

令和元年6月19日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08593

研究課題名(和文) 核内受容体Ad4BPによるレギュロンスイッチングの制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of regulon switching controlled by Ad4BP

研究代表者

馬場 崇 (BABA, Takashi)

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：40435524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、Ad4BPのアセチル化修飾部位を3カ所(K45, K392, およびK435)同定した。これら3カ所のリジン残基がそれぞれアセチル化されたAd4BPを特異的に認識するモノクローナル抗体の作成を行った。その結果、K392アセチル化Ad4BP特異的抗体が得られた。K45、およびK435アセチル化Ad4BPに対する抗体は、順次スクリーニング中である。今後、免疫染色により生体内におけるアセチル化Ad4BPの時空間的局在を調べる。また、アセチル化Ad4BPが制御する標的遺伝子をChIP-seqにより明らかにすることで、外界刺激に応答したAd4BPによるレギュロン制御メカニズムを理解する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では副腎・生殖腺における糖濃度の変化に応答した代謝リプログラミング機構の解明を目指した。副腎・生殖腺はコレステロールから合成される多種のステロイドホルモンを産生・分泌することから、これらの組織における細胞内代謝系の破綻が、内分泌系を通じて全身へ影響を及ぼす可能性は十分に考えられる。よって、外界刺激に応答したレギュロン制御メカニズムの理解は、恒常性の破綻によって引き起こされる疾患の根源的理解に向けて新たな視点を与える

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified three acetylation sites (K45, K392, and K435) of Ad4BP protein. Then, we tried to generate monoclonal antibodies recognizing each acetylated protein. We succeeded in generating anti-K392Ac-Ad4BP antibody, and are screening anti-K45Ac-Ad4BP and anti-K435Ac-Ad4BP antibodies. Spatio-temporal localization of acetylated Ad4BP in vivo will be determined by immunohistochemical staining with the antibodies. Moreover, we will perform ChIP-seq to identify genes regulated by acetylated Ad4BP to understand the mechanism of "regulon switching" in response to environmental stimuli.

研究分野：分子生物学

キーワード：核内受容体 翻訳後修飾 代謝 遺伝子発現制御

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体の恒常性は様々な代謝系の協調的な制御のもとに成立する。一般に、代謝系は複数の酵素による連続した反応によって構築されるが、その制御機構に関する研究は主に律速酵素の活性調節とその遺伝子発現制御の観点から進められてきた。コレステロール合成におけるHMG CoA還元酵素はその典型的な例である。一方、代謝系を構築する全ての遺伝子を一つのユニットとして一斉に制御する系は合理的である。このような制御系が証明された例は稀であるが、長年に渡る研究により、核内受容体Ad4BP/SF-1がステロイドホルモンの合成に関与する全遺伝子の発現を制御することが示されている。加えて、最近我々は全ゲノムを対象とする実験により、Ad4BP/SF-1が解糖系とコレステロール合成系を構築するほぼ全ての遺伝子のプロモーター領域もしくはエンハンサー領域に結合し、これらの遺伝子をユニットとして制御することを見出した(馬場 *Nature Communications* 2014)。このように一つの転写因子によって一斉に制御される一群の遺伝子は「レギュロン」と呼ばれ、「オペロン」とともに効率的な代謝制御を可能にする仕組みとして理解されてきた。従来、これらの仕組みは原核生物に特有であるとされてきたが、近年我々はAd4BP/SF-1のレギュロンを同定することにより、多細胞真核生物においてもレギュロンによる代謝制御が行われていることを示した。

上記に加え、最近我々は、Ad4BP/SF-1のレギュロン制御が、外界刺激のひとつである糖濃度の変化にตอบสนองしてON/OFFされるという現象(レギュロンスイッチング)を見いだした(図)。糖は血流を介し、多臓器間機能ネットワークのメディエーターとして機能し得る分子である。よって我々は、各組織・細胞は糖濃度にตอบสนองしたレギュロンスイッチングによって最適な代謝状態の構築(代謝リプログラミング)を行うのではないかと考えた。そして、各組織・細胞における代謝リプログラミングが全身の代謝ネットワークを通じて統合されることが、生体恒常性維持機構の基本メカニズムではないかと着想するに至った。

