

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08200

研究課題名(和文)カルシウムシグナル調節を介した新規代謝制御機構の解明

研究課題名(英文)Novel mechanism for energy metabolism regulated by a Ca<sup>2+</sup>-sensor protein

研究代表者

西谷 友重(Nishitani, Tomoe)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：50393244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肥満は各種生活習慣病のリスクを高めることから制御機構の解明は重要である。私達は、カルシウムセンサーNCS-1の全身欠損(KO)マウスが顕著な肥満を呈することから、カルシウムシグナル調節を介した新規代謝制御機構を明らかにすることを目的とした。個体レベルの解析により、摂食、運動量は変わらないが、エネルギー代謝がKOマウスで低下していること、また細胞レベルの解析により、それがミトコンドリア呼吸量低下によることを見出した。さらにメタボローム解析から、KOマウスではエネルギー代謝に関わる因子が低下し、一方、肥満蓄積に寄与する因子が増加することにより、肥満に陥っていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Obesity is a leading cause of life-threatening diseases, thus clarifying its molecular mechanism is important. We have previously reported that mice lacking a Ca<sup>2+</sup> sensor protein NCS-1(NCS1<sup>-/-</sup>) exhibited significant obesity. Using metabolic cages, we found that food intake and locomotor activity were similar between the two groups. However, energy metabolism (i.e. O<sub>2</sub> consumption/CO<sub>2</sub> emission) were significantly lower in NCS1<sup>-/-</sup> mice. In the cellular level, indicators for mitochondrial function and number (respiratory rate, and the levels of UCP1, PGC-1) were also decreased. Metabolome analyses demonstrated that the metabolites involved in energy consumption were decreased whereas those in energy storage were increased, leading to massive obesity. Taken together, these results suggest that NCS-1 is a novel regulator of energy metabolism in adipocytes, and hence can be an important target for treatment of metabolic syndrome.

研究分野：細胞生理学

キーワード：カルシウム 代謝異常 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満は、日常生活の容易さや外見などを損なうのみならず、生活習慣病として知られる糖尿病、脂肪肝、心筋梗塞や脳梗塞など、命にもかかわるような重大な病気の大きな要因や増悪因子となり得ることから、現代における重篤な社会問題と言える。従って、肥満の発症や調節の生体経路を明らかにすることは、各種疾患の予防や治療において重要である。

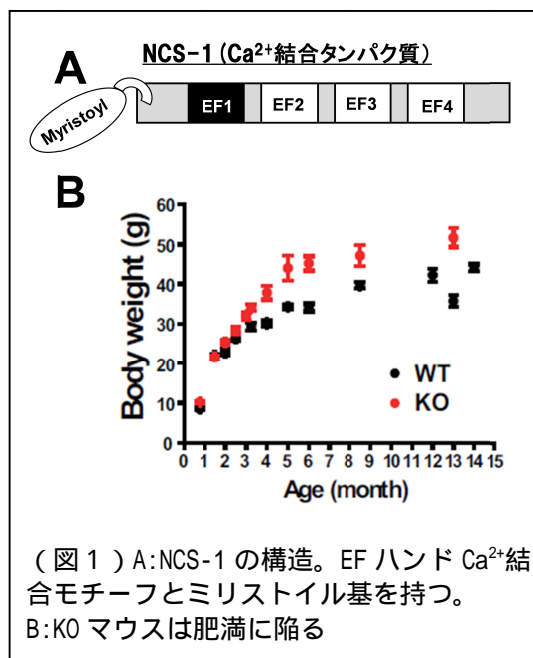
(2) 生体丸ごとの全エネルギー量は、エネルギー摂取(摂食)と消費(運動や熱産生など)が連動して自動調節されることによって維持されており、この調節が破綻すると“肥満”になる。すなわち、過度の摂食、運動不足、エネルギー代謝の低下などにより肥満が発症する。

(3) 脂肪組織には、余剰のエネルギーを中性脂質として貯蔵する白色脂肪組織の他、栄養分を熱に変換してエネルギーを消費する褐色脂肪組織が存在する。褐色脂肪組織をいかに活性化できるかが抗肥満のカギとなるが、それを調節する因子として、寒冷刺激や交感神経興奮刺激が知られている。

