

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18008

研究課題名(和文) ページュ脂肪細胞におけるUCP1非依存性熱産生機構の解明

研究課題名(英文) Ucp1-independent thermogenesis in beige fat

研究代表者

長野 学 (Nagano, Gaku)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：40838786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ページュ脂肪細胞において、これまで必須と考えられてきた熱産生遺伝子UCP1に依存しない、クレアチン余剰回路やカルシウムサイクリングなどによる熱産生経路があることが近年報告されてきた。しかし、その分子機構など詳細は不明であった。我々は、ピルビン酸キナーゼPKM2が、細胞内カルシウム経路において重要な役割を果たすERのイノシトール三リン酸受容体(IP3R)と相互作用し、ミトコンドリア膜電位を正に調節していることを見出した。また、メチル基供与体合成酵素MAT1Iが、クレアチン余剰回路によるUCP1非依存性熱産生に関わっていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでUCP1非依存性熱産生に関する報告はあるが、その詳細なメカニズムは不明な点が多かった。本研究によって、PKM2やMAT1Iがそれぞれ異なるメカニズムを介してUCP1非依存性熱産生に関わっていることを突き止められた。ページュ脂肪細胞の誘導や活性化については慢性的なアドレナリン刺激やPPAR α アゴニスト投与など報告があるが、いずれも心血管系の副作用が大きく、肥満や耐糖能異常への治療応用が困難を極めている。また、ヒトの熱産生脂肪細胞の多くはページュ脂肪細胞の特徴をもつことが示されており、本研究の成果が肥満や耐糖能異常の治療応用のターゲットとなりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recent studies identified UCP1-independent thermogenesis, including creatine futile cycle and calcium cycling in beige adipocytes. However, detailed mechanisms remain unknown. We identified that pyruvate kinase PKM2 interacts with IP3R, which plays a pivotal role in cellular calcium cycling. PKM2 regulates mitochondrial membrane potential in beige adipocytes. We also found that methionine adenosyltransferase II (MAT1I) plays an important role in UCP1-independent thermogenesis through creatine futile cycle.

研究分野：内分泌学

キーワード：ページュ脂肪細胞 熱産生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肥満症は最も重要な健康問題の一つであるとともに、全世界的に増加している。脂肪細胞はエネルギー収支の中心的役割を担っている。なかでも褐色脂肪細胞や、白色脂肪組織中に長期寒冷暴露などの環境要因によって誘導されるベージュ脂肪細胞は非ふるえ熱産生を介してエネルギー消費する機能をもっており、肥満症や糖尿病治療ターゲットとして注目されている。ベージュ脂肪は誘導型の熱産生脂肪細胞である。

近年の研究によって、その誘導について多くが明らかとなり、さらにその特徴的な bioenergetics について明らかになりつつある。例えば、褐色脂肪はミトコンドリアに富むにもかかわらず ATP 産生能は極めて低い。それに対しベージュ脂肪は活発な解糖系や TCA 回路、それに続く酸化的リン酸化によって ATP が多く産生され、その ATP を利用した熱産生をおこなっている。興味深いことに、それらは UCP1 非依存性である。具体的には、UCP1 非依存性熱産生機構として、クレアチン余剰回路や、カルシウム(Ca²⁺)回路の関与が報告されている。

上記のように、すべてではないが、ベージュ脂肪細胞の多くは白色脂肪細胞と同じ細胞起源をもつにも関わらず、ベージュ脂肪細胞はエネルギー消散能や糖利用の点で白色脂肪細胞とは全く異なった性質をもつ。この白色/ベージュ脂肪の性質の違いは、何によって明確になっているのか、その分子基盤は未だ明らかではない。

(2) 研究代表者らは、熱産生脂肪細胞の分化制御において、メチル基供与体合成酵素 MATII (Methionine adenosyltransferase II) が必須であることを明らかにしてきた。そして、MATII はクレアチン合成において必須の酵素である。しかし、MATII がクレアチン余剰回路による熱産生に与える影響は明らかではない。

2. 研究の目的

(1) 上記背景から、ベージュ脂肪細胞の UCP1 非依存性熱産生回路に着目した上で、白色脂肪とベージュ脂肪との性質の違いを明らかにする。

(2) ベージュ脂肪細胞やヒトベージュ脂肪細胞における、クレアチン余剰回路による熱産生に MATII が与える影響を解明する。

3. 研究の方法

(1)

