



The construction of dominant negative type peroxisome proliferator-activated receptor γ and the analysis of molecular mechanism of dominant negative activity

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード: 作成者: 鈴木, 究子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1228

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 375号	学位授与年月日	平成14年 3月26日
氏名	鈴木 究子		
論文題目	The construction of dominant negative type peroxisome proliferator-activated receptor γ and the analysis of molecular mechanism of dominant negative activity (ペルキシゾーム増殖剤応答性レセプターガンマ(PPAR γ)のドミナントネガティブ型変異体の作成とその分子機構に関する研究)		

博士(医学) 鈴木 究子

論文題目

The construction of dominant negative type peroxisome proliferator-activated receptor γ and the analysis of molecular mechanism of dominant negative activity

(ペルオキシゾーム増殖剤応答性レセプターガンマ(PPAR γ)のドミナントネガティブ型変異体の作成とその分子機構に関する研究)

論文の内容の要旨

[はじめに]

ペルオキシゾーム増殖剤応答性レセプターガンマ(PPAR γ)は脂肪細胞分化、インスリン抵抗性に関与するとされる核内レセプターであり、PPAR 応答領域(PPRE)に結合し、リガンド依存性にその標的遺伝子の転写を抑制する。最近、PPAR γ のホルモン結合ドメイン(LBD)に変異を有する患者が、強いインスリン抵抗性と高血圧を呈することが報告され、変異 PPAR γ のドミナントネガティブ作用がその病態に寄与していると考えられている。PPAR γ と同じく核内レセプターである甲状腺ホルモン受容体(TR)においては、LBD の変異で甲状腺ホルモン不応症(RTH)を来することが知られており、そのドミナントネガティブ効果の発現には、コリプレッサーの結合が必要とされている。しかし、PPAR γ ではコリプレッサーの結合について明確な見解がなく、変異 PPAR γ のドミナントネガティブ作用の機序の詳細は不明である。今回我々は、ドミナントネガティブ型変異 PPAR γ の分子機構、更に PPAR γ の機能解析のため、PPAR γ の DNA 結合ドメイン(DBD)を含む N 端と TR の LBD からなる複数のキメラレセプターを作成し、それらの転写活性能とドミナントネガティブ効果について検討した。

[材料ならびに方法]

- 1) トランスフェクション：レセプターを AOX-PPRE-ルシフェラーゼレポーター遺伝子と共に CV1細胞へは、リン酸カルシウム法、3T3-L1細胞へは、リポフェクション法を用いてトランスフェクションした。
- 2) ゲルシフトアッセイ：PPRE を含むオリゴヌクレオチドを $\alpha^{32}\text{P}$ でラベルし、レセプター蛋白については、無細胞転写翻訳系を用いてトランスレートした。
- 3) Mammalian two hybrid assay：VP-16融合 TR β 、GAL-4融合 SMRT と共にレセプタープラスミドをカルシウムリン酸法を用いてトランスフェクションした。
- 4) GST プルダウンアッセイ：レセプター蛋白は ^{35}S メチニオンで標識し、大腸菌を用いて発現した NCoR 蛋白をグルタチオンセファロースビーズに結合させ、共に 4℃ 3 時間で反応させた。

[結果]

PPAR γ の A/Bドメイン及びDBD を含む N 端と TR の CoR box、LBD からなるキメラレセプターPPPを作成した。PPP はトログリタゾン存在下での野性型 PPAR γ と同等の T3依存性の転写活性能を示した。ドミナントネガティブ効果も発揮し、トログリタゾン存在下での野性型 PPAR γ の転写活性を約50%まで抑制した。コリプレッサーとの結合が阻害される CoR box の AHT 変異を導入した PPP では、ドミナントネガティブ効果が減弱した。PPAR γ の DNA への結合に必要なとされる T box、A box を PPP から欠失した変異 PPP では、DNA 結合能、転写活性能は共に減弱したが、ドミナントネガティブ効果には変化な

た。興味深いことに PPP の A/B ドメインを欠失させると、ドミナントネガティブ効果は著しく増強し、野性型 PPAR γ の活性をほぼ基礎転写レベルまで抑制した。この効果はインスリン抵抗性を有する症例で発見された PPAR γ の P467L 変異でも認められた。Mammalian two hybrid assay、GST プルダウンアッセイで、A/B ドメインの欠失によりコリプレッサーとの結合能が増強することが示された。一方、変異 TR β では A/B ドメインを欠失しても、コリプレッサーの結合能、ドミナントネガティブ効果に変化は見られなかった。

