

【トピックス】

カロリー制限が白色脂肪組織における脂肪酸合成に及ぼす影響の経時的解析

土屋 拓郎、沖田 直之、須藤 結香、樋上 賀一

東京理科大学 薬学部 薬学科 分子病理・代謝学研究室

はじめに

1935年、米国の栄養学者である McCay らは、適度な摂取カロリーの制限 (caloric restriction; CR) がラットの平均および最大寿命を延伸し、加齢性疾患の発症を抑制または軽減することを報告した [1]。以降、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様々な生物種において、CR が老化を遅延、平均および最大寿命を延伸することが明らかにされてきた [2-4]。

CR の抗老化・寿命延伸効果には、エネルギー代謝に関わるミトコンドリアが重要な役割を担うと考えられている [5]。また、CR のエネルギー代謝の特徴は、エネルギー効率の高い脂質を利用することである [6]。近年、エネルギーの貯蔵庫であり、放出源でもある白色脂肪組織 (WAT) において、CR がミトコンドリア機能を亢進させ、脂質代謝を活性化させるという報告が数多くなされている [6-8]。我々も、6ヶ月間 CR したラットの WAT をプロテオーム解析し、CR がミトコンドリアや脂肪酸合成に関わるタンパク発現量を増加させることを報告した [9]。本稿では、CR による WAT での脂質代謝変化の経時的な解析から、CR による代謝の分子メカニズムについて報告する。

1. 脂肪細胞の小型化とアディポカイン

WAT における主要な構成細胞である脂肪細胞は、そのサイズによってアディポカイン分泌プロファイルを変化させることが知られている [10]。また、CR に伴い WAT では脂肪細胞が小型化し、アディポネクチンの分泌が増加し、レプチンや多くの炎症性サイトカインの分泌が減少することが知られている [11-13]。アディポネクチンは、肝臓や骨格筋などの非脂肪組織での脂肪蓄積を減少させ、インスリン感受性を亢進させる [14]。また、レプチンは、視床下部の受容体を介して強力な摂食抑制やエネルギー消費を亢進させる [15]。

まず、我々は脂肪細胞の形態学的観察とエネルギー代謝に関連が深いアディポネクチンとレプチンの経時的解析を行った。WAT の組織学的解析において、CR 群の脂肪細胞のサイズは自由摂食 (ad libitum; AL) 群に比

べ5ヶ月齢 (CR 期間2ヵ月) から有意に減少した。アディポカインの解析において、CR 群のアディポネクチンの mRNA 発現量は、3.5ヶ月齢で顕著に上昇した。一方、CR 群のレプチンの mRNA 発現量は、5ヶ月齢から AL 群に比べ有意に減少した (図1)。

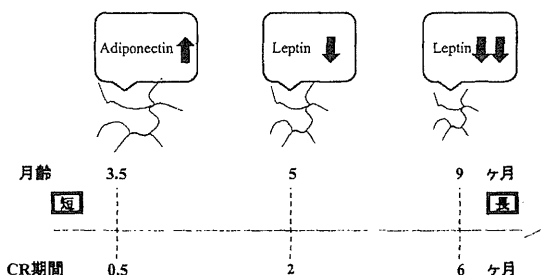


図1 脂肪細胞サイズとアディポカインの経時的変化

2. 脂肪酸合成

前項でも述べたが、我々は6ヶ月間 CR したラットの WAT をプロテオーム解析し、CR が脂肪酸合成に関わるタンパク発現量を増加させることを報告した [9]。また、CR が WAT の脂肪酸合成効率を増加させるという報告もある [6]。

我々は脂肪酸合成において重要な酵素である FASN (Fatty acid synthase)、ACC (Acetyl-CoA carboxylase)、ACLY (ATP-citrate synthase)、ME1 (Malic enzyme1) のタンパク質発現量の経時的変化をウエスタンブロット法により解析した。すると、WAT では、全月齢において CR でこれらの脂肪酸合成関連タンパク質の発現量が顕著に増加した。しかしながら、5ヶ月齢において CR に伴う増加が一時的に抑制された。CR 群のみ経時的に発現量を比べると、5ヶ月齢に境に V 字型を示していた (図2)。次に、3.5、5、9ヶ月

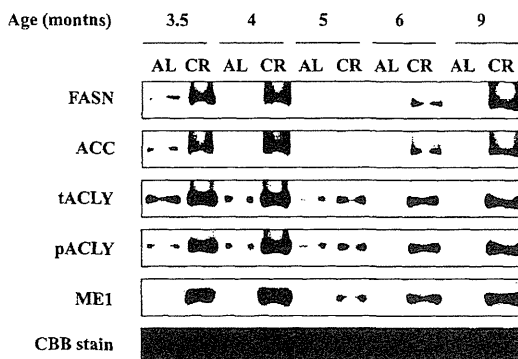


図2 脂肪酸合成関連因子の経時的変化

連絡先：〒 278-851
千葉県野田市山崎 264
TEL：04-7121-3676
FAX：04-7121-3676
E-mail：taku6384@gmail.com

月齢においてこれらの脂肪酸合成関連因子の mRNA 発現量の解析を行った。タンパク質発現と同様の変化が、mRNA 発現でも見られ、CR に伴う経時的な変化は転写レベルで制御されていると考えられた。

3. SREBP1 (Sterol regulatory element-binding protein1)

SREBP1 は basic helix-loop-helix (b-HLH) leucine zipper 型の転写因子であり、*Fasn*、*Acc*、*Acly*、*mel* などの脂肪酸合成系遺伝子発現を正に転写制御する [16-18]。SREBP1 には SREBP1a と SREBP1c の 2 つのアイソフォームが存在する [18]。これらの 2 つのアイソフォームの発現分布は組織によって異なり、SREBP1a は脾臓や骨髄由来マクロファージ、骨髄樹状細胞などの免疫や炎症に関連する臓器および細胞で優位に発現しているのに対し、SREBP1c は肝臓や脂肪組織などのインスリン感受性臓器で優位に発現している [19]。また、細胞内の SREBP1 は、Srebp cleavage activating protein (Scap) と複合体を形成し、SREBP1 自身の膜貫通領域を介して小胞体 (ER; endoplasmic reticulum) 膜に結合している。Sterol が豊富な時には ER 膜上で insulin inducing gene (Insig) と三量体を形成している。Sterol が減少すると Insig との複合体形成が抑制され、Srebp-Scap 複合体がゴルジ体に輸送される。ゴルジ体において、site 1 protease (S1P) および site 2 protease (S2P) により C 末端側を順次切断され、全長を持つ前駆型から bHLH 領域を含む N 末端側のみの活性型となり核内に移行して転写活性を示す [20]。

