

課題番号 : 29指1027  
研究課題名 : タンパク質アセチル化による脂肪細胞の機能発現制御機構の解明  
主任研究者名 : 飯田 智、松本 道宏  
分担研究者名 : 該当なし

キーワード : タンパク質アセチル化、エネルギー代謝制御、白色脂肪細胞、褐色脂肪細胞、ベージュ脂肪細胞

研究成果 :

2型糖尿病や肥満症などの生活習慣病で認められる代謝障害の多くが、その制御遺伝子の転写調節障害に起因する。報告者らは、これまでに行った2型糖尿病の“転写病”としての側面に注目した研究から、肝臓においてKAT2Aがタンパク質のアセチル化を介して糖代謝を制御することを明らかにした(Nat Med. 2012, Nat Commun. 2016)。KAT2Aは他臓器においても代謝調節に重要な役割を果たす可能性が高い。KAT2AにはKAT2Bと呼ばれるパラログが存在し、両者とも全身性に発現し機能的なオーバーラップがあることが報告されている。本研究では、脂肪細胞のKAT2ファミリーアセチル化酵素が代謝制御に果たす役割を解明し、代謝性疾患の創薬標的を同定し、新規治療法の開発を目指す。平成29年度の本研究についてサブテーマごとに報告する。

#### ①代謝制御における脂肪細胞KAT2のin vivoにおける役割の解明

Cre-loxPシステムを用いて作製した脂肪細胞特異的KAT2A欠損マウス(Adipo-KOマウス)を普通食ないし高脂肪食にて飼育し、代謝表現型を解析した。Adipo-KOマウスは対照と比べて、脂肪組織におけるKAT2AのmRNA発現が~60%減少していたが、代謝表現型に差を認めなかった。この理由として、実際に表現型がない可能性を除けば、1. KAT2Aの欠損効率が低いこと、2. KAT2Bによる代償機転、3. 慢性欠損のためのKAT2Bによらない代償機転の存在などが想定された。1に関しては、全身性のKAT2Aヘテロ欠損の遺伝的背景を導入し、欠損効率を上げて再解析する。2に関しては、KAT2Bの全身性欠損の遺伝的背景を導入し、脂肪細胞特異的KAT2A・全身性KAT2Bダブル欠損マウスの作製に着手した。3に関しては当初の研究計画に加えて下記③を行うこととした。

#### ②脂肪細胞におけるKAT2の代謝制御機構のin vitro解析

皮下脂肪組織より単離した前駆脂肪細胞をSV40 large T抗原の導入により不死化させ、成熟ベージュ脂肪細胞に分化させた後、short hairpin RNA (shRNA)を用いてKAT2Aの発現を85%以上抑制し、KAT2Aによる代謝制御機構を検討した。cAMP依存的な脂肪分解能に差を認めなかったが、ベージュ脂肪細胞に特異的に発現するUCP-1、CIDEAなどの遺伝子発現の低下を認めた。ベージュ脂肪細胞機能の維持にKAT2Aが関与するものと推察された。一方Adipo-KOマウス、対照マウスの皮下脂肪組織より前駆脂肪細胞を単離し、in vitroで成熟ベージュ脂肪細胞に分化させて遺伝子発現を比較した場合、KAT2Aの発現は対照の~60%減少に留まり、UCP-1、CIDEAなどの遺伝子発現に2群間で差を認めなかった。in vitroにおいてもAdipo-KO細胞は欠損効率が低いことが疑われ、今後のin vitro解析はshRNAによるノックダウン系を用いて行うこととした。

#### ③時期特異的急性遺伝子欠損システムを用いたKAT2の代謝制御機構の解析

KAT2Aの慢性的な欠損では代償機転により代謝表現型が得られない可能性が考えられる。そこで薬剤(タモキシフェン)投与により成体において急性にKAT2Aの欠損を誘導可能なシステムの構築を行った。本システムより代償機転を回避して表現型が得られること、表現型が強く出る臓器の特定などが期待できる。必要に応じて、ノックアウトの効率を上げるため既述のKAT2Aヘテロ欠損の背景の導入も考慮する。

Subject No. : 29S1027

Title : Elucidation of regulatory mechanisms of adipocyte function by protein acetylation

Researchers : Satoshi Iida, Michihiro Matsumoto

Key word : protein acetylation, adipocytes

Abstract :

It has been well known that protein acetylation plays a pivotal role in intracellular signal transduction and regulation of gene expression. Histone acetyltransferase KAT2A and KAT2B has been shown to be involved in the regulation of energy metabolism by acetylating histones and other transcription-relating proteins. In order to elucidate the function of KAT2A and KAT2B in adipocyte, which is also important organ for energy metabolism, we generated adipocyte specific KAT2A and KAT2B double knockout (DKO) mice.