ベージュ脂肪細胞における特徴的細胞内遺伝子・経路の探索

これまでに報告されている既存の RNA-seq データセット (Shinoda K, et al. Nat Med. 2015) をもとに、十分に分化した白色脂肪細胞とベージュ脂肪細胞とを、トランスクリプトームについて比較した。

ピルビン酸キナーゼ M2 (PKM2) がベージュ脂肪細胞の機能に与える影響の解明

ピルビン酸キナーゼ (PKM) には PKM1 と PKM2 の 2 つのアイソフォームが存在するが、脂肪細胞内では PKM2 がドミナントに存在していることが知られている。そこで、PKM2 を、siRNA によってノックダウンし、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析に供し、ダウンストリーム解析を実施した。また、PKM2 活性化剤である TEPP-46 をベージュ脂肪細胞に投与し、定量的リアルタイム PCR (qPCR) によって遺伝子発現解析やウェスタンブロットングによる蛋白発現解析を行った。

PKM2 が細胞内 Ca²⁺ サイクルに与える影響の解明

PKM2 と Ca²⁺ サイクルに関わる因子とを、免疫沈降を行なって確認した。また、ミトコンドリア内の Ca²⁺ を評価する目的で、ミトコンドリア膜電位 (ψ_m) を TMRE 染色で測定し、TEPP-46 の添加の有無で比較検討した。

(2) ベージュ脂肪細胞、ヒトベージュ脂肪細胞において阻害薬投与によって MATII を阻害し、酸素消費量を測定する。

4. 研究成果

(1)

既存のデータセットを再解析したところ、ベージュ脂肪細胞では解糖系関連酵素群の発現や、TCA 回路関連酵素の発現が有意に上昇していた。しかし、解糖系の最終酵素である PKM2 は有意な差がみられなかった。実際、白色脂肪細胞とベージュ脂肪細胞でウェスタンブロットングを用いて発現の差をみたところ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) はベージュ脂肪細胞で高発現しているものの PKM2 の発現に差を認めなかった。しかし、興味深いことに、PKM2 の活性はベージュ脂肪細胞で有意に高かった (図 1a, b)。

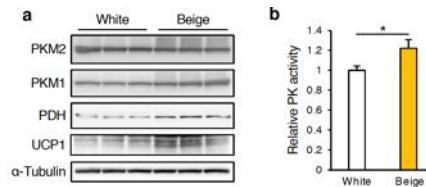


図1. ベージュ脂肪細胞におけるPKM2。a. ウェスタンブロットングによる発現解析。b. PK活性を測定した所、有意にベージュ脂肪細胞で高かった。

TEPP-46 刺激後に同様に検証したところ、代表的な熱産生遺伝子である *Ucp1* や *Ppargc1a* の発現は有意に上昇した。さらに、RNA-seq による網羅的トランスクリプトーム解析を実施した。パスウェイ解析ではカルシウムシグナル経路が挙がり、またジーンオントロジー解析の cellular component では ER(endoplasmic reticulum)や ER 膜、ミトコンドリアが上位を占めていた (図 2)。続いて、PKM2 を siRNA によってノックダウンすると、有意差はないものの代表的熱産生遺伝子である *Ucp1* の発現が減少したほか、熱産生遺伝子に有意な差はみられなかった。以上の結果から、PKM2 の活性化によって、ベージュ脂肪細胞内では Ca²⁺回路が活性化し、ER やミトコンドリアの機能に影響を与えたと考えられた。

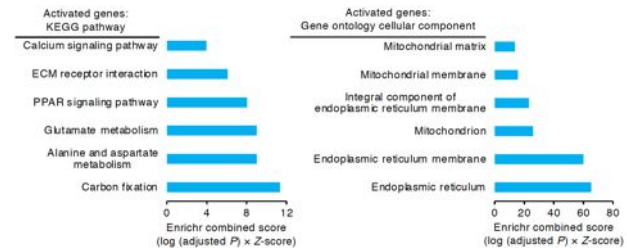


図2. TEPP-46刺激したベージュ脂肪細胞におけるトランスクリプトーム解析。a. KEGGによるパスウェイ解析。カルシウムシグナル経路が挙がっている。b. ジーンオントロジー解析。ER(Endoplasmic reticulum)やER膜、ミトコンドリアに関するcellular componentが上位を占める。

