

タンパク質分解経路を標的とした脂肪肝治療法の開発

東北大学大学院歯学研究科先端再生医学研究センター
犬塚 博之

1. はじめに

緒言：近年の食生活の欧米化に伴う過度のカロリー摂取やライフスタイルの変化、運動不足などの要因により、体重増加や肥満といった問題が顕在化している。世界的な肥満症の増加は、内臓脂肪蓄積型肥満のほか、高血圧、脂質異常症、高血糖などの複合的な兆候を呈するメタボリック症候群の蔓延を誘起している。メタボリック症候群は、先進国において最も頻度の高い肝疾患とされる非アルコール性脂肪性肝疾患（Non-alcoholic Fatty Liver Disease: NAFLD）の引き金となっており、メタボリック症候群が深刻化している米国では、すでに3人に1人が潜在的なNAFLDである可能性が指摘されている。また、それらNAFLDの30%は、非アルコール性脂肪肝炎（Non-alcoholic Steatohepatitis: NASH）を罹患するとも言われており、NASHが進行すると、肝硬変から肝不全、そして最終的には悪性腫瘍である肝細胞癌の発症につながる。NAFLDやNASHの罹患率の増加がもたらす影響が今後ますます増大していくことが予想されることから、これら肝疾患の発症分子機序解明ならびに治療法の開発が期待されている。

目的：我々は、メタボリック症候群に伴う肝疾患の治療・発症予防のためには、肝脂質合成経路の人為的遮断が重要であると考え、ユビキチン-プロテアソーム経路（UPS: Ubiquitin Proteasome System）関連分子の調節に着目した。UPSは、不要タンパク質の除去のみならず、様々なシグナル伝達分子の活性調節を介して、細胞周期、細胞分化、免疫、エネルギー代謝など多様な生体機能の制御を司っている。本申請では、UPS関連因子の中でも特に、SCF（Skp1-Cullin1-F-box protein）型E3ユビキチンリガーゼ複合体SCF^{β-TRCP}の機能に着目した。β-TRCPを基質受容体サブユニットとして包有するSCF^{β-TRCP}は、基質に対し、リン酸化修飾を受けたコンセンサスな結合配列（リン酸化デグロン）を認識して結合後、基質分子にポリユビキチン鎖を付加することにより、それらをプロテアソーム依存的な分解に導く。我々が最近行ったβ-TRCP基質の網羅的な探索から、脂質代謝調節分子Lipin1が基質候補として同定されたことから、本申請では、β-TRCP・Lipin1経路による脂質代謝調節の分子メカニズムを解明し、同経路の制御によるNASH治療法の開発に貢献することを主要な目的とした。

背景：Lipin1は全身脂肪萎縮症マウス（Fatty liver dystrophy, fldマウス）の原因遺伝子として同定された。Lipin1は脂質代謝に重要な機能を有しており、肝臓組織において脂質合成のマスターレギュレーター転写因子であるSREBPの転写活性化能を抑制するほか、転写共役因子としてPPARαやPGC1αなどと共に脂肪酸酸化に関与する遺伝子群の発現を誘導している。これらの知見から、Lipin1は肝細胞での脂質代謝恒常性維持に必須であると考えられているが、Lipin1タンパク質安定性制御に関する知見は未だ得られていない。本研究により、肝脂肪合成経路でのLipin1のプロテアソーム依存的な分解調節の役割が明らかとなれば、NASH発症分子機序解明への有力な手がかりとなることが期待される。

序論：SCF^{β-TRCP}ユビキチンリガーゼ複合体のさらなる生理機能解明を目的として、β-TRCPリン酸化デグロン配列を有する分子を網羅的に探索する新規プロテオミクス解析法を開発し、Lipin1をβ-TRCP基質候

補分子として同定した。さらに、高脂肪食摂取後に野生型マウスで観察される脂肪肝が、 β -TRCPノックアウトマウス (β -TRCP^{-/-}) で有意に抑制される事実を合わせて見出した。SCF ^{β -TRCP}・Lipin1経路の詳細な分子制御機構を解明することが出来れば、脂質合成の効率的な抑制とNASH治療法の開発に役立つ知見が得られると考え、解析を行なった。

