

その他

マウス3T3-L1脂肪細胞における各種転写因子遺伝子の 発現調節と標的遺伝子の検索

山田 一哉・三崎 紀展・塩谷 一紗・吉田 瀬七・
田中 高志・富田 晃司

The Regulation of the Expression of Various Transcription Factor Genes and the
Identification of Target Genes in Mouse 3T3-L1 Adipocytes

YAMADA Kazuya, MISAKI Toshinori, SHIOTANI Kazusa, YOSHIDA Sena,
TANAKA Takashi, and TOMITA Koji

要 旨

SHARP familyは転写抑制因子であり、SHARP-1およびSHARP-2の2種類のアイソフォームが存在する。Zhx2は、Zhx1、Zhx2、Zhx3の3つのアイソフォームからなるZhx転写抑制因子familyの一員である。これらの転写因子は、マウス3T3-L1脂肪細胞において、セカンドメッセンジャーであるcAMPを産生するアデニル酸シクラーゼの活性化剤であるForskolinにより発現が変動する。本研究では、3T3-L1脂肪細胞での、それぞれの転写因子の標的遺伝子の検索を行うために、ドキシサイクリン存在下でSHARP familyやZhx2を発現できる細胞システムの構築を試みた。現在までに、ドキシサイクリンでmRNAの発現が上昇するクローンは得られたものの、転写因子たんぱく質を発現する細胞株を得るには至っていない。

キーワード

SHARP family Zhx family cAMPシグナル 標的遺伝子 3T3-L1 脂肪細胞

目 次

- I. はじめに
- II. 各種転写因子遺伝子が発現する細胞システムの構築

謝辞

参考文献

I. はじめに

SHARP family は、basic helix-loop-helix 型転写抑制因子であり、SHARP-1とSHARP-2の2つのアイソフォームが存在する¹⁾。SHARP family 遺伝子の発現は、肝でインスリンにより誘導される²⁾。また、SHARP family は血糖上昇に関わる *phosphoenolpyruvate carboxykinase* 遺伝子のプロモーターに作用して転写を抑制するため、インスリンによる肝での血糖低下に関わる転写因子であると考えられる³⁾。一方、膵 α 細胞から分泌される血糖上昇ホルモンであるグルカゴンのセカンドメッセンジャーである cAMP では、SHARP family 遺伝子の肝での発現変動は認められない。しかし、興味深いことに、他のインスリン感受性組織であるマウス 3T3-L1 脂肪細胞では、SHARP-1 遺伝子の発現はインスリンにより変動しないにも関わらず、アデニル酸シクラーゼの活性化剤である Forskolin や cAMP の誘導体である 8-Br-cAMP では抑制されること、および、SHARP-2 遺伝子の発現はインスリンにより促進されるだけでなく、Forskolin や 8-Br-cAMP でも促進されることを見出している⁴⁾。

Zhx family も転写抑制因子であり、Zhx1、Zhx2、Zhx3の3つのアイソフォームが存在する⁵⁻⁷⁾。現在までに、これらのうち、がん抑制遺伝子でもある Zhx2 の発現も 3T3-L1 脂肪細胞での cAMP シグナルにより誘導されることを見出している⁸⁾。

本研究では、3T3-L1 脂肪細胞での cAMP シグナルによるこれらの転写因子遺伝子の発現調節機構の詳細な解析や標的遺伝子の検索を行うことを目的とする。今年度は、とくに標的遺伝子の検索を行うための細胞システム構築を目指した。

II. 各種転写因子遺伝子を発現する細胞システムの構築

SHARP family および ZHX2 の標的遺伝子を検討するために、3T3-L1 脂肪細胞において、ドキシサイクリン存在下でこれらの転写因子を発現誘導できる細胞システムの構築を試みた。まず、pENTR1A プラスミドにそれぞれの転写因子の cDNA を挿入した。このプラスミドとレンチウイルス発現用の CSIV-TRE-R1A-Ubc-KT プラスミドを混合し、

LR clonase の存在下で相同的組み換えを起こさせて、それぞれの転写因子を発現するレンチウイルスベクターを作製した。次に、このプラスミドをレンチウイルスのエンベロープタンパク質を発現する pCMV-VSV-G-RSV-Rev プラスミドとウイルスの構造タンパク質と逆転写酵素を発現する pCAG-HIVgp プラスミドとともに、HEK293T 細胞にトランスフェクションした。これらの3つのプラスミドが同時に存在する細胞からは、ドキシサイクリン存在下でのみ、それぞれの転写因子を発現するレンチウイルスが培養液中に放出される。そこで、培養上清からウイルスの遠心・濃縮を行い、3T3-L1 細胞に感染させた。ウイルスが感染した細胞はピューロマイシン耐性となるため、ピューロマイシン存在下で細胞を培養・選択した。現在までに、ドキシサイクリン存在下で、4時間で約2.5倍に Zhx2 mRNA を発現誘導できるクローンを1つだけ得ることができた。しかし、ウエスタンブロット解析を行ったところ、Zhx2 タンパク質の発現誘導については確認できなかった。今後も引き続き発現誘導できるクローンの確立を目指す。

謝辞

本研究は日本私立学校振興・共済事業団の「2022年度大学間連携等による共同研究」の補助を受けて行われたものである。ご支援いただきました事業団に深く感謝致します。

参考文献

- 1) Yamada K, and Miyamoto K, "Basic helix-loop-helix transcription factors, BHLHB2 and BHLHB3; their gene expressions are regulated by multiple extracellular stimuli", *Front Biosci* 10, pp.3151-3171, (2005).
- 2) Yamada K, Kawata H, Shou Z, Mizutani T, Noguchi T, and Miyamoto K, "Insulin induces the expression of the SHARP-2/Stra13/DEC1 gene via a phosphoinositide 3-kinase pathway", *J Biol Chem* 278, pp.30719-30724, (2003).
- 3) Yamada K, Ogata-Kawata H, Matsuura K, and Miyamoto K, "SHARP-2/Stra13/DEC1 as a potential repressor of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression", *FEBS Lett* 579, pp.1509-1514, (2005).
- 4) Kawata H, Yamada K, Matsuura K, Shou Z, and Miyamoto K, "Insulin regulates the expression of the enhancer of split- and hairy-related protein-2 gene via different pathways in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes", *Horm Metab Res* 36, pp.526-530, (2004).
- 5) Yamada K, Printz RL, Osawa H, and Granner DK, "Human ZHX1: cloning, chromosomal location, and interaction with transcription factor NF-Y", *Biochem Biophys Res Commun* 261, pp.614-621, (1999).
- 6) Kawata H, Yamada K, Shou Z, Mizutani T, and Miyamoto K, "The mouse zinc-fingers and homeoboxes (ZHX) family; ZHX2 forms a heterodimer with ZHX3", *Gene* 323, pp.133-140, (2003).
- 7) Yamada K, Kawata H, Shou Z, Hirano S, Mizutani T, Yazawa T, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, and Miyamoto K, "Analysis of zinc-fingers and homeoboxes (ZHX)-1-interacting proteins: molecular cloning and characterization of a member of the ZHX family, ZHX3", *Biochem J* 373, pp.167-178, (2003).
- 8) 山田一哉・三崎紀展・吉田瀬七・小野萌・田中高志・富田晃司, 「3T3-L1脂肪細胞におけるcAMP系によるZHX2遺伝子の発現誘導機構の解析と標的遺伝子の検索」松本大学研究紀要 21, pp.173-176, (2023).