

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461355

研究課題名(和文)プロリン異性化酵素Pin1と肥満発症との関係解明及び創薬への展開

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

## 研究代表者

中津 祐介(Nakatsu, Yusuke)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・助教

研究者番号：20452584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、プロリン異性化酵素Pin1と肥満発症との関係について検討を行った。まず、肥満発症に関係するPin1結合蛋白を探索したところ、AMPKを同定した。Pin1によるAMPKリン酸化への影響を検討したところ、Pin1はAMPKリン酸化を抑制した。また、その作用機序としてAMPによる脱リン酸化保護機構をPin1が解除することで、結果的にリン酸化を抑制することが明らかとなった。

さらに、Pin1 KOマウスの筋肉では、AMPKリン酸化がコントロールマウスと比較して促進されていた。以上より、Pin1はAMPKを抑制することにより、脂質代謝を制御していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of prolyl isomerase Pin1 in obesity. We identified AMPK gamma subunit as a Pin1 binding partner. Pin1 overexpression decreased AMPK phosphorylation by 2-deoxy-glucose, while Pin1 knockdown by siRNA enhanced. Pin1 canceled the protective effect of AMP on dephosphorylation, resulting in inducing the decrease of AMPK phosphorylation. Lastly, we examined the phosphorylation levels of AMPK in mice muscle. We found Pin1 deficiency in muscle enhanced AMPK phosphorylation.

In summary, Pin1 regulates lipid metabolism through decreasing AMPK phosphorylation.

研究分野：代謝学

キーワード：Pin1 AMPK 肥満

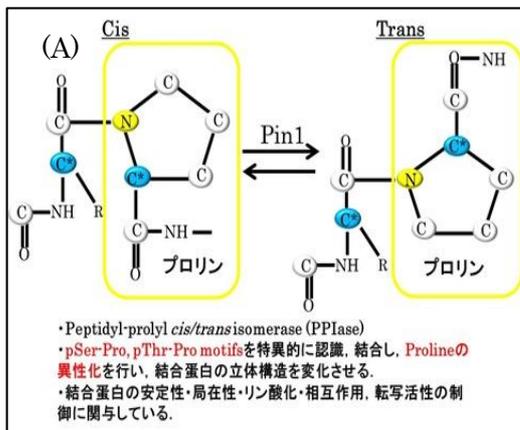
### 1. 研究開始当初の背景

肥満症患者は、増加の一途をたどっているが、現在まで画期的な治療薬はなく、運動療法と食事療法に依存しているのが現状である。

AMPK は  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の3量体からなり、栄養飢餓等の低栄養状態時に LKB1 により T172 がリン酸化されることで、活性化する。AMPK の活性化は、同化を抑制し、異化を促進することで、細胞内の ATP を回復させる方向に働く。AMPK は脂肪酸酸化を促進させるため、その活性化剤は肥満抑制につながると考えられている。しかしながら、AMPK の活性化・抑制機構は未だ不明な点が多い。

我々が着目しているプロリン異性化酵素 Pin1 は、pSer/pThr-Pro を含むモチーフに結合し、プロリンの異性化を行うことにより標的蛋白の安定性、活性、局在性などを制御している蛋白である(A)。

全身性の Pin1 KO マウスは高脂肪食負荷による体重増加に対して、顕著な抵抗性を示したことから、Pin1 は肥満発症に対して重要な役割を担っていると考えられた。



### 2. 研究の目的

上記のように、Pin1 は肥満発症に対して重要な役割を担っていると考えられたことから、肥満発症に関する Pin1 結合蛋白を探索したところ、AMPK を同定した。そこで、本研究では、Pin1 を介した AMPK 機能制御機構と肥満との関係を明らかにすることを研究の目的とした。

また、同時に、臓器特異的 Pin1 KO マウスを作製し、肥満時の各組織における Pin1 の役割の解明を目的に、解析を行った。

### 3. 研究の方法

(1) Pin1 と AMPK の結合は、293T 細胞に両プラスミドを過剰発現させた後、免疫沈降法により検討した。

(2) LKB1 による AMPK リン酸化に対する Pin1 の影響は、293T 細胞より Pin1 含有または不含の AMPK 複合体を調整したのち、PP2C と反応させ、脱リン酸化を行った。その後、AMPK 複合体を recombinant LKB1 と ATP 存在下で反応させ、ウエスタンブロットにて確認した。

ットにて確認した。

(3) PP2C による AMPK 脱リン酸化に対する Pin1 の影響は、上記(2)の方法で AMPK 複合体を調整したのち、recombinant PP2C と反応させた。

(4) 臓器特異的 Pin1 KO マウスは Pin1 ff マウスと Ins-Cre Tg または ap2-Cre Tg と交配させ、作成した。その後、高脂肪食負荷を行い、解析した。

