

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12349

研究課題名(和文)新規エネルギー代謝関連分子WDR6の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of WDR6, a novel energy metabolism related gene

研究代表者

千葉 卓哉(CHIBA, Takuya)

早稲田大学・人間科学学術院・教授

研究者番号：40336152

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):生物の老化を制御するシグナルとして、インスリンシグナルが重要な役割を担うことが知られている。我々はこれまでの研究で、インスリンシグナルの下流分子として働いているWDR6(WD repeat protein 6)を同定した。本研究において、WDR6ノックアウトマウスをもちいた解析から、WDR6が細胞の増殖やオートファジー制御に重要な、mTORC1経路に関与していることが示唆された。このことから、WDR6が高等生物における寿命制御に重要な役割を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文):Insulin signal is one of the major regulatory signals of aging process. We have been reported that WDR6(WD repeat protein 6) functions as a novel insulin signal molecule. In this research, we showed that WDR6 is involved in mTORC1 pathway which is important for cell growth and autophagy regulation by using WDR6 knock out mice and WDR6 knock down cells. These results suggest that WDR6 might have important roles in the longevity regulation in higher organisms.

研究分野:実験病理学

キーワード:インスリンシグナル 老化 老化関連疾患 オートファジー カロリー制限 遺伝子改変動物

1. 研究開始当初の背景

インスリン/インスリン様成長因子-I (insulin/IGF-I) およびレプチンシグナルは、加齢性疾患の発症に深く関与していることが示唆されている。それらの疾患に至るシグナル伝達系の解明は、健康長寿社会を実現する上で重要な研究課題である。

我々は、これらのシグナルに関わる新規の代謝調節分子 WD repeat protein 6 (WDR6) を単離した。WDR6 はタンパク質とタンパク質の間の相互作用に重要な WD モチーフを複数持つタンパク質であり、インスリンおよびレプチンシグナルの調節分子として機能している可能性が示唆されている。

これまでに我々は、WDR6 は視床下部で高発現しているインスリン受容体基質-4 (IRS-4) と結合して機能する可能性を報告した。また、カロリー制限を行ったラットなど長寿命動物では、WDR6 の視床下部における発現が低下していることを報告した。

インスリンシグナルは、mTORC1 経路の下流に存在する S6K のリン酸化の制御や、オートファジー調節に影響を与えている。これらのことから、WDR6 が mTORC1 経路の調節に関わり、オートファジー制御にも関与することが強く示唆され、このことが高等生物における寿命延長と、何らかの関わりを持つことが示唆されていた。

2. 研究の目的

我々のこれまでの研究から、insulin/IGF-I およびレプチンシグナルが老化そのものや、加齢性疾患の発症・進行に深く関与していることを明らかにしてきた。それらの疾患に至るシグナル伝達系の解明は、我が国における超高齢社会化がもたらす様々な問題を解決するために重要な、健康長寿社会を実現する上で重要な研究課題である。

本研究により WDR6 遺伝子改変動物を作製し WDR6 が、(1)糖・脂質代謝の制御、(2)神経変性疾患の発症を抑制するオートファジーの制御、(3)DNA 損傷応答の活性化による発ガン抑制、(4)酸化ストレスおよび小胞体ストレス耐性増強による病態抑制作用、の4つの主要な老化制御機構に関わっていることを明らかにすることを目指して研究を行った。これらの成果から、新規の老化研究モデル動物として、WDR6 遺伝子改変動物を確立するとともに、老化および老化関連疾患の予防・治療法開発に貢献する。

3. 研究の方法

(1) WDR6 ノックアウト (KO) マウスの作製と糖代謝の解析

Cre-loxP システムをもちいて WDR6 KO マウスの作製を行った。全身性の WDR6 KO マウス、および脳特異的 WDR6 KO マウスは、それぞれ CMV-cre, Nestin-creERT2 発現マウスとの交配により作製した。

