

山梨若手奨励事業 研究成果報告書

所属機関 山梨大学医学部内科学第二講座

職名・氏名 臨床助教 渡邊 陽介

1. 研究テーマ

酸化蛋白修飾 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に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蛋白修飾であり、他の酸化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。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。

3. 実験の方法

① 脂肪細胞分化誘導

脂肪細胞前駆細胞である 3T3L1 細胞を 0.5 mmol/L IBMX、1 μ mol/L dexamethasone、1 μ mol/L insulin、4.5 g/L glucose および 10% FBS 含有した DMEM で 2 日間培養後、1 μ mol/L insulin、4.5 g/L glucose および 10% FBS 含有した DMEM で培養し脂肪細胞分化誘導を行った。脂肪細胞に含有される脂質は細胞をホルマリン固定したのちに Oil red O で染色し、isopropanol で溶解したのちに吸光度を測定し定量を行った。

② 脱グルタチオン化酵素グルタレドキシン(Glrx)のノックアウト

3T3L1 細胞において Glrx を CRISPR/Cas9 を用いてノックアウトを行った。pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 のクローニングサイトにガイディング RNA を含んだ総補鎖を挿入した(シークエンス CACCGTTCTTGGGTCTTTCTGCAGT および AACACTGCAGAAA GACCCAAGAAC)。作成したプラスミドを 3T3L1 細胞にトランスフェクションし、puromycin で 2 日間セレクションを行うことにより Glrx のノックアウトを確立した。

③ C/EBP β におけるグルタチオン化の検出

脂肪細胞分化後の 3T3L1 細胞のライセートを抗グルタチオン(GSH)抗体を用いて免疫沈降し、S-グルタチオン化蛋白をプルダウンした。プルダウンした蛋白を非還元条件でウエスタンブロッティングし C/EBP β を検出した。さらに HEK293 細胞を用いて精製したリコンビナント C/EBP β 蛋白を試験管内で S-グルタチオン化を誘導し、質量解析を行うことで S-グルタチオン化されたシステインを同定した。

④ 共免疫沈降

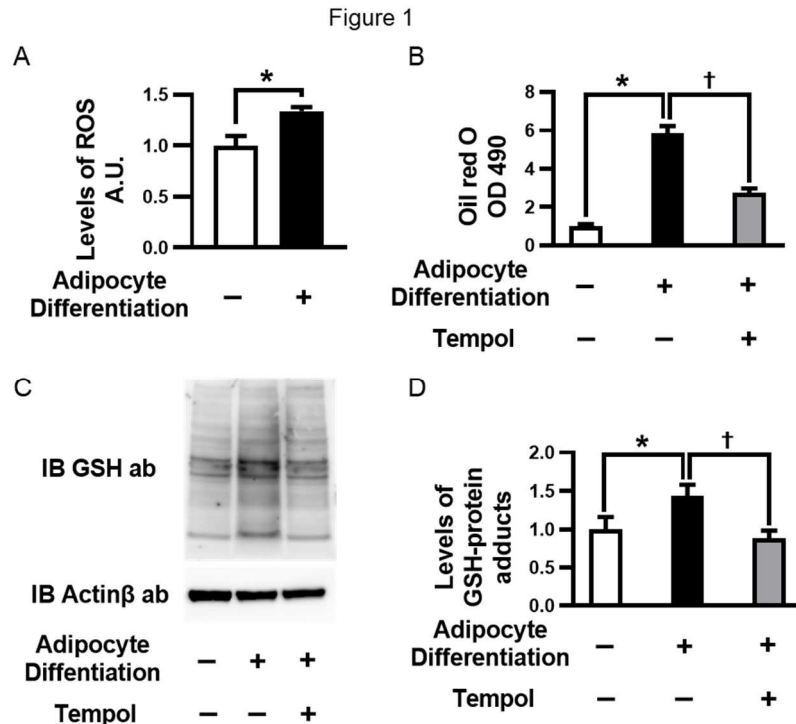
PIAS1 と C/EBP β の相互作用において C/EBP β の S-グルタチオン化がどのような影響を与え

