

課題番号 : 26指301
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26年度は研究計画に基づき、主に骨格筋特異的 CITED2 欠損マウスの高脂肪食飼育下での代謝表現型解析を行うと共に、骨格筋特異的 CITED2 トランスジェニックマウスの普通食飼育下での解析を行った。またアセチル化酵素 GCN5 のマウス肝臓における機能獲得実験を行い、GCN5 を CITED2 と共に強発現させると糖新生系酵素の発現が増強し肝糖新生が亢進することを見出した。この詳細なメカニズムをマウス初代培養肝細胞にて検討し、グルカゴン-cAMP シグナル依存的に CITED2-GCN5-PKA 複合体が形成されること、ここで cAMP により活性化した PKA により GCN5 がリン酸化を受けるとヒストンアセチル化活性が亢進し、糖新生系酵素の遺伝子転写が活性化することを明らかにした。また CITED2 制御性メチル化酵素 SetU が培養肝細胞において、サーチエンファミリーの脱アセチル化酵素 X をメチル化し、その活性を調節していることを見出した。この調節機構の代謝における重要性を *in vivo* で検証するために肝臓特異的 SetU 欠損マウスの作製も行った。さらに、CITED2 とその結合タンパクとして同定した Retinoblastoma タンパクとの相互作用が脂肪細胞分化における意義を 3T3-L1 細胞にて検証し、*in vivo* においても高脂肪食負荷 CITED2 ヘテロ欠損マウスを用いて検証した。CITED2 制御性分子として同定した α -ケトグルタル酸と Fe^{2+} 依存性のジオキシゲナーゼに関する、short hairpin RNA によるノックダウンの系で肝細胞代謝への影響を検討し、本分子が広範な絶食応答遺伝子の発現誘導に必須であることを見出した。これらのうち、大きく進展した GCN5 に関する研究の概要について以下に報告する。

アセチル化酵素 GCN5 による糖新生調節機構の解明

A. 肝臓特異的 GCN5 機能欠損/獲得マウスの代謝表現型解析

本年度はアデノウイルスベクターを用いて野生型 GCN5 ならびにアセチル化酵素活性を欠損する変異 GCN5 (Δ AT) を肝臓特異的に強発現させ、その機能獲得が個体レベルでの代謝に与える影響を検討した。野生型 GCN5 は CITED2 と共発現させると、絶食時の糖新生系酵素の発現が増加し、肝糖新生の亢進により空腹時血糖値が上昇した。一方 Δ AT にはこの作用は認められなかった。これらの結果から、*in vivo* においても GCN5-CITED2 複合体は絶食時の糖新生系酵素の発現誘導に必要であり、この効果発現にはアセチル化酵素活性が必須であることが明らかとなった。

B. GCN5 による糖新生調節のメカニズム-初代培養肝細胞を用いた *in vitro* での検討

本年度から、GCN5 が cAMP・CITED2 依存性に基質指向性を変化させる分子メカニズムの検討に着手した。GCN5 が cAMP 依存的にリン酸化されることから、プロテインキナーゼ A (PKA) の関与を想定し、培養肝細胞における共沈実験・*in vitro* ヒストンアセチル化酵素アッセイなどによる検討を行った。その結果、GCN5 は CITED2、PKA と複合体を形成すること、cAMP 刺激により PKA 触媒サブユニットが活性化すると GCN5 がリン酸化されること、リン酸化された GCN5 はその基質指向性を PGC-1 α からヒストン H3 に変化させることを見出した。一方インスリンは、cAMP/CITED2 依存性の GCN5 の HAT 活性の増加を抑制した。また GCN5 内の PKA によるリン酸化モチーフを *in silico* で探索し、モチーフ内の各種セリン・スレオニン残基をアラニンに置換した各種変異体を作製し、PKA 依存的なリン酸化部位の同定を行った。その結果、275 番目のセリンが PKA 依存的なリン酸化部位であることを見出した。現在、同部位を各々アラニンないしアスパラギン酸に置換した恒常的非リン酸化型変異体 (S275A)・恒常的リン酸化型変異体(S275D)を作製し、アセチル化酵素活性・糖新生系酵素遺伝子の発現に及ぼす影響を検討中である。また、同部位のリン酸化が個体レベルでの代謝に与える影響を検討するために CRISPR/Cas9 システムを用いて S275A ノックインマウスならびに S275D ノックインマウスの作製に着手した。現在ヘテロノックインマウスの系統を樹立中である。

Subject No. : 26S301

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 carried out phenotypic analysis of skeletal muscle-specific CITED2 knockout mice fed a high fat diet and muscle-specific CITED2 transgenic mice on a chow diet. We investigated the role of general control of amino acid synthesis 5-like 2 (GCN5), an acetyltransferase, SetU, a methyltransferase, and a sort of dioxygenase in the regulation of hepatic glucose metabolism. We also sought to clarify the role of CITED2 and its binding partner, retinoblastoma protein (Rb) in the regulation of adipose tissue mass. 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

Gluconeogenic gene induction via the cAMP–PKA (protein kinase A) pathway requires epigenetic changes and assembly of transcriptional machinery at the corresponding promoters. Although various components of this machinery have been identified, how glucagon triggers epigenetic changes has remained unclear. The histone acetyltransferase (HAT) GCN5 acetylates PGC-1 α and thereby suppresses its transcriptional coactivator activity^{13–15}, whereas the transcriptional coregulator CITED2, which is induced by glucagon, binds to and suppresses this function of GCN5 and thereby activates PGC-1 α ¹⁶. The precise role of GCN5 in the regulation of gluconeogenesis has remained unknown, however. Here we show that GCN5 functions as a PKA-regulated acetyltransferase that integrates epigenomic modification and transcriptional coactivation to control gluconeogenesis. The abundance of GCN5 was found to be increased in the liver of diabetic animal models and in cAMP-treated hepatocytes. Depletion of hepatic GCN5 attenuated, whereas its coexpression with CITED2 increased, cAMP-induced gluconeogenic gene expression and glycemia. GCN5 recruitment to gluconeogenic gene promoters was induced by cAMP-PKA signaling, and its inhibition attenuated epigenetic changes associated with active gene transcription. In response to cAMP accumulation, PKA phosphorylates GCN5 at serine-275, thereby increasing its HAT activity and attenuating its PGC-1 α acetyltransferase activity. This substrate switch concomitantly promotes both epigenetic changes associated with transcriptional activation as well as PGC-1 α –mediated coactivation, thereby triggering the gluconeogenic program. Our results have thus revealed the GCN5-CITED2-PKA module and an associated GCN5 substrate switch as a key driver of a hormone-regulated pathway that integrates epigenetic changes and transcriptional coactivation for efficient metabolic gene induction.

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26年度 事業実績要旨 (1)

報告者らは平成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(*Nat 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26年度は研究計画に基づき、骨格筋特異的CITED2欠損マウスの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、メチル化酵素SetUの機能を欠損した肝臓および肝細胞におけるによる代謝解析とSetUの相互作用分子の同定を行った。また、CITED2ならびに結合分子Retinoblastomaタンパクの脂肪組織量調節における役割、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(DioxY)の肝細胞代謝における役割の解析を進めた。以下にサブテーマごとの進捗について要旨を報告する。

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強発現マウスを用いた検討より

1.野生型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、血糖値を上昇させた。これはアセチル化酵素活性を欠損する変異型GCN5では認められなかったことから、GCN5-CITED2複合体の形成とGCN5の酵素活性がともに糖新生に重要であることが明らかとなった。

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依存的にCITED2、PKAと複合体を形成し、PKAによりGCN5が175番目のセリン(S175)がリン酸化されるとヒストンアセチル化活性が亢進することを見出した。
2.GCN5 S175の恒常的な非リン酸化／リン酸化変異体(S175A, S175D)を作製し、アセチル化酵素活性・糖新生系酵素遺伝子の発現に及ぼす影響の検討に着手した。また、S275A/S275Dノックインマウスの作製にも着手した。

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欠損マウスを用いて—

1.高脂肪食飼育での代謝表現型解析を終了。通常食飼育と同様に対照と比べ差を認めなかった。
2.トレッドミルにより運動耐用能を検討するも対照と比べ差を認めなかった。
3.骨格筋特異的CITED2トランスジェニックマウスを作製し代謝表現型解析に着手した。

今後、CITED2欠損がトレーニング(有酸素運動や無酸素運動)による骨格筋の量や質の変化や全身の代謝に与える影響を検討する。また後肢懸垂による廃用性萎縮などの実験系を確立し、筋萎縮に対するCITED2の関与も検討する。

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として同定したサーチインファミリーの脱アセチル化酵素の1つである分子XとSetUとの相互作用の意義の検討、ならびにSetUの標的遺伝子の網羅的同定を行った。

