

脂肪細胞分化における PDZRN3 による制御

(Regulation of Adipocyte Differentiation of 3T3-L1 Cells  
by PDZRN3)

石井 愛子

山口大学大学院医学系研究科

情報解析医学系専攻 分子薬理学分野

平成 26 年 1 月 10 日

## 目次

要旨	．．．	3
背景	．．．	4
目的	．．．	6
方法	．．．	6
結果	．．．	10
考察	．．．	21
結論	．．．	24
文献	．．．	25

## 要旨

PDZRN (または LNX) ファミリーに属する PDZRN3 蛋白質は、間葉系幹細胞の筋管細胞への分化には必須因子であり、骨芽細胞への分化には抑制的に働く。間葉系幹細胞は筋、骨以外に脂肪細胞へも分化するため、脂肪細胞分化における PDZRN3 の役割について解析を行った。マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞を脂肪細胞へ分化誘導すると、PDZRN3 の発現は蛋白質および mRNA レベルで共に減少した。RNA 干渉法により PDZRN3 発現を抑制すると、脂肪蓄積の増強が見られ脂肪細胞への分化が促進した。脂肪細胞への分化マーカーである aP2 や C/EBP $\alpha$  の発現も PDZRN3 の発現を抑制すると増加していた。aP2 や C/EBP $\alpha$  の制御因子で脂肪分化のマスターレギュレーターとされる PPAR $\gamma$  も蛋白質および mRNA レベルで発現が増加していた。さらに、PPAR $\gamma$  の遺伝子発現を制御する転写因子群の解析から、PDZRN3 の発現抑制により STAT5b の発現が蛋白質および mRNA レベルで増加していることが明らかとなった。一方、STAT5a ではそのような変化は見られなかった。そのため、分化初期に見られる STAT5 のチロシンリン酸化も PDZRN3 発現抑制によって STAT5b で増加し、STAT5a では変化が無かった。また、脂肪分化初期に誘導される C/EBP $\beta$  も PDZRN3 の発現抑制により蛋白質および mRNA レベルで増加していた。これらの結果は、PDZRN3 が STAT5b や C/EBP $\beta$  の発現を抑制することにより PPAR $\gamma$  の発現を抑制することを示している。即ち、PDZRN3 は、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化を負に制御していることが示された。

## 背景

近年、再生医療分野において幹細胞を利用した細胞治療が大きく注目されており、臨床応用に向けた開発が急速に進んでいる。その実用化には、細胞の未分化および分化状態を安定に制御することや癌化をはじめとする異常を検出、排除するなどの安全性確保が要求される。これらを実現するため、細胞分化における制御メカニズムを詳細に理解することが重要な課題の一つとなっている。我々は、臨床応用に最も近い幹細胞システムの一つである間葉系幹細胞において、PDZRN3 蛋白質が関わる新しい分化制御機構の存在を明らかにしてきた。

PDZRN 蛋白質は、ユビキチン付加活性を有する RING フィンガードメインと、蛋白質間相互作用に関わる PDZ ドメインを併せ持つことが名前の由来となっており、標的蛋白質に結合してユビキチン化する酵素、すなわち E3 ユビキチンリガーゼに属する。PDZRN ファミリーに共通して、N 末端に RING ドメインが位置し、中間領域には複数の PDZ ドメイン、また C 末端には PDZ 結合モチーフが存在する [1]。PDZRN ファミリーは PDZ ドメイン数などの構造的特徴から、PDZRN1 及び PDZRN2、そして PDZRN3 及び PDZRN4 に二分される。前者の PDZRN1/2 は LNX (ligand of NUMB-proteinX) として知られており、Notch シグナル経路で働く NUMB をユビキチン化してプロテアソーム分解に誘導することで、細胞運命決定を制御することが明らかとなっている。これに対して PDZRN3/4 に関する研究は遅れており、当研究室にて解析がなされるまでその機能は全く不明であった。

PDZRN3 は当研究室で筋組織よりクローニングされた遺伝子で、特に骨格筋や心臓に発現が多く、その他、脳、肝臓などでも検出される [2]。マウスを用いた解析では、胎児期に多く、加齢と共に減少していくことが分かっている。マウスの筋再生モデルを用いた解析から、筋傷害後の筋再生過程において PDZRN3 の発現が誘導されることが

示され、骨格筋の発生に PDZRN3 が関与することが想定された [2]。また、筋組織に含まれる筋前駆細胞（筋衛星細胞）を株化した C2C12 細胞をはじめ、間葉系の未分化細胞株やマウス骨髄より単離した間葉系幹細胞に PDZRN3 が高発現していることが判明し、PDZRN3 が間葉系未分化細胞の分化制御に何らかの役割を持つのではないかと想定される。当研究室では、これまでに C2C12 細胞を用いた PDZRN3 の機能解析から、筋管細胞への分化には PDZRN3 が必須因子であることを明らかにした。また、Lu らは、神経筋接合部の形成に重要な Muscle specific kinase の発現制御に PDZRN3 が関与することを報告している [3]。当研究室では、さらに PDZRN3 が筋分化のみならず骨芽細胞分化においても分化に関わることを明らかにした [4]。その作用機序は、PDZRN3 が Wnt シグナル経路を抑制することにより骨芽細胞分化を負に制御するというものである。これは、PDZRN3 が Wnt シグナルの新たな制御因子であるという観点からも重要な知見である。これら以外に、最近、ゼブラフィッシュの菱脳節、網膜、視床、運動神経を含む中枢神経系での PDZRN3 の存在と神経系発生への関与が報告されている [5]。

間葉系の未分化細胞は筋肉や骨のみならず脂肪細胞にも分化するが、その分化過程での PDZRN3 の関与は全く知られていない。近年、先進国で強く問題視される肥満、即ち脂肪組織の過剰蓄積は、糖尿病をはじめとする生活習慣病の大きなリスクファクターである。そのため、脂肪分化制御の分子機構を詳細に理解することは重要な課題である。本研究では脂肪細胞分化における PDZRN3 の分化制御機構を明らかにすることを目的として、マウス前駆脂肪細胞株である 3T3-L1 細胞を用いた脂肪細胞分化モデルでの PDZRN3 の機能を解析した。

## 目的

本研究は、マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 の脂肪細胞分化制御における PDZRN3 蛋白質の役割を解明することを目的とする。

