

課題番号 : 26指106  
研究課題名 : 肝臓における代謝シグナルの解明と創薬標的の探索  
主任研究者名 : 酒井 真志人  
分担研究者名 :

キーワード :  
研究成果 :

#### ① 肝臓における脂肪酸・中性脂肪合成経路の役割の解明

脂肪酸合成酵素 (fatty acid synthase: FAS) は脂肪酸・中性脂肪合成経路の鍵となる酵素であり、肥満・2型糖尿病の肝臓ではその発現が亢進していることが知られている。しかし、脂肪肝を合併する2型糖尿病の病態におけるFASの発現亢進の病態生理学的意義は明らかにされていなかった。我々は、*ob/ob*マウス (以下 *ob/ob*) を対照として肝臓特異的FAS欠損 *ob/ob* マウス (以下 K0) の代謝表現型解析をおこない、K0では*ob/ob*に比べ、著明な脂肪肝の抑制とグルコース負荷試験における耐糖能の劇的な改善を認める一方、随時の高血糖を示すことを明らかにした。また、メタボローム解析の結果より、K0は摂食時に十分なグリコーゲンが蓄積し、解糖系/脂肪酸合成系、グリコーゲン合成系の双方で糖利用ができなくなった時点で、高血糖となると考えられた。またK0の肝臓におけるグリコーゲン量は摂食時に比べ、絶食時に大きく減少している。そこで、アデノウイルスベクターによってK0の肝臓特異的にグリコーゲン合成酵素を強発現し、絶食時にも摂食時と同様のグリコーゲン蓄積を誘導したモデルを作製した。絶食後、ブドウ糖負荷試験をおこなったところ、コントロールと比較して、グリコーゲン合成酵素を強発現したK0では、ブドウ糖負荷後の血糖上昇が大きく、耐糖能が増悪することが明らかとなった。この結果からK0の肝臓ではグリコーゲン蓄積が感知されて、糖取り込みが減少するメカニズムが存在することが示唆された。現在我々はK0にNASH食を負荷し、NASHの発症と進展におけるFAS欠損の効果を解析している。

#### ② 肝臓における摂食依存的な遺伝子発現調節メカニズムの解明

転写調節因子 CITED2 および CITED2 と相互作用する分子であるヒストンアセチル基転移酵素 GCN5、CITED2 のターゲット遺伝子である SetU が摂食依存的な遺伝子発現調節メカニズムに果たす役割の解析を進めている。

ヒストンアセチル化酵素 GCN5 の肝臓の摂食依存的な遺伝子発現調節メカニズムにおける役割を明らかにするために、肝臓特異的 GCN5 欠損マウスを作製した。PCAF は GCN5 と同様に Histone H3K9 のアセチル化に重要なことが報告されており、本酵素によって GCN5 欠損の代謝表現型が代償される可能性が考えられる。そこで CRISPR/Cas9 システムを用いて、肝臓特異的 GCN5 欠損/全身 PCAF 欠損マウスを作製中である。

我々は GCN5-CITED2-PKA モジュール内で起こる PKA 依存的な GCN5 Ser275 リン酸化が GCN5 機能を調節し、糖新生系酵素遺伝子の発現を誘導することを見出した。個体における GCN5 Ser275 リン酸化の生理学的・病態生理学的意義を明らかにするために、Ser275 を変異させたノックインマウスを CRISPR/Cas9 システムを用いて作製している。

転写調節因子 CITED2 の標的遺伝子として同定したメチル化酵素 SetU による糖新生系酵素遺伝子の発現誘導メカニズムを解析し、SetU は SIRT1 活性の上昇、SIRT1-PGC-1 $\alpha$  の相互作用の増加を介して SIRT1 依存的な PGC-1 $\alpha$  の脱アセチル化を促進することが明らかとなった。さらに SetU のメチル化活性が PKA 依存的に制御されていることが示唆されたため、そのメカニズムを検討中である。

Subject No. : 26S106

Title : Elucidating hepatic metabolic signaling to identify novel therapeutic targets for type 2 diabetes

Researchers : Mashito Sakai

Key word : Diabetes mellitus, NAFLD, NASH, Insulin resistance, Transcription, Epigenetics

Abstract :

