

課題番号 : 24指102

研究課題名 : 2型糖尿病の創薬のための分子標的の同定に資する転写共役因子CITED2を中心とした代謝制御エピジェネティクスの解明

主任研究者名 : 松本 道宏

分担研究者名 : 該当なし

キーワード : 糖尿病、メタボリックシンドローム、創薬、分子標的、代謝疾患モデル動物

研究成果 :

平成25年度は研究計画に基づき、骨格筋特異的 CITED2 欠損マウスの通常食ならびに高脂肪食飼育下での代謝表現型解析および骨格筋特異的 CITED2 トランスジェニックマウスの作製、肝臓におけるアセチル化酵素 GCN5 の糖新生調節の分子機構に関する詳細な解析、肝臓および肝細胞におけるメチル化酵素 SetU の強発現による機能解析と SetU の相互作用分子の同定を行った。また、CITED2 結合分子としてした癌抑制遺伝子産物 Retinoblastoma タンパク (Rb) の脂肪細胞分化における役割、ならびに CITED2 制御性分子として同定したジオキシングナーゼの肝細胞代謝における役割の解析を進めた。また、CITED2 結合性 lincRNA ならびに CITED2 によって発現調節を受ける lincRNA の探索も行った。これらの内、大きく進展した GCN5 と Retinoblastoma タンパクに関する研究の概要について報告する。

アセチル化酵素 GCN5 による糖新生調節の分子機構

GCN5 は糖新生に重要な転写共役因子 PGC-1 α をアセチル化し不活化する。近年、我々は本作用が転写調節分子 CITED2 と GCN5 との相互作用により抑制されることを明らかにしたが (Nat Med. 18: 612-617, 2012)、ヒストンアセチル基転移酵素(HAT)としての GCN5 の肝糖新生調節への役割は不明であった。そこで、肝糖新生調節における GCN5 の HAT としての役割の解明を試みた。昨年までに GCN5 は 1)肝糖新生系酵素の遺伝子発現に必須の HAT であること、2)cAMP/CITED2 依存性の GCN5 の基質指向性の変化が糖新生の誘導に中心的な役割を果たすことを明らかにした。

本年度はグルカゴン-cAMP 経路ならびに CITED2 による GCN5 の機能調節の分子機構についてさらに詳細な検討を行った。まず肝細胞を用いたクロマチン免疫沈降法により糖新生系酵素遺伝子プロモーターへの GCN5 のリクルートとエピジェネティックな変化検討をおこなった。GCN5 は cAMP 刺激時に CITED2 依存性に G6pc, Pck1 promoter に誘導され、ヒストン H3 をアセチル化することが明らかとなった。次に GCN5 の強発現の効果を検討した。肝細胞における GCN5 単独での強発現は糖新生系酵素の発現を増加させなかったが、CITED2 の強発現下に GCN5 を共発現させると、GCN5 は cAMP/CITED2 依存性に誘導された糖新生系酵素の発現をさらに大きく増加させた。

以上の結果から、GCN5 の機能はグルカゴン-cAMP 経路と CITED2 により制御されていることが明らかとなった。さらに cAMP/CITED2 依存性の Post-translational modification による GCN5 機能調節機構についても検討をおこなった。その結果、GCN5 はグルカゴン-cAMP 依存的にリン酸化を受け、このリン酸化が GCN5 のアセチル化の基質を変換するのに必要な可能性が示唆された。

CITED2 による癌抑制遺伝子産物 Rb を介した脂肪細胞分化調節機構

CITED2 は脂肪細胞分化に重要な分子である PPAR γ や CBP と相互作用するが、その脂肪細胞分化における役割は不明であった。本研究では脂肪細胞分化における CITED2 の役割を、in vitro ならびに in vivo における機能欠損実験により検討した。3T3-L1 細胞における CITED2 のノックダウンにより、PPAR γ の発現が抑制され分化が障害された。これは PPAR γ の発現誘導に重要な前駆脂肪細胞の一過性の細胞増殖、mitotic clonal expansion (MCE)の障害によると考えられた。共沈実験の結果などから、CITED2 が Rb と相互作用し、MCE とこれに続く PPAR γ の発現を促進していることが明らかとなった。さらに、高脂肪食負荷 CITED2ヘテロ欠損マウスは前駆脂肪細胞の増殖低下による肥満抵抗性を示した。これらの結果から CITED2 は脂肪細胞分化に必須の分子であることが明らかとなった。

