

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15067

研究課題名(和文) 褐色脂肪細胞の小胞体ストレス応答による生体エネルギー制御機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms responsible for regulation of bioenergy consumption by endoplasmic reticulum stress response in brown adipocytes

研究代表者

今泉 和則 (Imaizumi, Kazunori)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・教授

研究者番号：90332767

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)：体内に取り込まれたエネルギーを熱として放散し、エネルギー消費に寄与するのが褐色脂肪組織である。褐色脂肪細胞におけるエネルギー産生及び放散の仕組みが解明できれば、様々な代謝性疾患の要因である肥満に対する新たな治療戦略に繋がる。本研究課題では、褐色脂肪細胞の機能制御機構を明らかにすべく、小胞体に収斂するシグナル経路に着目して研究を進めた。その結果、ノルアドレナリンを受容した褐色脂肪細胞において、IRE1-XBP1経路が特異的に活性化し、熱産生機能を担うタンパク質であるUCP1の転写を誘導することがわかった。また、IRE1-XBP1経路はPKA依存的に活性化することも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Brown adipose tissue (BAT) is a key tissue that controls the energy balance of whole body. Brown adipocytes are able to dissipate energy in the form of heat owing to their mitochondrial protein, uncoupling protein 1 (UCP1). Because the energy consumption system in BAT is attractive for counteracting obesity and its related metabolic diseases, it is important to understand the mechanism responsible for regulating thermogenesis. In this study, we focused on the signal which originates from endoplasmic reticulum. We found IRE1-XBP1 branch is activated during the thermogenesis in brown adipocytes. In addition, it is demonstrated that PKA-dependent IRE1-XBP1 activation is crucial for the transcriptional induction of UCP1 in brown adipocytes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：褐色脂肪細胞 小胞体ストレス センサー UCP1 IRE1

1. 研究開始当初の背景

生体内エネルギーの出納はエネルギー摂取と消費のバランスにより維持される。肥満はこの調節機構が破綻することで発症する。肥満の治療にはエネルギー消費を如何に増大させるかが重要である。体内に取り込まれたエネルギーを熱として放散し、エネルギー消費に寄与するのが褐色脂肪組織である。そのため、人工的に褐色脂肪細胞を増加させる、あるいは褐色脂肪組織を活性化させることで肥満を克服しようとする試みに大きな注目が集まっている。しかし、褐色脂肪細胞の分化や活性化機構については未だ不明な点が多い。

我々はこれまで、小胞体から発信されるシグナル(小胞体ストレス応答UPR)の生理機能について解析を進めてきた。UPRは小胞体に蓄積した不良タンパク質を排除するストレス応答系として知られているが、細胞の分化や機能制御など様々な生理現象にも深く関わることがわかってきた。また、小胞体膜に局在するPERK、IRE1、ATF6から発信されるシグナルによる脂肪酸酸化や脂質合成の制御が明らかにされており、褐色脂肪細胞で起こるエネルギー代謝や熱産生に小胞体を起点とするシグナルが深く関連することが示唆されている。しかし、褐色脂肪細胞におけるUPRの役割については不明であった。

2. 研究の目的

褐色脂肪細胞におけるエネルギー産生及び放散の仕組みが解明できれば糖尿病や心筋梗塞をはじめとした様々な代謝性疾患の要因である肥満に対する新たな治療戦略の構築につながる。本研究課題では、小胞体に収斂するシグナル経路を中心に解析し、褐色脂肪細胞の機能制御機構を解明することを目的に研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) 褐色脂肪細胞の熱産生時におけるUPR活性化の検討: 野生型マウスの寒冷暴露、あるいは初代培養した褐色脂肪細胞へ 3 アドレナリン受容体アゴニスト CL 316,243 を処理することで褐色脂肪細胞を活性化させた。各種 UPR 関連分子の発現量や活性化レベルを生化学的手法により解析した。

(2) 褐色脂肪細胞における UPR の役割解明: UPR シグナルの発信源となる小胞体膜局在タンパク質の阻害剤 4 μ 8C や下流分子の機能欠失コンストラクトを用いて、褐色脂肪細胞の熱産生時における UPR の役割を調べた。

(3) 褐色脂肪細胞における UPR 活性化機構の解明: UPR の活性化機構を明らかにするために、既に褐色脂肪細胞を活性化させることが解明されている 3 アドレナリン受容体シグナルに着目した。3 アドレナリン受容体シグナル構成分子の阻害剤 H89 や SB203580 を褐色脂肪細胞に事前処理し、