#### 1. Understanding the role of fatty acid and triglyceride synthesis in the liver

Hepatic Fatty acid synthase (FAS) expression is increased in obese diabetic subjects. We examined the pathophysiological role of FAS in type 2 diabetes with fatty liver using liver-specific FAS knockout *ob/ob* mice (*ob/ob* LKO). While hepatic FAS deletion improved fatty liver and glucose tolerance, it aggravated fed hyperglycemia. Metabolomic analysis revealed that during feeding, glucose mainly enters the glycogen synthesis pathway, as the glucose flux in the glycolytic pathway is disturbed by hepatic FAS deletion. Next we examined the effect of glycogen synthase 2 (*Gys2*) overexpression in the liver of *ob/ob* LKO mice. During fasting, *Gys2* overexpression increased hepatic glycogen content of *ob/ob* LKO to levels comparable to those in fed state, leading to glucose intolerance. These data indicate that hepatic glucose uptake in *ob/ob* LKO mice is impaired after saturation of the glycogen synthesis pathway, resulting in fed hyperglycemia.

We are currently trying to elucidate the role of FAS in the progression of NASH (non-alcoholic steatohepatitis), using a diet-induced NASH model.

#### 2. Elucidating feeding state-dependent transcriptional regulation in the liver

As planned, we analyzed the role of transcriptional regulators CITED2, GCN5, and SetU in feeding state-dependent metabolic gene expression in the liver.

We generated liver-specific GCN5 knockout (KO) mice to determine the role of histone acetyltransferase GCN5 in transcriptional regulation of metabolic genes in the liver. Similar to GCN5, PCAF is a histone acetyltransferase that catalyzes H3K9 acetylation. Therefore, we generated PCAF KO mice and crossed them with liver-specific GCN5 KO mice to exclude the possibility of compensation by PCAF.

We revealed that PKA-dependent phosphorylation of GCN5 at Ser275 in the GCN5-CITED2-PKA module regulates GCN5 activity and induces gluconeogenic gene expression during fasting. To further explore the physiological/pathophysiological role of GCN5 Ser275 phosphorylation *in vivo*, we are in the process of generating GCN5 Ser275 knockin mice with serine-to-alanine or serine-to-aspartic acid mutations using the CRISPR/Cas9 system.

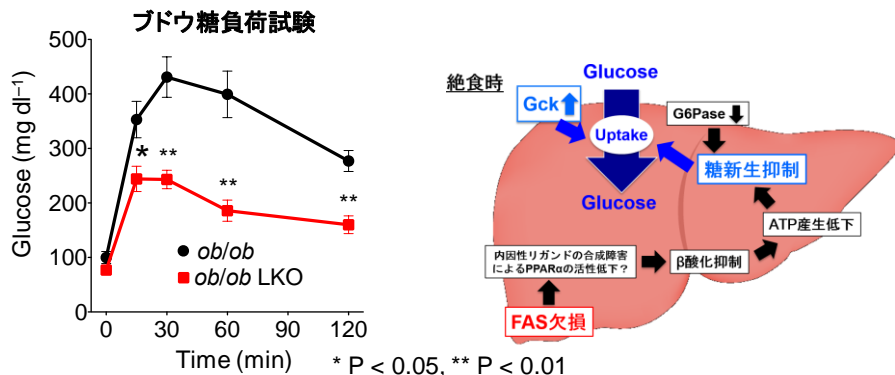
SetU is a methyltransferase identified as the target of CITED2, which enhances cAMP-dependent gluconeogenic gene induction. We examined the mechanism of SetU-regulated gluconeogenesis, and found that SetU promotes SIRT1-dependent PGC-1 $\alpha$  deacetylation, leading to the activation of PGC-1 $\alpha$  and enhanced gluconeogenesis. We also found that Set U methyltransferase activity is regulated by PKA. Therefore, we are currently investigating the regulatory mechanism of SetU by PKA.

Researchers には、分担研究者を記載する。

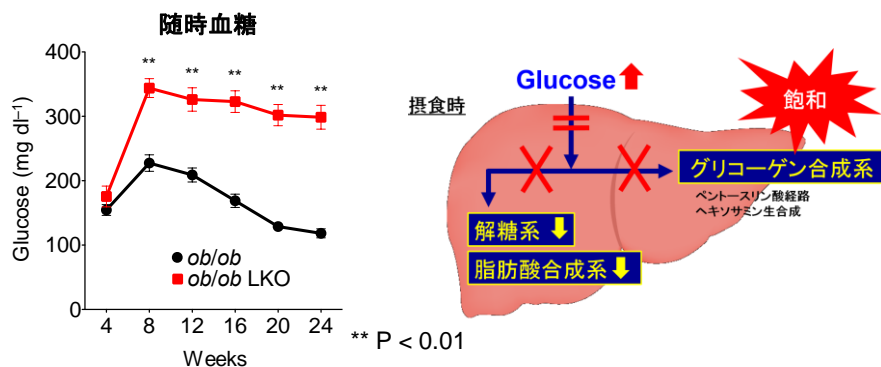
# 26指106 肝臓における代謝シグナルの解明と創薬標的の探索

## ① 肝臓における脂肪酸・中性脂肪合成経路の役割の解明

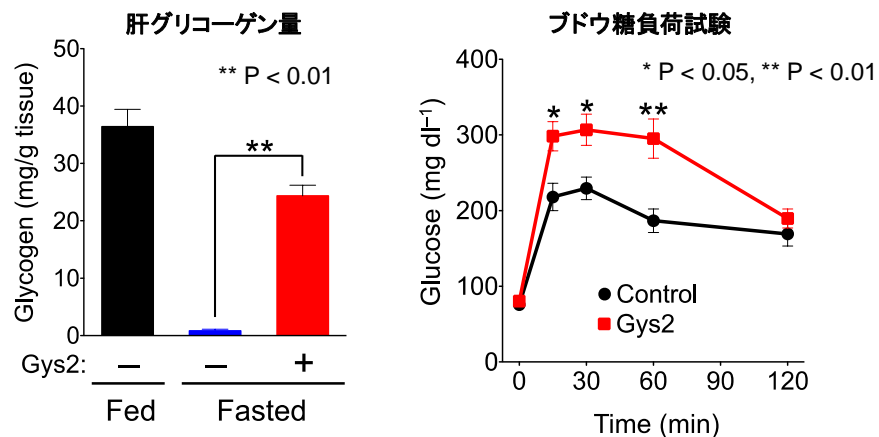
### ob/ob LKOマウスの耐糖能の改善とそのメカニズム



### ob/ob LKOマウスの随時高血糖とそのメカニズム



### 肝臓におけるグリコーゲン合成酵素(Gys2)の強発現で ob/ob LKOマウスの耐糖能は増悪する



グリコーゲン酵素をob/ob LKOマウスの肝臓に発現させて、摂食時と同レベルのグリコーゲン蓄積を絶食時に誘導すると(左図)、ブドウ糖負荷試験においてob/ob LKOマウスの耐糖能が増悪した(右図)。

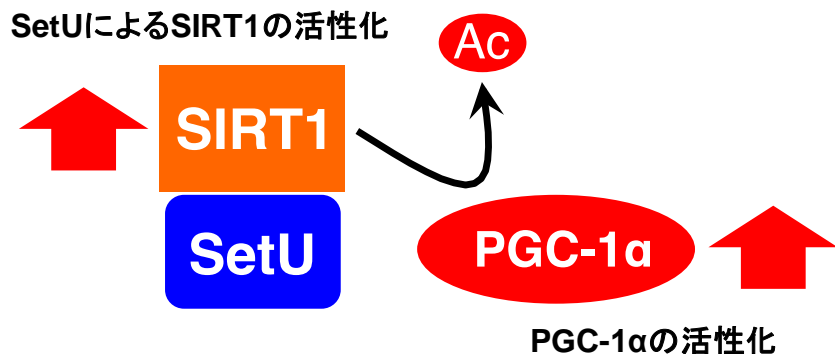
ob/obマウスにおける肝臓特異的な脂肪酸合成酵素(FAS)の欠損により、① 絶食時には脂肪酸酸化の抑制によるATP量の減少およびG6Pase発現の減少による糖新生の抑制、Glucokinaseの増加によって肝糖取り込み量が増加し、② 摂食時には解糖系・脂肪酸合成経路での糖利用の低下により、グルコースは主にグリコーゲン合成経路に流入するが、グリコーゲン蓄積が飽和すると糖取り込みが低下し、随時高血糖を呈することが明らかとなった(左図)。実際、グリコーゲン合成酵素の強発現によってグリコーゲンを肝臓に蓄積させると、ob/ob LKOマウスの耐糖能が増悪し、ob/ob LKOマウスの肝臓にはグリコーゲン蓄積を感知して糖取り込みが減少するメカニズムが存在することが示唆された(右図)。

