

## 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25年 6月 3日現在

機関番号：14401  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23700445  
 研究課題名（和文）  
 Necdin-Sirt1 複合体によるエネルギー代謝調節機構  
 研究課題名（英文）  
 Regulation of energy metabolism by necdin-Sirt1 complex  
 研究代表者  
 長谷川 孝一（HASEGAWA KOICHI）  
 大阪大学・たんぱく質研究所・助教  
 研究者番号：20546783

## 研究成果の概要（和文）：

エネルギー代謝や長寿に關与する脱アセチル化酵素 Sirt1 と、その神経系における正の制御因子である Necdin によるエネルギー代謝関連因子の制御機構と生理的意義について検討した。中枢神経系の Necdin-Sirt1 複合体は視床下部-下垂体-甲状腺経路を介した熱産生を制御し、さらに、Necdin は細胞内のエネルギー産生工場であるミトコンドリアの機能についても關与し得る事を見いだした。

## 研究成果の概要（英文）：

I examined the regulation of energy metabolism-related factors by necdin-Sirt1 complex. Necdin-Sirt1 complex controlled Foxo1 acetylation and neuropeptide gene expression to modulate the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. I also found necdin regulates the mitochondrial biogenesis and function.

## 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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

## 研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：エネルギー代謝、アセチル化、視床下部

## 1. 研究開始当初の背景

Necdin は胚性がん細胞から最終分化したニューロンに出現する遺伝子産物として同定された (Maruyama et al., 1991, *Biochem Biophys Res Commun* 178:291-296)。Necdin は末梢及び中枢神経系のほぼ全てのニューロンで発現し、特に視床下部で高発現している (Uetsuki et al., 1996, *J Biol Chem* 271:918-924)。また、転写因子 (E2F1、p53 など) や膜蛋白質 (p75NTR、TrkA) と結合し、細胞増殖抑制、ニューロンの生存維持及び、分化促進に作用する多機能アダプター分子である。例えば、がん抑制遺伝子 p53 はアセチル化修飾を受ける事で転写活性が増強さ

れるが、Necdin は脱アセチル化酵素 Sirt1 と安定的な三者の複合体を形成して p53 の脱アセチル化を促進し、ニューロンのアポトーシスを阻害する事が明らかとなった (Hasegawa and Yoshikawa, 2008, *J Neurosci* 28:8772-8784)。一方、Sirt1 は p53 以外にも様々な調節因子を基質とし、エネルギー代謝や寿命に關与する事が示唆されている (Bordone and Guarente, 2005, *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:298-305)。この内、フォークヘッド型転写因子である Foxo1 は視床下部における摂食や体温調節を司っている (Kitamura et al., 2006, *Nat Med* 12:534-540)。近年、世界的に社会問題となっている肥満は食生

活や運動習慣の影響から引き起こされる単純性肥満の他に、代謝異常や内分泌疾患の一部で起こる症候性肥満に大別される。後者は遺伝的背景が大きく関与している。Prader-Willi 症候群(PWS)は症候性肥満の内、視床下部性肥満に分類される代表的な疾患である。PWS は過食による肥満以外に、低身長、性腺機能不全、体温調節能の異常等を症状とし、これらは全て視床下部の異常であると推察される。また、PWS はゲノムインプリンティングが関与する代表的な疾患である。ゲノムインプリンティングとは、配偶子形成の際に特定の遺伝子がメチル化を受けて不活性化される現象の事で、厳密なエピジェネティック制御が存在する。PWS はヒト父性染色体 15q11-q13 の欠失によって起こる事が多く、この領域に存在する父性発現遺伝子の欠損が疾患の原因である事が示唆される。興味深い事に、Necdin は PWS の責任領域に位置し、PWS では Necdin の発現が認められない。PWS における摂食や体温調節の異常と Necdin 遺伝子の欠損の相関は現在明らかとなっていないが、本研究では Necdin-Sirt1 複合体が脱アセチル化を介した Foxo1 の転写活性を制御し、摂食や体温を調節するという着想に至った。一方、末梢の褐色脂肪組織において Necdin がインスリン/IGF-1 シグナル経路の調節因子として作用する事が、米ハーバード大学 Ronald Kahn 博士らとの共同研究によって明らかとなった(Tseng et al., 2005, Nat Cell Biol 7:601-611)。Sirt1 は上述の様に、この経路に関与する Insulin receptor substrate (IRS) や Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 (PGC-1) の脱アセチル化を触媒する。このため、末梢組織においても Necdin-Sirt1 複合体を介した代謝調節機構の存在が示唆される。Necdin-Sirt1 複合体を中核とする中枢神経系(視床下部)および末梢組織(脂肪組織や筋肉)におけるエネルギー代謝調節機構の解明は、PWS だけでなく様々な肥満の予防や治療を包括的に考察するうえで重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

