

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

# 発生段階での PPAR $\gamma$ ノックアウトマウスの 選択的スプライシングバリエント制御解明 ～脂肪細胞分化誘導型 PPAR $\gamma$ 1 遺伝子特異的プロモーター ノックアウトマウスの樹立～

研究代表者 井上 郁夫 (大学病院 内分泌内科・糖尿病内科)

## 緒言

ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 PPAR  $\gamma$  は核内受容体であり、レチノイドX受容体 (RXR) とヘテロダイマーを形成して、リガンド依存的に標的遺伝子のプロモーターに結合し、コリプレッサー、コアクチベーターと協調して標的遺伝子の転写量を調節する。PPAR  $\gamma$  は脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであり、脂質代謝、インスリン感受性、動脈硬化等メタボリックシンドロームに関わる重要な因子として注目されている。この PPAR  $\gamma$  は哺乳類においていくつかの選択的スプライシングバリエントが存在することが知られ、マウスとヒトでそれぞれ報告されていて、異なるプロモーターで、それらの発現が厳格に制御されている。マウスの PPAR  $\gamma$  のスプライシングバリエントは、PPAR  $\gamma$  1 と PPAR  $\gamma$  2 のみで、一方、ヒトでは PPAR  $\gamma$  1, PPAR  $\gamma$  2, PPAR  $\gamma$  3, PPAR  $\gamma$  4 のみである<sup>1)</sup>。しかしながら、我々は新たに、マウスにおいてスプライシングバリエント PPAR  $\gamma$  1sv (accession number AB644275) を見出し、さらに、ヒトにおいてもスプライシングバリエント新規 hPPAR  $\gamma$  (accession number AB472042.1) を見出した。特に、現在、マウス胚において PPAR  $\gamma$  の3つのバリエントのうち、PPAR  $\gamma$  1sv が最も多く発現し、遅れて、PPAR  $\gamma$  1, PPAR  $\gamma$  2 の発現が増加することを見いだしている<sup>2)</sup>。そこで今回我々は、マウス胚における PPAR  $\gamma$  の3つのバリエントの発生段階の選択的スプライシングバリエントの制御機構とその発現制御メカニズムを解明するため、まず、マウスにおいて、それぞれの特異的プロモーターを欠失させたノックアウト (KO) マウスを樹立しようと試みた。

## 材料と方法

Cre/lox と FRT/FLP の system で targeting construct を構築 (図 1A), エレクトロポレーションのために、株式会社トランスジェニック社 (神戸) に依頼する。構築したそのベクター DNA を導入した ES 細胞を、薬剤 (Neomycin) 選択により、Neomycin 耐性 ES 細胞を取得し、PCR による導入遺伝子を解析し、陽性の ES 細胞株を区別し得る。再度、株式会社トランスジェニック社 (神戸) で、ジャームライン・トランスミッションなどによりキメラマウス作成を依頼し、KO マウスを構築し、ES 細胞寄与率の高いキメラマウスと、野生型マウスと交配し、ヘテロ接合体型マウスを同定する。次に埼玉医科大学中央研究施設実験動物施設にて、誘導性 Cre マウス (B6;CBA-Tg(CAG-Cre)47Imeg, 熊本大学 生命科学系事務ユニット) との交配により、PPAR  $\gamma$  1sv のプロモーター領域のエクソン (エクソン C) を欠失させる。

## 結果

Cre/lox と FRT/FLP の system で構築した targeting construct を図 1A で示す。エクソン C を loxP 配列で挟んだ Targeting Vector を作成・エレクトロポレーションのために、株式会社トランスジェニック社 (神戸) に依頼し、Targeting Vector DNA を ES 細胞に導入、Neomycin 薬剤耐性 ES 細胞を取得 (356 クローン) した。その中から、3 種の陽性の ES 細胞株を区別し、8 細胞期胚と ES 細胞のアグリゲーションによるキメラマウスを作製した。次に、ES 細胞寄与率の高い、exon C flox アレルが germline transmission したキメラマウスと、野生型マウスと交配し、ヘテロ接合体型マウスを作成し、これらのマウスからホモ接合体型マウス、