## 方法

### 試薬

3T3-L1 細胞を用いて脂肪細胞へ分化誘導をするために、組換えヒト insulin, 3-isobutyl-1-methylxanthine, dexamethasone を使用した。蓄積した脂肪滴の染色には Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 社より購入した Oil red O を使用した。Protease inhibitor cocktail および phosphatase inhibitor cocktail は、Roche (Branchburg, NJ) 社より購入した。抗 PDZRN3 ポリクローナル抗体は、過去に報告したようにウサギを免疫し精製したものを用いた [2]。C/EBP  $\alpha$  (sc-61)、STAT5a (sc-1081) に対するウサギ・ポリクローナル抗体、C/EBP  $\beta$  (sc-7692)、PPAR  $\gamma$  (sc-7233)、STAT5b (sc-1656) に対するマウス・モノクローナル抗体、aP2 (sc8661) に対するヤギ・ポリクローナル抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) 社、C/EBP  $\delta$  (#2318)、STAT1 (#9172) に対するウサギ・ポリクローナル抗体、c-Fos (#2250)、c-Jun (#9165) に対するウサギ・モノクローナル抗体は Cell Signaling Technology (Danvers, MA) 社、KLF5 (ab24331) に対するウサギ・ポリクローナル抗体は Abcam (Cambridge, MA) 社、リン酸化チロシンに対する HRP 標識マウス・モノクローナル抗体 (PY-20) は BD Biosciences (San Jose, CA) 社、 $\alpha$ -tubulin に対するマウス・モノクローナル抗体は Sigma-Aldrich 社よりそれぞれ購入した。

### 細胞培養

マウス由来前駆脂肪細胞株 3T3-L1 は American Type Culture Collection (Manassas, VA) 社より購入した。3T3-L1 細胞は、5% CO<sub>2</sub>、37°C の環境で、10% FBS、penicillin (100 U/ml)、と streptomycin (100  $\mu$ g/ml) を加えた Dulbecco's modified

Eagle's medium (DMEM) で培養した。細胞がコンフルエントの状態に達した後、さらに 2 日間培養し、MDI (0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine、1  $\mu$  M dexamethasone、10  $\mu$  g/ml insulin) を加えた培地に交換して分化誘導を行った。2 日間の培養以降は、24 時間毎に insulin (5  $\mu$  g/ml) を加えた培地に交換した。

## RNA 干渉

マウス PDZRN3 mRNA に特異的な shRNA、またはそのスクランブル配列 (コントロール) に相当する shRNA をコードしたアデノウイルス・ベクターは以前に報告したものを使用した [4]。24-well plate に 3T3-L1 細胞を  $5 \times 10^4$  個/well で播種し、12 時間培養した後、各種アデノウイルスを感染多重度 10 で 24 時間感染させた。PDZRN3 の shRNA に耐性のあるマウス PDZRN3 mRNA をコードしたアデノウイルス・ベクターは以前の報告に記載した方法で生成した [4]。

## Oil red O 染色

3T3-L1 細胞を 4%ホルムアルデヒドで室温 15 分間固定し、PBS で洗浄後、イソプロパノールに溶解した 0.3% Oil red O で室温 15 分間染色した。60%イソプロパノール溶液で洗浄後、実体顕微鏡で撮影し、染色された面積を ImageJ 1.32i (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いて計測した。

## トリグリセリド量の測定

3T3-L1 細胞を PBS で洗浄後、5% Triton X-100 を含む PBS を加えて、80°C で 5 分間インキュベーションし、細胞を溶解した。溶解液を遠心し、その上清に含まれるトリグリセリド量を WAKO LabAssay Triglyceride Kit (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を用いて測定した。トリグリセリド含有量は、蛋白質 1 mg 当たりのトリグリ

セリド量 (mg) で表記した。

### ウエスタンブロット解析と免疫沈降

3T3-L1 細胞を TBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4) で 2 回洗浄し、Lysis buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 20 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 20 mM NaF, 5 mM EDTA, 0.3% Triton X-100, phosphatase inhibitor cocktail, protease inhibitor cocktail) にて細胞を溶解した。DC Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて溶解液の総蛋白質量を測定し、蛋白質濃度を一定に合わせた溶解液を SDS-PAGE に供した。分離された蛋白質を PVDF 膜 (Millipore, Billerica, MA) に転写した後、膜をブロックして一次抗体を室温で 1 時間反応させた。洗浄後、HRP 標識二次抗体 (Promega, Madison, WI) を室温 1 時間反応させ、洗浄後に HRP の基質として Chemi-Lumi One detection kit (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を反応させ、感光フィルムである Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare/Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) を用いてバンドを検出した。Lane & Spot Analyzer (ATTO, Tokyo, Japan) を用いて、得られたバンドをデンシトメトリーで定量した。リン酸化 STAT5 の検出では、細胞溶解液に STAT5a または STAT5b の抗体を添加して 30 分、4°C で反応させ、その後、protein G 結合セファロースビーズ (GE Healthcare/Amersham Biosciences) を加え、6 時間、4°C で反応させた。ビーズを Lysis buffer で 5 回洗浄した後、SDS で溶出したサンプルについて PY-20 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。

### RT-PCR

Total RNA は、3T3-L1 細胞から SV total RNA isolation system (Promega) を用いて抽出した。逆転写反応は ReverTra Ace qPCR RT Kit (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて行った。リアルタイム PCR には FastStart Universal SYBR Green Master kit (Roche)



および Applied Biosystems StepOne Plus real-time PCR system (Life Technologies, Carlsbad, CA) を使用した。対象とする遺伝子の相対発現量は、G3PDH を対照遺伝子に設定し、 $\Delta\Delta Ct$  法によって算出した。各遺伝子の検出に用いたプライマーは以下の通りである。PDZRN3 ; 5'-CTCGACTCGCTCAGCCGCTG-3' および 5'-CGGGATGCTCTTCAGGCAGCA-3'、PPAR $\gamma$  ; 5'-ATAAAGTCCTTCCCGCTGACCAAAGCC-3' および 5'-GCGGTCTCCACTGAGAATAATGACAGC-3'、STAT5a ; 5'-ATTACACTCCTGTACTTGCGA-3' および 5'-GGTCAAACCTCGCCATCTTGG-3'、STAT5b ; 5'-TCCCCTGTGAGCCCGCAAC-3' および 5'-GGTGAGGTCTGGTCATGACT-3'、C/EBP  $\beta$  ; 5'-CAAGCTGAGCGACGAGTACA-3' および 5'-AGCTGCTCCACCTTCTTCTG-3'、G3PDH ; 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' および 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。

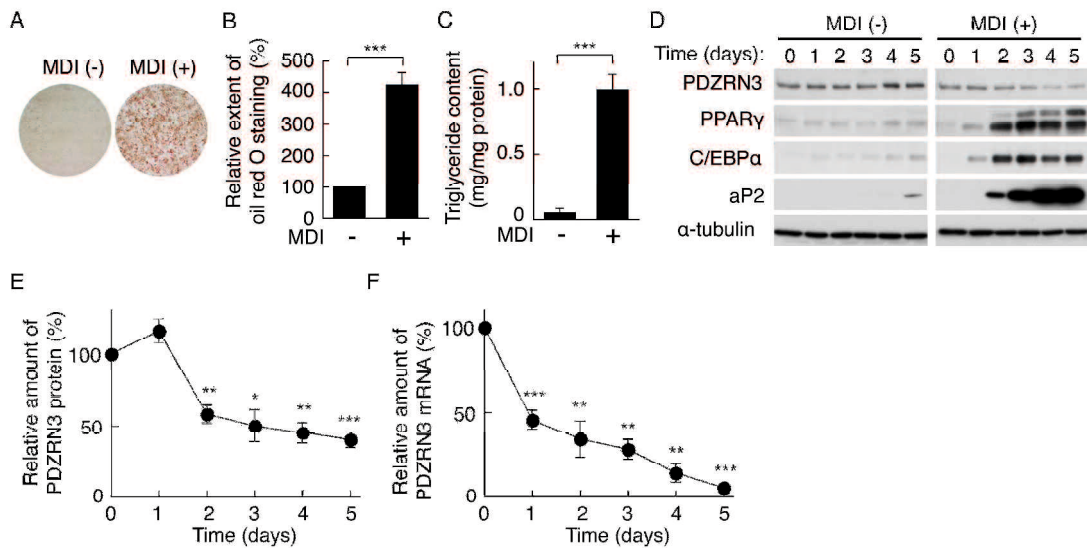
## 統計

データは平均値±標準誤差で表示し、多重比較検定では one-way ANOVA 解析後に事後比較解析を行った。2 グループ間の検定では、two-tailed unpaired Student's *t* test を用いた。P 値が 0.05 未満の場合を統計学上有意な差があると判定した。

