

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293068

研究課題名(和文)多機能タンパク質ナルディライジンによる恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the multifaceted roles of nardilysin in homeostatic maintenance

研究代表者

西 英一郎 (Nishi, Eiichiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30362528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：恒常性とは、生物においてその内部環境を「一定の状態」に保つ働きだが、各種恒常性のセットポイントがいかに設定されているか、その分子機序はよくわかっていない。Nardilysin (NRDC)欠損マウスは、低体温、徐脈、低血圧、低インシュリン血症を呈したが、ネガティブフィードバックが機能せず異なるセットポイントで平衡を維持しているように見えた。本研究においては、糖代謝恒常性におけるNRDCの役割を検討し、NRDCがIslet1と協調して細胞特異的転写因子MafAの発現を制御し、MafA調節を介してインスリンの発現および分泌を制御していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Homeostasis is the property that living things use to actively maintain fairly stable conditions necessary for survival. Molecular mechanism by which the set point of homeostatic regulation is determined has not been clarified. Nardilysin (NRDC)-deficient mice show hypothermia, bradycardia and hypoinsulinemia, in which "normal" negative feedback system appears not to work. These findings suggest that NRDC plays important roles in the determination of homeostatic set points. Here, we demonstrate that NRDC-deficient mice showed glucose intolerance and severely decreased glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). Moreover, beta-cell-specific NRDC-deficient mice showed a diabetic phenotype with markedly reduced GSIS. ChIP assay revealed that NRDC is associated with Islet-1 in the enhancer region of MafA, where NRDC controls the recruitment of Islet-1 and MafA transcription. Our findings demonstrate that NRDC controls beta-cell function via regulation of the Islet-1-MafA pathway.

研究分野：分子病態医化学

キーワード：恒常性

1. 研究開始当初の背景

恒常性とは、生物においてその内部環境を「一定の状態」に保つ働きであり、何重ものフィードバック機構によって厳密に維持されている。恒常性が破綻し「一定の状態」からずれた状態が疾患であり、そのずれを元に戻すことが疾患の治療となる。したがって、当然のことながら医学研究は“ずれ”が生じるメカニズムと、その“ずれ”をいかにして元に戻すか、という点に焦点を当ててきた。では「一定の状態」、言い換えればセットポイントのプログラミングはいかに行われているのか。ヒトでは体温 37 度、心拍数 60-100/分、収縮期血圧 100-135mmHg、空腹時血糖 70-100mg/dl がセットポイント(基準値)と考えられているが、これらを設定する分子機構についてはよくわかっていない。我々が作製した NRDC 欠損マウスは、低体温、徐脈、低血圧、低インシュリン血症を呈したが、いわゆる正常のネガティブフィードバックが機能せず、あたかも異なるセットポイントで平衡を保ちつつ生命を維持しているように見える。

NRDC は、我々は増殖因子 HB-EGF の結合タンパク質として同定したメタロプロテアーゼであり、ADAM プロテアーゼの活性化を介して膜型 HB-EGF 前駆体のシェディングを増強すること、NRDC のシェディング増強効果は HB-EGF に限定されず、TNF- α やアミロイド前駆体タンパク質 APP を含む広範な膜タンパク質に及ぶことを明らかにしてきた(Nishi 他 EMBO.J,2001, Nishi 他 JBC,2006, Hiraoka 他 J.Neurochem,2007 など)。さらに NRDC 遺伝子改変マウスの解析より、NRDC がニューレギュリンのシェディングを介して神経軸索・髄鞘形成を司ること(Ohno 他 Nat. Neurosci. 2009)、TNF- α のシェディングと下流の IL-6 発現増強を介して胃がん進展に関わること(kanda 他 EMBO Mol Med 2012)、APP のシェディング(切断)調節を介してアミロイドプラーク産生を制御すること(Ohno 他 Neurobiol Aging 2013)を明らかにし、NRDC のシェディング調節因子として重要性を明らかにしてきた。

