

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 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791034

研究課題名（和文） プロリン異性化酵素 Pin1 によるエネルギー代謝調節機構の解明

研究課題名（英文） The role of prolyl isomerase Pin1 in energy metabolism

研究代表者 中津 祐介 (Nakatsu Yusuke)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：20452584

研究成果の概要（和文）：プロリン異性化酵素 Pin1 の非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)発症に対する影響を検討するために、コントロールマウスと Pin1 KO マウスにメチオニン・コリン欠乏食(MCD)を負荷し、病態を解析した。その結果、Pin1 KO マウスは MCD による肝脂肪蓄積、炎症性サイトカインの誘導、肝線維化が顕著に抑制されていた。以上より、Pin1 は NASH 発症に重要であることがあきらかとなった。

研究成果の概要（英文）： I investigated the role of Pin1 in nonalcoholic steatohepatitis (NASH), using Pin1 KO mice. Pin1 KO mice show the resistance to fatty liver, cytokine inflammation and fibrosis. These results indicate that Pin1 is an important regulator of NASH.

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	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：エネルギー代謝

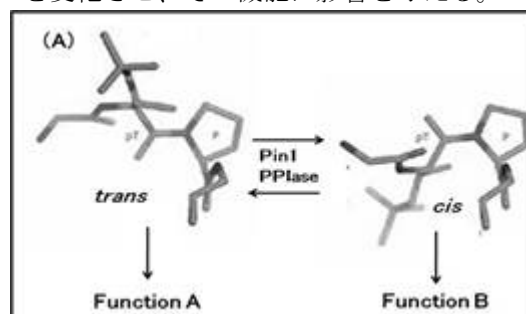
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：Pin1, NASH, KO マウス

1. 研究開始当初の背景

細胞現象は、一般的に、多くのシグナル伝達タンパクと転写因子を多段階に介して誘導される。肝臓や筋肉の糖代謝の調節には、インスリン受容体→IRS-1/2→PI 3-キナーゼ→Akt の経路と、LKB1→AMPK を中心としたエネルギー感知の経路が特に重要である。この経路の障害は糖尿病を引き起こすことから、申請者は、これらの経路に結合するタンパクを同定する目的で、Yeast two hybrid 法や cDNA expression library を進めてきた。その過程で、インスリンシグナルを形成する key molecule である、IRS-1 に prolyl isomerase 1 (Pin1) が結合することを発見した。Pin1 は、リン酸化 Ser/Thr-Pro の motif に結合し、プロリンの構造を *cis* 体から *trans* 体に変化させることで、タンパクの立体構造

を変化させ、その機能に影響を与える。



また、この構造変化は、種々の protein kinase や phosphatase によるリン酸化や脱リン酸化の受けやすさにも影響を及ぼすことが、多くのタンパクについて知られている。具体的には、Pin1 は細胞周期の調整、DNA 修復、免疫応答、神経生存など多くの細胞内機

能に関与していることが報告されており、Pin1 ノックアウトマウスは加齢とともに、神経細胞の脱落、精巣の萎縮、視神経の減少などの症状が認められる。また、ガンや喘息、アルツハイマー等いくつかの病気に関与することも示唆されている。現在までに、Pin1 の標的タンパク質として多くの重要なタンパクが報告されており、例えば p53, cyclin D1, NF- κ B, CDC25 などと Pin1 の結合は cell cycle や癌化、炎症などに非常に重要であることが報告されている。我々のグループでは、Pin1 がインスリンシグナルや糖代謝に重要であることを明らかにしてきた。

今回、Pin1 が非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の発症に関与している可能性を考え、検討を行った。

2. 研究の目的

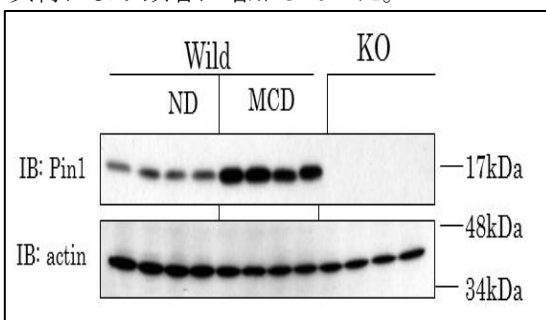
Pin1 と NASH 発症との関係を明らかにするとともに、そのメカニズムの解明を行う。

