

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26750041

研究課題名(和文)n-3系脂肪酸がChREBPの分解を促進する分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanisms underlying n-3 polyunsaturated fatty acids mediated degradation of ChREBP

研究代表者

中川 勉(NAKAGAWA, TSUTOMU)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50722063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：n-3系多価不飽和脂肪酸(PUFA)による血清中性脂肪低下作用のメカニズムを明らかにするため、n-3 PUFA がCarbohydrate response element-binding protein (ChREBP) の活性に及ぼす影響について検討した。本研究において、n-3 PUFAはChREBPの分解を促進することにより活性を抑制することを明らかにした。また、ChREBPはオートファジー-リソソーム経路により分解されることを明らかにした。これらの結果から、オートファジー亢進によるChREBPの分解促進がn-3 PUFAによる血清中性脂肪低下作用のメカニズムの1つであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) can reduce plasma triglyceride (TG) level. However, the underlying mechanism of plasma TG reduction remains unclear. Carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) is a transcription factor responsible for the coordinated metabolism of carbohydrate and fat synthesis. It was reported that the inhibition of ChREBP in leptin-deficient mice improved plasma TG level. Therefore, it was suggested that ChREBP could be a protein affected by n-3 PUFA, which was involved in reducing plasma TG level. In this study, it was shown that n-3 PUFA could promote the degradation of ChREBP. Moreover, it was found that ChREBP was degraded via the autophagy-lysosomal pathway. The inhibitory effect on ChREBP activity by n-3 PUFA disappeared when the degradation of ChREBP was inhibited by chloroquine treatment. These results suggested that n-3 PUFA promoted the degradation of ChREBP by inducing autophagy, resulting in reduction of plasma TG level.

研究分野：生化学

キーワード：ChREBP

### 1. 研究開始当初の背景

n-3 系多価不飽和脂肪酸に分類されるエイコサペンタエン酸 (EPA) とドコサヘキサエン酸 (DHA) は血清中性脂肪を低下させる作用があり、これらを主成分とする医薬品は脂質異常症治療薬として承認、販売されている。また、これらを含む食品は特定保健用食品として数多くの商品が消費者庁より許可を受けており、容易に入手し、摂取することが可能である。しかしながら、EPA と DHA が血清中性脂肪を低下させる分子メカニズムの詳細は未だ明らかになってはいない。

Carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) は 2001 年に Uyeda らにより単離、クローニングされた転写因子であり、肝臓において血中グルコース濃度の上昇によりインスリン非依存的に解糖系の亢進と脂肪酸の合成を誘導する。レプチン欠損マウスにおいて肝臓特異的な ChREBP の発現抑制により血清中性脂肪の値が減少することが報告されている。このことから、EPA や DHA による血清中性脂肪低下作用のメカニズムの 1 つとして ChREBP の活性阻害が考えられた。ChREBP の活性はグルコース濃度依存的なリン酸化/脱リン酸化による細胞内局在の変化により制御されることが報告されている。グルコース濃度が低い時には、ChREBP はプロテインキナーゼ A (PKA) によるリン酸化を受け、そのリン酸基に 14-3-3 が結合する。我々は ChREBP の核移行を担う Importin の結合部位を同定し、Importin と 14-3-3 の結合が競合することを明らかにした。これにより PKA によるリン酸化は、14-3-3 の結合を促進することにより Importin の結合を阻害し、活性を阻害することを明らかとした。また、絶食時や高脂肪食摂取時に増加するケトン体である  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸やアセト酢酸は、ChREBP と 14-3-3 の結合を増加させることにより Importin の結合を阻害し、活性を阻害することを明らかにした。この結果は、脂肪酸の摂取により ChREBP の活性が阻害されることを示している。

### 2. 研究の目的

ChREBP の活性は細胞内局在の変化のみでなく、細胞内のタンパクレベルの変化によっても制御されると考えられる。しかしながら、ChREBP の合成、および分解のメカニズムに関しては、これまでに詳細な研究がなされておらず明らかになってはいない。

