

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）

研究期間：2008～2010

課題番号：20200068

研究課題名（和文） ナルディライジンによる体温恒常性維持機構の解明

研究課題名（英文） The role of nardilysin in body temperature homeostasis

研究代表者

平岡 義範 (HIRAOKA YOSHINORI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60397552

研究成果の概要（和文）：我々が作製したナルディライジン欠損マウス（NRDc^{-/-}）は、寒冷環境下（4℃）での体温維持機構が破綻していた。寒冷環境下で適応熱産生を担っているのは、褐色脂肪組織（BAT）のミトコンドリア脱共役タンパク質（UCP1）である。寒冷負荷後のNRDc^{-/-}のBATでは、UCP1の発現上昇が認められなかった。一方、NRDc^{-/-}において熱放散が亢進していることを明らかにし、NRDc^{-/-}における体温恒常性の破綻が、適応熱産生および熱放散抑制両者の障害によることを明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：Nardilysin (N-arginine dibasic convertase; NRDC) is a metalloendopeptidase of M16 family. We have generated NRDC knockout mice (NRDC^{-/-}) by gene targeting. NRDC^{-/-} mice showed cold-intolerance when exposed to cold temperature (4°C). Brown adipose tissue (BAT) is specialized for adaptive thermogenesis in response to cold exposure, which occurs through the activity of uncoupling protein 1 (UCP1). UCP1, a mitochondrial inner-membrane protein, uncouples the mitochondrial proton gradient from ATP production, which results in heat generation. We have evaluated the expression of thermogenic genes including UCP1 in BAT of wild-type (NRDC^{+/+}) and NRDC^{-/-} mice. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis revealed that UCP1 mRNA expression level of NRDC^{-/-} BAT did not change after cold exposure, while that of NRDC^{+/+} BAT was markedly increased. We have also evaluated changes in tail blood flow after cold exposure by using laser doppler flowmetry. While tail blood flow of NRDC^{+/+} mice was dramatically reduced after cold exposure, that of NRDC^{-/-} mice was not affected. These results indicate that NRDC^{-/-} mice could not keep their body temperature after cold exposure because of (i) impaired adaptive thermogenesis and (ii) impaired vasoconstriction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2009年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2010年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
総計	26,000,000	7,800,000	33,800,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：体温恒常性、適応熱産生、褐色脂肪組織、メタロプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の体温（核心温）は、外気温によ

らずほぼ一定に保たれる。寒冷暴露下の適応熱産生（adaptive thermogenesis）は、ふる

え(筋収縮)による熱産生と、主に褐色脂肪組織(BAT)における非ふるえ熱産生に依存する。非ふるえ熱産生の中心と考えられているのが、ミトコンドリア脱共役タンパク質(UCP1)によるプロトン勾配の熱への変換である。寒冷刺激は脳で察知され、交感神経活動の亢進を介してBATのβアドレナリン受容体を活性化する。同刺激は細胞内中性脂肪の分解を誘導し、遊離した脂肪酸はUCP1のプロトンチャンネル機能を活性化する。一方、β受容体刺激は、転写コアクチベーターであるPGC-1αと核内受容体(PPAR, TR, RXRなど)の協調作用を介して、UCP1の遺伝子発現も誘導する。生体は寒冷暴露下で、このように異なる時系列でのUCP1調節系を用いて熱産生を誘導していると考えられている。ところが、クローニングから欠損マウス作製まで一貫してUCP1を研究しているKozakは、同欠損マウスが遺伝背景によっては体温の低下を認めなかったことから、未知の熱産生機構の存在を類推している。我々が思いがけず手にすることになった低体温マウスの存在は、この未知のメカニズム解明への大きな手がかりとなる可能性がある。

2. 研究の目的

膜近傍部での蛋白分解により、膜蛋白質の細胞外ドメインが切断される現象を、細胞外ドメインシェディングと呼び、ADAMファミリー蛋白質が主な切断酵素であると考えられている。細胞外ドメインシェディングは、定常状態でも少しずつ生じているが、細胞の活性化に伴い劇的に誘導される。生体においても厳密に制御されていると思われるが、その活性化機構はよく分かっていなかった。我々は、ヘパリン結合性EGF様増殖因子(HB-EGF)の新規結合蛋白質として、メタロプロテアーゼ nardilysin (NRDc)を単離同定し、更に、NRDcがHB-EGF前駆体のシェディングを増強すること、NRDcのシェディング増強効果はADAMプロテアーゼの活性化を介して、HB-EGFに限定されず広範な膜蛋白質に及ぶことを明らかにした。個体レベルにおけるNRDcの生物学的機能を明らかにするため、NRDc欠損マウスを作製したところ、同ホモ接合体(NRDc^{-/-})は、思いがけず室温で低体温を呈し、更に驚くべきことに、寒冷暴露下(4℃)でNRDc^{-/-}は体温維持機構が破綻していた。したがって、本研究はNRDcによる体温恒常性維持機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

