

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：24500966
研究課題名(和文) カロリーバランスと加齢におけるWntシグナリング

研究課題名(英文) Calorie Balance, aging and wnt signaling.

研究代表者

山本 徳男 (Yamamoto, Tokuo)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：30192412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：WntLRP5/6はカルシウム代謝や糖、脂質の代謝調節を担うことが明らかにされている。本研究は、精製Wntを用いて、種々の代謝系やエイジングにおける役割を明らかにすることを目的としている。Wntは疎水性が高く、界面活性剤なしで精製することは極めて困難である。内在性Wntを除去した培地や無血清培地を用いて、Wnt3aとWnt4、Wnt5aを高度に精製し、分子量3万9千の単量体以外の複数のWnt分子種が存在することを明らかにした。また、Wntの標的たんぱく質も精製し、同定した。精製したWntと標的たんぱく質を用いて、細胞と個体レベルで、Wntが代謝やエイジングに及ぼす影響を解析した。

研究成果の概要(英文)：Wnt and its coreceptors, low density lipoprotein receptor related proteins (LRP5/6), play a key role in the metabolism of calcium, glucose and lipids. Mutations in LRP5 cause osteoporosis pseudoglioma (OPPG) in humans, whereas rare point mutation in LRP6 leads to autosomal dominant atherosclerosis, combined hyperlipidemia, and fatty liver disease. To study the effects of wnts in lipid and glucose metabolism and aging related diseases, wnt3a, wnt4 and wnt5a proteins are overexpressed in HEK293 cells using wnt-depleted medium or chemically defined serum-free medium, and purified without using detergents. The purified wnt proteins appeared as several protein bands ranging at 39-80 kDa, suggesting the presence of molecular variants. In addition, I also purified and identified a wnt-induced protein. The effects of purified wnt proteins and its induced protein on cell-proliferation and glucose metabolism were examined. Animal studies on the effects of these proteins are underway.

研究分野：総合領域

キーワード：エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) カロリー制限は酵母をはじめ、線虫やマウス、霊長類などの生物の寿命を延ばすことが広く認められている。これに対し、過剰カロリーの摂取と運動不足が起因するメタボリックシンドロームは、インスリン感受性を低下させ、2型糖尿病や動脈硬化症のリスクを高め、超高齢社会の深刻な問題となっている。申請者らは低密度リポたんぱく質レセプター類似たんぱく質 (LRP) の1つである LRP5 を欠損したマウスを作製し、LRP5 の欠損が骨粗しょう症や、高脂血症、インスリン感受性に大きな影響を与え、LRP5 がカロリーバランスやエイジングに関与し、動脈硬化や骨粗しょう症、2型糖尿病の発症のリスクを調節している可能性を示した(引用文献、)

(2) その後、ヒトの LRP6 の変異が明らかにされ、LRP6 が家族性複合型高脂血症の原因で、脂肪肝や動脈硬化も併発することが示された。さらに、組換え型の Wnt3a の投与により、LRP6 変異により引き起こされた高脂血症が改善することが示された(引用文献、)。このように、Wnt とその共役レセプターである LRP5/6 は体内のカルシウムや糖、脂質代謝の調節に重要であることが示され、Wnt 投与の有効性も明らかにされたが、現在まで精製された Wnt は界面活性剤を用いて精製されたもので、必ずしも動物やヒトに対して安全で有効とは言えず、界面活性剤なしの精製標品が必要とされた。

2. 研究の目的

(1) Wnt たんぱく質はパルミチン酸により修飾を受けるために、疎水性が高く(引用文献)、さらに凝集能が高く、界面活性剤なしで精製することは極めて困難であった。本研究では、Wnt たんぱく質を界面活性剤なしで精製し、その効果を細胞と個体レベルで明らかにすることを目的とした。

