

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08293

研究課題名(和文) 糖尿病・肥満関連因子であるプロテインホスファターゼPPM1Lの分子基盤の解明

研究課題名(英文) Mechanism involved in resistance to diet-induced obesity observed in protein phosphatase PPM1L knockout mice.

研究代表者

小林 孝安 (Kobayashi, Takayasu)

東北大学・遺伝子実験センター・准教授

研究者番号：10221970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：プロテインホスファターゼ PPM1Lに関して、肥満症の原因遺伝子であるとの報告があるが、その分子メカニズムは明らかとなっていない。PPM1L遺伝子欠損(PPM1L-KO)マウスに、高脂肪食を摂取させたところ、WTと比較し高脂肪食誘導性の肥満に対する抵抗性が観察された。PPM1L-KOマウスでは、個体当たりの摂食量が減少しており、要因の一つとして神経系の異常の関与が示唆された。PPM1L-KOマウスの脳では、線条体および前交連の縮小が観察された。さらに分子レベルでの機能解明のため会合タンパク質の探索を試み、相互作用するタンパク質の候補として核膜表面に存在する分子を数多く同定した。

研究成果の概要(英文)：Obesity is major risk factor for diabetes and cardiovascular diseases. In an earlier study using quantitative trait loci (QTL) analysis in mice, protein phosphatase Ppm1l was identified as a gene connected to obesity and other metabolic syndrome traits (Chen et al, 2008), but the underlying mechanism remains unclear. PPM1L-KO mice were protected against high fat diet-induced obesity. This was partly due to diminished food intake. PPM1L-KO mice exhibit morphological abnormalities in the central nerve system including reduction of striatum, corpus callosum and anterior commissure, suggesting that defect of neural network in CNS may result in reduced appetite. Using recently described proximity-dependent biotin labeling (BioID) technique, a number of nuclear envelope associated proteins were identified as interacting partner of PPM1L.

研究分野：生化学

キーワード：プロテインホスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

肥満症は糖尿病，高脂血症，高血圧症などの生活習慣病に共通する要因であり，肥満の形成過程の解明は，これらの病気が重複して発症するメタボリックシンドロームの予防を考える上で重要である。糖尿病（2型糖尿病）は，遺伝的要因によるインスリン分泌不全と，肥満を主要な要因とするインスリン抵抗性が基盤となって発症するが，もともとインスリン分泌能が低い日本人は，わずかな肥満により惹起される軽度のインスリン抵抗性により，容易に糖尿病を発症しやすいという現実があり，肥満症の解消は日本人の健康問題において重要な課題であり続けている。

肥満症は1つの形質が複数の遺伝子座によって支配されている多因子性の疾患であるが，その原因遺伝子の同定のため，遺伝子型が異なる2種類の系統マウスから得た肝臓と脂肪細胞の遺伝子発現データを用いて量的形質座位(QTL)解析が行われた(Chen et al., 2008)。その結果，3種類の遺伝子，リポプロテインリパーゼ，ラクタマーゼ およびプロテインホスファターゼ PPM1L が，新規の肥満関連遺伝子として報告された。

これらの肥満関連遺伝子のうち，プロテインホスファターゼ PPM1L (protein phosphatase Mg²⁺/Mn²⁺-dependent 1L) は，ストレス応答シグナル伝達経路の制御因子として我々が初めて同定し，当初プロテインホスファターゼ 2C (PP2C) と命名したものである。その後，N末端に膜貫通ドメインを持つ小胞体膜タンパク質であることを見出し，小胞体・ゴルジ体間のセラミド輸送に関与することを報告した。

2. 研究の目的

以上の学術的背景を踏まえ，本研究ではプロテインホスファターゼ PPM1L の肥満形成における役割を検証し，その分子基盤を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PPM1L 遺伝子欠損マウス (以下 PPM1L-KO マウス) の高脂肪食負荷試験

6週齢の野生型マウスおよび PPM1L-KO マウスに通常食または高脂肪食を 16 週間投与して，経時的に体重を測定した。18 週齢時にインスリン抵抗性試験，グルコース負荷試験および血中生化学検査を実施した。同時に屠殺し，肝臓および脂肪組織の中性脂肪含量を測定した。

レプチン感受性は 9 週齢のマウスに，1 日 2 回，3 日間に渡ってレプチンを投与し，その間の摂食量と体重を測定することで検討した。

(2) PPM1L-KO マウスの組織学的解析

野生型および PPM1L-KO マウスを灌流固定後，脳を取り出しヘマトキシリン・エオジン染色 (HE) 染色および髄鞘タンパク質 (myelin basic protein, MBP) を用いた免疫組織染色