[考察]

PPAR γ の DNA 結合ドメイン (DBD) を含む N 端と TR の LBD からなるドミナントネガティブ型 PPAR γ を作成した。その分子機構の解析から、転写活性には T box、A box が重要であるが、ドミナントネガティブ作用には関与せず、ドミナントネガティブ作用の発現にはコリプレッサー関与がすることが示唆された。さらに、PPAR γ の A/B ドメインを欠失させるとコリプレッサーとの結合能が増し、ドミナントネガティブ作用が増強したことは、A/B ドメインと LBD との相互作用 (inter-domain communication) がコファクターを介して、PPAR γ の転写活性だけでなくドミナントネガティブ作用をも調節していると考えられた。このような A/B ドメインの機能は TR β では見られず、PPAR γ 固有の機能と考えられた。今後 PPAR γ の機能解析に、ドミナントネガティブ作用を有するキメラレセプターは有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

ベルオキシゾーム増感剤応答レセプターガンマ (PPAR γ) は核内レセプタースーパーファミリーの一員であり、そのリガンドとしてはプロスタグランジン-J2 (15d-PGJ2) やチアゾリジン誘導体が知られている。PPAR γ は核内転写因子として脂肪細胞の分化や血圧調節等に関与しているが、その転写抑制機構に関しては不明の点が多い。研究開始当時は PPAR γ では遺伝子変異がみつかっていなかったことから、申請者は PPAR γ と TR のキメラレセプターとしてドミナントネガティブ体をデザインし、それを用いて PPAR γ の機能解析を行う研究を遂行した。主な研究手法は、TR とのキメラを含む種々の PPAR γ の変異体を作製し、その発現ベクターと PPAR γ の結合配列を持つレポーター遺伝子とを CV-1 細胞にコトランスフェクトして行うレポーターアッセイである。この一連の研究により以下の結果を得ている。

- 1) N 末端側に PPAR γ の A/B ドメインおよび DNA 結合ドメイン (DBD)、その下流に TR の CoR box、リガンド DNA 結合ドメイン (LBD) からなるキメラレセプター PPP の cDNA を作製した。
- 2) PPRE レポーターアッセイにより PPP は T3 依存的転写活性を示すことが明らかになった。
- 3) 一方で PPP は野性型 PPAR γ の転写活性を抑制した。
- 4) CoR box への変異導入により 3) の活性は低下した。
- 5) T box、A box への変異導入により 2) の活性は低下したが、3) の活性には影響がなかった。
- 6) A/B ドメインの欠失はコリプレッサー (NcoR) との結合能の増強を引き起こし、ドミナントネガティブ効果を増強した。

以上の様に申請者は PPAR γ と TR とのキメラレセプターをデザインし、T3 依存的な転写活性化能を持ち、ドミナントネガティブ効果を示す PPAR γ の変異体を作製することに成功した。さらにここで作製し

た種々の変異体を用いたレポーターアッセイ等の解析により各ドメインの機能が明らかになり、PPAR γ の標的遺伝子に対する転写調節の分子機構に新知見をもたらした。審査委員会ではこれらの研究成果を高く評価した。

以上の研究に対し、審査委員会では以下の質疑応答を行った。

- 1) 本研究のデザインと意義について
- 2) PPAR γ 遺伝子の変異部位とインスリン抵抗性の関係について
- 3) インスリン抵抗性に関与するといわれる TNF α と PPAR γ の関係について
- 4) 実験に用いられた細胞に内因性 RXR、PPAR γ が発現しているか
- 5) トランスフェクトした遺伝子の発現(量)を確認しているか
- 6) PPAR γ P467L で silencing 効果が認められるか
- 7) PPAR γ のドミナントネガティブ体の効果は特異的と言えるか
- 8) PPAR γ および TR の各ドメイン構造とその機能について
- 9) PPAR γ の A/B ドメインに転写活性化能はないとって良いか
- 10) PPAR γ と NcoR との結合の強さについて(GST-pull down アッセイの結果の解釈について)
- 11) PPAR γ の真のリガンドを同定するにはどのような実験が有効か
- 12) PPAR γ のドミナントネガティブ体はどんな研究に利用できるか
- 13) PPAR γ のドミナントネガティブ体の治療への応用に発展性はあるか

これらの質問に対し申請者の解答はほぼ適切であり、問題点も十分理解していた。よって博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 北川 雅 敏
副査 大関 武彦 副査 永田 年