

アセトアセチル CoA 合成酵素の生理的意義に関する研究

Studies on the physiological role of acetoacetyl-CoA synthetase

長谷川 晋也

目次

論文リスト	1
略号リスト	2
緒論	4
第一章 3T3-L1 前駆脂肪細胞における AACCS の転写調節及び生理的役割の解析	10
第二章 肝臓における AACCS の転写調節および生理的意義	31
第三章 神経細胞の発達における AACCS の役割	44
総括	56
結語	58
謝辞	59
実験の部	60
参考文献	78

論文リスト

- 1) Shinya Hasegawa, Masahiro Yamasaki, Tasuku Inage, Noriko Takahashi, Tetsuya Fukui
Transcriptional regulation of ketone body-utilizing enzyme, acetoacetyl-CoA synthetase, by C/EBP α during adipocyte differentiation., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1779 (6-7), 414-419 (2008).
- 2) Shinya Hasegawa, Kazuki Noda, Akina Maeda, Masaru Matsuoka, Masahiro Yamasaki, Tetsuya Fukui
Acetoacetyl-CoA synthetase, a ketone body-utilizing enzyme, is controlled by SREBP-2 and affects serum cholesterol levels., *Mol. Genet. Metab.*, 107 (3), 553-560 (2012)
- 3) Shinya Hasegawa, Hiroki Kume, Sayuri Iinuma, Masahiro Yamasaki, Noriko Takahashi, Tetsuya Fukui
Acetoacetyl-CoA synthetase is essential for normal neuronal development., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 427 (2), 398-403 (2012)
- 4) Shinya Hasegawa, Yotaro Ikeda, Masahiro Yamasaki, Tetsuya Fukui
The role of acetoacetyl-CoA synthetase, a ketone body-utilizing enzyme, in 3T3-L1 adipocyte differentiation., *Biol. Pharm. Bull.*, 35 (11), 1980-1985 (2012)

略号リスト

AACS; acetoacetyl-CoA synthetase
ACC; acetyl-CoA carboxylase
ACL; ATP-citrate lyase
AMP; adenosine monophosphate
AP; activator protein
bp; base pairs
BSA; bovine serum albumin
cDNA; complementary DNA
ChIP; chromatin immunoprecipitation
CRE; cyclic AMP response element
C/EBP; CCAAT/enhancer binding protein
DMEM/F-12; Dulbecco's modified Eagle's medium: Nutrient Mixture F-12
DTT; dithiothreitol
EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid
EMSA; electrophoretic mobility shift assay
E-MEM; Eagle's minimal essential medium
FAS; fatty acid synthase
FBS; fetal bovine serum
GAPDH; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Gusb; β -glucuronidase
HBSS; Hanks' balanced salt solutions
HMG-CoA; 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HMGCR; HMG-CoA reductase
HMGCS; HMG-CoA synthase
HRP; horseradish peroxidase
LPDS; lipoprotein deficient FBS
MAP-2; microtubule-associated protein 2
NeuN; neuronal nuclei
NF; nuclear factor
PMSF; phenylmethylsulfonyl fluoride

PVDF; polyvinylidene difluoride
RACE; rapid amplification of cDNA Ends
PBS; phosphate-buffered saline
PPAR; peroxisome proliferator-activated receptor
RA; retinoic acid
RNA; ribonucleic acid
rRNA; ribosomal RNA
RT-PCR; reverse transcription-polymerase chain reaction
SCOT; succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA transferase
SDS-PAGE; sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
shRNA; short hairpin RNA
Sp1; stimulating protein 1
SRE; sterol response element
SREBP; sterol response element-binding protein
SSC; standard saline citrate
STZ; streptozotocin
TBS; tris (hydroxymethyl) aminometane buffer saline
WAT; white adipose tissue

緒言

ケトン体はアセト酢酸、 β -ヒドロキシ酪酸およびアセトンの総称であるが、これらのうち、アセトンはアセト酢酸から非酵素的に生じる副産物であるため、アセト酢酸と β -ヒドロキシ酪酸の両者をもってケトン体と称する場合もある。特に、アセト酢酸は、両者が生体に利用される場合に必ず経由する中間体と考えられるので、代謝的観点からは特に重要である。ケトン体の発見は 19 世紀に遡り¹⁾、様々な臨床所見から、アセト酢酸および β -ヒドロキシ酪酸が糖尿病患者の尿中に増加すること、そしてこれらが糖尿病ケトアシドーシスの原因物質であることが明らかにされてきた。長年の間、アセト酢酸は長鎖脂肪酸の β 酸化の結果生じる余剰な代謝産物であり、生体内で利用され得る代謝中間体であるとは考えられていなかった。1960 年代になると、ケトン体が酸化されエネルギー源と利用されることが明らかとなり、グルコースが利用できない飢餓状態における代替エネルギーであることがわかった。最近、遺伝子工学的手法により、通常の生理状態においてもケトン体利用が重要な役割を果たすことが報告され^{2,3)}、生理活性物質としてのケトン体の役割が明らかにされつつある。

Fig. 1 に示すようにケトン体の合成は、ミトコンドリア内に存在する 2 分子の acetyl-CoA が、acetoacetyl-CoA thiolase により acetoacetyl-CoA になる縮合反応から始まる。続いて、3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) synthase (EC 4.1.3.5, HMGCS) により acetoacetyl-CoA と acetyl-CoA が縮合して HMG-CoA が産生され、最終的に HMG-CoA lyase (EC 4.1.3.4) の作用によりアセト酢酸と acetyl-CoA へと開裂する⁴⁻⁶⁾。アセト酢酸は、ミトコンドリアに存在する D-(-)- β -hydroxybutyrate dehydrogenase により酵素的に還元されて β -ヒドロキシ酪酸となるか、非酵素的な脱炭酸反応によりアセトンになる^{7,8)}。現在まで、 β -ヒドロキシ酪酸およびアセトンを利用する酵素の存在は知られておらず、ケトン体利用のために活性化される基質はア

セト酢酸のみであると考えられる。

ケトン体は正常時においても合成されるが、特に飢餓や重度の糖尿病時などのグルコースの供給が不十分な状態において、脂肪酸分解によって生じる acetyl-CoA が TCA サイクルで代謝しきれずに、上記の反応を経て多量のケトン体に変換される。産生されたケトン体は、血中を循環し尿中へと排泄されるが、重度の糖尿病においては血中のケトン体が過剰量となり、血液の緩衝能を超え酸性を呈するケトアシドーシスと呼ばれる状態になり、意識障害を引き起こす。このように、ケトン体は糖尿病時における診断や血糖維持などの治療における重要な判断基準であり、生化学の発展と共にその合成や代謝に関する研究に関心がもたれてきた。

ケトン体は肝臓以外の組織において acetoacetyl-CoA に再変換されることが明らかとなり⁹⁾、特に筋肉や脳ではケトン体が脂肪酸よりもはるかに酸化されやすいことが報告され、エネルギー源として利用されることが見いだされた^{8, 10)}。ケトン体が酸化的代謝に利用されるためには、アセト酢酸が acetoacetyl-CoA へと活性化される必要がある。この反応には、肝臓以外のミトコンドリア画分に存在する succinyl-CoA: 3-oxoacid-CoA transferase (SCOT) が関与することが知られている。SCOT は succinyl-CoA からアセト酢酸に CoA を転移させる反応を触媒し、これによりアセト酢酸は acetoacetyl-CoA へと活性化される^{11, 12)} (Fig. 2)。

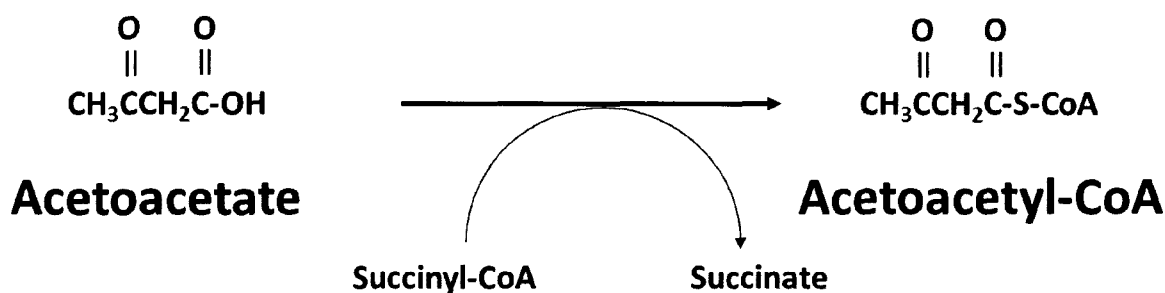


Figure 2 CoA transferase reaction

活性化された acetoacetyl-CoA は同じくミトコンドリアに存在する acetoacetyl-CoA thiolase によって acetyl-CoA へと変換され、TCA サイクルへと取り込まれる。この酵素の活性は個体の成長に応じて変化することが知られているが¹³⁾、栄養状態によっては変動しないとされている。近年、CoA 転移酵素のノックアウトマウスが作製され、出生直後にケトアシドーシスを発症し死亡することが明らかになった¹⁴⁾。また、このマウスではエネルギー代謝を調節する AMP-activated protein kinase のリン酸化が脳において増加しており、ケトン体利用酵素がエネルギー産生に関わるだけでなく、正常状態におけるエネルギーバランスを制御する可能性も見いだされている。

一方、Blecher ら¹⁵⁾ 及び Chen ら¹⁶⁾によるラット肝臓のスライスを用いた実験で、SCOT の存在しない肝臓においてもアセト酢酸が、相当量脂肪酸やコレステロールへ取り込まれることが報告された。前述したように、肝臓は SCOT の活性を持たないこと、またアセト酢酸を酸化できないことから、アセト酢酸を活性化する他の酵素の存在が予想され、1970 年代にサイトゾルに存在するアセト酢酸の活性化酵素として acetoacetyl-CoA synthetase (AACS) の存在が見いだされた。本酵素は、ラット肝臓^{17, 18)}、脳¹⁸⁾ 脂肪組織¹⁹⁾、乳腺²⁰⁾、副腎²¹⁾、マウス肝臓²²⁾や種々の腫瘍細胞²³⁾においてその活性が確認されている。また、本酵素の活性が SCOT と異なりサイトゾル画分に局在すること¹⁶⁾、あるいは新生仔の脳²³⁾ や授乳期の乳腺²⁰⁾ など脂質代謝の盛んな臓器においてその活性が高いことから、本酵素の生理的役割が脂質生合成に関連する可能性が示唆されている。また、灌流肝²⁴⁾および脳スライス²⁵⁾を用いた実験により、ATP citrate lyase (ACL) 阻害剤である (-)-ヒドロキシクエン酸の存在下においても、アセト酢酸からの脂質合成が阻害されないことから、アセト酢酸がミトコンドリアの関与なしに脂質に取り込まれると考えられる。

これらのことをふまえて、肝臓におけるアセト酢酸の活性化酵素の検討が行われた結果、福井、伊藤らにより活性汚泥菌 *Zoogloea ramigera* からの精製を足掛かりに²⁶⁾、ラット肝臓のサイトゾル画分より acetoacetyl-CoA synthetase (EC 6.2.1.16) が初めて精製された¹⁷⁾。SCOT が転移酵素であるのに対し、本酵素は ATP の加水分解とカップルしてアセト酢酸を acetoacetyl-CoA に活性化する新規のリガーゼであることが明らかとなった (Fig. 3)。

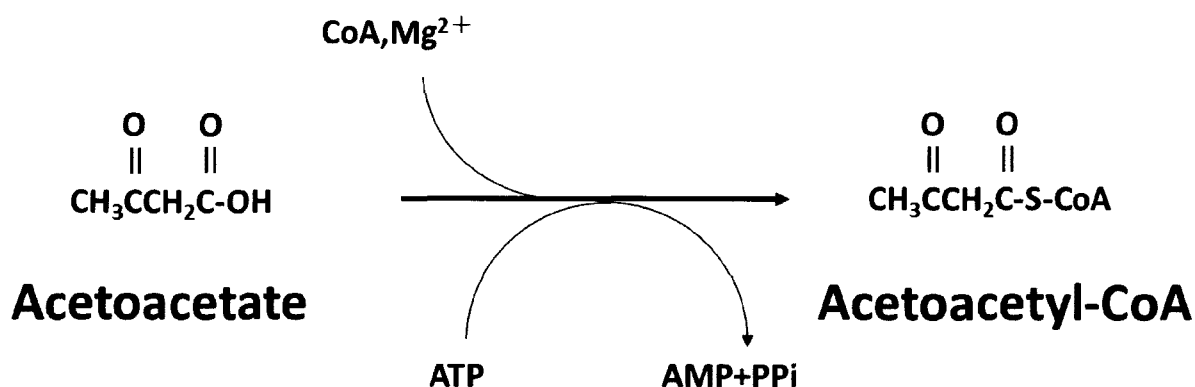


Figure 3 Acetoacetyl-CoA synthetase reaction

先に述べたように、SCOT が存在しない肝臓においてアセト酢酸が脂肪酸やコレステロールに取り込まれるという報告があること、肝臓の成長および脂肪細胞の分化段階において AACs の発現が誘導されることから^{27, 28)}、本酵素により活性化されたケトン体が、各臓器の発生・分化過程において脂質合成を介して重要な役割を果たす可能性が考えられる。また、肝臓においてコレステロール低下剤の pravastatin (HMG-CoA reductase 阻害剤) や cholestyramine (陰イオン交換樹脂) によって本酵素及びコレステロールの律速段階を触媒する HMG-CoA reductase (HMGCR) が誘導されることが明らかになっており^{29, 30)}、本酵素も肝臓においてコレステロール合成系と同様の制御を受けている可能性が考えられる。しかしながら、AACs の生理

的意義の詳細は明らかとなっておらず、またその転写調節機構も解明されていない。

そこで著者は、

(1) AACCS の promoter 領域の解析

(2) 脂肪細胞、肝臓および神経細胞における AACCS の生理的意義および転写調節について検討した。

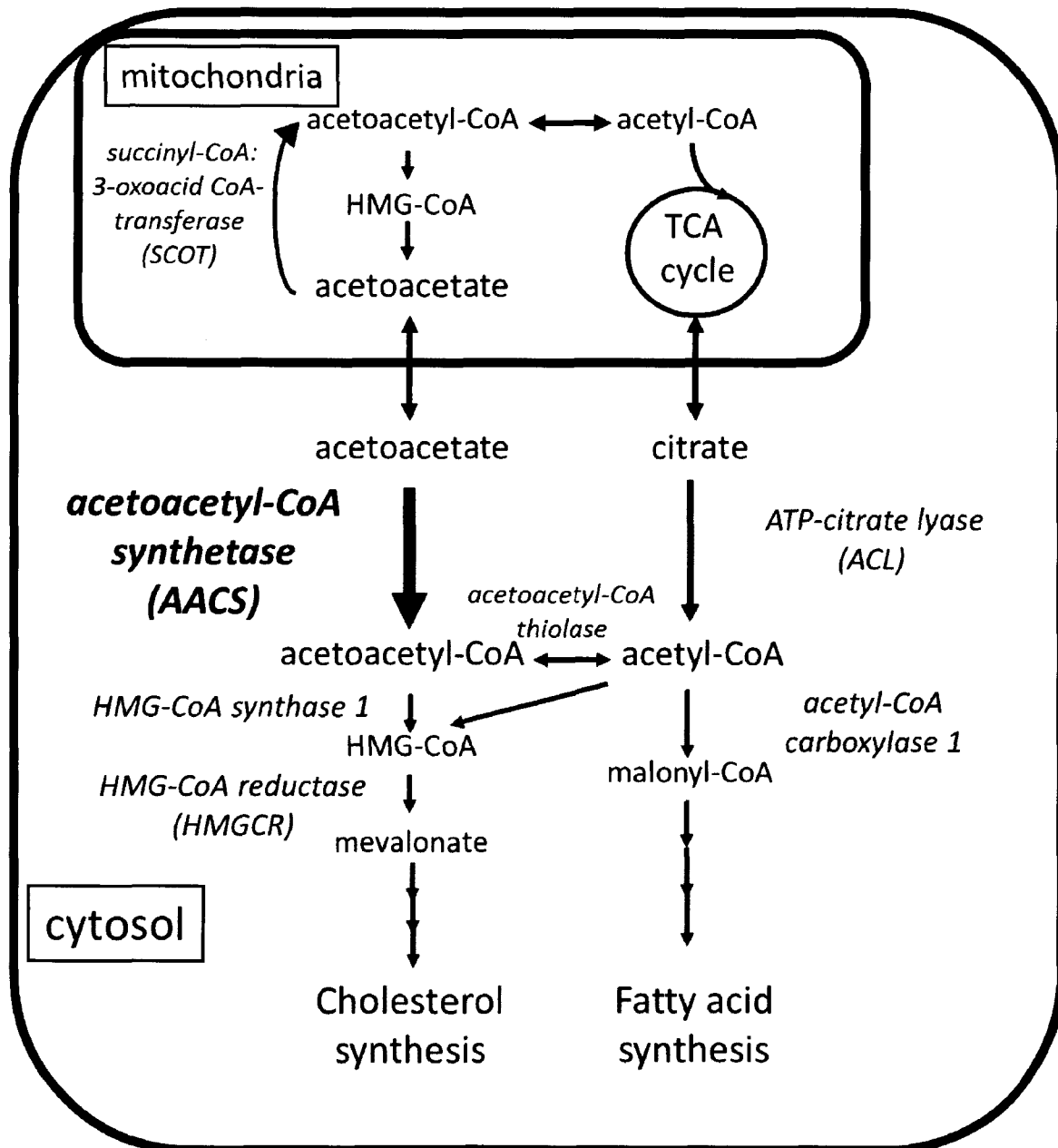


Figure 1 Pathway of ketone body metabolism

In extra-hepatic tissues, acetoacetate is utilized mainly for energy production through its activation by succinyl-CoA:3-ketoacid-CoA transferase (SCOT) in the mitochondria. In the liver, acetoacetate activation is carried out by acetoacetyl-CoA synthetase (AACS) in the cytosol. Acetoacetyl-CoA is also formed from two units of acetyl-CoA by acetoacetyl-CoA thiolase in the cytosol. Cytosolic acetoacetyl-CoA in addition to acetyl-CoA is utilized for lipogenesis pathways, such as cholesterol synthesis and fatty acid synthesis. Carboxylation of Acetyl-CoA is catalyzed by acetyl-CoA carboxylase 1 to produce malonyl-CoA for fatty acid synthesis. HMG-CoA is produced from acetyl-CoA and acetoacetyl-CoA by HMG-CoA synthase 1. HMG-CoA reductase, a rate-limiting enzyme of cholesterol synthesis, provides mevalonate of mevalonate pathway.

第一章 3T3-L1 脂肪細胞における AACCS の転写調節及び生理的役割

第一節 緒言

緒論で述べたように、AACCS の酵素活性はコレステロール低下剤の投与や脂質合成の盛んな組織の分化・発生期に変動することが明らかになっているが、その調節機構および生理的機能の詳細は不明なままである。我々は AACCS の mRNA 量が離乳後のラット皮下脂肪組織において著しく増加すること、また、初代培養の前駆脂肪細胞の分化段階においてその発現量が増加することを明らかにしている²⁸⁾。さらに、AACCS の遺伝子発現が肥満による影響を受けることから、本酵素が脂肪細胞の分化および脂質の蓄積において重要な役割を果たす可能性が考えられる。そこで、本章では AACCS の promoter 領域の決定および転写因子の同定、そして、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化における役割を検討した。

第二節 結果

Mouse AACS mRNA の組織分布

主要器官における AACS の mRNA レベルを検討するために、マウスから epididymal white adipose tissue (WAT)、skeletal muscle、cerebrum、cerebellum、spinal cord、lung、spleen、liver および kidney を摘出し total RNA を抽出後、Northern blot 法に供した。その結果、Fig. 4 に示すように AACS の遺伝子発現は epididymal WAT および kidney で多く、brain、spinal cord および liver においては中等度の発現であった。また、SCOT が高発現する skeletal muscle においては AACS の発現はほとんど観察されなかった。以上の結果から、AACS の発現は SCOT とは大きく異なる転写機構により調節されている可能性が示唆された。

AACS 遺伝子の転写開始点の決定

そこで、AACS の promoter 領域を決定するために、5'-Rapid Amplification of cDNA Ends (5'-RACE) 法を用いてマウスの肝臓における AACS 遺伝子の 5'末端領域を検討した。5'-RACE の解析により、AACS は翻訳開始点 (+1) から上流-104 base pairs (bp) の位置に主要転写開始点を持つことが明らかになった。

TFSEARCH (www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCHJ.html) を使用し、転写結合領域を解析した結果を Fig. 5 に示す。この解析により、AACS 遺伝子上流には、activator protein 1 (AP1)、cyclic AMP response element (CRE)、stimulating protein 1 (Sp1)、nuclear factor 1 (NF-1) および leucine zipper CCAAT/Enhancer binding protein (C/EBP) family などの結合予測配列が存在することが明らかとなった。AACS 遺伝子の転写開始点付近には、典型的な TATA box は存在しなかったが、transcriptional initiator element や GC box が存在していた。これらの配列は、

TATA-less promoter によく見られる配列であることから³¹⁾、本領域が AACCS の転写開始点である可能性が示唆された。

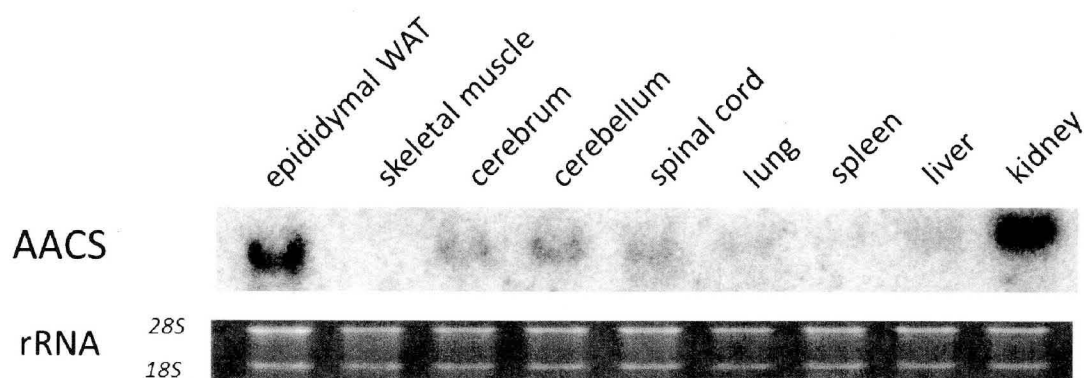


Figure 4 Northern blot analysis of AACCS mRNA in various mouse tissues

Total RNAs were obtained from epididymal WAT, skeletal muscle, cerebrum, cerebellum, spinal cord, lung, spleen, liver, and kidney. Hybridization was performed with a ³²P-labeled mouse AACCS cDNA probe. The lower panel shows EtBr staining of ribosomal RNAs (1 µg/lane).