我々は図 2 の結果より SREBP1 の解析をおこなった。すると、CR 群における前駆型及び核内にある活性型の SREBP1 のタンパク質発現量も、5 ヶ月齢を境に V 字型に変化を示した。また、*Srebp1a*、*1c* の mRNA 発現量を解析したところ、CR 群の *Srebp1a* の mRNA 発現量は、全月齢で AL 群に比べ有意な差は見られなかった。一方、*Srebp1c* の mRNA 発現量は、全月齢で AL 群に比べ高く、特に 3.5 ヶ月齢で有意に高かった。以上より、SREBP1c が CR による脂肪酸合成関連タンパク質の 5 ヶ月齢を境にした V 字型の発現増加に関与していると考え

えられる。

4. インスリンとレプチンによる SREBP1 の調節機構

SREBP1 の転写活性は、インスリンやレプチンによって調節されていることが知られている [21]。インスリンは SREBP1 の転写を促進するが、特に SREBP1c の発現を強く誘導する [22]。この転写機構は、インスリン受容体の下流にある PI3k/Akt 経路の一部依存する。SREBP1c の転写調節因子として同定されているのが Liver X receptor (LXR) である。LXR は SREBP1c のプロモーター部位に存在する LXR-responsive elements (LXRE) を介して、その転写を亢進する [23]。PI3k/Akt 経路の中には、核内移行した pAkt が、LXR を抑制する Forkhead box protein O1 (FoxO1) をリン酸化させ、核外移行させることで、*Srebp1c* の mRNA 発現量を増加させるという知見もある [24] (図 3)。一方、レプチンは脂肪組織で SREBP1c の転写を抑制し、下流遺伝子である *Fasn*、*Accl*、*Acly*、*Mel* や *LaminB1* の mRNA 発現量を低下させる [25]。また、これらの脂肪酸合成酵素の活性も低下させると報告がある [26]。

我々は SREBP1 の転写調節するインスリンやレプチンに関連した因子の解析をおこなった。核内移行した pAkt のタンパク質発現量は、CR 群の 3.5 ヶ月齢で特に高かった。一方、レプチンのタンパク質発現量は、CR 群の全月齢で低かった。また、レプチンにより発現が低下するという報告がある *LaminB1* のタンパク質発現量は、CR 群の全月齢で高く、レプチンのタンパク質発現量と相関していた。

以上より、CR が脂質代謝に及ぼす影響は、CR の期間によって異なることが明らかになった。短期の CR ではインスリン感受性の亢進により、pAkt の核内移行が増加し、SREBP1c の転写活性を増強する。一方、長期の CR では、レプチンの低下により、SREBP1c の転写活性を増強すると考えられる。よって、CR による WAT での脂質代謝は、インスリンとレプチンが協調して、発現および転写調節される SREBP1c に強く依存することを示唆する (図 3)。

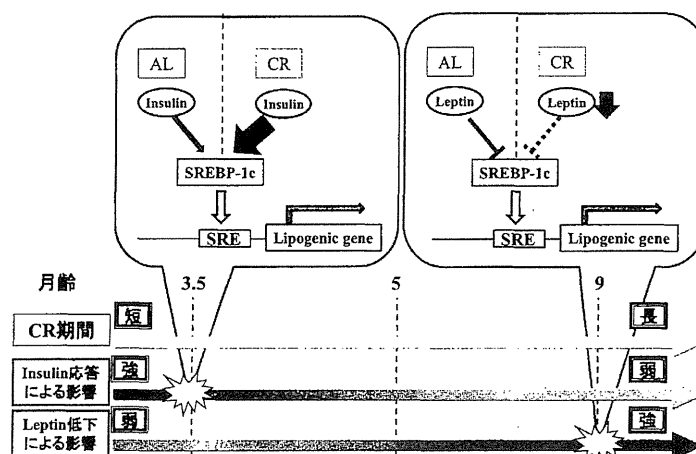


図3 CRによる脂質代謝の経時的変化

おわりに

本研究により、これまで未解明であったCRによる脂質代謝活性化の分子メカニズムの一端を明らかにした。また、CRの期間による経時的な脂質代謝の変化を明らかにした。今後は、CRによる脂肪分解やエネルギー代謝において重要な役割を担うミトコンドリア機能の解析に取り組みたいと考えている。

