



教授  
伊藤 太二

共同研究者  
徳島大学・

先端酵素学研究所・  
教授・親泊 政一

|          |   |
|----------|---|
| 2001年3月  | 東京大学大学院 理学系研究科 博士課程 (生物化学専攻) 修了、博士 (理学) |
| 2001年4月  | 東京大学 医科学研究所 リサーチ・アソシエイト (日本学術振興会研究員)    |
| 2001年11月 | 東京大学 医科学研究所 助手                          |
| 2007年4月  | 宇部工業高等専門学校 物質工学科 准教授                    |
| 2010年7月  | 徳島大学 疾患ゲノム研究センター 講師                     |
| 2012年4月  | 鎌倉女子大学 家政学部 管理栄養学科 講師                   |
| 2016年4月  | 鎌倉女子大学 家政学部 管理栄養学科 准教授                  |
| 2018年10月 | 国立病院機構 横浜医療センター 客員研究員 (現在に至る)           |
| 2020年4月  | 東京都立大学 理学研究科 客員研究員 (現在に至る)              |
| 2021年4月  | 鎌倉女子大学 家政学部 管理栄養学科 教授 (現在に至る)           |

## 飽和脂肪酸はなぜ糖尿病発症リスクを高めるのか？ -飽和脂肪酸添加による膜脂質変化と小胞体ストレス 応答がもたらす遺伝子発現のエピジェネティクス-

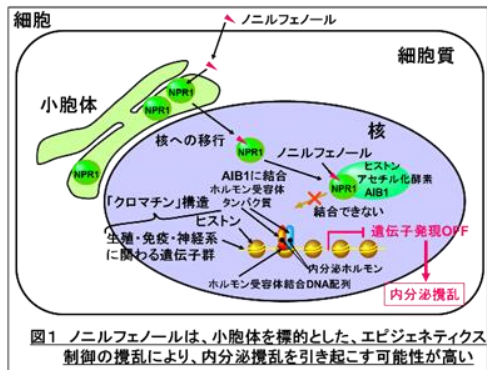
### 1. 背景と目的

近年の食生活は、飽和脂肪酸を多く含む高脂質食中心である。脂質は「おいしさ」を支える中心的役割を果たすが、特に飽和脂肪酸は、肥満とインスリン抵抗性を惹起するため、過剰摂取に注意を要する。特に肝臓では、インスリン抵抗性がNAFLDさらにはNASHの発症に深く関与することが明らかになってきた。一方、膵β細胞においても飽和脂肪酸は、M1型炎症性マクロファージの膵島集積を介して、インスリン分泌低下をもたらすこともわかってきた。こうした疾患の発症には、代謝等にかかわる遺伝子群の発現のエピジェネティクス変化が深く関与することが予想されるが、飽和脂肪酸による膜脂質変化とエピジェネティクスとを結びつけるメカニズムを解明することが発症機序解明の鍵となる。

小胞体は、細胞内環境の変化(小胞体ストレス)を検知して、それに適応する「小胞体ストレス応答」機構を持つ。これには、①タンパク質の翻訳抑制、②タンパク質折りたたみを司る分子シャペロンの発現誘導、③変性タンパク質の分解除去 [1]、④細胞の修復機能を超える場合のアポトーシス誘導 [2] 等がある。

申請者はこれまでに、内分泌攪乱物質ノニルフェノール (NP) の受容体として、ヒト前立腺正常細胞から新規タンパク質 NPR1 (Nonylphenol Receptor 1) を同定した。そして、NPの小胞体ストレスにより、小胞体中のNPR1がNPを受容して核内に移行し、小胞体ストレスメディエーターとして、エピジェネティカルな遺伝子発現制御を担うヒストンアセチル化酵素 AIB1 と直接結合することを示した (図 1、[3])。さらに申請者は、NPR1 が、NP と構造が類似した脂肪酸と特異的に結合する可能性も見出した。そこで本研究では、

