

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890123

研究課題名（和文）

Necdin-Sirt1 複合体による転写因子の制御と神経発生、分化、生存への関与

研究課題名（英文）

Regulation of transcription factors and neuronal development by necdin-Sirt1 complex

研究代表者

長谷川 孝一 (HASEGAWA KOICHI)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号：20546783

研究成果の概要（和文）：

蛋白質の翻訳後修飾の一つであるアセチル化はヒストンのみならず、様々な転写因子にもみられる重要な反応で、その活性に大きく関与している。本研究では摂食に關与する Foxo1 に着目し、Necdin-Sirt1 複合体による制御機構と生理的意義について検討した。Necdin-Sirt1 複合体は Foxo1 を脱アセチル化し、視床下部における神経ペプチド及び、末梢の甲状腺ホルモンを制御し、体温調節に關与する事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Necdin is a positive regulator of Sirt1 protein deacetylase. In this study, I focused Foxo1 that is related for feeding. Necdin-Sirt1 complex deacetylated Foxo1 and modified thermoregulation through controlling neuropeptides and thyroid hormones.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	840,000	252,000	1,092,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,840,000	552,000	2,392,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医科学一般

キーワード：エネルギー代謝、摂食、肥満、体温調節、アセチル化、視床下部、脳神経疾患

## 1. 研究開始当初の背景

発生期に神経幹細胞から分化したニューロンは、新たに新生する事なく長期的に生存する。このため生存維持のために極めて強固な防御機構、修復機構が存在する事が考えられる。本研究代表者が所属するグループでは、これまでに、神経幹細胞からニューロンに分化する際に強く発現する因子 Necdin を発見し、これが細胞増殖とアポトーシスを抑制することによって、分化状態を安定的に保っている事を明らかにしてきた。また、ニューロンのアポトーシスを誘導する p53 は Necdin

と結合し、その活性が阻害されるが、研究代表者はこの分子メカニズムとして Necdin が脱アセチル化酵素である Sirt1 と p53 の接近性を高める事によって、Sirt1 の触媒反応を促進し、p53 依存性のニューロンのアポトーシスを抑制する事を突き止めた (Hasegawa and Yoshikawa, 2008, J Neurosci 28:8772-8784)。Sirt1 は長寿遺伝子として近年注目を集めているが、代謝制御の分子基盤は十分に理解されておらず、また、Sirt1 は p53 以外にも様々な因子を基質にしているため、研究代表者は、この内、摂食に係る転写

因子 Foxo1 に着目し、Necdin-Sirt1 複合体と Foxo1 の制御機構と生理学的意義の解析に着手した。

## 2. 研究の目的

フォークヘッド型転写因子 Foxo1 は視床下部で高発現しており、摂食を正に調節している神経ペプチドの転写を制御している (Kitamura et al., 2006, Nat Med 12:534-540, Kim et al., 2006, Nat Neurosci 9:901-906)。また、Necdin も中枢神経系において特に視床下部での発現が高い。この Necdin はゲノムインプリンティングによる発現制御を受けており、父性アリルからのみ発現するが、興味深い事にこの遺伝子を含む領域の欠失により発症するブラダー・ウィリー症候群(PWS)は過食を伴う肥満などの視床下部性の症状がみられる。このことから Necdin と Foxo1 の代謝における相関があると考え、また Sirt1 は Foxo1 を脱アセチル化の基質としてコントロールするため、この3者の関係性とエネルギー代謝調節の分子メカニズムを明らかにし、PWS をはじめとするメタボリック症候群の予防及び治療法の開発に寄与出来るのではないかと考えた。

## 3. 研究の方法

### (1)分子メカニズム

主に株細胞(HEK293A)を用いて、免疫沈降法による3者の結合、ルシフェラーゼをレポーターたんぱく質とした転写活性測定、アセチル化 Foxo1 を特異的に認識する抗体を用いた脱アセチル化反応測定を行った。

### (2)生理学的意義の解析

主に Necdin 欠損マウスを用いて、その野生型マウスと比較検討した。具体的にはそれぞれのマウスの視床下部から mRNA 及びたんぱく質を回収し、それらの発現量をリアルタイム PCR と Western blot 法により解析した。エネルギー代謝を包括的に理解する一端として、離乳期前後からの摂食量と体重変化を成体までモニタリングした。また、直腸温の低下がみられた事から、血液中の甲状腺ホルモンの測定を ELISA により行った。

