

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790232

研究課題名(和文) 摂食調節における p62、Nbr1 の分子機能の解明

研究課題名(英文) Role of p62 and Nbr1 in regulation of food intake regulation

研究代表者

藤 栄治 (Warabi, Eiji)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70396612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000 円、(間接経費) 1,050,000 円

研究成果の概要(和文)：互いに類似したドメイン構造を持つタンパク質 p62 と Nbr1 は、ともにタンパク質分解系オートファジーにより選択的に分解される基質として見出されている。これまでの解析の結果、p62 は中枢神経で摂食行動を制御する重要な役割を担っており、その欠損により個体は過食、肥満を引き起こすことを明らかとした。しかし、Nbr1 の生理機能はほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、Nbr1 の役割について、p62 との相違を明らかにし、その生理機能を解明することを目的とした。Nbr1 は p38 のタンパク質量を調節しており、その欠損により細胞増殖速度の低下が引き起こされることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Though Nbr1 is known to have similar domain structure as p62, the physiological function has been uncovered. In this study, we aimed to examine the Nbr1 function. We used WT and p62-KO mice to establish WT, p62-KO, WT:Nbr1-KD, p62-KO:Nbr1KD MEFs (mouse embryonic fibroblast). We found the cell growth ratio in WT:Nbr1-KD cells are significantly slower than the other cells. Because total- and phosphorylated-p38 levels were decreased, we speculated Nbr1 has a role to regulate p38 protein level, and Nbr1 deficiency results in the decrease in cell growth ratio.

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：摂食調節 オートファジー レプチン

1. 研究開始当初の背景

Nbr1(neighbor of BRCA1)、p62 は互いに非常に類似したドメイン構造を持っている。近年、栄養飢餓時、あるいは神経変成疾患において神経細胞内に認められる異常タンパク質の蓄積過程に、タンパク質分解系「オートファジー」の重要性が明らかとなってきている。オートファジーは、細胞内にオートファゴソーム膜が形成され、これがリソソームと融合することによりオートファゴソーム内に含まれるタンパク質、細胞小器官などを分解する経路である。申請者らの研究により、p62 はオートファゴソーム膜形成の際に必須なタンパク質 LC3 と直接結合し、オートファジーにより選択的に分解されるタンパク質であることが明らかになった(Cell, 2007)。

さらに、申請者らが作製した p62 ノックアウト(KO)マウスは、驚くことに過食に伴う著しい肥満症、脂肪肝やインスリン抵抗性等のメタボリックシンドロームを呈することを発見した。代表者らによるそのメカニズムの詳細な研究から、p62 は中枢視床下部神経細胞において摂食抑制ホルモンであるレプチンの作用に関与するタンパク質であることを明らかにした。そのメカニズムとして、p62 はレプチンの神経細胞内シグナル伝達における転写因子 Stat3 の核移行およびその量的制御に重要な役割を果たしていることを見出した。すなわち、p62 欠損マウスはレプチンシグナル伝達に異常があり、レプチンによる摂食抑制が起きにくいために過食、肥満を呈すると考えられた。これらのことから、p62 は中枢において摂食行動を制御する新しい因子であることが明らかになった。

一方、Nbr1 の機能については不明な点が多く、共通の理解が得られていない。しかしながら、ドメイン構造、および同定されている相互作用タンパク質から、p62 とオーバーラップしているものと推測される。興味深いことに、申請者はマウスの視床下部神経細胞が Nbr1 と p62 をともに発現していることを見出している。さらに、両者タンパク質は PB1 ドメインを介して互いにヘテロダイマーを形成することが報告されている(Mol Cell, 2009)。これらの知見は、Nbr1 と p62 は互いに機能的相補、調節関係にあることを示唆している。

そこで本研究は、Nbr1 は p62 と同様に中枢神経系において摂食行動を制御する役割を持っていると予想し、その可能性を詳細に検討することで、摂食調節機構の更なる理解、

さらには肥満病態を基盤とするメタボリックシンドロームの予防、治療標的に繋がると考え、着想に至った。

2. 研究の目的

p62 と Nbr1 の生理的機能、およびその相違を細胞増殖に着目して解明する。

3. 研究の方法

WT、p62-KO マウスより単離したマウス胎児由来線維芽細胞(MEF)のそれぞれの Nbr1 をノックダウンさせた細胞を作成した。これらの細胞における細胞増殖、死細胞数の測定、細胞周期の解析を MTT 法、LDH 法、FACS により行い、随時ウエスタンブロット、リアルタイム PCR による解析を加えた。

