

博士論文

肥満・2型糖尿病に関連した 分子群の生理学的意義の解明

令和3年3月

広島大学大学院生物圏科学研究科

岡崎 優利

博士論文

肥満・2型糖尿病に関連した 分子群の生理学的意義の解明

令和3年3月

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物機能開発学専攻

岡崎 優利

目次

目次.....	2
略語.....	4
序論.....	7
1. 肥満・2型糖尿病の概要と社会的背景.....	7
2. 骨格筋における糖代謝異常と2型糖尿病.....	8
3. 筋繊維型とミトコンドリアの生理学的意義.....	10
4. ARIDファミリーの機能と疾患に関する概要.....	12
5. 白色脂肪組織と肥満・2型糖尿病.....	14
6. 肥満・2型糖尿病における骨格筋と白色脂肪組織のクロストーク.....	17
7. 本論文の構成.....	17
第一章 <i>Arid5b</i> 遺伝子欠損マウス由来骨格筋を用いたARID5Bの生理的役割の解明....	18
第一節 緒言.....	18
第二節 材料と方法.....	21
1. <i>Arid5b</i> KOマウスの作製.....	21
2. 定量的 PCR.....	22
3. ウェスタンブロット法によるタンパク質の発現解析.....	23
4. 基質酸化活性測定.....	26
4-1. グルコース酸化活性測定.....	26
4-2. 脂肪酸酸化活性測定.....	26
5. 代謝物量の定量とクエン酸合成酵素の活性測定.....	27
6. 骨格筋からの核酸抽出と定量.....	27
7. 耐糖能試験、および血漿中インスリン濃度の測定.....	28
8. グルコース取り込み活性測定.....	28
9. 初代筋幹細胞の培養、および筋分化の誘導.....	29
10. 形質膜における GLUT4 タンパク質の検出.....	29
11. 蛍光免疫染色.....	30
12. 統計解析.....	30
第三節 結果.....	
1. <i>Arid5b</i> KO マウスの体組成に関する解析と摂餌量.....	31
2. <i>Arid5b</i> KO マウスの代謝に関する表現型解析.....	31
3. <i>Arid5b</i> KO マウス由来骨格筋におけるミトコンドリアの含有量および形態に関する 解析.....	32
4. ミオシン重鎖アイソフォームの発現解析.....	32
5. 耐糖能試験、および骨格筋へのグルコース取り込み活性の測定.....	33

6. 形質膜への GLUT4 小胞の移行に関与するタンパク質の発現解析.....	33
第四節 考察.....	50
第二章 白色脂肪細胞における GDE5 の機能解析.....	55
第一節 緒言.....	55
第二節 材料と方法.....	59
1. 細胞.....	59
2. 細胞培養、トランスフェクション、および細胞容量の測定.....	59
3. LC-MS/MS 解析.....	60
4. ウェスタンブロット法によるタンパク質の発現解析.....	60
5. Oil Red O 染色.....	61
6. 定量的 PCR.....	61
7. Bromodeoxyuridine 取り込みアッセイ.....	62
8. DNA マイクロアレイ解析.....	62
9. アミノ酸、および尿素濃度の測定.....	63
10. 統計解析.....	63
第三節 結果.....	64
1. 3T3-L1 細胞における GDE5 の発現パターンの解析.....	64
2. GDE5 の発現抑制による細胞内の choline 代謝の変化.....	64
3. GDE5 の発現抑制による細胞内への中性脂肪の蓄積の変化、および白色脂肪細胞の 分化に関連する遺伝子群の発現解析.....	64
4. GDE5 の発現抑制による MCE への影響の解析.....	65
5. DNA マイクロアレイ法を利用した網羅的な遺伝子発現変動の解析.....	66
6. GDE5 の発現抑制による細胞の浸透圧調節に関する解析.....	66
7. GDE5 の発現抑制による細胞膜透過性の変化.....	67
第四節 考察.....	81
統合討論.....	83
引用文献.....	88
謝辞.....	101

略語

aP2	: adipocyte protein 2
ALL	: acute lymphoblastic leukemia
AMPK	: AMP-activated protein kinase
ARID	: AT-rich interactive domain
AUC	: area under the curve
BMI	: body mass index
BrdU	: bromodeoxyuridine
BSA	: bovine serum albumin
CaMKK	: Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase kinase
CCT	: CTP: phosphocholine cytidyltransferase
C/EBP	: CCAAT- enhancer-binding protein
CEPT	: choline/ethanolamine phosphotransferase
CHOP10	: C/EBP homologous protein-10
CHT1	: choline transporter 1
CK	: choline kinase
Col2a1	: collagen type II alpha 1 chain
COX-1	: cyclooxygenase-1
CS	: citrate synthase
CSF	: cerebrospinal fluid
2-DG	: 2-deoxyglucose
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DRP1	: dynamin-related protein 1
DTT	: dithiothreitol
EDL	: extensor digitorum longus
Esrra	: estrogen-related receptor alpha
ETC	: electron transport chain
ECM	: extracellular matrix
FFA	: free fatty acid
FAS	: fatty acid synthase
FGF21	: fibroblast growth factor 21
FNDC5	: fibronectin type III domain containing 5
Gabpa	: GA binding protein transcription factor subunit alpha
GAPs	: Rab-GTPase-activating proteins
GC	: gastrocnemius muscle (腓腹筋)
GDE	: glycerophosphodiester phosphodiesterase
GLUT1	: glucose transporter 1
GLUT4	: glucose transporter 4
G6P	: glucose-6-phosphate

G6Pase	: glucose-6-phosphatase
GPs	: glycerophosphodiester
GPC	: glycerophosphocholine
GPCRs	: G-protein-coupled receptors
GPI	: glycerophosphoinositol
GPI4P	: glycerophosphoinositol-4-phosphate
G3P	: glycerol-3-phosphate
GEF	: guanine-nucleotide exchange factor
GYS1	: glycogen synthase 1
H3K9Me2	: dimethylated lysine 9 on histone 3
HSP70	: heat shock protein 70
HSP90	: heat shock protein 90
IACUC	: An Institutional Animal Care and Use Committee,
IBMX	: 3-isobutyl-1-methylxanthine
IDF	: International Diabetes Federation
Igflr	: insulin-like growth factor-1 receptor
IL-6	: interleukine-6
IP-GTT	: intraperitoneal glucose tolerance test
IRS	: insulin responsive substrate
Isnr	: insulin receptor
JARID	: Jumonji AT-rich interactive domain
JmjN	: Jumonji N
JmjC	: Jumonji C
KHB	: Krebs-Henseleit Bicarbonate
LD	: lipid droplets
LDH	: lactate dehydrogenase
MCE	: mitotic clonal expansion
MEFs	: mouse embryonic fibroblasts
MFN1	: mitofusin 1
MFN2	: mitofusin 2
MIGIRKO	: muscle-specific double knockout of insulin-like growth factor and insulin receptor
M-IE	: major immediate early
MSC	: mesenchymal stem cell
mTORC2	: mammalian target of rapamycin complex 2
MYH	: myosin heavy chain
NaF	: sodium fluoride
Nrf-1	: nuclear respiratory factor-1
OPA1	: optic atrophy 1
OXPHOS	: oxidative phosphorylation
PBS	: phosphate buffered saline
PC	: phosphatidylcholine

P-choline	: phosphocholine
PE	: phosphatidylethanolamine
PEMT	: phosphatidylethanolamine N-methyltransferase
Pepck	: phosphoenolpyruvate carboxykinase
PGC-1 α	: peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha
PGI ₂	: prostaglandin I ₂
PGK	: 3-phosphoglycerate kinase
PHF2	: plant homeodomain (PHD) finger 2
PI3K	: phosphatidylinositol-3-phosphate kinase
PKA	: protein kinase A
PMSF	: phenylmethylsulfonyl fluoride
PPAR γ	: peroxisome proliferator-activated receptor γ
PRC2	: polycomb repressive complex 2
QC	: quadriceps (大腿筋)
QOL	: quality of life
Rab	: Ras-associated binding protein
Rpl13a	: ribosomal protein L13a
SAM	: S-adenosylmethionine
SCs	: satellite cells
SDS	: sodium dodecyl sulfate
SGK-3	: serum/glucocorticoid regulated kinase-3
SIRT3	: Sirtuin 3
SoL	: soleus (ヒラメ筋)
SLC6A9	: solute carrier family 6 member 9
SOX9	: SRY-box transcription factor 9
TAG	: triacylglycerol
TBC1D1	: TBC1 domain family member 1
TBC1D4	: TBC1 domain family member 4
TBS	: Tris-buffered saline
TFAM	: mitochondrial transcription factor A
TNF- α	: tumor necrosis factor- α
TNS	: Tris-NaCl-Sucrose
TRPM2	: transient receptor potential melastatin 2
UCP1	: uncoupling protein 1

序論

1. 肥満・2型糖尿病の概要と社会的背景

生活習慣病は2型糖尿病、脂質異常症、高血圧症、高脂血症等の疾患を指し、栄養バランスや摂取量が不適切な食生活や運動不足、過度な飲酒に代表されるような身体に悪影響を与える生活習慣が原因となる疾患の総称である。不適切な生活習慣によって引き起こされた肥満、すなわち白色脂肪組織重量の過剰な増大は、生活習慣病の主要な発症の素因の一つと認識されている [1, 2]。最近の日本における統計学的調査により、20歳以上の男性の30%以上、また女性の20%以上が肥満者 (Body Mass Index [BMI] $\geq 25 \text{ kg/m}^2$) であることが報告された [3]。この肥満者の割合は過去10年間に同水準で推移していることから [3]、生活習慣病の予防法および治療法の開発が必要である。さらに生活習慣病の罹患によって健康を損なうことで患者本人や家族の生活の質 (quality of life, QOL) を低下させるだけでなく、継続的な治療が必要となることから医療費の増加の要因の一つとなっており、肥満や生活習慣病の予防法および効果的な治療法の必要性は引き続き高い。

糖尿病は1型と2型に分類され、1型糖尿病は、膵臓の β 細胞に対する自己抗体が β 細胞を破壊することでインスリン分泌が著しく減弱し発症する [4]。一方で、生活習慣病である2型糖尿病は、骨格筋、脂肪組織、および肝臓におけるインスリン感受性が低下することで高血糖状態が引き起こされ、インスリン感受性の低下をインスリン分泌量の増加により代償するサイクルが繰り返された結果、インスリン抵抗性と β 細胞の疲弊が生じ、空腹時にも高血糖状態を示す病態である [5-7]。糖尿病における慢性的な高血糖状態は、糖毒性によって血管内皮細胞を障害し、合併症として神経障害、腎障害、網膜障害を引き起こす [8]。近年では糖尿病と認知症などの中枢性疾患との関連性も指摘されている [9, 10]。国際糖尿病連合 (International Diabetes Federation, IDF) の調査結果によると、世界の糖尿病患者数は2019年には約4.6億人であったが2045年には7億人に達すると予想されており、その約90%は2型糖尿病患者である [11]。加齢とともに2型糖尿病の発症リスクが上昇するとの報告があり [12]、また超高齢化社会に突入した日本の状況を踏まえると、糖尿病の効果的な発症予防法、さらに治療法の開発は緊急の課題である。なお近年、生活習慣などの環境要因に加え、疫学調査とゲノム配列解析により2型糖尿病の発症リスクを上昇させる遺伝的要因が報告されているが [13-15]、現段階では発症リスクの把握と生活習慣の指導にとどまっており、それら遺伝情報の治療薬開発への応用にはしばらく時間を要する状況である。

2. 骨格筋における糖代謝異常と 2 型糖尿病

骨格筋は姿勢保持や歩行等の運動機能に必須であるだけでなく、体重のおよそ 30-40% を占める大きな組織であり、生体のエネルギー要求と栄養状態に応答して、膵臓、脂肪組織および肝臓と連携しながらエネルギー代謝の恒常性を調節する重要な機能を担っている [16]。特に血中から骨格筋へのグルコースの取り込み、そして骨格筋のミトコンドリアにおける好氣的なエネルギーの産生は、全身のエネルギー代謝の恒常性に大きな影響を与える [7, 17]。肝臓や白色脂肪組織においてはインスリン刺激に応答してグルコースを取り込み、グリコーゲンの蓄積あるいは中性脂肪の合成に利用されるが [18]、骨格筋での血中からのグルコースの取り込みは全体の 75-80% を占めるため [6, 19, 20]、肥満や 2 型糖尿病における治療標的組織として骨格筋は極めて重要である [7]。

骨格筋へのグルコースの取り込みは、インスリン刺激によりインスリン受容体が活性化された後、insulin responsive substrate (IRS)、phosphatidylinositol-3-phosphate kinase (PI3K)、mechanistic target of rapamycin complex 2 (mTORC2)、AKT を介したシグナル伝達によって促進される (図 1) [21, 22]。骨格筋での細胞内へのグルコースの輸送は glucose transporter 4 (GLUT4) 小胞が担っており、通常細胞質に存在する GLUT4 小胞は AKT の活性化により形質膜上に移行することでグルコースの取り込みを担う (図 1) [23]。GLUT4 小胞の形質膜への移行は、GLUT4 小胞に結合する低分子タンパク質である Ras-associated binding protein (Rab) の活性により制御されている (図 1)。Rab は GTP 結合型 Rab (活性型 Rab)、あるいは GDP 結合型 Rab (非活性型 Rab) の状態で存在し、グアニンヌクレオチド交換因子 (guanine-nucleotide exchange factor, GEF) が GTP と GDP の変換を担う [24]。GLUT4 小胞は活性型 Rab によって形質膜上へ輸送されるが、Rab GTPase 活性化タンパク質 (GTPase-activating proteins, GAPs) である TBC1 domain family member 1 (TBC1D1) と TBC1 domain family member 4 (TBC1D4) は、Rab が有する GTP 加水分解活性を亢進することで活性型 Rab を不活性型 Rab へ変換し、形質膜への GLUT4 小胞の輸送を阻害する (図 1) [23]。骨格筋においては TBC1D1 が Rab8A および Rab14 を、TBC1D4 が Rab8A、Rab13、Rab14 を標的として活性調節を行っていることが報告されている [25-27]。すなわち、インスリン刺激によって活性化された AKT は、TBC1D1 および TBC1D4 をリン酸化することで不活性化し、GLUT4 小胞上の 活性型 Rab が維持されることで形質膜への GLUT4 小胞の輸送を促進する (図 1) [23]。

肥満患者や 2 型糖尿病の骨格筋においては、インスリン刺激による IRS の活性化が抑制されており、その結果、AKT の活性化が減弱し、GLUT4 小胞の形質膜への輸送が抑制されていることが報告されている [6]。また骨格筋に取り込まれたグルコースはグリコーゲンとして貯蔵、あるいは解糖系により分解されるが、2 型糖尿病患者の骨格筋ではグリコーゲン合成酵素の活性の低下が認められており、グルコースの取り込み量の減少を引き起こす原因となっている可能性が示されている [28-30]。さらに 2 型糖尿病患者の骨格筋ではミトコンドリア量の減少や [17, 31]、ミトコンドリア形態制御因子の発現変動が報告されており、ミトコンドリアの機能低下とグルコース取り込み量との関連性が注目されている [32-34]。

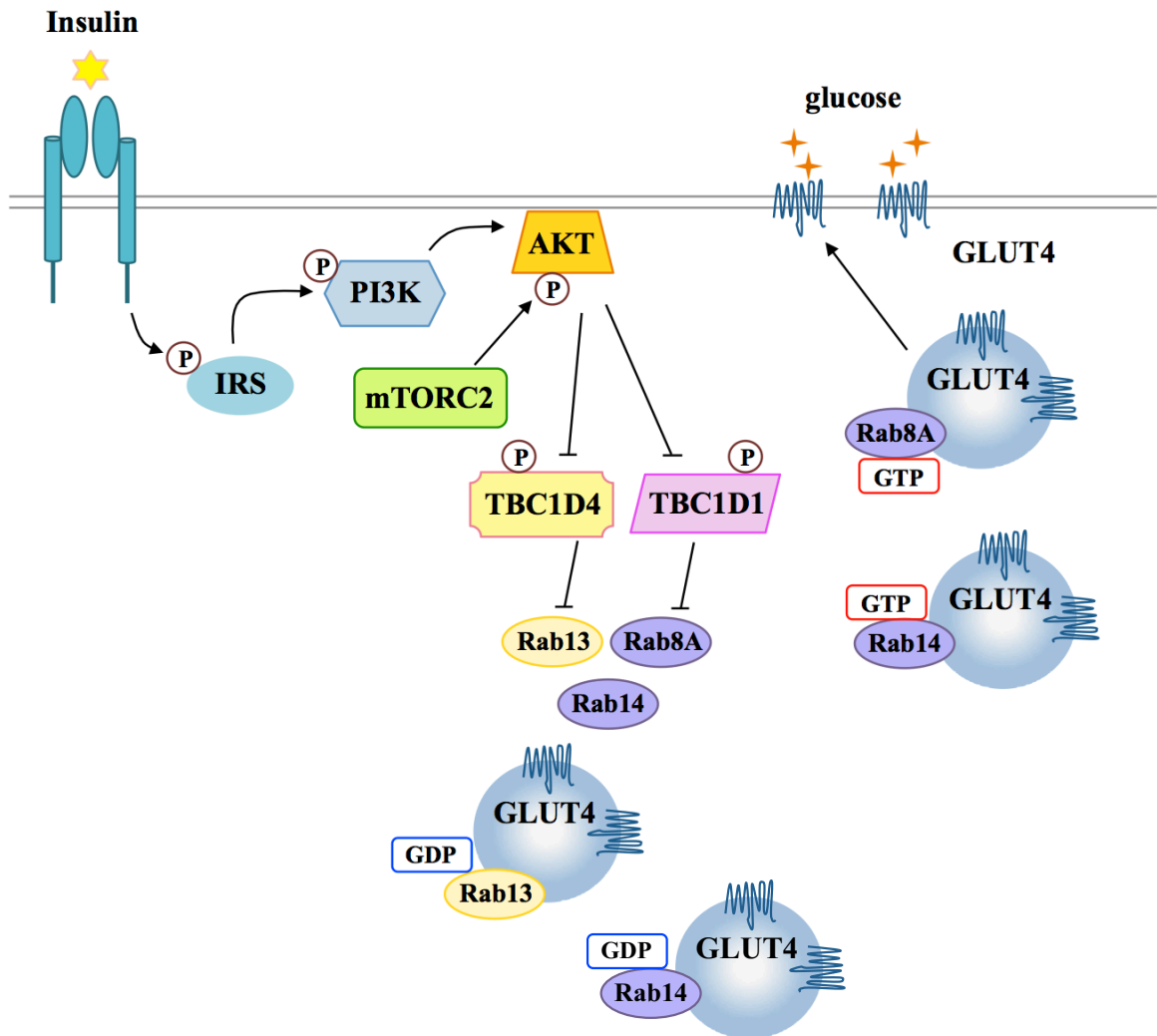


図 1. インスリンシグナル伝達経路と形質膜への GLUT4 小胞の輸送制御機構

インスリン受容体へのインスリンの結合によって、下流の連続的なリン酸化によるシグナル伝達が活性化される。

(*Trends Endocrinol Metab.* 2017 Aug; 28 (8): 597-611 から改変し引用)

3. 筋線維型とミトコンドリアの生理学的意義

骨格筋の筋線維型は、齧歯類においては、収縮速度や代謝表現型等を指標として 4 種類 (Type I、Type IIA、Type IIX、Type IIB) に分類される [35, 36]。表 1 に筋線維型におけるミトコンドリアの量、ミトコンドリアの形態、および主なエネルギー産生経路についてまとめた。Type II 筋線維は収縮速度が速い速筋型に分類され、収縮速度が比較的緩やかな Type I 筋線維は遅筋型に分類される。筋収縮の要であるミオシンタンパク質は、筋線維型において特徴的な発現パターンを示し、各筋線維における代表的なミオシンのアイソフォームは、Type I - MYH7、Type IIA - MYH2、Type IIX - MYH1、Type IIB - MYH4 である [35, 36]。ミトコンドリアはエネルギー産生を担うオルガネラであり、その含有量は筋線維のエネルギー産生経路と関連している。すなわち、ミトコンドリア含有量が比較的高い Type I、および Type IIA の筋線維では好氣的なエネルギー産生が優位であり、ミトコンドリア含有量が比較的低い Type IIX、Type IIB の筋線維においては嫌氣的なエネルギー産生が優位である [35, 36]。なお嫌氣的なエネルギー産生の活性が高い Type IIX および Type IIB の筋線維においては主にグルコースがエネルギー源として利用され、一方で好氣的なエネルギー産生の活性が高い Type I 筋線維、および Type IIA 筋線維においてはグルコースと脂肪酸の両方がエネルギー源として利用される。またミトコンドリアは分裂と融合を繰り返している。断片化したミトコンドリアは mitophagy によって除去されること、そして融合が阻害されるとミトコンドリアの機能が低下することから、分裂と融合はミトコンドリアの品質管理に必要な機構であると考えられている [37]。好氣的なエネルギー産生が活性化すると、ミトコンドリアの膜電位が上昇し、ミトコンドリアの融合促進因子が活性化されることで、ミトコンドリアの融合を促進することが知られている [38, 39]。ミトコンドリアの形態は筋線維型とも関連しており、好氣的なエネルギー産生の活性が優位である Type I 筋線維、Type IIA 筋線維においてはミトコンドリアの融合率が高く、伸長した形態のミトコンドリアが多く観察され、一方、嫌氣的なエネルギー産生の活性が優位である Type IIX 筋線維、および Type IIB 筋線維においては融合率が低く、多くの断片化したミトコンドリアが観察される [39]。以上のように、ミトコンドリアの量やミトコンドリアの形態は、骨格筋におけるエネルギー産生に利用する基質の選択に関与し、さらに基質の細胞内への取り込み活性にも影響することから、ミトコンドリアの生合成やミトコンドリアの形態の制御は全身のエネルギー恒常性の維持にとって極めて重要である。2 型糖尿病患者においては、Type I 筋線維の割合の減少 [40, 41] やミトコンドリアにおける好氣的なエネルギー産生の活性の低下 [17, 42, 43] が認められ、これらの要因がインスリン抵抗性の発症に関与する可能性が示されている。

表 1. 筋線維型と特徴のまとめ

筋線維型大分類	I型(遅筋型)	II型(速筋型)		
筋線維型	Type I	Type IIA	Type IIX	Type IIB
収縮スピード	遅い	中程度	速い	速い
主なエネルギー産生経路	好氣的	好氣的	嫌氣的	嫌氣的
ミオシンのアイソフォーム	MYH7	MYH2	MYH1	MYH4
ミトコンドリア量	比較的多い	比較的多い	比較的少ない	比較的少ない
ミトコンドリアの形態	伸長	伸長	断片化	断片化

Wiley Interdiscip Rev Dev Biol 2016 Jul;5 (4):518-34から改変し引用)

4. ARID ファミリーの機能と疾患に関する概要

AT-rich interactive domain (ARID) タンパク質ファミリーは、細胞増殖、細胞分化、および細胞老化において多様な生理機能に関与する転写因子であり、標的遺伝子の転写調節に加え、クロマチンリモデリングを担うことが報告されている [44-46]。ARID タンパク質は ARID ドメインと呼ばれる DNA 結合ドメインを有しており、酵母、ショウジョウバエ、マウス、ヒトにおいて高度に保存されている [44-46]。哺乳動物においてはこれまでに、ARID タンパク質として ARID1 から ARID5、そして Jumonji N (JmjN) および Jumonji C (JmjC) ドメインを有する Jumonji ARID (JARID)1、および JARID2 の 7 つのサブファミリーが同定されている (図 2) [44]。ARID ファミリーの中で、ARID1A、ARID2、ARID5B、JARID1D は発癌との関連性が指摘されている。ARID1A および ARID2 はクロマチンリモデリングを介して細胞増殖を制御し [47]、ヒトにおける *ARID1A* 遺伝子の変異は、卵巣明細胞腫や子宮内膜癌、直腸癌といった複数の癌に罹患するリスクとの関連性が報告されており [48, 49]、さらに *ARID2* 遺伝子は肝炎に関連した肝臓癌において変異が多く認められている [50]。また *ARID5B* の遺伝子多型は白血病との関連性が示唆されており [51-53]、JARID1D は前立腺癌の浸潤と転移に関与するとの報告がある [54]。さらに、ARID1B および JARID3C はコッフィン・シリス症候群や X 連鎖精神遅滞症候群との関連性が指摘されている [55-57]。

一方、ARID3A-C、ARID4A-B、および ARID5A-B は細胞分化への機能的関与が知られている。ARID3A-C は B 細胞分化において多段階的に生理作用を有し [58-60]、ARID4A-B は精子形成を正に制御する [61, 62]。ARID5A は軟骨分化を促進する一方で、白色脂肪細胞分化を抑制することが報告されている [63, 64]。さらに、JARID1A-B は脱メチル化酵素活性を介して細胞老化の誘導に関与し [46]、JARID2 はクロマチンリモデリング複合体である polycomb repressive complex 2 (PRC2) に結合し、その活性を制御することで胚性幹細胞の正常な分化を誘導することが明らかとなっている [65, 66]。

本研究において着目した ARID5B は、間葉系細胞である軟骨細胞、脂肪細胞、筋細胞の分化を促進することが培養細胞を用いた研究により明らかにされている一方で [67-69]、*Arid5b* 遺伝子欠損マウス (*Arid5b* KO マウス) においては高脂肪食下で肥満への抵抗性を示すこと [70] や耐糖能が上昇するという知見が得られており (未発表データ)、ARID5B がエネルギー消費やグルコース取り込みの調節機構に関与する可能性が示唆されていた。そこで本研究では、エネルギー代謝が活発な骨格筋に着目し、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋の代謝に関する表現型の解析に着手した。

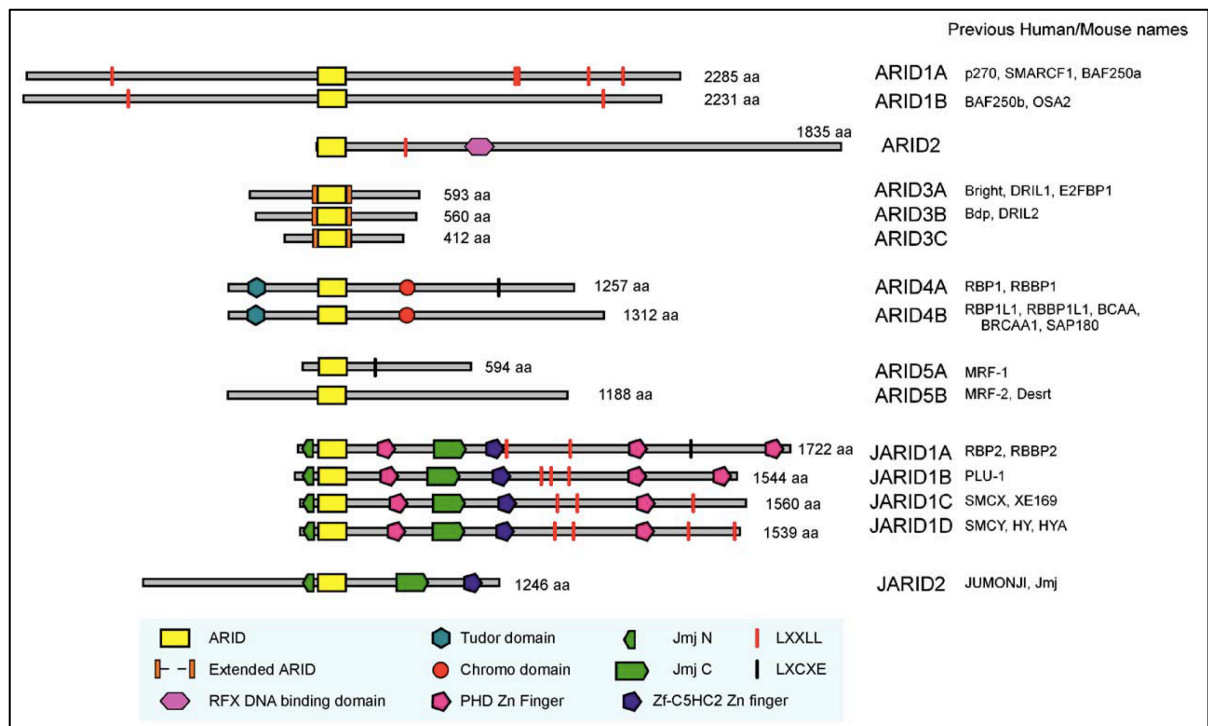


図 2. ARID ファミリータンパク質 (ヒト) のリストと構造上の特徴
 (*Genomics* 86 (2005) 242 – 251 から引用)

5. 白色脂肪組織と肥満・2型糖尿病

白色脂肪組織は、生体内の過剰なエネルギー源をトリアシルグリセロール (triacylglycerol, TAG)として貯蔵する役割を担う。TAGは脂肪滴 (lipid droplets, LD)として白色脂肪細胞内に貯蔵されており、エネルギー欠乏時には脂肪滴のTAGが加水分解されることで遊離脂肪酸 (free fatty acid, FFA)やグリセロールが血中に放出され、他組織のエネルギー源として使用される [71, 72]。また白色脂肪組織はレプチンやアディポネクチンに代表されるアディポカインと呼ばれる様々なホルモンを分泌し、生体内での代謝調節に関与する [73]。以上のように白色脂肪組織はエネルギー貯蔵において極めて重要な役割を果たしているが、白色脂肪組織の生体内への過剰な蓄積は肥満を誘導し、2型糖尿病を発症するリスクを高めることとなる [1, 2, 74]。白色脂肪組織重量の増大は、白色脂肪細胞数の増加 (hyperplasia)、および白色脂肪細胞の肥大 (hypertrophy)によって引き起こされ [75–77]、特に白色脂肪細胞のサイズの増大には細胞内でのTAGの蓄積、すなわちLDの形成が伴う [78]。白色脂肪細胞のサイズの増大は、マクロファージの浸潤量の増加、および tumor necrosis factor- α (TNF- α)や interleukine-6 (IL-6)などの炎症性サイトカインの発現量、および分泌量を増加させ、インスリン抵抗性に大きく関与している [79–81]。特に、肥大化した白色脂肪組織から分泌される炎症性サイトカインによって、他組織において慢性炎症が誘導されることは、肥満が2型糖尿病を引き起こす重要なメカニズムとして提案されている [1, 2]。以上の知見から、2型糖尿病の発症予防には、白色脂肪細胞の増殖抑制、および白色脂肪細胞のサイズのコントロールが重要であると考えられている [1, 80]。

LDはTAGなどの中性脂質を核として単層のリン脂質膜に覆われた構造をしており、リン脂質膜上にはLDの安定化や脂質代謝に重要な役割を果たすタンパク質が存在する [82]。白色脂肪組織におけるLDの形成は過剰なエネルギーの貯蔵に重要なだけでなく、他の組織を脂肪毒性から保護する重要な役割を有する [82]。LDの形成においては、小胞体膜内にて合成されたTAGが小胞体のリン脂質膜から出芽してLDとなり、細胞質へ解離するLD形成モデルが提唱されている (図3) [82]。

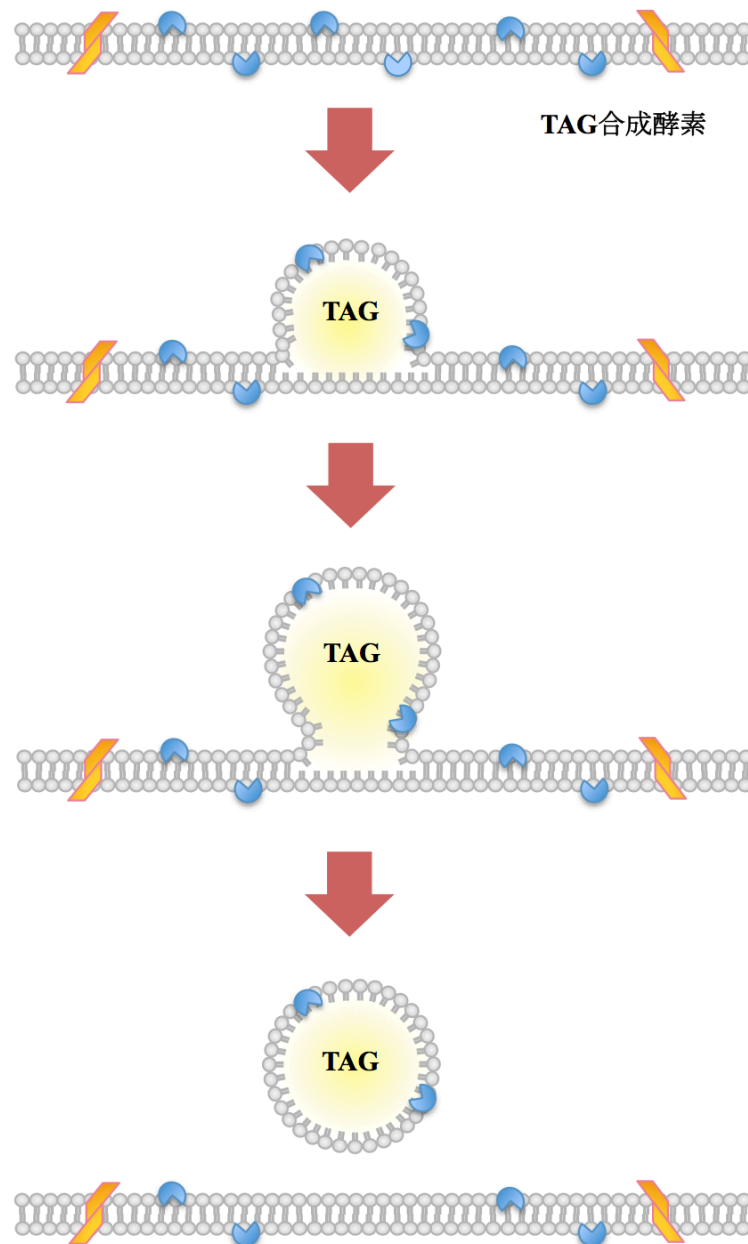


図 3. LD の形成
 (Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2017. 33:491–510 から改変し引用)

in vitro において前駆脂肪細胞が成熟脂肪細胞へ分化する際に LD の形成が観察されることから、LD 形成のメカニズムの解析にはマウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞やマウス胎児線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblasts, MEFs)を用いた脂肪細胞分化モデルが一般的に用いられている。白色脂肪細胞分化は多数の転写因子の段階的、かつ協調的な遺伝子発現調節によって制御され、その中でも核内受容体に属する peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) は白色脂肪細胞分化に必須の制御因子である。一方で白色脂肪細胞の分化に対して促進的な作用を示す Krüppel-like factor 5 などの他因子は PPAR γ の発現量の上昇、あるいは PPAR γ の活性化を介して白色脂肪細胞分化を誘導すると考えられている [83]。分化誘導剤による刺激に応答して発現上昇する CCAAT- enhancer-binding protein β (C/EBP β)、および CCAAT- enhancer-binding protein δ (C/EBP δ)によって PPAR γ 遺伝子の発現は誘導され [83]、CCAAT- enhancer-binding protein α (C/EBP α)とともに相互に遺伝子発現を正に調節することで白色脂肪細胞分化を誘導し、白色脂肪細胞の成熟化に関与する adipocyte protein 2 (aP2)や fatty acid synthase (FAS)等の遺伝子発現を誘導する [84–86]。3T3-L1 細胞を用いた白色脂肪細胞の分化誘導においては、上記の分化誘導段階に先行して、mitotic clonal expansion (MCE)と呼ばれる特徴的な初期の分化段階がある [83, 87–89]。MCE とは、コンフルエントに達することで細胞増殖を停止した 3T3-L1 細胞の細胞周期が再開し、前駆脂肪細胞の状態において 1-2 回の細胞分裂が引き起こされる現象であり、3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)、dexametazone、およびインスリンを含む分化誘導用培地を用いて培養することで誘導される [88]。

以上のように、白色脂肪組織の肥大化、および白色脂肪細胞の分化には、細胞増殖と LD の形成の両面が深く関与している。哺乳動物細胞の細胞膜や LD 膜の主要構成成分はホスファチジルコリン (phosphatidylcholine, PC)であることから、PC の生合成は白色脂肪細胞の分化と白色脂肪組織の肥大化の両面において重要な役割を果たすと考えられる [90–93]。当研究室において単離された glycerophosphodiester phosphodiesterase 5 (GDE5)は、哺乳動物の細胞内でグリセロホスホコリン (glycerophosphocholine, GPC)を分解してコリン (choline)を生成する酵素であり、細胞内 choline は PC の生合成に利用されることが知られている [94]。そこで本研究においては、3T3-L1 細胞を用いた *in vitro* 脂肪細胞分化モデルを利用し、白色脂肪細胞分化、および白色脂肪細胞内での LD の形成における GDE5 の生理的役割を解明することを目的として検討を行った。