ヘテロ接合体型マウス, 野生型マウスをそれぞれ同定した。これらの同定は, *LoxP* primer set (図 1A) で PCR することでそれぞれを区別した (図 1B)。positive control としてカルシウム非依存性ホスホリパーゼ A2 (iPLA2) を用い, *loxP* 配列を含む場合 (700 bp) と *loxP* 配列を含まない場合 (500 bp) の PCR 産物でホモ接合体型マウス, ヘテロ接合体型マウス, 野生型マウスを区別した (図 1B)。次に得られたホモ接合体型マウス, exonC flox マウスに, Cre 組換え酵素を発現するトランスジェニックマウス, 誘導性 Cre マウス (B6;CBA-Tg(CAG-Cre)47Imeg) を交配させ, PPAR  $\gamma$  1sv のプロモーター領域のエクソン C を欠失させた。LoxP primer set に加えて Neo primer (図 1A) も加え, PPAR  $\gamma$  1sv (エ

クソン C) プロモーター領域欠失ホモ接合体型マウス・ヘテロ接合体型マウスを, 欠失されていない野生型マウスと区別した (図 1C)。次に, PPAR  $\gamma$  1sv (エクソン C) プロモーター領域欠失ホモ接合体型マウスとそのヘテロ接合体型マウスを区別するため, 再度, *LoxP* primer set を用いた。PPAR  $\gamma$  1sv (エクソン C) プロモーター領域欠失ホモ接合体型マウスは *loxP* 配列を含むので PCR 産物は 700 bp を示し, そのヘテロ接合体型マウスは誘導性 Cre マウス由来の *loxP* 配列を含まない PCR 産物 500 bp と, PPAR  $\gamma$  1sv (エクソン C) プロモーター領域欠失ヘテロ接合体型マウス由来の *loxP* 配列を含む PCR 産物 700 bp を示すことで区別した。