## 結果

### 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化時における PDZRN3 の発現低下

3T3-L1 細胞にメチルキサンチン、デキサメタゾン、インスリン (MDI) のカクテルを加え、脂肪蓄積量の増加、すなわち脂肪細胞への分化が進んでいることを確認した (Fig. 1A-C)。分化により誘導される PPAR $\gamma$  および C/EBP $\alpha$  の蛋白質発現レベルをウェスタンブロットで解析したところ、両者の発現量は分化後 2 日で増加した (Fig. 1D)。aP2 は 2 日目以降さらに増加した。PDZRN3 については、分化後 1 日目に一次的な増加が見られたが、統計学的に有意ではなく、それ以降は蛋白質および mRNA レベルのいずれにおいても発現量の減少が見られた (Fig. E, F)。



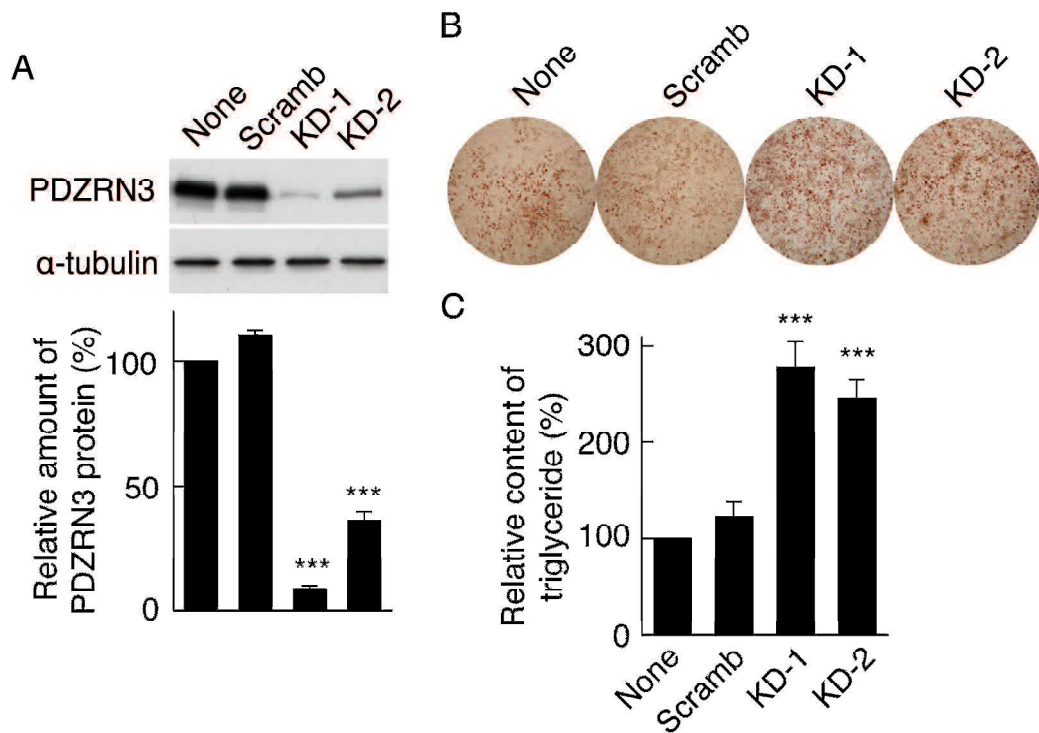
**Fig. 1 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化における PDZRN3 の発現挙動**

(A) 3T3-L1 細胞に MDI を添加し、分化誘導 5 日後の細胞を Oil red O で染色した。MDI 未添加の細胞をコントロールとした。(B) Oil red O 染色度を画像解析によって測定した。MDI 未添加細胞での値を基準とした相対値 (%) を示す。(C) 分化誘導 7 日後の細胞でトリグリセリド含有量を測定した。B および C では、それぞれ 10 回および

9回の独立した実験のデータから平均値と標準誤差を算出した。(D) 分化誘導後、図中に示す日数でサンプルを調製し、PDZRN3 抗体、PPAR $\gamma$  抗体、C/EBP $\alpha$  抗体、aP2 抗体、 $\alpha$ -tubulin 抗体 (コントロール) によってウエスタンブロット解析を行った。(E) Dと同様のブロットで検出されたPDZRN3のバンド強度を測定した。 $\alpha$ -tubulinのバンド強度で補正し、分化誘導前に対する相対値 (%) で示した。5回の独立した実験のデータから平均値と標準誤差を算出した。(\* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\*  $P$  < 0.001 versus time 0) (F) 分化誘導後、図中に示す日数で細胞から total RNA を調製し、リアルタイム PCR 解析を行った。G3PDH 遺伝子で補正し、分化誘導前に対する相対値 (%) で示した。3-6 回の独立した実験のデータから平均値と標準誤差を算出した。(\*\* $P$  < 0.01, \*\*\*  $P$  < 0.001 versus time 0)

### PDZRN3 発現抑制による脂肪細胞分化の亢進

次に、脂肪細胞分化における PDZRN3 の役割を調べるため、RNA 干渉により PDZRN3 の発現を抑制し 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化に与える効果を調べた。PDZRN3 mRNA に特異的な 2 つの異なる shRNA をそれぞれコードしたアデノウイルス・ベクター 2 種 (KD-1 および KD-2) を 3T3-L1 細胞に感染させて PDZRN3 の発現を抑制した (Fig. 2A)。その細胞を分化させて 5 日目に Oil red O 染色を、7 日目にトリグリセリド量の測定を行った。コントロールの細胞に比べて、PDZRN3 発現抑制細胞では、Oil red O 染色度およびトリグリセリド含量のいずれにおいても有意に増加していた (Fig. 2B、C)。すなわち PDZRN3 の発現抑制は、脂肪生成を増強させることが明らかとなった。

