

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02977

研究課題名（和文）ミトコンドリア関連小胞体膜を介した褐色脂肪細胞の即時的熱産生亢進機構の解明

研究課題名（英文）The study of thermogenic mechanisms via mitochondria associated membrane

研究代表者

池田 賢司 (Ikeda, Kenji)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：30846944

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：褐色脂肪細胞は、ミトコンドリアの電子伝達系の活性化によって生じたプロトン密度勾配

本研究では、褐色脂肪細胞のMAM（Mitochondria-associated membrane：小胞体とミトコンドリアが接触する領域）に着目し、交感神経刺激による褐色脂肪細胞の即時的な熱産生亢進の分子メカニズムを解明することを目指している。本研究では、マウス褐色脂肪細胞からMAMを単離しミトコンドリア、小胞体、MAM分画それぞれから発現するタンパク質を質量解析を用いて同定した。さらに、MAMに発現する分子であるPP2A サブユニットを褐色脂肪細胞特異的に欠損するマウスを作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、褐色脂肪細胞の熱産生メカニズムにおけるMAM（ミトコンドリア関連膜）の役割、分子を発見しています。質量解析を用いて、褐色脂肪細胞のMAM、ミトコンドリア、小胞体に発現するタンパク質を特定し、MAMに発現する分子PP2A サブユニットの欠損が熱産生に及ぼす影響を示しました。この研究は、交感神経刺激による即時的な熱産生亢進の分子メカニズムの理解を深め、新たな肥満治療や代謝疾患の治療法開発に寄与する可能性があります。社会的意義としては、肥満や糖尿病などの代謝疾患の予防や治療法の進展が期待され、健康増進や医療費削減に貢献できる点が挙げられます。

研究成果の概要（英文）：Brown adipocytes generate a proton gradient through the activation of the mitochondrial electron transport chain. This study focuses on the mitochondria-associated membrane (MAM), the region where the endoplasmic reticulum contacts mitochondria, in brown adipocytes. The aim is to elucidate the molecular mechanisms underlying the immediate enhancement of thermogenesis in brown adipocytes induced by sympathetic nervous stimulation. In this study, we isolated MAM from mouse brown adipocytes and identified proteins expressed in the mitochondria, endoplasmic reticulum, and MAM fractions using mass spectrometry. Furthermore, we created mice with brown adipocyte-specific deletion of the PP2A subunit, a molecule expressed in MAM.

研究分野：熱産生脂肪細胞

キーワード：褐色脂肪細胞 MAM 熱産生脂肪細胞 PP2A

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

褐色脂肪細胞は、ミトコンドリアの電子伝達系の活性化によって生じたプロトン密度勾配のエネルギーを、Uncoupling protein 1 (UCP1) によって脱共役することで熱産生を行う。褐色脂肪細胞の長期的な熱産生亢進には、転写・翻訳を介した UCP1 の発現増加が重要であることが知られているが、褐色脂肪細胞の熱産生は、交感神経刺激によって分単位で即時的に上昇するが、その際に UCP1 が活性化するメカニズムは明らかになっていない。

本研究では、褐色脂肪細胞の MAM (Mitochondria-associated membrane: 小胞体とミトコンドリアが接触する領域であり、ミトコンドリアの電子伝達系を活性化する小胞体からのカルシウム流入を制御する) に着目した。褐色脂肪細胞における MAM の役割は不明な点が多く、熱産生、代謝への制御を行っていることが推定される。

2. 研究の目的

本研究では、褐色脂肪細胞のミトコンドリア関連小胞体膜 (MAM) に着目し、褐色脂肪細胞の即時的に生じる熱産生増大メカニズムを、細胞モデル、マウスモデルを用いて生理的な意義を含めて明らかとすることを目的とする。

・本研究では世界に先駆けて、褐色脂肪細胞のミトコンドリア関連小胞体膜 (MAM) に着目し、即時的な熱産生亢進の分子メカニズムを解明する。このような着眼点で計画された研究はこれまでになく、独自性は高いものと思われる。