-968 TCTTGCTTGGGGGGCCCTGGACACTGACTCCTCTCTTTGTTTCGGAAACCTGCAAGATTTCCTAAAG
-904 CTCCCCTCTGTACCTGCAAGCCACTGTGAGCAACATGGAGTCACATCCCTAGCCCTCTCTTTTCT
-840 TTTAGTTTTAACACATGGCTTTTTAAAGTTTGCCCGGACTAGTCTTTTCTTTCTTTCTTTCTTTT
-776 CTTTTTTTTTGGTTTTTCGAGACAGGGTTTCTCTGCTGGCCTCGAACTCAGAAATCCACCTGCCTCT
-712 GCCTCCCAAGTGTGGGATTAAAGAAAGGTGTGCGCCACCACGCCCGGCGCCCCGGCTAGTCTTG
-648 AACTCACTCTGTTACAAGAATAATCTTAAAGCCAGACGCCTCTCCACCTTACCTCCCAAGTAT
-584 TCCGATTACAGGGTTTTGCTTTGAGGTCCATGCTGGAGTGGAECTTACTGTTCATCCTCCTGTCTTA
-522 GTCTTTAAAGTGTGGGTTTTCAGGCTTGCCCCAGAATGCCTGTGCTTAACGCTTTTTATTTTCAGTC
-458 TTGACGATAGACTTGAGGCTCACTCACTCAGTATCTTATGTTACATTATATACCCCATGTATCCCT
 CRE AP-1
-394 GCTACAGCATCCCTGTGAGTGAGCACACGCGACACGGACACGCATTTTAGAGGTCTTCTGCACGC
-330 GTTTTAGGCTTAAGACATCTCCGCAGCTAAAGTGAGTGTGGAGGAGCAACTTAATTTGAATAAGT
-266 GAATGAATGAACGAACGAACGAGGGCAATAAGTAAACAGAGCAACACCCGGTAAAGTTGTGCAATA
 C/EBP family
-202 AGTGAGGGCGTGGAACATGCTTATCGCGCCTGCGCAGGCGAGGCCTCTTTTTGGCAGCAAGCGC
 E2F NF-1
-138 ACCTTTTGCAGGCGCGGCGCGGCGGAGGGTTACAGAAGAGGGCGTGGTCTCAAGAGGCGTGGCT
 Sp1 GC box
-74 TTCTGGAGGCGTGGCGAAGGCTGCTGGGGGTGTGACCAGGCCGGATGTCCCACAGGCCGCGCCG
 t-Ets1
 +1 →
-10 GCGCTGGTTCAGTCTCGCGCTGTGGTTCGTCGGCGCACCGCTGATCCGCTCCACGCCTTGGGCTC
+56 TCCGCTCTCAGCCAAAGCCCGGCAGCCCCGCCAGCAGCTCCGCAACCATG
 +107

Figure 5 Positions of potential regulatory elements in the 5' flanking and non-coding region -968 to +104 of the mouse AACS gene

Arrow indicates the transcription start site. The translation start codon is in bold. Putative binding sites for transcription factors are underlined.

脂肪細胞分化段階における AACS mRNA レベルの検討

C/EBP family は脂肪細胞分化におけるマスターレギュレータであることが明らかになっており³²⁾、AACS の mRNA は epididymal WAT において高発現している (Fig. 4)。そこで、脂肪細胞の分化段階における AACS の役割を検討する目的で、マウスの前駆脂肪細胞である 3T3-L1 細胞の分化段階における AACS の遺伝子発現を検討した。

コンフルエント状態まで培養した 3T3-L1 細胞に分化誘導剤 (10%FBS、0.5 mM 3-isobutyl-methylxanthine、0.25 μ M dexamethasone および 0.5 μ g/mL insulin) を処理し、脂肪細胞への分化を誘導した。Fig. 6 に示すように、AACS の遺伝子発現は脂肪滴の蓄積が始まる分化 3 日目から 4 日目にかけて著しく増加した。またこの時、C/EBP α および β の発現を検討した結果、過去の報告と一致して C/EBP β は脂肪細胞分化の初期に、C/EBP α は脂肪細胞分化の中期である分化 4 日目においてその発現が上昇した³³⁾。

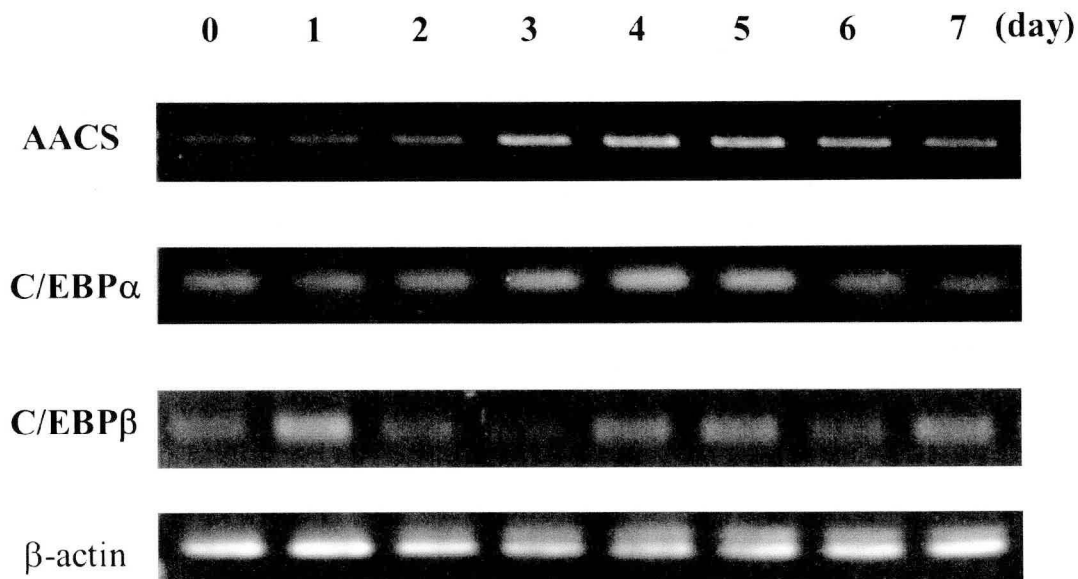


Figure 6 AACS mRNA expression during differentiation of 3T3-L1 cells

Proliferating 3T3-L1 cells were cultured in 10% calf serum until they reached confluence. Two days post-confluence (day 0), cells were induced to differentiate by exposure to adipocyte differentiation inducers. The numbers indicate the days on which the cells were harvested. Total RNA (4 µg) was reverse transcribed to cDNA, and AACS, C/EBP α , C/EBP β and β -actin mRNAs were detected by PCR. β -actin was amplified simultaneously to serve as an internal control.

AACS 遺伝子の 5'末端領域の転写活性

AACS 遺伝子の転写活性に関わるシス配列を明らかとするために、AACS 遺伝子の 5'末端領域を pGL3 reporter vector に組み込み、3T3-L1 分化 4 日目における promoter 活性を luciferase assay を用いて測定した (Fig. 7A)。その結果、遺伝子上流-3 bp と比較して、-110bp を導入した時に AACS の転写活性が著しく増加し、-335 bp に延伸すると転写活性が最大となった。その領域には、先に示した転写因子結合配列である GC box および C/EBP family 結合配列が存在している。そこで inverse PCR 法を用いて両配列に変異を導入し、転写活性への影響を検討した。Fig. 7B に示す通り、C/EBP family 結合配列および GC box に対する変異導入により、AACS の転写活性がそれぞれ 50%減少することが明らかになり、両配列が 3T3-L1 細胞の分化段階において AACS の転写調節に関与する可能性が示唆された。

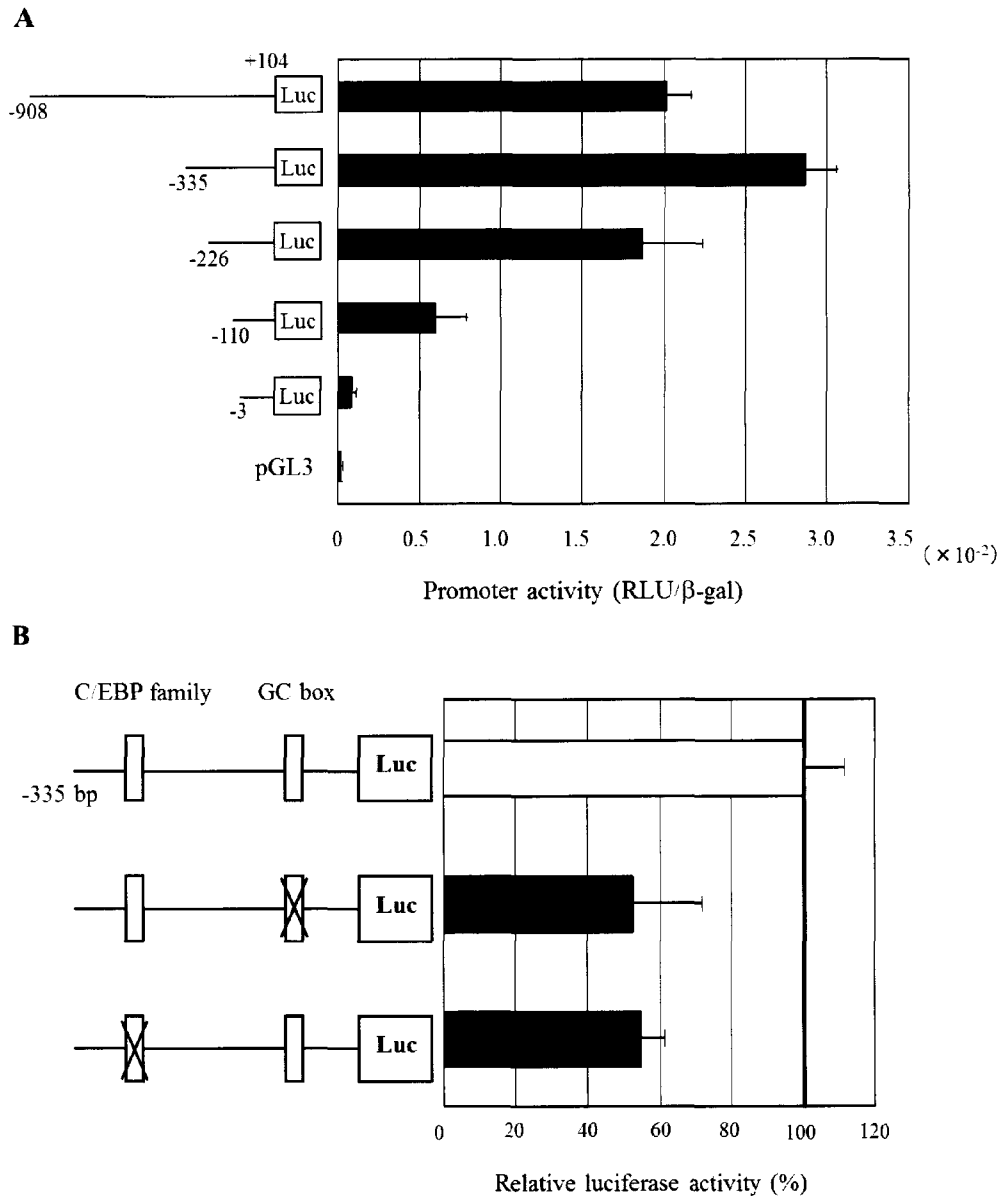


Figure 7 Functional analysis of the 5'-flanking region of AACS in 3T3-L1 cells

(A) Nucleotide numbering starts with +1 corresponding to the transcriptional start. Reporter constructs having varying 5' ends and an identical 3' end (+104) were transfected in 3T3-L1 cells. Luciferase activity was normalized by β -galactosidase activity. Assays were carried out in triplicate, and error bars indicate the standard deviation. RLU, relative light units; β -gal, β -galactosidase.

(B) 3T3-L1 adipocytes were transfected with a series of AACS promoter constructs. Schematic representation of different mutated reporter constructs used in transfection assays. Values are presented as percentages of the control (unmutated construct). Assays were carried out in triplicate, and error bars indicate the standard deviation.

転写調節因子の同定

前節で明らかとなった GC box および C/EBP family 結合配列と相互作用する核タンパク質を検討する目的で、分化開始日（未分化:P）および分化4日目（A）の3T3-L1から核タンパク質を抽出し electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を行った (Fig. 8A)。その結果、GC box と C/EBP family 結合配列は共に核タンパク質との結合が認められた。またその結合は過剰な非ラベル化 DNA の処理により消失したことから、配列特異的な相互作用であることが明らかになった。未分化時、分化時の結合量を比較すると、C/EBP family 結合配列と相互作用する核タンパク質が分化4日目において増加することから、AACS の転写調節には C/EBP family が重要な役割を果たす可能性が示唆された。C/EBP α および C/EBP β は脂肪細胞分化のマスターレギュレータである。そこで、両転写因子の抗体を用いて、super shift assay を行った (Fig. 8B)。その結果、C/EBP β は分化時および未分化時において C/EBP family 配列と相互作用することが明らかとなり、また C/EBP α は分化4日目においてのみ結合することが明らかとなった。以上の結果は C/EBP α および β が共に AACS の発現を調節する可能性を示唆するものであるが、EMSA は抽出したタンパク質と DNA 配列を反応させる方法であり、細胞内の状態を十分反映しているとは言い難い。そこで、細胞内における C/EBP α および β と AACS の promoter 領域の相互作用を検討する目的で、chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay を行った。Fig. 9 に示すように C/EBP α との相互作用は 3T3-L1 分化4日目において著しく増加したが、C/EBP β の相互作用は比較的弱くまた分化段階による差も観察されなかった。以上の結果より、脂肪細胞の分化段階中期においては C/EBP α が AACS の発現を調節する可能性が示唆された。

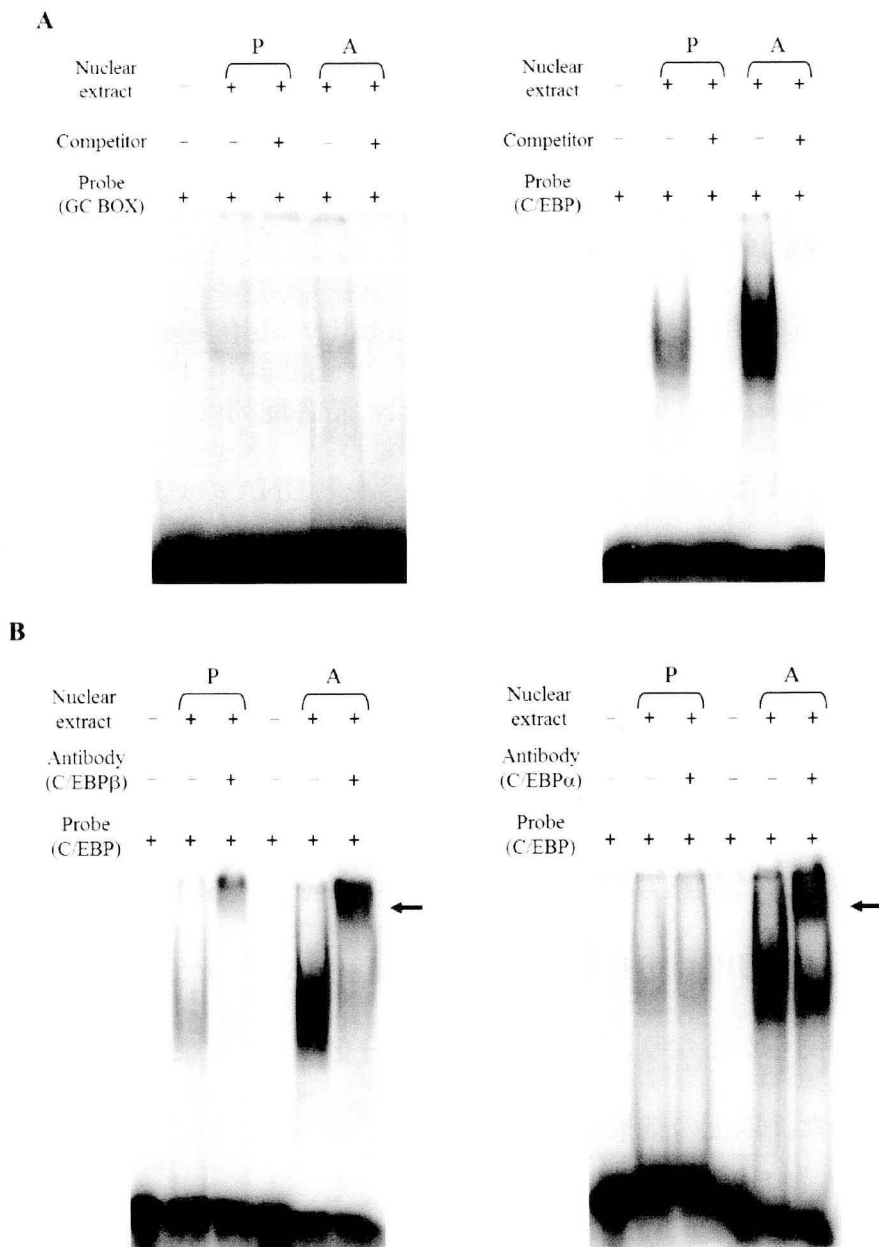


Figure 8 EMSA of the GC box motif and C/EBP family binding site with nuclear extracts of 3T3-L1 cells

(A) EMSA was performed with nuclear extracts from 3T3-L1 preadipocytes (P: day 0) and adipocytes (A: day 4). 32 P-labeled double-stranded consensus GC box site and C/EBP family binding site oligonucleotides were used as probes. For competition experiments, 100-fold excess non-labeled oligos were added before incubation.

(B) EMSA was performed with nuclear extracts from 3T3-L1 preadipocytes (P: day 0) and differentiated adipocytes (A: day 4). A 32 P-labeled double-stranded consensus C/EBP family binding site oligonucleotide was used as a probe. C/EBP α and β antibodies were used to supershift the DNA/protein complexes individually. Supershifts (arrow) are indicated on the right.

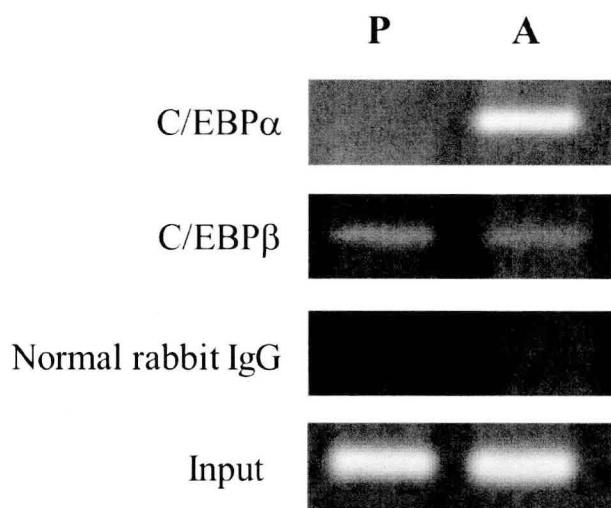
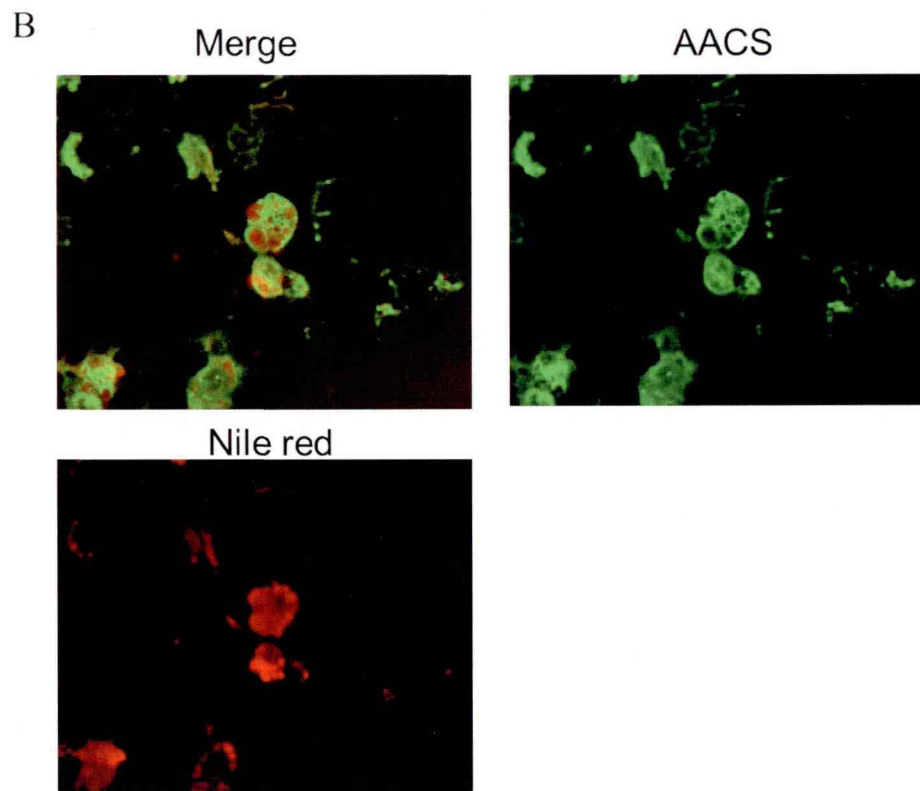
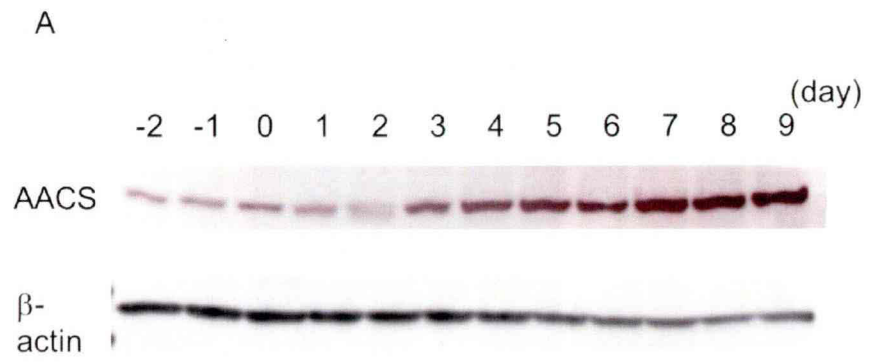


Figure 9 Association of C/EBP α and β with the AACS promoter

Cross-linked DNA was prepared from 3T3-L1 preadipocytes (P: day 0) and adipocytes (A: day 4). ChIP assays were performed using the indicated antibodies, and the recovered DNA was subjected to PCR amplification using the primers specific to the AACS proximal promoter region. A small aliquot before immunoprecipitation was used for PCR amplification as the input control (Input).

