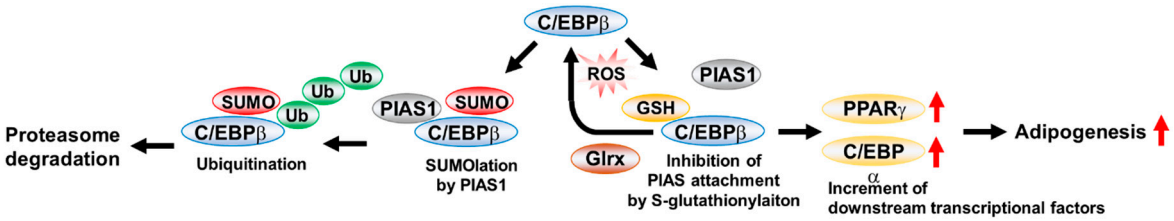
212　肥満における酸化的蛋白修飾S-グルタチオン化の役割	渡邉　陽介

【目的】肥満になると脂肪組織中で活性酸素が増加する。さらに活性酸素は脂肪細胞の分化に関わっており、活性酸素による細胞内シグナル伝達が脂肪細胞の分化を促進することが予想される。しかしながらその分子メカニズムは十分には解明されていない。蛋白質 S-グルタチオン化は比較的安定で可逆的な酸化的蛋白修飾で活性酸素によるシグナル伝達を媒介するが、既報の S-グルタチオン化される蛋白では肥満や脂肪細胞の分化に関わるものは報告されていない。未知の S-グルタチオン化蛋白の関与が考えられるため、これを探索しその機能を解明する。

【方法】脂肪細胞に分化する 3T3-L1 細胞において CRISPR/Cas9 システムを用いて脱グルタチオン化酵素であるグルタレドキシン（*Glrx*）をノックアウトした。*Glrx* KO 3T3-L1 細胞を用いて S-グルタチオン化が脂肪合成およびその細胞内シグナリングに与える影響を検討した。

【結果】3T3-L1 細胞において *Glrx* をノックアウトするとコントロール細胞に比べ脂肪細胞分化誘導後に S-グルタチオン化が増加することが分かった。脂肪細胞分化誘導は活性酸素を増加させるが、活性酸素はコントロール細胞と *Glrx* KO 3T3-L1 細胞間で差はなかった。脂肪合成分化誘導後の脂肪含有量は *Glrx* KO 3T3-L1 細胞で優位に増加した。この効果は還元剤である Tempol 投与でなくなることが確認できた。*Glrx* KO 3T3-L1 細胞では PPARγ、C/EBPα、C/EBPβの発現の増加が認められ、特に、C/EBPβについては蛋白レベルで発現が制御されていることが示唆された。また C/EBPβは S-グルタチオン化される蛋白であることが分かった。C/EBPβは SUMO 化後にユビキチン化を受けプロテアソームで分解される蛋白であるが、S-グルタチオン化されることにより SUMO E3 Ligase である PIAS1 の結合が低下することが分かった。