参考文献

1. McCay, C.M., Cromwell, M.F. and Maynard, L.A. The effect of retarded growth upon the length of lifespan and upon the ultimate body size. *J. Nutr.* 10: 63-79, 1935
2. Sohal, R.S. and Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273: 59-63, 1996.
3. Masoro, E.J. Overview of caloric restriction and ageing. *Mech. Ageing Dev.* 126: 913-922, 2005.
4. Colman, R.J., Anderson, R.M. and Johnson, S. C. et al. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* 325: 201-204, 2009.
5. Lanza, I.R. and Nair, K.S. Mitochondrial function as a determinant of life span. *Pflugers Arch* 459: 277-289, 2010.
6. Bruss, M. D., Khambatta, C. F. and Ruby, M. A. et al. Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298: E108-16, 2010.
7. López-Lluch, G., Hunt, N. and Jones, B. et al. Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:1768-1773, 2006.
8. Nisoli, E., Tonello, C. and Cardile, A. et al. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 310: 314-317, 2005.
9. Okita, N., Hayashida, Y. and Kojima, Y. et al. Differential responses of white adipose tissue and brown adipose tissue to caloric restriction in rats. *Mech Ageing Dev.* 133: 255-66, 2012.
10. Ouchi, N., Parker, J. L. and Lugus, J. J. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 11: 85-97, 2012.
11. Bordone, L. and Guarente, L. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:298-305, 2005.
12. Higami, Y., Pugh, T. D. and Page, G. P. et al. Adipose tissue energy metabolism: altered gene expression profile of mice subjected to long-term caloric restriction. *FASEB J.* 18:415-7, 2004.
13. Zhu, M., Lee, G. D. and Ding, L. et al. Adipogenic signaling in rat white adipose tissue: modulation by aging and calorie restriction. *Exp Gerontol.* 42: 733-44, 2007.
14. Zhu, M., Miura, J. and Lu, L. X. et al. Circulating adiponectin levels increase in rats on caloric restriction: the potential for insulin sensitization. *Exp Gerontol.* 39: 1049-59, 2004.
15. Brennan, A. M. and Mantzoros, C. S. Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology--emerging clinical applications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2: 318-27, 2006.
16. Osborne, T. F. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J. Biol. Chem.* 275: 32379-32382, 2000.
17. Amemiya-Kudo, M., Shimano, H. and Hastay, A. H. et al. Transcriptional activities of nuclear SREBP-1a, -1c, and -2 to different target promoters of lipogenic and cholesterologenic genes. *J Lipid Res.* 43: 1220-35, 2002
18. Eberlé, D., Hegarty, B. and Bossard, P. et al. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie.* 86:839-48, 2004
19. Im, S. S., Yousef, L. and Blaschitz, C. et al. Linking lipid metabolism to the innate immune response in macrophages through sterol regulatory element binding protein-1a. *Cell Metab.* 13: 540-549, 2011.
20. Xiao, X. and Song, B. SREBP: a novel therapeutic target. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 45: 2-10, 2013.
21. Kersten, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep.* 2: 282-6, 2001.
22. Yellaturu, C. R., Deng, X., Cagen, L. M. and Wilcox, H. G. et al. Insulin enhances post-translational processing of nascent SREBP-1c by promoting its phosphorylation and association with COPII vesicles. *J. Biol. Chem.* 284: 7518-7532, 2009.
23. Yoshikawa, T., Shimano, H. and Amemiya-Kudo, M. et al. Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Mol. Cell. Biol.* 21: 2991-3000, 2001.
24. Liu, X., Qiao, A. and Ke, Y. et al. FoxO1 represses LXR α -mediated transcriptional activity of SREBP-1c promoter in HepG2 cells. *FEBS Lett.* 584: 4330-4, 2001.
25. Soukas, A., Cohen, P. and Socci, N.D. et al. Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue. *Genes Dev.* 14: 963-80, 2000.
26. Swierczynski, J. Leptin and age-related down-regulation of lipogenic enzymes genes expression in rat white adipose tissue. *J Physiol Pharmacol.* 57: 85-102, 2006.

カロリー制限による抗老化・寿命延伸効果のメカニズム

～脂肪組織のリモデリングと脂質代謝の活性化～

須藤結香 沖田直之 樋上賀一

キーワード：カロリー制限 (CR)、脂肪組織、脂質代謝、ミトコンドリアバイオジェネシス (MtBio)、sterol regulatory element binding protein 1c (SREBP1c)
caloric restriction, adipose tissue, lipid metabolism, mitochondrial biogenesis, SREBP1c

抄録：カロリー制限 (CR; caloric restriction) による抗老化・寿命延伸効果のメカニズムについては、成長ホルモン様成長因子 1 シグナルの抑制や酸化ストレスの抑制、サーチュインの活性化、ミトコンドリアバイオジェネシスの亢進など様々な生理 (的適応) 反応が関わることで報告されている。しかしながら、未だその詳細は不明である。我々は、前述のような CR により誘導される生理反応の多くが脂肪組織において観察されることから、CR による抗老化・寿命延伸効果に脂肪組織の改変が重要であると考え研究を行ってきた。そして、脂肪酸合成系の主要な転写因子である sterol regulatory element binding protein 1c が CR に伴う脂肪組織の改変や脂質代謝の活性化、さらには抗老化・寿命延伸に重要であることを示唆する知見を得た。本稿では、近年の CR 研究について解説しつつ、我々の最新のデータから CR における脂肪組織の重要性を考察する。

(自律神経, 50: 192 ~ 195, 2013)

背景

カロリー制限 (CR; caloric restriction) は、げっ歯類の平均および最大寿命を延伸し、加齢にともなう生理的・病理学的変化を抑制する⁸⁾¹⁹⁾。この時、摂取エネルギーの減少に適応するため、全身の代謝が変化する。Holliday は CR による抗老化・寿命延伸効果のメカニズムを、進化論的観点から、以下のように考察した⁹⁾。食餌が豊富な時期には、強い大きな個体で積極的に生殖することで子孫を増やし、さらに過剰なエネルギーを脂肪組織 (WAT) に貯蔵する。一方、食餌が不足する時期には、個体の成長や生殖を抑制し、WAT に貯えたエネルギーを使いながら、寿命を延伸し、食餌が十分に得られる時期を待つ。このような食餌不足に対する適応能力の発達した動物が、進化の過程で選択されてきた。CR は、この食餌不足に対する適応反応を活性化し、抗老化・寿命延伸をもたらす。

CR による抗老化・寿命延長効果の詳細な分子メカニズムは未だに不明な点が多く、議論の分かれるところであるが、近年、以下に示すような複数のメカニズムの関与が示唆されている。

1. CR による成長ホルモン/インスリン様成長因子 1 シグナルの抑制

CR により、成長ホルモン (GH) やインスリン様成長因子 1 (IGF-1) の分泌が減少する⁸⁾¹⁹⁾。また、Ames 矮小マウスや Snell 矮小マウス、GH 受容体/結合タンパク質ノックアウト (KO) マウス、アンチセンス GH 遺伝子の導入により GH 発現を抑制したトランスジェニック (Tg) ラットは野生型に比べて長寿である¹⁷⁾。しかし、Ames 矮小マウス¹⁾ やアンチセンス GHTg ラット¹⁸⁾ では、CR によりさらに寿命が延長した。一方、GH 受容体/結合タンパク質 KO マウスでは CR による寿命延伸が認められなかった²⁾。これらの知見は、CR の効果は GH/IGF-1 依存の以外、非依存的なメカニズムによっても制御されていることを示唆する。