## 4. 研究成果

### (1)分子メカニズム

免疫沈降法より、Necdin が Foxo1 と結合する事、また、Sirt1 は両者と結合する事が既に報告されているが、これら3者は互いに拮抗する事なく結合している事が分かった。興味深い事に、Necdin 存在下では、Sirt1 と Foxo1 の結合能が上がっていた。また、アセチル化 Foxo1 を特異的に認識する抗体を用いた脱アセチル化反応測定において Necdin は、Foxo1 を効果的に脱アセチル化した。しかし、Necdin 自身に脱アセチル化活性はみ

られなかった。次に、Foxo1 が認識する Insulin response sequence を3つタンデムに並べたプロモーターをルシフェラーゼの上流に付加したプラスミドを用いて、Foxo1 の転写活性を測定した。Foxo1 は転写を効果的に促進したが、Necdin は量依存的に転写を抑制した。また、Necdin と Sirt1 は相加的に Foxo1 の転写を抑制した。さらに、Necdin による転写抑制が Sirt1 に依存するかを検討するために、内在性の Sirt1 を阻害する事を目的とした siRNA を用いて検討した。その結果、Necdin による転写抑制は Sirt1 siRNA によって打ち消された事から、この効果は Sirt1 依存的なものであると考えられる。以上より、Necdin は Sirt1、Foxo1 と3者の安定的な複合体を形成し、Sirt1 の脱アセチル化反応を促進し、Foxo1 の転写活性を抑制している事が明らかとなった。

### (2)生理学的意義の解析

免疫組織化学染色により、Necdin、Sirt1 及び Foxo1 が視床下部の弓状核で共局在している事を確認した。また、顕微測光を用いた定量解析により、視床下部の弓状核のみならず室傍核、腹内側核におけるアセチル化 Foxo1 陽性シグナルは Necdin 欠損マウスにおいて増加していた。しかし、視床下部以外の領域、海馬や大脳皮質では有意な差はみられず、この現象は視床下部特異的である事が明らかとなった。また、視床下部を用いた免疫沈降法により、3者が内在的に結合している事、さらに、Foxo1 の結合配列が存在する Agrp プロモーター領域をターゲットとしたクロマチン免疫沈降法により、3者がこの領域に存在する事が明らかとなった。そこで、次に、Foxo1 によって正に転写が制御されている Agrp と Npy の発現を Necdin 欠損マウスの視床下部から抽出した mRNA を用いて定量的 PCR により解析したところ、有意に発現が増強していた。Agrp 及び Npy は摂食亢進作用だけでなく、視床下部の室傍核に存在する TRH(Thyrotropin-releasing hormone)ニューロンを抑制して、熱産生を阻害する。TRH は下垂体の TSH(Thyroid stimulating hormone)や、甲状腺の T4 及び T3 を介し、熱産生を上げ、体温を上昇させる。これらのホルモンを ELISA により測定すると、Necdin 欠損マウスにおいて血清中の量がいずれも少なかった。この事から、Necdin 欠損マウスにおいては熱産生異常が期待されたので、直腸温を測定したところ、野生型マウスに対し2℃程低かった。

本研究成果をまとめると、Necdin は Sirt1 と Foxo1 と結合し、Sirt1 による Foxo1 の脱アセチル化反応を促進する。Necdin 欠損マウスでは Sirt1 による Foxo1 の脱アセチル化反

応が不十分となり、アセチル化 Foxo1 の存在比が高まっていた。この状態は摂食に関連する神経ペプチド AgRP や Npy の発現上昇、熱産生に係る甲状腺ホルモンの減少につながり、低体温症の表現型がみられた。本研究では Foxo1 による視床下部—下垂体—甲状腺の経路のコントロールを Necdin-Sirt1 複合体が制御している事を突き止める事が出来た。また、PWS の患者において、甲状腺ホルモンの減弱や、低体温症の傾向がみられることから、本研究の分子メカニズムはこれらの現象を説明し得る可能性を示しており、この症候群の治療や予防に貢献出来得る成果である。

#### 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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Takako Aizawa\*, Koichi Hasegawa\*, Tsuyoshi Ohkumo, Seiichi Haga, Kazuhiko Ikeda and Kazuaki Yoshikawa, Neural stem cell-like gene expression in a mouse ependymoma cell line transformed by human BK polyomavirus, Cancer Science 102(1):122-129, 2010

\*T. A. and K. H. contributed equally to this work.

