

様式 C-18

研究成果報告書（研究領域）

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

（転写代謝システム 領域番号：3307）

平成23年度～平成27年度科学研究費助成事業

（科学研究費補助金）

「新学術領域研究（研究領域提案型）」研究成果報告書

平成29年3月

領域代表者 深水 昭吉

（筑波大学 生命環境系 教授）

## 1. はしがき

新学術領域研究「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」を終えて

遺伝子発現は、DNA にコードされたゲノム情報、DNA のメチル化、ヒストンのリン酸化・アセチル化・メチル化などクロマチン修飾で調節されるエピゲノム情報、そして転写因子作用など、これらが形成する転写環境によって制御されています。このような転写環境は、核内複合体と連動して、細胞種特有のアイデンティティーの確立や増殖・分化などの多様な細胞機能に深く関係している一方で、細胞のエネルギー代謝は、その増殖状態や分化段階によりダイナミックに制御され、恒常性維持や新しい定常状態への移行を実現しています。その際、ATP、アセチル CoA、NAD<sup>+</sup>、FAD や  $\alpha$ -ケトグルタル酸など、解糖系や TCA サイクルなど代謝産物 (=生命素子; hub metabolites) の一部は、転写環境の形成にも利用されています。

本領域は、転写環境の構築とエネルギー代謝のクロストーク制御を解明するアプローチとして、1) 転写環境の形成に直結する化学修飾がエネルギー代謝に働きかける作用、2) エネルギー代謝の変化が転写環境の形成に及ぼす作用、というクロストークを支える分子実体とその制御メカニズムの理解を深化させるため、修飾基転移酵素によって書き込む (Writing)、アダプター分子で修飾基を読み取る (Reading)、または脱修飾酵素で取り去る (Erasing) ことや、クロマチン修復によって書き換える (Rewriting) メカニズムに着目してきました。「転写」と「代謝」の協調機能の理解を目指し、総括班、計画班、公募班がフラットな立場で「転写代謝システム」を討論する場として、ラウンドテーブル形式で交流を図って参りました。技術的側面だけでなく、実質的な共同研究をはじめ、それらの活動を通して、若手育成にも積極的に取り組んでいただきました。2011 年の震災の年に開始されました当初から、若手の先生方が活発に活動いただき、今後の人的ネットワークの広がり、研究の発展をとっても期待しております。

最後になりましたが、総括班、計画班と公募班の先生方にはお世話になって参りました。皆様のご協力とご指導に、改めて感謝申し上げます。また、大変多くの先生方にご助言を賜り、本当に有難うございました。心より御礼申し上げます。

領域代表 深水昭吉  
(筑波大学 生命環境系 教授)

## 目次

1. はしがき	1
2. 目次	2
3. 研究組織	3
4. 交付決定額（分配額）	9
5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況	10
6. 研究成果および研究発表（雑誌論文・学会発表・図書等）	
計画研究班	14
公募研究班	65

### 3. 研究組織

#### 【総括班】

課題番号：23116001

領域代表 深水昭吉（筑波大学 生命環境系 教授）  
連携研究者 五十嵐和彦（東北大学 大学院医学系研究科 教授）  
連携研究者 中尾光善（熊本大学 発生医学研究所 教授）  
連携研究者 菅澤 薫（神戸大学 バイオシグナル総合研究センター 教授）  
連携研究者 本橋ほづみ（東北大学 加齢医学研究所 教授）  
連携研究者 矢作直也（筑波大学 医学医療系 准教授）  
連携研究者 清水敏之（東京大学 大学院薬学系研究科 教授）  
研究協力者 佐々木裕之（九州大学 生体防御医学研究所 教授、副学長）  
研究協力者 米田悦啓（独立行政法人 医学基盤研究所 理事長）  
研究協力者 春日雅人（独立行政法人 国立国際医療センター 理事長、総長）

#### 【計画研究班】

課題番号：23116002

研究代表者 本橋ほづみ（東北大学 加齢医学研究所 教授）

課題番号：23116003

研究代表者 五十嵐和彦（東北大学 大学院医学系研究科 教授）

課題番号：23116004

研究代表者 深水昭吉（筑波大学 生命環境系 教授）  
研究分担者 高橋秀和（山口大学 医学系研究科 講師）  
連携研究者 大徳浩照（筑波大学 生命環境系 講師）  
連携研究者 廣田恵子（筑波大学 生命環境系 助教）

課題番号：23116005

研究代表者 柳澤 純（筑波大学 生命環境系 教授）  
連携研究者 村山明子（筑波大学 生命環境系 講師）

課題番号：23116006

研究代表者 矢作直也（筑波大学 医学医療系 准教授）

課題番号：23116007

研究代表者 清水敏之（東京大学 大学院薬学系研究科 教授）

連携研究者 藤間祥子（東京大学 大学院薬学系研究科 助教）

連携研究者 仲島由佳（筑波大学 生命環境系 助教）

課題番号：23116008

研究代表者 菅澤 薫（神戸大学 バイオシグナル研究センター 教授）

連携研究者 酒井 恒（神戸大学 バイオシグナル研究センター 助教）

連携研究者 岩井成憲（大阪大学 大学院基礎工学研究科 教授）

課題番号：23116009

研究代表者 中尾光善（熊本大学 発生医学研究所 教授）

連携研究者 日野信次朗（熊本大学 発生医学研究所 助教）

#### 【公募研究班】

課題番号：24116502、26116702

研究代表者 鈴木教郎（東北大学 大学院医学系研究科 講師）

課題番号：24116503

研究代表者 長嶋剛史（東北大学 大学院医学系研究科 非常勤講師）

連携研究者 中山啓子（東北大学 大学院医学系研究科 教授）

連携研究者 舟山 亮（東北大学 大学院医学系研究科 助教）

課題番号：24116504、26116705

研究代表者 小林麻己人（筑波大学 医学医療系 講師）

課題番号：24116505

研究代表者 佐々木努（群馬大学 生体調節研究所 准教授）

課題番号：24116506

研究代表者 田中知明（千葉大学 大学院医学研究院 准教授）

課題番号：24116507、26116708

研究代表者 酒井寿郎（東京大学 先端科学技術研究センター 教授）

連携研究者 稲垣 毅（東京大学 先端科学技術研究センター 特任准教授）

連携研究者 稲垣恭子（日本医科大学付属病院 糖尿病・内分泌代謝内科 助教）

連携研究者 松村欣宏（東京大学 先端科学技術研究センター 助教）

連携研究者 曾我朋義（慶應義塾大学 環境情報学部 教授）

課題番号：24116508

研究代表者 田中 稔（東京大学 分子細胞生物学研究所 准教授）

課題番号： 24116509, 26116711

研究代表者 大澤 毅（東京大学 先端科学技術研究センター 特任助教）

連携研究者 島村徹平（名古屋大学 大学院医学系研究科 特任准教授）

連携研究者 神吉康晴（東京大学 アイソトープ総合センター 助教）

課題番号：24116510

研究代表者 清水宣明（東京大学 医科学研究所 特任研究員）

連携研究者 田中廣壽（東京大学 医科学研究所 教授）

連携研究者 吉川賢忠（東京大学 医科学研究所 助教）

連携研究者 佐野元昭（慶應義塾大学 医学部 准教授）

課題番号：24116511

研究代表者 中川 崇（富山大学 先端ライフサイエンス拠点 特命助教）

課題番号：24116512、26116716

研究代表者 尾野 亘（京都大学 大学院医学研究科 准教授）

連携研究者 佐藤史顕（京都大学 大学院医学研究科 准教授）

課題番号： 24116513 26116717

研究代表者 石濱 泰（京都大学 大学院薬学研究科 教授）

連携研究者 杉山直幸（京都大学 大学院薬学研究科 准教授）

連携研究者 若林真樹（京都大学 大学院薬学研究科 助教）

課題番号：24116514、26116718

研究代表者 二村圭祐（大阪大学 大学院医学系研究科 准教授）

課題番号：24116515

研究代表者 田嶋正二（大阪大学 たんぱく研究所 教授）

課題番号：24116517、26116720

研究代表者 中井 彰（山口大学 医学系研究科 教授）

連携研究者 藤本充章（山口大学 医学系研究科 准教授）

課題番号： 24116518、26116721

研究代表者 松本雅記（九州大学 生体防御医学研究所 准教授）

課題番号：24116519

研究代表者 松下正之（琉球大学 大学院医学研究科 教授）

課題番号：24116521

研究代表者 池田和博（埼玉医科大学 医学部 講師）

連携研究者 井上 聡（埼玉医科大学 医学部 客員教授）

課題番号：24116522

研究代表者 永松 剛（慶應義塾大学 医学部 助教）

課題番号：24116523

研究代表者 堀澤健一（九州大学 生体防御医学研究所 助教）

課題番号：24116524

研究代表者 白木琢磨（近畿大学 生物理工学部 准教授）

課題番号：24116525

研究代表者 深澤壽太郎（広島大学 大学院理学研究科 助教）

連携研究者 高橋陽介（広島大学 大学院理学研究科 教授）

課題番号：24116526、26116729

研究代表者 松本道宏（国立国際医療研究センター研究所  
糖尿病研究センター 分子代謝制御研究部 部長）

課題番号：24116527、26116730

研究代表者 林 良樹

(現：筑波大学 生命領域学際研究センター 助教)

旧：自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 助教)

課題番号：24116528

研究代表者 竹森 洋 (独立行政法人 医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー)

課題番号：26116703

研究代表者 今井由美子 (秋田大学 医学系研究科 教授)

課題番号：26116707

研究代表者 加藤光保 (筑波大学 医学医療系 教授)

連携研究者 渡邊幸秀 (筑波大学 医学医療系 助教)

連携研究者 沖田結花里 (筑波大学 医学医療系 研究員)

課題番号：26116709

研究代表者 長谷耕二 (慶應義塾大学 薬学部 教授)

連携研究者 福田真嗣 (慶應義塾大学 先端生命科学研究所 特任准教授)

課題番号：26116712

研究代表者 豊島文子 (京都大学 ウイルス研究所 教授)

課題番号：26116713

研究代表者 F U S T I N J M (京都大学 薬学研究科 特定研究員)

連携研究者 岡村 均 (京都大学 大学院薬学研究科 教授)

連携研究者 土居雅夫 (京都大学 大学院薬学研究科 准教授)

連携研究者 山口賀章 (京都大学 大学院薬学研究科 助教)

課題番号：26116715

研究代表者 西 英一郎 (京都大学 大学院医学研究科 准教授)

課題番号：26116719

研究代表者 西川恵三 (大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 特任准教授)

課題番号：26116722

研究代表者 尾池雄一（熊本大学 大学院生命科学研究部 教授）

研究分担者 門松 毅（熊本大学 大学院生命科学研究部 助教）

課題番号：26116724

研究代表者 中江 淳（慶應義塾大学 医学部 特任准教授）

課題番号：26116725

研究代表者 小林 聡（同志社大学 大学院生命医科学研究科 教授）

連携研究者 谷口浩章（同志社大学 生命医科学部 助教）

課題番号：26116726

研究代表者 川村晃久（立命館大学 生命科学部 准教授）

連携研究者 木田泰之（国立研究開発法人 産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門  
主任研究員）

課題番号：26116728

研究代表者 櫛引俊宏（防衛医科大学校 医用工学講座 准教授）

#### 4. 交付決定額（分配額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	171,400	51,510	222,910
2012年度	187,000	57,540	244,540
2013年度	187,500	53,220	240,720
2014年度	188,140	57,810	245,950
2015年度	182,400	60,318	242,718
2016年度 とりまとめ	2,950	885	3,835
総計	919,390	281,283	1,200,673

## 5. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

### 計画研究班：五十嵐和彦（東北大学 大学院医学系研究科 教授）

<出願状況：2件>

発明の名称：免疫沈降用の内部標準分子及び免疫沈降方法

出願番号：特願 2015-035734

出願日：2015/02/25

出願人：東北大学

発明者：五十嵐和彦、落合恭子、中山啓子、木下賢吾、  
舟山亮、細金正樹、岡村容伸

発明の名称：抗リン酸化 Bach2 抗体及び抗腫瘍免疫活性化剤のスクリーニング方法

出願番号：特願 2015-219945

出願日：2015/11/09

出願人：東北大学

発明者：五十嵐和彦、武藤哲彦、落合恭子、島弘季、安藤亮、  
佐藤好宏、玉原亨、佐藤勇樹

### 計画研究班：中尾光善（熊本大学 発生医学研究所 教授）

<出願状況：1件 >

発明の名称：神経変性疾患治療剤

出願番号：特願 2016-011705

出願日：2016/01/25

出願人：熊本大学

発明者：谷原秀信、岩尾圭一郎、中尾光善、林秀樹、  
日野信次朗、堤孝之

<取得状況：3件>

発明の名称：ミトコンドリア機能向上剤

登録番号／登録日：EP2417985／2016/5/10（欧州）

登録番号／登録日：特許第 5685764 号／2015/1/30（日本）

登録番号／登録日：US8,637,480／2014/1/28（米国）

出願人：熊本大学

発明者：中尾光善、日野信次朗

公募研究班：尾野 亘（京都大学 大学院医学研究科 准教授）

<出願状況：1件>

発明の名称：miR-33b ノックインマウスによる非アルコール性脂肪肝炎モデル

出願番号：特願 2017-59580

出願日：2017/03/24

出願人・発明者：尾野 亘、堀江貴裕、西野共達

公募研究班：中井 彰（山口大学 医学系研究科 教授）

<取得状況：1件>

発明の名称：HSF1とRPA1との相互作用阻害ペプチド

登録番号：特許第 6019530 号

登録日：2016年10月14日

出願人：国立大学法人山口大学

発明者：中井 彰、藤本充章

公募研究班：竹森 洋（独立行政法人 医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー）

<出願状況：3件>

発明の名称：プレロシン誘導体を含む軟骨骨変性、および/または軟骨菲薄疾患治療剤

出願番号：特願 2014-234698

出願日：2014/11/19

出願人：国立大学法人京都大学、独立行政法人医薬基盤研究所

発明者：妻木範行、竹森 洋、淵野裕之、川原信夫

発明の名称：プレロシン誘導体を含む軟骨変性、および/または軟骨菲薄疾患治療剤

出願番号：特願 2013-135040

出願日：2013/6/27

出願人：国立大学法人京都大学、独立行政法人医薬基盤研究所

発明者：妻木範行、竹森 洋、淵野裕之、川原信夫

発明の名称：カスパーゼ1活性化阻害剤、抗炎症剤、鎮痒剤、及びカスパーゼ1活性化阻害剤の評価方法

出願番号：特願 2013-094995

出願日：2013/4/30

出願人：独立行政法人医薬基盤研究所、株式会社桃谷順天館

発明者：竹森 洋、佐野坂真人、伊東祐美、瀧野裕之、川原信夫

<取得状況：1件>

発明の名称：肝機能の保護・改善薬

登録番号：特許第 5498754 号

登録日：2014/3/14

出願人：学校法人関西大学、独立行政法人医薬基盤研究所、有限会社一栄

発明者：河原秀久、長岡康夫、竹森 洋、小出芳栄

**公募研究班：西 英一郎（京都大学 大学院医学研究科 准教授）**

<取得状況：1件>

発明の名称：ナルディライジンの高感度免疫測定法

登録番号：特許第 5610256 号

登録日：2014/9/12

出願人：京都大学（50%）、三洋化成工業株式会社（50%）

発明者：國近 誠、平岡 義範、松本 恭一、西 英一郎

**公募研究班：小林 聡（同志社大学 大学院生命医科学研究科 教授）**

<出願状況：2件>

発明の名称：抗がん剤

出願番号：特願 2016-230449

出願日：2016/11/28

出願人・発明者：和久剛、小林聡、加藤裕紀、渡辺秀教

発明の名称：抗がん剤

出願番号：PCT/JP2017/010445

出願日：2017/3/15

出願人・発明者：和久剛、小林聡、加藤裕紀、糀美早紀、渡辺秀教

公募研究班：川村晃久（立命館大学 生命科学部 准教授）

<出願状況：1件>

発明の名称：REPROGRAMMING PROGENITOR COMPOSITIONS AND METHODS OF USE THEREFORE

出願番号：U.S. Provisional Patent Application No. 62/126,417

出願日：2015/2/27

出願人・発明者：Downes MR, Kida YS, Kawamura T, Wei Z, Yu RT.

6. 研究成果および研究発表（雑誌論文・学会発表・図書等）

# 計 画 研 究 班

研究課題名：転写環境制御による代謝応答と酸化ストレス応答のクロストーク  
 Crosstalk between metabolic control and oxidative stress response  
 through transcriptional regulation

研究期間：2011～2015

課題番号：23116002

研究代表者 本橋ほづみ（東北大学 加齢医学研究所 教授）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	15,200,000	4,560,000	19,760,000
2012 年度	13,400,000	4,020,000	17,420,000
2013 年度	13,500,000	4,050,000	17,550,000
2014 年度	12,800,000	3,840,000	16,640,000
2015 年度	12,800,000	3,840,000	16,640,000
総計	67,700,000	20,310,000	88,010,000

**研究成果の概要：**転写因子 NRF2 は、生体防御系遺伝子群の統括的な制御因子であり、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。一方、がん細胞における NRF2 の過剰な活性化は、その悪性化をもたらすことが報告されている。本研究を通して、NRF2 がグルコースとグルタミンの代謝に関与する酵素遺伝子群を誘導して、細胞増殖に有利な代謝環境を実現し、がん細胞の増殖を促進することを見いだした。また、NRF2 活性を抑制する代謝物として 2-ヒドロキシグルタル酸を同定し、同代謝物が蓄積する IDH1/IDH2 変異脳腫瘍では NRF2 活性が抑制されており、それとよく相関して予後が比較的良好であることを明らかにした。

1. 研究の背景

細胞の代謝様式は静止期(G0)と増殖期(G1)では大きく異なっている。G0 期では定常状態の維持が重要であり、酸素呼吸が生体の構成因子を常に酸化障害の危険に曝していることを鑑みれば、酸化ストレスからの防御が最も基本的な恒常性維持機構であるといえる。一方、G1 期では、核酸、細胞膜、細胞内小器官など娘細胞の構成因子を新規に合成する必要があるため、細胞はグルコースやグルタミンを大量に取り込み、同化反応を活性化させている。増殖シグナルは、細胞の代謝様式を改変すること（代謝プログラミング）により、細胞の増殖を可能にしている。

転写因子 Nrf2 は、親電子性毒物や活性酸素種への曝露に際して誘導的に安定化し、生体防御系遺伝子群の転写を活性化させる。近年、肺がん、胆道がん、前立腺がんなどの固形腫瘍において Nrf2 が恒常的に安定化し、がん細胞の治療抵抗性の獲得に寄与すると同時に、増殖を促進することが報告された。我々は、増殖中の細胞において、Nrf2 が、グルコース代謝経路の一つであるペントースリン酸経路を触媒する 4 酵素をすべて直接活性化し、かつ、それに引き続くイノシンーリン酸の合成に関与する酵素を活性化することにより、プリンヌクレオチドの新規合成を促進すること、グルタチオン合成と

ンゴ酸の酸化脱炭酸反応の活性化によりグルタミン消費を活性化することを見いだした。そして、Nrf2 がこれらのグルコース・グルタミン代謝酵素遺伝子を活性化できるのは、PI3K-Akt 経路が活性化している場合であることがわかった。

## 2. 研究の目的

酸化ストレス応答の鍵因子である転写因子 Nrf2 が、増殖シグナルにより機能変換を受け、代謝リプログラミングを推進するという発見に基づき、代謝リプログラミングを支える分子機構として2つの方向からアプローチすることにした。

(1) 酸化ストレス応答制御因子である Nrf2 が、PI3K-Akt 経路との間のポジティブフィードバックにより同化反応促進因子としての新たな機能を獲得する分子機構を解明する。

(2) 糖やアミノ酸代謝物が転写環境に与える影響を明らかにし、Nrf2 の機能発現と機能変換を解明する。

## 3. 研究成果

### (1) NRF2 による同化反応制御機構

#### 1) NRF2 活性化による代謝リプログラミングがもたらす肝臓再生促進効果の検証

野生型マウスと肝臓特異的な *Keap1* 遺伝子欠損マウスを用いて、門脈枝結紮術をおこなった。門脈枝結紮により、結紮された門脈がやしなっている肝臓葉は萎縮するが、対側の肝臓葉は反応性の肥大を呈する。こうした門脈枝結紮後の反応性肥大が、NRF2 の活性化により促進されるかどうかを検討した。

肝臓特異的 *Keap1* 欠損マウスでは、野生型マウスに比較して、門脈枝結紮後の代償性肝臓肥大がより顕著であった。Ki67 染色により細胞増殖の様子を調べると、肝臓特異的 *Keap1* 欠損マウスでは、

反応性の肝細胞増殖がより長期間にわたり持続することがわかった。また、門脈枝結紮後の代償性肥大を呈する非結紮葉においては、一過性に PI3K-AKT 経路が活性化されることがわかり、生理的範囲内の PI3K-AKT 経路の活性化が NRF2 機能を増強できる可能性が示唆された。

そこで、NRF2 の標的遺伝子発現レベルを調べたところ、通常時は、生体防御系遺伝子群のみ、肝臓特異的 *Keap1* 欠損マウスが野生型に比較して高発現を示し、代謝系遺伝子群の発現レベルに違いはみとめられなかった。しかし、門脈枝結紮により一過性に PI3K-AKT 経路を活性化させると、生体防御系遺伝子群も代謝系遺伝子群もともに肝臓特異的 *Keap1* 欠損マウスが野生型に比較して高発現を示した。したがって、NRF2 機能が増強し、代謝リプログラミングに貢献することで、肝細胞の反応性増殖を促進したものと考えられる。

#### 2) PI3K-AKT 経路の活性化による NRF2 機能増強機構の解明

PI3K-AKT 経路の活性化と NRF2 の安定化が共存する *Pten:Keap1* 二重欠損マウスと、PI3K-AKT 経路の活性が弱く、NRF2 の安定化のみがみられる *Keap1* 欠損マウスを比較すると、前者において NRF2 標的遺伝子の発現レベルが顕著に増強している。このメカニズムを調べるため、*Pten:Keap1* 二重欠損マウスと *Keap1* 欠損マウス、それぞれの肝臓から内因性の NRF2 複合体を精製し、その構成因子の機能的貢献を検討した。

*Pten:Keap1* 二重欠損マウスと *Keap1* 欠損マウス、それぞれの肝臓から内因性の NRF2 複合体を精製したところ、両者に共通してふくまれていた因子としては、メディエーター複合体、SWI/SNF クロマ

チンリモデリング複合体が得られた。なかでも、メディエーター複合体のサブユニットである MED16 は NRF2 に直接結合することがわかり、NRF2 依存的に NRF2 結合領域にリクルートされ、NRF2 依存的転写活性化に貢献することがわかった。NRF2 の標的遺伝子のうち、8 割近くが MED16 の活性を必要としていることがわかり、さらに、MED16 欠損細胞は Nrf2 欠損細胞と同様に酸化ストレスに対して極めて脆弱であることがわかった。

#### (2)代謝物による NRF2 機能制御の解析～脳腫瘍患者検体の解析による IDH1 変異と NRF2 活性化状態の関連の検討

脳腫瘍患者から得られる手術検体を用いて、NRF2 の標的遺伝子発現レベルを検討したところ、IDH1 変異を有する患者では、NRF2 の標的遺伝子発現レベルが低いことが明らかになった。そこで、そのメカニズムの詳細を検討するために、培養細胞へ IDH1 変異体を導入し NRF2 機能への影響を検討した。脳腫瘍由来の培養細胞である T98 細胞に IDH1 変異体を導入すると NRF2 タンパク質の蓄積量が低下、NRF2 の発現量も低下することがわかった。このことから、IDH1 変異体が NRF2 機能を抑制する結果、患者予後が比較的良好になるものと考えられた。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計 22 件)

- ① Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, Tanaka N, Moriguchi T, Motohashi H, Nakayama K, Yamamoto M. NRF2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat. Commun.* 7, 11624, 2016. 査読有
- ② Honkura Y, Matsuo H, Murakami S, Sakiyama M, Mizutani K, Shiotani A,

Yamamoto M, Morita I, Shinomiya N, Kawase T, Katori Y, and Motohashi H\*. NRF2 is a key target for prevention of noise-induced hearing loss by reducing oxidative damage of cochlea. *Sci. Rep.* 6, 10329, 2016. (\*Correspondence) 査読有

- ③ Ando R, Shima H, Tamahara T, Sato Y, Watanabe-Matsui M, Kato H, Sax N, Motohashi H, Taguchi K, Yamamoto M, Nio M, Maeda T, Ochiai K, Muto A, Igarashi K. The transcription factor Bach2 is phosphorylated at multiple sites in murine B cells but a single site prevents its nuclear localization. *J. Biol. Chem.* 291, 1826-1840, 2016. 査読有
- ④ Sekine H, Okazaki K, Ota N, Shima H, Katoh Y, Suzuki N, Igarashi K, Ito M, Motohashi H\*, Yamamoto M. The Mediator subunit MED16 transduces NRF2-activating signals into antioxidant gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 36, 407-420, 2016. (\*Correspondence) 査読有
- ⑤ Goto M, Kitamura H, Alam MM, Ota N, Haseba T, Akimoto T, Shimizu A, Takano-Yamamoto T, Yamamoto M and Motohashi H\*. Alcohol dehydrogenase 3 contributes to the protection of liver from nonalcoholic steatophepatitis. *Genes Cells* 20, 464-480, 2015. (\*Correspondence) 査読有
- ⑥ de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Ahn H, Hagey LR, Romanoski CE, Lee RG, Graham MJ, Motohashi H, Yamamoto M, Edwards PA. MAFG Is a Transcriptional Repressor of Bile Acid Synthesis and Metabolism. *Cell Metab.* 21, 298-310, 2015. 査読有
- ⑦ Kanamori M, Higa T, Sonoda Y, Murakami S, Dodo M, Kitamura H, Taguchi K, Shibata T, Watanabe M, Suzuki H, Shibahara I, Saito R, Yamashita Y, Kumabe T, Yamamoto M, Motohashi H\*, and Tominaga T. Activation of the NRF2 pathway and its impact on the prognosis of anaplastic glioma patients. *Neuro Oncol.* 17, 555-565, 2015. 査読有
- ⑧ Shirasaki K, Taguchi K, Unno M, Motohashi H\*, and Yamamoto M. Nrf2 promotes compensatory liver hypertrophy after portal vein branch ligation in mice. *Hepatology* 59, 2371-2382, 2014. (\*Correspondence)

- ⑨ Taguchi K, Hirano I, Itoh T, Tanaka M, Miyajima A, Suzuki A, Motohashi H\*, and Yamamoto M. Nrf2 enhances cholangiocyte expansion in Pten-deficient livers. *Mol. Cell. Biol.* 34, 900-913, 2014. 査読有
- ⑩ Onodera Y, Motohashi H, Takagi K, Miki Y, Shibahara Y, Watanabe M, Ishida T, Hirakawa H, Sasano H, Yamamoto M, and Suzuki T. NRF2 immunolocalization in human breast cancer patients as a prognostic factor. *Endocri. Relat. Cancer* 21, 241-252, 2014. 査読有
- ⑪ Murakami S, Shimizu R, Romeo P-H, Yamamoto M, and Motohashi H\*. Keap1-Nrf2 system regulates cell fate determination of hematopoietic stem cells. *Genes Cells* 19, 239-253, 2014. (\*Correspondence) 査読有
- ⑫ Murakami S, Yamamoto M, and Motohashi H\*. Hematopoietic stem and progenitor cell activation during chronic dermatitis provoked by constitutively active aryl-hydrocarbon receptor driven by Keratin14 promoter. *Toxicol. Sci.* 138, 47-58, 2014. (\*Correspondence) 査読有
- ⑬ Ichimura Y, Waguri S, Sou YS, Kageyama S, Hasegawa J, Ishimura R, Saito T, Yang Y, Kouno T, Fukutomi T, Hoshii T, Hirao A, Takagi K, Mizushima T, Motohashi H, Lee MS, Yoshimori T, Tanaka K, Yamamoto M, Komatsu M. Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol. Cell.* 51, 618-631, 2013. 査読有
- ⑭ Fujita R, Takayama-Tsujimoto M, Satoh H, Gutiérrez L, Aburatani H, Fujii S, Sarai A, Bresnick EH, Yamamoto M, and Motohashi H\*. NF-E2 p45 is important for establishing normal function of platelets. *Mol. Cell. Biol.* 33, 2659-2670, 2013. 査読有 (\*Correspondence)
- ⑮ Suzuki T, Shibata T, Takaya K, Shiraishi K, Kohno T, Kunitoh H, Tsuta K, Furuta K, Goto K, Hosoda F, Sakamoto H, Motohashi H and Yamamoto M. Regulatory nexus of synthesis and degradation deciphers cellular Nrf2 expression levels. *Mol. Cell. Biol.* 33, 2402-2412, 2013. 査読有
- ⑯ Taguchi K, Fujikawa N, Komatsu M, Ishii T, Unno M, Akaike T, Motohashi H and Yamamoto M. Keap1 degradation by autophagy for the maintenance of redox homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 13561-13566, 2012. 査読有
- ⑰ Mitsuishi Y, Taguchi K, Kawatani Y, Shibata T, Nukiwa T, Aburatani H, Yamamoto M, and Motohashi H\*. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming. *Cancer Cell* 22, 66-79, 2012. (\*Correspondence) 査読有
- ⑱ Inoue D, Suzuki T, Mitsuishi Y, Miki Y, Suzuki S, Sugawara S, Watanabe M, Sakudara A, Endo C, Uruno A, Sasano H, Nakagawa T, Satoh K, Tanaka N, Kubo H, Motohashi H\*, and Yamamoto M. Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 103,760-766, 2012. 査読有
- ⑲ Murakami S and Motohashi H\*. Roles of NRF2 in cell proliferation and differentiation. *Free Rad. Biol. Med.* 88, 168-178, 2015. (\*Correspondence) Invited review. 査読有
- ⑳ Suzuki T, Motohashi H, and Yamamoto M. Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway. *Trends Pharmacol. Sci.* 34, 340-346, 2013. Review. 査読有
- ㉑ Mitsuishi Y, Motohashi H\*, and Yamamoto M. The Keap1-Nrf2 system in cancers: Stress response and anabolic metabolism. *Front. Oncol.* 2, Article 200, 2012. (\*Correspondence) Invited review. 査読有
- ㉒ Taguchi K, Motohashi H and Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells* 16, 123-140, 2011. Review. 査読有
- [学会発表等] (研究代表者の招待講演)  
(計 29 件)
- ① Hozumi Motohashi, KEAP1-NRF2 system in stress response and cancer malignancy Kumamoto University Advance Research Project A & Program for Advancing Strategic International Networks to Accelerate the Circulation

- of Talented Researchers, International Symposium 平成 29 年 2 月 11 日、熊本大学、熊本
- ② Hozumi Motohashi, NRF2 and ROS metabolism. Educational session. ESMO Asia 2016. December 16, 2016. Suntec Signapore Convention & Exhibition Centre, Singapore.
- ③ Hozumi Motohashi, KEAP1-NRF2 system in stress response and cancer malignancy. III International Scientific Conference: Oxygen 2016. November 18, 2016. Jagiellonian University, Krakow, Poland.
- ④ Hozumi Motohashi, Antioxidant response and cell senescence regulation by KEAP1-NRF2 system. “Frontiers in aging research toward healthy longevity” 平成 28 年 11 月 17 日、丸の内 MY PLAZA ホール、東京
- ⑤ 本橋ほづみ, KEAP1-NRF2 制御系による酸化ストレス応答とその破綻 Marianna Research Council (MRC) 平成 28 年 10 月 18 日、聖マリアンナ医科大学、川崎
- ⑥ 本橋ほづみ, NRF2 の活性制御による加齢疾患の予防と治療の可能性 スマート・エイジングカレッジ in 東京 平成 28 年 10 月 18 日、東京丸の内・東北大学東京分室、東京
- ⑦ 本橋ほづみ, 造血細胞の分化・増殖における酸化ストレス応答機構の役割 第 78 回日本血液学会学術集会教育講演 平成 28 年 10 月 14 日、パシフィコ横浜、横浜
- ⑧ 本橋ほづみ, KEAP1-NRF2 制御系による酸化ストレス応答と細胞老化制御 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会 教育講演 平成 28 年 8 月 31 日、仙台国際センター、仙台
- ⑨ 本橋ほづみ, がんの悪性化と酸化ストレス応答機構 安田女子大学・薬学部・薬学科 10 周年記念学術講演会 平成 28 年 8 月 24 日、安田女子大、広島
- ⑩ Hozumi Motohashi, KEAP1-NRF2 system in stress response and cancer malignancy. The special seminar at Joslin Diabetes Center. March 18, 2016. Boston, Massachusetts, USA.
- ⑪ Hozumi Motohashi, Crosstalk between regulation of redox balance and cell proliferation by NRF2. The Society of Toxicology, 55th Annual Meeting and ToxExpo. March 13-17, 2016. Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans, Louisiana, USA.
- ⑫ Hozumi Motohashi, Cytoprotection and metabolic reprogramming governed by KEAP1-NRF2 system. The 46<sup>th</sup> International Symposium of The Princess Takamatsu Cancer Research Fund. 平成 27 年 11 月 18 日、パレスホテル、東京
- ⑬ 本橋ほづみ, 細胞のがん化と老化における酸化ストレス応答機構の役割. 東北エイジングサミット-加齢制御研究から臨床まで- 平成 27 年 9 月 27 日、仙台国際センター、仙台
- ⑭ 本橋ほづみ, KEAP1-NRF2 制御系によるストレス応答と代謝制御 山口大学大学院医学系研究科 大学院セミナー 平成 27 年 6 月 22 日、山口大学、宇部
- ⑮ Hozumi Motohashi, Functional nexus between Keap1-Nrf2 system and cellular metabolism. Joint International Symposium on TGF- $\beta$  Family and Cancer: Signaling Network in Tumor Microenvironment. 平成 27 年 1 月 13 日、エポカルつくば、つくば
- ⑯ 本橋ほづみ, Keap1-Nrf2 system for redox regulation and metabolic reprogramming in cancers. 第 73 回日本癌学会学術総会 コアシンポジウム “Cancer cell metabolism and cellular senescence” 平成 26 年 9 月 27 日、パシフィコ横浜、横浜
- ⑰ Hozumi Motohashi, Crosstalk between redox regulation and cell proliferation. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa & Symposium on Drug Discovery in Academics. 平成 26 年 1 月 23 日、金沢エクセルホテル、金沢
- ⑱ 本橋ほづみ, Keap1-Nrf2 制御系によるストレス応答と代謝リプログラミング 東北薬科大学セミナー 平成 26 年 1 月 15 日、東北薬科大学、仙台
- ⑲ 本橋ほづみ, Keap1-Nrf2 制御系によるストレス応答と代謝リプログラミング 第 6 回 Symphony 平成 25 年 9 月 23 日、ホテルメトロポリタンエドモント飯田橋、東京
- ⑳ 本橋ほづみ, Keap1-Nrf2 ストレス応答機構による代謝リプログラミングと細胞増殖 TARA セミナー 平成 25 年 7 月 22 日、筑波大学生命領域学際研究センター、つくば
- ㉑ 本橋ほづみ, Keap1-Nrf2 制御系によるストレス応答と代謝リプログラミング 名古屋大学大学院基盤医学特論 特徴あるプログラム Cancer Science Course 平成 25 年 7 月 2 日、名古屋大学大学院医学系研究科、名古屋
- ㉒ 本橋ほづみ, がん細胞における酸化

- ストレス応答と代謝リプログラミング 武田薬品 癌創薬ユニットセミナー 平成 25 年 6 月 18 日、武田薬品湘南研究所、藤沢
- ⑳ 本橋ほづみ、がん細胞における酸化ストレス応答と代謝リプログラミング アジレント メタボロミクスセミナー 平成 25 年 5 月 23 日、青山ダイヤモンドホール、東京
- ㉑ 本橋ほづみ、がん細胞における Keap1-Nrf2 制御系の役割 がん代謝 メタボロミクスセミナー 平成 25 年 3 月 13 日、国立がん研究センター研究所、東京
- ㉒ 本橋ほづみ、がん細胞における Keap1-Nrf2 制御系の役割 第 29 回臨床フリーラジカル会議 平成 24 年 12 月 7-8 日、里山の休日、京都・烟河
- ㉓ 本橋ほづみ、がん細胞における酸化ストレス応答と代謝リプログラミング 日本医科大学医学会特別講演会 平成 24 年 11 月 28 日、日本医科大学、東京
- ㉔ 本橋ほづみ、がん細胞における酸化ストレス応答と代謝制御 第 7 回メタボロームシンポジウム ランチョンセミナー (ヒューマンメタボロームテクノロジー株式会社) 平成 24 年 10 月 12 日、慶應義塾大学先端生命科学研究所、鶴岡
- ㉕ 本橋ほづみ、がん細胞における酸化ストレス応答と代謝リプログラミング 京都大学放生研セミナー 平成 24 年 9 月 14 日、京都大学放射線生物研究センター、京都
- ㉖ Hozumi Motohashi, Cross-regulation of redox homeostasis and anabolic metabolism by the Keap1-Nrf2 pathway. The 33rd NAITO Conference on “Oxygen Biology: Hypoxia, Oxidative Stress and Diseases.” 平成 24 年 6 月 26-29 日、シャトラーゼ・ガトーキングダム SAPPORO、札幌

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

〔その他〕 ホームページ等

研究室ホームページ

<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/ger/index.htm>

1

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

本橋ほづみ (MOTOHASHI, Hozumi)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：00282351

研究課題名：メチオニン代謝回路とエピゲノムの共役機構とそのがん化への関与  
 Crosstalk of transcriptional control and energy pathways  
 by hub metabolites

研究期間：2011～2015

課題番号：23116003

研究代表者 五十嵐和彦（東北大学 大学院医学系研究科 教授）

【交付決定額（分配額）】

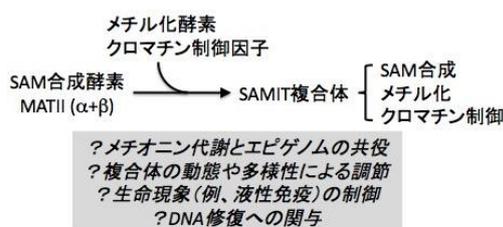
（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	22,400,000	6,720,000	29,120,000
2012年度	19,900,000	5,970,000	25,870,000
2013年度	20,100,000	6,030,000	26,130,000
2014年度	16,230,000	4,869,000	21,099,000
2015年度	16,230,000	4,869,000	21,099,000
総計	94,860,000	28,458,000	123,318,000

研究成果の概要：メチル基供与体 S-adenosylmethionine (SAM) の合成酵素のアイソザイム methionine adenosyltransferase (MAT) 2 について、MAT2 の機能未知サブユニット  $\beta$  が触媒サブユニット  $\alpha$  の核局在を促進することを証明した。さらに、MAT2 がクロマチンリモデリング因子やヒストンメチル化酵素などと複合体を形成することを見いだした。MAT2 活性が触媒サブユニット MAT2a mRNA の安定性をその RNA メチル化を通して制御するという、全く新しい恒常性維持機構を発見した。鉄代謝を制御する転写因子 Bach1 および Bach2 の造血における機能の一端を明らかにした。

1. 研究の背景

**メチル基代謝とエピゲノム** 細胞はそれぞれ特異的な遺伝子発現パターンを安定に維持するとともに、外来性のシグナルや細胞内の状況に応答して特定の遺伝子群の発現を変え、増殖、分化、そして環境への適応といった現象をつくりだす。この過程では、クロマチンを中心とした化学修飾と転写因子の変動が制御の根幹を成す。従来、ヒストンや DNA のメチル化は安定な化学修飾とされ、エピゲノム（クロマチン修飾によりゲノムがある程度プログラム化を受けた状態）の安定性を担う基本原理と考えられてきた。しかし、これらメチル基を消去する酵素が多数発見され、エピゲノムもメチル化と脱



メチル化の動的平衡に立脚することが理解されつつある。メチル化修飾をクロマチンに書き込むメチル化酵素は、全て S-adenosyl-L-methionine (SAM) を基質とするが、核内における SAM 量の増減や SAM 合成酵素の局在化がヒストンのメチル化レベルなどのエピゲノム動態を左右する可能性は、これまでほとんど注目されていない。

**SAM 合成酵素の核内機能の発見** 我々は転写因子 MafK の複合体精製および質量

分析により、転写因子が SAM 合成酵素 (methionine adenosyltransferase II, **MATII**) を局所的にクロマチンへ動員し、周辺ヒストンメチル化を促進することにより転写を調節することを発見し、局所的 SAM 合成酵素動員はエピゲノム制御の基本原則であることを提唱した (*Mol. Cell*, 2011)。SAM 合成酵素はヒストンメチル化酵素やクロマチン構造制御因子と複合体を形成することも報告した

(SAM-integrating transcription regulation module, **SAMIT 複合体**と命名;上図参照)。**エピゲノム研究における B リンパ球の利点** エピゲノム制御を調べる上では、刺激に応答してエピゲノムが大きく変化するシステムが有用となる。B リンパ球は、抗原刺激により抗体分泌を担う形質細胞へ分化するが、この際、遺伝子発現パターンが大きく変動するだけでなく、ヘテロクロマチンが増加し、核が凝集する。このことから、B リンパ球-形質細胞分化は、刺激応答性エピゲノムリモデリングの優れた実験系になると考えた。我々は、転写因子 Bach1 や Bach2 が MafK とヘテロ二量体を形成し、互いに相補しながら B リンパ球-形質細胞分化や抗体クラススイッチなどを制御することを発見し、同応答における遺伝子ネットワークを解明している。しかも、Bach はいずれも MATII と相互作用することも見いだしている。したがって、液性免疫の遺伝子ネットワークと SAMIT 複合体を結びつけることにより、独創性の高い研究を推進できると考えた。

## 2. 研究の目的

B リンパ球と肝癌細胞の実験系を用いて、SAM 合成酵素 MATII と SAMIT 複合体によるエピゲノム制御を解明する。また新

しいテーマとして MATII のリクルーターである転写因子 Bach1 や Bach2 が鉄やヘムの代謝を制御することに着目し、詳細な分子機構と生理的意義を解明する。これにより、本新学術領域が掲げる到達目標の一つ「エネルギー代謝の変化が転写環境の形成に及ぼす作用」の解明に寄与する。

[1] エピゲノム制御における SAM 合成酵素複合体 (SAMIT 複合体) の機能と作用機構の解明: MATII の核局在の制御機構、肝癌細胞等におけるクロマチン結合部位、周辺ヒストンの化学修飾、B リンパ球-形質細胞分化に伴うこれら動態の変化を調べる。また、B リンパ球および肝癌細胞における MATII の複合体を解明し、クロマチン局所の SAM 合成機構を理解する。

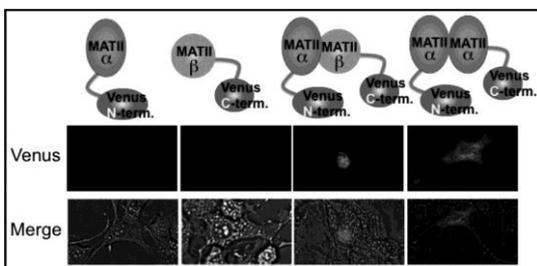
[2] SAM 合成酵素複合体 (SAMIT 複合体) の液性免疫における生理機能の解明とその異常: 核局在能を欠く変異 MATII $\alpha$  あるいは MATII $\beta$  を B リンパ球で誘導的にノックインできるマウスを作成し、B リンパ球-形質細胞分化をモデルとし、液性免疫応答における生理機能を解明する。また、クロマチン結合部位等の情報に基づいてがんにおける異常の理解へつなげる。

[3] ヘム-Bach 経路と MATII による鉄代謝の制御: Bach1 および Bach2 はいずれもヘム受容体でもあり、それぞれ鉄欠乏への適応に必須である。MATII がこれら転写因子により標的遺伝子へ動員されることに着目し、Bach-MATII 複合体で制御される鉄関連標的遺伝子を特定する。そして、その遺伝子制御における MATII の役割を明らかにする。あわせて、鉄代謝の観点から造血系細胞における Bach1 および Bach2 の機能の詳細を解明する。

### 3. 研究成果

#### [1] エピゲノム制御における SAM 合成酵素複合体 (SAMIT 複合体) の機能と作用機構の解明:

MATII $\alpha$ および $\beta$ について、種間の保存性や既知ドメインを参考に多数の欠失変異体を作成し、293T 細胞や HeLa 細胞などで細胞内分布を比較した。まず、予想外な知見として、 $\alpha$  と  $\beta$  はそれぞれ単独で過剰発現した場合、全く異なる細胞内分布を示すことを見いだした。 $\alpha$  は主に細胞質に分布するのに対して、 $\beta$  はほとんどの細胞で核に局在した。両者を同時



に発現させると、 $\alpha$  も核に局在する細胞が著しく増加した。 $\alpha$  単独で発現した場合には上述のごとく細胞質に主に分布するが、一部 (約 10%程度) の細胞では細胞質+核の分布を示したことから、これを指標に  $\alpha$  の欠失変異の分布を比較した。そして、 $\alpha$  の C 末端 7 アミノ酸の領域が核分布に必須であることを見いだした。しかも、この C 末端欠失  $\alpha$  を  $\beta$  と共発現しても、 $\beta$  による核移行促進は観察されず、免疫沈降ウエスタン実験で結合が失われていた。以上の結果から、 $\beta$  は  $\alpha$  の核移行を制御する調節サブユニットであること、そして  $\alpha$  の C 末端領域と結合することにより核への分布を調節することが考えられた。

領域代表の深水らとの共同研究により、 $\alpha$  と  $\beta$  がヘテロオリゴマーとして分布する細胞内部位を特定することを split venus 系を応用して進めている。この系では蛍光蛋白質 Venus が二つに分断され、

それぞれを相互作用を調べたいタンパク質に融合して発現させる。相互作用が細胞内で生じた場合には Venus が再構成され、相互作用形成部位にて蛍光が観察される。深水らは断片化 Venus と対象タンパク質の間に入れる連結アミノ酸配列を工夫し、効率良く相互作用を検出できる改良 Venus ベクターを開発してきた。この系を  $\alpha$  および  $\beta$  の細胞内オリゴマー形成の解析に用いた。 $\alpha$  全長を改良 Venus 系で調べると、 $\alpha$  は細胞内でホモオリゴマーを形成すること、これは主に細胞質に分布することがわかった。一方、 $\beta$  のホモオリゴマーは検出されなかった。 $\alpha$  と  $\beta$  の相互作用は改良 Venus 系でも確認され、さらに、このヘテロオリゴマーは主に核に分布することがわかった。

以上の結果から、 $\beta$  サブユニットの機能が MATII の核移行にあることが結論できた。現在、共同研究論文を執筆しており、近々投稿予定である。SAM は細胞質でも核でも必要であることから、 $\alpha$  と  $\beta$  の相互作用 (すなわち核分布) が何らかのシグナル、特に代謝や細胞分化キュー等によって制御されることが予想され、この点を解明することが今後の重要な課題となる。

[2] SAM 合成酵素複合体 (SAMIT 複合体) の液性免疫における生理機能の解明とその異常: 上に述べた研究から、MAT2  $\alpha$  の C 末端 7 アミノ酸が核局在に重要であることが判明し、この領域を欠失する遺伝子変異を導入することを試みたが、予備的実験から、この戦略の根本的な問題が明らかになった。この C 末端欠失 MAT2  $\alpha$  は極めて不安定であり、立体構造が大きく変化した可能性、あるいは、核局在や MAT2 $\beta$  との相互作用自体が安定化に重要である可能性が考えられた。そ

ここで、前者の可能性については様々な点変異をこの7アミノ酸領域に導入することを試み、1ヶの点変異で核局在がほぼ失われることを見だし、その変異を有するES細胞の作成を進めた。しかし、誘導的にcDNAが置換するシステムを目指したため、様々な技術的ハードルがあり、研究期間内では完成することができなかった。一方、 $\beta$ との相互作用自体が安定性に関わる可能性については、内在性 $\beta$ をノックダウンすると $\alpha$ のタンパク質量が著減することから、ほぼ間違いのないものと考えられた。従って、例えば点変異を導入して核移行を阻害したとしても、それが核における $\alpha$ の機能低下を反映するのか、細胞全体での $\alpha$ の量の低下を反映するのか決定的ではないと予想され、得られる実験結果については慎重に判断する必要がある。

マウス初代Bリンパ球を効率良く試験管内で形質細胞へ分化誘導する系を開発し、MAT2 $\alpha$ のノックダウン実験を行った。その結果、本酵素のノックダウンにより形質細胞分化が激減することを見だし、その形質細胞分化における重要性は確定することができた。

さらに、Bリンパ球における機能を理解するために、試験管内で活性化したマウス初代Bリンパ球より内在性MAT2 $\alpha$ を部分精製し、その複合体組成を質量分析法により調べた。そして、HP1など様々なクロマチン因子やRNA結合因子などと相互作用することを見だした。研究終了後は、これら相互作用因子の機能解明を進めている。

**[3]ヘム-Bach経路とMAT2による鉄代謝の制御:**鉄は生体に必須の金属であり、その体内量は様々な仕組みにより厳密に制御されている。Bach1の下流で制御さ

れる鉄代謝関連遺伝子を探索するために、新しい鉄欠乏モデルマウスを作出した。このモデルでは妊娠マウスに鉄欠乏食を与えることで発生過程から出生後まで鉄欠乏状態を維持する。これにより、Bach1ノックアウトマウスでは鉄欠乏性貧血が重篤化することを見だし、Bach1の鉄代謝における重要性を確定することができた。さらに、鉄芽球でゲノムワイドなDNAメチローム解析を行うことで、Bach1欠損赤芽球では鉄欠乏時にDNAメチル化の低下がおきることも見いだした。遺伝子発現プロファイリングのデータと突合することで、DNAメチル化依存的に制御されるBach1の標的遺伝子を同定することを試みたが、有望なものは見いだすことができなかった。しかし、DNAメチル化とは直接関連しないものの、鉄がマイトファジー系遺伝子の発現調節に関わることを見いだした。赤芽球の分化過程ではマイトファジーが亢進することでミトコンドリアが除去され、ヘモグロビンを満載する赤血球になるとされている。したがって、鉄、あるいは鉄を含むヘムが、赤血球分化のシグナル因子となっている可能性が考えられた。Bach1はグロビン遺伝子の抑制に作用することを考え合わせれば、ヘムは一方でマイトファジーを誘導し、他方ではBach1を不活性化することでグロビンを誘導し、細胞質の成熟(ミトコンドリア除去)とヘモグロビン合成の秩序だった進行を担保するという役割を持つ可能性がある。この制御にMAT2が関与する可能性について、期間内には証明できなかったが、現在、上に述べた遺伝子改変マウスの系を確立し、検証すべく研究を進めている。さらに、Bach2もヘム受容体であること、Bach2はB細胞やT細胞の分化・活性化を制御

することから、鉄やヘムがこれら細胞の応答を調節する可能性も視野に研究を進めている。

#### 4. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計 29 件)

- ① Matsumoto, M., Kondo, K., Shiraki, T. (公募代表), Brydun, A., Funayama, R., Nakayama, K., Yaegashi, N., Katagiri, H. and Igarashi, K.\* Genomewide approaches for BACH1 target genes in mouse embryonic fibroblasts showed BACH1-Pparg pathway in adipogenesis. **Genes Cells** in press (2016) 査読有
- ② Kusakabe, M., Oku, H., Matsuda, R., Hori, T., Muto, A., Igarashi, K., Fukagawa, T. and Harata, M. Genetic complementation analysis showed distinct contributions of the N-terminal tail of H2A.Z to epigenetic regulations. **Genes Cells** 21, 122-135 (2016) 査読有
- ③ Tanimura, N., Miller, E., Igarashi, K., Yang, D., Burstyn, J.N., Dewey, C.N., and Bresnick, E.H. Mechanism governing heme synthesis reveals a GATA factor/heme circuit that controls differentiation. **EMBO Rep.** 17, 249-265 (2016) 査読有
- ④ Dhanasekaran, K., Kumari, S., Boopathi, R., Shima, H., Swaminathan, A., Bachu, M., Ranga, U., Igarashi, K., and Kundu, T.K. Multifunctional human transcriptional coactivator protein PC4 is a substrate of Aurora kinases and activates the Aurora enzymes. **FEBS J.** 283, 968-985 (2016) 査読有
- ⑤ Tanaka, H., Muto, A., Shima, H., Katoh, Y., Sax, N., Tajima, S., Brydun, A., Ikura, T., Yoshizawa, N., Masai, H., Hoshikawa, Y., Noda, T., Nio, M., Ochiai, K. and Igarashi, K.\* Epigenetic regulation of the Blimp-1 gene in B cells involves Bach2 and histone deacetylase 3. **J. Biol. Chem.** 291, 6316-6330 (2016) (国際雑誌査読あり)
- ⑥ Ando, R., Shima, H., Tamahara, T., Sato, Y., Watanabe-Matsui, M., Kato, H., Sax, N., Motohashi, H. (計画代表), Taguchi, K., Yamamoto, M., Nio, M., Maeda, T., Ochiai, K., Muto, A., and Igarashi, K.\* The transcription factor Bach2 is phosphorylated at multiple sites in murine B cells but a single site prevents its nuclear localization. **J. Biol. Chem.** 291, 1826-1840 (2016) 査読有
- ⑦ Sekine, H., Okazaki, K., Ota, N., Shima, H., Katoh, Y., Suzuki, N., Igarashi, K. (計画代表), Ito, M., Motohashi, H.\* (計画代表), and Yamamoto, M. The Mediator Subunit MED16 Transduces NRF2-activating Signals into Antioxidant Gene Expression. **Mol. Cell. Biol.** 36, 407-420 (2015) 査読有
- ⑧ Stees, J.R., Hossain, M.A., Sunose, T., Kudo, Y., Pardo, C.E., Nabils, N.H., Darst, R.P., Poudyal, R., Igarashi, K., Huang, S., Kladd, M.P., and Bungert, J. High Fractional Occupancy of a Tandem MARE and its Role in Long-Range  $\beta$ -globin Gene Regulation. **Mol. Cell. Biol.** 36, 238-250 (2015) 査読有
- ⑨ Watanabe-Matsui, M., Matsumoto, T., Matsui, T., Ikeda-Saito, M., Muto, A., Murayama, K., and Igarashi, K.\* Heme binds to an intrinsically disordered region of Bach2 and alters its conformation. **Arch Biochem Biophys.** 565, 25-31 (2015) 査読有
- ⑩ Jang, K.J., Mano, H., Aoki, K., Hayashi, T., Muto, A., Nambu, Y., Takahashi, K., Itoh, K., Taketani, S., Nutt, S.L., Igarashi, K., Shimizu, A., and Sugai M. Mitochondrial function provides instructive signals for activation-induced B-cell fates. **Nature Commun.** 6, 6750. (2015) 査読有
- ⑪ Igarashi, K. and Watanabe-Matsui, M. Wearing red for signaling: the heme-Bach axis in heme metabolism, oxidative stress response and iron immunology. **Tohoku J. Exp. Med.** 232, 229-253 (2014) 査読有
- ⑫ Igarashi, K., Ochiai, K., Itoh-Nakadai, A. and Muto, A. Orchestration of plasma cell differentiation by Bach2 and its gene regulatory network. **Immunol. Rev.** 261, 116-125 (2014) 査読有
- ⑬ Itoh-Nakadai, A., Hikota, R., Muto, A., Kometani, K., Matsui-Watanabe, M., Sato, Y., Kobayashi, M., Nakamura, A., Miura, Y., Yano, Y., Tashiro, S., Sun, J., Ikawa, T., Ochiai, K., Kurosaki, T. and Igarashi, K.\* The transcription repressors Bach2 and Bach1 promote B cell development by repressing myeloid program. **Nature Immunol.** 15, 1171-1180 (2014) 査読有

- ⑭ Xu, N., Tochio, N., Wang, J., Tamari, Y., Uewaki, J., Utsunomiya-Tate, N., **Igarashi, K., Shiraki, T.** (公募代表), Kobayashi, N. and Tate S. The C113D mutation in human Pin1 causes allosteric structural changes in the phosphate binding pocket of the PPIase domain through the tug of war in the dual-histidine motif. *Biochemistry* 53, 5568-5578 (2014). (国際雑誌査読あり) (生物物理学/分子生物学)
- ⑮ Ota K, Brydun A, Itoh-Nakadai A, Sun J, **Igarashi K.\*** Bach1 deficiency and accompanying overexpression of heme oxygenase-1 do not influence aging or tumorigenesis in mice. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, 757901 (2014) 査読有
- ⑯ Motoike, I.N., Matsumoto, M., Danjoh, I., Katsuoka, F., Kojima, K., Nariai, N., Sato, Y., Yamaguchi-Kabata, Y., Ito, S., Kudo, H., Nishijima, I., Nishikawa, S., Pan, X., Saito, R., Saito, S., Saito, T., Shirota, M., Tsuda, K., Yokozawa, J., **Igarashi, K.**, Minegishi, N., Tanabe, O., Fuse, N., Nagasaki, M., Kinoshita, K., Yasuda, J., Yamamoto, M. Validation of multiple single nucleotide variation calls by additional exome analysis with a semiconductor sequencer to supplement data of whole-genome sequencing of a human population. *BMC Genomics* 15, 673 (2014) 査読有
- ⑰ Hada, H., **Shiraki, T.** (公募代表), Watanabe-Matsui, M., and **Igarashi, K.** Hemopexin-dependent heme uptake via endocytosis regulates the Bach1 transcription repressor and heme oxygenase gene activation. *Biochem. Biophys. Acta.* 1840, 2351-2360 (2014). 査読有
- ⑱ Ichikawa, S., Fukuhara, N., Katsushima, H., Takahashi, T., Yamamoto, J., Yokoyama, H., Sasaki, O., Fukuhara, O., Nomura, J., Ishizawa, K., Ichinohasama, R., Muto, A., **Igarashi, K.**, and Harigae, H. Association between BACH2 expression and clinical prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci.* 105, 437-444 (2014). 査読有
- ⑲ Haldar, M., Kohyama, M., So, A.Y., Kc, W., Wu, X., Briseño, C.G., Satpathy, A.T., Kretzer, N.M., Arase, H., Rajasekaran, N.S., Wang, L., Egawa, T., **Igarashi, K.**, Baltimore, D., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. Heme-Mediated SPI-C Induction Promotes Monocyte Differentiation into Iron-Recycling Macrophages. *Cell* 156, 1223-1234 (2014). 査読有
- ⑳ Shima, H., Suzuki, H., Sun, J., Kono, K., Shi, L., Kinomura, A., Horikoshi, Y., Ikura, T., Ikura, M., Kanaar, R., **Igarashi, K.**, Saitoh, H., Kurumizaka, H., and Tashiro S. Activation of the SUMO modification system is required for the accumulation of RAD51 at sites containing DNA damage. *J Cell Sci.* 126, 5284-5292 (2013). 査読有
- ㉑ Nakamura, A., Shibuya, R. E., Itoh-Nakadai, A., Muto, A., Shima, H., Saigusa, D., Aoki, J., Ebina, M., Nukiwa, T. and **Igarashi, K.\*** The transcription repressor Bach2 is required for pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage function. *J. Exp. Med.* 210, 2191-2204 (2013). 査読有
- ㉒ Okita, Y., Kamoshida, A., Suzuki, H., Itoh, K., **Motohashi, H.** (計画班), **Igarashi, K.**, Yamamoto, M., Ogami, T., Koinuma, D., and **Kato, M.** (公募班) Transforming Growth Factor- $\beta$  Induces transcription factors MafK and Bach1 to Suppress Expression of the Heme Oxygenase-1 Gene. *J. Biol. Chem.* 288, 20658-20677 (2013). 査読有
- ㉓ Tsukumo, S., Unno, M., Muto, A., Takeuchi, A., Kometani, K., Kurosaki, T., **Igarashi, K.** and Saito, T. Bach2 maintains T cells in a naïve state by suppressing effector memory-related genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 10735-10740 (2013). 査読有
- ㉔ Swaminathan, S., Huang, C., Geng, H., Chen, Z., Harvey, R., Kang, H., Ng, C., Titz, B., Hurtz, C., Sadiyah, M. F., Nowak, D., Thoennissen, G. B., Rand, V., Graeber, T. G., Koeffler, H. P., Carrooll, W. L. Willman, C. L., Hall, A. G., **Igarashi, K.**, Melnick, A. and Muschen, M. BACH2 mediates negative selection and p53-dependent tumor suppression at the pre-B cell receptor checkpoint. *Nature Med.*, 19, 1014-1022 (2013) 査読有
- ㉕ Roychoudhuri, R., Hirahara, K., Mousavi, K., Clever, D., Klebanoff, C. A., Bonelli, M., Sciume, G., Zare, H., Vahedi, G., Dema, B., Yu, Z., Liu, H., Takahashi, H., Rao, M., Muranski, P., Crompton, J. G., Punkosdy, G., Bedognetti, D., Wand, E., Hoffmann, V., Rivera, J., Marinocola, F. M. Nakamura, A., Sartorelli, V., Kanno,

- Y., Gattinoni, L., Muto, A., **Igarashi, K.**, O'Shea, J. J., and Restifo, N. P. Bach2 represses effector programmes to stabilize Treg-mediated immune homeostasis. *Nature*, 498, 506-510 (2013) 査読有
- ②⑥ Ohbayashi, N., Matsumoto, T., Shima, H., Goto, M., Watanabe, K., Yamano, A., Katoh, Y., **Igarashi, K.**, Yamagata, Y., and Murayama, K. Solution structure of clostridial collagenase H and its calcium-dependent global conformation change. *Biophys. J.* 104, 1538-1545 (2013) 査読有
- ②⑦ Kera, Y., Katoh, Y., Ohta, M., Matsumoto, M., Takano-Yamamoto, T. and **Igarashi, K.\*** Methionine adenosyltransferase II-dependent histone H3K9 methylation at the COX-2 gene locus. *J. Biol. Chem.* 288, 12592-13601 (2013). 査読有
- ②⑧ Nakanome, A., Brydun, A., Matsumoto, M., Ota, K., Funayama, R., Nakayama, K., Ono, M., Shiga, K., Kobayashi, T., and **Igarashi, K.\*** Bach1 is critical for the transformation of mouse embryonic fibroblasts by Ras(V12) and maintains ERK signaling. *Oncogene*, 32, 3231-3245 (2013) 査読有
- ②⑨ **Igarashi, K.** and Katoh, Y. Metabolic aspects of epigenome: coupling of S-adenosylmethionine synthesis and gene regulation on chromatin by SAMIT module. *Subcell. Biochem.* 61, 105-118 (2012). 査読有
- 〔学会発表等〕(研究代表者の招待講演)  
(計 42 件)
- ① **K. Igarashi**, “Regulatory mechanisms and biological significance of the local production of S-adenosylmethionine for local consumption in nuclei” 11th Asian Epigenomics Meeting, Sep 30 - Oct 1, 2016, JNCASR, Bangalore.
- ② **K. Igarashi**, “Heme regulates protein interaction of Bach2 by binding to its intrinsically disordered region” 9th International Conference on Heme Oxygenase, Sept 14-17, 2016, Prague
- ③ **五十嵐和彦**, “Inner myeloid の遺伝子制御ネットワークとその環境応答機構” 日本生化学会大会シンポジウム「細胞外環境を転写とエピゲノムへ統合する分子機構」(2016年9月26日 宮城県仙台市 仙台国際センター)
- ④ **五十嵐和彦** “代謝経路とエピジェネティクス制御系のクロストークとストレス応答” 第 57 回日本心身医学会総会 特別講演 (仙台国際センター 2016年6月5日)
- ⑤ **五十嵐和彦** “S-アデノシルメチオン (SAM) の地産地消機構とその意義” 第 34 年会日本生化学会北陸支部大会シンポジウム「転写産物のダイナミクスとそこからかきま見る生命像」金沢大学 (2016年5月28日)
- ⑥ **五十嵐和彦** S-アデノシルメチオン (SAM) の地産地消機構とその意義 日本薬学会第 136 年会シンポジウム「メタボライトとエピゲノム」招待講演 (2016年3月28日 横浜市)
- ⑦ **五十嵐和彦** S-アデノシルメチオン地産地消機構 ver2 ～クロマチンと RNA の制御～ 京都大学放射線生物研究センター 招待講演 (2016年3月4日 京都市)
- ⑧ **K. Igarashi** “Local synthesis of S-adenosylmethionine for local consumption, version 2: methylation of chromatin and beyond” International Symposium on Transcription and Metabolism. Invited Talk (2016年2月17日 東京大学)
- ⑨ **五十嵐和彦** 細胞分化・応答を制御する遺伝子制御ネットワーク ～肝臓と B リンパ球へのアプローチ～ 第 28 回がん・エピゲノム研究会 特別講演 (2016年1月27日 仙台市)
- ⑩ **Kazuhiko Igarashi** “Local production of S-adenosylmethionine (SAM) for local consumption to promote and to regulate methylation of chromatin and beyond.” ワークショップ”Collaborative regulatory mechanism between cell differentiation and gene expression in eukaryotic cells” (2015年12月1日 神戸市)
- ⑪ **五十嵐和彦** S-アデノシルメチオン (SAM) の核内産生機構とそのエピゲノム制御における役割 第 26 回フォーラム・イン・ドージン代謝システムと遺伝子発現制御～意外な縁～特別講演 (2015年11月13日 熊本市)
- ⑫ **五十嵐和彦** S-アデノシルメチオン合成酵素のクロマチン RNA 制御における機能&肝再生におけるクロマチン転写ネットワーク 長崎医学会招待講演 (2015年9月18日)

- 諫早)
- ⑬ K. Igarashi, Identification of B lymphoid cell gene regulatory network and its therapeutic application. The 2<sup>nd</sup> Japan-Russia Medical Joint Seminar, Sendai, Japan, March 5, 2015.
- ⑭ Kazuhiko Igarashi, Local synthesis of S-adenosylmethionine for local consumption: how metabolism is coupled with epigenomic regulation. 5<sup>th</sup> Meeting of the Asian Forum of Chromosome and Chromatin Biology, Bangalore, India, Jan 14-18, 2015 (Invited Talk)
- ⑮ Kazuhiko Igarashi, Synthesis of S-adenosylmethionine in nuclei for epigenetic regulation. National Institute of Immunology, New Delhi, India, Jan 20, 2015 (Special Lecture)
- ⑯ Kazuhiko Igarashi, Synthesis of S-adenosylmethionine in nuclei for epigenetic regulation. Institute of Genomics and Integrative Biology, Delhi, India, Jan 22, 2015 (Special Lecture)
- ⑰ Kazuhiko Igarashi, Synthesis of S-adenosylmethionine in nuclei for epigenetic regulation. National Center of Cell Sciences, Pune, India, Jan 23, 2015 (Special Lecture)
- ⑱ K. Igarashi, The function of methionine adenosyltransferase 2 in plasma cell differentiation. 日本分子生物学会シンポジウム「代謝とエピジェネティクスの分子交差点」(2014年11月26日 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜)
- ⑲ K. Igarashi, Regulation of acquired and innate immune cells development by Bach transcription factors. NIH-Japan-JSPS Symposium “Highlights from the frontier biomedical sciences from NIH and Japan”, Oct 23-24, 2014, Bethesda, USA.
- ⑳ 五十嵐和彦, The heme-Bach1 pathway regulates the adaptive erythropoiesis under iron deficiency. 第87回日本生化学会大会シンポジウム「鉄生化学の新しい潮流」(2014年10月16日、京都)
- ㉑ 五十嵐和彦, 代謝酵素核内複合体が仲介する代謝とエピゲノムの相互作用 新学術領域「性差構築の分子基盤」領域班会議 特別招待講演 (2014年10月9日、浜松)
- ㉒ 五十嵐和彦, 核内メチル化反応における地産地消機構とヘム 国際高等研プロジェクト「生命活動を生体高分子への修飾から俯瞰する」(2014年9月9日 京都)
- ㉓ 五十嵐和彦, ヘム-Bach1経路による遺伝子発現調節と鉄欠乏への適応 鉄バイオサイエンス学会 特別講演 (2014年9月7日 仙台)
- ㉔ 五十嵐和彦, Bリンパ球初期分化における遺伝子発現プログラムの分離機構 京都大学放射線生物研究センター 特別セミナー (2014年8月29日 京都)
- ㉕ 五十嵐和彦, SAM合成酵素の核内局在によるエピゲノムの制御 第二回がん代謝研究会 特別講演 (2014年7月10日 東京理科大学)
- ㉖ K. Igarashi, Regulation of B and myeloid cells development by the transcription factors Bach1 and Bach2. Washington University at St. Louis, Department of Pathology Seminar, May 21, 2014
- ㉗ 五十嵐和彦, 落合恭子、加藤恭丈、武藤哲彦 国際高等研究所クロマチンデコーディング集会 “転写因子によるB細胞-形質細胞分化調節ネットワーク” (2014年3月29日、京都)
- ㉘ K. Igarashi, 17<sup>th</sup> Chromatin Assembly Meeting, “Nuclear localization of methionine adenosyltransferase II and its function in B cell response.” Bangalore, March 17-18, 2014
- ㉙ International Symposium on Transcription and Metabolism “Regulation of B cell activation and differentiation by methionine adenosyltransferase II Kazuhiko Igarashi (2013年 11月 淡路島)
- ㉚ 日本人類遺伝学会 (特別講演) “転写因子-エピゲノムネットワークによる遺伝情報のプログラミング” 五十嵐和彦 (2013年11月 仙台)
- ㉛ 京都大学放生研セミナー “The heme-Bach1 axis orchestrates the adaptive gene responses during iron-deficient anemia.” 五十嵐和彦 (2013年7月 京都)
- ㉜ NIH/NCI “Regulation of B and myeloid cells development by the transcription repressors Bach1 and Bach2” K. Igarashi (2013年6月, NIH, Bethesda, USA)
- ㉝ 高知大学医学部大学院セミナー “エピゲノム制御における地産地消機構をS-アデノシルメチオニン合成酵素から考える” 五十嵐和彦 (2013年3月 高知)

- ③④ 広島大学原爆放射線医科学研究所セミナー“エピゲノム制御における産地消機構”五十嵐和彦 (2013年3月 広島)
- ③⑤ Jawaharlal Nehru Center for Advanced Scientific Research. (Invited lecture) “Reconfiguration of gene expression in iron-deficiency anemia by the heme-Bach1 axis.” K. Igarashi (2013.3.20 India)
- ③⑥ THE FIRST JAPAN-RUSSIA MEDICAL FORUM, Moscow State University (Invited Talk) “Understanding disease processes based on transcription factor networks.” K. Igarashi (2012年12月)
- ③⑦ Joint JSPS –Karolinska Institute (KI) Symposium (Invited talk) “Heme as a signaling molecule for globin gene regulation and iron homeostasis.” M.Kobayashi., A.Muto., H.Harigae., K.Igarashi. (2012年10月 Stockholm)
- ③⑧ 第3回 Molecular Cardiovascular Conference II“酸化ストレス応答のエピゲノム制御”五十嵐和彦 (2012年9月 小樽)
- ③⑨ 第39回日本毒性学会学術年会シンポジウム「エピジェネティクスから捉えた毒作用発現」 “ストレス応答性遺伝子発現におけるS-アデノシルメチオニン合成酵素の核内機能”五十嵐和彦 (2012年7月 仙台)
- ④⑩ 7th International Congress on Heme Oxygenase and Related enzymes (Invited talk) “Heme as an intercellular messenger for gene regulation.” K.Igarashi. (2012.5.28-31Edinburgh, Scotland)
- ④⑪ Stowers Institute “Nuclear Function of Methionine Adenosyltransferase in Gene Regulation Histone Methylation.” K.Igarashi. (2012年2月 Kansan City)
- ④⑫ Genetech “Regulation of B cell development and macrophage function by Bach2.” K.Igarashi. (2012年2月)

〔図書〕 (計1件)

- ① 五十嵐和彦、深水昭吉、山本雅之監訳 遺伝情報の発現制御 MEDSi (2012)

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

出願状況：2件

- ①発明の名称：免疫沈降用の内部標準分子及び免疫沈降方法  
出願番号：特願 2015-035734  
出願日：2015/02/25  
出願人：東北大学  
発明者：五十嵐和彦；落合恭子；中山啓子；木下賢吾；舟山亮；細金正樹；岡村容伸
- ②発明の名称：抗リン酸化 Bach2 抗体及び抗腫瘍免疫活性化剤のスクリーニング方法  
出願番号：特願 2015-219945  
出願日：2015/11/09  
出願人：東北大学  
発明者：五十嵐和彦；武藤哲彦；落合恭子；島弘季；安藤亮；佐藤好宏；玉原亨；佐藤勇樹

〔その他〕 ホームページ等

研究室ホームページ

<http://www.biochem.med.tohoku.ac.jp/>

5. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐和彦 (IGARASHI, Kazuhiko)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：00250738

研究課題名：転写環境の構築とアミノ酸代謝のクロストーク制御  
Crosstalk of transcriptional status and amino acid metabolism

研究期間：2011～2015

課題番号：23116004

研究代表者 深水昭吉（筑波大学 生命環境系 教授）

研究分担者 高橋秀和（山口大学 医学系研究科 講師）

連携研究者 大徳浩照（筑波大学 生命環境系 講師）

連携研究者 廣田恵子（筑波大学 生命環境系 助教）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	33,800,000	10,140,000	43,940,000
2012年度	29,800,000	8,940,000	38,740,000
2013年度	30,100,000	9,030,000	39,130,000
2014年度	25,390,000	7,617,000	33,007,000
2015年度	25,390,000	7,617,000	33,007,000
総計	144,480,000	43,344,000	187,824,000

**研究成果の概要：**メチル化反応のメチル基供与体である *S*-アデノシルメチオニン (SAM) は、メチオニン代謝回路で産生される。本研究は、メチオニン代謝と転写環境のメチル化修飾のクロストークを解明することを目的とした。まず、生体内のメチオニンや SAM を高感度に検出する測定系を確立した。また、モデル動物として線虫を用いることで、食餌中のメチオニンが SAM に代謝されてヒストンのメチル化に影響することや、SAM を大量に消費するリン脂質合成酵素の 1 つが寿命の調節に関わることを明らかにした。

1. 研究の背景

摂食の有無や食餌中の栄養成分は、代謝シグナルとして内分泌経路、細胞内情報伝達経路を介して受容され、リン酸化やアセチル化、メチル化などの翻訳後修飾としてタンパク質に刻印される。とりわけヒストンや転写制御因子の翻訳後修飾による機能調節は、転写環境をダイナミックに変化させることで、生体恒常性の維持に寄与している。我々はこれまで、転写因子 FOXO1 がリン酸化、アセチル化、ユビキチン化、メチル化などの多重修飾によって多層的に制御されていることを見出してきたが (PNAS 2003, 2004,

2005, 2011; *Mol. Cell* 2008; *PNAS* 2011; *Cell Metab.* 2011)、一方で修飾酵素側の活性調節メカニズムについては不明な点が多く残されていた。こうした背景の下、我々は酵素による基質の修飾反応には、両者の量的関係に加えて、反応に関わる修飾基供与体や補酵素の存在が必須であること、またそれらの生成量は細胞内の普遍的な代謝反応経路によって規定されていることに着目した。すなわち、リン酸化反応における ATP やアセチル化反応のアセチル CoA、脱メチル化反応における  $\alpha$ -ケトグルタル酸のように、修飾反応のコファクターの多くが、糖やアミノ

酸からの代謝物であるという一面を持っており (図 1)、この概念は、世界的にも注目され始めていた。

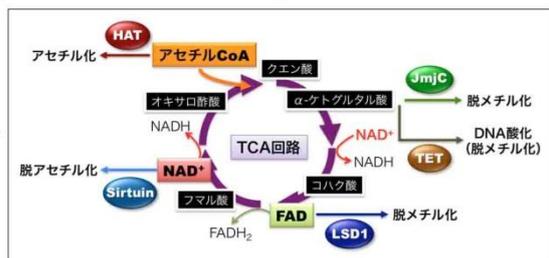


図 1 代謝と転写修飾酵素のネットワーク

## 2. 研究の目的

本計画研究で我々は、代謝と転写環境をつなぐ分子の1つとして、メチル化修飾反応のメチル基供与体である SAM に着目した (図 2)。SAM は生体内において、必須アミノ酸であるメチオニンと ATP から SAM 合成酵素 (線虫では SAMS [SAM synthase]) を介して生成されることから、「食餌・栄養の摂取」や「メチオニン代謝サイクル」が SAM 量を規定する律速段階であると予想される。この可能性を最もシンプルな多細胞モデル動物である線虫 *C. elegans* を用いて検証するとともに、SAM 量の変動がメチル化修飾を介して転写環境、さらには個体機能に与える影響についても解析を進める。このように本計画研究では、SAM を起点として代謝反応と転写環境を一体として捉えることで、メチオニン代謝と転写環境構築のクロストーク制御機構の解明を目指した。

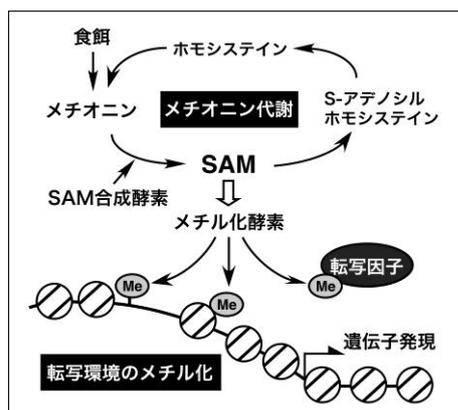


図 2 メチオニン代謝と転写環境のメチル化制御

## 3. 研究成果

### (1) メチオニン (Met) および S-アデノシルメチオニン (SAM) 定量系の確立

① 従来 Met 分析の検出には、他のアミノ酸同様ニンヒドリンによる発色が用いられてきたが、線虫体内の微量な Met を検出するには感度が低いという問題があった。そこでニンヒドリンに比べ、1,000 倍以上の感度を有する蛍光検出系の確立を試み、6-aminoquinolyl carbamyl (AQC) 基で蛍光標識することにより、線虫抽出物中の AQC-Met を HPLC にて分離・検出することに成功した。なお当該ピークは、MALDI-QIT-TOF/MS にて分子量を確認し、Met を検出できていることを確認している。

② SAM は Met 同様  $\alpha$ -アミノ基を有することから、最初に AQC 化を試みたが、HPLC クロマトグラム上にピークが検出されず、質量分析でも AQC-SAM の分子量に対応するイオンは検出されなかった。そこで新たにグラファイトカラムを用いた LC-MS/MS による直接分析を試みた。SAM の熱不安定性を考慮し、サンプルや標準品のハンドリングは常に  $10^{\circ}\text{C}$  以下で行うよう留意した。また化学的性質が SAM と全く同等の  $d\beta$ -SAM (SAM のメ

チル基の水素原子を重水素に置換した安定同位体)を定量の際の内部標準に採用することで、分析の定量性を担保した。さらに、SAM 自体のイオンの検出感度では、細胞や線虫に微量に存在する SAM を検出するには不十分だったため、multiple reaction monitoring を行った。その結果、フラグメントイオンとして生じるアデニンイオンが高感度に検出されたことから、この方法をもって SAM の定量系とした。

## (2) SAM 生合成系と食餌中 Met のメチル化修飾への影響

① *sams-1* 遺伝子を RNAi した線虫体内の SAM 量を定量した結果、コントロールに比べて顕著な減少が認められた。この結果は *sams-1* が線虫の SAM 量を規定する律速酵素であることを示すと同時に、*sams-1* 遺伝子の転写調節が SAM 合成と密接に相関することを示唆している。そこで我々は、*sams-1* の発現を制御する転写因子を探索するため、*sams-1* のプロモーター配列を GFP に連結したレポーター遺伝子を線虫に導入し、約 600 の転写因子 RNAi ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。その結果、*sams-1* 遺伝子の発現を制御する 2 つの転写因子を同定した。

② Met を制限した合成培地で線虫を 1 週間飼育したところ、線虫体内の SAM 量は Met 含有培地と比較して約 70% 減少した。この条件下で飼育した線虫からヒストンを抽出し、WB にてリジン残基のメチル化を検出したところ、H3K9me3 では有意な変化は見られなかったのに対し、H3K4me3 および H3K36me3 でメチル化の減弱が認められた。一方、Met 制限培地に SAM を添

加することで、H3 のリジンメチル化レベルは Met 含有培地と同程度まで回復した。これらの結果は、食餌中の Met が生体内の SAM 量を規定し、転写活性化のマークである H3K4 および K36 のメチル化レベルと正に相関することを示唆している。

## (3) SAM 消費経路の探索

① 生体内の SAM 量は、SAM 合成系のみならず、SAM 消費系とのバランスによって規定されると考えられる。そこで我々は、線虫において最も多く SAM を消費するメチル基転移酵素を、RNAi スクリーニング法で探索した。約 200 のメチル基転移酵素ライブラリーのすべてをノックダウンして線虫体内の SAM 量を測定した結果、エタノールアミンをメチル化する酵素のひとつである *pmt-1* が、SAM を最も多く消費する因子として同定された。*pmt-1* はフォスファチジルコリン (PC) の生合成経路の律速酵素であり、PC は細胞膜の主な構成成分であることから、生体内の SAM 量は細胞膜のダイナミックな挙動 (分裂や運動、小胞形成など) と相関する可能性が考えられた。

② *pmt-1* が実際に線虫体内の SAM の主要な消費酵素であるのかを検証するため、*pmt-1* 遺伝子を導入したトランスジェニック (Tg) 線虫を樹立し、SAM 量を測定した。その結果、予想通り *pmt-1* の過剰発現によって、野生型に比べて SAM 量が約 20% 低下していた。

③ アルギニンメチル化酵素ファミリーでは、脳特異的なノックアウトマウスの解析から、PRMT1 がグリア細胞の分化に必要であることを示した。また、PRMT1 とアミノ酸配列で 83% の相同性を有してい

る脳特異的 PRMT8 の解析に着手した。高い相同性にも関わらず、X線結晶解析から PRMT1 と PRMT8 は構造的に大きく異なることが判明した。さらに、モデル生物 (線虫・ゼブラフィッシュ・マウス) を用いた検証の結果、PRMT8 がホスホリパーゼ活性を有することを見出し、脳におけるリン脂質代謝の維持に必須であることを明らかにした。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[論文-英文総説含む] (計 15 件)

- ① Sha L, Daitoku H, Araoi S, Kaneko Y, Takahashi Y, Kako K, and Fukamizu A. Asymmetric arginine dimethylation modulates mitochondrial energy metabolism and homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. **Mol. Cell. Biol.** pii: MCB.00504-16 (2017) 査読有 (掲載号の Spotlight に選定)
- ② Hirota K, Shigekawa C, Araoi S, Sha L, Inagawa T, Kanou A, Kako K, Daitoku H, and Fukamizu A. Simultaneous ablation of *prmt-1* and *prmt-5* abolishes asymmetric and symmetric arginine dimethylations in *Caenorhabditis elegans*. **J. BioChem.** 161, 521-527 doi: 10.1093/jb/mvw101. (2017) 査読有
- ③ Kanou A, Kako K, Hirota K, and Fukamizu A. PRMT-5 converts monomethylarginines into symmetrical dimethylarginines in *Caenorhabditis elegans*. **J. BioChem.** 161, 231-235 (2017) 査読有
- ④ Daitoku H, Kaneko Y, Yoshimochi K, Matsumoto K, Araoi S, Sakamaki J, Takahashi Y, and Fukamizu A. Non-transcriptional function of FOXO1/DAF-16 contributes to translesion DNA synthesis. **Mol. Cell. Biol.** 36, 2755-2766 (2016) 査読有 (掲載号の Spotlight に選定)
- ⑤ Kaneko Y, Daitoku H, Komeno C, and Fukamizu A. CTF18 interacts with replication protein A in response to replication stress. **Mol. Med. Rep.** 14, 367-372 (2016) 査読有
- ⑥ Waku T, Nakajima Y, Yokoyama W, Nomura N, Kako K, Kobayashi A, Shimizu T, and Fukamizu A. NML-mediated rRNA base methylation links ribosomal subunit formation to cell proliferation in a p53-dependent manner. **J. Cell Sci.** 129, 2382-2393 (2016) 査読有 (掲載号の IN THIS ISSUE に選定)
- ⑦ Toma-Fukai S, Kim JD, Park KE, Kuwabara N, Shimizu N, Krayukuhina E, Uchiyama S, Fukamizu A, and Shimizu T. Novel helical assembly in arginine methyltransferase 8. **J. Mol. Biol.** 428, 1197-1208 (2016) 査読有
- ⑧ Hashimoto M, Murata K, Ishida J, Kanou A, Kasuya Y, and Fukamizu A. Severe hypomyelination and developmental defects are caused in mice lacking protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) in the central nervous system. **J. Biol. Chem.** 291, 2237-2245 (2016) 査読有
- ⑨ Kim JD, Park KE, Ishida J, Kako K, Hamada J, Kani S, Takeuchi M, Namiki K, Fukui H, Fukuhara S, Hibi M, Kobayashi M, Kanaho Y, Kasuya Y, Mochizuki N, and Fukamizu A. PRMT8 as a phospholipase regulates Purkinje cell dendritic arborization and motor coordination. **Science Adv.** 1, e1500615 (2015) 査読有
- ⑩ Hasegawa M, Toma-Fukai S, Kim JD, Fukamizu A, and Shimizu T. Protein arginine methyltransferase 7 has a novel homodimer-like structure formed by tandem repeats. **FEBS Lett.** 58, 1042-1048 (2014) 査読有
- ⑪ Park KE, Kim JD, Nagashima Y, Kako K, Daitoku H, Matsui M, Park GG, and Fukamizu A. Detection of choline and phosphatidic acid (PA) catalyzed by Phospholipase D (PLD) using MALDI-QIT-TOF/MS with 9-aminoacridine matrix. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 78, 981-988 (2014) 査読有
- ⑫ Tamiya H, Hirota K, Takahashi Y, Daitoku H, Kaneko Y, Sakuta G, Iizuka K, Watanabe S, Ishii N, and Fukamizu A. Conserved SAMS function in regulating egg-laying in *C. elegans*. **J. Recept. Signal Transduct.** 33, 56-62 (2013) 査読有
- ⑬ Nagashima Y, Kako K, Kim JD, and Fukamizu A. Enhanced histamine production through the induction of histidine decarboxylase expression by phorbol ester in Jurkat cells. **Mol. Med. Rep.** 6, 944-948 (2012) 査読有
- ⑭ Ozcan L, Wong CC, Li G, Xu T, Pajvani U, Park SK, Wronska A, Chen BX, Marks AR, Fukamizu A, Backs J, Singer HA, Yates JR 3rd, Accili D, and Tabas I.

