

機関番号 : 34519

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009 ~ 2010

課題番号 : 21700710

研究課題名 (和文) 糖尿病病態下における転写因子 ChREBP の新規活性化機構の解明

研究課題名 (英文) Clarification of novel activation mechanism of transcription factor ChREBP under diabetic condition

研究代表者 崎山 晴彦 (SAKIYAMA HARUHIKO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 30508958

研究成果の概要 (和文) : 転写因子 ChREBP は、グルコースに応答して核内移行する。核内に移行した ChREBP は、解糖系・脂肪酸合成系の調節酵素である L-PK, ACC, FAS などの遺伝子発現を促進させる。その活性化メカニズムは、従来よりリン酸化、脱リン酸化により制御されていると考えられていた。しかし、近年になり我々は新たな結合タンパク 14-3-3 が新たにその活性化に深く関与していることを見出した。今回、さらに翻訳後修飾の一つである *O*-GlcNAc 修飾が活性化に影響を与えるかどうかを検討するとともに、M1x の変異体を作製しその役割も合わせて再検討することを目的とした。

M1x の変異体を HEK293 に発現し、ChREBP の細胞内局在の観察を行った。また、GFP-ChREBP を HEK293 あるいは Hepa1,6 細胞に高発現させ、低濃度と高濃度のグルコース下で培養し、GFP 抗体で免疫沈降したのち SDS 電気泳動を行い *O*-GlcNAc 抗体にて修飾の解析を行った。また、*O*-GlcNAcase の阻害剤 (PUGNAc) を用いて、転写活性をルシフェラーゼアッセイで測定し、*O*-GlcNAc 修飾が及ぼす影響を検討した。HEK293 において、野生型 M1x とは異なり変異型 M1x では ChREBP の核内への移行が確認されなかった。よって、ChREBP が核内に存在する為には、M1x は必須であると考えられる。

抗 *O*-GlcNAc 抗体を用いた解析により ChREBP は、*O*-GlcNAc で修飾されていることが明らかとなった。また阻害剤を用いた実験より、*O*-GlcNAc 化が促進すれば ChREBP の核内への局在も増え、転写活性が増強されることが判明した。しかし、*O*-GlcNAc 修飾のリン酸化部位への影響は見られなかった。

今後は、*O*-GlcNAc の修飾部位を特定し、転写因子のさらなる核内移行へのメカニズムおよびグルコース応答の反応機構を解明することを目指す。

研究成果の概要 (英文) : The carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) functions as a transcription factor in mediating the glucose-activated gene expression of multiple liver enzymes, which are responsible for converting excess carbohydrate to storage fat. ChREBP is translocated into the nucleus in response to high glucose levels, and then up-regulates transcriptional activity. Although this glucose activation of ChREBP is generally observed only in liver cells, overexpression of wild type max-like protein X (M1x), but not an inactive mutant M1x, resulted in the exhibition of the ChREBP functions also in a human kidney cell line. Because high glucose conditions induce the glycosylation of cellular proteins, the effect of *O*-linked GlcNAc modification on ChREBP functions was examined. Treatment with an *O*-GlcNAcase inhibitor (PUGNAc), which increases the *O*-linked GlcNAc modification of cellular proteins, caused an increase in the glucose response of ChREBP. In contrast, treatment with a glutamine fructose amidotransferase inhibitor (DON), which decreases *O*-GlcNAcylation by inhibiting the hexosamine biosynthetic pathway, completely blocked the glucose response of ChREBP. These results suggest that the *O*-linked glycosylation of ChREBP itself or other proteins that regulate ChREBP is essential for the production of functional ChREBP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学（生活習慣病）

キーワード：転写因子、ChREBP、肥満、糖尿病、細胞内局在

1. 研究開始当初の背景

肥満等に伴う高脂血症や動脈硬化症、2型糖尿病等のいわゆる生活習慣病は、先進国において近年増加の一途をたどり、重大な問題となっている。これら疾病の標的器官の一つとして肝臓がある。ほ乳動物においては、肝臓は炭水化物を脂質に変換することで長期的なエネルギー貯蔵を担う最も重要な組織である。過剰に摂取された炭水化物は速やかに単糖類に消化され解糖系を経て脂肪酸や中性脂肪に変換、蓄積される。糖質から脂肪酸合成経路には多岐にわたる酵素群が関与している。この経路を担う酵素群は、翻訳後修飾や、ホルモン合成、分泌、栄養摂取などにより制御されている。事実、肝臓より単離された hepatocyte cell において、glucose 濃度、インスリン濃度の上昇に伴い、これら鍵となる酵素の転写、翻訳活性が上昇することがすでに報告されている。

