

## 27. 褐色脂肪細胞の小胞体を起点とするエネルギー代謝機構

今泉 和則

広島大学 大学院医歯薬保健学研究院 分子細胞情報学

Key words : 小胞体ストレス応答, 褐色脂肪細胞, IRE1  $\alpha$ , UCP1,  $\beta$ 3 アドレナリン受容体シグナル

### 緒言

小胞体はタンパク質の折り畳み・修飾または脂質合成を行う細胞内小器官である。細胞が様々な異常環境に曝されると、小胞体内腔に正しい立体構造を取らない異常タンパク質が蓄積する。このような状態を小胞体ストレスと呼び、小胞体ストレスが発生すると、小胞体膜上に存在する小胞体ストレスセンサーが活性化してシグナルを発信し、小胞体ストレスを緩和するような細胞応答を引き起こす（小胞体ストレス応答（Unfolded Protein Response: UPR）<sup>1)</sup>）。最近の研究から UPR シグナルは小胞体ストレス以外にも発信されており、細胞の分化や増殖、エネルギー代謝などの生理機能制御と深く関わることを示唆されている。生体のエネルギー代謝に寄与する組織の一つに褐色脂肪組織がある。褐色脂肪組織には、寒冷環境における体温低下の防止や、生体内の過剰エネルギーを消費するために、熱を産生する機能を持っている<sup>2)</sup>。熱産生機能は、褐色脂肪細胞特異的に発現するタンパク質 UCP1 が担っており、熱産生の必要性を褐色脂肪細胞が感知すると UCP1 の発現量が増加して熱産生機能が亢進する。褐色脂肪細胞の機能が生体のエネルギー恒常性維持において非常に重要であることから、熱産生機能制御の上で UPR が重要な役割を担っている可能性が高いが、褐色脂肪細胞における UPR の役割はこれまでに明らかにされていない。そこで本研究では、褐色脂肪細胞の熱産生機能制御における UPR の役割を明らかにすべく解析を行った。

### 方法および結果

#### 1. 褐色脂肪細胞の *Ucp1* 転写誘導において IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路が活性化している

褐色脂肪細胞が熱産生機能を亢進する時の UPR シグナルについて検討した。野生型マウスを 4 °C 環境に 24 時間置いた後、褐色脂肪組織を摘出して遺伝子発現を調べた。その結果、*Ucp1* の発現量が室温 (28 °C) に置いたマウスより有意に増加しており、褐色脂肪細胞が熱産生機能を亢進していることが確認できた。この時、UPR 活性化のマーカーとなる *Bip* や *Xbp1* スプライドフォームの発現量を調べた。その結果、いずれも有意に増加しており、UPR シグナルが発信されていることが示唆された。この結果について更に詳細に検討するために、初代培養した褐色脂肪細胞を使用して実験を行った。生体が寒冷環境に曝されると、交感神経からノルアドレナリンが放出され、これを褐色脂肪細胞上の  $\beta$ 3 アドレナリン受容体 ( $\beta$ 3-AR) が受容すると、*Ucp1* の転写が誘導される。 $\beta$ 3-AR アゴニスト CL 316,243 を用いて褐色脂肪細胞を刺激すると、培養上で寒冷暴露に対する応答を再現することができる<sup>2)</sup>。CL 316,243 刺激後、経時的に遺伝子の発現量を解析した結果、*Ucp1* の一過的な増加と同調して、*Xbp1* スプライドフォームが増加した (図 1)。また、*Xbp1* mRNA の細胞質スプライシングを行う小胞体ストレスセンサー IRE1  $\alpha$  のリン酸化フォームの量が CL 316,243 刺激によって一過的に増加しており、活性化していた。以上の結果から、褐色脂肪細胞において *Ucp1* の転写が誘導される時、UPR シグナルが発信されており、特に IRE1  $\alpha$ -XBP1 経路に関連していることが示唆された。