6. 肥満・2型糖尿病における骨格筋と白色脂肪組織のクロストーク

骨格筋と白色脂肪組織は、栄養素や分泌ホルモンを介して互いの機能調節を行ない、全身のエネルギー代謝の恒常性の維持に寄与している [95]。例えば、絶食下や空腹時には白色脂肪細胞内の TAG が分解されることにより血中へ FFA が放出され、骨格筋においてミトコンドリアの好氣的なエネルギー産生の基質として利用される [34]。一方、食後には血中のグルコース濃度、およびインスリン濃度が上昇し、インスリンによって白色脂肪組織における TAG の分解が抑制されるとともに、骨格筋におけるグルコースの取り込み量が増加し、ミトコンドリア内での好氣的なエネルギー産生経路の主要な基質が FFA からグルコースに切り替わる [34, 96]。肥満症や2型糖尿病患者においては白色脂肪組織が肥大化しており、白色脂肪組織におけるインスリン抵抗性によって TAG の分解活性が亢進することで、白色脂肪細胞からの FFA の放出量が増加している [74, 97]。また白色脂肪組織においては骨格筋に先行してインスリン抵抗性が誘導することが齧歯類において報告されており [34, 98]、以下の三つの経路を介して、肥大化した白色脂肪組織が骨格筋におけるインスリン感受性の低下に関与することが示唆されている。一つ目は、肥大化した白色脂肪細胞から血中に放出された FFA を介したインスリンシグナル伝達経路を阻害する経路 [99–102]、二つ目は肥大化した白色脂肪組織への単球・マクロファージの浸潤量が増加し、炎症性サイトカインの分泌量の増加を誘導する経路 [74, 79, 80, 103]、三つ目は異所性脂肪の蓄積による脂質毒性を介した経路である [74, 104–106]。また2型糖尿病や肥満患者の骨格筋においてはミトコンドリアの好氣的エネルギー産生の活性が低下しており、骨格筋への過剰な FFA の流入、および脂質毒性と関連していることが示唆されていることから [107, 108]、2型糖尿病の発症において白色脂肪組織と骨格筋のクロストークは重要な役割を担うと考えられる [34, 98]。

7. 本論文の構成

本研究においては、肥満・2型糖尿病の発症における骨格筋、および白色脂肪組織の役割に着目し、肥満・2型糖尿病の発症予防、および治療戦略に貢献する情報を見出すことを目指した。そこで本論文の第一章では、*Arid5b* KO マウス、および同 KO マウス由来骨格筋の代謝に関する表現型解析、および代謝関連分子の発現解析を行い、骨格筋のエネルギー代謝における *ARID5B* の生理的役割を明らかにすることで、2型糖尿病の治療戦略に貢献できる知見の獲得を目的とした。第二章では、白色脂肪細胞の分化における *choline* 供給源としての *GDE5* の生理的役割を明らかにし、白色脂肪細胞の肥大化に関する新たなメカニズムの解明を通じて肥満の発症予防法の開発に貢献することを目的とした。

第一章 *Arid5b* 遺伝子欠損マウス由来骨格筋を用いた ARID5B の生理的役割の解明

第一節 緒言

骨格筋は、グルコースおよび脂肪酸を利用して生体内のエネルギー代謝を制御する極めて重要な組織である [16]。2 型糖尿病や肥満においては、インスリン抵抗性により骨格筋へのグルコースの取り込み量が低下した結果、高血糖状態が生じ [109]、血管内皮細胞に対する糖毒性により冠動脈疾患や網膜症、そして腎症といった合併症が引き起こされる [110]。世界における 2 型糖尿病の罹患数は増加しており [11]、また加齢によって 2 型糖尿病のリスクが上昇することが報告されていることから [12]、2 型糖尿病の病態の解明と治療法の開発は引き続き重要な課題である。ARID に関する研究では、間葉系細胞の分化制御における ARID5B の生理的役割の解明に力が注がれてきたが、近年、ARID5B とエネルギー代謝との関連性が明らかにされつつある。しかしながら、これまでの ARID5B による代謝調節に関する研究では *in vitro* における解析が主であり、またエネルギー代謝が活発な骨格筋における ARID5B による代謝調節機構は未だ不明である。

そもそも ARID5B は、ヒト胎児性癌由来細胞株 Tera-2 細胞において、cytomegalovirus の複製に関わる major immediate early (M-IE) 遺伝子の発現を抑制する因子として単離された [6]。Tera-2 細胞の分化誘導時に ARID5B の DNA 結合能が低下することで M-IE 遺伝子の発現抑制が解除されることから、ARID5B と細胞分化との関連性が示唆されていた。ARID5B は転写因子としての役割においては、標的遺伝子の発現調節には 5'-AATA(T/C)-3' が推定 ARID5B 結合配列として重要であることが報告され [111]、特に間葉系細胞の分化制御に関する生理機能が報告されている。ARID5B の白色脂肪細胞分化への関与に関しては、RNAi 法を用いて *Arid5b* mRNA を破壊した 3T3-L1 細胞、あるいは *Arid5b* KO マウスの胎児から単離した MEFs を用いた検討により、C/EBP の転写調節機能を阻害する C/EBP homologous protein-10 (CHOP10) の発現抑制を介して白色脂肪細胞への分化を促進する機能や TAG の代謝を調節する機能などが明らかにされている [9]。また軟骨細胞分化においては、SRY-box transcription factor 9 (SOX9) の標的遺伝子であり、軟骨細胞の分化マーカーである collagen type II alpha 1 chain (*Col2a1*) や aggrecan 遺伝子のプロモーター領域に推定 ARID5B 結合配列が存在し、ARID5B がヒストン脱メチル化酵素である plant homeodomain (PHD) finger 2 (PHF2) をプロモーター領域へリクルートすることが報告されている [11]。PHF2 は転写抑制のエピゲノムマークであるヒストン H3 の 9 番目のリジン残基のジメチル基 (H3K9Me2) を脱メチル化することで *Col2a1* や aggrecan 遺伝子の発現を誘導し、軟骨分化を促進することが報告されている [11] (図 5)。筋細胞分化においては、*Arid5b* を欠損した初代筋幹細胞ではシクロオキシゲナーゼ-1 (cyclooxygenase-1, COX-1) とプロスタグランジン I₂ (prostaglandin I₂, PGI₂) 合成酵素遺伝子

の発現量が低下し、 PGI_2 の分泌量が低下していることを見出された。 PGI_2 量の低下は筋幹細胞の細胞遊走活性を上昇させ、筋管形成や融合を阻害することが報告されている [69]。 PGI_2 は、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化や脂肪酸代謝などのエネルギー代謝に関連した遺伝子発現を誘導し、褐色脂肪細胞への分化を促進することが報告されているが [112, 113]、筋細胞のエネルギー代謝における ARID5B の生理的役割については未だ不明である。

ARID5B のエネルギー代謝における生理作用については、*Arid5b* KO マウスを用いた高脂肪食における解析が行われている。*Arid5b* KO マウスは、野生型マウスと比較して体重および白色脂肪組織重量の減少が認められ、肥満発症への抵抗性を示したことから [13]、*Arid5b* KO マウスにおいてエネルギー消費量が上昇している可能性が示唆されている。また *Arid5b* KO マウスは高脂肪食下において耐糖能が上昇しており (未発表データ)、さらに高脂肪食を摂取させた *Arid5b* KO マウスより単離した骨格筋ではインスリン刺激、および非刺激下でのグルコースアナログ (2-deoxyglucose, 2-DG) の取り込み量が増加していた (未発表データ)。肥満や 2 型糖尿病においてはインスリン感受性が低下した結果、インスリンシグナル伝達経路の活性が低下することで骨格筋へのグルコースの取り込み量が減少することが先行研究により報告されているが [6]、高脂肪食下の *Arid5b* KO マウス由来骨格筋においてはインスリン非刺激下でグルコースの取り込み量が増加していたことから、ARID5B はインスリンシグナル伝達経路を介さずグルコースの取り込みを調節する機構に関与する可能性が示唆されている。一方 ARID5B の糖代謝における役割については、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞において報告されており、ARID5B は、絶食ホルモンであるグルカゴンにより活性化されたプロテインキナーゼ A (protein kinase A, PKA) によりリン酸化された PHF2 と複合体を形成する [8]。絶食下に活性化される糖新生でのホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子 (phosphoenolpyruvate carboxy kinase, *Pepck*) やグルコース-6-ホスファターゼ遺伝子 (glucose-6-phosphatase, *G6Pase*) のプロモーター領域には、推定 ARID5B 結合配列が存在し、ARID5B と相互作用する PHF2 がプロモーター領域の H3K9Me2 を脱メチル化することによって、これら遺伝子の転写を活性化することが示されている [8] (図 4)。

以上のように、ARID5B は肥満や 2 型糖尿病の発症において密接であるエネルギー代謝との関連性が示唆されているものの、糖代謝において主要な組織である骨格筋における生理的役割については *in vitro* での培養細胞を用いた解析のみであり、さらには骨格筋の筋線維の生理作用において重要な因子であるミトコンドリアにおける好氣的なエネルギー産生経路への関与などは未だ検証されていない。本研究では *Arid5b* KO マウスおよび同マウス由来の骨格筋組織を研究に供することで、骨格筋での糖代謝やエネルギー代謝における ARID5B の生理的役割を解明することを目的とした。本研究によって、骨格筋でのエネルギー代謝において重要な役割を担う新たな調節因子を見出せる可能性も考えられ、2 型糖尿病の新しい治療薬開発への研究成果の利用が期待される。

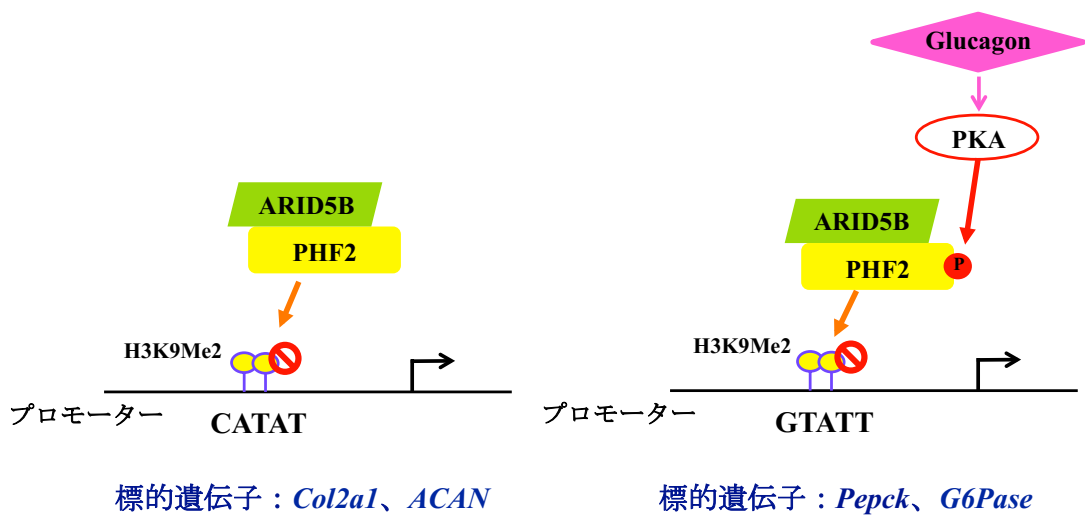


図 4. 推定 ARID5B 結合配列を含む標的遺伝子のプロモーター領域への ARID5B による PHF2 のリクルート

第二節 材料と方法

本研究の全ての動物実験は、City of Hope National Medical Centerにおける動物実験委員会 (An Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)による審査を受け、承認された動物実験プロトコール (#2001)に従って実施した。

1. *Arid5b* KO マウスの作製

Arid5b KO マウスは、PGK (3-phosphoglycerate kinase)プロモーターとその下流に結合させたネオマイシンカセットを *Arid5b* のエクソン 5-7 の領域に相同組換えを利用して導入することで作製した (図 5) [70]。遺伝子型の判定はマウスの尾から抽出した genomic DNA とネオマイシンカセットの配列内にデザインした forward と reverse プライマーを用いた PCR により決定した。Forward primer (neo): 5'-CGCTGGGTGGAGAGGCTATTCG-3', Reverse primer (neo): 5'-CGGCAGGAGCAAGGTGAGATGAC-3' [70]。

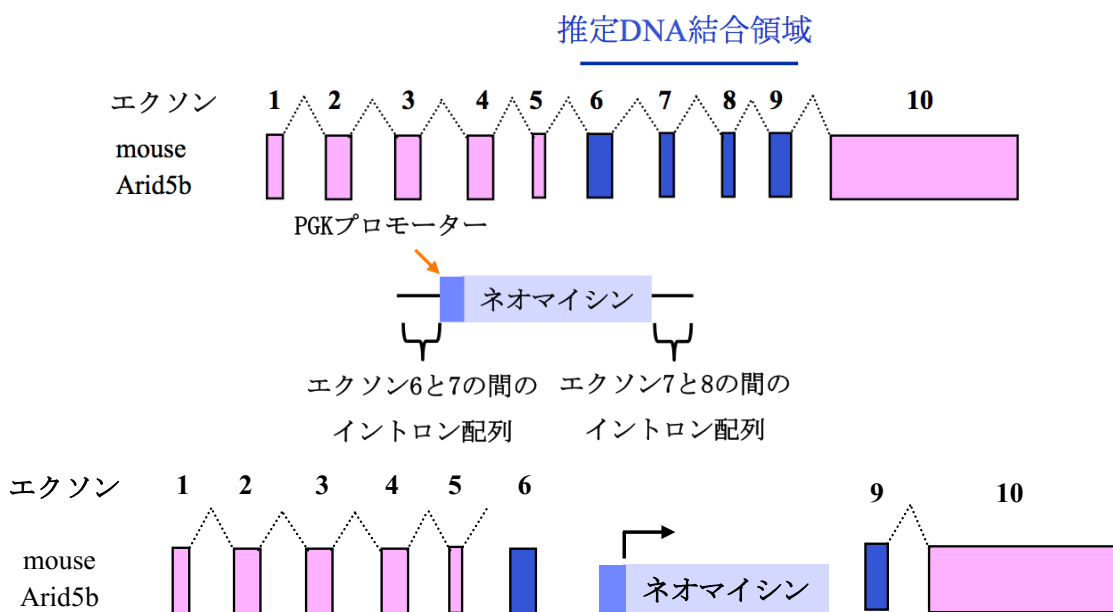


図 5. PGK プロモーター/ネオマイシンカセットの *Arid5b* ゲノム領域への挿入イメージ図

マウスは正常食を自由摂食させ、12時間の明暗サイクル (明サイクル 6AM-6PM) にて飼育した。10-21 週齢の正常食にて飼育した雄マウスを本研究の全ての実験に使用した。動物からのサンプル回収は 11AM-2PM の間に行った (本時間外に行った場合はその旨を明記した)。活動量、酸素消費量、二酸化炭素産生量、および摂食量は、Beckman Research Institute (Duarte,

California)の the Comprehensive Metabolic Phenotyping Core において TSE PhenoMaster V5.9.3 (2016-5420) を用いて測定した。マウスは測定前に実験機器に接続した個別の飼育容器で最低 16 時間飼育し、環境に慣れさせた。その後、活動量、酸素消費量、二酸化炭素産生量、および摂食量を 48 時間、30 分毎に計測した。

2. 定量的 PCR

マウスから単離した腓腹筋 (GC)は凍結状態で粉末状にした。30 mg 程度の凍結させた GC の粉末に 700 μ L の QIAzol® Lysis Reagent を加え、POLYTRON® homogenizer (Kinematica, #PT2100)を用いてホモジナイズした。全 RNA は miRNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いてホモジネートより精製した。逆転写反応は 0.75 μ g の RNA と iScript™ cDNA synthesis kit (Bio-Rad) を用いて行った。サンプル中の転写産物量は iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad) と CFX96™ Real-Time System を用いて解析した。標的遺伝子の転写産物量は ribosomal protein L13a (*Rpl13a*) の発現量により補正した。標的遺伝子の転写産物の定量に用いたプライマー配列を表 2 に示す。

表 2. 定量的 PCR に用いたプライマー配列の一覧

Gene symbol	Forward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')
<i>Arid5b</i>	AGAAAAACGCCATCGACC	CTCCCAGGATTACCACCTAAC
<i>Rpl13a</i>	TGCTGCTCTCAAGGTTGTTC	TTTCCTTCCGTTTCTCCTCC
<i>Myh1</i>	TTGACTTTGGGATGGACCTG	TCTTGAAGGAGGTGTCTGTCTGTC
<i>Myh2</i>	AGGACCAAATCATCAGTGCC	TGTCAGCAGATGCCAGTTTC
<i>Myh4</i>	TTGATGACCAGGAAGAGCTG	ATAATGCATCACAGCGCCTG
<i>Myh7</i>	TGGAGAATGACAAGCAGCAG	TTGCTCATCCTCAATCCTGG
<i>Tbc1d1</i>	TACCTCATCAGTCCTGACAC	AGTGGTCCACATGTCTGATG
<i>Tbc1d4</i>	TCTTTGCCTCTCAGTTTCCC	CTCAGTAAGCTGAGAGCAAC
<i>Rab8a</i>	AGTCCTTTGACAACATCCGG	TTGGACACCTGTCTCTTGTCTGTC
<i>Rab14</i>	ACACGGAGCTACTATAGAGG	ATTCCTTGCGTCTGTCAACC

3. ウェスタンブロット法によるタンパク質の発現解析

骨格筋のタンパク質溶液は、200 μ L の Tris-NaCl-Sucrose (TNS) バッファーに 10 mg 程度の凍結した GC の粉末を加え、Q700 sonicater (QSONICA)を用いて超音波処理によりタンパク質溶液を調製した [114]。超音波処理は氷水中にて行い、amplitude 35 で1分間の超音波処理を行い、氷上に1分間静置した。この操作は6回繰り返した。超音波処理後、最終濃度1%となるように Triton X-100 を加え、4°C にて1時間転倒混和した。その後タンパク質溶液を4°C、10,000 x g にて短時間遠心分離し、上清を回収した。タンパク質溶液のタンパク質濃度は PierceTM BCA assay kit (Thermo Fisher Scientific, #23225)を用いて測定した。1 ウェルに約 10-60 ug のタンパク質を SDS-PAGE に供し、SDS-PAGE は CriterionTM TGXTM precast stain-free gels (Bio-Rad)を用いて行った。電気泳動後、ゲル内の総タンパク質を Trans-Blot Turbo System (Bio-Rad)を用いて PVDF membranes (0.45 μ m, Bio-Rad, #174275)に転写した。初代筋管細胞のタンパク質回収には RIPA lysis buffer を用い、4°C、12,000 rpm にて15分間遠心分離して得られた上清をタンパク質発現解析に使用した。ウェスタンブロット法に使用した試薬は表 3 に示した。目的タンパク質の検出は表 4 に示す抗体を用いて行った。

表 3. ウェスタンブロット法に使用した試薬の一覧

試薬名	組成
Tris-NaCl-Sucrose (TNS)	20 mM Tris-HCl (pH7.4), 50 mM NaCl, 250 mM sucrose
RIPA lysis buffer	50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 0.25% deoxycholic acid, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 0.1% SDS (pH 7.4)
Protease/phosphatase inhibitors、および還元剤 (TNS および RIPA lysis バッファーに添加した、なお NaF は TNS にのみ添加した)	20 mM sodium fluoride (NaF), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1x Halt® Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (100 x, Thermo Fisher Scientific, #78420), 1 mM dithiothreitol (DTT)
4 x Laemmli サンプルバッファー	62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 25% glycerol, 0.01% Bromophenol blue, 5% 2-mercaptoethanol
SDS-PAGE バッファー	25 mM Tris-HCl (pH8.3), 192 mM glycine, 0.1% SDS
転写バッファー	25 mM Tris-HCl (pH8.3), 192 mM glycine, 20% methanol
Tris-buffered saline (TBS)/Tween-20 buffer (TBST)	2 mM Tris, 50 mM NaCl (pH7.4), 0.1% Tween-20

表 4. タンパク質の発現解析に用いた抗体の一覧

タンパク質	カタログ No.	メーカー
pAMPK (Thr172)	2535	Cell Signaling
AMPK	2603	Cell Signaling
PGC-1 α	ab54481	Abcam
myosin heavy chain 7 (MYH7)	M8421	Sigma
myosin heavy chain 1 (MYH1)	PA5-31466	Thermo Fisher Scientific
GLUT4	2213	Cell Signaling
TBC1D1	4629	Cell Signaling
TBC1D4	2670	Cell Signaling
MFN 1	ab126575	Abcam
MFN2	9482	Cell Signaling
OPA1	ab42364	Abcam
DRP1	5391	Cell Signaling
Total OXPHOS	ab110413	Abcam
pAKT (Ser473)	4060	Cell Signaling
AKT	9272	Cell Signaling
HSP70	4872	Cell Signaling
HSP90	4877	Cell Signaling
vinculin	13901	Cell Signaling

GLUT4、TBC1D1、TBC1D4、および pAKT (Ser473)に関しては、一次抗体、および二次抗体の希釈液として Western BLoT Immuno Booster (Takara, #T7111A) を用いた。他の一次抗体には各メーカーの推奨に従い、5% non-fat milk/TBST、あるいは 5% BSA/TBST を抗体希釈液として使用した。二次抗体にはヤギ抗マウス IgG (H+L)-HRP 抗体 (BioRad, #1706516)、あるいはヤギ抗ラビット IgG (H+L)-HRP 抗体 (BioRad, #1706515)を用い、希釈液には 3% non-fat milk/TBST を用いた。一次抗体、および二次抗体との反応後、TBST を用いて PVDF を 5 分間洗浄した。洗浄は 3 回行った。目的タンパク質の検出には Amersham ECL Prime (GE Healthcare)、HyGLOTM Chemiluminescent detection reagent (Denville Scientific Inc.)、または Prosignal Dura ECL Reagent (Prometheus, #84-834) を使用した。

4. 基質酸化活性測定

正常食で飼育した自由摂食下の野生型マウス、および *Arid5b* KO マウスからヒラメ筋 (soleus, SoL) および長趾伸筋 (extensor digitorum longus, EDL) を単離し、グルコース酸化活性あるいは脂肪酸酸化活性測定に使用した。

4-1. グルコース酸化活性測定

単離した SoL および EDL は Krebs-Henseleit Bicarbonate (KHB) バッファーに入れ氷上に 1 時間程度静置し、続いて 37°C のインキュベーター内に 40 分間静置した。なお KHB バッファーの組成は 116 mM NaCl/ 4.6 mM KCl/ 1.16 mM KH₂PO₄/ 25.3 mM NaHCO₃/ 2.5 mM CaCl₂/ 1.16 mM MgSO₄ であり、アッセイ当日に 2 mM glucose、38 mM mannitol、および 2% fatty-acid free bovine serum albumin (BSA) を加えて調製した (以後グルコース酸化活性測定用バッファーとする)。グルコース酸化活性測定用の KHB バッファーには、それぞれ最終濃度が 1 μ Ci/mL および 50 μ M となるように、glucose D- [¹⁴C] (uniformly labeled, American Radiolabeled Chemicals, Inc., #ARC0122E, 1 mCi/mL) および 50 mM パルミチン酸を加えた。glucose D- [¹⁴C] とパルミチン酸を加えた 500 μ L の KHB バッファー、および単離した骨格筋をシンチレーションバイアル (Research Products International Corp, #121000CA) に入れた。さらにグルコース酸化反応により放出される ¹⁴CO₂ のアクセプターとなる 200 μ L の benzethonium hydroxide (Sigma, #B2156) を 0.5 mL のキャップを切除したチューブに入れ、さらに同チューブを 1.5 mL のチューブ に入れた後、骨格筋に接触しないようにシンチレーションバイアルに入れた。シンチレーションバイアルはラバーストッパー (Kimble Chase, #882310-0000) とパラフィルムにて封をし、37°C、5% CO₂ インキュベーター内にて 1 時間静置した。グルコース酸化反応は、シリンジとニードルを用いてラバーストッパーから 100 μ L の 60% perchloric acid (Sigma, #311413) をシンチレーションバイアル中の KHB バッファーに加えることで停止した。その後バイアルに新しいパラフィルムを巻き、4°C にて一晩静置した。翌日、benzethonium hydroxide の入った 0.5 mL チューブを 10 mL の EcoscintTM A (National Diagnostics, #LS-273) を入れた新しいシンチレーションバイアルに移し、激しく混合した。 [¹⁴C] の放射性量は Beckman Liquid Scintillation CounterTM (#LS6500) を用いた 1 分間の測定により定量した。

4-2. 脂肪酸酸化活性測定

単離した SoL および EDL は KHB バッファーに入れ、氷上にて 1 時間程度静置し、続いて 37°C のインキュベーター内で 30 分間静置した。なお KHB バッファーの組成はグルコース酸化活性測定試験と同様に 116 mM NaCl/ 4.6 mM KCl/ 1.16 mM KH₂PO₄/ 25.3 mM NaHCO₃/ 2.5 mM CaCl₂/ 1.16 mM MgSO₄ であり、活性測定当日に 10 mM HEPES、5 mM glucose、そして 4% fatty-acid free BSA を加えて調製した (以後、脂肪酸酸化活性測定用バッファーとする)。パルミチン酸- [9, 10-³H]-BSA 複合体は以下の方法により調製した。1.6 x 10⁻⁶ μ mol のパルミチン酸- [9, 10-³H] (Moravek, Inc., MT-845) と 4 μ mol の non-label のパルミチン酸を 3 μ mol の

KOH と混和し、混合物を窒素ガスにより風乾させた。風乾したパルミチン酸-[9, 10-³H]は 25% BSA 溶液に溶解することで最終濃度 1.6×10^{-6} mM のパルミチン酸-[9, 10-³H]と $4 \mu\text{mol}$ の non-label のパルミチン酸を含むパルミチン酸-[9, 10-³H]-BSA 複合体 (脂肪酸-BSA ストック溶液)とした。1 mL の脂肪酸酸化活性測定用バッファーを丸底チューブ (12x75mm, #110428, Globe Scientific Inc.)に入れ、続いて $50 \mu\text{L}$ の脂肪酸-BSA ストック溶液を加えた。単離した骨格筋を同チューブに入れ、37°C の 5% CO₂ インキュベーター内に 1 時間静置した。1 時間後に $400 \mu\text{L}$ の上清を新しい 15 mL tube に移し、上清中のパルミチン酸-[9, 10-³H]から ³H₂O を分離するため 2 mL のクロロフォルム-メタノール溶液 (2:1, vol/vol) を加えた。この 15 mL チューブを 10 秒ボルテックスにより混和し、室温にて $3,000 \times g$ で短時間遠心分離した。その後、0.8 mL の 2 M KCl-2 M HCl 溶液を添加し、同様に 10 秒のボルテックス後、室温にて $3,000 \times g$ で 5 分間遠心分離した。10 mL の Ecoscint™ A を入れたシンチレーションバイアルを用意し、0.5 mL の上清を添加した後、激しく混和した。³H]の放射性量は Beckman Liquid Scintillation Counter™ (LS6500)を用いた 5 分間の測定により定量した。なお各活性測定試験後には骨格筋を蒸留水中で洗い、予め重量を測定したアルミニウムホイル上へのせ、60°C にて 20-24 時間乾燥させ、重量を測定した。¹⁴C]と³H]の値は単離した骨格筋の乾燥重量により補正した。

5. 代謝物量の定量とクエン酸合成酵素 (citrate synthase, CS) の活性測定

代謝物として GC 中の乳酸量、ピルビン酸量およびグリコーゲン量、そして血漿中の乳酸濃度および FFA 濃度を定量した。定量には Lactate Colorimetric Assay (Biovision, #K607-100)、Pyruvate Colorimetric/Fluorometric assay kit (Biovision, #K609-100)、Glycogen Colorimetric Assay (Biovision, #K648-100)、Lactate Colorimetric assay kit II (Biovision, #K627-100)、Free Fatty Acid Quantification Colorimetric/Fluorometric Kit (Biovision, #K612-100)を使用した。GC 中の CS 活性測定には Citrate Synthase Activity Colorimetric Assay (Biovision, #K318-100)を使用した。測定は各キットの指示書に従って行った。測定に使用したサンプルの調製方法を以下に示す。10-20 mg 程度の凍結した GC の粉末に各アッセイキットに付属しているバッファーを添加し、超音波処理により測定用サンプルを調製した (Q700 sonicator、QSONICA)。超音波処理は氷水中にて行い、amplitude 35 で 1 分間の超音波処理を行い、氷上に 1 分間静置した。この操作は 6 回繰り返した。その後、 $10,000 \times g$ にて 4°C で 10 分間遠心分離し、上清を各測定に使用した。なお遠心分離後に $10 \mu\text{L}$ 程度サンプリングし、BCA 法によりタンパク質濃度を定量した。

6. 骨格筋からの核酸抽出と定量

GC 中の ATP、ADP、および AMP 量を定量するため、GC より核酸の抽出を行なった。10-15 mg 程度の凍結した GC の粉末に 3% トリクロロ酢酸/PBS を加え、超音波処理により測定用サンプルを調製した (Q700 sonicator、QSONICA)。超音波処理は氷水中にて行い、amplitude 35 にて 30 秒間超音波処理した後、氷上に 1 分間静置した。この操作は 6 回繰り返

した。その後、12,000 x g にて 4°C で 5 分間 遠心分離し、上清を新しい 1.5 mL チューブに移し、等量の精製水を加えた後 1 M KOH を用いて pH を中性に調整した。遠心分離後に得られた沈殿物は 5% sodium dodecyl sulfate (SDS)/ 0.1 N NaOH に溶解し、タンパク質濃度の定量に使用した (BCA 法)。City of Hope の Analytical Pharmacology Core (Duarte, CA) に依頼し、UV-HPLC により ATP、ADP、および AMP 量を定量した。なお UV-HPLC による定量値は、各サンプル中のタンパク質量により補正した。

7. 耐糖能試験 (intraperitoneal glucose tolerance test, IP-GTT)、および血漿中インスリン濃度の測定

7-8 時間絶食させたマウスを IP-GTT に使用した。腹腔内へのグルコース (2 mg D-glucose/g 体重) 投与前 (0 分) と投与後 10、20、30、60、そして 120 分に、全血をマウスの尾静脈から回収した。血中グルコース濃度の測定には Clarity Diagnostics BG1000 グルコース測定器を使用した。曲線下面積 (area under the curve, AUC) は台形公式を用いて IP-GTT の曲線から求めた。インスリン濃度測定のための血漿サンプルは 1,000 x g、10 分間の遠心分離により準備した。血漿中インスリン濃度はインスリン (マウス・ラット) EIA キット (Cayman Chemical, #589501) を用いてメーカーのマニュアルに従い測定した。IP-GTT において回収した血漿はキット付属のインスリン標準液 (1 ng/mL) を用いてスパイクした。インスリン濃度の計算には Cayman の解析ワークブック (ELISADouble) を用いた。血漿中インスリン濃度は、スパイクしたサンプルの値からインスリン標準サンプル (1 ng/mL, duplicate) の平均値を差し引いた値から算出した。

8. グルコース取り込み活性測定

骨格筋へのグルコース取り込み量の測定は、既報の方法にいくつかの修正を加えて行なった [115]。マウスは試験の前に 7-8 時間絶食させ、その後 SoL および EDL を単離した。24 ウェルプレートに 1 mL ずつ分注した改良 KHB バッファー (以後 KHB バッファー) に骨格筋を入れ、30°C で 40 分間静置した。改良 KHB バッファーの組成は、4.7 mM KCl/ 1.2 mM KH_2PO_4 / 118 mM NaCl/ 1.2 mM MgSO_4 / 2.5 mM CaCl_2 / 15 mM NaHCO_3 / 1% fatty acid free BSA/ 10 mM HEPES/ 1 mM glucose とした。2 mL KHB バッファーに 1 mM グルコースと放射性標識した 2-DG- [^3H] (1.5 $\mu\text{Ci/mL}$) を添加し、インスリン (Gibco, #12585-014) は添加 (150 nM)、あるいは非添加とした。本バッファーに骨格筋を入れ、30°C にて 20 分間静置し、その後既報 [115] の方法に従って、1 mM グルコースを含む 1 mL の KHB バッファー中で骨格筋の洗浄を行った。PBS 中にて再度簡単に洗浄後、余分な水分をキプワイプ上で落とし、骨格筋重量の測定を行なった。その後、骨格筋を 100 μL の 1 M KOH に入れ、70°C において 15 分間加熱することによりホモジナイズした。ホモジネートは 4°C にて 10,000 x g、5 分間遠心分離し、上清を回収した。10 mL の EcoscintTM A をシンチレーションバイアルに入れ、40 μL の上清を加えた後混和し、[^3H] の放射性量は Beckman Liquid Scintillation CounterTM (LS6500) を用いた 5 分間の測定により定量した。

9. 初代筋幹細胞の培養、および筋分化の誘導

本検討には、以前板倉研究室においてマウス下肢骨格筋より単離された初代筋幹細胞を使用した [69]。初代筋幹細胞は表 5 に示した増殖用培地と筋分化誘導用培地を用いて増殖・分化させた。なお増殖用培地は 2 日毎、分化誘導用培地は毎日交換し 4 日間の筋分化を行った。

表 5. 初代筋幹細胞の維持と筋分化の誘導に用いた培地の組成

培地名	組成
増殖用培地	40% DMEM (Dulbecco's modified medium, high-glucose), 40% Ham's F-10, 20% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS), 2.5 ng/mL 塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic-fibroblast growth factor, bFGF), penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 μ g/mL)
筋分化用培地	DMEM, 5% ウマ血清 (horse serum, HS), penicillin (100 units/mL), streptomycin (100 μ g/mL)

10. 形質膜における GLUT4 タンパク質の検出

筋分化誘導後 4 日目の初代筋管細胞を使用した。形質膜に局在する GLUT4 タンパク質の検出には Llanos らの方法 [116] を一部変更して使用した。分化させた初代筋管細胞を PBS にて 2 回洗浄し、0.5 mg/mL の sulfo-NHS biotin (Thermo scientific, #21217) を加えた後、室温で 1 時間静置した。1 時間後に 100 mM glycine により反応を停止し、PBS にて 2 回洗浄した。洗浄後、氷冷したタンパク質回収用溶液 (140 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, and 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 x Halt protease and phosphatase inhibitor) にて細胞を回収し、氷水中にて 1 分間の超音波処理を行なった。その後、タンパク質溶液を氷上に 30 分間静置し、4°C、3,000 x g にて 30 分間遠心分離することで上清を回収した。タンパク質濃度は BCA 法を用いて測定した。氷冷したタンパク質回収用溶液を用いてタンパク質溶液のタンパク質濃度を一律に揃えた後、タンパク質溶液に NeutrAvidin plus ultralink resin (Thermo Scientific, #53151) を加え、4°C で一晩転倒混和した。翌日、4°C、14,000 rpm にて 15 分間遠心分離し、上清を非ビオチン化画分として回収した。ビーズペレットとしてチューブ内に残ったビオチン化画分は氷冷したタンパク質回収用溶液にて 2 回洗浄した後 1x Sample buffer に懸濁し、65°C で 30 分間加熱した。その後、上清のビオチン化画分は 14,000 rpm にて 2 分間遠心分離して回収した。ビオチン化画分 (細胞膜画分) と非ビオチン化画分 (細胞質画分) における GLUT4 タンパク質の発現量をウェスタンブロット法により解析した。

