
研究報文

速度論に基づくマウス脂肪細胞分化過程の解析

朝日 まどか, 池谷 千咲, 吉良 奈美子, 小西 由佳, 小堀 美佳,
辻 ひとみ, 綱井 典子, 村山 涼子, 大和 亜紗,
山本 咲也夏, 宮田 堅司

Analysis of the Adipocyte-Differential Process of Mouse by Kinetics

Madoka Asahi, Chisa Ikeya, Namiko Kira, Yuka Konishi, Mika Kohori,
Hitomi Tsuji, Noriko Tsunai, Ryoko Murayama, Asa Yamato, Sayaka Yamamoto
and Kenji Miyata

Summary

It is possible to determine rate kinetic constants for cell-differential processes in vivo through the measurement of the transcription-ratio of some genes by real-time PCR(1). In the previous paper, the differentiation of adipocytes was investigated and rate constants for the processes, at which PPAR γ -expressing cells differentiated into AD(adiponectin)- or Re(resistin)-expressing cells, were determined in the thymus of BALB/c mouse(2). In this paper, the rate constant for the process of PPAR γ -expressing cells changing to HSL(hormone sensitive lipase)-expressing cells. Considering both results, it was concluded that PPAR γ -expressing cells change to express HSL firstly, AD secondly and then Re in adipocytes-differential process.

(Received September 11, 2010)

I. はじめに

生体内であっても、細胞が分化段階に応じて発現する複数の遺伝子間の転写量比の加齢変化を、リアルタイムPCR法で測定することにより、それらの遺伝子を発現する分化段階間の分化の速度定数を求めることが可能である¹⁾。前報では、この方法にしたがって、マウス胸腺でのPPAR γ (PR)、アディポネクチン (Ad) およびレジスチン (Re) の転写量比の加齢変化を測定し、脂肪細胞系列の細胞が、PRを転写する分化段階からAdおよびReを転写する段階へと変わる分化の速度定数を求めた²⁾。

胸腺は、マウスでは、胎生12日頃に第3咽頭溝に由来する上皮様細胞から原基が形成され、幹細胞が流入し、上皮様細胞の影響下にリンパ球様の胸腺

細胞へと分化する³⁾。出生後、リンパ球の増殖により胸腺は急激に増大し、生後数週齢で最大となり、その後リンパ球の減少により退縮する。この退縮に伴い、トラベキュラや被膜に脂肪細胞が増殖し、リンパ球領域が脂肪細胞で置換された様相を呈する様になる⁴⁾。胸腺は脂肪細胞の分化過程を検討するのに適している。

本報では、脂肪細胞系列の細胞が発現することが知られているホルモン感受性リパーゼ (HSL)⁵⁾ と PR⁶⁾ の転写量比をリアルタイムPCR法で測定し、PR転写段階の細胞からHSL転写段階の細胞へと変わる過程の分化の速度定数を求めた。また、その結果を、前報の結果と比較することにより、マウス胸腺での脂肪細胞分化過程において、PR転写細胞からHSL、Ad、Re転写細胞へと分化する順を明らかにした。

II. 方法

1. 材料

コンベンショナルな条件下で飼育した雌雄の BALB/c マウスを用いた。出生後 3 週間は母親マウスと同居させ、21 日齢で分離した。固型飼料 (MF, オリエンタル酵母) および水道水は自由に摂取させた。頸椎脱臼させたマウスより胸腺を摘出し、サンプルチューブに入れ直ちに液体窒素中で凍結した後、 -80°C で保存した。

2. トータル RNA の抽出, 逆転写反応およびリアルタイム PCR

凍結した組織より、酸性グアニジンチオシアン酸-フェノール-クロロホルム法によってトータル RNA を抽出した⁷⁾。精製したトータル RNA を、濃度 $100\text{ng}/\mu\text{l}$ に調整し、 300ng を鋳型として逆転写反応を行った。逆転写反応は M-MLV リバーストランスクリプターゼ (ReverTra Ace-a, 東洋紡), oligo dT20 プライマーを用い、メーカーのプロトコールに従い、 30°C で 10 分間、さらに 42°C で 20 分間行った。 99°C で 5 分間処理することにより反応を停止させるとともに鋳型 RNA を分解した。この反応産物を水で 15 倍に希釈し、リアルタイム PCR (Line Gene, Bio Flux) の試料溶液とした。リアルタイム PCR は、メーカーのプロトコールに従い、SYBR Green mix (Real time PCR Master Mix, 東洋紡) $7.5\mu\text{l}$, forward primer および reverse primer ($4\text{ pmol}/\mu\text{l}$) を各 $1.5\mu\text{l}$, 試料溶液 $4.5\mu\text{l}$, 合計 $15\mu\text{l}$ を反応溶液とした。PCR 反応では、 95°C 10 分の前処理の後、変性 94°C 15 秒, アニーリング 60°C 15 秒, 伸長反応 72°C 30 秒のサイクルを 45 回行い、各サイクルの伸長反応終了時点毎に蛍光強度を測定し、PR および HSL の