作製した全身性 WDR6 KO マウスは、WDR6 の wild (WDR6+/+)、hetero (WDR6+/-)、KO ホモ (WDR6-/-) を作製し、糖代謝に変化が生じている可能性を検討するため、インスリン負荷試験および糖負荷試験を行った。

また、多くの長寿命をもつ遺伝子改変動物は酸化ストレスに対する耐性が、対象マウスと比較して亢進していることが数多く報告されていることから、3-nitropropionic acid (3NPA) を腹腔内投与し、生存分析を行い、WDR6 KO マウスの酸化ストレス耐性に対する解析を行った。

(2) Insulin/IGF-I シグナルの下流に存在する mTOR シグナル系の解析

WDR6 KO マウスの肝臓サンプルをもちいて、Insulin/IGF-I シグナルの下流に存在し、老化制御に重要な役割を担っている mTORC1 シグナル関連タンパク質の発現を Western Blot 法をもちいて解析した。また、リアルタイム PCR 法によって脂質代謝に関わる Apoc2、Cpt1a、Fasn、Srebf1、さらにインスリンシグナルに関わる Igfbp2、活性酸素種の代謝に関わる Gstm3、Gstp2 の肝臓における遺伝子発現量の変化を解析した。

(3) WDR6 のオートファジーにおける役割の解析

WDR6 KO マウスの肝臓において、オートファジー制御に変化が見られるか否かについて解析するため、p62 および LC3 のタンパク質発現解析を行った。次に、HeLa 細胞に対して siRNA をもちいて WDR6 をノックダウンし、同様に p62 および LC3 タンパク質の発現解析を行った。また、リソソーム阻害剤であるバフィロマイシン A1 をもちいた LC3 フラックスアッセイを行うとともに、mTORC1 経路のリン酸化状態を解析した。

(4) WDR6 と相互作用する新規タンパク質の探索

Flag-tag をもつ WDR6 発現ベクターを作製し、COS-1 細胞等の培養細胞にトランスフェクションによって導入し、インスリンシグナル関連タンパク質との相互作用を解析した。これにより、新規の WDR6 結合タンパク質の単離を目指した。

4. 研究成果

(1) WDR6 KO マウスの解析結果

全身性 WDR6 KO マウスは通常に発生し、成長することが確認された。脳特異的 WDR6 KO マウスも生存可能であり、現在その表現系解析を進めている。

全身性 WDR6 KO マウスをもちいたインスリン耐性試験、および糖負荷試験の結果、WDR6 KO マウスではインスリンの感受性に変化が生じている可能性が示唆された。一方で、3NPA をもちいた酸化ストレス耐性試験では、ストレスを与えた後の体重や生存曲線に有

意な差は見られなかった。

(2) mTOR シグナル系の解析結果

WDR6 KO マウスの肝臓サンプルをもちいた解析結果、mTORC1 のリン酸化レベル減少しており、mTORC1 の活性が低下している可能性が示唆された。また、WDR6 KO マウスにおいて Igfbp2 の発現が上昇し、Gstm3 の発現が低下していることが示された。

(3) オートファジーにおける役割の解析結果

WDR6 KO マウスにおいては、野生型マウスと比較して LC3-I, II ともにそのタンパク質発現レベルに上昇傾向が見られた。WDR6 ノックダウン細胞においても、コントロール細胞と比較して LC3-I, II のタンパク質発現レベルがともに上昇した。しかし、p62 の発現には明確な WDR6 欠損による変化は見られなかった。これらの結果からは、オートファジーの進行に対して WDR6 が促進作用を持つのか、あるいは阻害作用を持つのかは明らかではなかった。そこで LC3 フラックスアッセイを行った結果、バフィロマイシン A1 を添加した WDR6 ノックダウン細胞において LC3-II のタンパク質発現量の増加が見られたが、コントロール細胞と比較してその発現増加率は低かった。また、WDR6 ノックダウン細胞において mTORC1 および S6K のリン酸化レベルが減少しており、その活性が低下していることも示唆された。

