

54. Ptprij による摂食・エネルギー代謝制御機構の解明

野田 昌晴

自然科学研究機構 基礎生物学研究所 統合神経生物学研究部門

Key words : RPTP, Ptprij, レプチン, 摂食中枢, 摂食制御

緒言

レプチンは脂肪細胞から分泌されるペプチドホルモンであり、視床下部の摂食中枢に働いて強力に摂食を抑制するとともに、エネルギー消費を増大させる。このようにレプチンは適正な体重を保つため重要なホルモンである。レプチン受容体は、その細胞内領域に非受容体型のプロテインチロシンキナーゼ (PTK) である JAK2 を結合しており、タンパク質のチロシンリン酸化を介して情報伝達を行っている。すなわち、レプチンがレプチン受容体の細胞外領域に結合すると、レプチン受容体に結合している JAK2 は自己リン酸化することで活性化し、レプチン受容体の細胞内領域の特定のチロシン残基をリン酸化する。これらのチロシン残基に STAT3 等の情報伝達分子がリクルートされ活性化されることで、摂食制御やエネルギー代謝調節の情報が伝達されていると考えられている。

我々は、受容体型プロテインチロシンホスファターゼ (RPTP) が、さまざまな受容体型プロテインチロシンキナーゼ (RPTK) を基質とし、その活性化を制御することによって生体内において重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。最近、Ptprib, Ptprih, Ptprij 及び Ptpripro から構成される R3 RPTP サブファミリーが、*in vitro* において、インスリン受容体を基質分子として脱リン酸化し、その活性化を制御することを見出した¹⁾。さらに、Ptprij の遺伝子欠損マウスを用いて、Ptprij が、予想通り、生体内でインスリンシグナルの制御を通して血糖値の制御に働いていることを明らかにした。Ptprij は、動物個体レベルでインスリン受容体の活性化を制御していることが明らかになった、最初の RPTP である。

レプチン受容体はそれ自身が RPTK ではないが、JAK2 と複合体を形成することで、あたかも RPTK として振る舞う。レプチン受容体の活性制御を行う RPTP については、これまで報告がなかった。Ptprij の遺伝子欠損マウスは野生型マウスに比べて低体重であり摂食量も少ないことから、我々は Ptprij がレプチンシグナルの制御に関与している可能性があると推定した。そこで本研究においては、Ptprij によるレプチン受容体の活性制御の実態を明らかにする目的で、培養細胞レベルおよび動物個体レベルの解析を行った。

方法および結果

1. Ptprij 遺伝子欠損マウスの体重および摂食量の解析

Ptprij ヘテロ欠損マウス間の交配から得たホモのオスマウスを用いて、体重および摂食量の詳細な解析を行った。まず、普通食 (日本クレア, CA-1) を自由摂食させて体重および摂食量の測定を行ったところ、Ptprij 遺伝子欠損マウス (KO) の体重および摂食量は野生型マウスに比べて有意に低いことが明らかになった (図 1A)。さらに、高脂肪高シヨ糖食 (オリエンタルバイオ, F2HFHSD) で飼育して体重と摂食量について調べたところ、普通食飼育の場合と同様に、Ptprij 遺伝子欠損マウスの体重および摂食量は野生型マウスに比べて有意に低いことが明らかになった (図 1B)。またコンピュータ断層撮影 (CT) による解析から、Ptprij 遺伝子欠損マウスは野生型マウスに比べて脂肪量が少ないことが分かった (図 2)。以上の結果から、Ptprij 遺伝子欠損マウスは野生型マウスに比べて摂食量が少ないため、肥満になりにくく低体重であると考えられた。通常の飼育状態の Ptprij 遺伝子欠損マウスは、これ以外の点では野生型マウスと同様に健常に見える。