増幅曲線を得た。

増幅反応終了後に、増幅された DNA の融点解析を行い、増幅された DNA が均一なものであることを確認した。PR および HSL の増幅反応に用いたプライマーを下記に示す。

プライマー PR-R CTGACCCAATGGTTGCTGAT

プライマー PR-F GAGCTGGGTCTTTTCAGAAT

プライマー HSL-RTGACCCGAGTCATCTAGCATG

プライマー HSL-F CAGGATGACACCAAAACCCT

これらのプライマーは、少なくとも一つのイントロン領域を間を含むエクソン領域に相補的に結合し、110塩基対の DNA フラグメントが増幅されるように設定した。

3. 転写量比の測定

リアルタイム PCR のインターカレーター法では、増幅された 2 本鎖 DNA に取り込まれた色素が励起されて発する蛍光強度を測定することにより、増幅曲線がリアルタイムに得られる。増幅曲線より、それぞれ蛍光強度が一定値に達するまでに要した PCR のサイクル数 n_p , n_H を読み取った。試料溶液中に存在した PR と HSL のコピー数比の常用対数値 $\log \text{HSL}/\text{PR}$ は ①式により求めた⁸⁾。

$$\log \frac{\text{HSL}}{\text{PR}} = (n_p - n_H) \log 2 \quad \text{①}$$

III. 結果および考察

BALB/c 雌雄マウス胸腺での転写量比 $\log \text{HSL}/\text{PR}$ の加齢変化の測定値を図 1 に示した。生後数週間は PR の転写量が HSL の転写量を上回り負の値となったが、その後、正の値をとる傾向を示した。

前報と同様に、図 2 に示した様な分化過程を考え

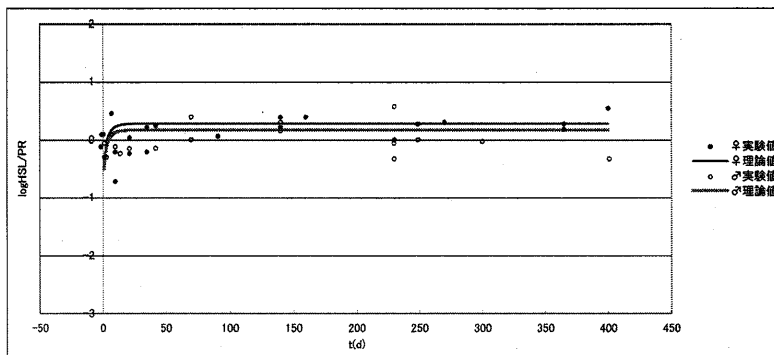


図 1 転写量比 $\log \text{HSL}/\text{PR}$ の加齢変化

転写量比 $\log \text{HSL}/\text{PR}$ は、雌 (●) 雄 (○) ともに、出生後数週間で増大し正の値となり、その後はほぼ一定となった。表 1 に示した速度定数 k_1 および a の値を用いて、②式により計算した理論値も示した。

る。



図 2 マウス脂肪細胞の分化過程

PPAR γ を転写する細胞は分化初期の細胞であり、ホルモン感受性リパーゼを転写する細胞へと分化する。S は幹細胞、PR は PPAR γ 転写細胞、HSL はホルモン感受性リパーゼ転写細胞を表す。k₀, k₁, および k₂ は各分化過程の速度定数を表す。

ここで、S は脂肪細胞系列の幹細胞を、PR および HSL は、それぞれの転写細胞を表し、k₀, k₁ および k₂ は各分化過程の速度定数である。PR および HSL の転写量は、それらの転写細胞数に比例すると仮定すると、転写量比の加齢変化の理論値は

$$\log \frac{[HSL]}{[PR]} = \log(1 - e^{-at}) - \log a \quad (2)$$

で与えられる²⁾。ここで、[HSL] および [PR] は、それぞれ HSL および PR 転写細胞濃度を表し、t は日齢、a は転写量と転写細胞数との比例定数等を含めた定数である。

