. Pharmacol.*, **22**, 614–618 (1982).
- 31) Tozzo E., Shepherd P. R., Gnudi L., Kahn B. B., *Am. J. Physiol.*, **268**, 956–964 (1995).
- 32) Laustsen P. G., Michael M. D., Crute B. E., Cohen S. E., Ueki K., Kulkarni R. N., Keller S. R., Lienhard G. E., Kahn C. R., *Genes Dev.*, **16**, 3213–3222 (2002).