11. 蛍光免疫染色

トラガカントゴムを用いて、マウスから単離した骨格筋をコルクボード上 (2cm x 2cm) に置き、直ちに、液体窒素により冷却したイソペンテンに約 10 秒浸し凍結させた。10 μm の凍結切片は Tissue Path Superfrost Plus Gold microscope slides (Fisher Scientific) 上に接着させて作製した。凍結切片を 4%ホルムアルデヒド/PBS 溶液にて固定し、0.15% Triton-X 100 (Fisher Scientific)/PBS 溶液にて透過処理を行った。GLUT4 抗体 (#MA5-17176, 1:500, Thermo Fisher Scientific) およびジストロフィン抗体 (#ab15277, 1:400, Abcam) の両方を含む溶液を切片に添加し、室温にて 2 時間静置した。その後、切片を PBS にて 3 回洗浄した。2 次抗体は、GLUT4 抗体に対してはヤギ抗マウス Alexa Fluor 488 抗体 (Thermo Fisher Scientific) を、ジストロフィン抗体に対してはヤギ抗ラビット Alexa Fluor 555 抗体 (Thermo Fisher Scientific) を 1:500 の希釈にて使用し、両方の 2 次抗体を含む溶液を切片に添加後、室温にて 45 分間静置した。PBS にて切片を 3 回洗浄し、ProLong Glass Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific) を用いて封入した。画像は Zeiss LSM 880 inverted confocal microscope (Carl Zeiss, Inc.) を用いて撮影した。撮影時には全ての画像においてレーザー強度を一定とした。形質膜への GLUT4 タンパク質の局在解析には、Zen Black software (Carl Zeiss, Inc.) を用いて算出したジストロフィンタンパク質との近接の程度を示す Pearson の相関係数を利用した。

12. 統計解析

データは平均値 \pm 標準偏差として示した。野生型マウスと同齢の *Arid5b* KO マウスを比較した場合の有意差検定には Student's *t* 検定 (unpaired, two tailed) を使用し、*P* 値が 0.05 以下の場合に二群間に有意差があると判断した。

第三節 結果

1. *Arid5b* KO マウスの体組成に関する解析と摂餌量

野生型および *Arid5b* KO マウス由来 GC から total RNA を調製し、*Arid5b* 遺伝子内で欠損させたエクソン領域 (エクソン 6-8) の塩基配列に相当するプライマー (表 2、材料と方法参照) を用いて *Arid5b* mRNA の発現量を定量的 PCR 法により解析した。*Arid5b* KO マウスの骨格筋において *Arid5b* mRNA は検出されなかったことから、*Arid5b* 遺伝子の欠損が確認された (図 6A)。*Arid5b* KO マウスにおいては体重と白色脂肪組織重量が低下することが既に報告されているが [70]、本検討でも同様の重量の低下を確認した (図 6B-D)。骨格筋重量について解析したところ、*Arid5b* KO マウスにおいて GC、QC、および SoL の組織重量の低下が認められたが EDL の重量は野生型と同等であり (図 6E-F)、一方で、体重に対する骨格筋相対重量は野生型と *Arid5b* KO マウスとの間に差が認められなかったことから、*Arid5b* KO マウスの骨格筋重量の低下は体重低下に伴っていることが示唆された (図 6G-H)。なお、野生型と *Arid5b* KO マウスにおいては摂餌量、および体重あたりの摂餌量に差は認められなかった (図 6I-J)。

2. *Arid5b* KO マウスの代謝に関する表現型解析

Arid5b KO マウス由来骨格筋の代謝に関する表現型を解析するため、酸素消費量を測定した。その結果、*Arid5b* KO マウスでは野生型マウスに比べて酸素消費量、およびエネルギー消費量の増加が観察されたが (図 7A-B)、マウスの基礎活動量から計測した全移動距離は *Arid5b* KO マウスと野生型マウスで同等であったことから (図 7C)、*Arid5b* KO マウスの酸素消費量とエネルギー消費量の増加は運動量の上昇に基づかないことが示唆された。*Arid5b* KO マウスの酸素消費量が増加していたことから、ミトコンドリアの好氣的なエネルギー産生の活性が変化した可能性を想定し、マウスから単離した SoL および EDL においてグルコースと FFA を利用した際の酸化活性を測定した。その結果、グルコースを基質とした際の好氣的なエネルギー産生活性は *Arid5b* KO マウス由来 SoL および EDL において野生型と比較して有意に上昇していたが (図 7D)、FFA を利用した際の好氣的なエネルギー産生の活性は野生型と差はなかった (図 7E)。一方、解糖系によって生じたピルビン酸は乳酸へ変換されることから、GC 中の乳酸量を測定した結果、*Arid5b* KO マウス由来 GC において乳酸量が有意に低下していた (図 7F)。なお GC 中のピルビン酸濃度、および血漿中乳酸濃度は野生型と *Arid5b* KO マウスにおいて有意な差はなかったことから (図 7G-H)、骨格筋から血中への乳酸の放出量は *Arid5b* KO マウスにおいて変化しておらず、ピルビン酸からの乳酸への変換量が低下している可能性が示唆された。ミトコンドリア内での ATP 産生効率は解糖系の 15 倍以上であることから、グルコースを基質とした場合の好氣的なエネルギー産生の活性が上昇した *Arid5b* KO マウス由来 GC 中の ATP、ADP、そして AMP 量を野生型マウスと比較したところ、*Arid5b* KO マウス由来 GC において ATP 量の有意な増加が認められた (図 7I)。一方で ADP および AMP 量、そして AMP/ATP 比は野生型と同等であった (図 7I)。以上の結果より、

Arid5b KO マウス由来骨格筋においては、グルコースを基質とした好氣的なエネルギー産生の活性が上昇していることが示された。

3. *Arid5b* KO マウス由来骨格筋におけるミトコンドリアの含有量および形態に関する解析

骨格筋中のミトコンドリア含有量はミトコンドリアにおける好氣的なエネルギー産生の活性に影響を与えることから、*Arid5b* KO マウス由来 GC におけるミトコンドリアの生合成経路について解析した。PGC-1 α は共役因子と複合体を形成した後 [117-119]、標的遺伝子である電子伝達系 (electron transport chain, ETC) や酸化リン酸化に関連した遺伝子群の発現とともに、ミトコンドリア DNA の複製、および転写を担う mitochondrial transcription factor A (TFAM) の発現を誘導し、ミトコンドリアの生合成を促進する [120, 121]。そこで PGC-1 α の発現量とその下流遺伝子である estrogen-related receptor alpha (*Esrra*)、GA binding protein transcription factor subunit alpha (*Gabpa*)、nuclear respiratory factor-1 (*Nrf-1*)、*Tfam* の mRNA 発現量を解析した [119, 122]。一方、骨格筋組織中のミトコンドリア含有量のマーカーとして、CS の活性を測定した [20]。野生型と *Arid5b* KO マウスの GC における PGC-1 α タンパク質の発現量をウェスタンブロット法にて解析したところ、野生型と比較して差異はなく (図 8A)、*Esrra*、*Gabpa*、*Nrf-1*、*Tfam* などの下流遺伝子の mRNA の発現量も野生型と比較して差は認められなかった (図 8B)。さらに CS の活性とミトコンドリアにおける ETC の各複合体サブユニットのタンパク質発現量は野生型と *Arid5b* KO マウスの GC において差は認められなかったことから (図 8C-D)、*Arid5b* KO マウスの GC においてミトコンドリアの生合成量、および含有量は野生型と同等であることが示唆された。これらの結果は、*Arid5b* KO マウスにおける酸素消費量の上昇、および *Arid5b* KO マウスの骨格筋におけるグルコース酸化活性の上昇はミトコンドリアの含有量には起因しないことが示唆された。さらにミトコンドリアにおける好氣的なエネルギー産生はミトコンドリアの形態と関連することから [38]、GC を用いてミトコンドリア形態に関与するタンパク質の発現解析を行った。ミトコンドリアの形態はミトコンドリアの分裂と融合とのバランスによって決定される [123]。ミトコンドリアの融合は mitofusin 1 (MFN1)、mitofusin 2 (MFN2)、そして optic atrophy protein 1 (OPA1) により促進され、分裂には dynamin-related protein 1 (DRP1) が重要な役割を果たす [123]。これら因子のタンパク質の発現量を解析したところ、野生型と *Arid5b* KO マウスにおいて同等であったことから (図 8E)、ミトコンドリアの形態変化は生じていないことが示唆された。

4. ミオシン重鎖 (Myh) アイソフォームの発現解析

好氣的なエネルギー産生の活性は、Type II 筋繊維と比較して、Type I 筋繊維において高いことが知られている [35, 36]。酸素消費量や骨格筋における ATP 含有量が変化した骨格筋特異的な Sirtuin 3 (*SIRT3*) トランスジェニックマウスや transient receptor potential melastatin 2 (*TRPM2*) 遺伝子欠損マウスなどの遺伝子改変マウスにおいては筋繊維型の遷移が報告されていることから [124, 125]、GC における Myh アイソフォームである *Myh7*、*Myh2*、*Myh1*、お

よび *Myh4* mRNA の発現量を解析することで Type I から Type II への筋繊維型の遷移の可能性を検討した。その結果、*Arid5b* KO マウス由来 GC においては *Myh1* mRNA の発現が野生型と比較して有意に低下していたが、その他の *Myh* アイソフォームの mRNA 発現量に変化は認められなかった (図 9A)。MYH1 および MYH7 のタンパク質レベルでの発現解析を行ったところ、MYH1 および MYH7 の発現量は野生型と *Arid5b* KO マウスにおいて有意な差は認められなかった (図 9B)。以上の結果より、*Arid5b* KO マウス由来 GC においては筋繊維型の遷移は起こっていないと考えられた。

5. 耐糖能試験、および骨格筋へのグルコース取り込み活性の測定

Arid5b KO マウスにおけるグルコースの代謝に関する表現型をさらに解析するため、耐糖能試験を行った。また *Arid5b* KO マウス由来骨格筋におけるグルコースの取り込み活性を測定した。耐糖能試験の結果、*Arid5b* KO マウスでは血中インスリン濃度の上昇が認められない状態で、血中グルコースのクリアランスの有意な上昇が認められた (図 10A-B)。さらに *Arid5b* KO マウスから単離した SoL においては、非刺激条件下におけるグルコースの取り込み活性が有意に増加しており、耐糖能試験の結果と一致していた (図 10C)。なおインスリン刺激下では、野生型から単離した SoL においてグルコースの取り込み活性が非刺激下と比較して有意に上昇したが、*Arid5b* KO マウスから単離した SoL におけるグルコース取り込み活性は非刺激下と同等であった (図 10C)。これらの結果により、*Arid5b* KO マウスから単離した SoL においては、インスリン刺激非依存的にグルコースの取り込み量が最大まで増加している可能性が示唆された。骨格筋へのグルコースの取り込み活性は骨格筋内へのグリコーゲンの蓄積量と相関することが報告されていることから [126]、GC 中のグリコーゲン含有量を測定したところ、*Arid5b* KO マウス由来 GC においては野生型と比較して増加していた (図 10D)。これらの結果は、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋へのグルコース取り込み量の増加を支持する結果であった。

6. 形質膜への GLUT4 小胞の移行に関与するタンパク質の発現解析

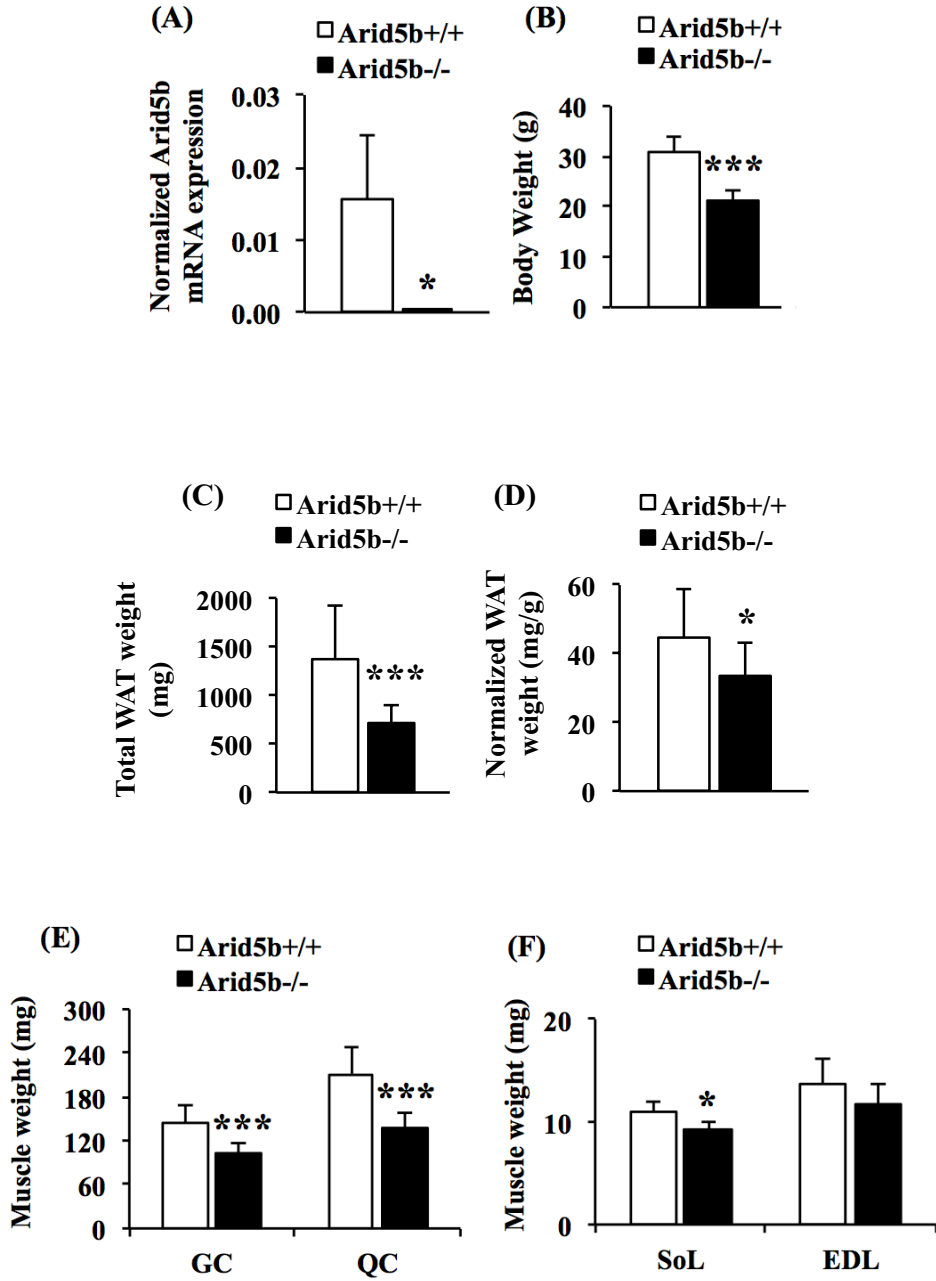
Arid5b KO マウス由来骨格筋へのグルコース取り込み量がインスリン非刺激下において上昇していたことから、形質膜への GLUT4 小胞の移行に関与する AKT の活性化について検討を行った。AKT は mTORC2 による 473 番目の Ser 残基がリン酸化されることで活性化される [21, 22]。そこで、*Arid5b* KO マウス由来 GC におけるリン酸化 AKT (pAKT-S473)量、および AKT の総発現量について解析したところ、野生型と *Arid5b* KO マウスにおいて同等であった (図 11A)。また AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMP-activated protein kinase, AMPK) は運動により活性化され、AKT と同様に、TBC1D1 をリン酸化により不活化することでグルコースの取り込みを活性化することが知られている [127, 128]。AMPK は Thr172 のリン酸化により活性化されることから [129]、GC におけるリン酸化 AMPK (pAMPK α 1/2-Thr172)量、および AMPK の総発現量を解析したところ、野生型と *Arid5b* KO マウスにおいて差は認められなかった (図 11B)。これらの結果により、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋へのグルコースの取

り込みは、インスリンシグナル経路や運動シグナル経路以外のメカニズムによって促進されている可能性が示唆された。

GLUT4 小胞の形質膜への局在は Rab-GTPase ファミリーである TBC1D1、および TBC1D4 により負に制御され [23, 130]、骨格筋におけるグルコースの取り込みにおいて TBC1D ファミリーは重要な制御因子である [25, 131, 132]。そこで、TBC1D1、および TBC1D4 mRNA、およびタンパク質の発現解析を行った結果、*Arid5b* KO マウス由来 GC において TBC1D4 の発現量は変化しなかったが、TBC1D1 のタンパク質の発現量は減少していた (図 12A-B)。これまでに TBC1D1 を欠損したマウス骨格筋、および骨格筋で TBC1D1 タンパク質の発現量の減少が認められた骨格筋特異的に *Bmal1* 遺伝子を欠損したマウスを用いた以前の研究において、骨格筋における GLUT4 タンパク質の発現量の変化が報告されていることから [115, 131, 132]、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋における GLUT4、および GLUT1 タンパク質の発現量を解析した結果、予想外にも野生型マウスとの間に差は認められなかった (図 12C-D)。*Arid5b* KO マウス由来骨格筋においてはインスリン非刺激下でグルコース取り込み量が上昇していたことから、GC 由来の組織切片を用いて形質膜のマーカであるジストロフィンと GLUT4 の蛍光免疫染色を行い、形質膜における GLUT4 タンパク質の局在について解析した。形質膜における GLUT4 タンパク質の局在量の解析には、ジストロフィンタンパク質との近接の程度を示す Pearson の相関係数を利用した [133]。野生型および *Arid5b* KO マウス由来 GC における典型的な蛍光免疫染色の画像を図 13A に示した。*Arid5b* KO マウス由来骨格筋において Pearson の相関係数は野生型と比較して有意に上昇していたことから (図 13B)、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋では形質膜における GLUT4 タンパク質の局在量が増加したことが示された。

Arid5b KO マウス由来骨格筋における形質膜への GLUT4 小胞の移行をさらに検証するため、野生型、および *Arid5b* KO マウス由来骨格筋から初代筋幹細胞 [69] を単離し、筋分化を誘導した後、初代筋管細胞の形質膜画分および細胞質画分における GLUT4 タンパク質の発現量を解析した。まず、初代筋管細胞における TBC1D1、GLUT4、および GLUT1 の発現量について検討したところ、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋と同様に、*Arid5b* KO マウス由来初代筋管細胞において GLUT4 および GLUT1 タンパク質の発現変動は認められなかったが、TBC1D1 タンパク質の発現量が減少していた (図 14A)。なお *Tbc1d1* mRNA の発現量は *Arid5b* KO マウス由来初代筋管細胞において減少しており、これは *Arid5b* KO マウス由来骨格筋における *Tbc1d1* mRNA の発現パターンと異なっていた (図 14B)。初代筋管細胞における形質膜への GLUT4 タンパク質の局在解析には、形質膜上タンパク質の sulfo-NHS ビオチン化法およびアビジンビーズを用いたビオチン化タンパク質の免疫沈降法を利用し [116]、形質膜画分 (ビオチン化タンパク質)、および細胞内画分 (非ビオチン化タンパク質) における GLUT4 タンパク質の局在量の比を算出した。その結果、形質膜画分と細胞内画分の GLUT4 タンパク質の局在量の比は *Arid5b* KO マウス由来初代筋管細胞において野生型よりも高かったことから (図 14C)、*Arid5b* KO マウス由来初代筋管細胞において形質膜への GLUT4 小胞の移行が促進して

いることが示唆された。以上をまとめると、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋においては、TBC1D1 タンパク質の発現量の減少により GLUT4 小胞の形質膜への輸送が促進され、グルコース取り込み量が増加した可能性が示唆された。



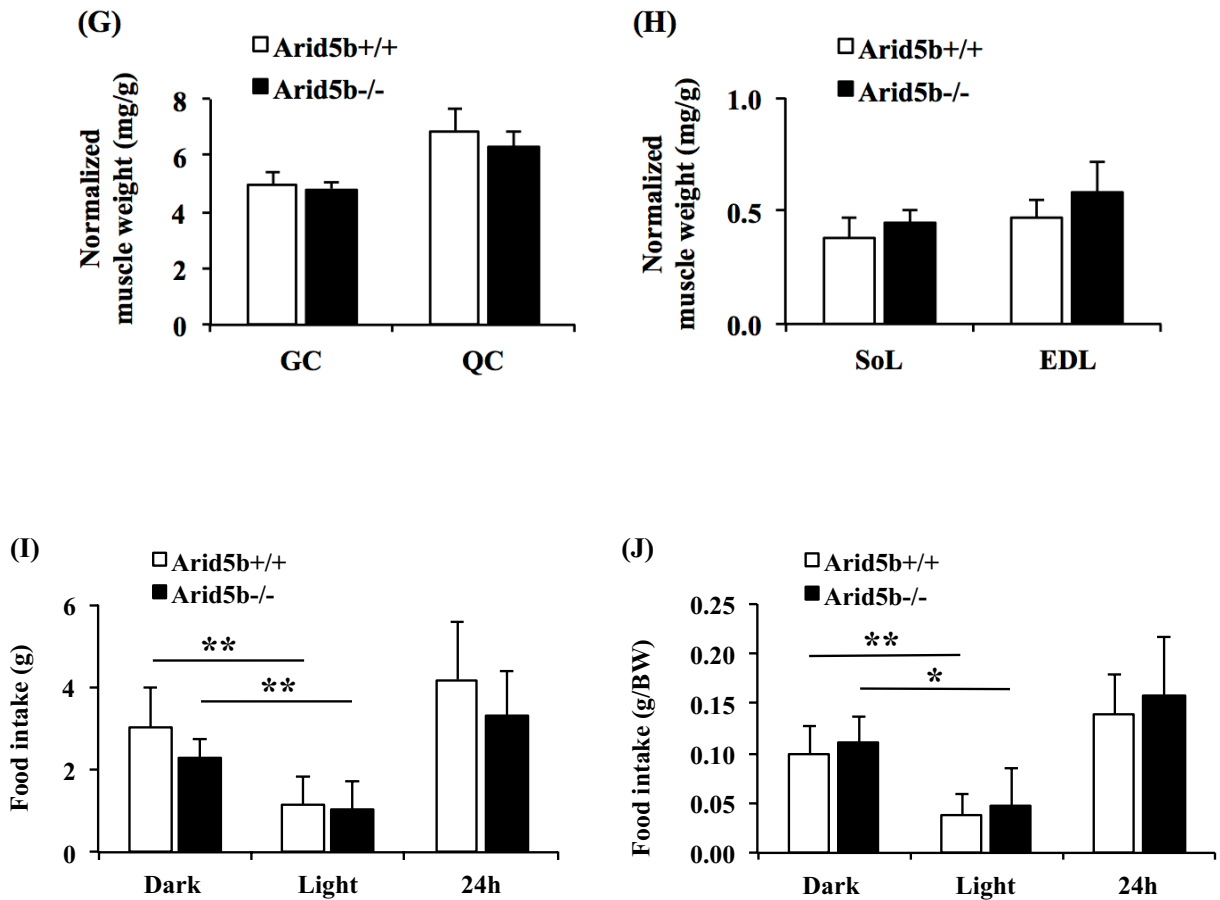
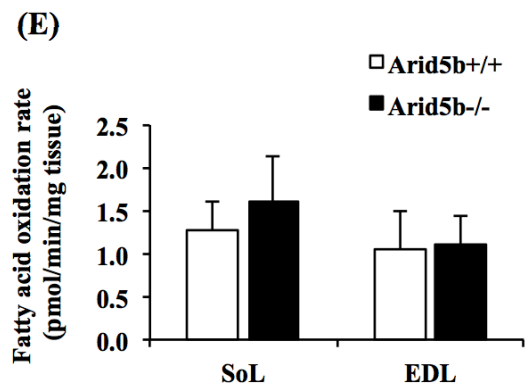
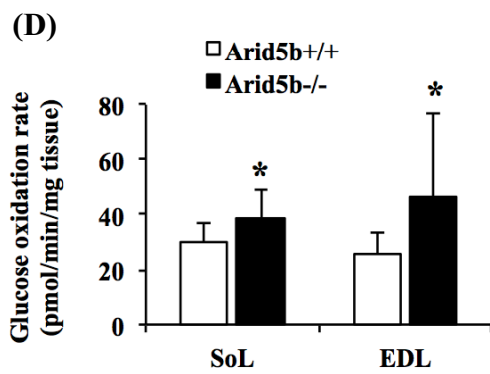
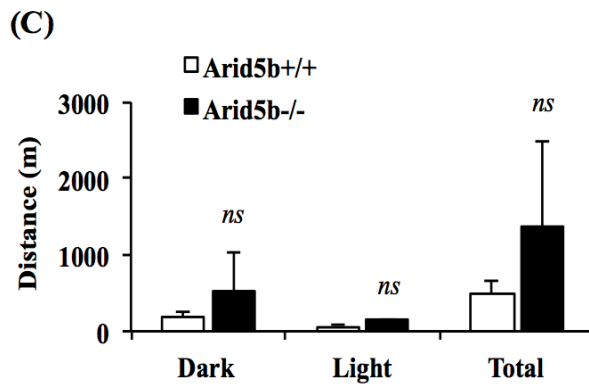
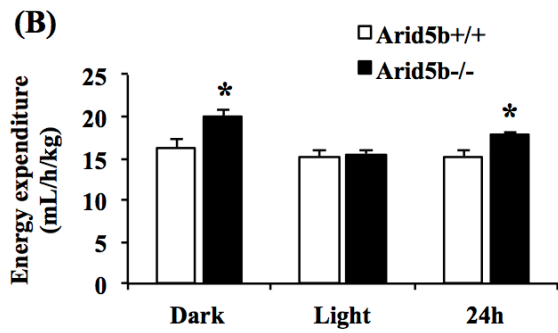
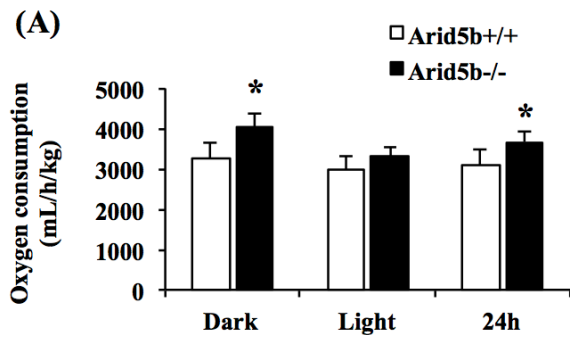


図 6. *Arid5b* KO マウスの体組成に関する解析と摂食量

(A) QC を用いた PCR 法による *Arid5b* mRNA の発現解析 (野生型マウス: n=7、*Arid5b* KO マウス: n=3)。(B) マウス体重 (野生型マウス: n=19、*Arid5b* KO マウス: n=10)。(C) 白色脂肪組織重量、および (D) 白色脂肪組織量 (対体重比)を示した (野生型マウス: n=19、*Arid5b* KO マウス: n=10)。(E, F) 骨格筋重量、および (G, H) 骨格筋量 (対体重比)を示した。GC および QC : 野生型マウス (n=18)、*Arid5b* KO マウス (n=9)。SoL および EDL : 野生型マウス (n=3)、*Arid5b* KO マウス (n=4)とした。(I) 明暗サイクル (12h/サイクル)、および 24 時間の摂餌量 (n=5)、(J) 明暗サイクル (12h/サイクル)、および 24 時間あたりの摂餌量 (対体重比)を示した (n=5)。*, $P < 0.05$; **, $p < 0.01$ (暗サイクル対明サイクル); ***, $P < 0.001$ (対応のない t 検定)



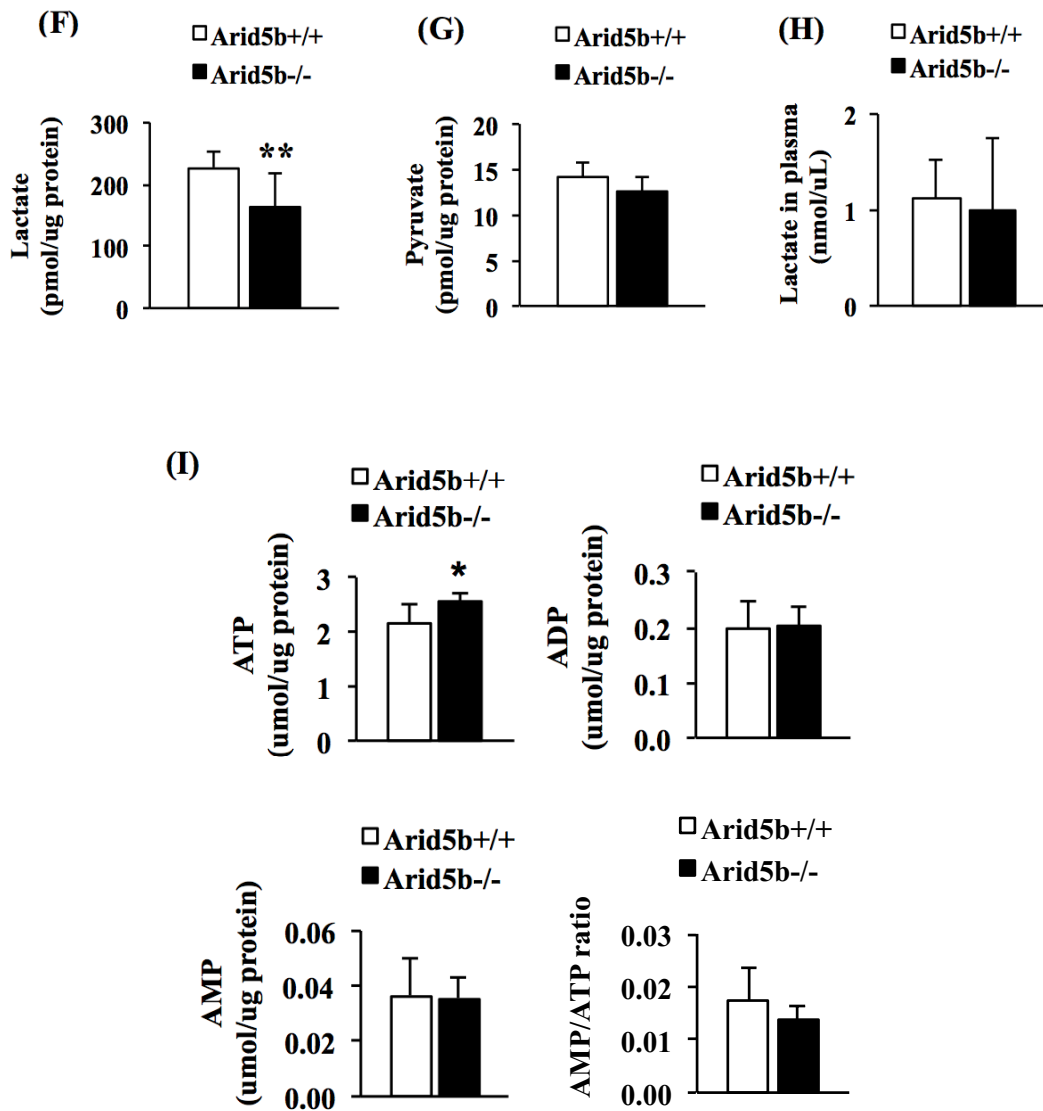
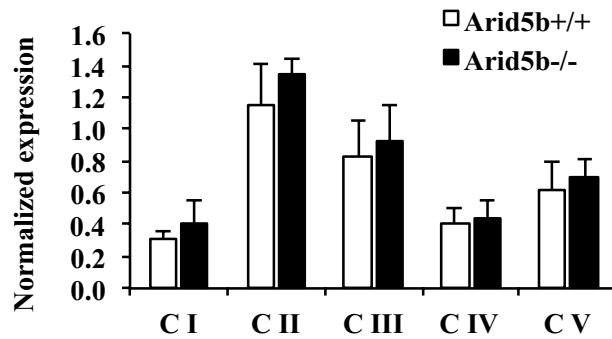
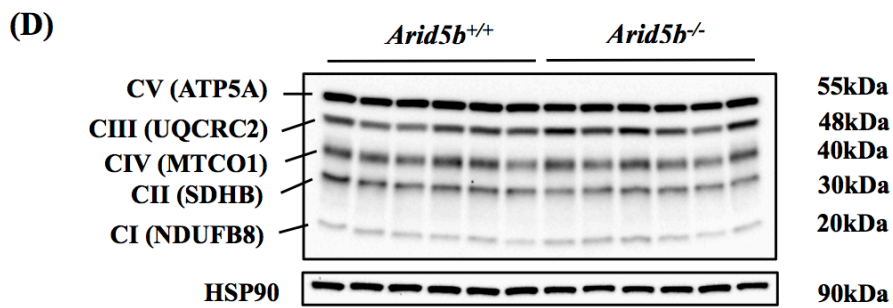
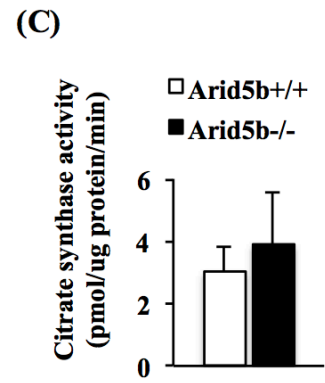
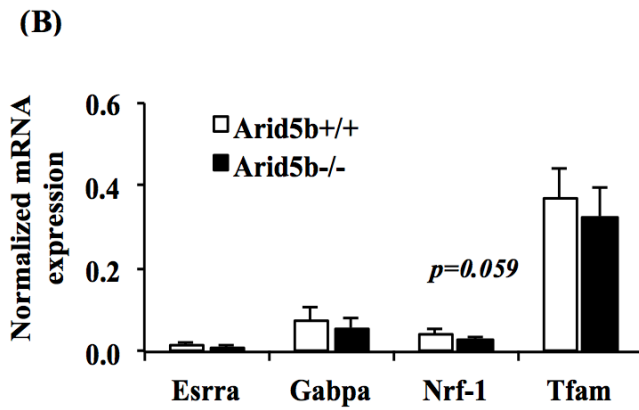
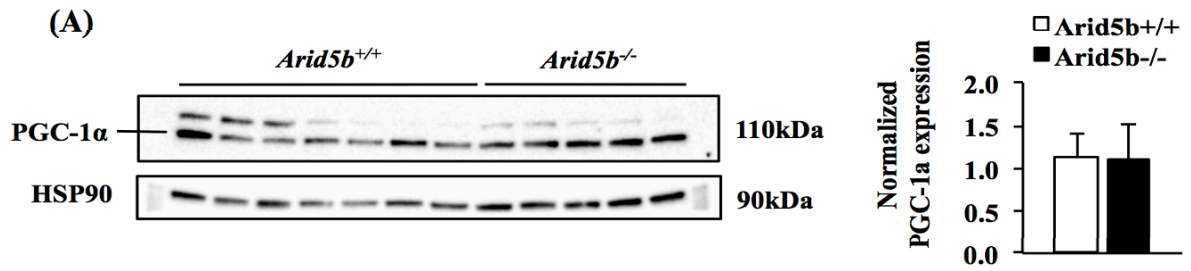


図 7. *Arid5b* KO マウスの代謝に関する表現型解析

(A) マウスの酸素消費量、(B) マウスのエネルギー消費量、(C) マウスの移動距離 (A-C: n=5)、(D)骨格筋におけるグルコース酸化活性、および(E) 脂肪酸酸化活性を示した (野生型マウス: n=13-15、*Arid5b* KO マウス: n=5-6)。(F) GC 中の乳酸量、および(G)ピルビン酸の量を示した (野生型マウス: n=11、*Arid5b* KO マウス: n=6)。(H) 血漿中の乳酸濃度 (n=8)、(I) GC 中の ATP 量、ADP 量、および AMP 量を示した。また AMP/ATP 比を算出した (野生型マウス: n=10、*Arid5b* KO マウス: n=5)。ns: 有意差なし、*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (対応のない t 検定)



(E)