るか検討するため共免疫沈降を行った。HA-tagged C/EBP β 、HA tag を付加した C/EBP β の LIP 領域および LIP を除いた領域、HA tag を付加した Cys201 または C296 および Cys201・Cys296 をともにセリンに置換した変異 C/EBP β を発現するプラスミドを作成した。作成したプラスミドをトランスフェクションした HEK293 細胞溶解液に還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオンを加え試験管内で S-グルタチオン化を誘導した。これらの細胞溶解液に Myc flag tagged PIAS1 を過剰発現させた HEK293 細胞溶解液を加え抗 Myc 抗体を用いて共免疫沈降を行った。

4. 実験結果

① 脂肪細胞分化における活性酸素と S-グルタチオン化

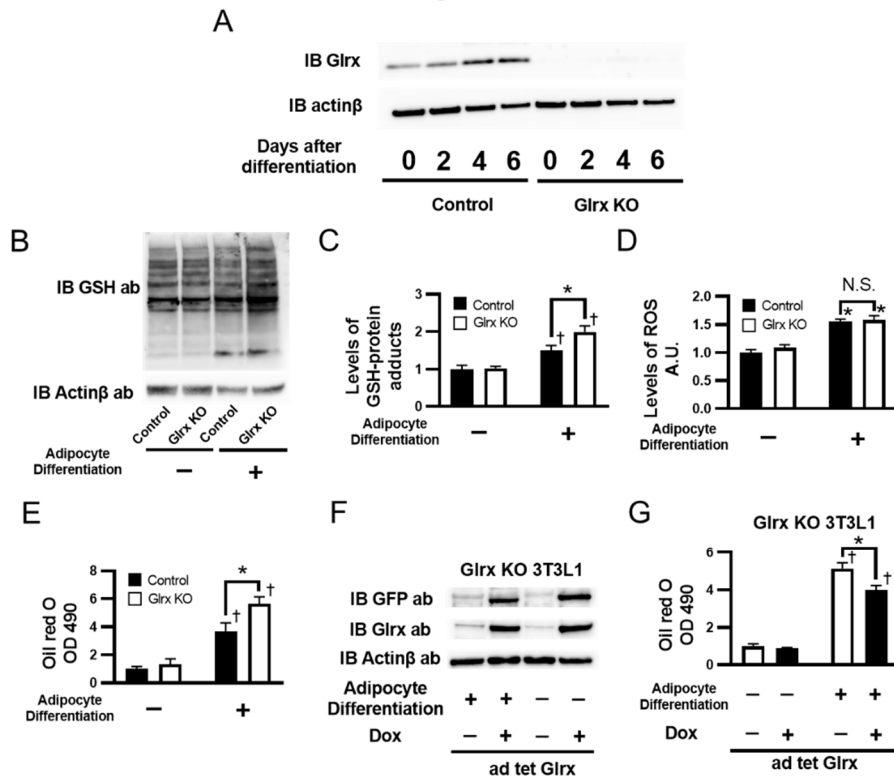
脂肪細胞分化誘導後 4 日目の 3T3L1 細胞における活性酸素(ROS)を測定した。活性酸素は脂肪細胞分化後に有意に増加した(Fig.1 A)。抗酸化物質である Tempol を脂肪細胞分化の間に加えると合成される脂質は有意に低下した(Fig.1 B)。脂肪細胞分化誘導にて S-グルタチオン化は増加するが、この反応も Tempol により抑制された(Fig.1 C および D)。



② Grlx が脂肪細胞分化に与える影響

3T3L1 細胞において CRISPR/Cas9 を用いて Grlx をノックアウトした(Fig.2A)。Grlx をノックアウトすると脂肪細胞分化後の S-グルタチオン化は増加した(Fig.2B および C)。一方で Grlx のノックアウトは活性酸素の量には影響しなかった(Fig.2D)。Grlx ノックアウトした 3T3L1 細胞ではコントロール細胞と比べ脂肪細胞分化後の脂質含有量が増加した(Fig.2E)。tetracycline-inducible GFP-tagged Grlx (Ad tet-Grlx)を発現するアデノウイルスを Grlx ノックアウト細胞にトランスフェクションした後、ドキシサイクリンを加え GFP tagged Grlx を発現させた(Fig.2F)。Grlx を発現させることにより脂肪細胞分化後の脂肪合成を抑制することができた(Fig.2G)。

