

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430178

研究課題名(和文) エピジェネティクス因子による代謝プログラミングとエネルギー恒常性の研究

研究課題名(英文) Study on the epigenetic regulation of metabolic programming and energy homeostasis

研究代表者

日野 信次郎 (Hino, Shinjiro)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：00448523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：栄養等の環境因子が代謝プログラミングを引き起こし、細胞機能や表現型を作り出す仕組みを解明することを目的として研究を行った。特にヒストン脱メチル化酵素LSD1及びLSD2の代謝制御における役割とその分子基盤に焦点を当てて研究を行った。LSD1が骨格筋の線維型決定に寄与すること、がん細胞代謝と腫瘍形成に寄与すること、LSD2が脂質ストレスからの肝細胞保護に関わることを明らかにした。また、LSD1/LSD2の補酵素である細胞内FAD変動を明らかにした。これらの成果から、LSD1とLSD2が環境ストレスをエピゲノム変換に結びつける重要分子であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to explore the epigenetic mechanisms that underpin the metabolic programming in response to environmental stress. We focused on the molecular function and the biological roles of histone demethylases LSD1 and LSD2. We found that LSD1 was involved in the fiber type determination of skeletal muscle and that it also plays an essential role in the glycolytic shift in cancer cells. LSD2 was involved in the protection of hepatocytes from lipotoxic cell damage. We also investigated the behavior of biosynthetic enzymes for FAD, which is an essential coenzyme of LSD1 and LSD2. We found that FAD synthesis enzymes exhibited a unique subcellular localization, indicating that LSD1 and LSD2 might interact with FAD in a specific region in the cell. Altogether, our study indicates that LSD1 and LSD2 serve as molecular hubs that transmit environmental information into epigenetic modifications.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：ヒストン脱メチル化 エネルギー代謝 骨格筋 がん代謝 クロマチン

1. 研究開始当初の背景

(1) 国内外の研究動向

多因子疾患の多くでは、長期に亘る生活習慣がその発症リスクに関与すると考えられている。特に肥満を端緒とするエネルギー恒常性破綻は、胎生期・若齢期の栄養環境の影響を受けることがわかりつつあり、DOHaD (developmental origin of health and diseases) 仮説が提唱されている (Gluckman et al. Nat Rev Endocrinol. 2009)。この現象は、栄養摂取の影響下で細胞・組織レベルの代謝プログラムが構築されることに起因すると考えられ、その機序として DNA メチル化やヒストン修飾等のエピゲノム変化が土台をなすことが想定されている。

近年、栄養代謝産物である、アセチル CoA や NAD⁺、S-アデノシルメチオニン等がクロマチン制御因子の活性に直接作用することから、代謝-エピゲノムクロストークによる制御モデルが提唱されている (Hino et al. J Hum Genet 2013, 図 1)。しかしながら、栄養・代謝物がどのような時空間的制御や分子シグナルを介して代謝エピゲノム変換に結びつくかは不明な点が多い。

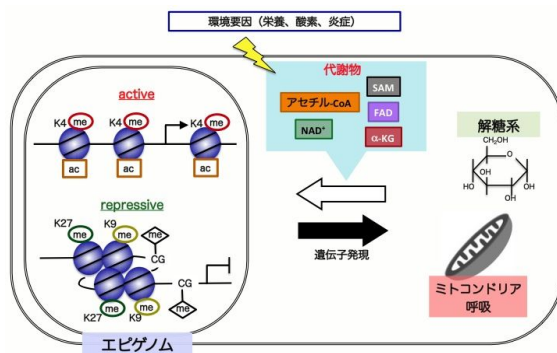


図1. 細胞内代謝とエピゲノム制御の相互作用

環境応答性エピゲノム変化が、長期に亘り記憶され、体質や疾患発症にどのような影響を及ぼすかはほとんどわかっていない。骨格筋は、生体内エネルギー消費の中心組織としてエネルギー恒常性を担っている。骨格筋は、運動・栄養等の外的刺激による細胞・組織レベルのリモデリングが活発であることから、エピジェネティックな代謝プログラミングが機能しやすい組織である可能性が考えられる。実際に、ミトコンドリア好気呼吸の低下は 2 型糖尿病や加齢に伴う骨格筋機能低下と密接に関わっており、これらの状況下で好気呼吸遺伝子の発現は抑制される (Mootha et al. Nat Genet. 2003)。また、転写調節因子であり好気呼吸の統合的制御因子である