近年、EPA および DHA が ChREBP の mRNA の発現を抑制することが報告された。しかしながら、EPA と DHA による ChREBP の細胞内タンパクレベルと活性の減少は、mRNA レベルの減少のみでは説明できないと考えられる。

我々は EPA と DHA により ChREBP の分解が促進されるか調べるため、遊離脂肪酸が ChREBP の分解におよぼす影響について予備的な検討を行った。その結果、飽和脂肪酸であるパルミチン酸やステアリン酸、一価の不飽和脂

肪酸であるオレイン酸では分解の促進が見られなかったのに対して、EPA と DHA は ChREBP の分解を促進するデータが得られた。そこで本研究では、EPA と DHA による血清中性脂肪低下作用の分子メカニズムを解明するため、ChREBP の分解機構を明らかにし、EPA と DHA による ChREBP の分解促進のメカニズムを検討する。この基盤的なデータは脂質異常症を改善させる新しい薬剤の開発のみならず、肥満を原因とする様々な生活習慣病の治療へ応用されることが期待される。

### 3. 研究の方法

(1) ChREBP の活性と細胞内タンパクレベルに及ぼす遊離脂肪酸の影響

ヒト胎児腎細胞 (HEK293A) を用いて、FLAG タグを付加した ChREBP をリポフェクション法により一過性に発現させた。遊離脂肪酸を培養液中に添加した後、6 時間後の活性と細胞内タンパクレベルの変化を調べた。ChREBP の活性は、ルシフェラーゼアッセイにより脂肪酸合成酵素 (FAS) 遺伝子のプロモーター活性を測定することにより行った。ChREBP の細胞内タンパクレベルは、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロット法により測定した。

(2) ChREBP の分解機構の解明

(1) と同様の方法で細胞内タンパクレベルの変化を検討することにより評価した。タンパク質分解を阻害/誘導する試薬として、プロテアソーム阻害剤は MG-132 (10  $\mu$ M)、リソソーム機能阻害剤はクロロキン (50  $\mu$ M) と塩化アンモニウム (20 mM)、オートファジー誘導剤はレスベラトロール (50  $\mu$ M) を用いた。

(3) 遊離脂肪酸が ChREBP のタンパク結合に及ぼす影響

FLAG タグを付加した ChREBP を発現した HEK293A 細胞の細胞溶解液から FLAG 抗体ビーズを用いて ChREBP を単離し、大腸菌に発現させたりコンビナントタンパク質 (14-3-3) と遊離脂肪酸を加え 1.5 時間振とうした。ChREBP に結合した 14-3-3 の量は、ビーズを洗浄した後、SDS-PAGE で分離し、ウェスタンブロット法により測定した。

### 4. 研究成果

(1) 遊離脂肪酸が ChREBP の活性に与える影響

遊離脂肪酸が ChREBP の活性に与える影響について検討した結果、飽和脂肪酸であるパルミチン酸とステアリン酸は ChREBP の活性を抑制しなかったのに対して、不飽和脂肪酸は ChREBP の活性を抑制することが明らかとなった。活性阻害の程度は、一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸が最も強く、次いで多価不飽和脂肪酸である EPA、リノレン酸、リノール酸の順に活性を抑制することが明らかとなった。

(2)不飽和脂肪酸が ChREBP のタンパク結合に及ぼす影響

我々は以前にオレイン酸が ChREBP の核への局在を抑制することにより活性を阻害することを報告している。そこで、不飽和脂肪酸による ChREBP の活性抑制のメカニズムを検討するため、核移行を阻害する 14-3-3 との結合に及ぼす不飽和脂肪酸の影響を調べた。その結果、オレイン酸が最も強く結合を促進したのに対して、EPA と DHA は 14-3-3 の結合に影響を与えないことが明らかとなった。この結果から EPA と DHA は ChREBP の細胞内局在に影響を与えないことが示唆された。