本研究より、肝臓のFASは血糖の恒常性維持に寄与していることが明らかとなった。現在ob/ob LKOマウスを用いて、NASHの発症と進展におけるFAS欠損の効果の解析を進めており、FAS欠損により肝腫瘍の発症頻度が増加するという予備的なデータを得ている。

# 26指106 肝臓における代謝シグナルの解明と創薬標的の探索

## ② 肝臓における摂食依存的な遺伝子発現調節メカニズムの解明

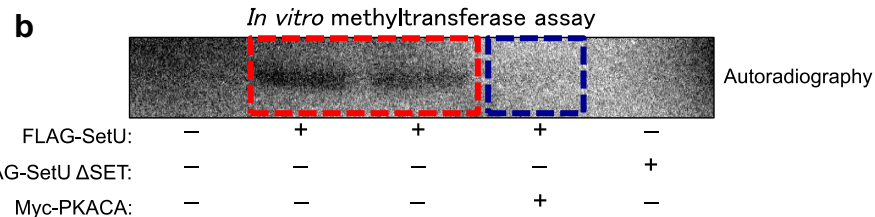
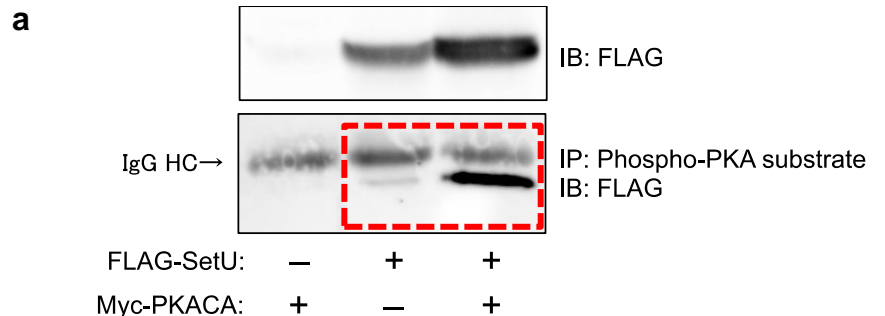
### SetUによる代謝遺伝子の転写制御機構



SetUはSIRT1と相互作用して、活性化させ、糖代謝に重要な転写コアクチベーターであるPGC-1αの脱アセチル化を促進して活性化させる。

この効果に対してSetUのメチル化酵素活性が抑制的に働くことから、摂食サイクル依存的にSetUの活性が調節されると考え、インスリン、グルカゴン/cAMP/PKAシグナルによる制御メカニズムの検討をおこなった。

### PKA依存的なSetUリン酸化による活性制御機構の解析



- SetUはPKA catalytic subunit(PKA C)によって、そのPKAモチーフがリン酸化される。
- PKA C強発現によって、SetUのメチル化活性が減弱する。

→ 質量分析でPKA CによるSetUのリン酸化部位を同定した。同部位が摂食サイクル依存的なSetUによる遺伝子発現調節に与える効果を検討予定である。

転写調節因子CITED2、及びCITED2と相互作用するヒストンアセチル基転移酵素であるGCN5、CITED2の標的遺伝子であるSetUによる摂食依存的な遺伝子発現調節メカニズムの解析から、糖尿病をはじめとする生活習慣病の新規創薬ターゲットを同定する。

SetUがSIRT1と相互作用して活性化し、糖代謝に重要な転写コアクチベーターであるPGC-1αの脱アセチル化を促進して活性化させ、標的遺伝子の発現を増加させるメカニズムを明らかにした(左図)。また、この効果に対してSetUのメチル化活性が抑制的に働くことから、ホルモン依存的なSetUの活性調節メカニズムを検討し、グルカゴン/cAMPで活性化するPKAによってリン酸化されること、PKA依存的に活性が抑制されることを明らかにした(右図)。これらの結果をもとに、SetUによる摂食サイクル依存的な遺伝子発現制御機構を明らかにす

