

## 論文内容の要旨

論文題目 褐色脂肪細胞の成熟における ASK1 の新規機能解析

氏名 服部 一輝

### 【序論】

通常我々の体は、細胞および個体レベルでの代謝恒常性が保たれた状態にあるが、ひとたびこのバランスが崩されると様々な問題が生じる。その一つの例が「肥満」である。肥満は、個体のエネルギー摂取と消費のバランスが崩れた病態であると捉えることができ、2型糖尿病やアテローム性動脈硬化を始めとする様々な疾患に寄与していることが示唆されている。さらには、脳梗塞や心筋梗塞などを介して、時には人を死にさえ導く重篤な疾患である。我が国においても全人口の2割から3割もの人々が「肥満者」であると言われている現状でありながら、肥満が引き起こされる詳細な分子メカニズムに関しては不明な部分が多く、特定の分子をターゲットとした抗肥満薬開発も遅れていると言わざるを得ない。

抗肥満薬の一つの標的である脂肪組織は2種類に大別されるといわれ、白色脂肪組織が「エネルギー貯蔵」を主な目的とする器官であるのに対し、褐色脂肪組織はむしろ「エネルギー消費」を担う器官であると考えられている。褐色脂肪細胞は、クリステが発達したミトコンドリアを豊富に持ち、Ucp1という脱共役タンパクを介した熱産生を盛んに行なっている。近年、活性のある褐色脂肪組織が成人において存在することが証明され、その活性と体脂肪率が逆相関することが報告された。これらの事実より、褐色脂肪組織における体熱産生系の働きを促すことによって、エネルギー消費を亢進させ、抗肥満効果を期待する治療戦略に注目が集まっている。

これまでの報告から、脂肪分化や脂質代謝などといった代謝系経路において p38 や JNK などのストレス応答性キナーゼの関与が示唆されているが、これらの分子の活性制御のために上流でどのようなシグナル伝達が行われているかについては未知な点が多い。p38 および JNK は、3段階により構成されるストレス応答性 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) 経路の最下流に位置する分子であり、その上流には MAPK Kinase Kinase (MAPKKK) および MAPK Kinase (MAPKK) の存在が知られている。

MAPKKK の一つである ASK1 は、ヒトの脂肪組織において発現が確認されており、「代謝」という観点においてはインスリン抵抗性などとの関わりが示唆されているものの、それらの分子基盤を含め、代謝系経路における詳細な機能に関しては全く解析がなされていない。そこで、脂肪組織を含む「代謝」に深く関わる組織における ASK1 の役割に注目することとした。また、当研究室におけるこれまでの知見から、ASK ファミリーを構成する ASK1, ASK2, ASK3 は互いに相互作用し合い、協同的に機能を発揮する場面が存在することが示唆されている。このような背景に基づき、「代謝」に関わるシグナル伝達経路における ASK ファミリー分子の機能解明を本研究の目標とした。

## 【方法, 結果】

### 1. ASK1 欠損マウスの褐色脂肪組織において体熱産生に関わる遺伝子の発現量が低下している。

まず我々は、ASK ファミリー分子の遺伝子発現に対する寄与を検討すべく、それぞれの欠損マウスの褐色脂肪組織、白色脂肪組織、肝臓を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。それらの結果の中で、ASK1 欠損マウスの褐色脂肪組織において、Pgc1a や Dio2 などといった複数の体熱産生系遺伝子の発現量が低下していることに注目した。

### 2. ASK1 欠損マウスの褐色脂肪組織において Ucp1 の発現量が低下している。

マウスの褐色脂肪組織においては、Ucp1 という分子がミトコンドリア内膜の内外に形成されるプロトン勾配を失わせてしまうことにより、熱産生をもたらすことが知られている。また、本研究の DNA マイクロアレイ解析において発現量が低下していた Dio2 などの因子が Ucp1 の発現を誘導することが知られていた。そこで、ASK1 欠損マウスの褐色脂肪組織における Ucp1 の発現量を定量したところ、mRNA およびタンパクレベルにおいて発現量が低下していることが明らかとなった (Fig. 1)。

