

表 題 Valosin-containing protein (VCP) を介した新規  
sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1)  
活性化メカニズムの解明

論文の区分 博士課程

著 者 名 澁谷 浩史

担当指導教員氏名 海老原 健 准教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
専攻 地域医療学系  
専攻分野 内分泌代謝疾患・病態解析学  
専攻科 代謝疾患学

2023年1月10日申請の学位論文

## 目次

1. 背景と目的	P. 3-4
2. 方法	P. 5-9
2-1. 実験動物	
2-2. <i>Vcp</i> <sup>A232E</sup> 変異マウスの作製	
2-3. 肝臓の組織学的評価	
2-4. 脂肪組織の組織学的評価と脂肪細胞面積の測定	
2-5. 生化学的分析	
2-6. グルコース負荷試験およびインスリン負荷試験	
2-7. リアルタイム PCR 解析	
2-8. 細胞培養、細胞処理および siRNA のトランスフェクション	
2-9. ウェスタンブロット分析	
2-10. 肝臓内 ATP 濃度の測定	
2-11. 統計解析	
3. 結果	P. 10-29
3-1. <i>in vivo</i> における解析	P. 10-23
3-1-1. A232E/+ マウスの作製と成長曲線	
3-1-2. 肉眼的所見と臓器重量	
3-1-3. 肝臓および eWAT における組織学的所見	
3-1-4. 耐糖能、インスリン感受性、血中脂質	
3-1-5. 肝臓の ATP 濃度、VCP および小胞体ストレスマーカーの発現	
3-1-6. 肝臓における TG 代謝に関連した遺伝子の発現	
3-1-7. 肝臓における SREBP2 およびその標的遺伝子の発現	
3-1-8. eWAT における TG 代謝に関連した遺伝子の発現	
3-1-9. 肝臓における SREBP1, SREBP2, ChREBP のタンパク質発現	
3-1-10. VCP と相互作用するタンパク質分解酵素の検討	
3-2. <i>in vitro</i> における解析	P. 24-29
3-2-1. HepG2 細胞を用いた VCP, RHBDL4 の RNA 干渉によるノックダウン、および VCP 阻害薬投与実験	
3-2-2. E3 ligase (HRD1 および gp78) の RNA 干渉によるノックダウン実験	
3-2-3. E3 ligase ノックダウン時のタンパク質間相互作用	

4. 考察	P. 30-32
5. 結語	P. 33
6. 謝辞	P. 34
7. 引用文献	P. 35-38

## 1. 背景と目的

非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease : NAFLD) は、肝臓への過剰な中性脂肪 (triglyceride : TG) 蓄積、およびインスリン抵抗性による高血糖をきたすことを特徴とし、メタボリックシンドロームにおける肝臓表現型と考えられている (1)。NAFLD はしばしば肝硬変に進行し、さらには肝細胞癌に進行する可能性もある (2)。NAFLD の有病率は世界中の成人の約 25% と推定され、近年世界中で増加している (3,4)。これまでに多くの治療薬が研究されてきたが、NAFLD に対する確立された治療法はない。したがって、NAFLD の治療法の開発は解決すべき重要課題である。NAFLD の主な原因の 1 つとして肝臓における脂肪酸合成の増加が挙げられるが (5)、脂肪酸合成に関連する遺伝子発現は、肝臓における主要な sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) である SREBP1c によって制御を受けている (6)。そのため、SREBP1c は NAFLD の治療標的となる可能性がある。実際、多価不飽和脂肪酸は SREBP1 を標的とすることで脂質異常症を改善させることが示されている (7)。

SREBP ファミリーは、2 つの SREBP1 スプライスバリエントである SREBP1a と SREBP1c、および SREBP2 で構成される (8)。SREBP1 は主に脂肪酸と中性脂肪合成に関する遺伝子の転写を増加させるが、SREBP2 は主にコレステロール生合成に関する遺伝子を標的とする (8)。SREBP ファミリーは、小胞体の SREBP cleavage-activating protein (SCAP) に結合し、ゴルジ装置に輸送された後に site-1 protease (S1P) および site-2 protease (S2P) による切断を受ける (8)。SREBP1 はフィードフォワード制御を通じて脂肪酸とインスリンにより調節される一方、SREBP2 は負のフィードバックを通じてステロールにより SCAP と insulin-induced gene (INSIG) の結合を介して制御される (9)。しかしながら、SREBP ファミリーの活性化メカニズムについては未だ多くの不明点が残っている。例えば、SCAP が欠落したショウジョウバエでも、SREBP の切断は保たれる (10)。このことは、少なくともショウジョウバエにおいては SCAP が関与しない別の SREBP 活性化メカニズムが存在することを示唆している。

Valosin-containing protein (VCP) は、様々な細胞機能を有する AAA (ATPase associated with various cellular activities) ATPase ファミリーに属する六量体タンパク質であり (11)、小胞体関連分解などにも関与している (12)。VCP の ATPase 機能獲得型変異は、小胞体ストレスを通じて骨パジェット病および前頭側頭型認知症を伴う封入体ミオパチー (inclusion body myopathy associated with Paget's disease of bone and frontotemporal dementia :

IBMPFD) を引き起こすことが報告されている (11,13)。一方、小胞体ストレスは糖尿病や肥満などの代謝性疾患にも関与していることが知られているため (14-17)、我々は VCP の代謝疾患における病態生理的意義解明のために、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を用いて VCP の ATPase 機能獲得型遺伝子変異の 1 つである *Vcp*<sup>A232E</sup> ノックインマウスを作製した。このマウスでは当初予想した肥満や糖尿病は認められない一方で、高脂肪食による脂肪肝が軽減し、SREBP1 が標的とする脂肪合成関連酵素の遺伝子発現が低下していた。

そこで今回、VCP が SREBP1 の活性化に関与している可能性を考え、*Vcp*<sup>A232E</sup> 変異マウスにおいて SREBP1 の活性化が障害されていることを確認するとともに、VCP を介した SREBP1 の新しい活性化メカニズムの解明を試みた。SREBP1 の活性化メカニズム解明は、新しい脂肪肝の治療法開発に繋がるものと期待される。

## 2. 方法

### 2-1. 実験動物

マウスは、温度 (23°C±1°C)、湿度 (55%±5%)、および照明 (明期 7:30~19:30) の制御された条件下で飼育され、普通食 (standard diet : SD) (MF ; オリエンタル酵母株式会社) または高脂肪食 (high-fat diet : HFD) (D12492 ; Research Diets) を自由摂食できるように給餌した。特に記載のない限り、HFD は 8 週齢より給餌し、20 週齢の雄マウスを解析に使用した。Vcp<sup>A232E</sup> 変異マウスは C57BL/6J を遺伝的背景とするマウスに対して、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行って作製した。Vcp におけるターゲットの詳細は次項で示す。すべての動物実験は動物実験委員会から承認を得た後、自治医科大学の動物実験規則に従って実施した。

### 2-2. Vcp<sup>A232E</sup> 変異マウスの作製

マウスとヒトの VCP タンパク質は、アミノ酸レベルで 100% 相同である (18) ことを踏まえ、CRISPR/Cas9 により VCP のエクソン 6 内にヒトの疾患原因である A232E ミスセンス変異が導入されるように設計した。相同組換え修復のために用いる一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (single-stranded oligodeoxynucleotide : ssODN) には、A232E アミノ酸置換、修復されたアレルの Cas9 活性を防ぐためのサイレント変異、および *Dra* I 切断部位を作成するサイレント変異を導入する配列が含まれた。配列の詳細は下記の通りである (5'AGATAAAGGAGATGGTGGAGCTGCCACTGAGACATCCTGCACTGTTTAAAGAGATTGGTGTAAAGGTGAGTATCCTAAGGTCTGTGGGGAGTCT-3')。目的の遺伝子変異を導入した Vcp<sup>A232E/+</sup> 変異マウスを確立した後の遺伝子型は、PCR 産物の制限酵素反応あるいはサンガー法によって確認した。

### 2-3. 肝臓の組織学的評価

20 週齢のマウスから肝臓を採取し、10% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィンで包埋した。厚さ 5 mm の肝臓切片をヘマトキシリン-エオジン (H&E)、またはオイルレッド O で染色し、光学顕微鏡でデジタルイメージを取得した。

#### 2-4. 脂肪組織の組織学的評価と脂肪細胞面積の測定

精巣上体周囲脂肪組織 (epididymal white adipose tissue : eWAT) を 20 週齢のマウスから採取し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィンで包埋した。厚さ 5 mm の脂肪組織切片をヘマトキシリン-エオジン (H&E) で染色し、光学顕微鏡でデジタルイメージを取得した。脂肪細胞のサイズは、マウス毎にランダムな 2 箇所の視野 (倍率 x100) で評価した。脂肪細胞の断面積の測定は、顕微鏡デジタルカメラ (DP70 ; オリンパス株式会社) でデジタルイメージを取得した後、ImageJ ソフトウェア (National Institutes of Health) を用いて行った。

#### 2-5. 生化学的分析

特に記載のない限り、血液サンプルの採取は自由摂食下において眼窩静脈叢から行った。血漿グルコース濃度は、グルコース CII-テストワコー (和光純薬工業株式会社) を使用して測定した。血漿インスリン濃度は、マウスインスリン測定キット (森永生科学研究所) を使用して測定した。血漿中性脂肪、遊離脂肪酸 (NEFA)、および総コレステロール (total cholesterol : T·chol) 濃度は、それぞれ測定キット (トリグリセリド E-テストワコー、NEFA C-テストワコー、コレステロール E-テストワコー ; 和光純薬工業株式会社) を使用して測定した。肝臓の中性脂肪含有量は 20 週齢のマウスから肝臓を採取してすぐに液体窒素で凍結した後、脂質をイソプロピルアルコールとヘプタンを 1:1 で用いて抽出し、溶媒を蒸発させた後、脂質を濃度 99.5%のエタノールに再懸濁し、中性脂肪含有量をトリグリセリド E-テストワコー (和光純薬工業株式会社) を用いて測定した。

#### 2-6. グルコース負荷試験およびインスリン負荷試験

腹腔内グルコース負荷試験 (IPGTT) および腹腔内インスリン負荷試験 (IPITT) は、20 週齢のマウスを 16 時間絶食させた後に実施した。IPGTT では、マウスに 1.0 g/kg のグルコースまたは生理食塩水を腹腔内投与し、グルコース負荷前、30、60、90、120 分後に尾静脈から血液を採取し解析に用いた。IPITT では、マウスに 0.5 IU/kg のインスリン (Novolin R ; Novo Nordisk) を

腹腔内投与し、インスリン負荷前、30、60、90、および 120 分後に尾静脈から血液を採取し解析に用いた。

## 2-7. リアルタイム PCR 解析

解析に用いた組織検体は採取後に液体窒素で速やかに凍結し、使用するまで 80°C で保存した。肝臓と培養細胞の RNA は Trizol (Thermo Fisher Scientific) 試薬を使用して抽出し、eWAT の RNA については RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) を使用して製造元のプロトコルに従って抽出した。抽出 RNA の品質と濃度は、Nano-Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて確認した。その後、リアルタイム PCR 用の cDNA 合成キット (iScript cDNA Synthesis Kit ; Bio-Rad Laboratories) を使用して、一本鎖 cDNA を合成した。すべてのリアルタイム PCR 解析は、TaqMan プローブ (Applied Biosystems) を用いて QuantStudio 3 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) で行った。mRNA 発現レベルは、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現レベルで補正した。本研究で使用したプライマーとプローブの配列を、表 1 に示す。

