

令和 2 年 4 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09784

研究課題名(和文)プロリン異性化酵素Pin1による熱産生抑制機構の解明と抗肥満薬の開発

研究課題名(英文)Prolyl isomerase Pin1 suppresses thermogenesis

研究代表者

中津 祐介(Nakatsu, Yusuke)

広島大学・医系科学研究科(医)・講師

研究者番号：20452584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画は、プロリン異性化酵素Pin1と熱産生との関係に着目し、研究を行った。WTマウスと脂肪特異的Pin1 KOマウスを寒冷刺激すると、皮下脂肪と褐色脂肪細胞の熱産生関連遺伝子の発現量は、KOマウスの方で顕著に高かった。そのメカニズムとして、Pin1は熱産生に重要な転写共役因子PRDM16に結合し、分解を促進することを見出した。また、肥満時には脂肪組織のPin1発現量は増加し、Pin1 KOマウスは高脂肪食負荷による体重増加に対して抵抗性を示した。

以上の結果より、脂肪組織のPin1発現増大が熱産生を抑制し、肥満発症につながる機序があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満になると脂肪組織での熱産生が抑制され、ますます太りやすくなると考えられている。しかしながら、肥満時に熱産生が抑制される機序については、ほとんど明らかにされていない。本研究では、肥満時に発現が増加したPin1がPRDM16の分解を促進し、熱産生を抑制することを明らかにした。従って、脂肪組織のPin1発現量を抑制することができれば、抗肥満作用につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we reveal that Pin1 suppresses thermogenesis in scWAT and BAT. After cold stimulation, Pin1 KO mice showed the higher expression levels of thermogenic genes in scWAT and BAT than WT mice. Interestingly, we found that Pin1 associates with transcriptional co-factor PRDM16 which is essential for the induction of thermogenic genes. Pin1 overexpressions suppressed the expression of PRDM16 protein, while Pin1 knockdown increased. Proteasome inhibitor rescued the decrease of PRDM16 by Pin1 overexpressions, suggesting that Pin1 promotes the degradation of PRDM16 through ubiquitin-proteasome system. In primary adipocytes, Pin1 deficiency also upregulated the expression of UCP-1 by CL316243. In addition, PRDM16 knockdown abrogated the increase of UCP-1 protein by Pin1 deficiency.

In summary, Pin1 suppresses the thermogenesis through regulating the stability of PRDM16 protein.

研究分野：代謝学

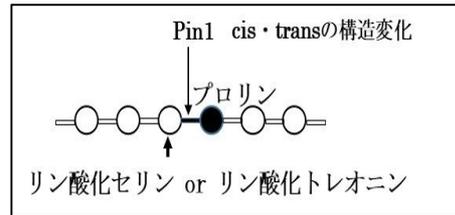
キーワード：Pin1 熱産生 PRDM16 UCP-1 肥満

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂肪細胞は、白色・ベージュ・褐色脂肪細胞の三種類に大別される。白色脂肪細胞が主にトリグリセリドという形でエネルギーを蓄積するのに対し、ベージュ脂肪細胞と褐色脂肪細胞は、熱産生によりエネルギー消費を行う。従って、ベージュ・褐色脂肪細胞の機能亢進は、肥満抑制につながると考えられている。一方、肥満時には熱産生が抑制され、それが肥満の増悪につながると考えられている。しかしながら、肥満時に熱産生が抑制されるメカニズムは、ほとんど明らかにされていない。

我々が着目しているプロリン異性化酵素 Pin1 は、プロリンのシス・トランス異性化を行うことにより様々な標的蛋白の機能を調節している (右図)。我々は、Pin1 と代謝性疾患との関係に着目し研究を行ってきた。興味深いことに、高脂肪食負荷時のマウスの白色脂肪組織では、Pin1 の発現量が顕著に増加し、Pin1 null マウスは高脂肪食負荷による体重増加に対して抵抗性を示した。以上より、Pin1 は肥満発症に強く関すると考えられた。