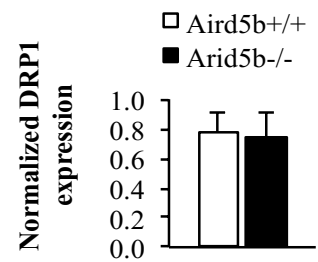
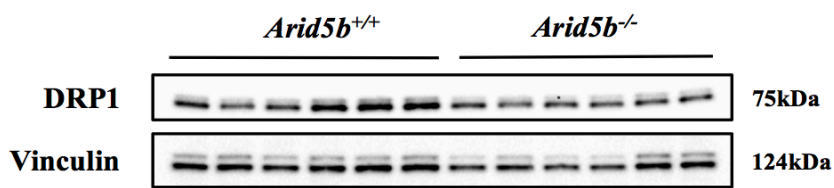
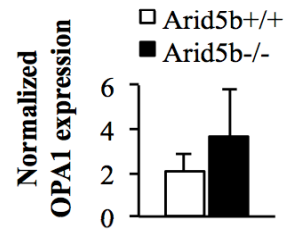
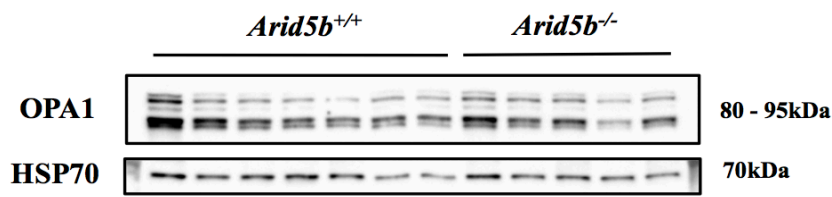
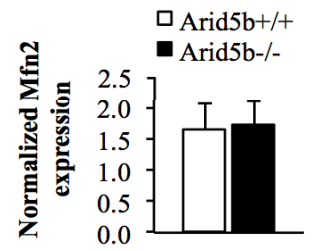
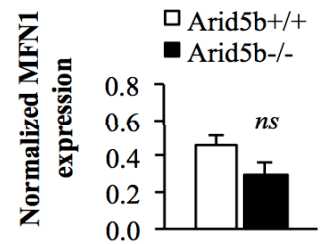
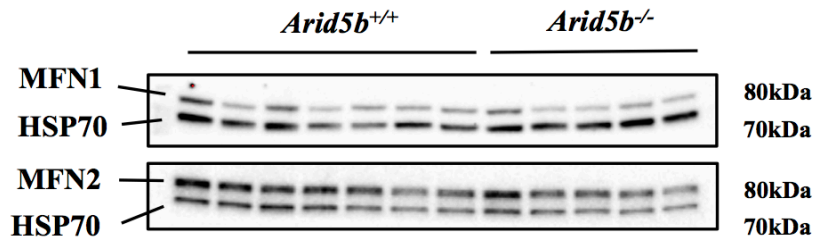
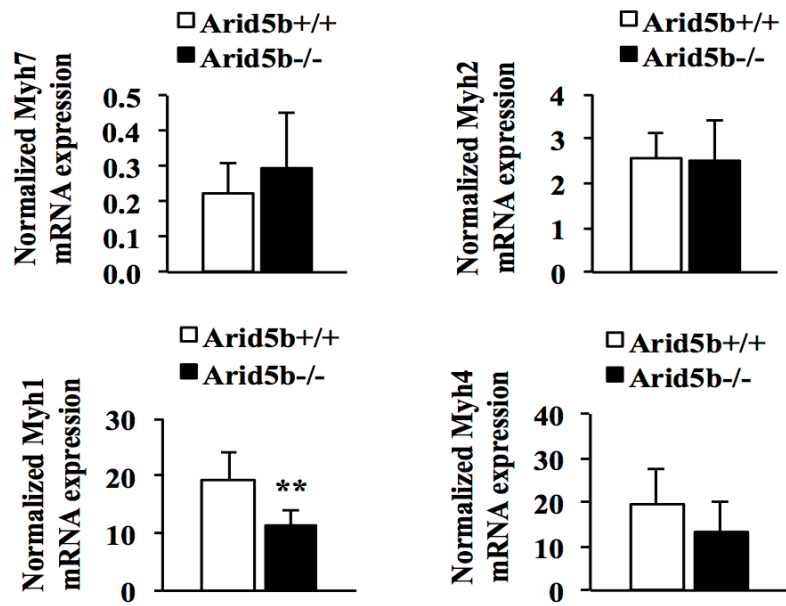


図 8. *Arid5b* KO マウス由来骨格筋におけるミトコンドリアの含有量、およびミトコンドリアの形態制御に關与するタンパク質の発現解析

(A) GC における PGC-1 α タンパク質の発現量を示した (野生型マウス: n=7、*Arid5b* KO マウス: n=5)。PGC-1 α の発現量は HSP90 により補正しグラフ化した。(B) GC における *Esrra*、*Gapba*、*Nrf-1*、および *Tfam* の mRNA の発現量を示した。各 mRNA の発現量は *Rpl13a* mRNA の発現量にて補正した (野生型マウス: n=10、*Arid5b* KO マウス: n=6)。(C) CS 活性 (野生型: n=13-15、*Arid5b* KO マウス: n=5-6)。(D) ETC 複合体サブユニットタンパク質の発現量を示した。各サブユニットのタンパク質の発現量は HSP90 により補正した。CI: NADH: Ubiquinone oxidoreductase subunit B8 (NDUFB8)、CII: succinate dehydrogenase complex iron sulfur subunit B (SDHB)、CIII: ubiquinol-cytochrome C reductase core protein 2 (UQCRC2)、CIV: mitochondrially encoded cytochrome C oxidase I (MTCO1)、CV: ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1 (ATP5A1)。各 n=6。(E) GC における MFN1、MFN2、OPA1、および DRP1 のタンパク質の発現量を示した (野生型マウス: n=7、*Arid5b* KO マウス: n=5、あるいは各 n=6)。各タンパク質の発現量は HSP70、または Vinculin のタンパク質の発現量を用いて補正した。ns: 有意差なし。

(A)



(B)

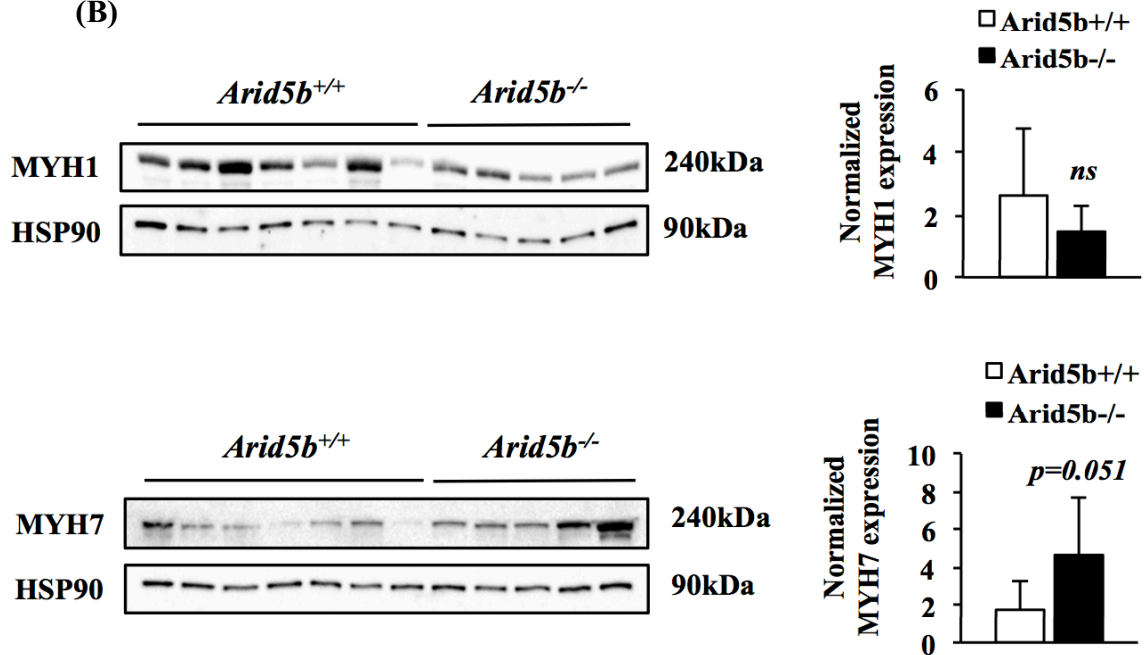
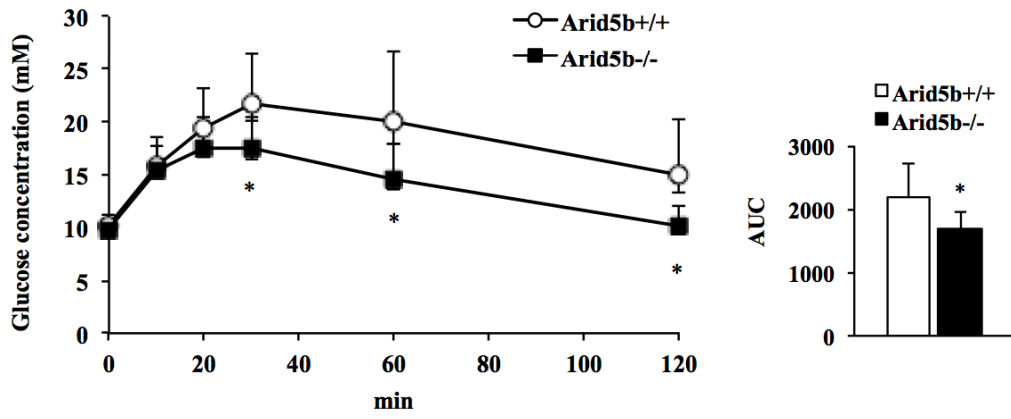


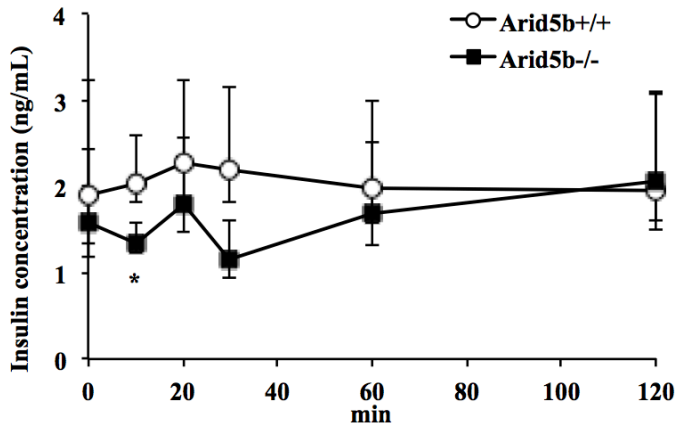
図 9. Myh アイソフォームの発現解析

(A) GC における 4 つの Myh アイソフォームの mRNA の発現量を示した。各 mRNA の発現量は *Rpl13a* mRNA の発現量により補正した (n=5-7)。(B) GC における MYH1 および MYH7 のタンパク質の発現量を示した。MYH の発現量は HSP90 により補正しグラフ化した (野生型マウス: n=7、*Arid5b* KO マウス: n=5)。ns: 有意差なし、**, $P < 0.01$ (対応のない t 検定)

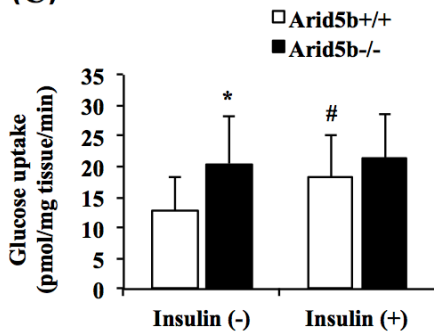
(A)



(B)



(C)



(D)

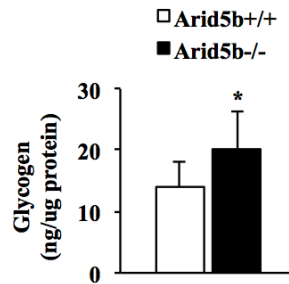
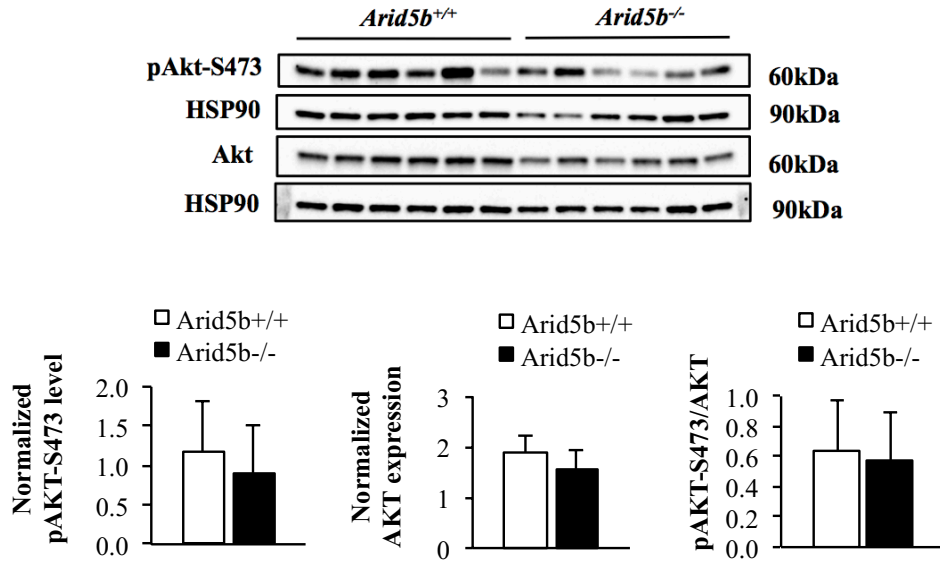


図 10. 耐糖能試験、および骨格筋へのグルコース取り込み活性の測定

(A) 耐糖能試験における血中のグルコースクリアランスを示した。腹腔内へグルコース投与後、0、10、20、30、60、120分の時点における血中のグルコース濃度を測定し(左図、n=9)、AUCを算出した(右図、n=9)。(B) 耐糖能試験における血漿中のインスリン濃度を示した(各n=5-6)。(C) SoLにおけるグルコース取り込み活性を示した(野生型マウス:n=11-13、*Arid5b* KOマウス:n=8)。インスリン濃度は150 nMとした。(D) GC中のグリコーゲン量を示した(野生型マウス:n=10、*Arid5b* KOマウス:n=5)。*, $P < 0.05$ (野生型マウスとの比較、対応のないt検定); #, $P < 0.05$ (非刺激下との比較、対応のないt検定)。

(A)



(B)

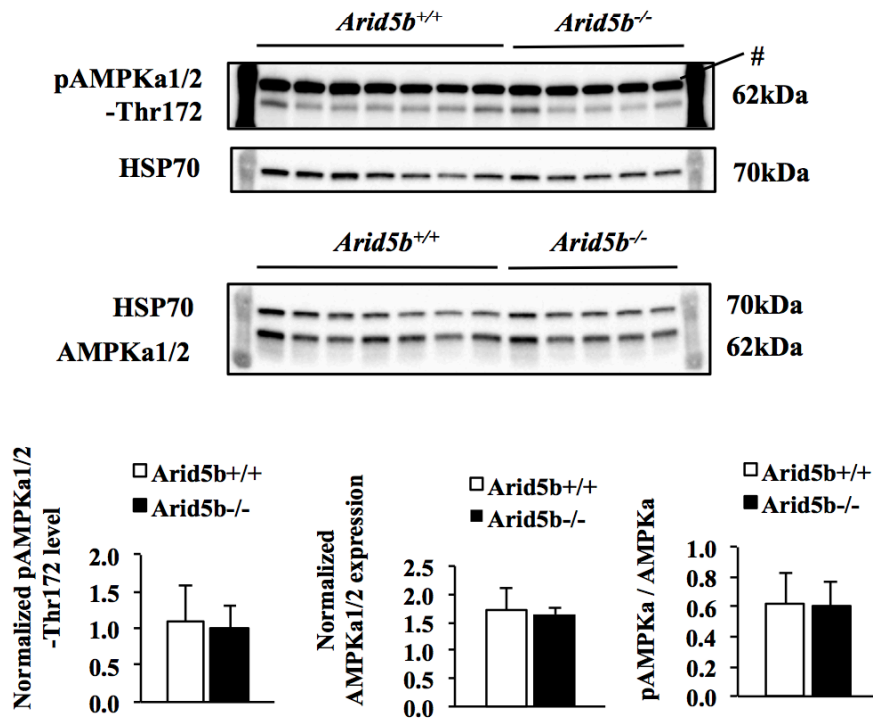


図 11. AKT、および AMPK のリン酸化量の解析

(A) GC における AKT の総発現量、およびリン酸化 AKT 量(pAKT-S473)を示した。各タンパク質の発現量は HSP90 により補正しグラフ化した (n=6)。また pAKT-S473 と AKT の総発現量の比を算出した (n=6)。(B) GC における AMPKα1/2 の総発現量、およびリン酸化 AMPK 量 (pAMPKα1/2-Thr172) を示した。各タンパク質の発現量は HSP70 の発現量により補正しグラフ化した。pAMPKα1/2 (Thr172) と AMPK の総発現量の比を算出した(野生型マウス: n=7、*Arid5b* KO マウス: n=5)。

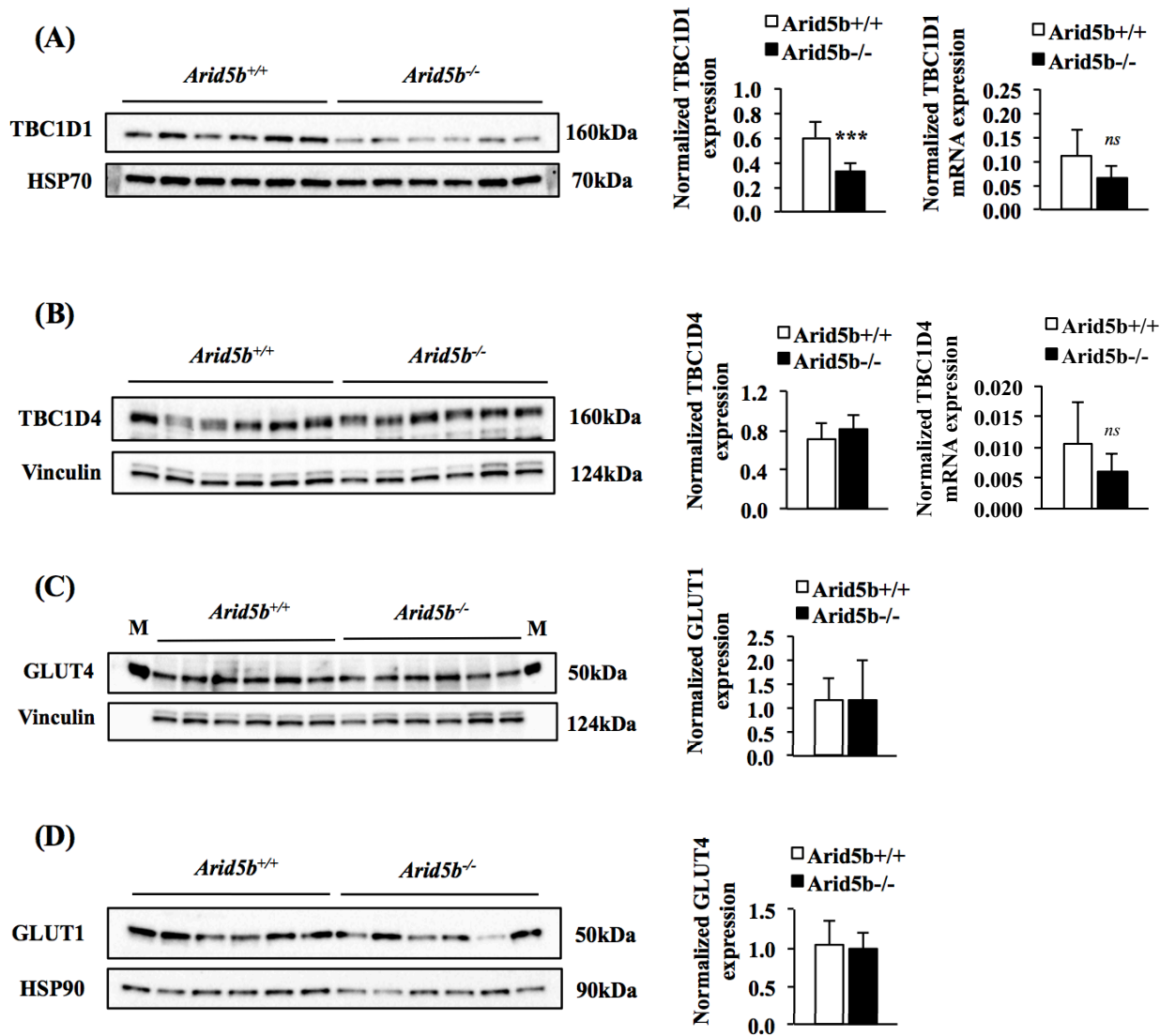
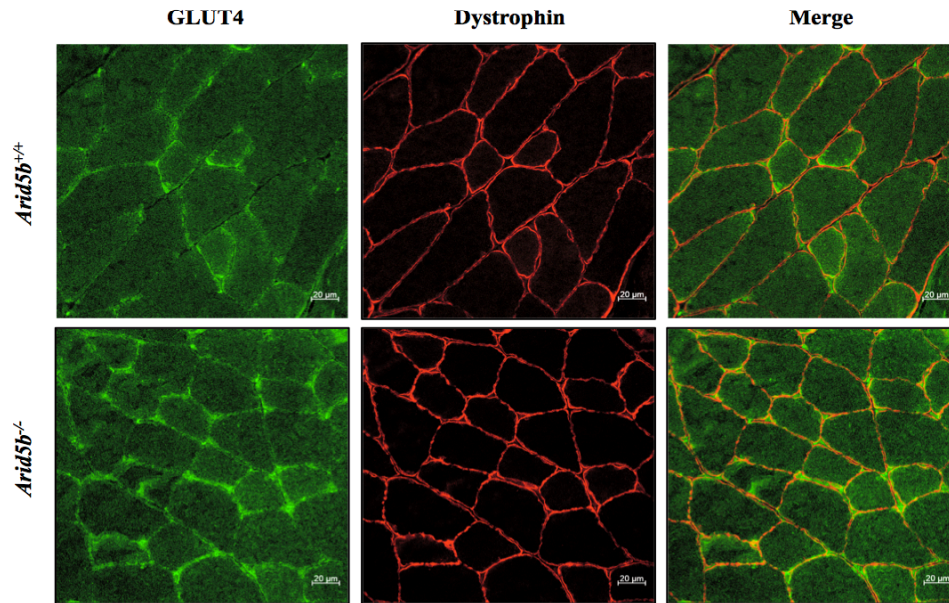


図 12. 形質膜への GLUT4 小胞の輸送に関与するタンパク質の発現解析

(A) TBC1D1、(B) TBC1D4 のタンパク質および mRNA の発現量、(C) GLUT4、および (D) GLUT1 のタンパク質の発現量を示した。各タンパク質の発現量は HSP70、vinculin、あるいは HSP90 により補正シググラフ化した (n=6)。mRNA の発現量は *Rpl13a* mRNA の発現量にて補正した (野生型マウス: n=7、*Arid5b* KO マウス: n=5)。ns: 有意差なし、***, $P < 0.001$ (対応のない t 検定)

(A)



(B)

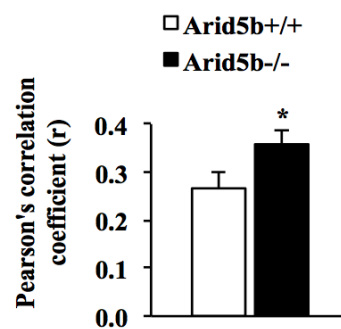


図 13. 形質膜における GLUT4 タンパク質の検出

(A) GC の組織切片において、GLUT4 (緑)、およびジストロフィン (赤) の局在を蛍光免疫染色により可視化した。最右は各蛍光波長にて撮影した画像の重ね合わせ画像であり、共焦点顕微鏡を用いて撮影した典型的な画像を示した。(B) Pearson's correlation coefficient を利用し、GLUT4 タンパク質とジストロフィンタンパク質の近接の程度を解析した (n=3)。*, $P < 0.05$ (対応のない t 検定)

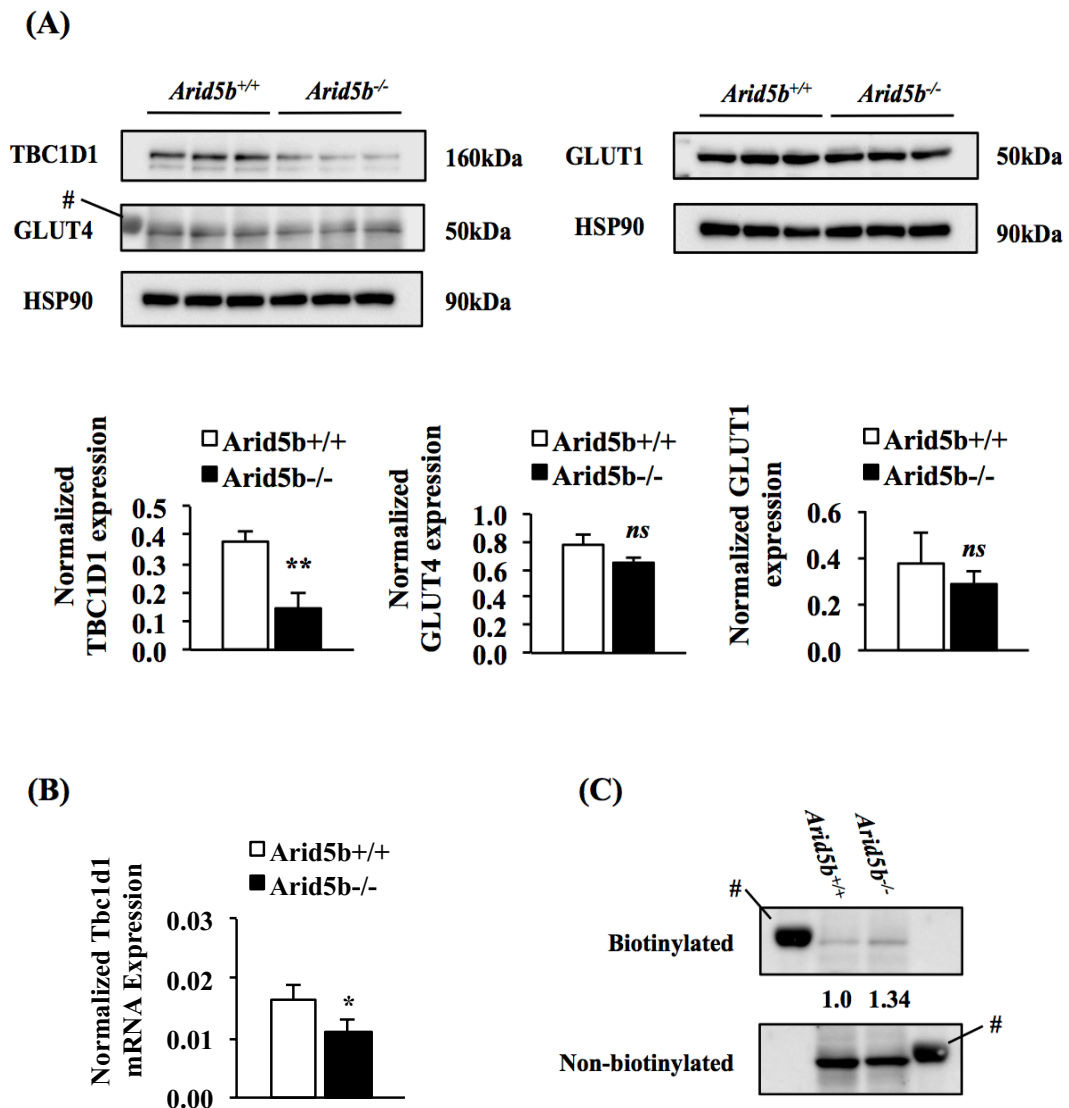


図 14. 初代筋管細胞における形質膜への GLUT4 タンパク質の局在解析

(A) 筋分化 4 日目の初代筋管細胞における TBC1D1、GLUT4、GLUT1 のタンパク質の発現量を解析した。各タンパク質の発現量は HSP90 により補正シグナリゼーションした (各 $n=3$)。 (B) 分化 4 日目の初代筋管細胞における *Tbc1d1* mRNA の発現量を示した (各 $n=4$)。 (C) 分化 4 日目の初代筋管細胞の細胞膜画分 (biotinylated)、および細胞質画分 (non-biotinylated) における GLUT4 の発現量を解析した。形質膜上のタンパク質を sulfo-NHS ビオチンによりビオチン化後、アビジンをを用いて免疫沈降し、分画した。#: 分子量マーカー。ns: 有意差なし、*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (対応のない t 検定)

第四節 考察

本研究では、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋において、エネルギー代謝に関する表現型の解析を行い、インスリン非依存的にグルコースの取り込み量が増加し、さらにグルコースを用いた好氣的なエネルギー産生の活性化が明らかにされた。*Arid5b* KO マウス由来骨格筋においては形質膜での GLUT4 タンパク質の局在量の増加、さらに形質膜への GLUT4 小胞の移動の阻害因子である TBC1D1 タンパク質の発現減少が認められたことから、グルコース取り込み量の増加は、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋における TBC1D1 の発現減少により誘導されたことが強く示唆された (図 15)。

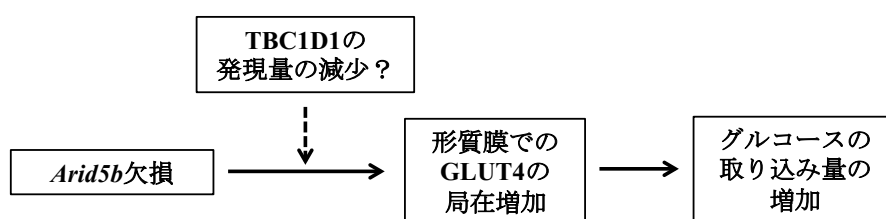


図 15. 本研究において得られた知見のまとめ

骨格筋での TBC1D1 タンパク質の発現量の低下を介したグルコースの取り込みの促進経路

TBC1D1 を介した形質膜への GLUT4 小胞の局在化機構は、ラット筋芽細胞株 L6 細胞などの培養細胞やマウスから単離した骨格筋を用いた研究 [25]、さらに *Akt2* 遺伝子欠損マウスなどの遺伝子改変マウス由来骨格筋を用いた研究によって詳細に解析されてきた [134–136]。Rab-GTPase 活性化タンパク質の一つである TBC1D1 は、GLUT4 小胞体上に局在する Rab タンパク質の GTPase を活性化し、GTP 結合型 Rab (活性型) を GDP 結合型 Rab (不活性型) へ変換することで、形質膜への GLUT4 小胞の輸送を阻害する [23]。TBC1D1 の活性は、インスリン刺激や運動によって活性化される AKT、AMPK、あるいは Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK) を介したリン酸化によって抑制され、TBC1D1 タンパク質がリン酸化された結果、GLUT4 小胞体上の活性型 Rab が維持されることで、形質膜への GLUT4 小胞の輸送が促進される [23, 134–136]。すなわち、インスリンなどによる GLUT4 小胞の輸送を促進するシグナル伝達経路において TBC1D1 は負に働く鍵因子である。*Arid5b* KO マウス由来骨格筋においては、TBC1D1 タンパク質の発現量が減少していた一方で、pAKT-S473 および pAMPK-Thr172 の量は野生型と差がなかったことから、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋における形質膜への GLUT4 の局在は、AKT や AMPK の活性化を介してではなく、TBC1D1 のタンパク質量の減少によって誘導されたことが示唆された。さらに *Arid5b* KO マウス由来

骨格筋におけるグルコースの取り込み量の増加はインスリン非依存的であり、この結果は、L6 細胞株における RNAi 法を用いた TBC1D1 の発現抑制によって、インスリン非存在下で形質膜への GLUT4 小胞の移行が促進された先行研究の結果と一致した [25]。なお TBC1D1 は GLUT1 小胞の形質膜への移行の阻害にも関与することが最近報告されたことから [137]、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋における GLUT1 の形質膜における局在についても、今後解析する必要がある。

肝臓や軟骨細胞において、ARID5B がヒストンタンパク質のメチル化調節を介して標的遺伝子の転写調節を行う生理機能が報告されていることから [68, 138]、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋における TBC1D1 タンパク質の発現量の減少は、*Arid5b* 遺伝子の欠損により *Tbc1d1* 遺伝子の転写が抑制された結果である可能性が考えられた。しかしながら、*Arid5b* KO マウス骨格筋における *Tbc1d1* mRNA の発現量を野生型と比較したが有意な差が認められなかった一方で、*Arid5b* KO マウス由来初代筋管細胞における *Tbc1d1* mRNA の発現量は有意に減少しており、ARID5B による *Tbc1d1* mRNA の転写調節については筋繊維レベルでの解析が必要であると考えられた。ARID5B による標的遺伝子の転写調節機構に関しては、軟骨細胞および肝臓細胞において ARID5B が PHF2 と複合体を形成し、標的遺伝子のプロモーター領域の H3K9Me2 を PHF2 が脱メチル化することで転写抑制を解除し、標的遺伝子の発現を誘導することが報告されている [68, 138]。今後は、初代筋管細胞を利用したクロマチン免疫沈降アッセイなどによって、ARID5B が PHF2 を介して *Tbc1d1* 遺伝子の転写を調節する可能性について詳細に解析する必要がある。

TBC1D1 タンパク質の発現量の減少を介さず、骨格筋へのグルコースの取り込みを促進する経路

ラット筋芽細胞株 L6 細胞、およびマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞などの培養細胞やマウス骨格筋を用いた研究においては、TBC1D1 の発現抑制あるいは活性低下は形質膜での GLUT4 の局在量を増加させ、骨格筋へのグルコースの取り込み量を増加させることが示されてきた [25, 135, 139, 140]。また *Arid5b* KO マウス由来骨格筋を用いた解析においても、TBC1D1 の発現量の減少、形質膜での GLUT4 の局在量の増加、さらにグルコースの取り込み量の増加が認められたことから、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋へのグルコースの取り込み量の増加は、TBC1D1 の発現量の減少に起因することが示唆された。しかしながら、その一方で、*Tbc1d1* 遺伝子欠損マウス (*Tbc1d1* KO マウス)などの遺伝子改変マウス由来骨格筋においては、TBC1D1 タンパク質の発現量が減少するものの、グルコースの取り込み量が減少するなどの矛盾が認められた (表 6)。骨格筋における TBC1D1 タンパク質の発現量の減少が観察された骨格筋特異的 *Bmall* 遺伝子欠損 (*Bmall* KO)マウス、および *Tbc1d1* KO マウスにおいては、骨格筋における GLUT4 タンパク質の発現量の減少とともにインスリン刺激によるグルコースの取り込み量が減少した [115, 131, 141]。一方で、骨格筋特異的にインスリン様成長ホルモン-1 受容体 (insulin-like growth factor-1 receptor, *Igflr*)遺伝子、およびインスリン受容体 (insulin

receptor, *Isnr*) 遺伝子を両方欠損させたノックアウトマウス (MIGIRKO マウス)の骨格筋においては、TBC1D1 タンパク質の発現量の減少とともに GLUT4 タンパク質の発現量が増加し、インスリン非刺激下および刺激下でのグルコース取り込み量の増加が認められた [132]。以上の結果は、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋におけるグルコースの取り込み量の増加は、TBC1D1 タンパク質の発現量の減少に起因しない可能性も示唆している。

表 6. 遺伝子改変マウスにおける TBC1D1 および GLUT4 の発現変動と骨格筋へのグルコースの取り込み量のまとめ

KO マウス	TBC1D1 タンパク質発現量	GLUT4 タンパク質発現量	骨格筋へのグルコースの取り込み量 (非刺激下)	骨格筋へのグルコースの取り込み量 (インスリン刺激下)
<i>Tbc1d1</i> (全身性)	欠損	減少	変化なし	減少
<i>Bmal1</i> (骨格筋特異的)	減少	減少	変化なし	減少
<i>Arid5b</i> (全身性)	減少	変化なし	増加	変化なし
<i>Igfl1/Insr</i> (骨格筋特異的)	減少	増加	増加	増加

TBC1D1 の発現量あるいは活性の調節を介さず、骨格筋へのグルコースの取り込み量に影響を及ぼすと考えられる 2 つの経路を図 16 に示した。①グリコーゲンの合成経路、および②乳酸の産生経路が *Arid5b* KO マウス由来骨格筋におけるグルコースの取り込み量に与える影響について考察した。まず①の経路であるが、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋においてはグリコーゲンの含有量が有意に増加していたことから、①グリコーゲンの合成経路が活性化されている可能性が示唆された。グリコーゲン合成酵素 (glycogen synthase 1, GYS1)の活性は、グルコース-6-リン酸 (glucose-6-phosphate, G6P)を介したアロステリックな調節、およびインスリンによる GSK-3 β の抑制を介した脱リン酸化により調節されることが報告されているが、最近、骨格筋におけるグリコーゲンの合成量は G6P を介した GS のアロステリックな調節によって主に制御されることが明らかとなった [142, 143]。従って、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋においては、グルコースの取り込み量の増加によって細胞内 G6P 量が増加し、G6P によって GYS1 が活性化した結果、グリコーゲンの含有量が増加した可能性も考えられた。*Arid5b* KO マウス由来骨格筋におけるグルコースの取り込み量の増加への関与を明らかにするためには、*Arid5b* KO マウスの骨格筋から単離した初代筋幹細胞を用いて、GYS1 の発現抑制がグルコースの取り込み量に与える影響について解析する必要がある。

