

課題番号 : 29指1009  
研究課題名 : 糖尿病創薬を目指したDyrk1による代謝制御機構の解明  
主任研究者名 : 満島 勝  
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、メタボリックシンドローム、肥満、遺伝子発現制御、肝糖新生  
研究成果 :

肝糖新生は絶食時において他の臓器にグルコースを供給する非常に重要な役割を果たしており、肝糖新生を担う一連の酵素の発現が、グルカゴンやインスリンなどのホルモンの作用により遺伝子発現レベルで厳密に制御されており、そのキー分子として CITED2 を同定してきた。本研究では、我々の研究部で新規に同定した CITED2 結合性キナーゼである Dyrk が肝糖新生を促進する結果を得たことより、その制御機構を解明すると共に、メタボリックシンドローム発症と関連した遺伝子多型が機能に与える効果を検証し、糖尿病、メタボリックシンドローム予防・治療の創薬につなげることを目指す。

### 肝臓における Dyrk1B の発現調節メカニズムの解明

ヒトにおいて Dyrk1B の遺伝子多型がメタボリックシンドロームの早期発症と関連するが、Dyrk1 の発現自体に関する情報はまだない。そこで、マウスの肝臓において Dyrk1 の発現を検討した。肥満モデルマウスや自由摂食時の肝臓では Dyrk1A、1B 共に顕著な変化が見られなかったが、絶食-再摂食のサイクルにおいて Dyrk1B の発現が顕著に変化し、絶食時に高く再摂食により強く抑制されることが分かった。そのメカニズムを、初代培養肝細胞を用いて検討したところ、インスリン-PI3K-Akt-FoxO1 シグナリング経路によって発現が制御されることを明らかにした。つまり生体においては、(再)摂食時に血糖の上昇に伴ってすい臓より分泌されるインスリンによって Dyrk1B の発現が抑制されると考えられる。

### Dyrk1B による肝糖新生制御メカニズムの解明

CITED2 相互作用分子として Dyrk1B を同定したが、我々が最近同定した GCN5-CITED2-PKA からなる糖新生制御モジュールのどの分子とも Dyrk1B は、免疫沈降法レベルで相互作用が確認できた。このことから、Dyrk1B も本モジュールの構成分子であることが示唆された。さらに、初代肝細胞において Dyrk1B をノックダウンする、あるいは Dyrk1 の阻害剤として知られている Harmine を処理すると、糖新生系酵素の発現および糖産生が抑制されたことから、Dyrk1B が糖新生に重要な分子であることが明らかになった。逆に、Dyrk1B を強発現させると糖新生系酵素の発現および糖産生が促進されたが、その効果はキナーゼ活性を欠損した変異体では起こらなかったことから、Dyrk1B が何かの基質分子をリン酸化して制御していることが示唆され、現在その候補分子を絞り込んでいる。

### Dyrk1B の活性制御機構の解明

これまでに Dyrk 1 はタンパク質の翻訳時に自己リン酸化し活性化すると考えられているが、近年様々な活性調節機構が報告されてきている。我々は Dyrk1B の活性が cAMP 刺激により亢進することを、MBP を基質とした *in vitro* のキナーゼアッセイにより確認した。このことは絶食時に発現に加え Dyrk1B の活性が亢進することで糖新生を制御していることを示唆している。現在、cAMP による Dyrk1B の活性調節機構を検討している。

Subject No. : 29S1009  
Title : Elucidation of the mechanism that controls hepatic gluconeogenesis by Dyrk1 for developing novel drugs against type II diabetes mellitus  
Researchers : Masaru Mitsushima  
Michihiro Matsumoto (Collaborator)  
Key word : Diabetes mellitus / Metabolic Syndrome/ obesity / transcription / Hepatic gluconeogenesis  
Abstract :

Hepatic gluconeogenesis plays essential roles in supplying glucose to maintain whole body homeostasis. A series of gluconeogenic enzymes, such as G6pases and PEPCK, involves in gluconeogenesis. The expression of these enzymes are well known to be regulated in the level of transcription of these genes. We have previously identified CITED2 as a key molecule that plays essential roles in the regulation of hepatic gluconeogenic genes expression. In this research, we obtained preliminary data that Dyrk1B, which we identified as a protein interacting with CITED2 in the nucleus, engage in the regulation of gluconeogenic gene expression. Therefore, we are trying to unveil the mechanism how Dyrk1B regulates the gluconeogenic gene expression. In addition, we would investigate the function of metabolic syndrome-associated SNPs in Dyrk1B. We make it to develop novel drugs to prevent or cure the type II diabetes through our basic research.