表 1 リアルタイム PCR 解析に使用したプライマー、プローブ一覧

Gene	Forward primer	Reverse primer	Probe
Mouse			
<i>Fas</i>	GCTGCGGAAACTTCAGGAAAT	AGAGACGTGTCACTCCTGGACTT	ACTCGGCTACTGACACGA
<i>Acc1</i>	GGACAGACTGATCGCAGAGAAAG	TGGAGAGCCCCACACACA	TGGCAGGAGATCGCAGT
<i>Scd1</i>	TCCGGAATGAACGAGAGAAGGTGAAGA	AGATCTCCAGTCTTACACGACCAC	GACGGATGTCTTCTCCAGGTG
<i>Srebp1c</i>	TGGATTGCACATTTGAAGACATG	GGCCCGGGAAGTCACTGT	CAGCTCATCAACAACCA
<i>Lxra</i>	GCTCTGCTCATTGCCATCAG	TGTTGCAGCCTCTACTTGGGA	CTGCAGACCGGCCA
<i>Lxrβ</i>	AAGCAGGTGCCAGGGTTCT	TGCATTCTGTCTCGTGGTTGT	ATTGAGATCATGTTGCTAGAA
<i>Pparγ</i>	TCTTAACTGCCGGATCCACAA	GCCCAAACCTGATGCCATT	TCGGTTTCAGAAGTGC
<i>Ppara</i>	Taqman® Gene Expression Assays; ID: Mm00440939_m1		
<i>Cpt1a</i>	GAACCCCAACATCCCCAAC	TCCTGGCATTCTCCTGGAAT	CACCAGGCTACAGTGG
<i>Acox1</i>	CCATGTTTATCCCTACCTTGCTG	CCAAGCCTCGAAGATGAGTTC	ACTCCAGATAATTGGCCTACGCC
<i>Mtp</i>	GCTCCCTCAGCTGGTGGAT	CAGGATGGCTTCTAGCGAGTCT	ACCTCTGCTCAGACTC
<i>Hsl</i>	CATATCCGCTCTCCAGTTGAAC	CCTATCTTCTCCATCGACTACTCC	CGAGGCTCCCTTCCCGAG
<i>Srebp2</i>	GCGTTCTGGAGACCATGGA	ACAAAGTTGCTCTGAAAACAAATCA	ACGGAGCTGGGCGAT
<i>Hmgcs</i>	GCCGTGAAGTGGTCCGAAT	TCTCCTGCACTACCAGAGCATAT	AGCTCTTGGGATGGAC
<i>Hmgcr</i>	CGTCATTCAATTCCTCGACAAA	AGCAGAAAAAGGGCAAAGCT	AACTGACAGGCTTAAAT
<i>Sqs</i>	CCAACTCAATGGGTCTGTTCCT	TGGCTTAGCAAAGTCTTCCAAC	CAGAAAAACAAATATCATTCCG
<i>Ldlr</i>	AGGCTGTGGGCTCCATAGG	TGCGGTCCAGGGTCACTCT	TATCTGCTCTTCCCAACC
<i>Pcsk9</i>	TTGCAGCAGCTGGGAACCT	CCGACTGTGATGACCTCTGGA	ACGACGCTGCCTCTACTCCCCAG
<i>Gapdh</i>	GTGGAGTCATACTGGAACATGTAG	AATGGTGAAGTCCGGTGTG	TGCAAATGGCAGCCCTGGTG
Human			
<i>FAS</i>	GAACTCCTTGGCGGAAGAGA	GGACCCCGTGAATGTCA	CACCCGCTGGGCATGGCTATCTT
<i>SCD1</i>	CACCACATTCCTCATTGATTGCA	ATGGCGGCTTGGAGACT	CCGCCCTCGGTCTGGCCTATG
<i>GAPDH</i>	ACATCGCTCAGACACCATG	TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG	AAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGTC



## 2-8. 細胞培養、細胞処理および siRNA のトランスフェクション

*in vitro* の実験には HepG2 細胞を用い、10%のウシ胎児血清と 100 単位/ml の抗生物質（ペニシリンとストレプトマイシン）を含む DMEM 培地で、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。VCP 阻害薬投与実験は、細胞を 15  $\mu$ M の NMS-873 (MedChem Express)、または dimethyl sulfoxide (DMSO) で処理した。siRNA を用いたノックダウン実験は、VCP siRNA (s14765 ; Life Technologies)、RHBDL4 siRNA (s38699 ; Life Technologies)、gp78 siRNA (s1324 ; Life Technologies)、HRD1 siRNA (s39019 ; Life Technologies)、またはネガティブコントロール siRNA (sc-37007 ; Santa Cruz Biotechnology) を、Opti-MEM (Gibco) および Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を使用して、最終濃度 100 nM でトランスフェクションした。VCP 阻害薬投与または siRNA トランスフェクション後 48 時間の時点で細胞を回収し、ウエスタンブロット解析やリアルタイム PCR 解析に使用した。

## 2-9. ウエスタンブロット解析

採取した組織検体は、バッファー内 (20 mM Tris (pH 7.5) 150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1% Triton X-100、2.5 mM ピロリン酸ナトリウム、1 mM オルトバナジン酸ナトリウムを含む溶液) で粉砕した。細胞内画分は、Subcellular Protein Fractionation Kit for Tissues (Thermo Fisher Scientific) を使用し分離した。共免疫沈降については Capturem IP & Co-IP kit (タカラバイオ株式会社) を用いて、各抗体で免疫沈降を行った。各サンプルは、4~12% Bis-Tris ゲル (Bio-Rad) を使用した SDS-PAGE で分離し、PVDF メンブレン (Bio-Rad) に転写し、下記に示す各抗体を用いてイムノブロットした。Amersham™ ECL Prime™ Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences) で化学発光させ、ImageQuant LAS 4000mini (GE Healthcare Life Sciences) によって検出および定量化した。

本研究で使用した抗体を以下に示す。SREBP1 (ab3259 ; Abcam)、VCP (ab11433 ; Abcam)、S1P (ab140592 ; Abcam)、SREBP2 (ab30682 ; Abcam)、CHOP (2895 ; Cell Signaling Technology)、BiP (3177 ; Cell Signaling Technology)、 $\beta$ -actin (3700 ; Cell Signaling Technology)、RHBDL4 (20869-1-AP ; Proteintech)、TBP (22006-1-AP ; Proteintech)、gp78 (16675-1-AP ; Proteintech)、HRD1 (13473-1-AP ; Proteintech)、Ubiquitin (10201-2-AP ;

Proteintech)、ChREBP (NB400-135 ; Novus Biologicals)、ATF6 (NBP1-40256 ; Novus Biologicals)、normal mouse IgG (sc-2025 ; Santa Cruz Biotechnology)。

## 2-10. 肝臓内 ATP 濃度の測定

肝臓を採取した後、ATP 濃度は luciferase-based Tissue ATP assay Kit (東洋ビーネット株式会社) を使用して測定した。

## 2-11. 統計解析

データは SPSS (IBM) を用いて解析し、すべて平均値±標準誤差で示した。グループ間の比較については Student の t 検定、または two way ANOVA による検定を行った。p 値 < 0.05 を統計学的に有意とした。

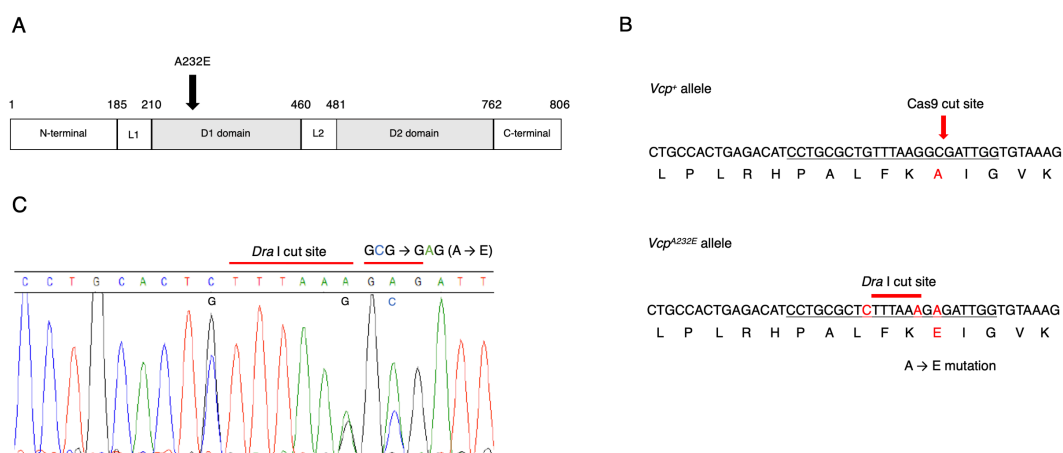
### 3. 結果

#### 3-1. *in vivo* における解析

##### 3-1-1. A232E/+ マウスの作製と成長曲線

VCP は構造学的に、N 末端ドメイン、2 つのリンカー領域 (L1 および L2)、2 つの ATPase ドメイン (D1 および D2)、および C 末端ドメインで構成されている (図 1A) (19)。今回変異を導入した A232E ミスセンス変異は、D1 ATPase ドメインに位置する (図 1A)。前述のように今回導入した *Vcp*<sup>A232E</sup> アレルは、232 部位のアミノ酸をアラニン (A) からグルタミン酸 (E) に置換するミスセンス変異、*Dra*I 制限酵素切断部位、および修復されたアレルの Cas9 活性を防ぐためのサイレント変異を有する (図 1B)。目的の変異アレル導入については、シーケンスにより確認を行った (図 1C)。マウスのジェノタイピングには、導入した *Dra*I 切断部位を利用した (図 1D)。すなわち変異アレルは PCR で増幅した 775 bp の DNA が *Dra*I によって 473 bp と 302 bp に切断されたが、野生型 (WT) のアレルは *Dra*I による酵素切断を受けないことを確認した。ヘテロ接合体の *Vcp*<sup>A232E/+</sup> マウスを繁殖させることで、ホモ接合体の *Vcp*<sup>A232E/A232E</sup> マウスが生まれたが、生後数日以内に死亡した。したがって、本研究の各分析にはヘテロ接合体マウス (以下 A232E/+ マウスとする) を使用した。

SD を給餌した WT マウスと A232E/+ マウスの間で外見に違いは認めなかったが、出生時より A232E/+ マウスは WT マウスと比較して僅かだが有意に体重は低値で推移した (図 1E)。一方で、8 週齢より HFD を給餌した場合も、A232E/+ マウスの体重は常に WT マウスよりも低く推移したが、経過とともに統計的有意差は消失した (図 1E)。HFD を給餌した場合、WT マウスと A232E/+ マウスの間で摂餌量に統計的有意差は認めなかった (図 1F)。



