

氏名	澁谷 浩史
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 682 号
学位授与年月日	令和 5 年 3 月 23 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	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
論文審査委員	(委員長) 教授 原 一 雄 (委員) 教授 小谷 和彦 准教授 三浦 光 一

論文内容の要旨

1 研究目的

非アルコール性脂肪肝はメタボリック症候群の一表現型であり、肝硬変や肝細胞癌の原因となるが、これまでに確立した治療法はない。SREBP1 は肝臓における脂肪合成の主要制御因子である。SREBP は小胞体膜に存在する前駆体の N 末端が切断され核内に移行することにより転写因子として機能するが、コレステロール代謝の要制御因子である SREBP2 とは対照的に、SREBP1 の活性化機構には未だ不明な点が多い。

一方、VCP は AAA (ATPase associated with various cellular activities) ATPase family に属し、小胞体ストレス応答など様々な細胞機能を担う蛋白質であるが、VCP の ATPase 機能獲得型変異は小胞体ストレスを介して一部の神経変性疾患の原因となることが報告されている。糖尿病や肥満などの代謝疾患の発症においても小胞体ストレスの関与が報告されているが、哺乳類における VCP と代謝疾患との関連は未だ報告がない。VCP の代謝疾患における病態生理的意義解明のために VCP 変異マウスを作製し解析したところ、偶然にも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ることを見出した。

そこで今回、VCP 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 研究方法

CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集によりマウスに VCP の ATPase 機能獲得型変異 (A232E) を導入した。作製した A232E 変異マウスを対象に高脂肪食を負荷した後、表現型を解析した。また、A232E 変異マウスの肝臓を用いて遺伝子やタンパク質発現を解析した。

また、ヒト肝細胞癌由来細胞株 HepG2 細胞を用いて、各種タンパク質発現に対する RNA 干渉や VCP 阻害薬投与時の遺伝子やタンパク質発現を解析した。また、共免疫沈降法によりタンパク質の相互作用を解析した。

3 研究成果

A232E 変異マウスは、ホモ接合体では生直後に死亡するため、解析にはヘテロ接合体を用いた。普通食下では A232E/+マウスは野生型マウスと比較し僅かに体重の減少が認められたが、高脂肪食下では体重に有意な差を認めなかった。各臓器重量を計測したところ、高脂肪食負荷後では A232E/+マウスの肝臓重量は野生型マウスと比較して有意に減少していた。組織学的検討においても、A232E/+マウスでは高脂肪食負荷による肝細胞の ballooning は軽度であり、オイルレッド O の染色性も抑制されていた。これと一致して、肝中性脂肪含有量も A232E/+マウスで有意に減少しており、A232E/+マウスでは野生型マウスと比較して高脂肪食負荷による脂肪肝が軽度であることが明らかとなった。

脂肪肝抑制のメカニズム解明を目的に A232E/+マウスの肝臓における脂肪合成関連酵素の遺伝子発現を検討したところ SREBP1 の標的遺伝子が SREBP1 の発現に比して低下していることを見出した。そこで SREBP1 のタンパク質発現を検討したところ、前駆型タンパク質に比して活性化型タンパク質が減少しており、A232E/+マウスでは SREBP1 の活性化が障害されていることが明らかとなった。

次に SREBP1 の活性化過程で VCP が相互作用し得る分子について検討した。SREBP2 はステロールの減少に伴い SCAP とともに小胞体からゴルジ体に移送され、2 種の蛋白分解酵素 (S1P と S2P) により切断を受け活性化される。しかし酵母では S1P や S2P は存在せず VCP のホモログである Cdc48 が rhomboid protease である Rbd2 と相互作用して SREBP の切断活性化を担うことが報告されている。そこでマウス肝臓タンパク質を対象に共免疫沈降法にて解析したところ、VCP が哺乳類における Rhomboid Protease の 1 つである RHBDL4 と相互作用していることが明らかとなった。さらに HepG2 細胞における siRNA を用いたノックダウン実験により SREBP1 の活性化には VCP と RHBDL4 の両方が必要であることが明らかとなった。

そこで 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。酵母を用いた既報から、Cdc48 は Dsc E3 ユビキチンリガーゼによりユビキチン化された SREBP を認識して Rbd2 にリクルートすることが示唆された。そこで HepG2 細胞を用いて Dsc E3 ユビキチンリガーゼに構造が類似したマウスの E3 ユビキチンリガーゼである gp78 および HRD1 の siRNA によるノックダウン実験を実施した。その結果、SREBP1 の活性化には、gp78 あるいは HRD1 による SREBP1 のユビキチン化が必要であることが明らかとなった。

