

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590324

研究課題名(和文)細胞内シグナルと代謝物リガンドによる核内受容体活性制御

研究課題名(英文)Regulation of nuclear receptor activity by intracellular signals and ligands

研究代表者

白木 琢磨 (SHIRAKI, Takuma)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：10311747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外シグナル分子は膜結合型受容体を介したシグナル伝達に加え、その細胞内代謝物がリガンドとして働くにより直接PPAR $\gamma$ を制御している。申請者自身のこれらの研究結果から、「膜型受容体と核内受容体のクロストーク」の解明を目指した。

細胞内シグナルと、リガンドによる作用を時間的・空間的に分離し定量化するために、最大6つの転写制御について時間的な制御を視覚化するシステムを開発した。細胞内リン酸化シグナルによる核内受容体PPAR $\gamma$ の活性制御を解析し、PPAR $\gamma$ 蛋白質の安定化の変化と細胞内局在変化という、代謝物リガンドとは別の次元での制御機構でPPAR $\gamma$ の活性調節を行っていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：According to our previous findings of endogenous ligands for PPAR $\gamma$ , we hypothesized that extracellular signaling molecules regulate PPAR $\gamma$  activity through not only their intracellular metabolites acting as ligands, but also intracellular signals evoked by membrane associated receptors.

To analyze the temporal and spatial regulation of PPAR $\gamma$  activity, we developed novel reporter system, by which six independent transcriptional activities were simultaneously detected. We found that expression of phosphorylation induced stabilization of PPAR $\gamma$  proteins by itself and blocked nuclear export of PPAR $\gamma$  protein only in the presence of SDP-1. We also analyzed the effects of PPAR $\gamma$  mutation identified in German obese subjects on the phosphorylation-dependent regulation, and found that P85Q mutation blocked the effects of SDP-1. Thus, we conclude that phosphorylation signal regulates PPAR $\gamma$  activity in the distinct mechanism from that of ligands.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：転写制御 シグナル伝達 セロトニン エイコサノイド

1. 研究開始当初の背景

脂肪酸代謝物による PPAR 活性化機構を検討し、システイン残基との共有結合を介した新しい活性化機構を発見した(JBC 2005, Biochem. J. 2006)。さらに、脂肪酸代謝物とは異なるポケットに結合する新たなリガンドとしてセロトニン代謝物を同定した(EMBO J. 2010)。

一方、細胞内シグナル伝達系により PPAR の Ser84 がリン酸化され、プロリンイソメラーゼ Pin1 により認識され活性が抑制されることを見出した(JBC, 2010)。細胞外シグナル分子は膜結合型受容体を介したシグナル伝達に加え、その細胞内代謝物がリガンドとして働くにより直接 PPAR を制御している。申請者自身のこれらの研究結果から、「膜型受容体と核内受容体のクロストーク」の解明を目指す本研究を着想した(図1)。

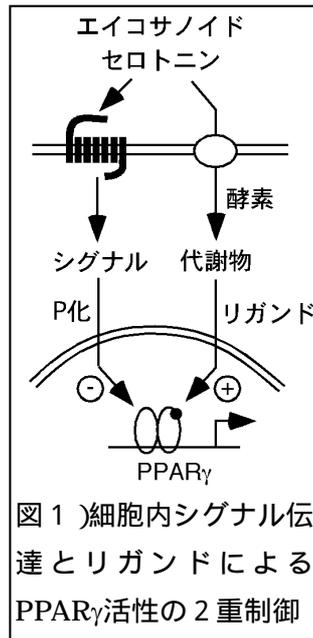


図1)細胞内シグナル伝達とリガンドによる PPAR<sub>γ</sub>活性の2重制御

2. 研究の目的

セロトニンは形質膜に存在する受容体を活性化するとともに、細胞内に取り込まれ酵素により代謝される。核内受容体 PPAR のリガンドとしての作用とともに、膜結合型受容体からのリン酸化シグナルも PPAR の転写活性を制御する本研究では、この2重の PPAR 制御の分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