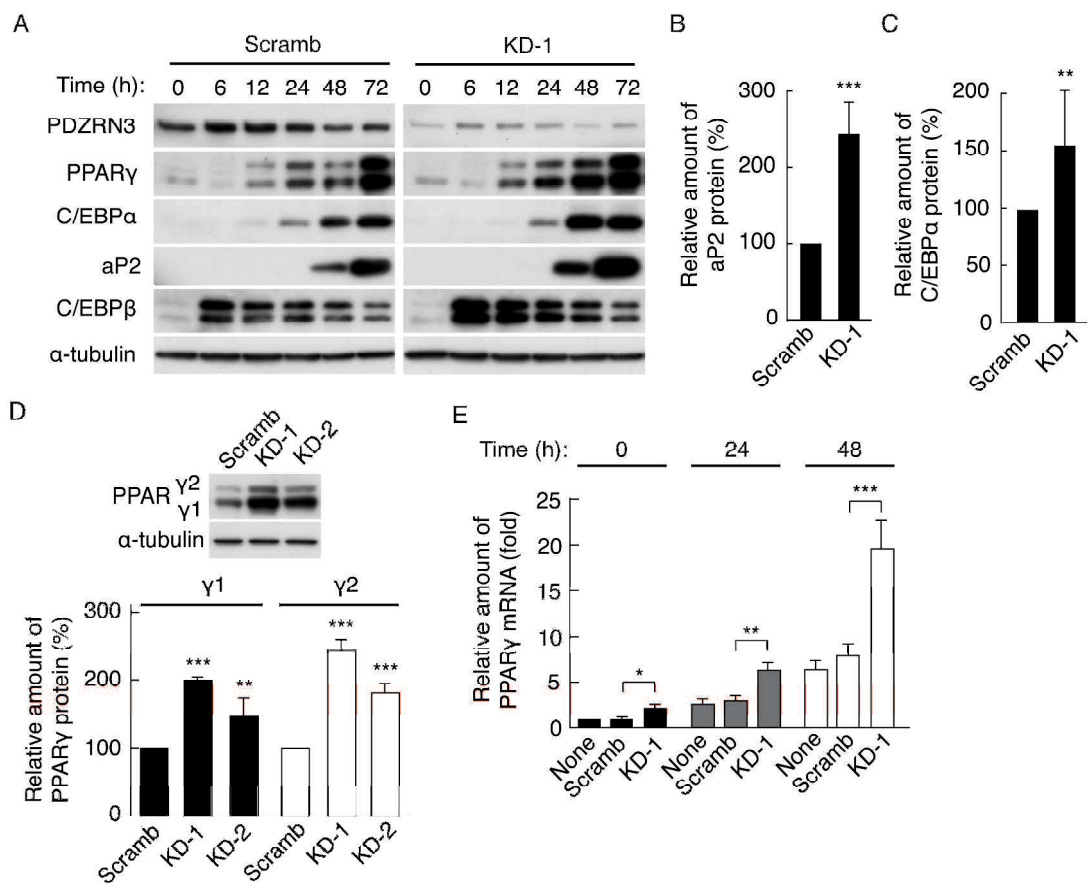


**Fig. 2 3T3-L1 細胞での脂肪細胞分化に対する RNA 干渉を用いた PDZRN3 発現抑制による効果**

(A) PDZRN3 mRNA に特異的な shRNA をコードしているアデノウイルス (KD-1 および KD-2)、または KD-1 配列をスクランブルしたもの (Scramb) を 3T3-L1 細胞に感染させ、それらの細胞について PDZRN3 抗体、 $\alpha$ -tubulin 抗体 (コントロール) を用いたウエスタンブロット解析を行った (上)。ブロットで検出されたバンド強度をデンストメトリーで数値化し、 $\alpha$ -tubulin で補正し、PDZRN3 の発現量を定量した。グラフは、ウイルス非感染細胞で得られた数値に対する相対値 (%) を示す (下)。17 回の独立した実験のデータから平均値と標準誤差を算出した。 (\*\*\*)  $P < 0.001$  versus the value for Scramb.) (B, C) 分化誘導 5 日後の細胞を Oil red O で染色し (B)、分化誘導 7 日後の細胞のトリグリセリド含有量を測定した (C)。C では、8~12 回の独立した

実験のデータから平均値と標準誤差を算出した。 (\*\*\*) $P < 0.001$  versus the value for Scramb.)

C/EBP $\alpha$  と aP2 の発現量を分化早期に調べた結果、コントロール細胞に比べて PDZRN3 発現抑制細胞では発現量が増加していた (Fig. 3A-C)。また、C/EBP $\alpha$  と aP2 を上流で制御する PPAR $\gamma$  の発現は、PDZRN3 発現抑制によって mRNA および蛋白質レベルいずれにおいても増加していた (Fig. 3A, D, E)。

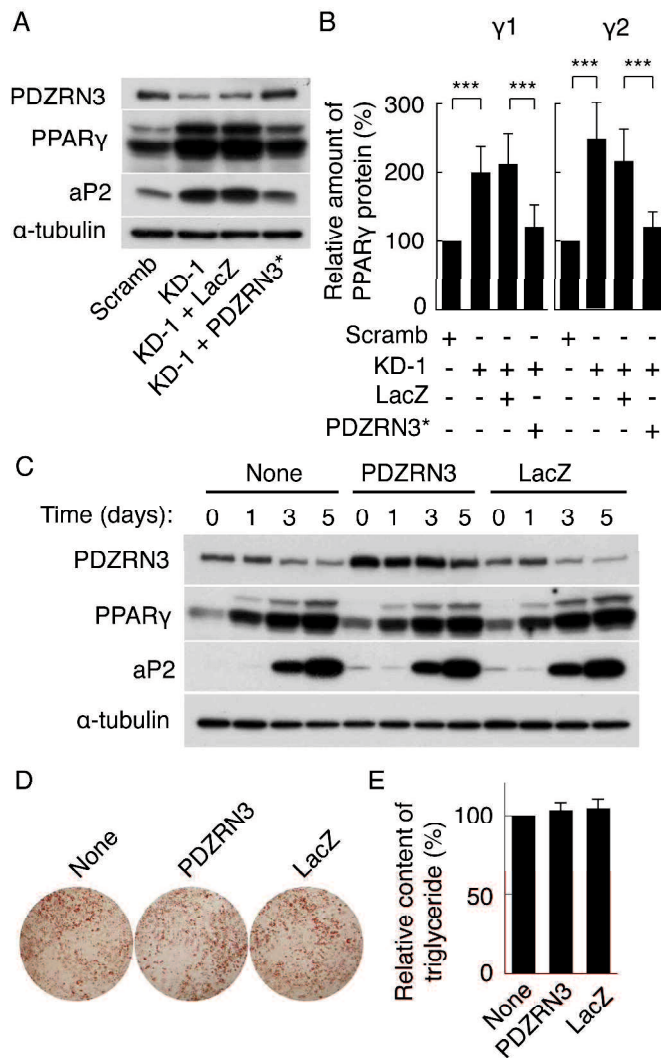


**Fig. 3 脂肪細胞分化過程における aP2、C/EBP $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\beta$  の発現に与える PDZRN3 発現抑制の効果**

(A) PDZRN3 (KD-1 または KD-2) またはコントロール (Scramb) の shRNA をコードするアデノウイルスを感染させた 3T3-L1 細胞に、MDI を添加して脂肪細胞へと分化させた。分化誘導後、図中に示す日数で PDZRN3 抗体、PPAR $\gamma$  抗体、C/EBP $\alpha$  抗体、aP2 抗体、C/EBP $\beta$  抗体、 $\alpha$ -tubulin 抗体 (コントロール) によってウエスタンブロット解析を行った。(B-D) 分化誘導 48 時間後の A と同様のブロットのバンド強度を、aP2 (B)、C/EBP $\alpha$  (C)、PPAR $\gamma$  1 および PPAR $\gamma$  2 (D) について定量した。 $\alpha$ -tubulin をで補正し、コントロール細胞で得られた数値に対する相対値 (%) を示した。8-10 回の独立した実験のデータから平均値と標準誤差を算出した。(\*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 versus Scramb)

