

平成 22 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19300227

研究課題名（和文） 種々の代謝調節系における L R P 5 の役割

研究課題名（英文） Role of LRP5 in various metabolic pathways

研究代表者

山本 徳男（YAMAMOTO TOKUO）

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：30192412

研究成果の概要（和文）：

低密度リポタンパク関連遺伝子 5（LRP5）の異常は耐糖能や血中コレステロール値、動脈硬化の悪化などを促進します。糖や脂質など種々の代謝系における LRP5 の個体・細胞レベルでの機能を明らかにするために LRP5 のアゴニストである Wnt タンパクやアンタゴニストである Dickopf 1-3、可溶性のレセプター-soluble frizzled related proteins、やドミナント・ネガティブミュータント LRP5/6 などの LRP5 シグナリングに関わる種々のタンパクを遺伝子導入培養細胞の培地より精製し、これらの精製タンパクの性質を明らかにし、個体レベルの役割の解析をしました。

特に Wnt タンパクは脂肪酸により修飾されているため、その精製は極めて難しく、界面活性剤を用いてのみ精製されています。しかしながら、界面活性剤を用いているために、個体レベルでの解析に用いることはできず、種々の代謝異常を伴う人の加齢疾患治療への応用もできません。本研究では細胞や個体レベルで使用可能な Wnt の精製を試み、個体レベルで糖や脂質代謝に及ぼす Wnt の効果を明らかにし、種々の加齢疾患治療への応用を目指しました。種々の試行錯誤の結果、最終的に Wnt タンパクを界面活性剤を用いず、大量に精製することができました。精製された Wnt タンパクの性質をタンパク化学的に解析して、その個体レベルでの役割が解析可能にすることができました。

研究成果の概要（英文）：

In previous studies, we showed that the deficiency of LRP5, an LDL receptor related protein, impairs various metabolic pathways including cholesterol, glucose and calcium. We also showed that the lack of LRP5 enhances the formation of atherosclerosis, using mice lacking both apoE and LRP5. To further clarify the role of LRP5 in these metabolic disorders, we purified various agonists and antagonists of LRP5, including Wnt proteins, Dickopf 1-3, soluble frizzled related proteins, soluble LRP5 and LRP6 lacking membrane domains. Purification of Wnt proteins without detergents was extremely difficult because

they are modified with palmitate. Nusse and his colleges purified Wnt3a using Triton X-100 and CHAPS, showing that Wnts proteins are modified with palmitate, thereby exhibiting extremely hydrophobic character. In this study, I purified Wnt3a, Wnt 5a and Wnt4 without using detergents and characterized. The purification and characterization of these proteins will be published.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学 ・ 応用健康科学

キーワード：生活習慣病、コレステロール

1. 研究開始当初の背景

私たちは低密度リポタンパク (LDL) レセプター・ファミリー (LRP) の一員であるLRP5の欠損が食事性高コレステロール血症、中性脂肪代謝異常、耐糖能異常、骨粗しょう症や動脈硬化を促進するなど、加齢疾患を促進することを明らかにしてきました。これらの結果は、LRP5とそのリガンドであるWntによるLRP5シグナリングが定常状態ではアンチ・エイジング効果があり、その破綻が加齢疾患を促進させることを示しています。しかしながら、定常状態でのLRP5シグナリングが脂質代謝や、グルコース代謝、骨形成において、どのように機能しているかは不明です。本研究では脂質代謝や、グルコース代謝、骨形成におけるLRP5シグナリングの役割を、精製したリガンドやアンタゴニストを用いて、細胞・個体レベルで明らかにし、LRP5シグナリングの破綻がどのようにして、高脂血症や耐糖能

異常、骨粗しょう症などの加齢疾患を引き起こすかを明らかにすることを目的としました。

LRP5はアポEを認識し、その欠損は食事性の高コレステロール血しょうを引き起こし、同時に食事由来のコレステロールの肝臓への輸送を担うカイロミクロソームの代謝が障害されることを明らかにしてきました (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion、藤野等、Proc Natl Acad Sci U S A、100、229-234、2003.)。また、LRP5ノックアウトマウスに中性脂肪負荷テストを行うと、血中中性脂肪のクリアランスが異常に遅延すること、この遅延はアポE非依存的であることを示しました。さらに、LRP5の欠損は動脈硬化を促進することを明らかにしま

した (Severe hypercholesterolemia, impaired fat tolerance, and advanced atherosclerosis in mice lacking both low density lipoprotein receptor-related protein 5 and apolipoprotein E、馬郡等、J Biol Chem、278、11331-11336、2003.)。しかしながら、なぜ LRP5 の欠損が食事性の高コレステロール血症や中性脂肪代謝異常を引き起こすかについては依然として不明であります。LRP5 はアポEや Wnt 以外にコリパーゼと相同な Dickkopf (Dkk) も高親和性に結合することが知られています。また、Wnt はリポタンパクと結合していることが昆虫で示されていますが、高等動物では詳細は不明で、コリパーゼとの関連も含めて明らかにする必要があります。

LRP5 はヒトの劣勢遺伝病である osteoporosis-pseudoglioma syndrome の原因であることが解明され、骨密度を Wnt と共に調節していることが同時に示されました (LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development、Gong Y 等、Cell、107、513-523、2001)。また、アンタゴニストである Dkk と結合できないミューテーションでは骨密度が増加することが示されています。私たちの作製したマウスもヒトの欠損症同様に骨粗しょう症を引き起こすことを示しました。しかしながら、なぜ、どのようにして、LRP5 シグナリングの異常が骨粗しょう症を引き起こすかは不明で、明らかにする必要があります。

