

鶏前駆脂肪細胞における脂肪酸誘導性分化過程の特徴

*Characterization of chicken specific adipocyte differentiation during  
fatty acid-induced adipogenesis*

2013.9

東京農工大学大学院 連合農学研究科  
生物生産科学専攻  
動物生産科学大講座

松原 雄介

第一章 緒論	1
第二章 鶏前駆脂肪細胞の分化誘導の検討	10
第一節 脂肪蓄積及び分化マーカーの発現を指標とした検討	
第二節 分化制御転写因子の発現を指標とした検討	
第三章 鶏脂肪細胞の分化関連遺伝子の発現変動	22
第四章 PPAR $\gamma$ の活性と発現制御による鶏脂肪細胞の分化様相の確認	30
第一節 PPAR $\gamma$ リガンド (Troglitazone) 添加時の鶏脂肪細胞分化の様相	
第二節 脂肪酸誘導性分化誘導における PPAR $\gamma$ 遺伝子発現亢進の意義の解明	
第五章 PPAR $\gamma$ の発現に関わる adipogenesis 関連因子 (ZNF423, KLFs, FGF10) の発現解析	37
第一節 鶏脂肪細胞分化時における ZNF423, KLFs, FGF10 の発現変化	
第二節 ZNF423, KLFs, FGF10 の鶏組織発現分布の評価	
第三節 ZNF423, KLFs, FGF10 の鶏腹腔脂肪組織での経日的発現変化の評価	
第六章 外因性の脂肪酸誘導性鶏脂肪細胞分化誘導機構の解明	49
・脂肪酸による遺伝子発現調節機構 (核 run-on assay)	
・PPAR $\gamma$ 遺伝子の発現調節機構の検討 (Promoter assay)	
第七章 総合考察	57
参考文献	64
図表	72
謝辞	97

# 第一章

## 緒論

## ① 脂肪細胞の機能

動物は、本来飢餓に耐えるために、脂肪組織にトリアシルグリセロールの形で過剰なエネルギーを貯蔵する機構を持っている。蓄積されたエネルギーは必要に応じて放出され、エネルギーホメオスタシスを保つために用いられている。このバランスが崩れ、摂取エネルギーが消費エネルギーを上回ると、脂肪組織に脂肪が過剰に蓄積して、肥満を引き起こす。

これまで、脂肪組織は主にエネルギーの貯蔵器官として考えられてきたが、近年 leptin などのように脂肪細胞から生体内のエネルギー代謝を制御する様々な分泌物（アディポサイトカイン）の分泌器官としての機能が明らかにされ（Masuzaki et al., 1995）、生体内代謝を調節する重要な組織として認識されている。すなわち、脂肪を過剰に蓄積した脂肪組織・脂肪細胞が分泌する物質が、動脈硬化、高脂血症、心疾患、糖尿病など、いわゆる生活習慣病を調節する因子となることが明らかとなっている（Gregoire, 2001）。例えば、脂肪細胞から放出されるサイトカインや遊離脂肪酸は骨格筋における glucose 利用を減少させ、肝臓での glucose 生産を上昇させ、結果的に高血糖・糖尿病を誘発する。また、アテローム硬化症の病変は脂肪細胞から多量に放出された脂肪酸により進展する。そのため、現在では、生活習慣病予防・治療の観点から、脂肪組織・細胞の発達・肥大化とその機能の関係が注目され、様々な研究が行なわれている。そのなかでも、脂肪細胞が前駆脂肪細胞から脂肪を蓄積する形態である成熟脂肪細胞に分化する過程が、肥満を予防する鍵を握っているとの観点から、マウス 3T3-L1 細胞株を用いた細胞分子生物学的研究が進んでいる。

## ② マウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化機構

脂肪細胞の分化は前駆脂肪細胞の増殖過程、前駆脂肪細胞が脂肪細胞へと分化する過程、脂肪細胞に脂肪が蓄積して成熟する過程の 3 過程からなる。前述のマウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いた分化機構の検討から、以下に示す分化を制御する重要な転写因子・遺伝子の機能と動態が明らかにされてきた。

### 2-1) CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) ファミリーと Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ファミリー

前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化は、各種ホルモン（insulin、glucocorticoid など）や栄養素と、それらから誘導される様々な転写因子群が関与しており、それらは複雑な相互作用をしながら多くの adipogenic gene の発現を誘導している（Morrison et al., 2000）。現在、哺乳類における脂肪細胞の主な分化制御因子は、転写因子である C/EBP ファミリーと PPAR ファミリーであることが明らか

となっている。

C/EBP ファミリーは C/EBP $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$  の 3 種類のアイソフォームが存在し、basic-region leucine-zipper (bZIP) 構造を持ち、adipogenic gene のプロモーター領域に存在する CCAAT 配列を認識し、転写を活性化する。

C/EBP $\alpha$  のプロモーター領域には C/EBP の結合部位が存在し、C/EBP $\alpha$  は C/EBP $\beta$  や C/EBP $\delta$  から階層的な発現調節とともに、自身によるオートクリン的な発現調節の機能も有している。C/EBP $\delta$  と C/EBP $\beta$  は C/EBP $\alpha$  などの分化に関連する他の転写因子を直接的に誘導するとともに、それらが活性化するためのリガンド生産に関わっていることが示されており、脂肪細胞分化において重要な役割を担っている (Yeh et al., 1995)。

また、もうひとつの主要な転写因子である PPAR ファミリーは核内ホルモンレセプターファミリーの一種で、PPAR $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  の 3 種類のアイソフォームが存在する (Lee et al., 2003)。その作用機構は ligand binding domain (LBD) に脂肪酸やプロスタグランジンなどのリガンドが結合した後、RXR と二量体を形成して、DNA 上の標的配列 (peroxisome proliferator response element:PPRE) に結合し転写を誘導する。PPAR はリガンド未結合の状態では転写抑制因子と結合しているため転写は誘導されない。

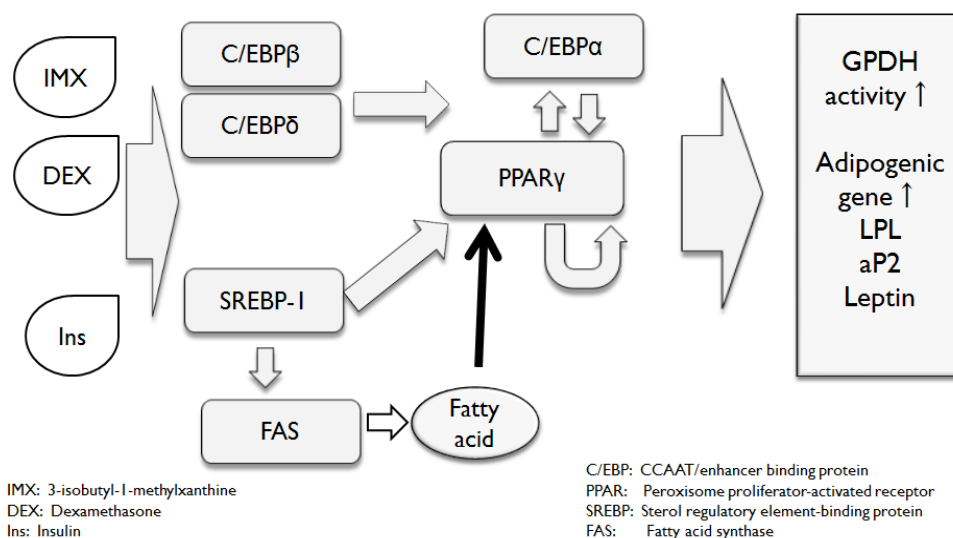
脂肪細胞には主に PPAR $\gamma$  が発現し、その標的配列は lipoprotein lipase (LPL) や adipocyte-fatty acid binding protein (aP2) といった脂肪酸の取り込みや細胞内輸送、そのエステル化を促す遺伝子上に多く見られる。そのため PPAR $\gamma$  は脂肪蓄積、脂肪酸の anabolism を促す役割を担っているとされる。

## 2-2) 3T3-L1 前駆脂肪細胞分化における段階的な転写因子群による制御

現在までに、マウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞における分化過程の各種遺伝子の発現制御機構が明らかとされている。すなわち、分化の初期に C/EBP $\beta$  と C/EBP $\delta$  が亢進し、PPAR $\gamma$  のリガンド生産を担っている因子に関与する (Hamm et al., 2001)。その後、C/EBP $\beta$ 、 $\delta$  の作用に加え、Notch-1、Adipocyte determination and differentiation-dependent factor-1/sterol regulatory element-binding protein-1 (ADD-1/SREBP-1) の作用が協調し、PPAR $\gamma$  と C/EBP $\alpha$  の発現を促進していく (Kim et al., 1998)。SREBP-1 は fatty acid synthase (FAS) の発現を制御しており、FAS は脂肪酸合成を調節し、細胞への脂肪酸供給を行なっている。この脂肪酸やその代謝産物は細胞内へエネルギー源として蓄積させるだけでなく PPAR のリガンドとして作用し、分化を促進する。このように脂肪細胞の分化において最も中心的な役割を果たす C/EBP $\alpha$  と PPAR $\gamma$  は、分化過程においてその発現が亢進し、相互作用することにより、お互いの発現を維持しな

から脂肪細胞として機能するための遺伝子発現（LPL など）を誘導する（Rangwala et al., 2000）。その後、脂肪細胞が成熟するに伴い aP2、glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)や Leptin などの発現が亢進することにより脂肪細胞が成熟していく。

### マウス3T3-L1脂肪細胞の転写因子群による分化制御



### 2-3) 脂肪細胞分化マーカー

以上のように哺乳類、特にマウス 3T3-L1 細胞を用いた研究では前駆脂肪細胞が脂肪細胞へと分化し、成熟するに伴い様々な遺伝子が誘導されることが明らかとされている。それらの因子は分化時のマーカーとしても利用されており、分化の初期には LPL や FAS が発現するとされている。LPL は脂肪細胞だけでなく、骨格筋や心筋、マクロファージなどで合成、分泌され血管内皮表面に移行し、血中のカイロミクロンや VLDL 中のトリグリセリド (TG) を水解する機能を持っている。FAS は glucose から代謝されるマロニル CoA から脂肪酸を合成する酵素であり、脂肪酸合成の主要な酵素である。これらは脂肪細胞分化時において脂肪滴の蓄積が認められる以前に発現していることから、細胞内への脂質の取り込みや合成が脂肪細胞の機能として重要であることを示す。その後分化が進行するに伴い aP2 や Cluster of Differentiation 36 (CD36)、VLDL receptor といった細胞表面での脂質取り込みに関する因子の発現が誘導される。これらの発現は成熟脂肪細胞のマーカーとして利用されている。aP2 は細胞内で脂肪酸輸送を行っており、脂肪細胞特異的な脂肪酸結合タンパク質であるため、脂肪細胞分化において、その発現を分化のマーカーとして最もよく用いられている。CD36 は細胞膜上に存在するタンパク質で、脂肪細胞では主に細胞

内への脂肪酸の取り込みを担っており、aP2 と同様に脂肪細胞での脂肪酸代謝に関して重要な働きを担っている。これらとともに脂肪細胞の研究では GPDH 活性が分化のマーカーとして用いられる。GPDH は脂肪細胞で脂質をトリグリセリドとして蓄積する際、glucose から glycerose を代謝する際の律速酵素であり、脂肪細胞で脂肪細胞への分化に伴いその活性が上昇することが知られている (Wise et al., 1978)。

#### 2-4) PPAR $\gamma$ のアゴニスト

PPAR $\gamma$  アゴニストとして知られるチアゾリジン誘導体(Thiazolidinedione : TZD)は脂肪組織では glucose 取り込み、脂質取り込みと貯蔵を亢進する (Houseknecht et al., 2002)。これは脂肪細胞において、チアゾリジン誘導体が PPAR $\gamma$  のリガンドとして作用して脂肪細胞分化を促進する作用によるものである。チアゾリジン誘導体の代表的なものとして Troglitazone や Rosiglitazone などが挙げられる。これらは PPAR $\gamma$  特異的リガンドとして作用して脂肪細胞の分化を誘導することが知られている (Camp et al., 2000)。3T3-L1 細胞での研究では、これらは PPAR $\gamma$  を活性化することにより PPAR $\gamma$  から誘導される様々な遺伝子の発現を誘導し、細胞への脂肪蓄積を増加させる。また、脂肪細胞において内因性のリガンド生産を抑制した系、例えば C/EBP $\beta$  の不活性型である Liver-enriched transcriptional inhibitory protein (LIP)を過剰発現させた系 (Hamm et al., 2001) や、不活性型 SREBP-1 を導入した系では脂肪細胞分化は著しく抑制されるが (Kim et al., 1998)、そこに Troglitazone などの外因性 PPAR $\gamma$  リガンドを添加することにより分化を回復させることが知られている。

### ③ PPAR $\gamma$ の発現制御と adipogenesis 関連因子

#### 3-1) 新規転写因子群 zinc finger protein 423 (ZNF423)と Krüppel-like transcription factors (KLFs)

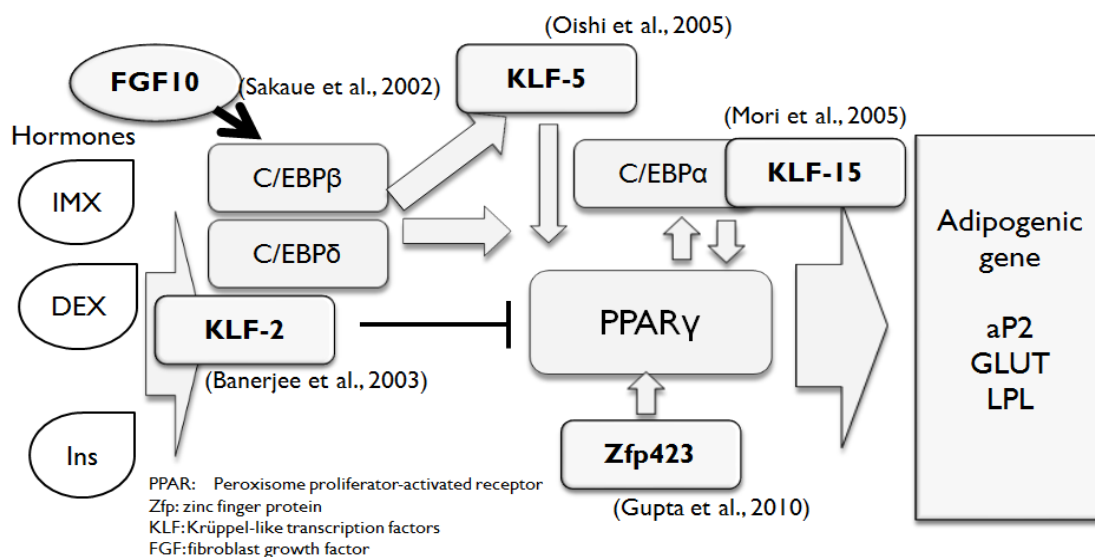
近年、C/EBP ファミリー、PPAR ファミリーや SREBP といった転写因子以外にも、脂肪細胞の分化制御を含め、adipogenesis の過程においては、特に PPAR $\gamma$  の発現誘導に関連し adipogenesis を制御していると考えられる因子が多く報告されている。新規な転写因子としては、C 末端に C2H2 型の zinc finger モチーフのある転写因子であり、細胞増殖や分化に関与するとされていた zinc finger protein である Zfp423 (マウス; ZNF423)が、前駆脂肪細胞の分化決定因子であることが報告された (Gupta et al., 2010)。実際に、Zfp423 の遺伝子導入により PPAR $\gamma$  の発現が誘導されることが示され、Zfp423 が前駆脂肪細胞において PPAR $\gamma$  の発現制御に関わり、分化制御・決定を担っていると報告されている。同研究では、Zfp423 のノックアウトマウスにおいて、脂肪組織形成の減弱

が認められることを報告している。

Krüppel-like transcription factors (KLFs)も、同様に zinc finger を有する転写因子であり、脂肪細胞の分化制御を担うことが報告されている (Kaczynski et al., 2003)。KLF-2 は、マウス脂肪組織で高発現していることが示されているが、前駆脂肪細胞で発現が高いことが明らかとなっている。KLF-2 は PPAR $\gamma$  のプロモーター領域に直接結合することが示されており、KLF-2 の発現を抑制することにより PPAR $\gamma$  の発現が誘導されることから、脂肪細胞分化には負の制御因子として機能していると報告されている (Banerjee et al., 2003)。KLF-5 は、そのヘテロノックアウトマウスにおいて脂肪組織の減弱が報告されており、また 3T3-L1 の分化時においては、C/EBP $\beta$ ,  $\delta$  により誘導され PPAR $\gamma$  の発現誘導前の分化初期で、PPAR $\gamma$  の発現に関与していると考えられている (Oishi et al., 2005)。KLF-15 についても 3T3-L1 の分化時に強く発現が誘導されることが示されており、C/EBP $\alpha$  と協調的な作用を行い PPAR $\gamma$  の発現を誘導すると考えられている (Mori et al., 2005)。また脂肪細胞での GLUT4 といった脂肪細胞特有の遺伝子発現を誘導にも直接関与することが報告されている (Gray et al., 2002)。

### 3-2) サイトカイン fibroblast growth factor 10 (FGF10)

サイトカインである fibroblast growth factor 10 (FGF10)は、adipogenesis における主要な細胞内シグナル因子として発見され、その発現は脂肪組織に特異的と報告されている (Yamasaki et al., 1999)。更に FGF10 は脂肪細胞において分泌され、3T3-L1 の分化においては C/EBP $\beta$  の発現と関連して、PPAR $\gamma$  の発現や adipogenesis に強く関与していることが報告されている (Sakaue et al., 2002)。





#### ④ 鶏 PPAR $\gamma$ プロモーター解析

近年の研究では更に、ニワトリにおける PPAR $\gamma$  の直接的な発現誘導経路の探索、すなわちニワトリの fibroblast の cell line である DF-1 細胞を用いた鶏 PPAR $\gamma$  の上流プロモーター領域解析の研究が報告された。同研究からは、鶏 PPAR $\gamma$  のプロモーター領域は哺乳類の PPAR $\gamma$ 2 のものと構造上は近く、C/EBP $\alpha$  が直接的に結合する領域があることが報告されている(Ding et al., 2011)。

#### ⑤ ニワトリの脂肪過剰蓄積

以上のように、哺乳類、とくに前駆脂肪細胞株であるマウス 3T3-L1 における脂肪細胞の分化過程は分子生物学的レベルから、その全貌がほぼ明らかにされており、個体における脂肪組織の生成・発達を含めての adipogenesis の全容への理解が高まっている。しかし家禽においては、脂肪細胞の分化機構がほとんど明らかにされていない。ニワトリは腹腔内に脂肪が蓄積しやすい動物であり、脂肪合成には多量の飼料エネルギーを消費するにもかかわらず、そのほとんどが食肉利用の際に廃棄されている。また、脂肪の過剰蓄積は鶏肉生産におけるエネルギーロスとなるだけでなく、脂肪肝といった代謝異常を引き起こす原因となっている。また、近年、消費者は低カロリー食肉や低脂肪食肉を志向しており、高脂肪食肉は食肉消費拡大を抑制する大きな要因となっている。

脂肪組織の発達はもちろん食餌によっても変化する。高タンパク質給与では、腹腔内脂肪は減少する (March et al., 1984)。これは脂肪細胞の数とサイズの変化によるものである。このように栄養的な操作は脂肪組織の発達を制御する有効な手段ではあるが、簡便で養鶏現場で安価に使用できる方法はいまだ確立されていない。

ブロイラーにおける成長に伴う脂肪細胞の成長パターンは、4 週齢時までの脂肪細胞数の急増に依存する (Hood, 1982)。すなわち、脂肪細胞の増殖能の高い孵化後から生後 4 週間における脂肪細胞の増殖を抑制 (前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化の促進) できれば鶏脂肪蓄積を大きく制御できるものと考えられる。

しかし、現在までに鶏脂肪細胞の分化に関する知見は少なく、鶏腹腔内脂肪蓄積に関する分子生物学的メカニズムを明らかにすることにより、鶏脂肪蓄積の有効な抑制法へ応用することが、現在の養鶏産業に求められている。

#### ⑥ 鶏脂肪組織の代謝特徴

鶏脂肪組織には哺乳類には認められない特異的代謝特徴を有している。すなわち、

- 1) 脂肪組織において SREBP-1 の発現が小さく、また FAS の活性が弱いこ

と (Gondret et al., 2001)。そのため脂肪組織への脂肪酸供給は主に肝臓における脂肪酸合成に依存している。

- 2) 脂肪組織の大部分が腹腔内に存在しており、筋間脂肪はほとんどみられない。
- 3) 哺乳類の脂肪組織でその発現が高く、分化に伴って発現するとされている insulin 感受性 glucose トランスポーター (GLUT4) は、ニワトリにおいて欠如している (Seki et al., 2003)。
- 4) 哺乳類の脂肪蓄積制御には大きくは関与していない脂肪組織リポプロテインリパーゼ(LPL)が、ニワトリでは腹腔内脂肪蓄積の制御において非常に重要である (Sato et al., 1999)。また、脂肪細胞が増殖・分化の盛んであると推定される成長期 (2 週齢) においてその発現や活性が低い (Sato et al., 2002)。
- 5) 鶏初代前駆脂肪細胞において、3T3-L1 と同様の分化誘導操作を行なっても、鶏脂肪細胞は分化しない (Ramsay et al., 2003)。

以上のように、鶏脂肪組織とその脂肪蓄積機構には哺乳類は異なる機構が存在している。すなわち、ニワトリでは、脂肪細胞の分化機構も異なる可能性が予想される。しかし、現在までに鶏脂肪細胞における分化機構を解明する研究では転写因子を含めた知見は非常に少ない。そのためニワトリの脂肪過剰蓄積制御を脂肪細胞の増殖・分化から制御するためには、鶏前駆脂肪細胞の分化機構を細胞分子生物学的に解析する必要がある。

## ⑦ 本研究の目的

本研究では未だ明らかとされていない鶏脂肪細胞の分化・発達過程の特徴を分子生物学的に解明することを試みた。

細胞の分化・機能を検討するにあたり、樹立細胞株を用いることがより一般的であるが、ニワトリにおいては株化された細胞は少なく、またその樹立が難しいとされている。そのため本研究では Wu ら方法を参考 (Wu et al., 2000) として、純度の高い鶏前駆脂肪細胞を組織から調製し研究に用いることとした。

本研究はまず、同手法にて安定した鶏脂肪細胞の分化誘導系を確立し、鶏脂肪細胞が前駆脂肪細胞から成熟脂肪細胞へと分化・成熟する過程での制御因子を同定するとともに、その制御因子を中心としたニワトリにおける adipogenesis の制御に関しての検討を分子生物学的手法にて明らかとすることを試みた。

## ⑧ 本論文の構成

本研究は、鶏脂肪細胞培養実験系を確立するため、まずマウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞における培養実験系の分化誘導に用いられる培養条件を参考にして、各種ホルモンおよび脂肪酸を添加して、細胞の分化状態を形態学的に比較検討し、同時に哺乳類での脂肪細胞分化マーカーとされる aP2 mRNA 発現を定量した(第二章一節)。次に、哺乳類における分化制御転写因子である PPAR $\gamma$  および C/EBP $\alpha$  の mRNA およびタンパク質の発現を定量し、その発現が変動するかを検討し、転写因子の観点からも脂肪細胞の分化が進行していることを確認した(第二章二節)。分化誘導が確認できた培養条件で各種の遺伝子の発現変動を経時的に詳細に観察し、そこから鶏脂肪細胞の分化に伴った遺伝子の発現変動とその相互関係や、鶏の特徴的な代謝との関連を考察した(第三章)。次に、哺乳類などで脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとされる PPAR $\gamma$  の、鶏脂肪細胞分化時の機能について考察するため、PPAR $\gamma$  アゴニスト (Troglitazone)を加えた際の分化時の様相(第四章一節)、および鶏 PPAR $\gamma$  の遺伝子導入による PPAR $\gamma$  の強制発現時における鶏脂肪細胞の分化様相を確認した(第四章二節)。以上の研究から、PPAR $\gamma$  の遺伝子発現とその活性化がニワトリで認められる脂肪酸誘導生分化制御の中心的な役割を果たすことを確認した。更に PPAR $\gamma$  の発現を制御する因子として報告されている ZNF423、KLFs および FGF10 の発現解析から、PPAR $\gamma$  の発現誘導因子の探索と adipogenesis への関与を探索した(第五章)。その結果、哺乳類とは異なり、既存の脂肪細胞分化に関与する転写因子ではニワトリ特異的な脂肪酸誘導性の分化においては、PPAR $\gamma$  遺伝子発現を調節しない可能性が示唆されたため、PPAR $\gamma$  の直接的な発現誘導機構の解明に向けて、脂肪酸含有分化誘導培地添加時の PPAR $\gamma$  遺伝子発現の亢進が転写レベルで起こっているかどうかを確認するために核 run-on assay を行った。その結果、PPAR $\gamma$  の発現亢進が転写レベルで起こっていることを確認することができ、脂肪酸がこれまで報告されていない新たな経路を介し、PPAR $\gamma$  遺伝子発現を直接誘導していると推察された。そこで、鶏 PPAR $\gamma$  のプロモーターアッセイを用いて外因性の脂肪酸を要求する鶏脂肪細胞の分化機構の制御因子を明らかにすることを試みた(第六章)。

## 第二章

### 鶏前駆脂肪細胞の分化誘導の検討

哺乳類での脂肪細胞の研究において最もよく利用されているマウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いた研究では、脂肪細胞を分化させるホルモンとして、Dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IMX), Insulin (Ins)を、FBS 10%添加培地に添加して用いるのが一般的である。この実験系では、分化誘導後約 3 日で PPAR $\gamma$  や aP2、LPL の発現が認められるようになり、7~10 日にかけて急激に脂肪蓄積が認められる。一方、これまでのニワトリを用いた報告によると、鶏前駆脂肪細胞を分化させる場合には、insulin と dexamethasone を添加した 10%鶏血清添加培地で分化を誘導することが可能であることが示されている。しかし同時に、この実験系では細胞への脂質蓄積量はあまり多くないことも報告されている。この原因は、ニワトリの脂肪細胞における脂肪酸合成能が低いこと、脂肪細胞において脂肪を取りこむ重要な酵素である LPL 発現の様相が特異的であるとの理由が推測されている (Ramsay et al., 2003)。

そこで、本章では初代鶏前駆脂肪細胞においてマウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞と同様に、牛血清、各種ホルモンを用いた培養条件で、分化誘導による変化を観察することにより、鶏脂肪細胞の分化過程を哺乳類の脂肪細胞の分化過程と比較検討し、鶏前駆脂肪細胞の分化過程の特徴をより明らかにする実験条件を確立することを試みた。

本章では、まず、マウス 3T3-L1 で分化を誘導するホルモンを培地に添加して、分化誘導を形態学的に観察するとともに、ニワトリの脂肪細胞では脂肪酸合成能が低く、肝臓からの脂肪酸の取り込みによって脂肪を蓄積するとの鶏脂質代謝の特徴を考慮に入れ、各種ホルモンに脂肪酸 (oleate) を加えた試験区も設定し、比較検討することを試みた。さらに、細胞内 TG 蓄積量を測定するとともに、Oil-red-O 法を用いて細胞内脂肪滴の染色を行ない、脂肪蓄積の観点から脂肪細胞の分化状態を観察した。また、一般に哺乳類の脂肪細胞分化マーカーとして使用されている aP2、および分化期にその発現が変動することが知られている PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$  の mRNA 発現が、鶏脂肪細胞の分化過程で発現変動しているかを明らかにして、遺伝子発現のレベルから、本実験系が鶏前駆脂肪細胞を分化誘導している実験系であるかを明らかにすることを試みた。