Calcium signaling through CaMKII regulates hepatic glucose production in fasting and obesity. **Cell Metab.** 15, 739-751 (2012) 査読有

- ⑮ Takahashi H, Sun X, Hamamoto M, Yashiroda Y, and Yoshida M. The SAGA histone acetyltransferase complex regulates leucine uptake through the Agp3 permease in fission yeast. **J. Biol. Chem.** 287, 38158-38167 (2012) 査読有

〔学会発表等〕(研究代表者の招待講演)  
(計 32 件)

- ① 深水昭吉、アルギニンメチル化酵素の特性解析 -PRMT1 と PRMT8-、第 33 回染色体ワークショップ・第 14 回核ダイナミクス研究会合同開催、平成 28 年 1 月 12 日、松島一の坊、宮城県仙台市
- ② 深水昭吉、メチル化細胞生物学：小さな修飾、大きな作用、Advans 研究会 2015、平成 27 年 12 月 12 日、ホテルグランドパレス、東京都
- ③ 深水昭吉、代謝調節と遺伝子発現に関する研究、CVMW2015、平成 27 年 12 月 11 日、神戸国際会議場、兵庫県神戸市
- ④ 深水昭吉、メチル化の医科学：小さな修飾、大きな作用、Research PlaNet2015、平成 27 年 6 月 20 日、梅田スカイビルタワーウエスト、大阪府大阪市
- ⑤ 深水昭吉、Methylation related to transcription and metabolism. 第 37 回日本基礎老化学会大会、平成 26 年 6 月 27 日、あいち健康プラザ、愛知県知多郡
- ⑥ 深水昭吉、転写代謝システム：遺伝子発現とエネルギー分子のクロストーク、第 88 回日本内分泌学会学術総会、平成 26 年 4 月 25 日、ホテルニューオータニ東京、東京都
- ⑦ 深水昭吉、エピゲノムと代謝、第 87 回日本内分泌学会学術総会、平成 26 年 4 月 24 日、福岡国際会議場、福岡県福岡市
- ⑧ 深水昭吉、糖代謝とエピゲノム：リン酸化とメチル化の新展開、第 15 回分子内分泌代謝学セミナー、平成 26 年 2 月 17 日、ホテル東京ガーデンパレス、東京都
- ⑨ 深水昭吉、メチル化反応と代謝機能の新しい接点、第 19 回アンジオテンシンカンファレンス、平成 26 年 2 月 1 日、千里ライフサイエンスセンター、大阪府豊中市
- ⑩ 深水昭吉、Interface of methylation and metabolites. 第 2 回 IRG

(inflammation and regeneration) Meeting、平成 26 年 1 月 17 日、品川プリンスホテル、東京都

- ⑪ Fukamizu A. Crosstalk between Transcription and Metabolism. THE 4D NUCLEOME 2014、平成 25 年 12 月 17 日、安芸グランドホテル、広島県廿日市市
- ⑫ 深水昭吉、メチル化の作用点と機能、第 32 回染色体ワークショップ・第 13 回核ダイナミクス研究会合同開催、平成 25 年 12 月 17 日、安芸グランドホテル、広島県廿日市市
- ⑬ 深水昭吉、エピゲノムによる生体機能調節、第 18 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、平成 25 年 11 月 22 日、横浜市開港記念会館、神奈川県横浜市
- ⑭ Fukamizu A. メチル化制御と遺伝子発現、第 12 回 RCGM フロンティア国際シンポジウム、平成 25 年 10 月 31 日、埼玉医科大学日高キャンパス、埼玉県日高市
- ⑮ 深水昭吉、メチオニン代謝と細胞機能のネットワーク、第 383 回東北医学会例会シンポジウム、平成 25 年 11 月 19 日、東北大学長陵会館、宮城県仙台市
- ⑯ Fukamizu A. Stress responses and arginine methylation in *C. elegans*. International Symposium on Cellular Responses to Stress, 平成 25 年 4 月 3 日、北京大学医学部、北京市、中国
- ⑰ 深水昭吉、加香孝一郎、アルギニンメチル化の化学特性とシグナル機能、蛋白研セミナー「シグナル伝達と解析技術のあらたな潮流」、平成 25 年 3 月 5 日、大阪大学蛋白質研究所、大阪府吹田市
- ⑱ 深水昭吉、A role for SAM synthetase in methionine cycle of *C. elegans*. 第 85 回日本生化学会大会、平成 24 年 12 月 15 日、福岡国際会議場、福岡県福岡市
- ⑲ Fukamizu A. Arginine methylation and lifespan control in *C. elegans*. AACL-2012 : Korea-Japan Joint Conference on Aging, Metabolism and Neurobiology. 平成 24 年 11 月 23 日、ソウル市立大学、ソウル市、韓国
- ⑳ 深水昭吉、メチル化を介した転写と代謝のクロストーク制御、第 8 回 KAMOGAWA Cardiovascular Conference、平成 24 年 11 月 16 日、京都ブライトンホテル、京都府京都市
- ㉑ 深水昭吉、メチル化サイクルと代謝調節、糖尿病研究センターセミナー、平成 24 年 10 月 29 日、国立国際医療研究センター、東京都新宿区
- ㉒ 深水昭吉、メチル化を介した転写と代謝のクロストーク、病態代謝・血管医

- 学セミナー、平成 24 年 10 月 25 日、熊本大学、熊本県熊本市
- ⑳ 深水昭吉、代謝と寿命を結ぶメチル化制御、第 30 回内分泌代謝学サマーセミナー、平成 24 年 7 月 13 日、福一、群馬県渋川市
- ㉑ 深水昭吉、Methionine metabolism and arginine methylation. 第 33 回内藤カンファレンス、平成 24 年 6 月 28 日、シャトレゼガトーキングダムサッポロ、北海道札幌市
- ㉒ 深水昭吉、インスリンシグナルによる転写調節と寿命の分子遺伝学、第 12 回日本抗加齢医学会総会、平成 24 年 6 月 23 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
- ㉓ Fukamizu A. Lifespan controlled by arginine methylation in *C. elegans*. The 12<sup>th</sup> Asian Conference on Transcription 平成 24 年 6 月 8 日、済州島、韓国
- ㉔ 深水昭吉、エピゲノムマーク・アルギニンメチル化の機能的役割、第 76 回日本生化学会中部支部例会、平成 24 年 5 月 26 日、自然科学研究機構／岡崎コンファレンスセンター、愛知県岡崎市
- ㉕ 深水昭吉、エピゲノムとメタボリックシンドローム、第 85 回日本内分泌学会学術総会、平成 24 年 4 月 20 日、名古屋国際会議場、愛知県名古屋市
- ㉖ 深水昭吉、転写と代謝のクロストーク機能、第 21 回群馬遺伝子診療研究会、平成 24 年 2 月 28 日、群馬大学医学部、群馬県前橋市
- ㉗ 深水昭吉、Regulation of Lifespan in *C. elegans* by Asymmetric Arginine Dimethylation of Forkhead Transcription Factor DAF-16. 34 回日本分子生物学会年会ワークショップ、平成 23 年 12 月 15 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
- ㉘ 深水昭吉、転写と代謝のクロストーク、34 回日本分子生物学会年会バイオテクノロジーセミナー、平成 23 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
- ㉙ 深水昭吉、アルギニンメチル化-リン酸化による寿命制御、第 84 回日本生化学大会、平成 23 年 9 月 22 日、国立京都国際会館、京都府京都市

〔図書〕(計 8 件)

- ① 深水昭吉 基礎老化研究学会、生物学的メチル化を介した寿命と老化、2017、(41) 19-21
- ② 廣田恵子、深水昭吉 羊土社、実験医学増刊 遺伝子制御の新たな主役栄養シグナル、2016、2568-2573
- ③ 大徳浩照、深水昭吉 メディカルビュー社、アンチエイジング医学の基礎と

臨床、2015、52-53

- ④ 金俊達、深水昭吉 羊土社、知る・見る・活かす！シグナリング研究 2015、1543-1547
- ⑤ 波田一誠、深水昭吉 羊土社、老化・寿命のサイエンス、2013、3301-3305
- ⑥ 深水昭吉他、メディカルサイエンスインターナショナル、遺伝情報の発現制御 - 転写機構からエピジェネティクスまで -、2012、429
- ⑦ 高橋悠太、大徳浩照、深水昭吉 羊土社、世代を超えて伝わる代謝エピジェネティクス、2011、2236-2240
- ⑧ 坂巻純一、深水昭吉 医師薬出版、転写因子修飾の新しい展開、2011、617-622

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

〔その他〕ホームページ等

研究室ホームページ

<http://akif2.tara.tsukuba.ac.jp>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

深水昭吉 (FUKAMIZU, Akiyoshi)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：60199172

### (2) 研究分担者

高橋秀和 (TAKAHASHI, Hidekazu)

山口大学・医学系研究科・講師

研究者番号：90450402

### (3) 連携研究者

大徳浩照 (DAITOKU, Hiroaki)

筑波大学・生命環境系・講師

研究者番号：30361314

廣田恵子 (HIROTA, Keiko)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：00375370

研究課題名：エネルギー情報とエピゲノム情報のクロストーク機構の解析  
 Analysis of crosstalk between energy information and  
 epigenome information

研究期間：2011～2013

課題番号：23116005

研究代表者 柳澤 純（筑波大学 生命環境系 教授）

連携研究者 村山明子（筑波大学 生命環境系 講師）

【交付決定額（分配額）】 中途終了(2013年度)（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	16,900,000	5,070,000	21,970,000
2012年度	14,900,000	4,470,000	19,370,000
2013年度	15,000,000	4,500,000	19,500,000
総計	46,800,000	14,040,000	60,840,000

**研究成果の概要：**eNoSC は核小体に存在する新たなタンパク質複合体であり、rRNA 領域のエピゲノム状態を制御することによりエネルギー消費を調節する鍵因子である。我々は、eNoSC の構成因子である NML ノックアウト (KO) マウスを作製し、個体での eNoSC の役割を解析した。NML は肝臓で高発現しており、NML KO マウスでは肝臓での rDNA 領域のエピゲノム状態の変化と rRNA 転写の上昇が観察された。また、NML KO マウスでは全身でのエネルギー消費が亢進しており、高脂肪摂取による体重の増加と白色脂肪細胞の増加が抑制されることを見出した。

### 1. 研究の背景

「生命」が形成されるためには、DNA、RNA、タンパク質、脂質等の生体構成因子に加えて、適切なエネルギーの流れ(エネルギーフロー)が不可欠である。エネルギーフローをする維持ためには、エネルギー産生系と消費系のバランスを保つ「エネルギーの動的平衡システム」が必要であり、このシステムの破たんは、様々な疾患につながる。

我々は、エネルギー制御システムを解明するために、核内の最も大きな構造体である核小体に注目した。核小体では、リボソーム RNA (rRNA) が転写され、プロセッシングを受けたのちにリボソームタンパク質に組み込まれるというプロセスでタンパク質工場であるリボソームが

生合成される。細胞内エネルギーの多くがタンパク質の合成で消費されていることから、核小体でのリボソーム生合成を調節することにより細胞のエネルギー消費を制御できるとの着想に基づき、核小体因子の解析を行った。我々は、rRNA 転写を制御する因子として、核小体に存在する新たなタンパク質複合体 eNoSC を発見した。eNoSC は脱アセチル化酵素 SIRT1、ヒストン H3-K9 メチル化酵素 Suv39、およびそれまで未同定の核小体タンパク質 Nucleomethylin (NML) から構成される。NML はジメチル化されたヒストン H3-K9 残基に特異的に結合する因子の一つとして同定された。また、X 線構造解析から NML のカルボキシ末端のメチル基転移酵素モチーフには S-ア

デノシルメチオニン (SAM) が結合するポケットを持つことを見出した。eNoSC は、細胞のエネルギー状態を感知し、リボソーム DNA (rDNA) 領域のエピゲノム状態の変化を介してリボソーム RNA (rRNA) 転写を制御した。すなわち、低グルコースを含んだ培地で細胞を培養した際に、eNoSC は rDNA に結合して rRNA 転写を低下させることにより、エネルギー消費を抑制した (*Cell* 2009)。さらに、我々は NML がミトコンドリア機能にも影響を与えることを見出している。これらの実験結果から、培養細胞において NML は、エネルギーフローの維持に重要な役割を持っていることが示唆された。

さらに、我々は eNoSC の個体での機能を解析するために、NML 過剰発現マウスと NML ノックアウト (KO) を作製した。NML 過剰発現マウスでの解析はすでに一部進んでおり、NML の過剰発現が部分的肝切除後の肝臓での ATP レベルの上昇を引き起こすことを見出した (*BBRC* 2009)。この結果から、NML が細胞レベルのみならず、個体レベルでのエネルギーフローの調節に関与していることが示唆された。

## 2. 研究の目的

本計画研究では、我々は eNoSC を中心としたネットワークを解析することにより、細胞内エネルギー制御システムとエピゲノム制御システムのクロストークを解明することを目的とした。また、eNoSC の中心因子である NML KO マウスを用いて、エピゲノム制御システムの個体における役割や疾患との関連を調べることを目的とした。さらに、eNoSC を制御する化学物質を探索し、創薬へつな

げることを目標とした。

具体的には以下の項目を研究の目的とした。

### (1) eNoSC を中心とした細胞内エネルギーシステムの解明

eNoSC の主要構成因子 NML は、アミノ末端側でジメチル化されたヒストン H3-K9 に結合し、カルボキシ末端側にメチル基転移酵素様のモチーフを持つ。NML のメチル化標的因子を解析するとともに、ゲノム上の NML 結合領域の同定を行い、eNoSC を中心としたエネルギー代謝制御機構の解明を目指した。

### (2) eNoSC と協調してエネルギー情報とエピゲノム情報をつなぐネットワークの解明

核小体に存在する約 700 種類のタンパク質の siRNA ライブラリーを作製して、網羅的な解析をすることにより、核小体において eNoSC と協調してエネルギー制御システムに関わる因子を同定することを目指した。

### (3) eNoSC を中心とした細胞内エネルギー制御システムの破綻と疾患との関連の解明

我々は、NML 過剰発現マウス (*BBRC* 2009) と NML KO マウスを作製した。これらの遺伝子改変マウスを用いて、表現型の詳細な解析を行う。さらに、それを引き起こす分子メカニズムを解析し、個体での eNoSC の機能とエピゲノム制御システムを解析し、エピゲノム制御システムの破たんや疾患との関係の解明を目指した。

### (4) eNoSC の人為的制御技術の開発と疾患治療への応用

我々は X 線結晶解析から、NML がカルボキシ末端側に SAM 結合ポケットを持つことを見出した。また、生化学的な

解析により、NML への SAM の結合が eNoSC の機能に必須であることが明らかにしている。そこで、SAM 結合ポケットに結合して NML の活性を制御する低分子化合物を探索する。さらに、同定した化合物によるエネルギー代謝およびエピゲノムの変化への影響の解明することにより、新たな創薬への応用を目標とした。

### 3. 研究成果

既に作製済みである、eNoSC の主要構成因子である NML の KO マウスを用いて、個体における eNoSC の機能を解析した。

まず組織における NML 発現レベルを解析したところ、肝臓において特に高い発現が観察された。NML KO マウスは、約 9 割が胎児期に死亡した。出生した 1 割について解析を進めたところ、NML KO マウスでは肝臓特異的に rRNA の転写とタンパク質合成が有意に上昇することを見出した。また、クロマチン免疫沈降の実験から、NML KO マウスでは rDNA 領域のヒストン H3-K9 のジメチル化が低下しており、ヒストン H3 のアセチル化が上昇していた。この実験結果は、eNoSC が個体レベルでも rDNA 領域のエピゲノム情報の制御に寄与することにより、rRNA の転写を制御することを示している。また、NML KO マウスでは肝臓特異的に AMP 濃度の上昇と ATP 濃度の減少をもたらした。その結果、NML KO マウスの肝臓では、AMP 依存的に活性化するキナーゼである AMPK の活性化が認められた。細胞内での AMPK の活性化は、エネルギー産生を上昇させる方向（解糖系の亢進、TCA サイクルの活性化、脂肪の  $\beta$  酸化の促進）に

働くので、それらに対する影響を解析した結果、NML KO マウスでは脂肪の  $\beta$  酸化のみが亢進してすることを見出した。また、NML KO マウスでは野生型マウスと比較して、肝臓での脂質合成の低下、全身での酸素消費量の増加が観察され、総体重も低下していた。この結果は、eNoSC が個体レベルでも肝臓の rDNA のエピゲノム情報を制御することにより、エネルギーフローを調節していることを示唆する。

次に、エネルギーバランスが破綻した際の NML の役割をより詳細に解析するために、高脂肪食を与えたマウスに対する NML の影響を解析した。一般に高脂肪摂取により肥満すると代謝が低下することが知られる。我々はマウスに高脂肪食を摂取させて rRNA 転写量を測定したところ、野生型マウスでは、高脂肪食摂取によって体重と白色脂肪細胞の割合が増加し、rRNA 転写量が低下していることを見出した。この結果は、高脂肪食摂取による rRNA 転写の低下が肥満に関係していることを示唆する。そこで、rRNA 転写抑制に関与する eNoSC の構成因子である NML の KO マウスに高脂肪食を与えたところ、野生型のマウスで見られた rRNA 転写量の減少は観察されず、体重の増加が抑制された。また、NML の KO マウスでは白色脂肪細胞の総体重に占める割合の増加も抑制された。この結果から、脂肪の過剰摂取による rRNA 転写の抑制が肥満につながることを示唆された。

さらに、NML を肝臓で欠損させることが、高脂肪食を摂取させたマウスの rRNA 転写の低下と肥満の抑制に関わるかどうかを証明するために、NML の肝臓特異的 KO マウスを作製した。このマ

ウスで、肝臓で NML のタンパク質量が低下していることが確認された。NML 肝臓特異的 KO マウスは、胎児時には死亡せず正常に成長した。NML 肝臓特異的 KO マウスの肝臓での rRNA 転写量を調べたところ、野生型マウスと比較して増加しており、rDNA 領域のヒストン H3-K9 のジメチル化の低下およびヒストン H3 のアセチル化の上昇が観察された。また、この KO マウスの肝臓で、AMP/ATP 比が上昇と AMPK の活性化が観察された。さらに、NML 全身での KO マウスと同様に、NML 肝臓特異的 KO マウスでも、高脂肪食摂取による総体重の増加と白色脂肪細胞の割合の増加が抑制され、全身での酸素消費量も抑制された。これらの結果から、肝臓における NML の欠損により、肝臓の rDNA のエピゲノム情報の変化が誘導され、高脂肪食摂取による肥満への耐性につながることを示された (*Cell Rep.* 2014)。

また、eNoSC の人為的制御技術を開発し疾患治療へ応用することを目的として、eNoSC 阻害剤の発見を目指した。NML の X 線結晶解析の結果に基づいたフラグメント・エボリューション法により、NML に結合することが予想される化合物 3 種類を設計し合成した。これらの 3 種類の化合物のうち 2 種類の化合物を細胞培養液中に添加すると rRNA 転写の促進が観察された。NML KO マウスでの実験結果から、個体レベルで rRNA 転写の促進が肥満の抑制につながることを示されたので、これらの化合物が創薬の対象となることが期待される。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計 7 件)

- ① Oie S, Matsuzaki K, Yokoyama W, Tokunaga S, Waku T, Han SI, Iwasaki N, Mikogai A, Yasuzawa-Tanaka K, Kishimoto H, Hiyoshi H, Nakajima Y, Araki T, Kimura K, Yanagisawa J, and Murayama A. Hepatic rRNA transcription regulates high-fat-diet-induced obesity. *Cell Rep.* 7, 807-820 (2014) 査読有
- ② Ono W, Akaogi K, Waku T, Kuroda T, Yokoyama W, Hayashi Y, Kimura K, Kishimoto H, and Yanagisawa J. Nucleolar protein, Myb-binding protein 1A, specifically binds to nonacetylated p53 and efficiently promotes transcriptional activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 434, 659-663 (2013) 査読有
- ③ Oie S, Matsuzaki K, Yokoyama W, Murayama A, Yanagisawa J. HDAC3 regulates stability of estrogen receptor  $\alpha$  mRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有 432, 236-241 (2013)
- ④ Akaogi K, Ono W, Hayashi Y, Kishimoto H, Yanagisawa J. MYBBP1A suppresses breast cancer tumorigenesis by enhancing the p53 dependent anoikis. *BMC Cancer* 13:65 (2013) 査読有
- ⑤ Komatsu Y, Waku T, Iwasaki N, Ono W, Yamaguchi C, and Yanagisawa J. Global analysis of DNA methylation in early-stage liver fibrosis. *BMC Med. Genomics* 5:5. (2012) 査読有
- ⑥ Miyachi H, Kuwabara N, Oyama T, Tomioka D, Ohashi M, Yanagisawa J, and Shimizu T. Peroxisome Proliferator-activated receptors (PPARs) have multiple binding points that accommodate ligands in various conformations: Phenylpropanoic acid-type PPAR ligands bind to PPAR in different conformations, depending on the subtype. *J. Med. Chem.* 55, 893-902 (2012) 査読有
- ⑦ Kumazawa T, Nishimura K, Kuroda T, Ono W, Yamaguchi C, Katagiri N, Tsuchiya M, Masumoto H, Nakajima Y, Murayama A, Kimura K, and Yanagisawa J. Novel nucleolar pathway connecting intracellular energy status with p53 activation. *J. Biol. Chem.* 286, 20861-20869 (2011) 査読有

〔学会発表等〕（研究代表者の招待講演）

（計 8 件）

- ① 柳澤純、乳癌シグナルの伝達について、**Brest Cancer Conference**、平成 24 年 7 月 20 日、帝国ホテル、東京都千代田区
- ② 柳澤純、核小体の新機能と個体の制御、**CREATE2012**、平成 24 年 7 月 13 日、ロイヤルパークホテル、東京都中央区
- ③ 柳澤純、性ステロイドホルモンと癌の新展開、第 12 回関東ホルモンと癌研究会、平成 24 年 1 月 21 日、東京大学山上会館、東京都文京区
- ④ 柳澤純、核内受容体を介した転写と代謝のクロストーク、第 12 回 **Wako** つくばフォーラム 転写と代謝のクロストーク 病態バイオロジーの新展開、平成 23 年 11 月 29 日、筑波和光ホール、茨城県つくば市
- ⑤ 柳澤純、核内受容体と疾患、第 5 回川島腎系球体カンファレンス、平成 23 年 11 月 19 日、内藤記念くすり博物館、岐阜県各務原市
- ⑥ 柳澤純、核内受容体を介した転写と代謝のクロストーク、第 12 回 **Wako** つくばフォーラム 転写と代謝のクロストーク 病態バイオロジーの新展開、平成 23 年 11 月 29 日、筑波和光ホール、茨城県つくば市
- ⑦ 柳澤純、エピジェネティクスによる脂肪代謝制御、第 37 回新潟脂質研究会、平成 23 年 11 月 17 日、新潟大学、新潟県新潟市
- ⑧ 柳澤純、核内受容体の新規メカニズムと疾患、第 51 回生命科学夏の学校、平成 23 年 9 月 2 日、八王子セミナーハウス、東京都八王子市

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

5. 研究組織

(1) 研究代表者

柳澤 純 (YANAGISAWA, Junn)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：50301114

(2) 連携研究者

村山明子 (MURAYAMA, Akiko)

筑波大学・生命環境系・講師

研究者番号：50431656

研究課題名：代謝シグナルが投射されるゲノム領域の同定と転写環境調節機構の解明  
 Exploring the mechanisms of metabolic control of gene expression  
 through new approaches of nutrigenomics

研究期間：2011～2015

課題番号：23116006

研究代表者 矢作直也（筑波大学 医学医療系 准教授）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	14,300,000	4,290,000	18,590,000
2012年度	12,500,000	3,750,000	16,250,000
2013年度	12,600,000	3,780,000	16,380,000
2014年度	9,520,000	2,856,000	12,376,000
2015年度	9,520,000	2,856,000	12,376,000
総計	58,440,000	17,532,000	75,972,000

研究成果の概要：独自開発の in vivo Ad-luc シグナル検出法と TFEL scan 複合体解析法を駆使し、エネルギー代謝シグナルが投射されるゲノム上の領域を同定するとともに、その領域上における転写複合体の解明を目指した。主要課題の1つとして、中性脂肪合成系の転写調節カスケードの解析を進めた結果、脂質合成系のマスターレギュレーターである SREBP-1 の上流領域に形成される、LXR/RXR-KLF15-RIP140 複合体が脂質合成の ON・OFF 制御を担っていることが明らかになった。

1. 研究の背景

代謝シグナルを受けた遺伝子発現制御機構の中で、転写因子が特定のゲノム DNA 配列を読み取る「目」となって作用するには、複数の核内因子とゲノム上で複合体を構成することが重要である。近年、ヒトを含む多くの生物種のゲノム情報が解読され、さらに比較ゲノム学的手法や全ゲノム相関研究(GWAS)などの進歩により、ゲノム上の重要箇所、特に蛋白質をコードしない非コード領域の重要箇所が次々に明らかになってきている。このようなゲノムワイドの情報をベースとして、そこにさらに我々独自の in vivo imaging 手法を用いた in vivo Ad-luc シグナル検出法という「生きたマウスの中で cis 配列解析をする新たなアプローチ」により、

代謝シグナルが投射されるゲノム領域を高精度に特定できることを我々は実証してきた (*Nature Cell Biol*, 2004; *Nat Med*, 2006, 2007; *JBC*, 2010)。

さらに、「ゲノム上のその箇所は一体どのように《読まれる》のか？」という点を系統的に明らかにしていく方法論として、転写因子をゲノムワイドに網羅する発現プラスミドライブラリ TFEL (Transcription Factor Expression Library) を独自に開発し、転写複合体の実体解明に取り組んできた(図1)。

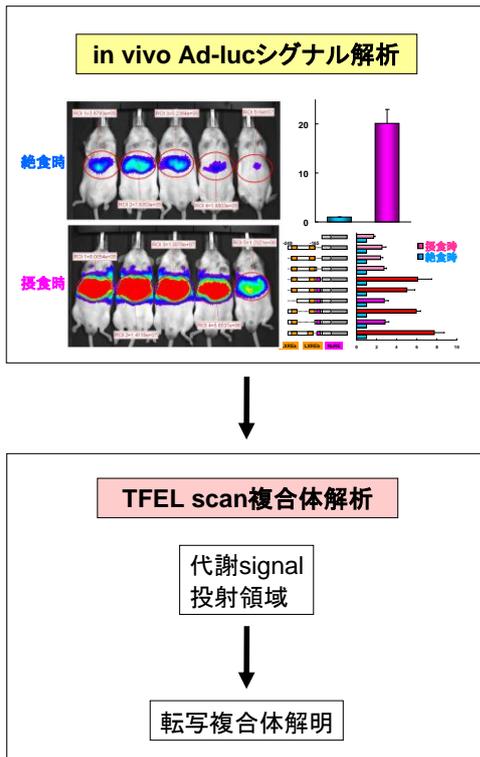


図1) in vivo Ad-luc シグナル解析と TFEL scan 複合体解析

## 2. 研究の目的

本研究で我々は、上述のような我々独自の 方法論を用いて、様々なエネルギー代謝シグナルが投射されるゲノム上の領域をマウス個体の中で特定し、さらにその領域上 どのような転写因子複合体が形成され、実 際にどのようなメカニズムで代謝シグナル がそこでの遺伝子発現制御に反映されてい るのか、その実体を解明することを目標と した。また、それらを通じ、最終的には、 エネルギー貯蔵と消費のバランス制御の転 写調節機構の全体像を明らかにすること を目指した。

## 3. 研究成果

### (1) in vivo Ad-luc による代謝シグナル 投射領域の特定

①中性脂肪合成の転写調節カスケードの 解明を行った。脂質合成系のマスターレ

ギュレーターである SREBP-1 の上流領域 に重要箇所を特定できた。また、SREBP-1 の調節因子であることが判明した KLF15 遺伝子についても、代謝シグナル投射領 域を探索し、特定することができた。

②糖新生系・アミノ酸代謝系の転写調節 カスケードについても解析を行った。特 に糖新生系については、重要な糖新生系 酵素遺伝子である Pck1 遺伝子の周辺領 域に代謝シグナル投射領域を特定できた。

### (2) TFEL scan による転写複合体解明

上記に引き続き、中性脂肪合成の転写調 節カスケードの解明を行った。SREBP-1 の上流領域に我々が特定した重要箇所に、 LXR/RXR-KLF15-RIP140 複合体が形成され、 それにより脂質合成の ON・OFF 制御が行 われることを明らかにした (*Cell Rep*, 2016) (図2)。

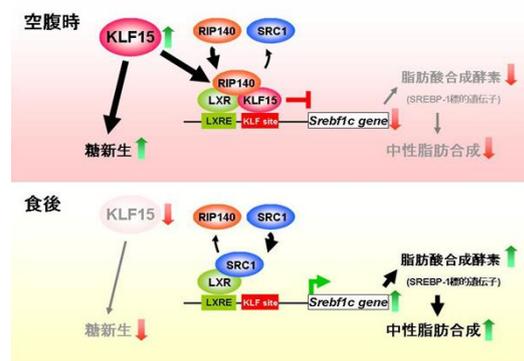


図2) LXR/RXR-KLF15-RIP140 複合体による 脂質合成の ON・OFF 制御機構

### (3) 転写複合体の分子修飾の探索

上記により解明された転写複合体につい て、さらに分子修飾の探索を行い、SAM、 ATP、Acetyl-CoA のような hub metabolites (生命素子)との関わりの解 明を進めた。特にメチル化とアセチル化 修飾については質量分析器を用いた探索 を行い、重要と思われる分子修飾につい ては、修飾アミノ酸抗体の作成を行って解 析した。その結果、代謝シグナルの伝達 に際して、一部の代謝産物が関与する可

能性のあることが明らかになった。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計 28 件)

- ① Yahagi N: Hepatic control of energy metabolism via the autonomic nervous system. *J Atheroscler Thromb* 24(1):14-18 (2017) 査読有
- ② Takei K, Han SI, Murayama Y, Satoh A, Oikawa F, Ohno H, Osaki Y, Matsuzaka T, Sekiya M, Iwasaki H, Yatoh S, Yahagi N, Suzuki H, Yamada N, Nakagawa Y, Shimano H: The selective PPAR $\alpha$  modulator K-877 efficiently activates the PPAR $\alpha$  pathway and improves lipid metabolism in mice. *J Diabetes Investig*, in press (2017) 査読有
- ③ Takeuchi Y, Yahagi N, Aita Y, Murayama Y, Sawada Y, Piao X, Toya N, Oya Y, Shikama A, Takarada A, Masuda Y, Nishi M, Kubota M, Izumida Y, Yamamoto T, Sekiya M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Urayama O, Kawakami Y, Iizuka Y, Gotoda T, Itaka K, Kataoka K, Nagai R, Kadowaki T, Yamada N, Lu Y, Jain MK, Shimano H: KLF15 Enables Rapid Switching between Lipogenesis and Gluconeogenesis during Fasting. *Cell Rep* 16:2373-86 (2016) 査読有
- ④ Nakagawa Y, Satoh A, Tezuka H, Han SI, Takei K, Iwasaki H, Yatoh S, Yahagi N, Suzuki H, Iwasaki Y, Sone H, Matsuzaka T, Yamada N, Shimano H: CREB3L3 controls fatty acid oxidation and ketogenesis in synergy with PPAR $\alpha$ . *Sci Rep* 6:39182 (2016) 査読有
- ⑤ Kikuchi T, Orihara K, Oikawa F, Han SI, Kuba M, Okuda K, Satoh A, Osaki Y, Takeuchi Y, Aita Y, Matsuzaka T, Iwasaki H, Yatoh S, Sekiya M, Yahagi N, Suzuki H, Sone H, Nakagawa Y, Yamada N, Shimano H: Intestinal CREBH overexpression prevents high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia by reducing Npc1l1 expression. *Mol Metab* 5:1092-1102 (2016) 査読有
- ⑥ Suzuki-Kemuriyama N, Matsuzaka T, Kuba M, Ohno H, Han SI, Takeuchi Y, Isaka M, Kobayashi K, Iwasaki H, Yatoh S, Suzuki H, Miyajima K, Nakae D, Yahagi N, Nakagawa Y, Sone H, Yamada N, Shimano H: Different Effects of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids on Atherogenic High-Fat Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *PLoS One* 11:e0157580 (2016) 査読有
- ⑦ Nakagawa Y, Oikawa F, Mizuno S, Ohno H, Yagishita Y, Satoh A, Osaki Y, Takei K, Kikuchi T, Han SI, Matsuzaka T, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Yahagi N, Isaka M, Suzuki H, Sone H, Takahashi S, Yamada N, Shimano H: Hyperlipidemia and hepatitis in liver-specific CREB3L3 knockout mice generated using a one-step CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 6:27857 (2016) 査読有
- ⑧ Kuba M, Matsuzaka T, Matsumori R, Saito R, Kaga N, Taka H, Ikehata K, Okada N, Kikuchi T, Ohno H, Han SI, Takeuchi Y, Kobayashi K, Iwasaki H, Yatoh S, Suzuki H, Sone H, Yahagi N, Arakawa Y, Fujimura T, Nakagawa Y, Yamada N, Shimano H: Absence of Elovl6 attenuates steatohepatitis but promotes gallstone formation in a lithogenic diet-fed Ldlr(-/-) mouse model. *Sci Rep* 5:17604 (2015) 査読有
- ⑨ Osaki Y, Nakagawa Y, Miyahara S, Iwasaki H, Ishii A, Matsuzaka T, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Yahagi N, Suzuki H, Sone H, Ohashi K, Ishibashi S, Yamada N, Shimano H: Skeletal muscle-specific HMG-CoA reductase knockout mice exhibit rhabdomyolysis: A model for statin-induced myopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 466:536-40 (2015) 査読有
- ⑩ Shikama A, Shinozaki H, Takeuchi Y, Matsuzaka T, Aita Y, Murayama T, Sawada Y, Piao X, Toya N, Oya Y, Takarada A, Masuda Y, Nishi M, Kubota M, Izumida Y, Nakagawa Y, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Suzuki H, Yagyu H, Kawakami Y, Yamada N, Shimano H, Yahagi N: Identification of human ELOVL5 enhancer regions controlled by SREBP. *Biochem Biophys Res Commun* 465:857-63 (2015) 査読有
- ⑪ Fujihara K, Suzuki H, Sato A, Kodama S, Heianza Y, Saito K, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Yahagi N, Yagyu H, Sone H, Shimano H: Circulating malondialdehyde-modified LDL-related variables and coronary artery stenosis in asymptomatic patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Res*

- 2015:507245 (2015) 査読有
- ⑫ Nakagawa Y, Satoh A, Yabe S, Furusawa M, Tokushige N, Tezuka H, Mikami M, Iwata W, Shingyouchi A, Matsuzaka T, Kiwata S, Fujimoto Y, Shimizu H, Danno H, Yamamoto T, Ishii K, Karasawa T, Takeuchi Y, Iwasaki H, Shimada M, Kawakami Y, Urayama O, Sone H, Takekoshi K, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Yahagi N, Suzuki H, Yamada N, Shimano H: Hepatic CREB3L3 controls whole-body energy homeostasis and improves obesity and diabetes. **Endocrinology** 155:4706-19 (2014) 査読有
- ⑬ Tang N, Matsuzaka T, Suzuki M, Nakano Y, Zao H, Yokoo T, Suzuki-Kemuriyama N, Kuba M, Okajima Y, Takeuchi Y, Kobayashi K, Iwasaki H, Yatoh S, Takahashi A, Suzuki H, Sone H, Shimada M, Nakagawa Y, Yahagi N, Yamada N, Shimano H: Ablation of Elovl6 protects pancreatic islets from high-fat diet-induced impairment of insulin secretion. **Biochem Biophys Res Commun** 450:318-23 (2014) 査読有
- ⑭ Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Nakamura T, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K: MicroRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1) exhibit reduced HDL-C in vivo. **Sci Rep** 4:5312 (2014) 査読有
- ⑮ Fujihara K, Suzuki H, Sato A, Ishizu T, Kodama S, Heianza Y, Saito K, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Yahagi N, Sone H, Shimano H: Comparison of the Framingham risk score, UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Risk Engine, Japanese Atherosclerosis Longitudinal Study-Existing Cohorts Combine (JALS-ECC) and maximum carotid intima-media thickness for predicting coronary artery stenosis in patients with asymptomatic type 2 diabetes. **J Atheroscler Thromb** 21:799-815 (2014) 査読有
- ⑯ Izumida Y, Yahagi N, Takeuchi Y, Nishi M, Shikama A, Takarada A, Masuda Y, Kubota M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Iizuka Y, Itaka K, Kataoka K, Shioda S, Nijima A, Yamada T, Katagiri H, Nagai R, Yamada N, Kadowaki T, Shimano H: Glycogen shortage during fasting triggers liver-brain-adipose neurocircuitry to facilitate fat utilization. **Nature Communications** 4:2316 (2013) 査読有
- ⑰ Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Matsumura S, Inoue K, Marusawa H, Nakamura T, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K: MicroRNA-33 regulates sterol regulatory element-binding protein 1 expression in mice. **Nature Communications** 4:2883 (2013) 査読有
- ⑱ Fujimoto Y, Nakagawa Y, Satoh A, Okuda K, Shingyouchi A, Naka A, Matsuzaka T, Iwasaki H, Kobayashi K, Yahagi N, Shimada M, Yatoh S, Suzuki H, Yogosawa S, Izumi T, Sone H, Urayama O, Yamada N, Shimano H: TFE3 controls lipid metabolism in adipose tissue of male mice by suppressing lipolysis and thermogenesis. **Endocrinology** 154:3577-88 (2013) 査読有
- ⑲ Takase S, Osuga J, Fujita H, Hara K, Sekiya M, Igarashi M, Takanashi M, Takeuchi Y, Izumida Y, Ohta K, Kumagai M, Nishi M, Kubota M, Masuda Y, Taira Y, Okazaki S, Iizuka Y, Yahagi N, Ohashi K, Yoshida H, Yanai H, Tada N, Gotoda T, Ishibashi S, Kadowaki T, Okazaki H: A polipoprotein C-II deficiency with no rare variant in the APOC2 gene. **J Atheroscler Thromb** 20:481-93 (2013) 査読有
- ⑳ Naka A, Iida KT, Nakagawa Y, Iwasaki H, Takeuchi Y, Satoh A, Matsuzaka T, Ishii KA, Kobayashi K, Yatoh S, Shimada M, Yahagi N, Suzuki H, Sone H, Yamada N, Shimano H: TFE3 inhibits myoblast differentiation in C2C12 cells via down-regulating gene expression of myogenin. **Biochem Biophys Res Commun** 430:664-9 (2013) 査読有
- ㉑ Matsuzaka T, Atsumi A, Matsumori R, Nie T, Shinozaki H, Suzuki-Kemuriyama N, Kuba M, Nakagawa Y, Ishii K, Shimada M, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Takekoshi K, Sone H, Yahagi N, Suzuki H, Murata S, Nakamura M, Yamada N, Shimano H: Elovl6 promotes nonalcoholic steatohepatitis in

- mice and humans. *Hepatology* 56:2199-208 (2012) 査読有
- ②② Fujimoto Y, Nakagawa Y, Shingyouchi A, Tokushige N, Nakanishi N, Satoh A, Matsuzaka T, Ishii KA, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Suzuki H, Yahagi N, Urayama O, Yamada N, Shimano H: Dicer has a crucial role in the early stage of adipocyte differentiation, but not in lipid synthesis, in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 420:931-6 (2012) 査読有
- ②③ Heianza Y, Arase Y, Fujihara K, Hsieh SD, Saito K, Tsuji H, Kodama S, Yahagi N, Shimano H, Yamada N, Hara S, Sone H: Longitudinal Trajectories of HbA1c and Fasting Plasma Glucose Levels During the Development of Type 2 Diabetes: The Toranomon Hospital Health Management Center Study 7 (TOPICS 7). *Diabetes Care* 35:1050-2 (2012) 査読有
- ②④ Iwasaki H, Naka A, Iida K, Nakagawa Y, Matsuzaka T, Ishii KA, Kobayashi K, Takahashi A, Yatoh S, Yahagi N, Sone H, Suzuki H, Yamada N, Shimano H: TFE3 regulates muscle metabolic gene expression, increases glycogen stores, and enhances insulin sensitivity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302:E896-902 (2012) 査読有
- ②⑤ Kumadaki S, Karasawa T, Matsuzaka T, Ema M, Nakagawa Y, Nakakuki M, Saito R, Yahagi N, Iwasaki H, Sone H, Takekoshi K, Yatoh S, Kobayashi K, Takahashi A, Suzuki H, Takahashi S, Yamada N, Shimano H: Inhibition of ubiquitin ligase F-box and WD repeat domain-containing 7 $\alpha$  (Fbw7 $\alpha$ ) causes hepatosteatosis through Kruppel-like factor 5 (KLF5)/peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 2 (PPAR $\gamma$ 2) pathway but not SREBP-1c protein in mice. *J Biol Chem* 286:40835-46 (2011) 査読有
- ②⑥ Saito R, Matsuzaka T, Karasawa T, Sekiya M, Okada N, Igarashi M, Matsumori R, Ishii K, Nakagawa Y, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Sone H, Suzuki H, Yahagi N, Yamada N, Shimano H: Macrophage Elovl6 deficiency ameliorates foam cell formation and reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:1973-9 (2011) 査読有
- ②⑦ Amemiya-Kudo M, Oka J, Takeuchi Y, Okazaki H, Yamamoto T, Yahagi N, Matsuzaka K, Okazaki S, Osuga J, Yamada N, Murase T, Shimano H: Suppression of the pancreatic duodenal homeodomain transcription factor-1 (Pdx-1) promoter by sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c). *J Biol Chem* 286:27902-14 (2011) 査読有
- ②⑧ Karasawa T, Takahashi A, Saito R, Sekiya M, Igarashi M, Iwasaki H, Miyahara S, Koyasu S, Nakagawa Y, Ishii K, Matsuzaka T, Kobayashi K, Yahagi N, Takekoshi K, Sone H, Yatoh S, Suzuki H, Yamada N, Shimano H: Sterol regulatory element-binding protein-1 determines plasma remnant lipoproteins and accelerates atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:1788-95 (2011) 査読有
- 〔学会発表等〕（研究代表者の招待講演）  
（計 18 件）
- ① 矢作直也、"栄養シグナル"から読み解くエネルギー代謝の制御機構、Chiba Diabetes Academia、平成 28 年 12 月 7 日、千葉県幕張市
- ② 矢作直也、n-3 系多価不飽和脂肪酸と脂質異常症・動脈硬化、シンポジウム 9「栄養・食品と動脈硬化」、第 48 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、平成 28 年 7 月 15 日、東京
- ③ 矢作直也、摂食・絶食サイクルの転写調節機構、柏崎糖尿病セミナー、平成 27 年 9 月 15 日、新潟県柏崎市
- ④ 矢作直也、エネルギー代謝の未知の制御機構を"転写複合体"から読み解く、5th Annual Diabetes Conferences for Clinicians by Clinicians、平成 27 年 7 月 3 日、東京
- ⑤ 矢作直也、n-3 系脂肪酸による脂質異常症治療 ～SREBP-1 特異的な抑制メカニズム～、ランチオンセミナー・第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、平成 26 年 7 月 10 日、東京
- ⑥ 矢作直也、in vivo イメージングから見えてきた代謝学の新世界、第 15 回京都心血管代謝セミナー、平成 25 年 12 月 6 日、京都
- ⑦ 矢作直也、Studies on fasting response、第 10 回 インスリン抵抗性とメタボリックシンドローム研究会、平成 25 年 7 月 6 日、東京
- ⑧ 矢作直也、in vivo イメージングと転写因子発現ライブラリ(TFEL)が拓く、代謝学の新展開、学術講演会「肝臓か

- ら糖尿病を考える」、平成 25 年 6 月 14 日、京都
- ⑨ 矢作直也、ニュートリゲノミクスの挑戦 - 脂質代謝と糖代謝の統合的理解を目指して、第 3 回生活習慣病予知予防研究会、平成 25 年 2 月 22 日、東京
- ⑩ 矢作直也、糖・脂質代謝の統合的理解を目指して ~ニュートリゲノミクスからの挑戦~、Medical Science Frontier Forum、平成 24 年 11 月 21 日、千葉県千葉市
- ⑪ 矢作直也、PUFA による SREBP-1 抑制のメカニズム、城南地区 n-3 脂肪酸研究会、平成 24 年 10 月 18 日、東京
- ⑫ 矢作直也、in vivo イメージングが拓く、ニュートリゲノミクスの新展開 ~ エネルギー代謝の統合的理解を目指して ~、Kyoto Cardiovascular Cutting Edge Seminar、平成 24 年 6 月 22 日、京都
- ⑬ 矢作直也、in vivo イメージングを用いたエネルギー代謝の転写調節カスケードの解析、第 5 回インビボ実験医学シンポジウム、平成 23 年 12 月 8 日、東京
- ⑭ 矢作直也、エネルギー代謝の転写調節機構解明の新展開~脂質代謝と糖代謝の接点を探る~、第 30 回神奈川脂質研究会学術集会、平成 23 年 11 月 19 日、東京
- ⑮ 矢作直也、エネルギー代謝の転写調節カスケード解明の新展開、代謝・腎・高血圧セミナー、平成 23 年 10 月 25 日、金沢
- ⑯ 矢作直也、エネルギー代謝の転写調節機構の探索~脂質代謝と糖代謝の接点を探る~、第 48 回東京 DM 研究会、平成 23 年 9 月 14 日、東京
- ⑰ 矢作直也、中性脂肪合成系の転写調節カスケードの解析、第 12 回 AB カンファランス、平成 23 年 8 月 6 日、兵庫県神戸市
- ⑱ 矢作直也、in vivo イメージングと転写因子発現ライブラリ(TFEL)が開く、Metabolic-Hepatology の新展開、第 4 回メタボリックヘパトロジー研究会、平成 23 年 6 月 17 日、宮城県仙台市

〔図書〕(計 9 件)

- ① 矢作直也 羊土社、栄養シグナルの一覧と全体像、実験医学増刊号「遺伝子制御の新たな主役・栄養シグナル」、2016、16-18
- ② 矢作直也 羊土社、ニュートリゲノミクスとは、実験医学増刊号「遺伝子制御の新たな主役・栄養シグナル」、2016、86-87
- ③ 矢作直也 羊土社、摂食・絶食サイク

- ルの転写調節機構、実験医学増刊号「遺伝子制御の新たな主役・栄養シグナル」、2016、127-136
- ④ 矢作直也 羊土社、医学・疾患研究とニュートリゲノミクス、実験医学増刊号「遺伝子制御の新たな主役・栄養シグナル」、2016、138-139
- ⑤ 矢作直也、島野仁 エル・アイ・シー、SREBP、疾患モデルの作製と利用—脂質代謝異常と関連疾患 上巻、2015、34-40
- ⑥ 泉田欣彦、矢作直也 診断と治療社、肝臓グリコーゲンから脂肪分解への中枢性シグナリング—神経による糖質と脂質エネルギー供給源の選択、糖尿病学 2014、2014、23-29
- ⑦ 矢作直也、大西由希子 SCICUS、メディカルるるる 糖尿病編、2014、1-128
- ⑧ 矢作直也、他 羊土社、糖尿病の分子標的と治療薬事典、2013、228-238
- ⑨ 矢作直也 講談社、筑波大学附属病院とクックパッドのおいしく治す糖尿病食、2013、1-200

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕  
・該当なし

〔その他〕ホームページ等  
研究室ホームページ  
<http://nyahagi.wixsite.com/nrg>

5. 研究組織

(1) 研究代表者

矢作直也 (YAHAGI, Naoya)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号：60420246

研究課題名：代謝とクロストークする転写環境形成因子の構造科学的な解明  
 Structural analysis of the transcription environment factors that engage in crosstalk with metabolic pathways

研究期間：2011～2015

課題番号：23116007

研究代表者 清水敏之（東京大学 大学院薬学系研究科 教授）

連携研究者 藤間祥子（東京大学 大学院薬学系研究科 助教）

連携研究者 仲島由佳（筑波大学 生命環境系 助教）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	19,100,000	5,730,000	24,830,000
2012 年度	14,900,000	4,470,000	19,370,000
2013 年度	15,000,000	4,500,000	19,500,000
2014 年度	12,070,000	3,621,000	15,691,000
2015 年度	12,070,000	3,621,000	15,691,000
総計	73,140,000	21,942,000	95,082,000

**研究成果の概要：**本研究では代謝とクロストークするエピゲノム情報形成因子を構造面から明らかにし、その制御機構を解明することを目的とした。具体的には、アルギニンメチル化酵素 PRMT に着目した。PRMT8 はプロトマーの構造はすでに報告されている PRMT コアドメインとほぼ同一の構造をとっていたが、溶液中ではらせん状の多量体構造を形成しその多量体構造が活性や局在に重要であることを明らかにした。また、PRMT7 は PRMT コアドメインをタンデムにもつ。構造解析の結果、単量体でありながらコアドメインの二量体様の構造を取っていることを明らかにした。

1. 研究の背景

アルギニンメチル化酵素(protein arginine methyltransferase; PRMT)は、蛋白質のアルギニン残基をメチル化する酵素である。この酵素ファミリーは哺乳動物で広く保存されており、主に核内で働き、シグナル伝達、mRNA のスプライシング、転写制御、DNA 修復、蛋白質の転移など幅広い生命現象に関与する。アルギニンのメチル化は主要な翻訳語修飾として転写制御、mRNA スプライシング、DNA 修復、シグナル伝達等アルギニンメチル化を行う酵素が(PRMT)であり、哺乳類には9種類存在する。

PRMT の活性はメチル化様式により3タイプに分類され、アルギニン残基に一つメチル基を転移してモノメチルアルギニンを生じた後、タイプ I では非対称ジメチルアルギニンを、タイプ II では対称ジメチルアルギニンを生じる。タイプ III はモノメチルアルギニンのみを生じる(図1)。PRMT はコアドメインと呼ばれる保存されたドメインを一般には分子内に一つ持つ(図2)。タイプ I PRMT ではコアドメインが二量体(コアダIMER構造)を形成することが活性に重要である。PRMT7 は他の PRMT と比べユニークな特徴を備え、一般には一つ分子内に存在

するコアドメインを、PRMT7は二つタンデムに持つ特徴的なドメイン構成をとる。また現在のところ PRMT7 は唯一タイプ III 活性を示す PRMT である。我々は PRMT に注目して研究を進めてきた。

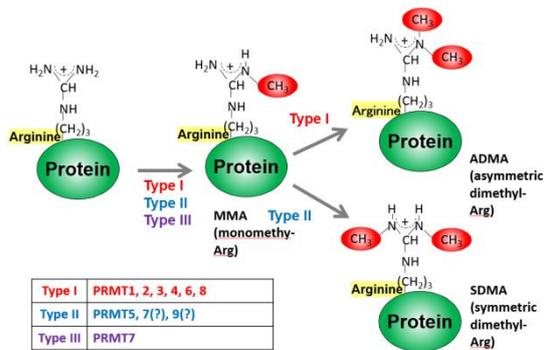


図1 PRMTによるメチル化様式

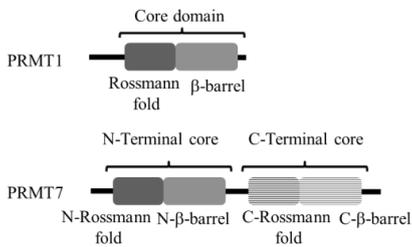


図2 PRMT1とPRMT7のドメイン構成

## 2. 研究の目的

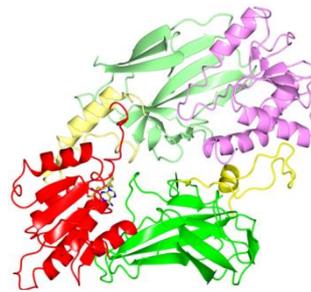
我々は PRMT ファミリーの結晶構造決定を行い、基質認識、メチル化活性制御機構、酵素活性機構の原子レベルでの解明を目的として研究を行った。さらに内在性リガンドによって活性化するビタミンD受容体(VDR)にも注目して、リガンドによる活性化機構を明らかにすることも目的とした。

## 3. 研究成果

### (1) PRMT7の構造科学的研究

本研究では線虫由来 CePRMT7 に注目し X線結晶解析によって立体構造を決定し構造科学的な研究を行った。CePRMT7の単量体構造は、分子内に二つタンデムに存在するコアドメインが会合してコア

ダイマー構造をとる新規構造であった(図3)。コアドメイン同士の相互作用は既存の PRMT と似るが、その相対的配置は新規であった。各ドメインのトポロジーも多少の差異はあるが、既知の PRMT と似ていた。SAHはN末端側活性部位のみ見られ、C末端側活性部位は PRMT に高度に保存される二つのループに占められていた。N末端側活性部位の変異体を作成し AdoMet 結合実験を行った結果、変異体の AdoMet 結合能は大きく低下し、CePRMT7 のコファクター結合部位が N末端側コアドメインのみであろうことを示した。また、CePRMT7 のアルギニン結合ポケットの大きさを PRMT1、5と比較し、CePRMT7 のポケットが最小であることを示した。一般に PRMT はコアダイマー構造中に2つの活性部位を持つ。基質のアルギニンが片方の活性部位でメチル化を受け、その後コアダイマーから離れることなく、もう片方の活性部位でさらなるメチル化を受ける機構が提唱されている。しかしながら、PRMT7ではC末端コアドメインが不活性であり、このようなジメチル化をうける可能性は低いと考えられる。さらに、N末端コアドメインの狭いアルギニン結合ポケットには、ジメチルアルギニンが結合できる空間がなく、結果としてモノメチルアルギニンのみが生成すると推測される。



PRMT7の構造

図3 PRMT7の構造

## (2) PRMT8 の構造科学的研究

PRMT8 は最も一般的な PRMT1 と 81% の相同性がある。PRMT-8 の基質は長い間不明であったが、筑波大の深水博士のグループはその基質の一つが脂質であることを証明した。PRMT1 との相同性から予想されていたように PRMT8 は PRMT1 とほぼ同一のドメイン構成をとっており、2 量体の構造もほぼ同一であったが、会合の状態は大きく変わっており、らせん状の 8 量体構造をとっていた (図 4)。これまでの研究から PRMT1 は溶液中で二量体以上の多量体を形成して働くと考えられているが、既に報告されているラット PRMT1 の結晶構造は二量体の構造であった。これまで多量体の PRMT 構造は酵母 PRMT1 (配列の identity~50%) で報告されているのみである。しかも酵母 PRMT1 は六量体であり、会合状態は PRMT8 と全く異なっている。

結晶中で観察された会合状態が溶液中でも維持していることを示すため、ゲルろ過クロマトグラフィー、超遠心分析、多角度光散乱検出器(MALS)を組み合わせた小角散乱を行った。その結果、いずれの測定法においても PRMT8 は溶液中において 8 量体で存在していることを示すことができた。

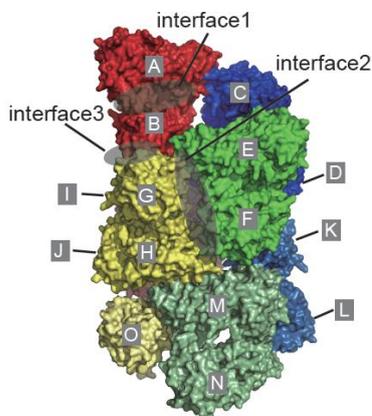


図 4 らせん状に会合した PRMT8

次にこの会合状態が PRMT8 の機能に影響を及ぼすかどうかを検討するため、会合に重要な役割を果たすと考えられるアミノ酸に変異をいれて 8 量体をとることができないような変異体を作成し、PRMT 活性および細胞内での局在を観察した。その結果、活性は顕著に減弱し、本来脂質修飾のため膜に局在するタンパク質である PRMT8 は細胞質に分布するようになった (図 5)。これらのことは高次の会合状態が正常な機能発現に必須であることを意味する。核内レセプターはリガンド依存的に活性が制御される転写因子である。

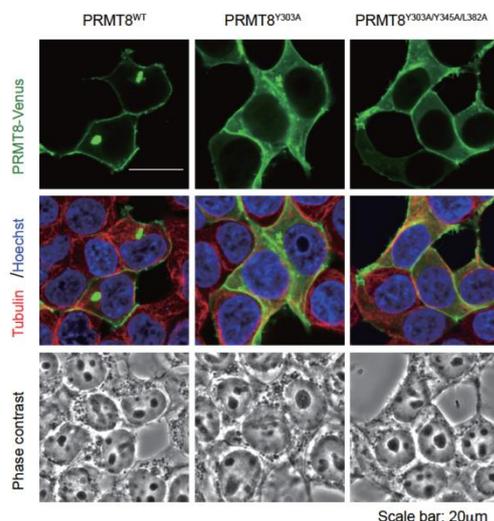


図 5 高次構造をとることができない PRMT8 変異体の細胞内局在

## (3) ビタミン D レセプター(VDR)

活性型ビタミン D3 は、カルシウム代謝調節や細胞の分化・誘導など様々な生理機能に関与しており、その作用は核内受容体であるビタミン D 受容体(VDR)を介して起こることが知られている。リガンド結合に伴って、RXR とのヘテロダイマー化、helix12 の安定化及び活性化因子である coactivator(CoA) のリクルートという一連の変化が起こり、標的遺伝子の転写を活性化することが分かっている。VDR のリガンドはこれまでも数多く

の報告があるが、本研究ではノンセコステロイド型である TTYN7, 8, 11, 12 と呼ばれる4種類のリガンドに着目した。TTYN8, 11 はアゴニスト活性が強く、TTYN7, 12 はアゴニスト活性が弱く、特に TTYN12 はほとんど活性を持たない。これらのリガンドと VDR の複合体構造解析によりその活性の相違を構造科学的に明らかにした。rat の VDR のリガンド結合ドメイン(LBD)を大腸菌発現系で発現精製を行い、co-activator ペプチドとリガンドの三者複合体の結晶化を行った。活性型ビタミン D においては、1 位の OH 基は Tyr143, Ser274 と、2 位の OH 基は Ser233, Arg270 と、25-OH は His301, His393 と水素結合を形成していることが既に知られている。その結果、一部で強い活性を持つリガンドと弱い活性を持つリガンドとでは結合様式の違いが見られた。TTYN11,7 では Ser233 と Arg270 と 1 位の OH 基と直接水素結合しているのに対し、TTYN8, 12 では水分子を介した間接的な水素結合を起こしていた。更に最も活性の弱い TTYN12 では Ser271 のマルチコンフォマーが見られ、リガンドと Ser271 との間に新たな水素結合の形成が見られた。変異体解析を行うことにより、TTYN と Ser233 及び Arg270 との水素結合が VDR の活性に重要であることが分かった。また Ser271 のマルチコンフォマーによって、アゴニストフォームの安定化に重要と思われるタンパク質内水素結合やリガンド-タンパク質間の水素結合の寄与が小さくなっていることが分かった。

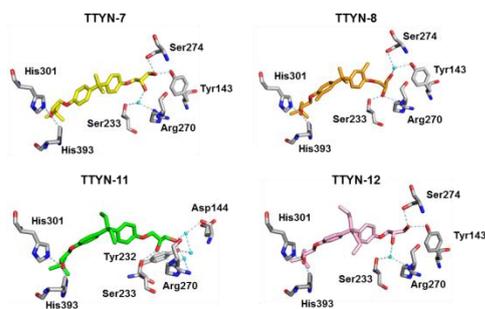


図6 VDR と各種リガンドとの複合体構造

我々はアンタゴニスト活性を示す DLAM 化合物との複合体構造にも取り組んでいる。DLAM は VDR の内在性リガンドである活性型ビタミン (1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3) の代謝産物とよく似た構造をとっており、天然基質の代謝産物がどのように認識機構の解明にもつながる。我々は VDR と一連の DLAM との複合体構造の構造解明に成功した。代謝産物に特徴的なラクトン環の認識を明らかにし、リガンド認識に重要な His301 が構造変化すること (His301 が構造変化を起こす) を明らかにした。さらに VDR の DNA 結合に依存しないノンジェノミック作用についても明らかにした。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計 7 件)

- ① Asano L, Waku T, Abe R, Kuwabara N, Ito I, Yanagisawa J, Nagasawa K, Shimizu T. Regulation mechanism of the vitamin D receptor by vitamin D lactam derivatives *FEBS Lett.* 590, 957-963 (2016)査読有
- ② Waku T, Nakajima Y, Yokoyama W, Nomura N, Kako K, Kobayashi A, Shimizu T, Fukamizu A. NML-mediated rRNA base methylation links ribosomal subunit formation to cell proliferation in a p53-dependent manner. *J Cell Sci.* 129, 2382-2393 (2016)査読有
- ③ Toma-Fukai S, Kim JD, Park KE, Kuwabara N, Shimizu N, Krayukuhina

E, Uchiyama S, Fukamizu A, and Shimizu T. Novel helical assembly in arginine methyltransferase 8.

*J. Mol. Biol.* 428, 1197-208 (2016) 査読

- ④ Sakurai S., Ohto U. and Shimizu T. Crystal structure of human Roquin-2 and its complex with constitutive decay element RNA *Acta Crystallogr.* **F71**, 1048-1054 (2015)査読有
- ⑤ Hasegawa M, Toma-Fukai S, Kim JD, Fukamizu A, and Shimizu T. Protein arginine methyltransferase 7 has a novel homodimer-like structure formed by tandem repeats *FEBS Lett.* 588, 1942-1948 (2014)査読有
- ⑥ Asano, L., Ito, I., Kuwabara, N., Waku, T., Yanagisawa, J., Miyachi, H. and Shimizu T. Structural basis for vitamin D receptor agonism by novel nonsecosteroidal ligands *FEBS Lett.* 587, 957-963 (2013)査読有
- ⑦ Ito, I., Waku, T., Aoki, M. Abe, R., Nagai, Y., Watanabe, T., Nakajima, Y., Ohkido, I., Yokoyama, K., Miyachi, H., Shimizu T, Murayama, A., Kishimoto, H., Nagasawa, K., Yanagisawa, J. A nonclassical vitamin D receptor pathway suppresses renal fibrosis. *J. Clin. Invest.* 123, 4579-4594 (2013) 査読有

〔学会発表等〕（研究代表者の招待講演）

（計 4 件）

- ① Toshiyuki Shimizu, Structural studies of protein arginine methyltransferases, PRMTs、International Symposium on Transcription and Metabolism、平成 25 年 11 月 11 日、淡路、兵庫県
- ② 清水敏之、核内レセプターの新規機能解析と構造情報に基づいた線維化疾患治療法の開発、ターゲットタンパク研究プログラム公開シンポジウム、平成 24 年 3 月 12 日、学術総合センター、東京都
- ③ 清水敏之、代謝とクロストークする転写環境形成因子の構造科学的な解明、第 1 2 回 Wako つくばフォーラム 転写と代謝のクロストーク 病態バイオロジーの新展開、平成 23 年 11 月 29 日、筑波和光ホール、茨城県
- ④ 清水敏之、薬学における蛋白質 X 線結晶解析、第 9 回次世代を担う若手のフィジカル・ファーマフォーラム (PPF2011)、平成 23 年 9 月 12 日、箱根、神奈川県

〔図書〕（計 1 件）

- ① 清水敏之 Drug Design – Structure and ligand-based approaches Merz Jr., K.M., Ringe D., Reynolds C.H. ドラッグデザイン 構造とリガンドに基づくアプローチ 田之倉優、小島正樹 監訳 15 章 プリンヌクレオシドホスホリラーゼを標的とした遷移状態類似体設計、2014

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

〔その他〕 ホームページ等

研究室ホームページ

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~kouzou/index.html>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水敏之 (SHIMIZU, Toshiyuki)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：30273858

### (2) 連携研究者

藤間祥子 (TOMA, Sachiko)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：40363535

仲島由佳 (NAKAJIMA, Yuka)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：40399499

研究課題名：ゲノム配列情報とエピゲノム情報の維持・変異のクロスレギュレーション  
 Cross-regulation of the maintenance and mutagenesis of genomic sequence and epigenetic information

研究期間：2011～2015

課題番号：23116008

研究代表者 菅澤 薫 (神戸大学 バイオシグナル研究センター 教授)

連携研究者 酒井 恒 (神戸大学 バイオシグナル研究センター 助教)

連携研究者 岩井成憲 (大阪大学 基礎工学研究科 教授)

【交付決定額（分配額）】

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	21,900,000	6,570,000	28,470,000
2012 年度	17,100,000	5,130,000	22,230,000
2013 年度	17,300,000	5,190,000	22,490,000
2014 年度	14,760,000	4,428,000	19,188,000
2015 年度	14,760,000	4,428,000	19,188,000
総計	85,820,000	25,746,000	111,566,000

研究成果の概要：ヌクレオチド除去修復において、XPC による DNA 損傷認識が非アセチル化ヒストンを含むヘテロクロマチン様構造との相互作用による制御を受けることを示すとともに、XPC と DDB2 の機能的相互作用におけるユビキチン化や SUMO 化といった翻訳後修飾の新たな役割を明らかにした。また、塩基除去修復酵素 TDG が大規模な遺伝子発現変動を介して細胞の DNA 損傷応答に影響を与え得ること、ALKBH タンパク質の発現変動が細胞内代謝環境の変化をもたらし、細胞増殖の変化や細胞死の誘導を引き起こす可能性があることを見出した。

1. 研究の背景

ゲノム DNA は種々の環境因子に加え、活性酸素種や S-アデノシルメチオニン (SAM) などの代謝産物によって絶えず損傷を受けている。DNA 損傷はゲノムの不安定化や細胞死を誘導することにより、がんや神経変性、早期老化など、種々の疾患・病態の原因となり得る。このような弊害を未然に防ぐ DNA 修復機構のなかでも、特に日常的に発生する膨大な数の塩基損傷を処理する塩基除去修復 (BER) やヌクレオチド除去修復 (NER) に関しては、生化学的な分子機構の理解が進んでいた。一方、細胞内において修

復反応の開始のために必要とされるクロマチン構造変換の分子機構については未だに不明な点が多く残されていた。BER や NER のような除去修復反応に伴い、その領域にあらかじめ存在する 5-メチルシトシンを含む短い DNA 鎖の切除、あるいは修飾ヒストンの解離により局所的なエピゲノム情報の攪乱が引き起こされる可能性があり、細胞の遺伝子発現と正常な機能を維持するためには、修復完了後に元のエピゲノム情報を正確に再構築する必要がある (図 1)。すなわち DNA 損傷とその修復はエピゲノム情報を書き換える ("**Rewriting**") 機会を与えるもの

と捉えることができ、ゲノム塩基配列情報とエピゲノム情報、それぞれの維持・再編に関わる分子機構とその相互制御関係(クロスレギュレーション)を理解することの重要性が急速に高まっていた。

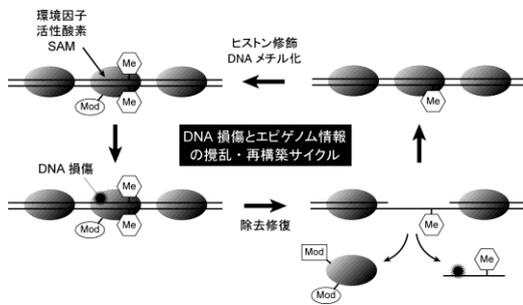


図1 DNA 損傷修復とエピゲノム情報の維持・変異のクロストーク

## 2. 研究の目的

本計画研究ではゲノム配列情報の維持にあたる DNA 修復機構と、遺伝子発現を制御するエピゲノム情報の修飾・維持機構との機能的連携を分子レベルで明らかにすることで、その破綻によって引き起こされるゲノム不安定性やエピゲノム異常と種々の疾患・病態発現機構との関連の理解に資することを目的とした。

具体的には、NER を制御するヒストン修飾やクロマチン構造変換因子の同定、NER における損傷認識因子の翻訳後修飾を介した転写環境制御、遺伝子発現制御に関わる BER 因子の機能の多様性、SAM による塩基損傷の修復機構と細胞内代謝との関連等を明らかにすることを旨として研究を行った。

## 3. 研究成果

### (1) DNA 損傷修復制御におけるエピゲノム環境の役割

① NER における DNA 損傷認識因子とクロマチンの機能的相互作用

ヒト NER において損傷認識を担う XPC 及び DDB2 を標的とするクロマチン免疫

沈降を行い、これらの因子が結合したクロマチン領域からアセチル化ヒストンが排除されていることを見出した。細胞をヒストン脱アセチル化酵素阻害剤で処理すると、XPC の損傷部位への結合や損傷修復の遅延が見られ、また局所紫外線照射部位においてアセチル化ヒストンの減少が見られたことから、NER の初期過程にヒストンの脱アセチル化に関わる可能性が示唆された。

一方、ヒストン H3 がその N 末端テールを介して XPC と直接相互作用すること、ヒストン H3 のアセチル化によってこの XPC との相互作用が著しく減弱することを明らかにした。さらに XPC はヒストン H1 とも直接相互作用することが示され、遺伝子発現に対して抑制的に働くヘテロクロマチン様構造の形成が XPC の損傷認識を補助する、というまったく新しいモデルを提唱するに至った(図2)。これらの知見と一致して、細胞内において XPC がヘテロクロマチンに局在する傾向があることを見出している。従来、遺伝子発現の制御に関して確立されてきたクロマチン高次構造の役割とは異なる概念を提起するものとして興味深い。

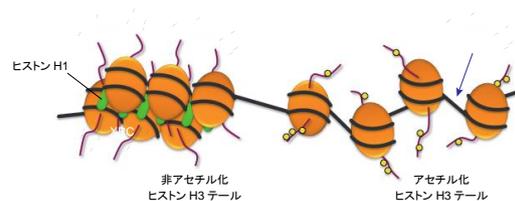


図2 ヒストンとの相互作用を介した XPC の局在制御機構モデル

② 細胞の DNA 損傷応答を制御する DDB2 の翻訳後修飾

DDB2 は損傷認識因子としての機能に加え、p53 との相互作用を介して DNA 損傷応答における転写環境の調節に関わり、その機能制御の解明は重要な課題である。

我々は DDB2 の紫外線誘導性ユビキチン化及び分解を XPC が負に制御することを見出した。XPC は CRL4<sup>DDB2</sup> E3 リガーゼの基質として DDB2 と競合関係にあり、XPC が正常に損傷部位にリクルートされれば、DDB2 は分解を免れるというモデルを提唱した。これと並行して CRL4<sup>DDB2</sup> の構造解析を通して、DDB2 のユビキチン化及び分解を介した機能制御の分子基盤の理解に貢献した。

さらに、XPC がユビキチン様タンパク質 SUMO による修飾を受けることを見出した。紫外線誘発損傷が DDB2 から XPC に受け渡される過程で XPC の SUMO 化が重要な役割を担っており、SUMO 化の非存在下では損傷部位に結合した DDB2 自身が DNA 修復の開始を妨害することが示唆された。

## (2) エピゲノム制御における DNA 修復機構の役割

### ① TDG による DNA 損傷応答と遺伝子発現の制御

BER 酵素チミン DNA グリコシラーゼ (TDG) は、シトシン及び 5-メチルシトシンの脱アミノ化に起因する自然突然変異の抑制に寄与する一方、転写因子との相互作用や DNA 脱メチル化過程への関与を介して遺伝子発現制御にも関わる重要な因子である。我々は TDG が種々の DNA 損傷に応答してプロテアソームによる分解を受けることを新たに見出し、その分解に関わる E3 リガーゼとして CRL4<sup>CDT2</sup> を同定した。

興味深いことに、*Tdg* 遺伝子欠損マウス細胞において、外来 TDG の発現レベルに応じて細胞の紫外線感受性の増強及び NER 活性の低下が引き起こされることを新たに見出した。この時、TDG の酵素活性非依存的に広範な遺伝子発現の変動が

認められたが、NER に直接関わる因子については有意な発現変動は見られなかった。近年、XPC やその他の NER 因子が転写制御に関わるという報告がなされており、TDG が NER 因子を転写プロモーター領域に拘束することで、結果的に細胞の NER 活性を減弱させている可能性が考えられる。

### ② SAM によるメチル化塩基損傷の修復酵素と細胞内代謝の変化

SAM は DNA や RNA と反応してメチル化損傷塩基を生じることが知られている。これらの損傷の修復に関わる大腸菌 AlkB のヒトホモログ ALKBH ファミリーは、ある種のがん細胞において発現が亢進していることが報告されている。HeLa 細胞において ALKBH2 及び ALKBH3 の安定過剰発現および発現抑制を行ったところ、ALKBH2/3 の発現レベルと細胞増殖速度の間に正の相関が認められた。

ALKBH はジオキシゲナーゼ・ファミリーに属し、 $\alpha$ -ケトグルタル酸を補因子としてメチル基の酸化を触媒することから、ALKBH の発現が細胞内代謝に及ぼす影響に着目した。メタボローム解析の結果、ALKBH3 過剰発現細胞において、特にポリアミン合成経路の亢進が見られ、この細胞がポリアミン合成阻害剤に対して高感受性を示すことを新たに見出した。一方、ALKBH3 過剰発現細胞において ALKBH3 の発現を siRNA によって抑制すると、細胞死が誘導されることがわかった。ALKBH3 の高発現に適応した細胞内代謝環境が、ALKBH3 の基質となる核酸のメチル化損傷を引き起こしやすい状態になっている可能性が考えられる。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計 17 件)

- ① Nakamura T, Murakami K, Tada H, Uehara Y, Nogami J, Maehara K, Ohkawa Y, Saitoh H, Nishitani H, Ono T, Nishi R, Yokoi M, Sakai W, and Sugasawa K. Thymine DNA glycosylase modulates the DNA damage response and gene expression by base excision repair-dependent and -independent mechanisms. *Genes Cells* in press (2017) 査読有
- ② Kakumu E, Nakanishi S, Shiratori HM, Kato A, Kobayashi W, Machida S, Yasuda T, Adachi N, Saito N, Ikura T, Kurumizaka H, Kimura H, Yokoi M, Sakai W, and Sugasawa K. Xeroderma pigmentosum group C protein interacts with histones: regulation by acetylated states of histone H3. *Genes Cells* in press (2017) 査読有
- ③ Sugasawa K. Molecular mechanisms of DNA damage recognition for mammalian nucleotide excision repair. *DNA Repair* 44, 110-117 (2016) 査読有
- ④ Cavadini S, Fischer ES, Bunker RD, Potenza A, Lingaraju GM, Goldie KN, Mohamed WI, Faty M, Petzold G, Beckwith RE, Tichkule RB, Hassiepen U, Abdulrahman W, Pantelic RS, Matsumoto S, Sugasawa K, Stahlberg H, and Thomä NH. Cullin-RING ubiquitin E3 ligase regulation by the COP9 signalosome. *Nature* 531, 598-603 (2016) 査読有
- ⑤ Osakabe A, Tachiwana H, Kagawa W, Horikoshi N, Matsumoto S, Hasegawa M, Matsumoto N, Toga T, Yamamoto J, Hanaoka F, Thomä NH, Sugasawa K, Iwai S, and Kurumizaka H. Structural basis of pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct recognition by UV-DDB in the nucleosome. *Sci. Rep.* 5, 16330 (2015) 査読有
- ⑥ Li CL, Golebiowski FM, Onishi Y, Samara NL, Sugasawa K, and Yang W. Tripartite DNA Lesion Recognition and Verification by XPC, TFIIH, and XPA in Nucleotide Excision Repair. *Mol. Cell* 59, 1025-1034 (2015) 査読有
- ⑦ Akita M, Tak YS, Shimura T, Matsumoto S, Okuda-Shimizu Y, Shimizu Y, Nishi R, Saitoh H, Iwai S, Mori T, Ikura T, Sakai W, Hanaoka F, and Sugasawa K. SUMOylation of xeroderma pigmentosum group C protein regulates DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *Sci. Rep.* 5, 10984 (2015) 査読有
- ⑧ Matsumoto S, Fischer ES, Yasuda T, Dohmae N, Iwai S, Mori T, Nishi R, Yoshino K, Sakai W, Hanaoka F, Thomä NH, and Sugasawa K. Functional regulation of the DNA damage-recognition factor DDB2 by ubiquitination and interaction with xeroderma pigmentosum group C protein. *Nucleic Acids Res.* 43, 1700-1713 (2015) 査読有
- ⑨ Kikuchi Y, Umemura H, Nishitani S, Iida S, Fukasawa R, Hayashi H, Hirose Y, Tanaka A, Sugasawa K, and Ohkuma Y. Human mediator MED17 subunit plays essential roles in gene regulation by associating with the transcription and DNA repair machineries. *Genes Cells* 20, 191-202 (2015) 査読有
- ⑩ Toga T, Kuraoka I, Watanabe S, Nakano E, Takeuchi S, Nishigori C, Sugasawa K, and Iwai S. Fluorescence detection of cellular nucleotide excision repair of damaged DNA. *Sci. Rep.* 4, 981-988 5578 (2014) 査読有
- ⑪ Moriyama T, Fujimitsu Y, Yoshikai Y, Sasano T, Yamada K, Murakami M, Urano T, Sugasawa K, and Saitoh H. SUMO-modification and elimination of the active DNA demethylation enzyme TDG in cultured human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 447, 419-424 (2014) 査読有
- ⑫ Okashita N, Kumaki Y, Ebi K, Nishi M, Okamoto Y, Nakayama M, Hashimoto S, Nakamura T, Sugasawa K, Kojima N, Takada T, Okano M, and Seki Y. PRDM14 promotes active DNA demethylation through the ten-eleven translocation (TET)-mediated base excision repair pathway in embryonic stem cells. *Development* 141, 269-280 (2014) 査読有
- ⑬ Nishi R, Sakai W, Tone D, Hanaoka F, and Sugasawa K. Structure-function analysis of the EF-hand protein centrin-2 for its intracellular localization and nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res.* 41, 6917-6929 (2013) 査読有
- ⑭ Pines A, Vrouwe MG, Marteiijn JA, Typas D, Luijsterburg MS, Cansoy M, Hensbergen P, Deelder A, de Groot A, Matsumoto S, Sugasawa K, Thoma N, Vermeulen W, Vrieling H, and Mullenders L. PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2

- stabilization and recruitment of ALC1. *J. Cell Biol.* 199, 235-249 (2012) 査読有
- ⑮ Shiomi Y, Hayashi A, Ishii T, Shinmyozu K, Nakayama J, **Sugasawa K**, and Nishitani H. Two different replication factor C proteins, Ctf18 and RFC1, separately control PCNA-CRL4<sup>Cdt2</sup>-mediated Cdt1 proteolysis during S phase and following UV irradiation. *Mol. Cell. Biol.* 32, 2279-2288 (2012) 査読有
- ⑯ Fischer ES, Scrima A, Böhm K, Matsumoto S, Lingaraju GM, Faty M, Yasuda T, Cavadini S, Wakasugi M, Hanaoka F, Iwai S, Gut H, **Sugasawa K**, and Thomä NH. The molecular basis of CRL4<sup>DDB2/CSA</sup> ubiquitin ligase architecture, targeting, and activation. *Cell* 147, 1024-1039 (2011) 査読有
- ⑰ Naegeli H, and **Sugasawa K**. The xeroderma pigmentosum pathway: decision tree analysis of DNA quality. *DNA Repair* 10, 673-683 (2011) 査読有

[学会発表等] (研究代表者の招待講演)  
(計 25 件)

- ① **Sugasawa K**. Interaction of DNA damage recognition factors with the chromatin structure. Japan-Swiss Symposium on "Chromatin Structure and Dynamics", 平成 29 年 1 月 20 日、バーゼル、スイス
- ② **Sugasawa K**. Roles of DNA topology and TFIIH ATPases in mammalian nucleotide excision repair. The 10th 3R Symposium, 平成 28 年 11 月 14 日、ホテル一畑、島根県松江市
- ③ 菅澤 薫、多田遥人、大西優貴、岩井成憲、胡桃坂仁志、酒井 恒、ヌクレオチド除去修復の DNA 損傷認識とその制御の分子基盤、第 89 回日本生化学会大会、平成 28 年 9 月 26 日、東北大学川内キャンパス、宮城県仙台市
- ④ **Sugasawa K**. DNA damage recognition mechanism for mammalian nucleotide excision repair. KSBMB International Conference 2016、平成 28 年 5 月 19 日、ソウル、韓国
- ⑤ **Sugasawa K**. Molecular mechanisms regulating nucleotide excision repair *in vivo*. Conference on "Response to DNA Damage: from Molecule to Disease", 平成 28 年 4 月 19 日、エグモント・アーン・ゼー、オランダ
- ⑥ 菅澤 薫、ヌクレオチド除去修復の細胞内制御機構とその多様性、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2015)、平成 27 年 12 月 4 日、神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市
- ⑦ 菅澤 薫、紫外線誘発 DNA 損傷の修復促進と皮膚癌の抑制に関わる分子機構、第 74 回日本癌学会学術総会、平成 27 年 10 月 9 日、名古屋国際会議場、愛知県名古屋市
- ⑧ Onishi Y, Tone D, Kinoshita M, Iwai S, Sakai W, and **Sugasawa K**. Molecular mechanism of DNA damage recognition in mammalian nucleotide excision repair. The 15th International Congress of Radiation Research、平成 27 年 5 月 26 日、国立京都国際会館、京都府京都市
- ⑨ **Sugasawa K**. *In vivo* regulation of mammalian nucleotide excision repair. Gordon Research Conference on Mammalian DNA Repair、平成 27 年 2 月 9 日、ベンチュラ、米国
- ⑩ **Sugasawa K**. Post-translational modifications coordinating recognition and repair of UV-induced DNA damage. The 9th 3R Symposium、平成 26 年 11 月 18 日、御殿場高原ホテル、静岡県御殿場市
- ⑪ **Sugasawa K**. Post-translational modifications coordinating recognition and repair of UV-induced DNA damage. The 5th Japan-U.S. DNA Repair Meeting、平成 26 年 10 月 30 日、グランドエクスプレッソ鳴門、徳島県鳴門市
- ⑫ Akita M, Matsumoto S, Sakai W, and **Sugasawa K**. Roles for post-translational protein modifications in regulation of DNA damage recognition for mammalian nucleotide excision repair. International Symposium on "Xeroderma Pigmentosum and Related Diseases", 平成 26 年 3 月 5 日、神戸国際会議場、兵庫県神戸市
- ⑬ **Sugasawa K**. Regulation of the DNA damage recognition machinery in mammalian nucleotide excision repair. 第 36 回日本分子生物学会年会、平成 25 年 12 月 6 日、神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市
- ⑭ 菅澤 薫、ゲノム DNA 損傷の修復と細胞応答を制御するタンパク質翻訳後修飾の役割、第 86 回日本生化学会大会、平成 25 年 9 月 12 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
- ⑮ **Sugasawa K**, and Hanaoka F. Functional regulation of the DNA damage recognition factor DDB2 via post-translational modifications. 第 71 回日本癌学会学術総会、平成 24 年 9 月 21 日、ホテルロイトン札幌、北海道札幌市
- ⑯ 菅澤 薫、紫外線誘発 DNA 損傷の認識と修復の分子基盤、第 34 回日本光医学・光生物学会、平成 24 年 7 月 28 日、神戸国際会議場、兵庫県神戸市
- ⑰ **Sugasawa K**. Post-translational protein

- modification regulating mammalian nucleotide excision repair. The 4th U.S.-Japan DNA Repair Meeting、平成 24 年 4 月 12 日、リーズバーク、米国
- ⑱ Sugasawa K. Molecular mechanism of DNA damage recognition in mammalian nucleotide excision repair. NIH DNA Repair Mini-symposium、平成 24 年 4 月 10 日、ベセスダ、米国
- ⑲ Sugasawa K., Tone D, Yasuda T, and Hanaoka F. Reconstitution of mammalian nucleotide excision repair: molecular basis for DNA damage recognition. 第 34 回日本分子生物学会年会、平成 23 年 12 月 16 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
- ⑳ Sugasawa K. DNA damage recognition in nucleotide excision repair: molecular mechanism and involvement of chromatin structure. The 27th RBC-NIRS International Symposium、平成 23 年 12 月 9 日、コープイン京都、京都府京都市
- ㉑ 菅澤 薫、DNA 損傷修復とエピゲノム制御のクロストーク、第 12 回 Wako つくばフォーラム、平成 23 年 11 月 29 日、筑波和光ホール、茨城県つくば市
- ㉒ Sugasawa K. Regulation of DNA repair through post-translational protein modifications. Taiwan-Japan Joint Symposium on Cell Signaling and Gene Regulation、平成 23 年 11 月 19 日、台南、台湾
- ㉓ 菅澤 薫、ヌクレオチド除去修復における DNA 損傷認識の分子基盤、日本放射線影響学会第 54 回大会、平成 23 年 11 月 17 日、神戸国際会議場、兵庫県神戸市
- ㉔ 菅澤 薫、UV-DDB : ヌクレオチド除去修復とエピゲノム制御のクロスロード、構造エピゲノム研究会 第 4 回ワークショップ「DNA 損傷とエピゲノム」、平成 23 年 7 月 27 日、理化学研究所横浜研究所、神奈川県横浜市
- ㉕ Sugasawa K. Regulation of DNA damage recognition in mammalian NER. Conference on "Responses to DNA Damage: from Molecular Mechanism to Human Disease"、平成 23 年 4 月 6 日、エグモント・アーン・ゼー、オランダ

〔図書〕(計 4 件)

- ① Hanaoka F, and Sugasawa K. (eds.) Springer, DNA Replication, Recombination, and Repair: Molecular Mechanisms and Pathology, 2016
- ② Sakai W., and Sugasawa, K. Springer, DNA Replication, Recombination, and Repair: Molecular Mechanisms and

- Pathology, 2016, 155-174
- ③ 酒井 恒、菅澤 薫 シーエムシー出版、光老化科学の最前線、2015、81-88
- ④ Sugasawa K. InTech, DNA Repair, 2011、453-476

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕  
・該当なし

〔その他〕ホームページ等  
研究室ホームページ  
<http://www.research.kobe-u.ac.jp/brce-sugasawa/>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

菅澤 薫 (SUGASAWA, Kaoru)  
神戸大学・バイオシグナル研究センター・教授  
研究者番号：70202124

### (2) 連携研究者

酒井 恒 (SAKAI, Wataru)  
神戸大学・バイオシグナル研究センター・助教  
研究者番号：70526251

岩井成憲 (IWAI, Shigenori)  
大阪大学・基礎工学研究科・教授  
研究者番号：10168544

研究課題名：クロマチン変換による代謝リプログラミングの分子基盤  
Molecular basis of metabolic reprogramming by chromatin conversion

研究期間：2011～2015

課題番号：23116009

研究代表者 中尾光善 (熊本大学 発生医学研究所 教授)

連携研究者 日野信次郎 (熊本大学 発生医学研究所 助教)

【交付決定額（分配額）】

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	21,100,000	6,330,000	27,430,000
2012年度	18,600,000	5,580,000	24,180,000
2013年度	18,800,000	5,640,000	24,440,000
2014年度	17,800,000	5,340,000	23,140,000
2015年度	17,800,000	5,340,000	23,140,000
総計	94,100,000	28,230,000	122,330,000

**研究成果の概要：**LSD1ファミリーは、ヒストンH3のリジン脱メチル化酵素であり、フラビン(FAD)がその酵素活性に不可欠である。本研究において、LSD1が脂肪細胞でエネルギー消費を抑制し、脂肪蓄積を促進するエネルギー代謝調節を明らかにした。また、癌細胞においてLSD1が好氣的解糖と低酸素誘導性の転写因子HIFの安定化をもたらすことを示した。さらに、LSD2が肝細胞の脂肪毒性に対する防御に働くことが判明した。生命素子と転写環境の観点から、DNAおよびリジン残基のメチル化・脱メチル化によるクロマチン変換に着目した研究を行い、代謝のリプログラミングの分子基盤を明らかにした。

1. 研究の背景

エピジェネティクス機構は、細胞が刺激を受容した時の短期応答、そして、刺激が消失した後にも刺激を受容したという記憶を維持する長期応答を通して、遺伝子制御に働いている。他方、転写不活性なクロマチンに位置する遺伝子は、刺激に対して不応になり得る。この転写環境としてのエピゲノム制御には、DNAメチル化とクロマチンの形成が関わり、代謝恒常性の維持と破綻に重要な役割を果たしていると考えられる。このため、生命素子と転写環境の観点から、DNAおよびリジン残基のメチル化・脱メチル化によるクロマチン変換に着目して、代謝のリ

プログラミングの分子基盤を明らかにすることを構想した。

2. 研究の目的

本研究では、フラビン(FAD: flavin adenine dinucleotide)依存性のリジン脱メチル化酵素LSD1(lysine specific demethylase-1)のエネルギー代謝調節における意義、DNAとタンパク質のメチル化・脱メチル化による遺伝子制御について明らかにすることを目的とした。生命素子と転写環境の観点から、クロマチン変換および代謝のリプログラミングの重要な分子基盤を理解することを目指した。具体的には、次の3つの観点から研究を

実施することにした。

(1) 各種の細胞・組織におけるLSD1の発現状況に関する解析 [1] 各種細胞におけるLSD1の発現解析：RNAおよびタンパク質、免疫染色法で確認した。また分化誘導や栄養状態を変化させて検討した。[2] マウス代謝組織におけるLSD1の発現解析：マウスの各種組織での発現状況を検討した。[3] LSD1の細胞内局在の解析：特異的な抗体を用いて、免疫沈降および免疫染色を行い、細胞内や組織内の局在を検討した。

(2) LSD1阻害による遺伝子発現および代謝機能の解析 [1] LSD1のRNA干渉法、トラニルシプロミンによる阻害：LSD1の特異的ノックダウン、トラニルシプロミンまたは阻害化合物を用いた。[2] LSD1阻害における遺伝子発現の網羅的解析：定量RT-PCRおよびマイクロアレイで検討した。[3] LSD1のクロマチン免疫沈降-リアルタイムPCR解析：特異抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行い、標的遺伝子プロモーターにおける局在を検討した。[4] LSD1阻害におけるミトコンドリア機能の解析：蛍光色素JC-1の細胞染色、細胞外フラックスアナライザーを用いて、細胞の代謝能を検討した。

(3) FAD 合成経路の解析 [1] リボフラビンキナーゼ (RFK) および FAD 合成酵素 (FADS) の RNA 干渉法による阻害：細胞内の FAD 濃度の変化について検討した。[2] RFK 阻害における遺伝子発現の網羅的解析：マイクロアレイで検討した。[3] 細胞状態の解析：RNA およびタンパク質について定量 RT-PCR、ウェスタンブロット、細胞染色などで解析した。

### 3. 研究成果

(1) LSD1 とその補酵素 FAD の合成系によるエネルギー代謝調節

LSD1 とその補酵素 FAD の合成系がエネルギー代謝調節に重要な役割を果たすことを明らかにした (図 1)。マウスの脂肪細胞・組織において、LSD1 を機能阻害すると、エネルギー消費遺伝子群 (脂肪酸代謝とミトコンドリア代謝) の発現が誘導されて、蓄積した脂肪の分解とミトコンドリアの酸化的リン酸化が著しく増加することが分かった。高脂肪食による肥満モデルマウスで、LSD1 を阻害する

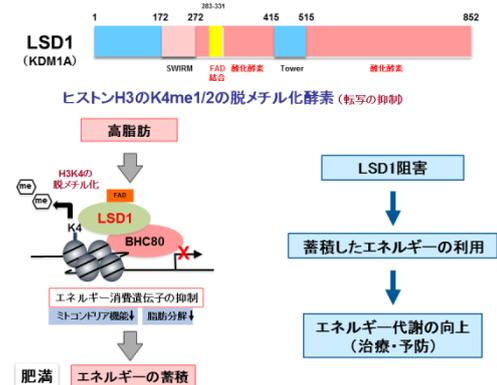


図 1 LSD1 によるエネルギー代謝調節

と、*PGC-1 $\alpha$*  などのエネルギー消費遺伝子群の誘導とともに、肥満の病態が明らかに改善した。この LSD1 活性に細胞内 FAD とその合成経路が不可欠であることを実証した (*Nature Commun.*, 2012)。

(2) ヒトの癌細胞代謝における LSD1 の関与

①ヒトの癌細胞代謝における LSD1 の関与について、肝細胞癌で高発現する LSD1 を機能阻害すると、亢進していた解糖系の活性が低下する一方、ミトコンドリアの酸化的リン酸化が増強することが分かった。低酸素応答性の転写因子 HIF1 $\alpha$  のタンパク質量が低下し、不安定化を認めた。つまり、多くの癌細胞に共通に見られる好氣的解糖と乳酸産生という、Warburg 効果が LSD1 阻害によって逆転することが分かった (*Cancer Res.*, 2015) (図 2)。

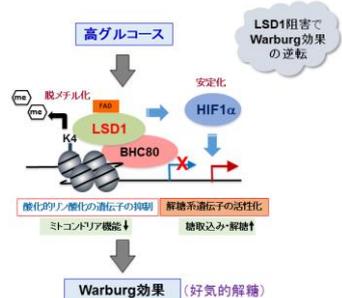


図2 LSD1による癌細胞代謝調節

②FDG-PET が臨床診断に有用である食道癌において、LSD1 の高発現と悪性度が高く相関することが分かった。食道癌において、LSD1 を機能阻害すると、グルコースの取込みおよび解糖系の活性が低下する一方、ミトコンドリアの酸化的リン酸化が増強することから、LSD1 による癌代謝制御が癌種を超えた機序であることが明らかになった (*Int. J. Cancer*, 2015)。

(3) LSD2 が肝細胞の脂肪代謝に関与もうひとつの LSD1 ファミリー分子である LSD2 が、肝細胞で脂肪代謝に重要な役割を果たすことが判明した。LSD2 を機能阻害すると、脂肪の細胞内取込みが増強して、脂肪毒性を生じることが分かった。つまり、LSD2 は肝細胞の脂肪毒性を防御していることが判明した (*Mol. Cell. Biol.*, 2015) (図3)。

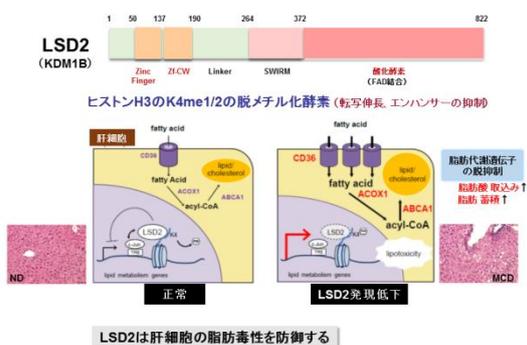


図3 LSD2による脂肪代謝調節

このように、LSD1 ファミリータンパク質によるエネルギー代謝のエピジェネティックな制御機構を明らかにすることで、基礎研究の知見は元より、治療・予防的なポテンシャルにつながる可能性が示唆された。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計25件)

- ① Hino S, Kohroggi K, and Nakao M. Histone demethylase LSD1 controls the phenotypic plasticity of cancer cells. *Cancer Sci.* 107, 1187-1192 (2016) 査読有
- ② Tsutsumi T, Iwao K, Hayashi H, Kawaji T, Inoue T, Hino S, Nakao M, and Tanihara H. Potential neuroprotective effects of an LSD1 inhibitor in retinal ganglion cells via p38 MAPK $\gamma$  activity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57, 6461-6473 (2016) 査読有
- ③ Kosumi K, Baba Y, Ishimoto T, Sakamoto A, Harada K, Kurashige J, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Iwagami S, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Yoshida N, Watanabe M, Hino S, Nakao M, and Baba H. Lysine-specific demethylase-1 contributes to malignant behavior by regulation of invasive activity and metabolic shift in esophageal cancer. *Int. J. Cancer* 138, 428-439 (2016) 査読有
- ④ Matsumoto A, Sakamoto C, Matsumori H, Katahira J, Yasuda Y, Yoshidome K, Tsujimoto M, Goldberg IG, Matsuura N, Nakao M, Saitoh N, and Hieda M. Loss of the integral nuclear envelope protein SUN1 induces alteration of nucleoli. *Nucleus*, 7, 68-83 (2016) 査読有
- ⑤ Xi Y, Shen W, Ma L, Zhao M, Zheng J, Bu S, Hino S, and Nakao M. HMG2 promotes adipogenesis by activating C/EBP $\beta$ -mediated expression of PPAR $\gamma$ .

- Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 472, 617-623 (2016) 査読有
- ⑥ Sakamoto A, Hino S, Nagaoka K, Anan K, Takase R, Matsumori H, Ojima H, Kanai Y, Arita K, and Nakao M. Lysine demethylase LSD1 coordinates glycolytic and mitochondrial metabolism in hepatocellular carcinoma cells. **Cancer Res.** 75, 1445-1456 (2015) 査読有
- ⑦ Nagaoka K, Hino S, Sakamoto A, Anan K, Takase R, Umehara T, Yokoyama S, Sasaki Y, and Nakao M. Lysine-specific demethylase LSD2 suppresses lipid influx and metabolism in hepatic cells. **Mol. Cell. Biol.** 35, 1068-1080 (2015) 査読有
- ⑧ Takebayashi S, Tanaka H, Hino S, Nakatsu Y, Igata T, Sakamoto A, Narita M, and Nakao M. Retinoblastoma protein promotes oxidative phosphorylation through up-regulation of glycolytic genes in oncogene-induced senescent cells. **Ageing Cell** 14, 689-697 (2015) 査読有
- ⑨ Murata A, Baba Y, Ishimoto T, Miyake K, Kosumi K, Harada K, Kurashige J, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Yamamoto M, Oda S, Watanabe M, Nakao M, and Baba H. TET family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in esophageal squamous cell carcinoma. **Oncotarget** 6, 23372-23382 (2015) 査読有
- ⑩ Kitamura H, Matsumori H, Kalendova A, Hozak P, Goldberg IG, Nakao M, Saitoh N, and Harata M. The actin family protein ARP6 contributes to the structure and the function of the nucleolus. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 464, 554-560 (2015) 査読有
- ⑪ Koga T, Suico MA, Shimasaki S, Watanabe E, Kai Y, Koyama K, Omachi K, Morino-Koga S, Sato T, Shuto T, Mori K, Hino S, Nakao M, and Kai H. Endoplasmic reticulum (ER) stress induces Sirtuin 1 (SIRT1) expression via PI3K-Akt-GSK3 $\beta$  signaling pathway and promotes hepatocellular injury. **J. Biol. Chem.** 290, 30366-30374 (2015) 査読有
- ⑫ Matsumura Y, Nakaki R, Inagaki T, Yoshida A, Kano Y, Kimura H, Tanaka T, Tsutsumi S, Nakao M, Doi T, Fukami K, Osborne TF, Kodama T, Aburatani H, and Sakai J. H3K4/H3K9me3 bivalent chromatin domains targeted by lineage-specific DNA methylation pauses adipocyte differentiation. **Mol. Cell** 60, 584-596 (2015) 査読有
- ⑬ Kanda S, Ohmori T, Taguchi A, Kudo K, Horiuchi T, Sato Y, Hino S, Suzuki Y, Sander M, Sugano S, Nakao M, and Nishinakamura R. Sall1 co-operates with Six2 to actively maintain nephron progenitors. **J. Am. Soc. Nephrol.** 25, 2584-2595 (2014) 査読有
- ⑭ Baba T, Otake H, Sato T, Miyabayashi K, Shishido Y, Wang C-Y, Shima Y, Kimura H, Yagi M, Ishihara Y, Hino S, Ogawa H, Nakao M, Yamazaki T, Kang D, Ohkawa Y, Suyama M, Chung B-C, and Morohashi K. Glycolytic genes as the targets of a nuclear receptor Ad4BP/SF-1. **Nature Commun.** 5, 3634 (2014) 査読有
- ⑮ Murata A, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Yoshida N, Oki E, Morita M, Nakao M, and Baba H. IGF2 DMR0 methylation, loss of imprinting, and patient prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. **Ann. Surg. Oncol.** 21, 1166-1174 (2014) 査読有
- ⑯ Baba Y, Watanabe M, Murata A, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Yoshida N, Oki E, Sakamaki K, Nakao M, and Baba H. LINE-1 hypomethylation, DNA copy number alterations, and CDK6 amplification in esophageal squamous cell carcinoma. **Clin. Cancer Res.** 20,

- 1114-1124 (2014) 査読有
- ⑰ Sasai N, Saitoh N, Saitoh H, and Nakao M. The transcriptional cofactor MCAF1/ATF7IP is involved in histone gene expression and cellular senescence. *Plos One* 87, e68478 (2013) 査読有
- ⑱ Hino S., Nagaoka K, and Nakao M. Metabolism-epigenome crosstalk in physiology and diseases. *J. Hum. Genet.* (Reviews, Special Section on Epigenomics: biological understanding and clinical application) 58, 410-415 (2013) 査読有
- ⑲ Xi Y, Watanabe S, Hino Y, Sakamoto C, Nakatsu Y, Okada S, and Nakao M. Hmga1 is differentially expressed and mediates silencing of the Cd4/Cd8 loci in T cell lineages and leukemic cells. *Cancer Sci.* 103, 439-447 (2012) 査読有
- ⑳ Fournier A, Sasai N, Nakao M. and Defossez PA. The role of methyl-binding proteins in chromatin organization and epigenome maintenance. *Brief Funct. Genomics* 11, 251-264 (2012) 査読有
- ㉑ Saitoh N, Sakamoto C, Hagiwara M, Agredano-Moreno LT, Jiménez-García LF, and Nakao M. The distribution of phosphorylated SR proteins and alternative splicing are regulated by RANBP2. *Mol. Biol. Cell* 23, 1115-1128 (2012) 査読有
- ㉒ Taura M, Suico MA, Koyama K, Komatsu K, Miyakita R, Matsumoto C, Kudo E, Kariya R, Goto H, Kitajima S, Takahashi C, Shuto T, Nakao M. Okada S, and Kai H. Rb/E2F1 regulate innate immune receptor Toll-like receptor 3 in epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 32, 1581-1590 (2012) 査読有
- ㉓ Hirose A, Ishihara K, Tokunaga K, Watanabe T, Saitoh N, Chandra T, Narita M, Shinohara M, and Nakao M. Quantitative assessment of higher-order chromatin structure of the INK4/ARF locus in human senescent cells. *Aging Cell* 11, 553-556 (2012) 査読有
- ㉔ Watanabe T, Ishihara K, Hirose A, Watanabe S, Hino S., Ojima H, Kanai Y, Sasaki Y, and Nakao M. Higher-order chromatin regulation and differential gene expression in human tumor necrosis factor/lymphotoxin locus in hepatocellular carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 32, 1529-1541 (2012) 査読有
- ㉕ Hino S., Sakamoto A, Nagaoka K, Anan K, Wang Y, Mimasu S, Umehara T, Yokoyama S, Kosai K, and Nakao M. FAD-dependent lysine demethylase LSD1 regulates cellular energy expenditure. *Nature Commun.* 3, 758 (2012) 査読有
- 〔学会発表等〕（研究代表者の招待講演）  
（計 18 件）
- ① Nakao M. Epigenetic reprogramming in physiology and cancer. The 6<sup>th</sup> Hiroshima Conference and 50<sup>th</sup> Anniversary Commemoration. 平成 27 年 10 月 24 日、広島国際会議場、広島県広島市
- ② 中尾光善、環境エピゲノムによるエネルギー代謝調節と病態、日本人類遺伝学会第 60 回大会（シンポジウム：疾患発症に関わる環境エピゲノム変化）、平成 27 年 10 月 15 日、京王プラザホテル、東京都新宿区
- ③ 中尾光善、エピジェネティクスと現代人の体質学、第 33 回日本眼腫瘍学会、平成 27 年 10 月 3 日、くにびきメッセ国際会議場、島根県松江市
- ④ 中尾光善、エピジェネティクスと現代人の体質学、第 4 回 DoHad 研究会・学術集会、平成 27 年 8 月 2 日、昭和大学、東京都品川区
- ⑤ 中尾光善、エピジェネティクス：生命のプログラムを解く、第 13 回日本プロテオーム学会 JHUPO2015 年大会（シンポジウム：エピゲノミクス～エピゲノム、RNA、タンパク質の協調的な相互作用～）、平成 27 年 7 月 24 日、くまもと森都心プラザ、熊本県熊本市
- ⑥ 中尾光善、坂元顕久、長岡克弥、日野信次朗、エピジェネティクス機構による代謝制御と病態、第 88 回日本内分泌学会学術集会（シンポジウム：エネルギー代謝のエピジェネティクス）、平成 27 年 4 月 25 日、ホテ

- ルニューオータニ東京、東京都千代田区
- ⑦ Nakao M, Sakamoto A, Nagaoka K, and Hino S. Epigenetic cell regulation in energy metabolism and cancer. 第 87 回日本生化学会大会 (シンポジウム: The role of epigenome in response to environmental cues)、平成 26 年 10 月 18 日、京都国際会館、京都府京都市
- ⑧ Nakao M. Epigenetic cell regulation in energy metabolism and cancer. Epigenetics in development and diseases. 9th Asian Epigenomics Meeting. 平成 26 年 8 月 26 日、国立シンガポール大学、シンガポール
- ⑨ 中尾光善、エピジェネティクス機構によるエネルギー代謝調節と病態、第 34 回日本肥満学会 (シンポジウム: 白色・褐色脂肪細胞研究の最前線)、平成 25 年 10 月 11 日、東京国際フォーラム、東京都千代田区
- ⑩ 中尾光善、エピジェネティクス機構によるエネルギー代謝調節と病態、第 21 回日本血管生物医学会学術集会 (シンポジウム: 細胞代謝が制御する動的恒常性と破綻～心血管疾患の制圧に向けて～)、平成 25 年 9 月 27 日、千里阪急ホテル、大阪府豊中市
- ⑪ 中尾光善、エピジェネティクス機構によるエネルギー代謝調節と病態、第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会 (シンポジウム: 糖尿病とエピジェネティクス)、平成 25 年 5 月 18 日、ホテル日航熊本、熊本県熊本市
- ⑫ 中尾光善、石原宏、斉藤典子、高次エピゲノム機構による細胞プログラムの制御、第 85 回日本生化学会大会 (シンポジウム: 生命活動における高次エピゲノム制御の分子基盤)、平成 24 年 12 月 15 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、福岡市博多区
- ⑬ Nakao M. Gene regulation and cell function mediated by epigenetic factors. 8th 3R Symposium (International Symposium on DNA Replication, Recombination and Repair. 平成 24 年 11 月 27 日、淡路夢舞台国際会議場、兵庫県淡路市
- ⑭ 中尾光善、坂元顕久、日野信次朗、エピジェネティクス機構によるエネルギー代謝調節と病態、日本人類遺伝学会第 57 回大会 (シンポジウム: エピジェネティクス研究の新展開)、平成 24 年 10 月 25 日、京王プラザホテル、東京都新宿区
- ⑮ 中尾光善、エピジェネティクス機構による細胞制御と病態、第 35 回日本基礎老化学会 (特別講演) 平成 24 年 7 月 26 日、東邦大学習志野キャンパス、千葉県船橋市
- ⑯ 中尾光善、エピジェネティクス機構による細胞病態と治療、第 18 回日本遺伝子治療学会学術集会 (シンポジウム)、平成 24 年 6 月 29 日、ホテル熊本テルサ、熊本県熊本市
- ⑰ 中尾光善、エピジェネティクス機構による細胞制御と病態、第 55 回日本腎臓学会 (教育講演)、平成 24 年 6 月 2 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
- ⑱ 中尾光善、日野信次朗、石原宏、クロマチン因子によるエピジェネティックな細胞制御と病態、第 34 回日本分子生物学会年会 (シンポジウム: エピゲノムの静と動 - 維持、形成、リプログラミング)、平成 23 年 12 月 15 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

〔図書〕 (計 12 件)

- ① 中尾光善 羊土社、あなたと私はどうして違う? 体質と遺伝子のサイエンス-99.9%同じ設計図から個性と病気が生じる秘密、222、2015
- ② 中尾光善 羊土社、驚異のエピジェネティクス-遺伝子がすべてではない!? 生命のプログラムの秘密、215、2014
- ③ 田中宏、坂元顕久、中尾光善 金原一郎 医学医療振興財団/医学書院、エピジェネティック調節 (ヒストン修飾) 生体の科学 (細胞シグナル操作法)、2015、66: 476-477
- ④ 日野信次朗、中尾光善 The Lipid、メディカルレビュー社、エネルギー代謝とエピジェネティクス、2015、26: 181-184
- ⑤ 高瀬隆太、日野信次朗、中尾光善 シーエムシー出版、エネルギー代謝のエピジェネティック制御と疾患、エピジェネティクス-基礎研究から産業応用への展望一、2014、189-197
- ⑥ 阿南浩太郎、中尾光善、日野信次朗 メディカル・ドゥ、エネルギー代謝病、遺伝子医学 MOOK25 号 (エピジェネティクスと病気) (佐々木裕之、中尾光善、中島欽一 編)、2013、106-111
- ⑦ 富田さおり、笹井信広、日野信次朗、中尾光善 日本臨床社、エピゲノム修飾を標的とした癌治療ポテンシャル、2012、70: 91-97
- ⑧ 中尾光善 細胞工学、基礎の基礎、3D-エピゲノムが生む新たな生命情報 (中尾光善 監修)、2012、31: 858-862
- ⑨ 日野信次朗、中尾光善 羊土社、エピジェネティック制御、シグナル伝達キーワード事典 (山本雅、仙波憲太郎、山梨裕司 編集)、2012、327-334

- ⑩ 中尾光善、日野信次朗 建帛社、エピジェネティクス機構による代謝制御と病態、栄養とエピジェネティクス—食による身体変化と生活習慣病の分子機構—(ネスレ栄養科学会議監修)、2012、63-73
- ⑪ 木下 聡、渡邊智佳子、中尾光善 メディカル・サイエンス・インターナショナル、遺伝子調節とヒト疾患 (12章翻訳)、遺伝情報の発現制御—転写機構からエピジェネティクスまで (David S. Latchman 原著、五十嵐和彦、深水昭吉、山本雅之 監訳)、2012、365-385
- ⑫ 中尾光善 羊土社、概論—エピジェネティック遺伝:生命情報のメモリーに迫る、代謝エピジェネティクス(中尾光善 編)、実験医学、2011、29: 2204-2210

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

出願状況：1 件

- ① 発明の名称：神経変性疾患治療剤  
出願番号：特願 2016-011705  
出願日：2016/01/25  
出願人：熊本大学  
発明者：谷原秀信；岩尾圭一郎；中尾光善；林秀樹；日野信次朗；堤孝之

取得状況：3 件

- 発明の名称：ミトコンドリア機能向上剤  
出願人：熊本大学  
発明者：中尾光善；日野信次朗
- ① 登録番号／登録日：EP2417985  
／2016/5/10 (欧州)
- ② 登録番号／登録日：特許第  
5685764 号／2015/1/30 (日本)
- ③ 登録番号／登録日：US8,637,480  
／2014/1/28 (米国)

〔その他〕 ホームページ等  
研究室ホームページ

- <http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp>
- [http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/medical\\_cell\\_biology/](http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/medical_cell_biology/)

5. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾光善 (NAKAO, Mitsuyoshi)  
熊本大学・発生医学研究所・教授  
研究者番号：00217663

(2) 連携研究者

日野信次朗 (HINO, Shinjiro)  
熊本大学・発生医学研究所・助教  
研究者番号：00448523

# 公 募 研 究 班

研究課題名：間欠的低酸素環境下での代謝系を介した転写制御機構の解明  
 低酸素環境での代謝リプログラミングを促す転写制御機構の解明

研究期間：2012～2013、2014～2015

課題番号：24116502、26116702

研究代表者 鈴木教郎（東北大学 大学院医学系研究科 講師）

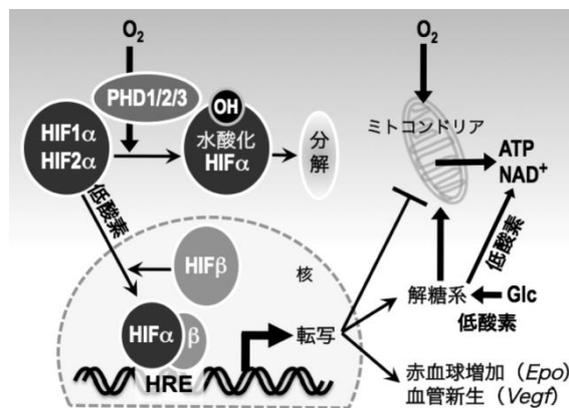
【交付決定額（分配額）】 (金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2013年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2014年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2015年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000

**研究成果の概要：**酸素は細胞の生存に必須であり、低酸素環境は遺伝子発現と代謝環境を大きく変化させる。本研究では、転写因子 HIF を中心とした低酸素誘導性遺伝子発現制御系に対する細胞内代謝環境の影響について、主に遺伝子改変マウスを用いた解析を行った。その結果、虚血再灌流による間欠的低酸素環境が低酸素ストレスに加え、酸化ストレスを発生させ、臓器の線維化や遺伝子発現不全を引き起こすことがわかった。また、 $\alpha$ -ケトグルタル酸や NADPH などの代謝産物がストレス誘導性の転写制御系において重要な役割を果たすことを明らかにした。

1. 研究の背景

細胞はミトコンドリアで酸素を代謝することにより、生存に必要なエネルギーの大部分を得ている。そのため、細胞への酸素供給が低下すると、生命の存続を脅かす「低酸素ストレス」となる。一方、生体は低酸素ストレスに対する防御機構を備えており、低酸素誘導性の HIF 転写因子群を中心とした遺伝子発現様式の変化が分子基盤となっている。

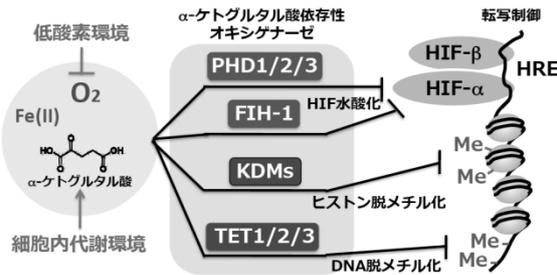


低酸素環境における遺伝子発現と細胞内代謝環境の変化 (HRE: HIF 結合配列)

低酸素応答機構では、赤血球産生や血管新生などに関連した遺伝子発現が誘導され、エネルギー産生経路はミトコンドリアに依存しない解糖系に切り替わる（代謝リプログラミング）。この低酸素誘導性代謝リプログラミングでは、HIF による遺伝子発現誘導に加え、酸素や代謝産物・基質の量的変動によって様々な酵素

の活性が変化することが重要な引き金となる。

HIF を抑制的に制御する PHD 因子群は、酸素に加え、2 価鉄とミトコンドリアの代謝産物である  $\alpha$ -ケトグルタル酸を必要とする脱水素酵素であることから、低酸素応答系は細胞内の代謝状態と相互に影響しあうことが考えられた。



低酸素誘導性遺伝子発現制御系と細胞内代謝系の相互作用

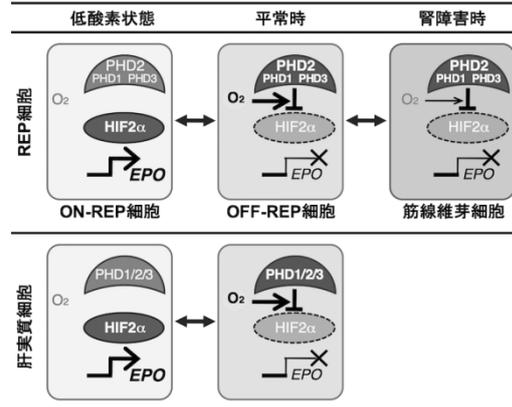
## 2. 研究の目的

慢性低酸素や間欠的低酸素などの様々な低酸素状態に応答した遺伝子発現制御系と細胞内代謝環境の相互作用について、遺伝子改変マウスや細胞株を用いた解析により明らかにすることを目的とした。とくに、転写因子 HIF による遺伝子発現機構を中心に解析を進めた。

## 3. 研究成果

まず、間欠的低酸素の生体への影響を検討するために、マウスを用いた各種臓器の虚血再灌流解析を行った。腎臓では、組織の線維化が進行したが、このとき、尿細管間質に存在する赤血球増殖因子エリスロポエチン (EPO) の産生細胞 (REP 細胞) が筋線維芽細胞に形質転換することを明らかにした。形質転換した細胞は EPO 産生能を失い、組織線維化に直接的に寄与していた。すなわち、REP 細胞は慢性腎臓病で問題となる臓器の線維化と貧血の双方において中心的に関与するこ

とが明らかとなった (*J. Am. Soc. Nephrol.* 2013; *Kidney Int.* 2013)。また、形質転換に伴い、DNA メチル化酵素の発現が誘導されたことから、EPO 遺伝子の不活性化は DNA メチル化が原因であると考えられた。実際に、他の研究グループから、線維化腎の EPO 遺伝子領域が高度にメチル化されていることが報告された。

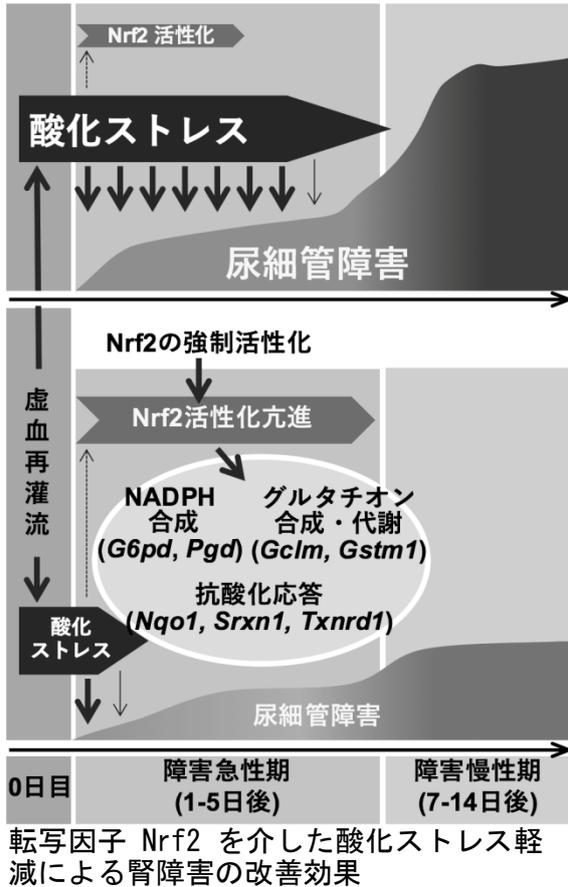


REP 細胞と肝実質細胞における EPO 遺伝子発現制御機構

次に、REP 細胞における低酸素誘導的な EPO 産生制御機構について解析を進めたところ、PHD 因子群のなかでも PHD2 が EPO 産生制御において重要であることがわかった。また、HIF 因子群のなかでは HIF2 $\alpha$  が主要な EPO 遺伝子発現の活性化因子であることが示された (*J. Am. Soc. Nephrol.* 2016)。さらに、EPO 遺伝子転写開始点の上流域に REP 細胞での低酸素誘導的発現を制御する DNA 配列を同定した (*Mol. Cell. Biol.* 2017)。興味深いことに、マウスにおける PHD2 の不活性化は虚血灌流後の EPO 産生低下を抑制したことから、腎性貧血治療における PHD 阻害剤の有効性を示すことができた (*Front. Physiol.* 2015)。

腎臓への虚血再灌流障害は低酸素ストレスに加え、酸化ストレスを著しく惹起

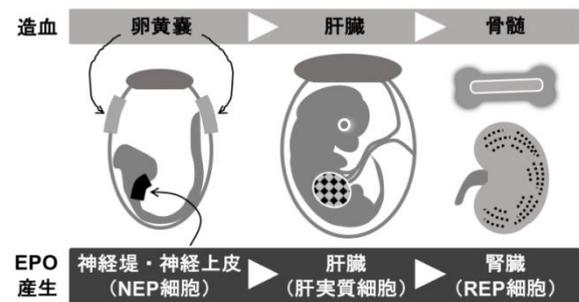
した。



このとき、抗酸化作用のある代謝産物である NADPH の濃度が腎臓において一過性に上昇した。そこで、NADPH 産生酵素 G6PD の遺伝子発現を誘導する転写因子 Nrf2 を活性化させたところ、腎虚血再灌流障害後の NADPH 産生量が増大し、腎障害と線維化が大幅に抑制された (*Kidney Int.* 2017)。また、虚血再灌流障害後の Nrf2 活性化は腎臓の *EPO* 遺伝子発現低下を減弱させたことから、酸化ストレスが低酸素応答系を破綻させていることが示唆された。

*EPO* 遺伝子発現制御機構の解析を行う過程で、胎仔期には一過性に神経堤と神経上皮に *EPO* 産生細胞が局在することを見いだした。その後、肝実質細胞を経て REP 細胞へと *EPO* 産生の際は変遷することを発見した (*Pflugers Arch.* 2016; *Tohoku J. Exp. Med.* 2015; *Nat.*

*Commun.* 2013a, 2013b)。

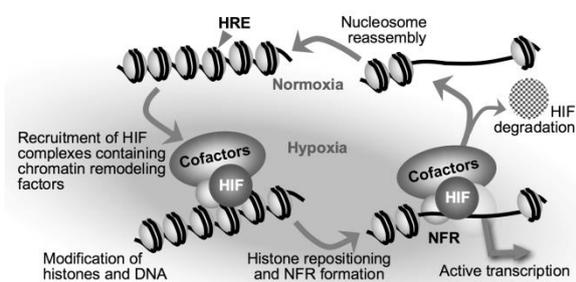


### EPO 産生部位の個体発生に伴う変遷

神経系細胞における *EPO* 遺伝子発現制御機構の解析については、研究材料が乏しいため、進めることができていないが、肝 *EPO* 産生機構については遺伝子改変マウスを用いた解析を行なった。その結果、REP 細胞と同様に、HIF2 $\alpha$ が肝臓における *EPO* 産生に重要な役割を担っていることが明らかとなった。一方、PHD 因子群については、REP 細胞と異なり、肝実質細胞では PHD1, 2, 3 が相補的に機能していた (*Mol. Cell. Biol.* 2015)。また、PHD を欠損したことにより HIF を強制活性化したマウスの肝臓には、脂肪およびグリコーゲンの著しい蓄積を観察した。さらに、HIF2 $\alpha$ は HIF3 $\alpha$ の発現を誘導すること、HIF3 $\alpha$ は HIF2 $\alpha$ による転写活性化を抑制的に制御することを見出した。肝臓の培養細胞を用いた解析からは、HIF が低酸素環境下ではクロマチン構造変換を介して転写を誘導することを明らかにした。

低酸素下での転写制御系の分子機構を解明する目的で、*EPO* 欠乏性の貧血モデルマウスと HIF2 $\alpha$ 過剰発現マウスを樹立し、マイクロアレイ解析とメタボローム解析を行った。また、HIF 恒常活性化細胞を複数種類樹立し、低酸素応答性のクロマチン制御系について解析した。さらに、転写因子 Nrf2 および HIF2 $\alpha$ の核内

タンパク質複合体を単離し、その構成因子を解析したところ、クロマチン構造変換に関わる因子が同定された *Mol. Cell. Biol.* 2016)。



#### HIF による低酸素誘導性遺伝子の可逆的なヌクレオソーム構造変換機構

以上のマウス個体レベルから分子レベルの解析により、低酸素応答性の遺伝子発現制御系と細胞内代謝環境の変化が相互に影響しあう分子機構の一端を明らかにすることができた。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[論文-英文総説含む] (計 20 件)

- ① Hirano I, Suzuki N, Yamazaki S, Sekine H, Minegishi N, Shimizu R, Yamamoto M. Renal anemia model mouse established by transgenic rescue with an erythropoietin gene lacking kidney-specific regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* 37. pii: e00451-16. (2017) 査読有
- ② Nezu M, Souma T, Yu L, Suzuki T, Saigusa D, Ito S, Suzuki N, Yamamoto M. Transcription factor Nrf2 hyperactivation in early-phase renal ischemia-reperfusion injury prevents tubular damage progression. *Kidney Int.* 91, 387-401 (2017) 責任著者 査読有
- ③ Suzuki N, Sasaki Y, Kato K, Yamazaki S, Kurasawa M, Yorozu K, Shimonaka Y, and Yamamoto M. Efficacy estimation of erythropoiesis-stimulating agents using erythropoietin-deficient anemic mice. *Haematologica* 101, e356-e360 (2016) 責任著者 査読有
- ④ Souma T, Nezu M, Nakano D, Yamazaki S, Hirano I, Sekine H, Dan T, Takeda K,

Fong GH, Nishiyama A, Ito S, Miyata T, Yamamoto M, Suzuki N. Erythropoietin synthesis in renal myofibroblasts is restored by activation of hypoxia signaling. *J. Am. Soc. Nephrol.* 27, 428-438 (2016) 責任著者 査読有

- ⑤ Sekine H, Okazaki K, Ota N, Shima H, Katoh Y, Suzuki N, Igarashi K, Ito M, Motohashi H, and Yamamoto M. The Mediator subunit MED16 transduces NRF2-activating signals into antioxidant gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 36, 407-420 (2016) 査読有
- ⑥ Suzuki N, Yamamoto M. Roles of renal erythropoietin-producing (REP) cells in the maintenance of systemic oxygen homeostasis. *Pflugers Arch.* 468, 3-12 (2016) 責任著者 査読有
- ⑦ 宮内健一郎, 鈴木教郎. エリスロポエチン産生細胞の同定と機能解析. *最新医学* 71, 123-128 (2016) 査読無
- ⑧ Tojo Y, Sekine H, Hirano I, Pan X, Souma T, Tsujita T, Kawaguchi S, Takeda N, Takeda K, Fong GH, Dan T, Ichinose M, Miyata T, Yamamoto M, Suzuki N. Hypoxia signaling cascade for erythropoietin production in hepatocytes. *Mol. Cell. Biol.* 35, 2658-2672 (2015) 責任著者 査読有
- ⑨ Suzuki N, Mukai HY, Yamamoto M. In vivo regulation of erythropoiesis by chemically inducible dimerization of the erythropoietin receptor intracellular domain. *PLoS One.* 10, e0119442 (2015) 責任著者 査読有
- ⑩ Suzuki N. Erythropoietin gene expression: developmental-stage specificity, cell-type specificity, and hypoxia inducibility. *Tohoku J. Exp. Med.* 235, 233-240 (2015) 査読有
- ⑪ Souma T, Suzuki N, Yamamoto M. Renal erythropoietin-producing cells in health and disease. *Front. Physiol.* 6, 167 (2015) 責任著者 査読有
- ⑫ 鈴木教郎. 赤血球造血制御による個体レベルの酸素恒常性維持機構. *実験医学* 33, 1724-1730 (2015) 査読無
- ⑬ 関根弘樹, Lorenz Poellinger, 鈴木教郎. 低酸素応答性転写因子 HIF と疾患. *細胞工学* 33, 711-715 (2014) 査読無
- ⑭ Wang L, Jia Y, Rogers H, Suzuki N, Gassmann M, Wang Q, McPherron AC, Kopp J, Yamamoto M, Noguchi CT. Erythropoietin contributes to slow oxidative muscle fiber specification via PGC-1 $\alpha$  and AMPK activation. *Int. J.*

- Biochem. Cell. Biol.** 45, 1155-1164 (2013) 査読有
- ⑮ Yamazaki S, Souma T, Hirano I, Pan X, Minegishi N, Suzuki N, Yamamoto M. A mouse model of adult-onset anaemia due to erythropoietin deficiency. **Nat. Commun.** 4, 1950 (2013a) 責任著者 査読有
- ⑯ Souma T, Yamazaki S, Moriguchi T, Suzuki N, Hirano I, Pan X, Minegishi N, Abe M, Kiyomoto H, Ito S, Yamamoto M. Plasticity of renal erythropoietin-producing cells governs fibrosis. **J. Am. Soc. Nephrol.** 24, 1599-1616 (2013) 査読有
- ⑰ Suzuki N, Hirano I, Pan X, Minegishi N, and Yamamoto M. Erythropoietin production in neuroepithelial and neural crest cells during primitive erythropoiesis. **Nat. Commun.** 4, 2902 (2013b) 責任著者 査読有
- ⑱ Miyata T, Suzuki N, van Ypersele de Strihou C. Diabetic nephropathy: are there new and potentially promising therapies targeting oxygen biology? **Kidney Int.** 84, 693-702 (2013) 査読有
- ⑲ 鈴木教郎. 腎エリスロポエチン産生細胞: REP 細胞. **細胞** 45, 44-47 (2013) 査読無
- ⑳ Jia Y, Suzuki N, Yamamoto M, Gassmann M, Noguchi CT. Endogenous erythropoietin signaling facilitates skeletal muscle repair and recovery following pharmacological induced damage. **FASEB J.** 26, 2847-2858 (2012) 査読有
- 〔学会発表等〕(研究代表者の招待講演)  
(計 20 件)
- ① 鈴木教郎, 腎臓における低酸素・酸化ストレス応答機構、分子細胞情報学セミナー、2017 年 1 月 12 日、広島大学、広島市
- ② 鈴木教郎, エリスロポエチンの造血外機能の探索、産と学をつなぐ senri の会、2016 年 1 月 13 日、千里ライフサイエンスセンター、豊中市
- ③ 鈴木教郎, 腎臓エリスロポエチン産生細胞『REP 細胞』の正常と病態の分子機構、城南腎臓病セミナー、2016 年 5 月 10 日、八芳園、東京都
- ④ 鈴木教郎, 低酸素応答における赤血球造血誘導、第 16 回抗加齢医学会、2016 年 6 月 10 日、パシフィコ横浜、横浜市
- ⑤ 鈴木教郎, 腎性貧血にかかわる分子機構、2016 年 6 月 11 日、第 61 回日本透析医学会、大阪国際会議場、大阪市
- ⑥ 鈴木教郎, 造血因子エリスロポエチンの低酸素誘導的産生制御機構、第 4 回低酸素研究会、2016 年 7 月 23 日、早稲田大学 TWInS、東京都
- ⑦ 鈴木教郎, 低酸素ストレスに対する造血誘導の分子機構、佐島シンポジウム、2016 年 10 月 21 日、東北大学、仙台市
- ⑧ Norio Suzuki, Mechanism of transcriptional activation of HIF-target genes after HIF activation, Lorenz Poellinger Memorial Symposium, Nov 5, 2016, Gifu
- ⑨ 鈴木教郎, 低酸素応答と赤血球産生制御機構、東北大学循環器内科セミナー、2015 年 2 月 4 日、東北大学、仙台市
- ⑩ 鈴木教郎, エリスロポエチン産生細胞の正常と病態、第 2 回日本腎臓研究会、2015 年 1 月 17 日、経団連会館、東京都
- ⑪ 鈴木教郎, 腎エリスロポエチン産生細胞『REP 細胞』の筋線維芽細胞への可逆的な形質転換、第 57 回日本腎臓学会総会 教育セッション、2014 年 7 月 5 日、パシフィコ横浜、横浜市
- ⑫ 鈴木教郎, 造血因子エリスロポエチンの産生制御機構、第 6 回群馬分子医学研究会、2014 年 11 月 20 日、群馬大学、前橋市
- ⑬ 鈴木教郎, Epo 欠乏性貧血モデルマウスにおける ESA の造血促進機構、第 23 回腎とエリスロポエチン研究会フロンティア講演、2014 年 11 月 22 日、品川プリンスホテル、東京都
- ⑭ 鈴木教郎, 酸素供給の恒常性維持における赤血球産生制御機構、第 11 回がんとハイポキシア研究会シンポジウム、2013 年 12 月 13 日、東北大学片平さくらホール、仙台市
- ⑮ 鈴木教郎, 「腎エリスロポエチン産生細胞」慢性腎臓病対策講演会、ウエスティンホテル仙台、2013 年 11 月 21 日
- ⑯ 鈴木教郎, 低酸素環境応答における腎臓の役割と遺伝子発現調節機構、第 2 回川島腎カンファレンス、2013 年 10 月 26-27 日、エーザイ川島工園くすり博物館、各務原市
- ⑰ 鈴木教郎, 赤血球増殖因子エリスロポエチンの機能と産生制御機構、第 1 回 TYCOONS Seminar、2013 年 8 月 3 日、勝山館、仙台市
- ⑱ 鈴木教郎, EPO 産生細胞の同定から機能解析へ、第 58 回日本透析医学会シンポジウム、2013 年 6 月 23 日、福岡国際会議場、福岡市
- ⑲ 鈴木教郎, エリスロポエチンの造血外機能と産生制御機構の解明、日本生化学会東北支部 第 78 回例会・シンポジウム、2012 年 5 月 26 日、山形大学大講義室、山形市 (奨励賞 受賞講演)

- ⑳ 鈴木教郎、低酸素誘導的・組織特異的  
エリスロポエチン遺伝子発現の分子機  
構、第35回日本分子生物学会年会ワー  
クショップ、2012年12月12日、福岡  
国際会議場、福岡市

〔研究成果による産業財産権の出願・取  
得状況〕

・該当なし

〔その他〕

研究室ホームページ

<https://didms-comart-tohoku.jimdo.com/>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木教郎 (SUZUKI, Norio)

東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20447254

研究課題名：細胞増殖の起点となる核酸代謝の亢進のメカニズムの解明  
 Analysis of nucleotide metabolism status required for cell cycle initiation

研究期間：2012～2013

課題番号：24116503

研究代表者 長嶋剛史（東北大学 大学院医学系研究科 非常勤講師）

連携研究者 中山啓子（東北大学 大学院医学系研究科 教授）

連携研究者 舟山 亮（東北大学 大学院医学系研究科 助教）

【交付決定額（分配額）】 (金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2012 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2013 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000

**研究成果の概要**：増殖が停止している細胞に増殖因子刺激を加えることによってグルタミンを基質とした核酸代謝カスケードを構成する酵素群の転写がただちに活性化することを見いだした。それらは細胞周期進行の引き金である E2F による転写活性化ではなく E2F の活性化に先行して異なる転写因子によって誘導されていた。増殖刺激存在下とシグナル阻害時における転写プロファイルの比較解析から核酸代謝経路上部に位置するホスホリボシルピロリン酸合成酵素の十分な発現が核酸供給に必要であることが示された。

### 1. 研究の背景

細胞増殖の静止状態から細胞増殖へ移行する際の代謝環境の変動をもたらす仕組みを理解することによって、細胞増殖に求められる代謝産物の供給メカニズムを明らかとし、細胞の正常な増殖を可能としているシステムを解明することが本研究の目標である。

われわれは、増殖が停止している細胞に増殖因子刺激を加えることによって核酸代謝経路を構成する酵素群の転写がただちに活性化することを見いだした。一方で、例えば細胞増殖が著しいがん細胞で亢進が認められる解糖系に対しては何ら効果を認めていない。すなわち静止状態から細胞増殖へ進入する際に代謝環境はダイナミックに変化することが予想されるが、その中で核酸の供給は、転写を介して調整されていることがわかる。

細胞周期のG1期からS期への進入についてはE2Fが活性化型転写因子として機能し、S期への進行に必須な遺伝子の転写を促進することが知られている（図1上）。そこでE2Fによって転写制御されているDHFRの転写量の変化と核酸代謝カスケードとの変化を比較したところ、核酸代謝カスケードに属する酵素群は、DHFRの転写活性化に先行し、かついくつかの酵素群は類似した時間経過で活性化されていることが判明した（図1下）。

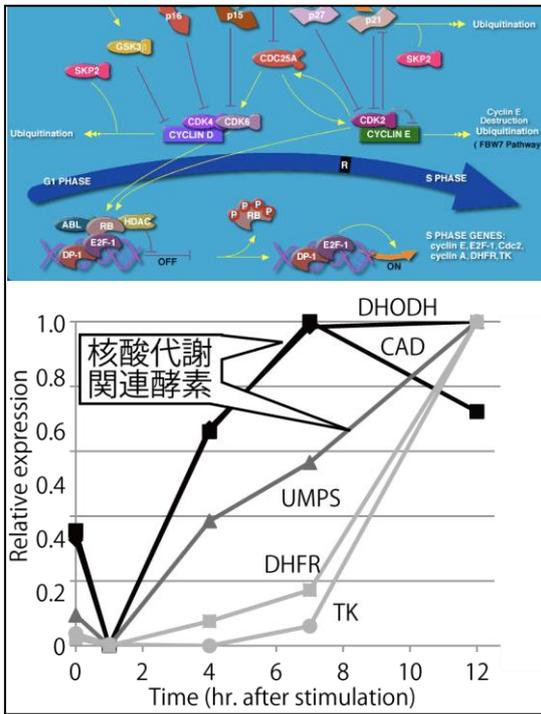


図1：CDK複合体とE2Fによる細胞周期の制御（上）、核酸代謝カスケードに属する酵素群の発現変化（下）

これは、核酸代謝カスケード酵素群は、これまで細胞周期進行の引き金と考えられてきたE2Fによる転写活性化ではなく、E2Fの活性化に先行して、異なる転写因子によって誘導されていることが示唆される。実際に核酸の細胞内量がS期の進行を制御すると報告されていることから核酸生合成経路は細胞周期制御の新しい活性化経路であると考えられる。さらにこのような解析を他の代謝経路にも適応することによって代謝マップという平面に細胞増殖を視点とした軸を加えた立体的代謝マップを描くことが可能であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は細胞増殖の静止状態から細胞増殖へ移行する際の代謝環境の変動をもたらす仕組みを理解することによって、細胞増殖に求められる代謝産物の供給メカニズムを明らかとし、細胞の正常な増殖を可能としているシステムを解明

することである。

そのために本研究課題では細胞周期進行に伴って代謝酵素の発現量変化を網羅的に調べ、発現量変化パターンによるグループ分けから転写による律速酵素の同定、律速酵素を起点とする転写カスケードの記載を試みる（代謝産物-酵素ループ）。さらに代謝酵素の細胞周期進行にともなう変化を調べ、その因果関係を調べる（細胞周期-酵素ループ）。これらのループはいずれも既存のデータベースより*in silico*で作製し、培養細胞で検証する。

細胞が分裂するためには、細胞内の全てのコンポーネントが生合成されて倍加しなくてはならず、そのためには生合成経路もまた細胞周期の各フェーズにおいて精緻に制御されていることが予想される。そのメカニズムを細胞周期と代謝酵素の転写環境の相関関係に注目して解明することを目指す。

## 3. 研究成果

### (1) 細胞周期進行に伴う時系列転写プロファイルの解析

細胞周期進行における転写レベルでの律速酵素を同定するために、特に代謝酵素に注目し、遺伝子発現量の変化パターンに基づくグループ化を行った。解析に際して細胞増殖停止状態にあるNIH3T3細胞にFGF刺激を与えた際のトランスクリプトームデータを対象として用いた。データセットに含まれる17306遺伝子のうち1965個を発現変動遺伝子として抽出した(FDR<0.01)。時系列発現プロファイルのクラスター解析の結果、増殖刺激に対する4種類の応答パターンを見いだした(図2)。

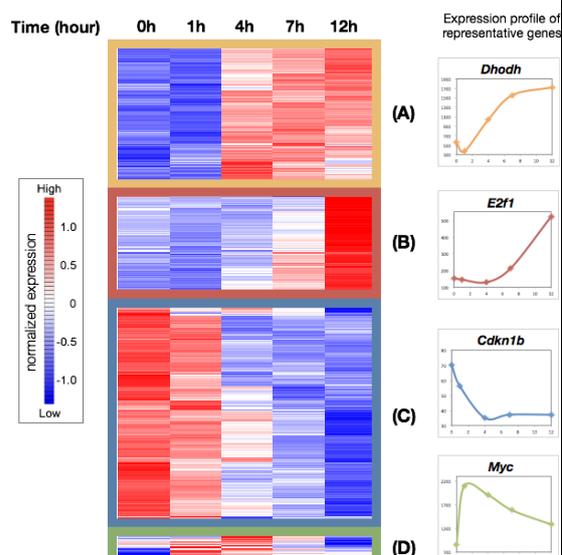


図2：細胞増殖刺激に対する遺伝子発現変化のクラスター解析

増殖刺激後の活性化はクラスターD→A→Bの順でありそれぞれ刺激後4時間以内、7時間以内、12時間以降に発現亢進が認められた。クラスターCは刺激後速やかに発現量が低下する群でありRB1やCDKN1Bといった細胞周期の抑制因子が含まれていた。パスウェイエンリッチメント解析の結果、クラスターAには核酸代謝に関わる遺伝子が、クラスターBには細胞周期制御やDNA複製に関わる遺伝子が濃縮されていた。プロモーター解析の結果から中期応答遺伝子群にはMYCの、後期応答遺伝子群にはE2Fの転写因子結合部位が濃縮されていた。これらの結果は細胞周期進行に先立って核酸代謝経路が活性化されていること、それら時間特異的な転写活性が異なる転写因子によって制御されていることを示している。

### (2) 網羅的データベース解析による類似パターンの探索

これらの結果がデータベース解析に用いたデータセットに固有の現象かを検討するため他のデータセットを用いて同様の解析を行った。網羅的データベース解析の結果、同様の傾向がヒト乳腺上皮細胞

および線維芽細胞において見られることを見いだした(図3)。この結果から解析対象とした細胞に固有の現象ではなく複数種の細胞間で見られる現象であることを確認した。

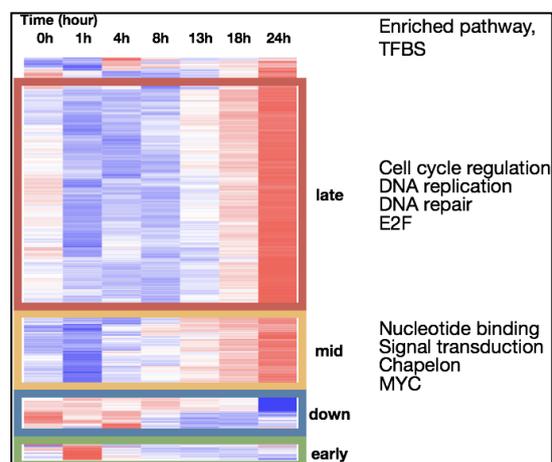


図3：ヒト乳腺上皮細胞におけるEGF刺激への応答パターンとエンリッチメント解析の結果

### (3) 細胞周期進行における律速酵素の同定

個々の核酸代謝酵素の活性化タイミングを詳細に調べるために応答パターンのパスウェイマッピング解析を行った。その結果、はじめにRNA合成に至る一連の経路が活性化され(図4マップ上部)、続いてリボヌクレオチド還元酵素(図4マップ中央EC番号1.17.4.1)およびDNA複製に関わる酵素(図4マップ下部)が活性化されることが明らかとなった。

### Pyrimidine metabolism

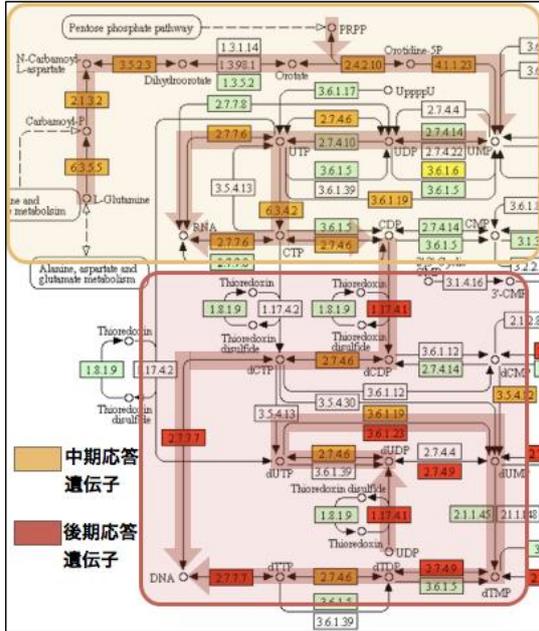
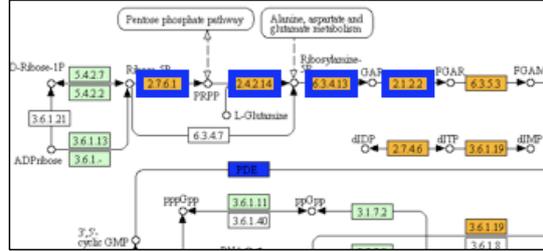


図 4 : 細胞増殖刺激に対するピリミジン代謝酵素の応答パターン

細胞周期進行に必要な代謝カスケードの律速段階を調べるために増殖シグナル刺激を途中で停止した際の発現プロファイルと比較パスウェイ解析を行ったところ、RNA 合成および DNA 複製に関わる酵素群の発現抑制が認められた (図 5 の青枠で示した酵素群)。核酸合成経路の初期に位置する酵素、特に、ホスホリボシルピロリン酸 (PRPP) の代謝に関わる酵素の発現も減少していた。これらの酵素が FGF 刺激後短時間で発現誘導されることと合わせて考えると、PRPP 合成酵素の十分な発現が核酸供給の必要条件であることが示唆された。

### Purine metabolism



### Pyrimidine metabolism

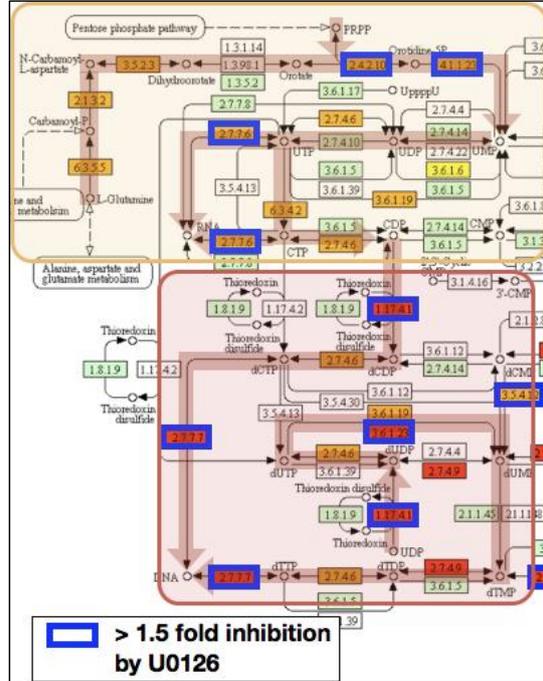


図 5 : 増殖シグナル停止に伴う核酸代謝酵素の発現低下

### (4) 増殖刺激応答のタイミングとシグナル強度依存性

データベース解析の結果を検証するために増殖停止状態から細胞増殖へ向かう際の核酸代謝酵素の遺伝子発現量を RT-qPCR 法によって時間軸にそって計測した。その結果、転写活性化のタイミングと応答性に顕著な特徴が認められた。増殖刺激後速やかに (4-6 時間) 活性化される遺伝子はリボヌクレオチド合成およびサルベージ経路に含まれる酵素であること、それらの活性化タイミングは刺激の強度に依存する事が明らかとなった (図 6)。

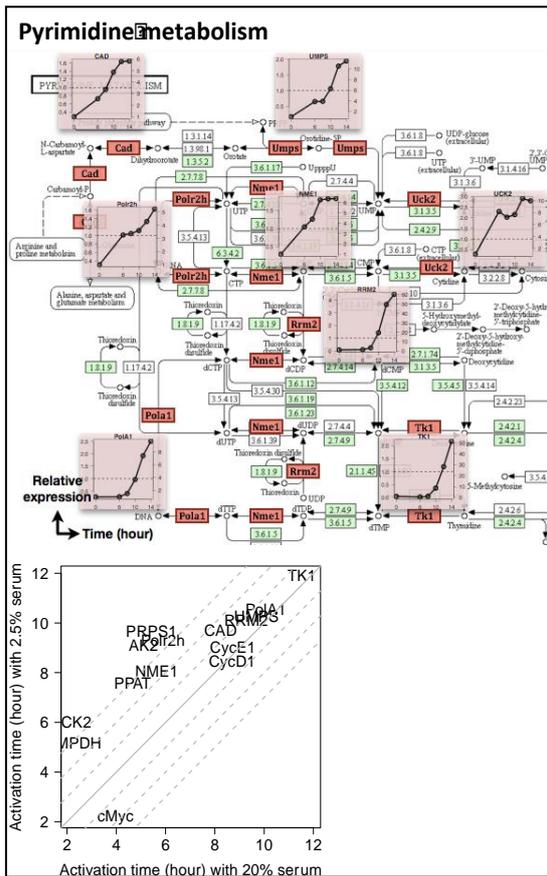


図6：核酸代謝酵素の増殖刺激応答パターンとシグナル強度依存性

これは増殖因子の刺激強度に依存して細胞周期が進行するという FACS 解析の結果とも一致していた。一方で刺激後後期(10時間以降)に発現する遺伝子の活性化タイミングと刺激強度の間に明確な相関は認められなかった。以上の結果から、核酸代謝に関わる酵素群はこれまで細胞周期進行の引き金と考えられてきた E2F による転写活性化ではなく、E2F の活性化に先行して異なる転写因子によって誘導されていること、また経路上部に位置する酵素が転写による律速酵素であることが明らかとなった。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計1件)

- ① Hosogane M, Funayama R, Nishida Y, Nagashima T, Nakayama K. Ras-induced changes in H3K27me3 occur after those in transcriptional activity. *PLoS Genet.* 9(8):e1003698 (2013) 査読有

〔学会発表等〕(研究代表者の招待講演)

(計1件)

- ① 長嶋剛史、細胞増殖の起点となる核酸代謝の亢進のメカニズムの解明、転写代謝システム第3回領域班会議平成24年7月2-4日、筑波山温泉つくばグランドホテル、茨城県つくば市

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

#### 5. 研究組織

(1) 研究代表者

長嶋剛史 (NAGASHIMA, Takeshi)

東北大学・大学院医学系研究科・

非常勤講師

研究者番号：80443000

(2) 連携研究者

中山啓子 (NAKAYAMA, Keiko)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60294972

舟山亮 (FUNAYAMA, Ryo)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20452295

研究課題名：血球分化におけるリジン脱メチル化酵素 LSD1 の機能発現機構  
 Regulation of histone demethylase LSD1 in hematopoiesis  
 血球分化のエピジェネティクス制御変遷とエネルギー代謝  
 Epigenetic regulation and energy metabolism in hematopoiesis

研究期間：2012～2013、2014～2015

課題番号：24116504、26116705

研究代表者 小林麻己人（筑波大学 医学医療系 講師）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2013年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2014年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2015年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究成果の概要：ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 はフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を補酵素とするエピジェネティクス因子である。本研究の目的は、血球分化における LSD1 と FAD の機能解明であり、戦略としてゼブラフィッシュを用いた。まず、LSD1 が血管内皮マスター因子 Etv2 を発現抑制し、血球分化を促すことを解明し、論文発表した。一方、この血球分化促進能には FAD 合成酵素 Flad1 は必要ないという意外な結果を得た。LSD1・FAD とともに内臓組織形成に必要という新たな発見もでき、今後の展開が楽しみとなった。

1. 研究の背景

細胞分化の方向性やタイミングの制御は、ヒストンや DNA のメチル基着脱などによるエピジェネティクス制御が担う。しかし、どのように分化すべき細胞が多分化能細胞から選抜され、どのように分化制御のスイッチが入るのかはよくわかっていない。未分化細胞と分化細胞で消費量や産生システムが異なるエネルギー代謝の変化が、謎を解く鍵の一つと考える。

我々はこれまで、血球分化における細胞運命決定に重要な分子機構をいくつか明らかにしてきた (*Development* 2001; *Mol Cell Biol* 2003; *Curr Biol* 2010)。さらに、順方向遺伝学を駆使した大規模スクリーニングを行い、血球分化異常を示す数系統の突然ゼブラフィッシュ系統単離に成功した。そのうちの一つの系統が、

FAD 依存性のリジン脱メチル化酵素 LSD1 を責任遺伝子としていた。LSD1 は、2004年に Shi らにより初めて同定されたヒストン脱メチル化酵素であり、さまざまな細胞分化の細胞運命決定において、重要なエピジェネティクス制御を行うと考えられている。種々のゲノム解析より、LSD1 はユビキタスに発現し、細胞が分化しても、多くの遺伝子上に存在し続けることがわかった。したがって、LSD1 の機能発現を制御するのは、相互作用する分化細胞特異的な因子の変化による LSD1 複合体の変遷と考えられる。

一方、近年、エネルギー代謝とエピジェネティクス制御の関連性が指摘され始めている。LSD1 の酵素活性には、エネルギー通貨の一つ FAD が補酵素として必要であることから、血球分化における

FAD の量的変動を含むエネルギー代謝の変化と、LSD1 複合体によるヒストン脱メチル化を中心とするエピジェネティクス制御に関連性があるとの仮説を想起した (図1)。



図1 LSD1 活性とエネルギー代謝

## 2. 研究の目的

本研究では、血球分化過程において、複数あると予想される LSD1 の機能を特定し、その作用機序とともに、補酵素である FAD の量的変動との関連性を明らかにすることを目的にする。戦略としては、モデル動物であるゼブラフィッシュの遺伝学を活用する。

具体的には、まず、LSD1 突然変異系統を造血異常を詳細に解析し、その作用機序を分化段階毎に明らかにする。次に、ゼブラフィッシュ胚発生における FAD 量の変動を測定し、さらに、FAD 合成酵素である Flad1 遺伝子の突然変異系統を作製し、その表現型を調べ、LSD1 変異系統の種々表現型との異同を調べる。

## 3. 研究成果

### (1) 胚型造血における LSD1 の機能及び作用機序解明

造血には胚型 (胎児型) 造血と成体型造血がある。胚型造血は、血球-血管内皮共通前駆細胞 (ヘマンジオブラスト) から赤血球及びマクロファージが分化する造血で、魚類であるゼブラフィッシュにおいても存在する。

LSD1 突然変異胚では、血球分化の進

行が遅延し、結果的にヘマンジオブラストが増加していた。我々は、この原因が血管内皮前駆細胞形成のマスター因子 Etv2 の発現亢進によることを見出し、胚型造血の血球分化進行には Etv2 の発現抑制が重要で、この抑制を LSD1 が Etv2 遺伝子のヒストン脱メチル化を介して行うことを明らかにした (図2)。

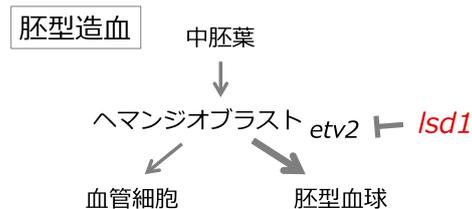


図2 胚型造血における Lsd1 機能

このことは、LSD1 突然変異胚の胚型造血異常が Etv2 突然変異系統との二重変異で表現型回復することからも実証された。

### (2) 成体型造血における LSD1 の機能及び作用機序解明

LSD1突然変異系統は成体型造血にも異常を示した。成体型造血は、造血幹細胞から免疫細胞を含む、全ての血球に分化する造血で、哺乳類では動脈-生殖-中腎領域 (AGM) で造血幹細胞の前駆細胞が発生し、胎性肝、骨髄と移動しながら成熟した造血幹細胞になると考えられている。魚類においても、AGMに相当する背側動脈領域で前駆細胞が発生し、尾部造血組織 (CHT)、腎臓と分化しながら移動する。

LSD1突然変異系統では、造血幹細胞が減少し、その結果、赤血球も免疫細胞も分化異常を示した。マーカー解析の結果、前駆細胞の段階で造血幹細胞分化が留まっている可能性が示唆された。近年、造血幹細胞はヘモジェニック・エンドテリウムという血管内皮細胞から発生することが明らかとなったことから、我々は、胚型造血との類似性から Etv2 の関与を疑

い、LSD1;Etv2二重変異系統の解析を行った。結果は、成体型造血異常はEtv2量を減少させても表現型回復はできず、胚型造血とは異なる機構が存在すると予想された(図3)。

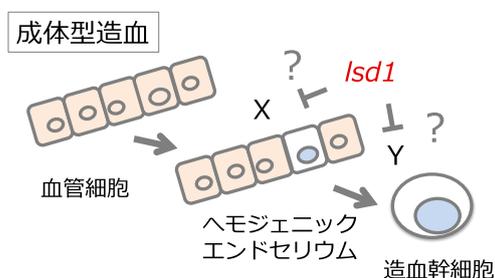


図3 成体型造血におけるLsd1機能

### (3) Flad1 突然変異系統の作製と解析

ゼブラフィッシュ受精卵と5日齢胚を比較すると、全身のFAD量が50倍と激増することが、本領域研究班員の中尾・日野との共同研究により明らかとなった。この結果は、FAD量の増加が胚発生に何らかの影響を与えることを示唆する。

そこで、FAD合成に必須の酵素Flad1の突然変異体をTilling法を用いて作製し、その発生異常を観察したが、意外なことに、Flad1突然変異胚は明快な造血異常を示さなかった。この結果は、ミトコンドリア系のエネルギー代謝と造血発生の間には、大きな関連性がない可能性を推測させる。一方、Flad1突然変異胚では、内胚葉系臓器の発生異常が観察された。興味深いことに、LSD1突然変異胚でも肝臓・膵臓・鰾の発生異常が観察され、内胚葉系臓器の発生には、FAD量とLSD1活性の双方が必要である可能性が示唆された。エネルギー代謝の中軸を担うこうした臓器の発生と、FAD-LSD1軸のエピジェネティクス制御の関係は興味深く、新しい研究の方向性と期待する。

### (4) Keap1-Nrf2 システムによるペントースリン酸経路制御の進化的保存

Keap1-Nrf2 システムは、転写因子 Nrf2 とその制御因子 Keap1 から成り立つストレス応答機構であり、酸化ストレスや親電子生物質に対する主要な生体防御機構として知られている。本領域研究班員の本橋らは、Keap1-Nrf2 システムはペントースリン酸経路の酵素群の遺伝子発現を正に制御し、がん細胞の増殖異常にも寄与するという興味深い発見を2012年に報告した。

我々は、マイクロアレイ解析を行い Nrf2 標的遺伝子の網羅的探索をしたところ、ゼブラフィッシュにおいても Nrf2 がペントースリン酸経路の酵素遺伝子を標的とすることを見出した。このことは、魚類においても、Keap1-Nrf2 システムが、がん細胞における代謝リプログラミングを制御する可能性を示唆する。この可能性検証のために、がん細胞の Nrf2 過剰状態を再現する、Keap1 遺伝子破壊ゼブラフィッシュを CRISPR-Cas9 法で作製した。哺乳類と異なり、魚類には Keap1a と Keap1b の二種類の Keap1 遺伝子が存在する。生後まもなく致死となる Keap1 遺伝子破壊マウスは成体での解析が厳しいが、ゼブラフィッシュでは成体でのがん化研究ができる可能性がある。Nrf2 突然変異系統も系統済で、Keap1 遺伝子破壊体が成体で生存可能であれば、多重変異系統の解析によりがん化と Nrf2 の関連性を遺伝学的に検証できると期待している。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計9件)

- ① Nguyen TV, Fuse Y, Tamaoki J, Akiyama S, Muratani M, Tamaru Y and Kobayashi M. Conservation of the Nrf2-mediated gene regulation of proteasome subunits and glucose metabolism in zebrafish. **Oxid. Med. Cell. Longev.** 2016, 5720574 (2016) 査読有
- ② Fuse Y, Nguyen VT, and Kobayashi M. Nrf2-dependent protection against acute sodium arsenite toxicity in zebrafish. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 305, 136-142 (2016) 査読有
- ③ Vong LB, Kobayashi M and Nagasaki Y. Evaluation of the toxicity and antioxidant activity of redox nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Mol. Pharm.** 13, 3091-3097 (2016) 査読有
- ④ Osborne OJ, Mukaigasa K, Nakajima H, Stolpe B, Romer I, Philips U, Lynch I, Mourabit S, Hirose S, Lead JR, Kobayashi M, Kudoh T and Tyler CR. Sensory systems and ionocytes are targets for silver nanoparticle effects in fish. **Nanotoxicology** 10, 1276-1286 (2016) 査読有
- ⑤ Takeuchi M, Fuse Y, Watanabe M, Andrea CS, Takeuchi M, Nakajima H, Ohashi K, Kaneko H, Kobayashi-Osaki M, Yamamoto M and Kobayashi M. LSD1/KDM1A promotes hematopoietic commitment of hemangioblasts through downregulation of Etv2. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 112, 13922-13927 (2015) 査読有
- ⑥ Fuse Y, Nakajima H, Nakajima-Takagi Y, Nakajima O and Kobayashi M. Heme-mediated inhibition of Bach1 regulates the liver specificity and transience of the Nrf2-dependent induction of zebrafish heme oxygenase 1. **Genes Cells** 20, 590-600 (2015) 査読有
- ⑦ Kim JD, Park KE, Ishida J, Kako K, Hamada J, Kani S, Takeuchi M, Namiki K, Fukui H, Fukuhara S, Hibi M, Kobayashi M, Kanaho Y, Kasuya Y, Mochizuki N and Fukamizu A. PRMT8 as a phospholipase regulates Purkinje cell dendritic arborization and motor coordination. **Science Adv.** 1, e1500615 (2015) 査読有
- ⑧ Ichijo H, Hamada M, Takahashi S,

Kobayashi M, Nagai T, Toyama T and Kawaguchi M. Lateralization, maturation, and anteroposterior topography in the lateral habenula revealed by ZIF268/EGR1 immunoreactivity and labeling history of neuronal activity.

**Neurosci. Res.** 95, 27-37 (2015) 査読有

- ⑨ Mukaigasa K, Nguyen LTP, Li L, Nakajima H, Yamamoto M and Kobayashi M. Genetic evidence of an evolutionarily conserved role for Nrf2 in the protection against oxidative stress. **Mol. Cell. Biol.** 32, 4455-4461 (2012) 査読有

〔学会発表等〕(研究代表者の招待講演)  
(計7件)

- ① 小林麻己人、ゼブラフィッシュを用いた環境ストレス応答の研究、第42回日本毒性学会学術年会シンポジウム、平成27年7月1日、石川県金沢市
- ② 小林麻己人、Keap1-Nrf2システムの化学物質およびストレス応答機序、第42回日本毒性学会学術年会シンポジウム、平成27年7月1日、石川県金沢市
- ③ 小林麻己人、ゼブラフィッシュを用いた医生物学研究、第87回日本生化学会大会シンポジウム、平成26年10月17日、京都府京都市
- ④ Kobayashi, M. Study of the anti-multiple stress system Keap1-Nrf2 using zebrafish, 17th Transcription Assembly Meeting, 平成26年3月18日、バンガロール、インド
- ⑤ Kobayashi, M. Endoplasmic reticulum stress-dependent Nrf2 activation in a zebrafish model of human congenital disorder of glycosylation, International Conference on Environmental Response IV, 平成26年3月1日、宮城県仙台市
- ⑥ 小林麻己人、ゼブラフィッシュ研究、第7回XCIJ-MA研究集会、平成25年3月10日、埼玉県和光市
- ⑦ Kobayashi, M. Evolutionary aspects of Nrf2 in anti-oxidant strategies, UK-Japan Research Exchange Symposium "Molecular Mechanisms of Stress Response in Disease", 平成24年4月6日、茨城県つくば市

〔図書〕(計1件)

- ① 南山堂「医学大辞典」第20版分筆(秋澤忠男ら編) 南山堂、3101、2015

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

〔その他〕 ホームページ等  
研究室ホームページ

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/MBiology/mdbiol.index.html>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林麻己人 (KOBAYASHI, Makoto)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50254941

研究課題名：代謝シグナルによる視床下部 NAD 依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 の制御機構の解明

Elucidation of the mechanisms regulating hypothalamic NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 by metabolic signals.

研究期間：2012～2013

課題番号：24116505

研究代表者 佐々木努（群馬大学 生体調節研究所 准教授）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2013 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000

**研究成果の概要：**加齢は肥満の危険因子だが、NAD<sup>+</sup>依存性タンパク脱アセチル化酵素 Sirt1 は、加齢に伴い視床下部弓状核で減少する。そこで、本研究では、視床下部弓状核で Sirt1 が減少するメカニズムの解明と、同部位での Sirt1 増量に加齢性の肥満を抑制するか検討した。まず、Sirt1 の減少に寄与するユビキチン E3 リガーゼ候補を 3 つ同定した（未発表データ）。また、視床下部弓状核での Sirt1 過剰発現マウスを作成・解析し、Sirt1 はレプチン感受性を改善し加齢に伴う体重増加を抑制することを明らかにした。

### 1. 研究の背景

加齢は肥満の危険因子だが、NAD<sup>+</sup>依存性タンパク脱アセチル化酵素 Sirt1 は、加齢に伴い視床下部弓状核で減少する。研究代表者は、視床下部 Sirt1 と肥満・エネルギーバランスに関する研究を通して、Sirt1 が視床下部特異的に絶食時にユビキチン化され減少すること、摂食による視床下部 Sirt1 タンパクの増加が食事性肥満マウスで認められないこと、過食モデルマウスの視床下部内側基底部の Sirt1 強制発現は過食と体重増加を抑制すること、そして視床下部 Sirt1 は摂食とエネルギー消費の両方を制御することを明らかにした（[Sasaki T et al., Endocrinology](#), 2010）。しかし、全身エネルギーバランスを反映する代謝シグナルによる視床下部 Sirt1 制御機構と、肥満におけるその制御破綻の機序は未解明であった。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究では、(1) 視床下部弓状核で Sirt1 が減少するメカニズムの解明と、(2) 上記の機序を明らかにした後に、同部での Sirt1 増量の治療的意義を検討するために、視床下部弓状核での Sirt1 増量に加齢性の肥満を抑制するかを検討した。

### 3. 研究成果

#### (1) 視床下部弓状核で Sirt1 が減少するメカニズムの解明

①SIRT1 タンパクに結合しうるユビキチン E3 リガーゼの結合スクリーニングを行った。リコンビナント SIRT1 タンパクと、酵素認識部位と活性部位が一体型のユビキチン E3 リガーゼ(224 個の RING 型もしくは U box 型の E3) のリコンビナントタンパク同士の結合スクリーニングを  $\alpha$ スクリーン法を用いて行い、4 つの陽性反応を得た。

②そのうち3つで発現ベクターを作成し、培養細胞で強制発現させ、細胞内での SIRT1 との複合体形成を確認した。

③これらの E3 リガーゼの機能的意義は現在も解析中である。

## (2) 視床下部での Sirt1 増量は、加齢性の肥満を抑制するか？

①Cre リコンビナーゼ依存性に Sirt1 を過剰発現できる遺伝子組換えマウス (Rosa26-Sirt1 マウス) を作成した。

②視床下部弓状核によるエネルギーバランス制御に重要な POMC もしくは AgRP ニューロンで特異的に Sirt1 を過剰発現させたマウスを作成・解析した。その結果、これらのマウスではレプチン感受性が亢進し加齢に伴う体重増加が抑制された。しかし、体重増加抑制のメカニズムは2種類のマウスで異なり、POMC ニューロンでの SIRT1 過剰発現はエネルギー消費量の増加、AgRP ニューロンでの SIRT1 過剰発現は摂食量の減少によるものであった。

③食事性肥満は視床下部弓状核の Sirt1 タンパクの過剰発現と視床下部 NAD<sup>+</sup>量が減少させ、視床下部 Sirt1 過剰発現による抗肥満効果を消失させることが分かった。

④上記の遺伝子組換えマウスでも食事性肥満により同等の SIRT1 タンパク量の減少を認めたため、食事性肥満の誘導時に動くなんらかの代謝シグナルが、翻訳後修飾依存性に視床下部の SIRT1 タンパクの減少を引き起こしていることが示唆された。

## 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計2件)

- ① Sasaki T\* Age-associated weight gain, leptin, and SIRT1: a possible role for hypothalamic SIRT1 in the prevention of weight gain and aging through modulation of leptin sensitivity. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 6:109 (2015)査読有
- ② Sasaki T\*, Kikuchi O, Shimpuku M, Susanti VY, Yokota-Hashimoto H, Taguchi R, Shibusawa N, Sato T, Tang L, Amano K, Kitazumi T, Kuroko M, Fujita Y, Maruyama J, Lee YS, Kobayashi M, Nakagawa T, Minokoshi Y, Harada A, Yamada M, Kitamura T.\* Hypothalamic Sirt1 prevents age-associated weight gain by improving leptin sensitivity in mice. **Diabetologia**, 57(4):819-31 (2014)査読有

〔学会発表等〕(研究代表者の招待講演)  
(計5件)

- ① 佐々木努、中枢神経系の SIRT1 による体重調節、日本薬学会第136年会、平成28年3月28日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
- ② 佐々木努、中枢神経系の SIRT1 による体重調節—なぜ中年太りするの？、日本薬学会関東支部若手シンポジウム、平成27年9月13日、日本大学薬学部、千葉県船橋市
- ③ 佐々木努、中枢神経系の SIRT1 による体重調節—なぜ中年太りするの？、第58回日本糖尿病学会年次学術集会、平成27年5月22日、下関市民会館、山口県下関市
- ④ 佐々木努、北村忠弘 視床下部弓状核の Sirt1 は加齢に伴う体重増加を抑制する、日本肥満学会第18回アディポサイエンス・シンポジウム、平成25年8月23日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)
- ⑤ 佐々木努、視床下部 Sirt1 とエネルギーバランス、日本内分泌学会第31回内分泌代謝学サマーセミナー、平成25年7月13日、ゆふいん山水館(大分県由布市)

〔図書〕(計2件)

- ① 佐々木努、北村忠弘 羊土社、**実験医学別冊「マウス表現型解析スタンダード」**、2016、第4章12、242-250
- ② 佐々木努 科学評論社、**内分泌・糖尿病・代謝内科**、2015、41(1)；14-18

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

〔その他〕ホームページ等  
研究室ホームページ  
<http://taisha.imcr.gunma-u.ac.jp/index.html>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐々木努 (SASAKI, Tsutomu)  
群馬大学・生体調節研究所・准教授  
研究者番号：50466687

研究課題名：転写因子 p53 のタンパクコードと細胞内代謝エネルギー制御機構  
Regulatory network of intracellular energy and metabolism by protein code of transcriptional factor p53

研究期間：2012～2013

課題番号：24116506

研究代表者 田中知明（千葉大学 大学院医学研究院 准教授）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

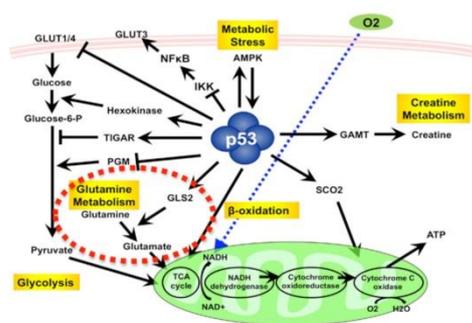
	直接経費	間接経費	合計
2012 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2013 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000

**研究成果の概要：**糖尿病が発癌リスクを高める一方、p53 遺伝的多型が生活習慣病や老化に関与する事実が報告され、両者を結ぶ共通の分子機序が注目されている。ゲノムワイド解析から p53 依存的代謝調節因子を多く同定したが、中でもグルタミン代謝に関与する Phosphate Activated Glutaminase (GLS2)を見出した。p53-GLS2 経路の解析ではグルタチオンを介した p53 依存的抗酸化作用と  $\alpha$  ケトグルタル酸を介した好氣的エネルギー産生機構が示された。さらに乳がんのがん幹細胞性を制御する転写ネットワークとして、転写因子 p53 及び GATA3 の複合体解析により、Akt シグナルによる転写/代謝制御スイッチを明らかにした。

1. 研究の背景

糖尿病や肥満などの内分泌代謝性疾患において、細胞や生体レベルでの代謝環境が膵  $\beta$  細胞や脂肪細胞、血管内皮や平滑筋でのエピジェネティック変化を引き起こしゲノムに刷り込まれるという「代謝のリプログラミング仮説」が提唱されている。そして、細胞は内外界からの刺激や代謝環境変化にตอบสนองして、核内の種々の転写因子がシグナルを受け、エピジェネティクスとそれに連動した代謝関連遺伝子発現制御を通じて、細胞内代謝経路を流動的にシフトさせ、恒常性維持や新たな代謝バランスへと移行する。その際、基質や代謝産物がアロステリックに作用したり、転写因子複合体やクロマチンに作用することで転写環境形成に機能することが明らかにされつつある。従って、Cell Metabolism 調節と生命素子による転写因子制御のクロストーク機構は、いわゆる疾患エピジェネティクスを引き

図1. 転写因子p53による多彩な細胞内エネルギー・代謝調節機構



起こし、がんや細胞老化、糖尿病や肥満などの生活習慣病の分子病態と深く関わっている。そのような背景の中、研究代表者は、p53 によるクロマチン制御機能を独創的な手法を用いて解析したきたが (*Cell*, 2007)、p53 が癌幹細胞を制御している事実からも、これらの制御機構にはある程度共通の分子基盤を共有する可能性が推定されている。実際に、ChIP アッセイとプロテオミクスを組み合わせた手法を応用し、p53 クロマチン複合体に

含まれる機能的分子を同定する方法を開発し、human Cellular Apoptosis Susceptibility protein (hCAS/CSE1L) の同定とそのクロマチン制御の役割と p53 転写調節機構について明らかにした (Cell, 2007)。興味深いことに、この分子はクロマチンにカップリングし、ヒストンのメチル化 (tri-MeK27-H3) を介してヘテロクロマチンの伸長を阻害することで遺伝子の転写を調節していることがわかった。そこで、本提案では「転写因子 p53 エネルギー代謝調節機構の解明」を目指して、これまでの知見とシステムを基に、「エピゲノム・トランスクリプトーム解析」「メタボロミクス」を融合させて、p53 依存的代謝調節分子の探索的解析とその代謝作用機序の検証によるメカニズム解明、転写因子複合体ネットワークを明らかにして、クロマチン機能調節・エピジェネティクス制御解析を通じて、それらの本質的分子メカニズムにアプローチした。

## 2. 研究の目的

転写因子 p53 と Cell Metabolism 制御という新たな視点から、脂肪細胞や血管内皮での代謝環境応答によるエピジェネティクス制御における p53 転写因子複合体解析と細胞内代謝調節を司る新たな p53 下流遺伝子の探索を通じて、糖尿病内分泌・代謝性疾患におけるエピジェネティクスの統合的理解を目的に、新たな細胞治療の可能性にアプローチし、癌と生活習慣病や幹細胞におけるエピジェネティック治療創薬や新たな治療ターゲットの創薬基盤の開発につなげることを目的とした。

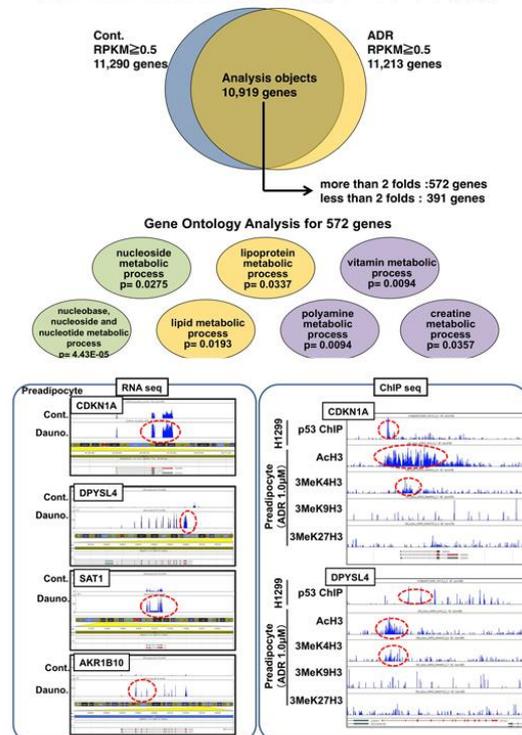
## 3. 研究成果

### (1) p53 依存的代謝調節経路の探索

次世代型シーケンサーを用いた ChIP-seq とトランスクリプトーム解析に

よる細胞内代謝を制御する新規 p53 下流遺伝子の同定による新たな生理的役割の探索・代謝環境応答時の p53 依存的 epigenetics 解析を行った。p53 標的遺伝子として、核酸代謝に関わ

図2. RNA Sequenceによるゲノムワイド解析



る酵素に高い相同性を持つ DPYSL4、ポリアミン代謝関連の SAT1 など 20 種類以上の遺伝子を同定した (図 2)。

その中で、グルタミン代謝に関与する Phosphate Activated Glutaminase (GLS2) に注目した。GLS2 は主にミトコンドリアに局在しグルタミンを加水分解しグルタミン酸を供給する酵素だが、種々の細胞において p53 がその転写誘導を引き起こし、グルタミン代謝を調節していることが確認された。メタボローム解析や生化学的手法による p53-GLS2 経路の機能解析から、還元型グルタチオン産生を介した通じた ROS 調節を通じて p53 依存的抗酸化作用を発揮していた。Warburg 効果に関連して、グルタミン酸から  $\alpha$  ケトグルタル酸を介して TCA 回路に作用し、

好氣的回路を経て ATP 産生と酸素消費量を正に司る仕組みが明らかとなった。さらに、ミトコンドリアスーパーコンプレックスアッセイ解析から、GLS2 の抗酸化作用や好氣的エネルギー産生作用には、酵素反応を担う Glutaminase core domain と共に、C 末端を介したミトコンドリア複合体への会合が重要であるといった詳細なメカニズムが明らかとなった。マウス肥満モデルにおいて、高脂肪食負荷マウスの脂肪や脂肪肝、NASH 肝において GLS2 は有意に増加していた。ところが興味深いことに NASH から HCC になると、逆に GLS2 遺伝子の発現は低下することが明らかとなった。これらの一連の結果から、細胞レベルでのミトコンドリア機能制御能と肥満や腫瘍形成の動物モデル解析から、癌と生活習慣病を結ぶ分子機構に関与している可能性が示唆された。これらの知見や遺伝子群は、クロマチン制御とメタボリックストレス応答、細胞内代謝調節の接点で作用する機能的分子であることを示している。従って、糖尿病や肥満モデルにおける解析を更に押し進めることにより、新たな分子病態の解明と新しいタイプの治療薬開発に結びつくことが期待される。

## (2) 代謝調節と転写複合体制御

研究を進展させる中で、乳がんモデルにおいて、がん抑制遺伝子 p53 と転写因子 GATA3 が転写ネットワークを形成して、がん幹細胞性と代謝を制御していることが明らかとなった。そこで、p53 転写複合体システムを GATA3 複合体の生化学的な解析に発展・応用させ、LC-MS/MS により新規の会合分子の同定と GATA3 の新規翻訳後修飾の検出、それらの機能解析をおこなった。具体的には、Th2 細胞クロ

ーンである D10G4.1 細胞に Flag-tag を付加した GATA3 を発現させ、抗 Flag 抗体および抗 GATA3 抗体を用いた Tandem-affinity 精製を行った。その結果、コントロールと比較して GATA3 特異的な数多くのバンドを検出した。その中には抑制性複合体として知られている NuRD 複合体の構成分子である Chd4, p66a, Mat1, Mta2 及び Mbd3 が含まれていた。この結果は、Chd4 が GATA3 の機能である Th2 サイトカイン遺伝子座のクロマチンリモデリングの誘導と Th1 細胞分化の抑制の両方に関わっていることを示唆していた。さらに、GATA3 の翻訳後修飾解析では、実に多くの新規リン酸化やアセチル化、メチル化部位を発見した。GATA3 の特徴的なドメイン構造として、C 末端側に 2 つの Zinc-finger motif を有することが挙げられる。今回、これらの zinc-finger motif のリンカー部位に新規のリン酸化が認められ、リン酸化を mimic する変異体解析から、GATA3 の transcriptional activating complex と repressive complex の複合体組み替えがリン酸化スイッチによって引き起される可能性を見出した。リン酸化を mimic する変異体解析から、GATA3 の transcriptional activating complex と repressive complex の複合体組み替えがリン酸化スイッチによって引き起される可能性を見出した。そこで、これらの上流シグナルの探索を in vitro の In-gel-assay 法を改良して実施した。具体的には、GATA3 免疫複合体を試験管内で、放射ラベルした ATP とリコンビナント GATA3 タンパクと反応させたところ、複合体に GATA3-リン酸化キナーゼが含まれていることが判明した。そこで、SDS-PAGE gel を作製する行程において、

基質としてのリコンビナント GATA3 を加えた。複合体を SDS-PAGE 展開後に脱 SDS 処理を行い、In-gel リン酸化反応を実施した結果、約 50kDa の GATA3-リン酸化活性を有する分子の同定に成功した。LC-MS/MS から Akt であることが明らかとなった (*Nature Commun.* 2016)。細胞レベルと vitro のキナーゼアッセイにおいて、Akt が GATA3 の zinc finger 間のリンカー領域に存在するリン酸化クラスター (Ser308/Thr315/Ser316) の責任酵素のひとつであることを確認した。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[論文-英文総説含む] (計 11 件)

- ① Hashimoto N, Tanaka T\*. Role of miRNAs in the pathogenesis and susceptibility of diabetes mellitus. *J. Hum. Genet.* 62, 141-150 (2017). 査読有
- ② Yoshida A, Kitajima S, Li F, Cheng C, Takegami Y, Hayashi N, Nishimoto Y, Nagatani N, Kohno S, Muranaka S, Nishiuchi T, Suzuki S, Nakao S, Tanaka T, Hirose O, and Takahashi C. MicroRNA-140 mediates RB tumor suppressor function to control stem cell-like activity through interleukin-6. *Oncotarget.* 8,13872-13885. (2017). 査読有
- ③ Kobayashi S, Hoshino T, Hiwasa T, Satoh M, Rahmutulla B, Tsuchida S, Komukai Y, Tanaka T, Matsubara H, Shimada H, Nomura F, Matsushita K. Anti-FIRs (PUF60) auto-antibodies are detected in the sera of early-stage colon cancer patients. *Oncotarget.* 7(50):82493-82503,(2016). 査読有
- ④ Sakuma I, Higuchi S, Fujimoto M, Takiguchi T, Nakayama A, Tamura A, Kohno T, Komai E, Shiga A, Nagano H, Hashimoto N, Suzuki S, Mayama T, Koide H, Ono K, Sasano H, Tatsuno I, Yokote K, Tanaka T\*. Cushing syndrome due to ACTH-secreting pheochromocytoma aggravated by a glucocorticoid-driven positive-feedback loop. *J Clin Endocrinol Metab.* 101:841-846,(2016). 査読有

- ⑤ Hosokawa H, Tanaka T, Endo Y, Kato M, Shinoda K, Suzuki A, Motohashi S, Matsumoto M, Nakayama KI, Nakayama T. Akt1-mediated Gata3 phosphorylation controls the repression of IFN  $\gamma$  in memory-type Th2 cells. *Nat Commun.* 7: 11289, (2016). 査読有
- ⑥ Hosokawa, H., Kato, M., Tohyama, H., Tamaki, Y., Endo, Y., Kimura, M. Y., Tumes, D. J., Motohashi, S., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Tanaka, T., and Nakayama, T.: Methylation of Gata3 at Arg261 regulates transactivation of the Il5 gene in T helper 2 cells. *J Biol Chem.* 290(21):13095-13103, (2015). 査読有
- ⑦ Hosokawa, H., Tanaka, T., Kato M., Tohyama H., Hanazawa A., Tamaki Y., Hirahara K., Sakikawa I., Morita A., Nagira M., Suzuki, Y. and Nakayama, T. Gata3/Ruvbl2 complex regulates T helper 2 cell proliferation via repression of Cdkn2c expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110,18626-31 (2013). 査読有
- ⑧ Hosokawa H, Tanaka T, Suzuki Y, Iwamura C, Ohkubo S, Endoh K, Kato M, Endo Y, Onodera A, Tumes J D, Kanai A, Sugano S, Nakayama T. Functionally distinct Gata3/Chd4 complexes coordinately establish Th2 cell identity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 12, 4691-4696 (2013) 査読有
- ⑨ Tatsuno I, Terano T, Nakamura M, Suzuki K, Kubota K, Yamaguchi J, Yoshida T, Suzuki S, Tanaka T, Shozu M. Lifestyle and osteoporosis in middle-aged and elderly women: Chiba bone survey. *Endocr J.* (2013) 査読有
- ⑩ Utsumi T, Kawamura K, Imamoto T, Kamiya N, Komiya A, Suzuki S, Nagano H, Tanaka T, Nihei N, Naya Y, Suzuki H, Tatsuno I, Ichikawa T. High predictive accuracy of Aldosteronoma Resolution Score in Japanese patients with aldosterone-producing adenoma. *Surgery* (2012) 査読有
- ⑪ Terano T, Suzuki S, Yoshida T, Nagano H, Hashimoto N, Mayama T, Koide H, Suyama K, Tanaka T, Yamamoto K, Tatsuno I. Glycemic control and bone metabolism in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Diabetology International*, (2012) 査読有

[学会発表等] (研究代表者の招待講演) (計 15 件)

- ① 鈴木佐和子、田中知明. p53 は GLS2 によるグルタミン代謝制御を介した

- 抗酸化作用とエネルギー調節により腫瘍抑制作用を発揮する。第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡。
- ② 中山哲俊、鈴木佐和子、永野秀和、橋本直子、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、横手幸太郎、田中知明(ポスター口演)p53 による転写抑制遺伝子群の探索的解析と癌における予後の検討。第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡。
- ③ 永野秀和、鈴木佐和子、中山哲俊、橋本直子、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、龍野一郎、横手幸太郎、田中知明(ポスター口演)p53 下流遺伝子 DPYSL4 の癌抑制機構と細胞内エネルギー調節作用。第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡。
- ④ 佐久間一基、鈴木佐和子、永野秀和、橋本直子、中山哲俊、樋口誠一郎、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、横手幸太郎、田中知明(ポスター口演)脂肪細胞における転写因子 p53 による新たな代謝調節分子の探索的解析とその生活習慣病における役割。第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡。
- ⑤ 橋本直子、田中知明(ポスター口演)p53 クロマチン複合体に含まれる Nuclear body protein SP110 と細胞老化誘導・癌抑制機能。第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 12 日、福岡。
- ⑥ 鈴木佐和子、永野秀和、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、龍野一郎、横手幸太郎、田中知明.p53 と GLS2 のミトコンドリア制御を介した生活習慣病および癌における役割。第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、北海道。
- ⑦ 橋本直子、滝口朋子、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、横手幸太郎、田中知明. 癌細胞における COP9signalosome による p53 および p73 のリン酸化と安定化の制御機構。第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、北海道。
- ⑧ 永野秀和、鈴木佐和子、中山哲俊、橋本直子、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、龍野一郎、横手幸太郎、田中知明. RNA-sequencing 解析を用いた p53 下流遺伝子 DPYSL4 の同定とそのエネルギー代謝調節機構。第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、北海道。
- ⑨ 田中知明. 癌抑制遺伝子産物 p53 による細胞内代謝制御機構～がん、エネルギー代謝、肝細胞性の接点の新展開～第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日、北海道。
- ⑩ 鈴木佐和子 他 (2012) GLS2 を介した p53 による iPS/ES 幹細胞の機能調整から癌・生活習慣病の基盤病態にかかわるエネルギー産生と ROS 制御機構の解明。第 85 回日本内分泌学会学術総会、4 月 19 日、名古屋。
- ⑪ 鈴木佐和子、龍野一郎、鈴木穰、菅野純夫、横手幸太郎、田中知明 (2012) AIMAH 症例の臨床内分泌学的特徴と RNA sequence を用いたゲノムワイドの遺伝子発現解析。第 85 回日本内分泌学会学術総会、4 月 20 日、名古屋。
- ⑫ 陶山佳子、樋口誠一郎、佐久間一基、永野秀和、今田映美、鈴木佐和子、吉田知彦、川村幸治、今本敬、市川智彦、龍野一郎、横手幸太郎、田中知明 (2012) サブクリニカルクッシング症候群 (SCS)101 症例の手術の有無による合併症への影響に関する検討。第 85 回日本内分泌学会学術総会、4 月 20 日、名古屋。
- ⑬ 橋本直子、大石賢吾、龍野一郎、鈴木穰、菅野純夫、横手幸太郎、田中知明 (2012) ゲノムワイド解析に用いた細胞老化における p53 による老化形質制御機構。第 85 回日本内分泌学会学術総会、4 月 20 日、名古屋。
- ⑭ 永野秀和、鈴木佐和子、鈴木穰、菅野純夫、北川光洋、曾我朋義、横手幸太郎、田中知明 (2012) p53 下流遺伝子 DPYSL4 のエネルギー代謝調節作用と癌抑制機能。第 85 回日本内分泌学会学術総会、4 月 20 日、名古屋。
- ⑮ 吉田知彦、鈴木穰、菅野純夫、龍野一郎、横手幸太郎、田中知明 (2012) RANKL 依存性破骨細胞分化におけるゲノムワイドでの転写産物解析。第 85 回日本内分泌学会学術総会、4 月 21 日、名古屋。
- [図書] (計 4 件)
- ① 田中知明 p53 による細胞内代謝調節機構, Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌, (2012)
- ② 田中知明 細胞老化における p53 の役割, メディカルサイエンスダイジェスト, (2013)
- ③ 田中知明、横手幸太郎 エピジェネティクスと老化, BIO Clinica. 29(18):18-24. (2014)
- ④ 橋本直子、田中知明 p53 と老年疾患, 医学のあゆみ. 253(9):15107-1512. (2015)

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

〔その他〕 ホームページ等

研究室ホームページ

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/moldiag/>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中知明 (TANAKA, Tomoaki)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：50447299

研究課題名：ヒストン修飾酵素の細胞内エネルギー感知機構の解明  
栄養環境によるヒストンメチル化制御機構の解明

研究期間：2012～2013、2014～2015

課題番号：24116507、26116708

研究代表者 酒井寿郎（東京大学 先端科学技術研究センター 教授）

連携研究者 稲垣 毅（東京大学 先端科学技術研究センター 特任准教授）

連携研究者 稲垣恭子（日本医科大学付属病院 糖尿病・内分泌代謝内科 助教）

連携研究者 松村欣宏（東京大学 先端科学技術研究センター 助教）

連携研究者 曾我朋義（慶應義塾大学 環境情報学部 教授）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2013年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2014年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2015年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000

**研究成果の概要：**環境からの刺激がゲノム上に化学修飾として記憶されるエピゲノムの解明は生活習慣病の発症解明に重要である。脂肪組織は環境からの刺激に動的にリモデリングし、恒常性の維持に重要な役割を果たす。本研究では、翻訳後修飾・プロテオーム、ChIP シークエンス、3C、メタボローム解析を統合し、脂肪細胞における環境刺激とエピゲノム変化を解析した。その結果、(i) 環境変化に応答する際のヒストンメチル化酵素の役割、そして、(ii) 環境変化に対する初期応答にはエピゲノム修飾酵素の翻訳後修飾が鍵となることを明らかとした。

## 1. 研究の背景

糖尿病や動脈硬化などの生活習慣病の発症に、脂肪細胞の生理的機能の破綻が原因であるメカニズムが注目されており、脂肪細胞の分化と機能の制御メカニズムの解明は重要な課題となってきた。脂肪細胞は環境に応じて動的にリモデリングし、個体の恒常性の維持に寄与する。栄養過多の時には過形成・肥大化し脂肪として蓄える一方、寒冷環境下ではミトコンドリアに富んだ熱産生細胞が増加し褐色化してくる。それでは細胞はどのようにして細胞外の栄養環境を感知し、これに応答するのか。この応答のメカニズムにエピゲノムの関与が明らかにされつつある。エピゲノム酵素は、環境をシグナリングや

栄養と代謝物を通して感知し、記憶として定着させると考えられる。エピゲノムはヒストンのアセチル化、メチル化などによって修飾される。この修飾酵素は、代謝物を補酵素、基質とすることから代謝状態が大きくエピゲノムの状態を制御すると考えられる。しかし、栄養や寒冷などの環境に、エピゲノム酵素はどのように応答してエピゲノムを変化させ代謝の環境に適応していくのかよくわかっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、脂肪細胞をモデルに、細胞外環境がエピゲノムに及ぼす影響を解析する。細胞培養のグルコース刺激やカテコールアミン刺激に伴い変化する細胞内の代謝物が

エピゲノムを調節するか、代謝のコファクターであるSアデノシルメチオニン(SAM)、 $\alpha$ ケトグルタル酸( $\alpha$ KG)などがどう影響を受けるか、ヒストン脱メチル化酵素がどのように変化し、メチル化酵素と代謝の間のリンクを解析する。

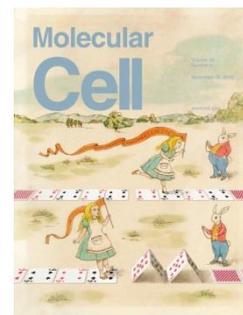
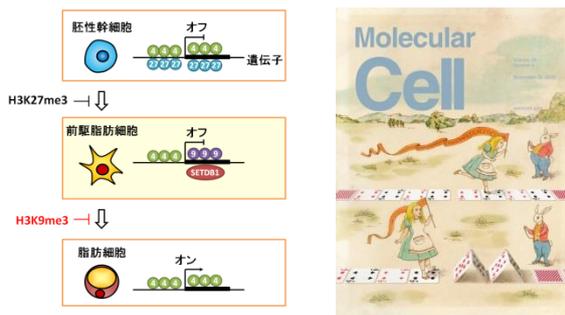
### 3. 研究成果

エピゲノム修飾酵素に対する高機能性モノクローナル抗体作製、翻訳後修飾・プロテオーム解析、ChIP シークエンス、3C(クロマチン高次構造変化解析)法といった要素技術を確立し、メタボローム解析(慶応大学曾我教授との協同研究)をこれに加え、脂肪細胞・個体レベルでのエピゲノム解析を行い、下記の成果をあげた。

(i) 環境変化に応答する際のヒストンメチル化酵素(SETDB1)の役割解明(Mol Cell 2015)

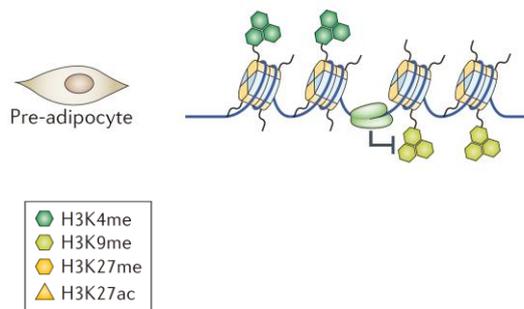
脂肪細胞の分化は高グルコース、cAMP誘導剤、インスリンによって誘導される。分化に伴うエピゲノム変化をチップシーケンス法によって網羅的に解析したところ、分化の鍵となる転写因子に特徴的なヒストン修飾を見出した。そしてヒストンメチル化酵素 SETDB1 が前駆脂肪細胞において、*Cebpa*, *Pparg* 遺伝子の転写因子開始点を挟みヘテロクロマチン-ユークロマチン境界を形成し、この H3K4/H3K9me3 ビバレントクロマチンと命名された新規なクロマチンドメインが遺伝子発現を抑制すること解明した(Molecular Cell 2015)。未分化状態では SETDB1 によりこのエピゲノム情報が維持されているが、分化誘導刺激による SETDB1 の発現が低下するとエピゲノム情報が書き換えられ、このクロマチンドメインはユークロマチンへと変化し、遺伝子発現が誘導され、その結果、前駆脂肪細胞が脂肪細胞へと分化した。

### H3K4/H3K9me3 ビバレントクロマチン



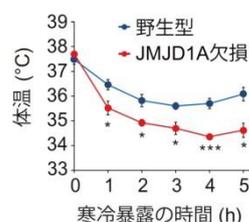
Mol Cell のカバー Matsumura Y, Sakai j et al, Mol Cell, 2015

アリス(RNA Pol2)は4のカード(H3K4me3)のもとで走りRNAを伸展させ、脂肪細胞に必要な転写を促進する。K4のもとでH3K9(カードの9)をみるとここでとどまってしまい、前駆脂肪細胞の状態にとどまる。



Inagaki T, Sakai j Kajimura S

Nature Reviews Molecular Cell Biology 2016 のレビューより新規ビバレントクロマチンのイラスト。

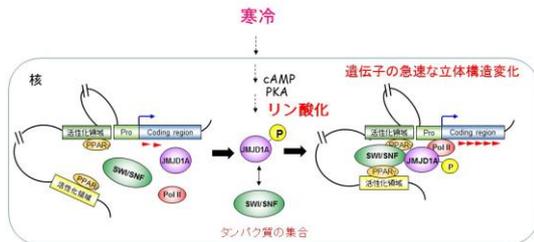


(ii) 環境変化に対する初期応答にはエピゲノム修飾酵素の翻訳後修飾が鍵となる

(Nat Commun 2015)

私たちヒトや哺乳動物は、急激な環境の変化に瞬時に応答し生命を守るしくみがある。からだは寒冷という危険な状態にさらされると、中枢でこれを感知し、交感神経からはノルアドレナリンというホルモンが分泌されて、熱産生を専門に行う褐色脂肪組織ですみやかに熱が産生され、低体温になることを防ぐ。急速に外界の温度が低下したとき、これを感知し、交感神経の活性化から熱を産するためには数分の速さで対応できるしくみが必要である。これまで

我々は、DNA が巻き付いているヒストンタンパク質のメチル基を除く働きのある JMJD1A タンパク質を欠損したマウスは低体温に陥ることを突き止めていたが、そのしくみの詳細は明らかではなかった。



我々は本研究において、JMJD1A という核内タンパク質が寒冷刺激にともない交感神経刺激を介してリン酸化されることで、「遺伝子の高次構造を変化させる複数のタンパク質群」が熱産生遺伝子 DNA に結合し、「長距離 DNA ルーピング」と呼ばれる遺伝子 DNA の高次構造変化を起こすことによって、熱産生遺伝子の発現を活性化させることを明らかにした。寒冷刺激によってβアドレナリン受容体—細胞内シグナリングを経て、cAMP 依存性キナーゼ (A キナーゼ: PKA) が活性化し、JMJD1A は 265 番目のセリンでリン酸化翻訳後修飾を受けた。リン酸化 JMJD1A は DNA 結合の核内受容体 PPAR $\gamma$  とクロマチン再構成因子 SWI/SNF とタンパク質複合体を形成し、複合体中の核内受容体によって標的遺伝子に局在し (標的特異性の決定)、遠隔のエンハンサー領域をクロマチンルーピングによってプロモーターに近接させ、急速な転写誘導を促すというシーケンシャルな機構を解明した (Nat Commun 2015)。このエピゲノム修飾酵素の翻訳後修飾を介した数時間の急性応答は、エピゲノム情報が書換えられるための重要な鍵となることが示唆された。(iii) これらの内容の一部は Nature Reviews Molecular Cell Biology 2016 で紹介した。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕 (計 14 件)

- ① Mimura I, Nangaku M, Kanki Y, Tsutsumi S, Inoue T, Kohro T, Yamamoto S, Fujita T, Shimamura T, Suehiro J, Taguchi A, Kobayashi M, Tanimura K, Inagaki T, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Aburatani H, Kodama T, Wada Y. (2012) Dynamic change of chromatin conformation in response to hypoxia enhances the expression of GLUT3 (SLC2A3) by cooperative interaction of hypoxia-inducible factor 1 and KDM3A. *Mol Cell Biol*, 32, 3018-32. 査読有
- ② Nakae J, Cao Y, Hakuno F, Takemori H, Kawano Y, Sekioka R, Abe T, Kiyonari H, Tanaka T, Sakai J, Takahashi S, Itoh H. (2012) Novel repressor regulates insulin sensitivity through interaction with Foxo1. *EMBO J*, 31, 2275-95. 査読有
- ③ Ishimoto K, Tachibana K, Hanano I, Yamasaki D, Nakamura H, Kawai M, Urano Y, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Doi T. (2013) Sterol-regulatory-element-binding protein 2 and nuclear factor Y control human farnesyl diphosphate synthase expression and affect cell proliferation in hepatoblastoma cells. *Biochem J*, 429, 347-57. 査読有
- ④ Matsumura Y, Sakai J, Skach WR. (2013) Endoplasmic reticulum protein quality control is determined by cooperative interactions between Hsp/c70 protein and the CHIP E3 ligase. *J Biol Chem*, 288, 31069-79. 査読有
- ⑤ Tachibana K, Takeuchi K, Inada H, Sugimoto K, Ishimoto K, Yamashita M, Maegawa T, Yamasaki D, Osada S, Tanaka T, Rakugi H, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Doi T. (2013) Human mannose-binding lectin 2 is directly regulated by peroxisome proliferator-activated receptors via a peroxisome proliferator responsive element. *J Biochem*, 154, 265-73. 査読有
- ⑥ Maejima T, Inoue T, Kanki Y, Kohro T, Li G, Ohta Y, Kimura H, Kobayashi M, Taguchi A, Tsutsumi S, Iwanari H, Yamamoto S, Aruga H, Dong S, Stevens JF, Poh HM, Yamamoto K, Kawamura T, Mimura I, Suehiro J, Sugiyama A, Kaneki K, Shibata H, Yoshinaka Y, Doi T, Asanuma A, Tanabe S, Tanaka T, Minami T, Hamakubo T, Sakai J, Nozaki N, Aburatani H, Nangaku M, Ruan X, Tanabe

- H, Ruan Y, Ihara S, Endo A, Kodama T, Wada Y. (2014) Direct Evidence for Pitavastatin Induced Chromatin Structure Change in the KLF4 Gene in Endothelial Cells. *PLoS One*, 9, e96005. 査読有
- ⑦ Tanaka T, Tahara-Hanaoka S, Nabekura T, Ikeda K, Jiang S, Tsutsumi S, Inagaki T, Magoori K, Higurashi T, Takahashi H, Tachibana K, Tsurutani Y, Raza S, Anai M, Minami T, Wada Y, Yokote K, Doi T, Hamakubo T, Johan A, J. GF, Nakajima A, Aburatani H, Naito M, Shibuya A, Kodama T, Sakai J.\* (2014) PPAR beta/delta activation of CD300a controls intestinal immunity. *Scientific Reports*, 4, 5412. 査読有
- ⑧ Abe Y, Rozqie R, Matsumura Y, Kawamura T, Nakaki R, Tsurutani Y, Tanimura-Inagaki K, Shiono A, Magoori K, Nakamura K, Ogi S, Kajimura S, Kimura H, Tanaka T, Fukami K, Osborne TF, Kodama T, Aburatani H, Inagaki T, Sakai J.\* (2015) JMJD1A is a signal-sensing scaffold that regulates acute chromatin dynamics via SWI/SNF association for thermogenesis. *Nat Commun*, 6, 7052. 査読有
- ⑨ Inagaki T, Iwasaki S, Matsumura Y, Kawamura T, Tanaka T, Abe Y, Yamasaki A, Tsurutani Y, Yoshida A, Chikaoka Y, Nakamura K, Magoori K, Nakaki R, Osborne TF, Fukami K, Aburatani H, Kodama T, Sakai J.\* (2015) The FBXL10/KDM2B Scaffolding Protein Associates with Novel Polycomb Repressive Complex-1 to Regulate Adipogenesis. *J Biol Chem*, 290, 4163-77. 査読有
- ⑩ Matsumura Y, Nakaki R, Inagaki T, Yoshida A, Kano Y, Kimura H, Tanaka T, Tsutsumi S, Nakao M, Doi T, Fukami K, Osborne TF, Kodama T, Aburatani H, Sakai J.\* (2015) H3K4/H3K9me3 Bivalent Chromatin Domains Targeted by Lineage-Specific DNA Methylation Pauses Adipocyte Differentiation. *Mol Cell*, 60, 584-96. 査読有 (表紙に選ばれた)
- ⑪ Raza-Iqbal S, Tanaka T, Anai M, Inagaki T, Matsumura Y, Ikeda K, Taguchi A, Gonzalez FJ, Sakai J, Kodama T. (2015) Transcriptome Analysis of K-877 (a Novel Selective PPARalpha Modulator (SPPARMalphalpa))-Regulated Genes in Primary Human Hepatocytes and the Mouse Liver. *J Atheroscler Thromb*, 22, 754-72. 査読有
- ⑫ Tachibana K, Gotoh E, Kawamata N, Ishimoto K, Uchihara Y, Iwanari H, Sugiyama A, Kawamura T, Mochizuki Y, Tanaka T, Sakai J, Hamakubo T, Kodama T, Doi T. (2015) Analysis of the subcellular localization of the human histone methyltransferase SETDB1. *Biochem Biophys Res Commun*, 465, 725-31. 査読有
- ⑬ Hachiya R, Shiihashi T, Shirakawa I, Iwasaki Y, Matsumura Y, Oishi Y, Nakayama Y, Miyamoto Y, Manabe I, Ochi K, Tanaka M, Goda N, Sakai J, Suganami T, Ogawa Y. (2016) The H3K9 methyltransferase Setdb1 regulates TLR4-mediated inflammatory responses in macrophages. *Sci Rep*, 6, 28845. 査読有
- ⑭ Ohguchi H, Hideshima T, Bhasin MK, Gorgun GT, Santo L, Cea M, Samur MK, Mimura N, Suzuki R, Tai YT, Carrasco RD, Raje N, Richardson PG, Munshi NC, Harigae H, Sanda T, Sakai J, Anderson KC. (2016) The KDM3A-KLF2-IRF4 axis maintains myeloma cell survival. *Nat Commun*, 7, 10258. 査読有

〔学会発表等〕(研究代表者の招待講演)

(計 30 件)

- ① Juro Sakai: Epigenomic Regulation of Inflammation, Energy Metabolism and Adipogenesis, **Key Stone Symposia**, Alpbach, Austria, April 5, 2013
- ② Juro Sakai: Epigenomic Regulation of Energy Metabolism and Obesity, **7th Asia Oceania Conference of Obesity**, Bandung, Indonesia, November 1, 2013
- ③ Juro Sakai: Epigenomic Regulation of Energy Metabolism in Brown Adipocytes Though Phosphorylation of Histone Demethylase Jmjd1a, **Cold Spring Harbor Asia meeting**, Nuclear Receptors & Diseases, Suzhou, China, November 6, 2013
- ④ Juro Sakai: PKA-dependent phosphorylation of JMJD1A drives energy expenditure through Higher-Order Chromatin Regulation via SWI/SNF and PPARγ Association in Brown Adipocytes, **The 18th International Vascular Biology Meeting**, Kyoto, Japan, April 15, 2014
- ⑤ Juro Sakai: The immuno-inhibitory receptor CD300A controls intestinal immunity and prevents onset of diabetes through a PPARδ dependent pathway. 第 44 回日本動脈硬化学会, 福岡, 2012 年 7 月 19 日 (シンポジウム)
- ⑥ 酒井寿郎: PPARδ と腸管免疫ならびに糖脂質代謝の制御. 脳心血管抗加齢研究会 2012, 大阪, 2012 年 11 月 18 日
- ⑦ 酒井寿郎: ヒストン脱メチル化酵素

- Jmjd1a と肥満・メタボリックシンドローム. 第 60 回日本実験動物学会総会, 筑波, 2013 年 5 月 16 日 (シンポジウム)
- ⑧ **酒井寿郎**: ヒストン脱メチル化酵素 Jmjd1a の翻訳後修飾によるメタボリックシンドローム発症機構. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会, 熊本, 2013 年 5 月 18 日 (シンポジウム)
- ⑨ **酒井寿郎**: 生活習慣病、分子遺伝学からエピゲノミクスへ. 第 38 回日本香粧品学会, 東京, 2013 年 6 月 6 日 (シンポジウム)
- ⑩ **酒井寿郎**: 肥満・生活習慣病発症におけるヒストン脱メチル化酵素 Jmjd1a と交換神経経路の役割. 第 2 回日本 DOHaD 研究会年会, 東京, 2013 年 6 月 7 日
- ⑪ **酒井寿郎**: Epigenomic Regulation of Energy Metabolism in Brown Adipocytes and metabolic syndrome. 第 45 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 東京, 2013 年 7 月 19 日 (シンポジウム)
- ⑫ **酒井寿郎**: ヒストン脱メチル化酵素の翻訳後修飾と肥満・メタボリックシンドローム. 脳心血管抗加齢研究会 2013, 大阪, 2013 年 12 月 15 日 (シンポジウム)
- ⑬ **酒井寿郎**: 交感神経刺激による脂肪燃焼と肥満におけるエピゲノム変化の役割. 第 87 回日本内分泌学会学術総会, 福岡, 2014 年 4 月 24 日 (シンポジウム)
- ⑭ **Juro Sakai**: Metabolic and environmental regulations of Jmjc histone demethylases, The 14<sup>th</sup> Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan, Yokohama, Japan, June 27, 2014 (ワークショップ)
- ⑮ **Inagaki, T., Abe, Y., Rozqie, R., Kawamura, T., Tsurutani, T., Tanimura, T., Matsumura, Y., Sakai, J.**: JMJD1A Regulates Metabolic Gene Expression by Mediating Long-Range Genomic Interactions in Response to  $\beta$ -Adrenergic Stimulation, The 46th Annual Scientific Meeting of the Japan Atherosclerosis Society, Tokyo, Japan, July, 2014 (シンポジウム)
- ⑯ **酒井寿郎**: PKA-dependent phosphorylation of JMJD1A drives energy expenditure through higher-order chromatin regulation via SWI/SNF and PPAR $\gamma$  association in brown adipocytes. 第 87 回日本生化学会大会, 京都, 2014 年 10 月 18 日 (シンポジウム)
- ⑰ **Sakai, J.**: PKA-dependent Association of Histone Demethylase JMJD1A with SWI/SNF and PPAR $\gamma$  Alters Chromatin Dynamics and Thermogenesis in Brown Adipocytes, The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Yokohama, Japan, November 26, 2014 (シンポジウム)
- ⑱ **稲垣毅, 岩崎聡, 松村欣宏, 川村猛, 阿部陽平, 吉田文乃, 中村加奈子, 馬郡健太, 仲木竜, 田中十志也, 児玉龍彦, 油谷浩幸, 酒井寿郎**: FBXL10 によるエピゲノム複合体を介した脂肪細胞分化調節機構. 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月 25 日 (ワークショップ)
- ⑲ 田中十志也, 田原聡子, Jiang Shuying, 内藤眞, 渋谷彰, 児玉龍彦, **酒井寿郎**: PPAR $\beta/\delta$  は CD300a の活性化を介して腸管免疫を制御する. 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014 年 11 月 27 日 (ワークショップ)
- ⑳ **稲垣毅, 阿部陽平, Rozqie Royhan, 松村欣宏, 川村猛, 仲木竜, 鶴谷悠也, 谷村恭子, 田中十志也, 児玉龍彦, 油谷浩幸, 酒井寿郎**: 脂肪細胞における新規エピゲノム制御機構. 第 52 回日本臨床分子医学会学術集会, 京都, 2015 年 4 月 11 日 (シンポジウム)
- ㉑ **酒井寿郎**: 核内受容体 PPAR $\gamma$  とシグナル感知脱メチル化酵素によるエネルギー代謝制御機構. 第 88 回内分泌学会総会, 東京, 2015 年 4 月 25 日 (シンポジウム)
- ㉒ **稲垣毅, 阿部陽平, Rozqie Royhan, 松村欣宏, 梶村真吾, 児玉龍彦, 油谷浩幸, 酒井寿郎**: アディポバリオロジーを制御するヒストン脱メチル化酵素 JMJD1A の修飾シグナル. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 下関, 2015 年 5 月 22 日 (シンポジウム)
- ㉓ **Sakai, J.**:  $\beta$ -Adrenergic induced phosphorylation of JMJD1A drives energy expenditure via SWI/SNF chromatin remodeler in Brown Adipocytes, The 47th Annual Scientific Meeting of the Japan Atherosclerosis Society, Sendai, Japan, July 10, 2015 (シンポジウム)
- ㉔ **酒井寿郎, Eko F. Ariyant, 曾我朋義, 稲垣毅, 松村欣宏**: Metabolic regulation of Adipocyte differentiation by isocitrate dehydrogenase and Jmjc histone demethylase. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回生化学会大会合同大会, 神戸, 2015 年 12 月 3 日 (ワークショップ)
- ㉕ **松村欣宏, 吉田文乃, 仲木竜, 鹿野優佳, 稲垣毅, 油谷浩幸, 酒井寿郎**: 細胞系譜特異的 DNA メチル化により形成される H3K4/H3K9me3 クロマチンドメインは脂肪細胞分化を停止させる. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回生化学会大会合同大会, 神戸, 2015

- 年12月3日(ワークショップ)
- ②6 **酒井寿郎**: 絶食でのケトン体産生のメカニズム. 第16回日本抗加齢医学会総会シンポジウム, 横浜, 2016年6月10日(シンポジウム)
- ②7 **Juro Sakai**: Nuclear receptor PPAR $\gamma$  epigenomic modifier complexes that control adipocyte differentiation and metabolic phenotype. 第48回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 東京, 2016年7月14日(シンポジウム)
- ②8 稲垣毅, 阿部陽平, Rozqie Royhan, 松村欣宏, 仲木竜, 川村猛, 梶村真吾, 児玉龍彦, 油谷浩幸, **酒井寿郎**: JMJD1A 複合体による熱産生のエピゲノム制御機構. 第39回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016年11月30日(シンポジウム)
- ②9 **酒井寿郎**: 生活習慣病、遺伝子からエピゲノムへ. 第24回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 大分, 2016年12月3日(シンポジウム)
- ③0 **Juro Sakai**: Environmental cues and Epigenetic Regulation of Adipogenesis and Obesity. 第24回血管生物医学会学術集会, 長崎, 2016年12月9日(シンポジウム)

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

〔その他〕 ホームページ等

研究室ホームページ

<http://www.mm.rcast.u-tokyo.ac.jp/>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

酒井寿郎(SAKAI, Juro)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号: 80323020

### (2) 連携研究者

稲垣 毅 (INAGAKI, Takeshi)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授

研究者番号: 10507825

稲垣恭子 (INAGAKI, Kyoko)

日本医科大学付属病院・

糖尿病内分泌代謝内科・助教

研究者番号: 70537430

松村欣宏 (MATSUMURA, Yoshihiro)  
東京大学・先端科学技術研究センター・助教

研究者番号: 20375257

曾我朋義 (SOGA, Tomoyoshi)

慶応義塾大学・環境情報学部・教授

研究者番号: 60338217

研究課題名：非アルコール性脂肪性肝炎におけるエネルギー代謝と転写環境の  
クロストーク

Crosstalk of transcriptional control and energy pathways in  
non-alcoholic steatohepatitis

研究期間：2012～2013

課題番号：24116508

研究代表者 田中 稔（東京大学 分子細胞生物学研究所 准教授）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2013 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000

**研究成果の概要：**非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）は近年患者数が増加している代謝性疾患であり、脂肪肝から肝炎、肝線維化、肝癌に進行しうる。本研究では NASH 発症における Oncostatin M (OSM) の役割を中心に、代謝制御やメチル化、細胞間相互作用の視点から、NASH の発症機序を解明することを目的とした。OSM 受容体 KO マウスや OSM 発現マウスを利用した *in vivo* 及び *in vitro* の解析を行い、高脂肪食負荷や NASH モデルにおいて、OSM はマクロファージに作用して M2 様活性化に寄与し、耐糖能や炎症、線維化に関わることを明らかにした。

## 1. 研究の背景

近年、代謝性疾患の一環として非アルコール性脂肪性疾患（NAFLD）が大きな問題となってきている。その重症型である非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）は脂肪肝から慢性肝炎を発症し、やがて肝線維化、肝硬変を経て肝癌へと進行しうる。肝臓での脂肪蓄積を背景とした炎症反応の長期化と、それに伴う肝星細胞の活性化による細胞外基質の過剰産生が肝線維化・肝硬変へと進行させる原因となっているが、その発症機構は不明であった。サイトカインの異常分泌によるネットワークの破綻や ROS の関与が示唆されているが、細胞レベルでの解析は進んでおらず、NASH 発症とメチル化等の関連についても、ほとんど解析されていない。我々はこれまでに IL-6 ファミリーに属するサイトカインであるオンコスタチン M (OSM) の多様な臓器に対する作用

について研究を行ってきた (Rev Physiol Biochem Pharmacol 2003)。OSM 受容体 (OSMR) KO マウスは造血系に異常を示すのみならず (Blood 2003)、急性肝障害モデルにおいては著しい肝再生不良と肝炎の増悪化が認められた (Hepatology 2004)。また、OSM が脂肪細胞分化を強く抑制することも報告している (JBC 2006)。このように、OSM はエネルギー代謝に関わる肝臓、脂肪細胞だけでなく、炎症に関わる血液細胞にも作用することから、NASH 発症に関与することが予想された。実際、OSMR KO マウスは NASH の背景となる肥満や耐糖能障害において異常が見られていたため、NASH 発症における OSM シグナルに着目し、研究を進めた。

## 2. 研究の目的

NASH は肝臓における代謝異常から、肝炎、肝線維化、肝硬変へと進行する疾患

である。このような代謝性疾患の研究には全身のエネルギーバランスを考慮した個体レベルでの解析のみならず、病因となる臓器を構成する細胞レベルでの解析が重要であると考えられる。本研究では、NASH 発症における代謝と転写の制御に関わる因子として OSM に着目し、細胞レベルでの解析を中心として、NASH 発症の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。特に、代謝異常からの耐糖能障害や肝炎の発症、その後の肝線維化への進行における OSM の作用を細胞間相互作用という視点から解明することを目指した。

### 3. 研究成果

#### (1) OSM シグナルと脂肪肝、耐糖能障害、メチル化との関連

① OSMR KO マウスは高脂肪食投与により著しい肥満と NAFLD 様の症状を呈した。このマウスは高インスリン血漿を呈し、ITT, GTT によりインスリン抵抗性であることが明らかとなった。その発症機序として、脂肪組織マクロファージに対する OSM の作用を明らかにした。すなわち、野生型マウスでは、高脂肪食負荷により脂肪組織での OSM の産生が上昇し、脂肪組織のマクロファージに作用すると、抗炎症性の M2 様マクロファージが誘導されるのに対して、OSMR KO マウスでは炎症性の M1 マクロファージが優位となり、炎症性サイトカインの亢進によりインスリン抵抗性を引き起こされることが明らかとなった。

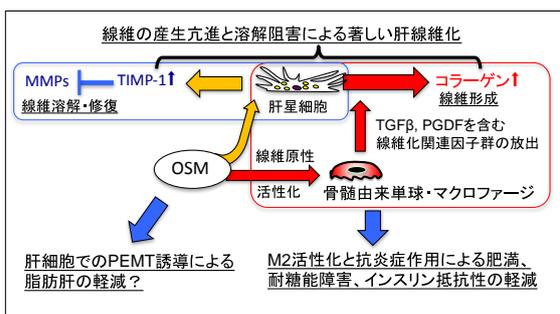
② OSMR KO マウスにコリン欠乏食を投与すると、著しい脂肪肝を呈した後に、線維化が進行して NASH 様の症状を示した。コリンはベタインを介し、メチオニンの供給源となりうる栄養素であることから、NASH 発症には S-アデノシルメチオニン (SAM) やメチル化が関与する可

能性が考えられた。そこで、OSM シグナルが肝臓での SAM 産生やメチル化に及ぼす影響を調べるために、コリン欠乏食投与後の野生型マウスと OSMR KO マウスのメチオニンアデノシルトランスフェラーゼ (Mat) の発現を比較した。その結果、KO マウスでは、Mat2a は野生型と同程度であったが、Mat1a は低下が認められた。さらに、フォスファチジルエタノールアミン-N-メチルトランスフェラーゼ (PEMT) の有為な低下も認められた。PEMT は PE をメチル化することで PC を生合成する酵素であり、PC は肝細胞内の中性脂肪を VLDL として末梢に送るのに必要とされる。よって、OSMR KO マウスでは、メチル化の低下を介して肝細胞内に中性脂肪が蓄積し、著しい脂肪肝に至った可能性が示唆された。

#### (2) 肝線維化における OSM の作用と細胞間相互作用

① 高脂肪食投与による肥満や耐糖能障害、インスリン抵抗性における OSM の作用は、脂肪組織での OSM の発現上昇によるマクロファージの M2 活性化を介した作用であったことから、NAFLD 時には OSM の血中濃度が上昇し、肝臓においても何らかの作用を及ぼす可能性が予想された。そこで、NASH の病態進行過程で重要となる肝線維化に着目し、OSM の作用を検討した。まず、Hydrodynamic Tail Vein injection 法 (HTVi 法) を用いて野生型マウスの正常肝臓で OSM を発現させると、それだけで著しい肝線維化に進行した。さらに、OSMR KO マウスに慢性肝炎モデルを施すと、肝線維化の有為な軽減が認められた。以上の結果から、NAFLD 時に発現上昇する OSM は肝線維化へ移行するためのリスクファクターであることが示唆された。

② OSM による肝線維化誘導機構をさらに詳細に明らかにするために、肝臓を構成する細胞群をセルソーターを用いて分離し、*in vitro* 共培養系を構築して、OSM の作用の検討を行った。その結果、OSM は肝線維化の責任細胞である肝星細胞に直接作用し、コラーゲンの分解を抑制する Timp-1 遺伝子の発現を強く誘導したが、コラーゲン遺伝子自体の発現は誘導しなかった。一方、肝マクロファージと肝星細胞との共培養系では OSM 刺激により肝星細胞のコラーゲン発現が誘導された。OSM は肝マクロファージに作用すると TGFβ の転写を亢進させ、間接的に肝星細胞を活性化させることで肝線維化に寄与していることが示唆された。



NASH発症と肝線維化過程における細胞間相互作用モデル

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計 10 件)

- ① Komori T, Tanaka M, Furuta H, Akamizu T, Miyajima A, Morikawa Y. Oncostatin M is a potential agent for the treatment of obesity and related metabolic disorders: a study in mice. *Diabetologia*. 58(8):1868-76. (2015) 査読有 doi:10.1007/s00125-015-3613-9
- ② Guo S, Li ZZ, Gong J, Xiang M, Zhang P, Zhao GN, Li M, Zheng A, Zhu X, Lei H, Tanaka M, Li H. Oncostatin M Confers Neuroprotection against Ischemic Stroke. *J Neurosci*. 35(34):12047-62. (2015) 査読有 doi:10.1523/JNEUROSCI.1800-15.
- ③ Yagai T, Miyajima A, Tanaka M. Semaphorin 3E secreted by damaged hepatocytes regulates the sinusoidal

regeneration and liver fibrosis during liver regeneration. *Am J Pathol*. 184: 2250-9 (2014) 査読有

- doi:10.1016/j.ajpath.2014.04.018.
- ④ Sato F, Miyaoka Y, Miyajima A, Tanaka M. Oncostatin M maintains the hematopoietic microenvironment in the bone marrow by modulating adipogenesis and osteogenesis. *PLoS One* 9:e116209 (2014) 査読有 doi:10.1371/journal.pone.0116209.
- ⑤ Miyajima A, Tanaka M, Itoh T. Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. *Cell Stem Cell* 14:561-74 (2014) 査読なし doi:10.1016/j.stem.2014.04.010.
- ⑥ Lauber S, Wong S, Cutz JC, Tanaka M, Barra N, Lhoták S, Ashkar A, Richards CD. Novel function of Oncostatin M as a potent tumor-promoting agent in lung. *Int J Cancer*. 136:831-43 (2014) 査読有 doi:10.1002/ijc.29055.
- ⑦ Komori T, Tanaka M, Senba E, Miyajima A, Morikawa Y. Deficiency of Oncostatin M receptor b (OSMRb) exacerbates high-fat diet-induced obesity and related metabolic disorders in mice. *J Biol Chem*. 289:13821-37 (2014) 査読有 doi:10.1074/jbc.M113.542399.
- ⑧ Taguchi K, Hirano I, Itoh T, Tanaka M, Miyajima A, Suzuki A, Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2 enhances cholangiocyte expansion in Pten-deficient livers. *Mol Cell Biol*. 34:900-13 (2013) 査読有 doi:10.1128/MCB.01384-13
- ⑨ Komori T, Tanaka M, Senba E, Miyajima A, Morikawa Y. Lack of oncostatin M receptor b leads to adipose tissue inflammation and insulin resistance by switching macrophage phenotype. *J Biol Chem*. 288(30):21861-75 (2013) 査読有 doi:10.1074/jbc.M113.461905.
- ⑩ Inagaki FF, Tanaka M, Inagaki NF, Yagai T, Sato Y, Sekiguchi K, Oyaizu N, Kokudo N, Miyajima A. Nephronectin is upregulated in acute and chronic hepatitis and aggravates liver injury by recruiting CD4 positive cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 430(2):751-6 (2013) 査読有 doi:10.1016/j.bbrc.2012.11.076.

〔学会発表等〕(研究代表者の招待講演)

(計 10 件)

- ① Tanaka M. Study on the molecular mechanisms linking between hepatic cell death and fibrosis. Japan Australia Meeting on Cell Death (WEHI, Melbourne, Australia) Oct 23, 2015
- ② Tanaka M. Isolation and characterization of liver stem/progenitor cell (LPC) in mouse hepatic disease model. 18<sup>th</sup> A-IMBN Annual Conference (SIMS, Cheonan-si, Korea) Sep 22, 2015
- ③ 田中稔 生体恒常性維持に関わるオンコスタチン M の多彩な機能 ~脂肪細胞分化から肝疾患まで~ 第 162 回 東京脂質談話会(東京大学医学部教育研究棟) 2015 年 4 月 15 日
- ④ 田中稔 肝臓の発生・再生・疾患における細胞間相互作用の研究第一回 Hepato-Diabetology Conference (山の上ホテル、東京) 2014 年 11 月 20 日
- ⑤ Tanaka M, Komori T, Matsuda M, Morikawa Y, Miyajima A. Oncostatin M regulates the crosstalk between insulin resistance and liver fibrosis by switching the M1/M2 activation of macrophage. International Symposium on Transcription and Metabolism. 2013 年 11 月 11-13 日 兵庫県・淡路島
- ⑥ Minoru Tanaka, Marika Motomura, Yoshiko Kamiya and Atsushi Miyajima P75NTR-positive mesenchymal cells contribute to erythropoiesis in both fetal and adult liver by expressing erythropoietin. JAPAN LIVER CELL WEEK (第 20 回肝細胞研究会) 2013 年 9 月 26-27 日
- ⑦ 田中稔、谷貝知樹、宮島篤 肝細胞死から見た肝障害後の再生および線維化の制御機構、第 86 回日本生化学会シンポジウム「多様な細胞死を起点とする生体制御ネットワーク」パシフィコ横浜 2013 年 9 月 11 日
- ⑧ 田中稔、谷貝知樹、宮島篤 肝細胞死から見た肝障害後の再生および線維化の制御機構、第 86 回日本生化学会シンポジウム「多様な細胞死を起点とする生体制御ネットワーク」パシフィコ横浜 2013 年 9 月 11 日
- ⑨ 田中稔、小森 忠祐、森川 吉博、仙波 恵美子、宮島 篤 オンコスタチン M はマクロファージの M1/M2 バランスに作用しインスリン抵抗性を改善する、第 19 回 肝細胞研究会 2012 年 6 月 29 日 札幌医科大学(北

海道札幌市)

- ⑩ 田中稔、小森 忠祐、森川 吉博、仙波 恵美子、宮島 篤、オンコスタチン M はマクロファージの M1/M2 バランスに作用しインスリン抵抗性を改善する、第 85 回日本生化学会 2012 年 12 月 16 日 福岡国際会議場・マリメッセ福岡

〔図書〕(計 3 件)

- ① 田中稔 実験医学 細胞死からみた肝線維化の制御機構 第 34 巻 7 号 pp.158-163 羊土社 (2016)
- ② 田中稔 臨床免疫・アレルギー科 細胞死と肝臓の再生および線維化 第 63 巻 第 5 号 pp. 445-451. 科学評論社 (2015)
- ③ 田中稔 サイトカイン・増殖因子キーワード辞典 gp130 を介して作用するサイトカイン pp. 52-66. 羊土社 (2015)

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕  
・該当なし

〔その他〕 ホームページ等  
研究室ホームページ

<http://ncgm-regenerative-medicine.org>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 稔 (TANAKA, Minoru)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・  
准教授  
研究者番号：80321909

研究課題名：低酸素・低栄養の腫瘍微小環境における転写と代謝のクロストーク  
腫瘍微小環境における転写環境とエネルギー代謝の解明

研究期間：2012～2013, 2014～2015

課題番号：24116509, 26116711

研究代表者 大澤 毅 (東京大学 先端科学技術研究センター 特任助教)

連携研究者 島村徹平 (名古屋大学 大学院医学系研究科 特任准教授)

連携研究者 神吉康晴 (東京大学 アイソトープ総合センター 助教)

【交付決定額（分配額）】

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2013年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2014年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2015年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000

**研究成果の概要:** がんの増殖と転移には腫瘍微小環境が重要な役割を果たす。本研究は、腫瘍微小環境の変化が転写と代謝に与える影響を *in vitro* 及び *in vivo* で解析し、がんの悪性化や治療抵抗性などを引き起こす「転写・代謝システム」を明らかにすることを目的として研究を行った。我々は低酸素・低栄養下の癌細胞がエネルギー産生を解糖系ではなく脂質分解系に依存することをスーパーコンピュータのシミュレーション解析から見出した。さらに細胞リン脂質合成経路の中間代謝物であるエタノールアミンリン酸が低栄養のがん細胞で蓄積し粗悪微小環境でのがん細胞の生存・悪性化に寄与していることが示唆された。本研究から低酸素・低栄養に抵抗性ながん細胞に特異的な「転写・代謝システム」を標的とした新規癌制御法の開発と、現存する化学療法との併用に相乗効果が期待できる標的分子の探索など治療への応用が期待できる。

1. 研究の背景

がんの悪性化には腫瘍微小環境が重要な役割を果たす。研究代表者は、低酸素・低栄養などの腫瘍微小環境がエピゲノム変化を介してがんの悪性化を促進することを報告してきた(**Cancer Sci.** 2009, **Science Trnas Med.** 2010, **BCJ** 2011, **Cell Death Dis.** 2011, **PNAS** 2011, **Nature Commun.** 2012, **Cancer Res.** 2013, **Cell cycle** 2013, **Cell Reports** 2013, **Oncogene** 2014, **Cell Reports** in press)。

一方、低酸素・低栄養などの腫瘍微小

環境ががんの転写・代謝にどのような影響があるか未だ不明な点が多い。

研究代表者らのこれまでの研究から、低酸素・低栄養などの腫瘍微小環境に適応するがん細胞は悪性化することが示され(図1)、エピゲノム修飾の書き換え、クロマチン構造、転写環境や代謝経路を制御することにより、がんの悪性化や治療抵抗性につながることを示唆される。このように腫瘍微小環境に起因する転写環境の構築とエネルギー代謝を制御することが新規のがん治療法につながることを期待できる。

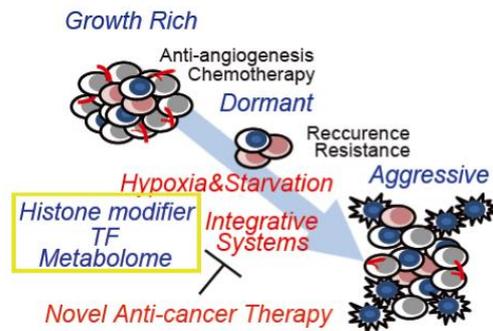


図1 低酸素・低栄養の腫瘍微小環境による転写・代謝機構の解明

## 2. 研究の目的

がんの増殖と転移には腫瘍微小環境が重要な役割を果たす (Osawa *et al.*, *Cancer Sci.* 2009, *BCJ* 2011, *Cell Death & Dis.* 2011, *PNAS* 2011)。本研究は研究代表者がこれまでに見出した低酸素・低栄養など癌の悪性化や治療抵抗性をもたらす腫瘍微小環境をシステムとしてとらえ、エピゲノム、トランスクリプトームおよびメタボロームという各階層のネットワークを統合する①新しい数理ネットワークモデルを構築し、このシステムの統合解析によって得られた癌微小環境適応経路の重要性を *in vitro* のみならず、*in vivo* における分子生物学的手法で検証し、癌の悪性化や治療抵抗性などを起こす腫瘍微小環境の②マルチオミクス統合理解に基づく新規がん治療標的の探索と治療法の開発に繋がる研究を目的とした。本研究において、計画研究班（深水研、中尾研）や公募研究班（酒井先生、松本先生、石濱先生、鈴木先生）との綿密な研究連携を行い設定目標達成のための研究をスムーズに推進することができた。

具体的には、

- ① メタボローム解析に関する新しい数理モデル (COMICS) を島村徹平先生と共同で構築し、測定不能な代謝物や流速を予測することが可能になりつつある。
- ② ①のオミクス統合解析技術により新しく腫瘍微小環境で蓄積する機能未知で

あった生理活性代謝物（エタノールアミンリン酸など）を幾つか同定し、その代謝経路、発現上昇酵素、エピゲノム修飾酵素の同定や腫瘍の悪性化の解明および治療への応用につながる研究ができた。

## 3. 研究成果

本研究は、低酸素・低栄養など腫瘍微小環境におけるシステムの鍵となるエピゲノム、転写、代謝のオミクス統合解析から新しい癌の制御法の開発など治療への応用のための基盤となる研究を目指した。

主な研究成果として、

- ① 低酸素・低栄養という腫瘍微小環境において、エピゲノム修飾因子 (JMJD1A) が血管新生や治療抵抗性などがんの悪性化を促進することを発見し (Osawa *et al.*, *Cancer Res.* 2013), 低酸素・低栄養で悪性化した癌細胞を標的にすることが新しいがん治療法になることを提唱した (Osawa and Shibuya, *Cell Cycle* 2013, 図2)。

	+++	+	-
Nutrition	+++	+	-
Oxygen (pO <sub>2</sub> )	+++	+	-
Vascularity	+++	+	-
Angiogenic factors	+++	+	+++
JMJD1A (KDM3A)	+++	+	+++
JHDM1D (KDM7A)	+++	+++	++
Angiogenesis	+++	+/-	+++
Cell Cycle	+++	+	-
Cancer Stemness	+/-	+/-	++

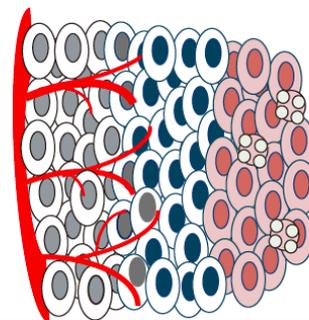


図2 低酸素・低栄養のがん細胞のエピゲノム修飾因子とがん悪性化の関連性

- ② メタボローム解析に関する新しい数理モデル (COMICS) を島村徹平先生と共同で構築し、測定不能な代謝物や流速を予測することが可能になりつつある。
- ③ このオミクス統合解析技術により腫瘍微小環境で蓄積する機能未知であった生理活性代謝物 (エタノールアミンリン酸など) を同定し、そのメカニズムとして代謝経路 (脂質分解経路、ケネディー経路)、発現上昇酵素 (エタノールアミンキナーゼなど)、エピゲノム修飾酵素 (JHDM1D) の関与の解明および治療への応用につながる研究ができた。
- さらに本研究より見出したがんの「飢餓シグナル」を誘導するがん代謝物は、肝臓の栄養の蓄積を低下させることを発見した。この生理活性代謝物を利用して生活習慣病などの疾患の特効薬へ応用できる可能性を見出した (図 3)。

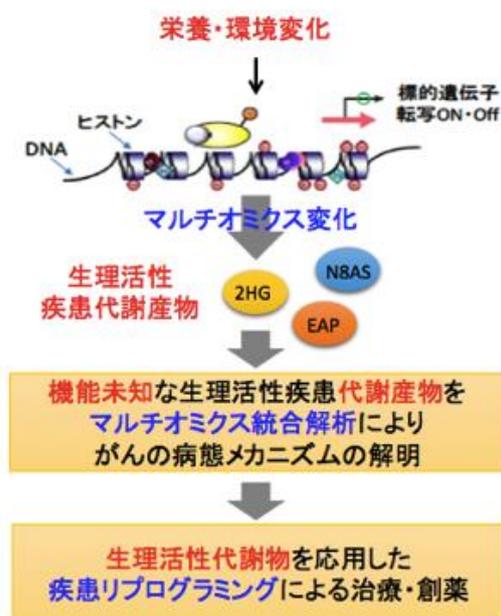


図 3 低酸素・低栄養のがん細胞におけるエピゲノム修飾因子とがん悪性化の関与

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[論文-英文総説含む] (計 7 件)

- ① Kondo A, Yamamoto S, Nakaki R, Shimamura T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Yoshida T, Aburatani H\* and Osawa T\*. Extracellular Acidic pH Activates the Sterol Regulatory Element-binding Protein 2 to Promote Tumor Progression. *Cell Reports*, in press. (2017) 査読有
- ② Tsuchida R\*, Osawa T\*, Wang F, Nishii R, Tsuchida S, Muramatsu M, Das B, Takahashi T, Yuasa Y, Inoue T, Wada Y, Minami T, and Shibuya M: BMP4/ Thrombospondin-1 loop paracrinically inhibits tumor angiogenesis and suppresses the growth of solid tumors. *Oncogene* 29, 3803-11 (2014) 査読有
- ③ Méndez-Barbero N, Esteban V, Villahoz S, Escolano A, Urso K, Alfranca A, Rodríguez C, Sánchez SA, Osawa T, Andrés V, Martínez-González J, Minami T, Redondo JM, Campanero MR. A major role for RCAN1 in atherosclerosis progression. *EMBO Mol Med*. 2013 12, 1901-17. 査読有 doi:10.1002/emmm.201302842.
- ④ Minami T, Jiang S, Schadler K, Suehiro JI, Osawa T, Oike Y, Miura M, Naito M, Kodama T, Ryeom S. The Calcineurin -NFAT-Angiopoietin-2 Signaling Axis in Lung Endothelium Is Critical for the Establishment of Lung Metastases. *Cell Reports* pii:S2211-1247 (13) 00383-5 (2013) 査読有
- ⑤ Osawa T\* and Shibuya M\*: Targeting cancer cells resistant to hypoxia and nutrient starvation to improve anti-angiogenic therapy. *Cell Cycle* 16, 2519-20 (2013) 査読有
- ⑥ Osawa T\*, Tsuchida R, Muramatsu M, Shimamura T, Wang F, Suehiro J, Kanki Y, Wada Y, Yuasa Y, Aburatani H, Miyano S, Minami T, Kodama T, and Shibuya M: Inhibition of histone demethylase JMJD1A improves anti-angiogenic therapy and reduces tumor associated macrophages. *Cancer Research* 73, 3019-3028 (2013) 査読有
- ⑦ Yae T, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Motohara T, Yoshikawa M, Yoshida GJ, Wada T, Masuko T, Mogushi K, Tanaka H, Osawa T, Kanki Y, Minami

T, Aburatani H, Ohmura M, Kubo A, Suematsu M, Takahashi K, Saya H and Nagano O: Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell. *Nature Commun* 3, 883 (2012) 査読有 doi: 10.1038/ncomms1892

〔学会発表等〕（研究代表者の招待講演）  
（計 14 件）

- ① 大澤毅、腫瘍微小環境から捉えたがん代謝、御茶ノ水がん学アカデミア第122回集会、2016年3月23日、東京
- ② 大澤毅、癌代謝物エタノールアミンリンは低栄養のがんの生存に寄与する、第2回血管生物医学会若手研究会：2016年3月4日-5日、世話人、仙台
- ③ 大澤毅、腫瘍微小環境から捉えるがん代謝、2015年12月9日、東京薬科大学、大学院講義、東京
- ④ 大澤毅、島村徹平、近藤彩乃、曾我朋義、宮野悟、油谷浩幸、児玉龍彦、澁谷正史、マルチオミクス統合解析から捉えた腫瘍微小環境、BMB2015（第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会）、ワークショップ「マルチオミクス統合解析の新機軸」座長（大澤毅、島村徹平）、2015年12月1日~12月4日、神戸ポートアイランド
- ⑤ 大澤毅、Tumor microenvironment and cancer metabolism, 46<sup>th</sup> Princess Takamatsu Cancer Fund Symposium, 第46回高松宮妃癌研究基金国際シンポジウム、招待講演、Tokyo, November 16-20, 2015.
- ⑥ 大澤毅、オミクス統合解析から捉えた腫瘍微小環境とがん代謝、国立がんセンター東病院悪液質セミナー、千葉、2015年8月5日
- ⑦ 大澤毅、島村徹平、近藤彩乃、曾我朋義、宮野悟、油谷浩幸、児玉龍彦、澁谷正史、オミクス統合解析から捉えた腫瘍微小環境とがん代謝、招待講演、第3回がんと代謝研究会、2015年7月16-17日（金）、金沢
- ⑧ 大澤毅、代謝システムとがんのメタボロミクス解析、オミクス解析学、名古屋大学講義、2015年6月24日
- ⑨ 大澤毅、腫瘍微小環境とがん代謝、第一回血管生物医学会若手研究会：2015年2月5日-6日、世話人、東京
- ⑩ 大澤毅、熊本大学発生物学研究所、平成26年11月14日。
- ⑪ 大澤毅、金沢大学がん進展制御研究

所、平成26年10月14日。

- ⑫ 大澤毅、協和発行キリン講演会、平成26年10月31日。
- ⑬ 大澤毅、島村徹平、近藤彩乃、南敬、宮野悟、油谷浩幸、児玉龍彦、澁谷正史、Hypoxia and nutrient starvation induces tumor aggressiveness using lipid metabolism, 第11回がんとハイポキシア研究会、仙台、平成25年12月13日~14日。
- ⑭ **Osawa T**, Inhibition of histone demethylase JHDM2A expressed under hypoxia and nutrient starvation suppresses tumor growth and enhances anti-angiogenic therapy, Keystone Symposia on Angiogenesis, Snowbird Utah, 16-21 Jan 2012.

〔図書〕（計 1 件）

- ① 大澤毅 羊土社、栄養による遺伝子制御のサイエンス、実験医学 増刊、2016、2417-2422

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕  
・該当なし

〔その他〕 ホームページ等  
研究室ホームページ  
<http://www.lsbm.org/>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

大澤毅 (OSAWA, Tsuyoshi)  
東京大学・先端科学技術研究センター・特任助教  
研究者番号：50567592

### (2) 連携研究者

島村徹平 (SHIMAMURA, Teppei)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任准教授  
研究者番号：00623943

神吉康晴 (KANKI, Yasuharu)  
東京大学・アイソトープ総合センター・助教  
研究者番号：00534869

研究課題名：骨格筋グルココルチコイドレセプターによるシステミック  
エネルギー代謝制御機構の解明

Regulatory Roles of Skeletal Muscle Glucocorticoid Receptor in  
the Systemic Energy Metabolism

研究期間：2012～2013

課題番号：24116510

研究代表者 清水宣明（東京大学 医科学研究所 特任研究員）

連携研究者 田中廣壽（東京大学 医科学研究所 教授）

連携研究者 吉川賢忠（東京大学 医科学研究所 助教）

連携研究者 佐野元昭（慶應義塾大学 医学部 准教授）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	3,800,000円	1,140,000円	4,940,000円
2013年度	3,800,000円	1,140,000円	4,940,000円

**研究成果の概要：**骨格筋タンパク質の分解を全身性に抑制したモデルとして、骨格筋特異的にグルココルチコイドレセプター(GR)を欠損させた GRmKO マウスを作出し、その表現型を解析した。その結果、エネルギー代謝異常を含めた様々な要因による骨格筋量調節異常の発症機序とグルココルチコイド-骨格筋 GR 軸の関わりが明らかとなった。さらに、骨格筋 GR を介したタンパク質異化の結果生じるアミノ酸、とくにアラニンが、肝臓、脂肪組織における遺伝子発現調節を制御し、システミックなエネルギーフローの調節において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

## 1. 研究の背景

エネルギー代謝などの細胞機能の調節には、細胞内外の多彩なシグナルによる遺伝子転写制御が関わっている。これらシグナルは、栄養素やその代謝物などの低分子化合物、ホルモン、サイトカインなどの分泌性シグナル伝達分子、あるいは神経系における電気信号を介するシグナルのほか、より原始的ともいえる物理刺激、すなわち温度や張力（メカニカルストレス）など、きわめて多岐にわたる。細胞が随時これら多種多様なシグナルを受容して情報を統合し、遺伝子発現調節を介して適切に応答する分子機構の全貌は明らかでない。また、とくに高等生物においては、ある末梢組織におけるシグナル応答の内容が、異なる末梢組織に伝

達されることは、個体としての協調的な環境適応、究極的には生存に必須であると考えられるが、かかる組織間連携の分子機構に関する理解はきわめて限定的である。

副腎皮質ホルモンであるグルココルチコイド(GC)は、エネルギー代謝調節をはじめ、多くの組織においてきわめて多彩な作用を発現し、生体のストレス応答、恒常性維持、そして生存に必須である。また、GCは臨床医学の広範な領域において、現在も欠くことのできない治療薬としての位置を占めている。しかし、現在までの膨大な研究によってもその作用機構の全貌は不明であり、GC生理作用の本質的理解や、多臓器において多岐にわたる副作用の根本的解決にはほど遠い。

核内レセプターのひとつであるグルココルチコイドレセプター (GR) は、ほぼすべての組織に発現している。GR はリガンド依存性転写因子として多くの遺伝子発現を多彩な様式で制御することにより、各組織における多様な GC 作用の共通のプラットフォームとして機能する。しかし、実際に GR による組織特異的遺伝子発現調節機構を掘り下げた研究は少なく、とくに特定の組織における GR 機能が全身の生体システムにおいて果たしている役割を解析する必要性が高まっている。

研究代表者らは、骨格筋 GR は転写因子 Krüppel-like factor 15 (KLF15)、Forkhead box O (FoxO) 1, 3、の発現を誘導するとともに、これら下流転写因子と協調して GR 転写カスケードを形成し、多彩な標的遺伝子の転写を一括して制御することを示した。これら標的遺伝子群の機能は、(1)ユビキチンプロテアソーム系 (E3 ユビキチンリガーゼ atrogen-1, MuRF1)、(2)オートファジー系 (LC3, Bnip3)、(3)アミノ酸分解系酵素 (BCAT2)、(4) mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) 阻害によるタンパク質翻訳抑制系 (REDD1, BCAT2)であった。すなわち、かかる骨格筋 GR 転写カスケードは、筋細胞内の代謝をタンパク質合成によるエネルギー貯蔵 (同化) 優位から、タンパク質分解によるエネルギー供給 (異化) 優位にスイッチするといえる (図 1)。

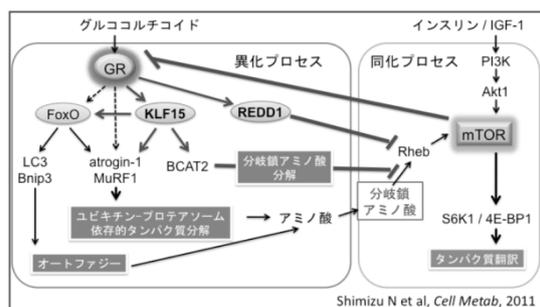


図 1 骨格筋におけるグルココルチコイド

## ドによるタンパク質分解経路

骨格筋は運動機能のみならず、脂肪組織、肝臓とならぶエネルギー貯蔵庫としての機能を持つ。骨格筋代謝状態変化が及ぼす影響は、骨格筋組織内の生理作用に留まらず、全身エネルギー代謝におけるこれら組織間の機能的相互関連の分子機構を担っている可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究は以上の成果を踏まえ、骨格筋代謝制御における GC の作用機構と生理的な意義を、GR を介した遺伝子発現制御機構の解析を基軸として究明するとともに、骨格筋組織と他のエネルギー貯蔵組織 (脂肪組織、肝臓) との間における代謝調節の連携機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究成果

骨格筋特異的に GR を欠損させた (GRmKO) マウスを、骨格筋タンパク質の分解を全身性に抑制するモデルと捉え、GRmKO マウスを用いて、エネルギー代謝における骨格筋タンパク質代謝と脂肪組織脂質代謝の関連を明らかにすることを試み、以下の結果を得た。野生型マウスと比して GRmKO マウスでは骨格筋量が増加する一方、脂肪組織量は脂質分解関連遺伝子の発現増加により著明に減少していた。血中のアラニンなどのアミノ酸濃度は減少し、脂肪酸やケトン体、脂肪分解作用を有するホルモン Fibroblast growth factor 21 (FGF21) の濃度が増加していた。マウス初代培養肝細胞の培地中アラニン濃度を低下させると、FGF21 プロモーター上への転写因子 ATF4 のリクルートメント、また FGF21 mRNA 発現が増加した。動物個体でも、絶食による肝臓 FGF21 発現の誘導と血漿 FGF21 濃度の

上昇は、GRmKO マウスで亢進していた。以上のことから、肝臓がアラニンシグナルを FGF21 シグナルに変換し、骨格筋と脂肪組織の遺伝子発現と代謝の制御をつなぐ役割を担うことがわかった。すなわち、GRmKO マウスの体組成は、骨格筋 (Muscle)- 肝臓 (Liver)- 脂肪組織 (Adipose) 連携 (MLA 軸) を介して「タンパク質利用と脂質利用のバランス制御機構」が変容し、エネルギー代謝系を脂質利用優位にトランスフォームさせた結果と考えられる。以上の結果などから、骨格筋はタンパク質分解に由来する血中アラニンにより、肝臓の FGF21 発現量を調節し、脂肪組織からの脂質動員量を規定していると結論づけた (図 2)。

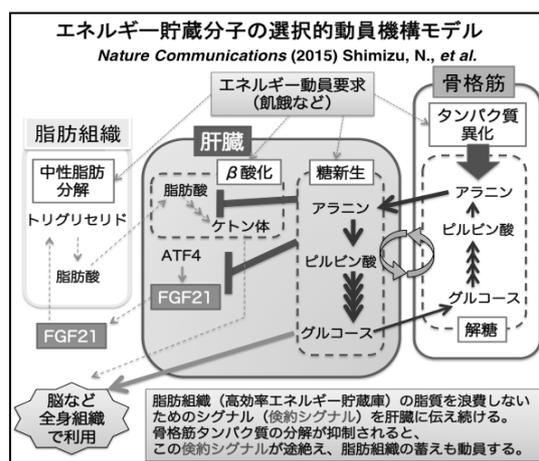


図 2 エネルギー貯蔵分子の選択的動員機構モデル

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕 (計 7 件)

- ① Ono T, Kamimura N, Matsubashi T, Nagai T, Nishiyama T, Endo J, Hishiki T, Nakanishi T, Shimizu N, Tanaka H, Ohta S, Suematsu M, Ieda M, Sano M, Fukuda K, Kaneda R. The histone 3 lysine 9 methyltransferase inhibitor chaetocin improves prognosis in a rat model of high salt diet-induced heart

failure. **Scientific Reports**. 7, Article number 39752. (2017) 査読有

- ② Yoshikawa N, Shimizu N, Uehara M, Oda A, Matsumiya R, Matsubara E, Kobayashi H, Hosono O, Kuribara-Souta A, Baba H, Nagamura F, Kiryu S, Tanaka H. The effects of bolus supplementation of branched-chain amino acids on skeletal muscle mass, strength, and function in patients with rheumatic disorders during glucocorticoid treatment. **Mod Rheumatol**. [Epub ahead of print] DOI: 10.1080/14397595.2016.1213480 (2016) 査読有
- ③ Ito N, Shimizu N, Tanaka H, Takeda S. Enhancement of Satellite Cell Transplantation Efficiency by Leukemia Inhibitory Factor. **J Neuromuscul Dis**. 3, 201-207 (2016) 査読有
- ④ Shimizu N, Maruyama T, Yoshikawa N, Matsumiya R, Ma Y, Ito N, Tasaka Y, Kuribara-Souta A, Miyata K, Oike Y, Berger S, Schutz G, Takeda S, Tanaka H. A muscle-liver-fat signalling axis is essential for central control of adaptive adipose remodelling. **Nat Commun**. 6, Article number 6693 (2015) 査読有
- ⑤ Hosono O, Yoshikawa N, Shimizu N, Kiryu S, Uehara M, Kobayashi H, Matsumiya R, Kuribara A, Maruyama T, Tanaka H. Quantitative analysis of skeletal muscle mass in patients with rheumatic diseases under glucocorticoid therapy--comparison among bioelectrical impedance analysis, computed tomography, and magnetic resonance imaging. **Mod Rheumatol**. 25, 257-63 (2015) 査読有
- ⑥ Yoshikawa N, Shimizu N, Ojima H, Kobayashi H, Hosono O, Tanaka H. Down-regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor by HEXIM1 attenuates myocardial angiogenesis in hypoxic mice. **Biochem Biophys Res Commun**. 53, 600-605 (2014) 査読有
- ⑦ Yoshikawa N, Shimizu N, Maruyama T, Sano M, Matsubashi T, Fukuda K, Kataoka M, Satoh T, Ojima H, Sawai T, Morimoto C, Kuribara A, Hosono O, Tanaka H. Cardiomyocyte-specific overexpression of HEXIM1 prevents right ventricular hypertrophy in hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. **PLoS One**. 7, e52522 (2012) 査読有

〔学会発表等〕（研究代表者の招待講演）

（計 16 件）

- ① 清水宣明、臓器間連携を介したエネルギー代謝制御における骨格筋グルココルチコイド受容体の役割、日本ステロイドホルモン学会第 1 回研究奨励賞受賞講演、平成 28 年 12 月 3 日、ホルトホール大分、大分県大分市
- ② 清水宣明、田中廣壽、骨格筋グルココルチコイド受容体を介した個体レベルの脂質代謝制御、第 39 回日本分子生物学会年会シンポジウム『核内受容体バイオロジー』、平成 28 年 12 月 1 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
- ③ Shimizu N, Tanaka H. Regulation of Energy Metabolism via Muscle-Liver-Adipose Signaling Axis. EDIN Seminar. 平成 28 年 11 月 7 日、ルーヴァン・カトリック大学、ブリュッセル市、ベルギー
- ④ 清水宣明、吉川賢忠、田中廣壽、骨格筋-肝臓-脂肪組織シグナル軸とメカノ-メタボカップリング、第 2 回日本筋学会学術集会シンポジウム『筋萎縮、サルコペニア ～分子、細胞から治療へ～』、平成 28 年 8 月 6 日、国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター、東京都小平市
- ⑤ 清水宣明、グルココルチコイドによる骨格筋タンパク質代謝制御の機構と生理的意義の解明、日本内分泌学会第 36 回研究奨励賞受賞講演、平成 28 年 4 月 23 日、国立京都国際会館、京都府京都市
- ⑥ 清水宣明、吉川賢忠、田中廣壽、Mechano-Metabo カップリング ～骨格筋グルココルチコイドレセプターが全身のエネルギー貯蔵物質の消費バランスを制御する機構、埼玉医科大学ゲノム医学研究セミナー、平成 28 年 3 月 4 日、埼玉医科大学日高キャンパス、埼玉県日高市
- ⑦ 清水宣明、田中廣壽、筋-肝-脂肪シグナル軸によるエネルギー代謝制御、第 23 回日本ステロイドホルモン学会学術集会シンポジウム『ステロイド・脂溶性物質と代謝』、平成 28 年 1 月 15 日、倉敷市芸文館、岡山県倉敷市
- ⑧ 清水宣明、田中廣壽、エネルギー代謝における筋-肝-脂肪シグナル軸、第 4 回 AAA (Academy of Aging and Cardiovascular-Diabetes Research)、平成 28 年 1 月 9 日、ロイヤルパークホテル、東京都中央区
- ⑨ 清水宣明、骨格筋グルココルチコイドレセプターによるエネルギー代謝制御、東京大学医科学研究所学友会セミナー、平成 28 年 1 月 7 日、東京大学

- ⑩ 清水宣明、田中廣壽、消費するエネルギー貯蔵分子の選択を調節する筋-肝-脂肪シグナル軸、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会ワークショップ『栄養・メタボライトと遺伝子発現調節～ニュートリゲノミクスの最前線』、平成 27 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市
- ⑪ 清水宣明、基礎研究から生まれる医療向上への萌芽の一例、創薬科学研究会 2015、平成 27 年 10 月 3 日、東京工業大学大岡山キャンパス、東京都目黒区
- ⑫ 清水宣明、田中廣壽、骨格筋-肝臓-脂肪組織間シグナル軸を介したエネルギー代謝制御、大阪大学生命先端工学セミナー、平成 27 年 9 月 14 日、大阪大学吹田キャンパス、大阪府吹田市
- ⑬ 清水宣明、骨格筋グルココルチコイド受容体とエネルギー代謝、第 8 回日本薬学会関東支部若手シンポジウム「生活習慣病の理解に向けた Molecular Metabolism の新展開」、平成 27 年 9 月 12 日、日本大学薬学部、千葉県船橋市
- ⑭ 清水宣明、田中廣壽、エネルギー代謝制御ネットワークにおける骨格筋のグルココルチコイド応答、第 33 回日本骨代謝学会学術集会「筋・腱・靭帯シンポジウム」、平成 27 年 7 月 25 日、新宿京王プラザホテル、東京都新宿区
- ⑮ 清水宣明、田中廣壽、脂質消費の全身性制御における骨格筋の役割、第 3 回代謝と脳心血管疾患研究会、平成 26 年 9 月 20 日、京都タワーホテル、京都府京都市
- ⑯ Shimizu N, Yoshikawa N, Maruyama T, Kuribara A, Matsumiya R, Tanaka H. Physiological Regulation of Skeletal Muscle Mass via Glucocorticoid Receptor. Keystone Symposia 2013 "Nuclear Receptors and Friends: Roles in Energy Homeostasis and Metabolic Dysfunction" (Short Talk in the Plenary Session on Skeletal Muscle, Exercise and Diet). 平成 25 年 4 月 7 日、アルプバッハコンgres セントラム、アルプバッハ市、オーストリア

〔図書〕（計 5 件）

- ① 清水宣明、田中廣壽 羊土社、遺伝子制御の新たな主役 栄養シグナル糖、脂質、アミノ酸による転写調節・生体恒常性機構と疾患をつなぐニュートリゲノミクス、2016、2587-2593
- ② 清水宣明、田中廣壽 科学評論社、特集 亜鉛が関わる生命現象と疾患、

2016、151-156

- ③ 田中廣壽、清水宣明 メディカルレビュー社、特集 筋骨格系とエネルギー代謝、2015、43-48
- ④ 清水宣明 メディカルレビュー社、特集 飢餓応答、2015、22-28
- ⑤ 松宮遼、清水宣明、吉川賢忠、丸山崇子、田中廣壽 科学評論社、特集 リウマチ性疾患にみられる筋病変と合併症、2013、463-470

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

〔その他〕 ホームページ等

研究室ホームページ

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/Rheumatol/allery/>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水宣明 (SHIMIZU, Noriaki)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：30396890

### (2) 連携研究者

田中廣壽 (TANAKA, Hirotoshi)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：00171794

吉川賢忠 (YOSHIKAWA, Noritada)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：70396878

佐野元昭 (SANO, Motoaki)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：30265798

研究課題名：NAD/Acetyl-CoA 代謝がヒストンアセチル化に及ぼす影響  
 Role of NAD/Acetyl-CoA metabolism in histone acetylation

研究期間：2012～2014

課題番号：24116511

研究代表者 中川 崇（富山大学 先端ライフサイエンス拠点 特命助教）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2013 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000

**研究成果の概要：**ヒストンのアセチル化・脱アセチル化は、Acetyl-CoA や NAD といった細胞内の代謝産物が必要であり、これら代謝産物がヒストンアセチル化制御に重要な役割を果たしていると考えられる。本研究課題では、低栄養状態に伴ったグローバルなヒストン脱アセチル化に着目し、それらと Acetyl-CoA/NAD 代謝との関連を明らかにすることを目標とした。その結果、低栄養条件下でのグローバルなヒストン脱アセチル化に関与するのは、Sirtuin よりもむしろ HDAC であることを見出した。また、グローバル脱アセチル化を阻害した後、再びグルコース含有培地に変更した際の、再増殖に障害があることが解った。このことから、グローバルな脱アセチル化は、低栄養状態での環境適応のためであると考えられた。

1. 研究の背景

ヒストンリジン残基のアセチル化は、転写促進の hallmark であり、逆に脱アセチル化は転写抑制を意味する。これらヒストンのアセチル化は Histone acetyltransferase(HAT)により触媒され、ドナーとして Acetyl-CoA が利用される。また、脱アセチル化反応は Histone deacetylase(HDAC)により媒介され、そのうち Class III HDAC である Sirtuin は、その脱アセチル化反応に NAD を基質として必要とする。近年多くの研究により、Sirtuin の酵素活性が NAD 濃度により制御されていることが示されている。また、Thompson らのグループは、グルコース由来のクエン酸から、ATP Citrate Lyase (ACL) により産生された Acetyl-CoA がヒストンアセチル化のドナーとして重要であることを報告している (Wellen

et.al.*Science*,324:1076- 1080,2009)。このように、ヒストンのアセチル化はドナーやレシピエントである、Acety-CoA や NAD といった細胞内の代謝産物とその制御に重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら Acetyl-CoA や NAD は、細胞内での主要な代謝産物であり、様々な代謝経路で制御されていることから、これら代謝産物が実際にどのような状況でヒストンアセチル化の制御に積極的に関わっているかということに関しては、未だ良く解っていないのが現状である。研究代表者は、グルコース除去もしくは飢餓状態といった、栄養ストレス下での細胞内タンパク質のアセチル化の変化を、抗アセチル化リジン抗体を用いて調べていた際に、このような低栄養条件下ではヒストンのグローバルな脱アセチル化が誘導されることを見いだ

した。また飢餓だけでなく Hypoxia もしくは Anoxia でも同様な現象が観察されたことから、こういった低栄養条件では、細胞が防御機能の一つとして、Acetyl-CoA や NAD 等の代謝産物を介してヒストンをグローバルに脱アセチル化し、代謝産物→転写の逆向きシグナルによって様々な遺伝子発現をシャットダウンすることで、生存のための戦略としているのではないかとの仮説を立てた。本研究課題では、この仮説を検証すべく、低栄養状態に伴ったグローバルなヒストン脱アセチル化のメカニズムの解明を目指すとともに、グローバルなヒストン脱アセチル化の生物学的意義の解明を目指していく。

## 2. 研究の目的

本研究計画では、低栄養状態におけるヒストンのグローバルな脱アセチル化の制御機構について、そのメカニズムを明らかにし、代謝産物による転写の「逆向き」制御機構の生物学的意義について明らかにする。

### ①低栄養状態におけるヒストンのグローバルな脱アセチル化の制御機構解明

低栄養状態におけるヒストンのグローバルな脱アセチル化の分子メカニズムを解明すべく、NAD/Acetyl-CoA を供給する代謝経路のうち、どのような代謝経路がヒストンのグローバルな脱アセチル化に関与しているのか、代謝産物、遺伝子、タンパク質、酵素活性の各レベルから解析し、ヒストンのグローバルな脱アセチル化の制御機構について全貌解明を目指す。

### ②低栄養状態におけるヒストンのグロー

### バル脱アセチル化の転写へのインパクト

グローバルなヒストン脱アセチル化の生物学的意義の解明を目指し、果たしてどのような遺伝子群の転写が影響を受けているのか明らかにするため、低栄養条件と通常状態での遺伝子発現を比較し、影響を受ける遺伝子群を同定し、その生物学的意義を解明する。

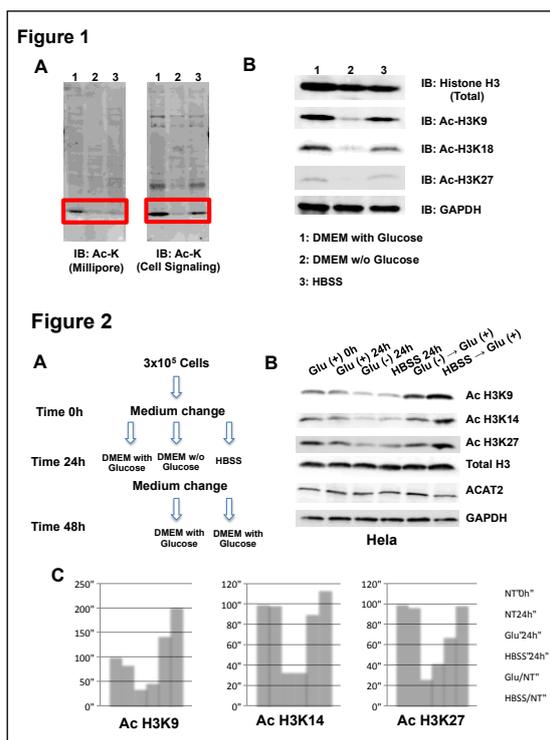
## 3. 研究成果

まず、栄養状態の変化に伴って、グローバルなヒストン修飾の変化が起こるか調べた。Hela 細胞を低栄養培地である、通常の DMEM 培地 (4.5g/l Glucose)、グルコース除去 DMEM 培地、飢餓培地 (HBSS) にて培養し、タンパク質のアセチル化状態の変化を、抗アセチルリジン抗体にて確認した。すると、低栄養状態ではヒストンのグローバルな脱アセチル化が見られた (Fig. 1A)。さらにどのヒストンリジン残基が、脱アセチル化を受けているのか、H3K9、H3K14、H3K27 のアセチル化抗体を用いて調べたところ、すべてにおいてグローバルな脱アセチル化が見られた

(Fig. 1B)。同様な現象は NIH3T3 細胞でも見られた。さらに、低栄養培地で 24 時間培養後、再び通常の DMEM 培地 (4.5g/l Glucose) にて培養し、アセチル化が回復するか調べた (Fig. 2A)。すると、H3K9、H3K14、H3K27 のいずれのリジン残基においても、アセチル化状態はほぼ回復した (Fig. 2B)。興味深いことに、転写状態の

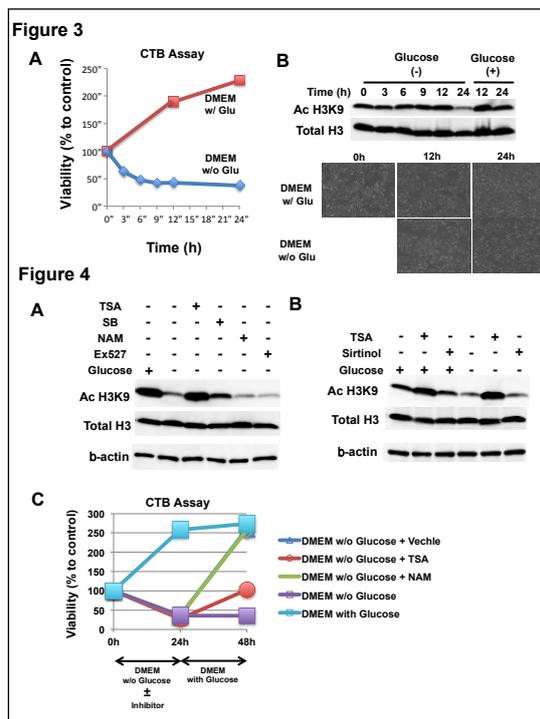
Hallmark となる H3K9 は、低栄養培地から通常培地への変更で、むしろ hyper アセチル化されることが解った (Fig. 2C)。つまり、一種のリバウンドのようなことが起こっていると考えられる。そこで、グローバルな脱アセチル化の様子を time course を取り調べてみたところ、脱アセチル化は約 12-24 時間の間に起こってい

ることが解った (Fig. 3B)。そこで、細胞の増殖・viability と、グローバルな脱アセチル化との関連を探るため、グルコース除去後の viability を CTB assay (ミトコンドリア他代謝活性を指標として細胞生存率を見るアッセイ) を用いて調べた。すると、Figure 3A に見られるように、グルコース除去後約 3 時間で viability は急速に下がり始め、約 12 時間でプラトーになり、その後 24 時間まではほぼ一定であった。しかしながら、位相差顕微鏡でこれら細胞を観察した限りでは、特に形態的に変化はなく、明らかな死細胞は見られなかった (Fig. 3B)。このことから、これら CTB assay での急激な viability の低下は、細胞死よりもむしろ、代謝の急激な低下を示唆しているものと考えられた。



一般に、ヒストンの脱アセチル化は HDAC もしくは Sirtuin などのヒストン脱アセチル化酵素により媒介されているが、低栄養状態でのグローバル脱アセチル化には、どの脱アセチル化酵素が重要か、こ

れらに特異的な阻害剤を用いて調べた。すると、Class I, II HDAC 阻害剤である、Tricostatin A (TSA) や Sodium butyrate (SB) では低栄養状態でのグローバル脱アセチル化が著明に阻害されたが、Class III HDAC である Sirtuin の阻害剤では、ヒストンの脱アセチル化には全く影響がなかった (Fig 4A, B)。これらの結果から、低栄養に伴ったグローバルな脱アセチル化の最下流での実行役は Class I, II HDAC であると推察された。さらに、グルコース除去下で培養した細胞を HDAC 阻害剤で処理し、グローバル脱アセチル化を阻害した後、再びグルコース含有培地に変更した際の viability を調べたところ、再増殖に障害があることが解った (Fig. 4C)。このことから、グローバルな脱アセチル化は、低栄養状態での環境適応のためであると考えられた。



次に、グローバルな脱アセチル化が実際どのような遺伝子の転写に影響を及ぼしているのか、DNA マイクロアレイを用いて検討した。すると、通常培地での培養

と比較し、グルコース除去条件下では、2倍以上の遺伝子発現があったものは1139個、逆に0.5倍以下に発現が下がったものが、827個であった。つまり、予想に反し、多くの遺伝子発現には大きな変化はなく、むしろ上昇した遺伝子数は、減少した遺伝子数より多かった。ヒストンの脱アセチル化は転写抑制のマークであり、今回との結果とは一致しない結果となったが、今後、変化した遺伝子の内容を詳しく調べるとともに、アセチル化ヒストン抗体を用いた、ChIP-Sequenceを行うなどして、更に検討していきたい。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計3件)

- ① Hikosaka K, Ikutani M, Shito M, Kazuma K, Gulshan M, Nagai Y, Takatsu K, Konno H, Tobe K, Kanno H, Nakagawa T. Deficiency of Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase 3 (Nmnat3) Causes Hemolytic Anemia by Altering the Glycolytic Flow in Mature Erythrocytes. *J Biol Chem*. 289(21): 14796-14811. (2014) 査読有
- ② Nakagawa T, Guarente L, SnapShot: Sirtuins, NAD and Aging. *Cell Metab*. 20(1): 192. (2014) 査読有
- ③ Sasaki T, Kikuchi O, Shimpuku M, Susanti VY, Yokota-Hashimoto H, Taguchi R, Shibusawa N, Sato T, Tang L, Amano K, Kitazumi T, Kuroko M, Fujita Y, Maruyama J, Lee YS, Kobayashi M, Nakagawa T, Minokoshi Y, Harada A, Yamada M, Kitamura T. Hypothalamic SIRT1 prevents age-associated weight gain by improving leptin sensitivity in mice. *Diabetologia*. 57(4): 819-831. (2014) 査読有

〔学会発表等〕(研究代表者の招待講演)

(計3件)

- ① 中川崇、がん細胞代謝～その治療標的としての可能性～. 第62回富山県耳鼻咽喉科臨床研究会. 平成24年12月6日、富山
- ② 中川崇、NAD代謝を標的とした創薬に

- 向けて、フォーラム富山「創薬」第38回研究会『アカデミアから創薬に向けて』、平成25年10月2日、富山
- ③ 中川崇、メタボロミクスを用いたNAD代謝の疾患生物学、2014京都心臓代謝研究会、平成26年2月7日、京都

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

〔その他〕ホームページ等

研究室ホームページ

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/metabolism/>

#### 5. 研究組織

(1) 研究代表者

中川崇 (NAKAGAWA, Takashi)

富山大学・

先端ライフサイエンス拠点・特命助教

研究者番号：40610374

研究課題名：ノンコーディング RNA による脂質代謝調節を担う転写因子間の  
クロストーク  
脂質代謝を起点としたマイクロ RNA、転写因子、  
エピゲノムの相互作用の解明

研究期間：2012～2013、2014～2015

課題番号：24116512、26116716

研究代表者 尾野 亘（京都大学 大学院医学研究科 准教授）

連携研究者 佐藤史顕（京都大学 大学院医学研究科 准教授）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2013 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2014 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2015 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000

**研究成果の概要：** コレステロール代謝制御を司る転写因子である SREBP-2 遺伝子のイントロン16にはmicroRNA(miR)-33aが存在し、脂肪酸代謝の主要な転写因子の SREBP-1 遺伝子のイントロン 16 には miR-33b がある。これまでの検討により、SREBP-2 と SSREBP-1 の間には miR-33a を介する制御機構があることが明らかとなった。また、これらの転写因子は脂質代謝と密接に関与することから、進化における飢餓を生き延びるための儉約遺伝子としての働きや、生活習慣病を基盤とする病態形成に大きな働きを持ってきた可能性があり、今回の検討において各種疾患での機能が明らかとなった。

1. 研究の背景

ヒトのゲノムの中にタンパク質を作る遺伝子が占める領域は数%に過ぎず、多くの領域には機能が無いと考えられていた。しかし近年、哺乳類のゲノムの約半分の領域は RNA に転写され、それらの多くはタンパク質を作らないノンコーディング RNA (non-codingRNA; ncRNA) であると報告された。これらの機能のほとんどはまだ不明のため、ncRNA は現在のライフサイエンスのなかで非常に活気のある研究領域となっている。

マイクロ RNA (microRNA; miRNA; miR) はおもに 20～24 塩基長の短鎖 RNA であり、ncRNA の一種である。miRNA はメッセンジャー RNA (mRNA) の主に 3' 非翻訳領域に結合し、翻訳の阻害や mRNA

の不安定化によってその遺伝子の発現を転写後に調節するという形で、遺伝子発現の「ファインチューナー」の役割を果たしている。

我々はこれまでに代謝性疾患を中心とした miRNA の働きについて詳細に検討し、論文報告を行ってきた。

miR-33a は、コレステロール合成の主要な転写因子である Sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP-2) 遺伝子のイントロン 16 にある。我々は、miR-33a 欠損マウスを作成し、マクロファージおよび肝臓において miR-33a の標的遺伝子である ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) の蛋白発現が上昇することを示した。また血中 HDL コレステロールがオスで 22% メスで 39% 増加

することを見いだした (*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010)。

一方、脂肪酸代謝の主要な転写因子の SREBP-1 遺伝子のイントロン 16 には miR-33b があるため、miR-33a および 33b はそれらの宿主遺伝子である SREBP-2 と SREBP-1 と共に相互作用を持ち、生体内の恒常性維持に働いている可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、miR-33a および miR-33b、さらにそれらの宿主遺伝子の SREBP-2、SREBP-1 が制御する代謝システムの全貌を解明することを目標とする。

## 3. 研究成果

①miR-33a 欠損マウスは動脈硬化に抵抗性である：

miR-33 と Apoe ダブルノックアウトマウス (miR-33<sup>-/-</sup>Apoe<sup>-/-</sup>) においては HDL-C が上昇し、この血清はコレステロール引き抜き能が miR-33<sup>+/+</sup> Apoe<sup>-/-</sup>マウスに比し上昇していた。miR-33<sup>-/-</sup> Apoe<sup>-/-</sup>の腹腔内マクロファージにおいては ABCA1、ABCG1 発現とも上昇し、ApoA-I と HDL-C によるコレステロール引き抜き

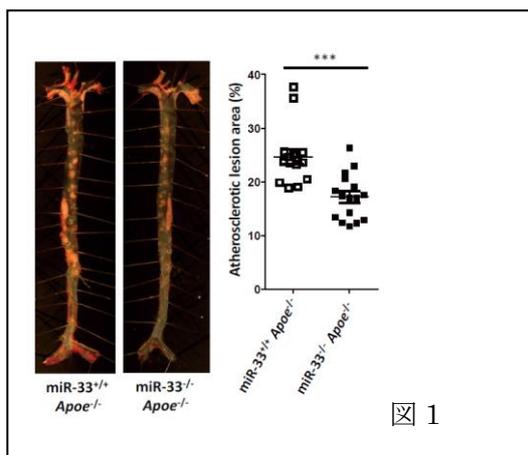


図 1

能が miR-33<sup>+/+</sup> Apoe<sup>-/-</sup>より上昇した。また、遊離コレステロールによるアポトーシス

にも抵抗性であった。この結果、コレステロール含有食負荷 miR-33<sup>-/-</sup> Apoe<sup>-/-</sup>においてはプラークのサイズ (図 1) と脂質蓄積量、CD68 陽性細胞数、CD3 陽性細胞数、VCAM-1 発現面積、iNOS 陽性面積が低下した。 (*JAHA* 2012)

②miR-33a 欠損マウスは肥満と共に脂肪肝を呈する：

miR-33 欠損マウスは正常食においても 26 週齢を越えると肥満を呈する。また高脂肪食を負荷すると、さらに肥満が亢進し脂肪肝を呈する。このマウスの肝臓を用いたマイクロアレイ解析においては脂肪酸代謝系の遺伝子群が発現上昇していた。データベースによる検討では miR-33 の標的遺伝子に *Srebf1* が存在した。まず、培養細胞系において、*Srebf1* が標的遺伝子であることを確認した。さらに miR-33 欠損マウス *Srebf1* ヘテロマウス (miR-33<sup>-/-</sup>*Srebf1*<sup>+/+</sup>) においては SREBP-1 のレベルが miR-33<sup>+/+</sup>*Srebf1*<sup>+/+</sup> と同等になり、miR-33<sup>-/-</sup>*Srebf1*<sup>+/+</sup> で認められた肥満 (脂肪細胞の増大と炎症) と脂肪肝が改善し

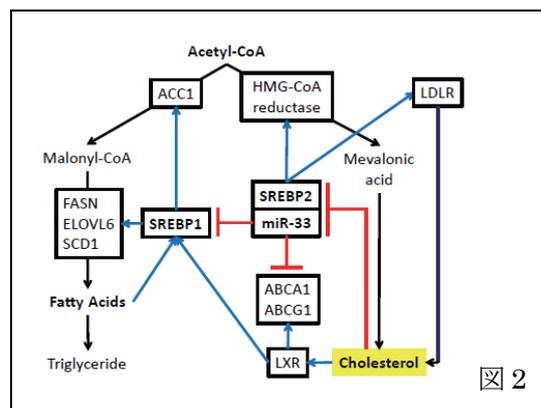


図 2

た。miR-33 が欠損すると SREBP-1 が増加し、脂肪酸合成の上昇と脂肪酸の脂肪組織、肝臓への蓄積につながる。これは SREBP-1 と SREBP-2 の間に miR-33 を介する新たな制御機構が存在することを示す (図 2)。 (*Nature Communications* 2013)

③miR-33b ノックインマウスは低 HDL-C を呈する：

今回、miR-33 を 2 つ持つマウス（ヒト化マウス）を作成した。イントロンの改変を行ったが、特にスプライシングには異常がな

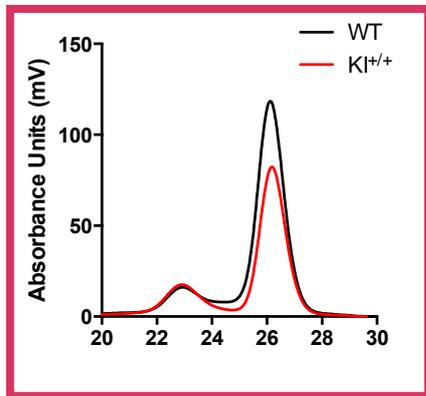


図 3

く、miR-33b の発現はそのホストの遺伝子である *Srebf1* とほぼ平行して上昇を認めた。このマウス ( $KI^{+/+}$ ) の血清脂質のプロファイルを検討したところ、図 3 のように miR-33a 欠損マウスとは反対に HDL-C の減少を認めた (*Sci Rep.* 2014)。

④miR-33a 欠損マウスは圧負荷に対する線維化が置きにくい：

脂質代謝および動脈硬化の進展に重要な miRNA である miR-33a の心不全の進行における役割を検討した。まず病態への関与を調べる目的で、拡張型心筋症患者の心室での miR-33a 発現量を測定したところ、心不全の重症な患者ほど低かった。次に、miR-33 の役割を調べるために、miR-33a 欠損 (KO) マウスを用いて検討したところ、圧負荷による心肥大は野生型と同程度であったが、心室の線維化が軽減されていた (図 4)。一方、線維化の

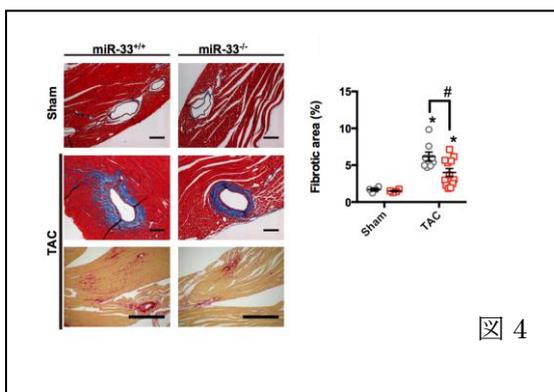


図 4

軽減にも関わらず、KO マウスの左室収縮能は慢性期においてむしろ低下した。

これらの原因を探る目的で細胞実験を行ったところ、miR-33aKO 線維芽細胞は増殖能が低下しており、脂質ラフトの減少を認めた。また、心臓線維芽細胞特異的な miR-33a 欠損マウスでも線維化の軽減を認めた。これらの結果より、miR-33 が心臓の線維化、線維芽細胞における脂質ラフト維持、細胞増殖能維持に関わっていることが示された (*Circ Res* 2017)。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕 (計 19 件)

- ① Izuhara M, Kuwabara Y, Saito N, Yamamoto E, Hakuno D, Nakashima Y, Horie T, Baba O, Nishiga M, Nakao T, Nishino T, Nakazeki F, Ide Y, Kimura M, Kimura T, Ono K. Prevention of Neointimal Formation Using miRNA-126-Containing Nanoparticle-Conjugated Stents in a Rabbit Model. *PLoS One*. (2017) 査読有 in press
- ② Nishiga M, Horie T, Kuwabara Y, Nagao K, Baba O, Nakao T, Nishino T, Hakuno D, Nakashima Y, Nishi H, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Kimura M, Hanada R, Nakamura T, Inada T, Hasegawa K, Conway SJ, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 Controls Adaptive Fibrotic Response in the Remodeling Heart by Preserving Lipid Raft Cholesterol. *Circ Res*. (2017) 査読有 in press
- ③ Koyama S, Kuragaichi T, Sato Y, Kuwabara Y, Usami S, Horie T, Baba O, Hakuno D, Nakashima Y, Nishino T, Nishiga M, Nakao T, Arai H, Kimura T, Ono K. Dynamic Changes of Serum MicroRNA-122-5p through Therapeutic Courses Indicates Amelioration of Acute Liver Injury Accompanied by Acute Cardiac Decompensation *ESC Heart Failure* (2017) 査読有 in press.
- ④ Ono K. A Novel Link between Plasma MicroRNA-33b Levels and Lipid Disorders in Diabetes Mellitus. *J Atheroscler Thromb*. (2016). 査読有 [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27476669.