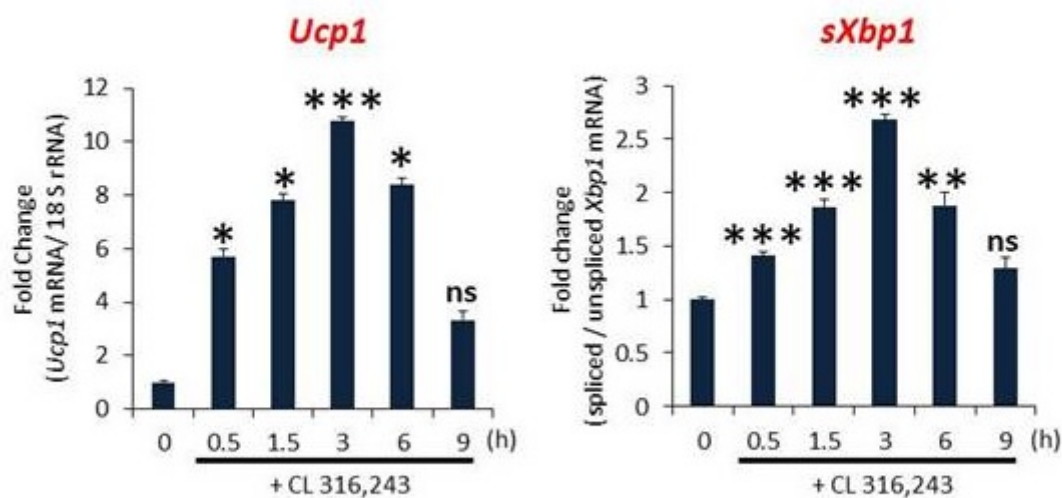


図1. CL 316,243 刺激による *Ucp1* 及び *Xbp1* スプライドフォーム mRNA 量の変化

(A)  $\beta$ 3-AR アゴニスト CL 316,243 刺激した褐色脂肪細胞における、リアルタイム PCR を用いた *Ucp1* の経時的発現解析結果。(B) RT-PCR による同一サンプルにおける *Xbp1* mRNA のスプライシングレベル解析結果。*Ucp1* の発現変化と同調して *Xbp1* スプライドフォームが一過的に増加する。Error bar: SD, n = 4, ns: not significant, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, vs without treatment, Student's t-test.

## 2. *Ucp1* 転写誘導において IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路は必要であるが、小胞体ストレス非依存的に活性化する

次に、IRE1  $\alpha$ -XBP1 経路の *Ucp1* 転写誘導への必要性について検討した。IRE1  $\alpha$  のヌクレアーゼドメインを選択的に阻害する化合物 4 $\mu$ 8C を使用して *Xbp1* のスプライシングを阻害し、CL 316,243 刺激に対する褐色脂肪細胞の応答を解析した。その結果、4 $\mu$ 8C 処理を行うと、CL 316,243 刺激によって誘導される *Ucp1* の転写誘導が有意に抑制された。UPR シグナルである IRE1  $\alpha$ -XBP1 経路は小胞体ストレスによって活性化する。次に、小胞体ストレスによって IRE1  $\alpha$ -XBP1 経路を活性化させた時の *Ucp1* 転写誘導について検討した。小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンを様々な濃度で褐色脂肪細胞に処理すると、全ての濃度において *Xbp1* mRNA がスプライシングされた。一方、*Ucp1* の発現は全ての濃度において増加しなかった。以上より、IRE1  $\alpha$ -XBP1 経路の活性化は小胞体ストレスとは異なるメカニズムによって行われていることが示唆された。

## 3. *Ucp1* 転写誘導において IRE1 $\alpha$ -XBP1 経路は PKA 依存的に活性化する

*Ucp1* 転写誘導における IRE1  $\alpha$ -XBP1 経路の活性化メカニズムを解明するため、 $\beta$ 3-AR 下流分子群に着目した。褐色脂肪細胞ではノルアドレナリンを受容すると細胞質中で PKA が活性化する。続いて活性化した PKA が p38 MAPK をリン酸化する。リン酸化によって活性化した p38 MAPK が ATF2 や PG1  $\alpha$  などの転写因子群をリン酸化・活性化し、*Ucp1* の転写誘導に繋がる<sup>3)</sup>。PKA 阻害剤である H89 を褐色脂肪細胞に処理すると、CL 316,243 刺激による *Ucp1* の転写が誘導されない。興味深いことに、IRE1  $\alpha$  のリン酸化や *Xbp1* mRNA のスプライシングが *Ucp1* の転写と同様に H89 処理によって有意に抑制された。一方、p38 MAPK 阻害剤である SB 203580 を処理すると *Ucp1* の転写誘導が抑制されるにも関わらず、IRE1  $\alpha$  のリン酸化や *Xbp1* mRNA のスプライシングに大きな変化はなかった。

以上の結果から、*Ucp1* 転写誘導における IRE1  $\alpha$ -XBP1 経路の活性化は p38 MAPK ではなく PKA によって制御されていることが明らかとなった。

#### 4. XBP1 スプライドフォームは PKA 活性によって誘導される因子と協調的に働いて *Ucp1* を直接転写誘導する

最後に、転写因子である XBP1 スプライドフォームによる *Ucp1* の転写誘導について検討した。*Ucp1* 遺伝子上流 3.8 kb プロモーター領域を用いてレポーターアッセイを行った。その結果、XBP1 スプライドフォームを生理的レベルで発現させても、レポーター活性は上昇しなかった。しかし、PKA を活性化するフォルスコリン刺激を同時に行うと、フォルスコリン刺激単独よりもレポーター活性が有意に増加した (図 2)。一方、DNA 結合領域を含む bZIP ドメインを欠失した XBP1 スプライドフォームを発現させると、フォルスコリン刺激単独よりも高いレポーター活性は見られなかった (図 2)。以上より、XBP1 スプライドフォームは PKA 活性によって誘導されるその他の因子と協調的に働いて *Ucp1* 転写を直接誘導していることが明らかとなった。

