



ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ の抑制型変異体の作成

馬杉, 治郎

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 60(1):17-23

(Issue Date)

1999-06

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00042526>



ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ の抑制型変異体の作成

馬 杉 治 郎

神戸大学大学院医学研究科内科学II
 (担当:春日 雅人教授)
 連絡先 兵庫県神戸市中央区楠町7-5-2
 神戸大学医学部第二内科 馬杉 治郎
 Tel:078-382-5868
 FAX:078-382-2080
 E-mail:masugi@med.kobe-u.ac.jp

(平成11年1月22日受付)

要 約

ペルオキシソーム増殖剤応答受容体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) は脂肪細胞の分化にきわめて重要な役割を担っている。しかし分化以外の役割についてはいまだ十分な検討がなされていない。蛋白質の機能解析の1つの有力な方法に、抑制型変異体を用いる方法があり、PPAR γ においても抑制型変異体が得られれば研究に有用であると考えられる。

今回、PPAR γ の抑制型変異体の作成を試みたところ、 ΔC 変異体と名付けた変異体は、転写活性が低下し、3T3-L1線維芽細胞の脂肪細胞への分化を抑制した。PPAR γ の抑制型変異体を得られたと考えられるため、報告する。

緒 言

核内受容体の一種であるペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) は脂肪細胞の分化の初期から発現が見られ、脂肪細胞分化においてきわめて重要な役割を担っていることが明らかとされている。しかし分化後にもPPAR γ の発現が認められるものの、その役割については未だ検討がなされていない。

今回PPAR γ の成熟脂肪細胞における機能解析に利用するための抑制型変異体の作成を試した。

方 法

材料

細胞はAmerican Type Tissue Culture Collec-

tionより入手した。InsulinはSigma Chemical Co.(St. Louis, MO)より、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、LipofectinはGIBCO BRL, Life Technologies, Inc. (Rockville, MD, USA)より、CellPfect, Glutathione sepharose 4B, pGEX4T-3はPharmaciaよりそれぞれ購入した。troglitazoneは三共 (Japan) より提供された。BRL 49653はSmithKline Beecham (United Kingdom) より提供された。DNA-TPCおよびpAdex 1 CAwt vectorは齊藤泉先生 (東京大学) より分与いただいた。

プラスミドの作成

マウスPPAR γ 2のcDNAは3T3-L1脂肪細胞のmRNAからreverse-transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) を行い入手した。エンザイムサイトとhemagglutinin A (HA)-tagをPCRにより挿入した。野生型PPAR γ 2 (WT) のcDNA作成にはS-プライマー:5'-attctagagttatgggtgaaactctggga-3', およびAS-HA-プライマー:5'-taggtacctcatgctagtcgggaacatcgtacggatacaagtccttctgtagatctctctg-3' を使用し、抑制型変異体 (ΔC) にはS-プライマーおよびCAS-HA-プライマー:5'-ctggtaccctacgcgtaatcggggacatcgtacgggtatgtctctgtctctctgtatcacatg-3'を使用した。PCR産物はpBluescript II-KS vector (Stratagene) のXba I-KpnIサイトに挿入され、確認のためシーケンスを行った後、それぞれのcDNAをpcDL-SR α (pcDL-SR α -WT及びpcDL-SR α ΔC と命名した) あるいはpGEX4T-3に挿入した。

アデノウイルスの作成

HA-tagのついたWTおよび ΔC 変異体のcDNAをpBluescript II-KS vectorよりそれぞれXba IとKpnI

キーワード: PPAR γ , adipogenesis, dominant-negative action

で分離, 両端をプラント化し, pAdex1CAwt vector のSwaIサイトに挿入した。DNA-TPCと共に293細胞にCellPfectによりトランスフェクトし, プラークアッセイを行って単一クローンを分離した。293細胞にてウイルスの増幅を繰り返した後, CsClを使った超遠心分離を2度行って精製し, phosphate-buffered saline (PBS), pH7.4-1% glycerolにて透析した。ウイルスタイターはプラークアッセイにより決定した。分離されたマウス野生型PPAR γ 2, あるいはC末側欠損変異体PPAR γ 2を含むアデノウイルスをそれぞれAdex-PPAR γ 2-WT, Adex-PPAR γ 2- Δ Cと命名した。