(4) 一方、近年、細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナル変化と代謝調節との関連が示唆されている。例えば、Ca<sup>2+</sup>透過チャネル TRPV4 が肥満制御に関わることが、近年報告されている<sup>1</sup>。

細胞内 Ca<sup>2+</sup>の働きはカルモジュリンなどに代表される一連の Ca<sup>2+</sup>センサータンパク質により制御される。その一つ **Neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor-1(NCS-1)** は、神経などの興奮性組織に高発現し、シナプス伝達など神経機能に重要な役割を担うことが報告されている。それ以外に、申請者らは NCS-1 の未知なる機能を探索した結果、イオンチャネルの制御<sup>2</sup>、障害神経におけるサバイバル作用<sup>3</sup>、心筋 Ca<sup>2+</sup>シグナル調節作用<sup>4,5</sup> など様々な機能を持つことを報告してきた。

(5) これらの研究の中で、NCS-1 の遺伝子欠損 (KO/NCS1<sup>-/-</sup>) マウスでは、老化に伴い顕著な肥満が生じ(図 1B)、血糖値も糖尿病なみに増加していることを見出した。これらの結果は、**NCS-1 が肥満およびその結果生じる生活習慣病の抑制に寄与することを示唆している。**また、NCS-1 は褐色脂肪組織にも発現が認められたことから、**直接、代謝に関わっている可能性**がある。しかし、**NCS-1 の代謝制御における役割およびその分子機構については全く不明であった。**

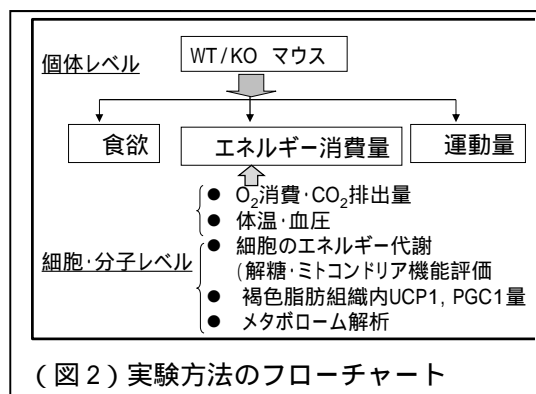


2. 研究の目的

以上の結果を踏まえ、**NCS1<sup>-/-</sup>マウスの肥満の原因を 個体・細胞・分子レベルで探ることにより、NCS-1 の標的分子を含めた新しい肥満抑制経路を見出し、細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナル変化による肥満調節機構の詳細を明らかにすることを目的とした。**

3. 研究の方法

NCS1<sup>-/-</sup>マウスに認められる肥満の原因を明らかにするため、個体・細胞・分子レベルでの解析を行った(図 2 のフローチャート参照)。



(1) **個体レベルでの解析:** まず食欲、運動量、エネルギー消費量のうち、いずれが変化したのが、“マウス用代謝総合システム”を用いて明らかにした。具体的には、食欲に関しては摂食量・節水量を、運動量に関しては、自発運動量を赤外線ビームによりモニターした。エネルギー消費量に関しては、酸素消費量および二酸化炭素排出量を測定した。また身体中の脂肪組織の割合は、7テ

スラーのMRI解析によりWTとKOで比較を行った。

(2) 細胞レベルでの解析:細胞レベルでのエネルギー代謝(解糖系、TCA回路、ミトコンドリア呼吸)の状態を評価するため、“細胞外フラックスアナライザー”を用いて解析を行った。解糖系が亢進すると乳酸が生成されて細胞外の酸性化速度が上昇し、一方、ミトコンドリア呼吸が亢進すると酸素消費速度が上昇する。従って、この2つのパラメータを同時に測定することにより、どちらの代謝経路が優勢か、またエネルギー代謝状態の高低などを評価できる。さらに様々な呼吸阻害剤添加により、ミトコンドリアの機能(基礎呼吸・ATP代謝回転・プロトンリーク・最大呼吸量)が評価できる。本来、WTおよびKOマウス由来の褐色脂肪組織を用いて行うべきであるが、今回はミトコンドリア含有量の大きい培養心筋細胞を用いてミトコンドリア呼吸量、解糖系による糖代謝を測定した。