グリコーゲンの合成に利用されなかったグルコースは、解糖系を介してピルビン酸へ分解される (図 16)。ピルビン酸は②乳酸の産生、あるいはミトコンドリアの TCA 回路と ETC を介して好氣的なエネルギー産生に利用される (図 16)。Arid5b KO マウス由来骨格筋においては乳酸の含有量が有意に減少していたが、血漿中の乳酸濃度は野生型と差がなかったことから、Arid5b KO マウス由来骨格筋においてピルビン酸からの乳酸産生や組織からの血中への分泌量は増加していないことが示唆された。従って、Arid5b KO マウス由来骨格筋におけるグルコースの取り込み量の増加が②乳酸の産生経路の活性化を介して誘導された可能性は低いと考えられた。なお Arid5b KO マウス由来骨格筋においてミトコンドリアの生合成、およびミトコンドリアの形態制御、さらに筋繊維型の遷移に関連する解析を行ったが、野生型との有意な差が認められなかったことから、Arid5b KO マウス由来骨格筋におけるグルコースを基質とした際の好氣的なエネルギー産生の活性上昇は、骨格筋へのグルコースの取り込み量が増加し、解糖系の代謝流量が増加した結果、あるいはミトコンドリア内へのピルビン酸の輸送が増加した結果、誘導された可能性が推測された。

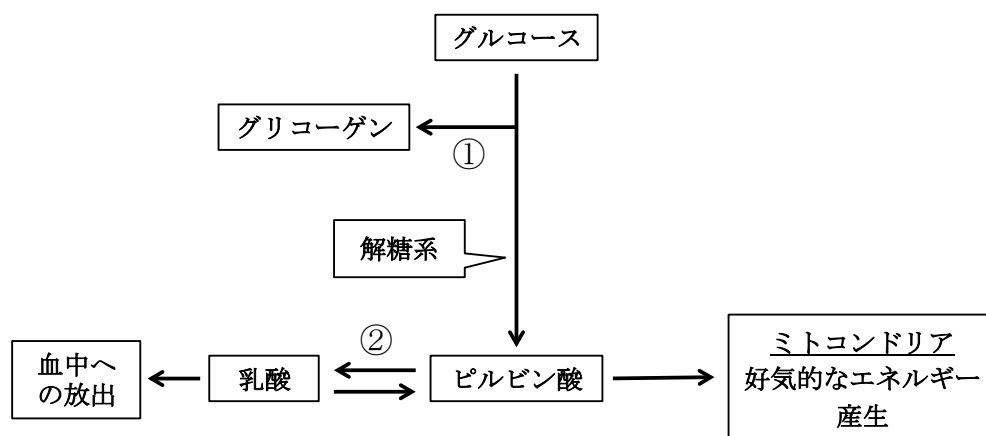


図 16. 骨格筋におけるグルコースの取り込み量に影響する経路の概要図

さらに、骨格筋以外の組織が骨格筋へのグルコースの取り込み量に影響を与えた可能性も考えられる。骨格筋におけるグルコースの取り込みは、白色脂肪組織から分泌されるアディポネクチンや肝臓から分泌される fibroblast growth factor 21 (FGF21) により活性化されることが知られている。アディポネクチンは、アディポネクチン受容体を介して骨格筋における AMPK を活性化し、リン酸化により TBC1D1 の活性を抑制することで、骨格筋におけるグルコースの取り込みを促進する [144]。一方 FGF21 は、骨格筋において PKC ζ を活性化し、アクチンリモデリングを介してインスリン依存的な骨格筋へのグルコースの取り込み量を増加させることが報告されている [145]。Arid5b KO マウス由来骨格筋においては、AMPK のリン酸化量は野生型と比較して差がなかったこと、また Arid5b KO マウス由来骨格筋へのグルコースの取り込みの増加はインスリン非依存的であったことから、アディポネクチンおよび FGF21 は、Arid5b KO マウス由来骨格筋へのグルコースの取り込み量の増加に関与しないと

考えられた。しかしながら、*Arid5b* 遺伝子は全身に偏在的に発現しており、全身性の *Arid5b* 遺伝子の欠損によって複数の組織に変化が生じた可能性があることから、今後は骨格筋特異的な *Arid5b* KO マウスを用いて、TBC1D1 の発現抑制を介した骨格筋へのグルコースの取り込み量の促進メカニズムを解析する必要があると考えられた。

骨格筋以外の組織が血中グルコースのクリアランスに与える影響

Arid5b KO マウスにおいては血中のグルコースクリアランスが上昇しており、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋におけるグルコースの取り込み量の増加が要因であると考えられた。しかしながら、血中のグルコースは骨格筋だけでなく白色脂肪組織、肝臓、脳、心臓等にも取り込まれるため、血中のグルコースクリアランスの上昇には、骨格筋以外の組織におけるグルコースの取り込み量の増加が関与している可能性は否定できない。一方で、TBC1D1 タンパク質の発現量は骨格筋において高く、白色脂肪組織、肝臓、脳、心臓においては骨格筋と比較してその発現量は極めて低い [146]。従って、*Arid5b* KO マウスにおける血中のグルコースクリアランスの上昇には、TBC1D1 の発現量の減少を介した骨格筋へのグルコースの取り込み量の増加が主に貢献しており、骨格筋以外の組織の関与は小さいことが推測された。

一方で、分泌因子を介して骨格筋以外の組織におけるグルコースの取り込みが促進される機構が知られており、特に、FGF21 や fibronectin type III domain containing 5 (FNDC5)により、白色脂肪細胞において褐色脂肪細胞化が誘導されることが報告されている [147, 148]。白色脂肪細胞の褐色化は、脂肪組織内のミトコンドリア含有量および好氣的なエネルギー産生経路を活性化し、脂肪細胞へのグルコースの取り込み量、および FFA の酸化活性の上昇を誘導する [147]。骨格筋における FGF21 の発現はストレス応答機構を介した ATF4 の活性化により誘導され [147]、また FNDC5 の発現は PGC-1 α の活性化によって誘導されるが [149]、*Arid5b* KO マウスにおいては PGC-1 α の発現誘導は認められないことから、FNDC5 を介して白色脂肪組織の褐色化が誘導されている可能性は低いと考えられる。ただし褐色脂肪細胞化では、マウスにおいてエネルギー消費量の増加が認められ、高脂肪食による肥満誘導に対して抵抗性を示すことが報告されており [46, 47]、これら表現型は *Arid5b* KO マウスにおいても観察されていること、さらに FGF21 は肝臓や白色脂肪組織からも分泌されることから、分泌因子を介した *Arid5b* KO マウスの白色脂肪組織の褐色脂肪細胞化の可能性は否定できない。従って、今後、ヘマトキシリン・エオジン染色による脂肪細胞の形態の解析、さらに脂肪細胞の褐色化のマーカーである PGC-1 α や uncoupling protein 1 (UCP1) などの発現解析により、*Arid5b* KO マウスの白色脂肪組織の褐色化について検証する必要がある。

以上、本研究においては、*Arid5b* KO マウス由来骨格筋において TBC1D1 タンパク質の発現量が減少し、インスリン非依存的なグルコース取り込み量の増加を誘導する可能性を示すとともに、ARID5B が 2 型糖尿病の治療標的となる可能性を提示した。

第二章 白色脂肪細胞における GDE5 の機能解析

第一節 緒言

骨格筋と白色脂肪組織は、栄養因子や分泌因子を介した組織間クロストークにより互いの生理機能を調節しており、2 型糖尿病における骨格筋でのインスリン抵抗性の誘導には、肥大化した白色脂肪組織からの FFA の放出量や炎症性サイトカインの分泌量の増加、および異所性脂肪の蓄積が大きく関与する [34, 74, 95, 97]。従って、本研究の目的である肥満・2 型糖尿病の発症予防法、および治療戦略に貢献できる新規知見の獲得を目指し、第一章における ARID5B の骨格筋のエネルギー代謝における生理的役割の解明に加え、第二章においては白色脂肪組織の肥大化に関する新たなメカニズムの解明に取り組んだ。

白色脂肪組織の肥大化は、白色脂肪細胞の増殖、あるいは白色脂肪細胞のサイズの増大によって起こり [75–77]、白色脂肪細胞のサイズの増大には細胞内への TAG の蓄積、すなわち LD の形成が伴う [78]。LD の膜の主要な構成成分は PC であり、LD の形成が促進された場合には、PC の生合成に関与する酵素である CTP:コリンリン酸シチジルトランスフェラーゼ α (CTP: phosphocholine cytidyltransferase α , CCT α)が核内から LD の膜上へ移行し、PC の生合成を制御することが報告されている [92]。PC は細胞膜の構成成分でもあり、細胞の増殖と LD の形成の両面において重要な役割を果たしていることから [90–93]、PC の生合成は白色脂肪組織のサイズの制御において重要な機構であると考えられる。

PC の生合成は以下の 2 つの独立した経路によって制御されている (図 17) [150]。一つ目は細胞内 choline 濃度に依存した PC 合成経路である CDP-choline (Kennedy)経路、二つ目はホスファチジルエタノールアミン-N-メチルトランスフェラーゼ (phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, PEMT)による連続メチル化反応を介して、ホスファチジルメタノールアミン (phosphatidylethanolamine, PE)から新たに PC を合成する PE メチル化経路である [94]。CDP-choline 経路において律速となる酵素は CCT α であり、PE メチル化経路においては、S-アデノシルメチオニン (S-adenosylmethionine, SAM)が主要なメチルドナーとなる。choline は SAM の生合成にも関与することから、細胞内の choline は PC の合成に必須の代謝物であると言えるが、細胞内の choline の供給ルートに関しては未だ不明な点が多い。細胞内の choline 濃度は、酵母においては choline トランスポーターを介した細胞外から直接的に取り込む経路、あるいは GPC の加水分解により細胞内で産生する経路によって調節されている [151–153]。哺乳動物細胞においては、CHT1 (choline transporter 1)が神経細胞の choline トランスポーターとして機能することを見出したが、3T3-L1 細胞においては choline の輸送に関与する choline トランスポーターについての知見は極めて乏しい。一方、哺乳動物におけるリン脂質代謝酵素の一つである GDE5 が、GPC を加水分解し choline を生成することが明らかにされており、哺乳動物の白色脂肪細胞における choline の供給経路として、GPC の加水分解による細胞内での choline 産生経路が関与している可能性が示唆されている。

CDP - choline経路

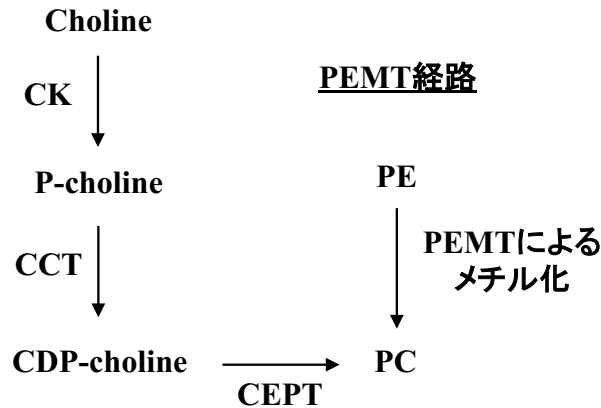


図 17. PC の生合成経路

CK: choline kinase, CEPT: choline/ethanolamine phosphotransferase

(*Curr Opin Gastroenterol.* 2012 March; 28(2): 159–165k から改変し引用)

GPC などのグリセロホスホジエステル (glycerophosphodiester, GPs)は、ホスホリパーゼ A1、および A2 によりグリセリン脂質の両アシル基が切断されることで生成される [154, 155]。GDE は、微生物、植物、哺乳動物において高度に保存された GDE 領域を有し、GPs を分解する酵素群である [156, 157]。微生物における GDE は、グリセロホスホイノシトール (glycerophosphoinositol, GPI)や GPC といった GPs をグリセロール-3-リン酸 (glycerol-3-phosphate, G3P)とアルコールに分解し、リン源、および炭素源の確保において重要な役割を担う [158]。一方で哺乳動物細胞における GPs は生理活性物質として細胞機能を多様に調節することが報告されている。例えば GPI は、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞において細胞増殖を誘導し [159, 160]、その一方で、GPI のリン酸化体であるグリセロホスホイノシトール-4-リン酸 (glycerophosphoinositol-4-phosphate, GPI4P) は、GTPase Rac や Rho の活性化を介した membrane ruffle とストレスファイバーの形成を誘導し、細胞移動時や細胞形態変化時における細胞骨格の制御を担うことが報告されている [161]。また GPC は、Na 濃度および尿素濃度が極めて高い腎髄質内層において、尿細管上皮細胞の浸透圧調節を担う重要な GPs として知られている [155]。さらに GPC は choline、ホスホコリン (phosphocholine, P-choline)とともに脳脊髄液 (cerebrospinal fluid, CSF)中に存在する水溶性代謝物であり、アルツハイマー病などの神経変性疾患患者においては GPC 濃度が CSF 中で上昇していることから、GPC がアルツハイマーの病態へ関連する可能性も推測されている [162]。哺乳動物の GDEs は基質に対する特異性や局在が微生物とは異なることが報告されており、GPs 濃度の

調節を介して多様な細胞機能を制御する生理的役割を進化の過程で獲得したと推測される [157, 163–165]。

哺乳動物の GDE としては、酵母 two-hybrid 法により発見された GDE1 を初めとし、differential display 法により見出された GDE3 を含む 7 種類の GDEs (GDE1-7)が見出されており (図 18) [156]、それぞれが特異的な GPs に対して分解活性を示す。GDE1 と GDE3 は GPI に、GDE2 と GDE5 は GPC の分解活性を有する [164, 166, 167]。GDE1 は G タンパク質シグナル経路の調節因子 RGS16 に結合し、G タンパク質共役受容体 (G-protein-coupled receptors, GPCRs)への刺激により活性化することから、GPCRs と GPI シグナルの橋渡し役として機能すると考えられている [168]。GDE3 は GPI 添加による MC3T3-E1 の細胞増殖を阻害し、また骨分化誘導時にその発現が強く誘導されることから、GPI の分解を介して細胞増殖を負に制御することで骨分化を促進する可能性が示唆されている [160]。GDE2 は Na 濃度および尿素濃度の上昇により発現が抑制され、GPC の分解活性が低下することで GPC が細胞内へ蓄積し、腎尿細管上皮細胞の浸透圧を調節する機能が報告されている [167]。また GDE2 は神経細胞においても高発現しており、運動ニューロン分化 [169]やレチノイン酸による神経突起伸長を促進する [170]ことから、GPC の代謝を介して脳の発達やアルツハイマー病の発症へ関与する可能性が推測されている。

当研究室においては、*in vitro* の酵素反応実験を用いて GDE5 も GPC の分解活性を有することを明らかにした [164]。GDE5 を除く他の GDEs は細胞膜貫通ドメインを有し細胞膜上に局在するが (図 18)、GDE5 は細胞膜貫通ドメインを持たず、N 末端に多糖類結合領域を有するといったユニークな酵素であることから [164]、当研究室では GDE5 の生理的機能を精力的に研究してきた。GDE5 は様々な組織において発現しているが、特に骨格筋、心筋において高い発現が認められること、そして多様な骨格筋萎縮モデルにおいて GDE5 の mRNA 発現レベルが低下したことをこれまでに明らかにしている [164]。GDE5 の活性領域の一部を含む C 末端を欠失させた変異体 (GDE5 Δ C471)を C2C12 細胞に過剰発現させると筋分化が抑制され [164]、さらに同変異体を骨格筋特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウス (GDE5 Δ C471 Tg)においては、異常タンパク質蓄積ストレスが原因と推測される継続的な速筋型骨格筋の萎縮と運動機能の低下が認められたことから、GDE5 は酵素活性非依存的に筋繊維の維持に関与する可能性が示唆されている [171]。その一方で、GDE5 による GPC の分解は、PKC α を介した細胞遊走を促進し、子宮内膜癌および卵巣癌の転移に関与することが報告されている [172]。以上のように、GDE5 の生理機能の解明は進んでいるものの、GDE5 の酵素活性と正常細胞における生理的役割についての報告は未だに少ない。

そこで本研究において、GDE5 が細胞内 choline の供給に重要な役割を果たすことで PC の合成を調節し、白色脂肪細胞の増殖、および白色脂肪細胞内での LD の形成を制御するとの仮説を立てた。3T3-L1 細胞を用いた *in vitro* 白色脂肪細胞分化誘導モデルを用いることで白色脂肪細胞の増殖と LD の形成の両面における機能解析を行った。白色脂肪細胞における GDE5 の生理的意義を解明することは、肥満や 2 型糖尿病の発症や病態進展の解明に貢献で

きると考え、本研究に着手した。

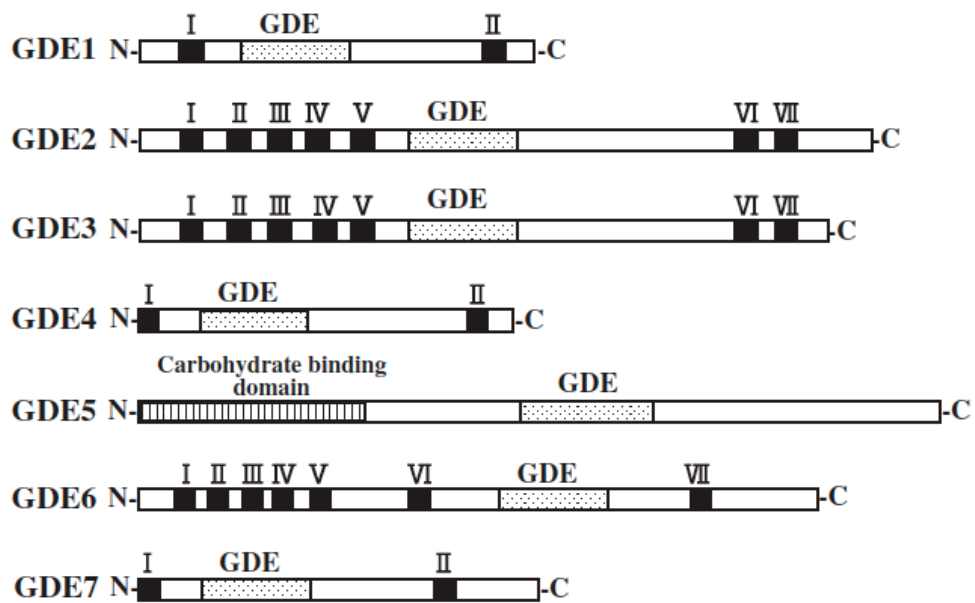


図 18. マウスにおける GDE の構造
(*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71 (8), 1811–1818, 2007 から引用)

第二節 材料と方法

1. 細胞

3T3-L1 細胞とマウス線維芽細胞株 NIH-3T3 細胞はヒューマンサイエンス研究資源バンクより入手した。DMEM (high-glucose)と FBS は Invitrogen から、GPC、choline、および P-choline は Sigma から購入した。

2. 細胞培養、トランスフェクション、および細胞容量の測定

3T3-L1 細胞、および NIH-3T3 細胞の維持には増殖用培地を使用し、37°C、5% CO₂のインキュベーター内にて培養した。3T3-L1 前駆脂肪細胞の白色脂肪細胞への分化は、コンフルエントに達した 3T3-L1 前駆脂肪細胞を分化誘導培地により 2 日間培養することで誘導した。その後、脂肪分化維持用培地に切り替え、2 日毎に培地交換を行った。各培地の組成は表 7 に示した。トランスフェクションに使用した Stealth siRNA は invitrogen より購入した。siRNA の配列は表 8 に示した。最終濃度 20 nM の siRNA を LipofectAMINE RNAimax (Invitrogen)を用いて 3T3-L1 細胞、および NIH-3T3 細胞へ導入した。細胞へ siRNA を導入した 2 日後にトリプシンを用いて細胞を回収し、少なくとも 10,000 個の細胞を使用して細胞容量を測定した。測定には Sceptor (Miliipore)を用いた。

表 7. 培地の組成

培地名	組成
増殖用培地	DMEM, 10% FBS, penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 µg/ml)
脂肪分化誘導用培地	以下の試薬 (MDI)を添加した増殖用培地 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma) 5 µg/ml insulin (Sigma) 1 µM dexametazone
脂肪分化維持用培地	5 µg/ml insulin (Sigma)を添加した増殖用培地

表 8. siRNA の配列

標的遺伝子	siRNA 配列
GDE5 - sense	5' -CAGUGUGUUGUGGAAAGCAGUGAUU -3'
GDE5 - antisense	5' -AAUCACUGCUUCCACAACACACUG -3'
CCTβ - sense	5' -AAACUCUGGAGUAAGAGUCCAUGGC -3'
CCTβ - antisense	5' -GCCAUGGACUCUACUCCAGAGUUU -3'

3. LC-MS/MS 解析

3T3-L1 脂肪細胞はメタノールと超純水を 1:4 (vol/vol)で混合した溶液によりホモジナイズし、ガラス素材のスクリーキャップチューブに入れた。メタノールと超純水の混合溶液によりホモジナイズ溶液を 400 μ L に調製した後、クロロフォルムを加え、最終的な溶液の比率が超純水/メタノール/クロロフォルム (1:4:2)となるように調製した。その後、本ホモジナイズ溶液を 1 時間振盪した。振盪後、相分離させるため各 160 μ L のクロロフォルムと超純水を加え、1 分間の vortex 後、1,800 x g にて 5 分間遠心分離した。上清は回収後に乾燥し、メタノールに溶解して UPLC-MS 解析に使用した。UPLC-MS 解析には Acquity TQD とエレクトロスプレーイオン化 (ESI)装置を備えた Acquity UPLC システムを使用した。BEH HILIC カラムを用いて、0.4 mL/min の速度で(A) 80%アセトニトリル/5 mM ギ酸アンモニウム (pH 3.0)溶液、および(B) 5%アセトニトリル/5 mM ギ酸アンモニウム (pH 3.0)溶液の 2 つの溶液を用い、以下の濃度勾配により溶出した。0-0.1 分には A 溶液 100%、0.1-2.75 分には B 液 0%、0.1-2.75 分には B 液 100%とした。解析は ESI 法 (positive mode)により行い、choline を m/z 104、GPC を m/z 258、そして P-choline を m/z 184.5 でそれぞれ定量化した。上清回収後の下層についても同様に乾燥させ、ESI を利用した UPLC-MS 解析に用いた。逆相 BEH C18 カラムにを用いて、0.4 mL/min の速度で(A) 40%アセトニトリル/10 mM 酢酸アンモニウム (pH 5.0)溶液、および (B) アセトニトリル/イソプロパノール (1:9, vol/vol)/10 mM 酢酸アンモニウム (pH 5.0)溶液の 2 つの溶液を用い、以下の濃度勾配により溶出した。0-3 分には B 溶液 20%から B 液 100%、3-4 分には B 液 100%とした。カラムの温度は 40°C に保持した。解析は ESI 法 (positive mode)により行い、PC (16:0/18:2)は m/z 758.7 から m/z 184.2 へのシフトをモニターすることで定量した。

4. ウェスタンブロット法によるタンパク質の発現解析

GDE5 に対するポリクローナル抗体は GDE5 の 1-163 アミノ酸配列をウサギに免疫することで作製し、コントロール siRNA あるいは GDE5 siRNA を導入した C2C12 筋芽細胞株のタンパク質溶液を用いたウェスタンブロット法により抗原検出能を確認している [164]。3T3-L1 脂肪細胞は氷冷した PBS にて洗浄し、氷冷したタンパク質回収用バッファーにて回収後、ハンディ超音波装置により 15 秒、3 回処理し、10,000 x g にて 30 分遠心分離した。タンパク質濃度の定量は Detergent compatible Protein Assay Reagent Kit (Bio Rad 社製)を用いて行い、10 μ g の上清を SDS-PAGE に使用した。SDS-PAGE により分離したタンパク質は Immobilon P filter (Millipore)に転写し、メンブレンは 5% nonfat dried milk/PBS により 4°C で 18 時間ブロッキング後、抗 GDE5 抗体 (1:1,000)、抗 β -アクチン抗体 (clone 2F3、Wako)、あるいは抗 α -tubulin 抗体 (clone MAS077)にて 4°C で 18 時間静置した。2 次抗体には HRP 標識抗ウサギ IgG を使用し、シグナルの検出には化学発光システム (GE Healthcare)を利用した。ウェスタンブロット法に使用した試薬の組成は表 9 にまとめた。

表 9. ウェスタンブロット法に使用した試薬の一覧

試薬名	組成
タンパク質回収用バッファー	40 mM Tris-HCl, pH 7.5, 15 mM benzamide, 5 μ g/ml pepstatin A, and 5 μ g/ml leupeptin
	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.25% deoxycholic acid, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 0.1% SDS (pH 7.4)
アクリルアミド分離ゲル (10%)	30% アクリルアミド, 1M Tris-HCl (pH 8.8), 10% SDS, 10% ammonium peroxodisulphate (APS), tetramethylethylenediamine (TEMED)
アクリルアミド濃縮ゲル	30% アクリルアミド, 0.5M Tris-HCl (pH.6.8), 10% SDS, 10% APS, TEMED

5. Oil Red O 染色

3T3-L1 脂肪細胞は 10% ホルムアルデヒドにて 5 分間固定し、超純水にて洗浄後、60%イソプロパノールにて洗浄した。その後、60%イソプロパノールにて 1.8 mg/mL に調製した Oil Red O (Sigma)にて細胞を 37°C で 30 分間加温した。加温後に試薬を回収し、60%イソプロパノールと超純水を用いて洗浄することで、余分な試薬を取り除いた。Oil Red O はイソプロパノールを用いて細胞から抽出し、分光光度計にて 520 nm の波長を測定することで、細胞内の中性脂肪量の定量を行なった。

6. 定量的 PCR

逆転写反応による cDNA 合成は 1 μ g の RNA を鋳型として ReverTra Ace (TOYOBO)と random hexamers (Takara)を用いてメーカーのプロトコールに従って行った。定量的 PCR 解析は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)と StepOnePlus (Applied Biosystems)を用いて 20 μ L の容量にて行なった。反応サイクルを以下に示す。

95°C、2 分 \rightarrow (95°C、15 秒 \rightarrow 60°C、1 分) x 40 サイクル

定量的 PCR 解析に用いたプライマーの配列は表 10 にまとめた。なお標的遺伝子の発現量は 60S ribosomal protein L19 (L19) mRNA の発現量により補正し、グラフ化した。

表 10. 定量的 PCR に用いたプライマー配列の一覧

Gene	Forward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')
<i>Gde5</i>	TTTGATGTCCACCTTTCAAAGGAC	CTCCATCCCTGTGTTGGCAAATCC
<i>L19</i>	CTCCATCCCTGTGTTGGCAAATCC	GGATGTGGTCCCATGAGGATGC-
<i>Cebpa</i>	TGGACAAGAACAGCAACGAG	CCTTGACCAAGGAGCTCTCA
<i>Pparg</i>	ATCAGCTCCTGTGGAGCCTCTC	GATGCTTTAATCCCCACAGAC
<i>ap2</i>	AGCGTAAATGGGGATTTGGT	TCGACTTTCCATCCCTCTTC
<i>Fas</i>	TGGGTTCTAGCCAGCAGAGT	ACCACCAGAGACCGTTATGC
<i>Ccta</i>	GCCAGCTCCTTTTTTCTGATG	TCATCACATGAAGCCCTTG
<i>Cctβ</i>	TGCCATGGGAGTTACTAGGG	GTGCAAGGCTCTTTGAGGAC
<i>Cka</i>	GCCATTCTTGCAGAGAGGTC	GGATCTTGTGCAGTTGGTGA
<i>Cept</i>	TTCAGTTACCGACACCACCA	AATGAAAGGCCACAAGCAC
<i>UT-B (Slc14a1)</i>	GAAGGAATGGAAGCAGCAAC	TGAGTGTGGCAGTGGAAAAC
<i>Osteoglycin</i>	GACCTGGAATCTGTGTGCCTCC	GTTTGGATGCTTTCCCAGAG
<i>Decorin</i>	TGAGCTTCAACAGCATCACC	AAGTCATTTTGCCCAACTGC
<i>Epiphycan</i>	AAGAGCTGGTGGTTCTGGGTGAC	TAGAGGGATGTGGTCCAAGC
<i>Lumican</i>	TGCAGTGGCTCATTCTTGAC	GCAGCTTGCTCATCATGATTG
<i>Slc6a9</i>	CTGTCTGGCAACCTGTCTCA	GAAGACAACCACCCAGGAGA

7. Bromodeoxyuridine (BrdU) 取り込み実験

3T3-L1 前駆脂肪細胞は 6-well plate 内に静置したカバーガラス上で培養した後、分化誘導を行なった。18 時間後、最終濃度が 50 μ M になるように BrdU (Sigma) を細胞に添加し、2 時間静置した。その後細胞を氷冷したメタノールにて 10 分間固定し、1.5 N HCl にて変性させ、0.1 M ホウ酸ナトリウム (pH 8.5) にて中和した。4°C で一晚 ImmunoBlock (大日本製薬) にてブロッキング後、PBS にて希釈した抗 BrdU 抗体 (DAKO) を加え室温で 2 時間静置した。続いて細胞を PBS にて希釈した抗 IgG- cyanine 3 (Cy3, GE Healthcare) にて室温で 1 時間静置した。カバーガラスをスライドガラス上に置き、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) を含む PBS/glycerol (1:1) 溶液にて観察した。各検討条件につき、細胞を培養したカバーガラスを 3 枚準備した。1 枚のカバーガラスにつき 6 視野撮影し、Cy3 と DAPI の両方が陽性の細胞数を計測した。

8. DNA マイクロアレイ解析

Total RNA は RNeasy lipid tissue kit (Qiagen Sciences) を用いて細胞から抽出し、メーカーのプロトコールに従って、DNA マイクロアレイ用の cDNA 合成に利用した。DNA マイクロアレイ解析には 44K whole-mouse genome 60-mer oligo microarray (Agilent Technologies) を用いた。蛍光ラベル、ハイブリダイゼーション、そして撮像はメーカーのプロトコールに従って行なった [173]。なお、各蛍光ラベル (Cyanine 3-CTP と Cyanine 5-CTP) のハイブリダイゼーション

効率に起因したバイアスの影響を除くため、DyeSwap 法を用いた 2 つのアレイデータを用いた。発現変動した遺伝子群の抽出には Agilent Feature Extraction software を使用し、ratio term 以外の全てのパラメーターについてデフォルト設定を使用した。ratio term はメーカーの推奨に従い、蛍光ラベルの手法に合致した設定とした。データファイルと画像は Agilent Feature Extraction Program (version 9.5)を用いて保存した。マイクロアレイのデータは National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus database に登録した (accession no. GSE83644, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)。

9. アミノ酸、および尿素濃度の測定

3T3-L1 脂肪細胞を氷冷した PBS で 2 回洗浄し、500 μ L の蒸留水に懸濁させ、15 分間煮沸した。懸濁液は 5,000 rpm で 3 分間遠心分離し、上清を回収した。本上清中のアミノ酸と尿素濃度はアミノ酸解析装置 JLC-500/V2 (JEOL)にて解析した。

10. 統計解析

データは平均値 \pm 標準誤差として示した。有意差検定には one-way ANOVA と Duncan の多重範囲検定 (multiple-range test)、あるいは Student *t* 検定 (対応のない *t* 検定)を使用し、*P* 値が 0.05 以下の場合に有意差があると判断した。

第三節 結果

1. 3T3-L1 細胞における GDE5 の発現パターン解析

当研究室においては、バキュロウイルスを感染させた Sf9 細胞から調製した GDE5 リコンビナントタンパク質を用い、GDE5 は GPC に対して特に高い分解活性を有することを示した [164]。始めに、3T3-L1 の白色脂肪細胞の分化過程における GDE5 の発現パターンを解析した。その結果、GDE5 mRNA とタンパク質の発現は分化誘導後 3 日目から上昇し、9 日目においても GDE5 の発現が確認された (図 19A-B)。GDE5 は *in vitro* において GPC を選択的に分解することから、3T3-L1 の白色脂肪細胞の分化過程において細胞内の GPC 量を測定したところ、分化誘導後 3 日目から細胞内の GPC 量の減少が認められた (図 19C)。細胞内の GPC 量の変化は GDE5 の発現上昇と時期が一致していた。

2. GDE5 の発現抑制による細胞内の choline 代謝の変化

続いて 3T3-L1 細胞において、GDE5 の GPC 分解への関与について評価するため、RNAi 法を用いて GDE5 の発現抑制を行なった。3T3-L1 前駆脂肪細胞を分化誘導培地により 2 日間培養した後、分化維持用培地にて 5 日間培養した。その後コントロール用の luciferase siRNA (siLuc) と GDE5 を標的とした siRNA (siGDE5) を細胞へ導入し、2 日間培養した。分化誘導後 9 日目において、siGDE5 によって GDE5 の発現が低下していることをウェスタンブロット法と PCR 法によって確認した。GDE5 の発現抑制により細胞内に顕著な量の GPC が蓄積した一方で、P-choline および choline の量は siLuc を導入した 3T3-L1 細胞と比較して低値であった (図 20)。また 3T3-L1 細胞の容量を測定し、図 20 に示した choline 代謝物の細胞内の濃度を算出したところ、細胞内の GPC 濃度は P-choline や choline の濃度と比較して著しく高く、GDE5 の発現抑制により GPC が細胞内に蓄積したことが示された (図 21)。これらのデータは、分化した白色脂肪細胞において、GDE5 が GPC の代謝を制御していることを強く示唆した。

3. GDE5 の発現抑制による細胞内への中性脂肪の蓄積の変化、および白色脂肪細胞の分化に関連する遺伝子群の発現解析

3T3-L1 細胞における GDE5 の生理的役割について明らかにするため、GDE5 の発現抑制が白色脂肪細胞の分化に与える影響について検討した。siLuc あるいは siGDE5 を導入した 3T3-L1 前駆脂肪細胞をコンフルエントに達するまで培養し、分化誘導用培地、および分化維持用培地により白色脂肪細胞の分化を誘導した。9 日間の分化誘導後、Nile Red 染色により 3T3-L1 脂肪細胞内の中性脂肪を染色し可視化したところ、GDE5 の発現抑制によって、細胞内への中性脂肪の蓄積が大幅に低下していた (図 22A)。この結果は、同様の条件において、Oil Red O を用いて細胞内の中性脂肪の量を定量することで確認した (図 22B)。一方、6 日間の白色脂肪細胞の分化誘導後に siGDE5 を導入した場合、3T3-L1 脂肪細胞内への中性脂肪の蓄

積は siLuc を導入したコントロール細胞と比較して差が認められなかった (図 22C)。GDE5 の発現抑制によって細胞内への中性脂肪の蓄積が抑制された 3T3-L1 細胞を用いて、白色脂肪細胞の分化に関連する遺伝子群の発現解析を行なったところ、C/EBP α 、PPAR γ 、aP2、および FAS の mRNA の発現量がコントロール細胞と比較して有意に減少していた (図 22D)。以上の結果より、GDE5 の発現抑制の白色脂肪細胞の分化に対する抑制作用は、初期の白色脂肪細胞の分化を抑制したことに起因していると推察された。

4. GDE5 の発現抑制による MCE への影響の解析

白色脂肪細胞の分化初期には、MCE と呼ばれる一過性の細胞増殖が起こる [83, 87, 88]。MCE は、3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化誘導後 24 時間以内に誘導され、また同時期に、C/EBP β 、C/EBP α 、および PPAR γ の遺伝子発現が誘導される [83, 88, 89]。PC は哺乳動物細胞の細胞膜の主要な構成成分であり、細胞分裂においては、細胞内の PC の合成と分解のバランスによって細胞内の PC の量が調節されていることから [174]、3T3-L1 細胞の MCE においては、PC の生合成が活性化していると考えられた。ただし MCE を終えた 3T3-L1 前駆脂肪細胞は、再度、細胞増殖が停止した状態へと移行する [175]ため、細胞膜の形成も終了し、PC の生合成は抑制されると推測した。そこで、分化誘導前のコンフルエントに達した 3T3-L1 前駆脂肪細胞 (pre)、および白色脂肪細胞の分化誘導後 3 日目の 3T3-L1 脂肪細胞 (d)を用いて、CDP-choline (Kennedy)経路 (図 23A)に関わる酵素の mRNA の発現量について解析した (図 23B-F)。その結果、白色脂肪細胞の分化に伴い、CTP:phosphocholine cytidyltransferase β (CCT β) 遺伝子の mRNA の発現量が劇的に減少した (図 23E)。CCT α の発現抑制は、3T3-L1 前駆脂肪細胞における PC の生合成に影響しないことが報告されていることから [176]、MCE における 3T3-L1 前駆脂肪細胞内での PC の生合成は、CCT β によって調節されている可能性が示唆された (図 23D-E)。