4. 研究成果

(1)Nbr1 siRNA 導入による Nbr1 ノックダウンの効果

Nbr1 siRNA を導入した MEF の WT 細胞で Nbr1 がノックダウンされるかをウエスタンブロットティング法、Real-time PCR 法を用いて確認した。その結果、Nbr1 が効率よくノックダウンされることを確認した。また、その効果は siRNA 導入から少なくとも5日間は続くことを確かめた。

(2)0%血清含有培養液での WT、p62-KO 細胞とそれぞれの Nbr1-KD の増殖速度の比較

p62-KO 大動脈血管平滑筋細胞では、増殖能が WT 細胞に比べ著しく亢進していることが見出されている。そこで、MEF の WT、WT:Nbr1-KD、p62-KO、p62-KO:Nbr1-KD 細胞の4種類を用いて 10%血清含有培養液で培養し細胞増殖の比較を行った。

24 well plate に WT、p62-KO 細胞を 0.8×10^4 cells/well 播種し 24 時間後 siRNA を用いて Nbr1 を KD した。siRNA を添加した日を1日目とし、その日から5日間、24時間毎に細胞数を測定した。その結果、WT:Nbr1-KD は WT に比べ増殖速度が顕著に減少した。一方 p62-KO:Nbr1-KD 細胞は p62-KO と有意な差が見られなかった。

(3)フローサイトメトリーによる WT と WT:Nbr1-KD 細胞の細胞周期の解析

WT:Nbr1-KD 細胞の増殖速度を検討した結果、WT:Nbr1-KD 細胞は WT 細胞に比べ増殖速度が顕著に減少することが明らかとなった。

そこで、この増殖速度の減少はセルサイクルの停止によるものか、細胞周期をフローサイトメトリーで解析することにより検討した。

その結果、WT 細胞と WT:Nbr1-KD 細胞を比較すると、G0/G1 期、S 期、G2/M 期の細胞分布に有意な差は認められなかった。

(4)Nbr1-KD による死細胞率の変化

死細胞により培養液中に放出される LDH を測定することにより Nbr1-KD による死細胞率の変化を検討した。

その結果、Nbr1 ノックダウン 2 日後に WT:Nbr1-KD 細胞は WT 細胞に比べ死細胞率が大きく増加することが明らかとなった。一方で p62-KO 細胞と p62-KO:Nbr1-KD 細胞には死細胞率の差がなかった。

またこの実験では培養液に添加した血清中の LDH による影響を抑えるため、siRNA 添加後は 1%血清の培養液で培養した。

(5)Nbr1-KD による細胞内リン酸化 p38 と総 p38 のレベルの変化

p62-KO 血管平滑筋細胞 (VSMC) の増殖は野生型 VSMC に比べて著しく亢進していることが見出されている。この現象は、血清および増殖因子によって誘導され、増殖シグナルの下流にあるリン酸化 p38 の亢進により起こることを示唆しており p62 は細胞内で p38MAPK の抑制に関与する因子であると考えられる。そこで Nbr1 をノックダウンした細胞で総 p38 とリン酸化 p38 が変化しているのか調べた。その結果、WT:Nbr1-KD 細胞では総 p38 の減少を示した。さらに、リン酸化 p38 はより顕著な減少を示した。この傾向は p62-KO:Nbr1-KD 細胞においても同様に見られた。

(6)p62-KO 細胞における Src と STAT3 のレベルの変化

ウエスタンブロッティング法による比較により、p62-KO 細胞と p62-KO:Nbr1-KD 細胞でのリン酸化 Src、Total-Src、リン酸化 STAT3、STAT3 の発現レベルの増加が見られた。

(7)Nbr1-KD と p62-KO による p38 、 、 、 の転写量の変化

Nbr1 をノックダウン後 3 日目における p38 の mRNA 発現量を定量した。Nbr1 を KD したものは p38 、 、 、 全てで転写量が減少したが、特に 、 の減少が顕著であった。

また p62-KO により p38 の転写量が顕著に増加し、逆に 、 が顕著に低下した。

以上のことから、Nbr1 は細胞増殖速度の促進に関与していることが明らかとなり、p62 は抑制に関与していることが確認された。この 2 つの因子は構造類似体であるがその増殖における機能は拮抗的に作用していることが推測された。Nbr1 はネクローシスを抑制する作用があることも示唆され、WT:Nbr1-KD 細胞における増殖速度の低下はネクローシスの増加が原因の一つとも考えられた。また、Nbr1 と p62 は p38 , Src , STAT3 などの発現調節に影響を与えるが、その調節機能は両者で異なっていることが示唆された。特に Nbr1 は p38 を転写レベルで制御しており、WT:Nbr1-KD 細胞の増殖速度低下は p38 の転写量の低下が原因の一つとも考えられた。しかし、p38 タンパク質の低下は未確認のためウエスタンブロッティング等で確認する必要があり、同様にリン酸化 p38 の確認も今後の課題である。また今回の研究から、p38 を増減、活性化する経路のどこに Nbr1 が関与しているかを明らかにするには至らなかった。今後の研究課題として、Nbr1 と p38 の直接的な関係性、またその上流に位置する MAPKK や MAPKKK との関係性を調べる必要がある。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件) 査読あり