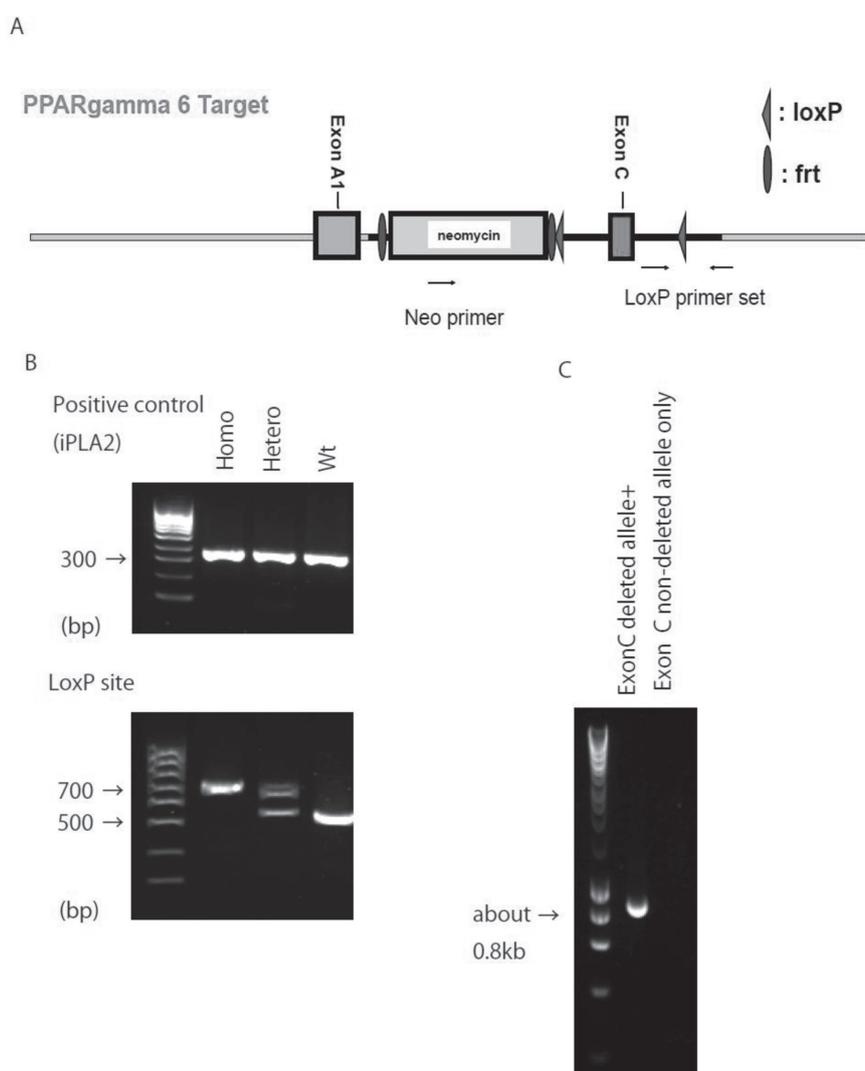


図 1. Cre/*lox* と FRT/FLP の system で構築した targeting construct とそれによるノックアウト (KO) マウスの同定。Cre/*lox* と FRT/FLP の system で構築した targeting construct と設定した primer の部位 (図 1A)。LoxP primer set (図 1A) で PCR すると, ホモ接合体型マウスでは *loxP* が挿入されているので PCR 産物は 700 bp となり, 野生型マウスでは *loxP* が挿入されていないので, PCR 産物は 500 bp となり, ヘテロ接合体型マウスの PCR 産物は 500 bp と 700 bp となり同定できる (図 1B)。LoxP primer set に加え Neo primer (図 1A) により, エクソン C のプロモーター領域を欠失したマウスでは 0.8 kb の PCR 産物が得られる。理由が明らかでないが, 欠失していないマウスでの LoxP primer set と Neo primer による PCR 産物は, 得られない (図 1C)。

考 察

先に述べたが、PPAR  $\gamma$  は哺乳類においていくつかの選択的スプライシングバリエントが存在することが知られ、マウス(図2)とヒト(図3)でそれぞれ報告されていて、異なるプロモーターで、それらの発現が厳格に制御されている。マウスPPAR  $\gamma$  には、ヒトと同様に、今までPPAR  $\gamma$  1およびPPAR  $\gamma$  2、以上2つのアイソフォーム(選択的スプライシングバリエント)が知られている(図2)。PPAR  $\gamma$  1の発現はエクソンA1

から転写され、多くの組織でユビキタスにみられ、脂肪細胞分化誘導に関わらないと言われている。一方、PPAR  $\gamma$  2はエクソンBから転写され、脂肪組織に特異的に発現しており主に脂肪細胞分化誘導に関わる、とされている。また、翻訳開始コドン(ATG)がエクソンBとエクソンE1にあるため(図3)、PPAR  $\gamma$  2蛋白の分子量はPPAR  $\gamma$  1蛋白のそれより若干長い(図3, 4)。

我々は、以前から報告されたPPAR  $\gamma$  1と異なるプロモーターである新規なスプライシングバリエントを発見し<sup>3)</sup>、特許とした<sup>4)</sup>。これが、PPAR  $\gamma$  2と同様

