

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19516

研究課題名(和文) 褐色脂肪細胞における小胞体ストレス応答の役割

研究課題名(英文) The role of unfolded protein response in brown adipocytes

研究代表者

浅田 梨絵 (Asada, Rie)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・助教

研究者番号：70751882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体ストレス応答シグナルは、小胞体ストレスに対する防御システムを駆動させるだけでなく、細胞の分化・増殖、エネルギー代謝など細胞の生理機能制御に重要である。本研究課題では、褐色脂肪細胞の分化・成熟、活性化機構において小胞体ストレス応答シグナルの重要性を明らかにすることを目的に研究を行った。その結果、小胞体ストレス応答シグナル経路の一つであるIRE1 α -XBP1経路が熱産生遺伝子UCP1の転写誘導に必要であることが明らかとなった。また、組織特異的小胞体ストレストランスデューサーBBF2H7が褐色脂肪細胞の分化に重要な役割を担っていることもわかった。

研究成果の概要(英文)：The unfolded protein response (UPR) not only resolves endoplasmic reticulum (ER) stress, but also regulates cellular physiological functions such as proliferation, differentiation, and energy metabolism. In this study, we explored the physiological role of UPR in brown adipocytes. We found the one of UPR branch, IRE1 α -XBP1 pathway, is crucial for the transcriptional induction of thermogenin UCP1. We also revealed that tissue-specific ER stress transducer BBF2H7 is involved in the differentiation of brown adipocytes.

研究分野：生化学

キーワード：小胞体ストレス応答 褐色脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

褐色脂肪組織は、生体内のエネルギー代謝の恒常性を維持する上で重要な組織の一つであり、熱を産生することで体内に過剰に摂取されたエネルギーを消費する機能を持っている。近年、高齢者や肥満症患者においてその細胞量や活性が低下していることが明らかになり、褐色脂肪組織におけるエネルギー代謝異常が肥満発症と深く関連していることが指摘され、肥満症治療の新たな標的組織として注目を集めている。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く、またこれらの破綻によってどのようにして褐色脂肪組織のエネルギー代謝異常へと繋がるのかは全く解明されていない。

細胞内オルガネラの一つである小胞体はタンパク質が正しい立体構造をとり、糖鎖付加などの修飾を受けて成熟する場として機能している。しかし、虚血や低栄養状態、あるいは脂質濃度変化など細胞外からの様々な刺激が存在すると、小胞体内に正しい立体構造をとらない不良タンパク質が大量に発生・蓄積する小胞体ストレスという細胞にとって極めて重篤な事態に陥る。そのため、細胞には小胞体ストレスを感知し、シグナルを発信して不良タンパク質の修復もしくは分解を行う小胞体ストレス応答 (Unfolded Protein Response: UPR) という機構が備わっている。興味深い事に近年の研究より、UPR シグナルは不良タンパク質の排除だけでなく細胞の分化・成熟や増殖、あるいはエネルギー代謝など様々な生理機能を制御していることが明らかになってきた。特に肝臓や膵臓、白色脂肪組織において、小胞体の機能障害や UPR シグナルの過剰な活性が肥満や糖尿病など代謝性疾患の発症と深く関連していることが明らかになりつつある。そのため、褐色脂肪組織においても UPR シグナルが脂質代謝や熱産生機能制御に重要な役割を担っている可能性が想定されるが、褐色脂肪細胞における UPR の重要性については不明であり、「小胞体」という視点から行った褐色脂肪細胞に関する研究も研究開始当初には無かった。

2. 研究の目的

本研究課題では、これまでにない「小胞体」という新しい視点から褐色脂肪細胞の分化・成熟、活性化機構の分化メカニズムを解明し、褐色脂肪細胞の生理機能制御における UPR の重要性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

褐色脂肪細胞の単離・培養：新生仔マウスの肩甲骨間に存在する褐色脂肪組織からコラゲナーゼ消化により、褐色脂肪前駆細胞を単離した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (10% FBS, 20 nM insulin,

1 nM 3,3',5-triiodo-L-thyronine [T3]含有) 下でコンフルエントまで培養した後、0.5 mM isobutylmethylxanthine、0.5 μ M dexamethasone、0.125 mM indomethacin を添加した培地で 48 時間培養することで分化誘導を行った。その後、上記の DMEM 下で 4~5 日間培養し成熟褐色脂肪細胞を得て、実験に使用した。

