

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14806

研究課題名(和文) 三大栄養素の代謝を制御する遺伝子Smek2の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Smek2 which regulates metabolisms of three major nutrients

研究代表者

田中 愛健 (Yasutake, Tanaka)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：90809435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は新規代謝調節遺伝子として同定されたSmek2遺伝子の機能の全容を解明することにある。そのためにCRISPER/Cas9システムを用いたノックアウトラットの作製と、in vitroにおける過発現系の作製に取り組んだ。Smek2ノックアウトラットの作製については技術的な問題から作製に至らなかった。過発現系用のベクターの構築に成功し、ラット肝臓細胞およびヒト神経芽細胞腫細胞における過発現実験を行った。その結果、Smek2が肝臓糖代謝を制御する経路を特定し、また、Smek2は脳内アミロイドを減少方向に制御している可能性があることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Smek2に欠損変異のあるExHCラットの脳ではアミロイドの蓄積が見られたことから、Smek2はアルツハイマー型認知症の発症・進展においても重要な意味を持つ遺伝子であると考えてきた。今回、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y細胞における過発現実験において、Smek2過発現によってアミロイド量が減少したことから、そのことが裏付けられる形となった。これまでアルツハイマー型認知症研究の対象となる遺伝子はアミロイドそのものあるいはその切断酵素(セクレターゼ)であったため、本成果はアルツハイマー型認知症研究に新たな展開をもたらす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to analyze the function of the Smek2 gene, which was identified as one of the causative genes for diet-induced hypercholesterolemia in exogenous hypercholesterolemic (ExHC) rat. To achieve this aim, we tried to create Smek2 knockout rats using the CRISPER/Cas9 system and to establish an in vitro Smek2 overexpression system. While we did not achieve to create Smek2 knockout rats due to technical problems, we succeeded in constructing a vector for an overexpression system to conduct an overexpression experiment with human neuroblast cells. As a result, overexpression of Smek2 decreased the amount of amyloid contained in the cell culture supernatant. This suggested that Smek2 may control suppressively amyloid production in the brain. This result may bring new developments to Alzheimer's disease research.

研究分野：栄養学

キーワード：Smek2 アミロイド アルツハイマー型認知症

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖代謝異常は、さまざまな疾患のリスクを上昇させるリスク因子として、広く認識されている。申請者が見出した新規な糖代謝制御遺伝子である *Smek2* (*Suppressor of mek1, homolog 2*) は解糖系の律速酵素である肝臓型ホスホフルクトキナーゼ (PFKL) の発現制御を介して肝臓の糖代謝、および脂質代謝を制御している (図1) しかし、*Smek2* がどのような機序で *Pfk1* の遺伝子発現を制御しているのかは未解明である。加えて、*Smek2* の機能異常を抱える外因性高コレステロール血症 (ExHC) ラットにおいて、糖代謝との直接の関連が指摘されていない高ホモシステイン血症や、脳での不溶性アミロイド蓄積量の増加が確認され、*Smek2* がこれらの制御に関与することが示唆されている。

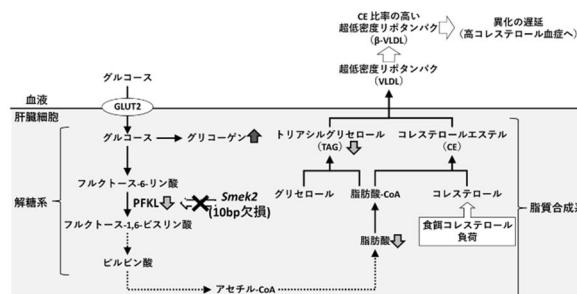


図1. *Smek2* 機能異常時の肝臓における代謝変化

2. 研究の目的

本申請はこれらの肝臓の糖・脂質代謝と関連していると思われる、高ホモシステイン血症およびアルツハイマー型認知症の予防の観点から、新奇な三大栄養素代謝間コミュニケーションを見出すことを目的とする。そのために、ゲノム編集により作出する *Smek2* ノックアウトラットおよび *Smek2* の発現を操作した培養細胞を用いて複数の代謝物解析を併用し、比較することで、三大栄養素代謝間の新奇な関連を見出す。これにより、各代謝性疾患の発症を抑制する三大栄養素の摂取バランスを決定する新奇な側面からの知見を得ることができる。