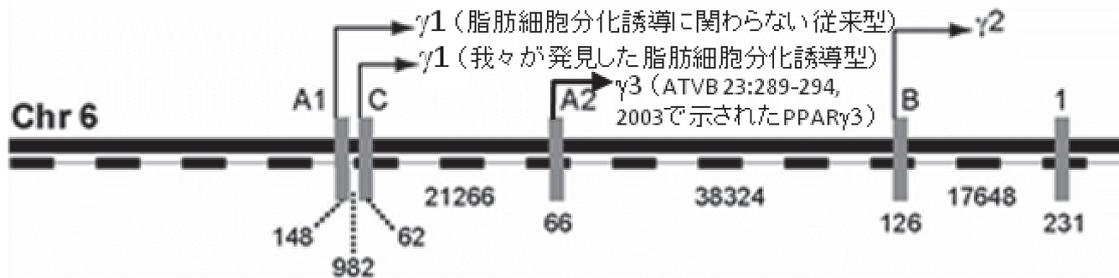


図2. マウスPPAR  $\gamma$  (mPPAR  $\gamma$ ) の選択的スプライシングバリエントのプロモーター開始部位。脂肪細胞分化誘導に関わらないとされる従来型のmPPAR  $\gamma$  1と、我々が見出した脂肪細胞分化誘導に関わるmPPAR  $\gamma$  1(脂肪細胞分化誘導型 Ppar  $\gamma$  1sv)。それぞれのプロモーター開始部位が異なる。Meirhaegheらが報告しているmPPAR  $\gamma$  3のプロモーター開始部位も示した。

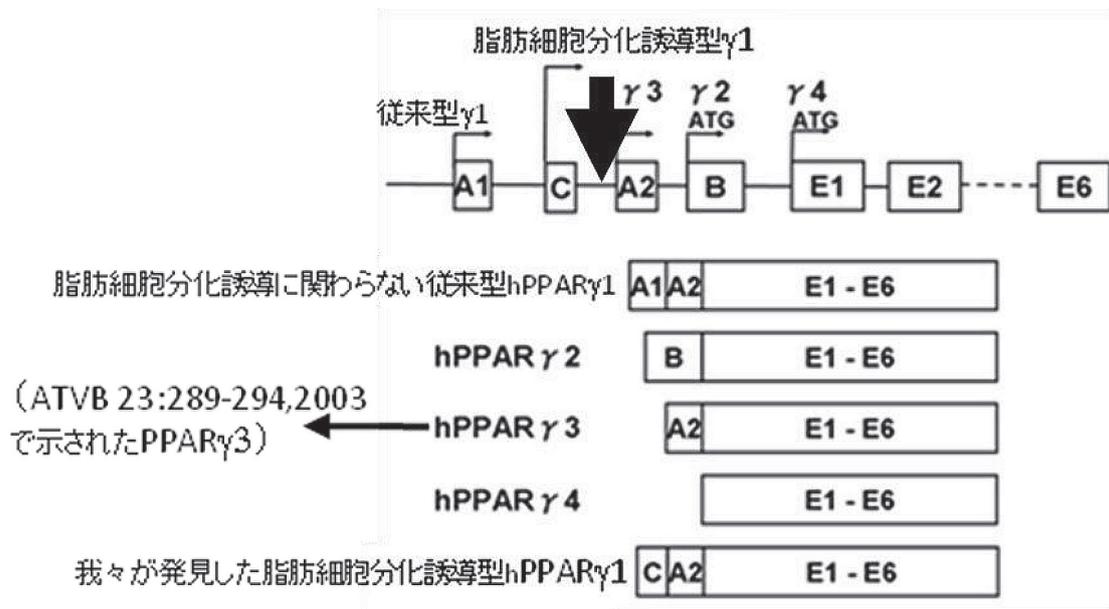


図3. ヒトPPAR  $\gamma$  (hPPAR  $\gamma$ ) の選択的スプライシングバリエント。ヒトもマウスと同様に認められる。特に、Meirhaegheらが報告しているhPPAR  $\gamma$  3のプロモーター開始部位と産物を矢印で示した。我々が見出した脂肪細胞分化誘導に関わるhPPAR  $\gamma$  1(脂肪細胞分化誘導型 Ppar  $\gamma$  1sv)の選択的スプライシングバリエントのサイズは、脂肪細胞分化誘導に関わらないとされる従来型のhPPAR  $\gamma$  1と同程度を示す。翻訳開始コドン(ATG)がaxonE1にあるため脂肪細胞分化誘導型 Ppar  $\gamma$  1svと従来型のhPPAR  $\gamma$  1の産生される蛋白は同じとなる。