(2) LRP5 と LRP6 の異常により、カルシ

ウムや糖、脂質代謝の調節が障害されることが示され、さらに Wnt3a により改善することも明らかになったが、現在までに有効性が示されたのは Wnt3a のみで、他の Wnt の有効性は不明である。Wnt3a 以外の Wnt の効果についても、明らかにする必要があり、Wnt4 と Wnt5a も同様に界面活性剤なしで精製し、その性質と機能を比較することも目的とした。

(3) Wnt は カテニンの安定化を伴うカノニカル経路と、伴わない非カノニカル経路が知られている。LRP5/6 の機能が変異動物や遺伝子変異の解析で明らかにされたが、Wnt3a に代表されるカノニカル経路以外の経路については不明な点が多い。遺伝子導入以外の方法で、Wnt の機能を明らかにするために、精製たんぱく質の調製が重要である。

3. 研究の方法

(1) Wnt の発現。HEK293 細胞に Wnt を多量発現させるために、内在性のリボソームエントリーサイト(IRES)を有するベクターに Wnt3a, Wnt4, Wnt5a をそれぞれ組み込み、細胞に導入し、薬剤耐性の多量発現株を得た。

(2) Wnt の精製。最初に無血清発現システムであるフリースタイル培養系を用いたが、接着細胞に比べ、Wnt の発現量が低く、また 100,000 X g で沈降してしまうために、培地中の主たる Wnt はエキソゾームに存在するものと示唆された(引用文献)。その後、接着培養系で細胞を培養したが、血清に内在的に存在する Wnt たんぱく質の存在に気づき、内在性 Wnt 除去を試み、Wnt を効率よく吸着する樹脂を除いた Wnt 除去培地を用いて精製材料とした。複数のイオン交換カラム、疎水性カラムなどを用いて、Wnt を精製した。さらに、化学組成の明確な無血清培地の条件検討を行い、HEK293 細胞を無血清で培養することに成功し、この培地からも同様に精製した。

(3) 細胞系での機能解析。精製 Wnt を用

い、細胞内の カテニンの安定性や、糖代謝や細胞増殖に与える影響などを解析した。

(4) 動物実験。代表的肥満マウスである KK^{ay} マウスに精製 Wnt を腹腔内投与し、血糖や血中脂質などに与える影響を解析した。

4. 研究成果

(1) Wnt の発現と発現培地の調製。IRES ベクターに代表的 Wnt である Wnt3a, Wnt4, Wnt5a を組み入れ、多量発現細胞を得た。HEK293F 細胞と無血清の培地であるフリースタイル 293 培地を用いて Wnt 発現細胞を浮遊培養した。無血清浮遊培養は接着培養に比べ、発現量も少なく、培地中の Wnt の多くは 100,000 X g の遠心により沈降した。このことは、Wnt がエキソゾームとして細胞外に存在することを示唆した(引用文献)。また、しょ糖密度勾配による沈降でも同様な結果が得られた。無血清による浮遊培養に比べ、接着培養で得られた Wnt は 100,000 X g の上清に留まり、これを精製に用いた。牛胎児血清には検出可能な程度の Wnt が存在するために、この内在性の Wnt を除去することを試み、Wnt を効率的に吸着する樹脂を用いた Wnt 除去培地で細胞を培養し、精製に供した。さらに、無血清培地の条件検討を行い、Wnt 発現細胞の完全無血清培養に成功した。

(2) Wnt の精製。Wnt 除去培地と無血清培地より Wnt3a, Wnt4, Wnt5a の精製を可能にした。精製は、各種イオンクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィーの数種のクロマトグラフィーの組み合わせにより行った。精製 Wnt の主要分子量は 39 KDa で、このバンド以外に複数のバンドが検出され、抗体により認識された。このことは糖鎖修飾などによる複数の分子種が存在することを示唆する。精製たんぱく質は極めて疎水性が高く、強力な疎水性クロマトグラフィーを用いると、溶出できなかった。また、透析膜や限外ろ過膜に