NRDC は主に細胞質に存在する可溶性の酵素で、明らかなシグナルペプチドを有さないが、未知の経路で細胞外に分泌され、シェディング増強活性を発揮する。一方、典型的な核移行、核外移行シグナルも有さないが、核と細胞質をシャトリングする。最近同タンパク質が転写調節に重要な働きを持つことを、2つの独立した系で明らかにすることができた。まずひとつは、ヒストン H3 結合タンパク質の網羅的解析で NRDC が同定され、詳細な検討から NRDC が H3, H3K4me1-3, H3K9me1-3, H3K27me1-3 の中で、H3K4me2 に特異的に結合することが明らかになったことである(Lin 他 JBC 2012)。さらに HeLa 細胞核抽出物から NRDC と複合

体を形成するタンパク質を解析したところ、NCoR, HDAC3, SMRT が同定され、NRDC が NCoR/SMRT コリプレッサー複合体に含まれている可能性が示唆された。実際に野生型および NRDC 欠損細胞の遺伝子発現パターンの比較から抽出した標的遺伝子のうち、複数遺伝子のプロモーター上に NRDC が存在し、H3 アセチル化を負に制御していることを明らかにした(Lin 他 JBC 2012)。

もうひとつは、NRDC 欠損マウスが呈したエネルギー代謝表現型(低体温と寒冷不耐性)に端を発した系である。詳細な解析から、NRDC 欠損マウスが体温を保持できないのは、褐色脂肪組織(BAT)における熱産生が常温ですでにピークに達しており、寒冷負荷時に亢進しないためであることがわかった。BAT における適応熱産生は、ミトコンドリア脱共役タンパク質(UCP1)に依存しており、UCP1 の発現は、転写コアクチベーター PGC-1 の制御を受けている。我々はクロマチン免疫沈降(ChIP)が可能な抗 NRDC モノクローナル抗体を作製し、NRDC が UCP1 のエンハンサー領域に存在し、PGC-1 と共存していること、さらに PGC-1 の転写コアクチベーター活性の調節を介して、UCP1 発現を制御していることを明らかにした。非常に興味深いことに、この転写制御活性には NRDC の酵素活性が必要であることが明らかになった(Nat. Commun. 2014)。以上2つの独立したプロジェクトの結果から、1) NRDC が新規修飾特異的 H3 結合タンパク質であること、2) NRDC が転写コアクチベーター、コリプレッサー複合体双方に結合可能な、転写のスイッチングに関わる分子である可能性、が示唆された。

以上から NRDC が細胞外と核内で異なる機能を有することが明らかになり、さらに他のグループから NRDC のメタロプロテアーゼ機能が、細胞傷害性 T 細胞における抗原プロセッシングに必要であることが報告されていることから(Nat Immunol 2011)、NRDC は局在依存性に異なる機能を持つ多機能タンパク質であることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、NRDC 欠損マウスが呈した低体温、徐脈、低血圧、低インシュリン血症に注目し、同タンパク質が神経系、内分泌系およびその標的臓器(BAT、心臓、膵臓など)における作用を介して、体温、循環動態、糖代謝の恒常性(セットポイント)をいかに調節しているかを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

体温、循環動態、糖代謝の恒常性維持において、各臓器に発現する NRDC が果たす役割を明らかにすることを目的とし、臓器特異的 NRDC 欠損マウスを作製、解析する。本研究においては、①脂肪細胞(Adiponectin-Cre) ②交感神経(DBH)

③心筋細胞(MHC)、④血管平滑筋(SM22)、⑤膵細胞(insulin)、⑥肝細胞(Albumin) 特異的欠損マウスを作製し、①②を用いて体温恒常性、②③④を用いて循環動態恒常性、⑤⑥を用いて糖代謝恒常性における臓器特異的 NRDC の役割を検討した。