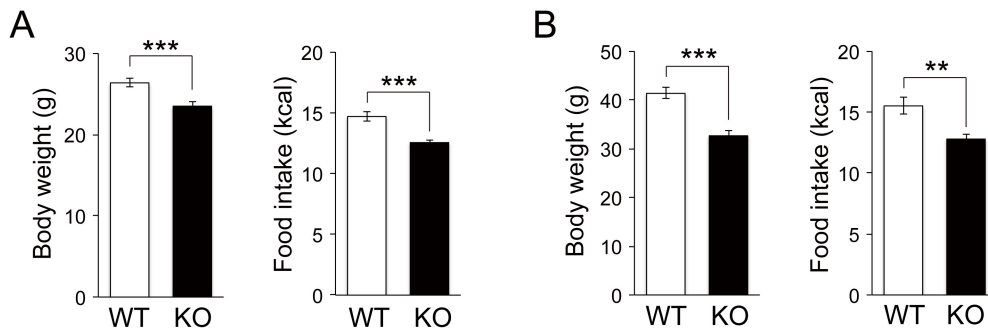


図1. *Ptprij* 遺伝子欠損マウスの体重および摂食量の解析

(A) 普通食飼育における体重および摂食量の解析

普通食で10週間飼育した野生型マウス (WT) 及び *Ptprij* 遺伝子欠損マウス (KO) の体重および1週間の積算摂食量を解析した。*Ptprij* 遺伝子欠損マウスの体重および摂食量は野生型マウスに比べて有意に低いことが明らかになった。それぞれ $n = 11$ 。*** $P < 0.001$ (Student の t 検定)。

(B) 高脂肪高シヨ糖食飼育における体重と摂食量の解析

高脂肪食で10週間飼育した野生型マウス (WT) 及び *Ptprij* 遺伝子欠損マウス (KO) の体重および1週間の積算摂食量を解析した。*Ptprij* 遺伝子欠損マウスの体重および摂食量は野生型マウスに比べて有意に低いことが明らかになった。それぞれ $n = 10$ 。** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ (Student の t 検定)。

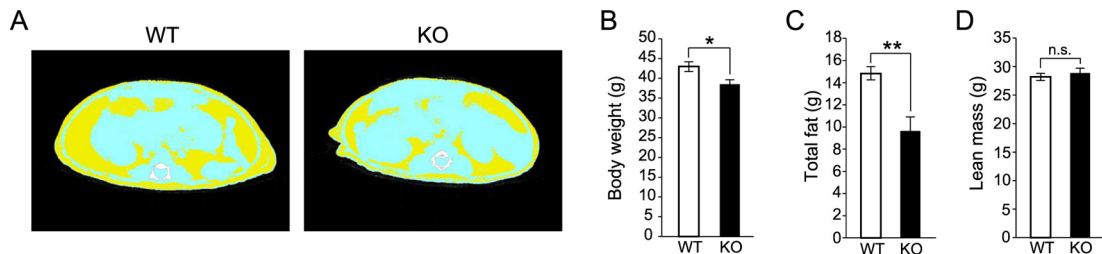


図2. *Ptprij* 遺伝子欠損マウスの脂肪量の解析

(A) コンピュータ断層撮影 (CT) による脂肪組織の解析

高脂肪食で12週間飼育した野生型マウス (WT) 及び *Ptprij* 遺伝子欠損マウス (KO) の全身をCTにより解析した。写真は代表的な腹部の断面像を示している。黄色が脂肪組織であり、水色が非脂肪組織。

(B) 解析したマウスの体重

それぞれ $n = 7$ 。* $P < 0.05$ (Student の t 検定)。

(C) 総脂肪重量

それぞれ $n = 7$ 。** $P < 0.01$ (Student の t 検定)。

(D) 除脂肪重量

それぞれ $n = 7$ 。n.s.: 有意差なし (Student の t 検定)。

2. 視床下部における *Ptprj* 遺伝子の発現解析

レプチンは視床下部内の弓状核 (arcuate nucleus、ARC) に作用して摂食抑制効果を発揮する。*Ptprj* がレプチン受容体の活性制御に関わっているならば、弓状核で発現していると考えられる。そこで、*In situ* ハイブリダイゼーション法により、視床下部内の *Ptprj* 遺伝子の発現について解析を行ったところ、予想通り弓状核において高発現することが明らかになった (図3)。また、弓状核とともに摂食制御に重要な役割を果たしている腹内側核 (VMH) においても高発現を示した。