続いて、siGDE5、あるいは CCT β を標的とした siRNA (siCCT β)を用いて、3T3-L1 前駆脂肪細胞株において GDE5、あるいは CCT β を発現抑制し、MCE に与える影響を検討した。siRNA を細胞へ導入後、分化誘導培地により白色脂肪細胞の分化を 18 時間誘導し、細胞増殖のマーカーである BrdU の細胞への取り込み試験により MCE への影響を評価したところ、GDE5、あるいは CCT β の発現抑制により BrdU 陽性細胞率がコントロール細胞と比較して低下した (図 24)。なお DAPI 陽性細胞数は、コントロール細胞と GDE5 を発現抑制した細胞において有意な差が認められなかったことから、GDE5 の発現抑制による BrdU 陽性細胞率の低下は総細胞数に起因しないことが示唆された (図 24)。さらに同条件において、細胞内の choline 代謝物の濃度を解析したところ、CCT β の発現抑制により PC 量がコントロール細胞と比較して有意に減少しており (図 25C)、CCT β の発現抑制により細胞内での PC の合成が抑制され、MCE が阻害されることが示唆された。一方で、GDE5 を発現抑制した細胞において、細胞内の PC 量、および choline の量はコントロール細胞と比較して有意な差は認められなかったが、細胞内に GPC が顕著に蓄積していた (図 25A-B)。従って、GDE5 の発現抑制による

MCEの阻害は、PCの合成量に関連しないことが示唆された。

5. DNA マイクロアレイ法を利用した網羅的な遺伝子発現変動の解析

GDE5の発現抑制によるMCEの阻害の分子メカニズムを明らかにするため、3T3-L1脂肪細胞から抽出したRNAを用いてDNAマイクロアレイ解析を行ったところ、GDE5の発現抑制により多様な遺伝子の発現変動が認められた。3T3-L1前駆脂肪細胞におけるGDE5の発現抑制は初期の白色脂肪細胞の分化を抑制したことから、これらの発現変動した遺伝子群には白色脂肪細胞の分化に関与する遺伝子が含まれていることが推測され、それら遺伝子群を排除することが必要である。GDE5の発現抑制により直接的な影響として発現変動する遺伝子群を探索するため、NIH-3T3細胞においてもGDE5の発現抑制を行い、3T3-L1細胞とNIH-3T3細胞の両細胞においてGDE5の発現抑制により変動する遺伝子群を抽出した。なおNIH-3T3細胞はPPAR γ の強制発現させた場合には脂肪細胞へ分化する能力を有しており[177, 178]、3T3-L1細胞と同様に間葉系線維芽細胞株として利用可能であると考えた。NIH-3T3細胞においてもsiGDE5を用いてGDE5の発現抑制を行い、細胞へのsiGDE5の導入によりGDE5 mRNAの発現量が減少すること、また細胞内にGPCが蓄積することを確認した(図26A-B)。続いて、NIH-3T3細胞より抽出したtotal RNAを用いてDNAマイクロアレイ解析を行い、GDE5の発現抑制により発現変動した遺伝子群を単離した(図27A)。そしてGDE5の発現抑制によって3T3-L1脂肪細胞とNIH-3T3細胞において発現変動した遺伝子データの比較解析を行い、両細胞において共通して2倍以上の発現上昇が認められた54個の候補遺伝子を単離した(図27B、表11)。一方で、上記2つの細胞において共通して2倍以上の発現低下が認められた遺伝子は33個抽出された(データ未掲載)。

6. GDE5の発現抑制による細胞の浸透圧調節に関する解析

3T3-L1細胞とNIH-3T3細胞の両細胞においてGDE5の発現を抑制した際に有意に発現上昇していた遺伝子の中でも、複数のproteoglycan遺伝子の発現量が大幅に発現上昇していた(表11)。osteoglycin、decorin、epiphycan、およびlumicanのmRNAの発現量についてPCR法を用いて検討したところ、GDE5の発現を抑制した3T3-L1細胞とNIH-3T3細胞において、上記遺伝子のmRNAの発現量がコントロール細胞よりも有意に増加していることを確認した(図26C)。proteoglycanはコアタンパク質のセリンまたはスレオニン残基にグリコサミノグリカン鎖が結合した高分子物質の総称で、特にosteoglycin、decorin、epiphycan、lumicanは細胞外マトリクス(extracellular matrix, ECM)に局在し、細胞の形態維持に寄与している[179]。一方、腎尿細管上皮細胞においては、高濃度のNaや尿素に応答して細胞内にGPCが蓄積し、GPCは浸透圧調節物質として機能することで高張環境下において細胞を防御する役割がこれまでに報告されている[180-182]。そこで、glycineや尿素を輸送するトランスポーターのslc6a9(solute carrier family 6 member 9)mRNAの発現量を解析したところ、GDE5の発現を抑制した3T3-L1細胞において、glycineのトランスポーターであるSLC6A9と尿素のトランスポーターであるUT-Bの発現量が増加していた(図28)。また、細胞内のglycine、および尿素

の濃度が GDE5 の発現抑制により有意に増加していたことから (図 28)、細胞内への GPC の蓄積は浸透圧ストレス応答を誘導することが強く示唆された。GDE5 の発現抑制により誘導された浸透圧ストレスによって、MCE が阻害された可能性を検証するため、GDE5 を発現抑制した 3T3-L1 脂肪細胞内の GPC 濃度を算出し (図 21)、siRNA を細胞へ導入した後、細胞内の GPC 濃度と一致するように 3T3-L1 細胞の培養液に GPC を添加し、BrdU の取り込み試験を行った。その結果、培養液に GPC を添加した場合には、GDE5 の発現抑制による BrdU 取り込み活性は変化せず、GDE5 の発現抑制による MCE の阻害効果が消失したことが示唆された (図 29A)。従って、GDE5 の発現抑制により細胞内に GPC が蓄積し、浸透圧バランスが変化した結果、MCE が阻害されたことが示された。

7. GDE5 の発現抑制による細胞膜透過性の変化

GDE5 の発現抑制により細胞膜が傷害された可能性について評価するため、3T3-L1 細胞の培養液中の乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase, LDH) 活性を測定した。培養液中への LDH の遊離は、細胞膜の透過性が上昇していることの指標となる。GDE5 の発現抑制により、3T3-L1 脂肪細胞の培養液中では LDH の活性がコントロール細胞と比較して有意に上昇していたことから、GDE5 の発現抑制により細胞膜の透過性が上昇していることが示唆された (図 29B)。

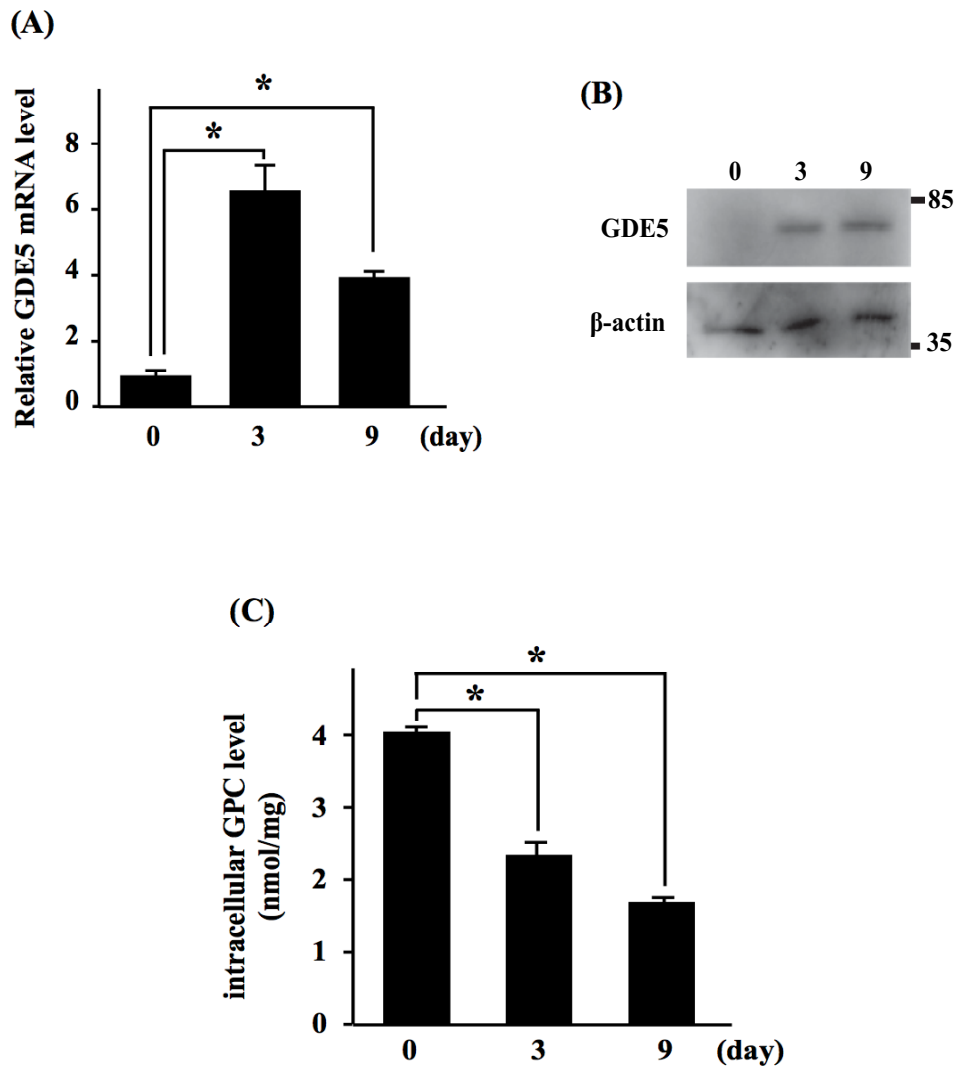


図 19. 白色脂肪細胞分化における GDE5 の発現パターンの解析、および細胞内の GPC 量の変化

(A) 白色脂肪細胞の分化誘導後 0、3、9 日目における GDE5 mRNA の発現量を示した。
 (B) 白色脂肪細胞の分化誘導後 0、3、9 日目における GDE5 タンパク質の発現量を示した。
 (C) 細胞内の GPC 量 (n=4)。*, $P < 0.05$ (対応のない t 検定)

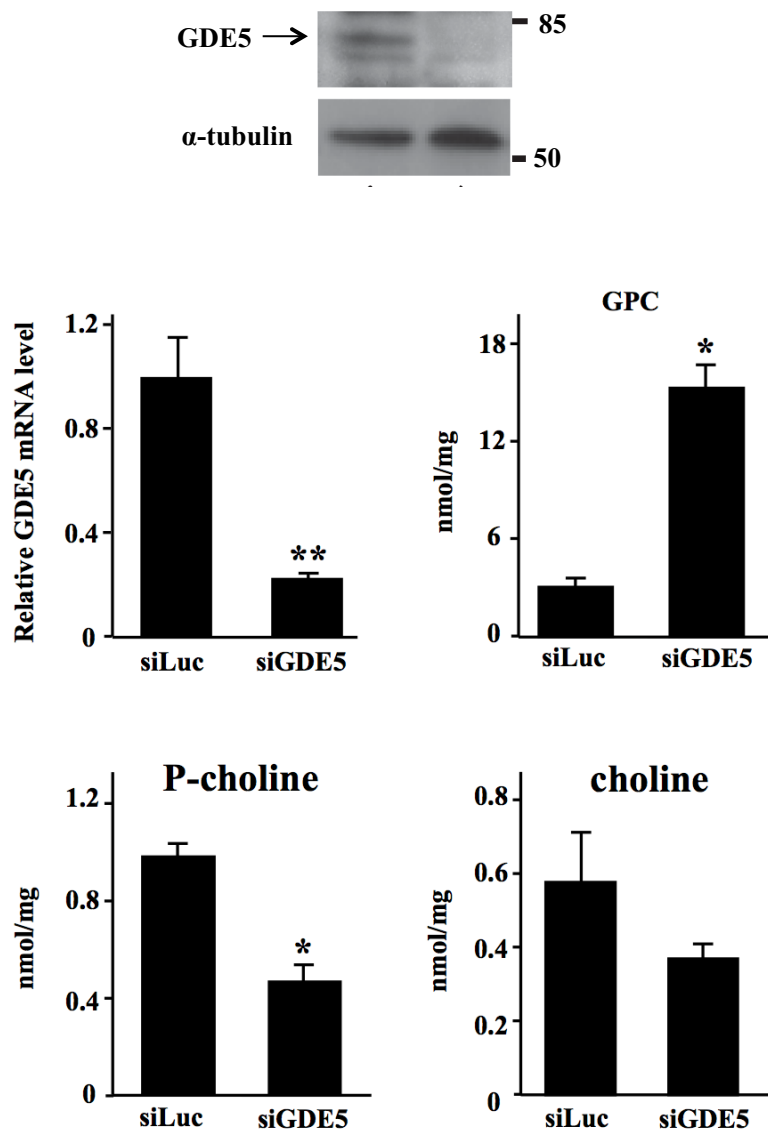


図 20. GDE5 の発現抑制による 3T3-L1 脂肪細胞内の choline 代謝物量の変化
 3T3-L1 細胞は MDI を含む分化誘導培地により 2 日間培養した後、分化維持用培地にて 5 日間培養した。その後、siLuc あるいは siGDE5 を細胞へ導入し、2 日間培養した。分化誘導後 9 日目に GDE5 の mRNA、GDE5 タンパク質の発現量、および細胞内の GPC、P-choline、choline の量を測定した (n=5)。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (対応のない t 検定)

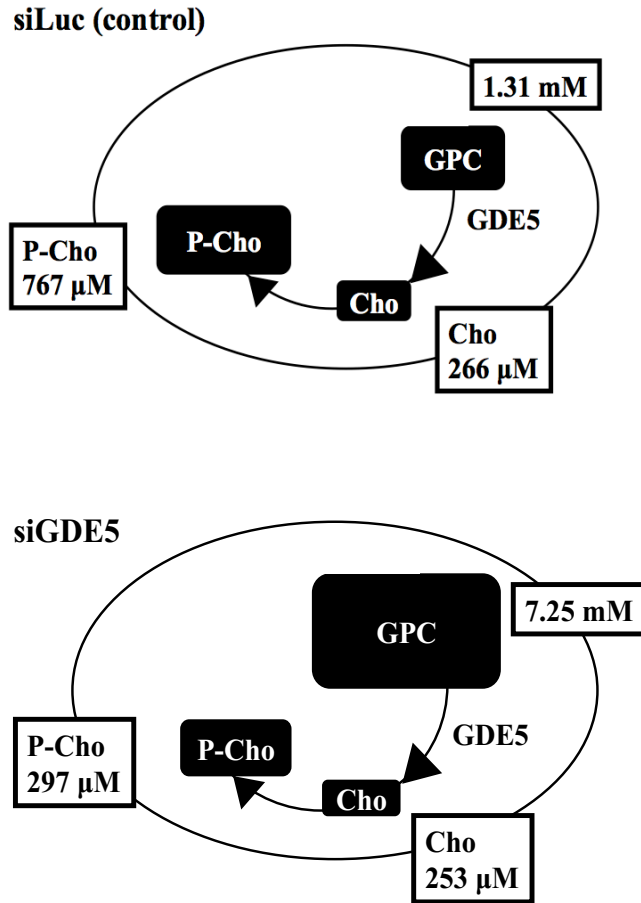
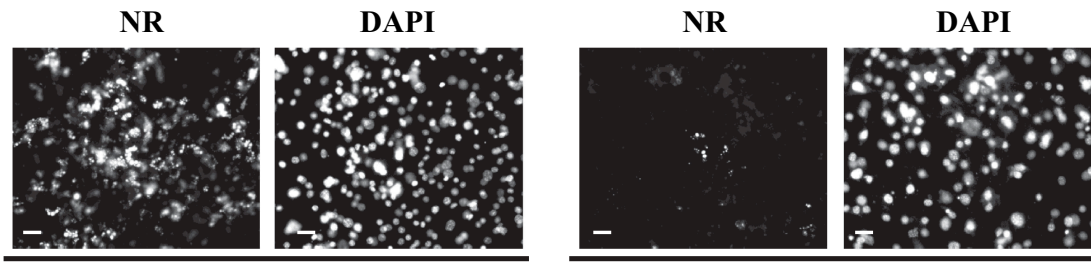


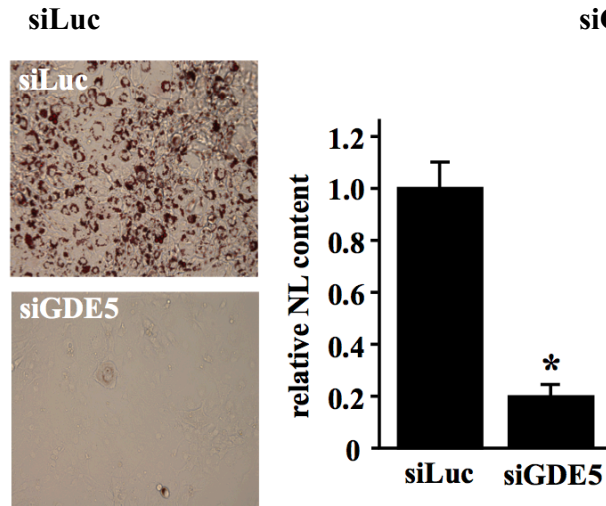
図 21. GDE5 を発現抑制した 3T3-L1 脂肪細胞における choline 代謝物の細胞内濃度の変化

図 20 において測定した choline (Cho)代謝物量、および分化誘導後 9 日目の細胞容量 (n=5)を利用し、choline 代謝物の細胞内濃度を算出した。なお choline 代謝物量と細胞容量は異なる細胞群を用いて測定した。siLuc あるいは siGDE5 を導入した細胞の細胞容量の平均はそれぞれ 5.50 μ L、5.55 μ L であった。

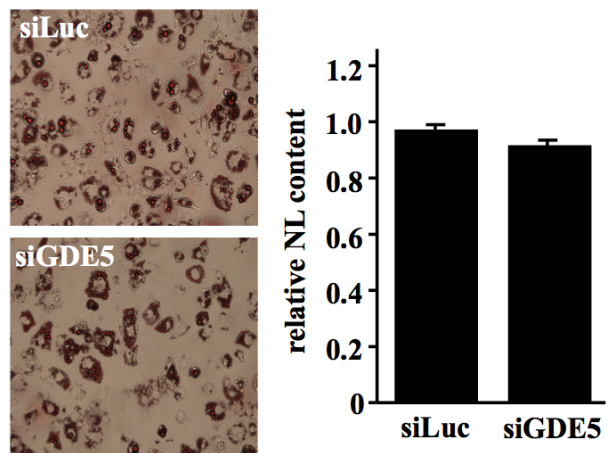
(A)



(B)



(C)



(D)

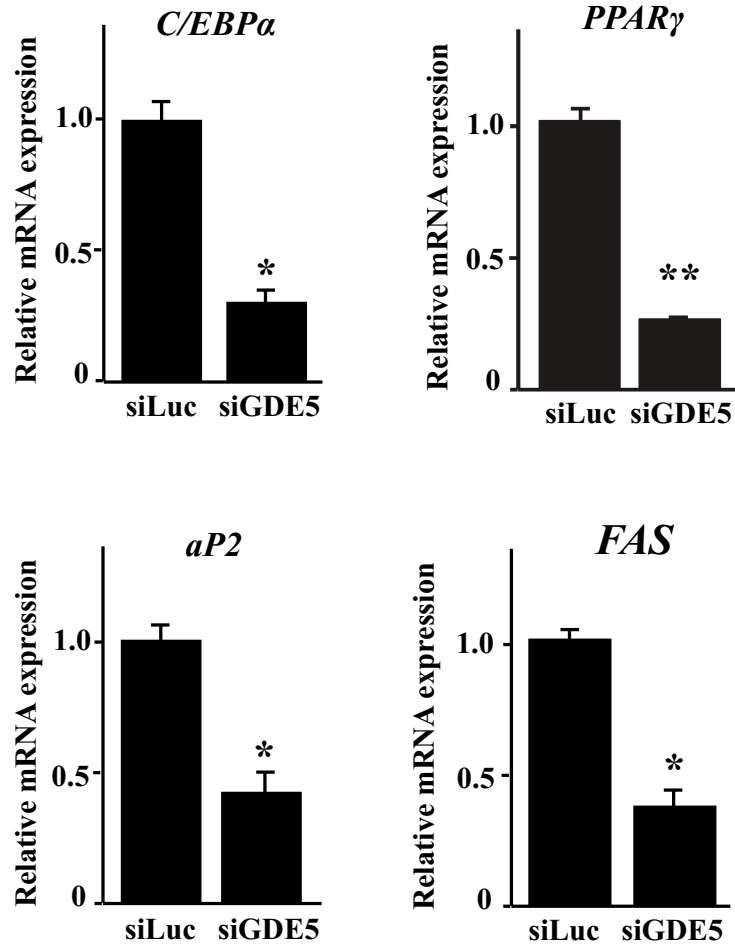


図 22. GDE5 の発現抑制による細胞内への中性脂肪の蓄積の変化、および白色脂肪細胞の分化に関連する遺伝子群の発現変動

(A, B) 3T3-L1 細胞に siLuc あるいは siGDE5 を導入後、分化誘導培地と分化維持培地により 9 日間培養した。(A) 細胞内の中性脂肪の蓄積を Nile Red (NR) 染色により可視化し、核は DAPI により染色した。(B) 細胞内の中性脂肪の蓄積を Oil Red O 染色により可視化し、イソプロパノールにより中性脂肪を細胞から抽出後、抽出液の OD₅₂₀ を分光光度計により測定した (右、n=5)。(C) 分化誘導培地と分化維持培地を用いて、6 日間の白色脂肪細胞分化を誘導した 3T3-L1 細胞に siLuc あるいは siGDE5 を導入した。分化誘導後 9 日目に細胞内の中性脂肪の蓄積を Oil Red O 染色により可視化し、イソプロパノールにより中性脂肪を細胞から抽出後、抽出液の OD₅₂₀ を分光光度計により測定した (n=5)。(D) 分化誘導培地を用いて 3T3-L1 細胞の白色脂肪細胞分化を 2 日間誘導し、total RNA を回収後、PCR 法により遺伝子発現解析を行った (n=5)。画像中のスケールバーは 20 μ m である。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (対応のない t 検定)

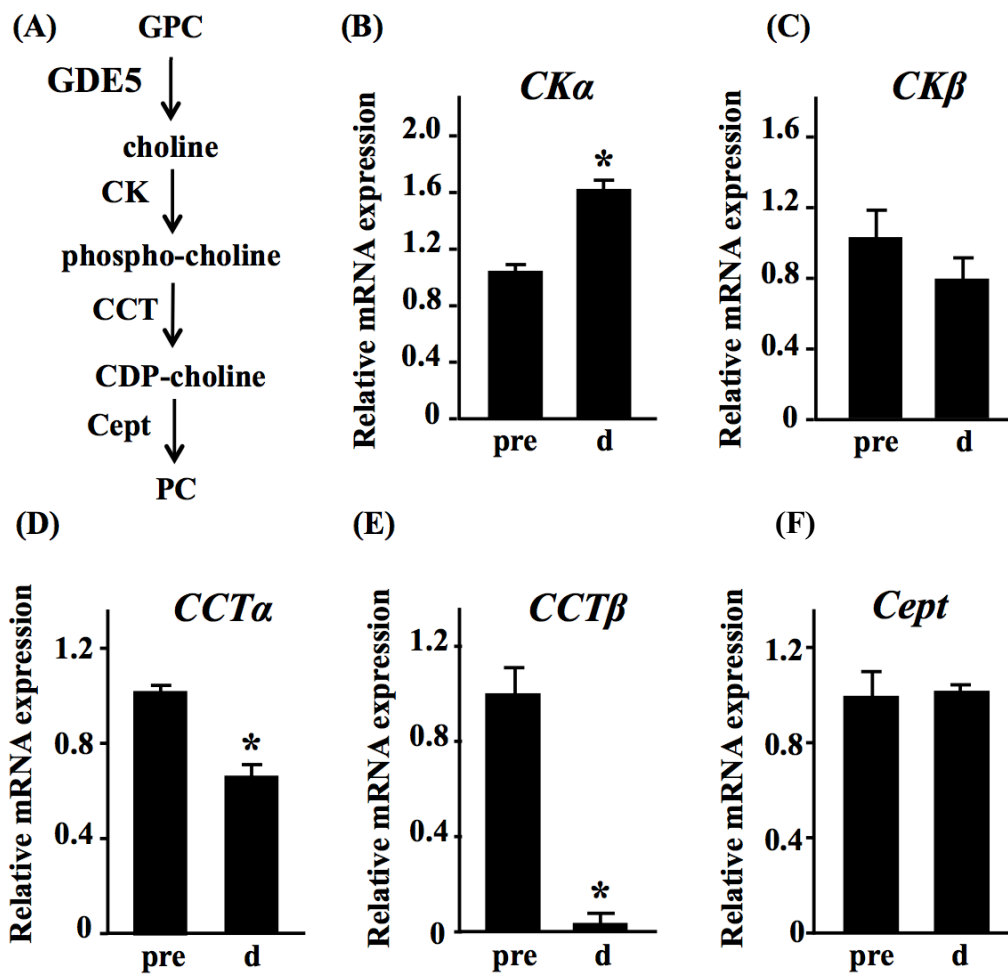


図 23. GDE5 を発現抑制した細胞における PC の生合成に関与する遺伝子の発現変動
 (A) CDP-choline (Kennedy)経路、(B-F) 3T3-L1 前駆脂肪細胞 (pre)、あるいは白色脂肪細胞の分化誘導後 3 日目の脂肪細胞 (d)より total RNA を抽出し、遺伝子発現解析を行った。
CKα: choline kinase α 、*CKβ*: choline kinase β 、*CCTα*: CTP:phosphocholine cytidyltransferase α 、*CCTβ*: CTP:phosphocholine cytidyltransferase β 、*Cept*: choline/ethanolamine phosphotransferase、*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (対応のない t 検定)

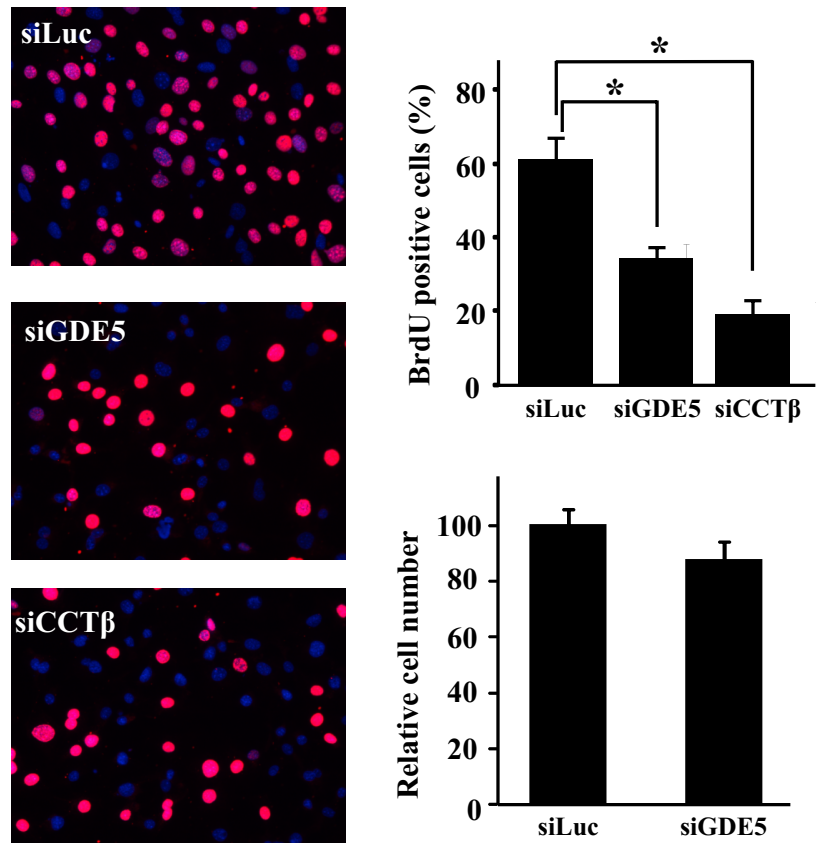


図 24. GDE5、あるいは CCT β の発現を抑制した細胞における BrdU の取り込み試験
 3T3-L1 細胞に siLuc、siGDE5、あるいは siCCT β を導入後、分化誘導培地を用いて白色脂肪細胞の分化誘導を 18 時間行い、その後 BrdU の取り込み試験を行なった。BrdU の取り込みは抗 BrdU 抗体および Cy3 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を用いて可視化した。核は DAPI により染色した。本実験は 2 回行なった。画像中のスケールバーは 20 μm である。*, $P < 0.05$ (対応のない t 検定)

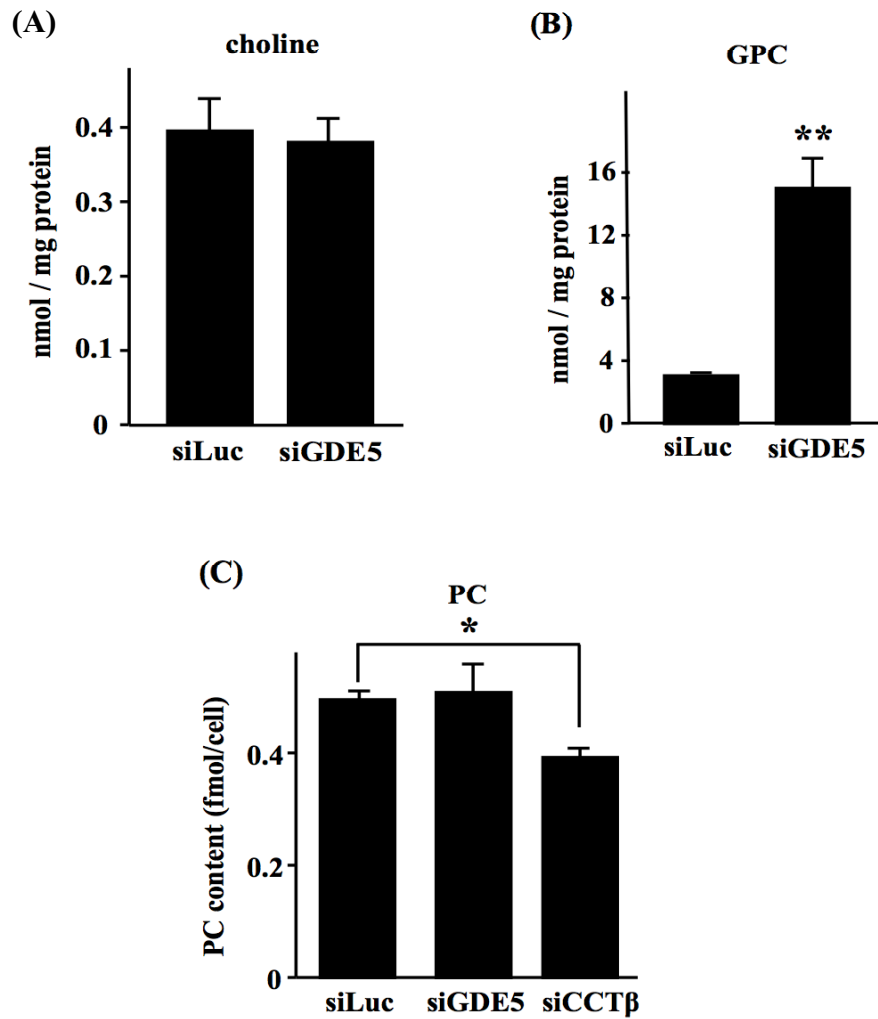


図 25. GDE5、あるいは CCT β を発現抑制した 3T3-L1 細胞における細胞内の choline 代謝物量の変化

3T3-L1 細胞に siLuc、siGDE5、あるいは siCCT β を導入後、分化誘導培地を用いて白色脂肪細胞の分化誘導を 18 時間行い、その後、細胞内(A) choline、(B) GPC、(C) PC 量を測定した。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (対応のない t 検定)

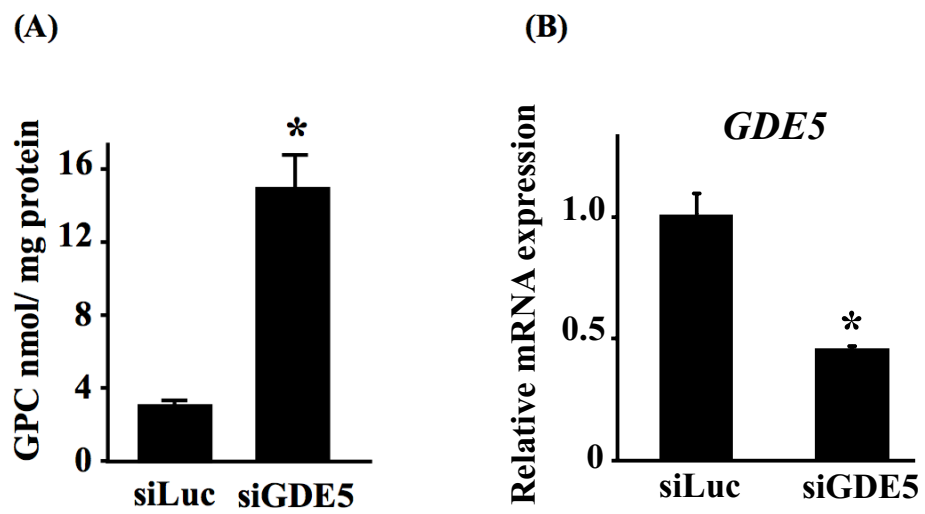


図 26. NIH-3T3 細胞における GDE5 の発現抑制による細胞内への GPC の蓄積
 NIH-3T3 細胞に siRNA を導入後、2 日目における (A) 細胞内の GPC 量、および (B)
 GDE5 mRNA の発現量 (n=4) を示した。

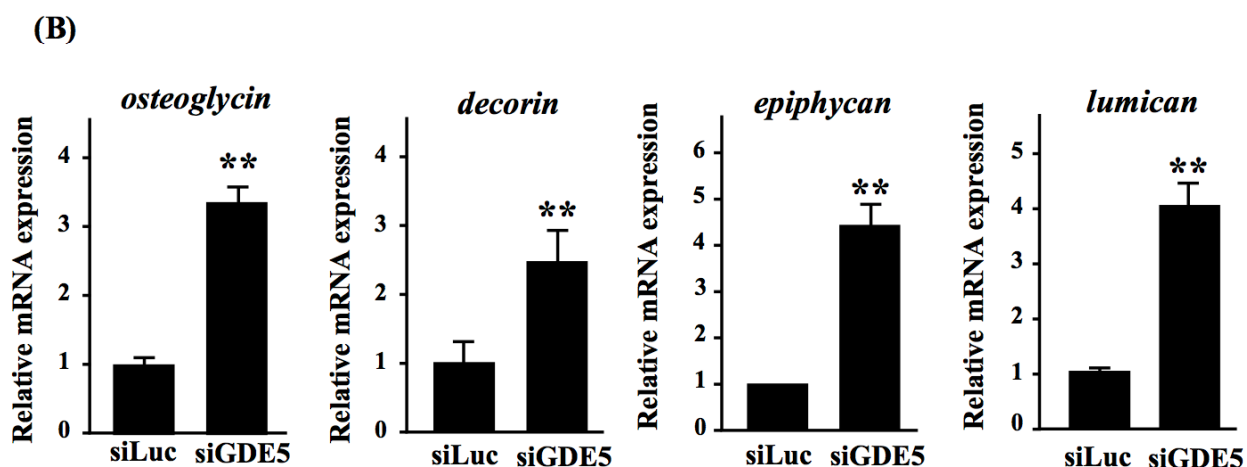
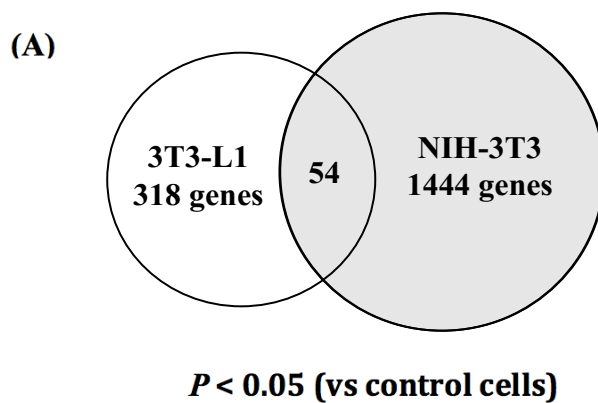