3T3-L1 細胞における AACS 発現と局在性

脂肪細胞における AACS の役割を検討するために、分化誘導後の 3T3-L1 細胞における AACS のタンパク質発現を検討した。AACS の発現は分化 4 日目以降、著しく増加した (Fig. 10A)。次に、分化 8 日目における AACS の細胞内局在を検討した。脂肪滴を Nile red により染色、また核を propidium iodide により染色して AACS の局在と比較すると、AACS は主に細胞質画分、特に核周辺部の細胞質に局在することが明らかとなった (Fig. 10B and C)。これらの結果は、AACS が脂質合成に必要なアセチル基を核付近の細胞質で供給する可能性を示唆している。



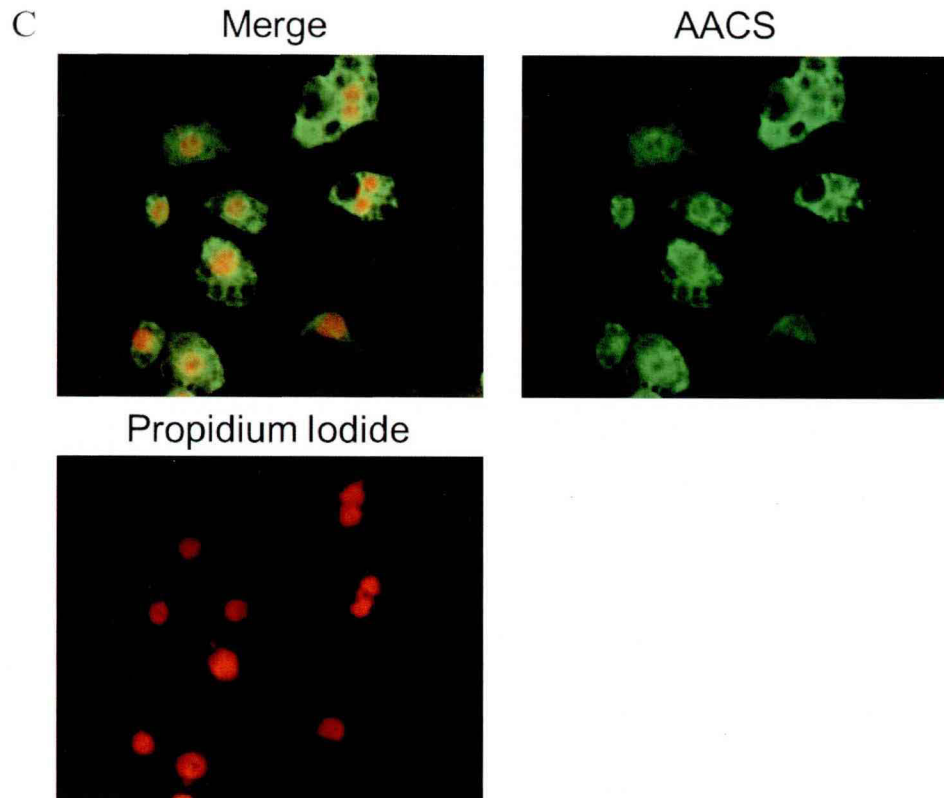


Figure 10 Protein expression and localization of AACS in 3T3-L1 cells

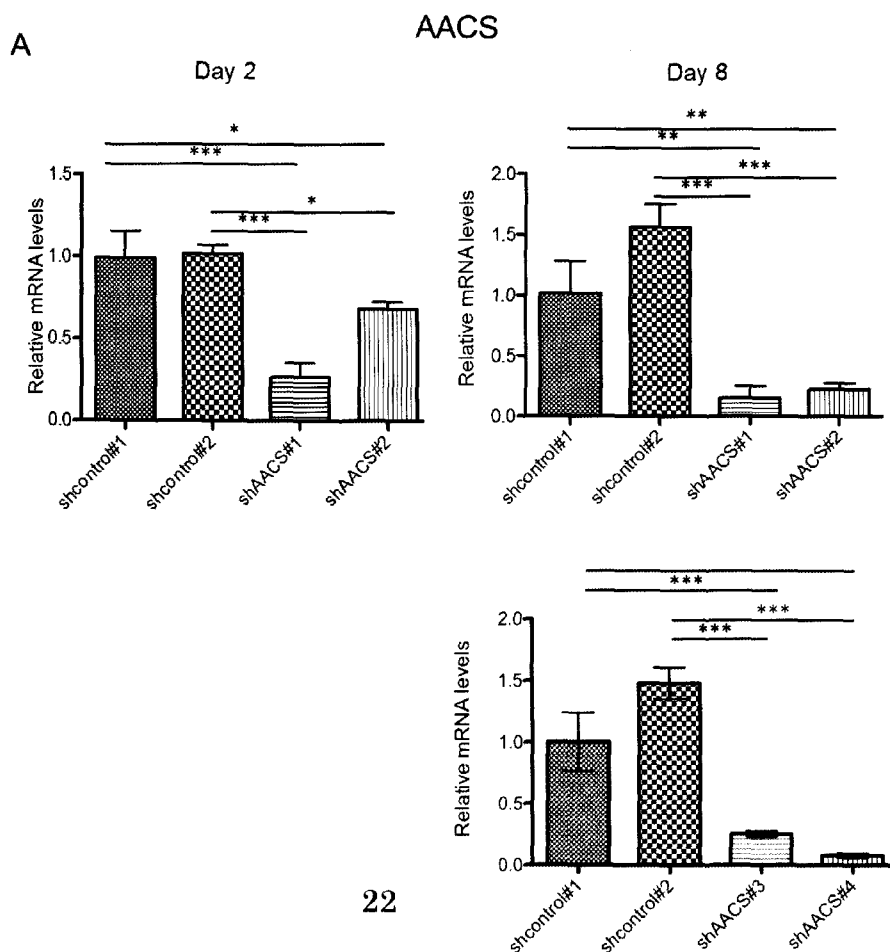
(A) Proliferating 3T3-L1 cells were cultured in 10% CS until they reached confluence (day -2). Two days post-confluence (day 0), cells were induced to differentiate by exposure to adipocyte differentiation inducers. The numbers indicate the days on which the cells were harvested. AACS and β -actin were detected by western blotting.

(B) 3T3-L1 cells on day 8 after the initiation of differentiation were stained for AACS (green). For visualization of lipid droplets, preparations were stained with Nile red (red).

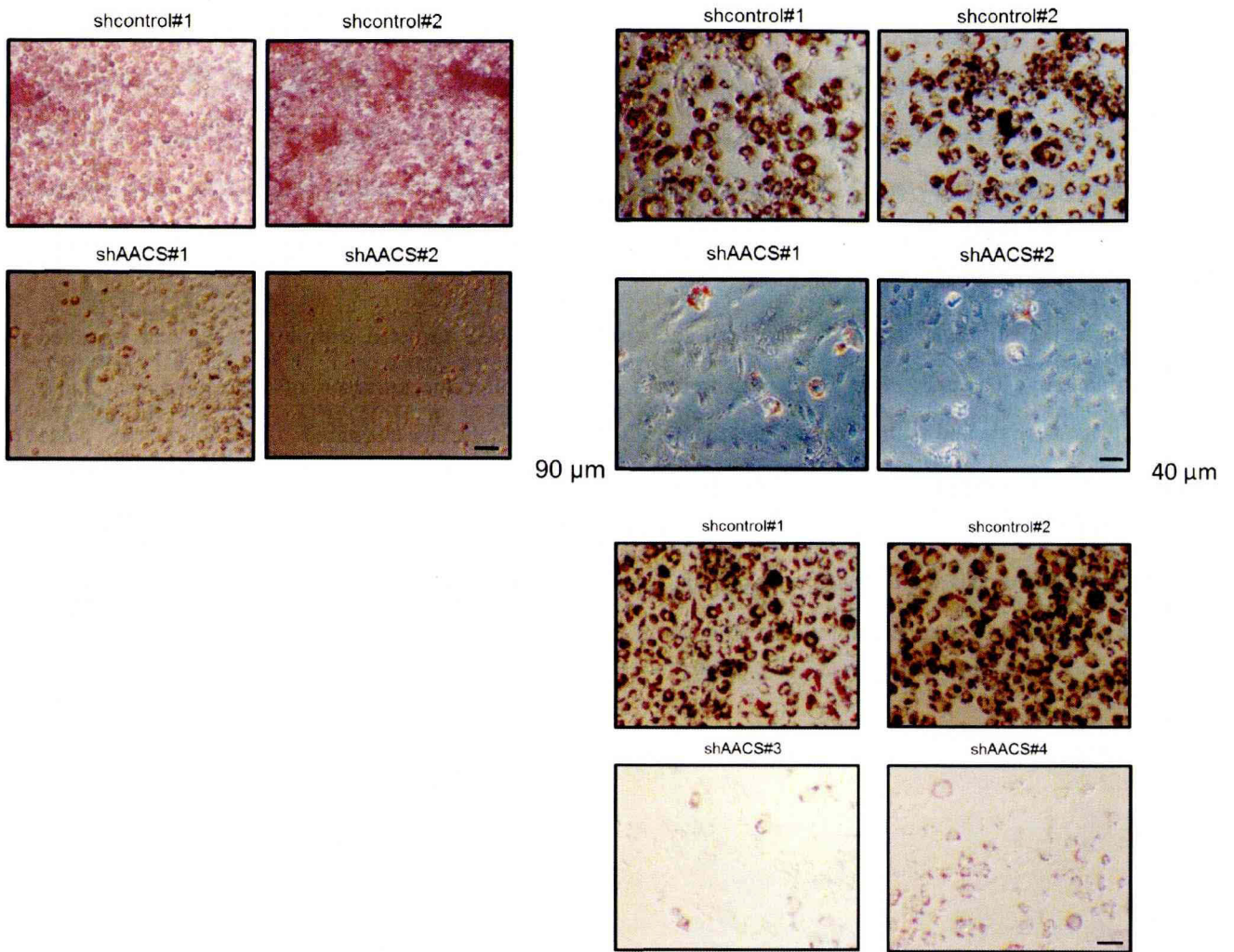
(C) 3T3-L1 cells on day 8 were stained for anti-AACS (green). For visualization of DNA, preparations were stained with propidium iodide (red).

3T3-L1 細胞の分化に対する AACS 発現抑制の影響

次に、AACS の発現が脂肪細胞の分化に必要なか否かを検討するために、我々は shRNA を用いたノックダウン実験を行った。コンフルエント状態に達した 3T3-L1 前駆脂肪細胞に、コントロールまたは AACS に対する shRNA をコードしたレンチウイルスを感染させた。AACS の mRNA 量を real-time PCR 法により解析した結果、分化 2 日目および 8 日目において、shAACS を処理した細胞における AACS mRNA が有意に減少した (Fig. 11A)。そこで、oil red O 染色を使用し 3T3-L1 細胞が分化した割合を顕微鏡下で観察すると、AACS をノックダウンした細胞において脂肪滴の蓄積が顕著に減少することが明らかになった (Fig. 11B)。顕微鏡による観察と一致し、oil red O の吸光度も shAACS を処理した細胞では有意に減少した (Fig. 11C)。以上の結果は、3T3-L1 脂肪細胞の分化メカニズムにおいて AACS が重要な役割を果たすことを示すものである。



B



C

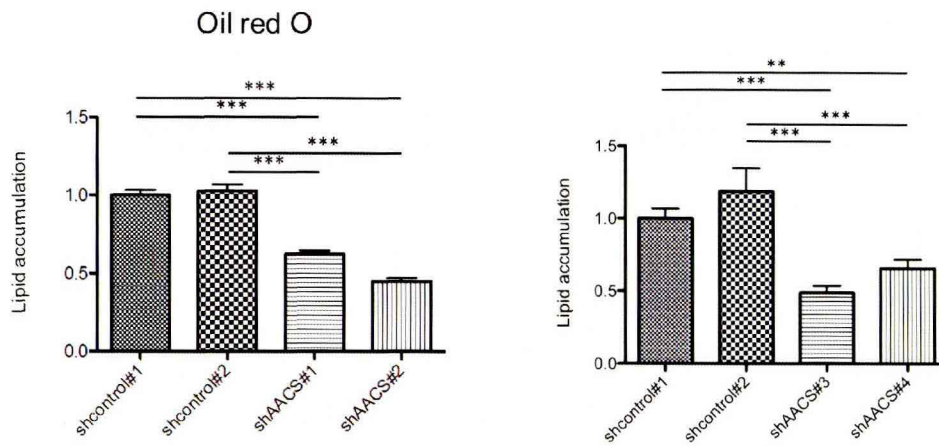


Figure 11 The effect of AACS knockdown on 3T3-L1 differentiation

(A) 3T3-L1 cells were infected with shcontrol or shAACS targeted lentivirus when cells reached confluence. Total RNA was extracted from 3T3-L1 cells at the indicated time. The expression of AACS was analyzed by real-time PCR, and the mRNA levels were normalized to 18S rRNA. The average expression values in the control are indicated as 1.0. Error bars indicate the standard deviation (S.D., N=3); * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

(B) The 3T3-L1 cells were infected with shcontrol or shAACS targeted lentivirus when cells reached confluence. The cells were fixed with formalin on day 8 after the initiation of differentiation. Lipid droplets were stained with oil red O, and the cells were microscopically examined. Left four panels; scale bar = 90 μm . Right eight panels; scale bar = 40 μm .

(C) 3T3-L1 cells were infected with shcontrol or shAACS targeted lentivirus. After 8 days of differentiation, cells were stained with oil red O and treated with 100% isopropanol to extract the oil red O. The solution was then measured for absorbance at 520 nm. The error bars indicate the S. D. (N=3); *** $P < 0.001$.

脂質合成酵素や adipocyte markers に対する shAACS の影響

C/EBP α や peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ などの adipocyte marker や脂質合成酵素は、脂肪細胞分化や脂肪滴蓄積に重要な役割を果たしている^{34, 35}。そこで、分化 2 日目における adipocyte markers と脂質合成酵素の発現を検討した (Fig. 12)。その結果、shAACS 処理によって PPAR γ と C/EBP α の発現に有意な変化は認められなかった。また、ケトン体をエネルギー産生系へと供給する SCOT の発現は同じく変動しなかった。脂肪酸合成系の酵素である、ACL、acetyl-CoA carboxylase-1 (ACC-1) や fatty acid synthase (FAS)、そしてコレステロール合成酵素の律速酵素である HMGCR の発現にも変化が観察されなかったことから、shAACS の処理による脂質代謝に関わる遺伝子に対するオフターゲット効果は生じないことが明らかになった。

続いて分化 8 日目における PPAR γ と C/EBP α の発現を検討した結果、shAACS を処理した 3T3-L1 細胞においては、両転写因子の遺伝子発現が著しく減少することが明らかになった (Fig. 13)。

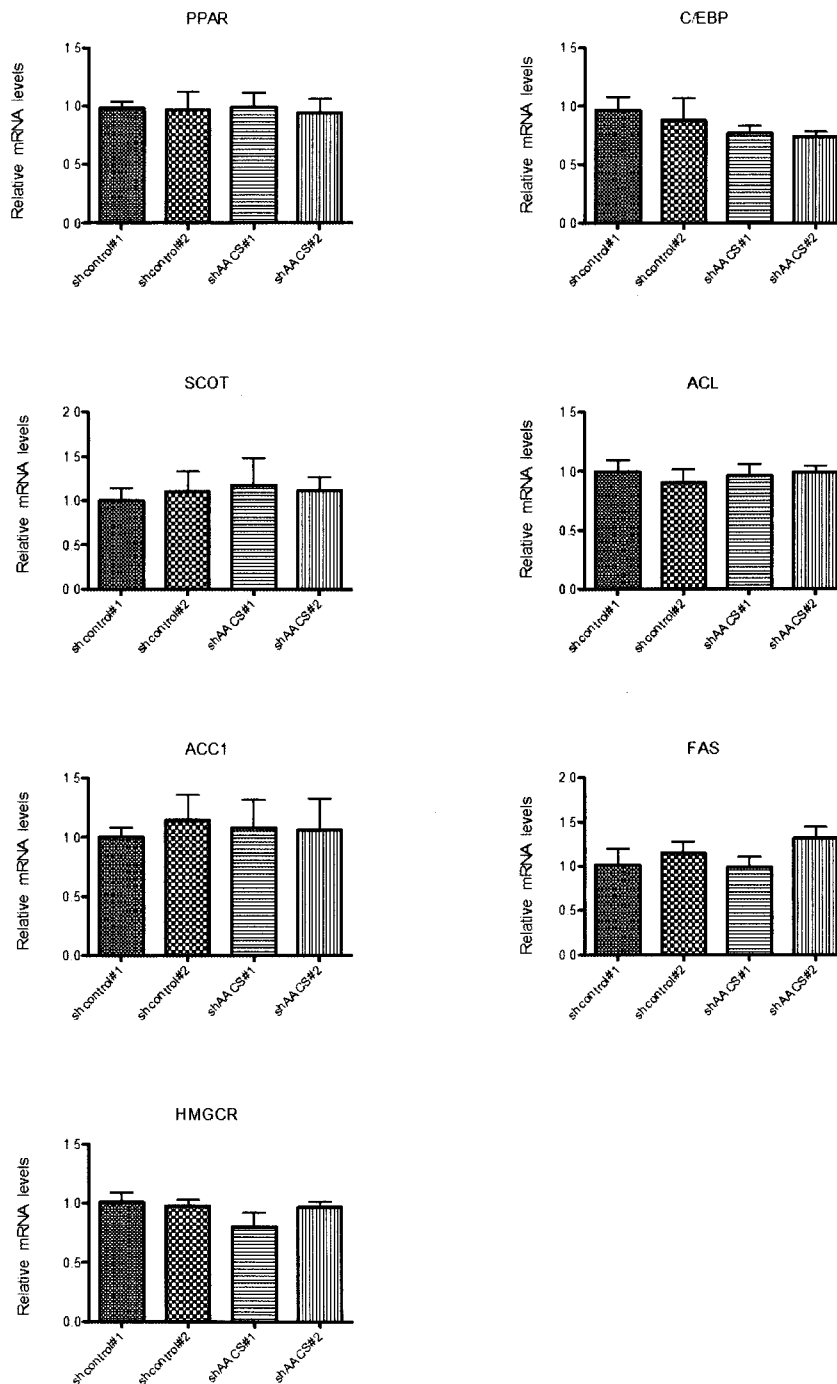


Figure 12 Effect of shAACS on gene expression of lipogenic enzymes and adipocytes markers in 3T3-L1 cells

3T3-L1 cells were infected with shcontrol or shAACS targeted lentivirus when cells reached confluence. Two days post-confluence (day 0), cells were induced to differentiate by exposure to adipocyte differentiation inducers. Total RNA was extracted from 3T3-L1 cells on day 2 after the initiation of differentiation. The mRNA levels of PPAR γ , C/EBP α , SCOT, ACL, ACC-1, FAS and HMGCR were analyzed by real-time PCR. Gene expression was normalized to 18S rRNA. The average expression values in the control are indicated as 1.0. The data are shown as the mean \pm S. D. (N=3).

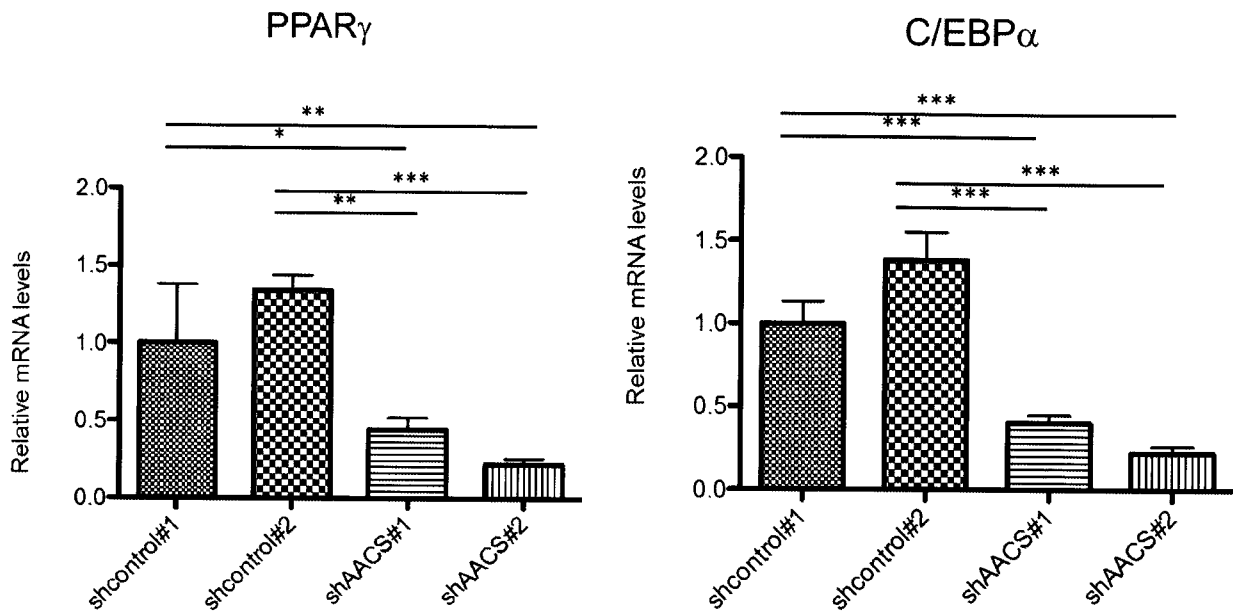


Figure 13 Effect of shAACS on gene expression of adipocyte markers on day 8 in 3T3-L1 cells

3T3-L1 cells were infected with shcontrol or shAACS targeted lentivirus when cells reached confluence. Total RNA was extracted from 3T3-L1 cells on day 8 after the initiation of differentiation. The mRNA levels of PPAR γ and C/EBP α were analyzed by real-time PCR. Gene expression was normalized to 18S rRNA. The average expression values in the control are indicated as 1.0. The data are shown as the mean \pm S. D. (N=3); * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001.

