

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08534

研究課題名(和文)メタボリックシンドローム関連キナーゼDyrk1Bによる肝糖新生制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanisms that Dyrk1B controls hepatic gluconeogenesis

研究代表者

満島 勝 (Mitsushima, Masaru)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・分子代謝制御研究部上級研究員

研究者番号：40621107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではCITED2相互作用分子として同定したDyrk1Bが、糖新生系酵素の遺伝子発現制御を介し、肝糖新生に関与していることを明らかにした。Dyrk1BはキナーゼとしてGCN5およびPGC-1を直接リン酸化し、それらの分子の活性を亢進させていること、更に、Dyrk1BはPKAにより直接リン酸化されることで、その活性が負に調節されていることを明らかにした。Dyrk1Bの肝臓での発現は食事後のインスリンにより抑制されており、肥満糖尿病モデルのDIOマウスでは発現亢進がみられ、Dyrk1Bの抑制により絶食時血糖の低下が見られたことから、Dyrk1Bは糖尿病治療標的となり得ると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Dyrk1Bは近年その遺伝子多型がメタボリックシンドロームの早期発症への関与が報告されているが、その聖書機構はほとんど解明されていない。本研究ではDyrk1Bが我々の研究部で独自に見出してきた肝糖新生制御GCN5-CITED2-PKAモジュールの相互作用因子としてDyrk1Bを同定し、本モジュール内でGCN5を直接リン酸化しモジュールの活性を調節すると同時に、PGC-1もリン酸化して活性化することで肝糖新生を制御していることを明らかにした。2型糖尿病モデルのDIOマウスでDyrk1Bを抑制すると絶食時血糖が低下したことから、Dyrk1Bは2型糖尿病治療標的にもなり得ると考えらる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified Dyrk1B as a binding partner of CITED2 as well as novel regulator of hepatic gluconeogenesis through the gene expression of several gluconeogenic enzymes. Dyrk1B directly phosphorylates GCN5 and PGC-1, which result in the activation of HAT or co-activation, respectively. In addition, Dyrk1B is directly phosphorylated by PKA, which suppresses the kinase activity of Dyrk1B. We also found that the expression of Dyrk1B in the mouse liver is suppressed by postprandial insulin. In dietary induced obesity (DIO) mice, model for type 2 diabetes, the expression of Dyrk1B is up-regulated because of their insulin resistance and the suppression of exceeded expression of Dyrk1B in the liver resulted in the lowered blood glucose level during fasting. Altogether, we propose that Dyrk1B is a novel regulator of hepatic gluconeogenesis as well as therapeutic target for type 2 diabetes.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：糖尿病 肝糖新生 Dyrk1B 遺伝子転写

1. 研究開始当初の背景

近年、肥満、糖尿病、高血圧、脂質異常症を合併するメタボリックシンドロームの人口が世界的に増加しており、その信仰は、動脈硬化を促進し、心筋梗塞、脳梗塞などの重篤な疾患を引き起こすリスクを増大させることから、メタボリックシンドロームの解消は社会的な関心の一つとなっている。糖尿病患者はインスリンの作用不全により、慢性的な高血糖を呈しその主因の一つが肝臓における糖新生の亢進である。申請者の属する研究グループは、これまでの研究により、転写調節因子 CITED2、ヒストンアセチル化酵素 (HAT) GCN5、リン酸化酵素 PKA が核内モジュールを形成し、グルカゴン-cAMP のシグナルによって誘導される糖新生系酵素の発現に必須な役割を果たしていることを明らかにしてきた。さらには肥満糖尿病モデルマウスを用いた解析より、これらのモジュールの活性を抑制することで、糖尿病の絶食時高血糖が抑制できることを明らかにしてきた。つまり、本モジュールは糖尿病治療の新規ターゲットとなりうると思われる。そこで、ほんモジュールを介した肝糖新生制御機構を明らかにするため、CITED2 と相互作用する分子の網羅的探索より、新たに Dyrk1B を同定した。Dyrk1B はヒトの遺伝子多型においてメタボリックシンドロームの早期発症との関連が報告されているが、その作用機序は不明であった。そこで、本研究においては肝糖新生制御モジュールと Dyrk1B の関係に着目して、Dyrk1B による肝糖新生制御機構を明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

