

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析と創薬標的の探索
主任研究者名 : 酒井 真志人 (平成26-27年) ・ 満島 勝 (平成28年)
分担研究者名 : 該当なし
協力研究者 : 松本 道宏

キーワード : 糖尿病・脂肪肝・インスリン抵抗性・転写・エピジェネティクス

研究成果 :

2型糖尿病の患者は日本を含め世界的に急増しており、その治療法の開発、創薬は社会的に大きなニーズとなっている。肝臓は筋肉、脂肪組織と共に、糖・脂質代謝の中心臓器であり、その機能異常は他臓器との連関により、様々な病態を引き起こす。2型糖尿病の肝臓ではインスリン抵抗性により糖代謝異常を示すと共に、脂肪酸・中性脂肪合成に関する酵素群の発現が亢進することで、非アルコール性脂肪肝 (NASH) を誘発し、肝繊維化、肝硬変や発ガンのリスクが高まると考えられているが、その詳細な分子機構や脂肪肝自体が糖尿病の病態に与える効果については明らかにされていない。本申請研究は、肝臓の脂肪酸・中性脂肪合成経路の2型糖尿病における病態生理学的な意義と、同経路の酵素群の転写のエピジェネティクス制御系を明らかにすることで、2型糖尿病の病態解明と新規創薬ターゲットの同定をめざすものである。それらを明らかにするために、我々は、①肝臓における脂肪酸・中性脂肪合成経路の役割の解明、②肝臓において摂食/摂食で制御される代謝調節機構を遺伝子発現調節メカニズムの解明の2つのアプローチより解析を試みた。

① 肝臓における脂肪酸・中性脂肪合成経路の役割の解明

肥満・糖尿病モデルマウスである *ob/ob* バックグラウンドを肝臓特異的 FAS 欠損マウスに導入し、*ob/ob* LFASKO マウスの作出を行った。本 *ob/ob* LFASKO は脂肪肝が改善されていたが、随時高血糖を呈した。血中インスリン値及びインスリン感受性には差が見られなかった。一方、ブドウ糖負荷試験により耐糖能を検討したところ、*ob/ob* LFASKO はコントロールに比べ耐糖能の改善が見られた。つまり、*ob/ob* LFASKO マウスではインスリン感受性とは無関係に摂食時における高血糖と、絶食時における耐糖能の改善が見られた。このことは、肝臓の FAS がインスリン作用とは別に血糖調節に重要であることを意味している。

まず、絶食時における耐糖能の改善効果について検討を行った。絶食時には血糖を維持するために肝臓で糖新生が起こるが、*ob/ob* LFASKO は *ob/ob* 対照群に比べ糖新生基質であるピルビン酸やグリセロール負荷時の血糖上昇が抑制されていた。実際に、糖新生系酵素である G6Pase の発現の減少が見られた。同時に、絶食時における肝臓のメタボローム解析を行ったところ、*ob/ob* LFASKO では糖新生経路の代謝産物の減少を認めた。さらに、アセチル CoA の減少が見られたことから、その原因の一つとして脂肪酸β酸化の関与について関連酵素の遺伝子発現を調べた結果、PPARα、Cpt1α、Acox1 など複数の遺伝子発現の減少が見られた。これまでに、FAS が PPARα の内因性リガンドの合成に必要なとの報告があることから、FAS の欠損が PPARα を介した脂肪酸β酸化の抑制につながったと考えられる。実際、肝臓内の ATP/AMP 比が減少しており、糖新生の抑制効果として ATP 供給不足も一因と考えられた。一方、肝臓の糖取り込みについて検討を行ったところ、骨格筋では差が見られないが、肝糖取り込みの促進が見られた。その結果に一致して、糖取り込みの律速酵素である Glucokinase の発現上昇が見られた。以上の結果より、肝臓での FAS の欠損は絶食時におい

て、①糖新生系酵素の発現および細胞内 ATP の減少による糖新生の抑制、②Glucokinase の発現上昇による肝糖取り込みの促進の二面性により耐糖能の改善が見られると考えられた。

次に随時高血糖について検討を行った。メタボローム解析により *ob/ob* LFASKO の肝臓では解糖系においてグルコースからフルクトース 6 リン酸までの代謝産物が増え、フルクトース 1,6-2 リン酸以下の代謝産物が減少していた。つまり、解糖系が抑制されていると考えられた。FAS はクエン酸を原料として脂肪酸合成を行うが、メタボローム解析より *ob/ob* LFASKO では肝臓のクエン酸量は上昇していた。クエン酸は解糖系において上流の PFK をアロステリックに阻害することが知られており、FAS 欠損による解糖系抑制の一因と考えられた。一方、解糖系に使われないグルコースはグリコーゲンとして蓄えられる。実際 *ob/ob* LFASKO では食後のグリコーゲン蓄積が有意に増加しており、グリコーゲン蓄積が上限に達するタイミングに一致して高血糖を来すことが分かった。実際、*ob/ob* LFASKO の肝臓にグリコーゲン合成酵素を過剰発現させると絶食時において見られていた耐糖能が悪化することが分かった。つまり、*ob/ob* LFASKO では肝臓での糖利用・グリコーゲン蓄積の容量を超えることで、肝糖取り込みが抑制され高血糖を示していると考えられた。