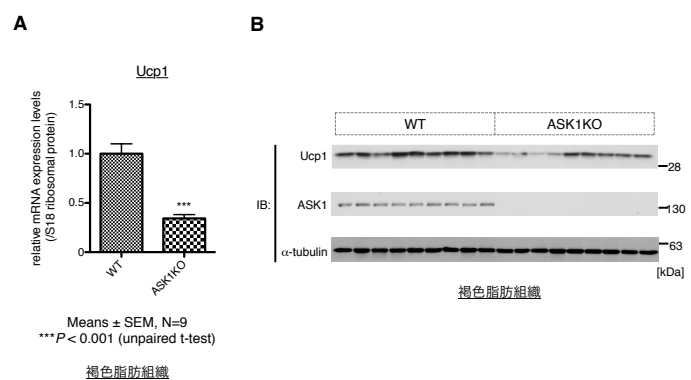


Fig. 1 野生型およびASK1欠損マウスの褐色脂肪組織におけるUcp1 mRNA発現量 (A) およびタンパク発現量 (B)

### 3. ASK1 欠損マウス由来の初代培養褐色脂肪細胞において分化依存的な Ucp1 の発現誘導が抑制される。

個体レベルで確認された Ucp1 発現レベルの低下が単離細胞系においても再現できるか、初代培養細胞を用いて検討を行った。新生児の褐色脂肪組織より未分化細胞を採取し、in vitro 分化誘導系にて褐色脂肪細胞へ分化させた後、Ucp1 の発現量をウエスタンブロット法により検出した。その結果、ASK1 欠損マウス由来の初代培養褐色脂肪細胞において Ucp1 の発現量が低下していることを確認した。

### 4. ASK-p38 経路はβアドレナリン性刺激によって活性化し、Ucp1 の発現を誘導する。

過去の報告より、褐色脂肪細胞において、βアドレナリン性刺激によって PKA 経路が活性化され、Ucp1 の発現が誘導されることが明らかとなっている。そこで、脂肪細胞などに特異的に発現が認められるβ<sub>3</sub> アドレナリン受容体の特異的アゴニストである CL316,243 を分化誘導途中の未成熟な初代培養褐色脂肪細胞に処置したところ、ASK1-p38 経路の顕著な活性化と Ucp1 の発現誘導が確認された。さらに

は、CL316,243 処置依存的な p38 の活性化 (Fig. 2A) および Ucp1 の発現誘導 (Fig. 2B) は、ASK1 欠損マウス由来の細胞において抑制されることが明らかとなった。また、PKA 阻害剤である H89 の処置によって CL316,243 依存的な ASK-p38 経路の活性化が抑制されることも確認された。これらの結果より、分化過程の褐色脂肪細胞において、PKA-ASK1-p38 経路が活性化された結果、Ucp1 の発現誘導を導くことが示唆された。

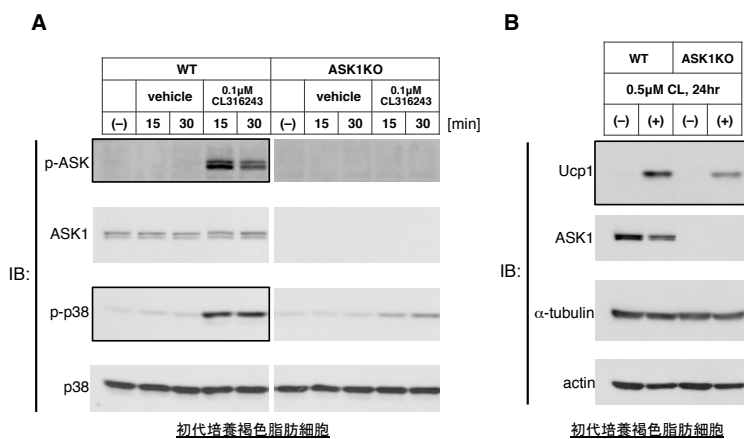


Fig. 2 CL316,243 ( $\beta_3$  作動薬) 処置依存的なASK-p38経路の活性化 (A) およびUcp1の発現誘導 (B)