2. 研究の目的

本研究では、Pin1 が肥満発症を誘発する新たなメカニズムとして熱産生を抑制している可能性を考え、検討を行った。

3. 研究の方法

- (1) 脂肪特異的 Pin1 KO マウスの作成： Pin1 flox マウスと ap2-Cre Tg マウスを交配し、脂肪特異的 Pin1 KO マウスを作成した。
- (2) ウスタンプロット： マウスから脂肪組織を摘出後、定法に従い組織を可溶化し、蛋白定量後、サンプルを調整した。その後、SDS-PAGE, PVDF メンブレンへの転写、一次・二次抗体の反応を行い、ECL により検出した。
- (3) Real time PCR：各組織から RNA を抽出後、同量の RNA を逆転写した。SYBR Green と各種プライマーを用いて Real time PCR を行った。

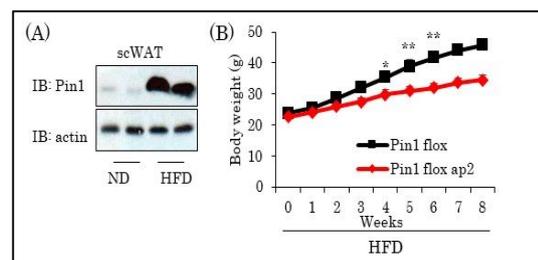
4. 研究成果

(1) 脂肪特異的 Pin1 KO マウスの表現型の解析

まず、肥満モデルマウスでの皮下脂肪組織と褐色脂肪組織の Pin1 発現量について検討した。高脂肪食負荷マウスの皮下脂肪組織の Pin1 は顕著に発現量が増加していた (Fig.1A)。また、遺伝的肥満モデルマウスである ob/ob マウスの皮下脂肪組織においても同様の結果が得られた。一方、褐色脂肪組織においては、両マウスにおいて Pin1 発現量の変動は認められなかった。次に脂肪特異的 Pin1 KO マウス (以下 Pin1 KO マウス) の解析を行った。

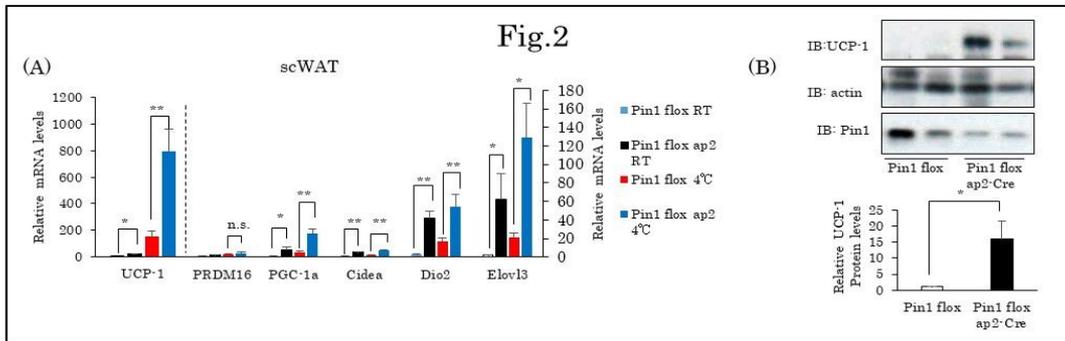
高脂肪食負荷を行うと、WT マウスの体重増加に比較して、Pin1 KO マウスの体重増加は軽度であった (Fig.1B)。また、これと一致して各脂肪組織、肝重量も KO マウスで低値を示した。次に、耐糖能への影響を調べるために、糖負荷試験とインスリン負荷試験を行った。その結果、Pin1 KO マウスは WT マウスと比較して良好な耐糖能を示した。