強力に吸着する性質を持つために、これらの操作はできなかった。このために、精製標本の評価は困難を極めた。精製 Wnt の生物活性は主として、マウス L 細胞を用いて カテニンの安定性をウエスタンブロットで確認した。また、グルコースの細胞内への取り込みや、細胞増殖についても検討した。

(3) Wnt により誘導されるたんぱく質の精製と同定。Wnt を発現させると様々な細胞応答が起こることが明らかである。Wnt 精製過程で、最も顕著に誘導されるたんぱく質を見だし、これを精製し、同定することができた。このたんぱく質は Wnt の機能発揮のために重要と考えられ、現在、その機能解析や性質や Wnt 機能との関連を明らかにしている。

(4) 動物実験。Go, G-W らは LRP6 ミュータントマウスを作製し、ヒト同様に高脂血症を発症することを示した。このミュータントマウスに組換え体 Wnt3a を投与すると高脂血症が改善することも示し、個体レベルで Wnt の有効性を示した。本研究では、界面活性剤なしで Wnt を精製することを可能にし、種々の加齢疾患動物に投与することも可能となった。この動物実験は現在進行中で、結果が得られ次第公表する予定である。また、Wnt に誘導されるたんぱく質の細胞と個体レベルの機能解析も進行中で、Wnt シグナリングの標的の役割の解明が可能となった。

<引用文献>

Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion.

Fujino T, Asaba H, Kang MJ, Ikeda Y, Sone H, Takada S, Kim DH, Ioka RX, Ono M, Tomoyori H, Okubo M, Murase T, Kamataki A, Yamamoto J, Magoori K, Takahashi S, Miyamoto Y, Oishi H, Nose M, Okazaki M,

Usui S, Imaizumi K, Yanagisawa M, Sakai J, Yamamoto TT.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jan 7;100(1):229-34. Epub 2002 Dec 30.

Severe hypercholesterolemia, impaired fat tolerance, and advanced atherosclerosis in mice lacking both low density lipoprotein receptor-related protein 5 and apolipoprotein E.

Magoori K, Kang MJ, Ito MR, Kakuuchi H, Ioka RX, Kamataki A, Kim DH, Asaba H, Iwasaki S, Takei YA, Sasaki M, Usui S, Okazaki M, Takahashi S, Ono M, Nose M, Sakai J, Fujino T, Yamamoto TT.

J Biol Chem. 2003 Mar 28;278(13):11331-6. Epub 2002 Dec 31.

Mutation in EGFP domain of LDL receptor-related protein 6 impairs cellular LDL clearance.

Liu W, Mani S, Davis NR, Sarrafzadegan N, Kavathas PB, Mani A.

Circ Res. 2008 Nov 21;103(11):1280-8. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.183863. Epub 2008 Oct 23.

The combined hyperlipidemia caused by impaired Wnt-LRP6 signaling is reversed by Wnt3a rescue.

Go GW, Srivastava R, Hernandez-Ono A, Gang G, Smith SB, Booth CJ, Ginsberg HN, Mani A.

Cell Metab. 2014 Feb 4;19(2):209-20. doi: 10.1016/j.cmet.2013.11.023. Review.

Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors.

Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd, Nusse R. Nature. 2003 May 22;423(6938):448-52. Epub 2003 Apr 27.

Active Wnt proteins are secreted on exosomes.

Gross JC1, Chaudhary V, Bartscherer K, Boutros M. Nat Cell Biol. 2012

Oct;14(10):1036-45. doi: 10.1038/ncb2574. Epub 2012 Sep 16.

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 1件)

Hirota Y, Kubo K, Katayama K, Honda T, Fujino T, Yamamoto TT, Nakajima K. Reelin receptors ApoER2 and VLDLR are expressed in distinct spatiotemporal patterns in developing mouse cerebral cortex. J Comp Neurol. 査読有、523巻、2015、463-478 DOI:10.1002/cne.23691.

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織
(1)研究代表者
山本 徳男 (YAMAMOTO, Tokuo)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号：30192412

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：