・研究代表者は、独自の検討により MAM を脂肪含量の多い褐色脂肪細胞から純粋に単離することに成功し、MAM に発現するタンパク質を質量分析により網羅的に解析した。その結果、褐色脂肪細胞の MAM 分子として、褐色脂肪細胞に選択的に発現する Protein phosphatase 2 (PP2A) のサブユニット (Brown adipocyte selective subunit: BA SU) を既に同定しており、本研究における独自性と優位性を有している。

・本研究により、褐色脂肪細胞の熱産生亢進の核心にせまる分子メカニズムが明らかになれば、肥満や糖尿病に対してエネルギー消費の亢進という観点からの新たな治療戦略の創出に繋がることが期待され、創造性も高いものと思われる。

3. 研究の方法

(1) MAM 分子 BA SU の褐色脂肪細胞 MAM 形成制御についての検討

PP2A は肝臓において MAM の形成制御に関わることが報告されている。褐色脂肪細胞においても PP2A が発現していることから MAM を制御している可能性が考えられる。

PP2A は調節サブユニットを有することが知られており、サブユニットが基質の選択性及び酵素活性を制御すること、すなわち組織における選択的な機能を規定すると考えられている。実際、BA SU の遺伝子発現は褐色脂肪細胞選択的な遺伝子発現パターンを示しており、褐色脂肪細胞の MAM における非常に重要な機能をサブユニットである BA SU が制御している可能性が考えられる。研究代表者は褐色脂肪細胞の MAM を単離し、発現するタンパク質の網羅的解析 (質量分析) を行い、褐色脂肪細胞の MAM に BA SU が多く発現していることを独自に見出している。BA SU が褐色脂肪細胞の MAM 形成制御をどのように行うか、野生型マウスの初代褐色脂肪細胞株 (樹立済み) を対象に、PKA 経路の活性化を行うノルエピネフリン (NE) 刺激、BA SU の遺伝子ノックダウン、過剰発現などを行い、電子顕微鏡を用いて MAM の構造がどのように変化するか観察する。

(2) MAM 分子 BA SU の褐色脂肪細胞における結合タンパクの同定

PP2A のサブユニットは、基質の選択性及び酵素活性を制御することが知られている。このことは、褐色脂肪細胞選択的に MAM に発現するサブユニットである BA SU が、褐色脂肪細胞の特異的な機能を制御している可能性を示唆するものであり、BA SU と結合するタンパクは MAM における基質や酵素活性制御因子の候補になるものと考えられる。そこで、褐色脂肪細胞の MAM を抽出したサンプルに対して BA SU に対する抗体を用いて免疫沈降を行い、沈降したサンプルを質量分析により網羅的に解析、BA SU に結合するタンパクを同定する。

(3) MAM 分子 BA SU のマウス褐色脂肪細胞の熱産生および個体レベルのエネルギー消費に及ぼす影響の解明

マウス個体レベルで褐色脂肪細胞の熱産生に及ぼす影響を検討する。

最近、研究代表者らが作製した褐色脂肪細胞選択的タモキシフェン誘導型 Cre マウス (UCP1CreERT2 マウス) と BA Suflox マウスを交配し、任意の時期に褐色脂肪細胞選択的に BA SU 遺伝子を欠損することができる褐色脂肪細胞選択的遺伝子欠損マウスモデルを作製する。作成した遺伝子欠損マウスに対して、MAM の形成を電子顕微鏡で観察するとともに、寒冷刺激による褐色脂肪組織の温度変化やマウス個体レベルの酸素消費量などを解析する。遺伝子欠損マウスにおいて、褐色脂肪細胞の熱産生および個体レベルでのエネルギー消費の低下が観察されれば、そのマウスに高脂肪食を負荷し体重増加に及ぼす影響を個体レベルで検討する。

以上の実験により、マウスの褐色脂肪組織の熱産生および個体レベルのエネルギー消費にお

ける、MAM 制御分子としての BA SU の意義を解明する。

4. 研究成果

(1) MAM 分子 BA SU の褐色脂肪細胞 MAM 形成制御についての検討

褐色脂肪細胞株を用いて MAM の定量的な画像評価を行ったところ、ノルエピネフリン投与によって褐色脂肪細胞の MAM が増加した。また PKA 阻害薬は MAM の形成を阻害しなかったことから MAM の形成制御と PKA シグナルは独立している可能性が示唆された。