[査読有り]

- ② Takaaki Kuwajima\*, Koichi Hasegawa\* and Kazuaki Yoshikawa, Necdin Promotes Tangential Migration of Neocortical Interneurons from Basal Forebrain, The Journal of Neuroscience 30(10):3709-3714, 2010

\*T. K. and K. H. contributed equally to this work.

[査読有り]

[学会発表] (計 14 件)

- ① 長谷川孝一、吉川和明 : Necdin enhances Sirt1-dependent deacetylation of Foxo1 to control hypothalamic thermoregulation 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010, 12, 10

- ② 藤原一志郎、長谷川孝一、吉川和明 : Necdin controls proliferation of white adipocyte progenitors 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010, 12, 10

- ③ 吉田直史、長谷川孝一、吉川和明 : Necdin serves as Nse3 in mammalian Smc5/6

complex 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010, 12, 9

- ④ 橋長秀典、長谷川孝一、吉川和明 : Necdin regulates neural stem cell proliferation during postnatal development 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010, 12, 8

- ⑤ Koichi Hasegawa, Kazuaki Yoshikawa : Necdin regulates Foxo1 acetylation via Sirt1 in mouse hypothalamus Neuroscience 2010 40th Annual Meeting, San Diego CA, 2010, 11, 15

- ⑥ 南出良平、長谷川孝一、大雲剛志、吉川和明 : Neural stem cell proliferation is regulated through interaction between neccdin and Bmi1 polycomb complex protein (神経幹細胞の増殖は neccdin とポリコム複合体タンパク質 Bmi1 の相互作用によって制御されている) 第 53 回日本神経化学会大会 (Neuro2010)、神戸、2010, 9, 2

- ⑦ 長谷川孝一、吉川和明 : Necdin-Sirt1 complex regulates hypothalamic Foxo1 acetylation to control energy homeostasis (Necdin-Sirt1 複合体による視床下部 Foxo1 のアセチル化の制御) 第 53 回日本神経化学会大会 (Neuro2010)、神戸、2010, 9, 2

- ⑧ 大雲剛志、長谷川孝一、藤原一志郎、吉川和明 : Epigenetic regulation of neccdin gene expression during neural development (神経分化における neccdin 遺伝子のエピジェネティックな発現制御) 第 53 回日本神経化学会大会 (Neuro2010)、神戸、2010, 9, 2

- ⑨ Koichi Hasegawa, Kazuaki Yoshikawa : Regulation of Foxo1 acetylation by neuronal neccdin-Sirt1 complex The Joint Symposium of the 5th International Symposium of Institute Network, Kanazawa, 2010, 6, 24

- ⑩ Koichi Hasegawa : Acetylation status of transcription factors is regulated by neuronal neccdin-Sirt1 complex (ニューロンにおける neccdin-Sirt1 複合体による転写因子アセチル化状態の制御) Institute for Protein Research Retreat, Hyogo, 2009, 11, 17

- ⑪ 大雲剛志、蔡宗樺、長谷川孝一、吉川和明：  
Regulation of necdin expression by DNA  
methylation during neural development  
(神経発生における necdin 遺伝子のメチ  
ル化による発現調節) 第 82 回日本生化学  
会大会、神戸、2009, 10, 24
- ⑫ 長谷川孝一、吉川和明：The necdin-Sirt1  
complex deacetylates Foxo1 to suppress  
its transcriptional activity  
(Necdin-Sirt1 複合体は Foxo1 を脱アセチ  
ル化して転写活性を抑制する) 第 82 回日  
本生化学会大会、神戸、2009, 10, 24
- ⑬ 藤原一志郎、長谷川孝一、大雲剛志、吉川  
和明：Necdin regulates adipocyte  
differentiation via mitotic clonal  
expansion (Necdin による脂肪細胞分化の  
制御機構の解析) 第 82 回日本生化学会大  
会、神戸、2009, 10, 24
- ⑭ 大雲剛志、蔡宗樺、長谷川孝一、吉川和明：  
Regulated expression of MAGE family  
genes during neural development 第 52  
回日本神経化学会大会、群馬、2009, 6, 22

[その他]

大阪大学 蛋白質研究所 蛋白質高次機能  
学研究部門 神経発生制御研究室  
ホームページ

[http://www.protein.osaka-u.ac.jp/regulation/index\\_jap.html](http://www.protein.osaka-u.ac.jp/regulation/index_jap.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長谷川 孝一 (HASEGAWA KOICHI)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号：20546783