

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02967

研究課題名(和文)肥満を引き起こす新たな組織・分子基盤の解明

研究課題名(英文)Elucidation of new tissue and molecular bases causing obesity

研究代表者

自見 英治郎(Jimi, Eijiro)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：40276598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：肥満を起因とする生活習慣病は、QOLを著しく低下させるとともに生命の危機にも繋がる合併症を併発する。近年、NF- κ Bの転写制御に534番目(S534)のセリン残基のリン酸化が極めて重要と考えられているので、リン酸化を受けないS534Aノックインマウスを作製した。S534Aマウスは高脂肪食(HFD)で飼育すると、食事量、飲水量共に増加することで肥満が亢進し、耐糖能の低下およびインスリン抵抗性を示した更にS534Aマウスを20週齢以上飼育すると高頻度に腎臓および子宮の浮腫が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究成果は、p65の安定性制御を介した持続的活性化がPara-Inflammationを意味することを示した。さらにp65のリン酸化制御が、生活習慣病の発症機序の解明とともに、予防法や治療法の開発につながる事が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Metabolic diseases caused by obesity significantly reduce quality of life and are accompanied by life-threatening complications. In recent years, it has been reported that phosphorylation of p65 plays an important role in the transcriptional regulation of NF- κ B, and in particular, phosphorylation of the serine 534 (S534) residue at the C-terminal has been considered to be extremely important. Therefore, we generated S534A knock-in mice that are not phosphorylated. When S534A mice were maintained on a high-fat diet (HFD), body weight was gained by increasing both the amount of food and water consumed. Furthermore, it showed decreased glucose tolerance and insulin resistance. Histologically, fatty liver was exhibited when S534A mice were bred in HFD. Furthermore, when S534A mice were maintained over 20 weeks, renal and uterine edema was frequently observed regardless of whether they were maintained on a normal diet or HFD.

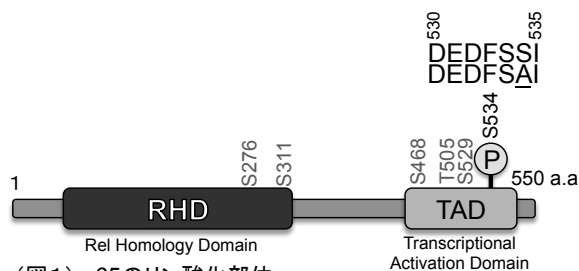
研究分野：生化学

キーワード：肥満 緩やかな炎症 NF- κ B

1. 研究開始当初の背景

肥満を起因とする糖尿病、脂質異常症や高血圧などの生活習慣病は増加の一途をたどっており、生活習慣病の成因の解明と新しい治療戦略の確立は国民の健康や医療・福祉の向上に不可欠である。摂食と代謝の調節機構の解明は歯学研究の重要な課題であり、歯学分野から肥満研究へ貢献も期待されている。

転写因子 NF- κ B は、炎症性サイトカインや増殖因子などの発現を調節し、炎症反応や免疫応答をはじめとする様々な生命現象に深く関与する。NF- κ B は5つのサブユニットから構成されるが、そのうちの1つである p65 は、NF- κ B による転写活性の中心的な役割を担う。近年、NF- κ B の転写制御に p65 のリン酸化が重要な役割を果たしていることが報告されており、特に C 末端の 536 番目 (マウスでは 534 番目 :S534) のセリン残基のリン酸化が極めて重要と考えられてきた(図1)。そこで申請者はリン酸化を受けないアラニン変異体(S534A)を作製して、個体レベルで S534 の生理的役割を解析するために S534A ノックインマウスを作製した(図1)。S534A マウスはやや肥満傾向を示した。そこで高脂肪食で飼育すると、肥満が亢進した。



(図1) p65のリン酸化部位

これまでにS534を含む6箇所のリン酸化部位が報告されている。リン酸化を受けない変異体は、534番目のセリンをアラニンに置換した(下線部)。数字はアミノ酸の番号を示す。

S534A マウス由来の胎生線維芽細胞(MEF)を用いて *in vitro* で詳細に解析したところ、細胞外刺激に対して p65 が長時間核内に留まり、標的遺伝子の発現が上昇した。この結果は、S534 のリン酸化は核内での p65 の安定性を制御することを示唆する。

これらの結果から、NF- κ B の持続的活性化が肥満を促進する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、p65 の安定性の制御による「NF- κ B の持続的活性化」と肥満との関連を明らかにし、その分子機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