ウェスタンブロット

マウスPPAR γ 2に対する抗体はGST-mouse PPAR γ 2をウサギに免疫することにより入手した。

3T3-L1細胞をPBSで二度洗った後, lysis buffer (50mM Tris/HCl, pH7.5, 150mM KCl, 1% TritonX-100, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1mM dithiothreitol)にて15分間溶解し, 10000gにて10分間遠心分離を行った。上清を10%SDS-PAGEゲルにて展開, ニトロセルロース膜に転写し, ミルクバッファーでブロックした後, マウスPPAR γ 2抗体もしくはHA抗体でブロットした。horseradish peroxidaseの結合した二次抗体と混合した後, enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham, Little Chalfont, UK)にて蛋白バンドを可視化した。

リガンド結合アッセイ

Glutathione S-transferase (GST) 単独, あるいはGST-PPAR γ 融合蛋白を大腸菌 (NM522) に発現させた。50mM Tris/HCl (pH7.5), 50mM KCl, 1% Tritonのバッファー中でこれらの大腸菌をソニケートし, 10000gにて30分遠心分離してその上清を回収, Glutathione sepharose 4BにてGST, あるいはGST-PPAR γ 融合蛋白を精製した。約10 μ gの精製蛋白, 500 μ gの大腸菌蛋白, 200nMの [3 H]-BRL49653 (specific activity. 40 Ci/mmol), そして必要に応じて100 μ Mの非標識のBRL49653とを50mM Tris/HCl (pH7.5), 50mM KCl, 10mM DTTのバッファー中にて4 $^{\circ}$ Cで6時間混合した後, Quick Spin Sephadex G-25 columns (Boehringer Mannheim)にて蛋白に結合したBRL49653とフリーのBRL49653とを分離した。シンチレーションカウンターにて蛋白に結合した標識BRL49653の量を測定した。

ゲルシフトアッセイ

PPRE (peroxisome proliferator responsive element) オリゴヌクレオチド (5'-gttactaggacaaa ggtcacagat-3'及び3'-aatgatcctgtttccagtgtctag-5')を1サイクルのPCR (4min of denaturation at 94 $^{\circ}$ C, 10 min of annealing at 55 $^{\circ}$ C, 10min of elongation at 72 $^{\circ}$ C)によりアニールし [α 32 P]-dCTPにて標識した。CHO細胞の培地にAdex-PPAR γ 2-WTあるいはAdex-PPAR γ 2- Δ Cを加えて2時間培養し48時間後lysis buffer (50mM Tris/HCl pH7.5, 150mM KCl, 1% Triton X-100, 1mM PMSF)にて細胞を溶解し, その上清を回収した。ウェスタンブロットによりほぼ同等の蛋白発現が見られることを確認した後, 細胞溶液とラベルされたPPREとを20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 2mM EDTA, 5mM MgCl $_2$, 1mM PMSF, 10% glycerol, 1 μ g poly [d(I-C)]の溶液 (最終量15 μ l)に混合し20分間室温にて静置した。競合実験には, 非標識のPPREオリゴヌクレオチドを標識PPREオリゴヌクレオチドの10~200倍加えた。蛋白とDNAとの結合した複合体は6%ポリアクリルアミドゲルにて分離し, 乾燥させた後, フィルムに感光した。

ルシフェラーゼアッセイ

24ウェルプレート上, DMEMにて培養されたCV-1細胞にレポータープラスミドPPRE $_3$ -TK-LUC (250 ng/well), 蛋白発現ベクターpcDL-SR α -WT, pcDL-SR α Δ C, あるいはpcDL-SR α vector (200 ng/well), 及びpSV- β galactosidase (300ng/well)をLipofectin (0.5 μ g/well)にてトランスフェクトした。24時間後, dimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解した1 μ Mのtroglitazone, あるいはDMSO単独を加えた。さらに24時間後, 細胞を回収し, ルシフェラーゼアッセイと β -ギャラクトシダーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼアッセイの値を β -ギャラクトシダーゼアッセイの値で補正した。実験は少なくとも2検体以上の複数で行われ3回以上繰り返された。