### 5. PKA の触媒サブユニットはASK1 と結合し、ASK1 の活性化を導く。

PKA と ASK1 の関係性をより詳細に解析すべく、HEK293A 細胞に PKA の触媒サブユニット (PKACA および PKACB) と ASK1 を共発現すると ASK1 の活性化に必須なリン酸化部位のリン酸化レベルを上昇させた (Fig. 3A)。この効果はキナーゼ不活性化型 PKA との共発現によっては見られなかった。また、過剰発現した PKA 触媒サブユニットと内在性 ASK1 との結合も確認された (Fig. 3B)。

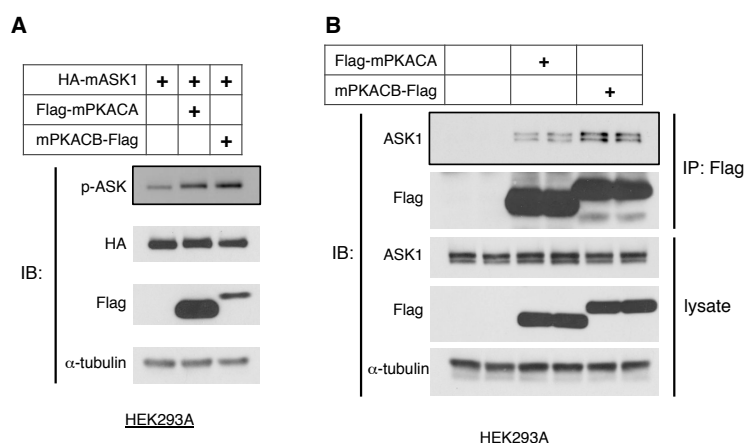


Fig. 3 PKAによるASK1の活性化 (A) および PKAとASK1の結合 (B)

### 6. ASK1 欠損マウスは低温刺激に対して脆弱である。

最後に、体熱産生に対する ASK1 の関与を個体レベルで検討すべく、ASK1 欠損マウスを用いた検討を行った。その結果、飢餓条件下において低温刺激 (4 °C) を負荷すると、野生型マウスがある程度体温を保持するのに対して、ASK1 欠損マウスは顕著に体温を低下させることが明らかとなった (Fig. 4)。

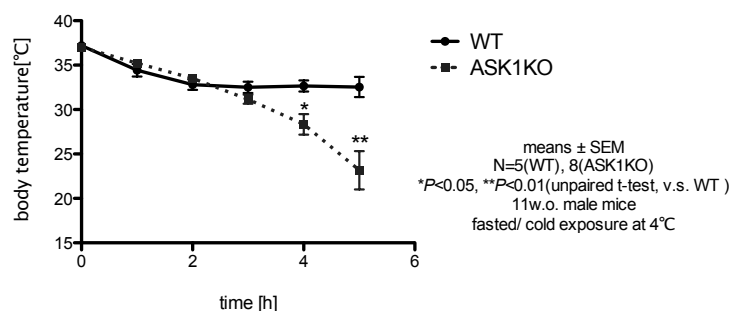


Fig. 4 低温刺激依存的な体温変化

なお、ASK1 欠損マウスの糖質および脂質の体内蓄積量に関しては、通常飼育条件下、および飢餓条件下いずれにおいても野生型との差異は確認されなかった。そのため、エネルギー貯蔵能の差異が ASK1 欠損マウスにおける低温刺激脆弱性の原因ではないと考えられる。

## 7. ASK1 欠損マウスの白色脂肪組織においても Ucp1 の発現誘導が抑制されている。

最近、高脂肪食負荷などの刺激によって白色脂肪組織内に Ucp1<sup>+</sup> な「褐色脂肪様細胞」が誘導されるという現象が注目を浴びている。その「褐色脂肪様細胞」は褐色脂肪細胞と同様にエネルギーを消費する機能を持っていると考えられている。野生型マウスにおいては高脂肪食負荷依存的に Ucp1 の発現量増加が観察されるが、ASK1 欠損マウスにおいては顕著に抑制されていた (Fig. 5A)。

さらに、高脂肪食負荷後の白色脂肪組織重量比の値は ASK1 欠損マウスにおいて有意に上昇していた (Fig. 5B)。これらの結果は、高脂肪食負荷依存的な「褐色脂肪様細胞」の誘導が ASK1 欠損マウスにおいて抑制されているが故に、「褐色脂肪様細胞」依存的なエネルギー消費が抑制され、脂肪組織重量が高くなってしまったものと考えられる。

