

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11528

研究課題名（和文）新規S-グルタチオン化蛋白C/EBP β が活性酸素による肥満・脂肪合成を媒介する研究課題名（英文）S-glutathionylation on C/EBP β stimulates adipogenesis and obesity

研究代表者

渡辺 陽介（Watanabe, Yosuke）

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：90535551

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究においてグルタレドキシンを3T3L1細胞でノックアウトすると、脂肪合成誘導後のS-グルタチオン化が増強すること、脂肪合成が促進することが確認できた。さらに脂肪細胞の分化に関わる転写因子であるC/EBP β が増加することが確認できた。質量解析により、C/EBP β がグルタチオン化されることが確認できた。C/EBP β はSUMO E3ライゲースであるPIAS1によりSUMO化され引き続きユビキチン化されユビキチンプロテアソームに分解される。C/EBP β をS-グルタチオン化するとPIAS1の結合が抑制されることが確認され、C/EBP β のS-グルタチオン化が脂肪合成において重要なことが解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛋白S-グルタチオン化の亢進が脂肪合成を促進することを解明した。またC/EBP β が新規の脱グルタチオン化酵素であることを発見した。臨床検体を用いて、脱グルタチオン化酵素G1rxが肥満のマーカーであることを報告した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we confirmed that glutaredoxin knockout in 3T3L1 cells enhances S-glutathionylation after induction of adipogenesis and promotes adipogenesis. Furthermore, C/EBP β , a transcription factor involved in adipocyte differentiation, was found to be increased. Mass spectrometry analysis confirmed that C/EBP β is glutathionylated, C/EBP β is SUMOylated by PIAS1, a SUMO E3 ligase, and is subsequently ubiquitinated and degraded into ubiquitin proteasomes. S-glutathionylation of C/EBP β is important for adipogenesis.

研究分野：循環器内科

キーワード：蛋白質S-グルタチオン化 肥満 C/EBP β レドックス G1rx

1. 研究開始当初の背景

肥満では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。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。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 (Watanabe Y et al. *CircJ*2016)。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 (Matsui R, Watanabe Y, Murdoch CE. *Redox Biol.* 2017)(図 1)。申請者は自身が新規の S-グルタチオン化蛋白であることを発見した HIF-1 α (Watanabe Y et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016)に加え、カルシウムポンプ SERCA2a (Watanabe Y et al. *Cardiovasc Res* 2013)、転写因子 NF- κ B (Murdoch CE, Watanabe Y et al. *J Biol Chem* 2014)、低分子 GTP アーゼ Rac1 (Han J, Watanabe Y et al. *Redox Biol* 2016)といった蛋白質の S-グルタチオン化が循環器病に関わることを報告してきた。他にも約 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 (Watanabe Y et al. *Cardiovasc Res* 2013)、GCLM KO マウスは野生型マウスと比べ低体重であった (Kobayashi T, Watanabe Y et al. *Cardiovasc Res* 2010)。対照的に脱 S-グルタチオン化酵素である 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を申請者の研究協力者が報告した (Shao D, Cohen RA, Matsui R, Bachschmid MM. et al. *Antioxid Redox Signal.* 2017)。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。



2. 研究の目的

本研究の目的は新規の S-グルタチオン化蛋白である C/EBP が脂肪合成や肥満に関わるメカニズムを分子レベルで解析する。

3. 研究の方法

C/EBP における S-グルタチオン化されるシステインの質量解析による同定

質量解析(LC/MS/MS)による S-グルタチオン化されたシステインの同定にはマイクログラム単位の精製された蛋白が必要である。HEK 293 細胞に C/EBP を過剰発現させたのちタグを用いて免疫沈降して C/EBP を精製する。さらに試験管内で酸化型グルタチオンを加えることで S-グルタチオン化を誘導する。作成したサンプルを質量解析により解析し (MS-Bioworks 社に委託)、S-グルタチオン化されたシステインを同定する。十分量の C/EBP が得られないときは大腸菌を用いてスケールアップする。

システイン変異型 C/EBP の機能解析

C/EBP には6つのシステインが存在する。これはマウスおよびヒトで保存されている。6つのシステインをそれぞれセリンに変異させた変異型 C/EBP を作成し、どのシステインの変異で野生型 C/EBP で観察された S-グルタチオン化後の PIAS1 との結合の抑制(図 5)が消失するか検討する。単独のシステイン変異では結合の抑制が消失しない場合は複数のシステインを変異させた変異型 C/EBP を作成し同様の実験を行う。

臨床検体を用いた血中脱グルタチオン化酵素 Glrx と肥満についての検討

S-グルタチオン化は細胞内で起こるため、血液検体を用いた評価は困難であった。その一方で S-グルタチオン化が亢進した際に発現が増加する脱グルタチオン化酵素の Glrx は血清中で測定可能であることが報告されている。山梨大学医学部附属病院循環器内科に入院し、カーテル検査を施行した患者の血清検体中の Glrx を測定し肥満と関連があるか検討する。

4．研究成果

蛋白質 S-グルタチオン化を増強させると脂肪合成が促進すること、脂肪細胞の分化に関わる転写因子である C/EBP β は S-グルタチオン化されることを解明した。

また C/EBP β は S-グルタチオン化されると SUMO 化および引き続くユビキチンプロテアソームに分解が抑制されることにより安定化することを発見した。C/EBP β の安定化には Cys201 および Cys296 両方の S-グルタチオン化が必要であることを解明した。また臨床検体を用いて、血中の脱グルタチオン化酵素である Grlx を測定し、Grlx 低値の群では有意差はつかないもの、BMI が高値であることが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	松井 玲子 (Matsui Reiko)	ボストン大学・医学部・血管生物学講座	
研究協力者	バッチャミド マーカス (Bachschmid Markus)	ボストン大学・医学部・血管生物学講座	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	ボストン大学	医学部	血管生物学講座