(E) A と同様に処理した細胞を分化誘導後、図中に示す時間で total RNA を抽出し、PPAR $\gamma$  の mRNA 量をリアルタイム PCR にて解析した。グラフは、ウイルス非感染細胞の分化誘導前の値を基準とした相対値を示す。4 または 5 回の独立した実験のデータから平均値と標準誤差を算出した。(\* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001)

一方、PDZRN3 発現抑制細胞に、RNAi 耐性の PDZRN3 遺伝子をコードしたアデノウイルスを感染させ、PDZRN3 の発現量を回復させた結果、PDZRN3 発現抑制により増加していた PPAR $\gamma$  および aP2 の発現量が元のレベルに戻った (Fig. 4A, B)。PDZRN3 発現抑制細胞に  $\beta$ -galactosidase (LacZ) をコードしたアデノウイルスを感染させた細胞では、そのような効果は見られなかった。これに対し、RNAi 処理を施していない 3T3-L1 細胞に対する PDZRN3 の過剰発現は、分化誘導時における PPAR $\gamma$  または aP2 の発現に影響を及ぼさなかった (Fig. 4C)。また分化誘導後 5 日目の Oil red O 染色度 (Fig. 4D)、7 日目のトリグリセリド含有量 (Fig. 4E) にも影響を及ぼさなかった。



**Fig. 4** 3T3-L1 細胞における aP2、PPAR $\gamma$  の発現量および脂肪細胞分化に対する PDZRN3 強制発現の効果

(A) PDZRN3 (KD-1) またはコントロール (Scramb) の shRNA をコードしたアデノウイルス、また LacZ もしくは RNAi 耐性の PDZRN3 (PDZRN3\*) 遺伝子をコードしたアデノウイルスを感染させた 3T3-L1 細胞を MDI によって分化誘導し、48 時間後に PDZRN3 抗体、PPAR $\gamma$  抗体、aP2 抗体、 $\alpha$ -tubulin 抗体 (コントロール) でウェスタンブロット解析を行った。(B) A と同様のブロットで PPAR $\gamma$  1 および PPAR $\gamma$  2

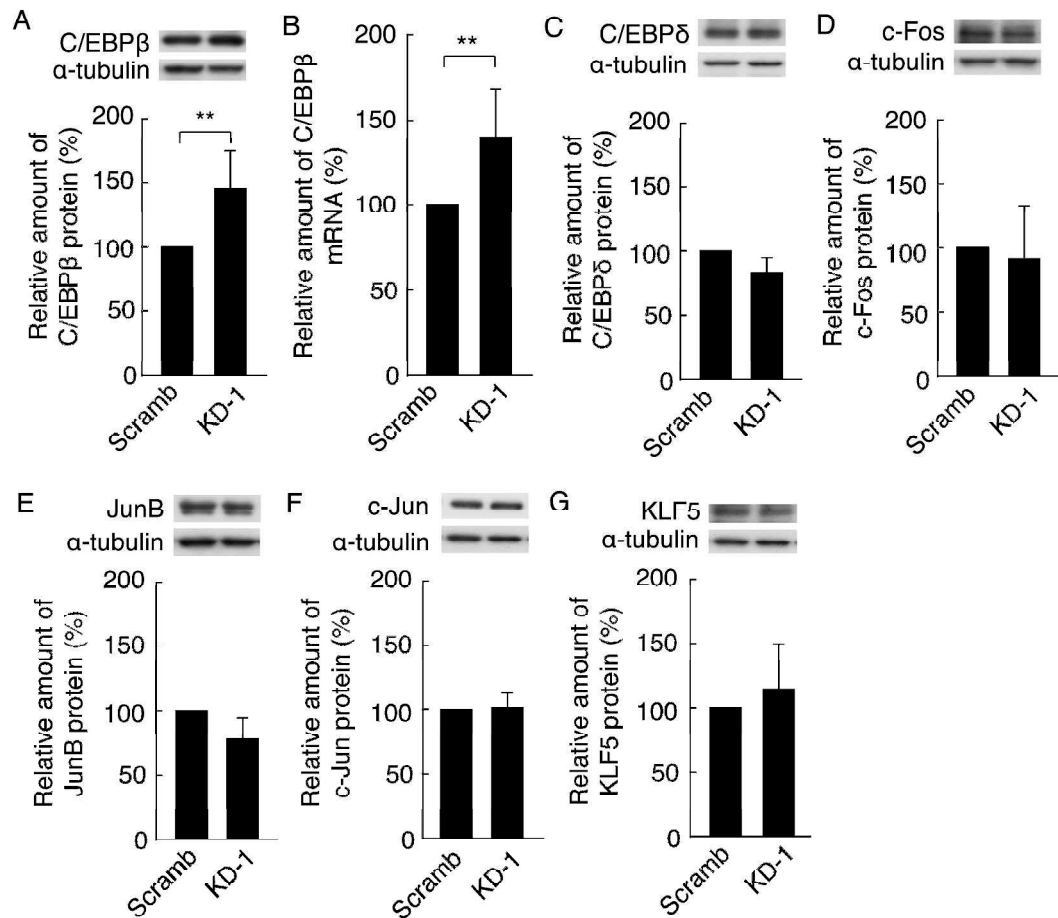
のバンド強度を測定し、 $\alpha$ -tubulin で補正し、コントロール細胞で得られた数値に対する相対値 (%) で示した。8 回の独立した実験のデータから平均値と標準誤差を算出した (\*\*\*) $P < 0.001$ )。 (C-E) PDZRN3 または LacZ をコードするアデノウイルスを 3T3-L1 細胞に感染させ、MDI にて分化誘導した。分化誘導後、図中に示す日数でそれぞれの抗体によってウエスタンブロット解析を行った (C)。また、分化誘導 5 日後の細胞を Oil red O で染色し (D)、分化誘導 7 日後の細胞についてトリグリセリド含有量を測定した (E)。E は、ウイルス非感染細胞で得られた数値に対する相対値 (%) を示しており、6 回の独立した実験のデータから平均値と標準誤差を算出した。

