

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24658119

研究課題名（和文）ラット褐色脂肪組織における絶食時特異的なユビキチン化標的タンパク質の探索

研究課題名（英文）Identification of target proteins for ubiquitination in brown adipose tissue of fasted rat

研究代表者

中井 雄治 (NAKAI YUJI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任准教授

研究者番号：10321788

研究成果の概要（和文）：本研究では、絶食時／摂食時にユビキチン化の標的となる分子を同定することにより、タンパク質分解によるエネルギー代謝の調節機構を解明することを目的として研究を行った。Wistar系7週齢雄ラットを7日間の制限給餌の後に摂食群と絶食群の2群に分け、プロテアソーム阻害剤であるエポキシマイシンの投与量、投与方法を検討した。その結果、ユビキチン化タンパク質の量に2群で差が認められる条件を決定した。

研究成果の概要（英文）：To clarify the mechanism for energy metabolism regulation by specific protein degradation, we attempt to identify the proteins that ubiquitinated in response to energy level in rat brown adipose tissue. Male Wistar rats aged 7 weeks old were subjected to 1 week restricted feeding, and then divided into 2 groups, fed and fasted. The rats were administrated epoxomicin, a potent proteasome inhibitor. The dose and method for administration of epoxomicin were determined to detect the difference of ubiquitinated protein levels between the 2 groups.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：ユビキチン、エネルギー代謝、プロテアソーム阻害剤、ラット、褐色脂肪組織

1. 研究開始当初の背景

近年巷でよく話題に上るメタボリックシンドロームとは、内臓脂肪の蓄積が引き金となり、高血圧・高脂血症・高血糖を複合的に併発する、生活習慣病予備段階である。脂肪組織にはエネルギーを脂肪として蓄積する白色脂肪組織、余剰のエネルギーを熱として発散する褐色脂肪組織（brown adipose tissue, 以下BATと略する）があり、ここでいう内臓脂肪は前者に属する。生体は通常エネルギー代謝の恒常性によって、エネルギー収支のバランスが保たれているが、何らかの

理由によってバランスが崩れ、エネルギー過剰状態が続くと、内臓脂肪の蓄積が起こる。

絶食応答の解析は、このようなエネルギー代謝の恒常性を理解する上でよいモデルとなるが、絶食時の末梢組織での網羅的遺伝子発現解析は、意外にも少なく、絶食時のBATにおける遺伝子発現の網羅的解析は行われていなかった。そこで我々は、DNAマイクロアレイを用い、絶食時にBATにおいて発現変動を示す遺伝子を網羅的に解析した。その結果、多くのユビキチン-プロテアソーム関連遺伝子の絶食による発現上昇が認められ、中でもタンパク質のユビキチン化反応の基

質特異性を担う E3 ユビキチンリガーゼをコードする遺伝子が多数発現上昇を示していた。このことから、複数の特異的なユビキチン化標的分子の存在が示唆された (Nakai *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 139-148, 2008)。従って「絶食時に多種類のタンパク質がユビキチン化される」と考えるに至った。

これまで、特異的なタンパク質分解システムが絶食時のエネルギー代謝調節に関与しているという報告は、極めて少ない。しかしながら、申請者らのこれまでの研究は、複数のユビキチン化標的タンパク質が存在し、未知の調節機構が存在する可能性を示唆している。本研究では、絶食時にユビキチン化されるタンパク質を網羅的に探索するものであり、エネルギー代謝の恒常性を担う新たな調節機構に関する知見を得ることが期待できる。標的となる分子は、解糖系の酵素群や、脂肪酸合成やタンパク質の生合成など、エネルギー状態が高い時に働く経路を担う分子であると推定される。これらの分子は絶食時に mRNA レベルで抑制がかかることがこれまでわかっているが、特異的なタンパク質分解によって、すでに存在するタンパク質を速やかに減少させ、代謝経路をドラステックに切り替えているのではないかと考えている。これらの分子の新たな調節機構が明らかとなれば、新たな機能性食品の開発や、メタボリックシンドロームに対する新たな創薬の標的の発見につながることを期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、絶食時にユビキチン化の標的となる分子を同定することにより、絶食応答における特異的なタンパク質分解によるエネルギー代謝の調節機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 動物の飼育および BAT の摘出