Subject No. : 24S102

Title : Elucidation of the epigenetic regulatory mechanism of metabolism by transcriptional coregulator CITED2 to identify target molecules for developing new therapeutic drugs for type 2 diabetes

Researchers : Michihiro Matsumoto

Key words : Diabetes mellitus, Metabolic syndrome, Drug development, Molecular target, Animal model for metabolic diseases

Abstract : This year, as planned, we successfully generated mice overexpressing transcriptional coregulator CBP/p300-interacting transactivator with glutamic acid (E)/aspartic acid (D)-rich C-terminal domain 2 (CITED2) specifically in the skeletal muscle. We also carried out phenotypic analysis of skeletal muscle-specific CITED2 knockout mice fed on a high fat diet as well as a normal chow diet. In addition, we investigated the role of general control of amino acid synthesis 5-like 2 (GCN5), an acetyltransferase, and SetU, a methyltransferase in the regulation of hepatic glucose metabolism. We also sought to identify molecules for which expression is regulated by or that interact with CITED2 in both mouse liver and cultured hepatocytes. We obtained several candidates and are now investigating the metabolic function of 2 shortlisted molecules, retinoblastoma protein (Rb) and a sort of dioxygenase. Herein, we present full details of the GCN5-related project that has progressed the most within this past year.

The role of GCN5 in the regulation of hepatic gluconeogenesis

Hepatic gluconeogenesis is critical to maintain fasting glucose homeostasis; unrestrained activity under hepatic insulin resistance contributes to hyperglycemia in diabetic patients. We have shown that the transcriptional co-regulator CBP/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 2 (CITED2) promotes PGC-1 α -dependent gluconeogenesis by inhibiting its acetylation by GCN5. GCN5 is a PGC-1 α acetyltransferase (AT) that seems to inhibit gluconeogenesis; however, hepatic GCN5 (not the paralog PCAF) is upregulated in diabetic mice. Therefore, we investigated the role of GCN5 as a histone acetyltransferase (HAT) in the transcriptional regulation of hepatic gluconeogenesis. GCN5 knockdown in murine liver reduced glycemia and gluconeogenic gene expression. GCN5 depletion in hepatocytes attenuated the induction of gluconeogenic genes by cAMP, PGC-1 α or CITED2. Neither GCN5 nor its AT-defective mutant (Δ AT) enhanced cAMP-triggering gluconeogenic gene induction when overexpressed; co-expression of CITED2 and GCN5, not Δ AT, did enhance induction. These data suggest GCN5 induces gluconeogenesis in an AT-dependent manner in concert with CITED2. We also investigated the regulation of GCN5 activity by AT assays with histone H3 and PGC-1 α as substrates. In the absence of CITED2, GCN5 preferentially acetylated PGC-1 α . In the presence of CITED2, GCN5 bound CITED2 and acetylated histone H3, not PGC-1 α . CHIP analysis revealed that recruitment of, and H3K9 acetylation by, GCN5 on cAMP-induced gluconeogenic gene promoters were abolished by CITED2 depletion. Our results suggest GCN5 promotes gluconeogenic gene induction through a CITED2-dependent substrate switch from PGC-1 α to histone H3.

Researchers には、分担研究者を記載する。

2型糖尿病の創薬のための分子標的の同定に資する転写共役因子CITED2を中心とした代謝制御エピジェネティクスの解明

平成25年度 研究報告要旨 (1)

我々は平成23年度まで国際医療研究開発費(21指116)による助成を受け、転写共役因子CITED2がホルモンによる肝糖産生制御の鍵分子であり、2型糖尿病モデルマウスの高血糖に病因的な役割を果たしていることを報告した(*Nature Med.* 18: 612-7, 2012)。本研究から、CITED2は肝臓以外の臓器においても代謝調節に関与し、その機能を抑制することが血糖値を低下させ、糖尿病の治療となる可能性が示唆された。すなわちCITED2の活性を調節する分子は、新規糖尿病治療薬の標的となると考えられた。

本研究では、CITED2の筋肉における代謝調節への関与を明らかにすると共に、これまでに同定したCITED2関連エピジェネティック酵素であるGCN5とSetUの代謝調節における役割を解明する。また、糖尿病治療の分子標的として新規CITED2制御性分子の同定・機能解析を行う。

