

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32658

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21292

研究課題名（和文）脂肪酸合成律速酵素ACCのポリマー化による活性制御機構の解明と阻害剤開発への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of activity control by polymerization of ACC

研究代表者

井上 順（Inoue, Jun）

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：70323962

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）：本研究では脂肪酸合成の律速酵素であるACCの活性制御機構について検討を行った。ACC活性はそのポリマー化により促進することが知られている。ACCポリマー化促進因子MIG12とACCの結合領域について検討を行い、結合に必須なそれぞれの領域を同定した。また、MIG12のC末端側に存在するロイシンジッパードメインを変異させることでその結合が大きく減弱することを示した。さらに、ACC活性をin vitroで解析する評価系の構築に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ACCの活性抑制は抗肥満や抗糖尿病につながり、今回の研究成果は新たな阻害剤開発のツールとして利用できる。酵素のポリマー化による活性化の例は少なく、MIG12によるACCポリマー化制御機構の解明は学術的に貴重な事例になる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the regulatory mechanism of ACC activity, which is the rate-limiting enzyme for fatty acid synthesis. ACC activity is known to be promoted by its polymerization. We identified the binding regions between ACC and MIG12, which is ACC polymerization-promoting factor. We also showed that mutation of the leucine zipper domain on the C-terminal region of MIG12 greatly attenuates its binding. Furthermore, we succeeded in constructing an evaluation system to analyze ACC activity in vitro.

研究分野：生化学

キーワード：脂肪酸合成 アセチルCoAカルボキシラーゼ ポリマー化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 転写因子 LXR は摂食時に脂肪酸合成系酵素群の発現を亢進することで、余剰エネルギーをトリグリセリドとして蓄積する機能を有しており、生体の摂食応答において、中心的な役割を果たしている。我々はこれまで、摂食時に活性化される LXR の新規標的遺伝子の探索を行い、MIG12を見出した。また、MIG12 は脂肪酸・トリグリセリド合成を増加させることを明らかにした (Inoue J, *Mol Endocrinol* 25: 995-1005, 2011)。

(2) ACC のポリマー化による活性制御は古くから知られていたが、その分子機構は不明な点が多く残されている。ACC ポリマー化促進因子としての MIG12 の発見は、その活性化機構の分子レベルでの解析に大きく寄与することが期待される。2018 年には ACC ポリマーには活性型と不活性型が存在すること、さらに不活性型ポリマー形成の促進にはがん抑制遺伝子 BRCA1 が関与していることが報告された (Hunkerler M, *Nature* 558: 470-474, 2018)。

(3) MIG12 はおよそ 22kDa のタンパク質であるが特徴的なドメイン構造を有しておらず、MIG12 と ACC が結合するお互いの領域や、MIG12 が ACC のポリマー化をどのようにして促進するのかは不明である。

2. 研究の目的

(1) LXR 活性化による脂肪酸・トリグリセリド合成促進において、MIG12 発現上昇によるアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) のポリマー形成促進が関与するかどうかについて検討する。また、ACC 活性制御機構を明らかにし、余剰エネルギーを脂肪として蓄積する分子機構の解明を目的とする。

(2) ACC は脂肪酸合成の律速酵素であり、その活性阻害は肥満抑制や糖尿病改善につながると考えられている。本研究では、ACC 二量体やポリマーの構成因子の同定・解析を行い、さらに *in vitro* で ACC 活性を測定できる評価系を構築し、小分子化合物 (食品成分や医薬品) による ACC 活性制御実現に向けた新たな方向性を提示することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) LXR 活性化時の ACC ポリマー化促進における MIG12 の影響

HepG2 細胞を LXR リガンドである T0901317 で処理し、ACC ポリマーへの影響を検討した。また、MIG12 ノックダウンにより、それらの作用に変化があるか検討した。

(2) MIG12 と ACC 結合領域の同定

MIG12 と ACC の結合領域について検討を行い、結合に必須なそれぞれの領域の同定を行った。ACC の部分欠失体および MIG12 の発現プラスミドを作製した。ACC には Flag タグを、MIG12 には His タグを連結した。HEK293 細胞にトランスフェクション後、Flag 抗体を用いて免疫沈降を行い、部分欠失体 ACC と MIG12 の結合の有無を判定することで結合領域を絞り込んだ。

(3) ACC 二量体およびポリマー構成因子の探索

ACC 二量体および ACC ポリマーの構成因子の同定を目指し、HEK293 細胞に Flag-ACC 発現プラスミドをトランスフェクション後、細胞を回収した。次に、Flag 抗体を用いて免疫沈降を行い BN-PAGE に供した。ACC 二量体および ACC ポリマー部分をゲルから切り出し、質量分析により因子の同定を試みた。

(4) ACC 活性の *in vitro* 評価系の確立

バキュロウイルス系を用いてリコンビナント ACC タンパク質を合成・精製し、*in vitro* で ACC 活性を測定できる評価系の構築を行った。

リコンビナント ACC タンパク質の合成・精製

ACC には His タグを連結し、ニッケルカラムでの精製を行った。同時に MIG12 についても同様に合成・精製を行った。精製した ACC タンパク質を用いて ACC 活性を測定し、MIG12 添加による ACC 活性の変化についても検討した。

ACC 活性の測定

ACC はアセチル CoA からマロニル CoA を合成する際に ADP を産生する。この ADP 産生量を NADH の減少量に変換して測定した。NADH の減少は 340nm の吸光度の減少として測定した。ACC 活性は、ACC の反応に必要な炭酸水素カリウムを加えた群から、加えていない blank 群の吸光度の減少量を引いて算出した。

