

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 25 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659175

研究課題名（和文）プロリン異性化酵素による脂肪細胞の分化制御機構解明と抗肥満薬開発への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the role of Pin1 on the adipose differentiation

研究代表者

浅野 知一郎 (ASANO TOMOICHIRO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70242063

研究成果の概要（和文）：

我々は、代表的なプロリン異性化酵素 Pin1 の発現量が高脂肪食負荷で数倍にも上昇することを見出した。Pin1 は脂肪細胞の分化に不可欠であると共に、IRS-1 に結合することでインスリンによる糖取り込みを亢進させる。また、Crtc2 や CREB に結合することで CRE 転写活性を抑制し、肝からの糖新生を抑制する。以上から、Pin1 は糖・脂質代謝異常や肥満を含むメタボリックシンドロームの成因に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We reported that Pin1 binds to Crtc2 and suppresses CRE transcriptional and gluconeogenic activity in the liver. In addition, Pin1 associates with IRS-1, a major insulin receptor substrate, and enhances insulin-induced metabolic actions. The associations of Pin1 with IRS-1 and Crtc 2 ultimately contribute to the incorporation of excess nutrients into tissues, based on a data series obtained using *in vitro* and *in vivo* over-expressions of Pin1, gene silencing, a specific inhibitor and Pin1 knock-out mice. In addition, it was shown that Pin1 is also indispensable for differentiation from pre-adipocytes into mature adipocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	0	1,800,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	330,000	3,230,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：メタボリックシンドローム

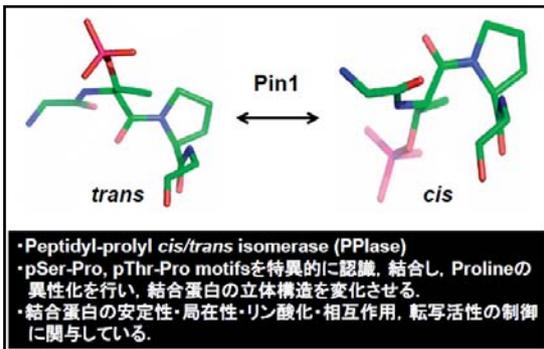
1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代において、タンパクの翻訳後修飾による細胞現象や病態への関与は大きく残されたテーマである。我々はインスリンシグナルにおいて中心的役割を果たしている IRS-1 の結合蛋白を検索する過程で、Pin1 が IRS-1 のチロシンリン酸化を亢進させ

ることを見出した。Pin1 はプロリンの構造をシス・トランスに変化させることでタンパク全体の機能に影響を与える独特なタンパクレギュレーターであり、その類似タンパクとして Par14 が同定されている。

Pin1 の発現量異常や遺伝子変異は、癌やアルツハイマー病、パーキンソン病などの発症に

関与しており、これらは Nature 等の一流誌に報告されている。しかし、未だ、代謝調節に関与している報告は全くない。我々は、Pin1 の機能解析をすすめる過程で、(1)Pin1 KO マウスが高脂肪食負荷で脂肪蓄積及び体重増加が少ないこと、(2) Pin1 KO マウス由来の繊維芽細胞は脂肪細胞へ分化しにくいこと、(3) ヒト前駆脂肪細胞やマウス 3T3-L1 細胞に Pin1 siRNA を処理すると、脂肪細胞への分化が強く抑制されることを発見した。これらの結果から、Pin1 は脂肪細胞分化の新規レギュレーターであると考え、本計画を着想するに至った。



2. 研究の目的

現在までに、Pin1はがん、免疫疾患および神経変性疾患等の病態形成に重要な役割を果たすことが明らかになっている。また、Par14も脳神経系における異常との関与が示唆されつつある。しかし、両タンパクとも代謝における機能は全く報告されていない。本計画ではPin1やPar14による脂肪細胞分化メカニズムの解明をブレークスルーとし、肥満を伴うメタボリック症候群発症の新規メカニズムを明らかにすることで、臨床応用につなげることを目的とする。