平成25年度は研究計画に基づき、骨格筋特異的CITED2欠損マウスの通常食ならびに高脂肪食飼育下での代謝表現型解析および骨格筋特異的CITED2トランスジェニックマウスの作製、肝臓におけるアセチル化酵素GCN5の糖新生調節の分子機構に関する詳細な解析、肝臓および肝細胞におけるメチル化酵素SetUの強発現による機能解析とSetUの相互作用分子の同定を行った。また、CITED2結合分子Retinoblastomaタンパクの脂肪細胞分化における役割、ならびにCITED2制御性分子として同定したジオキシゲナーゼの肝細胞代謝における役割の解析を進めた。また、CITED2結合性lincRNAならびにCITED2によって発現調節を受けるlincRNAの探索も行った。以下にサブテーマごとの進捗について要旨を報告する。

骨格筋CITED2の代謝調節における役割の解明

—骨格筋特異的CITED2欠損 (mCITED2KO) マウスを用いて

1. 通常食飼育での体重、血糖値、行動量・呼吸代謝、筋組織像などの代謝表現型解析を終了。対照と比べ差を認めなかった。高脂肪食飼育下で同様の解析を継続中。
2. 筋肉における遺伝子発現の変化を網羅的に解析—NR4As, Pck1, 各種ミオシンなどの発現の変化を同定。これらの変化の週齢依存的な消失を見出した。
3. 培養筋細胞における機能喪失でも、CITED2欠損骨格筋と同様の変化が起こることを見出した。
3. 骨格筋特異的CITED2トランスジェニックマウスを作製した。

今後、運動負荷や後肢懸垂による廃用性萎縮などの実験系を用いた解析を進めると共に、CITED2の機能獲得実験等によりCITED2の筋肉における機能を明らかにする予定である。

肝臓GCN5の代謝制御エピジェネティクスの解明

肝臓特異的GCN5機能抑制/獲得マウスを用いた検討より

1. GCN5の強発現はCITED2を共発現した場合にのみ肝糖新生系酵素の発現を誘導し、血糖値を上昇させることを見出した。—GCN5-CITED2複合体の重要性をin vivoで明らかにした。

GCN5による糖新生調節のメカニズム—in vitroでの検討より

1. GCN5が、cAMP、PGC-1 α 、CITED2的な糖新生系酵素の発現誘導に必須の分子であることを発見。
2. GCN5のヒストンアセチル化活性ならびにGCN5-CITED2複合体形成が糖新生系遺伝子の発現誘導に重要であることを見出した。—GCN5はホルモンないし栄養素依存性のEpigenetic modifierであることを明らかにした。

2型糖尿病の創薬のための分子標的の同定に資する転写共役因子CITED2を中心とした代謝制御エピジェネティクスの解明

平成25年度 研究報告要旨 (2)

肝臓SetUの代謝調節における役割の解明

昨年度、肝臓特異的SetU機能抑制マウスならびに初代培養肝細胞における機能喪失実験から、SetUの機能抑制が、グルカゴン/cAMP依存性の肝糖新生系酵素の発現誘導を抑制し、糖新生抑制に基づく血糖値の低下を起こすことを見出した。本年度は、SetUと相互作用する分子の同定と相互作用の役割の検討、ならびにSetUのメチル化酵素としての特性の解析を行った。

1. SetU結合蛋白として絶食応答性転写共役因子、サーチュインファミリーの脱アセチル化酵素の1つXを同定した。
2. SetUとXとの共沈実験ならびにin vitroメチル化アッセイから、SetUはメチル化酵素活性を持ち、XはSetUの基質である可能性が示唆された。
3. 肝臓特異的SetU欠損マウスを作製した。

今後SetUのメチル化酵素としての性質や起こるエピゲノム変化を明らかにする。また、未同定の基質の探索も行う。

CITED2制御性分子の探索

CITED2結合核タンパク

CITED2結合核タンパクの候補として同定したRetinoblastomaタンパク (Rb)の機能解析を進めた。CITED2の機能欠損により起こる脂肪細胞分化障害はPPAR γ の発現抑制によるが起こるが、これはCyclin-CDK複合体によるRbのリン酸化がCITED2の欠損により障害されることによることを見出した。—CITED2は細胞周期・分化の制御分子として機能することを明らかにした。