## 第一節 脂肪蓄積および分化マーカーの発現を指標とした検討

本節ではまず、マウス 3T3-L1 脂肪細胞を分化誘導する際の各種ホルモンにより分化誘導した区 (non-FA 区) とそこに脂肪酸を加えた区 (FA 区) でそれぞれ細胞の分化状態を形態学的に観察すると同時に、3T3-L1 系と同様に培地置換後 7 日までにおいて、脂肪細胞の研究で分化マーカーとして最もよく用いられる aP2 mRNA 発現を real time PCR により観察し、鶏脂肪細胞の分化の様相を分子生物学的に検討するための実験系を確立することを試みた。また、細胞への脂質蓄積を確認するために細胞内 TG 量と DNA 量を測定し、細胞あたりの TG 蓄積量を算出するとともに、細胞を Oil-red-O 法により脂肪滴を染色して、脂肪蓄積の観点からも実験系が適切であることを証明することを試みた。

### 【材料および方法】

#### 《培養用試薬》

- ・ FBS (Fetal Bovine Serum) : FBS は 56°C で 30 分の非動化処理を行なった。
- ・ 抗生物質 (Penicillin Streptomycin:PS ;GIBCO BRL;1570-014)
- ・ PBS(Phosphate-Buffered Saline) : KCl 0.2g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g、NaCl 8.0g、CaCl<sub>2</sub> 0.1g、MgCl<sub>2</sub> 0.1g/l で作成し加熱滅菌後使用した。
- ・ 酵素消化液 (Digestion medium) : PBS[-]に 0.1% Collagenase (和光純薬;034-10533) と 0.05% Glucose、4% 牛血清アルブミン (SIGMA A-7906) を溶解しフィルター (0.2μm) で濾過滅菌後使用した。
- ・ Trypsin : 2.5%-Trypsin (GIBCO BRL;9002-07-7) を 0.1%になるように PBS で希釈した。
- ・ 細胞増殖培地 (Growth medium) : 1L 中に Medium 199 (Nissui; 05915) を 9.5g と NaHCO<sub>3</sub> 1.75g を溶解した。そこに 10%FBS と PS を 100U/ml 添加し 0.2μm のボトルトップフィルター (CORNING 430521) で濾過滅菌後、冷蔵保存した。
- ・ 分化誘導培地 (Differential medium) : Dulbecco's Modified Eagle Medium : DMEM (Nissui;05909) と 10mM glucose , 20μg/ml insulin (SIGMA; I-5500 牛睪臓由来), 500nM dexamethasone:DEX (和光純薬;047-18863), 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine:IMX (和光純薬;095-03413) を溶解し 10% FBS および PS 100U/ml を加えボトルトップフィルターで濾過滅菌したものを脂肪酸無添加培地 (non-FA) とした。また、同様な培地にさらに脂肪酸として 300μM oleate (ナカライテスク;257-02) を溶解して加えボトルトップフィルターで濾過滅菌したものを脂肪酸添加培地 (FA) とした。

《供試動物》環境温度 ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ )、市販飼料(CP 23%, ME3100kcal/kg) で自由摂水、自由摂食で飼育した 10 日齢ブロイラーのオス (Cobb)

#### (1) 鶏初代前駆脂肪細胞の調製 (Wu et al., 2000)

- ① 10 日齢のニワトリを放血屠殺し、ヨードチンキを塗布し腹腔表面を消毒し、腹腔内脂肪を、腸管などを切開しないよう注意しながら無菌的に摘出し洗浄液 (M199、PS 500U/ml) で洗浄した。
- ② シャーレ上で余分な組織を除去した後、滅菌済みハサミで細切し、Digestion medium を加え  $37^\circ\text{C}$  で 45~60min 消化した。
- ③ 酵素消化後、Growth medium を加え、100 ステンレスメッシュでろ過した。ろ液を 1500rpm ( $240 \times g$ )、10min、 $4^\circ\text{C}$  で遠心分離した。
- ④ 上澄み(脂肪細胞)を除去し、沈殿を再度  $25\mu\text{m}$  のメッシュでろ過し、1500rpm、10min、 $4^\circ\text{C}$  で遠心分離した。沈殿として得られた細胞塊を前駆脂肪細胞群とした。

#### (2) 鶏前駆脂肪細胞の濃縮

調製した鶏前駆脂肪細胞中の繊維芽細胞をできるだけ除去するために Differential adhesion 法 (Yaffe, 1968) を行なった。繊維芽細胞は前駆脂肪細胞よりも吸着力が強いという性質を利用してはじめに 90φ dish (SUMILON) 上で 3~5min 培養をおこない、その非吸着細胞を回収した。この操作を繰り返すことにより混在する多数の繊維芽細胞を取り除き、前駆脂肪細胞の含有率を増加させた細胞集団を試験に用いた。

#### (3) 細胞数の測定

トリパンブルーで染色した後、細胞数の計算は血球計算を用いて測定した。

#### (4) 細胞培養

細胞を培地に浮遊させ、90φ dish に細胞を撒き growth medium を加え、 $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  条件下により培養し細胞を増殖させた。細胞がコンフルエントに達した後、トリプシンを用いて細胞を回収し、試験に必要な細胞数が得られるまで継代を繰り返した。継代を繰り返すと細胞の分化能が低下するため、2~3 回の継代で試験をするようにした。

試験区に細胞を撒く場合、60φ dish に約 10000cells/cm<sup>2</sup> の濃度で撒き、growth medium により細胞がサブコンフルエントに達するまで (24~36h) 培養した。その後培地を differential medium に置換することにより試験を行った。

増殖中、及び試験中ともに培地交換は 24 時間ごとに行なった。

#### (5) 細胞回収法

細胞はラバーポリスマンを用いて回収した。細胞を PBS にて培地を洗浄し、再度 PBS を dish に加え、ラバーポリスマンにて丁寧に dish から剥がし、マイクロチューブに細胞浮遊液を回収した。細胞に脂肪が蓄積していない場合は 4℃、8000rpm、15min。脂肪が蓄積している場合には 4℃、12000rpm、15min 遠心により細胞ペレットを得て、-20℃で保存した。

#### (6) DNA 定量法 (Kissane, 1958)

《試薬》

- ・ 99% エタノール
- ・ 40% DABA (3,5-diaminobenzoic acid dihydrochloride) 溶液
- ・ 牛胸腺 DNA (100 $\mu$ g/ml 1N-NH<sub>4</sub>OH)

《方法》

- ① 500 $\mu$ l の PBS でサンプルを超音波破碎した。
- ② 0.5ml 99%エタノールをサンプル 500 $\mu$ l に加え 5min 固定後、窒素ガス乾燥させた。
- ③ 40% DABA 溶液を 0.5ml 加え、60℃ 1h インキュベートした。
- ④ 1N HCl を 2ml 加え反応を停止させた。
- ⑤ 励起波長 400nm、蛍光波長 530nm で測定した。
- ⑥ 測定値をウシ胸腺 DNA により作成した検量線に代入して、各サンプルの DNA 量を算出した。

#### (7) TG (トリグリセリド) 量の測定

(和光純薬 トリグリセライド G-テストワコー ; 276-69801)

- ① 50 $\mu$ l の PBS で回収したペレットに加え超音波破碎した。
- ② 混合発色液を 1ml 添加し、混合した。
- ③ 37℃で正確に 10 分間加温して、492nm の吸光度で比色定量した。スタンダードにはキット内の基準液を用いた。

#### (8) RNA の分離 (AGPC 法)

- ① トリゾール 1ml で細胞を 60 $\phi$  dish から回収した。トリゾール 1ml に対してクロロホルム 200 $\mu$ l を加えた。10min ほど放置したのち、2層に分離したことを確認し、11000rpm,15min,4℃で遠心した。
- ② 上澄み 500 $\mu$ l とイソプロパノール 500 $\mu$ l を混合し、11000rpm,10min,4℃で遠心した。
- ③ 上澄みを捨て 80%エタノール 500 $\mu$ l で洗浄し、8500rpm, 5min, 4℃で遠心、



風乾した。

- ④ 得られた沈殿が total RNA とした。

(9) cDNA の作成

- ① totalRNA を全量が 5 $\mu$ g になるよう DDW 8 $\mu$ l に溶かした。  
② 60 $^{\circ}$ C, 10min incubate した。  
③ oligo dT (0.45 $\mu$ M) 1 $\mu$ l を加え、70 $^{\circ}$ C, 10min incubate した。  
④ 5 x buffer 4 $\mu$ l, 2.5mM dNTP 4 $\mu$ l, DDTsol 2 $\mu$ l を加えた。  
⑤ M-MLV transcriptase (Invitrogen) を 1 $\mu$ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 1h、42 $^{\circ}$ C で 30min incubate した。

(10) RT-PCR および cDNA スタンダードの作成

各プライマーの配列および反応条件を以下に示す

**【GAPDH】** product size : 543bp (nucleotides from 400 to 942, AF047874)

sense: 5'-AAGCGTGTTATCATCTCAGCTCC- 3'

anti-sense: 5'-CGCATCAAAGGTGGAGGAATGGC- 3'

条件: 94 $^{\circ}$ C  $\times$  1 3min

94 $^{\circ}$ C  $\times$  30 30sec、65 $^{\circ}$ C 1min、72 $^{\circ}$ C 1min

72 $^{\circ}$ C  $\times$  1 5min

4 $^{\circ}$ C stock

**【aP2】** product size : 330 bp (nucleotides from 1482 to 1811, AF432507)

sense: 5'-GAGTTTGATGAGACCACAGCAGA- 3'

anti-sense: 5'-ATAACAGTCTCTTTGCCATCCCA- 3'

条件: 94 $^{\circ}$ C  $\times$  1 3min

94 $^{\circ}$ C  $\times$  30 30sec、58 $^{\circ}$ C 1min、72 $^{\circ}$ C 1min

72 $^{\circ}$ C  $\times$  1 5min  $\times$  1

4 $^{\circ}$ C stock

- ① primer を用いて PCR を行った。  
② 0.8% アガロースゲルにアプライし、約 30min 電気泳動を行った。  
③ 目的のバンドを切り取り、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。  
④ 吸光度を用いて、濃度を測定し、このサンプルをスタンダードとした。

(11) real time PCR

- ① スタンダードを DDW で必要な濃度に希釈して利用した。

- ② 10×buffer 5μl、2.5mM dNTP mix 4μl、sense primer 0.25μl、anti-sense primer 0.25μl、TEMP 1μl、100×SYBA Green I 0.05μl、DDW 38.2μl、rTaq polymerase (1.25U Takara Bio Inc.) 0.25μl を混ぜ、96 穴 PCR plate(24 穴×4)にアプライした。
- ③ well factor program を用いて、Real Time PCR (iCycler; Bio Rad) を行った。
- ④ スタンダードによる検量線をもとに、サンプルの濃度を求めた。
- ⑤ melt program を用いて melt peak が一致していることを確認した。

## (12) Oil-red-O 法

- ① 培地を除去せずに 60φ dish に冷 10%ホルマリン/PBS 1ml を加え 20min 間室温放置し、細胞を固定した。
- ② 培地を除去し、さらに冷 10%ホルマリン/PBS 1.5ml で 1h 固定した。
- ③ ホルマリンを除去し、2~3 回蒸留水で洗浄した。
- ④ あらかじめ 0.5% Oil-red-O/イソプロピルアルコール溶液と蒸留水を 3:2 の割合で混合し、10min 放置後、ろ紙でろ過した。
- ⑤ 上記の染色液を加え約 1h 染色した。
- ⑥ 細胞が剥がれないように蒸留水で 2~3 回洗浄した。

## (13) 実験群と評価項目

3T3-L1 培養実験系を参考にした 2 種類の分化誘導培地、すなわち、DMEM に IMD (dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine, insulin), glucose を溶解し 10% FBS を加えた脂肪酸無添加培地 (non-FA 区)、および上記のホルモン添加培地に 300μM の oleate を添加した脂肪酸添加区 (FA 区)を用いて鶏初代前駆脂肪細胞を分化させた。分化培地置換後の細胞を 0, 6, 12, 24, 48, 72 時間及び 7 日目での細胞および、Growth medium で培養した 72 時間の細胞から total RNA を抽出し、real time PCR により aP2 mRNA 発現を定量した。

また、分化培地置換後 0, 6, 12, 24, 48, 72 時間、及び Growth medium で培養した 72 時間の細胞を回収し、細胞内 TG 量と DNA 量を測定した。

Oil-red-O 法により分化培地置換後 108 時間での細胞の脂肪滴の染色を行った。脂肪滴の染色においては細胞に脂肪滴の蓄積が十分に進んだ時間として 108 時間の細胞で検討を行った。

## 【結果】

3T3-L1 を分化誘導する培地を添加して培養しても、鶏前駆脂肪細胞では脂肪滴の蓄積や細胞内 TG 蓄積が確認されなかった (Fig.2-1-1,B , Fig.2-1-3)。また細胞への脂肪蓄積とともに発現し、3T3-L1 分化誘導実験で最もよく分化マーカー

一として使用されている aP2 mRNA 発現も同様に変動しなかった (Fig.2-1-2)。一方、分化誘導培地に脂肪酸を添加して培養した鶏前駆脂肪細胞 (FA 区)は、細胞内に脂肪滴が観察され (Fig.2-1-1,C)、分化マーカーである aP2 mRNA 発現の亢進も認められた (Fig.2-1-2)。FA 区における細胞内の脂肪滴の蓄積は、培養時間が長くなるに伴った増加が細胞内 TG 量 (Fig.2-1-3)とともに、Oil-Red-O 染色 (Fig.2-1-4)からも確認された。

### 【考察】

本試験の結果、脂肪酸 (300 $\mu$ M oleate) を添加したマウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞分化誘導培地において、鶏前駆脂肪細胞は典型的な脂肪細胞への分化の形態を示した。すなわち、細胞内脂肪滴の蓄積と分化マーカーである aP2 mRNA 発現の亢進である。一方、マウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞分化誘導培地である各種ホルモンのみを添加した培地では、鶏前駆脂肪細胞の分化は誘導できなかった。一般に、マウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞では、本試験で用いた各種ホルモン添加培地で、3日間培養することにより、分化が誘導され、その後 insulin のみを添加した培地で 5日程度培養することにより、細胞内脂肪滴の蓄積が観察される (Wu et al., 2000)。また、その培地に oleate を加えた場合には、脂肪蓄積を増長させること (Guo et al. 2000)、また添加する脂肪酸種により分化誘導に対する効果が異なること、例えば 3T3-L1 細胞では octanoate 添加では分化が阻害されることが報告されている (Han et al., 2002)が、鶏前駆脂肪細胞の分化誘導には、培地への脂肪酸添加が必須であった。

マウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞における脂肪細胞への分化誘導は以下の機構で引き起こされるものと考えられている。まず、DEX や IMX は細胞内 cAMP 濃度を上昇させ、チロシンキナーゼ活性と細胞シグナリングを介して分化へ向かわせることが知られている (Elks et al., 1985)が、IMX は C/EBP $\beta$  や C/EBP $\delta$  に作用し、その転写を促進する。この転写活性の上昇が C/EBP $\alpha$  や PPAR $\gamma$  の発現を誘導し、同時に PPAR $\gamma$  リガンド生産に関する因子、すなわち脂肪酸などの合成を insulin との協調作用により促進する。このように、各種のホルモン刺激は脂肪細胞を分化させ、脂肪蓄積する細胞形態に変化するのである。ここで、鶏前駆脂肪細胞の分化について考えてみると、鶏前駆脂肪細胞はマウス 3T3-L1 細胞と同様の各種ホルモン、および培養条件だけでは分化誘導が起こらなかった。そこに脂肪酸を添加することにより、細胞への脂肪蓄積と aP2 mRNA 発現を誘導することができた。鶏脂肪組織では脂肪酸合成酵素 (FAS) の発現を誘導する転写因子である SREBP-1 の発現が低いことが報告されている (Gondret et al., 2001)。そのため鶏脂肪細胞では脂肪酸の合成能は低いものと予想される。すなわち、鶏前駆脂肪細胞の分化には、PPAR $\gamma$  のリガンドとなる脂肪酸の外部

からの供給が必須であるものと推察され、これが脂肪酸を添加しない培地では、鶏前駆脂肪細胞が分化しない理由であると考えられた。

また実験条件として、本実験条件以外にも、様々な脂肪酸の添加濃度、細胞密度、ホルモン濃度やホルモン添加培養時間なども検討したが、脂肪滴を蓄積した、典型的な脂肪細胞に分化させることはできなかった (**Data not shown**)。以上のように、鶏前駆脂肪細胞において、その分化の刺激として外因性の脂肪酸の役割が非常に重要であることが推察された。

## 第二節 分化制御転写因子の発現を指標とした検討

鶏前駆脂肪細胞を分化誘導させる実験は、これまでほとんど行なわれていない。わずかに報告されている研究によると、鶏血清と **insulin**、**dexamethasone** を添加した培地で鶏前駆脂肪細胞を培養すると、7~10 日で脂肪滴をわずかに保有した脂肪細胞様の形態に変化したことが明らかとなっている (**Ramsay et al.,2003**)。一方、前節の培養条件で鶏前駆脂肪細胞を分化誘導すると、分化のマーカーとして利用されている **aP2 mRNA** 発現が誘導培地置換後の 6~12 時間で亢進していた。また、形態学的にも多量に脂肪滴の蓄積も認められ、成熟に向かっていることが確認された。すなわち、各種ホルモンに脂肪酸を添加した培地を用いた本研究では、非常に早い速度で分化誘導が行われたものと考えられた。しかし一方で、この分化誘導の進行が早すぎるため、本研究の目的である鶏脂肪細胞の分化制御機構を分子生物学的に解析することが困難である可能性が考えられた。そこで本節では、哺乳類脂肪細胞で中心的な分化制御転写因子とされる **PPAR $\gamma$**  と **C/EBP $\alpha$**  の mRNA 発現を、**aP2** 発現の亢進が確認された 48h までの前節の **FA** 区と **non-FA** 区でそれぞれ測定し、本実験系が鶏脂肪細胞の分化を観察できる系であるかを検討した。さらに、分化に伴う細胞内の **aP2** のタンパク質量の変動を観察し、ニワトリでも哺乳類同様に遺伝子レベルによる解析がタンパク質レベルに反映されているかを考察することを試みた。

### 【材料および方法】

(1) 鶏初代前駆脂肪細胞の調製～細胞回収

第二章 第一節参照

(2) RNA の分離、cDNA の作成、

第二章 第一節参照

(3) real time PCR

## 第二章第一節参照

各プライマーの配列および反応条件を以下に示す

【PPAR $\gamma$ 】 product size : 470bp (nucleotides from 664 to 1133, AF163811)

sense: 5'-TACATAAAGTCCTTCCCGCTGACC- 3'

anti-sense: 5'-TCCAGTGCGTTGAACTTCACAGC- 3'

条件: 94°C × 1 3min

94°C × 35 30sec, 57°C 1min, 72°C 1min

72°C × 1 5min

4°C stock

【C/EBP $\alpha$ 】 product size : 191bp (nucleotides from 349 to 539, X66844)

sense: 5'-GTGCTTCATGGAGCAAGCCAA- 3'

anti-sense: 5'-TGTCGATGGAGTGCTCGTTCT- 3'

条件: 95°C × 1 3min

95°C × 35 30sec, 64°C 1min, 72°C 1min

72°C × 1 5min

4°C stock

### (4) SDS-PAGE によるタンパク質の分離

- ① ラバーポリスマンで回収した細胞を SDS buffer (1mM EDTA·Na<sub>2</sub>, 2.5% SDS, 5% メルカプトエタノールを含む Tris-HCl buffer/pH8.0) で可溶化し、100°C、5分煮沸し、氷中で急冷した。
- ② SDS-PAGE は Mini Protein II (BioRad) を用いて行い、分子量マーカーは Prestained SDS-PAGE Standards (BioRad もしくはナカライ) を使用し、ゲルは 10% ポリアクリルアミドゲルを使用した。電気泳動用 buffer は 25mM Tris-HCl, 192mM グリシン、10% SDS を使用した。
- ③ サンプルをレーンにアプライし、15A(～30A)・120V で泳動を行った。

### (5) タンパク質の Hybond-C Extra への転写

- ① 電気泳動終了後、+極の方からパッド、ろ紙 (No.2 ADVANTEC)、Hybond C extra (Amersham)、ゲル、ろ紙、パッドの順になるようにゲルサンドイッチを作り、ゲルホルダーにセットした。
- ② ゲルホルダーをブロッキング装置 (BioRad) にセットし、氷冷下でブロッキング buffer (25mM Tris-HCl, 192mM グリシン) を攪拌しながら 80～100V、260mA、1時間の通電条件で、転写を行った。
- ③ 転写終了後、20%メタノール (ブロッキング buffer + メタノール) に浸した。

④ ウェスタンブロットに供試した。

(6) aP2 抗体によるウェスタンブロット

《一次抗体》

Anti human A-FABP (aP2) 抗体 × 25 倍希釈 (HyCult biotechnology ;HP9028)

《二次抗体》

Anti rabbit IgG HRP conjugate × 5000 倍希釈 (Sigma)

- ① membrane を 7%スキムミルク(T-PBS (0.1%Tween20/PBS(-)) で希釈)に浸し、室温で 1 時間振とうし、非特異的結合のブロッキングを行った。
- ② 一次抗体に浸し、室温で 3 時間振とうした。
- ③ T-PBS で 2~3 回洗浄した。
- ④ 二次抗体に浸し、室温で 1 時間振とうした。
- ⑤ T-PBS で 2~3 回洗浄した。
- ⑥ ECL 発色液 (PIERCE) をかけて、フィルムに現像した。

(7) 実験群と評価項目

本節は前節と同様の培養条件における 2 区(FA 区・non-FA 区)の細胞で、0, 6, 12, 24, 48 時間における PPAR $\gamma$  と C/EBP $\alpha$  の mRNA 発現を定量し、GAPDH 発現量により補正を行った。脂肪蓄積および aP2 が誘導される 48 時間までにおける脂肪細胞の中心的な分化制御転写因子の発現変動を観察した。また mRNA 発現の結果を踏まえ、FA 区における aP2 タンパク質の 0, 6, 12, 24, 48 時間における経時的発現を確認した。

### 【結果】

本節では、前節で確立したマウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化誘導培地に脂肪酸 (oleate 300 $\mu$ M) を添加する前駆脂肪細胞の分化誘導実験系で、鶏脂肪細胞の分化機構を解析できるかを明らかにするために、脂肪細胞の中心的な分化制御転写因子である PPAR $\gamma$  及び C/EBP $\alpha$  の mRNA の発現変動を観察した。その結果、FA 区でのみ培地置換後 6~12h で発現が亢進していた (Fig.2-2-1)。前節で発現の亢進が認められた aP2 mRNA の発現は PPAR $\gamma$  の発現亢進後の 12h で最大量に達していた。aP2 タンパク質は、培地置換後 6h から発現が認められた (Fig. 2-2-2)。

### 【考察】

本節では、前節で確立したマウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化誘導培地に脂肪

酸 (oleate 300 $\mu$ M) を添加する前駆脂肪細胞の分化誘導実験系で、鶏脂肪細胞の分化機構を解析できるかを明らかにするために、3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化制御に中心的な役割を果たしている PPAR $\gamma$  と C/EBP $\alpha$  の mRNA 発現量を定量し、その発現変動を観察した。その結果、鶏脂肪細胞の分化過程においても PPAR $\gamma$  と C/EBP $\alpha$  mRNA 発現が、哺乳類と同様に亢進していることが明らかとなった。以上の培養系を用いることにより、鶏脂肪細胞の分化過程とその制御機構が解析可能であることが示された。また鶏前駆脂肪細胞の分化は外因性の脂肪酸により誘導される鶏特異的な分化機構であることが示された。

本研究で分化マーカーとして用いた aP2 mRNA 発現は、PPAR $\gamma$  の発現が亢進された後に上昇した。また、本節の結果より aP2 はタンパク質レベルでも培地置換後 6 時間でその発現が確認された。PPAR $\gamma$  は脂肪酸などのリガンドで活性化されてはじめて転写活性を持ち、様々な脂肪細胞特異的遺伝子の発現を誘導する。aP2 も、PPAR $\gamma$  によって誘導される遺伝子の一つとして知られている (Krey et al., 1997)。すなわち、鶏脂肪細胞でも、哺乳類の脂肪細胞に類似した分化誘導機構が存在するものと推察された。

そこで、次章では、本章で確立された、ニワトリにおいて前駆脂肪細胞から脂肪細胞に分化を誘導する培養条件を用いて、各種の遺伝子の発現変動を経時的に詳細に観察し、鶏脂肪細胞の分化に伴った主要な転写因子群の遺伝子の発現変動と、代謝に関連する各種因子の発現の特徴とその相互関係を考察することにした。

## 第三章

### 鶏脂肪細胞の分化関連遺伝子の発現変動



前章より、ニワトリの前駆脂肪細胞の培養培地を各種ホルモンと脂肪酸を添加した分化培地に置換すると、前駆脂肪細胞から、脂肪滴を細胞内に保有する脂肪細胞へと分化することが明らかとなった。また、その分化の移行速度は非常に速く、培地置換後の 48h までに進行していることが示された。さらに、その中心的な分化制御に、哺乳類などと同様に PPAR $\gamma$  と C/EBP $\alpha$  が関与している可能性が示された。そこで、本章では、鶏脂肪細胞の分化の様相を、分化関連遺伝子の mRNA 発現の変動から分子生物学的に解析し、鶏脂肪細胞の分化過程の特徴を明らかにすることを試みた。

哺乳類では、脂肪細胞の分化を制御する関連遺伝子が相互に作用し合うことで前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化が進行することが明らかとなっている。その中心的な役割を果たすのが C/EBP および PPAR ファミリーである。哺乳類の脂肪細胞では、まず、培地への各種のホルモン添加により C/EBP $\beta$  や C/EBP $\delta$  が活性化する。次に、これらの転写因子により PPAR $\gamma$  と C/EBP $\alpha$  の発現が誘導され、PPAR $\gamma$  と C/EBP $\alpha$  はお互いの発現を活性化しながら脂肪細胞特異的遺伝子の転写活性を促進する。また insulin は SREBP-1 の発現を誘導し (Le Lay et al., 2002)、脂肪酸合成を活性化させることにより、PPAR $\gamma$  の転写活性を上昇させ、分化を促進する (Kim et al. 1998)。これらの転写因子によって、発現を促進された脂肪細胞特異的遺伝子、例えば fatty acid synthase (FAS)、lipoprotein lipase (LPL)、adipocyte fatty acid binding protein (aP2)、glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH)、glucose transporter (GLUT) などの脂肪蓄積に関係する遺伝子や leptin、tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) といった脂肪細胞内分泌物 (アディポサイトカイン) に関するものなど、実に多様な脂肪細胞の機能に関与する遺伝子の発現が上昇し、脂肪細胞への分化が完了する。

このように哺乳類における脂肪細胞の分化はその過程がほぼ明らかにされつつあるが、現在までに鶏脂肪細胞の分化においては、各種遺伝子の発現は転写因子を含めほとんど明らかにされていない。そこで、本章ではニワトリでその存在が同定されている分化関連遺伝子の発現を、前章で確立した鶏前駆脂肪細胞を脂肪細胞に分化誘導する実験系を用いて、経時的な発現変動を詳細に調査し、鶏脂肪細胞分化過程の特徴の一端を明らかにすることを試みた。

## 【材料および方法】

- (1) 鶏初代前駆脂肪細胞の調製～細胞回収  
第二章第一節参照

(2) RNA の分離、cDNA の作成、

第二章第一節参照

18S rRNA 測定用として random primers (Invitrogen;48190-011) を用いて cDNA を作成した。

(3) real time PCR

第二章第一節参照

各プライマーの配列および反応条件を以下に示す

**【C/EBP $\beta$ 】** product size : 331bp (nucleotides from 353 to 683,AY212285)

sense: 5'–CGCTCCATGACCGAACTTACC– 3'

anti-sense: 5'–CCACTTTGGTCTCCACGATCTG– 3'