4. 研究成果

(1) 褐色脂肪細胞活性化における UPR の役割解明

褐色脂肪細胞の活性化時に UPR シグナルが発動する：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。その活性化機構は、交感神経から分泌されるノルアドレナリンを褐色脂肪細胞上の β 3 アドレナリン受容体が受容することにより誘導される。これまでに β 3 アドレナリン受容体アゴニスト CL 316,243 を生体に投与すると寒冷暴露を模倣することができることが報告されている。実際に CL 316,243 (1 mg/kg) を皮下注射したマウスの褐色脂肪組織において、熱産生遺伝子 UCP1 の発現量が増加して活性化していることが確認できた。この時の UPR シグナル発動のマーカーとなる BiP、GRP94、カルレチキュリンの発現量や XBP1 のスプライシングレベルを解析すると、いずれも CL 316,243 投与マウスにおいて増加しており、褐色脂肪細胞が活性化する際に UPR シグナルが発動していることが明らかとなった。

褐色脂肪細胞活性化時に IRE1-XBP1 経路が特異的に活性化する：褐色脂肪細胞がノルアドレナリンを受容するとアデニル酸シクラーゼの活性化が誘導され、細胞質中のサイクリック AMP (cAMP) 濃度が上昇する。その結果、細胞質中の protein kinase A (PKA) が活性化し、下流分子群のリン酸化を介して最終的に UCP1 の転写を誘導する。褐色脂肪細胞の活性化において特に重要な UPR シグナル経路を明らかにするために、アデニル酸シクラーゼのアクチベーターであるフォルスコリンを用いて解析を行った。初代培養した褐色脂肪細胞にフォルスコリン刺激を行うと、UCP1 の発現増加が確認できた。次に、UPR シグナルの発信源となる主要小胞体ストレストランスデューサー群 (PERK、IRE1、ATF6) の活性化レベルを解析した。その結果、フォルスコリン刺激に応答して活性化フォームであるリン酸化型 IRE1 の一過的な増加が見られた。同様に、IRE1 のリン酸化下流で発生する XBP1 のスプライシングも増加した。一方で、リン酸化型 PERK や ATF6-N 末端断片のフォルスコリン刺激による増加は認められなかった。以上より、褐色脂肪細胞の活性化において IRE1-XBP1 経路が特異的に活性化することが明らかとなった。

褐色脂肪細胞における UCP1 の転写誘導において IRE1-XBP1 経路が必要である：

IRE1-XBP1 経路が UCP1 の転写誘導に必要であるかについて検討した。IRE1 はリン酸化すると自身のヌクレアーゼドメインによって XBP1 mRNA の細胞質スプライシングを行う。IRE1 のヌクレアーゼドメインのみを特異的に阻害する 4 μ 8C を用いて解析を行った。4 μ 8C を褐色脂肪細胞に前処理すると、フォールスコリン刺激依存的な XBP1 のスプライシングが消失した。この時の UCP1 の発現量を調べると、フォールスコリン刺激に誘導される UCP1 の発現増加が有意に抑制されていた。以上より、褐色脂肪細胞における UCP1 の転写誘導において、IRE1 によるスプライシングが必要であることが明らかとなった。スプライシング型 XBP1 mRNA から翻訳されるタンパク質 XBP1s は転写因子である。UCP1 のプロモーター領域を解析すると複数の XBP1s 結合配列が発見された。このことから、IRE1-XBP1 経路の活性化下流で産生される XBP1s により UCP1 の転写が誘導される可能性が推察される。

