

助成番号 0916

Na⁺イオン共輸送型ーグルタミントランスポーターを介したアミノ酸取り込みによる脂質代謝関連遺伝子発現制御

井上 順

東京大学大学院農学生命科学研究科

概要 グルタミンは生体において最も高濃度に存在する遊離アミノ酸であり、増殖速度の速い細胞はグルタミンを多く取り込み、栄養素として利用することが知られている。正常肝細胞へのグルタミンの取り込みは System N と呼ばれる Na⁺イオン共輸送型トランスポーター SN1/2 によって行われる。一方、肝がん由来細胞株ではグルタミンの取り込み速度が 10～30 倍に上昇していることが知られており、その取り込み上昇は System ASC と呼ばれる Na⁺イオン共輸送型トランスポーター ASCT2 の発現亢進に起因している。肝細胞を高濃度のグルタミン含有培地で培養すると、細胞内への Na⁺イオンの流入が起き、その結果、低浸透圧培地で培養したときと同様に細胞膨張が起こることが知られている。

申請者はこれまでに、肝がん由来細胞株である HepG2 細胞を高濃度のグルタミン含有培地で培養すると、脂肪酸合成およびコレステロール合成系の酵素群の転写が亢進することを見出している。本研究では、グルタミンによる脂質代謝関連遺伝子の転写亢進メカニズムの解明を目指し検討を行った。

その結果、HepG2 細胞における 40 mM グルタミン処理による脂質代謝関連遺伝子の転写亢進は、SREBP の活性化を介していることを明らかにした。グルタミンによる SREBP 活性化の分子機構に関しては不明な点が多いが、アラニンやプロリンといったグルタミンと同様にナトリウム共輸送型のトランスポーターにより細胞内に取り込まれるアミノ酸に関しては SREBP の活性化を引き起こさないことから、グルタミンによる SREBP 活性化は細胞内の塩濃度の変化に起因しないと考えられる。

SREBP は脂質代謝を包括的に制御する転写因子であり、SREBP の活性化は脂肪酸やコレステロール生合成を促進させる。培養細胞に用いる培地中には、他のアミノ酸よりも高濃度のグルタミン(2～4 mM)が含まれており、活発に細胞増殖を繰り返す細胞には高濃度のグルタミンが必要とされている。高濃度のグルタミンは SREBP を活性化し、細胞増殖に必要な膜脂質成分の供給を促していると考えられる。

今後、グルタミンによる SREBP 活性化の分子機構の解明に加えて、動物個体においても培養細胞と同様に、高グルタミン食摂取が SREBP 活性化を引き起こすかどうかを検討し、アミノ酸による脂質代謝制御の可能性についてさらに検討を進めていきたいと考えている。

1. 研究目的

グルタミンは生体において最も高濃度に存在する遊離アミノ酸であり、増殖速度の速い細胞はグルタミンを多く取り込み、栄養素として利用することが知られている。正常肝細胞へのグルタミンの取り込みは System N と呼ばれる Na⁺イオン共輸送型トランスポーター SN1/2 によって行われる。一方、肝がん由来細胞株ではグルタミンの取り込み

速度が 10～30 倍に上昇していることが知られており、その取り込み上昇は System ASC と呼ばれる Na⁺イオン共輸送型トランスポーター ASCT2 の発現亢進に起因している。肝細胞を高濃度のグルタミン含有培地で培養すると、細胞内への Na⁺イオンの流入が起き、その結果、低浸透圧培地で培養したときと同様に細胞膨張が起こることが知られている。細胞膨張シグナルは PI3 キナーゼ経路の活性

化を介して脂肪酸合成系の酵素である Acetyl-CoA Carboxylase および Glycogen Synthase の転写を亢進することが報告されている。

申請者はこれまでに、肝がん由来細胞株である HepG2 細胞を高濃度のグルタミン含有培地で培養すると、脂肪酸合成およびコレステロール合成系の酵素群の転写が亢進することを見出している。本申請研究の目的は、グルタミンによる脂質代謝関連遺伝子の転写亢進メカニズムを解明することである。

2. 研究方法

2.1 レポーターアッセイ

アミノ酸添加による効果を感じ度良く検討するために、DMEM 培地中に含まれているアミノ酸濃度を約 1/16 にした培地をアミノ酸培地として用いた。アミノ酸培地に含まれるアミノ酸濃度は次の通りである。

