

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 20 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591155

研究課題名（和文） 肝臓の糖産生制御における転写共役因子 CITED2 の役割の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the role of CITED2 in hepatic glucose production

研究代表者

松本 道宏（MATSUMOTO MICHIMIRO）

国立国際医療研究センター研究所・糖尿病研究センター・分子代謝制御研究部・部長

研究者番号：90467663

研究成果の概要（和文）：CITED2 が血糖値の調節に重要なホルモンであるグルカゴン・インスリンのシグナルを受け取り、転写共役因子 PGC-1 α のアセチル化・活性へと変換することで、肝臓からのブドウ糖の産生を調節し、正常な血糖値の維持に寄与していることを明らかにした。また、CITED2 のタンパク量の増加が糖尿病の高血糖の病因の一つであることを見出し、CITED2 の作用の抑制が高血糖の治療に繋がることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We unveiled that CITED2 functions as a transducer of glucagon and insulin signaling in the regulation of PGC-1 α activity that is associated with the transcriptional control of gluconeogenesis and that this function is mediated through the modulation of GCN5-dependent PGC-1 α acetylation. We also found that loss of hepatic CITED2 function suppresses gluconeogenesis in diabetic mice, suggesting it as a therapeutic target for hyperglycemia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：CITED2、遺伝子転写、糖尿病、インスリン、グルカゴン、

1. 研究開始当初の背景

肝臓からの糖産生は、絶食時の低血糖による臓器障害を回避するために極めて重要である。一方、2型糖尿病ではインスリンの肝糖産生抑制作用が障害され、その病的亢進は高血糖の主要な原因の一つとなっており、その分子機構の解明は、学術的に重要であるのみならず、新規糖尿病治療薬開発のためにも重要な課題である。

転写共役因子 CITED2 は、ヒストンアセチル化酵素(HAT)活性をもつ転写コアクチベーターである CBP/p300 との相互作用を介して、遺伝子転写を調節することが報告されていた。また、ノックアウトマウスを用いた検討から、CITED2 は胎児の発生や、成体の造血幹細胞の維持に不可欠であることが明らかとなった。

一方、CITED2 は HNF-4 α 5)、PPAR α / γ 、

CBP といった肝臓の糖脂質代謝調節において重要な役割を果たす分子と相互作用することが報告されていたが、その肝糖代謝調節における役割は明らかとなっていなかった。

2. 研究の目的

肝糖産生調節における CITED2 の役割の解明を目的とする。

(1) 個体レベルでの機能解析

マウスにおいて CITED2 の肝臓特異的な機能獲得・喪失実験を行い、糖産生系酵素の遺伝子発現と肝糖産生への影響を明らかにする。また、耐糖能、インスリン感受性など全身の代謝への影響をも明らかにする。さらに糖尿病や肝インスリン抵抗性を有するモデル動物を用いて、これらの病態への関与も明らかにする。

(2) 肝臓における CITED2 の作用の分子メカニズムの解明

CITED2 の発現が絶食-再摂食で変化するのか、変化が起こるのであれば、関与しているホルモン（例：グルカゴン、インスリンなど）や栄養素（例：グルコース、脂質など）を同定し、受容体からのシグナル伝達経路についても明らかにする。さらに共沈実験などから CITED2 と相互作用する分子（群）を探索し、CITED2 を中心とした転写因子・転写共役因子複合体を同定する。CITED2 転写複合体へのインスリンやグルカゴンなどのホルモンの作用についても明らかにする。

3. 研究の方法

肝臓特異的に CITED2 を欠損あるいは過剰発現するマウスを作製し、代謝表現型解析によって CITED2 の肝糖産生への影響ならびに全身のエネルギー代謝における影響を検討する。また糖尿病モデル動物を用いてインスリン抵抗性への CITED2 の関与を検討する。培養肝細胞においても CITED2 の機能喪失ならびに機能獲得実験を行い、糖産生系遺伝子発現への影響を *in vitro* でも検討する。CITED2 と相互作用する分子は共沈実験などにより同定、機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) 肝臓における CITED2 蛋白の発現はグルカゴンによって増加する

マウスの肝臓における CITED2 蛋白の発現は、絶食時ならびにグルカゴン腹腔内投与時に増加した。また、培養肝細胞における CITED2 蛋白の発現は、グルカゴンとそのセカンドメッセンジャーである cAMP によって増加し、その増加はプロテインキナーゼ A (PKA) インヒビター処理により抑制された。このことから CITED2 はグルカゴン-cAMP-PKA シグナ