(4) 新規 WDR6 結合タンパク質の探索結果

Flag-WDR6 を過剰発現させた培養細胞をもちいた解析結果から、糖および脂質代謝に関連する新たな結合因子を同定した。現在、その相互作用の生物学的な意味の解析を行っている。

これらの結果から、WDR6 は insulin/IGF-I 系を介して mTORC1 経路を活性化していることが示唆された。また、WDR6 の KO は酸化ストレス耐性を上昇させると予測されたが、Gstm3 の発現が低下していたためか、酸化ストレスに対する生存率の上昇は認められなかった。

また、WDR6 による mTORC1 活性の抑制は、オートファジー制御に影響を与えることが示唆された。興味深いことに、WDR6 の発現低下は mTORC1 の活性を抑制するが、その結果として必ずしもオートファジーの活性化を引き起こしてはいない可能性が示唆された。しかし、このことは長期間の WDR6 ノックダウンが、オートファジーの活性化に対してフィードバック制御を行っている可能性もあり、今後さらなる検討が必要である。

本研究によって得られた成果から、WDR6 は老化および老化関連疾患の治療標的として重要な役割を担っていることが示唆され、今後さらにその詳細な分子機能について解析する必要があると考えられる。

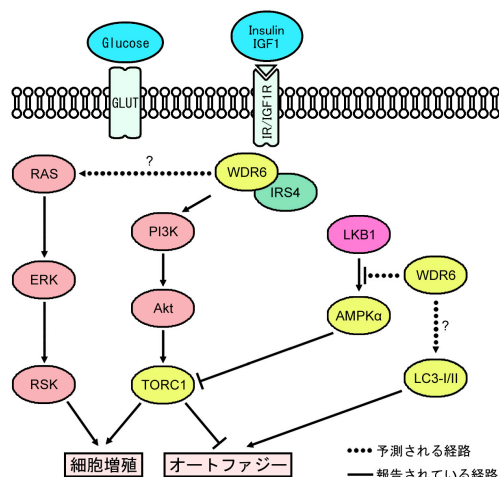


図 1. WDR6 が関与する細胞内シグナル伝達系の模式図

本研究による成果から、WDR6 はインスリン感受性に影響を与え、mTORC1 経路に対して抑制的に働くことが示唆された。また、直接あるいは間接的に LC3 の発現に対しても抑制的に働き、オートファジー経路に影響を与えていることが示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

① Insulin/IGF-I - mTORC1 経路における WDR6 の役割
大畑佳久、王 梓、芹澤慎一郎、熊谷真帆、下川 功、千葉卓哉
第 16 回日本抗加齢医学会総会、2016 年 6 月

② 新規インスリン関連分子 WDR6 がオートファジー経路に与える影響の解析
大畑佳久、王 梓、渡辺由香里、西園祥子、小松利光、下川 功、千葉卓哉
第 18 回日本抗加齢医学会総会、2018 年 5 月

③ WDR6 knock down affects LC3 expression in mammalian cell: possible involvement in the autophagy pathway
Yoshihisa OHATA, ZI WANG, Yukari WATANABE, Shoko NISHIZONO, Toshimitsu KOMATSU, Isao SHIMOKAWA, Takuya CHIBA
第 41 回日本基礎老化学会大会、2018 年 5 月

[図書] (計 0 件)

[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

<http://www.f.waseda.jp/takuya/index.htm>

1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 卓哉 (CHIBA, Takuya)

早稲田大学・人間科学学術院・教授

研究者番号：40336152

(2) 研究分担者

下川 功 (SHIMOKAWA, Isao)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系)・

教授

研究者番号：70187475

(3) 研究分担者

大畑 佳久 (OHATA, Yoshihisa)

早稲田大学・人間科学学術院・助教

研究者番号：60779289