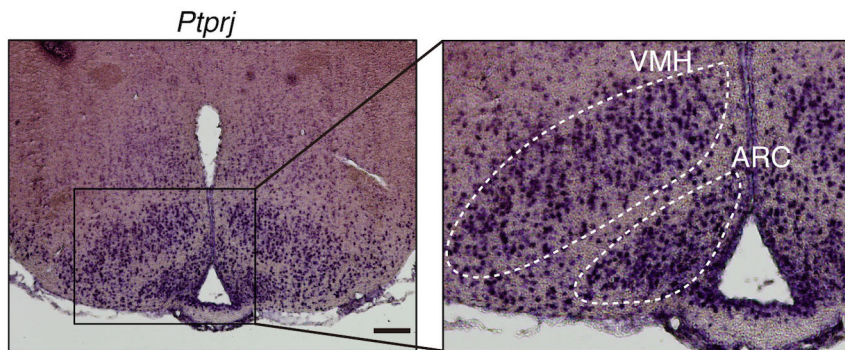


図3. *Ptprj* 遺伝子の視床下部における発現

In situ ハイブリダイゼーションにより、視床下部における *Ptprj* 遺伝子の発現を調べたところ、レプチンの標的組織である摂食中枢の弓状核 (ARC) に高発現していることが明らかになった。また、弓状核とともに摂食制御に重要な役割を果たしている腹内側核 (VMH) においても *Ptprj* は高発現していた。Scale bar : 200 μ m.

3. レプチン受容体の活性制御機構の解析

Ptprj のレプチン受容体の活性化制御について明らかにする目的で、培養細胞株 293T を用いて細胞レベルでの解析を行った。レプチン受容体 (LepRb) と JAK2 を共発現させた 293T 細胞にレプチンを作用させると、レプチン受容体及び JAK2 のチロシンリン酸化が亢進し、活性化が見られる (図4)。ここに *Ptprj* を共発現させると、レプチン受容体及び JAK2 のチロシンリン酸化 (活性化) が顕著に抑制された。これらの結果は、*Ptprj* はレプチン受容体の活性化に対して抑制的に働くことを示している。

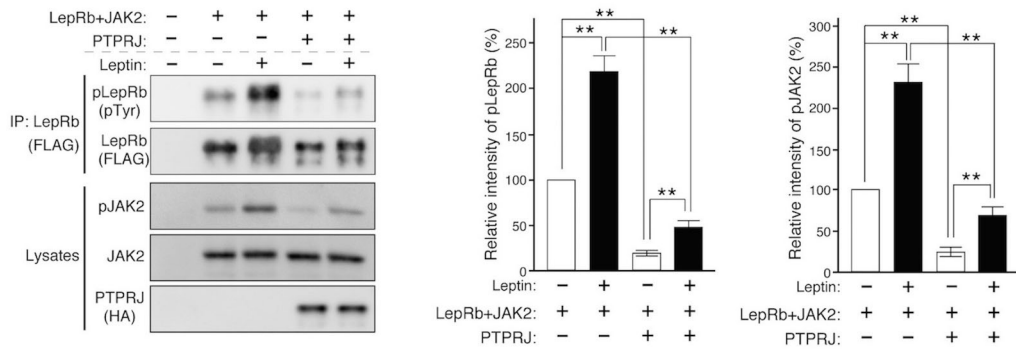


図 4. Ptprij によるレプチン受容体の活性抑制

293T 細胞にレプチン受容体 (LepRb) と JAK2 を共発現させ、レプチン (50 ng/ml) を作用させた。細胞抽出液をウエスタンブロッティングにより解析したところ、LepRb 及び JAK2 のリン酸化レベルの亢進が観察された。ここに Ptprij を共発現させると、リン酸化レプチン受容体 (pLepRb) 及びリン酸化 JAK2 (pJAK2) のレベルが顕著に減少した。右の 2 つの図は、4 回の独立した実験の定量解析の結果。* $P < 0.01$ (ANOVA 検定及び Scheffe のポストホック検定)。

