

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670159

研究課題名(和文)糖、脂質代謝調節における核膜孔複合体の役割～新しい分子制御モデルの提唱～

研究課題名(英文)The role of nuclear pore complex in the regulation of glucose and lipid metabolism

研究代表者

北村 忠弘 (KITAMURA, TADAHIRO)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：20447262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マスマスペクトロメトリーによりChREBPが核膜孔複合体の一つであるNup53と結合することを見出した。培養肝細胞を用いた共沈実験でもChREBPとNup53との結合を確認した。また、ChREBPが他の核膜孔構成タンパク質であるNup62とNup153とも結合することを明らかとした。培養肝細胞にNup62をトランスフェクションにて過剰発現させると、ChREBPのO-グリコシル化が増加し、それに伴ってユビキチン化が減少した。さらにアデノウイルスでFoxO1を過剰発現させるとNup62の発現量が用量依存性に低下し、逆にSiRNAを用いてFoxO1をノックダウンするとNup62の発現量が増加した。

研究成果の概要(英文)：We show that carbohydrate response element binding protein (ChREBP), a glucose-regulated transcription factor, is O-glycosylated by OGT, leading to increased ChREBP levels, owing to decreased ubiquitination. Conversely, expression of O-GlcNAcase (GCA) in hepatocytes decreases ChREBP O-glycosylation, thus reducing its protein levels. FoxO1, a downstream effector of insulin signaling, has been known to regulate glucose metabolism in liver. We show here that FoxO1 overexpression inhibits ChREBP O-glycosylation in hepatocytes, thus reducing ChREBP levels. Conversely, conditional FoxO1 knockout in liver results in increased levels of O-glycosylated ChREBP, even in the fasted state. O-glycosylation is an important mechanism to regulate ChREBP function, and that FoxO1 is required for ChREBP O-glycosylation. We propose that FoxO1 is the shared signaling element linking glucose- and insulin-activated pathways to regulate hepatic glucose metabolism.

研究分野：糖尿病

キーワード：Chrebp 核膜孔

1. 研究開始当初の背景

Carbohydrate Response Element Binding Protein (ChREBP) は解糖経路で重要なピルビン酸キナーゼ (L-PK) や脂肪合成系酵素であるアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) と脂肪酸合成酵素 (FAS) の転写調節因子である。一方、高血糖により過剰なグルコースが肝細胞に流入すると、ヘキソサミン合成系が活性化され、産生された UDP-グルコサミンをドナー基質として、O-GlcNAc transferase (OGT) が種々のタンパク質を O-グリコシレーションする。最近、TORC2、PGC1 α 、FoxO1 などの糖代謝調節に関わる転写因子が O-グリコシレーションにより調節されることが報告された。核膜孔複合体タンパクのいくつかは O-グリコシレーションされることが知られており、本研究課題では ChREBP の O-グリコシレーションの生理的意義と、核膜孔が代謝制御に関わる可能性を検討する。本研究の特色は2つある。1つ目は糖、脂質代謝学領域において、未だ不明な点の多い ChREBP の制御メカニズムを分子レベルで解明しようとする点である。2つめは ChREBP を1つのモデル分子として研究することで、これまで核細胞質間の物質輸送の為の“穴”としか認識されてこなかった核膜孔に、全く新しい生理的意義を見出す点である。結果として、核膜孔複合体が糖、脂質代謝調節に関与することが証明できれば、細胞構造学と代謝学の両方に全く新しい概念を吹き込むばかりでなく、代謝疾患に対する新しい治療標的を提示できる可能性もある。