2. CR による酸化ストレスの抑制

酸化ストレスは、活性酸素種 (ROS; reactive oxygen species) 産生の増加とそれに対する防御機構の低下により、増悪する。ROS は生体内において、ミトコンドリア電子伝達系を含む様々な反応により産生される。ミトコンドリア電子伝達系では複合体 I や III、IV において産生さ

れ、中でも特に複合体 I の寄与が大きい。CR は複合体 I の活性をかなり選択的に抑制することが示され、この機構が CR によるミトコンドリア由来 ROS 産生の抑制の一因ではないかと考えられる⁶¹。産生された ROS はカタラーゼなどいわゆるスカベンジャーエンザイムにより除去される。ミトコンドリア選択的にカタラーゼを過剰発現したマウスは、長寿となる⁶⁰。CR はカタラーゼや SOD の活性を増大、もしくは加齢に伴う活性の低下を抑制する⁶⁰。CR はこれらの反応を介して、酸化ストレスを抑制すると考えられる。

3. CR によるサーチュインの活性化

Sir2 (サーチュイン) は酵母の老化制御遺伝子として報告された。ほ乳類では SIRT1 から SIRT7 まで 7 つの Sir2 ホモログが存在する。現在まで、NAD 依存性脱アセチル化酵素活性を有する SIRT1 と 3、ADP リボシル化酵素活性を有する SIRT6 において、CR との関連が示されている¹¹。

SIRT1 は CR により WAT や骨格筋において発現が亢進する。また、種々のタンパク質の脱アセチル化を介して、CR による DNA 安定性やストレス応答などを調節する可能性が示唆されている。しかしながら、肝臓においては、CR により発現はかえって減少し、肝特異的 Sirt1 KO マウスでは耐糖能が改善する。

SIRT3 は CR により WAT や褐色脂肪組織 (BAT)、肝臓において発現が上昇する。また、アセチル CoA の合成や β 酸化、ケトン体合成、還元型/酸化型グルタチオン比の増加を介した酸化ストレスに対する防御能の亢進にも関与する。

SIRT6 は CR により WAT や心臓、脳において発現が上昇する。また、NF- κ B やテロメアの安定化、poly (ADP-ribose) polymerase 1 などの活性化を通じて炎症や DNA 修復などに関与する。Sirt6 を過剰発現した雄マウスでは血中 IGF-1 濃度は低下し、寿命は延長する。

4. CR によるミトコンドリアバイオジェネシスの亢進

CR により、PPAR γ coactivator-1 α を介して、WAT や肝臓、心臓などでミトコンドリアバイオジェネシス (MtBio) の亢進が報告されている¹²。しかしながら、近年、CR によるこの亢進に異を唱える論文が報告された⁷¹。我々は 3 ヶ月齢より CR を開始した 9 ヶ月齢ラットの WAT や BAT、肝臓を解析し、CR は WAT では顕著に、肝臓では軽度で MtBio を亢進するものの、BAT では抑制することを明らかにした¹³。また、WAT において MtBio に関する様々なバイオマーカーを経時的に解析したところ、CR の期間によってその影響が異なった。それゆえ、

CR による MtBio への影響は、臓器や組織により異なり、また CR の期間によっても異なるが、少なくとも WAT において長期間 (6 ヶ月以上) CR すると、MtBio が亢進することは明らかと思われる (未発表データ)。

5. CR における白色脂肪組織の重要性

WAT はアディポカインを分泌する内分泌組織である。アディポカインには、インシュリン感受性を正に制御し、炎症を抑制する善玉アディポカインであるアディポネクチンや、逆の作用を示す悪玉アディポカインである腫瘍壊死因子 α などがある¹⁵。また WAT は生体内での脂質の合成と貯蔵、消費を調節する能力 (脂質に対する緩衝能) を有する。この WAT の脂質緩衝能が障害されると、脂質が非脂肪組織に蓄積され、全身性あるいは各臓器におけるインスリン抵抗性を惹起する¹⁵。それゆえ、善玉アディポカインを多く分泌し、脂質緩衝能の高い脂肪組織が、生体にとって良い WAT である。

近年、WAT やアディポカインそのものが寿命制御に重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。脂肪組織特異的インシュリン受容体 KO マウス¹⁷ や脂肪細胞の分化に必須な転写因子である C/EBP α 遺伝子座に C/EBP β をノックインした C/EBP β / β マウス¹¹、肝臓においてアディポネクチンの発現を亢進させた Tg マウス¹¹ は長寿であり、前 2 者では WAT での MtBio が亢進している。加えて、野生型マウスでは内臓脂肪の外科的切除は生体にとって有益で、寿命を延長するが、長寿を示す GHR/BP KO マウスでの内臓脂肪の切除は、悪影響を及ぼすことが報告された¹⁰。このことは、個体にとって良い WAT と悪い WAT があることを示している。

WAT が寿命制御に重要であること、CR の有益な効果には、GH/IGF1 シグナル依存的および非依存的なメカニズムがあることから、我々は、自由摂餌したアンチセンス GHTg ラットと野生型 CR ラットの WAT での遺伝子発現プロファイルを比較することで、CR の GH 非依存性メカニズムを探索した。その結果、CR は GH/IGF-1 非依存的に脂肪酸合成関連遺伝子の発現を誘導し、炎症関連遺伝子の発現を抑制した。また、前者は sterol regulatory element binding protein (SREBP) 1 により制御されていた³¹。

6. CR における SREBP1c の重要性

SREBP は、脂質代謝における主要な転写因子で、SREBP1a、1c、2 の 3 つのアイソフォームが存在する。我々は WAT における主たるアイソフォームである SREBP1c KO マウスと野生型マウス各々に CR を行い、寿命をはじめとする様々なパラメーターを解析した。その結