3. 研究の方法

3.1 *Smek2* 過発現ベクターの構築

本実験では、ExHC ラット及び BN ラットの肝臓より抽出した total RNA を用いて cDNA 合成後、NCBI のデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) を基にして設計したプライマー (F : GCTTACTCGAGACCATGTCGGATACACGGCGGCG, R : GCTCACTGGATCCCCATGTGTTGGGAATCCCTC、下線部が制限酵素サイト) により全長 *Smek2* 遺伝子を PCR 法により増幅し、発現ベクター用のプラスミド pSF-CMV-Amp (OXF 社 : #OG2) に制限酵素 (XhoI および BamHI-HF) およびリガーゼを用いてライゲーションした。なお、本実験で用いる pSF-CMV-Amp プラスミドは、導入遺伝子を大腸菌内では発現せず哺乳類細胞でのみ発現するように設計されている。作製した発現プラスミドは大腸菌 JM109 株にトランスフェクションし、増幅後、抽出して用いた。

3.2 ラット肝癌由来細胞 McA-RH 7777 細胞における *Smek2* 過発現実験

細胞を 10% (v/v) FBS を添加した DMEM 基本培地 (グルコース 1.0 g/l 含有) で懸濁し、播種後 70~90% コンフルエントに達した時点で継代した。その 48 時間後に 10% (v/v) FBS を添加したグルコース添加 DMEM 培地 (グルコース 2.0 g/L 含有) を用いて細胞を 3.2×10^5 cells/ml となるように希釈し、12 well もしくは 24 well plate に播種した。播種 24 時間後にトランスフェクション試薬 HilyMax (同仁化学研究所 : 342-91103) を用いて、3-1 で作製した *Smek2* 発現プラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後に細胞、培養上清を回収した。回収した細胞中の mRNA 発現量を real-time RT-PCR により、タンパク発現量をウェスタンブロットングにより、水溶性代謝物を GC-MS を用いた水溶性代謝物解析により測定した。

3.3 ヒト神経芽細胞 SH-SY5Y 細胞における *Smek2* 過発現実験

細胞を 6 well plate あるいは 96 well plate に播種し、細胞が 70% confluent に達したところで、プラスミドのトランスフェクションを行った。滅菌 1.5 ml チューブに、グルコース添加培地 60 μ l、トランスフェクション試薬 HilyMax (同仁化学研究所 : 342-91103) 10 μ l、plasmid (正常型 *Smek2* 発現ベクターまたは空ベクター) 2 μ g を加え、ピペッティングにより混合した後、室温で 15 分間静置した。この plasmid-lipid complex を各 well に添加し、穏やかに混和し、トランスフェクションを行った。トランスフェクションから 24 時間後、ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させた 27-hydroxycholesterol を終濃度 1 μ M となるように添加した。溶解させる DMSO の量は培地に対して 0.1 v/v% である 0.2 μ l とした。なお、トランスフェクション及び、添加のタイミングで培地の交換も行った。添加の 24 時間後、培養上清を回収した。培養上清中のアミロイド β 量を Human/Rat β Amyloid(42) ELISA Kit Wako (富士フイルム和光純薬株式会社) を用いて測定した。

3.4 水溶性メタボロミクス解析

上記 3.2 および 3.3 で回収した細胞は回収後、氷冷しながら 10 分間超音波による破碎処理を行った。細胞破碎液を 500 μ l サンプリングし、クロロホルム：メタノール：水 = 2 : 5 : 2 溶液を 500 μ l 添加し、内標準物質として 0.05 mg/ml の 2-Isopropylmalic acid (Sigmanteiso-Aldrich) 水溶液 100 μ l 添加した。10 分ごとにボルテックスしながら 37°C で 30 分インキュベートし、4°C、14000 rpm で 10 分間遠心して上層 600 μ l を回収した。回収した上層に脱イオン水 400 μ l を添加し混和した後、再度 4°C、14000 rpm で 10 分間遠心して上層 600 μ l を回収した。真空下で遠心濃縮し完全に乾固させた後、20 mg/ml メトキシアミン塩酸塩 (Sigmanteiso-Aldrich)-ピリジン (関東化学) 溶液を 80 μ l 添加し、20 分間ソニケーションした。30°C の恒温槽で 15 分ごとにボルテックスしながら 90 分間保温してメトキシアミン誘導体化後、N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (MSTFA, Sigmanteiso-Aldrich) を 30 μ l 添加、ボルテックスし、37°C の恒温槽で 10 分ごとにボルテックスしながら 60 分間反応させ、トリメチルシリル誘導体化した。GC 用バイアルに移し、誘導体化サンプル 1 μ l を GC/MS に供した。なお、分析バッチ全てのサンプル抽出液から等量プールして集め、Quality Control (QC) サンプルを作製した。測定対象サンプルを QC サンプルで挟むような順番で分析に供した。