CITED2制御性分子

昨年同定したグルカゴン、CITED2で誘導されるジオキシゲナーゼに対するshRNAアデノウイルスベクターを用いて機能喪失実験を行った。一本分子は糖新生の制御分子である可能性が示唆された。

CITED2結合lincRNAの探索

肝細胞からのRNA免疫沈降法により強発現系で探索を行った。用いた抗体の免疫沈降効率が悪く、新たなウサギ抗CITED2ポリクローナル抗体の作製に着手。

<平成25年度 研究発表・論文など>

論文発表

Kimura K et al, Diabetes. 62:2266-2277, 2013

受賞

- 第3回 日本糖尿病学会若手研究奨励賞, 5月, 2013. (酒井真志人)
 - 2013年度 日本肥満学会若手研究奨励賞, 10月, 2013. (酒井真志人)
- 学会発表等

第50回 臨床分子医学会学術集会2題 (酒井真志人, 山地大介他)、第86回日本内分泌学会学術総会総会3題 (酒井真志人, 松本道宏, 木村久美他)、第56回日本糖尿病学会年次学術集会総会4題, 内シンポジウム1題 (松本道宏, 酒井真志人, 山地大介, 木村久美他)、1st Annual Helmholtz-

Nature Medicine Diabetes Conference, Sep 2013. (酒井真志人)、第34回日本肥満学会2題 (酒井真志人, 山地大介他)、1st Korea-Japan Diabetes Forum, Korea, May 11, 2013. (松本道宏)、2nd Annual World Congress of Diabetes-2013, May, 2013. (松本道宏)、Asia-Pacific Diabetes and Obesity (APDO) Study Group symposium 2013. (松本道宏)、第18回アディポサイエンスシンポジウム (山地大介他) 他

大学院講義 (松本道宏)

京都大学大学院薬学研究科, 6月, 2013. (松本道宏)
富山大学大学院医学薬学教育部, 10月, 2013. (松本道宏)

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 24指102

研究課題名： 2型糖尿病の創薬のための分子標的の同定に資する転写共役因子CITED2を中心とした代謝制御エピジェネティクスの解明

主任研究者名： 松本 道宏

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
The miR-17/92 cluster is targeted by STAT5 but dispensable for mammary	Yamaji D 他	Genesis	50 (9)	2013年
Histidine Augments the Suppression of Hepatic Glucose Production by Central Insulin Action	Kimura K, Matsumoto M, Inoue H 他	Diabetes	62 (7)	2013年
Sequential activation of genetic programs in mouse mammary epithelium during pregnancy depends on STAT5A/B	Yamaji D, 他	Nucleic Acids Research	41 (3)	2013年
Mammary-specific gene activation is defined by progressive recruitment of STAT5 during pregnancy and the establishment of H3K4me3 marks	Yamaji D 他	Mol Cell Biol	34 (3)	2014年