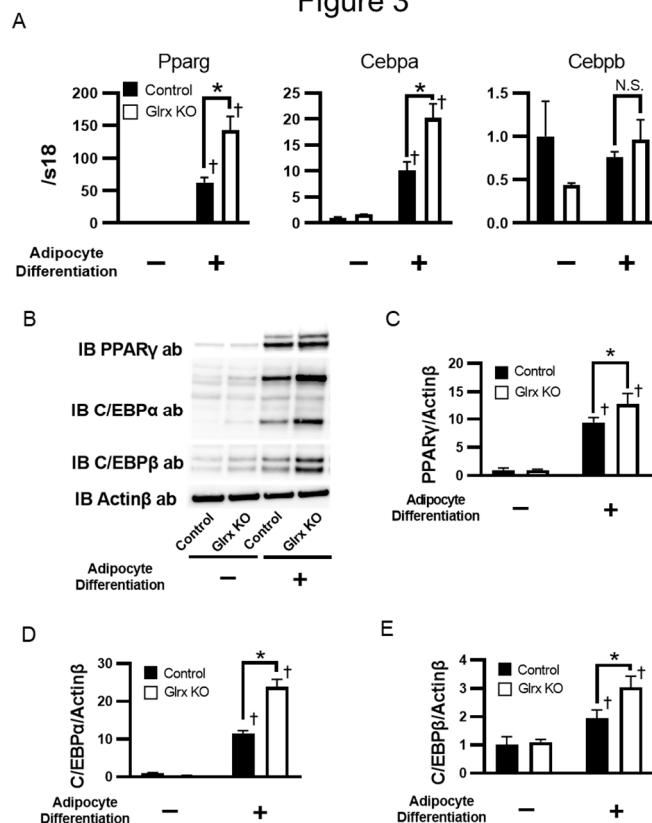
Figure 2



③ Glrx が脂肪細胞分化に関与する転写因子発現に与える影響

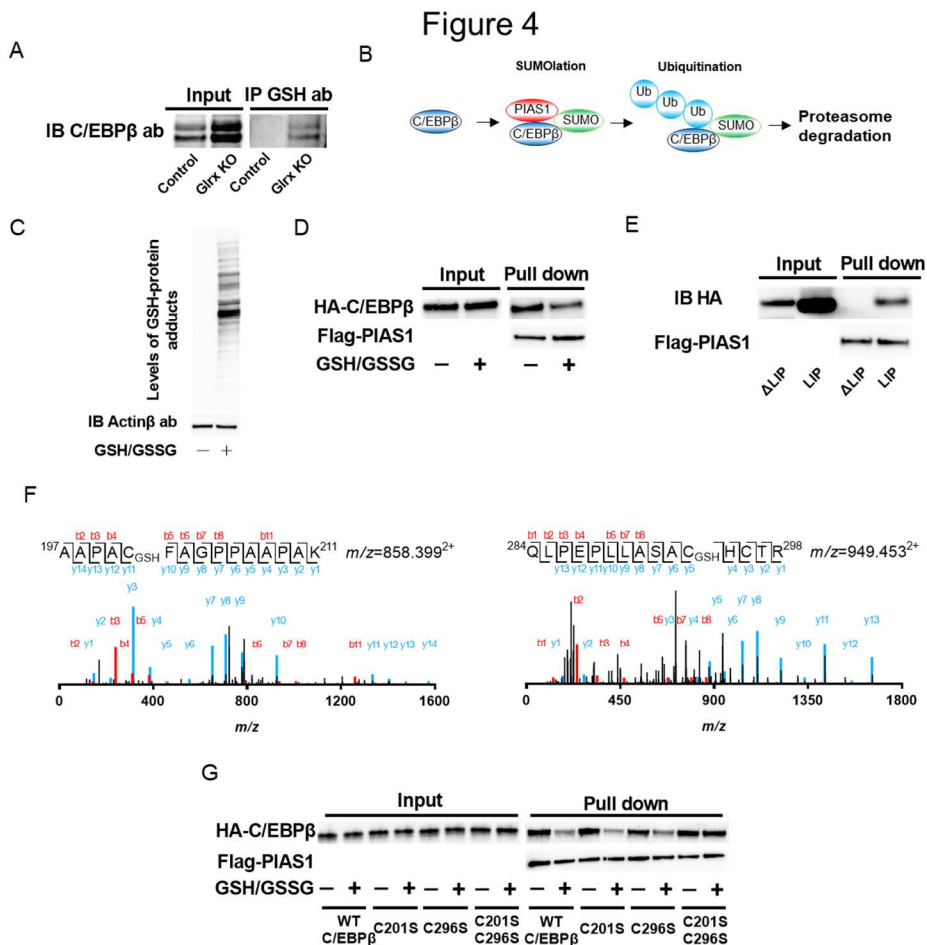
Glrx ノックアウト 3T3L1 細胞では脂肪細胞分化に関わる転写因子 PPAR γ 、C/EBP α が mRNA レベルで上昇したが、C/EBP β は有意な変化は認められなかった(Fig.3A)。一方で蛋白レベルでは PPAR γ 、C/EBP α および C/EBP β 共に有意に増加することが判明した(Fig.3B-E)。