(3)不飽和脂肪酸が ChREBP の細胞内タンパクレベルに及ぼす影響

(2)において EPA と DHA が ChREBP の細胞内局在に影響を与えないことが示唆されたことから、EPA と DHA による活性抑制のメカニズムを明らかにするため、ChREBP の分解に及ぼす影響について検討した。その結果、オレイン酸は ChREBP の細胞内タンパクレベルに影響を与えなかったのに対して、EPA と DHA では ChREBP の細胞内タンパクレベルが顕著に減少し、分解を促進することが明らかとなった。

(1)-(3)の結果から、ChREBP 活性の阻害様式は遊離脂肪酸ごとに異なり、オレイン酸が核への局在を抑制することにより ChREBP の活性を抑制するのに対して、EPA や DHA は ChREBP の分解を促進することにより活性を抑制していることが示唆された。

(4)ChREBP の分解機構の解明

ChREBP の分解のメカニズムに関しては、これまでに詳細な検討がなされておらず、未だ明らかになってはいない。EPA や DHA による ChREBP の分解促進のメカニズムを明らかにするため、ChREBP の分解機構について検討を行った。

ユビキチン化の影響

ChREBP はユビキチン化されることが報告されていることから、まずは ChREBP がユビキチン-プロテアソーム経路で分解されるか明らかにするため、プロテアソーム阻害剤である MG-132 処理を行った際のタンパクレベルの変化について検討した。その結果、ChREBP の細胞内タンパクレベルは MG-132 処理により変化しないことが明らかとなった。

0-GlcNAc 修飾の影響

0-GlcNAc 修飾はタンパク質の安定化に関与するという報告があることから、0-GlcNAc 修飾が ChREBP の分解に与える影響について検討した。0-GlcNAc 修飾のドナー基質である UDP-GlcNAc を増加させるグルコサミンと 0-GlcNAcase 阻害剤である PUGNAc を併用処理することにより 0-GlcNAc 修飾を増加させた際の細胞内タンパクレベルと活性の変化を

調べた結果、活性は増加したものの細胞内タンパクレベルに大きな変化が見られないことから、0-GlcNAc 修飾は分解に影響を与えないことが明らかとなった。

オートファジー-リソソーム経路の関与

の結果から ChREBP がユビキチン-プロテアソーム経路で分解されないことが示唆されたことから、オートファジー-リソソーム経路で分解されるかについて検討した。リソソーム機能阻害剤であるクロロキンや塩化アンモニウム処理により ChREBP の細胞内タンパクレベルが増加し、オートファジー誘導剤であるレスベラトロール処理により細胞内タンパクレベルが減少することが明らかとなった。これらの結果から、HEK293A 細胞において ChREBP の主要な分解経路は、ユビキチン-プロテアソーム経路ではなく、オートファジー-リソソーム経路であることが示唆された。

(5)ChREBP の細胞内タンパクレベルが活性に与える影響

ChREBP の分解により生じる細胞内タンパクレベルの変化が活性に与える影響について検討するため、(4)と同様の試薬を用いて活性の変化を調べた。その結果、細胞内タンパクレベルと活性は同様の傾向を示し、クロロキンや塩化アンモニウム処理により活性は増加し、レスベラトロール処理により活性はほぼ消失することが明らかとなった。また、MG-132 処理では活性の変化はみられなかった。この結果は、ChREBP の分解を制御することにより活性を制御することができることを示しており、EPA や DHA は ChREBP の分解を促進することにより活性を抑制していることが示唆された。

(6)EPA による ChREBP の活性抑制機構の解明

EPA による ChREBP の活性阻害のメカニズムが分解の促進に起因するか明らかにするため、クロロキン処理により分解を阻害した際に EPA が ChREBP の活性に及ぼす影響について検討した。その結果、分解を阻害するクロロキンの併用により、EPA 単独処理で見られた活性の減少がほぼ消失することが明らかとなった。この結果は、EPA による ChREBP の活性の抑制が分解の促進に起因することを示唆している。

本研究結果より、ChREBP の分解機構がこれまで考えられていたユビキチン-プロテアソーム経路ではなく、オートファジー-リソソーム経路であることが示唆された。n-3 系脂肪酸はオートファジーを亢進することが報告されており、EPA や DHA による血清中性脂肪低下作用は、オートファジーの亢進による ChREBP の分解の促進に起因することが示唆された。また本研究により、ChREBP の活性が細胞内局在ばかりでなく、細胞内タンパクレ

