

平成 22 年 4 月 2 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790178

研究課題名（和文）ストレス応答タンパク質 A170 による新規摂食調節機構

研究課題名（英文）Novel mechanism of food intake regulation by stress protein A170

研究代表者

藤 栄治（WARABI EIJI）

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：70396612

研究成果の概要（和文）：A170 はタンパク質分解経路であるオートファジーや自然免疫、様々なシグナル伝達を調節することが報告されている。我々は A170 欠損（KO）マウスを作製したところ、加齢とともに過食に起因する肥満症、メタボリックシンドロームを呈することを発見した。本研究は、KO マウスが肥満を引き起こすメカニズムを解析することを目的とした。その結果、A170 は摂食抑制ホルモンであるレプチンの作用に関与した新規な因子であり、その欠損によりレプチン抵抗性による過食が引き起こされることが明らかになった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：摂食調節、メタボリックシンドローム、レプチン

## 1. 研究開始当初の背景

異物の侵襲など種々の環境因子が引き起こすストレスに応答して、生体内には抗酸化タンパク質、解毒代謝酵素などが誘導される。近年、これら生体防御に関わる遺伝子群を統一的に制御する転写因子として Nrf2 が発見され、外的環境因子が引き起こす慢性炎症性疾患、化学発がんなどに対する防御作用を持つことが明らかとなり、注目を集めている。研究代表者らは、Nrf2 により転写誘導される遺伝子として A170 を見出した。A170 についてこれまでに明らかになっていることは、

- ・ A170(マウス)/p62 (ヒト) /ZIP (ラット) のホモログがあり、高い相同性をもって保存されている。
  - ・ 細胞内の非分泌性タンパク質であり、SH2 ドメインを持つタンパク質と結合し、シグナル伝達因子として働く。
  - ・ ユビキチン結合ドメインを持ち、細胞内のタンパク質凝集体の形成やオートファジーに関与する因子である。
  - ・ 種々の酸化ストレスにより誘導されるタンパク質である。等である。
- 研究代表者らは、A170 の生体内における機

能を明らかにするために、ジーンターゲットイング法により A170 遺伝子欠損マウス (KO マウス) を作製し表現型を解析した。その結果驚くことに、A170 KO マウスは加齢とともに著しく体重が増加し、重度の肥満症を呈した。病態は肥満症にとどまらず、脂肪肝、2 型糖尿病、高インスリン血症などの生活習慣病を併発していることが明らかになった。

## 2. 研究の目的

A170 KO マウスの食餌量は野生型マウスと比べ著しく増加していることから、A170 は中枢で摂食を調節する新規因子であり、その欠損により摂食調節機構が異常となり、過食を引き起こしていると考えに至った。そこで本研究は、A170 の中枢における機能に着目し、「ストレス応答タンパク質 A170 が摂食行動を調節する分子メカニズム」を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

C57BL/6 バックグラウンドの雄性 A170 欠損マウス、および野生型マウスを用いた。

### (1) 摂餌量制限における体重変化、病態の解析

一日摂餌量を生後 5 週齢から 10 週間にわたり、野生型マウスと同等の 3g に制限し、体重変化を解析した。また、制限給餌後、耐糖能を中心に病態の解析を行ない、KO マウスに起きるメタボリックシンドロームが過食にきんするものであるか否かを検討した。

### (2) レプチンの摂食抑制効果の解析

マウス脳室内に微小カニューレを留置する手術を行ない、十分に回復させた後に、摂食抑制ホルモンであるレプチンを脳室内に投与し、摂餌量抑制効果を調べた。また、他の摂食調節因子 (NPY、MC4 レセプターアゴニスト) についても同様な検討を行った。

### (3) 血清レプチン含量の測定

若齢時から高齢の各種マウスを用いて、自由摂食下および 48 時間絶食後のマウスから血清を調整し、ELISA 法によりレプチン含量を測定した。

### (4) 視床下部における A170 タンパク質発現分布の解析

免疫組織染色により、A170 の発現パターンを解析した。POMC(Proopiomelanocortin) 神経、NPY(Neuropeptide Y) 神経に GFP を発現するトランスジェニックマウスを用いて、これらの神経における発現状態についても検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 摂餌量制限における体重変化、病態の解析