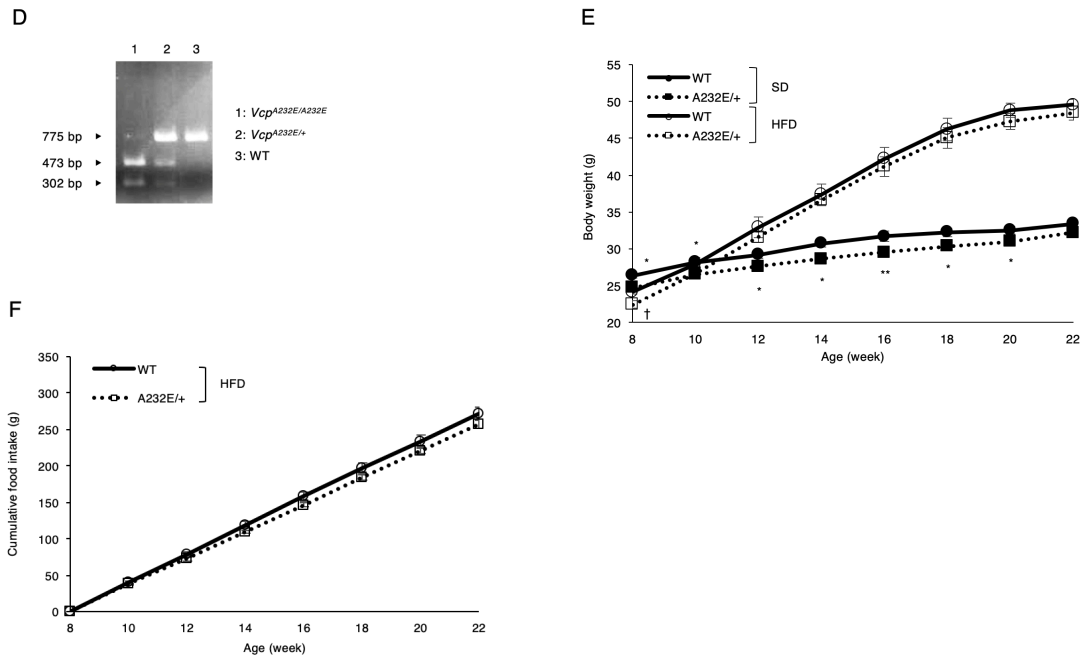


図 1. A232E/+ マウスの作製と体重および累積摂餌量の推移

A: VCP の構造模式図と A232E 変異の部位。

B: WT アレルと *Vcp*<sup>A232E</sup> アレルの塩基配列およびアミノ酸配列。ミスセンス変異部およびアミノ酸置換部を赤字で示した。

C: A232E/+ マウスにおける *Vcp* 変異導入部位のシーケンス結果。

D: *Dra*I 制限酵素を用いたジェノタイピング時におけるアガロースゲルのバンド。

E: SD および HFD 条件下における野生型マウスと A232E/+ マウスの体重推移。SD 条件下の WT マウスを黒丸、SD 条件下の A232E/+ マウスを黒四角、HFD 条件下の WT マウスを白丸、HFD 条件下の A232E/+ マウスを白四角で示した。(n=5-8)

F: HFD 条件下における野生型マウスと A232E/+ マウスの累積摂餌量推移。WT マウスを白丸、A232E/+ マウスを白四角で示した。(n=5-6)

(† or \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

### 3-1-2. 肉眼的所見と臓器重量

SD 条件下では、WT マウスと A232E/+ マウス間に明らかな肉眼的所見の相違は認めなかった (図 2A)。実際、肝臓や eWAT の組織重量、および肝臓の TG 含有量に有意差は認めなかった (図 2B-D)。一方 HFD 条件下では、A232E/+ マウスは WT マウスと比較して肉眼的に肝臓が小さく、eWAT が肥大していた (図 2A)。実際に、A232E/+ マウスでは、HFD 負荷による肝臓重量および肝臓 TG 含有量増加は有意に抑制され、逆に eWAT 重量が有意に増加した (図 2B-D)。HFD 条件下において、肝臓と eWAT 以外の組織重量に有意差は認めなかった (図 2E)。

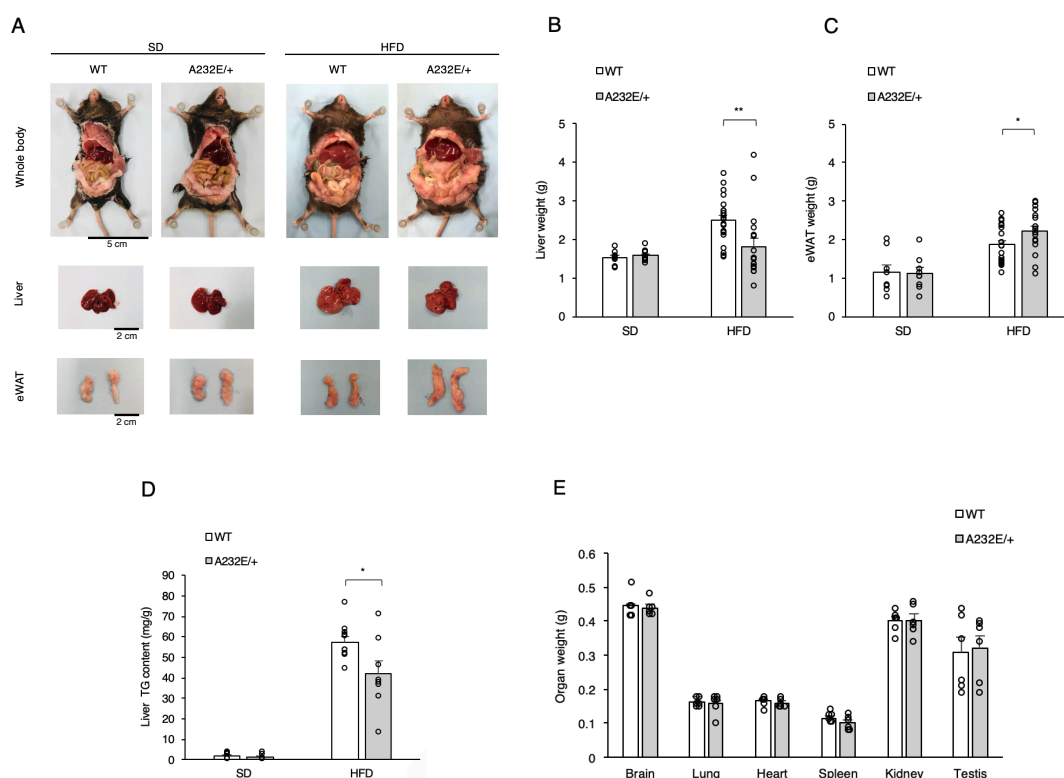


図 2. WT および A232E/+ マウスの肉眼的所見と臓器重量

A: 解剖時の肉眼的所見。

B: 肝臓重量。(SD: n=8-9, HFD: n=18-22)

C: eWAT 重量。(SD: n=8-9, HFD: n=18-22)

D: 肝臓 TG 含有量。(SD: n=5-6, HFD: n=8-11)

E: HFD 条件下における各臓器重量。(n=6)

(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

### 3-1-3. 肝臓および eWAT における組織学的所見

肝臓における組織学的評価は、ヘマトキシリン-エオジン (H&E) 染色およびオイルレッド O 染色により行った。HFD を与えたマウスの肝臓では多数の脂肪滴が観察されたが、A232E/+ マウスでは WT マウスと比較して脂肪滴の数と大きさが減少していた (図 3A)。対照的に、HFD 条件下において A232E/+ マウスの個々の eWAT 細胞は WT マウスと比較して肥大化しており (図 3B,C)、平均脂肪細胞断面積も有意に増加していた (図 3D)。

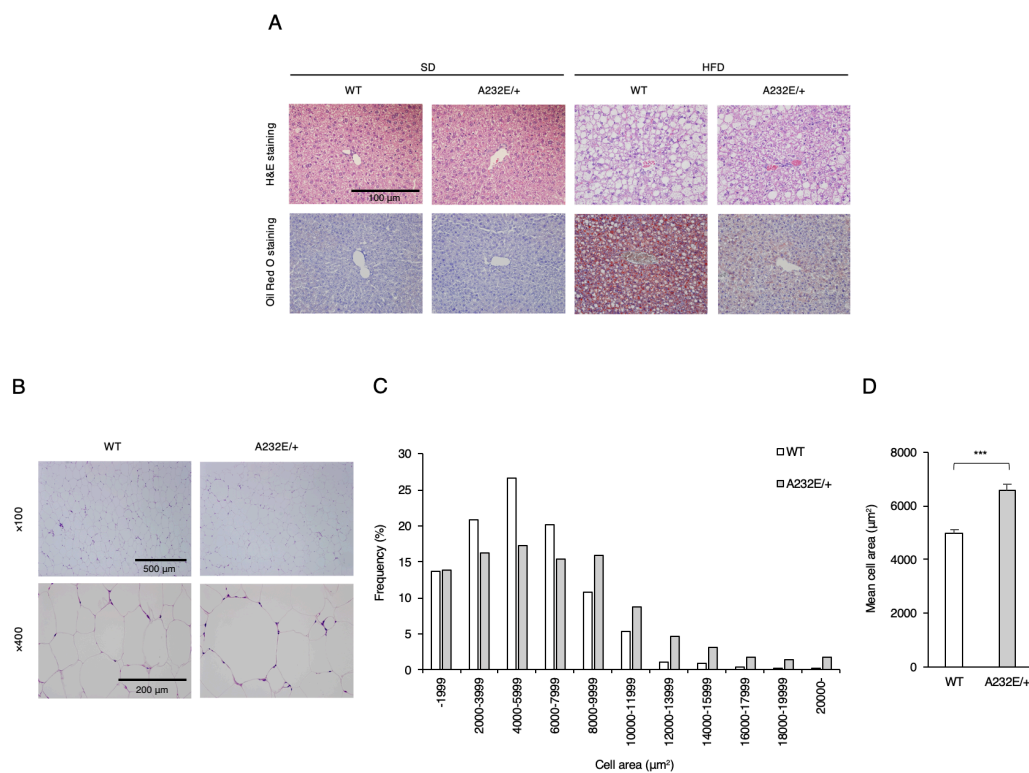


図 3. WT および A232E/+ マウスの組織学的所見

A: 肝臓における H&E 染色およびオイルレッド O 染色。

B: HFD 条件下における eWAT の H&E 染色。

C: HFD 条件下における eWAT の断面積サイズ分布。

D: HFD 条件下における eWAT の平均細胞面積。(SD : n=5-6, HFD : n=8-11)

(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ )

### 3-1-4. 耐糖能、インスリン感受性、血中脂質

糖脂質代謝に重要な肝臓と白色脂肪組織に変化が生じたため、次に HFD 条件下における A232E/+ マウスの糖脂質代謝について評価した。WT マウスと A232E/+ マウスの間には、血中グルコース濃度とインスリン濃度に有意差は認めなかった (図 4A,B)。IPGTT についても WT と A232E/+ マウスで有意差は認めなかったが (図 4C)、IPITT でインスリン感受性を評価したところ、WT マウスと比較して A232E/+ マウスで有意にインスリン感受性が良好であった (図 4D)。