果、野生型ではCRより寿命が延伸したが、KOではこのような効果が見られなかった。また、CRに伴って野生型で観察されるWATにおける脂肪酸合成関連タンパク質発現の亢進やMtBioの亢進、酸化ストレスの抑制などは、KOでは観察されなかった。以上より、SREBP1cが少なくともCRによるWATでの代謝のリモデリングを介して抗老化・寿命延伸効果の一端を担っている可能性が高い(未発表データ)。

7. CRにおける脂肪組織のリモデリングと脂質代謝の活性化

CRに伴う適応反応のうちWATでは、GH/IGF-1シグナル非依存的に炎症の抑制と脂肪酸合成系の活性化が観察された。また、後者はSREBP1cの活性化を介しており、MtBioの亢進と酸化ストレスの抑制を伴っていた。さらにサーチュインの活性化(SIRT1, SIRT3, SIRT6発現の増加)も観察される。このようなWATでの代謝のリモデリングは、悪玉に比し善玉アディポカイン優位な分泌を誘導し、脂質代謝を活発にする。CRはエネルギー源として脂質の利用を亢進させる⁶⁾。脂質利用の増加により、電子伝達系の複合体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も示唆される²¹⁾。

おわりに

我々は、CRの抗老化・寿命延伸メカニズムとして、GH/IGF-1非依存性のメカニズムの一つにはSREBP1cを介した脂肪組織リモデリングと脂質代謝の活性化が重要であろうと考えている。この考え方は、進化論的観点からHollidayが提唱した仮説を支持するものである。最後に第65回日本自律神経学会総会のシンポジウムにおいて講演の機会、さらにこの総説を執筆する機会を与えて下さった黒澤美枝子先生ならびに田村直俊先生に感謝致します。

文献

- 1) Bartke A, Wright JC, Mattison JA, et al. Extending the lifespan of long-lived mice. *Nature* 2001; 414: 412.
- 2) Bonkowski MS, Rocha JS, Masternak MM, et al. Targeted disruption of growth hormone receptor interferes with the beneficial actions of calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 7901—7905.
- 3) Bruss MD, Khambatta CF, Ruby MA, et al. Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298:

- E108—116.
- 4) Chiu CH, Lin WD, Huang SY, et al. Effect of a C/EBP gene replacement on mitochondrial biogenesis in fat cells. *Genes Dev* 2004; 18: 1970—1975.
- 5) Chujo Y, Fujii N, Okita N, et al. 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)* 2013; 35: 1143—1156.
- 6) Guarente L. Mitochondria — a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell* 2008; 132: 171—176.
- 7) Hancock CR, Han DH, Higashida K, et al. Does calorie restriction induce mitochondrial biogenesis? A reevaluation. *FASEB J* 2011; 25: 785—791.
- 8) Higami Y, Yamaza H, Shimokawa I. Laboratory findings of calorie restriction in rodents and primates. *Adv Clin Chem* 2005; 39: 211—237.
- 9) Holliday R. Food, reproduction and longevity: is the extended lifespan of calorie-restricted animals an evolutionary adaptation? *Bioessays* 1989; 10: 125—127.
- 10) Masternak MM, Bartke A, Wang F, et al. Metabolic effects of intra-abdominal fat in GHRKO mice. *Aging Cell* 2012; 11: 73—81.
- 11) 道下(來生)江利子. サーチュインと老化. *基礎老化研究* 2013; 37: 1—6.
- 12) Nisoli E, Tonello C, Cardile A, et al. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 2005; 310: 314—317.
- 13) Okita N, Hayashida Y, Kojima Y, et al. Differential responses of white adipose tissue and brown adipose tissue to calorie restriction in rats. *Mech Ageing Dev* 2012; 133: 255—266.
- 14) Otabe S, Yuan X, Fukutani T, et al. 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* 2007; 293: E210—218.
- 15) Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 85—97.
- 16) Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, et al. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 2005; 308: 1909—1911.
- 17) Shimokawa I, Chiba T, Yamaza H, et al. Longevity genes: insights from calorie restriction and genetic longevity models. *Mol Cells* 2008; 26: 427—435.
- 18) Shimokawa I, Higami Y, Tsuchiya T, et al. Life span extension by reduction of the growth hormone-insulin-like growth factor-1 axis: relation to calorie restriction. *FASEB J* 2003; 17: 1108—1109.
- 19) Yu BP. *Modulation of aging processes by dietary restriction*. CRC: Boca Raton: 1994.

Abstract

Anti-aging and pro-longevity effects of caloric restriction

—Remodeling of white adipose tissue and activation of lipid metabolism—

Yuka Sudo, Naoyuki Okita and Yoshikazu Higami

Molecular Pathology and Metabolic Disease, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science,
Chiba 278-8510, Japan

Caloric restriction (CR) can extend both mean and maximum lifespans, and delay the onset of several age-related patho-physiological changes. It has been suggested that the beneficial actions of CR may be involved in several adaptive responses against food shortage including suppression of growth hormone (GH) /insulin like growth factor 1 (IGF-1) signaling, reduced oxidative stress, activation of sirtuin and enhanced mitochondrial biogenesis. However, the exact underlying mechanisms are still debatable. Recently, we found that CR promotes metabolic remodeling with the activation of *de novo* fatty acid biosynthesis, mitochondrial biogenesis and reduced oxidative stress in the adipose tissue via sterol regulatory element binding protein (SREBP) 1c, a master transcriptional factor of fatty acid biosynthesis. Our findings suggest that SREBP1c might play an important role in the anti-aging and pro-longevity actions of CR in the GH/IGF-1-independent manner.