を行った。さらに，電子顕微鏡により大脳交連線維が走行する前交連の冠状断面の解析を行った。

(3) BioID 法による相互作用タンパクの検索

PPM1L の C 末に好熱細菌由来のビオチンリガーゼ BirA (DNA 結合や特異的なビオチン化をしない変異を導入済み) を融合させたプラスミドを作成し，HEK293 Flp-In 細胞における安定発現株を樹立した。培養液にドキシサイクリンを添加することで，融合タンパクを発現させた後，細胞抽出液よりストレプトアビジンビーズでビオチン化したタンパク質を回収した。SDS-PAGE によりタンパク質を分離し，質量分析 (LC-MS) でタンパク質を同定，解析を行った。

4. 研究成果

(1) PPM1L-KO マウスへの高脂肪食負荷試験

PPM1L-KO マウスに高脂肪食を摂取させたところ，WT マウスと比較し，高脂肪食誘導性の肥満に対する抵抗性が観察された (図 1)。また，糖負荷試験およびインスリン負荷試験を行った結果，高脂肪食を負荷した PPM1L-KO マウスでは，インスリン感受性が著しく改善されていることが確認された。さらに，PPM1L-KO マウスでは，血中代謝調節因子である，インスリンおよびレプチンの濃度の低下が観察された。PPM1L-KO マウスでは，個体当たりの摂食量が減少しており，肥満抵抗性の要因の一つとして，摂食量の低下が示唆された。

摂食量の調節において重要な機能を有するレプチンに対する感受性を検討したところ，PPM1L-KO マウスではレプチンに対する感受性が低下していることが明らかとなった。

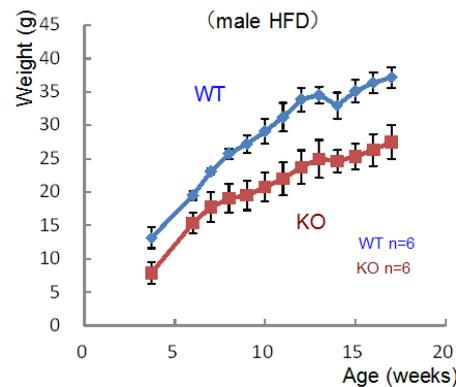


図1 PPM1L KOマウスは高脂肪食(HFD)誘導性の肥満に抵抗性を示す。
6週齢のマウス(WTおよびPPM1L-KO)に高脂肪食(HFD)を負荷し，体重の推移を観察した。

(2) PPM1L-KO マウスの組織学的解析

PPM1L は中枢神経系に高い発現がみられることから，遺伝子欠損が中枢神経系に何らかの変化をもたらす，摂食行動に影響を与えていることが考えられた。

そこで，PPM1L-KO と野生型マウスの神経構築を神経解剖学的に解析した結果，以下のよう

側脳室の拡大と大脳神経線維束の非薄化

PPM1L-KO の脳矢状断および冠状断切片に対して、HE 染色、MBP を指標とした免疫染色を施した結果、PPM1L-KO では線条体および前交連の縮小とそれに伴う脳室の著明な拡大が明らかになった(図 2)。一方、大脳皮質、小脳皮質および摂食調節で重要な働きを担う視床下部などの皮質層構造の明らかな異常は認められなかった。

PPM1L-KO の前交連における有髄神経線維の減少

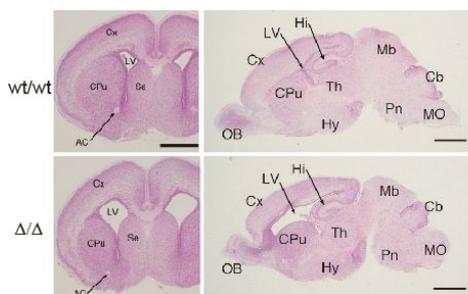


図2 PPM1L KOマウスで観察された脳の形態異常
PPM1Lの欠損により線条体および前交連が縮小し、側脳室が拡大した。AC(前交連)、Cb(小脳)、CC(脳梁)、CPu(尾状核被殻)、Cx(大脳皮質)、HC(海馬交連)、Hi(海馬)、Hy(視床下部)、LV(側脳室)、Mb(中脳)、MO(延髄)、Pn(橋(脳橋))、Th(視床)、

光学的顕微鏡レベルで検出された神経線維束の減少が、神経線維の減少あるいは髄鞘形成の障害のいずれに起因するかを明確にするため、大脳交連線維が走行する前交連の冠状断面に対する電子顕微鏡解析を行った。その結果、単面積あたりの髄鞘を持つ軸索の著明な減少が明らかになった。

(3)BioID法による新規 PPM1L 会合タンパク質の検索

タンパク質の機能を知る上で、そのタンパク質と相互作用するタンパク質の情報は非常に有用である。これまで、相互作用するタンパク質を同定する方法として、タグを付けたタンパク質を用いたプルダウンアッセイなどが用いられてきた。しかし、これらの方法では結合が弱いあるいは一過性であるタンパク質の同定は困難であった。それを改善する手法として、最近「近位依存性ビオチン標識」を用いたプルダウンアッセイ法(BioID法)が報告され、多くの新規会合タンパク質が同定・報告されている。本課題では、PPM1Lと好熱細菌由来のビオチンリガーゼ BirA の融合タンパク質を培養細胞中で発現させたときに細胞内でビオチン化されるタンパク質をストレプトアビジンビーズで回収し、質量分析法で同定することを試みた。その結果、核膜、特に核質側表面に局在するタンパク質が会合タンパク質の候補として多数同定された(図 3)。