また、肝臓の FAS 欠損が NASH の進展に対して与える影響について検討した。*Ob/ob* LFASKO にフルクトース、トランス脂肪酸、コレステロールを多く含む NASH 食を与えて飼育したところ、通常食同様に *ob/ob* LFASKO では脂肪肝が顕著に抑制されていたが、随時の高血糖は呈さなかった。さらに、*ob/ob* LFASKO では *ob/ob* コントロールに比べ肝臓での炎症関連遺伝子 (TNF α や F4/80) や繊維化マーカー (Coll1a1 や SMA) の発現が減少し、実際のコラーゲン沈着も減少しており、血中肝逸脱酵素 (AST や ALT) の減少も見られた。

以上の研究結果から、肥満・糖尿病の肝臓において起こる FAS の発現増加は、グルコースを中性脂肪の形で蓄積させ脂肪肝を悪化させる反面、血糖値を絶食時には低くなり過ぎないように、摂食時には高くなり過ぎないようにし、糖代謝の恒常性を維持するために起こる、つまり“緩衝効果”と推察された。

② 肝臓における摂食依存的な遺伝子調節メカニズムの解明

摂食/絶食における代謝調節シグナルが遺伝子転写を如何に制御するかを明らかにするため、当研究部で同定した①CITED2-GCN5 系によるエピジェネティクス制御機構の解析、②CITED2-GCN5 系の下流で発現が誘導されるヒストンメチル化酵素 SetU の代謝制御機構に着目して解析を行った。

1) CITED2-GCN5 系によるエピジェネティクス制御機構の解析

当研究部では転写共役因子 CITED2 が絶食時において発現誘導され、アセチル化酵素 GCN5 と複合体を形成することが、絶食応答性遺伝子転写を活性化する PGC-1 α の活性化を通して糖新生を促進することを明らかにしてきた (Sakai et al., Nat. Med., 2012)。本研究ではまず、GCN5-CITED2 の複合体の機能について検討を行った。はじめに、GCN5 のヒストンアセチル化酵素 (HAT) 活性が、cAMP (絶食) のシグナルで変化するかを検討したところ、GCN5 の HAT 活性は cAMP で促進し、その効果は CITED2 と共発現することで亢進した。つまり、絶食時において CITED2-GCN5 はヒストンアセチル化酵素として機能していることを示している。実際に、cAMP による糖新生系酵素の発現誘導は CITED2、GCN5 のノックダウンで減少するが、この時各プロモーターのヒストン H3K9 のアセチル化が減少し

ていた。その結果に一致して、GCN5がcAMP刺激依存的にそれらのプロモーター上にリクルートされていることが分かった。そこで、GCN5-CITED2と、PKAについて検討を行ったところ、①CITED2依存的にGCN5-CITED2-PKAの複合体（以後モジュールと記載）が形成されること、②本モジュール内でGCN5の275番目のセリンがPKAによって直接リン酸化されること、③本リン酸化を模擬した変異体は野生型に比べ、HATとしての活性が高く、PGC-1 α に対するアセチル化活性が低いこと、④逆に本リン酸化ができない変異体はHATの活性が低いことを明らかにした。実際マウスの肝臓においても絶食時においてGCN5の275番目のセリンのリン酸化が検出され、摂食時にはこれが弱まることも見出した。つまり、摂食/絶食のサイクルにおいて、GCN5-CITED2-PKAモジュールが分子スイッチとしてエピジェネティック制御を調節していることを明らかにした。更に、糖尿病肥満モデルマウスであるdb/dbマウスでは①このGCN5のリン酸化が亢進しており、②リン酸化できない変異体を発現するとdb/dbマウスの血糖が低下すること、③CITED2の発現抑制によりそのリン酸化及び血糖の低下が見られることを明らかにした。以上の結果は、GCN5-CITED2-PKAシグナリングモジュールが、糖尿病創薬の標的としての可能性を示唆するものである。

2) CITED2-GCN5系の下流で発現が誘導されるヒストンメチル化酵素 SetU の代謝制御機構の解析

先行実験のマイクロアレイの結果よりCITED2依存的にcAMP刺激で誘導されるヒストンメチル化酵素 SetU を同定し、その発現抑制の実験から本酵素が糖新生系酵素の発現制御に必要な分子であることを明らかにしてきた。本研究では、SetUによる制御機構を詳細に検討した。まず、SetU結合因子の探索を行い、脱アセチル化酵素 Sirt1 及びその基質である PGC-1 α との相互作用が確認できた。Sirt1はPGC-1 α を脱アセチル化して活性化することが知られていることから、SetUの効果を検討したところ、①SetUの強発現でPGC-1 α のアセチル化が減少し、発現抑制により増加すること、②SetUの強発現が、Sirt1とPGC-1 α の相互作用を強めること、③SetUを発現させることで、Sirt1のヒストン脱アセチル化酵素活性が亢進することを明らかにした。また、それらの効果はメチル化酵素活性のない変異体で強いことが分かった。そこでSetUの基質として、糖新生制御に関与する分子を調べたが、いずれにおいてもメチル化を検出できなかったが、*in vitro*において自己メチル化する結果を得た。この自己メチル化反応は活性型PKA存在下で消失したことから、cAMP-PKAシグナルによって、SetU活性が制御されていることが示唆された。つまり、絶食時に誘導されたSetUはPKAによってそのメチル化酵素活性が抑制されており、その状態のSetUはSirt1-PGC-1 α の相互作用を促進することでPGC-1 α の脱アセチル化/活性化を亢進して糖新生を促進する“ポジティブフィードバック”として機能するが、摂食時にPKA活性が減少すると、メチル化酵素活性が誘導され、抑制的に働く分子スイッチとして機能していることが示唆された。また、マイクロアレイの結果より、SetU依存的に変化する遺伝子として、複数の脂肪酸/コレステロール代謝遺伝子を見出している。このことは、SetUが糖代謝/脂質代謝に関わるヒストンメチル化酵素であることを示唆している。今後、SetUが糖代謝・脂質代謝のバランスを制御する分子スイッチである可能性について検討して行きたい。