一日摂餌量を野生型と同等に制限すると、A170 KO マウスの体重増加は全く起きず、野生型とほとんど同様の増加パターンとなった。またこのとき、CT を用いた解析から、脂肪組織の増加も認められなかった。さらに、脂肪肝の形成、耐糖能異常についても、摂餌量の制限により改善されることが明らかになった。

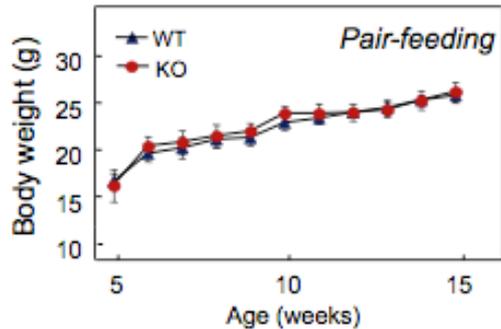


図1 摂餌量制限下における体重増加

### (2) レプチンの摂食抑制効果の解析

マウス側脳室にカニューレを留置する手術を行い、レプチン (0.3  $\mu\text{g}$ ) を投与して摂餌量を測定した。野生型マウスでは、レプチンにより著しい摂食抑制が認められた一方、A170 KO マウスではほとんど抑制されなかった。

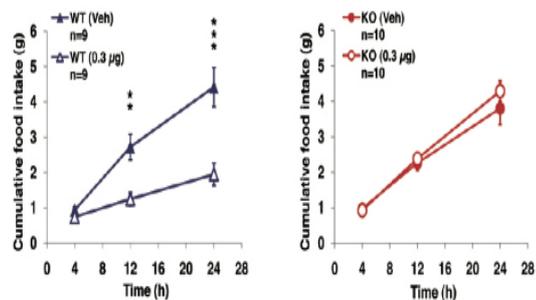


図2 レプチンの脳室内投与による摂食抑制効果

### (3) 血清レプチン含量の測定

各週齢のマウスにおける血清レプチン値を測定した。その結果 A170 KO マウスでは高レプチン血症を呈していることが明らかになった。とくに、体重差が野生型とほとんどない若齢時においても KO マウスは高レプチン状態であり、レプチン抵抗性はかなり早期に発症していることが示唆された。

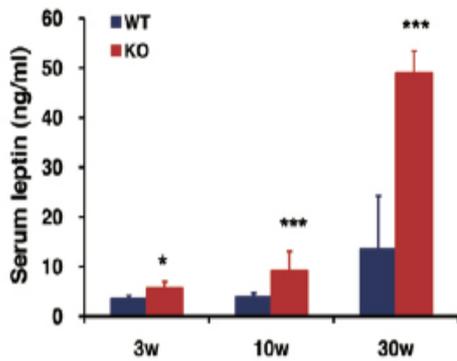


図3 各週齢のマウスにおける血清レプチン値

#### (4) 視床下部における A170 タンパク質発現分布の解析

マウス脳の凍結切片を用いて A170 の発現パターンを視床下部領域を中心に解析した。その結果、視床下部神経細胞で A170 の発現が認められ、さらに、強い発現が認められる神経細胞が存在することが明らかになった。そこで、摂食調節に重要であることが知られている POMC 神経、NPY 神経で GFP を発現するマウスを用いて A170、GFP に対する 2 重染色を行った。その結果、ほとんどすべての POMC 神経、NPY 神経の一部で A170 が発現していることを見出した。

