

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K13231

研究課題名（和文）抗老化治療の開発につながり得る、ミトコンドリアペプチダーゼMIPEPの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of MIPEP, a mitochondrial peptidase, aiming to develop new anti-aging therapies

研究代表者

小林 正樹 (Kobayashi, Masaki)

東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・助教

研究者番号：30795612

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：抗老化・寿命延伸効果を示すカロリー制限（CR: Caloric Restriction）のメカニズムの一つとして、白色脂肪組織におけるミトコンドリア（Mt）機能の活性化がある。本研究は、上記のCR効果に関与する因子としてMtシグナルペプチダーゼの一つであるMIPEPに着目し、そのMt機能との関連に加え、白色脂肪組織の質への影響について、細胞および動物モデルを用いて明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRによる抗老化作用は、人類にとって魅力的なものであるが、実際に実験動物で行われているような長期間のCRを実践することは難しい。それゆえ、その作用の分子メカニズムの模倣は効果的な抗老化治療につながり得る。本研究の成果により、未だ不明な点の多いMtシグナルペプチダーゼの学術的な知見を取得するとともに、MIPEPを新たなCR模倣対象として提唱するに至った。

研究成果の概要（英文）：The action mechanisms of caloric restriction (CR), which retards the onset of age-related pathology and extends the lifespan, include the activation of mitochondrial function in white adipose tissue. The present study elucidated the association of MIPEP with mitochondrial function and the qualitative alterations in white adipose tissue.

研究分野：分子代謝学

キーワード：カロリー制限 白色脂肪組織 ミトコンドリア MIPEP

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

適度なCRは、幅広い生物種において加齢に伴う種々の生理的、病理学的変化を抑制し、平均及び最大寿命を延伸する。申請者らは、CRの効果の中でも、加齢とともに蓄積する酸化ストレスの抑制効果と代謝改善効果に興味を持ち、これらに深く関わるミトコンドリアに着目し研究を行ってきた。その過程で、CRが白色脂肪組織(WAT: White Adipose Tissue) 特異的にミトコンドリア機能を改善することが見出された(Aging cell, 2017)。これを踏まえ、申請者らは、WATにおけるミトコンドリア機能の改善はCRの代謝改善効果、ひいては抗老化・寿命延伸効果において重要であると考えている。

SIRT3はミトコンドリアに局在する脱アセチル化酵素であり、ミトコンドリア機能の制御に加え、広範な生理作用を有している。過去の報告で、SIRT3のタンパク質発現がCRによって亢進することが知られている。申請者らはCRによるミトコンドリア機能維持にSIRT3が重要であると考え、CRマウスのWATにおけるSIRT3のタンパク質発現を解析した。すると、SIRT3の37kDaの前駆型から28kDaの活性型への成熟化が亢進していることを発見した(図1A)。しかしSIRT3のmRNA発現量はCRにより変化しなかった(図1B)。それゆえ、申請者らは、SIRT3タンパク質の切断による活性化がCRによって亢進しているのではないかと予測した。

一般に多くのミトコンドリアタンパク質は、前駆型としてミトコンドリアに輸送されると、そのN末端にある輸送シグナル配列がMtSPase (mitochondrial signal peptidase)ファミリーというミトコンドリアシグナルペプチダーゼにより特異的に切断される。申請者らは、SIRT3の成熟化に寄与する因子として、このMtSPaseファミリーに着目した。実際にSIRT3はMtSPaseファミリーの一つであるMPP (mitochondrial matrix processing peptidase)により切断されることが報告されていたが、MPPのmRNA発現量に関してはCRによる変化は見られなかった。そこで、CRによりWATで誘導されるMtSPaseファミリーを探索するため、マイクロアレイ解析を行ったところ、MPPにより切断されたタンパク質のみを基質とするMIPEPが見出された。実験的にも、CRしたマウスのWATでのMIPEPの発現誘導が確認された。以上の知見から、申請者らは「CRにおけるSIRT3の活性型へのプロセッシングはMIPEPが担っている(図2)」との仮説に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞と動物レベルでCR時に上記の仮説がWATにおいて成り立つことを立証し、MIPEPのCRによる寿命延長への寄与を確認することである。これにより、MIPEPがミトコンドリアタンパク質の成熟を通して、包括的にミトコンドリアの機能を制御し、CRの抗老化・寿命延伸効果に寄与するかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) レトロウイルスベクターを用いて、MIPEPをノックダウンもしくは過剰発現させた3T3-L1脂肪細胞株を用いて、SIRT3のプロセッシングがMIPEP依存であることを細胞レベルで解析した。
- (2) MIPEPノックダウンもしくは過剰発現脂肪細胞株において、ミトコンドリア形態や酸化ストレスの程度を解析し、MIPEPのミトコンドリア機能への影響を評価した。
- (3) 申請者の所属する研究室で作成したMIPEP-floxマウスとWAT特異的にCreリコンビナーゼを発現するAdiponectin-Cre transgenicマウスとを交配させることで、WAT特異的MIPEP KOマウスを得た。ミトコンドリア機能への影響を検出しやすくするために、本マウスを通常食摂餌群と高脂肪食摂餌群とに分け、体重等の基礎データに加え、摘出WATに