さらに、Ptprij が基質サイトとしているチロシン残基を明らかにするために、レプチン受容体と JAK2 中のリン酸化されることが分かっているチロシン残基について、前後のアミノ酸を含むリン酸化ペプチドを作製し、Ptprij タンパク質による脱リン酸化反応を解析した。その結果、Ptprij は JAK2 の 813 番目と 868 番目のチロシン残基を選択的に脱リン酸化することが明らかになった (図 5)。これに対し、レプチン受容体の方は基質としていないという結果であった (図 5)。このように、Ptprij はこれら 2 つのチロシン残基を基質サイトにすることで JAK2 の活性化を抑制し、レプチンシグナルを負に制御していると考えられる。

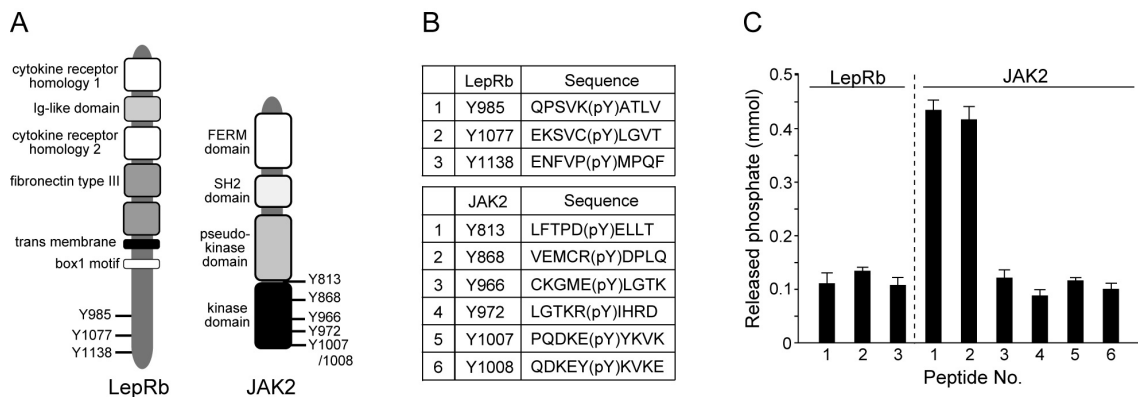


図 5. Ptprij による脱リン酸化サイトの同定

レプチン受容体及び JAK2 の構造 (A)、リン酸化ペプチドの配列 (B)、及び、脱リン酸化反応の結果 (C)。

リン酸化ペプチドを Ptprij タンパク質と反応させ、遊離したリン酸量を測定した。Ptprij は JAK2 の 813 番目と 868 番目のチロシン残基を含むペプチド 1 及び 2 を選択的に脱リン酸化することが明らかになった。

4. *Ptprj* 遺伝子欠損マウスを用いた解析

Ptprj によるレプチンシグナルの制御について、*Ptprj* 遺伝子欠損マウス (KO) を用いて解析を行った。*Ptprj* 欠損マウスでは、*Ptprj* による抑制効果が無いために、レプチンの作用が亢進していると推定される。そこで、これを検証するために、レプチンを脳室内に投与した場合の摂食量と体重の変化について、*Ptprj* 欠損マウスと野生型マウスで比較した。その結果、レプチン投与による摂食量及び体重の減少は、*Ptprj* 欠損マウスにおいて有意に大きかった (図 6A)。また、レプチン投与後の STAT3 のリン酸化レベルも、*Ptprj* 欠損マウスにおいて有意に高かった (図 6B)。これらの結果は、生体内においても、レプチンシグナルが *Ptprj* によって負に制御されていることを示している。