また、ヒトにおいて、LRP5 遺伝子がインスリン依存性糖尿病と遺伝的にリンクすることから、欠損マウスの糖代謝を解析したところ、耐糖能が著しく低下していることが示されました。Wnt タンパクとすい臓のランゲルハンス島を一緒に培養するとグルコース依存性のインスリン分泌が促進され、LRP5 の欠

損によりその効果がなくなることを私たちは示しました (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion、Proc Natl Acad Sci U S A、100、229-234、2003.)。すなわち、ベータ細胞からのグルコース依存性のインスリン分泌は Wnt と LRP5 により調節されることが明らかになりました。しかしながら、その作用メカニズムは依然として不明で、明らかにする必要があります。

2. 研究の目的

LRP5 シグナリングの破綻は食事性高コレステロール血症、中性脂肪代謝異常、耐糖能異常、骨粗しょう症や動脈硬化を促進することより、定常状態では LRP5 シグナリングはアンチエイジングに機能していることが明らかです。従来、分化やガン化に関与すると信じられてきた Wnt シグナリング系が耐糖能異常やコレステロール代謝、動脈硬化などの加齢疾患に関連することを示した時はなかなか世界で受け入れてもらえませんでした。その後の研究により、現在では多くの研究者の信じる所となりました。このようにアンチ・エイジング効果を持つ LRP5 シグナリング経路の解明により、食事性高コレステロール血症、中性脂肪代謝異常、耐糖能異常、骨粗しょう症や動脈硬化などの種々の加齢疾患の予防や治療に応用することが可能になります。本研究は Wnt タンパクをはじめ、種々の LRP5 シグナリングに関与するタンパクを調製し、その効果を明らかにし、種々の代謝系における役割を明らかにすることを目的にしています。

3. 研究の方法

個体と細胞レベルにおけるLRP5/Wntシグナリングを明らかにするための第一歩として、高度に精製されたリガンドやアンタゴニストであるDkk、可溶性のレセプター阻害剤であるsFRPや可溶性ドミナントネガティブなレセプターの大量発現と精製が必要となります。このような精製した材料を用いて、個体と細胞レベルでのLRP5シグナリングの影響を解析するのが、本研究の計画の概要です。また、LRP5のリガンドであるWnt3a, Wnt4, Wnt5aやアンタゴニストであるDkk1, Dkk2, Dkk3, レセプターそのもの、レセプターのコファクターであるクレメン1, 2などの高発現する種々のベクターを構築し、高発現細胞をスクリーニングし、Dkk1とDkk3についてはミリグラムオーダーで精製しました。

Wntタンパクは脂肪酸による修飾を受けているために、高度な精製は極めて困難であります。Nusse等は界面活性剤を用いてWnt3aとWnt5aを精製しましたが(Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors、Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd, Nusse R, Nature, 423(6938)、448-452, 2003.)、界面活性剤を用いているために、個体レベルの解析や臨床応用にも、用いることはできません。本研究では、界面活性剤なしにWntタンパクを精製し、個体レベルの基礎研究や臨床応用に用いることを目的とし、精製法を確立しました。

4. 研究成果

LRP5のアゴニストの1つであるDkk1-3についてはHisタグをつけたベクターを作成し、ニッケルカラムを用いて、高度に精製されたタンパクをミリグラムオーダーで得ることに成功しました。また、アンタゴニストとし

て作用する可溶性の膜結合ドメインを欠損するLRP5とLRP6を、それぞれHisタグをつけたベクターを作成し、ニッケルカラムとイオン交換クロマトグラフィーなどを用いて、高度に精製しました。

パルミチン酸で修飾され、きわめて疎水性の高いWntタンパクの精製は非常に困難でありましたが、界面活性剤を用いずに高度に、しかも大量に精製する方法を確立しました。

これらの精製タンパクを用いて、細胞と個体レベルの影響を解析し、その結果は近い将来、公表予定であります。

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3件)

1.

Fasting-induced hypothermia and reduced energy production in mice lacking acetyl-CoA synthetase 2.

Sakakibara I, Fujino T, Ishii M, Tanaka T, Shimosawa T, Miura S, Zhang W, Tokutake Y, Yamamoto J, Awano M, Iwasaki S, Motoike T, Okamura M, Inagaki T, Kita K, Ezaki O, Naito M, Kuwaki T, Chohnan S, Yamamoto TT, Hammer RE, Kodama T, Yanagisawa M, Sakai J, Cell Metab、査読有、2009、9(2)、191-202.

2.

SOX6 suppresses cyclin D1 promoter activity by interacting with beta-catenin and histone deacetylase 1, and its down-regulation induces pancreatic beta-cell proliferation.

Iguchi H, Urashima Y, Inagaki Y, Ikeda Y, Okamura M, Tanaka T, Uchida A, Yamamoto TT,

Kodama T, Sakai J, J Biol Chem、査読有、
2007、282、19052-19061.

3.

Involvement of apolipoprotein E in excess
fat accumulation and insulin resistance.
Gao J, Katagiri H, Ishigaki Y, Yamada T,
Ogihara T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y,
Kanzaki M, Yamamoto TT, Ishibashi S, Oka
Y, Diabetes、査読有、2007、56、24-33.

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 徳男 (YAMAMOTO TOKUO)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号：30192412

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし