

氏名（本籍） ほしの しゅん すけ 星 野 駿 介（東京都）
学位の種類 博士（薬科学）
学位記番号 甲第34号
学位授与の日付 2020年3月17日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
学位論文題目 E3 ユビキチンリガーゼ WWP1 が脂肪細胞
機能に及ぼす影響の検討

論文審査委員 （主査）教授 樋上 賀一
教授 内海 文彰 准教授 早田 匡芳
教授 斎藤 顕宜 准教授 吉澤 一巳

論文内容の要旨

現在、世界人口の3分の1が肥満や過体重状態とされ、これらは心・脳血管疾患、がん、2型糖尿病等の生活習慣病の発症原因となっている。内蔵型肥満に端を発し、高血糖・高血圧・高脂血症の併発により動脈硬化性疾患の発症リスクを高める病態は「メタボリックシンドローム」と呼ばれ、我が国では予備軍を含め40～74歳の4～5人に1人が該当するとされる。このような背景から、肥満症及び肥満関連疾患の予防のための研究が求められる。肥満病態の主要な組織がWAT(white adipose tissue)である。WATはエネルギー貯蔵だけではなく、アディポネクチン、レプチン、炎症性サイトカイン等の多様なアディポカインを分泌する働きも報告されている。アディポネクチンは肝臓や骨格筋の脂肪酸利用を促進し、脂質減少、インスリン抵抗性改善、糖新生抑制に関与する。脂肪細胞の肥大化に伴い放出されるレプチンは、視床下部にあるレプチン受容体に作用して強力な食欲抑制やエネルギー消費亢進に繋がる。肥満症患者のWATにおける成熟脂肪細胞の肥大化は、アディポネクチン産生及びレプチン感受性の低下を誘発し、糖・脂質代謝異常に繋がる。さらに、肥大化した成熟脂肪細胞から分泌される多様な炎症性サイトカインや遊離脂肪酸はインスリン抵抗性を惹起し、2型糖尿病、脂質異常症、脂肪肝等の肥満関連疾患を誘発する。

肥満症脂肪組織は強い酸化ストレスに曝される。高酸化ストレス状態は、ROS(reactive oxygen species)による酸化反応とそれを消去する抗酸化作用のバランスが崩れることで生じる。ROSは生体内のミトコンドリア電子伝達系で90%が生成される非常に反応性の高い分子種である。過剰なROS存在下ではタンパク質、脂質、DNA等生体構成分子と反応して構造を変化させ、様々な細胞機能を障害する。実際、肥満患者の脂肪組織ではROS量や酸化

的損傷マーカーが増加している。

ミトコンドリアは、 β 酸化やTCA サイクル、酸化的リン酸化を介して代謝臓器のエネルギー代謝で中心的役割を果たす。ミトコンドリア数や酵素活性の低下はインスリン抵抗性を惹起するとされる。実際、肥大化した脂肪組織ではミトコンドリアが減少する報告があり、ミトコンドリア依存的な代謝能の低下が 2 型糖尿病併発の一因とされる。よって、脂肪細胞のミトコンドリア数及び酵素活性の維持は、肥満症の治療戦略上重要である。

癌抑制遺伝子 p53 は、栄養飢餓に伴う AMPK 活性化やインスリンシグナル亢進による Akt 活性化に応答して安定化する報告から、代謝との関係が示唆され、近年 WAT でも関与が明らかになった。肥満モデル動物である leptin 遺伝子変異(*ob/ob*)マウスの WAT では、p53 タンパク質の発現増加を介して SREBP-1 の発現量が減少し、過度な脂質合成を抑制する。一方、2 型糖尿病モデルマウスの WAT では p53 依存的に細胞老化シグナルが活性化し、悪玉アディポカインと炎症性細胞の浸潤が生じる。このように、脂肪細胞での p53 の役割は複雑である。その理由として、p53 の機能が発現量だけではなく、リン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化等の翻訳後修飾で制御されると考えた。ユビキチン化は、標的タンパク質のリジン残基に 7.6 kDa 程のユビキチンタンパク質を結合させ、その過程には E1(ユビキチン活性化酵素)、E2(ユビキチン結合酵素)、E3(ユビキチンリガーゼ)の 3 種の酵素群がある。中でも E3 ユビキチンリガーゼはユビキチン化の基質特異性に重要な酵素である。p53 を標的とする E3 ユビキチンリガーゼは、p53 タンパク質の分解や細胞内局在変化を介して機能を制御する。よって、肥満症脂肪組織の病態解明には、p53 を制御する E3 ユビキチンリガーゼを同定及びその機能解析が重要と考えた。

第 1 章では、p53 を標的とする肥満誘導性 E3 ユビキチンリガーゼを解析した。初めに、p53 をユビキチン化する 17 種類の E3 ユビキチンリガーゼについて、p53 欠損型及び野生型肥満マウスの WAT、肝臓、脾臓の mRNA 発現量を解析した。その結果、HFD(High fat diet) 摂餌した野生型マウスの WAT で発現量が増加し、p53 欠損型マウスで変化しない E3 ユビキチンリガーゼとして *Wwp1* を同定した。ND(Normal diet)を摂餌させた後 X 線照射で p53 を活性化させた p53 野生型マウスの WAT では *Wwp1* の mRNA 発現量は変化せず、WAT における *Wwp1* は肥満誘導性の E3 ユビキチンリガーゼであると考えた。実際、HFD 摂餌で肥満を誘導した C57BL/6 マウスや *fa/fa* Zucker ラットの WAT でも、*Wwp1* の mRNA 発現量が増加した。続いて当研究室で作製した WWP1 抗体を用いて、p53 欠損型及び野生型肥満マウスの WAT でタンパク質発現量を解析した結果、mRNA と同様の変化を示した。以上より、WWP1 が p53 を標的とし、WAT 選択的かつ肥満で発現量が増加する E3 ユビキチンリガーゼとして同定された。WWP1 は N 末端側に C2 ドメイン、C 末端に HECT ドメイン、その間に 4 つの WW ドメインを持つ E3 ユビキチンリガーゼである。C2 ドメインは細胞内局在や活性化に、WW ドメインは基質タンパク質の認識に、HECT ドメインはユビキチン化活性に関連する。

第 2 章では、脂肪細胞における WWP1 の機能解析を、*in vitro* で解析した。脂肪細胞における WWP1 の標的を探索するため、レトロウイルスベクターを用いて脂肪前駆細胞 3T3-L1 WWP1 過剰発現株(WWP1 OE)およびノックダウン株(WWP1 KD)を作製した。それらを成熟

脂肪細胞へと分化させ、抽出タンパク質を二次元電気泳動法によって分離した。発現変動があったスポットから得たペプチド断片を LC-MS/MS で網羅的に解析した結果、抗酸化及びストレス応答関連因子が WWP1 発現量と相関、多数のミトコンドリア関連タンパク質発現量が逆相関していた。次に WWP1 と酸化ストレスの関係に着目し、成熟脂肪細胞へと分化させた 3T3-L1/WWP1 OE 株及び KD 株に、パラコート又はパルミチン酸処理で ROS 産生を誘導し、細胞内とミトコンドリア内の ROS 量を測定した。その結果、WWP1 OE 株で ROS 量が減少、KD 株で増加し、プロテオーム解析の結果を裏付けた。また、成熟脂肪細胞におけるミトコンドリアの最大呼吸活性を測定したところ、WWP1 KD 株で低下した。以上より、成熟脂肪細胞では WWP1 がミトコンドリア由来の ROS を抑制し、ミトコンドリア機能維持に寄与することを明らかにした。

第 3 章では、*Wwp1* KO マウスを用いて WWP1 が肥満症脂肪組織に及ぼす影響を解析した。HFD 摂餌期間を 4、8、18 週間の各群に分けたマウスの WAT で WWP1 タンパク質発現量を解析した結果、8、18 週間 HFD 摂餌マウスで増加した。そこで、*Wwp1* KO マウスで HFD 摂餌期間を 8、18 週間の 2 群に分け、解析した。採取した臓器重量は、18 週間 HFD 摂餌させた *Wwp1* KO マウスで肝重量が増加した。さらに組織学的解析で、18 週間 HFD 摂餌させた *Wwp1* KO マウスで WAT の組織線維化や肝臓の脂肪蓄積の増加が認められ、WAT の機能異常が示唆された。グルタチオン量と過酸化脂質のバイオマーカーである 4-ヒドロキシノネナールを指標に酸化ストレスレベルを解析した結果、肥満症 *Wwp1* KO マウスの WAT で抗酸化能低下と酸化ストレス増大を示し、*in vitro* の結果を裏付けた。次に、*Wwp1* 欠損に伴う脂肪組織のミトコンドリア量や機能への影響を解析した。その結果、ミトコンドリアの ATP 産生律速酵素であるクエン酸合成酵素とミトコンドリア量が、肥満症 *Wwp1* KO マウスの WAT で低下した。肥満時に酸化ストレスが増大するとインスリン抵抗性が生じるため、インスリンシグナル経路の中心的役割を担う Akt のリン酸化レベルを評価した。その結果、肥満症 *Wwp1* KO マウスでリン酸化 Akt の割合が低下し、インスリンシグナルの低下が示された。以上より、肥満症脂肪組織で誘導される WWP1 は酸化ストレス増大を介した肥満関連病態から脂肪細胞を保護し、その機能維持に関わることを示唆した。

