

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：33303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15038

研究課題名(和文)細胞ストレス応答反応の解析から挑む「過食」の分子メカニズム

研究課題名(英文)Molecular mechanism of overeating regulated by cellular stress response

研究代表者

岩脇 隆夫 (IWAWAKI, Takao)

金沢医科大学・総合医学研究所・教授

研究者番号：50342754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では小胞体ストレスによる引き起こされる過食のメカニズムに迫ることを目的としている。そのため1年目は過食行動自体の詳細な解析と過食行動が引き起こされる際のホルモンおよび神経細胞機能の予備的解析を、2年目は過食行動に関わる責任遺伝子の同定および分子機序解析を行った。これらの解析から小胞体ストレス性過食の原因が摂食を制御するホルモンの異常ではないことを明らかにし、加えて小胞体ストレス誘導性過食に関与するニューロンや小胞体ストレス応答分子を特定した。さらに摂食を制御するホルモンの受容体シグナル伝達経路と小胞体ストレス応答分子の相互作用にも迫ることができた。

研究成果の概要(英文)：Our focus is on molecular mechanism of overeating regulated by endoplasmic reticulum (ER) stress in this research. In the first year we have performed elaborate analysis of overeating itself and preliminary analysis of function of hormones and neurons when overeating is induced. In the second year we have performed screening of responsive genes for overeating and functional analysis of the genes. These analyses revealed that ER stress inducible overeating is not caused by abnormal regulation of leptin and ghrelin, and that specific neurons and genes are responsible for ER stress inducible overeating. We also found interaction between an ER stress responsive molecule and a receptor of regulatory hormone in food intake.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：小胞体ストレス 過食

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の摂食行動は視床下部を中心として大脳皮質、中脳腹側被蓋野および自律神経などを含む神経ネットワークにより制御されている。視床下部では末梢ホルモンや栄養素を感知し、全身のエネルギーバランスを一定に保つ役割を果たしている。また中脳腹側被蓋野を中心とした報酬系ではドーパミン神経により脂肪や甘味といった食事の嗜好性に関係している。さらに大脳皮質は食の探索行動と連携することが分かっている。その一方で拒食や過食は心的ストレスやうつ病とも関連すると考えられている。しかし、そのような摂食行動異常の神経機構や分子機構は未だ不明な部分が多い。

話は全く変わるが、細胞がストレスに曝された際、様々な応答反応が引き起こされる。そのうち、eIF-2 のリン酸化/脱リン酸化制御は特に重要なものとして知られる。eIF-2 は真核細胞の細胞質中に存在し、タンパク質の翻訳開始複合体形成で働いている。具体的には eIF-2B によって GDP 型から GTP 型への転換を受ける分子である。ただ eIF-2 の 52 番目のセリンがリン酸化されると、この eIF-2B による機能は抑制され、一般的なタンパク質合成にはブレーキがかかる。eIF-2 の 52 番目のセリンをリン酸化するキナーゼは哺乳動物では 4 種類 (GCN2、PERK、PKR、HRI) が知られる。

eIF-2 の 52 番目のセリンをリン酸化する 4 種類のキナーゼは次のように働く。GCN2 は細胞質中に存在し、アミノ酸とは結合していない tRNA と相互作用することで細胞内のアミノ酸レベルを間接的に感知する。もし細胞がアミノ酸飢餓に曝されて GCN2 に対するフリーの tRNA の相互作用が高まると、GCN2 分子内のキナーゼドメインが活性化し、eIF-2 をリン酸化するようになる。この反応は原料となるアミノ酸が不足する状況下でタンパク質合成を抑制できることから合理的なものと言える。PERK は小胞体膜上に I 型膜貫通タンパク質として存在し、小胞体内腔域には分子シャペロンである BiP が結合している。この BiP は PERK の活性化を抑制するように働いているが、もし細胞 (小胞体) 内に構造異常タンパク質が蓄積すると、その対応に BiP が必要とされるため、BiP は PERK からは解離し、その抑制は解除され、PERK の細胞質域にあるキナーゼドメインが活性化し、eIF-2 をリン酸化するようになる。この反応も異常なタンパク質が蓄積する状況下で新たなタンパク質合成を抑制できることから合理的なものと考えられている。PKR は細胞質中に存在し、2 本鎖 RNA を感知する。もしある種のウイルスが感染し、細胞内に外来の 2 本鎖 RNA が生じるようになると、PKR 分子内のキナーゼドメインが活性化し、eIF-2 をリン酸化するようになる。この反応は感染したウイルスの増殖を妨げることができるので、抗ウイルス応