第三節 考察

C/EBP family は脂肪細胞分化において必須の転写因子であり、C/EBP β は分化の初期に発現しクローナルエクспанジョンを惹起する。その後、C/EBP α が発現して細胞は細胞周期から脱し脂肪形成に関わる遺伝子を発現し始める^{33, 36)}。本研究において、著者は3T3-L1細胞の分化段階におけるAACCSの発現が、C/EBP α によって調節されることを明らかとした (Fig. 7-9)。C/EBP α は脂肪滴の蓄積に関与する様々な脂肪細胞の特異的因子 (aP2、leptin、phosphoenolpyruvate carboxykinase など) を転写活性化することが知られている^{33, 36, 37)}。さらにC/EBP α は脂肪細胞分化段階の初期から中期において誘導され、脂肪細胞の分化において重要な役割を果たすことが明らかとなっている³⁸⁾。AACCSは、サイトゾル画分においてコレステロールや脂肪酸合成にケトン体を供給し²⁴⁾、脂肪細胞の分化に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

我々はまたGC motifがAACCSの遺伝子上流領域に存在し、転写活性に重要な役割を果たすことを明らかとした (Fig. 7 and 8)。GC motifは、ユビキタスに存在する転写因子であるSp1およびそのファミリーが結合するとされる配列である³⁹⁾。これらの転写因子はresistinやadipocyte amino acid transporter geneなどの脂肪細胞特異的因子の発現を調節している⁴⁰⁻⁴²⁾。Sp1結合配列はインスリンに応答する様々な遺伝子上流領域に存在しており、また、ケトン体合成を調節するHMGCS2の遺伝子上流にも存在し、c-Mycによる転写調節を介することが知られている⁴³⁾。Freedらは脂肪酸やステロールへのケトン体の取り込みがstreptozotocin (STZ)により糖尿病を発症したラットにおいて減少することを報告した⁴⁴⁾。我々は、AACCSの活性がSTZ投与したラットの肝臓において減少すること、またAACCSの遺伝子発現が同じくSTZを投与したラットの脳組織において減少することを明らかとしている^{45, 46)}。従って、インスリンがSp1を介してAACCSの転写活性を調節する可能性が示唆され

る。また最近、ヒトの AACS 遺伝子が、脂肪細胞において PPAR γ によって転写調節されることが明らかとなった⁴⁷⁾。PPAR γ は Sp1 と共に協調して AACS の発現を調節することから、マウス前駆脂肪細胞である 3T3-L1 においても同様に、PPAR γ と Sp1 が GC motif または近傍に存在する Sp1 配列を介して、AACS の転写を調節する可能性も考えられる。

3T3-L1 における AACS の細胞内局在を検討した結果、AACS が核近傍において脂質合成にアセチル基を供給する可能性が示唆された (Fig. 10B and C)。最近の研究により、同じく細胞質においてアセチル基を脂質合成系へと供給する ACL が、核においてクロマチンの修飾に関与し脂肪細胞分化に重要な役割を果たすことが報告された⁴⁸⁾。細胞質における acetoacetyl-CoA は 2 つの acetyl-CoA が acetoacetyl-CoA thiolase により結合することで生合成される⁴⁹⁾。Thiolase の活性は AACS の活性より遥かに強く⁵⁰⁾、acetoacetate から acetoacetyl-CoA を生合成する経路は代替経路であるとみなされてきた。しかしながら、AACS の発現抑制により脂肪細胞の分化が著しく抑制されることから、ACL や AACS は細胞内において、単にアセチル基を供給する酵素という括りではなく、それぞれ独自の役割を持ち細胞の分化機構に寄与する可能性が示唆された。

Fig. 11 に示すように、shAACS#1 および shAACS#4 を処理した細胞では、shAACS#2 および shAACS#3 より AACS の遺伝子発現に対する効果が顕著であるが、脂肪細胞の分化抑制効果は shAACS#2 および shAACS#3 を処理した細胞において強い傾向を示した (Fig. 11C and 13)。また、shAACS#2 を処理した細胞においては FAS の遺伝子発現が増加傾向を示したことから (Fig. 12)、各 shAACS は細胞に対して多様な影響を与える可能性が示唆された。Ensembl のデータベースでは、様々な種において AACS の転写バリエーションが存在する可能性を示唆しており、前述した細胞に

対する多様な影響は、shAACS が異なる転写バリエーションに影響するためと考えられる。

以前の研究では、脂肪細胞の分化段階において AACS の発現パターンが脂肪酸合成に関わる ACC-1 と同様の变化を示すことを明らかにしている²⁸⁾。しかしながら、AACS の発現は脂肪組織において非常に多いが、脂肪細胞におけるケトン体の脂肪酸への取り込みは肝臓よりも少ない⁵¹⁾。過去の報告により HMGCR の阻害剤である lovastatin や simvastatin を処理すると、3T3-L1 細胞の分化が阻害されることが明らかとなっている^{52, 53)}。さらに近年、イソプレノイドの前駆物質である farnesyl pyrophosphate が、PPAR γ を活性化し脂肪滴蓄積を促進することが報告された⁵⁴⁾。以上の結果は、脂肪細胞の分化において、脂肪酸合成だけでなくコレステロール合成経路も重要な役割を果たすことを示している。AACS の発現はコレステロール枯渇により増加し、ケトン体はコレステロール合成に利用されることから^{24, 29)}、AACS の発現抑制によりコレステロール合成が阻害され脂肪細胞の分化が抑制される可能性も考えられる。肥満や生活習慣病のメカニズムを解明するために、脂質合成におけるアセチル基利用の役割を検討することが、今後の発展の為に重要となると思われる。

第二章 肝臓における AACCS の転写調節および生理的意義

第一節 緒言

脂質生合成は細胞の機能や代謝疾患において重要な役割を果たしており^{55, 56)}、サイトゾルにおける acetyl-CoA の合成はその第一段階の反応である。Acetyl-CoA の合成は ACL により触媒され、脂質合成において重要な役割を果たすと考えられている^{57, 58)}。しかし、前章で述べたようにケトン体からもこの acetyl-CoA が産生される。

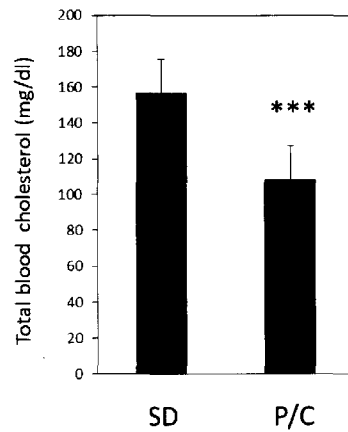
アセト酢酸および β -ヒドロキシ酪酸を含むケトン体は、グルコース利用が制限されたときの代替エネルギーであり⁵⁹⁾、ミトコンドリアに存在する SCOT は、肝臓以外の組織に発現しケトン体をエネルギー産生に利用することが知られている⁶⁰⁾。過去の研究により、SCOT が存在しないラット肝臓においても、 $[^{14}\text{C}]$ -acetoacetate がコレステロールや脂肪酸に取り込まれることが明らかになっており²⁴⁾、肝臓においてアセト酢酸が脂質合成に利用される可能性が示唆された。それを踏まえて、1984 年に伊藤らによりラット肝臓のサイトゾル画分から acetoacetyl-CoA synthetase が単離・精製され、本酵素がアセト酢酸特異的リガーゼであることが明らかになった¹⁷⁾。前章で述べたように、本酵素は脂質合成の盛んな組織において高発現することを明らかにしており、さらに、AACCS の活性はコレステロール低下剤の投与によりその活性が著しく増加すること、またコレステロールの投与により活性が減少することが明らかになっている^{21, 24)}。以上の結果は、AACCS の調節がコレステロールや脂質の恒常性に関与することを示唆するものであるが、肝臓における AACCS の生理的役割と転写調節機構は明らかとなっていない。また、SCOT が存在しない肝臓は、ケトン体については合成専用の臓器であると考えられているため、AACCS の役割を明らかにすることは、代謝中間体としてのケトン体の役割を明らかにする上でも重要であると考えられるので以下の実験を行った。

第二節 結果

AACS の遺伝子発現に対するコレステロール低下剤の影響

マウスにコレステロール低下剤 (0.4% pravastatin および 4% cholestyramine) を 3 日間給餌し、血清総コレステロールが 31%減少した状態の肝臓における AACS の遺伝子発現を検討した結果、AACS の発現は約 5 倍程度に増加した (Fig. 14A and B)。また HMGCR と ACL の発現は、それぞれ 25 倍および 5 倍程度に増加した。以上の結果よりコレステロールの減少によって、AACS の転写が誘導される可能性が示唆された。

A



B

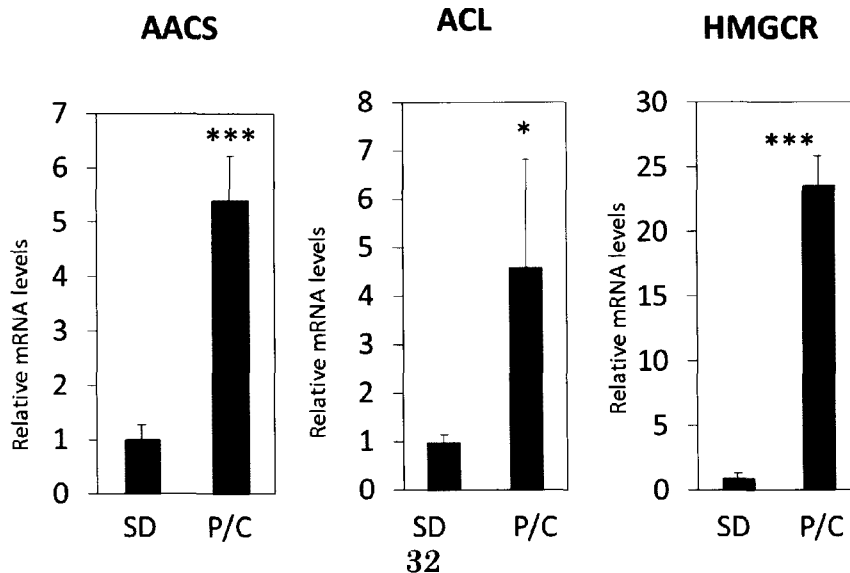


Figure 14 Effect of hypocholesterolemic agents on AACS gene expression in the mouse liver

(A) The data are shown as the mean \pm S.D. (n=4). ***, P<0.001 between control mice and mice fed with the standard diet containing 0.4% pravastatin and 4% cholestyramine.

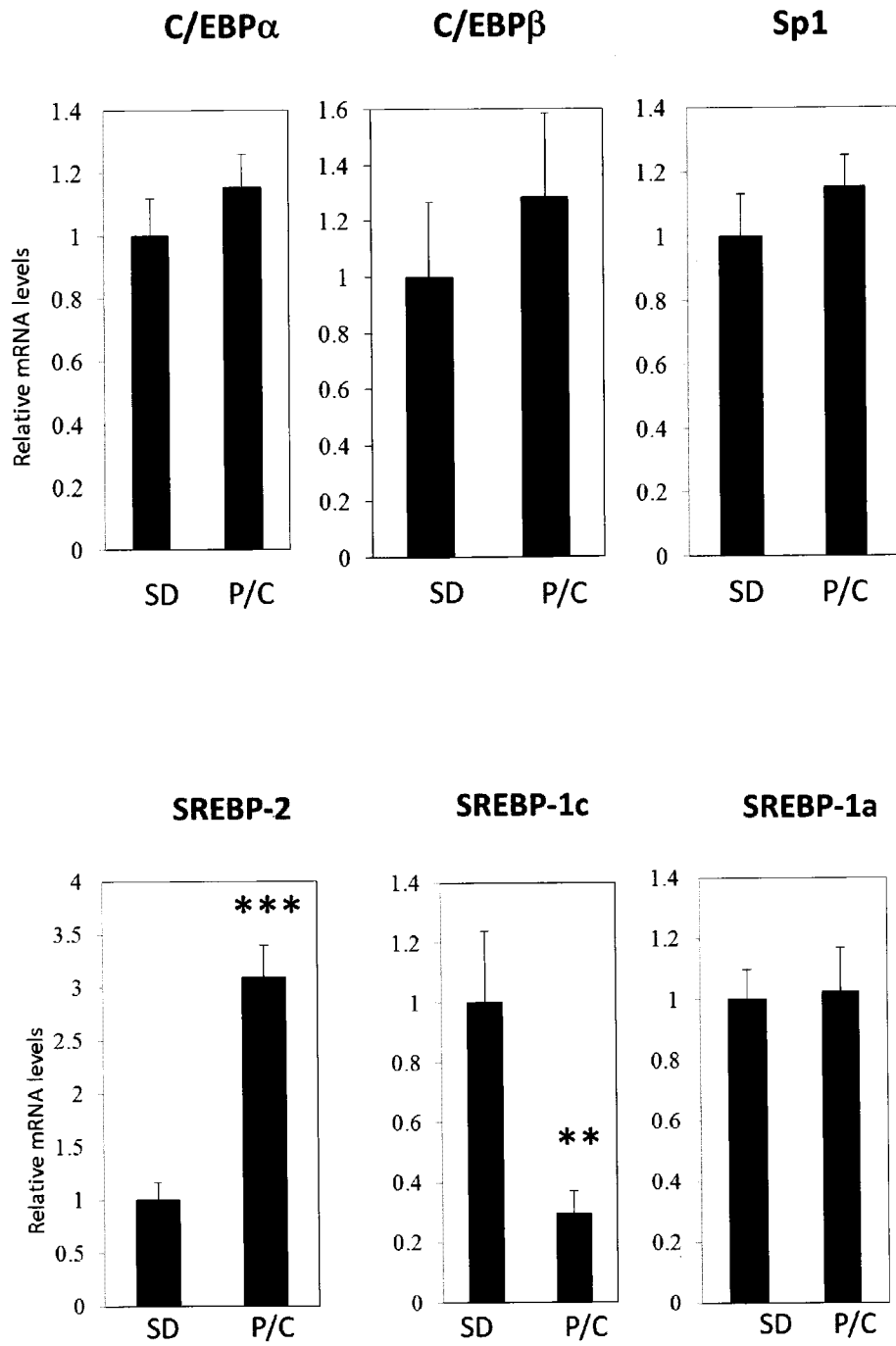
(B) The expression of AACS, ACL and HMGCR mRNA in the liver of mice that were fed a standard diet (SD) or a standard diet containing 0.4% pravastatin and 4% cholestyramine (P/C) was analyzed by real-time PCR. The mRNA levels were normalized to GAPDH. The standard deviation (S.D.) is shown. The average expression values in control mice are indicated as 1.0. *, P<0.05; ***, P<0.001 between control mice and mice fed with the standard diet containing 0.4% pravastatin and 4% cholestyramine. Number of animal pairs used: n=4.

コレステロール低下剤による転写因子の発現変動

次に我々は、AACS の転写調節に関わると考えられる転写因子の発現を検討した。Fig. 15A に示すように、C/EBP α 、C/EBP β および Sp1 の mRNA 量はコレステロール低下剤の投与により変動しなかった。また、転写因子の核内移行を検討した結果、C/EBP β および Sp1 は減少しており、C/EBP α の発現に変動は認められなかった (Fig. 15B)。従って、これらの転写因子は AACS の転写調節に関わる可能性が低いと考えられる。

過去の研究により SREBPs が細胞内のコレステロールレベルに応答し、脂質代謝に関係する酵素の発現を調節することが明らかになっている⁶¹⁾。SREBPs と AACS の転写調節との関係の評価するために、SREBP2 の発現を検討した。その結果、コレステロール低下剤投与による SREBP-1a の遺伝子発現変動は観察されなかった (Fig. 15A)。しかしながら、脂肪酸合成系を司る SREBP-1c の発現は有意に減少しており、コレステロール合成系を調節する SREBP-2 の発現は有意に増加した。また、コレステロール低下剤投与により SREBP-1 の核移行活性体の量は減少したが、SREBP-2 の活性体は著しく増加した (Fig. 15B)。以上の結果より、AACS の転写調節には SREBP-2 が関わる可能性が示唆された。

A



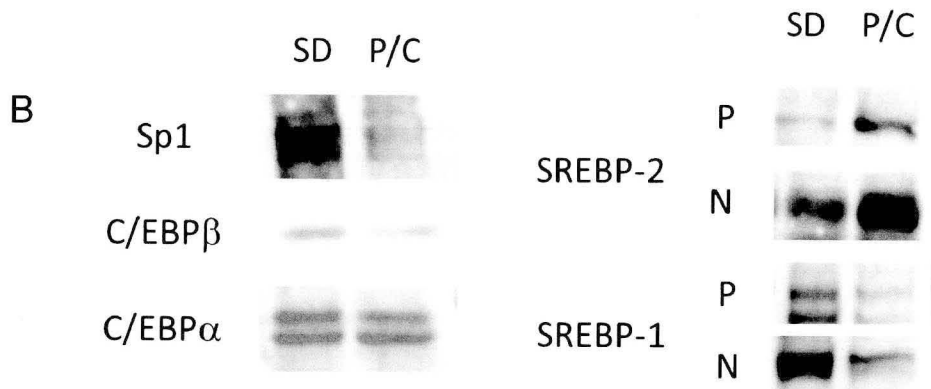


Figure 15 Effect of hypocholesterolemic agents on gene expression transcription factor in the mouse liver

(A) The expression of C/EBP α , C/EBP β , Sp1, SREBP-1a, -1c and -2 mRNA in the liver of mice that were fed a standard diet (SD) or a standard diet containing 0.4% pravastatin and 4% cholestyramine (P/C) was analyzed by real-time PCR. The mRNA levels were normalized to GAPDH. The average expression values in the control are indicated as 1.0. Error bars indicate the S.D.; **, P<0.01; ***, P<0.001. Number of animal pairs used: n=4.

(B) The protein expression of C/EBP α , C/EBP β , Sp1, SREBP-1 and -2 in the liver of mice that were fed a standard diet (SD) or a standard diet containing 0.4% pravastatin and 4% cholestyramine (P/C) was analyzed by Western blotting.

AACS の遺伝子発現に対する U18666A の効果

次にマウス初代培養細胞に U18666A を処理した。U18666A はエンドソームからリソソームへのコレステロール輸送を阻害し⁶²⁾、SREBP-2 を介した遺伝子転写の増加および HMGCR 活性の増加を誘導することが報告されている⁶³⁾。マウス初代培養肝細胞に U18666A を処理すると、AACS および HMGCR の遺伝子発現が用量依存的に増加した (Fig. 16)。また、この時 SREBP-1c の発現は減少する一方で SREBP-2 の発現は増加しており、in vivo の実験と同様の傾向を示した。

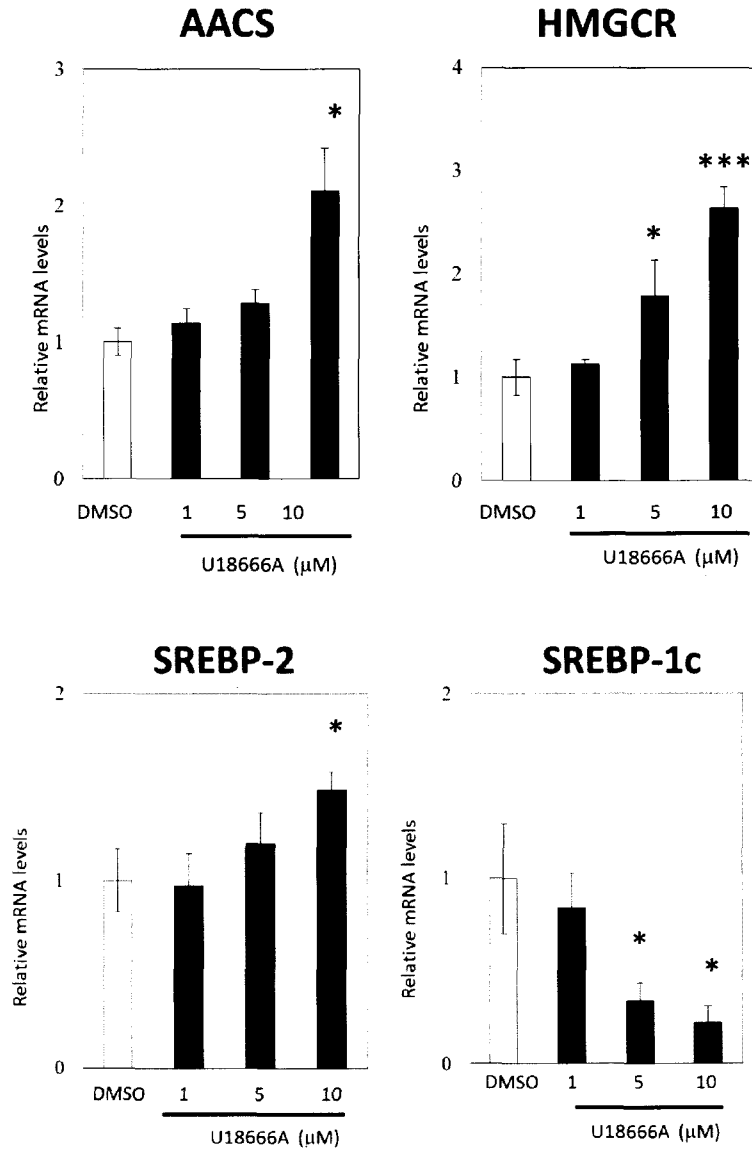


Figure 16 Effect of U18666A on lipogenic gene expression in hepatocytes

The expression of AACS, HMGCR, SREBP-2 and SREBP-1c was analyzed by real-time PCR. The mRNA levels were normalized to GAPDH. The data are shown as the mean \pm S.D. (n=4). The average expression values in the control are indicated as 1.0. **,P<0.01; ***,P<0.001 compared with DMSO-treated cells.

細胞内コレステロールの枯渇による AACS 遺伝子の発現変動

また *in vitro* において、コレステロールの枯渇による AACS の発現調節が起きるか否かを検討する目的で、LPDS 含有培地を使用し肝細胞を培養した。その結果、AACS の遺伝子発現は HMGCR や low-density lipoprotein receptor (LDLR) と同様に、LPDS 処理により有意に増加した (Fig 17)。以上の結果より AACS は細胞内コレステロールの枯渇により、その遺伝子発現が誘導されることが明らかとなった。

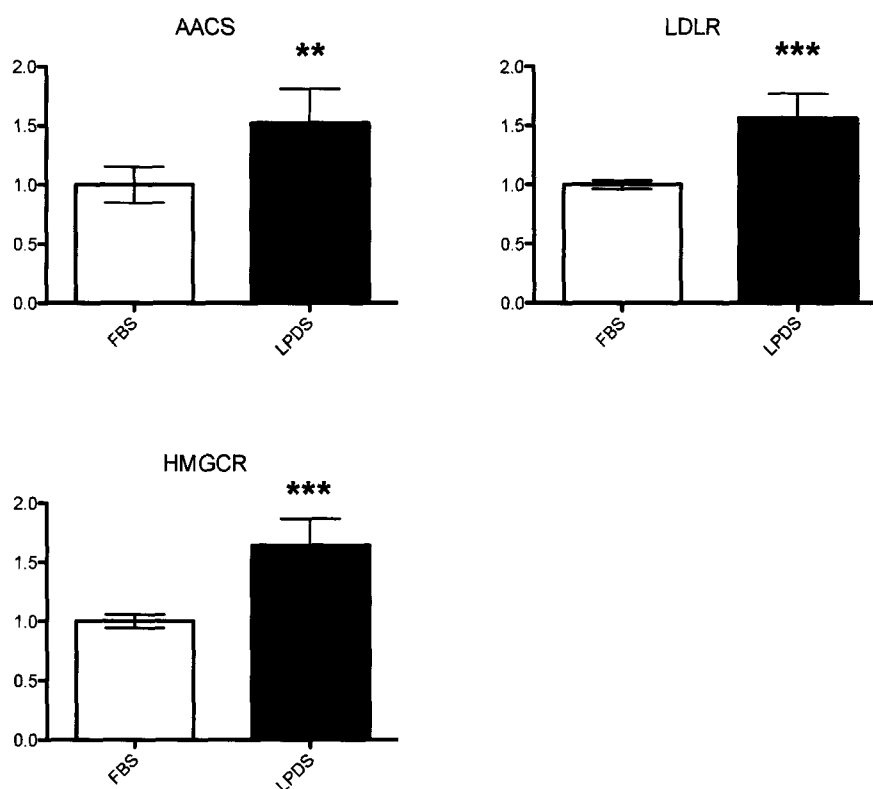


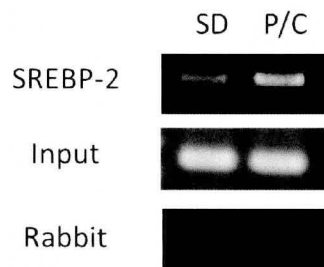
Figure 17 Total RNA was extracted from FBS- or LPDS-treated hepatocytes.