PPAR γ WT及び Δ C変異体の脂肪細胞分化に対する影響

10%FCS-DMEMにて培養された3T3-L1 fibroblastsにAdex-PPAR γ 2-WT, Adex-PPAR γ 2- Δ C, あるいはPBS-1% glycerolのみを加えて感染させた。2時間後メディアムを交換してウイルスを除去し, さらに46時間培養した。次にBRL49653 (5 μ M)及びinsulin (100nM)を含んだ10% FCS-DMEMにて4日間培養し, 脂肪分化の誘導を行った。培地交換は2日置きに行い, 脂肪細胞の分化度は分化誘導8日目に

検討した。また必要に応じてOil Red O染色を行った。細胞内中性脂肪の測定は細胞を溶解液 (50mM Tris/HCl pH7.5, 150mM KCl, 1% Triton X-100, 1mM PMSF) で溶解しその上清のtriglyceride含有量をTriglyceride G-test (WAKO) にて測定した。

結 果

抑制型変異体の作成

PPAR γ はレチノイドX受容体 (retinoid-X receptor; RXR) とヘテロ二量体形成してDNAに結合し、様々な蛋白発現の調節を行う核内受容体の一種である。これら核内受容体はそれぞれ構造上類似性を呈し、スーパーファミリーを形成している。N末側よりA/Bドメイン、DNA結合ドメイン、ヒンジドメイン、リガンド結合ドメインと機能的に分かれており、リガンド結合部位をもってRXRに結合する。さらにこのリガンド結合部位の最もC末端にactivating function-2 (AF-2) と呼ばれる部位があり、ここを介して転写活性が行われると考えられている。この部位の欠損変異体や点変異体はスーパーファミリーを形成している他の受容体 (例えばレチノイドA受容体、あるいは甲状腺ホルモン受容体など) では抑制型変異体になることが知られている^(1, 2)。同様のことがPPAR γ にても起こることを予想してPPAR γ 2のC末端の16アミノ酸を欠損させた変異体を作成した。この変異体をPPAR γ 2- Δ Cと名付け、野生型をWTとよび区別した。なおWT、 Δ CともにC末にHA-tagを挿入した (図1)。これらPPAR γ 2-WT、- Δ CのcDNAを蛋白発現ベクター-pcDL-SR α 、あるいはGST融合蛋白発現ベクター-pGEX4T-3、あるいはアデノウイルスベクターに組み込んだ。

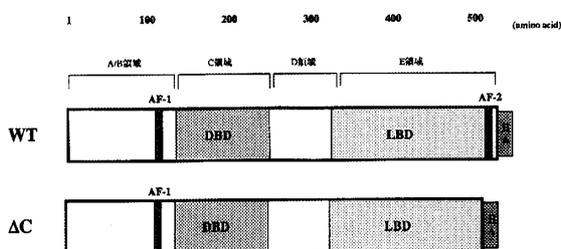


図1 野生型PPAR γ と Δ C変異体の構造

PPAR γ はN末側よりA/Bドメイン、DNA結合ドメイン、ヒンジドメイン、リガンド結合ドメインと機能的に分かれている。リガンド結合部位の最もC末端にactivating function-2 (AF-2) と呼ばれる部位があり、転写活性に重要と考えている。(DBD:DNA binding domain, LBD:ligand binding domain)

リガンド結合アッセイ

BRL4953はチアゾリジン誘導体の一種で、PPAR γ に対し強い親和性を示すリガンドであることが知られている⁽³⁾。

GST-PPAR γ 2-WT融合蛋白、GST-PPAR γ 2- Δ C融合蛋白、およびGST蛋白を大腸菌内にて作成し、それぞれ10 μ gと、^{[3}H]で標識されたBRL49653 200 nMとの結合能の有無について検討を行った。同時に特異的結合であるかどうかを調べる目的で、標識BRL49653の500倍の非標識BRL49653を加えて標識BRL49653の結合量が変化するか否かを検討した。その結果、PPAR γ 2-WTはコントロールのGST単独に比し約500倍のきわめて強い結合を示し、この結合は非標識BRL49653を加えることにより約99%の減少が認められた。

これに反し、リガンド結合ドメインのC末端16アミノ酸を欠損させたPPAR γ 2- Δ CはBRL49653に対する特異的結合能をほとんど有しておらず、GST単独と比べ1.2倍と、GST単独と有意な差を認めることが出来なかった (図2)。

