

学位申請論文

カロリー制限による 白色脂肪組織の代謝リモデリングと その新規制御メカニズム

平成 30 年 3 月

成田 匠

目次

略語表	1
<hr/>	
論文要旨	4
<hr/>	
序論	7
<hr/>	
はじめに	8
カロリー制限とその効果	9
カロリー制限と GH/IGF1 シグナル	9
霊長類におけるカロリー制限の効果	10
カロリー制限における脂肪組織	10
カロリー制限における脂質代謝	12
目的	12
<hr/>	
第一章 Srebp-1c を介したカロリー制限の効果	13
<hr/>	
背景	14
材料と方法	15
結果	22
考察	26
Figure	30
<hr/>	
第二章 部位別 WAT における CR への応答の相違	49
<hr/>	
背景	50
材料と方法	51
結果	54
考察	57
Figure	60

第三章 WAT における CR 期間による脂肪酸合成への影響	75
背景	76
材料と方法	78
結果	81
考察	84
Figure	86
第四章 Mipep がミトコンドリア機能に与える影響	97
背景	98
材料と方法	101
結果	106
考察	108
Figure	110
総括	119
参考文献	124
謝辞	146

略語表

3-HB	3-hydroxybutyric acid
ACADL	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
ACC	Acetyl-CoA carboxylase
AceCS2	Acetyl-CoA synthase 2
ACLY	ATP citrate lyase
AL	<i>ad libitum</i>
AKT	Thymoma viral proto-oncogene 1
ATGL	adipose triglyceride lipase
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding proteins
CBB	Coomassie brilliant blue
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
Chol	Cholesterol
COX IV	Cytochrome c oxidase subunit 4
CR	Caloric restriction
CS	Citrate synthase
CT	Computed Tomography
DHEAS	Dehydroepiandrosterone sulfate
DNA	Deoxyribo nucleic acid
DTNB	5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic) acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ERR	Estrogen related receptor
eWAT	Epididymal WAT
FASN	Fatty acid synthase
γ -GCS	γ -glutamyl-cysteine synthetase
Gclc	Glutamate-cysteine ligase
GH	Growth hormone
GHR/BP	Growth hormone receptor/binding protein
GSH	Glutathione (reduced form)
GSSG	Glutathione (oxidized form)

HDACs	Histone deacetylases
HE	Hematoxylin-Eosin
HSL	Hormone sensitive lipase
IDH2	Isocitrate dehydrogenase 2
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IMP	Inner membrane peptidase
IL-6	Interleulin-6
IR	Insulin receptor
IRS	Insulin receptor substrate
KO	Knockout
MCP-1	Monocyte chemoattractant-1
ME-1	Malic enzyme-1, NADP ⁺ -dependent, cytosolic
MEFs	Murine embryonic fibroblasts
MIPEP	Mitochondrial intermediate peptidase
MPP	Mitochondrial processing peptidase
MtSPases	Mitochondrial signal peptidases
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NEFA	Non-esterified fatty acid
NIA	National Institute on Aging
Oct1	Octapeptidyl aminopeptidase 1
PCI	Phenol / Chloroform / Isoamylalcohol
Pgc-1	Peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator 1
ROS	Reactive oxygen species
rWAT	Retroperitoneal WAT
SIRT	Sirtuin
SOD	Superoxide dismutase
SREBP-1c	Sterol regulatory element binding protein-1c
Sir2	Silence information regulator 2
sWAT	Subcutaneous WAT
TCA	Tricarboxylic acid
TG	Triglyceride
TNF α	Tumor necrosis factor- α Translocase of the inner membrane
TIM	Translocase of the inner membrane

TOM20	Translocase of outer mitochondrial membrane 20
WAT	White adipose tissue
WHO	World Health Organization
WNPRC	Wisconsin National Primate Research Center
WT	Wild type

論文要旨

平成 28 年現在、日本の総人口に対する高齢者の割合は 27.3%であり、すでに超高齢社会を迎えている。また、平成 27 年現在で世界の総人口に対する高齢者の割合は 8.3%であるが、平成 72 年には 18.1%になると予測され、今後半世紀の間に世界規模で高齢化が急速に進展する。日本の平均寿命と健康寿命の差は、平成 22 年で、男性 9.13 年、女性 12.68 年であるが、急速に進む高齢化に対して平均寿命と健康寿命の差は縮まらず、これを改善することは喫緊の課題となっている。これらの問題を解決するために、「老化・寿命」を制御するメカニズムを解明して、その知見を基盤に老化プロセスを薬理的・栄養学的にコントロールする必要がある。このメカニズムを解明するべく注目されているのが、老化研究における中心的な科学モデルであるカロリー制限 (CR; caloric restriction) に関する研究である。

CR とは生存に必要な栄養素を与えたうえで、継続的に総摂取カロリーを適度に制限する方法である。齧歯類などの実験動物においては、摂取カロリーを自由摂食 (AL; *ad libitum*) 群の 60~70% 程度に制限することが多い。CR による寿命延伸効果は酵母や線虫から齧歯類を中心とした哺乳類に至るまで幅広い生物種において観察されるので、CR によって活性化される種を超えた普遍的な寿命制御シグナルの存在が示唆される。

CR は、成長ホルモン (GH; growth hormone) の分泌や血漿中 GH 濃度、また、GH 刺激により肝臓などから分泌されるインスリン様成長因子 1 (IGF-1; insulin-like growth factor-1) の血漿中濃度を減少させる。しかし、GH/IGF-1 シグナルが抑制されて長寿である Ames 矮小マウスやアンチセンス GH トランスジェニックラットでは、CR によりさらに寿命が延伸する。これらの知見は、CR の寿命延伸効果が GH/IGF-1 依存的なメカニズムによってのみ制御されているわけではなく、GH/IGF-1 非依存的メカニズムによっても制御されている可能性を示唆するものである。また、白色脂肪細胞選択的に、もしくはアディポカイン遺伝子の発現を修飾することにより寿命が延伸しうることが報告されている。それゆえ、白色脂肪組織 (WAT; white adipose tissue) が寿命制御に重要であることが示唆される。そこで、CR による WAT での遺伝子発現変動を網羅的に解析したところ、GH 非依存的に、脂質代謝関連遺伝子、特に sterol regulatory element binding protein-1 (Srebp-1) に転写制御される脂肪酸合成関連遺伝子の発現が上昇することを見出した。

第一章では Srebp-1c knockout (KO) マウスを使用して、CR のメカニズムを解析した。その結果、以下の点を明らかにした。1) CR は Srebp-1c 依存的に寿命を延伸する。2) CR は Srebp-1c 依存的に脂肪酸合成関連およびミトコンドリア関連タンパク質発現を亢進する。3) CR は Srebp-1c 依存的

にミトコンドリア生合成制御因子である peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator 1 α (Pgc-1 α) 発現を亢進する。4) Srebp-1c が直接的に Pgc-1 α 発現を亢進する。5) CR は Srebp-1c 依存的に酸化ストレスを抑制する。6) CR による2)～5)の変化はおおよそ WAT 選択的に観察される。以上より、Srebp-1c は、WAT において、CR によりミトコンドリア生合成を活性化することでグルコースをよりエネルギー価の高い脂肪酸に変換させ、効率的なエネルギー代謝を促進することで、低栄養状態に対して適応し、また酸化ストレスを抑制し、さらに寿命を延伸する遺伝子であることが示唆された。これらの知見をもとに第二章以降は WAT を中心に研究を進めた。

昨今、脂肪の貯蔵部位による違いもメタボリックシンドロームのリスクと関係すると考えられている。ヒトでは内臓脂肪が増加する中心性肥満はインスリン抵抗性、2 型糖尿病、脂質異常症やアテローム性動脈硬化症と関連しているが、皮下脂肪の増加による末梢性肥満はインスリン感受性の改善、2 型糖尿病、脂質異常症およびアテローム性動脈硬化のリスク低減に寄与している。そこで第二章では、WAT における CR の代謝リモデリング応答をより正確に理解するために、ラットにおいて後腹膜脂肪組織 (rWAT; retroperitoneal WAT)、精巣周囲脂肪組織 (eWAT; epididymal WAT) および皮下脂肪組織 (sWAT; subcutaneous WAT) での CR に対する応答性を比較した。その結果 WAT の体積・重量・脂肪細胞サイズは CR により rWAT、eWAT、sWAT の順で小さくなった。次に、脂質代謝への CR の効果に焦点を当てて解析したところ、全ての WAT で脂肪酸合成関連因子およびミトコンドリア関連因子の発現が CR により同程度増加した。一方、脂質分解関連因子であるホルモン感受性リパーゼのリン酸化が rWAT と eWAT では CR 群の fed 時に、sWAT では CR 群の fasted 時に亢進した。また、インスリンシグナルの指標となる AKT のリン酸化は CR により sWAT でのみ亢進した。CR による脂質代謝への影響は、sWAT ではインスリンシグナルの寄与が強く、rWAT、eWAT ではレプチンなどインスリン以外のシグナルの寄与が強いことが示唆された。

第三章では、CR の効果における経時的な代謝リモデリングを解明するために、ラットの WAT および肝臓において脂肪酸合成に関連する mRNA およびタンパク質発現を経時的に解析した。その結果、WAT において、*de novo* 脂肪酸合成関連 mRNA およびタンパク質発現は 3.5 ヶ月齢で顕著に発現が増加した後に 5 ヶ月齢まで減少し、その後 9 ヶ月齢まで増加した。一方で、この変動は肝臓では見られなかったため、CR の脂肪酸合成に関する効果は WAT 特異的であることが強調された。今回のモデルにおいては、CR 期間 2 ヶ月を境に前半はエネルギー不足に対する適応応答 (短期 CR)、後半は CR による有益な代謝リモデリング (長期 CR) を示しており、特に *de novo* 脂肪酸合成の活性化は前者がインスリンシグナルの活性化により、後者はレプチンシグナルの抑制によって支配される可能性が示唆された。

第四章では、CR によるミトコンドリア活性化の制御機構に着目した。酵母におけるカロリー制限の主要因子として発見された silence information regulator 2 (Sir2) の哺乳類におけるミトコンドリアオソログの 1 つである Sirt3 は、ミトコンドリア局在代謝酵素の活性化や抗酸化因子の活性化、さら

に reactive oxygen species (ROS) によって生ずる傷害タンパク質の分解などミトコンドリアの機能維持や品質管理に重要な脱アセチル化酵素である。多くのミトコンドリアタンパク質は mitochondrial signal peptidase (MtSPase) によって切断されることで活性型になることが知られている。WAT において、CR により Sirt3 のタンパク質発現は亢進するが、mRNA 発現は亢進しなかった。我々は WAT 選択的に CR により 37 kDa の前駆型 Sirt3 タンパク質から 28 kDa の成熟型タンパク質へのプロセッシングが亢進している可能性を発見した。そこで DNA マイクロアレイを用いて CR により発現が増加する MtSPase を網羅的に解析したところ、mitochondrial intermediate peptidase (Mipep) が CR により発現が増加することを見出した。そこで、Mipep mRNA の発現変動を解析したところ、CR により上昇していた。Mipep は mitochondrial matrix processing peptidase (MPP) により切断されたタンパク質を N 末よりオクタペプチドを切断する酵素である。そこで、マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 に Sirt3 を過剰発現させて Sirt3 タンパク質のプロセッシングを確認したところ、二段階のプロセッシングにより成熟型タンパク質となり、活性化することが明らかとなった。さらに、マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1 において shRNA を用いて Mipep をノックダウンしたところ、Mipep の他の基質タンパク質と同様に成熟型 Sirt3 タンパク質は減少し、Sirt3 の標的タンパク質の一つである manganese superoxide dismutase (MnSOD) のアセチル化は増加した。また、同時にクエン酸回路の律速酵素である citrate synthase 活性も減少した。それゆえ、Mipep が Sirt3 の成熟化および活性化のみならずミトコンドリア活性も制御している可能性が示唆された。そこで、個体および組織レベルでの Mipep の役割を明らかにするために、Mipep KO mice を作製した。しかし、全身で Mipep を KO すると胎生致死になった。そこで、Mipep ヘテロマウスを用いて個体および組織への影響を解析することとした。また、現在、脂肪組織特異的 Mipep KO mice を作製中である。

本研究では、CR のメカニズムは WAT 特異的に Srebp-1c が脂質代謝を活性化し、Pgc-1 α を介してミトコンドリアを活性化すること、これらの代謝リモデリングは CR 期間が少なくとも 3 ヶ月以上を有するということが示唆された。また、WAT の部位によっても CR に対する応答が異なることが示された。さらに、CR は MIPEP の発現量を増加させることで SIRT3 のプロセッシングを亢進し、ミトコンドリア機能向上、代謝改善に寄与していることが示された。以上より、健康長寿を実現するには、WAT において Pgc-1 α や Mipep を活性化させて WAT のミトコンドリアを活性化し、かつ品質を向上させることが重要ではないかと考えられる。

序論

はじめに

老化とは、「性成熟期もしくは生殖期後に、時間とともに不可逆的に進行する衰退現象」と定義されている。しかしながら、ヒトは古来より、不老不死や不老長寿の妙薬を求めてきた。最も古い記述は古代メソポタミアにおける「ギルガメシュ叙事詩」にある。この作品は現存する最古の文学作品であり、紀元前 2600 年頃のシュメールの都市国家ウルクに実在したとされる王ギルガメシュの叙事詩で、旧約聖書やギリシャ神話の原型にもなったと言われる。一方、東洋においても始皇帝（紀元前 259 年-紀元前 210 年）が不老不死を求め、徐福を蓬莱の国に行くように命じたことが「史記」に記録されていることは有名な話である。また、李白や白居易が不老不死の薬を作ろうとしたことが知られている。日本においては「古事記」「日本書紀」に食べれば不死になるとされるトキジクノカクという木の実に関する記述や「竹取物語」の最後に不老不死の秘薬に関する記述が登場する。このように、世界中で人々は古来より不老不死を求めてきた。

現代では先進諸国において高齢化が急速に進行している。世界保健機関（WHO; World Health Organization）加盟国 194 カ国を対象とした統計において、世界の平均寿命は 2015 年に 71.4 歳となっている。日本においては 83.7 歳であり、最長寿命国となっている（WHO, World Health Statistics 2017）。この側面から不死とまではいかないが、長寿という目標は達成されつつある。しかし、時代とともに「不老不死」という考え方は変遷し、現在では「健康長寿」、すなわち「老化にともなう疾患の予防および治療への応用」が主な焦点となっている。我が国では、健康日本 21（第 2 次）において、1. 健康寿命の延伸と健康格差の縮小、2. 主要な生活習慣病の発症予防と重症化予防の徹底、3. 社会生活を営むために必要な機能の維持及び向上、4. 健康を支え、守るための社会環境の整備、5. 栄養・食生活、身体活動・運動、休養、飲酒、喫煙及び歯・口腔の健康に関する生活習慣及び社会環境の改善、の 5 つの目標が提案された（厚生労働省告示第四百三十号、平成 24 年 7 月；厚生労働省、健康日本 21（第 2 次）の推進に関する参考資料、平成 24 年 7 月）。

このような目標が設定された背景には、日本における他には類を見ないほどの急激な高齢化および少子化がある。平成 28（2016）年 10 月 1 日現在において、日本の総人口は 1 億 2,693 万人で平成 23（2011）年から減少している一方、65 歳以上の高齢者は 3,459 万人、総人口に対する割合は 27.3%となり、高齢者人口および総人口における割合ともに過去最高となった（内閣府、平成 29 年度版高齢社会白書）。また、2053 年には総人口が 9,924 万人と 1 億人を切り、2065 年には 8,808 万人、65 歳以上の高齢者は 3,381 万人、総人口に対する割合は 38.4%となると推計されている。このような社会背景から国民医療費は年々増大しており、平成 26 年度においては国民医療費 40 兆 8071 億円（前年比 1.9%増）のうち、65 歳以上の国民医療費は 23 兆 9066 億円（対国民医療費 58.6%、前年比 3.4%増）となっており、日本における財政圧迫の原因の一つとなっている（厚生労働省、平成 26 年度 国民医療費の概況）。

これらの問題を解決するには、「老化・寿命」を制御するメカニズムを解明し、そこから老化プロセスを薬理的・栄養学的にコントロールする必要がある。このメカニズムを解明するべく注目されているのが、老化研究における中心的な科学モデルであるカロリー制限 (CR; caloric restriction) に関する研究である。

カロリー制限とその効果

CR とは生存に必要な栄養素を与えたうえで、継続的に総摂取カロリーを適度に制限する方法である。げっ歯類などの実験動物においては、摂取カロリーを自由摂食 (AL; *ad libitum*) 群の 60～70%程度に制限することが多い。1935 年に McCay らが、CR によりラットの平均及び最大寿命が延伸し、疾患の発症が抑制されることを、初めて報告した (McCay et al., 1935)。その後約 80 年にわたり、多くの研究者によって研究されてきた確立された再現性の高い唯一の寿命延伸法である。CR による寿命延伸効果は酵母や線虫からげっ歯類を中心とした哺乳類に至るまで幅広い生物種において観察されるので、CR によって活性化される種を超えた普遍的な寿命シグナルが存在することが示唆される。哺乳類においては、加齢に伴う生理的バイオマーカーの変化、慢性疾患の発症およびその他の病理学的変化を抑制する (Higami et al., 2006a; Masoro, 2005; Sohal and Weindruch, 1996; Weindruch and Walford, 1988; Yu, 1994)。さらに、CR 時には摂取エネルギーの不足に対応するために全身の代謝が変化し、多くの生理的適応反応が誘導される。げっ歯類では、CR により個体は小型化し、主要臓器も小さくなるが、特に脂肪組織量の減少が顕著である (Weindruch and Sohal, 1997)。また、CR により運動量は増加し (Hart and Turturro, 1998)、老化に伴う肉体的な能力の低下が抑制されるが (Means et al., 1993)、低温に対して脆弱になることが知られている (Johnson et al., 1982)。最近の CR に関する研究は、そのメカニズム、ヒトへの応用の可能性、さらに模倣薬物の開発が主となっている。

カロリー制限と GH/IGF1 シグナル

CR は、成長ホルモン (GH; growth hormone) の分泌や血漿中 GH 濃度、また、GH 刺激により肝臓などから分泌されるインスリン様成長因子 1 (IGF-1; insulin-like growth factor-1) の血漿中濃度を減少させる (D'Costa, et al., 1993; Sonntag et al., 1995)。また、GH やプロラクチンおよび甲状腺刺激ホルモンの分泌不全を呈する Ames 矮小マウス (Prop-1^{df/df}) (Brown-Borg et al., 1996) や Snell 矮小マウス (Pit-1^{dw/dw}) (Flurkey et al., 2002) は、野生型に比べ 20-50%の長寿を示す。さらに、GHR/BP (growth hormone receptor/binding protein) ノックアウト (KO) マウス (Coschigano et al., 2000) や IGF-1 receptor KO マウス (Holzenberger et al., 2003)、アンチセンス GH 遺伝子の導入により GH 発現を抑制したラット (Shimokawa et al., 2002) も野生型に比べて長寿である。それゆえ、CR のメカニズムとして GH/IGF-1 シグナルの抑制が重要であると考えられる。事実、GHR/BP

KO マウスでは CR による寿命延伸が認められなかった (Bonkowski et al., 2006)。一方 GH/IGF-1 シグナルが抑制されて長寿である Ames 矮小マウス (Bartke et al., 2001) やアンチセンス GH トランスジェニックラット (Shimokawa et al., 2003) では、CR によりさらに寿命が延伸した。これらの知見は、CR の寿命延伸効果は GH/IGF-1 依存的なメカニズムのみではなく、GH/IGF-1 非依存的メカニズムによっても制御されている可能性を示唆する。

霊長類におけるカロリー制限の効果

CR のヒトへの応用のために、米国ではサルを用いた研究が行われている。2009 年に Wisconsin National Primate Research Center (WNPRC) の Colman らがアカゲザルに対する CR の効果として、CR は外見を若く保ち、糖尿病や心臓疾患、脳萎縮、がんの罹患率を抑制し、寿命を延伸することを報告した (Colman et al., 2009)。一方で、2012 年には National Institute on Aging (NIA) の Mattison らにより、CR はアカゲザルの triglyceride (TG) や空腹時血糖、酸化ストレスマーカーなどを低下させ、健康機能は改善し、健康寿命は延伸する傾向が見られたものの、寿命は延伸しなかったと報告された (Mattison et al., 2012)。この違いは、2 つの施設で使用されている飼料の組成や給餌のタイミングなど、飼育環境の違いによるものと推測され、WNPRC と NIA それぞれのデータを再解析し比較したところ、少なくとも CR による寿命延伸および加齢性疾患の発症抑制といった有益な効果は霊長類においても有効であると結論付けられた (Mattison et al., 2017)。ただし、今回の再解析では、適度の CR は有効だが、それ以上の過度な CR ではアカゲザルにとってのメリットが増えないことも示唆されている。

一方、米国ボルチモア市に住む 65 歳以上の男性を対象とした長期縦断研究において、CR したアカゲザルやマウス、ラットで共通する表現型である低体温、低血中インスリン、高血中 dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) を示すヒトの余命が長いことが報告された (Roth et al., 2002)。また、CR によって成人男女の体重や血圧、血糖値など様々な疾患のリスクファクターが減少することが示された (Walford et. al., 2002)。

以上から、CR はサルやヒトなどの霊長類においても、少なくとも加齢に伴う疾患発症抑制や代謝改善、つまり健康寿命の延伸には有効であると考えられる。

カロリー制限における脂肪組織

白色脂肪組織 (WAT; white adipose tissue) は単胞性の大型脂肪滴を有する成熟脂肪細胞を主体に、脂肪前駆細胞、血管構成細胞、繊維芽細胞およびマクロファージなどの炎症細胞などから構成される。長年、WAT は単にエネルギーを貯蔵及び放出する組織として考えられてきたが、現在では生理活性物質であるアディポサイトカインを産生・分泌して臓器間ネットワークを担う内分泌組織として、注目されている (Kershaw et al., 2004)。アディポサイトカインの多くは WAT に蓄積され

る TG の量によって分泌動態が変化し、糖・脂質代謝や心血管系の調節因子として作用することが知られている。代表的なアディポサイトカインとして、成熟脂肪細胞から分泌される leptin、adiponectin、resistin や、間質系細胞も含めて分泌される炎症性サイトカイン tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-6 (IL-6)、monocyte chemoattractant-1 (MCP-1) 等があげられる。これらは adiponectin に代表される善玉アディポサイトカインと TNF- α 、IL-6、MCP-1 に代表される悪玉アディポサイトカインに分類される (Gnanińska et al., 2009; Torres-Leal et al., 2010)。過度なエネルギー供給が続くと過剰なエネルギーは TG として脂肪細胞に蓄えられる。この時 WAT では成熟脂肪細胞の肥大化に加え、マクロファージやリンパ球の間質への浸潤による脂肪組織の炎症が認められる (Weisberg et al., 2003)。肥満により脂肪細胞が肥大化することにより、TNF- α 、IL-6、MCP-1 等の炎症性アディポサイトカインの産生が増加し、一方、adiponectin の産生が低下するなど、アディポサイトカイン分泌プロファイルの異常が生ずる。このような肥満症によるアディポサイトカインの分泌動態の変化が、糖・脂質代謝異常、高血圧、動脈硬化等の老化関連疾患の病態の一部を形成していることが明らかとなっている (Lago et al., 2007; Ouchi et al., 2011)。

近年、WAT そのものが寿命制御に対して重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。インシュリン受容体 (IR) 全身 KO マウスでは生後すぐにケトosisのために死亡する (Accili et al., 1996)。同様に IR と IGF1 受容体の膵 β 細胞特異的 KO で重篤な糖尿病のため、心筋・骨格筋特異的 KO では心不全のために、いずれも数週間以内に死亡する (Ueki et al., 2006; Laustsen et al., 2007)。さらに肝臓特異的 IR KO マウスでは、重度のインスリン抵抗性を惹起し、進行性の肝機能障害につながる (Michael et al., 2000)。しかしながら、脂肪組織特異的 IR KO マウスでは、WAT 重量が減少し、WAT におけるミトコンドリアバイオジェネシスが亢進し、寿命が延伸する (Blüher et al., 2003)。肝臓において善玉アディポサイトカインである adiponectin の発現を亢進させたトランスジェニックマウスは寿命延伸することが報告されている (Otabe et al., 2007)。また、脂肪細胞の分化に必須な転写因子である CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) α 遺伝子座に同様の機能を有する転写因子である C/EBP β をノックインした C/EBP β/β マウスでは脂肪組織でのミトコンドリアバイオジェネシスが亢進し、長寿であることが報告されている (Chiu et al., 2004)。また、外科的に内臓脂肪を切除したマウスではインスリン抵抗性が改善し、寿命が延長する (Barzilai et al., 1999; Gabriely et al., 2002)。加えて、野生型マウスでは内臓脂肪の外科的切除により骨格筋における脂質蓄積の抑制や体温の低下、呼吸商の低下が観察されるが、長寿を示す GHR KO マウスに対する外科的な内臓脂肪の切除は、野生型と正反対の悪影響を及ぼすことが報告された (Masternak et al., 2012)。このことは WAT 自体の形質として個体にとって良い WAT と悪い WAT があることを示している。

このように脂肪細胞特異的な遺伝子改変やアディポサイトカイン分泌の修飾によって寿命制御が可能である。また、WAT は種々の老化に伴って発症する疾患の主要な病態であるインスリン抵抗

性や酸化ストレス、炎症に密接に関連する。これらの知見から、ミトコンドリアバイオジェネシス亢進を含めた質の高い WAT へのリモデリングが、CR による有益な効果をもたらす可能性が示唆される。

カロリー制限における脂質代謝

CR したマウスでは、摂食直後にはエネルギー源として糖質を利用し、脂質合成が亢進するが、その後はエネルギー源として脂質を利用し、 β 酸化が亢進する代謝パターンを示す (Bruss et al., 2010; Higami et al., 2006b)。また、1 日を通してエネルギー源として脂質を利用する割合が増加する (Bruss et al., 2010)。脂質利用の増加により、電子伝達系の Complex I が迂回され、ROS の産生低下を介して酸化ストレスを低減する可能性が示唆されている (Guarente 2008)。摂食に応答した糖質利用・脂質合成と非摂食時の脂質利用を切り替える形質は、metabolic flexibility と呼ばれ、2 型糖尿病の患者では metabolic flexibility が低下している (Corpeleijn et al., 2008, Corpeleijn et al., 2009)。このような患者の体重を減量すると、metabolic flexibility とインスリン抵抗性がともに改善する (Corpeleijn et al., 2008, Corpeleijn et al., 2009)。また、インスリン抵抗性を示すマウスモデルでは、明暗期での呼吸商の差が少なくなり (Chibalin et al., 2008)、逆にインスリン抵抗性を改善すると、絶食時に素早く脂質利用への切り替えがなされると報告されている (Kim et al., 2007)。

目的

本研究では、CR の分子メカニズムの解明、特に CR に伴う WAT リモデリングの詳細なメカニズムの解明から、「老化・寿命」を制御する分子メカニズムを明らかにしたい。そして、その知見を基盤に、健康長寿を目指すために、老化プロセスを薬理的・栄養学的にコントロールする分子ターゲットを同定することを目的とした。

第一章

Srebp-1c を介した カロリー制限の効果

1-1. 背景

CR は成長ホルモン (GH; growth hormone) の分泌や血漿中 GH 濃度、また、GH 刺激により肝臓などから分泌されるインスリン様成長因子 1 (IGF-1; insulin-like growth factor-1) の血漿中濃度を減少させる (D'Costa, et al., 1993; Sonntag et al., 1995)。また、GH やプロラクチンおよび甲状腺刺激ホルモンの分泌不全を呈する Ames 矮小マウス (Prop-1^{df/df}) (Brown-Borg et al., 1996) や Snell 矮小マウス (Pit-1^{dw/dw}) (Flurkey et al., 2002) は、野生型に比べ 20-50%の長寿を示す。さらに、GHR/BP (growth hormone receptor/binding protein) ノックアウト (KO) マウス (Coschigano et al., 2000) や IGF-1 receptor KO マウス (Holzenberger et al., 2003)やアンチセンス GH 遺伝子の導入により GH 発現を抑制したラット (Shimokawa et al., 2002) も野生型に比べて長寿である。

GHR/BP KO マウスでは CR による寿命延伸が認められなかった (Bonkowski et al., 2006)。一方 GH/IGF-1 シグナルが抑制されて長寿である Ames 矮小マウス (Bartke et al., 2001) やアンチセンス GH トランスジェニックラット (Shimokawa et al., 2003) では、CR によりさらに寿命が延伸した。これらの知見は、CR の寿命延伸効果が GH/IGF-1 依存的なメカニズムによってのみ制御されているわけではなく、GH/IGF-1 非依存的メカニズムによっても制御されている可能性を示唆している。そこで、DNA マイクロアレイを用いて、白色脂肪組織 (WAT) における遺伝子変動を網羅的に探索したところ、GH 非依存的にかつ CR 依存的に、脂質代謝関連遺伝子、特に Srebp-1 に転写制御されると考えられる脂肪酸合成関連遺伝子の発現上昇を見出した (Chujo et al., 2013)。

Srebp (Sterol regulatory element-binding protein) -1 は脂質生合成の主要制御因子であり、Srebp-1a、Srebp-1c の二つのアイソフォームが存在する。特に Srebp-1c は肝・WAT・骨格筋の様なインシュリン感受性組織で発現する主要なアイソフォームとして知られている (Shimano, 2009)。脂質の蓄積は様々な臓器や器官で機能障害に関わり、脂肪毒性と呼ばれている (Unger, 1995)。脂肪肝は肝インスリン抵抗性やインスリン分泌障害を伴う β 細胞の脂肪毒性を伴い、いずれも糖尿病のトリガーとなる (Shimano et al., 1999)。正のエネルギー不均衡が慢性的に SREBP-1c を活性化させ、様々な組織や器官において脂肪毒性を引き起こすと考えられ、SREBP-1c が脂肪肝および β 細胞機能不全に関与していることが報告されている (Yahagi et al., 2002; Takahashi et al., 2005)。

Srebp-1c の発現機構や下流遺伝子に関する研究は数多く実施されているが、肝臓あるいは *in vitro* における解析が中心であり、WAT における知見は乏しい。加えて、CR に関連した研究はほとんど報告されていない。そこで、本研究では、WAT において CR により発現が増加する因子であり、また脂肪肝の増悪因子である Srebp-1c が CR の有益な効果にどの様に関与するかを解明することを目的として、CR した Srebp-1c KO マウスを解析した。そして新規性の高い Srebp-1c の機能を見出し、CR の抗老化・寿命延伸効果のメカニズムの一端を明らかにした。

1-2. 材料と方法

1-2-1. 使用マウスについて

Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) より購入した *Srebp1c*^{+/-}マウス (B6;129S6-*Srebp1*^{tm1Mbr/J}, Liang et al., 2002) から、交配により *Srebp1c*^{+/+}(以降 WT マウス)、*Srebp1c*^{-/-}(以降 KO マウス) を作出した。東京理科大学薬学部動物実験施設内 specific-pathogen-free (SPF) 環境下、明暗サイクルは 12 時間で飼育し、AL 群には CRF-1 (Oriental Yeast, Tokyo, Japan) を十分量与えた。AL 群の摂食量を測定し、CR 群にはその 70%量を消灯前に与えた。CR は 3 ヶ月齢より開始し、WTAL, WTCR, KOAL, KOCR の計 4 群を作製した。36 から 40 週齢で安楽死させ、精巢周囲脂肪、肝臓、心臓、腎臓、大腿四頭筋を採取した。臓器は一部をホルマリン固定し、残りは液体窒素により急速凍結後-80°C にて保存した。採血した血液は EDTA を加え、遠心 (2500 x g, 4°C, 10 min) して採取した上清を血漿サンプルとし、-80°C にて保存した。屠殺は CR 群の給餌 1-4 時間後と給餌 2-5 時間前に分けて行い、それぞれ fed 群、fast 群とした。fast 群については、屠殺前日の CR 群給餌時に餌を取り除き絶食状態とした。以上 WTAL fed, WTAL fast, WTCR fed, WTCR fast, KOAL fed, KOAL fast, KOCR fed, KOCR fast の計 8 群を作製した。摂食の影響が大きいと考えられる因子の解析には fed 群および fast 群の両方を、影響が少ないと考えられる因子の解析には fed 群のみを用いた。すべての動物実験は、東京理科大学動物実験委員会による審査、学長による承認を得て、東京理科大学動物実験指針に従い行われた (承認番号; Y12027, Y13028, Y14028)。また、すべての遺伝子組み換え実験は、東京理科大学遺伝子組換え実験安全委員会による審査、学長による承認を得て、東京理科大学遺伝子組換え実験実施規則に従い行われた (承認番号; 1589)。

1-2-2. 血漿中 TG、非エステル型脂肪酸 (non-esterified fatty acid; NEFA)、コレステロール (Cholesterol; Chol)、グルコース、インスリン、IGF-1、アディポネクチンおよびレプチンの定量

血漿中の TG、NEFA、Chol、グルコース、インスリン、アディポネクチンおよびレプチンはそれぞれ LabAssay™ Triglyceride (Wako, 290-63701)、LabAssay™ NEFA (Wako, 294-63601)、LabAssay™ Cholesterol (Wako, 294-65801)、Autokit Glucose C II (Wako, 439-90901)、Mouse Insulin ELISA KIT (U-type) (Shibayagi, Gunma, Japan, AKRIN-031)、Quantikine® ELISA Mouse/Rat IGF-1 Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、Quantikine® ELISA Mouse Adiponectin/Acrp30 Immunoassay (R&D Systems) および Quantikine® ELISA Mouse Leptin Immunoassay (R&D Systems) を用いて定量した。なお、それぞれの反応は各メーカーが提供するプロトコールに従い行った。

1-2-3. 血漿中ケトン体の定量

Hansen と Freier および Li らの方法 (Hansen and Freier, 1978; Li et al., 1980) をもとに、血漿中ケトン体として 3-hydroxybutyric acid (3-HB) を定量した。Reaction buffer (80 mM Tris-HCl (pH9.5), 4 mM β -NAD⁺ (Wako, 049-16461)) にサンプルを加え、37 °C で 5 分間インキュベートし、5 U/mL D-3-Hydroxybutyrate Dehydrogenase (Wako, 086-05441) を総液量の 1/10 量加え、ARVO MX/Light Wallac 1420 Multilabel/Luminescence Counter (PerkinElmer, Waltham, MA) を用いて 37 °C、340 nm における吸光度を測定した。

1-2-4. Murine embryonic fibroblasts (MEFs)の樹立

Srebp-1c ヘテロ欠損型マウス同士を交配させ、妊娠後 13.5-15.5 日のマウスの子宮から胎児を取り出し PBS で洗浄後、頭や尾及び手足など余分な臓器を取り除き、0.05 % Trypsin-EDTA in PBS (Invitrogen, Carlsbad, CA, 15400) にて 37°C、10 分間消化した。その後 100 U/mL penicillin G and streptomycin (SIGMA, St. Louis, MO, P0781) 及び 10% FBS (BOVOGEN, Essendon Vic, Australia, SFBS-F) 含有の DMEM -high glucose- (WAKO, 043-30085) により Trypsin-EDTA を失活させ、cell strainer (BD, Franklin Lakes, NJ, 352340) で余分な細胞を除くことで樹立した。

1-2-5. 細胞培養

10 % FBS, 100 U/mL penicillin G and streptomycin 及び 0.1 mM 2-Mercaptoethanol を含有する DMEM -high glucose-で MEFs を培養し、 $1.2\sim 15\times 10^4$ cells/cm² の細胞密度で維持した。また、MEFs は継代数を 5 回までとした。

1-2-6. 成熟脂肪細胞への分化誘導

MEFs は 1.2×10^4 cells/cm² の密度で播種し、培地交換を挟んで 3 日後を Day0 とした。その後は 2 日置きに 0.5 mM IBMX (SIGMA, I5879) 、1 μ M DEX (SIGMA, D1756) 、10 μ g/mL insulin (WAKO, 096-03443) 及び 10 μ M troglitazone (Lkt-Lab, T7056) を加えた維持培地で培養することで成熟脂肪細胞へと誘導した。

1-2-7. クローニングベクターの作製

Srebp-1c 過剰発現哺乳類発現ベクターに関して、活性体型 (mature form) を作製した。活性体型は Srebp-1c mRNA の一部 (1-1368bp) をコードした遺伝子を PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara, R010A) により増幅させ、*EcoRV* により切断した pBluescript II KS (+) ベクターへとサブクローニング後、そのベクターを *EcoRI* 及び *Apal* で切断し、*EcoRI* 及び *Apal* で切断済みの pMXs-AMNN-puro レトロウイルスベクターヘライゲーションすることで pMXs-Srebp-1c mature form ベクタ

ーを作製した。なお、Srebp-1c を増幅させた際に用いたプライマーは Table 1-1 に示す。

1-2-8. レトロウイルスによる Srebp-1c 復帰変異株の作製

Plat E を 1×10^5 cells/cm² で播種し一晩培養後、Fugene HD Transfection Reagent (promega, Tokyo, Japan) を用いて pMXs-AMNN-puro, pMXs-Srebp-1c precursor form, pMXs-Srebp-1c mature form ベクターを導入した。反応溶液は 10 μ L/cm² で調整し、プラスミド DNA 1 μ g に対して Fugene を 6 μ L の比率で脂質・DNA 複合体を形成させた。室温で 30 分静置した反応溶液を細胞へ処理し、16 時間培養後、ウイルスを含む培養液を Millex-GV Filter (MILLIPORE, Billerica, MA) で濾過し、回収した。培養液の 1/3 量の 4 \times PEG Buffer (32 % PEG6000, 400 mM NaCl, 40 mM HEPES, pH 7.4) を加え、2250 \times g, 4 $^{\circ}$ C で 30 分間遠心し、上清を廃棄後、2250g, 4 $^{\circ}$ C で更に 5 分間遠心を行い、ウイルス沈殿を適量の OPTI-MEM で溶解し、 0.6×10^4 cells/cm² で播種し一晩培養させた primary MEFs に感染させた。この時、培養液の濾過から感染までの過程は全て氷上で行った。感染の 24 時間後から 5 μ g/mL の puromycin 入りの培地で 5~7 日間 selection を行い primary MEFs Srebp-1c precursor form 過剰発現株および primary MEFs Srebp-1c mature form 過剰発現株を作製した。selection 後は 1 μ g/mL の puromycin を含む培地で培養、維持した。

1-2-9. 白色脂肪組織の組織学的解析

WAT を 10 % 中性緩衝ホルマリン溶液 (10 % formaldehyde in PBS) にて固定し、パラフィン包埋後、5 μ m の厚さで薄切し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行った。標本は光学顕微鏡 Eclipse 80i およびオプシオンユニット DS-Fi1c, DS-L2 (Nikon, Tokyo, Japan) を用いて拡大率 100 倍で観察、1 視野あたり複数枚の画像を撮影し、画像編集解析ソフトウェア ImageJ 1.4 (Wayne Rasband National Institute of Health, Bethesda, MD) を用い、コンポジット合成によるノイズを除去後、脂肪細胞のサイズを測定した。

1-2-10. Real-time RT-PCR

mRNA を抽出し、分光光度計 NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて濃度を測定した。1 μ g の RNA を PrimeScript[®] RT reagent Kit (TaKaRa, RR037A) により逆転写させ cDNA を得た。目的遺伝子は、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (TaKaRa, RR041A) を用いて、Real-time PCR システム ABI PRISM[®]7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA) により解析した。なお、それぞれの反応は各メーカーが提供するプロトコールに従い行い、使用したプライマーを Table 1-2 に記載した。

1-2-11. Western blotting

組織または細胞を、適量の SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 3 M urea, 6% glycerol) を加えホモジェナイズ後、さらにソニケーションした。得られたライセートを遠心 (12000 x g, 4 °C, 30 min) し、上清を回収し、95°C で 5 分間インキュベートした。得られた上清に含まれるタンパク質量を BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, 23225) を用いて測定し、SDS sample buffer により 1 mg/mL の濃度に調製した。サンプルの 1/10 量の 0.25 % BPB / 5 % 2-mercaptoethanol = 1 : 1 混液を加え、95 °C で 5 分間還元処理をした。以上の処理で得られたサンプルを SDS-PAGE 法により泳動後、coomassie brilliant blue (CBB) 染色を行った。脱色後のゲルの泳動像を LAS-3000 ルミノ・イメージアナライザー (Fujifilm, Tokyo, Japan) にて撮影し、解析ソフトウェア Multi Gauge 3.1 (Fujifilm) を用いてラダー状になった全タンパク質の染色強度からタンパク量を定量し、サンプル間のタンパク質量を統一した。調製し直したサンプルを SDS-PAGE 法にて泳動し、ニトロセルロースメンブレン (PALL, Port Washington, NY, 66485) に転写した。転写後、メンブレンは blocking 溶液中 (2.5 % skim milk (WAKO, 190-12865) / 0.25 % BSA in TTBS (25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 140 mM NaCl, 2.5 mM KCl (Wako, 163-03545), 0.1 % Tween 20) = 1 : 1) にて室温で 1 時間震盪させた。その後、一次抗体を反応液 (Canget solution I (Toyobo, Osaka, Japan, NKB-201) / blocking 溶液 = 2 : 1) 中に加え、4 °C にてメンブレンと一晚または二晩反応させた。一次抗体反応後、メンブレンを TTBS にて洗浄し (5 分×2 回および 10 分×2 回)、二次抗体を反応液 (Canget solution II (Toyobo, NKB-101) / blocking 溶液 = 2 : 1) 中に加え、1 時間室温にてメンブレンと反応させた。二次抗体反応後、メンブレンを TTBS にて洗浄し (5 分×2 回および 10 分×2 回)、ImmunoStar® LD (WAKO, 290-69904) を用いた化学発光を行い、LAS-3000 ルミノ・イメージアナライザーにて撮影し、Multi Gauge 3.1 を用いて定量した。以下、Table 1-3 に一次抗体、Table 1-4 に二次抗体の情報を記載した。

1-2-12. CS (citrate synthase) 活性の測定

WAT に 2 倍量の Homogenization Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Phosphatase Inhibitor Cocktail, 1 % Protease Inhibitor Cocktail, 1 % Triton X-100 (Sigma, T8532), 0.05 % sodium deoxycholate (Wako, 192-08312)) を加え、ホモジェナイズした。ホモジェネートに対し、反応液 (0.1 mM DTNB (5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic) acid) (WAKO, 047-16401), 0.5 mM Acetyl-CoA (WAKO, 011-17383), 0.1 % Triton X-100, 100 mM Tris-HCl (pH8.0)) を加え、25 °C で 5 分間インキュベートした。吸光度の baseline を安定させた後、10 mM oxaloacetate (WAKO, 150-00411) を総液量の 1/20 倍量加え、ARVO MX/Light Wallac 1420 Multilabel/Luminescence Counter を用いて 30 °C、412 nm における吸光度測定を行った。

1-2-13. ミトコンドリア DNA の定量

Total DNA 抽出を行うため、組織サンプルに DNA extraction Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1 % SDS, 100 µg/mL Proteinase K (WAKO, 160-14001)) を加えて 55 °C で一晩インキュベートした。その後、Phenol (Sigma, P4557) を加えて常温で 1 時間ローテートした後、上清をとり PCI (Phenol / Chloroform / Isoamylalcohol = 25 : 24 : 1) を加え、さらに 1 時間ローテートした。上清をとり、200 µg/ml RNaseA (WAKO, 182-01493) により 37 °C で 1 時間処理した後、再び Phenol 及び PCI 処理を繰り返し、エタノール沈殿を行うことで DNA を精製した。抽出した DNA は TE Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA) に溶解後、NanoDrop 1000 を用いて濃度を測定した。定量的 Real-time RT-PCR は、1 ng の DNA を SYBR® Premix Ex Taq™ を用いて反応させ、Real-time PCR システム ABI PRISM®7300 にて解析した。核 DNA の定量には β -globin gene locus を、ミトコンドリア DNA の定量には cytochrome c oxidase II (COX II) gene locus を用い、ミトコンドリア DNA 存在量比を COX II/ β -globin として算出した。なおプライマー配列は以下 Table 1-5 に示した。