条件: 95°C × 1 3min

95°C × 35 30sec、64°C 1min、72°C 1min

72°C × 1 5min

4°C stock

**【C/EBP $\delta$ 】** product size : 121bp (nucleotides from 82 to 202,

008618.1 <http://www.chick.umist.ac.uk/>)

sense: 5'–CAACCAGGAGATGCAGCAGAAG– 3'

anti-sense: 5'–GGGCAGCTGCTTGAAGAAGTG– 3'

条件: 95°C × 1 3min

95°C × 35 30sec、64°C 1min、72°C 1min

72°C × 1 5min

4°C stock

**【SREBP-1】** product size : 237 bp (nucleotides from 2356 to 2592,

AY029224)

sense: 5'–CATTGGGTCACCGCTTCTTCGTG– 3'

anti-sense: 5'–CGTTGAGCAGCTGAAGGTACTCC– 3'

条件: 95°C × 1 3min

95°C × 35 30sec、67°C 1min、72°C 1min

72°C × 1 5min

4°C stock

**【SREBP-2】** product size : 340bp (nucleotides from 1009 to 1348,

AJ414379)

sense: 5'–ACAGACGCCAAGATGCACAAGTC– 3'

anti-sense: 5'–CCACAGGAGGAGAGTCAGGTTCA– 3'

条件: 94°C × 1 3min  
94°C × 35 30sec、58°C 1min、72°C 1min  
72°C × 1 5min  
4°C stock

**【FAS】** product size : 979bp (nucleotides from 3076 to 4054, J03860)

sense: 5' - ACGATTGCCACCAGGATTCGCT - 3'

anti-sense: 5' - GCTGTGCTCTTGCTGTAGGTCTG - 3'

条件: 94°C × 1 3min  
94°C × 35 30sec、61°C 1min、72°C 1min  
72°C × 1 5min  
4°C stock

**【LPL】** product size : 535bp (nucleotides from 1387 to 1921, X14670)

sense: 5' - GCATTCACCATTCAGAGAGTCAG - 3'

anti-sense: 5' - AACTGCTAAAGAGGAACTGATGG - 3'

条件: 94°C × 1 3min  
94°C × 35 30sec、63°C 1min、72°C 1min  
72°C × 1 5min  
4°C stock

**【LR8】** product size : 475bp (nucleotides from 1964 to 2438, X80207)

sense: 5' - GCCAGGATCGTAGACTTGTGCTC - 3'

anti-sense: 5' - CACATGAAGTAGCCAGCCAATGC - 3'

条件: 94°C × 1 3min  
94°C × 35 30sec、57°C 1min、72°C 1min  
72°C × 1 5min  
4°C stock

**【GLUT1】** product size : 554bp (nucleotides from 391 to 944, L07300)

sense: 5' - GATGGCTTTGTCCTTTGAGATGC - 3'

anti-sense: 5' - CAAAGATGCTGGTGGAGTAGTAG - 3'

条件: 95°C × 1 3min  
95°C × 35 30sec、65°C 1min、72°C 1min  
72°C × 1 5min  
4°C stock

**【GLUT8】** product size : 309bp (nucleotides from -45 to 263, AB083371)

sense: 5' - GCAGCAGAGGTTATTCGCGCCG - 3'

anti-sense: 5' - GCCTCCCAGTATTCCTCCAGCAG - 3'

条件: 94°C × 1 3min

94°C×35 30sec、67°C 1min、72°C 1min  
72°C×1 5min  
4°C stock

【18S rRNA】 product size : 312bp (nucleotides from 217 to 528, AF173612)

sense: 5'-TAGATAACCTCGAGCCGATCGCA- 3'

anti-sense: 5'-GACTTGCCCTCCAATGGATCCTC- 3'

条件: 94°C×1 3min

94°C×35 30sec、63°C 1min、72°C 1min

72°C×1 5min

4°C stock

aP2 および PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$  に関しては第二章参照

#### (4) 実験群と評価項目

前章で用いた脂肪酸添加分化誘導培地を用いて、培地置換後 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48 時間での細胞を回収し、各種分化関連遺伝子の発現を real time PCR により定量し、18S rRNA の発現量を用いて補正した。

#### 【結果】

脂肪細胞の分化マーカーである aP2 mRNA は分化誘導培地置換後、6h でその発現が認められ、9h で最大値を取り、48h まで高い発現量を維持していた (Fig.3A)。

哺乳類の脂肪細胞で分化制御の中心を担う PPAR $\gamma$  mRNA 発現は、分化誘導開始後、3h ですでにその発現量が大きく亢進し、9h でその発現は最大となり、その後、急速に発現が減少した (Fig.3B)。一方、PPAR $\gamma$  と同様に分化を制御する C/EBP $\alpha$  は、PPAR $\gamma$  の発現パターンとは異なり、分化誘導開始後 18h までの発現は変動せず、24h でその発現が 2 倍程度に増加し、その後、徐々に減少して、48h には分化誘導前のレベルに低下した (Fig.3C)。

分化開始時の最初のシグナルに関与することが哺乳類で確認されている C/EBP $\beta$  と  $\delta$  は、分化の進行に伴い徐々に増加する傾向が確認された (Fig.3D, 3E)。

insulin に反応し、脂肪細胞の初期分化を進行する役割を担っている SREBP-1 (Student et al., 1980) とそれによる制御を受けている FAS は、分化誘導後 12h からその発現が徐々に増加し、24h で最大値を取り、その後高い発現レベルを維持した (Fig.3F, 3G)。一方、SREBP-1 のホモログであり、コレステロール代謝に関与するとされる SREBP-2 は (Kawabe et al., 1999)、分化誘導培地に置換により、一過的な抑制が示されるものの大きな発現変動は認められなかった

(Fig.3H)。

3T3-L1 細胞で初期分化マーカーとして利用されている LPL は、鶏脂肪細胞の分化実験系である本培養条件では、分化の進行に伴い mRNA 発現が減少した (Fig.3I)。VLDL receptor のホモログである LR8 (Bujo et al., 1995) は増加傾向が認められた (Fig.3J)。

糖取り込みに関与し、insulin に反応する GLUT8 は 12h までに減少傾向を示したのち、その後発現が亢進する傾向を示した (Fig.3K)。また GLUT1 は分化の進行に伴い増加傾向を示した (Fig.3L)。

### 【考察】

本章では、mRNA 発現に対する内部標準としての補正を、前章までの GAPDH から 18S rRNA に変更した。これは、SREBP-1 発現において、insulin が存在すると、GAPDH mRNA 発現量が変動することが報告され (Le Lay et al., 2002)、本培養実験系の内部標準としては適切ではないものと推察されたためである。第 2 章 2 節では、aP2 mRNA 発現量が 24h 以降、分化誘導開始前に比べては有意に高いものの、その発現が低下する、という結果が得られていたものの、本試験では高いレベルを維持していたことが確認された。すなわち、本章の結果から、鶏前駆脂肪細胞を分化誘導することにより、分化マーカーである aP2 の発現がはじめて認められ、少なくとも分化誘導培地置換後 48h までは、脂肪細胞の分化が進行していることが示された。このような条件下で、本章では、哺乳類で確認されている様々な分化関連遺伝子の発現変動を観察した。

哺乳類における脂肪細胞分化制御の中心を担っている PPAR $\gamma$  と C/EBP $\alpha$  の発現は、ほぼ同時に発現亢進が認められることが明らかとなっている (Spiegelman et al., 1996)。しかし、本試験の鶏脂肪細胞では、分化培地置換後、直ちに PPAR $\gamma$  発現が上昇するものの、C/EBP $\alpha$  の発現は少し遅れて(約 16h 後)誘導された。一方、分化マーカーである aP2 mRNA の発現は、C/EBP $\alpha$  mRNA の発現亢進が認められる以前に上昇している。これら結果は、PPAR $\gamma$  の mRNA 発現の亢進が、鶏脂肪細胞分化の master regulator となっている可能性を示唆するものである。鶏脂肪細胞の分化に必須である脂肪酸は、哺乳類において PPAR $\gamma$  だけでなくそれと二量体を形成する retinoid X receptor (RXR) にもリガンドとしても作用して活性化させることが知られている (Goldstein et al., 2003)。そのため、鶏脂肪細胞においては外因性の脂肪酸の刺激による PPAR $\gamma$  の活性化、RXR との二量体形成、そして、その転写活性の調節が分化調節を担っている可能性が推察された。

SREBP-1 は insulin に反応してその発現や活性を高め、合成された脂肪酸が PPAR $\gamma$  を活性化して、脂肪細胞への分化を導くことが哺乳類で知られている

(Kim et al. 1998)。鶏脂肪組織では脂肪酸合成能が低く、SREBP-1 発現もごくわずかであることが知られており (Gondred et al., 2001)、本研究の結果が明らかになるまでは、脂肪酸合成関連遺伝子の発現は鶏脂肪細胞分化には影響しないものと推測していた。しかし本培養条件下では、脂肪細胞の分化により SREBP-1 と FAS mRNA 発現が亢進していた。これは、分化過程の鶏脂肪細胞において、脂肪酸合成能の制御が行なわれている可能性を示す初めての結果である。一方、SREBP-1 の発現上昇は、PPAR $\gamma$  発現上昇よりも遅く、C/EBP $\alpha$  の発現とほぼ同一の発現パターンを示した。脂肪細胞における分化制御は、細胞における脂肪酸の合成が関与している。しかし鶏脂肪細胞は分化初期では FAS の mRNA 発現が低いことから、脂肪酸合成能は弱いことが推察される。そのため鶏脂肪細胞では、哺乳類と異なり、分化誘導に外因性の脂肪酸が必須であり、かつ脂肪酸による PPAR $\gamma$  の活性化により分化が進行していくことが示唆された。すなわち、鶏脂肪酸合成関連遺伝子は、鶏脂肪細胞の分化を誘導する作用より、分化を促進する役割を果たしているものと推察された。また、PPAR $\gamma$  とともに C/EBP $\alpha$  も脂肪酸添加区で発現していることから、鶏脂肪細胞分化においても哺乳類と同様に C/EBP $\alpha$  により各種の adipogenic gene の誘導による分化への関与と、鶏脂肪細胞の分化においては、PPAR $\gamma$  の発現亢進による C/EBP $\alpha$  の発現誘導が行なわれているものと推察された。

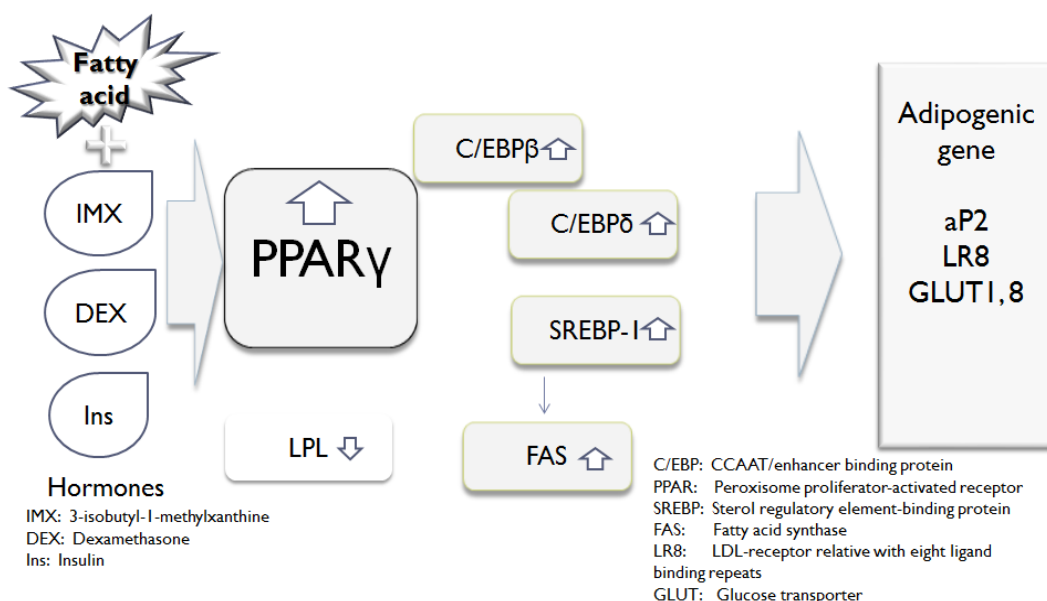
糖取り込みの遺伝子も、脂肪細胞分化に関与することが哺乳類で報告されている (Wu et al., 1998)。すなわち、分化初期には GLUT1 が発現し、脂肪細胞が分化して、成熟に向かうと、insulin 感受性 GLUT である GLUT4 が発現する。一方、ニワトリでは insulin 感受性 GLUT である GLUT4 が欠損している (Seki et al., 2003)。そこで、本試験では GLUT1 と GLUT4 以外の insulin 感受性 GLUT とされる GLUT8 (Carayannopoulos et al., 2000) の mRNA 発現の変動を測定した。GLUT1 および GLUT8 は、鶏脂肪細胞の分化の進行に伴い、発現が上昇する傾向を示した (Fig.3K)。すなわち、鶏脂肪細胞の GLUT 遺伝子は、脂肪細胞の分化に伴うエネルギー基質の供給、そして脂肪酸合成への基質を供給している可能性が推察された。またこれらの発現は PPAR $\gamma$  よりも C/EBP $\alpha$  の発現パターンと類似しており、哺乳類と同様に、ニワトリにおいても糖代謝に関する因子の発現制御には C/EBP $\alpha$  が関与している可能性が推察された。

C/EBP $\beta$  や C/EBP $\delta$  は PPAR $\gamma$  や C/EBP $\alpha$ 、SREBP-1 などを直接的に誘導する機能を有する可能性が哺乳類で示唆されている (Mandrup et al., 1997) が、本試験の結果から、鶏前駆脂肪細胞の分化誘導に C/EBP $\beta$ ・C/EBP $\delta$  が関与している直接的な証拠を得ることはできなかった。しかし、これら C/EBP ファミリー遺伝子は、鶏脂肪細胞でも発現していることから、分化に何らかの関与をしている可能性も否定できない。脂肪細胞の分化マーカーである aP2 は、PPAR $\gamma$

発現の上昇とともに増加した。これは、鶏脂肪細胞分化誘導が PPAR $\gamma$  の亢進によって引き起こされるとする本章の考察を支持するものである。aP2 は脂肪型脂肪酸結合タンパク質であるので、脂肪細胞が成熟し、エネルギーを貯蔵する機能に影響しているものと考えられる。一方、貯蔵脂肪を供給する LPL 発現は分化過程で減少していた。哺乳類では、分化制御転写因子発現、得に PPAR $\gamma$  の発現の上昇にともない、LPL mRNA 発現が上昇することが報告されている (Kageyama et al., 2003)。すなわち、この発現変動は鶏脂肪細胞特異的なものであった。この発現変化がどのような代謝的意義を持つかは現在のところ不明ではあるが、3T3-L1 細胞において LPL の活性に関しては PPAR リガンドであるチアゾリジン誘導体により抑制される (Ranganathan et al., 1998)、鶏脂肪細胞の分化が盛んに行なわれていると推定される 1~2 週齢の脂肪組織 LPL は mRNA 発現およびその活性も低い (Sato et al., 2002) などの報告を考えると、LPL 発現が低下することは、脂肪酸により誘導される鶏前駆脂肪細胞への分化の誘導・促進や、あるいは腹腔内脂肪組織の発達を制御する鍵となっている可能性が推察された。

以上のように哺乳類と比べ、鶏脂肪細胞にはその分化時の発現特異性が示された。特に、鶏前駆脂肪細胞の脂肪細胞への分化には、PPAR $\gamma$  の発現亢進が重要であることが明らかとなった。そこで、次章では、鶏脂肪細胞分化の Master regulator と推察された PPAR $\gamma$  に焦点を当て、その制御機構の特徴を明らかにすることを試みた。

## 鶏脂肪細胞の分化関連遺伝子の発現変動まとめ



## 第四章

### PPAR $\gamma$ の活性と発現制御による鶏脂肪細胞の 分化様相の確認



前章までに鶏脂肪細胞の分化は外因性の脂肪酸要求性の分化機構を有していることが示された。またその分化には PPAR $\gamma$  が鶏脂肪細胞の **master regulator** として機能している可能性が示唆された。鶏脂肪細胞は細胞独自の脂肪酸合成能が低いため、外因性の脂肪酸の添加によりはじめて PPAR $\gamma$  の誘導および活性化が生じ、その結果分化が進行している可能性が考えられるが、脂肪酸が哺乳類と同様に鶏 PPAR $\gamma$  のリガンドとして作用しているのか、また鶏脂肪細胞において PPAR $\gamma$  の誘導にどのように関与しているかは不明である。

脂肪酸により活性化される因子は PPAR $\gamma$  以外にも多様に存在する。例えば PPAR $\gamma$  だけでなく、他の PPAR ファミリーも脂肪酸をリガンドとしており (Krey et al., 1997)、また PPAR と二量体を形成する RXR も脂肪酸をリガンドとすることにより活性化されることが報告されている (Goldstein et al., 2003)。それ以外にも SREBP-1 と同様に Notch-1 が、PPAR $\gamma$  や PPAR $\delta$  のように脂肪酸により活性化される転写因子を誘導すると報告されている (Garcés et al., 1997)。このように、鶏脂肪細胞を分化誘導に必要な脂肪酸は PPAR $\gamma$  のみに作用して分化を誘導するのではなく、PPAR $\gamma$  以外の因子に作用して鶏前駆脂肪細胞を脂肪細胞に分化させる可能性も考えられる。

哺乳類の研究において、チアゾリジン誘導体である Troglitazone は特異的に PPAR $\gamma$  のリガンドとして活性化させ (Camp et al., 2000)、脂肪細胞における adipogenic gene の発現を誘導することが知られている。またニワトリに Troglitazone を投与することにより腹腔脂肪量の変化や、PPAR $\gamma$ 、LPL の発現変化が誘導されることが報告されており (Sato et al., 2004)、ニワトリにおいても Troglitazone が PPAR $\gamma$  を活性化するリガンドとして作用すると考えられる。このような PPAR $\gamma$  特異的に働く薬剤により、PPAR $\gamma$  の活性を制御して PPAR $\gamma$  の役割を明らかにすることが可能である。

そこで本章では鶏脂肪細胞分化機構の特徴の一端を明らかにするために、脂肪酸と PPAR $\gamma$  の関係について着目し、第一節では PPAR $\gamma$  のアゴニスト (Troglitazone) を、また第二節では脂肪酸による鶏脂肪細胞分化誘導は、PPAR $\gamma$  の遺伝子発現亢進が直接の **key factor** であるかどうかを検証するため、PPAR $\gamma$  を鶏脂肪細胞に過剰発現させた際の分化の様相を観察した。

## 第一節 PPAR $\gamma$ リガンド (Troglitazone) 添加時の鶏脂肪細胞分化の様相

本節では PPAR $\gamma$  の特異的リガンドであり、その転写活性を亢進させる Troglitazone を培地に添加して、鶏脂肪細胞分化に必須な脂肪酸が、PPAR $\gamma$  のリガンドとして機能しているのか、あるいはそれ以外の機構で鶏脂肪細胞分化を誘導するのかを推察することを試みた。添加する Troglitazone は、チアゾリジン誘導体であり、PPAR $\gamma$  のリガンドとして、脂肪酸の 100 倍以上親和性が高い。すなわち、Troglitazone のみを培地に添加して、前駆脂肪細胞の分化が誘導されれば、鶏脂肪細胞分化誘導に必須である脂肪酸は、PPAR $\gamma$  のリガンドとしてのみ機能していると推察できる。

### 【材料および方法】

#### (1) 鶏初代前駆脂肪細胞の調製～細胞回収

第二章第一節参照

##### 《試薬》

・培地に添加する Troglitazone (三共製薬) は濃度を 10 $\mu$ M とした。水には難溶性であるので 100 倍量をエタノールに溶解したものを培地に添加した。

#### (2) RNA の分離、cDNA の作成、

第二章第一節参照

#### (3) real time PCR

第二章および第三章参照

aP2、PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$ 、18S rRNA のプライマーに関しては第三章参照

#### (4) 実験群と評価項目

各区 (以下参照) で 0,6,12,24,48 時間での細胞を回収し、aP2、PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$ 、LPL の発現を real time PCR により定量し、18S rRNA の発現量を用いて補正を行なった。

Non-FA	FA	Troglitazone	FA+Troglitazone
・500nM DEX ・0.5mM IMX ・20 $\mu$ g/ml Ins	・500nM DEX ・0.5mM IMX ・20 $\mu$ g/ml Ins  +300 $\mu$ M oleate	・500nM DEX ・0.5mM IMX ・20 $\mu$ g/ml Ins  +10 $\mu$ M Troglitazone	・500nM DEX ・0.5mM IMX ・20 $\mu$ g/ml Ins  +300 $\mu$ M oleate +10 $\mu$ M Troglitazone

#### 【結果】

FA 区と FA+Troglitazone 添加区では細胞への脂肪蓄積が確認され、また FA のみの区よりも FA+Troglitazone 添加区のほうが、肉眼的に多量の脂肪滴の蓄積が観察された (Fig.4-1-1)。また aP2 mRNA も同様に FA および FA+Troglitazone 添加区でのみ発現が上昇した。Troglitazone のみ添加では aP2 mRNA 発現の誘導はほとんど見られなかった (Fig.4-1-2A)。また PPAR $\gamma$  mRNA 発現も aP2 mRNA 発現が認められた FA 区および FA+Troglitazone 区でのみ発現が認められ、その発現の経時的変動は前章での結果と同様であった (Fig.4-1-2B)。

C/EBP $\alpha$  は FA 区では前章の結果と同様に 24h で発現が亢進していたのに対し、FA+Troglitazone 区では培地置換後 6h にすでに発現が亢進していることが確認された (Fig.4-1-2C)。また LPL はすべての区において減少傾向を示していたが、FA 区と FA+Troglitazone 区がより低い発現を示す傾向を示していた (Fig.4-1-2D)。

#### 【考察】

PPAR $\gamma$  特異的リガンドである Troglitazone は、哺乳類前駆脂肪細胞において PPAR $\gamma$  の ligand-binding domain (LBD) に結合し、その転写活性を亢進し、それにより aP2 などの adipogenic gene の発現を増加させ、分化を誘導する (Houseknecht et al., 2002)。しかし、ニワトリでは PPAR $\gamma$  および aP2 mRNA の発現自体は Troglitazone のみ添加によって誘導されない。脂肪酸とともに Troglitazone を同時に添加した際に、aP2 mRNA 発現量も増大していたことから、鶏脂肪細胞においても Troglitazone は PPAR $\gamma$  のリガンドとして作用し、そ

の活性を高めている可能性は高いものの、脂肪細胞分化過程における PPAR $\gamma$  mRNA の発現の誘導は、脂肪酸の培地への添加が必須であることが明らかとなった。つまり、脂肪酸は鶏脂肪細胞において PPAR $\gamma$  リガンドとしての作用も有しているが、脂肪酸が PPAR $\gamma$  mRNA 発現自体を制御する因子として機能している、あるいは PPAR プロモーターに作用する因子に作用している可能性が推察された。また FA 区と比べ FA+Troglitazone 区で C/EBP $\alpha$  の発現が早められており、Troglitazone による PPAR $\gamma$  の活性化からの C/EBP $\alpha$  の誘導が推察された。また、鶏脂肪細胞分化において特徴的な LPL の発現の減少は、脂肪蓄積が認められない non-FA 区や Troglitazone 区においても発現が減少する傾向を示していた。脂肪細胞において、細胞内 cAMP 濃度が上昇すると、LPL 合成と活性が低下することが知られており (Bensadoun et al., 1986)、LPL の低発現はホルモンによる作用であることも推察される。また、脂肪滴を蓄積している FA 区や FA+Troglitazone 区で、non-FA 区より発現低下の傾向を示している。すなわち、この LPL の低発現は、ホルモンによる分化初期での分化誘導作用とともに、鶏脂肪細胞分化において、その促進・維持に関わる特徴である可能性が示唆された。

## 第二節 脂肪酸誘導性分化誘導における PPAR $\gamma$ 遺伝子発現亢進の意義の解明

前節では、PPAR $\gamma$  の特異的アゴニストを用い、外因性の脂肪酸を要求する鶏脂肪細胞分化の機構を明らかにすることを目的に実験してきたが、前節までの結果を考えると、外因性の脂肪酸は PPAR $\gamma$  リガンドとして機能しているだけではない脂肪酸特有のシグナルに依存している可能性が示唆された。

そこで本節では、PPAR $\gamma$  の mRNA 発現亢進は、脂肪酸シグナルに依存し、PPAR $\gamma$  の細胞内量が増加することにより、分化が進行していくものと仮説を立て、鶏 PPAR $\gamma$  を鶏前駆脂肪細胞で過剰発現させた時の鶏脂肪細胞の分化の様相を観察した。

### 【材料および方法】

#### PPAR $\gamma$ 遺伝子の過剰発現による検討

##### (1) 鶏初代前駆脂肪細胞の調製

##### 第二章 第一節参照

##### (2) 鶏前駆脂肪細胞の濃縮

## 第二章 第一節参照

### (3) 細胞数の測定

## 第二章 第一節参照

### (4) 細胞数の測定

## 第二章 第一節参照

### (5) コンストラクトの作製

鶏 PPAR $\gamma$  遺伝子配列の ORF(1425bp)を pTracer CMV2 の EcoR I サイトに Ligation したコンストラクトを作製した。

### (6) 細胞へのリポフェクションと試験培地

- ① 1.5ml チューブに 50 $\mu$ l のオプティ MEM を 2 $\mu$ g のコンストラクト(0.4 $\mu$ g/ $\mu$ l) を加えた。
- ② 別の 1.5ml チューブに 50 $\mu$ l のオプティ MEM に 0.6 $\mu$ l の Lipofectamine 2000(invitrogen: 11668) を加え 5 分間室温に放置した。
- ③ 上記二つを混ぜ室温に 1 時間放置した。
- ④ 1 時間後 100 $\mu$ l のオプティ MEM を加えた。
- ⑤ 上の混合物を 24 穴プレート (SUMIRON CI) に播種した鶏前駆脂肪細胞に添加し、12 時間インキュベートした。
- ⑥ その後 300 $\mu$ l の Growth medium を加えて 12–24 時間培養し、200 $\mu$ g/ml の Zeocin で 2 日間培養して導入細胞を選択し、蛍光顕微鏡で観察した。
- ⑦ 試験培地 (IMD or IMD+FA) に交換し、24 時間後に細胞を回収して、遺伝子発現を測定した。

### (7)mRNA 測定法

RNA の分離(AGPC 法)、cDNA の作成、Real time PCR

## 第二章 第一節参照

### 【結果】

鶏脂肪細胞に脂肪酸を添加した区では今までの実験同様に、細胞内に脂肪滴が見られ、また PPAR $\gamma$ 、aP2 遺伝子発現とも IMD のみの区と比較すると高い値を示した。同様に IMD 培地で pTracer-PPAR $\gamma$  により PPAR $\gamma$  遺伝子を過剰発現させた区では脂肪酸添加区と同等の PPAR $\gamma$ 、aP2 mRNA 発現が確認された。形態学的には脂肪滴は確認できなかったが、細胞増殖の停止と細胞の形状に肥

大変化が認められた (Fig.4-2-1)。さらに、pTracer-PPAR $\gamma$  により PPAR $\gamma$  遺伝子を過剰発現させ IMD 培地に脂肪酸を添加した区では、aP2 mRNA 発現量は脂肪酸添加区、pTrace-PPAR $\gamma$  により PPAR $\gamma$  遺伝子を過剰発現させた区より高い発現を示し (Fig.4-2-2)、同様に細胞の鏡顕像においても多量の脂肪蓄積が認められた (Fig.4-2-1)。

### 【考察】

pTracer-PPAR $\gamma$  を導入した細胞では、IMD 培地のみによる分化誘導でも、細胞に形態学的変化が観察されるとともに、aP2 mRNA 発現の増加が認められた。これまでの実験の結果からは IMD 培地のみの添加で鶏前駆脂肪細胞は分化誘導されないことが示されていたが、本結果から、その理由は IMD 培地によっては PPAR $\gamma$  が活性化されない、あるいは PPAR $\gamma$  の mRNA 発現が亢進しないことを直接的に明示するとともに、鶏脂肪細胞分化は細胞内 PPAR $\gamma$  mRNA 発現量の増加により引き起こされていることを明らかにした。