PGC-1α 遺伝子のプロモーター領域では、糖尿病患者の骨格筋において DNA メチル化が顕著に認められ、エピジェネティック制御異常と代謝疾患の直接的関係が示唆される (Barres et al. Cell Metab. 2009)。

(2) 応募者のこれまでの研究からの着想

研究代表者はこれまでに、ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 が脂肪細胞において好気呼吸を調節することを明らかにした (Hino et al. Nat Commun. 2012)。LSD1 は、主にメチル化されたヒストン H3 リジン 4 (H3K4) からメチル基を除去する酵素であり、転写抑制や抑制型クロマチン形成に寄与する。LSD1 は、リボフラビン (ビタミン B2) 誘導体でありエネルギー代謝において重要な補酵素である FAD (フラビンアデニンジヌクレオチド) を要する酵素であることから、細胞内エネルギー状態が LSD1 によるエピゲノム制御に影響を及ぼす可能性を着想し、研究を行った。研究代表者は、*PGC-1α* を含む好気呼吸調節に関わる重要遺伝子のいくつかを LSD1 による発現抑制の標的であり、LSD1 機能阻害によりミトコンドリア呼吸が活性化されることを見出した。興味深いことに LSD1 による代謝遺伝子制御は、高カロリー環境でのみ認められた。これらのデータと一致して、LSD1 阻害化合物トラニルシプロミンをマウスに投与すると、高脂肪食誘導性肥満が抑制された。

以上の成果から、LSD1 は栄養環境依存的エピゲノム形成と代謝プログラミングを担う重要分子である可能性を考察し、本研究の立案に至った。

2. 研究の目的

栄養環境が細胞・組織の代謝プログラミングを惹起する過程をエピジェネティクスの観点から明らかにすることを目的として、ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 の機能を分子、細胞、個体レベルで解明する。

(1) LSD1 依存性エピゲノム制御における FAD 代謝動態の役割の解明

栄養環境変動がいかんして LSD1 を介した選択的エピゲノム制御に結びつくかを解明する目的で、細胞内 FAD 合成系の分子動態を解析し、LSD1 機能とのリンクを検討する。

(2) 骨格筋代謝プログラミングにおける LSD1 の役割の解明

骨格筋では *PGC-1α* 遺伝子の発現制御が代

謝プログラミングのキーポイントであると考えられる。このことから、LSD1/ PGC-1 α 軸の骨格筋における機能解析を行い、代謝プログラミングと代謝疾患リスクの関係性を解明する。

(3) 環境応答性 LSD1 機能の分子メカニズムの解明

様々な生物学的局面における LSD1 依存性代謝調節の可能性を検討し、LSD1 が選択的遺伝子制御を行う分子機構の詳細を解明する。さらに、LSD1 と相同性が高く、同じくヒストン脱メチル化酵素である LSD2 の代謝制御における役割を検討し、LSD1 との類似性・特異性を検証する。

3. 研究の方法

(1) LSD1 依存性エピゲノム制御における FAD 代謝動態の役割の解明

培養細胞やマウス個体を用いて、FAD 量が様々な栄養・代謝刺激に応じてどのように変化するか HPLC 法で解析すると共に、LSD1 による代謝遺伝子発現制御との関係性を検討する。また、LSD1 が FAD 合成系と相互作用し直接 FAD 供給を受けることが、LSD1 活性調節に際して合理的であると考えられることから、FAD 合成酵素(リボフラビンキナーゼと FAD シンセターゼ)の機能解析を行う。免疫染色法による細胞内局在、免疫沈降法による LSD1 との相互作用を解析する。