1-2-14. ChIP (chromatin immunoprecipitation)

MEFs を、1 % formaldehyde (Wako, 064-00401) 存在下、常温にて 10 分間インキュベートした。さらに 300 mM Glycine (Wako, 077-00735) 存在下、常温にて 10 分間インキュベートした。組織液を遠心 (700 x g, 4 °C, 5 min) し、上清を取り除いて再度 PBS を加え、同条件で遠心した。上清を取り除き、Cell lysis Buffer (10 mM Hepes-KOH (pH 7.9), 1.5 mM MgCl₂ (Wako, 135-00165), 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5 % Nonidet P-40 (NP-40) (Nacalai tesque, Kyoto, Japan, 25223-04)) を加え、氷上にて 10 分間インキュベートした。遠心 (1,400 x g, 4 °C, 5 min) して上清を取り除き、SDS lysis Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 1 % SDS) を加え、氷上にて 10 分間インキュベートした。ソニケーションしたのちに、遠心 (13,000 x g, 4 °C, 10 min) し、上清を採取し、Dilution buffer (16.7 mM Tris-HCl (pH8.0), 167 mM NaCl, 1.2 mM EDTA, 1.1 % Triton-X 100, 0.01 % SDS) を加えた。さらに、Protein G Agarose, Fast Flow (Millipore, 16-266) を加え、4 °C にて 1 時間ローテートした。以下、本項においては特に記載のない限り 4 °C にてローテートした。遠心 (800 x g, 4 °C, 2 min) し、上清を新しい 1.5 mL チューブに移した。このうちの 10 % を input として 4 °C で保存しておいた。上清に対して Srebp-1 抗体を加えて一晩ローテートし、新しい Protein G Agarose, Fast Flow を加え、1 時間ローテートした。遠心 (800 x g, 4 °C, 2 min) し、上清を取り除き、Low Salt Buffer (20 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1.0 % Triton-X 100, 0.1 % SDS) を加え、10 分間ローテートした。再度遠心 (800 x g, 4 °C, 2 min) して上清を取り除き、High Salt Buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1.0 % Triton-X 100, 0.1 % SDS) を加え、10 分間ローテートすることを 2 回繰り返した。続いて遠心 (800 x g, 4 °C, 2 min) し、上清を取り除き、LiCl Buffer (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 250 mM LiCl (Wako, 123-01162), 1 mM

EDTA, 1.0 % NP-40, 1.0% sodium deoxycholate) を加え、10 分間ローテートすることを 2 回繰り返した。さらに、遠心 (800 x g, 4 °C, 2 min) し、上清を取り除き、TE Buffer を加え、10 分間ローテートすることを 3 回繰り返した。最後のローテート後に遠心 (800 x g, 4 °C, 2 min) し、上清を取り除き、ChIP Elution Buffer (100 mM NaHCO₃, 10 mM DTT, 1.0 % SDS) を加え、常温にて 10 分間ローテートした。遠心 (800 x g, 25 °C, 2 min) し、上清を新しい 1.5 mL チューブに採取した。遠心後のチューブに再度 ChIP Elution Buffer を加え、上記のローテートおよび遠心を繰り返し、遠心後の上清を 1.5 mL チューブに採取した。ここで保存しておいた input を取り出し、サンプルと同量になるように ChIP Elution Buffer を加えた。以下、サンプルと input で同工程とした。65 °C にて 4 時間インキュベートした後、RNaseA を加えて 37 °C で 30 分間インキュベートし、Proteinase K を加えて 55 °C で 3 時間インキュベートした。フェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿により、DNA を抽出し、TE buffer にて溶解した。目的遺伝子のプロモーター部位が含まれるように設計した標的プライマーおよび KOD-FX (Takara, KFX-201) を用いた PCR 反応を行うことで増幅させた。反応産物はアガロースゲル電気泳動により分離し、ethidium bromide solution (Nippon Gene, Tokyo, Japan, 315-90051) にて染色し、LAS-3000 ルミノ・イメージアナライザーにて特異的バンドを可視化した。なお、ChIP に用いたプライマーを Table 1-6 に記載した。

1-2-15. Aconitase 活性の測定

凍結臓器 30-50 mg を秤取し、Aconitase assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, 705502) を用いて、キットに付属のプロトコールに従って aconitase 活性を測定した。

1-2-16. 還元型／酸化型グルタチオン比の測定

グルタチオンは Rahman らの方法 (Rahman et al., 2006) により定量した。組織に Extraction buffer (0.1 % Triton X-100, 0.6 % sulfosalicylic acid (Wako, 190-04572), 5 mM EDTA, 0.1 M potassium phosphate buffer) を加え、Rotor-Stator 型ホモジナイザーを用いて破碎し、遠心 (8000 x g, 4 °C, 10 min) した。肝臓と腎臓は、Extraction Buffer に 5 % metaphosphoric acid (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, 033267) を加えたものを添加してホモジェナイズし、遠心 (3000 x g, 4 °C, 10 min) した。上清に対し、0.5 mM DTNB および 2.0 U/mL Glutathione Reductase (Oriental Yeast, 46540005) を添加し、氷上にて 2 分間インキュベートした。さらに、0.24 mM β-NADPH (Sigma, N7505) を加え、ARVO MX/Light Wallac 1420 Multilabel/Luminescence Counter を用いて 412 nm の吸光度を測定し、総グルタチオンを定量した。

また、GSSG の定量を以下のように行った。上記の上清に対して 0.2 % 2-vinylpyridine を加え、常温で 1 時間インキュベート後、5.6 % triethanolamine (Wako, 145-05605) を加えたものをサンプルとし、総グルタチオンの定量と同様に測定した。測定後、総グルタチオン量および GSSG 量より、

GSH 量を算定し、GSH/GSSG 比を算出した。

1-2-17. 統計検定

データは平均±標準誤差で示した。データの統計検定は、2 群間では Student's t-test、多群間では二元もしくは三元配置分散分析を行なった後に Tukey's t-test を行なった。

生存曲線における統計検定は、寿命の統計的分布が正規分布で近似できることを、Normal Quantile-quantile plot で確認し、多重検定を解決するために、それぞれの群間の寿命において Tukey の honestly significant difference 法で推定し、最終的に log-lank test を用いた。また、実験ごとに用いた検定方法は、材料と方法の各項目または Figure legends に記載した。

1-3. 結果

1-3-1. 寿命

まず、野生型自由摂食群 (WTAL)、野生型カロリー制限群 (WTCR)、Srebp-1c KO 自由摂食群 (KOAL)、Srebp-1c KO カロリー制限群 (KOCR) の 4 群に関して寿命を解析した。マウスの寿命はポアソン分布に従うと考えられ、この分布は正規分布に近似されることを示した (Figure 1-1A)。さらに、今回使用した全マウスの寿命においても同様に正規分布で近似された (Figure 1-1 B)。そこで、それぞれの群に分け同様の解析を行ったところ、およそ同じ傾きを持つ正規分布で近似されたが、Y 切片に関しては $WTCR > WTAL > KOAL = KOCR$ となっていた (Figure 1-1C)。Y 切片は平均寿命と考えられ、野生型 (WT) マウスはカロリー制限 (CR) により約 18 % 延伸したが (WTAL: 126.1 週、WTCR: 148.4 週)、Srebp-1c KO (KO) マウスは CR により約 1 % しか延伸しなかった (KOAL: 108.8 週、KOCR: 109.8 週) (Figure 1-1C, D)。また、KOAL 群は WTAL 群と比較して寿命が減少する傾向 (約 14 %) が見られた (Figure 1-1C, D)。

1-3-2. 重量・摂食量・血漿プロファイル

摂食量は 84 週齢まで WT マウスより KO マウスの方が平均で約 22 %、最大で約 41 % 多かった (Figure 1-2)。また、32-40 週齢で、体重は AL では WT マウスより KO マウスの方が約 24 % 有意に重かったが、それ以降では有意な差はなかった (Figure 1-1, Table 1-7)。一方で、CR では約 80 週齢まで WT マウスより KO マウスの方が重い傾向であったが、有意な差ではなかった (Figure 1-1)。臓器重量に関しては、AL では肝臓 (約 33 %)・心臓 (約 36 %)・腎臓 (約 19 %) で、CR では肝臓 (約 26 %)・心臓 (約 26 %) で WT マウスより KO マウスの方が有意に重かった (Table 1-7)。

血漿中グルコース濃度は、WT および KO マウスにおいて、fed 時に CR により減少傾向 (WT: 約 13 %, KO: 約 20 %) を示した。Insulin 濃度は、WTAL (約 83 %)、WTCR (約 97 %)、KOAL (約 84 %)、KOCR (約 79 %) とも fasted 時に有意に低下した (Table 1-8)。また、総コレステロール濃度は、WT および KO の両マウスにおいて、特に fed 時に CR により約 50% 低下した (Table 1-8)。Triglyceride (TG) 濃度は、WT マウスにおいては CR により減少傾向を示し、特に fasted 群では約 48 % 減少した。一方、KO マウスにおいては CR による減少傾向は減弱していた (Table 1-8)。Non-esterified fatty acid (NEFA) 濃度は、WT マウスにおいて CR により fed 時に約 29 %、fasted 時に約 17% 減少したが、KO マウスでは CR による影響が乏しかった (fed 時: 約 20 %、fasted 時: 約 14 %)。また、WTAL (約 76 %)、WTCR (約 105%)、KOAL (約 59%)、KOCR (約 71 %) とも fasted 時に増加したが、KOAL 群では WTAL 群に比べてその増加が小さかった (Table 1-8)。これは、KOAL 群において絶食に対する WAT からの NEFA の分泌が減少していることを示唆する。3-hydroxybutyric acid (3-HB) 濃度は全ての群で fed 時は検出限界以下であった。fasted 時のみで比較すると、WT マウスでは CR により約 63 % 減少したが、KO マウスでは CR により 40% しか減少

しなかった。また、KOAL 群では WTAL 群に比べ 50 %有意に低値を示した (Table 1-8)。これは、KOAL 群において絶食に対して肝臓でのケトン体合成が低下していることを示唆する。以上より、KO マウスは絶食に対して脆弱である可能性が示唆された。

IGF-1 の濃度は、WT・KO マウス共に CR により減少し、WT-KO 間に大きな差はなかった。Adiponectin の濃度は fasted 時に WTAL より KOAL のほうが約 59 %有意に高かった。また、KOAL 群において fasted 群で約 48 %有意に上昇した (Table 1-8)。一方、Leptin 濃度は、fed 群において WTAL より KOAL のほうが約 103 %高い傾向にあった。また、WT および KO の両マウスにおいて、CR により減少した (Table 1-8)。

1-3-3. 各臓器における脂肪酸合成関連タンパク質発現解析

Fatty acid synthase (FASN) や acetyl-CoA carboxylase (ACC)、ATP citrate lyase (ACLY)、malic enzyme-1 (ME-1) は Srebp-1c に直接転写制御される脂肪酸合成に関わる下流タンパク質である。Western blot 法によりこれらのタンパク質の発現変動を肝臓、白色脂肪組織 (WAT)、心臓、骨格筋、腎臓において解析した。

肝臓において、ME-1 以外の各タンパク質では、Srebp-1c KO あるいは CR による発現変動は観察されなかった (Figure 1-3A-D)。ME-1 タンパク質発現は Srebp-1c KO により全群で約 0.4 倍に減少したが、CR による変動は認められなかった (Figure 1-3A, E)。この結果より、CR は肝臓における *Srebp-1c* の発現を fed 時は約 3 倍、fast 時は約 6 倍に増加させるものの (Figure 1-3L)、その下流タンパク質である脂肪酸合成関連タンパク質の発現に大きな影響を与えないことが示された。

WAT において、WTAL 群および KOAL 群間における脂肪酸合成関連タンパク質発現に有意な差は認められなかった (Figure 1-3F-J)。また、WT では、CR により FAS (fed: 約 8 倍、fast: 約 2 倍)、ACC (fed: 約 20 倍、fast: 15 倍)、ACLY (fed: 約 20 倍、fast: 10 倍)、ME-1 (fed: 約 8 倍、fast: 約 7 倍) タンパク質の発現は有意に亢進し、その亢進は fasted 時に比べて fed 時で顕著であった。しかしながら、KO マウスでは CR による脂肪酸合成関連タンパク質発現の亢進は観察できず、摂食による発現変動も確認できなかった (Figure 1-3F-J)。

骨格筋および腎臓において、WTAL 群および KOAL 群間における差はなかった一方、WT マウスにおいて、CR は脂肪酸合成関連タンパク質の発現を顕著に亢進させた (骨格筋: FASN 約 10 倍、ACC 約 5 倍、ACLY 約 10 倍、ME-1 約 5 倍、腎臓: ACC 約 2 倍、ACLY 約 2 倍)。しかしながら、KO マウスでは CR による脂肪酸合成関連タンパク質発現の亢進しなかった (Figure 1-4A-I)。心臓において、脂肪酸合成関連タンパク質は Srebp-1c KO あるいは CR による発現変動が観察されなかった (Figure 1-4J-M)。

1-3-4. 各臓器におけるミトコンドリアの解析

ミトコンドリアマトリックスに存在する citrate synthase (CS) は、tricarboxylic acid (TCA) 回路の最初のステップに関与する酵素であり、その活性はミトコンドリア活性の指標として用いられる。WAT において、WT マウスでは CR により CS 活性は約 2 倍に増加したが、KO マウスでは増加しなかった (Figure 1-5A)。しかし、肝臓、骨格筋、心臓、腎臓においては、Srebp-1c KO あるいは CR による発現変動は見られなかった (Figure 1-5B)。

さらに、ミトコンドリア関連タンパク質発現を解析した。WAT において WT マウスでは CR によりミトコンドリアタンパク質である SIRT3 (約 2~3 倍)、COX IV (約 2~4 倍)、TOM20 (fed: 約 2 倍) のタンパク質発現が有意に上昇し、その亢進は fasted 時に比べて fed 時で顕著であったが、KO マウスでは CR に伴う発現上昇は観察されなかった (Figure 1-6E-H)。一方、肝臓、心臓、骨格筋、腎臓においては Srebp-1c KO あるいは CR による発現変動は見られなかった (Figure 1-6A-D, Figure 1-7A-L)。

そのため、WAT に着目しミトコンドリア関連遺伝子発現を解析した。*Peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator 1 (Pgc-1) α* や *Pgc-1 β* 、*Estrogen related receptor (Err) α* はミトコンドリアバイオジェネシスに関わる転写補助因子と言われている (Schreiber et. al., 2004; Scapulla, 2011)。その中でも *Pgc-1 α* は CR に伴うミトコンドリアバイオジェネシスの主要な調節因子であると報告されている (Anderson et. al., 2008)。そこで、*Pgc-1 α* 遺伝子発現を解析したところ、WT マウスでは *Pgc-1 α* の発現は、CR により約 4 倍に増加したが、KO マウスでは CR に伴って発現は増加しなかった (Figure 1-8A)。さらにミトコンドリア関連遺伝子である *CoxIV* mRNA 発現量および mt DNA 量を解析した。*CoxIV* mRNA 発現量 (約 2 倍) および mt DNA 量 (約 2 倍) とも、WT マウスでは CR により増加したが、KO マウスでは CR に伴う増加は見られなかった (Figure 1-8B, C)。

1-3-5. primary MEFs の解析

マウスの組織を用いた解析により、WAT が Srebp-1c を介した CR の効果に重要であることが示唆された。そこで、primary MEFs を白色脂肪細胞に分化させ解析した。Pparg と adiponectin を指標として、成熟脂肪細胞への分化の程度を確かめたところ、WT・KO 共に同程度に分化していることが確認できた (Figure 1-9A, B)。

脂肪酸合成関連タンパク質のうち FAS および ACC、ME-1 発現は WT において分化誘導開始後 8~16 日目で発現が最大になり、その後減少した (Figure 1-9C)。また ACLY に関しては分化開始直後に発現が最も高く、徐々に減少した。しかし、KO ではこのような発現変動は観察されず、低レベルのままであった (Figure 1-9C)。

ミトコンドリア関連タンパク質発現は、WT において、分化に伴い増加し、分化誘導開始後 16~24 日目ではプラトーに達した (Figure 1-9D)。一方、KO において TOM20 の発現変動は観察され

ず、COX IV、SIRT3 タンパク質発現は分化に伴って増加するものの、WT に比べその増加はごく僅かであった (Figure 1-9D)。Pgc-1 α の mRNA 発現に関しても、WT において分化に伴い発現が増加したが、KO においてその発現変動は見られなかった (Figure 1-9E)。CS 活性は、全期間において WT と比べ KO で有意に低く、KO は WT と異なり、分化によって活性は亢進しなかった (Figure 1-9F)。mtDNA も同様に KO は WT と異なり、分化によって量は増加せず、day16~24 において有意に低かった (Figure 1-9G)。

以上の結果から、ミトコンドリアバイオジェネシスの活性化に重要な役割を果たす Pgc-1 α 発現は Srebp-1c に制御されている可能性が示唆された。そこで、Srebp-1c KO MEFs に Srebp-1c を強制発現させて、Pgc-1 α 発現が回復するかを検討した。Srebp-1c に転写制御されている *Fasn* の mRNA 量は、強制発現により回復した (Figure 1-9H)。この結果は、強制発現により、Srebp-1c は転写活性も含めて回復したことを示唆する。そこで Pgc-1 α の mRNA 発現を解析したところ、強制発現により有意に発現が回復した (Figure 1-9H)。

Srebp-1c の回復により、Pgc-1 α の mRNA 発現が回復したことから、Srebp-1c が Pgc-1 α の転写を正に制御している可能性が示唆された。また、Pgc-1 α のプロモーター部位を検索したところ、SREBP タンパク質が結合するために必要な SRE 配列が、転写開始点より上流に 2 か所見つかった。そのため、primary MEFs を用いて ChIP assay を行った。その結果、WT MEFs において SREBP-1 タンパク質と Pgc-1 α のプロモーター部位の結合が確認されたが、KO では確認できなかった (Figure 1-9I, J)。

1-3-6. 酸化ストレス応答

CR の効果として、酸化ストレスの抑制が重要である可能性が示唆されている (Gredilla and Barja, 2005)。そこで、マウスの WAT において、aconitase 活性および GSSG/GSH を測定した。WAT における aconitase 活性は、WT マウスにおいて CR により約 4 倍に増加した (Figure 1-10A)。しかし、KO マウスにおいて CR による活性の上昇は観察されなかった (Figure 1-10A)。また、GSSG/GSH は WT マウスにおいて CR により約 12 %に有意に低下した (Figure 1-10B)。しかし、KO CR 群における有意な低下は観察されなかった (Figure 1-10B)。この時、WAT 中の総 GSH 量は、WT マウスにおいて CR により約 5 倍に増加したが、KO では CR による増加は観察されなかった (Figure 1-11C)。加えて、肝臓・心臓・骨格筋・腎臓における GSSG/GSH および、総 GSH 量の CR による増加も観察されなかった (Supplemental Figure 1-2)。また、*de novo* GSH 産生の律速酵素である γ -glutamyl-cysteine synthetase (γ -GCS、遺伝子名 glutamate-cysteine ligase; *Gclc*) の mRNA 発現は、WT マウスにおいて CR により約 1.5 倍に増加傾向をが見られた (Figure 1-10D)。しかし、KO マウスにおいて CR により増加しなかった (Figure 1-10D)。一方で、Srebp-1c KO MEFs に Srebp-1c を回復させても、 γ -GCS の mRNA 発現は回復しなかった (Figure 1-10E)。

さらに、CR によるマクロファージマーカーの発現変動に関しても測定したところ、WT・KO 共に CR によって有意に減少するが、WT と KO に有意な差は無かった (Figure 1-10F, G)。

1-4. 考察

1-4-1. CR による Srebp-1c を介した脂肪酸合成への影響

以前の報告では、Srebp-1c およびその下流である *de novo* 脂肪酸合成遺伝子の発現は、肝臓および WAT の両方において、摂食条件で亢進し、絶食条件で抑制されることがわかっている (Horton et al., 1998b; Sekiya et al., 2007)。しかしながら、本研究では、CR は摂食条件にかかわらず、WAT における Srebp-1c を介した *de novo* 脂肪酸合成に関与するタンパク質の発現を増強した。さらに、CR は、摂食条件および絶食条件下の両方で、肝臓における Srebp-1c の発現を亢進したが、*de novo* 脂肪酸合成関連タンパク質の発現を変化させなかった。この知見は、CR が肝臓ではなく WAT における *de novo* 脂肪酸合成を活性化し、全身の脂質利用を亢進するという Bruss らの報告を強く支持するものである (Bruss et al., 2010)。また同時に、Srebp-1c による *de novo* 脂肪酸合成の活性化が、CR による WAT における代謝リモデリングの主要な機構であるとする我々の報告を強く支持するものである (Okita et al., 2012; Chujo et al., 2013)。しかし、肝臓における矛盾や、肝臓と WAT との間の CR に対する差異の応答を明らかにするために、さらなる研究が必要である。

脂肪酸合成関連タンパク質である ME-1 は細胞質において malate から pyruvate を産生する酵素であるが、その反応時に同時に NADPH を産生することでも知られている (Figure 1-11)。ME-1 は FASN と同様 Srebp-1c によって強くその発現を制御される酵素であるので、Srebp-1c は脂肪酸合成関連遺伝子発現だけでなく、ME-1 活性化を介して NADPH の生成にも重要であることが示唆される。NADPH は FASN の補酵素としても作用し、*de novo* 脂肪酸合成を活性化させる。

今回の結果により、CR は、Srebp-1c を介して WAT における *de novo* 脂肪酸合成を活性化し、さらに全身でエネルギーに使用する基質を炭水化物から脂質へシフトすることが示唆された。

1-4-2. CR による Srebp-1c を介したミトコンドリアへの影響

CS 活性はミトコンドリアバイオジェネシス活性化の指標の一つであり、CR によるミトコンドリアバイオジェネシスの活性化は WAT 特異的であった。CR によるミトコンドリアバイオジェネシスの亢進には Pgc-1 α や Pgc-1 β 、Err α 発現の亢進が見られ (Schreiber et al., 2004; Scarpulla, 2011)、その中でも Pgc-1 α が重要な役割を果たしていると報告されている (Anderson et al., 2008)。この報告に矛盾せず、本研究により、CR は WAT 選択的に Srebp-1c 依存的、且つ Pgc-1 α を介して、ミトコンドリアバイオジェネシスを亢進していることが明らかになった。

ME-1 によって産生される pyruvate はミトコンドリア内に入り、TCA サイクルの基質として利用されるミトコンドリアの活性には重要な基質であり、TCA サイクルでは CS により citrate となり脂肪酸合成に使用される (Figure 1-11)。また、TCA サイクルの活性化により NADH など呼吸鎖に必要な基質が作られる。さらにミトコンドリア内で CS により産生した citrate は細胞質内に移動し、ACLY により

oxaloacetic acid になり、malate dehydrogenase により malate が産生される (Figure 1-11)。この malate/pyruvate/citrate/oxaloacetic acid 生成回路は pyruvate/malate 回路と呼ばれている。我々はプロテオーム解析により、CR により WAT においてこの回路に関連するタンパク質発現が増加することを報告し、CR 動物の WAT はグルコースをよりエネルギー価の高い脂肪酸に変換する機能を有している可能性を指摘した (Okita et al., 2012)。また、ACLY が citrate を oxaloacetic acid に変換する際に、同時に acetyl-CoA が産生されるので、CR 時には acetyl-CoA の産生量は増加することが予想される。Acetyl-CoA はアセチル基供与体となるため、多くある場合はタンパク質のアセチル化が進みやすくなることが知られている (Pietrocola et al., 2015)。しかしながら、CR では脱アセチル化酵素である Sirtuin が活性化していることから、ヒストンアセチル化に代表される転写の活性化には大きく寄与していないと考えられる。一方で、acetyl-CoA は TCA サイクルや脂質合成における炭素源としても知られている。WAT において、CR 時に解糖系を介してミトコンドリア内で産生された acetyl-CoA は pyruvate/malate 回路を介して優先的に脂肪酸合成に使用されることが報告されている (Valle et al., 2010)。本研究においても、TCA サイクルや脂肪酸合成が活性化していることから、CR 動物の WAT はグルコースをよりエネルギー価の高い脂肪酸に変換し、脂質を効率的に利用できるようにリモデリングされていることが示唆された。

成熟脂肪細胞に分化した primary MEFs においても、ミトコンドリア関連タンパク質発現や Pgc-1 α mRNA 発現に Srebp-1c が重要であることが明らかになった。特に、Srebp-1c は Pgc-1 α のプロモーターに直接結合することにより、ミトコンドリアバイオジェネシスを亢進させていることを明らかにした。

以上より、Srebp-1c は *de novo* 脂肪酸合成の活性化とともに、Pgc-1 α の転写を直接活性化することにより、ミトコンドリアバイオジェネシスを亢進することが示唆された。Srebp-1c が *de novo* 脂肪酸合成系とミトコンドリアバイオジェネシスを同時に活性化することは、pyruvate/malate 回路の活性化という点においても合理的であると考えられる。

1-4-3. CR 時における Srebp-1c の酸化ストレスへの影響

ミトコンドリアは主要な ROS の発生源であるので (Halliwell and Gutteridge, 2007; Balaban et al., 2005)、ミトコンドリアバイオジェネシスの亢進は、ミトコンドリア機能の活性化および ROS 産生の亢進を意味する。それゆえ、CR に伴うミトコンドリアバイオジェネシスの亢進により、ROS 産生も増加すると推測される。一方、CR によって酸化ストレスは減少することが知られている (Gredilla and Barja, 2005)。実際、WT マウスの WAT では CR により酸化ストレスは抑制されるが、KO マウスでは抑制されなかった。線虫において、ROS 産生が亢進するような高圧条件下で、ストレス抵抗性の亢進や平均余命の延伸が報告されている (Boveris and Chance, 1973; Cypser et al., 2002; Yanase et al., 1999; Turrens, 2003)。また、CR 動物の特徴でもある低体温により ROS 産生が亢進する (Conti et al., 2006; Hosono et al., 1982)。さらに、線虫において、2-deoxy-D-glucose による寿命延伸効果

は、抗酸化剤の処置によって打ち消されるという報告がある (Schulz et al., 2007)。これらの報告は、ROS 産生の減少が酸化ストレスの減少、さらに寿命延伸に単純に結びつくわけでないことを示している。

NEFA や 3-HB のデータから、WT マウスに比べて KO マウスは絶食に対して脆弱であることが示唆される。ケトン体は acetoacetate、acetone および 3-HB の総称であり、肝臓において産生される。厳密には 3-HB はケトン基を持たないが、3 つのうちで最も生体内の比率が高く、90%ほどを占めている (Hansen and Freier, 1978; Li et al., 1980)。絶食時の血漿中 3-HB 濃度は Srebp-1c KO により減少した。3-HB は内在性の histone deacetylases (HDACs) に対する阻害効果を持ち、FoxO3a の発現亢進を介して MnSOD や catalase の発現を増加させ、酸化ストレスの抑制に寄与する (Shimazu et al., 2013)。それゆえ、Srebp-1c は絶食に対する抵抗性と共に 3-HB の産生増加を介して非摂食状態での酸化ストレスを低減している可能性を示唆する。

WAT においてのみ、ミトコンドリア内の NAD⁺依存性脱アセチル化酵素である SIRT3 タンパク質発現は Srebp-1c 依存的に増加した。SIRT3 はミトコンドリア内における抗酸化因子である superoxide dismutase 2 (SOD2)を脱アセチル化して活性化することが報告されている (Qiu et al., 2010)。

マウスの WAT では、総 GSH 量は CR により Srebp-1c 依存的に増加した。また、MEFs においても、総 GSH 量は KO に比べて WT で有意に高かった。これらを考え合わせると、CR による WAT における酸化ストレスの抑制は、Srebp-1c を介したグルタチオン産生の亢進にあると示唆される。事実、グルタチオン合成の律速酵素である γ -GCS mRNA 発現は WT では CR により増加傾向を示したが、KO では増加傾向が見られなかった。しかしながら、KO MEFs に mature form の Srebp-1c を復帰変異させ γ -GCS mRNA 発現を解析したところ、発現は回復しなかった。それゆえ、 γ -GCS 遺伝子発現は、Fasn や Pgc-1 α 遺伝子とは異なり、Srebp-1c に直接制御されていないと考えられる。一方、グルタチオンの酸化還元において、glutathione peroxidase は二分子の GSH をジスルフィド結合させることで一分子の GSSG にし自身を酸化させることで ROS を還元し、ROS を減少させていることが報告されている (Lu, 2013)。マウス WAT では、GSSG が CR により Srebp-1c 依存的に増加していることから、glutathione peroxidase が活性化している可能性も考えられる。加えて、前述したように CR における ME-1 の活性化により、NADPH が豊富となる。glutathione reductase は NADPH を利用して GSSG から GSH への再還元することから、このような微小環境は GSSG から GSH への再還元 zu 有利と考えられる。また、CR で SIRT3 が活性化することで、IDH2 を脱アセチル化され、NADPH 量を増やし、glutathione reductase を介する GSSG の再還元に関与し、酸化ストレスに対する防御能を高めることが報告されている (Someya et al., 2010)。

以上から、CR における酸化ストレスの低減は ROS 産生の減少によるものではなく、Srebp-1c 依存的に GSH の生合成や SIRT3 の発現増加、ME-1 の発現増加を介した NADPH の増加、さらに

グルタチオンの酸化還元の活性化を介して、抗酸化能を活性化することによるものであることが示唆される。

1-4-4. CR による Srebp-1c を介した寿命および健康寿命の延伸

生物は、常に飢餓と戦いながら、進化してきた。Holliday は CR の抗老化・寿命延伸効果を食餌供給の不足に対する反応であると仮説した (Holliday, 1989)。また、Masoro と Austad は、その学説を深化させ、CR のメカニズムを進化論的立場から以下のように説明した。動物は餌が充分にない時には生殖エネルギーを個体の生存のためのエネルギーに再配分する。一方、肥沃な時期には個体の生存より生殖を優先し、強い子孫を残す (Masoro & Austad, 1996)。CR はこのような神経内分泌系の適応反応を刺激する。脂肪細胞における脂肪滴形成は、Srebp-1 活性化を介して脂肪合成促進、さらなる脂肪滴形成を亢進する正の循環システムを駆動させることが報告されている (Takahashi et al., 2013)。Srebp-1c は主として肝臓において摂食に応答して発現が亢進し、脂肪酸合成関連遺伝子を活性化するため、現代社会では肥満症や脂肪肝の原因遺伝子と考えられてきた (Horton et al., 1998b; Sekiya et al., 2007; Matsuzaka et al., 2007)。しかしながら、Srebp-1c は、脂肪組織においては食餌不足に対して *de novo* 脂肪酸合成とミトコンドリア活性を亢進させることにより、グルコースをよりエネルギー価の高い脂肪酸に変換させる飢餓耐性遺伝子であり、CR によって活性化される重要な因子の一つであると考えられる。

以上の結果は、CR が WAT 特異的に Srebp-1c を介して脂質合成系やミトコンドリア機能を亢進させ、効率的な脂質利用を可能とすると同時に、抗酸化因子を活性化する。結果として酸化ストレスを抑制している可能性を示唆するものであり、CR による抗老化・寿命延伸効果の新たなメカニズムの一端が明らかになったと考える。特に 1. CR による効果が WAT において特に強く誘導されること、2. CR 時の WAT において Srebp-1c が Pgc-1 α mRNA 発現を正に制御すること、3. CR において Srebp-1c が酸化ストレスを抑制することは新規性の高い発見であると考えられる (Figure 5-1)。今回の発見は CR による効果に WAT が重要な役割を果たしていることを示し、この制御に Srebp-1c が中心的な役割を果たしていることを示唆する。元来、肥満症や脂肪肝を増悪させる原因遺伝子として知られていた Srebp-1c が、WAT において CR ではグルコースをよりエネルギー価の高い脂肪酸に変換させ、効率的な代謝を促進するための遺伝子であると考えられることは、これまでと異なる視点を与えるものである。

Figure 1-1

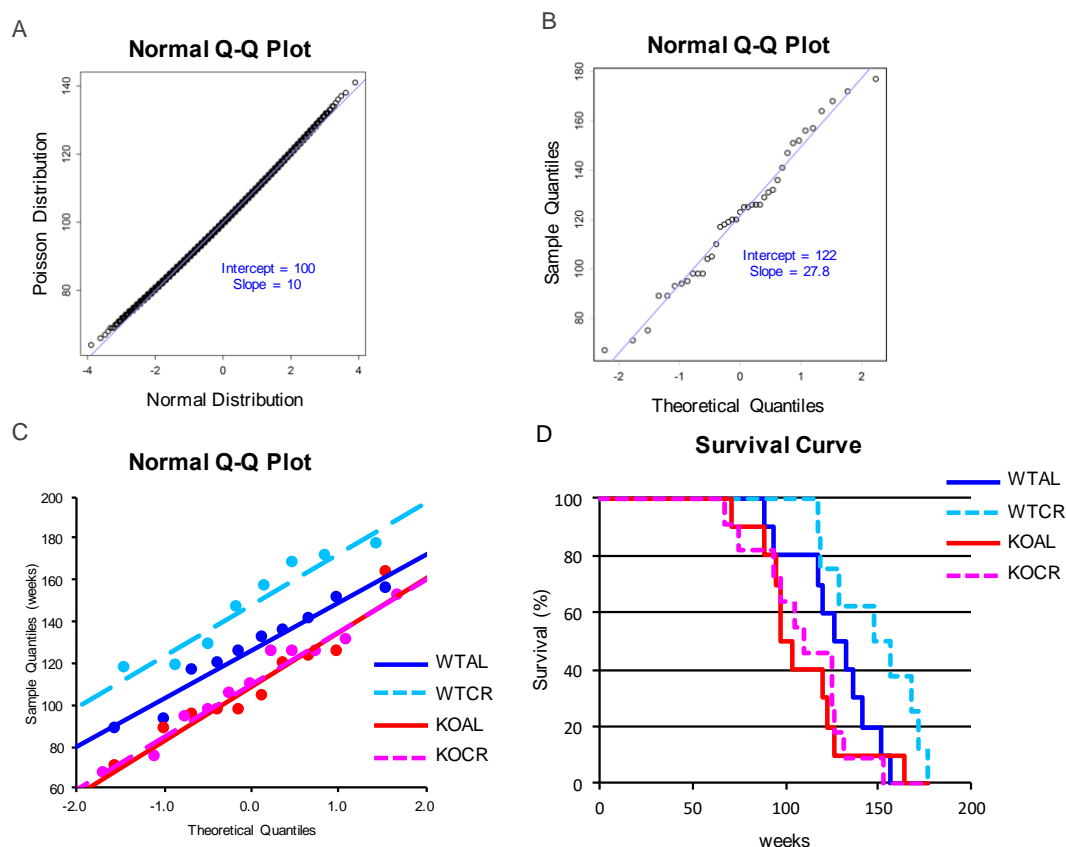


Figure 1-1 Survival curve of mice. (A) Comparison between quantiles of the normalization and Poisson distribution ($\lambda = 100$). Regression line was drawn by using the normal distribution (N:0,1) with the indicated parameters: square root of the intercept coincided with the slope. (B) Normal Quantile-quantile plot for longevity of mice studied. A straight relationship indicates normality of the distribution. (C) 10–12 mice in four groups were maintained under pathogen-free condition. To compare survival distributions of *ad libitum* (AL) and caloric restriction (CR) mice, the log-rank test was applied. P values less than 0.05 were considered statistically significant. (D) Survival curve. 8–11 mice in four groups were maintained under pathogen-free condition. To compare survival distributions of AL and CR mice, the log-rank test was applied. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

Figure 1-2

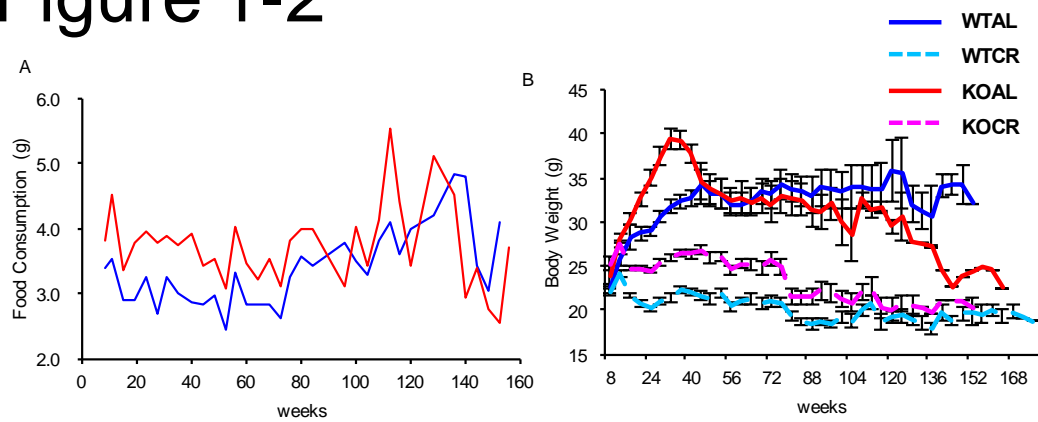


Figure 1-2 Time-course analysis of food consumption and body weight. Food consumption

(A) and body weight (B) were measured every four weeks. Values shown in two panels are means \pm SEM.

Figure 1-3

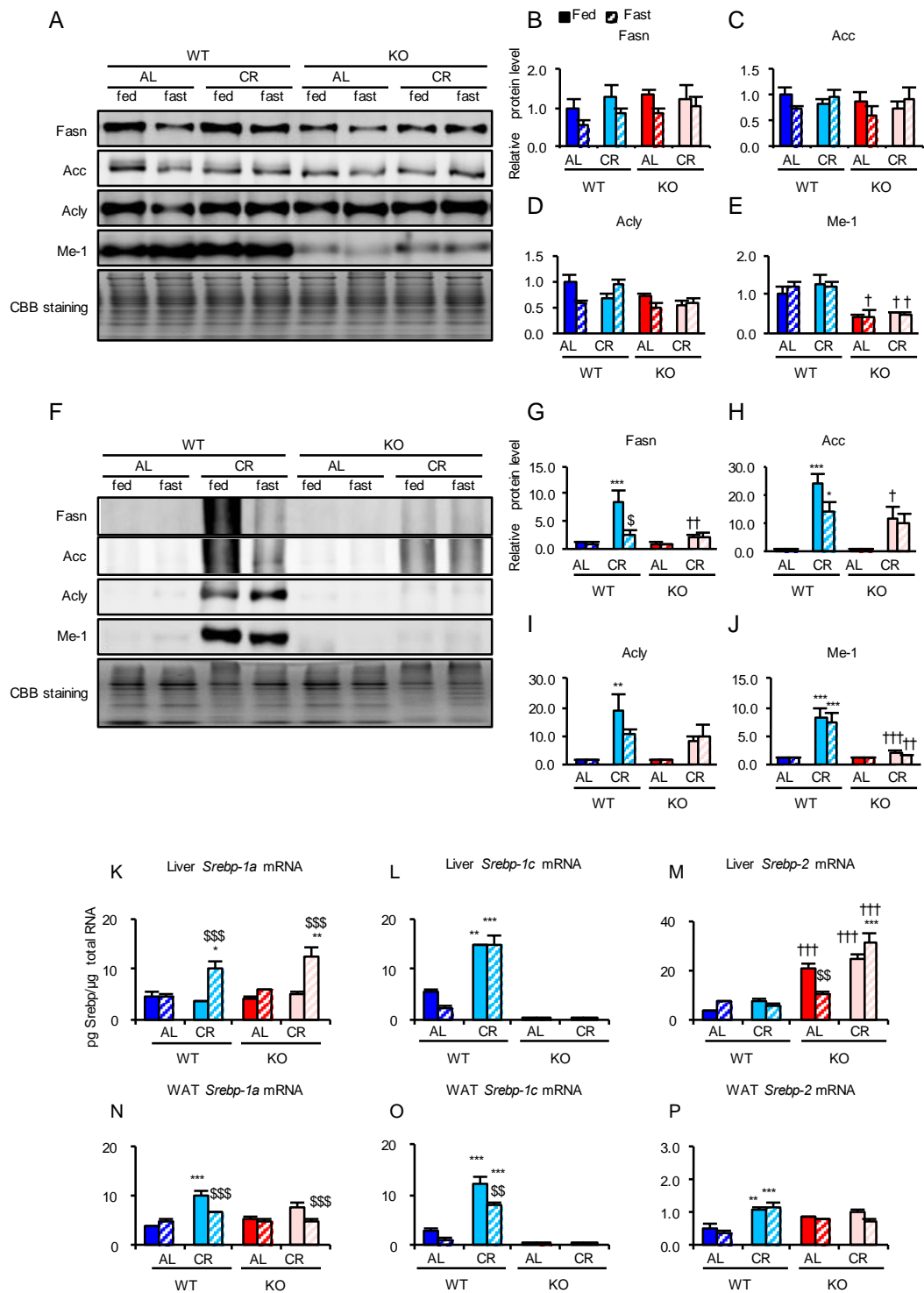


Figure 1-3 Sterol regulatory element binding protein (Srebp)-1c was required for caloric restriction (CR)-associated upregulation of proteins involved in fatty acid (FA) biosynthesis in white adipose tissue (WAT) but not in liver.

(A–E) Liver, (F–J) WAT. Example of an immunoblot images showing expression of proteins involved in FA biosynthesis in liver (A) and WAT (F) from eight groups of mice (wild type (WT) *ad libitum* (AL)-fed, -fast, WTCR-fed, -fast, Srebp-1c knockout (KO) AL-fed, -fast, KOCR-fed, -fast). Quantitative analysis of immunoblots was performed using a chemiluminescence method. Results for levels of fatty acid synthase (Fasn) (B, G), acetyl-CoA carboxylase (Acc) (C, H), ATP citrate lyase (Acly) (D, I) and malic enzyme (Me)-1 (E, J) are expressed as relative intensities of indicated protein/coomassie brilliant blue (CBB) staining compared with in the WTAL fed group (n=4 per group). (K–M) Copy numbers of *Srebp-1a* (K), *Srebp-1c* (L) and *Srebp-2* (M) mRNAs in liver tissue from WTAL-fed, -fast, WTCR-fed, -fast, KOAL-fed, -fast and KOCR-fed, -fast. (N–P) Copy numbers of *Srebp-1a* (N), *Srebp-1c* (O) and *Srebp-2* (P) mRNAs in WAT samples from WTAL-fed, -fast, WTCR-fed, -fast, KOAL-fed, -fast and KOCR-fed, -fast. Accordingly, eight groups of mice (WTAL-fed, -fast, WTCR-fed, -fast, KOAL-fed, -fast, KOCR-fed, -fast) were euthanized at 8–10 months of age (n=3–6 per group). Values shown in all panels are means \pm SEM. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs. AL, †: $p < 0.05$, ††: $p < 0.01$ and †††: $p < 0.001$ vs. WT, \$: $p < 0.05$ vs. fed, analyzed by Tukey's t-test.