答として適している。HRI はヘモグロビンを大量産生する赤血球分化過程で重要な機能をもつ。HRI は直接の相互作用で細胞内のヘムを感知することができるが、ヘム不足になると HRI 分子内のキナーゼドメインが活性化し、eIF-2 をリン酸化するようになる。この反応はグロビタンパク質のムダな合成を防ぐことができ、正常な赤血球産生に欠かせないものとなっている。

哺乳動物の摂食行動のうち、興味深いものとして「偏った栄養バランスの餌を嫌い、食べなくなる」ことが知られている。この行動には大脳辺縁系領域の一つである前梨状皮質が関わると分かっていたが、分子レベルでの理解は長らく乏しい状況にあった。しかし、数年前に「GCN2 のノックアウトマウスは偏栄養餌に対する拒否行動を示さなくなること」と「偏栄養餌をマウスに与えた際、前梨状皮質のニューロンで eIF-2 のリン酸化レベルが高まること」がアメリカとフランスの研究グループにより報告され、現在では GCN2 および eIF-2 が偏栄養餌拒否行動を分子レベルで解明するための重要な手がかりとなっている。

一方、研究代表者は今日まで小胞体ストレスを主テーマとして研究を行ってきた。最初に手掛けたのは哺乳動物の IRE1 探しである。IRE1 とよばれる遺伝子は、そもそも酵母のイノシトール要求性突然変異株の原因遺伝子として 1992 年に報告され、その直後に小胞体ストレス応答でも必須の遺伝子として再発見されている。小胞体は真核細胞に特徴的な細胞小器官のひとつで、分泌タンパク質や膜タンパク質の合成・修飾・輸送とその品質管理という機能を担っている。小胞体ストレスは小胞体内に構造異常タンパク質が蓄積することにより生じるもので、IRE1 はその異常を感知してストレスを回避・軽減するための反応を誘導する役割をもつ。小胞体ストレス応答は酵母だけでなく哺乳動物でも見られる細胞の生体防御反応のひとつであり、哺乳動物にも IRE1 が存在することを 2001 年に研究代表者は報告している (Iwawaki T. et al, Nat. Cell Biol.)。ほぼ時を同じくして IRE1 以外の小胞体ストレス応答分子も哺乳動物で発見され、次第に単一細胞レベルから動物個体レベルへと小胞体ストレス研究が拡大していった。その幾つかの研究では、ある種の疾患原因として小胞体ストレスが示唆された。これを受け、研究代表者はマウス生体レベルで小胞体ストレスを可視化する技術の開発に乗り出し、IRE1 の RNase 活性とレポーター遺伝子を巧みに利用して、細胞や組織を溶解せずに、生きている状態の細胞やマウスで小胞体ストレスを検出できるようにした (Iwawaki T. et al, Nat. Med.)。以後、疾患モデルマウスの病理部位で生じる小胞体ストレスを検出することにも成功している (Thorp E. et al, J. Lipid Res.)。小胞体ストレスの可視化に平行して、