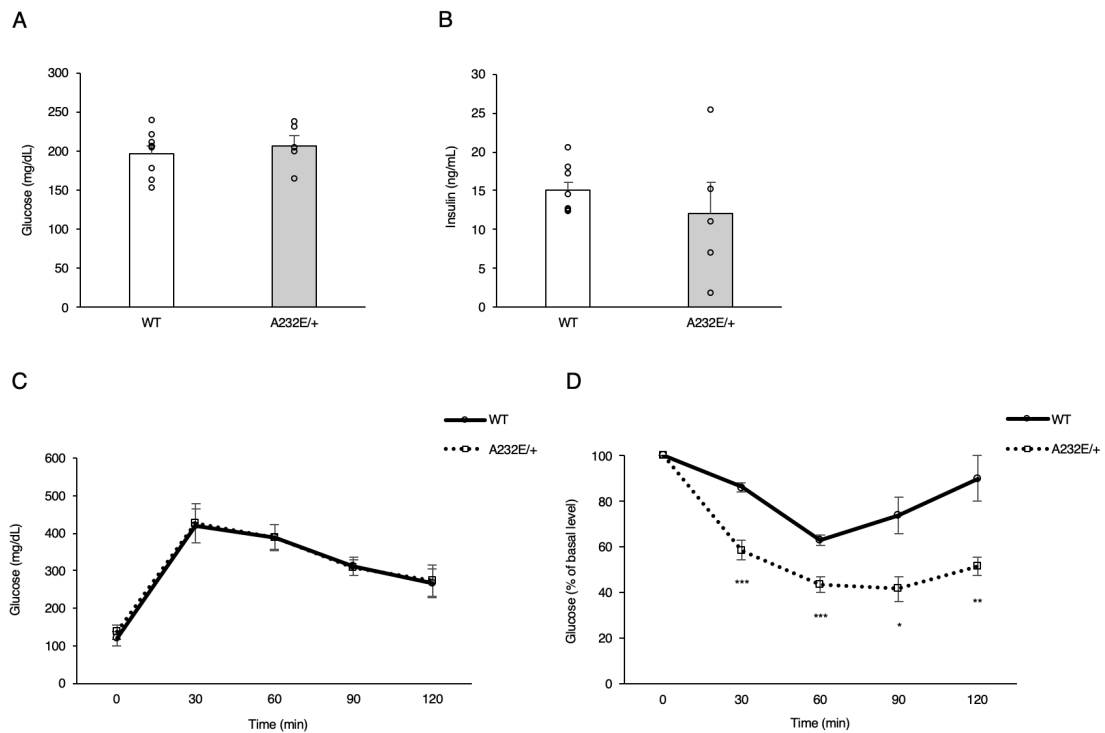


図 4. HFD 条件下における耐糖能およびインスリン感受性

A: 自由摂食下における血中グルコース濃度。(n=5-8)

B: 自由摂食下における血中インスリン濃度。(n=5-8)

C: 糖負荷試験。(n=5-6)

D: インスリン負荷試験。(n=5-6)

(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ )

血中脂質に関しては、TG 濃度は WT マウスと比較し A232E/+ マウスで僅かだが有意に増加し (図 5A)、T-chol および NEFA 濃度は変化を認めなかった (図 5B,C)。

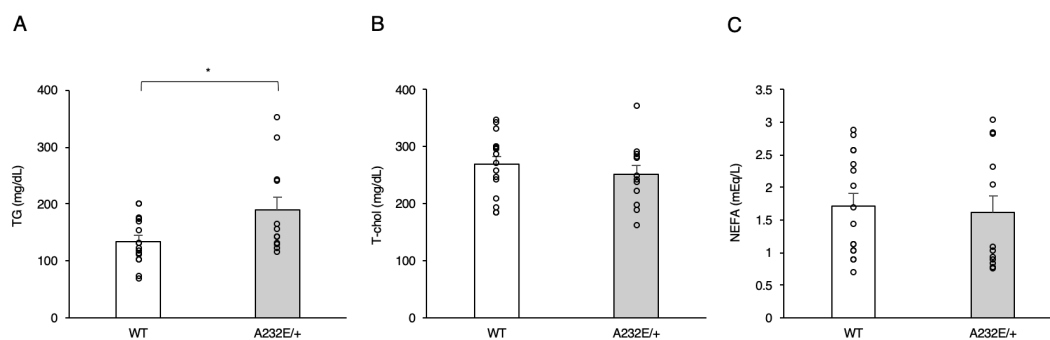


図 5. HFD 条件下における血中脂質

A: 自由摂食下における血中 TG 濃度。(n=12-16)

B: 自由摂食下における血中総コレステロール濃度。(n=12-16)

C: 自由摂食下における血中 NEFA 濃度。(n=12-16)

(\* $p < 0.05$ )



### 3-1-5. 肝臓の ATP 濃度、VCP および小胞体ストレスマーカーの発現

前述のように A232E 変異は、VCP の ATPase 機能獲得型変異であり、ATPase 機能獲得型変異は細胞内 ATP 濃度の低下や小胞体ストレスの原因となるため、(11,20)、肝臓における ATP 濃度や、小胞体ストレスマーカーの発現を検討した。HFD 条件下において、少なくとも今回解析に用いた 20 週齢のマウスでは、WT マウスと比較して A232E/+ マウスの肝臓 ATP 濃度や小胞体ストレスマーカーの発現に変化は見られなかった (図 6A-C)。VCP の発現量も変化がないことを確認した (図 6B,C)。以上より、A232E 変異による VCP の ATPase 活性変化は、肝臓における脂肪蓄積抑制の原因ではないと考えられた。

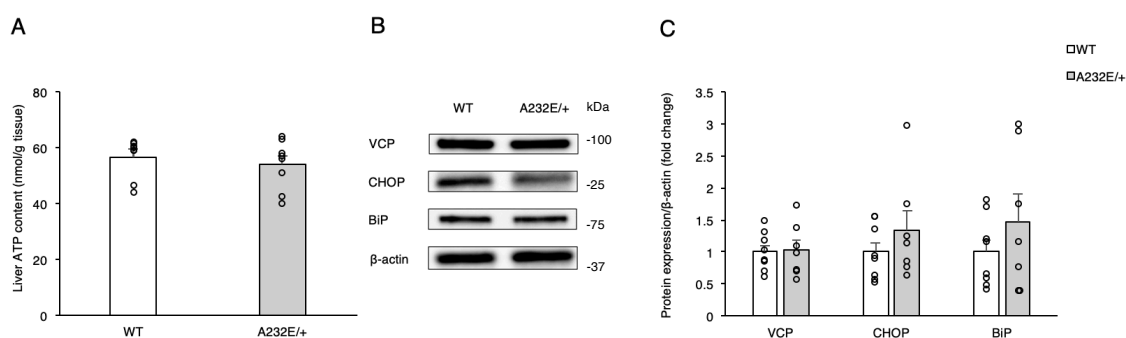


図 6. 肝臓における ATP 濃度、VCP および小胞体ストレスマーカー発現

A: HFD 条件下における肝臓 ATP 濃度。(n=8)

B: HFD 条件下における代表的なウエスタンブロット解析像。VCP、小胞体ストレスマーカーとして CHOP と BiP、ローディングコントロールとして  $\beta$ -actin について解析した。

C: B の各バンドを定量化し、 $\beta$ -actin で補正した後、WT マウスと A232E/+ マウスを比較した。(n=7-8)

(\* $p < 0.05$ )

### 3-1-6. 肝臓における TG 代謝に関連した遺伝子の発現

HFD 条件下で A232E/+ マウスの脂肪肝が抑制されるメカニズムを調べるために、HFD 条件下で飼育した A232E/+ マウスの肝臓での TG 代謝に関連した遺伝子の mRNA 発現を調べた (図 7)。SREBP1c によって正に調節される脂肪酸合成遺伝子である fatty acid synthase (FAS) の mRNA 発現は、WT マウスと比較して A232E/+ マウスで有意に減少した (図 7A)。この時、acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1) や stearyl-CoA desaturase 1 (SCD1) など、SREBP1c によって正に調節される他の脂肪酸合成系遺伝子の mRNA 発現は統計的に有意な変化はなかったが、これらの遺伝子の SREBP1c に対する相対的な mRNA 発現は WT マウスと比較して A232E/+ マウスで有意に減少した (図 7B)。一方で、SREBP1c および SREBP1c を正に調節する因子である liver X receptor (LXR)  $\alpha$  および  $\beta$  の mRNA 発現は、有意な変化を認めなかった。また、peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )、carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a)、acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) などの  $\beta$  酸化関連遺伝子や、リポタンパク質の構築と分泌に関連する遺伝子である microsomal triglyceride transfer protein (MTP) の mRNA 発現には有意差は見られなかった (図 7A)。

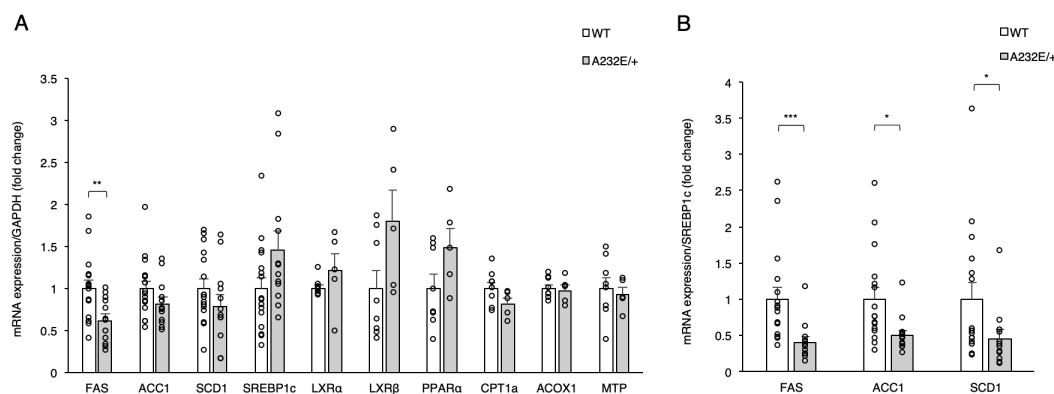


図 7. 肝臓における TG 代謝に関連した遺伝子の発現

A: HFD 条件下における、肝臓の TG 代謝に関連した遺伝子の mRNA 発現量。(FAS-SREBP1c, n = 12-16 ; LXR $\alpha$ -MTP, n = 5-8)

B: A における SREBP1c に対する標的遺伝子群の相対的な mRNA 発現量。(n=12-16)

(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ )

### 3-1-7. 肝臓における SREBP2 およびその標的遺伝子の発現

次に、HFD 条件下で肝臓における SREBP2 と SREBP2 によって正に調節される標的遺伝子群の mRNA 発現を調べた。標的遺伝子群としては、3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (HMGCS)、3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR)、squalene synthase (SQS)、low-density lipoprotein receptor (LDLR) を解析した。WT マウスと比較して A232E/+ マウスの mRNA 発現は、いずれも有意な変化はなかった (図 8A)。また、SREBP2 標的遺伝子群の SREBP2 に対する相対的な mRNA 発現も変化していなかった (図 8B)。

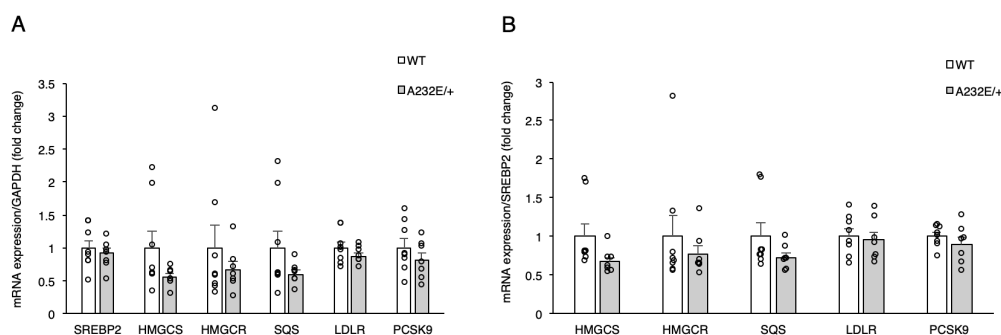


図 8. 肝臓における SREBP2 およびその標的遺伝子の発現

A: HFD 条件下における、肝臓における SREBP2 およびその標的遺伝子の発現量。(n=7-8)

B: A における SREBP2 に対する相対的な標的遺伝子群の mRNA 発現量。

(n=7-8)

(\* $p < 0.05$ )

### 3-1-8. eWAT における TG 代謝に関連した遺伝子の発現

HFD 条件下で A232E/+ マウスの eWAT が肥大化したメカニズムを調べるために、HFD 条件下で A232E/+ マウスの eWAT での TG 代謝に関連した遺伝子の mRNA 発現量を解析した (図 9)。eWAT では、A232E/+ マウスと WT マウスの間で、脂肪酸合成、 $\beta$  酸化、および脂肪分解 (hormone-sensitive lipase : HSL を解析対象とした) に関する遺伝子発現量に有意差は認めなかった (図 9)。