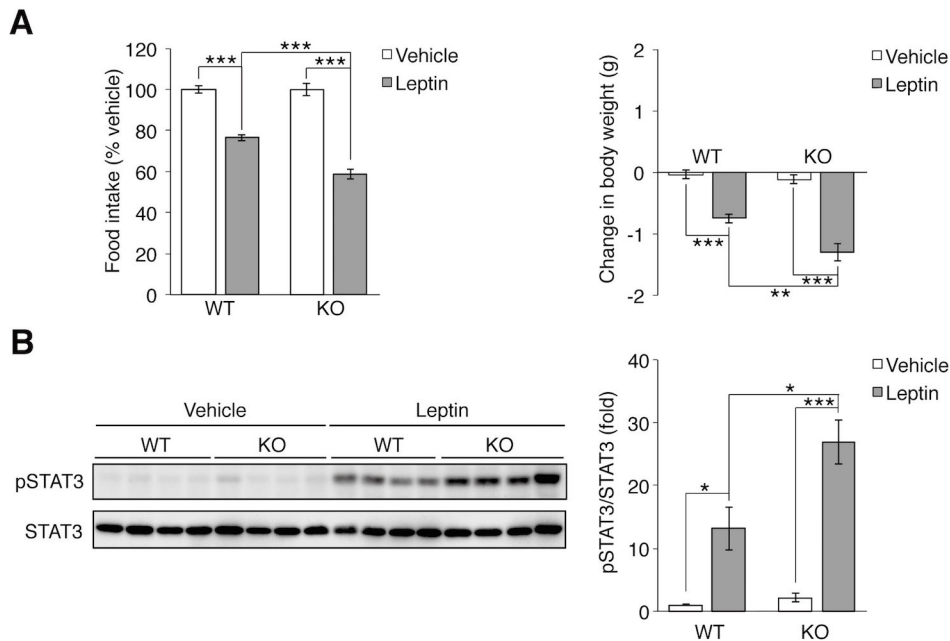


図 6. *Ptprj* 遺伝子欠損マウスにおけるレプチンシグナルの解析

(A) 脳室内にレプチンを投与した場合の摂食量と体重の変化

脳室内にレプチン (4 μ g) を投与し、1 日中の摂食量と 1 日後の体重を測定した。野生型マウス (WT) に比べて、*Ptprj* 遺伝子欠損マウス (KO) において有意に摂食量と体重が減少していた。それぞれ n = 10。** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ (ANOVA 検定及び Scheffe のポストホック検定)。

(B) 脳室内にレプチンを投与した場合のリン酸化 STAT3 の解析

脳室内にレプチン (4 μ g) を投与し、30 分後の視床下部における STAT3 のリン酸化のレベルをウエスタンブロッティングにより解析した。野生型マウス (WT) に比べて *Ptprj* 遺伝子欠損マウス (KO) において、レプチン投与後の STAT3 のリン酸化レベルは有意に高かった。それぞれ n = 4。* $P < 0.05$ 、*** $P < 0.001$ (ANOVA 検定及び Scheffe のポストホック検定)。

考 察

以上の結果は、*Ptprj* は生体内において、レプチン受容体と複合体を形成している JAK2 を基質として脱リン酸化することによってレプチンシグナルを負に制御していることを示している。すなわち *Ptprj* は、摂食中枢である視床下部内の弓状核において、レプチン受容体・JAK2 と共発現しており、JAK2 の 813 番目と 868 番目のチロシン残基を基質サイトとすることでレプチン受容体の活性化を抑制していると考えられる (図 7)。レプチンシグナルは摂食を抑制し、