第 4 章では、脂肪細胞で WWP1 の切断体を同定し、成熟脂肪細胞での発現を解析した。脂肪細胞内の WWP1 の局在や標的タンパク質同定のため、マウス *Wwp1* mRNA の 5'末端又は 3'末端に flag タグをコードした pMXs-Flag-mouse *Wwp1*-puro 及び pMXs-mouse *Wwp1*-3×Flag-puro レトロウイルスベクターを作製した。これらを用いて脂肪前駆細胞 3T3-L1 / Flag-WWP1 過剰発現株 (Flag-WWP1 OE) 及び WWP1-3×Flag 過剰発現株 (WWP1-3×Flag OE) を作製した。各細胞株で未分化状態の細胞 (Day0) と成熟脂肪細胞へ分化させた細胞 (Day8) を作製し、Mouse IgG 抗体及び Mouse FLAG 抗体を用いた免疫沈降で得たサンプルの WWP1 及び FLAG タンパク質発現を解析した。WWP1 タンパク質はいずれの細胞でも 1 本のバンドが確認できた。FLAG タンパク質は、Flag-WWP1 OE 株では WWP1 と同じ位置に 1 本バンドが確認できた一方、WWP1-3×Flag OE 株では 15kDa ほど下に 2 本目のバンドが確認された。抗体認識部位と Flag コード部位の違いから、脂肪細胞では C2 ドメインが欠損した WWP1 切断体の存在が考えられた。さらに、full length WWP1 に対する切

断体のタンパク質発現量の割合が、成熟脂肪細胞で増加した。以上より、WWP1 切断体の増加が成熟脂肪細胞の表現型に関与することを示唆した。

本研究では、肥満症脂肪組織における p53 とユビキチン化の關係に着目し、解析した。その結果、E3 ユビキチンリガーゼ WWP1 が p53 依存的かつ脂肪組織特異的に肥満時に誘導され、ROS に対して防御的に機能することを明らかにした。ROS 抑制を介し、肥満に伴うミトコンドリア機能やインスリンシグナルの破綻、異所性の脂肪蓄積を防いだと考えられる。これらは、肥満症脂肪組織で WWP1 が酸化ストレスの低減を介して脂肪細胞機能維持の一端を担うことを示している。さらに、細胞内局在や活性化に重要な C2 ドメインを欠損する WWP1 切断体は、正常な full length WWP1 と競合する可能性があり、その増加は脂肪細胞機能を破綻させる可能性が考えられる。よって、WWP1 の切断機構やその機能解明を進めることで、full length WWP1 の安定発現を目的とした新規肥満関連疾患治療薬開発に繋がることが期待される。

論文審査の結果の要旨

肥満症は心・脳血管疾患、がん、2 型糖尿病等の生活習慣病の発症原因となっているため、肥満症脂肪組織の病態の解明が望まれる。肥満症脂肪組織では、がん抑制遺伝子 p53 の活性化が生ずることが報告されているが、この p53 の活性化は肥満病態にとって良い面と悪い面があることが報告されている。申請者は、p53 の両面性は p53 自体の翻訳後修飾、特に E3 ユビキチンリガーゼによるユビキチン化が原因の一つではないかと考えた。