C/EBPβの S-グルタチオン化による安定化と脂肪合成



ROS: 活性酸素、GSH: グルタチオン、Ub: ユビキチン

212. 肥満における酸化的蛋白修飾 S-グルタチオン化の役割

渡邉　陽介

山梨大学 大学院総合研究部 医学域 内科学第二講座

Key words：S-グルタチオン化，酸化的蛋白修飾，肥満，脂肪合成

緒　言

肥満になると脂肪組織において活性酸素が増加しメタボリックシンドロームに悪影響を与える［1］。また活性酸素は脂肪細胞の分化に関わっていることが報告されている［2］。これらの研究結果から活性酸素は肥満で増加しさらには肥満を悪化させる要因であることが示唆される。病的状態で増加する活性酸素は様々な蛋白質を酸化修飾しシグナル伝達に関わる。酸化的蛋白修飾のうち 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に結合する修飾であるが、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［3］。約 40 の S-グルタチオン化により制御される蛋白が報告されているが、肥満や脂肪細胞の分化に関わるものは知られていない。グルタチオン合成の律速酵素である、γグルタミルシステインリガーゼ修飾サブユニットのノックアウト（*Gclm* KO）マウスは S-グルタチオン化の基質であるグルタチオンが減少し S-グルタチオン化も低下するが［4］、*Gclm* KO マウスは野生型マウスと比べ低体重であった［5］。対照的に脱 S-グルタチオン化酵素であるグルタレドキシン（Glrx）のノックアウトマウスでは S-グルタチオン化が増加するが、近年このマウスは加齢とともに肥満となることが報告されている［6］。以上の研究から S-グルタチオン化が肥満に寄与することが予想されるが、S-グルタチオン化が肥満や脂肪細胞の分化にどのように関わるのか分子レベルのメカニズムは未だ解明されていない。本研究では肥満および脂肪細胞の分化にかかわる未知の S-グルタチオン化蛋白を発見し、その機能を解明する。

方　法

1.　3T3-L1 細胞から脂肪細胞への分化誘導

3T3-L1 細胞は JCRB 細胞バンクから供与されたものを使用した。3T3-L1 細胞による脂肪分化誘導はコンフルエントとなった後、さらに 2 日間 10%ウシ胎児血清含有 DMEM にて培養し、その後 10%ウシ胎児血清含有 DMEM に 115 μg/ml IBMX、1 μg/ml Insulin、1 μg/ml Dexamethasone を加えた培地で 2 日間、その後 10%ウシ胎児血清含有 DMEM に 1 μg/ml Insulin を加えた培地で 4 日間培養することにより実施した。

2. 3T3-L1 細胞での CRISPR/Cas9 による *Glrx* ノックアウト

pSpCas9（BB）-2A-Puro（PX459）V2.0 plasmid は Addgene を介して Broad Institute、Massachusetts Institute of Technology の Feng Zhang 氏から供与された。PX459 plasmid の BbsI クローニングサイトにガイディング RNA を含んだオリゴヌクレオチド（配列 CACCGTTCTTGGGTCTTTCTGCAGT、AAACACTGCAGAAAGACCCAAGAAC）を挿入した。作製したプラスミドおよびガイディング RNA を含まない PX459 plasmid を Lipofectamine 3000（Thermo Fisher Scientific）を用いて 3T3-L1 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクション後、1 日目から 2 日間ピューロマイシンを用いてセレクションした。

3. C/EBPβの S-グルタチオン化の検出

C/EBPβが S-グルタチオン化しているか検出するため、脂肪細胞分化誘導後 3T3-L1 細胞を抗グルタチオン抗体で免疫沈降後、抗 C/EBPβ抗体を用いてウエスタンブロッティングを施行した。

4. S-グルタチオン化 C/EBP β と PIAS1 の共免沈

C/EBP β clone plasmid (Origene) より C/EBP β のオープンリーディングフレームをクローニングし、HA tag Vector (Origene) のマルチクローニングサイトに挿入し、HA tagged C/EBP β clone plasmid を作製した。HA tagged C/EBP β clone plasmid および Myc and flag tagged PIAS1 clone plasmid (Origene) を Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて 6 cm dish に撒かれた HEK 293 細胞にトランスフェクションした。HA tagged C/EBP β clone plasmid をトランスフェクションした HEK 293 細胞のライセートを蛋白含有量 500 μg になるように調製し終濃度 45 mmol/L 酸化型グルタチオン、5 mmmol/L 還元型グルタチオンもしくはコントロールとしてこれらを含まない PBS を加えで 4℃、12 時間インキュベーションした。インキュベーション後、Zeba column (Thermo Fisher Scientific) を用いて脱塩を行った。前述の処置を行ったライセートに蛋白含有量 250 μg の Myc and flag tagged PIAS1 clone plasmid をトランスフェクションした HEK293 細胞のライセートを加え、Myc tag magnetic beads (MBL) を用いて共免沈を行った。