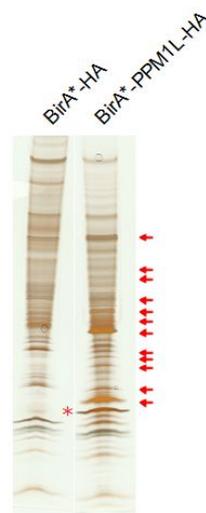


図3 BioID法によるPPM1L会合タンパク質の探索
赤矢印はBirA-PPM1Lを発現したときに特異的に現れるバンドを示す。* bait

(4)今後の展望

PPM1L-KO マウスでは中枢神経系に構造的な異常が認められていることから、遺伝子欠損により摂食制御に関わる神経回路に異常が生じ、摂食量が低下した結果、肥満しにくくなっていることが示唆された。しかし、摂食調節で重要な働きを担う視床下部の構造には異常が認められなかったことから、どの神経回路の異常が関係しているかについて、今後より詳細な検討が必要である。

今回、BioID法により核膜に局在するタンパク質が会合タンパク質の候補として同定された。PPM1Lはこれまで小胞体局在のタンパク質として知られていたが、新たに核膜の機能制御にも関わる可能性が示唆された。PPM1L-KO細胞における核膜の構造や機能を検討することで、PPM1Lの新たな機能が明らかになることが期待される。

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 4件)

1. Shima, H., Sasaki, K., Suzuki, T., Mukawa, C., Obara, T., Oba, Y., Matsuo, A., Kobayashi, T., Mishima, E., Watanabe, S., Akiyama, Y., Kikuchi, K., Matsushashi, T., Oikawa, Y., Nanto, F., Ho, H.J., Suzuki, C., Saigusa, D., Masamune, A., Tomioka, Y., Masaki, T., Ito, S., Hayashi, K.I., Abe, T., A novel indole compound MA-35 attenuates renal fibrosis by inhibiting both TNF-alpha and TGF-beta1 pathways. Sci Rep. 7, 1884, 2017 査読有り DOI:10.1038/s41598-017-01702-7
2. Kusano, R., Fujita, K., Shinoda, Y., Nagaura, Y., Kiyonari, H., Abe, T., Watanabe, T., Matsui, Y., Fukaya, M., Sakagami, H., Sato, T., Funahashi, J.I.,

Ohnishi, M., Tamura, S., Kobayashi, T., Targeted disruption of the mouse protein phosphatase ppm1l gene leads to structural abnormalities in the brain. FEBS Lett. 590, 3606-3615, 2016 査読有り DOI: 10.1002/1873-3468.12429

3. Iwashita, S., Suzuki, T., Yasuda, T., Nakashima, K., Sakamoto, T., Kohno, T., Takahashi, I., Kobayashi, T., Ohno-Iwashita, Y., Imajoh-Ohmi, S., Song, S.Y., Dohmae, N., Mammalian Bcnt/Cfdp1, a potential epigenetic factor characterized by an acidic stretch in the disordered N-terminal and Ser250 phosphorylation in the conserved C-terminal regions. Biosci. Rep. 35, e00228, 2015 査読有り DOI: 10.1042/BSR20150111

4. 小林孝安, 哺乳動物細胞の PPM ファミリーの多彩な機能. 生化学. 87, 525-560, 2015 査読無 DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870525

〔学会発表〕(計4件)

1. 小林孝安, プロテインホスファターゼ PPM1L の肥満形成への関与のメカニズムの解明. 第 89 回 日本生化学会大会, 仙台, 2016 年
2. 小林孝安, プロテインホスファターゼ PPM1L の肥満形成への関与のメカニズムの解明. 第 7 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会, 岡崎, 2016 年
3. 岩下 新太郎, 中島 健太郎, 鈴木 健裕, 安田 武嗣, 坂本 泰一, 河野 俊之, 高橋 一朗, 小林孝安, 大野 岩下 淑子, 今城 大海 忍, 堂前 直, 時栄, 宋., Two post-translational modifications in mammalian B cnt/Cfdp1, a potential epigenetic factor: S250 phosphorylation and K268 acetylation in the conserved C-terminal region 第 88 回日本生化学会大会/第 38 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2015 年
4. 藤田 宏介, 篠田 康晴, 永浦 裕子, 草野 理恵, 渡邊 利雄, 松居 靖久, 阪上 洋行, 佐藤達也, 舟橋淳一, 大西 素子, 田村 眞理, 小林孝安, ノックアウトマウスを用いたプロテインホスファターゼ PPM1L の新規機能解明. 日本生化学会東北支部会第 81 回例会, 仙台, 2015 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 孝安 (Kobayashi, Takayasu)
東北大学・遺伝子実験センター・准教授
研究者番号: 10221970