Figure 1-4

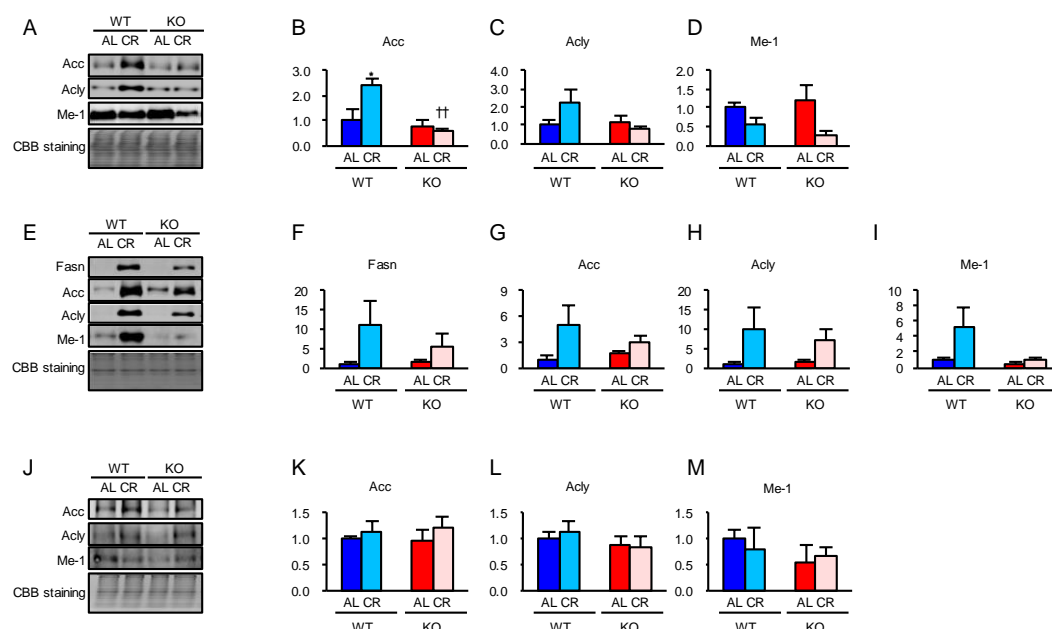


Figure 1-4 Effects of caloric restriction (CR) on expression of proteins involved in fatty acid (FA) biosynthesis and mitochondria in kidney, quadriceps femoris muscles (QFM) and heart of wild type (WT) and knockout (KO).

(A–D) Kidney, (E–I) QFM and (J–M) heart. Example of immunoblot images showing expression of proteins involved in FA biosynthesis in kidney (A), QFM (E) and (J) from four groups of fed mice (n=3–5 per group). Quantitative analysis was performed using chemiluminescence method. Results of fatty acid synthase (Fasn) (F), acetyl-CoA carboxylase (Acc) (B, G, K), ATP citrate lyase (Acly) (C, H, L) and malic enzyme (Me)-1 (D, I, M) are expressed as relative intensity of indicated protein / coomassie brilliant blue (CBB) staining compared with WTAL. Values shown in all panels are means \pm SEM with analysis by Tukey's t-test.

Figure 1-5

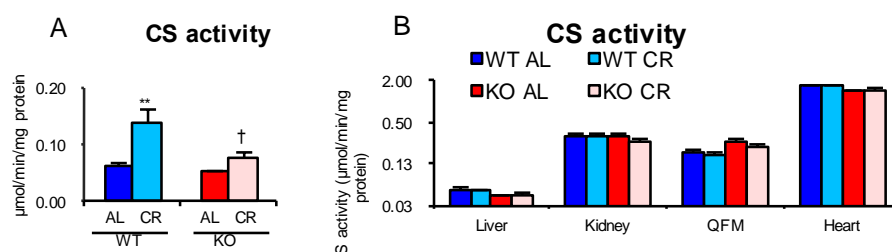


Figure 1-5 CS activity

(A) Citrate synthase (CS) activity in white adipose tissue (WAT) from four groups of fed mice was measured spectrophotometrically at 412 nm. (B) CS activity in liver, heart, quadriceps femoris muscles (QFM) and kidney from four groups of fed mice was measured spectrophotometrically at 412 nm. Values shown in the panel are means \pm SEM with analysis by Tukey's t-test. **: $p < 0.01$ vs. AL, †: $p < 0.05$ vs. WT, analyzed by Tukey's t-test.

Figure 1-6

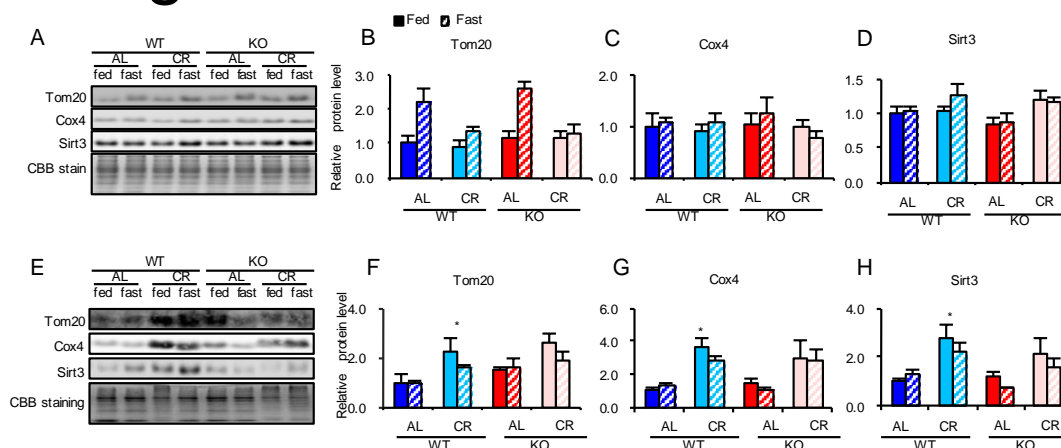


Figure 1-6 Sterol regulatory element binding protein (Srebp)-1c was required for caloric restriction (CR)-associated upregulation of proteins involved in mitochondrial biogenesis in white adipose tissue (WAT) but not in liver.

(A–D) Liver and (E–H) WAT. Example of an immunoblot images showing expression of proteins involved in mitochondrial biogenesis in liver (A) and WAT (E) tissue samples from eight groups of mice (wildtype (WT) *ad libitum* (AL)-fed, -fast, WTCR-fed, -fast, knockout (KO) AL-fed, -fast, KOCR-fed, -fast). Quantitative analysis of immunoblots was performed using a chemiluminescence method. Results for translocase of outer mitochondrial membrane (Tom) 20 (B, F), cytochrome c oxidase subunit 4 (Cox4) (C, G) and Sirt3 (D, H) are each expressed as relative intensity of the indicated protein / coomassie brilliant blue (CBB) staining compared with values in the WTAL fed group (n=4 per group). Values in all panels are means \pm SEM. *: $p < 0.05$ vs. AL analyzed by Tukey's t-test.

Figure 1-7

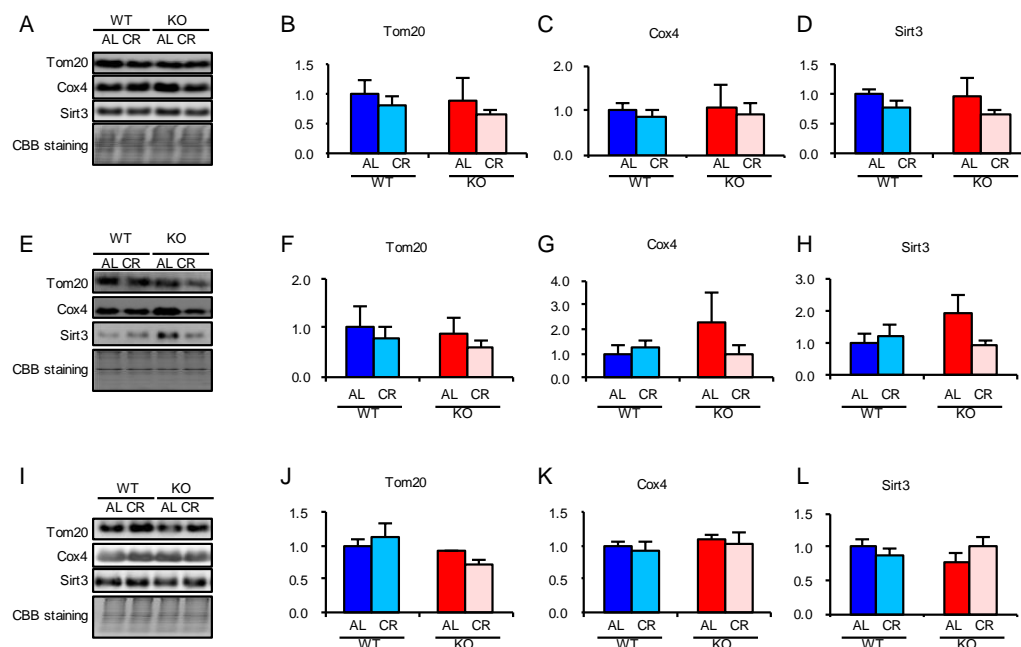


Figure 1-7 Effects of caloric restriction (CR) on expression of proteins involved in mitochondria in kidney, quadriceps femoris muscles (QFM) and heart of wildtype (WT) and knockout (KO).

(A–D) Kidney, (E–H) QFM and (I–L) heart. Example of immunoblot images showing expression of proteins involved in mitochondria in kidney (A), QFM (E) and heart (I) from four groups of fed mice (n=3–5 per group). Quantitative analysis was performed using chemiluminescence method. Results of translocase of outer mitochondrial membrane (Tom) 20 (B, F, J), cytochrome c oxidase subunit 4 (Cox4) (C, G, K) and Sirt3 (D, H, L) are expressed as relative intensity of indicated protein / coomassie brilliant blue (CBB) staining compared with WTAL. Values shown in all panels are means \pm SEM with analysis by Tukey's t-test.

Figure 1-8

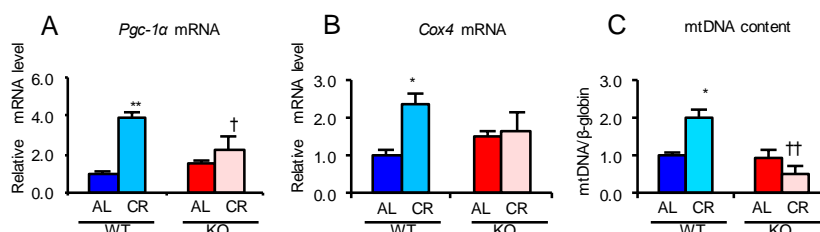


Figure 1-8 Sterol regulatory element binding protein (Srebp)-1c was required for caloric restriction (CR)-associated activation of mitochondrial biogenesis in white adipose tissue (WAT).

(A, B) mRNA expression levels of mitochondrial-related genes, *peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator 1α* (*Pgc-1α*) (A) and *cytochrome c oxidase subunit 4* (*Cox4*) (B), in WAT from four groups of fed mice were analyzed by real-time RT-PCR. Data were normalized against values for TATA box binding protein (*Tbp*) expression (n=3–5). (C) Ratio of mitochondrial (COX2) vs. nuclear (β-globin) DNA in WAT from four groups of fed mice were obtained by real-time PCR (n=4–6). Values in all panels are means ± SEM. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. AL, †: $p < 0.05$ and ††: $p < 0.01$ vs. WT, analyzed by Tukey's t-test.

Figure 1-9

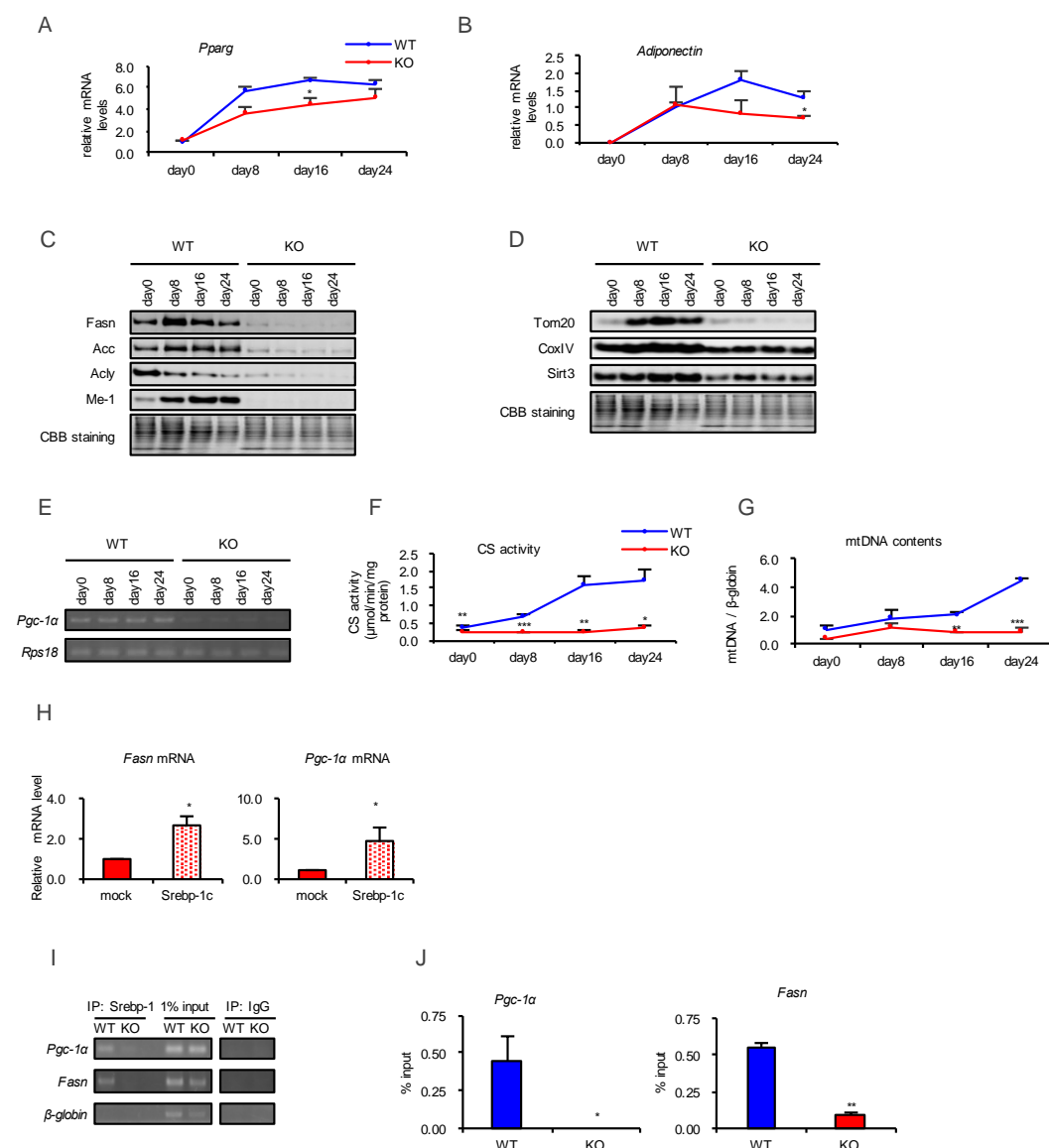


Figure 1-9 Sterol regulatory element binding protein (Srebp)-1c enhanced mitochondrial biogenesis via transcriptional activation of *peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator 1α* (*Pgc-1α*).

(A, B) mRNA expression levels of adipocyte differentiated-related genes, *peroxisome proliferator activated receptor gamma* (*Pparg*) (A) and *adiponectin* (B), in white adipose tissue (WAT) from four groups of fed mice were analyzed by real-time RT-PCR. Data were normalized against values for *TATA box binding protein* (*Tbp*) expression (n=3). (C, D) Example of an immunoblot images showing expression of proteins involved in fatty acid (FA) biosynthesis (C) and mitochondria (D) during adipocyte differentiation in primary mouse embryonic fibroblasts (MEFs) derived from wildtype (WT) and knockout (KO) mice, respectively. (E) Representative gel image of RT-PCR showing expression of *Pgc-1α* genes in primary MEFs. (F) citrate synthase (CS) activity in MEFs from WT and KO was measured spectrophotometrically at 412 nm. (G) Ratio of mitochondrial (COX2) vs. nuclear (β -globin) DNA in MEFs from WT and KO were obtained by real-time PCR (n=3). (H) Transfection of the mature form of Srebp-1c expression vector in KO MEFs. The mRNA expression levels of *Fasn* and *Pgc-1α* were analyzed by real-time RT-PCR. Data were normalized to values for *Rps-18* expression. Values are means \pm SEM (n=3). *: $p < 0.05$ by Student's t-test. (I) SREBP-1c is occupied on *Pgc-1* and *Fasn* promoters in MEFs. Representative gel image of chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay for Srebp-1c enrichment on *Pgc-1α* and *Fasn* promoters. PCRs for promoter of *Pgc-1α*, β -globin and *Fasn* genes were performed using DNA pulled down with Srebp-1 antibody-transcription factor complexes in WT and KO MEFs. (J) ChIP assay was performed by real-time PCR, using the same DNA-Srebp-1 antibody-transcription factor complexes samples as for (I). Percent (%) Input was calculated using the formula: $2^{(Ct_{[1\% \text{ of input}]} - Ct_{[ChIP]})}$. For ChIP assays, IgG was used as a negative control. Experiments were each run twice, with similar results.

Figure 1-10

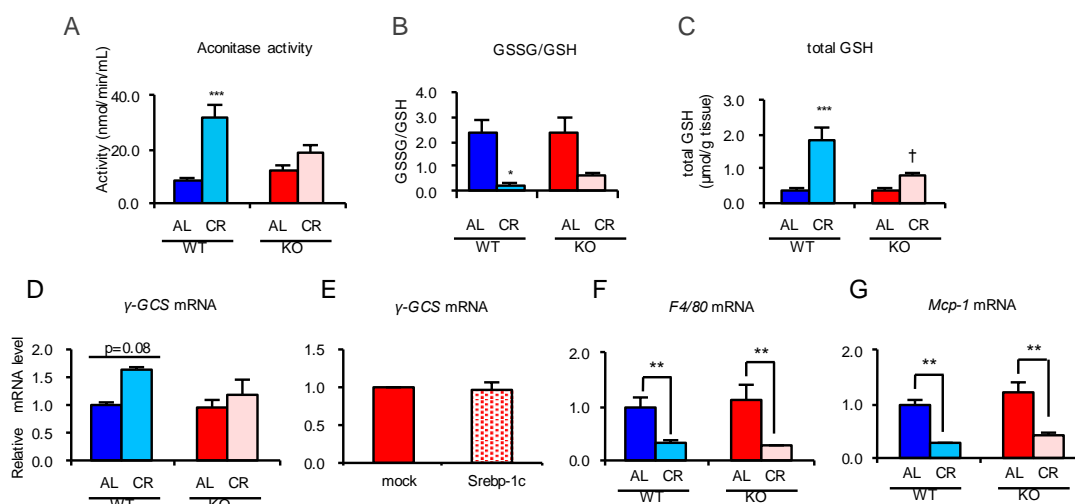


Figure 1-10 Sterol regulatory element binding protein (Srebp)-1c was required for caloric restriction (CR)-associated suppression of oxidative stress and prolongevity effects but was not required for macrophage infiltration in white adipose tissue (WAT).

(A–D) Various biomarkers for oxidative stress, including aconitase activity (A), glutathione disulfide (GSSG) to glutathione (GSH) ratio (B), total GSH (C) and expression level of γ -glutamyl-cysteine synthetase (γ -Gcs) mRNA (D) were measured in WAT from four groups of fed mice (n=3–5 per group). (A) Aconitase activity was spectrophotometrically determined at 340 nm monitoring production of NADPH, generated by a coupled reaction of aconitase with isocitric dehydrogenase. (B, C) GSSG to GSH ratio (B) and total GSH (C) were measured spectrophotometrically at 412 nm by a 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)-GSSG reductase (DTNB-GSSG reductase) recycling assay. (D, F, G) mRNA expression levels of γ -Gcs (D), *F4/80* (F) and *Mcp-1* (G) in WAT from four groups of fed mice were analyzed by real-time RT-PCR. Data were normalized to values for *Tbp* expression (n=3–5). (E) Transfection of the mature form of Srebp-1c expression vector in knockout (KO) MEFs. The mRNA expression level of γ -Gcs was analyzed by real-time RT-PCR. Data were normalized to that for *Rps-18* expression. Values are means \pm SEM (n=3). Values in all panels are means \pm SEM. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs. AL, †: $p < 0.05$ vs. WT analyzed by Tukey's t-test.

1,3-BPG; D-glycerate 1,3-bisphosphate

ACLY; ATP-citrate lyase

FAS; fatty acid synthase

GAPDH: Glyceraldehyde

GR: glutathione reductase

GSSG: glutathione (oxidized)

IDH; isocitrate dehydrogenase
MDH; malate dehydrogenase

ME-1; malic enzyme-1
NAD: nicotinamide adenine di-

MNM; nicotinamide mononucleotide

COA

Acetyl-CoA
Acetyl-CoA

ACC

Acetyl-CoA

ACLY

Citra

Outcomes

Mitochondria

Percentage of population aged 65 and over

Year

Ultra

Case

onit

ac

Isocitra

ID:



5 NAD⁺

4, \rightarrow

Comp

5

$$V \rightarrow \text{NMN}$$

Figure 1-11 Diagram

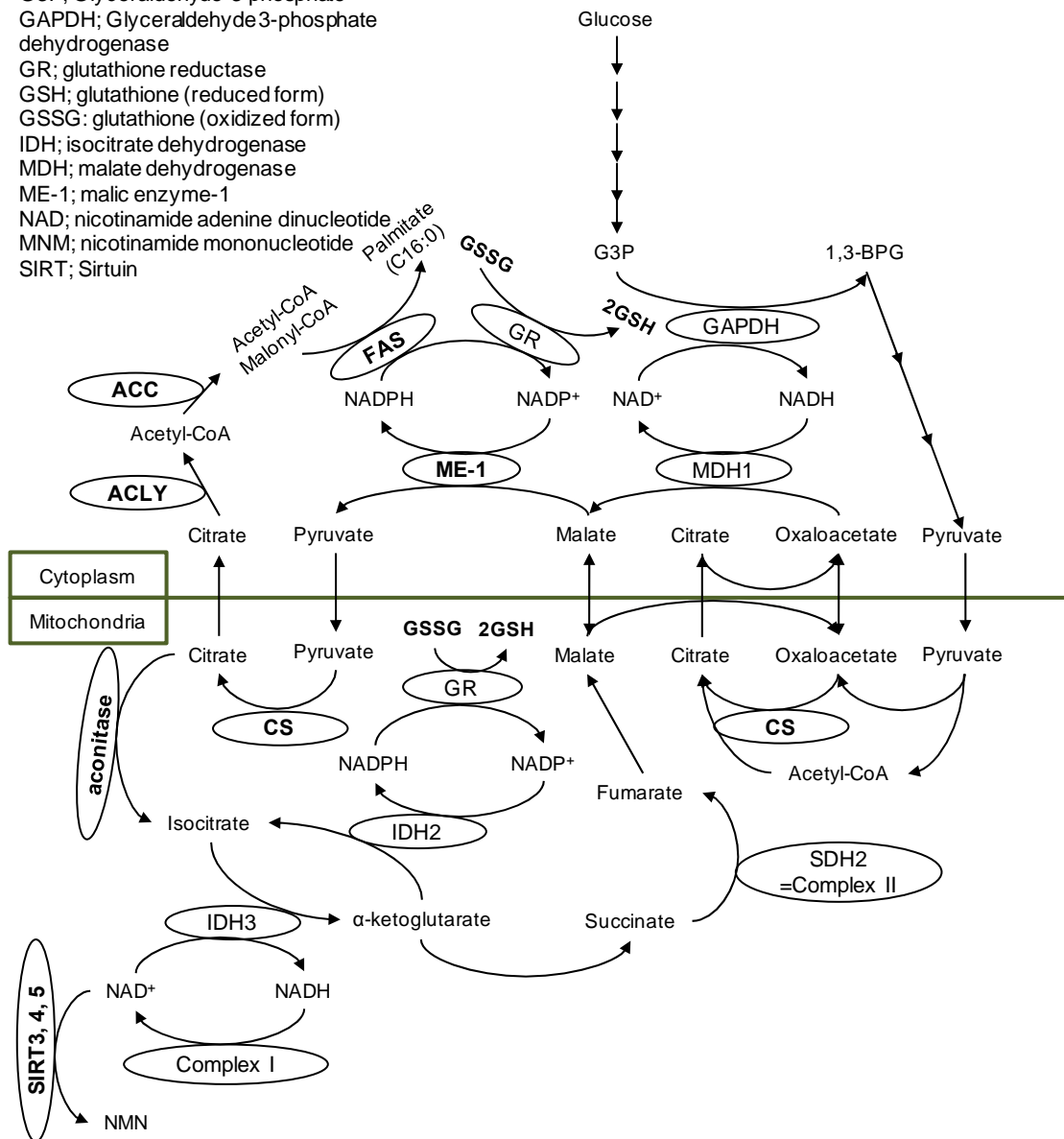


Figure 1-11 Diagram of fatty acid synthesis and use of NAD(P)

Table 1-1: List of primers for Srebp cloning.

	Forward	Reverse
full length Srebp-1c	5'-GTC GAC CAC CAT GGA ACA AAA ACT CAT	
	CTC AGA AGA GGA TCT GGA CTA CAA AGA	5'-GTC GAC TTA GTG GTG GTG GTG GTG
	CGA TGA CGA CAA GGG AGC CAT GGA TTG	GTG GCT GGA AGT GAC GGT GGT TC-3'
	CAC ATT TGA AGA-3'	
mature Srebp-1c	5'-GTC GAC CAC CAT GGA ACA AAA ACT CAT	
	CTC AGA AGA GGA TCT GGA CTA CAA AGA	5'-GTC GAC TTA GTG GTG GTG GTG GTG
	CGA TGA CGA CAA GGG AGC CAT GGA TTG	GTG CAG GGC CAG GCG GGA G-3'
	CAC ATT TGA AGA-3'	

Table 1-2 List of primers for real-time RT-PCR.

	Forward	Reverse
Adiponectin	5'-TGC CGA AGA TGA CGT TAC TAC AAC-3'	5'-CTT CAG CTC CTG TCA TTC CAA C-3'
Cox IV	5'-CAT TTC TAC TTC GGT GTG CCT TC-3'	5'-CAC ATC AGG CAA GGG GTA GTC-3'
F4/80	5'-GGC CAA GAT TCT CTT CCT CAC-3'	5'-TCA CCA CCT TCA GGT TTC TCA C-3'
Fasn	5'-AGC AGG CAC ACA CAA TGG AC-3'	5'-GAA GAA GAA AGA GAG CCG GTT G-3'
γ-Gcs	5'-CCA TCA TCA ATG GGA AGG AAG-3'	5'-TCC ACC TGG CAA CAG TCA TTA G-3'
Mcp-1	5'-CCA GCC AAC TCT CAC TGA AGC-3'	5'-CTT CTT TGG GAC ACC TGC TG-3'
Pparg	5'-CAC AAT GCC ATC AGG TTT GG-3'	5'-GCG GGA AGG ACT TTA TGT ATG AG-3'
Ppargc1a	5'-AGA CGG ATT GCC CTC ATT TG-3'	5'-CAG GGT TTG TTC TGA TCC TGT G-3'
Srebp-1a	5'-GGC CGA GAT GTG CGA ACT-3'	5'-TTG TTG ATG AGC TGG AGC ATG T-3'
Srebp-1c	5'-GGA GCC ATG GAT TGC ACA TT-3'	5'-GGC CCG GGA AGT CAC TGT-3'
Srebp-2	5'-CGA TCA AGT CAG CAG CCA AG-3'	5'-AAT CCC ACA GAG TCC ACA AAA G-3'
Tbp	5'-CAG TAC AGC AAT CAA CAT CTC AGC-3'	5'-CAA GTT TAC AGC CAA GAT TCA CG-3'

Table 1-3 List of 1st antibody for Western blotting.

Name	Immunized	Clonal	Supplier	Catalog Number
Acc	rabbit	polyclonal	Cell Signaling, Boston, MA	#3662
Acly	rabbit	EP704Y	Epitomics, Burlingame, CA	1699-1
COX IV	rabbit	polyclonal	Cell Signaling	#4844
Fasn	mouse	23	Becton, Dickinson, Franklin Lakes, NJ	610962
ME-1	rabbit	polyclonal	Sigma	SAB4501853
Sirt3	rabbit	D22A3	Cell Signaling	#5490
Tom20	mouse	4F3	Sigma	WH0009804M1

Table 1-4 List of 2nd antibody for Western blotting.

Name	Supplier	Catalog Number
HRP-conjugated F(ab') ₂ fragment of goat anti-mouse IgG	Jackson Immunological Research (West Grove, PA)	115-036-062
HRP-conjugated F(ab') ₂ fragment of goat anti-rabbit IgG	Jackson Immunological Research	111-036-045

Table 1-5 List of primers for COX II and β -globin.

	Forward	Reverse
Cox II (Mt DNA)	5'-CCA TCC CAG GCC GAC TAA-3'	5'-AAT TTC AGA GCA TTG GCC ATA GA-3'
β -globin (genomic DNA)	5'-ATC CAG GTT ACA AGG CAG CT-3'	5'-GGG AAA CAT AGA CAG GGG-3'

Table 1-6 List of primers for ChIP.

	Forward	Reverse
Fasn	5'-CCA GTG TGA CCA AGC ACG CC-3'	5'-GCG CTG GAG CAC AAG GAA CG-3'
Pgc-1 α	5'-AGT GAC AGC CCA GCC TAC TTT-3',	5'-AGC CCC TTA CTG AGA GTG AAC-3'
β -globin	5'-CCT GCC CTC TCT ATC CTG TG-3'	5'-GCA AAT GTG TTG CCA AAA AG-3'

Table 1-7 Body and tissue weight

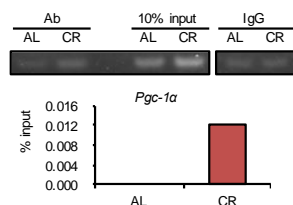
Body and tissue weight		WT			KO	
		AL	CR		AL	CR
Body weight	(g)	29.97 \pm 0.89	21.78 \pm 0.53 *		37.27 \pm 1.81 †	26.11 \pm 0.87
Liver	(g)	1.018 \pm 0.035	0.821 \pm 0.024		1.358 \pm 0.073 †	1.038 \pm 0.037 *†
WAT	(g)	0.915 \pm 0.105	0.230 \pm 0.027 *		1.227 \pm 0.152	0.327 \pm 0.031 *
BAT	(g)	0.099 \pm 0.008	0.078 \pm 0.006		0.155 \pm 0.025	0.086 \pm 0.009 *
Heart	(g)	0.146 \pm 0.004	0.119 \pm 0.003		0.198 \pm 0.010 †	0.150 \pm 0.007 *†
Kidney	(g)	0.197 \pm 0.006	0.144 \pm 0.003 *		0.235 \pm 0.012 †	0.156 \pm 0.008 *

Table 1-8 Plasma parameter

Plasma parameter	WT				KO			
	AL		CR		AL		CR	
	Fed	Fasted	Fed	Fasted	Fed	Fasted	Fed	Fasted
Glucose (mg/dL)	203.7 ± 9.6	110.8 ± 18.1 \$	176.8 ± 4.5	169.9 ± 14.2	243.7 ± 9.7	157.3 ± 21.1 \$	190.2 ± 9.4	200.1 ± 11.4
t-Cho (mg/dL)	72.63 ± 2.37	71.12 ± 1.65	49.90 ± 0.80 *	53.31 ± 5.08	55.96 ± 0.76	62.40 ± 0.00	24.89 ± 4.24 *†	43.07 ± 2.22 *\$
TG (ng/dL)	107.9 ± 10.6	140.2 ± 6.5	84.1 ± 2.8	72.4 ± 4.6 *	86.3 ± 14.1	103.9 ± 5.8	84.0 ± 5.9	65.9 ± 3.3
NEFA (mEq/mL)	0.59 ± 0.03	1.04 ± 0.04 \$	0.42 ± 0.05 *	0.86 ± 0.05 *\$	0.51 ± 0.02	0.81 ± 0.04 †\$	0.41 ± 0.02	0.70 ± 0.01 \$
3-HB (mM)	undetected	1.94 ± 0.15	undetected	0.72 ± 0.05 **	undetected	0.97 ± 0.12 †	undetected	0.58 ± 0.22
Insulin (pg/mL)	1575 ± 347	262 ± 92 \$	1373 ± 40	45 ± 4 \$	2234 ± 59	362 ± 43 \$	2158 ± 187	455 ± 95 \$
IGF-1 (ng/mL)	426.28 ± 11.33	322.24 ± 40.45	313.63 ± 11.59 *	244.11 ± 32.21	482.20 ± 18.75	360.20 ± 20.40 \$	347.02 ± 29.11 **	306.41 ± 8.42
Adiponectin (µg/mL)	8.97 ± 0.41	8.91 ± 0.67	10.87 ± 0.32	11.70 ± 0.37	9.60 ± 0.91	14.17 ± 1.43 †\$	13.03 ± 1.14	11.61 ± 1.04
Leptin (ng/mL)	12.80 ± 2.09	8.98 ± 1.86	5.82 ± 0.73	1.07 ± 0.21 ***	25.92 ± 6.03	17.66 ± 6.38	8.50 ± 1.33 *	3.40 ± 0.45 **†

Each value represents the mean±S.E.M. of 3-5 mice. *, p<0.05 vs. AL, †, p<0.05 vs. Fed analyzed by Tukey's test. t-Cho: total cholesterol, TG: triglyceride, NEFA: non-esterified fatty acid, 3-HB: 3-hydroxybutyric acid.

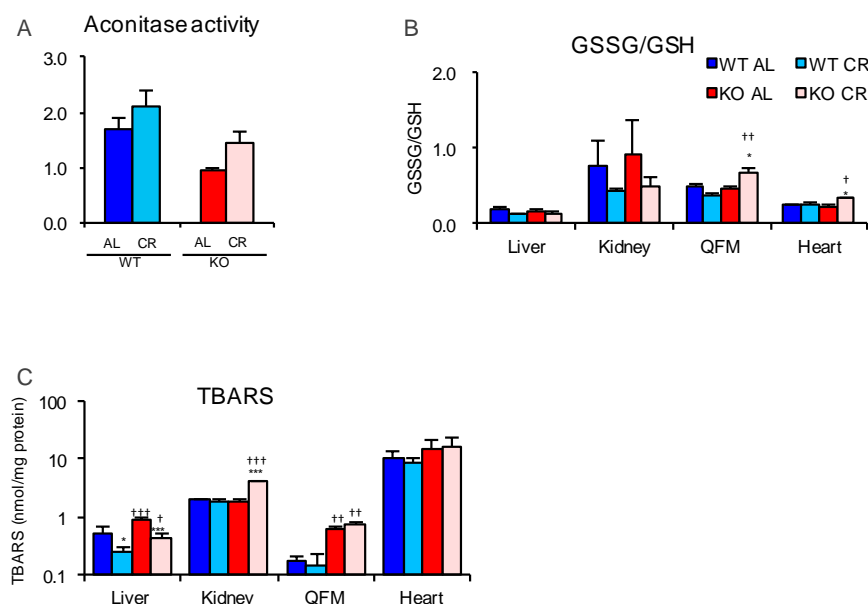
Supplemental Figure 1-1



Supplemental Figure 1-1 ChIP assay in rat WAT

(A) CR increases Srebp-1 enrichment on *Pgc-1α* promoter in rat WAT. Representative gel image of chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay for Srebp-1c enrichment on *Pgc-1α* promoter. PCRs for promoter of *Pgc-1α* genes were performed using the DNA pulled down with the Srebp-1 antibody-transcription factor complexes in WAT. % Input was calculated using the formula: $2^{(Ct [1\% \text{ of input}] - Ct [\text{ChIP}])}$. For ChIP assays, IgG was used as negative control. Experiments were duplicated.

Supplemental Figure 1-2



Supplemental Figure 1-2 Effects of CR on oxidative stress in various tissues of WT and KO.

Various biomarkers for oxidative stress were measured in several tissues from four groups of fed mice (n=3–6 per group). (A) Aconitase activity of liver was spectrophotometrically measured by NADPH formation at 340 nm. (B) oxidized glutathione (GSSG) to glutathione (GSH) ratio was measured spectrophotometrically at 412 nm by DTNB-GSSG reductase recycling assay. (C) Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) level, as a lipid peroxidation marker, was measured spectrophotometrically at 532 nm and normalized by protein content. Values shown in all panels are means \pm SEM. *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$ vs AL, †: $p < 0.05$, ††: $p < 0.01$, †††: $p < 0.001$ vs. WT analyzed by Tukey's t-test.

第二章

部位別 WAT における CR への応答の相違

2-1. 背景

第一章では CR における主要臓器の解析結果を示したが、その中でも WAT は全身に分布しており、部位によって特性が異なることが知られている。例えば、脂肪酸のターンオーバーは皮下 WAT (sWAT) よりも内臓 WAT (vWAT) の方が速く、vWAT は sWAT に比べインスリンによる脂肪分解抑制作用を受けにくいことが知られている (Engfeldt et al., 1988)。さらに分泌タンパク質のプロファイルも異なっており、ヒトにおけるアディポネクチンおよびレプチンの発現は vWAT より sWAT の方が高い (Fisher et al., 2002)。これらの違いは内臓肥満患者と皮下肥満患者におけるメタボリックシンドロームリスクの相違に関連していると考えられている。ヒトにおいて、vWAT が増加する中心性肥満はインスリン抵抗性、2 型糖尿病、脂質異常症やアテローム性動脈硬化症と関連しているが (Carey et al., 1997; Wang et al., 2005; Nicklas et al., 2006; Ross et al., 2007)、sWAT の増加による末梢性肥満はインスリン感受性の改善、2 型糖尿病、脂質異常症およびアテローム性動脈硬化のリスク低減に寄与している (Misra et al., 1997; Snijder et al., 2003; Tanko et al., 2003)。高脂肪食誘導性肥満マウス、レプチンシグナル欠損マウスおよび老齢マウスを含むげっ歯類モデルでは、WAT の中でも特に vWAT を蓄積し、インスリン抵抗性になると報告されている (Rebuffe-Scrive et al., 1993; Dubuc et al., 1976; Barzilai et al., 1998)。また、マウスにおいて sWAT を腹腔内に移植することで、体重、脂肪量、血漿グルコースおよびインスリンレベルを低下させ、また同マウスで高インスリン正常血糖クランプを行なうとインスリン感受性が改善し、グルコース取り込み量が増加することが報告されている (Tran et al., 2008)。これらの知見は sWAT と vWAT が本質的に異なることを示している。

以上の背景より、CR による WAT への効果が、WAT の部位により異なると考えた。そこで、長期 CR の効果が得られる 6 ヶ月間 CR した 9 か月齢ラットを用いて、内臓脂肪である eWAT に加え、後腹膜 WAT (rWAT) と sWAT での、CR による応答を比較した。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 使用ラットについて

日本クレア株式会社 (Tokyo, Japan) から 5-7 週齢♂Wistar 系ラットを購入し、東京理科大学薬学部動物実験施設内 SPF 環境下、明暗サイクルは 12 時間で飼育し、AL 群には CRF-1 (Oriental Yeast, Tokyo, Japan) を十分量与えた。AL 群の摂食量を測定し、CR 群にはその 70 %量を与える事とし、1 日に 1 回 70 %量の食餌を与えた。CR は 3 ヶ月齢より開始した。AL 群、CR 群、それぞれに関して fed 群、fast 群を作製した。fast 群については、屠殺前日の CR 群給餌時に餌を取り除き絶食状態とした。4 群を 9 ヶ月齢で屠殺し、後腹膜 WAT、精巣上体周囲 WAT、皮下 WAT を摘出した。臓器は一部をホルマリン固定し、残りは液体窒素で凍結後、-80 °Cフリーザーで保存した。採血した血液は EDTA を加え、遠心 (2500 x g, 4 °C, 10 min) して採取した上清を血漿サンプルとし、-80 °C にて保存した。

すべての動物実験は、東京理科大学動物実験委員会による審査、学長による承認を得て、東京理科大学動物実験指針に従い行われた。また、すべての遺伝子組み換え実験は、東京理科大学遺伝子組換え実験安全委員会による審査、学長による承認を得て、東京理科大学遺伝子組換え実験実施規則に従い行われた。

2-2-2. コンピューター断層撮影 (Computed Tomography; CT)

第三世代 CT スキャナーである Latheta LCT-200 (Hitachi-Alola, Tokyo, Japan) を使用し、管電圧は 50 kV、電流は 0.5 mA の一定状態で断層撮影を行なった。ラットを直径 120 mm のホルダー内に入れ、走査機を 360°回転させ、データを収集し、画素あたり 96 μm の解像度、一枚あたりの幅が 240 μm 、1500 μm 間隔で撮影をした。-550~-140 HU の密度範囲を WAT として評価し、解析した。ラットの推定 X 線被曝は 40 mSv 未満に維持して撮影を行なった。

2-2-3. 白色脂肪組織の組織学的解析

WAT を 10 %中性緩衝ホルマリン溶液 (10 % formaldehyde in PBS) にて固定し、パラフィン包埋後、5 μm の厚さで薄切し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行った。標本は光学顕微鏡 Eclipse 80i およびオプションユニット DS-Fi1c, DS-L2 (Nikon, Tokyo, Japan) を用いて拡大率 40 倍で観察、1 視野あたり複数枚の画像を撮影し、画像編集解析ソフトウェア ImageJ 1.4 (Wayne Rasband National Institute of Health, Bethesda, MD) を用い、コンポジット合成によるノイズを除去後、脂肪細胞のサイズを測定した。

2-2-4. Western blotting

組織または細胞を、適量の SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2 % SDS, 3 M urea, 6 %

glycerol) を加えホモジェナイズ後、さらにソニケーションした。得られたライセートを遠心 (12000 x g, 4 °C, 30 min) し、上清を回収し、95 °C で 5 分間インキュベートした。得られた上清に含まれるタンパク質量を BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, 23225) を用いて測定し、SDS sample buffer により 1 mg/mL の濃度に調製した。サンプルの 1/10 量の 0.25 % BPB / 5 % 2-mercaptoethanol = 1 : 1 混液を加え、95 °C で 5 分間還元処理をした。以上の処理で得られたサンプルを SDS-PAGE 法により泳動後、coomassie brilliant blue (CBB) 染色を行った。脱色後のゲルの泳動像を LAS-3000 ルミノ・イメージアナライザー (Fujifilm, Tokyo, Japan) にて撮影し、解析ソフトウェア Multi Gauge 3.1 (Fujifilm) を用いてラダー状になった全タンパク質の染色強度からタンパク量を定量し、サンプル間のタンパク質量を統一した。調製し直したサンプルを SDS-PAGE 法にて泳動し、ニトロセルロースメンブレン (PALL, Port Washington, NY, 66485) に転写した。転写後、メンブレンは blocking 溶液中 (2.5 % skim milk (WAKO, 190-12865) / 0.25 % BSA in TTBS (25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 140 mM NaCl, 2.5 mM KCl (Wako, 163-03545), 0.1 % Tween 20) = 1 : 1) にて室温で 1 時間震盪させた。その後、一次抗体を反応液 (Canget solution I (Toyobo, Osaka, Japan, NKB-201) / blocking 溶液 = 2 : 1) 中に加え、4 °C にてメンブレンと一晚または二晩反応させた。一次抗体反応後、メンブレンを TTBS にて洗浄し (5 分×2 回および 10 分×2 回)、二次抗体を反応液 (Canget solution II (Toyobo, NKB-101) / blocking 溶液 = 2 : 1) 中に加え、1 時間室温にてメンブレンと反応させた。二次抗体反応後、メンブレンを TTBS にて洗浄し (5 分×2 回および 10 分×2 回)、ImmunoStar® LD (WAKO, 290-69904) を用いた化学発光を行い、LAS-3000 ルミノ・イメージアナライザーにて撮影し、Multi Gauge 3.1 を用いて定量した。以下、Table 2-1 に一次抗体、Table 2-2 に二次抗体の情報を記載した。

2-2-5. Real-time RT-PCR

mRNA を抽出し、分光光度計 NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて濃度を測定した。1 µg の RNA を PrimeScript® RT reagent Kit (TaKaRa, RR037A) により逆転写させ cDNA を得た。目的遺伝子は、SYBR® Premix Ex Taq™ (TaKaRa, RR041A) を用いて、Real-time PCR システム ABI PRISM®7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA) により解析した。なお、それぞれの反応は各メーカーが提供するプロトコールに従い行い、使用したプライマーを Table 2-3 に記載した。

2-2-6. 血漿中グルコース、インスリン、アディポネクチンの定量

血漿中のグルコース、インスリン、アディポネクチンはそれぞれ LabAssay™ Glucose (Wako, 298-65701)、Rat Insulin ELISA Kit (U-E type) (AKRIN-130, Shibayagi, Gunma, Japan)、Mouse/Rat High Molecular Weight Adiponectin ELISA KIT (Shibayagi) を用いて定量した。なお、それぞれの