研究代表者は IRE1 のコンディショナルノックアウト (CKO) マウスの作製も世界に先駆けて行い、胎盤での血管新生における IRE1 の重要な機能を発見している (Iwawaki T. et al, PNAS)。また、この IRE1CKO マウスは以下で述べる腸炎研究に欠かせない重要なモデル動物となっており、海外ラボとの共同研究により研究代表者は次の3つのことを見出している。1つは、先に述べたことと重複するが、XBP1 遺伝子の単独欠損で見られたマウスの腸炎は ATG16L1 遺伝子または ATG7 遺伝子の欠損が合わさることで重症化し、IRE1 遺伝子の欠損が合わさることで逆に軽症化する (Adolph TE. et al, Nature)。あと2つは、IRE1 タンパク質の代謝分解が遅れて安定化すると腸炎を発症しやすくなること (Sun S. et al, Nat. Cell Biol.)。その IRE1 タンパク質の分解促進にはオートファジー関連分子である optineurin が機能すること (Tschurtschenthaler M. et al, J. Exp. Med.) である。さらに小胞体ストレス以外の細胞ストレスや炎症をマウス生体レベルで可視化する技術の開発にも研究代表者が中心となって成功している (Oikawa D. et al, Sci. Rep., Iwawaki T. et al, Sci. Rep.)。また最近では、膵細胞における eIF-2 のリン酸化/脱リン酸化調節の解析にも力を注いでいる (Akai R. et al, Genes Cells)。

2. 研究の目的

満腹時および空腹時における摂食行動の制御機構は詳細なところまで明確になっている。しかしながらストレスが引き起こすとされる過食や拒食のメカニズムはまだまだ不明な部分が多い。研究代表者は、細胞小器官のひとつである小胞体へのストレス負荷実験を行っていた際、次の意外なことに気が付いた。マウスへある種の小胞体ストレス剤を投与すると過食行動が引き起こされるのである。この現象は「やけ食い」のような心的ストレス性の摂食異常を分子レベルで解明する糸口になるかもしれない。研究代表者はこれまでの研究により小胞体ストレスを分子レベルから生体マウスレベルで解析できる独自のツールを揃えている。本研究では、これらを活かして前述した過食モデルマウスを解析することで、細胞ストレス (特に小胞体ストレス) 応答分子が果たしているであろう摂食行動制御への新たな役割を見つけ出す。

一般的に細胞にとってストレスとなるような薬剤をマウスへ投与すると、体調を崩し、それに伴って行動量も低下し、どちらかと言えば拒食になる。拒食をモデルとして研究する場合、体調異常の二次的な影響を大きく疑わなければならないので、マウスでは非常に研究がやりにくい。拒食モデルからのスタートであれば、おそらく本研究の遂行を諦めたと思う。しかし幸いにも研究代表者が手にしたのが過食モデルであり、ほとんど全ての小

胞体ストレス剤の投与によって過食となる。そのレベルはヒトで言う「やけ食い」に近い。餌がない場合には床敷まで胃袋に入れる。こんなマウスモデルは滅多にないので、是非研究を進める価値があると考ええる。また、先に「やけ食い」と表現したが、ヒトの心的ストレス性摂食異常などのメカニズムはほとんど解明されていない。本研究が進めば、その謎にもアプローチする糸口が見出せるかもしれない。

3. 研究の方法

まず過食モデルマウスの摂食行動中枢における細胞ストレス関連分子の動態調査として小胞体ストレス応答の重要分子の活性化を過食モデルマウスと通常マウスの間で比較した。基本的にはオーソドックスに摂食行動中枢を含む脳の切片と特異的抗体を用いて組織学的解析を行った。また小胞体ストレスの生体イメージング解析も利用しながら、この課題にアプローチした。また小胞体ストレスで引き起こされる過食行動と事前の絶食が引き起こす過食行動の比較も行った。

次に過食モデルマウスにおける摂食行動関連ニューロンおよび分子の活性調査として摂食行動に関連するニューロンおよび分子 (ホルモンなど) の活性化状態を過食モデルマウスにおいて調査した。基本的には視床下部の室傍核および弓状核にあるニューロンの働き、そしてレプチンやグレリンの動態を過食モデルマウスと通常マウスの間で比較した。またレプチン自身やレプチン作動性の POMC/CART ニューロンへの刺激でモデルマウスの過食行動が抑制できるかどうかを調査し、ツニカマイシン誘導性過食が引き起こされたメカニズムに迫った。この2年間で非常に興味深いデータを得ることができた。しかしながら論文等で発表するには十分でない。今後は新たな実験手法などを加えながら研究をまとめつつ、発展させていく。