「NPR1 が飽和脂肪酸添加による膜脂質変化のセンサーとなり、小胞体ストレスメディエーターとして核移行し核内でヒストンアセチル化酵素 AIB1 と結合して遺伝子発現のエピジェネティクスを変化させ、NAFLD やインスリン分泌低下をもたらす」との仮説を立てた。そして、NAFLD とインスリン分泌低下の培養細胞モデルを用いて、この仮説を検証し、上記疾患発症における飽和脂肪酸の病理学的意義を明らかにすることを本研究の目的とした。



## 2. 方法

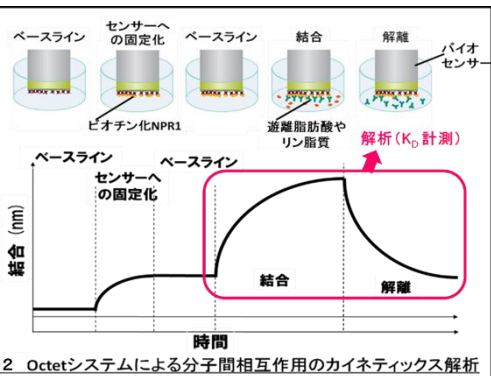
### 2.1. 大腸菌を用いたタンパク質の精製と電気泳動

本研究に用いたグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST ; 26kDa) 融合タンパク質発現・精製システムは、GST をキャリアタンパク質とし、大腸菌内で目的タンパク質を高い発現量で得ることができ、GST の基質であるグルタチオンとの親和性を用いて簡単に精製できる特徴をもつ。本研究では GST 融合 NPR1 およびその変異体の発現プラスミド DNA を大腸菌 DH5α 株に導入し、対数増殖期において 1 mM IPTG で発現誘導した。誘導したタンパク質は凍結融解により全タンパク質の中からグルタチオンビーズによって精製した。そして、このビーズに 40mM グルタチオンを添加することで、目的タンパク質を溶出した。さらに、溶出したタンパク質を透析後、Sulfo-NHS-LC-LC-biotin 溶液を加えビオチン化し、再度透析した。

精製したタンパク質は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) を用い分子量の違いにより分離して、精製の純度や収量を確認した。

### 2.2. Octet システムによる分子間相互作用解析

本研究で用いる Octet RED システムは、バイオレイヤー干渉法 (BLI) を基盤とし、バイオセンサーの上側から白色光を照射し先端からの反射光の干渉波を解析する。そして、バイオセンサー先端に低分子化合物が結合した場合、先端の厚みが変化することで反射光がシフトして元の波長との相違が発生し、これを  $\Delta\lambda$  (波長シフト) として計測する (図 2)。本研究で NPR1 との結合性を解析した化合物は、飽和脂肪酸と



して、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、不飽和脂肪酸として、パルミトレイン酸、オレイン酸、リノール酸の6種類であり、NPR1 変異体との結合性を解析した化合物は飽和脂肪酸としてステアリン酸、不飽和脂肪酸としてオレイン酸である。また、飽和又は不飽和の脂肪酸から構成されるホスファチジルコリン (DSPC 又は DOPC) をもとに作成したリポソームも結合解析に用いた。バイオセンサーを各化合物溶液に浸して、ビオチン化タンパク質と各化合物との結合性を解析し、解離平衡定数 ( $K_D$ ) を算出した。

### 2.3. 細胞株の培養

これまでに、ヒト前立腺癌由来細胞株 LNCap.FGC 細胞株を用いた細胞内局在性解析から、NPR1 は小胞体に局在することが分かっている。従って本研究での細胞内局在性解析には、小胞体の詳細な解析が可能なアフリカミドリザル腎細胞由来 COS7 細胞株を用いた。また、各種脂肪酸処理をした際の小胞体ストレス応答解析には、ヒト肝細胞癌由来 HepG2 細胞株を用いた。COS7 及び HepG2 細胞株の培養には DMEM (10%FCS) を使い、CO<sub>2</sub> 培養器中で CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 平衡を利用し pH を中性の状態に保って培養した。