2. 研究の目的

外界刺激にตอบสนองした代謝リプログラミング、およびレギュロン間の連携による代謝系の制御は、バランスのとれた生体機能の維持、すなわち恒常性の維持に不可欠である。よって、これらの制御に変化が蓄積すれば、代謝系の変化を引き起こし、ひいては生体恒常性の破綻を招くと推測することができる。したがって、外界刺激にตอบสนองしたレギュロン制御メカニズムの理解は、恒常性の破綻によって引き起こされる疾患の根源的理解に向けた重要な研究課題と位置づけられる。そこで本研究では、核内受容体 Ad4BP/SF-1 に焦点を当て、そのレギュロンスイッチングの制御機構を解明することを目的とする。そして、「外界刺激にตอบสนองしたレギュロンスイッチングによる代謝リプログラミング」という新たな概念の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、以下に示す3つ実験項目を遂行する。糖濃度にตอบสนองした Ad4BP のレギュロンスイッチングの分子メカニズムを多方面から検討することで、その実体解明を目指す。

実験(1) 糖濃度の変化にตอบสนองした Ad4BP/SF-1 の翻訳後修飾の同定とその機能解析

Ad4BP の翻訳後修飾を同定し、その修飾を受けた Ad4BP のクロマチン結合領域を ChIP-seq により明らかにする。修飾 Ad4BP の特定の代謝系遺伝子座への集積が期待される。

実験(2) 糖濃度の変化にตอบสนองした Ad4BP/SF-1 の共役因子の同定とその機能解析

Ad4BP の共役因子を同定する。これらの因子をノックダウンした細胞で Ad4BP の ChIP-seq を行うことにより、糖濃度にตอบสนองしたレギュロンスイッチングへの関与について検討する。

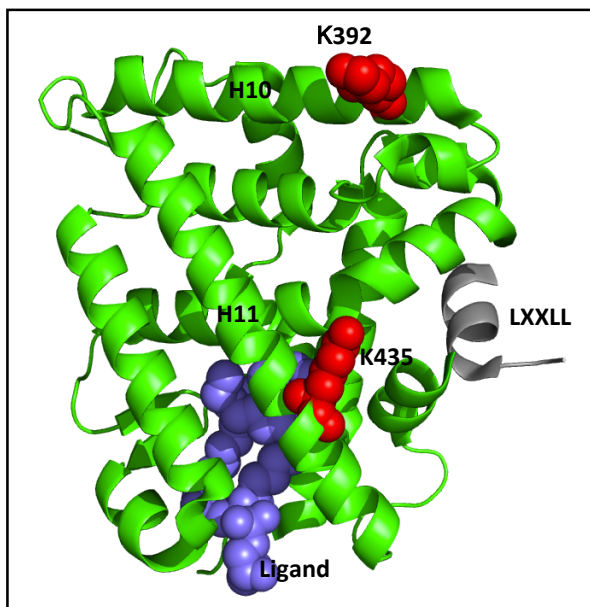
実験(3) 糖濃度の変化にตอบสนองした Ad4BP/SF-1 結合領域のクロマチン構造変化の検討

クロマチン構造の変化する領域を FAIRE-seq で同定する。また、メチル化 H4R3 の ChIP-seq を行い、このヒストン修飾とレギュロンスイッチングの関連について検討する。

4. 研究成果

実験(1) 糖濃度の変化に応答した Ad4BP/SF-1 の翻訳後修飾の同定とその機能解析

Ad4BP の翻訳後修飾を同定するために、FLAG タグを付加した Ad4BP を安定的に発現する HEK293 細胞 (293-FLAG-Ad4BP) を樹立した。293-FLAG-Ad4BP の核抽出液から FLAG 抗体による免疫沈降を行い、FLAG-Ad4BP を単離し、質量分析によりその翻訳後修飾の同定を行った。その結果、これまでに報告のない、3カ所のリジン残基のアセチル化修飾 (K45, K392, および



K435) が同定された。そのうち2カ所のリジン残基は C 末端側のリガンド結合ドメインに存在した (図)。Ad4BP のリガンド結合ドメインは、 β -カテニン等との相互作用に必要であることが分かっていることから、今回同定した Ad4BP のアセチル化が Ad4BP と共役因子との相互作用の調節に参与している可能性が示唆される。また、アセチル化の修飾基の供与体であるアセチル CoA は糖、および脂肪酸の代謝によって産生されることから、細胞内のエネルギー代謝状態のセンサーの一つであると考えられている。実際、Ad4BP のアセチル化修飾は高糖濃度条件下で亢進していることから、糖濃度に応じた Ad4BP の機能制御をおこなっている可能性が十分に考えられる。

