

## 山梨県若手研究者奨励事業 研究成果概要書

所属機関

山梨大学医学部

職名・氏名

臨床助教 渡邊 陽介

## 1 研究テーマ

酸化的蛋白修飾 S-グルタチオン化は脂肪合成および肥満を促進する

## 2 研究の目的

肥満になると脂肪組織中で活性酸素が増加することが知られている。また活性酸素が脂肪の合成を促進する可能性が示唆されているが、そのメカニズムは十分にはわかっていない。蛋白質は生合成された後、リン酸化やグリケーション等によって様々な翻訳後修飾され機能や活性が調節される。病的状態で増加する活性酸素も様々な蛋白質を酸化修飾しシグナル伝達に関わる。

S-グルタチオン化は酸化的状況において細胞内に豊富に存在するグルタチオンが蛋白質のシステイン残基を修飾する酸化的蛋白修飾であり、他の酸化的蛋白修飾に比べ安定かつ可逆的で活性酸素によるシグナル伝達として注目されている(図2)。本研究では脂肪合成および肥満における S-グルタチオン化の果たす役割のメカニズムについて解明する(図1)。

## 3 研究の方法

本研究では脂肪合成および肥満における S-グルタチオン化の果たす役割のメカニズムについて解明する脂肪細胞に分化する細胞株である 3T3L1 細胞において脱グルタチオン化酵素である GlrX をノックアウトし S-グルタチオン化を増加させ表現型を解析する。また GlrX KO マウスの表現型および脂肪組織の解析を行う。

## 4 研究の成果

① 脂肪細胞様 cell line 3T3L1 細胞において GlrX をノックアウトすると脂肪合成が促進する: 脂肪細胞に分化する細胞株である 3T3L1 細胞において CRISPR/Cas9 を用いて GlrX をノックアウトすると脂肪細胞分化誘導後の脂肪の合成が増加することを確認した(図3)。

② 脂肪合成に関わる転写因子 C/EBP $\beta$  は S-グルタチオン化される: 脂肪合成に関わる転写因子である PPAR $\alpha$ 、C/EBP $\alpha$  および

留意事項

- ① 3枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

図1. 本研究の目的

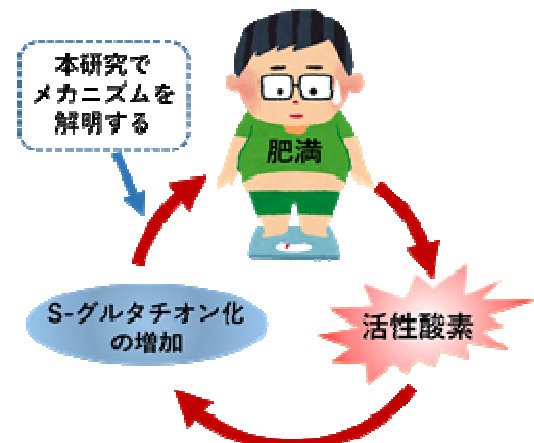
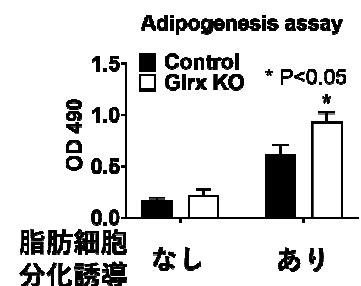


図2. 蛋白質S-グルタチオン化



図3. GlrXノックアウトで脂肪合成が促進する



$\beta$  は 3T3L1 細胞において Glrx をノックアウトすると増加することが分かった。また C/EBP $\beta$  は蛋白質レベルで発現が制御されることが示唆された。さらに C/EBP $\beta$  は S-グルタチオン化されることが判明した(図4)。

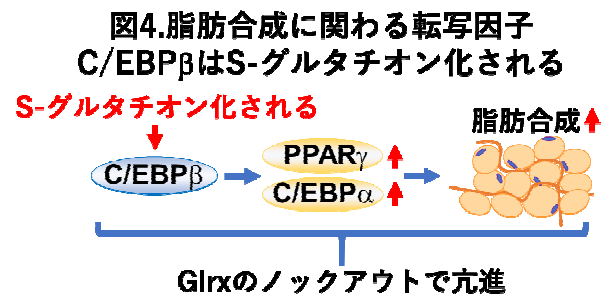
③ C/EBP $\beta$  が S-グルタチオン化されると SUMO E3 Ligase である PIAS1 の結合が抑制される: C/EBP $\beta$  は SUMO 化されたのちユビキチン化されプロテアソームにより分解される。一連の反応は SUMO E3 Ligase である PIAS1 が C/EBP $\beta$  に結合することで始まるが、S-グルタチオン化した C/EBP $\beta$  では PIAS1 の結合が低下することが分かった(図5)。

④ C/EBP $\beta$  は mRNA の翻訳開始点の違いにより full length、LAP、LIP と 3 つのアイソフォームを持つ。LIP および LIP 以外のドメインと PIAS の結合を調べる解析により、PIAS は LIP に結合することを解明した。