(3) 分子レベルでの解析: 褐色脂肪組織においてエネルギー消費に重要な役割を担うタンパク質群(ミトコンドリア脱共役タンパク質UCP1やその上流の転写共役因子PGC1など)の量をWestern blot法を用いてWTとKOで比較した。さらに褐色・白色脂肪組織における様々な代謝経路(解糖系、TCAサイクル、脂質・アミノ酸・核酸代謝など)の産物をWTとKOで網羅的に比較するため、CE-TOFMSおよびCE-QqMSを用いたメタボローム解析を行い、どの代謝経路がNCS-1のターゲットなのか明らかにした。また、褐色、白色脂肪組織以外に身体全体の代謝をWTとKOで比較するため、肝臓も試料として用いた。

#### 4. 研究成果

(1) NCS-1のKOマウスは肥満に陥った。  
図1Bで認められたように、NCS-1のKOマウスは同腹のWTに較べて体重が増加した。

(2) NCS-1 KOマウスの肥満は、脂肪蓄積による。KOマウスの体重増加の原因が水分増加によるものか、脂肪蓄積によるものか確認するため、MRI解析により脂肪量を測定した。その結果、KOマウスで皮下脂肪、内臓脂肪ともに顕著に増大していることがわかった。

(3) 摂食量・節水量はWTとKOで差は無かった。  
マウス用代謝総合システムにより、8日間の総摂食量および総節水量を測定したところ、両方ともWTとKOで有意差は無かった。

(4) 自発運動量もWTとKOで差は無かった。

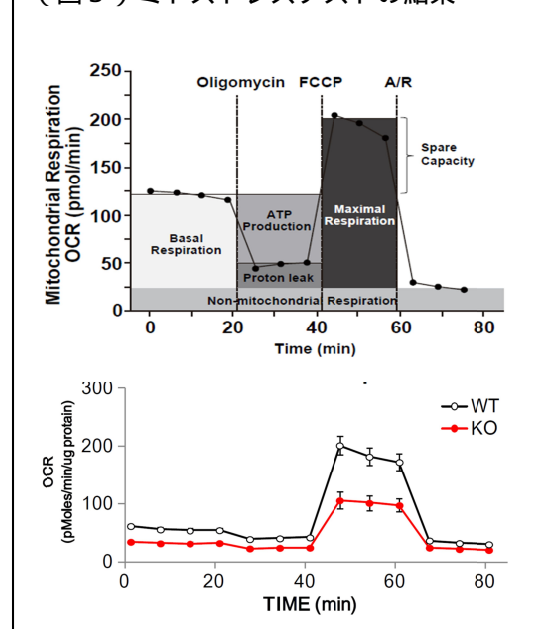
マウス用代謝総合システムにより、8日間の自発運動量(垂直および水平方向)を測定したところ、夜間、昼間ともWTとKOで有意差は無かった。

(5) NCS-1のKOマウスはエネルギー代謝が低いため肥満に陥った。WTおよびKOマウスのエネルギー代謝を比較するため、8日間の酸素消費量および二酸化炭素排出量を測定したところ、両方ともKOマウスでヒストグラムのピークを示す値が低くなっていること、すなわちエネルギー代謝が低下していることがわかった。

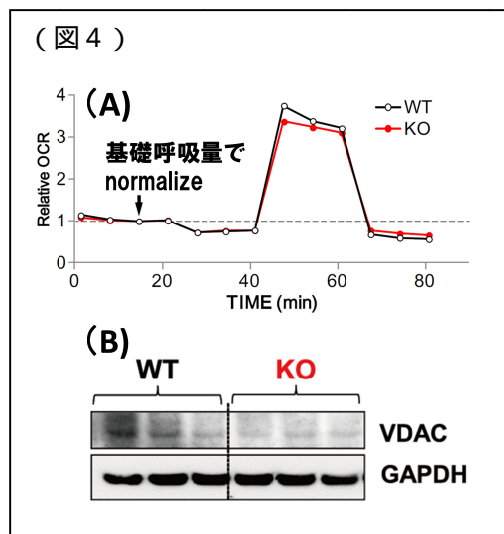
(6) KOマウスでは細胞レベルでも解糖系、ミトコンドリア呼吸量両方が低下していた。フラックスアナライザーを用いて生きた細胞の代謝を測定した。