NRDcによる体温恒常性の制御機構の解明に向け、以下の実験を行った。

(1) BATにおける非ふるえ熱産生機構上重要とされる分子群の表現型解析;①BATの組

織学的解析;光学顕微鏡(H&E染色など)や電子顕微鏡を用いて、BATの組織学的解析を行った。②熱産生関連分子の発現解析;室温および寒冷負荷(4℃で3時間)後のNRDc^{+/+}とNRDc^{-/-}のBATを採取し、PGC-1αやUCP1などの熱産生関連分子群のmRNA発現量をqRT-PCRにより解析した。

(2) Skin coolingに伴うBATの温度変化の検討;NRDc^{+/+}およびNRDc^{-/-}のBATに直接、温度プローブを差し込み、skin coolingにより温度を下げた時のBATにおける温度変化を測定した。

(3) 寒冷負荷後の血流量変化の検討;寒冷負荷前後のNRDc^{+/+}とNRDc^{-/-}の尾の血流量変化を、レーザードップラー血流計を用いて測定を行った。

4. 研究成果

(1) BATにおける非ふるえ熱産生機構上重要とされる分子群の表現型解析;①BATの組織学的解析;H&E染色により、NRDc^{-/-}のBATで著明な脂肪蓄積の減少を認め、熱産生が亢進していることが示唆された。②熱産生関連分子の発現解析;室温において、NRDc^{-/-}のBATでPGC-1αやUCP1の発現が上昇していた。これは、H&E染色結果の所見と一致するものである。一方、寒冷負荷後、NRDc^{+/+}のBATでは、PGC-1αやUCP1の急激な発現上昇が認められたが、NRDc^{-/-}のBATではそれらの発現上昇が認められなかった。

(2) Skin coolingに伴うBATの温度変化の検討;NRDc^{+/+}はskin cooling後、BATにおける温度上昇が認められたが、NRDc^{-/-}ではskin cooling後の温度上昇が認められなかった。

(3) 寒冷負荷後の血流量変化の検討;NRDc^{+/+}は寒冷負荷5分後には、血管収縮に伴う血流量の低下が認められたが、NRDc^{-/-}は寒冷負荷後も血流量の変化が認められなかった。

以上の結果から、NRDc^{-/-}における体温恒常性の破綻が、適応熱産生および熱放散抑制両者の障害によることを明らかにすることができた。

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8件)

- ① Furuyama K, Kawaguchi Y, Akiyama H, Horiguchi M, Kodama S, Kuhara T, Hosokawa, S Elbahrawy A, Soeda T, Koizumi M, Masui T, Kawaguchi M, Takaori K, Doi R, Nishi E, Kakinoki R, Deng JM, Behringer RR, Nakamura T, and