#### **Elucidation of the mechanism how the expression of Dyrk1B is regulated in the liver**

In human research, some SNPs in Dyrk1B are reported to intercorrelate with metabolic syndrome. However, there is few evidences for the expression of Dyrk1B. We firstly examined the gene expression of Dyrk1A and 1B in the liver of mice under several conditions such as obesity *ob/ob*, diabetes *db/db*, NCD/HFD or fasting/re-feeding. Among them, the expression of Dyrk1B in the liver of mice fasted was remarkably up-regulated compared with that re-fed, suggesting that Dyrk1B functions under fasting condition in the liver. We found out the mechanism that the expression of Dyrk1B depends on FoxO1 transcriptional factor and is suppressed through the insulin-PI3K-Akt pathway at least in primary hepatocytes.

#### **Elucidation of the mechanism how Dyrk1B regulates the gluconeogenic gene expression in the liver**

As we identified Dyrk1B as an interacting protein with CITED2, we examined if Dyrk1B interacts with GCN5-CITED2-PKA ternary complex. We could confirm the interaction of Dyrk1B with CITED2 as well as GCN5 and PKA using immune precipitation assay. Loss of function experiments, including knockdown of endogenous Dyrk1B or inhibitor treatment, in primary hepatocyte showed that Dyrk1B is important for proper regulation of the hepatic gluconeogenic gene expression. In contrast, over expression of Dyrk1B in primary hepatocyte promoted the expression of gluconeogenic genes as well as glucose production in a kinase activity-dependent manner, indicating existence of some substrates of Dyrk1B.

#### **Elucidation of the mechanism how the activity of Dyrk1B is regulated in the liver**

It is well known that the kinase activity, especially toward serine/threonine residues, of Dyrk1B is upregulated by auto-phosphorylation of tyrosine residue upon its translation. Several

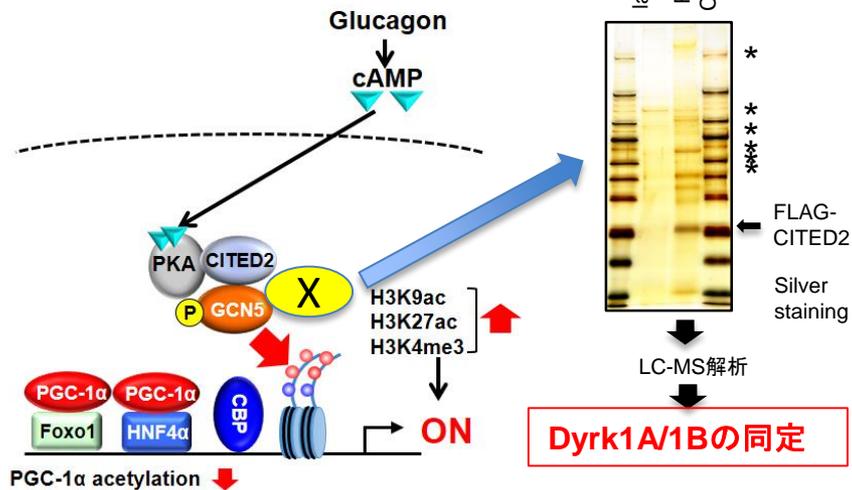
recent studies have reported that post-translational modification of Dyrk1B affects the kinase activity. We found that the kinase activity of Dyrk1B is upregulated by the cAMP stimulation *in vitro* kinase assay using MBP as substrate, suggesting that the activity of Dyrk1B might be upregulated by cAMP signaling during fasting, which serves as gluconeogenic gene induction. Now, we are investigating this possibility.

# 29指1009 糖尿病創薬を目指したDyrk1による代謝制御機構の解明

絶食時の肝臓において糖新生系酵素の発現を制御する新規GCN5-CITED2-PKAシグナリングモジュールの活性を調節する分子を見つけるため、キーマンと考えられるCITED2の相互作用分子の網羅的探索より、Dyrk(dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase)1A/1Bを新たに同定した(下左図)。本分子は細胞増殖の抑制因子として知られているが、近年様々な代謝制御に関与が示唆されてきている。特にDyrk1Bはヒトの遺伝子多型がメタボリックシンドロームの早期発症と関連が指摘された(*N.Engl.J.Med.*, 2012)。我々は、Dyrk1Bの発現がマウスの肝臓において絶食/摂食のサイクルで大きく変動し、絶食時に発現が高く、再摂食により強く抑制されることを見出した。Dyrk1Bの遺伝子発現は、転写因子FoxO1に依存しており、インスリン-PI3K-Akt経路によって抑制されるというメカニズムを明らかにした(下右図)。