(7) KOマウスではミトコンドリア呼吸量全体が低下したが、これはミトコンドリア量が減少したためであると考えられる。ミトストレステスト法を用いて、ミトコンドリア呼吸のうち、基礎呼吸量、最大呼吸量、プロトンリーク量など、どのパラメータがKOマウスで変化したか調べた結果、全てのパラメータで減少が認められた(図3)。

(図3) ミトストレステストの結果



しかし、WTとKOの酸素消費量を基礎呼吸量で標準化すると、形がほとんど同じであったことから、ミトコンドリアの機能は正常であるが量が低下したものと考えられる。実際、ミトコンドリアマーカーであるVDACの量がKO組織で低下していた(図4)。



(8) KO マウス褐色脂肪組織ではミトコンドリア生合成に関わる因子が低下していた。  
褐色脂肪組織においてエネルギー消費に関わる因子として、UCP-1が知られている。UCP-1はミトコンドリア内膜に発現するプロトンチャネルであり、呼吸鎖で生成されたプロトンの濃度勾配を無くす方向に働くことから、栄養分がATPに変換されず熱として放散される。従って、UCP-1の多い動物は痩せており、少ない動物は太っていることが報告されている。また、UCP-1の上流にはPGC1というミトコンドリアの生合成に寄与する因子が知られている。そこで、UCP-1およびPGC1のタンパク量をWTとKOの褐色脂肪組織で比較したところ、顕著にKOで低下していることがわかった。

(9) 116種類の代謝産物を用いた網羅的解析。  
NCS-1欠損により、どの代謝経路が変化するか褐色および白色脂肪組織を用いてメタボローム解析を行った。クラスター解析の結果、KOマウスの褐色脂肪組織では、ATPをはじめとしたエネルギー代謝に関わる代謝産物が低下し、一方、白色脂肪組織では中性脂肪など脂肪蓄積に関わる代謝産物の量が増加していることがわかった。そして、その両方が原因で肥満に陥ると考えられた。

(結論) NCS-1の欠損により、顕著な肥満が認められた。その原因として、摂食量や運動量の変化というよりはエネルギー代謝が低下するためであることがわかった。細胞レベルの研究により、NCS-1 KOマウスでは、ミトコンドリアの生合成が低下することにより、上記の結果になっていることが示唆された。NCS-1は神経系や褐色脂肪組織に発現しており、交感神経が興奮することにより、エネルギー代謝が亢進し肥満抑制的に働くのではないかと考えられた。今後の課題はNCS-1の脂肪組織における役割、Ca<sup>2+</sup>シグナルとの関連に

ついて検討する予定である。

#### <引用文献>

- 1) Ye L, Kleiner S, Wu J, Sah R, Gupta RK, Banks AS, Cohen P, Khandekar MJ, Boström P, Mepani RJ, Laznik D, Kamenecka TM, Song X, Liedtke W, Mootha VK, Puigserver P, Griffin PR, Clapham DE, Spiegelman BM. TRPV4 is a regulator of adipose oxidative metabolism, inflammation, and energy homeostasis. *Cell*, 2012 Sep 28;151(1):96-110.
- 2) Nakamura TY, Pountney DJ, Ozaita A, Nandi S, Ueda S, Rudy B, Coetzee WA. A role for frequenin, a Ca<sup>2+</sup>-binding protein, as a regulator of Kv4 K<sup>+</sup>-currents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Oct 23;98(22):12808-13
- 3) Nakamura TY, Jeromin A, Smith G, Kurushima H, Koga H, Nakabeppu Y, Wakabayashi S, Nabekura J. Novel role of neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor-1 as a survival factor up-regulated in injured neurons. *J Cell Biol*. 2006 Mar 27;172(7):1081-91
- 4) Nakamura TY, Jeromin A, Mikoshiba K, Wakabayashi S. Neuronal calcium sensor-1 promotes immature heart function and hypertrophy by enhancing Ca<sup>2+</sup> signals. *Circ Res*. 2011 19;109(5):512-23
- 5) Nakamura TY, Nakao S, Wakabayashi S. Neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor-1 contributes to stress tolerance in cardiomyocytes via activation of mitochondrial detoxification pathways. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;99:23-34.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