Wistar 系 7 週令雄ラット 10 匹に、5 日間の馴化後、7 日間、毎日 10 時から 16 時の間のみ通常飼料を自由摂取させた。(制限給餌: restricted feeding)。8 日目の 10 時に平均体重が同程度となるように 2 群に分け、16 時まで 1 群には同様に餌を与え (Refed 群)、もう 1 群は絶食とした (Fasted 群)。また、8 日目の 13 時に、ラットにエポキシマイシン (ペプチド研究所) を 80 マイクログラム / Kg 体重で投与した。16 時にペントバルビタール (ソムノペンチル、共立薬品) で麻酔した後、解剖を行った。両群共に BAT を摘出

し、液体窒素で新鮮凍結した。その後 -80°C で保存した。なお、動物実験は東京大学大学院農学生命科学研究科動物実験委員会の承認のもと、同委員会の定めるガイドラインに従って行った。

(2) 摘出した BAT からのタンパク質抽出、ウェスタンブロッティング

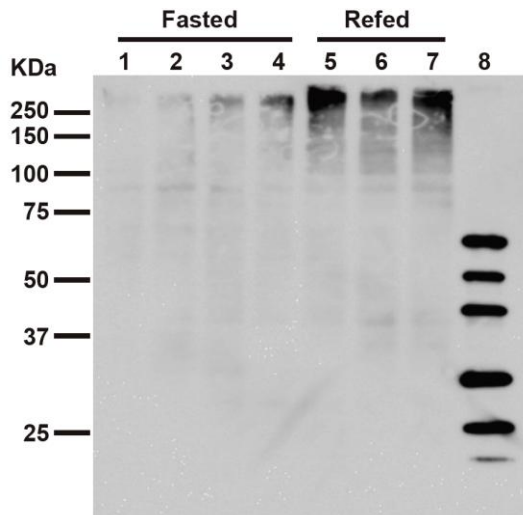
凍結保存した BAT を、クライオプレス (マイクロテックニチオン製) を用いて凍結したまま破碎した。破碎した組織は -80°C のフリーザー中で液体窒素をとばした後、1% (v/v) の protease inhibitor cocktail (P8340-1ML, Sigma) および Clasto-lactacystin beta-lactone (L7035-1MG, Sigma) を含む 1 mL の Lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol) を加え、氷上で直ちにポリトロンホモジナイザー (キネマティカ) で 20,000 rpm、1 分間ホモジナイズした。その後 4°C、12,000 × g、10 分間遠心して上清を得た。上清中のタンパク質量を Bradford 法で定量し、20 μg / レーンで 10% SDS-PAGE に供した。その後、PVDF 膜に転写し、ウェスタンブロッティングを行った。一次抗体に抗ユビキチン抗体 (Enzo Life Sciences)、2 次抗体に HRP-anti-mouse IgG (GE Healthcare) を用いた。化学発光シグナルの検出には、Image Quant LAS4000 mini (GE Healthcare) を用いた。

4. 研究成果

まず、エポキシマイシンの投与条件の検討を行った。当初は本飼育開始後 8 日目の 10 時に群分けすると同時にエポキシマイシンを腹腔内投与する予定だったが、予備実験の結果、8 日目の 10 時に投与したラットが Refed 群においても餌を食べなくなったため、3 時間給餌後の 13 時に投与することとした。これは、おそらく麻酔なしで腹腔に注射を行ったストレスも影響していると考えられた。そこで、8 日目の 13 時に腹腔内投与する (すなわち、3 時間の再摂食後にエポキシマイシンを投与する) こととした。6 時間の制限給餌中の最初の 3 時間で約 70% 餌を食べることをこれまでに確認している (Ushiyama *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 1320-1323, 2010) ため、このタイムポイントを採用した。しかし、8 日目の 13 時に投与した系においても、BAT においてエポキシマイシンの顕著な効果は認められず、ユビキチン化タンパク質のシグナルが得られなかった。

そこで、次にラットにイソフルラン吸入麻酔下でエポキシマイシンを BAT 近傍の皮下

に注入することとした。投与量は 80 マイクログラム/Kg 体重で、本飼育 8 日目の 13 時に投与した。その結果、Refed 群では Fasted 群に比べて 100 kDa 以上の分子質量を示す高分子量領域に強いユビキチン化タンパク質と思われるシグナルが得られた (図)。このことから、エポキシマイシン投与法は組織近傍の皮下に麻酔下で注入するのがよいと考えられた。



