

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893036

研究課題名(和文) 褐色脂肪細胞におけるASK1経路の機能解析および新規生理的意義の解明

研究課題名(英文) The analysis of ASK1 pathway in brown adipocytes

研究代表者

服部 一輝(Hattori, Kazuki)

東京大学・薬学研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：40708575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：肥満をはじめとする代謝性疾患に対抗する手段の一つとして、褐色脂肪細胞の分化促進および活性化が注目されている。各種組織を用いた網羅的な解析の結果、ASK1欠損マウスの褐色脂肪組織において、熱産生に重要な遺伝子の発現が低下していることを見出した。さらなる詳細な検討の結果、褐色脂肪細胞の分化過程においてPKA-ASK1-p38経路が活性化されることによって、Ucp1をはじめとする複数の遺伝子発現が誘導され、完全な成熟褐色脂肪細胞が形成されることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Brown adipose tissue is in the spotlight as a therapeutic target for some metabolic diseases. We revealed that the expression levels of specific subset of genes, which are known to be involved in thermogenesis, were suppressed in ASK1-deficient brown adipose tissue by DNA microarray analysis. Further analysis using primary culture of brown adipocytes elucidated that PKA-ASK1-p38 pathway is activated during the course of differentiation, which leads to gene induction, including Ucp1, and induces maturation of brown adipocytes.

研究分野：細胞内シグナル伝達

キーワード：褐色脂肪 ASK1 Ucp1 熱産生 脂肪分化

1. 研究開始当初の背景

肥満は2型糖尿病やアテローム性動脈硬化症をはじめとする様々な疾患に寄与していることが示唆されており、脳梗塞や心筋梗塞などを介して時には人を死にさえ導く重篤な疾患である。肥満という病態は主に、脂肪細胞における異常な脂肪蓄積とそれに伴う内分泌系の異常によってもたらされるものと考えられるが、ここでいう脂肪細胞とは、主に白色脂肪組織に存在するものものを指す。一方、ヒトの新生児や齧歯類においては、白色脂肪組織とは全く異なる褐色脂肪組織と呼ばれる器官の存在が以前より示されてきた。白色脂肪組織が「エネルギー貯蔵」を主な目的とする器官であるのに対し、褐色脂肪組織はむしろ「エネルギー消費」を担う器官であると提唱されている。褐色脂肪細胞はミトコンドリアを豊富に持ち、Ucp1という脱共役タンパクを介した熱産生を盛んに行っている。

近年になって、成人においても活性のある褐色脂肪組織の存在が証明され、褐色脂肪組織の活性と体脂肪率が逆相関することなどから、肥満を含めた代謝性疾患の重要なターゲットとして認識されている。しかしながら、褐色脂肪細胞がどのようなメカニズムで分化しているか、また、どのような刺激にตอบสนองすることで活性化しているかという観点において得られている知見は多くない。特に、褐色脂肪細胞内で引き起こされているシグナル伝達機構に関してはあまり理解が進んでいない。

2. 研究の目的

我々が精力的に研究を行っている Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK1) は、Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) 経路に属するリン酸化酵素であり、心肥大や神経変性疾患など様々な疾患との関連性が示唆されているが、脂肪組織における機能解析は未だ行われていない。

各種組織を用いた検討から、我々は ASK1 が脂肪組織に高発現していることを見出したため、その生理的意義の探索を目的として研究を始めた。いくつかの組織を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った結果、ASK1 欠損マウスの褐色脂肪組織において複数の遺伝子発現変化が見受けられた。そのため、褐色脂肪細胞における ASK1 の機能に注目することとした。

褐色脂肪細胞を用いた解析は最近盛んに行われているが、シグナル伝達分子の動態に着目をして、脂肪分化や脂肪活性化に対する寄与を詳細に検討しているものはほとんどない。そのため、本研究においては脂肪細胞内で引き起こされるシグナル伝達経路システムを詳細に検討することも一つの目標とした。