3. 研究の方法

コントロールマウスと Pin1 KO マウスに NASH 誘発食であるメチオニン・コリン欠乏食 (MCD) を負荷した後、肝臓を摘出し、病態を解析する。また、骨髓移植により、骨髓由来細胞または非骨髓由来細胞のどちらかの Pin1 を欠損させたマウスを作成した。NASH 発症に関わる Pin1 結合蛋白を同定するために、マウス肝臓に Myc-TEV-Flag タグがついた Pin1 をアデノウイルスにより過剰発現させ、肝臓を摘出、可溶化後、myc, Flag 抗体で段階的に免疫沈降した。その後、Flag peptide により elution し、LC/MS/MS により結合蛋白の同定を行った。

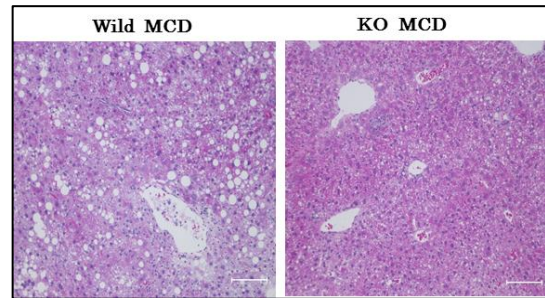
4. 研究成果

①コントロールマウスと Pin1 KO マウスの間で MCD 食負荷による体重変動への影響は認められなかった。また、Pin1 の発現量は MCD 食負荷により顕著に増加していた。

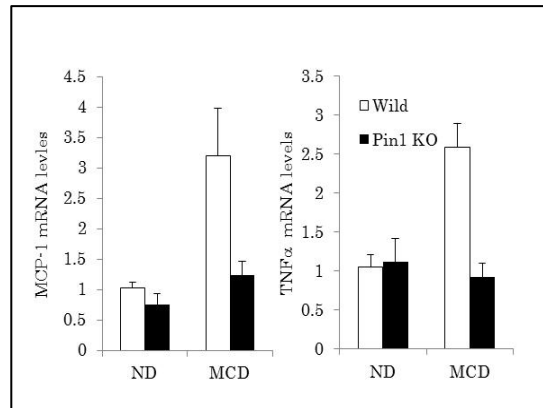


②脂肪肝形成への影響をみるために、HE 染色を行ったところ、コントロールマウスでは MCD 食負荷により顕著な脂肪滴の形成が認められたが、KO マウスでは脂肪滴の形成が減少していた。Pin1 KO マウスの肝臓では、脂肪酸酸化を促進する PPAR α 及びその下流の遺伝子の発現がコントロールマウスより高いことから、脂肪酸酸化の亢進が Pin1 KO マウスで脂肪滴形成が減少している一因であると

考えられた。



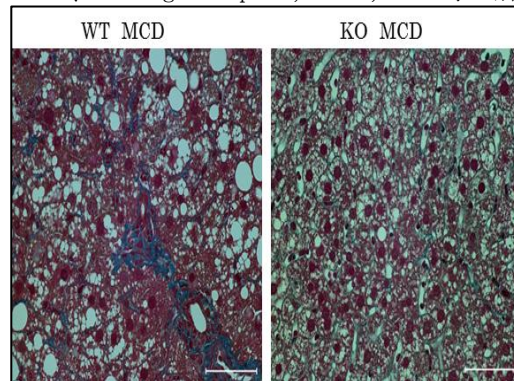
③次に、NASH 発症に重要な炎症性サイトカイン誘導への影響について検討したところ、Pin1 KO マウスの肝臓は MCD 食負荷による炎症性サイトカインの誘導が抑制されていることがあきらかとなった。



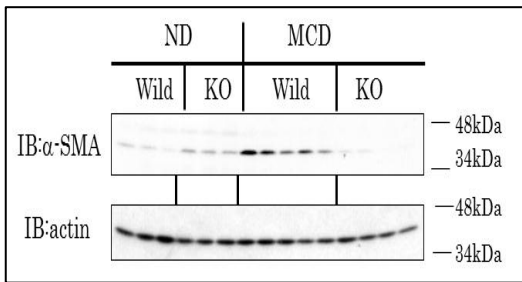
そこで、Pin1 がマクロファージからの炎症性サイトカインの放出を直接抑制しているか否かを検討するために、primary macrophage 及び THP-1 細胞を用いて検討を行った。その結果、Pin1 欠損またはノックダウンしたマクロファージは LPS 刺激による炎症性サイトカインの誘導が減弱した。以上の結果より、Pin1 はサイトカインの誘導に調節関与していると考えられた。

④肝線維化への影響を検討するために、コラーゲンの蓄積を Azan 染色により検討したところ、Pin1 KO マウスはコントロールマウスと比較してコラーゲンの蓄積が抑制されていた。