(2) MAM 分子 BA SU の褐色脂肪細胞における結合タンパクの同定

BA サブユニットと結合するタンパク質を同定するために、サブユニットに FLAG タグを発現する褐色脂肪細胞株を作製した。続いて褐色脂肪細胞に分化させタンパク質を抽出 FLAG-IP を行い SU に結合するタンパクを回収し、質量分析法により 1794 のタンパク質の同定を行った。タンパク質には、ミトコンドリア呼吸、TCA サイクルに関わるタンパク質、MAM 形成に関わることが報告されている GRP75 などを認めた。

(3) MAM 分子 BA SU のマウス褐色脂肪細胞の熱産生および個体レベルのエネルギー消費に及ぼす影響の解明

研究代表者らが作製した褐色脂肪細胞選択的タモキシフェン誘導型 Cre マウス (UCP1CreERT2 マウス) と BA SU flox マウスを交配し、任意の時期に褐色脂肪細胞選択的に BA SU 遺伝子を欠損するマウスを作製した。褐色脂肪細胞における MAM の組織学的検討は電子顕微鏡を用いて現在解析を進めている。褐色脂肪細胞の遺伝子発現を検討したところ、熱産生に関わる遺伝子発現が KO マウスでは有意に低下した。通常食負荷では個体の酸素消費量がコントロールマウスと KO マウスでは差が認められなかった。そのため、KO マウスでは何らかの代償性変化が起こっていることが推定される。現在、マウスに高脂肪食負荷をおこない体重増加、肥満モデルでの褐色脂肪細胞における SU の影響を検討する。

(4) まとめ

本研究において、新たにその機能が明らかになりつつある MAM という小胞体-ミトコンドリアのオルガネラ連関に着目し、長年に亘って不明であった交感神経刺激によって即時的に生じる褐色脂肪細胞の熱産生亢進の分子メカニズムが明らかになることが予想される。また、本研究によって明らかになることが想定されるメカニズムは、細胞内シグナル伝達によって、オルガネラの物理的な位置関係を変化させ相互作用を生むことが、熱産生という物理変化につながる生命現象の一端を解明する可能性もあり、興味深いと思われる。SU の結合タンパクは代謝だけでなく、様々な機能を有するタンパク質が存在することから MAM の機能は熱産生のみならず細胞の恒常性制御なども推定される。引き続きマウス個体の解析を進め、明らかとしたい。

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 0件）

1. 著者名 Horino M, Ikeda K, Yamada T	4. 巻 11
2. 論文標題 The Role of Thermogenic Fat Tissue in Energy Consumption.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Curr Issues Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 3166-3179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Ikeda K, Yamada T	4. 巻 172
2. 論文標題 Adipose tissue thermogenesis by calcium futile cycling.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Biochem.	6. 最初と最後の頁 197-203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Niitsu Y, Komiya C, Takeuchi A, Hara K, Horino M, Aoki J, Okazaki R, Murakami M, Tsujimoto K, Ikeda K, Yamada T.	4. 巻 18
2. 論文標題 Increased serum extracellular vesicle miR-144-3p and miR-486a-3p in a mouse model of adipose tissue regeneration promote hepatocyte proliferation by targeting Txnip.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0284989
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0284989.	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4件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池田 賢司, 堀野 雅人, 岡崎 玲, 新津 吉博, 竹内 彬, 原 一成, 青木 惇, 村上 正憲, 辻本 和峰, 小宮 力, 山田 哲也
2. 発表標題 加齢マウスにおける新規ページ脂肪前駆細胞の同定およびその機能解析
3. 学会等名 第33回分子糖尿病学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田 賢司
2. 発表標題 ベージュ脂肪細胞の熱産生制御
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田 賢司
2. 発表標題 ベージュ脂肪細胞の熱産生制御
3. 学会等名 日本肥満学会/JASSOシンポジウム6（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田 賢司、岡崎 玲、堀野 雅人、青木 惇、兼田 稜、原 一成、竹内 彬、村上正憲、辻本和峰、小宮力、山田哲也
2. 発表標題 褐色脂肪細胞に発現するミトコンドリア関連小胞体膜（MAM）分子PP2Aのサブユニットの機能解析
3. 学会等名 日本肥満学会
4. 発表年 2023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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------