2重の核内受容体活性制御の分子機構を解明するため、本研究では細胞内シグナルを介した作用と、リガンドによる作用を時間的・空間的に分離し定量化することを目指した。そのために、本研究ではまず、時間・空

間的な活性の視覚化を行う(図2)。さらに、リン酸化シグナルおよびリガンドによる制御について、実験事実を満たす時間変化を記述可能なモデルを構築する。

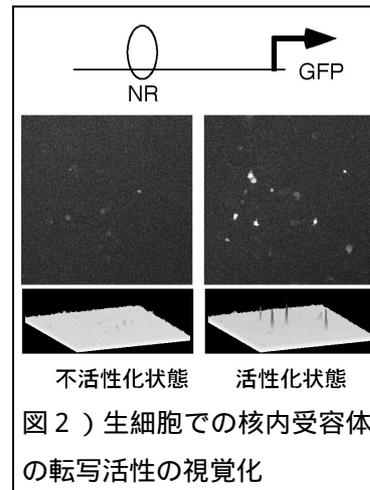


図2)生細胞での核内受容体の転写活性の視覚化

4. 研究成果

分子の挙動を同時に測定するためには、それぞれの分子を異なる色で視覚化すれば可能である。しかし通常の顕微鏡ではフィルターにより波長を分離するため、蛍光波長の近い色素の分離は困難である。

本研究では視覚の原理を応用し、3原色の蛍光蛋白質のみを用いその発現量の組み合わせにより様々な色を作成する技術を開発した(図3)。

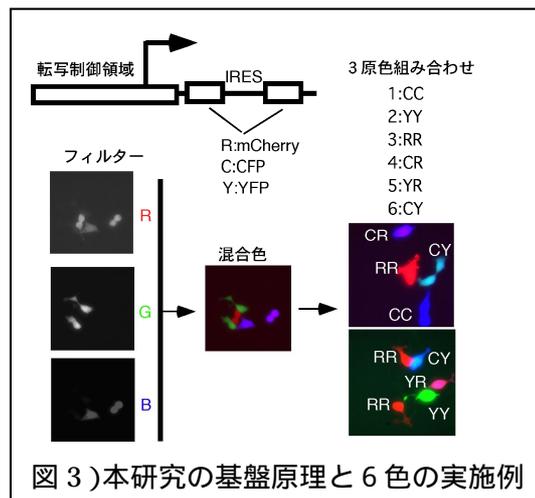


図3)本研究の基盤原理と6色の実施例

この方法により最大6つの転写制御について時間的な制御を視覚化可能になった。そこで、炎症応答ネットワークをモデルとして、インターロイキン8のプロモーターを用いて様々な刺激に応答して変化する様子を視

覚化することに成功した ( 図 4 )。

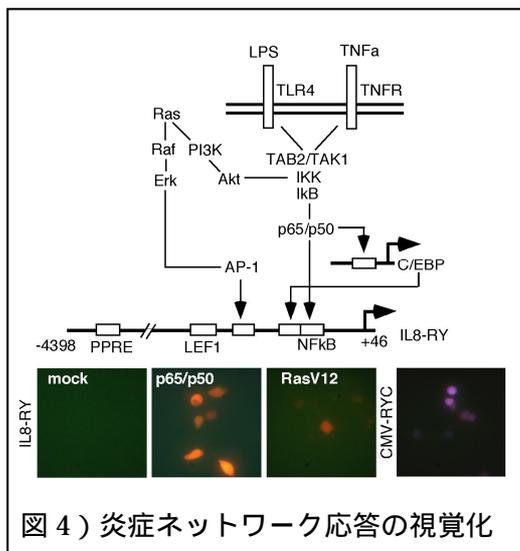


図 4) 炎症ネットワーク応答の視覚化

細胞内リン酸化シグナルによる核内受容体 PPARg の活性制御を解析するために、リン酸化シグナルによる PPARg 蛋白質の安定化の変化を評価した。その結果、変異型 Ras の発現により誘導されたリン酸化シグナルは PPARg 蛋白質を安定化することがわかった。