2. 方法

β -TRCPによるLipin1量的制御機構とその脂質合成経路への関与を明らかとするため、下記実験系をデザインし施行した。

(1) β -TRCPのLipin1結合を誘導するリン酸化酵素の同定：SCF ^{β -TRCP}のLipin1タンパク質への結合には、Lipin1配列中に存在する β -TRCPデグロンのリン酸化が必須である。Lipin1のデグロンリン酸化酵素同定のため、各種リン酸化酵素発現プラスミドの293T細胞への導入、さらに内在性リン酸化酵素のノックダウンを行い、Lipin1タンパク質量の変化とLipin1タンパク質半減期に影響がないか観察を行う。

(2) β -TRCP依存的なLipin1ポリユビキチン化の分子機構の解析：Lipin1の野生型とデグロン配列変異型の組換えタンパク質をそれぞれ精製してリン酸化酵素処理したのち、*In vitro*でのLipin1と β -TRCPの結合実験ならびにポリユビキチン化実験を行う。これらの解析により、 β -TRCPがLipin1リン酸化デグロン配列に結合してLipin1ポリユビキチン化を行うことの直接的な証明を行う。

(3) β -TRCP・Lipin1経路とSREBP脂質合成経路のクロストークの解析： β -TRCPノックダウンNIH-3T3細胞に、Lipin1の野生型と、 β -TRCPにより分解を受けない安定化型デグロン配列変異体Lipin1を安定発現させ、SREBP結合エレメントをルシフェラーゼ遺伝子に連結させたレポーター遺伝子を用いてSREBP活性の計測を行う。また、SREBP下流標的遺伝子のmRNA発現量を定量することで、同様にLipin1を介したSREBP転写活性変化を数値化する。さらに、ヒト肝細胞株HepG2で内在性 β -TRCPとLipin1をノックダウンし、SREBP下流標的遺伝子のmRNA発現量の定量、および細胞内トリグリセリド含量の測定を行う。

(4) mTORC1によるLipin1リン酸化がLipin1分解に及ぼす影響の解析：Lipin1は、mTORC1からリン酸化を受けることで、その機能が抑制されることが報告されている。このことから、mTORC1依存的なLipin1リン酸化が β -TRCPを介したLipin1分解に寄与しているのではないかと仮説を立て、その可能性を検討した。方法として、mTORC1によるリン酸化部位全てをアラニン残基に置換したLipin1変異体の解析と、mTORC1特異的阻害剤Torinを用いた解析により、mTORC1によるLipin1リン酸化が、リン酸化酵素CK1によるLipin1デグロンリン酸化と、Lipin1タンパク質不安定化の促進に寄与しているか解析を行う。

3. 結果 研究成果

(1) β -TRCPのLipin1結合を誘導するリン酸化酵素の同定：これまでに β -TRCPデグロン配列をリン酸化することが報告されている各種リン酸化酵素(CK1 $\alpha/\delta/\epsilon$ 、S6K、GSK3 β 、CK2)を293T細胞に過剰発現させたところ、CK1 ϵ 過剰発現細胞内においてLipin1タンパク質の明らかな減少が認められた。この結果と一致してCK1 ϵ の過剰発現に伴いLipin1タンパク質半減期が短縮し、CK1 ϵ をノックダウンした細胞においてLipin1半減期の延長が確認された。また、293T細胞へのCK1阻害剤投与により細胞内でのLipin1ポリユビキチン化の減少が観察された。