Subject No. : 26S106
Title : Elucidation of the signaling mechanisms that control metabolism in liver and examination of molecular targets for developing novel drugs
Researchers : Mashito Sakai (H26-27) / Masaru Mitsushima (H28)
Michihiro Matsumoto (Collaborator)
Key word : Diabetes mellitus/Hepatosteatosis/insulin resistance/transcription/epigenetics
Abstract : Since the proportion of population suffering from type 2 diabetes mellitus (T2DM) is increasing all around the world, including in Japan, it has become extremely important to develop novel therapies and drugs for treating T2DM. Liver, along with the muscles and adipose tissue, is one of the main organs regulating systemic glucose and lipid metabolism. Since individual organs connects with each other *via* nerve system or endocrine system, disorders in liver influence the systemic homeostasis. It is known that insulin resistance in liver results in an increase in the expression of enzymes that regulate fatty acid (FA)/triglyceride (TG) metabolism. This results in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and increases the risk of developing hepatic fibrosis, hepatocirrhosis, and/or hepatoma. However, the detailed molecular mechanisms, as well as the effect of hepatic steatosis, on the pathogenesis of T2DM are largely unknown. In this study, we focused on the pathophysiological significance and epigenetic regulation of the FA/TG synthesis pathway in T2DM, in order to reveal the pathogenesis of T2DM and to develop novel drugs to counteract it. For proving this, we adopted two approaches: (1) Clarification of the function of fatty acid synthase (FAS), which governs FA synthesis in liver, and (2) Elucidation of the molecular mechanism that controls the feeding/fasting-induced responses in the liver.

1) Elucidation of the function of FAS in the liver

We generated the *ob/ob* LFASKO mice, which possessed the *ob* allele and lacked the FAS allele (specifically in the liver), by crossing the *ob/+* FAS^{fl} mice with the *ob/+* FAS^{fl} Alb-Cre^{+/-} mice. Despite showing improvement in the symptoms of hepatic steatosis, the *ob/ob* LFASKO mice showed higher blood glucose levels upon *ad libitum* feeding compared with the *ob/ob* FAS^{fl} control mice, without showing significant changes in the level of blood insulin or insulin sensitivity. In contrast, the glucose tolerance test (GTT) revealed that the glucose tolerance of *ob/ob* LFASKO mice improved compared to that of the control mice. These results suggested that FAS played an important role in controlling glycemia; however, this role was independent of the action of insulin.

First, we investigated the improvement in glucose tolerance in the *ob/ob* LFASKO mice during fasting. Under fasting conditions, the increase in glycemia observed after the administration of pyruvate or glycerol, both of which are used as substrates for gluconeogenesis, was found to decrease in the *ob/ob* LFASKO mice compared to that in the control mice. In concert with these results, the expression of the gluconeogenic gene G6Pase was also found to be suppressed in the liver of *ob/ob* LFASKO mice. In addition, metabolomic analysis revealed a decrease in the levels of the metabolites involved in gluconeogenesis, along with a decrease in the level of acetyl-CoA in the liver of the fasted *ob/ob* LFASKO mice. We observed decreases in the expression of PPAR α , Cpt1 α , and Acox1, all of which promoted β -oxidation of FA. This observation could explain the decrease observed in the level of acetyl-CoA in the liver of *ob/ob* LFASKO mice. Concomitantly, we observed

a decrease in the ATP:AMP ratio in the liver of *ob/ob* LFASKO mice, which explained the reduction in gluconeogenesis. We also measured glucose uptake by liver and muscles using 2-deoxy-D-glucose (2DG). While the uptake of 2DG by muscles was insignificant, the uptake by liver was considerably higher in the *ob/ob* LFASKO mice compared to that in the control mice. This observation was consistent with the observation of higher expression of Gck in the liver of *ob/ob* LFASKO mice. Altogether, we speculated that the following reasons may be responsible for improved glucose tolerance in the *ob/ob* LFASKO mice during fasting: (1) reduced production of hepatic glucose due to low expression of G6Pase and low level of ATP, and (2) enhanced glucose uptake by liver due to the upregulation of Gck.

We next proceeded to investigate the reason behind elevation in the blood glucose levels upon *ad libitum* feeding in the *ob/ob* LFASKO mice. Metabolomic analysis confirmed that the accumulation of metabolites from glucose to F-6-P in the glycolytic pathway increased; however, those lying downstream of F-1,6-P showed decreased accumulation. This suggested suppression of glycolysis. We noticed that citrate, which is known to inhibit PFK allosterically and is involved in fatty acid biosynthesis mediated by FAS, accumulated in the liver of *ob/ob* LFASKO. Since the excess glucose present in liver is stored in form of glycogen, we measured the amount of glycogen in the liver of *ob/ob* LFASKO mice post-re-feeding. As expected, during feeding, the amount of glycogen in the liver of *ob/ob* LFASKO mice was significantly higher than that in the liver of control mice. Subsequently, the mice displayed hyperglycemia following glycogen overload. This observation was supported by the observed overexpression of glycogen synthase in the liver of *ob/ob* LFASKO that resulted in the worsening of glucose tolerance. These results indicated that lower utilization of glucose and higher storage of glycogen during *ad libitum* feeding in the liver of *ob/ob* LFASKO mice lead to hyperglycemia.