3. 研究の方法

本研究においては、以下の点を重点的に解析することとした。

- 1) 褐色脂肪細胞における ASK1 活性化メカニズムの解析
- 2) 褐色脂肪細胞において ASK1 の活性化下流で引き起こされるイベントの解析
- 3) 白色脂肪細胞における ASK1 の機能解析

以下に具体的な手法を記す。

- 1) 初代培養褐色脂肪細胞に対して、各種阻害剤や siRNA を処置することによって、ASK1 上流因子の探索を行う。ただし、脂肪細胞に siRNA を処置する実験系は世界的に普及していないため、系の構築が第一に必要となる。

また、褐色脂肪細胞における ASK1 結合分子を新たに同定することにより、ASK1 活性制御メカニズムへと迫る。我々は既に褐色脂肪細胞内の内在性 ASK1 複合体を精製する新たな系の構築に成功をしており、本法を用いることによって今まで知られていない新たな結合分子を同定することができると考えられる。

- 2) ASK1 は アドレナリン受容体刺激によって強く活性化することが明らかとなった。そのため、アドレナリン受容体下流で引き起こされることが知られている各種応答に対して ASK1 が寄与しているかどうかの検討を行う。

褐色脂肪組織を用いた DNA マイクロアレイの結果から、Ucp1 をはじめとするいくつかの遺伝子の発現量が ASK1 欠損マウスにおいて抑制されていることが示唆された。これら遺伝子は、アドレナリン受容体刺激によって発現が誘導されること、さらには脂肪分化の過程でも発現誘導されることが知られていた。アドレナリン受容体が脂肪分化において重要な機能を示すことから、アドレナリン受容体刺激依存的な脂肪分化誘導における ASK1 の機能についてまずはじめに注目することとした。

- 3) 初代培養白色脂肪細胞系を用いたシグナル伝達解析も世界的にあまり行われていないため、完全に分化した白色脂肪細胞を得るための系構築が第一優先事項である。その後、ASK1 の刺激応答性、および白色脂肪細胞における生理機能を解析する。

4. 研究成果

- 1) 褐色脂肪細胞における ASK1 活性化メカニズムの解析

褐色脂肪細胞を活性化する刺激として、

アドレナリン受容体刺激が挙げられる。これは、交感神経が活性化した際に、その神経末端からカテコラミンが放出され引き起こされるものと考えられており、現状最も重要視されている経路である。

アドレナリン受容体はGs タイプのGタンパク共役型受容体 (GPCR) であるため、その活性化依存的に細胞内の cAMP 濃度が上昇する。我々は、複数種類のアドレナリン受容体作動薬および cAMP アナログの処置が ASK1 の強い活性化を導くことを明らかにした。さらには、cAMP 濃度上昇を直接感知することで活性化するキナーゼである PKA が ASK1 の上流で機能していることを阻害剤や阻害タンパクを用いた系によって証明するに至った。

さらには、我々が新たに構築した ASK1 複合体精製系を用いたプルダウンアッセイによって、褐色脂肪細胞における ASK1 複合体構成因子候補を 70 程度同定することに成功した。それらのうちいくつかの因子に関しては、ASK1 と結合することが確認されており、今後 ASK1 活性調節機構との関連性を解析していく予定である。

2) 褐色脂肪細胞において ASK1 の活性化下流で引き起こされるイベントの解析

前述の アドレナリン受容体刺激によって、脂肪細胞内では、脂肪分解、熱産生、遺伝子発現制御などの様々な応答が導かれることが知られている。これらの応答の中で我々は、遺伝子発現制御に対する ASK1 の寄与を明らかにすべく、初代培養褐色脂肪細胞系を用いた解析を行った。