世界的な社会問題となっている肥満はエネルギーの過剰摂取や消費不足によってもたらされるが、遺伝的要因に関しても重要視されている。脱アセチル化酵素である Sirt1 はエネルギー代謝や長寿に関与する因子として注目を集めているが、申請者は神経系における正の調節因子として Necdin を同定した。Necdin は特に脳における視床下部や筋肉で発現しており、エネルギー代謝に関与し Sirt1 の基質である Foxo1 や PGC-1 の調節に寄与している可能性が高い。本研究では、Necdin-Sirt1 複合体による代謝関連因子の

脱アセチル化を介したエネルギー代謝調節機構の解明に迫り、PWS をはじめとするメタボリック症候群の予防及び治療法の開発に貢献しうると考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) 分子メカニズム

主に株化細胞(HEK293A 等)を用いて、免疫沈降法による 3 者の結合、ルシフェラーゼをレポーターたんぱく質とした転写活性測定、アセチル化 Foxo1 を特異的に認識する抗体を用いた脱アセチル化反応測定を行った。

### (2) 生理学的意義の解析

主に Necdin 欠損マウスを用いて、その野生型マウスと比較検討した。具体的にはそれぞれのマウスの視床下部または、大脳皮質由来の分散培養ニューロンから mRNA 及びたんぱく質を回収し、それらの発現量をリアルタイム PCR と Western blot 法により解析した。エネルギー代謝を包括的に理解する一端として、離乳期前後からの摂食量と体重変化を成体までモニタリングした。また、直腸温の低下がみられた事から、血液中の甲状腺ホルモンの測定を ELISA により行った。

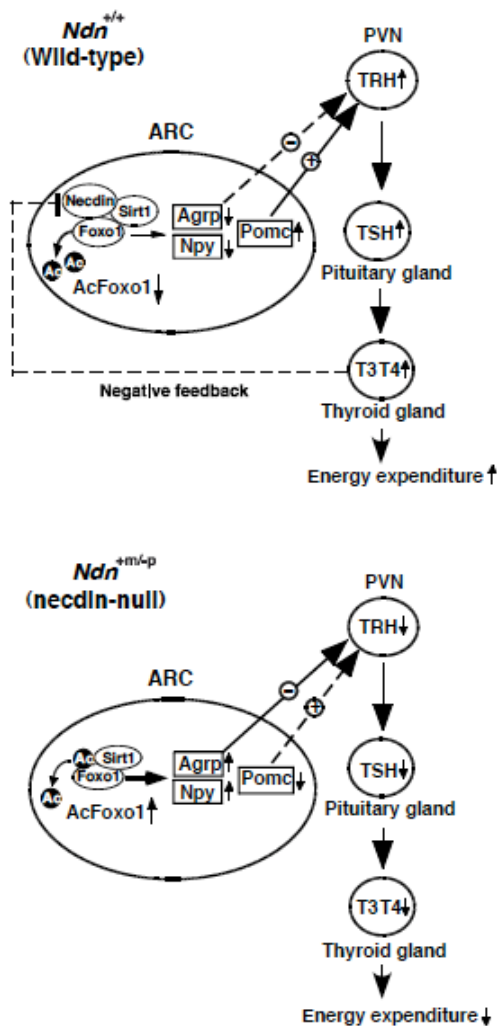
## 4. 研究成果

### (1) 視床下部 Foxo1 の脱アセチル化制御を介した熱産生機構

本研究課題採択までに、申請者は Necdin が Sirt1 による Foxo1 の脱アセチル化を増強し、転写活性を阻害する事を明らかにした。また、Necdin 欠損マウスを用いた解析から、このマウスの視床下部におけるアセチル化 Foxo1 の陽性細胞の増加及び、Foxo1 によって正に制御されている Npy と Agrp の転写産物が増加している事を明らかにした。