We further tested whether inhibition of FAS in liver affected the progression of NASH. Upon feeding the NASH diet (which contained high fructose, trans-fatty acids, and cholesterol), an improvement in hepatic steatosis in the *ob/ob* LFASKO mice was observed as compared to the mice fed on normal chow diet. Additionally, the mice also presented normal blood glucose levels. Furthermore, the expressions of inflammatory genes [such as TNF- α and F4/80] and fibrotic marker genes [such as Col1A1 and SMA]; deposition of collagen in the liver; and the levels of AST and ALT in the blood, were suppressed in the *ob/ob* LFASKO mice. These observations indicated an improvement in liver function.

In conclusion, increased expression of FAS in the liver of obese and T2DM patients behaved like a “buffer for glycemia” and worsened the symptoms of hepatic steatosis.

2) Elucidation of the molecular mechanism that regulates feeding/fasting-induced responses in liver

We tried to elucidate the mechanism by which metabolic signals from the fasting-feeding cycle control the expression of a variety of genes *via* epigenetic regulation by understanding: (1) the mechanisms by which the CITED2–GCN5 axis controls the epigenetic modifications of the gluconeogenic genes, and (2) the mechanism by which SetU, a downstream target of CITED2–GCN5, regulates the fasting response.

1) Analysis of the mechanisms by which the CITED2–GCN5 axis controls the epigenetic modifications of gluconeogenic genes

We firstly examined whether cAMP mediated signaling altered the histone acetyl transferase (HAT) activity of GCN5. As expected, the HAT activity of GCN5 increased upon stimulation with cAMP that was promoted by the co-expression of CITED2. Consistent with this result, we observed that the recruitment of GCN5 on the promoters of gluconeogenic genes increased in the presence of cAMP; however, the acetylation of histone H3K9 on these promoters decreased upon knockdown of CITED2 or GCN5. These results implied the direct involvement of protein kinase A (PKA) in the functioning of CITED2–GCN5 complex. In order to prove the above, we obtained several evidences which are listed as follows: (1) CITED2 is essential for GCN5–CITED2–PKA complex formation, (2) PKA phosphorylates serine 275 in GCN5 within the module, (3) the phosphomimetic mutant, S275D, favors histone H3 as a substrate rather than PGC-1 α , (4) the phosphodeficient mutant, S275A, showed low HAT activity. We also observed the phosphorylation of serine 275 on GCN5 during fasting; however, it disappeared after re-feeding. This suggested that the module acted as a molecular switch for regulating the epigenetic modifications in response to fasting and feeding in the liver. We further observed that the extent of phosphorylation on serine 275 in GCN5 (which was dependent on CITED2) was considerably higher in the liver of *ob/ob* mice than that in the liver of the control *db/m* mice and that the overexpression of S275A in the liver of *db/db* mice could lower blood glucose level. Altogether, we propose that the GCN5–CITED2–PKA signaling module acted like a molecular switch and activated the gluconeogenic genes *via* epigenetic modifications during fasting.

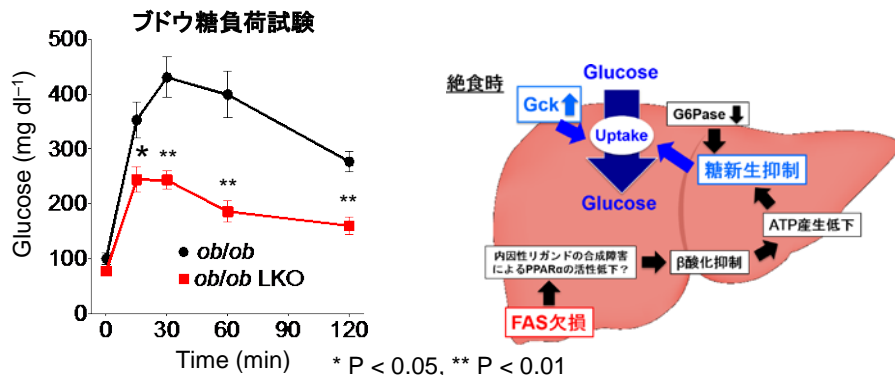
2) Analysis of the mechanism by which SetU regulates fasting response

We previously identified SetU, a putative histone methyl transferase (HMT), as one of the downstream targets of the CITED2–GCN5 signaling module and confirmed that SetU played an essential role in the induction of gluconeogenic genes. We identified two novel SetU-interacting proteins, Sirt1 and PGC-1 α . Since Sirt1 has been reported to activate PGC-1 α , we proceeded to evaluate the effect of SetU on Sirt1 and PGC-1 α . We obtained the following evidences in support of the above hypothesis: (1) overexpression of SetU decreased the acetylation of PGC1- α , whereas its knockdown increased the acetylation, (2) overexpression of SetU promoted the interaction of Sirt1 with PGC-1 α , (3) overexpression of SetU enhanced the histone de-acetylation activity of Sirt1. Furthermore, these effects are stronger with a SetU mutant that lacks HMT activity. We also found that SetU was capable of catalyzing auto-methylation *in vitro*, which was inhibited by the co-expression of the active form of PKA. We hypothesized that the HMT activity of SetU was inhibited by the activation of PKA under fasting conditions that resulted in the upregulation of Sirt1-mediated PGC-1 α activation and induction of the gluconeogenic genes; however, this effect was suppressed by reduced PKA activity flowed by auto-methylation under feeding conditions. We also observed that SetU modulated lipid metabolism in addition to modulating gluconeogenesis. Altogether, we propose that SetU acts as a molecular switch that regulates the homeostasis of glucose as well as lipid metabolism.