(2) 骨格筋代謝プログラミングにおける LSD1 の役割の解明

LSD1 阻害下の細胞に分化誘導を施した後、分化マーカー遺伝子、タンパク質発現及び筋管形成を評価する。また、マイクロアレイ解析により LSD1 の標的遺伝子の同定を行い、メチル化 H3K4 のゲノムワイド解析(ChIP-seq 法)によりエピゲノム変化を解析する。さらに、重鎖ミオシンアイソフォーム解析により LSD1 の有無による筋線維性状(遅筋、速筋)の変化を検討する。また、ミトコンドリア好気呼吸機能を細胞外フラックスアナライザーを用いて解析する。筋分化に伴う代謝プログラミングにおける LSD1 の役割を検討する目的で、分化誘導時に LSD1 阻害と様々な代謝刺激を組み合わせた試験も合わせて行う。

(3) 環境応答性 LSD1 機能の分子メカニズムの解明

様々ながん由来細胞を用いて LSD1 の代謝

制御における役割を調べる。がん細胞増殖において高グルコース代謝回転が必須であることから(解糖系シフト)この点に注目して研究を実施する。マイクロアレイ、メタボローム解析による LSD1 の作用標的の解明、共免疫沈降法による LSD1 結合タンパク質の同定を行う。また、マウスを用いた腫瘍移植試験により LSD1 の腫瘍形成における役割を検討し、ヒトがん組織を用いた LSD1 発現状況の解析を行う。

LSD2 の機能解析にあたり、トランスクリプトーム、エピゲノム、メタボローム解析を組み合わせたマルチオミックス解析を行う。

4. 研究成果

(1) LSD1 依存性エピゲノム制御における FAD 代謝動態の役割の解明

細胞内代謝補酵素である FAD の合成量・様式が LSD1 によるエピゲノム形成にどのように作用するかを検討した。生化学的解析や細胞染色法を用いて FAD 合成酵素群が核内を含む細胞内の様々な部位で観察された。一方で、ペプチドタグを融合させた FAD 合成酵素を細胞に強制発現させたところ、内因性タンパク質とは異なる局在を示したことから、その局在は能動的にコントロールされている可能性が示唆された。また、細胞内 FAD 量を安定的に定量する方法を確立した。この方法を用いて外部環境に応じて細胞内 FAD 量がどのように変化するか検討したところ、脂肪酸暴露による FAD 量増加は認められたが、その他の栄養・ホルモン刺激下では増減は認められなかった。

細胞内 FAD 量を安定的に定量出来るようになったので、今後は様々な生物材料を用いて FAD 量が生理条件下でどのように変化するかを評価する。また、核内における FAD 合成とエピゲノム制御を結ぶ分子機構を解明する目的で、FAD 合成酵素である RFK の結合タンパク質の同定をプロテオミクス解析を実施したい。これにより、FAD 合成と LSD1 及び 2 機能の直接的関係が解明できると共に、新たな FAD 依存性エピゲノム制御機構の発見にも繋がるものと期待している。

(2) 骨格筋代謝プログラミングにおける LSD1 の役割の解明

LSD1 が骨格筋細胞の代謝特性形成にどのように関与するかを検討した。LSD1 阻害下でマウス骨格筋由来細胞 C2C12 に筋分化刺激を施すと、特徴的な代謝特性をもつ筋管が形成

された。また、この代謝特性と一致する代謝関連遺伝子発現変化やヒストン修飾の変化が観察された。ChIP-seq 法によるゲノム上の LSD1 結合部位を網羅的に検索した結果、これらの遺伝子群が LSD1 による直接的な制御を受けていることがわかった。

次に LSD1 による筋線維・代謝遺伝子制御がどのような環境因子によって規定されるかを検討した結果、LSD1 のタンパク質発現量が代謝ホルモン刺激によって変動することがわかった。これらのことから、LSD1 は、生体内の栄養・代謝環境に応答して速筋線維形成をエピジェネティックに誘導することが示唆された（投稿準備中）。