1. SetUは*in vitro*で、脱アセチル化酵素Xをメチル化し脱アセチル化酵素活性を増強させることを見出した。
2. 肝臓特異的SetU欠損マウスの肝臓、SetUノックダウン肝細胞を用いた検討からSetUの標的分子の候補としてG6pc, Pck1の他、Rev-erbaおよびSREBP2とそのターゲット遺伝子であるLdlr, Hmgcrなどを同定した。

今後SetUのメチル化酵素としての特性や関与す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に着手する。

CITED2制御性分子の探索

CITED2結合核タンパク

CITED2結合性核タンパクとして同定したRetinoblastomaタンパク(Rb)とCITED2の相互作用が、脂肪細胞のBiologyへの関与を検討した。共沈実験などからCITED2-Rb複合体形成が前駆脂肪細胞の増殖・分化に必要であり、CITED2がRbとcyclin-CDK複合体との相互作用を増強させ、本複合体によるRbのリン酸化・不活化を促進し、細胞周期回転を促進することを明らかにした。この結果、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであるPPAR γ の発現誘導が起こると推察された。また高脂肪食負荷CITED2ヘテロ欠損マウスを用いてCITED2の脂肪組織量や脂肪細胞数の調節への関与を検討した。欠損マウスは脂肪組織量と脂肪前駆細胞数の減少に基づく肥満抵抗性を示し、CITED2がマウス脂肪組織においても脂肪前駆細胞の増殖を介して脂肪組織量を調節していることが示唆された。

CITED2制御性分子

報告者らが同定したCITED2の標的分子ジオキシゲナーゼY (Diox Y)の標的分子の同定を行った。候補分子として糖新生系酵素(G6pc, Pck1, Pgc1a, Nr4a1-3)、アミノ酸異化系酵素(Got, Sds, Hal, Bhmt, Tat)など広範な絶食応答遺伝子を見出した。これらの遺伝子発現誘導に関与する転写制御分子(CREB, CRTC2, CBP, p300など)に対するDiox Yの関与についても検討を進めている。また、Diox Yの臓器特異的役割を検討するためのfloxマウスの作製を終え、現在、肝臓特異的欠損マウスを作製中である。

<平成26年度 研究発表・論文など>

招待講演(松本道宏)

International Symposium for the Study of Obesity, Miyazaki, Japan, 4th Annual Diabetes Conferences for Clinicians by Clinicians (DCCC), 東京, 第14回日本蛋白質科学会年会 ワークショップ 生命素子による転写環境とエネルギー代謝のクロストーク制御, 横浜, The 9th Atherosclerosis & Cardiovascular Research Conference, 東京
学会発表等

第51回 臨床分子医学会学術集会2題(酒井真志人、八木孝他)、第87回 日本内分泌学会学術総会1題(酒井真志人他、若手研究者シンポジウム)、

第57回日本糖尿病学会年次学術集会総会3題(松本道宏、酒井真志人、八木孝他)、第35回日本肥満学会2題(八木孝(YIAプレゼンテーション)、松本道宏他)、第19回アディポサイエンスシンポジウム2題(八木孝、松本道宏他)、第1回肝臓と糖尿病・代謝研究会 1題(八木孝他)、自然科学研究機構 生理学研究所研究会 1題(松本道宏)、第29回日本糖尿病合併症学会 2題(八木孝、酒井真志人)、9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress 2題(酒井真志人、松本道宏(Poster award)他)