ルによって増加することが明らかとなった。

CITED2 蛋白はユビキチン-プロテアゾーム系により急速に分解されることが報告されている。肝細胞において CITED2 を免疫沈降し、そのユビキチン化を検討したところ、cAMP 処理によりユビキチン化の減少がみられ、グルカゴンによる CITED2 蛋白量の増加の少なくとも一部はユビキチン化の減少により分解が抑制されたためと考えられた。

(2) CITED2 は肝臓の糖新生系酵素発現を増強し糖産生を亢進させる

CITED2 の肝糖代謝調節への関与を、CITED2 をノックダウンないし強発現した初代培養肝細胞を用いて検討した。CITED2 shRNA 発現アデノウイルスによって CITED2 をノックダウンすると、cAMP による糖新生系酵素遺伝子 G6pc、Pck1 の発現誘導が障害され、糖産生は減少した。逆に、CITED2 の強発現により、糖新生系酵素遺伝子の発現ならびに糖産生が著明に増強した。この増強作用は、CBP ならびに HNF-4 α への結合に必要な部位である CR2 ドメインを欠損する変異体である CITED2 (Δ CR2) の強発現によっても認められたことから、CITED2 による cAMP 依存性の糖新生系酵素発現の調節には CBP、HNF4 α との結合を必要としないことが示唆された。

これらの結果から CITED2 は *in vitro* では糖新生系酵素の発現調節を介して糖産生を制御していると考えられた。

次に *in vivo* における効果を検討した。マウスの肝臓にアデノウイルスベクターを用いて CITED2 を強発現すると、絶食時の糖新生系酵素 G6pc、Pck1 の発現が約 3 倍に増加し、空腹時血糖値が増加した。また肝臓からの肝糖新生能を評価するピルビン酸負荷試験を行ったところ、CITED2 の強発現によって負荷後の血糖上昇が著明に増加し、CITED2 が *in vivo* でも肝糖新生を増加させることが明らかとなった。

(3) CITED2 は PGC-1 α のコアクチベーター活性を増加させる

CITED2 が肝糖新生系酵素の発現調節を介して血糖値を調節していることが明らかになったのでそのメカニズムについて検討した。転写コアクチベーター PGC-1 α は絶食時にグルカゴン-cAMP-PKA 経路によってその発現が増加し、糖新生系酵素の発現を強力に誘導する、肝糖産生の鍵分子である (図 1)。そこで cAMP 依存性の糖新生系酵素の発現誘導における CITED2 の効果が、PGC-1 α を介しているかを検討した。PGC-1 α をノックダウンした代培養肝細胞では、CITED2 の効果は消失していた。PGC-1 α 依存性の糖新生系酵素発現誘導への CITED2 の関与についても検討したところ、PGC-1 α による糖新生系酵素の発

現誘導は CITED2 ノックダウンにより著明に抑制され、逆に強発現により増強した。さらに、CITED2 ならびに CITED2(Δ CR2)の PGC-1 α のコアクチベーター活性への影響を G6pc プロモーターアッセイにて検討したところ、いずれもコアクチベーター活性を増強した。これらの結果より、CITED2 が CR2 ドメイン非依存性に PGC-1 α のコアクチベーター活性を増強することが示唆された。

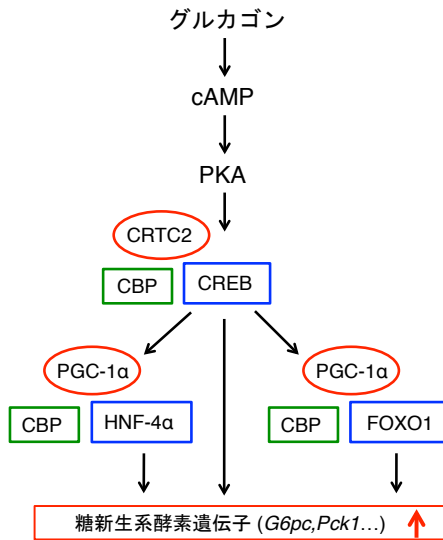


図1

(4) CITED2 は GCN5 による PGC-1 α のアセチル化を抑制する

次に CITED2 による PGC-1 α 活性の増強作用の分子機構を検討した。PGC-1 α の活性はアセチル化、リン酸化、メチル化、SUMO 化などの様々な翻訳後修飾によって調節されている。PGC-1 α のアセチル化に対する CITED2 の効果を検討したところ、CITED2 が PGC-1 α のアセチル化を抑制することが明らかとなった。

PGC-1 α の活性は GCN5 によるアセチル化によって抑制され、SIRT1 による脱アセチル化によって増強することが報告されている。そこで CITED2 と PGC-1 α 、SIRT1、GCN5 の相互作用について、共沈実験によって検討した。CITED2 は PGC-1 α 、SIRT1 いずれとも共沈しなかった。CITED2 は PGC-1 α と SIRT1 の結合や細胞内 NAD⁺/NADH 比、および SIRT1 のターゲットである FOXO1 のアセチル化にも影響を与えず、SIRT1 依存性の PGC-1 α 脱アセチル化には関与しないと考えられた。