申請者らは、肥満、糖尿病という病態が、“絶食シグナルの制御異常”との観点より GCN5-CITED2-PKA からなる新規肝糖新生制御シグナリングモジュールを明らかにしてきた。その詳細な制御メカニズムを明らかにするため、CITED2 と相互作用する分子の網羅的探索より、その候補分子として Dyrk1B を同定した。これまでに、Dyrk1B はヒトの遺伝子多型がメタボリックシンドロームの早期発症との関連が報告されているが、その分子基盤は不明なままである。我々が見出した絶食シグナルの制御モジュールの制御機構の解明を通して、本分子による代謝制御機構を明らかにしようと考えた。本研究において、肝臓における Dyrk1B の制御機構を明らかにすること、Dyrk1B による GCN5-CITED2-PKA モジュールの活性制御機構を明らかにすること、以上の 2 つの視点よりの解析より肝糖新生を標的とする糖尿病に対する分子標的治療薬開発のための基盤研究を行う。

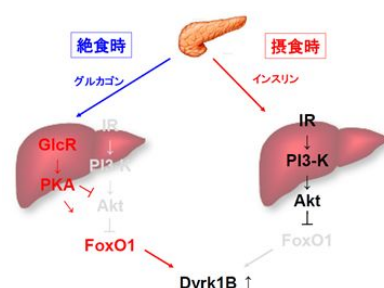
3. 研究の方法

肝糖新生の分子生物学的解析は主にマウスより初代培養肝細胞を採取し、アデノウイルスを用いて Dyrk1B をはじめ各遺伝子を強発現させるあるいは shRNA を発現させてノックダウンして、cAMP 誘導性の糖新生系酵素の発現誘導を q-PCR により検出する。また、免疫沈降法やそれを用いた in vitro における酵素活性の測定などによる生化学的な解析よりモジュール形成における Dyrk1B や GCN5 の活性制御機構を明らかにする。また、マウスを用いた個体の解析においては CRISPR/CAS9 を用いた全身性の Dyrk1B ノックアウトマウスあるいは、尾静脈より上記のアデノウイルスを投与し、in vivo の肝臓における各分子の強発現、ノックダウンを行い、肝臓を摘出し各糖新生系酵素遺伝子の発現を解析する。また、それらのマウスを絶食とし、糖新生基質を投与した際の血糖を測定することで、in vivo における糖新生を評価する。

4. 研究成果

肝臓における Dyrk1B の発現調節メカニズムの解明

ヒトにおいて Dyrk1B の遺伝子多型がメタボリックシンドロームの早期発症と相関することが報告されているが、Dyrk1A/1B の遺伝子、タンパク質発現自体に関する情報はまだない。そこで、マウスの肝臓において Dyrk1A/1B の遺伝子、タンパク質発現を検討した。自由摂食時における肥満モデルマウス (*ob/ob*) の肝臓では非肥満マウスと比べ、Dyrk1A/1B 共に顕著な変化が見られなかった。一方、非肥満マウスの肝臓では、絶食-再摂食のサイクルにおいて Dyrk1B の発現が mRNA、タンパク質レベルにおいて顕著に変化し、絶食時に高く再摂食により強く抑制されることが分かった。また、糖尿