反応は各メーカーが提供するプロトコールに従い行った。

2-2-7. 統計検定

データは平均±標準誤差で示した。データの統計検定は、2 群間では Student's t-test、多群間では二元配置分散分析を行なった後に Tukey's t-test を行なった。また、実験ごとに用いた検定方法は、材料と方法の各項目または Figure legends に記載した。

2-3. 結果

2-3-1. 脂肪組織量および分布

体重および白色脂肪組織 (WAT) の重量は CR ラットで有意に少なく、特に後腹膜脂肪 (rWAT) で顕著だった (Table 2-4)。そこで我々は computed tomography (CT) を用いて、横隔膜の上端から精巣までの領域を 10 等分し、WAT の分布を詳細に解析した (Figure 2-1A)。総 WAT 量に対する領域毎 WAT 量の割合は領域 2-4 では有意に低く、領域 9 では有意に高かった (Figure 2-1B)。さらに内臓脂肪 (vWAT) と皮下脂肪 (sWAT) に分けて解析したところ、vWAT/総 WAT は領域 2-4 で有意に低く、sWAT は領域 3, 4, 7, 9 で有意に高かった (Figure 2-1C, D)。これらの知見は CR で sWAT よりも vWAT で減少し、特に rWAT で減少することを示唆した。

2-3-2. 組織学的解析

次に、3つの部位の WAT (後腹膜脂肪 (rWAT)、精巣周囲脂肪 (eWAT)、皮下脂肪 (sWAT)) の脂肪細胞サイズの分布を比較した。AL での脂肪細胞の大きさは $rWAT > eWAT > sWAT$ の順であった (Figure 2-2A, B)。また、脂肪細胞サイズの平均や大型脂肪細胞 ($< 5000 \mu m^2$) の割合は、2 要因分散分析により 3 つのすべての部位で CR により有意に減少した。また、両パラメーターは rWAT および eWAT では AL fed に比べ CR fed で有意に減少し (平均: 約 0.5 倍、大型: 約 0.05 倍)、rWAT では AL fast に比べ CR fast においても有意に減少した。一方で、sWAT では両摂餌状態でも有意な差はなかった (平均: 約 0.6 倍、大型: 約 0.1 倍) (Figure 2-2C, D)。これらの結果は、CR により脂肪細胞サイズは減少するが、 $rWAT > eWAT > sWAT$ の順で減少しやすいことを示唆する。

2-3-3. 各 WAT における脂肪酸合成および分解関連タンパク質の発現

我々は第一章で示したように、eWAT で脂肪酸合成関連タンパク質の発現が CR により亢進することを示している。そこで、脂肪酸合成関連タンパク質である ATP citrate lyase (ACLY) および malic enzyme (ME)-1 の発現を測定したところ、いずれの WAT においても同様に CR fed で発現が有意に増加した (Figure 2-3)。一方で、CR ラットにおいて、rWAT と eWAT では fast 状態で ACLY および ME-1 の発現が減少したが、sWAT では変動しなかった (ACLY; rWAT: 約 0.5 倍, eWAT: 約 0.3 倍, sWAT: 約 0.5 倍、ME-1; rWAT, eWAT: 約 0.3~0.4 倍, sWAT: 約 0.9 倍) (Figure 2-3)。

続けて、脂肪分解関連タンパク質である、hormone sensitive lipase (HSL)、活性型である HSL pSer563、adipose triglyceride lipase (ATGL) を測定した。ATGL はいずれの WAT でも AL fast に比べ、CR fast で有意に高かった (Figure 3-4 A-C, M-O)。一方で、HSL のリン酸化は rWAT と eWAT では CR fed で、sWAT では CR fast で有意に高かった (fed; rWAT, eWAT: 約 3 倍, sWAT: 約 2 倍、fast; rWAT: 約 1 倍, eWAT: 約 0.6 倍, sWAT: 約 2.5 倍) (Figure 2-4A-L)。これらの結果は、CR による脂肪酸合成の活性化には 3 つの WAT で大差がないものの、脂肪分解関連タンパク

質に対する CR の効果が vWAT (rWAT と eWAT) と sWAT で異なることを示している。

2-3-4. 各 WAT におけるミトコンドリア関連タンパク質の発現

続けて、第一章と同様にミトコンドリア関連因子である sirtuin 3 (SIRT3)、toranslocase of outer mitochondrial membrane 20 (TOM20)、cytochrome c oxidase subunit 4 (COXIV) のタンパク質発現を測定したところ、いずれの WAT においても同様に CR fed で発現が有意に増加し (約 2~3 倍)、CR fast で AL と同等まで減少した (Figure 2-5)。

2-3-5. 各 WAT におけるインスリンシグナル

ここまでの結果で唯一異なっていた HSL のリン酸化はインスリンシグナルによって負の制御を受けることが知られている (Berwick et al., 2002; Lampidonis et al., 2011)。そこで、各 WAT における脂肪分解のメカニズムを調べるため、血漿中グルコース量およびインスリン量、インスリンシグナルの活性化を示す WAT における insulin receptor substrate 1 (IRS1) および pAKT を測定した。

血漿中グルコース量は CR により減少したが、摂食状態による変動はなかった (Table 2-4)。一方、血漿中インスリン量は fast 状態で顕著に減少していたが、CR による変動はなかった (Table 2-4)。

IRS1 タンパク質発現量は、vWAT に比べ sWAT で高かった (data not shown)。また、rWAT では CR fed で IRS1 タンパク質に発現変動は無かったが、eWAT で有意な増加および sWAT で増加傾向を示した (Figure 2-6A-F)。さらに、CR fed において、sWAT でのみ IRS1 のバンドが 高分子量側へシフトしていた (Figure 2-6A-C)。vWAT では、pAKT および total AKT タンパク質発現量は、CR による変化がなかった (Figure 2-6G, H, J, K, M, N, P, Q)。しかし、sWAT では、摂食条件において、CR により total AKT は減少した一方で、pAKT はわずかに増加したため、pAKT/total AKT は有意に増加した (Figure 2-6I, L, O, R)。ただし、CR 条件下においては pAKT が fed 状態に比べ fast 状態で、いずれの WAT でも減少した (Figure 2-6D-F, J-L)。これらの知見により、いずれの WAT においても CR 条件下でインスリンシグナルの切り替え能が改善されるが、特に sWAT でインスリン感受性が改善することが示唆された。

2-3-6. 各 WAT におけるアディポカイン関連遺伝子発現

さらに、各 WAT における表現型の違いを調べるため、アディポカインであるアディポネクチンとレプチンについて検討した。血漿中アディポネクチン量は CR により増加したが、摂食状態による変動はなかった (Table 2-4)。eWAT および sWAT において、CR fed でアディポネクチンの mRNA 発現は顕著に増加したが、rWAT では変化しなかった (rWAT: 約 1.5 倍, eWAT: 約 2 倍, sWAT: 約 2.5 倍) (Figure 2-7A-C)。また、いずれの WAT においても CR fed に比べ CR fast において、アディポネクチンの mRNA 発現が顕著に減少した (Figure 2-7A-C)。一方で、レプチン mRNA 発現は

rWAT と eWAT において CR により減少したが、sWAT では減少しなかった (fed; rWAT: 約 0.5 倍, eWAT: 約 0.8 倍, sWAT: 約 0.8 倍, fast; rWAT: 約 0.3 倍, eWAT: 約 0.4 倍, sWAT: 約 0.7 倍) (Figure 2-7D-F)。対照的に、レプチンの mRNA 発現は AL・CR どちらにおいても fed 状態に比べ fasted 状態で有意に減少した (Figure 2-7D-F)。これらの知見は、rWAT、eWAT、sWAT それぞれで アディポカイン発現に対する CR の効果が異なることを示唆する。

2-3-7. 各 WAT におけるマクロファージ関連遺伝子発現

最後に、WAT におけるマクロファージ浸潤の CR による効果を調べた。全マクロファージのマーカーである F4/80 の mRNA 発現は rWAT と sWAT で CR により顕著に減少したが、eWAT では変化しなかった (fed; rWAT: 約 0.4 倍, eWAT: 約 0.6 倍, sWAT: 約 0.5 倍, fast; rWAT: 約 0.6 倍, eWAT: 約 1 倍, sWAT: 約 0.7 倍) (Figure 2-8A-C)。全ての WAT において、M1 マクロファージ特異的マーカーである Cd11c の mRNA 発現は CR により顕著に減少した (Figure 2-8D-F)。しかし、M2 マクロファージ特異的マーカーである Cd163 の mRNA 発現は F4/80 と同様に rWAT と sWAT で CR により顕著に減少したが、eWAT では変化しなかった (fed; rWAT: 約 0.4 倍, eWAT: 約 0.9 倍, sWAT: 約 0.4 倍, fast; rWAT: 約 0.7 倍, eWAT: 約 1.2 倍, sWAT: 約 0.6 倍) (Figure 2-8G-I)。また、炎症性サイトカインである IL-6 と TNF α の mRNA 発現も確認した。IL-6 mRNA 発現は rWAT と eWAT において CR により減少したが、sWAT では減少しなかった (fed; rWAT: 約 0.2 倍, eWAT: 約 0.3 倍, sWAT: 約 1 倍, fast; rWAT: 約 0.1 倍, eWAT: 約 0.2 倍, sWAT: 約 0.1 倍) (Figure 2-8J-L)。一方で、TNF α mRNA 発現は大きな変動はなかった (Figure 2-8M-O)。

2-4. 考察

2-4-1. 3 つの WAT における CR による脂質代謝の違い

今回の研究では、rWAT、eWAT、sWAT における CR 応答の差異に関して解析した。Table 1 に示すように、CR は他の組織よりも WAT 優先的に影響し、WAT 量の減少は eWAT や sWAT よりも rWAT においてより顕著であった。この知見は CT 解析によって CR ラットにおける上腹部の vWAT の顕著な減少によっても裏付けされた。また、以前の報告と一致して AL の rWAT の脂肪細胞サイズが他の WAT の脂肪細胞サイズに比べ大きいことから (Mårin et al., 1992; Misra & Vikram, 2003)、他の WAT よりも rWAT で CR による脂肪細胞サイズの減少が顕著であると考えられた。

脂肪細胞の大きさは細胞のトリグリセリド含量に依存するので、WAT における脂質代謝、特に脂肪酸合成と脂質分解に及ぼす CR の影響を解析した。第一章および第二章で示したのと同様に、CR により 3 つ WAT において、脂肪酸合成関連タンパク質発現が増加した。脂質分解関連因子である HSL のリン酸化は AKT などのインスリンシグナルにより抑制され、protein kinase A (PKA) などのアドレナリンシグナルによって促進されることが報告されている (Ramakrishna & Benjamin, 1985; Potapova et al., 2000; Holm, 2003; Lampidonis et al., 2011)。また CR がインスリン感受性を亢進させることは広く知られている (Wojtaszewski et al., 2000)。いくつかの報告において、インスリン処理した細胞で IRS1 タンパク質のバンドが高分子側にシフトすることが示されている (Sun et al., 1992; Pederson et al., 2001; Ruiz-Alcaraz et al., 2005)。すなわち、IRS1 タンパク質はインスリンシグナルの活性化によってリン酸化の影響のためか高分子量側にシフトすると考えられる。実際に IRS1 タンパク質は CR fed の sWAT においてのみ高分子側にシフトしていた。さらに、sWAT では CR fed で顕著に pAKT/tAKT が高くなり CR fast で減少する一方で、pHSL の変動は逆相関を示していることから、sWAT では CR によりインスリンシグナルの影響を強く受けていることが示唆される。しかし、rWAT と eWAT は pHSL と pAKT の変動が正の相関を示しているため、インスリンシグナルによる影響は小さいと考えられた。纏めると、sWAT は他の WAT に比較して、CR によりインスリンシグナルの影響を強く受けることが示唆される。一方、全ての WAT において AL では fed/fast の差が見られないものの、CR fed に比べ CR fast で有意に pAKT が減少することから、CR によりインスリン感受性が改善されていることが示唆される。 β -アドレナリンシグナルは cAMP を介して PKA を活性化し、HSL をリン酸化することで脂質分解を誘導する (Carmen and Victor, 2006; Jocken and Blaak, 2008)。カテコールアミン刺激による α_2 および β_3 アドレナリン受容体の感受性は sWAT に比べ vWAT の方が高く (Imbeault P et. al., 2000)、 β_3 アドレナリン受容体の発現レベルが sWAT に比べ vWAT の方が高いと報告されている (Krief S et. al., 1993)。事実、 β_3 アドレナリン受容体の mRNA 発現量は sWAT に比べ eWAT の方が高い (Supplemental Figure 3-4)。しかし、rWAT における β_3 アドレナリン受容体の mRNA 発現量は低いことから、感受性のみが増強されている可能性がある。これらの知見より、rWAT および eWAT の CR fed 時に活性化する HSL リン酸化は PKA を

介したアドレナリンシグナルの可能性が考えられるが、さらなる実験が必要である。さらに、インスリンシグナルは ATGL mRNA 発現を負に制御することが報告されている (Kim et al., 2006)。Fasted 状態では 3 つの WAT で AL と CR でインスリンレベルには大きな差がないのにも関わらず、CR ラットは AL ラットに比べ有意に ATGL タンパク質発現が増加していることから、fasted 状態では CR はインスリンシグナル抑制/ATGL タンパク質発現増加を介して脂質分解を AL よりも強く誘導していることが示唆される。

2-4-2. 3 つの WAT における CR によるアディポカイン応答の違い

5 ヶ月齢から 3 ヶ月間 CR したラットの eWAT では M1 マクロファージマーカーである *Cd11c* や M2 マクロファージマーカーの *Arginase-1* mRNA 発現が減少するが、rWAT や sWAT では変化しないと報告されている (Rojas et al., 2016)。これらの知見とは対照的に、我々の結果では CR により 3 つの WAT で *Cd11c* mRNA 発現が減少し、M2 マクロファージマーカーである *Cd163* mRNA 発現は rWAT や sWAT で減少したが、eWAT では変化しなかった。また、今回の結果と同様、我々は以前 6 週齢から 4.5~5.5 ヶ月間 CR したラットの eWAT において、*Cd163* mRNA 発現は変化しないものの、*F4/80* と *Cd11c* の mRNA 発現は減少することを見出している (Chujo et al., 2013)。我々の結果と Rojas らの結果の違いは CR を始めた時期や期間を含む実験条件の違いによるものだと考えられる。一方で、マウスでは、CR により M1 マクロファージマーカーの mRNA 発現が減少するのはラットと同様であるが、M2 マクロファージマーカーの mRNA 発現は逆に増加する (Fabbiano et al., 2016)。M2 マクロファージの増加は sWAT における白色脂肪細胞の褐色化に関わることが知られている (Hui et al., 2015)。また、CR は WAT を褐色化すると報告がある (Fabbiano et al., 2016)。しかしながら、今回ラットにおいては CR による褐色化が観察されず、マウスに比べてラットでは sWAT の褐色化が起こりにくいと考えられる。この原因の一つとして、ラットでは CR による M2 マクロファージの浸潤が少ないことがあげられる。

次に、炎症マーカーである *IL-6* や *Tnfa* の mRNA 発現も確認したところ、*IL-6* は rWAT と eWAT において CR により減少していたが、*Tnfa* はいずれの WAT においても変化がなかった。これは AL においても 9 ヶ月齢ではほとんど炎症が起きていないために、CR との差が見られなかった。加齢に伴う炎症はまず *IL-6* の発現増加が生じた後に *Tnfa* 発現の増加が誘導されると仮定すると、AL においても 9 ヶ月齢では *Tnfa* が誘導される程の強い炎症が起きていないために、CR との差が見られなかった。一般に sWAT は老化に伴う炎症やストレスが vWAT より低いことが知られており (Rojas et al., 2016)、我々の知見と矛盾しないが、この点に関しては引き続き解析する必要がある。

本研究では、rWAT・eWAT・sWAT における CR に対する応答性を比較した。皮下脂肪と内臓脂肪は本質的に異なることは知られていたが、CR に対する応答に関しても、脂質分解・インスリンシ

グナル・アディポカイン・炎症は 3 つの WAT において異なることが示唆された。一方、脂肪酸合成関連およびミトコンドリア関連因子に関してはいずれの WAT においても同様の変化を示していた。それゆえ、第一章において明らかとなった Srebp-1c による脂肪酸合成関連因子の発現増強および Pgc-1 α を介したミトコンドリア関連因子発現の増強はいずれの WAT においても共通の応答であることが示唆される。今後、WAT において CR の応答性に関して脂質分解・インスリンシグナル・アディポカイン・炎症について解析する際には、解析する WAT の部位を慎重に選択する必要があること、一方、脂肪酸合成やミトコンドリア生合成に関しては、WAT の部位をあまり気にせずに解析可能であることと考えられる。

Figure 2-1

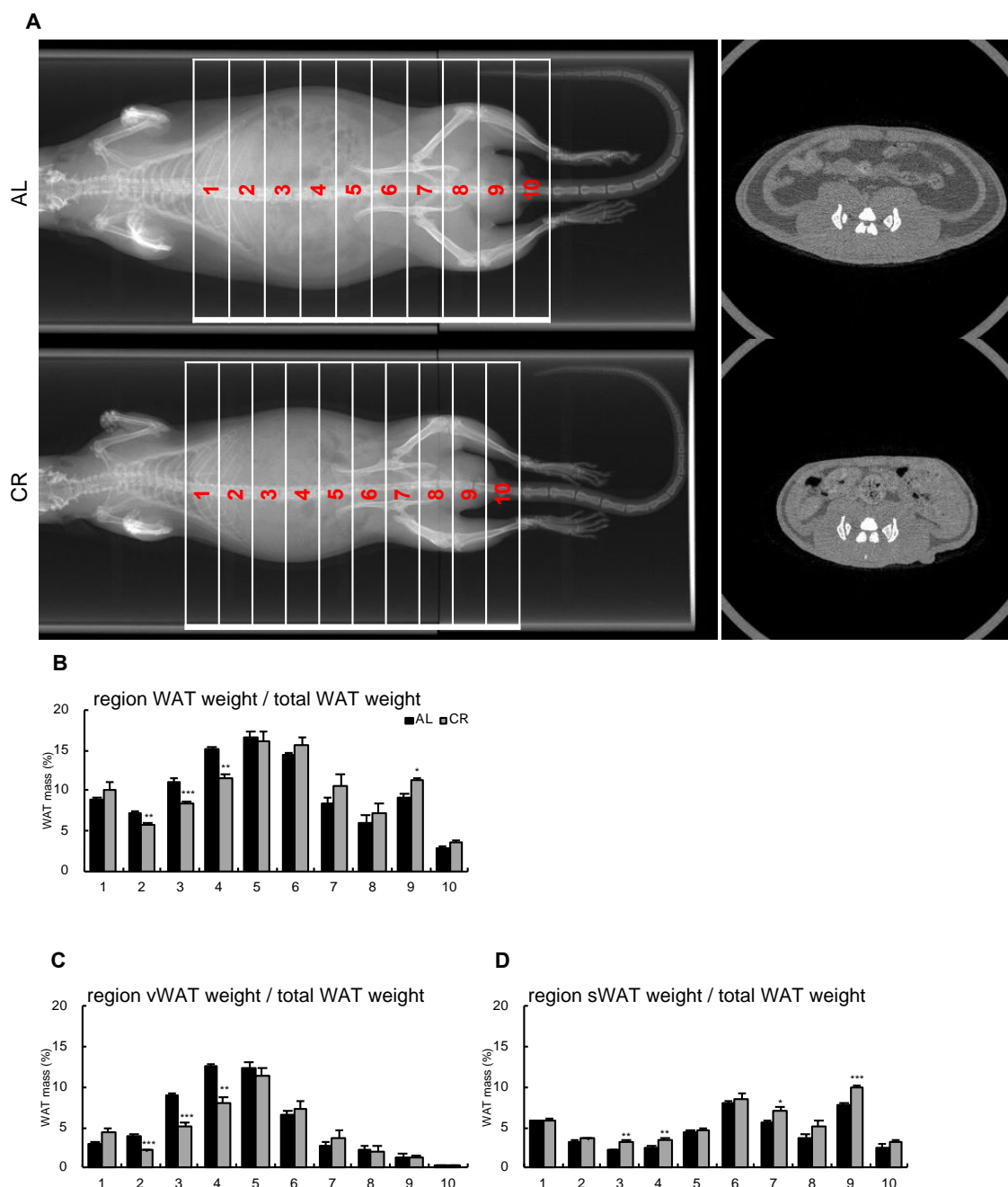


Figure 2-1 Body fat distribution

WAT depot size per whole slice was determined by computed tomography (CT) scan. (A) Whole body x-ray image, (B) Regional white adipose tissue (WAT) volume / total WAT volume, (C) Regional visceral WAT (vWAT) volume / total WAT volume, and (D) Regional subcutaneous WAT (sWAT) volume / total WAT volume. Error bars represent SEM (n=4). CT image slices were taken from section 10, described in (A). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs AL, analyzed by Student's t-test.

Figure 2-2

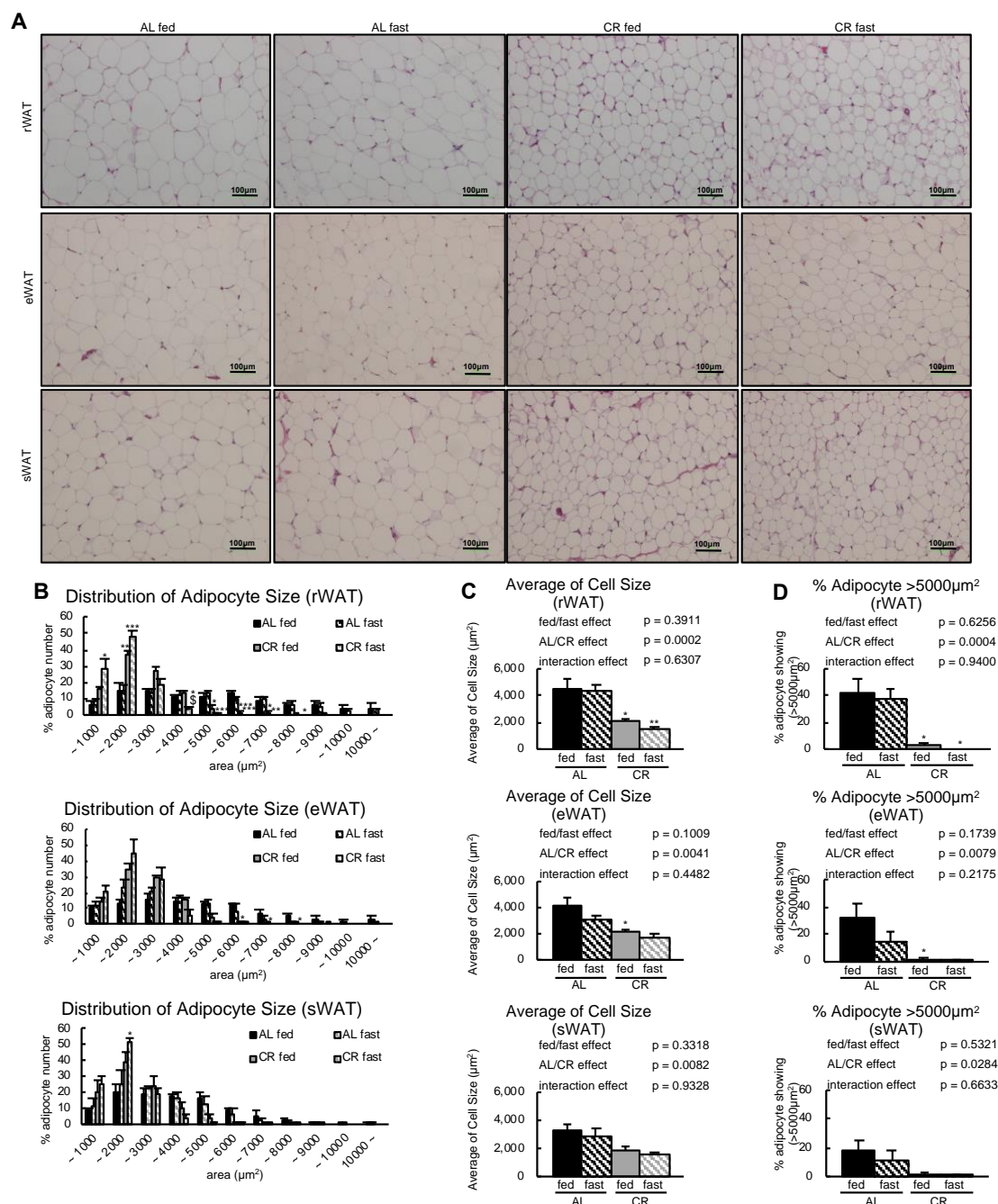


Figure 2-2 Histology of rWAT, eWAT and sWAT in AL and CR rats

(A) Representative histological sections of retroperitoneal WAT (rWAT), epididymal WAT (eWAT) and subcutaneous WAT (sWAT) from *ad libitum* (AL) and caloric restriction (CR) rats (magnification: $\times 100$, scale bar: 100 μm). Sections were stained with hematoxylin and eosin. (B) Distribution of adipocyte size in rWAT, eWAT and sWAT, measured using a quantitative morphometric method in ImageJ 1.43u/ Java1.6.0_22 software. (C) Mean adipocyte size, and (D) Percentage of large adipocytes ($>5000 \mu\text{m}^2$) in rWAT, eWAT and sWAT. Values are mean \pm SEM ($n=6$). *: $p<0.05$, **: $p<0.01$ vs AL, \$: $p<0.05$ vs. fed, analyzed by Tukey's t-test after 2-way ANOVA.

Figure 2-3

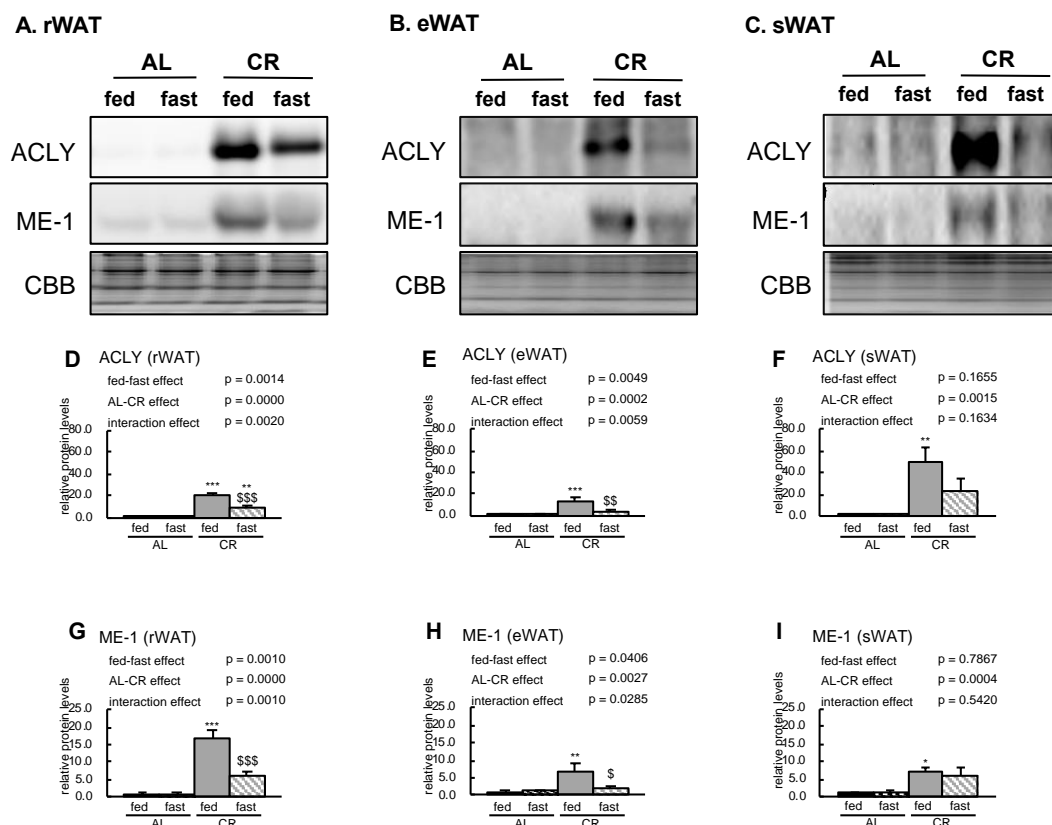


Figure 2-3 Expression of proteins involved in lipogenesis in rWAT, eWAT and sWAT

Sample immunoblot images showing expression of proteins involved in lipogenesis in retroperitoneal WAT (rWAT) (A), epididymal WAT (eWAT) (B) and subcutaneous WAT (sWAT) (C) from the four groups (*ad libitum* (AL)-fed, AL-fast, caloric restriction (CR)-fed, CR-fast). Quantitative analysis of immunoblots was performed using a chemiluminescence method. Results for total ATP citrate lyase (ACLY) (D–F) and malic enzyme (ME)-1 (G–I) are expressed as relative intensity of the indicated protein / Coomassie Brilliant Blue staining, compared with values in the AL-fed group (n=5–6 per group). Values are mean SEM *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 vs. AL, \$: p<0.05, \$\$: p<0.01, \$\$\$: p<0.001 vs. fed, analyzed by Tukey's t-test after 2-way ANOVA.

Figure 2-4

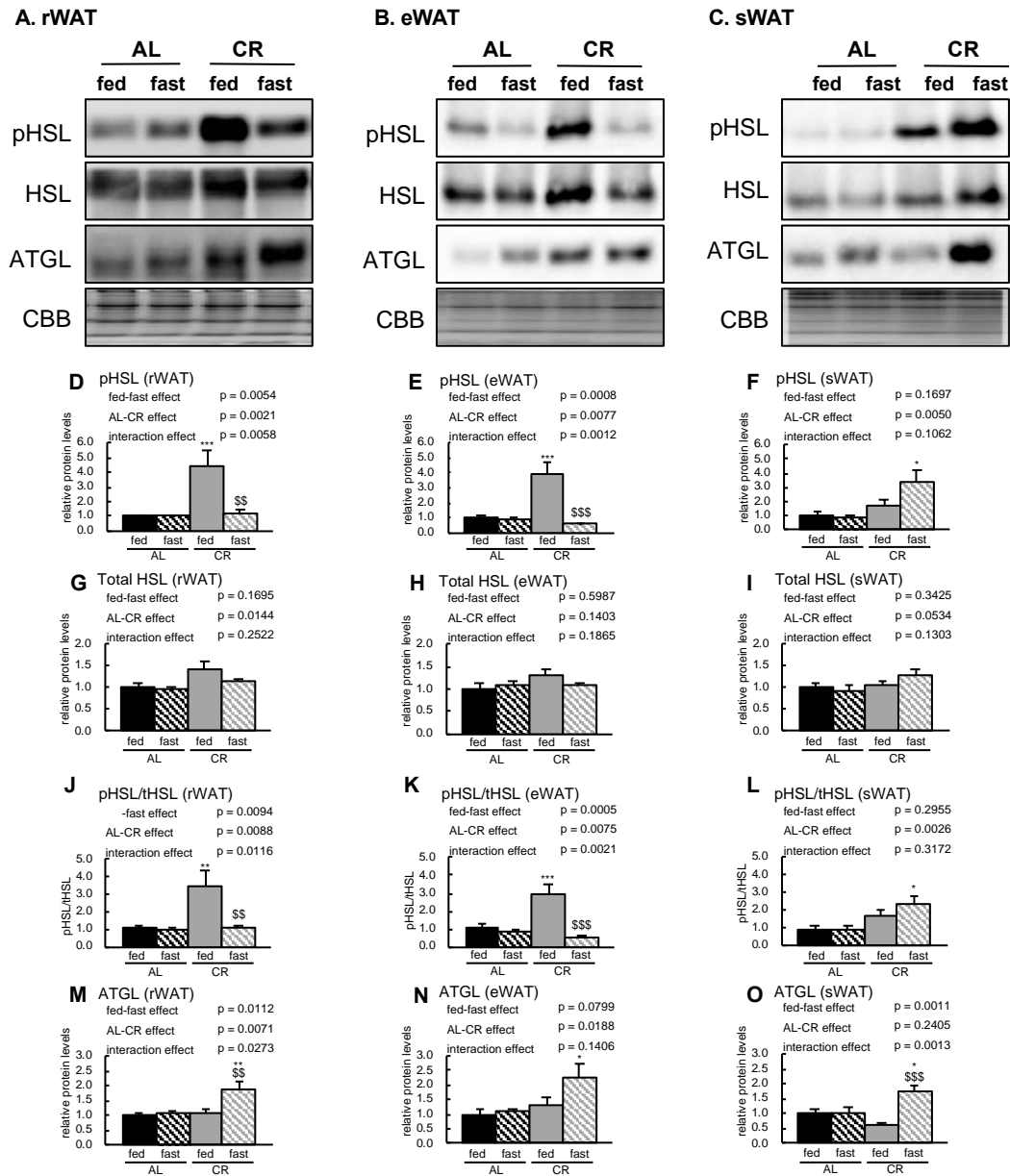


Figure 2-4 Expression of proteins involved in lipolysis in rWAT, eWAT and sWAT

Sample immunoblot images showing expression of proteins involved in lipolysis in retroperitoneal WAT (rWAT) (A), epididymal WAT (eWAT) (B) and subcutaneous WAT (sWAT) (C), in the four groups (*ad libitum* (AL)-fed, AL-fast, caloric restriction (CR)-fed, CR-fast). Quantitative analysis of immunoblots was performed using a chemiluminescence method. Results for phospho-hormone sensitive lipase (pHSL) (D-F), total hormone sensitive lipase (HSL) (G-I), pHSL / total HSL (J-L) and adipose triglyceride lipase (ATGL) (M-O) are expressed as relative intensity of the indicated protein / Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining, compared with values in the AL-fed group (n=5–6 per group). Values are mean \pm SEM *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs. AL, \$\$: $p < 0.01$, \$\$\$: $p < 0.001$ vs. fed, analyzed by Tukey's t-test after 2-way ANOVA.

Figure 2-5

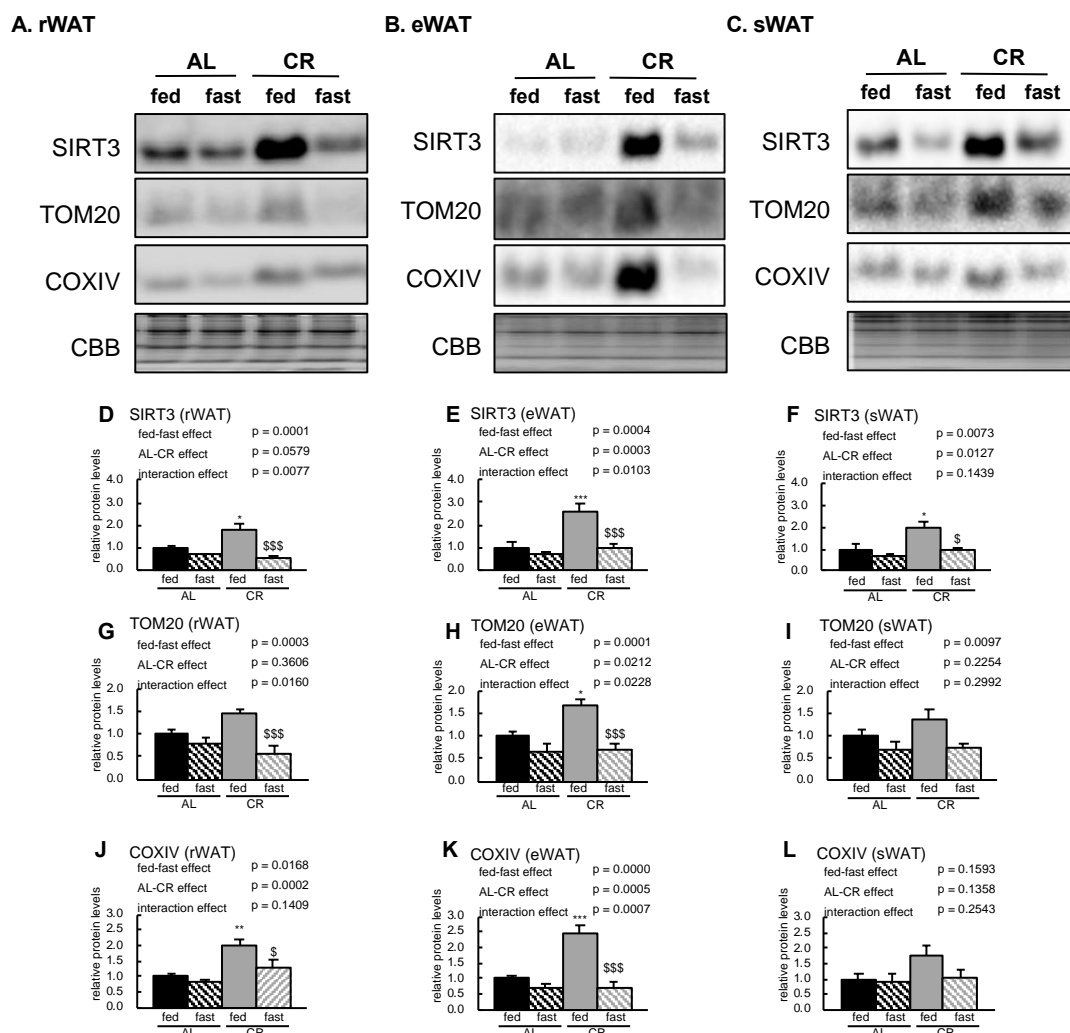


Figure 2-5 Expression of proteins involved in mitochondria in rWAT, eWAT and sWAT

Sample immunoblot images showing expression of proteins involved in mitochondria in retroperitoneal WAT (rWAT) (A), epididymal WAT (eWAT) (B) and subcutaneous WAT (sWAT) (C), in the four (*ad libitum* (AL)-fed, AL-fast, caloric restriction (CR)-fed, CR-fast). Quantitative analysis of immunoblots was performed using a chemiluminescence method. Results for sirtuin 3 (SIRT3) (D–F), translocase of outer mitochondrial membrane 20 (TOM20) (G–I) and cytochrome c oxidase subunit 4 (COXIV) (J–L) are expressed as relative intensity of the indicated protein / Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining, compared with values in the AL-fed group ($n=5-6$ per group). Values are mean \pm SEM *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ vs. AL, \$: $p<0.05$, \$\$\$: $p<0.001$ vs. fed, analyzed by Tukey's t-test after 2-way ANOVA.

Figure 2-6

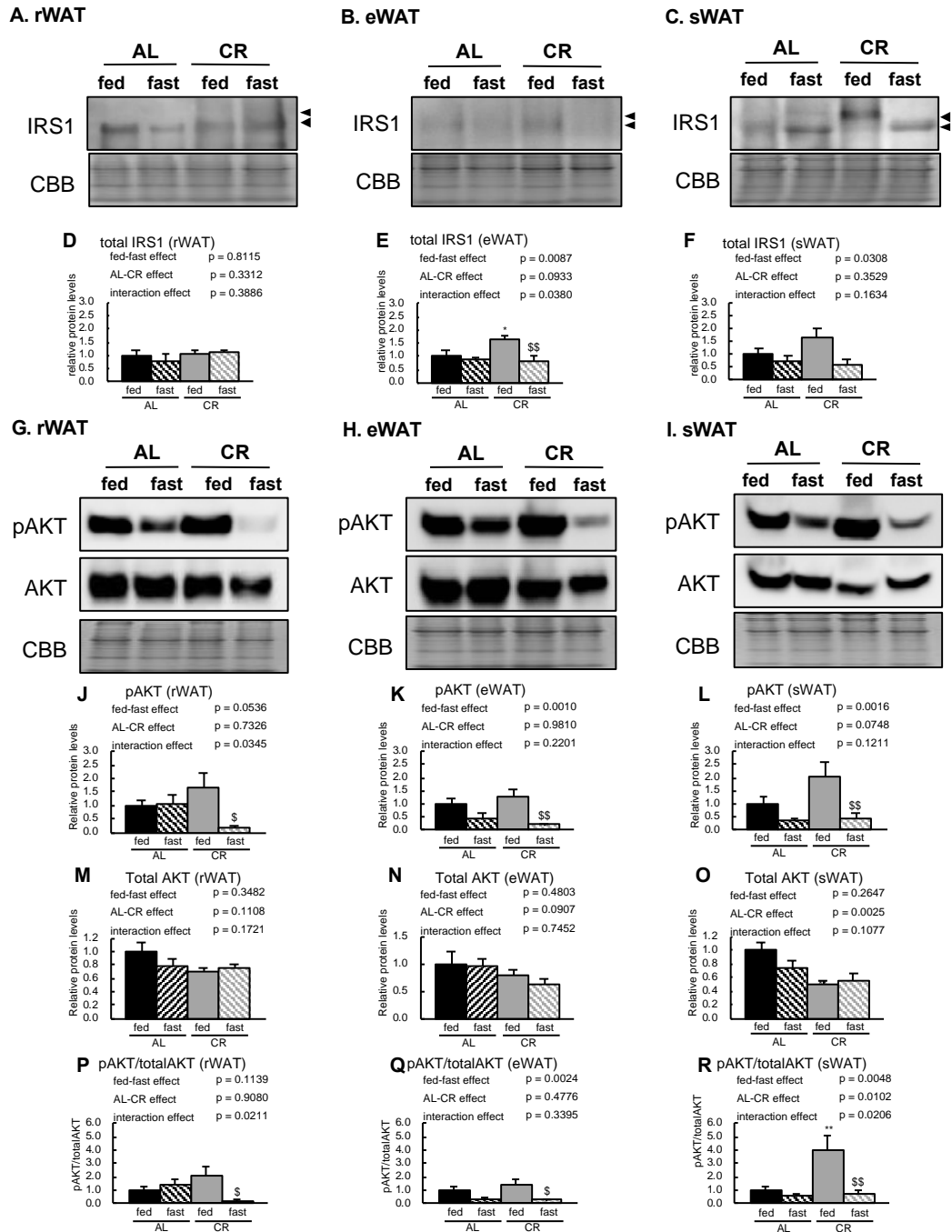


Figure 2-6 Expression of insulin signal proteins in rWAT, eWAT and sWAT

Sample immunoblot images showing expression of proteins involved in insulin signaling in retroperitoneal WAT (rWAT) (A and G), epididymal WAT (eWAT) (B and H), and subcutaneous WAT (sWAT) (C and I), from the four groups of rats (*ad libitum* (AL)-fed, AL-fast, caloric restriction (CR)-fed, CR-fast). Quantitative analysis of immunoblots was performed using a chemiluminescence method. Results for total insulin receptor substrate (IRS)1 (D–F), pAKT (J–L), total AKT (M–O), and pAKT / total AKT (P–R) are respectively expressed as relative intensity of the indicated protein / Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining, compared with values in the AL-fed group (n = 5–6 per group). Values are mean \pm SEM. **: p < 0.01 vs. AL, \$: p < 0.05, \$\$: p < 0.01 vs. fed, analyzed by Tukey's t-test after 2-way ANOVA.