5 μM Trp; 12.5 μM Cys, Met, His; 25 μM Gly, Ala, Ser, Asn, Glu, Asp, Phe, Tyr, Arg, Pro; 50 μM Thr, Val, Leu, Ile, Lys; 250 μM Gln。

また、血清中に含まれるアミノ酸の影響を考慮し、透析血清を 5% で用いた。

HepG2 細胞にリン酸カルシウム法により、それぞれの遺伝子のプロモーター領域を含むルシフェラーゼ発現プラスミドおよび β -ガラクトシダーゼ発現プラスミドを導入した。トランスフェクション約 36 時間後、40 mM Gln を含むアミノ酸培地に交換し、12 時間後にアッセイを行った。 β -ガラクトシダーゼ発現プラスミドはトランスフェクション効率の補正のために用いた。

2.2 遺伝子発現解析

グルタミン処理後、RNA を回収、cDNA 合成を行い、リアルタイム PCR により各種遺伝子の発現を定量化した。

2.3 ウェスタンブロット

抗 SREBP-1 モノクローナル抗体 (2A4)、抗 SREBP-2 C 末端側認識モノクローナル抗体 (1C6) は Santa cruz より購入した。抗 SREBP-2 N 末端側認識ポリクローナル抗体は自作のもの (Rs004)¹⁾ を用いた。

3. 研究結果

3.1 グルタミンは SREBP 活性化を介して脂質代謝関連遺伝子の発現を制御する

これまでに 40 mM グルタミン添加により LDL (low density lipoprotein) 受容体、HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA) 合成酵素、SQS (squalene synthase) 遺伝子等の脂質代謝関連遺伝子のプロモーター活性が上昇することを見出しているが、これらの遺伝子は共通して SREBP による活性化を受けることから、SREBP の関与が想定された。そこでコレステロール添加による影響を検討した (コレステロールは SREBP のプロセッシングを抑制することで SREBP 活性を低下させる)。グルタミンによる HMG-CoA 合成酵素および SQS 遺伝子のプロモーター活性の上昇はコレステロール添加により完全に抑制された (Fig. 1 A)。また、HMG- HMG-CoA 合成酵素および SQS 遺伝子のプロモーター領域に存在する SREBP 結合配列に変異を導入すると (SREKO)、グルタミンによる活性化が低下した。これらの結果はグルタミンによるプロモーター活性の亢進には SREBP が関与していることを示している。また、グルタミンによる HMG-CoA 合成酵素プロモーター活性の上昇は、Caco2 細胞においても確認された (Fig. 1 B)。

3.2 グルタミンは SREBP の発現を転写レベルで亢進する

グルタミンによる SREBP の活性化は様々なレベルでの制御が関与している可能性が考えられるが、まず始めに転写レベルでの制御について検討を行った。SREBP には 3つのアイソフォーム (SREBP-1a, SREBP-1c, SREBP-2) が存在し、40 mM グルタミン処理によって SREBP-1c は 4 時間から発現亢進が観察され、処理後 8 時間ではすべてのアイソフォームの転写が亢進していた (Fig. 2 A)。

SREBP 標的遺伝子である HMG-CoA 合成酵素遺伝子の発現レベルも同時期に上昇が見られることから (Fig. 2 A)、グルタミンによる SREBP 活性化には SREBP の転写レベルでの亢進も関与しているが、これは Primary effect ではないと考えられる。グルタミンによる SREBP-2 遺伝子の発現上昇はコレステロール処理により完全に抑制され、SREBP-1c に関してはわずかながら抑制されたが、SREBP-1a は影響を受けなかった (Fig. 2 B)。SREBP-1c および SREBP-2 遺伝子は自己活性化することが知られている^{2), 3)}。グルタミン処理による SREBP-1c および SREBP-2 遺伝子の発現上昇はコレステロール処理により抑制を受けたことから、これらの転写誘導は自己活性化に

