

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08669

研究課題名(和文) ヒストンを中心としたタンパク質新規アシル化の制御機構と生理的意義の解明

研究課題名(英文) Analysis of the novel protein acylations focused on histone modifications

研究代表者

西田 友哉 (Nishida, Yuya)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10581449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質翻訳後修飾の一種であるアシル化修飾にはリシン残基のアセチル化と、ヒドロキシ酪酸(BOHB)化が含まれるが、それらはケトン体の代謝と密接な関係を持つことが知られている。本研究ではケトジェニック食を負荷したマウスを用いてケトーシスを誘導したのち、多くの臓器で上記アシル化が増加すること、またそれらのヒストン修飾は酵素依存的・非依存的なメカニズムが想定されることを見出した。また、哺乳類細胞でのアシル化修飾因子の同定を行うための手法として、オートファジーフラックスの制御因子を同定する系を作成することにより、CRISPR/Cas9によるgRNAスクリーニングを実施可能な細胞株を樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化が進む我が国において健康寿命の延長は喫緊の課題であり、ケトジェニック食の有効性が示唆されているが、そのメカニズムの一端には本研究で明らかにしたタンパク質のアシル化修飾の制御が関係しているものと考えられる。その分子機構を明らかにすることにより、健康長寿に寄与する新しい治療法の開発につながることを期待され、本研究で確立したCRISPR/Cas9によるゲノムワイドスクリーニング法はその分子メカニズムの解明に大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that protein lysine acylations, including acetylation and beta-hydroxybutyrylation, are closely related to ketone body metabolism. In this study, we investigated whether those lysine modifications are induced after mice were fed with ketogenic diet, containing no carbohydrate. The mice manifested increase of lysine acetylation and beta-hydroxybutyrylation in whole cell lysates of various organs such as liver, heart and kidney. However, the amounts of those modifications in histones are not always proportional to those in whole cell lysates, suggesting that lysine acylations are regulated by different mechanisms between organelles. In addition, we developed the system in which genome-wide gRNA screening is feasible using CRISPR/Cas9 system, focusing on identifying regulators for autophagic flux, in order to examine key molecules involved in protein acylation or de-acylation.

研究分野：糖尿病・内分泌学

キーワード：アシル化 ケトン体 ヒストン修飾

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質翻訳後修飾 (PTM) のひとつであるアシル化修飾に関しては、早くから着目されていたアセチル化に加え、サクシニル化、マロニル化など多様な修飾の存在が報告され、その生理的意義に関しても検討が進んでいる。特に、(1)これらの修飾を行う官能基の基質となる分子は、代謝経路における重要な中間産物であるという点、さらに(2)NAD 依存性脱アセチル化酵素であるサーチュインファミリーが脱アシル化活性をも有するという点は、代謝と翻訳後修飾の密接な関係を示唆している。

我々は研究開始当初まで、上記の新規アシル化のうちサクシニル化とマロニル化に注目して研究を行っていた。特にサーチュインファミリーに属する SIRT5 が脱サクシニル化・脱マロニル化活性を有することを見出し、SIRT5 ノックアウト(KO)マウスを用いてこれらのアシル化に特異的な抗体を用いて免疫沈降を行い、LC-MS/MS によって修飾タンパクの網羅的・定量的解析を行った。これにより、新規アシル化が β 酸化、ケトン体産生、解糖系などの代謝経路の制御に関与していることを明らかにした[1]。

2. 研究の目的

我々は上述のように、新規アシル化修飾に関して網羅的解析を行うことで修飾タンパクを同定し、どのような機能制御が行われているかを検討してきた。個別のタンパクの修飾について検討を行ってきた結果、それぞれの機能制御については解明されているが、その範囲はごく限られている。特に重要な PTM であるヒストン修飾を介したエピジェネティック制御に関しての検討は十分ではない。さらに、どのような栄養状態の変化がアシル化修飾にとって重要であるかについても知見は乏しい。我々はまず、最近老化抑制の観点から有益であることが報告されているケトジェニック食に着目した[2]。ケトジェニック食は炭水化物を含まない脂質主体の食事であり、摂食によりケトーシスを惹起する。ケトン体の主な成分である β ヒドロキシ酪酸(BOHB)はヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の阻害効果が報告されており[3]、間接的にアセチル化の制御に関与することが知られているが、近年、BOHB によるリシン残基のアシル化修飾である β ヒドロキシ酪酸化の存在も報告されている[4]。我々はまずこのモデルに着目し、ケトジェニック食によるケトン体の増加が、(1)HDAC 阻害によるアセチル化(2)タンパクの直接修飾による BOHB 化を介して生体内の機構制御を行い、さらに老化の抑制に寄与しているとの仮説を提示し、そのメカニズムを明らかにすることを目的に研究を開始した。そのために、(1)ケトジェニック食負荷による各臓器でのタンパクアシル化の動態の検討を行うとともに、(2)哺乳類細胞での遺伝子ノックアウトスクリーニングを施行する系の確立を、オートファジー誘導モデルを用いて行った。