- ⑤ **Ono K.** Functions of microRNA-33a/b and microRNA therapeutics. *J Cardiol.* 67, 28-33 (2016). 査読有 doi: 10.1016/j.jjcc.2015.10.017.
- ⑥ Horie T, Kimura T, **Ono K.** Emerging Novel Biomarkers for Arteriosclerosis Obliterans. *J Atheroscler Thromb.* 23, 171-2 (2016). 査読有 doi: 10.5551/jat.ED028.
- ⑦ Miyamoto S, Usami S, Kuwabara Y, Horie T, Baba O, Hakuno D, Nakashima Y, Nishiga M, Izuhara M, Nakao T, Nishino T, Ide Y, Nakazeki F, Wang J, Ueyama K, Kimura T, **Ono K.** Expression Patterns of miRNA-423-5p in the Serum and Pericardial Fluid in Patients Undergoing Cardiac Surgery. *PLoS One.* 10, e0142904 (2015). 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0142904.
- ⑧ Kim J, Yoon H, Horie T, Burchett J, Restivo J, Rotllan N, Ramírez C, Verghese P, Ihara M, Hoe HS, Esau C, Fernández-Hernando C, Holtzman D, Cirrito J, **Ono K.** and Kim J. microRNA-33 regulates ApoE lipidation and Amyloid- $\beta$  metabolism in the brain. *J Neurosci.* 35, 14717-26 (2015). 査読有 doi:10.1523/JNEUROSCI.2053-15.2015
- ⑨ **Ono K.** Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Kimura T. MicroRNAs and High-Density Lipoprotein Cholesterol Metabolism. *Int Heart J.* 56, 365-71 (2015). 査読有 doi: 10.1536/ihj.15-019.
- ⑩ **Ono K.** MicroRNA-133a in the Development of Arteriosclerosis Obliterans. *J Atheroscler Thromb.* 22, 342-3 (2015). 査読有 doi: 10.5551/jat.ED006.
- ⑪ **Ono K.** Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T. MicroRNA-33a/b in Lipid Metabolism-novel “thrifty” models. *Circ J.* 79, 278-84 (2015). 査読有 doi: 10.1253/circj.CJ-14-1252.
- ⑫ Kuwabara Y, Horie T, Baba O, Watanabe S, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakao T, Nishino T, Otsu K, Kita T, Kimura T, **Ono K.** MicroRNA-451 Exacerbates Lipotoxicity in Cardiomyocytes and High-Fat Diet-Induced Cardiac Hypertrophy in Mice through Suppression of the LKB1/AMPK Pathway *Circ Res.* 116, 279-88 (2015). 査読有 doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.304707
- ⑬ Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Nakamura T, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, and **Ono K.** MicroRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1) exhibit reduced HDL-C in vivo *Sci Rep.* 4,5312 (2014) 査読有 DOI:10.1038/srep05312.
- ⑭ Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T, and **Ono K.** MicroRNAs and lipoprotein metabolism. *J of Atherosclerosis and Thrombosis* 21, 17-22 (2014). 査読有
- ⑮ Nagao K, Sowa N, Inoue K, Tokunaga M, Fukuchi K, Uchiyama K, Ito H, Hayashi F, Makita T, Inada T, Tanaka M, Kimura T, and **Ono K.** Myocardial expression level of neural cell adhesion molecule correlates with reduced left ventricular function in human cardiomyopathy. *Circulation; Heart Failure.* 7, 351-8 (2013). 査読有 doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000939.
- ⑯ Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Matsumura S, Inoue K, Marusawa H, Nakamura T, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, and **Ono K.** MicroRNA-33 regulates sterol regulatory element-binding protein 1 expression in mice *Nat Commun.* 4, 2883 (2013). 査読有 doi: 10.1038/ncomms3883.
- ⑰ Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Chujo Y, Watanabe S, Kinoshita M, Horiguchi M, Nakamura T, Chonabayashi K, Hishizawa M, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, **Ono K.** MicroRNA-33-deficiency reduces the progression of atherosclerotic plaque in apoE<sup>-/-</sup> mice. *J Am Heart Assoc.* 1, e003376 (2012). 査読有 doi: 10.1161/JAHA.112.003376.
- ⑱ **Ono K.** Current concept of reverse cholesterol transport and novel strategy for atheroprotection. *J Cardiol.* 60, 339-43 (2012). 査読有 doi: 10.1016/j.jjcc.2012.07.014.
- ⑲ Sowa N, Horie T, Kuwabara Y, Baba O, Watanabe S, Nishi H, Kinoshita M, Takanabe-Mori R, Wada H, Shimatsu A, Hasegawa K, Kimura T, and **Ono K.**

MicroRNA 26b Encoded by the Intron of Small CTD Phosphatase (SCP) 1 Has an Antagonistic Effect on its Host Gene. *Journal of Cellular Biochem.* 113, 3455-65 (2012). 査読有  
doi: 10.1002/jcb.24222.

〔学会発表等〕（研究代表者の招待講演）

（計 17 件）

- ① 尾野 亘、脂質恒常性維持におけるマイクロ RNA-33 の働き、第 1 回 J-ISCP 学術集会 医学・薬学ジョイントシンポジウム 心血管疾患の創薬分子標的と再生・発生、2015 年 6 月 20-21 日、京都
- ② 尾野 亘、microRNA-33a/b による細胞・臓器レベルの脂質代謝制御機構 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会シンポジウム 25 脂質代謝研究の最前線、2015 年 5 月 23 日、下関
- ③ 尾野 亘、脂質代謝を起点とした microRNA-33a/b の作用の解明 Future Perspective in Atherosclerosis Research: Seeking for Novel Therapeutic Targets against Cardiovascular Diseases ‘miR-33a/b as novel therapeutic targets for the treatment of cardiovascular diseases’ 第 79 回日本循環器学会 プレナリーセッション、2015 年 4 月 25 日、大阪国際会議場 大阪
- ④ 尾野 亘、miR-33a/b による細胞・臓器レベルの脂質代謝制御機構、第 44 回日本心臓病学会学術集会 シンポジウム 2 高血圧における臓器連関、2015 年 2 月 7 日、香川
- ⑤ 尾野 亘、microRNA-33a/b の脂質代謝における働き、動脈硬化 Update 2015、2015 年 9 月 5 日、東京
- ⑥ 尾野 亘、microRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1) exhibit reduced HDL-C in vivo. 第 5 回 Molecular Cardiovascular Conference II、平成 26 年 9 月 5 日、神戸ベイシェラトンホテル&タワーズ
- ⑦ 尾野 亘、microRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1) exhibit reduced HDL-C in vivo 第 1 回 iHF フォーラム、平成 26 年 8 月 10 日、東京
- ⑧ 尾野 亘：High impact of microRNA-33 on atherosclerosis and lipid metabolism 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、第 9 回五島雄一郎賞受賞講演、平成 26 年 7 月 11 日、東京

- ⑨ 尾野 亘：microRNA-33 の動脈硬化・脂質制御における役割 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 Featured Session：最先端の病態研究、平成 26 年 7 月 10 日、東京
- ⑩ 尾野 亘：次世代心不全治療の新機軸「microRNA と動脈硬化・心不全」第 23 回 循環薬理学会(Symposium)、平成 25 年 12 月 6 日、福岡メディカルホール、福岡
- ⑪ 尾野 亘: MicroRNA encoded by an intron of Srebf2 regulates SREBP-1 in vivo. 国際シンポジウム“International Symposium on Transcription and Metabolism” (Symposium)、平成 25 年 11 月 11 日、兵庫
- ⑫ 尾野 亘: マイクロ RNA のバイオマーカーとしての応用 第 45 回日本動脈硬化学会 (Symposium)、平成 25 年 7 月 19 日、東京
- ⑬ 尾野 亘、「プラーク不安定化の分子機序」microRNA-33 deficiency causes dual nature of macrophages in atherosclerotic plaque 第 77 回日本循環器学会学術集会 シンポジウム 2、平成 25 年 3 月 17 日、横浜
- ⑭ 尾野 亘、循環器疾患における microRNA の働き 第 42 回日本心臓管作動物質学会 シンポジウム 2「心血管病研究の最前線」、平成 25 年 2 月 9 日、奈良
- ⑮ 尾野 亘、動脈硬化進展におけるマイクロ RNA-33 の働き 第 60 回日本心臓病学会学術集会 パネルディスカッション 8、平成 24 年 9 月 16 日、ホテル日航金沢
- ⑯ 尾野 亘、microRNA-33 の動脈硬化形成における役割の検討 第 44 回日本動脈硬化学会学術集会 シンポジウム 6、平成 24 年 7 月 19 日、東京
- ⑰ 尾野 亘、Increased MicroRNA-1 and MicroRNA-133a Levels in Serum of Patients with Cardiovascular Disease Indicate the Existence of Myocardial Damage. Diagnosis of Heart Failure Using Genetic Biomarker、第 76 回日本循環器学会 (Symposium)、平成 24 年 3 月 17 日、福岡

〔図書〕（計 5 件）

- ① 尾野 亘、「生活習慣病と miRNA」実験医学 ノンコーディング RNA テキストブック 2015 年 羊土社 pp122-125
- ② Ono K. microRNAs and Cardiovascular Remodeling. *Adv Exp Med Biol.* 2015;888:197-213.doi: 10.1007/978-3-319-22671-2\_10.

PubMed PMID: 26663184.

- ③ **Ono K.**, Gaetano Santulli (Eds): microRNA: Medical Evidence, Chapter 10 “microRNAs and Cardiovascular Remodeling” 2015 Springer
- ④ **Ono K.**, MicroRNAs and cardiovascular diseases. In: Charles H. Lawrie (ed): MicroRNAs in Medicine, pp.477-493 Wiley Blackwell, 2014
- ⑤ 尾野 亘. 疾患エクソソーム:病をもたらすパンドラの箱がいま開かれる【第1部:疾患とエクソソーム】循環器疾患におけるエクソソームの役割. 細胞工学 32, 27-31, 2012

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

出願：1件

発明の名称：miR-33b ノックインマウスによる非アルコール性脂肪肝炎モデル

出願番号：特願 2017-59580

出願日：2017/03/24

出願人・発明者：尾野 亘、堀江貴裕、西野共達

〔その他〕 ホームページ等

研究室ホームページ

<http://kyoto-u-cardio.jp/kisokenkyu/metabolic/>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾野 亘 (ONO, Koh)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00359275

### (2) 連携研究者

佐藤史顕 (SATO, Fumiaki)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20467426

研究課題名：マルチ翻訳後修飾プロテオミクスによる代謝・転写システムの大規模解析  
アセチル化修飾と制御酵素の大規模相関解析

研究期間： 2012～2013、2014～2015

課題番号： 24116513 26116717

研究代表者 石濱 泰（京都大学 大学院薬学研究科 教授）

連携研究者 杉山直幸（京都大学 大学院薬学研究科 准教授）

連携研究者 若林真樹（京都大学 大学院薬学研究科 助教）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2013年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2014年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2015年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究成果の概要：細胞内の Lys アセチル化ペプチドを配列不偏的に濃縮することが可能な新規アセチル化ペプチド濃縮法を開発した。化学標識法と酵素処理を組み合わせ、内在性のアセチル化修飾解析を行ったところ、存在量の極めて少ない修飾部位を同定することに成功した。さらに脱アシル化酵素と組み合わせることにより、アセチル化以外のリジン翻訳後修飾にも応用が可能であった。一方で、ヒトアセチル化修飾のストイキオメトリーは、ほとんどのものが 0.1%以下であることが明らかとなり、それに対応した手法開発が今後必要であることも明らかとなった。

1. 研究の背景

近年の質量分析(MS)と特異的濃縮技術の急速な進歩により、リン酸化修飾をはじめとする翻訳後修飾(PTM)解析のプロテオーム規模での計測が可能になりつつある。しかし化学的濃縮が可能なリン酸化プロテオームを除き、多くの PTM プロテオーム解析の現状は、PTM 特異的抗体による濃縮法の未熟さから試料の前分画が必須で、多検体測定妨げになったり、濃縮できるペプチド配列に偏りがあるため大規模解析の障害になったりしており、抗体を用いずに高い濃縮効率とペプチド配列に対する不偏性を有する代替法の開

発が強く望まれている。

さて、Lys アセチル化はごく最近まで、ヒストンに対する可逆的アセチル化を通じて転写的にのみ機能制御に関わるとされてきた。しかし数年前から、Lys アセチル化修飾はリン酸化修飾と同程度に広範囲のタンパク質に対して認められ、多くの細胞機能を広範囲に制御していることが報告され始めた。一部の脱アセチル化酵素に対する阻害薬が抗癌活性を持っていることもあり、創薬の観点からも細胞内アセチロームプロテオームとそれを制御している酵素群（Lys アセチル転移酵素（KAT）および Lys 脱アセチル化酵

素(KDAC)) に注目が集まっている。

## 2. 研究の目的

細胞内の Lys アセチル化ペプチドを配列不偏的に濃縮することが可能であり、かつアセチル化の制御酵素 (Lys アセチル転移酵素 (KAT) および Lys 脱アセチル化酵素 (KDAC)) の情報を同時に入手することが可能な新規アセチル化ペプチド濃縮法を開発し、細胞内アセチル化プロテオーム大規模相関解析を行うことを目的とした。

## 3. 研究成果

代表者は本領域の公募研究第一期 (H24-25) において、抗体を用いずに細胞内アセチル化ペプチドを濃縮する DAPE(DeAcetylated Peptide Enrichment 法)を開発した。DAPE 法では細胞抽出タンパク試料のトリプシン消化ペプチドに対し、全アミノ基をジメチルアミノ基に化学変換した後、任意の KDAC で脱アセチル化したペプチドをタグ化して濃縮するというものである (図 1)。

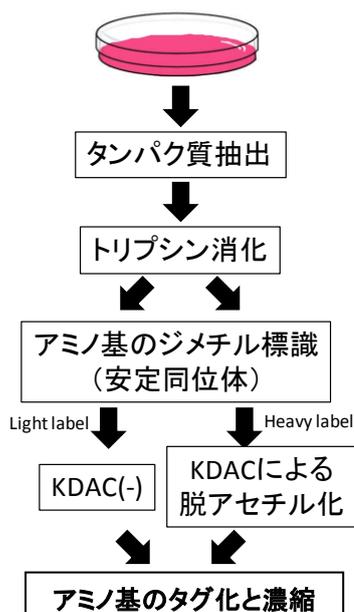


図 1 DAPE 法によるアセチル化ペプチド濃縮

まず、疎水性タグを用いる濃縮法を最適化し、細胞内の内在性アセチル化サイト同定を目的として、HeLa 細胞および大腸菌を試料として検討を行った。大腸菌については野生型および脱アセチル化酵素 *cobB* 欠損型を用いた。その結果、存在量の極めて少ない内在性アセチル化ペプチドを同定することに成功した (図 2)。さらに脱アセチル化酵素と組み合わせることにより、アセチル化以外のリジン翻訳後修飾へも応用を試みた。無水コハク酸により化学的にスクシニル化修飾を施した HeLa 細胞抽出タンパク質をトリプシン消化し、リジン脱スクシニル化酵素として知られる SIRT5 基質ペプチドを濃縮後、LC-MS/MS 測定した。図 3 に結果を示す。

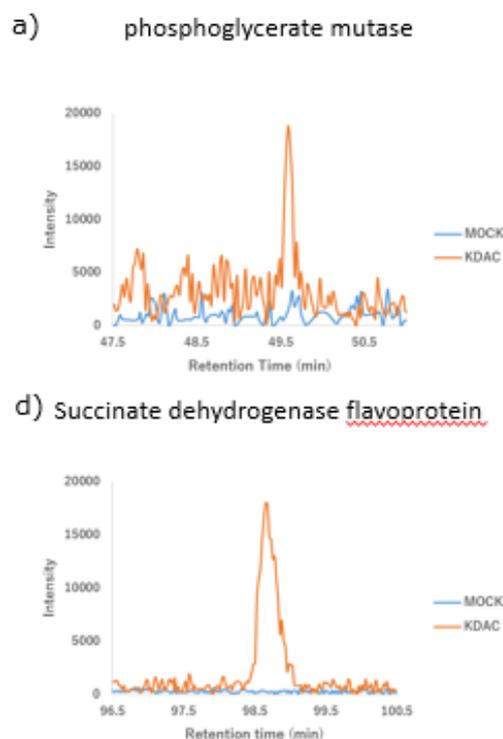


図 2 *E. coli* 内在性アセチル化サイトの同定例: タグ化リジンペプチドの抽出イオンクロマトグラム

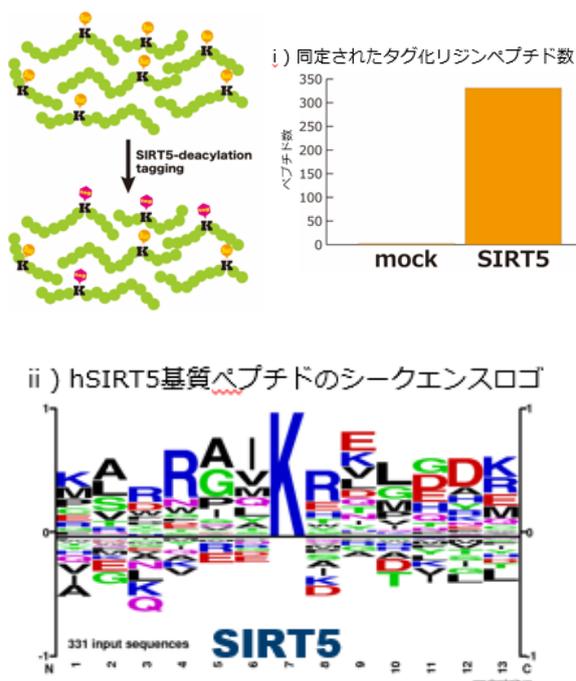


図 3 SIRT5 と化学的スクシニル化 HeLa タンパク質を用いた DAPE 法によるリジンスクシニル化修飾サイトの同定

脱アセチル化酵素の基質特異性にも注目し、化学的にアセチル化を施した *E. coli* (BW25113) 抽出タンパク質をトリプシン、V8、キモトリプシンのいずれかで消化し、SIRT 1~3 それぞれの基質ペプチドを DAPE 法を用いて濃縮後、LC-MS/MS 測定した (図 4)。その結果、ヒト脱アセチル化酵素 SIRT1,2,3 はそれぞれ異なった基質特異性を示すことが示唆された。

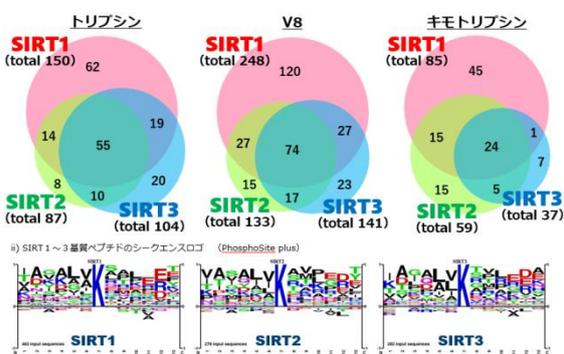


図 4 SIRT1, 2, 3 と化学的アセチル化 *E. coli* タンパク質を用いた DAPE 法によるリジン脱アセチル化サイトの同定

一方で、ヒトアセチル化修飾のストイキオメトリーはリン酸化とは違い、ほとんどのものが 0.1%以下であることが明らかとなり、それに対応した手法開発が今後必要であることも明らかとなった。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[論文-英文総説含む] (計 5 件)

- ① Lin M H, Sugiyama N, Ishihama Y. "Systematic profiling of the bacterial phosphoproteome reveals bacterium-specific features of phosphorylation". *Sci Signal*, 8(394), rs10, 2015. 査読有  
doi: 10.1126/scisignal.aaa3117
- ② Wakabayashi M, Yoshihara H, Masuda T, Tsukahara M, Sugiyama N, Ishihama Y. "Phosphoproteome analysis of formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections mounted on microscope slides". *J Proteome Res*, 13(2), 915-924, 2014. 査読有  
doi:10.1021/pr400960r
- ③ Imamura H, Sugiyama N, Wakabayashi M, Ishihama Y. "Large-scale identification of phosphorylation sites for profiling protein kinase selectivity". *J Proteome Res*, 13(7), 3410-3419, 2014. 査読有 doi:10.1021/pr500319y
- ④ Horie K, Kamakura T, Ikegami T, Wakabayashi M, Kato T, Tanaka N, Ishihama Y. "Hydrophilic interaction chromatography using a meter-scale monolithic silica capillary column for proteomics LC-MS". *Anal Chem*, 86(8), 3817-3824, 2014. 査読有  
doi:10.1021/ac4038625
- ⑤ Yamana R, Iwasaki M, Wakabayashi M, Nakagawa M, Yamanaka S, Ishihama Y. "Rapid and Deep Profiling of Human Induced Pluripotent Stem Cell Proteome by One-shot NanoLC-MS/MS Analysis with Meter-scale Monolithic Silica Columns". *J Proteome Res*, 12(1), 214-221, 2013. 査読有  
doi:10.1021/pr300837u

〔学会発表等〕(研究代表者の招待講演)

(計 36 件)

- ① 石濱 泰、プロテオーム統合データベースjPOSTの構築、第39回日本分子生物学会年会、2016/11/30、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
- ② 石濱 泰、ヒトプロテオーム解明に向けたプロテオーム解析法の開発、第36回キャピラリー電気泳動シンポジウム、2016/11/11、徳島大学常三島キャンパス工業会館、徳島県徳島市
- ③ 石濱 泰、キナーゼ収斂型リン酸化プロテオミクスによるシグナルネットワーク解析、第89回日本生化学会大会、2016/09/27、仙台国際センター、宮城県仙台市
- ④ Yasushi Ishihama, Kinase-centric pharmacoproteomics for molecular-targeting drug discovery, HUPO2016, 2016/09/21, TICC, Taipei, Taiwan
- ⑤ Yasushi Ishihama, Slicing Proteomics to Unveil the Human Proteome, 21st International Mass Spec Conference, 2016/08/22, Metro Toronto Convention Centre, Toronto, ON, Canada
- ⑥ Yasushi Ishihama, High Resolution Shotgun Proteomics for Kinome Profiling, HPLC2016: 44th international symposium on high performance liquid phase separations and related techniques, 2016/06/22, Marriott San Francisco Marquis, San Francisco, CA, USA
- ⑦ 石濱 泰、高分離能LCと高分解能MSのハイファネーションによる超高分離分析システムの実現とその応用、第76回分析化学討論会、2016/05/28、岐阜大学、岐阜市
- ⑧ 石濱 泰、プロテオーム間引き解析とSWATH、第64回質量分析総合討論会、2016/05/19、ホテル阪急エキスポパーク、大阪府吹田市
- ⑨ 石濱 泰、リン酸化プロテオミクスを駆使した創薬キノームプロファイリング、第371回CBI学会講演会、2016/04/22、グランフロント大阪ナレッジキャピタルVisLab OSAKA、大阪市
- ⑩ 石濱 泰、Proteomic Challenges to complete the Human Proteome and Phosphoproteome, 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会、2015/12/1、神戸ポートアイランド、神戸市
- ⑪ Yasushi Ishihama, Illumination of Kinase-mediated Phosphoproteomes by High Resolution LC-MS, 15th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis (APCE2015), 2015/11/16, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan
- ⑫ Yasushi Ishihama, Slicing Proteome to illuminate the Human Proteome and Phosphoproteome, 2015 IUPAC 48th General Assembly and 45th World Chemistry Congress, 2015/08/11, BEXCO, Busan, Republic of Korea
- ⑬ 石濱 泰、Challenges to illuminate Human Proteome and Phosphoproteome, 日本プロテオーム学会2015年会、2015/07/24、くまもと森都心プラザ、熊本市
- ⑭ 石濱 泰、ヒトプロテオーム完全解析への挑戦、第33回内分泌代謝学サマーセミナー、2015/07/10、柳川藩主立花邸御花、福岡県柳川市
- ⑮ Yasushi Ishihama, High resolution shotgun proteomics for illuminating human proteome and phosphoproteome, 1st Symposium of the Center of Toxins, Immune-Response and Cell Signaling "From Proteomics to Systems Biology", 2015/05/21, Instituto Butantan, Sao Paulo, Brazil
- ⑯ Yasushi Ishihama, Slicing the Human Proteome: Chromatographic Challenges Facing Complete Human Proteome & Phosphoproteome Analysis, Keystone Symposia meeting on "The Human Proteome", 2015/04/27, Clarion Hotel Sign, Stockholm, Sweden
- ⑰ 石濱 泰、翻訳後修飾プロテオミクスと分子標的創薬、日本薬学会第135年会、2015/03/26、神戸学院大学、兵庫県神戸市
- ⑱ 石濱 泰、次世代リン酸化プロテオミクスによるヒトリン酸化ストイキオメトリーの大規模解析、第12回北里疾患プロテオーム研究会、2015/03/18、北里大学相模原キャンパス、神奈川県相模原市
- ⑲ 石濱 泰、深化するHigh Resolution LC-MSとプロテオミクスへの応用、第86回日本生化学会大会、2014/10/17、国立京都国際会館、京都市
- ⑳ Yasushi Ishihama, Data Processing/Mining in Shotgun Proteomics & PTMomics, The 1st SNU International Computational Bioinformatics Workshop, 2014/10/14, Wide River Institute of Immunology, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea
- ㉑ 石濱 泰、深化するプロテオミクス LC-MS、日本分析化学会第63年会、2014/09/17、広島大学東広島キャン

パス、広島県東広島市

- ②② Yasushi Ishihama, High Resolution LC coupled with High Resolution MS for In-Depth Proteomics, 11th International Symposium on Mass Spectrometry in the Health & Life Sciences: Molecular & Cellular Proteomics, 2014/08/19, Hotel Nikko San Francisco San Francisco, CA, USA
- ②③ 石濱 泰、高深度プロテオミクスを用いたキヌームリン酸化シグナリング、大阪大学蛋白質研究所セミナー：キナーゼシグナリング、2014/03/14、大阪大学蛋白質研究所、大阪府吹田市
- ②④ 石濱 泰、高分離・高分解能LC-MSが牽引する高深度プロテオミクス、第24回クロマトグラフィー科学会議・第33回キャピラリー電気泳動シンポジウム、2013/11/13、東京大学工学部2号館、東京
- ②⑤ 石濱 泰、超高分離LCを用いた定量プロテオミクスLC-MS、第86回日本生化学会大会、2013/09/11、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
- ②⑥ 石濱 泰、細胞内リン酸化ネットワーク解析と分子標的創薬、日本分析化学会第62年会、2013/09/10、近畿大学東大阪キャンパス、大阪府東大阪市
- ②⑦ 石濱 泰、高深化プロテオミクスによるプロテオーム・リン酸化プロテオーム大規模解析への挑戦、第61回質量分析総合討論会、2013/09/10、つくば国際会議場エポカル、茨城県つくば市
- ②⑧ Yasushi Ishihama, Illuminating cellular phosphorylation through one-shot phosphoproteomics, Gordon Research Conference, Posttranslational Modification Networks, 2013/07/28, The Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong, China.
- ②⑨ Yasushi Ishihama, Illuminating cellular phosphorylation through one-shot phosphoproteomics, The 4th Asia Oceania Mass Spectrometry Conference, 2013/07/10, Taipei International Convention Center, Taiwan.
- ③⑩ 石濱 泰、リン酸化プロテオミクスを用いた細胞内リン酸化ネットワークの解明、日本薬学会第133年会、2013/03/29、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
- ③⑪ 石濱 泰、高深度リン酸化プロテオミクスによる細胞内リン酸化の徹底解明に向けて、大阪大学蛋白質研究所セミナー：シグナル伝達と解析技

術のあらたな潮流、2013/03/04、大阪大学蛋白質研究所、大阪府吹田市

- ③② Yasushi Ishihama, Illuminating human complete proteome by in-depth proteogenomics approaches, 2013 PGM21-KSBMB joint symposium on multi-omics in medicine, 2013/01/16, High-one resort, Republic of Korea
- ③③ 石濱 泰、高深化する細胞内リン酸化ネットワーク、第85回日本生化学会大会、2012/12/16、福岡国際会議場、福岡市
- ③④ Yasushi Ishihama, Ultrahigh Resolution Chromatography to Extend Phosphoproteome World, 28th International Symposium on MicroScale Bioseparations and Analyses (MSB2012), 2012/10/23, Shanghai, China
- ③⑤ 石濱 泰、広がる細胞内リン酸化ワールド、第10回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム、2012/08/07、ホテル平安の森京都、京都市
- ③⑥ Yasushi Ishihama, Modern methods of chromatography for complex mixture analysis, MaxQuant Summer School 2012: Computational Mass Spectrometry-Based Proteomics, 2012/06/22, Max-Planck Institute for Biochemistry, Munich, Germany.

[研究成果による産業財産権の出願・取得状況]  
・該当なし

[その他] ホームページ等  
研究室ホームページ  
<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/seizai/>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

石濱泰 (ISHIHAMA, Yasushi)  
京都大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：30439244

### (2) 連携研究者

杉山直幸 (SUGIYAMA, Naoyuki)  
京都大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号：50545704

若林真樹 (WAKABAYASHI, Masaki)  
京都大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：70552024

研究課題名：心発生に必要な ATP 量を確保するための転写環境の解明  
転写環境の破綻によるATP量の変動が惹起する先天性心疾患発症機構の  
解明

研究期間：2012～2013、2014～2015

課題番号：24116514、26116718

研究代表者 二村圭祐（大阪大学 大学院医学系研究科 准教授）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2013 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2014 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2015 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000

**研究成果の概要：**心臓発生において ATP 産生関連遺伝子を大量に発現させる転写環境を解明し、転写環境の破綻による ATP 量の変動が心筋細胞の分化・増殖、心臓の形態形成や拍動に与える影響を明らかにするとともに、その破綻による先天性心疾患の発症機構を理解し、新たな治療法開発の基盤を確立することを目的とし研究を行った。本研究結果より、発生期のマウス心臓におけるゲノムワイドなクロマチン修飾状況、転写制御因子の結合領域、遺伝子発現を解明することができた。さらに、ヒストンメチル化酵素 Whsc1 が ATP 産生関連遺伝子の発現制御を行うことを見出した。

## 1. 研究の背景

心臓は胚発生において最初に発生する器官であり発生初期から拍動を開始し死ぬまで拍動を続けるため、組織量あたり最も ATP を生産し、かつ消費する。さらに、心臓発生において1本の heart tube が looping と呼ばれる複雑な形態形成運動を行なうことで心臓の形が作られるため、その運動のエネルギー源として ATP が十分量あることが必須である。これまでに多くの転写因子やエピジェネティック因子の変異によって先天性心疾患が引き起こされることがヒトや遺伝子改変マウスによって明らかにされてきたが、これらの因子の変異が先天性心疾患を引き起こすメカニズムは全く不明である (Nimura et al. J. Mol. Med. 2010 年、

二村圭祐 Annual Review 循環器 2011 年)。

転写因子やエピジェネティック因子の変異による先天性心疾患の発症メカニズムを明らかにするためには、心臓の形態形成や拍動に欠かすことのできないエネルギーの産生に関連する遺伝子の転写環境を明らかにし、転写因子やエピジェネティック因子の変異がこの転写環境に与える影響を同定する必要がある。

## 2. 研究の目的

形態形成運動や心臓の拍動のエネルギーを生み出すための ATP 産生関連遺伝子群がどのような転写環境によって発現調節されているか明らかにし、先天性心疾患の原因となる転写因子やエピジェネテ

ック因子の変異が ATP 産生に与える影響を明らかにすることも目的に研究を行った。

### 3. 研究成果

#### 1) ATP 産生を変動させる転写因子やエピジェネティック因子のスクリーニング

先天性心疾患の原因となる転写因子やエピジェネティック因子のノックダウンもしくはノックアウトを行い、マウス胎仔心筋細胞を回収し、ATP 量の計測を行った。その結果、発生中の心筋細胞において ATP 産生を制御している因子を複数同定することに成功した。中でもヒストン H3 の 36 番目のリジンのメチル化を行う Whsc1 (別名 NSD2) を欠損したマウス胎仔心筋細胞では ATP 産生が亢進することがわかった。この結果から、ヒストンメチル化を中心とするクロマチン修飾と ATP 産生という代謝経路がクロストークしている可能性が示唆された。

#### 2) ATP 産生を変動させる転写因子やエピジェネティック因子の標的 ATP 産生関連遺伝子群の同定

ヒストンメチル化酵素 Whsc1 がマウス胎仔心筋細胞において ATP 産生量を制御することが示唆されたので、Whsc1 の標的遺伝子の探索を行った。Whsc1 欠損マウス胎仔心臓と野生型マウス胎仔心臓の網羅的な遺伝子発現解析を次世代シーケンサーによって行った。その結果、ATP 産生を行う解糖系や TCA 回路に関連する遺伝子の発現が Whsc1 欠損によって変動することが明らかになった。

次に、Whsc1 をこれらの遺伝子群にリクルートする因子を探索した。まず、Whsc1 のクロマチン免疫沈降を行い、回収した DNA を次世代シーケンサーで解析した。得られたシーケンスデータを解析し、Whsc1 が結合している領域を同

定した。この領域の塩基配列を解析した結果、この領域には転写因子 Nrf2 が認識し得るモチーフ配列が存在することがわかった。Whsc1 が Nrf2 と相互作用するか免疫沈降法にて確認したところ、この 2 つのタンパク質は相互作用することがわかった。これらの結果から、Whsc1 は Nrf2 によって ATP 産生関連遺伝子にリクルートされていることが示唆された。

#### 3) ATP 産生関連遺伝子を高発現させるためのクロマチン構造の同定

ATP 産生関連遺伝子を制御するためのクロマチン構造を明らかにするために、まず、マウス胎仔心臓におけるゲノムワイドなヒストン修飾状態の同定を次世代シーケンサーによって行った。その結果、Whsc1 が結合していることが認められた遺伝子座において、ヒストン H3 の 36 番目のリジンがトリメチル化されていることが明らかになった。このメチル化は Whsc1 の欠損によって減少した。酵母においてヒストン H3 の 36 番目のリジンのメチル化はヒストンのターンオーバーを抑制することでアセチル化を低下させることが知られている (Nature 2012 489 452)。しかし Whsc1 欠損マウス胎仔心臓では、ヒストン H3 の 36 番目のリジンのトリメチル化は低下するが、アセチル化は亢進しなかった。

Whsc1 欠損によって発現の変動する遺伝子座における RNA ポリメラーゼ II のローディング量が Whsc1 欠損によって変化するか検討した。その結果、Whsc1 欠損によって発現が増加する遺伝子の転写開始点近傍において、RNA ポリメラーゼ II の量が顕著に増加することがわかった。このことから、Whsc1 は RNA ポリメラーゼ II のローディング量を適切に制御していることがわかった。以上の結果から、

ヒストンメチル化酵素 Whsc1 が ATP 産生を制御することが明らかになった。

また、これらシーケンシングデータの解析から Whsc1 の新規機能を発見し報告した。さらに、これまでに知られていなかった新規の転写因子による転写終結制御機構を明らかにし、報告した。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計 12 件)

- ① Regulation of alternative polyadenylation by Nkx2-5 and Xrn2 during mouse heart development. Nimura K (corresponding author), Yamamoto M, Takeichi M, Saga K, Takaoka K, Kawamura N, Nitta H, Nagano H, Ishino S, Tanaka T, Schwartz RJ, Aburatani H, Kaneda Y. *eLife*. 2016 Jun 22;5. pii: e16030. doi: 10.7554/eLife.16030. 査読有
- ② Differences in histone modifications between slow- and fast-twitch muscle of adult rats and following overload, denervation or valproic acid administration. Kawano F, Nimura K, Ishino S, Nakai N, Nakata K, Ohira Y. *J Appl Physiol*. 2015, Nov 15;119(10):1042-52. 査読有
- ③ CRISPR/Cas9-mediated gene knockout of NANOG and NANOGP8 decreases the malignant potential of prostate cancer cells. Kawamura N, Nimura K (corresponding author), Nagano H, Yamaguchi S, Nonomura N, Kaneda Y. *Oncotarget*. 2015 Sep 8;6(26):22361-74. 査読有
- ④ Endogenous Mesenchymal Stromal Cells in Bone Marrow Are Required to Preserve Muscle Function in mdx Mice. Fujita R, Tamai K, Aikawa E, Nimura K, Ishino S, Kikuchi Y, Kaneda Y. *Stem Cells*. 2015 Mar;33(3):962-75. 査読有
- ⑤ Histone H3 lysine 36 methyltransferase Whsc1 promotes the association of Runx2 and p300 in the activation of bone-related genes. Lee Y F, Nimura K (corresponding author), Lo W N, Saga K, Kaneda Y. *PLoS One*. 2014 Sep 4;9(9):e10661. 査読有
- ⑥ Karyopherin alpha2 is essential for rRNA transcription and protein synthesis in proliferative keratinocytes. Umegaki-Arao N, Tamai K, Nimura K, Serada S, Naka T, Nakano H, Katayama I. *PLoS One*. 2013 Oct 3;8(10):e76416. 査読有
- ⑦ WHSC1 links transcription elongation to HIRA-mediated histone H3.3 deposition. Sarai N, Nimura K, Tamura T, Kanno T, Patel MC, Heightman TD, Ura K, Ozato K. *EMBO J*. 2013 Aug 28;32(17):2392-406. 査読有
- ⑧ Residual Prostate Cancer Cells after Docetaxel Therapy Increase the Tumorigenic Potential via Constitutive Signaling of CXCR4, ERK1/2 and c-Myc. Hatano K, Yamaguchi S, Nimura K, Murakami K, Nagahara A, Fujita K, Uemura M, Nakai Y, Tsuchiya M, Nakayama M, Nonomura N, Kaneda Y. *Mol Cancer Res*. 2013 Sep;11(9):1088-100. 査読有
- ⑨ The transcription factors Tbx18 and Wt1 control the epicardial epithelial-mesenchymal transition through bi-directional regulation of Slug in murine primary epicardial cells. Takeichi M, Nimura K, Mori M, Nakagami H, Kaneda Y. *PLoS One*. 2013 8(2):e57829. 査読有
- ⑩ Essential role for miR-196a in brown adipogenesis of white fat progenitor cells. Mori M, Nakagami H, Rodriguez-Araujo G, Nimura K, Kaneda Y. 査読有 *PLoS Biol*. 2012;10(4):e1001314.
- ⑪ Androgen-regulated transcriptional control of sialyltransferases in prostate cancer cells. Hatano K, Miyamoto Y, Mori M, Nimura K, Nakai Y, Nonomura N, Kaneda Y. *PLoS One*. 2012;7(2):e31234. Review 査読有
- ⑫ Elucidating the mechanisms of transcription regulation during heart development by next-generation sequencing. Nimura K (corresponding author) and Kaneda Y. *J Hum Genet*. 2016 Jan;61(1)5-12 査読有

〔学会発表等〕(研究代表者の招待講演)  
(計 5 件)

- ① 二村圭祐 心臓発生における転写制

御機構 大阪大学生命機能研究科  
2012年

- ② 二村圭祐 先天性心疾患における転写制御機構 2014年 千葉大学
- ③ 二村圭祐 先天性心疾患における転写制御機構 2015年 アメリカ国立衛生研究所金曜会
- ④ 二村圭祐 次世代シーケンサー、超高解像度顕微鏡によるクロマチンダイナミクスの解明 2016年 国立循環器病研究センター
- ⑤ 二村圭祐 心臓発生における転写制御機構の解明 2016年 第15回日本心臓血管発生研究会

〔図書〕(計1件)

- ① 二村圭祐、金田安史  
日本臨床 ゲノム情報と遺伝子治療-  
遺伝子治療の最新動向- 高速シーケンサーによる  
遺伝子解析の現状  
印刷中

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

〔その他〕ホームページ等

研究室ホームページ

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gts/>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

二村圭祐 (NIMURA, Keisuke)  
大阪大学・大学院医学系研究科・  
准教授  
研究者番号：00462713

研究課題名：新規DNAメチル化形成にリンクしたメチル化消去機構に関する研究  
DNA demethylation linked to *de novo* DNA methylation.

研究期間：2012～2013

課題番号：24116515

研究代表者 田嶋正二（大阪大学 たんぱく質研究所 教授）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2013年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000

**研究成果の概要：** DNA メチル化修飾は、転写制御、特にその抑制に寄与しており、メチル化模様は胚発生初期、生殖細胞、終末分化時に書き換えられている。DNA の脱メチル化は、その樹立と維持とともに、メチル化制御にとり重要なステップである。メチル化されたシトシン塩基（5mC）のヒドロキシル化（5hmC）が脱メチル化の印となっていることが最近報告された。本研究では、メチル化された DNA の中からどのように特定のメチル化部位が選びだされ、ヒドロキシル化されているのかを解析するとともに、5hmCを一塩基レベルで解析する手法を開発した。

1. 研究の背景

高等真核生物では、ゲノム DNA 中の CpG 配列のシトシン塩基の 5 位の炭素がしばしばメチル化修飾を受ける。ゲノムのメチル化模様は、長期間安定に遺伝情報の発現を抑制する“エピジェネティック”な印として、高等真核生物で広く利用されている。DNA メチル化により組織特異的な遺伝子の発現やレトロトランスポゾンの発現抑制、また、哺乳類におけるゲノムインプリンティング、雌の X 染色体不活性化が制御されている。また、ゲノム DNA のメチル化模様の異常は、癌などの疾患の発症を引き起こすなど、DNA メチル化はあらゆる生命現象に深く関わっている。

DNA メチル化模様は発生の初期に *de novo* 型の DNA メチルトランスフェラーゼ、Dnmt3a と Dnmt3b により書き込まれ、それ以降は複製に伴い、維持型 DNA メチル

トランスフェラーゼ、Dnm1 により次世代の細胞に伝えられる。（図 1）

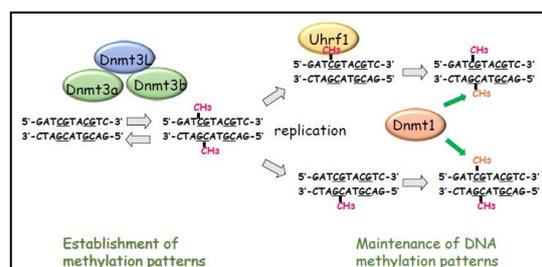


図 1 DNA のメチル化は初期胚と生殖細胞で樹立され、その後複製期に細胞系譜特異的に維持される。

DNA メチル化模様は、生殖細胞でゲノム全体が、また、細胞が分化するときには特定の遺伝子で脱メチル化される。この能動的な脱メチル化の機構については長い間不明であったが、最近、メチルシトシン（5mC）が酸素添加酵素、TET により酸化されたヒドロキシメチルシトシン（5hmC）が脱メチル化の中間体であることが報告された。しかし、どのようにして標的のゲノム領域を認識して脱メチ

ル化されているのかなど、詳しい機構については明らかになっていない。ゲノムの脱メチル化機構を明らかにするためには、5hmC のゲノム上の位置を解析する技術が欠かせない。これまでに報告されている方法にはいずれも難があり、簡便に 5hmC を解析する技術の開発は DNA メチル化模様の制御を理解する上で必須である。

## 2. 研究の目的

本研究では、多くのメチル化された DNA の中からどのようにメチル化部位が選ばれるか、ヒドロキシル化されているのかを明らかにする。これにより、未分化恒常性と分化刺激による細胞内外のシグナルにより、DNA メチル化模様がどのように制御されているのかを解明することを目指した。

また、ゲノム中の 5hmC を一塩基レベルで解析する技術は、生体内における脱メチル化機構とそれに果たす 5hmC の機能を解析するうえで欠かせない技術であり、安定で使いやすい技術を開発することは急務である。ゲノムの 5hmC を一塩基レベルの解像度で解析する技術を開発することを目指した。

## 3. 研究成果

### (1) 選択的なヒドロキシル化部位

胚性幹 (ES) 細胞では、新規メチル化模様を形成する Dnmt3a と Dnmt3b が書き込んだメチル化修飾 (ヘミメチル化状態にあると予想される) が選択的にヒドロキシル化されていることを明らかにした。また、Dnmt1 はヘミヒドロキシメチル化修飾を受けた DNA をほとんどメチル化できないこと、さらに、複製と共役した維持メチル化に必須な因子である Uhrf1

(Np95) のヘミメチル化 DNA 結合領域はヒドロキシル化修飾を受けた DNA に結合できないことを明らかにした。以上の結果は Dnmt3a や Dnmt3b によってヒドロキシル化修飾を受けたゲノム領域は複製の過程で受動的に脱メチル化されることを示している。

すなわち、ゲノムの新規にメチル化されたシトシンは図 2 のように制御されていると考えられる。Dnmt1 は維持メチルを時々入れそこなうことが知られているが (A)、Dnmt3a と Dnmt3b は Dnmt1 が維持できなかった脱メチル化部位にメチル基を導入している。しかし、Dnmt3a と Dnmt3b はそれ以外の「望ましくない」箇所にも新たにメチル基を入れてしまう

(B)。望ましくない新規メチル化は TET により検知され、ヒドロキシル化される (C)。この 5hmC は複製時に Dnmt1-Uhrf1 によるフィルターにより排除される (D)。De novo のメチル化活性とヒドロキシル化活性の高い ES 細胞では高頻度でおきた新規メチル化部位はすみやかにヒドロキシル化され、複製に依存した維持メチル化系によってそのほとんどが消去されている。

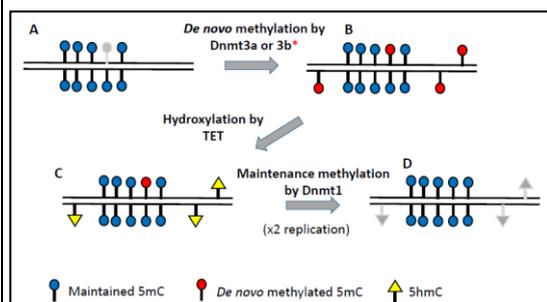


図 2 胚性幹細胞でのメチル化の書き込みと消去

一方で、興味深いことに、5hmC は DNA の損傷部位に選択的に集積していることを明らかにした。5hmC は脱メチル化の中間体というだけでなく、それ自身で DNA 修復などの生理的なプロセスに寄与して

いる可能性が示唆された。

## (2) 5hmCの一塩基レベルでの解析技術の開発

(1) で述べたように、DNMT1 はヘミヒドロキシメチルシトシンをほとんどメチル化できない。この DNMT1 の持つ性質と、5hmC を一塩基レベルで解析するバイサルファイト法を組み合わせることで、DNMT1 を用いた 5hmC のゲノム内での位置を一塩基解像度で解析する技術を開発した。

他法であるが、5hmC を化学的にホルミルシトシン (5fC) に効率よく酸化することができれば、バイサルファイト法と組み合わせることにより、5hmC のゲノム内の位置を一塩基レベルで特定することが可能になる。5hmC を、温和な酸化試薬 Azadol を用いることにより安定に 5fC に変換する方法を開発して、5hmC のゲノム内の位置を一塩基レベルで解析する技術をさらにもう一つ開発した。

## 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕 (計 13 件)

- ① Kawasaki Y, Kuroda Y, Suetake I, Tajima S, Ishino F, and Kohda T. A Novel method for the simultaneous identification of methylcytosine and hydroxymethylcytosine at single base resolution. *Nucl Acids Res* 45 (4): e24. (2017), 査読有  
doi: 10.1093/nar/gkw994
- ② Fukuzawa S, Takahashi S, Tachibana K, Tajima S, Suetake S. Simple and accurate single base resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine by catalytic oxidative bisulfite sequencing using micelle incarcerated oxidants. *Bioorg Medicinal Chem*, 24, 4254-4262 (2016). 査読有  
doi: 10.1016/j.bmc.2016.07.016.
- ③ Tajima S, Suetake I, Takeshita K, Nakagawa A, Kimura H. Domain structure of the Dnmt1, Dnmt3a, and Dnmt3b DNA methyltransferases. *Adv Exp Med Biol*, 945, 63-86 (2016) 査

- ④ Tajima S, Kimura H, and Suetake I. Establishment and maintenance of DNA methylation. *In* DNA replication, recombination, and repair, edited by Hanaoka F and Sugasawa K, pp 489-516, **eBook**, 2016, 査読無 Feb, Springer Japan. doi: 10.1007/978-4-431-55873-6.
- ⑤ Kafer GR, Li X, Horii T, Suetake I, Tajima S, Hatada I, and Carlton PM. 5-hydroxymethylcytosine marks sites of DNA damage and promotes genome stability. *Cell Rep* 14(6), 1283-1292 (2016) 査読有  
doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.035
- ⑥ Fukuzawa S, Tachibana K, Tajima S, Suetake I. Selective oxidation of 5-hydroxymethylcytosine with micelle incarcerated oxidants to determine it at single base resolution. *Bioorg Medicinal Chem Lett*, 25, 5667-5671 (2015) 査読有  
doi: 10.1016/j.bmcl.2015.11.017
- ⑦ Takahashi S, Suetake I, Engelhardt J, and Tajima S. A novel method to analyze 5-hydroxymethylcytosine in the CpG sequence using maintenance DNA methyltransferase DNMT1. *FEBS Open Bio* 5, 741-747 (2015) 査読有  
doi: 10.1016/j.fob.2015.09.003
- ⑧ Berkyurek AC, Suetake I, Arita K, Takeshita K, Nakagawa A, Shirakawa M, and Tajima S. The DNA methyltransferase Dnmt1 directly interacts with the SET and RING finger associated (SRA) domain of the multifunctional protein Uhrf1 to facilitate accession of the catalytic center to hemi-methylated DNA. *J. Biol. Chem.* 289, 379-386 (2014) 査読有  
doi: 10.1074/jbc.M113.523209
- ⑨ Garvilles RG, Hasegawa T, Kimura H, Sharif J, Muto M, Koseki H, Takahashi S, Suetake I, Tajima S. Dual functions of the RFTS domain of Dnmt1 in replication-coupled DNA methylation and in protection of the genome from aberrant methylation. *PLoS ONE* 10, e0137509 (2015) 査読有  
doi: 10.1371/journal.pone.0137509
- ⑩ Horii T, Morita S, Kimura M, Kobayashi R, Tamura D, Takahashi R, Kimura H, Isao Suetake, Hirokazu Ohata, Okamoto K, Tajima S, Ochiya T, Abe Y and Hatada I. Genome engineering of mammalian haploid embryonic stem cells using the Cas9/RNA system. *Peer J* 1, e230 (2013) 査読有  
doi: 10.7717/peerj.230

- ⑪ Otani J, Kimura H, Sharif J, Endo TA, Mishima Y, Kawakami T, Koseki H, Shirakawa M, Suetake I, and **Shoji Tajima**. Cell Cycle-dependent turnover of 5-hydroxymethyl cytosine in mouse embryonic stem cells. *PLoS ONE* 8, e82961 (2013) 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0082961
- ⑫ Morita S, Horii T, Kimura M, Ochiya T, **Tajima S**, and Hatada I. miR-29 represses the activities of DNA methyltransferases and DNA demethylases. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 14647-14658 (2013) 査読有 doi: 10.3390/ijms140714647
- ⑬ Genome-wide analysis of DNA methylation and expression of microRNAs in breast cancer cells. Morita S, Takahashi R, Yamashita R, Toyoda A, Horii T, Kimura M, Fujiyama A, Nakai K, **Tajima S**, Matoba R, Ochiya T, and Hatada I. *J. Mol. Sci.*, 13, 8259-8272 (2012) 査読有 doi:10.3390/ijms13078259

〔学会発表等〕（研究代表者の招待講演）  
（計 5 件）

- ① **田嶋正二**、エピジェネティクスと生化学。第 10 回日本エピジェネティクス研究会年会、2016 年 5 月 19 日 20 日、千里ライフサイエンスセンター（大阪府吹田市）
- ② **田嶋正二**、DNA メチル化制御の生化学。蛋白質研究所セミナー「エピジェネティクス、分子機構から高次機能まで」2015 年 12 月 11 日～12 日大阪大学蛋白質研究所（大阪府吹田市）
- ③ **田嶋正二**、DNA メチルトランスフェラーゼによる DNA メチル化模様の形成・維持。第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会年会、ワークショップ「POK ファミリーが司る組織分化の複雑性－転写抑制とクロマチン制御」、2015 年 12 月 1～4 日、神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）
- ④ **田嶋正二**、Dnmt1 (RFTS) と Uhrf1 (SRA) が保証する DNA 維持メチル化。蛋白質研究所セミナー「DNA のメチル化の制御機構-メチル化模様形成、維持と消去」2013 年 11 月 1 日、2 日大阪大学蛋白質研究所（大阪府吹田市）
- ⑤ **Shoji Tajima**, Kohei Takeshita, Isao Suetake, and Atsushi Nakagawa. Multi-step process of maintenance methylation. FASEB Science Research Conference on Biological Methylation: From DNA and Histones to Disease, August 12-17, 2012, the Westin

Conference Center, Snowmass Village, Colorado, USA.

〔図書〕（計 2 件）

- ① **田嶋正二**編、エピジェネティクス その分子機構から高次生命機能まで、化学同人、2013/11/29、296
- ② 木村博信、**田嶋正二**、DNA のメチル化エピジェネティクスキーワード事典、牛島俊和、眞貝洋一編、羊土社、2013、20-25

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕  
・該当なし

## 5. 研究組織

(1) 研究代表者

田嶋正二 (TAJIMA, Shoji)

大阪大学・たんぱく質研究所・教授

研究者番号：50132931

研究課題名：核酸代謝と熱ショック応答のクロストークの解明  
代謝変化によるストレス誘導性転写機構の調節

研究期間：2012～2013、2014～2015

課題番号：24116517、26116720

研究代表者 中井 彰（山口大学 医学系研究科 教授）

連携研究者 藤本充章（山口大学 医学系研究科 准教授）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2013年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2014年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2015年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000

**研究成果の概要：**代謝変化が転写因子 HSF1 により制御されるプロテオスタシス容量と密接に関連していることが分ってきた。本研究は、HSF1 が形成する転写複合体およびそれによる転写調節機構を解明することで、代謝と転写環境の関連を明らかにすることを目標とした。その結果、DNA、糖・脂質、そしてエネルギーの代謝と関連する因子群が HSF1 転写複合体の構成因子として、HSF1 のクロマチンへの結合、それによる転写誘導と減衰、ならびにプロテオスタシス容量を調節することを明らかにした。

## 1. 研究の背景

熱ショック応答は、すべての生物に備わる細胞の適応機構であり、一群の熱ショック蛋白質（HSP）の誘導を特徴とする。この応答を転写のレベルで制御するのが進化の過程で保存された熱ショック因子（HSF）である。線虫を用いた研究から、HSF が HSP 発現を介してプロテオスタシス容量（タンパク質ミスフォールディングに対処できる能力）を調節し、老化や老化と関連する病気の進行を抑制することが分かっている。我々はこれまで、哺乳動物細胞の HSF 群（HSF1、HSF2、HSF3、HSF4）は、蛋白質フォールディングを助ける HSP 及び分解関連因子を含む非 HSP 蛋白質の発現を介してプロテオスタシスの維持に極めて重要な役割を担い、老化や老化と関連する蛋白質ミスフォールド病の進行を抑制することを示してきた

（*EMBO J.* 2004, 2010; *Mol. Biol. Cell* 2010, 2011）。また、プロテオスタシスは代謝ホメオスタシスと密接な関連があることが、老化やがんの研究から分ってきた。実際に、HSF1 は単独で、あるいは代謝ホメオスタシスを制御する転写因子群と協調的に糖・脂質やエネルギー代謝に関連する遺伝子の転写調節を行っている。しかし、一方で、代謝調節因子や代謝産物が HSF1 により構築される転写環境にどのように関与するかについては明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本計画研究で我々は、ほとんど明らかにされていない哺乳動物細胞の HSF1 転写複合体調節に着目した。HSF1 転写複合体による転写機構の全貌を明らかにするために蛋白質相互作用ネットワーク解析を

行い、HSF1 転写複合体の構成因子として核酸代謝、糖・脂質やエネルギー代謝に関連する分子群を同定した。これらの分子群による HSF1 転写複合体形成と転写調節機構を解明することで、代謝と転写環境の関連を明らかにすることを旨とした。

### 3. 研究成果

#### (1) 核酸代謝と熱ショック応答

##### ① DNA 複製因子 RPA による HSF1 のクロマチンへの結合

ショウジョウバエ *HSP70* 遺伝子のプロモーターは、非ストレス状態でも GAGA 因子が結合することで隣接するクロマチンが開き、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) がプリロードしている。このようなヌクレオソーム非存在領域のおかげで、熱ストレスに曝されたときに HSF1 が速やかにプロモーターに結合し、*HSP70* の転写が短時間で急激に誘導される。しかし、高等動物細胞には GAGA 因子は存在せず、クロマチン構造変化の分子機構についてはほとんど明らかにされていなかった。一方、マウス胎児線維芽細胞 (MEF) の *HSP70* プロモーターにはあらかじめ HSF1 が結合し、Pol II がプリロードされていた。我々は、HSF1 と核酸代謝に関与する RPA 複合体がヒストンシャペロンである FACT をリクルートすることで *HSP70* プロモーターのクロマチンを開いて HSF1 の結合を助けることを明らかにした (*Mol. Cell* 2012)。この HSF1-RPA 複合体は、非ストレス条件下での多くの遺伝子プロモーターに結合し、それらの発現に必要であった。さらに RPA1 は、HSF1 と同様に細胞の温熱耐性及び蛋白質凝集体形成の抑制に必要であることも分かった。以上の結果は、HSF1 転写複合体が DNA 複製因子を介してゲノム DNA へ結合することを示した。

##### ② DNA 修復因子 PARP1 による転写調節

我々は、ポリ ADP リボシル化酵素である PARP1 が HSF1 転写複合体の構成因子であり、熱ショック応答を調節することを見いだした。驚いたことに、HSF1-PARP1 は DNA 損傷時においても誘導性遺伝子発現を促進する。さらにこの複合体が、二本鎖 DNA 切断時の相同組換えおよび非同末端結合による修復も促進していた。これら HSF1-PARP1 の役割の遂行のためには、あらかじめ HSF1 および PARP13 を介してゲノム上に局在していた PARP1 が、DNA 損傷によって転写される遺伝子および損傷 DNA へ一過性に再分布することが必要であった。つまり、DNA 代謝と関連する PARP1 が遺伝子発現を制御する仕組みを明らかにした (論文投稿中)。

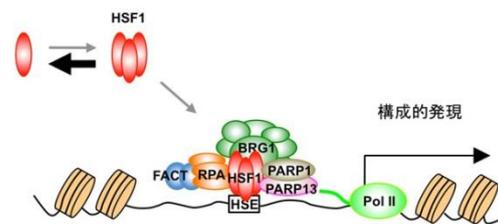


図 1 HSF1 による構成的発現制御

#### (2) 糖・脂質やエネルギー代謝と熱ショック応答

##### ① 糖・脂質代謝と関連する HSF1 転写複合体調節

熱ストレスに曝された細胞では、糖・脂質代謝の恒常性を担う転写因子 ATF1 が *HSP70* プロモーター上で HSF1 転写複合体の構成因子となることを見いだした (*Mol. Cell. Biol.* 2015)。この HSF1-ATF1 複合体は、クロマチン再構成複合体の構成因子 BRG1 のリクルートを促すことで *HSP70* の熱誘導を促進した。一方、熱ストレス条や代謝シグナルを模倣するフォルスコリン処理により ATF1-Ser63 のリン酸化が亢進して p300/CBP が引き寄せられる。そ

の結果、ストレスからの回復期に HSF1 がアセチル化されて HSF1 活性の減弱が促進されることも分かった。HSF1-ATF1 複合体は熱ストレス時や回復期の熱ストレス感受性に大きな効果を示した。以上の結果は、代謝変化が HSF1 転写複合体形成と熱ストレス耐性に重要な役割を担うことを示す。

## ② エネルギー代謝と関連する HSF1 転写複合体調節

ストレスに曝された細胞では、核と細胞質だけでなく、エネルギー産生のあるミトコンドリアを含むすべての細胞小器官のタンパク質変性が導かれる。熱ショック応答は細胞内のプロテオスタシス容量を調節する重要な仕組みの一つであるが、それがミトコンドリアからのシグナルで調節されることは知られていなかった。我々は、ミトコンドリア DNA の複製と維持に関与する SSBP1 が、熱ストレスにより核へ移行し、HSF1 転写複合体の構成因子となることを明らかにした (*Nat. Commun.* 2015)。SSBP1 は BRG1 のリクルートを促すことでミトコンドリアと細胞質・核の熱ショックタンパク質の転写を誘導し、ストレス条件下でのミトコンドリア機能の維持に寄与していた。

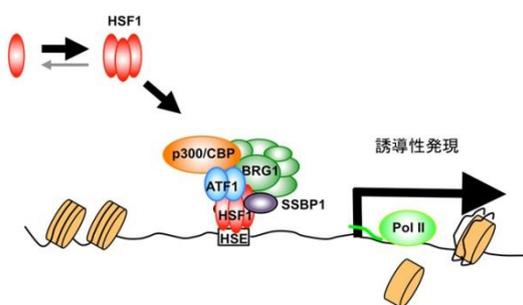


図2 HSF1 による誘導性発現制御

一連の結果は、DNA、糖・脂質、そしてエネルギーの代謝と関連する因子群が HSF1 転写複合体を介してクロマチンへの結合、転写誘導と減衰、ならびにプロテオスタシス容量を調節することを明らかにした。

## 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[論文-英文総説含む] (計 30 件)

- ① Ishii S, Torii M, Son AI, Rajendraprasad M, Morozov YM, Kawasawa YI, Salzberg AC, Fujimoto M, Brennan K, Nakai A, Mezger V, Gage F, Rakic P, and Hashimoto-Torii K. Variations in brain defects by prenatal alcohol exposure result from cellular mosaicism in the activation of heat shock signaling. *Nat. Commun.* in press (2017) 査読有
- ② Nagata Y, Fujimoto M, Nakamura K, Isoyama N, Matsumura M, Fujikawa K, Uchiyama K, Takaki E, Takii R, Nakai A, and H. Matsuyama. Anti-TNF- $\alpha$  agent infliximab and splenectomy are protective against renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 100, 1675-1682, (2016) 査読有
- ③ Yokoyama S, Ohno Y, Egawa T, Yasuhara K, Nakai A, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Okita M, Origuchi T, and Goto K. Heat shock transcription factor 1-associated expression of slow myosin heavy chain in mouse soleus muscle in response to unloading with or without reloading. *Acta Physiol.* 217, 325-337 (2016) 査読有
- ④ Nakai A. Molecular basis of HSF1 regulation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 93-95 (2016) 査読無(News and Views)
- ⑤ Kondo T, Hisatome I, Yoshimura S, Mahati E, Notsu T, Li P, Iitsuka K, Kato M, Ogura K, Miake J, Aiba T, Shimizu W, Kurata Y, Sakata S, Nakasone N, Ninomiya H, Nakai A, Higaki K, Kawata Y, Shirayoshi Y, Yoshida A, and Yamamoto K. Characterization of the novel mutant A78T-HERG from a long QT syndrome type 2 patient: Instability of the mutant protein and stabilization by heat shock factor 1. *J. Arrhythm.* 32, 433-440 (2016) 査読有
- ⑥ Mahati E, Li P., Kurata Y, Maharani N, Nobuhito I, Sakata S, Ogura K, Miake J,

- Aiba T, Shimizu W, Nakasone N, Ninomiya H, Higaki K, Yamamoto K, **Nakai A**, Shirayoshi Y, and Hisatome I. M3 muscarinic receptor signaling stabilizes a novel mutant hERG channel protein via phosphorylation of HSF1 in transfected cells. **Circ. J.** 80, 2443-2452, (2016) 査読有
- ⑦ Tsuda J, Sugahara K, Hori T, Kanagawa E, Takaki E, Fujimoto M, **Nakai A**, and Yamashita H. A study of hearing function and histopathologic changes in the cochlea of the type 2 diabetes model Tsumura Suzuki obese diabetes mouse. **Acta Otolaryngol.** 136, 1097-1106, (2016) 査読有
- ⑧ Tamura H, Kawamoto M, Sato S, Tamura I, Maekawa R, Taketani T, Aasada H, Takaki E, **Nakai A**, Reiter RJ, and Sugino N. Long-term melatonin treatment delays ovarian aging. **J. Pineal Res.** 62(2). doi: 10.1111/jpi.12381 (2016). 査読有
- ⑨ Takii R, **Fujimoto M**, Tan K, Takaki E, Hayashida N, Nakato R, Shirahige K, and **A. Nakai**. ATF1 modulates the heat shock response by regulating the stress-inducible HSF1-transcription complex. **Mol. Cell. Biol.** 35, 11-25 (2015) 査読有
- ⑩ Tan K, **Fujimoto M**, Takii R, Takaki E, Hayashida N, and **Nakai A**. Mitochondrial SSBP1 protects cells from proteotoxic stresses by potentiating stress-induced HSF1 transcriptional activity. **Nat. Commun.** 6, 6580 (2015) 査読有
- ⑪ Kagawa Y, Yasumoto Y, Sharifi K, Ebrahimi M, Islam A, Miyazaki H, Yamamoto Y, Sawada T, Kishi H, Kobayashi S, Maekawa M, Yoshikawa T, Takaki E, **Nakai A**, Kogo H, Fujimoto T, and Owada Y. Fatty acid-binding protein 7 regulates lipid raft formation in astrocytes through expression of caveolin-1. **Glia** 63, 780-794 (2015) 査読有
- ⑫ Saito K, Kukita K, Kutomi G, Okuya K, Asanuma H, Tabeya T, Naishiro Y, Yamamoto M, Takahashi H, Torigoe T, **Nakai A**, Shinomura Y, Hirata K, Sato N, and Tamura Y. Heat shock protein 90 associates with Toll-like receptors 7/9 and mediates self-nucleic acid recognition in SLE. **Eur. J. Immunol.** 45, 2028-2041 (2015) 査読有
- ⑬ Yamagata Y, Takaki E, Shinagawa M, Okada M, Jozaki K, Lee L, Sato S, Maekawa R, Taketani T, Asada H, Tamura H, **Nakai A**, and Sugino N. Retinoic acid has the potential to suppress endometriosis development. **J. Ovarian Res.** 8, 49 (2015) 査読有
- ⑭ Ohno Y, Egawa T, Yokoyama S, **Nakai A**, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, and Goto K. Deficiency of heat shock transcription factor 1 suppresses heat stress-associated increase in slow soleus muscle mass of mice. **Acta Physiol.** 215, 191-203 (2015) 査読有
- ⑮ Chuma M, Sakamoto N, **Nakai A**, Hige S, Nakanishi M, Natsuzaka M, Suda G, Sho T, Hatanaka K, Matsuno Y, Yokoo H, Kamiyama T, Taketomi A, Fujii G, Tashiro K, Hikiba Y, **Fujimoto M**, Asaka M, and Maeda S. Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor κB/ mitogen-activated protein kinase. **Carcinogenesis** 35, 272-281 (2014) 査読有
- ⑯ Yamagata Y, Nishino K, Takaki E, Sato S, Maekawa R, **Nakai A**, and Sugino N. Genome-wide DNA methylation profiling in cultured eutopic and ectopic endometrial stromal cells. **PLoS One** 9, e83612 (2014) 査読有
- ⑰ Hashimoto-Torii K, Torii M, **Fujimoto M**, **Nakai A**, El Fatimy R, Mezger V, Ju MJ, Ishii S, Chao S, Brennand KJ, Gage FH, and Rakic P. Roles of heat shock factor 1 in neuronal response to fetal environmental risks and its relevance to brain disorders. **Neuron** 82, 560-572 (2014) 査読有
- ⑱ Nakamura Y, **Fujimoto M**, Fukushima S, Nakamura A, Hayashida N, Takii R, Takaki E, **Nakai A**, and Muto M. Heat shock factor 1 is required for migration and invasion of human melanoma in vitro and in vivo. **Cancer Lett.** 354, 329-335 (2014) 査読有
- ⑲ Akagi R, Ohno M, Matsubara K, **Fujimoto M**, **Nakai A**, and Inouye S. Glutamine protects intestinal barrier function of colon epithelial cells from ethanol by modulating Hsp70 expression. **Pharmacology** 91, 104-111 (2013) 査読有
- ⑳ Kondo N, Katsuno M, Adachi H, Minamiyama M, Doi H, Matsumoto S, Miyazaki Y, Iida M, Tohnai G, Nakatsuji H, Ishigaki S, Fujioka Y, Watanabe H, Tanaka F, **Nakai A**, and Sobue G. Heat shock factor-1 influences pathological lesion distribution of polyglutamine-induced neurodegeneration. **Nat. Commun.** 4,

- 1405 (2013) 査読有
- ②① Lennikov A, Kitaichi N, Kase S, Noda K, Horie Y, **Nakai A**, Ohno S, Ishida S. Induction of heat shock protein 70 ameliorates ultraviolet-induced photokeratitis in mice. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 2175-2189 (2013) 査読有
- ②② Maekawa R, Sato S, Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Okada M, Tamura H, Takaki E, **Nakai A**, and Sugino N. Genome-wide DNA methylation analysis reveals a potential mechanism for the pathogenesis and development of uterine leiomyomas. *PLoS One* 8, e66632 (2013) 査読有
- ②③ Nishizawa S, Koya T, Ohno Y, Goto A, Ikuita A, Suzuki M, Ohira T, Egawa T, **Nakai A**, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Beppu M, and Goto K. Regeneration of injured skeletal muscle in heat shock transcriptional factor 1-null mice. *Physiol. Rep.* 1, e00071 (2013) 査読有
- ②④ Iwai C, Li P, Kurata Y, Hoshikawa Y, Morikawa K, Maharani N, Higaki K, Sasano T, Notsu T, Ishido Y, Miake J, Yamamoto Y, Shirayoshi Y, Ninomiya H, **Nakai A**, Murata S, Yoshida A, Yamamoto K, Hiraoka M, and Hisatome I. Hsp90 prevents interaction between CHIP and HERG proteins to facilitate maturation of wild-type and mutant HERG proteins. *Cardiovasc. Res.* 100, 520-528 (2013) 査読有
- ②⑤ Prakasam R, **Fujimoto M**, Takii R, Hayashida N, Takaki E, Tan K, Wu F, Inouye S, and **Nakai A**. Chicken *IL-6* is a heat-shock gene. *FEBS Lett.* 587, 3541-3547 (2013) 査読有
- ②⑥ Koya T, Nishizawa S, Ohno Y, Goto A, Ikuita A, Suzuki M, Ohira T, Egawa T, **Nakai A**, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Beppu M, and Goto K. Heat shock transcription factor 1-deficiency attenuates overloading-associated hypertrophy of mouse soleus muscle. *PLoS One* 8, e77788 (2013) 査読有
- ②⑦ **Fujimoto M**, Takaki E, Takii R, Tan K, Prakasam R, Hayashida N, Iemura S, Natsume T, and **Nakai A**. RPA assists HSF1 access to nucleosomal DNA by recruiting histone chaperone FACT. *Mol. Cell* 48, 182-194 (2012) 査読有
- ②⑧ Nakamoto T, Mikuriya T, Sugahara K, Hirose Y, Hashimoto T, Shimogori H, Takii R, **Nakai A**, and Yamashita H. Geranylgeranylacetone suppresses noise-induced expression of proinflammatory cytokines in the

- cochlea. *Auris Nasus Larynx* 39, 270-274 (2012) 査読有
- ②⑨ Ma H, Gong H, Chen Z, Liang Y, Yuan Zhang JG, Wu J, Ye Y, Yang C, **Nakai A**, Komuro I, Ge J, and Zou Y. Association of Stat3 with HSF1 plays a critical role in G-CSF-induced cardio-protection against ischemia/ reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52, 1282 – 1290 (2012) 査読有
- ③⑩ Kubo M, Li TS, Kurazumi H, Takemoto H, Ohshima M, Yamamoto Y, Nishimoto A, Mikamo A, **Fujimoto M**, **Nakai A**, and Hamano K. Heat shock factor 1 contributes to ischemia-induced angiogenesis by regulating the mobilization and recruitment of bone marrow stem/progenitor cells. *PLoS One* 7, e37934, 2012. 査読有

【学会発表等】（研究代表者の招待講演）  
（計 8 件）

- ① **中井 彰**、熱ショック応答によるミトコンドリアのプロテオスタシス制御、第 12 回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム（日本学術振興会産学協力研究委員会主催）、平成 28 年 8 月 18 日、熊本市
- ② **中井 彰**、HSF1 転写複合体による細胞の恒常性維持機構、第 89 回日本生化学会大会シンポジウム、平成 28 年 9 月 2 日、仙台市
- ③ **Nakai A**. Regulation of proteostasis and the heat shock response. College of Life Science, Hebei Normal University、平成 28 年 10 月 27 日、Shijiazhuang, China
- ④ **Nakai A**. Heat shock response is modulated by poly(ADP-ribose) polymerases in mammalian cells. The 7th International Congress on Stress Response in Biology and Medicine、平成 27 年 9 月 18 日、Huangshan, China
- ⑤ **Nakai A**. A mitochondrial protein accelerates the heat shock response. EMBO workshop: the regulation of aging and proteostasis、平成 27 年 2 月 16 日、Maale Hachamisha, Israel
- ⑥ **Nakai A**. Epigenomic regulation of the HSF-transcription complexes under physiological and stressed conditions. HSF Workshop、平成 26 年 4 月 23 日、Paris, France
- ⑦ **中井 彰**、熱ショック応答の分子機構、第 8 回臨床ストレス応答学会シンポジウム、平成 25 年 11 月 15 日、松本市
- ⑧ **中井 彰**、熱ショック応答におけるエピゲノム制御、第 86 回日本生化学会大会シンポジウム、平成 25 年 9 月 11 日、

横浜市

〔図書〕 (計 2 件)

- ① Nakai A. ed. Springer Japan, Heat Shock Factor, 2016, p301.
- ② Fujimoto M, Takii R, Hayashida N, Nakai A. Human Press, Stress Response (Methods Mol. Biol. 1292), 2015, p53-65.