よると考えられる。一方、SREBP-1aの転写はSp1による制御を受けることが報告されていること、およびグルタミン処理はヘキソサミン合成経路を活性化させ、Sp1のO-型糖鎖付加を亢進することにより核内移行を促進し、Sp1活性を上昇させることが報告されている^{4),5)}。そこでGFAT阻害剤であるアザセリンを用いてヘキソサミン合成経路を阻害し、グルタミンによるSREBP-1a遺伝子の発現亢進に与える影響を検討した。その結果、グルタミンによるSREBP-1a遺伝子の発現上昇はアザセリン処理により完全に抑制された(Fig. 2 B)。そこで次に、グルタミン処理によるSp1のO-型糖鎖付加レベルおよび細胞内の局在性について検討を行った。グルタミン処理によりSp1のO-型糖鎖付加レベルは上昇し、アザセリンによりその上昇は完全に消失した。さらにアザセリン処理により、グルタミンおよびアザセリン未処理の時よりもSp1のO-型糖鎖付加レベルは低下していた(Fig. 2 C)。また、グルタミン処理2時間で核内のSp1量は増加し、同時に細胞質のSp1量が低下していた(Fig. 2 D)。これらの結果は、グルタミン処理によるSREBP-1a遺伝子の発現亢進は、Sp1のO-型糖鎖付加の亢進に伴うSp1の活性化により引き起こされていることを示唆している。

3.3 グルタミンはSREBPのプロセッシングを亢進する

グルタミン処理によりSREBP遺伝子の発現は亢進したが、SREBP標的遺伝子の転写亢進と同時期であることから、グルタミンの効果のPrimary effectは他にあると考えられた。そこで次に、SREBPのプロセッシングに及ぼすグルタミンの影響を検証した。SREBPは合成後小胞体膜に膜タンパク質として局在し、刺激に応じてゴルジ体へと輸送され、ゴルジ体に存在するS1P(site 1 protease)およびS2P(site 2 protease)といったプロテアーゼによる切断(プロセッシング)を受け切り離されたN末端側が核内へと移行し、転写因子として機能する⁶⁾。ウエスタンブロットによる解析の結果、SREBP-1、SREBP-2の核内型(プロセッシングを受けた後のN末端側)およびSREBP-2のプロセッシングを受けた後のC末端側が、40 mMグルタミン処理0.5時間で上昇していた(Fig. 3 A)。グルタミンの濃度依存性を検討したところ、10 mMではわずかにプロセッシング亢進が観察され、20 mM処理では40 mMと同程度のプロセッシング亢進が観察された(Fig. 3 B)。これらの結果はグルタ

ミン処理によりSREBPのプロセッシングが亢進していること、さらにその効果はグルタミンの濃度依存的に亢進することを示している。

次に、グルタミンはグルタミン酸へと代謝されるため、グルタミン酸の効果を検討した。グルタミン処理によりSREBPプロセッシングは亢進したが、同濃度のグルタミン酸処理によりSREBPプロセッシングの亢進は起こらなかった(Fig. 4)。この結果はグルタミンの効果は、その代謝物ではなく、グルタミンそのものの効果であることを示している。また、グルタミンはナトリウム共輸送型のトランスポーターにより細胞内に取り込まれるため、高濃度のグルタミン処理は浸透圧に起因する細胞膨張を引き起こすことが知られている⁷⁾。そこで同様に細胞膨張を引き起こすと考えられるアラニンやプロリンに関して、SREBPプロセッシングにおよぼす影響を検討した。その結果、アラニンおよびプロリン処理によりSREBPプロセッシングの亢進は観察されなかった(Fig. 4)。これらの結果はグルタミンによるSREBPプロセッシング亢進は細胞膨張に起因しないことを示唆している。

4. 考察

HepG2細胞における40 mMグルタミン処理による脂質代謝関連遺伝子の転写亢進は、SREBPの活性化を介していることが明らかになった。グルタミンによるSREBP活性化の分子機構に関しては不明な点が多いが、アラニンやプロリンといったグルタミンと同様にナトリウム共輸送型のトランスポーターにより細胞内に取り込まれるアミノ酸に関してはSREBPの活性化を引き起こさないことから、グルタミンによるSREBP活性化は細胞内の塩濃度の変化に起因しないと考えられる。

SREBPは脂質代謝を包括的に制御する転写因子であり、SREBPの活性化は脂肪酸やコレステロール生合成を促進させる。今回の研究によりグルタミンがSREBPを活性化することを明らかにした。培養細胞に用いる培地中には、他のアミノ酸よりも高濃度のグルタミン(2~4 mM)が含まれており、活発に細胞増殖を繰り返す細胞には高濃度のグルタミンが必要とされている。高濃度のグルタミンはSREBPを活性化し、細胞増殖に必要な膜脂質成分の供給を促していると考えられる。