### 【まとめ】

未成熟な褐色脂肪細胞内において、PKA-ASK1-p38 シグナルが活性化されることによって、熱産生を担う Ucp1 の発現を誘導し、成熟した褐色脂肪細胞の形成が導かれることが本研究により明らかとなった。これまでの報告において、Ucp1 の発現誘導に対して PKA および p38 が関与していることは示唆されていたが、その PKA 経路と MAPK 経路とのシグナル伝達経路のつながりを明らかにしたのは、本研究が初めてである。また、この経路依存的に Ucp1 発現陽性 (Ucp1<sup>+</sup>) な成熟褐色脂肪細胞が作られることが、低温刺激に対抗して体温を維持することに寄与していることが示唆された (Fig. 6)。

冒頭に述べたように、活性のある褐色脂肪細胞の増加が抗肥満効果をもたらすという説に則ると、未成熟な褐色脂肪細胞内の ASK1 を活性化させることによって Ucp1 の発現を伴う褐色脂肪細胞の成熟化を促し、抗肥満効果をもたらされることが期待される。また、白色脂肪組織における Ucp1<sup>+</sup> な細胞の誘導に対しても ASK1 が寄与していることを本研究において明らかとした (Fig. 6)。これらの結果から、褐色脂肪組織のみならず白色脂肪組織内の Ucp1<sup>+</sup> な細胞の成熟に対しても類似した ASK1 経路が寄与している可能性があり、双方の脂肪組織において ASK1 を活性化させることで相乗的な抗肥満効果をもたらす可能性があると考えている。これらの事実からも、ASK1 が新たな抗肥満薬創出のための重要なターゲットになることを期待している。

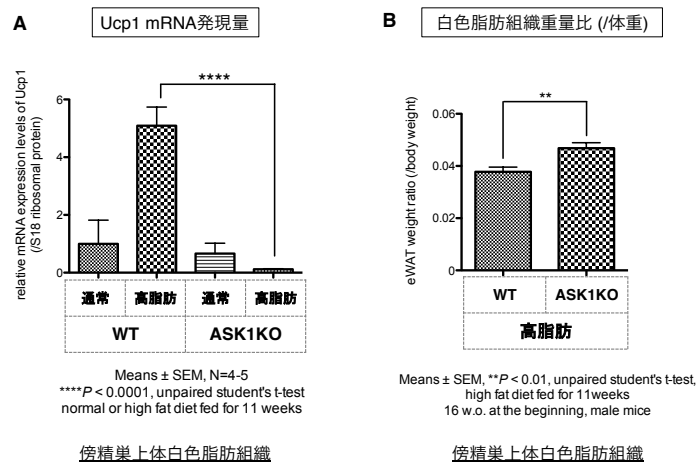


Fig. 5 高脂肪食負荷依存的な白色脂肪組織内におけるUcp1発現誘導 (A) および高脂肪食負荷後の白色脂肪組織重量比 (B)

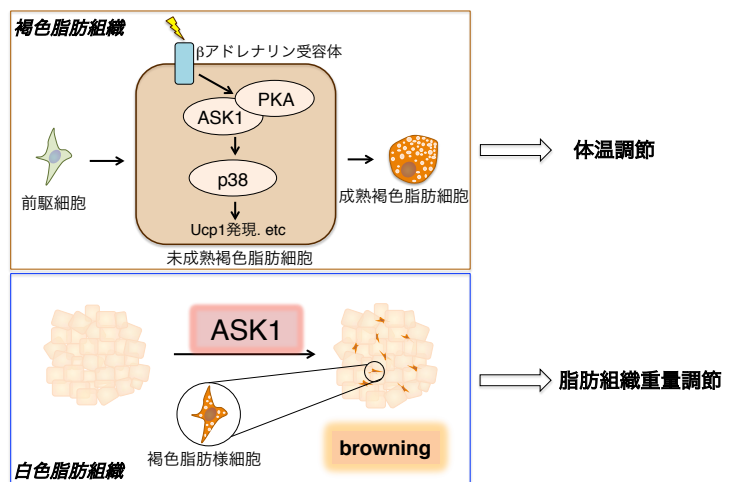


Fig. 6 モデル図