

平成 25 年 1 月 10 日(金)

<研究課題> 加齢に伴う酸化ストレスによる脂肪酸受容体の
翻訳後修飾のプロテオミクス的手法による解明

代表研究者 奈良県立医科大学医学部 准教授 小澤 健太郎

【まとめ】

脂肪酸をリガンドとする受容体が同定されたが、その生理的意義は十分解明されておらず、疾患との関係も明らかになっていない。今回我々は短鎖脂肪酸をリガンドとする受容体、GPR43 の白色脂肪細胞における脂質代謝制御機構を明らかにした。さらに脂肪酸受容体が加齢に伴う酸化ストレスによる影響を、質量分析を使ったプロテオミクス的手法で解析しており、現在いくつかの興味深い候補タンパク質が同定できたところである。

1. 研究の目的

1-1 我々の研究室では脂肪酸をリガンドとする G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の機能解析をおこなっており、長鎖脂肪酸をリガンドとする受容体、GPR120 が脂肪組織の脂質代謝を制御していることを見いだした。脂肪酸をリガンドとする受容体には、短鎖脂肪酸をリガンドとするものも報告されているが、その生理的意義は明らかになっていなかった。我々は短鎖脂肪酸のリガンドとする受容体、GPR43 のノックアウトマウスと脂肪細胞特異的に強制発現させたトランスジェニックマウスを作製し、GPR43 の生理的役割と高脂肪食負荷時における病態生理的な役割を検討した。

1-2 現在加齢により脂質異常症や糖尿病などの疾患が発症することは知

られているが、その機構は明らかになっていない。加齢による発症機構には酸化ストレスの関与が有名であるにもかかわらず、その機構は不明なままである。我々の研究室ではこの機構を担う経路として、受容体の情報伝達機構を司るタンパク質が酸化修飾されているのではないかと考えた。そこで GPR43 と同様に短鎖脂肪酸をリガンドとする受容体、GPR41 の活性化における一酸化窒素のタンパク質修飾の役割を検討使用と試みた。

1-3 脂質異常症や糖尿病と同様、加齢がリスクファクターになるパーキンソン病において、家族性パーキンソン病の原因タンパク質 parkin における一酸化窒素による修飾機構を検討した。

2. 研究方法と経過

2-1 GPR43 の機能を検討するため、GPR43 の発現を、in situ ハイブリダイゼーションとリアルタイム PCR 法により確認した。GPR43 の発現は骨髄や胸腺などの免疫系の組織と白色脂肪組織に認められたが、褐色脂肪組織には認められなかった。そこでさらに GPR43 の機能を解析するため、GPR43 の遺伝子を破壊したノックアウトマウス (以下 KO マウス) と脂肪細胞特異的に GPR43 を強制発現させたトランスジェニックマウス (以下 Tg マウス) を作製した。KO マウスは高脂肪食負荷

により野生型と比べ有意な体重増加が認められ、その体重増加は白色脂肪組織の増大によるものであった。一方で Tg マウスの白色脂肪組織は野生型マウスに比べ著しい減少が認められた。KO マウス、Tg マウスの糖代謝を負荷試験により評価したところ、高脂肪食負荷の KO マウスは耐糖能異常が認められ、その原因はインスリン抵抗性と考えられた。一方で Tg マウスはインスリン抵抗性が改善しており、野生型に比べ耐糖能が良好であった。これらの結果はグルコースクランプ試験でも同様であった。

次に我々はこの2種類のマウスの表現型が食餌と関係しているかどうかを検討した。短鎖脂肪酸は腸内細菌の発酵により産生されると考えられているため、無菌マウスや抗生剤により腸内細菌を死滅させたマウスなどを作製し、腸内細菌と GPR43 の関連を検討した。すると腸内細菌がないマウスでは、KO マウス、Tg マウスの表現型はほぼ完全に消失した。

最後に GPR43 がどのようにして糖代謝、脂質代謝を制御しているのかの分子機構を検討した。その結果、GPR43 の活性化は PTEN の活性化を通して、インスリンシグナルを抑制していることを見いだした。