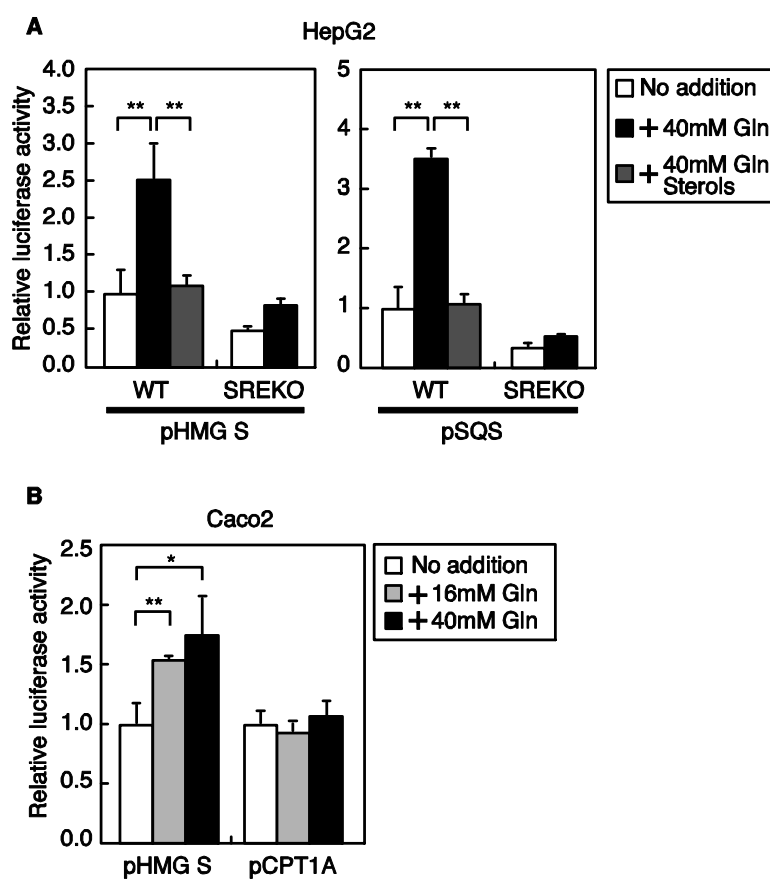


Fig. 1. Glutamine stimulates the promoter activities of SREBP targets. Hep G2 cells (A) and Caco-2 cells (B) were transfected with 200 ng of the reporter constructs consisting of the indicated gene promoters and 200 ng of pEF- β -Gal. The cells were cultured with medium A (A) or medium B (C) for 36 h and then refed with the low amino acid medium supplemented with the indicated concentration of glutamine for 12 h in the presence or absence of sterols (10 μ g/ml of cholesterol plus 1 μ g/ml of 25-hydroxycholesterol). Luciferase assays were performed as described previously ¹⁾. The promoter activities without glutamine addition are represented as 1. All data are presented as means \pm S.D. values of three independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