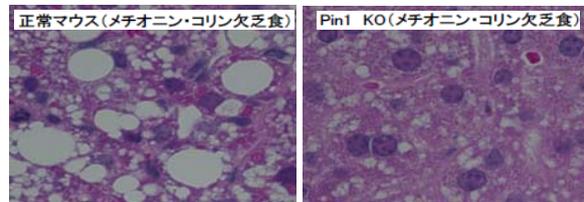
3. 研究の方法

DNA マイクロアレイからのクラスター解析を駆使し、プロリン異性化酵素 Pin1 や Par14 によって発現が制御され、脂肪細胞分化に関与する遺伝子群の発現変化を同定する。また、Pin1 や Par14 に結合するタンパクを、複合体精製からの LC/MS/MS のシステムで網羅的に検索し、DNA マイクロアレイの検討と総合して、脂肪分化調節の分子機構を解明する。さらに、プロリン異性化酵素の阻害薬を肥満マウスに少量、持続注入し、抗肥満作用を検討する。平成 23 年度には、プロリン異性化酵素と標的タンパクを特異的に阻害することで脂肪細胞分化を抑制する薬剤のスクリーニング系を開発するとともに、メタボリック

症候群の患者を対象に、プロリン異性化酵素遺伝子の SNP 解析を行い、肥満原因遺伝子としての可能性についても明らかにする。

4. 研究成果

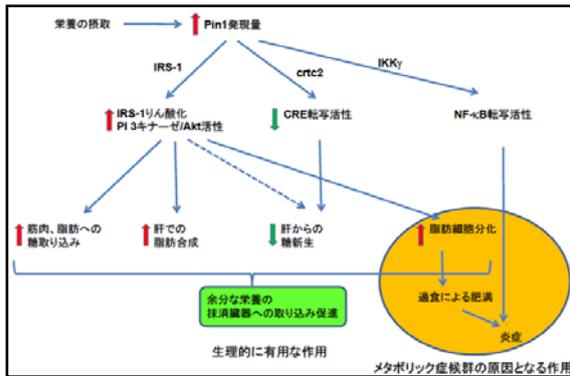
我々はインスリンシグナルにおいて中心的役割を果たしている IRS-1 の結合蛋白を検索する過程で、代表的なプロリン異性化酵素である Pin1 が IRS-1 に結合することで、インスリンによる IRS-1 のチロシンリン酸化から Akt 活性化を顕著に亢進させることを見出した。さらに、Pin1 の発現量が、高脂肪食を負荷したマウスの肝臓、筋肉、脂肪組織中で 10 倍近くも顕著に増加することを見出した。発現増加した Pin1 は、CREB の co-activator である CRTC family にも結合し、CRTC を核内から細胞質へと移動させることで、CRE 転写活性低下を導き、肝臓においては糖新生を抑制することを報告した。また、興味深いことに、Pin1 を発現抑制あるいは Pin1 の活性阻害薬を用いると、脂肪細胞の分化が高度に抑制される。逆に、肝臓に Pin1 を過剰発現させると、肝臓に脂肪蓄積が促進される。さらに、Pin1 KO マウスでは、コリン・メチオニン欠乏食 (MCD) による非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の発症も強く抑制される。これらの機序には、Pin1 の糖・脂質代謝シグナルへの調節作用に加え、マクロファージにおける NF- κ B 活性化制御機序も関係していると考えられる。



現在まで、Pin1 の発現量異常や遺伝子変異は、癌やアルツハイマー病、パーキンソン病などの発症に関与することが、Nature 等の一流誌に報告されている。一方、これまで、Pin1 が代謝調節に関係する報告はなく、我々が世界に先駆けて認識したことである。

さらに、Pin1 KO マウスでは、類似蛋白である PAR14 の発現が増加しており、PAR14 が Pin1 欠損をある程度、代償している可能性が高い。Pin1 と PAR14 では N 端側の構造が異なっており、Pin1 では N 端側の WW ドメインを介してリン酸化 Ser/Thr-Pro motif に結合するのに対し、PAR14 の N 端側の部位は DNA の AT rich な領域との結合が報告されている。しかし、我々は、PAR14 の過剰発現でも Akt のリン酸化が Pin1 と同様に亢進することから、PAR14 にも多くの標的蛋白が存在すると

考えている。PAR14 については、今後の重要な研究課題と考えられ、現在、KO マウスの作成中である。



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 16 件)