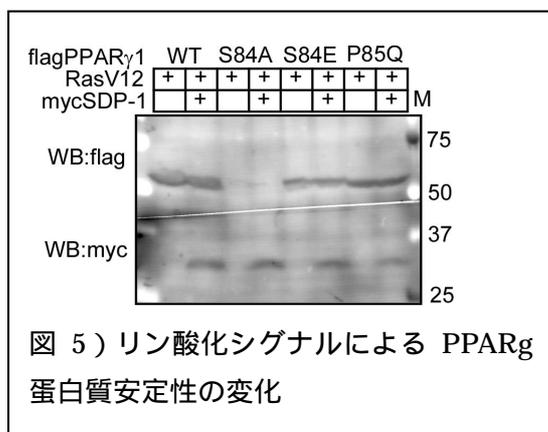


図 5) リン酸化シグナルによる PPARg 蛋白質安定性の変化

リン酸化部位である S84 をアラニンに置換すると不安定化することから、リン酸化されないうちは不安定化しており、リン酸化を受けると安定化する事が示唆された。

安定性の変化を介在する分子を検索する為に、リン酸化制御を受ける PPARg の AF-1 領域に結合することが知られている SDP-1 を共発現した。myc タグを付加した SDP-1 を発現すると、PPARg の蛋白質が減少することから、蛋白質が不安定化している可能性が考えられた ( 図 5 )。この効果は肥満家系で同定された PPARg の変異である P85Q によりキャ

ンセルされることから、SDP-1 による PPARg の制御異常により肥満や糖尿病が誘導されている可能性が示唆された。

さらに、リン酸化シグナルと SDP-1 に依存して、PPARg の局在がダイナミックに変化する事を見いだした。通常、PPARg は核と細胞質と両方に局在している。変異型 Ras の発現によりリン酸化シグナルを誘導しても局在に変化はない。しかし、SDP-1 存在下に変異型 Ras を発現すると PPARg は核にのみ局在ようになる ( 図 6 上段 )。SDP-1 のみの発現では局在に変化はなかった ( data not shown )。SDP-1 の発現による PPARg の不安定化は P85Q (PPARg2 では P113Q) でブロックされたが、この変異は核集積を阻害するのではなくむしろ、通常状態でも核集積を誘導した ( 図 6 下段 )。したがって、リン酸化シグナルが

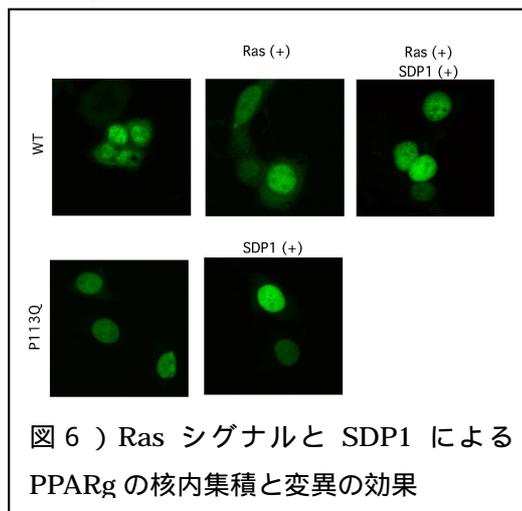


図 6) Ras シグナルと SDP1 による PPARg の核内集積と変異の効果

ある場合、SDP-1 依存性に核外排出がブロックされるのに対し、P85Q はリン酸化シグナルがない場合も核外排出をブロックしていることになる。これらの結果は、PPARg 蛋白質は常に細胞質と核をダイナミック動き回っており、核外排出のブロックがスイッチとして機能していることを示唆する。