以上の結果より、脂肪特異的に Pin1 を欠損させると、肥満抵抗性になることが明らかとなった。



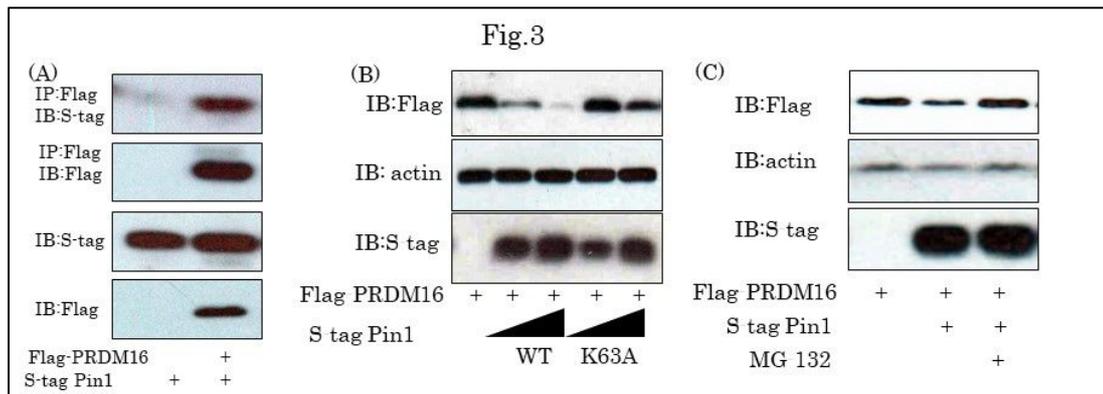
(2) 熱産生に対する Pin1 の役割検討

熱産生に対する Pin1 の役割を調べるために、マウスを寒冷刺激下に置き、一定時間後に皮下脂肪組織と褐色脂肪組織を摘出した。その後、UCP-1 等の熱産生関連遺伝子の発現量について調べた。KO マウスの両脂肪組織において、UCP-1 等の熱産生関連遺伝子の発現量は、WT マウスと比較して顕著に高かった (Fig.2A)。また、遺伝子レベルの発現量と一致して、UCP-1 の蛋白発現量についても KO マウスの方が顕著に高かった (Fig.2B)。



(3). Pin1 を介した熱産生抑制機構の解明

上記の結果より、Pin1 は皮下脂肪組織と褐色脂肪組織において熱産生を抑制していることが明らかとなったので、次にそのメカニズムについて検討を行った。熱産生に関する因子の中で Pin1 結合蛋白を探索したところ、転写共役因子である PRDM16 を同定した。293T 細胞に S-tag Pin1 と Flag-PRDM16 を共発現し、免疫沈降を行ったところ両者の結合が確認された (Fig. 3)。また、過剰発現系のみならず、内在性の両者の結合も確認できた。次に、Pin1 が PRDM16 の発現量を検討するために、293T 細胞に PRDM16 と Pin1 を共発現させたところ、PRDM16 単独時と比較して、PRDM16 の発現量が顕著に減少した。また、イソメラーゼ活性がない Pin1 変異体を導入しても PRDM16 の発現量には、影響を与えなかった (Fig.3B)。逆に siRNA で Pin1 をノックダウンすると、PRDM16 の発現量は増加した。以上の結果より、Pin1 は、イソメラーゼ活性依存的に PRDM16 の発現量を抑制していると考えられた。次に、この発現抑制が蛋白分解の促進であるかを検討するために、プロテアソーム阻害剤 MG-132 で処理を行った。その結果、Pin1 過剰発現による PRDM16 の発現抑制は、解除された (Fig.3C)。また、Pin1 ノックダウンを行うと、PRDM16 のポリユビキチン化が減少した。上記の結果より、Pin1 はユビキチン-プロテアソーム系を介した PRDM16 蛋白分解を促進することが明らかとなった。



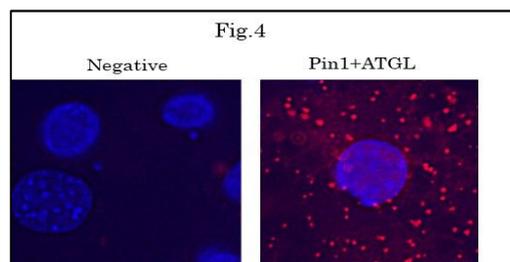
(4) Primary adipocytes での Pin1 を介した熱産生抑制機構の解明

WT マウスと KO マウスの脂肪組織から stromal vascular fraction を調整した後、脂肪細胞に分化させた。その後、β3 受容体アゴニストである CL316243 で刺激したところ、Pin1 KO 脂肪細胞は、WT の細胞と比較して UCP-1 の発現量が高かった。また、PRDM16 をノックダウンすると Pin1 欠損による UCP-1 蛋白量増加が認められなくなった。以上の結果より、Pin1 は PRDM16 の機能制御を介して UCP-1 等の熱産生関連遺伝子の発現量を調節していると考えられた。