この研究成果を踏まえ、Necdin-Sirt1 複合体による Foxo1 のアセチル化制御と、それに係る生理学的意義について検討した。視床下部弓状核に存在する Npy と Agrp は摂食を正に制御する事から、Necdin 欠損マウスにおける摂食量を検討したところ、上述の様に Necdin 欠損マウスの Npy と Agrp の転写産物が増加しているにも関わらず、摂食量の亢進(過食)はみられなかった。Agrp 及び Npy は摂食亢進作用だけでなく、視床下部の室傍核に存在する TRH(Thyrotropin-releasing hormone)ニューロンを抑制して、熱産生を阻害する。TRH は下垂体の TSH(Thyroid stimulating hormone)や、甲状腺の T4 及び T3 を介し、熱産生を上げ、体温を上昇させる。これらのホルモンを Western blot 法及び、ELISA 法により測定すると、Necdin 欠損マウスにおいて脳及び、血清中のホルモン量がいずれも少なかった。この事から、Necdin 欠損マウスにおい

では熱産生異常が期待されたので、直腸温を測定したところ、野生型マウスに対し2℃程低かった。これらの結果から、Necdin-Sirt1複合体はFoxo1を脱アセチル化し、視床下部-下垂体-甲状腺経路を介した熱産生を促進する事で体温を上昇させるが、これら一連の経路を打ち消すネガティブフィードバック機構が存在するか検討した。Necdin-Sirt1複合体の活性化により最終的に存在量が増大する甲状腺ホルモン T3 に着目し、マウスにこれを腹腔内投与する事で、甲状腺機能亢進状態を起こさせると、興味深い事に、視床下部特異的に Necdin の発現量が減少し、それに伴う下流の経路のスイッチングが起こった。本研究では Foxo1 による視床下部-下垂体-甲状腺の経路のコントロールを Necdin-Sirt1 複合体が制御している事を突き止める事が出来た。また、PWS の患者において、甲状腺ホルモンの減弱や、低体温症の傾向がみられることから、本研究の分子メカニズムはこれらの現象を説明し得る可能性を示しており、この症候群の治療や予防に貢献出来得る成果である。



## (2) PGC-1 $\alpha$ をはじめとする新たな Necdin-Sirt1 複合体によるエネルギー代謝調節機構の解析

ミトコンドリアを介したエネルギー代謝の中核をなす PGC-1 $\alpha$  に焦点を当て、Necdin-Sirt1 複合体による調節機構について、主に、分子レベルの解析を行った。PGC-1 $\alpha$  は Sirt1 による脱アセチル化を受けて、転写を補助的に活性化させるが、現在のところ、PGC-1 $\alpha$  のアセチル化状態を検出する実験系の構築に至らなかった。しかし、Necdin が PGC-1 $\alpha$  の発現量を増大させる現象を見だし、現在この分子メカニズムに関して引き続き検討中である。また、Necdin が調節する新規代謝関連因子の探索として、Necdin 欠損マウスを用いた DNA マイクロアレイによる解析を行い、Necdin の標的因子のスクリーニングを行った。この結果、いくつかの細胞内代謝に関わる因子の発見に至り、Necdin が関与する新たなエネルギー代謝調節機構の解析につながる事が出来た。

## 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 2 件)

① Koichi Hasegawa, Tomohiro Kawahara, Kazuhiro Fujiwara, Mayumi Shimpuku, Tsutomu Sasaki, Tadahiro Kitamura and Kazuaki Yoshikawa, Necdin Controls Foxo1 Acetylation in Hypothalamic Arcuate Neurons to Modulate the Thyroid Axis, *The Journal of Neuroscience* 32(16):5562-5572, 2012[査読有り] doi: 10.1523/JNEUROSCI.0142-12.2012.