論文名は西谷友重 (Tomoe Nishitani) ではなく、中村友重 (Tomoe Y. Nakamura) となっております。

Nakamura TY, Nakao S, Nakajo Y, Takahashi JC, Wakabayashi S, Yanamoto H: Possible Signaling Pathways Mediating Neuronal Calcium Sensor-1-Dependent Spatial Learning and Memory in Mice. PLoS ONE, 査読有, vol .12, No.1, 2017, e0170829.

DOI: 10.1371/journal.pone.0170829.

Nakamura TY, Nakao S, Wakabayashi S: Neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor-1 contributes to stress tolerance in cardiomyocytes via activation of mitochondrial detoxification pathways. *J. Mol Cell Cardiol.*, 査読有, vol.20, 2016, 23-34  
DOI: 10.1016/j.yjmcc.2016.08.013

Kobayashi S, Nakamura TY, Wakabayashi S. Calcineurin B homologous protein 3 negatively regulates cardiomyocyte hypertrophy via inhibition of glycogen synthase kinase 3 phosphorylation. *J. Mol. Cell., Cardiol.* 査読有, Vol. 84, 2015;133-42  
DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.04.018

Nakao S, Wakabayashi S, Nakamura, TY. Stimulus-dependent regulation of nuclear Ca<sup>2+</sup> signaling in cardiomyocytes: a role of neuronal calcium sensor-1. *PLoS ONE*, 査読有, vol. 10, No. 4, 2015, :e0125050  
DOI: 10.1371/journal.pone.0125050

〔学会発表〕(計17件)

渡邊裕介、石井修平、深山俊治、上本泰生、井原大、西谷友重、荒井勇二、中川修。Hey1 expression in pharyngeal arch and presomitic mesoderm is regulated by a distal enhancer. ConBIO2017, (神戸ポートアイランド, 2017年12月)

Tomoe Y, Nakamura, Shu Nakao and Shigeo Wakabayashi. Novel mechanism of stress tolerance of cardiomyocytes mediated by a Ca<sup>2+</sup> sensor protein NCS-1. 第94回日本生理学会大会(アクトシティ浜松, 2017年3月)

Nakamura TY. Role of NCS1 in cardiovascular and neuronal tissues. *Workshop Neuronal Calcium Sensors in Health and Disease* (Delmenhorst/Germany, 2016年12月)

西谷(中村)友重。細胞内カルシウムセンサーを介したミトコンドリア機能制御と心筋ストレス防御機構 第26回日本循環薬理学会(信州大学医学部付属病院, 2016年12月)

Tomoe Y, Nakamura-Nishitani, Shu Nakao and Shigeo Wakabayashi Divergent roles

of Neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor-1 in immature and diseased hearts. International and Interdisciplinary Symposium 2016 (東京医科歯科大学, 2016年7月)

西谷(中村)友重, 中尾周, 中城有香子, 若林繁夫, 柳本広二。マウスの空間学習・記憶におけるカルシウムセンサーNCS-1の役割とシグナル伝達経路。第109回近畿生理学談話会(大阪市立大学, 2016年11月)

西谷(中村)友重, 中尾周, 若林繁夫。筋細胞における核内Ca<sup>2+</sup>濃度制御機構とCa<sup>2+</sup>センサーNCS-1の役割。心血管膜輸送研究会2016(九州大学, 2016年10月)

久光隆、中村-西谷友重, 中川修, 若林繁夫。TRPC6のNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体NHE1によるカルシニューリン活性化作用への関与 Involvement of TRPC6 in Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE1-induced enhancement of calcineurin-NFAT signaling. 第93回日本生理学会大会(札幌コンベンションセンター, 2016年3月)