申請時にはリン酸化シグナルも代謝物リガンドと同様、PPARg の転写活性を増減すると考えていたが、上記の結果から、転写活性の制御以前に、蛋白質の局在および安定性という別の次元での制御機構にリン酸化シグ

ナルが作用している事が明らかとなった。

#### 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5件)

1. Hada, H., Shiraki, T., Watanabe-Matsui, M., Igarashi, K., Hemopexin-dependent heme uptake via endocytosis regulates the Bach1 transcription repressor and heme oxygenase gene activation. *BBA*, 査読有, 1840, 2351-2360, 2014, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.02.029.
2. Gamo, K., Shiraki, T., Matsuura, N., and Miyachi, H., Transactivation by Hesperetin Glucuronides is Distinct from That by a Thiazolidine-2,4-dione Agent. *CHEM.PHARM.BULL.*, 査読有, 62, 491-493, 2014, [https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/62/5/6\\_2\\_c14-00021/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/62/5/6_2_c14-00021/_article)
3. Li, J., Shiraki, T. and Igarashi, K., Bach1 as a regulator of mitosis, beyond its transcriptional function. *Communicative & Integrative Biology*, 査読無, 5, 1-3, 2012, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3502211/>
4. Li, J., Shiraki, T., Igarashi, K. Transcription-independent role of Bach1 in mitosis through a nuclear exporter Crml-dependent mechanism. *FEBS Lett.*, 査読有, 586, 448-454, 2012, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579312000610>
5. Shionyu-Matsuyama, C., Waku, T., Shiraki, T., Oyama, T., Shirai, T., and Morikawa, K. Detecting structural similarity of ligand interactions in the lipid metabolic system including enzymes, lipid binding proteins, and nuclear receptors. *PEDS*, 査読有, 24, 397-403, 2011,

<http://peds.oxfordjournals.org/content/24/4/397.long>

(学会発表)(計10件)

1. Shiraki, T., Morikawa, K., Igarashi, K., Multiple metabolic pathways regulate PPAR $\gamma$  in multiple ways. CSHL meeting, Aug. 13-Aug. 17, 2013, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA
  2. Waku, T., Shiraki, T., Morikawa, K., Structural basis for the activation of the nuclear receptor, PPAR $\gamma$ , by fatty acid- and serotonin metabolites. 第85回日本生化学会大会, 2012/12/14-2012/12/16, 福岡国際会議場
  3. Shiraki, T., Morikawa, K., Igarashi, K., One receptor senses two ligands; the nuclear receptor PPAR $\gamma$  monitors multiple cellular metabolism. Metabolism, Diet and Disease. May 29-May 31, 2012, Georgetown University Hotel and Conference Center, Washington DC, USA
  4. 白木琢磨「核内受容体 PPAR $\gamma$  の機能解析: 分子生物学的アプローチと生化学的アプローチ」第84回日本生化学会大会, 2011/9/21-2011/9/24, 国立京都国際会館
  5. Shiraki, T., Morikawa, K., Igarashi, K., Serotonin metabolites act on the nuclear receptor PPAR $\gamma$  as endogenous ligands independently of fatty-acid metabolites. LXXVI Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, June 1-June 6, 2011, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA
- 他 国内学会 ポスター発表5件

(図書)(計3件)

1. 白木琢磨、和久剛、森川耿右「生体内代謝物をモニターする転写システム: 核内受容体 PPAR $\gamma$ による転写を介した代謝ネットワーク間のクロストーク」生化学(日本生化学会)9月号、749-761, 2013
2. 木下賢吾、白木琢磨企画特集「タンパク質

構造機能相関再考」生化学(日本生化学会)

8月号, 2013

3. 白木琢磨「薬が作用するということ」化学  
と生物(国際文献社)3月号 193-195,  
2013

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

白木 琢磨 (SHIRAKI, Takuma)  
近畿大学・生物理工学部・准教授  
研究者番号: 10311747

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

五十嵐 和彦 (IGARASHI Kazuhiko)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 00250738