② Kazuhiro Fujiwara, Koichi Hasegawa, Tsuyoshi Ohkumo, Hiroyuki Miyoshi, Yu-Hua Tseng and Kazuaki Yoshikawa, Necdin Controls Proliferation of White Adipocyte Progenitor Cells, *PLoS ONE* 7(1):e30948, 2012[査読有り] doi: 10.1371/journal.pone.0030948.

[学会発表] (計 11 件)

① 長谷川孝二、白石千夏、藤原一志郎、吉川和明：Necdin による PGC-1 $\alpha$  を介したニューロン内ミトコンドリア生合成の促進 第 85 回日本生化学会大会、福岡、2012、12、15

② 瀬戸口良、長谷川孝二、三澤昭博、吉川和明：哺乳類ニューロンの DNA 修復における Necdin の関与 第 85 回日本生化学会大会、福岡、2012、12、15

- ③ 藤原一志郎、長谷川孝一、江連徹、吉川和明：In vitro SUMO 化反応系による Necdin の SUMO 修飾解析 第 85 回日本生化学会大会、福岡、2012、12、15
- ④ 長谷川孝一：視床下部 Necdin によるエネルギー代謝関連因子の調節 大阪大学蛋白質研究所セミナー「エネルギー代謝制御の分子機構」、大阪、2012、11、29
- ⑤ Kazuhiro Fujiwara, Koichi Hasegawa, Kazuaki Yoshikawa: Necdin suppresses preadipocyte proliferation to prevent adipocyte hyperplasia Rare Syndromic Body Fat Disorders: What Can They Teach Us? National Institutes of Health, Bethesda Maryland USA, 2012, 3, 1
- ⑥ 白石千夏、長谷川孝一、吉川和明：Hypothalamic necdin regulates thyroid hormone-mediated energy expenditure (視床下部における Necdin は甲状腺ホルモンによるエネルギー消費を制御する) 第 54 回日本神経化学会大会、石川、2011、9、26
- ⑦ 柏木裕呂樹、長谷川孝一、吉川和明：Necdin forms multiprotein complexes with Smc5/6 components in mammalian brain (Necdin は哺乳類脳において Smc5/6 構成要素と多蛋白質複合体を形成する) 第 54 回日本神経化学会大会、石川、2011、9、26
- ⑧ 橋長秀典、長谷川孝一、吉川和明：Necdin regulates proliferation of postnatal neural stem cells in mouse forebrain 第 84 回日本生化学会大会、京都、2011、9、23
- ⑨ 黄振宇、長谷川孝一、吉川和明：Interaction between necdin and HIF-2alpha in neural stem cells 第 84 回日本生化学会大会、京都、2011、9、23
- ⑩ Kazuhiro Fujiwara, Koichi Hasegawa, Kazuaki Yoshikawa: Necdin suppresses proliferation of white adipocyte progenitor Stem Cells in Development and Disease 2011 Max Delbruck Center, Berlin Germany, 2011, 9, 14
- ⑪ Ryohei Minamide, Koichi Hasegawa, Kazuhiro Fujiwara, Kazuaki Yoshikawa: Interplay between necdin and Bmi1 regulates proliferation of embryonic neural stem cells ISN-ESN 23th Biennial Meeting, Athens Greece, 2011, 8, 30

〔その他〕

大阪大学 蛋白質研究所 蛋白質高次機能学  
学研究部門 神経発生制御研究室ホームページ

[http://www.protein.osaka-u.ac.jp/regulation/index\\_jap.html](http://www.protein.osaka-u.ac.jp/regulation/index_jap.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長谷川 孝一 (HASEGAWA KOICHI)  
大阪大学・たんぱく質研究所・助教  
研究者番号：20546783