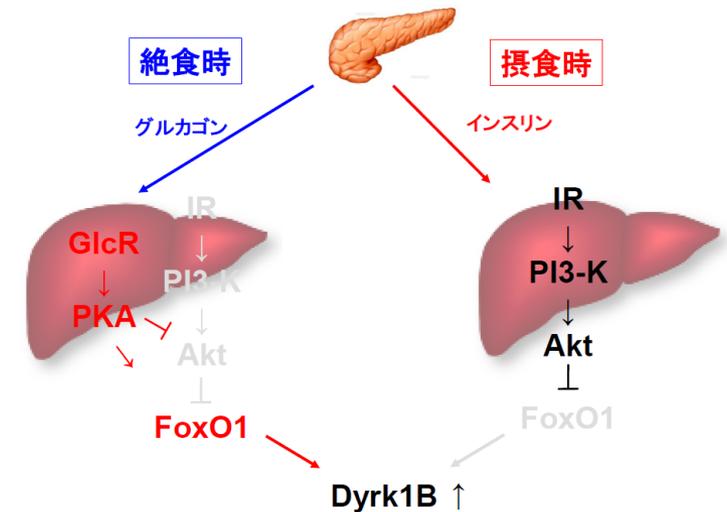
## CITED2相互作用タンパク質の同定

### 絶食時



これまでに当研究部で明らかにしたGCN5-CITED2-PKAシグナリングモジュールによる、肝糖新生系酵素の遺伝子発現制御メカニズム(左)。モジュール構成分子の探索(右)よりDyrk1A/1Bを同定した。

## マウス肝臓におけるDyrk1Bのホルモン依存的発現制御



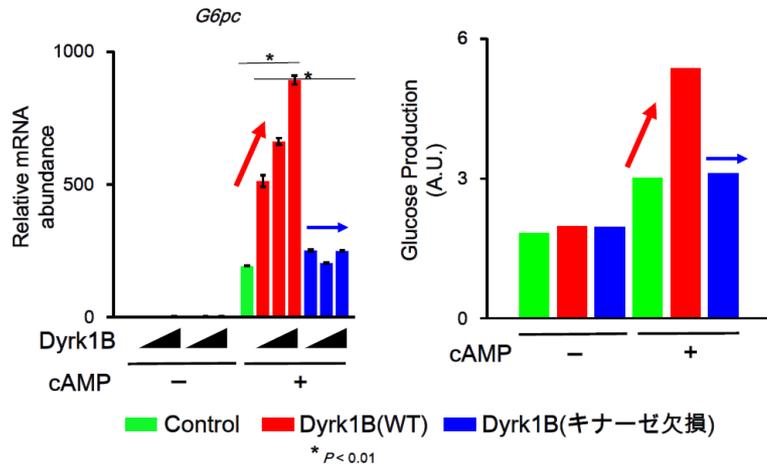
肝臓におけるDyrk1Bの発現は絶食時に発現が亢進し、再摂食時に強く抑制される。これにはインスリン-PI3K-Akt経路による転写因子FoxO1の抑制が関与していることが明らかになった。

# 29指1009 糖尿病創薬を目指したDyrk1による代謝制御機構の解明

GCN5-CITED2-PKAモジュールの結合分子として同定したDyrk1Bが肝糖新生に関与するかを検討した。マウスより単離した初代培養肝細胞にDyrk1Bを強発現させ、cAMP刺激依存的な糖新生系酵素(G6pc)の遺伝子発現を調べたところ、Dyrk1Bの用量依存的にG6pcの発現が亢進し、同時に糖産生も亢進した。一方、Dyrk1Bのキナーゼ活性を欠損した変体ではその効果が見られないことから、Dyrk1Bはキナーゼとして糖新生を制御することを明らかにした(下左図)。

一方、Dyrk1Bの発現はcAMPにより変化しなかったことから、活性調節機構の存在が考えられた。そこでDyrk1Bを発現させた細胞をcAMPで刺激し、免疫沈降してMBPを基質とした*in vitro*リン酸化アッセイによりDyrk1Bの活性を測定した。Dyrk1Bの活性がcAMP依存的に亢進した(下右図)ことから、Dyrk1BがcAMPシグナルによって活性調節がされていることが示唆された。