一方、CITED2 は GCN5 と共沈し、相互作用することが示唆された。そこで、GCN5 による PGC-1 α のアセチル化に対する CITED2 の効果を HEK293 細胞で検討した。既報のように GCN5 は PGC-1 α に結合し、そのアセチル化を増加

させたが、CITED2 は PGC-1 α に結合する GCN5 の量ならびに PGC-1 α のアセチル化を用量依存性に減少させた。一方、GCN5 のヒストン H3 を基質とした HAT アッセイで検討したところ、CITED2 の強発現は GCN5 活性を抑制しないことが明らかとなった。これらの結果から、CITED2 は GCN5 に結合し、PGC-1 α と GCN5 の結合を阻害することで PGC-1 α のアセチル化を抑制すると考えられた。

CITED2 と GCN5 の相互作用に必要な部位を同定するために、それぞれの欠損変異体を HEK293 細胞に発現させ、共沈実験をおこなった。その結果 CITED2 の CR1、SRJ ドメインが GCN5 との相互作用に必要であることが明らかとなった。実際、SRJ ドメインを欠損する CITED2(Δ SRJ)は GCN5 依存性の PGC-1 α アセチル化を抑制せず、初代培養肝細胞において cAMP 依存性の糖新生系酵素発現を増加させなかった。

(5) CITED2 による PGC-1 α アセチル化の抑制はインスリンによって解除される

次に CITED2 と GCN5 の相互作用へのインスリンの効果を検討した。インスリンは GCN5 と共沈する CITED2 の量を減少させ、この効果は PI3 キナーゼ阻害剤および Akt 阻害剤で解除されたが mTOR 阻害剤である Rapamycin では解除されなかった。またインスリンは CITED2 による PGC-1 α アセチル化の抑制を完全に回復させた。これらの結果からインスリンは PI3 キナーゼ-Akt シグナルを介して CITED2 と GCN5 の相互作用を減少させ、PGC-1 α のアセチル化を回復させることが明らかとなった。

(6) CITED2 発現の抑制により肥満・糖尿病モデルマウスの高血糖が改善する

db/db マウスはレプチン受容体の変異のために多食、肥満、糖尿病を呈する。db/db マウスや高脂肪食負荷マウスは、肥満・糖尿病モデルマウスとして有用である。これらのモデルマウスの肝臓における CITED2 の発現は著明に増加していた。さらに db/db マウスの肝臓で CITED2 をノックダウンすると、糖新生系酵素 G6pc、Pck1 の発現が大きく減少し、高血糖が改善した。これらの結果は、CITED2 が db/db マウスの病的糖産生亢進に強く関与すること、糖尿病モデルマウスの肝臓における CITED2 作用の抑制が高血糖の治療となることを示すものであった。

本研究により新たに明らかになった転写共役因子 CITED2 による肝糖産生制御メカニズムを図 2 に示す。摂食時にはグルカゴンレベルの低下により CITED2 の発現が減少すると共に、インスリンによって CITED2 による

GCN5 の抑制が解除され、GCN5 による PGC-1 α のアセチル化は亢進し、PGC-1 α が不活性化され糖産生は抑制される。一方絶食時には、グルカゴンによって CITED2 の発現が増加し、GCN5 による PGC-1 α アセチル化を抑制することで、PGC-1 α 活性および糖産生が増加する(図2)。CITED2 はグルカゴン・インスリン刺激に応答して PGC-1 α のアセチル化・活性を調節し糖新生を制御する重要な代謝調節分子であると言える。また、肥満・糖尿病モデルマウスである db/db マウス、高脂肪食負荷マウスの肝臓では CITED2 の発現増加が肝糖産生亢進の一因であり、CITED2 作用の抑制が高血糖の治療に繋がることも明らかにした。新規糖尿病治療薬の標的分子としての CITED2 抑制因子の同定は、今後の重要な研究課題である。本研究結果は、Nature Medicine 誌に掲載された。

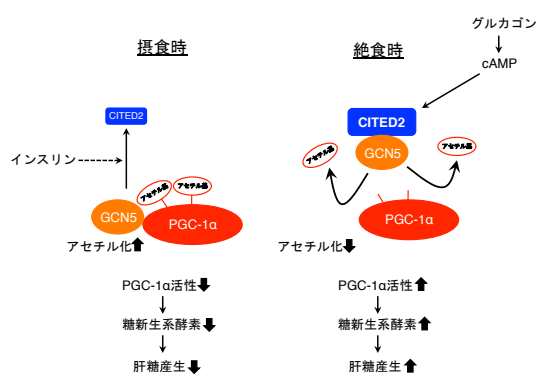


図2

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 8 件)