- Uemoto S. Continuous cell supply from the Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat. Genet.* 2011; 43: 34-41.
- ② Masuda S, Oda Y, Sasaki H, Ikenouchi J, Higashi T, Akashi M, Nishi E, and Furuse M. Angulin/LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *J. Cell. Sci.* 2011; 15: 548-55.
- ③ Horie T, Ono K, Nishi H, Nagao K, Kinoshita M, Watanabe S, Kuwabara Y, Nakashima Y, Takanabe-Mori R, Nishi E, Hasegawa K, Kita T, Kimura T. Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with miR-146a-induced inhibition of the neuregulin-ErbB pathway. *Cardiovasc Res.* 2010; 87: 656-64.
- ④ Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Tomimoto H, Takao K, Miyakawa T, Oshima N, Kiyonari H, Kimura T, Kita T, and *Nishi E. Nardilysin Regulates Axonal Maturation and Myelination in the Central and Peripheral Nervous System. *Nat. Neurosci.* 2009; 12: 1506-1513
- ⑤ Hoshino K, Horiuchi H, Tada T, Tazaki J, Nishi E, Kawato M, Ikeda T, Yamamoto H, Akao M, Furukawa Y, Shizuta S, Toma M, Tamura T, Saito N, Doi T, Ozasa N, Jinnai T, Takahashi K, Watanabe H, Yoshikawa Y, Nishimoto N, Ouchi C, Morimoto T, Kita T, Kimura T. Clopidogrel Resistance in Japanese Patients Scheduled for Percutaneous Coronary Intervention. *Circ J.* 2009; 73: 336-42
- ⑥ Mitsuoka H, Kume N, Hayashida K, Inui-Hayashiada A, Aramaki Y, Toyohara M, Jinnai T, Nishi E, Kita T. Interleukin 18 stimulates release of soluble lectin-like oxidized LDL receptor-1 (sLOX-1). *Atherosclerosis.* 2009; 202: 176-82
- ⑦ Hiraoka Y, Yoshida K, Ohno M, Matsuoka T, Kita T, Nishi E*. Ectodomain shedding of TNF-alpha is enhanced by nardilysin via activation of ADAM proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 370: 154-8
- ⑧ Matsuda M, Kobayashi Y, Masuda S, Adachi M, Watanabe T, Yamashita JK, Nishi E, Tsukita S, Furuse M. Identification of adherens junction-associated GTPase activating proteins by the fluorescence localization-based expression cloning. *Exp Cell Res.* 2008; 314: 939-49
- [学会発表] (計 23 件)
- ① 西 英 一 郎 : Nardilysin regulates axonal maturation and myelination through modulating ectodomain shedding of neuregulin1、シンポジウム『Ectodomain shedding biology-細胞膜蛋白質の機能変換機構-』 BMB2010 (2010年12月9日、神戸)
- ② Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Kita T, Kimura T, Nishi E. The role of a metalloendopeptidase nardilysin in adaptive thermogenesis. ポスター発表 BMB2010 (2010年12月7-10日、神戸)
- ③ Matsuoka T, Hiraoka Y, Ohno M, Oshima N, Kiyonari H, Kimura T, Kita T, Nishi E. NRDC controls lipid and glucose metabolism through the modulation of PPARalpha activity. ポスター発表、BMB2010 (2010年12月7-10日、神戸)
- ④ Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Nishi K, Kimura T, Kita T, Nishi E. シェディング活性化因子ナルディライジンの多発性硬化症における意義の解明、ポスター発表 BMB2010 (2010年12月7-10日、神戸)
- ⑤ Matsuoka T, Hiraoka Y, Ohno M, Nishi K, Kimura T, Kita T, Nishi E. A Metalloendopeptidase Nardilysin controls Lipid and Glucose metabolism through the modulation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor alpha activity. American Heart Association Sessions 2010 November 13-17 Chicago, Illinois
- ⑥ 神田啓太郎、米門秀行、妹尾浩、千葉勉、西英一郎 : ナルディライジンによる IL-6/Stat3 シグナルを介した胃癌細胞の増殖制御、第 69 回日本癌学会学術総会 2010.09.22-24 大阪
- ⑦ 松岡 龍彦、平岡 義範、大野 美紀子、