その結果、分化の途中段階にある褐色脂肪細胞に対して アドレナリン受容体刺激を負荷したところ、Ucp1 などの遺伝子発現誘導が観察された。さらに、その発現誘導は ASK1 欠損マウス由来の褐色脂肪細胞において抑制されていた。アドレナリン受容体が Ucp1 をはじめとする遺伝子の分化依存的な発現制御に対して重要な役割を担っていることを鑑みると、ASK1 は脂肪分化過程で活性化され、遺伝子発現誘導を介して脂肪細胞の成熟化に寄与しているものと考えられる。

3) 白色脂肪細胞における ASK1 の機能解析

成体マウスより白色脂肪前駆細胞を単離し、成熟白色脂肪細胞にまで分化させる系は既に存在しているが、分化程度の低さなど、いくつかの点で改善の余地があると考えられた。そこで、過去の報告などの情報をもとに、各種条件検討を行った結果、ほとんどすべての前駆細胞を脂肪細胞に分化させることができるシステムを構築することに成功した。

この系を用いて分化誘導した白色脂肪細胞に対し、アドレナリン受容体刺激を負荷したところ、褐色脂肪細胞と同様に、ASK1 の

顕著な活性化が観察された。さらに、他のアドレナリン受容体作動薬や cAMP アナログの処置によっても ASK1 は活性化され、その活性化は PKA の阻害剤処置によって抑制された。すなわち、我々が見出した PKA-ASK1 経路というものは、褐色脂肪細胞のみならず白色脂肪細胞においても存在していることが証明されたと言える。

それでは果たして白色脂肪細胞中で活性化された ASK1 はどのような機能を発揮しているのかという点に関しては、未だ情報を得ることができていない。白色脂肪細胞においても、アドレナリン受容体刺激依存的に脂肪分解や遺伝子発現制御が行われることが知られているため、これらへの ASK1 の寄与からまずは探っていきたいと考えている。

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)

[学会発表](計9件)

1

曾我真弓、服部一輝、一條秀憲

新規ケミカルプルダウン法を用いた褐色脂肪細胞における ASK1 複合体構成因子の同定
第 37 回日本分子生物学会年会

2014 年 11 月 25-27 日

パシフィコ横浜

2

服部一輝、一條秀憲

褐色脂肪細胞の成熟化における ASK1 の機能解析

第 35 回日本肥満学会

2014 年 10 月 24-25 日

宮崎シーガイアコンベンションセンター

3

古谷昌太郎、服部一輝、一條秀憲

ストレス応答性キナーゼ ASK1 の脂肪組織における新規機能解析

第 87 回日本生化学会大会

2014 年 10 月 15-18 日

国立京都国際会館

4

古谷昌太郎、服部一輝、一條秀憲

ASK1 による褐色脂肪細胞の分化制御

第 23 回日本 Cell Death 学会学術集会

2014 年 7 月 18-19 日

東京医科歯科大学

5

曾我真弓、服部一輝、丸山 剛、一條秀憲

Analog-sensitive kinase を用いたプルダウン法による新規 ASK1 複合体構成因子の同定

第 14 回東京大学生命科学シンポジウム

2014 年 4 月 26 日

東京大学

6

ASK1 regulates brown adipocyte differentiation

Kazuki Hattori, Isao Naguro and Hidenori Ichijo

Keystone Symposia

2014年1月12-17日

Vancouver, BC, Canada

7

古谷昌太郎、服部一輝、一條秀憲

ストレス応答性キナーゼ ASK1 の血糖値制御に関わる機能解析

第36回日本分子生物学会年会

2013年12月3-6日

神戸ポートアイランド

8

Shotaro Furutani, Kazuki Hattori and Hidenori Ichijo

The analysis of ASK1 function in blood glucose regulation

The 8th Japan-Korea conference on cellular signalling for young scientists

2013年11月6-7日

九州大学

9

服部一輝、古谷昌太郎、名黒功、一條秀憲

褐色脂肪細胞の分化における ASK1 の新規機能解析

第86回日本生化学会大会

2013年9月11-13日

パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 一輝 (HATTORI KAZUKI)

東京大学大学院薬学系研究科

細胞情報学教室

特任助教

研究者番号：40708575