### 2.4. ウェスタンブロット法を用いた、脂肪酸処理における NPR1、AIB1、及び小胞体ストレスマーカーの発現解析

HepG2 細胞株を  $2.6 \times 10^5$  cells/6 cm dish でまき、その 2.5 日後に、400uM のパルミチン酸またはオレイン酸となるように、各々の脂肪酸を培地に添加した。添加 16 時間後に培地を除き、PBS で 3 回洗浄後、SDS sample buffer を 150 uL 加え、細胞を溶解させた。これを 96°C で 5 min 加熱しタンパク質を完全に変性させ total cell lysate とした。5-20% グラジエントゲルを用いた SDS-PAGE を行った後、ニトロセルロース膜に転写しスキムミルクでブロッキング後、一次抗体として、マウス抗 AIB1 抗体、ラビット抗 NPR1 抗体、マウス抗 CHOP 抗体、マウス抗  $\beta$ -actin 抗体、及び、二次抗体として、HRP 標識した、対応する動物種の IgG に対する抗体を用いてウェスタンブロットした。

### 2.5. 免疫染色法と共焦点レーザー顕微鏡観察

2.5.1. NPR1 と mCherry-NPR1 の局在性の解析では、COS7 細胞を MAS コートされたスライドガラス上で培養し、mCherry-NPR1 発現プラスミドをトランスフェクトして一過性に発現させた。培地を除き、1%ホルムアルデヒドで細胞をスライドガラスに固定した。界面活性剤 TritonX-100 (0.01%) で膜透過処理を行った後、1%BSA でブロッキングを行った。ラビット抗 NPR1 抗体を、コスモバイオ製「Immunoshot MILD 溶液」

で 50 倍に希釈した一次抗体を作製し 37°C、1 時間反応させた。

2. 5. 2. NPR1 と AIB1 の共局在性の解析では、COS7 細胞を MAS コートされたスライドガラス上で培養し、2 $\mu$ g/mL の Tunicamycin により 24 時間刺激を行った。培地を除き、1%ホルムアルデヒドで細胞をスライドガラスに固定した。界面活性剤 TritonX-100 (0.01%) で膜透過処理を行った後、1%BSA でブロッキングを行った。ラビット抗 NPR1 抗体、及びマウス抗 AIB1 抗体を、それぞれコスモバイオ製「Immunoshot MILD 溶液」で 50 倍に希釈した一次抗体を作製し 37°C、1 時間反応させた。

2. 5. 1. 、2. 5. 2. とともに、それぞれの抗体に対して、一次抗体の場合と同様の溶液で 2000 倍に希釈した Alexa488 標識二次抗体、及び、2. 5. 2. では、これに加え Alexa568 標識二次抗体で 25°C、1 時間反応させた。これを共焦点レーザー走査型顕微鏡 (LSM510 (カールツァイス製)) により観察した。これはそれぞれの蛍光色素に対応する励起光をサンプルに当て、それによって発生する蛍光を、焦点を変えることで特定の断面の蛍光のみを検出できるものである。微分干渉像の観察後、蛍光色素に対応する励起光を照射してタンパク質の局在性を観察した。Alexa488 は 488nm の青色レーザー照射により、NPR1 を緑色蛍光として、Alexa568 は 543 nm の緑色レーザー照射により、AIB1 を赤色蛍光として、それぞれ検出した。

### 3. 結果

#### 3. 1. タンパク質の精製と電気泳動による確認

大腸菌で発現誘導させた GST 融合 NPR1 およびその変異体タンパク質を SDS-PAGE 及びクマシーブリアントブルー (CBB) 染色で解析した結果、全タンパク質と可溶化タ

ンパク質のバンドの濃さが同じであり、ほぼ 100%の可溶化率であることがわかった。ビーズに結合したいずれのタンパク質においても、単一のバンドが検出されていることから、高い純度で精製できたものと考えられる (図 3)。

#### 3. 2. Octet システムによる分子間相互作用解析

大腸菌で発現・精製した GST-NPR1 (図 3A) をビオチン化してストレプトアビジンセンサーに固相化した。この NPR1 バイオセンサーを各脂肪酸溶液に浸して、NPR1 と各脂肪酸との結合性を解析した。解析したデータから解離平衡定数 ( $K_D$ ) を算出した。