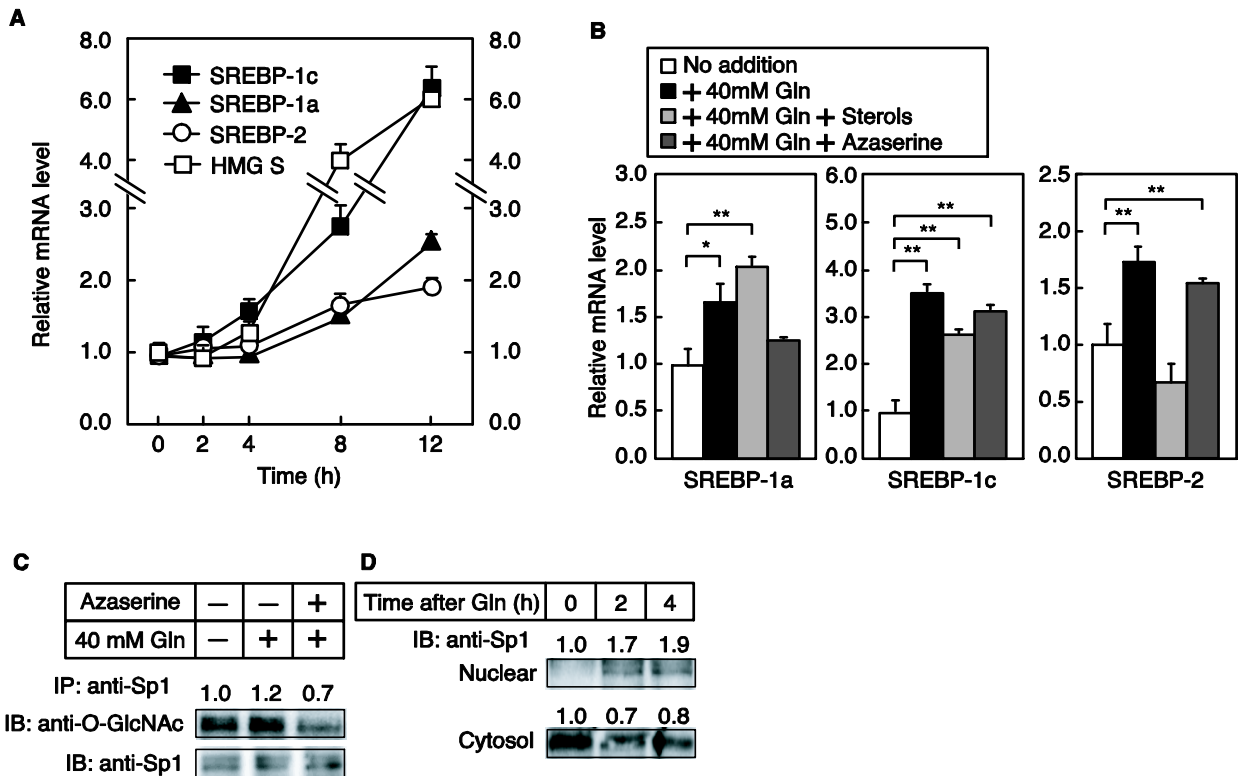


Fig. 2. Glutamine increases the mRNA levels of SREBPs and O-glycosylated Sp1 in the nucleus. A, Hep G2 cells were cultured with the low amino acid medium for 4 h and then refed with the medium supplemented with 40 mM glutamine for 2, 4, 8, or 12 h and total RNA was isolated. Real-time PCR analysis was performed, and relative mRNA levels were obtained after being normalized to GAPDH mRNA. The mRNA levels at 0 time are represented as 1. All data are presented as means \pm S.D. values of three independent experiments performed in triplicate. B, Hep G2 cells were cultured with the low amino acid medium supplemented with 40 mM glutamine for 12 h in the presence or absence of sterols (10 mg/ml of cholesterol plus 1 mg/ml of 25-hydroxycholesterol) or 5 mM azaserine. Real-time PCR analysis was performed, and relative mRNA levels were obtained after being normalized to GAPDH mRNA. The mRNA levels without glutamine addition are represented as 1. All data are presented as means \pm S.D. values of three independent experiments performed in triplicate. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. C, Hep G2 cells were cultured with the low amino acid medium supplemented with or without 40 mM glutamine in the presence or absence of 5 mM azaserine for 12 h. The whole cell extracts were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-Sp1 antibody. Aliquots of immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE and immunoblot (IB) analysis with anti-O-GlcNAc or anti-Sp1 antibodies, and the signals were quantified with a Fujifilm LAS-3000 Luminoimager. Fold change was calculated by the ratio of the intensity between the O-glycosylated Sp1 and the whole Sp1 signals. The ratio in the absence of both glutamine and azaserine was set as 1. The same results were obtained in more than three separate experiments. D, Hep G2 cells were cultured with the low amino acid medium for 4 h and then refed with the medium supplemented with 40 mM glutamine for the indicated periods. The nuclear fraction, cytosol fraction, and the whole cell extracts were subjected to IB with Sp1 antibody, and the signals were quantified with a Fujifilm

