



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士(薬学)
報告番号	甲第1540号
学位記番号	第316号
氏名	落合 なつき
授与年月日	平成28年3月25日
学位論文の題名	脂肪細胞分化促進因子 fad24 が初期胚発生および筋再生において担う機能の解析
論文審査担当者	主査： 服部 光治 副査： 今川 正良, 肥田 重明, 田中 正彦

氏名	おちあい なつき 落合 なつき
学位の種類	博士（薬学）
学位の番号	薬博第 316 号
学位授与の日付	平成 28 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	脂肪細胞分化促進因子 fad24 が初期胚発生および筋再生において担う機能の解析
論文審査委員	(主査) 教授 服部 光治 (副査) 教授 今川 正良・教授 肥田 重明・准教授 田中 正彦

論文内容の要旨

【研究背景および目的】

当研究室では肥満の分子機構を解明するために、脂肪細胞分化初期に発現が上昇する遺伝子を PCR-subtraction 法により多数単離している。単離した遺伝子のいくつかは新規遺伝子であり、その中の一つを factor for adipocyte differentiation 24 (fad24) と名付けた。現在では、DNA 複製と rRNA 生合成を制御する酵母 Noc3p の哺乳類におけるホモログであることが知られている。

Fad24 は、特徴的なドメインとして bZIP-like domain と Noc domain を有し、タンパク質が核小体ならびに核内の微小構造に局在する。また、マウスとヒトで高い類似性を示す。当研究室では、fad24 が脂肪細胞分化誘導 3 時間後に一過性に発現上昇すること、脂肪細胞分化を正に制御することをこれまでに明らかとしている。FAD24 は、ヒストン修飾酵素 histone acetyltransferase binding to ORC1 (HBO1) を DNA 複製開始地点にリクルートすることにより、マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 細胞が脂肪細胞分化するために必要な一過性の細胞増殖 mitotic clonal expansion (MCE) を促進した。さらに、当研究室で樹立した fad24 過剰発現マウスは糖代謝能が亢進しており、その脂肪組織では小型の脂肪細胞が増加していた。過剰発現マウスでは、血清中のアディポネクチン量が野生型マウスと比較して高かったことから、fad24 過剰発現により正常脂肪組織の形成が亢進した結果アディポネクチン分泌量が増進し、糖代謝能を改善したものと推測された。これらの知見より、fad24 は生体内において脂肪細胞分化を正に制御し、糖代謝能の調節に重要な因子であると考えられた。しかし、fad24 の機能については未だ多くが不明である。そこで本研究では、生体内における fad24 の機能についてより詳細に明らかとすることを目的として、全身性の fad24 欠損マウスを樹立しその表現系を解析した。検討の結果、fad24 は胚盤胞形成に必須であり、fad24 ホモ欠損マウスは着床前に死亡することが明らかとなった。

当研究室では、ヒト fad24 が骨格筋で豊富に発現していること、fad24 がマウス筋芽細胞 C2C12 の細胞増殖を正に制御することを見出している。また、fad24 を欠損したゼブラフィッシュは骨格筋の発生に異常を生じることが他の研究室より報告されている。したがって、fad24 は脂肪組織のみならず、骨格筋においても何らかの機能を有していることを示唆している。しかしながら、骨格筋における fad24 の機能はほとんど分かっていない。そこで、骨格筋における fad24 の機能を明らかとするため、骨格筋の再生機構に着目した検討を行った。その結果、fad24 は骨格筋再生の初期段階で一過性に発現上昇し、C2C12 の増殖再開を正に制御することが分かった。

【結果】

1. fad24 欠損マウスの樹立

個体レベルで *fad24* の機能をより詳細に解析するため、全身性の *fad24* 欠損マウスの樹立を試みた。マウス *fad24* は 19 番染色体に存在し、その first ATG はエクソン 1 に存在する。当研究室ではこれまでに、*fad24* のエクソン 1 またはエクソン 1, 2 を標的としたストラテジーにより *fad24* 欠損マウスの樹立を試みたが、いずれも組換え ES 細胞を得ることができなかった。そこで本研究では、エクソン 6~9 を標的としたターゲティングベクターを構築し ES 細胞に導入した。得られた ES 細胞 576 クローンをスクリーニングした結果、3 クローンの組換え ES 細胞が得られた。これらの組換え ES 細胞を用いて *fad24* ヘテロ欠損マウスを樹立した。

次に、ヘテロ欠損マウス同士をかけ合わせて *fad24* ホモ欠損マウスの作製を試みた。野生型およびヘテロ欠損マウスはメンデル則に従って生まれてきた一方、*fad24* ホモ欠損マウスは全く生まれてこなかった。このことから、*fad24* ホモ欠損マウスは胎生致死であると考えられた。

2. fad24 欠損が初期胚発生に与える影響

Fad24 ホモ欠損マウスが死亡する発生ステージを明らかとするため、胎生 13.5 日齢ならびに胎生 9.5 日齢の胎児を摘出し、遺伝子型を決定した。しかし、いずれのステージにおいても、ホモ欠損マウスは得られなかった。この結果より、ホモ欠損マウスは着床する前に死亡するのではないかと考えられた。