3. 研究の方法

(1) ケトジェニック食負荷による各臓器でのタンパクアシル化の動態の検討

B6/J マウスに対してケトジェニック食およびコントロール食を投与し、ケトジェニック食でケトーシスが誘導されることを確認する。ケトジェニック食投与後の糖代謝のプロファイルを検討する。その上で、各臓器におけるアシル化修飾の変化をウェスタンブロット法によって確認する。また、ヒストンの抽出も行い、ヒストン特異的なアシル化修飾の変化を検討する。一方で、

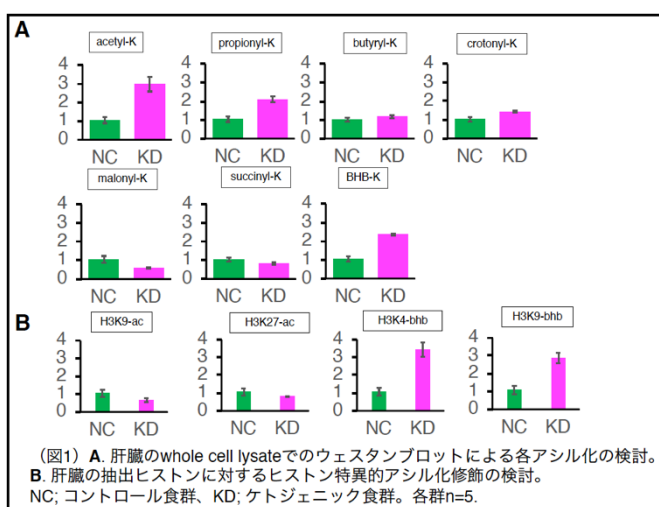
それらの修飾を介した遺伝子発現の変化について、RNA-seq による網羅的検索を行う。

(2) 哺乳類細胞での遺伝子ノックアウトスクリーニングを施行する系の確立

アシル化修飾の制御因子に関して哺乳類細胞で遺伝子スクリーニングを行うための CRISPR/Cas9 を用いた系を作成する。具体的には、我々が作成したオートファジーフラックスの蛍光モニタープローブを使い、ゲノムワイド gRNA による遺伝子スクリーニングが可能な細胞を確立する。一方で、いくつかのアシル化修飾に関しては化学的修飾により検出可能な蛍光プローブが報告されていることから[5]、これらを遺伝子スクリーニングと併用することでアシル化修飾の制御因子の同定を目指す。

4. 研究成果

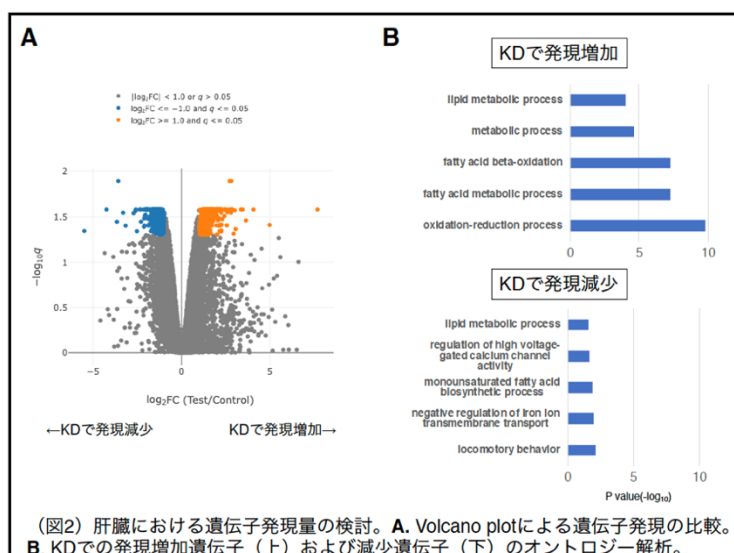
(1) ケトジェニック食負荷による各臓器でのタンパクアシル化の動態の検討



野生型 B6/J マウスに対して、等カロリーのケトジェニック食とコントロール食を給餌しケトーシスの誘導を確認した。6 週間の給餌後にブドウ糖負荷試験を行い、両群で耐糖能が大きく変化しないことを確認した。また、体重に関しても両群で有意な差は認められなかった。各臓器を摘出し、ウェスタンブロットにてタンパクアシル化の程度を検討した。その結果、肝臓や心臓、腎臓においてはリシン残基のアセチル化や BOHB 化がケトジェニック食給餌群で有意に増加した。一方で、脳においては明らかな変化が認められなかった。これらの変化に関して細胞全体のライセートでの評価に加えて、ヒストンを抽出した上での検討を肝臓に対して行った。その結果、BOHB 化に関しては、抽出ヒストンにおいてもケトジェニック食給餌群で増加が認められたが、アセチル化については細胞全体のライセートと異なり、変化が見られなかった。さらに、ヒストン修飾特異的抗体を用いて検討を行なったが、H3K4 の BOHB 化・H3K9 の BOHB 化については同様にケトジェニック食給餌群で増加が認められる一方、H3K9 のアセチル化・H3K27 のアセチル化については変化が見られなかった(図 1)。このようにケトジェニック食給餌群では、BOHB 化に