また PPAR $\gamma$  はリガンド要求性の転写因子であり、リガンドとなる脂肪酸は前章の結果から、細胞内でわずかではあるものの内因性の SREBP-1 が発現し、それにより脂肪酸合成酵素 (FAS) の遺伝子発現もわずかではあるが誘導されていることから、PPAR $\gamma$  過剰発現の細胞においては、内因性の脂肪酸によって PPAR $\gamma$  が活性化され分化が進行したものと推定された。また、脂肪酸添加区と IMD+pTracer-PPAR $\gamma$  区で aP2 mRNA 発現量は、若干、脂肪酸無添加の pTracer-PPAR $\gamma$  導入区よりは高いものの、大きく上昇しているわけではなかった。以上のことから、脂肪酸による鶏脂肪細胞の分化誘導機構には PPAR $\gamma$  遺伝子を亢進させる機構が重要ではないかと考えられた。

## 第五章

PPAR $\gamma$  の発現に関わる adipogenesis 関連因子  
(ZNF423, KLFs, FGF10) の発現解析

前章までの検討より、鶏脂肪細胞の分化制御には外因性の脂肪酸が必須であり、脂肪酸は PPAR $\gamma$  のリガンドとしての作用だけでなく、PPAR $\gamma$  の mRNA 亢進による細胞内 PPAR $\gamma$  量を増加させることにより分化が促進する、特異的な分化機構に作用していることが推察された。

近年、脂肪細胞の分化制御機構について、哺乳類を用いた研究が進められ、zinc finger protein ファミリーのうち、Zfp423 (マウス ZNF423)が、前駆脂肪細胞分化の決定因子であるとの報告がされた (Gupta et al., 2010)。すなわち、Zfp423 は前駆脂肪細胞の分化において PPAR $\gamma$  の発現と同調して発現が誘導され、PPAR $\gamma$  の発現を誘導し、分化制御を強く担っていると報告されている。また、Krüppel-like transcription factors (KLFs)も脂肪細胞の分化制御を担うことが報告されている (Kaczynski et al., 2003)。KLF-2 は PPAR $\gamma$  のプロモーター領域に直接結合する。またホルモン刺激によりその発現が抑制されることから、脂肪細胞分化には負の制御因子としての報告がある (Banerjee et al., 2003)。KLF-5 もまた脂肪細胞の分化進行に伴い発現が誘導されることが報告されており (Oishi et al., 2005)、KLF-15 については PPAR $\gamma$  の発現を誘導することともに、GLUT4 といった脂肪細胞特有の遺伝子発現を誘導に関与することが報告されている (Gray et al., 2002)。サイトカインである fibroblast growth factor 10 (FGF10)は、adipogenesis における主要な細胞内シグナル因子であり、その発現は脂肪組織に特異的と報告されている (Yamasaki et al., 1999)。更に FGF10 は脂肪細胞において分泌され、3T3-L1 の分化においては C/EBP $\beta$  の発現と関連して adipogenesis に強く関与していることが報告されている (Sakaue et al., 2002)。

本章では、鶏脂肪細胞特異的な脂肪酸誘導性分化制御機構の更なる解明に向けて PPAR $\gamma$  の発現誘導並びに脂肪細胞の分化制御に関わる ZNF423 と、KLF ファミリーおよび FGF10 の発現解析について、in vitro における鶏脂肪細胞の分化時の経時的な発現変化とともに、in vivo での組織発現分布、また腹腔脂肪組織における発現変化から、これら因子が PPAR $\gamma$  を発現誘導する可能性、そして脂肪細胞の成熟への関与を検討した。



## 第一節 鶏脂肪細胞分化時における ZNF423, KLFs, FGF10 の発現変化

本節ではまず、外因性脂肪酸添加による分化誘導時の鶏脂肪細胞でのこれら adipogenesis 関連因子の発現評価を、real time PCR による定量的遺伝子発現評価とともに、ウエスタンブロットによるタンパク質の発現の確認を行った。

### 【材料および方法】

#### (1) 鶏初代前駆脂肪細胞の調製～細胞回収

第二章第一節参照

[一部改変]：分化誘導培地 (Differential medium) に添加する insulin, DEX, IMX は Takara Bio Inc. ; MK429 を使用した。

#### (2) RNA の分離、cDNA の作成、

第二章第一節参照

[一部改変]：cDNA の作成 (iScript™ cDNA Synthesis kit バイオラッド; 170-8891) を使用した。

- ① TotalRNA を全量が 1μg となるように DDW 9μl に溶かした。
- ② 5x iScript reaction mix 4μl と iScript reverse transcriptase 1μl を混合し最終容量 20μl 作成した。
- ③ 混合液を 25°C 5min、42°C 30min、85°C 5min 処理した。

#### (3) real time PCR

第二章および第三章参照

[一部改変]：Sso Advanced™ SYBR® Green Supermix (バイオラッド; 172-5260) を使用した。

- ① スタンダードを DDW で必要な濃度に希釈して利用した。
- ② Sso Advanced SYBR Green supermix 10μl, sense primer 0.2μl, anti-sense primer 0.2μl, DDW 9μl, TEMP 1μl を 96 穴 PCR plate にアプライした。
- ③ スタンダードによる検量線をもとに、サンプルの濃度を求めた。
- ④ melt program を用いて melt peak が一致していることを確認した。

aP2, PPAR $\gamma$  のプライマー、反応条件については第二章および第三章参照

【ZNF423】 product size : 193bp

(nucleotides from 1090 to 1282, XM414103.3)

sense: 5' - CAGACAACCTGACTCCAGCA - 3'

anti-sense: 5' - AGACCAATTCTGGCCTTCCT - 3'

条件: 95°C × 1 3min

95°C × 35 10sec, 60°C 10sec, 72°C 30sec

4°C stock

**【FGF10】** product size : 224bp

(nucleotides from 136 to 359, NM204696.1)

sense: 5' - CAGAAGCAGCAACCACCGGCT - 3'

anti-sense: 5' - TCCTGGCCGAGGTCATGGCA - 3'

条件: 95°C × 1 3min

95°C × 30 10sec, 60°C 10sec, 72°C 30sec

4°C stock

**【KLF-2】** product size : 232bp

(nucleotides from 912 to 1143, JQ687128)

sense: 5' - CGGGAAGACCTACACCAAGA - 3'

anti-sense: 5' - GCTACATGTGCCGCTTCAT - 3'

条件: 95°C × 1 3min

95°C × 30 10sec, 60°C 10sec, 72°C 30sec

4°C stock

**【KLF-5】** product size : 151bp

(nucleotides from 1417 to 1567, XM417013.3)

sense: 5' - CTGCCAATAACTCCCCAGAA - 3'

anti-sense: 5' - GAGTTCTCAGGTGCGCTTTT - 3'

条件: 95°C × 1 3min

95°C × 30 10sec, 60°C 10sec, 72°C 30sec

4°C stock

**【KLF-15】** product size : 207bp

(nucleotides from 822 to 1028, XM\_425161.2)

sense: 5' - TGCCAAGCCGATTGGGCCAG - 3'

anti-sense: 5' - GGCCACGTGCAAGCAAACGG - 3'

条件: 95°C × 1 3min

95°C × 30 10sec, 65°C 10sec, 72°C 30sec

4°C stock

【RPS9】 product size : 176bp

(nucleotides from 1054 to 1229, XM416921)

sense: 5' - TGCGAAGTTTTGTGACTGAAACA - 3'

anti-sense: 5' - ATTCTTGGAGCATTCAGCCTTTC - 3'

条件: 95°C × 1 3min

95°C × 30 10sec, 60°C 10sec, 72°C 30sec

4°C stock

本章では、遺伝子発現の内部標準としての補正を、18s rRNA から Ribosomal protein 9 (RPS9) に変更した。これは細胞分化時での発現比較においては18sと同様に安定していたが、次節以降での各組織間での発現比較や、脂肪組織での経時的な発現比較の際では、より安定した内部標準因子であることから変更した(Bionaz et al., 2007)。

#### (4) SDS-PAGE によるタンパク質の分離

- ① 細胞を Protease inhibitor Complete Mini (Roche; 11836153001) を加えた RIPA buffer (Thermo; 89901) にて回収し、Pierce® BCA protein kit (Thermo; 23227) にてタンパク濃度を測定後、EzApply [BPB、10%ショ糖、1% SDS、50mM DDT を含む Tris-HCl buffer] (ATTO; AE-1430) を加え、100°C、5分煮沸し、氷中で急冷した。
- ② SDS-PAGE は Mini Protein Tetra cell (BioRad) を用いて行い、分子量マーカーは Precision plus protein™ All blue Standards(BioRad; 161-0373)を使用し、ゲルは7.5%ポリアクリルアミドゲルを使用した。電気泳動用 buffer は 25mM Tris-HCl、192mM グリシン、0.1%SDS を使用した。
- ③ サンプルをレーンにアプライし、200V (定電圧)で泳動を行った。

#### (5) タンパク質の PVDF membrane への転写 (Pierce® Fast Semi-Dry Blotter を使用)

- ① 電気泳動終了後、ゲルを DW 10min と Blotting buffer (Pierce® Fast Semi-Dry Transfer Buffer; Thermo Scientific; 37536)にて10min 浸し、親水化処理した。また、PVDF membrane (Millipore; IPVH07850) もメタノールにて30sec と、Blotting buffer にて10min 処理し親水化しておく。濾紙 (Blotting buffer に浸しておいたもの)、PVDF、ゲル、濾紙のゲルサンドイッチを作り Semi-DryBlotter にセットした。
- ② 25V (定電圧) の通電条件にて7-8min 転写を行った。
- ③ 転写終了後、T-TBS にて3回洗浄した。

④ ウェスタンブロットに供試した。

(6) ZNF423, KLF-5, KLF-15, FGF10 抗体によるウェスタンブロット  
《一次抗体》

Rabbit Anti-ZNF423 抗体 ×2500 倍希釈 (Abcam; ab94451)

Mouse Anti-KLF-5 抗体 ×2500 倍希釈 (Sigma; SAB4200338)

Rabbit Anti-KLF-15 抗体 ×2500 倍希釈 (Abcam; ab22851)

Goat Anti-FGF10 抗体 ×2500 倍希釈 (Santacruz; sc-27148)

Rabbit Anti-beta-actin 抗体 ×5000 倍希釈 (Cell signaling; 4970S)

《二次抗体》

ECL™ anti rabbit IgG HRP ×25000 倍希釈 (GE Healthcare; NA934)

ECL™ anti mouse IgG HRP ×25000 倍希釈 (GE Healthcare; NA931)

Anti-goat IgG HRP conjugate ×25000 倍希釈 (Invitrogen; R21459)

- ① membrane をブロックエース粉末 (DS ファーマバイオメディカル; UKB80) を T-TBS にて調製したもの冷蔵で一晩振盪、もしくは SuperBlock® Blocking buffer (Thermo; 37536) にて室温で 30 分振盪し、非特異的結合のブロッキングを行った。
- ② 一次抗体に浸し、室温で 2 時間振とうした。
- ③ T-TBS で 3 回洗浄した。
- ④ 抗体に浸し、室温で 1 時間振とうした。
- ⑤ T-TBS で 3 回洗浄した。
- ⑥ Luminata Forte Western HRP substrate (Millipore; WBLUF0100) をかけて発色させ、membrane を ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare) にて撮影した

(7) 実験群と評価項目

第二章と同様に、鶏前駆脂肪細胞を、脂肪酸 (300 $\mu$ M oleate) を含む分化誘導培地に置換し分化誘導を行い、0, 1, 3, 5, 7, 9, 12, 24, 48 時間での細胞から RNA を抽出し、aP2、PPAR $\gamma$ 、ZNF423、FGF10、KLF-2、KLF-5、KLF-15 の mRNA 発現を real time PCR により定量し、Ribosomal protein S9 (RPS9) mRNA の発現量を用いて補正を行なった。また、ウェスタンブロットにより 0, 6, 12, 24, 48 時間での細胞における ZNF423、FGF10、KLF-5、KLF-15 のタンパク質発現を確認した。発現タンパク質の標準化は  $\beta$ -actin の発現で行った。ウェスタンブロットは少なくとも 2 回の試験を実施し発現を確認した。

## 【結果】

aP2 および PPAR $\gamma$  の発現は、前章までと同様に、その発現亢進が確認できた (Fig.5-1-1A, B)。同サンプルにおける各種の adipogenesis 関連因子の mRNA の発現変動に関して、まず ZNF423 は分化誘導後、3-9h において発現が顕著に減少したが、48h においては逆に発現が亢進していた (Fig.5-1-1C)。FGF10 mRNA については、3-24h にかけて発現が減少し、48h では分化誘導前と同程度に回復していた (Fig.5-1-1D)。KLF-2 は分化誘導後、48h にかけて発現が減少した (Fig.5-1-1E)。KLF-5 については、分化誘導後、3-12h にかけて発現が減少していた (Fig.5-1-1F)。KLF-15 については、12h から発現が有意に増加し、48h まで維持されていた (Fig.5-1-1G)。これら因子について、鶏前駆脂肪細胞においてこれらタンパク質発現について、ウエスタンブロットにより検出することができた (Fig.5-1-2)。

## 【考察】

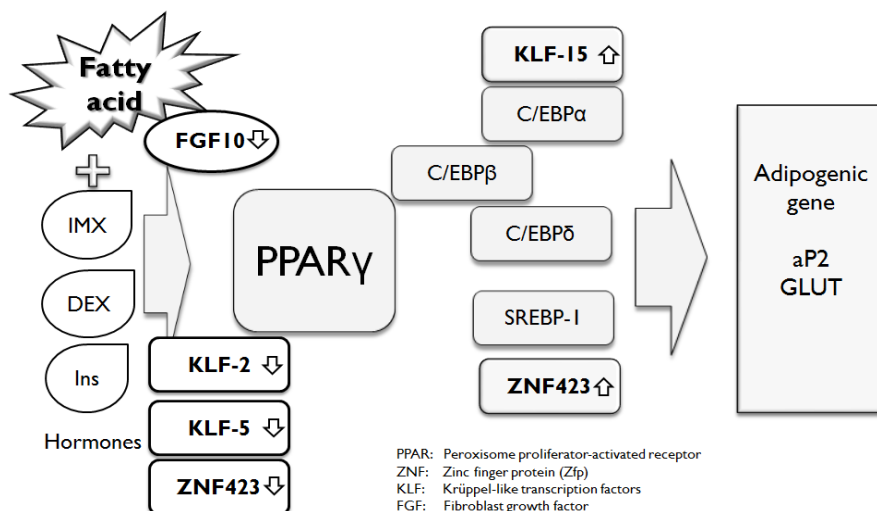
前章までの検討から、鶏前駆脂肪細胞においては PPAR $\gamma$  がその分化の中心的な制御を担うことが示された。本節では、PPAR $\gamma$  の発現誘導を担うと推定され、哺乳類において adipogenesis への関与の報告のある各種の因子についての発現を脂肪酸によって鶏前駆脂肪細胞の分化過程で観察し、PPAR $\gamma$  の発現との関連性と adipogenesis への関与を考察することを行った。まず、第 2 章では PPAR $\gamma$  の mRNA 発現は 9h がピークに発現亢進したが、初代細胞での実験であることを踏まえ、aP2 および PPAR $\gamma$  の発現を同章では再度評価した。本実験においても、鶏前駆脂肪細胞を脂肪酸(300 $\mu$ M oleate)により分化誘導することにより、同様に PPAR $\gamma$  の分化初期からの発現亢進が認められたが、発現のピークは 12h となっていた。これは分化誘導する際の細胞密度などの状態にも依存するものと推察され、同発現パターンに対しての各種の因子の発現を評価することとした。Zfp423 は、哺乳類においては前駆脂肪細胞分化の決定因子として、PPAR $\gamma$  の直接的な誘導を担うことが報告されているが (Gupta et al., 2010)、外因性の脂肪酸を要求する鶏脂肪細胞分化においてはその発現は一過的に減少することが示されたが、48h にかけた分化の進行にともないその発現は亢進しており、鶏脂肪細胞の分化、成熟両面に関わりのあることが示唆された。ただし PPAR $\gamma$  の発現パターンと比較すると協調的な発現パターンは示されておらず、ニワトリにおいては PPAR $\gamma$  の直接的な誘導因子ではないことが推察された。

次に KLF ファミリーについては、各種の KLFs のうち、KLF-2, 5 および KLF-15 に着目して評価を行った。KLF-2 は分化刺激により、顕著にその発現が減少していた。哺乳類脂肪細胞において KLF-2 は adipogenesis での負の制御因子として考えられており、また PPAR $\gamma$  の発現を阻害する因子であるとの報告

がある (Banerjee et al., 2003)。KLF-2 の発現減少は、3T3-L1 においては添加する各種ホルモン (insulin, dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine) により誘導されることが示されており、本試験の鶏脂肪細胞の分化誘導系においても同様な経路によりその発現変化が誘導されているものと推察される。KLF-5 については、哺乳類において、PPAR $\gamma$  の誘導とともに adipogenesis を制御する因子と報告されている (Oishi et al., 2005)。しかし、鶏前駆脂肪細胞の分化においては、その発現は減少しており、哺乳類とは異なることが示されていた。哺乳類においては、KLF-5 は C/EBP $\beta$ 、 $\delta$  から誘導され間接的に PPAR $\gamma$  の発現を制御するとされているが、鶏前駆脂肪細胞の分化では C/EBP $\beta$ 、 $\delta$  の分化初期の発現亢進は認められないことが示されており、鶏脂肪細胞において KLF-5 は、哺乳類のような PPAR $\gamma$  の発現誘導経路とは異なることが推察された。KLF-15 については、鶏脂肪細胞の分化進行に伴い発現が増強していることが示された。哺乳類においては、KLF-15 は C/EBP $\alpha$  との協調的な作用で PPAR $\gamma$  の誘導に関与すると報告があるが (Mori et al., 2005)、鶏脂肪細胞においては、C/EBP $\alpha$  の発現は PPAR $\gamma$  発現亢進よりも遅れて発現亢進しており、それは今回認められた KLF-15 の発現変化と類似している。ニワトリにおいても KLF-15 と C/EBP $\alpha$  の協調的な作用は存在する可能性はあるが、分化制御を担う PPAR $\gamma$  誘導に寄与する程度は小さいようである。

細胞内シグナリング因子である FGF10 は、PPAR $\gamma$  が発現亢進している分化期間で発現が減少した。哺乳類においては C/EBP $\beta$  の発現と関連して PPAR $\gamma$  の発現や adipogenesis に関与することが示されているが (Sakaue et al., 2002)、鶏脂肪細胞の初期分化において寄与は少ないことが推察された。

### 鶏脂肪細胞分化時における ZNF423, KLFs, FGF10 の発現変化



## 第二節 ZNF423, KLFs, FGF10 の鶏組織発現分布の評価

第一節において、哺乳類で脂肪細胞の分化に関連するとされる各種因子の遺伝子発現の評価を行った。これら因子に関しては、哺乳類では脂肪組織に高く発現していることが示されているが、鶏脂肪組織における報告はなく、本節ではニワトリでの主要な組織での遺伝子発現分布を評価し、その様相を確認することを行った。

### 【材料および方法】

#### (1) 供試動物の飼育

環境温度 ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ )、市販飼料(CP 23%, ME3100kcal/kg) で自由摂水、自由摂食にて飼育したブロイラー (Cobb)

#### (2) 各種鶏組織の単離

20 日齢のニワトリを放血屠殺し、腹腔内脂肪組織、脳、心臓、腎臓、肝臓、骨格筋 (浅胸筋)、小腸および脾臓を摘出した。各種臓器は凍結後、 $-80^\circ\text{C}$  で保存した。

#### (3) RNA の分離、cDNA の作成、 第二章第一節参照

#### (4) real time PCR 第五章第一節参照

#### (5) 実験群と評価項目

各群から RNA を回収し、aP2、PPAR $\gamma$ 、ZNF423、FGF10、KLF-2、KLF-5、KLF-15 の mRNA 発現を real time PCR により定量し、RPS9 発現量を用いて補正を行なった。

### 【結果】

鶏組織での adipogenesis 関連因子の遺伝子発現のプロファイリングしたところ、脂肪細胞の分化マーカーである aP2、分化制御転写因子である PPAR $\gamma$  および FGF10 の遺伝子は腹腔脂肪組織特異的に高発現していることが確認された (Fig.5-2A, B, D)。ZNF423 については、脳で高い発現が確認できた (Fig.5-2C)。

KLF-2 と KLF-5 は脾臓にて高く発現しており、脂肪組織でも発現は確認できた (Fig.5-2E, F)。KLF-15 は全体的に発現が低く、肝臓が比較的高発現であった (Fig.5-2G)。

### 【考察】

前節で評価を行った各種因子は、哺乳類においては脂肪細胞、および脂肪組織での高発現が示されているが、ニワトリにおいての組織での分布については報告がない。そこで、これら因子のニワトリでの主要組織での遺伝子発現分布を評価し、adipogenesis への関与を推定することを試みた。本章にて評価している各種の adipogenesis 関連因子の遺伝子発現は、評価を行った鶏組織すべてで発現が確認できた。ZNF423 は脳での高発現が示されており、これは Zfp423 が哺乳類において神経前駆細胞の制御に関与し、脳の発達に機能することが報告されており (Alcaraz et al., 2006)、ニワトリにおいても同様な機構を有している可能性が考えられる。KLF に関しては、腹腔内脂肪組織での特異的な高発現は示されなかったが、一定の発現を有することが確認された。興味深い点としては、FGF10 は、腹腔内脂肪組織で特異的に高発現であった。前節の結果では、鶏前駆脂肪細胞分化過程においては発現が減少しており、前駆脂肪細胞分化には一過的な発現抑制されるものの、哺乳類での報告と同様に、ニワトリにおいても FGF10 は、脂肪細胞の分化成熟にも関与し、腹腔内脂肪組織の adipogenesis に強く関連しているものと考えられた。

### 第三節 ZNF423, KLFs, FGF10 の鶏腹腔脂肪組織での経日的発現変化の評価

adipogenesis 関連因子の発現について、前節までの検討から、鶏前駆脂肪細胞の分化においてはすべての因子についての発現変動が認められており、主要組織での分布も確認できている。本節では、ニワトリの腹腔内脂肪組織の発達時の経日的な発現変化の評価を行い、ニワトリの adipogenesis におけるこれらの因子の関連を考察することを行った。

### 【材料および方法】

#### (1) 供試動物の飼育

環境温度 (25±1℃)、市販飼料(CP 23%, ME3100kcal/kg) で自由摂水、自由摂食にて飼育したブロイラー (Cobb)

#### (2) 経時的鶏腹腔脂肪組織の単離



放血屠殺した 3, 10, 20 日齢のニワトリより、腹腔内脂肪組織を摘出した。摘出サンプルは凍結後、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

(3) RNA の分離、cDNA の作成、  
第二章第一節参照

(4) real time PCR  
第五章第一節参照

(5) SDS-PAGE によるタンパク質の分離  
第五章第一節参照

[一部改変]：凍結した組織約 100mg を、Protease inhibitor を加えた T-PER (Thermo: 78510) 1mL 中にてホモジナイズし総タンパクを抽出した。

(6) タンパク質の PVDF membrane への転写  
第五章第一節参照

(7) ZNF423, KLF-5, KLF-15, FGF10 抗体によるウエスタンブロット  
第五章第一節参照

(8) 実験群と評価項目

3, 10, 20 日齢の腹腔脂肪組織から RNA を回収し、aP2、PPAR $\gamma$ 、ZNF423、FGF10、KLF-2、KLF-5、KLF-15 の発現を real time PCR により定量し、RPS9 を用いて補正を行なった。また、ウエスタンブロットにより 3, 10, 20 日齢の腹腔脂肪組織における ZNF423、FGF10、KLF-5、KLF-15 のタンパク質発現を確認した。発現タンパク質の標準化は  $\beta$ -actin の発現にて確認した。ウエスタンブロットは少なくとも 2 回の試験を実施し発現を確認した。

### 【結果】

鶏脂肪組織での経時的な発現を評価した結果、aP2、PPAR $\gamma$  の mRNA については 3 日と比べ、10, 20 日の脂肪組織にて有意に高い発現を示すことが確認された (Fig.5-3-1A, B)。ZNF423 については、mRNA の発現が 10, 20 日の脂肪組織にて有意に高い発現が示された (Fig.5-3-1C)。鶏脂肪組織において、これら因子についてのタンパク質発現もウエスタンブロットにより確認できた (Fig.5-3-2)。

## 【考察】

本節では、鶏腹腔内脂肪組織の経日的な組織サンプルにおける ZNF423、KLFs および FGF10 の mRNA およびタンパク質の発現変化を評価し、ニワトリの adipogenesis の更なる理解を得ることを試みた。aP2 および PPAR $\gamma$  は腹腔内脂肪組織の発達に伴っての発現亢進しており、3 日齢では、前駆脂肪細胞の増殖が盛んであるが、10, 20 日になるに従い、徐々に細胞の分化が盛んとなり、また細胞レベルでも成熟脂肪細胞へと分化の進展が進むと考えられる (Sato et al., 2008)。ZNF423 の遺伝子発現は、それらの変化と同調して発現の亢進が示された。本章第一節の細胞分化時の発現変化では、一過的な発現の減少が示されていたが、組織レベルでの解析においては、その減少は反映されず、むしろ分化誘導後 48h で示されていた発現の亢進が反映されていた。よって本結果から、ZNF423 は特に脂肪組織の発達に関与をしている可能性が示唆された。一方、分化で発現が減少した KLF-2 は発現変化が示されず、分化初期での発現減少があった KLF-5 は、有意ではないものの 10 日でやや発現が低い傾向であった。KLF-15 は分化進行に伴い発現亢進した因子であるが、本評価期間での腹腔脂肪組織発達過程においては有意な変動は示されていなかった。FGF10 についても、有意な変化ではないものの、遺伝子の発現は経日的に増加傾向を示しており、また組織サンプルにおいては、タンパク発現は相対的に高いようであり、本章第二節での組織分布の結果と合わせ、ニワトリの adipogenesis に深く関与していることが推察されたが、PPAR $\gamma$  の発現を直接制御している因子ではないものと推測された。本章での検討により、哺乳類での PPAR $\gamma$  の発現に関わり、adipogenesis に関与するとされる因子の発現プロファイリングを実施し、ニワトリにおける adipogenesis においてのこれら因子の寄与を示すことができた。しかしながら、鶏脂肪細胞の分化制御因子である PPAR $\gamma$  の発現亢進と協調的な発現変化を示す因子は見出すには至らなかった。

## 第六章

### 外因性の脂肪酸誘導性鶏脂肪細胞分化誘導機構 の解明

前章までの検討からは、PPAR $\gamma$  が鶏前駆脂肪細胞の分化とともに、脂肪組織の発達過程においても発現亢進しており、細胞分化制御ならびに組織発達の制御に繋がる因子であることが明白となっている。しかしながら、これまでに評価した各種転写因子群の発現パターンからはPPAR $\gamma$ の発現の上流に位置すると考えられる因子が見いだされていない。

本章では、分子生物学的手法を用いて、脂肪酸による鶏脂肪細胞分化の誘導を明らかにするため、そして脂肪酸による分化シグナルの機構を明らかにするために、まず、脂肪酸による脂肪細胞の分化誘導が、PPAR $\gamma$  および脂肪細胞分化マーカーaP2 遺伝子の転写レベルにおける発現亢進によるものなのか、脂肪酸による発現後 mRNA 分解抑制機構によるものなのかを検証するため核 run-on assay を行い、制御様式を同定することを試みた。次に、上記試験から、外因性の脂肪酸による PPAR $\gamma$  の mRNA 合成の亢進が鶏脂肪細胞の分化機構の中心を担っていることが推定されたため、この鶏特異的分化機構がどのような転写因子により制御されているのかを推測するために、鶏脂肪細胞を用いて PPAR $\gamma$  遺伝子のプロモーターアッセイを行った。