Figure 3



④ C/EBP β の安定化に S-グルタチオン化が与える影響

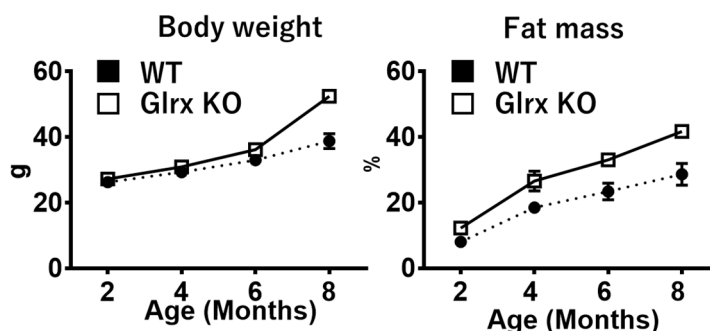
抗グルタチオン抗体で免疫沈降後、抗 C/EBP β 抗体を用いてウエスタンブロッティングを施行した。Glrx をノックアウトした 3T3L1 細胞では脂肪細胞分化後に C/EBP β の S-グルタチオン化が確認できた(Fig.4A)。C/EBP β は SUMO E3 Ligase である PIAS1 により SUMO 化され、引き続いてユビキチン化されプロテアソームで分解される(Fig.4B)。HEK293 細胞の細胞溶解液に試験管内で還元型グルタチオンおよび酸化型グルタチオンを加えインキュベーションすると S-グルタチオン化を誘導することができた(Fig.4C)。C/EBP β が S-グルタチオン化されると PIAS1 の結合が低下することが分かった(Fig.4D)。PIAS1 が C/EBP β のどの部位に結合するかを判定するため、C/EBP β における LIP ドメインおよび LIP を除いた C/EBP β (Δ LIP)を発現するプラスミドを作成し、HEK293 細胞で過剰発現させ共免疫沈降を行った。PIAS1 は LIP ドメインに結合することが判明した(Fig.4E)。さらに質量解析を施行し、LIP ドメインに存在するシステインがグルタチオン化されるか解析した。LIP ドメインに存在する Cys201 および Cys296 はともに S-グルタチオン化されることが判明した(Fig.4F)。Cys201 および Cys296 の S-グルタチオン化が実際に PIAS1 の結合に影響を与えるか検討するために、それぞれまた両方のシステイン残基をセリンに変換した変異型 C/EBP β を作成した(C201S、C296S 単独変異および C201S \cdot C296S 変異 C/EBP β)。Cys201 および Cys296 をともに変異させた C/EBP β では S-グルタチオン化誘導後の PIAS1 の結合の低下が消失した(Fig.4G)。PIAS1 の C/EBP β に対する結合抑制において Cys201 および Cys296 両方の S-グルタチオン化が重要であることを解明できた。



⑤ Glrx ノックアウトがマウスの肥満に与える影響

Glrx ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して体重および脂肪率が有意に増加する (Fig.5)

Figure 5



5. 今後の展望

ヒトとマウス間で C/EBP β は保存されており、ヒトにもマウスの Cys201 に対応する Cys248、Cys296 に対応する Cys345 が存在する。ヒトの C/EBP β でも Cys248 および 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/EBP β 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/EBP β 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する方針である。

6 研究成果の発信方法

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った。また研究成果は論文として投稿し現在査読中である。