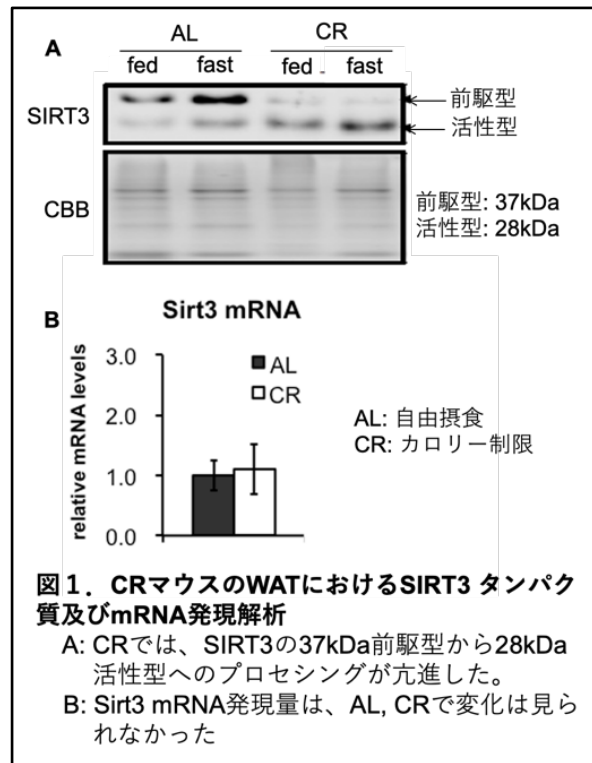


図1. CRマウスのWATにおけるSIRT3タンパク質及びmRNA発現解析

A: CRでは、SIRT3の37kDa前駆型から28kDa活性型へのプロセッシングが亢進した。
B: Sirt3 mRNA発現量は、AL, CRで変化は見られなかった

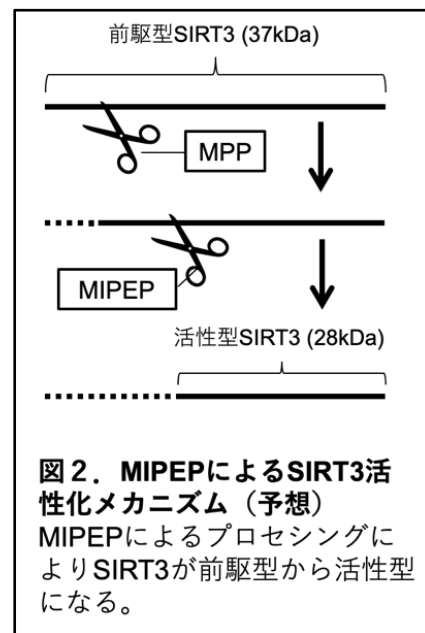


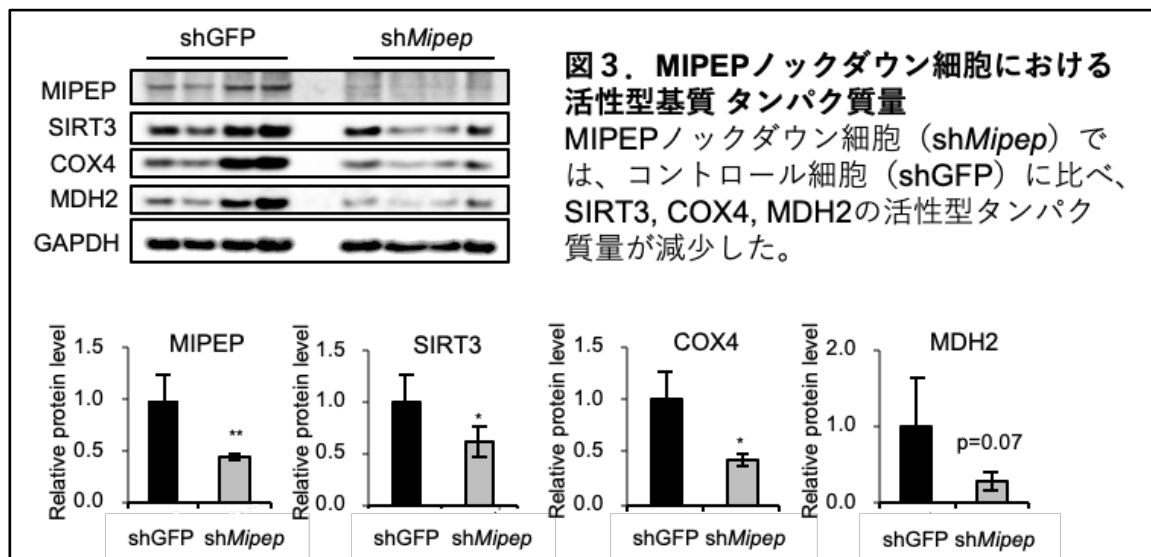
図2. MIPEPによるSIRT3活性化メカニズム(予想)