ベルによっても制御されることが明らかとなった。このことから ChREBP の分解機構をより詳細に検討することにより、脂質異常症治療薬の開発において新たな創薬ターゲットの発見につながることを期待される。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 5 件)

Sato S., Jung H., Nakagawa T., Pawlosky R., Takeshima T., Lee W. R., Sakiyama H., Laxman S., Wynn R. M., Tu B., MacMillan J. B., De Brabander J. K., Veech R. L., Uyeda K., Metabolite Regulation of Nuclear Localization of Carbohydrate Response Element-binding Protein (ChREBP). Role of AMP as an Allosteric Inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 291(20), 2016, 10515-10527.  
DOI: 10.1074/jbc.M115.708982.

Yamamoto K., Irooi T., Kanaya K., Shinomiya K., Komoto S., Hirata S., Harada K., Watanabe A., Suno M., Nishioka T., Kume M., Makimoto H., Nakagawa T., Hirano T., Miyake H., Fujisawa M., Hirai M., STAT3 polymorphism rs4796793 may be a predictive factor of tumor response to multiple tyrosine kinase inhibitors in metastatic renal cell carcinoma in Japanese population. *Med. Oncol.*, 査読有, 33(3), 2016, 1-7.  
DOI: 10.1007/s12032-016-0733-0.

Yamamoto K., Shinomiya K., Irooi T., Hirata S., Harada K., Suno M., Nishioka T., Kume M., Makimoto H., Nakagawa T., Hirano T., Bito T., Nishigori C., Miyake H., Fujisawa M., Hirai M. Association of Single Nucleotide Polymorphisms in STAT3 with Hand-Foot Skin Reactions in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Multiple Tyrosine Kinase Inhibitors: A Retrospective Analysis in Japanese Patients. *Target Oncol.* 査読有, 11(1), 2016, 93-99.  
DOI: 10.1007/s11523-015-0382-9.

Mizumoto A., Yamamoto K., Nakayama Y., Takara K., Nakagawa T., Hirano T., Hirai M., Induction of epithelial mesenchymal transition via activation of epidermal growth factor receptor constitutes to sunitinib resistance in human renal cell carcinoma cell lines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 査読有, 355(2), 2015, 152-158.  
DOI: 10.1124/jpet.115.226639.

Yamamoto K., Shichiri H., Uda A., Yamashita K., Nishioka T., Kume M., Makimoto H., Nakagawa T., Hirano T., Hirai M., Apoptotic Effects of the Extracts of *Cordyceps militaris* via Erk Phosphorylation in a Renal Cell Carcinoma Cell Line. *Phytother. Res.* 査読有, 29(5), 2015, 707-13.  
DOI: 10.1002/ptr.5305

### 〔学会発表〕(計 3 件)

中川勉、吉村友希、崎山晴彦、山本和宏、藤原範子、鈴木敬一郎、平井みどり、Carbohydrate response element-binding protein (ChREBP)の活性制御に及ぼす核移行/核外搬出シグナルの影響、BMB2015、2015.12.3-4、神戸国際会議場(兵庫県)

吉村友希、中川勉、崎山晴彦、山本和宏、江口裕伸、藤原範子、平野剛、鈴木敬一郎、平井みどり、ChREBP- の活性化機構の解明、日本薬学会第 135 年会、2015.3.27、神戸学院大学(兵庫県)

中川勉、吉村友希、Qiang Ge、Robert pawlosky、R. Max Wynn、山本和弘、平野剛、Richard L. Veech、Kosaku Uyeda、平井みどり、ChREBP と 14-3-3 の結合に影響を与える代謝物の同定、第 87 回日本生化学会大会、2014.10.16-17、国立京都国際会館(京都府)

### 〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/yakudo/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

中川 勉 (NAKAGAWA, Tsutomu)

神戸大学・大学院医学研究科・特命講師

研究者番号：50722063