4. 研究成果

NRDC の全身欠損(*NRDC*^{-/-})マウスを用いてグルコース負荷試験を行ったところ耐糖能異常を示し、グルコース負荷に対するインスリン分泌反応が著明に減弱していることがその原因と考えられた。次に、*NRDC*^{-/-}マウスの全身表現型の二次的な影響を除外し、膵細胞における NRDC の役割を明らかにするために、細胞特異的 NRDC 欠損(*K0*)マウスを用いた解析を行った。 *K0* マウスは、*NRDC*-floxed マウスと RIP (rat insulin promoter)-Cre マウスとの交配によって樹立した。 *K0* マウスに対する糖負荷試験では、*NRDC*^{-/-}マウスと同様に、著明なインスリン分泌反応の減弱と耐糖能異常を認め、膵細胞の NRDC がインスリン分泌に重要な役割を果たすことが確認できた。

一方興味深いことに、*K0* マウスの膵島では細胞/細胞比の有意な上昇、細胞の膵島辺縁部から中心部への局在変化を認めた。*K0* マウス膵島の遺伝子発現を検討したところ、細胞産生ホルモンであるグルカゴンだけでなく、*Ngn3* など膵内分泌幹細胞のマーカー遺伝子の発現も上昇しており、細胞の脱分化(dedifferentiation)や分化転換(transdifferentiation)が起こっている可能性が示唆された。そこで細胞系譜解析を用いて解析したところ、*K0* マウスの膵島においては、いったんインスリン産生細胞に分化した細胞のうち、ごく一部はグルカゴン産生能を有する細胞様細胞に変化していることが明らかになった。このことから、NRDC はインスリン分泌制御だけではなく、細胞の分化維持にも重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

K0 マウス膵島における遺伝子発現を見ると、*GLUT2* や *Glucokinase* などグルコースの取込みや利用に関わる遺伝子群の発現が低下していた。次にそれらの遺伝子上流にある膵細胞特異的転写因子群について解析したところ、特に *MafA* の発現が低下していることがわかった。さらに、膵細胞株 *INS832/13* を用いて検討したところ、NRDC のノックダウンによって *MafA* 発現およびインスリン分泌の減弱が、NRDC の過剰発現によって *MafA* 発現およびインスリン分泌の亢進が、それぞれ認められた。以上の結果から NRDC が膵細胞において細胞自律的にインスリン分泌を制御していることがわかった。さらに、NRDC の過剰発現と *MafA* のノックダウンを組み合わせて検討したところ、NRDC 過剰発現によるインスリン遺伝子(*Ins1*、*Ins2*)の発現亢進は、*MafA* に依存していることが明ら

かになり、NRDC が *MafA* 発現制御を介してインスリン遺伝子発現を制御していることが明らかになった。

NRDC による *MafA* 発現の制御機構を検討したところ、NRDC が *MafA* のエンハンサー領域(*MafAR3*)に結合し、*MafAR3* のエンハンサー活性を正に制御することがわかった。さらに検討を進め、*MafAR3* に結合することが報告されている既知の転写因子のうち、*Islet1* が NRDC と特異的に複合体を形成することがわかった。そのため、*Islet1* に着目して解析を進めたところ、1) NRDC をノックダウンすると *MafAR3* 上の *Islet1* が減少する、2) 高度酸性ドメインを欠損した NRDC や LIM ドメインを欠損した *Islet1* では複合体形成が著明に障害される、3) 複合体形成が障害される変異体を膵細胞株に過剰発現しても野生型の過剰発現に比べて *MafA* の発現上昇が軽度である、ことがわかった。

