

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670193

研究課題名(和文) 包括的なミトコンドリア品質管理制御機構の解明と代謝性疾患におけるその破綻

研究課題名(英文) Comprehensive mitochondrial quality control and its collapse in metabolic diseases

研究代表者

樋上 賀一 (Higami, Yoshikazu)

東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：90253640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、抗老化・寿命延伸効果のあるカロリー制限(CR)によるミトコンドリア(MT)の品質管理の向上に、Sirt3タンパク質のプロセッシング亢進が重要である可能性を発見した。MTタンパク質のプロセッシングには、シグナルペプチダーゼが関わっている。Sirt3はMPPとMipepという2つのシグナルペプチダーゼにより2段階切断をうけて活性型になる可能性を明らかにした。また、CRによりMPPではなくMipep発現が亢進した。そのため、CRによるMT品質管理の向上にMipepが重要であると考え、in vivoで証明するために、臓器特異的Mipep欠損マウスを作製した。今後このマウスを解析予定である。

研究成果の概要(英文)：We discovered that the activation of Sirt3 processing plays an important role of the improvement of mitochondrial (MT) quality control by anti-aging and longevity actions of calorie restriction. In the processing of the MT protein, MT signal peptidases are involved. We found that two signal peptidases, MPP and Mipep, were involved in the processing of Sirt3 protein. In addition, CR upregulated the expression of Mipep but not MPP. Therefore, we considered Mipep is important to the improvement of CR-associated MT quality control. In order to prove in vivo, the organ-specific Mipep-deficient mice were created. In the future, we are going to analyze these mice.

研究分野：実験病理学

キーワード：カロリー制限 ミトコンドリア 品質管理 シグナルペプチダーゼ Sirt3 Mipep ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

適度な摂取カロリー制限 (CR; caloric restriction) は、加齢に伴う種々の生理的、病理学的変化を抑制し、平均および最大寿命を延伸する。この CR による抗老化・寿命延伸効果の分子メカニズムとして、成長ホルモン (GH)/インスリン様成長因子 1 (IGF1) シグナルの抑制、ミトコンドリアバイオジェネシスの亢進、Sirtuin の活性化などが示唆されているが、未だ不明な点も多い。

GH/IGF1 シグナルを抑制したマウスやラットでも CR により更に寿命が延伸するため、CR の有益な効果は GH/IGF1 非依存的に制御されていることも示唆される (Bartke *et al*, *Nature*, 2001; Shimokawa *et al*, *Am J Pathol*, 2003)。我々は、CR により GH 非依存的に sterol regulatory element binding protein-1 (Srebp-1c) に転写制御される脂肪酸合成関連遺伝子群の発現が上昇することを見出した (Chujo *et al*, *Age*, 2013)。

そこで、CR による抗老化・寿命延伸効果に Srebp-1c が及ぼす影響の解明を目的に、自由摂食もしくは 30%CR させた野生型と Srebp-1c 欠損 (KO; knockout) マウス、および両マウスより mouse embryonic fibroblasts (MEFs) を採取し、解析した。その結果、1) CR による寿命延伸効果は Srebp-1c KO によって打ち消されること、2) CR による脂肪酸合成関連タンパク質発現の亢進は、白色脂肪組織 (WAT) に特異的に観察され、Srebp-1c 依存的であること、3) CR により WAT 選択的且つ Srebp-1c 依存的に Pgc-1 を介してミトコンドリアバイオジェネシスが亢進すること、4) CR により WAT 選択的且つ Srebp-1c 依存的に酸化ストレスが抑制されること、が明らかとなった。

2. 研究の目的

ミトコンドリアは主要な活性酸素種産生場である。CR により WAT においてミトコンドリアバイオジェネシスの亢進と同時に酸化ストレスの抑制が観察される。それゆえ、CR によりミトコンドリアの品質が向上している可能性が示唆される。そこで、ミトコンドリアの活性や品質管理に重要な役割を果たしていると言われている Sirt3 に注目し、その発現機構および活性化機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

- i) 自由摂食もしくは 30%CR させた野生型と Srebp-1c マウスの WAT を解析した。
- ii) Sirt3 のプロセッシングに関わるミトコンドリアシグナルペプチダーゼを同定した。
- iii) 同ミトコンドリアシグナルペプチダーゼの発現をノックダウンさせた 3T3-L1 脂肪細胞株を作製し、解析した。
- vi) 同ミトコンドリアシグナルペプチダーゼの発現を欠損するマウスを作製した。