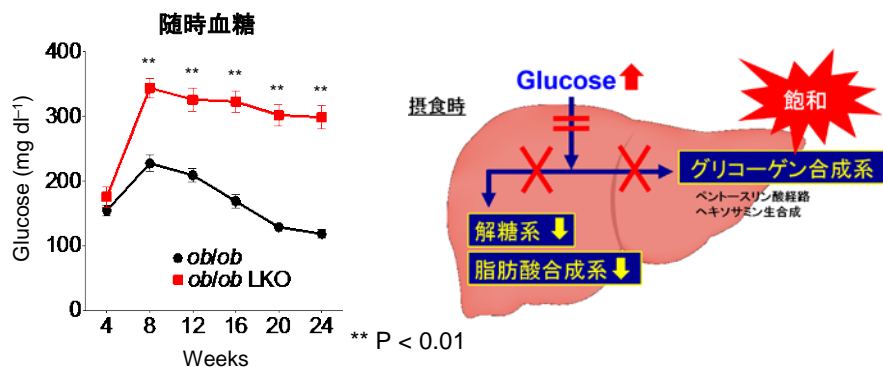
26指106 肝臓における代謝シグナルの解明と創薬標的の探索

① 肝臓における脂肪酸・中性脂肪合成経路の役割の解明

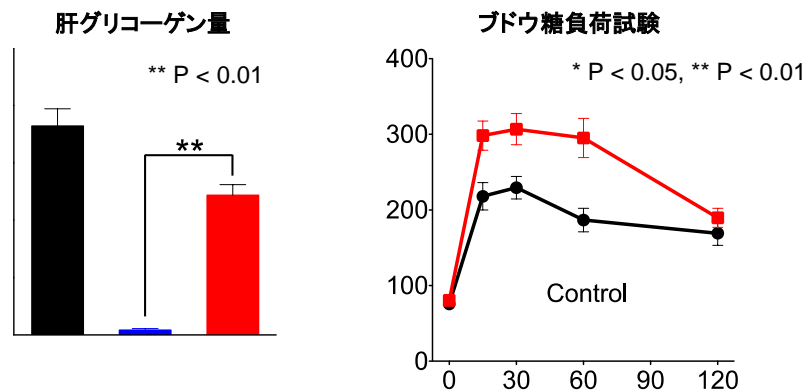
ob/ob LKOマウスの耐糖能の改善とそのメカニズム



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



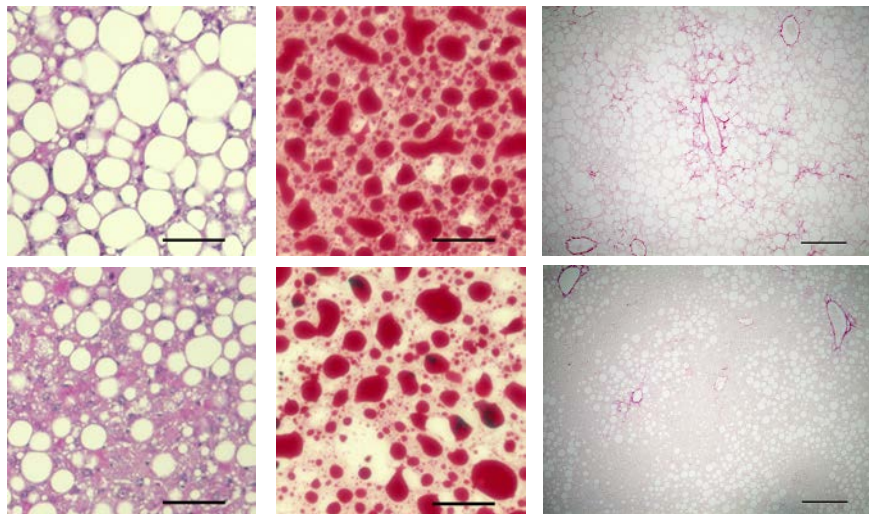
グリコーゲン酵素をob/ob LKOマウスの肝臓に発現させて、摂食時と同レベルのグリコーゲン蓄積を絶食時に誘導すると(左図)、ブドウ糖負荷試験においてob/ob LKOマウスの耐糖能が増悪した(右図)。

ob/obマウスにおける肝臓特異的な脂肪酸合成酵素(FAS)の欠損は、絶食時には①脂肪酸酸化の抑制によるATP量の減少と、それに伴いG6Pase発現の減少による糖新生が抑制される、②Glucokinase (Gck) の増加によって肝糖取り込み量が増加することで血糖値を低くする効果を示す。一方、摂食時においては①解糖系・脂肪酸合成経路での糖利用の低下により、余剰なグルコースはグリコーゲン合成経路に流入する。その結果、グリコーゲン蓄積の飽和をきたし、結果、肝臓における糖取り込みが抑制され、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、絶食時におけるob/ob LKOマウスの耐糖能が増悪した(右図)。つまり、肝グリコーゲン量による肝糖取り込み調節機構が存在することを示唆している。肝臓におけるFASは、糖取り込みとグリコーゲン蓄積量のバランスを適切に保つことで、血糖値をある範囲で一定に保つ緩衝剤としての機能が示唆された。