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：26指106

研究課題名：肝臓における代謝シグナルの解明と創薬標的の探索

主任研究者名：酒井 真志人

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
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, 酒井 真志人, 内田 亨, 辻村-早川 知子, 山地 大介, 矢野 宏行, 満島 勝, 長嶋 洋治, 南 史朗, 春日 雅人, 松本 道宏	第52回日本臨床分子医学会学術集会	京都	2015年4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, 辻村-早川 知子, 山地 大介, 八木 孝, 満島 勝, 矢野 宏行, 春日 雅人, 松本 道宏	第52回日本臨床分子医学会学術集会	京都	2015年4月
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, 酒井 真志人, 辻村-早川 知子, 山地 大介, 矢野 宏行, 満島 勝, 内田 亨, 長嶋 洋治, 南 史朗, 春日 雅人, 松本 道宏	第88回日本内分泌学会学術総会	東京	2015年4月
CITED2-GCN5複合体による肝糖新生調節機構の解明	酒井 真志人, 辻村-早川 知子, 山地 大介, 八木 孝, 満島 勝, 矢野 宏行, 春日 雅人, 松本 道宏	第88回日本内分泌学会学術総会	東京	2015年4月
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, 酒井 真志人, 辻村-早川 知子, 山地 大介, 矢野 宏行, 満島 勝, 内田 亨, 長嶋 洋治, 南 史朗, 春日 雅人, 松本 道宏	第58回日本糖尿病学会年次学術集会	下関	2015年5月
CITED2-GCN5複合体による肝糖新生調節機構の解明	酒井 真志人, 辻村-早川 知子, 山地 大介, 八木 孝, 満島 勝, 矢野 宏行, 春日 雅人, 松本 道宏	第58回日本糖尿病学会年次学術集会	下関	2015年5月
肝臓における糖代謝調節の分子機構	松本 道宏, 酒井 真志人, 八木 孝	第2回肝臓と糖尿病・代謝研究会	下関	2015年5月
絶食応答性エピゲノム修飾酵素による代謝調節機構の解明	松本 道宏, 酒井 真志人	平成27年転写代謝システム班会議	熊本	2015年6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	第33回内分泌代謝サマーセミナー	柳川	2015年7月
The histone acetyltransferase GCN5 regulates hepatic gluconeogenesis through CITED2-dependent substrate switch	Mashito Sakai, Masato Kasuga, Michihiro Matsumoto	The 8th Asia-Oceania Conference on Obesity	名古屋	2015年10月

研究発表及び特許取得報告について

The GCN5-CITED2-PKA module controls glucose metabolism via a cAMP-induced substrate switch	Mashito Sakai, Masato Kasuga, Michihiro Matsumoto	KEYSTONE SYMPOSIA Diabetes: New Insights into Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies	京都	2015年10月
GCN5-CITED2-PKAモジュールを介した肝糖新生制御メカニズム	松本 道宏、酒井 真志人	第38回日本分子生物学会	神戸	2015年12月
脂肪肝合併2型糖尿病の病態における肝臓の脂肪酸合成酵素の役割の解明	八木 孝, 酒井 真志人, 辻村-早川 知子, 矢野 宏行, 満島 勝, 長嶋 洋治, 南 史朗, 春日 雅人, 松本 道宏	第27回分子糖尿病シンポジウム	東京	2015年12月
肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の欠損は食餌誘導性非アルコール性脂肪肝の進展を抑制する	八木 孝, 酒井 真志人, 辻村-早川 知子, 満島 勝, 矢野 宏行, 飯田 智, 長沼 孝雄, 高 峰英, 南 史朗, 春日 雅人, 松本 道宏	第19回日本病態栄養学会	横浜	2016年1月
GCN5-CITED2-PKAモジュールによる肝糖新生制御機構	酒井 真志人	第4回AAA	東京	2016年1月
代謝シグナル応答性メチル化酵素の同定と機能解析	酒井 真志人, 満島 勝, 辻村-早川 知子, 高 峰英, 八木 孝, 矢野 宏行, 長沼 孝雄, 飯田 智, 春日 雅人, 松本 道宏	第30回日本糖尿病・肥満動物学会	大宮	2016年3月
肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の欠損は食餌誘導性非アルコール性脂肪肝の進展を抑制する	八木 孝, 酒井 真志人, 辻村-早川 知子, 満島 勝, 矢野 宏行, 飯田 智, 長沼 孝雄, 高 峰英, 長嶋 洋治, 南 史朗, 春日 雅人, 松本 道宏	第30回日本糖尿病・肥満動物学会	大宮	2016年3月

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
肝での糖新生制御機構と薬物治療標的(糖尿病)	松本 道宏, 酒井 真志人, 八木 孝	Annual review. 糖尿病・代謝・内分泌		2016年1月1日

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。