Figure 2-7

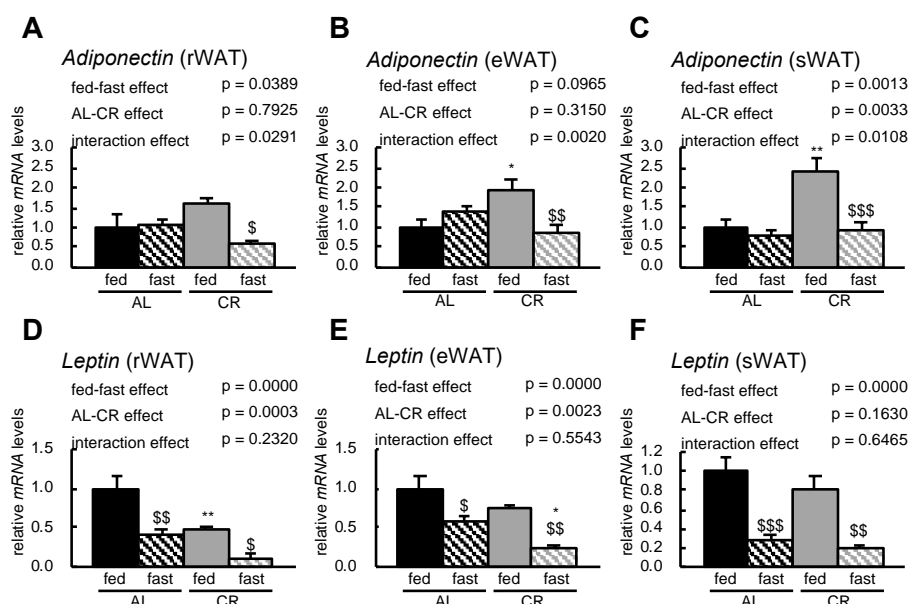


Figure 2-7 Expression of adipocytokine genes in rWAT, eWAT and sWAT

mRNA expression of adiponectin (A–C) and leptin (D–F), in retroperitoneal WAT (rWAT), epididymal WAT (eWAT) and subcutaneous WAT (sWAT) from the four groups (ad libitum (AL)-fed, AL-fast, caloric restriction (CR)-fed, CR-fast) were analyzed by real-time RT–PCR. All data were normalized to *Tbp* expression ($n=5-6$). Values are mean \pm SEM. *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$ vs. AL, \$: $p<0.05$, \$\$: $p<0.01$, \$\$\$: $p<0.001$ vs. fed, analyzed by Tukey's t-test after 2-way ANOVA.

Figure 2-8

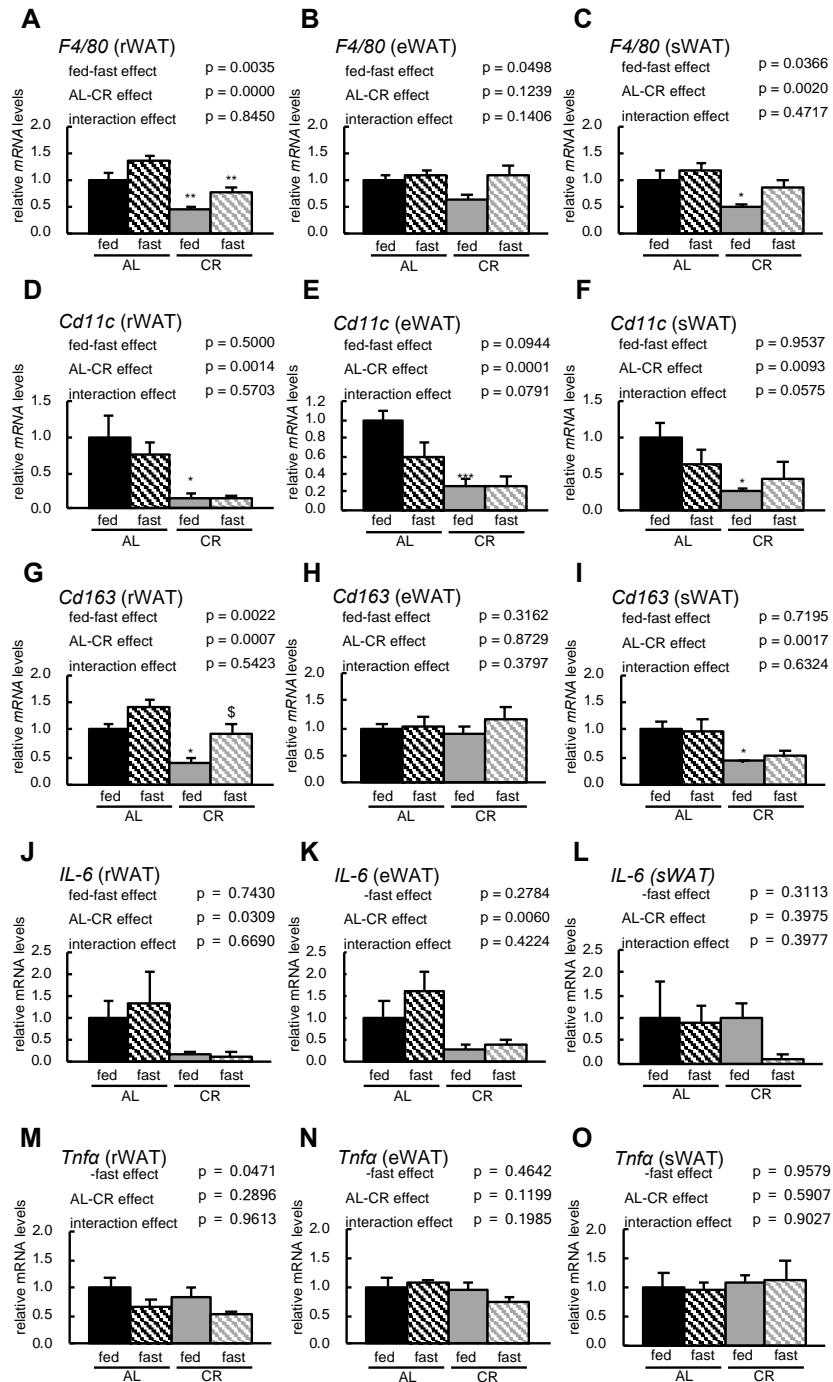


Figure 2-8 Expression of macrophage and inflammation genes in rWAT, eWAT and sWAT

mRNA expression of the macrophage genes *F4/80* (A–C), *Cd11c* (D–F), and *Cd163* (G–I), in retroperitoneal WAT (rWAT), epididymal WAT (eWAT) and subcutaneous WAT (sWAT) from the four groups (*ad libitum* (AL)-fed, AL-fast, caloric restriction (CR)-fed, CR-fast) was analyzed by real-time RT–PCR. mRNA expression of the inflammation genes *IL-6* (J–L) and *Tnf α* (M–O), in rWAT, eWAT and sWAT from the four groups was analyzed by real-time RT–PCR. All data were normalized to *Tbp* expression (n=5–6). Values are mean \pm SEM. *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 vs. AL, \$: p<0.05, \$\$: p<0.01, \$\$\$: p<0.001 vs. fed, analyzed by Tukey’s t-test after 2-way ANOVA.

Figure 2-9

vs AL		rWAT	eWAT	sWAT
WAT weight		↓	↓	↓
FA biosynthesis		↑	↑	↑
HSL	fed	↑	↑	→
	fast	→	→	↑
mitochondria		↑	↑	↑
insulin signal	fed	→	→	↑
	fast	↓	→	→
adiponectin		↑	↑	↑
macrophage		↓	→	↓
inflammation		↓	↓	→

Table 2-1: List of 1st antibody for Western blotting.

Name	Immunized	Clonal	Supplier	Catalog Number
ACLY	rabbit	EP704Y	Epitomics, Burlingame, CA	1699-1
AKT	rabbit	polyclonal	Cell Signaling, Boston, MA	#9272
AKT pSer473	rabbit	D9E	Cell Signaling	#4060
ATGL	rabbit	30A4	Cell Signaling	#2439
HSL	rabbit	polyclonal	Cell Signaling	#4107
HSL pSer563	rabbit	polyclonal	Cell Signaling	#4139
IRS1	rabbit	polyclonal	EMD Millipore, Temecula, CA	#06-248
ME-1	rabbit	polyclonal	Sigma	SAB4501853

Table 2-2: List of 2nd antibody for Western blotting.

Name	Supplier	Catalog Number
HRP-conjugated F(ab') ₂ fragment of goat anti-mouse IgG	Jackson Immunological Research (West Grove, PA)	115-036-062
HRP-conjugated F(ab') ₂ fragment of goat anti-rabbit IgG	Jackson Immunological Research	111-036-045

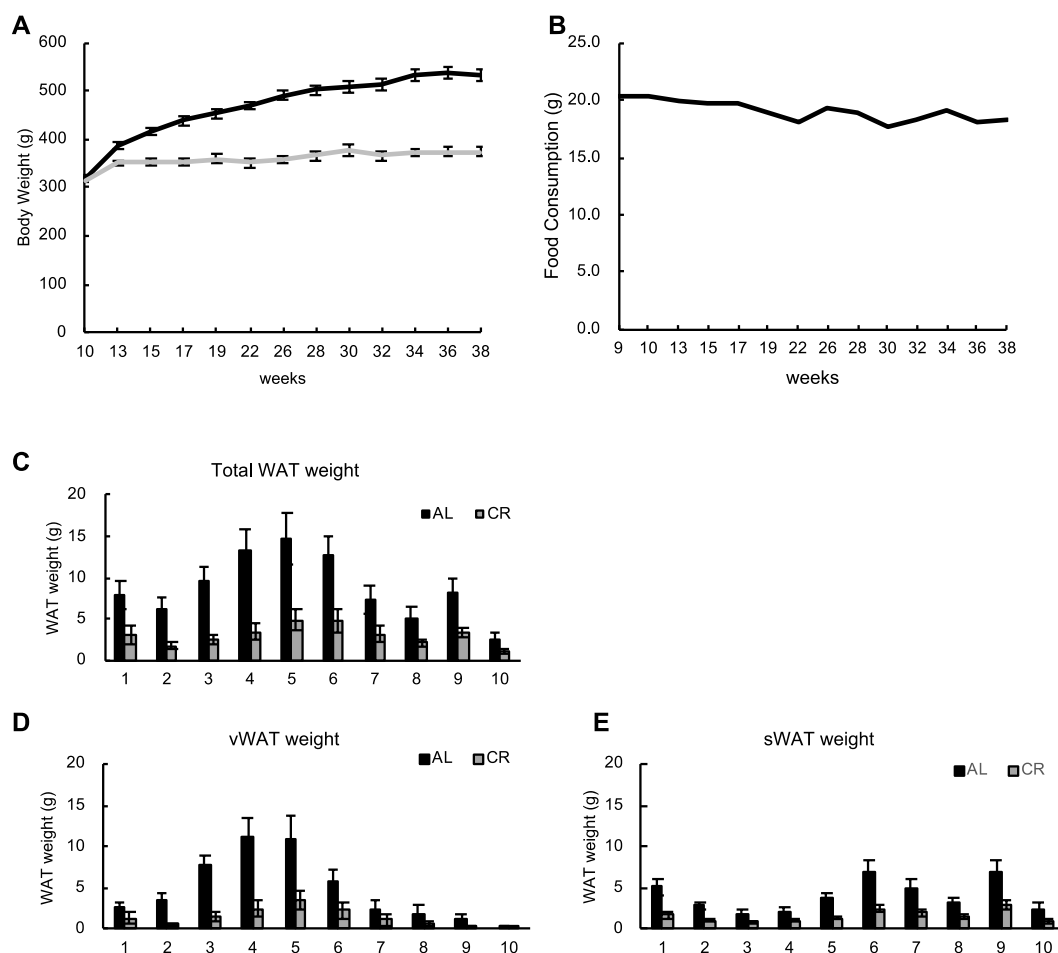
Table2-3: List of primer pairs for real-time RT-PCR.

	Forward	Reverse
Adiponectin	5'-GGG AGA CGC AGG TGT TCT TG-3'	5'-AGC CCT ACG CTG AAT GCT G-3'
Cd11c	5'-AGC ACA CGG GGA AGG TTG TC-3'	5'-CAG GTC AGT GCT GCC ATC TCT ATC-3'
Cd163	5'-ACA AAT ACG TGG CTC TTT CCT G-3'	5'-ATG GGA TTT CTC CTC CAA CC-3'
F4/80	5'-GGC CAA GAT TCT CTT CCT CAC-3'	5'-TCA CCA CCT TCA GGT TTC TCA C-3'
IL-6	5'-GCC TTC CCT ACT TCA CAA GTC C-3'	5'-CAG AAT TGC CAT TGC ACA AC-3'
Leptin	5'-CCA GGA TCA ATG ACA TTT CAC ACA C-3'	5'-CAG GGA GCA GCT CTT GGA GAA G-3'
Tbp	5'-CAG TAC AGC AAT CAA CAT CTC AGC-3'	5'-CAA GTT TAC AGC CAA GAT TCA CG-3'
TNF- α	5'-CCC TCA CAC TCA GAT CAT CTT CTC-3'	5'-GCC TTG TCC CTT GAA GAG AAC C-3'

Table 2-4: Body and tissue weight, and plasma parameter

Body and tissue weight	AL		CR		p values (2-way ANOVA)		
	AL		CR		fed/fast effect	AL/CR effect	interaction effect
	fed	fast	fed	fast			
Body Weight (g)	529.84 ± 12.38	532.11 ± 21.00	396.49 ± 16.76 ***	364.27 ± 11.23 ***	0.3553	< 0.0001	0.2887
rWAT (g)	8.75 ± 0.71	8.51 ± 0.66	1.84 ± 0.21 ***	1.83 ± 0.36 ***	0.8123	< 0.0001	0.8232
eWAT (g)	7.93 ± 0.62	8.25 ± 0.69	2.85 ± 0.16 ***	2.82 ± 0.20 ***	0.7604	< 0.0001	0.7178
sWAT (g)	9.80 ± 0.71	8.62 ± 1.51	2.58 ± 0.39 ***	2.01 ± 0.26 ***	0.3237	< 0.0001	0.7328
BAT (g)	0.41 ± 0.06	0.34 ± 0.01	0.27 ± 0.03 *	0.18 ± 0.02 *	0.0350	0.0003	0.7339
Heart (g)	1.29 ± 0.05	1.40 ± 0.06	1.07 ± 0.03 *	1.02 ± 0.03 ***	0.5550	< 0.0001	0.0717
Liver (g)	19.22 ± 0.73	15.96 ± 0.58 \$\$	18.75 ± 0.57	10.87 ± 0.35 *** \$\$\$	< 0.0001	0.0001	0.0006
Spleen (g)	0.88 ± 0.03	0.91 ± 0.06	0.71 ± 0.03 *	0.69 ± 0.03 **	0.9786	0.0001	0.5638
Kidney (g)	1.74 ± 0.06	1.70 ± 0.06	1.21 ± 0.07 ***	1.20 ± 0.04 ***	0.7153	< 0.0001	0.8974
Plasma parameter							
Glucose (mg/dL)	762.07 ± 60.92	549.12 ± 58.34	428.61 ± 28.95 **	467.09 ± 94.76	0.1950	0.0046	0.0676
Insulin (pg/mL)	1549.76 ± 232.22	477.25 ± 91.87 \$\$\$	1787.84 ± 102.61	224.56 ± 22.10 \$\$\$	< 0.0001	0.9575	0.0851
Adiponectin (ng/mL)	769.26 ± 64.68	596.09 ± 56.02	980.45 ± 72.73	964.36 ± 60.69 **	0.1537	0.0002	0.2328
Each value represents the means ± S.E.M. of 6 mice. *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 vs. AL, \$\$: p<0.01, \$\$\$: p<0.001 vs. fed, analyzed by Tukey's test.							
WAT: white adipose tissue, eWAT: epididymal WAT, rWAT: retroperitoneal WAT, sWAT: subcutaneous WAT, BAT: brown adipose tissue							
Body Weight	CR/AL						
	fed		fast				
	0.748		0.685				
	rWAT		0.215				
	0.210		0.342				
	eWAT		0.233				
	0.359		0.532				
	sWAT		0.724				
	0.264		0.681				
	BAT		0.757				
	0.664		0.702				
	Heart						
	0.831						
	Liver						
	0.976						
	Spleen						
	0.804						
	Kidney						
	0.698						

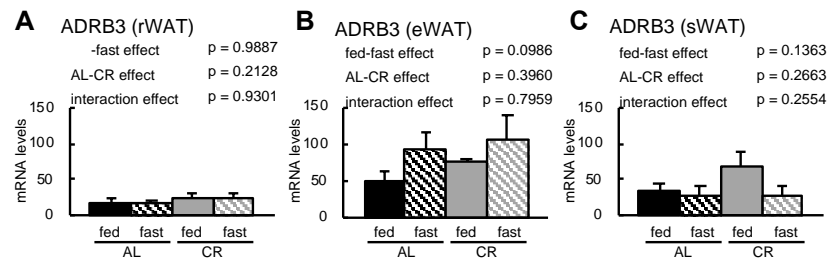
Supplemental Figure 2-1



Supplemental Figure 2-1 Time-course analysis of food consumption and body and fat weight

body weight (A) and Food consumption (B) were measured every two weeks. (C) Regional WAT volume, (D) Regional vWAT volume and (E) Regional sWAT volume. Values shown in panels are means \pm SEM.

Supplemental Figure 2-2



Supplemental Figure 2-2 Expression of ADRB3 in rWAT, eWAT and sWAT

(A–C) mRNA expression of ADRB3 (β -adrenergic receptor) in rWAT, eWAT and sWAT from the four groups were analyzed by real-time RT-PCR. (n = 5–6). Values are mean \pm SEM.

第三章

WAT における CR 期間による 脂肪酸合成への影響

3-1. 背景

第一章において、GH/IGF1 非依存的な CR の効果のうち、Srebp-1c 依存的な効果は WAT 特異的であることを示した。WAT の主要構成細胞である成熟脂肪細胞は、食後に脂質を取り込み、食前から食前にかけて脂質を放出するので、強力な脂質のバッファリング機能を有する。このバッファリング機能が損なわれることによって、肝臓や骨格筋など非脂肪組織にも TG として脂質が蓄積し、インスリン抵抗性を呈する (Frayn, 2002)。そのため、脂質のバッファリング機能がより高い小型の脂肪細胞は、大型の脂肪細胞よりも健康寿命延伸のためにより有益であると考えられる。

序論に示したように、WAT は生理活性物質であるアディポカインを産生・分泌して臓器間ネットワークを担う内分泌器官として注目されている (Kershaw et al., 2004)。アディポカインの多くは糖・脂質代謝や心血管系の調節因子として作用し、アディポカインの分泌動態の変化が、糖・脂質代謝異常、高血圧、動脈硬化等の老化関連疾患の病態の一部を形成している (Lago et al., 2007; Ouchi et al., 2011)。アディポカインの一つであるレプチンは、視床下部で受容体を介し摂食抑制し、エネルギー消費を亢進するホルモンであり、レプチン遺伝子およびレプチン受容体遺伝子に変異を有するマウスはそれぞれ *ob/ob* マウスおよび *db/db* マウスとして高度肥満モデルになっている (Ahima & Flier, 2000)。そのため、レプチンは当初、抗肥満薬のターゲットとして注目されたが、食餌性肥満モデルマウスやヒト肥満者では脂肪量の増加に比例して血中レプチン濃度が増加し、肥満患者にレプチンを投与しても改善しないことから、レプチン抵抗性の存在が示唆されている (El-Haschimi et al., 2000; Heymsfield et al., 1999)。一方で、糖尿病や脂肪肝を高率で合併する脂肪萎縮症患者は血中レプチン濃度が低く、レプチン投与が脂肪萎縮症による代謝異常を改善し、インスリン抵抗性や脂肪肝を改善することも報告されている (Ebihara et al., 2001; Ebihara et al., 2007)。また、レプチン処理は Srebp-1 および Fasn, Acly, Me1 を含む下流因子を減少させる (Soukas et al., 2000)。第一章で示したように、CR により WAT では脂肪酸合成が活性化し、さらにミトコンドリアも活性化している。そのため、WAT では Srebp-1c を介してグルコースをよりエネルギー変換効率の良い脂質に変換し、エネルギー不足時において効率よくエネルギーを使用していることが示唆された。さらに、CR は体脂肪を減少させ、脂肪細胞サイズを小さくし、血漿中アディポネクチン量を増加させ、レプチンを含む血漿中の炎症促進性サイトカインを減少させる (Higami et al., 2004, 2006b; Yamaza et al., 2007; Zhu et al., 2007)。

これらの知見より、我々は Srebp-1c による脂肪酸合成の増強および WAT におけるアディポカインプロファイルの変化を含む代謝リモデリングが、CR の有益な作用のための中心的役割を示すと仮定した。本研究では、CR による代謝リモデリングのメカニズムを解明するために、ラットの WAT および肝臓において、CR 開始後の脂肪酸合成に関連する mRNA およびタンパク質発現の変化を経時的に調べた。さらに、WAT における CR による脂肪酸合成の活性化にレプチンシグナルが及ぼす影響を明らかにするために、レプチン受容体が機能していない *fa/fa Zucker* ラットを用いて、

同様の解析も行った。第二章において Srebp-1c 依存的な脂肪酸合成の活性化およびミトコンドリア生合成の活性化は、精巣上体周囲脂肪組織、後腹膜脂肪組織および皮下脂肪組織において共通な応答であることが示されたため、本章では WAT として精巣上体周囲脂肪組織 (eWAT) を解析した。

3-2. 材料と方法

3-2-1. 使用ラットについて

日本クレア株式会社 (Tokyo, Japan) から5-7 週齢♂Wistar 系ラットを購入し、東京理科大学薬学部動物実験施設内 SPF 環境下、明暗サイクルは 12 時間で飼育し、AL 群には MR ラボストック (NOSAN, Yokohama, Japan) を十分量与えた。AL 群の摂食量を測定し、CR 群にはその 70%量を与える事とし、2 日に 1 回 140%量の食餌を与えた。CR は 3 ヶ月齢より開始した。2 群を 3.5、4、5、6、9 ヶ月齢で屠殺し、精巣上体周囲 WAT、肩甲骨間 BAT および肝臓を摘出した。臓器は一部をホルマリン固定し、残りは液体窒素で凍結後、-80 °Cフリーザーで保存した。採血した血液は EDTA を加え、遠心 (2500 x g, 4 °C, 10 min) して採取した上清を血漿サンプルとし、-80 °C にて保存した。

日本エスエルシー株式会社 (Hamamatsu, Japan) から購入した4 週齢の lean (+/+) および obese (fa/fa) Zucker ラット (Slc:Zucker) を、長崎大学先端生命科学研究支援センター比較動物医学分野動物実験施設内 SPF 環境下で飼育した。AL 群には Charles River-LPF 食餌 (Oriental Yeast Co., Tsukuba, Japan) を十分量与えた。AL 群の摂食量を測定し、CR 群にはその 70 %量を与える事とし、2 日に 1 回 140 %量の食餌を与えた。CR は 6 週齢より開始した。6 ヶ月齢で、全てのラットを断頭により安楽死させ、それらの精巣上体 WAT と肝臓を摘出し、液体窒素中で急速凍結させ、分析まで-80 °Cで保存した。

すべての動物実験は、東京理科大学と長崎大学の動物実験委員会による審査、学長による承認を得て、東京理科大学動物実験指針に従い行われた。また、すべての遺伝子組み換え実験は、東京理科大学遺伝子組換え実験安全委員会による審査、学長による承認を得て、東京理科大学遺伝子組換え実験実施規則に従い行われた。

3-2-2. 白色脂肪組織の組織学的解析

WAT を 10 %中性緩衝ホルマリン溶液 (10 % formaldehyde in PBS) にて固定し、パラフィン包埋後、5 µm の厚さで薄切し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行った。標本は光学顕微鏡 Eclipse 80i およびオプシオンユニット DS-Fi1c, DS-L2 (Nikon, Tokyo, Japan) を用いて拡大率 40 倍で観察、1 視野あたり複数枚の画像を撮影し、画像編集解析ソフトウェア ImageJ 1.4 (Wayne Rasband National Institute of Health, Bethesda, MD) を用い、コンポジット合成によるノイズを除去後、脂肪細胞のサイズを測定した。

3-2-3. 血漿中 TG、非エステル型脂肪酸 (non-esterified fatty acid; NEFA)の定量

血漿中の TG および NEFA はそれぞれ LabAssay™ Triglyceride (Wako, 290-63701) および LabAssay™ NEFA (Wako, 294-63601) を用いて定量した。なお、それぞれの反応はメーカーが提

供するプロトコールに従い行った。

3-2-4. Western blotting

組織または細胞を、適量の SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 3 M urea, 6 % glycerol) を加えホモジェナイズ後、さらにソニケーションした。得られたライセートを遠心 (12000 x g, 4 °C, 30 min) し、上清を回収し、95 °C で 5 分間インキュベートした。得られた上清に含まれるタンパク質量を BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, 23225) を用いて測定し、SDS sample buffer により 1 mg/mL の濃度に調製した。サンプルの 1/10 量の 0.25 % BPB / 5 % 2-mercaptoethanol = 1 : 1 混液を加え、95 °C で 5 分間還元処理をした。以上の処理で得られたサンプルを SDS-PAGE 法により泳動後、coomassie brilliant blue (CBB) 染色を行った。脱色後のゲルの泳動像を LAS-3000 ルミノ・イメージアナライザー (Fujifilm, Tokyo, Japan) にて撮影し、解析ソフトウェア Multi Gauge 3.1 (Fujifilm) を用いてラダー状になった全タンパク質の染色強度からタンパク量を定量し、サンプル間のタンパク質量を統一した。調製し直したサンプルを SDS-PAGE 法にて泳動し、ニトロセルロースメンブレン (PALL, Port Washington, NY, 66485) に転写した。転写後、メンブレンは blocking 溶液中 (2.5 % skim milk (WAKO, 190-12865) / 0.25 % BSA in TTBS (25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 140 mM NaCl, 2.5 mM KCl (Wako, 163-03545), 0.1 % Tween 20) = 1 : 1) にて室温で 1 時間震盪させた。その後、一次抗体を反応液 (Canget solution I (Toyobo, Osaka, Japan, NKB-201) / blocking 溶液 = 2 : 1) 中に加え、4°C にてメンブレンと一晚または二晩反応させた。一次抗体反応後、メンブレンを TTBS にて洗浄し (5 分×2 回および 10 分×2 回)、二次抗体を反応液 (Canget solution II (Toyobo, NKB-101) / blocking 溶液 = 2 : 1) 中に加え、1 時間室温にてメンブレンと反応させた。二次抗体反応後、メンブレンを TTBS にて洗浄し (5 分×2 回および 10 分×2 回)、ImmunoStar® LD (WAKO, 290-69904) を用いた化学発光を行い、LAS-3000 ルミノ・イメージアナライザーにて撮影し、Multi Gauge 3.1 を用いて定量した。以下、Table 3-1 に一次抗体、Table 3-2 に二次抗体の情報を記載した。

3-2-5. Real-time RT-PCR

mRNA を抽出し、分光光度計 NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて濃度を測定した。1 µg の RNA を PrimeScript® RT reagent Kit (TaKaRa, RR037A) により逆転写させ cDNA を得た。目的遺伝子は、SYBR® Premix Ex Taq™ (TaKaRa, RR041A) を用いて、Real-time PCR システム ABI PRISM®7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA) により解析した。なお、それぞれの反応は各メーカーが提供するプロトコールに従い行い、使用したプライマーを Table 3-3 に記載した。

3-2-6. 統計検定

データは平均±標準誤差で示した。データの統計検定は、2 群間では Student's t-test、多群間では Tukey's t-test を行なった。また、実験ごとに用いた検定方法は、材料と方法の各項目または Figure legends に記載した。

3-3. 結果

3-3-1. Wister rats の重量・摂食量・血漿プロファイル・組織学的解析

体重量・精巣周囲脂肪 (WAT) 重量・肝臓重量は月齢とともに AL では増加したが、CR では維持されていた (Figure 3-1A-C)。ゆえに、5 ヶ月齢から AL は CR に比べ有意に重くなっていた。また、血漿中の triglyceride (TG) (約 0.3~0.5 倍) や non-esterified fatty acid (NEFA) (約 0.5~0.6 倍) はいずれの期間においても AL に比べ CR で有意に減少した (Figure 3-1D-E)。

脂肪細胞のサイズは 4 ヶ月齢までは変化しなかったが、5 ヶ月齢以降で CR に比べ、AL の脂肪細胞サイズが大きくなった (Figure 3-2A-E)。また、脂肪細胞サイズの中央値は 5 ヶ月齢以降で AL に比べ、CR で有意に小さくなった (Figure 3-2F)。同様に、5000 μm^2 以上の脂肪細胞サイズの割合に関しても、5 ヶ月齢以降で AL に比べ、CR の方が著しく少なくなった (Figure 3-2G)。肝臓の TG はいずれの期間においても AL に比べ CR で減少した (Figure 3-1F)。

3-3-2. Wister rats の WAT と肝臓における *de novo* 脂肪酸合成関連タンパク質の発現

CR 開始後の *de novo* 脂肪酸合成関連タンパク質発現の継時的変化をみるために、3.5、4、5、6、9 ヶ月齢の AL および CR rats の fatty acid synthase (FASN)、acetyl-CoA carboxylase (ACC)、total ATP citrate lyase (ACLY)、pACLY、malic enzyme (ME)-1 のタンパク質発現を解析した。AL 群では継時的な変化は無かった。一方で、CR 群ではいずれのタンパク質も 3.5 ヶ月齢から有意に発現が上昇していたが (FASN: 約 30 倍, ACC: 約 8 倍, ACLY: 約 20 倍, pACLY: 約 40 倍, ME-1: 約 60 倍)、この発現上昇が次第に弱まっていき、5 ヶ月齢を境に再び増強した (5 ヶ月齢; FASN: 約 7 倍, ACC: 約 4 倍, ACLY: 約 6 倍, pACLY: 約 10 倍, ME-1: 約 4 倍、9 ヶ月齢; FASN: 約 40 倍, ACC: 約 10 倍, ACLY: 約 30 倍, pACLY: 約 100 倍, ME-1: 約 20 倍) (Figure 3-3)。

一方、肝臓では、ME-1 以外のタンパク質は CR しても発現に変化はなく、経時的な変化も無かった。また、ME-1 は CR によって発現が増加し、特に 5~6 ヶ月齢では有意に発現が増加した (約 2~4 倍) (Figure 3-4)。

3-3-3. Wister rats の WAT における *de novo* 脂肪酸合成関連遺伝子の発現

WAT において *de novo* 脂肪酸合成関連タンパク質は 5 ヶ月齢を境に V 字に CR 依存的な増加をした。そこで、我々は 3.5、5、9 ヶ月齢における WAT の *de novo* 脂肪酸合成関連 mRNA 発現を測定した。CR により 3.5、9 ヶ月齢では mRNA 発現が 4 つともに有意に増加したが、5 ヶ月齢では *Fasn* と *Acc1* が有意に増加した一方で、*Acly* と *Me1* は有意な増加は見られなかった (3.5 ヶ月齢; *Fasn*: 約 35 倍, *Acc1*: 約 20 倍, *Acly*: 20 倍, *Me1*: 約 30 倍、5 ヶ月齢; *Fasn*: 約 7 倍, *Acc1*: 約 5 倍, *Acly*: 約 2 倍, *Me1*: 約 3.5 倍、9 ヶ月齢; *Fasn*: 約 25 倍, *Acc1*: 約 10 倍, *Acly*: 約 7 倍, *Me1*: 約 9 倍) (Figure 3-5)。さらに、CR において 5 ヶ月齢では 4 つの *de novo* 脂肪酸合成関連 mRNA

は 3.5 ヶ月齢に比べ有意に減少した (Figure 3-5)。

3-3-4. Wister rats の WAT における SREBP1 発現

第一章でも記述した様に、CR は sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1 を介して *de novo* 脂肪酸合成関連因子を増加させる。SREBP1 は *Srebp-1a* と *Srebp-1c* の二つのアイソフォームがあり、どちらも *Srebp1* 遺伝子にコードされている。SREBP-1a と SREBP-1c は通常はいずれも不活性型の前駆体としてゴルジ体に存在し、小胞体で切断後に活性型の成熟体となって核内に移行する (Osborne and Espenshade, 2009)。そこで我々は、*de novo* 脂肪酸合成関連因子の CR 経時依存的な V 字カーブが SREBP1 を介した影響かを 3.5、5、9 ヶ月齢を用いて確かめた。核内 SREBP1 タンパク質はいずれの期間においても CR により増加した (Figure 3-6A)。そこで、次に 3.5、5、9 ヶ月齢における *Srebp-1a* と *Srebp-1c* の mRNA 発現を解析した。*Srebp-1a* mRNA 発現は CR でも増加しなかった (Figure 3-6B)。対照的に、*Srebp-1c* mRNA 発現はいずれの期間においても CR により有意に増加したが、特に CR においても 3.5 ヶ月齢では 5 ヶ月に比べ、有意に高かった (3.5 ヶ月齢; 約 7 倍、5~9 ヶ月齢; 約 2 倍) (Figure 3-6C)。これは、CR における *Fasn*、*Acc1*、*Acly*、*Me1* の mRNA 発現が *Srebp-1c* に強く制御されていることを示唆する。

3-3-5. Wister rats の WAT における *Srebp-1c* の上流制御シグナル

SREBP1 発現はインスリンシグナルによって制御されていることはよく知られている。実際に再摂食時に SREBP1 の mRNA およびタンパク質発現が亢進する (Horton et al., 1998a; Sekiya et al., 2007)。逆にレプチンシグナルの活性化は SREBP1 や *Fasn*、*Acly*、*Me1* を含む下流シグナルを抑制する (Soukas et al., 2000)。そこで我々は CR による *Srebp-1c* の発現が増加する制御メカニズムを解明するため、インスリンシグナルとレプチンシグナルに焦点を当てた。

CR はいずれの期間においても AKT のリン酸化レベルを変えなかった (Figure 3-7B, C)。しかし、核内のリン酸化 AKT は 3.5 ヶ月齢の CR によって有意に増加した (Figure 3-7E)。対照的に、CR により、レプチンの mRNA 発現は 5 ヶ月齢と 9 ヶ月齢で減少し、タンパク質発現も 9 ヶ月齢で有意に低かった (Figure 3-7A, B, D)。

3-3-6. fa/fa Zucker rats の WAT における *de novo* 脂肪酸合成関連遺伝子とタンパク質の発現

CR による *de novo* 脂肪酸合成の活性化にレプチンシグナルが及ぼす影響を明らかにするために、レプチン受容体欠損 fa/fa Zucker rats における *de novo* 脂肪酸合成関連タンパク質の CR による効果を解析した。AL rats で対照群に比べ、fa/fa Zucker rats で *de novo* 脂肪酸合成関連タンパク質の発現が有意に高かった (FASN: 約 15 倍, ACC: 約 1.5 倍, ACLY: 約 8.5 倍, pACLY: 約 1.5 倍, ME-1: 約 2 倍) (Figure 3-8)。また、対照群では *de novo* 脂肪酸合成関連遺伝子およびタンパ

ク質の発現が CR により有意に増加したが、fa/fa Zucker rats では増加しなかった (対照群; FASN: 約 20 倍, ACC: 約 3.5 倍, ACLY: 約 25 倍, pACLY: 約 3 倍, ME-1: 約 5 倍、fa/fa; FASN: 約 1 倍, ACC: 約 1.5 倍, ACLY: 約 1.5 倍, pACLY: 約 1 倍, ME-1: 約 1.5 倍) (Figure 3-8)。

3-4. 考察

本章では、WAT における CR の効果のうち特に *de novo* 脂肪酸合成に着目し、CR 開始後どのくらいの期間で効果が現れるのかを解析した。WAT において、*de novo* 脂肪酸合成関連 mRNA およびタンパク質発現は 3.5 ヶ月齢で顕著に発現が増加した後に 5 ヶ月齢まで減少し、その後 9 ヶ月齢まで増加した。*de novo* 脂肪酸合成の主要制御因子である SREBP-1a および-1c 各々に対する特異的な抗体が入手できないため、SREBP-1 タンパク質発現に対する解析となったが、核内 SREBP-1 量に加え Srebp-1c-mRNA 発現量も同様の傾向を示したこと、また、第一章で示したように Srebp-1c KO マウスにおいて、WAT では CR の効果が無くなることから、WAT における経時的な効果に関しても、Srebp-1c の制御が強いと考えられた。Srebp-1c は絶食後に再摂食を行うことによって高発現することが報告されており、さらに WAT より肝臓においてこの傾向は顕著であることが知られている (Horton et al., 1998a; Sekiya et al., 2007)。しかしながら、CR ではいずれの期間においても CR にともなう *de novo* 脂肪酸合成関連タンパク質の発現は肝臓ではなく WAT においてのみ高くなった。また、この発現は fed/fasted に関わらず増加していたため、CR による発現増加は摂食応答によるものでないことが示唆された。

Srebp-1c の発現はインスリンにより転写レベルで制御されていることはよく知られている。pAKT の量は、インスリンシグナル伝達の活性化レベルを表す。CR は血漿インスリンを低下させるが、インスリン感受性を高める (Yamaza et al., 2004; Higami et al., 2005)。WAT の Srebp-1c の転写活性化におけるインスリンシグナルの寄与を明らかにするため、pAKT の変化を測定した。その結果、核内 pAKT は 3.5 ヶ月齢で CR により増加したが、5 ヶ月齢および 9 ヶ月齢では増加は見られなかった。これは、短期 CR においてインスリンシグナルを介して Srebp-1c の転写を促進していることを示唆する。注目すべきことは、WAT 全体ではいずれの月齢においても pAKT 量が変化していないが、3.5 か月齢のみ核内 pAKT 量が増加していることから、3.5 ヶ月齢では CR により pAKT の核内移行が促進したと考えられた。AKT には DNA binding domain と考えられる site が無いため、直接転写制御していることは考えられない。しかし AKT は、核内 FoxO1 をリン酸化することで核内から細胞質へ移行し、FoxO1 の転写活性を抑制することが知られている (Taniguchi et al., 2006; Dharaneeswaran et al., 2014)。さらに FoxO1 は retinoid X receptor/liver X receptor 依存的な Srebp-1c の転写を抑制することから (Kamei et al., 2008)、pAKT は Srebp-1c の転写を活性化すると考えられる。また、AKT は、glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) をリン酸化することで活性を抑制することが知られている (Cross et al., 1995)。さらに GSK3 β は核内 SREBP-1c をリン酸化することで F-box and WD Repeat Domain-containing 7 α によるユビキチン化を介した核内 SREBP-1c の分解を引き起こすことから (Shao and Espenshade, 2012; Kumadaki et al., 2011)、pAKT は核内 SREBP-1c の分解抑制にも寄与する。すなわち、3.5 ヶ月齢では CR により pAKT の核内移行が促進することで、Srebp-1c の転写促進による増加や SREBP-1c 安定化を介して、核内 SREBP-1c が増加して

いることが示唆された。

さらに、9ヶ月齢までのCRにおける*de novo* 脂肪酸合成の亢進を解明するため、レプチンに着目した。レプチン処理は Srebp-1 および Fasn, Acly, Me1 を含む下流因子を減少させることが報告されている (Soukas et al., 2000)。それゆえ、CR による脂肪酸合成関連遺伝子やタンパク質発現の増加はレプチンの低下によるのではないかと考えた。予想通り、レプチン受容体を機能欠損した *fa/fa Zucker rats* では AL でも CR でも脂肪酸合成関連タンパク質発現は常に亢進しており、CR によるさらなる発現の増加は見られなかった。これらの知見は 9ヶ月齢までの CR ではレプチンシグナルの不活性化を介して Srebp-1c の発現が増加し、*de novo* 脂肪酸合成が亢進している可能性を示唆する。

酸化ストレスの減少は CR の有益な効果に寄与する重要な因子の一つとしてよく知られている (Sohal and Weindruch, 1996)。また、NADPH はグルタチオンやチオレドキシンなどを含む抗酸化システムを活性化する基質である (Oka et al., 2012)。Sirt3 による isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) の活性化はミトコンドリア内 NADPH 量を増加させ、酸化ストレスを減少させることが示唆されている (Someya et al., 2010)。さらに、CR により発現上昇した ME1 はリンゴ酸の脱カルボキシル化を触媒してピルビン酸およびNADPHを産生する (Wise and Ball, 1964)。これらより、我々は ME1 や IDH2 を介した NADPH 産生の亢進および第一章で示した総グルタチオン量の増加により、CR は酸化ストレスを抑制すると考えた。

今回得られた知見および以前報告された知見 (Bruss et al., 2010) より、CR による*de novo* 脂肪酸合成の活性化は、肝臓よりも WAT で顕著であることを結論した。興味深いことに、WAT における*de novo* 脂肪酸合成の活性化は 5ヶ月齢 (CR 期間 2ヶ月) で減弱することを示した。今回のモデルにおいては、CR 期間 2ヶ月を境に前半はエネルギー不足に対する適応応答 (短期 CR)、後半は CR による有益な代謝リモデリング (長期 CR) と考えられ、前半はインスリンシグナルの活性化、後半はレプチンシグナルの抑制によって制御されている可能性が示唆された。したがって、長期 CR による有益な効果を誘導するためには、少なくとも 3 か月以上の CR 期間が必要であると考えた。

Figure 3-1

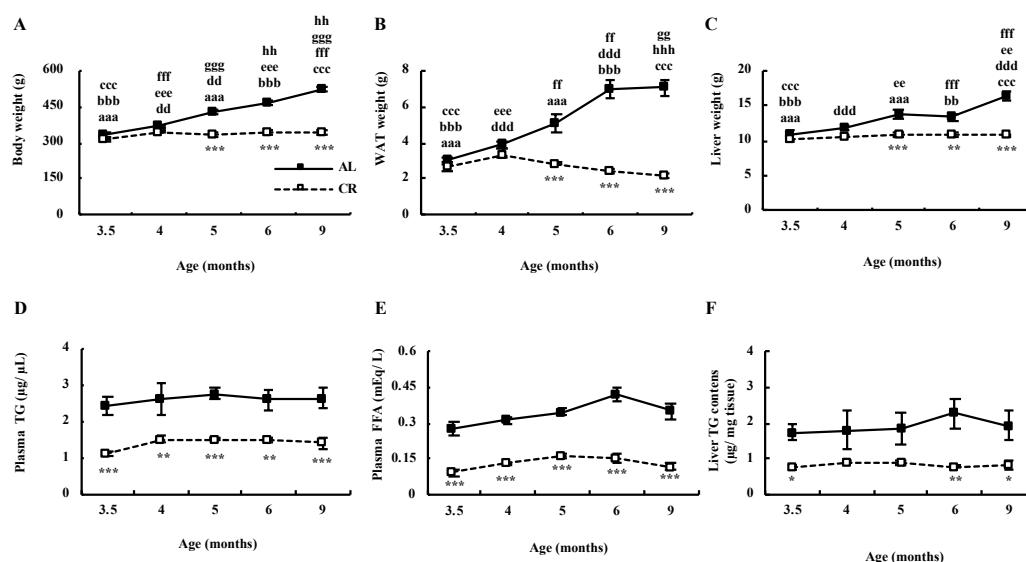


Figure 3-1 CR-associated chronological alterations of body and organ weights, plasma lipid profiles, and hepatic TG contents of Wistar rats.

(A–F) The body weights (A), epididymal white adipose tissue (WAT) weights (B), liver weights (C), plasma triglyceride (TG) levels (D), plasma non-esterified fatty acid (NEFA) levels (E), and hepatic TG contents (F) are shown. The values shown in the panels are means \pm SEM for 5–6 animals in each group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. age-matched AL rats by Tukey's t -test. Values indicated by the same double and triple superscripts differ significantly with age in the same dietary group at $p < 0.01$ and $p < 0.001$ by Tukey's t -test, respectively.