結　果

1. 3T3-L1 細胞における *Glrx* のノックアウトと脂肪細胞への分化における影響

CRISPR/Cas9 システムを用いて *Glrx* KO 3T3-L1 細胞株を作製した。Glrx は脂肪細胞分化誘導後に発現が増加するが *Glrx* ノックアウトでは Glrx の発現が著明に減少していることが確認できた (図 1A)。S-グルタチオン化のレベルは脂肪細胞分化誘導後の *Glrx* KO 細胞で増加していることが確認できた (図 1B および 1C)。活性酸素は脂肪分化誘導後に増加するが、*Glrx* KO 細胞とコントロール細胞間で差はなかった (図 1D)。脂肪細胞分化誘導後の脂肪の含有量は有意差をもって *Glrx* KO 細胞で増加していた (図 1E)。これらの差は還元剤である Tempol で抑制された。

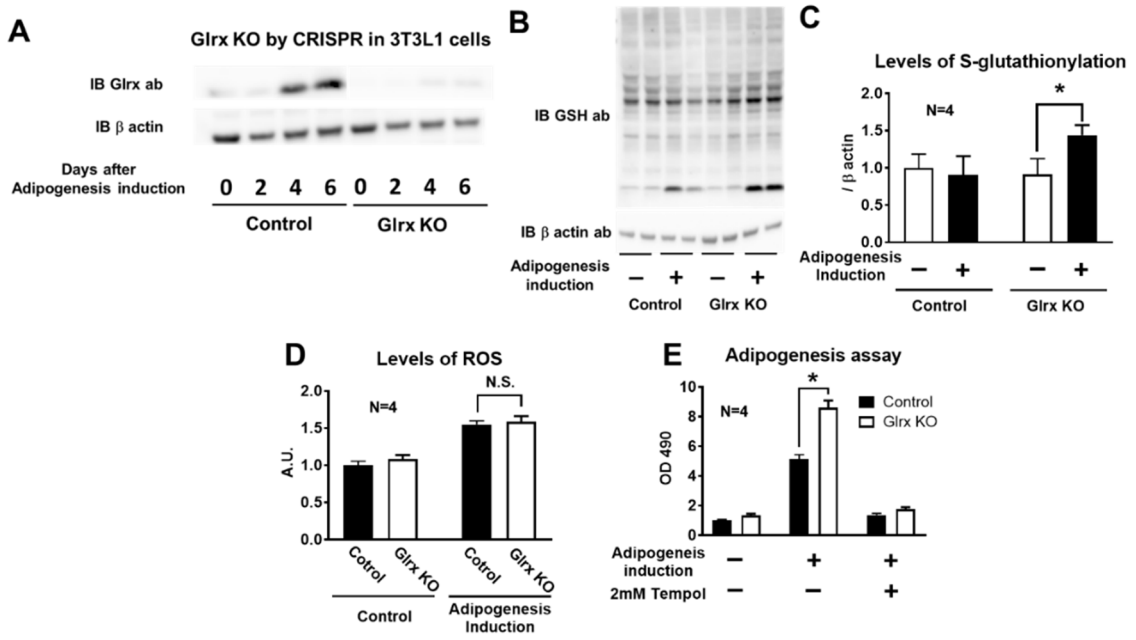


図 1. 3T3-L1 細胞における *Glrx* のノックアウトおよび S-グルタチオン化、活性酸素、脂肪分化に与える影響

A) コントロールおよび *Glrx* KO 3T3-L1 細胞における脂肪細胞分化後の Glrx の発現のウエスタンブロッティング。

B) コントロールおよび *Glrx* KO 3T3-L1 細胞における脂肪細胞分化後の S-グルタチオン化のウエスタンブロッティング。