(5) 脂肪組織における他の Pin1 結合蛋白の同定と機能制御

既報では、PRDM16 KO マウスは、褐色脂肪組織への影響はほとんど認められないが、Pin1 KO マウスの褐色脂肪細胞は、WT マウスと比較して脂肪含有量が少なく、また熱産生関連遺伝子の発現量も高い。これらのことより、Pin1 は、部分的には PRDM16 非依存的に脂肪組織の機能を制御していると推測された。

そこで脂肪組織における Pin1 結合蛋白を探索



したところ、脂肪分解に関わる ATGL と HSL を同定した。293T 細胞に ATGL と Pin1 を過剰発現させると、両者の結合が確認された。また、3T3-L1 細胞を用いて proximal ligation assay により、内在性の結合も確認できた (Fig.4)。

次に、Pin1 による ATGL の機能制御について検討したところ、Pin1 は ATGL の分解を促進することが明らかとなった。興味深いことに、イソメラーゼ活性がない Pin1 変異体を ATGL とともに発現しても、ATGL の発現量は抑制された。このことより、Pin1 はイソメラーゼ活性非依存的に ATGL の機能を制御していると考えられた。

以上の結果より、肥満時には脂肪組織の Pin1 発現量が増加し、PRDM16 の分解促進を介した熱産生抑制が起こると考えられた。実際に、Pin1 KO マウスは酸素消費量が WT マウスと比較して高かった。脂肪組織の Pin1 発現量や活性を抑制することができれば、肥満抑制につながると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nakatsu Y, Matsunaga Y, Yamamotoya T, Ueda K, Inoue MK, Mizuno Y, Nakanishi M, Sano T, Yamawaki Y, Kushiyama A, Sakoda H, Fujishiro M, Ryo A, Ono H, Minamino T, Takahashi SI, Ohno H, Yoneda M, Takahashi K, Ishihara H, Katagiri H, Nishimura F, Kanematsu T, Yamada T, Asano T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Prolyl Isomerase Pin1 Suppresses Thermogenic Programs in Adipocytes by Promoting Degradation of Transcriptional Co-activator PRDM16.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 3221-3230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.02.066.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakatsu Y, Matsunaga Y, Ueda K, Yamamotoya T, Inoue Y, Inoue MK, Mizuno Y, Kushiyama A, Ono H, Fujishiro M, Ito H, Okabe T, Asano T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of Pin1 inhibitors and their potential as therapeutic agents.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Curr Med Chem	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/0929867325666181105120911.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakatsu Y, Mori K, Matsunaga Y, Yamamotoya T, Ueda K, Inoue Y, Mitsuzaki-Miyoshi K, Sakoda H, Fujishiro M, Yamaguchi S, Kushiyama A, Ono H, Ishihara H, Asano T.	4. 巻 292
2. 論文標題 The prolyl isomerase Pin1 increases -cell proliferation and enhances insulin secretion	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 11886-11895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.780726	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakatsu Y, Kokubo H, Bumdelger B, Yoshizumi M, Yamamotoya T, Matsunaga Y, Ueda K, Inoue Y, Inoue MK, Fujishiro M, Kushiyama A, Ono H, Sakoda H, Asano T.	4. 巻 18
2. 論文標題 The SGLT2 Inhibitor Luseogliflozin Rapidly Normalizes Aortic mRNA Levels of Inflammation-Related but Not Lipid-Metabolism-Related Genes and Suppresses Atherosclerosis in Diabetic ApoE KO Mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E1704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18081704.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamotoya T, Nakatsu Y, Kushiya A, Matsunaga Y, Ueda K, Inoue Y, Inoue MK, Sakoda H, Fujishiro M, Ono H, Kiyonari H, Ishihara H, Asano T.	4. 巻 7