Figure 3-2

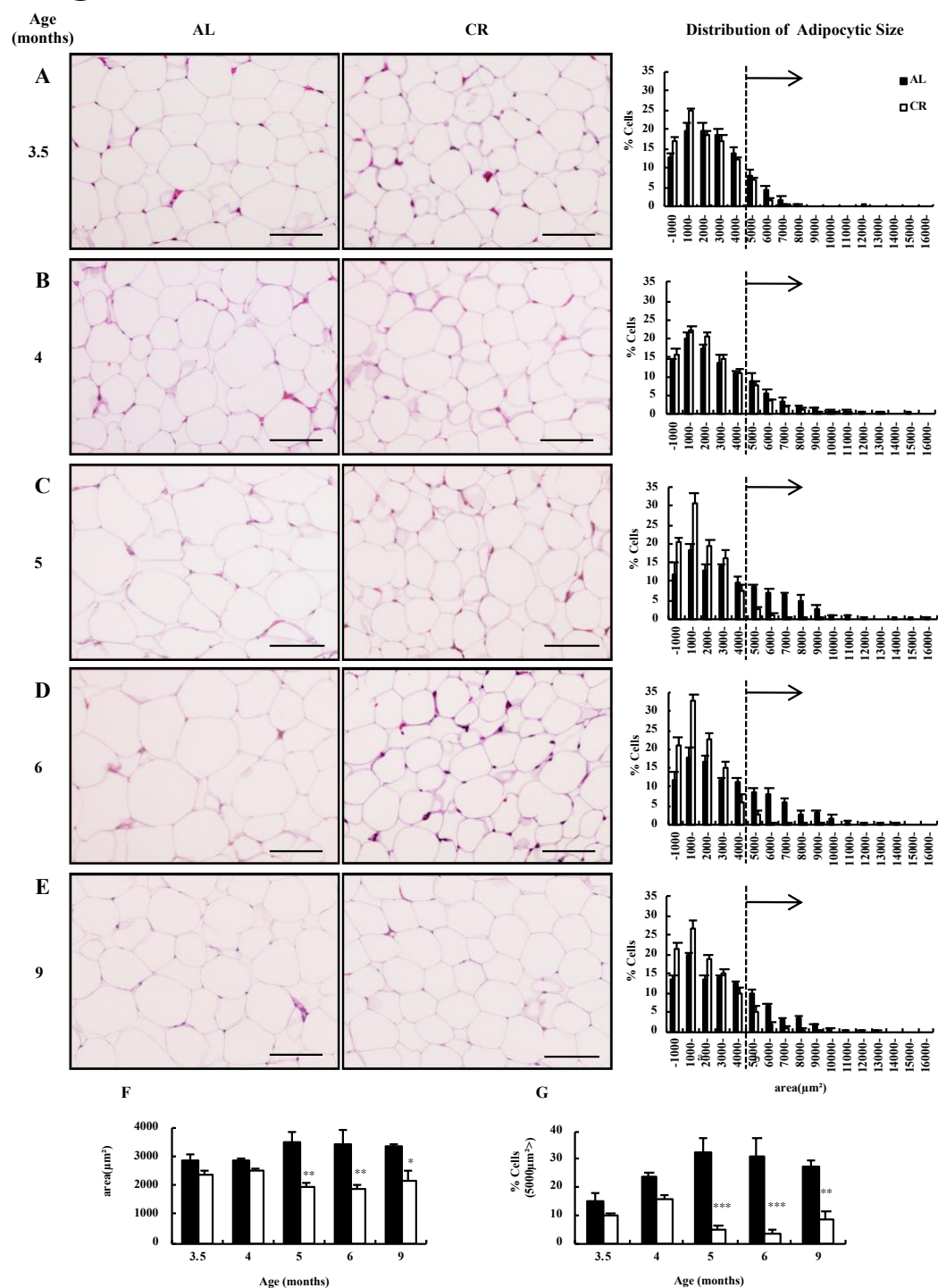


Figure 3-2 CR-associated chronological alterations of WAT morphology in Wistar rats.

(A-E) Representative histological sections of white adipose tissue (WAT) from *ad libitum* (AL) and caloric restriction (CR) rats at 3.5 (A), 4 (B), 5 (C), 6 (D), and 9 (E) months of age (magnification: $\times 40$; scale bars: 100 μm). Sections were stained with hematoxylin and eosin (HE). (F,G) The sections with HE staining were evaluated by a quantitative morphometric method using ImageJ 1.43u/Java1.6.0_22 software. (F) Median adipocyte sizes in WAT. (G) Percentages of large adipocytes (over 5000 μm^2). The values shown in the panels are means \pm SEM for 3 animals in each group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. age-matched AL by Tukey's t -test. Values indicated by the same single superscripts differ significantly with age in the same dietary group at $p < 0.05$ by Tukey's t -test.

Figure 3-3

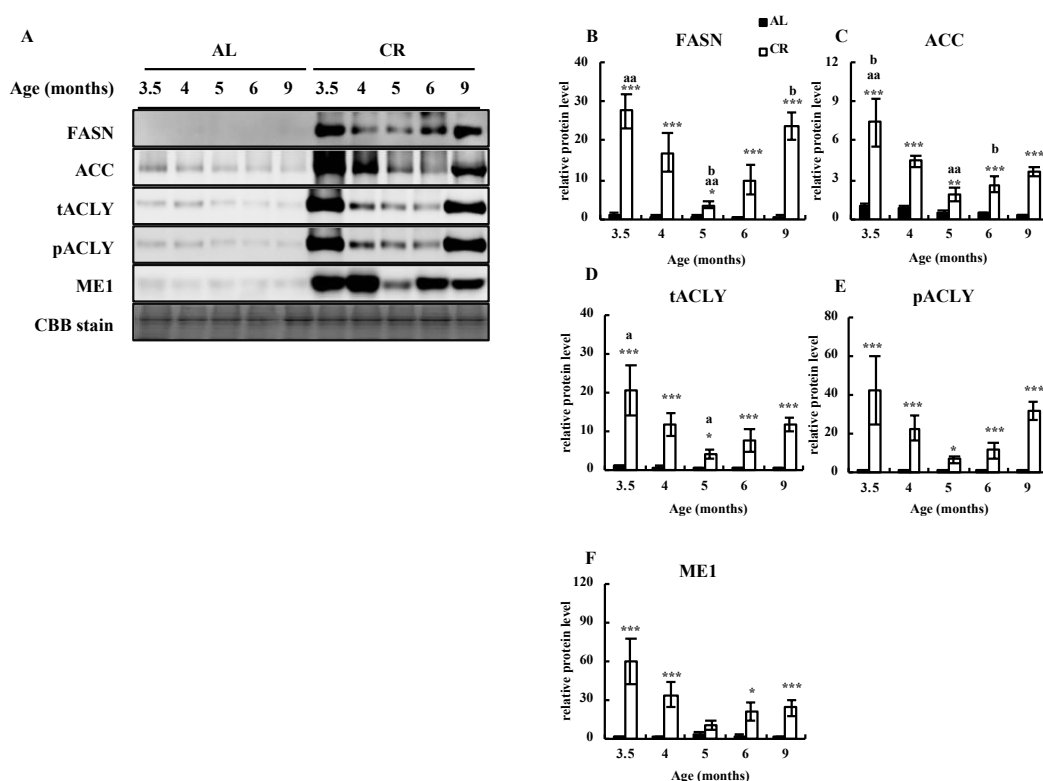


Figure 3-3 CR-associated chronological alterations of protein expressions involved in de novo Fatty acid (FA) biosynthesis in white adipose tissue (WAT) of Wistar rats. Protein samples were extracted from WAT of *ad libitum* (AL) and caloric restriction (CR) rats at 3.5, 4, 5, 6, and 9 months of age. Western blot analyses of total fatty acid synthase (FASN), acetyl-CoA carboxylase (ACC), total ATP citrate lyase (tACLY), phospho-ACLY (pACLY), and malic enzyme (ME)1 were performed using a chemiluminescence method. The antibody-bound proteins were visualized using an LAS3000 Image Analyzer. The intensity of Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining was used as a normalization control. The western blot analyses were performed in duplicate or triplicate for each sample with biological repeats of $n = 4$ for each group. (A) Representative images of western blots and CBB staining. (B-F) Densitometry data for FASN (B), ACC (C), tACLY (D), pACLY (E), and ME1 (F). The values shown in the panels are means \pm SEM for each group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, vs. age-matched AL rats by Tukey's t-test. Values indicated by the same single and double superscripts differ significantly with age in the same dietary group at $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.01$ by Tukey's t-test, respectively.

Figure 3-4

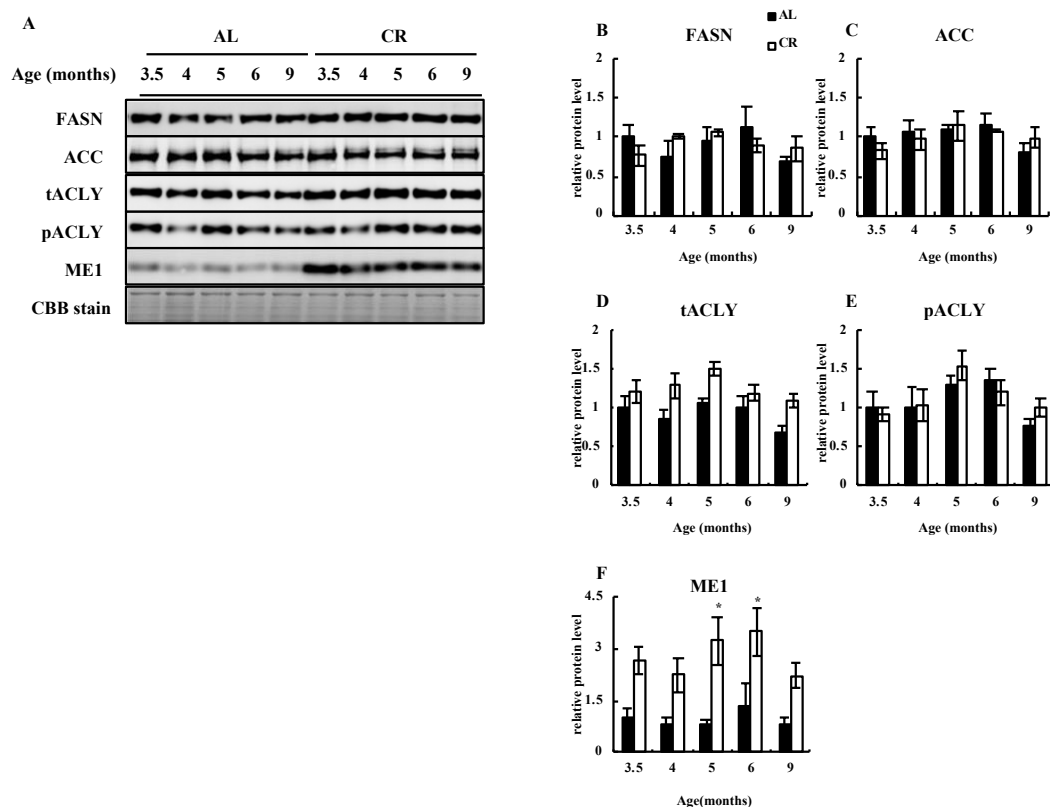


Figure 3-4 CR-associated chronological alterations of protein expressions involved in de novo

Fatty acid (FA) biosynthesis in the liver of Wistar rats. Protein samples were extracted from the liver of *ad libitum* (AL) and caloric restriction (CR) rats at 3.5, 4, 5, 6, and 9 months of age. Western blot analyses of total fatty acid synthase (FASN), acetyl-CoA carboxylase (ACC), total ATP citrate lyase (tACLY), phospho-ACLY (pACLY), and malic enzyme (ME)1 were performed using a chemiluminescence method. The antibody-bound proteins were visualized using an LAS3000 Image Analyzer. The intensity of Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining was used as a normalization control. The western blot analyses were performed in duplicate or triplicate for each sample with biological repeats of $n = 4$ for each group. (A) Representative images of western blots and CBB staining. (B-F) Densitometry data for FASN (B), ACC (C), tACLY (D), pACLY (E), and ME1 (F). The values shown in the panels are means \pm SEM for each group. * $p < 0.05$, vs. age matched AL rats by Tukey's t-test.

Figure 3-5

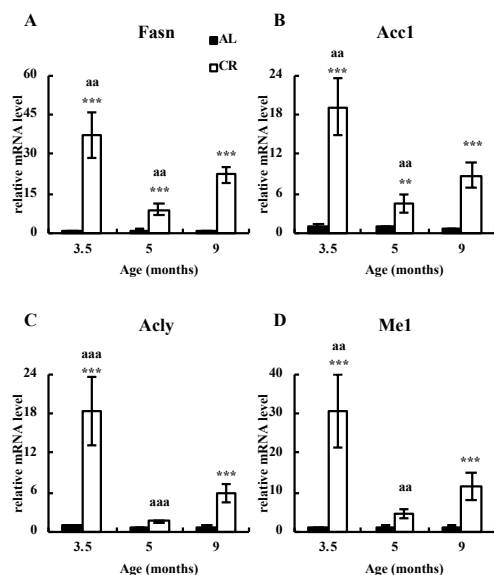


Figure 3-5 CR-associated chronological alterations of gene expressions involved in de novo FA biosynthesis in WAT of Wistar rats.

Total RNA was extracted from white adipose tissue (WAT) of four to six *ad libitum* (AL) and caloric restriction (CR) rats at 3.5, 5, and 9 months of age, and real-time quantitative RT-PCR was performed. Transcripts of fatty acid synthase (Fasn), acetyl-CoA carboxylase (Acc)1, ATPcitrate lyase (Acly), malic enzyme (Me)1, and TATA binding protein (Tbp) were amplified. Tbp was used for normalization. (A–D) Data for Fasn (A), Acc1 (B), Acly (C), and Me1 (D). The values shown in the panels are means \pm SEM for each group. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, vs. age-matched AL rats by Tukey's t-test. Values indicated by the same double and triple superscripts differ significantly with age in the same dietary group at $p < 0.01$ and $p < 0.001$ by Tukey's t-test, respectively.

Figure 3-6

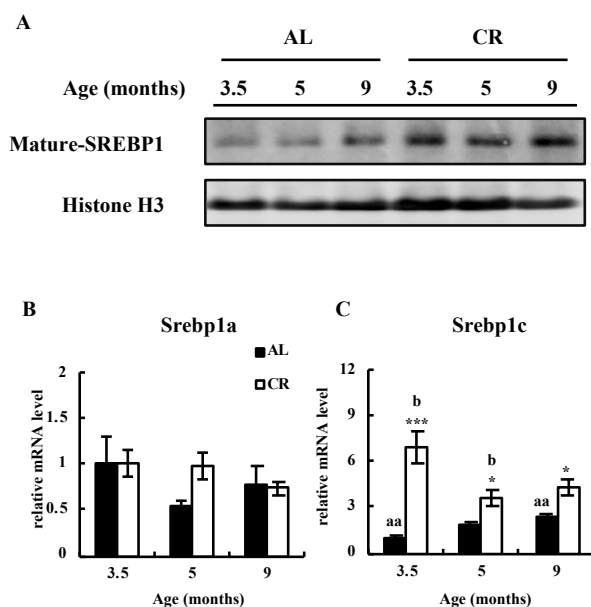


Figure 3-6 CR-associated chronological alterations of SREBP1 in WAT.

(A) Nuclear protein extracts were obtained from pooled white adipose tissue (WAT) samples of three *ad libitum* (AL) and caloric restriction (CR) rats at 3.5, 5, and 9 months of age. Western blot analyses of sterol regulatory element-binding protein (SREBP)1 and Histone H3 were performed using a chemiluminescence method. The antibody-bound proteins were visualized using an LAS3000 image analyzer. The intensity of Histone H3 was used as a normalization control. The western blot analyses were performed in triplicate. Representative images of western blots are shown. (B,C) Total RNA was extracted from WAT of four to six AL and CR rats at 3.5, 5, and 9 months of age, and real-time quantitative RT-PCR was performed. Transcripts of *Srebp1a*, *Srebp1c*, and TATA box binding protein (*Tbp*) were amplified. *Tbp* was used for normalization. Data for *Srebp1a* (B) and *Srebp1c* (C) are shown. The values shown in the panels are means \pm SEM for each group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, vs. age-matched AL rats by Tukey's test. Values indicated by the same single and double superscripts differ significantly with age in the same dietary group at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ by Tukey's t-test, respectively.

Figure 3-7

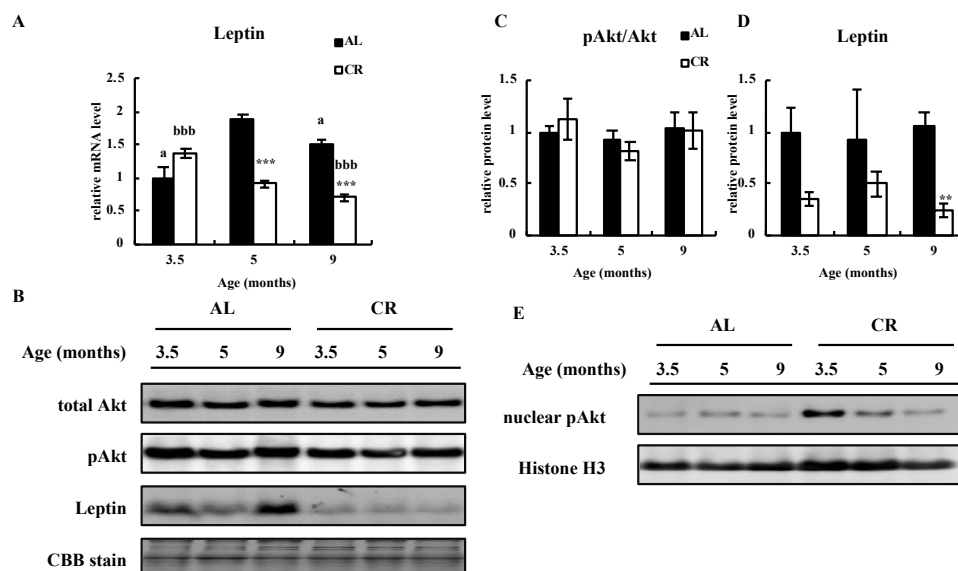


Figure 3-7 CR-associated chronological alterations of protein and gene expressions involved in the signals regulating SREBP1.

(A) Total RNA was extracted from white adipose tissue (WAT) of four to six *ad libitum* (AL) and caloric restriction (CR) rats at 3.5, 5, and 9 months of age, and real-time quantitative RT-PCR was performed. Transcripts of Leptin and TATA box binding protein Tbp were amplified. Tbp was used for normalization. Data for Leptin are shown. (B–D) Protein samples were extracted from WAT of AL and CR rats at 3.5, 5, and 9 months of age. Western blot analyses of AKT, pAKT, and Leptin were performed using a chemiluminescence method. The antibody-bound proteins were visualized using an LAS3000 Image Analyzer. The intensity of Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining was used as a normalization control. The western blot analyses were performed in duplicate or triplicate for each sample with biological repeats of $n = 4$ for each group. Representative images of western blots and CBB staining are shown (B). Densitometry data for pAKT/AKT (C) and Leptin (D) are shown. (E) Nuclear protein extracts were obtained from pooled WAT samples of three AL and CR rats at 3.5, 5, and 9 months of age. Western blot analyses of pAKT and Histone H3 were performed using a chemiluminescence method. The antibody-bound proteins were visualized using an LAS3000 Image Analyzer. The intensity of Histone H3 was used as a normalization control. The western blot analyses were performed in triplicate. Representative images of western blots are shown. The values shown in the panels are means \pm SEM for each group. *** $p < 0.001$, vs. age-matched AL rats by Tukey's test. Values indicated by the same single and triple superscripts differ significantly with age in the same dietary group at $p < 0.05$ and $p < 0.001$ by Tukey's t-test, respectively.

Figure 3-8

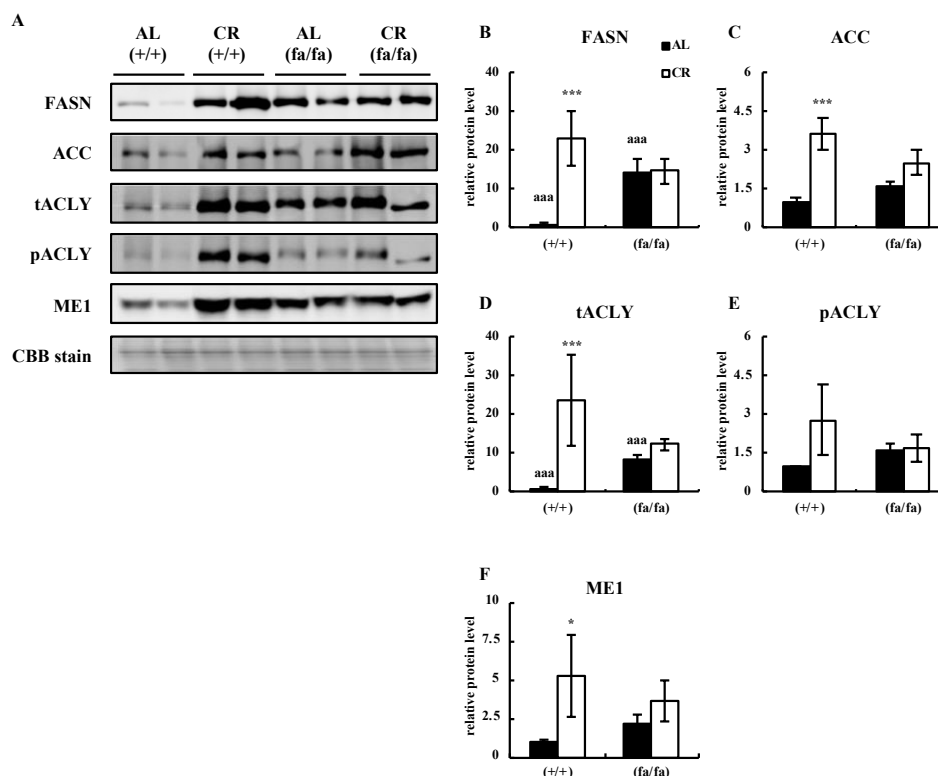


Figure 3-8 CR-associated alterations of protein expressions involved in de novo FA biosynthesis in WAT of fa/fa Zucker rats.

Protein samples were extracted from white adipose tissue (WAT) of ad libitum (AL) and caloric restriction (CR) obese fa/fa and lean +/+ Zucker rats. Western blot analyses of total fatty acid synthase (FASN), acetyl-CoA carboxylase (ACC), total ATP citrate lyase (tACLY), pACLY, and malic enzyme (ME)1 were performed using a chemiluminescence method. The antibody-bound proteins were visualized using an LAS3000 Image Analyzer. The intensity of Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining was used as a normalization control. The western blot analyses were performed in duplicate or triplicate for each sample with biological repeats of $n = 4-5$ for each group. (A) Representative images of western blots and CBB staining. (B–F) Densitometry data for FASN (B), ACC (C), tACLY (D), pACLY (E), and ME1 (F). The values shown in the panels are means \pm SEM for each group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, vs. AL rats by Tukey's test. Values indicated by the same triple superscripts differ significantly in the same dietary group at $p < 0.001$ by Tukey's t-test.

Figure 3-9

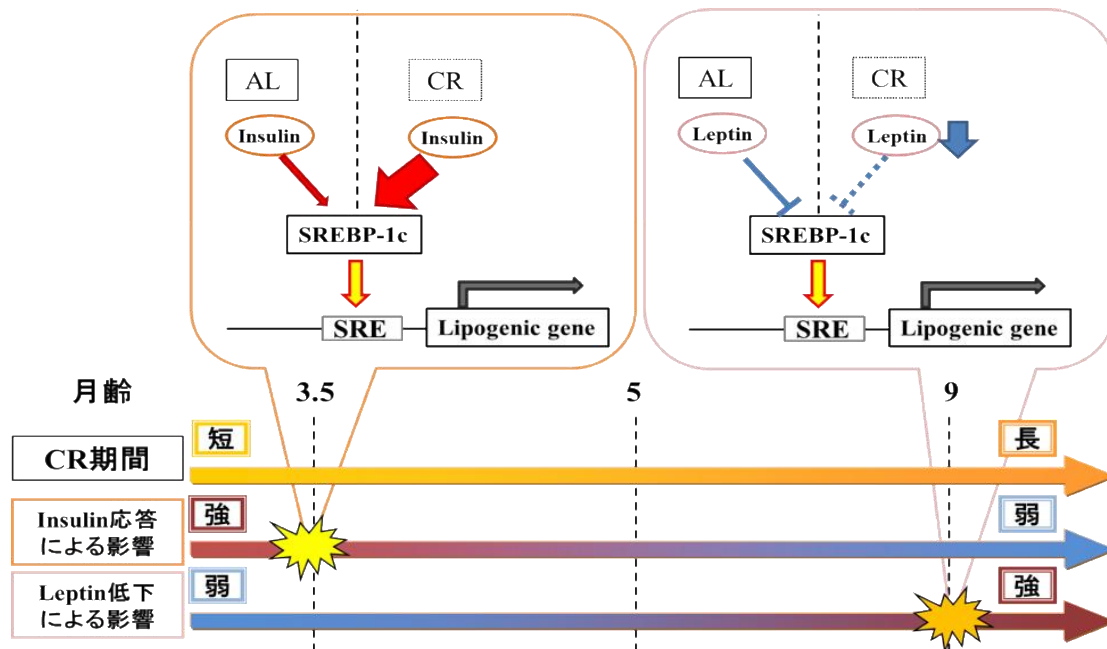


Figure 3-9 Schematic overview of the regulation of caloric restriction-induced chronological alteration of Srebp-1c.

Table 3-1: List of 1st antibody for Western blotting.

Name	Immunized	Clonal	Supplier	Catalog Number
ACC	rabbit	polyclonal	Cell Signaling, Boston, MA	#3662
ACLY	rabbit	EP704Y	Epitomics, Burlingame, CA	1699-1
ACLY pSer455	rabbit	EP828Y	Epitomics	1822-1
AKT	rabbit	polyclonal	Cell Signaling	#9272
AKT pSer473	rabbit	D9E	Cell Signaling	#4060
FASN	mouse	23	Becton, Dickinson, Franklin Lakes, NJ	610962
Histone H3	rabbit	D1H2	Cell Signaling	#4499
ME-1	rabbit	polyclonal	Sigma	SAB4501853
SREBP1	rabbit	H-160	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA	sc-8984

Table 3-2: List of 2nd antibody for Western blotting.

Name	Supplier	Catalog Number
HRP-conjugated F(ab') ₂ fragment of goat anti-mouse IgG	Jackson Immunological Research (West Grove, PA)	115-036-062
HRP-conjugated F(ab') ₂ fragment of goat anti-rabbit IgG	Jackson Immunological Research	111-036-045

Table 3-3: List of primers for real-time RT-PCR.

	Forward	Reverse
Acc1	5'-TGG ATG AAC CAT CTC CGT TG-3'	5'-CAT GTG AAA GGC CAA ACC-3'
Acly	5'-TGA TGG GAG AAG TTG GGA AG-3'	5'-TAA GGA GGA AGT TGG CAG TGT G-3'
Fasn	5'-AGC AGG CAC ACA CAA TGG AC-3'	5'-GAA GAA GAA AGA GAG CCG GTT G-3'
Me1	5'-TGC TTT GAG TAA TCC GAC CAG-3'	5'-TGG CCA GGA AAC AGA GTC C-3'
Leptin	5'-CCA GGA TCA ATG ACA TTT CAC ACA C-3'	5'-CAG GGA GCA GCT CTT GGA GAA G-3'
Srebp-1a	5'-CCG AGG TGT GCG AAA TGG-3'	5'-TTG ATG AGC TGA AGC ATG TCT TC-3'
Srebp-1c	5'-GGA GCC ATG GAT TGC ACA TT-3'	5'-GGC CCG GGA AGT CAC TGT-3'
Tbp	5'-CAG TAC AGC AAT CAA CAT CTC AGC-3'	5'-CAA GTT TAC AGC CAA GAT TCA CG-3'

第四章

Mipep がミトコンドリア機能 に与える影響

4-1. 背景

第一章で CR の効果において Srebp-1c を介したミトコンドリアの活性化が重要であることを示したが、一方で Srebp-1c は肥満の増悪因子として知られており (Yahagi et al., 2002; Takahashi et al., 2005)、また肥満によりミトコンドリア機能は低下することが知られている (Fernández-Sánchez et al., 2011)。

ヒト細胞のミトコンドリアには、約 1500 種のタンパク質が存在する (Reinders et al., 2006)。ミトコンドリアは、約 15 億年前の α プロテオバクテリアの食食に由来すると考えられており、転写および翻訳を完全に独立して行うミトコンドリアゲノムを持つ (Gray et al., 1999)。しかし、進化の過程でミトコンドリアタンパク質をコードする遺伝子のほとんどは核ゲノムにコードされるようになった。その結果、99 %以上のミトコンドリアタンパク質は細胞質のリボソーム上で合成され、翻訳後にミトコンドリアに輸送される。一方、13 種類のタンパク質のみがミトコンドリアゲノムによってコードされている (Neupert et al., 2007)。

リボソームで作られたミトコンドリアに輸送されるタンパク質前駆体の多くは、N 末端にミトコンドリアターゲティングシグナル配列を有する。このシグナル配列が、ミトコンドリア外膜上の TOM (translocase of the outer membrane) 複合体及び内膜上の TIM (translocase of the inner membrane) 複合体に認識されることで、ミトコンドリアタンパク質はミトコンドリア内の適切な箇所へと輸送される (Wiedemann and Pfanner, 2017)。輸送後シグナル配列は、MtSPases (mitochondrial signal peptidases) によるプロセッシングを受け切断される。ミトコンドリアタンパク質の約 70 %がプロセッシングを受けると推定され (Vögtle et al., 2009)、このプロセッシングが完了すると、ミトコンドリアタンパク質は活性型となる (Mossmann et al., 2012)。MtSPases については古くから研究されており、シグナルペプチド切断に関与する MPP (mitochondrial processing peptidase)、IMP (inner membrane peptidase) 及び Oct1 (Octapeptidyl aminopeptidase 1) 等の主要な酵素は、1980 年代に既に同定されている (Gakh et al., 2002)。現在では 10 種以上の MtSPases の存在が報告されている。現在までに同定された MtSPases はすべて、メタロ、セリンまたはシステインプロテアーゼに属している。そして、前駆体プロセッシング機能を持つものの他にも、シグナル配列の分解、ミスフォールド、老化または損傷を受けたタンパク質の分解によるミトコンドリア品質管理を担う MtSPases も存在する (Quirós et al., 2015)。また、近年、前駆体プロセッシングを担うとされてきた MtSPases が、ミトコンドリアタンパク質の半減期制御、ミトコンドリアリボソーム集合体の制御、およびミトコンドリアの分裂・融合等の二重の役割を担うことも報告されている (Quirós et al., 2015)。以上から、MtSPases はミトコンドリアの機能維持に重要な役割を果たすと考えられる。

silence information regulator 2 (Sir2) 遺伝子は、1993 年にテロメア、接合型遺伝子座領域 (HM loci)およびリボソーム DNA (rDNA) 領域のサイレンシングを保持するタンパク質として出芽酵母で発見された (Braunstein et al., 1993)。Sir2 は原核生物から真核生物まで高度に保存されており、

Sirtuin family と呼ばれている。1999 年に Kaeberlein らによって、出芽酵母の Sir2 遺伝子を変異させると寿命が約 50 %に短縮し、Sir2 を過剰発現させると寿命が約 30 %延伸することが報告された (Kaeberlein et al., 1999)。さらに線虫やショウジョウバエにおいて、Sir2 の欠損により CR の寿命延伸作用が消失することが報告され (Rogina and Helfand 2004; Wang and Tissenbaum, 2006)、生物種を越えて同様の報告がされていることから、長寿遺伝子と呼ばれるようになった。ヒトを含めた哺乳類には SIRT1～SIRT7 の 7 種類の Sirtuin が存在する (Haigis and Guarente, 2006)。酵素活性部位であるサーチュインドメインの配列は高度に保存されているが、それ以外の相同性は高くはない。また SIRT1、SIRT6 および SIRT7 は核内に局在しており、SIRT1 は核質に、SIRT6 はヘテロクロマチン領域に、SIRT7 は核小体に局在する。SIRT2 は主に細胞質に、SIRT3、SIRT4、SIRT5 はミトコンドリアに局在する (Finkel et al., 2009; Nakagawa and Guarente, 2011)。

哺乳類では SIRT1～7 のうち、SIRT1、3、6 が老化や寿命にかかわっているとの報告がある。SIRT1 を脳特異的に過剰に発現させたマウスの寿命が延伸することが報告されている (Satoh et al., 2013)。また SIRT3 の過剰発現により寿命が延伸するとの報告はないが、SIRT3 を欠損したマウスは、肝臓で絶食時にも中性脂肪が蓄積し、高脂肪食負荷によるインスリン抵抗性・肥満・非アルコール性脂肪性肝炎を呈しやすい (Hirschey et al., 2011)。また、SIRT3 は CR による加齢性難聴の抑制に必要な遺伝子であることが報告されている (Someya et al., 2010)。興味深いことに、酵素活性が不活性型となる SIRT3 多型 (SNP: rs11246020) は、メタボリック症候群患者と関連することが見出されている (Hirschey et al., 2011)。SIRT6 に関して、ノックアウトマウスは生後 2～3 週までは正常に発育するが、その後急速に、皮下脂肪量の低下、骨密度の低下、脊柱彎曲、リンパ球の減少などの強い早老症様症状を呈し、約 1 か月で死に至る (Mostoslavsky et al., 2006)。一方、SIRT6 を過剰発現した雄マウスは血中 IGF-1 濃度が低下しており、Sirtuin を過剰発現した哺乳類としては初めて寿命が延伸することが報告された (Kanfi et al., 2012)。しかし一方で、線虫およびショウジョウバエにおいて Sir2 を過剰発現しても寿命は延伸しないという報告もあり (Burnett et al., 2011)、寿命制御における Sirtuin の役割は未だ議論の多いところである。

また、ミトコンドリアではエネルギー代謝に関わる多くのタンパク質がアセチル化されており、SIRT3 を欠損させたマウスでは SIRT4 および SIRT5 存在下でも多くのミトコンドリア局在タンパク質のアセチル化が亢進することが報告されている (Lombard et al., 2007)。それゆえ、SIRT3 はミトコンドリアにおける主要な脱アセチル化酵素であると考えられている。Fig. 4-1 で示すように、SIRT3 は、酢酸からアセチル CoA を合成する acetyl-CoA synthase 2 (AceCS2) や β 酸化の最初の段階を触媒する acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain (Acadl)、ミトコンドリア内における抗酸化因子の Manganese superoxide dismutase (MnSOD) など、その脱アセチル化活性を介して各酵素の活性化に関わる (Schwer et al., 2006; Hirschey et al., 2010; Qiu et al., 2010)。SIRT3 は、WAT および褐色脂肪組織 (BAT; brown adipose tissue) においては CR により発現が増加し (Shi et al.,

2005)、肝臓においても CR や絶食により発現が上昇する (Hallows et al., 2011; Hirschey et al., 2010)。また、SIRT3 KO マウスでは絶食により HMGCS2 (3-hydroxy-3-methylglutarylCoA synthase 2) の過アセチル化が起こり、ケトン体の血中濃度が低下を示すことから、SIRT3 は絶食時のエネルギー基質となるケトン体の合成にも関与することや (Shimazu et al., 2010)、CR 時に mitochondrial isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) を脱アセチル化することにより、NADPH 量を増やし、酸化型グルタチオンを還元することによって、還元型／酸化型グルタチオン比の増加を介して酸化ストレスからの防御能を高めることも報告されている (Someya et al., 2010)。それゆえ、CR が SIRT3 に及ぼす影響、言い換えると CR による SIRT3 活性化機構を解明することは極めて重要である。

我々は WAT において CR により SIRT3 がプロセッシングを受ける可能性を発見した。本章では、そのメカニズムを解析し、CR による WAT でのミトコンドリア活性化は、MtSPases の1つである mitochondria intermediate peptidase (Mipep) が重要であることを示し、さらに Mipep 遺伝子欠損マウスを作製した。

4-2. 材料と方法

4-2-1. 使用マウスおよび臓器について

Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) より購入した *Srebp1c*^{+/-}マウス (B6;129S6-*Srebp1*^{tm1Mbr/J}, Liang et al., 2002) から、交配により *Srebp1c*^{+/+}を作出した。東京理科大学薬学部動物実験施設内 specific-pathogen-free (SPF) 環境下、明暗サイクルは 12 時間で飼育し、AL 群には CRF-1 (Oriental Yeast, Tokyo, Japan) を十分量与えた。AL 群の摂食量を測定し、CR 群にはその 70%量を消灯前に与えた。CR は 3 ヶ月齢より開始し、AL, CR の計 2 群を作製した。8.5 から 10 ヶ月齢で安楽死させ、精巣周囲脂肪を採取し、液体窒素により急速凍結後-80°Cにて保存した。安楽死は CR 群の給餌 1-4 時間後と給餌 2-5 時間前に分けて行い、それぞれ fed 群、fast 群とした。fast 群については、屠殺前日の CR 群給餌時に餌を取り除き絶食状態とした。以上 AL fed, AL fast, CR fed, CR fast の計 4 群を作製した。また、筑波大学 内分泌代謝・糖尿病内科 島野仁教授・中川嘉准教授より 15 週齢 *Sirt3*^{+/+}および *Sirt3*^{-/-}マウスの精巣周囲脂肪を供与していただき、液体窒素により急速凍結後-80 °C にて保存した。すべての動物実験は、東京理科大学動物実験委員会による審査、学長による承認を得て、東京理科大学動物実験指針に従い行われた。また、すべての遺伝子組み換え実験は、東京理科大学遺伝子組換え実験安全委員会による審査、学長による承認を得て、東京理科大学遺伝子組換え実験実施規則に従い行われた。

4-2-2. Mipep KO mice の作製

4-2-2-1. Targeting vector の作製および ES 細胞への導入

東京理科大学 生命医科学研究所 動物実験学研究部門 岩倉洋一郎教授および海部知則助教 (現 東北医科薬科大学 医学部 講師) のご指導のもと、DT-A/conditional KO FW vector より targeting vector を作製した。Insert (5' arm, targeting arm, 3' arm) は RP23-142O16 (Advanced Geno Techs Co., Ibaraki, Japan)を template とし、Table 4-1 に示した primer を使用して、KOD FX Neo (TOYOBO) により増幅した。これを、5' arm を *AscI* および *NotI*, targeting arm を *PmeI* および *SacII*, 3' arm を *SwaI* および *XhoI* で処理し、NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (TaKaRa, U0609B) を使用して精製後に、DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (TaKaRa, 6023) を使用して制限酵素処理済みの DT-A/conditional KO FW vector にライゲーションした。これを DH-5α にトランスフォーメーションし、アンピシリン入り LB 培地で培養後、Pure Link™ HiPure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen, K210005) を使用して、targeting vector を精製した。Targeting vector を *XhoI* で制限酵素処理した後、エレクトロポレーション法を使用して、C57BL/6N 由来の ES cells に導入した。使用したプライマーを Table 4-1 に記載した。

4-2-2-2. Southern blotting

RP23-142O16 を template とし、Table 4-1 に示した primer を使用して、KOD FX Neo により 3'

probe を増幅した。その後、targeting vector を導入した ES cells よりフェノール・クロロホルム法で genome DNA を抽出し、ApaI で処理した。そして、0.8 % agarose gel に genome DNA 20 µg をアプライし、泳動後にエチジウムブロマイドにつけ、撮影する。その後、酸処理 (0.25 M HCl を室温で 15 min 浸透)、塩基処理 (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl を室温で 15 min 浸透)、中和処理 (0.5 M Tris-HCl (pH 8.0), 1.5 M NaCl を室温で 20 min 浸透)の順で処理する。処理後、10×SSC (1.5 M NaCl, 150 mM sodium citrate) の浸透圧を利用して、ナイロンメンブレン (Gene Screen Plus, NEN Research Products, Boston, MA) に転写し、150 mJ の UV で DNA をクロスリンクした。クロスリンク後、5×SSCP (0.75 M NaCl, 75 mM sodium citrate, 50 mM NaH₂PO₄, 5 mM EDTA), 50 % Formamide, 2×Denhardt's solution, 1 % SDS, 100 µg/mL salmon testis DNA を含むバッファーに浸して、42 °C でプレハイブリダイゼーションを一晩行い、³²P で標識した 3' probe をバッファー中に混ぜ、42 °C でハイブリダイゼーションを一晩行った。その後、バッファーを除き、2×SSC, 0.1 % SDS 溶液内で 42 °C にて 15 min 洗浄し、0.1×SSC, 0.1 % SDS 溶液内で 65 °C にて 15 min ×2 回洗浄した。このメンブレンを感光板に乗せ、一晩放置後に FLA-7000 (FUJIFILM, Tokyo, Japan) で撮影した。

4-2-2-3. マウスの作製

目的の部位に target allele が入った ES 細胞を ICR mice の 8 細胞期の受精卵と混ぜ、一晩培養後、胚盤胞期になった受精卵を偽妊娠マウスの子宮に移植し、キメラマウスを作製した (アグリゲーション法)。キメラマウスと日本クレア株式会社より購入した C57BL/6Jcl を交配し、純粋な C57BL/6 mice を作製した。東京理科大学 生命医科学研究所 発生及び老化研究部門 後飯塚僚教授より CAG-FLPe mice を供与していただき (Kanki et al., 2006)、作製したマウスと交配し、flippase-FRT システムを利用してネオマイシン耐性配列を削除し、Mipep^{fllox/fllox} mice を作製した。その後、大阪大学 医学部 宮崎純一教授の承諾のもと、東京理科大学 生命医科学研究所 生命情報科学研究部門 中村岳史教授より供与していただいた CAG-Cre mice と Mipep^{fllox/fllox} mice を交配し (Sakai and Miyazaki, 1997)、Mipep KO mice を作製した。

全ての動物実験は、東京理科大学動物実験委員会による審査、学長による承認を経て、東京理科大学動物実験指針に従い行われた。また、全ての遺伝子組換え実験は、東京理科大学遺伝子組換え実験安全委員会による審査、学長による承認を経て、東京理科大学遺伝子組換え実験実施規則に従い行われた。

4-2-3. 細胞および細胞培養

マウス白色前駆脂肪細胞株 3T3-L1 は JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources) より購入し、10 % FBS (fetal bovine serum; Hyclone, Logan, UT)、100 U/mL P/S (penicillin-streptomycin; Sigma, MO, USA) を含有する DMEM -low glucose- (Wako, Osaka, Japan) (通常培

地) で培養し、 $0.25 \sim 2.5 \times 10^4$ cells/cm² の細胞密度で維持した。また、レトロウイルスパッケージング細胞 Plat E (Platinam-E Packaging Cell Line) は東京大学医科学研究所の北村俊雄教授よりご提供頂き、10 % FBS, 100 U/mL P/S, 1 µg/mL puromycin (Wako), 10 µg/mL blasticidin (Funakoshi, Tokyo, Japan) を含有する DMEM -high glucose- (Wako) で培養し、 $0.5 \sim 2.0 \times 10^5$ cells/cm² の細胞密度で維持した。

4-2-4. 成熟脂肪細胞への分化誘導

3T3-L1 細胞の分化誘導は 1.5×10^4 cells/cm² の密度で播種し、2 日後に 100 %コンフルエントに達した時点を Day0 とした。Day0 から 2 日間は 500 µM 3-isobutyl-1-methylxanthine (Sigma) 及び 1 µM dexamethasone (Sigma) を含む維持培地で培養することで脂肪細胞への分化誘導を行い、その後は 2 日置きに 10 µg/mL insulin (Wako) 及び 50 nM tri-iodo thyronine (Sigma) を含む維持培地で培養することで成熟脂肪細胞へと誘導した。

4-2-5. Sirt3 過剰発現レトロウイルスベクターの作製

FLAG-SIRT3 を発現するレトロウイルスベクターを作製するため、Addgene より mSIRT3-L (Addgene plasmid 33309) を購入した。このベクターを *EcoRI* 及び *Apal* で切断し、*EcoRI* 及び *Apal* で切断済みの pMXs-AMNN-puro レトロウイルスベクターヘライゲーションすることで作製した。

4-2-6. Mipep ノックダウンレトロウイルスベクターの作製

siDirect (Tokyo University) を用いて *Mipep* の標的配列を決定した (Figure 4-2)。さらに Figure 4-2 に示すようにプラスミド DNA の安定性及び off-target 効果を軽減するため sense 鎖に複数の変異を入れた (Patzel et al., 2005; Miyagishi et al., 2004)。設計した 2 本のオリゴ DNA 鎖の合成は Operon Biotechnologies (Tokyo, Japan) に依頼した。2 本のオリゴ DNA 鎖は annealing buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) を加え、100 °C に達した温浴の中に入れて自然に室温まで下げる事によりアニールさせた。その後、37 °C で 3 時間 PmeI を処理した後に、65 °C で 3 時間 BstBI 処理し、切断した pMX-mU6-puro ベクターとアニールさせた DNA 鎖をライゲーションすることで pMX-mU6-sh*Mipep*-puro ベクターを作製した (Figure 4-2)。