(The Autonomic Nervous System, 50: 192 ~ 195, 2013)



Inhibitory effect of p53 on mitochondrial content and function during adipogenesis

Naoyuki Okita^{a,b,1,*}, Natsumi Ishikawa^{a,1}, Yuhei Mizunoe^a, Misako Oku^a, Wataru Nagai^a, Yuki Suzuki^a, Shingo Matsushima^a, Kentaro Mikami^a, Hitoshi Okado^a, Takashi Sasaki^{b,c}, Yoshikazu Higami^{a,*}

^aLaboratory of Molecular Pathology and Metabolic Disease, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda-shi, Chiba 278-0022, Japan

^bDepartment of Internal Medicine Research, Sasaki Institute, Sasaki Foundation, 2-2 Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan

^cDivision of Translational and Molecular Medicine, Research Center for Medical Sciences, The Jikei University School of Medicine, 163-1 Kashiwashita, Kashiwa-shi, Chiba 277-8567, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 February 2014

Available online 21 February 2014

Keywords:

p53

Ppargc1a

Adipogenesis

Mitochondrial biogenesis

ABSTRACT

The p53 protein is known as a guardian of the genome and is involved in energy metabolism. Since the metabolic system is uniquely regulated in each tissue, we have anticipated that p53 also would play differential roles in each tissue. In this study, we focused on the functions of p53 in white adipose tissue (adipocytes) and skeletal muscle (myotubes), which are important peripheral tissues involved in energy metabolism. We found that in 3T3-L1 preadipocytes, but not in C2C12 myoblasts, p53 stabilization or overexpression downregulates the expression of *Ppargc1a*, a master regulator of mitochondrial biogenesis. Next, by using p53-knockdown C2C12 myotubes or 3T3-L1 preadipocytes, we further examined the relationship between p53 and mitochondrial regulation. In C2C12 myoblasts, p53 knockdown did not significantly affect *Ppargc1a* expression and mtDNA, but did suppress differentiation to myotubes, as previously reported. However, in 3T3-L1 preadipocytes and mouse embryonic fibroblasts, p53 downregulation enhanced both differentiation into adipocytes and mitochondrial DNA content. Furthermore, p53-depleted 3T3-L1 cells showed increase in mitochondrial proteins and enhancement of both Citrate Synthase and Complex IV activities during adipogenesis. These results show that p53 differentially regulates cell differentiation and mitochondrial biogenesis between adipocytes and myotubes, and provide evidence that p53 is an inhibitory factor of mitochondrial regulation in adipocyte lineage.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Tumor suppressor p53, which is known as a genome guardian that functions in various intrinsic and extrinsic stresses, is one such protein [1]. Under stress conditions, p53 is stabilized and activated via post-translational modifications such as phosphorylation and acetylation, whereas under non-stress conditions, p53 protein is maintained at low levels by proteasomal degradation via ubiquitination involving ubiquitin E3 ligases such as MDM2 [1]. In the last decade, diverse physiological functions of p53 have been reported. Regulation of metabolic pathways such as glycolysis, oxidative

phosphorylation, and fatty acid oxidation are among these functions of p53 [2]. Furthermore it has been shown that p53 regulates mitochondrial function, which is closely involved in metabolic regulation [3,4]. An important regulatory system of mitochondrial function is mitochondrial biogenesis. In most cases, mitochondrial biogenesis is organized by a transcriptional coactivator PGC1 α , which is a protein product of *Ppargc1a* and upregulates nuclear genes encoding mitochondrial proteins via enhancement of mRNA expression of transcriptional factors such as NRF1 and NRF2 [5]. It has been reported previously that p53 positively or negatively regulates *Ppargc1a* expression according to each tissue or cell type [6–9]. Furthermore, it has been reported that p53 deficient fibroblasts show low mtDNA copy number [10], and p53 accumulation in neonatal cardiomyocytes leads to mitochondrial impairment [8]. Thus, although there are emerging evidences for links between p53 and mitochondrial biogenesis, the distinct physiological roles in each tissue type remain unclear.

Control of cell differentiation is also regarded as one of the diverse physiological functions of p53. For example, it was recently

* Corresponding authors at: Department of Internal Medicine Research, Sasaki Institute, Sasaki Foundation, 2-2 Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan (N. Okita), Laboratory of Molecular Pathology and Metabolic Disease, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda-shi, Chiba 278-0022, Japan (Y. Higami).

E-mail addresses: okita@po.kyoundo.jp, nmsokita@gmail.com (N. Okita), higami@rs.noda.tus.ac.jp (Y. Higami).

¹ These authors contributed equally to this work.

reported that in the process of reprogramming differentiated cells into induced pluripotent stem cells, p53 functions as a barrier to dedifferentiation [11]. Also, in the field of cell differentiation, roles for p53 in adipogenesis and myogenesis have been reported. mouse embryonic fibroblasts (MEFs) or bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) derived from p53 knockout (KO) mice and p53 knockdown 3T3-L1 preadipocytes differentiate into adipocytes more efficiently than p53 proficient cells [12–14]. In C2C12 myoblasts p53 knockdown or p53 mutant expression inhibits differentiation to myotubes [12,15,16]. Thus, the roles of p53 in cell differentiation differ according to cell types.

Investigation of individual tissues involved in energy metabolism appeared to be important to elucidate the diversity of the metabolic roles of p53 in energy metabolism within the whole body. Therefore in this study, we selected adipose tissue and skeletal muscle, which are peripheral metabolic tissues, as the target tissues. Adipose tissue, which is mainly composed of adipocytes, functions as an organ for energy storage and release *via* lipid metabolism. Skeletal muscle, which is mainly composed of myotubes, plays a central role for basal metabolism in the whole body. Using 3T3-L1 preadipocytes and MEFs as the origin cells of adipocytes and C2C12 myoblasts as the origin cells of myotubes, we found that p53 has a differential contribution to mitochondrial biogenesis and cell differentiation in each cell type. Our results imply that p53 is a key factor that reflects on tissue-specific diversity in metabolism.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines and drugs

3T3-L1 preadipocytes were purchased from RIKEN Bioresource Center (Ibaraki, Japan) and 3T3-L1/shGFP and 3T3-L1/shp53 preadipocytes were previously established by our laboratory using a retrovirus system [17,18]. Primary mouse embryonic fibroblasts (MEFs) derived from p53 WT and p53 KO mice (RIKEN Bioresource Center) were established as previously reported by our laboratory [19]. C2C12 myoblasts were kindly provided by Dr. Kazuhiro Shigemoto. C2C12/shGFP and C2C12/shp53 myoblasts were established as the same retroviral systems used for 3T3-L1/shGFP and 3T3-L1/shp53. Nutlin-3a was supplied by Cayman (MI, USA).