C) コントロールおよび *Glrx* KO 3T3-L1 細胞における脂肪細胞分化後のデンシトメトリーによる評価。

D) コントロールおよび *Glrx* KO 3T3-L1 細胞における脂肪細胞分化後の活性酸素のレベル。

E) コントロールおよび *Glrx* KO 3T3-L1 細胞における脂肪細胞分化後の脂肪含有量の評価および還元剤の効果。

統計処理は、two-way ANOVA で行った。*P < 0.05。

2. *Glrx* ノックアウトの脂肪分化における主要転写因子に与える影響

脂肪分化における主要な転写因子である PPARγ、C/EBPα、C/EBPβの発現をウエスタンブロッティング法で解析した。脂肪分化後に上昇が認められるが PPARγ、C/EBPα、C/EBPβすべてコントロール細胞と比し *Glrx* KO 3T3-L1 細胞で増加していることが確認できた（図 2A)。mRNA レベルでは PPARγ、C/EBPαの増加を認めるものの、C/EBPβの増加は認められず（図 2B2、C、D)、蛋白レベルで発現が調節されていることが考えられた。

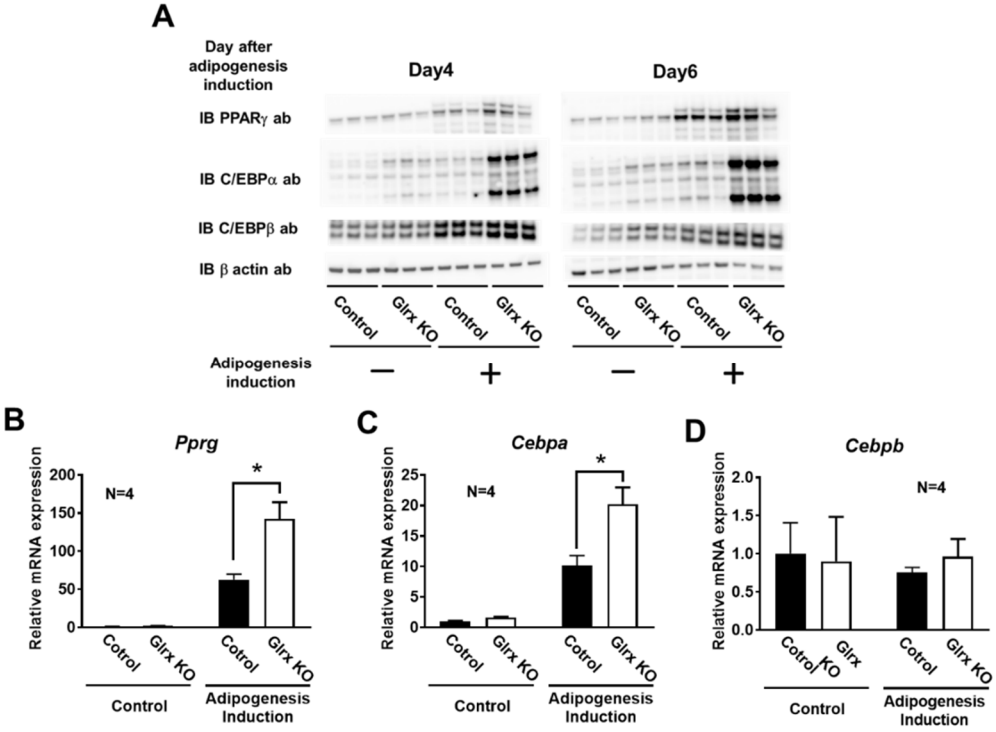


図 2. コントロールおよび *Glrx* KO 3T3-L1 細胞における脂肪細胞分化誘導後の PPARγ、C/EBPα、C/EBPβの蛋白および mRNA の発現レベル

