

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16156

研究課題名(和文)肥満形成におけるポリアミン合成と脂肪酸合成の関連性の解明と創薬ターゲットの探索

研究課題名(英文)Elucidation of the relationship between polyamine synthesis and fatty acid synthesis in obesity formation and the investigation of drug targets

研究代表者

田島 彩沙(TAJIMA, AYASA)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：20780688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ATPクエン酸リアーゼ(ACLY)は、アセチルCoA生成酵素で脂肪酸合成に関与している。今までの研究で、ポリアミン調節因子アンチザイム(AZ)がACLYと結合して活性を増強させ、アセチルCoA生成を増加させることを明らかにした。本研究では、ACLYのポリアミン代謝系に対する作用を調べ、脂肪酸代謝との相互作用について検討した。ACLYが脂肪酸合成系に利用されるだけでなく、ポリアミンのアセチル化にも消費されていることが分かり、両代謝系が密接に関与していることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人の肥満者(BMI 25)の割合は、男性 30.7%、女性 21.9% (平成30年度国民健康・栄養調査結果)とされ、肥満は糖尿病・高血圧・脂質異常症と同様に、改善を必要とする生活習慣病であり、効果的な抑制策が必要とされている。そのため、肥満メカニズムの解明は重要であり、本研究により明らかとなった新たな機能から、ACLYを分子標的とする脂肪酸合成系とポリアミン代謝系の両方に影響を及ぼす物質の検索をすることで、今後の肥満の予防法・治療法への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：ATP citrate lyase (ACLY) is an acetyl-CoA synthase and is involved in fatty acid synthesis. Previous studies have demonstrated that the polyamine regulator antizyme (AZ) binds ACLY to enhance activity and increase acetyl-CoA production. In this study, I investigated the effect of ACLY on the polyamine metabolism system and investigated its interaction with the fatty acid metabolism. It was found that ACLY is not only used in the fatty acid synthesis system, but it is also consumed in the acetylation of polyamine. This suggests that both metabolic systems are closely related.

研究分野：脂質代謝

キーワード：ポリアミン アンチザイム ATPクエン酸リアーゼ 肥満 脂質代謝 脂肪酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ATP クエン酸リアーゼ (ACLY) は、脂肪酸の前駆体であるアセチル CoA の合成を細胞質において触媒する酵素である。ACLY は脂肪酸合成の増加に伴って発現・活性が増加しており肥満治療のターゲット分子として注目されている。他方、ポリアミンは、細胞増殖に必須の因子であり、増殖の盛んな細胞では高濃度で存在する。また、ACLY 同様に肥満や非アルコール性脂肪性肝疾患でも高濃度で存在する (Subhash C et al, *Enzyme Protein* 1996)。さらに、ポリアミン異化に関与する酵素の欠損マウス(ポリアミン高値)は肥満となり、逆にその酵素の過剰発現マウス(ポリアミン低値)ではやせの症状が見られる (Jell J et al, *J Bio Chem* 2007)。これらのことから、ポリアミンの値が肥満と密接に関与していることが想像できる。しかし、ポリアミンと ACLY の関係についてはよくわかっていなかった。私はポリアミン代謝の調節因子であるアンチザイム (AZ) が ACLY に結合し ACLY を活性化することを初めて明らかにした。これは、ポリアミン代謝と脂肪酸代謝の二つの経路が連動している可能性を示唆するものである。

2. 研究の目的

肥満は、糖尿病や高血圧、脂質異常症などの生活習慣病に繋がることが知られている。肥満の原因についてはこれまでも研究が進んでいるが、ポリアミン代謝と脂質代謝の関係に着目したものはない。ポリアミン制御分子であるAZによるACLY活性化と脂質代謝との相互作用を解明することは、肥満を予防・治療するための新たな治療ターゲットになる可能性がある。そこで本研究では、まずAZのACLY活性化によって促進されるアセチルCoA生成が、ポリアミン代謝に与える影響を解明する。さらに、その作用が細胞の生存や脂肪酸合成とどのように関係しているのか、そのメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

脂肪前駆細胞である 3T3-L1 細胞を用いて、脂肪細胞の分化過程における AZ と ACLY の関係を調べるために、AZ あるいは ACLY を過剰発現させた場合、逆にノックダウンさせた場合のタンパク量と ACLY 活性について解析を行った。また、「AZ による ACLY の活性化で生成されるアセチル CoA が、細胞内で増加したポリアミンを細胞外に排出させるために積極的に利用され、細胞をアポトーシスから保護して細胞増殖を可能にしているのではないか」との仮説を検証する。そのために、ポリアミン過剰発現株 EXOD-1 細胞を用いて解析を行った。本細胞はポリアミン過剰生成により細胞死するために、EXOD-1 細胞の維持はポリアミン合成阻害薬である DFMO を用いてコントロールした。ポリアミンの定量は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用い、細胞内ポリアミンと細胞外のポリアミンを別々に測定することで、細胞外への排出を評価した。また、早期のアポトーシスを解析するために、PSVue480 による蛍光染色法を用いた。さらに、細胞内ポリアミンのイメージングには Polyamine RED Staining を用いて、アポトーシス細胞との共染色による確認を行った。そして、細胞内コレステロールのイメージングには、Filipin III による蛍光染色法を用い、コレステロールの定量的解析には LC-MS を使用した。