ベージュ脂肪細胞において、PKM2 と IP3R とが相互作用していることを免疫沈降によって確認した。さらに、TEPP-46 刺激を行なうと ΔU_m が有意に上昇した。また、ミトコンドリアの酸化リン酸化に関わる蛋白群の発現が TEPP-46 投与で上昇した。以上の結果から、ベージュ脂肪細胞において、PKM2 の活性化が Ca²⁺シグナル経路の活性化に寄与し、酸化リン酸化をも活性化していると考えられた。

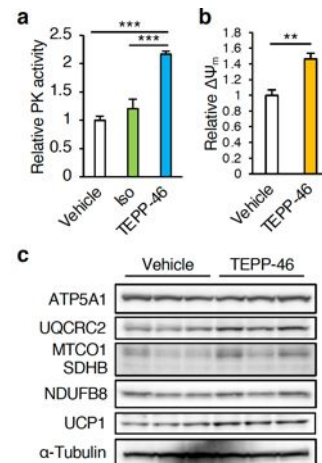


図3. TEPP-46投与によるベージュ脂肪細胞内での変化。a. TEPP-46投与によって有意にPK活性は上昇。b. TEPP-46投与によってミトコンドリア膜電位が有意に上昇。c. 酸化リン酸化酵素群の発現も上昇。

(2) 十分に分化したベージュ脂肪細胞に MAT1I 阻害薬を投与すると、細胞内クレアチンが有意に減少した。さらに総酸素消費量が有意に減少したが、UCP1 が関わる脱共役酸素消費に有意な差はみられなかった。同様に UCP1 をノックアウトしたベージュ脂肪細胞においてもそう酸素消費量は有意に減少した。また、ヒトベージュ脂肪細胞においても、総酸素消費量のみ有意に減少した (図 4)。

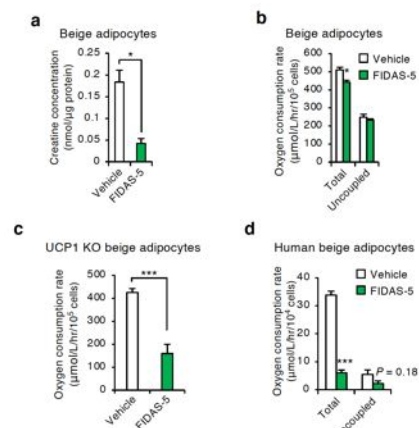


図4. MAT1Iがベージュ脂肪細胞のクレアチン産生回路による熱産生に与える影響。a. FIDAS-5(MAT1I阻害薬)投与によってクレアチンは有意に低下。b. 総酸素消費量が有意に減少。c. UCP1ノックアウト(KO)ベージュ脂肪でも総酸素消費量が有意に減少。d. ヒトベージュ脂肪細胞でも同様だった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 江草 玄太郎, 長野 学, 大野 晴也, 佐川 純司, 一町 清澄, 小武家 一博, 沖 健司, 米田 真康
2. 発表標題 選択的 PPAR モジュレーターによるベージュ脂肪細胞の identity 維持機構の解明
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐川 純司, 長野 学, 大野 晴也, 江草 玄太郎, 小武家 和博, 一町 澄宜, 沖 健司, 米田 真康
2. 発表標題 メチル基供与体合成酵素 MAT11 による脂肪組織熱産生機構の解明
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐川 純司, 長野 学, 江草 玄太郎, 大野 晴也, 小武家 和博, 一町 澄宜, 沖 健司, 米田 真康
2. 発表標題 メチル基供与体合成酵素 MAT11 による脂肪組織熱産生機構の 解明
3. 学会等名 第41回日本肥満学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江草 玄太郎, 大野 晴也, 長野 学, 沖 健司, 米田 真康
2. 発表標題 ベージュ脂肪細胞の機能維持に必要な因子の検討
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長野 学, 大野晴也, 佐川純司, 江草玄太郎, 森田好美, 小武家和博, 一町澄宜, 冲健司, 米田真康
2. 発表標題 褐色脂肪の分化と機能を制御するエピジェネティック機構
3. 学会等名 第69回日本体質医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐川 純司, 長野 学, 大野 晴也, 江草 玄太郎, 森田 好美, 米田 真康
2. 発表標題 メチル基供与体合成酵素MAT は褐色脂肪細胞の分化と機能を制御する
3. 学会等名 日本糖尿病学会中国四国地方会第57回総会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------