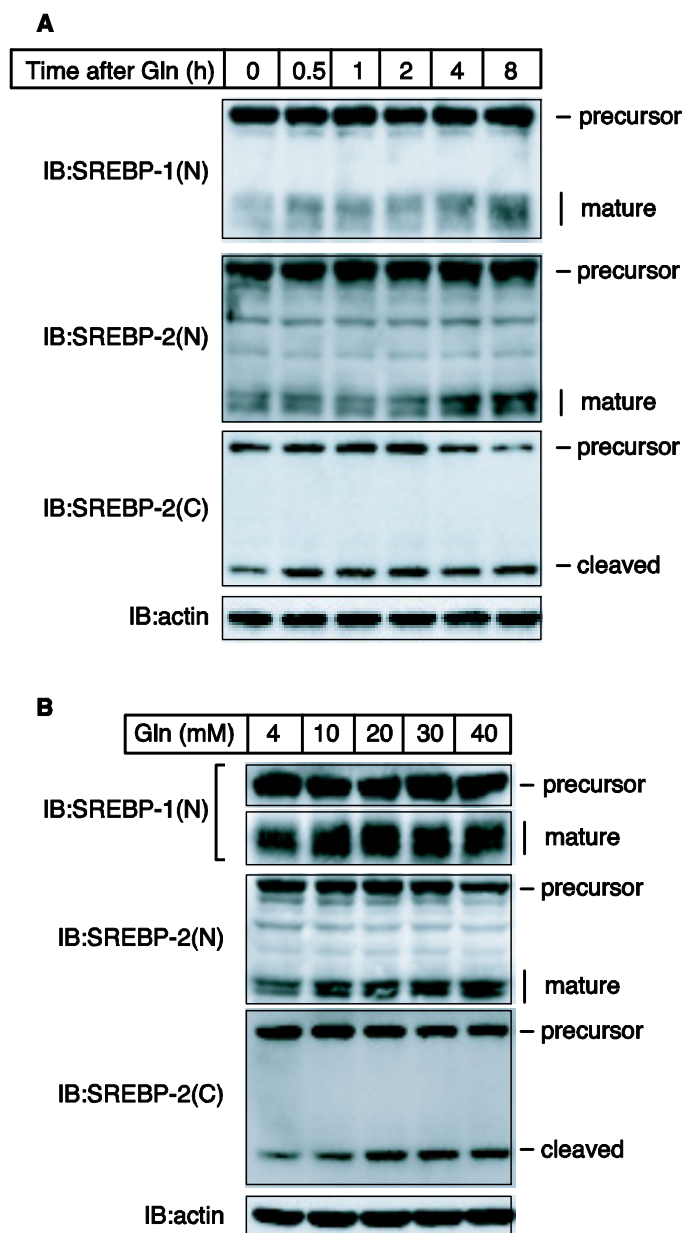


Fig. 3. Glutamine stimulates the processing of both SREBP-1 and SREBP-2. *A*, Hep G2 cells were cultured with medium A containing 4 mM glutamine for 48 h and refed with the medium containing 40 mM glutamine for the indicated period of time before harvest. The whole cell extracts were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting (IB) with anti-SREBP-1(N) (2A4), anti-SREBP-2(N) (Rs004), anti-SREBP-2(C) (1C6), or anti- β -actin antibodies. *B*, Hep G2 cells were cultured with medium A containing 4 mM glutamine for 40 h and then refed with the medium containing the indicated concentration of glutamine for 4 h. The whole cell extracts were subjected to SDS-PAGE and IB with the antibodies as described in Fig. 4A. The same results were obtained in more than three separate experiments.

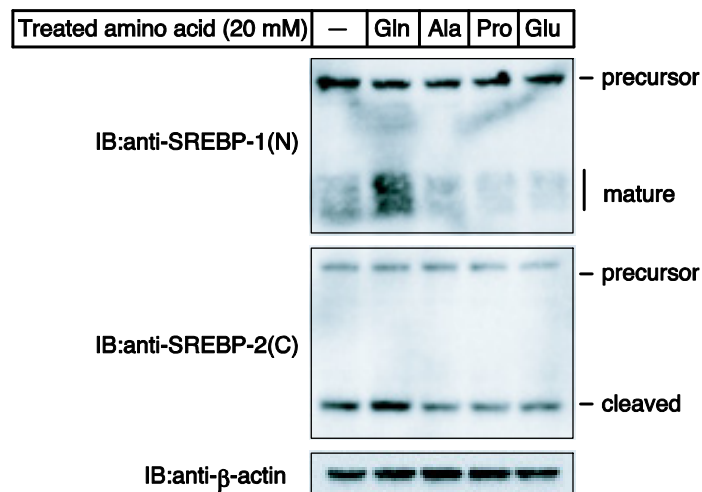


Fig. 4. Treatment with alanine, proline, or glutamate does not stimulate SREBP processing. Hep G2 cells were cultured with medium A which contained 4 mM glutamine for 48 h and refed with the medium containing the indicated amino acid at a concentration of 20 mM for 4 h before harvest. The whole cell extracts were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting (IB) with anti-SREBP-1(N), anti-SREBP-2(C), or anti-β-actin antibodies. The same results were obtained in more than three separate experiments.