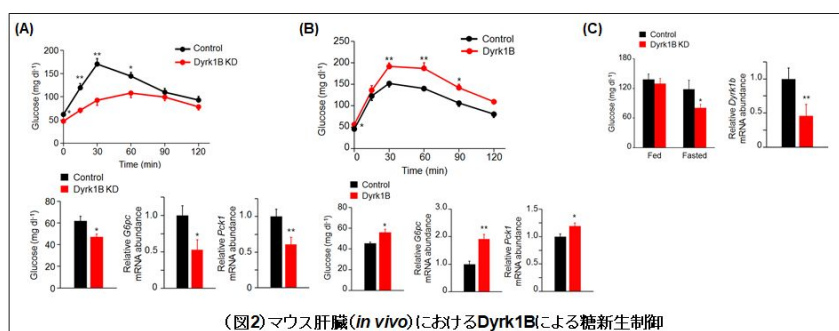


(図1) 肝臓におけるDyrk1Bの発現制御機構

病肥満モデルマウス (*db/db*) においても絶食時の肝臓における Dyrk1B の発現が mRNA、タンパク質発現の亢進がみられた。これらの結果より、Dyrk1B は絶食時の肝臓で機能することが予想された。その発現制御メカニズムを、初代培養肝細胞を用いて検討したところ、インスリン-PI3K-Akt-FoxO1 シグナリング経路によって発現が制御されることを明らかにした。つまり肝臓においては、(再) 摂食時に血糖の上昇に伴ってすい臓より分泌されるインスリンの作用によって肝臓における Dyrk1B の発現が抑制されると考えられる (図 1)。

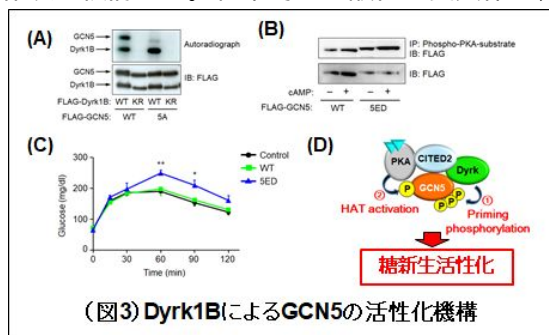
Dyrk1B による肝糖新生制御メカニズムの解明

Dyrk1B が CITED2 同様に肝臓の糖新生制御に関与するかを検討した。初代培養肝細胞で Dyrk1B のノックダウンを行うと、グルカゴンのセカンドメッセンジャーである cAMP 誘導性の糖新生系酵素の発現が強く抑制された。逆に、Dyrk1B の野生型を強発現したところ、糖新生系酵素の発現が亢進した。しかしながら、この促進効果はキナーゼ活性を欠損した Dyrk1B の変異体では見られなかった。これらの結果より、Dyrk1B は肝細胞において、cAMP による糖新生系酵素の発現に必要な分子であることが明らかになった。さらに、生体における血糖制御に対する Dyrk1B の効果を検討するため、マウスの尾静脈よりアデノウイルスを注射して肝臓で Dyrk1B のノックダウンおよび強発現させ、絶食時におけるピルビン酸依存的な糖新生を PTT 試験により検討したところ、Dyrk1B のノックダウンにより糖新生系酵素の発現および血糖の上昇が抑制され、逆に強発現により糖新生系酵素の発現および血糖の上昇が亢進した。さらに、肥満/糖尿病モデルである DIO マウスの肝臓で Dyrk1B のノックダウンを行ったところ、絶食時血糖の低下を確認した。以上の結果より、Dyrk1B はマウス肝臓では糖新生系酵素の発現制御を介して肝糖新生を制御していること、その発現抑制が糖尿病の高血糖を抑制する可能性が示唆された (図 2)。