4 考察

本研究により VCP は肝臓において脂肪合成の主要制御因子である SREBP1 の活性化に関与していることが明らかとなった。今回のマウスやヒト肝細胞株を用いた検討結果から、哺乳類において VCP は gp78 や HRD1 によりユビキチン化された SREBP1 を認識し、SREBP1 をタンパク質分解酵素である RHBDL4 へリクルートすることで SREBP1 が切断活性化を受けることが示唆された。

当初我々は小胞体ストレスを念頭に、VCP の代謝疾患における意義を解析することを目的として A232E 変異マウスを作製したが、偶然にも A232E 変異マウスでは脂肪肝が軽減することを見出した。VCP の A232E 変異は ATPase 機能獲得型変異であり、ATP 濃度の低下による小胞体ストレスをきたすことが知られている。そこで、肝臓における ATP 濃度や小胞体ストレスマーカー

についても解析した。しかし、少なくとも 20 週齢の若い A232E/+マウスにおいては ATP 濃度も小胞体ストレスマーカーも変化しておらず、小胞体ストレスや ATP 濃度は今回我々が見出した新規 SREBP1 活性化メカニズムに参与していないと考えられた。以上より、A232E の変異部位は VCP の ATPase 活性のみならず SREBP1 や RHBDL4 などの蛋白との結合にも重要であると考えられる。

5 結論

本研究は VCP に着眼し、RHBDL4 や E3 ligase との相互作用を介した新しい SREBP1 活性化メカニズムを明らかにした。今回の研究成果により、今後、VCP や RHBDL4、E3 ligase (gp78 および HRD1) を標的とした新しい脂肪肝の治療法開発につながることを期待される。

論文審査の結果の要旨

AAA-ATPase スーパーファミリーのバロシン含有タンパク質 (VCP) の代謝疾患における病態生理学的役割を、既知のヒト VCP 遺伝子変異である A232E ノックインマウスを作成して解析した。A232E 変異のノックインで ER stress を介して、肥満、糖尿病、脂肪肝が惹起されることが予想されたが、予想とは反対に、野生型マウスに比して体重差はなく脂肪肝がむしろ軽減する結果が得られた。VCP と SREBP1 および RHBDL4 が相互作用すること、A232E/+ マウスでは相互作用が減弱し SREBP1 の核内移行が阻害され、脂肪酸合成遺伝子の活性化が抑制された結果、脂肪肝が改善したことを明らかにした。SREBP1 の核内移行についてはいくつかのメカニズムが示されているが、申請者は VCP が RHBDL4 に結合することにより、SREBP1 の核内移行を促進することを明らかにした点に新規性を有する。脂肪肝疾患を治療するための新しい治療戦略の開発につながる可能性があり画期的である。

論文はすでに J biol chem に受理されており、また提出された学位論文もよくまとまっており、特に問題となるような内容はない。よって学位論文としてふさわしい内容と考える。より高いレベルにするため、以下の点で追記をお願いしたい。

- 1) マウスの餌の摂取量に差がなかったことを本文中で加筆して下さい。
- 2) A232E/+マウスでインスリン抵抗性が改善したメカニズム、インスリン抵抗性に脂肪肝が重要であるのか、脂肪組織の腫大が重要かについて考察し追記して下さい。
- 3) A232E/+マウスでの血中中性脂肪が高値である機序について考察のパートに追記して下さい。

以上の指摘事項に対して適切に加筆がなされたため合格と判断した。

最終試験の結果の要旨

最終試験は論文の内容に沿ってプレゼンがなされた。質疑応答についても審査委員の質問に適切に答えており、合格と判断して良いと思われた。以下の事項について論文中に追記することが提案された。

- 1) マウスの餌の摂取量に差がなかったことを本文中で加筆して下さい。

2) A232E/+マウスでインスリン抵抗性が改善したメカニズム、インスリン抵抗性に脂肪肝が重要であるのか、脂肪組織の腫大が重要かについて考察し追記して下さい。

3) A232E/+マウスでの血中中性脂肪が高値である機序について考察のパートに追記して下さい。

以上の指摘事項に対して適切に加筆がなされたため合格と判断した。