2.2. Cell culture and differentiation

3T3-L1 preadipocytes were maintained in DMEM (low glucose) (Wako Pure Chemical; Osaka, Japan) with 10% fetal calf serum (FCS) (Bovogen Biologicals; Victoria, Australia) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma; MO, USA). MEFs were grown in DMEM (high glucose) (Wako Pure Chemical) with 10% FCS, 0.1 mM 2-mercaptoethanol, and 1% penicillin/streptomycin. Differentiation of 3T3-L1 preadipocytes or MEFs to adipocytes was performed as previously reported by our laboratory [18]. C2C12 myoblasts were maintained in DMEM high glucose supplemented with 10% FCS and antibiotics. Differentiation of C2C12 myoblasts to myotubes was performed using horse serum essentially as previously reported [20].

2.3. Western blotting

Western blotting was performed as previously reported by our laboratory [18,19,21] with the following primary antibodies: anti-p53 monoclonal antibody (clone Ab-1; Calbiochem; CA, USA), anti- β actin monoclonal antibody (clone AC-15; Sigma), or anti- α tubulin monoclonal antibody (clone DM1A; Sigma), anti-PPAR γ polyclonal antibody (E-8; Santa Cruz Biotechnology; CA,

USA), anti-FABP4 polyclonal antibody (Cayman), anti-COXIV polyclonal antibody (Cell Signaling Technology; MA USA), anti-TOM20 (clone 4S3; Sigma).

2.4. Oil Red O staining

Oil Red O staining was performed as previously reported by our laboratory [18,19]. The stained cells were observed by a BIOREVO BZ-9000 microscope (Keyence; Osaka, Japan).

2.5. RNA purification and RT-PCR

RNA purification and RT-PCR were performed essentially as previously reported by our laboratory [19,21]. Total RNA was extracted from cells using RNAiso PLUS (TaKaRa; Shiga, Japan) and purified with a FastPure RNA kit (TaKaRa) according to the manufacturer's protocol. The purified RNA was subjected to reverse transcription with PrimeScript Reverse Transcriptase (TaKaRa) and random hexamer (TaKaRa). The semi-quantitative RT-PCR was performed using Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). Quantitative RT-PCR was performed using the Applied Biosystems 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems; CA, USA) and SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa) according to the manufacturer's protocol. The sequences of primers used for RT-PCR are shown in Table 1.

2.6. Mitochondrial DNA (mtDNA) content

mtDNA content was evaluated essentially as previously reported by our laboratory [21]. Briefly, extracted total DNA was subjected to real-time PCR using COXII primers (forward, 5'-CCATCCCAGGCCGACTAA-3'; reverse, 5'-AATTCAGAGCAITGGC-CATAGA-3') or β -Globin primers (forward, 5'-ATCCAGTTACAAGG-CAGCT-3'; reverse, 5'-GGGAAACATAGACAGGG-3'). The relative mitochondrial copy number is represented by the ratio of COXII encoded in mtDNA to β -Globin encoded in genomic DNA.

2.7. Citrate synthase (CS) and Complex IV activity

To prepare cell lysates for the measurement of mitochondrial activity, 3T3-L1/shGFP and 3T3-L1/shp53 were homogenized in homogenization buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% phosphatase inhibitor cocktail, 5 mM EDTA, 1% protease inhibitor cocktail, 1% NP-40 and 0.05% sodium deoxycholate. Protein concentration was determined using the BCA protein assay kit (Thermo Scientific; IL, USA) according to the manufacturer's protocol.

CS activity was measured by monitoring color development of thio-bis-(2-nitrobenzoic) acid (TNB) generated from reduction of 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) by CoA-SH, the by-product of citrate, as previously reported [21]. Briefly, cell lysates were added to reaction mixtures containing 0.1 mM DTNB, 0.5 mM acetyl-CoA, 0.1% Triton X-100 and 100 mM Tris-HCl, pH 8.0. After incubation at 25 °C for 5 min, reactions were then initiated by the addition of 0.5 mM oxaloacetate in a final volume of 200 μ L, and the change in absorbance at 412 nm was recorded for at least 3 min using ARVO MX/Light Wallac 1420 Multilabel/Luminescence Counter (PerkinElmer; MA, USA).

Complex IV activity was measured by monitoring the change in absorbance at 550 nm of cytochrome *c* by oxidation as previously reported [21]. Briefly, reactions were initiated by adding cell homogenates to the reaction mixture containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.2, and 25 μ M reduced cytochrome *c*. The absorbance at 550 nm (at 30 °C) was measured using EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer). The first order rate constant (*k*) was calculated from

Table 1
Sequences of primers used in RT-PCR.

Gene	Forward sequence	Reverse sequence
Actb	5'-TCITTTGCAGCTCCTTCGTTG-3'	5'-GGCCTCGTCACCCACATAG-3'
Fabp4	5'-TCGATGATTACATGAAAGAAGTGG-3'	5'-CGCCCAGTTTGAAGGAAATC-3'
Gusb	5'-CCAGAGCGAGTATGGAGCAGAC-3'	5'-GGTGACTGGTTCGTCATGAAGTC-3'
Myod	5'-CTGCTCTGATGGCATGATGG-3'	5'-TATGCTGGACAGGCAGTCG-3'
Myog	5'-ATCCAGTACATTGAGCGCTAC-3'	5'-TGCCACGATGGACGTAAGG-3'
p21	5'-AGTACTTCCTCTGCCTGCTG-3'	5'-GCGCTTGGAGTGATAGAAATCTG-3'
p53	5'-TAAAGGATGCCCATGCTACAG-3'	5'-GACCGGGAGGATTGTGTCTC-3'
Pgc1a	5'-AGACGGATTGCCCTCATTG-3'	5'-CAGGGTTTGTCTGATCCTGTG-3'
Pparg	5'-CACAAATGCCATCAGGTTTGG-3'	5'-GCGGGGAGGACTTTATGTATGAG-3'
Rps18	5'-TGCAGTACTCAACACCAACAT-3'	5'-CTTTCCTCAACACCAACATGAGC-3'
Tbp	5'-CAGTACAGCAATCAACATCTCAGC-3'	5'-CAAGTTTACAGCCAAGATTCCAGC-3'

the natural logarithms of the absorbance after the addition of cell homogenates.