(図2) マウス肝臓 (*in vivo*) における Dyrk1B による糖新生制御

Dyrk1B が糖新生系酵素の発現制御に重要であることが分かったので、その分子制御メカニズムの解析を行った。当研究部で近年同定した GCN5-CITED2-PKA からなる糖新生制御モジュールとの関係を検討したところ、Dyrk1B はそれらのどの分子とも、免疫沈降法レベルで相互作用、および細胞染色により核内での共局在が確認できた。このことから、Dyrk1B も本モジュールの構成分子であることが強く示唆された。次に、モジュールの形成における Dyrk1B の役割を検討したところ、Dyrk1B をノックダウンすると、モジュールの形成が抑制され、強発現することで亢進することが分かった。同様に、CITED2 あるいは GCN5 をノックダウンしてもモジュール分子と Dyrk1B の相互作用が弱まることから、CITED2、GCN5、Dyrk1B はモジュールの形成に不可欠な分子であることが分かった。驚いたことに、本モジュールの形成には Dyrk1B のキナーゼ活性は必要ないことが分かった。つまり、Dyrk1B による糖新生系酵素の発現制御には GCN5-CITED2-PKA-Dyrk1B からなるモジュールの形成以外にもキナーゼ活性に依存した作用点があることが推察された。そこで、まず本モジュール内における Dyrk1B の作用点を検討したところ、GCN5 が Dyrk1B 依存的にリン酸化されることを見出した。Dyrk1B は +1 位にプロリン残基となるセリン、スレオニンにリン酸化することが知られている。GCN5 の配列解析より、GCN5 の N 末端領域において哺乳動物の種間で高度に保存されたセリン-プロリン、スレオニン-プロリン配列が 5 つ見つかった。それら Dyrk1B によってリン酸化されることを *in vitro*、*in vivo* において明らかにした。これらのリン酸化が、GCN5 による糖新生系酵素の発現制御に必要なかを非リン酸化変異体 (5A) および恒常的リン酸化型変異体 (5ED) を作製し検討した。恒常的リン酸化型変異体は、初代肝細胞における糖新生系酵素の発現、およびピルビン酸依存的な肝糖新生を亢進したが、非リン酸化型変異体はそれらが抑制された。つまり、Dyrk1B の効果の一部は GCN5 のリン酸化を介していることが示唆された。本リン酸化の意義を検討したところ、Dyrk1B による GCN5 のリン酸化は PKA による GCN5 のリン酸化、それに伴うヒストンアセチル化酵素の活性化に必要であることが分かった。つまり、Dyrk1B が PKA に対するプライミングキナーゼとして機能していることを明らかにした (図 3)。



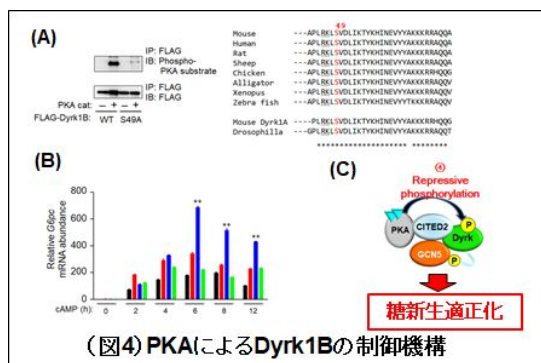
(図3) Dyrk1BによるGCN5の活性化機構

当研究部では、CITED2 はモジュール内で GCN5 の活性化を介する効果とともに、PGC-1 のアセチル化を抑制することで PGC-1 を活性化することを明らかにしている。そこで、Dyrk1B の PGC-1 への効果を検討した。PGC-1 誘導性の糖新生系酵素の発現誘導は Dyrk1B のノックダウ

ンにより抑制され、強発現により亢進した。また、*G6pc* プロモーターを用いたルシフェラーゼ活性の解析より、Dyrk1B は PGC-1 のコアクチベーション活性をキナーゼ活性依存的に促進した。この時、PGC-1 のアセチル化は変化しなかったが、PGC-1 のリン酸化が亢進することが分かった。そこで、リン酸化プロテオミクス解析により PGC-1 の Dyrk1B によるリン酸化部位の同定を試み、複数のセリン、スレオニン残基を同定した。それらを欠損した変異体は糖新生系酵素の発現誘導、転写コアクチベーション活性が抑制されることが分かった。つまり、Dyrk1B は PGC-1 をリン酸化し活性化していることが明らかになった。