4. 研究成果

3T3-L1 細胞をインスリン、デキサメタゾンを用いて脂肪細胞へと分化させた場合に、分化誘導前・分化誘導時・分化誘導後の各段階において、ポリアミン(プトレシン, スペルミジン, スペルミン)量と ACLY 活性に変動が認められた。いずれの段階においても AZ を過剰発現すると ACLY の活性は亢進し、siRNA によってノックダウンすると ACLY の活性の低下が見られた。また、同時にポリアミン量も AZ の発現によって変化が見られ、AZ によって誘導されるポリアミン量の変化の一部分は、ACLY を介していると考えられる。AZ の過剰発現や ACLY 活性の抑制によって、脂肪細胞への分化は顕著に障害された。このことから、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化には、ポリアミン量や ACLY 活性は厳密にコントロールされる必要があることがうかがえる。

さらに研究を進めていく中で、細胞内ポリアミン濃度の上昇時に AZ が ACLY の活性化を介して、ポリアミンのアセチル化に必要なアセチル CoA の量を調節して、細胞外へのポリアミン排出を促進している可能性が示唆された。通常の細胞では細胞内ポリアミンが高濃度になると細胞死を引き起こしてしまうことから、その後の解析にはポリアミン過剰発現株である EXOD-1 細胞を用いて行なった。

EXOD-1 細胞のポリアミン濃度が高い状態で AZ を過剰発現させると、細胞内アセチルポリアミンが増加することが確認できた。すなわち、AZ が ACLY 活性を促進することにより、アセチル CoA の生成量が増加して、このアセチル CoA がポリアミンのアセチル化に利用されていることが明らかとなった。

EXOD-1 細胞は、ポリアミン合成阻害剤であるジフロロメチルオルニチン (DFMO) を添加しなければ、細胞死が誘導される。そこで、この細胞死のタイプを調べたところ、早期アポトーシスの指標である細胞膜ホスファチジルセリンの発現を蛍光標識する PSVue 480 を用いて、アポトーシスであることを確認した。次に、細胞死とポリアミン濃度との関係を詳細に調べたところ、細胞内プトレシン濃度の上昇と細胞死は相関していたが、細胞内スペルミジン濃度は途中から減少を始め、細胞内スペルミン濃度の上昇は認められなかった。一方で細胞内の *NI*-アセチルスペルミジンと *NI*-アセチルスペルミンは途中から増加が確認された。そして細胞外の *NI*-アセチルスペルミジンは次第に増加することが確認できたが、アセチルスペルミンについては細胞外排出が認められなかった。そこで、EXOD-1 細胞のアポトーシスがポリアミン濃度増加と一致しているかどうかを確認する目的で、細胞内ポリアミンを標識する蛍光プローブ Polyamine RED Staining を用いて、PSVue 480 との共染色を行なったところ、一致が確認されたことから、細胞内ポリアミン濃度の上昇がアポトーシスを誘導している可能性が示唆された。

一方、EXOD-1 細胞に ACLY を過剰発現させることによって細胞死を抑制できることが明らかとなった(PSVue 480 でアポトーシスの抑制であることも確認した)。ACLY によるこの細胞保護効果は、DFMO の共存下でも確認されたことから、作用機序は異なることが示唆される。この ACLY の細胞保護効果は、ACLY の発現量の増加と比例していることも確認された。

この時の細胞内および細胞外のポリアミン濃度を調べたところ、細胞内のプトレシン・スペルミジン・スペルミンや細胞内の *NI*-アセチルスペルミジン・アセチルスペルミンは、ACLY の発現量と一致していなかった。但し、細胞外の *NI*-アセチルスペルミジンとは比例していた。この結果から、ACLY によるこの細胞保護作用は細胞内ポリアミン濃度とは無関係のメカニズムによるものであることが考えられた。そこで、ACLY によって生成されるアセチル CoA のコレステロール合成作用を考えて、細胞膜のコレステロールと細胞死との関係を調べた。