エネルギー消費を増大させることから、Ptpj は逆に摂食を促進し、エネルギー消費を抑制する方向に働いていると考えられる。

一方、我々はこれまでに、Ptpj がインスリン受容体を基質として脱リン酸化することによって、インスリン受容体の活性化を抑制していることを明らかにしている¹⁾。糖尿病においてはインスリンの作用不全が生じており(インスリン抵抗性)、インスリンの作用を増強する薬剤は糖尿病を治療できると考えられる。Ptpj に対する阻害剤は、インスリンシグナルを増強することから糖尿病の治療薬として有望であるだけでなく、同時に、レプチンシグナルを増強することから抗肥満薬としても有効であると考えられる。肥満により糖尿病等の生活習慣病の発症率が大きく増加することが知られているが、Ptpj に対する阻害剤が開発できれば、人々の健康の増進に大きく貢献できると考えられる。

尚、本研究成果については、Scientific Reports 誌に発表した²⁾。

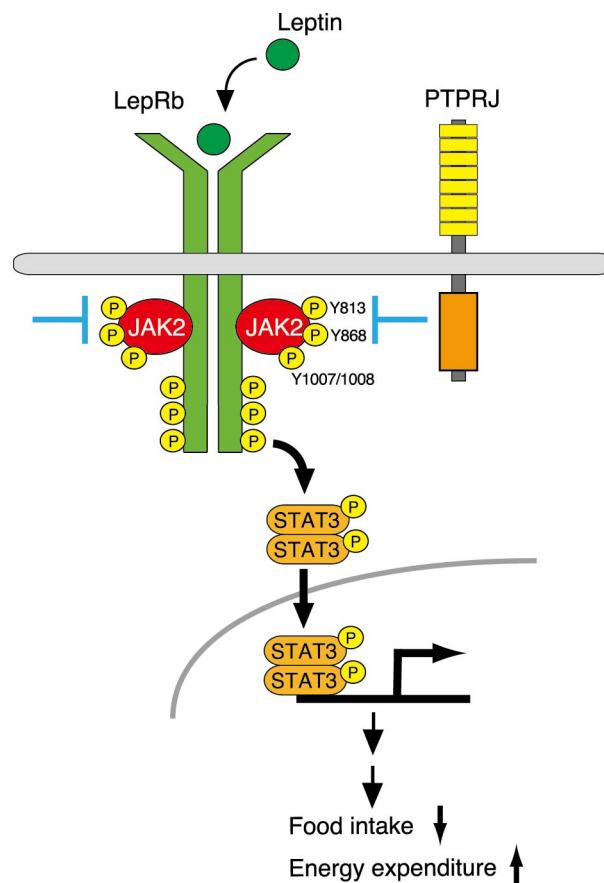


図 7. Ptpj によるレプチン受容体活性化の抑制機構

Ptpj は、JAK2 の 813 番目と 868 番目のチロシン残基を基質サイトとすることで、レプチン受容体の活性化を抑制している。Ptpj は摂食を促進し、エネルギー消費を抑制する方向に働いていると考えられる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、基礎生物学研究所・統合神経生物学研究部門の新谷隆史及び東覚である。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いたします。

文献

- 1) Shintani T, Higashi S, Takeuchi Y, Gaudio E, Trapasso F, Fusco A, Noda M. The R3 receptor-like protein tyrosine phosphatase subfamily inhibits insulin signalling by dephosphorylating the insulin receptor at specific sites. J Biochem. 2015;158(3):235-43. PubMed PMID: 26063811.

- 2) Shintani T, Higashi S, Suzuki R, Takeuchi Y, Ikaga R, Yamazaki T, Kobayashi K, Noda M. PTPRJ inhibits leptin signaling, and induction of PTPRJ in the hypothalamus is a cause of the development of leptin resistance. *Sci Rep.* 2017 Sep 14;7(1):11627. doi: 10.1038/s41598-017-12070-7. PubMed PMID: 28912580.