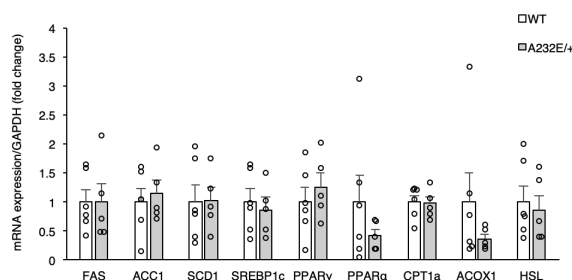


図 9. eWAT における TG 代謝に関連した遺伝子の発現

HFD 条件下における、eWAT の TG 代謝に関連した遺伝子の発現量を解析した。(n=5-6)

以上の遺伝子発現の結果は、A232E/+ マウスにおける脂肪肝の軽減が、肝臓における SREBP1c が標的とする脂肪酸合成遺伝子の発現抑制によるものであることを示唆していた。SREBP1c そのものの遺伝子発現は抑制されていることから、SREBP1c の活性化が障害されている可能性が考えられた。

### 3-1-9. 肝臓における SREBP1, SREBP2, ChREBP のタンパク質発現

SREBP は膜結合型の前駆体タンパク (precursor form of SREBP : pSREBP) として合成され、ゴルジ体へと輸送された後に膜結合部位周辺で蛋白分解酵素 (S1P、S2P) により 2 箇所の切断を受け、活性化タンパク (nuclear form of SREBP : nSREBP) として N 末端側が核に移行し転写因子として標的遺伝子のプロモーターを活性化する (9)。

そこで、次に肝臓における pSREBP1 と nSREBP1 のタンパク質発現を分画し別々に解析した。膜画分における pSREBP1 のタンパク質発現は、SD では WT マウスと比較して A232E/+ マウスで有意に増加し、HFD では増加する傾向を認めた (図 10A,B)。対照的に、核画分における nSREBP1 のタンパク質発現は、WT マウスと比較して A232E/+ マウスでは SD 条件下で減少する傾向があり、HFD 条件下では統計的に有意な減少を認めた (図 10D,E)。

一方で、pSREBP2 と nSREBP2 のタンパク質発現は、いずれも SD および HFD 条件下において WT マウスと比較して A232E/+ マウスで有意な変化は見られなかった (図 10A,C,D,F)。

また、SREBP1 の他に脂肪酸合成遺伝子を正に調節する重要な転写因子として carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) が知られている (9)。ChREBP は脱リン酸化により活性化され、核へ移行して転写因子として働く。核画分における非リン酸化 ChREBP のタンパク質発現は、いずれの食事条件下においても A232E/+ マウスで変化しなかった (図 10D,G)。

以上の結果より、A232E/+ マウスでは SREBP1 の活性化が低下しており、それが脂肪酸合成遺伝子の発現低下に関与していることが示唆された。

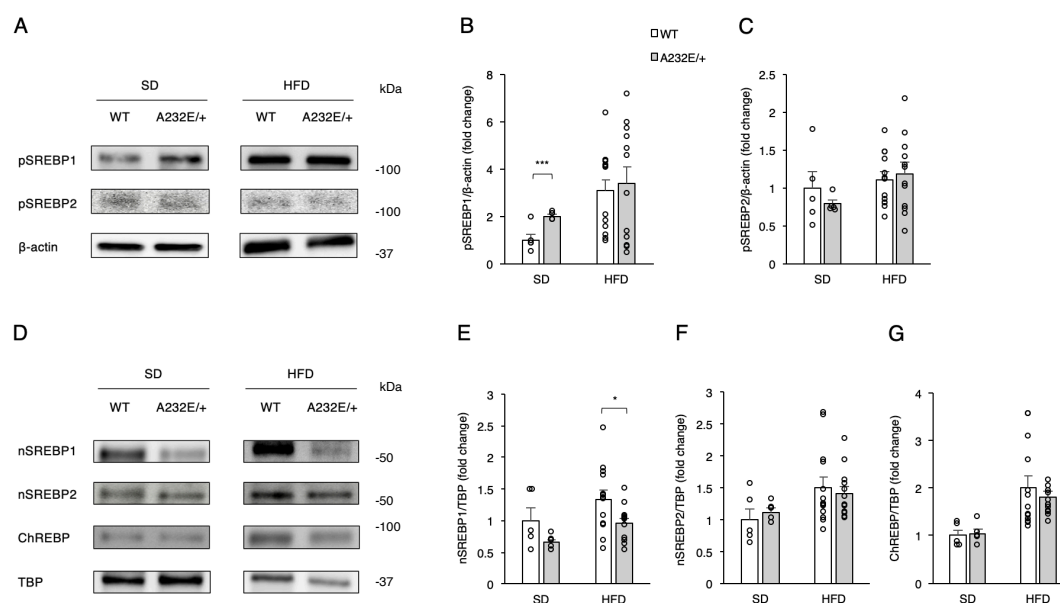


図 10. 肝臓における膜および核画分のタンパク質発現

- A: 膜画分における代表的なウエスタンブロット解析像。pSREBP1、pSREBP2、ローディングコントロールとして  $\beta$ -actin について分析した。
- B: SREBP1 について A の各バンドを定量化し、 $\beta$ -actin で補正した後、WT マウスと A232E/+ マウスを比較した。(SD, n=5 ; HFD, n=12-13)
- C: SREBP2 について A の各バンドを定量化し、 $\beta$ -actin で補正した後、WT マウスと A232E/+ マウスを比較した。(SD, n=5 ; HFD, n=12-13)
- D: 核画分における代表的なウエスタンブロット解析像。nSREBP1、nSREBP2、ChREBP、ローディングコントロールとして TBP について分析した。
- E: SREBP1 について D の各バンドを定量化し、TBP で補正した後、WT マウスと A232E/+ マウスを比較した。(SD, n=5 ; HFD, n=12-13)
- F: SREBP2 について D の各バンドを定量化し、TBP で補正した後、WT マウスと A232E/+ マウスを比較した。(SD, n=5 ; HFD, n=12-13)
- G: ChREBP について D の各バンドを定量化し、TBP で補正した後、WT マウスと A232E/+ マウスを比較した。(SD, n=5 ; HFD, n=12-13)
- (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ )

### 3-1-10. VCP と相互作用するタンパク質分解酵素の検討

A232E/+ マウスで SREBP1 の活性化が低下したことから、VCP が SREBP1 の活性化に関与していることが示唆された。一方、SREBP2 の活性化に変化がないことから、VCP が関与する SREBP1 の活性化には S1P や S2P 以外のタンパク質分解酵素が関与する可能性が考えられた。実際、HFD 条件下の肝臓を用いた共免疫沈降法による解析において、WT マウスと A232E/+ マウスのいずれにおいても S1P と VCP の相互作用は確認されなかった (図 11A)。

分裂酵母では、rhomboid protease である Rbd2 が Sre1 (SREBP のホモログ) の切断活性化プロセスに必要であることが知られている (図 12) (21)。Rbd2 は VCP のホモログである Cdc48 に結合し、Rbd2 と Cdc48 の結合が阻害されると Sre1 の活性化が低下する (22-23)。一方で哺乳動物では、rhomboid protease のホモログの 1 つである RHBDL4 が、小胞体関連分解の際に VCP と結合する (24)。さらに近年、RHBDL4 が SREBP1 を直接切断することが報告された (25)。以上の既報を踏まえ、VCP と RHBDL4、および SREBP1 の間の相互作用を解析した。WT マウスでは VCP と RHBDL4 の結合が確認されたが、A232E/+ マウスでは確認されなかった (図 11B)。さらに、VCP と SREBP1 の結合は WT マウスと比較し A232E/+ マウスで低下していた (図 11C)。

以上の結果は、VCP は RHBDL4 や SREBP1 と相互作用し、A232E 変異が VCP と RHBDL4、および SREBP1 との相互作用を障害することを示唆している。



図 11. 共免疫沈降法による肝臓のタンパク質相互作用解析

- A: 抗 S1P 抗体で免疫沈降したタンパク質を使用した S1P および VCP のウエスタンブロット。  
 B: 抗 RHBDL4 抗体で免疫沈降したタンパク質を使用した RHBDL4 および VCP のウエスタンブロット。  
 C: 抗 SREBP1 抗体で免疫沈降したタンパク質を使用した SREBP1 および VCP のウエスタンブロット。

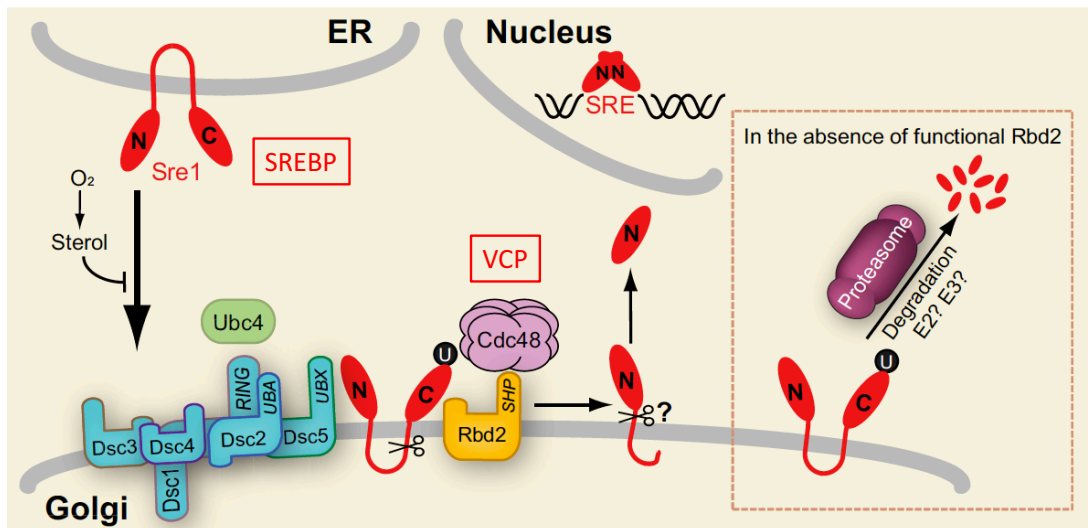


図 12. 分裂酵母における Cdc48 を介した Sre1 活性化メカニズムの模式図 (文献 25 (図 10) を参照、一部改変)  
 赤枠内に哺乳類のホモログを示した。



### 3-2. *in vitro* における解析

#### 3-2-1. HepG2 細胞を用いた VCP, RHBDL4 の RNA 干渉によるノックダウン、および VCP 阻害薬投与実験

SREBP1 の活性化における VCP および RHBDL4 の意義を直接検討するために、ヒト肝細胞株である HepG2 細胞を用いて siRNA による VCP または RHBDL4 のノックダウン、および VCP のアロステリック阻害薬である NMS-873 の投与実験を行った。VCP と RHBDL4 の siRNA は、それぞれ標的タンパク質の発現を効果的に減少させた (図 13A,C)。また、いずれの場合も nSREBP1 はコントロールと比較して明らかに減少したが、pSREBP1 は変化しなかった (図 13A,C)。NMS-873 の投与は VCP の発現量に影響を与えなかったが、RNA 干渉実験と同様に pSREBP1 の発現量に変化を与えずに nSREBP1 を減少させた (図 13B)。また、小胞体ストレス調節膜貫通転写因子である activating transcription factor 6 (ATF6) は、SREBP1 と同様に S1P および S2P によって切断活性化されることが知られている (26)。*in vivo* における VCP と S1P の結合がないことを示す結果 (図 11A) と一致して、VCP のノックダウンおよび阻害薬投与いずれの場合も、活性化 ATF6 は減少しなかった (図 13A,B)。これは RHBDL4 のノックダウンについても同様であった (図 13C)。