1. Uchida, T., Furumai, K., Fukuda, T., Akiyama, H., Takezawa, M., Asano, T., Fujimori, F., and Uchida, C. Prolyl isomerase Pin1 regulates mouse embryonic fibroblast differentiation into adipose cells. 査読有
PLoS One 2012;7(3):e31823 (in press)
2. Hasegawa, Y., Saito, T., Ogihara, T., Ishigaki, Y., Yamada, T., Imai, J., Uno, K., Gao, J., Kaneko, K., Shimosawa, T., Asano, T., Fujita, T., Oka, Y., and Katagiri, Y. Blockade of the nuclear factor- κ B pathway in the endothelium prevents insulin resistance and prolongs life spans. 査読有
Circulation 125(9):1122-33, 2012
3. Iwasita, M., Sakoda, H., Kushiyama, A., Fujishiro, M., Ohno, H., Nakatsu, Y., Fukushima, T., Kumamoto, S., Tsuchiya, Y., Kikuchi, T., Kurihara, H., Akazawa, H., Komuro, I., Kamata, H., Nishimura, F. and Asano, T. Valsartan, independently of AT1 receptor or PPAR α , suppresses LPS-induced macrophage activation and improves insulin resistance in co-cultured adipocytes
Am. J. Physiol. Cell Physiol. 302: E286-96, 2012 査読有
4. Kushiyama, A., Okubo, H., Zhang, J., Sakoda, H., Kikuchi, T., Fujishiro, M., Sato, H., Kushiyama, S., Iwashita, M., Nishimura, F., Fukushima, T., Nakatsu, Y., Kamata, H., Kurihara, H., Kikuchi, M.,

Kawazu, S., and Asano, T. Xanthine oxidoreductase is involved in macrophage foam cell formation and atherosclerosis development

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 32: 291-8, 2012 査読有

5. Kikuchi, T., Zhang, J., Sakoda, H., Koketsu, Y., Fujishiro, M., Kushiyama, A., Nakatsu, Y., Kamata, H., Inoki, K., Takahashi, S., Kurihara, H., Katagiri, H., Oka, Y., and Asano, T. LST8 level controls basal p70 S6 kinase and Akt phosphorylations, and mTORC1 and mTORC2 negatively regulate each other by competing for association with LST8
Obesity Res Clin Pract. 2012 (in press) 査読有

6. Nakarai, H., Yamashita, A., Nagayasu, S., Iwashita, M., Kumamoto, S., Ohyama, H., Hata, M., Soga, Y., Kushiyama, A., Asano, T., Abiko, Y., and Nishimura, F. Adipocyte-macrophage interaction may mediate LPS-induced low-grade inflammation: potential link with metabolic complications.

Innate Immun. 18: 164-70, 2012 査読有

7. Nakatsu, Y., Sakoda, H., Kushiyama, A., Zhang, J., Ono, H., Fujishiro, M., Kikuchi, T., Fukushima, T., Yoneda, M., Ohno, H., Horike, N., Kanna, M., Tsuchiya, Y., Kamata, H., Nishimura, F., Isobe, T., Ogihara, T., Katagiri, H., Oka, Y., Takahashi, S., Kurihara, H., Uchida, T., and Asano, T.

Peptidyl-prolyl Cis/Trans Isomerase NIMA-interacting 1 Associates with Insulin Receptor Substrate-1 and Enhances Insulin Actions and Adipogenesis.

J. Biol. Chem. 286:20812-22, 2011 査読有

8. Ohno, H., Nakatsu, Y., sakoda, H., Kushiyama, A., Ono, H., Fujishiro, M., Otani, Y., Okubo, H., Yoneda, M., Fukushima, T., Tsuchiya, Y., Kamata, H., Nishimura, F., Kurihara, H., Katagiri, H., Oka, Y., and Asano, T. 4F2hc stabilizes GLUT1 protein and increases glucose transport activity.

Am. J. Physiol. Cell Physiol. 300: C1047-54, 2011 査読有

9. Fukushima, T., Okajima, H., Yamanaka, D., Ariga, M., Nagata, S., Ito, A., Yoshida, M., Asano, T., Chida, K., Hakuno, F., and Takahashi, S. HSP90 interacting with IRS-2

is involved in cAMP-dependent potentiation of IGF-I signals in FRTL-5 cells.