以上の結果から、NRDC は *Islet1* との相互作用を介して *MafA* の発現を制御し、*MafA* の発現制御を介してインスリンの発現および分泌を制御していることが明らかになった⁴⁾。また、細胞表面における NRDC の作用を阻害しても、*MafA* 発現における NRDC の効果に変化がなかったことから、膵細胞の核内に発現する NRDC が *MafAR3* への結合を介して *MafA* 転写を調節していることが示唆された。さらにペプチダーゼ活性を欠損した変異体 NRDC による *MafA* 転写の増強効果が、野生型 NRDC と比較して有意に減少していたことから、NRDC が、自身のペプチダーゼ活性を介して *MafA* 転写を制御していることが示唆された。今後 NRDC のペプチダーゼ活性が、いかに下流遺伝子の転写制御に関わっているのか、その分子機構を明らかにすることが重要と考えられた。

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10件、うち6件記載)

1. Kasai Y, Toriguchi K, *Hatano E, Nishi K, Ohno M, Yoh T, Fukuyamaⁿ K, Nishio T, Okuno M, Iwaisako K, Seo S, Taura K, Kurokawa M, Kunichika M, Uemoto S, *Nishi E

Nardilysin promotes hepatocellular carcinoma through activation of signal transducer and activator of transcription 3 **Cancer Sci.** 108: 910-917, 2017
doi: 10.1111/cas.13204.

2. Kimura Y, Ikuta K, Kimura T, Chiba T, Oshima H, Oshima M, *Nishi E, *Seno H
Nardilysin regulates inflammation, metaplasia, and tumors in murine stomach **Sci Rep.** 7: 43052, 2017
doi: 10.1038/srep43052.

3. Yoon WH, Sandoval H, Nagarkar-Jaiswal S, Jaiswal M, Yamamoto S, Haelterman NA, Putluri N, Putluri V, Sreekumar A, Tos T, Aksoy A, Donti T, Graham BH, Ohno M, Nishi E, Hunter J, Muzny DM, Carmichael J, Shen J, Arboleda VA, Nelson SF, Michael F, Wangler MF, Karaca E, Lupski JR, and Bellen HJ

Loss of Nardilysin, a mitochondrial co-chaperone for α -Ketoglutarate Dehydrogenase, promotes mTORC1 activation and neurodegeneration

Neuron 93: 115-131, 2017

doi: 10.1016/j.neuron.2016.11.038

4. Nishi K, Sato Y, Ohno M, Hiraoka Y, Saijo S, Sakamoto J, Chen PM, Morita Y, Matsuda S, Iwasaki K, Sugizaki K, Harada N, Mukumoto Y, Kiyonari H, Furuyama K, Kawaguchi Y, Uemoto S, Kita T, Inagaki N, Kimura T and *Nishi E

Nardilysin is Required for maintaining Pancreatic α -Cell Function

Diabetes 65: 3015-27, 2016

DOI: 10.2337/db16-0178

5. Tien DN, Kishihata M, Yoshikawa A, Hashimoto A, Sabe H, Nishi E, Kamei K, Arai H, Kita T, Kimura T, Yokode M, Ashida N.

AMAP1 as a negative-feedback regulator of nuclear factor- κ B under inflammatory conditions.

Sci Rep. 4:5094. 2014.

doi: 10.1038/srep05094.

6. Ishizu-Higashi S, *Seno H, *Nishi E, Matsumoto Y, Ikuta K, Tsuda M, Kimura Y, Takada Y, Kimura Y, Nakanishi Y, Kanda K, Komekado H, Chiba T (*Co-corresponding author)

Deletion of nardilysin prevents the development of steatohepatitis and liver fibrotic changes

PLOS ONE 9(5): e98017, 2014

doi:10.1371/journal.pone.0098017

[学会発表](計65件、うち9件記載)

1. Ohno M, Chen P-M, Hiwasa T, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Morita Y, Watanabe S, Kuwabara Y, Ono K, Imai M, Inoue K, Murai T, Kita T, Kimura T, and Nishi E.

Nardilysin is a Promising Biomarker for the Early Diagnosis of Acute Coronary Syndrome.