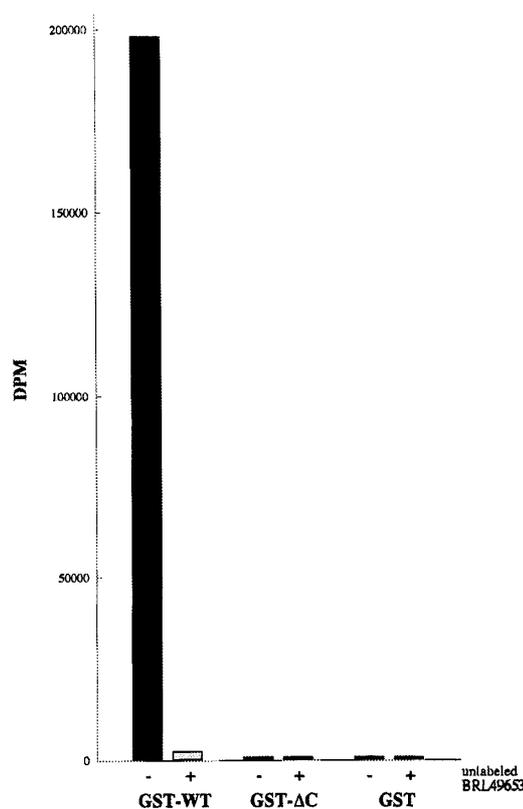


図2 リガンド結合アッセイ

GST-PPAR γ 2-WT融合蛋白、GST-PPAR γ 2- Δ C融合蛋白、およびGST蛋白それぞれ10 μ gと、^{[3}H]-BRL49653 200nMとの特異的結合能の有無を100 μ Mの非標識BRL49653の非存在下および存在下の条件で検討した。

ゲルシフトアッセイ

次にDNAとの結合能を調べる目的でゲルシフトアッセイを行った。CHO細胞にAdex-PPAR γ 2-WT, Adex-PPAR γ 2- Δ Cを感染させてそれぞれを発現させ、ほぼ同量のWT, Δ Cを含む細胞溶解液（ウエスタンブロットにて確認）と [α^{32} P]-dCTPにて標識したPPREオリゴヌクレオチドを混合し、6%ポリアクリルアミドゲルにて蛋白と結合したPPREと非結合のPPREとを分離した。競合実験では非標識のPPREを標識PPREの10, 25, 50, 100, 200倍それぞれ加え、蛋白と結合するPPREのカウントを測定し、その減少率をそれぞれ算出し比較した。その結果、PPAR γ 2-WTとPPAR γ 2- Δ CのDNAに対する親和性には有意な差を認めず、同程度のDNA結合を持つと考えられた（図3）。

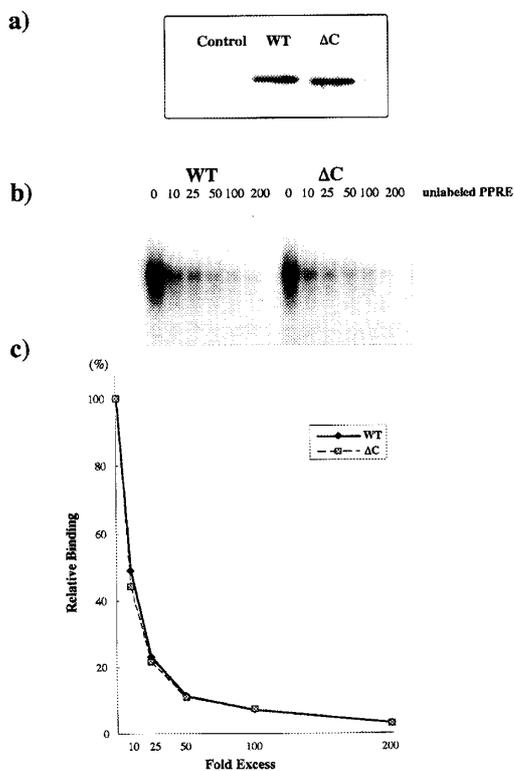


図3 ゲルシフトアッセイ

CHO細胞にAdex-PPAR γ 2-WT, Adex-PPAR γ 2- Δ Cを感染させてそれぞれを発現させ、ほぼ同量のPPAR γ 2-WT, PPAR γ 2- Δ Cを含む細胞溶解液と [α^{32} p]-dCTPにて標識したPPREオリゴヌクレオチドを混合し、6%ポリアクリルアミドゲルにて蛋白と結合したPPREと非結合のPPREとを分離した。競合実験では非標識のPPREを標識PPREの10, 25, 50, 100, 200倍それぞれ加え、蛋白と結合するPPREのカウントを測定し、その減少率をそれぞれ算出し比較した。(a) Western blotによるWT, Δ Cの発現 (b) ゲルシフトアッセイ (c) 競合実験による減少率の変化の比較