The expression of AACS, HMGCR and LDLR was analyzed by real-time PCR. The mRNA levels were normalized to GAPDH. The data are shown as the mean \pm S.D. (n=3). The average expression values in the control are indicated as 1.0. **, P<0.01; ***, P<0.001 compared with FBS-treated cells.

AACS の発現調節に関わる転写因子の同定

そこで AACS の調節に関わる転写因子の同定を試みた。通常食またはコレステロール低下剤を給餌したマウスの肝臓を用いて ChIP assay を行った結果、AACS の遺伝子上流領域と SREBP-2 の相互作用が、コレステロール低下剤の投与により増加することが明らかとなった (Fig.15A)。また、SREBP-2 が AACS の遺伝子発現に寄与しているか否かを検討するために、SREBP-2 に対する siRNA を肝細胞に処理した (Fig. 18B)。SREBP-2 の発現が抑制されると、AACS の mRNA 量は HMGCR と共に有意に減少した。従って、マウスの肝臓においては SREBP-2 が AACS の転写調節に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

A



B

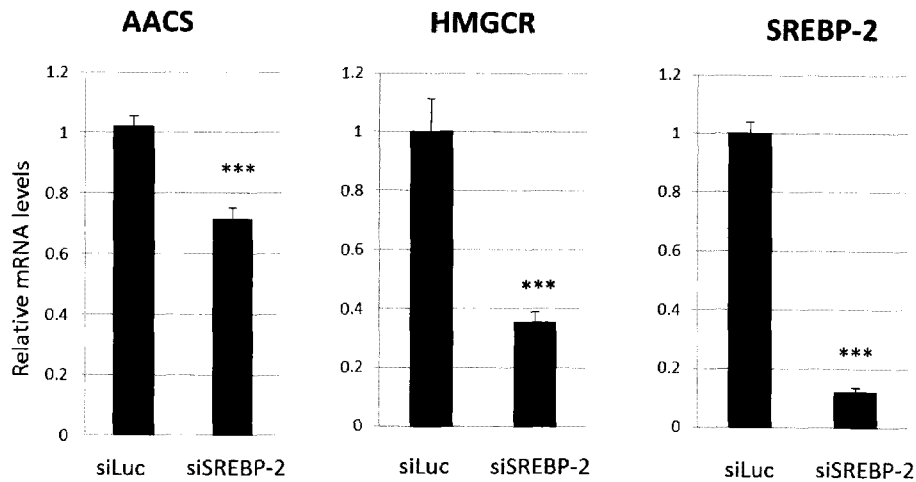


Figure 18 Association of SREBP-2 with the promoter of AACS gene

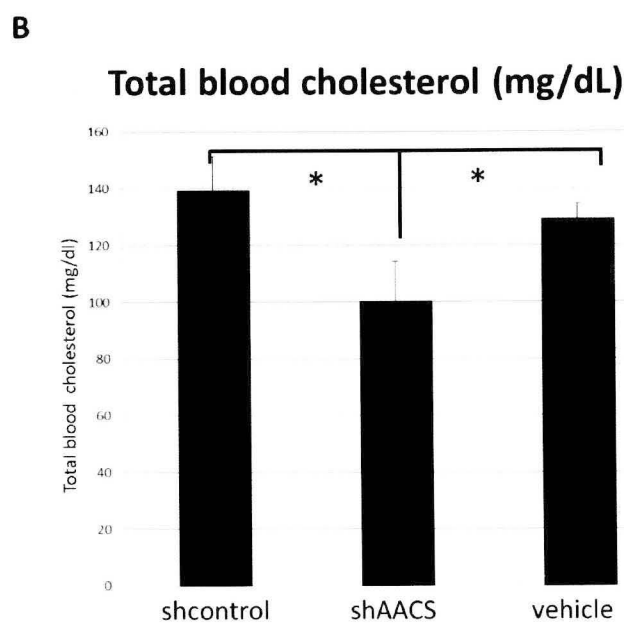
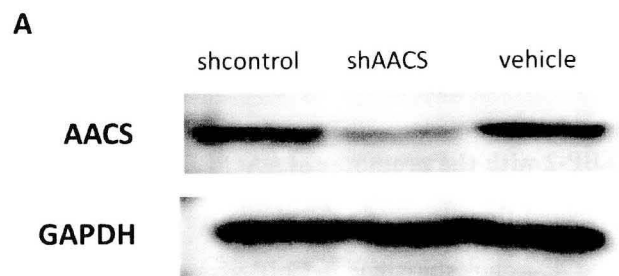
(A) Cross-linked DNA was prepared from liver of mice that were fed a standard diet or a standard diet containing 0.4% pravastatin and 4% cholestyramine. ChIP assays were performed using the indicated antibodies, and the recovered DNA was subjected to PCR amplification using the primers specific to the AACS proximal promoter region. A small aliquot before immunoprecipitation was used for PCR amplification as the input control (Input).

(B) Effect of siSREBP-2 on AACS and HMGCR expression in the mouse hepatocytes

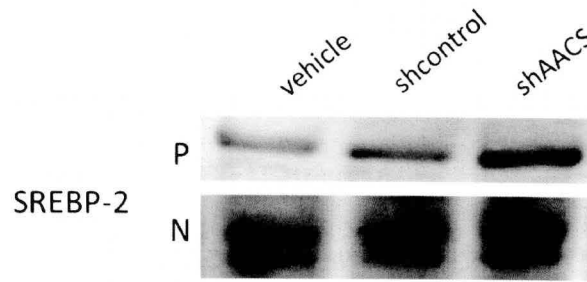
The expression of SREBP-2, AACS and HMGCR mRNA was analyzed by real-time PCR. Gene expression was normalized to 18S rRNAs. The data are shown as the mean \pm S.D. (n=4). The average expression values in the control are indicated as 1.0. *, P<0.05; ***, P<0.001 between siLuciferase (siLuc) and siSREBP-2-treated hepatocytes.

血清コレステロール恒常性に対する AACS 発現変動の影響

AACS が細胞内コレステロール量によって調節されることが明らかとなったが、本酵素の発現がコレステロールの恒常性に影響を与え得るかどうかは明らかとなっていない。そこで、AACS に対する shRNA (shAACS) を hydrodynamics 法によりマウス個体に導入した。肝臓の AACS 発現を western blotting により確認した結果、shAACS を導入した肝臓で顕著に減少することが明らかとなった (Fig. 19A)。また、血清中のコレステロールは 28%減少しており (Fig. 19B)、SREBP-2 の活性化体、並びに HMGCR と LDLR の遺伝子発現は有意に増加した (Fig. 19C and D)。以上の結果より、AACS の発現がコレステロール恒常性に影響を与えることが明らかとなった。



C



D

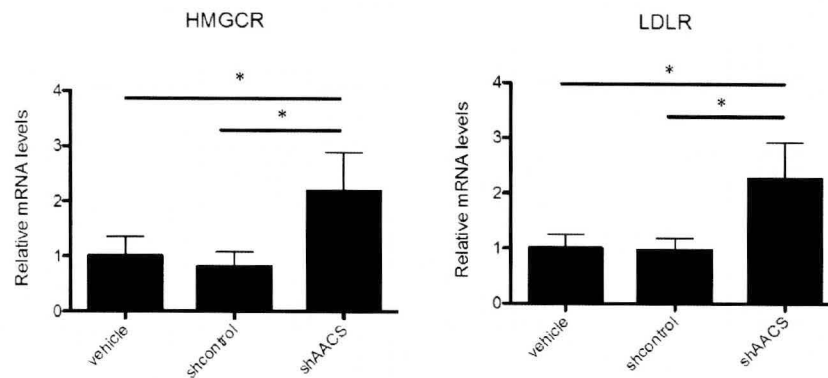


Figure 19 Effect of shAACS on total cholesterol in the mouse

(A) The mice were administered shAACS vector via tail-vein injection. After 24 hrs, the cytosolic protein fraction was extracted from the liver. Total proteins were analyzed by Western blotting.

(B) The data are shown as the mean \pm S.D. (n=4).

(C) The mice were administered shAACS vector or shcontrol vector via tail-vein injection. After 48 hrs, the mice were treated with shAACS vector or shcontrol vector and were reared for 48 hrs. Protein expression of SREBP-2 in the liver of mice that were treated with shcontrol or shAACS was analyzed by Western blotting.

(D) The mice were administered shAACS vector or shcontrol vector via tail-vein injection. After 48 hrs, the mice were treated with shAACS vector or shcontrol vector and were reared for 48 hrs. Gene expression of HMGCR and LDLR in the liver of mice that were treated with shcontrol or shAACS was analyzed by real-time PCR.

第三節 考察

本章では、肝臓における AACCS の転写調節およびコレステロール恒常性への寄与を検討した。一般的に、肝臓はケトン体の合成専用臓器と考えられてきたが、著者は AACCS の発現変動がコレステロール生合成に影響を与え得る新たな証拠を提示した。

コレステロール低下剤の投与により、肝臓における AACCS の mRNA レベルが有意に増加した (Fig. 14)。マイクロアレイを用いた研究により、AACCS の遺伝子発現が SREBP-2 および SREBP-1c を導入したトランスジェニックマウスの肝臓において顕著に増加することが明らかとなっている⁶⁴⁾。これらの結果は SREBP-2 が AACCS の転写調節に関与する可能性を示唆している。SREBP-2 はロイシンジッパー構造を持つ転写因子であり、sterol response element (SRE) に結合しコレステロール合成の律速酵素である HMGCR の遺伝子発現を調節するが^{65, 66)}、AACCS の promoter 領域には、典型的な SREBP 結合配列 (SRE) が存在していない。

一方、本研究において SREBP-2 が AACCS の promoter 領域と相互作用することが明らかとなった (Fig. 18A)。さらに、SREBP-2 をノックダウンすると HMGCR と同様に AACCS の発現が減少することを明らかとした (Fig. 18B)。以上の結果は、肝臓において AACCS の発現が、主に SREBP-2 によって調節される可能性を示唆している。これらの事実より、SREBP-2 は AACCS の発現を他の転写因子と協調的に調節すると推察される。様々な研究により、SREBP-2 は Sp1、nuclear factor (NF)-Y、または cAMP response element binding protein (CREB) と協調的に SRE 配列を持つ遺伝子の発現を調節することが明らかとなっている⁶⁷⁾。AACCS の promoter 領域には NF-1、Sp1、CREB そして GC box が存在することから、これらの転写因子と SREBP-2 が AACCS の発現を調節する可能性が考えられる。

我々はまた、AACCS の発現変動が *in vivo* におけるコレステロール恒常性に影響を及

ぼすか否かを検討した。マウス個体の肝臓において AACCS の発現を抑制するために hydrodynamics 法を使用した⁶⁸⁾。本方法は肝臓において遺伝子をノックダウンするために有効な方法であり、shAACCS を導入した結果、AACCS の発現は効果的に抑制された (Fig. 19A)。この時、血清コレステロールの濃度が減少したことから (Fig. 19B)、AACCS を介したケトン体利用が、コレステロール恒常性に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

細胞質の acetyl-CoA および acetoacetyl-CoA は脂質合成経路の重要な代謝中間体であり、それぞれ ACL および acetoacetyl-CoA thiolase により生合成される⁴⁹⁾ (Fig. 1)。従って、AACCS によって acetoacetate から acetoacetyl-CoA を生合成する反応は、代替経路とみなされてきた。しかしながら、肝臓の ACL を抑制すると脂肪酸合成は減少する一方、コレステロールには変動がないことから⁴⁸⁾、アセチル基をコレステロールもしくは脂肪酸合成のどちらの経路に利用するかは、細胞内のアセチル基の時空間的分布に依存する可能性が考えられる。

多くの研究結果から、絶食状態にケトン体産生および血中ケトン体量が増加し、エネルギーとして利用されることが示されている。しかしながら、我々の結果を踏まえて推察すると、この増加は細胞内で利用しきれなかったケトン体が血中に漏出した結果であると考えられ、通常の生理状態では、ケトン体が細胞内で利用され血中へと放出されないという可能性も挙げられる。最近の研究では、ケトン体利用がインスリン分泌や、胎児期の代謝恒常性に関わることが報告されており^{3,14)}、前述した通常の生理状態におけるケトン体利用の重要性を支持するものである。

本章では、AACCS が SREBP-2 により調節され、その発現変動がコレステロール恒常性に重要な役割を果たすことを明らかとした。

第三章 神経細胞の発達における AACCS の役割

第一節 緒言

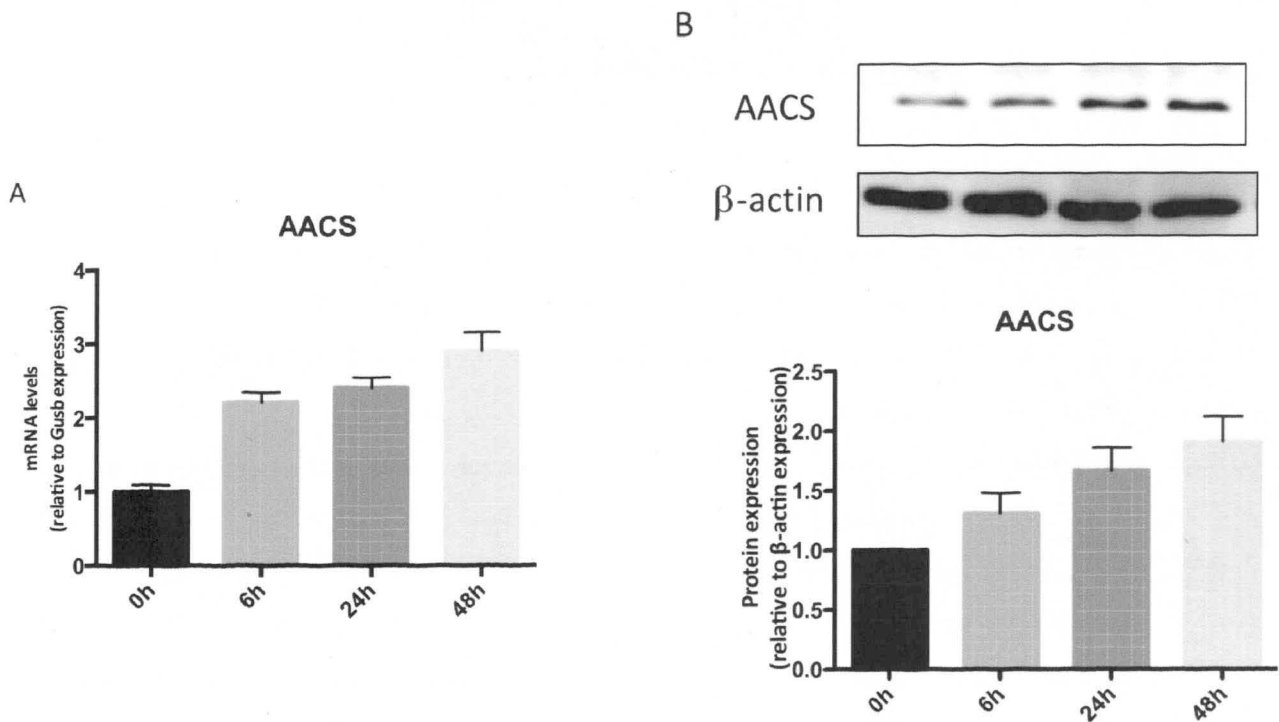
脂質は細胞膜の重要な構成成分であり、特に神経組織に高濃度で存在している⁶⁹⁾。特にコレステロールや脂肪酸は胎児期の発生・分化過程、そして神経細胞の発達において重要な役割を果たしている^{70,71)}。前章までに示したように、AACCS は脂肪細胞の分化やコレステロール恒常性に重要な役割を果たしている。また、ヒトおよびマウスの脳組織において AACCS は高発現しており、海馬および大脳皮質領域の神経様細胞に局在することすることも明らかとしている^{45,72)}。AACCS の発現パターンは SCOT と異なることから、AACCS を介したケトン体利用が、神経組織において何らかの役割を果たす可能性が考えられる。そこで、神経細胞における AACCS の生理的意義を検討するために、神経突起伸長時および胎生期の脳における AACCS の発現変動、そして神経細胞の発達に対する AACCS のノックダウンの影響を検討した。

第二節 結果

神経突起伸長時におけるケトン体利用酵素の誘導

以前の研究において、我々は AACCS の mRNA がマウスおよびヒトの脳において豊富に存在していること、および大脳皮質の神経様細胞に局在することを明らかにした^{45,73})。これらの結果は、AACCS が神経の発達・機能において重要な役割を示すものである。そこで神経における AACCS の生理的意義を検討するために、我々はマウス神経芽細胞種 Neuro-2a 細胞の神経突起伸長段階における AACCS の発現変動を検討した。

AACCS の遺伝子およびタンパク質の発現は、神経突起伸長に伴い顕著に増加した (Fig. 20A and B)。次に蛍光免疫染色法を用いて、AACCS の細胞内局在を検討した結果、AACCS は核近くの細胞質および growth cone に局在することが明らかとなった (Fig. 20C)。以上の結果から、AACCS が神経突起およびその機能維持において重要な役割を果たす可能性が示唆された。



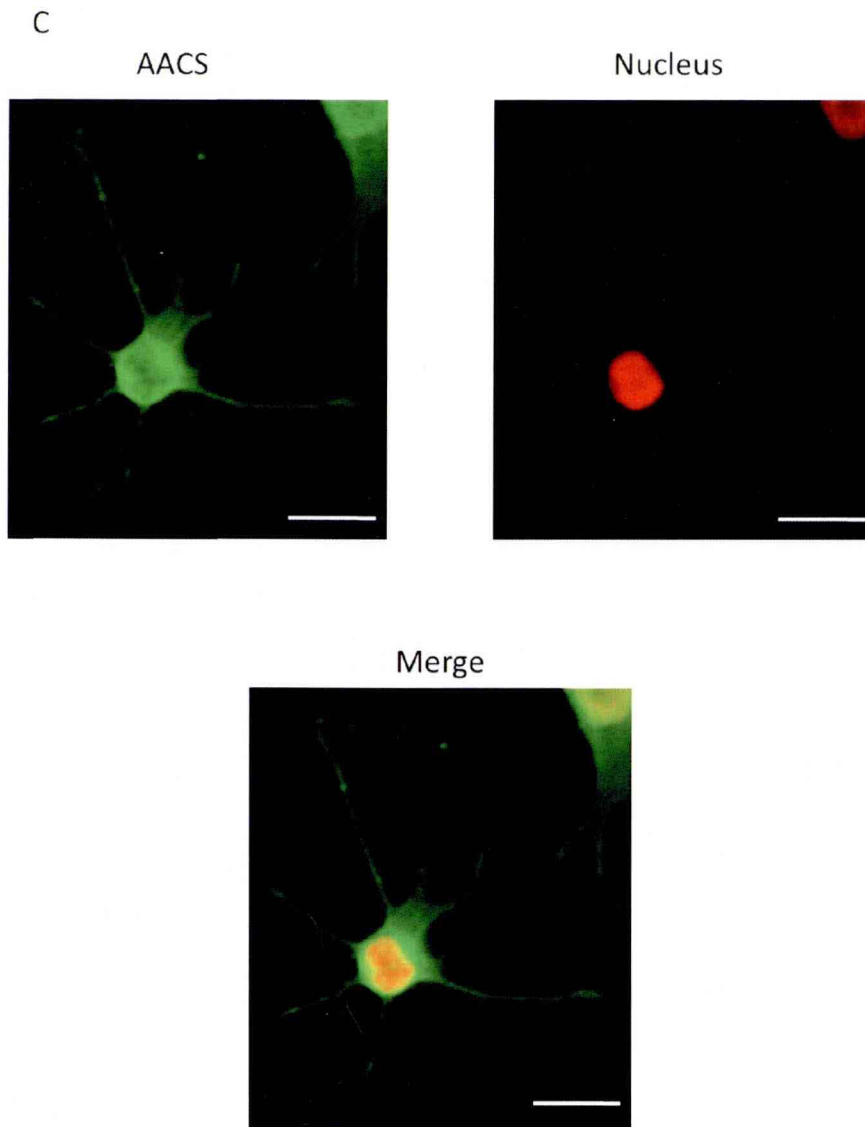


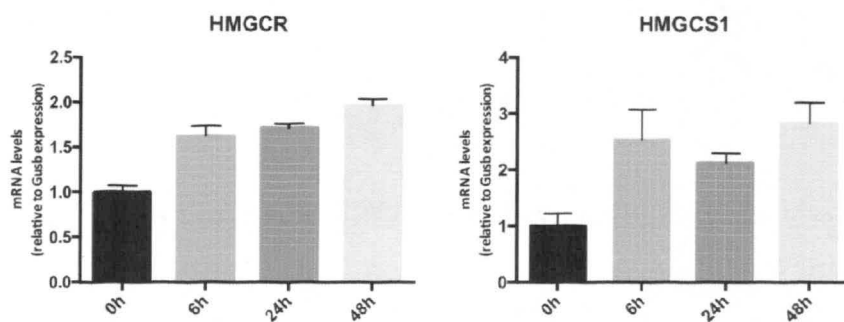
Figure 20 Expression and localization of AACS during neurite outgrowth in Neuro-2a cells

(A) Cells were seeded and incubated for 24 h and then cultured in serum-free E-MEM containing 10 μ M all-trans retinoic acid. The numbers indicate the hours at which the cells were harvested. AACS and Gusb were detected by real-time PCR. Gusb was used as an internal control.

(B) Cells were seeded and incubated for 24 h and then cultured in serum-free E-MEM containing 10 μ M all-trans retinoic acid. The numbers indicate the hours at which the cells were harvested. AACS and β -actin were detected by western blotting.

(C) Neuro-2a cells were stained at 48 h with anti-AACS and Alexa Fluor 488 secondary antibody (green). For the visualization of DNA, preparations were stained with propidium iodide (red). Scale bar = 50 μ m.