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/obLKOマウスはNASH抵抗性を呈する



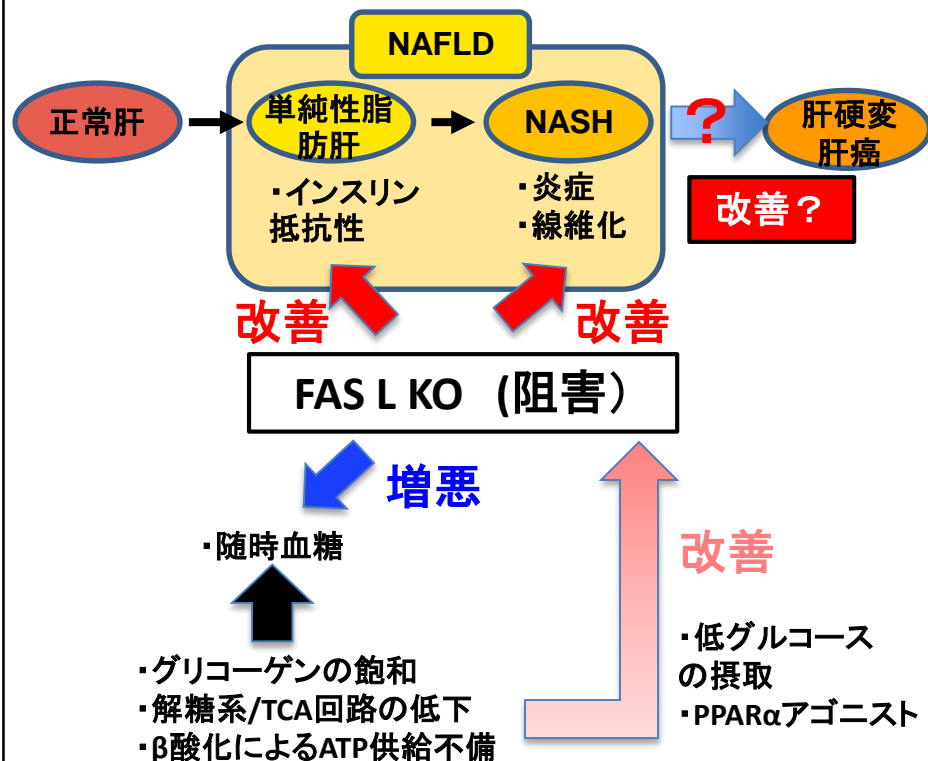
H-E

Oil-Red-O
(tri-glyceride)

Sirius Red
(collagen)

24週間のNASH食飼育後の肝臓のH-E、Oil-Red-O、Sirius Redの各染色を行った。ob/obLKOマウスの肝臓では脂肪肝・炎症・線維化が軽減していた。

NASH/NAFLD進行に対するFAS阻害の効果



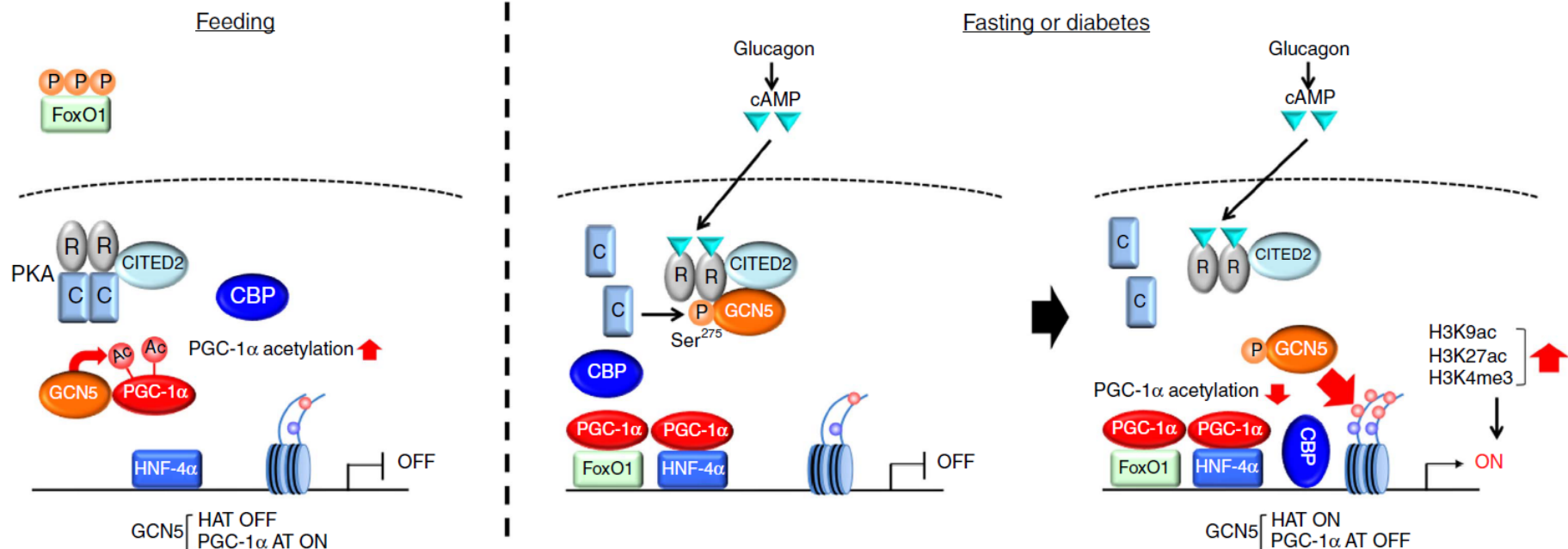
また、肝脂肪蓄積と、インスリン抵抗性、NASH/NAFLDで見られる肝硬変(肝繊維化・炎症反応)に与えるFAS欠損の効果を検討した。肥満モデルob/obバックグラウンドでNASHを誘導する餌を与えた場合、通常食と異なり自由摂食時においても高血糖をきたさなかった。一方、通常食と同様に絶食時の耐糖能の改善が見られ、解剖所見より顕著な脂肪蓄積に減少、及び繊維化の減少、炎症の抑制、肝障害の低減が見られるなど、ob/ob FASLKOマウスで、脂肪肝、繊維化、炎症等NASHの病態が改善していた(左図)。