その結果、不飽和脂肪酸のみが全て NPR1 と結合し、飽和脂肪酸では、NPR1 との結合性は検出されなかった (図 4)。

パルミトレイン酸、オレイン酸、リノール酸の  $K_D$  はそれぞれ、10mM、50 $\mu$ M、100 $\mu$ M

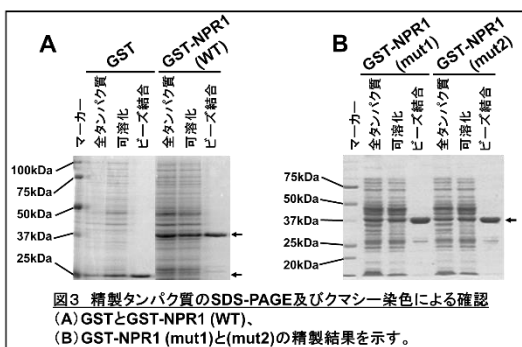


図3 精製タンパク質のSDS-PAGE及びクマシー染色による確認  
(A) GSTとGST-NPR1 (WT)、  
(B) GST-NPR1 (mut1)と(mut2)の精製結果を示す。

であった。従って、NPの受容体として、元々単離したNPR1は本来、不飽和脂肪酸に対する受容体として機能すると考えられた。

次に、DSPC（飽和脂肪酸

をもつホスファチジルコリン）又はDOPC（不飽和脂肪酸であるオレイン酸をもつホスファチジルコリン）を用いてリポソームを作製し、NPR1との結合性を調べた。その結果、DOPCリポソームはNPR1との結合性を示すが、DSPCリポソームは結合性を示さないことが明らかになった（図5）。従って、NPR1は遊離脂肪酸のみならず、膜構造を形成するホスファチジルコリンのうち、不飽和脂肪酸から成るものに特異的に結合すると考えられた。

NPR1は、ヒトで多くのSNPが報告されており、その中には、アミノ酸コード領域でないものの小児肥満に関連すると考えられるものなどが知られている[4]。今回、アミノ酸コード領域内に見られるSNP2種類をもとに作製した変異体について、野生型と同様にGST融合タンパク質を発現・精製（図3B）してバイオセンサーを作製し、飽和脂肪酸としてステアリン酸、不飽和脂肪酸としてオレイン酸との結合性をOctetシステムで解析した。その結果、いずれの変異体でも、野生型と同様に、ステアリン酸との結合性は検出されなかった。そして、オレイン酸との結合性に関しては、変異体1では減弱し、変異体2では、検出されなくなった（図6）。さらに、DSPCリポソーム、DOPCリポソームとNPR1変異体との結合性を調べたところ、DSPCリポソームに対しては野生型と同様、いずれの変異体でも結合性を示さず、DOPCリポソームに対しては、変異体1では結合性が減弱し、変異体2では、結