そこで、胎生 3.5 日齢の着床前胚を採取し、遺伝子型を決定した。胎生 3.5 日齢においては、*fad24* ホモ欠損胚はメンデル則に従って存在していた。しかしながら、野生型およびヘテロ欠損胚の大多数が胚盤胞または桑実胚まで発生した一方、ホモ欠損胚は桑実胚より発生ステージが前のものが多く、胚盤胞まで発生した胚は一つもなかった。

次に、発生過程におけるホモ欠損胚の形態変化をより詳細に解析するため、ヘテロ欠損マウス由来の精子および卵子を用いて体外受精を行った。得られた受精卵を 8 細胞までディッシュ内で培養した後、一つ一つの胚を 96 well に分離し、形態変化を顕微鏡下で観察した。その結果、野生型およびヘテロ欠損胚は受精後 3 日目には桑実胚となり、4 日目にはほぼ全ての胚が胚盤胞まで発生した。しかし、ホモ欠損胚は、受精後 3 日目の桑実胚までは野生型と同様に発生したが、その後発生異常を起こし、胚盤胞に発生した胚はなかった。

受精卵は最初、卵割により細胞数が増加していくが、桑実胚期から胚盤胞期にかけては急激な細胞増殖が起こることが知られている。*Fad24* は細胞の増殖を正に制御することから、ホモ欠損胚では細胞増殖が異常を呈している可能性が考えられた。そこで、桑実胚を構成する細胞数に違いがあるか否か検討するために、4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で桑実胚の核を染色し、核の数および形状を観察した。ホモ欠損胚は野生型胚と比較して、桑実胚期における核の数が有意に少なかった。以上の結果より、*fad24* は胚盤胞の形成に必須であることが明らかとなった。

3. ヘビ毒 cardiotoxin (CTX) による骨格筋再生過程における *fad24*, *hbo1* の発現変化

骨格筋は再生能に優れた組織である。ヘビ毒 CTX を骨格筋に投与すると、筋線維が破壊されて炎症反応が起こった後、新しい筋線維が作られて筋組織が再生することが知られている。筋再生に *fad24* が関与しているか否か明らかとするために、CTX を用いて検討を行った。まず、*fad24* 過剰発現マウスに CTX を投与し、筋組織切片を作製して筋再生能を評価したが、野生型マウスと過剰発現マウスで明確な違いは見られなかった。この結果について、過剰発現マウスの骨格筋における *fad24* 発現量が、筋再生能に影響を及ぼすほど高くなかった可能性が考えられた。次に、CTX 投与による *fad24* の発現変化をリアルタイム PCR で解析した。CTX 投与により筋組織の破壊と再生が起こっていることを、組織切片の観察ならびに筋再生マーカー *myoD* の発現検討により確認した。その結果、これまでの報告通り *myoD* は CTX 投与後 12 時間および 3 日で発現が上昇した。*Fad24* は、CTX 筋注 12 時間後に発現が一過性に上昇した。また、*fad24* の相互作用因子である *hbo1* の発現も *fad24* と同様に上昇していたことから、*fad24* は骨格筋の再生において何らかの機能を有している可能性が考えられた。

4. 筋芽細胞 C2C12 の増殖再開における *fad24* の役割

筋再生には、筋組織に存在する組織幹細胞サテライトセルが重要である。サテライトセルは、普段は増殖を停止した静

止状態で存在しているが、傷害を受けると活性化して細胞周期に再進入し、増殖、筋分化、融合して新しい筋線維を形成する。CTX 投与において、サテライトセルの活性化や分化に重要な *myoD* と同様の時間帯に発現が上昇したことから、*fad24* もこれらの過程において機能しているのではないかと推測した。

まず、*fad24* が筋分化に寄与するか否かについて、筋芽細胞 C2C12 を用いて検討を行った。分化誘導培地で 6 日間培養したところ、*shScramble* 発現プラスミドを導入したコントロール細胞では太い筋管細胞を形成しており、筋分化していることが確認された。この条件下において、*shfad24* 発現プラスミドを導入した *fad24* 発現抑制細胞もコントロール細胞と同程度に筋管細胞を形成しており、明確な違いは見られなかった。また、筋分化マーカーである *myogenin* の発現量にも差はなかった。

次に、サテライトセルの活性化について検討した。G0 期に移行し、増殖を停止した C2C12 細胞は、静止サテライトセルのモデルとして用いられている。そこで、血清飢餓培養により増殖を停止させた C2C12 を用いて、血清刺激による増殖再開に *fad24* が関与するか否か検討を行った。まず、血清刺激における *fad24* の発現変化を検討した。その結果、血清刺激により *fad24* ならびに *hbo1* の発現が一過性に上昇することが分かった。この発現上昇は、サテライトセルや C2C12 の増殖再開を制御する因子 *myoD* の発現上昇と同時期に起こっており、*fad24* および *hbo1* も、C2C12 の増殖再開において機能している可能性が考えられた。そこで、*fad24* を発現抑制した後、血清飢餓状態にした C2C12 細胞を血清刺激し、増殖能への影響を検討した。その結果、*fad24* 発現抑制により、血清刺激による細胞増殖が阻害された。