また、collagen alpha1, TIMP, SMA 等の肝線



維化マーカーの発現量も Pin1 KO マウスでは減少していた。

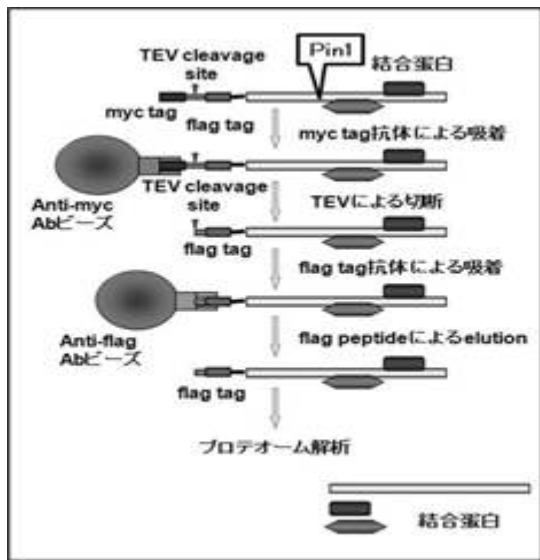


⑤骨髄由来細胞の Pin1 と非骨髄由来細胞の Pin1 のどちらが、NASH 発症に重要であるかを検討するために、骨髄移植によりどちらか一方の Pin1 を欠損させたマウスを作成した。どちらか一方の Pin1 を欠損させたマウスは、肝線維化や脂肪肝形成が抑制されていたことから、NASH 発症には骨髄由来細胞と非骨髄由来細胞のどちらの Pin1 も必要であることが明らかとなった。

以上の結果より、Pin1 が NASH 発症に重要であることが明らかとなった。

⑥Pin1 結合蛋白の同定

Pin1 結合蛋白を同定するために、多段階免疫沈降法と LC-MS/MS の解析を組み合わせて行った。その結果、脂肪酸合成や脂肪酸酸化に関わるいくつかの因子が同定された。それらの因子を細胞に過剰発現させ、免疫沈降法を行ったところ、結合が確認された。



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 1 件)

1. Nakatsu Y, Otani Y, Sakoda H, Zhang J,

Guo Y, Okubo H, Kushiyama A, Fujishiro M, Kikuch T, Fukushima T, Ohno H, Tsuchiya Y, Kamata H, Nagamachi A, Inaba T, Nishimura F, Katagiri H, Takahashi S, Kurihara H, Uchida T, Asano T. Role of Pin1 protein in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis in a rodent model. *J Biol Chem.* 287(53):44526-35. (2012) 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. 中津 祐介, 迫田 秀之, 尾山 大明, 秦 裕子, 福嶋 俊明, 櫛山 暁史, 内田 隆史, 鎌田 英明, 浅野 知一郎 脂肪肝発症におけるプロリン異性化酵素 Pin1 の役割と脂質代謝に関する結合蛋白の同定 分子生物学会 2012 年 12 月 10 日 福岡

2. Yusuke Nakatsu, Hideyuki Sakoda, Midori Fujishiro, Akifumi Kushiyama, Toshiaki Fukushima, Fusanori Nishimura, Takafumi Uchida, Tomoichiro Asano Role of Pin1 in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis in a rodent model. American Diabetes Association 2012 年 6 月 8 日 フィラデルフィア アメリカ

3. 中津 祐介, 張 君, 大久保 博史, 福嶋 俊明, 迫田 秀之, 藤城 緑, 櫛山 暁史, 高橋 伸一郎, 鎌田 英明, 栗原 裕基, 内田 隆史, 浅野 知一郎 非アルコール性脂肪性肝炎発症における、肝および血球系細胞のプロリン異性化酵素 Pin1 の役割

日本糖尿病学会 2012 年 5 月 23 日 横浜

4. 中津 祐介, 張 君, 大久保 博史, 福嶋 俊明, 迫田 秀之, 藤城 緑, 櫛山 暁史, 高橋 伸一郎, 鎌田 英明, 栗原 裕基, 内田 隆史, 浅野 知一郎

非アルコール性脂肪性肝炎発症における、肝および血球系細胞のプロリン異性化酵素 Pin1 の役割 分子生物学会 2011 年 12 月 10 日 横浜

5. 中津 祐介, 張 君, 大久保 博史, 福嶋 俊明, 迫田 秀之, 櫛山 暁史, 鎌田 英明, 栗原 裕基, 内田 隆史, 浅野 知一郎

非アルコール性脂肪性肝炎発症における
ロリン異性化酵素 Pin1 の役割
日本生化学会 2011年9月20日 京都

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中津 祐介 (Nakatsu Yusuke)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
助教
研究者番号：20452584

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：