2. 論文標題 Trk-fused gene (TFG) regulates pancreatic cell mass and insulin secretory activity.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 13026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-13432-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamotoya T, Nakatsu Y, Matsunaga Y, Fukushima T, Yamazaki H, Kaneko S, Fujishiro M, Kikuchi T, Kushiya A, Tokunaga F, Asano T, Sakoda H.	4. 巻 18
2. 論文標題 Reduced SHARPIN and LUBAC Formation May Contribute to CCl4- or Acetaminophen-Induced Liver Cirrhosis in Mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 E326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18020326	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakatsu Y, Matsunaga Y, Yamamotoya T, Ueda K, Inoue Y, Mori K, Sakoda H, Fujishiro M, Ono H, Kushiya A, Asano T.	4. 巻 17
2. 論文標題 Physiological and Pathogenic Roles of Prolyl Isomerase Pin1 in Metabolic Regulations via Multiple Signal Transduction Pathway Modulations.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms17091495	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中津 祐介, 山本屋 武, 上田 晃嗣, 井上 賢紀, 井上 由貴, 櫛山 暁史, 浅野知一郎
2. 発表標題 プロリン異性化酵素Pin1による脂肪蓄積制御機構の解明
3. 学会等名 第61回 日本糖尿病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中津 祐介、松永 泰花、山本屋 武、櫛山 暁史
2. 発表標題 プロリン異性化酵素Pin1は、PRDM16の分解を促進することで熱産生を抑制する。
3. 学会等名 日本糖尿病学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本屋 武、中津 祐介、松永 泰花、迫田 秀之、藤城 緑、山崎 広貴、菊池 貴子、櫛山 暁史、浅野 知一郎
2. 発表標題 Trk-fused gene (TFG) の隣 細胞における役割の解明
3. 学会等名 日本糖尿病学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 浅野 知一郎、山本屋 武、松永 泰花、井上 由貴、迫田 秀之、藤城 緑、山崎 広貴、櫛山 暁史、中津 祐介
2. 発表標題 SGLT2阻害薬ルセオグリフロジンによる動脈硬化抑制効果の検討
3. 学会等名 日本糖尿病学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井上 由貴、中津 祐介、山本屋 武、松永 泰花、迫田 秀之、藤城 緑、菊池 貴子、櫛山 暁史、浅野 知一郎
2. 発表標題 プロリン異性化酵素Pin1はATGL及びHSLに結合し、分解を促進する
3. 学会等名 日本糖尿病学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松永 泰花、中津 祐介、山本屋 武、井上 由貴、迫田 秀之、藤城 緑、櫛山 暁史、佐野 朋美、西村 英紀、浅野 知一郎
2. 発表標題 SGLT2阻害薬カナグリフロジンによる糖尿病性腎症発症抑制効果とプロリン異性化酵素Pin1の関与
3. 学会等名 日本糖尿病学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中津 祐介、山本屋 武、上田 浩二、井上 由貴、井上 賢紀、松永 泰花、浅野 知一郎
2. 発表標題 プロリン異性化酵素Pin1を介した脂肪細胞機能の制御と肥満発症への関与
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中津 祐介、山本屋 武、井上 由貴、井上 賢紀、櫛山 暁史、浅野 知一郎
2. 発表標題 プロリン異性化酵素Pin1を介した脂肪蓄積制御と肥満発症への関与
3. 学会等名 分子糖尿病学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中津 祐介、森 馨一、松永 泰花、山本屋 武、藤城 緑、石原 寿光、浅野 知一郎
2. 発表標題 プロリン異性化酵素Pin1を介した膵 細胞調節機構の解明
3. 学会等名 第59回 日本糖尿病学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中津 祐介、浅野 知一郎
2. 発表標題 プロリン異性化酵素Pin1による糖・脂質代謝制御機構
3. 学会等名 第89回 日本生化学大会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中津 祐介、松永 泰花、山本屋 武、浅野 知一郎
2. 発表標題 プロリン異性化酵素Pin1は、転写共役因子PRDM16の分解を介して、脂肪細胞の熱産生を抑制する
3. 学会等名 第39回 分子生物学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中津 祐介、松永 泰花、山本屋 武、櫛山 暁史、浅野 知一郎
2. 発表標題 プロリン異性化酵素Pin1は、転写共役因子PRDM16の分解を促進し、熱産生を抑制する
3. 学会等名 第28回 分子糖尿病学会シンポジウム
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中津 祐介、中井 菜摘、伊藤 輝、山本屋 武、味八木 茂、安達 伸生、浅野 知一郎
2. 発表標題 骨格筋のプロリン異性化酵素Pin1は、運動能力と全身の代謝制御に重要である。
3. 学会等名 第5回 筋学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中津 祐介、中井 菜摘、伊藤 輝、山本屋 武、上田 晃司、井上 賢紀、水野 優、味八木 茂、安達 伸生、櫛山 暁史、浅野 知一郎
2. 発表標題 骨格筋Pin1は、運動機能及び糖代謝を制御する
3. 学会等名 第61回 日本糖尿病学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----