Since systemic knockout of KAT2A gene in mice leads to embryonic lethality, we employed Adipoq-Cre gene for adipocyte specific ablation of KAT2A gene. We generated adipocyte specific KAT2A and 2B DKO mice by crossing whole body KAT2B KO mice and adipocyte specific KAT2A KO mice. The mice were born at Mendelian ratio and both KO mice were fertile. We analyzed the gene expressions in subcutaneous white adipose tissues (WAT) from DKO mice and found that the expression of Ucp1 gene, which is important for thermogenic function of brown fat cells, tended to be lower in DKO than that in wild type mice. This tendency of suppressed Ucp1 expression in DKO mice was not seen in brown adipose tissues (BAT). Because thermogenic beige adipocytes are produced in subcutaneous WAT in response to cold exposure, and the expression of Ucp1 is strongly induced in beige adipocytes, we expected that the effects of KAT2A and 2B knockout is detected more clearly during beiging of subcutaneous WAT. Then we exposed the DKO mice to cold (6°C) and analyzed Ucp1 expression in subcutaneous WAT. However, contrary to expectation, the expression of Ucp1 gene was not significantly suppressed in DKO mice, although there was a tendency of reduced Ucp1 expression in DKO mice. We next prepared adipocyte precursor cells from subcutaneous WAT and induced differentiation in vitro to analyze cell-autonomous effects of KAT2A and 2B KO. However, Ucp1 expression was not affected by KAT2A and 2B ablation and, furthermore, the expression of KAT2A gene decreased only 20~30% in KO mice in comparison to that in wild type mice. These results suggest that adipocyte-specific deletion of KAT2A gene by this system does not work efficiently, and thus the phenotype of the mice was not so clear. In order to delete KAT2A gene more efficiently, we are preparing another mice having one knockout allele. The other allele of KAT2A gene is flanked by flox sequence and is deleted adipocyte-specifically.

We also examined other system to delete KAT2A gene in adult mice using Rosa26-CreERT2. In these mice, tamoxifen-activated Cre recombinases are expressed in whole body and KAT2A gene is deleted when tamoxifen is administered. Using this system, we found that KAT2A knock in adult mice caused pronounced decrease of body weight, although they were preliminary results. Moreover, subcutaneous and epididymal WAT of these mice lost their lipid profoundly. We are planning to confirm these results and analyze what happened in adipose and other tissues.

Researchers には、分担研究者を記載する。

# タンパク質アセチル化による脂肪細胞の 機能発現制御機構の解明

2型糖尿病や肥満症などの生活習慣病で認められる代謝障害の多くが、その制御遺伝子の転写調節障害に起因する。報告者らは、これまでに行った2型糖尿病の“転写病”としての側面に注目した研究から、肝臓においてKAT2Aがタンパク質のアセチル化を介して糖代謝を制御することを明らかにした(Nat Med. 2012, Nat Commun. 2016)。KAT2Aは他臓器においても代謝調節に重要な役割を果たす可能性が高い。KAT2AにはKAT2Bと呼ばれるパラログが存在し、両者とも全身性に発現し、機能的なオーバーラップがあることが報告されている。本研究では、脂肪細胞のKAT2ファミリーアセチル化酵素が代謝制御に果たす役割を解明し、代謝性疾患の創薬標的を同定し、新規治療法の開発を目指す。平成29年度の本研究についてサブテーマごとに報告する。

## ①代謝制御における脂肪細胞KAT2のin vivoにおける役割の解明

本年度は、Cre-loxPシステムを用いて作製した脂肪細胞特異的Kat2a欠損マウス(Adipo-KOマウス)を普通食ないし高脂肪食にて飼育し、代謝表現型を解析した。Adipo-KOマウスは対照と比べて、脂肪組織におけるKAT2AのmRNA発現が～60%減少していたが、代謝表現型に差を認めなかった。この理由として、実際に表現型がない可能性を除けば、1. KAT2Aの欠損効率が低いこと、2. KAT2Bによる代償機転、3. 慢性欠損のためのKAT2Bによらない代償機転の存在などが想定された。1に関しては、全身性のKAT2Aヘテロ欠損の遺伝的背景を導入し、欠損効率を上げての再解析に着手している。2に関しては、KAT2Bの全身性欠損の遺伝的背景を導入し、脂肪細胞特異的KAT2A・全身性KAT2Bダブル欠損マウスの作製に着手した。3に関しては当初の研究計画に加えて下記③を行うこととした。

## ②脂肪細胞におけるKAT2の代謝制御機構のin vitro解析

皮下脂肪組織より単離した前駆脂肪細胞をベージュ脂肪細胞に分化させた後、short hairpin (sh) RNAを用いてKAT2Aの発現を85%以上抑制し、その代謝制御機構を検討した。UCP-1、CIDEAなどのベージュ脂肪細胞特異的遺伝子の発現低下を認め、ベージュ脂肪細胞機能の維持にKAT2Aが関与すると推察された。一方Adipo-KOマウス由来のベージュ脂肪細胞は、KAT2Aの発現は対照の60%に留まり、UCP-1等の発現減少を認めなかった。Adipo-KO細胞は欠損効率が低いため、今後のin vitro解析にはshRNAによるノックダウン系を用いることとした。