### 4. 研究成果

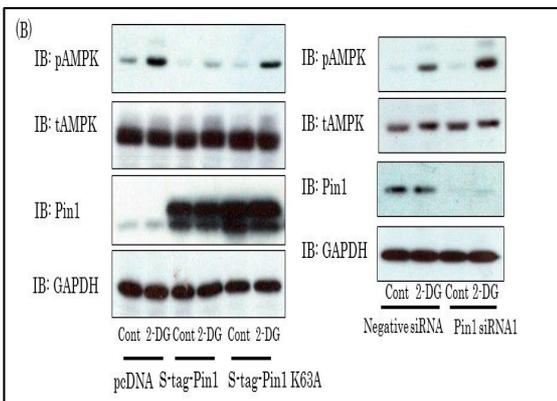
(1) Pin1 と AMPK subunit との結合を検討したところ、Pin1 は AMPK  $\gamma 1/\gamma 2/\gamma 3$  と結合することが明らかとなった。また、Pin1 の WW domain と AMPK  $\gamma 1$  の T211-Pro 配列が両者の結合に必要であることが明らかとなった。

AMPK  $\gamma 2/\gamma 3$  は複数の pSer/pThr-Pro 配列が Pin1 との結合に必要であった。

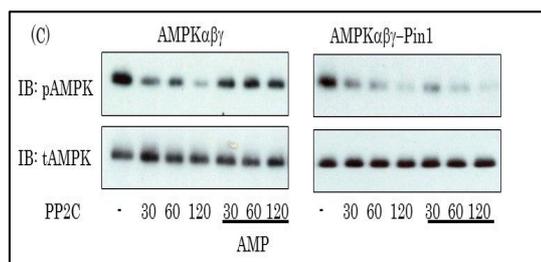
(2) AMPK の活性化は  $\alpha$  subunit の Thr172 のリン酸化に依存しているため、Pin1 による AMPK リン酸化への影響について検討した。293T 細胞に Pin1 を過剰発現させた後、2-deoxy-glucose (2-DG) で刺激を行ったところ、Pin1 は AMPK のリン酸化を抑制することが明らかとなった。このリン酸化の抑制には、Pin1 のイソメラーゼ活性が必要であった。逆に、siRNA で Pin1 をノックダウンすると AMPK のリン酸化は促進した。

(3) LKB1 による AMPK リン酸化を検討したところ、Pin1 不含 AMPK 複合体では、AMP 添加による AMPK のリン酸化は促進されたが、Pin1 含有複合体では、AMP によるリン酸化の促進は認められなかった。

(4) PP2C による AMPK 脱リン酸化を検討したところ、Pin1 不含 AMPK 複合体では、AMP 添加により、脱リン酸化は抑制されたが、Pin1 含有複合体では、AMP を添加して



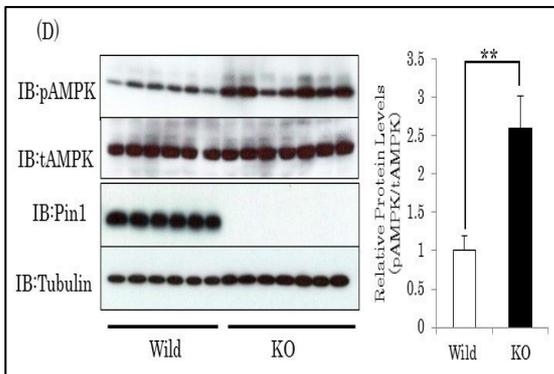
も脱リン酸化の抑制は認められなかった。以上のことより、Pin1 は AMP による AMPK リン酸化促進・脱リン酸化抑制機構を解除す



ること、結果的に、AMPK リン酸化を抑制していると考えられた(C)。

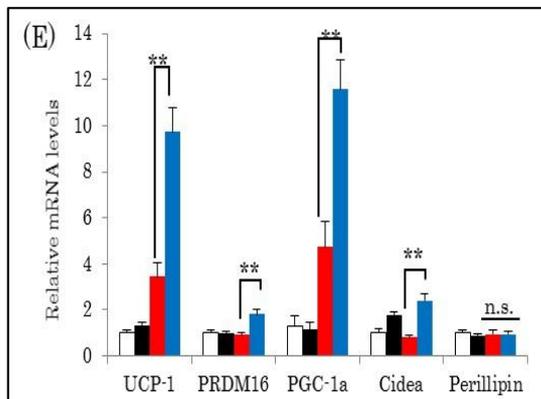
(5) Pin1 KO マウスを用いて、in vivo においても Pin1 による AMPK 機能制御が認められるか否かについて検討を行った。野生型マウスと Pin1 KO マウスを絶食後、肝臓と筋肉を摘出し、AMPK リン酸について検討した。

その結果、肝臓では、両マウスにおいて顕著な差は認められなかったが、筋肉においては、KO マウスの方が AMPK のリン酸化が顕著に強かった (D)。また、AMPK 活性化により、筋肉では、PGC1-alpha 等のミトコンドリア関連遺伝子の発現が誘導されるが、Pin1 KO マウスの筋肉では、これらの遺伝子の発現量も高かった。これらのデータと一致するように、トリグリセリド含量は、Pin1 KO マウスの方が低かった。



(6) 膵β細胞特異的 Pin1 KO マウスとコントロールマウスを高脂肪高スクロース食に20週間負荷したのち、膵島の大きさを比較したところ、KO マウスでは膵島の大きさが有意に小さかった。このことより、肥満による代償的な膵島の肥大化には Pin1 が重要であることが示唆された。