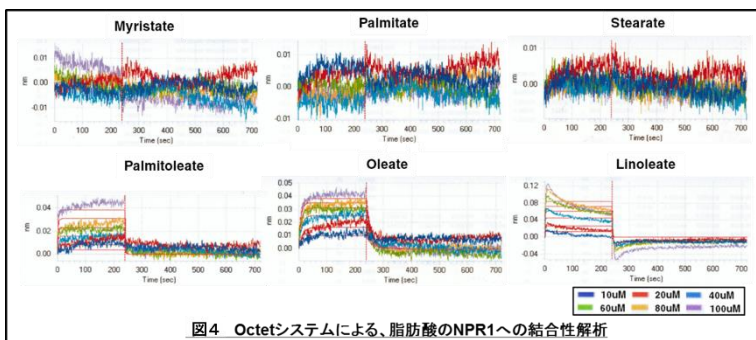


図4 Octetシステムによる、脂肪酸のNPR1への結合性解析

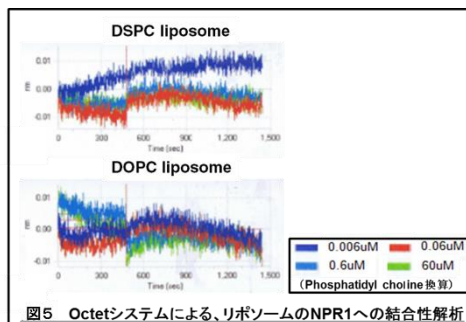


図5 Octetシステムによる、リポソームのNPR1への結合性解析

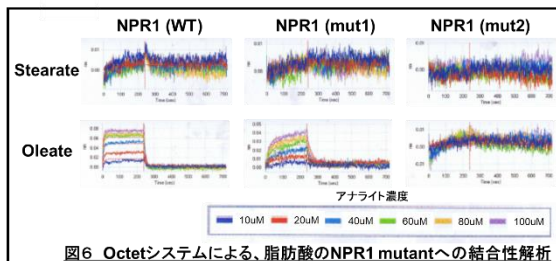


図6 Octetシステムによる、脂肪酸のNPR1 mutantへの結合性解析

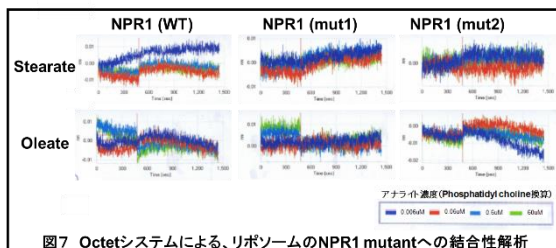
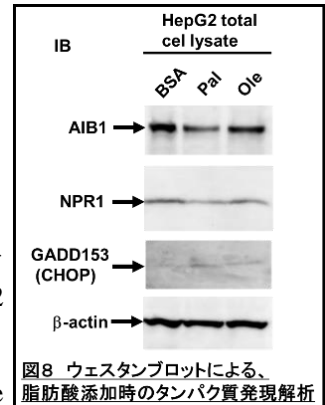


図7 Octetシステムによる、リポソームのNPR1 mutantへの結合性解析

合性は検出されなくなった (図 7)。以上のことから、SNP の中には、NPR1 のオレイン酸との結合性を減弱または欠失させるものがあることが明らかとなった。今後、疾患との関連性がみられるかを精査したい。

### 3.3. ウェスタンブロット法を用いた、脂肪酸添加時の NPR1 及び AIB1 の発現変動の解析

肝細胞癌由来培養細胞 HepG2 に飽和脂肪酸を添加することで NAFLD や NASH の培養細胞モデルとなることがこれまでに報告されている。そこで、サブコンフルエントの状態の HepG2 細胞株に対して、終濃度 400uM となるようにパルミチン酸またはオレイン酸を添加し、添加後 16 時間後に、total cell lysate



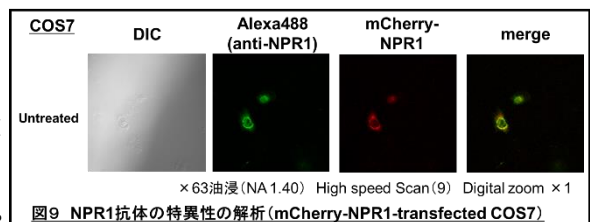
を調製した。コントロールとしては、BSA のみを添加した細胞

を用いた。これらの lysate を用いて、細胞内の  $\beta$ -actin、CHOP、NPR1、AIB1 の発現を調べた (図 8)。 $\beta$ -actin の発現については、BSA コントロール、パルミチン酸、オレイン酸ともに、同等の発現量であった。小胞体ストレスに応答して DR5 (Death Receptor 5) 等の発現誘導を介して caspase 経路を活性化シアポトーシス惹起に關与する CHOP の発現が、飽和脂肪酸であるパルミチン酸処理により上昇することが、これまでに報告されているが、本実験においても、BSA コントロールに比べ、パルミチン酸処理により、CHOP の発現が誘導された。NPR1 と、NP 依存的に NPR1 に結合するヒストンアセチル化酵素 AIB1 の発現については、驚いたことに、BSA コントロールに比べ、パルミチン酸処理により、NPR1、AIB1 ともに発現量が減少した。これまでに、小胞体ストレス応答として、活性化した PERK により eIF2 $\alpha$  がリン酸化されタンパク質合成開始複合体形成阻害を介した翻訳抑制が起きることがこれまでに報告されていることから、NPR1 や AIB1 がその標的となっている可能性も考えられる。今後、NPR1 や AIB1 が転写、転写後修飾、翻訳のどの過程で発現が抑制されているのかを精査したい。