次に我々は、ケトン体をエネルギー産生に利用する SCOT の発現を検討した。その結果、SCOT の発現が減少することから、神経突起伸長時には、ケトン体利用が脂質合成系へと傾く可能性が示唆された。そこで、脂肪酸合成またはコレステロール合成に関わる酵素の遺伝子発現を検討した。脂肪酸合成に関わる FAS の発現は神経突起伸長の初期段階で増加したが、ACL および ACC-1 の発現に変動は認められなかった (Fig. 21)。続いて、コレステロール合成系酵素の遺伝子発現を検討した結果、HMGCR および HMG-CoA synthase 1 (HMGCS1) の発現が顕著に増加した。以上の結果より、神経突起伸長時には、コレステロール合成系にケトン体が利用される可能性が示唆された。



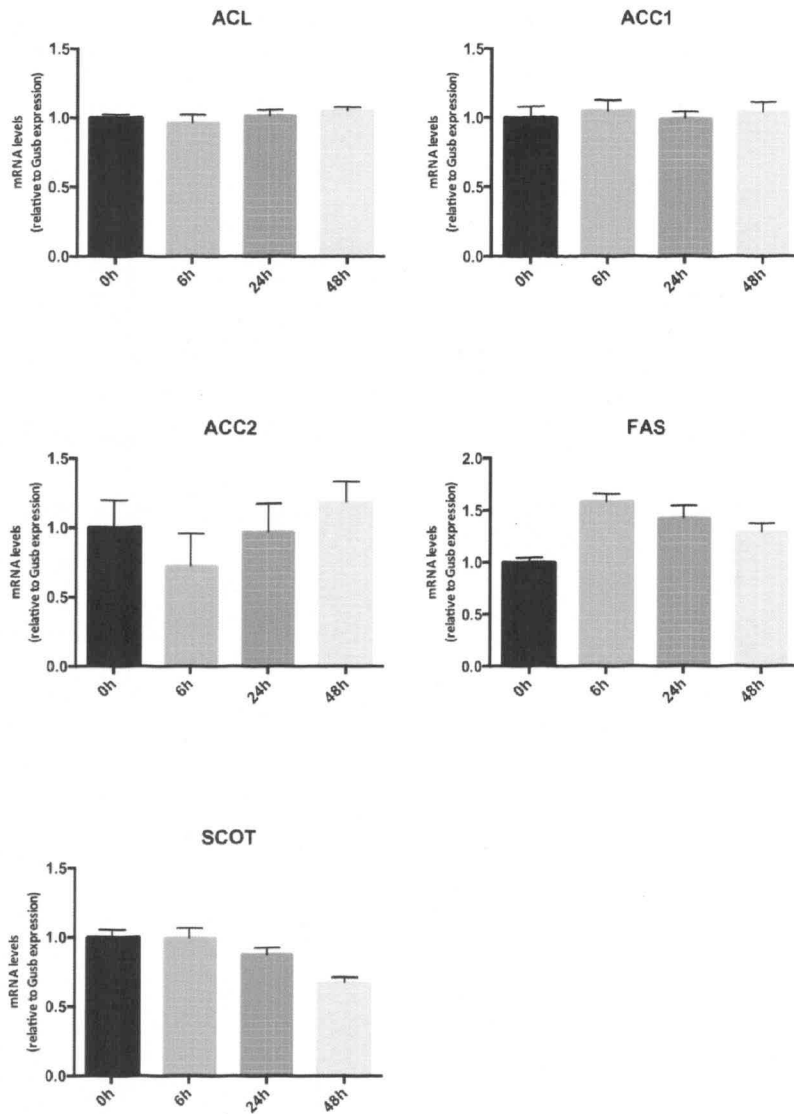
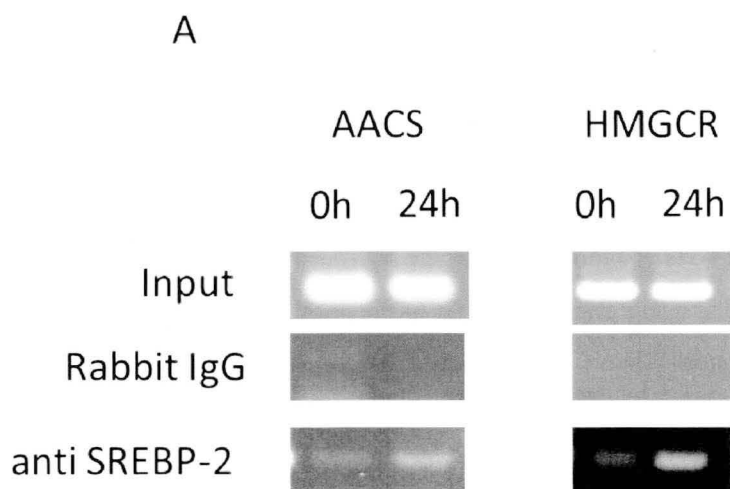


Figure 21 Gene expression of lipogenic factors and a ketone body-utilizing enzyme during neurite outgrowth in Neuro-2a cells

Cells were seeded and incubated for 24 h, and then cultured in serum-free E-MEM containing 10 μ M all-trans retinoic acid. The numbers indicate the hours at which the cells were harvested. Gene expression of lipogenic and ketone body-utilizing enzymes was detected by real-time PCR.

神経突起伸長時の転写調節

神経突起伸長時における AACS の転写機構を解析するために、AACS の promoter 領域と相互作用する転写因子の同定を試みた。前章で述べたように、AACS は肝臓において、コレステロール合成系を司る SREBP-2 によって転写調節されることが明らかになった。また、神経突起伸長時においては AACS の発現変動がコレステロール合成系と類似することから (Fig. 20A and 21)、肝臓および神経細胞においては同様の転写機構により調節される可能性が考えられる。そこで、ChIP assay により SREBP-2 と AACS または HMGCR の promoter 領域との相互作用を検討した結果、神経突起伸長に伴い SREBP-2 の相互作用が増加することがわかった (Fig. 22A)。次に、siRNA を使用して SREBP-2 の発現をノックダウンすると、ACL の発現は変動しなかったが、AACS および HMGCR の発現が有意に減少した (Fig. 22B)。以上の結果より、神経突起伸長時においては SREBP-2 が AACS を転写調節することが明らかになった。



B

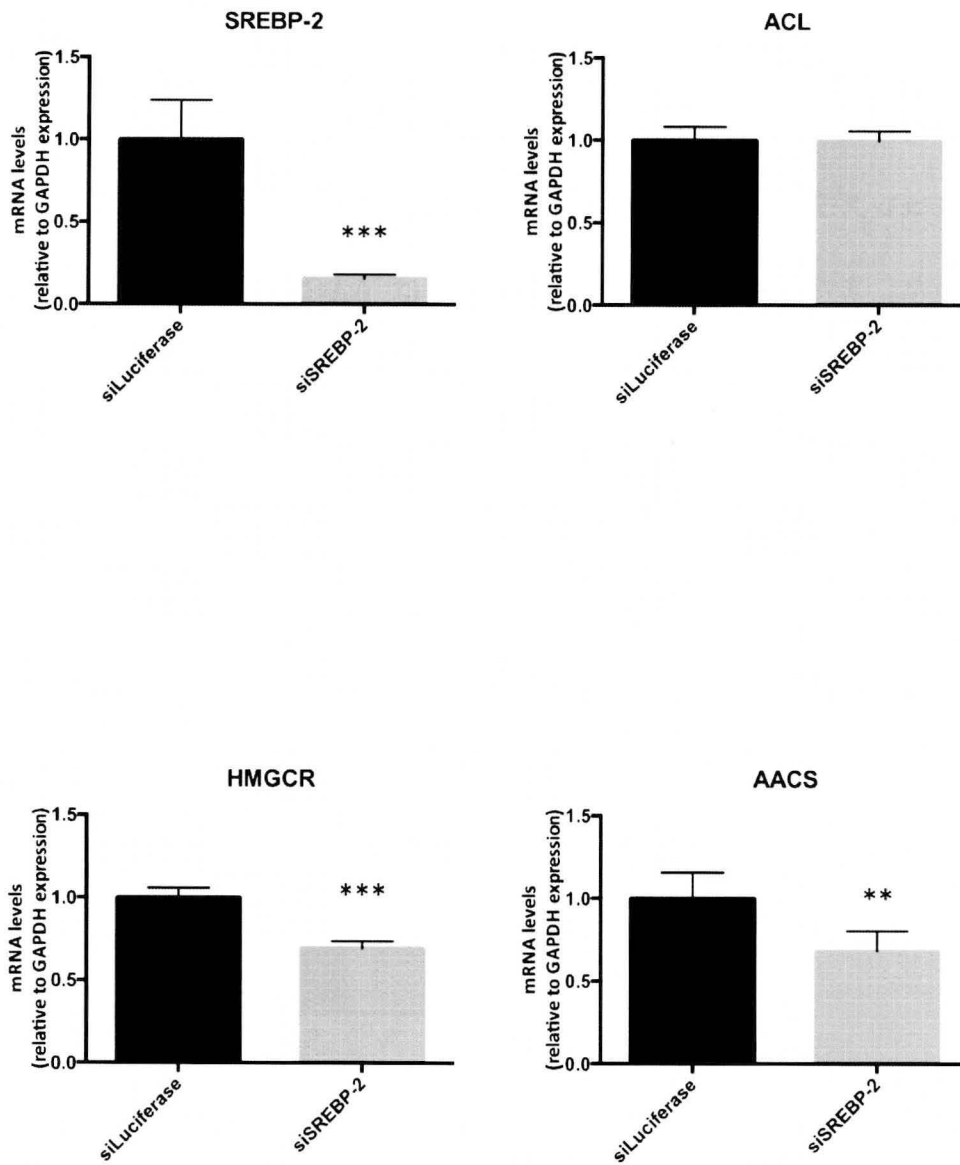


Figure 22 Association of SREBP-2 with the promoter region of the AACS gene

(A) Cross-linked DNA was prepared from undifferentiated Neuro-2a cells (0 h) and differentiated Neuro-2a cells (24 h). ChIP assays were performed using the indicated antibodies, and recovered DNA was subjected to PCR amplification using primers specific to the proximal promoter region of the AACS gene or the HMGR gene. A small aliquot was removed before immunoprecipitation and used for PCR amplification as an input control (Input).

(B) The expression of SREBP-2, ACL, AACS or HMGR mRNA was analyzed by real-time PCR. Gene expression was normalized to that of GAPDH. The data are shown as the mean \pm S.D. (n=4). The average expression values in the control are indicated as 1.0. **, P<0.01; ***, P<0.001 between siLuciferase (siLuc) and siSREBP-2-treated Neuro-2a cells.

神経発生時における AACCS の発現変動

マウス胎生期の脳における AACCS の発現変動を検討するため、胎生期 14.5 日 (E14.5)、16.5 日または 18.5 日目の脳組織を採取し、Western blot 法に供した。

Fig. 23 に示すように、AACCS の発現は E16.5 から E18.5 にかけて顕著に増加した。SCOT の発現は E14.5 と比較して E16.5 および E18.5 においてわずかに増加したが、脂肪酸合成にかかわる ACL と FAS の発現に変動は観察されなかった。対照的に、HMGCR の発現は AACCS の発現変動と同様、神経発生段階において著しく増加した。次に、発生段階における AACCS の役割を推察するために、神経マーカーの発現を調べた。その結果、neuronal nuclei (NeuN) と microtubule-associated protein 2 (MAP-2) の発現が E18.5 において増加することが明らかとなった。さらに、spine apparatus の主要構成タンパク質である synaptopodin の発現が E18.5 において増加した。以上の結果から AACCS を介したケトン体からのコレステロール合成が、神経発生、特に樹状突起伸長において重要な役割を果たす可能性が示唆された。

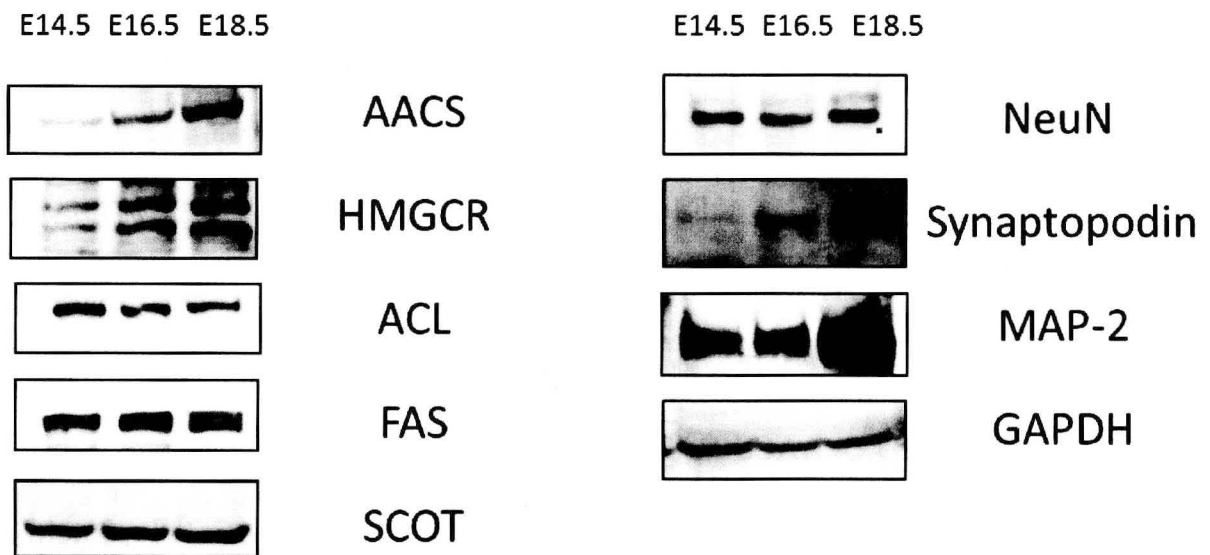


Figure 23 Effects of shAACS on expression of neuronal markers in primary neurons

(A) Brain tissue was dissected from mouse embryos at E14.5, 16.5 or 18.5. Protein was extracted from the brain tissue, and the expression of AACS and other proteins was assessed by western blotting.

初代培養神経細胞における AACS ノックダウンの影響

神経細胞における AACS の役割を検討するために、初代培養神経細胞において AACS の発現を抑制し、神経マーカー発現への影響を検討。細胞を播種した 1 日後 (1 day in vitro, 1 DIV) に AACS を標的とした shRNA を発現するレンチウイルスを感染させ、15 DIV にタンパク質を回収後 Western blot 法を用いて各種タンパク質の発現を検討した (Fig. 24)。shAACS を処理した細胞においては、AACS の発現が著しく抑制されており、また NeuN および MAP-2 の発現がコントロール群と比較して低下した。さらに、synaptopodin の発現も減少することが明らかになった。以上の結果から、神経細胞の神経突起伸長およびその機能維持において AACS が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

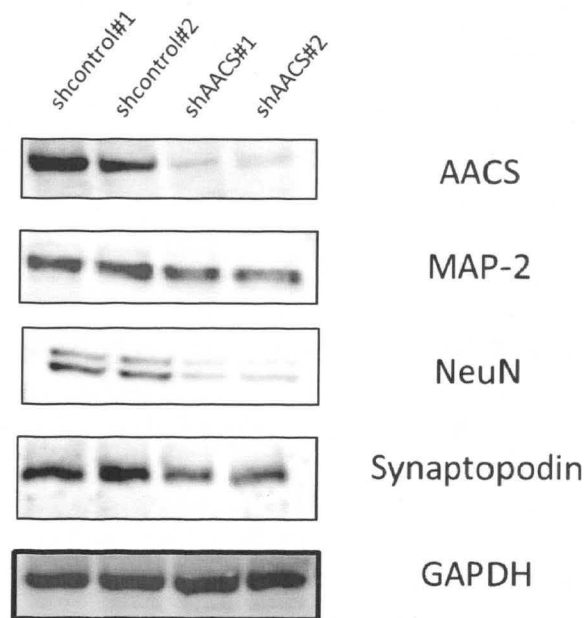


Figure 24 Effects of shAACS on protein expression of neuronal markers in primary neurons

Primary neurons were infected with shcontrol- or shAACS-targeted lentivirus at 2 DIV. Protein was extracted from the cultures at 15 DIV. The expression of AACS, MAP-2, NeuN, synaptopodin and GAPDH was analyzed by western blotting. GAPDH was used as an internal control.

第三節 考察

胎生後期の胎児のコレステロールは、母体からの供給ではなく胎児内のコレステロール生合成によって賄われる⁷⁴⁾。ケトン体は、胎盤を単純拡散または非特異的な能動輸送によって通過し、胎児における脂質合成の原料として利用され得る⁷⁴⁻⁷⁶⁾。小脳においては、AACS の mRNA は主にグリア細胞に局在しているが、大脳皮質においては神経様細胞に局在することが明らかになっている。以上の結果は、神経発生および神経の機能維持に AACS が重要な役割を果たす可能性を示唆するものである。本章では、AACS の発現が神経突起伸長に伴い増加し、その発現が核周辺部の細胞質および growth cone に局在すること、また AACS の発現抑制により NeuN、MAP-2 および synaptopodin などの神経マーカーが減少することを明らかにした。これらの結果より、AACS を介したケトン体利用が神経発生において重要な役割を果たすことが明らかになった。

神経突起伸長時においては AACS の発現が HMGCR の発現変動と類似していたため、ケトン体から産生された acetoacetyl-CoA が、コレステロール合成系に利用される可能性が示唆された。さらに、AACS の発現抑制により神経細胞のマーカーである NeuN と MAP-2 の発現が減少した (Fig. 24)。過去の研究により、コレステロール合成が神経突起伸長やその機能において重要な役割を果たすことが明らかとなっている⁷⁷⁻⁷⁹⁾。さらに、ケトン体はミエリンやシナプトソーム画分に取り込まれることから²⁾、AACS によるケトン体の利用が神経の機能、特に活動電位伝導やシナプス伝達において重要な役割を果たす可能性が示唆された。さらに、蛍光免疫染色法により AACS は growth cone に局在することが明らかとなった (Fig. 20)。Growth cone の形態は低分子量 GTPase である Rho family (Rac1 や Cdc42) によって制御されており、Rho family の活性は、メバロン酸経路によって合成されるイソプレニル基による

翻訳後修飾により調節されることが報告されている^{80,81)}。AACCS はコレステロール恒常性に重要な役割を果たすことから、メバロン酸経路を介した Rho family の翻訳後修飾に影響し、神経の形態形成に関与する可能性が考えられる。

第三章・第二節の ChIP assay および siRNA を使用した実験により、SREBP-2 が AACCS の転写を調節することが明らかになった。鈴木らにより、SREBP-2 のノックダウンがシナプス形成のマーカータンパク質の発現を減少させること、また視床下部における SREBP-2 のノックダウンにより摂食量や体重の増加を引き起こすことが明らかとなっている⁷⁹⁾。我々の研究により、AACCS の mRNA 量は STZ を投与したラットの脳において減少することが明らかとなっている⁴⁵⁾。また、本章において AACCS の発現抑制により、synaptopodin の発現が減少することを明らかとした (Fig. 24)。Synaptopodin は spine apparatus の形成および海馬の long-term potentiation に関与することから⁸²⁾、AACCS がシナプス形成や摂食量の調節に関わる可能性が考えられる。

本研究の結果から、AACCS の発現が神経突起伸長に伴い増加すること、またその発現調節が SREBP-2 に依ることが明らかとなった。また、AACCS の発現変動が神経マーカーである NeuN、MAP-2 および synaptopodin の発現に影響を及ぼすことを明らかとした。以上の発見は、神経発生・発達におけるケトン体利用の役割に新たな知見を与え、神経発生や病態メカニズムの解明に大きく寄与するものである。

総括

第一章においては AACS の転写調節が C/EBP α によって調節されていること、またその発現が脂肪細胞の分化に重要な役割を果たすことを明らかにした。脂肪細胞の分化においては、コレステロール・脂肪酸合成共に必須の経路であることが明らかになっている。第二章の結果により、AACS がコレステロールの恒常性に影響を与えることから、脂肪細胞の分化段階においても、ケトン体からのコレステロール合成が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。近年、HMGCR の肝特異的 knockout マウスが作製され、肝臓に対する過度の脂肪蓄積により生後 6 週間以内に 60~70% のマウスが死亡することが明らかとなった⁸³⁾。このマウスは、脂肪酸合成の著しい増加を示しており、コレステロール合成と脂肪酸合成は密接に連動していると考えられる。第一章・Fig. 12 においても AACS の knockdown により FAS の発現が上昇傾向を示していることから、AACS が HMGCR と同様の役割を脂肪細胞分化において果たしている可能性が示唆される。

第二章および第三章においては、AACS の発現が SREBP-2 により転写調節されることを示した。ChIP assay により AACS の promoter 領域と SREBP-2 が相互作用することを明らかとしたが、その作用点は不明なままである。そこで、promoter 活性を初代培養肝細胞および Neuro-2a 細胞で測定した結果、共に Sp1 配列が promoter 活性に重要な配列であることが明らかとなった（未発表データ）。また、この Sp1 配列を用いて DNA affinity precipitation assay を行った結果、神経突起伸長時およびコレステロール低下剤投与時において、Sp1 配列と SREBP-2 との相互作用が増加し、Sp1 配列に変異を導入することでその相互作用が消失することが明らかとなった（未発表データ）。SREBP-2 はロイシンジッパー構造を持ち、Sp1 配列に直接結合するとは考えにくい。しかし、Sp1 の核移行はコレステロール低下剤の投与によって減少す

ることから、SREBP-2 は Sp1 配列に結合し得る他の転写因子と相互作用し、AACCS を転写調節すると考えられる。

近年、細胞内の acetyl-CoA がタンパク質の翻訳後修飾およびヒストンのアセチル化に重要な役割を果たすことが明らかにされつつある。acetyl-CoA synthetase がヒストンアセチル化に必要な acetyl-CoA を供給する酵素として知られていたが⁸⁴⁾、最近、ACL が核内においてヒストンアセチル化に必要となる acetyl-CoA を供給すること、またその発現を **knockdown** すると 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化が抑制されることが明らかとなった⁴⁸⁾。AACCS はタンパク質の翻訳後修飾が行われる核付近の細胞質画分に存在しており、その発現が分化に重要な役割を果たすことから、AACCS 自身が翻訳後修飾に必要なアセチル基を供給する可能性も十分考えられる。

以上の結果より、AACCS は脂肪細胞、肝臓および神経細胞の脂質合成および分化機構において重要な役割を果たしていることが明らかになった。コレステロールや脂肪酸の生合成経路は、阻害剤などを用いた生化学的な研究によりほぼ確立されたものと考えられていた。しかし、代替経路と考えられてきた AACCS がコレステロール・脂肪酸合成に重要な役割を果たすこと、また、前述したように HMGCR の肝特異的 **knockout** マウスが、HMGCR 阻害剤を投与した時とは異なる表現型を示すことから、分子生物学的手法を用いた解析が脂質合成系の役割や相互作用の理解により重要になると考えられる。本研究では、AACCS を介したケトン体利用経路が、生体内の脂質合成および細胞の分化・機能維持において重要な役割を果たすことを示した。本酵素の更なる解析は、脂質代謝異常や細胞の形態異常の理解およびその治療に重要な知見を与えると考えられる。

結語

1. AACCS の遺伝子発現は epididymal WAT および kidney で多く、brain、spinal cord および liver においては中等度であった。また、SCOT が高発現する skeletal muscle においては AACCS の発現はほとんど観察されなかった。
2. AACCS は翻訳開始点 (+1) から上流-104 bp の位置に主要転写開始点を持ち、TATA-less promoter である可能性が示唆された。
3. 3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化段階において、AACCS の発現が C/EBP α により調節され増加した。また、AACCS は核周辺の細胞質領域に局在しており、その発現抑制により、脂肪滴の蓄積並びに PPAR γ や C/EBP α などの脂肪細胞分化マーカーが減少した。
4. 肝臓における AACCS の発現は、細胞内のコレステロール濃度の枯渇によって増加すること、コレステロール合成を調節する転写因子である SREBP-2 によって発現誘導されることを明らかにした。また、AACCS の発現抑制により血清総コレステロールが減少することを見出した。
5. マウス神経芽細胞種である Neuro-2a 細胞の神経突起伸長段階において、AACCS の発現が増加すること、核周辺部の細胞質および growth cone に局在することを明らかにした。また、コレステロール合成の律速酵素である HMGCR の発現も増加し、その発現変動には SREBP-2 が重要な役割を果たすことを明らかにした。神経細胞において AACCS の発現を knockdown すると、神経細胞のマーカーである MAP2 や NeuN および synapse apparatus のマーカーである synaptopodin の発現が減少することを見出した。