以上より、LSD1 は骨格筋の代謝戦略策定に関わる重要因子である可能性が示唆された。

(3) 環境応答性 LSD1 機能の分子メカニズムの解明

がん細胞のエネルギー代謝転換における LSD1 の役割

肝がん細胞において、LSD1 が解糖系を活性化し、ミトコンドリア呼吸を抑制することによりがん細胞固有の代謝戦略である好氣的解糖を維持していることを明らかにした。LSD1 はヒストン H3K4 脱メチル化を介してミトコンドリア代謝関連遺伝子を抑制すると同時に、転写因子 HIF-1 α を安定化することにより解糖系遺伝子発現を活性化していた。さらに、マウスを用いた腫瘍細胞移植試験において LSD1 は肝がん細胞の生着に重要であることを突き止めた。これらの成果は LSD1 が統合的ながん代謝制御因子であることを示唆している（Sakamoto *et al.* Cancer Res. 2015）。

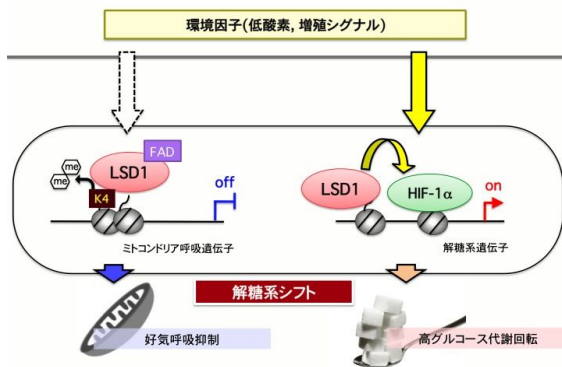


図2. LSD1 は、がん細胞の解糖系シフトを統合的に制御する

ヒト食道がんにおいて、LSD1 発現とグルコース取り込み能が有意に正の相関を示すことを明らかにした。また、食道がん細胞において、LSD1 がグルコース取り込み及び解糖系を活性化する役割を担うことを明らかにし

た。さらに、LSD1 が細胞の移動能に必須であることがわかった。これらの結果から、LSD1 による代謝制御ががん細胞の遊走・浸潤能と直結することが示唆された（Kosumi *et al.* Int. J. Cancer 2016）。

LSD2 による肝細胞における脂質代謝制御
トランスクリプトーム、エピゲノム及びメタボローム解析を駆使して、LSD2 が肝細胞の脂質代謝量を適正に維持していることを明らかにした。このような LSD2 の働きは、脂質輸送や代謝に関わる多数の遺伝子発現を H3K4 脱メチル化を介して抑制していることとリンクしていた。これらの遺伝子制御において、LSD2 はストレス応答性転写因子である c-Jun と協働していることを突き止めた。また、LSD2 は過剰な脂質負荷による肝細胞障害を抑制することがわかった。これらの点から、LSD2 は肝細胞の脂質代謝を適正に保ち、脂肪毒性から保護している可能性が示唆された（Nagaoka *et al.* Mol. Cell. Biol. 2015）。

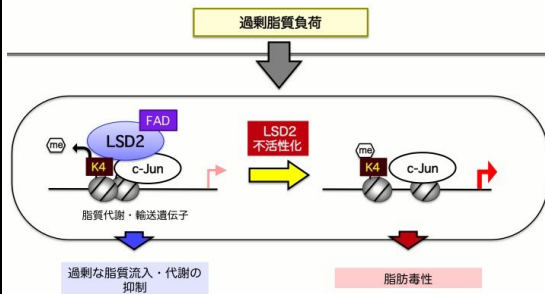


図2. LSD2は、肝細胞を過剰な脂質負荷から保護する

上記に示したとおり、LSD1 及び 2 を介した環境依存性エピゲノム制御と代謝転換との関係について、その一端を明らかにすることができた。特に LSD1 及び 2 による代謝遺伝子制御の全体像を明らかにすると共に、環境依存的に両分子と機能的に相互作用する転写因子を同定することができた。今後の研究では、環境に応じたこれらエピゲノム制御の分子機構の詳細を解明したい。具体的には、栄養・代謝センシングを司るホルモンのシグナル伝達経路と LSD1 及び 2 がどのように関係するかを検討する。特に、骨格筋分化や代謝転換におけるホルモンシグナルとエピジェネティクス機構の相互作用に焦点を当てて研究を進める。また、遺伝子改変マウス等を用いて、LSD1 の骨格筋代謝転換における役割を検討したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計15件)