2. 研究の目的

糖尿病、高脂血症、脂肪肝といった代謝疾患は糖、脂質代謝調節の障害から発症する。ChREBP は解糖系と脂質合成系に関わる酵素の発現量を調節する重要な転写因子であるが、その調節メカニズムについては不明な点が多い。申請者は高グルコースで ChREBP が O-グリコシレーションされることを見出しており、その生理的意義を明らかにする。また、申請者の予備検討において、ChREBP がグルコース濃度依存性に複数の核膜孔複合体タンパクと結合することを見出した。本研究課題では、核膜孔複合体が積極的に細胞、及び生体の代謝調節に関わっているという全く新しい概念を検証したい。従来、核膜孔複合体は物質輸送を円滑に行うためののみ機能していると考えられてきたが、ごく最近になって核膜孔複合体タンパクが物質輸送以外の生理作用を持つ可能性が示唆された。即ち、核膜孔複合体タンパクがクロマチンを核膜近傍に引き寄せ、遺伝子の転写調節に関与する可能性があるという報告である。このシステムは転写因子が核内に移行した後、速やかに転写を開始するのに合理的である。申請者は予備検討の結果、ChREBP が複数の核

膜孔複合体タンパクと結合することを見出した。ChREBP は刻々と変化する細胞内グルコース濃度を感知し、直ちに解糖、脂肪合成酵素の発現を調節する上で、このシステムは理にかなっている。一方で、申請者は ChREBP が高グルコースで O-グリコシレーションされることを見出したが、核膜複合体タンパクのいくつかは OGT と結合し、O-グリコシレーションされることが報告されている。以下のモデルを検証することを目的とする。即ち、ChREBP は核へ移行する際に核膜孔複合体タンパクと結合し、それが引き金となって SUMO 化や O-グリコシレーションの修飾を受け、タンパク安定性が制御される。一方、核膜孔を通過した ChREBP は標的遺伝子の転写を行うが、その際も核膜孔複合体タンパクが標的遺伝子のクロマチンを核膜近傍に誘導し、ヒストン修飾やコファクターのリクルートを調節して、効率的な遺伝子転写に貢献している。インスリンは FoxO1 を介して核膜孔複合体タンパクの発現を調節することで、結果として ChREBP の転写活性を制御する。

3. 研究の方法

初代培養肝細胞を高グルコースやインスリンで刺激した場合の ChREBP とそれに結合する核膜孔複合体タンパクの動態、及びこれらの分子を過剰発現やノックダウンした場合の糖、脂質代謝調節因子への影響を検討する。次に、糖尿病、脂肪肝モデルマウスの肝臓における ChREBP と核膜孔複合体タンパクの動態を調査する。また、アデノウイルスを用いて、肝臓にこれらの分子を発現させた場合の糖、脂質代謝への影響を検討する。さらに、肝臓特異的 FoxO1 遺伝子改変マウスにおける ChREBP と核膜孔複合体タンパクについても解析する。培養肝細胞を高グルコースやインスリンで刺激し、ChREBP、Nup358、Nup153、Nup62 などの発現量とタンパク修飾をウエスタンブロット法と定量 RT-PCR で検討し、細胞内局在を蛍光免疫染色と免疫電顕を用いて解析する。また、ChREBP の転写活性は標的遺伝子であるピルビン酸キナーゼ (L-PK) のプロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイで検討する。次に、培養肝細胞において、作製したアデノウイルスや siRNA を用いて、ChREBP や核膜孔複合体タンパクの過剰発現やノックダウンを行い、肝細胞内の脂肪蓄積量の変化を Oil red O 染色や中性脂肪の定量により検討する。また、糖、脂質代謝に関わる種々の酵素の発現量を定量 RT-PCR 法を用いて検討する。次に、実験動物を用いた解析としては、野生型マウスを絶食、再摂食させた場合、または高脂肪食で飼育した場合、さらには重度の糖尿病、脂肪肝を発症している db/db マウスの肝臓における ChREBP と核膜孔複合体タンパクの発現量や細胞内局