②式は、t > 1 の場合

$$\log \frac{[HSL]}{[PR]} = -\log a \quad (3)$$

t < 1 の場合

$$\log \frac{[HSL]}{[PR]} = \log t + \log k_1 - \log a \quad (4)$$

となり、実測値 log HSL/PR を log t に対してプロットした図 3 より、定数 a および速度定数 k₁ を求めた結果を表 1 に示した。また、これらの値を用いて②式により計算した加齢変化の理論値は実験値と良く一致した (図 1)。

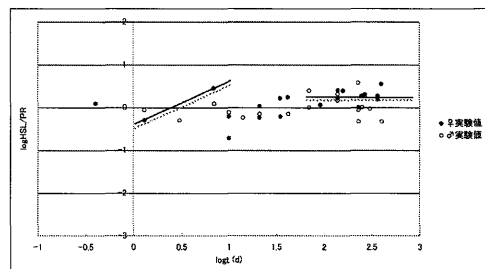


図 3 速度定数 k₁ および a の決定

log HSL/PR の測定値を log t に対してプロットした。t が大きい領域の値から -log a の値が、また、log t が小さい領域で傾き 1 の直線を log t → 0 に外挿することにより log k₁ - log a の値が求まる。

表 1 には、前報で求めた Ad および Re の場合の定数 a および速度定数 k₁ の値も示した。PR に対する転写量比から判断すると、転写量は Ad および Re と比較して HSL の方が少なく、およそ 1/10 であった。AD と比較すると、PR から分化する速度定数 k₁ の値は、HSL の方がわずかに大きかった。このことは、脂肪細胞系列の分化過程において、PPAR γ を転写する段階の細胞から、HSL を転写する様になり、少し遅れて Ad を転写する様になることを示している。Re を転写する細胞への分化は、これらよりもさらに遅れることが明らかとなった。ノザンブロットや RTPCR で検出し、特定の遺伝子の転写開始順を明らかにする従来の方法は、転写量の影響を受け易い。今回示した様に、転写量に差異があっても、ある基準状態から分化する速度定数を求めて比較するならば、より正確に転写開始順を決定することが可能である。

		k ₁ (1/d)	a
雌	HSL	0.207	0.524
	Ad	0.169	0.055
	Re	0.0607	0.055
雄	HSL	0.240	0.679
	Ad	0.232	0.075
	Re	0.156	0.075

表 1 速度定数 k₁ および定数 a の値

IV. 要約

BALB/c マウスの胸腺での脂肪細胞の分化過程を、PPAR γ (PP) に対するホルモン感受性リパーゼ (HSL) の転写量を指標として、リアルタイム PCR 法により検討した。PP に対する HSL の転写量比は、生後直後は 1 より小さかったが、その後増大し一定値となった。この加齢変化を、遺伝子の転写量は、その転写細胞数に比例すると仮定することにより、また、脂肪細胞系列の幹細胞を考えることにより、速度論により説明することができた。この速度論に基づく方法は、細胞の分化過程で発現する遺伝子の発現順を決定することに応用できることを示した。

文献

- 1) 楠本瑠美, 長尾由貴子, 橋本珠実, 舟木真知子, 三仲亜季子, 森林さやか, 山田浄, 宮田堅司: 本誌 62, 13 (2007)

- 2) 清水里枝, 竹内亜里沙, 田中麻由里, 玉井千晶, 中西美貴, 西尾依里奈, 二田智恵子, 宮崎木綿子, 山口文乃, 宮田堅司: 本誌 64, 11 (2009)
- 3) R. Rugh: *The Mouse, Its Reproduction and Development* (Burgess Publishing), 253 (1968)
- 4) D.E.Kelly, R.L.Wood and A.G.Enders: *BAILEY'S TEXTBOOK OF MICROSCOPIC ANATOMY*, 18th ed. (Williams & Wilkins), 453 (1984)
- 5) H.Mulder, M.W.Sorhede, A.J.Contreras, M.Fex, K.Strom, T.Ploug, H.Galbo, P.Arner, C.Lundberg, F.Sundler, B.Ahren and C.Holm: *J.Biol.Chem.*, 278, 36380 (2003)
- 6) P.Tontonoz, A.R.Graves, I.A.Budavari and M.B. Spiegelman: *Genes & Dev.*, 8, 1224 (1994)
- 7) P. Chomczynski and N. Sacchi: *Analytical Biochem.*, 162, 156 (1987)
- 8) 安達綾希子, 井上摩耶, 大野理絵, 城清佳, 長尾美沙子, 宮田堅司: 本誌 61, 7 (2006)