中村-西谷友重, 中尾周, 中川修, 若林繁夫。細胞内カルシウムセンサーによる心筋ストレス防御機構: ミトコンドリア機能維持を介して。第93回日本生理学会大会(札幌コンベンションセンター, 2016年3月)

西谷(中村)友重, 中尾周, 中川修, 若林繁夫。細胞内Ca<sup>2+</sup>センサーによる新規代謝調節経路 Novel pathway of energy metabolism by neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor-1 第38回日本分子生物学会年会および第88回日本生化学会大会 合同大会(神戸国際会議場), 2015年12月

若林繁夫, 中尾周, 稲垣薫克, 土持裕胤, 中村 西谷友重, 白井幹康。継続的な有酸素運動はCa<sup>2+</sup>センサー蛋白質欠損で起こるマウスの肥満を解消できる 第38回日本分子生物学会年会および第88回日本生化学会大会 合同大会(神戸国際会議場), 2015年12月

西谷(中村)友重, 中尾周, 若林繁夫。細胞内カルシウムセンサーによる心筋ストレス防御機構 心血管膜輸送研究会2015(生理学研究所, 2015年10月)

西谷(中村)友重, 中尾周, 若林繁夫。細胞内Ca<sup>2+</sup>センサー蛋白質を介した心筋内ストレス防御機構 第108回近畿生理談話会(近畿大学, 2015年10月)

中村 - 西谷友重、中尾周、中川修、若林  
繁夫：細胞内  $Ca^{2+}$ シグナルによる代謝調  
節。第 92 回日本生理学会大会（神戸国際  
会議場、2015 年 3 月）

中尾 周, 中城有香子, 高橋 淳, 中川修,  
若林繁夫, 柳本広二, 中村(西谷)友重：  
カルシウムセンサーNCS-1 はマウスの空  
間学習・記録に寄与する。第 92 回日本生  
理学会大会（神戸国際会議場、2015 年 3  
月）

Nakamura, T.Y., Nakao, S., Wakabayashi,  
S. : Cardioprotective Role of Neuronal  
 $Ca^{2+}$ -Sensor -1 during Stress.  
Biophysical Society 59<sup>th</sup> Annual  
Meeting Feb.11, 2015 Baltimore/USA

Morganstein, J., Jana, K., Foster,  
M.N., Nakamura, T.Y., McDonald, T.V.,  
Tang, Y., Coetzee, W.A.: Infant Sudden  
Death: Novel Mutations Responsible for  
Impaired Nav1.5 Channel Function.  
Biophysical Society 59<sup>th</sup> Annual  
Meeting Feb.11, 2015 Baltimore/USA

〔図書〕(計1件)

中村友重、中尾周、若林繁夫。心筋細胞  
における核内  $Ca^{2+}$ 濃度調節の重要性: 刺  
激に応じた制御と生理的役割。 *Biomed*  
*Circus.com*  
([http://biomedcircus.com/paper\\_03\\_38.html](http://biomedcircus.com/paper_03_38.html))

〔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

西谷 友重 (NISHITANI, Tomoe)  
国立研究開発法人国立循環器病研究センタ  
ー・研究所・室長  
研究者番号：5 0 3 9 3 2 4 4

(2) 研究分担者

中川 修 (NAKAGAWA Osamu)  
国立研究開発法人国立循環器病研究センタ  
ー・研究所・部長  
研究者番号：4 0 2 8 3 5 9 3

(3) 連携研究者

若林 繁夫 (WAKABAYASHI Shigeo)  
大阪医科大学・生命科学講座薬理学・  
非常勤講師  
研究者番号：7 0 1 5 8 5 8 3

中尾 周 (NAKAO Shu)  
立命館大学・生命科学部生命医科学科・  
助教  
研究者番号：3 0 6 4 6 9 5 6

(4) 研究協力者

川上 春香 (KAWAKAMI Haruka)  
国立研究開発法人国立循環器病研究センタ  
ー・研究所・研究補助員