そこで、今回同定した3カ所のリジン残基がそれぞれアセチル化された Ad4BP を特異的に認識するモノクローナル抗体の作成を行った。その結果、K45 がアセチル化された Ad4BP を特異的に認識する抗体が得られた。また、K392、および K435 アセチル化 Ad4BP に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマもすでに数10種ずつ得られており、順次スクリーニングを行なっている。今後、免疫染色により生体内におけるアセチル化 Ad4BP の時空間的局在を調べる。また、アセチル化 Ad4BP が制御する標的遺伝子を ChIP-seq により明らかにすることで、糖濃度の変化が Ad4BP を介して制御する標的遺伝子群を明らかにする。

実験(2) 糖濃度の変化に応答した Ad4BP/SF-1 の共役因子の同定とその機能解析

Ad4BP/SF-1 の抗体を用いた免疫沈降を行い、免疫沈降されるタンパク質群を質量分析により同定した。これまでにいくつかのタンパク質を共役因子として同定することに成功した。共役因子の中には通常細胞質でエネルギー代謝に関与していることが知られている酵素タンパク質が含まれていた。Ad4BP/SF-1 は核内に局在する転写因子であるため、これらの酵素タンパク質が Ad4BP/SF-1 と物理的に相互作用するためには、少なくともある一定の条件下では核内に存在する必要がある。この可能性に関して検討した結果、Ad4BP/SF-1 の共役因子として同定した酵素タンパク質は、高糖濃度条件下では一部が核内に移行することを示すことができた。以上より、エネルギー代謝の制御に関与する酵素タンパク質が、Ad4BP/SF-1 との相互作用を通じ、核内で未同定の機能を発揮している可能性が示唆された。

実験(3) 糖濃度の変化に応答した Ad4BP/SF-1 結合領域のクロマチン構造変化の検討

オープンクロマチン領域をゲノムワイドに同定する手法である FAIRE-seq により、糖濃度の変化に応答してクロマチン構造の変化する領域の同定を試みた。全ゲノム中に数万箇所オープンクロマチン領域を同定したが、糖濃度の変化により顕著な差を示す領域は見つからなかった。この結果は、糖濃度の変化によって変化する遺伝子発現は、主に転写に関与するタンパク質の制御を通じて引き起こされるものであり、クロマチン構造の制御を通じたものではないということを示唆するものであった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

- ① Yokoyama C, Chigi Y, **Baba T**, Ohshitanai A, Harada Y, Takahashi F, Morohashi KI.

Three populations of adult Leydig cells in mouse testes revealed by a novel mouse HSD3B1-specific rat monoclonal antibody

Biochem. Biophys. Res. Commun. **511(4)**:916-920. 2019 査読有り

doi: 10.1016/j.bbrc.2019.02.100.

- ② Katoh-Fukui Y, **Baba T**, Sato T, Otake H, Nagakui-Noguchi Y, Shindo M, Suyama M, Ohkawa Y, Tsumura H, Morohashi KI, Fukami M.
Mouse polycomb group gene Cbx2 promotes osteoblastic but suppresses adipogenic differentiation in postnatal long bones.
Bone. 2019 Mar;120:219-231. 2018 査読有り doi: 10.1016/j.bone.
- ③ **Baba T**, Otake H, Inoue M, Sato T, Ishihara Y, Moon JY, Tsuchiya M, Miyabayashi K, Ogawa H, Shima Y, Wang L, Sato R, Yamazaki T, Suyama M, Nomura M, Choi MH, Ohkawa Y, Morohashi KI.
Ad4BP/SF-1 regulates cholesterol synthesis to boost the production of steroids
Commun. Biol. **1**, 18, 2018 査読有り doi: 10.1038/s42003-018-0020-z.
- ④ Syu JS, **Baba T**, Huang JY, Ogawa H, Hsieh CH, Hu JX, Chen TY, Lin TC, Tsuchiya M, Morohashi KI, Huang BM, Lu FL, Wang CY
Lysosomal activity maintains glycolysis and cyclin E1 expression by mediating Ad4BP/SF-1 stability for proper steroidogenic cell growth.
Sci Rep. **2017 Mar 21;7(1):240**. 査読有り doi: 10.1038/s41598-017-00393-4.
- ⑤ Li B, **Baba T**, Miyabayashi K, Sato T, Shima Y, Ichinose T, Miura D, Ohkawa Y, Suyama M, Morohashi KI.
Role of Ad4-binding protein/steroidogenic factor 1 in regulating NADPH production in adrenocortical Y-1 cells.
Endocr J. **64(3)**:315-324. 2017 査読有り doi: 10.1507/endocrj.EJ16-0467
- ⑥ Shishido Y, **Baba T**, Sato T, Shima Y, Miyabayashi K, Inoue M, Akiyama H, Kimura H, Kanai Y, Ishihara Y, Haraguchi S, Miyazaki A, Rozman D, Yamazaki T, Choi MH, Ohkawa Y, Suyama M, Morohashi KI.
Differential lactate and cholesterol synthetic activities in XY and XX Sertoli cells.
Sci Rep. **7**:41912. 2017 査読有り doi: 10.1038/srep41912
- ⑦ Igarashi M, Takasawa K, Hakoda A, Kanno J, Takada S, Miyado M, **Baba T**, Morohashi KI, Tajima T, Hata K, Nakabayashi K, Matsubara Y, Sekido R, Ogata T, Kashimada K, Fukami M.
Identical NR5A1 Missense Mutations in Two Unrelated 46,XX Individuals with Testicular Tissues.
Hum Mutat. **38**, 39-42. 2017 査読有り doi: 10.1002/humu.23116
- ⑧ Miyabayashi K, Shima Y, Inoue M, Sato T, **Baba T**, Ohkawa Y, Suyama M, Morohashi KI.
Alterations in Fetal Leydig Cell Gene Expression during Fetal and Adult Development.
Sex Dev. **11**, 53-63. 2017 査読有り doi: 10.1159/000453323