まず、細胞膜のコレステロールを蛍光標識する Filipin III を用いて調べた。EXOD-1 細胞から DFMO を除去すると Filipin III の蛍光強度の減少が認められたことから、次に LC-MS によって細胞のコレステロール量を測定した結果、顕著な低下が確認された。ACLY を過剰発現させた EXOD-1 細胞についても同様に調べたところ、Filipin III の蛍光強度の上昇と LC-MS による細胞コレステロール量の有意な増加が確認された。しかも AZ と ACLY を共に過剰発現させることで、更なるコレステロール量の増加も認められた。従って、EXOD-1 細胞の細胞死は細胞膜コレステロールの減少に起因して惹起されている可能性が示唆された。ACLY の細胞保護効果は細胞膜コレステロール生成を増加させることによって、細胞膜の安定を維持させていることが考えられる。AZ は ACLY 活性を増強させ、より効果を高めたものと考えられる(図 1)。

この研究で明らかとなったことは、AZ が ACLY と結合して安定化することで、ACLY 活性を増強してアセチル CoA 生成量を高めて、アセチル CoA の一部はポリアミンのアセチル化に積極的に利用・消費されることで、ACLY が生成するアセチル CoA のコレステロール合成や脂肪酸合成への供給量を低下させることになると考えられる。従って、脂肪細胞において ACLY が生成するアセチル CoA のコレステロール合成や脂肪酸合成への供給量をコントロールすることで、肥満を抑制できる可能性が考えられ、例えば ACLY 活性を増強する AZ との結合を制御したり、ACLY 活性を適度に阻害できる化合物を検索することで、肥満の予防と治療に応用できるのではないかと期待される。ACLY は肥満をコントロールための新たな分子標的として考えることができる。

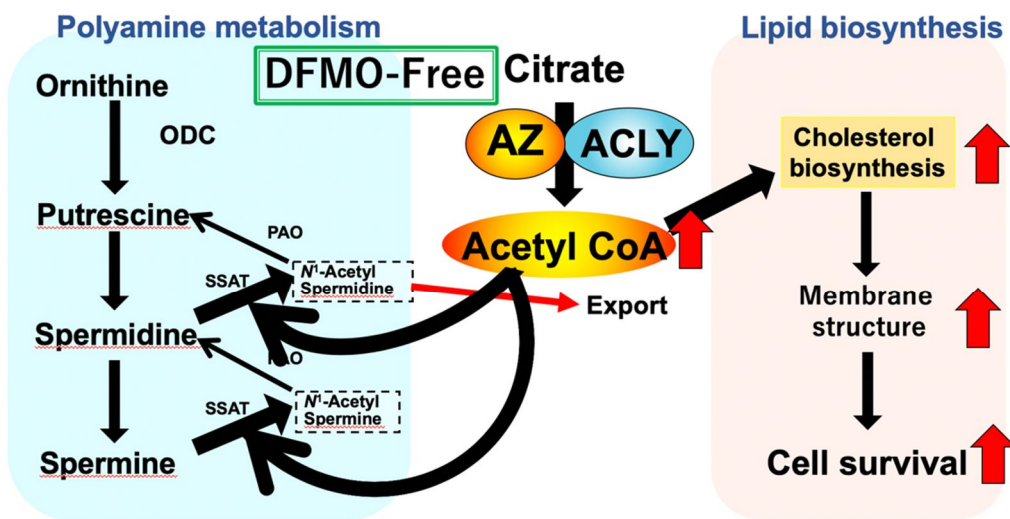


図1 ACLYのアセチルCoA生成によるポリアミン代謝と細胞の生存の関係

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Murai Noriyuki, Murakami Yasuko, Tajima Ayasa, Matsufuji Senya	4. 巻 8
2. 論文標題 Novel ubiquitin-independent nucleolar c-Myc degradation pathway mediated by antizyme 2	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3005
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-21189-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takahiko J. Fujimi, Yoshihiro Mezaki, Takahiro Masaki, Ayasa Tajima, Mariko Nakamura, Akira Yoshikawa, Noriyuki Murai, Mamoru Aizawa, Soichi Kojima, Yoshihiro Matsumoto, Hideki Aizaki, Tomokazu Matsuura	4. 巻 -
2. 論文標題 Investigation of the effects of urea cycle amino acids on the expression of ALB and CEBPB in the human hepatocellular carcinoma cell line FLC-4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ayasa Tajima
2. 発表標題 Antizyme and ATP citrate lyase suppresses the cell death of ornithine decarboxylase-overproducing cell line
3. 学会等名 5th International Conference on Polyamines: Biochemical, Physiological and Clinical Perspectives（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayasa Tajima
2. 発表標題 Relationship between ATP citrate lyase and Polyamine metabolism
3. 学会等名 Gordon Research Conference（国際学会）
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----