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
CITED2-GCN5複合体による肝糖新生調節機構の解明	松本 道宏 他	第56回日本糖尿病学会年次学術集会 特別シンポジウム3；インスリン作用研究の進化と展望	熊本	2013/5/17
Central Role of Fasting Inducible CITED2-GCN5 Interaction in Hepatic Gluconeogenesis	松本 道宏 他	International Symposium on Transcription and Metabolism 2013	淡路夢舞台国際会議場	2013/11/11
Central Role of Fasting Inducible CITED2-GCN5 Interaction in Hepatic Gluconeogenesis	松本 道宏 他	Asia-Pacific Diabetes and Obesity (APDO) Study Group symposium 2013	東京	2013/10/12
The Histone Acetyltransferase GCN5 is an Essential Regulator of hepatic Gluconeogenesis	酒井 真志人 他	1st Annual Helmholtz-Nature Medicine Diabetes Conference	ミュンヘン・ドイツ	2013. 9
CITED2: a new player in hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis	松本 道宏 他	2nd Annual World Congress of Diabetes-2013	西安・中国	2013/5/20
CITED2: a new player in hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis	松本 道宏 他	1st Korea-Japan Diabetes Forum, 26th Spring Congress of Korean Diabetes Association	済州島・韓国	2013/5/11
CITED2-GCN5複合体による肝糖新生調節機構	酒井 真志人	The 7th Kobe Diabetes Night Seminar	神戸	2013/10/4
転写調節分子CITED2による代謝制御機構	松本 道宏 他	国立健康・栄養研究所 所内セミナー	国立健康・栄養研究所・東京	2013/10/10
肝臓における2型糖尿病治療標的の同定への試みー肝糖産生亢進と脂肪肝を中心にー	松本 道宏 他	日本医科大学老人病研究所セミナー	日本医科大学老人病研究所・川崎	2013/9/26
転写調節分子CITED2による代謝制御機構の解明	松本 道宏	第34回 Osaka Diabetes Forum ーParadigm Conversion for Diabetesー	大阪	2013/8/22
肝インスリン抵抗性による病態の分子機構-肝糖産生亢進と脂肪肝を中心に-	松本 道宏	第6回 Metabolic-Hepatology 研究会	仙台	2013/7/30
ヒストンアセチル化酵素GCN5による肝糖代謝調節機構の解明	酒井 真志人 他	第34回日本肥満学会・若手研究奨励賞審査口演	東京	2013/10/11
転写調節分子CITED2は癌抑制遺伝子産物Rbの機能調節を介して脂肪細胞分化を制御する	山地 大介 他	第34回日本肥満学会	東京	2013/10/11
転写調節分子CITED2は癌抑制遺伝子産物Rbの機能調節を介して脂肪細胞分化を制御する	山地 大介 他	第18回アディポサイエンスシンポジウム	東京	2013/8/24
ヒストンアセチル化酵素GCN5による肝臓の糖新生調節機構の解明	酒井 真志人 他	第56回日本糖尿病学会年次学術集会・若手研究奨励賞審査口演	熊本	2013/5/16
転写調節分子CITED2は癌抑制遺伝子産物Rbの機能調節を介して脂肪細胞分化を制御する	山地 大介 他	第56回日本糖尿病学会年次学術集会	熊本	2013/5/17
ヒスチジンは、中枢神経を介してインスリン作用による肝糖産生抑制を増強する	木村 久美, 松本 道宏 他	第56回日本糖尿病学会年次学術集会	熊本	2013/5/18

研究発表及び特許取得報告について

ヒストンアセチル化酵素GCN5による肝糖代謝調節機構	酒井 真志人 他	第86回日本内分泌学会学術総会	仙台	2013/4/27
転写調節因子CITED2の脂肪細胞分化における役割の解析	松本 道宏 他	第86回日本内分泌学会学術総会	仙台	2013/4/26
ヒスチジンは中枢作用を介して肝糖新生を抑制する	木村 久美, 松本 道宏 他	第86回日本内分泌学会学術総会	仙台	2013/4/25
ヒストンアセチル化酵素GCN5による肝臓の糖新生調節機構の解明	酒井 真志人 他	第50回日本臨床分子医学会学術集会	東京	2013/4/12
転写調節因子CITED2は癌抑制遺伝子産物Rbの機能調節を介して脂肪細胞分化を制御する	山地 大介 他	第50回日本臨床分子医学会学術集会	東京	2013/4/12
The histone acetyltransferase GCN5 is an essential regulator of hepatic gluconeogenesis	酒井 真志人 他	International Symposium on Transcription and Metabolism	淡路夢舞台国際会議場	2013. 11. 12
The Transcriptional Coregulator CITED2 regulates adipocyte differentiation and lipid accumulation	山地 大介 他	International Symposium on Transcription and Metabolism	淡路夢舞台国際会議場	2013. 11. 12
CITED2-GCN5複合体による肝糖新生調節機構の解明	松本 道宏 他	第28回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会シンポジウム 2	宮崎	2014/2/15
The histone acetyltransferase GCN5 regulates hepatic gluconeogenesis through a CITED2-dependent substrate switch	松本 道宏 他	Keystone Symposia, Challenges and Opportunities in Diabetes Research and Treatment	バンクーバー・カナダ	2014/1/14
The transcriptional coregulator CITED2 regulates adipocyte differentiation by interacting with retinoblastoma protein	松本 道宏 他	12th International Congress on Obesity	クアラルンプール・マレーシア	2014/3/17

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
特別シンポジウム3 インスリン作用研究の進歩と展望	松本 道宏	第56回日本糖尿病学会年次学術集会 Official News Flash No. 3 Report	熊本	2013/5/18
ヒストンアセチル化酵素GCN5による肝糖代謝調節機構の解明	酒井 真志人	第56回日本糖尿病学会年次学術集会 Official News Flash No. 2 Report	熊本	2013/5/17

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。
 ※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。