UPR 関連分子の発現・活性化レベルについて生化学的手法により解析した。

4. 研究成果

(1) 褐色脂肪細胞活性化における UPR シグナルの検討

褐色脂肪細胞の活性化時に UPR シグナルが発信される: 褐色脂肪細胞は生体が寒冷環境に曝されると活性化することが知られている。野生型マウスを 4 環境に 24 時間曝した後、褐色脂肪組織を摘出してミトコンドリア内膜に存在する脱共役タンパク質 UCP1 の発現量を解析した。その結果、UCP1 が増加して褐色脂肪細胞が活性化していることが確認できた。この時の UPR シグナル発信のマーカーとなる BiP の発現量や XBP1 のスプライシングレベルについて調べると、いずれも寒冷暴露により上昇していた。褐色脂肪細胞の活性化は交感神経から分泌されるノルアドレナリンを受容することによって誘導される。3 アドレナリン受容体アゴニスト CL 316,243 を初代培養した褐色脂肪細胞に処理すると、寒冷暴露と同様に UCP1 の発現量だけでなく BiP やスプライスされた XBP1 の発現量も増加した。以上の結果から、褐色脂肪細胞の活性化時に UPR シグナルが発信されていることが生体・細胞レベルで明らかとなった。

褐色脂肪細胞の活性化時には IRE1-XBP1 経路が特異的に活性化する: 褐色脂肪細胞の活性化において特に重要な UPR シグナル経路を特定するため、シグナルの発信源となる PERK、IRE1、ATF6 の活性化レベルを調べた。その結果、褐色脂肪細胞への CL 316,243 刺激後、一過的に活性化フォームであるリン酸化型 IRE1 が増加した。また XBP1 のスプライシングも確認できた。一方、CL 316,243 処理によるリン酸化型 PERK および ATF6 N 末端断片については、有意な増加は検出されず、PERK や ATF6 の活性化は認められなかった。以上より、褐色脂肪細胞の活性化時に UPR シグナル経路のうち IRE1-XBP1 経路が特異的に活性化することが示唆された。

(2) 褐色脂肪細胞の活性化における IRE1-XBP1 経路の役割

褐色脂肪細胞の UCP1 転写誘導において IRE1-XBP1 経路が必要である: 褐色脂肪細胞における IRE1-XBP1 経路の必要性を明らかにするため、IRE1 のヌクレアーゼドメインを阻害する 4 μ 8C を用いて解析をおこなった。褐色脂肪細胞に 4 μ 8C を事前処理すると、CL 316,243 刺激依存的な XBP1 のスプライシングが抑制された。この時の UCP1 の mRNA 量を解析すると、スプライスされた XBP1 と同様に有意に抑制されており、褐色脂肪細胞における UCP1 の転写誘導において IRE1 による XBP1 のスプライシングが必要であることがわかった。IRE1-XBP1 経路は小胞体ストレスによって活性化する。そこで、小胞体ストレスそのものが UCP1 の転写誘

導を促進するか否かについて検討した。褐色脂肪細胞に小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを様々な濃度で処理した。その結果、いずれの濃度においても XBP1 のスプライシングは増加した。しかし、UCP1 の mRNA 量はいずれの濃度においても増加しなかった。以上より、ノルアドレナリン受容による IRE1-XBP1 経路を介した UCP1 の転写誘導は小胞体ストレスと独立した事象であることがわかった。

転写因子 XBP1 は UCP1 の転写を直接誘導する：スプライドフォーム XBP1 (sXBP1) から翻訳される XBP1 タンパク質は、bZIP ファミリーに属する転写因子である。UCP1 遺伝子上流 1 kb 以内のプロモーター領域を解析すると複数の XBP1 結合配列を発見した。IRE1-XBP1 経路による UCP1 の転写誘導が XBP1 によるものかを検討するために、UCP1 のプロモーター領域を用いてリポーターアッセイを行った。その結果、XBP1 を導入するのみではリポーター活性が上昇しなかった。一方、 β 3 アドレナリン受容体シグナルを活性化させるフォルスコリン刺激を行うと、リポーター活性が大きく上昇した。興味深いことに、フォルスコリン刺激を行うと同時に XBP1 を導入すると、フォルスコリン刺激単独より大きくリポーター活性が上昇した。しかし、DNA 結合領域である bZIP ドメインを欠失した XBP1 (XBP1- bZIP) を導入するとリポーター活性の上昇はフォルスコリン刺激単独と変わらなかった。以上より、XBP1 は β 3 アドレナリン受容体下流で誘導される分子と協調して UCP1 遺伝子の転写を誘導することが示唆された。XBP1 は、他の bZIP ファミリー転写因子と bZIP ドメインを介してヘテロダイマーを形成することで標的遺伝子を変えることが知られている。今回、ツニカマイシンによって UCP1 の転写が誘導されなかったのは、CL 316,243 刺激時に活性化する転写因子群が異なる可能性が推測される。

(3) 褐色脂肪細胞における IRE1-XBP1 経路の活性化機構

褐色脂肪細胞における IRE1-XBP1 の活性化は PKA 依存的である：ノルアドレナリン受容による IRE1-XBP1 経路の活性化機構を明らかにするため、 β 3 アドレナリン受容体下流で活性化する分子に着目した。 β 3 アドレナリン受容体がノルアドレナリンを受容すると、細胞質中のサイクリック AMP 濃度が上昇して Protein kinase A (PKA) が活性化される。その後、PKA の下流分子である p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK) がリン酸化され、活性化される。活性化型 p38 MAPK は各種転写因子・補助活性化因子をリン酸化して UCP1 の転写を誘導する。PKA 阻害剤 H89 を褐色脂肪細胞に処理すると、CL 316,243 刺激による UCP1 の発現増加が大きく抑制された。この時の IRE1 のリン酸化や XBP1 のスプライシングを解析