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

取得：1 件

発明の名称：H S F 1 と R P A 1 との相互作用阻害ペプチド

登録番号：特許第 6019530 号

登録日：平成 28 年 10 月 14 日

出願人：国立大学法人山口大学

発明者：中井 彰、藤本充章

〔その他〕 ホームページ等

研究室ホームページ

<http://ds22.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~seika2/>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

中井 彰 (NAKAI, Akira)

山口大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60252516

### (2) 連携研究者

藤本充章 (FUJIMOTO, Mitsuaki)

山口大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80359900

研究課題名：トランスオミクス解析によるシグナル伝達-代謝-転写制御間の接点解明  
多階層オミクス動態解析に基づく代謝制御システム解明

研究期間： 2012～2013、2014～2015

課題番号： 24116518、26116721

研究代表者 松本 雅記（九州大学 生体防御医学研究所 准教授）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2013年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2014年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2015年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000

**研究成果の概要：**生命が恒常性を維持するために日々営まれている代謝を構成するネットワークの動作原理理解のためには、様々な条件下での代謝ネットワークの動的挙動を代謝酵素や代謝物の変動として追跡する必要がある。本研究では様々なプロテオミクスの手法を開発・応用し、代謝とそれを取り巻く制御ネットワークの関係性を解き明かすことも目的とした。その結果、超超高感度なタンパク質絶対定量法やリン酸化ネットワークの解析法を開発に成功し、これを用いてがんや老化などで見られる代謝ネットワークの変化とその意義を明らかにした。

## 1. 研究の背景

生命の本質的な営みである『代謝』は、千種類を超える多数の酵素によって触媒される極めて複雑な生化学反応システムである。細胞は自らが置かれた環境（栄養状態や酸素濃度、さらには各種ホルモン刺激など）を検知し、代謝状態をダイナミックに変化させ適応する。近年、個々の分子の詳細な解析から、シグナル伝達-代謝酵素間、転写-代謝酵素間、さらには代謝物-転写間などの関係性を示す発見が次々となされ、代謝経路の周囲には予想以上に複雑な制御ネットワークが存在する可能性が示されてきたが、その全体像は未だ多く謎に包まれている。

このように極めて複雑な多階層にまたがる分子ネットワークの理解のためには、各階層に属する分子の量的・質的变化を定量的にとらえるトランスオミクス解析

が必須である。しかしながら、実際の生化学反応の担い手であるタンパク質に関してはその解析法が極めて未成熟であり、トランスオミクス解析を実施する上で大きな足枷となっていた。このような背景から、申請者はこれまでに様々な革新的なタンパク質発現量解析技術である『情報基盤定量法』（特許出願中：特願2009-169045）や大規模リン酸化プロテオーム解析法の開発を考案・開発してきた。

## 2. 研究の目的

本研究では代謝とそれを取りまくシグナル伝達あるいは転写との関連性を包括的に理解するために、研究代表者が考案した定量プロテオミクスの原理を元に、代謝酵素や各種タンパク質のリン酸化を正格に定量解析を可能とする技術を構築し、これらの手法を用いて様々な状況下での

細胞内分子ネットワーク構成要素の変化を追跡することで、代謝とそれを取り巻く制御ネットワークの全体像を明らかにすることを目的とする（図1）。

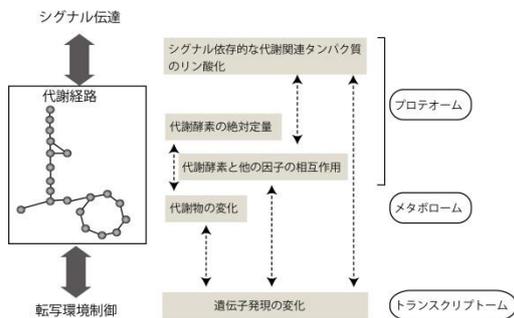


図1：トランスオミクス解析を用いた代謝とその関連ネットワーク解析

### 3. 研究成果

#### (1) 代謝ネットワーク理解のためのプロテオーム解析技術の構築

##### ① 次世代定量プロテオミクスプラットフォームの構築

組換えタンパク質を網羅的に作製し、これを用いて事前情報を取得することで容易に任意のタンパク質の絶対定量法の構築が可能な新規プラットフォームである iMPAQT (in vitro proteome assisted protein absolute quantification) 法の構築に成功した(図2)。本手法を用いて約1000種類の代謝酵素の絶対定量系を構築し、様々な細胞に対して代謝酵素の発現量を計測した。

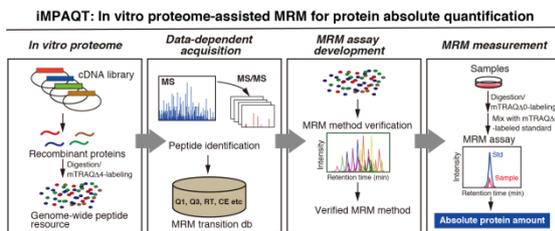


図2：iMAPQT法の概要

##### ② リン酸化定量解析法の構築

リン酸化ペプチド濃縮技術と isobaric tag を用いた定量解析技術を組み合わせ

ることで大規模にリン酸化の変動をモニターする技術を構築した。また、個々のリン酸化に関してもターゲットプロテオミクスによる定量が可能であることを確認した。これをいくつかのシグナル伝達系に応用し、シグナル伝達経路のネットワークの特性や動作原理に関する知見を得ることに成功した。

##### ③ ヒト型汎用ロボットを用いたプロテオミクス技術の高精度化

プロテオーム解析では試料調製過程が煩雑であるため、実験者のスキルが精度や再現性に影響を与える。そこで、タンパク質絶対定量用試料調製プロトコルのロボット化を実施することでシステム全体の再現性や精度の向上を図った。具体的には全実験工程を細分化後、ロボットプログラムへ翻訳し、バーチャル空間でシミュレーションすることでプログラムの検証を行い、最終的には人的な微調整を施した。ティーチング終了後、ロボットの動作を実際の検体を用いて検証し、最適化を繰り返すことで精度や再現性を向上させた(図3)。

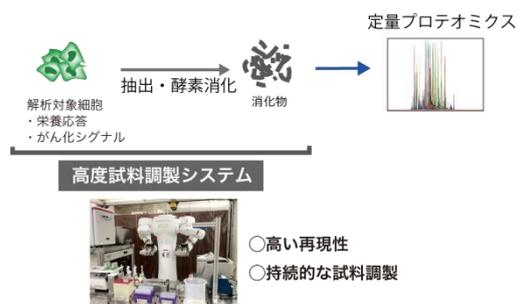


図3：ヒト型ロボットを用いた高精度プロテオミクス試料調製技術の確立

##### ④ 代謝ネットワーク理解のためのモデル細胞系の構築

本研究ではヒト正常細胞に対して各種がん関連遺伝子の導入によって人工的に癌化誘導を行うモデルシステムを構築す

る。ヒト正常細胞はマウス等の細胞に比べて単一がん原遺伝子導入ではがん化しないことが知られている。そこで、TERT 遺伝子と SV40 遺伝子を導入した細胞に Myc, 活性型 Akt, 活性型 Ras などを多重導入しがん化を誘導した。また、SV40 遺伝子非存在下で活性化 Ras を発現することで、細胞老化を誘導できる系を構築した。さらに、血清飢餓と接触阻止を用いて休止期に導入した細胞も得た。

## (2) モデル細胞系を用いたトランスオミクス計測

これらのモデル状態の細胞を対象に、代謝酵素の発現量やリン酸化状態の解析、さらにはメタボロームやトランスクリプトームなどの解析を実施した。得られた結果を統合し、統計解析や数理モデルの構築により、いくつかの仮説形成を行い、その検証実験も実施した。

### ① プロテオームレベルでの Warburg 効果の理解

正常細胞と各種がん原遺伝子の導入によってトランスフォームした細胞における約 1,000 種類の代謝酵素の精密絶対定量を実施した（一部の例を図 4 に示す）。

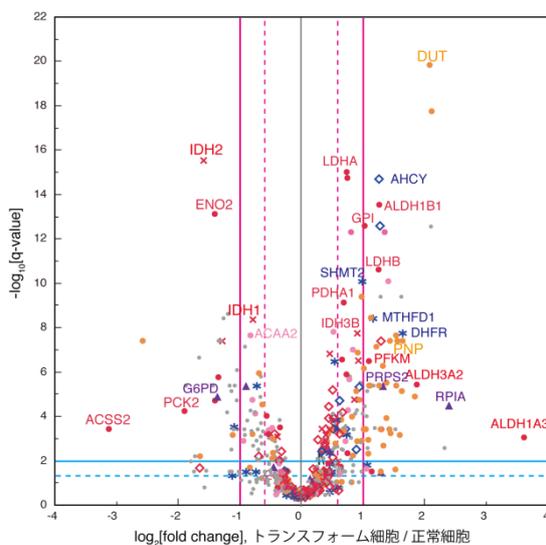


図 4 : c-Myc トランスフォーム株で見られる代謝酵素の変化

その結果、特定の解糖酵素の発現亢進が認められたことに加えて、多数の核酸代謝に関する酵素の発現量変化が広範囲に認められた。また、これらの細胞株を対象にメタボローム解析やグルコース消費等の細胞代謝能の計測を実施した。それらの結果を用いて、代謝酵素変動による代謝物へのインパクトを示す数理モデルの構築やそれを用いたシミュレーションを実施し、重要酵素の推定等を行なった。さらに、トランスクリプトーム解析やメチローム解析などの他のオミクス解析も実施し、全オミクス階層にまたがる、細胞がん化の影響を定量的に俯瞰することに成功した。例えば、活性化 Ras は DNA メチル化にも大きなインパクトを与えていることが判明した。

### ② ペントースリン酸経路と解糖の相互作用

上記の解析結果を統合的に解釈することで、がん細胞の増殖に必要なとされる核酸の合成にはペントースリン酸経路と解糖経路の上流酵素の協調的作用が関連しているという仮説を立てることができた。実際、正常細胞にペントースリン酸経路関連酵素 (PRPS1 や RPE など) を単独過剰発現してもグルコースに由来する核酸合成に影響は認められないが、これらの酵素に加えて解糖経路酵素である GPI を過剰発現すると核酸合成促進が認められた。PRPS1 や RPE が増加しているトランスフォーム株から GPI の発現を抑えると、核酸合成能とコロニー形成能が抑制された。

### ③ 細胞休止期における代謝変動

細胞休止期状態の誘導はコレステロール合成系の代謝酵素の発現抑制を引き起こすことが明らかとなった。これに加え

て IDH2 の発現も顕著に抑制された。

#### ④細胞老化における代謝変動

SV40 非存在化での Ras 誘導による細胞老化過程で、いくつかのアミノ酸代謝酵素の発現が顕著に抑制されていることが判明した。そこで、アミノ酸代謝の変動が積極的な老化誘導に関与しているという仮説を立て、これを検証した。実際、これらのアミノ酸代謝関連酵素の発現抑制を解除すると細胞老化の遅延が認められ本仮説が支持された。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計 20 件)

- ① Matsumoto M, Matsuzaki F, Oshikawa K, Goshima N, Mori M, Kawamura Y, Ogawa K, Fukuda E, Nakatsumi H, Natsume T, Fukui K, Horimoto H, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Nakayama KI. Development of large-scale targeted proteomics assay resource based on an in vitro human proteome. *Nature Methods* in press. 査読有
- ② Yachie N, Robotic Biology Consortium (include Masaki Matsumoto) and Natsume T. Robotic Crowd Biology: LabDroids accelerate life science experiments. *Nature Biotech.* 35 310-312, 2017 査読有
- ③ Matsumoto A, Pasut A, Matsumoto M, Yamashita R, Fung J, Monteleone E, Saghatelian A, Nakayama KI, Clohessy JG, Pandolfi PP. mTORC1 and muscle regeneration are regulated by the LINC00961-encoded SPAR polypeptide. *Nature.* 541, 228-232 (2017) 査読有
- ④ Okuda S, et al., Matsumoto M (14 名中 6 番目), Ishihama, Y. jPOSTrepo: an international standard data repository for proteomes. *Nucleic Acids Res.* D45, D1107-D1111 (2017). 査読有
- ⑤ Kayama K, et al., Matsumoto M (14 名中 6 番目), Fujita M. GRWD1 negatively regulates p53 via the RPL11-MDM2 pathway and promotes tumorigenesis. *EMBO Rep.* 18, 123-137 (2017). 査読有
- ⑥ Hatano A, Matsumoto M, Nakayama, KI. Phosphoproteomics analyses show subnetwork systems in T-cell receptor signaling. *Genes Cells* 21, 1095-1112 (2016). 査読有
- ⑦ Inoue D, Matsumoto M, Nagase R, Saika M, Fujino T, Nakayama KI, Kitamura T. Truncation mutants of ASXL1 observed in myeloid malignancies are expressed at detectable protein levels. *Exp. Hematol.* 44: 172-176.e171 (2016). 査読有
- ⑧ Hosokawa H, Tanaka T, Endo Y, Kato M, Shinoda K, Suzuki A, Motohashi S, Matsumoto M, Nakayama, KI, Nakayama, T. Akt1-mediated Gata3 phosphorylation controls the repression of IFN $\gamma$  in memory-type Th2 cells. *Nature Commun.* 7, 11289 (2016). 査読有
- ⑨ Maehara K, Harada A, Sato Y, Matsumoto M, Nakayama KI, Kimura H, Ohkawa Y. Tissue-specific expression of histone H3 variants diversified after species separation. *Epigenetics Chromatin* 8, 35 (2015). 査読有
- ⑩ Hosokawa H, et al., Matsumoto M (12 名中 9 番目), Nakayama T. Methylation of gata3 protein at arg-261 regulates transactivation of the il5 gene in T helper 2 cells. *J. Biol. Chem.* 290, 13095-13103 (2015). 査読有
- ⑪ Yugi K, et al., Matsumoto M (18 名中 12 番目), et al., Kuroda S. Reconstruction of insulin signal flow from phosphoproteome and metabolome data. *Cell Rep.* 8, 1171-1183 (2014). 査読有
- ⑫ Adachi S, Homoto M, Tanaka R, Hioki Y, Murakami H, Suga H, Matsumoto M, Nakayama K. I., Hata, T., Iemura, S., Natsume, T. ZFP36L1 and ZFP36L2 control LDLR mRNA stability via the ERK-RSK pathway. *Nucleic Acids Res.* 42, 10037-11049 (2014). 査読有
- ⑬ Kitagawa K, Shibata K, Matsumoto A, Matsumoto M, Ohhata T, Nakayama KI, Niida H, Kitagawa M. Fbw7 targets GATA3 through cyclin-dependent kinase 2-dependent proteolysis and contributes to regulation of T-cell development. *Mol. Cell Biol.* 34, 2732-2744 (2014). 査読有
- ⑭ Yumimoto K, Matsumoto M, Onoyama I, Imaizumi K, Nakayama KI. F-box and WD repeat domain-containing-7 (Fbxw7) protein targets endoplasmic reticulum- anchored osteogenic and chondrogenic transcriptional factors for

- degradation. *J. Biol. Chem.* 288, 28488-28502 (2013). 査読有
- ⑮ Hirano A., Yumimoto K, Tsunematsu R, Matsumoto M, Oyama M, Kozuka-Hata H, Nakagawa T, Lanjakornsiripan D, Nakayama KI, Fukada Y. FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes. *Cell* 152, 1106-1118 (2013). 査読有
- ⑯ Narumi R, et al., Matsumoto M (15名中 9 番目), et al., Tomonaga T. A strategy for large-scale phosphoproteomics and SRM-based validation of human breast cancer tissue samples. *J. Proteome Res.* 11, 5311-5322 (2012). 査読有
- ⑰ Yumimoto K, Matsumoto M, Oyamada K, Moroishi T, Nakayama KI. Comprehensive identification of substrates for F-box proteins by differential proteomics analysis. *J. Proteome Res.* 11, 3175-3185 (2012). 査読有
- ⑱ Liu, N, Matsumoto M, Kitagawa K, Kotake Y, Suzuki S, Shirasawa S, Nakayama KI, Nakanishi M, Niida H, Kitagawa M. Chk1 phosphorylates the tumour suppressor Mig-6, regulating the activation of EGF signalling. *EMBO J.* 31, 2365-2377 (2012). 査読有
- ⑲ Kanie T, Onoyama I, Matsumoto A, Yamada M, Nakatsumi H, Tateishi Y, Yamamura S, Tsunematsu R, Matsumoto M, Nakayama KI. Genetic reevaluation of the role of F-box proteins in cyclin D1 degradation. *Mol. Cell. Biol.* 32, 590-605 (2012). 査読有
- ⑳ Oshikawa K, Matsumoto M, Oyamada K, Nakayama KI. Proteome-wide identification of ubiquitylation sites by conjugation of engineered lysine-less ubiquitin. *J. Proteome Res.* 11, 796-807 (2012). 査読有

〔学会発表等〕（研究代表者の招待講演）

（計 10 件）

- ① Masaki Matsumoto, iMPAQT: A platform for large scale targeted proteomics based on in vitro human proteome. 1<sup>st</sup>-International Symposium of the Kyoto Biomolecular Mass Spectrometry Society. 平成 29 年 2 月 7 日、京都大学、京都
- ② 松本雅記, iMPAQT: 組換えタンパク

- 質を利用したタンパク質絶対定量プラットフォーム～がん代謝研究への応用～第 4 回次世代がんインフォマティクス研究会、平成 28 年 12 月 16 日 岡山大学工学部 5 号館 1 階、岡山
- ③ 松本雅記, 定量プロテオミクスプラットフォームのためのインフォマティクス、質量分析インフォマティクス研究会・第 1 回ワークショップ、平成 28 年 10 月 7 日、JST 東京本部（サイエンスプラザ）、東京
- ④ 松本雅記, 次世代定量プロテオミクスによる癌代謝研究、第 3 回がんと代謝研究会、平成 27 年 7 月 16 日、石川県立音楽堂交流ホール、金沢
- ⑤ 松本雅記, 次世代定量プロテオミクスによるヒトプロテオーム解析 第 33 回内分泌代謝学サマーセミナー シンポジウム 平成 27 年 7 月 9 日 御花、柳川市
- ⑥ 松本雅記, 押川清孝、松崎芙美子、五島直樹、夏目徹、中山敬一、次世代ターゲットプロテオミクスによるヒト全代謝経路の絶対定量マッピング、第 87 回生化学会大会、平成 26 年 10 月 17 日、国立京都国際会館、京都
- ⑦ 松本雅記, プロテオーム研究を支えるインフォマティクス、2014 年年会 JSBi2014・第 3 回生命医薬情報学連合大会、平成 26 年 10 月 3 日、仙台国際センター、仙台
- ⑧ 松本雅記, 中津海洋一、中山敬一 リン酸化定量プロテオミクスによるシグナル伝達研究、第 14 回蛋白質科学会年会、平成 26 年 6 月 25 日、ワークピア横浜/横浜産貿易ホール、横浜
- ⑨ 松本雅記, 次世代プロテオミクスによる癌代謝経路の網羅的解析、がんと代謝シンポジウム、平成 25 年 1 月 17 日、慶應義塾大学医学部信濃町キャンパス 北里記念医学図書館講堂、東京
- ⑩ 松本雅記, 大規模ターゲットプロテオミクス・パソシングナリングバイオロジー ワークショップ、平成 24 年 4 月 24 日、東京医科歯科大学、東京

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕  
・該当なし

〔その他〕ホームページ等

研究室ホームページ

- <http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/lab/proteomics/iMPAQT/knowledge/DB>
- <http://impaqt.jpost.org/iMPAQT/>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本雅記 (MATSUMOTO, Masaki)  
九州大学・生体防御医学研究所・准教授  
研究者番号：60380531

## 研究課題名：代謝変化による eEF1BdeltaL の転写活性御機構の解明

研究期間：2012～2014

課題番号：24116519

研究代表者 松下正之（琉球大学 大学院医学研究科 教授）

### 【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2013年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000

**研究成果の概要：**本研究では、スプライシングにより翻訳機能と転写機能を持つ eEF1BdeltaL の代謝性のストレス感知から転写シグナルへの情報伝達経路の解明を目指します。さらに、eEF1Bdelta の転写因子としての機能を獲得する Exon III のみを特異的に欠損したマウスを用いて、脳における新たなストレス応答機構の分子基盤確立を目指した研究を行います。神経細胞における酸化・熱ストレス応答機構は、シャペロン病と呼ばれるパーキンソン病、アルツハイマー病に代表される神経変性疾患や脳梗塞などの病態に密接に関係しているため、神経に高発現する eEF1BdeltaL の機能解析より、これらの疾患の病態解明が進むことが強く期待されます。

### 1. 研究の背景

私たちは、低酸素応答機構を解明するためにハエ RNAi ライブラリーを用いて低酸素条件下での個体レベルでの生死を指標にスクリーニングを行い、新たな低酸素応答遺伝子を発見しています。この研究によって発見された遺伝子の中に SIRT2 がありました。SIRT2 は細胞質に存在する NAD 依存性の脱アセチル化酵素です。我々は SIRT2 の基質をプロテオーム解析を用いて検索し、eEF1B $\delta$  蛋白質を基質として同定しました。この蛋白質は、翻訳因子として知られている 40kda に相当する分子量の eEF1B $\delta$  が知られていましたが、マウスで組織分布を調べてみる 90kda 付近に脳と精巣に特異的に存在する蛋白質の存在が確認されました。eEF1B $\delta$  ゲノム解析により、Exon III がスプライシング変化することにより 90kda の蛋白質が生み出されることがわかりました。この大きい分子を

我々は eEF1B $\delta$ L と呼んでいます。eEF1B $\delta$ L の機能解析を行ったところ、核内にも存在し過剰発現によるアレイ解析により、酸化ストレス応答の重要な遺伝子である HO-1 やシャペロン遺伝子群の発現を高めることを見出しました。また、eEF1B $\delta$ L の組換え蛋白質は HSE DNA と直接結合し、ChiP Assay でもストレス依存性に結合が増強する結果が得られました。これらの結果より、eEF1B $\delta$  はスプライシング変化によって翻訳因子から転写因子に機能変化することが明らかになりました。転写因子として機能変化するために必要なエクソンのみを欠損させた変異マウスを作成しました。この変異マウスを用いて個体レベルでの機能解析を行い、神経細胞において熱ストレスなどに脆弱である結果が得られています。

## 2. 研究の目的

eEF1B $\delta$ の機能解析を行ったところ、核内にも存在し過剰発現によるアレイ解析により、酸化ストレス応答の重要な遺伝子であるHO-1やシャペロン遺伝子群の発現を高めることを見出しました。また、eEF1B $\delta$ の組換え蛋白質はHSE DNAと直接結合し、ChiP Assayでもストレス依存性に結合が増強する結果が得られました。これらの結果より、eEF1B $\delta$ はスプライシング変化によって翻訳因子から転写因子に機能変化することが明らかになっています。本研究では、Exon IIIのみを特異的に欠損させた遺伝子改変マウスを用いて、代謝とストレス応答の関係を明らかにすることを目的としています。

## 3. 研究成果

神経細胞はエネルギー消費量が多く代謝変化やストレスに脆弱です。そのため、ストレスが引き金となり神経変性疾患等が発症すると考えられています。アルツハイマー病やパーキンソン病は原因遺伝子が同定されている家系もありますが、多くの患者では遺伝性の背景は不明です。これらの神経変性疾患はシャペロン病とも呼ばれ、異常蛋白質の蓄積が分子病理の本質です。SIRT2の基質として発見したeEF1B $\delta$ Lは、神経細胞に高発現し、ストレス時に翻訳因子から転写因子へと変化しシャペロンタンパク質群の誘導を行います。神経細胞においては、加齢によるエネルギー状態変化に伴うシャペロン蛋白質発現制御の中心転写因子である可能性がeEF1B $\delta$ に遺伝子改変マウスにより明らかになりました。このシャペロン発現の調節機構の破綻が、癲癇や海馬機能の異常を引き起こすことを明らかにし、論文投稿を準備しています。

## 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計7件)

- ① Kozuka C, Yabiku K, Sunagawa S, Ueda R, Taira S, Ohshiro H, Ikema T, Yamakawa K, Higa M, Tanaka H, Takayama C, Matsushita M, Oyadomari S, Shimabukuro M, Masuzaki H (2012) Brown rice and its component,  $\gamma$ -oryzanol, attenuate the preference for high-fat diet by decreasing hypothalamic endoplasmic reticulum stress in mice. *Diabetes* doi: 10.2337/db11-1767. 査読有
- ② Iketani M, Iizuka A, Sengoku K, Kurihara Y, Nakamura F, Sasaki Y, Sato Y, Yamane M, Matsushita M, Nairn AC, Takamatsu K, Goshima Y, Takei K (2012) Regulation of neurite outgrowth mediated by localized phosphorylation of protein translational factor eEF2 in growth cones. *Developmental Neurobiology* 73: 230-246. 査読有
- ③ Li ST, Wang Y, Matsushita M. Neurological disorders related neuronal network impairment: function and mechanism (2014) *Neural Plasticity*. 945078. doi: 10.1155/2014/945078. 査読有
- ④ Kaitsuka T and Matsushita M. Regulation of Translation Factor EEF1D Gene Function by Alternative Splicing (2015) *Int. J. Mol. Sci.* 16, 3970-3979. 査読有
- ⑤ Kozuka C, Sunagawa S, Ueda R, Higa M, Ohshiro Y, Tanaka H, Shimizu-Okabe C, Takayama C, Matsushita M, Tsutsui M, Ishiuchi S, Nakata M, Yada T, Miyazaki JI, Oyadomari S, Shimabukuro M, Masuzaki H. A novel insulinotropic mechanism of whole grain-derived  $\gamma$ -oryzanol via the suppression of local dopamine D2 receptor signalling in mouse islet (2015) *Br J Pharmacol*. doi: 10.1111/bph.13236. 査読有
- ⑥ Kozuka C, Sunagawa S, Ueda R, Higa M, Tanaka H, Shimizu-Okabe C, Ishiuchi S, Takayama C, Matsushita M, Tsutsui M, Miyazaki JI, Oyadomari S, Shimabukuro M, Masuzaki H (2015) Gamma-oryzanol protects pancreatic  $\beta$ -cells against endoplasmic reticulum

stress in male mice. *Endocrinology*. 156, 1242-1250. 査読有

- ⑦ Takamatsu G, Katagiri C, Tsumuraya T, Shimizu-Okabe C, Nakamura W, Nakamura-Higa M, Hayakawa T, Wakabayashi S, Kondo T, Takayama C, **Matsushita M** (2017) Tescalcin is a potential target of class I histone deacetylase inhibitors in neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.036. 査読有

〔学会発表等〕（研究代表者の招待講演）

（計 2 件）

- ① 松下正之. 転写機能を持つ翻訳因子によるストレス応答機構. (シンポジウム) 第 90 回日本生理学会大会 2013 年 3 月 27 日～29 日, 東京
- ② 松下正之. 翻訳因子 eEF1B  $\delta$  による酸化ストレス制御機構. 第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム 低酸素応答システムの分子機構と多様な役割, 2014 年 10 月 15 日～18 日, 京都市.

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

〔その他〕 ホームページ等

研究室ホームページ

<http://ryukyu-physiology.info>

## 5. 研究組織

(1) 研究代表者

松下正之

(MATSUSHITA, Masayuki)

琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30273965

研究課題名：エストロゲン応答遺伝子の転写調節とエネルギー代謝に関わる  
生体作用の解明

研究期間：2012～2013

課題番号：24116521

研究代表者 池田和博（埼玉医科大学 医学部 講師）

連携研究者 井上 聡（埼玉医科大学 医学部 客員教授）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2013年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000

**研究成果の概要：**エストロゲンは代謝調節に重要な役割を担っていると考えられているがその作用メカニズムは十分に解明されていない。我々はエストロゲン応答遺伝子である **COX7RP** が、ミトコンドリア呼吸鎖スーパー複合体の形成促進因子であり、**ATP** 産生を亢進させる機能を有することを初めて明らかにした。また、遺伝子改変マウスの解析から、**COX7RP** は骨格筋の運動持続能と褐色脂肪組織の熱産生に重要であることが示された。これらのことより、**COX7RP** はエストロゲンとエネルギー代謝との制御に関わる鍵分子として、生理機能を担っていることが示唆された。

## 1. 研究の背景

ステロイドホルモンであるエストロゲンは転写因子として機能するエストロゲン受容体(ER)を介して標的遺伝子の発現を調節することにより生理的ならびに病態生理的な作用を発揮している。エストロゲンは脂質および骨の代謝と関連しており、エストロゲン欠乏が閉経後女性の動脈硬化、肥満ならびに骨粗鬆症を促進することが知られているがメカニズムの解明は十分ではなく、その他のエネルギー代謝、糖代謝などの各種代謝における作用とそのメカニズムも不明の点が多く残されている。

我々は独自にエストロゲン標的遺伝子を複数同定し、機能解析を進めてきた (*Mol. Cell. Biol.* 18, 442-449, 1998; *Nature* 417, 871-875, 2002; *Nature* 446, 916-920, 2007)。なかでも、**COX7RP** はミトコンドリアに存在する電子伝達系のシ

トクロム c オキシダーゼ (**COX**) と高い相同性を有することから、ミトコンドリアにおける機能が想定された。ミトコンドリアは、エネルギー産生を行う重要な細胞内小器官であり、その機能の破綻は、筋力低下や中枢神経症状を主とするミトコンドリア病をはじめ、老化、糖尿病、がんなどの様々な疾患に深く関わっている。ミトコンドリア呼吸鎖複合体（複合体 I～V）の作用モデルに関しては、従来はそれぞれの複合体がミトコンドリア内膜上で個別に散在して存在する流動モデルや、逆に全ての複合体が結合して存在するレスピラソームモデルが提唱されていた。しかしながら、最近の解析技術の革新により、ミトコンドリア呼吸鎖複合体は、単体で存在する複合体と中間的に複数の複合体が結合してスーパー複合体を形成するものが共存し、さらに、環境などに応答してスーパー複合体の会合

と解体が行われているとする仮説が提唱されてきた。スーパー複合体の形成制御や安定性に関わるメカニズムは、エネルギー代謝と密接に関連すると想定されることからその全容解明が注目されている(図1)。

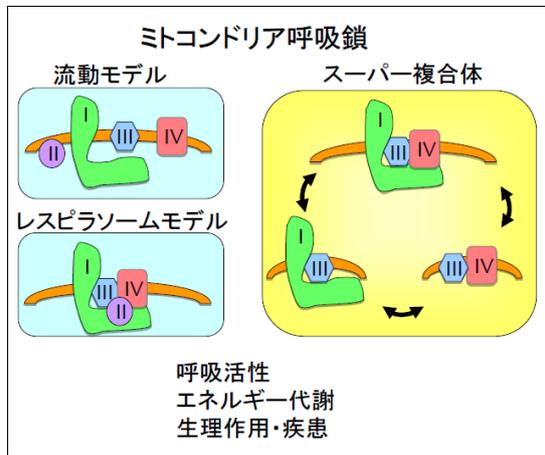


図1 ミトコンドリア呼吸鎖の作用モデル

## 2. 研究の目的

本研究は我々が独自に同定した COX7RP をはじめとするエストロゲン応答遺伝子の転写調節メカニズムと代謝環境による制御を明らかにし、さらに、遺伝子改変マウスも用いてエネルギー代謝をはじめとする各種代謝におけるエストロゲン応答遺伝子の機能を解明することを目的とした。これにより、エストロゲン作用と各種代謝調節との接点を明らかにし、解明の進んでいないエストロゲンの代謝における新たな作用メカニズムを明らかにすることにより、医学、薬学的に臨床応用可能な知見をもたらすことを目指した。

## 3. 研究成果

### (1) COX7RP 遺伝子改変マウスの作製

我々はステロイドホルモンの作用と病態における役割の解明を目指し、エストロゲン応答遺伝子の同定・解析を行っているが、この過程で COX7RP を単離した

(*Mol. Cell. Biol.* 18, 442-449, 1998)。

COX7RP タンパク質は、アミノ酸配列の特徴から、ミトコンドリア内膜に局在する複合体 IV (シトクロム c オキシダーゼ) の COX7A サブユニットと相同性が高いことが示された(図2)。我々は構造的特徴から COX7RP が複合体 IV の機能と関連する可能性を想定し解析を進めた。はじめに、COX7RP の生体における作用を解明するため、*Cox7rp* ノックアウトマウス (*Cox7rp*KO) ならびに COX7RP トランスジェニックマウス (COX7RP-Tg) を作製した。作製した *Cox7rp*KO マウスから胎児繊維芽細胞(MEF) を樹立し、*Cox7rp* タンパク質の発現消失、ならびに、シトクロム c オキシダーゼ(COX)活性と ATP 生産が低下していることを確認した。また、*Cox7rp*KO MEF から調整したミトコンドリアは、複合体 I、複合体 II、複合体 IV のそれぞれの基質を利用した酸素消費量が、有意に低下していることが認められた。これらの結果から、COX7RP がミトコンドリアの呼吸活性とエネルギー産生を促進する機能を有することが示された。

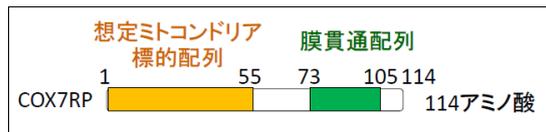


図2 ヒト COX7RP タンパク質の構造

### (2) COX7RP の生体における作用

骨格筋はエネルギー消費量の大きな代表的臓器の 1 つであることから、*Cox7rp*KO ならびに COX7RP-Tg マウスの骨格筋について着目して解析を行ったところ、*Cox7rp*KO マウスにおいて、大腿四頭筋の重量が野生型(WT)と比較して減少していることが明らかになった。加えて、*Cox7rp*KO マウスの大腿四頭筋と

腓腹筋を用いて COX 活性を測定したところ、有意に減少していることが確認された。これらの骨格筋における COX 活性の減少が個体の運動能に影響を及ぼすか否かトレッドミルを用いて解析したところ、*Cox7rp*KO マウスでは運動持続時間が有意に減少していることが明らかになった。反対に、COX7RP-Tg マウスにおいては、運動持続時間が有意に延長することが明らかになった。従って、骨格筋において COX7RP はミトコンドリアのエネルギー産生を増加させ、運動持続能を亢進させる作用を有すると考えられた。

また、*Cox7rp*KO マウスにおいて褐色脂肪組織(BAT)が肥大化していることが明らかになった。BAT をオイルレッド O 染色することによって脂肪が過度に蓄積されていることが示された(図 3)。さらに、*Cox7rp*KO マウスは寒冷環境(4°C)での熱産生が十分に行えず低体温症を起こすことが明らかとなり、COX7RP は BAT における熱産生に重要な役割を担っていることが明らかになった。この BAT の肥大化は、COX7RP Tg マウスとの交配により部分的に回復することが示された。従って、COX7RP は BAT における熱産生においても重要な役割を担っていると考えられた。

#### 褐色脂肪組織(BAT)



図 3 *Cox7rp*KO マウスにおける BAT の肥大化

(3) COX7RP はミトコンドリア呼吸鎖スー

#### パー複合体の形成を促進する

COX7RP の細胞内作用メカニズムを明らかにするため、ミトコンドリア呼吸鎖スーパー複合体形成における COX7RP の影響を Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) を利用した 2 次元電気泳動法にて解析した。BN-PAGE はタンパク質の高次構造や複合体構造を保持したまま分離することができる手法である。2 次元目として SDS-PAGE を行った後、Uqcrc2 (複合体 III のサブユニット)、Ndufa9 (複合体 I のサブユニット)、Cox4 (複合体 IV のサブユニット)、Cox7rp に対する抗体などを用いてウエスタンブロットを行い、ミトコンドリア呼吸鎖スーパー複合体の形成状態を解析した。その結果、*Cox7rp*KO マウスの骨格筋ミトコンドリアにおいて、スーパー複合体形成が減少していることが示された。また、COX7RP を培養細胞に過剰発現すると、スーパー複合体の形成が促進されることが示された。従って、COX7RP の分子作用メカニズムとして、ミトコンドリア呼吸鎖のスーパー複合体形成を促進する機能を有することが明らかになった(図 4)。

本研究において、COX7RP はミトコンドリア呼吸鎖スーパー複合体促進因子であることを初めて明らかにし、エネルギー産生の亢進に関与することを示した。また、COX7RP は生体において骨格筋の運動持続能ならびに BAT における熱発生に重要な機能を果たしていることを解明した。COX7RP はエストロゲン応答遺伝子であることから、エストロゲンとエネルギー代謝との制御に関わる鍵分子として、重要な機能を担っていることが示唆された。COX7RP 遺伝子改変マウスは、ミトコンドリア呼吸鎖スーパー複合体の生体・疾患における役割を解明するため

の有用なツールとなることが期待された。

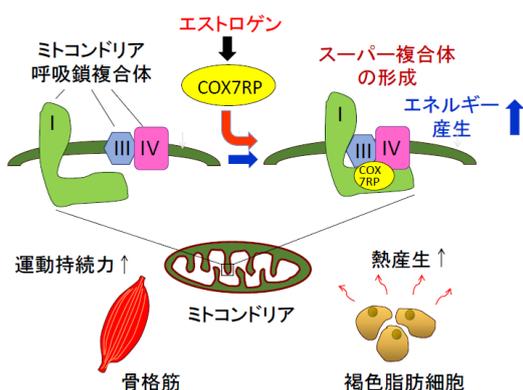


図4 ミトコンドリア呼吸鎖超複合体の形成を促進する COX7RP のメカニズムと骨格筋、褐色脂肪細胞におけるエネルギー代謝の作用メカニズム

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計 15 件)

- ① Nagai S, Ikeda K, Horie-Inoue K, Shiba S, Nagasawa S, Takeda S, Inoue S: Estrogen modulates exercise endurance along with mitochondrial uncoupling protein 3 downregulation in skeletal muscle of female mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 480, 758-764 (2016) 査読有
- ② Ikeda K, Horie-Inoue K, Ueno T, Suzuki T, Sato W, Shigekawa T, Osaki A, Saeki T, Berezikov E, Mano H, Inoue S: miR-378a-3p modulates tamoxifen sensitivity in breast cancer MCF-7 cells through targeting GOLT1A. *Sci. Rep.* 5, 13170 (2015) 査読有
- ③ Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S: Identification of estrogen-responsive genes based on the DNA binding properties of estrogen receptors using high-throughput sequencing technology. *Acta Pharmacol. Sin.* 36, 24-31 (2015) 査読有
- ④ Ujihira T, Ikeda K, Suzuki T, Yamaga R, Sato W, Horie-Inoue K, Shigekawa T, Osaki A, Saeki T, Okamoto K, Takeda S, Inoue S: MicroRNA-574-3p, identified by microRNA library-based functional screening, modulates tamoxifen response in breast cancer. *Sci. Rep.* 5, 7641 (2015) 査読有
- ⑤ Miyazaki T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Kondo T, Takahashi S, Inoue S: EBAG9 modulates host immune defense against tumor formation and metastasis by

regulating cytotoxic activity of T lymphocytes. *Oncogenesis.* 3 e126 (2014) 査読有

- ⑥ Boele J, Persson H, Shin JW, Ishizu Y, Newie IS, S?kilde R, Hawkins SM, Coarfa C, Ikeda K, Takayama K, Horie-Inoue K, Ando Y, Burroughs AM, Sasaki C, Suzuki C, Sakai M, Aoki S, Ogawa A, Hasegawa A, Lizio M, Kaida K, Teusink B, Carninci P, Suzuki H, Inoue S, Gunaratne PH, Rovira C, Hayashizaki Y, de Hoon MJ: PAPP5-mediated 3' adenylation and subsequent degradation of miR-21 is disrupted in proliferative disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111, 11467-11472 (2014) 査読有
- ⑦ Yamaga R, Ikeda K, Boele J, Horie-Inoue K, Takayama K, Urano T, Kaida K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Ouchi Y, de Hoon M, Inoue S: Systemic identification of estrogen-regulated genes in breast cancer cells through cap analysis of gene expression mapping. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 447, 531-536 (2014) 査読有
- ⑧ Shiba S, Ikeda K, Azuma K, Hasegawa T, Amizuka N, Horie-Inoue K, Inoue S:  $\gamma$ -Glutamyl carboxylase in osteoblasts regulates glucose metabolism in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453, 350-355 (2014) 査読有
- ⑨ Takayama K, Horie-Inoue K, Katayama S, Suzuki T, Tsutsumi S, Ikeda K, Urano T, Fujimura T, Takagi K, Takahashi S, Homma Y, Ouchi Y, Aburatani H, Hayashizaki Y, Inoue S: Androgen-responsive long noncoding RNA CTBP1-AS promotes prostate cancer. *EMBO J.* 32, 1665-1680 (2013) 査読有
- ⑩ Ikeda K, Shiba S, Horie-Inoue K, Shimokata K, Inoue S: A stabilizing factor for mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates energy metabolism in muscle. *Nat. Commun.* 4, 2147 (2013) 査読有
- ⑪ Yamaga R, Ikeda K, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Suzuki Y, Inoue S: RNA-sequencing of MCF-7 breast cancer cells identifies novel estrogen-responsive genes with functional estrogen receptor-binding sites in the vicinity of their transcription start sites. *Horm. Cancer.* 4, 222-232 (2013) 査読有
- ⑫ Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, Miyazaki T, Horie-Inoue K, Shimizu C,

Saji S, Aogi K, Tsuda H, Osaki S, Saeki T, Inoue S: Association of positive EBAG9 immunoreactivity with unfavorable prognosis in breast cancer patients treated with tamoxifen. **Clin. Breast. Cancer.** 13, 465-470 (2013) 査読有

- ⑬ Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Shimizu C, Saji S, Aogi K, Tsuda H, Osaki A, Saeki T, Inoue S: Association of double-positive FOXA1 and FOXP1 immunoreactivities with favorable prognosis of tamoxifen-treated breast cancer patients. **Horm. Cancer.** 3, 147-159 (2012) 査読有
- ⑭ Takayama K, Horie-Inoue K, Suzuki T, Urano T, Ikeda K, Fujimura T, Takahashi S, Homma Y, Ouchi Y, Inoue S: TACC2 is an androgen-responsive cell cycle regulator promoting androgen-mediated and castration-resistant growth of prostate cancer. **Mol Endocrinol.** 26, 748-761 (2012) 査読有
- ⑮ Ikeda K, Tsukui T, Tanaka D, Maruyama Y, Horie-Inoue K, Inoue S: Conditional expression of human bone Gla protein in osteoblasts causes skeletal abnormality in mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 424, 164-169, (2012) 査読有

〔学会発表等〕（研究代表者の招待講演）  
（計 4 件）

- ① 池田和博、堀江公仁子、井上聡：機能的スクリーニングを用いたホルモン依存性がんの内分泌療法耐性に関わるシグナル分子の解明。第38回日本分子生物学会、平成27年12月1日、神戸ポートピアホテル、神戸市
- ② 池田和博、堀江公仁子、井上聡：乳がん細胞におけるノンコード RNA 発現プロファイルの解析とエストロゲン応答シグナルにおける機能。第36回日本分子生物学会、平成25年12月4日、神戸ポートピアホテル、神戸市
- ③ 池田和博：宿主側因子による腫瘍増殖・転移の制御。第14回ホルモンと癌研究会、平成25年7月13日、東京大学、東京都
- ④ 池田和博：エストロゲンの作用機構と生体における役割。第74回寒冷バイオフィロンティア研究センターセミナー、平成24年12月21日、岩手大学、盛岡市

〔図書〕（計 4 件）

- ① 池田和博、井上聡：ミトコンドリア呼吸鎖スーパー複合体と筋肉・骨。アンチ・エイジング医学 11, 22-27 (2015)
- ② 池田和博、堀江公仁子、井上聡：ミトコンドリア呼吸鎖スーパー複合体形成因子 COX7RP の骨における役割。Osteoporosis Japan 22, 59-62 (2014)
- ③ Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S: Analysis of TFRNs associated with steroid hormone-related cancers in Methods in Molecular Biology Transcription Factor Regulatory Networks (ed. Miyamoto-Sato E, Ohashi H, Sasaki H, Nishikawa J, and Yanagawa H) 197-209 (Springer 2014)
- ④ Ijichi N, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S: Roles of estrogen-related receptors in adipocyte differentiation in Adipocytes: Biology, Regulation and Health Impact (ed. Weber M and Hoffmann J), 145-154 (Nova Science Publishers 2013)

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕  
・該当なし

〔その他〕 ホームページ等  
研究室ホームページ  
[http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div02\\_GRST/index.html](http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div02_GRST/index.html)

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

池田和博 (IKEDA, Kazuhiro)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：30343461

### (2) 連携研究者

井上聡 (INOUE, Satoshi)

埼玉医科大学・医学部・客員教授

研究者番号：40251251

研究課題名：対称・非対称性アルギニンメチル化と多能性維持機構  
 Functional analysis of symmetric and asymmetric methylation of arginine for pluripotency.

研究期間：2012～2013  
 課題番号：24116522  
 研究代表者 永松 剛（慶應義塾大学 医学部 助教）

【交付決定額（分配額）】 (金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2013年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究成果の概要：非対称性にメチル化を入れる Prmt6 に関してはその基質の候補として Oct3/4, Nanog を同定した。一方で、対称性にメチル化が入っているタンパク質については PDH の同定に成功し、その修飾酵素が Prmt5 であることを明らかにした。これらの事から非対称性アルギニンメチル化は転写因子を介して、対称性メチル化は代謝経路を介して、それぞれ多能性幹細胞の性質を制御していることが考えられる。

### 1. 研究の背景

生殖細胞は次世代に遺伝子を繋ぐ唯一の細胞であり、受精を経て再び全能性を獲得することができる。すなわち生体内において生殖細胞はその発生運命をリプログラミングしていると考えられる。そこで、生殖細胞の機能因子には体細胞を多能性幹細胞へとリプログラミングする活性を持つのではないかと考えた。実際にいくつかの因子の体細胞リプログラミング活性を検討したところ Klf4, Oct3/4 にアルギニンメチル化酵素 (Prmt) の一つである Prmt5 を加えることによって多能性幹細胞を誘導できることを見出した。この細胞は遺伝子発現のみならず三胚葉全てへの分化能を持ちキメラマウスを経ることで生殖細胞へも分化することができ、ES 細胞や iPS 細胞と同等の細胞と考えられる。

一方で、Prmt の阻害剤を加えることで体細胞リプログラミングの効率を上昇させるという報告がなされた。この結果は一

見矛盾するようであるが、報告された阻害剤 AMI-5 が阻害する Prmt は Prmt1/3/4/6 である。Prmt はタンパク質内のアルギニンをモノメチル化し、後にジメチル化の際に非対称性にメチル基を付加する酵素 (Type I) と対称性にメチル基を付加する酵素 (Type II) が存在する。我々の見出したリプログラミング活性を持つ Prmt5 は対称性にメチル基を付与する Type II であり、阻害によりリプログラミング効果が上昇する Prmt1/3/4/6 は非対称性にメチル基を付与する Type I に属する。これらのことから対称性のジメチル化は多能性幹細胞を支持する方向性があり、逆に非対称性のジメチル化は多能性幹細胞を支持しない方向性がある可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

対称性と非対称性のアルギニンメチル化に着目し多能性幹細胞の誘導や維持における転写環境とエネルギー代謝のクロス

トークを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究成果

生殖細胞の作用因子においてリプログラミング活性を持つものとして同定した Prmt5 はアルギニンのメチル化酵素であり、対称にジメチル化の修飾を行う。一方で非対称にジメチル化を入れる Prmt の阻害剤がリプログラミング効率を上昇させるという報告があり、対称、非対称のアルギニンメチル化と多能性幹細胞における機能について解析を行った。対称にメチル化を入れる Prmt7 は ES 細胞で未分化状態特異的に発現しており、分化誘導とともにその発現が消失する一方で、非対称にメチル化を入れる Prmt6 は ES 細胞で発現がみられない。Prmt6 を誘導性に ES 細胞に発現させると ES 細胞に増殖阻害をもたらした。

アルギニンメチル化の基質を同定するため多能性幹細胞に関わる因子と Prmt6 との結合を調べたところ、Prmt6 は Oct3/4 や Nanog と結合することが明らかとなった。一方で、対称にメチル化を入れる Prmt5 は多能性幹細胞における機能因子であり、その作用基質を同定するために未分化な ES 細胞と Activin および bFGF を作用させてエピブラスト用の細胞に分化させた細胞において二次元電気泳動を行った。抗 SDMA (Symmetric DiMethyl Arginine) 抗体を用いて未分化な ES 細胞で対称ジメチルアルギニン修飾を受けているタンパクについて質量分析機をもちいて同定を行ったところ、複数の代謝酵素が候補因子となり、その中から解糖系から TCA サイクルへと代謝を繋ぐピルビン酸脱水素酵素 (Pyruvate dehydrogenase: PDH) を同定した。

インヴィトロメチレーションアッセイの

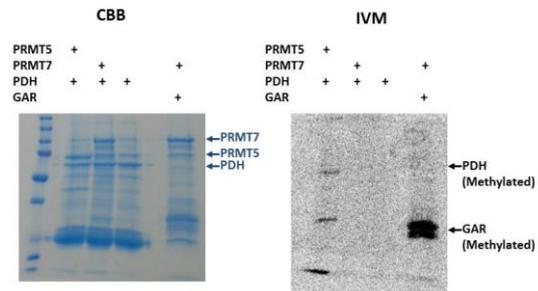


図1. PRMT5によるPDHE1bのメチル化  
Glycine- and arginine-rich (GAR) motif はポジティブコントロールとして使用

結果 PDH は PRMT5 によって確かにメチル化されることが明らかとなった (図 1)。

PDH は解糖系の最終産物であるピルビン酸をアセチル CoA に変え、ミトコンドリアの好気呼吸のエントリーとなる物質を提供する酵素である。そのため PDH は解糖系とミトコンドリアの好気呼吸との分岐を制御する重要な酵素と考えることができる。PDH の活性はピルビン酸キナーゼ (Pdk) によってネガティブに制御されている。低分子化合物

1-aminoethylphosphonic acid (1-AA) は Pdk の活性を模倣して PDH を抑制することができる。1-AA を iPS 細胞誘導のリブ

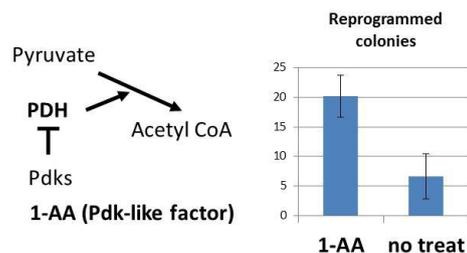


図2. 1-AA処理(PDHの阻害)によりリプログラミング効率が上昇する

ロプログラミングの際に作用させると誘導効率を上昇させることができることを見出した (図 2)。

このことはリプログラミングにおける PDH の活性による代謝メカニズムの制御を示唆するものである。

これらの事から非対称性アルギニンメチ

ル化は転写因子を介して、対称性メチル化は代謝経路を介して、それぞれ多能性幹細胞の性質を制御していることが考えられる。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計3件)

- ① Nagamatsu G\*, Saito S, Takubo K, Suda T. Integrative Analysis of the Acquisition of Pluripotency in PGCs Reveals the Mutually Exclusive Roles of Blimp-1 and AKT Signaling. **Stem Cell Reports**. 査読有 doi: 10.1016/j.stemcr.2015.05.007.(\*corresponding author)
- ② Kinoshita T#, Nagamatsu G#\*, Saito S, Takubo K, Horimoto K, Suda T. Telomerase reverse transcriptase has an extratelomeric function in somatic cell reprogramming. **J Biol Chem**. 査読有 doi: 10.1074/jbc.M113.536037. (#equally contribution, \*corresponding author)
- ③ Nagamatsu G\*, Suda T. Conversion of primordial germ cells to pluripotent stem cells: methods for cell tracking and culture conditions. **Methods Mol Biol**. 査読有 doi: 10.1007/7651\_2013\_24. (\*corresponding author)

〔学会発表等〕(研究代表者の招待講演)

(計2件)

- ① 永松剛、山本雄広、石渡恭子、田久保圭誉、林克彦、末松誠、須田年生、多能性幹細胞の代謝を制御する対称性アルギニンメチル化タンパク質の解析：第37回分子生物学会、平成26年11月25-27日、神奈川県横浜市
- ② 永松剛、山本雄広、石渡恭子、田久保圭誉、林克彦、末松誠、須田年生、多能性幹細胞の代謝を制御する対称性アルギニンメチル化タンパク質の解析：第14回再生医療学会、平成28年3月19-21日、神奈川県横浜市

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

#### 5. 研究組織

##### (1) 研究代表者

永松剛 (NAGAMATSU, Go)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70453545

研究課題名：ケミカルプローブによるメチル化標的転写因子のプロテオミクス解析  
A proteomic analysis for methylated proteins using a novel chemical probe

研究期間：2012～2013

課題番号：24116523

研究代表者 堀澤健一（九州大学 生体防御医学研究所 助教）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
2013年度	900,000	270,000	1,170,000

**研究成果の概要：***S*-アデノシルメチオニン（SAM）依存的メチル基転移酵素に取り込まれることで、メチル基に代わって click chemistry による特異的な標識を可能とするアルキニル基を転移する誘導体分子（AdoEnYn）を有機合成し、未知のメチル化標的生体分子を探索する技術の確立を目的として研究を行った。培養細胞に直接 AdoEnYn を添加し、click chemistry による蛍光染色を行うことで、生細胞内でのメチル化タンパク質の特異的標識が可能であり、その標的のほぼ全てがタンパク質であることを示すことができた。さらには、2D-PAGE と LC-MS/MS を用いた解析により、複数の新規のメチル化標的タンパク質の候補を同定することに成功した。

## 1. 研究の背景

タンパク質のメチル化修飾は、主にリジンやアルギニン残基に生じる翻訳後修飾であり、エピジェネティックな発現制御において中心的な役割を果たすヒストンタンパク質修飾が最も良く解析されている。しかし近年、非ヒストンタンパク質へのメチル化修飾が次々と明らかにされてきた。中でも、転写因子への修飾が DNA 結合能を変化させ、転写活性を変化させることが報告されたことから、転写調節研究におけるメチル化修飾解析の重要性が高まっている（*Cell Metab.* 13, 505-516, 2011）。メチル化はメチル基転移酵素群（methyltransferases; MTases）により特異的に制御され、*S*-アデノシルメチオニン（SAM）をメチル基のドナーとする。SAM はメチオニン代謝や葉酸代謝をはじめとした種々の代謝経路に関連しており、また細胞内 SAM 濃度と全細胞レ

ベルのメチル化ステートが連動することが観察されることから、代謝変動と遺伝子発現制御の結節点の一つであると考えられる。

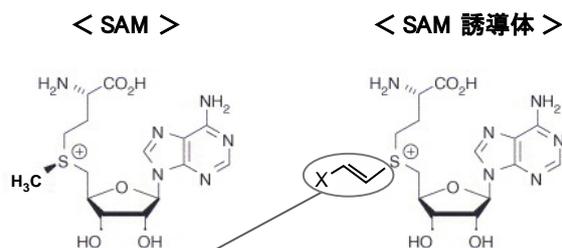
これまでに高等生物では数多くのタンパク質メチル化酵素が発見されており、その広範な役割が示唆されている。しかし、各 MTase の基質タンパク質や基質特異性などはほとんどが未知であり、実際に機能解析が行われたメチル化標的転写因子は多くはない。さらには、メチル化修飾は、癌や循環器系疾患、免疫賦活化といった疾患との関連も示唆されており（*Mol. Cell* 33, 1-13, 2009）、病態生理も含めた包括的な機能解析が望まれている。しかしながら、メチル化修飾タンパク質の大規模な同定はほとんど行われていないのが現状である。なぜなら、他の翻訳後修飾と比べて修飾前後の物性変化が乏しく、また分子量変化も僅かである

ため、標的基質の特異的選択と質量分析が困難であるからである。これまでにアルギニンメチル化修飾基質タンパク質を broad に認識する抗体が開発されているものの、結合力が弱く、また認識特異性に偏りがあるため、抗体を利用しない新たな網羅的選択系の構築が求められていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、抗体に代わる新たなメチル化タンパク質標識・選択技術として、化学的に改変したメチル基ドナー誘導体を利用したタンパク質の酵素特異的標識技術の確立を目的とした。これは元々 DNA メチル基転移酵素 (DNMT) で研究されてきた技術であり、**図 1** に示すような SAM のメチル基を、β 位に二重または三重結合をもつ炭素鎖に置換した誘導体を用いることで、メチル基の代わりに置換された官能基が丸ごと転移する現象を利用したものである (*ChemBioChem* **5**, 265-269, 2004)。タンパク質と DNA の MTase の活性部位の構造は極めて類似しており、この SAM 誘導体を用いたタンパク質のメチル化部位の特異的標識は可能性が高いと考えられてきた。しかし実際、タンパク質への応用は報告はされたが (*Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 5170-5173, 2009)、酵素によって標識の成否が変わるうえ、酵素の構造と誘導体の分子構造の関連の規則性が全く予測できないことから (*JACS* **133**, 7648-7651, 2011)、更なる条件検討が必要となっていた。本研究では、**図 1** の X にアルキンを導入し、huisgen 反応という click chemistry の技術を利用することで、特異的な標識を可能とする SAM 誘導体 (AdoEnYn) を有機合成し、生体分子へ

の取り込みとターゲット生体分子の同定を試みた。



メチル基を、β 位に二重または三重結合を有する炭素鎖に置換することで、メチル基転移酵素により置換基が丸ごと基質に転移する

図 1 SAM と SAM 誘導体の構造

## 3. 研究成果

メチル供与体 SAM 誘導体である AdoEnYn を、生体分子である AdoHcy から有機合成する手法に関しては既に報告がなされていたが、AdoEnYn は不安定な分子であり、まずは安定的な合成・分離・保存の方法を確立する必要があった。本領域の研究員からのアドバイス・協力もあり、SepPack を応用した簡便かつ高精度な AdoEnYn 精製法を確立し、AdoEnYn の安定的な供給、適切なハンドリングを行うことが可能となった。

次に、合成した AdoEnYn を A549 細胞の培地に添加し、メチル化標的分子の metabolic labeling が可能かを検討した。その結果、AdoEnYn 特異的なシグナルを確認することができ (**図 2**)、生細胞中のメチル化標的分子の特異的標識を行うことができることを証明した。

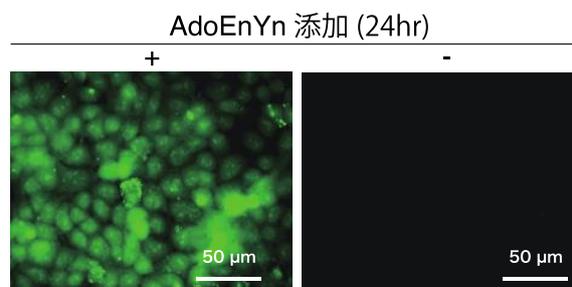


図 2 AdoEnYn により標識した A549 細胞

また、標識されたタンパク質を生化学的に分画することにより、生細胞内で AdoEnYn により標識される生体分子のほとんどはタンパク質であり、核酸や他の生体分子への転移反応はほぼ起こっていないことを明らかにすることができた。

さらに、AdoEnYn で標識した A549 細胞から総タンパク質を抽出し、2D-PAGE による解析を行ったところ多数の AdoEnYn 特異的なスポットを検出することができた。そのうちのいくつかのスポットについてゲル内消化と LC-MS/MS 解析を行うことで、AdoEnYn を特異的に受容したと考えられる新規のメチル化標的タンパク質を複数同定することに成功した。

以上、AdoEnYn によるメチル化標的タンパク質の metabolic labeling 技術が確立したことにより、生細胞内における未知のメチル化標的タンパク質の探索技術への道が開けたと言える。今後は、AdoEnYn への感受性のある MTase の絞り込みや、特定の MTase の gain/loss-of-function 操作を行った細胞による標識実験などを積み重ねることにより、タンパク質メチル化修飾研究の有力な解析技術として発展していくことが望まれる。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計 9 件)

- ① Nakayama M, Komiya S, Fujiwara K, Horisawa K, and Doi N, *In vitro* selection of bispecific diabody fragments using covalent bicistronic DNA display. **Biochem Biophys Res Commun.** 478, 2, 606-611 (2016) 査読有
- ② Nagumo Y, Fujiwara K, Horisawa K, Yanagawa H and Doi N. PURE mRNA display for *in vitro* selection of single-chain antibodies. **J Biochem.** 159, 519-26 (2016) 査読有

- ③ Niikura K, Horisawa K, and Doi N, Endosomal escape efficiency of fusogenic B18 and B55 peptides fused with anti-EGFR single chain Fv as estimated by nuclear translocation., **J Biochem.**, 159, 123-132 (2016) 査読有
- ④ Niikura K, Horisawa K, and Doi N, A fusogenic peptide from a sea urchin fertilization protein promotes intracellular delivery of biomacromolecules by facilitating endosomal escape., **J Control Release** 212, 85-93 (2015) 査読有
- ⑤ Horisawa K Specific and quantitative labeling of biomolecules using click chemistry. **Front Physiol.** 5, 457 (2014) 査読有
- ⑥ Nagata T, Shirakawa K, Kobayashi N, Shiheido H, Tabata N, Sakuma-Yonemura Y, Horisawa K, Katahira M, Doi N, and Yanagawa H, Structural basis for inhibition of the MDM2:p53 interaction by an optimized MDM2-binding peptide selected with mRNA display. **PLoS One** 9, e109163 (2014) 査読有
- ⑦ Oyobiki R, Kato T, Katayama M, Sugitani A, Watanabe T, Einaga Y, Matsumoto Y, Horisawa K, and Doi N. Toward high-throughput screening of NAD(P)-dependent oxidoreductases using boron-doped diamond microelectrodes and microfluidic devices. **Anal Chem.** 86, 9570-9575 (2014) 査読有
- ⑧ Tokunaga M, Shiheido H, Tabata N, Sakuma-Yonemura Y, Takashima H, Horisawa K, Doi N, and Yanagawa H. MIP-2A is a novel target of an anilinoquinazoline derivative for inhibition of tumour cell proliferation. **PLoS One** 8, e76774 (2013) 査読有
- ⑨ Tokunaga M, Shiheido H, Hayakawa I, Utsumi A, Takashima H, Doi N, Horisawa K, Sakuma-Yonemura Y, Tabata N, and Yanagawa H. Hereditary spastic paraplegia protein spartin is an FK506-binding protein identified by mRNA display. **Chem Biol.** 20, 935-942 (2013) 査読有

〔学会発表等〕(研究代表者の招待講演)

(計 3 件)

- ① Horisawa K., Applications of the evolutionary protein engineering for molecular biology and studies of translational control., *MIB seminar in*

*Kyushu university*、平成 25 年 8 月 22 日、九州大学生体防御医学研究所、福岡県福岡市

- ② 堀澤健一、翻訳調節による遺伝子発現制御の研究と解析技術の開発、筑波大学大学院生命環境科学研究科「動物細胞バイオテクノロジー」、平成 25 年 5 月 30 日、筑波大学、茨城県つくば市
- ③ 堀澤健一、タンパク質の試験管内探索技術の開発 -幹細胞システム研究への応用に向けて-、第 30 回配偶子制御セミナー、平成 25 年 2 月 21 日、横浜市立大学医学部、神奈川県横浜市

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

〔その他〕 ホームページ等

研究室ホームページ

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/lab/orgreg/top.html>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀澤健一 (HORISAWA, Kenichi)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：70424207

研究課題名：疾患において変動する代謝物リガンドによる核内受容体 PPAR $\gamma$ の機能制御  
 Erythroid-derived protoporphyrin IX acts as an endogenous PPAR $\gamma$  antagonist in macrophage through the covalent binding

研究期間：2012～2013

課題番号：24116524

研究代表者 白木琢磨（近畿大学 生物理工学部 准教授）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2013年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000

**研究成果の概要：**ポリフィリン症(EPP)患者は光過敏以外に、動脈硬化などの生活習慣病を高頻度で発症することが報告されているが、その原因は不明である。今回我々はポリフィリン症モデル赤芽球から分泌されたプロトポリフィリン IX(PPIX)が、マクロファージの核内受容体 PPAR $\gamma$ の Cys285 に共有結合することで、内在性アンタゴニストとして働くことを見いだした。PPIXのこの作用はマクロファージ特異的に起こり、他の培養細胞では起こらないことから、食食を介していることが考えられた。NMRによる構造解析の結果、PPIXの結合はPPAR $\gamma$ とコリプレッサーSMRTとの相互作用を安定化することがわかった。以上の結果からPPIXが生活習慣病における新たなリスクファクターになり得る事が示唆された。

1. 研究の背景

脂肪細胞の分化決定因子として同定された核内受容体 PPAR $\gamma$ は、2型糖尿病治療薬の標的分子として知られる。PPAR $\gamma$ は脂肪細胞分化以外にも、いくつかの臓器で糖代謝、脂質代謝の両方を制御する事でエネルギー代謝に深く関与することから、エネルギー代謝におけるキーとなる低分子代謝物リガンドの増減に応答していると考えられるが、各組織において機能する PPAR $\gamma$ の内在性リガンドは未解明のままである。

各臓器に浸潤したマクロファージが疾患の進行に深く関与することが知られている。例えば生活習慣病関連の疾患では多くの場合炎症性 M1 マクロファージが蓄積しており、慢性炎症という状態に陥っ

ていると指摘されている。2型糖尿病治療薬である PPAR $\gamma$ リガンドは、単球から抗炎症性 M2 マクロファージを誘導する事で、治療効果を発揮すると考えられている。しかし、なぜ生活習慣病関連の疾患では内在性リガンドが PPAR $\gamma$ を活性化出来ないのか不明である。

本研究では、骨髄性ポリフィリン症(EPP)患者では光過敏に加え、動脈硬化などの生活習慣病関連病態が高頻度で見られることに着目し、ヘム代謝と生活習慣病のクロストークにおけるマクロファージ PPAR $\gamma$ の機能解析をおこなった。

2. 研究の目的

生理的、病理的状況においてどのような内在性代謝物が PPAR $\gamma$ に作用している

のかを検討する。

### 3. 研究成果

#### (1) PPAR $\gamma$ 組換えタンパク質における結合代謝物の同定

PPAR $\gamma$ リガンド結合ドメインを組換えタンパク質として大腸菌に発現し、結晶化グレードの精製を行った。この時タンパク質溶液がうっすら茶色に着色していることに気付いた。吸収スペクトルを測定するとタンパク質の 280 nm の吸収の他にヘム関連代謝物の特徴である 410 nm(ソーレー帯)に吸収が観察された。このことより、大腸菌培養時に $\delta$ -アミノレブリン酸を添加し、ヘム産生を増加した大腸菌から PPAR $\gamma$ 組換えタンパク質を精製すると、黄色に蛍光を示す事を発見した。ヘムには蛍光はないため、ヘムの中間代謝物であるプロトポルフィリン IX (PPIX) の結合が示唆された。

#### (2) 結合様式の解析

PPAR $\gamma$ 組換えタンパク質をトリプシンで部分消化し、SDS-PAGE で展開したところ、電気泳動後も PPAR $\gamma$ 由来のペプチドに蛍光が見られたため、共有結合で結合していることがわかった。トリプシンで完全分解して得たペプチドを逆相クロマトグラフィーで精製後、LC-MS によりペプチドの分子量を解析した。その結果、Cys285 を含むペプチドに PPIX が結合したペプチド断片を見いだした。MS/MS 解析の結果、Cys285 のチオール基に共有結合しているのが観察された。

#### (3) EPP モデル細胞の構築

優性の家族性 EPP 患者で見つかった ALAS2 変異体を、赤芽球細胞株 K562 に恒常発現した細胞を構築し、マクロファージに分化誘導した単球細胞株 THP-1 と共培養し、マクロファージへの影響を検討した。その結果、PPAR $\gamma$ リガンドに

より発現誘導した標的遺伝子 FABP4 が EPP モデル細胞の存在により抑制された。この抑制活性は細胞の培養上清に含まれることから、EPP モデル細胞から抑制性の因子が分泌されていることが示唆された。培養上清の抑制活性はタンパク質画分に含まれ、NativePAGE により BSA タンパク質に蛍光物質すなわち PPIX が結合していた。そこで、BSA と PPIX を試験管内で結合し、THP-1 から分化誘導したマクロファージに添加したところ、EPP モデル細胞同様 PPAR $\gamma$ リガンドによる FABP4 の誘導が抑制された。BSA/PPIX 複合体添加による PPAR $\gamma$ 抑制活性は HEK293T 細胞に発現した PPAR $\gamma$ に対しては見られないことから、マクロファージの貪食により BSA/PPIX 複合体が細胞内に取り込まれ、リソソームで分解されることで PPIX が細胞内に移行していると考えられた。リソソームで分解されると赤色蛍光を発する DQ-BSA と PPIX の複合体を THP-1 に添加し、FACS により貪食活性を見ると、赤色蛍光のある細胞のみ PPIX に由来する赤色蛍光が観察された。従って、PPIX は EPP モデル細胞から分泌されると BSA と複合体を形成し、マクロファージの貪食により取り込まれることで PPAR $\gamma$ に作用すると思われる。

#### (4) 内在性リガンド結合による PPAR $\gamma$ ・SMRT 複合体形成への影響

PPIX が共有結合することで PPAR $\gamma$ 抑制活性を示す事から、PPIX の有無、共有結合の有無による、コリプレッサー SMRT との結合活性への影響を検討した。NMR によりリガンドがない状態でも PPAR $\gamma$  は SMRT と結合することが観察され、リガンドの共有結合の有無により SMRT との結合様式が異なることが示された。以上のことから、EPP 患者におい

てはヘム合成中間代謝物 PPIX が血中に分泌され、臓器に浸潤したマクロファージによる貪食により PPAR $\gamma$ 抑制活性が誘導され、慢性炎症から生活習慣病へとつながってしまうと考えられた。興味深いことに自己免疫疾患の全身性エリテマトーデスに置いても高頻度で生活習慣病が起こり、さらに血清メタボロームにより PPIX の上昇が報告されている。従って、今後通常の食事性生活習慣病において PPIX がリスクファクターとして働くことを示す必要がある。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計6件)

- ① Matsumoto M, Kondo K, Shiraki T, Brydun A, Funayama R, Nakayama K, Yaegashi N, Katagiri H, Igarashi K. Genome-wide approaches for BACH1 target genes in mouse embryonic fibroblasts showed BACH1-Pparg pathway in adipogenesis. **Genes Cells**. 21: 553-567, 2016 査読有
- ② Ikura, M., Furuya, K., Matsuda, S., Matsuda, R., Shima, H., Adachi, J., Matsuda, T., Shiraki, T., and Ikura, T. Acetylation of histone H2AX at Lys 5 by the TIP60 histone acetyltransferase complex is essential for the dynamic binding of NBS1 to damaged chromatin. **Mol. Cell. Biol.**, 35(24):4147-57, 2015 査読有
- ③ Xu, N., Tochio, N., Wang, J., Tamari, Y., Uewaki, J., Utsunomiya-Tate, N., Igarashi, K., Shiraki, T., Kobayashi, N. and Tate, S. The C113D Mutation in Human Pin1 Causes Allosteric Structural Changes in the Phosphate Binding Pocket of the PPIase Domain through the Tug of War in the Dual-Histidine Motif. **Biochemistry**, 53, 5568-5578, 2014 査読有
- ④ Hada, H., Shiraki, T., Watanabe-Matsui, M, Igarashi, K., Hemopexin-dependent heme uptake via endocytosis regulates the Bach1 transcription repressor and heme oxygenase gene activation. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1840, 2351-2360, 2014 査読有

- ⑤ Gamo, K., Shiraki, T., Matsuura, N., and Miyachi, H., Transactivation by Hesperetin Glucuronides is Distinct from That by a Thiazolidine-2,4-dione Agent. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**. 62, 491-493, 2014 査読有
- ⑥ 佐藤夏海、白木琢磨 (13人中8番目) 「梅果汁成分による抗疲労効果 (第2報)」 **果汁協会報**, 656, 1-8, 2013. 査読無

〔学会発表等〕(研究代表者の招待講演)

(計5件)

- ① 白木琢磨「核内受容体の数理解析から見えたこと」第39回日本分子生物学会年会, 2016.12 パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
- ② 白木琢磨「核内受容体 PPAR $\gamma$ 複合体の動的性質と転写制御機構」第89回日本生化学会大会, 2016.9 仙台国際センター、仙台市
- ③ 白木琢磨「満腹中枢における内在性 DNA 損傷因子としてのレトロトランスポゾン」第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会、合同大会, 2015.12 神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市
- ④ 白木琢磨「核内受容体に作用する生体内代謝物の分子解剖」第14回日本蛋白質科学会年会. 2015.12 ワークピア横浜、神奈川県横浜市
- ⑤ Shiraki T. Structural basis for the activation of the nuclear receptor, PPAR $\gamma$ , by fatty acid- and serotonin metabolites. 第85回日本生化学会大会 2012.12 福岡国際会議場、福岡市

〔図書〕(計5件)

- ① 白木琢磨「南山堂 医学大事典」共著、南山堂、3101頁、2015
- ② 白木琢磨「最新肥満症学」共著、日本臨床社、p365-369、2015
- ③ 白木琢磨、和久剛、森川耿右「生体内代謝物をモニターする転写システム：核内受容体 PPAR $\gamma$ による転写を介した代謝ネットワーク間のクロストーク」生化学 9月号、749-761, 2013
- ④ 木下賢吾、白木琢磨企画特集「タンパク質構造機能相関再考」生化学第85巻第8号, 2013
- ⑤ 白木琢磨「薬が作用するということ」化学と生物、国際文献社、3月号 193-195, 2013

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

白木琢磨 (SHIRAKI, Takuma)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：10311747

研究課題名：ジベレリンの転写代謝システム及び成長制御機構の解析  
Regulation of GA homeostasis and signaling in plant

研究期間：2012～2013

課題番号：24116525

研究代表者 深澤壽太郎（広島大学 大学院理学研究科 助教）

連携研究者 高橋陽介（広島大学 大学院理学研究科 教授）

【交付決定額（分配金）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2013 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000

**研究成果の概要：** ジベレリン (GA) の転写代謝システムの基幹はフィードバック制御による恒常性維持である。GA 信号伝達では核内信号伝達抑制因子 DELLA の分解が鍵反応である。GA 受容体と SCF 複合体による GA 依存的な DELLA の分解機構が明らかとなったが、その下流の制御は不明であった。DELLA と相互作用する GAF1 転写因子を単離した。DELLA は GAF1 の co-activator であり、別の相互作用因子 TPR は co-repressor として機能することを明らかにした。さらに、成長制御に関与する標的遺伝子を同定した。

1. 研究の背景

植物ホルモンは、植物の形態形成や環境応答の制御において中心的な役割を果たしている。ジベレリン (GA) は、重要な生命素子の一つイソプレヌユニットから合成されるジテルペン化合物で、種子発芽、伸長成長、開花を制御するホルモンである。GA 内生量は、GA 信号伝達系を介した GA 代謝酵素遺伝子群の転写レベルでのフィードバック制御によって厳密に調節されている。これまでに GA 内生量を制御する bZIP 型転写因子 RSG を単離し解析を行ってきた。1. RSG は、GA 生合成酵素遺伝子の発現を正に制御する (*Plant Cell* 2000, 2004)。2. GA 内生量の増減に伴い 14-3-3 タンパク質の結合部位がリン酸化/脱リン酸化され、RSG の細胞内局在が変化し、GA の恒常性を維持する (*Plant Cell* 2001, 2004, 2008, *Pant J* 2010)。3. GA 内生量に応じて、GA20ox

プロモーター上のヒストンのアセチル化修飾が変動する (*Pant J* 2010)。を明らかとしてきた。

一方、分子遺伝学的な解析から GA 信号伝達経路が明らかになりつつある。GA 信号伝達における抑制因子として DELLA タンパク質と SPY タンパク質が相次いで発見された。DELLA は、機能未知の核タンパク質であり下流の信号伝達を抑制している。DELLA が核内に蓄積すると、成長が抑制され著しい矮化、花成遅延を誘引する(下写真)。



野生型      DELLAタンパク質蓄積型(変異体)

GA は、ユビキチン-26S プロテアソーム系を介して DELLA の分解を促進することで植物の成長を誘導する。また、SPY は、その構造から GlcNAc 転移酵素としての機能が予測されているが、具体的な標的タンパク質が明らかになっておらず、その機能は明らかとなっていない。さらに、DELLA タンパク質は、リン酸化、SUMO 化修飾を受けることが報告されており、GA 信号伝達には複数の翻訳後修飾が関与すると考えられている。

## 2. 研究の目的

ジベレリン (GA) は、生命素子の一つイソプレヌユニットから合成され、発芽、成長、開花を制御する植物ホルモンである。GA の転写代謝システムの基幹はフィードバック制御による恒常性維持である。フィードバック制御では GA 信号伝達系を介して GA 代謝酵素遺伝子群の発現が調節される。GA 信号伝達では核内信号伝達抑制因子 DELLA タンパク質の分解が鍵反応である。GA 受容体と SCF 複合体による GA 依存的な DELLA の分解機構が明らかにされたが、DELLA の下流に位置する転写因子は不明であった。これまでに、DELLA と相互作用する転写因子として PIF 等が同定されていたが、DELLA は、PIF の DNA 結合を抑制することで標的遺伝子の発現を抑制する抑制モデルが報告されていた (右モデル図)

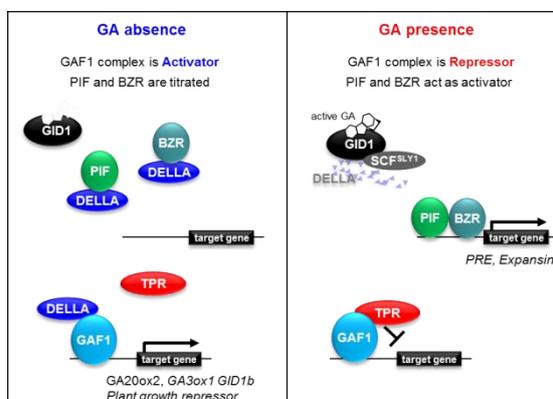
しかしながら、GA 応答遺伝子の多くは、GA の投与により発現が減少する遺伝子が多く、また ChIP 解析より、DNA 結合能をもたない DELLA が DNA に結合することから、別の転写因子が存在すると考えられた。DELLA と結合する新しい転写因子として GAF1 を単離した。さらに GAF1 と相互作用する複数の因子を同

定しこれらは複合体を形成すると考えられた。本研究では、GAF1 複合体による GA 信号伝達機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究成果

### (1) GAF1 複合体によるジベレリン信号伝達制御機構の解析

植物ホルモンのジベレリン (GA) は成長抑制因子 DELLA の分解を介して植物の成長を促進する。GA は転写を制御しているが、その分子機構は不明であった。DELLA と結合する転写因子 GAF1 を新たに単離した。本研究では、GAF1 は DELLA と共に転写促進複合体を、TPR と共に転写抑制複合体を形成すること。GA は GAF1 複合体の機能を転写促進から転写抑制へと変換することで転写を制御することを明らかにした (下モデル図)。この制御モデルは、GA フィードバック制御に合致し、GAF1 複合体は、GA フィードバック制御を受ける GA 生合成、GA レセプター遺伝子を標的遺伝子とすることを明らかにした。 (*Plant Cell* 2014 26, 2920-2938.) またこの成果は、理化学研究所発行の国際誌 RIKEN Research の Research Highlights で紹介された。

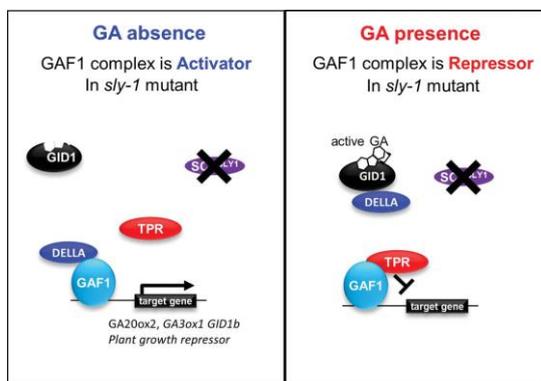


### (2) GA フィードバック制御における GAF1 複合体の役割

これまでに、GA フィードバック制御に関わる因子は複数報告されており、GAF1 複合体における制御もその 1 つと考えられる。GA フィードバック制御を受ける *AtGA20ox2* 遺伝子について、詳細に解析を行なった結果、*AtGA20ox2* プロモーターには、複数の GAF1 結合配列が存在することが明らかになった。GAF1 結合配列に、変異を導入したプロモーターにレポーター遺伝子 GUS をつないだ形質転換体を作製し解析を行なった結果、GAF1 結合配列の変異により、GA フィードバック制御が完全に失われた。以上より、GAF1 複合体は、*AtGA20ox2* のフィードバック制御において主要な役割を果たしていると考えられた。(投稿中)

### (3) DELLA の分解を介さない GA 信号伝達経路の解析

活性型 GA がレセプター-GID1 に認識されると、GA-GID1 は、DELLA に結合



し GA-GID1-DELLA 複合体を形成する。3 者複合体は、SCF 複合体によって認識され、DELLA は、ユビキチン化され 26S プロテアソーム経路によって分解される。一方で、SCF 変異体では、DELLA の分解が抑制されるが、GA - GID1 が過剰に存在することで、GA 信号伝達が促進されることが知られている。本研究では、DELLA の分解されない条件下

でも、DELLA-GAF1 の複合体形成は、GA 依存的な GA レセプター-GID1 の結合により阻害され、GA 信号伝達が促進されることを明らかにした。(Plant Signaling and Behavior 2015 10, e1052923)

### (4) GAF1 複合体が制御する成長制御遺伝子の探索

植物の成長においていつ花を咲かせるかの決定(花成)は、次世代に子孫を残すための最重要決定事項の 1 つである。花成を決定する要因の 1 つは、ジベレリンによって制御されることが知られているが、不明な点も多い、GAF1 の過剰発現体は花成が促進され、変異体では花成が大幅に遅延する。



また、DELLA タンパク質が蓄積した植物体は成長が抑制され矮化する。DELLA 蓄積時には、GAF1 複合体によって標的遺伝子の発現が促進される。以上より、GAF1 標的遺伝子には、GA フィードバック関連遺伝子のほかに、花成制御遺伝子、成長抑制遺伝子が存在すると考えられた。GAF1 複合体の新たな標的遺伝子を探索するため、薬剤依存的に GAF1 の発現が誘導される形質転換体を作製し、GAF1 誘導後短時間で発現が変動する遺伝子を RNA-seq 解析を用いて探索した。さらに、GAF1 関連変異体において、既に同定している GAF1 の標的遺伝子の 1

つである GA 生合成遺伝子と同様の発現パターンを示す遺伝子を探索し GAF1 の新たな標的遺伝子を複数単離した。

#### (5) 翻訳後修飾によるジベレリン信号伝達機構の解析

ジベレリン信号伝達において GlcNAc 修飾酵素である SPY は、DELLA タンパク質と共に GA 信号伝達の抑制因子としてはたらくことが報告されている。また、GlcNAc 修飾は、リン酸化と拮抗することが知られており、この修飾制御にはキナーゼ、加水分解酵素等も重要なはたらきをすると考えられる。本研究では、GAF1 タンパク質と結合する、機能未知の修飾酵素を単離した。この修飾酵素タンパク質による GAF1 複合体の制御を解析した。また、GAF1 複合体は、複数のリン酸化修飾を受けることを明らかにし、リン酸化修飾が及ぼす GAF1 複合体への影響を解析した。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計 4 件)

- ① Fukazawa, J., Ito, T., Yoshida, M., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., and Takahashi, Y.  
Binding of *GID1* to DELLAs Promotes Dissociation of *GAF1* from DELLA in GA Dependent *Manner Plant Signaling and Behavior*. 10, e1052923 (2015) 査読有
- ② Ito, T., Nakata, M., Fukazawa, J., Ishida, S. and Takahashi, Y.  
Phosphorylation-independent binding of 14-3-3 to NtCDPK1 by a new mode. *Plant Signal Behav.* 9, e977721. (2014) 査読有
- ③ Fukazawa, J., Teramura, H., Murakoshi, S., Nasuno, K., Nishida, N., Ito, T., Yoshida, M., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., and Takahashi, Y.

DELLAs function as coactivators of GAI ASSOCIATED FACTOR1 in regulation of GA homeostasis and signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*. 26, 2920-2938. (2014) 査読有

- ④ Ito, T., Nakata, M., Fukazawa, J., Ishida, S. and Takahashi, Y.  
Scaffold function of Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase: NtCDPK1 transfers 14-3-3 to the substrate RSG after phosphorylation. *Plant Physiol.* 165, 1737-1750. (2014) 査読有

〔学会発表等〕(研究代表者の招待講演)

(計 16 件)

- ① 深澤壽太郎、大橋由紀、森亮太、高橋陽介 ジベレリン信号伝達における DELLA-GAF1 複合体による新たな標的遺伝子の制御 日本植物生理学会 第 58 回年会 鹿児島大学 2017.3.16-18
- ② Fukazawa J., Ito T, Takahashi Y. “DELLA-GAF1/IDD2 COMPLEX REGULATES GIBBERELLIN HOMEOSTASIS AND SIGNALING” 22<sup>th</sup> International Plant Growth Substances Association Conference, Toronto Canada 2016.6.21-25
- ③ 深澤壽太郎、高橋竜平、藤井麻弥、高橋陽介 DELLA-GAF1 複合体によるジベレリン信号伝達の制御機構 第 73 回 中国四国植物学会 米子コンベンションセンター 2016.5.15
- ④ 深澤壽太郎、高橋竜平、藤井麻弥、三島由佳、高橋陽介 ジベレリン信号伝達における DELLA-GAF1 複合体の標的遺伝子の探索 植物化学調節学会 第 50 回大会 東京大学 2015.10.23-25
- ⑤ 深澤壽太郎、森雅彦、宮本知佳、三島由佳、神谷勇治、山口信次郎、高橋陽介、DELLA-GAF1/IDD2 複合体による GA 信号伝達とフィードバック制御機構、日本植物生理学会 第 56 回年会 東京農業大学 2015.3.16-18
- ⑥ 深澤壽太郎、森雅彦、宮本知佳、三島由佳、神谷勇治、山口信次郎、高橋陽介 DELLA-GAF1 複合体による GA 信号伝達とフィードバック制御機構の解析 植物化学調節学会 第 49 回大会 京都大学 2014.10.18-19
- ⑦ Fukazawa J., Fujiki T, Mori M, Miyamoto C, Mishima Y, Kamiya Y, Yamaguchi S, Takahashi Y. “GAF1, A DELLA INTERACTING PROTEIN, REGULATES GIBBERELLIN HOMEOSTASIS AND SIGNALING”

- 25th International Conference on Arabidopsis Research, Vancouver Canada, 2014.7.28-8.1
- ⑧ 森雅彦, 渡邊哲史, 深澤壽太郎, 伊藤岳, 高橋陽介 ジベレリン生合成酵素遺伝子 *AtGA20ox2* のフィードバック制御機構の解析 日本植物生理学会 第 55 回年会 富山大学 2014.3.18-20
- ⑨ 深澤壽太郎, 森雅彦, 増谷優次, 宮本知佳, 三島由佳, 高橋陽介 ジベレリンの転写代謝システム及び翻訳後修飾制御機構 冬の若手ワークショップ 2014 (転写研究会&転写サイクル&転写代謝システム共催) 舌切雀のお宿 磯部ガーデン 2014.1.30-2.1
- ⑩ Fukazawa J, Fujiki T, Mori M, Miyamoto C, Kamiya Y, Yamaguchi S, Takahashi Y. “GAF1, a DELLA Interacting Protein, Regulates Gibberellin Homeostasis and Signaling” International Symposium on Transcription and Metabolism, Awaji City, Hyogo, Japan 2013.11.11-13
- ⑪ Fukazawa J, Fujiki T, Mori M, Miyamoto C, Kamiya Y, Yamaguchi S, Takahashi Y. “GAF1, A DELLA INTERACTING PROTEIN, REGULATES GIBBERELLIN SIGNALING IN ARABIDOPSIS” 21<sup>th</sup> International Plant Growth Substances Association Conference, Shanghai China 2013.6.21
- ⑫ 宮本知佳, 深澤壽太郎, 高橋陽介 ジベレリンによる転写制御に關与する GAF1 の解析 第 70 回 中国四国植物学会 徳島大学 2013.5.11-12
- ⑬ 深澤壽太郎, 藤木敬大, 森雅彦, 増谷優次, 神谷勇治, 山口信次郎, 高橋陽介 ジベレリンの転写代謝システム及び成長制御機構の解析 若手ワークショップ@鬼怒川 (転写研究会&転写サイクル&転写代謝システム共催) ホテル鬼怒川御苑 2013.1
- ⑭ 深澤壽太郎, 藤木敬大, 森雅彦, 増谷優次, 神谷勇治, 山口信次郎, 高橋陽介 ジベレリンによる DELLA-GAF1 複合体を介した転写調節制御機構の解析 第 35 回 日本分子生物学会年会 ワークショップ 福岡国際会議場 2012.12.11
- ⑮ Fukazawa J, Murakoshi S, Teramura H, Nasuno K, Nishida N, Yoshida M, Kamiya Y, Yamaguchi S, Takahashi Y. “GAF1, A DELLA INTERACTING PROTEIN, REGULATES GIBBERELLIN SIGNALING IN ARABIDOPSIS”

- Frontiers in plant biology: From discovery to applications (Nature conference), Ghent Belgium, 2012.10
- ⑯ 深澤壽太郎, 村越悟, 寺村浩, 那須野慶, 西田尚敬, 吉田充輝, 神谷勇治, 高橋陽介, 山口信次郎 DELLA - GAF1 complex regulates gibberellin signaling in Arabidopsis. 日本植物生理学会 第 53 回年会 京都産業大学 2012.3.17

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

〔その他〕 ホームページ等

研究室ホームページ

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/ppclab/>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

深澤壽太郎 (FUKAZAWA, Jutarou)

広島大学・理学研究科・助教

研究者番号：90385550

### (2) 連携研究者

高橋陽介 (TAKAHASHI, Yohsuke)

広島大学・理学研究科・教授

研究者番号：90183855

研究課題名：代謝シグナル応答性ヒストン修飾酵素の同定と機能解析  
 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

研究期間：2012～2013、2014～2015

課題番号：24116526、26116729

研究代表者 松本道宏（国立国際医療研究センター研究所  
 糖尿病研究センター 分子代謝制御研究部 部長）

【交付決定額（分配額）】 (金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2013年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2014年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2015年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000

**研究成果の概要：** 栄養環境の変化に応答した代謝の恒常性維持において、遺伝子転写を介した調節は重要な役割を果たしている。本研究では、絶食応答性に形成される GCN5-CITED2 複合体ならびに CITED2 の標的分子として同定したメチル化酵素ドメイン含有分子 SetX の代謝調節における役割の解明を目的とした。マウスの肝臓や肝細胞における検討から、GCN5、CITED2 は PKA を含めた複合体を形成し、肝糖新生酵素遺伝子転写活性化に必須のエピゲノム変化と転写共役因子の活性化の統合モジュールとして機能することを明らかにした。また SetX が、cAMP シグナルとサーチェーンの活性化をつなぐ絶食応答性メチル化酵素であることを明らかにした。

### 1. 研究の背景

栄養環境の変化に応答して起こるホルモンなどの液性因子の分泌や神経系の活性の変化は核へ伝達され、変化に適応するための遺伝子転写調節が起こり、エネルギー代謝の恒常性が維持される。転写調節には、細胞外刺激応答性に形成される転写装置と遺伝子プロモーターとの相互作用に加えて、発現調節のプラットフォームとしてのエピゲノム修飾、特にアセチル化、メチル化などのヒストン修飾の変化が重要であることが示唆されている。エピゲノム情報の変化が個体レベルでのエネルギー代謝状態を変え得るという報告はあるものの、代謝調節を担うエピゲノム修飾因子については大部分不明であった。我々はこれまで一貫して肝臓にお

ける遺伝子転写を介した代謝調節機構の解析を行った (Cell Metab 2007, J Clin Invest 2006, Nat Med 2004, J Clin Invest 2003)。糖尿病状態と絶食時の肝臓において共通して認められる肝糖新生系酵素遺伝子の転写活性化の分子機構を重点的に解析してきた。その中で、転写調節分子 CITED2 が糖新生の鍵分子である PGC-1 $\alpha$  を活性化し糖新生系酵素の発現を誘導すること、そのメカニズムとして CITED2 が、PGC-1 $\alpha$  をアセチル化し不活性化するアセチル化酵素 GCN5 の作用を阻害すること、CITED2 が糖新生のみならず脂肪酸酸化やケトン体合成などの広範な絶食応答に必須の分子であることを見出した(Nat Med 2012)。この過程で、絶食時に形成される GCN5-CITED2 複合

体がヒストンのアセチル化を介して肝新生調節に関与することを示唆する知見を得た。また肝細胞における CITED2 の標的分子の網羅的探索から、リシンメチル化酵素に特徴的なドメインである SET ドメインを持つ分子 (SetX) を同定した。

## 2. 研究の目的

本研究では、肝代謝調節における GCN5-CITED2 複合体ならびに SetX のエピゲノム修飾因子としての役割を明らかにすることを目的とした。特に糖新生、脂肪酸酸化などの絶食応答に関与する遺伝子転写への関与に着目し、以下の点に焦点を絞って解析を行った。

1. GCN5-CITED2 複合体による遺伝子転写活性化の分子機構、特にホルモン応答性と標的遺伝子プロモーターにおけるエピゲノム修飾の変化を検討した。
2. 肝臓における GCN5-CITED2 複合体の機能欠損実験などから個体レベルでの本複合体の代謝への影響を検討した。
3. *in vitro* 系において SetX の酵素特性、基質、相互作用分子を明らかにしようと試みた。
4. 肝臓の SetX の代謝調節における役割を個体レベルで検討した。

## 3. 研究成果

### (1) GCN5-CITED2-PKA モジュールの同定と糖新生調節における役割の解明

①絶食時に CITED2 と複合体を形成する GCN5 が、ヒストンアセチル化酵素 (HAT) として糖新生系酵素の転写に関与することを想定し解析を行った。GCN5 の発現は肝細胞においてグルカゴン-cAMP-PKA 経路により誘導され、グルカゴン作用の亢進を呈する肥満・糖尿病モ

デルマウスの肝臓において著明に増加していた。マウスの肝臓における GCN5 のノックダウンにより糖新生系酵素の発現誘導は低下し、肝糖新生の抑制により血糖値が低下した。これらの結果から、GCN5 は糖新生系酵素の発現誘導における負の制御因子でなく、必要不可欠な分子であると考えられた。また GCN5 は、肝細胞において CITED2 と共に強発現させると、cAMP による糖新生系酵素の発現誘導を増強し、本作用にはアセチル基転移酵素活性が必要であった。

②糖新生系酵素遺伝子プロモーターにおいて GCN5 が HAT として機能しているかを、初代培養肝細胞における ChIP-qPCR (Chromatin immunoprecipitation-quantitative PCR、クロマチン免疫沈降-定量的 PCR) 法によって検証した。GCN5 は cAMP 刺激により糖新生系酵素遺伝子 G6Pase、PEPCK のプロモーター上に誘導され、同部において主に GCN5 によりアセチル化されることが知られているヒストン H3 の 9 番目のリジンのアセチル化 (H3K9ac) が増加した。本増加は GCN5 のノックダウンによって大きく減弱したことから、GCN5 によるアセチル化であることが示唆された。一方、CITED2 のノックダウンにより GCN5 のプロモーター上へのリクルートとヒストン H3K9 のアセチル化の増加が抑制された。以上の結果より、GCN5 は糖新生系酵素遺伝子の発現誘導に必須の HAT であり、本機能のためには cAMP と CITED2 が必要であることが明らかとなった。これまでの知見と合わせ、GCN5 には摂食時に PGC-1 $\alpha$  をアセチル化し糖新生を抑制する機能と、絶食時に cAMP/CITED2 依存的にヒストンをアセチル化し糖新生を誘導する機能

とがあることが示唆された。

③そこでこの相反する2つの機能を統合するメカニズムの解析を試みた。分子間相互作用やGCN5の*in vitro* HAT アッセイによる検討などを行い、絶食時に形成されるGCN5-CITED2-PKAの3者複合体は、GCN5がPKAによってリン酸化を受けるためのモジュールとして機能することを見いだした。また、本モジュール内でPKAにより275番目のセリン残基(Ser275)がリン酸化を受けること、本リン酸化によりGCN5がその基質をPGC-1 $\alpha$ からヒストンH3にスイッチすることも明らかにした。この結果、転写コアクチベーターPGC-1 $\alpha$ の脱アセチル化による活性化が起こりHNF-4 $\alpha$ やFoxO1の活性化がされ起こる。GCN5によるヒストンH3K9のアセチル化は、糖新生系酵素遺伝子プロモーターにおいて転写活性化に必要な一連のエピゲノム修飾を起こす起点となると考えられた。

絶食時に形成されるGCN5-CITED2-PKAモジュールにおけるcAMP依存的なGCN5の基質のスイッチ機構により、GCN5が肝糖新生系酵素の発現を絶食時に促進し、摂食時に抑制することが可能になる。加えて本機構により、グルカゴン-cAMPシグナル応答性のエピジェネティックな変化とコアクチベーターの活性化による転写複合体形成が統合されることが明らかとなった。

## (2) 肝臓の代謝調節におけるSetXの役割の解明

①肝細胞において遺伝子発現がグルカゴン-cAMP-PKA経路により誘導され、CITED2の欠損により抑制され、強発現により増強する分子、すなわちCITED2の標的分子の網羅的探索を行った。得られ

た複数の分子の中にリシンメチル化酵素に特徴的なSETドメインを有するSetXを見いだした。本分子もCITED2と同様に絶食応答への関与を想定し機能解析を行った。肝細胞・マウス肝における本分子のノックダウンにより、グルカゴン-cAMP依存的な糖新生系酵素遺伝子の発現は抑制され、肝糖新生の抑制により血糖値が低下した。また網羅的遺伝子発現解析から、SetXは糖新生の他、脂肪酸酸化などに関与する分子の発現を誘導することが明らかとなった。これらの結果より、SetXは絶食応答を誘導するメチル化酵素である可能性が示唆された。

②SetXのメチル化酵素活性の有無を検討した。SetXは*in vitro*メチル化アッセイにより自己メチル化能を有し、メチル化酵素であることを初めて明らかにした。さらにヒストンメチル化酵素活性についても各種ヒストンを用いて検討したが、我々の実験系では検出できなかった。種々のコファクターの存在を想定し、更なる検討を続けている。

③次にSetXの相互作用分子の同定を行った。肝細胞における共沈実験の結果、SetXはGCN5とは共沈しなかったが、PGC-1 $\alpha$ とSIRT1とは共沈した。PGC-1 $\alpha$ のコアクチベーター活性はSIRT1による脱アセチル化により活性化するが、SetXの存在下でこれは増強された。SetXはSIRT1の活性調節を介して絶食応答を制御することが明らかとなった。

## 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計7件)

① Sakai M, Tujimura-Hayakawa T, Yagi T, Yano H, Mitsushima M, Unoki-Kubota

- H, Kaburagi Y, Inoue H, Kido Y, Kasuga M, Matsumoto M. The GCN5-CITED2-PKA signalling module controls hepatic glucose metabolism through a cAMP-induced substrate switch. *Nat. Commun.* 7:13147 (2016) 査読有
- ② Takikawa A, Mahmood A, Nawaz A, Kado T, Okabe K, Yamamoto S, Aminuddin A, Senda S, Tsuneyama K, Ikutani M, Watanabe Y, Igarashi Y, Nagai Y, Takatsu K, Koizumi K, Imura J, Goda N, Sasahara M, Matsumoto M, Saeki K, Nakagawa T, Fujisaka S, Usui I, Tobe K. HIF-1 $\alpha$  in Myeloid Cells Promotes Adipose Tissue Remodeling Toward Insulin Resistance. *Diabetes* 65:3649-3659 (2016) 査読有
- ③ Karigane D, Kobayashi H, Morikawa T, Ootomo Y, Sakai M, Nagamatsu G, Kubota Y, Goda N, Matsumoto M, Nishimura EK, Soga T, Otsu K, Suematsu M, Okamoto S, Suda T, Takubo K. p38 $\alpha$  Activates Purine Metabolism to Initiate Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Cycling in Response to Stress. *Cell Stem Cell* 19:192-204 (2016). 査読有
- ④ Asahara S, Etoh H, Inoue H, Teruyama K, Shibutani Y, Ihara Y, Kawada Y, Bartolome A, Hashimoto N, Matsuda T, Koyanagi-Kimura M, Kanno A, Hirota Y, Hosooka T, Nagashima K, Nishimura W, Inoue H, Matsumoto M, Higgins MJ, Yasuda K, Inagaki N, Seino S, Kasuga M, Kido Y. Paternal allelic mutation at the Kcnq1 locus reduces pancreatic  $\beta$ -cell mass by epigenetic modification of Cdkn1c. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:8332-8337 (2015) 査読有
- ⑤ Cook JR, Matsumoto M, Banks AS, Kitamura T, Tsuchiya K, Accili D.A mutant allele encoding DNA binding-deficient FoxO1 differentially regulates hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetes* 64:1951-65 (2015) 査読有
- ⑥ Inaba Y, Furutani T, Kimura K, Watanabe H, Haga S, Kido Y, Matsumoto M, Yamamoto Y, Harada K, Kaneko S, Oyadomari S, Ozaki M, Kasuga M, Inoue H. Growth arrest and DNA damage-inducible 34 regulates liver regeneration in hepatic steatosis in mice. *Hepatology* 61:1343-1356 (2015) 査読有
- ⑦ Matsumoto M. InsP3R-Ca<sup>2+</sup> signaling takes center stage in the hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Cell Res* 22:1530-1532 (2012) 査読有
- 〔学会発表等〕（研究代表者の招待講演）  
（計 30 件）
- ① 松本道宏、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、第 31 回日本糖尿病・肥満動物学会 研究賞受賞講演、平成 29 年 2 月 10 日、横浜
- ② 松本道宏、肥満・2 型糖尿病合併 NAFLD と脂肪酸合成酵素、第 37 回日本肥満学会 日本肝臓学会・日本肥満学会合同シンポジウム:肝疾患と肥満:NAFLD と肝臓、平成 28 年 10 月 8 日、東京
- ③ 松本道宏、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、第 89 回日本生化学会大会シンポジウム:病気と生化学:個体レベルでの糖代謝調節機構と糖尿病 (共催:日本糖尿病学会)、平成 28 年 9 月 26 日、仙台
- ④ 松本道宏、A Fasting - Inducible Gluconeogenic Module in Liver as a Novel Therapeutic Target for Type 2 Diabetes Mellitus、第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会シンポジウム、平成 28 年 5 月 21 日、京都
- ⑤ 松本道宏、肝臓における代謝調節の分子メカニズムの解明: Treatment Strategy of Diabetes in Chiba、平成 28 年 2 月 5 日、千葉
- ⑥ 松本道宏、肝臓における新たな糖代謝調節メカニズム:新学術創成研究機構セミナー、平成 28 年 1 月 28 日、金沢
- ⑦ 松本道宏、GCN5-CITED2-PKA モジュールを介した肝糖新生制御メカニズム:第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会ワークショップ 栄養・メタボライトと遺伝子発現調節、平成 27 年 12 月 3 日、神戸
- ⑧ 松本道宏、肝臓における代謝調節とその破綻の分子機構: The 14th Meeting of Cardiovascular Research Conference、平成 27 年 11 月 25 日、東京
- ⑨ Matsumoto M. The transcriptional coregulator CITED2 regulates adipose tissue mass by enhancing preadipocyte proliferation and PPAR $\gamma$  expression through Rb inactivation. The 46th NIPS International Symposium: Homeostatic mechanisms among interacting organ systems- Key to understanding obesity for the Study of Obesity, Nagoya, Japan, October 2, 2015.
- ⑩ 松本道宏、肝臓における糖代謝調節の分子機構、第 2 回肝臓と糖尿病・代謝

- 研究会シンポジウム、平成 27 年 5 月 23 日、下関
- ⑪ 松本道宏、肝臓における代謝調節作用とその障害の分子機構の解明-新規糖尿病治療薬の開発を目指して-、第 52 回日本臨床分子医学会学術集会学会賞受賞講演、平成 27 年 4 月 11 日、京都
- ⑫ 松本道宏、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：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、平成 26 年 11 月 27 日、東京
- ⑬ Matsumoto M. Transcriptional coregulator CITED2 stimulates adipogenesis by enhancing preadipocyte proliferation and PPAR $\gamma$  expression through Rb inactivation. International Symposium for the Study of Obesity, Miyazaki, Japan, October 26, 2014.
- ⑭ 松本道宏、CITED2-GCN5 複合体を介して糖新生制御機構の解明：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、平成 26 年 9 月 28 日、岡崎
- ⑮ 松本道宏、2 型糖尿病の肝代謝障害の分子機構：4th Annual Diabetes Conferences for Clinicians by Clinicians (DCCC)、平成 26 年 7 月 4 日、東京
- ⑯ 松本道宏、CITED2-GCN5 複合体による肝糖新生調節機構：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、平成 26 年 6 月 27 日、横浜
- ⑰ 松本道宏、インスリン抵抗性による肝代謝障害の分子機構：The 9th Atherosclerosis & Cardiovascular Research Conference、平成 26 年 5 月 17 日、東京、
- ⑱ 松本道宏、CITED2-GCN5 複合体による肝糖新生調節機構の解明：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、平成 26 年 2 月 15 日、宮崎
- ⑲ 松本道宏、転写調節分子 CITED2 による代謝制御機構：国立健康・栄養研究所 所内セミナー、平成 25 年 10 月 10 日、東京
- ⑳ 松本道宏、肝臓における 2 型糖尿病治療標的の同定への試み：日本医科大学 老人病研究所セミナー、平成 25 年 9 月 26 日、川崎
- ㉑ 松本道宏、転写調節分子 CITED2 による代謝制御機構の解明：第 34 回 Osaka Diabetes Forum、平成 25 年 8 月 22 日、大阪
- ㉒ 松本道宏、肝インスリン抵抗性による病態の分子機構：第 6 回 Metabolic-Hepatology 研究会、平成 25 年 7 月 30 日、仙台
- ㉓ 松本道宏、CITED2-GCN5 複合体による肝糖新生調節機構の解明：第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会特別シンポジウム、平成 25 年 5 月 17 日、熊本
- ㉔ Matsumoto M. CITED2: a new player in hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. 1st Korea-Japan Diabetes Forum, 26th Spring Congress of Korean Diabetes Association, ICC JEJU, Korea, May 11, 2013.
- ㉕ Matsumoto M. The Role of CITED2 in the Hormonal Regulation of Hepatic Gluconeogenesis：第 85 回日本生化学会大会シンポジウム：Networks of transcription and metabolism: physiology, disease, and structural basis、平成 24 年 12 月 15 日、福岡
- ㉖ 松本道宏、肝臓における新たな糖代謝調節メカニズム：「食」による生活習慣病予防医学の展開、平成 24 年 12 月 6 日、金沢
- ㉗ 松本道宏、ホルモンによる肝糖産生制御機構：糖尿病・メタボリックシンドロームリサーチ special meeting、平成 24 年 12 月 5 日、富山
- ㉘ Matsumoto M. CITED2: a new player in hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. 2012 International Conference on Diabetes and Metabolism, Seoul, Korea, November 9, 2012.
- ㉙ 松本道宏、肝臓を標的とした糖尿病治療標的の探索への取り組み：医薬基盤研究所セミナー、平成 24 年 10 月 25 日、大阪
- ㉚ Matsumoto M. CITED2: a new player in hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. 2012 Asia-Pacific Diabetes and Obesity (APDO) Study Group Symposium Joint with Korean Endocrinology Society, Seoul, Korea, April 20, 2012.
- 〔図書〕(計 7 件)
- ① 松本道宏、酒井真志人、絶食時のエネルギー代謝とヒストンアセチル化制御、実験医学増刊「遺伝子制御の新たな主役 栄養シグナル」34(15): 102-109、羊土社 2016.
- ② 松本道宏、酒井真志人、インスリン・グルカゴンと飢餓応答、The Lipid 26(1): 14-21、メディカルレビュー社 2015.1

- ③ 松本道宏、肝糖新生と糖尿病の創薬標的、*BIO Clinica* 29 (14): 1368-1372、ニュー・サイエンス社 2014
- ④ 松本道宏、肝臓でのインスリン作用とその障害、*ホルモンと臨床* 60(11): 19-27、医学の世界社 2012 (2014年5月30日発行)
- ⑤ 松本道宏、酒井真志人、転写共役因子 CITED2 による膵ホルモン応答性の肝糖新生制御機構、*Diabetes Journal* 41(2): 44-45、2013.
- ⑥ 松本道宏、酒井真志人、転写調節分子 CITED2 による肝臓における新たな糖代謝調節メカニズム、*医学のあゆみ* 245(3): 260-261、医歯薬出版(株) 2013.4.20
- ⑦ 松本道宏、酒井真志人、春日雅人、CITED2 はホルモン応答性に PGC-1 $\alpha$  のアセチル化を調節し肝糖新生を制御する、*Diabetes Update* 2(1): 16-18、メディカルレビュー社 2013

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

〔その他〕 ホームページ等

研究室ホームページ

<http://www.rincgm.jp/department/dia/03/>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本道宏 (MATSUMOTO, Michihiro)

国立国際医療研究センター研究所・糖尿病研究センター・分子代謝制御研究部・部長

研究者番号：90467663

研究課題名：ショウジョウバエ始原生殖細胞の遺伝子発現制御における細胞内代謝経路の役割  
The role of cell metabolism during *Drosophila* primordial germ cell development.