### PDZRN3 発現抑制による STAT5b および C/EBP $\beta$ の発現増加

脂肪分化の初期に見られる PPAR $\gamma$  の発現増加は、AP-1、C/EBP、Krüppel-likefactor (KLF)、STAT 蛋白質を含む様々な転写因子によって仲介される可能性がある。実際、C/EBP  $\beta$  は、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化過程において PPAR $\gamma$  より早期に発現が誘導される (Fig. 3A)。MDI の添加後 6 時間において、C/EBP  $\beta$  の発現量は PDZRN3 発現抑制によって有意に増加していた (Fig. 3A および Fig. 5A)。また、3T3-L1 細胞で MDI 添加後 2 時間でピークになる C/EBP  $\beta$  の mRNA 発現量は [8]、PDZRN3 発現抑制細胞で有意に増加していた (Fig. 5B)。

C/EBP $\delta$  や KLF5、また AP-1 構成要素である c-Fos、JunB、c-Jun の発現は、過去の報告と一致して MDI 添加後 2 時間で誘導された [6, 7]。この際、PDZRN3 発現抑制とコントロールの間で各々の蛋白質の発現量に有意な差は認められなかった (Fig. 5C-G)。



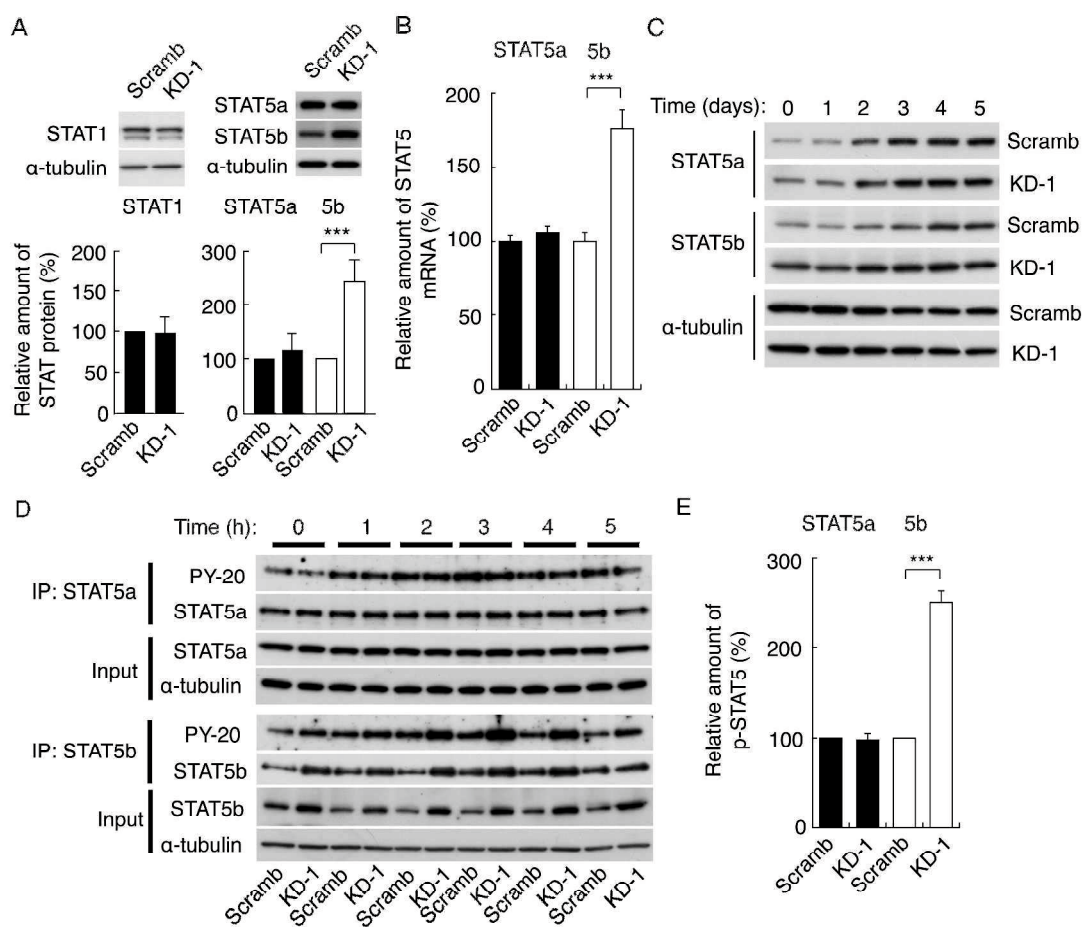


**Fig. 5 MDI 誘導性の転写因子発現に対する PDZRN3 発現抑制の効果**

PDZRN3 (KD-1) またはコントロール (Scramb) の shRNA をコードするアデノウイルスを 3T3-L1 細胞に感染させ、分化誘導 6 時間後 (A) または 2 時間後 (C-G) に C/EBPβ 抗体 (A)、C/EBPδ 抗体 (C)、c-Fos 抗体 (D)、JunB 抗体 (E)、c-Jun 抗体 (F)、KLF5 抗体 (G)、α-tubulin 抗体 (コントロール) でウェスタンブロット解析を行った。各々のバンド強度は、α-tubulin で補正し、コントロール細胞で得られた数値に対する相対値 (%) で示した。4-5 回の独立した実験のデータから平均値と標準誤差を算出した (\*\* $P < 0.01$ )。 (B) MDI 添加後 2 時間の細胞から total RNA を調製し、C/EBPβ の mRNA 量を解析した。G3PDH 遺伝子で補正し、コントロール細胞で得られた数値に対する相対

値 (%) で示した。3 回の独立した実験のデータから平均値と標準誤差を算出した。(\*\* $P < 0.01$ )

PDZRN3 発現を抑制した 3T3-L1 細胞では、分化誘導前からコントロールの細胞に比べて STAT5b の発現に有意な増加が見られた (Fig. 6A)。STAT1 あるいは STAT5a の発現には影響が見られなかった。同様に STAT5b の mRNA 発現量も PDZRN3 発現抑制細胞で増加していたが、STAT5a の mRNA には影響が見られなかった (Fig. 6B)。3T3-L1 細胞における STAT5a および STAT5b の発現は、脂肪分化後期に増加することが報告されている[9] (Fig. 6C)。しかしながら、PDZRN3 発現抑制細胞では、そのような STAT5b の発現増加は見られなかった (Fig. 6C)。これは、分化誘導前に既に発現が増加しているため、それ以上の増加が見られないと考えられる。STAT5a および STAT5b のチロシンリン酸化 (活性化) 量は、コントロール細胞でも分化誘導後に増加し 5 時間後には減少する (Fig. 6D)。PDZRN3 発現抑制細胞では、分化誘導後に著しい STAT5b の活性化が認められた (Fig. 6D, E)。STAT5a ではそのような現象は見られなかった。



**Fig. 6 STAT5 発現と分化誘導後の STAT5 活性化に対する PDZRN3 発現抑制の効果**

(A) PDZRN3 (KD-1) コントロール (Scramb) の shRNA をコードしているアデノウイルスを感染させた 3T3-L1 細胞で、STAT1 抗体、STAT5a 抗体、STAT5b 抗体、 $\alpha$ -tubulin 抗体 (コントロール) によるウェスタンブロット解析を行った。それぞれのバンド強度は、 $\alpha$ -tubulin で補正し、コントロール細胞で得られた数値に対する相対値 (%) で示した。22 回の独立した実験のデータから平均値と標準誤差を算出した (\*\*\*) $P < 0.001$ 。

(B) A と同様に処理した細胞から total RNA を調製し、STAT5a および STAT5b の mRNA 量をリアルタイム PCR にて解析した。コントロール細胞で得られた数値に対する相対値 (%) を示す。13 回の独立した実験のデータから平均値と標準誤差を算出した (\*\*\*) $P < 0.001$ 。(C) A と同様に感染させた細胞を分化誘導し、それぞれの抗体を用いてウェスタンブロットを行った。(D) A と同様に感染させた細胞を分化誘導し、

STAT5a 抗体および STAT5b 抗体を用いて免疫沈降を行った。得られた免疫沈降サンプル (IP) および細胞溶解液 (Input) について、STAT5a 抗体、STAT5b 抗体、リン酸化チロシン抗体 (PY-20)、 $\alpha$ -tubulin 抗体 (コントロール) を用いてウエスタンブロット解析を行った。(E) D の分化誘導 3 時間後に相当するリン酸化 STAT5a およびリン酸化 STAT5b について、バンド強度をデンストメトリーで測定した。コントロール細胞で得られた数値に対する相対値 (%) をグラフに示した。6 回の独立した実験のデータから平均値と標準誤差を算出した (\*\*\*) $P < 0.001$ 。

## 考察

本研究は、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化において、PDZRN3 が分化のマスターレギュレーターである PPAR $\gamma$  を抑制し、分化を負に制御することを示した。PPAR $\gamma$  は、分化刺激で誘導されてくるいくつかの転写因子の制御下にあるが [6, 7]、その因子の一つに STAT5 がある。STAT5 は脂肪分化の初期にチロシンリン酸化を受けると、核内に移行して PPAR $\gamma$  の発現を誘導し、脂肪分化を促進させる働きを持つ [10, 11, 12]。PDZRN3 発現抑制細胞では、STAT5 の中でも特に STAT5b の発現が増加し、それに伴ってリン酸化 STAT5b のレベルも増加することが分かった。即ち、PDZRN3 は STAT5b を介して PPAR $\gamma$  の発現を調節していることが示された。加えて、PPAR $\gamma$  の発現誘導に重要な役割を持つ転写因子 C/EBP $\beta$  も MDI により誘導されるが [13, 14, 15]、その発現量は PDZRN3 発現抑制細胞で増加していることが分かった。これらの結果は、PDZRN3 が STAT5b や C/EBP $\beta$  の発現を制御することで 3T3-L1 細胞の脂肪分化を制御していることを示唆する。

間葉系幹細胞は、脂肪細胞の他、筋管細胞や骨芽細胞などに分化する能力を有する。当研究室では、それらの分化過程における PDZRN3 の機能解析を行ってきた。C2C12 細胞の筋分化および骨芽細胞分化では、いずれも PDZRN3 発現は分化につれて増加していた [2, 4]。特に骨芽細胞分化では PDZRN3 は分化の早期 (<12 時間) に誘導されるのに対して、筋分化ではより遅い時間帯 (>48 時間) に誘導される。これらと対照的に、3T3-L1 の脂肪細胞分化における PDZRN3 発現は、分化につれて減少することが本研究で示された。PDZRN3 の分化への寄与という観点では、骨芽細胞分化および脂肪細胞分化では分化を抑制するように機能しているが、筋分化では必須因子として働く [2, 4]。つまり筋分化では、分化時に増加し分化への必須の因子として機能するが、

骨芽細胞分化では、増加した PDZRN3 が分化を抑制し negative feedback 系として機能している。今回の脂肪細胞分化では、分化阻害因子である PDZRN3 が減少することにより脂肪分化を促進するという合目的な機構が働いていることが明らかになった。PDZRN3 は、異なる刺激にそれぞれ応答してその発現を変え、筋、骨、脂肪分化の 3 経路でそれぞれ異なる役割を果たしている。このような複数の機能を発現する理由の一つに、PDZRN3 に複数の相互作用相手が存在する可能性が考えられる。実際、PDZRN3 は 2 つの PDZ ドメインや C 末端の PDZ 結合モチーフを介して複数の蛋白質と相互作用することが可能である。

以前、C2C12 細胞において、PDZRN3 の発現抑制が Wnt 受容体である LRP6 (low density lipoprotein receptor-related protein 6) の発現を増加し、結果として Wnt シグナルが増強されて骨芽細胞分化が促進されることを明らかにした [4]。しかし、3T3-L1 細胞では、PDZRN3 発現抑制は LRP6 発現に影響を与えなかった (data not shown)。さらに PDZRN3 発現抑制による分化促進は、Wnt3a 刺激や Wnt シグナル阻害因子 DKK の影響を受けなかった (data not shown)。従って、Wnt シグナルは前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化を阻害することが報告されているが [16]、3T3-L1 細胞での PDZRN3 による脂肪分化の制御機構には LRP6 は寄与しないと考えられる。

PDZRN3 が脂肪分化を抑制することから、PDZRN3 の過剰発現は分化抑制を引き起こすのではないかと予測された。しかしながら、3T3-L1 細胞での PDZRN3 過剰発現は、Oil red O 染色、トリグリセリド測定をはじめ PPAR $\gamma$  や aP2 の発現量解析を行った結果、脂肪分化への抑制効果を示さなかった (Fig. 4C-E)。PDZRN3 の過剰発現が 3T3-L1 細胞の脂肪分化に影響を与えない理由は不明だが、PDZRN3 と相互作用相手との量比による可能性が考えられる。PDZRN3 は 1 つまたはそれ以上の結合蛋白質と相互作用することにより脂肪分化を抑制することが推測される。3T3-L1 細胞において、それらの結合蛋白質の発現レベルが内在性 PDZRN3 の発現レベルと同量もしくは少な

いと、それら相手蛋白質の量を凌駕する量の PDZRN3 を過剰発現させても脂肪分化に影響を与えない。一方、PDZRN3 の発現を抑制した細胞に PDZRN3 を発現させる、すなわち PDZRN3 を本来の量に戻すと、PDZRN3 の発現抑制で見られた分化亢進効果は消失した (Fig. 4A and B)。

本研究では、3T3-L1 細胞において PDZRN3 は STAT5b の発現レベルの重要な決定因子であることが示された。PDZRN3 発現抑制による STAT5b の発現量増加は、MDI によって活性化された STAT5b 量の増強、すなわちチロシンリン酸化 STAT5b 量に反映されていた。一方で PDZRN3 発現抑制は、STAT5a 発現量および脂肪細胞分化初期に見られる STAT5a の活性化には影響を及ぼさなかった。STAT5a、STAT5b の両者は、様々な組織において、その相対量に違いがあることが報告されており [17]、両者はそれぞれ異なる転写調節を受けている可能性がある。しかし、3T3-L1 細胞において STAT5b の発現量がどのように調節されているのか、その調節に PDZRN3 がどのように寄与するのかは不明である。