以上のことより、過食状態ではFASの欠損は肝臓のグルコース/グリコーゲンバランスの破綻に伴い随時高血糖を引き起こすが、脂肪肝を抑制し、インスリン抵抗性を改善する。肝臓の繊維化、炎症も抑制されており、肝保護効果があることが明らかになった(右図)。

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

GCN5-CITED2-PKAモジュールによる糖新生系酵素の遺伝子転写制御機構



Sakai M. et al., Nature Communications, 2016

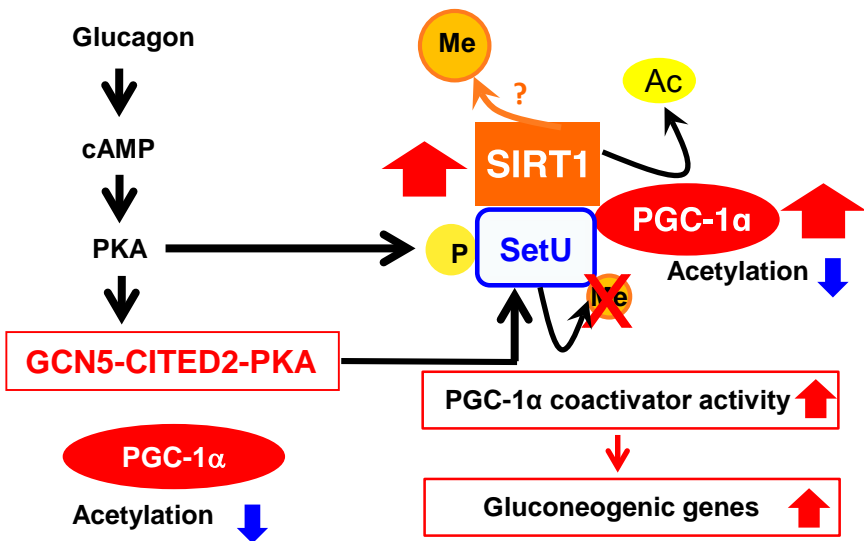
摂食時において転写調節因子CITED2は発現が抑制されており、GCN5がPGC-1αと複合体を形成し、PGC-1αをアセチル化しその転写コアクチベーション活性が抑制されている(左図: Feeding)。一方、絶食時においてグルカゴンが肝臓に作用するとCITED2の安定化と共に、GCN5-CITED2-PKAシグナリングモジュールが形成されると、GCN5によるPGC-1αのアセチル化が抑制され、PGC-1αが活性化する。同時にモジュール内においてGCN5の275番目のセリンがPKAによってリン酸化をされると、GCN5の基質特異性が変化し、ヒストンをよりアセチル化しやすくなる(右図: Fasting)。つまり、糖新生系酵素の遺伝子プロモーター上でPGC-1αの活性化(転写活性化)とGCN5によるヒストンアセチル化(エピジェネティック)が協調的に起こることで、糖新生が効率よく誘導されていると考えられる。これらの結果はGCN5-CITED2-PKAシグナリングモジュールが、摂食/絶食の代謝状態を切り替える分子スイッチの一つとして機能していることを示唆するものである。

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

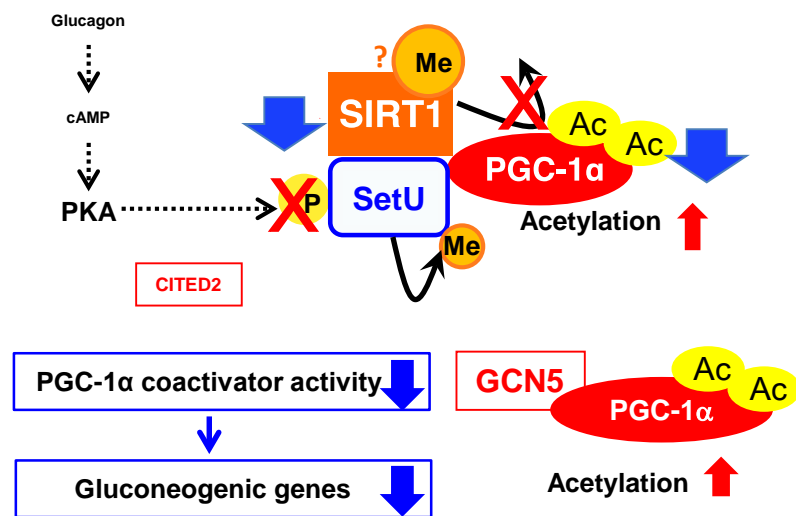
② 肝臓における摂食依存的な遺伝子発現調節メカニズムの解明

SetUによる代謝遺伝子の転写制御機構（仮説）

Fasting



Feeding



前述のGCN5-CITED2-PKAモジュールが絶食応答の遺伝子転写を活性化し、誘導されたSetUはPKAによりリン酸化されることでメチル化酵素活性が抑制される。一方、この状態のSetUはSIRT1の活性化を介してPGC-1αの脱アセチル化、活性化を引起し、絶食応答遺伝子の発現を亢進させる(左図)。逆に、摂食によってグルカゴン-PKAシグナルが低下するとSetUのメチル化酵素活性が回復し、Sirt1活性の低下によりPGC-1αの脱アセチル化反応が抑制される。同時にGCN5によるアセチル化反応が促進するため、PGC-1αによる絶食応答性の遺伝子転写が抑制される。つまり、PKAによるSetUのリン酸化が絶食/摂食応答を切り替えるスイッチとして機能している可能性が示唆された。