4. 研究成果

- i) WAT において CR による Sirt3 mRNA の発現増加は観察されなかった。しかし、CR により Srebp-1c 依存的に 37kDa の前駆型から 28kDa の活性型への切断が亢進していた。
- ii) Sirt3 のプロセッシングに関わるミトコンドリアシグナルペプチダーゼ (MtSPase) の発現を解析した。その結果、代表的な MtSPase で Sirt3 のプロセッシングに関わると報告されている mitochondrial matrix processing peptidase (MPP) は、CR により発現が亢進しなかった。しかし、mitochondrial intermediate peptidase (Mipep) の発現が CR により Srebp-1c 依存的亢進していた。それゆえ、Sirt3 は MPP と Mipep の 2 段階のプロセッシングを受ける可能性が示唆された。
- iii) レトロウイルスベクターを用いて Mipep の発現をノックダウンさせた 3T3-L1 脂肪細胞株を作製した。その結果、MPP と Mipep により 2 段階でプロセッシングされると報告されている活性化型 Cox4 は減少した。同様に、活性化型 Sirt3 も減少した。以上より、Sirt3 は Cox4 と同様、MPP と Mipep により 2 段階でプロセッシングされると示唆された。
- vi) Cre-loxp システムを用いて Mipep の発現を臓器特異的に欠損するマウスを homologous recombination 法で作製した。現在、キメラマウスの作製は完了した。今後、このマウスを CAG-Cre マウス、Adipoq-Cre マウス、MCK-Cre マウスと交配することにより、各々、全身、脂肪組織特異的および筋肉特異的 KO マウスを作製して、解析する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Okita N, Tsuchiya T, Fukushima M, Itakura K, Yuguchi K, Narita T, Hashizume Y, Sudo Y, Chiba T, Shimokawa I, Higami Y. Chronological analysis of caloric restriction-induced alteration of fatty acid biosynthesis in white adipose tissue of rats. *Exp Gerontol*. 63:59-66, 2015 (査読有り)。
2. Okita N, Ishikawa N, Mizunoe Y, Oku M, Nagai W, Suzuki Y, Matsushima S, Mikami K, Okado H, Sasaki T, Higami Y. Inhibitory effect of p53 on mitochondrial content and function during adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 446:91-97, 2014 (査読有り)

[学会発表] (計 22 件)

1. 板倉佳穂、蒲谷里穂、斎藤宏樹、須藤結

- 香、樋上賀一、代謝臓器におけるカロリー制限が及ぼす影響の解析、日本薬学会第136年会、横浜(パシフィコ横浜)、2016年3月26~29日
2. 後藤彰文、斎藤宏樹、蒲谷里穂、須藤結香、樋上賀一、カロリー制限が骨格筋繊維タイプ別の機能に与える影響、日本薬学会第136年会、横浜(パシフィコ横浜)、2016年3月26~29日
 3. 東端里佳子、水之江雄平、須藤結香、樋上賀一、肝臓においてグルタチオンがオートファジー機能に及ぼす影響、日本薬学会第136年会、横浜(パシフィコ横浜)、2016年3月26~29日
 4. Narita T, Fujii N, Okita N, Sudo Y, Higami Y, Srebp-1c orchestrates metabolic remodeling of white adipose tissue by caloric restriction, 4th International Postgraduate Conference on Pharmaceutical Science 2016, Noda (Noda campus, Tokyo University of Science), February 27~28 (2016)
 5. 水之江雄平、樋上賀一、肥満症脂肪組織におけるオートファジー・リソソーム障害、第36回日本肥満学会、名古屋(名古屋国際会議場)、2015年10月2日~3日
 6. 成田匠、沖田直之、須藤結香、樋上賀一、新たなカロリー制限の分子メカニズム~脂肪代謝と脂肪組織のリモデリング~、第30回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会、岐阜(岐阜大学サテライトキャンパス)、2015年7月4日(招待講演)
 7. 渡邊秀行、水之江雄平、名取大輝、沖田直之、須藤結香、樋上賀一、トレハロースによる新規細胞防御メカニズム、第38回日本基礎老化学会、横浜(パシフィコ横浜)、2015年6月12~14日
 8. Mizunoe Y, Sudou Y, Hiraoka H, Okita N, Higami Y, Lysosomal dysfunction and autophagy alteration in adipose tissue. 第38回日本基礎老化学会、横浜(パシフィコ横浜)、2015年6月12~14日
 9. Higami Y, Srebp-1c plays an important role for metabolic remodeling of white adipose tissue, and anti-aging and pro-longevity actions of caloric restriction. Asian Aging Core for Longevity "2006-2015, 10 years and Beyond" 大阪市(大阪大学中之島センター)、2015年3月10日(招待講演)
 10. 成田匠、藤井波木、須藤結香、沖田直之、樋上賀一、カロリー制限による抗老化・寿命延長効果に Srebp-1 が及ぼす影響、第14回日本ミトコンドリア学会年会(九州大学) 福岡市 2014年12月3日
 11. 水之江雄平、須藤結香、沖田直之、樋上賀一、肥大化した脂肪細胞のオートファジーにおけるリソソーム機能障害、第8回オートファジー研究会、札幌市(シャトレーゼ ガトーキングダム サッポロ)、2014年11月10日
 12. 沖田直之、成田匠、藤井波木、須藤結香、樋上賀一、カロリー制限における Srebp1c を介した de novo 脂肪酸合成とミトコンドリアバイオジェネシス、酸化ストレスの関連、第36回日本基礎老化学会シンポジウム、東京都港区(東海大学高輪キャンパス)、2014年10月26日(招待講演)
 13. 吉田実樹、水之江雄平、奈良原誠大、須藤結香、沖田直之、樋上賀一、栄養状態の変化が骨格筋線維タイプ別のオートファジーに及ぼす影響、第58回日本薬学会関東支部大会、町田市(昭和薬科大学)、2014年10月4日
 14. 橋爪由香里、酒井将弘、須藤結香、沖田直之、樋上賀一、絶食耐性における脂肪酸合成転写因子 Srebp-1c の関与、第58回日本薬学会関東支部大会、町田市(昭和薬科大学)、2014年10月4日
 15. 田川亮真、鈴木裕規、沖田直之、今野竜太郎、須藤結香、樋上賀一、脂肪細胞における新規肥満応答性 E3 ユビキチンリガーゼ WWP1 による分化制御、第19回アディポサイエンスシンポジウム、豊中市(千里ライフサイエンスセンター)、2014年8月23日
 16. 西村 瞳、宮野加奈子、横山明信、山川央、須藤結香、白石成二、長瀬隆弘、樋上賀一、上園保仁、アディポネクチン受容体シグナルアッセイ法確立と新規受容体アゴニストの開発、第19回アディポサイエンスシンポジウム、豊中市(千里ライフサイエンスセンター)、2014年8月23日
 17. Miyagawa R, Sudo Y, Otsuka H, Goto A, Kashiwase Y, Yezono Y, Higami Y. Lipid metabolism in cancer cachexia and caloric restriction in adipose tissue, effects of Rikkunshito. 第37回基礎