ショウジョウバエ始原生殖細胞の転写抑制機構におけるメチオニン代謝の役割  
The role of methionine metabolism during *Drosophila* primordial germ cell development.

研究期間：2012～2013、2014～2015

課題番号：24116527、26116730

研究代表者 林 良樹

(現：筑波大学 生命領域学際研究センター 助教)

(旧：自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 助教)

【交付決定額（分配額）】

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2013年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2014年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2015年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000

**研究成果の概要：**生殖細胞の前駆細胞である始原生殖細胞（PGC）は抑制的転写状態や潜在的分化多能性など、様々な細胞学的・発生的特徴を持つ細胞である。本研究ではショウジョウバエ PGC をモデルとして、PGC がもつ細胞内代謝状態およびその発生過程における役割の解明を目的に研究を行った。その結果、PGC においては体細胞に比べて解糖系が亢進していること、さらに細胞の主要なメチル基供与体である S-アデノシルメチオニン（SAM）の産生が抑制されていることが明らかとなった。そこでこれらの代謝経路が PGC の発生過程において果たす役割の解明を試みた。その結果、解糖系は胚期 PGC に対する選択的な細胞死誘導に関与すること、さらに SAM 合成抑制は生殖系列におけるレトロトランスポゾンの発現抑制に寄与することが明らかとなった。以上の結果は、これら代謝経路が不全な PGC を選択的に排除すること、さらにレトロトランスポゾンの発現を抑制することで、生殖系列の品質管理における重要な役割を担っていることを強く示唆している。

## 1. 研究の背景

多くの動物種において、生殖細胞の前期細胞である始原生殖細胞（PGC）は、抑制的な転写状態をもつこと、抑制的なクロマチン状態をもつこと、さらに潜在的に分化多能性を有することなど、様々な細胞学的・発生的特徴を持つことが

知られている（Hayashi et al, 2004, PNAS, Hanyu-Nakamura et al, 2008, Nature）。その一方で、PGC が持つ代謝生理的特徴については全く研究がなされてこなかった。

近年、ガン細胞あるいは哺乳類多能性幹細胞の研究により、細胞内代謝はその

ハウスキーピングな働きに加えて、細胞の性質を左右する働きがあることが明らかになりつつある。例えば、多くのガン細胞ではエネルギー産生において効率がよいミトコンドリアにおける酸化的リン酸化 (OXPHOS) ではなく、解糖系が用いられていることが知られている。またガン細胞における解糖系の活性は、ガンの悪性化において重要な働きを持つことも明らかとなっている (Vander Heiden et al, 2009, Science)。また哺乳類多能性幹細胞においては解糖系およびメチオニン代謝がその未分化性の維持において重要な働きをしていることが知られている (Shiraki et al, 2014, Cell Metab., Moussaieff et al, 2015, Cell Metab.)。これらの知見は個体の発生過程において、それぞれの細胞・組織は固有の代謝状態をもつこと、さらに固有の細胞内代謝はその細胞の発生過程に寄与することを予想させる。しかし、個体発生過程におけるそれぞれの細胞・組織がもつ代謝状態およびその役割については不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では生殖系列の発生研究における優れたモデルであるショウジョウバエの PGC を用いることで、PGC が持つ細胞内代謝状態の解明およびその発生過程における役割の解明を目指した。このためにセルソーターを用いた PGC の分取とメタボロミクスを組み合わせることで PGC の細胞内代謝の解明を試みた。さらに遺伝子発現解析と遺伝学的解析を合わせて行うことで、生殖系列における細胞内代謝の果たす役割の解明を目的に研究を行った。

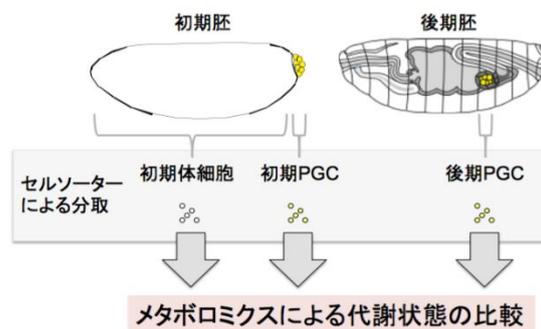
## 3. 研究成果

### 3-1 : *in vivo* 単一細胞種メタボロミク

### スによる PGC の細胞内代謝の解明

PGC がもつ細胞内代謝状態を解明する第一歩として、セルソーターによる細胞分取とメタボロミクスを併用した *in vivo* 単一細胞種メタボロミクスの実験系を確立した。この実験において、胚発生初期および後期の胚よりセルソーターを用いて PGC を 20 万個程度分取し、CE-TOFMS および CE-QqQ ベースのメタボロミクスに供した (それぞれ初期 PGC および後期 PGC : 図 1)。

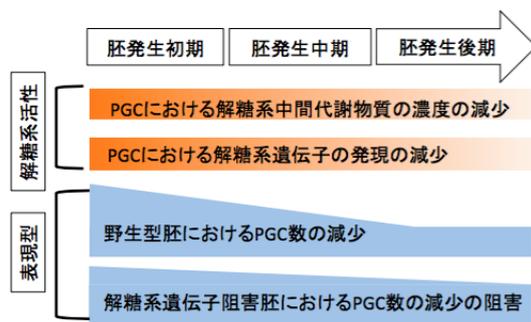
図 1 : *in vivo* 単一細胞種メタボロミクスの試み



その際、比較対象として胚発生初期の体細胞 (初期体細胞) を用い、PGC と比較した。その結果、初期 PGC は初期体細胞と比べて、解糖系の代謝物質を顕著に多く含有していることが明らかとなった。さらに解糖系代謝物質量は後期 PGC においては減少することが明らかとなった。以上の結果は、PGC では体細胞に比べて解糖系が亢進していること、さらに PGC における解糖系の活性は、胚発生の進行にともなって減弱することを強く示唆していた (図 2)。そこで次に、解糖系代謝酵素をコードする遺伝子 (解糖系遺伝子) の発現解析を行った。 *in situ* hybridization 法により解糖系遺伝子の発現解析を行った結果、解糖系遺伝子のほとんどのものが初期 PGC において顕著に高い発現を示すこと、さらにこの発

現は後期 PGC では減弱することが明らかとなった (図 2)。

図2: 胚期PGCにおける解糖系の活性とその影響

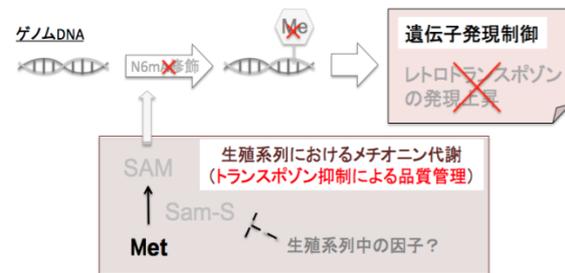


さらに解糖系代謝酵素に対する抗体を作成し、免疫化組織学染色法によりその発現を解析した結果、mRNA と同様の結果を得た。これらの結果は、メタボロミクスの結果を支持する。以上の結果より、初期 PGC は体細胞に比べて解糖系の活性が高い細胞であり、PGC における解糖系の活性は発生の進行に従って減弱すると結論づけた。

単一細胞種メタボロミクスから明らかになったもう一つの重要な点として PGC における特徴的なメチオニン代謝が挙げられる。すなわち PGC では体細胞に比べてメチオニン (Met) の含有量が顕著に高いのにたいし、その代謝産物である S-アデノシルメチオニン (SAM) の含有量が顕著に低いことが明らかとなった。この結果は PGC においては Met から SAM を産生する反応が抑制されていることを強く示唆していた。そこで次に Met から SAM を合成する酵素 (SAM 合成酵素、Sam-S) の発現を解析した。in situ hybridization 法および免疫組織化学染色法により Sam-S の mRNA およびタンパク質の発現を解析した結果、生殖系列の発生過程を通じて Sam-S の発現が低いことが明らかとなった。以上の結果を考え合わせ、私たちはショウジョ

ウバエ生殖系列では Sam-S の発現抑制を介して、SAM の合成が抑制されていると結論づけた (図 3)。

図3: 生殖系列におけるSAM産生抑制の役割のモデル



### 3-2 : PGC 発生過程における解糖系の役割の解析

上記の研究の結果より明らかとなった PGC における解糖系の亢進が、その発生過程において果たす役割の解明を試みた。このために、解糖系遺伝子の機能を RNAi 法により PGC 特異的に阻害し、その影響を観察した。hexokinase A (hexA)、glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase 1 (gapdh1)、pyruvate kinase (pyk)などの複数の解糖系遺伝子の機能を阻害しその影響を観察したところ、胚発生後期において解糖系遺伝子を阻害した胚は野生型胚よりも多くの PGC を持つことが明らかになった。そこでこのような胚の胚発生過程を通じて PGC 数の変化を観察したところ、解糖系遺伝子を阻害した胚では、野生型において観察される PGC 数の減少が観察されないことが明らかとなった。

これまでの研究により、胚発生初期において形成された PGC のうち、約 30% は胚発生過程において選択的な細胞死誘導によって失われることが明らかとなっていた。さらに PGC の細胞死は非アポトーシス細胞死であることも明らかになっていた (Sato, Hayashi et al, 2007, PNAS, Yamada et al, 2008,

Development)。この PGC の選択的細胞死誘導は不全な PGC を排除する品質管理機構であると考えられてきたものの、その細胞死誘導のメカニズムおよび選択の基準は不明であった。上記の結果は、解糖系は PGC の選択的細胞死誘導に必要な新規の要因であること、さらにこの過程を制御することで PGC の品質管理機構に寄与するという点を強く示唆している。現在、解糖系がどのようなメカニズムで PGC の細胞死誘導を制御するのか、さらに PGC の選択の基準は何かという点について着目し解析を行っている。本研究を通じて得られた知見は、これまで明らかにされてこなかった発生過程における解糖系の新規な機能を解明するだけでなく、次世代を担う生殖細胞の品質管理が行われるメカニズムを明らかにする上で重要な基礎的知見となるものであると考える。

### 3-3 : PGC 発生過程におけるメチオニン代謝の役割の解析

3-1 の研究により、ショウジョウバエの生殖系列においては Met から SAM を産生する反応が抑制されていることが明らかとなった。そこで生殖系列における SAM の産生抑制の意義を明らかにすることを試みた。このために生殖系列において Sam-S を強制発現しその影響を観察した。解析の対象として、組織学的観察等の解析が容易な卵巣を対象としてその影響を観察した。

解析の第一歩として、Sam-S を強制発現した卵巣においてメチオニン代謝が変化しているかどうかを解析した。野生型および Sam-S 強制発現個体の卵巣より代謝物質を抽出し Met および SAM の含有量を比較したところ、Sam-S を強制発現した個体においては Met の含有量が減

少し、SAM の含有量が顕著に増加することが明らかとなった。この結果は、Sam-S の強制発現した生殖系列において SAM の合成が亢進したことを示している。

そこでこのような卵巣において卵形成過程への影響を観察した。その結果、Sam-S を生殖系列において強制発現した個体では、卵形成過程の初期において生殖系列のアポトーシス誘導が亢進していることが明らかとなった。このような表現型はレトロトランスポゾンが活性化した卵巣において観察される表現型に類似していた。そこで Sam-S を強制発現した卵巣においてレトロトランスポゾンの活性化が起きているか検証した。その結果、野生型に比べてレトロトランスポゾン (Het-A など) の発現が増加していることが明らかとなった。以上の結果は、生殖系列における SAM の合成抑制は、レトロトランスポゾンの発現抑制に寄与することを示している。

近年、ショウジョウバエのゲノムメチル化はアデニンに対してなされること (N6mA 修飾)、さらに N6mA 修飾がなされたゲノム領域の遺伝子発現が亢進することが明らかとなっている (Zhang et al, 2016, Cell)。SAM は細胞内の主要なメチル基供与体であること、さらに SAM の強制発現により SAM 含有量の増加およびレトロトランスポゾンの発現の亢進が観察されたことを考え合わせて、私たちは現在、生殖系列における SAM の合成抑制はゲノムの低メチル化状態を形成することで、レトロトランスポゾンの発現を抑制すると考えている。

本研究で明らかになった知見は、生殖系列では Met から SAM を産生する反応を抑えることで、レトロトランスポゾンが発現しにくい細胞内環境を構築し、生

殖系列のゲノムを損傷から防ぐという新たな生殖系列の防御機構の解明に寄与するものであると考える。

最後に：

生殖系列において特徴的なプロファイルを示した二つの代謝経路が双方、PGCの選択およびレトロトランスポゾンの抑制という生殖系列の品質、さらには種の継続を担保する上で必須なプロセスに関与することが明らかになりつつある。細胞内代謝は細胞の誕生とともに存在する細胞機能であること、生殖細胞は多細胞生物が子孫を残すために獲得した起源の古い細胞種であること考えると、本研究で明らかになりつつある品質管理の仕組みは、多細胞生物が種の安定的な継続のために獲得したもっとも始原的な仕組みの一端なのかもしれないと期待している。この後、本研究で得られた知見をさらに深め、他の動物等においても発展させることでこの概念について追求していきたい。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計3件)

- ① Oohara Y, Shimada-Niwa Y, Niwa R, Kayashima Y, Hayashi Y, Akagi K, Ueda H, Yamakawa-Kobayashi K, Kobayashi S, Autocrine regulation of ecdysone synthesis by beta3-octopamine receptor in the prothoracic gland is essential for *Drosophila* metamorphosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 112, 1452-1457 (2015) 査読有
- ② Dejima K, Takemura M, Nakato E, Peterson J, Hayashi Y, Kinoshita-Toyoda A, Toyoda H, Nakato H, Analysis of *Drosophila* glucuronyl C5-epimerase: implications for developmental roles of heparan sulfate sulfation compensation and 2-O-sulfated glucuronic acid. **J. Biol. Chem.** 288, 34384-34393 (2013) 査読有
- ③ Hayashi Y, Sexton TR, Dejima K, Perry DW, Takemura M, Kobayashi S, Nakato

H, Harrison DA, Glypicans regulate JAK/STAT signaling and distribution of the Unpaired morphogen. **Development.** 139, 4162-4171 (2012) 査読有

(This article is evaluated by F-1000)

〔学会発表等〕(研究代表者の招待講演)

(計14件)

- ① 林良樹、メタボロミクスから見えてきたショウジョウバエ始原生殖細胞の代謝的性質とその役割、国立生育医療研究センターセミナー、平成27年11月6日、国立生育医療研究センター、東京都世田谷区
- ② 林良樹、メタボロミクスから見えてきた始原生殖細胞の代謝的性質とその役割、第14回日本再生医療学会総会、平成27年3月21日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
- ③ 林良樹、Characteristics of *Drosophila* primordial germ cells from metabolic aspect. 新学術領域「植物発生ロジック」メタボロミクス研究会、平成27年2月15日、慶応義塾大学先端生命科学研究所鶴岡メタボロームキャンパス、山形県鶴岡市
- ④ 林良樹、幹細胞の居場所(ニッチ)の広さを決める仕組み—ショウジョウバエの遺伝学から分かること—、弘前大学農学生命科学部研究推進セミナー、平成27年1月22日、弘前大学、青森県弘前市
- ⑤ Hayashi Y, Characteristics of *Drosophila* primordial germ cells from metabolic aspect. Young Scientist Meeting for Sexual Differentiation. 平成26年12月10日、静岡県熱海市
- ⑥ Hayashi Y, The role of Glycolysis in primordial germ cell development of Fruit fly, *Drosophila melanogaster*. 第14回日米先端科学(JAFoS)シンポジウム、平成26年12月6日、ホテルニューオータニ、東京都千代田区、
- ⑦ 林良樹、メタボロミクスから見えてきた始原生殖細胞の代謝的性質とその役割、第87回日本生化学会大会、平成26年10月17日、国立京都国際会館、京都府京都市
- ⑧ 林良樹、幹細胞の居場所(ニッチ)の広さを決めるメカニズム、同志社大学セミナー、平成26年6月27日、同志社大学、京都府京田辺市
- ⑨ Hayashi Y, The role of Heparan Sulfate Proteoglycans in *Drosophila* germline stem cell niche. 47<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society of Developmental Biology. 平成26年5月30日、

- WINC AICHI, 愛知県名古屋市
- ⑩ 林良樹、ショウジョウバエ始原生殖細胞の発生過程における解糖系の新規役割、第1回がんと代謝研究会、平成25年11月1日、慶応義塾大学先端生命科学研究所鶴岡メタボロームキャンパス、山形県鶴岡市
  - ⑪ 林良樹、ショウジョウバエの生殖系列の発生過程-始原生殖細胞と生殖幹細胞を中心に-、高知大学研究セミナー、平成25年9月6日、高知大学、高知県高知市
  - ⑫ 林良樹、ショウジョウバエ配偶子形成過程におけるヘパラン硫酸プロテオグリカンの役割、第85回日本生化学会大会、平成24年12月14日、福岡国際会議場、福岡県福岡市
  - ⑬ 林良樹（シンポジウムオーガナイザー）、ショウジョウバエ始原生殖細胞の発生過程における細胞内代謝の新規役割、第35回日本分子生物学会年会、平成24年12月12日、福岡国際会議場、福岡県福岡市
  - ⑭ 林良樹、ショウジョウバエ始原生殖細胞の発生過程における細胞内代謝の新規役割-セルソーティングとメタボローム解析による *in vivo* 単一細胞種メタボロミクスの試み-、第64回日本生物工学会大会、平成24年10月26日、神戸国際会議場、兵庫県神戸市

〔図書〕（計1件）

- ① **Hayashi Y.**, Kobayashi S, Regulatory Mechanism of the Germline Stem Cell niche of *Drosophila melanogaster*. Springer, “Reproductive & Developmental Strategies for Life Continuity”, in press

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

〔その他〕 ホームページ等

研究室ホームページ

<http://skob.tara.tsukuba.ac.jp/top/>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 良樹 (HAYASHI, Yoshiki)

筑波大学・生命領域学際研究セン

ター・助教

研究者番号：30508817

研究課題名：SIK3 遺伝子破壊によるクラス 2HDAC 制御不全とエネルギー代謝異常  
Dysregulation of Class2-HDAC and energy metabolism by SIK3 signal disruption.

研究期間：2012～2013

課題番号：24116528

研究代表者 竹森 洋（独立行政法人 医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2012 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2013 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000

**研究成果の概要：**塩誘導性キナーゼ(SIK)は、AMPK ファミリーに属すタンパクリン酸化酵素で生体エネルギーの代謝に重要であることが示唆されている。特に、進化上の起源と予想されるアイソフォーム SIK3 の遺伝子破壊マウスは多彩な表現型を示すが、その細胞内の分子機構は不明である。その理由の1つとして、生体レベルでの異常が絡み合うことで、直接作用と間接作用を区別できない点にある。本研究では、SIK3 を一過性に阻害することで直接作用をより明確に解明し、生体及び細胞レベルでのシグナル伝達機構を明らかにすることで、医療面での応用にも繋げる橋渡し研究を行った。

## 1. 研究の背景

肝臓における糖新生は、個体が空腹時に糖を合成することで血糖値を高める役割がある。一方で、糖尿病患者では糖新生が恒常的に亢進しており、糖新生を阻害すると血糖値が低下する。この糖新生はグルカゴン-cAMP シグナルにより制御されており、様々な酵素とその遺伝子の転写調節因子が関与する。転写調節因子の代表的なものには cAMP-応答配列結合因子 (CREB) やその共役因子 (CRTC 2) が挙げられる。加えて、Class2-HDAC も FOXO シグナルを介して cAMP で制御される糖新生に関与することが示唆されている。

塩誘導性キナーゼ (SIK) は CREB-CRTC2 と Class2-HDAC を抑制するため、SIK の活性化剤が糖尿病に有効であると予想される。しかし、SIK に

属する3番目のアイソフォーム (SIK3) の遺伝子破壊 (KO) マウスは、極度の痩せ身と低血糖の表現型を示し、SIK3 阻害剤の方が糖尿病に有効と予想される。実際に、SIK3 の阻害もしくは活性化のどちらが血糖値低下に繋がるかを実証する目的で、CRTC2 及び Class2-HDAC を利用したレポーターアッセイシステムを用いて SIK3 シグナル制御剤の同定を行った。

## 2. 研究の目的

SIK3 阻害は糖新生亢進、エネルギー代謝亢進以外にも軟骨細胞の増殖にも働くことが示唆されている。特に軟骨は Class2-HDAC 経路が重要と考えられている。そこで、SIK3 阻害で引き起こされる生理現象の変化の全体像を解明すると共に、創薬への応用を視野に入れた研究を行う。

### 3. 研究成果

SIK3 阻害を Class2-HDAC と CRTC2 のレポーターを利用して評価する系を構築し、低分子化合物をスクリーニングした。SIK3 シグナル阻害活性を示すワラビ成分 Pterosin B の同定に成功し、Pterosin B が糖新生関連酵素の遺伝子の発現を上昇させることが示唆された。すなわち、肝臓では SIK3 シグナルを阻害すると血糖値上昇に繋がってしてしまうと予想される。

Pterosin B が SIK3 の直接阻害剤では無かったことから、Pterosin B の作用部位としての SIK3 の上流因子を探索した。その結果、Pterosin B はグルコーゲン分解を刺激するキナーゼ PHKG2 の SIK3 への結合性を上昇させ、SIK3 抑制ドメインのリン酸化を亢進させることで SIK3 シグナルを阻害することが示唆された。以上の結果から、本研究のスクリーニング法を用いた SIK3 活性化剤の探索もしくは PHKG2 阻害により、糖新生を抑制可能な低分子のスクリーニングが可能となることが示唆された。

一方、Pterosin B は SIK3-CRTC2 を介して糖新生を活性化するにも関わらず、肝細胞における Pterosin B 依存的なグルコースの産生は、添加後 8 時間で急激に低下することが示された。さらに、これまでに Pterosin A が血糖値低下作用を示すことが報告されている。そこで、Pterosin B の SIK3 非依存的な糖新生制御作用について検討を行い、異なる糖新生経路の評価方法の開発を行った。

まず、糖尿病モデルマウスを用いて Pterosin B が血糖値改善効果を有するか検討を行った。その結果、Pterosin B

群は、コントロール群に比べて血糖値が低下することが示された。そこで次に、糖新生関連の遺伝子発現を確認したところ、Pterosin B は cAMP 誘導性の G6pc の発現を有意に抑制することが示された。これは、G6pc のプロモーターにおける Retinoic acid

receptor-related orphan receptor alpha-steroid receptor coactivator 2 (ROR $\alpha$ -SRC2)複合体の阻害により生じていることがレポーターアッセイにより明らかとなった。さらに、Pterosin B はミトコンドリア呼吸鎖の

Coenzyme Q の酸化還元サイクルに異常をきたし、細胞内の ATP レベルを有意に低下させることが示された。ミトコンドリア Complex III の阻害剤

Antimycin A も Pterosin B と同様に、ROR $\alpha$ -SRC2 複合体を阻害して G6pc の遺伝子発現を抑制することが明らかとなり、ROR $\alpha$ -SRC2 複合体はミトコンドリア呼吸鎖の Coenzyme Q の酸化還元サイクル異常を感知して G6pc の発現を調節している可能性が示唆された。糖尿病治療薬として知られているメトホルミンも、ミトコンドリア呼吸鎖 Complex I の阻害により細胞内の ATP レベルを低下させ、血糖値を抑制していることが報告されており、血糖値抑制効果とミトコンドリア呼吸鎖阻害は深く関係している。以上から、ミトコンドリア呼吸鎖 Coenzyme Q の酸化還元レベルと ROR $\alpha$ -SRC2 複合体の活性化レベルを指標に天然素材を評価できる可能性が示唆された(図 1)。

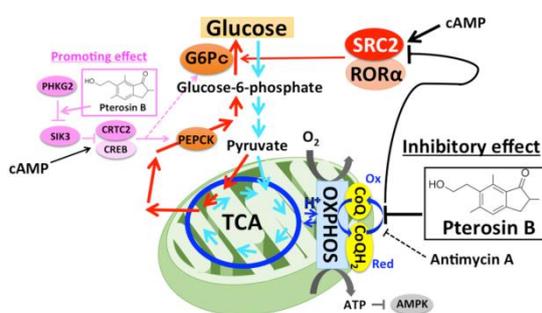


図1：Pterosin BのSIK3依存的作用と非依存的作用

軟骨組織は血管系が形成されておらず低酸素状態である。逆に、酸素に触れる環境にあると軟骨細胞は死滅すると考えられている。Pterosin BがSIK3を阻害し、且つミトコンドリアでの酸素利用を障害する作用を有することから、軟骨の増殖に有効であると予想された。そこで、Pterosin Bを軟骨研究グループ（京大iPSセンター:妻木研）に評価して頂いたところ、軟骨増殖活性及び保護活性を有することが示唆された。本成果はその後の、変形性膝関節症治療への研究へと繋がった。

#### 4. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔論文-英文総説含む〕（計5件）

- ① Yahara Y, Takemori H, Okada M, Kosai A, Yamashita A, Kobayashi T, Fujita K, Itoh Y, Nakamura M, Fuchino H, Kawahara N, Fukui N, Watanabe A, Kimura T, Tsumaki N. Pterosin B prevents chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis in mice by inhibiting SIK3. *Nat Commun.* 2016 7:10959. 査読有
- ② Itoh Y, Fuchino H, Sanosaka M, Kako K, Hada K, Fukamizu A, Takemori H, Kawahara N. Pterosin B has multiple targets in gluconeogenic programs, including coenzyme Q in RORα-SRC2 signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 473:415-20 査読有
- ③ Kumagai A, Suga M, Yanagihara K, Itoh Y, Takemori H, Furue MK. A Simple Method for Labeling Human Embryonic

Stem Cells Destined to Lose Undifferentiated Potency. *Stem Cells Transl Med.* 2016 5:275-81 査読有

- ④ Itoh Y, Sanosaka M, Fuchino H, Yahara Y, Kumagai A, Takemoto D, Kagawa M, Doi J, Ohta M, Tsumaki N, Kawahara N, Takemori H. Salt-inducible Kinase 3 Signaling Is Important for the Gluconeogenic Programs in Mouse Hepatocytes. *J Biol Chem.* 2015 290:17879-93 査読有
- ⑤ Sanosaka M, Fujimoto M, Ohkawara T, Nagatake T, Itoh Y, Kagawa M, Kumagai A, Fuchino H, Kunisawa J, Naka T, Takemori H. Salt-inducible kinase 3 deficiency exacerbates lipopolysaccharide-induced endotoxin shock accompanied by increased levels of pro-inflammatory molecules in mice. *Immunology.* 2015 145:268-78 査読有

〔学会発表等〕（研究代表者の招待講演）  
（計1件）

- ① 竹森 洋、SIK の逆遺伝学と創薬、第62回日本実験動物学会 ランチオンセミナー、2015.5.28-30、京都市

〔図書〕（計1件）

- ① 熊谷彩子、竹森 洋 シーエムシー出版、薬用植物成分評価のためのモデルマウスの新たな活用 薬用植物・生薬の開発と今後の展望～資源確保、品質評価、製品開発、2015、pp114-120

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

取得：1件

- ①発明の名称：肝機能の保護・改善薬  
出願番号：特許第5498754号  
登録日：2014/3/14  
出願人：学校法人関西大学、独立行政法人医薬基盤研究所、有限会社一栄  
発明者：河原秀久、長岡康夫、竹森 洋、小出芳栄

出願：3件

- ①発明の名称：プテロシン誘導体を含む軟骨骨変性、および/または軟骨菲薄疾患治療剤  
出願番号：特願2014-234698  
出願日：2014/11/19  
出願人：国立大学法人京都大学、独立行政法人医薬基盤研究所  
発明者：妻木範行、竹森 洋、瀧野裕之、川原信夫

- ②発明の名称：プテロシン誘導体を含む軟骨変性、および/または軟骨菲薄疾患治療剤  
出願番号：特願 2013-135040  
出願日：2013/6/27  
出願人：国立大学法人京都大学、独立行政法人医薬基盤研究所  
発明者：妻木範行、竹森 洋、瀧野裕之、川原信夫
- ③発明の名称：カスパーゼ 1 活性化阻害剤、抗炎症剤、鎮痒剤、及びカスパーゼ 1 活性化阻害剤の評価方法  
出願番号：特願 2013-094995  
出願日：2013/4/30  
出願人：独立行政法人医薬基盤研究所、株式会社桃谷順天館  
発明者：竹森 洋、佐野坂真人、伊東祐美、瀧野裕之、川原信夫

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹森 洋 (TAKEMORI, Hiroshi)

独立行政法人医薬基盤研究所・

プロジェクトリーダー

研究者番号：90273672

研究課題名：インフルエンザウイルス感染におけるエピゲノム・代謝システムのクロストーク  
 Cross-talk between epigenome and metabolic system in influenza virus infection

研究期間：2014～2015

課題番号：26116703

研究代表者 今井由美子（秋田大学 医学系研究科 教授）

【交付決定額（分配額）】 中途終了(2015年度) (金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2014年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2015年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000

**研究成果の概要：**本研究課題ではインフルエンザウイルス感染におけるエピゲノムと代謝システムのクロストークに関して検討した。H4K20me3 のメチル化修飾酵素を中心に、その欠損細胞や欠損マウスを用いた解析から、同メチル化酵素がインフルエンザウイルスの増殖を制御していることが明らかとなった。さらに、これらのマウス肺組織を用いたメタボローム解析から、SAM や NAD 等の宿主転写環境の形成に利用されていることが知られている代謝物の産生が感染に伴って大きく変動することがわかった。従って、このようなエピゲノム・代謝系のクロストークを介した転写環境の構築がインフルエンザの病態に関わっていることが示唆された。

### 1. 研究の背景

近年、ウイルス感染をはじめとした外因性ストレスに対してエピゲノムは脆弱性、可塑性を有していると考えられ、このような環境要因に対するエピゲノム応答は、生体の恒常性の維持機構と捉えることができる。この制御機構の破綻は疾患の発症につながり、逆に上手に操作することによって疾患の治療に応用することが可能となる。例えば、EBウイルスや肝炎ウイルス感染では、宿主細胞にエピジェネティック変化が生じ、その結果発がんが導かれることが明らかになっている。しかし、RNA ウイルスであるインフルエンザウイルスの感染に伴う宿主のエピゲノム応答機構に関しては未解明な点が多い。

一方最近、遺伝子発現を制御するエピゲノム情報をはじめとした転写環境と細胞内エネルギー代謝のクロストークに注目が集ま

っている。しかしながら、インフルエンザウイルスの感染における宿主のエピゲノム修飾変化との関わりは不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、インフルエンザウイルス感染によって、エピジェネティックな転写環境、とりわけ抑制性のヒストンマークである H4K20 のメチル化に関する修飾変化どのように構築され、それらとインフルエンザウイルスの増殖機構、病態との関わりを明らかにし、さらにこのプロセスに、感染に伴った代謝物 (ATP, SAM, NAD+, Acetyl-CoA 等) の産生変動がどのように関与しているか、また、そのようなエピゲノムと代謝系のクロストークとインフルエンザの病態との関わりを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究成果

抑制性のヒストンマークである H4K20me3 のメチル化修飾酵素に着目して、その欠損細胞や欠損マウスを用いた解析から、同メチル化酵素がインフルエンザウイルスの増殖を制御していることが明らかとなった (図 1、図 2)。さらに、これらのマウス肺組織を用いたメタボローム解析から、SAM や NAD 等の宿主転写環境の形成に利用されていることが知られている代謝物の産生が感染に伴って大きく変動することがわかった (図 3)。従って、このようなエピゲノム・代謝系のクロストークを介した転写環境の構築がインフルエンザの病態に関わっていることが示唆された。

図1 ヒストンメチル化酵素欠損細胞でのウイルス増殖

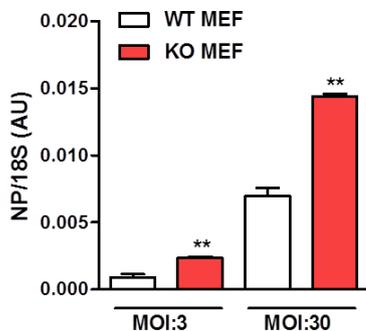


図2 ヒストンメチル化酵素欠損マウスのインフルエンザの生存曲線

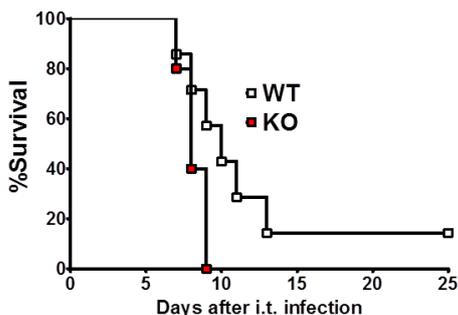
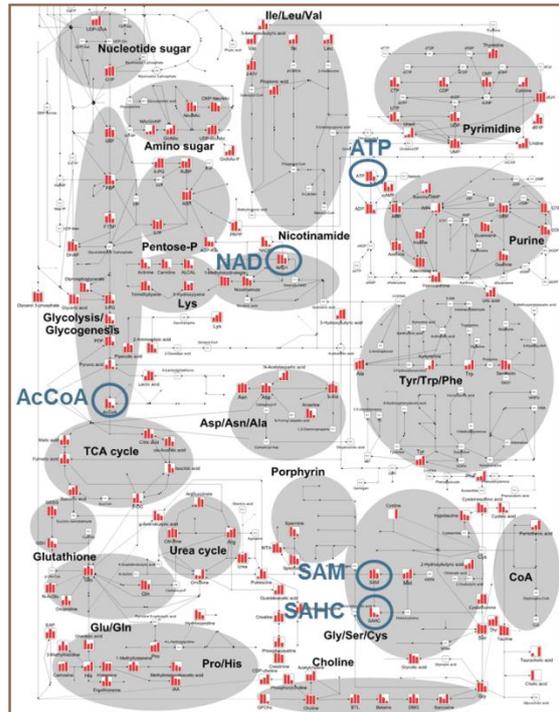


図3 インフルエンザウイルスに感染したマウス肺組織を用いたメタボローム解析 (未発表)



### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕 (計 7 件)

- ① Yang CY, Ramamoorthy S, Boller S, Rosenbaum M, Rodriguez Gil A, Mittler G, Imai Y, Kuba K, Grosschedl R. Interaction of CCR4-NOT with EBF1 regulates gene-specific transcription and mRNA stability in B lymphopoiesis. *Genes Dev.* 30(20):2310-2324 (2016). 査読有
- ② Tanaka KI, Tamura F, Sugizaki T, Kawahara M, Kuba K, Imai Y, Mizushima T. Evaluation of Lecithinized Superoxide Dismutase for Prevention of Acute Respiratory Distress Syndrome in Animal Models. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 56(2):179-190 (2017). 査読有
- ③ Blank T, Detje CN, Spieß A, Hagemeyer N, Brendecke SM, Wolfart J, Staszewski O, Zöller T, Papageorgiou I, Schneider J, Paricio-Montesinos R, Eisel UL, Manahan-Vaughan D, Jansen S, Lienenklaus S, Lu B, Imai Y, Müller M, Goelz SE, Baker DP, Schwaninger M, Kann O, Heikenwalder M, Kalinke

- U, Prinz M. Brain Endothelial- and Epithelial-Specific Interferon Receptor Chain 1 Drives Virus-Induced Sickness Behavior and Cognitive Impairment. *Immunity*. 44(4):901-12 (2016). 査読有
- ④ Katahira J, Dimitrova L, Imai Y, Hurt E. NTF2-like domain of Tap plays a critical role in cargo mRNA recognition and export. *Nucleic Acids Res*. 43(3):1894-904 (2015). 査読有
- ⑤ Demetz E, Schroll A, Auer K, Heim C, Patsch JR, Eller P, Theurl M, Theurl I, Theurl M, Seifert M, Lener D, Stanzl U, Haschka D, Asshoff M, Dichtl S, Nairz M, Huber E, Stadlinger M, Moschen AR, Li X, Pallweber P, Scharnagl H, Stojakovic T, März W, Kleber ME, Garlaschelli K, Uboldi P, Catapano AL, Stellaard F, Rudling M, Kuba K, Imai Y, Arita M, Schuetz JD, Pramstaller PP, Tietge UJ, Trauner M, Norata GD, Claudel T, Hicks AA, Weiss G, Tancevski I. The arachidonic acid metabolome serves as a conserved regulator of cholesterol metabolism. *Cell Metab*. 20(5):787-98 (2014). 査読有
- ⑥ Imai Y, Sakuma T, Imai H, Kuba K, Fujiwara S. Potential cellular targets for anti-influenza drug development. *Cellular Immunology and Immunotherapeutics*. 2016 In press 査読有
- ⑦ Imai Y. Role of omega-3 PUFA-derived mediators, the protectins, in influenza virus infection. *Biochim Biophys Acta* (4):496-502(2015). 査読有

〔学会発表等〕（研究代表者の招待講演）

（計 14 件）

- ① 今井由美子、ウイルス-宿主核内相互作用を標的としたウイルス感染症治療薬の可能性、千里ライフサイエンスセミナー、2016年11月15日、大阪市
- ② 今井由美子、ウイルス-宿主核内相互作用を標的としたインフルエンザ治療薬の可能性、感染症学会、2016年4月15日、宮城県仙台市
- ③ 今井由美子、インフルエンザウイルス感染に対する宿主核内応答機構、インターフェロン学会（招待講演）、2016年5月13日、長崎市
- ④ 今井由美子、Host-microbe interaction: Dynamic nuclear interaction between influenza virus and its host、第44回日本免疫学会学術集会、2015年11月18日、北海道札幌市
- ⑤ 今井由美子、感染症治療薬—現状と今後の可能性—、日本学術会議学術講演会、2015年11月25日、秋田市
- ⑥ 今井由美子、Dynamic nuclear interactions between influenza virus and its host、感染症研究グローバルネットワークフォーラム 2015、2015年11月14日、千葉市
- ⑦ 今井由美子、宿主核内ネットワークを標的としたインフルエンザ治療薬の可能性、新薬理学セミナー2015、2015年3月21日、富山市
- ⑧ 今井由美子、宿主核内ネットワークを標的とした抗ウイルス薬の可能性、日本ケミカルバイオロジー学会 第10回年会、2015年6月10日、宮城県仙台市
- ⑨ 今井由美子、インフルエンザウイルスの病原性発現を調節する核内ネットワーク、第8回日本エピジェネティクス研究会、2014年5月27日、東京
- ⑩ 今井由美子、Lipid Immunology: 脂肪酸代謝物によるウイルスの病原性発現調節機構、第35回日本炎症・再生医学会、2014年7月3日、沖縄県名護市
- ⑪ Yumiko Imai, Dynamic nuclear interactions between influenza virus and its host. RIKEN -JSI International Symposium on Immunology: Infection and Immunity 2015, June 19<sup>th</sup> 2015, Yokohama
- ⑫ Yumiko Imai, Host epigenetic responses to influenza virus infection. The 6th International Symposium of WPI IFRcC “Immunology at the Forefront”, February 23<sup>rd</sup> 2015, Osaka
- ⑬ Yumiko Imai, Dynamic nuclear interactions between influenza virus and its host. 2th World Congress of the Intensive Critical Care Medicine (WFSICCM), August 31<sup>st</sup> 2015, Soul, Korea
- ⑭ Yumiko Imai, Lipid metabolic signals control the pathology of influenza via RNA export machinery. International Symposium & Annual Meeting of the Korean Society for Microbiology and Biotechnology, June 27<sup>th</sup> 2014, Fusan, Korea

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

〔その他〕ホームページ等

研究室ホームページ

<http://www.imai-lab.com/>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

今井由美子 (IMAI, Yumiko)

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50231163

研究課題名：足場非依存性間欠性細胞分裂の転写制御と代謝  
Transcriptional Regulation and Metabolism of  
Anchorage-independent Intermittent Cell Division

研究期間：2014～2015

課題番号：26116707

研究代表者 加藤光保 (筑波大学 医学医療系 教授)

連携研究者 渡邊幸秀 (筑波大学 医学医療系 助教)

連携研究者 沖田結花里 (筑波大学 医学医療系 研究員)

【交付決定額（分配額）】

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2014 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2015 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000

**研究成果の概要：**種々のがんで転写因子 MafK や TMEPAI の発現が亢進している。MafK や TMEPAI は単層培養条件では細胞増殖を促進しないが、足場非依存性増殖を強く促進し、腫瘍形成を誘導する。転写因子 MafK は、上皮間葉転換と GPNMB の誘導を介して、腫瘍形成能を誘導することが示された。TMEPAI は SIM ドメインを介する TGF- $\beta$ /Smad 経路の抑制とともに、PY モチーフを介する機能も腫瘍形成に関与することが示された。また、領域での共同研究により MafK の SUMO 化修飾が上皮間葉転換と腫瘍形成能の誘導に必須であることが示唆された。

## 1. 研究の背景

通常の培養条件下で、上皮細胞株は足場に依存した連続した細胞分裂を持続する。これまで、足場非依存的な培養条件下での分裂増殖動態について詳しく報告された例はないが、私達は、マウス乳腺上皮細胞 NMuMG などの腫瘍形成能のない細胞は、足場非依存的なスフェア培養条件下で、間欠的な細胞分裂と連続的な細胞分裂を行う分化段階の階層性が生じ、分裂細胞数と細胞死のバランスが取れた段階で一定の大きさのスフェアを維持するようになること、さらに、がん細胞や転写因子 MafK を過剰発現させて形質転換した細胞では、分裂する細胞数の持続的な増加をもたらされスフェアが大きくなり続けるようになり、マウスの皮下に移植すると腫瘍形成能を獲得していることを見いだした。細胞集団としての足場非

依存性持続増殖能の獲得は、多くのがん遺伝子の発見をもたらした細胞がん化の *in vitro* の特性であり、間欠的な細胞分裂は、いわゆる幹細胞の分裂増殖動態の特性であると予測されるがその本態は不明である。また、並行して行っているシミュレーション研究では、幹細胞の間欠性均等分裂と有限回数しか分裂能をもたない連続性分裂細胞の幹細胞への逆移行が細胞集団としての足場非依存性持続増殖能の獲得をもたらすことが示されているが、その実験的証明はなされていない。

## 2. 研究の目的

足場非依存的なスフェア形成培養では、通常の付着平面培養とは全く異なった細胞分裂動態が見られる。本研究は、転写因子 MafK と TMEPAI のスフェア形成誘導能についてその分子機能を解析すると

ともに、スフェア培養時において間欠的に分裂増殖する幹細胞集団と連続して分裂増殖する細胞集団を分離し、転写因子の発現パターンと修飾転移酵素による書き込みの変化を同定することを目的とした。また、メタボローム解析によるエネルギー代謝の変化を解析するとともに MafK などのがん化を誘導することを見いだした転写因子がスフェア内細胞分裂動態に及ぼす作用を明らかにすることを目指した。

### 3. 研究成果

#### (1) 分子作用機序の解明

TMEPAI は、TGF- $\beta$  シグナルによって誘導されることをすでに報告しているが、EGF シグナルが加わると TMEPAI の発現が協調的に増加することを示した。また、がん細胞では、TMEPAI の発現亢進に EGF シグナルが関与していた (論文②)。TGF- $\beta$  による TMEPAI の発現誘導には、TCF7L2 が関与しているが、ファミリー分子の LEF1 にはこの作用がない。TCF7L2 の分子構造の解析から LEF1 にはない C 末端領域が TMEPAI の発現誘導に必要であることが示された (論文①)。肺腺がん細胞には、TMEPAI の持続的な発現があり、これをノックダウンすると足場非依存的なスフェア形成能、皮下腫瘍形成能、尾静脈注射による肺腫瘍形成能が低下することをすでに報告している (Vo Nguyen TT *et al.*, 2014)。また、TMEPAI と C18orf1 のノックアウトマウスと Apc<sup>Min/+</sup>マウスを交配し、大腸腺腫の発生に対する TMEPAI ファミリーの作用に関する検討を行っている。TMEPAI は TGF- $\beta$ /Smad 経路を抑制する活性があり、TMEPAI のノックダウンは TGF- $\beta$  による細胞増殖抑制を解除することで腫瘍形成を促進することが示唆されたが、他の分

子機構も働いていることを示すデータが得られ、さらに解析を続けている。また、TMEPAI のファミリー分子である C18orf1 にも TMEPAI と同様の TGF- $\beta$ /Smad シグナル経路の抑制活性があることを示した (論文③)。TGF- $\beta$  シグナル以外に対する作用についても、TMEPAI と同時に解析を進めている。さらに、TMEPAI 自身にも 4 種類のアイソフォームがあることが知られるようになり、アイソフォーム間での機能の違い、腫瘍形成能の違いに関する検討も行っている。

TGF- $\beta$  は乳腺上皮細胞などに上皮間葉転換 (EMT) を誘導する (図書・総説①②)。MafK は、TGF- $\beta$  によって発現が誘導されたが (Okita Y *et al.*, J. Biol. Chem. 2013)、MafK 単独の発現で EMT を誘導する活性を持ち、乳がん細胞の悪性化に伴って発現が亢進していた。また、強力な腫瘍形成促進作用をもつこと、膜タンパク質である GPNMB の発現を誘導することも腫瘍形成の促進に関与していることを見いだした (Okita Y *et al.*, in revision)。MafK は、種々の上皮細胞でも発現し機能している。特に、幹細胞の機能を制御していることが乳腺上皮細胞や乳がん細胞でも明らかになってきた。

#### (2) 足場非依存性増殖とは

TMEPAI と MafK は、がん幹細胞の特性とされる足場非依存的なスフェア形成を誘導した。単層培養時には、対数増殖期にほとんどすべての細胞が細胞周期を回っており、基本的には任意の細胞からクローンを樹立することが可能であるが、幹細胞マーカー遺伝子 (Sox2, Nanog, CD44) の発現は低く、スフェア形成能を有する細胞はごく少数である。一方、スフェア培養時では、TMEPAI や MafK の

発現に依存してスフェアの持続的増殖が見られたが、この細胞集団の中には、細胞周期を回っている細胞と増殖が停止している細胞が混在し、増殖が停止している細胞に幹細胞マーカー遺伝子の強い発現が見られた。また、これらの遺伝子は、スフェア培養時の幹細胞の増加を誘導していた。幹細胞数の増加誘導機序については、現在、さらに検討を加えているが、幹細胞の分裂速度に対する作用とは異なる機序が示唆された。

### (3) 臨床病理学研究

TMEPAI と MafK に対する抗体を作製し、TMEPAI に対する抗体は企業に導出した。GPNMB に対する抗体は市販のもののが十分高く、これを用いて検討した結果、GPNMB は全発現量よりも、その翻訳後修飾や細胞内分布の制御が腫瘍形成能に重要な役割を果たすことが示唆された。

## 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計4件)

- ① Nakano N, Kato M, Itoh S. Regulation of the TMEPAI promoter by TCF7L2: the C-terminal tail of TCF7L2 is essential to activate the TMEPAI gene. *J Biochem.* 159: 27-30, 2016. 査読有
- ② Azami S\*, Vo Nguyen TT\*, Watanabe Y and Kato M. Cooperative induction of transmembrane prostate androgen induced protein TMEPAI/PMRPA1 by transforming growth factor- $\beta$  and epidermal growth factor signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 456: 580-585, 2015. 査読有 (\*equal contribution)doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.107.
- ③ Nakano N, Maeyama K, Sakata N, Itoh F, Akatsu R, Nakata M, Katsu Y, Ikeno S, Togawa Y, Vo Nguyen TT, Watanabe Y, Kato M and Itoh S. C18 ORF1: A Novel Negative Regulator of TGF- $\beta$  Signaling. *J. Biol. Chem.* 289: 12680-12692, 2014. 査読有 doi: 10.1074/jbc.M114.558981.

- ④ Nakano N, Maeyama K, Sakata N, Itoh F, Akatsu R, Nakata M, Katsu Y, Ikeno S, Togawa Y, Vo Nguyen TT, Watanabe Y, Kato M and Itoh S. C18 ORF1: A Novel Negative Regulator of TGF- $\beta$  Signaling. *J. Biol. Chem.* 289: 12680-12692, 2014. doi: 10.1074/jbc.M114.558981. 査読有

〔学会発表等〕(研究代表者の招待講演)

(計3件)

- ① Mitsuyasu Kato, Roles of MafK and Gpnmb in malignant progression of breast cancer. The 4th International Symposium by JSPS Core-to-Core Program “Cooperative International Framework in TGF- $\beta$  Family Signaling”. 平成 27 年 1 月 12-13 日、つくば国際会議場、茨城県
- ② Mitsuyasu Kato, How does cancer grow? The 1st Asian Researcher Symposium 2016 平成 28 年 4 月 25-27 日、Universitas Indonesia, Indonesia
- ③ 加藤光保、転写因子 MafK は TGF- $\beta$  によって誘導され、腫瘍形成を促進する、第 75 回日本癌学会学術総会、平成 28 年 10 月 7 日、パシフィコ横浜、神奈川県

〔図書〕(計2件)

- ① Valcourt U, Carthy J, Okita Y, Alcaraz L, Kato M, Thuault S, Bartholin L, Moustakas A. Analysis of Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Transforming Growth Factor  $\beta$ . *Methods Mol. Biol.* 1344:147-181, 2016. doi:10.1007/978-1-4939-2966-5\_9.
- ② 加藤光保, 沖田結花里, 上皮間葉移行. *病理と臨床* 32(10): 1163-1167, 文光堂、2014.

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

〔その他〕ホームページ等

研究室ホームページ

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/epathol/>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤光保 (KATO, Mitsuyasu)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：20194855

### (2) 連携研究者

渡邊幸秀 (WATANABE, Yukihide)  
筑波大学・医学医療系・助教  
研究者番号：40618534

沖田結花里 (OKITA, Yukari)  
筑波大学・医学医療系・研究員  
研究者番号：30743710

研究課題名：腸内代謝バランスに基づく転写制御機構の解明  
Transcriptional Regulation by intestinal metabolism

研究期間：2014～2015

課題番号：26116709

研究代表者 長谷耕二（慶應義塾大学 薬学部 教授）

連携研究者 福田真嗣（慶應義塾大学 先端生命科学研究所 特任准教授）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2014 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2015 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000

**研究成果の概要：**腸内細菌が産生する代謝物は宿主細胞のエネルギー源となるほか、宿主の免疫系や代謝系を調節している。本研究では、無菌マウスに腸内細菌を定着させたマウスにおいて、大腸上皮細胞の増殖の動態を解析した。その結果、腸内細菌の定着は大腸上皮細胞の活発な増殖応答と機能成熟を促すことを明らかにした。さらに、免疫系においては一過性にエフェクターT細胞が活性化した後、制御性T細胞が誘導されエフェクターT細胞の過剰な応答が抑制されることが判明した。この際に糞便および盲腸内容物のメタボローム解析を実施し、上皮および免疫系を制御する代謝物の探索を行った。

### 1. 研究の背景

ヒトの消化管には、体細胞の総数を上回る膨大な数の腸内常在菌が生息している。腸内細菌は、宿主の消化酵素では分解できない食物せんいなどを微生物発酵により分解し、終末代謝産物として様々な低分子化合物を産生している。宿主はこれらの『発酵代謝産物（以下、発酵産物）』をエネルギー源として利用している。腸内細菌によって供給される短鎖脂肪酸は腸上皮にとって最も重要な栄養源である。加えて、腸内細菌は糖・脂質代謝の補酵素となるビタミンB群を宿主に供給している。腸上皮は体内でもっとも細胞増殖の盛んな場所の一つであり、絶えず新生とアポトーシスを繰り返し、マウスでは約3日間で、ヒトでは約5日間で全体が入れ替わる素早い細胞代謝回転を行っている。腸上皮は発酵産物を有効に利

用することでエネルギー(ATP)を獲得する以外に、ヒストンアセチル化やDNAメチル化の基質となるAcetyl-CoAやSAMなど生命素子の産生を増加させることが予想される。

### 2. 研究の目的

本研究では、発酵産物を起点とした転写調節とエネルギー代謝の相互作用を明らかにすることを試みた。

### 3. 研究成果

#### (1) 腸内細菌の定着が上皮細胞の性状に及ぼす影響の検討

腸上皮は体内でもっとも細胞増殖の盛んな場所の一つであり、絶えず新生とアポトーシスを繰り返し、マウスでは約3日間で、ヒトでは約5日間で全体が入れ替わる素早い細胞代謝回転を行っている。これは食物繊維などの機械的なスト

レスや消化酵素などで綻びを生じやすい単層上皮を修復する上でも、また、上皮細胞を感染の足場とする病原性微生物を排除するためにも重要である。しかしながら、無菌状態のマウスでは、上皮細胞の代謝回転は低下する傾向が認められた。一方、無菌マウスに腸内細菌叢を定着させて腸内発酵を促進させた際には、腸内細菌定着3日目において、クリプトにおける増殖細胞の数が約3倍に増加し、クリプト長も伸張することが判明した(図1)。その後、6日目以降には増殖細胞の数はやや低下したものの、無菌状態と比較して約1.5~2倍の増加を示した。

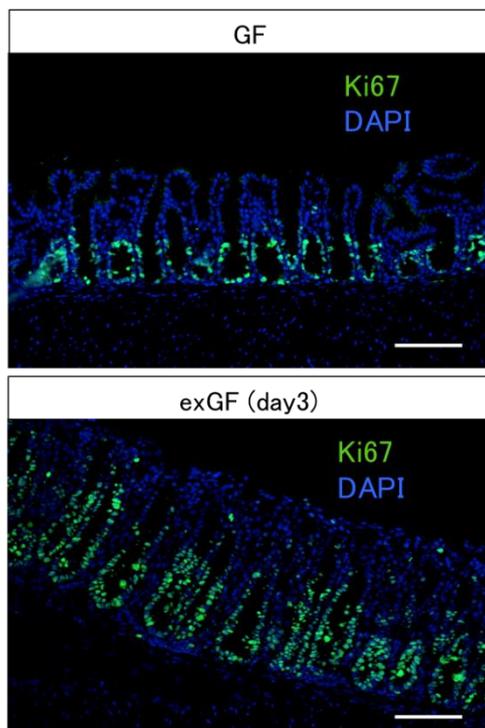


図1: 大腸上皮細胞の増殖に与える腸内細菌の影響。GFマウスおよび腸内細菌定着後3日目のexGFマウスの大腸組織において、増殖マーカーKi67に対する蛍光免疫染色を実施した。

大腸上皮細胞のトランスクリプトーム解析により、GFマウスと比較してexGFマウスで発現が上昇した遺伝子群をプロファイルし、gene ontologyに基づくfunctional enrichment analysisを行った。その結果、腸内細菌定着3日目ではcell

cycle関連の遺伝子群の上昇が顕著であった。一方で、腸内細菌定着6日目および9日目では、host defenseに関わる遺伝子群の上昇が特徴として認められた。以上の結果より、腸内細菌の定着は上皮細胞の一過性の過増殖をもたらした後に、バリア機能を成熟させることが明らかとなった。

## (2) 腸内細菌の定着に伴う上皮細胞の代謝変化

腸内細菌の定着による大腸上皮細胞の代謝変化を調べるために、CE-MSによる代謝物の一斉解析を行った。主成分解析の結果、GFマウスとexGFマウスの大腸上皮では全く異なる代謝物プロファイルを示すことが判明した。個々の代謝物の変化について見ていくと、exGFマウス由来の上皮細胞ではGFマウスの上皮細胞に比べて、ATP, NADH, アセチル CoA といったエネルギー代謝に関わる主要な代謝物の増加が観察され、高エネルギー状態にあることが示唆された。

## (3) 腸内細菌の定着に伴うヘルパーT細胞バランスの変動の解析

腸内細菌の定着は孤立リンパ小節の成熟を促し、IgA産生を高めることが知られている。その一方で、本来異物である腸内細菌に対する免疫応答は適度に調節され、炎症応答が起こらない仕組みが備わっているが、そのメカニズムについては不明な点が多い。我々は腸内細菌定着時における免疫の司令塔であるヘルパーT細胞バランスの変動を解析した。その結果、既報どおりGFマウスではSPF環境にて飼育したマウスに比べて、炎症やアレルギー反応を抑制するTreg細胞の減少が確認された。GFマウスに腸内細菌を定着させると、3日目までにIL-2を産生するエフェクターT細胞の増加が観察

された。しかし、その後、Treg 細胞が誘導されるに伴い、エフェクターT細胞は抑制されることが判明した。このように腸内細菌の増加は、一過性にエフェクターT細胞の誘導を促すものの、続いてTreg細胞が誘導されることで腸内細菌に対する過剰な免疫応答が抑制されると考えられる。このような変化は大腸組織にのみ認められ、脾臓などの全身免疫系では認められなかった。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計10件)

- ① Ohashi W, Kimura S, Iwanaga T, Furusawa Y, Irié T, Izumi H, Watanabe T, Hijikata A, Hara T, Ohara O, Koseki H, Sato T, Robine S, Mori H, Hattori Y, Watarai H, Mishima K, Ohno H, \*Hase K, \*Fukada T. Zinc Transporter SLC39A7/ZIP7 Promotes Intestinal Epithelial Self-Renewal by Resolving ER Stress. *PLoS Genet.* 12: e1006349, (2016). 査読有
- ② Li Y, Takahashi Y, Fujii S, Zhou Y, Hong R, Suzuki A, Tsubata T, \*Hase K, \*Wang JY. EAF2 mediates germinal centre B-cell apoptosis to suppress excessive immune responses and prevent autoimmunity. *Nat. Commun.* 7:10836 (2016). 査読有
- ③ Kimura S, Yamashita M, Yamakami-Kimura M, Sato Y, Yamagata A, Kobashigawa Y, Inagaki F, Amada T, Hase K, Iwanaga T, Ohno H, Fukai S. Distinct Roles for the N- and C-terminal Regions of M-Sec in Plasma Membrane Deformation during Tunneling Nanotube Formation. *Sci Rep.* 6: 33548 (2016). 査読有
- ④ Yamada T, Takahashi D, \*Hase K. The diet-microbiota-metabolite axis regulates the host physiology. *J Biochem.* 160: 1-10 (2016). 査読有
- ⑤ Hashimoto M, Bhuyan F, Hiyoshi M, Noyori O, Nasser H, Miyazaki M, Saito T, Kondoh Y, Osada H, Kimura S, Hase K, Ohno H, Suzu S. Potential Role of the Formation of Tunneling Nanotubes in HIV-1 Spread in Macrophages. *J Immunol.* 196: 1832-41 (2016). 査読有

- ⑥ Ohnmacht C, Park JH, Cording S, Wing JB, Atarashi K, Obata Y, Gaboriau-Routhiau V, Marques R, Dulauroy S, Fedoseeva M, Busslinger M, Cerf-Bensussan N, Boneca IG, Voehringer D, Hase K, Honda K, Sakaguchi S, Eberl G. The microbiota regulates type 2 immunity through ROR $\gamma$ t+ T cells. *Science* 349: 989-93 (2015). 査読有
- ⑦ Matsumura T, Sugawara Y, Yutani M, Amatsu S, Yagita H, Kohda T, Fukuoka S-I, Nakamura Y, Hase K, Ohno H and Fujinaga Y. Botulinum toxin A complex exploits intestinal M cells to enter the host and exert neurotoxicity. *Nat. Commun.*, 6: 6255 (2015). 査読有
- ⑧ Obata Y, Furusawa Y, Endo TA, Sharif J, Takahashi D, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Takahashi M, Ikawa T, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Tajima S, Ohara O, Honda K, Hori S, Ohno H, Koseki H and \*Hase K. Epigenetic regulator Uhrf1 is critical for functional expansion of colonic regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 15: 571-579, (2014). 査読有
- ⑨ \*Lee WJ and \*Hase K. Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nat. Chem. Biol.* 10:416-24 (2014). 査読有
- ⑩ Obata Y, Kimura S, Nakato G, Iizuka K, Miyagawa Y, Nakamura Y, Furusawa Y, Sugiyama M, Suzuki K, Ebisawa M, Fujimura Y, Yoshida H, Iwanaga T, \*Hase K, \*Ohno H. Epithelial-stromal interaction via Notch signaling is essential for the full maturation of gut-associated lymphoid tissues. *EMBO Rep.* 15:1297-304 (2014). 査読有

〔学会発表等〕(研究代表者の招待講演)

(計13件)

- ① Koji Hase, Epigenetic machineries facilitate mutualistic immune adaptation to microbial colonization in the gut. 109<sup>th</sup> Titisee Conference, Titisee, Germany, (2014/4/9)
- ② Koji Hase, Commensal microbiota shapes the gut immune system through epigenetic modifications. AGA-JSGE Joint Symposium in Digestive Disease Week 2014, Chicago, USA (2014/5/4)
- ③ 長谷耕二, 腸内細菌による免疫エピゲノム修飾機構の解明. 第38回阿蘇シンポジウム, 阿蘇(2014/7/25)
- ④ Koji Hase, Intestinal microbiota regulates the mucosal immune system

through epigenetic modifications. 第37回日本分子生物学会, 横浜, (2014/11/26)

- ⑤ Koji Hase. Symbiotic microorganisms regulate host physiology via interkingdom signaling. The 12th Japanese-German Frontiers of Science (JGFoS) Symposium. Kyoto (2015/10)
- ⑥ 長谷耕二. 腸内細菌による免疫エピゲノム修飾機構の解明. 千里ライフサイエンスセミナーJ1「粘膜免疫システムの解明と免疫疾患」大阪 (2015/5.11)
- ⑦ 石井功. システイン・活性イオウ分子産生酵素 CSE のアセトアミノフェン肝障害における保護的役割. 第42回日本毒性学会学術年会. 金沢 (2015/6/29)
- ⑧ 長谷耕二. 腸内細菌による免疫修飾作用の分子基盤. 第69回日本細菌学会東北支部総会. (2015/8)
- ⑨ 長谷耕二. 腸内細菌による代謝物を介した免疫調節メカニズムの解明. 第58回日本放線菌学会学術講演会. 東京 (2015/10/30)
- ⑩ 長谷耕二. 腸内代謝物による免疫修飾作用と炎症性腸疾患. 第2回生活習慣病のための機能性食品開発に関する研究会. 大阪 (2015/9/25)
- ⑪ 高橋大輔、長谷耕二. Commensal microbe-derived butyrate regulates the mucosal immune system. 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2015) 神戸 (2015/12)
- ⑫ 長谷耕二. 腸内細菌による Treg 誘導を介した炎症・アレルギー制御. 第24回関東アレルギークラブ. 東京 (2016/1)
- ⑬ Hase K. DNA methylation machinery in Treg cells prevents inflammatory response to microbial colonization. The 89th Annual Meeting of Japanese Society of Bacteriology. Osaka (2016/3/25)

〔図書〕 (計1件)

- ① 長谷耕二. 腸内細菌定着とエピゲノム変化. 「ヒトマイクロバイオーーム研究最前線.」 472 頁, (株) エヌ・ティー・エス (2014)

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

〔その他〕 ホームページ等

研究室ホームページ

<http://square.umin.ac.jp/keio-dbc/>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

長谷耕二 (HASE, Koji)

慶應義塾大学・薬学部・教授

研究者番号：20359714

### (2) 連携研究者

福田真嗣 (FUKUDA, Shinji)

慶應義塾大学・先端生命研・

特任准教授

研究者番号：80435677

研究課題名：分化条件下で ES 細胞の静止状態を維持する転写・代謝クロストーク  
 Regulation of transcription and metabolism for governing dormant pluripotent state of embryonic stem cells

研究期間：2014～2015

課題番号：26116712

研究代表者 豊島 文子（京都大学 ウイルス研究所 教授）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2014 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2015 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000

**研究成果の概要：** ES 細胞の *in vitro* 分化誘導系において未分化細胞が残存することが知られているが、これらの細胞の特性は不明である。本研究は、未分化残存細胞に特徴的な転写・代謝機構の解明を目的とした。まず、未分化残存細胞は多能性を維持したまま増殖を停止した「休眠多能性状態」にあり、ES 細胞とは異なる特徴的な転写因子や代謝制御因子の遺伝子発現プロファイルを示すことを明らかにした。また、転写因子 FoxO3 が休眠多能性細胞の多能性維持に必要であることを解明し、FoxO3 や休眠多能性状態をターゲットとした残存未分化細胞の除去法の可能性を示唆した。

1. 研究の背景

ES 細胞を *in vitro* で目的の細胞に分化させる手法については、これまで多くの研究がなされ、より効率良く分化させる実験系の確立が模索されてきた。しかしどの分化誘導系でも一部の細胞が未分化状態で残るため、移植後ががん化することが懸念され、臨床応用を考える上で大きな課題となっている。これまで、分化条件下でも未分化のまま残る細胞群は、分化シグナルが適切に活性化しなかったため「分化に失敗した」細胞群であると考えられてきた。しかし最近の研究から、生体内の幹細胞は、増殖性を抑制しつつ未分化能を維持する「静止状態」を保つための積極的な機構を持ち、また静止状態では低酸素反応系などの特異的な代謝経路が活性化していることも分かっている。更に、成体の組織には極少数の ES 細胞様の多分化能をもつ幹細胞が静止状態で存在することが報告されている。

このことから、ES 細胞の分化誘導系においても、一部の細胞では、特異的な代謝経路の活性化、未分化維持、増殖能低下を特徴とする「静止状態」が積極的に作り出されている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究で我々は、分化条件下で未分化を維持する ES 細胞の特性を解明し、特異的な遺伝子プロファイルの同定と代謝状態の解明を目指した。更に、未分化維持に必要な転写因子と代謝経路を特定し、代謝経路と転写ネットワークとの相互依存性の解明を目的とした。

3. 研究成果

(1) ES 細胞の分化誘導系における残存未分化細胞は Foxo3 依存的に休眠多能性状態を維持している。

本研究では、マウス ES 細胞を高効率な神経誘導法である SFEBq 法で分化誘導して、未分化のまま残る細胞の性質を解析

した。その結果、大半の細胞が神経細胞へ分化するなかで、1-5%の細胞は多能性マーカーである Oct4 の発現を維持し、また ES 細胞と同様に多能性と自己複製能を保持していた。しかし、これらの残存未分化細胞では細胞増殖が著しく低下し、細胞周期の進行を阻害する CDK インヒビター p21 の発現が上昇していた。これらの残存未分化細胞は、SFEBq 法の 2 次分化誘導下時においてもほとんど増殖・分化せず、かつ多能性を保持し続けたことから、「休眠多能性状態」にあることが分かった。また、LIF と血清を含む培地で培養すると再び ES 細胞様の性質を示したことから、休眠多能性状態は可逆的であることが分かった。更に、蛍光希釈アッセイと細胞周期解析から、休眠多能性細胞は SFEBq 法の 5-7 日目に出現することが明らかとなった。次に DNA マイクロアレイ解析を行った結果、休眠多能性細胞は通常の ES 細胞と比較してクロマチン構造や発生に関わる転写因子群の発現パターンが大きく異なることが分かった。また、脂質代謝制御に関わる因子の発現量も大きく変化していた。このうち、組織幹細胞の静止状態に必須である転写因子 FoxO3 について解析した。その結果、FoxO3 をノックダウンすると休眠多能性細胞の多能性が損なわれることが分かった。この時、細胞増殖能の停止状態には影響は無かった。また、SFEBq 法だけでなく、EB 法による三胚葉分化において残存する未分化細胞も FoxO3 に依存して多能性を維持していた。さらに、FoxO3 の阻害活性をもつ AS1842856 の処理により、休眠多能性細胞の多能性と自己複製能が損なわれた。これらのことから、ES 細胞は休眠状態に移行することにより、特異的な転写因子プロファイルを

獲得して LIF/血清非依存的に多能性を維持する能力を持つことが明らかとなった (図 1) (*Mol. Cell Biol.* 2017)。

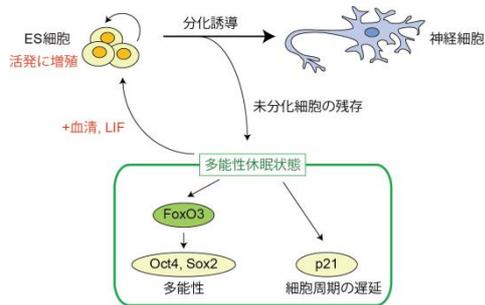


図 1 ES 細胞は休眠多能性状態に移行する

(2) 休眠多能性細胞の代謝経路の解析 DNA マイクロアレイと qPCR 解析の結果、休眠多能性細胞では脂肪酸β酸化に関連する酵素の発現量が上昇していた。そこでフラクッサアナライザーによる代謝解析を行った結果、休眠多能性細胞では酸化的リン酸化と解糖系の活性が ES 細胞よりも顕著に低下しており、また、解糖系よりも脂肪酸β酸化に依存して電子伝達系を駆動していることが分かった。更にエトモキシルにより脂肪酸β酸化を抑制したところ、ES 細胞で見られる ECAR の上昇が休眠多能性細胞では観察されなかった。かつ、ピルビン酸からアセチル CoA の合成を阻害する Pdk4 の発現が上昇していたことから、休眠多能性細胞では解糖系と TCA 回路が脱共役していることが示唆された。休眠多能性細胞における脂肪酸β酸化の機能を検討するため、脂肪酸β酸化に関わる酵素 (Lpl, Hadh, Bdh) を shRNA によりノックダウンした結果、いずれの場合においても SFEBq 法において残存する未分化細胞の割合が増加した。更に、SFEBq 法の 2 次培養にエトモキシルを添加したところ、多能性と自己複製能は維持したまま、細胞増殖が回復する傾向が観察された。これらの結果から、休眠多能性細胞は脂肪酸β酸化依

存的に休眠状態を維持している可能性が示唆された。脂肪酸 $\beta$ 酸化と休眠状態を繋ぐ転写ネットワークの解明が今後の課題である。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計1件)

- ① Ikeda, M. and Toyoshima, F. Dormant pluripotent cells emerge during neural differentiation of embryonic stem cells in a FoxO3-dependent manner. **Mol. Cell. Biol.** pii: MCB.00417-16 (2016)  
査読有 (掲載号のSpotlightに選定)

〔学会発表等〕(計4件)

- ① Ikeda, M. and Toyoshima, F. Dormant Pluripotent Cells Emerge during Neural Differentiation of Embryonic Stem Cells. Society for Developmental Biology, the 75<sup>th</sup> Annual Meeting, Boston, August 4-8, 2016.
- ② 池田愛、豊島文子、ES細胞の神経誘導下においてFoxO3依存的に休眠状態の多能性細胞が出現する 第39回日本分子生物学会年会、横浜、2016年11月30日-12月2日
- ③ Ikeda, M. and Toyoshima, F. Dormant cells emerging from Embryonic Stem Cells sustain pluripotency in differentiation condition”, East Asia Joint Symposium, Okinawa, 10-15 November, 2015.
- ④ 池田愛、豊島文子、神経分化誘導下におけるES細胞の休眠状態への移行、第38回日本分子生物学会年会、神戸、2015年12月1-4日

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.infront.kyoto-u.ac.jp/research/lab32/>

研究成果掲載ホームページ

<http://www.infront.kyoto-u.ac.jp/achievements/post-1237/>

#### 5. 研究組織

(1) 研究代表者

豊島文子 (TOYOSHIMA, Fumiko)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：40397576

研究課題名：細胞内メチレーションリズムと時計遺伝子 mRNA 制御のクロストークの分子基盤

研究期間： 2014～2015

課題番号： 26116713

研究代表者 F U S T I N J M (京都大学 大学院薬学研究科 特定研究員)

連携研究者 岡村 均 (京都大学 大学院薬学研究科 教授)

連携研究者 土居 雅夫 (京都大学 大学院薬学研究科 准教授)

連携研究者 山口 賀章 (京都大学 大学院薬学研究科 助教)

【交付決定額（分配額）】

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2014 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2015 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000

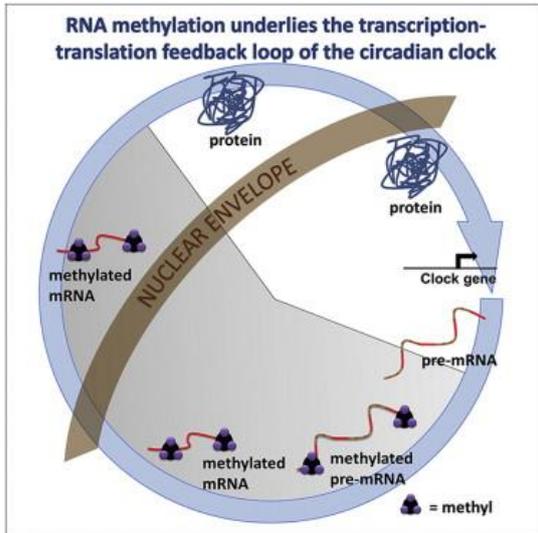
研究成果の概要： While it is known that the biological clock is under the control of m6A RNA methylation (the N-6 methylation of internal adenosines in mRNA), with many clock-related transcripts being methylated, what is the role of m6A in the regulation of their expression is unknown. Moreover, the physiological function of m6A in adult animals remains unknown since mRNA m6A methyltransferase (Mettl3) knock-out mice die before birth. Here, by studying the role of m6A in the expression control of a kinase (Kinase X, KX), critical for the function of the circadian clock and other fundamental cellular processes and encoded by a highly-methylated transcript, we have simultaneously answered the two questions notably by specifically inhibiting the methylation of KX transcripts via CRISPR-cas9 gene editing.

1. 研究の背景

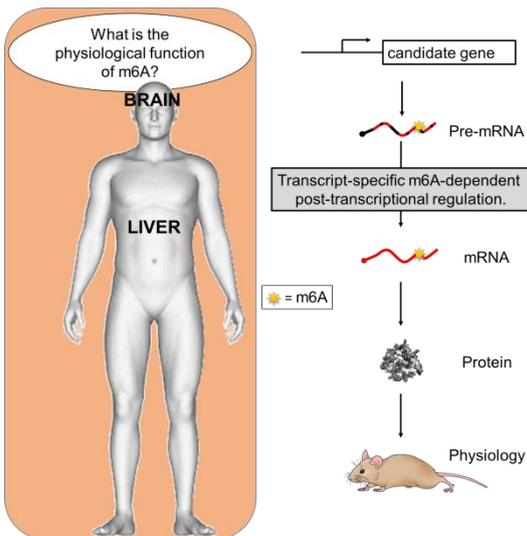
The circadian clock is composed of a transcription-translation negative feedback loop (TTFL) in which clock genes regulate their own expression and that of output genes to control rhythmic physiology and behaviour. This TTFL is so tightly regulated that subtle adjustments in transcription, splicing, RNA processing and translation rates of these clock genes will have dramatic effects on the behaviour of the animal.

In 2013 we reported that m6A was a circadian pacesetter, and demonstrated

that without m6A, such as when the m6A methyltransferase Mettl3 is silenced, the period of the circadian clock, normally around 24 hours, elongated to over 30 hours (*Cell* 2013). Specific mechanisms were however not reported.



## 2. 研究の目的



The main purpose of this research was to identify the tissue-specific physiological function of m6A and the function of m6A in the control of candidate transcripts. This was achieved using a combination of conditional Mettl3 knock out mice with CRISPR-Cas9 gene editing.

## 3. 研究成果

By m6A mRNA-immunoprecipitation followed by RNA-sequencing of the

liver transcriptome, we have identified that Kx is one of the clock-related transcripts with the highest m6A levels, which we located in the 3'-UTR. Surprisingly however, the expression of this transcript does not oscillate like that of many other clock genes. Since m6A has been reported to regulate dynamic RNA processing, what is then the role of such high m6A levels in a constitutive transcript?

To understand this question, we first silenced in vitro the expression of Mettl3 and Mettl14, the two m6A "writers", and observed how the expression of Kx protein was affected. Simultaneously, we also determined the role of the 2000bp 3'-UTR of Kx. We found the 3'-UTR is a negative regulator of Kx translation, and methylation of the 3'-UTR facilitates both translation and degradation of its mRNA.

To confirm these experiments in vivo, we then generated, by CRISPR-Cas9, mutant animals that lack a 43 bp in the genomic region corresponding to the methylated locus of the 3'-UTR of Kx. We confirmed that -43/-43 homozygous animals have lower Kx mRNA methylation levels in the liver compared to wild-type controls, and that the expression of KX proteins in the liver was higher than wild-type

controls. Interestingly, locomotor activity rhythms analysis revealed that the non-coding -43 mutation was sufficient to cause a circadian period elongation (wild-type, 23.55h +/- 0.13; -43/-43, 23.83h +/- 0.08, n = 3).

Next, we identified the mechanisms whereby an increase in Kx results in period elongation. Indeed, this result was surprising because available evidence showed that an increase in Kx normally lead to a shortening of period. During our investigations, we discovered two alternative transcripts coding for two uncharacterized isoforms of Kx. We studied the respective roles of these two isoforms and observed that the two isoforms have antagonistic function: while Kx1 accelerates the circadian clock by promoting degradation of its clock-related target phosphoproteins and underlies previously published observations on Kx, Kx2 instead stabilizes its targets and slows the circadian clock down. We are currently pursuing these investigations actively, notably by generating Kx1 or Kx2 overexpressing knock-in mice (in the ROSA locus), as well as Kx2-specific conditional knock-out mice. We are preparing a manuscript reporting these discoveries.

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計2件)

- ① Kumiko Dojo, Yoshiaki Yamaguchi, **Jean-Michel Fustin**, Masao Doi, Masaki Kobayashi, Hitoshi Okamura. Carbachol Induces Phase-dependent Phase Shifts of Per1 Transcription Rhythms in Cultured Suprachiasmatic Nucleus Slices. *J Biol Rhythms*. February 1, 2017 (online). 32(2):101-108. doi: 10.1177/0748730417691205. 査読有
- ② Doi M, Satoh F, Maekawa T, Nakamura Y, **Fustin JM**, Tainaka M, Hotta Y, Takahashi Y, Morimoto R, Takase K, Ito S, Sasano H, **Okamura H**. Isoform-specific monoclonal antibodies against 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase family provide markers for subclassification of human primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Feb;99(2):E257-62. doi: 10.1210/jc.2013-3279. 査読有

〔学会発表等〕(研究代表者の招待講演)

(計7件)

- ① m6A mRNA methylation controls the expression of two antagonistic Kx Isoforms. **Fustin JM**, MBSJ2016, Symposium 1AS3, Epitranscriptome regulation by RNA modifications, organized by Prof. Kazuhiko Igarashi, 2016/11/30, Yokohama.
- ② m6A mRNA methylation is coupled to transcription but enhance dynamic changes in mRNA levels. **Fustin JM**, TGSW2015, Frontier Science on Transcription and Metabolism, 2015/09/30 Tsukuba.
- ③ What is the most important trait or characteristic to be a successful scientist? **Fustin JM**, TGSW2015, Frontier Science on Transcription and Metabolism, Career Session, 2015/09/30 Tsukuba.
- ④ m6A shows its mettle. **Fustin JM**, Meeting of the Society for Research on Biological Rhythms, Slide session D 21, 2014/06/15, Montana, USA.

- ⑤ m6A RNA methylation sets the pace of the circadian clock. Fustin JM, Molecular Clock 2015, Shiran Kaikan, Kyoto.
- ⑥ RNA Methylation and Metabolic Cycle, Fustin JM, RNA and Clock, 2015, Yumebutai, Awaji.
- ⑦ m6A shows its mettle and resists investigation. Fustin JM, 第21回日本時間生物学会学術大会 S2-7、2014/11/7 九州大学医学部.