MIPEPによるプロセッシングによりSIRT3が前駆型から活性型になる。

おける活性型 SIRT3 量 とミトコンドリア機能の変化を解析し、SIRT3 活性化の MIPEP 依存性及び MIPEP のミトコンドリア機能への関与を動物レベルで検証した。

4. 研究成果

- (1) MIPEP ノックダウン細胞において、活性型 SIRT3 量が低下した。さらに、MIPEP の基質として報告されている、cytochrome c oxidase subunit 4 (COX4) と malate dehydrogenase 2 (MDH2) のタンパク質量の低下も観察された (図 3) (FEBS Letter, 2017)。これらより、MIPEP が既知の基質に加えて SIRT3 のプロセッシングに関与することが示唆された。一方、MIPEP 過剰発現細胞ではこれら活性型タンパク質量の増加を期待したが、大きな変化は見られなかった。



※ (2) (3) の結果については、特許申請等の理由により一定期間公表を差し控える。

<引用文献>

- ① Namiki Fujii, Takumi Narita, Naoyuki Okita, Masaki Kobayashi, Yurika Furuta, Yoshikazu Chujo, Masahiro Sakai, Atsushi Yamada, Kanae Takeda, Tomokazu Konishi, Yuka Sudo, Isao Shimokawa, Yoshikazu Higami, Sterol regulatory element-binding protein-1c orchestrates metabolic remodeling of white adipose tissue by caloric restriction. *Aging cell*. 2017;16:508-517.
- ② Masaki Kobayashi, Kanae Takeda, Takumi Narita, Keita Nagai, Naoyuki Okita, Yuka Sudo, Yuri Miura, Hiroki Tsumoto, Yoshimi Nakagawa, Hitoshi Shimano, Yoshikazu Higami, Mitochondrial intermediate peptidase is a novel regulator of sirtuin-3 activation by caloric restriction. *FEBS Lett*. 2017;591:4067-4073.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Shunsuke Hoshino, Masaki Kobayashi, Ryoma Tagawa, Ryutaro Konno, Takuro Abe, Kazuhiro Furuya, Kumi Miura, Hiroki Wakasawa, Naoyuki Okita, Yuka Sudo, Yuhei Mizunoe, Yoshimi Nakagawa, Takeshi Nakamura, Hiroshi Kawabe, Yoshikazu Higami	4. 巻 10
2. 論文標題 WWP1 Knockout in Mice Exacerbates Obesity-Related Phenotypes in White Adipose Tissue but Improves Whole-Body Glucose Metabolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 306-315
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.12795	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 Yuhei Mizunoe, Masaki Kobayashi, Shunsuke Hoshino, Ryoma Tagawa, Rei Itagawa, Ayana Hoshino, Naoyuki Okita, Yuka Sudo, Yoshimi Nakagawa, Hitoshi Shimano, Yoshikazu Higami	4. 巻 10
2. 論文標題 Cathepsin B Overexpression Induces Degradation of Perilipin 1 to Cause Lipid Metabolism Dysfunction in Adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 634
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-57428-6	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 Masaki Kobayashi, Yoshikazu Higami	4. 巻 140
2. 論文標題 Metabolic Alteration in Aging Process: Metabolic Remodeling in White Adipose Tissue by Caloric Restriction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Yakugaku Zasshi	6. 最初と最後の頁 383-389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.19-00193-2	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 Yuhei Mizunoe, Masaki Kobayashi, Ryoma Tagawa, Yoshimi Nakagawa, Hitoshi Shimano, Yoshikazu Higami	4. 巻 20
2. 論文標題 Association Between Lysosomal Dysfunction and Obesity-Related Pathology: A Key Knowledge to Prevent Metabolic Syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3688
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20153688	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 小林正樹、田川亮真、樋上賀	4. 巻 11
2. 論文標題 カロリー制限による抗老化効果	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 泌尿器科	6. 最初と最後の頁 195-200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Namiki Fujii, Seira Uta, Masaki Kobayashi, Tsugumichi Sato, Naoyuki Okita, Yoshikazu Higami	4. 巻 118
2. 論文標題 Impact of aging and caloric restriction on fibroblast growth factor 21 signaling in rat white adipose tissue.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental gerontology	6. 最初と最後の頁 55-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exger.2019.01.001	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 Masaki Kobayashi, Shunsuke Hoshino, Takuro Abe, Naoyuki Okita, Ryoma Tagawa, Wataru Nagai, Ryutaro Konno, Yuki Suzuki, Kazuhiro Furuya, Natsumi Ishikawa, Hitoshi Okado, Misako Oku, Machiko Iwamoto, Yuri Miura, Yuka Sudo, Yoshikazu Higami	4. 巻 508