第 1 章では、p53 をユビキチン化すると報告されている 17 種類の E3 ユビキチンリガーゼについて、p53 欠損型及び野生型肥満マウスの WAT、肝臓、脾臓の mRNA 発現量を解析した。その結果、野生型マウスの WAT で HFD (High fat diet) によって発現量が増加し、p53 欠損型マウスで変化せず、X 線照射でも発現が増加しない肥満症特異的かつ脂肪組織選択的に発現が増加する E3 ユビキチンリガーゼとして Wwp1 を同定した。

第 2 章では、脂肪細胞における WWP1 の機能を、in vitro で解析した。脂肪細胞における WWP1 の標的を探索するため、レトロウイルスベクターを用いて脂肪前駆細胞 3T3-L1 / WWP1 過剰発現株(WWP1 OE)およびノックダウン株(WWP1 KD)を作製した。それらを成熟脂肪細胞へと分化させ、抽出タンパク質を二次元電気泳動法によって分離した。その後、発現変動があったスポットから得たペプチド断片を LC-MS/MS で網羅的に解析した。その結果、抗酸化及びストレス応答関連因子が WWP1 発現量と相関、多数のミトコンドリア関連タンパク質発現量が逆相関することを明らかにした。また、

成熟脂肪細胞へと分化させた 3T3-L1/WWP1 OE 株及び KD 株に、パラコート又はパルミチン酸処理で ROS 産生を誘導し、細胞内とミトコンドリア内の ROS 量を測定した。すると、WWP1 OE 株で ROS 量が減少、KD 株で増加した。また、成熟脂肪細胞におけ

るミトコンドリアの最大呼吸活性を測定したところ、WWP1 KD 株で低下した。以上より、成熟脂肪細胞では WWP1 がミトコンドリア由来の ROS を抑制し、ミトコンドリア機能維持に寄与することが明らかとなった。

第 3 章では、Wwp1 KO マウスを用いて WWP1 が肥満症脂肪組織に及ぼす影響を解析した。WAT での WWP1 タンパク質発現は 4 週間の HFD 摂餌では増加せず、8 週間の HFD 摂餌から増加した。そこで、HFD 摂餌期間が 8 週間の Wwp1 KO マウスと野生型マウスで比較した。また、肥満症 Wwp1 KO マウスの WAT で抗酸化能低下と酸化ストレス増大を示し、*in vitro* の結果を裏付けた。また、肥満症 Wwp1 KO マウスの WAT では、ミトコンドリア TCA 回路律速酵素であるクエン酸合成酵素活性とミトコンドリア量が低下した。さらに、肥満症 Wwp1 KO マウスの WAT ではインスリンシグナル活性化の指標であるリン酸化 Akt の割合が低下し、血中インスリンレベルは低下したものの、血糖値は増加しなかった。一方、全身的な耐糖能は改善した。以上から、肥満症 WWP1 の欠損は、WAT での酸化ストレスやミトコンドリア機能には負に働くものの、少なくとも精巣周囲 WAT のインスリンシグナルへは大きな影響を与えず、全身的な糖代謝は改善する方向に働くと考えられた。

第 4 章では、脂肪細胞内での WWP1 の局在や標的タンパク質同定を目的に、マウス Wwp1 mRNA の 5' 末端又は 3' 末端に flag タグをコードした pMXs-Flag-mouse Wwp1-puro 及び pMXs-mouse Wwp1-3×Flag-puro レトロウイルスベクターを構築した。これらを用いて脂肪前駆細胞 3T3-L1 / Flag-WWP1 過剰発現株 (Flag-WWP1 OE) 及び WWP1-3×Flag 過剰発現株 (WWP1-3×Flag OE) を作製した。各細胞株のタンパク質抽出サンプルから Mouse 抗 FLAG 抗体による免疫沈降で得たサンプルを用いて、WWP1/FLAG 融合タンパク質発現を解析した。その結果、脂肪細胞では N 末側の C2 ドメインを欠損した切断体の存在し、脂肪細胞の分化に伴い切断体の割合が増加する可能性を示した。

本研究では、肥満症脂肪組織における p53 とユビキチン化の関係に着目し、肥満関連 E3 ユビキチンリガーゼとして WWP1 を同定し、*in vitro*、*in vivo* でその機能を解析した。WWP1 の標的タンパク質は結果的には見つけることはできていないが、新たな肥満症治療薬や糖尿病治療戦略の開発に繋がる研究であり、博士 (薬科学) の学位として十分に価値あるものと認められる。