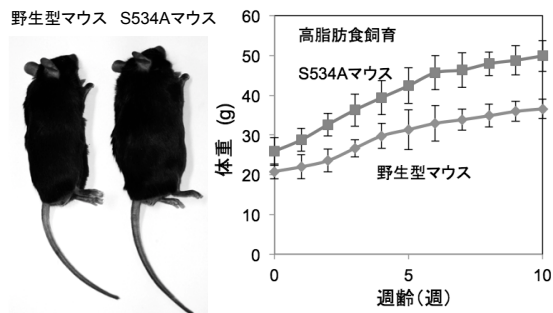
- (1) 野生型マウスと S534A マウスの普通食 (ND) および高脂肪食 (HFD) 飼育による体重変化および耐糖能の検討: 野生型マウスと S534A マウスを ND および HDF で飼育し、12 週間の体重変化を経時的に測定した。さらに各臓器の重量を測定するとともに、組織学解析を行った。
- (2) 野生型および S534A マウス由来胎仔線維芽細胞 (MEF) を用いた、脂肪細胞分化と細胞内情報伝達機構の解析: 野生型および S534A マウス由来 MEF をデキサメタゾン (1 μ M)、IBMX (0.5 mM)、インスリン (5 μ g/ml) およびロシグリタザン (0.5 μ M) 存在下で脂肪細胞へ分化誘導した。脂肪細胞は Oil Red O 染色で判定した。また、野生型および S534A マウス由来 MEF を TNF α (1 ng/ml) で 12 時間前処理を行い、インスリンで 0, 0.5, 1 時間刺激し、インスリンシグナルに関与する分子群の発現を Western blot 法で検討した。
- (3) 野生型および S534A マウス由来 MEF を用いた p65 の分解機構の解析: 野生型および S534A マウス由来 MEF を TNF α (1 ng/ml) で刺激して、経時的に細胞質画分と核画分に分け、抗 p65 抗体を用いて Western Blot を行った。さらに、核画分を抗 p65 抗体を用いて免疫沈降を行うことで、野生型 p65 および S534A と会合する分子を同定した。

4. 研究成果

- (1) 野生型マウスと S534A マウスを ND で飼育すると、雄では体重が2割程度増加したが、雌では有意な差はなかった。しかし、HFD で飼育すると S534A マウスでは明らかな体重増加が認められた(図2)。さらに、S534A マウスでは、耐糖能の低下およびインスリン抵抗性が認められ、肝臓での脂肪分解酵素の発現低下が認められた。また S534A マウスでは肝臓および白色脂肪組織重量の増加が認めら

れ、組織学的解析では、著明な脂肪肝と大型の白色脂肪細胞が多数認められた。

- (2) 野生型および S534A マウス由来 MEF から脂肪細胞を誘導すると、S534A マウス由来 MEF ではより多くの Oil Red O 陽性の細胞が確認された。さらに S534A マウス由来 MEF では、AKT のリン酸化と IRS-1 の発現が低下し、一方 SOCS3 の発現が亢進した。



(図2) S534Aマウスを高脂肪食で飼育すると肥満が亢進する

- (3) 野生型および S534A マウス由来 MEF を $\text{TNF}\alpha$ (1 ng/ml) で刺激すると、p65 の S534A は核内でより長い時間 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ プロモーター上の κB 配列に結合した。野生型および S534A マウス由来 MEF にレポーター遺伝子を導入した後に、 $\text{TNF}\alpha$ (1 ng/ml) で刺激すると S534A マウス由来の MEF でルシフェラーゼ活性の上昇が確認された。さらに $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ および IL-6 mRNA の発現量が亢進していた。現在、野生型および S534A マウス由来 MEF を $\text{TNF}\alpha$ (1 ng/ml) で刺激した後に誘導される遺伝子群のうち、インスリンシグナルに影響をおよぼす可能性のある分子を RNA-seq を用いて網羅的に解析中である。
- (4) p65 の野生型および S534A 変異体に核内で結合する分子を探索したところ、 β -TRCP を含む複合体を同定した。 β -TRCP の過剰発現は、p65 の分解を亢進し、 β -TRCP のノックダウンでは p65 が分解されず、長い時間閥内に留まった。そこで、 β -TRCP 欠損マウスを用いて、S534A マウスと同様の表現形が得られることを確認しようとしたが、コロナ禍において β -TRCP 欠損マウスの入手が困難なため、さらに、 β -TRCP 欠損マウスが胎生致死であるため、コンディショナルノックアウトマウスを作製する必要があるため、予定通りの実験が進んでいない。代替策として、 β -TRCP を含む複合体の他の分子を過剰発現、またはノックダウンすることで β -TRCP と同様な結果が得られることを確認した後に、複合体に含まれる別の分子の遺伝子欠損マウスを用いることにする。現在、候補分子の絞り込み段階である。

以上の結果より、S534 は p65 の核内でユビキチンリガーゼ β -TRCP の標的であり、核内における cp65 の安定性に関わることが明らかとなった。S534A マウスでは、p65 が閥内の標的遺伝子の発現を亢進することで、体重増加やエネルギー代謝を制御していると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	松田 美穂 (Matsuda Miho) (40291520)	九州大学・歯学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	高 靖 (Gao Jing) (40585882)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	溝上 顕子 (Mizokami Akiko) (70722487)	九州大学・歯学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	片桐 岳信 (Katagiri Takenobu) (80245802)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------