A) コントロールおよび *Glrx* KO 3T3-L1 細胞における脂肪細胞分化誘導後の PPARγ、C/EBPα、C/EBPβのウエスタンブロッティング。

B) コントロールおよび *Glrx* KO 3T3-L1 細胞における脂肪細胞分化誘導後の PPARγ の mRNA 発現レベル。

C) コントロールおよび *Glrx* KO 3T3-L1 細胞における脂肪細胞分化誘導後の C/EBPα の mRNA 発現レベル。

D) コントロールおよび *Glrx* KO 3T3-L1 細胞における脂肪細胞分化誘導後の C/EBPβ の mRNA 発現レベル。

統計処理は、two-way ANOVA で行った。*$P < 0.05$。

3. 3T3-L1 細胞における C/EBPβ の S-グルタチオン化および SUMO E3 LigasePISA1 の結合に与える影響

C/EBPβが S-グルタチオン化されているか調べるために、抗グルタチオン抗体で免疫沈降後に抗 C/EBPβ抗体でウエスタンブロッティングを行った（図 3A)。脂肪分化後の Glrx KO 3T3-L1 細胞では C/EBPβが S-グルタチオン化されていることが分かった。C/EBPβは SUMO 化後にユビキチン化を受けプロテアソームで分解される蛋白であることが知られている［7]。一連の反応は SUMO E3 Ligase である PIAS1 が結合することにより始まる。C/EBPβの S-グルタチオン化が PIAS1 の結合に与える影響を検討した。まず HEK293 細胞で C/EBPβを過剰発現させ、ライセートとしたものを酸化型および還元型グルタチオンとインキュベーションすることにより S-グルタチオン化を誘導した（図 3B)。これを Myc tagged PIAS1 を用いて共免沈すると、S-グルタチオン化を誘導した C/EBPβでは PIAS1 との結合が低下することが分かった（図 3C)。

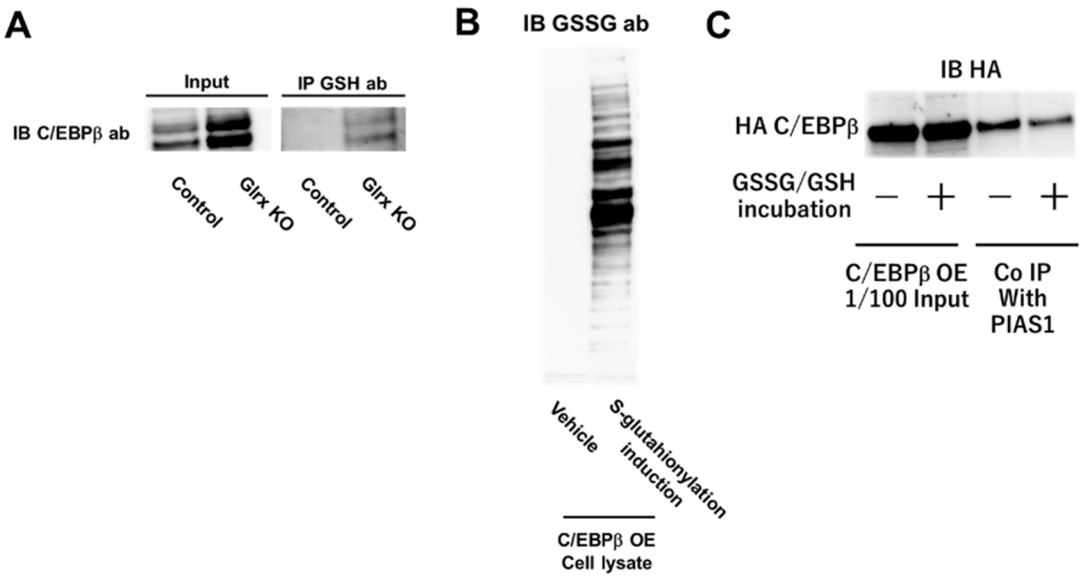


図 3. C/EBP β の S-グルタチオン化の検出および S-グルタチオン化が PIAS1 の結合に与える影響

A) 抗グルタチオン抗体による免疫沈降後の抗 C/EBP β 抗体を用いたウエスタンブロッティング、

B) HA tag C/EBP β を過剰発現させた HEK293 細胞のセルライセートに対し S-グルタチオン化誘導後に抗グルタチオン抗体を用いてウエスタンブロッティングを施行した。