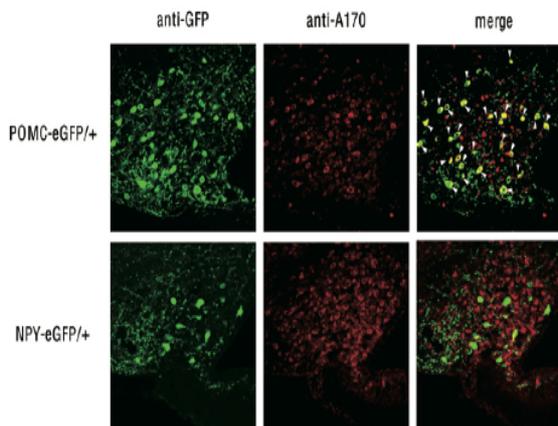


図4 視床下部における A170 の発現パターン

以上の結果から、A170 KO マウスが呈する肥満症が過食に起因するものであることが明確になり、さらに、そこには摂食抑制ホルモンであるレプチンの作用の減弱が関わっていることを見出した。摂食制御に中心的な役割を果たす組織は、視床下部神経細胞であるが、本研究により、A170 は POMC 神経、NPY 神経など、調節に非常に重要な神経に発現していることが明らかになった。

これまでの報告によると、A170 欠損は脂肪細胞の分化が亢進し、また、基礎代謝量が低下することで肥満症となると結論づけている。しかし、本研究により肥満症の原因はレプチン抵抗性とそれに伴う過食症に起因するものであることが明確に示された。

レプチンの摂食抑制効果の発現には、その受容体を介したシグナル伝達系、特に stat3 のリン酸化が重要であることが明らかになっている。今後、A170 の欠損により、レプチンシグナル伝達系のどこに異常があるのかを詳細に検討して行く必要がある。A170 は multi-functional なタンパク質であると考えられており、最近ではタンパク質分解経路であるオートファジーの必須因子である LC3 との相互作用が見出されている。様々な視点からの研究が A170 の機能を浮かび上がらせているが、本研究は、個体における A170 の真の機能を示唆するものとして非常に重要な意味を持つと思われる。

#### 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)

[学会発表] (計 8 件)

①稲葉博子、蕨栄治、鈴木栄子、榎本由紀子、柳川徹、酒井俊、石井哲郎、SQSTM1/A170 欠損マウスにおける血圧動態の解析、BMB2008、2008. 12. 9-12、神戸国際会議場

②Dongmei Ma, Eiji Warabi, Jutaro Hata, Noriko Noguchi, Tetsuro Ishii, EBBP/TRIM16 expression is regulated by Nrf2 in HUVEC, BMB2008、2008. 12. 9-12、神戸国際会議場

③蕨栄治、酒井俊、稲葉博子、鈴木栄子、友尾孝、富岡智子、榎本由紀子、原田春美、柳川徹、石井哲郎、新しい高血圧症モデル動物の発見-A170/p62 欠損マウス-、第 3 回臨床ストレス応答学会、2008. 11. 14-15、カレッジプラザ (秋田)

④原田春美、蕨栄治、岡田浩介、松木大造、大野耕作、桜井武、柳川徹、石井哲郎、A170/p62/sqstm1 欠損マウスにおけるレプチン抵抗性の解析、第 3 回臨床ストレス応答学会、2008. 11. 14-15、カレッジプラザ (秋田)

⑤原田春美、蕨栄治、岡田浩介、松木大造、大野耕作、宇和山純也、櫻井武、柳川徹、石井哲郎、A170/SQSTM1/p62 欠損マウスにおける過食のメカニズム、第 13 回アディポサイエンス研究会シンポジウム、2008. 8. 23、千里阪

急ホテル

⑥原田春美、宇和山純也、蕨栄治、松木大造、大野耕作、柳川徹、吉田廣、桜井武、石井哲郎、A170 欠損マウスにおける過食のメカニズム、第 2 回臨床ストレス応答学会、2007. 11. 30-12. 1、九州大学

⑦石井哲郎、杉本里香、蕨栄治、柳川徹、吉田廣、野口範子、リチャード・シアオ、ジョバンニ・マン、ストレスタンパク質 A170 欠損大動脈平滑筋細胞の増殖亢進、第 2 回臨床ストレス応答学会、2007. 11. 30-12. 1、九州大学

⑧蕨栄治、宇和山純也、柳川徹、岡田浩介、原田春美、中曾一裕、杉本里香、桐井恭子、吉田廣、石井哲郎、A170/p62 欠損マウスが呈する肥満症とインスリン抵抗性、第 1 2 回アディポサイエンス研究会シンポジウム、2007. 8. 18、千里阪急ホテル

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

蕨 栄治 (WARABI EIJI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：70396612