在、タンパク修飾を上記の培養細胞の場合と同様の方法を用いて解析する。さらに、作製した ChREBP や Nup358、Nup153、Nup62、及びこれらの siRNA を発現するアデノウイルスをマウスの尾静脈から投与し、肝臓において発現させ、血糖値、血清脂質などの代謝パラメータ、脂肪肝の程度、各種負荷試験（耐糖能試験、インスリン感受性試験など）を用いた代謝機能の評価を行う。また、これらのマウスの肝臓サンプルを採取し、解糖系酵素、及び脂質合成系酵素の発現量を RNA とタンパクの両方のレベルで調査する。本研究においては ChREBP を 1 つのモデル分子として利用しているが、ChREBP と同じく細胞外環境の変化を受けて核と細胞質の間を移行する（シャトルする）転写因子は多く存在し、その制御に核膜孔複合体タンパクが普遍的に同様の役割を担っている可能性があり、次にそれを検証する。特に糖や脂肪酸濃度、インスリンやレプチンなど代謝制御に関わる因子の影響を受け、核—細胞質間をシャトルする転写因子（FoxO1、FoxA2、SREBP1c、STAT3、Pdx1 など）について、上記で用いた同じサンプルを利用して解析を行う。これらの研究成果により、核膜複合体が核—細胞質間の物質輸送以外の生理機能を持つという普遍的な新しいメカニズムを明らかにすることができれば、将来的に本研究成果をさらに発展させた研究計画が提案できる。

4. 研究成果

マウス初代培養肝細胞に OGT、GCA、あるいはそれらの特異的 siRNA をトランスフェクション法により過剰発現させた所、ChREBP の O-グリコシレーションは O-GlcNAc transferase (OGT) によって惹起され、siRNA によって OGT をノックダウンすると、高グルコースによる ChREBP の O-グリコシレーションは抑制された。逆に ChREBP の O-グリコシレーションは O-GlcNAcase (GCA) によって抑制された。さらに OGT の発現により ChREBP の転写活性が増加し、逆に GCA の発現により減少することを確認した。マウス初代培養肝細胞に恒常的活性型の FoxO1 (FoxO1-ADA) をアデノウイルスを用いて強制発現させると、ChREBP のタンパクレベルが有意に減少した。その際、ChREBP の O-グリコシレーションが抑制されており、ユビキチン化は増加していた。逆に FoxO1 特異的 siRNA を発現させると、ChREBP の O-グリコシレーションが亢進した。また、FoxO1-ADA の過剰発現は高グルコースや OGT の発現によって増加した ChREBP の転写活性を有意に抑制した。ChREBP 結合タンパク質を、SDS-PAGE、銀染色を施行後、いくつかの分子量のタンパク質を切り出してマスペクトロメトリー解析を行った結果、ChREBP が核膜孔複合体の一つである Nup53 と結合することが判明

した。培養肝細胞を用いた共沈実験でも ChREBP と Nup53 との結合を確認した。また、核膜孔構成タンパク質に共通のドメインを抗原として作成された 414 モノクローナル抗体を用いて、ChREBP が他の核膜孔構成タンパク質である Nup62 と Nup153 とも結合することが明らかとなった。Nup62 はグリコシレーション修飾酵素である OGT の基質であり、自身も強く O-グリコシレーションされることが報告されている。興味深いことに培養肝細胞に Nup62 をトランスフェクションにて過剰発現させると、ChREBP の O-グリコシレーションが増加し、それに伴ってユビキチン化が減少した。さらにアデノウイルスで FoxO1 を過剰発現させると Nup62 の発現量が用量依存性に低下し、逆に SiRNA を用いて FoxO1 をノックダウンすると Nup62 の発現量が増加した。肝臓特異的 FoxO1 ノックアウトマウスの肝臓における ChREBP の発現、細胞内局在は解析中である。今後の研究展開によっては、肝細胞における代謝制御に核膜孔が積極的に関与しているという全く新しい仮説を提唱できる可能性がある。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://taisha.imcr.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者 北村忠弘
(KITAMURA TADAHIRO)
群馬大学・生体調節研究所・教授
研究者番号：20447262

(2)研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3)連携研究者 なし
()

研究者番号：