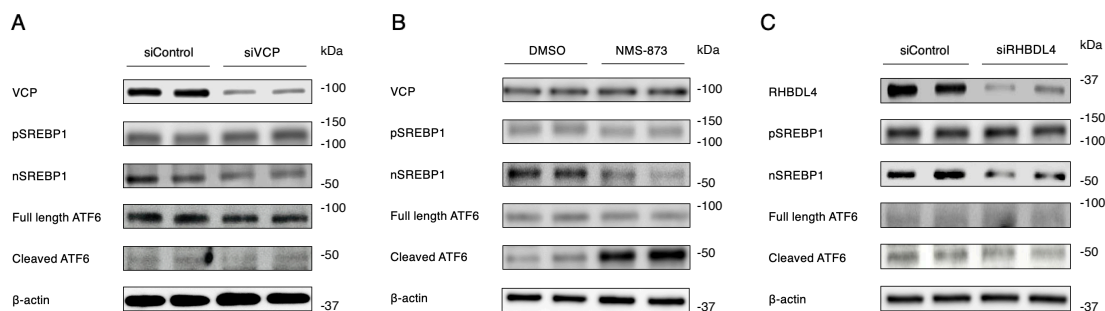


図 13. HepG2 細胞における RNA 干渉および NMS-873 投与の SREBP1 活性化に及ぼす影響の検討

A: siRNA で VCP をノックダウンした時のウエスタンブロット。

B: siRNA で RHBDL4 をノックダウンした時のウエスタンブロット。

C: NMS-873 で VCP を阻害した時のウエスタンブロット。

また、SREBP1 標的遺伝子である FAS および SCD1 の mRNA 発現についても解析した。VCP または RHBDL4 のノックダウン、VCP 阻害薬はいずれも FAS と SCD1 の mRNA 発現を有意に減少させた (図 14A-C)。これは、図 13 における nSREBP1 の減少と一致していた。

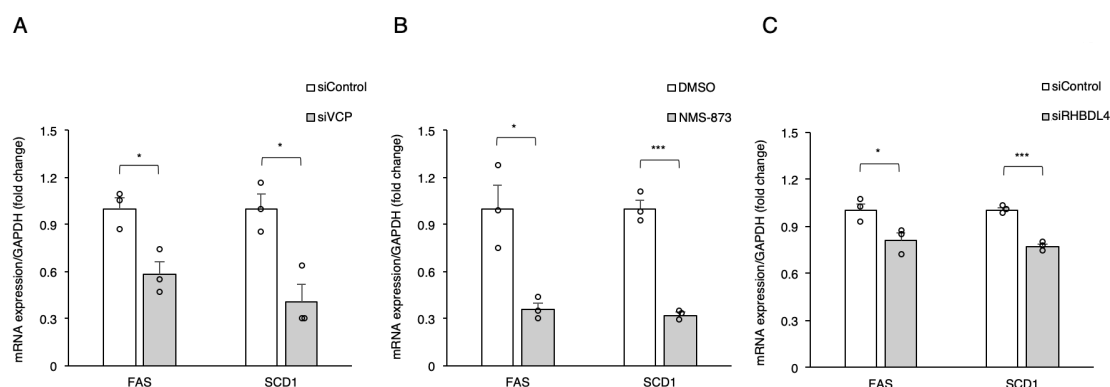


図 14. HepG2 細胞における RNA 干渉および NMS-873 投与の SREBP1 標的遺伝子の発現に及ぼす影響の検討

A: siRNA で VCP をノックダウンした時の脂肪酸合成遺伝子の mRNA 発現。(n=3)

B: siRNA で RHBDL4 をノックダウンした時の脂肪酸合成遺伝子の mRNA 発現。(n=3)

C: NMS-873 で VCP を阻害した時の脂肪酸合成遺伝子の mRNA 発現。(n=3)  
(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ )

以上より、SREBP1 の活性化において VCP と RHBDL4 は、それぞれ重要な役割を有していることが明らかとなった。

### 3-2-2. E3 ligase (HRD1 および gp78) の RNA 干渉によるノックダウン実験

次に、RHBDL4 による SREBP1 の切断活性化における VCP の意義について検討した。分裂酵母では、Dsc E3 ユビキチンリガーゼが前述の Rbd2 による Sre1 切断に先駆けて Sre1 をユビキチン化することが証明されており、Cdc48 がユビキチン化 Sre1 を認識して Rbd2 をリクルートすることが示唆されている (図 12) (23)。哺乳類においては、サブユニットや構造が Dsc E3 ユビキチンリガーゼと類似している E3 ユビキチンリガーゼとして glycoprotein 78 (gp78) と HMG-CoA reductase degradation protein 1 (HRD1) が知られており、それぞれの肝臓特異的ノックアウトマウスでは脂肪肝が軽減されることが報告されている (27-29)。マウス肝臓を用いた共免疫沈降法によるタンパク質相互作用解析では、A232E 変異の有無に関わらず gp78 と HRD1 いずれもが SREBP1 と結合することが確認された (図 15)。

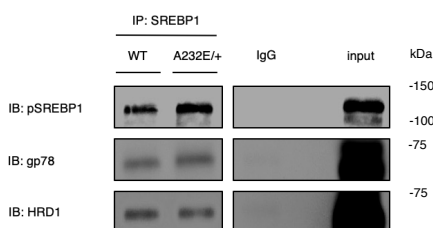
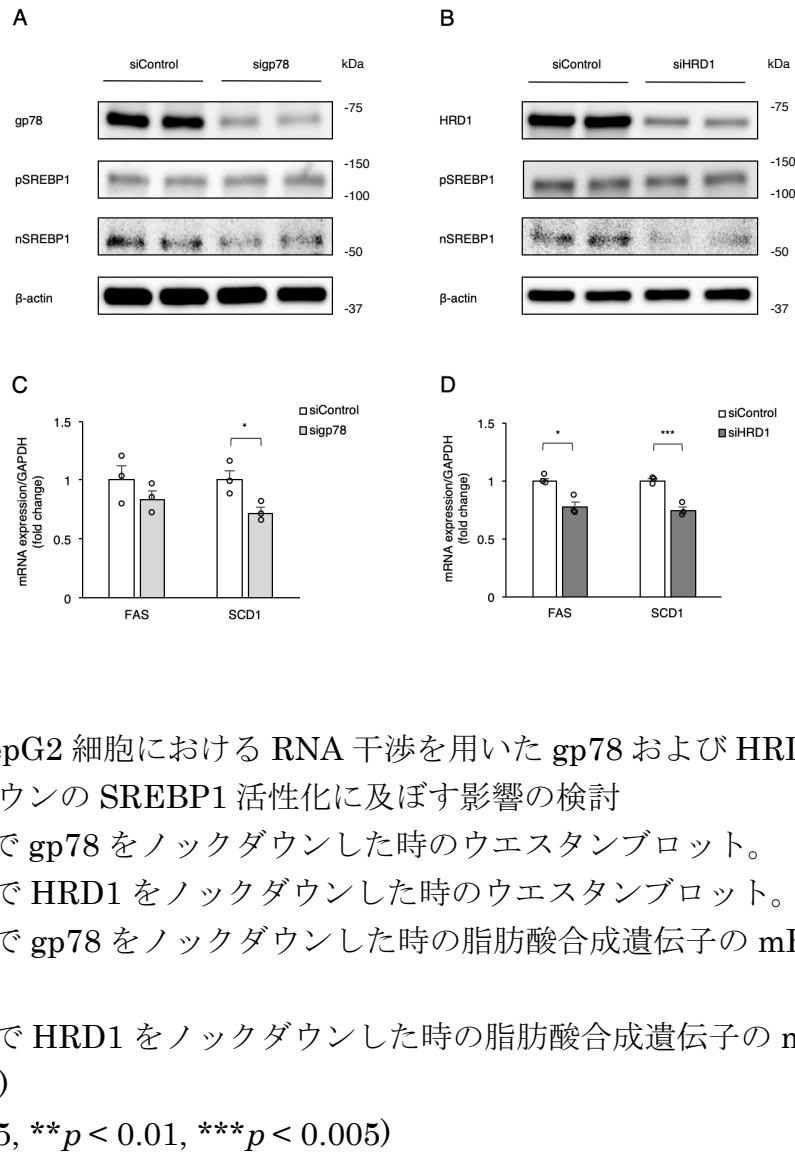


図 15. 肝臓における gp78, HRD1 と SREBP1 のタンパク質相互作用解析  
抗 SREBP1 抗体で免疫沈降したタンパク質を使用した gp78 および HRD1 のウエスタンブロット。

次に、HepG2 細胞を用いて siRNA による gp78 または HRD1 のノックダウンを行い、ヒト肝細胞の SREBP1 切断活性化における gp78 と HRD1 の役割を検証した。gp78 と HRD1 の siRNA は、それぞれ標的タンパク質の発現を効果的に減少させた (図 16A,B)。いずれの場合も nSREBP1 はコントロールと比較して明らかに減少したが、pSREBP1 は変化しなかった (図 16A,B)。

また、SREBP1 が標的とする脂肪酸合成遺伝子の発現に対する gp78 または HRD1 ノックダウンの影響も検証した。各ノックダウンにより FAS および SCD1 の遺伝子発現が減少し、nSREBP1 の減少と一致していた (図 16C,D)。



### 3-2-3. E3 ligase ノックダウン時のタンパク質間相互作用

gp78またはHRD1のノックダウンが、HepG2細胞におけるSREBP1とVCP、およびSREBP1とRHBDL4の相互作用に及ぼす影響について共免疫沈降法を用いて検証した。SREBP1とVCP、およびSREBP1とRHBDL4の相互作用は、いずれもgp78またはHRD1のノックダウンによって減少することが確認された(図17A,B)。また、ユビキチン化SREBP1のタンパク質量もそれぞれgp78とHRD1のノックダウンによって減少した(図17A,B)。

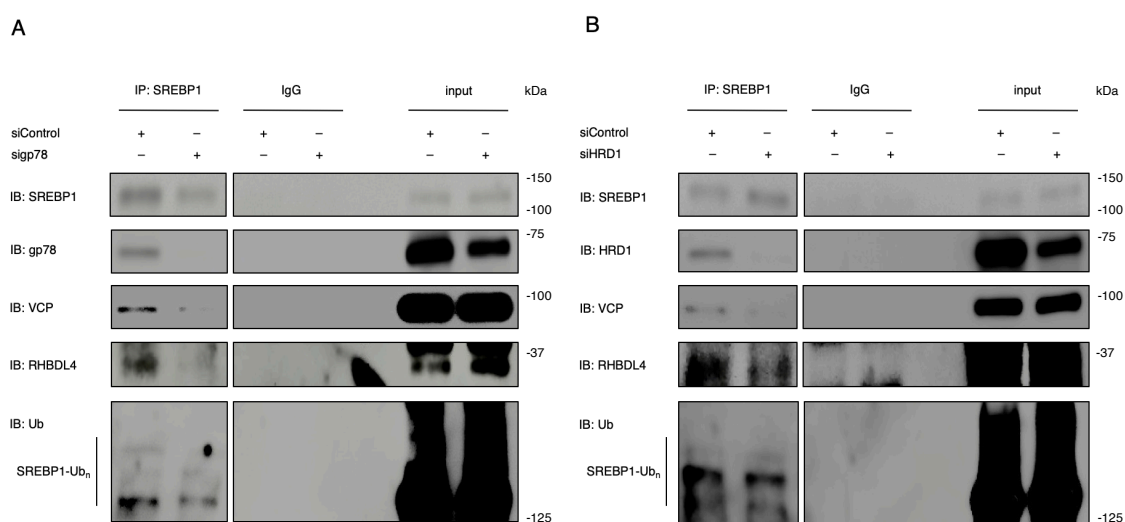


図 17. HepG2 細胞における gp78, HRD1 ノックダウン時のタンパク質相互作用の検討

A: siRNA で gp78 をノックダウンした細胞から抽出したタンパク質を抗 SREBP1 抗体で免疫沈降し解析に使用した、SREBP1、gp78、VCP、RHBDL4 およびユビキチン (Ub) のウエスタンブロット。