C) 前述の S-グルタチオン化誘導したセルライセートおよびコントロールのセルライセートに Myc tagged PIAS1 を過剰発現させた HEK293 細胞のライセートを加え Myc tag magnetic beads を用いて共免沈を行った。

考　察

脱グルタチオン化酵素である *Glrx* を 3T3-L1 細胞でノックアウトすると、脂肪細胞分化誘導後の S-グルタチオン化の増加と脂肪合成の促進が認められた。*Glrx* KO 3T3-L1 細胞では PPAR γ、C/EBP α、C/EBP β の発現の増加が認められ、特に、C/EBP β については蛋白レベルで発現が制御されていることが示唆された。また C/EBP β は S-グルタチオン化される蛋白であることが分かった。C/EBP β は SUMO 化後にユビキチン化を受けプロテアソームで分解される蛋白であるが、S-グルタチオン化されることにより SUMO E3 Ligase である PIAS1 の結合が低下することが分かった。以上の結果から C/EBP β は S-グルタチオン化により PIAS1 の結合が低下し、引き続くユビキチン-プロテアソームによる分解が阻害され、安定化することが示唆され、これが引き続く脂肪合成を促進すると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、ボストン大学血管生物学講座の Markus Bachschmid 准教授である。

文　献

1) Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. J Clin Invest. 2004;114:1752-61. doi: 10.1172/JCI21625

2) Tormos KV, Anso E, Hamanaka RB, Eisenbart J, Joseph J, Kalyanaraman B, Chandel NS. Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. Cell Metab. 2011;14:537-44. doi: 10.1016/j.cmet.2011.08.007

3) Watanabe Y, Cohen RA, Matsui R. Redox Regulation of Ischemic Angiogenesis -Another Aspect of Reactive Oxygen Species. Circ J. 2016 ;80:1278-84. doi:10.1253/circj.CJ-16-0317

4) Watanabe Y, Watanabe K, Kobayashi T, Saito Y, Fujioka D, Nakamura T, Obata JE,Kawabata K, Mishina H, Kugiyama K. Chronic depletion of glutathione exacerbates ventricular remodelling and dysfunction in the pressure-overloaded heart. Cardiovasc Res. 2013;97:282-92. doi: 10.1093/cvr/cvs333

5) Kobayashi T, Watanabe Y, Saito Y, Fujioka D, Nakamura T, Obata JE, Kitta Y, Yano T, Kawabata K, Watanabe K, Mishina H, Ito S, Kugiyama K. Mice lacking the glutamate-cysteine ligase modifier subunit are susceptible to myocardial ischaemia-reperfusion injury. Cardiovasc Res. 2010;85:785-95. doi: 10.1093/cvr/cvp342

6) Shao D, Han J, Hou X, Fry J, Behring JB, Seta F, Long MT, Roy HK, Cohen RA, Matsui R, Bachschmid MM. Glutaredoxin-1 Deficiency Causes Fatty Liver and Dyslipidemia by Inhibiting Sirtuin-1. Antioxid Redox Signal. 2017;27:313-327. doi: 10.1089/ars.2016.6716

7) Liu Y, Zhang YD, Guo L, Huang HY, Zhu H, Huang JX, Liu Y, Zhou SR, Dang YJ, Li X, Tang QQ. Protein inhibitor of activated STAT 1 (PIAS1) is identified as the SUMO E3 ligase of CCAAT/enhancer-binding protein β (C/EBPβ) during adipogenesis. Mol Cell Biol. 2013;33:4606-17. doi: 10.1128/MCB.00723-13