すると、両者ともに有意に抑制されていた。一方、SB203580 処理により p38 MAPK を阻害すると、PKA 阻害と同様に UCP1 の転写誘導が有意に抑制された。しかし、IRE1 のリン酸化や XBP1 のスプライシングは抑制されなかった。以上より、IRE1-XBP1 経路の活性化は PKA 依存的であることが示唆された。

XBP1 の核移行は p38 MAPK により制御される：項目(2)の解析で示したように、IRE1-XBP1 経路は UCP1 の転写誘導に必要である。しかし、p38 MAPK 阻害剤 SB203580 処理により IRE1-XBP1 経路の活性化は抑制されないにも関わらず、CL 316,243 刺激依存的な UCP1 の発現増加は有意に抑制された。この結果について詳細に検討するために XBP1 の核移行に着目した。褐色脂肪細胞から核分画を抽出して、核内の XBP1 のタンパク量を調べた。その結果、CL 316,243 刺激により核内 XBP1 は増加した。しかし、SB203580 処理によってこの増加は抑制されており、XBP1 の核移行が抑制されていることが示唆された。p38 MAPK は XBP1 の核移行制御に関わる 48 番目スレオニンおよび 61 番目セリンをリン酸化することが報告されている。従って、SB203580 処理により IRE1-XBP1 経路が活性化するにも関わらず UCP1 の転写誘導が抑制されたのは、p38 MAPK 阻害によって XBP1 の核移行が抑制されたためであると推察される。以上より、p38 MAPK は IRE1-XBP1 経路の活性化には関わらないが、XBP1 の核移行を制御することが示唆された。

(1)(2)および(3)の研究成果から、褐色脂肪細胞において IRE1-XBP1 経路が小胞体ストレス非依存的かつ、PKA 依存的に活性化しており、UCP1 の転写を誘導して熱産生機能を亢進することが明らかとなった。

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2件)

1. Kanemoto S, Nitani R, Murakami T, Kaneko M, Asada R, Matsuhisa K, Saito A, Imaizumi K.: Multivesicular body formation enhancement and exosome release during endoplasmic reticulum stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, 480(2): 166-172, 2016.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.019.
2. Asada R, Kanemoto S, Matsuhisa K, Hino K, Cui M, Cui X, Kaneko M, Imaizumi K.: IRE1 α -XBP1 is a novel branch in the transcriptional regulation of Ucp1 in brown adipocytes. *Scientific Reports*, 査読有, 5: 16580, 2015.
DOI: 10.1038/srep16580

〔学会発表〕(計9件)

1. 今泉和則: The biological roles of endoplasmic reticulum and its stress response. Academic Workshop by Hiroshima University and Cairo University, 広島大学(広島県・東広島市), 2/21, 2017.
2. 金本聡自、今泉和則: Endoplasmic reticulum stress and cellular homeostasis. Department of Medical Biophysics Lab Seminar, University of Toronto, Toronto(Canada), 12/6, 2016.
3. 今泉和則: 小胞体ストレス応答シグナルによる生理・病態制御. 第43回佐島シンポジウム, 東北大学(宮城県・仙台市), 10/21, 2016.
4. 今泉和則: 小胞体ストレス応答シグナルとその生理機能. 第63回徳島大学糖尿病臨床・研究開発センター講演会, 徳島大学(徳島県・徳島市), 5/24, 2016.
5. 今泉和則: 小胞体ストレスとその応答機構による生体制御. 第37回北海道大学獣医学学術交流基金群講演会, 北海道大学(北海道・札幌市), 1/21, 2016.
6. 浅田梨絵、今泉和則: IRE1 α -XBP1 経路による褐色脂肪細胞の熱産生遺伝子 *Ucp1* の発現制御. 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会, 神戸国際展示場(兵庫県・神戸市), 12/3, 2015.
7. 浅田梨絵、今泉和則: 褐色脂肪細胞における小胞体ストレス応答の役割. 第10回小胞体ストレス研究会, 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県・淡路市), 11/30, 2015
8. 今泉和則: 小胞体ストレス応答による生体制御と疾患. 第25回日本病態生理学会大会, 愛媛大学(愛媛県・松山市), 8/1, 2015.
9. 浅田梨絵、今泉和則: 小胞体ストレス応答による褐色脂肪細胞の機能調節. 第56回日本生化学会 中国・四国支部例会, 島根大学(島根県・松江市), 5/30, 2015.

〔その他〕

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/imaizumi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今泉 和則 (IMAIZUMI, Kazunori)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院
(医)・教授
研究者番号: 90332767