Mol. Cell. Endocrinol. 344; 81-9, 2011 査読有

10. Fukushima, T., Arai, T., Ariga-Nedachi, M., Okajima, H., Ooi, Y., Iijima, Y., Sone, M., Cho, Y., Ando, Y., Kasahara, K., Ozon, A., Yoshihara, H., Chida, K., Okada, S., Kopchick, JJ., Asano, T., Hakuno, F., and Takahashi SI. Insulin receptor substrates form high-molecular-mass complexes that modulate their availability to insulin/insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinases

Biochem. Biophys. Res. Commun. 404; 767-73, 2011 査読有

11. Tonami, K., kurihara, Y., Arima, S., Nishiyama, K., Uchijima, Y., Asano, T., Sorimachi, H., and Kurihara, H.

Calpain 6, a microtubule-stabilizing protein, regulates Rac1 activity and cell motility through interaction with GEF-H1 J. Cell Sci. 124; 1214-23, 2011 査読有

12. 大野晴也、浅野知一郎 SGLT2阻害薬 月刊糖尿病 12; 108-113, 2012 査読無

13. 大野晴也、浅野知一郎 骨格筋におけるインスリン抵抗性 メタボリックシンドローム (第2版) -基礎・臨床の最新知見- 176-179, 2012 査読無

14. 大谷裕一郎、浅野知一郎 SGLT 2 阻害薬 カレントセラピー 2012年7月号治療薬 24-28 解説 査読無

15. 迫田秀之、浅野知一郎 mTOR シグナルと糖脂質代謝異常 実験医学 2012年3月号 29(6): 895-899, 2011 査読無

16. 大久保博史, 大野晴也, 浅野知一郎 糖輸送体 G. I. Research 19(5): 412-417, 2011 査読無

[学会発表] (計9件)

1. 張 君、郭 瑩、浅野知一郎 プロリン異性化酵素 Par14 のインスリンシグナルと糖・脂質代謝における役割第23回分子糖尿病シンポジウム 2011年11月26日熊本

2. 浅野知一郎、中津祐介、迫田秀之 転写共役因子 CRTC3 は高脂肪食によって発現誘導され、脂肪細胞分化と肝糖新生を促進する。第54回日本糖尿病学会 2011年5月19日札幌

3. 菊池貴子、迫田秀之、浅野知一郎 LST8 肝過剰発現マウスの糖脂質代謝に与える影響の解析 第54回日本糖尿病学会 2011

年5月19日 札幌

4. 大野晴也、迫田秀之、浅野知一郎 プロリン異性化酵素 Pin1 類似蛋白 Par14/17 の生理的役割解明 第54回日本糖尿病学会 2011年5月19日 札幌

5. 櫛山暁史、迫田秀之、浅野知一郎 キサンチンオキシダーゼ経路のマクロファージ泡沫化と動脈硬化への関与 第54回日本糖尿病学会 2011年5月19日 札幌

6. 大谷裕一郎、中津祐介、浅野知一郎 Trk(Trk-fused gene)はPTENに結合し、細胞内 PIP3 量を増加させることで、インスリン作用を促進させる。第54回日本糖尿病学会 2011年5月19日 札幌

7. 迫田秀之、中津祐介、浅野知一郎 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の発症におけるプロリン異性化酵素 Pin1 の役割 第54回日本糖尿病学会 2011年5月19日 札幌

8. 大久保博士、中津祐介、浅野知一郎 レジスチン関連蛋白 β (RELM β) の非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の発症における役割 第54回日本糖尿病学会 2011年5月19日 札幌

9. 藤城緑、迫田秀之、浅野知一郎 モサブリドクエン酸塩の3T3-L1脂肪細胞におけるインスリン抵抗性改善作用の解明 第54回日本糖尿病学会 2011年5月19日 札幌

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/ikagaku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 知一郎 (Asano Tomoichiro)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 70242063

(2) 研究分担者

中津 祐介 (Nakatsu Yusuke)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 20452584

(3) 連携研究者

迫田 秀之 (sakoda hideyuki)
東京大学・大学病院・助教
研究者番号: 50376464