[学会発表] (計 9 件)

- ① ORCHESTRATION OF HOUSEKEEPING AND CELL-SPECIFIC METABOLISM FOR STEROID HORMONE SYNTHESIS BY A SINGLE TRANSCRIPTION FACTOR, Ad4BP/SF-1
Takashi Baba, Hiroyuki Otake, Miki Inoue, Kanako Miyabayashi, Yuichi Shima, Tetsuya Sato,

- ② 核内受容体 Ad4BP/SF-1 によるステロイドホルモン産生へ向けた全プロセスの制御
馬場 崇、諸橋 憲一郎
ConBio2017 2017 年
- ③ 核内受容体 Ad4BP/SF-1 による NADPH 産生制御
馬場 崇、Li Bing、諸橋 憲一郎
第 25 回日本ステロイドホルモン学会学術集会 2017 年
- ④ Role of Ad4-Binding Protein/Steroidogenic Factor-1 (Ad4BP/SF-1) in regulating NADPH production in adrenocortical Y-1 cells
Takashi Baba, Li Bing, Ken-ichirou Morohashi
Asian Sex Differentiation Network 2017年
- ⑤ 核内受容体Ad4BP/SF-1によるステロイドホルモン産生の統括的制御
馬場崇、大竹博之、井上実紀、佐藤哲也、石原康宏、宮林香奈子、嶋 雄一、山崎岳、須山幹太、Choi Man-Ho、大川恭行、諸橋憲一郎
第21回日本生殖内分泌学会学術集会
2017 年 01 月 14 日 大阪 千里ライフサイエンスセンター
- ⑥ 核内受容体 Ad4BP/SF-1 によるステロイドホルモン産生の全制御
馬場崇、大竹博之、井上実紀、石原泰宏、宮林香奈子、嶋雄一、山崎 岳、Man-Ho Choi、諸橋憲一郎
第 24 回日本ステロイドホルモン学会学術集会
2016 年 12 月 03 日 大分 ホルトホール大分
- ⑦ 核内受容体 Ad4BP/SF-1 によるステロイドホルモン産生の全制御
馬場崇、大竹博之、井上実紀、佐藤哲也、石原康宏、宮林香奈子、嶋雄一、山崎岳、須山幹太、Choi Man-Ho、大川恭行、諸橋憲一郎
第 39 回日本分子生物学会年会
2016 年 12 月 01 日 横浜 パシフィコ横浜
- ⑧ 核内受容体 Ad4BP/SF-1 によるステロイドホルモン産生の全制御
馬場崇
第 1 回次世代生命科学の研究会
2016 年 08 月 13 日 徳島大学
- ⑨ 栄養・代謝と性
馬場崇、井上実紀、諸橋憲一郎
第 89 回日本内分泌学会学術総会
2016 年 04 月 21 日 京都 京都国際会議場

〔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：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

www.med.kyushu-u.ac.jp/seisaseibutu/

6. 研究組織

(1) 研究分担者
なし

(2) 研究協力者
研究協力者氏名：横山敦
ローマ字氏名：Yokoyama Atsushi

※科費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。