- 大島 尚子、清成 寛、木村 剛、北 徹、西 英一郎. A metalloendopeptidase nardilysin is an essential regulator for glucose and lipid metabolism、第 47 回 日本臨床分子生物学会 2010 年 4 月 10-11 日 東京
- ⑧ 大野 美紀子、平岡 義範、松岡 龍彦、木村 剛、北 徹、西 英一郎. Nardilysin regulates axonal maturation and myelination in the central and peripheral nervous system, 第 47 回 日本臨床分子生物学会 2010 年 4 月 10-11 日 東京
- ⑨ Ohno M, Matsuoka T, Hiraoka Y, Niizuma S, Shioi T, Kita T, Kimura T, Nishi E. A Metalloendopeptidase Nardilysin is a Regulator of Blood Pressure and Heart Rate, Oral Presentation, The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 5-7, 2010, Kyoto
- ⑩ Matsuoka T, Ohno M, Hiraoka Y, Kita T, Kimura T, Nishi E. Nardilysin, a Novel Transcriptional Co-regulator of PPARalpha, Controls Glucose and Lipid Metabolism, Poster Presentation, The 74th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 5-7, 2010, Kyoto
- ⑪ Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Kita T, Kimura T, Nishi E. Critical roles of nardilysin in energy balance and thermoregulation. ポスター発表 第 32 回日本分子生物学会年回 (2009 年 12 月 9-12 日、横浜)
- ⑫ Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Kimura T, Kita T, Nishi E. Nardilysin regulates axonal maturation and myelination in the CNS and PNS. ポスター発表 第 32 回日本分子生物学会年回 (2009 年 12 月 9-12 日、横浜)
- ⑬ Matsuoka T, Ohno M, Hiraoka Y, Kita T, Kimura T, Nishi E. A metalloendopeptidase nardilysin is an essential regulator for glucose and lipid metabolism. ポスター発表 第 32 回日本分子生物学会年回 (2009 年 12 月 9-12 日、横浜)
- ⑭ Matsuoka T, Ohno M, Hiraoka Y, Kita T, Kimura T, Nishi E. A metalloendopeptidase nardilysin is an essential regulator for glucose and lipid metabolism. Poster presentation, The 82th Scientific Sessions of American Heart Association, November 15-18, 2009, Orland, Florida
- ⑮ Nishi E. : Nardilysin Regulates Axonal Maturation and Myelination in the Central Nervous System. Gordon Research Conference (Matrix Metalloproteinases) (Aug 30 - Sep 4, 2009, Les Diablerets, Switzerland) 招待講演
- ⑯ Ohno M, Matsuoka T, Hiraoka Y, Kita T, Nishi E. Nardilysin Regulates Axonal Maturation and Myelination in the Central and Peripheral Nervous System. Poster presentation, Gordon Research Conference (Matrix Metalloproteinases) (Aug 30 - Sep 4, 2009, Les Diablerets, Switzerland)
- ⑰ 西 英一郎 : A metalloendopeptidase nardilysin is a critical regulator for lipid and glucose metabolism, ポスター、第 41 回 日本動脈硬化学会・学術集会 (2009 年 7 月 17-18 日、下関)
- ⑱ Ohno M, Matsuoka T, Hiraoka Y, Kita T, Nishi E. Nardilysin, a Metalloendopeptidase, is a Novel Regulator of Blood Pressure and Heart Rate, Featured Research Session, The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 20-22, 2009, Osaka
- ⑲ Matsuoka T, Ohno M, Hiraoka Y, Kita T, Nishi E. Nardilysin Deficiency Causes Lean Phenotype with Hypotriglyceridemia and Hypoinsulinemia, Oral Presentation, The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 20-22, 2009, Osaka
- ⑳ Tada T, Horiuchi H, Nagai K, Tazaki J, Nishi E, Touma M, Tamura T, Akao M, Furukawa Y, Kimura T, Kita T. Clopidogrel Resistance in Japanese Patients Scheduled for Percutaneous Coronary Intervention, Poster Session, The 73rd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, March 20-22, 2009, Osaka

⑳ Hiraoka Y, Ohno M, Matsuoka T, Kita T, Nishi E. A metalloendopeptidase nardilysin is an essential regulator for inflammatory response. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity (Sep 7 - Sep 11, 2008, Hyogo)

㉑ 西 英一郎：細胞外ドメインシェディングの制御におけるナルディライジンの役割、シンポジウム『膜結合性プロテアーゼとその制御』第13回 病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会 (2008年8月22-23日、大阪)

㉒ Hiraoka Y, Ohno M, Matsuoka T, Kita T, Nishi E. A metalloendopeptidase nardilysin, activator for ectodomain shedding, is an essential regulator for growth and energy metabolism, ミニシンポジウム「膜近傍におけるプロテオリシス」：Mini-symposium "Proteolysis in the Perimembrane Region". 第60回日本細胞生物学会、(2008年6月29日-7月1日、横浜)

〔図書〕(計2件)

① 西 英一郎：『神経軸索と髄鞘形成におけるシェディング活性化因子ナルディライジンの役割』、*BIO Clinica* 25 (9): 818-22 (2010)

② 西 英一郎：『ナルディライジンによる細胞外ドメインシェディング制御機構と、その神経軸索・髄鞘形成における役割』、特集：細胞外プロテオリシス研究の最前線、*生化学* 82 (10): 931-939 (2010)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：ナルディライジンの高感度免疫測定法
発明者：西 英一郎、平岡 義範、松本 恭一、國近 誠
権利者：京都大学 (50%)、三洋化成工業株式会社 (50%)
種類：特許
番号：特願 2009-160792

出願年月日：2009年7月7日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://kyoto-u-cardio.jp/kisokenkyu/sentan-bunshi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平岡 義範 (HIRAOKA YOSHINORI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60397552

(2) 連携研究者

西 英一郎 (NISHI EIICHIRO)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：30362528