### 【材料および方法】

核 run-on assay による脂肪酸誘導性分化機構の検討

#### (1) 鶏初代前駆脂肪細胞の調製

第二章 第一節参照

#### (2) 鶏前駆脂肪細胞の濃縮

第二章 第一節参照

#### (3) 細胞培養

第二章 第一節参照

#### (4) 細胞数の測定

第二章 第一節参照

#### (5) 細胞の回収

トリプシンで細胞を回収し、PBS で 3 回 wash した。

#### (6)細胞の溶解と核の抽出

細胞を遠心して得たペレットに NP40 lysis 緩衝液 (10mM Tris-HCl,pH7.4,

10mM NaCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% NP40) を 500μl 入れ、ペッスルで細胞を破壊し、遠心した後に上清(浮遊物)を除去し、沈殿ペレットより核を得た。もう一度 NP40 buffer で wash した。

#### (7) 核 run-on assay

100μl の buffer (50mM Tris-HCl pH8.0, 5.0mM MgCl<sub>2</sub>, 40% glycerol, 0.1mM EDTA) で再懸濁し、さらに 100μl の reaction buffer (10mM Tris-HCl pH8.0, 5.0mM MgCl<sub>2</sub>, 300mM KCl, 5.0mM dithiothreitol, 2.5mM dNTP mix) を加え 30°C で 30 分間振盪培養した。

#### (8) mRNA 測定法

RNA の分離(AGPC 法)、cDNA の作成、Real time PCR  
第二章 第一節参照

#### (9) 実験群と評価項目

第二章 第一節、同様に鶏前駆脂肪細胞を調整し、control 区、脂肪酸区を設定した。培地を交換した後 6 時間後に細胞を回収し、核を抽出し mRNA 合成させた。mRNA を cDNA に逆転写した後、real time PCR によりその量を定量した。

### Promoter assay による PPAR $\gamma$ 遺伝子の発現調節機構の解明

#### (1) コンストラクトの作製： PPAR $\gamma$ プロモーター領域のクローニング

- ① 鶏ゲノムデータベースより PPAR $\gamma$  プロモーターを 2000bp 程度検索した。
- ② Ding らの報告にあるプライマーおよび適切なプライマー配列を作製した。
- ③ 鶏肝細胞よりゲノム DNA を抽出した(Wizard® Genomic DNA Purification Kit を使用)を template (約 100ng) にして、PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (Takara Bio Inc. ; R045A) を用いた。
- ④ 以下の条件とプライマーペアで PCR を行った。

#### プライマーセット 1

Product size : 2204bp

sense : 5' - gcggtaccCCATCTTAGGCAACATAA -3'  
anti-sense : 5' - gcgagctcACTTTGGCAATCCTGGAGC -3'  
条件 : 98°C 10sec

55°C	15sec	
72°C	10sec	×35
4°C	stock	

プライマーセット 2

Product size : 880bp

sense :	5' - gcggtaccGACCACCTTAAGATTTCA -3'
anti-sense :	5' - gcgagctcACTTTGGCAATCCTGGAGC -3'
条件 :	98°C 10sec
	55°C 15sec
	72°C 10sec ×35
	4°C stock

プライマーセット 2

Product size : 547bp

sense :	5' - gcggtaccAAGGGTAGCCTGAGCACT -3'
anti-sense :	5' - gcgagctcACTTTGGCAATCCTGGAGC -3'
条件 :	98°C 10sec
	55°C 15sec
	72°C 10sec ×35
	4°C stock

\*それぞれのプライマーは Kpn I (ggtacc)、Sac I(gagctc)の制限酵素認識タグをつけた。

- ⑤ PCR 産物は、illustra GFX PCR Purification Kit (GE ヘルスケア; 28-9034-70) により余分なプライマーを除去したのち、制限酵素処理 (Kpn I Takara Bio Inc.; 1068A, Sac I Takara Bio Inc.; 1078A) 37°Cで 60min を行った。同様に、pGL4.1 ベクターも制限酵素処理した。
- ⑥ 1% Sea Kem® GTG Agarose (Lonza; 50071) にて電気泳動し、PCR クローニング産物および pGL4.1 ベクターを QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて単離、精製した。
- ⑦ pGL4.1 ベクターは Alkaline Phosphatase (Takara Bio Inc.; 2250A) にて脱リン酸化処理した。
- ⑧ PCR により作成したプロモーター領域のインサートと、pGL4.1 ベクターを DNA Ligation kit (Takara Bio Inc.; 1068A)を用いてライゲーションした。

## (2) プラスミドの調製

- ① トランスフォーメーションは、作成したコンストラクト 10 $\mu$ l を大腸菌コンピテントセル DH5 $\alpha$  (Takara Bio Inc.; 9057) 100 $\mu$ l と氷上にて混合し、30min 放置後、42 $^{\circ}$ Cにて 45sec ~ 1min 加温後、氷上にて 1~2min 急冷した。
- ② 37 $^{\circ}$ Cに加温した SOC 培地を 1ml 加え、1 時間程度前培養した。
- ③ 抗生物質 (アンピシリン Sigma; A5354)を加えた LP plate に適当量のコンピテントセルを播種し、37 $^{\circ}$ Cにて一晩培養した。
- ④ プレート上で発育したシングルコロニーをピックアップし、下記プライマーと Sapphire Amp Fast PCR Master Mix (Takara Bio Inc.; RR350A)を用いた PCR によるインサートチェックした。

Sence: 5' -TAGCAAATAGGCTGTCCCC-3'

Anti-Sence: 5' -CTTCGAGTGGGTAGAATGGC-3'

- ⑤ 目的とするインサートが組み込まれているコロニーを、抗生物質が入った LB 培地 20ml にて更に 37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。
- ⑥ 増殖した大腸菌を 1500rpm 5min 遠心してペレットを得た。大腸菌ペレットからのプラスミド回収は QIAGEN Plasmid Plus Purification kit (QIAGEN; 12943) を使用し、キットの説明書に準じて 200 $\mu$ l のプラスミドを得た。
- ⑦ 得られたプラスミドは制限酵素処理し、インサートの確認と、塩基配列の確認を行った。

## (3) 鶏前駆脂肪細胞へのリポフェクション

- ① 12 ウェルプレートにて鶏前駆脂肪細胞を培養し、50-70%程度の細胞密度まで培養する。トランスフェクション前日に、抗生物質なしの培地に置換した。
- ② Lipofectamine 2000 (Invitrogen; 11668) によるリポフェクションを行った。各ウェルに対して、1 $\mu$ g プラスミド DNA、0.01 $\mu$ g pGL4.74 と plus reagent 0.1 $\mu$ l を 100 $\mu$ l の Opti-MEM 培地にて混合した。
- ③ Lipofectamine 4 $\mu$ l と Opti-MEM 培地 100 $\mu$ l を混合し、室温にて 5min 静置した。
- ④ プラスミドと、Liofectamine を混合し、室温にて 20min 静置した。
- ⑤ 培養細胞に各ウェル 200 $\mu$ l 加え 4~6 時間培養を行い細胞へプラスミドのリポフェクションを行った。
- ⑥ 培地を通常の増殖培地に戻し、一晩培養後、脂肪酸添加培地による分化刺激を実施した。

#### (4) プロモーターデュアルルシフェラーゼアッセイ

Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega; E1910) を用いて実施した。

- ① リポフェクション後の細胞を、脂肪酸添加分化培地にて刺激後、Passive Lysis buffer (Kit 内容物) を蒸留水にて希釈調製し、培養細胞を PBS にて洗浄後、細胞の回収を行った。
- ② 96 ウェルのルミノメーター用プレートに 20 $\mu$ l の細胞溶解液を加えた。
- ③ Luciferase Assay Buffer II (Kit 内容物) を各 100 $\mu$ l 加え、Firefly Luciferase を測定した。
- ④ データがでたら、速やかにルミノメーターから 96 ウェルを取り出し、100 $\mu$ l の Stop Glo reagent (Kit 内容物) を加え、Renilla Luciferase を測定した。

### 【結果】

核 run-on assay による脂肪酸誘導性分化機構の検討

核 run-on assay による解析では、control 区と脂肪酸区を比較すると aP2 mRNA 発現においては、10 倍程度の発現上昇がみられた。同様に PPAR $\gamma$  mRNA 発現においては、control 区では検出できず、脂肪酸区とは比較できないものの、その発現は脂肪酸添加区で亢進していた。一方、18S rRNA 発現量は脂肪酸添加と control 区で有意な差は見られなかった(Fig.6-1)。また核培養前の mixture から分離した RNA (Time 0, Negative control) を解析したものの、RNA の存在はほとんど確認できず、実験系としては問題ないことを確認している。

Promoter assay による PPAR $\gamma$  遺伝子の発現調節機構の解明

鶏 PPAR $\gamma$  上流プロモーター領域約 320, 660, 2000bp クローニングし、pGL4.1 ベクターに組み込んだコンストラクトを作成した。作成したコンストラクトは鶏前駆脂肪細胞にトランスフェクションし、脂肪酸添加分化培地にて分化刺激によるルシフェラーゼ活性の評価を行った。転写開始点を約 200bp 下流まで入れた場合に、変化が大きくなることを確認しており (data not shown)、上流領域では約 660bp までは顕著な亢進は認められなかったが、上流約 2000bp の領域にてルシフェラーゼ活性の顕著な亢進が認められた(Fig.6-2-1)。しかし、刺激対照としていた増殖培地との差は示されていなかったため、再度刺激後の回収時間をより短期の回収で検討したところ、培地置換後の 0.5h において脂肪酸添加区での亢進傾向が認められており、置換後 1.5h においては差が認められなくなっていた(Fig.6-2-2)。



## 【考察】

マウス 3T3-F442A 細胞を用いた脂肪酸と脂肪細胞分化に関する研究で、脂肪細胞に脂肪酸を添加したときは、aP2 mRNA 発現は亢進せず、前駆脂肪細胞に脂肪酸を添加したときに、aP2 mRNA 発現が亢進する。またこの発現上昇は核 run-on assay により脂肪酸の刺激による mRNA 合成量の増加ではなく、脂肪酸により aP2 mRNA の分解量が低減することによるものであることが報告されている (Distel et al., 1992)。すなわち、これまでの鶏脂肪細胞における研究で認められた脂肪酸含有 IMD 培地における aP2 mRNA 発現亢進が、脂肪酸を添加したことによる mRNA 分解抑制により制御されている可能性も考えられた。そこで、PPAR $\gamma$  および aP2 mRNA 合成を核 run-on assay で確認した。その結果、aP2 は脂肪酸により control 区と比較すると顕著な mRNA の合成量が増加していた。同様に PPAR $\gamma$  においても脂肪酸により mRNA の合成量が増加していることが示された。この結果は、Distel らの結果 (Distel et al., 1992) とは異なるものであった。しかしながら、哺乳類の脂肪細胞(マウス)においては脂肪細胞内における脂肪酸合成能が鶏脂肪細胞における脂肪酸合成能よりも高いことなどニワトリの脂肪細胞の特異性などから、この結果は、鶏脂肪細胞において、転写レベルで aP2 および PPAR $\gamma$  の活性化が亢進している可能性があるというデータを裏付けるものであると考えられる。

上記の検討結果から、外因性の脂肪酸を要求する鶏脂肪細胞の分化機構の詳細を明らかにするためには、これまで哺乳類では報告されていない新たなシグナル経路、すなわち脂肪酸の刺激により細胞内の PPAR $\gamma$  mRNA 発現を増加させる経路が存在することが強く示唆された。

そこで次に、直接的に鶏 PPAR $\gamma$  のプロモーター領域の解析を試みた。近年、Ding らによってニワトリの fibroblast の cell line である DF-1 細胞を用いた、鶏 PPAR $\gamma$  上流のプロモーター解析により、同プロモーター領域に C/EBP $\alpha$  の結合領域があることが報告された (Ding et al., 2011)。同研究では我々が作成している鶏前駆脂肪細胞における脂肪酸要求性の分化系での検討ではないため、今回同プロモーター領域を参考としたコンストラクトを作成し検討を行った。プロモーター領域を段階的に広げていったところ、転写開始点より上流約 660-2000bp において、脂肪酸での刺激に応答し、ルシフェラーゼ活性の亢進する配列が存在する可能性を見出した。Ding らの報告によれば、同領域には、C/EBP $\alpha$  を含め、GATA-3、GATA-2、SP-1、AP-1、Oct-1 の推定結合配列が含まれると考えられている。鶏脂肪細胞における脂肪酸感受性の PPAR $\gamma$  の発現誘導の詳細なメカニズムの解明には、これら領域における変異配列などの作成などによる詳細な検討が更に必要である。本研究では鶏 PPAR $\gamma$  プロモーターにこれまで報告されていない、脂肪酸刺激に応答して転写調節される、脂肪酸応

答性領域が存在することを証明し、これが鶏脂肪細胞で特異的な脂肪酸誘導性分化機構を担っていることを実証することができた。これは新たな家禽特異的な遺伝子発現調節機構を提示し、家禽における脂質代謝の新規な制御技術へと発展していく可能性を明示したものである。

## 第七章

### 総合考察

哺乳類において、脂肪組織は、その過剰な発達による肥満と、糖尿病や高脂血症、動脈硬化などいわゆる生活習慣病とが密接に関連していることから、脂肪の蓄積を細胞レベルで制御する研究が進んでいる。脂肪組織の発達過程は前駆脂肪細胞の増殖、脂肪細胞への分化、脂肪細胞の成熟の3つの過程から成り、マウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞を中心として脂肪細胞の分化に対する研究が進められ、その全貌が明らかにされつつある。脂肪細胞は前駆脂肪細胞から分化することにより増殖が停止し、細胞への脂肪蓄積を開始するが、その分化制御には様々なホルモンや栄養素により、正または負の調節を受けている。このような、細胞の分化を制御している本体は核内転写因子であり、それらにより脂肪細胞として機能するための **adipogenic gene** の誘導が行なわれることが知られている (Morrison et al., 2000)。

様々な転写因子のうち、脂肪細胞の分化の中心的な制御を担っているものは **PPAR $\gamma$**  と **C/EBP $\alpha$**  とされており、これらは分化初期に他の転写因子により直接的に誘導される。それらによる分化制御より前には、**C/EBP** ファミリーである **C/EBP $\beta$**  と **C/EBP $\delta$**  が前駆脂肪細胞の段階で発現しており、グルココルチコイドなどのホルモンに反応して転写を開始する (Hamm et al., 2001)。 **C/EBP $\beta$**  はサイトカインである **FGF10** のシグナルもその誘導に関与している (Sakaue et al., 2002)。 **PPAR $\gamma$**  の発現を負に制御している **KLF-2** は、その発現が分化刺激により抑制されることにより **PPAR $\gamma$**  の発現が誘導される (Banerjee et al., 2003)。また、 **C/EBP $\beta$**  と **C/EBP $\delta$**  から誘導される **KLF-5** もまた、 **PPAR $\gamma$**  の発現に寄与している。 **C/EBPs** の発現が亢進してくると、 **C/EBP** の結合配列を **C/EBP $\alpha$**  自身も有しているため、 **C/EBP $\alpha$**  は **C/EBP $\beta$** 、 **C/EBP $\delta$**  から階層的に転写誘導される (Yeh et al., 1995)。このような経路以外にも **PPAR $\gamma$**  は **SREBP-1** による調節を受けている (Fajas et al., 1999)。 **SREBP-1** は **insulin** に反応して転写を誘導する (Le Lay et al., 2002)。また、 **Zfp423** も **PPAR $\gamma$**  の上流にて直接 **PPAR $\gamma$**  を誘導し分化の決定因子として報告されている (Gupta et al., 2010)。 **KLF-15** については、 **C/EBP $\alpha$**  と同様に、 **PPAR $\gamma$**  と同調的に **PPAR $\gamma$**  の発現を増強し脂肪細胞の分化を成熟させると考えられている (Mori et al., 2005)。

このように脂肪細胞の分化は生体内で複雑に制御されているが、哺乳類においては脂肪細胞の分化制御因子としてのホルモンや栄養素の機能が、遺伝子のレベルで詳細にわたって研究されており、肥満予防、しいては糖尿病治療などへ役立てられている。

現在、家禽産業においても、ニワトリの過剰な脂肪蓄積は脂肪肝などを引き起こし、また食肉生産においてはその過剰な蓄積脂肪のほとんどは破棄されるため、飼料エネルギーの節約や生産効率を考えるうえで非常に重要な問題と

なっている。そのため、鶏脂肪過剰蓄積を制御するための研究は様々な側面からなされている。過去の研究では、栄養操作により肝臓からの脂質合成の調節や、脂肪組織における脂質取り込みを調節するといった観点での研究が進められてきた。ニワトリの脂肪組織の発達は4週齢時までの脂肪細胞数の急増に依存することが明らかとなっている (Hood, 1982)。鶏脂肪細胞において、前駆脂肪細胞の増殖を抑制、すなわち分化を誘導させることができたならば、脂肪の過剰蓄積を抑制することが可能であると考えられる (Sato et al., 2008)。しかし、鶏脂肪細胞の分化に関する知見は少なく、また遺伝子レベルでの解明はなされていないため、鶏脂肪細胞分化における制御機構は未だ不明である。そこで本研究では、鶏脂肪組織の発達における脂肪細胞の分化過程を *in vitro* 細胞培養系を用いて分子生物学的に解析するため、まず鶏前駆脂肪細胞の分化誘導系の確立を行い、栄養操作による脂肪蓄積の制御の可能性を考察し、そのターゲットとしての因子はなにであるかの検討を行った。

鶏前駆脂肪細胞分化誘導においては、マウス 3T3-L1 前駆脂肪細胞を分化させる各種のホルモンのみでは長期間(7日)の培養においても脂肪蓄積は認められず、同様に分化マーカーとして用いられる aP2 や分化制御転写因子である PPAR $\gamma$  と C/EBP $\alpha$  の mRNA 発現の亢進も認められなかった。ニワトリにおいては脂肪組織での脂肪酸合成能が低く、脂肪組織へは肝臓で合成される外因性の脂肪酸が供給されていることから (Griffin and Hermier, 1988)、これらホルモンにさらに脂肪酸を添加してみた結果、鶏前駆脂肪細胞において多量の脂肪蓄積が認められ、aP2 mRNA 発現の亢進が認められた。同時に分化制御転写因子である PPAR $\gamma$  および C/EBP $\alpha$  の発現の亢進も認められ、脂肪細胞へと分化が誘導できたと考えられた。本結果は、鶏脂肪細胞が 3T3-L1 細胞と同様の分化誘導では分化しないとの従来報告 (Ramsay et al. 2003) と一致し、同結果を遺伝子発現の面から支持するとともに、多量の脂肪滴を保有した鶏脂肪細胞に分化させることができた初めての結果である。本研究により、一般的な培地組成である牛血清と各種のホルモンを使用した鶏前駆脂肪細胞での分化誘導培養実験系が初めて確立された。また、それは外因性の脂肪酸により誘導される鶏特異的な分化機構であることが示めされた。

同培養系を用いて、次に鶏前駆脂肪細胞における分化関連遺伝子とニワトリでの代謝特徴との関連を考察するための因子の発現変動を観察することにより、鶏脂肪細胞分化の特徴を検討することを試みた。まず脂肪細胞の分化において中心的な役割を担う転写因子とされている PPAR $\gamma$  および C/EBP $\alpha$  の発現については、PPAR $\gamma$  は分化誘導後速やかに発現亢進が認められた。一方、C/EBP $\alpha$  は分化誘導後に緩やかな発現亢進が示された。3T3-L1 細胞における分化では、PPAR $\gamma$  と C/EBP $\alpha$  はほぼ同時に発現が亢進し、お互いが相互作用することによ

り発現を高めることが知られているが (Spiegelman et al., 1996, Ranganathan et al., 1998)、鶏脂肪細胞では PPAR $\gamma$  と C/EBP $\alpha$  の遺伝子発現は相補的・協調的ではなかった。また、哺乳類では、分化刺激により分化初期に C/EBP $\beta$  と C/EBP $\delta$  や、SREBP-1 がホルモンにより活性化されることに脂肪酸や各種のリガンドが分化初期に合成が誘導され分化が進展することが知られるが、ニワトリにおいては C/EBP $\beta$  と C/EBP $\delta$  はともに鶏脂肪細胞で発現していたが、哺乳類とは異なり、分化初期での発現亢進は示されていなかった。SREBP-1 と FAS については、鶏脂肪組織において、SREBP-1 の発現は低く、それにより誘導される FAS の発現と活性が低いことが知られている (Gondret et al., 2001)。しかし本研究からは、鶏前駆脂肪細胞分化時においては SREBP-1 および FAS の発現が、その発現は低いものの、亢進していることが示された。この FAS によって合成される脂肪酸は、分化時の刺激としてではなく、分化の維持や、細胞への脂肪蓄積などに用いられるものと予想される。同様に糖の取り込みに機能する GLUT1 と GLUT8 の発現も分化進行に伴い誘導されていた。これらは脂肪細胞におけるエネルギー基質や、脂肪酸合成の基質の供給を可能するための機能変化を反映していると考えられる。

鶏脂肪細胞で特徴的な変化として、LPL の発現が分化初期からの減少が示された。3T3-L1 細胞では分化初期に発現亢進が認められ、初期分化マーカーとしても利用されているが、ニワトリにおける分化時の LPL の低発現は、外因性の脂肪酸刺激に反応する鶏脂肪細胞の分化、および脂肪蓄積を制御するうえでの重要なファクターである可能性が推察される。

哺乳類において脂肪細胞分化に関連する主要な転写因子群の発現パターンや、代謝に関連する因子の発現について、以上のような特徴が、外因性の脂肪酸誘導性の鶏前駆脂肪細胞の分化において確認された。それらはやはりニワトリにおける代謝特徴と、それに関わる分化制御機構の違いを反映していると考えられた。

本研究では、このような鶏前駆脂肪細胞における分化初期の、外因性の脂肪酸を感受し、PPAR $\gamma$  の発現誘導から分化が開始していく鶏特異的な脂肪細胞の分化制御機構を解明するため、更に鶏前駆脂肪細胞の PPAR $\gamma$  の発現誘導経路を解明することを試みた。

まず鶏前駆脂肪細胞の分化に必須である脂肪酸機能を考えた場合、脂肪細胞においては、脂肪酸は蓄積脂肪の基質としての側面も当然であるが、aP2 などによる細胞内脂肪酸輸送タンパク質により、核へ運ばれ、核内転写因子のリガンドとして制御する役割も担っている。実際、鶏脂肪細胞の分化制御因子として推察される、PPAR $\gamma$  はリガンド要求性の転写因子であり、脂肪酸自体には、

PPARのリガンドとしての機能があることが報告 (Krey et al., 1997) されている。

鶏脂肪細胞の分化制御における脂肪酸のリガンドとしての機能を検討するため、PPAR $\gamma$  特異的な合成アゴニスト (Troglitazone)を添加することによる分化様相を観察したところ、脂肪酸無添加に Troglitazone を単独で添加し、PPAR $\gamma$  を活性化しても PPAR $\gamma$  mRNA は誘導されなかった。脂肪酸と Troglitazone を同時に添加した場合、aP2 の発現増強とともに、PPAR $\gamma$  発現自体も増強していた。以上のことから、脂肪酸による分化誘導における PPAR $\gamma$  発現誘導には、PPAR $\gamma$  の活性化とともに、脂肪酸による直接的な PPAR $\gamma$  の発現誘導経路が存在することが推察された。

また鶏脂肪細胞において、PPAR $\gamma$  の発現亢進による PPAR $\gamma$  量の増大が分化誘導の決定因子であることが、PPAR $\gamma$  の過剰発現の検討で強く支持された。その実験においても、PPAR $\gamma$  の過剰発現時に脂肪酸を添加するとさらに分化が増強しており、鶏脂肪細胞の分化誘導において、細胞内 PPAR $\gamma$  の量と、その活性化の両面が必須であることを示している。

そこで、哺乳類で PPAR $\gamma$  の誘導と adipogenesis に関与が報告される各種の因子を PPAR $\gamma$  の発現パターンとの比較から PPAR $\gamma$  誘導因子の探索を試みた。

哺乳類では分化の負の制御因子とされる KLF-2 (Banerjee et al., 2003)は、鶏脂肪細胞でも、その発現が減少しており、分化開始のトリガーとなっていることが推察されたが、脂肪酸による PPAR $\gamma$  の活性化と発現亢進に協調的に働いている因子ではないと考えられる。KLF-5 もまた C/EBP $\beta$  と C/EBP $\delta$  により誘導され PPAR $\gamma$  の誘導に寄与するとされるが (Oishi et al., 2005)、鶏脂肪細胞の分化においては、C/EBP $\beta$  と C/EBP $\delta$  の発現は分化初期では誘導されておらず、KLF-5 の鶏脂肪細胞での発現は分化刺激により一過的に発現が抑制されていた。ただし、分化後期の C/EBP $\beta$  と C/EBP $\delta$  が亢進している時期には発現が回復してきており、ニワトリにおいてもこれら因子による発現誘導の可能性は推察された。哺乳類での脂肪細胞分化の決定因子ともされる ZNF423 (Gupta et al., 2010)に関しては、鶏脂肪細胞の脂肪酸誘導の分化においては発現が減少していた。ただし同因子は分化後期では発現が亢進してきており、且つ鶏脂肪組織においても、経時的な発現亢進が認められたことから、脂肪細胞、組織の成熟に関わる重要な因子であることが考えられる。KLF-15 は哺乳類では C/EBP $\alpha$  のように PPAR $\gamma$  との協調的な発現誘導作用が報告されているが (Mori et al., 2005)、ニワトリにおいても C/EBP $\alpha$  の発現と類似して、分化初期からの発現亢進は認められず、分化進行に伴った PPAR $\gamma$  発現後での発現亢進であった。また、直接的な転写因子ではないが、細胞内の重要なシグナリング因子である FGF10

は C/EBP $\beta$  の発現を制御し脂肪細胞の分化と組織発達に関与が報告されている (Sakaue et al., 2002)。鶏脂肪細胞において FGF10 は分化初期から発現が減少し、分化後期で発現が回復するパターンを示していた。

以上のように、これまで哺乳類や樹立細胞で明らかにされている PPAR $\gamma$  発現誘導に寄与する因子に関して、鶏脂肪細胞における脂肪酸誘導性の分化過程で探索したが、PPAR $\gamma$  と協調的に発現している因子を見出されなかった。

一方で、哺乳類前駆脂肪細胞株である 3T3-F442A を用いた研究において、本培養系で刺激に用いている長鎖脂肪酸である (oleate) により濃度依存的に aP2 mRNA 発現量が亢進する報告がある。ただし、この mRNA 発現量の亢進は核 run-on assay を用いた研究により、脂肪酸による mRNA の分解抑制機構であることが明らかにされている (Distel et al., 1992)。

ニワトリにおいては細胞内の脂肪酸合成能が低く、外因性の脂肪酸を添加することで成熟した脂肪細胞に分化するという特異性と、脂肪酸添加による分化誘導では PPAR $\gamma$  mRNA 発現の亢進が、先に起こりそれに続いて aP2 mRNA の亢進が認められるとの結果を考えると、鶏脂肪細胞分化においては脂肪酸により mRNA の合成量が変化している可能性が考えられた。そこで、核 run-on assay を行った結果、やはり脂肪酸は、PPAR $\gamma$  と aP2 の mRNA 合成量を増加させる作用を持つことが明らかとなった。本結果から、鶏脂肪細胞の分化の key regulator である PPAR $\gamma$  の遺伝子発現は、脂肪酸に起因するなんらかのシグナルによって、転写レベルで亢進することが明らかとなった。前述のように、この応答は PPAR $\gamma$  アゴニストである Troglitazone による PPAR $\gamma$  の活性化のみでは認められない反応であり、脂肪酸による PPAR $\gamma$  の遺伝子発現自体を制御する栄養素とそれに関わる経路の存在を初めて示唆した結果であるといえる。

しかし、脂肪酸という栄養素による PPAR $\gamma$  の遺伝子発現を誘導する因子は、これまでの検討では見いだすことができなかった。そこで、PPAR $\gamma$  遺伝子発現を亢進する経路の探索に、より直接的なアプローチとして、PPAR $\gamma$  自体のプロモーターアッセイにて、脂肪酸による転写活性の亢進から、誘導因子の推定を目指すことも試みた。ごく最近に鶏 PPAR $\gamma$  のプロモーター解析が報告され (Ding et al., 2011)、C/EBP $\alpha$  の結合配列があることが確認されたが、鶏前駆脂肪細胞を用いての脂肪酸に応答した配列検討はなされていない。そこで、同報告を参考として、鶏 PPAR $\gamma$  上流プロモーター領域の約 2kb までをクローニングし、鶏前駆脂肪細胞にトランスフェクションしたところ、約 600-2000bp の領域にて脂肪酸に応答する可能性が示唆された。

データベースからの探索では、同配列においては、Ding らの報告 (Ding et al.,



2011) のよう、C/EPB $\alpha$ を含め、GATA-3、GATA-2、SP-1、AP-1、Oct-1の推定結合配列が含まれることが示されている。またそのほかにも転写因子としてPbx-1、MEF-2、RSRFC4、v-Myb、ROR $\alpha$ lpなどの推定結合配列も検索により推定される。これらの転写因子を含め、鶏脂肪細胞に特徴的な脂肪酸誘導性の分化機構の解明にむけて同プロモーター領域における脂肪酸応答領域を、ゲルシフトアッセイ、変異配列の作成といった手法により絞り込むことにより、脂肪酸により誘導されている脂肪細胞分化のトリガーのターゲットが明確とすることが可能となり、将来の脂質制御法へとつながるものである。

以上のように、本研究により鶏脂肪細胞を分化誘導する系を確立するとともに、鶏脂肪細胞におけるその分化や、adipogenesisの特異性の一端を明らかにすることができた。さらに、本研究では、脂肪酸によりPPAR $\gamma$ の遺伝子発現が誘導することによる特異的な分化機構を鶏が持っていることを証明した。また、本研究からは脂肪酸を中心とした、鶏PPAR $\gamma$ への機能とその発現を誘導している因子の探索により、多くの鶏脂肪細胞・組織における特徴を明らかにすることができた。

将来的には、分子生物学的手法を用いての遺伝子発現制御などにより、更に個々の因子の機能を評価や、プロモーター領域の解析を進めることにより脂肪酸応答領域の探索から、ニワトリにおける代謝特異性を含めた経路が解明できるものと考えられる。それら研究を進めることにより、より安全かつ簡便で有効な、栄養によるニワトリの過剰脂肪蓄積の制御へ応用することが可能となり、食肉生産の課題への有効な解決策のひとつとなることが期待される。

## 参考文献

Alcaraz WA, Gold DA, Raponi E, Gent PM, Concepcion D, Hamilton BA. (2006) Zfp423 controls proliferation and differentiation of neural precursors in cerebellar vermis formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103:19424-19429.

