

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05958

研究課題名(和文)多機能メタロプロテアーゼによる核内受容体REV-ERB活性制御機構の解明

研究課題名(英文)A metalloprotease regulates the activity of the nuclear receptor REV-ERBs

研究代表者

平岡 義範(Hiraoka, Yoshinori)

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号：60397552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ナルディライジン(NRDC)はM16ファミリーに属するメタロプロテアーゼで、細胞局在に依存した多機能性(細胞表面：細胞外ドメインシェディング活性化、核：転写調節)を有し、様々な生体恒常性の維持において重要な働きをしている。近年、私たちはNRDCが概日時計のコアフィードバックループを構成する時計タンパク質と複合体を形成し、その機能調節を介して概日リズムを制御する新規時計調節因子である可能性を見出している。今回、NRDCがコアループだけではなく、サブループ制御にも関与しているのではないかと考え、本研究ではその可能性について検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、NRDCが概日時計のコアループだけではなく、サブループも制御するユニークな時計調節因子である可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Nardilysin (N-arginine dibasic convertase; NRDC) is a zinc peptidase of the M16 family. We have reported that NRDC has multiple functions, which depend on its cellular localization. In the extracellular space, NRDC enhances ectodomain shedding of a variety of membrane proteins. On the other hand, NRDC in the nucleus works as a transcriptional coregulator. These findings suggest the important roles of NRDC in various homeostasis in vivo. We have recently found that NRDC regulates the mammalian circadian clock via modulating core clock proteins function. The mammalian circadian clockwork is composed of a core feedback loop and additional interlocking loops. Thus, we investigated the role of NRDC on the additional loop, consisting of ROR activators and REV-ERB repressors in this study.

研究分野：分子生物学、時間生物学

キーワード：概日時計 転写制御 核内受容体

1. 研究開始当初の背景

Nardilysin (N-arginine dibasic convertase; NRDC) は M16 ファミリーに属するメタロプロテアーゼで、細胞局在に依存した多機能性を有する。これまでの我々の研究で、NRDC は細胞表面では膜型増殖因子 HB-EGF、炎症性サイトカイン TNF- α 、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) など広範な膜タンパク質の細胞外ドメインシェディング活性化因子として働き、癌やアルツハイマー病などの病態制御において重要な働きをしていることを明らかにした (Kanda *et al.*, EMBO Mol. Med. 2012、Ohno *et al.*, Neurobiol. Aging. 2014)。一方、核では転写調節因子として働き、褐色脂肪組織 (BAT) において NRDC は転写コアクチベーター PGC-1 α と結合して、熱産生を司る脱共役タンパク質 UCP1 の発現を制御していること (Hiraoka *et al.*, Nat. Commun. 2014)、膵 β 細胞において NRDC は、 β 細胞特異的な転写因子 MafA を介して β 細胞の機能維持に必須であることを明らかにした (Nishi *et al.*, Diabetes. 2016)。以上述べたように、NRDC は細胞局在に依存した多機能性 (細胞表面: シェディング調節、核内: 転写調節) を有することが分かってきており、この多機能性が NRDC 欠損マウスの多彩な表現型 (低体温、成長遅延、行動異常など) の原因になっていると考えられる。つまり、NRDC は生体恒常性の維持において重要な働きをしていると考えられる。

概日リズムは、時計遺伝子の転写・翻訳を介したフィードバックループによって制御されている。哺乳類では、転写因子 CLOCK と BMAL1 がヘテロダイマーを形成し、*Period* (*Per*) や *Cryptochrome* (*Cry*) などの時計遺伝子上流の E-box 配列に結合し、転写が活性化される。転写・翻訳産物である PER (PER1、PER2、PER3) と CRY (CRY1、CRY2) タンパク質はヘテロダイマーを形成し、核内に移行して CLOCK/BMAL1 の転写活性を抑制することで自身の発現を抑制するフィードバックループ (コアループ) を構成している。このコアループが 1 周するのにかかる時間が約 24 時間である。一方、CLOCK/BMAL1 によって転写が活性化される核内受容体 ROR (ROR α 、ROR β 、ROR γ) と REV-ERB (REV-ERB α 、REV-ERB β) は、*Bmal1* 遺伝子上流の RORE 配列を介して、*Bmal1* 遺伝子の転写をそれぞれ活性化および抑制することにより、サブループを形成しており、このサブループは概日リズムの安定性に寄与していると考えられている。しかしながら、なぜ 24 時間周期を長期間安定に維持し続けられるのか、その分子機構はいまだ不明な点が多く、これは未知の時計調節因子や未知の時計制御機構の存在を示唆するものである。

2. 研究の目的

近年、我々は NRDC がコアフィードバックループを構成する時計タンパク質と複合体を形成し、その機能調節を介して概日リズムを制御する新規時計調節因子であることを見出している。今回、NRDC がコアループだけではなく、ROR/REV-ERB によって構成されるサブループ制御にも関与しているのではないかと考え、本研究ではその可能性について検討を行った。

