

機関番号 : 12102

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21790223

研究課題名 (和文) 摂食調節因子 A170 の分子機能解明と抗肥満標的としての可能性の追求

研究課題名 (英文) Study of molecular function of A170 as a factor for food intake regulation

研究代表者 藤 栄治 (WARABI EIJI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号 : 70396612

## 研究成果の概要 (和文) :

代表者はこれまでに、A170 ノックアウトマウスは過食となり、これに伴う肥満症、生活習慣病を通常食給餌下で呈すること、また A170 欠損マウス由来の繊維芽細胞は、MAP キナーゼの活性化が著しく亢進しており、これに起因する高い細胞増殖能、抗アポトーシスを有していることなどを明らかにしてきた。これらのことから A170 は個体内における摂食調節、脂肪細胞機能に関係していると考えられた。実際 A170 は視床下部に強い発現が認め、摂食調節に重要な神経細胞とオーバーラップしており、重要なことに A170 ノックアウトマウスでは摂食抑制ホルモンであるレプチンに対する感受性が著しく低下していた。本研究では、神経細胞内におけるレプチンシグナル伝達における A170 の役割の解析および中枢特異的な A170 コンディショナルノックアウトマウスの作製、表現型の解析を行い、摂食調節における A170 の役割、重要性を調べた。レプチンによる摂食抑制効果は、神経細胞内に存在するシグナル伝達因子である Stat3 の活性化、すなわちリン酸化とそれに続く核移行が必須であることがわかっているが、A170 欠損マウスはレプチン投与による Stat3 の核移行が野生型マウスと比べ著しく減弱していることが明らかとなり、A170 の摂食調節における分子機能として新たに Stat3 の制御に何らかの役割を果たしていることが示唆された。また、Nestin-Cre マウスと A170<sup>ox/fox</sup> マウスを掛け合わせるにより作製したマウスは、中枢神経細胞での A170 の発現の一部が抑制されたことを確認した。このマウスの体重は、一部で増加を認めたが、個体間の体重差が大きく、対照マウスとの明確な差を得ることは出来なかった。その原因として、Nestin-Cre 系による A170 遺伝子のノックアウトが不完全であり、必ずしも A170 が摂食調節に重要な役割を果たしている神経細胞全てで A170 の発現が抑制できた訳ではないことが原因として考えられる。

## 研究成果の概要 (英文) :

Deficiency of A170, a scaffold protein for aPKC, causes mature-onset obesity in mice, but the mechanisms of the abnormal weight gain are unclear. I found that hyperphagia is the major cause of obesity in A170-deficient (KO) mice. KO and wild-type mice exhibited the same energy expenditure, and food restriction reversed obesity and glucose intolerance in the KO mice. Although their feeding responses to intracerebroventricular administration of an anorexigenic  $\alpha$  MSH agonist and the orexigenic peptide NPY were normal, leptin did not induce anorexia, even in young, pre-obese KO mice. Immunohistochemical analyses revealed that A170 was normally expressed in leptin-responsive POMC- or NPY-expressing hypothalamic neurons. Importantly, although the leptin-induced phosphorylation of STAT3 on tyrosine was normal, the translocation of the phosphorylated STAT3 into the nucleus was defective in the KO hypothalamus. We propose that A170 is a novel regulator of leptin's anorectic signaling cascade in the central nervous system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

キーワード：摂食調節、メタボリックシンドローム、レプチン

1. 研究開始当初の背景

A170 は p62, sequestosome1, ZIP と呼ばれ、ヒト、マウス、ラット間で高い相同性を持って保存されている。この遺伝子のクローニングに最初に成功したのは申請者らのグループであるが、後に他の研究者からも報告された。ヒトにおいてはその変異が骨パジェット病の原因となることが報告されている。

