

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11628

研究課題名(和文) 糖尿病治療薬メトホルミンはChREBPの活性阻害を介して血糖低下作用を発現する

研究課題名(英文) Metformin lowers blood glucose levels via inhibition of ChREBP activity

研究代表者

中川 勉 (NAKAGAWA, Tsutomu)

北海道医療大学・薬学部・准教授

研究者番号：50722063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：メトホルミンは、DNA結合に必須であるChREBPとMlxのヘテロ2量体の形成を阻害することにより、ChREBPの活性を阻害することを明らかにし、ChREBPがメトホルミンの薬効の発現を担う標的タンパク質の1つであることを明らかにした。また、メトホルミンによるChREBPとMlxの2量体形成の阻害は、O-GlcNAc転移酵素(OGT)を共発現することにより消失することを明らかにした。さらに、ChREBP上のO-GlcNAc修飾はMlxとの結合に関与していないことを明らかにし、OGTはO-GlcNAc修飾非依存的にChREBPに対するMlxの結合を増加させることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ChREBPのDNA結合を制御する因子に関する研究は少ない。特にMlxとの2量体形成を制御する因子に関しては、これまでほとんど研究が行われておらず、Mlxの結合がAMPKによるリン酸化により制御されていることを明らかにした本研究は、ChREBPの活性化メカニズムの解明において新たな領域を開拓した重要な研究であり、学術的意義は大きいと考えられる。また、糖尿病患者数は近年急激に増加しており、次世代の治療薬の開発に対する社会的要請は極めて強い。本研究は糖尿病治療薬の開発において新たな標的部位を提案できたことから、新たな治療薬の開発に資する一助になると考えられるため、社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Metformin is known to regulate blood glucose levels by inhibiting hepatic gluconeogenesis via activation of AMPK. However, the identification of downstream substrates of AMPK has never been performed. Furthermore, the molecular basis for metformin response remains poorly understood. It is reported that metformin inhibited the activity of ChREBP, which could be a potential therapeutic target protein of type 2 diabetes mellitus. This suggests that ChREBP is one of a target protein of metformin.

In this study, metformin inhibited the formation of ChREBP-Mlx heterodimer, which is essential for DNA binding, via phosphorylation on Ser568 in ChREBP through AMPK activation. Moreover, overexpression of O-GlcNAc transferase (OGT) mitigated the effect of metformin on the binding of Mlx to ChREBP. OGT might enhance the interaction of ChREBP with Mlx in O-GlcNAcylation-independent manner because the binding of O-GlcNAc on ChREBP did not enhance the binding of Mlx to ChREBP.

研究分野：生化学

キーワード：ChREBP

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メトホルミンは、2型糖尿病の薬物治療の第一選択薬として世界中で使用されている。メトホルミンは、肝臓において AMP-activated protein kinase (AMPK) を活性化し、糖新生を抑制することで血糖低下作用を発現することが知られている。しかしながら、メトホルミンによる AMPK の活性化によりリン酸化され薬効の発現を担う標的タンパク質などその詳細な作用機序は明らかになっていない。

Carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) は解糖系の亢進と脂肪酸合成に関与する酵素群を誘導する転写因子である。レプチンを欠損した2型糖尿病モデルマウス (*ob/ob* マウス) と ChREBP ノックアウト (KO) マウスを掛け合わせたマウスでは、*ob/ob* マウスに比べて血糖値やインスリン抵抗性などが改善されたことから、ChREBP は糖尿病の発症に関与すると考えられている。ChREBP の活性がメトホルミンにより抑制されることが明らかになっていることから¹⁾、ChREBP がメトホルミンの標的タンパク質の1つであることが示唆された。また、これまでに AMPK の活性化による ChREBP 上の Ser568 のリン酸化が ChREBP の DNA 結合に必要な Max-like protein x (Mlx) との2量体形成を阻害することを明らかにしている。これらの結果から、メトホルミンは AMPK を活性化して ChREBP の DNA 結合を阻害することにより、血糖低下作用を発現することが示唆された。

2. 研究の目的

これまでに ChREBP がメトホルミンの標的タンパク質の1つであることが示唆されているが、メトホルミンの薬効発現における ChREBP の関与は報告されていない。したがって本研究では、メトホルミンの薬効発現における ChREBP の役割とその分子メカニズムを検討することにより、ChREBP の活性阻害を介したメトホルミンの新たな作用機序を明らかにする。これにより新たな糖尿病治療薬の開発へと展開するための研究基盤を確立することが目的である。