4. 研究成果

(1) LXR 活性化時の ACC ポリマー化促進における MIG12 の影響

T0901317 処理による LXR の活性化は ACC のポリマー化を促進したが、MIG12 のノックダウンにより ACC のポリマー化亢進は見られなくなった (図 1)。また、MIG12 のノックダウンレベルはウエスタンブロットにより確認している (図 2)。これらの結果は、LXR 活性化時の ACC ポリマー化促進には、MIG12 の発現上昇が関与していることを示している。

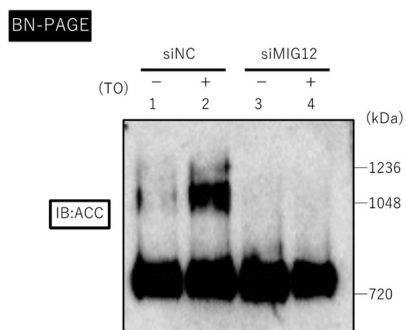


図 1. MIG12ノックダウン時のACCポリマー化レベルの検討

HepG2細胞にsiRNAをトランスフェクションし、24時間後にDMSOおよびT0901317(10 μ M)を含む培地に交換し、24時間後に細胞を回収した。その後、タンパク質を抽出しBN-PAGE後にImmunoblottingに供しACC抗体で検出した。

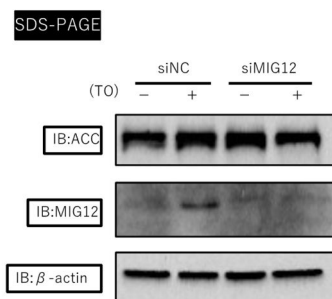


図 2. MIG12ノックダウン時のMIG12タンパク質発現の検討

HepG2細胞にsiRNAをトランスフェクションし、24時間後にDMSOおよびT0901317(10 μ M)を含む培地に交換し、24時間後に細胞を回収した。その後、タンパク質を抽出しSDS-PAGE後にImmunoblottingに供しMIG12抗体等で検出した。

(2) MIG12 と ACC 結合領域の同定

MIG12 と ACC の結合領域を探索するため、全長 ACC および ACC の一部を欠失させた 5 つの発現プラスミドを作製し、解析を行った。その結果、野生型 (WT 1-2346 aa)、(656-1734 aa) および (ACC- BCCP) では MIG12 との結合が検出されたが、(857-1734 aa) (BT(656-782 aa)) および (ACC- BT) では MIG12 との結合が消失していた。これらの結果より、MIG12 は ACC の BCCP 領域と結合していることが示された。

次に MIG12 の C 末端側に存在するロイシンジッパードメインに着目した。変異体 MIG12(3LA)-His と ACC との結合を検討したところ、結合が大きく減弱していた。MIG12 は二量体 (ホモダイマー) を形成していることが、このロイシンジッパー変異体では MIG12 二量体の形成も大きく減弱していた。これらの結果より、MIG12 のロイシンジッパードメインは ACC との結合に関与することが示された。

(3) ACC 二量体およびポリマー構成因子の探索

Flag-ACC 発現プラスミドおよび空ベクターを HEK293 細胞にトランスフェクション後、両者から同様にサンプルを作製し、質量分析に供した。Flag-ACC 群で検出され、空ベクター群で検出されない因子が目的の ACC 複合体構成因子の可能性があり。複数の候補因子を見出したが、現時点で、最終確認までには至っていない。今後、引き続き検討を継続する。

(4) ACC 活性の *in vitro* 評価系の確立

リコンビナント ACC タンパク質の合成・精製

野生型 ACC および MIG12 のリコンビナントタンパク質の合成・精製に成功した。ACC BT や MIG12(LA mutant)についても今後作製する。

ACC 活性の測定

リコンビナント ACC 活性を測定したところ、リコンビナントタンパク質の添加量依存的に活性の上昇が検出された。また、その活性は ACC 阻害剤 (TOFA) 添加で消失したことから、ACC 活性の評価系が確立できたと判断した。

また、リコンビナント MIG12 タンパク質やクエン酸を添加することで ACC 活性の上昇が観察された。

今後、確立した ACC 活性の評価系を用いて ACC 阻害剤の探索を行う。さらに MIG12 存在下でも同様の検討を行い、MIG12 活性を制御する小分子化合物の探索を行うことで、これまでにない作用機序の ACC 阻害剤の開発に繋がることが期待される。

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 Izumi A, Hiraguchi H, Kodaka M, Ikeuchi E, Narita J, Kobayashi R, Matsumoto Y, Suzuki T, Yamamoto Y, Sato R, and *Inoue J.	4. 巻 567
2. 論文標題 MIG12 is involved in the LXR activation-mediated induction of the polymerization of mammalian acetyl-CoA carboxylase.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 138-142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.06.040	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 0件）

1. 発表者名 和泉 彬子、平口 遥香、小高 愛未、池内 江美奈、成田 淳子、小林 里奈、松本 雄宇、鈴木 司、山本 祐司、佐藤 隆一郎、井上 順
2. 発表標題 MIG12はLXR活性化によるACCポリマー化亢進に関与する
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会 / 仙台
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小高 愛未、平口 遥香、太田 しえる、鈴木 司、山本 祐司、井上 順
2. 発表標題 脂質代謝制御因子MIG12によるACC活性化機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会 / 広島（Web）
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------