4-2-7. 遺伝子導入

遺伝子導入は、作製したベクターを安定に発現する 3T3-L1 細胞株を作成するため、plat-E を用いたレトロウイルスによる遺伝子導入法を行った。plat-E を 1.0×10^5 cells/cm² の細胞密度になるように播種し一晩培養後、FuGENE® 6 Transfection Reagent (Promega, Tokyo, Japan) を用いてそれぞれのベクターを plat-E 細胞に導入した。16 時間培養後、新しい培地に交換し、さらに 2 日間培

養した後、培地を回収した。回収した培地を Millex-GV Filter (MILLIPORE, Billerica, MA, SLGVJ13SL) にて濾過後、4×PEG (32 % PEG (polyethylglycol 6000; Fluka, Tokyo, Japan, 81253), 0.4 M NaCl, 40 mM HEPES, pH 7.4) を回収した培地の 1/3 量入れ 3000 rpm で 30 分間遠心し、上清を除去した後さらに 3000 rpm で 5 分間遠心した。上清をできるだけ除去した後、沈殿物に OPTI-MEM (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo, Japan) を加えて懸濁し、3T3-L1 の調整培地に加えて感染させた。なお、培地をフィルター濾過する工程からはすべて氷上にて行った。感染の 24 時間後から 2 µg/mL の puromycin 入りの培地で 5 ~ 7 日間 selection を行い作製したベクターを安定に発現する 3T3-L1 細胞株を作製した。selection 後は 0.4 µg/mL の puromycin を含む調製培地で培養、維持した。

4-2-8. 薬剤処理

プロテアソーム阻害剤である MG132 (Wako) は、最終濃度が 10 µM となるように調製培地に添加し、0, 6, 12, 24, 48 時間培養後に回収し解析した。

4-2-9. 血糖値測定

血糖値はマウスをイソフルランで眠らした後、尾静脈より血液を採取し、Accu-Chek Aviva Blood Glucose Meter (Roche, Basler, Switzerland) を用いて測定した。

4-2-10. Real-time RT-PCR

mRNA を抽出し、分光光度計 NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて濃度を測定した。1 µg の RNA を PrimeScript® RT reagent Kit (TaKaRa, RR037A) により逆転写させ cDNA を得た。目的遺伝子は、SYBR® Premix Ex Taq™ (TaKaRa, RR041A) を用いて、Real-time PCR システム ABI PRISM®7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA) により解析した。なお、それぞれの反応は各メーカーが提供するプロトコールに従い行い、使用したプライマーを Table 4-2 に記載した。

4-2-11. Western blotting

組織または細胞を、適量の SDS sample buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2 % SDS, 3 M urea, 6 % glycerol) を加えホモジェナイズ後、さらにソニケーションした。得られたライセートを遠心 (12000 x g, 4 °C, 30 min) し、上清を回収し、95 °C で 5 分間インキュベートした。得られた上清に含まれるタンパク質量を BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, 23225) を用いて測定し、SDS sample buffer により 1 mg/mL の濃度に調製した。サンプルの 1/10 量の 0.25 % BPB / 5 % 2-mercaptoethanol = 1 : 1 混液を加え、95 °C で 5 分間還元処理をした。以上の処理で得られたサン

プルを SDS-PAGE 法により泳動後、coomassie brilliant blue (CBB) 染色を行った。脱色後のゲルの泳動像を LAS-3000 ルミノ・イメージアナライザー (Fujifilm, Tokyo, Japan) にて撮影し、解析ソフトウェア Multi Gauge 3.1 (Fujifilm) を用いてラダー状になった全タンパク質の染色強度からタンパク量を定量し、サンプル間のタンパク質量を統一した。調製し直したサンプルを SDS-PAGE 法にて泳動し、ニトロセルロースメンブレン (PALL, Port Washington, NY, 66485) に転写した。転写後、メンブレンは blocking 溶液中 (2.5 % skim milk (WAKO, 190-12865) / 0.25 % BSA in TTBS (25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 140 mM NaCl, 2.5 mM KCl (Wako, 163-03545), 0.1 % Tween 20) = 1 : 1) にて室温で 1 時間震盪させた。その後、一次抗体を反応液 (Canget solution I (Toyobo, Osaka, Japan, NKB-201) / blocking 溶液 = 2 : 1) 中に加え、4 °C にてメンブレンと一晚または二晩反応させた。一次抗体反応後、メンブレンを TTBS にて洗浄し (5 分×2 回および 10 分×2 回)、二次抗体を反応液 (Canget solution II (Toyobo, NKB-101) / blocking 溶液 = 2 : 1) 中に加え、1 時間室温にてメンブレンと反応させた。二次抗体反応後、メンブレンを TTBS にて洗浄し (5 分×2 回および 10 分×2 回)、ImmunoStar® LD (WAKO, 290-69904) を用いた化学発光を行い、LAS-3000 ルミノ・イメージアナライザーにて撮影し、Multi Gauge 3.1 を用いて定量した。以下、Table 4-3 に一次抗体、Table 4-4 に二次抗体の情報を記載した。

4-2-12. 統計検定

データは平均±標準誤差で示した。データの統計検定は、2 群間では Student's t-test、多群間では二元配置分散分析を行なった後に Tukey's t-test を行なった。また、実験ごとに用いた検定方法は、材料と方法の各項目または Figure legends に記載した。

4-3. 結果

4-3-1. CR による前駆型および成熟型 SIRT3 タンパク質発現への影響

CR マウスの白色脂肪組織 (WAT) における SIRT3 タンパク質発現を調べたところ、約 37 kDa および 28 kDa のバンドが得られた。興味深いことに、28 kDa のバンドは第一章の結果と同様に CR により発現が上昇しているが、37 kDa のバンドは CR により発現が低下した。(Figure 4-3A)。これら約 37 kDa と 28 kDa のバンドは、SIRT3 欠損マウスの WAT では検出されなかった。それゆえ、これらは SIRT3 特異的なバンドと考えられた (Figure 4-3B)。CR は WAT における *Sirt3* mRNA 発現を増加すると報告されている (Shi et al., 2005)。しかしながら、我々のマウスでは CR によって *Sirt3* mRNA 発現は増加しなかった (Figure 4-3C)。SIRT3 は細胞質にて翻訳された後、ミトコンドリアに移行してプロセッシングされ、成熟および活性化することが報告されている (Schwer et al., 2002)。そこで、CR は SIRT3 タンパク質のプロセッシングを誘導し、活性化するのではないかと考えた。

4-3-2. CR による MIPEP 発現への影響

SIRT3 は mitochondrial signal peptidases (MtSPases) の一つである mitochondrial matrix processing peptidase (MPP) によりプロセッシングされることが報告されている (Schwer et al., 2002)。そこで CR マウスの WAT において、ミトコンドリア移行シグナル配列を認識するサブユニットである MPP α をコードする *Pmpca* および触媒サブユニットである MPP β をコードする *Pmpcb* の mRNA 発現を調べた。しかしながら、いずれの mRNA 発現も CR による変化は無かった (Figure 4-4A, B)。CR によって増加する MtSPases を同定するため、我々は CR ラット WAT 由来の DNA マイクロアレイを再解析した (Gene Expression Omnibus, accession code: GSE30668) (Chujo et al., 2013)。結果、CR によって発現上昇する MtSPase として mitochondrial intermediate peptidase (Mipep) を同定した。CR マウスの WAT で mRNA 発現を確認したところ、ラットと同様 CR により発現が増加していた (Figure 4-4C)。Cytochrome c oxidase subunit 4 (COXIV) と malate dehydrogenase 2 (MDH2) は、いずれも MIPEP によってプロセッシングを受けることが報告されている (Vögtle et al., 2011)。そこで、CR マウスの WAT でタンパク質発現を解析したところ、MIPEP の増加にともなって COXIV および MDH2 の発現は増加した (Figure 4-4D)。

4-3-3. 脂肪細胞における MIPEP の SIRT3 への影響

MIPEP は、MPP によってプロセッシングされたタンパク質を切断する、すなわち二段階目のプロセッシングに関わる MtSPase であることが知られている (Isaya et al., 1991)。SIRT3 タンパク質が MIPEP によって切断される場合、前駆体・中間体・成熟体の 3 つのバンドが確認できるはずである。しかし、マウスの WAT では前駆体 (37 kDa) と成熟体 (28 kDa) と推定されるバンドしか観察することができなかった (Figure 4-2A, B)。MPP にプロセッシングされた後、二度目のプロセッシングを受けていな

いミトコンドリアタンパク質は速やかにプロセッシングされる可能性がある (Emmermann et al., 1993; Vögtle et al., 2011)。したがって、中間体 SIRT3 を検出するため、FLAG-SIRT3 を発現する 3T3-L1 前駆脂肪細胞にプロテアソーム阻害剤の MG132 を処理した。この処理により、SIRT3 の前駆体・中間体・成熟体と予測される 3 つのバンドを観察することができた (Figure 4-5A)。さらに FLAG 抗体を用いても同様のバンドを検出できた (Figure 4-5A)。これらの結果は SIRT3 が二段階切断を受けていることを支持する。

MIPEP が SIRT3 の活性化に寄与するかを評価するため、3T3-L1 細胞を用いて Mipep のノックダウンしたところ、SIRT3・COXIV・MDH2 いずれにおいても mRNA 発現に影響せずタンパク質発現が減少した (Figure 4-5B, C)。さらに SIRT3 の脱アセチル化活性を調べたところ、Mipep のノックダウンにより SIRT3 の基質である manganese superoxide dismutase (MnSOD) のアセチル化レベルが増加した (Figure 4-5D)。

4-3-4. Mipep KO マウスの作製

さらに各臓器における Mipep の役割を調べるために、Mipep KO マウスを作製した。Mipep の活性中心 Zn の結合部位は HEXXH 配列のある exon13 にコードされている (Chew et al., 1997)。それゆえ、Cre-loxP システムの標的部位を exon13 とした (Figure 4-6A)。そして、loxP が標的部位に挿入されていることを、Southern blotting および PCR により確認した (Figure 4-6B, C)。Mipep^{+/-}マウス作製後、Mipep^{+/-}マウス同士で交配させたが、仔 25 匹中 Mipep^{-/-}マウスは 0 匹であったことから (Mipep^{+/+}: 13 匹、Mipep^{+/-}: 12 匹、Mipep^{-/-}: 0 匹)、全身での Mipep KO マウスは胎生致死である可能性が高い。一方、Mipep^{+/-}マウスは正常に発育した。12 週齢の Mipep^{+/+}マウスと Mipep^{+/-}マウスで比較をしたところ、体重および血糖値に差がなかった (Figure 4-6D)。

4-4. 考察

本章では、CR における SIRT3 を介したミトコンドリア活性化機構について解析した。CR により *Sirt3* mRNA 発現の変化はなく、約 37 kDa の前駆型が減少し約 28 kDa 成熟型が増加することから、成熟型 SIRT3 タンパク質の増加はプロセッシング活性化であることが示唆された。SIRT3 は MtSPases の一つである mitochondrial matrix processing peptidase (MPP) によりプロセッシングされることが報告されているが (Schwer et al., 2002)、MPP の発現には CR による変動は無かった。しかしながら、MIPEPが増加することから、このプロセッシングの律速段階になっているのが MIPEPであり、CR によって MIPEP が増加することにより成熟型 SIRT3 が増加すると考えられた。プロテアソーム阻害剤によって SIRT3 の前駆体・中間体・成熟体と考えられる 3 本のバンドが確認できることから、実際に二段階切断されていることが示唆される。ミトコンドリアマトリックス内において MPP 後の切断を担っているプロテアーゼは現在のところ MIPEP と ICP55 の 2 つと考えられているが、Mipep は N 末端からオクタペプチドを切断するのに対し、ICP55 はアミノ酸 1 つを切断するのみである (Becker et al., 2012)。Western blotting によるバンドのシフトの程度から考えても、中間体 SIRT3 は MIPEP によって切断されるとして矛盾しない。

また、MIPEP は、電子伝達系を構成する Complex I (NUHM) 及び Complex IV (COXK, COXM, COXO, COXIV)、酸化的リン酸化を行う Complex V (ATPA, ATPL, ATPM, ATPN, TPO, ATPR)、さらに MDH2 のプロセッシングに関わると報告されている (Branda and Isaya, 1995; Vögtle et al., 2011)。今回の結果においても、COXIV および MDH2 タンパク質発現が CR で MIPEP タンパク質と同様に増加し、さらに Mipep ノックダウンで減少した。また、N 末端則というミトコンドリアタンパク質の半減期制御を介してミトコンドリアの質は維持されているため、MIPEP はミトコンドリア活性制御に重要な因子として報告されている (Vögtle et al., 2011)。これらの報告から、CR 効果において MIPEP が重要な役割をしていると考えられる。

以上より、CR での Mipep によるプロセッシングの活性化でミトコンドリア内にあるタンパク質が成熟化し、さらに SIRT3 による脱アセチル化によって活性化することが CR における WAT でのミトコンドリアに対する有益な効果につながっていることが示唆された。

さらに *in vivo* において Mipep の機能を解析するために、Mipep 全身欠損マウスを作製したが、交配の結果、胎生致死の可能性が高いことが明らかとなった。しかし、Mipep ヘテロマウスでは正常に出生・発育し、12 週齢の体重および血糖値には差がなかった。現在、国際ノックアウトマウスコンソーシアム (IMPC) においても、Mipep KO 用の targeting vector は作製され、ES 細胞までは作製されているが、マウスの作製までは至っていない。そのため、Mipep KO マウスの表現型に関する報告は無い。一方で、Mipep と同様の MtSPase の一つである MPPβ (遺伝子名; *Pmpcb*) は IMPC において解析が進められているが、*Pmpcb* 全身欠損は胎生致死であり、ヘテロマウスは 15 週齢時点で体重に差がない一方で、行動異常が示されている (2017 年 11 月現在、

<https://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:1920328#section-associations>)。今後、Mipep ヘテロマウスにおいて、基礎データを蓄積し、さらなる解析を進めていく予定である。また、Adiponectin-Cre を用いた脂肪特異的 Mipep 欠損マウスを作製し、WAT における Mipep の役割を解析していく予定である。

ヒトにおいて、MPP α (遺伝子名; *Pmpca*) の変異は重度のミトコンドリア病や非進行性の小脳性運動失調症を引き起こし (Jobling et al., 2015; Joshi et al., 2016)、ミトコンドリア内膜タンパク質のプロセシングに重要な m-AAA プロテアーゼの変異は遺伝性痙性対麻痺発症に関連する (Nolden et al., 2005)。また Mipep の変異は乳幼児における左心室の非圧縮、筋緊張低下症および死亡を引き起こすことが報告されている (Eldomery et al., 2016)。これらのように MtSPases の変異が神経疾患や心疾患発症に関わるのが近年報告され始めている。しかしながら、未だに MtSPases の変異によるヒト疾患への影響に関する研究は少ない。今後さらに、様々な組織特異的な Mipep 欠損マウスを用いて各臓器における Mipep の役割を解明していくことによって、様々な疾患との関連が明らかになると考えられる。今回作成した Mipep^{fllox/fllox} mice はこれら疾患を解析する上でも貴重な動物モデルとなることが期待される。

Figure 4-1

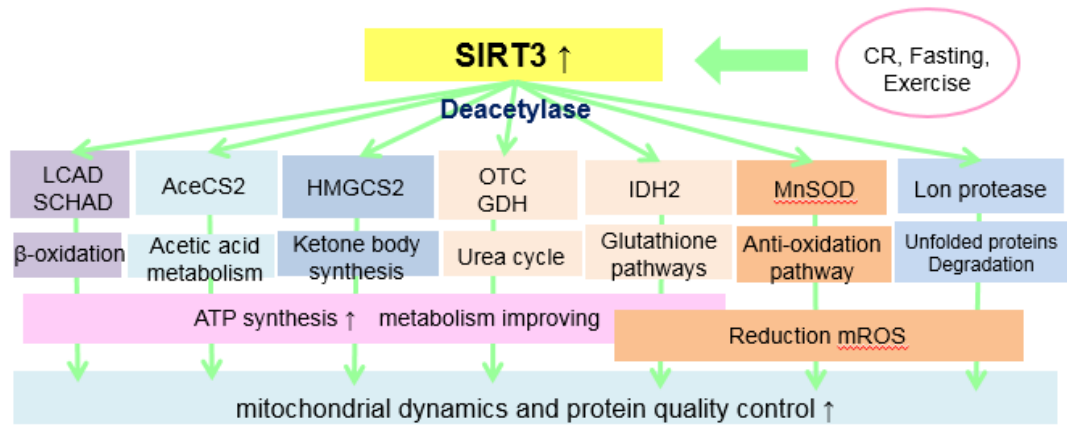


Figure 4-1 Schematic overview of molecular targets of SIRT3 and the effects of metabolism in mitochondria.

Figure 4-2

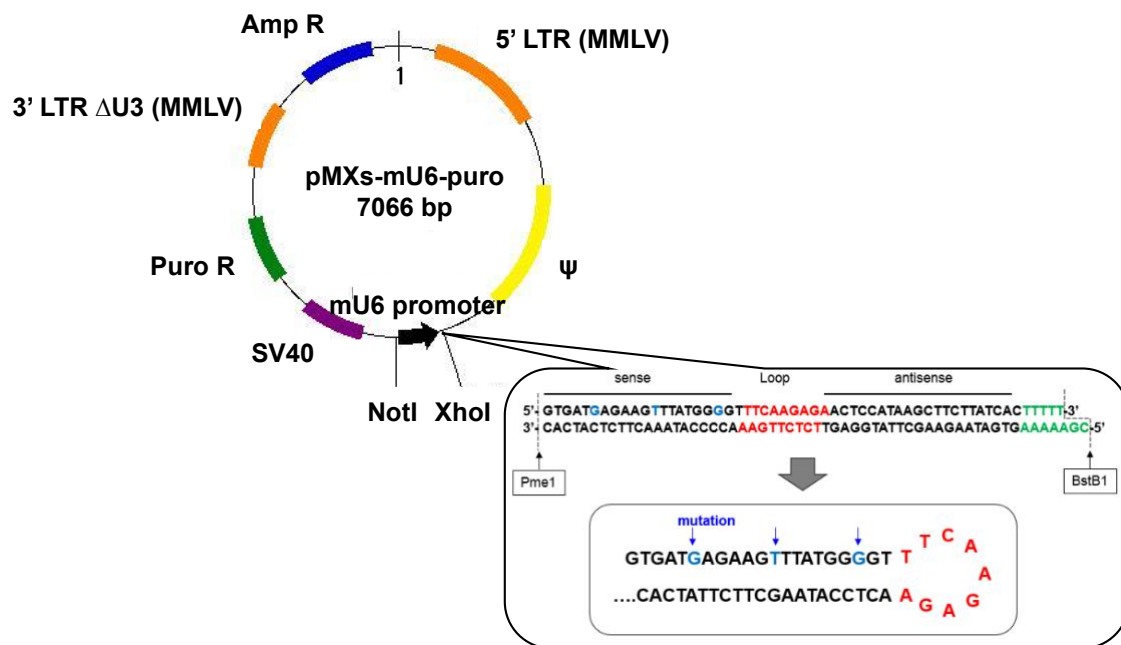


Figure 4-2 pMXs-mU6-shMipep-puro vector

Figure 4-3

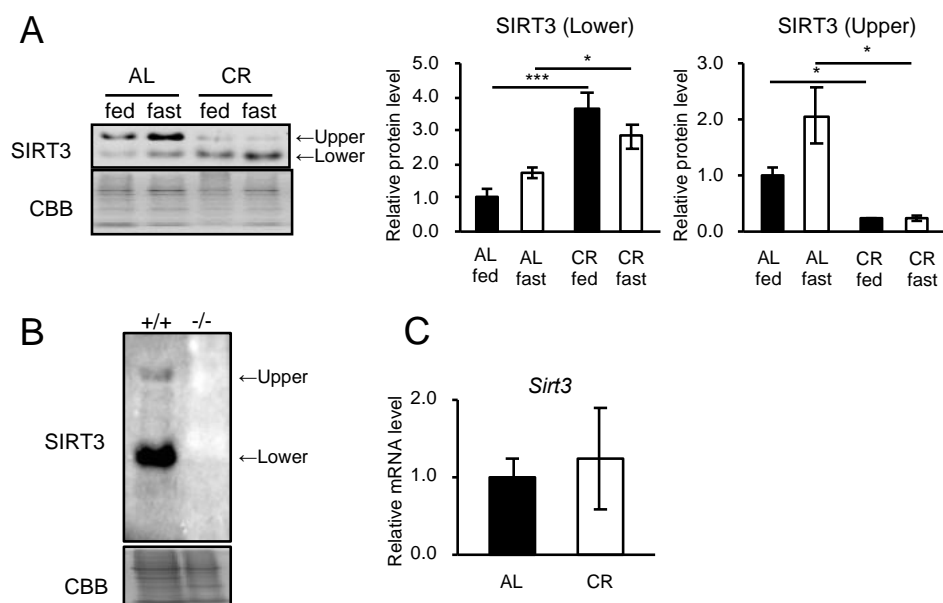


Figure 4-3 CR upregulated the mature form of SIRT3 in mice WAT.

(A) Protein levels of Sirtuin 3 (SIRT3) from the fed and fasted group of both *ad libitum* (AL) and caloric restriction (CR) mice were obtained by immunoblotting. The right panel is the representative image. The left graphs are quantitative data. (B) SIRT3 protein levels of Sirt3 wild type (+/+) and deficient (-/-) mice were obtained by immunoblotting with high-density gels. (C) mRNA levels of Sirt3 in AL and CR mice WAT were obtained by real-time RT-PCR. Coomassie brilliant blue (CBB) staining was used as a loading control in immunoblotting. Tbp was used as an internal control in real-time RT-PCR. Values shown in all panels are means \pm S.E.M. (n=3-4 per group). *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$, analyzed by Student's t-test or the Tukey's t-test.

Figure 4-4

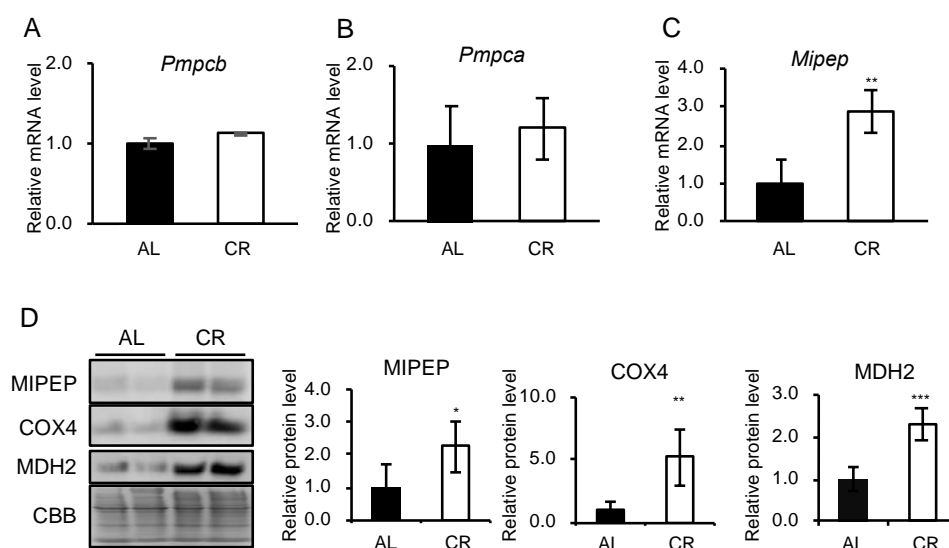
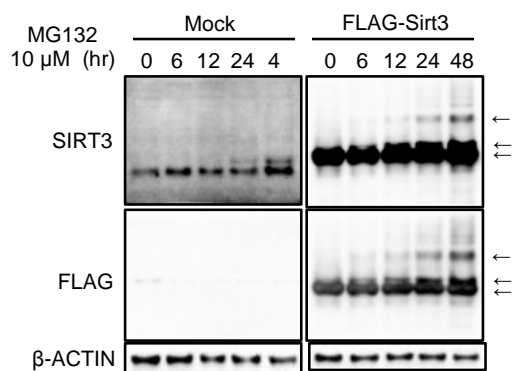


Figure 4-4 CR upregulated MIPEP, one of MtSPases in mice WAT.

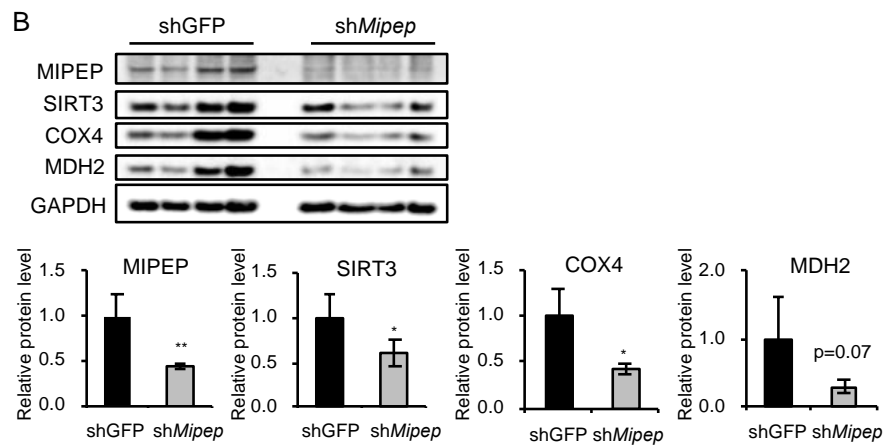
(A-C) mRNA levels of the mitochondrial signal peptidases (MtSPases), mitochondrial matrix processing peptidase beta (*Pmpcb*) (A), mitochondrial matrix processing peptidase alpha (*Pmpca*) (B), and mitochondrial intermediate peptidase (*Mipep*) (C) in *ad libitum* (AL) and caloric restriction (CR) mice were obtained by real-time RT-PCR. (D) Protein levels of MIPEP, cytochrome c oxidase subunit 4 (COXIV), and malate dehydrogenase 2 (MDH2) in white adipose tissue (WAT) from AL and CR mice were obtained by immunoblotting. Coomassie brilliant blue (CBB) staining was used as a loading control in immunoblotting. TATA box binding protein (*Tbp*) was used as an internal control in real-time RT-PCR. Values shown in all panels are means \pm S.E.M. (n=3-4 per group). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, analyzed by Student's t-test.

Figure 4-5

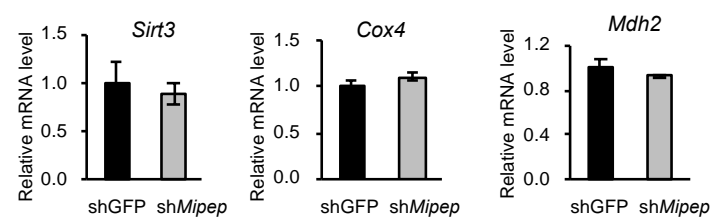
A



B



C



D

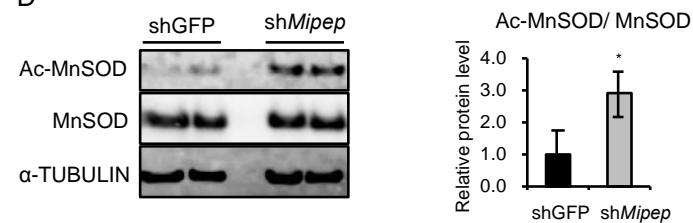


Figure 4-5 Maturation of SIRT3 was dependent on MIPEP.

(A) Protein levels of Sirtuin 3 (SIRT3) in mock or FLAG-Sirt3 expressing 3T3-L1 cells were obtained by immunoblotting with high-density gel (15%). Cells were treated with or without 10 μ M MG132 for 6, 12, 24, and 48 hours. Three arrows show each form of SIRT3. β -ACTIN was used as a loading control. (B) Protein levels of mitochondrial intermediate peptidase (MIPEP), SIRT3, cytochrome c oxidase subunit 4 (COXIV), and malate dehydrogenase 2 (MDH2) in sh*Mipep* 3T3-L1 cells were obtained by immunoblotting. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was as a loading control. The lower panel is the quantitative data. (C) mRNA levels of *Sirt3*, *CoxIV* and *Mdh2* in sh*Mipep* 3T3-L1 cells were obtained by real-time RT-PCR. Ribosomal protein S18 (*Rps18*) was used as an internal control. (D) Expression levels of acetylated-manganese superoxide dismutase (Ac-MnSOD) (K122 acetylated MnSOD) and total manganese superoxide dismutase (MnSOD) proteins in sh*Mipep* 3T3-L1 cells were obtained by immunoblotting. A-TUBULIN was used as a loading control. Values shown in all panels are means \pm S.E.M. (n=4-6 per group). *: p<0.05, **: p<0.01, analyzed by Student's t-test or the Tukey's t-test.

Figure 4-6

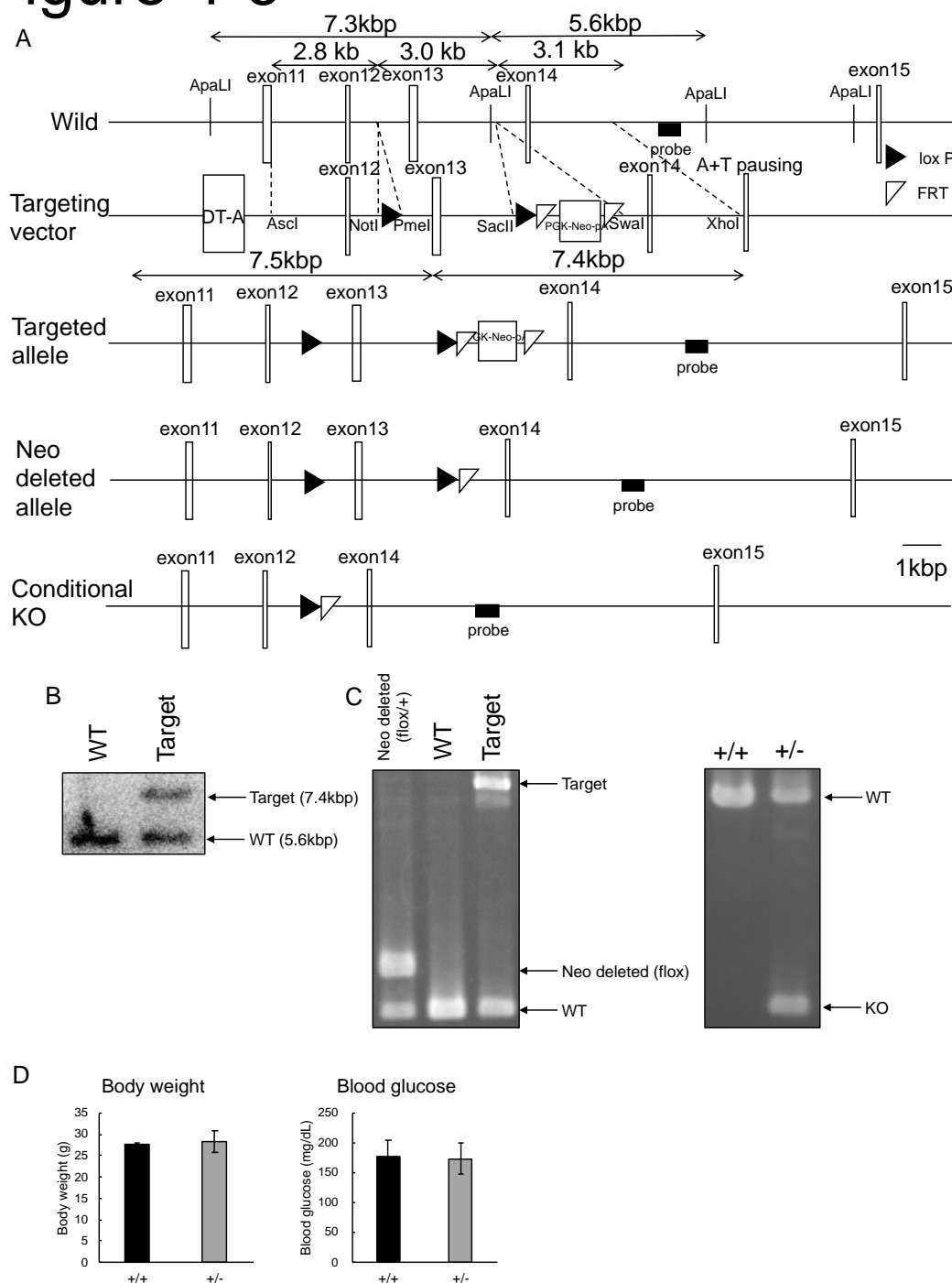


Figure 4-6 Generation of Mipep^{+/-} mice.

(A) Structure of the mouse Mipep locus (WT allele), the Mipep targeting construct (Targeting vector), and the predicted mutated Mipep gene (Target, Neo deleted, and KO allele). Exons are represented by white boxes. XhoI was used for linearization. (B) The Mipep-target allele was confirmed in the ApaLI-digested genome by Southern blot hybridization analysis using the probe. (C) The Mipep-flox allele and Mipep-deficient allele were confirmed by PCR. (D) Mipep^{+/+} and Mipep^{-/-} mice (12weeks old) were measured body weight (n=3) and blood glucose level (n=5).

Figure 4-7

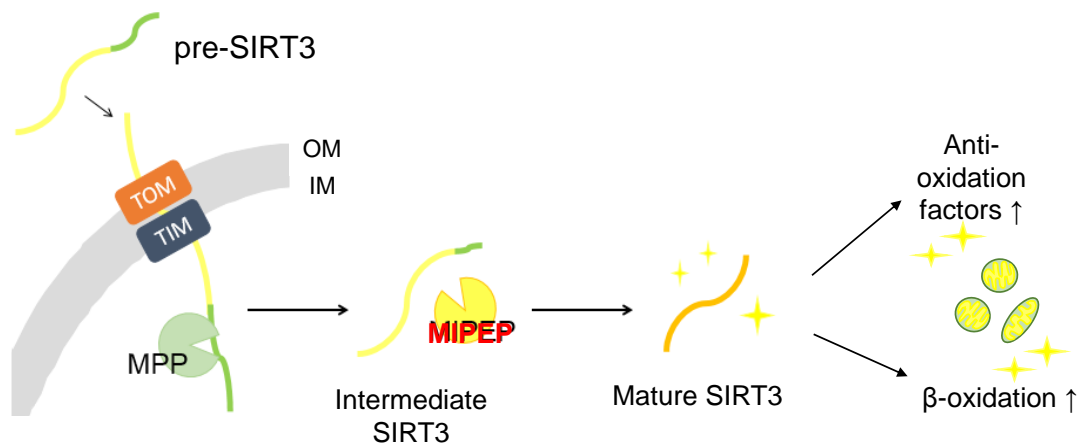


Figure 4-7 Schematic overview of SIRT3 activation via MIPEP

Table 4-1: List of primers for Mipep targeting vector cloning, southern blotting probe and genotyping primer

	Forward	Reverse
short arm (5' arm)	5'-GTC GAG GCG CGC CGT AAG CCT CTC CCT GCT G-3'	5'-GAC GTG CGG CCG CGT AGC AGA ACA GCA TCC AC-3'
medium arm (targeting arm)	5'-AGC TCG TTT AAA CCA GTT AGC TCA CAG CAT G-3'	5'-CGG ATC CGC GGG TAC AGC CAG GAA CCA TG-3'
long arm (3' arm)	5'-GGC CGA TTT AAA TCT TCT TCT GAA GTC CTC AGT TC-3'	5'-CGA TCC TCG AGA GTT ACC ACT AAC ATA CAG GTA AGG-3'
Southern blotting probe	5'-ATG ATC TCC AGT CTC CAA ACA C-3'	5'-TCA GCA GTC CCT TAT CCC TTG-3'
Mipep flox genotyping	5'-GGC TGC TTC CTT CTA CAA A-3'	5'-CCT CCT GGT GAT GCT CTT TTG-3'
Mipep KO genotyping	5'-TTT GCC TGG TTC ATC TGT GG-3'	5'-CCT CCT GGT GAT GCT CTT TTG-3'

Table 4-2. List of primers for real-time RT-PCR.

	Forward	Reverse
<i>Mipep</i>	5'-CAA AGG AGA GGT GTG GTG TAA TG-3'	5'-GGA AGA TTC AGC ATG AGA ACG AC-3'
<i>Cox4</i>	5'-CAT TTC TAC TTC GGT GTG CCT TC-3'	5'-CAC ATC AGG CAA GGG GTA GTC-3'
<i>Mdh2</i>	5'-AGG TTG ACT TTC CCC AAG ACC-3'	5'-CAT AAG CCA TGG ACA GAG TGG-3'
<i>Sirt3</i>	5'-CGT TGT GAA ACC CGA CAT TG-3'	5'-TCC CCT AGC TGG ACC ACA TC-3'
<i>Pmpca</i>	5'-AGT TTG GAC AAT TCT GTA CCG TAG G-3'	5'-TCG TCT TTG CTG TCA AAT CGA G-3'
<i>Pmpcb</i>	5'-AAA ACT CTG GGC TCT CAA CGT G-3'	5'-ACA GTC TGC TCT CTG GAG GTA TAG G-3'
<i>Tbp</i>	5'-CAG TAC AGC AAT CAA CAT CTC AGC-3'	5'-CAA GTT TAC AGC CAA GAT TCA CG-3'

Table 4-3. List of primary antibody for Western blotting.

Name	Immunized	Clonal	Supplier	Catalog Number
α -Tubulin	mouse	DM1A	Sigma	T6199
β -actin	mouse	AC-15	Sigma	A1987
COX IV	rabbit	polyclonal	Cell Signaling	#4844
GAPDH	mouse	polyclonal	Santa Cruz	sc-32233
MDH2	rabbit	polyclonal	Cell Signaling	#8610
MIPEP	rabbit	polyclonal	Santa Cruz	sc-84203
SIRT3	rabbit	D22A3	Cell Signaling	#5490
TOM20	mouse	4F3	Sigma	WH0009804M1

Table 4-4: List of 2nd antibody for Western blotting.

Name	Supplier	Catalog Number
HRP-conjugated F(ab') ₂ fragment of goat anti-mouse IgG	Jackson Immunological Research (West Grove, PA)	115-036-062
HRP-conjugated F(ab') ₂ fragment of goat anti-rabbit IgG	Jackson Immunological Research	111-036-045

総括

本研究では、老化を抑制し、寿命を延伸する CR のメカニズムについて、各章で以下の点を明らかにした。

第一章

- 1) CR は GH/IGF1 シグナル非依存的に Srebp-1c を介して寿命を延伸する。
- 2) Srebp-1c 依存的な CR の効果は WAT 特異的である。
- 3) CR により Srebp-1c を介して脂肪酸合成が活性化する。
- 4) CR により Srebp-1c は直接 Pgc-1 α を転写促進し、ミトコンドリア生合成を活性化する。

第二章

- 5) CR により WAT 重量は、特に vWAT において減少する。
- 6) CR の効果において、sWAT はインスリンシグナルによる影響が強く、vWAT はインスリンシグナル以外による影響が強い。
- 7) CR により、M1 マクロファージは3つの WAT 全てで減少するが、M2 マクロファージは rWAT と sWAT でのみ減少する。
- 8) CR による脂肪酸合成およびミトコンドリア生合成関連因子の発現増強は、3 つの WAT 共通な応答である。

第三章

- 9) CR 期間 2 ヶ月を境に前半はエネルギー不足に対する適応応答（短期 CR）、後半は CR による有益な代謝リモデリング（長期 CR）であると考えられる。
- 10) eWAT における CR 効果の経時的変動は、初期はインスリンシグナルの活性化、後期はレプチンシグナルの抑制に依存する可能性がある。

第四章

- 11) WAT における CR による SIRT3 を含む一部のミトコンドリアタンパク質の成熟・活性化は Mipep 依存的である。
- 12) Mipep ノックダウンは、ミトコンドリア関連因子の mRNA 発現は変化させず、一部のミトコンドリアタンパク質発現を減少する。
- 13) 作製した全身 Mipep KO マウスは胎生致死であることから、胎児発生においても Mipep は必須因子である。

遺伝子変異マウスや遺伝子改変マウスの研究成果から、GH/IGF1 シグナルの抑制は寿命延伸のための主要な因子であることが明らかとなっている。また CR でも GH/IGF1 シグナルは抑制され

るため、CR による寿命延伸には GH/IGF1 の抑制が重要であることは間違いない。肝臓におけるアディポネクチン過剰発現マウスが長寿である。また、CR によるアディポネクチン発現の増加は GH/IGF1 低下依存的だと報告されている (Nilsson et al., 2005; Yamaza et al., 2007)。CR によるアディポネクチン発現の亢進は、CR のメカニズムのうち GH/IGF-1 依存的なメカニズムの 1 つであると考えられる。一方で、我々は GH/IGF1 非依存性メカニズムとして、Srebp-1c の活性化、特に脂肪組織での活性化が重要であることを明らかにした。Srebp-1c 依存的な CR の効果の一つである脂質代謝の活性化に、特にレプチンシグナルの抑制が重要である可能性を示した。さらに、長寿をしめす FIRKO マウスや CEBP β / β マウスの結果から、長寿のためには脂肪組織におけるミトコンドリア生合成の活性化重要であると考えられるが、我々は CR が Srebp-1c 活性化を介して Pgc-1 α 発現を亢進し、ミトコンドリア生合成を亢進することを明らかにした。加えて Pgc-1 α だけでなく同時に Mipep の活性化も重要であることを示唆した (Figure 5-1)。Mipep は CR により Srebp-1c 依存的また Pgc-1 α 非依存的に発現が亢進している可能性がある (data not shown)。それゆえ、CR による脂肪組織のミトコンドリア活性化には、Srebp-1c 制御下に Pgc-1 α および Mipep 発現が亢進する事が重要ではないかと考えている。

第二章および第三章の結果より、9 ヶ月齢における CR による Srebp-1c の転写制御は内臓脂肪と皮下脂肪で異なることが示唆される。どちらの章でも内臓脂肪において、CR によりインスリンシグナルの変動が無く、レプチンが減少していることから、Srebp-1c の転写制御はレプチンシグナルによるものであると考えられる。一方、第二章の皮下脂肪において、CR によりインスリンシグナルは活性化するが、レプチンシグナルは減少しないことから、Srebp-1c の転写制御はインスリンシグナルによるものであると考えられる。いずれにしても Srebp-1c の転写が増加することで下流因子が増加・活性化していることから、Srebp-1c 以下の分子機構には大きな差が無いと考えられるが、今後の解析においてこの点にも留意する必要がある。我々は CR のメカニズムのうち GH/IGF1 非依存性メカニズムとして Srebp-1c の活性化を明らかにしたが、皮下脂肪と内臓脂肪での Srebp-1c 活性化メカニズムの違いがどのように影響するのかは興味深いところである。

現在、CR 様効果を模倣する化合物の探索が行われており、CR と似た効果を誘導するいくつかの化合物が報告されている。例えば、ブドウなどに含まれるポリフェノールの一種で SIRT1 活性化剤であるレスベラトロール (Baur et. al., 2006)、糖尿病治療薬で AMPK 活性化剤であるメトホルミン (Martin-Montalvo et.al. 2013)、mTORC を抑制しオートファジーを活性化する免疫抑制剤であるラパマイシン (Harrison et. al., 2009)、アディポネクチン様作用を示す Adiponectin receptor agonist であるアディポロン (Okada-Iwabu et. al., 2013) などが挙げられる。また、Fortney らは CR の遺伝子発現プロファイルと 1,309 種類の薬剤に対するヒト細胞の遺伝子発現プロファイルを比較したところ、14 種類の薬剤が CR と類似した遺伝子発現プロファイルを誘導したと報告しており

(Fortney et. al., 2012)、この 14 種類の薬剤はレスベラトロールやラパマイシンとの関連性が示唆されている。このように、様々な手法で CR 様効果を模倣する化合物は探索されているが、CR の一部の効果を模倣した化合物しか見出されていない。我々は、本研究において CR 模倣薬開発のために、Srebp-1c 制御下に Pgc-1 α および Mipep を活性化することが重要である可能性を見出した。今後は Pgc-1 α や Mipep 欠損マウスを使用して、さらなる解析を進め、さらにこれらの研究を発展させることにより、老化関連疾患や代謝異常の治療や予防に繋げ、少子高齢化が急激に進む我が国をはじめとする先進諸国における「健康寿命の延伸」という社会的要請に貢献していきたい。

Figure 5-1

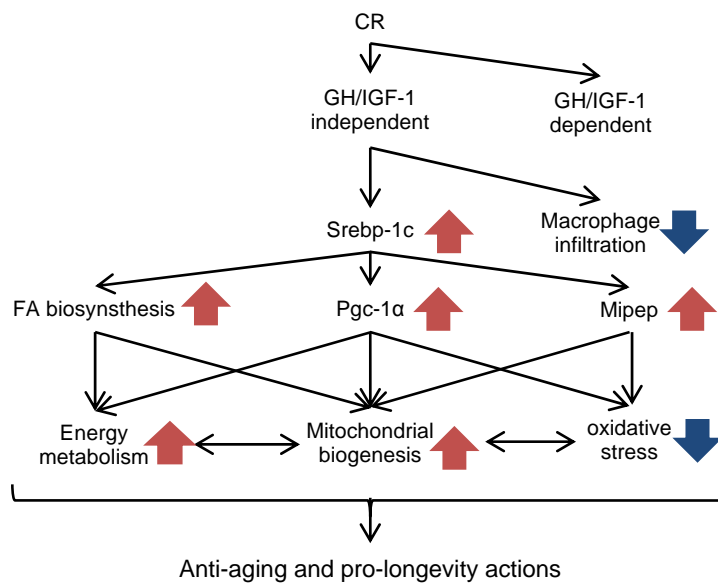


Figure 5-1 Diagram demonstrating the proposed novel molecular mechanism of CR-associated beneficial metabolic remodeling in WAT and pro-longevity effects.

