



The Kruppel-like factor KLF15 inhibits transcription of the adrenomedullin gene in adipocytes

永礼, 智基

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4489

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004489>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	永礼 智基
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 4489 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

The Kr?ppel-like factor KLF15 inhibits transcription of the adrenomedullin gene in adipocytes
(Kr?ppel-like factor KLF15 は脂肪細胞において adrenomedullin 遺伝子の転写を抑制する)

審 査 委 員

主 査	教 授	中村 俊一
	教 授	平田 健一
	准教授	深川 雅史

背景

Krüppel-like factors(KLFs)はC2H2型 zinc-finger モチーフをもつ転写因子であり細胞の増殖、分化、発達に関与すると考えられてる。また KLF family は現在 17 種が同定されており、GCbox や GTbox といった配列に結合することが知られている。我々は現在までに KLF15 が PPAR γ を介して脂肪細胞の分化に関与することや、KLF15 を過剰発現させることによりインスリン感受性のグルコーストランスポーターである GLUT4 の発現が増加することを証明してきた。今回我々はクロマチン免疫沈降法によるプロモーターの DNA マイクロアレイ(ChIP-chip)と遺伝子発現の DNA マイクロアレイを組み合わせることにより、培養脂肪細胞である 3T3-L1 脂肪細胞における KLF15 の新たな標的分子の同定を試みた。

結果

まず 3T3-L1 脂肪細胞における KLF15 の新たな標的遺伝子を同定するために ChIP-chip を行った。すなわち 3T3-L1 脂肪細胞の lysate を抗 KLF15 抗体にて免疫沈降したものを約 6000 のマウスの promoter 配列が搭載されたマイクロアレイ(プロモーターアレイ)により解析した。これにより KLF15 は 132 遺伝子のプロモーター配列に結合していることが明らかとなった。次に KLF15 を 3T3-L1 脂肪細胞にアデノウイルスベクターを用いて過剰発現させたものの RNA を採取し、これを DNA マイクロアレイ(発現アレイ)にて解析した。その結果 337 遺伝子が減少し、274 遺伝子が増加していた。以上のプロモーターアレイと発現アレイの結果を総合して考えると *Slc16a9*, *Cdk9*, *P4ha2*, *Klf3* の 4 遺伝子がプロモーターアレイによりそのプロモーター領域に KLF15 が結合しており、かつ発現アレイにより KLF15 の過剰発現でその発現が増加することが確認された。また、*Aprt*, *Adm* の 2 遺伝子が逆にプロモーターアレイにより KLF15 が結合しており、発現アレイによりその発現が減少することが確認された。これらの遺伝子のうち Adm(adrenomedullin)に関しさらに検討を行った。

まず、3T3-L1 脂肪細胞の分化前後で KLF15 と Adm の発現量の変化を RT-PCR にて検討したところ KLF15 は脂肪細胞分化前、分化後 4 日、分化後 8 日と段階的にその発現量が増加したのに対し、Adm は逆に段階的にその発現量が減少した。そこで 3T3-L1 脂肪細胞にアデノウイルスベクターを用いて KLF15 を過剰発現させたところ、Adm の発現は抑制された。逆に shRNA を用いて KLF15 をノックダウンしたところ、Adm の発現は増加した。以上の結果は発現アレイの結果を裏付けるものであり、KLF15 は Adm の転写を抑制している可能性があると考えた。

次に KLF15 が Adm の転写を直接抑制していることを証明するために、Adm のプロモーター領域(-4616bp から+108bp)を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、KLF15 の強制発現により Adm のプロモーター活性は抑制された。また KLF15 のノックダウンにより Adm のプロモーター活性は増強された。さらに Adm プロモーター領域における KLF15 の結合部位を同定するために、Adm のプロモーター(-4616bp から+108bp)を 5'

末端より切断し同様にルシフェラーゼアッセイを行ったところ -70bp のプロモーター断片にても KLF15 の抑制効果が認められた。以上よりこのプロモーター領域(-70bp から+108bp)に KLF15 の結合部位があると考えた。先に述べたように KLF15 は GCbox や GTbox といった配列に結合するとの報告があるため、この -70bp から+108bp におけるこれらの配列を検索した結果、GTbox (CACCC 配列) が一ヶ所存在することが判明した。以上の経過からこの CACCC 配列に KLF15 が結合すると考え、CACCC 配列を GACCC 配列と CACCG 配列とした 2 種類の変異プロモーターを作成し、同様にルシフェラーゼアッセイを行ったところどちらの変異プロモーターにても KLF15 の抑制効果は消失していた。さらにこの CACCC 配列を標的としたクロマチン免疫沈降法により内因性の KLF15 がこの配列に結合していることが証明された。以上の結果より KLF15 は培養脂肪細胞において Adm のプロモーターを直接制御することにより、その発現を抑制することが証明された。

考察

今回プロモーターアレイと発現アレイを組み合わせることにより転写因子 KLF15 の標的遺伝子の同定を試みた。転写因子の標的遺伝子は多岐にわたっており、また転写因子の過剰発現系などの実験では内因性の影響が否かの判断に迷うことがある。今回これらのアレイを組み合わせることにより標的遺伝子の絞り込みが可能であったと共に、実際にその標的遺伝子に転写レベルで関与することを証明する事が出来た。またクロマチン免疫沈降法により内因性にもプロモーター領域に結合していることが証明された。以上より転写因子の新たな標的遺伝子を検索する際に、プロモーターアレイと発現アレイを組み合わせることは有用な手段であると考えられた。