2-2 GPR43 と同じく、短鎖脂肪酸をリガンドとする受容体、GPR41 をテトラサイクリン依存性に強制発現させる細胞株（以下 GPR41 発現細胞）を作製した。ここに内在性の一酸化窒素ドナーである S-Nitrosoglutathione (GSNO) を添加し、GPR41 のリガンドであるプロピオン酸を加えたところ、GPR41 の下流の MAP キナーゼである ERK のリン酸化が増強された。この機構を明らかにするために、GPR41 発現細胞に GSNO を添加し、そこから

Modified biotin switch assay for protein S-nitrosothiols (SNOs) using resin-assisted capture (SNO-RAC 法)により一酸化窒素により修飾されたタンパク質を精製した。そのサンプルを蛍光ラベルした後、二次元電気泳動法により展開し、GSNO 添加により増加する修飾タンパク質の同定を試みた。現在、質量分析によりいくつかの候補タンパク質の同定が終了しており、今後、それぞれについて GPR41 下流のシグナル増強における役割を検討する。

2-3 家族性パーキンソン病の原因タンパク質 parkin の一酸化窒素により修飾されるアミノ酸を同定した。そのアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異体を使って、parkin における一酸化窒素の修飾の役割を検討したところ、一酸化窒素による修飾は parkin の E3 ligase 活性を増加させていることを見いだした。

3. 研究の成果

3-1 短鎖脂肪酸をリガンドとする受容体 GPR43 が、腸内細菌叢が産生する短鎖脂肪酸により活性化され、インスリンシグナルを抑制している。これにより GPR43 は過剰に脂質が白色脂肪組織に蓄積しないようにしている。GPR43 がいないとこの機構が失われるため、高脂肪食による過剰な脂質が脂肪組織に取り込まれ、肥満になる。また脂肪細胞特異的に GPR43 を過剰発現させると、常に脂肪細胞においてインスリンシグナルが抑制されるため、やせ形の表現型を取る。以上は短鎖脂肪酸が食餌によるインスリンシグナルの制御に関わっていることを示している。

3-2 短鎖脂肪酸をリガンドとする受容体 GPR41 のシグナルが、外来性の一

酸化窒素により制御されることを見いだした。この分子機構を解明するため、一酸化窒素により修飾されるタンパク質を濃縮／精製し、二次元電気泳動法により修飾が増強するタンパク質の網羅的解析をおこなった。その結果、複数の候補タンパク質が同定されたため、現在そのタンパク質が GPR41 下流のシグナルの制御に関わっているかを解析しているところである。

3-3 家族性パーキンソン病の原因タンパク質 parkin 内部の一酸化窒素により修飾されているアミノ酸を同定した。その結果、一酸化窒素による修飾が parkin の機能を正に制御していることを示した。

4. 今後の課題

2 番目の課題に関して、プロテオミクス的手法により同定された一酸化窒素被修飾タンパク質が、淡彩脂肪酸受容体の下流シグナルにどのように関わっているかを解析する。そのため同

定されたタンパク質をコードする cDNA をクローニングし、GPR41 発現細胞に発現させる。また修飾されているアミノ酸を同定し、そのアミノ酸を他のアミノ酸に置換することにより、一酸化窒素修飾がどのように GPR41 の下流を制御しているかの機構を解明していく。

5. 研究成果の公表方法

S-nitrosylation regulates mitochondrial quality control via activation of parkin.

Ozawa K., Komatsubara A.T., Nishimura Y., Sawada T., Kawafune H., Tsumoto H., Tsuji Y., Zhao J., Kyotani Y., Tanaka T., Takahashi R., Yoshizumi M.

Sci Rep. 2013;3:2202.

3 番目の成果に関しては、Scientific Reports 誌に成果を発表した。またこの成果は、読売新聞、産経新聞など新聞各紙と NHK などのニュース番組で取り上げられた。

以上