[GC-MS 分析条件]

GC-MS : GCMS-QP2020、カラム : InertCap 5MS/NP、内標準物質 : 2-Isopropylmalic acid
カラムオープン : 80°C \rightarrow 330°C (15°C/min)、気化室温度 : 230°C、インジェクション量 : 1 μ l、インジェクションモード : Split、スプリット比 : 25.0、オープン温度 : 80-330°C (15°C/min)、カラム流量 : ヘリウムガス 1.12 ml/min、IF(インタフェース) : 250°C、イオン源 : 200°C、イオン化電圧 : 70 V、マスレンジ : m/z 85-500、分析モード : Scan、スキャンスピード : 10000 u/sec、データ取得時間 : 3.5 min~24.0 min

測定データを GCMSolution (島津製作所) 上で NetCDF ファイルに変換し、MetAlign (<https://www.wur.nl/en/show/MetAlign-1.htm>) によるピーク検出および配列化処理を行った。Aloutput (BMC Bioinformatics, 2011, 12(1), 131.) によりマススペクトルを基準としたピーク同定およびフィルタリング処理を行った。分析順による変動を補正するため、QC の測定データを用いて LOWESS 標準化処理を行った (Bioinformatics, 2014, 30(16), 2379-2380.)。MetAlign および Aloutput の設定は全て ESI 友の会によるプロトコル集に従った (<https://sites.google.com/site/esitomonokai/>)。また細胞回収量に関しては、総タンパク質濃度測定の結果を用いて補正した。総タンパク質濃度測定法には DCTM プロテインアッセイ (Bio-Rad) を用いた。

3.4 ゲノム編集ラットの作製

8~10 週齢の雌性 SD 系ラットまたは F344 ラットを 1 週間以上の予備飼育を行った後、LH-RH ([des-Gly10, D-Ala6]-LH-RH エチルアミド 酢酸塩水和物、性腺刺激ホルモン放出ホルモン、メルク) を 200 μ l 腹腔内投与した。その 52~54 時間後、PMSG (妊馬血清性腺刺激ホルモン、動物用セロトロピン、あすか製薬株式会社) を 450 μ l (90 単位) および AIS (抗インヒピン血清) を 100 μ l 腹腔内投与した。さらに 48 時間後、hCG (ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン、ゴナトロピン筋注用 1000 単位、あすか製薬株式会社) を 200 μ l (100 単位) 腹腔内投与した。hCG 投与から 14~17 時間後、採卵および採精を行った。採卵を始める前に 6 cm ディッシュに 300 μ l の HTF 培地 (ARK Resource Co.) を入れ、周りをミネラルオイル (SIGMA) で沈め、37°C でインキュベートしたものを用意した。三種混合麻酔 (塩酸メドミジン、ドミトール、日本全薬工業株式会社) 0.15 mg/kg、ミタゾラム (ミタゾラム「サンド」、サンド株式会社) 2 mg/kg、酒石酸ブトルファノール (ペトルファール、明治製薬ファルマ株式会社) 2.5 mg/kg、投与量 : ラット体重 100 g あたり 0.25 ml) 下で開腹し、卵管を摘出した。卵管をミネラルオイルに入れ、顕微鏡下で卵管膨大部から卵を注射針で HTF 培地へかき出し、卵を採取した。また、採取した精子はミネラルオイルに沈めた HTF 培地に溶かし、37°C で 1 時間インキュベートした。インキュベートした精子を、ピペットマンを用いて培地の端の方から 5~10 μ l 取り、卵を含んだ培地上に滴下することで人工授精を行った。人工授精後は 37°C でインキュベートした。CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) でオフターゲットのリスクやジェノタイピングを考慮して設計した gRNA はそれぞれ個別に、1.25 μ l を Duplex Buffer 1.5 μ l に溶かし、95°C で 5 分、室温で 5~10 分静置した。その後、2 つを混ぜ合わせ、Cas9 タンパクを入れて、室温で 5 分置いた後、4°C で保存した。人工授精の 4~6 時間後、顕微鏡下で専用のキャピラリー (マウス胚操作器具セット、九動) を用いて新しい HTF 培地に受精卵を移した。この工程を 3~4 回行うことで、卵だけを選別し、不純物を取り除いた。その後、同様の方法で受精卵を opti-MEM 培地 (Thermo Fisher Scientific) へ移した。こちらの工程も 2~3 回行い、受精卵を培地へなじませた。その後、gRNA 及び、Cas9 タンパク溶解液を入れたエレクトロポレーション用のスライドガラスへ受精卵を移し、スライドガラスの電極にクリップを挟んで Super Electroporator NEPA21 TypeII In Vitro & In Vivo Electroporation (NEPA GENE 社) にセットした。キャピラリーで培地量の調整を行い、電気抵抗値 (Impedance) を 0.5 k Ω にしたのち、エレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーション後、卵を opti-MEM 培地に