Banerjee SS, Feinberg MW, Watanabe M, Gray S, Haspel RL, Denkinger DJ, Kawahara R, Hauner H, Jain MK. (2003) The Krüppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 278:2581-2584.

Bensadoun A, Marita RA. (1986) Dibutylryl cyclic AMP decreases the rate of lipoprotein lipase synthesis in cultured adipocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 879:253-263.

Bionaz M, Loor JJ. (2007) Identification of reference genes for quantitative real-time PCR in the bovine mammary gland during the lactation cycle. *Physiol. Genomics.* 29:312-319.

Bujo H, Lindstedt KA, Hermann M, Dalmau LM, Nimpf J, Schneider WJ. (1995) Chicken oocytes and somatic cells express different splice variants of a multifunctional receptor. *J. Biol. Chem.* 270:23546-23551.

Camp HS, Li O, Wise SC, Hong YH, Frankowski CL, Shen X, Vanbogelen R, Leff T. (2000) Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by troglitazone and rosiglitazone. *Diabetes* 49:539-547.

Carayannopoulos MO, Chi MM, Cui Y, Pingsterhaus JM, McKnight RA, Mueckler M, Devaskar SU, Moley KH. (2000) GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:7313-7318.

Ding N, Gao Y, Wang N, Li H. (2011) Functional analysis of the chicken PPAR $\gamma$  gene 5'-flanking region and C/EBP $\alpha$ -mediated gene regulation. *Comp. Biochem. Physiol., Part B.* 158:297-303.

Distel RJ, Robinson GS, Spiegelman BM. (1992) Fatty acid regulation of

gene expression. Transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J. Biol. Chem.* 267:5937-5941.

Elks ML, Manganiello VC. (1985) A role for soluble cAMP phosphodiesterases in differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J. Cell Physiol.* 124:191-198.

Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, Fruchart JC, Briggs M, Spiegelman BM, Auwerx J. (1999) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol. Cell Biol.* 19:5495-5503.

Garcés C, Ruiz-Hidalgo MJ, Font de Mora J, Park C, Miele L, Goldstein J, Bonvini E, Porrás A, Laborda J. (1997) Notch-1 controls the expression of fatty acid-activated transcription factors and is required for adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 272:29729-29734.

Goldstein JT, Dobrzyn A, Clagett-Dame M, Pike JW, DeLuca HF. (2003) Isolation and characterization of unsaturated fatty acids as natural ligands for the retinoid-X receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* 420:185-193.

Gondret F, Ferré P, Dugail I. (2001) ADD-1/SREBP-1 is a major determinant of tissue differential lipogenic capacity in mammalian and avian species. *J. Lipid Res.* 42:106-113.

Gray S, Feinberg MW, Hull S, Kuo CT, Watanabe M, Sen-Banerjee S, DePina A, Haspel R, Jain MK. (2002) The Krüppel-like factor KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. *J. Biol. Chem.* 277:34322-34228.

Gregoire FM. (2001) Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp. Biol. Med.* 226:997-1002.

Griffin HD, D. Hemier, (1988) Leanness in Domestic birds pp175-201. Butterworths, London, U.K.

Guo W, Choi JK, Kirkland JL, Corkey BE, Hamilton JA. (2000) Esterification of free fatty acids in adipocytes: a comparison between octanoate and oleate. *Biochem. J.* 349:463-471.

Gupta RK, Arany Z, Seale P, Mepani RJ, Ye L, Conroe HM, Roby YA, Kulaga H, Reed RR, Spiegelman BM. (2010) Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature* 464:619-623.

Hamm JK, Park BH, Farmer SR. (2001) A role for C/EBPbeta in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 276:18464-18471.

Han J, Farmer SR, Kirkland JL, Corkey BE, Yoon R, Pirtskhalava T, Ido Y, Guo W. (2002) Octanoate attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Nutr.* 132:904-910.

Hood RL., (1982) The cellular basis for growth of the abdominal fat pad in broiler-type chickens. *Poult. Sci.* 61:117-121.

Houseknecht KL, Cole BM, Steele PJ. (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and its ligands: a review. *Domest. Anim. Endocrinol.* 22:1-23.

Kaczynski J., Cook T., Urrutia R. (2003) Sp1- and Krüppel-like transcription factors. *Genome Biol.* 206:1-8.

Kageyama H, Hirano T, Okada K, Ebara T, Kageyama A, Murakami T, Shioda S, Adachi M. (2003) Lipoprotein lipase mRNA in white adipose tissue but not in skeletal muscle is increased by pioglitazone through PPAR-gamma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305:22-27.

Kawabe Y, Suzuki T, Hayashi M, Hamakubo T, Sato R, Kodama T. (1999) The physiological role of sterol regulatory element-binding protein-2 in

cultured human cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1436:307-318.

Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM. (1998) ADD1/SREBP1 activates PPAR $\gamma$  through the production of endogenous ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:4333-4337.

Kissane JM, Robins E. (1958) The fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the central nervous system. *J. Biol. Chem.* 233:184-188.

Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W. (1997) Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol. Endocrinol.* 11:779-791.

Lee CH, Olson P, Evans RM. (2003) Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology* 144:2201-2207.

Le Lay S, Lefrère I, Trautwein C, Dugail I, Krief S. (2002) Insulin and sterol-regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1C) regulation of gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Identification of CCAAT/enhancer-binding protein beta as an SREBP-1C target. *J. Biol. Chem.* 277:35625-35634.

Mandrup S, Lane MD. (1997) Regulating adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 272: 5367-5370.

March BE, MacMillan C, Chu S. (1984) Characteristics of adipose tissue growth in broiler-type chickens to 22 weeks of age and the effects of dietary protein and lipid. *Poult. Sci.* 63:2207-2216.

Masuzaki H, Ogawa Y, Isse N, Satoh N, Okazaki T, Shigemoto M, Mori K, Tamura N, Hosoda K, Yoshimasa Y, et al. (1995) Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes.* 44:855-858.

Mori T, Sakaue H, Iguchi H, Gomi H, Okada Y, Takashima Y, Nakamura K, Nakamura T, Yamauchi T, Kubota N, Kadowaki T, Matsuki Y, Ogawa W, Hiramatsu R, Kasuga M. (2005) Role of Krüppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 280:12867-12875.

Morrison RF and Farmer SR. (2000) Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J. Nutr.* 130:3116S-3121S.

Oishi Y, Manabe I, Tobe K, Tsushima K, Shindo T, Fujiu K, Nishimura G, Maemura K, Yamauchi T, Kubota N, Suzuki R, Kitamura T, Akira S, Kadowaki T, Nagai R. (2005) Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metab.* 1:27-39.

Ramsay TG, Rosebrough RW. (2003) Hormonal regulation of postnatal chicken preadipocyte differentiation in vitro. *Comp. Biochem. Physiol. B* 136:245-253.

Ranganathan S, Kern PA. (1998) Thiazolidinediones inhibit lipoprotein lipase activity in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 273:26117-26122.

Rangwala SM and Lazar MA. (2000) Transcriptional control of adipogenesis. *Annu. Rev. Nutr.* 20:535-559.

Sakaue H, Konishi M, Ogawa W, Asaki T, Mori T, Yamasaki M, Takata M, Ueno H, Kato S, Kasuga M, Itoh N. (2002) Requirement of fibroblast growth factor 10 in development of white adipose tissue. *Genes Dev.* 16:908-912.

Sato K, Fukao K, Seki Y, Akiba Y. (2004) Expression of the chicken peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene is influenced by aging, nutrition, and agonist administration. *Poult. Sci.* 83:1342-1347.

Sato K, Matsushita K, Matsubara Y, Kamada T, Akiba Y. (2008) Adipose tissue fat accumulation is reduced by a single intraperitoneal injection of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist when given to newly hatched chicks. *Poult. Sci.* 87:2281-2286.

Sato K, Takahashi T, Takahashi Y, Shiono H, Katoh N, Akiba Y. (1999) Preparation of chylomicrons and VLDL with monoacid-rich triacylglycerol and characterization of kinetic parameters in lipoprotein lipase-mediated hydrolysis in chickens. *J. Nutr.* 129:126-131.

Sato K, Akiba Y. (2002) Lipoprotein lipase mRNA expression in abdominal adipose tissue is little modified by age and nutritional state in broiler chickens. *Poult. Sci.* 81:846-852.

Seki Y, Sato K, Kono T, Abe H, Akiba Y. (2003) Broiler chickens (Ross strain) lack insulin-responsive glucose transporter GLUT4 and have GLUT8 cDNA. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133:80-87.

Spiegelman BM, Flier JS. (1996) Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* 87:377-389.

Student AK, Hsu RY, Lane MD. (1980) Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 255:4745-4750.

Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL. (1995) Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Develop.* 9:168-181.

Yaffe D. (1968) Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61:477-483.

Yamasaki M, Emoto H, Konishi M, Mikami T, Ohuchi H, Nakao K, Itoh N. (1999) FGF-10 is a growth factor for preadipocytes in white adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258:109-112.

Wise LS, Green H. (1978) Studies of lipoprotein lipase during the adipose conversion of 3T3 cells. *Cell.* 13:233-242.

Wu YJ, Wright JT, Young CR, Cartwright AL. (2000) Inhibition of chicken



adipocyte differentiation by in vitro exposure to monoclonal antibodies against embryonic chicken adipocyte plasma membranes. *Poult. Sci.* 79: 892-900.

Wu Z, Xie Y, Morrison RF, Bucher NL, Farmer SR. (1998) PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J. Clin. Invest.* 101:22-32.

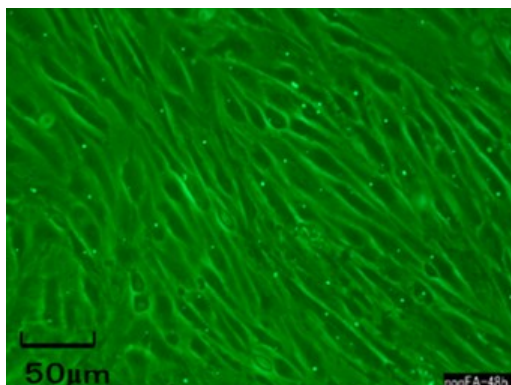
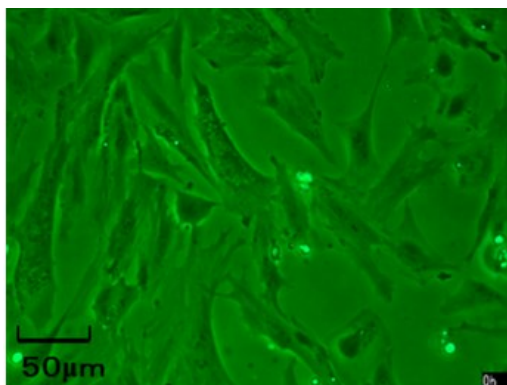
## 图表

## 第二章 鶏前駆脂肪細胞の分化誘導の検討

### 第一節 脂肪蓄積及び分化マーカーの発現を指標とした検討

A: 0h

B: Non-Fatty acid (FA) 48h



C: Fatty acid (FA) 48h

D: Growth Medium (GM) 48h

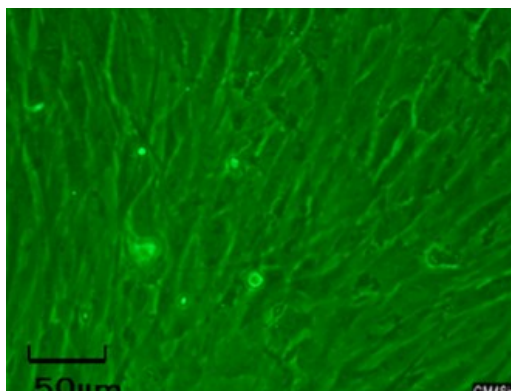
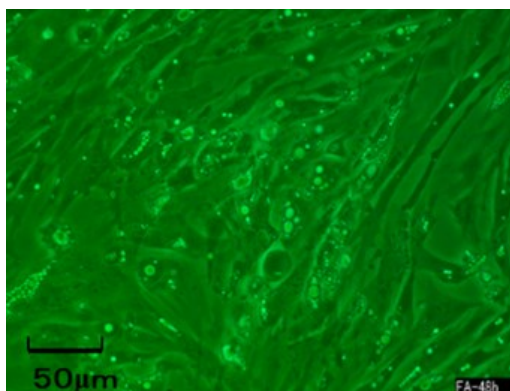


Fig.2-1-1 分化誘導培地置換後 48 時間 における鶏脂肪細胞の鏡検像

A: 分化誘導前の鶏前駆脂肪細胞 (Basic Control)

B: Non-fatty acid (non-FA) Dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine(IMX), Insulin(Ins)添加培地による分化誘導後 48 時間での細胞

C: Fatty acid (FA): DEX, IMX, Ins および脂肪酸 (300µM oleate) 添加培地による分化誘導後 48 時間での細胞 : 矢印は蓄積した脂肪滴を示す

D: Growth medium (GM) で 48 時間増殖した細胞 (Control)

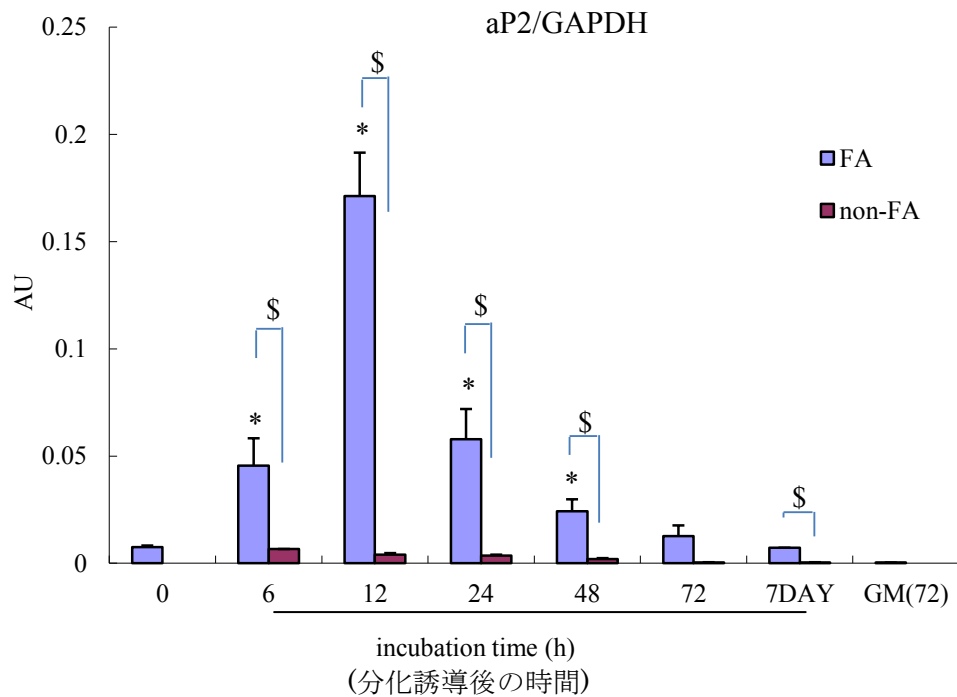


Fig. 2-1-2: 鶏前駆脂肪細胞分化時における Adipocyte-fatty acid binding protein (aP2) mRNA の経時的発現変動

Non-fatty acid (non-FA) 区 (赤棒): Dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IMX), Insulin (Ins) 添加培地

Fatty acid (FA) 区 (青棒): DEX, IMX, Ins および脂肪酸 (300 $\mu$ M oleate) を添加培地

GM(72): 増殖培地 (M199)にて培養 72 時間

各区で分化誘導した細胞における aP2 mRNA 発現量を real-time PCR により mRNA 発現量を定量し、GAPDH 発現量により値を補正した

値は n=3, means  $\pm$  S.D. で示した

\* は FA 区での 0h との比較での統計差 P<0.05 (t-test) を示す

\$ は各時間での FA 区と non-FA 区との比較での統計差 P<0.05 (t-test) を示す

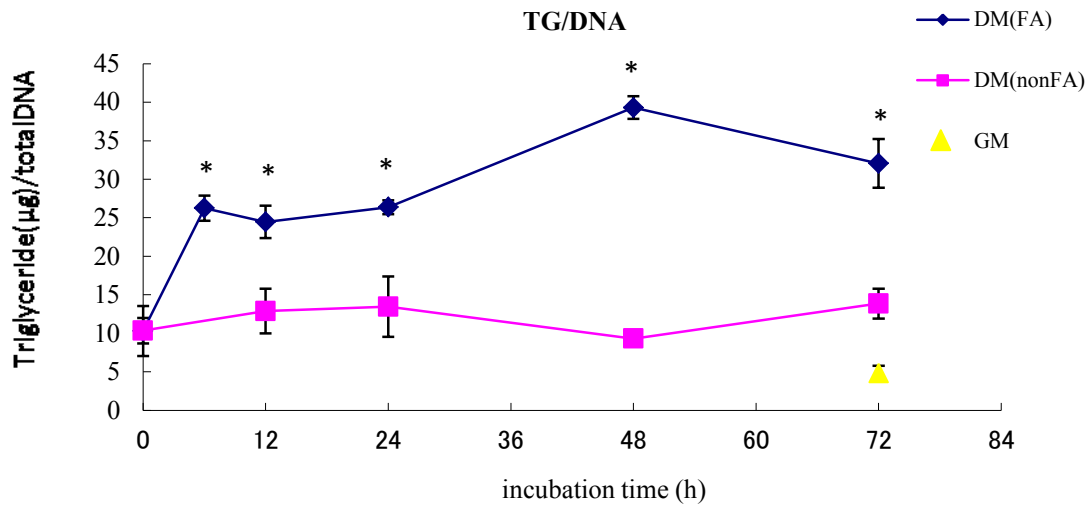


Fig.2-1-3: 細胞内 Triglycerid (TG) 存在量の経時的変動

Non-fatty acid (non-FA) 区: Dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IMX), Insulin (Ins)添加培地

Fatty acid (FA) 区: DEX, IMX, Ins および脂肪酸 (300μM oleate) 添加培地

Growth medium (GM): 増殖培地 (M199)により増殖させた細胞

各区から経時的に細胞を回収し、TG 量と DNA 量を測定し細胞あたりの TG 蓄積量を算出した

値は n=3, means±S.D.で示した

\* :0h との比較での統計差 P<0.05 (t-test) を示す

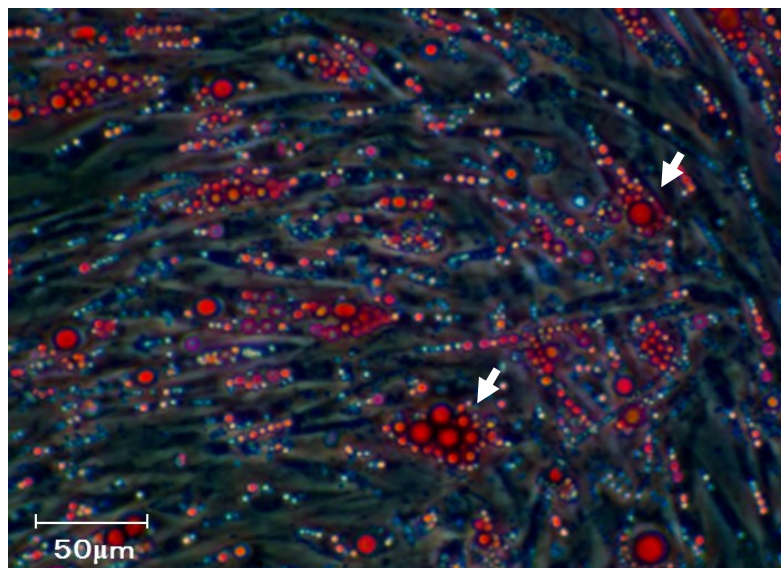
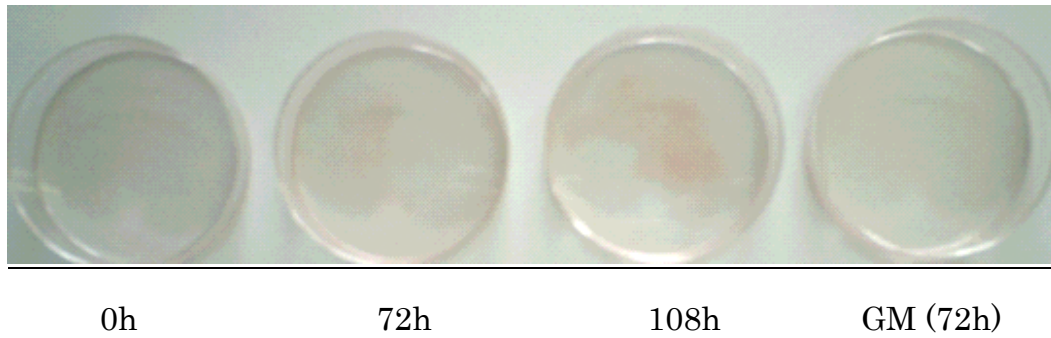


Fig.2-1-4: 鶏脂肪細胞分化誘導後 108 時間後での Oil red-O による脂肪滴の染色写真  
 IMD (Dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine(IMX), Insulin (Ins))および脂肪酸 (300 $\mu$ M oleate) 添加により鶏前駆脂肪細胞を分化誘導した細胞を Oil-red-O 法により脂肪滴の染色し、細胞へ蓄積された脂肪滴が赤く染色された (矢印)  
 上段:dish 全体像 左から Basic Control、培地置換後 72 時間、培地置換後 108 時間、Growth medium (GM) 72 時間の dish  
 下段：細胞鏡検像 分化誘導後 108 時間後の細胞

## 第二節 分化制御転写因子の発現を指標とした検討

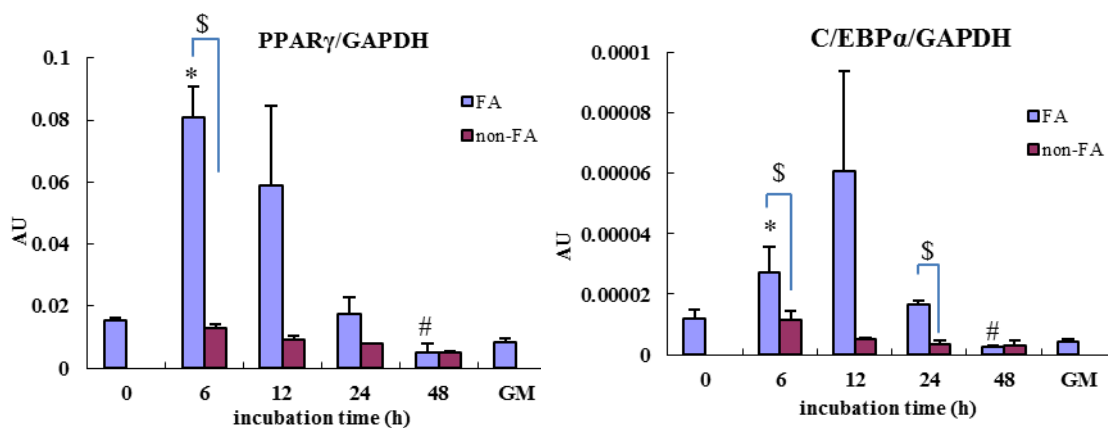


Fig.2-2-1: 鶏前駆脂肪細胞の分化における Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) および CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) の mRNA の発現変動

Non-fatty acid (non-FA) 区: IMD (Dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IMX), Insulin (Ins)) 添加培地

Fatty acid (FA) 区: IMD および脂肪酸 (300 $\mu$ M oleate) 添加培地

各区で分化誘導した細胞における PPAR $\gamma$  および C/EBP $\alpha$  の mRNA 発現量を real time PCR により定量し、Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 発現量により値を補正した