Dyrk1B の活性制御機構の解明

これまでに Dyrk1 はタンパク質の翻訳時に自己リン酸化し活性化すると考えられているが、近年様々な活性調節機構が報告されてきている。GCN5-CITED2-PKA-Dyrk1B のモジュール内で Dyrk1B が PKA の基質になるかを検討したところ、ほぼすべての種において保存されている Dyrk1B の 49 番目のセリン残基が PKA によって直接リン酸化されることを明らかにした。このリン酸化は CITED2 や GCN5 のノックダウンにより抑制されることから、本モジュール内で起こることが分かった。そこで、Dyrk1B の PKA によるリン酸化が糖新生に与える効果を検討したところ、非リン酸化型変異体 (S49A) は cAMP 誘導性の糖新生系酵素の発現を亢進したが、逆に恒常的リン酸化型変異体 (S49D) は抑制された。このことは、PKA により Dyrk1B のリン酸化が、糖新生制御において抑制的に働いていることを示している。そこで、これらのリン酸化部位の変異体がどの段階で影響を与えるかを検討したところ、非リン酸化型変異体の Dyrk1B を GCN5 と共発現させると、Dyrk1B による GCN5 のリン酸化および PKA による GCN5 のリン酸化がともに亢進した。一方、恒常的リン酸化型変異体の Dyrk1B との共発現では GCN5 のリン酸化はともに減少した。これらの結果は、Dyrk1B のキナーゼ活性が PKA によるリン酸化により抑制されていることを示唆するものであったため、免疫沈降した Dyrk1B の各変異体のキナーゼ活性を *in vitro* において GCN5 を基質として検討したところ、PKA による Dyrk1B のリン酸化は Dyrk1B のキナーゼ活性を減弱させることが分かった。また、PKA による Dyrk1B のリン酸化が PGC-1 に与える効果を検討したが、GCN5 同様に PKA による Dyrk1B のリン酸化は Dyrk1B の効果に対して抑制的に働くことが分かった。以上の結果より、糖新生制御モジュールを介して Dyrk1B は糖新生を誘導するが、その活性は PKA によりリン酸化され、キナーゼ活性が抑制されることで適切に調節されていると考えられた (図 4)。



(図4) PKAによるDyrk1Bの制御機構

Dyrk1B ノックアウトマウスの解明

ヒトにおいて Dyrk1B の遺伝子多型がメタボリックシンドロームの早期発症と相関することが報告されているが、Dyrk1B のノックアウトマウスの表現型に関する報告はまだない。そこで、生体における Dyrk1B の機能を検証するため、CRISPR/CAS9 システムにより Dyrk1B の全身性ノックアウト、およびヒトにおいて報告のあるメタボリックシンドローム関連変異 R102C 型のノックインマウスを作製した。ノックアウト、ノックインマウスは正常に生まれ、通常食、高脂肪食負荷時における体重変化には顕著な差がみられなかった。また、ノックアウトマウスは野生型マウスと比べ通常食、高脂肪食負荷時において自由摂食時、絶食時血糖にも差がみられなかった。一方、R102C ノックインマウスは通常食、自由摂食時には野生型と比較して血糖値に変化は見られなかったが、高脂肪食、自由摂食時の血糖において若干の低下が見られた。ヒトでは R102C を持つ場合、血糖値の亢進がみられることから、マウスでは異なる結果となった。ヒトとマウスの Dyrk1B 遺伝子産物の機能の違い、あるいはその他の複合的な要因の違いによるものであるかの検証が必要と考えられた。

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 1件）

1. 著者名 Yano H, Sakai M, Matsukawa T, Yagi T, Naganuma T, Mitsushima M, Iida S, Inaba Y, Inoue H, Unoki-kubota H, Kaburagi Y, Asahara SI, Kido Y, Minami S, Kasuga M, Matsumoto M.	4. 巻 8
2. 論文標題 PHD3 regulates glucose metabolism by suppressing stress-induced signaling and optimising gluconeogenesis and insulin signaling in hepatocyte	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-32575-z.	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 満島 勝、酒井 真志人、長沼 孝雄、矢野 宏行、松川 隼也、春日 雅人、松本 道宏
2. 発表標題 絶食応答性キナーゼDyrk1Bを介した肝糖新生制御機構の解明
3. 学会等名 第34回糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 満島勝、酒井真志人、飯田智、長沼孝雄、矢野宏行、松川隼也、高橋経太、春日雅人、松本道宏
2. 発表標題 Dyrk1Bによる肝糖新生制御機構の解析
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本道宏、満島勝、酒井真志人、松本雅記、長沼孝雄、矢野宏行、松川隼也、高橋経太、春日雅人
2. 発表標題 グルカゴン応答性キナーゼDyrk1Bによる肝糖新生制御機構の解明
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 満島勝、酒井 真志人、飯田 智、長沼 孝雄、矢野 宏行、松川 隼也、高橋 経太、春日 雅人、松本 道宏
2. 発表標題 Dyrk1Bによる肝糖新生制御機構の解析
3. 学会等名 第32回日本糖尿病・肥満動物学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松本 道宏、満島 勝	4. 発行年 2019年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 8
3. 書名 内分泌・糖尿病・代謝内科	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------