ルシフェラーゼアッセイ

次に、PPAR γ 2-WTとPPAR γ 2- Δ Cとの転写活性能力を検討するためルシフェラーゼアッセイを行った。pcDL-SR α -WT, pcDL-SR α Δ C, もしくはコントロールとしてのpcDL-SR α とをレポータープラスミドPPRE $_3$ -TK-LUC及びトランスフェクション効率を補正するためのpSV- β galactosidaseと共にLipofectinにてCV-1細胞にトランスフェクトし、PPAR γ 2-WTとPPAR γ 2- Δ Cとをそれぞれ発現させた後、troglitazone 1 μ M 24h刺激でのPPREに対する転写活性能力を検討した。

PPAR γ 2-WTはこのtroglitazone刺激により約7倍の活性上昇を示した。コントロール細胞もtroglitazoneに約2.3倍と少ないながらも反応を示し内因性のPPAR γ の存在を示唆した。一方、PPAR γ 2- Δ Cを発現した細胞はコントロール細胞よりも低く、ほとんど転写活性を示さなかった（図4）。この結果はPPAR γ 2- Δ Cが抑制型変異体の性質を持つことを示唆していると考えられた。

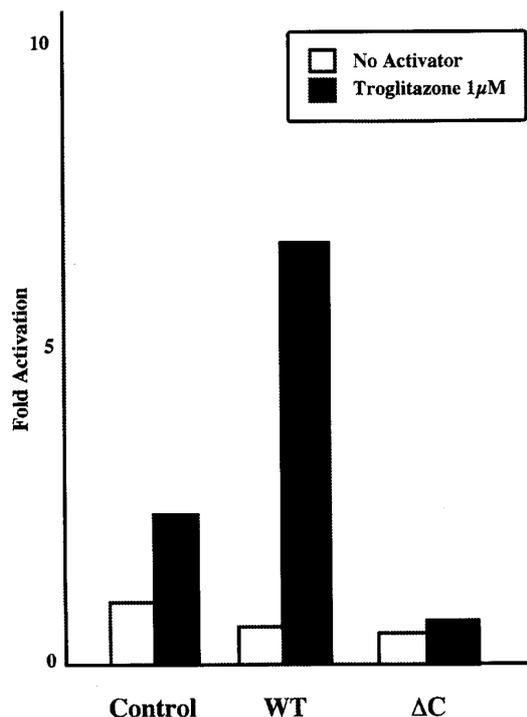


図4 ルシフェラーゼアッセイ

24ウェルプレート上に培養されたCV-1細胞にpcDL-SR α -WT, PCdl-sr α Δ C, pcDL-SR α のみのそれぞれに対し、PPRE $_3$ -TK-LUC, pSV- β galactosidaseをLipofectinにてトランスフェクトした。24時間後、1 μ MのDMSOに溶解したtroglitazone, あるいはDMSO単独を加えた。さらに24時間後、細胞を回収し、ルシフェラーゼアッセイと β -ギャラクトシダーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼアッセイの値は β -ギャラクトシダーゼアッセイの値により補正し、倍率表示した。

PPAR γ WT及び Δ C変異体の脂肪細胞分化に対する影響

次に脂肪細胞分化に対する影響を調べる目的で、3T3-L1 fibroblastsにAdex-PPAR γ 2-WT, Adex-PPAR γ 2- Δ C, あるいはPBS-1% glycerolのみを加えて感染させ、PPAR γ 2-WT, 及びPPAR γ 2- Δ Cを過剰発現させた。BRL49653 (5 μ M) 及びinsulin (100nM) にて4日間刺激して分化を誘導し、分化誘導開始8日目に脂肪細胞への分化度を検討した。この条件によりアデノウイルスを感染させていないコントロールの細胞では約50%の脂肪細胞への分化が認められた。PPAR γ 2-WTを発現させた細胞では分化の増強が見られ、ほぼ100%の細胞に分化が認められた。これに比し、PPAR γ 2- Δ Cを発現させた細胞では1%以下の細胞にしか分化が認められなかった(図5 a, b)。