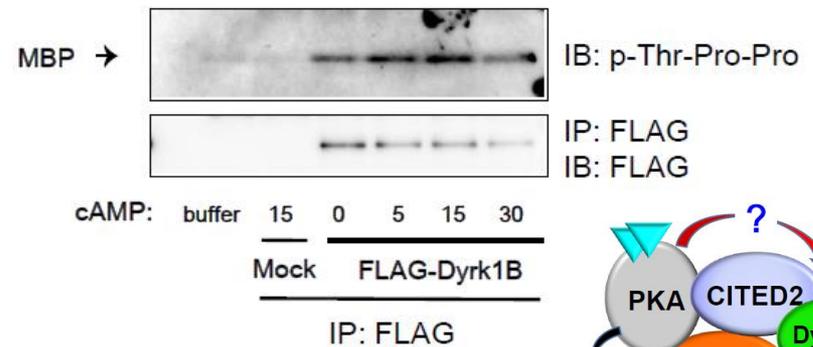
## Dyrk1Bはキナーゼ活性依存的に糖新生系酵素の発現、糖産生を制御する



Dyrk1Bの野生型(WT)とキナーゼ活性欠損型をマウス肝臓より単離した初代培養肝細胞に強発現し、cAMP刺激依存的な糖新生系酵素(G6pc)の発現誘導(左)および糖産生(右)を測定した。

Dyrk1Bのキナーゼ活性が、肝糖新生の亢進に重要であることが明らかになった。

## Dyrk1Bの活性はcAMPにより亢進する



Dyrk1Bは翻訳時に自己リン酸化することで活性化される、セリン/スレオニンキナーゼとして知られており、発現量が酵素の活性と関連していると考えられている。AML12細胞にFLAGタグ付きのDyrk1Bを発現させ、cAMP刺激後のタイムコースでDyrk1Bを免疫沈降し、MBPを基質とした*in vitro*リン酸化アッセイによりDyrk1Bの活性を測定した。

Dyrk1BによるMBPのリン酸化がcAMP刺激依存的に亢進したことから、Dyrk1Bの活性自身がcAMPシグナルによって調節されている(Dyrk1BがPKAによる直接のリン酸化等)ことが示唆された。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号： 29指定1009

研究課題名： 糖尿病創薬を目指したDyrk1による代謝制御機構の解明

主任研究者名： 満島勝

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
該当なし				

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
Dyrk1Bによる肝糖新生制御機構の解明	○満島勝、酒井真志人、辻村知子、八木孝、矢野宏行、飯田智、長沼孝雄、高峰英、春日雅人、松本道宏	第31回日本糖尿病・肥満動物学会	神奈川	2017年2月
Dyrk1Bによる肝糖新生制御機構の解析	○満島勝、酒井真志人、松本雅記、八木孝、矢野宏行、長沼孝雄、飯田智、高峰英、春日雅人、松本道宏	第54回日本臨床分子医学会	東京	2017年4月
DYRK1B promotes hepatic gluconeogenesis by modulating PGC-1 $\alpha$ and the histone acetyltransferase GCN5. International Symposium on Insulin Receptor and Insulin Action Poster Presentation	Masaru Mitsushima, Mashito Sakai, Masaki Matsumoto, Takashi Yagi, Hiroyuki Yano, Takao Naganuma, Satoshi Iida, Fengying Gao, Hiroshi Inoue, Masato Kasuga, ○Michihiro Matsumoto	International Symposium on Insulin Receptor and Insulin Action	France	2017年4月
Dyrk1Bによる肝糖新生制御機構の解明	○満島勝、酒井真志人、八木孝、矢野宏行、長沼孝雄、飯田智、高峰英、春日雅人、松本道宏	第60回日本糖尿病学会	愛知	2017年5月

研究発表及び特許取得報告について

新規転写調節モジュールを介した肝糖新生制御機構	○松本道宏、酒井真志人、満島勝	第60回日本糖尿病学会	愛知	2017年5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明	○松本道宏、満島勝、酒井真志人、飯田智、長沼孝雄、矢野宏行、松川隼也、高橋経太、春日雅人	第38回日本肥満学会	大阪	2017年10月
DYRK1Bによる肝糖新生制御機構の解明	○満島 勝、酒井 真志人、松本 雅記、飯田 智、長沼 孝雄、矢野 宏行、松川 隼也、高橋 経太、春日 雅人、松本 道宏	2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)	兵庫	2017年12月
Dyrk1Bによる肝糖新生制御機構の解析	○満島 勝、酒井 真志人、飯田 智、長沼 孝雄、矢野 宏行、松川 隼也、高橋 経太、春日 雅人、松本 道宏	第32回日本糖尿病・肥満動物学会	愛知	2018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。