Harada H, Warabi E, Matsuki T, Yanagawa T, Okada K, Uwayama J, Ikeda A, Nakaso K, Kirii K, Noguchi N, Bukawa H, Siow RC, Mann GE, Shoda J, Ishii T and Sakurai T. Deficiency of p62/Sequestosome 1 causes hyperphagia due to leptin resistance in the brain. J Neurosci., 33, 14767-14777. 2013 doi: 10.1523/JNEUROSCI.2954-12.2013

[学会発表] (計 14 件)

1. Eiji Warabi, Kentaro Akiyama, Junichi Shoda and Tetsuro Ishii. Obesity in p62-KO mice is prevented by estradiol.

- The Environmental Response, 2014.2.28, Sendai
2. 藤 栄治、石井哲郎、正田純一. p62/Sqstm1 欠損は中枢におけるレプチン抵抗性により過食を引き起こす. 第 8 回臨床ストレス応答学会 2013.11.15、松本
 3. 藤 栄治、秋山健太郎、正田純一. p62:Nrf2 遺伝子二重欠損マウスは過食により NASH を自然発症する. JDDW 2013.10.9、東京
 4. 秋山健太郎、岡田浩介、正田純一、藤 栄治. p62:Nrf2 遺伝子二重欠損マウスは脂肪性肝炎を自然発症する. 第 68 回日本生化学会 2013.9.11、横浜
 5. Tetsuro Ishii, Eiji Warabi, Richard C.M. Siow and Giovanni E. Mann. Interaction of Sequestosome1/p62 with voltage-activated potassium channels in injury-induced arterial remodeling. IUPS2013, 2013.6.21, Birmingham, UK
 6. 藤 栄治、柳川徹、正田純一. p62/Sequestosome1 欠損によるメタボリックシンドローム発症機序の解析. 第 66 回日本酸化ストレス学会 2013.6.13、名古屋
 7. 秋山健太郎、正田純一、藤 栄治. 過食肥満により脂肪性肝炎を自然発症する p62:Nrf2 遺伝子二重欠損マウスの腸管病変とその病態的意義. 第 21 回肝病態生理研究会 2013.6.5、東京
 8. 秋山健太郎、正田純一、藤 栄治. 過食肥満により脂肪性肝炎を自然発症する p62:Nrf2 遺伝子二重欠損マウスの腸管病変とその病態的意義. 第 49 回日本肝臓学会 2013.6.6、東京
 9. 池田瑛、藤 栄治、正田純一. 脂肪性肝炎を自然発症する過食肥満マウスの腸管病変と病態的意義. 第 99 回日本消化器病学会総会 2013.3.21、鹿児島
 10. 藤 栄治、岡田浩介、正田純一. Nrf2 : p62 遺伝子二重欠損マウスは脂肪性肝炎を自然発症し、肝腫瘍を発生する JDDW 2012.10.10、神戸
 11. 藤 栄治、岡田浩介、徳重克年、橋本悦子、正田純一. Nrf2/p62 遺伝子二重欠損マウスは脂肪性肝炎を自然発症し、肝

- 腫瘍を発生する. 第 20 回肝病態生理研究会 2012.6.6、金沢
12. 藤 栄治、岡田浩介、徳重克年、橋本悦子、正田純一. Nrf2/p62 遺伝子二重欠損マウスは脂肪性肝炎を自然発症し、肝腫瘍を発生する. 第 48 回日本肝臓学会総会 2012.6.7、金沢
 13. Eiji Warabi, Airi Ueda, Tetsuro Ishii. Estradiol prevents obesity formation in Sqstm1/p62-KO mice. 16th SFRR1 Biennial Meeting, 2012.9.6, London, UK
 14. Sechang Oh, Eiji Warabi, Masayuki Yamamoto, Kiyoji Tanaka, Junichi Shoda. Nrf2 activation remarkably improves exercise endurance capacity in mice. 16th SFRR1 Biennial Meeting, 2012.9.6, London, UK

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤 栄治 (WARABI, Eiji)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号 : 70396612

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし