

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K01827

研究課題名(和文) GADD34によるシグナル伝達系抑制と老化関連疾患の制御の解析

研究課題名(英文) Analysis of GADD34 function which inhibit the signal transduction and regulated age related diseases.

研究代表者

西尾 尚美(Nishio, Naomi)

埼玉大学・教育学部・准教授

研究者番号：80513457

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)：本研究では、GADD34遺伝子欠損(KO)マウスやKO MEF細胞ではインスリンシグナル伝達系が亢進しており、加齢や細胞老化とともにインスリン抵抗性を示すことから、GADD34はインスリンシグナル伝達系を介して老化の抑制に働いている可能性が明らかとなった。さらに、KOとWTで細胞膜タンパクであるcaveolinやCavin1(PTRF)の発現量が異なることが観察され、GADD34が加齢とともに変化する細胞の膜構造に関連して、膜に存在する受容体からのシグナル伝達系を制御する可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、GADD34は小胞体ストレス時の機能が主に報告されてきたが、本研究で、小胞体ストレスのみでなく、細胞膜に刺激が入った時、細胞膜あるいはその近くで作用し、各受容体からのシグナル伝達系を制御することで、老化に伴う細胞構造や代謝の変化に影響し、細胞老化や個体老化を制御している可能性が明らかとなった。このことから、GADD34の老化抑制メカニズムが、今後、老化や老化関連疾患発症の予防や治療を行うための新たな知見となる。

研究成果の概要(英文)： Previously, we found that mice deficient in DNA damage- inducible protein 34 (GADD34) become obese with age, developing fatty liver followed by liver cirrhosis hepatocellular carcinoma, and insulin resistance. Here, we examined the mechanism underlying the effects of GADD34 on fatty liver disease as age related disease. We found the GADD34 suppressed phosphorylation of the insulin receptor. The higher level of insulin signaling observed in GADD34-deficient liver and mouse embryonic fibroblasts led to accumulation of triglycerides via production of fatty acids. In addition, cellular senescence also accelerated. Then, the level of insulin signaling were decreased in GADD34 deficient liver and MEFs with aging or cellular senescence. Furthermore, we found the expression of Caveolin and Cavin1 on cell membranes were different by deficiency of GADD34. GADD34 may regulate the signal transduction in connection with structure of cell membrane.

研究分野：免疫、老化

キーワード：GADD34 インスリンシグナル伝達系 老化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

基礎的老化研究では、細胞の増殖や蛋白合成に関わる2つのシグナル伝達系が種を超えて老化、寿命に影響することが明らかになってきた。1つは TOR (Target of rapamycin, ほ乳類では mTOR) であり、もう1つは IGF-1/Insulin 受容体からのシグナル伝達系である。酵母、線虫といった下等動物はこの2つのシグナルに関与する分子の変異で寿命が延長する。これとは別の流れで、ほ乳類の特徴としてマクロファージ、好中球といったミエロ系の自然免疫系細胞が老化個体の組織で炎症性サイトカインを放出することで、組織の老化や疾患の原因になることが明らかになってきた。私たちが注目してきた GADD34 (Growth arrest and DNA damage inducible protein) は老化に何らかの影響を与えると期待されていたが、老化における役割は明らかとなっていない。

### 2. 研究の目的

これまでの研究で、GADD34 KO マウスは IGF-1/Insulin 受容体シグナル伝達系が亢進することによって老化に伴い肥満になり、加齢や脂質過剰によって IGF-1/Insulin 受容体シグナルが低下し、2型糖尿病や肝癌を発症することから、本研究では GADD34 遺伝子欠損マウスを老化に伴うメタボリックシンドローム発症のモデルとして、GADD34 がこれらのシグナル伝達系を制御するメカニズムを検索する。