G0 期に移行した細胞は、増殖刺激を受けると細胞周期に再進入し増殖を再開する。そこで、細胞周期への再進入に *fad24* 発現抑制が与える影響をより詳細に解析するため、fluorescence activated cell sorting (FACS) 解析を行った。コントロール細胞と比較して、*fad24* 発現抑制細胞では、刺激 16 時間後において S 期に移行した細胞が極めて少なかった。以上の結果より、*fad24* は血清刺激による S 期への再進入に寄与することが明らかとなった。

細胞周期の進行には、サイクリン/サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 複合体の活性を制御するサイクリン/CDK 阻害因子 (CKIs) の活性が重要である。CKIs の一つである *p27^{Kip1}* は、静止期から細胞周期への再進入を負に制御する細胞周期調節因子として知られている。*Fad24* が細胞周期への再進入に関与する分子機構を明らかとするため、*fad24* 発現抑制が *p27^{Kip1}* の発現に与える影響を解析した。その結果、*fad24* を発現抑制した細胞では *p27^{Kip1}* の mRNA には有意な影響が見られなかった一方、タンパク質レベルでは発現が高かった。したがって、*fad24* は静止状態の C2C12 において、*p27^{Kip1}* の発現をタンパク質レベルで制御することにより、増殖再開を正に制御していると考えられた。

【総括】

本研究により、*fad24* は脂肪細胞分化のみならず、初期胚発生においても胚盤胞形成に必須の役割を持っていることを明らかとした。野生型胚と比較して *fad24* ホモ欠損胚は核の数が少なかったことから、ホモ欠損胚では初期胚発生過程における細胞増殖が阻害されている可能性が考えられる。また、本研究では、*fad24* が骨格筋再生に重要な筋芽細胞の増殖再開にも関与していることを見出した。さらに、*fad24* が細胞周期調節因子 *p27^{Kip1}* の発現をタンパク質レベルで制御することにより、増殖再開に寄与することを示唆する検討結果を得た。以上の結果より、*fad24* は脂肪組織だけでなく、初期胚や骨格筋といった広範な組織において、細胞増殖を制御することにより生命現象に関わる重要な因子であると考えられる。

【結論】

1. *fad24* は胚盤胞形成に必須である。
2. *fad24* は、*p27^{Kip1}* の発現をタンパク質レベルで負に制御し、筋芽細胞 C2C12 の増殖再開に重要である。

【基礎となる論文】

1. [Natsuki Ochiai](#), Makoto Nishizuka, Tomomi Miyamoto, Ichiro Miyoshi, Masahito Ikawa, Shigehiro Osada, Masayoshi Imagawa
Targeted disruption of *fad24*, a regulator of adipogenesis, causes pre-implantation embryonic lethality due to the growth defect at the blastocyst stage.

2. Natsuki Ochiai, Makoto Nishizuka, Shigehiro Osada, Masayoshi Imagawa
Fad24, a positive regulator of adipogenesis, is required for S phase re-entry of C2C12 myoblasts arrested in G0 phase and involved in p27^{Kip1} expression at the protein level.
Biol. Pharm. Bull., **39**: 807-814 (2016)

論文審査の結果の要旨

落合なつき氏は、脂肪細胞分化を正に制御する因子として単離された新規遺伝子 fad24 (factor for adipocyte differentiation 24) について、その機能を明らかにするために全身性のノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析したところ、ホモ欠損マウスは胎生致死であることを明らかにした。そこで次に、fad24 が初期胚発生に与える影響について検討したところ、桑実胚から胚盤胞の発生期に fad24 が重要な役割を持つことを明らかにした。また、fad24 が骨格筋で豊富に発現していることに着目し、骨格筋再生時における fad24 の関与を検討した。その結果、筋芽細胞の増殖再開に fad24 が寄与することを明らかにした。以上、本研究成果は、fad24 の新たな機能を見出した重要な業績と認められる。

公開発表会（平成 28 年 1 月 7 日開催）においては、良く整理された口頭発表を行った。また質疑応答については、多くの先生方の質問に対して丁寧に返答した。さらに、平成 28 年 3 月 2 日に開催された最終審査会においては、公開発表会ならびに主査・副査による精査・面接指導で指摘された事項について新たなスライドとして要領良くまとめ、質の高い口頭発表を行うと共に質疑応答についても概ね的確に返答した。以上の結果より、落合氏は博士（薬学）の学位を得る資格があると認め、主査および副査全員より最終試験合格の判定を得た。

これらの結果を、教授および准教授で構成される薬学研究科論文審査会（平成 28 年 3 月 11 日開催）において主査が報告したところ、合格が認定された。