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

FUSTIN, Jean-Michel

京都大学・大学院薬学研究科・

特定研究員

研究者番号：50711818

### (2) 連携研究者

岡村均 (OKAMURA, Hitoshi)

京都大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：60158813

土居雅夫 (DOI, Masao)

京都大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：20432578

山口賀章 (YAMUGUCHI, Yoshiaki)

京都大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：30467427

研究課題名：エネルギー代謝と転写制御をつなぐ新規ヒストンコードリーダーに関する研究  
Investigation of a novel histone code reader linking energy metabolism with transcriptional regulation

研究期間：2014～2015

課題番号：26116715

研究代表者 西 英一郎（京都大学 大学院医学研究科 准教授）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2014 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2015 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000

**研究成果の概要：**メタロペプチダーゼ nardilysin (NRDC)は、細胞内外で異なる機能を持つ多機能タンパク質であり、核内では H3K4me2 への修飾特異的結合を介して標的遺伝子の転写を制御する。NRDC 欠損マウスは低体温、糖代謝異常など多彩なエネルギー代謝系表現型を呈する。本研究は、NRDC のヒストンコードリーダー、そして転写コレギュレーターとしての機能の、エネルギー代謝における役割を解明することを目的とした。結果として、膵β細胞に発現する NRDC がグルコース反応性インシュリン分泌を制御していること、そのメカニズムとして NRDC がβ細胞特異的転写因子 MafA の転写を調節していることを示した。

1. 研究の背景

ヒストンの翻訳後修飾は、修飾部位特異的に結合するタンパク質（ヒストンコードリーダー）を介して、転写制御に重要な役割を果たしている。Nardilysin (NRDC)は、主に細胞質に存在する可溶性の酵素で明らかなシグナルペプチドを有さないが、未知の経路で細胞外に分泌される。一方典型的な核移行、核外移行シグナルも有さないが、核と細胞質をシャットリングする。これまで我々は主に NRDC の細胞外機能（細胞外ドメインシグナル増強活性）に焦点を当てて研究してきた（EMBO J. 2001, JBC 2006, Nat Neurosci. 2009, EMBO Mol Med 2012 など）が、最近 NRDC の核内における機能、すなわち、1) NRDC が新規修飾特異的 H3 (H3K4me2) 結合タンパク質であること、2) NCoR/SMRT コリプレ

ッサー複合体と結合すること、3) PGC-1α と結合し、細胞・個体レベルにおける熱産生遺伝子転写制御に関わっていること、4) 同転写制御活性に NRDC の酵素活性が必要であること、を明らかにした（JBC 2012, Nat Commun 2014）。NRDC は既知のメチル化認識ドメインを持たない新しいヒストンコードリーダーであり、さらに、転写リプレッサーおよびコアクチベーター双方に結合する転写スイッチングに関わる分子である可能性、プロテアーゼ活性を介して転写制御に関わる可能性が示唆された。NRDC 欠損マウスは、低体温、寒冷不耐性、糖代謝異常など多彩な代謝系表現型を呈している。この新規転写制御因子の、標的遺伝子プロモーター上での挙動を明らかにし、個体レベルの代謝制御にいかにつながっているのかを解明する。

## 2. 研究の目的

本研究は、以下の3点を主たる目的として進めた。1) NRDC の標的遺伝子の網羅的同定、2) NRDC 酵素活性の転写調節機能における役割の検討、3) 個体レベルの代謝調節における NRDC の転写調節機能の役割の解明。1)、2)については、NRDC 欠損 MEF 細胞に野生型あるいは不活性型 NRDC を再導入した細胞 (NRDC<sup>-/+</sup>WT、NRDC<sup>-/+</sup>E>A 細胞) を用い解析した。3)については、NRDC 欠損マウス、膵β細胞特異的を用いて、糖代謝制御における NRDC の臓器特異的な機能を明らかにした。

## 3. 研究成果

1) NRDC の標的遺伝子の網羅的同定、  
2) NRDC 酵素活性の転写調節機能における役割の検討：野生型 MEF 細胞 (NRDC<sup>+/+</sup>)、NRDC 欠損 MEF 細胞 (NRDC<sup>-/-</sup>)、NRDC 欠損 MEF 細胞に野生型あるいは不活性型 NRDC を再導入した細胞 (NRDC<sup>-/+</sup>WT、NRDC<sup>-/+</sup>E>A 細胞) の遺伝子発現解析 (RNA-seq) から、NRDC の酵素活性依存性あるいは非依存性に発現がレスキューされる NRDC 依存性遺伝子群を抽出した。一方、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) に使用可能な抗体を作製し、ChIP シーケンスを行い、NRDC がプロモーター、エンハンサー領域に存在する NRDC 結合遺伝子群を抽出した。それらの結果を統合し、MEF における NRDC の標的遺伝子群を同定した (論文準備中)。  
3) 個体レベルの代謝調節における NRDC の転写調節機能の役割の解明：糖代謝における NRDC の役割を明らかにするために、糖負荷試験、インスリン負荷試験を行ったところ、*Nrdc*<sup>-/-</sup>マウスは著

明なインスリン分泌不全とインスリン感受性の亢進を示し、NRDC が糖代謝における重要な制御因子であることがわかった。

次に、*Nrdc*<sup>-/-</sup>マウスの全身表現型の二次的な影響を除外し、膵β細胞における NRDC の役割を明らかにするために、β細胞特異的 NRDC 欠損 (βKO) マウスを用いた解析を行った。βKO マウスにおける糖負荷試験では、*Nrdc*<sup>-/-</sup>マウスと同様に、著明なインスリン分泌反応の減弱と耐糖能異常を認め、膵β細胞の NRDC がインスリン分泌に重要な役割を果たすことが確認できた。

*Nrdc*<sup>-/-</sup>膵島における遺伝子発現を見ると、GLUT2 や Glucokinase などグルコースの取込みや利用に関わる遺伝子群の発現が低下していた。次にそれらの遺伝子上流にある膵β細胞特異的転写因子群について解析したところ、特に *MafA* の発現が低下していることがわかった。また、β細胞株である MIN6 を用いて ChIP を施行したところ *MafA* の enhancer 領域のクロマチンに NRDC が結合していることがわかり、β細胞において、NRDC が *MafA* の発現調節を介してインスリン分泌を制御していることが示唆された (Diabetes 2016)。

## 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕 (計6件)

- ① Ishizu-Higashi S, Seno H\*, Nishi E\*, Matsumoto Y, Ikuta K, Tsuda M, Kimura Y, Takada Y, Kimura Y, Nakanishi Y, Kanda K, Komekado H, Chiba T (\*Co-corresponding author). Deletion of nardilysin prevents the development of steatohepatitis and liver fibrotic changes. *PLOS ONE* 9(5): e98017 (2014)査読有
- ② Tien DN, Kishihata M, Yoshikawa A, Hashimoto A, Sabe H, Nishi E, Kamei

K, Arai H, Kita T, Kimura T, Yokode M, Ashida N. AMAP1 as a negative-feedback regulator of nuclear factor- $\kappa$ B under inflammatory conditions. *Sci Rep.* 4:5094 (2014) 査読有

- ③ Nishi K, Sato Y, Ohno M, Hiraoka Y, Saijo S, Sakamoto J, Chen PM, Morita Y, Matsuda S, Iwasaki K, Sugizaki K, Harada N, Mukumoto Y, Kiyonari H, Furuyama K, Kawaguchi Y, Uemoto S, Kita T, Inagaki N, Kimura T and \***Nishi E**. Nardilysin is Required for maintaining Pancreatic  $\beta$ -Cell Function. *Diabetes* 65: 3015-27 (2016) 査読有
- ④ Yoon WH, Sandoval H, Nagarkar-Jaiswal S, Jaiswal M, Yamamoto S, Haelterman NA, Putluri N, Putluri V, Sreekumar A, Tos T, Aksoy A, Donti T, Graham BH, Ohno M, **Nishi E**, Hunter J, Muzny DM, Carmichael J, Shen J, Arboleda VA, Nelson SF, Michael F, Wangler MF, Karaca E, Lupski JR, and Bellen HJ. Loss of Nardilysin, a mitochondrial co-chaperone for  $\alpha$ -Ketoglutarate Dehydrogenase, promotes mTORC1 activation and neurodegeneration. *Neuron* 93: 115-131 (2017) 査読有
- ⑤ Kimura Y, Ikuta K, Kimura T, Chiba T, Oshima H, Oshima M, \***Nishi E**, \*Seno H. Nardilysin regulates inflammation, metaplasia, and tumors in murine stomach. *Sci Rep.* 7: 43052 (2017) 査読有
- ⑥ Kasai Y, Toriguchi K, Hatano E, Nishi K, Ohno M, Yoh T, Fukuyama<sup>n</sup> K, Nishio T, Okuno M, Iwaisako K, Seo S, Taura K, Kurokawa M, Kunichika M, Uemoto S, **Nishi E**. Nardilysin promotes hepatocellular carcinoma through activation of signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Sci.* in press 査読有

〔学会発表等〕（研究代表者の招待講演）  
（計6件）

- ① **Nishi E**, Nishi K, Ohno M, Saijo S, Chen P, Sakamoto J, Kimura T, Kita T. Critical role of nardilysin in glucose-stimulated insulin secretion. **Cold Spring Harbor Meeting** (Nuclear Receptors & Diseases), Oct 28-Nov1, 2014, Cold Spring Harbor, NY, USA
- ② **Nishi E**. Critical roles of nardilysin in the maintenance of body temperature homeostasis. **International forum on pig thermogenesis and fat development**,

May 16, 2014, Harbin, China

- ③ 西英一郎：『 $\alpha$ セクレターゼ活性化因子ルディライジンのアルツハイマー病における意義』、シンポジウム  $A\beta$ 産生制御によるアルツハイマー病根本治療戦略の進歩、第33回認知症学会学術集会（2014年11月30日、横浜）
- ④ **Nishi E**, Hiwasa T, Ohno M, Chen PM, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Morita Y, Kimura T. Searching for Biomarkers Useful for Acute Coronary Syndrome Prediction by the Screening of Auto-antibodies. シンポジウム 動脈硬化の予防戦略：バイオマーカー、機能検査および画像の情報をどう活かすか。第79回日本循環器学会学術集会（2015年4月26日、大阪）
- ⑤ 西英一郎、大野美紀子、陳博敏、西清人、西城さやか、坂本二郎、森田雄介、日和佐隆樹、木村剛、多機能ペプチダーゼ NRD c の急性冠症候群予知マーカーとしての有用性、ワークショップ「生活習慣病のバイオマーカー研究—原因究明から治療標的の同定まで」、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会（2015年12月1-4日、神戸）
- ⑥ 西英一郎：『ナルディライジンによる体温恒常性維持機構』、第5回 Metabolic Scientific Forum（2015年12月19日、東京）

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

取得：1件

発明の名称：ナルディライジンの高感度免疫測定法

登録番号：特許第5610256号

登録日：2014年9月12日

出願人：京都大学（50%）、三洋化成工業株式会社（50%）

発明者：國近 誠、平岡 義範、松本 恭一  
西英一郎

## 5. 研究組織

(1) 研究代表者

西英一郎 (NISHI, Eiichiro)

京都大学・大学院医学研究科・准教授  
(2017.1月より滋賀医科大学・

薬理学・教授)

研究者番号：30362528

研究課題名：破骨細胞の代謝改変と DNA メチル化制御のクロストークの実体の解明  
Metabolic-epigenetic coupling in osteoclast differentiation

研究期間：2014～2015

課題番号：26116719

研究代表者 西川恵三（大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 特任准教授）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2014 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2015 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000

**研究成果の概要：**破骨細胞内の代謝は、細胞分化に伴って嫌氣的過程から好氣的代謝に変化する。この代謝様式の改変が担う役割には、不明な点が多い。本研究では、破骨細胞の分化過程を通して網羅的なメタボローム解析を実施したところ、S-アデノシルメチオニン(SAM)が、好氣的代謝と協調して増加することを見出した。一方、本研究では、破骨細胞制御において DNA メチル基転移酵素 Dnmt3a の重要性を明らかにした。本研究によって、SAM 産生と共役する DNA メチル化制御が破骨細胞分化を司る重要な制御基盤となることが明らかとなった。

## 1. 研究の背景

造血幹細胞から分化する破骨細胞は、骨吸収機能を介して骨の恒常性維持にかかわる。破骨細胞の骨吸収機能は、多量の酸や分解酵素の分泌を伴うために、多量のエネルギーを消費することが知られている。このエネルギー需要の高まりに対して、破骨細胞は、代謝様式を改変することで適応する。即ち、破骨細胞は、細胞分化とともにミトコンドリアの生合成を、転写レベルで促進する。このように、破骨細胞は、酸化的リン酸化の亢進によって、効率的に ATP を産生する細胞内代謝機構を作り上げる。この一方で、破骨細胞が実際に存在する骨髄腔においては、栄養素(グルコース、アミノ酸や脂肪酸)や酸素は、不均一に分布し、破骨細胞の好氣的代謝に適さない環境が存在する。この細胞外環境の制約を回避する上で、破骨細胞の形成や骨吸収機能が、好氣

的呼吸に適した場所で能動的に促進されるかどうかは、ほとんど明らかにされていない。

従来の破骨細胞の細胞内代謝と細胞分化との関係性の研究においては、細胞分化に伴って細胞内代謝がどのように変化するかに目が向けられており、代謝様式の改変が担う役割には不明点が多い。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、キャピラリー電気泳動・質量分析(CE-MS)を用いて、破骨細胞分化過程で変動する代謝産物の網羅解析を行い、破骨細胞分化にかかわる代謝産物の探索を試みた。その結果、破骨細胞分化の早期において、S-アデノシルメチオニン(SAM)の合成が顕著に亢進することを見出した。SAM はエピジェネティック酵素の補因子であることから、破骨細胞のエピジェネティック

制御への関与が予想される。これまでの破骨細胞の転写研究では、主に転写活性化因子(NFATc1 など)の働きに注目した、活性化型転写制御の解析に目が向けられていた。これに対して、申請者は、抑制性転写制御の重要性を世界で初めて見出した(JCI 2010, PNAS 2010, JBMR 2011)。即ち、抑制型転写因子(Blimp1 など)が、破骨細胞の分化抑制因子(IRF8 など)を抑制することで、破骨細胞分化を促進することを明らかにした。さらに、研究代表者の抑制性制御の発展研究の成果によって、DNAメチル基転移酵素 Dnmt3a を介した抑制性のエピジェネティクス制御の重要性が明らかになりつつある。そこで、本研究では、破骨細胞において SAM 産生と共役する DNA メチル化制御が担う役割を明らかにすることを目的とする。さらに、SAM を蛍光可視化する手法の開発に取り組むことで、細胞内代謝とエピジェネティクスの共役の実体の蛍光イメージングを可能にする技術基盤の確立に挑戦する。

### 3. 研究成果

#### (1)破骨細胞分化に伴う細胞内代謝改変の実体とその役割

破骨細胞の CE-MS 解析を試み、分化過程を通じて細胞内で変動する代謝物の同定を試みた。その結果、TCA 回路の代謝物の増加が、破骨細胞への分化に伴って生じることを見出した。さらに、他の代謝物に関しても解析を実施したところ、メチオニン代謝にかかわる SAM が、破骨細胞分化に伴って増加することを見出した。酸化的代謝(ミトコンドリアの電子伝達系)に対する阻害剤を用いた解析を行ったところ、SAM の産生には、破骨細胞の酸化的代謝が重要

であることが明らかとなった。次に、破骨細胞分化に対する SAM 産生亢進の重要性を明らかにするために、SAM 合成酵素であるメチオニンアデノシルトランスフェラーゼに対する阻害剤(シクロロイシン)を用いた解析を試みた。その結果、SAM 合成酵素阻害剤の処理によって SAM の細胞内量の低下が観察されたのに加えて、破骨細胞分化が低下した。これらの結果は、酸化的代謝を介して産生される SAM が、破骨細胞分化の重要な制御因子となることを示唆する。

#### (2)破骨細胞分化を司る SAM の作用機序

SAM がどのように破骨細胞分化を制御するかを明らかにするために、SAM と協調的に機能することが予想される遺伝子の探索を試みた。これまでに、SAM はメチル基転移酵素に対してメチル基を提供するメチル基供与体として機能することが知られている。そこで、破骨細胞の分化過程で取得したトランスクリプトームデータを用いて、全てのメチル基転移酵素の遺伝子発現動態を解析したところ、DNA 上のシトシン残基にメチル基を転移する酵素 Dnmt3a のみが破骨細胞分化に伴って遺伝子発現が増加することを見出した。Dnmt3a は、これまで、胚発生や神経細胞の分化における役割が知られていたが、骨代謝にかかわる機能は明らかとなっていない。そこで、コンディショナルノックアウトの手法を用いて、破骨細胞特異的に *Dnmt3a* 遺伝子を欠損したマウスを調べた結果、破骨細胞の数と骨吸収が減少し、骨量が著しく増加することが明らかとなった。この結果から

Dnmt3a が破骨細胞分化の制御にかかわることが示唆される。さらに詳細な解析を進めた結果、破骨細胞分化における Dnmt3a の役割が明らかとなった。すなわち、Dnmt3a は、(1) 自身もつ DNA メチル基転移の酵素活性を介して、DNA のメチル化によって遺伝子の発現制御にかかわること、(2) なかでも、破骨細胞分化の抑制にかかわる転写因子 *Irf8* の発現を抑制することで、破骨細胞の分化促進にかかわることが明らかとなった。通常、破骨細胞の前駆細胞では、*Irf8* 遺伝子の高い発現が観察される。これに対して、破骨細胞の前駆細胞において、SAM 存在下で Dnmt3a の過剰発現を試みたところ、*Irf8* 遺伝子の発現が抑制された。これらの結果から、Dnmt3a と SAM の協調的な作用によって *Irf8* 遺伝子の発現抑制が生じることが示唆される。

### (3) SAM の蛍光可視化プローブの開発

本研究によって、SAM は破骨細胞分化を制御する重要な代謝物であることが明らかとなった。しかしながら、SAM が細胞のどのような場所で産生され、細胞分化のどのようなタイミングで DNA メチル化制御に利用されるかは、未だ不明である。従来、代謝物の解析には、高感度質量分析計が広く汎用されているが、生細胞内の代謝産物の解析やリアルタイムの観察手段としての用途には不向きである。これに対して、近年、SAM の蛍光可視化手段として、RNA アプタマーの有用性が報告された (*Science* 2012)。当該アプタマーは、大腸菌内で最適化された蛍光プローブであったことから、我々は、哺乳類細胞用発現ベクターを構築し、破骨細胞

内で安定に RNA アプタマーを誘導できる発現ベクターの構築に取り組んだ。しかしながら、数十種類の RNA アプタマーのプロトタイプを作製したものの、破骨細胞内の SAM の検出に十分な蛍光シグナルを得ることができなかった。近年、国内外の様々な研究から、RNA アプタマーを用いた蛍光イメージングには、数々の技術的難題を伴うことが示されている。そこで、代替手段として、SAM に対する FRET センサーの開発に着手した。即ち、SAM のセンサー領域として複数の生物種から SAM 結合ドメインを単離し、ドナー(CFP)とアクセプター(YFP)の蛍光タンパク質を接続した FRET センサーの試作品の作製を試みた。これまでに、約 200 種類の FRET センサーのプロトタイプを作製し解析した結果、ダイナミックレンジ 53%を示す SAM 特異的な FRET センサーの開発に成功した。

### (4) 代謝エピジェネティクスの創薬応用への試み

超高齢社会を迎えている本邦では、加齢に伴う骨粗鬆症の患者数増加が大きな社会問題となっている。骨粗鬆症の原因としては、加齢や閉経によって生じる破骨細胞による骨吸収の異常な活性化が関係する。従って、破骨細胞を阻害する薬剤は、骨粗鬆症の有効な治療薬候補となる。近年、がんや精神疾患の治療薬開発において、エピジェネティック制御が有効な創薬標的となることが明らかにされている。本研究によって、破骨細胞のエピジェネティクスの実体が初めて明らかとなったことから、当該成果に対する創薬応用が期待される。そこで、破骨細胞分化にか

かわる Dnmt3a の創薬標的としての有効性の検討を試みた。今回、卵巣を摘出する手術によって骨粗鬆症を発症させた閉経後骨粗鬆症モデルマウスを用いた。卵巣を摘出後、病態マウスでは破骨細胞の増加並びに骨吸収が亢進し、骨量の減少が観察される。これに対して、破骨細胞特異的に *Dnmt3a* 遺伝子を欠損したマウスでは、骨粗鬆症の病態発症に抵抗性を示すことが明らかとなった。この結果から、Dnmt3a が骨粗鬆症治療の創薬標的となることが考えられる。そこで、次に、薬剤を用いた治療実験を試みた。Dnmt3a の酵素活性を阻害する化合物を探索したところ、新規化合物 TF-3 を同定した。実際に、TF-3 を用いた治療実験に取り組んだ結果、骨粗鬆症の病態を有意に改善することが明らかとなった。以上の結果から、骨代謝疾患の治療におけるエピジェネティック制御を標的としたエピゲノム創薬の有効性が示された。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計 4 件)

- ① Iwamoto Y, Nishikawa K, Imai R, Furuya M, Uenaka M, Ohta Y, Morihana T, Itoi-Ochi S, Penninger JM, Katayama I, Inohara H and Ishii M, Intercellular communication between keratinocytes and fibroblasts induces local osteoclast differentiation: a mechanism underlying cholesteatoma-induced bone destruction. **Mol. Cell. Biol.** 36, 1610-20, 2016. 査読有
- ② Nishikawa K, Iwamoto Y, Kobayashi Y, Katsuoka F, Kawaguchi S, Tsujita T, Nakamura T, Kato S, Yamamoto M, Takayanagi H and Ishii M, Dnmt3a regulates osteoclast differentiation by coupling to an S-adenosyl methionine-producing metabolic pathway. **Nature Med.** 21, 281-7, 2015. 査読有
- ③ Naito A, Yamamoto H, Kagawa Y, Naito

Y, Okuzaki D, Ohtani K, Iwamoto Y, Maeda S, Kikuta J, Nishikawa K, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Ishii H, Doki Y, Mori M and Ishii M, RFPL4A Increases the G1 Population and Decreases Sensitivity to Chemotherapy in Human Colorectal Cancer Cells. **J. Biol. Chem.** 290, 6326-37, 2015. 査読有

- ④ Nishikawa K, Iwamoto Y and Ishii M, Development of an *in vitro* culture method for stepwise differentiation of mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cell into mature osteoclasts. **J. Bone Miner. Metab.** 32, 331-6, 2014. 査読有

〔学会発表等〕(研究代表者の招待講演)

(計 11 件)

- ① 西川恵三、紅茶ポリフェノールがもつ代謝エピジェネティクスの阻害作用を利用した新たな骨粗鬆症治療、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学大会合同大会 ワークショップ、2015 年 12 月 2 日、神戸
- ② 西川恵三、代謝エピジェネティクスが担う破骨細胞分化制御の解明、第 18 回骨発生・再生研究会、2015 年 11 月 28 日、東京
- ③ 西川恵三、細胞内代謝経路を介した新たな破骨細胞分化制御機構の解明、第 8 回骨軟骨フロンティア、2015 年 11 月 7 日、東京
- ④ 西川恵三、RNA 導入による機能解析法を用いた代謝リプログラミング研究への試み、第 76 回共同研テクニカルセミナー、2015 年 9 月 28 日、大阪
- ⑤ 西川恵三、破骨細胞の転写代謝システムの解明、第 33 回日本骨代謝学会学術集会 シンポジウム、2015 年 7 月 24 日、東京
- ⑥ 西川恵三、細胞内代謝経路を介した新たな破骨細胞制御機構の解明、第 1 回日本骨免疫学会、2015 年 7 月 1 日、宮古島
- ⑦ 西川恵三、細胞内代謝経路を介した新たな破骨細胞制御機構の解明、ヒューマンメタボロームセミナー、2015 年 6 月 19 日、大阪
- ⑧ 西川恵三、破骨細胞の転写代謝システムの解明と創薬応用、第 6 回大阪免疫塾、2015 年 2 月 3 日、大阪
- ⑨ 西川恵三、破骨細胞の転写代謝システムの研究、第 2 回先進イメージング研究会、2015 年 1 月 9 日、神戸
- ⑩ 西川恵三、骨髄低酸素環境に応答した破骨細胞分化調節機構の解明、第 87

回日本生化学会大会、2014年10月18日、国立京都国際会館、京都府

- ⑪ Nishikawa K, Active repression by Dnmt3a plays an important role in osteoclast differentiation、Symposium Immunology and Infection Biology、2014年6月10日、Sweden

〔図書〕(計13件)

- ① 西川恵三 マクロファージの代謝リプログラミングと制御 **マクロファージのすべて**(松島綱治 編集) 259, 389-396, 2016.
- ② Kikuta J, Nishikawa K and Ishii M Macrophage dynamics during bone resorption and chronic inflammation **Chronic Inflammation: Mechanisms and Regulation** (Masahiro Miyawaki and Kiyoshi Takatsu edition) 2016 133-145.
- ③ 西川恵三 フードケミカルエピジェネティクスによる骨粗鬆症予防～紅茶成分テアフラビンがDNAメチル化制御を抑制する～ **実験医学** 35, 114-6, 2016.
- ④ 西川恵三 海外文献紹介 **The Bone** 30, 2016.
- ⑤ 阪口友香子、西川恵三 注目の海外文献 **Clinical Calcium** 26, 100-101, 2016.
- ⑥ Keizo Nishikawa Elucidation of the role of metabolic reprogramming in osteoclast differentiation **Clinical Calcium** 26, 713-719, 2016.
- ⑦ 西川恵三、石井優 細胞内代謝を基軸とした新たな破骨細胞制御 **医学のあゆみ** 257, 1328-29, 2016.
- ⑧ 西川恵三 代謝リプログラミングを基軸とした破骨細胞分化制御 **Osteo Lipid Vascular&Endocrinology** 6, 24-27, 2016.
- ⑨ 西川恵三 Maf 骨ペディア 骨疾患・骨代謝キーワード事典(日本骨代謝学会 編集) 86-87, 2015.
- ⑩ 西川恵三、石井優 マクロファージサブセットの代謝リプログラミングの実体とその役割 **感染・炎症・免疫** 45, 278-287, 2015.
- ⑪ 西川恵三 好氣的代謝と共役するエピジェネティック制御を介した新たな破骨細胞制御機構 **臨床免疫・アレルギー科** 64, 1-5, 2015.
- ⑫ 西川恵三 代謝と共役する Dnmt3a を介したエピジェネティクスは破骨細胞分化の制御にかかわる **実験医学** 33, 2115-2118, 2015.
- ⑬ 西川恵三、石井優 DNAメチル基転移酵素 Dnmt3a を介した代謝と共役するエピジェネティクスは破骨細胞の分

化の制御にかかわる **ライフサイエンス新着レビュー** 2015.

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

西川恵三 (NISHIKAWA, Keizo)  
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授  
研究者番号：30516290

研究課題名：慢性的エネルギー飢餓環境における DNA 脱メチル化経路を介した  
 がん転移機構の解明  
 Mechanism of cancer metastasis through DNA demethylation  
 pathway under chronic energy starvation

研究期間：2014～2015

課題番号：26116722

研究代表者 尾池雄一（熊本大学 大学院生命科学研究部 教授）

研究分担者 門松 毅（熊本大学 大学院生命科学研究部 助教）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2014 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2015 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000

**研究成果の概要：**本研究の成果として、低酸素・低栄養といったがん微小環境により、がん細胞における DNA 脱メチル化関連酵素である TET2 の発現が誘導されることで、種々のがん転移促進因子のプロモーター領域における DNA 脱メチル化とこれに伴う発現誘導が促進されることが明らかとなった。発現が上昇していたがん転移促進因子のうち因子 A は、オートクリン的にがん細胞に作用し、解糖系亢進や接着分子の発現誘導によりがん細胞の増殖や生存、転移先の組織への生着を亢進し、がん転移を促進することが明らかとなった。さらに、当該因子に対する中和抗体投与が新規がん転移抑制法となる可能性が示唆された。

1. 研究の背景

近年、がんの分子病態として、エピゲノムの変化が、がん抑制遺伝子等の不活性化をもたらす発症・進展に深く関与することが既に確立しており、がんにおけるエピゲノム変化が診断・治療の標的として応用されはじめています。一方で、がん組織内では、がん細胞の増殖に伴う低酸素や低栄養状態、または炎症といったようながん細胞周囲の微小環境の変化が認められる。このようながん微小環境の変化は、がん細胞の遊走能や浸潤能の活性化、がんの原発病巣の組織リモデリングを誘導し、がんの転移促進に寄与する。その分子機構として、がん微小環境によるエピゲノム変化が、がん細胞の転写環境の変容をもたらす、結果としてがん細胞の転移能活性化に繋がると考えられる。

がん微小環境によってもたらされるがん細胞の転写環境の変容に関わる分子機構、およびその変容によって影響を受ける標的遺伝子の同定と機能解明は、がん転移に対する新規予防法や治療法の開発に繋がる基盤研究となる。

我々は、これまでにアンジオポエチン様タンパク質（ANGPTL）ファミリー分子の1つである ANGPTL2 が生活習慣病やがんの発症・進展を促進することを世界に先駆けて明らかにした。特に、がん細胞においては、微小環境の変化により ANGPTL2 発現が誘導され、がん細胞から分泌された ANGPTL2 がオートクリンまたはパラクリン的に作用し、がん細胞の遊走能や浸潤能、腫瘍血管新生を促進することで、高い転移能を示すことを明らかにした（*Cancer Res.* 2011, 2012）。ま

た、最近、低酸素や低栄養といったがん微小環境によってがん細胞における ANGPTL2 プロモーター領域の DNA 脱メチル化が促進され、がん病態進展に繋がることを明らかにした (*Sci. Signal.* 2014)。

## 2. 研究の目的

がん微小環境の変化に伴い、がん細胞における ANGPTL2 遺伝子発現が、プロモーター領域の DNA 脱メチル化によって誘導されたように、微小環境の変化への適応またはがんの浸潤・転移に関わる様々な遺伝子の転写環境についても同様のメカニズムによって再編され、がん細胞の転移能活性化に寄与すると考えられる (図 1)。本研究では、低酸素や低栄養な

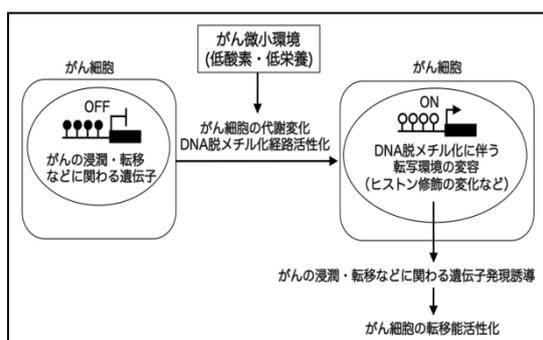


図1 がん微小環境によるがん細胞のエピゲノム変化を介した転移能活性化機構

どのがん微小環境に生じる慢性的なエネルギー飢餓状態により誘導される DNA 脱メチル化に着目し、がん微小環境において脱メチル化が生じるゲノム領域および当該領域の脱メチル化によって発現誘導される標的遺伝子の同定、低酸素・低栄養といった特殊なエネルギー代謝環境下において機能する DNA 脱メチル化経路とその活性化に関わるシグナル伝達経路を明らかにし、エピゲノム変化に伴う転写環境の変容により誘導されるがん細胞の転移能活性化の分子機構解明を目的とした。

## 3. 研究成果

### (1) がん微小環境によるがん細胞での DNA 脱メチル化促進とがん転移との関連

がん原発巣において、がん微小環境の変化によりがん細胞に生じたエピゲノム変化は、エピジェネティックメモリーとして維持され、転移過程や転移後の組織におけるがん細胞の生存や増殖などに寄与すると考えられる。以前、我々は、ANGPTL2 プロモーター領域が高度にメチル化され、その発現レベルが低い骨肉腫細胞株を免疫不全マウスの脛骨内に移植した場合、移植前の骨肉腫細胞に比べ、移植後の原発巣内の骨肉腫細胞における ANGPTL2 プロモーター領域の DNA メチル化レベルが低下し、ANGPTL2 の発現が誘導されることを明らかにした。そこでまず、同様に脛骨内へ骨育種細胞を移植し、その後肺転移した骨肉腫細胞を単離することで肺転移株を樹立した。移植前の骨肉腫細胞と肺転移株における ANGPTL2 プロモーター領域の DNA メチル化レベルとその発現レベルを検討したところ、肺転移株では DNA メチル化レベルの低下および発現レベルの有意な上昇が認められ、樹立した肺転移株は、原発巣におけるエピゲノム変化を維持していることが示唆された。

樹立した肺転移株では、ANGPTL2 を含む様々ながん転移促進に作用する遺伝子の発現が DNA 脱メチル化によって亢進していることが考えられた。そこで、移植前の骨肉腫細胞と肺転移株における遺伝子発現解析を行ったところ、肺転移株において、種々の炎症性サイトカインやケモカイン、マトリックスリモデリング因子などのがん転移促進に作用する遺伝子発現が著明に上昇していることを見出した。さらに、肺転移株において発現が上昇していた遺伝子のうち、因子 A につい

て移植後の原発巣内の骨肉腫細胞における発現を検討したところ、その発現レベルの上昇が認められた。

がん転移における因子 A の発現上昇の意義を検討するため、移植前の骨肉腫細胞と肺転移株をそれぞれ免疫不全マウスに尾静脈より投与し、生体イメージングによりその肺転移能を検討した。その結果、移植前の骨肉腫細胞は、ほとんど転移巣を形成しないのに対し、肺転移株では肺転移巣の形成が認められ、肺転移株の転移能が亢進していることが明らかとなった。その分子機構として、肺転移株では因子 A の下流シグナルにより ICAM-1 の発現誘導を介した肺組織への生着が促進され、結果として肺転移が亢進することが明らかとなった。さらに、移植前の骨肉腫細胞に比べ、肺転移株では解糖系代謝が亢進し、解糖系関連酵素遺伝子の発現も有意に上昇していることに加え、解糖系関連酵素遺伝子の発現誘導に関わる HIF-1 $\alpha$  タンパク質レベルが上昇していることを見出した。肺転移株における HIF-1 $\alpha$  タンパク質発現亢進のメカニズムを検討したところ、因子 A による MEK-ERK 経路活性化によって HIF-1 $\alpha$  発現が亢進することが明らかとなった。肺転移株に対し MEK 阻害剤処理もしくは因子 A のノックダウンを行うことで、解糖系関連酵素遺伝子の発現および解糖系代謝の低下が認められた。以上より、因子 A の発現誘導によって ICAM-1 発現誘導を介した肺組織への生着および MEK-ERK-HIF-1 $\alpha$  経路を介した解糖系亢進により、がん細胞の増殖・転移が促進されることが示唆された。

がん微小環境による因子 A の発現誘導機構を検討する目的で、移植前の骨肉腫細胞と肺転移株における因子 A のプロモーター領域の DNA メチル化レベルを検討

したところ、肺転移株において有意にメチル化レベルが減少していることを見出した。DNA 脱メチル化経路においては、TET ファミリーが重要な役割を果たしていることから、骨肉腫細胞株における TET ファミリーの発現を検討したところ、TET2 が豊富に発現していること、移植前に比べ移植後の原発巣内のがん細胞における TET2 発現レベルが上昇することが明らかとなった。さらに、骨肉腫細胞をがん微小環境に模した低酸素・低栄養環境下で培養すると、TET2 の発現に加え因子 A の発現が誘導されることを明らかにした。そこで、TET2 ノックダウン細胞株を樹立し、移植後の原発巣内のがん細胞における因子 A の DNA メチル化レベルと発現レベルを検討した結果、コントロール細胞株に比べ、TET2 ノックダウン株ではメチル化レベルの低下および発現誘導が抑制されていた。さらに、通常の培養環境下においては、コントロール細胞株と TET2 ノックダウン細胞株の細胞増殖に差を認めないが、TET2 ノックダウン細胞株を移植したマウスの原発腫瘍サイズはコントロール細胞株を移植したマウスの腫瘍サイズに比べて著明に減少していた。以上の結果から、がん微小環境によって TET2 の発現が誘導され、因子 A を含む種々のがん転移促進因子の DNA 脱メチル化とこれに伴う発現誘導が引き起こされることが示唆された。

がん微小環境による因子 A の発現亢進が、がん転移促進に寄与することから、因子 A に対する中和抗体投与によってがん転移が抑制されるか検討を行った。骨肉腫細胞を移植した免疫不全マウスに中和抗体を毎週 2 回腹腔内に投与したところ、コントロール群に比べ、中和抗体投与群の肺転移が抑制され、その生存期間

も有意に延長した。以上より、因子 A に対する中和抗体投与が新規がん転移抑制法となる可能性が示唆された。

以上より、低酸素・低栄養といったがん微小環境によりがん細胞における TET2 の発現が誘導されることで、因子 A のプロモーター領域の DNA 脱メチル化とこれに伴う発現誘導が促進される。その結果、因子 A がオートクリン的にがん細胞に作用し、MEK-ERK-HIF1a 経路を介した解糖系代謝亢進や ICAM-1 といった接着分子の発現誘導により、がん細胞の増殖や生存、転移先の組織への生着を促進し、がん転移を促進することが示唆された。さらに、因子 A に対する中和抗体投与が新規がん転移抑制法となる可能性が示唆された。

尚、上記の研究成果は論文投稿前であるため、標的分子名を因子 A として記載した。

## (2) がん細胞の抗がん剤抵抗性獲得の新規分子機構

がん治療において、抗がん剤に対してがん細胞が抵抗性を獲得し、抗がん剤治療の効果が低下することが問題となっている。我々は、がん微小環境によるプロモーター領域の DNA 脱メチル化によって発現が誘導され、がん病態進展を促進する ANGPTL2 のがん病態進展における新たな機能として、ANGPTL2 シグナルが抗がん剤に対するがん細胞の抵抗性獲得に関わっていることを明らかにした (*Cancer Sci.* 2014)。大腸がん細胞に ANGPTL2 を持続的に高発現させると、ANGPTL2 を高発現させていない大腸がん細胞に比べ、抗がん剤による大腸がん細胞の細胞死が減少することを見出した。そのメカニズムとして、ANGPTL2 は NFκB 経路を介して

大腸がん細胞における細胞死抑制分子である BCL-2 ファミリーの発現を誘導することで、抗がん剤による細胞死を抑制していることが明らかとなった。さらに、大腸がん患者をがん組織における ANGPTL2 発現レベルが低いグループと高いグループに分けた場合、ANGPTL2 発現レベルが高いグループでは、ANGPTL2 発現レベルが低いグループに比べて、抗がん剤治療が効きにくいことも明らかとなった。以上の結果から、がん細胞における ANGPTL2 シグナルを抑制することが、抗がん剤治療に対する抵抗性獲得の抑制に繋がる可能性が示唆された。

## 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[論文-英文総説含む] (計 2 件)

- ① Horiguchi H, Endo M, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Odagiri H, Masuda T, Kadomatsu T, Tanoue H, Motokawa I, Terada K, Morioka MS, Manabe I, Baba H, and Oike Y. Angiopoietin-like protein 2 renders colorectal cancer cells resistant to chemotherapy by activating spleen tyrosine kinase-phosphoinositide 3-kinase-dependent anti-apoptotic signaling. *Cancer Sci.* 105, 1550-1559 (2014) 査読有
- ② Endo M, Yamamoto Y, Nakano M, Masuda T, Odagiri H, Horiguchi H, Miyata K, Kadomatsu T, Motokawa I, Okada S, Iwase H, and Oike Y. Serum ANGPTL2 levels reflect clinical features of breast cancer patients: implications for the pathogenesis of breast cancer metastasis. *Int. J. Biol. Markers* 29, e239-245 (2014) 査読有

[学会発表等] (研究代表者の招待講演)  
(計 9 件)

- ① 尾池雄一、生活習慣病とがんの共通分子病態～健康長寿社会を目指して～、第78回神奈川県内科医学会集談会共催セミナー、平成27年2月14日、横須賀医師会館、神奈川県横須賀市
- ② 尾池雄一、がん組織内血管代謝ニッシエによる分子記憶形成とがん病態進

展の分子機構、The mechanisms of tumor progression through molecular memory constituted by vasculo-metabolic niche in tumor tissue、”臓器の記憶” 国際シンポジウム 2015、平成27年8月23日、東京国際フォーラム、東京都

- ③ 尾池雄一、生活習慣病とがんの共通分子病態～健康長寿社会実現化を目指して～、東北エイジングサミットー加齢制御研究から臨床までー、平成27年9月27日、仙台国際センター、宮城県仙台市
- ④ 尾池雄一、がんと心血管疾患の共通分子基盤解明、脳心血管抗加齢研究会 2015、平成27年11月29日、梅田スカイビル、大阪府大阪市
- ⑤ 尾池雄一、Metabolic alterations in the tumor microenvironment accelerates tumor cell invasivity and metastasis through epigenetic regulation of ANGPTL2、第18回国際血管生物学会、平成26年4月15日、京都市勧業館みやこめっせ、京都府京都市
- ⑥ 尾池雄一、生体恒常性維持機構とアンチエイジング、第14回日本抗加齢医学会総会、平成26年6月7日、大阪国際会議場、大阪府大阪市
- ⑦ 尾池雄一、生体恒常性とその変容による疾患発症の分子機構解明～健康長寿社会を目指して～、Research Forum、平成26年7月28日、新潟大学、新潟県新潟市
- ⑧ 尾池雄一、Diverse roles of ANGPTL2 signaling in physiology and patho-physiology、Taishan Academic Forum on Cancer & Immune Signaling Pathways And First Session Stem Cell Immunology Qilu International Forum、平成26年8月10日、Dongshan hotel building 6、中国・烟台市
- ⑨ 尾池雄一、Tumor cell-derived angiopoietin-like protein ANGPTL2 is a critical driver of metastasis、第73回日本癌学会学術総会、平成26年9月27日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

〔図書〕(計4件)

- ① 遠藤元誉、尾池雄一、産科と婦人科特集 血管新生を標的とした婦人科癌治療 82(2)、2015、141-146
- ② 門松 毅、尾池雄一、別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患「慢性炎症制御による加齢関連疾患治療の展望」、4(2)、2015、103-109
- ③ 尾池雄一、Anti-aging Science、7(3)、2015、178

- ④ 門松 毅、尾池雄一、血管医学 特集：臓器の記憶と血管代謝ニッチェ、16(4)、2015、21(331)-28(338)

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

〔その他〕ホームページ等

研究室ホームページ

<http://molegene.kumamoto-u.ac.jp>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾池雄一 (OIKE, Yuichi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：90312321

### (2) 研究分担者

門松 毅 (KADOMATSU, Tsuyoshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：90555757



用を有すると考えられた。*FcorKO* 膵島では、膵 $\alpha$ 細胞のマスター遺伝子である *Aristaless-related homeobox (Arx)* 遺伝子発現の上昇をきたし、 $\alpha$ 細胞量が増加している。FCoR は *Arx* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化を増強させることにより発現を抑制し、 $\alpha$ 細胞量を調節する。膵 $\alpha$ 細胞での *Foxo1* 発現が極めて低いことから *Foxo1* 以外にもその結合パートナーが存在する可能性が考えられる。私たちは、質量分析により脂肪組織より FCoR の結合蛋白の一つとして pyruvate carboxylase (Pcx) を既に同定しており、培養細胞を用いた検討で FCoR が、細胞質、核以外にミトコンドリアにも存在しうること、また Pcx のアセチル化を増強させることを確認している。このように **FCoR は、核、ミトコンドリアと細胞内局在を変え、様々な標的蛋白に作用し、それらのエピゲノム情報を変化させ活性を調節しうる蛋白と考えられる。** 本研究の目的は、その分子メカニズムを明らかにし、生理的役割を解明していくことである。

## 2. 研究の目的

そこで本研究課題では、FCoR の作用を分子レベルで明らかにし、糖・エネルギー代謝調節における鍵分子を同定し、2 型糖尿病における治療薬開発に役立てることを目的とし、具体的に次の研究計画をたて、2 年間で明らかにする。

(1) FCoR によるエピゲノム情報の変化による膵 $\alpha$ 細胞量調節—核内における FCoR の遺伝子発現調節メカニズムを明らかにする

本研究では、FCoR の膵島 $\alpha$ 細胞量調節メカニズムを明らかにする。まず、FCoR の標的遺伝子として *Arx* に焦点を当てる。すなわち、FCoR による *Arx* 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化のメカニズムを明らかにする。

(2) ミトコンドリアにおける FCoR の代謝調節メカニズムを明らかにする

本研究では FCoR による pyruvate carboxylase のアセチル化による活性調節メカニズムを明らかにするとともに、膵 $\beta$ 細胞での pyruvate carboxylase の生理的役割を、膵 $\beta$ 細胞特異的 Pyruvate carboxylase ノックアウトマウスを用いて明らかにする。

## 3. 研究成果

(1) FCoR によるエピゲノム情報の変化による膵 $\alpha$ 細胞量調節—核内における FCoR の遺伝子発現調節メカニズムを明らかにする

FCoR およびその標的蛋白の一つである *Foxo1* の遺伝子改変マウスを用いて、膵 $\alpha$ 及び $\beta$ 細胞量調節のメカニズムについて新規の知見をいくつか得ることができた。*Fcor* ノックアウトマウス (*FcorKO*) 膵島では、膵 $\alpha$ 細胞のマスター遺伝子の一つである *Aristaless-related homeobox (Arx)* プロモーター領域のメチル化が低下し *Arx* 発現が増加し胎生期より $\alpha$ 細胞量の増加が認められ、 $\beta$ - to  $\alpha$ -cell conversion が認められた。一方、Rat insulin Cre トランスジェニックマウスを用いて膵 $\beta$ 細胞特異的に FCoR 発現を回復させたマウス

(*FcorKO*- $\beta$ *Fcor*) では DNA メチル化、*Arx* 発現、 $\alpha$ 細胞量が正常化した。*FcorKO* 単離膵島を用いた Real-time PCR では、DNA methyltransferase 3a (*Dnmt3a*) 発現の低下および *FcorKO*- $\beta$ *Fcor* では *Dnmt3a* の正常化が認められ、 $\beta$ 細胞株である MIN6 細胞においても、FCoR 過剰発現により、*Dnmt3a* 発現が増加し、ノックダウンにより低下したことにより、FCoR には、*Dnmt3a* 発現を誘導する作用があると考えられた。一方、FCoR の標的蛋白である *Foxo1* の $\beta$ 細胞特異的ノックアウトマウス ( $\beta$ *Foxo1KO*) は $\alpha$ 細胞量、 $\beta$ 細胞量には変化ないが、*Arx* プロモーター領域のメチル化が有意に増加し、*Arx* 遺伝子発現の

有意の低下が認められた。さらに、*Fcor* と *Foxo1* のダブルノックアウトマウス (*DKO*)では、DNA メチル化および *Arx* 発現は正常化した。膵 $\alpha$ 細胞量は *FcorKO* に比べ低下傾向はあるものの完全には正常化せず、インスリン陽性かつグルカゴン陽性の double positive 細胞の有意の増加が認められた。さらに膵 $\alpha$ 細胞株である  $\alpha$ TC 細胞および MIN6 細胞に活性型 *Foxo1*(ADA-*Foxo1*)を過剰発現させると、有意に *Arx* 発現が増加し、ルシフェレールアッセイにおいても *Foxo1* は *Arx* プロモーター活性を有意に増加させた。また、ChIP アッセイ、EMSA により、*Foxo1* は *Arx* プロモーター領域にある Foxo-response element (FRE)に結合し、*Arx* は *Foxo1* の標的遺伝子の一つであると考えられた。さらに、ChIP アッセイにより、*Foxo1* の *Arx* プロモーターへの結合により *Dnmt3a* のプロモーター領域からの解離が認められ、*Foxo1* には、*Arx* プロモーターの DNA メチル化低下作用があることが考えられた。

以上、FCoR は、2つのメカニズムで $\alpha$ および $\beta$ 細胞量を調節していると考えられる。まず、”Foxo1-independent regulation”として *Dnmt3a* 発現を増加させ、*Arx* プロモーターの DNA メチル化を増加させ、発現を抑制する。さらに、”Foxo1-dependent regulation”として、*Foxo1* をアセチル化することにより活性を抑制し、*Foxo1* の *Arx* 発現誘導作用を抑制することにより、*Arx* 発現を抑制していると考えられ、FCoR-*Foxo1* 連関により膵 $\alpha$ および $\beta$ 細胞の”Identity”が保たれていると考えられる。

## (2) ミトコンドリアにおける FCoR の代謝調節メカニズムを明らかにする

これまで私たちは、質量分析により、

FCoR の結合蛋白として Pyruvate Carboxylase (Pcx)を同定した。膵 $\beta$ 細胞においてこれまで Pcx は pyruvate が TCA 回路に入る際、Pyruvate dehydrogenase と共に重要であると考えられていたが、実際に、生体内の膵 $\beta$ 細胞において検討された報告はない。また、私たちのこれまでの検討により、Pcx が膵 $\beta$ 細胞のみならず、 $\alpha$ 細胞にも発現しており、高脂肪食負荷、または、加齢により、その発現が有意に低下し、その低下は、 $\beta$ 細胞で顕著であることを確認している。したがって、膵島における Pcx は、生理的に何らかの役割を担っていることが考えられた。そこで私たちは、まず、組織特異的 Pcx ノックアウトマウスを作製し、Rat Insulin promoter Cre トランスジェニックマウスを用いて、膵 $\beta$ 細胞特異的 Pcx ノックアウトマウス( *$\beta$ PcxKO*)を作製した。 *$\beta$ PcxKO* は、正常食下において、体重に差異はないが、空腹時および摂食時の高血糖を認めた。興味深いことに、空腹時のみ低インスリン血症を認めたが、摂食時のインスリン値には差異を認めなかった。さらに、腹腔内ブドウ糖負荷試験では、耐糖能異常を認めず、インスリン分泌は過分泌傾向にあり、膵臓面積における $\beta$ 細胞の面積比はコントロールに比べ、有意に増加傾向にあった。インスリン負荷試験によるインスリン感受性には差異を認めなかった。単離膵島においては低グルコース濃度でのみインスリン分泌、ATP 産生量、細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の低値が認められた。以上から、膵 $\beta$ 細胞における Pcx は、低グルコース濃度、空腹時のインスリン分泌を調節するのに生理的に重要であると考えられた。さらに興味深いことに、 *$\beta$ PcxKO* の膵 $\beta$ 細胞では、小胞体の変性、小胞体ストレスマーカー遺伝子の発現低

下、単離膵島を用いたインスリンの Western blotting において、インスリン蛋白の有意の低下が認められた。以上のことは、*βPcxKO* の小胞体機能の低下、すなわち、disulfide 結合の低下が考えられ、Pcx の欠損によるミトコンドリア内の何らかの環境変化が小胞体に影響を及ぼしている可能性も考えられ、今後さらなる検討を行なっていく予定である。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計2件)

- ① Kawano Y, Nakae J, Watanabe N, Kikuchi T, Tateya S, Tamori Y, Kaneko M, Abe T, Onodera M, Itoh H. Colonic Macrophages Regulate Metabolic Disease in an Intestinal Ccl2/Ccr2-dependent Manner. *Cell Metab.* 2016; 24: 295-310. 査読有
- ② Sasanuma H, Nakata M, Parmila K, Nakae J, Yada T. PDK1-FoxO1 pathway in AgRP neurons of arcuate nucleus promotes bone formation via GHRH-GH-IGF1 axis. *Molecular Metabolism* 2017 (in press). 査読有

〔学会発表等〕(研究代表者の招待講演)

(計2件)

- ① 中江 淳、メタボリックシンドロームはどこまで解明されたか?～基礎から臨床応用への展望、Nordiscience forum 2014、平成26年6月7日、京都市
- ② 中江 淳、「免疫調節と糖・エネルギー代謝のクロストーク -Immunometabolism の新たな Key Player-」、第3回 Cutting Edge Seminar on Diabetes、平成27年12月9日、岡山大学病院、岡山県岡山市

〔図書〕(計3件)

- ① 中江 淳、川野義長、伊藤 裕. 腸管免疫細胞による代謝調節. 医学のあゆみ. 医歯薬出版株式会社 2016; 257: 711-717
- ② 中江 淳、川野義長、伊藤 裕. Foxo1 の慢性炎症における役割. 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患. 代謝・内分泌系の慢性炎症. 北隆館、2015; 4: 109-113

- ③ 中江 淳、川野義長、伊藤 裕. 腸内環境と糖・エネルギー代謝. 細胞 ニューサイエンス社、2015; 47: 480-483.

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

〔その他〕ホームページ等

研究室ホームページ

<http://www.keio-emn.jp/donation/04.html>

#### 5. 研究組織

(1) 研究代表者

中江 淳 (NAKAE, Jun)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：00344573

研究課題名：脂肪滴を介した新たな転写代謝システムの解明

Regulation of the NRF1-mediated lipid and protein metabolism

研究期間：2014～2015

課題番号：26116725

研究代表者 小林 聡（同志社大学 大学院生命医科学研究科 教授）

連携研究者 谷口浩章（同志社大学 生命医科学部 助教）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2014 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2015 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000

**研究成果の概要**：本研究では、分子生物学的解析とショウジョウバエの遺伝学的解析により、CNC ファミリーに属する転写因子 NRF1 の代謝制御機構を解析し、以下の3点を明らかにした。(1) ショウジョウバエの NRF1 ホモログ CncC は NRF1 同様に脂質代謝に関わることを明らかにし、NRF1/CncC による脂質代謝機構が高く保存されている。(2) マウス Nrf1 は神経細胞において脱ユビキチン化酵素の発現を制御している可能性がある。(3) Nrf1 の転写因子としての機能は、脱ユビキチン化酵素 Usp15 によるタンパク質安定化により制御されている。

### 1. 研究の背景

CNC 転写因子ファミリーは酸化ストレス応答に関わる NRF2 (NFE2L2) や血球分化・ヘム代謝に関わる BACH1/2 などで構成されており、それぞれが内的あるいは外的なシグナルに対する誘導型転写因子として機能している。我々は同ファミリーに属する NRF1 (NFE2L1) が形成する転写代謝システムの解明を行っている。これまで我々は、肝臓特異的 Nrf1 ノックアウトマウスが脂肪肝になることから、NRF1 が脂質代謝に関わることを明らかにしてきた (**JBC** 2011)。また近年 NRF1 はタンパク質恒常性

(Proteostasis) の維持に関わるということがわかり注目されはじめている。NRF1 はプロテアソーム活性阻害時に同遺伝子を誘導する「プロテアソームリカバリー」とよばれる生体応答を制御している。これによりプロテオソームの活性低下を相

補され、Proteostasis の維持が可能となる。

一方、NRF1 の活性制御機構に関しては、通常 NRF1 は小胞体にアンカーされ核移行が阻害されていることが明らかになっている (**Biochem J** 2016)。さらに我々は細胞質と核において NRF1 はユビキチン依存的なタンパク質分解を受けていることを明らかにした (図1、**MCB** 2011)。しかし NRF1 の活性化メカニズムの詳細については全く解明できていなかった。

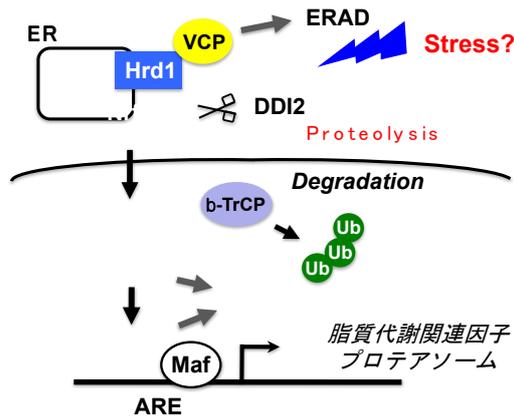


図1 NRF1による脂質代謝・プロテアソーム遺伝子発現機構

## 2. 研究の目的

本研究では、脂質代謝ならびにタンパク質代謝において重要な機能を有すると目される転写因子 NRF1 の転写調節機構に着目した。この詳細な生理作用を解明するために、ショウジョウバエの NRF1 ホモログ CncC のドメイン解析ならびに過剰発現実験を行うことで、NRF1 の代謝制御機構ならびに活性制御機構の種間保存性を検証する。また NRF1 活性化メカニズムを解明するために NRF1 結合因子を網羅的に同定するプロテオーム解析を行い、その詳細な作用メカニズムを追う。さらに神経幹・前駆細胞特異的 *Nrf1* ノックアウトマウス (*Nrf1* NKO マウス) が示す神経変性疾患の発症機構を、Proteostasis という側面で解析する。以上の解析から、NRF1 が形成する転写代謝ネットワークの全容解明を目指した。

## 3. 研究成果

### (1) NRF1 の活性制御機構と脂質代謝機構の種間保存性

本研究では、NRF1 の活性制御機構ならびに脂質代謝調節機構の種間保存性をショウジョウバエを用いた遺伝学的解析で明らかにした。

まず NRF1 の活性制御機構については、アミノ末端に存在する NHB1 (N-terminal Homology Box 1) ドメインを介して小胞体にアンカーし核移行が阻害されるため、その転写活性が抑制されていることがわかっている。この NHB1 ドメインはショウジョウバエホモログ CncC にも高く保存されているため、CncC から NHB1 を欠損させた変異体 (CncC  $\Delta$ NHB1) をショウジョウバエの複眼に過剰発現させたところ、顕著に rough eye 表現型を示した。したがって NHB1 を介した NRF1 ならびに CncC の小胞体膜アンカーによる抑制機構は、高等生物とショウジョウバエの種間で高く保存され機能的にも重要であることを明らかにした。この結果を支持するように、近年、NRF1/CncC の小胞体からの解離・核移行にはタンパク質切断酵素 DDI2 による切断が関わることを証明されている (*eLife* 2016)。

次に CncC の脂質代謝機構への関与を調べるために、CncC  $\Delta$ NHB1 をショウジョウバエの Fat body (高等生物の肝臓に相当する器官) に過剰発現させたところ、脂肪滴の形成ならびにトリグリセリド量が低下することを見出した。この結果は、脂質代謝における生理機能も、CncC と NRF1 の間で種間保存されていることを示す。

### (2) 脱ユビキチン化による NRF1 の活性化機構

NRF1 の活性は、NHB1 ドメインによる小胞体アンカー機構とともに、ユビキチン依存的なタンパク質分解系で制御されていることを我々は明らかにしてきた (*MCB* 2012)。しかし、これら抑制機構からの NRF1 活性化メカニズムについては不明なままであった。我々は NRF1 活

性化メカニズムを解明する目的で、NRF1 結合因子を網羅的に単離同定するプロテオーム解析を行い、脱ユビキチン化酵素 USP15 を同定に成功した。USP15 は、核において NRF1 を脱ユビキチン化し安定化させることを見出した。したがって NRF1 タンパク質の安定性は、USP15 による脱ユビキチン化機構と、すでに我々が解明した  $\beta$ TRCP によるユビキチン化機構の拮抗作用により制御されていることになる。一方、残念ながら、NRF1 によるプロテアソーム遺伝子の発現機構に USP15 が関わることを証明することはできなかった、なぜなら USP15 ノックダウンにより NRF1 遺伝子自体が強く誘導されるためである。しかし、この結果はむしろ USP15 ノックダウンに対するネガティブフィードバックループ機構の存在を意味するため、USP15 は NRF1 の活性制御していることを強く支持する。さらに、このように様々な活性制御機構が存在する NRF1 はプロテアソーム遺伝子群の発現を微細に制御する重要な転写因子であることを示唆しているものと考えられる。

### (3) NRF1 による脱ユビキチン化酵素群の発現制御と Proteostasis

Nrf1 はタンパク質分解酵素プロテアソーム遺伝子群の誘導的発現を制御することで、Proteostasis に関わることが明らかにされつつある (*Mol Cell* 2010, *MCB* 2013)。実際我々は、神経幹細胞・前駆細胞特異的な Nrf1 ノックアウトマウス (*Nrf1* NKO マウス) は、生後1週後に小脳変性疾患を発症することを見出している (*Genes Cells* 2011)。*Nrf1* NKO マウスが示す小脳変性疾患は、プロテアソームの発現低下が原因であることが強く予想されたが、予想外にプロテアソーム

の発現・活性は正常であることを見出した。そこで神経変性疾患を引き起こす *Nrf1* 標的遺伝子をマイクロアレイ解析で探索した結果、多くの脱ユビキチン化酵素群が発現低下していることを見出した。そのいくつかの遺伝子の制御領域には、*Nrf1* 結合配列である ARE 配列 (antioxidant response element) が存在することをゲノムデータ解析で確認した。次に、脱ユビキチン化酵素群の中で神経変性疾患に関わる *Usp9x* 遺伝子に着目し、実際 *Nrf1* が直接的に発現制御していることを siRNA ノックダウン実験ならびにルシフェラーゼ解析で示した。以上の結果から、*Nrf1* NKO マウスが示す神経変性疾患は、神経細胞内のユビキチン鎖の着脱機構の破綻による Proteostasis の低下である可能性を示した。

## 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[論文-英文総説含む] (計6件)

- ① Yamagata K, and Kobayashi A. The cysteine-rich domain of TET2 binds preferentially to mono- and dimethylated histone H3K36. *J. Biochem.* pii: mvx004. (2017) 査読有
- ② Taniguchi H, Okamuro S, Kohji M, Waku T, Kubo K, Hatanaka A, Sun Y, Chowdhury, AM A, Fukamizu A, and Kobayashi A. (2017) Possible roles of the transcription factor Nrf1 (NFE2L1) in neural homeostasis by regulating the gene expression of deubiquitinating enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 484, 176-183 (2017) 査読有
- ③ Fukagai K, Waku T, Chowdhury AM A, Kubo K, Matsumoto M, Kato H, Natsume T, Tsuruta F, Chiba T, Taniguchi H, and Kobayashi A. USP15 stabilizes the transcription factor Nrf1 in the nucleus, promoting the proteasome gene expression.

- Biochem. Biophys. Res. Commun.** 478, 363-370 (2016) 査読有
- ④ Waku T, Nakajima Y, Yokoyama W, Nomura N, Kako K, **Kobayashi A**, Shimizu T, and Fukamizu A. NML-mediated rRNA base methylation links ribosomal subunit formation to cell proliferation in a p53-dependent manner. **J Cell Sci.** 129, 2382-289 (2016) 査読有
- ⑤ Karim MR, **Taniguchi H**, and **Kobayashi A**. Constitutive activation of *Drosophila* CncC transcription factor reduces lipid formation in the fat body. **Biochem. Biophys. Res. Com.** 463, 693-698 (2015) 査読有
- ⑥ Ito T, **Taniguchi H**, Fukagai K, Okamuro S. and **Kobayashi A**. Inhibitory mechanism of FAT4 gene expression in response to actin dynamics during Src-induced carcinogenesis. **PLOS ONE**, 10, e0118336 (2015) 査読有

〔学会発表等〕（研究代表者の招待講演）

（計 1 件）

- ① 小林 聡、転写因子 Nrf1 による代謝制御、BMB2015、ワークショップ 2015 年 12 月 3 日、ポートアイランド、兵庫県神戸市

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

出願：2 件

- ①発明の名称：抗がん剤  
出願番号：特願 2016-230449  
出願日：2016/11/28  
出願人・発明者：和久剛、小林聡、加藤裕紀、渡辺秀教  
内容：転写因子 NRF3 をターゲットとした抗がん剤について
- ②発明の名称：抗がん剤  
出願番号：PCT/JP2017/010445  
出願日：2017/3/15  
出願人：和久剛、小林聡、加藤裕紀、糀美早紀、渡辺秀教  
内容：転写因子 NRF3 をターゲットとした抗がん剤について

〔その他〕 ホームページ等

研究室ホームページ

- <http://akobayas.wixsite.com/genetic-code-lab>
- <http://rc-neuro.wixsite.com/neurodegeneration>

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 聡 (KOBAYASHI, Akira)  
同志社大学・大学院生命医科学  
研究科・教授  
研究者番号：50292214

### (2) 連携研究者

谷口浩章 (TANIGUCHI, Hiroaki)  
同志社大学・生命医科学部・助教  
研究者番号：50587441

研究課題名：体細胞初期化過程で核内受容体が代謝と転写環境に果たす役割の解明

研究期間：2014～2015

課題番号：26116726

研究代表者 川村 晃久（立命館大学 生命科学部 准教授）

連携研究者 木田 泰之（国立研究開発法人 産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門 主任研究員）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2014年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2015年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000

**研究成果の概要：**本研究では、初期化誘導過程で生じる多様な細胞集団の中から iPS 細胞形成効率の高い集団を表面マーカーにより誘導早期で選別して解析を行った。その結果、iPS 細胞形成には核内受容体  $ERR\alpha/\gamma$  を介した高エネルギー状態が重要であることが判明した。興味深いことに、初期化過程で酸化的リン酸化の亢進は一過性である一方、解糖系の亢進は継続するが、この代謝シフトに関して、 $ERR\alpha/\gamma$  により発現誘導される TCA サイクルの制御因子のひとつ IDH ファミリーと、低酸素応答因子 HIF1 が重要な働きをしている可能性が見いだされた。

## 1. 研究の背景

iPS 細胞や ES 細胞のような多能性幹細胞は、一定の培養条件で無限増殖するため、癌細胞と同様に、解糖系を中心とした嫌気性代謝が優位であることが知られている。しかし、体細胞から iPS 細胞へ初期化される過程で如何に代謝が変化するか、その詳細については知られていない。

初期化の過程は多様であり、iPS 細胞の形成効率が数%未満と非常に低いため、その分子機構の解明は困難である。我々は、がん抑制遺伝子 p53 が初期化を負に制御していること (*Nature* 2009;460:1140-4) など、初期化過程の解析を精力的に進めており、最近、表面マーカーの解析から初期化成功群と不成功群を誘導早期に区別して解析する系を立ち上げた (PCT 特許出願中、**図 1**)。この方法により、初期化成功の予測マーカー

として、転写因子 Foxd1 (*Nature Commun* 2014;5:3197.) が同定された。さらに、初期化成功群では、一過性に、酸化的リン酸化に関わる遺伝子の発現亢進を認めており、これが核内受容体により制御されている可能性が見出された。また、近年の研究から、初期化過程における細胞内代謝様式の変化が、脱メチル化酵素などを介したヒストン修飾に影響して、iPS 細胞形成に重要なエピジェネティクスの変化を誘導している可能性も示唆されている。

## 2. 研究の目的

iPS 細胞形成過程では、一過性に好気性代謝が亢進している時期を経たのち嫌気性代謝へのシフトがなされている可能性が考えられる。これは、iPS 細胞への初期化は多くのエネルギーを必要とするが、好気性の代謝が遷延すると酸化ストレスや DNA 損傷シグナルが活性化され初期

化不成功となるため、最終的には嫌気性代謝へシフトすることが重要であることを物語っている。さらに、近年、脱メチル化酵素である JHDM や Tet が、TCA サイクルの中間産物である  $\alpha$  ケトグルタル酸依存性に、ヒストンや DNA の脱メチル化を誘導する報告がなされていることから、初期化に重要なエピジェネティクスの変化が一過性の好気性代謝を必要としているとも予想される。本研究では、上記の知見をもとに、初期化過程において、代謝経路と、遺伝子発現の重要な場である転写環境とのクロストークを、核内受容体に着目して解析する。

### 3. 研究成果

#### (1) 表面マーカーによる初期化成功群・不成功群の解析

初期化に関わる遺伝子を探索するため、4つの因子(4Fs/Oct4, Sox2, Klf4, cMyc)を感染させた MEF(マウス胚線維芽細胞)において、初期化早期(day5)での mRNA 発現をマイクロアレイにより網羅的に解析した。Gene Ontology データベースで「表面マーカー遺伝子」として登録された 886 個の遺伝子を抽出して解析したところ、4 因子 (Oct4, Sox2, Klf4, cMyc) を感染させた MEF (4Fs) と空ベクターを感染させた MEF (mock) を比較し、リプログラミングの初期段階において発現が亢進した遺伝子が 61 個、発現が減少した遺伝子が 131 個見出された(図 1)。本研究では、4Fs において遺伝子発現量が亢進している表面マーカー遺伝子のうち既に造血幹細胞のマーカーとして知られている Sca1、CD34 に着目して研究を開始した。

4Fs を感染させた MEF(マウス胎仔線維芽細胞)において、初期化過程の早期

から後期の各時相、すなわち誘導 5, 7, 9, 12 日目において表面マーカー Sca1, CD34 を用いて細胞選別を行った。その後、再び培養し 7~10 日後に、iPS 細胞に特異的な抗体 Nanog で染色後、Nanog 陽性 iPS 細胞コロニーの出現頻度を評価した。誘導 5 日目以降はおもに、Sca1/CD34 二重陰性細胞群 (DN)、Sca1 陽性/CD34 陰性細胞群 (S+)、Sca1/CD34 二重陽性細胞群 (DP) の主に 3 つの細胞群に分かれていた。さらに、いずれの時相においても Sca1/CD34 二重陰性細胞群 (DN) から主として Nanog 陽性 iPS 細胞コロニーが出現すること、Sca1/CD34 二重陽性細胞群 (DP) からはほとんど出現しないことが見出された。

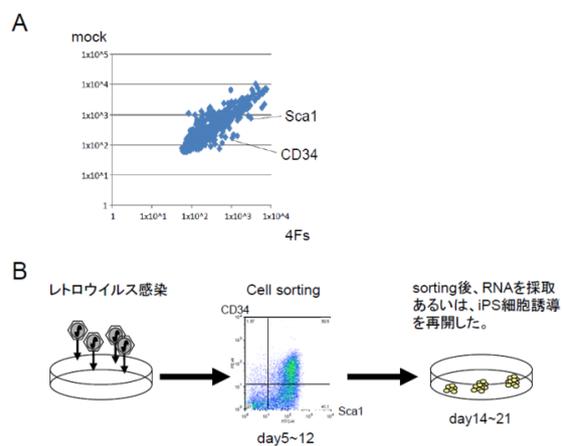


図 1. 表面マーカーを用いた初期化誘導過程の解析 (A) 4Fs により発現が増減した表面マーカー遺伝子の網羅的解析 (B) 初期化誘導過程における細胞選別を用いた解析

#### (2) 核内受容体 ERR と IDH family の発現解析

初期化誘導過程における代謝経路についてさらに解析するため、初期化誘導過程で TCA サイクルからの好氣的代謝経路を制御する分子として核内受容体 ERR $\gamma$ と、そのコファクター PGC1  $\beta$ に着目した。ERR $\gamma$ の標的遺伝子である IDH

family は、TCA サイクルの反応経路の中で、イソクエン酸が  $\alpha$ -ケトグルタル酸(2-オキソグルタル酸) となる反応を触媒する酵素であるが、近年の研究によりクロマチン修飾に関与すること、点変異による発癌との関わりも注目されている。

MEF へ、4Fs を感染後 5, 7, 9, 12 日目の各時相で、Sca1/CD34 二重陰性細胞群 (DN、初期化成功群)、Sca1/CD34 二重陽性細胞群 (DP、初期化不成功群)、Sca1 陽性 CD34 陰性細胞群 (S+群) の 3 分画から total RNA を抽出し、QPCR 法により ERR $\gamma$ 、PGC1 $\beta$ 、IDH1、IDH2、IDH3 $\alpha$  の発現量を定量的に解析した。興味深いことに、核内受容体である ERR とそのコファクター PGC1 $\beta$  の発現が誘導早期の Sca1/CD34 二重陰性細胞群では初期化過程の早期 (誘導 5, 7 日目) をピークに一過性に亢進していることが判明した。また同じ IDH family の中でも、ミトコンドリア内 (マトリクス) に局在し、TCA サイクルの反応経路により深く関与する IDH2、IDH3 $\alpha$  が、初期化成功群において発現亢進していることが見出された。

以上より、初期化の成功には、初期化過程の早期で、代謝関連遺伝子による好気性代謝経路が活性化することが重要である可能性が示唆された。IDH family により産生量が制御される  $\alpha$ -ケトグルタル酸は、脱メチル化酵素の基質として作用すること以外に、低酸素応答性 HIF1 の活性に関与することが知られている。我々は、初期化成功群では通常酸素濃度下においても HIF1 活性が高いこと、HIF1 $\alpha$  のノックダウンにより iPS 細胞形成効率が低下することも見出しており、HIF1 とのクロストークが初期化成功の鍵となることが示唆される。

### (3) 初期化誘導過程における細胞内 ATP 産生量

初期化誘導過程における代謝経路について明らかにするため、細胞内のエネルギー量の指標となる ATP 量を測定した。4Fs を感染させた MEF において、初期化過程の各時相 (誘導 5, 7, 9, 12 日目) で、Sca1/CD34 二重陰性細胞群 (DN、初期化成功群)、Sca1/CD34 二重陽性細胞群 (DP、初期化不成功群)、Sca1 陽性 CD34 陰性細胞群 (S+群) の 3 分画を選別し、それぞれの細胞内 ATP 量を測定した。その結果、初期化成功群 (DN) では、他の細胞群に比べ代謝が盛んで高エネルギー状態であることが示唆された。また、初期化過程の早期 (誘導 5 日目) で最も ATP 量が多く、その後は、徐々に低下していくことが示された。

ES 細胞や iPS 細胞のような増殖能の盛んな多能性幹細胞では、癌細胞と同様、Warburg 効果により細胞内の代謝が解糖系に依存していることが知られているため、初期化成功群における好気性代謝の亢進は一過性であると考えられる。また、先述の結果のように、初期化成功群 (DN) における ERR $\gamma$  と PGC1 $\beta$  発現レベルも初期化後期にかけて低下していくことから細胞内 ATP 量と良く相関することが見出された。

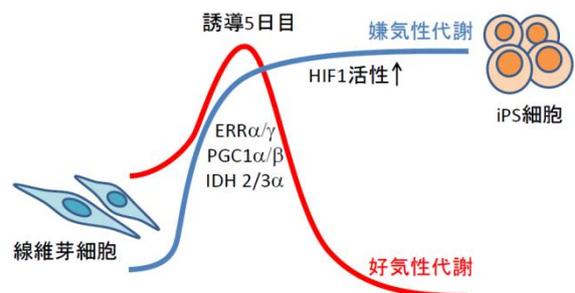


図 2. 初期化過程における細胞内代謝様式のシフトとその制御因子

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕(計2件)

- ① Kida YS\*, Kawamura T\*, Zong W, Sogo T, Jacinto S, Shigeno A, Kushige H, Yoshihara E, Liddle C, Ecker JR, Yu RT, Atkins AR, Downes M, Evans RM. ERRs Mediate a Metabolic Switch Required for Somatic Cell Reprogramming to Pluripotency. (\***Equal co-first author**) *Cell Stem Cell*. 2015;16:547-555. 査読有 doi: 10.1016/j.stem.2015.03.001.
- ② Koga M, Matsuda M, Kawamura T, Sogo T, Shigeno A, Nishida E, Ebisuya M. Foxd1 is a mediator and indicator of the cell reprogramming process. *Nature Commun*. 2014;5:3197. 査読有 doi: 10.1038/ncomms4197.

〔学会発表等〕(研究代表者の招待講演)

(計4件)

- ① 川村晃久、万能細胞の現状と将来展開、立命館科学技術振興会 ASTER 主催講演会、2014年5月27日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、滋賀県草津市
- ② 川村晃久、体細胞から iPS 細胞への初期化の分子機構の解明、第1回 J-ISCP 学術集会、2015年6月20～21日、ハイアットリージェンシー京都、京都府京都市
- ③ Kawamura T. Studies on regenerative medicine using iPS cell technologies. Meeting of the International Program for Life Science、2016年3月3日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス、滋賀県草津市
- ④ 川村晃久、体細胞から iPS 細胞への初期化制御機構、2016年7月30日、第6回細胞再生医療研究会、臨床研究情報(TRI)センター、兵庫県神戸市

〔図書〕(計1件)

- ① 川村晃久、重野麻子、十河孝浩、iPS細胞を用いた心血管創薬スクリーニング J-ISCP 会誌「心血管薬物療法」(2014年2巻1号、pp71-74) 国際心血管薬物療法学会日本部会 URL, <http://www.j-iscp.com/pdf/j-iscp02.pdf>

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

出願：1件

発明の名称：REPROGRAMMING PROGENITOR COMPOSITIONS AND METHODS OF USE THEREFORE

出願番号：U.S. Provisional Patent

Application No. 62/126,417

出願日：February 27, 2015

出願人・発明者：Downes MR, Kida YS, Kawamura T, Wei Z, Yu RT.

〔その他〕ホームページ等

研究室ホームページ

<http://kawamura-lab.jp/>

#### 5. 研究組織

(1) 研究代表者

川村晃久 (KAWAMURA, Teruhisa)

立命館大学・生命科学部・准教授

研究者番号：90393199

(2) 連携研究者

木田泰之 (KIDA, Yasuyuki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所

所・創薬基盤研究部門・主任研究員

研究者番号：20396526

研究課題名：オプトジェネティクスによる転写環境制御  
Transcriptional control by optogenetics

研究期間：2014～2015

課題番号：26116728

研究代表者 榎引俊宏（防衛医科大学校 医用工学講座 准教授）

【交付決定額（分配額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2014年度	6,800,000円	0円	6,800,000円
2015年度	6,800,000円	0円	6,800,000円

**研究成果の概要：**本研究ではオプトジェネティクスが創製する新しい転写環境の制御とその作用解析を行っている。特に、再生医療や細胞移植療法による細胞・組織の機能代替だけでは不十分であった領域に対して、オプトジェネティクスによる移植細胞の刺激や再生組織機能の改善を目指している。本研究期間での成果として、チャネルロドプシン2を発現させた膵β細胞を用い、光照射によるグルコース代謝非依存性インスリン分泌量増加と糖尿病モデルマウスの血糖値上昇抑制効果を明らかにした。さらに、本研究領域会議に参加することにより、オプトジェネティクスによるミリ秒単位での転写因子発現量イメージングを行うことに成功しつつある。

## 1. 研究の背景

オプトジェネティクス（光遺伝学）は、光のエネルギーを受容して活性化される分子を遺伝子工学的手法により細胞に発現させ、その細胞の機能や細胞内シグナル伝達を光技術によって操作・制御する技術である。このオプトジェネティクスの進歩により、特定の細胞をミリ秒以下のオーダーで正確に操作することが可能となった。特に、チャネルロドプシン2（Chanelrhodopsin 2: ChR2）を光受容体として細胞に導入し、神経活動と行動の関係を繋げる研究成果がこれまでに多く報告されている。これまで、長年議論され解決していなかった“記憶は海馬の神経細胞に記録されているのか？”という疑問に対する解が報告され、また、“グリア細胞が呼吸機能に関わっているのか？”、“不安を引き起こす扁桃体の神経回路の機能は？”という課題に対して、オプトジ

ェネティクスが1つの可能性を示してきたことは非常に功績が大きい。また、光照射によって細胞内シグナル伝達経路を制御するために、ロドプシンの細胞内ループをGタンパク質共役型受容体であるアドレナリン受容体の細胞内ループに置き換えたキメラタンパク質であるOptoXRsが報告された。さらに、光照射によってタンパク質の発現をON/OFFするLight-switchable transgene system、Photoactivated adenylyl cyclase (PAC)、LiGluRやHyLighterなど、レチナール以外を補因子とする光受容体も報告され、日進月歩でオプトジェネティクスに用いる光受容体の開発とその応用研究が報告されている。これら発展が目覚ましいオプトジェネティクスを研究ツールとしてだけでなく、疾病の診断や治療に応用する研究成果も近年報告数が増加している。

## 2. 研究の目的

本研究では、オプトジェネティクスを用いた膵ベータ細胞内の転写制御とインスリン分泌制御を目指して研究を行った。ChR2 をマウス膵ベータ細胞 (MIN6) に発現させ、光照射によるインスリン分泌制御を試みた。通常の膵ベータ細胞からのインスリン分泌機序は、グルコースが膵ベータ細胞で代謝された後、ATP 産生量の増加と ATP 感受性カリウムチャンネルが閉鎖することで細胞膜の電位が上昇し、続いて電位依存性カルシウムチャンネルが開いてカルシウムイオンが細胞内に流入しインスリン分泌が惹起される。本研究では、膵ベータ細胞に ChR2 を発現させ、光技術を用いて、解糖系とは異なる経路を経てグルコース濃度非依存的に膵ベータ細胞からインスリン分泌を促すことを目的とした。また、ChR2 を発現した膵ベータ細胞を糖尿病モデルマウスへ移植し、光照射による血糖値上昇の抑制を試みた。

## 3. 研究成果

ChR2 を膵ベータ細胞に強制発現させた後、波長 470 nm、パルス幅 3-6 ns、繰返し周波数 1 kHz、50  $\mu$ J のレーザー光を細胞に照射した結果、*in vitro* 実験系においてグルコース不含培地中 (解糖系の寄与なし) でも膵ベータ細胞からのインスリン分泌を促進することができた (図 1)。

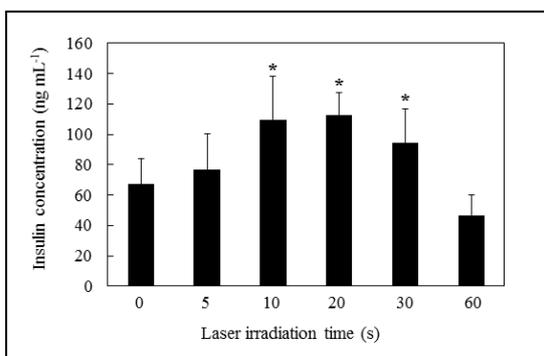


図 1 ChR2 を発現した膵ベータ細胞に種々の時間で光照射を行った際の培養上清中インスリン濃度

また、細胞内へのカルシウムイオン流入をパッチクランプ法 (図 2) とカルシウム指示薬 Fluo-4 の蛍光イメージング (図 3) により確認し、アデニル酸シクラーゼ (Adcy1) およびカルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ (Camk2d) の mRNA 発現増加をリアルタイム PCR により確認した (図 4)。

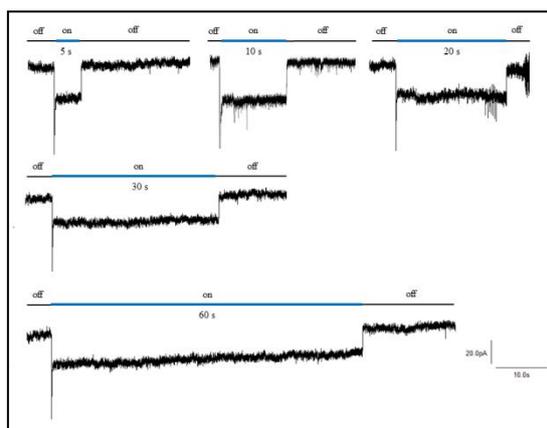


図 2 ChR2 を発現した膵ベータ細胞に光照射を行った際の細胞膜電位変化 (パッチクランプ法)

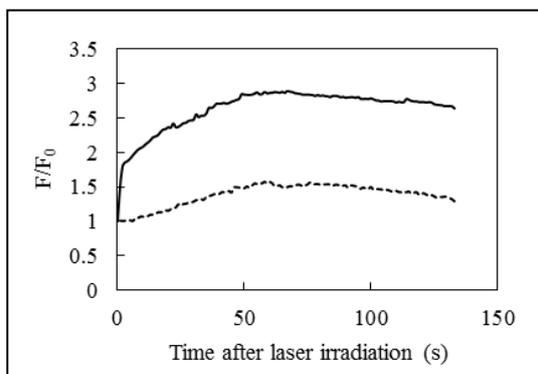


図 3 ChR2 を発現した膵ベータ細胞に光照射後のカルシウム指示薬 Fluo-4 の蛍光強度変化 (実線: ChR2 発現膵ベータ細胞、点線: ChR2 を発現していない膵ベータ細胞)

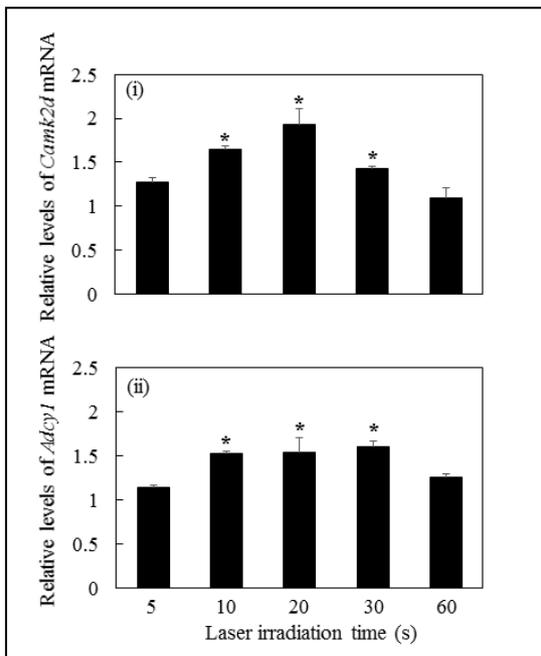


図4 Chr2 を発現した膵ベータ細胞に光照射を行った際の *Adcy1* および *Camk2d* の mRNA 発現量

さらに、この膵ベータ細胞をストレプトゾトシン (STZ) 誘発糖尿病モデルマウスに移植し、移植細胞への光照射と同時にグルコース負荷試験を行った結果、光を照射した場合のみ、血糖値上昇抑制効果がみられた (図5)。

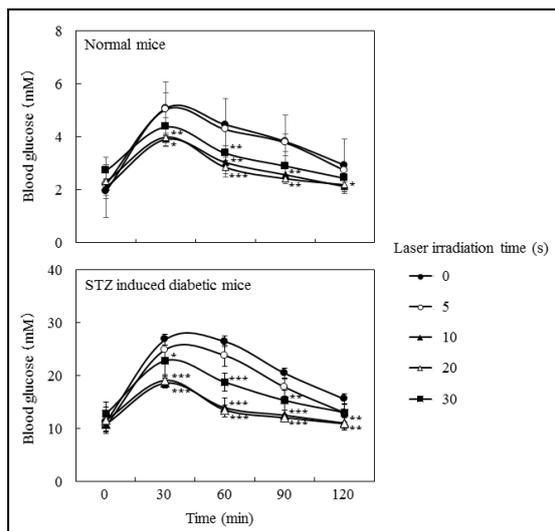


図5 Chr2 を発現した膵ベータ細胞を正常マウス (上) または STZ 誘発糖尿病モデルマウス (下) に移植後、移植細胞に光照射と同時にグルコース負荷試験を行った際の、血中グルコース濃度の経時的変化

これらの結果から、膵ベータ細胞に Chr2 を発現させることにより、解糖系に依存せず (グルコース濃度非依存的に) 膵ベータ細胞からインスリンの分泌を促すことができた (図6)。

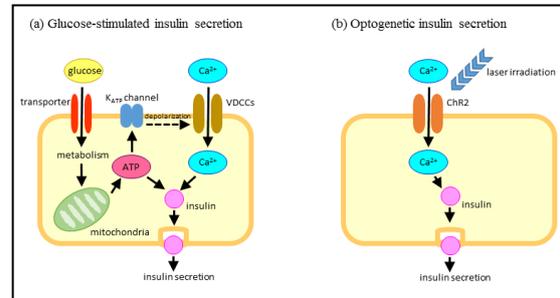


図6 オプトジェネティクスによるグルコース濃度非依存的インスリン分泌メカニズム。(a) 通常の解糖系によるインスリン分泌機序、(b) オプトジェネティクスによるインスリン分泌機序

この研究成果のように、これまでの再生医療や細胞移植療法による細胞・組織の機能代替だけでは不十分であった領域に対して、オプトジェネティクスによる移植細胞の刺激や再生組織機能の改善が期待できると考えている。今後は本研究領域で得られた研究成果を活かし、細胞機能制御と組織機能制御を光技術により行うことができる新しい分野としてのオプトジェネティクスを活用し、医療に役立つ技術の開発を目指して研究を進めたい。

#### 4. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔論文-英文総説含む〕 (計5件)

- ① Kushibiki T, Okawa S, Hirasawa T, and Ishihara M. Optogenetic control of insulin secretion by pancreatic beta-cells *in vitro* and *in vivo*. **Gene Ther.** 22, 553-559 (2015) 査読有
- ② 櫛引俊宏、大川晋平、平沢壮、石原美弥、オプトジェネティクス (光遺伝学) による細胞機能制御、**日本レーザー医学会誌** 34, 394-401 (2014) 査読有

- ③ 櫛引俊宏、オプトジェネティクスを用いた膵β細胞からのインスリン分泌制御、*実験医学* 33, 3079-3083 (2015) 査読無
- ④ 櫛引俊宏、大川晋平、平沢壮、石原美弥、オプトジェネティクスによる疾病治療への展望、*光アライアンス* 26, 33-37 (2015) 査読無
- ⑤ 櫛引俊宏、大川晋平、平沢壮、石原美弥、オプトジェネティクスの医療応用、*日本レーザー医学会誌* 36, 482-488 (2016) 査読有

〔学会発表等〕（研究代表者の招待講演）

（計 3 件）

- ① 櫛引俊宏、エポックメイキングレクチャー「光が働きかける細胞機能ー生命科学・医学とのかかわりー」、第 17 回日本 IVF 学会、平成 26 年 9 月 13 日、大阪国際会議場、大阪市
- ② 櫛引俊宏、光が働きかける細胞機能、第 20 回バイオテンプレート研究会、平成 27 年 1 月 29 日、東京都
- ③ Kushibiki T. Controlling cells function by light technology. JSAP-OSA Joint Symposia 2015. 平成 27 年 9 月 16 日、名古屋国際会議場、愛知県名古屋市

〔研究成果による産業財産権の出願・取得状況〕

・該当なし

〔その他〕

- ① 日経産業新聞 平成 28 年 4 月 1 日に記事掲載「光遺伝学、応用広がる」
- ② 転写代謝システム新学術領域・後援、第 35 回日本レーザー医学会総会 シンポジウム「オプトジェネティクス（光遺伝学）による生体機能制御」2014 年 11 月 30 日（東京）を開催
- ③ 転写代謝システム新学術領域・後援、第 33 回日本ヒト細胞学会 シンポジウム「細胞・組織の制御と解析に向けた技術インテグレーション」2015 年 8 月 23 日（宮崎）を開催

## 5. 研究組織

(1) 研究代表者

櫛引俊宏 (KUSHIBIKI, Toshihiro)

防衛医科大学校・医用工学講座・

准教授

研究者番号：30403158