Xi Y., Shen W., Ma L., Zhao M., Zheng J., Bu S., Hino S. and Nakao M. HMGA2 promotes adipogenesis by activating C/EBP β -mediated expression of PPAR γ . **Biochem. Biophys. Res. Com.** 472: 617-623, 2016. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.03.015. 査読有り

Matsushita S., Suzuki K., Ogino Y., Hino S., Sato T., Suyama M., Matsumoto T., Omori A., Inoue S. and Yamada G. Androgen regulates Mafk expression through its 3'UTR during mouse urethral masculinization. **Endocrinology** 157: 844-857, 2016. DOI: 10.1210/en.2015-1586. 査読有り

Kosumi K., Baba Y., Sakamoto A., Ishimoto T., Harada K., Nakamura K., Kurashige J., Hiyoshi Y., Iwatsuki M., Iwagami S., Sakamoto Y., Miyamoto Y., Yoshida N., Oki E., Watanabe M., Hino S., Nakao M. and Baba H. Lysine-specific demethylase-1 contributes to malignant behavior by regulation of invasive activity and metabolic shift in esophageal cancer. **Int. J. Cancer** 138: 428-39, 2016. DOI: 10.1002/ijc.29714. 査読有り

日野信次郎「細胞内代謝とエピゲノム制御のクロストーク(みにれびゅう)」**生化学** 87: 617-620, 2015. DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870617. 査読なし

Takebayashi S., Tanaka H., Hino S., Nakatsu Y., Igata T., Sakamoto A., Narita M., and Nakao M. Retinoblastoma protein promotes oxidative phosphorylation through up-regulation of glycolytic genes in oncogene-induced senescent cells. **Aging Cell** 14: 689-697, 2015. DOI: 10.1111/ace.12351. 査読有り

Sakamoto A., Hino S.*, Nagaoka K., Anan K., Takase R., Matsumori H., Ojima H., Kanai Y., Arita K. and Nakao M.* (*責任著

者) Lysine demethylase LSD1 coordinates glycolytic and mitochondrial metabolism in hepatocellular carcinoma cells. **Cancer Res.** 75: 1445-1456, 2015. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1560. 査読有り

Nagaoka K., Hino S.*, Sakamoto A., Anan K., Takase R., Umehara T., Yokoyama S., Sasaki Y. and Nakao M.* (*責任著者) Lysine-specific demethylase LSD2 suppresses lipid influx and metabolism in hepatic cells. **Mol. Cell. Biol.** 35: 1068-1080, 2015. DOI: 10.1128/MCB.01404-14. 査読有り

Baba T., Otake H., Sato T., Miyabayashi K., Shishido Y., Wang C., Shima Y., Kimura H., Yagi M., Ishihara Y., Hino S., Ogawa H., Nakao M., Yamazaki T., Kang D., Ohkawa Y., Suyama M., Chung B. and Morohashi K. Glycolytic genes are targets of the nuclear receptor Ad4BP/SF-1. **Nature Commun.** 5: Article No.3634, 2014. DOI: 10.1038/ncomms4634. 査読有り

Hino S.* (責任著者), Nagaoka K. and Nakao M. Metabolism-Epigenome Crosstalk in Physiology and Diseases. **J. Hum. Genet.** 58: 410-415, 2013. DOI: 10.1038/jhg.2013.57. 査読有り

[学会発表](計17件)

日野信次郎、坂元顕久、長岡克弥、阿南浩太郎、高瀬隆太、興相健作、中尾光善「FAD依存性ヒストン脱メチル化酵素によるエネルギー代謝制御機構」日本薬学会第136年会(シンポジウム:メタボライトとエピゲノム)2016年3月28日 横浜市 パシフィコ横浜