2.8. Statistical analysis

All statistical analyses (Student's *t*-test with or without Bonferroni correction) were performed using R software (R project for Statistical Computing). Differences with *p* values <0.05 were deemed statistically significant.

3. Results

3.1. Distinct effects of p53 on Ppargc1a expression in 3T3-L1 preadipocytes and C2C12 myoblasts

By using Nutlin-3a, which is a chemical inhibitor of MDM2 E3 ligase [22,23], when examining metabolic regulation by DNA damage-independent p53 stabilization in adipocytes and myotubes, we obtained interesting results. In both C2C12 myoblasts (Fig. 1A, left panel) and 3T3-L1 preadipocytes (Fig. 1B, left panel) Nutlin-3a induced p53 protein accumulation and p21 mRNA expression in a dose dependent manner. Interestingly, in 3T3-L1 preadipocytes (Fig. 1B, right panel) but not in C2C12 myotubes (Fig. 1A, right panel), *Ppargc1a* expression was decreased in a dose dependent manner. To exclude side-effects of Nutlin-3a, we examined whether p53 exogenous overexpression decreases *Ppargc1a* expression. Consistent with Nutlin-3a treatment, p53 overexpression in 3T3-L1 preadipocytes (Fig. 1D) but not C2C12 myoblasts (Fig. 1C) reduced *Ppargc1a* expression significantly. Next, to investigate the effects of p53 downregulation on *Ppargc1a* expression, we used p53-knockdown (KD) C2C12 myoblasts and 3T3-L1 preadipocytes (Fig. 1E and F, left panel). As shown in Fig. 1E and F, no significant change of *Ppargc1a* expression occurred in either of the cell lines. In these experimental conditions, although we analyzed the protein levels of PGC1 α , a protein product of *Ppargc1a*, by Western blotting using two commercially available anti-PGC1 α antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Cat. No. sc-13067 and Merk-Millipore, Cat. No. ST1202-1SET), we were not, unfortunately, able to detect any specific signals (data not shown). These results indicate that, p53 up-regulation in 3T3-L1 preadipocytes but not C2C12 myoblasts reduces *Ppargc1a* expression.

3.2. Effects of p53 downregulation on Ppargc1a expression and mtDNA content in myotubes differentiated from C2C12 myoblasts

Previous studies have suggested that p53 plays a positive regulatory role in mitochondrial regulation in skeletal muscle and myotubes [6,24]. However, our data indicated that, at least in C2C12 myoblasts, which were established from skeletal muscle [25], p53 may play an opposing role (Fig. 1). We therefore sought to

investigate the involvement of p53 in mitochondrial regulation in myotubes differentiated from myoblasts (Fig. 2). Several studies have shown that p53 positively regulates differentiation of C2C12 myoblasts into myotubes [12,15,16]. Consistent with the previous studies, p53 knockdown inhibited multinucleated myotube formation slightly (Fig. 2A) and tended to reduce the mRNA expression of differentiation markers (*Myog* and *Myod*) during myogenesis compared with control cells (data not shown). Interestingly, we found that *Ppargc1a* expression (Fig. 2B) and mtDNA content (Fig. 2C) were not affected by p53 downregulation, even in myotubes. These results indicate that p53 does not affect mitochondrial regulation in myotubes, although differentiation of C2C12 myoblasts to myotubes is suppressed by p53 knockdown.

3.3. Effects of p53 downregulation on Ppargc1a expression and mtDNA content in adipocytes derived from 3T3-L1 preadipocytes and MEFs

As shown in Fig. 1, it seemed to suggest that p53 is a negative regulator of mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. Because previous studies have reported that mitochondrial biogenesis is upregulated during adipogenesis of 3T3-L1 preadipocytes [26,27], we sought to confirm the effects of p53 knockdown on signs of mitochondrial biogenesis during adipogenesis. The results of Oil Red O staining showed that p53 KD leads to efficient accumulation of lipid droplets (Fig. 3A). Consistent with this result, the mRNA expressions of adipogenesis markers (*Pparg* and *Fabp4*) during differentiation of 3T3-L1/shp53 preadipocytes to adipocytes tended to increase compared with control (data not shown). Similar to the result in preadipocytes (Fig. 1), we found that p53-knockdown mature adipocytes have significantly increased *Ppargc1a* expression (Fig. 3B). Interestingly, since Day 8, mtDNA content in p53-knockdown cells significantly increased compared with those in mock cells (Fig. 3C). Furthermore we quantitatively analyzed protein levels of PPAR γ 2 (a form of PPAR γ protein responsible for adipogenesis) [28] and FABP4, which are protein products of *Pparg* and *Fabp4*, respectively. As shown in Fig. 3D, the protein levels of both PPAR γ 2 and FABP4 in 3T3-L1/shp53 cells at Day 8 of adipocyte differentiation are significantly higher than in the control. These results are consistent with a previous finding that p53 downregulation promotes adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes [14]. Since p53 downregulation in 3T3-L1 adipocyte-committed cells leads to the enhancement of adipogenesis and increase in mtDNA content, we analyzed whether the similar results were obtained in p53-deficient MEFs, adipocyte-uncommitted cells. Primary MEFs from p53 WT mice and p53 KO mice were differentiated into adipocytes. Oil Red O staining of the differentiated MEFs revealed that adipocytes from p53 KO MEFs accumulated more lipid droplets compared with those from p53 WT MEFs (Fig. 3E). Furthermore, as shown in Supplemental Fig. 1, the mRNA levels of adipocyte differentiation