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 26指301

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
A Mutant Allele Encoding DNA-Binding-Deficient Foxo1 Differentially Regulates Hepatic Glucose and Lipid Metabolism	Matsumoto M, Accili D. 他	Diabetes	64(6)	2015年
Gadd34 regulates liver regeneration in hepatic steatosis	Matsumoto M, Inoue H. 他	Hepatology	61(4)	2015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制御機構の解明	酒井 真志人 他	新学術領域研究 若手ワークショップ@伊香保	群馬	2015/2/5
CITED2-GCN5 複合体による肝糖新生調節機構の解明	酒井 真志人 他	第26回分子糖尿病学シンポジウム	高知	2014/12/6
ヒストンアセチル化酵素GCN5はCITED2依存的に基質指向性を変化させ肝臓の糖新生を制御する	松本 道宏 他	第37回日本分子生物学会ワークショップ 「食」と「カラダ」の相互作用：メタゲノミクスからニュートリゲノミクスまで	東京	2014/11/27
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29回日本糖尿病合併症学会	東京	2014/10/4
肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の欠損はob/obマウスの脂肪肝と耐糖能を改善するが随時高血糖を惹起する	八木 孝 他	第29回日本糖尿病合併症学会	東京	2014/10/3
CITED2-GCN5複合体による肝糖新生調節機構	松本 道宏 他	第14回日本蛋白質科学会年会ワークショップ 生命素子による転写環境とエネルギー代謝のクロストーク制御	横浜	2014/6/27
CITED2-GCN5複合体による肝糖新生調節機構の解明	酒井 真志人 他	第87回日本内分泌学会学術総会シンポジウム16若手研究者シンポジウム	福岡	2014/4/25
CITED2-GCN5複合体を介して糖新生制御機構の解明	松本 道宏	自然科学研究機構 生理学研究所研究会 臓器相関による生体制御システムとその変容の仕組み	岡崎	2014/9/28
2型糖尿病の肝代謝障害の分子機構～脂肪肝と糖新生亢進を中心に～	松本 道宏	4th Annual Diabetes Conferences for Clinicians by Clinicians (DCCC)	東京	2014/7/4
過栄養による脂肪肝・糖尿病における肝臓のde novo lipogenesis亢進の病態生理学的意義の検討	八木 孝 他	第1回肝臓と糖尿病・代謝研究会	東京	2014/7/4
インスリン抵抗性による肝代謝障害の分子機構-肝糖新生と脂肪肝を中心に-	松本 道宏	The 9th Atherosclerosis & Cardiovascular Research Conference	東京	2014/5/17
肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の欠損はob/obマウスの脂肪肝と耐糖能を改善するが随時高血糖を惹起する	八木 孝 他	第29回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会（若手研究奨励賞審査）	京都	2015/2/13
CITED2-GCN5 複合体による肝糖新生調節機構の解明	酒井 真志人 他	第29回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会	京都	2015/2/13
転写調節分子CITED2は癌抑制遺伝子産物Rbの不活化による前駆脂肪細胞の増殖を誘導し脂肪細胞分化を促進する	辻村-早川知子 他	第29回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会	京都	2015/2/14

研究発表及び特許取得報告について

肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の欠損はob/obマウスの脂肪肝と耐糖能を改善するが随時高血糖を惹起する	八木 孝 他	第18回 日本病態栄養年次学術集会	京都	2015/1/11
肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の欠損はob/obマウスの脂肪肝と耐糖能を改善するが随時高血糖を惹起する	八木 孝 他	第35回日本肥満学会 (YIAプレゼンテーション)	宮崎	2014/10/24
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	松本 道宏 他	第35回日本肥満学会	宮崎	2014/10/24
転写調節分子CITED2は癌抑制遺伝子産物Rbの不活化による前駆脂肪細胞の増殖を誘導し脂肪細胞分化を促進する	松本 道宏 他	第19回アディポサイエンスシンポジウム	大阪	2014/8/23
肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の欠損はob/obマウスの脂肪肝と耐糖能を改善するが随時高血糖を惹起する	八木 孝 他	第19回アディポサイエンスシンポジウム	大阪	2014/8/23
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	松本 道宏 他	第57回日本糖尿病学会年次学術集会	大阪	2014/5/24
脂肪酸合成酵素FASの脂肪肝・インスリン抵抗性における機能の解析	八木 孝 他	第57回日本糖尿病学会年次学術集会	大阪	2014/5/24
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57回日本糖尿病学会年次学術集会	大阪	2014/5/24
13. 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51回日本臨床分子医学会学術集会	東京	2014/4/11
14. 肝臓の脂肪酸合成酵素は肥満・糖尿病の病態において肝脂肪蓄積の促進と高血糖の抑制に寄与する	八木 孝 他	第51回日本臨床分子医学会学術集会	東京	2014/4/11
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 transcriptional coregulator CITED2 regulates adipocyte differentiation by interacting with retinoblastoma protein.	松本 道宏 他	9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress	京都	2014/9/13
Histone acetyltransferase GCN5 regulates hepatic gluconeogenesis through CITED2-dependent substrate switch.	酒井 真志 人 他	9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress	京都	2014/9/13
Transcriptional coregulator CITED2 stimulates adipogenesis by enhancing preadipocyte proliferation and PPAR γ expression through Rb inactivation.	松本 道宏	International Symposium for the Study of Obesity	宮崎	2014/10/26

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
該当なし				

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。