

主論文の要旨

**S100B impairs glycolysis via enhanced
poly(ADP-ribosyl)ation of glyceraldehyde 3-phosphate
dehydrogenase in rodent muscle cells**

〔 S100B は齧歯類筋細胞において GAPDH の
poly ADP-ribosyl 化を亢進させ解糖系を阻害する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 糖尿病・内分泌内科学分野

（指導：有馬 寛 教授）

細川 香里

【緒言】

S100B は主に神経系細胞や脂肪細胞に発現し、標的蛋白の種類や S100B 濃度により、多彩な作用を及ぼす 21kDa の蛋白である。我々は以前に、脂肪細胞から分泌される S100B が脂肪組織の慢性炎症に関与することを報告した。さらに S100B 濃度は BMI や A-FABP と相関するという報告もあり、S100B の肥満症への関与が示唆される。しかし末梢組織におけるインスリン作用や糖代謝に対する S100B の影響は未だ検討されていない。今回我々は齧歯類の筋芽細胞及び筋細胞の Glucose 代謝に対する S100B の作用について検討した。

【方法】

Rat 筋芽細胞 L6、Mouse 筋芽細胞 C2C12 をそれぞれ Dulbecco' s modified eagle medium (DMEM)に 10% fetal bovine serum(FBS)を添加して培養し、筋芽細胞として実験に使用した。また 80-90%confluency 時に 2%FBS へ変更し、分化させ筋細胞として以下の実験に使用した。インスリン、S100B 及び各種阻害薬を適宜組み合わせ添加し、0-6h 培養後各種項目を測定した。

- 1) 培養液中 Glucose 及び Lactate 濃度は酵素法で測定した。
- 2) 細胞内 Glycogen 量を酵素法で測定した。
- 3) Western Blot 法でインスリンシグナルを検討した。
- 4) 細胞を S100B 添加後一定時間培養したのち、Glucose analog の取り込みを蛍光測定で評価した。
- 5) CE-TOFMS 及び CE-QqQMS による Metabolome 解析で代謝産物を評価した。
- 6) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)、 Hexokinase(HK)については real-time PCR 法で発現を、Western Blot 法で蛋白量を、酵素リサイクリング法で活性を検討した。
- 7) poly ADP-ribosyl 化された GAPDH 蛋白量を検討するため、細胞回収後抗 GAPDH 抗体を用いて免疫沈降し、抗 PAR 抗体により Dot Blot で検討した。また S100B knock out mouse と C57BL/6J mouse の大腿四頭筋を採取し、同様の評価を行った。
- 8) poly(ADP-ribose)polymerase (PARP)阻害薬、Receptor of advanced glycation end products(RAGE)阻害薬、Toll-like receptor(TLR)4 阻害薬、Fibroblast growth factor receptors(FGFR)阻害薬で preincubate した後に S100B を添加し、S100B の作用に与える影響を検討した。

【結果】

- 1) インスリンは L6 myoblast 培養液中の Glucose 消費をコントロールに比して有意に増加させたが、S100B はそれを阻害し(Fig.1A,1B)、その効果は用量依存的であった(Fig.1C)。解糖系のバイオマーカーである Lactate 濃度もインスリンで上昇し S100B はそれを阻害した(Fig.1D)。細胞内 Glycogen 量はインスリンで増加したが、S100B は明らかな影響を与えなかった(Fig.1E)。

- 2) S100B は Akt 及び GSK3 β のリン酸化に影響を与えなかった(Fig2A,2B)。
- 3) S100B は単独でも Glucose 消費を阻害した(Fig3A)。Glucose analog である 6-NBDG の取り込みは、S100B 群で有意に減少した(Fig.3B)。
- 4) Metabolome 解析では S100B 群において GAPDH より上流の中間代謝産物が増加した (Fig.4A, 4B)。
- 5) S100B により GAPDH の発現及び蛋白量は変化しなかったが、活性は有意に抑制された(Fig.5A-C)。HK に対しては影響を与えなかった(Fig5D-F)。
- 6) その活性化により GAPDH 活性を抑制すると報告されている PARP に注目し、免疫沈降及び Dot Blot を行ったところ、poly ADP-ribosyl 化 GAPDH 蛋白は S100B 群で有意に増加した(Fig.6A)。
- 7) PARP 阻害薬は培養液中 Glucose 消費及び Lactate 濃度に対する S100B の作用を消失させ(Fig.6B,6C)、poly ADP-ribosyl 化 GAPDH の亢進を抑制した (Fig.6D)。
- 8) RAGE 阻害薬、TLR-4 阻害薬、FGFR 阻害薬はいずれも S100B の Glucose 消費阻害作用に影響を与えなかった(Fig.7A-C)。
- 9) C2C12 及び L6myotube を用いた実験においても、S100B は Glucose 消費を阻害し、その効果は PARP 阻害薬によって消失した(Fig.8A-8C)。C2C12 myotube において poly ADP-ribosyl 化 GAPDH 蛋白は S100B において増加傾向であった (Fig.8D)。S100B knock out mouse の大腿四頭筋における GAPDH の poly ADP-ribosyl 化は、Wild type に比して有意に抑制されていた(Fig.8E)。

【考察】

肝臓、筋肉、脂肪組織における糖代謝異常はインスリン抵抗性を惹起し、2 型糖尿病発症に重要な役割を果たす。多くの炎症性サイトカインがインスリン抵抗性や内臓脂肪における慢性炎症に関与するが、我々は以前に S100B が炎症性 adipokine の一つであることを解明した。今回の本研究結果から、S100B は筋細胞において解糖系を抑制することが明らかになり、S100B が脂肪細胞の慢性炎症以外に筋における糖代謝異常に関与する可能性が示唆された。

本研究では、S100B が齧歯類筋細胞において Glucose 消費を阻害することが明らかになった。我々は当初、S100B がインスリン作用を阻害する可能性を検討したが、インスリンシグナルに影響を与えないことが明らかとなったため、インスリンと独立して解糖系を抑制する機序につき探索した。Metabolome 解析において GAPDH より上流の代謝産物が増加していたことから、GAPDH 活性の低下を疑い測定したところ、実際に有意の抑制を認めた。GAPDH は PARP により修飾され活性を失うことが報告されているが、本研究により S100B が GAPDH の poly ADP-ribosyl 化を亢進させることが明らかとなり、さらに PARP 阻害薬によって S100B の Glucose 消費阻害作用は消失した。これらの結果は、S100B の筋細胞における糖代謝阻害効果は、主に GAPDH の poly ADP-ribosyl 化を介していることを示唆している。S100B knock out mouse の大腿四頭筋における poly ADP-ribosyl 化された GAPDH は、Wild type に比して著明に減少

しており *in vitro* のデータと矛盾しない結果であった。

一方、S100B のレセプターとして関連が報告される RAGE、TLR、FGFR については、その阻害薬によって S100B の Glucose 消費阻害作用は消失せず、細胞外 S100B が GAPDH の poly ADP-ribosyl 化を亢進させる機序については今後の課題である。

【結語】

本研究は、筋細胞において、S100B が GAPDH の poly ADP-ribosyl 化を亢進させることにより、インスリンと独立して解糖系を抑制することを明らかにした。肥満患者においては S100B 濃度が増加していることから、S100B が肥満患者の耐糖能異常に関与している可能性が示唆された。今後 *in vivo* 及び臨床を含むさらなる研究の蓄積が必要である。