A170 の機能については様々な報告があり、未だ統一的な理解には至っていないが、近年タンパク質分解経路オートファジーとの関連が注目されている。申請者らは 2007 年の Cell 誌にオートファジー不全が起こす凝集体形成、神経変性に A170 が重要な役割をしていることを報告した。この論文では、オートファジーの必須な因子である LC3 と A170 の相互作用を見出し、オートファジー不全状態において形成される細胞内異常タンパク質凝集体の形成、それに伴う細胞、組織レベルにおける機能障害に A170 が必須な機能を担っていること、さらに本来、バルク分解などのように非選択的な分解経路と考えられてきたオートファジー経路に、A170 を介したユビキチン化タンパク質の選択的分解経路が存在するという画期的な概念を示した。A170 は C 末端にユビキチン結合ドメインを持ち、この領域を介してタンパク質分解経路に関与しており、神経細胞や肝細胞内に生じる異常タンパク質の凝集体の形成に関わると考えられる。

また、A170 は細胞内に存在するアダプタータンパク質であり、TNF $\alpha$  シグナル伝達経路において TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) と結合し、NF- $\kappa$ B の活性化を仲介する分子であると報告されている (J. Biol. Chem., 2005)。また、神経成長因子 (NGF) の受容体 TrkA と結合し、そのシグナル伝達の正の制御因子であるという報告もある (Mol. Cell, 2005)。他にも、p38 MAPK との関連 (BBRC, 2006) や、ユビキチン-プロテアソーム系への関与 (J. Biol. Chem., 2008)

などがあり、A170 の機能は多岐にわたっていると考えられている。

以上の報告から共通して考えられることは、1) A170 は様々なシグナル伝達の scaffold タンパク質として機能すること、2) 細胞内タンパク質分解経路に関わること、であるが、申請者らは生体内における A170 が担う真の機能を明らかにするために、KO マウスを作製して表現型を解析するとともに、これまでの報告について検証した。その結果、A170 KO マウスには TNF $\alpha$  や NGF のシグナルには全く異常が見られなかった。しかし意外なことに、KO マウスは過食を起因とする肥満症を呈した。この表現型に関しては、Rodriguez らのグループからも報告されている (Cell Metab., 2006) が、彼らは MAPK の ERK の活性化亢進による脂肪細胞の分化促進と、基礎代謝量の低下が原因であると結論づけている。この結論について申請者は追試を行っているが、一部については否定的な結果を得ている。重要なことに、A170 KO マウスは、若齢時においてもレプチン投与による摂食抑制効果が見られなかった。すなわち、摂食調節の異常が肥満の主因であることが強く示唆される。

以上のことから、A170 の細胞内における機能は多岐であるが、個体においては中枢における摂食調節が本質的なものと考えられる。これを踏まえて、本研究ではこのメカニズムについてこれまでの研究成果に基づき、レプチンシグナル伝達調節における A170 の分子機能に焦点を当て明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では以上の知見に基づき、脳特異的 A170 欠損マウスの詳細な表現型解析、摂食抑制ホルモンレプチンの摂食抑制効果、レプチンによる神経細胞内シグナル伝達を解析し、過食、肥満形成に関わる A170 の分子機能について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

C57BL/6バックグラウンドの雄性A170欠損マウス、および野生型マウスを用いた。

(1) 中枢特異的 A170 欠損マウスの作製と表現型の解析

A170 遺伝子が loxP 配列で挟み込まれた flox/flox マウスと nestin-Cre トランスジェニックマウスと掛け合わせることで、脳特異的に A170 を欠損したマウスを得た。このマウスの中枢に行ける A170 の発現パターンの解析を行ない、体重増加量を継続的に解析した。

(2) A170 欠損マウスのレプチンに対する電気生理的な反応の解析

POMC-GFP マウスとの掛け合わせにより、A170+/+ : POMC-GFP あるいは A170-/- : POMC-GFP マウスを作製し、これらのマウスの POMC 神経におけるレプチンに対する電気生理学的応答をパッチクランプ法により神経した。