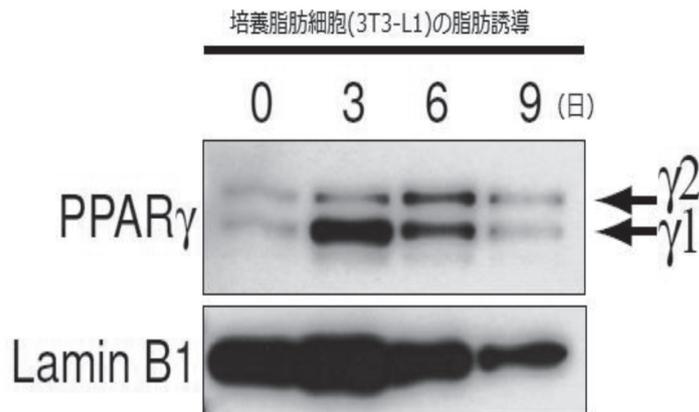


図4. マウスPPAR  $\gamma$  1とPPAR  $\gamma$  2の培養細胞での脂肪誘導した際の蛋白発現の違い(文献2から引用). 翻訳開始コドン(ATG)がaxonBとaxonE1にあるため(図3), PPAR  $\gamma$  2蛋白の分子量はPPAR  $\gamma$  1蛋白のそれより若干長い. 我々が見出した脂肪細胞分化誘導に関わるmPPAR  $\gamma$  1(脂肪細胞分化誘導型 Ppar  $\gamma$  1sv)の蛋白発現は, 脂肪誘導3日目に著しく増加し, 脂肪誘導9日目には, mPPAR  $\gamma$  2と同程度に低下する.

に脂肪細胞分化誘導に関わることを証明<sup>2)</sup>したので Ppar  $\gamma$  1svと名付け, 今回はさらに Ppar  $\gamma$  1svを脂肪細胞分化誘導型 Ppar  $\gamma$  1svとさらに名付けた.

今後, 得られたマウスはNeomycin 耐性遺伝子カセットを外すため, Flpトランスジェニックマウス(B6;D2-Tg(CAG-Flp)18Imeg, 熊本大学 生命科学系事務ユニット)との交配により, さらにNeomycin耐性遺伝子を欠失させる予定である. さらに, 脂肪細胞特異的なエクソンCをKOさせるため, 脂肪細胞特異的Creレコンビナーゼ(Cre)を発現するトランスジェニックマウスを入手して交配して, 解析を進める. 加えて, 現在, exonA1floxマウス作成が終了しているので, 上記と同様に, エクソンA1(図1A)のみを欠損したノックアウトマウス, エクソンA1およびCの両方(図1A)を欠損したKOマウス, それぞれのマウスの作成を試み, 比較検討を進める.

今回, 新リポ蛋白質の粒子径の決定法及びリポ蛋白質の粒子マーカーも確立したので<sup>5)</sup>, この該当遺伝子の特異的プロモーターのKOマウスの血中脂質のプロファイルの特徴も明らかとする.

#### 参考文献

- 1) Meirhaeghe A, Fajas L, Gouilleux F, Cottel D, Helbecque N, Auwerx J, Amouyel P. A functional polymorphism in a STAT5B site of the human PPAR gamma 3 gene promoter affects height and lipid metabolism in a French population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:289-94.
- 2) Takenaka Y, Inoue I, Nakano T, Shinoda Y, Ikeda M, Awata T, Katayama S. A novel splicing variant of peroxisome proliferator-activated

receptor-  $\gamma$  (Ppar  $\gamma$  1sv) cooperatively regulates adipocyte differentiation with Ppar  $\gamma$  2. *PLoS One* 2013;8:e65583.

- 3) Takahashi S, Inoue I, Nakajima Y, Seo M, Nakano T, Kumagai M, Yang F, Komoda T, Awata T, Ikeda M, Katayama S. A promoter in the novel exon of hPPAR  $\gamma$  directs the circadian expression of PPAR  $\gamma$ . *J Atheroscler Thromb* 2010;7:73-83.
- 4) 【発明の名称】新規 PPAR  $\gamma$  プロモーター配列, 及びその応用【出願人】学校法人埼玉医科大学, 独立行政法人産業技術総合研究所【発明者】池田正明, 井上郁夫, 高橋誠一郎, 中島芳浩【特願番号】特願2009-116845【出願日】2009年5月13日
- 5) 【発明の名称】新リポ蛋白質の粒子径の決定法及びリポ蛋白質の粒子マーカー【出願人】学校法人埼玉医科大学, 株式会社明日香特殊検査研究所【発明者】井上郁夫, 高橋誠一郎, 金澤敏行, 松田武英【特願番号】特願2012-91395【出願日】2012年3月27日

#### 研究成果リスト

##### 論文

- 1) Yang F, Inoue I, Xu H, Kumagai M, Piao C, Takahashi S, Nakajima Y, Ikeda M. Real-Time Analysis of the Circadian Oscillation of the Rev-Erb  $\beta$  Promoter. *J Atheroscler Thromb* 2013;20:267-76.
- 2) Takenaka Y, Inoue I, Nakano T, Shinoda Y, Ikeda M, Awata T, Katayama S. A novel splicing variant of peroxisome proliferator-activated receptor-  $\gamma$  (Ppar  $\gamma$  1sv) cooperatively regulates adipocyte differentiation with Ppar  $\gamma$  2. *PLoS One*

- 2013;8:e65583.
- 3) Shirai K, Saiki A, Oikawa S, Teramoto T, Yamada N, Ishibashi S, Tada N, Miyazaki S, Inoue I, Murano S, Sakane N, Satoh-Asahara N, Bujo H, Miyashita Y, Saito Y. The effect of partial use of formula diet on weight reduction and metabolic variables in obese type 2 diabetic patients-Multicenter trial. *Obesity Res Clinical Prac* 2013;7:e43-e54.
  - 4) Seo M, Inoue I, Tanaka M, Matsuda N, Nakano T, Awata T, Katayama S, David H, Alpers DH, Komoda T. Clostridium butyricum MIYAIRI 588 improves high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in rats. *Dig Dis Sci* 2013;58:3534-44.
  - 5) Miida T, Nishimura K, Okamura T, Hirayama S, Ohmura H, Yoshida H, Miyashita Y, Ai M, Tanaka A, Sumino H, Murakami M, Inoue I, Kayamori Y, Nakamura M, Nobori T, Miyazawa Y, Teramoto T, Yokoyama S. Validation of homogeneous assays for HDL-cholesterol using fresh samples from healthy and diseased subjects. *Atherosclerosis* 2014;233:253-9.
- 特許出願**
- 1) 【発明の名称】脂質異常症または高脂血症の表現型を簡易的に分類および判定する方法【出願人】学校法人埼玉医科大学，株式会社明日香特殊検査研究所【発明者】井上郁夫，高橋誠一郎，金澤敏行，松田武英【特願番号】特願2012-116943【出願日】2012年5月7日
  - 2) 【発明の名称】新リポ蛋白質の粒子径の決定法及びリポ蛋白質の粒子マーカ【出願人】学校法人埼玉医科大学，株式会社明日香特殊検査研究所【発明者】井上郁夫，高橋誠一郎，金澤敏行，松田武英【特願番号】特願2012-91395【出願日】2012年3月27日
  - 3) 【発明の名称】新規PPAR  $\gamma$  プロモーター配列，及びその応用【出願人】学校法人埼玉医科大学，独立行政法人産業技術総合研究所【発明者】池田正明，井上郁夫，高橋誠一郎，中島芳浩【特願番号】特願2009-116845【出願日】2009年5月13日