値は n=3, means $\pm$ S.D.で示した

\* (増加) or # (減少) は FA 区での 0h との比較での統計差 P<0.05 (t-test) を示す

\$は各時間での FA 区と non-FA 区との比較での統計差 P<0.05 (t-test)を示す

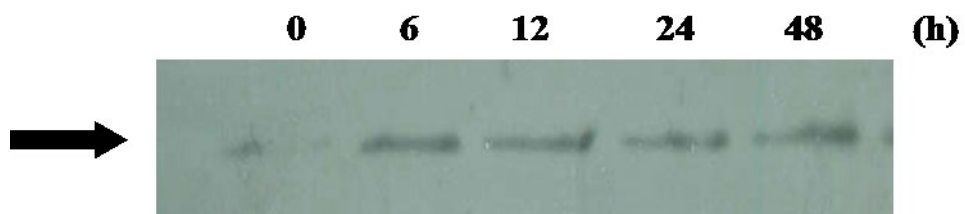
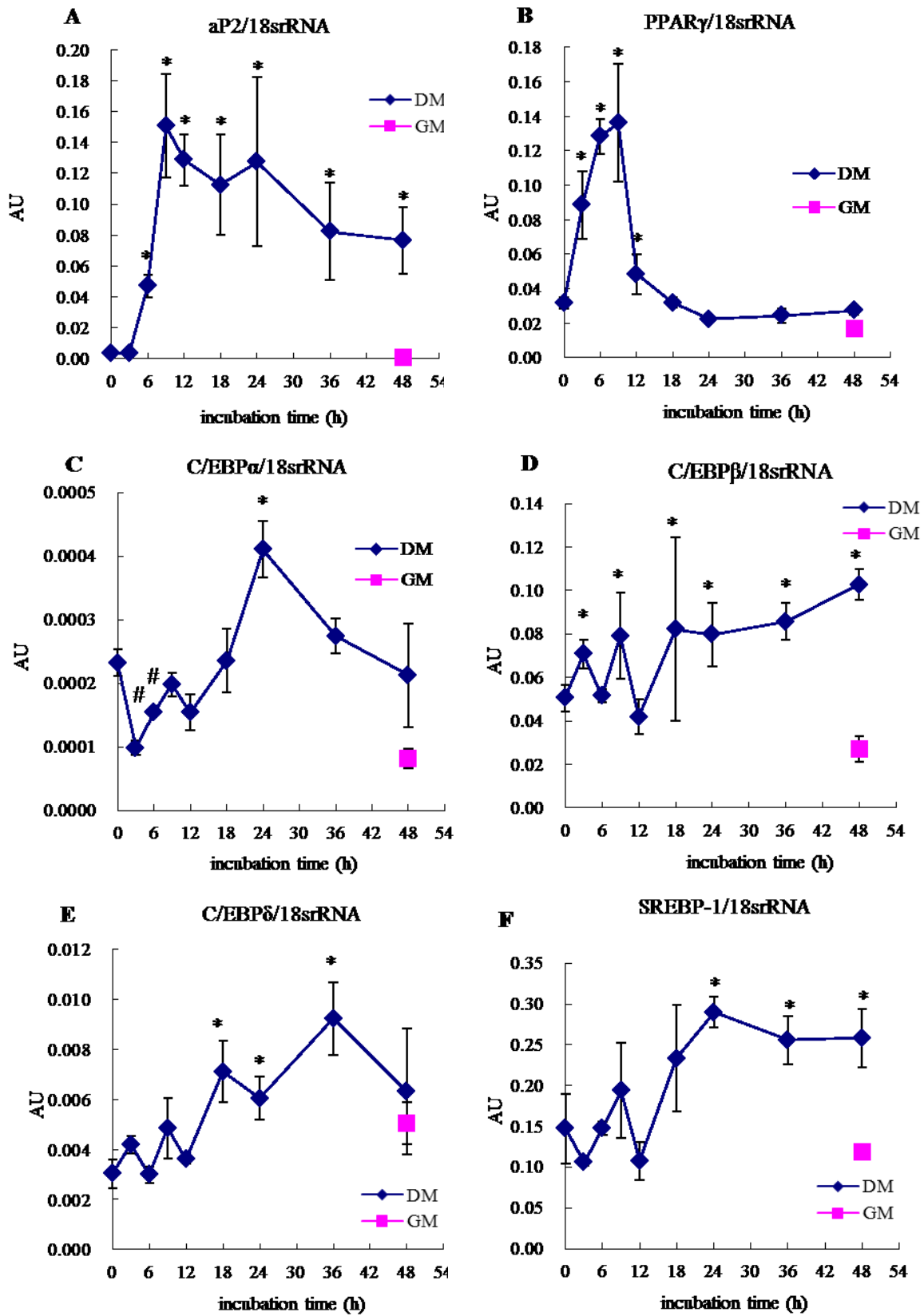


Fig.2-2-2: 鶏脂肪細胞分化における Adipocyte-fatty acid binding protein (aP2) タンパク質発現量の変動

IMD (Dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IMX), Insulin (Ins)) および脂肪酸 (300 $\mu$ M oleate) 添加培地による分化誘導後の鶏脂肪細胞から全タンパク質を抽出し、Western blot により aP2 タンパク質発現を測定した



### 第三章 鶏脂肪細胞の各種分化関連遺伝子発現の変動



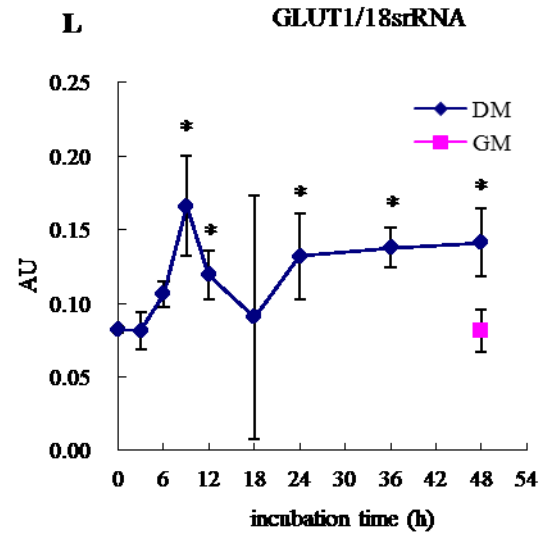
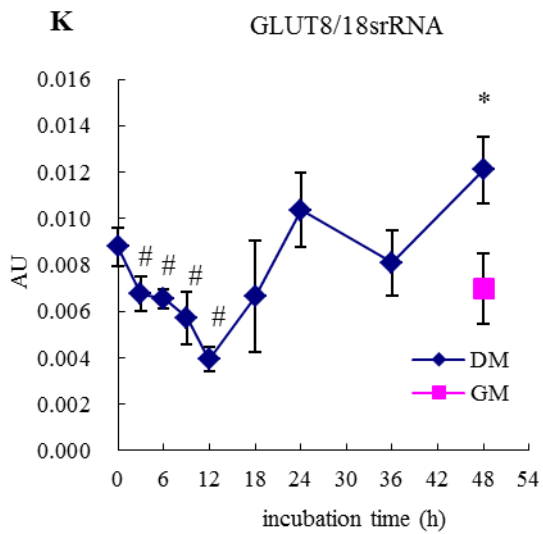
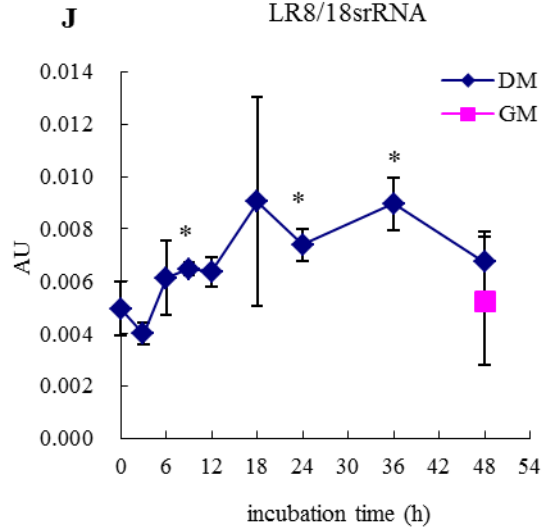
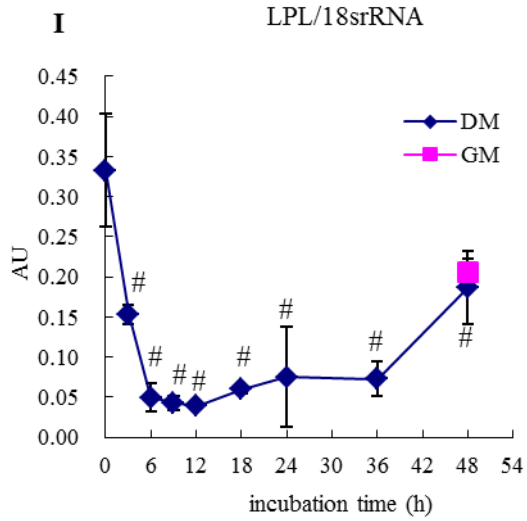
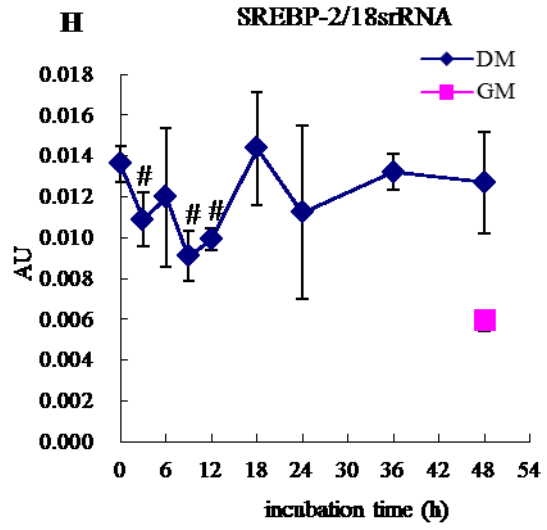
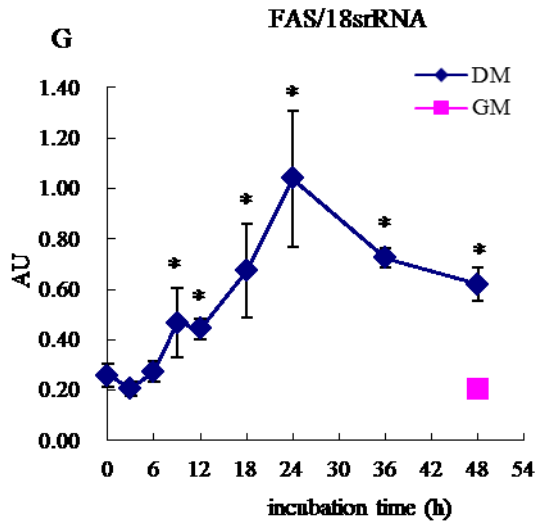


Fig.3: 鶏前駆脂肪細胞分化における各種分化関連遺伝子の発現変動

DM (differential medium): IMD (Dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IMX), Insulin (Ins)) および脂肪酸 (300 $\mu$ M oleate) 添加培地により分化誘導し、培地置換後の経時的な mRNA の発現変動を観察: 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48h

GM (growth medium): 細胞増殖培地で 48 時間後の細胞での mRNA 発現を分化時との比較に用いた

すべての mRNA 発現量は real time PCR を用いて定量し、18S rRNA 発現量により値を補正した

A: Adipocyte-fatty acid binding protein (aP2),

B: Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ),

C: CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ), D: C/EBP $\beta$ , E: C/EBP $\delta$ ,

F: Sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1), G: Fatty acid synthase (FAS), H: Sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2), I: Lipoprotein lipase (LPL), J: LDL-receptor relative with eight ligand binding repeats (LR8),

K: Glucose transporter 8 (GLUT8), L: GLUT1,

値は n=3, means  $\pm$  S.D. で示した

\* or # は 0h との比較での統計差 P<0.05 (t-test) を示す

## 第四章 PPAR $\gamma$ の活性と発現制御による鶏脂肪細胞の分化様相の確認

### 第一節 PPAR $\gamma$ リガンド(Troglitazone)添加時の鶏脂肪細胞分化の様相

A: Fatty acid (FA) + Troglitazone

B: Troglitazone

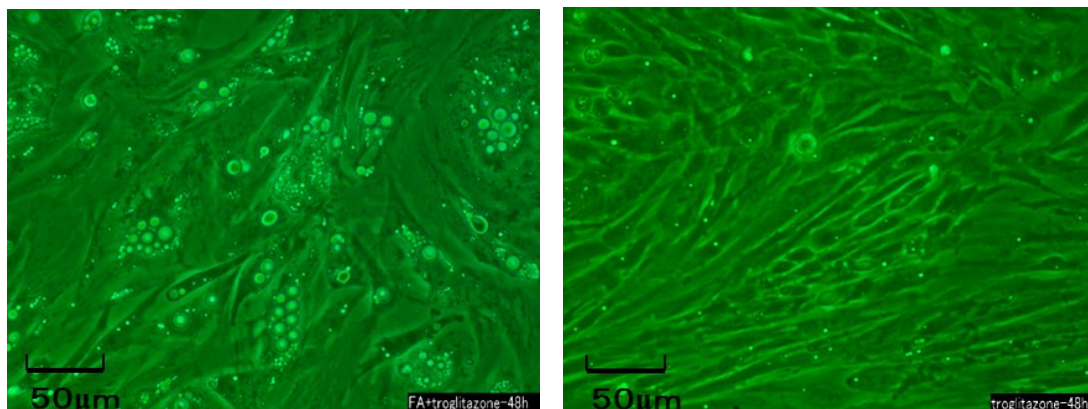


Fig.4-1-1: Troglitazone 添加分化誘導培地置換後(48 時間) における鶏脂肪細胞の鏡検像  
A: IMD (Dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IMX), Insulin (Ins)) および脂肪酸 (300 $\mu$ M oleate)と 10 $\mu$ M Troglitazone 添加培地による分化誘導後 48 時間の細胞  
B: IMD に 10 $\mu$ M Troglitazone を単独添加した培地による分化誘導後 48 時間の細胞

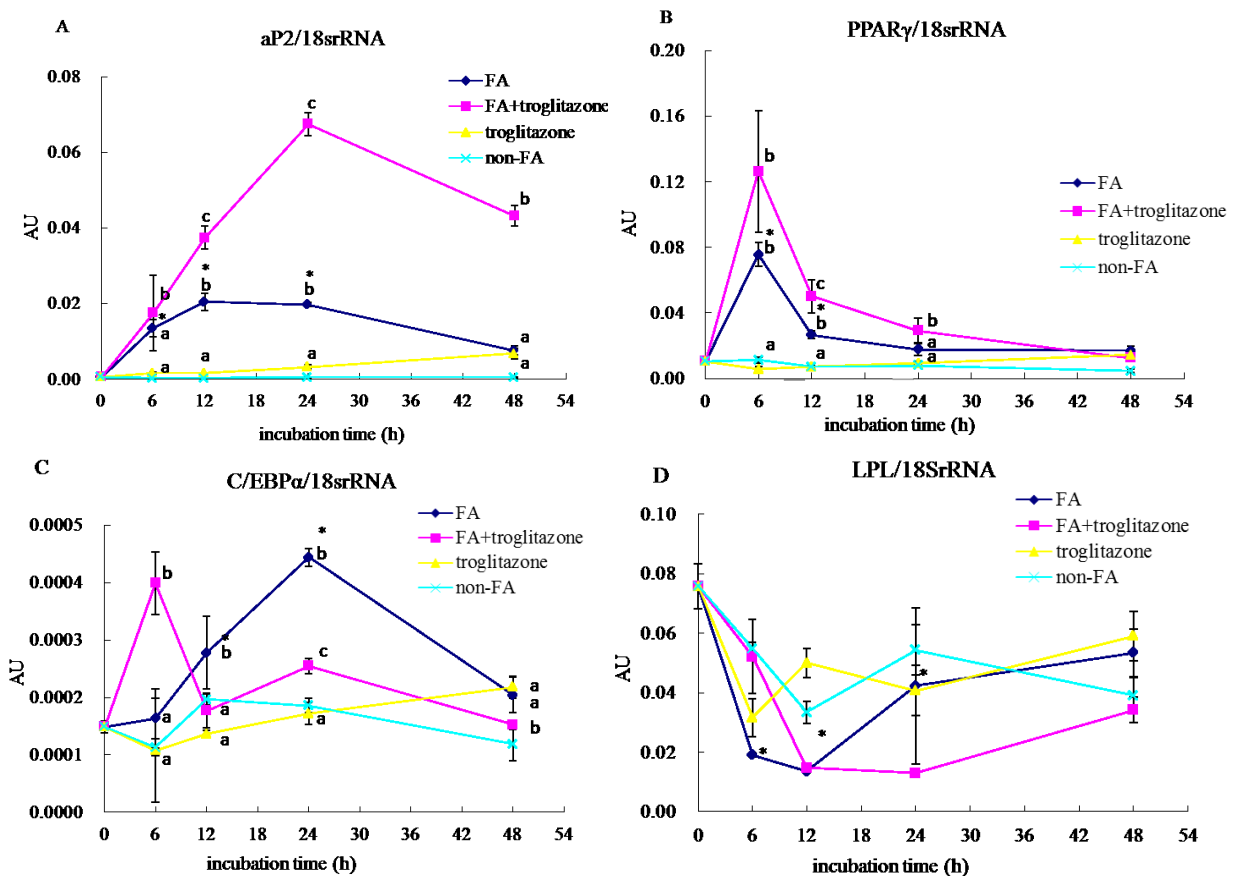


Fig.4-1-2: 鶏前駆脂肪細胞分化における各種分化関連遺伝子の発現変動

Fatty acid (FA) 区 (青): IMD (Dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IMX), Insulin (Ins)) および脂肪酸 (300 $\mu$ M oleate) 添加培地により分化誘導

FA +Troglitazone 区 (赤): IMD, 脂肪酸 (300 $\mu$ M oleate)および 10 $\mu$ M Troglitazone 添加培地により分化誘導

Troglitazone 区 (黄): IMD,および 10 $\mu$ M Troglitazone 添加培地により分化誘導

Non-FA 区 (水色): IMD 添加培地により分化誘導

培地置換後の経時的な mRNA の発現変動を観察: 0, 6, 12, 24, 48h

A: Adipocyte-fatty acid binding protein (aP2),

B: Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ),

C: CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ), D: Lipoprotein lipase (LPL)

すべての mRNA 発現量は real time PCR を用いて定量し、18S rRNA 発現量により値を補正した

値は n=3, means  $\pm$  S.D. で示した

\* (P<0.05) は、FA 区において分散分析後に 0h との多重比較での統計有意差 (Dunnnett's test) を示す

アルファベットの異符号間は、各時間での FA 区、FA+Troglitazone 区および Troglitazone 区内での分散分析後の多重検定後の P<0.05 の統計有意差 (Tukey's test) を示す

## 第二節 脂肪酸誘導性分化誘導における PPAR $\gamma$ 遺伝子発現亢進の意義の解明

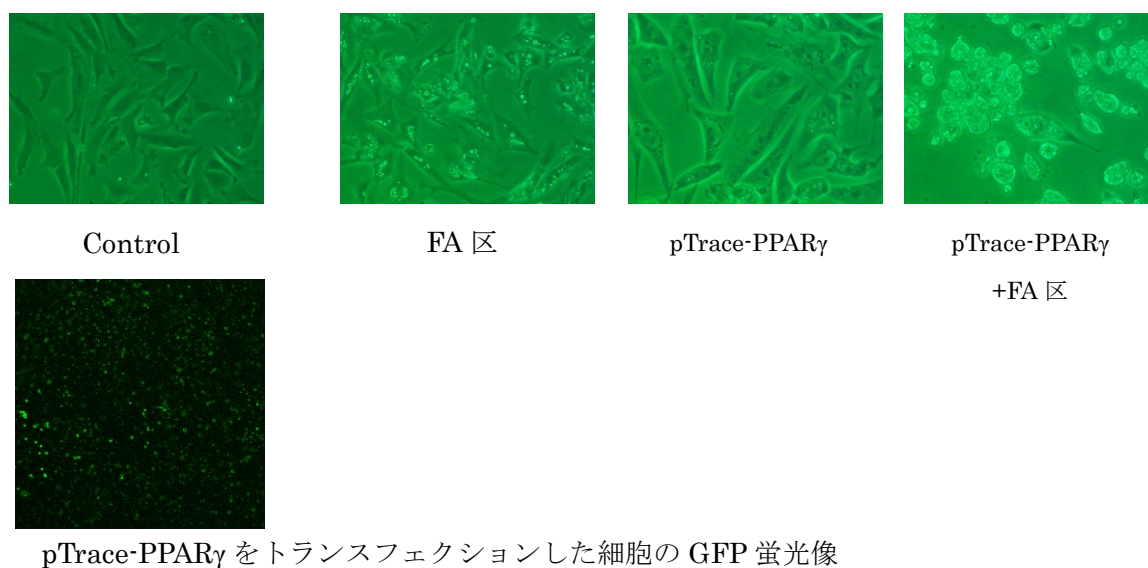


Fig.4-2-1: pTracer Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) のトランスフェクションによる鶏脂肪細胞の検鏡像

Control 区: IMD (Dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IMX), Insulin (Ins)) 添加培地

Fatty acid (FA) 区: IMD, 脂肪酸 (200 $\mu$ M oleate) 添加培地

pTracer PPAR $\gamma$  区: pTracerPPAR $\gamma$  をトランスフェクションしたのち IMD 培地添加にて培養

pTracer PPAR $\gamma$  + FA 区: pTracerPPAR $\gamma$  をトランスフェクションしたのち IMD と 脂肪酸 (200 $\mu$ M oleate) 添加培地にて培養

および pTrace-PPAR $\gamma$  をトランスフェクションした細胞の GFP 蛍光像

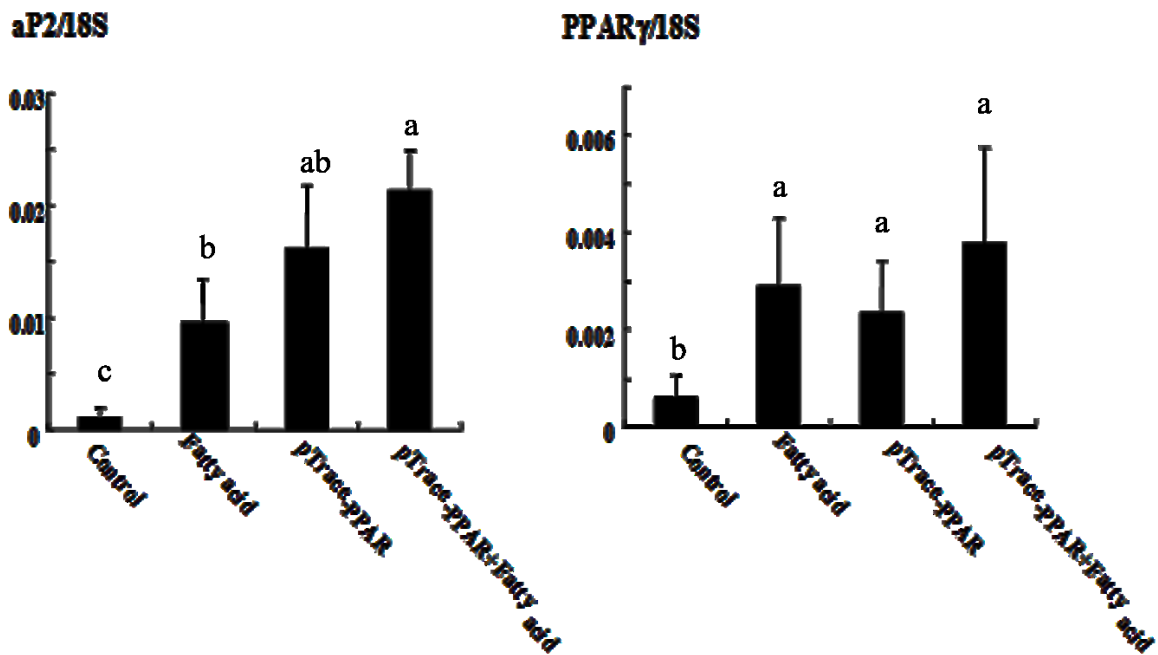


Fig.4-2-2: pTracer PPAR $\gamma$  のランスフェクションによる aP2, PPAR $\gamma$  mRNA 発現  
Control 区: IMD (Dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IMX), Insulin (Ins)) 添加培地  
FA 区: IMD, 脂肪酸 (200 $\mu$ M oleate) 添加培地  
pTracerPPAR $\gamma$  区: pTracerPPAR $\gamma$  をトランスフェクションしたのち IMD 培地添加  
pTracerPPAR $\gamma$  + FA 区: pTracerPPAR $\gamma$  をトランスフェクションしたのち IMD と脂肪酸 (200 $\mu$ M oleate)  
培養 24h 培養後に細胞を回収し、aP2, PPAR $\gamma$  の mRNA を測定し、18 S rRNA の発現量により値を補正した。  
値は n=4, means  $\pm$  S.D. で示した  
アルファベットは異符号間での P<0.05 の統計有意差 (Tukey's test) を示す

第五章 PPAR $\gamma$  の発現に関わる他の adipogenesis 関連因子の発現解析  
 第一節 鶏脂肪細胞分化時における ZNF423, KLFs, FGF10 の発現変化

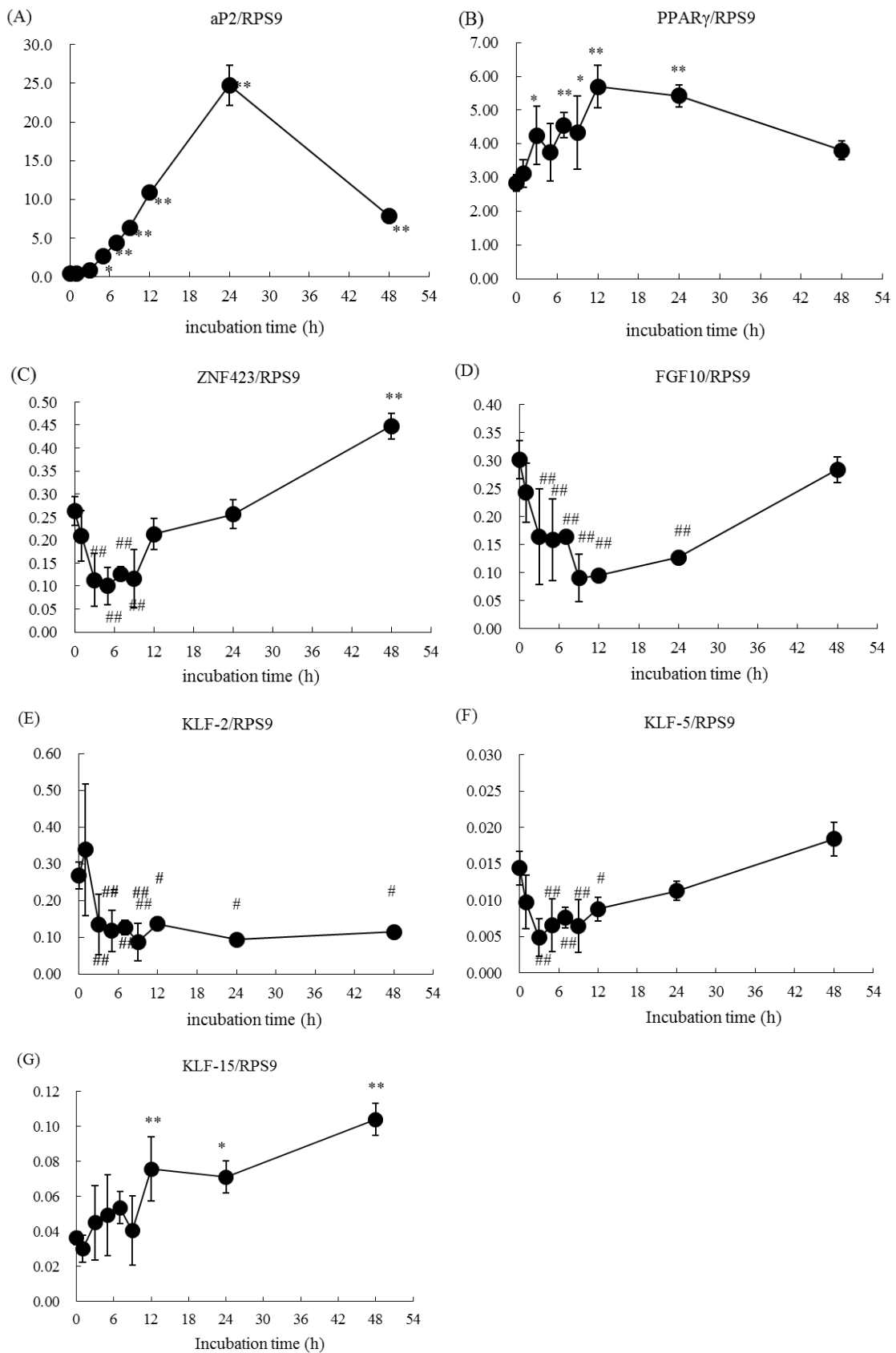




Fig.5-1-1: 鶏前駆脂肪細胞分化における各種 adipogenesis 関連遺伝子の発現変動

DM (differential medium): IMD (Dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IMX), Insulin (Ins)) および脂肪酸 (300 $\mu$ M oleate) 添加培地により分化誘導し、培地置換後の経時的な mRNA の発現変動を観察