謝辞

本研究にあたり、御懇篤なるご鞭撻を賜りました、
星薬科大学衛生化学教室 福井 哲也 教授に謹んで感謝申し上げます。

副査をお引き受けいただき、本論文の執筆にあたり貴重な御助言と御指導を賜りました、
星薬科大学微生物学教室 辻 勉 教授に謹んで感謝申し上げます。

副査をお引き受けいただき、本論文の執筆にあたり貴重な御助言と御指導を賜りました、
星薬科大学機能形態学研究室 小林 恒雄 教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、様々な相談に乗っていただき、御助言を賜りました
星薬科大学衛生化学教室 山崎 正博 准教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、様々な相談に乗っていただき、御助言を賜りました
星薬科大学衛生化学教室 渡辺 聡 助教に深く感謝いたします。

本研究に対し、終始御協力を頂きました星薬科大学衛生化学教室の皆様には厚く御礼申し上げます。

最後に、研究に専念できる環境を与えて下さり、終始激励を頂いた、
妻 陽子、息子 博己に深く感謝いたします。

実験の部

第一章に関する実験

(1) 5'-Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Quickprep mRNA Extraction Kit (GE Healthcare) を使用し、poly (A)-mRNA を ddY mouse (東京実験動物) から抽出した。GeneRacer Kit (Invitrogen) を用いて、1 本鎖 cDNA を合成した後、GeneRacer 5'-primer および AACS 遺伝子に特異的な primer と共に PCR 反応に供した。増幅した PCR 産物をテンプレートとして、GeneRacer 5'-nested primer と AACS 遺伝子を標的とした primer (5'-AGCGCAAGGCGTGGAGCGGATCA-3') を用いて PCR を行った。増幅された PCR 産物を pCR4-TOPO vector (Invitrogen) に組み込み大腸菌に導入後、ポジティブクローンを PCR 法およびシーケンスを利用して同定した。

(2) 培養細胞

マウス繊維芽細胞である 3T3-L1 cells は Health Science Research Resources Bank より購入した。細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12, Invitrogen) に 10% newborn calf serum (Invitrogen) を加えた培地中で、37°C、5%CO₂ の条件下で培養した。コンフルエント状態まで培養し培地交換した後 2 日間培養し、脂肪細胞分化誘導剤 [10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen)、0.5 mM 3-isobutyl-methylxanthine (Sigma)、0.25 μM dexamethasone (Nacalai tesque)、および 5 μg/mL insulin (Sigma)] に培地交換し脂肪細胞への分化を誘導した。以後、2 日ごとに 10%FBS および 5 μg/mL insulin を含む DMEM/F-12 培地に交換し実験に供した。

(3) RNA 抽出

Total RNA は Illustra RNA spin mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare) または ISOGEN (Nippon Gene) を用いて、3T3-L1 細胞およびマウス各臓器から抽出した。

(4) Northern blot analysis

Total RNA 10 μg を変性アガロースゲル (1%) 中で電気泳動した。泳動後、分離した RNA を $20\times$ standard saline citrate (SSC) を用いたキャピラリー法により Hybond-N+ (GE Healthcare) に膜転写し、UV 固定後 80°C で 2 時間乾燥した。

準備した膜を Hybridization buffer ($5\times$ SSPE、20 mM Dextran sulfate) 中で 42°C 、4 時間温置し、その後、Ready to Go DNA Labeling Beads (GE Healthcare) を用いて $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP 標識した AACs の cDNA probe を加え、 42°C で 18 時間インキュベートした。膜を $2\times$ SSC/0.1% SDS で 3 回洗浄し、更に 65°C に加温した $0.25\times$ SSC/0.1% SDS で 30 分間 2 回洗浄したのち、Imaging plate に設置した。18 時間露光した後、Typhoon (GE Healthcare) を用いて解析した。

(5) Complementary DNA (cDNA) 合成

抽出した total RNA 4 μg に滅菌水 8 μL を加え、 65°C 、3 分間インキュベートした後、下記に示した試薬を順に加えた。0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Random Primer (Takara)、300 U/ μL RNase inhibitor (Wako) および 200 U/ μL M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) を加え 37°C 、1 時間温置し cDNA を合成した。 65°C で 3 分間加温し反応を停止した後、以後実験に供した。

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

3T3-L1 細胞より合成した cDNA を鋳型とし、Ex Taq polymerase (Takara) を使用して AACS、C/EBP α 、C/EBP β および β -actin の遺伝子領域を増幅した。使用した primer は以下に示す。

AACS

Sense primer 5'-TCCGCAACCATGTCCAAGCT-3'

Antisense primer 5'-ATCACATGCACAGCTGGATG-3'

C/EBP α

Sense primer 5'-AAAGCCAAGAAGTCGGTGGAC-3'

Antisense primer 5'-CTTTATCTCGGCTCTTGCGC-3'

C/EBP β

Sense primer 5'-GCAAGAGCCGCGACAAG-3'

Antisense primer 5'-GGCTCGGGCAGCTGCTT-3'

β -actin

Sense primer 5'-CAGAGCAAGAGAGGCATCCT-3'

Antisense primer 5'-TCGGTCAGGATCTTCATGAG-3'

(6) レポータープラスミドの作製

RPCI-22 マウス BAC Library (Invitrogen) をテンプレートとして AACS プロモーター領域の上流 908 bp から下流 104 bp を PCR により増幅し、pGL3 basic luciferase reporter vector (Promega) の Sma I /HindIII 制限酵素部位に挿入した。AACS プロモーター領域は以下のプライマーを用いて PCR により作製した。

5' primers

-3/+104-Luc: 5'-TTCAGTCTCGCGCTGTGGTT-3'

-110/+104-Luc: 5'-GTTACAGAAGAGGGCGTGGT-3'

-226/+104-Luc: 5'-AACACCCGGTAAGTTGTGCA-3'

-335/+104-Luc: 5'-TTAGGCTTAAGACATCTCCG-3'

-908/+104-Luc: 5'-ACTGTGAGCAACATGGAGTC-3'

3' primer

5'-GGTTGCGGAGCTGCGTGGCC-3'

また、遺伝子変異体は、Pfu turbo polymerase (Stratagene) を用いた Inverse PCR 法で作製した⁸⁵⁾。GC box および C/EBPs 結合配列の変異体作製 primer は以下に示す。なお、antisense primer は sense primer の相補鎖配列を用いた。

GC box: 5'-GTGGTCTCAAGCTATCTGGCTTTCTGG-3'

C/EBPs 結合配列: 5' -CCCGGTAAGTTTACGCATAAGTGAGG-3'

(7) Promoter 活性の測定

AACS 遺伝子上流配列を組み込んだ pGL3 basic luciferase reporter vector (deletion vector) 0.4 μ g と pCMV- β -gal 0.1 μ g を、PLUS Reagent (Invitrogen) および Lipofectamine (Invitrogen) を使用して 3T3-L1 細胞の分化 2 日目に導入した。48 時間後に細胞を回収し、Luciferase Assay System (Promega) を用いて promoter 活性を測定した。なおトランスフェクション効率の補正には、AURORA GAL-XE (ICN) を使用して測定した β -Galactosidase 活性を用いた。

(8) 核タンパク質の抽出

35mm dish に播種した 3T3-L1 細胞を洗浄後、400 μ L buffer A [10 mM HEPES-KOH (pH7.8), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Dithiothreitol (DTT), 0.4 μ M

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.1% Nonidet P-40] で回収・遠心 (5000 rpm, 1 分間) した。得られた沈殿物に 100 μ L buffer C [20 mM Hepes-KOH (pH 7.8), 420 mM KCl, 0.2 mM EDTA, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.4 μ M PMSF, 25% Glycerol] を加えて再懸濁し、30 分間氷上で静置した。遠心分離 (15000 rpm, 15 分間) 後、得られた上清を核抽出物として使用した。核抽出物のタンパク質濃度は、Quick Start Bradford Dye Reagent (Bio-Rad) を用いて測定した。

(9) EMSA

転写因子結合配列の二本鎖 DNA を denaturation Buffer (TOYOBO)、10 \times Blunt End Kinase Buffer (TOYOBO)、 $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Perkin Elmer) および Polynucleotide kinase (TOYOBO) を用いて放射標識し、Probe Quant G-50 Micro columns (GE healthcare) を用いた精製後、EMSA で使用するプローブとした。5 μ g の核抽出物を 5 \times binding buffer [75 mM Hepes-NaOH (pH7.5)、375 mM NaCl、7.5 mM EDTA、37.6% Glycerol、57.5 mM DTT] および Poly (dI \cdot dC) (Sigma-Aldrich) と混合し、室温で 30 分間静置した。更に、放射標識したオリゴヌクレオチドと反応させ、20 分間室温で静置した。混合物を 4% 非変性ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動し、これをイメージングプレートに 18 時間露光した後、Typhoon 9410 (GE Healthcare) を用いて解析した。

GC box および C/EBPs 結合配列は以下に示す。

GC box: 5'-GGTCTCAAGAGGCGTGGCTTTCTGG-3'

C/EBPs 結合配列: 5'-CCGGTAAGTTGTGCAATAAGTGAGG-3'

(10) ChIP assay

ChIP assay は Agata らの方法を基に改変を加え実行した⁸⁶⁾。3T3-L1 細胞を 1% formaldehyde 溶液中で 10 分間温置し固定した。遠心分離後、細胞を 1% SDS、10 mM EDTA および protease inhibitor cocktail (Sigma) を含有した 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液に再懸濁した。ソニケーションによりクロマチンを細断した後、再び遠心し細胞残渣を取り除いた。上清は 167 mM NaCl、1.1% Triton X-100、0.11% sodium deoxycholate および protease inhibitor cocktail (Sigma) を含有した 50 mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液を用いて希釈した。溶液に Protein G-sepharose beads (GE Healthcare) を加え 15min 4°C で静置した後、2 µg の各種抗体 [anti-normal rabbit IgG, anti-C/EBP α および anti-C/EBP β] を加え一晩反応させた。DNA-protein 複合体を 300 mM NaCl、5 mM EDTA および 0.5% SDS を含んだ 10 mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液を用いて溶出し、DNA-protein のクロスリンクを 65°C 4 時間加温することで解除した。得られた溶液を用いて PCR 反応を行い、転写因子の集積量を検討した。PCR 反応に用いた primer の配列は以下に示す。

Sense primer: 5'-GAATGAACGAACGAACGAGG-3'

Antisense primer: 5'-ACCACGCCCTCTTCTGTAAC-3'

(11) タンパク質抽出

3T3-L1 細胞を RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH8.0), 1% Triton X-100, 1% SDS および 0.1% sodium deoxycholate] により溶解し、遠心分離後(14,000×g、15 分間) の上清を western blotting に使用した。タンパク質濃度は、Quick Start Bradford Dye Reagent (Bio-Rad) を用いて測定した。

(12) Western blotting

15 μ g のタンパク質溶液を 7.5% SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) により分離し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜にブロッティング装置 (Bio-craft) を用いて転写した。ブロッケーアス (DS ファーマ バイオメディカル) 溶液中で室温、一時間インキュベートした後、一次抗体を希釈した Can get signal 1 (TOYOBO) 溶液に浸し、4°Cで一晩静置した。Tween を含有した Tris buffer saline (T-TBS) を用いて洗浄後、horseradish peroxidase (HRP) を結合した二次抗体を Can get signal 2 (TOYOBO) に希釈した溶液中で室温、1 時間反応させた。膜を T-TBS で洗浄後、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) により目的タンパク質を検出した。

(13) 共焦点顕微鏡

3T3-L1 細胞をカバーガラス上で培養した。4% paraformaldehyde を含有した phosphate-buffered saline (PBS) 中で細胞を 15 分間固定した後、0.1% (v/v) Triton X-100 中で 5 分間放置し透過処理を行った。3% (w/v) bovine serum albumin (BSA) 中で 30 分間ブロッキングし、その後 AACS 抗体を加えた Can get signal immunostain solution A (TOYOBO) 溶液中で 4 度、一晩かけ抗原抗体反応を行った。細胞を 0.1% BSA を含有した PBS で洗浄した後、Alexa-fluor 488 二次抗体を希釈した Can get signal immunostain solution B (TOYOBO) 溶液に浸し室温、1 時間反応させた。細胞が接着したカバーガラスを PBS (0.1% BSA) で洗浄した後、Mowiol mounting solution を用いて封入した。

DNA を観察するために、propidium iodide (Calbiochem) を染色剤として使用した。前述した手順に従い二次抗体反応まで行った後、細胞を 1 mg/mL RNase を含む PBS に浸し、RNA を分解させた。その後 propidium iodide 溶液中で 15 分間静置後、

PBS (0.1% BSA) 溶液で洗浄し、Mowiol mounting solution を用いて細胞を封入した。デジタル画像は Confocal laser scanning microscope (Bio-Rad) を使用して取得した。

脂肪滴を可視化する目的で、細胞を Nile red (Wako) を用いて染色した。2次抗体反応後、細胞を 5 µg/mL Nile red 溶液中で静置した。細胞を PBS (0.1% PBS) で洗浄した後、Mowiol mounting solution を用いて封入した。

(14) ウイルス調製

Lenti-X 293T 細胞 (Takara) を 100 mm poly-L-lysine plate (IWAKI) に播種し、pGreenPuro shRNA vector (System Biosciences) および packaging mix (Invitrogen) を、リポフェクション法により導入した。導入後 14 時間培養し、培地を 10% FBS/D-MEM に交換した後 48 時間培養して培地を回収した。

AACS の発現をノックダウンするために、4 つの異なる short hairpin RNA (shRNA) を設計した。また、コントロールには luciferase (pGL3) および LacZ に対する shRNA を設計し使用した。以下にその配列を示す。

shAACS #1: GTTCAGTGGAATCGCTAC

shAACS #2: CCGTGIGGTCGGCTATCTA

shAACS #3: ACAGTGTGTTCCCTGGATGA

shAACS #4: GGCAGAGAGGAGATCGTGA

shcontrol #1 (shLuciferase): CTTACGCTGAGTACTTCGA

shcontrol #2 (shLacZ): ATCGCTGATTTGTGTAGTC

コンフルエント状態になった 3T3-L1 細胞にウイルスを処理し、2 日後に分化誘導培地に交換した。2 日ごとに培地を交換し、図に示した時間に total RNA を抽出した。

(15) Oil red O 染色

分化誘導後 8 日間経過した 3T3-L1 細胞を 10% formalin 溶液中で室温、10 分間固定した。細胞を 60% isopropanol で洗浄した後、oil red O (1.8 mg/mL) を処理し、20 分間染色した。細胞を顕微鏡下で撮影後、100% isopropanol を処理し oil red O 色素を抽出した。抽出した溶液の吸高度を、分光高度計を用い 520 nm の波長で測定した。

(16) Real-time PCR

Total RNA 1 µg から PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (Takara) を用いて cDNA を合成した。標的遺伝子の primer および SYBR Green PCR Master Mix (SYBR Premix Ex Taq, Takara) を加え、Applied Biosystems StepOne (Applied Biosystems) を使用して PCR 反応を行った。Standard curve 法を用いて増幅産物の定量を行い、18S ribosomal RNA (18S rRNA) を内標準遺伝子として使用した。Primer は GeneBank を基に Primer Express software (Applied Biosystems) を使用して設計した。Primer の配列を以下に示す。

18S rRNA

Sense primer 5'-TTCGTATTGCGCCGCTAGA-3'

Antisense primer 5'-CTTTCGCTCTGGTCCGTC TT-3'

AACS

Sense primer 5'-CTGGTCTGTCCGGTCGTATATG-3'

Antisense primer 5'-GTGAGTAGACGATTCCACTGAACTTC-3'

PPAR γ

Sense primer 5'-GCCCACCAACTTCGGAATC-3'

Antisense primer 5'-TGCGAGTGGTCTTCCATCAC-3'

C/EBP α

Sense primer 5'-AAAGCCAAGAAGTCGGTGGAC-3'

Antisense primer 5'-CTTTATCTCGGCTCTTGCGC -3'

第二章に関する実験

(1) マウス

ddY 系統の雄マウス 6 週齢 (東京実験動物) に通常食(オリエンタル酵母)、または 0.4% pravastatin (Sankyo Co., Ltd.) および 4% cholestyramine (Bristol-Myers Squibb K.K.) を含有した食餌を 3 日間与えた。すべての動物実験は星薬科大学動物実験委員会の承認を受け、規定に従い遂行した。

(2) 初代培養肝細胞

マウスの肝臓は 6 週齢のマウスより単離し、過去に報告された方法に改変を加え調製した⁸⁷⁾。肝臓に 0.5 mM ethylene glycol tetra-acetic acid および 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid を含有した Hanks' balanced salt solutions (HBSS) を灌流し、次に 5 mM CaCl₂ 含有 0.05% collagen I (Worthington bio. Co.) 溶液を灌流し肝細胞を剥離した。剥離した細胞を 150 mesh により濾過し HBSS で 3 回洗浄した。細胞を 10% FBS、1 μ M insulin および 1 μ M dexametasone を含有した Williams' medium E (Invitrogen) 培地中で 37°C、5% CO₂ の条件下で 3 時間培養した。その後培地を 10% FBS を加えた Williams' medium E に交換し実験に供した。細胞に U18666A を処理し 18 時間後に total RNA を回収し

て real-time PCR 法に使用した。また、コレステロール枯渇実験のために、細胞を lipoprotein deficient FBS (LPDS) で 48 時間処理し、total RNA を抽出し real-time PCR 法に利用した。

(3) RNA 抽出

Total RNA は Illustra RNA spin RNA Isolation Kit (GE Healthcare) または ISOGEN (Nippon Gene) を用いて、初代培養肝細胞および肝臓から抽出した。

(4) Real-time PCR 法

抽出した total RNA のうち 1 μ g を、PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (Takara) を使用して cDNA を合成した。標的遺伝子の primer および SYBR Green PCR Master Mix (SYBR Premix Ex Taq, Takara または SYBR select, Life technologies) を加え、Applied Biosystems StepOne (Applied Biosystems) を使用して PCR 反応を行った。Standard curve 法を用いて増幅産物の定量を行い、18S rRNA または glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内標準遺伝子として使用した。Primer は GeneBank を基に Primer Express software (Applied Biosystems) を使用して設計した。使用した primer の配列を以下に示す。

18S rRNA

Sense primer 5'-TTCGTATTGCGCCGCTAGA-3'

Antisense primer 5'-CTTTCGCTCTGGTCCGTC TT-3'

GAPDH

Sense primer 5'-CATGGCCTTCCGTGTTCCCTA-3'

Antisense primer 5'-GCGGCACGTCAGATCCA-3'

AACS

Sense primer 5'-CTGGTCTGTCCGGTCGTATATG-3'

Antisense primer 5'-GTGAGTAGACGATTCCACTGAACTTC-3'

ACL

Sense primer 5'-TGGAGGCAGCATTGCAAAC-3'

Antisense primer 5'-TCTCACAATGCCCTTGAAGGT-3'

HMGCR

Sense primer 5'-GTGCTGAGCAGCGACATCAT-3'

Antisense primer 5'-TGTACAGGATGGCGATGCA-3'

C/EBP α

Sense primer 5'-AAAGCCAAGAAGTCGGTGGAC-3'

Antisense primer 5'-CTTTATCTCGGCTCTTGCGC-3'

C/EBP β

Sense primer 5'-GCAAGAGCCGCGACAAG-3'

Antisense primer 5'-GGCAGCTGCTTGAACAAGT -3'

Sp1

Sense primer 5'-CCCCAGGTGATCATGGAAC-3'

Antisense primer 5'-CCTTCTCCACCTGCTGTCTCA-3'

SREBP-2

Sense primer 5'-TGTGAACCTGGCCGAGTGT-3'

Antisense primer 5'-CGCTGTCAGGTGGATCTCAA-3'

SREBP-1a

Sense primer 5'-TAGTCCGAAGCCGGGTGGGCGCCGGCGCCAT-3'

Antisense primer 5'-CCTGTCTCACCCCCAGCATA-3'

SREBP-1c

Sense primer 5'-ATCGGCGCGGAAGCTGTCGGGGTAGCGTC-3'

Antisense primer 5'-CCTGTCTCACCCCCAGCATA-3'

LDLR

Sense primer 5'-GCCGACCTGATGAATTCCA-3'

Antisense primer 5'-GCAGTCATGTTACGGTCACA-3'

(5) Western blotting

第一章に関する実験の部を参照。

抗体の希釈率は以下の通りである。

Rabbit anti-Sp1 (1:2500; Millipore)、 rabbit anti-C/EBP β (1:1000; SantaCruz)、 rabbit anti-C/EBP α (1:1000; SantaCruz)、 rabbit anti-SREBP-2 (1:500; SantaCruz)、 rabbit anti-SREBP-1 (1:500; SantaCruz)、 rabbit anti-GAPDH (1:2500; SIGMA)、 rabbit anti-AACS⁸⁸⁾ (1:2500)、 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:2500; GE Healthcare) および goat anti-mouse IgG (1:2500; GE Healthcare)。

(6) ChIP assay

ChIP assay は Agata らの方法を基に改変を加え実行した⁸⁶⁾。3T3-L1 細胞を 1% formaldehyde 溶液中で 10 分間温置し固定した。遠心分離後、細胞を 1% SDS、10 mM EDTA および protease inhibitor cocktail (Sigma) を含有した 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液に再懸濁した。ソニケーションによりクロマチンを細断した後、再び遠心し細胞残渣を取り除いた。上清は 167 mM NaCl、1.1% Triton X-100、0.11% sodium

deoxycholate および protease inhibitor cocktail (Sigma) を含有した 50 mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液を用いて希釈した。溶液に Protein G beads (VERITAS) を加え 15min 4°C で静置した後、2 µg の各種抗体 [anti-normal rabbit IgG, anti-SREBP-2 (Abcam) を加え一晩反応させた。DNA-protein 複合体を 300 mM NaCl、5 mM EDTA および 0.5% SDS を含んだ 10 mM Tris-HCl (pH8.0) 溶液を用いて溶出し、DNA-protein のクロスリンクを 65°C 4 時間加温することで解除した。得られた溶液を NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) を用いて精製し、PCR 反応に使用した。設計した primer の配列は以下に示す。

Sense primer: 5'-GTGGAACATGCTTATCGCGC -3'

Antisense primer: 5'-CAGCAGCCTTCGCCACGCCT -3'

(7) RNA 干渉

SREBP-2 の発現を抑制するために SREBP-2 に対する設計済み siRNA (siSREBP-2, Dharmacon) を使用した。初代培養肝細胞に 40 nM の siSREBP-2 を LipofectAMINE RNAi MAX Reagent (Invitrogen) を用いて導入し、24 時間後に total RNA を抽出後実験に供した。

(8) Hydrodynamics 法

マウスの AACS 遺伝子に特異的な shRNA を設計した。マウス個体において AACS の発現を抑制するために、hydrodynamics 法を過去に報告された方法に従って実行した⁶⁸⁾。マウスの尾静脈から全血液と等量の PBS に希釈した 50 µg の plasmid を 5 秒以内に注射した。18 時間後、血液および肝臓を採取し以下の実験に使用した。

shRNA 配列

5'-CTGGTCTGTCCGGTCGTAT-3'