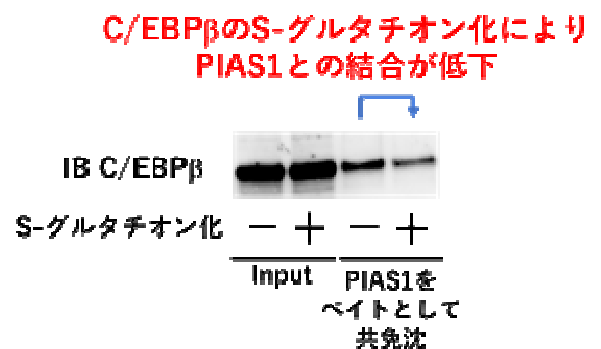
⑤ LIP ドメインには Cys201 および Cys296 の 2 つのシステインが存在する。これらをそれぞれセリンに置換したミュータント蛋白を作成しグルタチオン化した後 PIAS との結合を調べる実験を行ったところ、Cys296 をセリンに置換したミュータントではグルタチオン化による結合の抑制がなくなったため、Cys296 の S-グルタチオン化が C/EBP $\beta$  の安定化に重要であると考えられた。

⑥ アデノウイルスを用いて Glrx KO cell に Glrx を過剰発現させたところ、増加した脂肪合成が減少した。

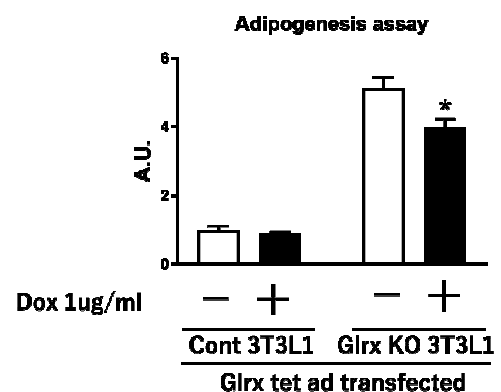
⑥ Glrx KO マウスでは野生型マウスと比較し肥満になることが分かった。



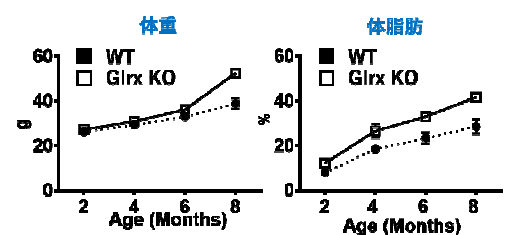
**図5. C/EBP $\beta$ のS-グルタチオン化はPIAS1の結合を抑制する**  
C/EBP $\beta$ をS-グルタチオン化してPIAS1と共免疫沈



**図6. Glrx過剰発現でGlrx KO細胞の脂肪合成が抑制される**



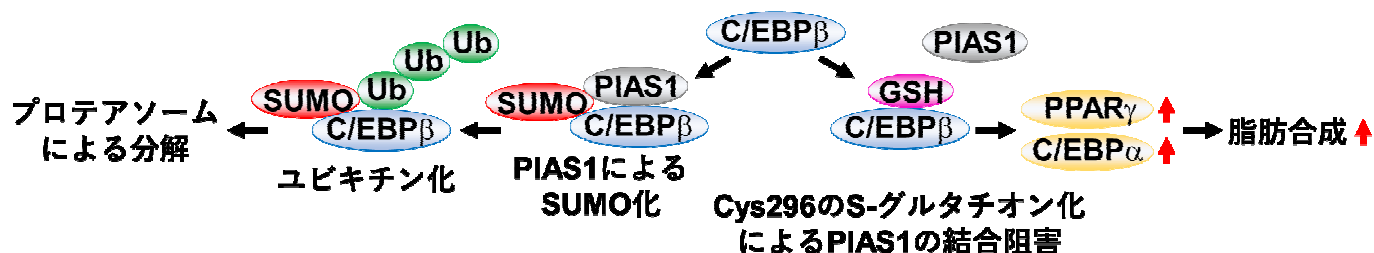
**図7. Glrx KOマウスは肥満となる**



#### 留意事項

- ① 3枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

図8.研究結果のサマリー



## 5 今後の展望

ヒトとマウス間で C/EBPβ は保存されており、ヒトにもマウスの Cys296 に対応する Cys345 が存在する。ヒトの C/EBPβ でも Cys345 のグルタチオン化が安定化に重要であるか検討する。

マウスの脂肪組織で C/EBPβ が S-グルタチオン化されるため安定化しているかを現在解析中である。これが解明できればヒトの脂肪組織を用いて同様に肥満のヒトの脂肪組織で C/EBPβ の S-グルタチオン化が起きているか検討する。マウスについてはボストン大学の研究チームと共同で解析を進めており、今後オーストラリアの研究チームと共同でヒトの脂肪組織の解析を行う予定である。さらにはマウスにおいて S-グルタチオン化を抑える薬剤を検討し、薬剤による S-グルタチオン化の抑制が肥満の抑制につながるか検討していく方針である。

## 6 研究成果の発信方法（予定を含む）

研究成果はシカゴで開催された 2018 年のアメリカ心臓学会にてポスター発表した。さらに 2019 年 3 月 29 日から 3 月 31 日に開催される日本循環器内科学会でもポスター発表を行う予定である。また研究成果は 2019 年中に論文投稿を行う予定である。

## 留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。