

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19889

研究課題名（和文）新しい栄養代謝産物センサーに注目したエピジェネティクス制御システムの解明

研究課題名（英文）unraveling an epigenetic system by targeting a novel metabolite sensor.

研究代表者

関谷 元博（Sekiya, Motohiro）

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：50420245

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：代謝産物センサー分子CtBP2の活性がどのようにエピゲノム調節を行っているか、膵細胞をモデルに解析した。CtBP2の活性化は膵細胞のインスリン遺伝子プロモーターをH3K4me2, H3K4me3, H3K9, H3K27ac, H3K27meなど多彩なヒストンマークの調節を介して開いた状態にすることでインスリン遺伝子発現を正に調節していた。こうしたエピゲノム調節に一致するように膵細胞特異的CtBP2欠損マウスを作成するとインスリン分泌能の低下、耐糖能の悪化が見られた。現在さらにCtBP2の代謝産物センシングポケット構造の変異マウスを作成し、解析している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CtBP2の代謝産物センシング機構、およびそのポケット構造は代謝疾患治療薬として標的に出来ることが申請者らの研究でわかってきており、今回の研究もそれをさらに裏付けるものとなっている。新しい機序の治療薬開発に向けた準備の意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：We investigated the role of CtBP2 in epigenomic transcriptional regulation mainly by focusing on pancreatic beta cells, where activation of CtBP2 opened the chromatin architecture by changing histone modifications represented by H3K4me2, H3K4me3, H3K9, H3H27ac and H3K27me.

We further generated pancreatic beta-cell specific CtBP2 knockout mice that showed impaired insulin secretion consistent with these findings.

We are currently analyzing mice lacking the metabolite-sensing pocket in CtBP2.

研究分野：代謝学

キーワード：代謝産物 センサー エピゲノム

# 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

CtBP2 は転写共因子であること、Rossmann fold と呼ばれる代謝産物収容ポケット構造があり NADH/NAD<sup>+</sup> に結合すると活性化、これら代謝産物のセンサーとして知られていた。また NADH/NAD<sup>+</sup> に関しては前者に対する結合親和性が後者へのそれに比して 100 倍ほど高く、NADH/NAD<sup>+</sup> 比の増加でも活性化するレドックスセンサーとして知られてきた。またその遺伝子発現調節は HDAC, EHMT1/2, LSD1/2 などのエピゲノム調節因子と複合体を形成し、エピゲノム調節を行うことで遺伝子発現を制御していることも報告されてきた。一方で全身性の遺伝子欠損マウスが胎生致死であることもあり、代謝疾患との関連性などは報告がなく、様々な代謝関連臓器をはじめとした生体内での役割も明らかでなかった。組織特異的欠損マウスを使ったような解析も存在しなかった。

## 2. 研究の目的

脂肪酸 CoA など NADH 以外の幅広い代謝産物をセンシングする機能を申請者らの研究では認めてきた。申請者らは CtBP2 が代謝産物の変動とエピゲノム修飾を結びつけ、またそれによって代謝制御を行う因子ではないかという仮説を立てた。

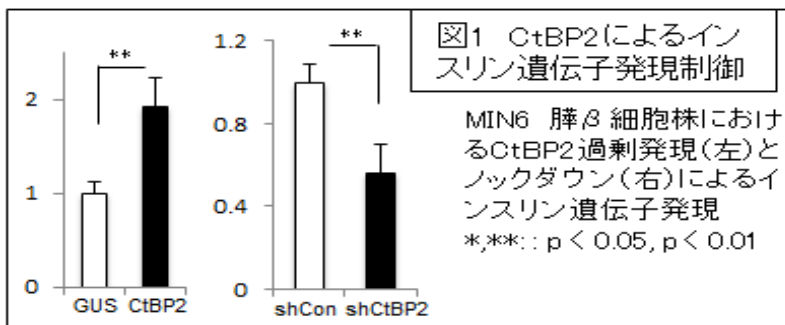
## 3. 研究の方法

代謝関連臓器・細胞として膵細胞を選択して in vitro で CtBP2 の過剰発現、ノックダウンによりインスリン遺伝子発現調節機構を探索した。また膵細胞遺伝子欠損マウスを作成し、in vivo での役割を解析した。さらにより一般的に CtBP2 の代謝産物センシングと in vivo での表現型のつながりを検証すべく、Rossmann fold の変異のノックインマウスを作成した。

## 4. 研究成果

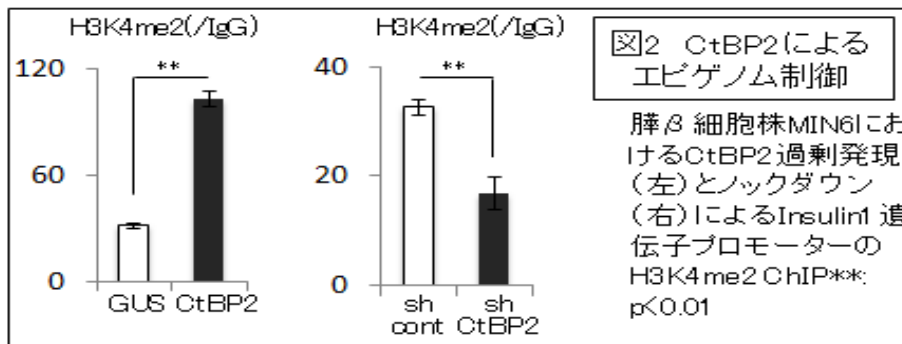
本申請研究ではまずインスリン分泌細胞である膵細胞に注目することにした。

インスリン分泌細胞である膵細胞の cell line である MIN6 細胞において CtBP2 の過剰発現



とノックダウンを行い、インスリン遺伝子発現を検証すると、CtBP2 過剰発現ではインスリン遺伝子の発現が増加、ノックダウンでは低下、CtBP2 はインスリン遺伝子の発現を正に制御していることが明らかになった(図1)。