炭水化物の消化により、血中グルコース濃度が上昇しその結果、β細胞からインスリンが分泌される。長年、このインスリン分泌が肝臓において脂肪酸合成の各種酵素の転写活性を上昇させると考えられてきたが、これは sterol regulatory element binding protein-1C (SREBP-1C) を介したものであると報告された。(Horton et al. J. Clin. Invest. 109, 1125-1131, 2002) さらに、SREBP-1C ノックアウトマウスでは脂肪酸合成が亢進することも報告されている。(Horton et al. J. Clin. Invest. 101, 2331-2339, 1998)

しかし近年になり、インスリンを介さない脂肪酸合成経路が Towle らその他研究グループにより報告され、特に、acetyl CoA carboxylase (ACC)、fatty acid synthase (FAS)、liver type pyruvate kinase (L-PK) の mRNA レベルがグルコース濃度に応じて上

昇することが見いだされた。(Towle et al. Annu. Rev. Nutr, 17, 403-433, 1997) (Vaulont et al. J. Biol. Chem. 275, 31555-31558, 2000) しかもこれら酵素遺伝子は、SREBP-1C ノックアウトマウスにおいても発現が促進されることから、その他の転写因子の存在が示唆された。(Liang et al. J. Biol. Chem. 277, 9520-9528, 2002)

その後、Uyeda らのグループによりラット肝臓より Carbohydrate response element binding protein (ChREBP) が単離、精製され、(Yamashita et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 9116-9121, 2001) この転写因子 ChREBP が、L-PK、ACC、FAS の転写を制御していたことが判明した。

これらの解糖系、脂質合成系の調節酵素、すなわち「肥満酵素」の遺伝子発現を促進する転写因子が ChREBP である。この転写因子 ChREBP の活性化機構は、ペントースリン酸側路において生じたキシルロース-5-リン酸によって活性化される脱リン酸化酵素 PP2A の作用を受けて、(1)細胞質における ChREBP の脱リン酸化とその後の核内移行、(2)核内における再脱リン酸化とそれによる ChREBP 結合能の獲得、の2段階からなっている。(Kawaguchi et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 13710-13715, 2001) さらに、新たな結合タンパクとして、14-3-3 が酵母を用いた研究により見いだされ、この 14-3-3 の結合が ChREBP の核移行に重要な役割を果たすことを我々が世界に先駆け報告したばかりである。(Sakiyama et al. J. Biol. Chem. 283, 24899-24908, 2008)

現在まで、14-3-3 はあらゆる組織に普遍的に存在し、その生理活性の意義が見いだされてきているが、肝臓において特に転写因子との係わりは未知な部分が多く、これからの研究が期待される場所である。

2. 研究の目的

そこで、本課題において新規活性化機構を明らかにしようと試みた。近年になり、複数の研究グループから新たに ChREBP に結合するタンパクとして 14-3-3 の存在が報告された。14-3-3 はあらゆる組織に普遍的に存在し、その生理活性は未知な部分が多く、これからの研究が期待される場所である。本研究では、14-3-3 とのタンパク間相互作用がどのように転写活性に影響を及ぼすのかという点と、様々な翻訳後修飾もまた ChREBP の制御に影響を与える可能性があり、リン酸化以外のタンパク修飾等を同定し、活性化カスケードの分子レベルでの解明を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 14-3-3 の ChREBP における新規結合部位を特定

- ① 14-3-3 の結合領域を決定するために、ChREBP の Tag 付き発現ベクターの構築をまず行う。その際、全長のもの、N 末のみ、C 末のみのものをそれぞれ作製する。
- ② 14-3-3 に Tag を付け、大腸菌で大量発現させる。それらをカラムに通して精製タンパクを得る。
- ③ ChREBP を細胞で発現させ、Tag 付きビーズで pull down し、大腸菌より精製した 14-3-3 と in vitro で混合し、ウエスタンブロッティングにより結合の度合いを比較する。
- ④ N 末側か C 末側かが判明すれば、さらに細かい種々の deletion 変異体を作製し、結合部位を絞り込み、領域を決定する。

(2) ChREBP と 14-3-3 との結合の制御機構解明

- ① 14-3-3 との結合領域が決まれば、ChREBP 上においてどのような領域を含んでいるのかコンピューター解析を行う。
- ② 14-3-3 結合による制御機構の解明の為、細胞において強発現させた場合と阻害剤や RNAi によるノックダウン系とを比較し、ChREBP の細胞内局在がどのように変化するかを考察する。
- ③ それと同時に、ルシフェラーゼ活性測定を行い、14-3-3 が転写活性にどのような影響を与えるのかを明らかにする。