B: siRNA で HRD1 をノックダウンした細胞から抽出したタンパク質を抗 SREBP1 抗体で免疫沈降し解析に使用した、SREBP1、HRD1、VCP、RHBDL4 および Ub のウエスタンブロット。

以上の結果より、哺乳類では VCP が E3 ユビキチンリガーゼによりユビキチン化された SREBP1 を認識し、リクルートすることにより、RHBDL4 による SREBP1 の切断活性化に寄与する、新規のメカニズムが存在することが示唆された (図 18)。

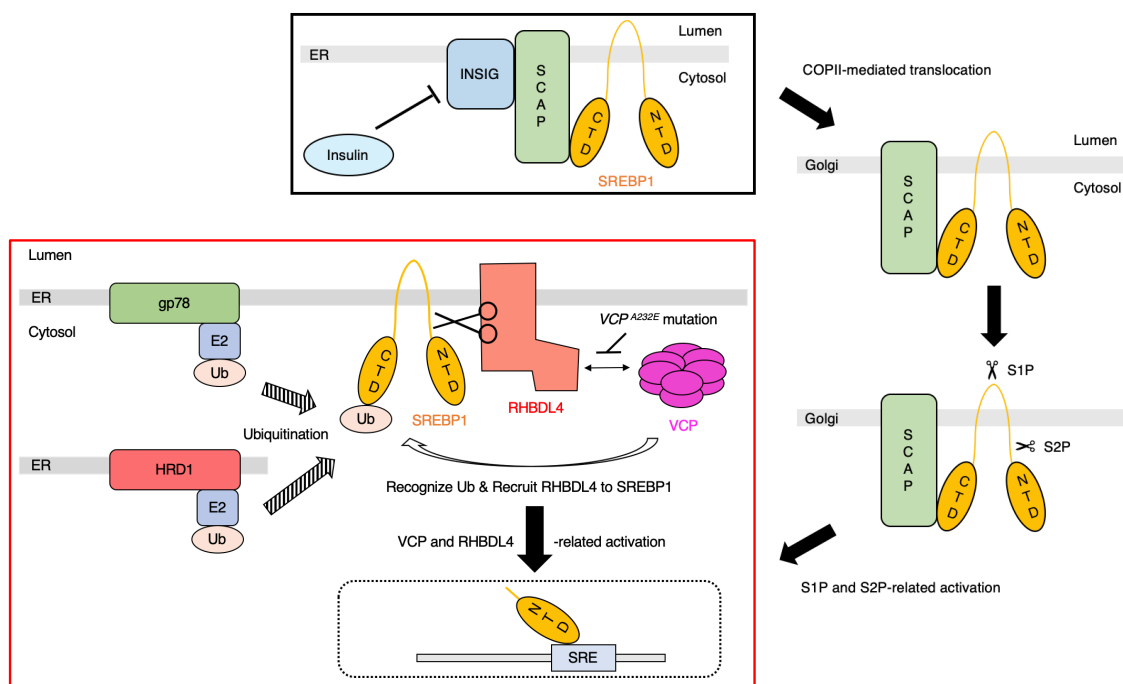


図 18. 哺乳類において VCP が関与する新規 SREBP1 活性化機構の模式図  
赤枠内に今回解明した VCP-RHBDL4-SREBP1-E3 ligase 経路を示す。  
(C-terminal domain : CTD, N-terminal domain : NTD)

#### 4. 考察

本研究では、A232E/+ マウスにおける食餌誘発性脂肪肝軽減の根底にあるメカニズムを解析することにより、肝臓の脂肪蓄積における VCP の病態生理学的意義を明らかにした。肝臓での脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現を調べたところ、FAS、ACC1、SCD1 などの SREBP1 標的遺伝子の発現が SREBP1c の発現と比較して相対的に減少していることが判明し、SREBP1c の翻訳または翻訳後修飾の障害が示唆された (図 7)。SREBP1 は小胞体に存在する膜タンパク質として合成され、タンパク分解酵素による切断を受けて活性型の成熟タンパク質となり、核に移行することで脂肪酸合成遺伝子の転写を活性化する (9)。A232E/+ マウスの肝臓では、膜画分の pSREBP1 は変化していなかった一方、核画分の nSREBP1 は明らかに WT マウスよりも減少していた (図 10)。これらの結果は、VCP の A232E 変異が SREBP1 の切断活性化を損なわせることを示している。食餌誘発性脂肪肝は A232E/+ マウスで抑制されたが、SD 給餌下では肝臓 TG 含有量に有意な変化は認めなかった (図 2,3)。これは、HFD 負荷による肝臓での TG 合成増加に応じて、SREBP1 の役割が増加したためと考えられる。

これまでに分裂酵母の検討において、SREBP の活性化における VCP の意義が示唆されていた。Rhomboïd protease である Rbd2 は、分裂酵母における SREBP の活性化を行うとされるが、この過程には VCP のホモログである Cdc48 の Rbd2 への結合が必要である (21-23)。哺乳類においては rhomboïd protease の 1 つである RHBDL4 が小胞体ストレス応答時に VCP と相互作用することが知られており (24)、さらに近年、RHBDL4 が、従来から広く知られる SREBP 活性化メカニズムである SCAP-INSIG システムとは独立したメカニズムで、SREBP1 を直接切断することが報告された (25)。本研究では、免疫共沈降法を用いて RHBDL4 および SREBP1 と VCP の相互作用が A232E/+ マウスで低下することを確認した (図 11)。A232E/+ マウスにおいて SREBP1 の活性化が障害されており、さらに VCP と RHBDL4 との相互作用が減弱していたため、哺乳類では RHBDL4 による SREBP1 の切断活性化に VCP と RHBDL4 の相互作用が必要であると考えられた。実際、siRNA を用いた RNA 干渉実験と VCP のアロステリック阻害薬を使用した実験は、この仮説を支持していた (図 13,14)。

分裂酵母では Dsc E3 ユビキチンリガーゼは、分裂酵母における SREBP の Rbd2 による切断に先駆けて SREBP に作用してユビキチン化し、Cdc48 はユビキチン化された SREBP に Rbd2 をリクルートする役割を果たすと考えられている (22)。Dsc E3 ユビキチンリガーゼは 5 つのサブユニットから構成される複合体であり、その構造は哺乳類の E3 ユビキチンリガーゼである gp78 および

HRD1 の構造と類似している。そこで、我々はヒト肝細胞株において、SREBP1 の切断活性化における gp78 と HRD1 の意義を分析した。siRNA を使用した RNA 干渉と共免疫沈降法を併せた分析により、gp78 や HRD1 のノックダウンにより SREBP1 の活性化が阻害され、VCP と SREBP1、および RHBDL4 と SREBP1 の相互作用が阻害されることを確認した (図 16,17)。以上の結果は、哺乳類の VCP による SREBP1 の認識には、gp78 や HRD1 などの E3 ユビキチンリガーゼによる事前の SREBP1 ユビキチン化が必要である可能性があることを示唆している (図 18)。

A232E 変異により VCP と RHBDL4 および SREBP1 との結合が損なわれることは、VCP のアミノ酸配列における 232 部位のアラニン残基が ATPase 活性だけでなく、RHBDL4 および SREBP1 との結合にも重要であることを示している。VCP は、補因子である Npl4/Ufd1 ヘテロダイマーを介してユビキチン化タンパク質を認識することが知られている (30)。そのため、SREBP1 についてもユビキチン化された後に Npl4/Ufd1 ヘテロダイマーを介して VCP と結合すると考えられる。RHBDL4 や Npl4/Ufd1 ヘテロダイマーを含む多くの VCP 補因子は、VCP の N 末端ドメインに結合することが知られている (13)。N 末端ドメインの立体構造は D1 ドメインによって制御されているため (31)、D1 ドメインにおける A232E を含む VCP の病的変異は N 末端ドメインの立体構造を変化させることで、その補因子との結合に影響を生じることが示されている (32)。したがって、A232E 変異は RHBDL4 と Npl4/Ufd1 ヘテロダイマーの両方に対する N 末端ドメインの結合親和性を減弱させていたと考えられる。

HFD による食餌誘発性脂肪肝は A232E/+ マウスで軽減されたが、白色脂肪組織重量は WT マウスと比較して有意に増加した (図 2)。A232E/+ マウスは全身におけるノックインマウスだが、脂肪組織における脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現変化は乏しく、VCP の A232E 変異が脂肪組織での表現型に直接影響を与えたとは考えにくい。また、肝臓特異的な遺伝子改変により脂肪肝が抑制されたマウスでは、脂肪組織での脂肪酸合成は増加していることが示されている (27,33)。これらの事実から、A232E/+ マウスにおける脂肪組織重量の増加は、脂肪肝軽減の二次的変化であったと考えられる。一方で、肝臓および脂肪組織はいずれにおいても中性脂肪の蓄積がインスリン抵抗性の原因となるため、A232E/+ マウスの肝臓ではインスリン抵抗性が抑制され、脂肪組織ではインスリン抵抗性が増大していたと予想される。HFD を給餌した場合、A232E/+ マウスは WT マウスよりも良好なインスリン感受性を示したため (図 4)、少なくとも今回の解析条件においては肝臓におけるインスリン抵抗性の抑制が、脂肪組織におけるインスリン抵抗性増大に優っていたと考えられるが、個体のインスリン感受性に対する各臓器の寄与度については、異なる解析条件における検討



がさらに必要である。また、血中 TG 濃度については A232E/+ マウスでは WT マウスと比較し高値であった (図 4)。脂肪組織が消失し代償的に他臓器に脂肪が蓄積する疾患である脂肪萎縮症では、表現型として脂肪肝や高 TG 血症を呈することが知られているが (34)、脂肪萎縮症モデルマウスに PPAR $\gamma$  アゴニストであるロシグリタゾン投与すると、肝臓での TG 合成が亢進し脂肪肝が増悪する一方で、血中 TG 濃度は低下することが報告されている (35)。このことは、肝臓における TG 合成亢進が肝臓内の TG 蓄積量を増やす一方で、循環血液中の TG 量は減少させることを示している。逆に、肝臓での TG 合成低下は肝臓内の TG 蓄積量を減らし、循環血液中の TG 量を増加させることが予想される。実際、肝臓での TG 合成が抑制されている A232E/+ マウスでは肝臓での TG 蓄積量は減少し血中 TG 濃度は上昇していた。以上より、肝臓における TG 合成能は肝臓での TG 貯蔵量を規定し、肝臓での TG 貯蔵量は血中 TG 濃度や脂肪組織などの他臓器における TG 蓄積量と逆相関すると考えられる。