本研究では2つの可能性を検討する。1つは受容体そのものあるいはシグナル伝達系の限りなく上流で、GADD34 が脱リン酸化反応に関与してシグナル伝達系を抑制している可能性である。これまでの研究の結果から Akt よりも上流での GADD34 の関与を探る。2つ目は細胞膜に GADD34 が直接作用する可能性である。細胞膜および ER 膜は脂質二重層で構成されている。シグナル伝達系の検討において飽和脂肪酸である Palmitate による刺激を行ったところ、GADD34 の発現上昇と Toll like receptor 4 シグナル伝達系の制御に加えて、膜蛋白の変化を確認した。従って、レセプターからのシグナルだけでなく、GADD34 の細胞膜における受容体の制御という観点から検索をする。

### 3. 研究の方法

- 3、4、5、6、10、12ヶ月齢の GADD34KO と WT マウスより肝臓細胞を単離培養し、インスリン刺激、脂肪酸刺激、グルコース刺激等を行い、肝臓細胞で GADD34 の機能と役割の解析を行った。

Western blotting による肝臓細胞の各種シグナル伝達系及び代謝系の解析

肝臓細胞の免疫組織学的解析

- 肝臓組織における GADD34 の機能と役割の解析  
肝細胞や肝組織における GADD34 の発現及び機能の解析  
MEFs 細胞、GADD34 強発現 HEK293 における GADD34 の発現及び機能の解析
- 長期培養が可能な細胞、MEFs 細胞、遺伝子移入した HEK293 細胞を用いて、免疫沈降による GADD34 の機能部位の解析

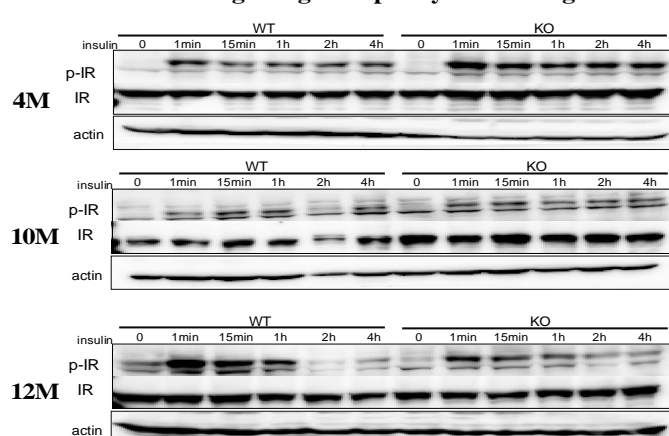
### 4. 研究成果

- GADD34 によるインスリン受容体とそのシグナル伝達系の制御

GADD34 がインスリン受容体からのシグナル伝達系を制御している可能性を検索するために、若齢マウス(2、5ヶ月齢)と老化マウス(6、10、12ヶ月齢)の肝細胞を *in vitro* で培養し、インスリンやグルコースで刺激をした後、Insulin/IGF1 レセプターのシグナル伝達系の解析を行った。これまでの研究では、GADD34 遺伝子欠損(KO)マウスでは5カ月齢より若い時は、Insulin/IGF1 レセプターのシグナル伝達系の Akt 2 のリン酸化が亢進しており、6カ月齢を過ぎた老化マウスでは低下していることが明らかとなっていた。そこで本研究では、Akt2 よりさらに上流を検索した結果、Insulin と IGF1 の共通部位である Tyr1162/1163 のリン酸化が若いマウスで亢進しており、6カ月齢を過ぎた老化マウスでは低下していることが明らかとなった。

従って、GADD34 は Insulin/IGF1 受容体に直接関与し、加齢とともに変化する Insulin/IGF1 受容体シグナル伝達系を制御していることが明らかとなった(図1)。インスリン抵抗性は TNF $\alpha$  によって JNK を介してインスリン受容体が抑制される。そこで、palmitate (脂肪酸)によって Toll like receptor4 シグナル伝達系を刺激した実験を行ったところ、GADD34 の発現の上昇が確認され、MEFs 細胞では、培養上清中に TNF- $\alpha$  が分泌されてインスリン抵抗性を示した (Rep2015)。