- ①. CITED2 links hormonal signaling to PGC-1 α acetylation in the regulation of gluconeogenesis. Sakai M, Matsumoto M, Tujimura T, Yongheng C, Inagaki K, Kasuga M. 他 8 名, Nat Med. 18(4):612-7, 2012. 査読有 doi: 10.1038/nm.2691.
- ②. Endoplasmic reticulum stress inhibits STAT3-dependent suppression of hepatic gluconeogenesis via dephosphorylation and deacetylation. Kimura K, Yamada T, Matsumoto M, Kasuga M, Inoue H. 他 9 名, Diabetes. 61:61-73, 2012. 査読有 doi: 10.2337/db10-1684
- ③. Overexpression of KLF15 transcription factor in adipocytes of

mice results in down-regulation of SCD1 protein expression in adipocytes and consequent enhancement of glucose-induced insulin secretion. Nagare T, Sakaue H, Matsumoto M, Cao Y, Inagaki K, Sakai M, Kasuga M. 他 9 名, J Biol Chem. 286(43):37458-69, 2011. 査読有 . doi: 10.1074/jbc.M111.242651.

- ④. Ablation of TSC2 enhances insulin secretion by increasing the number of mitochondria through activation of mTORC1. Koyanagi M, Asahara S, Matsuda T, Hashimoto N, Shigeyama Y, Shibutani Y, Kanno A, Fuchita M, Mikami T, Matsumoto M, Kasuga M, Kido Y. PLoS One. 6:e23238, 2011. 査読有. <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0023238>

[学会発表] (計 22 件)

- ①. CITED2 はホルモン応答性に PGC-1 α のアセチル化を調節し、肝糖産生を制御する, 酒井真志人: 第 55 回 日本糖尿病学会年次学術集会, 2012 年 5 月 19 日, 横浜
- ②. CITED2 はホルモン応答性に PGC-1 α のアセチル化を調節し、肝糖産生を制御する, 酒井真志人: 第 49 回 日本臨床分子医学会学術総会, 2012 年 4 月 13 日, 京都
- ③. CITED2 links hormonal signals to PGC-1 α acetylation for regulating fasting gluconeogenesis. Matsumoto M. Keystone Symposia, Pathogenesis of Diabetes: Emerging Insights into Molecular Mechanisms. Santa Fe, New Mexico, USA, February 1, 2012.
- ④. CITED2 はホルモン応答性に PGC-1 α のアセチル化を調節し、肝糖産生を制御する, 酒井真志人: 第 32 回 日本肥満学会, 2011 年 9 月 23 日, 兵庫県淡路市
- ⑤. CITED2 links hormonal signals to PGC-1 α acetylation for regulating fasting gluconeogenesis. Sakai M. 47th EASD Annual Meeting, Lisbon, Portugal, September 13, 2011.
- ⑥. 転写共役因子 CITED2 による肝臓の糖代謝制御機構の解明. 松本道宏: 第 84 回 日本内分泌学会学術総会 シンポジ

ウム：肝臓の糖代謝制御と転写調節，
2011年4月21日，神戸

- ⑦. Cited2 Regulates Hepatic Gluconeogenesis by Controlling PGC-1 α Activity. Sakai M. 11th International Symposium on Insulin Receptor AND Insulin Action, Naples, Italy, October 30, 2010.
- ⑧. The transcriptional Coactivator Cited2 regulates hepatic gluconeogenesis by controlling PGC-1 α activity. 松本道宏：第53回日本糖尿病学会年次学術集会シンポジウム15; Molecular Mechanisms of Glucose and Lipid Metabolism in the Liver (肝臓における糖代謝と脂質代謝の分子メカニズム)，2010年5月28日，岡山

[図書] (計2件)

- ①. 共著，糖尿病学イラストレイテッド. 糖代謝における肝臓の役割，編集 春日雅人，著者 松本道宏，羊土社. 108-118, 2012.3.15.
- ②. 共著，糖代謝調節の分子機構 (総論). 糖尿病ナビゲーター第2版，松本道宏，春日雅人. メディカルレビュー社. 28-29, 2010.

[その他]

ホームページ

<http://www.ncgm.go.jp/rese/top/j/news/news0028.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 道宏 (MATSUMOTO MICHIMIRO)

研究者番号：90467663

(2) 研究分担者

稲垣 健二郎 (INAGAKI KENJIRO)

研究者番号：80533736

(H21)

(3) 研究協力者

酒井 真志人 (SAKAI MASHITO)

辻村 知子 (TSUJIMURA TOMOKO)

曹 永恒 (CAO YONGHENG)