Hino S. Histone demethylase LSD1 links environmental cues to metabolic reprogramming. International Symposium for RIKEN Epigenetics Program (Selected short talk). Feb. 16, 2016. Wako, Saitama

日野信次郎、坂元顕久、長岡克弥、阿南浩太郎、高瀬隆太、興相健作、中尾光善「マルチオミックス解析技術を用いた代謝-エピゲノムクロストークの解明」BMB2015(ワークショップ:マルチオミックス統合解析の新機軸) 2015年12月2日 兵庫県神戸市

日野信次郎「FAD 依存性ヒストン脱メチル化酵素による代謝制御機構」第 26 回フォーラム・イン・ドージン（代謝システムと遺伝子発現制御 ～意外な縁～）2015 年 11 月 13 日 熊本県熊本市

日野信次郎、坂元顕久、中尾光善「リジンメチル化酵素 LSD1 によるがん代謝制御の分子機構」第 87 回日本生化学会大会（シンポジウム：低酸素応答システムの分子機構と多様な役割）2014 年 10 月 18 日 京都府京都市

日野信次郎「細胞のエネルギー戦略を担うエピジェネティクス機構」第 1188 回ウイルス研究所セミナー 2014 年 10 月 17 日 京都府京都市

Hino S. The molecular mechanisms of metabolism-epigenome crosstalk. KEY Forum: From Stem Cells to Organs. Sept. 5, 2014. Kumamoto City, Kumamoto

日野信次郎「代謝エピゲノムクロストークの分子機構と疾患」武田薬品癌創薬ユニットセミナー 2014 年 3 月 26 日 神奈川県藤沢市

Hino S., Sakamoto A., Nagaoka K., Anan K., Takase R. and Nakao M. Metabolism-epigenome crosstalk through FAD/LSD1 pathway. International Symposium on Transcription and Metabolism. Nov. 11, 2013. Awaji, Hyogo

日野信次郎、坂元顕久、中尾光善「がん代謝とエピジェネティクス」第 1 回がん代謝研究会 2013 年 10 月 31 日 山形県鶴岡市

日野信次郎「代謝-エピゲノムクロストークの分子機構」第 45 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 Young Faculty Initiative Session 2013 年 7 月 19 日 東京都新宿区

日野信次郎、坂元顕久、長岡克弥、阿南浩太郎、高瀬隆太、中尾光善「代謝-エピゲノムクロストークによるエネルギー戦略形成機構」第 40 回日本毒性学会学術年会・シンポジウム「毒性評価への展開を図るエピジェネティクス研究」2013 年 6 月 17 日 千葉県千葉市

〔図書〕(計 1 件)

高瀬隆太、日野信次郎、中尾光善「第 4 章 エネルギー代謝のエピジェネティック制御と疾患」エピジェネティクスの産業応用（監修：畑田出穂、久保田健夫）189-197 シーエムシー出版 2014.

〔産業財産権〕
出願状況（計 1 件）

名称：神経変性疾患治療剤
発明者：谷原秀信、岩尾圭一郎、中尾光善、林秀樹、日野信次郎、堤孝之
権利者：国立大学法人 熊本大学
種類：発明
番号：特願 2016-011705
出願年月日：平成 28 年 1 月 25 日
国内外の別：国内

取得状況（計 1 件）

名称：ミトコンドリア機能向上剤
発明者：中尾光善、日野信次郎
権利者：国立大学法人 熊本大学
種類：発明
番号：(米国)US8, 637, 480(国内)第 5685764 号
取得年月日：(米国)平成 26 年 1 月 28 日(国内)平成 27 年 1 月 30 日
国内外の別：米国及び国内

〔その他〕
ホームページ等

熊本大学発生医学研究所ホームページ
<http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp>
熊本大学 WEB マガジンにて研究活動紹介
http://www.kumamoto-u.ac.jp/daigakujo_uhou/kouhou/kouhoushi/kumada_inow/laboratory/k160107

6. 研究組織

(1)研究代表者

日野 信次郎 (HINO, Shinjiro)
熊本大学・発生医学研究所・助教
研究者番号：00448523