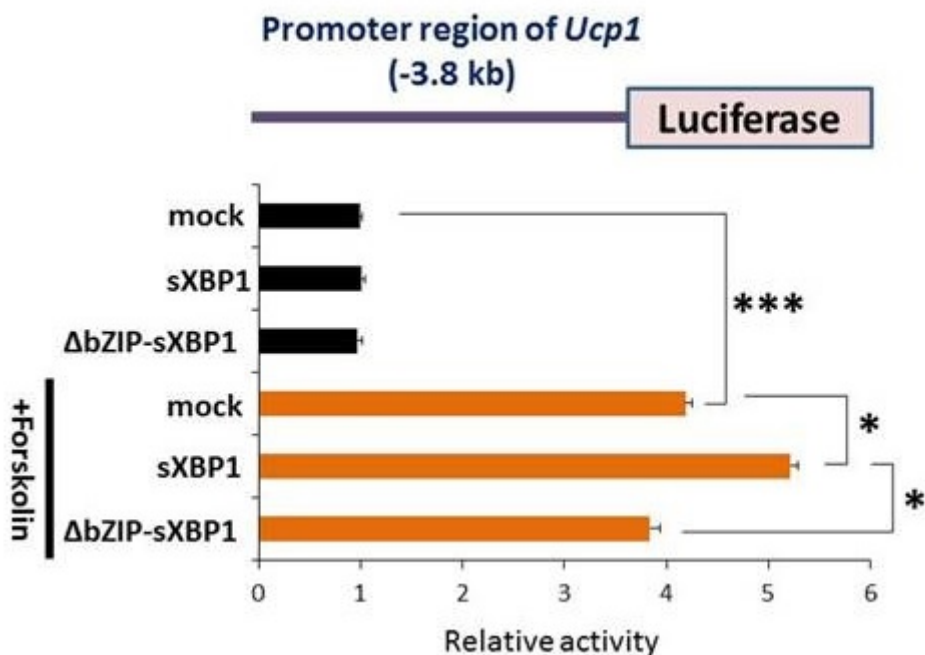


図 2. *Ucp1* プロモーター領域を用いたレポーターアッセイ解析

*Ucp1* 遺伝子上流 3.8 kb プロモーター領域を用いたレポーターアッセイ解析結果。XBP1 スプライドフォーム (sXBP1) を生理的レベルで発現させても、レポーター活性は増加しなかった。PKA を活性化させる Forskolin 刺激を同時に行うと Forskolin 刺激単独のサンプルよりもレポーター活性が大きく増加した。しかし、この増加は DNA 結合領域を含む bZIP ドメインを欠失した sXBP1 ( $\Delta$ bZIP-sXBP1) を発現させると見られなかった。Error bar: SD, n = 6, \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001, Student's t-test.

## 考 察

本研究結果から、褐色脂肪細胞の *Ucp1* 転写誘導において IRE1  $\alpha$ -XBP1 経路が重要であることが明らかとなった。最近、肝細胞において PKA が直接 IRE1  $\alpha$  をリン酸化することが報告されている<sup>4)</sup>。本研究において PKA 阻害剤 H89 によって IRE1  $\alpha$  のリン酸化が抑制されており、褐色脂肪細胞においても同様の機構が存在することが考えられる。一方、小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンを用いて IRE1  $\alpha$ -XBP1 経路を活性化させても *Ucp1* の転写が誘導されなかった。XBP1 は bZIP ファミリー転写因子であり、他の bZIP ファミリー転写因子とヘテロダイマーを形成して標的遺伝子を変えることが知られている<sup>5,6)</sup>。今回、ツニカマイシンによって *Ucp1* 転写が誘導されなかったのは、CL 316,243 処理時と細胞内に存在する転写因子群が異なるためであると推測される。今後、XBP1 のパートナー分子を同定することによって、褐色脂肪細胞の *Ucp1* 転写誘導メカニズムの更なる理解や、褐色脂肪細胞の熱産生機構のより精細な制御へと発展していくことが期待できる。

## 共同研究者

本研究を共同研究者として主に遂行したのは、広島大学大学院医歯薬保健学研究院分子細胞情報学の浅田梨絵である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

## 文 献

- 1) Schröder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 2005; 569(1-2): 29-63. PubMed PMID: 15603751.
- 2) Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004; 84(1):277-359. PubMed PMID: 14715917.
- 3) Cao W, Daniel KW, Robidoux J, Puigserver P, Medvedev AV, Bai X, Floering LM, Spiegelman BM, Collins S. p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(7):3057-67. PubMed PMID: 15024092. PubMed Central PMCID: PMC371122
- 4) Mao T, Shao M, Qiu Y, Huang J, Zhang Y, Song B, Wang Q, Jiang L, Liu Y, Han JD, Cao P, Li J, Gao X, Rui L, Qi L, Li W, Liu Y. PKA phosphorylation couples hepatic inositol-requiring enzyme 1alpha to glucagon signaling in glucose metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(38):15852-7. doi: 10.1073/pnas.1107394108. PubMed PMID: 21911379. PubMed Central PMCID: PMC3179066
- 5) Hai TW, Liu F, Coukos WJ, Green MR. Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers. *Genes Dev* 1989; 3(12B):2083-90. PubMed PMID: 2516827
- 6) Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell* 2007; 13(3):365-76. PubMed PMID: 17765680