3. 研究の方法

<ChREBP と Mlx の結合実験>

ヒト胎児腎由来細胞 (HEK293T) に 3xFLAG タグを付加した ChREBP、HA タグを付加した Mlx を共発現させ、ChREBP を FLAG 抗体を用いた免疫沈降法により精製後、ウェスタンブロット法により結合した Mlx の量を検出した。

<ChREBP の核移行の評価>

ChREBP の核移行は、GFP タグを付加した ChREBP をヒト肝癌由来細胞 (HepG2) に発現させ、核内に ChREBP が局在する細胞を蛍光顕微鏡によりカウントすることにより評価した。

<ChREBP 活性の測定>

HepG2 細胞を用いて、ChREBP の L 型ピルビン酸キナーゼのプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイにより測定した。

4. 研究成果

① メトホルミンによる ChREBP 活性阻害の分子メカニズムの解明

メトホルミンにより ChREBP 上の Ser568 がリン酸化され、Mlx との結合が阻害されるか明らかにするために、HEK293T 細胞に ChREBP と Mlx を共発現し、メトホルミン処理により結合が阻害されるか検討を行った。その結果、メトホルミンは濃度依存的に ChREBP と Mlx の結合を阻害することが明らかとなった。また、Ser568 をアラニンに置換し、AMPK によりリン酸化されない変異体 (Ser568Ala) では、メトホルミン処理による Mlx の結合阻害はみられなかった。これらの結果から、メトホルミンは、AMPK を活性化し ChREBP の Ser568 をリン酸化することで ChREBP-Mlx ヘテロ 2 量体の形成を阻害し、ChREBP の DNA 結合を阻害することが明らかとなった。

ChREBP の活性を抑制するメカニズムとして、ChREBP の DNA 結合の阻害のほかに核移行の阻害が考えられる。そこで、メトホルミンにより ChREBP の核移行も阻害されるのか明らかにするため、メトホルミン処理による ChREBP の細胞内局在の変化を調べた。その結果、ChREBP が核に局在する割合は、メトホルミン処理により大きな変化を認めなかったことから、メトホルミンが ChREBP の核移行に与える影響はわずかであり、主に DNA 結合を阻害することにより

ChREBP の活性を阻害していることが示唆された。

② 14-3-3 が ChREBP に対する Mlx の結合に与える影響

これまでに ChREBP に対する Mlx の結合部位が 701-750 番目のアミノ酸領域内にあることを明らかにしており、Ser568 とはアミノ酸の 1 次配列上離れた位置にある。したがって、メトホルミンによる Ser568 のリン酸化により Mlx の結合が阻害されるメカニズムについて明らかにするため、リン酸結合タンパク質である 14-3-3 が Ser568 のリン酸基に結合し Mlx の結合を競合的に阻害する可能性について検討した。その結果、ChREBP に対する 14-3-3 の結合は、AMPK の活性化では増加しないことが明らかとなり、Ser568 のリン酸基に対して 14-3-3 は結合しないことが明らかとなった。この結果から、メトホルミンによる ChREBP の Ser568 のリン酸化を介した DNA 結合阻害に 14-3-3 は関与しないことが明らかになった。

③ ChREBP に対する Mlx の結合における O-GlcNAc 修飾の影響

O-GlcNAc 修飾はリン酸化と競合することによりリン酸化の生理作用を阻害することが知られていることから、ChREBP の Ser568 のリン酸化による DNA 結合阻害における O-GlcNAc 修飾の影響について検討した。

・ ChREBP 上の O-GlcNAc 修飾部位の検討

ChREBP と Mlx の結合を阻害する Ser568 のリン酸化が O-GlcNAc 修飾により阻害されると考えられたため、Ser568 が O-GlcNAc 修飾を受けない変異体 (Ser568Ala) を用いたとき、または Ser568 をリン酸化したときの O-GlcNAc 修飾数について調べた結果、いずれも O-GlcNAc 修飾数が減少しなかったことから、Ser568 に O-GlcNAc は結合しないことが示唆された。これらの結果から、O-GlcNAc 修飾は ChREBP の Ser568 のリン酸化を阻害しないことが示唆された。

