

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：32660  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2011～2011  
課題番号：23659207  
研究課題名（和文） 新規肥満症関連 E3 ユビキチンリガーゼ WWP1 の機能解析  
研究課題名（英文） Functional Analysis of a Novel Obesity-associated E3 Ubiquitin Ligase WWP1  
研究代表者  
樋上 賀一 (HIGAMI YOSHIKAZU)  
東京理科大学・薬学部・教授  
研究者番号：90253640

## 研究成果の概要（和文）：

がん抑制遺伝子 p53 は種々の E3 ubiquitin ligase の発現を制御し、また p53 自身はこれら E3 ubiquitin ligase により翻訳後修飾を受けて細胞機能に影響を及ぼしていることが明らかとなっている。我々は過去に p53 に関連すると報告されている全 18 個の E3 ubiquitin ligase の中から、WWP1 が p53 依存的に、肥満に関連して脂肪組織において発現が増加することを見いだした。このタンパク質の発現はインシュリンにより負に制御されており、脂肪細胞株でのこのタンパク質のノックダウンは脂肪細胞の分化を抑制した。以上より、WWP1 は新規の肥満病態の増悪因子であり、その発現は p53 とインシュリンにより制御されている可能性が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

It is well known that tumor suppressor p53 transcriptionally regulates the expression of several E3 ubiquitin ligases and the ligases post-translationally modulate p53 itself. We found that the expression of p53-targeted E3 ubiquitin ligase WWP1 was specifically up-regulated in white adipose tissue (WAT) of obese mice. An insulin administration reduced the expression of WWP1 protein in WAT in obese mice. Moreover, a knockdown for WWP1 suppressed adipocyte differentiation in 3T3-L1 preadipocyte cell line. Our findings suggest that WWP1 is a novel marker protein of obese WAT, and its expression is regulated by both p53 and insulin.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：p53、WWP1、ユビキチンリガーゼ、脂肪細胞、肥満症

## 1. 研究開始当初の背景

がん抑制遺伝子 p53 は DNA 障害や酸化ストレス、ER ストレスなど種々のストレスに対するセンサーとして機能し、細胞周期チェックポイントや DNA 損傷修復、アポトーシス制御などに重要な役割を果たしていることが知られている。また、近年、p53 が細胞内の代謝制御にも重要な役割を果たすことが明らかになってきた。脂肪細胞や脂肪組織では p53 を特異的にノックアウトすることにより、インシュリン感受性が亢進し、種々の炎症性サイトカインの発現が抑制されることが報告されている。一方、p53 タンパク質は核内だけでなく細胞質にも局在し、様々な細胞機能を果たしており、この p53 の転写の活性化や安定性、細胞内局在は、種々の E3-ユビキチンリガーゼにより制御されていることが明らかとなってきた。

## 2. 研究の目的

我々は、全 18 種の p53 に対する E3-ユビキチンリガーゼの中から、高脂肪食負荷に特異的で、脂肪組織選択的、且つ、p53 により誘導される E3-ユビキチンリガーゼとして、WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 (WWP1) 遺伝子を同定した。そこで、本研究提案では、脂肪細胞分化およびマウス HFD 状態下での WWP1 の機能について解析した。

## 3. 研究の方法

1) ラット肥満モデルとして 6 ヶ月齢で屠殺した Zucker fatty ラットを用いた。またマウスは 4 週齢より高脂肪食を与え、適宜屠殺し、肥満モデルとした。

2) マウスおよびラット WWP1 に共通なアミノ酸配列をしめす 24 個のアミノ酸からなるポリプепチドを合成し、これをウサギに免疫することにより、マウスおよびラット WWP1 に交叉性を示すポリクローナル抗体を作成した。

3) WWP1 mRNA 発現レベルは real-time RT-PCR 法により解析した。

4) WWP1 タンパク質発現レベルは、作成したポリクローナル抗体を用いた Western blot 法により解析した。

5) shWWP1 を組み込んだレトロウイルスベクターを 3T3-L1 脂肪前駆細胞にトランスフェクションし、WWP1 ノックダウン株を作成した。そして、通常の方法で脂肪細胞へ分化させた。

## 4. 研究成果

1) real-time RT-PCR 法を用いて mRNA レベルを解析すると、Zucker fatty ラットの脂肪組織において、WWP1 mRNA の発現は顕著に亢進した。また、マウスへの高脂肪食給餌により、脂肪組織での WWP1 mRNA の発現は、経時的に増加した。

2) Western blot 法により WWP1 タンパク質レベルを解析すると、Zucker fatty ラットの脂肪組織において、WWP1 の発現は顕著に亢進していた。また、マウス脂肪組織においても、高脂肪食給餌の期間に比例して、WWP1 タンパク質発現は亢進した。また、その増加は mRNA の増加に比較して、より顕著であった。

3) インスリン投与により高脂肪食負荷マウス脂肪組織での WWP1 発現は抑制された。

4) レトロウイルスベクターを用いた WWP1 のノックダウンにより 3T3-L1 細胞の分化は促進されたが、脂肪滴の蓄積は抑制傾向にあった。

以上、in vivo および in vitro の解析結果を考え併せると、WWP1 は肥満病態のマーカーとなりうること、またその発現は p53 により促進的に、インスリンにより抑制的に制御されていること、さらにその発現増加は肥満病態を増悪する方向に機能している可能性が示唆された。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計◇件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋上 賀一 (HIGAMI YOSHIKAZU)

東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：90253640

(2) 研究分担者

沖田 直之 (OKITA NAUYUKI)

東京理科大学・薬学部・助教

研究者番号：60453841

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：