(3) ChREBP と 14-3-3 のタンパク間相互作用の解析

- ① ChREBP と 14-3-3 との結合にはリン酸化が重要な役割を果たすことが分かっているが、これとは別に、グルコース代謝物も関係することをすでに見出している。よってラットやマウスの肝臓から代謝物を抽出し、ChREBP と精製した 14-3-3 との反応液に添加しウエスタンブロッティングにより結合強度を比較検討する。
- ② 違いがあれば、代謝物を同定するために、

抽出物より HPLC にて単離精製し分取する。

(4) ChREBP のタンパク質修飾を解明し、修飾の生理的意義の検討 (細胞内動態、DNA への結合能の検討)

ChREBP の活性化には、リン酸化、脱リン酸化が大きく関与しているが、それだけでは説明がつかない部分がある。しかし我々は、14-3-3 の結合以外に糖鎖修飾を受けていることをウエスタンブロッティングにより突き止めている。

- ① 糖鎖修飾 (O-GlcNAc) の構造を MASS により解析する。
- ② 修飾による ChREBP に対する影響を、O-GlcNAc 転移酵素の阻害剤や RNAi によるノックダウン系を用いて核内移行、転写活性の両面から比較検討する。
- ③ 糖鎖修飾による影響があまり認められない場合、その他修飾に対する特異抗体などを用いて新たなタンパク修飾を探索する。

4. 研究成果

本研究では、肝臓において acetyl CoA carboxylase (ACC)、fatty acid synthase (FAS)、liver type pyruvate kinase (L-PK) を制御している転写因子、Carbohydrate response element binding protein (ChREBP) に着目し、その細胞内動態の機構を解明することで肥満や糖尿病などいわゆる生活習慣病により惹起される病気をコントロールできると期待するものである。ChREBP はグルコース濃度に応じて核内に移行するが、そのメカニズムはまだ不明な部分が多い。本研究においてその核移行のメカニズムを解明することで糖尿病治療薬の新薬開発につながると予想される。

我々はまず、14-3-3 が N 末に結合することを見出し、ChREBP の細胞質での安定化に寄与していること、この結合が外れた後に脱リン酸化が起こり核内輸送タンパク (importin) が結合すること、を突き止めた。

さらに C 末に結合する Mlx が細胞内局在に関与することを、293 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイや、GFP 融合タンパクによる細胞内局在の観察を行うことにより、本課題において見出した。さらに ChREBP が核内に局在し転写活性を上げる為には O-GlcNAc 修飾が深く関与することも判明した。それは、O-GlcNAc 修飾を受けている場合、転写活性が高いということである。通常、O-GlcNAc 付加部位はリン酸化部位もしくはその近傍である場合が多く、O-GlcNAc 付加により転写活性が高いという結果は、ChREBP が脱リン酸化状態にあれば転写活性が高いと考えてよい。

よって本転写活性化機構は、O-GlcNAc 修飾も重要な因子であり、以前より報告されているリン酸化・脱リン酸化の制御との関連性を示唆するものであった。

今後の展望は、O-GlcNAc 修飾の付加部位を決定することと、O-GlcNAc 修飾とリン酸化との関係をさらに明らかにすることである。ChREBP の転写活性を阻害できれば、生活習慣病にともなう様々な疾患の予防、診断、治療薬の開発に役立つものと期待できる。いち早く、肥満要素の一つである本転写因子に目を付け、研究することは、肥満・糖尿病関係の研究分野におけるインパクトは大きく、その波及効果は絶大であり、意義がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①Sakiyama, H., Fujiwara, N., Noguchi, T., Eguchi, H., Yoshihara, D., Uyeda, K. and Suzuki, K The role of O-linked GlcNAc modification on the glucose response of ChREBP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402, 784-789, 2010 (査読有り)

[学会発表] (計 3 件)

①崎山晴彦, 藤原範子, 江口裕伸, 吉原大作, Ko Uyeda, 鈴木敬一郎. 転写因子ChREBPの活性化に及ぼすO-GlcNAc修飾およびMlxの役割. 第83回日本生化学会大会第33回日本分子生物学会、合同大会 (神戸) 2010年12月7日

②崎山晴彦, 深澤昌史, 藤原範子, 江口裕伸, 横江俊一, 吉原大作, 鈴木敬一郎 Mlxの結合が転写因子ChREBPの細胞内局在に及ぼす影響の検討. 第82回日本生化学会大会 (神戸) 2009年10月23日

③崎山晴彦, 深澤昌史, 水口博之, 藤原範子, 江口裕伸, 横江俊一, 吉原大作, Ko Uyeda, 鈴木敬一郎. 14-3-3の結合が転写因子ChREBPの核移行に及ぼす影響の検討. 第56回日本生化学会近畿支部例会 (大阪) 2009年7月18日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

崎山 晴彦 (SAKIYAMA HARUHIKO)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：30508958

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