図1 Insulin signaling of Hepatocyte in each age



しかし、肝細胞を用いた本研究では、肝細胞の培養上清に TNF- $\alpha$  はほとんど分泌されなかったにも関わらず、加齢とともに肝細胞でのインスリン抵抗性が見られており、JNK による抑制だけではインスリン抵抗性の発生メカニズムの説明は付かなかった。

## (2) GADD34 による脂質代謝系の制御

インスリンシグナル伝達系の亢進は脂質合成を促進する。GADD34KO マウスでは脂肪細胞の分化増殖が促進され、加齢とともに脂肪肝が促進されることが明らかとなっている。そこで本研究では、脂質合成の律速酵素である ACC のリン酸化について GADD34 KO マウスと WT マウスで比較検討を行った。GADD34 KO マウスの MEFs や肝臓細胞では ACC のリン酸化が低下していることを Western で確認した。このことから、GADD34KO マウスの MEFs や肝臓細胞では脂質合成が促進されていることが明らかとなった。ACC のリン酸化は AMPK によって制御されていることが報告されており、Insulin/IGF1 レセプターのシグナル伝達系が AMPK に作用するメカニズムは明確でなく、GADD34 が Insulin/IGF1 レセプターのシグナル伝達系を抑制し、AMPK から ACC のシグナル伝達系を介して脂肪酸合成を促進している可能性に加えて、ACC のリン酸化に直接関与している可能性が示唆された。

しかし一方で、高脂肪コリン欠乏食(CDAHFD)によって脂肪肝が促進し、NASH になるマウスモデルがある。GADD34 KO マウスと WT マウスで CDAHFD を与えて肝臓組織を解析したところ、高脂肪のみの HFD では WT マウスに比べて GADD34 KO マウスで顕著な脂肪肝促進や肝臓でのインスリン抵抗性がみられたにも関わらず、CDAHFD では GADD34 KO マウスと WT マウスのそれは差が認められなかった。従って、GADD34 はアミノ酸欠乏の脂肪肝には関与せず、脂質過剰時に促進される脂肪肝に機能する可能性が明らかとなった。

以上のことから、本研究では GADD34 が脂質合成系を制御していることが明らかとなった。そのメカニズムについては今後、さらなる検討課題である。

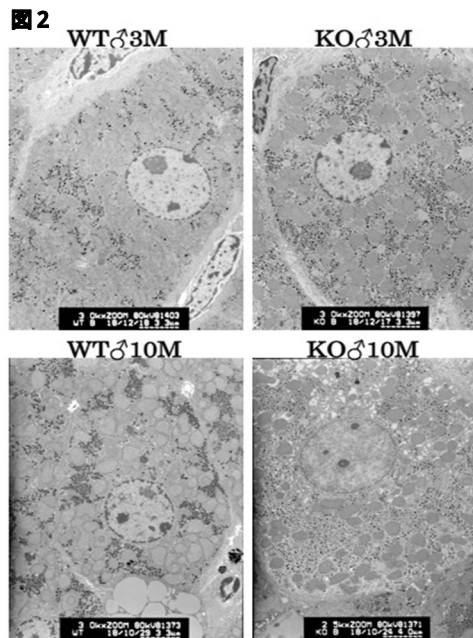
## (3) 加齢に伴うシグナル伝達系や脂質代謝系の制御メカニズム

GADD34 が細胞膜あるいはその付近で機能している可能性がある。そこで本研究では加齢に伴ってインスリンシグナル伝達系が亢進から抵抗性に变化するメカニズムを解明するため、刺激実験に加えて、細胞膜に関する解析を行った。GADD34 や Insulin/IGF1 受容体、膜タンパクである Caveolin や Cavin1(PTRF)で免疫染色した肝細胞を共焦点顕微鏡によって観察したところ、インスリン刺激後は細胞膜に強く GADD34 が発現し、その局在を確認したところ、細胞膜に発現する caveolin や Insulin/IGF1 受容体と GADD34 の発現部位は同じようなところに発現している可能性が示唆された。さらに詳細な局在や他のタンパク質との complex を確認するために、HEK293 細胞に Flag や Myc のタグ付き GADD34 ベクターを導入し、GADD34 を強発現させて、Insulin/IGF1 受容体のリン酸化が抑制されていることを Western で確認した。