ただし、この条件では当初予定していた「絶食時にユビキチン化される」タンパク質ではなく、「再摂食によって生体のエネルギー状態が上がった際にユビキチン化される」タンパク質が見えている可能性が高い。この点については、背景となる仮説を「生体のエネルギー状態が変化したときに代謝経路が

図 エポキシマイシン投与ラット BAT 抽出物の抗ユビキチン抗体によるウェスタンブロッティング
レーン 1-4: Fasted (絶食) 群、レーン 5-7: Refed (再摂食群)、レーン 8: ポリユビキチン鎖 (ポジティブコントロール)

切り替わり、その経路の切り替わりに特異的なタンパク質分解が働く」と考えれば、絶食でエネルギー状態が低下した場合だけでなく、その逆の再摂食によってエネルギー状態が上がった場合にも同様のタンパク質分解が起こっていても不思議はない。実際に、ラットを本研究と同様の系で制限給餌を行って、絶食後再給餌によってラット肝臓でプロテアソーム関連遺伝子の発現が上昇する (Ushiyama *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74,1320-1323, 2010) ことも我々のグループが報告している。従って、この系でユビキチン化される標的タンパク質についても今後検討する予定である。

しかしながら、当初の目的であった「絶食時にユビキチン化される」タンパク質もち

ろん同定したいと考えている。そこで、エポキシマイシンを投与するタイミングの検討も行った。前述の系では本飼育開始 8 日目、すなわち群分けを行ってから 3 時間後に投与していたが、7 日目の 16 時の、ラットが満腹時に投与することも試みた。こうすることで、エポキシマイシンの作用が 24 時間持続することを前提に、エネルギー状態が高い状態から低い状態に遷移する際に (すなわち絶食時に) ユビキチン化されるタンパク質の分解を阻害でき、検出できると考えた。その結果、ごく弱いながらも Fasted 群と Refed 群で差がありそうな結果は得られた (データ示さず)。ただし、この結果についてはまだ再現性が確認できていないので、さらなる検討が必要である。また、エネルギー状態が変化した際にユビキチン化されることがわかっている数少ないタンパク質である、Acetyl-CoA carboxylase 1 や Uncoupling protein-1などをポジティブコントロールとして、実験系が機能しているかどうかの検証も同時に行っているところである。

本研究のまとめ

本実験系が機能するためには、*in vivo* でエポキシマイシンが確実に作用することが必要不可欠であり、まず、投与条件の検討を行った。その結果、本飼育 8 日目の 13 時に、組織近傍の皮下に麻酔下、80 マイクログラム/Kg 体重で投与するという一つの条件を定めることができた。しかし、この条件でもユビキチン化タンパク質のシグナルも十分強いとはいえない。この問題点をクリアするため、現在投与量をさらに増やして検討を行っている。

また、ユビキチン化タンパク質をユビキチン結合レジン (Ubiquapture-Q Kit, Enzo Life Sciences) によって濃縮する条件を並行して検討しているが、未だ確立できていない。こちらも組織抽出液中のユビキチン化タンパク質の量を増やすことができれば、確立可能であると考えており、さらなる検討を行う予定である。

生体内でユビキチン化されたタンパク質はプロテアソームによって速やかに分解されてしまうため、もともと検出が難しいと予想はしていたが、想像以上に条件の確立に手間取ってしまった。予定からは遅れてしまったが、今後、ユビキチン化タンパク質の濃縮を行い、濃縮したユビキチン化タンパク質からイソペプチダーゼによってユビキチン鎖を切り離し、二次元電気泳動によって同定する、というように、着実に研究を進めていきたいと考えている。

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)

〔学会発表〕(計1件)

(1)2012年12月6日、第3回「食」による生活習慣病予防医学の展開(招待講演)、「ニュートリゲノミクス研究の最適化」、中井雄治、KKRホテル金沢(金沢)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中井 雄治 (NAKAI YUJI)
東京大学大学院農学生命科学研究科・特任准教授
研究者番号：10321788

(2) 研究分担者

なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし
()

研究者番号：