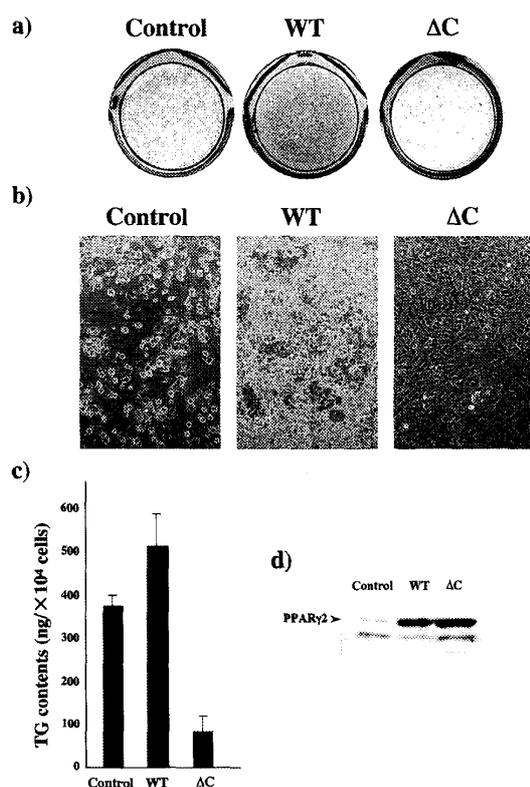


図5 脂肪細胞分化に対する影響

3T3-L1 fibroblastsにAdex-PPAR γ 2-WT, Adex-PPAR γ 2- Δ C, あるいはPBS-1% glycerolのみを加え、2日後にBRL49653 (5 μ M) 及びinsulin (100nM) で4日間刺激して分化を誘導し、分化誘導開始8日目に脂肪細胞の分化度を検討した。

(a)マクロ所見 Oil Red O染色 (b)ミクロ所見 (×100) (c)細胞内中性脂肪量含有量 (d)分化後のWestern blotによるWT, Δ Cの発現確認

さらに細胞内の中性脂肪量の定量を行ったが、PPAR γ 2-WTは有意に細胞内中性脂肪量含有量を増加させ、逆にPPAR γ 2- Δ Cは抑制した(図5 c)。

以上よりPPAR γ 2- Δ Cは、3T3-L1 fibroblastsにおいても内因性PPAR γ の脂肪細胞への分化の作用に対し、抑制的に機能していると考えられた。

考 察

核内受容体の一種であるペルオキシソーム増殖剤応答受容体(PPAR)は α , δ (ツメガエルでは β と呼ばれ、ヒトではNUC-1と呼ばれる), γ の三種類のサブタイプが報告されている。PPARはビタミンD受容体, 甲状腺ホルモン受容体などと類似構造を示し, DNA結合領域, リガンド結合領域を持つ。またリガンド結合領域のC末端側にAF2と呼ばれる部位があり, これを介して転写が開始されると考えられている。PPARは細胞内においてビタミンD受容体, 甲状腺ホルモン受容体などと同様RXRとヘテロ二量体を形成してDNAのエンハンサー, サイレンサー領域に結合し, 種々の蛋白発現をコントロールしている。PPARのDNA結合領域はPPRE (peroxisome proliferator responsive element) と呼ばれ, 5'-AGGTCA-3'に代表される6塩基列が1塩基のスペーサーをはさんで同方向に2つ並ぶダイレクトリピーター-1 (DR-1)の配列をとっている。

PPAR α は主として肝, 心, 腎などに発現の見られる蛋白で, ミトコンドリア内の脂肪酸代謝に中心的役割を果たすと考えられている⁽⁴⁾。一方PPAR δ は広範囲の組織に発現を見られるが主たる作用はあまり明らかになっていない。