3. 研究の方法

NRDC によるサブループ制御機構の解明に向け、以下の項目を検討した。

(1) NRDC と ROR および REV-ERB との複合体形成の検討

293T/17 細胞に NRDC と ROR (ROR α 、ROR β 、ROR γ) または REV-ERB (REV-ERB α 、REV-ERB β) を強発現させ、免疫沈降法により複合体形成を検討した。

(2) NRDC と REV-ERB の結合ドメインの同定

NRDC および REV-ERB (REV-ERB α 、REV-ERB β) の各ドメイン欠損変異体を作製し、免疫沈降法により、それぞれの複合体形成に重要なドメインの同定を行った。

(3) NRDC と REV-ERB 活性制御機構の検討

NRDC による REV-ERB (REV-ERB α 、REV-ERB β) の活性制御機構をレポーターアッセイにより検討する。具体的には、293T/17 細胞にレポーター遺伝子 (RORE-luc) と REV-ERB をトランスフェクションし、NRDC を過剰発現またはノックダウンしたときの転写活性の違いをレポーターアッセイにより検討する。

(4) NRDC による *Bmal1* 発現リズム制御機構の検討

Bmal1-luc を発現させた NIH3T3 細胞 (NIH3T3-*Bmal1*-luc 細胞) を用い、NRDC を過剰発現またはノックダウンしたときの *Bmal1* の発現リズムをルミノメーターで解析する。

4. 研究成果

(1) NRDC と ROR および REV-ERB との複合体形成の検討

NRDC と ROR (ROR α 、ROR β 、ROR γ) または REV-ERB (REV-ERB α 、REV-ERB β) との複合体形成を、免疫沈降法により検討したところ、NRDC は少なくとも REV-ERB α および REV-ERB β と複合体を形成することが分かった。

(2) NRDC と REV-ERB の結合ドメインの同定

NRDC および REV-ERB (REV-ERB α 、REV-ERB β) の各ドメイン欠損変異体を作製し、免疫沈降法により複合体形成を検討したところ、それぞれの複合体形成に重要なドメインの同定に成功した。

(3) NRDC と REV-ERB 活性制御機構の検討

レポーターアッセイにより NRDC による REV-ERB (REV-ERB α 、REV-ERB β) の活性制御機構を検討したところ、NRDC は REV-ERB の機能調節に関与している可能性が示唆された。

(4) NRDC による *Bmal1* 発現リズム制御機構の検討

Bmal1-luc を発現させた NIH3T3 細胞 (NIH3T3-*Bmal1-luc* 細胞) を用い、NRDC を過剰発現またはノックダウンしたときの *Bmal1* の発現リズムをルミノメーターで測定したところ、NRDC の増減により *Bmal1* の発現リズムに変化がみられたことから、NRDC が *Bmal1* の発現リズム制御に深く関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saijo S, Ohno M, Iwasaki H, Matsuda S, Nishi K, Hiraoka Y, Ide N, Kimura T, Nishi E.	4. 巻 12
2. 論文標題 Nardilysin in adipocytes regulates UCP1 expression and body temperature homeostasis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 3449
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-07379-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yasuda D, Hiraoka Y, Ohno M, Nishi K, Iwasaki H, Kita T, Nishi E, Kume N.	4. 巻 44
2. 論文標題 Deficiency of Nardilysin in the Liver Reduces Serum Cholesterol Levels.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 363-371
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b20-00722.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ohno M, Nishi K, Hiraoka Y, Niizuma S, Matsuda S, Iwasaki H, Kimura T, Nishi E.	4. 巻 34
2. 論文標題 Nardilysin controls cardiac sympathetic innervation patterning through regulation of p75 neurotrophin receptor.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 11624-11640
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.20200604R. Epub 2020 Jul 19.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平岡義範、古市真唯、鎌田真由子、斉藤沙樹、久米典昭、吉種光、深田吉孝、池田正明、西英一郎
2. 発表標題 ナルディライジンによる核内受容体ROR/REV-ERB活性調節機構
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiraoka Y, Yoshitane H, Ohno M, Morita Y, Nunokawa R, Nishi K, Kume N, Kimura T, Fukada Y and Nishi E
2. 発表標題 Nardilysin is a critical component of the mammalian circadian negative feedback loop
3. 学会等名 XVI EUROPEAN BIOLOGICAL RHYTHMS SOCIETY CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平岡義範、高田千春、原有希、久米典昭、吉種光、 深田吉孝、池田正明、西英一郎
2. 発表標題 ナルディライジンによるROR/REV-ERB活性調節機構の解明
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平岡義範、高田千春、原有希、久米典昭、吉種光、深田吉孝、池田正明、西英一郎
2. 発表標題 ナルディライジンによる核内受容体ROR/REV-ERBの機能調節機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平岡義範、吉種光、大野美紀子、森田雄介、布川莉奈、西清人、久米典昭、木村剛、深田吉孝、西英一郎
2. 発表標題 ナルディライジンによるPER2を介した概日リズム制御機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	西 英一郎 (Nishi Eiichiro) (30362528)	滋賀医科大学・医学部・教授 (14202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------