American Heart Association Scientific Session, 2016 Nov.12-16, New Orleans, LA, USA

2. Kasai Y, Hatano E, Nishi E, Toriguchi K, Yoh T, Nishio T, Okuno M, Seo S, Taura K, Yasuchika K, Okajima H, Kaido T, Uemoto S

Nardilysin, a novel biomarker for hepatocellular carcinoma, enhances diethylnitrosamine-induced mice carcinogenesis and cancer cell proliferation via activation of STAT3 signaling pathway

International Liver Cancer Association 2016, Sept 9-11, 2016, Vancouver

3. Fujii T, Nishi E, Ito H., Yoshitomi H., Ohno M, Nishi K., Okabe N., Furu M., Morita Y., Azukizawa M., Okahata A. Collagen Antibody Induced Arthritis is Attenuated by the Gene Deletion of Nardilysin.

ORS2016, March 5-8, 2016, Orlando, FL, USA

4. Ohno M, Hiraoka Y, Lichtenthaler SF, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Chen P-M, Tomimoto H, Araki W, Takahashi R, Kita T, Kimura T, Nishi E: Nardilysin prevents amyloid plaque formation by enhancing α -secretase activity in an Alzheimer's disease mouse model.

1st International Symposium on Brain Protein Aging and Dementia Control, Oct.9-10, 2015, Nagoya

5. Nishi K, Inagaki N, Nishi E:

Nardilysin is a critical regulator of glucose-stimulated insulin secretion

Keystone Symposia (Diabetes: New Insights into Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies), Oct 25-29, 2015, Kyoto

6. Toriguchi K, Nishi E, Hatano E, Tanabe K, Takemoto K, Seo S, Taura K, Uemoto S. Nardilysin deficiency attenuates promotion of hepatocellular carcinoma through suppressing the interleukin 6 signaling pathway

AASLD Liver Meeting 2014. Nov 9 (7-11), 2014, Boston, USA.

7. Ohno M, Hiraoka Y, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Chen P, Makiyama T, Kita T, Matsuura H, Kimura T, Nishi E.

Nardilysin controls heart rate through the regulation of sinus node automaticity

Cold Spring Harbor Meeting (Nuclear Receptors & Diseases), Oct 28-Nov1, 2014, Cold Spring Harbor, NY, USA

8. Nishi E, Nishi K, Ohno M, Saijo S, Chen

P, Sakamoto J, Kimura T, Kita T.
Critical role of nardilysin in
glucose-stimulated insulin secretion
(Oral presentation)
Cold Spring Harbor Meeting (Nuclear
Receptors & Diseases), Oct 28-Nov1, 2014,
Cold Spring Harbor, NY, USA

9. Nishi K, Sato Y, Ohno M, Saijyo S,
Sakamoto J, Chen P, Inagaki N, Kimura T,
Nishi E.
Nardilysin is a critical regulator of
glucose-stimulated insulin secretion
Keystone Symposia (Emerging concepts
and targets in islet biology), Apr 8 (6-11),
2014, Keystone, CO, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：検査方法及び肝内胆管がん用検査試薬
発明者：西 英一郎、大野 美紀子、黒川 祐
人、山口 里奈
権利者：京都大学(50%)、三洋化成工業株式
会社(50%)
種類：
番号：特願 2017-022201
出願年月日：平成 29 年 2 月 9 日
国内外の別：国内

取得状況(計 1 件)

名称：ナルディライジンの高感度免疫測定法
発明者：西 英一郎、平岡 義範、松本 恭
一、國近 誠
権利者：京都大学(50%)、三洋化成工業株式
会社(50%)
種類：
番号：特許第 5610256 号
取得年月日：2014 年 9 月 12 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等
滋賀医科大学薬理学講座ホームページ
<http://www.shiga-med.ac.jp/pharm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 英一郎 (Nishi Eiichiro)
滋賀医科大学・医学部医学科・教授
研究者番号：30362528

(2) 研究分担者

大野 美紀子 (Ohno Mikiko)
滋賀医科大学・医学部医学科・助教
研究者番号：10583198