・ ChREBP の DNA 結合におよぼす OGT 共発現の影響

O-GlcNAc 転移酵素 (OGT) を過剰発現することにより、ChREBP の DNA 結合が増加することが報告されていることから、HEK293T 細胞に OGT を過剰発現したときの ChREBP と Mlx の結合を調べた結果、メトホルミンによる ChREBP と Mlx の結合阻害効果は、OGT を共発現することによりほぼ消失することが明らかとなった。また、O-GlcNAc 修飾活性を有していない OGT の変異体 (Asp554Asn) を共発現したときの ChREBP と Mlx の結合は、野生型の OGT を共発現したときと比べて小さいことが明らかとなった。これらの結果から、野生型 OGT の過剰発現は、ChREBP と Mlx の結合を増加させることが明らかとなった。

次に、ChREBP と Mlx の結合における O-GlcNAc 修飾の関与について調べるため、O-GlcNAc 修飾を受けない ChREBP の変異体 (Δ 301-350) に対する Mlx の結合を調べた結果、野生型と Δ 301-350 間で Mlx の結合に違いが認められなかったことから、ChREBP と Mlx の結合に O-GlcNAc 修飾は関与していないことが示唆された。この結果から、OGT は O-GlcNAc 修飾非依存的に ChREBP に対する Mlx の結合を促進していることが示唆された。

以上の結果から、本研究において、ChREBP がメトホルミンの標的タンパク質であることが明らかとなった。また、メトホルミンが ChREBP の活性を阻害する分子メカニズムとして、AMPK の活性化による Ser568 のリン酸化が ChREBP と Mlx の結合を阻害し、ChREBP の DNA 結合を抑制することが明らかとなった。ChREBP の活性化メカニズムに関するこれまでの研究の大半は、核移行のメカニズムの解明に関する研究であり、ChREBP の DNA 結合を制御する因子に関する研究はほとんど行われていない。特に Mlx との 2 量体形成を制御する因子に関してはほとんど研究が行われておらず、Mlx の結合が AMPK によるリン酸化により制御されていることを明らかにした本研究は、ChREBP の活性化メカニズムの解明において新たな領域を開拓する重要な研究であるとともに、糖尿病治療薬の開発において新たな標的部位を提案できたことから、本研究結果は、新たな糖尿病治療薬の開発に資する一助となると考えられる。

<引用文献>

- 1) Sato S., Jung H., Nakagawa T., Pawlosky R., Takeshima T., Lee WR., Sakiyama H., Laxman S., Wynn RM., Tu BP., MacMillan JB., De Brabander JK., Veech RL., Uyeda K. Metabolite Regulation of Nuclear Localization of Carbohydrate-response Element-binding Protein (ChREBP): ROLE OF AMP AS AN ALLOSTERIC INHIBITOR. *J. Biol. Chem.* **291**, 2016, 10515-27

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 1.Sakiyama H., Li L., Kuwahara-Otani S., Nakagawa T., Eguchi H., Yoshihara D., Shinohara M., Fujiwara N., Suzuki K.	4. 巻 476
2. 論文標題 A lack of ChREBP inhibits mitochondrial cristae formation in brown adipose tissue.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol. Cell. Biochem.	6. 最初と最後の頁 3577-3590
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11010-021-04178-2	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 -

1. 著者名 Jung H, Takeshima T, Nakagawa T, MacMillan KS, Wynn RM, Wang H, Sakiyama H, Wei S, Li Y, Bruick RK, Posner BA, De Brabander JK, Uyeda K.	4. 巻 477
2. 論文標題 The structure of importin alpha and the nuclear localization peptide of ChREBP, and small compound inhibitors of ChREBP-importin alpha interactions.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 3253-3269
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BCJ20200520	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 崎山 晴彦, Li Lan, 中川 勉, 江口 裕伸, 吉原 大作, 藤原 範子, 鈴木 敬一郎
2. 発表標題 ChREBPの脂肪組織における新たな役割
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Eiji Miyoshi, Kazutoshi Fujita, Koichi Morishita, Tsunenori Ouchida, Tsutomu Nakagawa, Shinji Takamatsu, Jumpei Kondo	4. 発行年 2023年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 238
3. 書名 Glycosignals in Cancer	

〔産業財産権〕

〔その他〕

専任教員の学位及び主な研究内容について
<https://www.hoku-iryu-u.ac.jp/about/disclosure/faculty-staff/#pharm>

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		
米国	UT Southwestern Medical Center		