(2) β -TRCP依存的なLipin1ポリユビキチン化の分子機構の解析：*In vitro*解析系でリコンビナントタンパ

ク質を用いたLipin1と β -TRCPの間の直接的な相互作用の解析を行った。*In vitro*結合実験において、 β -TRCPは、CK1によりデグロンリン酸化修飾を受けたLipin1にのみ結合し、デグロン配列変異体Lipin1には結合しなかった。これと一致して、*In vitro*ポリユビキチン化実験においても、 β -TRCPに依存的なポリユビキチン鎖の付加が、リン酸化を受けた野生型Lipin1で観察されたが、リン酸化を受けることが出来ず β -TRCPに結合できないデグロン変異体Lipin1では、 β -TRCPによるポリユビキチン化が大きく減少した。これらの結果から、 β -TRCPが、CK1によるリン酸化を介してLipin1リン酸化デグロン配列に直接結合することで、Lipin1へポリユビキチン鎖を付加することを証明した。

(3) β -TRCP・Lipin1経路とSREBP脂質合成経路のクロストークの解析： β -TRCPノックダウンNIH-3T3細胞でLipin1野生型を過剰発現させると、 β -TRCPノックダウンに依存的なLipin1細胞内蓄積とそれに伴うSREBP転写活性の低下が観察された。対して、デグロン配列に変異を導入したLipin1安定化型変異体発現細胞では、 β -TRCPノックダウンの有無に関わらず変異型Lipin1の恒常的な安定化とSREBP転写活性の有意な低下が観察された。さらに、ヒト肝細胞株HepG2で内在性 β -TRCPをノックダウンしたところ、Lipin1の細胞内蓄積とSREBP活性低下が見られたのに対し、 β -TRCPとLipin1のダブルノックダウンによりSREBPの転写活性化能が有意に回復した。さらにこれらHepG2細胞株を用いて細胞内トリグリセリド含量を測定したところ、SREBPの転写活性化と細胞内トリグリセリド含量に明らかな正の相関が見られた。これらのことから、 β -TRCPがLipin1の分解を介して、細胞内脂質合成を促進していることを証明することが出来た。

(4) mTORC1によるLipin1リン酸化がLipin1分解に及ぼす影響の解析：Lipin1がmTORC1によるリン酸化を介して機能抑制を受けることから、 β -TRCPによるLipin1安定化調節にmTORC1のリン酸化が関与している可能性について検討を行なった。mTORC1のリン酸化部位全てに変異を導入したLipin1変異体では、野生型と比較してCK1依存的なデグロンリン酸化の減衰、 β -TRCP・Lipin1間での結合の解離が観察された。mTORC1特異的阻害剤Torin処理細胞において、同様にLipin1デグロンリン酸化の減衰と β -TRCP・Lipin1間の結合解離、そしてLipin1タンパク質半減期の延長がみられた。このことから、CK1と β -TRCPに依存的なLipin1タンパク質の分解には、mTORC1によるLipin1タンパク質のリン酸化が必要であることが確認された。

4. 考察 まとめ

以上の解析により、mTORC1によるLipin1のリン酸化が、CK1によるLipin1のデグロンリン酸化を促進し、さらにmTORC1とCK1によるLipin1リン酸化が、 β -TRCPのLipin1への結合とユビキチン化を誘導して、Lipin1タンパク質を分解に導く分子機構が明らかとなった。さらに、SCF ^{β -TRCP}が肝臓細胞で脂質代謝関連分子Lipin1の分解を介して、脂質合成を促進していることを見出した。これらの知見から、CK1阻害剤およびmTORC1阻害剤の投与がLipin1タンパク質安定化とそれに伴う肝臓脂肪合成抑制に有効である可能性が示唆された。さらに、脂質合成促進因子としての β -TRCPの機能を明らかにしたことから、 β -TRCP阻害剤を開発することで、特異性の高いNASH治療戦略の構築が可能になることが考えられる。

5. 発表論文

Shimizu K[#], Fukushima H[#], Ogura K, Lien EC, Nihira NT, Zhang J, North BJ, Guo A, Nagashima K, Nakagawa T, Hoshikawa S, Watahiki A, Okabe K, Yamada A, Toker A, Asara JM, Fukumoto S, Nakayama KI, Nakayama K, Inuzuka H*, Wei W* (* corresponding authors). The SCF ^{β -TRCP} E3 ubiquitin ligase complex targets Lipin1 for ubiquitination and degradation to promote hepatic lipogenesis. *Science Signaling*. 10, eaah4117 (2017)