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析と創薬標的の探索
 主任研究者名： 酒井 真志人(平成26-27年)・満島 勝(平成28年)

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
The GCN5-CITED2-PKA signalling module controls hepatic glucose metabolism through a cAMP-induced substrate switch.	Mashito Sakai, Tomoko Tsujimura, Takashi Yagi, Hiroyuki Yano, Masaru Mitsushima, Hiroyuki Unoki-Kubota, Yasushi Kaburagi, Hiroshi Inoue, Yoshiaki Kido, Masato Kasuga, and Michihiro Matsumoto.	Nature Communications	7	2016

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
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年4月
1. 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 他	第87回 日本内分泌学会学術総会	福岡	2014年4月
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年5月
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年5月
CITED2-GCN5複合体による肝糖新生調節機構	松本 道宏 他	第14回日本蛋白質科学学会年会	横浜	2014年6月
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年7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 他	第19回アディポサイエンス・シンポジウム	大阪	2014年8月

研究発表及び特許取得報告について

Histone acetyltransferase GCN5 regulates hepatic gluconeogenesis through CITED2-dependent substrate switch	Mashito Sakai 他	9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress (MSDA)	京都	2014年9月
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年10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 他	第29回日本糖尿病合併症学会	東京	2014年10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 他	第35回日本肥満学会	宮崎	2014年10月
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	横浜	2014年11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 他	第26回分子糖尿病学シンポジウム	高知	2014年12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 他	第18回日本病態栄養学年次学術集会	京都	2015年1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	転写研究会・転写サイクル・転写代謝システム共催 冬の若手ワークショップ2015	群馬	2015年2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 他	第29回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会	京都	2015年2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 他	第29回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会	京都	2015年2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	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 他	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調節機構の解明	酒井 真志人 他	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 他	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 他	第58回日本糖尿病学会年次学術集会	下関	2015年5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 他	第58回日本糖尿病学会年次学術集会	下関	2015年5月

研究発表及び特許取得報告について

肝臓における糖代謝調節の分子機構	松本 道宏 他	第58回日本糖尿病学会年次学術集会	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 他	新学術領域 平成27年度転写代謝システム班会議	熊本	2015年6月
Histone acetyltransferase GCN5 regulates hepatic gluconeogenesis through CITED2-dependent substrate switch	Mashito Sakai 他	The 8th Asia-Oceania Conference on obesity	名古屋	2015年10月
The GCN5-CITED2-PKA module controls glucose metabolism via a cAMP-induced substrate switch	Mashito Sakai 他	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 他	第38回日本分子生物学会 第88日本生化学会	兵庫	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炎の進展を抑制する	八木 孝 他	第27回分子糖尿病シンポジウム	東京	2015年12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
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 他	第19回日本病態栄養学会	横浜	2016年1月
CITED2結合性キナーゼDyrk1による肝糖新生制御機構の解析	満島 勝 他	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炎の進展を抑制する	八木 孝 他	第30回日本糖尿病・肥満動物学会	大宮	2016年3月
代謝シグナル応答性メチル化酵素の同定と機能解析	松本 道宏 他	第30回日本糖尿病・肥満動物学会	大宮	2016年3月
新規CITED2結合キナーゼDYRK1による肝糖新生制御機構の解析	満島 勝 他	第53回日本臨床分子医学会	東京	2016年4月
代謝シグナル応答性メチル化酵素の同定と機能解析	満島 勝 他	第53回日本臨床分子医学会	東京	2016年4月
代謝シグナル応答性メチル化酵素の同定と機能解析	松本 道宏 他	第89回日本内分泌学会	京都	2016年4月
A Fasting - Inducible Gluconeogenic Module in Liver as a Novel Therapeutic Target for Type 2 Diabetes Mellitus	松本 道宏 他	第59回日本糖尿病学会	京都	2016年5月
メタボリックシンドローム関連キナーゼDyrk1は肝糖新生を制御する	満島 勝 他	第59回日本糖尿病学会	京都	2016年5月

研究発表及び特許取得報告について

代謝シグナル応答性メチル化酵素の同定と機能解析	松本 道宏 他	第59回日本糖尿病学会	京都	2016年5月
肝臓における新規血糖調節モジュールと糖尿病治療標的	松本 道宏 他	第89回日本生化学会	仙台	2016年9月
細胞周期関連キナーゼDyrk1による肝糖新生制御機構の解析	満島 勝 他	第89回日本生化学会	仙台	2016年9月
CITED2 結合性キナーゼDyrk1による肝糖新生制御機構の解析	松本 道宏 他	第37回日本肥満学会	東京	2016年10月
肥満・2型糖尿病合併NAFLDと脂肪酸合成酵素	松本 道宏 他	第37回日本肥満学会	東京	2016年10月
細胞周期関連キナーゼDyrk1は肝糖新生を制御する	満島 勝 他	第39回分子生物学会	横浜	2016年12月
メタボリックシンドローム関連キナーゼDYRK1Bによる肝糖新生制御機構の解析	満島 勝 他	第28回分子糖尿病学シンポジウム	富山	2016年12月
遺伝子改変マウスを用いた肝臓における代謝調節とその障害の分子機構の解明	松本 道宏	第31回日本糖尿病・肥満動物学会	横浜	2016年2月
Dyrk1Bによる肝糖新生制御機構の解明	満島 勝 他	第31回日本糖尿病・肥満動物学会	横浜	2016年2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
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