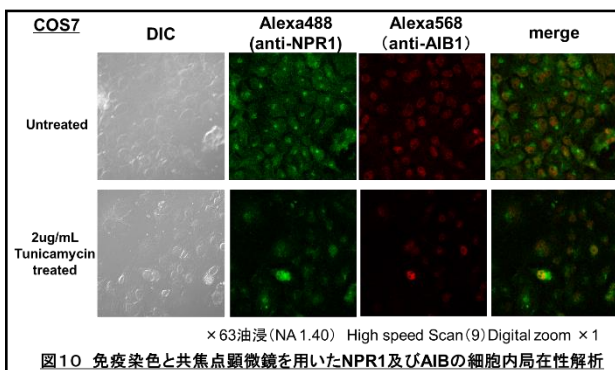
### 3.4. 免疫染色法と共焦点レーザー顕微鏡観察

共焦点レーザー顕微鏡による NPR1 や

AIB1 の細胞内局在性の記述にあたって、まず最初に、赤色蛍光タンパク質 mCherry と融合した NPR1 を作製し、これを COS7 細胞にトランスフェクトしたのち、細胞を固定して、抗 NPR1 抗体を用いた免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、mCherry-NPR1 と内在性 NPR1 が同じ局在性を示し、抗 NPR1 抗体により内在性 NPR1 が検出できると考えられた (図 9)。次に、全て内在性の NPR1 及び AIB1 タ



ンパク質に対して免疫染色を行い共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、AIB1はTunicamycin非存在下及び存在下のいずれの条件下でも、主に核に存在した。一方、NPR1はTunicamycin非存在下では細胞質に存在した(図10)。すなわち、Tunicamycin非存在下では、NPR1



と AIB1 は共局在しなかった。Tunicamycin 存在下では、NPR1 の大部分が核に移行した。そして、核に移行した NPR1 は AIB1 との共局在性を示した(図10)。

#### 4. 考察及び展望

本研究から、本来 NPR1 は細胞質に主に局在し、不飽和脂肪酸特異的受容体として脂肪酸代謝に機能するが、Tunicamycin 存在下では「小胞体ストレス情報」を核内の AIB1 に伝達する多機能なタンパク質であろうと考えられる。飽和脂肪酸であるパルミチン酸は、PERK-ATF4 経路の活性化を介して、アポトーシス関連転写因子 CHOP の発現を誘導することが報告されている。しかしながら、脂肪酸添加による膜脂質組成変化を核内に情報伝達するメカニズムと小胞体ストレス応答メカニズムとの共通性及び特殊性については不明な点が多い。今後、脂肪酸の有無や脂肪酸の分子種の違いによる NPR1 結合タンパク質群の分子構成変化に関する質量分析や、NPR1 の標的遺伝子群の網羅的同定を行い、NPR1 の膜脂質センサー、及びエピジェネティクス制御機構へのトランスデューサーとしての機能を解明し、小胞体ストレス応答機構とのクロストークについても記述して、2型糖尿病や NAFLD の発症機構の解明に結びつけたい。

#### 5. 謝辞

本研究を実施するにあたり、ご支援賜りました公益財団法人サッポロ生物科学振興財団に、心より感謝申し上げます。

#### 6. 参考文献

- [1] Oyadomari, S. et al. Cell 126, p727 (2006)
- [2] Marciniak, S.J. et al. Genes Dev. 18, p3066 (2004)
- [3] 伊藤太二、山崎俊介、太田一樹、大村正史、親泊政一 日本栄養・食糧学会誌 第 68 巻, p63 (2015)
- [4] Comuzzie A. G., et al. PLoS One 7, e51954 (2012)