RHBDL4 は小胞体ストレス応答時に VCP と相互作用することが報告されており (24)、本研究では前述のように A232E 変異が VCP と RHBDL4 との相互作用を低下させることを示した。今回、肝臓の脂肪蓄積に対する A232E 変異の影響についての解析を主体に行い、A232E/+ マウスの小胞体ストレス応答に関する表現型の解析は行っていない。少なくとも今回解析に用いた 20 週齢の比較的若いマウスでは、肝臓における小胞体ストレスマーカーの発現に変化は認められなかった。小胞体ストレスに関する表現型を検証するためには、より週齢の進んだマウスを用いた解析が必要であると考えられる。

## 5. 結語

本研究は、肝臓の脂肪蓄積における VCP の病態生理的意義を明らかにした。VCP は RHBDL4 との相互作用を介して SREBP1 の切断活性化に関与する。すなわち、VCP は E3 ユビキチンリガーゼによってユビキチン化された SREBP1 を認識し、RHBDL4 を SREBP1 へリクルートするという、新規の SREBP1 活性化機構の存在が示唆された。VCP の A232E 変異は、VCP と RHBDL4 あるいは SREBP1 との相互作用を減弱することにより、RHBDL4 による SREBP1 の切断活性化を障害して脂肪肝を軽減させる。今後、VCP、RHBDL4、E3 ligase を標的とした脂肪肝の新たな治療法開発が期待される。

## 6. 謝辞

本研究は、自治医科大学大学院医学研究科若手スタートアップ研究費からの助成を受けたものであり、ご支援賜りました関係各所の皆様に深く感謝いたします。

また、本研究を進めるにあたり、ご指導いただきました自治医科大学内科学講座内分泌代謝学部門教授 石橋俊先生、自治医科大学内科学講座内分泌代謝学部門准教授 海老原健先生、および研究の計画・遂行にあたり数々のご助言・ご支援を下さいました自治医科大学内科学講座内分泌代謝学部門の皆様、心より御礼を申し上げます。

さらに、本研究について度々のディスカッションのお時間を提供下さいました筑波大学内分泌代謝・糖尿病内科教授 島野仁先生をはじめとする筑波大学内分泌代謝・糖尿病内科の先生方に、厚く御礼を申し上げます。

## 7. 引用文献

1. Yoshino S, Iwasaki Y, Matsumoto S, Satoh T, Ozawa A, Yamada E, Kakizaki S, Trejo JAO, Uchiyama Y, Yamada M, Mori M. Administration of small-molecule guanabenz acetate attenuates fatty liver and hyperglycemia associated with obesity. *Sci Rep.* 10:13671, 2020.
2. Pennisi G, Celsa C, Spatola F, Dallio M, Federico A, Petta S. Pharmacological Therapy of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: What Drugs Are Available Now and Future Perspectives. *Int J Environ Res Public Health.* 16:4334, 2019.
3. Marjot T, Moolla A, Cobbold JF, Hodson L, Tomlinson JW. Nonalcoholic fatty liver disease in adults: Current concepts in etiology, outcomes, and management. *Endocr Rev.* 41:bnz009, 2020.
4. Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, George J, Bugianesi E. Global burden of NAFLD and NASH trends, predictors, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 15:11-20, 2018.
5. Hodson L. Hepatic fatty acid synthesis and partitioning: the effect of metabolic and nutritional state. *Proc Nutr Soc.* 78:126-134, 2019.
6. Peng J, Yu J, Xu H, Kang C, Shaul PW, Guan Y, Zhang X, Su W. Enhanced Liver Regeneration After Partial Hepatectomy in Sterol Regulatory Element-Binding Protein (SREBP)-1c-Null Mice is Associated with Increased Hepatocellular Cholesterol Availability. *Cell Physiol Biochem.* 47:784-799, 2018.
7. Takeuchi Y, Yahagi N, Izumida Y, Nishi M, Kubota M, Teraoka Y, Yamamoto T, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Sekiya M, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Gotoda T, Ishibashi S, Itaka K, Kataoka K, Nagai R, Yamada N, Kadowaki T, Shimano H. Polyunsaturated fatty acids selectively suppress sterol regulatory element-binding protein-1 through proteolytic processing and autoloop regulatory circuit. *J Biol Chem.* 285:11681-11691, 2010.
8. Monnerie H, Romer M, Jensen BK, Millar JS, Jordan-Sciutto KL, Kim SF, Grinspan JB. Reduced sterol regulatory element-binding protein (SREBP) processing through site-1 protease (S1P) inhibition alters oligodendrocyte differentiation in vitro. *J Neurochem.* 140:53-67, 2017.

9. Xu X, So JS, Park JG, Lee AH. Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by SREBP and ChREBP. *Semin Liver Dis.* 33:301-311, 2013.
10. Matthews KA, Ozdemir C, Rawson RB. Activation of sterol regulatory element binding proteins in the absence of Scap in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 185:189-198, 2010.
11. Manno A, Noguchi M, Fukushi J, Motohashi Y, Kakizaka A. Enhanced ATPase activities as a primary defect of mutant valosin-containing proteins that cause inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia. *Genes Cells.* 15:911-922, 2010.
12. Ide Y, Horie T, Saito N, Watanabe S, Otani C, Miyasaka Y, Kuwabara Y, Nishino T, Nakao T, Nishiga M, Nishi H, Nakashima Y, Nakazeki F, Koyama S, Kimura M, Tsuji S, Rodriguez RR, Xu S, Yamasaki T, Watanabe T, Yamamoto M, Yanagita M, Kimura T, Kakizuka A, Ono K. Cardioprotective Effects of VCP Modulator KUS121 in Murine and Porcine Models of Myocardial Infarction. *JACC Basic Transl Sci.* 4:701-714, 2019.
13. Ye Y, Tang WK, Zhang T, Xia D. A Mighty "Protein Extractor" of the Cell: Structure and Function of the p97/CDC48 ATPase. *Front Mol Biosci.* 4:39, 2017.
14. Wang J, Takeuchi T, Tanaka S, Kubo SK, Kayo T, Lu D, Takata K, Koizumi A, Izumi T. A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse. *J Clin Invest.* 103:27-37, 1999.
15. Harding HP, Zeng H, Zhang Y, Jungries R, Chung P, Plesken H, Sabatini DD, Ron D. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*<sup>-/-</sup> mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell.* 7:1153-1163, 2001.
16. Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, Myers MG Jr, Ozcan U. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab.* 9:35-51, 2009.
17. Hosoi T, Sasaki M, Miyahara T, Hashimoto C, Matsuo S, Yoshii M, Ozawa K. Endoplasmic reticulum stress induces leptin resistance. *Mol Pharmacol.* 74:1610-1619, 2008.
18. Noguchi M, Takata T, Kimura Y, Manno A, Murakami K, Koike M, Ohizumi H, Hori S, Kakizuka A. ATPase activity of p97/valosin-

- containing protein is regulated by oxidative modification of the evolutionally conserved cysteine 522 residue in Walker A motif. *J Biol Chem.* 280:41332-41341, 2005.
19. Tang WK, Xia D. Role of the D1-D2 Linker of Human VCP/p97 in the Asymmetry and ATPase Activity of the D1-domain. *Sci Rep.* 6:20037, 2016.
  20. Niwa H, Ewens CA, Tsang C, Yeung HO, Zhang X, Freemont PS. The Role of the N-Domain in the ATPase Activity of the Mammalian AAA ATPase p97/VCP. *J Biol Chem.* 287:8561-8570, 2012.
  21. Kim J, Ha HJ, Kim S, Choi AR, Lee SJ, Hoe KL, Kim DU. Identification of Rbd2 as a candidate protease for sterol regulatory element binding protein (SREBP) cleavage in fission yeast. *Biochem Biophys Res Commun.* 468:606-610, 2015.
  22. Hwang J, Ribbens D, Raychaudhuri S, Cairns L, Gu H, Frost A, Urban S, Espenshade PJ. A Golgi rhomboid protease Rbd2 recruits Cdc48 to cleave yeast SREBP. *EMBO J.* 35:2332-2349, 2016.
  23. Burr R, Ribbens D, Raychaudhuri S, Stewart EV, Ho J, Espenshade PJ. Dsc E3 ligase localization to the Golgi requires the ATPase Cdc48 and cofactor Ufd1 for activation of sterol regulatory element-binding protein in fission yeast. *J Biol Chem.* 292:16333-16350, 2017.
  24. Fleig L, Bergbold N, Sahasrabudhe P, Geiger B, Kaltak L, Lemberg MK. Ubiquitin-dependent intramembrane rhomboid protease promotes ERAD of membrane proteins. *Mol Cell.* 47:558-569, 2012.
  25. [preprint] Han S, Nakakuki M, Nakagawa Y, Wang Y, Araki M, Yamamoto Y, Tokiwa H, Takeda H, Mizunoe Y, Motomura K, Ohno H, Murayama Y, Aita Y, Takeuchi Y, Osaki Y, Miyamoto T, Sekiya M, Matsuzaka T, Yahagi N, Sone H, Kawano H, Shimano H. Rhomboid protease RHBDL4/RHBDD1 cleaves SREBP-1c at ER monitoring and regulating fatty acids. *bioRxiv.* 10.1101/457590, 2021.
  26. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell.* 6:1355-1364, 2000.
  27. Liu TF, Tang JJ, Li PS, Shen Y, Li JG, Miao HH, Li BL, Song BL. Ablation of gp78 in liver improves hyperlipidemia and insulin resistance by inhibiting SREBP to decrease lipid biosynthesis. *Cell Metab.* 16:213-225, 2012.

28. Wei J, Yuan Y, Chen L, Xu Y, Zhang Y, Wang Y, Yang Y, Peek CB, Diebold L, Yang Y, Gao B, Jin C, Melo-Cardenas J, Chandel NS, Zhang DD, Pan H, Zhang K, Wang J, He F, Fang D. ER-associated ubiquitin ligase HRD1 programs liver metabolism by targeting multiple metabolic enzymes. *Nat Commun.* 9:3659, 2018.
29. Tong Z, Kim MS, Pandey A, Espenshade PJ. Identification of candidate substrates for the Golgi Tull1 E3 ligase using quantitative diGly proteomics in yeast. *Mol Cell Proteomics.* 13:2871-2882, 2014.
30. Lee JJ, Park JK, Jeong J, Jeon H, Yoon JB, Kim EE, Lee KJ. Complex of Fas-associated factor 1 (FAF1) with valosin-containing protein (VCP)-Npl4-Ufd1 and polyubiquitinated proteins promotes endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD). *J Biol Chem.* 288:6998-7011, 2013.
31. Tang WK, Li D, Li CC, Esser L, Dai R, Guo L, Xia D. A novel ATP-dependent conformation in p97 N-D1 fragment revealed by crystal structures of disease-related mutants. *EMBO J.* 10:2217-2229, 2010.
32. Zhang X, Gui L, Zhang X, Bulfer SL, Sanghez V, Wong DE, Lee Y, Lehmann L, Lee JS, Shih PY, Lin HJ, Iacovino M, Weihl CC, Arkin MR, Wang Y, Chou TF. Altered cofactor regulation with disease-associated p97/VCP mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112:E1705-1714, 2015.
33. Kuriyama H, Liang G, Engelking LJ, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. Compensatory increase in fatty acid synthesis in adipose tissue of mice with conditional deficiency of SCAP in liver. *Cell Metab.* 1:41-51, 2005.
34. Polyzos SA, Perakakis N, Mantzoros CS. Fatty liver in lipodystrophy: A review with a focus on therapeutic perspectives of adiponectin and/or leptin replacement. *Metabolism.* 96:66-82, 2019.
35. Chao L, Marcus-Samuels B, Mason MM, Moitra J, Vinson C, Arioglu E, Gavrilova O, Reitman ML. Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J Clin Invest.* 106:1221-1228, 2000.