参考文献

厚生労働省告示第四百三十号、平成 24 年 7 月

(http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/dl/kenkounippon21_01.pdf)

厚生労働省、健康日本 21 (第 2 次) の推進に関する参考資料、平成 24 年 7 月

(http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/dl/kenkounippon21_02.pdf)

内閣府編、平成 29 年度版高齢社会白書、日経印刷、2017

厚生労働省、平成 26 年度 国民医療費の概況

(<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-iryohi/14/dl/data.pdf>)

Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, Jose PA, Taylor SI, and Westphal H (1996) Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat. Genet.*, 12, 106-109.

Ahima RS, and Flier JS (2000) Leptin. *Annu Rev Physiol.*, 62, 413-437.

Anderson RM, Barger JL, Edwards MG, Braun KH, O'Connor CE, Prolla TA, and Weindrach R (2008) Dynamic regulation of PGC-1 α localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response. *Aging Cell.*, 7, 101-111

Balaban RS, Nemoto S, and Finkel T (2005) Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell*, 120, 483-495.

Bartke A, Wright JC, Mattison JA, Ingram DK, Miller RA, and Roth GS (2001) Longevity: Extending the lifespan of long-lived mice. *Nature*, 414, 412.

Barzilai N, Banerjee S, Hawkins M, Chang CJ, Chen W, and Rossetti L (1998) The effect of age-dependent increase in fat mass on peripheral insulin action is saturable, *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, 53, B141-B146.

Barzilai N, She L, Liu BQ, Vuguin P, Cohen P, Wang J, and Rossetti L (1999) Surgical removal of visceral fat reverses hepatic insulin resistance. *Diabetes*, 48, 94-98.

Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KS, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Couteur DL, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, Cabo R, and Sinclair DA (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444, 337-342

Becker T, Böttlinger L, and Pfanner N (2012) Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network. *Trends Biochem. Sci.*, 37, 85-91.

Berwick DC, Hers I, Heesom KJ, Moule SK, and Tavaré JM (2002) The identification of ATP-citrate lyase as a protein kinase B (Akt) substrate in primary adipocytes, *J. Biol. Chem.*, 277, 33895-33900.

Blüher M, Kahn BB, and Kahn CR (2003) Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science*, 299, 572-574.

Bonkowski MS, Rocha JS, Masternak MM, Regaiey KA, and Bartke A (2006) Targeted disruption of growth hormone receptor interferes with the beneficial actions of calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 7901-7905.

Boveris A, and Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.*, 134, 707-716

Branda SS, and Isaya G (1995) Prediction and identification of new natural substrates of the yeast mitochondrial intermediate peptidase. *J. Biol. Chem.*, 270, 27366-27373.

Braunstein M, Rose AB, Holmes SG, Allis CD, and Broach JR (1993) Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes. Dev.*, 7, 592-604

Brown-Borg HM, Borg KE, Meliska CJ, and Bartke A (1996) Dwarf mice and the ageing process. *Nature*, 384, 33.

Bruss MD, Khambatta CF, Ruby MA, Aggarwal I, and Hellerstein MK (2010) Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 298, E108-E116.

Burnett C, Valentini S, Cabreiro F, Goss M, Somogyvári M, Piper MD, Hoddinott M, Sutphin GL, Leko V, McElwee JJ, Vazquez-Manrique RP, Orfila AM, Ackerman D, Au C, Vinti G, Riesen M, Howard K, Neri C, Bedalov A, Kaeberlein M, Soti C, Partridge L, and Gems D (2011) Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature*, 477, 482-485.

Carey VJ, Walters EE, Colditz GA, Solomon CG, Willet WC, Rosner BA, Speizer FE, and Manson JE (1997) Body Fat Distribution and Risk of Non-Insulin-dependent Diabetes Mellitus in Women the Nurses' Health Study. *Am. J. Epidemiol.*, 145, 614-619.

Carmen GY, and Victor SM (2006) Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cell Signal.*, 18, 401-408.

Chew A, Buck EA, Peretz S, Sirugo G, Rinaldo P, and Isaya G (1997) Cloning, expression, and chromosomal assignment of the human mitochondrial intermediate peptidase gene (MIPEP). *Genomics*, 40, 493-496.

Chibalin AV, Leng Y, Vieira E, Krook A, Björnholm M, Long YC, Kotova O, Zhong Z, Sakane F, Steiler T, Nylén C, Wang J, Laakso M, Topham MK, Gilbert M, Wallberg-Henriksson H, and Zierath JR (2008) Downregulation of diacylglycerol kinase delta contributes to hyperglycemia-induced insulin resistance. *Cell*, 132, 375-386.

Chiu CH, Lin WD, Huang SY, and Lee YH (2004) Effect of a C/EBP gene replacement on mitochondrial biogenesis in fat cells. *Genes Dev.*, 18, 1970-1975.

Chujo Y, Fujii N, Okita N, Konishi T, Narita T, Yamada A, Haruyama Y, Tashiro K, Chiba T, Shimokawa I, and Higami Y (2013) Caloric restriction-associated remodeling of rat white adipose tissue: effects on the growth hormone/insulin-like growth factor-1 axis, sterol regulatory element binding protein-1, and macrophage infiltration. *Age (Dordr.)*, 35, 1143-1156

Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, Allison DB, Cruzen C, Simmons HA, Kemnitz JW, and Weindruch R (2009) Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science*, 325, 201-204.

Conti B, Sanchez-Alavez M, Sommerer RW, Morale MC, Lucero J, Brownell S, Fabre V, Huitron-Resendiz S, Henriksen S, Zorrilla EP, Lecea L, and Bartfai T (2006) Transgenic Mice with a Reduced Core Body Temperature Have an Increased Life Span. *Science*, 314, 825-828

Coschigano KT (2000) Assessment of Growth Parameters and Life Span of GHR/BP Gene-Disrupted Mice. *Endocrinology*, 141, 2608-2613.

Corpeleijn E, Mensink M, Kooi ME, Roekaerts PMHJ, Saris WHM, and Blaak EE (2008) Impaired skeletal muscle substrate oxidation in glucose-intolerant men improves after weight loss. *Obesity (Silver Spring)*, 16, 1025–1032.

Corpeleijn E, Saris WHM, and Blaak EE (2009) Metabolic flexibility in the development of insulin resistance and type 2 diabetes: effects of lifestyle. *Obes. Rev.*, 10, 178-193.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, and Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378, 785-789.

Cypser JR, and Johnson TE (2002) Multiple stressors in *Caenorhabditis elegans* induce stress hormesis and extended longevity. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 57, B109–B114

DeClercq V, Taylor C, Zahradka P (2008) Adipose tissue: the link between obesity and cardiovascular disease. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets.*, 8, 228-237.

D’Costa AP, Lenham JE, Ingram RL, and Sonntag WE (1993) Moderate caloric restriction increases type 1 IGF receptors and protein synthesis in aging rats. *Mech. Ageing Dev.*, 71, 59–71.

Dharaneeswaran H, Abid MR, Yuan L, Dupuis D, Beeler D, Spokes KC, Janes L, Sciuto T, Kang PM, Jaminet SS, Dvorak A, Grant MA, Regan ER, and Aird WC (2014) FOXO1-mediated activation of

Akt plays a critical role in vascular homeostasis. *Circ. Res.*, 115, 238-251.

Dubuc PU (1976) The development of obesity, hyperinsulinemia, and hyperglycemia in ob/ob mice. *Metabolism.*, 25, 1567-1574.

Ebihara K, Ogawa Y, Masuzaki H, Shintani M, Miyanaga F, Aizawa-Abe M, Hayashi T, Hosoda K, Inoue G, Yoshimasa Y, Gavrilova O, Reitman ML, and Nakao K (2001) Transgenic overexpression of leptin rescues insulin resistance and diabetes in a mouse model of lipotrophic diabetes. *Diabetes*, 50, 1440-1448.

Ebihara K, Kusakabe T, Hirata M, Masuzaki H, Miyanaga F, Kobayashi N, Tanaka T, Chusho H, Miyazawa T, Hayashi T, Hosoda K, Ogawa Y, DePaoli AM, Fukushima M, and Nakao K (2007) Efficacy and safety of leptin-replacement therapy and possible mechanisms of leptin actions in patients with generalized lipodystrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 92, 532-541.

Eldomery MK, Akdemir ZC, Vögtle FN, Charng WL, Mulica P, Rosenfeld JA, Gambin T, Gu S, Burrage LC, Al Shamsi A, Penney S, Jhangiani SN, Zimmerman HH, Muzny DM, Wang X, Tang J, Medikonda R, Ramachandran PV, Wong LJ, Boerwinkle E, Gibbs RA, Eng CM, Lalani SR, Hertecant J, Rodenburg RJ, Abdul-Rahman OA, Yang Y, Xia F, Wang MC, Lupski JR, Meisinger C, Sutton VR (2016) MIPEP recessive variants cause a syndrome of left ventricular non-compaction, hypotonia, and infantile death. *Genome Med.*, 8, 106.

El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjørbæk C, and Flier JS (2000) Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.*, 105, 1827.

Emmermann M, and Schmitz UK (1993) The cytochrome c reductase integrated processing peptidase from potato mitochondria belongs to a new class of metalloendoproteases. *Plant Physiol.*, 103, 615-620.

Engfeldt P, and Arner P (1988) Lipolysis in human adipocytes, effects of cell size, age and of regional differences. *Horm. Metab. Res. Suppl.*, 19, 26.

Fabbiano S, Suárez-Zamorano N, Rigo D, Veyrat-Durebex C, Dokic AS, Colin DJ, and Trajkovski M

(2016) Caloric restriction leads to browning of white adipose tissue through type 2 immune signaling. *Cell Metab.*, 24, 434-446.

Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA (2011) Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int. J. Mol. Sci.*, 12, 3117-3132.

Finkel T, Deng CX, and Mostoslavsky R (2009) Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature*, 460, 587-591.

Fisher FM, McTernan PG, Valsamakis G, Chetty R, Harte AL, Anwar AJ, Starcynski J, Crocker J, Barnett AH, McTernan CL, and Kumar S (2002) Differences in adiponectin protein expression: effect of fat depots and type 2 diabetic status, *Horm. Metab. Res.*, 34, 650-654.

Flurkey K, Papaconstantinou J, and Harrison D (2002) The Snell dwarf mutation *Pit1^{dw}* can increase life span in mice. *Mech. Ageing Dev.*, 123, 121-130.

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, and Shimomura I (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.*, 114, 1752-1761

Fortney K, Morgen EK, Kotlyar M, and Jurisica I (2012) In Silico Drug Screen in Mouse Liver Identifies Candidate Calorie Restriction Mimetics. *Rejuvenation Res.*, 15, 148-152

Frayn KN (2002) Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia*, 45, 1201-1210.

Gabriely I, Ma X, Yang X, and Atzmon G (2002) Removal of Visceral Fat Prevents Insulin Resistance and Glucose Intolerance of Aging An Adipokine-Mediated Process? *Diabetes*, 51, 2951-2958.

Gakh O, Cavadini P, and Isaya G (2002) Mitochondrial processing peptidases. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1592, 63-77.

Gnacińska M, Małgorzewicz S, Stojek M, Łysiak -Szydłowska W, and Sworczak K (2009) Role of

adipokines in complications related to obesity: a review. *Adv. Med. Sci.*, 54, 150-157.

Gray MW, Burger G, and Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science*, 283, 1476-1481.

Gredilla R and Barja G (2005) Minireview: The Role of Oxidative Stress in Relation to Caloric Restriction and Longevity. *Endocrinology*, 146, 3713-3717

Guarente L (2008) Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell*, 132, 171-176.

Halliwell B and Gutteridge JMC (2007) *Free radicals in biology and medicine*, 4th ed. Oxford University Press.

Hallows WC, Yu W, Smith BC, Devries MK, Devires MK, Ellinger JJ, Someya S, Shortreed MR, Prolla T, Markley JL, Smith LM, Zhao S, Guan KL, and Denu JM (2011) Sirt3 promotes the urea cycle and fatty acid oxidation during dietary restriction. *Mol. Cell*, 41, 139-149.

Hansen L, and Freier F (1978) Direct assays of lactate, pyruvate, beta-hydroxybutyrate, and acetoacetate with a centrifugal analyzer. *Clin. Chem.*, 24, 475-479.

Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NC, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS, Pahor M, Javors MA, Fernandez E, and Miller RA (2009) Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, 460, 392-395

Hart RW and Turturro A (1998) Evolution and Dietary Restriction. *Exp. Gerontol.*, 33, 53-60

Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K, Dixon RM, Kushner R, Hunt T, Lubina JA, Patane J, Self B, Hunt P, and McCamish M (1999) Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *Jama*, 282, 1568-1575.

Higami Y, Pugh TD, Page GP, Allison DB, Prolla TA, and Weindruch R (2004) Adipose tissue energy metabolism: altered gene expression profile of mice subjected to long-term caloric restriction. *FASEB J.*, 18, 415-417.

Higami Y, Yamaza H, and Shimokawa I (2005) Laboratory findings of caloric restriction in rodents and primates. *Adv. Clin. Chem.*, 39, 211-237.

Higami Y, Barger J, Page G, Allison D, Smith S, Prolla T, and Weindruch R (2006a) Energy Restriction Lowers the Expression of Genes Linked to Inflammation, the Cytoskeleton, the Extracellular Matrix, and Angiogenesis in Mouse Adipose Tissue. *J. Nutr.*, 136, 342-352.

Higami Y, Tsuchiya T, Chiba T, Yamaza H, Muraoka I, Hirose M, Komatsu T, and Shimokawa I (2006b) Hepatic gene expression profile of lipid metabolism in rats: Impact of caloric restriction and growth hormone/insulin-like growth factor-1 suppression. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 61, 1099-1110.

Hirschey MD, Shimazu T, Goetzman E, Jing E, Schwer B, Lombard DB, Grueter CA, Harris C, Biddinger S, Ilkayeva OR, Stevens RD, Li Y, Saha AK, Ruderman NB, Bain JR, Newgard CB, Farese RV, Alt FW, Kahn CR, and Verdin E (2010) SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature*, 464, 121-125.

Hirschey MD, Shimazu T, Jing E, Grueter CA, Collins AM, Aouizerat B, Stančáková A, Goetzman E, Lam MM, Schwer B, Stevens RD, Muehlbauer MJ, Kakar S, Bass NM, Kuusisto J, Laakso M, Alt FW, Newgard CB, Farese RV Jr, and Kahn CR (2011) SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome. *Mol. Cell*, 44, 177-190.

Holliday R (1989) Food, Reproduction and Longevity: Is the Extended Lifespan of Calorie-Restricted Animals an Evolutionary Adaptation? *BioEssays*, 10, 125-127

Holm C (2003) Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem. Soc. T.*, 31, 1120-1124.

Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Gélouën A, Even PC, Cervera P, and Le Bouc Y (2003) IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature*, 421, 182-187.

Horton JD, Shimomura I, Brown MS, Hammer RE, Goldstein JL, and Shimano H (1998a) Activation

of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Clin. Invest.*, 101, 2331–2339.

Horton JD, Bashmakov Y, Shimomura I, and Shimano H (1998b) Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 5987-5992.

Hosono R, Mitsui Y, Sato Y, Aizawa S, and Miwa J (1982) Life span of the wild and mutant nematode *Caenorhabditis elegans*: Effects of Sex, Sterilization, and Temperature. *Exp. Gerontol.*, 17, 163-172

Hui X, Gu P, Zhang J, Nie T, Pan Y, Wu D, Feng T, Zhong C, Wang Y, Lam KSL, and Xu A (2015) Adiponectin enhances cold-induced browning of subcutaneous adipose tissue via promoting M2 macrophage proliferation. *Cell Metab.*, 22, 279-290.

Imbeault P, Couillard C, Tremblay A, Després JP, and Mauriège P (2000) Reduced α 2-adrenergic sensitivity of subcutaneous abdominal adipocytes as a modulator of fasting and postprandial triglyceride levels in men. *J. Lipid Res.*, 41, 1367-1375.

Isaya G, Kalousek F, Fenton WA, and Rosenberg LE (1991) Cleavage of precursors by the mitochondrial processing peptidase requires a competent mature protein or an intermediate octapeptide. *J. Cell. Biol.*, 113, 65-76

Jaworski K, Ahmadian M, Duncan RE, Sarkadi-Nagy E, Varady KA, Hellerstein MK, Lee HY, Samuel VT, Shulman GI, Kim KH, De Val S, Kang C, and Sul HS (2009) AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. *Nat. Med.*, 15, 159-168.

Jiang T, Liebman SE, Lucia MS, Phillips CL, and Levi M (2005) Calorie Restriction Modulates Renal Expression of Sterol Regulatory Element Binding Proteins, Lipid Accumulation, and Age-Related Renal Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 16, 2385-2394

Jobling RK, Assoum M, Gakh O, Blaser S, Raiman JA, Mignot C, Roze E, Dürr A, Brice A, Lévy N, Prasad C, Paton T, Paterson AD, Roslin NM, Marshall CR, Desvignes JP, Roëckel-Trevisiol N, Scherer SW, Rouleau GA, Mégarbané A, Isaya G, Delague V, Yoon G (2015) PMPCA mutations cause

abnormal mitochondrial protein processing in patients with non-progressive cerebellar ataxia. *Brain.*, 138, 1505-1517

Jocken JW, and Blaak EE (2008) Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. *Physiol. Behav.*, 94, 219-230.

Johnson TJ, Murray S, Young JB, and Landsberg L (1982) Restricted food intake limits brown adipose tissue hypertrophy in cold exposure. *Life Sci.*, 30, 1423-1426

Joshi M, Anselm I, Shi J, Bale TA, Towne M, Schmitz-Abe K, Crowley L, Giani FC, Kazerounian S, Markianos K, Lidov HG, Folkerth R, Sankaran VG, Agrawal PB (2016) Mutations in the substrate binding glycine-rich loop of the mitochondrial processing peptidase- α protein (PMPCA) cause a severe mitochondrial disease. *Cold Spring Harb. Mol. Case Stud.*, 2, a000786.

Kaeberlein M, McVey M and Guarente L (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.*, 13, 2570-2580

Kamei Y, Miura S, Suganami T, Akaike F, Kanai S, Sugita S, Katsumata A, Aburatani H, Unterman TG, Ezaki O, and Ogawa Y (2008) Regulation of SREBP1c gene expression in skeletal muscle: role of retinoid X receptor/liver X receptor and forkhead-O1 transcription factor. *Endocrinology*, 149, 2293-2305.

Kanki H, Suzuki H, and Itohara S (2006) High-efficiency CAG-FLPe deleter mice in C57BL/6J background. *Exp. Anim.*, 55, 137-141.

Kanfi Y, Naiman S, Amir G, Peshti V, Zinman G, Nahum L, Bar-Joseph Z, and Cohen HY (2012) The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature*, 483, 218-221.

Kershaw EE, and Flier JS (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89, 2548-2556.

Kim JY, Tillison K, Lee JH, Rearick DA, and Smas CM (2006) The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF- α in 3T3-L1 adipocytes and is a target for

transactivation by PPAR γ . *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 291, E115-E127.

Kim J, Van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, Schraw T, Durand JL, Li H, Li G, Jelicks LA, Mehler MF, Hui DY, Deshaies Y, Shulman GI, Schwartz GJ, and Scherer PE (2007) Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, 117, 2621–2637.

Krief S, Lönnqvist F, Raimbault S, Baude B, Van Spronsen A, Arner P, Strosberg AD, Ricquier D, and Emorine LJ (1993) Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man. *J Clin Invest.*, 91, 344-9.

Lago F, Dieguez C, Gómez-Reino J, and Gualillo O (2007) Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, 3, 716-724

Lampidonis AD, Rogdakis E, Voutsinas GE, and Stravopodis DJ (2011) The resurgence of Hormone-Sensitive Lipase (HSL) in mammalian lipolysis. *Gene.*, 477, 1-11

Laustsen PG, Russell SJ, Cui L, Entingh-Pearsall A, Holzenberger M, Liao R, and Kahn CR (2007) Essential role of insulin and insulin-like growth factor 1 receptor signaling in cardiac development and function. *Mol. Cell Biol.*, 27, 1649-1664.

Lelliott C, and Vidal-Puig AJ (2004) Lipotoxicity, an imbalance between lipogenesis de novo and fatty acid oxidation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 28 Suppl 4, S22-S28.

Li PK, Lee JT, MacGillivray MH, Schaefer P, and Siegel JH (1980) Direct, fixed-time kinetic assays for beta-hydroxybutyrate and acetoacetate with a centrifugal analyzer or a computer-backed spectrophotometer. *Clin. Chem.*, 26, 1713-1717.

Lombard DB, Alt FW, Cheng HL, Bunkenborg J, Streeper RS, Mostoslavsky R, Kim J, Yancopoulos G, Valenzuela D, Murphy A, Yang Y, Chen Y, Hirschey MD, Bronson RT, Haigis M, Guarente LP, Farese RVJ, Weissman S, Verdin E, and Schwer B (2007) Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol. Cell Biol.*, 27, 8807-8814.

Lu SC (2013) Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1830, 3143-3153

Mårin P, Andersson B, Ottosson M, Olbe L, Chowdhury B, Kvist H, Holm G, Sjöström L, and Björntorp P (1992) The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men, *Metabolism.*, 41, 1242-1248.

Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, Palacios HH, Mote PL, Scheibye-Knudsen M, Gomes AP, Ward TM, Minor RK, Blouin MJ, Schwab M, Pollak M, Zhang Y, Yu Y, Becker KG, Bohr VA, Ingram DK, Sinclair DA, Wolf NS, Spindler SR, Bernier M, and Cabo R (2013) Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat. Commun.*, 4, 2192

Masoro EJ (2005) Overview of caloric restriction and ageing. *Mech. Ageing Dev.* 126, 913-922.

Masoro EJ, and Aystad SN (1996) The Evolution of the Antiaging Action of Dietary Restriction: A Hypothesis. *J. Gerontol. A Biol. Med. Sci.*, 51A, B387-B391

Masternak MM, Bartke A, Wang F, Spong A, Gesing A, Fang Y, Salmon AB, Hughes LF, Liberati T, Boparai R, Kopchick JJ, and Westbrook R (2012) Metabolic effects of intra-abdominal fat in GHRKO mice. *Aging Cell*, 11, 73-81.

Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Kato T, Atsumi A, Yamamoto T, Inoue N, Ishikawa M, Okada S, Ishigaki N, Iwasaki H, Iwasaki Y, Karasawa T, Kumadaki S, Matsui T, Sekiya M, Ohashi K, Hasty AH, Nakagawa Y, Takahashi A, Suzuki H, Yatoh S, Sone H, Toyoshima H, Osuga J, and Yamada N (2007) Crucial role of a long-chain fatty acid elongase, Elov16, in obesity-induced insulin resistance. *Nat. Med.*, 13, 1193-1202.

Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, Tilmont EM, Handy AM, Herbert RL, Longo DL, Allison DB, Young JE, Bryant M, Barnard D, Ward WF, Qi W, Ingram DK, and De Cabo R (2012) Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature*, 489, 318-321.

Mattison JA, Colman RJ, Beasley TM, Allison DB, Kemnitz JW, Roth GS, Ingram DK, Weindruch R, de Cabo R, and Anderson RM (2017) Caloric restriction improves health and survival of rhesus monkeys. *Nat. Commun.*, 8.

Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, and Kahn CR (2000) Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol. Cell.*, 6, 87-97.

McCay CM, Crowell MF, and Maynard LA (1935) The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *Nutrition*, 5, 155-171.

Means LW, Higgins JL, and Fernandez TJ (1993) Mid-life onset of dietary restriction extends life and prolongs cognitive functioning. *Physiol. Behav.*, 54, 503-508

Misra A, Garg A, Abate N, Peshock RM, Stray-Gundersen J, and Grundy SM (1997) Relationship of anterior and posterior subcutaneous abdominal fat to insulin sensitivity in nondiabetic men. *Obes. Res.*, 5, 93-99.

Misra A, and Vikram NK (2003) Clinical and pathophysiological consequences of abdominal adiposity and abdominal adipose tissue depots, *Nutrition.*, 19, 457-466.

Miyagishi M, Sumimoto H, Miyoshi H, Kawakami Y, and Taira K (2004) Optimization of an siRNA-expression system with an improved hairpin and its significant suppressive effects in mammalian cells. *J. Gene Med.*, 6, 715-723.

Mossmann D, Meisinger C, and Vögtle FN (2012) Processing of mitochondrial presequences. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1819, 1098-1106.

Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, Liu P, Mostoslavsky G, Franco S, Murphy MM, Mills KD, Patel P, Hsu JT, Hong AL, Ford E, Cheng HL, Kennedy C, Nunez N, Bronson R, Frendewey D, Auerbach W, Valenzuela D, Karow M, Hottiger MO, Hursting S, Barrett JC, Guarente L, Mulligan R, Demple B, Yancopoulos GD, and Alt FW (2006) Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*, 124, 315-329.

Nadeau KJ, Ehlers LB, Aguirre LE, Moore RL, Jew LN, Ortmeyer HK, Hansen BC, Reusch JEB, and Draznin B (2006) Exercise training and calorie restriction increase SREBP-1 expression and

intramuscular triglyceride in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 291, E90-E98

Nakagawa T, and Guarente L (2011) Sirtuins at a glance. *J. Cell. Sci.*, 124, 833-8.

Neupert W, and Herrmann JM (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 723-749.

Nicklas BJ, Cesari M, Penninx BW, Kritchevsky SB, Ding J, Newman A, Kitzman DW, Kanaya AM, Pahor M, and Harris TB (2006) Abdominal obesity is an independent risk factor for chronic heart failure in older people, *J. Am. Geriatr. Soc.*, 54, 413-420.

Nilsson L, Binart N, Bohlooly-Y M, Bramnert M, Egcioglu E, Kindblom J, Kelly PA, Kopchick JJ, Ormandy CJ, Ling C, and Billig H (2005) Prolactin and growth hormone regulate adiponectin secretion and receptor expression in adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331, 1120-1126.

Nolden M, Ehses S, Koppen M, Bernacchia A, Rugarli EI, Langer T (2005) The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. *Cell.*, 123, 277-289.

Oka S, Hsu CP, and Sadoshima J (2012) Regulation of cell survival and death by pyridine nucleotides. *Circ. Res.*, 111, 611-627.

Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honmz T, Hamagami K, Matsuda K, Yamaguchi M, Tanabe H, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Ogata H, Tokuyama K, Ueki K, Nagano T, Tanaka A, Yokoyama S, and Kadowaki T (2013) A small- molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature*, 503, 493-499

Okita N, Hayashida Y, Kojima Y, Fukushima M, Yuguchi K, Mikami K, Yamauchi A, Watanabe K, Noguchi M, Nakamura M, Toda T, and Higami Y (2012) Differential responses of white adipose tissue and brown adipose tissue to caloric restriction in rats. *Mech. Ageing Dev.*, 133, 255-266.

Osborne TF and Espenshade PJ (2009) Evolutionary conservation and adaptation in the mechanism

that regulates SREBP action: what a long, strange tRIP it's been. *Genes Dev.*, 23, 2578-2591.

Otabe S, Yuan X, Fukutani T, Wada N, Hashinaga T, Nakayama H, Hirota N, Kojima M, and Yamada K (2007) Overexpression of human adiponectin in transgenic mice results in suppression of fat accumulation and prevention of premature death by high-calorie diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 293, E210-E218.

Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, and Walsh K (2011) Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 11, 85-97

Patzel V, Rutz S, Dietrich I, Köberle C, Scheffold A, and Kaufmann SH (2005) Design of siRNAs producing unstructured guide-RNAs results in improved RNA interference efficiency. *Nat. Biotechnol.*, 23, 1440-1444.

Pederson TM, Kramer DL, and Rondinone CM (2001) Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation. *Diabetes*, 50, 24-31.

Pessayre D (2007) Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 22 Suppl. 1, S20-S27.

Pietrocola F, Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Madeo F, Kroemer G (2015) Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger. *Cell Metab.*, 21, 805-821.

Potapova IA, El-Maghrabi MR, Doronin SV and Benjamin WB (2000) Phosphorylation of recombinant human ATP: citrate lyase by cAMP-dependent protein kinase abolishes homotropic allosteric regulation of the enzyme by citrate and increases the enzyme activity. Allosteric activation of ATP: citrate lyase by phosphorylated sugars. *Biochemistry*, 39, 1169-1179.

Qiu X, Brown K, Hirschey MD, Verdin E, and Chen D (2010) Caloric Restriction Reduced Oxidative Stress by SIRT3-Mediated SOD2 Activation. *Cell Metab.*, 12, 662-667

Quirós PM, Langer T, and López-Otín C (2015). New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 16, 345-359.

Ramakrishna S and Benjamin WB (1985) Cyclic nucleotide-independent protein kinase from rat liver. Purification and characterization of a multifunctional protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 260, 12280-12286.

Rebuffe-Scrive M, Surwit R, Feinglos M, Kuhn C and Rodin J (1993) Regional fat distribution and metabolism in a new mouse model (C57BL6J) of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 42, 1405-1409.

Reinders J, Zahedi RP, Pfanner N, Meisinger C, and Sickmann A (2006) Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *J. Proteome Res.*, 5, 1543-1554.

Rogina B, and Helfand SL (2004) Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, 15998-16003.

Rojas JXS, García-San Frutos M, Horrillo D, Lauzurica N, Oliveros E, Carrascosa JM, Fernández-Agulló T, and Ros M (2016) Differential development of inflammation and insulin resistance in different adipose tissue depots along aging in Wistar rats: effects of caloric restriction. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 71, 310-322.

Ross R, Berentzen T, Bradshaw AJ, Janssen I, Kahn HS, Katzmarzyk PT, Kuk JL, Seidell JC, Snijder MB, Sørensen TI, and Després JP (2008) Does the relationship between waist circumference, morbidity and mortality depend on measurement protocol for waist circumference? *Obes. Rev.*, 9, 312-325.

Roth GS, Lane M, Ingram DK, Mattison J, Elahi D, Tobin JD, Muller D, and Metter EJ (2002) Biomarkers of caloric restriction may predict longevity in humans. *Science*, 297, 811.

Ruiz-Alcaraz AJ, Liu HK, Cuthbertson DJ, Mcmanus EJ, Akhtar S, Lipina C, Morris AD, Petrie JR, Hundal HS, and Sutherland C (2005) A novel regulation of IRS1 (insulin receptor substrate-1) expression following short term insulin administration. *Biochem. J.*, 392, 345-352.

Sakai K, and Miyazaki Ji (1997) A transgenic mouse line that retains Cre recombinase activity in mature oocytes irrespective of the cre transgene transmission. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 237, 318-324.

Satoh A, Brace CS, Rensing N, Cliften P, Wozniak DF, Herzog ED, Yamada KA, Imai S (2013) Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 homeobox 1 in the DMH and LH. *Cell Metab.*, 18, 416-430.

Scarpulla RC (2011) Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1813, 1269-1278

Schreiber SN, Emter R, Hock MB, Knutti D, Cardenas J, Podvinec M, Oakeley EJ, and Kralli A (2004) The estrogen-related receptor α (ERR α) functions in PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101, 6472-6477

Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, and Ristow M (2007) Glucose Restriction Extends *Caenorhabditis elegans* Life Span by Inducing Mitochondrial Respiration and Increasing Oxidative Stress. *Cell Metab.*, 6, 280-293

Schwer B, North BJ, Frye RA, Ott M, and Verdin E (2002) The human silent information regulator (Sir) 2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J. Cell Biol.*, 158, 647-657.

Schwer B, Bunkenborg J, Verdin RO, Andersen JS, and Verdin E (2006) Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 10224-10229.

Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, Takeuchi Y, Nakagawa Y, Takahashi H, Okazaki H, Iizuka Y, Ohashi K, Gotoda T, Ishibashi S, Nagai R, Yamazaki T, Kadowaki T, Yamada N, Osuga J, and Shimano H (2007) SREBP-1-independent regulation of lipogenic gene expression in adipocytes. *J. Lipid Res.*, 48, 1581-1591.

Shi T, Wang F, Stieren E, and Tong Q (2005) SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates

mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 280, 13560-13567.

Shimano H, Horton JD, Shimomura I, Hammer RE, Brown MS, and Goldstein JL (1997) Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J. Clin. Invest.*, 99, 846.

Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Osuga J, Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Ishibashi S, and Yamada N (1999) Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J. Biol. Chem.*, 274, 35832-35839.

Shimano H (2009) SREBPs: physiology and pathophysiology of the SREBP family. *FEBS J.*, 276, 616-621.

Shimazu T, Hirschey MD, Hua L, Dittenhafer-Reed KE, Schwer B, Lombard DB, Li Y, Bunkenborg J, Alt FW, Denu JM, Jacobson MP, and Verdin E (2010) SIRT3 deacetylates mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase 2 and regulates ketone body production. *Cell Metab.*, 12, 654-661.

Shimazu T, Hirschey MD, Newman J, He W, Shimokawa I, Higami Y, Utsuyama M, Tuchiya T, Komatsu T, Chiba T, and Yamaza H (2002) Life span extension by reduction in growth hormone-insulin-like growth factor-1 axis in a transgenic rat model. *Am. J. Pathol.*, 160, 2259-2265.

Shimokawa I, Higami Y, Tuchiya T, Otani H, Komatsu T, Chiba T, and Yamaza H (2003) Life span extension by reduction of the growth hormone-insulin-like growth factor-1 axis: relation to caloric restriction. *FASEB J.*, 17, 1108-1109.

Shimomura I, Hammer RE, Richardson JA, Ikemoto S, Bashmakov Y, Goldstein JL, and Brown MS (1998) Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev.*, 12, 3182-3194.

Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, and Goldstein JL (1999) Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature*, 401, 73-76.

Shirakawa K, Le Moan N, Grueter C, Lim H, Saunders LR, Stevens RD, Newgard CB, Farese RV, De Cabo R, Ulrich S, Akassoglou K, and Verdin E (2013) Suppression of Oxidative Stress by β -Hydroxybutyrate, an Endogenous Histone Deacetylase Inhibitor. *Science*, 339, 211-214.

Snijder MB, Dekker JM, Visser M, Bouter LM, Stehouwer CD, Kostense PJ, Yudkin JS, Heine RJ, Nijpels G, and Seidell JC (2003) Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumference with the incidence of type 2 diabetes: the Hoorn Study, *Am. J. Clin. Nutr.*, 77, 1192-1197.

Someya S, Yu W, Hallows WC, Xu J, Vann JM, Leeuwenburgh C, Tanokura M, Denu JM, and Prolla TA (2010) Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell*, 143, 802-812.

Sonntag WE, Xu X, Ingram RL, and D'Costa A (1995) Moderate caloric restriction alters the subcellular distribution of somatostatin mRNA and increases growth hormone pulse amplitude in aged animals. *Neuroendocrinology*, 61, 601-608.

Sohal RS, and Weindruch R (1996) Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging. *Science*, 273, 59-63.

Soukas A, Cohen P, Socci ND, and Friedman JM (2000) Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev.*, 14, 963-980.

Sun XJ, Miralpeix M, Myers MG, Glasheen EM, Backer JM, Kahn CR, White MF (1992) Expression and function of IRS-1 in insulin signal transmission. *J. Biol. Chem.*, 267, 22662-22672.

Takahashi A, Motomura K, Kato T, Yoshikawa T, Nakagawa Y, Yahagi N, Sone H, Suzuki H, Toyoshima H, Yamada N, and Shimano H (2005) Transgenic mice overexpressing nuclear SREBP-1c in pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 54, 492-499.

Takahashi Y, Shinoda A, Furuya N, Harada E, Arimura N, Ichi I, Fujiwara Y, Inoue J and Sato R (2013) Perilipin-mediated lipid droplet formation in adipocytes promotes sterol regulatory element-binding protein-1 processing and triacylglyceride accumulation. *PLoS ONE*, 8, e64605.

Taniguchi CM, Emanuelli B, and Kahn CR (2006) Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 85-96.

Tanko LB, Bagger YZ, Alexandersen P, Larsen PJ, and Christiansen C (2003) Peripheral adiposity exhibits an independent dominant antiatherogenic effect in elderly women. *Circulation*, 107, 1626-1631.

Torres-Leal FL, Fonseca-Alaniz MH, Rogero MM, and Tirapegui J (2010) The role of inflamed adipose tissue in the insulin resistance. *Cell Biochem. Funct.*, 28, 623-631.

Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, and Kahn CR (2008) Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab.*, 7, 410-420.

Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.*, 552, 335-344

Ueki K, Okada T, Hu J, Liew CW, Assmann A, Dahlgren GM, Peters JL, Shackman JG, Zhang M, Artner I, Satin LS, Stein R, Holzenberger M, Kennedy RT, Kahn CR, and Kulkarni RN (2006) Total insulin and IGF-I resistance in pancreatic beta cells causes overt diabetes. *Nat Genet.*, 38, 583-588.

Unger RH (1995) Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes*, 44, 863-870.

Valle A, Sastre-Serra J, Roca P, and Oliver J (2010) Modulation of white adipose tissue proteome by aging and calorie restriction. *Aging Cell*, 9, 882-94.

Vögtle FN, Wortelkamp S, Zahedi RP, Becker D, Leidhold C, Gevaert K, Kellermann J, Voos W, Sickmann A, Pfanner N, and Meisinger C (2009) Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. *Cell*, 139, 428-439.

Vögtle FN, Prinz C, Kellermann J, Lottspeich F, Pfanner N, and Meisinger C (2011) Mitochondrial protein turnover: role of the precursor intermediate peptidase Oct1 in protein stabilization. *Mol. Biol. Cell.*, 22, 2135-2143.

Walford RL, Mock D, Verdery R, and MacCallum T (2002) Calorie restriction in biosphere 2: alterations in physiologic, hematologic, hormonal, and biochemical parameters in humans restricted for a 2-year period. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 57, B211–8224.

Wang Y, Rimm EB, Stampfer MJ, Willett WC, and Hu FB (2005) Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men, *Am. J. Clin. Nutr.*, 81, 555-563.

Wang Y, and Tissenbaum HA (2006) Overlapping and distinct functions for a *Caenorhabditis elegans* SIR2 and DAF-16/FOXO. *Mech. Ageing Dev.*, 127, 48-56.

Weindruch R, and Walford RL (1988) The retardation of aging and disease by dietary restriction. Charles C Thomas, Springfield

Weindruch R, and Sohal RS (1997) Caloric Intake and Aging. *N. Engl. J. Med.*, 337, 986-994

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, and Ferrante AW (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, 112, 1796-1808.

Wetter TJ, Gazdag AC, Dean DJ, and Cartee GD (1999) Effect of calorie restriction on in vivo glucose metabolism by individual tissues in rats. *Am. J. Physiol.*, 276, E728-E738.

Wiedemann N, and Pfanner N (2017) Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. *Annu Rev Biochem.*, 86, 685-714

Wise Jr. EM., and Ball EG. (1964) Malic enzyme and lipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 52, 1255-1263.

World Health Organization (2017) ANNEX B Tables of health statistics by country, WHO region and globally. *World health statistics 2017: monitoring health for the SDGs*, 85-93

Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Matsuzaka T, Ide T, Yoshikawa T, Amemiya-Kudo M, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, and

Yamada N (2002) Absence of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1) ameliorates fatty livers but not obesity or insulin resistance in Lep(ob) / Lep(ob) mice. *J. Biol. Chem.*, 277, 19353-19357.

Yamaza H, Komatsu T, Chiba T, Toyama H, To K, Higami Y, and Shimokawa I (2004) A transgenic dwarf rat model as a tool for the study of calorie restriction and aging. *Exp. Gerontol.*, 39, 269-272.

Yamaza H, Komatsu T, To K, Toyama H, Chiba T, Higami Y, and Shimokawa I (2007) Involvement of insulin-like growth factor-1 in the effect of caloric restriction: regulation of plasma adiponectin and leptin. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 62, 27-33.

Yanase S, Hartman PS, Ito A, and Ishii N (1999) Oxidative stress pretreatment increases the X-radiation resistance of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mutat. Res.*, 426, 31-39

Yu BP (1994) Modulation of aging processes by dietary restriction. CRC, Boca Raton

Zhu M, Lee GD, Ding L, Hu J, Qiu G, de Cabo R, Bernier M, Ingram DK, and Zou S (2007) Adipogenic signaling in rat white adipose tissue: modulation by aging and calorie restriction. *Exp. Gerontol.*, 42, 733-74

謝辞

本研究は、東京理科大学 薬学部 分子病理・代謝学研究室教授、樋上賀一博士の御指導のもとで行われたものであり、本研究の機会を与えてくださり、終始多大なる御指導、御鞭撻を賜りました。樋上賀一博士の御指導なくして本論文の完成はありませんでした。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、研究の場やゼミの場などで終始大変有意義な御助言や御指導にとどまらず、日々の生活においても私を支えてくださり、導いて下さいました、助教、小林正樹博士、前助教、須藤結香博士には深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、実験手法について懇切丁寧な御指導、御助言を賜りました、公益財団法人佐々木研究所 沖田直之博士、東京理科大学生命医科学研究所教授 岩倉洋一郎博士、東北医科薬科大学医学部講師 海部知則博士に謹んで御礼申し上げます。

本研究をまとめるにあたり、副査として本論文を審査して頂き、貴重な御助言を賜りました、東京理科大学 薬学部 分子病態学研究室教授 深井文雄博士、応用薬理学研究室教授 礒濱洋一郎博士、遺伝子制御学研究室教授 内海文彰博士、分子医科学研究室准教授 秋本和憲博士に御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、直接御協力を頂きました、東京理科大学薬学部分子病理・代謝学研究室 藤井波木氏、宮川隆太氏、橋爪由香里氏、後藤彰文氏、板倉佳穂氏、梅森愛氏、武田佳奈恵氏、古田裕里加氏、吉川真人氏、斉藤宏樹氏、蒲谷里穂氏、永井啓太氏、板川礼氏、右高稜大氏、瀧加菜里氏、哥静羅氏、櫻井実咲子氏に深謝致します。

本研究にとどまらず日々の生活においても、有益な御助言を頂き、支えて頂いた東京理科大学薬学部分子病理・代謝学研究室の皆様へ深謝致します。

本研究により失われた多くの実験動物の尊い命に哀悼の意を表し、御冥福を心より御祈り申し上げます。

最後に、終始私を支えてくださった家族および友人に感謝の意を表します。