5'-GAAGGCTTACTTCTCCAAA-3'

(9) 血清中のコレステロール濃度測定

採取した血清中の濃度は Wako cholesterol E-test (Wako) を用いて、cholesterol oxidase 法により測定した。測定方法は付属のプロトコールに準ずる。

第三章に関する実験

(1) 培養細胞

マウス神経芽細胞腫である Neuro-2a 細胞は Health Science Research Resources Bank より購入した。10% FBS (Invitrogen) を含有した Eagle's minimal essential medium (E-MEM, Invitrogen) 培地を使用し、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。5.0×10⁴ cells/mL の濃度で播種し、24 時間培養後 10 μM retinoic acid (RA, Sigma) 含む無血清 E-MEM 培地中で培養し、神経突起伸長を促した。

(2) RNA 解析

RNease mini kit (Qiagen) または Illustra RNAspin Mini Isolation Kit (GE Healthcare) を使用して Neuro-2a 細胞より total RNA を抽出した。前章と同様に、抽出した total RNA から cDNA を合成し、SYBR Green PCR Master Mix (SYBR Premix, Takara) のプロトコールに準じ real-time PCR を行った。装置は Applied Biosystems StepOne (Applied Biosystems) を使用し、β-glucuronidase (Gusb) or GAPDH を内標準遺伝子として、standard curve 法により発現量を解析した。使用した primer を以下に示す。

AACS

5'-CTGGTCTGTCCGGTCGTATATG-3'

5'-GTGAGTAGACGATTCCACTGAACTTC-3'

HMGCR

5'-GTGCTGAGCAGCGACATCAT-3'

5'-TGTACAGGATGGCGATGCA-3'

HMGCS1

5'-GACATTGCTATATATGCCACAGGAA-3'

5'-CAGGGCCACAGCTCCAAC-3'

ACL

5'-TGGAGGCAGCATTGCAAAC-3'

5'-TCTCACAATGCCCTTGAAGGT-3'

ACC1

5'-TGAAGCAGATCCGCAGCTT-3'

5'-GGTGAGATGTGCTGGGTCATG-3'

ACC2

5'-ATACTTTCAGAAACGACCATATTCGA-3'

5'-CGCCATACAGACAACCTTGTTTC-3'

FAS

5'-AAGTGTCTGGACTGTGTCATTTTTACA-3'

5'-TTAATTGTGGGATCAGGAGAGCAT-3'

SCOT

5'-GGAAAAGGCAAATCCGGTAAG-3'

5'-GCGGCTCGCTTGATGATC-3'

(3) Western blotting

第 1 章に関する実験の部を参照。

(4) 共焦点顕微鏡

Neuro-2a 細胞をカバーガラス上で培養した。4% paraformaldehyde を含有した PBS 中で細胞を 15 分間固定した後、0.1% (v/v) Triton X-100 中で 5 分間放置し透過処理を行った。3% (w/v) BSA 中で 30 分間ブロッキングし、その後 AACs 抗体を加えた Can get signal immunostain solution A (TOYOBO) 溶液中で 4 度、一晩かけ抗原抗体反応を行った。細胞を 0.1% BSA を含有した PBS で洗浄した後、Alexa-fluor 488 二次抗体を希釈した Can get signal immunostain solution B (TOYOBO) 溶液に浸し室温、1 時間反応した。細胞を 1 mg/mL RNase を含む PBS に浸し、次に propidium iodide 溶液中で 15 分間静置した後、PBS (0.1% BSA) 溶液で洗浄し、Mowiol mounting solution を用いて細胞を封入した。デジタル画像は Confocal laser scanning microscope (Bio-Rad) を使用して取得した。

(5) ChIP assay

第二章に関する実験の部を参照。

(6) RNA 干渉

SREBP-2 の発現を抑制するために SREBP-2 に対する設計済み siRNA (siSREBP-2, Dharmacon) を使用した。Neuro-2a 細胞に 40 nM の siSREBP-2 を LipofectAMINE RNAi MAX Reagent (Invitrogen) を用いて導入し、24 時間培養後 10 μ M RA (Sigma) 含む無血清 E-MEM 培地中で培養し、更に 24 時間培養した後 total RNA を回収した。

(7) 初代培養神経細胞

マウスの大脳皮質初代培養細胞は、胎生期 14 日目の胎児の脳を用いて過去に報告された調製法を改変し作製した⁸⁹⁾。単離した大脳皮質を 15 units papain (Worthington) および 0.01% DNase1 (Roche) 中で 20 分間温置した。細胞は 2% MACS Supplement B-27 (Miltenyi Biotec)、2 mM L-glutamine (Invitrogen) および penicillin/streptomycin を含む Neurobasal medium (Miltenyi Biotec) 培地に希釈し、poly-L-lysine コートディッシュ (IWAKI) に播種した。3 日後に 4 μ M Cytosine β -D-arabinofuranoside を加え非神経細胞の増殖を阻害した。

(8) ウイルス調製

第一章に関する実験の部を参照。

神経細胞を播種した翌日にウイルスを感染させ、2 日後に培地を交換した。以後、5 日ごとに新しい培地に交換し培養開始から 15 日後に実験に供した。

参考文献

- 1) Wieland O: Ketogenesis and its regulation. *Adv. Metab. Disord.*, **3**, 1-47 (1968).
- 2) Koper JW, Lopes-Cardozo M, Van Golde LM: Preferential utilization of ketone bodies for the synthesis of myelin cholesterol in vivo. *Biochim. Biophys. Acta.*, **666**, 411-417 (1981).
- 3) MacDonald MJ, Smith AD, 3rd, Hasan NM, Sabat G, Fahien LA: Feasibility of pathways for transfer of acyl groups from mitochondria to the cytosol to form short chain acyl-CoAs in the pancreatic beta cell. *J. Biol. Chem.*, **282**, 30596-30606 (2007).
- 4) Bates MW, Krebs HA, Williamson DH: Evidence for the existence of an extramitochondrial pathway of acetoacetate synthesis in rat liver. *Biochem. J.*, **104**, 59P (1967).
- 5) Lynen F, Henning U, Bublitz C, Sorbo B, Kroplin-Rueff L: [The chemical mechanism of acetic acid formation in the liver]. *Biochem. Z.*, **330**, 269-295 (1958).
- 6) Williamson DH, Mellanby J, Krebs HA: Enzymic determination of D(-)-beta-hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood. *Biochem. J.*, **82**, 90-96 (1962).
- 7) Green DE, Dewan JG, Leloir LF: The beta-hydroxybutyric dehydrogenase of animal tissues. *Biochem. J.*, **31**, 934-949 (1937).
- 8) Stadie WC: Ketogenesis. *Diabetes*, **7**, 173-180 (1958).
- 9) Green DE, Goldman DS, Mii S, Beinert H: The acetoacetate activation and cleavage enzyme system. *J. Biol. Chem.*, **202**, 137-150 (1953).
- 10) Olson RE: Effect of pyruvate and acetoacetate on the metabolism of fatty acids by the perfused rat heart. *Nature*, **195**, 597-599 (1962).
- 11) Williamson DH, Bates MW, Page MA, Krebs HA: Activities of enzymes involved in acetoacetate utilization in adult mammalian tissues. *Biochem. J.*, **121**, 41-47 (1971).
- 12) Robinson AM, Williamson DH: Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol. Rev.*, **60**, 143-187 (1980).
- 13) McGarry JD, Foster DW: Regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketone body production. *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 395-420 (1980).

- 14) Cotter DG, d'Avignon DA, Wentz AE, Weber ML, Crawford PA: Obligate role for ketone body oxidation in neonatal metabolic homeostasis. *J. Biol. Chem.*, **286**, 6902-6910 (2011).
- 15) Blecher M, Gurin S: The conversion of radioactive acetoacetate to cholesterol by surviving rat liver slices. *J. Biol. Chem.*, **209**, 953-962 (1954).
- 16) Chen RW, Chapman DD, Chaikoff IL: Acetoacetate conversion to fatty acids in liver: the role of insulin and the nutritional state of the animal. *J. Biol. Chem.*, **205**, 383-393 (1953).
- 17) Ito M, Fukui T, Kamokari M, Saito T, Tomita K: Purification and characterization of acetoacetyl-CoA synthetase from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.*, **794**, 183-193 (1984).
- 18) Yeh YY, Ginsburg JR, Tso TB: Changes in lipogenic capacity and activities of ketolytic and lipogenic enzymes in brain regions of developing rats. *J. Neurochem.*, **40**, 99-105 (1983).
- 19) Williamson DH, Ilic V: Activities of enzymes of acetoacetate metabolism in rat brown adipose tissue during development. *Biochem. J.*, **231**, 773-775 (1985).
- 20) Buckley BM, Williamson DH: Acetoacetyl-CoA synthetase; a lipogenic enzyme in rat tissues. *FEBS Lett.*, **60**, 7-10 (1975).
- 21) Bergstrom JD, Wong GA, Edwards PA, Edmond J: The regulation of acetoacetyl-CoA synthetase activity by modulators of cholesterol synthesis in vivo and the utilization of acetoacetate for cholesterologenesis. *J. Biol. Chem.*, **259**, 14548-14553 (1984).
- 22) Rous S: Fasting and insulin regulation of the utilization of acetoacetate for fatty acid synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **179**, 328-333 (1977).
- 23) Tisdale MJ: Role of acetoacetyl-CoA synthetase in acetoacetate utilization by tumor cells. *Cancer Biochem. Biophys.*, **7**, 101-107 (1984).
- 24) Endemann G, Goetz PG, Edmond J, Brunengraber H: Lipogenesis from ketone bodies in the isolated perfused rat liver. Evidence for the cytosolic activation of acetoacetate. *J. Biol. Chem.*, **257**, 3434-3440 (1982).
- 25) Patel MS, Owen OE: Lipogenesis from ketone bodies in rat brain. Evidence for conversion of acetoacetate into acetyl-coenzyme A in the cytosol. *Biochem. J.*, **156**, 603-607 (1976).
- 26) Fukui T, Ito M, Tomita K: Purification and characterization of

- acetoacetyl-CoA synthetase from *Zoogloea ramigera* I-16-M. *Eur. J. Biochem.*, **127**, 423-428 (1982).
- 27) Nakamoto M, Takahashi N, Iwahori A, Sato H, Fukui T: Effects of development on acetoacetyl-CoA synthetase biosynthesis in rat liver. *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 981-983 (1999).
 - 28) Yamasaki M, Hasegawa S, Suzuki H, Hidai K, Saitoh Y, Fukui T: Acetoacetyl-CoA synthetase gene is abundant in rat adipose, and related with fatty acid synthesis in mature adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **335**, 215-219 (2005).
 - 29) Iwahori A, Takahashi N, Nakamoto M, Iwama M, Fukui T: cDNA-derived amino acid sequence of acetoacetyl-CoA synthetase from rat liver. *FEBS letters.*, **466**, 239-243 (2000).
 - 30) Fujioka T, Nara F, Tsujita Y, Fukushige J, Fukami M, Kuroda M: The mechanism of lack of hypocholesterolemic effects of pravastatin sodium, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, in rats. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1254**, 7-12 (1995).
 - 31) McKnight S, Tjian R: Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell*, **46**, 795-805 (1986).
 - 32) Ramji DP, Foka P: CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem. J.*, **365**, 561-575 (2002).
 - 33) Lane MD, Tang QQ, Jiang MS: Role of the CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **266**, 677-683 (1999).
 - 34) Lenhard JM: Lipogenic enzymes as therapeutic targets for obesity and diabetes. *Curr. Pharm. Des.*, **17**, 325-331 (2011).
 - 35) White UA, Stephens JM: Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Mol. Cell Endocrinol.*, **318**, 10-14 (2010).
 - 36) Tang QQ, Lane MD: Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes. Dev.*, **13**, 2231-2241 (1999).
 - 37) Miller SG, De Vos P, Guerre-Millo M, Wong K, Hermann T, Staels B, Briggs MR, Auwerx J: The adipocyte specific transcription factor C/EBPalpha modulates human ob gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 5507-5511 (1996).

- 38) Ross SE, Erickson RL, Gerin I, DeRose PM, Bajnok L, Longo KA, Misek DE, Kuick R, Hanash SM, Atkins KB, Andresen SM, Nebb HI, Madsen L, Kristiansen K, MacDougald OA: Microarray analyses during adipogenesis: understanding the effects of Wnt signaling on adipogenesis and the roles of liver X receptor alpha in adipocyte metabolism. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 5989-5999 (2002).
- 39) Samson SL, Wong NC: Role of Sp1 in insulin regulation of gene expression. *J. Mol. Endocrinol.*, **29**, 265-279 (2002).
- 40) Zhu Q, Liao K: Differential expression of the adipocyte amino acid transporter is transactivated by SP1 and SP3 during the 3T3-L1 preadipocyte differentiation process. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **271**, 100-106 (2000).
- 41) Chung SS, Choi HH, Kim KW, Cho YM, Lee HK, Park KS: Regulation of human resistin gene expression in cell systems: an important role of stimulatory protein 1 interaction with a common promoter polymorphic site. *Diabetologia*, **48**, 1150-1158 (2005).
- 42) Wada T, Shimba S, Tezuka M: Transcriptional regulation of the hypoxia inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) gene during adipose differentiation in 3T3-L1 cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 49-54 (2006).
- 43) Camarero N, Mascaro C, Mayordomo C, Vilardell F, Haro D, Marrero PF: Ketogenic HMGCS2 Is a c-Myc target gene expressed in differentiated cells of human colonic epithelium and down-regulated in colon cancer. *Mol Cancer Res.*, **4**, 645-653 (2006).
- 44) Freed LE, Endemann G, Tomera JF, Gavino VC, Brunengraber H: Lipogenesis from ketone bodies in perfused livers from streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes*, **37**, 50-55 (1988).
- 45) Ohnuki M, Takahashi N, Yamasaki M, Fukui T: Different localization in rat brain of the novel cytosolic ketone body-utilizing enzyme, acetoacetyl-CoA synthetase, as compared to succinyl-CoA:3-oxoacid CoA-transferase. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1729**, 147-153 (2005).
- 46) Sato H, Takahashi N, Nakamoto M, Ohgami M, Yamazaki M, Fukui T: Effects of streptozotocin-induced diabetes on acetoacetyl-CoA synthetase activity in rats. *Biochem. Pharmacol.*, **63**, 1851-1855 (2002).
- 47) Aguilo F, Camarero N, Relat J, Marrero PF, Haro D: Transcriptional

- regulation of the human acetoacetyl-CoA synthetase gene by PPARgamma. *Biochem. J.*, **427**, 255-264 (2010).
- 48) Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB: ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science*, **324**, 1076-1080 (2009).
 - 49) Merilainen G, Poikela V, Kursula P, Wierenga RK: The thiolase reaction mechanism: the importance of Asn316 and His348 for stabilizing the enolate intermediate of the Claisen condensation. *Biochemistry*, **48**, 11011-11025 (2009).
 - 50) Salam WH, Wilcox HG, Cagen LM, Heimberg M: Stimulation of hepatic cholesterol biosynthesis by fatty acids. Effects of oleate on cytoplasmic acetoacetyl-CoA thiolase, acetoacetyl-CoA synthetase and hydroxymethylglutaryl-CoA synthase. *Biochem. J.*, **258**, 563-568 (1989).
 - 51) Agius L, Williamson DH: The utilization of ketone bodies by the interscapular brown adipose tissue of the rat. *Biochim. Biophys. Acta.*, **666**, 127-132 (1981).
 - 52) Nishio E, Tomiyama K, Nakata H, Watanabe Y: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor impairs cell differentiation in cultured adipogenic cells (3T3-L1). *Eur. J. Pharmacol.*, **301**, 203-206 (1996).
 - 53) Tomiyama K, Nishio E, Watanabe Y: Both wortmannin and simvastatin inhibit the adipogenesis in 3T3-L1 cells during the late phase of differentiation. *Jpn. J. Pharmacol.*, **80**, 375-378 (1999).
 - 54) Goto T, Nagai H, Egawa K, Kim YI, Kato S, Taimatsu A, Sakamoto T, Ebisu S, Hohsaka T, Miyagawa H, Murakami S, Takahashi N, Kawada T: Farnesyl pyrophosphate regulates adipocyte functions as an endogenous PPARgamma agonist. *Biochem. J.*, **438**, 111-119 (2011).
 - 55) Lingwood D, Simons K: Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, **327**, 46-50 (2010).
 - 56) Ferre P, Foufelle F: Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes. Metab.*, **12 Suppl 2**, 83-92 (2010).
 - 57) Mashima T, Seimiya H, Tsuruo T: De novo fatty acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *Br. J. Cancer.*, **100**,

- 1369-1372 (2009).
- 58) Bauer DE, Hatzivassiliou G, Zhao F, Andreadis C, Thompson CB: ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene*, **24**, 6314-6322 (2005).
 - 59) Mitchell GA, Kassovska-Bratinova S, Boukaftane Y, Robert MF, Wang SP, Ashmarina L, Lambert M, Lapierre P, Potier E: Medical aspects of ketone body metabolism. *Clin. Invest. Med.*, **18**, 193-216 (1995).
 - 60) Laffel L: Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **15**, 412-426 (1999).
 - 61) Brown MS, Goldstein JL: The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, **89**, 331-340 (1997).
 - 62) Cenedella RJ: Cholesterol synthesis inhibitor U18666A and the role of sterol metabolism and trafficking in numerous pathophysiological processes. *Lipids*, **44**, 477-487 (2009).
 - 63) Worgall TS, Johnson RA, Seo T, Gierens H, Deckelbaum RJ: Unsaturated fatty acid-mediated decreases in sterol regulatory element-mediated gene transcription are linked to cellular sphingolipid metabolism. *J. Biol. Chem.*, **277**, 3878-3885 (2002).
 - 64) Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, Goldstein JL: Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 12027-12032 (2003).
 - 65) Vallett SM, Sanchez HB, Rosenfeld JM, Osborne TF: A direct role for sterol regulatory element binding protein in activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene. *J. Biol. Chem.*, **271**, 12247-12253 (1996).
 - 66) Hua X, Yokoyama C, Wu J, Briggs MR, Brown MS, Goldstein JL, Wang X: SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 11603-11607 (1993).
 - 67) Weber LW, Boll M, Stampfl A: Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding proteins. *World J. Gastroenterol.*, **10**,

- 3081-3087 (2004).
- 68) Liu F, Song Y, Liu D: Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.*, **6**, 1258-1266 (1999).
 - 69) Dietschy JM, Turley SD: Cholesterol metabolism in the brain. *Curr. Opin. Lipidol.*, **12**, 105-112 (2001).
 - 70) Herrera E, Amusquivar E: Lipid metabolism in the fetus and the newborn. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **16**, 202-210 (2000).
 - 71) Fukata Y, Fukata M: Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.*, **11**, 161-175 (2010).
 - 72) Ohgami M, Takahashi N, Yamasaki M, Fukui T: Expression of acetoacetyl-CoA synthetase, a novel cytosolic ketone body-utilizing enzyme, in human brain. *Biochem. Pharmacol.*, **65**, 989-994 (2003).
 - 73) Hasegawa S, Yamasaki M, Inage T, Takahashi N, Fukui T: Transcriptional regulation of ketone body-utilizing enzyme, acetoacetyl-CoA synthetase, by C/EBPalpha during adipocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1779**, 414-419 (2008).
 - 74) Herrera E: Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine.*, **19**, 43-55 (2002).
 - 75) Seeds AE, Leung LS, Stys SJ, Clark KE, Russell PT: Comparison of human and sheep chorion laeve permeability to glucose, beta-hydroxybutyrate, and glycerol. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **138**, 604-608 (1980).
 - 76) Alonso de la Torre SR, Serrano MA, Medina JM: Carrier-mediated beta-D-hydroxybutyrate transport in brush-border membrane vesicles from rat placenta. *Pediatr. Res.*, **32**, 317-323 (1992).
 - 77) Funfschilling U, Jockusch WJ, Sivakumar N, Mobius W, Corthals K, Li S, Quintes S, Kim Y, Schaap IA, Rhee JS, Nave KA, Saher G: Critical Time Window of Neuronal Cholesterol Synthesis during Neurite Outgrowth. *J. Neurosci.*, **32**, 7632-7645 (2012).
 - 78) Suzuki S, Kiyosue K, Hazama S, Ogura A, Kashihara M, Hara T, Koshimizu H, Kojima M: Brain-derived neurotrophic factor regulates cholesterol metabolism for synapse development. *J. Neurosci.*, **27**, 6417-6427 (2007).
 - 79) Suzuki R, Lee K, Jing E, Biddinger SB, McDonald JG, Montine TJ, Craft S, Kahn CR: Diabetes and insulin in regulation of brain cholesterol

- metabolism. *Cell Metab.*, **12**, 567-579 (2010).
- 80) Chen C, Wirth A, Ponimaskin E: Cdc42: an important regulator of neuronal morphology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **44**, 447-451 (2012).
- 81) Dent EW, Gupton SL, Gertler FB: The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **3**, (2011).
- 82) Deller T, Korte M, Chabanis S, Drakew A, Schwegler H, Stefani GG, Zuniga A, Schwarz K, Bonhoeffer T, Zeller R, Frotscher M, Mundel P: Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 10494-10499 (2003).
- 83) Nagashima S, Yagyu H, Ohashi K, Tazoe F, Takahashi M, Ohshiro T, Bayasgalan T, Okada K, Sekiya M, Osuga J, Ishibashi S: Liver-specific deletion of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase causes hepatic steatosis and death. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **32**, 1824-1831 (2012).
- 84) Takahashi H, McCaffery JM, Irizarry RA, Boeke JD: Nucleocytosolic acetyl-coenzyme a synthetase is required for histone acetylation and global transcription. *Mol. Cell*, **23**, 207-217 (2006).
- 85) Weiner MP, Costa GL, Schoettlin W, Cline J, Mathur E, Bauer JC: Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene*, **151**, 119-123 (1994).
- 86) Agata Y, Katakai T, Ye SK, Sugai M, Gonda H, Honjo T, Ikuta K, Shimizu A: Histone acetylation determines the developmentally regulated accessibility for T cell receptor gamma gene recombination. *J. Exp. Med.*, **193**, 873-880 (2001).
- 87) Miyazaki M, Mars WM, Runge D, Kim TH, Bowen WC, Michalopoulos GK: Phenobarbital suppresses growth and accelerates restoration of differentiation markers of primary culture rat hepatocytes in the chemically defined hepatocyte growth medium containing hepatocyte growth factor and epidermal growth factor. *Exp. Cell. Res.*, **241**, 445-457 (1998).
- 88) Ito M, Fukui T, Saito T, Tomita K: Acetoacetyl-CoA synthetase specific activity and concentration in rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta.*, **876**, 280-287 (1986).
- 89) Zheng S, Eacker SM, Hong SJ, Gronostajski RM, Dawson TM, Dawson VL:

NMDA-induced neuronal survival is mediated through nuclear factor I-A in mice. *J. Clin. Invest.*, **120**, 2446-2456 (2010).