すべての mRNA 発現量は real time PCR を用いて定量し、Ribosomal Protein S9 (RPS9) mRNA 発現量により値を補正した。

A: Adipocyte-fatty acid binding protein (aP2),

B: Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ),

C: Zinc finger protein 423 (ZNF423), D: Fibroblast growth factor 10 (FGF10),

E: Krüppel-like transcription factors-2 (KLF-2), F: KLF-5, G: KLF-15

値は n=4, means  $\pm$  S.D. で示した

\* or # (P<0.05), \*\* or ## (P<0.01) は分散分析後、0h との多重比較での統計有意差 (Dunnett's test) を示す

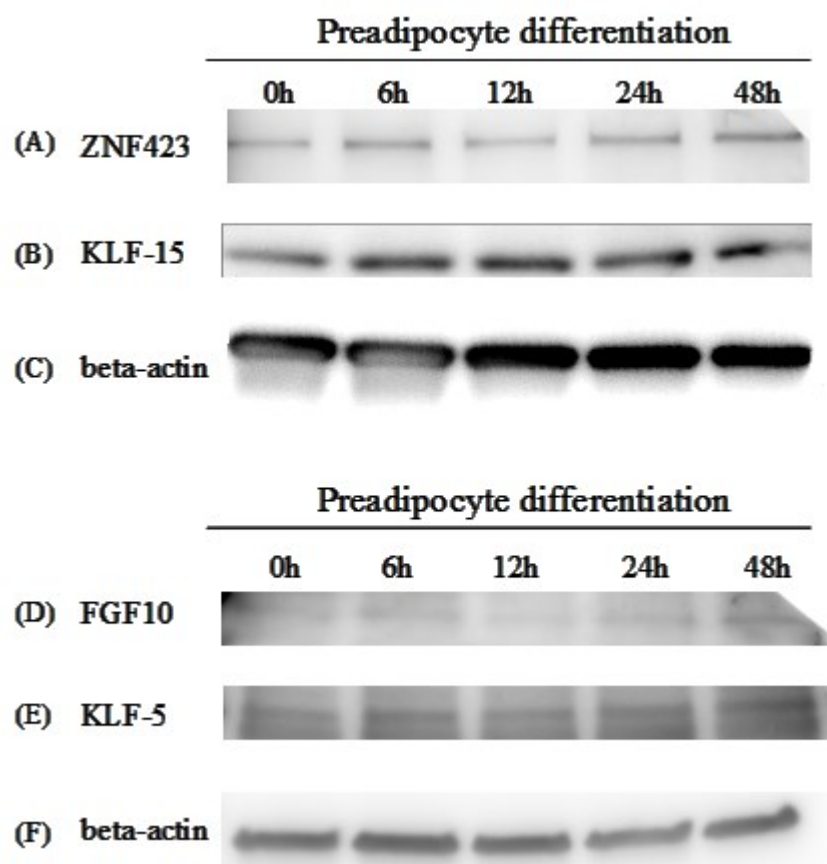
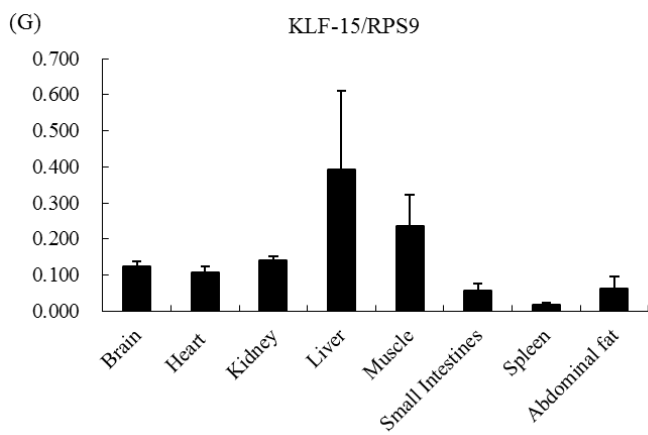
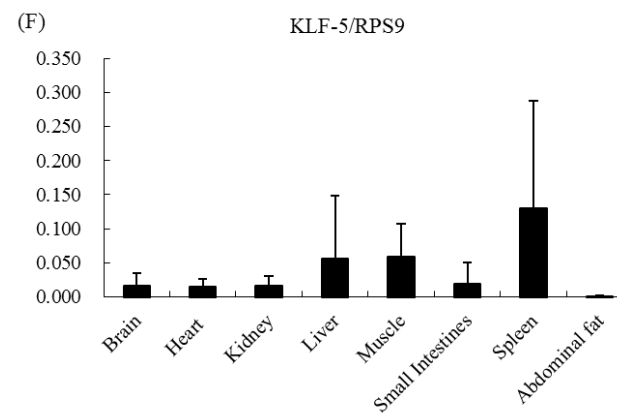
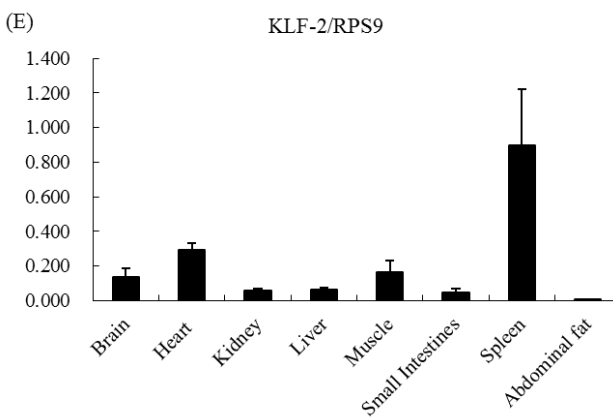
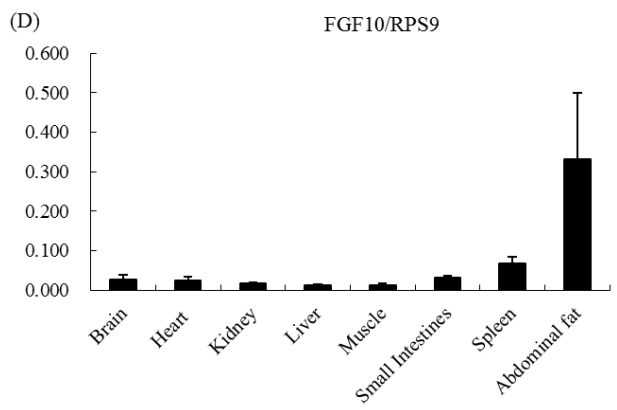
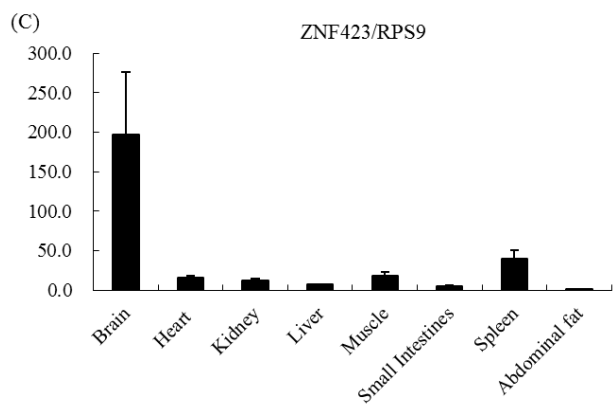
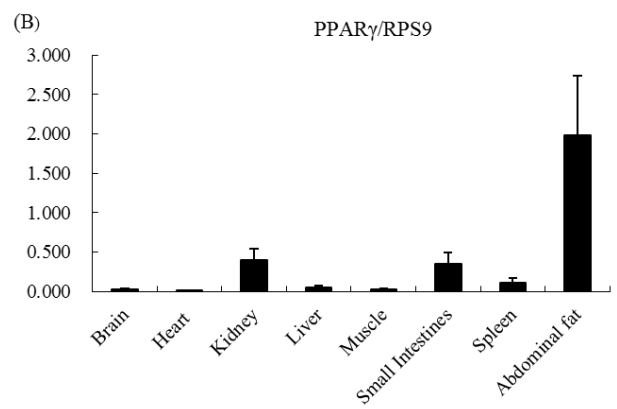
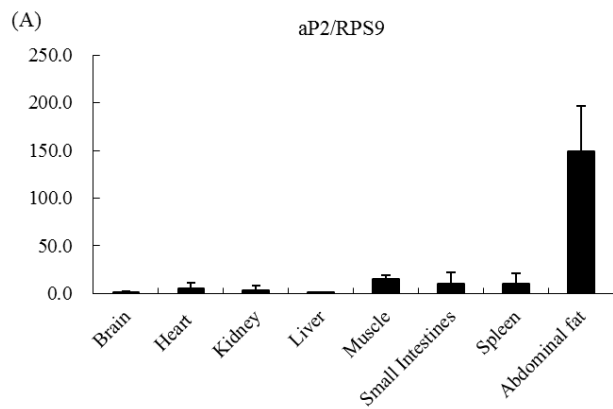


Fig.5-1-2: 鶏前駆脂肪細胞分化における各種 adipogenesis 関連タンパク質の発現変動  
 DM (differential medium): IMD (Dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IMX), Insulin (Ins)) および脂肪酸 (300 $\mu$ M oleate) 添加培地により分化誘導し、培地置換後の経時的なタンパク質の発現を観察

A: Zinc finger protein 423 (ZNF423), B: Krüppel-like transcription factors-15  
 C: beta-actin, D: Fibroblast growth factor 10 (FGF10), E: KLF-5



**Fig.5-2: 鶏主要臓器における各種 adipogenesis 関連遺伝子の発現変動**  
20 日齢の鶏より採取した脳、心臓、腎臓、肝臓、骨格筋、小腸、脾臓、腹腔内脂肪における遺伝子発現を評価  
すべての mRNA 発現量は real time PCR を用いて定量し、Ribosomal Protein S9 (RPS9) mRNA 発現量により値を補正した  
A: Adipocyte-fatty acid binding protein (aP2),  
B: Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ),  
C: Zinc finger protein 423 (ZNF423), D: Fibroblast growth factor 10 (FGF10),  
E: Krüppel-like transcription factors-2 (KLF-2), F: KLF-5, G: KLF-15  
値は n=6, means  $\pm$  S.D. で示した

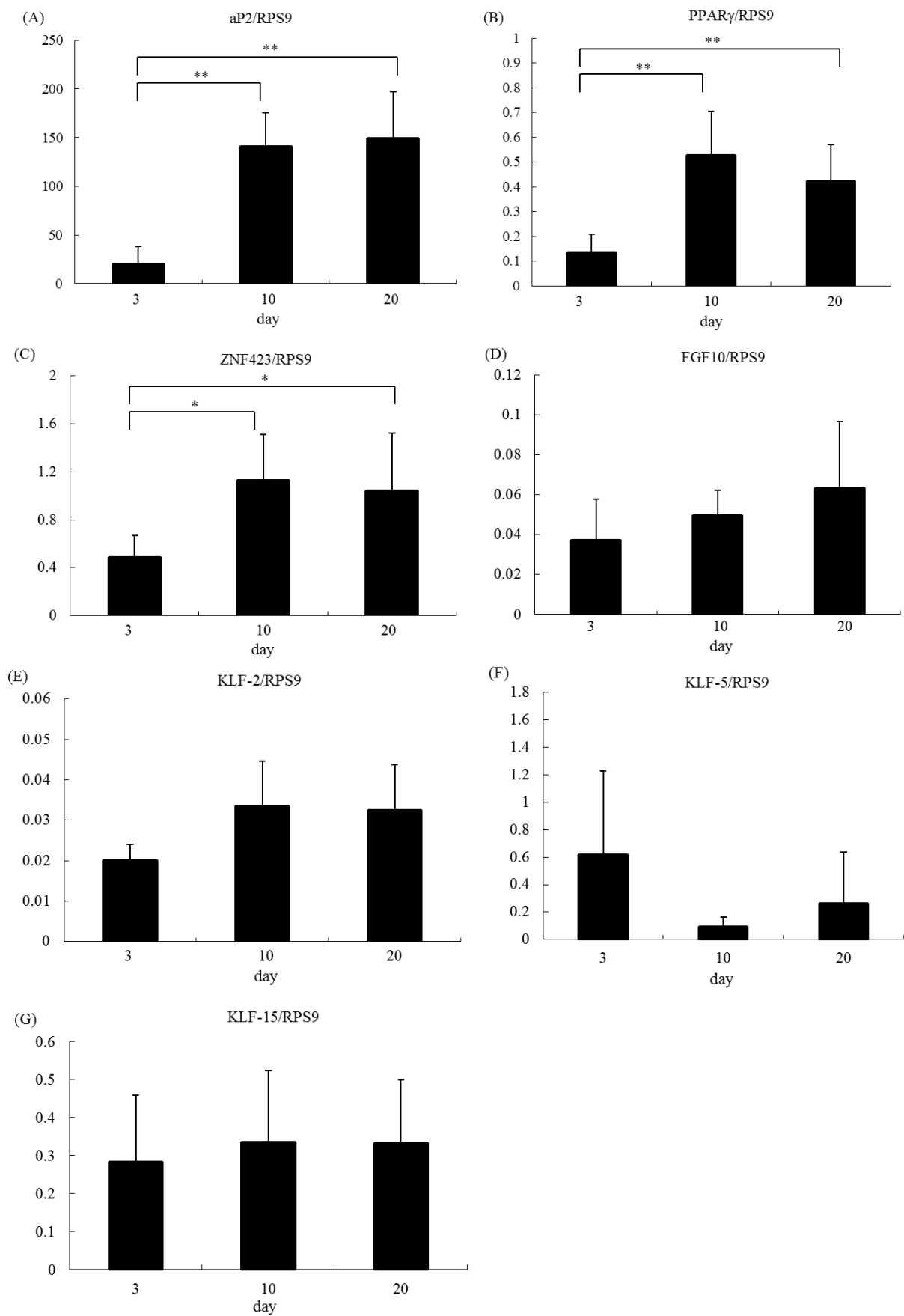


Fig.5-3-1: 鶏腹腔内脂肪組織の日齢進行に伴う経日的各種 adipogenesis 関連遺伝子の発現変動

3, 10, 20 日齢におけるニワトリの腹腔内脂肪組織における mRNA の発現変動を観察

すべての mRNA 発現量は real time PCR を用いて定量し、Ribosomal Protein S9 (RPS9) mRNA 発現量により値を補正した

A: Adipocyte-fatty acid binding protein (aP2),

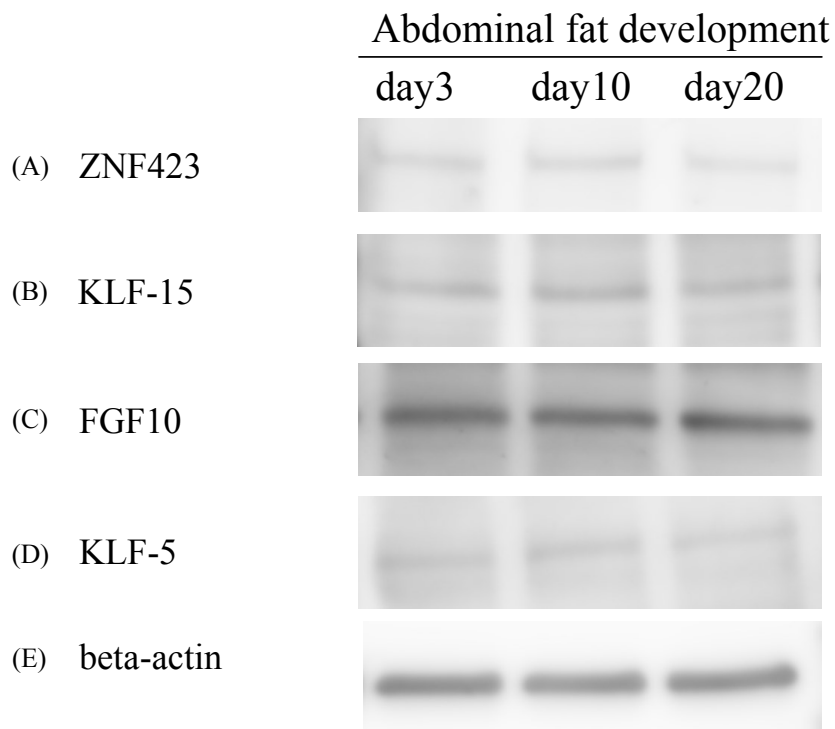
B: Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ),

C: Zinc finger protein 423 (ZNF423), D: Fibroblast growth factor 10 (FGF10),

E: Krüppel-like transcription factors-2 (KLF-2), F: KLF-5, G: KLF-15

値は n=5 - 6, means  $\pm$  S.D. で示した

\* (P<0.05), \*\* (P<0.01) は各群間での統計有意差 (Tukey's test) を示す



**Fig.5-3-2:** 鶏腹腔内脂肪組織の日齢進行に伴う経日的各種 adipogenesis 関連タンパク質の発現変動

3, 10, 20 日齢におけるニワトリの腹腔内脂肪組織におけるタンパク質の発現を観察

A: Zinc finger protein 423 (ZNF423), B: Krüppel-like transcription factors-15

C: Fibroblast growth factor 10 (FGF10), D: KLF-5, E: beta-actin

第六章 外因性の脂肪酸誘導性鶏脂肪細胞分化誘導機構の解明

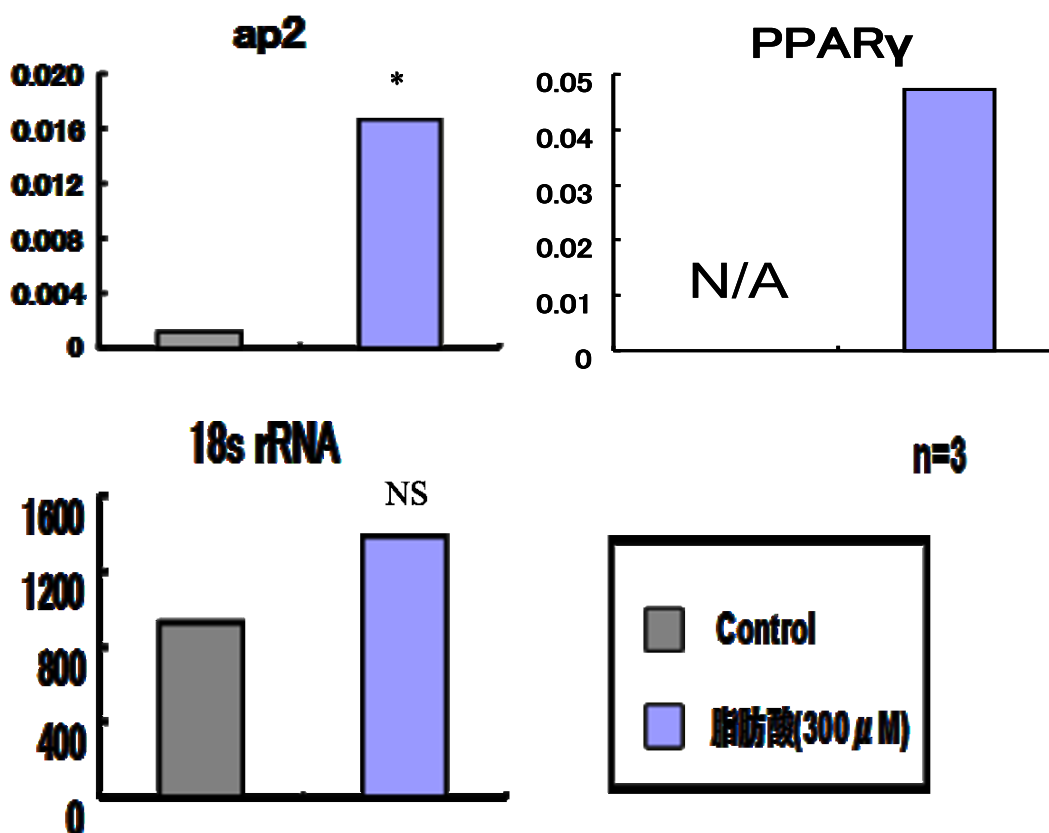


Fig.6-1: 核 run-on assay での核内の遺伝子発現量

Control 区: IMD (Dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IMX), Insulin (Ins)) 添加培地

脂肪酸区: IMD, 脂肪酸 (300μM oleate) 添加培地

培養 12h 後に細胞を回収し、核のみを抽出したのち、Adipocyte-fatty acid binding protein (aP2), Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), 18S rRNA を測定した

値は n=3, means  $\pm$  S.D. で示した

\* (P<0.05) はコントロールに対する統計有意差 (t- test) を示す



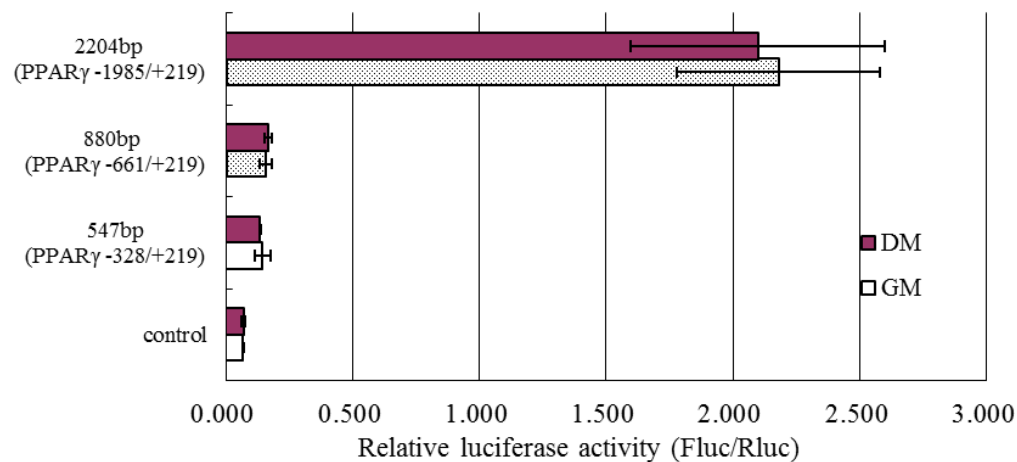


Fig.6-2-1: PPAR $\gamma$  プロモーターアッセイにおけるルシフェラーゼ活性

DM (differential medium): IMD (Dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IMX), Insulin (Ins)) および脂肪酸 (300 $\mu$ M oleate) 添加培地

GM (growth medium): 細胞増殖培地

2204, 880, 547bp はそれぞれ鶏 PPAR $\gamma$  上流プロモーター領域を含む配列を pGL4.1 に組み込んだコンストラクトを pGL4.74 ベクターとともにトランスフェクションした

Control は、プロモーター領域を含まない pGL4.1 をトランスフェクションした

培地置換後、培養 1h 後に細胞を回収し、ホタルルシフェラーゼ (Firefly luc) とウミシイタケルシフェラーゼ (Renilla luc) 活性を測定し、値は Fluc/Rluc で補正した

値は n=3, means  $\pm$  S.D. で示した

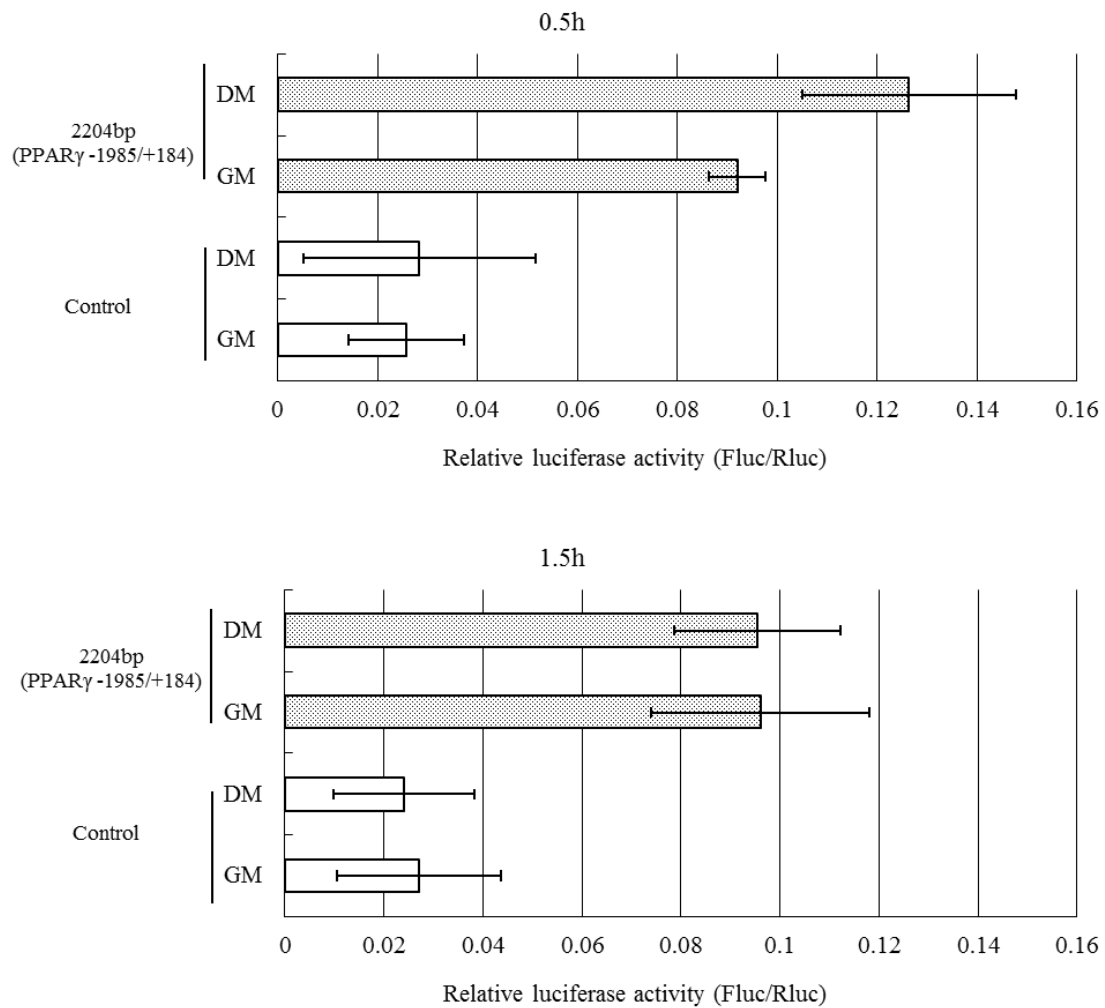


Fig.6-2-2: PPAR $\gamma$  プロモーターアッセイにおけるルシフェラーゼ活性

DM (differential medium): IMD (Dexamethasone (DEX), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IMX), Insulin (Ins)) および脂肪酸 (300 $\mu$ M oleate) 添加培地

GM (growth medium): 細胞増殖培地

2204bp はそれぞれ鶏 PPAR $\gamma$  上流プロモーター領域を含む配列を pGL4.1 に組み込んだコンストラクトを pGL4.74 ベクターとともにトランスフェクションした

Control は、プロモーター領域を含まない pGL4.1 をトランスフェクションした

培地置換後、培養 0.5h(上段)および 1.5h(下段) 後にそれぞれで細胞を回収し、ホタルルシフェラーゼ (Firefly luc)とウミシイタケルシフェラーゼ (Renilla luc) 活性を測定し、値は Fluc/Rluc で補正した

値は n=2-3, means  $\pm$  S.D. で示した

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、全実験におけるご指導ならびに、数々の貴重なご意見と多くのご協力を頂いた東京農工大学 佐藤幹准教授に心より深く感謝いたします。

研究面で惜しみなく丁寧なご助言と貴重な御教示をいただきました東京農工大学 新井克彦教授、宇都宮大学 菅原邦生教授に深く感謝いたします。

また、本研究を構築するにあたり、研究の基盤を提供し、数々の貴重なご意見と多くのご協力を頂いた東北生活文化大学 秋葉 征夫学長ならびに東北大学農学研究科動物栄養生化学分野の卒業生・修了生の一同に心から感謝いたします。

最後になりましたが、実験遂行にあたり、数々の貴重なご意見と多くのご協力をいただいた東京農工大学 畜産学研究室 遠藤 斗南様、青木 充様ならびに現室員の皆様に心から感謝いたします。