STAT5a、STAT5b 両蛋白質は、脂肪分化において重要な役割を果たしている。STAT5a および STAT5b は、いずれも 3T3-L1 細胞の脂肪分化早期の段階で活性化 (チロシンリン酸化) される [12]。また、STAT5a または STAT5b のノックアウトマウスでは、fat pad のサイズが減少する [18]。STAT5a と STAT5b の機能的相違についても幾つかの研究がなされている。例えば、繊維芽細胞に STAT5a のみ、あるいは STAT5a と STAT5b を共発現すると脂肪細胞に分化するが、STAT5b のみの発現では分化されない [11]。本研究では、PDZRN3 は STAT5b の発現を調節するが、STAT5a は調節されないこと、PDZRN3 による脂肪分化の調節では STAT5b が重要な役割を担うことを明らかにした。

今回、MDI 刺激で惹起される STAT5b の活性化および C/EBP  $\beta$  の発現が、PDZRN3 の発現抑制によって増加することを見出した。PPAR  $\gamma$  は脂肪分化を強力に促進させる

転写因子であり、STAT5b および C/EBP  $\beta$  は共に PPAR  $\gamma$  の発現を誘導する [6, 7]。以前の研究で、STAT5 の活性化は、成長ホルモンシグナルと密接に関連していることや [19, 20]、活性化された STAT5 がプロテアソームに依存した経路によって減少することが報告されている [21]。一方、C/EBP  $\beta$  は、その発現誘導に cAMP regulatory element-binding protein が関与することが報告されていることから [22]、PDZRN3 が cAMP シグナルを介して C/EBP  $\beta$  の発現制御している可能性がある。或いは STAT5 が C/EBP  $\beta$  の発現や PPAR  $\gamma$  遺伝子プロモーターの転写活性を増加させることも報告されており [19, 23]、PDZRN3 発現抑制による STAT5b 発現量の増加が C/EBP  $\beta$  の発現を増加させている可能性も考えられる。PDZRN3 が STAT5b および C/EBP  $\beta$  の発現をどのように制御するのか、その解明にはさらなる研究が必要である。

## 結論

本研究では、マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 の脂肪細胞分化において、PDZRN3 の発現抑制が分化を促進することを見出した。その分子機序は、PDZRN3 発現抑制によって STAT5b や C/EBP  $\beta$  の発現が増強され、その結果、脂肪分化のマスターレギュレーターである PPAR  $\gamma$  の発現が増加すること ~~によること~~ が明らかになった。これらの結果は、PDZRN3 が脂肪細胞分化を抑制的に制御しており、脂肪細胞分化に新たな制御機構が存在することが示された。



## 文献

- [1] **Kato M.** Identification and characterization of PDZRN3 and PDZRN4 genes in silico. *Int J Mol Med* 13 (2004) 607-613
- [2] **Ko JA, Kimura Y, Matsuura K, Yamamoto H, Gondo T, and Inui M.** PDZRN3 (LNX3, SEMCAP3) is required for the differentiation of C2C12 myoblasts into myotubes. *J Cell Sci* 119 (2006) 5106-5113
- [3] **Lu Z, Je HS, Young P, Gross J, Lu B, and Feng G.** Regulation of synaptic growth and maturation by a synapse-associated E3 ubiquitin ligase at the neuromuscular junction. *J Cell Biol* 177 (2007) 1077-1089
- [4] **Honda T, Yamamoto H, Ishii A, and Inui M.** PDZRN3 negatively regulates BMP-2-induced osteoblast differentiation through inhibition of Wnt signaling. *Mol Biol Cell* 21 (2010) 3269-3277
- [5] **Dente L, Gestri G, Tsang M, Kudoh T, Wilson SW, Dawid IB, and Andreazzoli M.** Cloning and developmental expression of zebrafish pdzrn3. *Int J Dev Biol* 55 (2011) 989-993
- [6] **Farmer SR.** Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* 4 (2006) 263-273
- [7] **White UA and Stephens JM.** Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 318 (2010) 10-14
- [8] **Ferguson BS, Nam H, Hopkins RG, and Morrison RF.** Impact of reference gene selection for target gene normalization on experimental outcome using real-time qRT-PCR in adipocytes. *PLoS One* 5 (2010) e15208
- [9] **Stephens JM, Morrison RF, and Pilch PF.** The expression and regulation of STATs during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 271 (1996) 10441-10444

- [10] **Baugh JE, Jr., Floyd ZE, and Stephens JM.** The modulation of STAT5A/GR complexes during fat cell differentiation and in mature adipocytes. *Obesity (Silver Spring)* 15 (2007) 583-590
- [11] **Floyd ZE and Stephens JM.** STAT5A promotes adipogenesis in nonprecursor cells and associates with the glucocorticoid receptor during adipocyte differentiation. *Diabetes* 52 (2003) 308-314
- [12] **Nanbu-Wakao R, Morikawa Y, Matsumura I, Masuho Y, Muramatsu MA, Senba E, and Wakao H.** Stimulation of 3T3-L1 adipogenesis by signal transducer and activator of transcription 5. *Mol Endocrinol* 16 (2002) 1565-1576
- [13] **Cao Z, Umek RM, and McKnight SL.** Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 5 (1991) 1538-1552
- [14] **Wu Z, Bucher NL, and Farmer SR.** Induction of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBP  $\beta$ , C/EBP  $\delta$ , and glucocorticoids. *Mol Cell Biol* 16 (1996) 4128-4136
- [15] **Yeh WC, Cao Z, Classon M, and McKnight SL.** Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev* 9 (1995) 168-181
- [16] **Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, and MacDougald OA.** Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289 (2000) 950-953
- [17] **Hennighausen L and Robinson GW.** Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B. *Genes Dev* 22 (2008) 711-721
- [18] **Teglund S, McKay C, Schuetz E, van Deursen JM, Stravopodis D, Wang D, Brown M, Bodner S, Grosveld G, and Ihle JN.** Stat5a and Stat5b proteins have essential

- and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 93 (1998) 841-850
- [19] **Kawai M, Namba N, Mushiake S, Etani Y, Nishimura R, Makishima M, and Ozono K.** Growth hormone stimulates adipogenesis of 3T3-L1 cells through activation of the Stat5A/5B-PPAR  $\gamma$  pathway. *J Mol Endocrinol* 38 (2007) 19-34
- [20] **Shang CA and Waters MJ.** Constitutively active signal transducer and activator of transcription 5 can replace the requirement for growth hormone in adipogenesis of 3T3-F442A preadipocytes. *Mol Endocrinol* 17 (2003) 2494-2508
- [21] **Wang D, Moriggl R, Stravopodis D, Carpino N, Marine JC, Teglund S, Feng J, and Ihle JN.** A small amphipathic  $\alpha$ -helical region is required for transcriptional activities and proteasome-dependent turnover of the tyrosine-phosphorylated Stat5. *EMBO J* 19 (2000) 392-399
- [22] **Zhang JW, Klemm DJ, Vinson C, and Lane MD.** Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  gene during adipogenesis. *J Biol Chem* 279 (2004) 4471-4478
- [23] **Wakao H, Wakao R, Oda A, and Fujita H.** Constitutively active Stat5A and Stat5B promote adipogenesis. *Environ Health Prev Med* 16 (2011) 247-252