2. 論文標題 Identification of WWP1 as an obesity-associated E3 ubiquitin ligase with a protective role against oxidative stress in adipocytes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 117-122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.11.127	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 Masaki Kobayashi, Namiki Fujii, Takumi Narita, Yoshikazu Higami	4. 巻 -
2. 論文標題 SREBP-1c-Dependent Metabolic Remodeling of White Adipose Tissue by Caloric Restriction.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	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/ijms19113335	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 小林正樹、樋上賀一	4. 巻 47
2. 論文標題 白色脂肪組織における新規ミトコンドリア活性化メカニズム	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 内分泌・糖尿病・代謝内科	6. 最初と最後の頁 365-368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 小林正樹、樋上賀一	4. 巻 42
2. 論文標題 カロリー制限による白色脂肪組織の代謝リモデリングとその制御因子	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 基礎老化研究	6. 最初と最後の頁 53-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Masaki Kobayashi, Kanae Takeda, Takumi Narita, Keita Nagai, Naoyuki Okita, Yuka Sudo, Yuri Miura, Hiroki Tsumoto, Yoshimi Nakagawa, Hitoshi Shimano and Yoshikazu Higami	4. 巻 591
2. 論文標題 Mitochondrial intermediate peptidase is a novel regulator of sirtuin-3 activation by caloric restriction.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 4067-4073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.12914	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13件(うち招待講演 4件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yoshikazu Higami, Masaki Kobayashi, Ryoma Tagawa
2. 発表標題 A Novel Molecular Mechanism of Metabolic Remodeling, Anti-aging and Pro-longevity Actions of Caloric Restriction
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧加菜里、樋上賀一、小林正樹、田川亮真
2. 発表標題 カロリー制限 (CR) 誘導性ミトコンドリア関連因子の脂肪細胞形質への影響
3. 学会等名 第40回日本肥満学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Kobayashi, Yoshikazu Higami
2. 発表標題 Novel Mechanisms of Caloric Restriction-induced Mitochondrial Activation in White Adipose Tissue
3. 学会等名 The 35th Spring International Conference of the Korean Society for Gerontology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 樋上賀一、小林正樹、田川亮真
2. 発表標題 栄養とサルコペニア～長期カロリー制限モデルからの知見を基にした考察～
3. 学会等名 第31回日本老年学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平尾勇人、瀧加菜里、小林正樹、樋上賀一
2. 発表標題 カロリー制限誘導性ミトコンドリアシグナルペプチターゼMIPEPの機能解析とそのプロモーター探索
3. 学会等名 第42回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki Kobayashi, Yoshikazu Higami
2. 発表標題 Novel mediators for caloric restriction -associated metabolic remodeling in white adipose tissue
3. 学会等名 第41回日本基礎老化学会大会・第9回東京理科大学総合研究院トランスレーショナルリサーチセンターシンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 樋上賀一、小林正樹
2. 発表標題 カロリー制限による白色脂肪組織における新規ミトコンドリア活性化メカニズム
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林正樹、瀧川菜里、樋上賀一
2. 発表標題 脂肪細胞における新規カロリー制限誘導因子のミトコンドリア機能への寄与
3. 学会等名 第39回日本肥満学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 樋上賀一、小林正樹
2. 発表標題 抗老化・寿命延伸作用を示すカロリー制限による脂肪組織リモデリングにおける新規メディエーター
3. 学会等名 第39回日本肥満学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内田理緒、瀧川菜里、小林正樹、樋上賀一
2. 発表標題 カロリー制限による脂肪細胞におけるミトコンドリア機能亢進メカニズムの解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keita Nagai, Yoshikazu Higami, Masaki Kobayashi
2. 発表標題 The role of MIPEP in improvement of metabolism by CR
3. 学会等名 第17回日本ミトコンドリア学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Keita NAGAI, Masaki KOBAYASHI, Yoshikazu HIGAMI
2. 発表標題 The role mitochondrial intermediate peptidase (MIPEP) in improvement of mitochondrial metabolism by Caloric Restriction
3. 学会等名 第40回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗肥満物質のスクリーニング方法及び抗肥満物質のスクリーニング用キット	発明者 樋上賀一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-133627	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----