加えて 3、10 ヶ月齢の GADD34 KO マウスと WT マウスの肝臓を電子顕微鏡で比較検討を行った。その結果、GADD34 KO マウスでは、細胞の膜構造に加えてミトコンドリアやヘテロクロマチン凝集について加齢に伴う著しい変化が認められた(図 2)。

肝細胞を免疫染色して GADD34 の発現部位を検討した。インスリン刺激後は細胞膜に強く発現し、その局在を確認したところ、細胞膜に発現する caveolin や Insulin/IGF1 受容体と GADD34 は同じ部位に発現している可能性が示唆された。さら詳細な局在や他のタンパク質との complex を確認するために、HEK293 細胞に Flag や Myc のタグ付き GADD34 ベクターを導入し、GADD34 を強発現させて、Insulin/IGF1 受容体のリン酸化が抑制されていることが Western で確認できた。

以上のことから、本研究では GADD34 が膜構造に関与をすることで、膜タンパクや膜に存在する受容体からのシグナル伝達系を制御している可能性が明らかとなった。本研究では、GADD34 のタンパク結合の詳細やどのタンパクをコントロールしているかの詳細までは明らかにできなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nishio N, Hasegawa T, Tatsuno I, Isaka M, Isobe KI.	4. 巻 17(12)
2. 論文標題 Female GADD34 mice develop age-related inflammation and hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Geriatrics & Gerontology International	6. 最初と最後の頁 2593-2601.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ggi.13080	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 Isobe KI, Nishio N, Hasegawa T.	4. 巻 8(2)
2. 論文標題 Immunological aspects of age-related diseases.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 World Journal of Biological Chemistry. Review	6. 最初と最後の頁 129-137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4331/wjbc.v8.i2.129.	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 Lintao Liu, Sachiko Ito, Naomi Nishio, Yang Sun, Yuriko Tanaka, Ken-ichi Isobe.	4. 巻 36(9)
2. 論文標題 GADD34 Promotes Tumor Growth by Inducing Myeloid-derived Suppressor Cells.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Anticancer Reserch.	6. 最初と最後の頁 4623-4628.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.11012	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 該当する
1. 著者名 Ken-ichi Isobe, Naomi Nishio, Tadao Hasegawa.	4. 巻 2(1)
2. 論文標題 Murine model of obesity-induced type II diabetes by GADD34(PPP1R15A) and other phosphatase 1 regulatory subunits deficiency.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Advances In Allergy & Immunologic Diseases(JAAID)	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) DOI: 10.25177/JAAID.2.1.1	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 該当する

1. 著者名 Naomi Nishio, Tadao Hasegawa, Ichiro Tatsuno, M asanori Isaka1 and Ken-chi Isobe.	4. 巻 12
2. 論文標題 Female GADD34 mice develop age-related inflammation and hepatocellular carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Geriatrics & Gerontology International	6. 最初と最後の頁 2593-2601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/ggi.13080.	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 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西尾尚美
2. 発表標題 GADD34 suppresses fatty acid synthesis through regulation of insulin signaling.
3. 学会等名 第41回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naomi Nishio, Tadao Hasegawa and Ken-ich Isobe.
2. 発表標題 Female GADD34 mice develop inflammation and hepatocellular carcinoma by aging.
3. 学会等名 第40回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西尾尚美
2. 発表標題 GADD34 works to suppress obesity-induced Metabolic Diseases including type 2 diabetes and NASH-2.
3. 学会等名 第86回日本衛生学会総会
4. 発表年 2016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
--	---------------------------	-----------------------	----