(2) 褐色脂肪細胞分化における UPR の役割解明

BBF2H7 欠損マウスでは褐色脂肪細胞の分化に異常を示す: BBF2H7 は組織特異的な発現分布を示す小胞体ストレスランズデューサーであり、褐色脂肪組織にも発現する。褐色脂肪細胞における BBF2H7 の役割を明らかにするため、BBF2H7 欠損マウスを解析した。その結果、胎生期 18.5 日目において褐色脂肪細胞数が増加して組織が肥大化していた。しかし、ヘマトキシリン・エオシン染色およびオイルレッド O 染色を行うと、BBF2H7 欠損マウスでは褐色脂肪細胞質中にエオシン及びオイルレッド O 陰性となる空胞状の巨大な構造体が確認された。透過型電子顕微鏡を用いてこの構造体を詳細に解析すると、高電子密度のロゼット構造を示す微細顆粒が大量に蓄積していることがわかった。このような特徴はグリコーゲン顆粒に見られるものであることから、BBF2H7 欠損マウスの褐色脂肪組織中のグリコーゲンを定量すると、野生型と比較して大きく増加していた。以上より、BBF2H7 欠損マウスでは、細胞質中にグリコーゲンが大量に蓄積して褐色脂肪細胞の分化に異常を来すことが明らかとなった。

BBF2H7 は褐色脂肪細胞分化の初期段階において重要である: 間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 は 72 時間 BMP7 を処理した後に isobutylmethylxanthine、dexamethasone、indomethacin による分化誘導を行うと、分化に伴って細胞質中に脂肪滴を含み、UCP1 の発現が増加して褐色脂肪細胞へと分化する。褐色脂肪細胞分化のどの段階で BBF2H7 が必要であるのかを明らかにするため、この in vitro 分化誘導モデル系を用いて BBF2H7 の発現量および活性化レベルを経時的に解析した。その結果、BMP7 処理期間において

時間依存的に BBF2H7 の発現および活性化フォームである N 末端断片が大きく増加した。一方、分化誘導を行うと急激に発現量が減少してその後の分化過程では低いレベルを維持し続けた。また、胎生期 16.5 日目における BBF2H7 欠損マウスの褐色脂肪組織を組織学的に解析すると、野生型と大きな差は見られなかった。以上の結果から、褐色脂肪細胞分化の初期段階において BBF2H7 が重要であることが示唆された。

(1) および (2) の解析から、褐色脂肪細胞の活性化において IRE1-XBP1 経路が、分化において BBF2H7 が必要であることが明らかとなり、褐色脂肪細胞の生理機能制御においても UPR が重要な役割を担っていることがわかった。

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 5 件)

1. Cui X, Cui M, Asada R, Saito A, Kanemoto S, Matsuhisa K, Kaneko M, Imaizumi K.: The androgen-induced protein AlbZIP facilitates proliferation of prostate cancer cells through downregulation of p21 expression. **Scientific Reports**, 6:30955, 2016, 査読有, DOI:10.1038/srep37310
2. 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**, 480(2):166-172, 2016, 査読有, DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.019.
3. Kanemoto S, Kobayashi Y, Yamashita T, Miyamoto T, Cui M, Asada R, Cui X, Hino K, Kaneko M, Takai T, Matsuhisa K, Takahashi N, Imaizumi K.: Luman is involved in osteoclastogenesis through the regulation of DC-STAMP expression, stability and localization. **Journal of Cell Science**, 128(23): 4353-4365, 2015, 査読有, DOI: 10.1242/jcs.176057
4. 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**, 5:16580, 2015, 査読有, DOI: 10.1038/srep16580
5. Cui M, Kanemoto S, Cui X, Kaneko M, Asada R, Matsuhisa K, Tanimoto K, Yoshimoto Y, Shukunami C, Imaizumi K.: OASIS modulates hypoxia pathway

activity to regulate bone angiogenesis.
Scientific Reports, 5:16455, 2015, 査読有,
DOI: 10.1038/srep16455

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Asada R, Kikushima K, Cui M, Imaizumi K: ER-resident transmembrane transcription factor OASIS plays important role in DNA damage response. ASCB Annual meeting, Moscone Center (San Francisco, 米国), 12/5, 2016.
2. 浅田梨絵、崔旻、今泉和則: アストロサイトの細胞分化における小胞体膜貫通型転写因子 OASIS の働き. 第 59 回日本神経化学学会大会, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市), 9/8, 2016.
3. 浅田梨絵、今泉和則: IRE1 -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, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市), 12/3, 2015.
4. 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.
5. 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

浅田 梨絵 (ASADA, Rie)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院
(医)・助教

研究者番号: 70751882