5. 今後の課題

今回の研究により、アミノ酸と脂質代謝の新たな接点を見出すことに成功した。今後、グルタミンによる SREBP 活性化の分子機構の解明に加えて、動物個体においても培養細胞と同様に、高グルタミン食摂取が SREBP 活性化を引き起こすかどうかを検討し、アミノ酸による脂質代謝制御の可能性についてさらに検討を進めていきたいと考えている。

謝辞

本研究に助成していただいた財団法人ソルト・サイエンス研究財団ならびに関係者の皆様に深く感謝いたします。

文献等

- 1) Sato R., Miyamoto W., Inoue J. *et al.*: Sterol regulatory element-binding protein negatively regulates microsomal triglyceride transfer protein gene transcription. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274; 24714-24720.
- 2) Sato R., Inoue J., Kawabe Y. *et al.*: Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271; 26461-26464.
- 3) Amemiya-Kudo M., Shimano H., Yoshikawa T., *et al.*: Promoter analysis of the mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275; 31078-31085.
- 4) Zhang C., Shin D. J., and Osborne T. F. : A simple promoter containing two Sp1 sites controls the expression of sterol-regulatory-element-binding protein 1a (SREBP-1a). *Biochem. J.*, 2005; 386; 161-168.
- 5) Brasse-Lagnel C., Fairand A., Lavoigne A. *et al.*: Glutamine stimulates argininosuccinate synthetase gene expression through cytosolic O-glycosylation of Sp1 in Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* 2003; 278; 52504-52510.
- 6) Brown M. S., and Goldstein J. L. : A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1999; 96; 11041-11048.
- 7) Bode B. P., Fuchs B. C., Hurley B. P. *et al.*: Molecular and functional analysis of glutamine uptake in human hepatoma and liver-derived cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2002; 283; G1062-G1073.

No. 0916

Transcriptional Regulation of the Genes Related to Lipid Metabolism through Amino Acid Uptake Mediated by the Na⁺ - Dependent Glutamine Transporter

Jun Inoue

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

Summary

Glutamine is the most abundant amino acid in stream and involves in many cell function through modulation of various signaling pathway. In the present study, we have demonstrated that glutamine stimulates HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA) synthase mRNA levels, known as SREBP target genes. Glutamine also up-regulated the expression of SREBPs mRNA, including SREBP-1a, SREBP-1c, and SREBP-2. Glutamine mediated induction of SREBP-1c and SREBP-2 mRNA levels was attenuated while glutamine mediated induction of SREBP-1a mRNA level was not changed by the treatment with sterols, that suppresses SREBP processing. The expression of SREBP-1a mRNA, a predominant form of SREBP-1 in most cultured cells and a target of the general transcription factor Sp1, is significantly augmented by an increase in glutamine-induced O-glycosylation of Sp1. In contrast, the increased expression of SREBP targets, including SREBP-1c and SREBP-2, is due to a stimulation of the processing of SREBP proteins by glutamine. Moreover, time-course experiments demonstrated that glutamine increased the amount of mature SREBP-1 and SREBP-2 prior to the induction of transcription levels.

The transport of glutamine into HepG2 cells via a sodium-dependent transporter causes an osmotic swelling of the cells. Since alanine and proline were also transported into HepG2 cells via a sodium-dependent transporter, we tested the effect of these amino acids on SREBP processing. While 20 mM glutamine treatment stimulated SREBP processing, same concentration of alanine or proline treatment did not influence SREBP processing, implying that osmotic change dose not involved in the stimulation of SREBP processing by glutamine.

In conclusion, the present study shows that the treatment of glutamine in HepG2 cells causes stimulation of SREBP-1a mRNA expression, which seems to be mediated by the activation of HBP. Furthermore, posttranslational processing of SREBP-1 and SREBP-2 is independently stimulated by the treatment of glutamine through distinct signaling pathway. The remaining question to be clarified is how glutamine stimulates transport of SREBP/SCAP complex from ER to Golgi. The molecular mechanism of this effect is now under investigation.