さらにその分子基盤を検証するため MIN6 細胞で



の CtBP2 結合部位を明らかにすべく ChIP-seq を行った。その結合モチーフを各種転写因子の結合モチーフとの比較を行うとインスリン遺伝子発現の master regulator である

る NeuroD1 の結合部位に CtBP2 が共局在している可能性が示唆された。

CtBP2 の結合タンパクには PxDLS モチーフという共通のアミノ酸配列が存在していることが知られているが、NeuroD1 にも同配列が存在しており、実際に CtBP2 と NeuroD1 は転写因子複合体を形成していた。

さらにこれら複合体が結合しているインスリン遺伝子プロモーターの様々なヒストンマークの変動を見た。H3K4me2, H3K4me3, H4K9me, H4K27ac, H4K27me など様々なヒストンマークに変動が見られ、CtBP2 の gain of function はインスリン遺伝子プロモーターを open chromatin

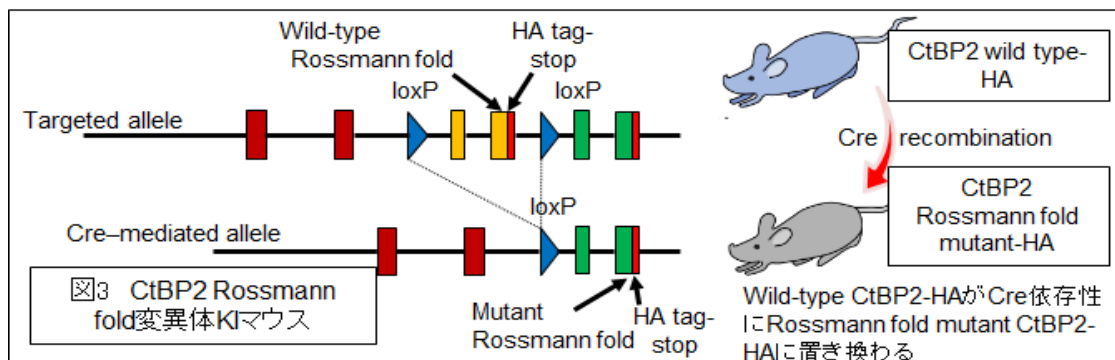
に、loss of function は closed chromatin にしていた (図 2)。H3K4me2, H3K4me3 の寄与が大きく、これらの変化と CtBP2 を結びつけるエピゲノム調節因子も同定した。

さらに踏み込んで NADH の増加でこうしたエピゲノム修飾が CtBP2 依存性に行われるかも検証したかったが、そこまでは到達できなかった。が、細胞内には NADH に比して NAD<sup>+</sup> が 100 倍程度多く存在しており、単純に過剰発現でも NAD<sup>+</sup> によって十分ではないものの活性化され、十分量の過剰発現で CtBP2 は活性化されることを別途確認しており、代謝産物によって活性化された場合も同様の効果を示すものと思われる。

さらにこうした in vitro で効果が in vivo でも見られるか検証すべく、CtBP2 の膵 細胞特異的欠損マウスを作成した。誘導型、非誘導型の 2 種類のマウスを作成し、いずれもインスリン分泌低下による耐糖能異常を示し、膵萎縮などの所見を示した。

肥満モデルマウスの CtBP2 発現レベルを検証すると肥満モデルマウスの膵 細胞における CtBP2 はタンパク発現が顕著に減少しており、肥満におけるインスリン分泌能の低下に病態レベルで寄与しているものと思われた。

CtBP2 の活性は NADH などの代謝産物で変化しており、総じて CtBP2 は代謝変動をエピゲノム修飾に連動させる因子で、インスリン遺伝子の発現を正に制御しているものと考えられた。



さらにより一般的に CtBP2 の代謝産物センシングの生体レベルでの役割を明らかにすべく、代謝産物収容ポケットである Rossmann fold の変異が Cre 依存性に挿入されるノックインマウスを作成した (図 3)。

誘導型と全身性の変異のノックインと両方作成、本報告書記載時点で全身性のノックインは部分胎生致死であり、生まれてきても非常に小型で生まれてくること、胎生期異常があること、が明らかになっている。体内での発達におけるエピゲノム変化、遺伝子発現調節まで探索を行いたかったが、研究期間内には到達できなかった。

これまで NADH によるエピゲノム修飾や転写共因子によるエピゲノム修飾は解析例がほとんど見られないが、本申請研究ではそうした部分に新しい展開を見いだす足場を作ることが出来たと言える。またその代謝産物収容ポケット構造が失われると胎生期異常を示すことも重要で、生体において非常に重要な役割を果たしているものと思われる。今後こうした知見をさらに深め、生物学的な理解を深めていく。また本研究とは別途行っている研究で CtBP2 の活性化を治療に役立てようと試みており、小分子化合物の開発を行っている。こうした研究は translational な側面にもサポータティブに働いていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 馬 洋
2. 発表標題 転写共因子CtBP2は膵 細胞におけるインスリン遺伝子発現に重要な役割を果たしている
3. 学会等名 日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 馬 洋
2. 発表標題 転写共因子CtBP2は膵 細胞におけるインスリン遺伝子発現に重要な役割を果たしている
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----