図 27. GDE5 の発現抑制による proteoglycan ファミリーに属する遺伝子の発現変動
 (A) GDE5 の発現を抑制した 3T3-L1 細胞、および NIH-3T3 細胞において、コントロール細胞と比較して 2 倍以上の発現上昇が認められた遺伝子数をベン図で示した。3T3-L1 細胞においては GDE5 の発現抑制により 318 個の遺伝子の発現上昇が認められ、そのうち 54 個の遺伝子については NIH-3T3 細胞においても同様に発現上昇していた ($P < 0.05$)。 (B) siRNA を細胞へ導入した後、2 日間分化誘導させた 3T3-L1 細胞における osteoglycin、decorin、epiphygan、lumican の mRNA の発現量を示した ($n=4$)。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (対応のない t 検定)

表 11. GDE5 発現抑制により、3T3-L1 細胞と NIH-3T3 細胞の両細胞において発現上昇が認められた遺伝子のリスト

Gene Name	Systematic Name	Description	3T3-L1		NIH-3T3	
			Fold	P value	Fold	P value
Lum	NM_008524	Lumican	9.3	0.00	6.3	0.00
Slc14a1	NM_028122	Solute carrier family 14 (urea transporter), member 1	7.9	0.00	2.6	0.00
Chgb	NM_007694	Chromogranin B	6.4	0.00	2.1	0.00
Lama2	U12147	Laminin-2 α 2 chain	6.4	0.00	2.8	0.00
Epyc	NM_007884	Epiphyccan	6.1	0.00	10.3	0.00
Sgk3	NM_133220	Serum/glucocorticoid regulated kinase 3	5.4	0.00	2.2	0.03
Kera	NM_008438	Keratocan	5.4	0.00	2.2	0.03
Hlf	NM_172563	Hepatic leukemia factor	5.2	0.00	3.2	0.00
Dcn	AK052759	Decorin	5.1	0.00	6.3	0.00
Me2	AK033595	Adult male cecum cDNA, clone:9130022D06	4.5	0.00	3.2	0.00
Egfr	AK033431	Adult male colon cDNA, clone:9030024J15	4.4	0.00	3.8	0.00
Cyp2f2	NM_007817	Cytochrome P450, family 2, subfamily f, polypeptide 2	4.3	0.00	6.8	0.00
Il33	NM_133775	Interleukin 33	4.3	0.00	2.2	0.00
Ypell	NM_023249	Yippee-like 1 (<i>Drosophila</i>)	4.3	0.00	2.6	0.00
C130026I21Rik	NM_175219	C130026I21 gene	4.1	0.01	2.1	0.00
Cdh26	NM_198656	Cadherin-like 26	4.1	0.01	2.9	0.00
Aldh1a7	NM_011921	Aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A7	3.6	0.00	12.5	0.00
A530050D06Rik	NM_001081169	A530050D06 gene	3.5	0.00	2.2	0.00
Fgfr2	NM_010207	Fibroblast growth factor receptor 2	3.4	0.00	3.2	0.00
Ablim1	AK029371	0 Day neonate head cDNA, clone:4833406P10	3.2	0.00	2.9	0.00
6330442E10Rik	NM_178745	6330442E10 gene	3.1	0.00	2.8	0.00
Sort1	NM_019972	Sortilin 1	3.1	0.00	2.5	0.00
Lbp	NM_008489	Lipopolysaccharide binding protein	3.0	0.00	2.3	0.00
Prelp	NM_054077	Proline arginine-rich end leucine-rich repeat	2.9	0.00	3.0	0.00
Glr3	NM_010298	Glycine receptor, β - subunit	2.9	0.02	2.1	0.00
Colec10	NM_173422	Collectin subfamily member 10	2.9	0.01	3.7	0.00
Agt	NM_007428	Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	2.9	0.00	4.3	0.00
C3	NM_009778	Complement component 3	2.8	0.00	4.1	0.00
Selenbp2	NM_019414	Selenium binding protein 2	2.6	0.00	3.1	0.00
Nid2	NM_008695	Nidogen 2	2.5	0.00	2.5	0.00
Svep1	NM_022814	Sushi, von Willebrand factor type A, EGF, and pentraxin domain containing 1	2.4	0.00	4.5	0.00
Bmf	NM_138313	BclII modifying factor	2.4	0.00	2.0	0.00
2900064A13Rik	AK033552	Adult male colon cDNA, clone:9030618C06	2.3	0.00	2.2	0.00
Zdhhc8	NM_172151	Zinc finger, DHHC domain containing 8	2.3	0.00	2.3	0.00
Calml4	NM_138304	Calmodulin-like 4	2.3	0.00	3.7	0.00
AI256396	AK134520	11 Days embryo head cDNA, clone:6230431N17	2.2	0.00	2.1	0.00
Ctso	NM_177662	Cathepsin O	2.2	0.00	3.0	0.00
Aytl1	NM_173014	Acyltransferase like 1 (Aytl1), mRNA NM_173014	2.2	0.00	2.2	0.00
Col5a3	NM_016919	Procollagen, type V, α 3	2.1	0.00	2.8	0.00
Igtp	NM_018738	Interferon γ -induced GTPase	2.1	0.00	3.9	0.00
Setd7	NM_080793	SET domain containing (lysine methyltransferase) 7	2.1	0.00	2.1	0.00
Adam19	NM_009616	A disintegrin and metalloproteinase domain 19 (meltrin β)	2.1	0.00	2.2	0.00
Sgcb	NM_011890	Sarcoglycan, β (dystrophin-associated glycoprotein)	2.1	0.00	2.1	0.00
Edg3	NM_010101	Endothelial differentiation, sphingolipid G protein-coupled receptor, 3	2.1	0.00	2.2	0.00
Grpr	NM_008177	Gastrin releasing peptide receptor	2.1	0.00	2.2	0.00
Irs1	AK141842	12 Days embryo spinal ganglion cDNA, clone:D130017A09	2.1	0.00	2.3	0.00
Igfp2	NM_019440	Interferon inducible GTPase 2	2.0	0.00	4.2	0.00
Ras11b	NM_026878	RAS-like, family 11, member B	2.0	0.00	2.0	0.00
Selenbp1	NM_009150	Selenium binding protein 1	2.0	0.01	7.4	0.00
Sned1	NM_172463	Sushi, nidogen and EGF-like domains 1	2.0	0.00	2.1	0.00
Nbl1	NM_008675	neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1	2.0	0.00	3.2	0.00
AI836003	NM_177716	Expressed sequence AI836003	2.0	0.00	4.7	0.00
Rab36	NM_029781	RAB36, member RAS oncogene family	2.0	0.00	2.1	0.00
Aspn	NM_025711	Asporin	2.0	0.00	4.7	0.00

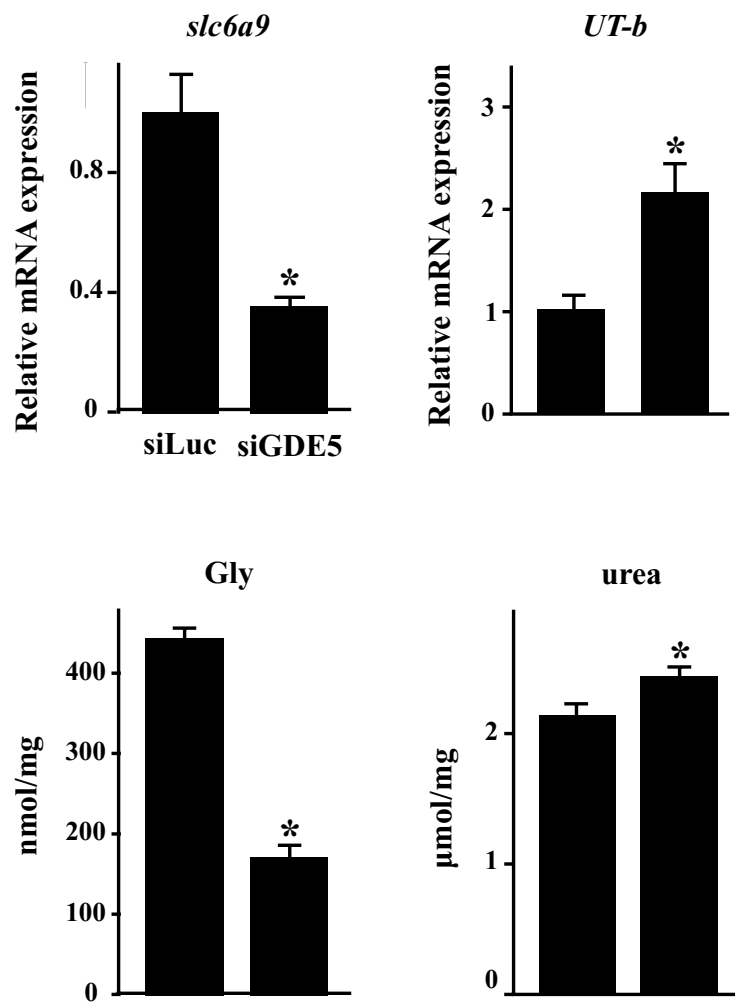


図 28. GDE5 の発現抑制による浸透圧調節に関連した遺伝子の発現変動、および細胞内の浸透圧調節物質濃度の変化

siRNA を細胞へ導入し、2 日間分化誘導させた 3T3-L1 細胞より抽出した total RNA を用い、*slc6a9* および *UT-B* の mRNA の発現量を PCR 法により解析した (n=4)。同様の処理を行った細胞を用い、細胞内のアミノ酸濃度をアミノ酸解析装置にて解析した (n=5)。*, $P < 0.05$ (対応のない t 検定)

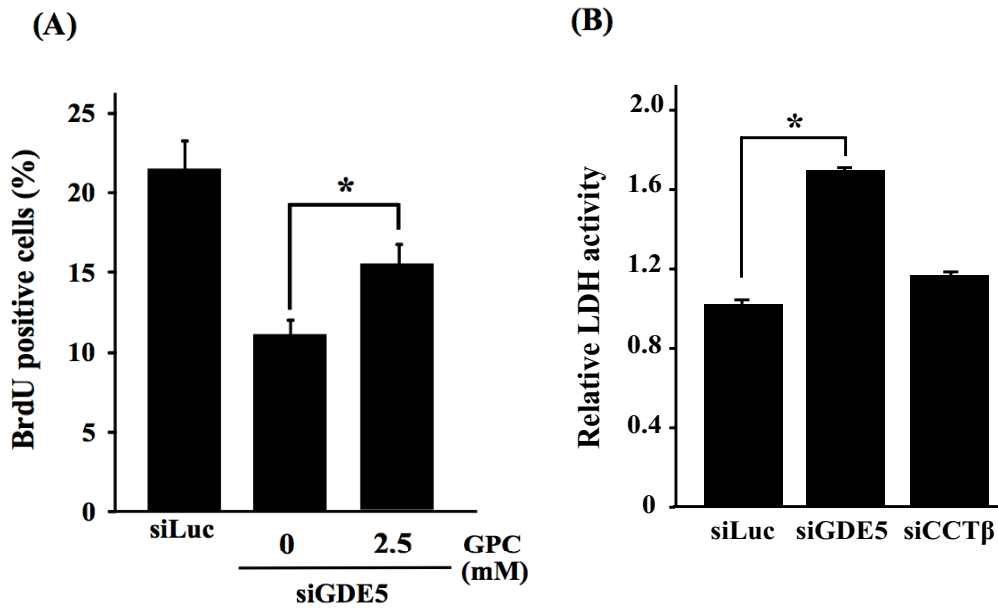


図 29. 培養液への GPC の添加による BrdU 陽性細胞率の変化、および培養液中の LDH 活性の解析

(A) 3T3-L1 細胞に siRNA を導入後、GPC 添加あるいは非添加の分化誘導培地により 18 時間培養し、BrdU 取り込み試験を行なった (n=6)。(B) 3T3-L1 細胞に siRNA を導入後、分化誘導培地により 18 時間培養し、培養上清中の LDH 活性を測定した。*, $P < 0.05$ (対応のない t 検定)

第四節 考察

本研究においては、GDE5 が GPC の分解活性を有し、細胞内の choline 産生を担うことから、GDE5 が choline 代謝を変化させることで白色脂肪細胞の増殖、および白色脂肪細胞内の LD の形成を制御するとの仮説を立て、*in vitro* 脂肪細胞分化モデルを用いて検証を行った。3T3-L1 前駆脂肪細胞における GDE5 の発現抑制は、細胞内の GPC を蓄積させることにより細胞の浸透圧バランスを変化させ、白色脂肪細胞分化の初期段階である MCE を阻害する可能性を明らかにした。GDE5 の発現抑制により MCE が阻害されたことで、脂肪細胞分化の主要な制御因子である C/EBP α 、PPAR γ の遺伝子発現が抑制され、結果的に白色脂肪細胞分化と白色脂肪細胞内への中性脂肪の蓄積が抑制されたことが示唆された。MCE は *in vitro* における白色脂肪細胞の分化誘導時において最初期に引き起こされる現象であり、前駆脂肪細胞における一過性の増殖過程である。本研究では、GDE5 の発現抑制は、細胞増殖において必須である PC の合成には影響せず、浸透圧バランスの変化が MCE を抑制した可能性が考えられた。前駆脂肪細胞の増殖は白色脂肪組織の肥大化に関与することが報告されていることから [75–77, 183, 184]、同メカニズムは肥満症の抑制に貢献できるものと考えられる。

GPC は choline の供給源であるだけでなく、腎尿細管上皮細胞に多量に存在する重要な浸透圧調節物質であることが知られている [155, 180–182]。尿の濃縮を行う腎尿細管上皮細胞は高 Na 濃度、あるいは高尿素濃度の環境下に位置し、細胞外からの浸透圧ストレスに暴露されており、細胞内に GPC を蓄積させることで環境に適応していると考えられている [182, 185]。以前 Gallazzini らは、哺乳動物の膜貫通型グリセロホスホジエステラーゼである GDE2 が GPC を加水分解することで浸透圧調節に関与することを報告している [155]。またマウス腎集合管由来細胞株 mIMCD 細胞を高 Na 濃度条件下で培養した際には、細胞外の高 Na 濃度に応答して *Gde2* mRNA の発現量が低下し、GPC の分解が抑制された [155, 186]。GDE5 は GDE2 と同様に GPC 分解活性を有し、かつ細胞質に局在することから細胞内 GPC の分解においては有利であり、細胞内浸透圧バランスを効率的に調節できる可能性が考えられた。3T3-L1 細胞において *Gde2* mRNA は PCR 法によって検出されなかったことから (データ未掲載)、3T3-L1 細胞においては GDE5 が細胞内の GPC 濃度を調節する細胞質酵素である可能性が考えられた。

本研究の後半では DNA マイクロアレイ法を用いて、3T3-L1 細胞と NIH-3T3 細胞の 2 つの細胞株において GDE5 発現抑制によるトランスクリプトーム解析を行った結果、両細胞において serum/glucocorticoid regulated kinase-3 (*Sgk-3*) mRNA の発現量の増加が認められた。*Sgk* は、乳腺上皮細胞や線維芽細胞を血清やグルココルチコイドによって刺激した際に発現量が増加する遺伝子として単離されており [187]、*Sgk-1* は高浸透圧、あるいは低浸透圧ストレス、UV 刺激、および熱ストレス等の刺激により発現誘導されることが乳腺上皮細胞や腎細胞を用いた研究により報告されている [188–190]。その中でも特に、アフリカツメガエル *Xenopus laevis* の腎臓由来 A6 細胞株を用いた研究では、低浸透圧状態下の A6 細胞において *Sgk-1*

mRNA の発現が誘導されたことから、本研究において観察された細胞内への GPC の蓄積による *Sgk-3* mRNA の発現誘導は、低浸透圧ストレス応答を示す形質である可能性が示唆された [190]。glycine のトランスポーターである *slc6a9* mRNA の発現量は GDE5 の発現抑制により減少し、実際、細胞内の glycine 濃度が低下していた。SLC6A9 はマウスの着床前胚において発現し、ごく初期の胚分裂時に細胞内の glycine の量を増加させることで細胞容量の維持に関与する可能性が報告されていることから [191]、GDE5 の発現を抑制した細胞においては、細胞容量の調節経路として SLC6A9 の発現を減少させることで細胞内の glycine 濃度を低下させ、細胞内の GPC の蓄積による浸透圧ストレスを調整した可能性が考えられる。

GDE5 の発現を抑制した細胞においては細胞内の glycine 濃度が低下した一方で、glycine 濃度と比較すると変化量は小さいものの、細胞内の尿素濃度が上昇し、尿素トランスポーターである UT-B の発現が誘導されていた。アフリカツメガエル *Xenopus laevis* の卵母細胞を用いた研究により、UT-B は浸透圧調節に応答した水分子の輸送に関与することが報告されている [192]。GDE5 の発現抑制により UT-B mRNA の発現量が増加していたことから、細胞内の GPC の蓄積に応答して水分子の透過性が上昇し、細胞内の尿素濃度が変動した可能性が考えられた [193]。

さらに DNA マイクロアレイ解析結果を分析したところ、GDE5 の発現抑制により、small leucine-rich proteoglycan に属する decorin、epiphygan、そして lumican の mRNA の発現上昇が認められた。これらの proteoglycan はコラーゲン分子や弾性線維成分に結合し、ECM 内のタンパク質やシグナル分子の活性化や安定化の役割を担っており [194, 195]、また多様な細胞分化や増殖の制御に関与することが報告されている。例えば、decorin を過剰発現させた筋芽細胞では筋分化が促進され [196]、lumican の発現上昇は monocytes から fibrocytes への分化を促進する [197]。さらに decorin と lumican は細胞増殖を抑制することが報告されている [198, 199]。関節軟骨においては proteoglycan が存在することによって、圧負荷に対する粘弾性が生み出されている [200]。本研究においては、GDE5 の発現抑制による proteoglycan の発現量の増加は、細胞内への GPC の蓄積によって浸透圧ストレスが生じ、浸透圧ストレスに応答して誘導された細胞表面の ECM の再構成に関連している可能性が示唆された。浸透圧バランスの変化により ECM の再構成に関与する遺伝子の発現が変動することは、本研究により初めて明らかにされたことから、本研究は浸透圧変化に対する細胞応答において新たな情報を提供したと考える。

総合討論

現代社会における生活習慣の現状を踏まえると、2 型糖尿病の発症予防や治療法の開発は重要な課題である。しかし、病因となる肥満の予防や 2 型糖尿病の病態の理解は未だ十分ではない。2 型糖尿病の効果的な発症予防法や治療薬の開発には、発症において重要な役割を果たすエネルギー代謝の異常、および中性脂肪の蓄積に関する分子機構の解明が不可欠である。以前の研究により、ARID5B、および GDE5 は、2 型糖尿病の発症に密接に関連する骨格筋のエネルギー代謝、および白色脂肪組織の肥大化への関与が示唆されていることから、本研究においてはこれら分子の生理的役割を解明することを目指した。

本研究の第一章においては、*Arid5b* KO マウスの単離骨格筋のエネルギー代謝の表現型を解析することにより、*Arid5b* 遺伝子の欠損によって TBC1D1 タンパク質の発現量が減少しており、インスリン非依存的な細胞内へのグルコースの取り込み量が増加するということが明らかとなった。2 型糖尿病の骨格筋においてはインスリン感受性の低下により骨格筋へのグルコースの取り込み量が減少しており、2 型糖尿病の治療薬としてピオグリタゾンや AMPK のアゴニストであるメトホルミンが臨床において使用されている。両薬剤とも、インスリンシグナル経路、あるいは運動シグナル経路を介して GLUT4 小胞の形質膜への輸送を促進し、グルコースの取り込み量を増加させることが作用機序の一つであると考えられている。一方、*Arid5b* 遺伝子の欠損によって TBC1D1 の発現量が減少を伴った単離骨格筋へのグルコースの取り込み量の増加は、インスリンシグナル経路、あるいは運動シグナル経路の活性化とは異なる経路を介して誘導されたことが示唆された。

本研究に使用した *Arid5b* KO マウスにおいては、体重、体長、前脛骨長および白色脂肪重量が野生型と比較して有意に減少あるいは短縮しているが [1]、最近、AMPK による TBC1D1 のリン酸化部位である Ser²³¹ を Ala に置換した TBC1D1 変異体 (TBC1D1^{Ser231Ala}) のノックイン (KI) マウス (TBC1D1^{Ser231Ala} KI マウス) においては、血中インスリン様成長因子-1 (insulin like growth factor-1, IGF-1) 濃度が上昇しており、体重、体長、前脛骨長、および白色脂肪重量が野生型と比較して有意に増加あるいは延長したことが報告された [201]。*Arid5b* KO マウスと TBC1D1^{Ser231Ala} KI マウスの表現型の比較について表 11 にまとめた。極めて興味深いことに、TBC1D1^{Ser231Ala} KI マウスにおいては、IGF-1 小胞に局在する RAB8A が TBC1D1 によって GDP 型に変換され、肝臓、骨格筋、および脂肪組織からの IGF-1 の分泌を促進することで血中の IGF-1 濃度が上昇することが示された [201]。また IGF-1 は TBC1D1^{Ser231Ala} KI マウスの白色脂肪組織に作用し、IGF1R-AKT-mTORC 経路を介して *Fas* 遺伝子などの脂質合成に関連する遺伝子群の発現を誘導することで、白色脂肪組織における TAG の蓄積を増大させることが明らかにされた (図 30) [201]。さらに、骨格筋や肝臓において TBC1D1 の GTP 加水分解活性が阻害された場合、GTP 型 RAB8A が維持されることで IGF-1 の分泌量が減少することが示されており [201]、*Arid5b* KO マウスの単離骨格筋においては TBC1D1 の発現量の減少により GTP 型 RAB8A が維持され、骨格筋からの IGF-1 の分泌量が減少している可能性が推測

された。*Arid5b* KO マウスの肝臓や白色脂肪組織における TBC1D1 の発現量は未解析であるが、*Arid5b* KO マウスにおいては、これらの組織においても TBC1D1 の発現量が減少した結果、IGF-1 の分泌量が減少し、成長不全や白色脂肪組織重量の減少が誘導された可能性が考えられた。従って、ARID5B は *Tbc1d1* 遺伝子の発現調節を介して、骨格筋へのグルコースの取り込みだけでなく、白色脂肪組織の脂質合成の調節において重要な役割を担う可能性がある。ただし、白色脂肪組織重量の減少は、FGF21 や FNDC5 などの分泌因子による白色脂肪細胞の褐色化を介して誘導された可能性が否定できないことから、今後、血中の IGF-1 濃度や FGF21 濃度の定量、および白色脂肪組織における褐色化関連遺伝子群の発現解析を行うことで、成長不全や白色脂肪組織重量の減少といった *Arid5b* KO マウスの表現型についてメカニズムを明らかにする必要がある。以上より、本研究は、骨格筋におけるグルコースの取り込みのみならず、組織間のクロストークを介した白色脂肪組織重量について新たな調節機構の可能性を提案するものであり、本研究は 2 型糖尿病の治療法の開発において新たな切り口を提示したと考える。

表 11. *Arid5b* KO マウスと TBC1D1^{Ser231Ala} KI マウスの表現型の比較

マウス	体重	体長	前脛骨長	白色脂肪組織重量	骨格筋における TBC1D1 の発現量/活性	IGF-1 分泌量
<i>Arid5b</i> KO	減少	短い	短い	減少	発現量減少	未解析
TBC1D1 ^{Ser231Ala} KI	増加	長い	長い	増加	一部活性化	増加

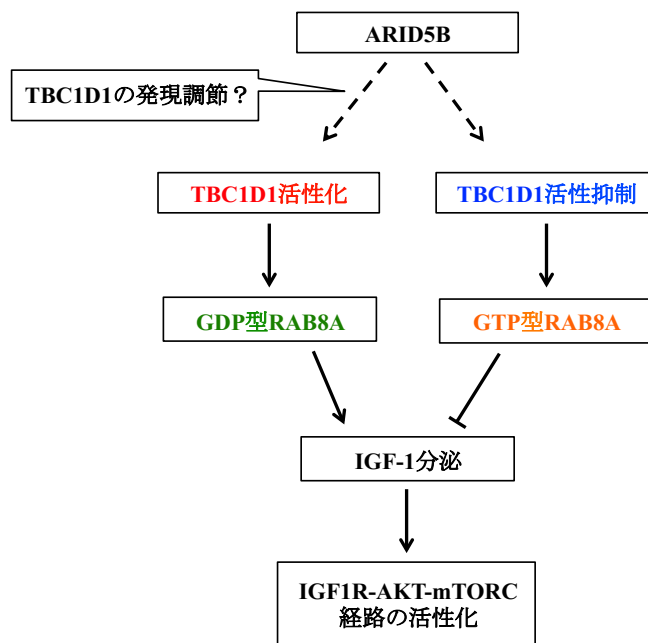


図 30. TBC1D1 による RAB8A を介した IGF-1 の分泌調節機構のまとめ
PNAS 2016, 113 (26):7219-7224 の supporting information より改変し引用

以前の研究において興味深いことに、ARID5B は癌の発症にも関与する可能性が指摘されている。最近、ゲノムワイド関連解析を利用した解析により、ARID5B の複数の一塩基多型 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) がヒトの B 細胞性、および T 細胞性の急性リンパ芽球性白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) と関連することが明らかにされた [202, 203]。前駆 B 細胞 ALL (B-ALL) の患者から単離した骨髄系の細胞においては HIF-1 α の発現量が増加しており、HIF-1 α の増加によって GLUT1、および HK2 などの解糖系に関連した遺伝子群の発現が誘導されることで糖利用が亢進し、癌細胞の増殖や生存に重要な役割を果たしていることが報告されている [204]。TBC1D1 は GLUT4 小胞だけでなく、GLUT1 小胞の形質膜の輸送を抑制することが示唆されていることから [137]、ARID5B 遺伝子の SNPs を有する ALL においては、TBC1D1 の発現量が減少することで GLUT1 小胞の形質膜への輸送が促進され、癌細胞での糖利用の亢進に寄与している可能性が推察された。HIF-1 α の発現量の増加や解糖系の亢進による癌細胞の増殖促進は ALL のみならず多様な癌細胞において認められていることから [205, 206]、本研究は多様な癌細胞のエネルギー代謝における ARID5B 遺伝子の病態的役割について新たな可能性を呈示するものである。今後、患者由来 ALL における TBC1D1 タンパク質の発現量の変動、および ALL の患者の予後や再発率との TBC1D1 タンパク質の発現量との関連性を解析することで、ALL における ARID5B の生理的役割を明らかにし、ALL の治療薬の開発に応用できる可能性が考えられた。

次に第二章では、GDE5 の発現抑制による細胞内への GPC の蓄積が低浸透圧ストレスを誘導し、白色脂肪細胞の増殖を抑制することを明らかにした。前駆脂肪細胞の増殖は白色脂肪組織の増大に寄与することが報告されていることから [183, 184]、本研究成果は肥満症の抑制に貢献できる可能性が考えられた。さらに本研究においては、網羅的な遺伝子発現解析によって GDE5 の発現を抑制した細胞において発現変動した遺伝子群を抽出した。その中でも特に、proteoglycan 類の発現量が著しく増加していること、また浸透圧調節物質である glycine のトランスポーターの発現量が減少していることを見出し、低浸透圧ストレス誘導への細胞応答として ECM の再構成が引き起こされた可能性を示した。低浸透圧ストレス下の細胞において proteoglycan の遺伝子発現が誘導されるという知見に関しては、これまでに、アフリカミドリザル腎臓由来 Cos-7 細胞を用いた研究において、低浸透圧ストレスが小胞体からの Ca^{2+} の放出を誘導した結果、 Ca^{2+} 依存的 calpain が活性化され、細胞外骨格構成タンパク質の一つである vimentin が速やかに分解されることが明らかにされている [207]。細胞外骨格構成タンパク質の再構成は、低浸透圧ストレスに対する細胞応答である可能性が考えられるが、GPC の蓄積による低浸透圧ストレス応答の分子機序の解明は、腎尿細管上皮細胞などの浸透圧ストレス変動に対する調節機構の解明の一端を担うと考えられた。また GDE5 の発現抑制により細胞内への GPC の蓄積を誘導する細胞実験系は、低浸透圧ストレスを模倣した細胞応答の解析に有用な細胞モデルとなると考えられる。

本研究においては、GDE5 による GPC/choline 代謝と細胞増殖との関連性を示したが、ヒトの乳癌や大腸癌を含む多様な癌細胞においては、CK α 、および CCT などの choline 代謝に関連する遺伝子の発現量が増加しており、細胞内の P-choline 量、および PC 量の増加と細胞増殖の関連性が報告されている [208–210]。例えば、ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞では CK α の発現量、および細胞内の P-choline 量の増加が認められるが、逆に CK α の発現抑制により細胞内の P-choline 量が減少すると細胞増殖が抑制され、細胞分化が誘導された [211]。P-choline は PC 合成経路以外にも DNA 合成を促進するセカンドメッセンジャーとしての役割を担っており、NIH-3T3 細胞においてはインスリンや上皮成長因子の刺激により細胞内の P-choline 量が増加し、p70 S6K や MAPK シグナル経路を介して、DNA 合成、および細胞増殖が促進されることが報告されている [212]。本研究においては、GDE5 の発現抑制により 3T3-L1 細胞内の P-choline 量がコントロール細胞と比較して有意に減少したことから、癌細胞において GDE5 の発現を抑制することで、GPC の分解による choline の供給経路を遮断し、PC 合成量の低下以外のメカニズムによって細胞増殖を抑制できる可能性が考えられた。さらに GDE5 を発現抑制した 3T3-L1 細胞においては、筋芽細胞などの細胞分化を促進する作用を有する decorin や lumican [196, 197] の発現量が増加していたことから、GDE5 の発現抑制により癌細胞の分化を誘導することで細胞増殖を抑制できる可能性も考えられた。なお GDE5 を発現抑制した 3T3-L1 細胞においては細胞内の PC 量にはコントロール細胞との差は認められなかったが、CK α を過剰発現させた NIH-3T3 細胞、あるいは CK α を発現抑制したヒト乳癌上皮細胞 MCF-12A 細胞においても、細胞内の PC 量にはコントロール細胞との差が認められて

いないことから、正常細胞においては細胞内の PC 量は CCT により制御されており、細胞内の P-choline 量による影響は小さいのかもしれない。従って、今後は癌細胞を用いて、GDE5 の発現抑制が細胞内の P-choline 量、PC 量、および細胞増殖に与える影響を詳細に解析することによって、癌細胞の増殖機構において新しい分子機序の切り口を提供することが期待される。

2 型糖尿病におけるインスリン抵抗性の誘導には、FFA や分泌因子を介した骨格筋と白色脂肪組織のクロストークが重要な役割を果たしていることがこれまでの研究により明らかにされており [95, 213]、2 型糖尿病の予防、および治療には骨格筋と白色脂肪組織の両組織からのアプローチが重要であると考えられる。通常、骨格筋へのグルコースの取り込みは、インスリンや運動シグナル伝達経路を介した TBC1D1、および TBC1D4 の活性阻害によって促進されるが、肥満症や 2 型糖尿病においては、白色脂肪組織の肥大化により血中 FFA 濃度の上昇や炎症性サイトカインの放出によって、インスリンシグナル伝達経路の活性化が抑制される [99–103]。本研究においては、ARID5B が TBC1D1 の発現量の調節を介して骨格筋へのインスリン非依存的なグルコースの取り込み量を調節する可能性を見出し、また GDE5 が浸透圧調節を介して前駆脂肪細胞の増殖・分化への関与を明らかにした。これらの知見は、インスリンシグナル伝達経路の活性に依存せず、骨格筋へのグルコースの取り込み量を増加させる 2 型糖尿病の治療戦略に貢献できるだけでなく、前駆脂肪細胞の増殖、および分化を抑制することによって白色脂肪組織の肥大化を予防する方法の開発に貢献でき、2 型糖尿病の発症予防、および治療戦略の開発の観点において重要な知見であると考えられる。本研究成果は、2 型糖尿病の発症の予防や治療を目的とした医薬品や機能性食品の開発を通じて、人々の健康維持への貢献が期待される。

引用文献

1. Wellen KE, Hotamisligil GS (2005) Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115:1111–1119
2. Reilly SM, Saltiel AR (2017) Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat Rev Endocrinol* 13:633–643
3. 厚生労働省 (2018): 国民健康・栄養調査結果の概要.
4. Katsarou A, Gudbjörnsdóttir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, Jacobsen LM, Schatz DA, Lernmark Å (2017) Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Prim* 3:17016
5. Jallut D, Golay A, Munger R, Frascarolo P, Schutz Y, Jéquier E, Felber JP (1990) Impaired glucose tolerance and diabetes in obesity: A 6-year follow-up study of glucose metabolism. *Metabolism* 39:1068–1075
6. DeFronzo RA (2009) From the triumvirate to the ominous octet: A new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 58:773–795
7. DeFronzo RA, Tripathy D (2009) Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 32:Suppl 2
8. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, et al (2017) Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. *Diabetes* 66:241–255
9. Cholerton B, Baker LD, Montine TJ, Craft S (2016) Type 2 diabetes, cognition, and dementia in older adults: Toward a precision health approach. *Diabetes Spectr* 29:210–219
10. McIntosh EC, Nation DA (2019) Importance of treatment status in links between type 2 diabetes and Alzheimer’s disease. *Diabetes Care* 42:972–979
11. International Diabetes Federation (2019) IDF Diabetes Atlas Ninth.
12. Shou J, Chen PJ, Xiao WH (2020) Mechanism of increased risk of insulin resistance in aging skeletal muscle. *Diabetol Metab Syndr* 12:1–10
13. Yamauchi T, Hara K, Maeda S, et al (2010) A genome-wide association study in the Japanese population identifies susceptibility loci for type 2 diabetes at UBE2E2 and C2CD4A-C2CD4B. *Nat Genet* 42:864–868
14. Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, et al (2008) Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 40:1092–1097
15. Smemo S, Tena JJ, Kim K-H, et al (2014) Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature* 507:371–375
16. Liesa M, Shirihai OS (2013) Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab* 17:491–506
17. Kelley DE, He J, Menshikova E V, Ritov VB (2002) Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51:2944–2950
18. Fazakerley DJ, Krycer JR, Kearney AL, Hocking SL, James DE (2019) Muscle and adipose tissue insulin resistance: malady without mechanism? *J Lipid Res* 60:1720–1732
19. DeFronzo RA (1988) The Triumvirate: -Cell, Muscle, Liver: A Collusion Responsible for NIDDM. *Diabetes* 37:667–687

20. Honka MJ, Latva-Rasku A, Bucci M, Virtanen KA, Hannukainen JC, Kalliokoski KK, Nuutila P (2018) Insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle, adipose tissue and liver: A positron emission tomography study. *Eur J Endocrinol* 178:523–531
21. Manning BD, Toker A (2017) AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 169:381–405
22. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR (2014) Insulin Receptor Signaling in Normal. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014 6:a009191
23. Jaldin-Fincati JR, Pavarotti M, Frendo-Cumbo S, Bilan PJ, Klip A (2017) Update on GLUT4 Vesicle Traffic: A Cornerstone of Insulin Action. *Trends Endocrinol Metab* 28:597–611
24. Pfeffer S, Aivazian D (2004) Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:886–896
25. Ishikura S, Klip A (2008) Muscle cells engage Rab8A and myosin Vb in insulin-dependent GLUT4 translocation. *Am J Physiol Cell Physiol* 295:C1016-1025
26. Ishikura S, Bilan PJ, Klip A (2007) Rabs 8A and 14 are targets of the insulin-regulated Rab-GAP AS160 regulating GLUT4 traffic in muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 353:1074–1079
27. Sun Y, Bilan PJ, Liu Z, Klip A (2010) Rab8A and Rab13 are activated by insulin and regulate GLUT4 translocation in muscle cells. *Proc Natl Acad Sci* 107:19909–19914
28. Shulman GI, Rothman DL, Jue T, Stein P, DeFronzo RA, Shulman RG (1990) Quantitation of Muscle Glycogen Synthesis in Normal Subjects and Subjects with Non-Insulin-Dependent Diabetes by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *N Engl J Med* 322:223–228
29. Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Mudaliar S, Mohideen P, Carter L, Henry RR (2000) Potential role of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle insulin resistance of type 2 diabetes. *Diabetes* 49:263–271
30. Højlund K, Birk JB, Klein DK, Levin K, Rose AJ, Hansen BF, Nielsen JN, Beck-Nielsen H, Wojtaszewski JFP (2009) Dysregulation of glycogen synthase COOH- and NH₂-terminal phosphorylation by insulin in obesity and type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 94:4547–4556
31. Morino K, Petersen KF, Dufour S, et al (2005) Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest* 115:3587–3593
32. Putti R, Migliaccio V, Sica R, Lionetti L (2016) Skeletal muscle mitochondrial bioenergetics and morphology in high fat diet induced obesity and insulin resistance: Focus on dietary fat source. *Front Physiol* 6:1–8
33. Zorzano A, Liesa M, Palacín M (2009) Role of mitochondrial dynamics proteins in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1846–1854
34. Goodpaster BH, Sparks LM (2017) Metabolic Flexibility in Health and Disease. *Cell Metab* 25:1027–1036
35. Schiaffino S, Reggiani C (2011) Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 91:1447–1531
36. Talbot J, Maves L (2016) Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle

- developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 5:518–534
37. Chen H, Vermulst M, Wang YE, Chomyn A, Prolla TA, McCaffery JM, Chan DC (2010) Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* 141:280–289
 38. Mishra P, Carelli V, Manfredi G, Chan DC (2014) Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 19:630–641
 39. Mishra P, Varuzhanyan G, Pham AH, Chan DC (2015) Mitochondrial dynamics is a distinguishing feature of skeletal muscle fiber types and regulates organellar compartmentalization. *Cell Metab* 22:1033–1044
 40. Oberbach A, Bossenz Y, Lehmann S, Niebauer J, Adams V, Paschke R, Schön MR, Blüher M, Punkt K (2006) Altered Fiber Distribution and Fiber- Specific Glycolytic and Oxidative Enzyme Activity in Skeletal Muscle of Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 29:895–900
 41. Mårin P, Andersson B, Krotkiewski M, Björntorp P (1994) Muscle fiber composition and capillary density in women and men with NIDDM. *Diabetes Care* 17:382–386
 42. Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, et al (2003) Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci* 100:8466–8471
 43. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI (2004) Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 350:664–671
 44. Wilsker D, Probst L, Wain HM, Maltais L, Tucker PW, Moran E (2005) Nomenclature of the ARID family of DNA-binding proteins. *Genomics* 86:242–251
 45. Patsialou A, Wilsker D, Moran E (2005) DNA-binding properties of ARID family proteins. *Nucleic Acids Res* 33:66–80
 46. Chicas A, Kapoor A, Wang X, Aksoy O, Everitts AG, Zhang MQ, Garcia BA, Bernstein E, Lowe SW (2012) H3K4 demethylation by Jarid1a and Jarid1b contributes to retinoblastoma-mediated gene silencing during cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci* 109:8971–8976
 47. Kadoch C, Crabtree GR (2015) Mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes and cancer: Mechanistic insights gained from human genomics. *Sci Adv* 1:1–17
 48. Jones S, Wang T, Shih I, et al (2010) Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 107:228–231
 49. Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, et al (2010) ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N Engl J Med* 363:1532–1543
 50. Li M, Zhao H, Zhang X, et al (2011) Inactivating mutations of the chromatin remodeling gene ARID2 in hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 43:828–829
 51. Mosaad YM, Khashaba M, Darwish A, Darwish M, Elwassefy M, Abdelmabood S, Fawzy IM, Youssef LF, Elbasiouny RA (2019) ARID5B rs10821936 and rs10994982 gene polymorphisms and acute lymphoblastic leukemia: relation to disease susceptibility and

- outcome. *Pediatr Hematol Oncol* 36:365–375
52. Tao R, Liu YJ, Liu LF, Li W, Zhao Y, Li HM, Yi XL, Zhao ZY (2019) Genetic polymorphisms of ARID5B rs7089424 and rs10994982 are associated with B-lineage ALL susceptibility in Chinese pediatric population. *J Chinese Med Assoc* 82:562–567
 53. Healy J, Richer C, Bourgey M, Kritikou EA, Sinnett D (2010) Replication analysis confirms the association of ARID5B with childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 95:1608–1611
 54. Li N, Dhar SS, Chen TY, Kan PY, Wei Y, Kim JH, Chan CH, Lin HK, Hung MC, Lee MG (2016) JARID1D is a suppressor and prognostic marker of prostate cancer invasion and metastasis. *Cancer Res* 76:831–843
 55. Celen C, Chuang JC, Luo X, et al (2017) Arid1b haploinsufficient mice reveal neuropsychiatric phenotypes and reversible causes of growth impairment. *Elife* 6:1–22
 56. Santen GWE, Aten E, Sun Y, et al (2012) Mutations in SWI/SNF chromatin remodeling complex gene ARID1B cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet* 44:379–380
 57. Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, et al (2012) Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Genet* 44:376–378
 58. Nixon JC, Ferrell S, Miner C, Oldham AL, Hochgeschwender U, Webb CF (2008) Transgenic Mice Expressing Dominant-Negative Bright Exhibit Defects in B1 B Cells. *J Immunol* 181:6913–6922
 59. Habir K, Aeinehband S, Wermeling F, Malin S (2017) A role for the transcription factor Arid3a in mouse B2 lymphocyte expansion and peritoneal B1a generation. *Front Immunol* 8:1387
 60. Kurkewich JL, Klopfenstein N, Hallas WM, Wood C, Sattler RA, Das C, Tucker H, Dahl R, Dahl KDC (2016) Arid3b Is Critical for B Lymphocyte Development. *PLoS One* 11:1–19
 61. Wu R-C, Jiang M, Beaudet AL, Wu M-Y (2013) ARID4A and ARID4B regulate male fertility, a functional link to the AR and RB pathways. *Proc Natl Acad Sci* 110:4616–4621
 62. Wu RC, Zeng Y, Pan IW, Wu MY (2015) Androgen receptor coactivator ARID4B is required for the function of sertoli cells in spermatogenesis. *Mol Endocrinol* 29:1334–1346
 63. Amano K, Hata K, Muramatsu S, et al (2011) Arid5a cooperates with Sox9 to stimulate chondrocyte-specific transcription. *Mol Biol Cell* 22:1300–1311
 64. Chalise JP, Hashimoto S, Parajuli G, et al (2019) Feedback regulation of Arid5a and Ppar- γ 2 maintains adipose tissue homeostasis. *Proc Natl Acad Sci* 116:15128–15133
 65. Peng JC, Valouev A, Swigut T, Zhang J, Zhao Y, Sidow A, Wysocka J (2009) Jarid2/Jumonji Coordinates Control of PRC2 Enzymatic Activity and Target Gene Occupancy in Pluripotent Cells. *Cell* 139:1290–1302
 66. Pasini D, Cloos PAC, Walfridsson J, Olsson L, Bukowski JP, Johansen J V., Bak M, Tommerup N, Rappsilber J, Helin K (2010) JARID2 regulates binding of the Polycomb repressive complex 2 to target genes in ES cells. *Nature* 464:306–310
 67. Yamakawa T, Whitson RH, Li S-L, Itakura K (2008) Modulator recognition factor-2 is required for adipogenesis in mouse embryo fibroblasts and 3T3-L1 cells. *Mol Endocrinol* 22:441–453

68. Hata K, Takashima R, Amano K, et al (2013) Arid5b facilitates chondrogenesis by recruiting the histone demethylase Phf2 to Sox9-regulated genes. *Nat Commun* 4:2850
69. Murray J, Whitson RH, Itakura K (2018) Reduced prostaglandin I2 signaling in Arid5b-/- primary skeletal muscle cells attenuates myogenesis. *FASEB J* 32:1868–1879
70. Whitson RH, Tsark W, Huang TH, Itakura K (2003) Neonatal mortality and leanness in mice lacking the ARID transcription factor Mrf-2. *Biochem Biophys Res Commun* 312:997–1004
71. Bartz R, Li W-H, Venables B, Zehmer JK, Roth MR, Welti R, Anderson RGW, Liu P, Chapman KD (2007) Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J Lipid Res* 48:837–847
72. Brown DA (2001) Lipid droplets: Proteins floating on a pool of fat. *Curr Biol* 11:446–449
73. Rajala MW, Scherer PE (2003) Minireview: The adipocyte - At the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 144:3765–3773
74. Montgomery MK, De Nardo W, Watt MJ (2019) Impact of lipotoxicity on tissue “cross talk” and metabolic regulation. *Physiology* 34:134–149
75. Jo J, Gavrilova O, Pack S, Jou W, Mullen S, Sumner AE, Cushman SW, Perival V (2009) Hypertrophy and/or hyperplasia: Dynamics of adipose tissue growth. *PLoS Comput Biol* 5:e1000324
76. Meyer LK, Ciaraldi TP, Henry RR, Wittgrove AC, Phillips SA (2013) Adipose tissue depot and cell size dependency of adiponectin synthesis and secretion in human obesity. *Adipocyte* 2:217–226
77. Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ (2001) The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev* 2:239–254
78. Konige M, Wang H, Sztalryd C (2014) Role of adipose specific lipid droplet proteins in maintaining whole body energy homeostasis. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1842:393–401
79. Weisberg SP, Leibel RL, Anthony W, Jr F, Weisberg SP, Mccann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue Find the latest version : Obesity is associated with. *J Clin Invest* 112:1796–1808
80. Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H (2007) Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1023–1033
81. McLaughlin T, Sherman A, Tsao P, Gonzalez O, Yee G, Lamendola C, Reaven GM, Cushman SW (2007) Enhanced proportion of small adipose cells in insulin-resistant vs insulin-sensitive obese individuals implicates impaired adipogenesis. *Diabetologia* 50:1707–1715
82. Walther TC, Chung J, Farese R V. (2017) Lipid Droplet Biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 33:491–510
83. Rosen ED, MacDougald OA (2006) Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:885–896
84. Lefterova MI, Zhang Y, Steger DJ, et al (2008) PPAR γ and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev* 22:2941–2952
85. Mosesti D, Regassa A, Kim WK (2016) Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules. *Int J Mol Sci* 17:1–24

86. Ambele MA, Dessels C, Durandt C, Pepper MS (2016) Genome-wide analysis of gene expression during adipogenesis in human adipose-derived stromal cells reveals novel patterns of gene expression during adipocyte differentiation. *Stem Cell Res* 16:725–734
87. Cornelius P, MacDougald O a, Lane MD (1994) Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr* 14:99–129
88. Gross DN, Van Den Heuvel APJ, Birnbaum MJ (2008) The role of FoxO in the regulation of metabolism. *Oncogene* 27:2320–2336
89. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS (1998) Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78:783–809
90. Guo Y, Walther TC, Rao M, Stuurman N, Goshima G, Terayama K, Wong JS, Vale RD, Walter P, Farese R V. (2008) Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature* 453:657–661
91. Kasturi R, Wakil SJ (1983) Increased synthesis and accumulation of phospholipids during differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes. *J Biol Chem* 258:3559–3564
92. Krahmer N, Guo Y, Wilfling F, et al (2011) Phosphatidylcholine synthesis for lipid droplet expansion is mediated by localized activation of CTP:Phosphocholine cytidylyltransferase. *Cell Metab* 14:504–515
93. Jackowski S (1996) Cell cycle regulation of membrane phospholipid metabolism. *J Biol Chem* 271:20219–20222
94. Hörl G, Wagner A, Cole LK, et al (2011) Sequential synthesis and methylation of phosphatidylethanolamine promote lipid droplet biosynthesis and stability in tissue culture and in vivo. *J Biol Chem* 286:17338–17350
95. Stanford KI, Goodyear LJ (2018) Muscle-adipose tissue cross talk. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8:a029801
96. Czech MP, Tencerova M, Pedersen DJ, Aouadi M (2013) Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia* 56:949–964
97. Guilherme A, Virbasius J V., Puri V, Czech MP (2008) Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:367–377
98. Turner N, Kowalski GM, Leslie SJ, et al (2013) Distinct patterns of tissue-specific lipid accumulation during the induction of insulin resistance in mice by high-fat feeding. *Diabetologia* 56:1638–1648
99. Goodpaster BH, Sparks LM (2017) Metabolic flexibility in health and disease. *Cell Metab* 25:1027–1036
100. Daniele G, Eldor R, Merovci A, Clarke GD, Xiong J, Tripathy D, Taranova A, Abdul-Ghani M, DeFronzo RA (2014) Chronic reduction of plasma free fatty acid improves mitochondrial function and whole-body insulin sensitivity in obese and type 2 diabetic individuals. *Diabetes* 63:2812–2820
101. Yu C, Chen Y, Cline GW, et al (2002) Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 277:50230–50236
102. Belfort R, Mandarino L, Kashyap S, Wirfel K, Pratipanawatr T, Berria R, DeFronzo RA, Cusi

- K (2005) Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling. *Diabetes* 54:1640–1648
103. Grant RW, Dixit VD (2013) Mechanisms of disease: Inflammasome activation and the development of type 2 diabetes. *Front Immunol* 4:1–10
 104. Amati F, Dubé JJ, Alvarez-Carnero E, et al (2011) Skeletal muscle triglycerides, diacylglycerols, and ceramides in insulin resistance: Another paradox in endurance-trained athletes? *Diabetes* 60:2588–2597
 105. Erion DM, Shulman GI (2010) Diacylglycerol-mediated insulin resistance. *Nat Med* 16:400–402
 106. Sokolowska E, Blachnio-Zabielska A (2019) The Role of Ceramides in Insulin Resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10:1–13
 107. Brehm A, Krssak M, Schmid AI, Nowotny P, Waldhäusl W, Roden M (2006) Increased lipid availability impairs insulin-stimulated ATP synthesis in human skeletal muscle. *Diabetes* 55:136–140
 108. Smith RL, Soeters MR, Wüst RCI, Houtkooper RH (2018) Metabolic flexibility as an adaptation to energy resources and requirements in health and disease. *Endocr Rev* 39:489–517
 109. Egan B, Zierath JR (2013) Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab* 17:162–184
 110. Kolluru GK, Bir SC, Kevil CG (2012) Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. *Int J Vasc Med* 2012:918267
 111. Whitson RH, Huang T, Itakura K (1999) The novel Mrf-2 DNA-binding domain recognizes a five-base core sequence through major and minor-groove contacts. *Biochem Biophys Res Commun* 258:326–331
 112. Bayindir I, Babaeikishomi R, Kocanova S, et al (2015) Transcriptional Pathways in cPGI2-Induced Adipocyte Progenitor Activation for Browning. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6:1–14
 113. Vegiopoulos A, Müller-Decker K, Strzoda D, et al (2010) Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science* 328:1158–1161
 114. LaBarge S, McDonald M, Smith-Powell L, Auwerx J, Huss JM (2014) Estrogen-related receptor- α (ERR α) deficiency in skeletal muscle impairs regeneration in response to injury. *FASEB J* 28:1082–1097
 115. Dyar KA, Ciciliot S, Wright LE, et al (2014) Muscle insulin sensitivity and glucose metabolism are controlled by the intrinsic muscle clock. *Mol Metab* 3:29–41
 116. Llanos P, Ferrat-Contreras A, Georgiev T, Osorio-Fuentealba C, Espinosa A, Hidalgo J, Hidalgo C, Jaimovich E (2015) The cholesterol-lowering agent methyl- β -cyclodextrin promotes glucose uptake via GLUT4 in adult muscle fibers and reduces insulin resistance in obese mice. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 308:E294–E305
 117. Scarpulla RC, Vega RB, Kelly DP (2012) Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 23:459–466
 118. Finck BN, Kelly DP (2006) PGC-1 coactivators : inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 116:615–622
 119. Mootha VK, Handschin C, Arlow D, et al (2004) Err α and Gabpa/b specify PGC-1 α -dependent

- oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc Natl Acad Sci* 101:6570–6575
120. Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, Barsh GS, Clayton DA (1998) Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* 18:231–236
 121. Garesse R, Vallejo CG (2001) Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* 263:1–16
 122. Kelly DP, Scarpulla RC (2004) Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* 18:357–368
 123. Giacomello M, Pyakurel A, Glytsou C, Scorrano L (2020) The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21:204–224
 124. Lin L, Chen K, Khalek WA, Ward JL, Yang H, Chabi B, Wrutniak-Cabello C, Tong Q (2014) Regulation of skeletal muscle oxidative capacity and muscle mass by SIRT3. *PLoS One* 9:e85636
 125. Lee SH, Kim BJ, Park DR, Kim UH (2018) Exercise induces muscle fiber type switching via transient receptor potential melastatin 2-dependent Ca²⁺ signaling. *J Appl Physiol* 124:364–373
 126. Ren JM, Barucci N, Marshall BA, Hansen P, Mueckler MM, Shulman GI (2000) Transgenic mice overexpressing GLUT-1 protein in muscle exhibit increased muscle glycogenesis after exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E588–E592
 127. Treebak JT, Pehmøller C, Kristensen JM, Kjøbsted R, Birk JB, Schjerling P, Richter EA, Goodyear LJ, Wojtaszewski JFP (2014) Acute exercise and physiological insulin induce distinct phosphorylation signatures on TBC1D1 and TBC1D4 proteins in human skeletal muscle. *J Physiol* 592:351–375
 128. Vichaiwong K, Purohit S, An D, Toyoda T, Jessen N, Hirshman MF, Goodyear LJ (2010) Contraction regulates site-specific phosphorylation of TBC1D1 in skeletal muscle. *Biochem J* 431:311–320
 129. Mounier R, Théret M, Lantier L, Foretz M, Viollet B (2015) Expanding roles for AMPK in skeletal muscle plasticity. *Trends Endocrinol Metab* 26:275–286
 130. Cartee GD (2015) Roles of TBC1D1 and TBC1D4 in insulin- and exercise-stimulated glucose transport of skeletal muscle. *Diabetologia* 58:19–30
 131. Szekeres F, Chadt A, Tom RZ, Deshmukh AS, Chibalin A V, Björnholm M, Al-hasani H, Zierath JR (2012) The Rab-GTPase-activating protein TBC1D1 regulates skeletal muscle glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303:524–533
 132. O'Neill BT, Lauritzen HPMM, Hirshman MF, Smyth G, Goodyear LJ, Kahn CR (2015) Differential Role of Insulin / IGF-1 Receptor Signaling in Muscle Growth and Glucose Homeostasis Article Differential Role of Insulin / IGF-1 Receptor Signaling in Muscle Growth and Glucose Homeostasis. *CellReports* 11:1220–1235
 133. Dunn KW, Kamocka MM, McDonald JH (2011) A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am J Physiol - Cell Physiol* 300:723–742
 134. Roach WG, Chavez JA, Miinea CP, Lienhard GE (2007) Substrate specificity and effect on

- GLUT4 translocation of the Rab GTPase-activating protein Tbc1d1. *Biochem J* 403:353–358
135. Sakamoto K, Holman GD (2008) Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E29–E37
 136. Sano H, Kane S, Sano E, Miinea CP, Asara JM, Lane WS, Garner CW, Lienhard GE (2003) Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 278:14599–14602
 137. Henriques AFA, Matos P, Carvalho AS, Azkargorta M, Elortza F, Matthiesen R, Jordan P (2020) WNK1 phosphorylation sites in TBC1D1 and TBC1D4 modulate cell surface expression of GLUT1. *Arch Biochem Biophys* 679:198223
 138. Baba A, Ohtake F, Okuno Y, et al (2011) PKA-dependent regulation of the histone lysine demethylase complex PHF2-ARID5B. *Nat Cell Biol* 13:668–675
 139. An D, Toyoda T, Taylor EB, Yu H, Fujii N, Hirshman MF, Goodyear LJ (2010) TBC1D1 regulates insulin- and contraction-induced glucose transport in mouse skeletal muscle. *Diabetes* 59:1358–1365
 140. Cheng KKY, Zhu W, Chen B, Wang Y, Wu D, Sweeney G, Wang B, Lam KSL, Xu A (2014) The adaptor protein APPL2 inhibits insulin-stimulated glucose uptake by interacting with TBC1D1 in skeletal muscle. *Diabetes* 63:3748–3758
 141. Dokas J, Chadt A, Nolden T, Himmelbauer H, Zierath JR, Joost HG, Al-Hasani H (2013) Conventional knockout of Tbc1d1 in mice impairs insulin- and AICAR-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. *Endocrinology* 154:3502–3514
 142. Bouskila M, Hunter RW, Ibrahim AFM, Delattre L, Peggie M, Van Diepen JA, Voshol PJ, Jensen J, Sakamoto K (2010) Allosteric regulation of glycogen synthase controls glycogen synthesis in muscle. *Cell Metab* 12:456–466
 143. McManus EJ, Sakamoto K, Armit LJ, Ronaldson L, Shpiro N, Marquez R, Alessi DR (2005) Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *EMBO J* 24:1571–1583
 144. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, et al (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8:1288–1295
 145. Rosales-Soto G, Diaz-Vegas A, Casas M, Contreras-Ferrat A, Jaimovich E (2020) Fibroblast growth factor-21 potentiates glucose transport in skeletal muscle fibers. *J Mol Endocrinol* 65:85–95
 146. Dokas J, Chadt A, Joost H-G, Al-Hasani H (2016) Tbc1d1 deletion suppresses obesity in leptin-deficient mice. *Int J Obes* 40:1242–1249
 147. Kim KH, Jeong YT, Oh H, et al (2013) Autophagy deficiency leads to protection from obesity and insulin resistance by inducing Fgf21 as a mitokine. *Nat Med* 19:83–92
 148. Shan T, Liang X, Bi P, Kuang S (2013) Myostatin knockout drives browning of white adipose tissue through activating the AMPK-PGC1-Fndc5 pathway in muscle. *FASEB J* 27:1981–1989
 149. Castillo-Quan JI (2012) From white to brown fat through the PGC-1 -dependent myokine irisin: implications for diabetes and obesity. *Dis Model Mech* 5:293–295
 150. Corbin KD, Zeisel SH (2012) Choline Metabolism Provides Novel Insights into Non-alcoholic Fatty Liver Disease and its Progression. *Curr Opin Gastroenterol* 28:159–165

151. McMaster CR, Bell RM (1994) Phosphatidylcholine biosynthesis via the CDP-choline pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Multiple mechanisms of regulation. *J Biol Chem* 269:14776–14783
152. Michel V, Yuan Z, Ramsubir S, Bakovic M (2006) Choline transport for phospholipid synthesis. *Exp Biol Med* 231:490–504
153. Fernández-Murray JP, McMaster CR (2005) Glycerophosphocholine catabolism as a new route for choline formation for phosphatidylcholine synthesis by the Kennedy pathway. *J Biol Chem* 280:38290–38296
154. Sato H, Taketomi Y, Murakami M (2016) Metabolic regulation by secreted phospholipase A2. *Inflamm Regen* 36:1–7
155. Gallazzini M, Burg MB (2009) What's new about osmotic regulation of glycerophosphocholine. *Physiology* 24:245–249
156. Yanaka N (2007) Mammalian glycerophosphodiester phosphodiesterases. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:1811–1818
157. Corda D, Mosca MG, Ohshima N, Grauso L, Yanaka N, Mariggio S (2014) The emerging physiological roles of the glycerophosphodiesterase family. *FEBS J* 281:998–1016
158. Larson TJ, Ehrmann M, Boos W (1983) Periplasmic glycerophosphodiester phosphodiesterase of *Escherichia coli*, a new enzyme of the glp regulon. *J Biol Chem* 258:5428–5432
159. Mariggio S, Sebastia J, Filippi BM, Iurisci C, Volonte C, Amadio S, Falco V De, Santoro M, Corda D, Cnr S (2006) A novel pathway of cell growth regulation mediated by a PLA2 α -derived phosphoinositide metabolite. *FASEB J* 20:E1964-1978
160. Corda D, Kudo T, Zizza P, Iurisci C, Kawai E, Kato N, Yanaka N, Mariggio S (2009) The developmentally regulated osteoblast phosphodiesterase GDE3 is glycerophosphoinositol-specific and modulates cell growth. *J Biol Chem* 284:24848–24856
161. Mancini R, Piccolo E, Mariggio S, Filippi BM, Iurisci C, Pertile P, Berrie CP, Corda D (2003) Reorganization of actin cytoskeleton by the phosphoinositide metabolite glycerophosphoinositol 4-phosphate. *Mol Biol Cell* 14:503–515
162. Walter A, Korth U, Hilgert M, Hartmann J, Weichel O, Hilgert M, Fassbender K, Schmitt A, Klein J (2004) Glycerophosphocholine is elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *Neurobiol Aging* 25:1299–1303
163. Ohshima N, Kudo T, Yamashita Y, et al (2015) New Members of the Mammalian Glycerophosphodiester Phosphodiesterase Family. *J Biol Chem* 290:4260–4271
164. Okazaki Y, Ohshima N, Yoshizawa I, et al (2010) A novel glycerophosphodiester phosphodiesterase, GDE5, controls skeletal muscle development via a non-enzymatic mechanism. *J Biol Chem* 285:27652–27663
165. Hashimoto T, Yang B, Okazaki Y, Yoshizawa I, Kajihara K, Kato N, Wada M, Yanaka N (2016) Time course analysis of Skeletal muscle pathology of GDE5 transgenic mouse. *PLoS One* 11:1–20
166. Corda D, Zizza P, Varone A, Bruzik KS, Mariggio S (2012) The glycerophosphoinositols and their cellular functions. *Biochem Soc Trans* 40:101–107
167. Gallazzini M, Ferraris JD, Burg MB (2008) GDPD5 is a glycerophosphocholine

- phosphodiesterase that osmotically regulates the osmoprotective organic osmolyte GPC. *Proc Natl Acad Sci* 105:11026–11031
168. Zheng B, Berridge CP, Corda D, Farquhar MG (2003) GDE1/MIR16 is a glycerophosphoinositol phosphodiesterase regulated by stimulation of G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci* 100:1745–1750
 169. Rao M, Sockanathan S (2005) Transmembrane protein GDE2 induces motor neuron differentiation in vivo. *Science* 309:2212–5
 170. Yanaka N, Nogusa Y, Fujioka Y, Yamashita Y, Kato N (2007) Involvement of membrane protein GDE2 in retinoic acid-induced neurite formation in Neuro2A cells. *FEBS Lett* 581:712–718
 171. 橋本 貴生 (2017): 骨格筋特異的 GDE5 過剰発現 マウスの病態解析 博士論文.
 172. Stewart JD, Marchan R, Lesjak MS, et al (2012) Choline-releasing glycerophosphodiesterase EDI3 drives tumor cell migration and metastasis. *Proc Natl Acad Sci* 109:8155–8160
 173. Sanada Y, Kumoto T, Suehiro H, Nishimura F, Kato N, Hata Y, Sorisky A, Yanaka N (2013) RASSF6 Expression in Adipocytes Is Down-Regulated by Interaction with Macrophages. *PLoS One* 8:1–14
 174. Tercé F, Brun H, Vance DE (1994) Requirement of phosphatidylcholine for normal progression through the cell cycle in C3H/10T1/2 fibroblasts. *J Lipid Res* 35:2130–2142
 175. Timchenko NA, Wilde M, Nakanishi M, Smith JR, Darlington GJ (1996) CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBP alpha) inhibits cell proliferation through the p21 (WAF-1/CIP-1/SDI-1) protein. *Genes Dev* 10:804–815
 176. Aitchison AJ, Arsenault DJ, Ridgway ND (2015) Nuclear-localized CTP:phosphocholine cytidyltransferase regulates phosphatidylcholine synthesis required for lipid droplet biogenesis. *Mol Biol Cell* 26:2927–2938
 177. Mori T, Sakaue H, Iguchi H, et al (2005) Role of krüppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis. *J Biol Chem* 280:12867–12875
 178. Yanaka N, Kanda M, Toya K, Suehiro H, Kato N (2011) Vitamin B6 regulates mRNA expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ target genes. *Exp Ther Med* 2:419–424
 179. Muncie JM, Weaver VM (2018) The Physical and Biochemical Properties of the Extracellular Matrix Regulate Cell Fate. In: *Curr. Top. Dev. Biol.* pp 1–37
 180. Burg MB (1995) Molecular basis of osmotic regulation. *Am J Physiol* 268:F983–996
 181. Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI (2007) Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev* 87:1441–1474
 182. Garcia-Perez A, Burg MB (1991) Renal medullary organic osmolytes. *Physiol Rev* 71:1081–1115
 183. Fujiwara K, Hasegawa K, Ohkumo T, Miyoshi H, Tseng YH, Yoshikawa K (2012) Necdin controls proliferation of white adipocyte progenitor cells. *PLoS One* 7:e30948
 184. Joe AWB, Yi L, Even Y, Vogl AW, Rossi FM V (2009) Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet. *Stem Cells* 27:2563–2570

185. Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI (2007) Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev* 87:1441–1474
186. Topanurak S, Ferraris JD, Li J, Izumi Y, Williams CK, Gucek M, Wang G, Zhou X, Burg MB (2013) High NaCl- and urea-induced posttranslational modifications that increase glycerophosphocholine by inhibiting GDPD5 phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci* 110:7482–7487
187. Loffing J, Flores SY, Staub O (2006) Sgk kinases and their role in epithelial transport. *Annu Rev Physiol* 68:461–490
188. Bell LM, Leong MLL, Kim B, Wang E, Park J, Hemmings BA, Firestone GL (2000) Hyperosmotic stress stimulates promoter activity and regulates cellular utilization of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase (Sgk) by a p38 MAPK-dependent pathway. *J Biol Chem* 275:25262–25272
189. Leong MLL, Maiyar AC, Kim B, O’Keeffe BA, Firestone GL (2003) Expression of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, is a cell survival response to multiple types of environmental stress stimuli in mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 278:5871–5882
190. Rozansky DJ, Wang J, Doan N, Purdy T, Faulk T, Bhargava A, Dawson K, Pearce D (2002) Hypotonic induction of SGK1 and Na⁺ transport in A6 cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F105–F113
191. Steeves CL, Hammer MA, Walker GB, Rae D, Stewart NA, Baltz JM (2003) The glycine neurotransmitter transporter GLYT1 is an organic osmolyte transporter regulating cell volume in cleavage-stage embryos. *Proc Natl Acad Sci* 100:13982–13987
192. Yang B, Verkman AS (1998) Urea transporter UT3 functions as an efficient water channel. Direct evidence for a common water/urea pathway. *J Biol Chem* 273:9369–9372
193. Yang B, Verkman AS (2002) Analysis of double knockout mice lacking aquaporin-1 and urea transporter UT-B. *J Biol Chem* 277:36782–36786
194. Iozzo R V, Schaefer L (2010) Proteoglycans in health and disease: Novel regulatory signaling mechanisms evoked by the small leucine-rich proteoglycans. *FEBS J* 277:3864–3875
195. Schaefer L (2011) Small Leucine-Rich Proteoglycans in Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 22:1200–1207
196. Li Y, Li J, Zhu J, Sun B, Branca M, Tang Y, Foster W, Xiao X, Huard J (2007) Decorin gene transfer promotes muscle cell differentiation and muscle regeneration. *Mol Ther* 15:1616–1622
197. Pilling D, Vakil V, Cox N, Gomer RH (2015) TNF- α – stimulated fibroblasts secrete lumican to promote fibrocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci* 112:11929–11934
198. Ferdous Z, Peterson SB, Tseng H, Anderson DK, Iozzo R V, Grande-Allen KJ (2010) A role for decorin in controlling proliferation, adhesion, and migration of murine embryonic fibroblasts. *J Biomed Mater Res A* 93:419–428
199. Krishnan A, Li X, Kao W-Y, Viker K, Butters K, Masuoka H, Knudsen B, Gores G, Charlton M (2012) Lumican, an extracellular matrix proteoglycan, is a novel requisite for hepatic fibrosis. *Lab Invest* 92:1712–1725
200. Han E, Chen SS, Klisch SM, Sah RL (2011) Contribution of proteoglycan osmotic swelling pressure to the compressive properties of articular cartilage. *Biophys J* 101:916–924

201. Chen L, Chen Q, Xie B, et al (2016) Disruption of the AMPK-TBC1D1 nexus increases lipogenic gene expression and causes obesity in mice via promoting IGF1 secretion. *Proc Natl Acad Sci* 113:7219–7224
202. Papaemmanuil E, Hosking FJ, Vijayakrishnan J, et al (2009) Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 41:1006–1010
203. Wang P, Deng Y, Yan X, Zhu J, Yin Y, Shu Y, Bai D, Zhang S, Xu H, Lu X (2020) The Role of ARID5B in Acute Lymphoblastic Leukemia and Beyond. *Front Genet* 11:1–12
204. Frolova O, Samudio I, Benito JM, et al (2012) Regulation of HIF-1 α signaling and chemoresistance in acute lymphocytic leukemia under hypoxic conditions of the bone marrow microenvironment. *Cancer Biol Ther* 13:858–870
205. Qiu GZ, Jin MZ, Dai JX, Sun W, Feng JH, Jin WL (2017) Reprogramming of the Tumor in the Hypoxic Niche: The Emerging Concept and Associated Therapeutic Strategies. *Trends Pharmacol Sci* 38:669–686
206. Porporato PE, Dhup S, Dadhich RK, Copetti T, Sonveaux P (2011) Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: A comprehensive review. *Front Pharmacol* 2:49
207. Pan L, Zhang P, Hu F, Yan R, He M, Li W, Xu J, Xu K (2019) Hypotonic Stress Induces Fast, Reversible Degradation of the Vimentin Cytoskeleton via Intracellular Calcium Release. *Adv Sci* 1900865:1–8
208. Glunde K, Bhujwala ZM, Ronen SM (2011) Choline metabolism in malignant transformation. *Nat Rev Cancer* 11:835–848
209. Dueck D, Chan M, Tran K, Wong J, Jay F, Littman C, Stimpson R, Choy P (1996) The modulation of choline phosphoglyceride metabolism in human colon cancer. *Mol Cell Biochem* 162:227535
210. Yang J, Zhang Z, Zhao Y, Cheng J, Zhao C, Wang Z (2019) CCT α is a novel biomarker for diagnosis of laryngeal squamous cell cancer. *Sci Rep* 9:11823
211. Glunde K, Raman V, Mori N, Bhujwala ZM (2005) RNA interference-mediated choline kinase suppression in breast cancer cells induces differentiation and reduces proliferation. *Cancer Res* 65:11034–11043
212. Chung T, Huang JS, Mukherjee JJ, Crilly KS, Kiss Z (2000) Expression of human choline kinase in NIH 3T3 fibroblasts increases the mitogenic potential of insulin and insulin-like growth factor I. *Cell Signal* 12:279–288
213. Argilés JM, Campos N, Lopez-Pedrosa JM, Rueda R, Rodríguez-Mañas L (2016) Skeletal Muscle Regulates Metabolism via Interorgan Crosstalk: Roles in Health and Disease. *J Am Med Dir Assoc* 17:789–796

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御指導を賜りました広島大学大学院統合生命科学研究科 食品栄養機能学教授 矢中規之先生、および Beckman Research Institute of City of Hope Department of Molecular and Cellular Biology 教授 板倉啓壹先生に深く感謝申し上げます。また論文審査の副査を御担当頂き、貴重なご助言を賜りました広島大学大学院統合生命科学研究科 応用動物生命科学教授 島田昌之先生、同教授 堀内浩幸先生、並びに人間社会科学研究科 行動科学教授 和田正信先生に深謝致します。

本研究の第一章の実験に関し、長きに亘り研究活動を惜しみなくご支援くださり、また議論に真摯に向き合ってくださいました Dr. Ali Ehsani、Dr. Jennifer Murray に心より感謝申し上げます。また Dr. Robert H. Whitson をはじめとする板倉研究室の研究員の皆様に感謝致します。

本研究の第二章の実験に関し、研究遂行に多大な貢献をされた生物圏科学研究科 分子栄養学研究室の中村啓司氏、武田崇登氏、吉澤郁美氏、吉田富美代氏に感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、Beckman Research Institute of City of Hope への研究出向の機会を与えて下さり、長期間に亘って御支援を賜りました湧永製薬株式会社 湧永寛仁 社長、湧永寛信 副社長に深謝致します。また、出向および論文執筆の間、支えてくださった湧永製薬株式会社 岡孝己 研究顧問、前川尻真司 試薬・診断薬事業部前部長、木下智彦 創薬研究所前所長、田村浩一 中央研究所前所長、並びに天野浩貴 同前所長、そして研究所の皆様々に感謝申し上げます。

最後に、多様な教育を与え終始激励してくれた母 直美、父 晃に心から感謝するとともに、応援してくれた姉 麻利、妹 留利、義兄 忠治に感謝致します。