臓や心臓、腎臓においてはリシン残基のアセチル化や BOHB 化がケトジェニック食給餌群で有意に増加した。一方で、脳においては明らかな変化が認められなかった。これらの変化に関して細胞全体のライセートでの評価に加えて、ヒストンを抽出した上での検討を肝臓に対して行った。その結果、BOHB 化に関しては、抽出ヒストンにおいてもケトジェニック食給餌群で増加が認められたが、アセチル化については細胞全体のライセートと異なり、変化が見られなかった。

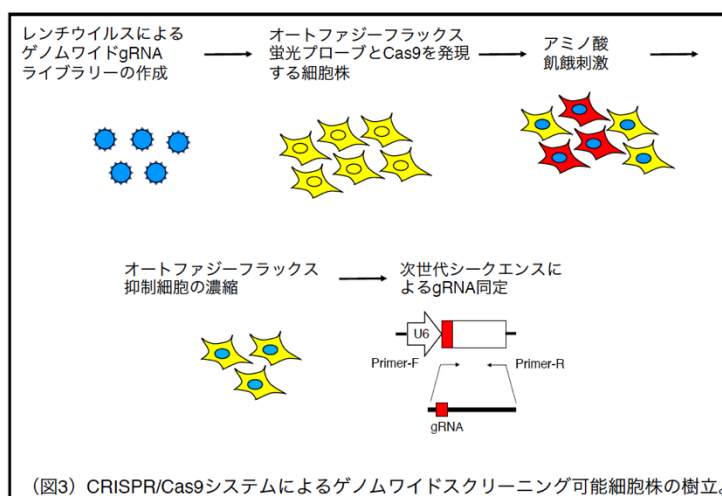
さらに、ヒストン修飾特異的抗体を用いて検討を行なったが、H3K4 の BOHB 化・H3K9 の BOHB 化については同様にケトジェニック食給餌群で増加が認められる一方、H3K9 のアセチル化・H3K27 のアセチル化については変化が見られなかった(図 1)。このようにケトジェニック食給餌群では、BOHB 化に



についてはヒストンを含めた細胞内タンパク全般での変化が認められたが、アセチル化ではヒストンでの変化が明らかではなく、遺伝子発現の制御に関してはヒストンアセチル化ではなくBOHB化を介して制御されている可能性が考えられた。また、アセチル化の程度が細胞全体のライセートの場合と抽出ヒストンで異なっている一方で、BOHB化は両者の傾向が一致することから、BOHB化はケトン体による受動的な修飾の可能性が高いが、アセチル化は従来の知見と一致するように、アセチル基転移酵素や脱アセチル化酵素による能動的な制御が強く示唆された。さらに、ケトジェニック食群と通常食群で肝臓の mRNA 発現解析を RNA-seq により行った。ケトジェニック食群では、脂肪酸代謝に関連する遺伝子の発現誘導が強く認められた (図 2)。

(2) 哺乳類細胞での遺伝子ノックアウトスクリーニングを施行する系の確立

Cas9 を過剰発現するマウス線維芽細胞(MEF)をクローニングし、自身の配列をターゲットとする gRNA 配列を含む蛍光レポーターをレンチウイルスによって導入し、高効率に遺伝子ノックアウト可能な MEF を樹立した。最終的には、この細胞株にオートファジーフラックスの蛍光レポーターを発現させ、ゲノムワイドの



gRNA ライブラリーを用いたスクリーニングを行い、オートファジーの制御因子が同定されることを確認し、実験系の確立に成功した (図 3) [6]。これを用いて、いくつかの特定のアシル化修飾を特異的に標識可能な蛍光プローブと組み合わせることにより、哺乳類細胞でアシル化修飾を制御する因子の同定に応用することを計画している。

5. 引用文献

1. *Mol Cell* 59, 321–332 (2015).
2. *Cell Metab* 26, 547–557.e8 (2017).
3. *Science* 339, 211–214 (2013).
4. *Mol Cell* 62, 194–206 (2016).
5. *J Am Chem Soc.* 140, 4757–4760 (2018).
6. *Biochem Bioph Res Co* 516, 686–692 (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yazawa Rieko, Nishida Yuya, Aoyama Shuhei, Tanida Isei, Miyatsuka Takeshi, Suzuki Luka, Himuro Miwa, Haruna Hidenori, Takubo Noriyuki, Shimizu Toshiaki, Watada Hirotaka	4. 巻 516
2. 論文標題 Establishment of a system for screening autophagic flux regulators using a modified fluorescent reporter and CRISPR/Cas9	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 686 ~ 692
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.06.129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuya Nishida
2. 発表標題 Establishment of a System for Screening Autophagic Flux Regulators Using a Modified Fluorescent Reporter and CRISPR/Cas9
3. 学会等名 2019 9th International Symposium on Autophagy（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考