(7) 脂肪特異的 Pin1 KO マウスを作製し、コントロールマウスとともに高脂肪食負荷したところ、KO マウスの方が体重の増加が抑制された。また、寒冷刺激による熱産生への影響を検討したところ、KO マウスの褐色脂肪やベージュ脂肪細胞において熱産生関連遺伝子の発現が有意に高かった(E)。



## 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, Iwashita M, Sakoda H, Ono H, Nagata K, Matsunaga Y, Fukushima T, Fujishiro M, Kushiyama A, Kamata H, Takahashi S, Katagiri H, Honda H, Kiyonari H, Uchida T, Asano T. Prolyl isomerase Pin1 negatively regulates AMP-activated protein kinase (AMPK) by associating with the CBS domain in the  $\gamma$  subunit. *J Biol Chem.* 2015, 290(40):24255-66. doi: 10.1074 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

- (1) 中津 祐介, 森 馨一, 松永 泰花, 迫田 秀之, 榑山 暁史, 石原 寿光, 浅野 知一郎 プロリン異性化酵素 Pin1 を介した膵細胞調節機構の解明 第 27 回分子糖尿病学シンポジウム 2015 年 12 月 5 日 東京
- (2) 中津 祐介, 森 馨一, 松永 泰花, 山本屋 武, 山口 賢, 石原 寿光, 浅野 知一郎 The role of Prolyl isomerase Pin1 in pancreatic beta cells. 第 38 回 日本分子生物学会 2015 年 12 月 1 日-12 月 4 日 神戸
- (3) Yusuke Nakatsu, Keiichi Mori, Yasuka Matsunaga, Toshiaki Fukushima, Hideaki Kamata, Ken Yamaguchi, Hisamitsu Ishihara, Tomoichiro Asano The role of prolyl isomerase Pin1 in beta cell functions 75<sup>th</sup> American diabetes association, 2015 年 6 月 5 日-6 月 9 日 Boston (USA)
- (4) 中津祐介, 森馨一, 松永泰花, 山本屋武, 迫田秀之, 藤城緑, 榑山暁史, 石原寿光, 浅野知一郎 膵β細胞のインスリン分泌におけるプロリン異性化酵素 Pin1 の役割 第 58 回 日本糖尿病学会、2015 年 5 月 21 日-24 日、下関
- (5) 中津 祐介, 森 馨一, 松永 泰花, 福嶋 俊明, 迫田 秀之, 藤城 緑, 榑山 暁史, 浅野 知一郎 プロリン異性化酵素 Pin1 のβ細胞における役割の解明 第 26 回分子糖尿病学シンポ, 高知, 2014 年 12 月 6 日
- (6) 中津 祐介, 森 馨一, 松永 泰花, 福嶋 俊明, 鎌田 英明, 山口 賢, 石原 寿光, 浅野 知一郎 膵β細胞機能におけるプロリン異性化酵素 Pin1 の役割 第 37 回日本分子生物学会、横浜、2014 年 11 月 25 日-27 日
- (7) 中津 祐介, 岩下 未咲, 福嶋 俊明, 迫田 秀之, 榑山 暁史, 菊池 貴子, 山本屋 武, 鎌田 英明, 浅野 知一郎 プロリン異性化酵素 Pin1 は AMPK $\gamma$  subunit に結合し、活性を抑制する 第 57 回 日本糖尿病学会、大阪、2014 年 5 月 22 日-24 日
- (8) 浅野 知一郎, 松永 泰花, 福嶋 俊明,

櫛山 暁史、山本屋 武、山崎 広貴、中津 祐介

膵β細胞からのインスリン分泌における  
プロリン異性化酵素 Pin1 の役割 第 57 回 日  
本糖尿病学会、大阪、2014 年 5 月 22 日-24  
日

(9) 中津 祐介、岩下 未咲、松永 泰花、  
福嶋 俊明、迫田 秀之、櫛山 暁史、鎌田  
英明、内田 隆史、浅野 知一郎 プロリン  
異性化酵素 Pin1 を介した AMPK 機能制御機  
構の解明 分子糖尿病学シンポジウム、大阪、  
2013 年 12 月 7 日

(10) 中津 祐介、岩下 未咲、松永 泰花、  
福嶋 俊明、迫田 秀之、櫛山 暁史、鎌田  
英明、内田 隆史、浅野 知一郎 プロリン  
異性化酵素 Pin1 による新規 AMPK 機能制御  
機構の解明 第 36 回 日本分子生物学会、神  
戸、2013 年 12 月 3 日-6 日

(11) 中津 祐介、大久保 博史、大谷 裕一  
郎、松永 泰花、山本屋 武、藤城 緑、鎌  
田 英明、内田 隆史、浅野 知一郎 プロ  
リン異性化酵素 Pin1 は AMPK と PPAR $\alpha$  を  
制御して脂質代謝に關与する。

第 56 回日本糖尿病学会、熊本、2013 年 5 月  
16 日-18 日

## 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：