4. 研究成果

小胞体ストレス剤の投与から過食行動は数時間のうちに表れはじめ、およそ1日続くようである。胃の内容物も調べたが明らかに増加していたので餌をかじっているだけではなく食べていることを示せた。ただ過食に伴う多飲は生じなかった。過食行動は前もって行う絶食によっても引き起こすことができるが小胞体ストレスで引き起こされる過食の場合は餌がなくなると床敷や体毛を口にして胃を大きくすることもあった。つまり単に空腹が引き起こす過食とは異なる何か小胞体ストレス性過食では生じていることを思わせる。この行動実験を行いながらマウスからは採血を行い、血糖値や各種ホルモン値の測定も行ったところ血糖値は小胞体ストレス負荷前後で僅かに上昇する程度であった。摂食抑制ホルモンはむしろ高まって

いたし摂食促進ホルモンは低レベルであった。これらのことから小胞体ストレス性過食の原因が摂食を制御するホルモンの異常ではないと考えている。そこで脳内の神経細胞における小胞体ストレス応答性を調査してみたが小胞体ストレス負荷を与えると全体的にストレス応答分子が高まっていて摂食中枢だけにストレスがかかりやすい訳ではないことが分かった。

小胞体ストレス応答分子を摂食中枢ニューロン特異的に欠損させ、その行動を調査した。この目的のため4種類のCreマウスを入手して、3種類のfloxマウスとの交配から合計12種類の二重遺伝子改変マウスを作出した。それらマウスに対して摂食量、飲水量、胃内容量を比較調査しながら、小胞体ストレス剤の投与により促される過食行動とマウス遺伝子型との関連性に迫った。結果として特定の摂食調節神経核特異的に小胞体ストレス応答分子の一つを欠損させると、小胞体ストレス誘導性過食が生じなくなった。これにより小胞体ストレス誘導性過食の責任遺伝子が明らかとなった。次に責任遺伝子が過食を引き起こしたメカニズムに迫るために責任遺伝子により制御されることが既に分かっている2つの遺伝子と同じ摂食調節神経核で特異的に欠損させるマウスの作出に取りかかった。一方で、絶食による促される過食行動に対して同定した小胞体ストレス応答分子が果たす役割についても調査したところ、驚くべきことに先述の小胞体ストレス応答分子欠損マウスは過食行動が完全ではないまでも有意に抑制されていた。また詳細に迫るために摂食中枢由来の神経培養細胞を用いた解析を行ったところ、摂食を制御するホルモンの受容体シグナル伝達経路と小胞体ストレス応答分子の相互作用が明らかとなった。

追加的実験から分かったことであるが、摂食量、飲水量、胃内容量をC57BL/6系統だけでなく他のICRや129系統のマウスでも調査した。また、その際、餌が自由に食べられる状況だけでなく餌が与えられていない状況での調査も行った。まず重要な結果としてマウスの系統間で同様の過食行動を示し、捉えている現象自体は少なくともマウスに共通して見られることが分かった。おそらく多くの哺乳類(ヒトを含む)で同じことが言えると考えている。

この2年間で非常に興味深いデータを得ることができた。しかしながら論文等で発表するには十分でない。今後は新たな実験手法などを加えながら研究をまとめつつ、発展させていく。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

1. 岩脇 隆夫「異常行動およびエイジングにまで広がる小胞体ストレス研究の新展開」東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室主催研究集会 2017「直感から紐解く生命現象の理解」依頼講演(2017年3月12日;和光純薬湯河原研修所(静岡県熱海市))

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩脇 隆夫 (IWAWAKI, Takao)
金沢医科大学・総合医学研究所・教授
研究者番号: 50342754

(2)研究分担者

河野 大輔 (KOHNO, Daisuke)
群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・助教
研究者番号: 10382904

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

赤井 良子 (AKAI, Ryoko)
金沢医科大学・総合医学研究所・研究補助員