また、adrenomedullin はヒト褐色細胞腫より同定された血管拡張ペプチドの一種であり、脂肪組織は個体レベルでの主な adrenomedullin の産生臓器と考えられている。さらに adrenomedullin は高脂肪食を負荷したマウスや遺伝的肥満マウスである *ob/ob* マウスの脂肪組織ではその発現が増加しているとの報告もある。我々の未発表のデータでは KLF15 はこれらのマウスの脂肪組織ではその発現が低下しており、本論文では証明した KLF15 の adrenomedullin の発現抑制は個体レベルで意味があることかもしれない。

論文審査の結果の要旨

受 付 番 号	甲 第 1980 号	氏 名	永礼 智基
論 文 題 目 Title of Dissertation	<p>The Krüppel-like factor KLF15 inhibits transcription of the adrenomedullin gene in adipocytes</p> <p>Krüppel-like factor KLF15 は脂肪細胞において adrenomedullin 遺伝子の転写を抑制する</p>		
審 査 委 員 Examiner	<p>主 査 中 村 俊 一 Chief Examiner</p> <p>副 査 平 岡 健 一 Vice-examiner</p> <p>副 査 浮 川 雅 久 Vice-examiner</p>		
審 査 終 了 日	平成 21 年 1 月 21 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

Krüppel-like factors(KLFs)はC2H2型zinc-fingerモチーフをもつ転写因子であり細胞の増殖、分化、発達に関与すると考えられてる。申請者のグループではこれまでにKLF15がPPAR γ を介して脂肪細胞の分化に関与することや、KLF15を過剰発現させることによりインスリン感受性のグルコーストランスポーターであるGLUT4の発現が増加することを証明してきた。今回の研究では、クロマチン免疫沈降法によるプロモーターのDNAマイクロアレイ(ChIP-chip)と遺伝子発現のDNAマイクロアレイを組み合わせることにより、培養脂肪細胞3T3-L1脂肪細胞におけるKLF15の新たな標的分子の同定を試みた。

まず3T3-L1脂肪細胞におけるKLF15の新たな標的遺伝子を同定するために、3T3-L1脂肪細胞のlysateを抗KLF15抗体にて免疫沈降したものを約6000のマウスのpromoter配列が搭載されたマイクロアレイにより解析した。これによりKLF15は132遺伝子のプロモーター配列に結合していることが明らかとなった。次にKLF15を3T3-L1脂肪細胞にアデノウイルスベクターを用いて過剰発現させたもののRNAを採取し、これをDNAマイクロアレイ(発現アレイ)にて解析した。その結果337遺伝子が減少し、274遺伝子が増加していた。以上のプロモーターアレイと発現アレイの結果を総合して考えるとSlc16a9、Cdk9、P4ha2、Klf3の4遺伝子のプロモーター領域にKLF15が結合しており、かつ発現アレイによりKLF15の過剰発現でそれらの発現が増加することが確認された。また、Appt、Admの2遺伝子のプロモーター領域にKLF15が結合しており、発現アレイによりその発現が減少することが確認された。これらの遺伝子のうちAdm(adrenomedullin)に関しさらに検討を行った。

まず、3T3-L1脂肪細胞の分化前後でKLF15とAdmの発現量の変化をRT-PCRにて検討したところKLF15は脂肪細胞分化前、分化後4日、分化後8日と段階的にその発現量が増加したのに対し、Admは逆に段階的にその発現量が減少した。そこで3T3-L1脂肪細胞にアデノウイルスベクターを用いて

KLF15 を過剰発現させたところ、Adm の発現は抑制された。逆に shRNA を用いて KLF15 をノックダウンしたところ、Adm の発現は増加した。以上の結果は発現アレイの結果を裏付けるものであり、KLF15 は Adm の転写を抑制している可能性があると考えた。

次に KLF15 が Adm の転写を直接抑制していることを証明するために、Adm のプロモーター領域(-4616bp から +108bp)を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、KLF15 の強制発現により Adm のプロモーター活性は抑制された。また KLF15 のノックダウンにより Adm のプロモーター活性は増強された。さらに Adm プロモーター領域における KLF15 の結合部位を同定するために、Adm のプロモーター(-4616bp から +108bp)を 5'末端より切断し同様にルシフェラーゼアッセイを行ったところ -70bp のプロモーター断片にても KLF15 の抑制効果が認められた。以上よりこのプロモーター領域(-70bp から +108bp)に KLF15 の結合部位があると考えた。先に述べたように KLF15 は GCbox や GTbox といった配列に結合するとの報告があるため、この -70bp から +108bp におけるこれらの配列を検索した結果、GTbox (CACCC 配列) が一ヶ所存在することが判明した。以上の経過からこの CACCC 配列に KLF15 が結合すると考え、CACCC 配列を GACCC 配列と CACCG 配列とした 2 種類の変異プロモーターを作成し、同様にルシフェラーゼアッセイを行ったところ、どちらの変異プロモーターにても KLF15 の抑制効果は消失していた。さらにこの CACCC 配列を標的としたクロマチン免疫沈降法により内因性の KLF15 がこの配列に結合していることが証明された。以上の結果より KLF15 は培養脂肪細胞において Adm のプロモーターを直接制御することにより、その発現を抑制することが証明された。

本研究は、プロモーターアレイと発現アレイを組み合わせるこにより KLF15 の新たな標的分子 Adm の同定に成功したものであり、脂肪細胞の分化機構を理解するうえで重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。