PPAR γ にはPPAR γ 1とPPAR γ 2の二つのisoformが知られており, PPAR γ 2はPPAR γ 1のN末側にマウスで30アミノ酸長く突出している以外は全く同じアミノ酸配列をしている。PPAR γ 1の発現は脂肪組織, 肝, 筋肉, 脾臓, 白血球など比較的広い範囲の臓器にその発現が見られ, それに比しPPAR γ 2は脂肪細胞に強い特異性を持って発現している。このPPAR γ 2は脂肪細胞分化の初期から発現がみられており, 興味深いことにこの蛋白をNIH3T3細胞のような線維芽細胞に発現させると脂肪細胞への分化能を有するようになる⁽⁵⁾。

PPAR γ 2はその後に発現されるDNA結合蛋白C/EBP α と強調して, 脂肪細胞特異的な蛋白発現を調節していると考えられるが, PPAR γ 2とC/EBP α を強制発現させることにより筋芽細胞ですら脂肪細胞に変化することが報告されている⁽⁶⁾。

このようにPPAR γ 2が脂肪分化に中心的な役割を果たしているのは以上より明らかであるが、分化後にもPPAR γ の発現が認められるものの、その役割については未だ十分な検討がなされていない。

今回PPAR γ の成熟脂肪細胞における機能を検討するため抑制型変異体の作成し、3T3L1細胞にアデノウイルス発現系を使って過剰発現させ分化能の機能の変化を検討した。 ΔC はリガンドに対する結合能を有していないものの、DNAに対する結合能は野生型とほぼ同程度有していた。またルシフェラーゼアッセイでは転写活性が見られず、むしろ抑制的に作用した。さらに脂肪細胞への分化を抑制したことより、ゲノムDNAのPPREを占拠することにより内因性のPPAR γ の働きを抑制していると考えられた。

今後この変異体を用いてPPAR γ が糖代謝や脂質代謝に対しどのように機能しているかについて検討を行っていく予定にしている。

以上、PPAR γ の ΔC 変異体がPPREによる転写活性及び脂肪細胞分化に対して抑制型変異体として機能することが明かとなったので報告する。

謝 辞

DNA-TPCおよびpAdex1CAwtを頂いた斉藤泉先生、PPRE₃-TK-LUCを頂いた梅園和彦先生に感謝申し上げます。また、実験のご指導、ご協力を頂いた田守義和先生、荒木悟先生、森啓行先生、仁木敏晴先生、川西正敏先生、岡沢秀樹先生、篠田弘幸先生、繁田さとみ女史に感謝申し上げます。最後に、常に温かく見守っていただき、ご指導いただきました春日雅人教授に深謝申し上げます。

文 献

1. Damm, K., Heyman, R.A., Umesono, K., Evans, R.M.: Functional inhibition of retinoic acid response by dominant negative retinoic acid receptor mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 : 2989-2993, 1993
2. Saitou, M., Narumiya, S., Kakizuka, A.: Alteration of a Single Amino Acid Residue in Retinoic Acid Receptor Causes Dominant-negative Phenotype. *J. Biol. Chem.* 269 : 19101-19107, 1994
3. Lehmann, J. M., Moore, L. B., Smith, Oliver-TA., Wilkison, W.O., Willson, T. M., Kliewer, S.A.: An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR gamma). *J. Biol. Chem.* 270(22):12953-12956, 1995
4. Aoyama, T., Peters, J. M., Iritani, N., Nakajima, T., Furihata, K., Hashimoto, T., Gonzalez, F.J.: Altered Constitutive Expression of Fatty Acid-metabolizing Enzymes in Mice Lacking the Peroxisome Proliferator-activated Receptor α (PPAR α). *J. Biol. Chem.* 273:5678-5684, 1998
5. Tontonoz, P., Hu, E., Spiegelman, B.M.: Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79 : 1147-1156, 1994
6. Hu, E., Tontonoz, P., Spiegelman, B.M.: Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. *Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 9856-9860, 1995

Construction of dominant-negative peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ).

Jiro Masugi

Second Department of Internal Medicine, Kobe University School of Medicine

Abstract

Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) plays a key role in adipogenesis. However, its role after maturation is not yet well clarified. In order to study its function in mature adipocytes, I constructed dominant-negative PPAR γ which does not contain transcription activity and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 fibroblasts. This mutant will be a good tool to study the function of PPAR γ in mature adipocytes.