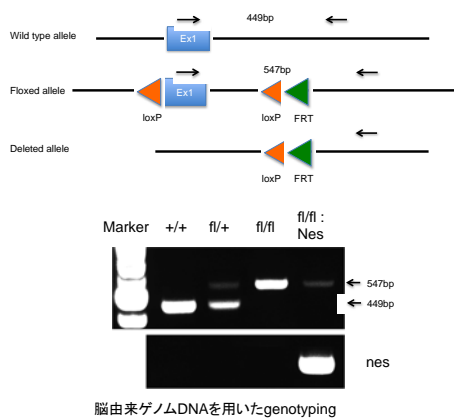
(3) A170 の欠損とレプチンによるシグナル伝達

レプチンを腹腔に投与し、一定時間後に脳を摘出して、病理切片を作製、抗 Stat3 抗体を用いて免疫染色を行なった。同様の脳検体を用いてリン酸化 Stat3 の検出をウエスタンブロットにより行なった。

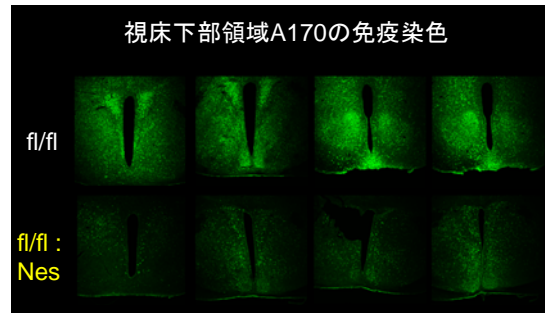
4. 研究成果

(1) 中枢特異的 A170 欠損マウスの作製と表現型の解析

下図のようなコンストラクトを作製し、Nestin-Cre マウスと掛け合わせることで中枢特異的 KO マウスを得た。それらの体重の増加を解析した結果、一部で増加を認めたが、個体間の体重差が大きく、対照マウスとの明確な差を得ることは出来なかった。免疫染色により、脳における A170 の発現の様子を解析したところ、その結果、WT と比べ発現量の低下が認められたが、かなりの神経細胞で発現が残存していたことから、欠損が

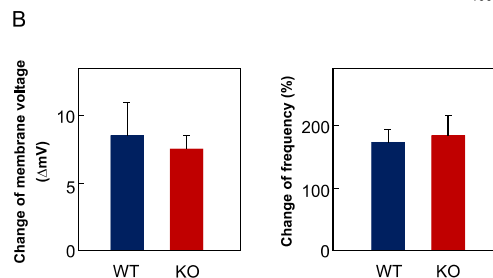
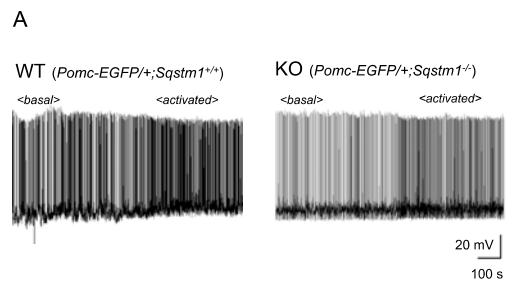


不十分であったためと考えられる。



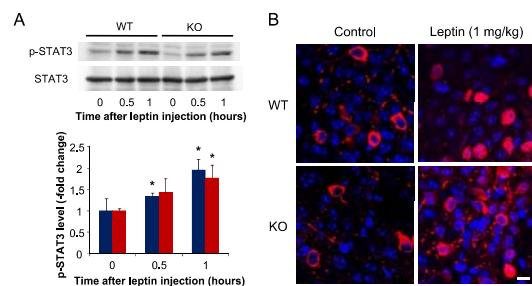
(2) A170 欠損マウスのレプチンに対する電気生理的な反応の解析

レプチン刺激による POMC 神経の電気生理的な活性化の程度は、マウス種間で同等であった。



(3) A170 の欠損とレプチンによるシグナル伝達

A170 KO マウスは、レプチンにより Stat3 のリン酸化は起きていると見られるが、免疫染色の結果から核への移行が阻害されていることが明らかになった。これにより、A170 は何らかのメカニズムで Stat3 の核移行に関与した因子であることが示唆された。



## 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)

- ① Tabuchi K, Oikawa K, Hoshino T, Nishimura B, Hayashi K, Yanagawa T, Warabi E, Ishii T, Tanaka S, Hara A., Cochlear protection from acoustic injury by inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase and sequestosome 1 stress protein. Neuroscience, 166, 665-670, 2010、査読有