老化学会、愛知県知多郡(あいち健康プラザ)、2014年6月26日

18. Negishi A, Mizunoe Y, Sudo Y, Higami Y. Inhibition of autophagy by fatty acids in hepatocyte. 第37回基礎老化学会、愛知県知多郡(あいち健康プラザ)、2014年6月26日
19. Higami Y, Caloric restriction enhances mitochondrial biogenesis and suppresses oxidative stress via a master transcription factor of fatty acid biosynthesis, Srebp-1c, in mice white adipose tissue. 2014 Spring Conferene of the Korean Society for Gerontology and the 13th Korea-Japan Gerontologist Joint Meeting、韓国・濟州島、2014年6月20日(招待講演)
20. Mizunoe Y, Sudo Y, Okita N, Higami Y, ROS-associated lysosomal dysfunction impaired autophagy flux and adipokine profile in adipocytes. 2014 Spring Conference of the Korean Society for Gerontology and The 13th Kprea-Japan Gerontologist Joint Meeting 韓国・濟州島、2014年6月21日(招待講演)
21. 樋上賀一、カロリー制限(CR)による脂肪組織での代謝リモデリングと抗老化・寿命延伸効果に Srebp1 が重要な役割を果たす、第57回日本糖尿病学会年次学術集会、大阪市(大阪国際会議場)、2014年5月23日
22. 樋上賀一、Srebp1cを介したカロリー制限による脂肪組織での代謝リモデリングと抗老化・寿命延伸効果、第103回日本病理学会総会、広島市(ANAクラウンプラザホテル広島)、2014年4月25日

〔図書〕(計1件)

1. Mizunoe Y, Sudo Y, Okita N, Higami Y. "Autophagy in adipose tissue" In AUTOPHAGY: CANCER, OTHER PATHOLOGIES, INFLAMMATION, IMMUNITY, INFECTION, AND ACING, VOL.10 edited by Hayat MA (Elsevier), pp149-158, in press

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

樋上賀一(HIGAMI, Yoshikazu)

東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・教授

研究者番号: 90253640

(2)研究分担者

須藤結香(SUDO, Yuka)

東京理科大学・薬学部・助教

研究者番号: 70646695

沖田直之(OKITA, Naoyuki)

公益財団法人佐々木研究所・付属研究所・研究員

研究者番号: 60453841