## ③時期特異的急性遺伝子欠損システムを用いたKAT2の代謝制御機構の解析

KAT2Aの慢性的な欠損では代償機転により代謝表現型が得られない可能性が考えられる。そこで薬剤(タモキシフェン)投与により成体において急性にKAT2Aの欠損を誘導可能なシステムの構築を行った。本システムより代償機転を回避して表現型を得られること、表現型が強く出る臓器の特定などが期待できる。必要に応じて、ノックアウトの効率を上げるため既述のKAT2Aヘテロ欠損の背景の導入も考慮する。

## <業績>

論文発表: Nat Commonなど 6報

招聘講演: 生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017)、第4回肝臓と糖尿病・代謝研究会、第8回糖尿病トランスレーショナルリサーチ研究会

学会発表等: 第54回 臨床分子医学会学術集会 1題、第60回日本糖尿病学会年次学術集会 2題、生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017) 1題、第38回日本肥満学会 1題、第39回分子生物学会 1題、第28回分子糖尿病学シンポジウム 1題、第32回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 1題、生理学研究所研究会 1題、International Symposium on Insulin Receptor and Insulin Action 2017 1題

## 研究発表及び特許取得報告について

課題番号：29指1027

研究課題名：タンパク質アセチル化による脂肪細胞の機能発現制御機構の解明

主任研究者名：飯田 智、松本 道宏

### 論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Sirt2 facilitates hepatic glucose uptake by deacetylating glucokinase regulatory protein.	Watanabe H, Inaba Y, Kimura K, Matsumoto M, Kaneko S, Kasuga M, Inoue H.	Nat Commun	9(1):30	2018年
Circadian clock regulates hepatic polyploidy by modulating Mkp1-Erk1/2 signaling pathway.	Chao HW, Doi M, Fustin JM, Chen H, Murase K, Maeda Y, Hayashi H, Tanaka R, Sugawa M, Mizukuchi N, Yamaguchi Y, Yasunaga JI, Matsuoka M, Sakai M, Matsumoto M, Hamada S, Okamura H.	Nat Commun	8(1):2238	2017年
CD206+ M2-like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors.	Nawaz A, Aminuddin A, Kado T, Takikawa A, Yamamoto S, Tsuneyama K, Igarashi Y, Ikutani M, Nishida Y, Nagai Y, Takatsu K, Imura J, Sasahara M, Okazaki Y, Ueki K, Okamura T, Tokuyama K, Ando A, Matsumoto M, Mori H, Nakagawa T, Kobayashi N, Saeki K, Usui I, Fujisaka S, Tobe K.	Nat Commun	8(1):286	2017年

研究発表及び特許取得報告について

GCN5-CITED2-PKAモジュールを介した血糖調節機構	松本道宏 酒井真志人	糖尿病学2017	p. 10-19	2017年
絶食時の糖新生とヒストンアセチル化制御	松本道宏 酒井真志人	肝胆膵	75(1): 17-23	2017年
ヒストンアセチル化と糖代謝制御	酒井真志人 松本道宏	The Lipid	28(3): 14-21	2017年

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
脂肪組織量制御における転写コレギュレーターCITED2の役割の解明	松本道宏	生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)	神戸	2017年12月
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4回肝臓と糖尿病・代謝研究会	名古屋	2017年5月
絶食応答性キナーゼDYRK1Bによる肝代謝調節機構	満島勝, 松本道宏	生理学研究所研究会	岡崎	2017年9月
肝臓における血糖調節の分子機構の解明～糖尿病創薬標的の同定をめざして～	松本道宏	第8回糖尿病トランスレーショナルリサーチ研究会	弘前	2017年9月
絶食応答性長鎖ノンコーディングRNAの代謝調節における役割の解明	長沼孝雄, 高橋経太, 酒井真志人, 満島勝, 矢野宏行, 松川隼也, 春日雅人, 松本道宏	第32回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会	名古屋	2018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, 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・肥満動物学会年次学術集会	名古屋	2018年2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	生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)	神戸	2017年12月
メタボリックシンドローム関連キナーDyrk1Bによる肝糖新生制御機構の解明	松本道宏	第38回日本肥満学会	大阪	2017年10月

研究発表及び特許取得報告について

絶食応答性プロリン水酸化酵素による糖代謝・炎症制御機構	矢野宏行, 長沼孝雄, 酒井真志人, 飯田智, 満島勝, 高峰英, 八木孝, 南史朗, 春日雅人, 松本道宏	第60回日本糖尿病学会年次学術集会	名古屋	2017年5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, 春日雅人, 松本道宏	第60回日本糖尿病学会年次学術集会	名古屋	2017年5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, 飯田智, 長沼孝雄, 矢野宏行, 高峰英, 春日雅人, 松本道宏	第54回日本臨床分子医学会学術集会	東京	2017年4月
DYRK1B promotes hepatic gluconeogenesis by modulating PGC-1 $\alpha$ and the histone acetyltransferase GCN5.	Mitsushima M, Sakai M, Matsumoto Ma, Yagi T, Yano H, Naganuma T, Iida S, Gao F, Inoue H, Kasuga M, Matsumoto M	International Symposium on Insulin Receptor and Insulin Action (IR2017)	Nice, France	2017年4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。