[学会発表] (計11件)

- ① 上田愛里、蕨栄治、原田春美、柳川徹、仲田真理子、小川園子、石井哲郎 Sequestosome1 欠損マウスの肥満症に対するエストロゲンの作用第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学大会(合同大会) 平成22年12月10日 神戸
- ② 村田安弘、馬冬梅、岡田浩介、柳川徹、森戸直記、蕨栄治、石井哲郎 シスプラチン腎毒性におけるパーオキシレドキシニンIの役割 第5回臨床ストレス応答学会 平成22年11月19日 徳島市
- ③ 木村伸太郎、川内泰弘、蕨栄治、石井哲郎 UVB 誘導性アポトーシスに対する Sequestosome1/p62/A170 の役割 第5回臨床ストレス応答学会 平成22年11月19日 徳島市
- ④ 石井哲郎、柳川徹、蕨栄治 マクロファージの抗酸化ストレス応答—転写因子 Nrf2 と誘導タンパク質の役割第17回日本免疫毒性学会学術大会シンポジウム 平成22年9月9日 つくば市
- ⑤ E. Warabi, S. Sakai, T. Yanagawa, H. Harada, R. C. M. Siow, G. E. Mann and T. Ishii DEFICIENCY OF SEQUESTOSOME1/P62/A170 IN MICE IS ASSOCIATED WITH METABOLIC SYNDROME: (III) NON-DIPPER TYPE HYPERTENSION INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE PATHOPHYSIOLOGY OF REACTIVE OXYGEN AND NITROGEN SPECIES 2010年5月20日スペイン、サラマンカ
- ⑥ H. Harada, E. Warabi, T. Matsuki, K. Okada, T. Yanagawa, T. Sakurai and T. Ishii DEFICIENCY OF SEQUESTOSOME1/P62/A170 IN MICE IS ASSOCIATED WITH METABOLIC SYNDROME: (II) ENHANCED NEOINTIMAL HYPERPLASIA AND CAROTID ARTERY REMODELING INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE

PATHOPHYSIOLOGY OF REACTIVE OXYGEN AND NITROGEN SPECIES 2010年5月20日スペイン、サラマンカ

- ⑦ H. Harada, E. Warabi, T. Matsuki, K. Okada, T. Yanagawa, T. Sakurai and T. Ishii DEFICIENCY OF SEQUESTOSOME1/P62/A170 IN MICE IS ASSOCIATED WITH METABOLIC SYNDROME: (I) OBESITY FORMATION BY HYPERPHAGIA INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE PATHOPHYSIOLOGY OF REACTIVE OXYGEN AND NITROGEN SPECIES 2010年5月20日スペイン、サラマンカ
- ⑧ 蕨栄治、原田春美、松木大造、柳川徹、櫻井武、石井哲郎 Sequestosome1 欠損マウスにおけるメタボリックシンドローム発症メカニズム レドックス生命科学第170委員会 第22回研究会 平成22年3月19日 千里ライフサイエンスセンター
- ⑨ Harumi Harada, Eiji Warabi, Taizo Matsuki, Kosuke Okada, Toru Yanagawa, Takeshi Sakurai, Tetsuro Ishii A novel mechanism of leptin resistance in sequestosome1-deficient mice. The 4<sup>th</sup> annual meeting of the biomedical society for stress response (2009年10月6-9日、札幌)
- ⑩ Dong mei Ma, Eiji Warabi, Toru Yanagawa, Shintarou Kimura, Harumi Harada, Kenji Yamagata, Tetsuro Ishii Peroxiredoxin I protects cells against cisplatin cytotoxicity through mitogen activated kinase signals. The 4<sup>th</sup> annual meeting of the biomedical society for stress response (2009年10月6-9日、札幌)
- ⑪ 原田春美、蕨栄治、松木大造、岡田浩介、柳川徹、櫻井武、石井哲郎 レプチンによる摂食調節における SQSTM1 の機能 第14回アディポサイエンス研究会シンポジウム 2009年8月22日 千里阪急ホテル

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

蕨 栄治 (WARABI EIJI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師  
研究者番号：70396612