回収した。その後、キャピラリーを用いて KSOM (ARK Resource Co.) へ移動させ、この工程を 2~3 回行うことで培地になじませたのち、37°C で 1 晩インキュベートした。翌日、受精卵移植前にキャピラリーで M2 培地 (SIGMA) へ移動させた。移植手術の前日、雌性ラットを精管結紮雄性ラットと同ケージで飼育し、偽妊娠状態を誘導しておいた雌性ラットを三種混合麻酔下で部分的 (体側面やや背中側) に開腹、卵管・卵巣・子宮を体外に引き出し、卵管にハサミで切れ込みを入れた。M2 培地中の受精卵をキャピラリーで吸い、子宮片側につき 15 個前後を目安に顕微鏡下で移植した。移植後、卵管・卵巣・子宮を体内に戻し、開腹部を縫合、外皮をクリップでとめた。その後、もう片方の子宮にも同様に移植を行い、ペニシリン (Meiji Seika ファルマ株式会社) 及びドルミトールを注射して、しばらく保温、経過観察した。麻酔からの回復を確認後、ケージに戻し、飼育した。

3.5 統計処理

群間の平均値の差の検定には 3 群間の比較は Dunnett's-test、2 群間の比較には Student's *t*-test を用い、アミロイド β42 産生量測定の際には二元配置分散分析を用いた。有意水準は $p < 0.05$ 、傾向ありは $p < 0.10$ とした。なお、水溶性メタボロミクスの結果は対数変換した後、検定を行った。

4. 研究成果

4.1 *Smek2* 過発現ベクターの構築

正常型 (BN ラット由来) および変異型 (ExHC ラット由来、10bp の欠損変異を含む) の *Smek2* 発現プラスミドの構築を確認した。

4.2 ラット肝癌由来細胞 McA-RH 7777 細胞における *Smek2* 過発現実験

McA-RH7777 細胞に *Smek2* 発現ベクターをトランスフェクションした結果、空ベクター群と比較して正常型群において、*Smek2* mRNA 発現量を 179 倍まで増加させた (図 2)。また、先行研究において *Smek2* のターゲットであると推定されていた *Pfkl* 遺伝子の mRNA 発現量も有意に増加しており、*Smek2* による *Pfkl* 制御経路を指示する結果となった。また、*Pfkl* の転写制御因子である AP-1 複合体を構成するタンパク質 *c-fos* および *c-Jun* について、その発現調節においてよりクリティカルな段階 (*c-fos*: mRNA、*c-Jun*: タンパクのリン酸化) を測定した。RT-PCR により *c-fos* mRNA 発現量を測定した結果、変異型 *Smek2* 群で統計的に有意な減少、正常型 *Smek2* 群で有意な増加を示した (図 3)。また、*c-JUN* リン酸化率をウエスタンブロット法により測定した結果、変異型群で減少傾向を示した。つまり、*Smek2* は転写調節因子 AP-1 を活性化することで、その下流の遺伝子の発現を誘導している可能性が見出された。なお、PFKL の転写因子 AP-1 の構成因子である、*c-fos* mRNA 発現量、*c-JUN* リン酸化率に関して、変異型群でどちらも減少した原因として、変異型 SMEK2 タンパクが競合阻害的に働き、機能しない PP4 が出来ている可能性が考えられる。

また、*Smek2* 過発現時、内標準遺伝子として利用されている主要な 13 の遺伝子の mRNA 発現量が有意に増加していた (図 4)。なお、この影響は変異型の *Smek2* 発現ベクターでは起こらず、*Smek2* の影響であると考えられる。したがって、*Smek2* は肝臓細胞において細胞増殖などの広い作用範囲を持つ可能性がある。

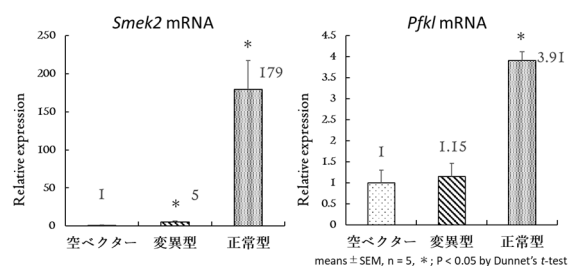


図 2. ラット肝細胞における *Smek2* 過発現時の遺伝子発現量の変化

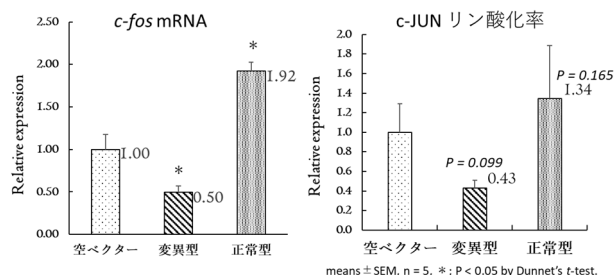


図 3. 転写調節因子 AP-1 の構成因子の *Smek2* 過発現による変化

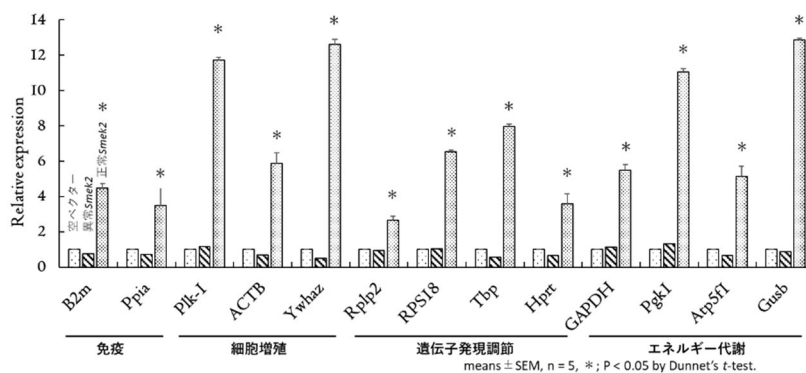


図 4. ラット肝細胞における *Smek2* 過発現時の内標準遺伝子発現量の変化

4.3 ヒト神経芽細胞 SH-SY5Y 細胞における *Smek2* 過発現実験

ヒト神経芽細胞 SH-SY5Y への *Smek2* 発現プラスミドの導入により、空ベクター群と比較して、*Smek2* mRNA 発現量の 1.9 倍の増加を確認した(図 5)。このとき、*Smek2* の発現誘導が SH-SY5Y のアミロイド β 42 産生に及ぼす影響について調査した。コントロール群、*Smek2* の発現誘導を行う群の 2 群に加え、アミロイド β 42 産生量を増加させる目的で 27-hydroxycholesterol (27-OH) を終濃度 1 μ M で添加した群をそれぞれ設け、測定した。二元配置分散分析の結果、今回の実験では 27-OH 添加によって、アミロイド β 42 の産生量を有意に増加させることはできなかったが、*Smek2* の発現誘導により、SH-SY5Y のアミロイド β 42 産生量は有意に減少した(図 6)。つまり、*Smek2* はアミロイド β の産生を直接制御しうる可能性がある。*Smek2* の神経細胞における機能の全容を探るため、発現誘導が細胞内代謝に与える影響を水溶性メタロミクスにより調査したところ、ロイシンやチロシン、バリン、ケトバリン等の分子アミノ酸の減少とサルコシンの増加を観察した (data not shown)。分枝アミノ酸はアルツハイマー型認知症は症とのかかわりが指摘されており、主要な 3 分子種 (バリン・ロイシン・イソロイシン) の血中濃度の低下はアルツハイマー型認知症の発症リスクが増大することがメタ解析の結果として示されている (*Neural Regen Res.* 2020, 15(8), 1460-1470)。また、断続的絶食によって変化した腸内細菌叢において産生されるサルコシンの増加がアルツハイマー型認知症モデル (5xFAD) マウスのアミロイド β 蓄積の改善を起こすことが示唆されている (*Nat Aging.* 2022, 2(11), 1024-1039)。つまり、*Smek2* の発現は脳はもちろんのこと、全身で発現を誘導させることができれば、サルコシンの増産を介してアルツハイマー型認知症の予防効果を得られる可能性がある。

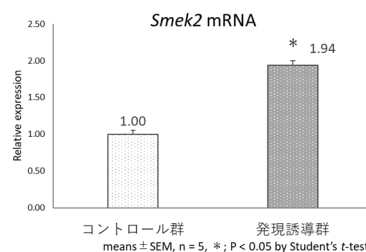


図 5. ヒト神経芽細胞における *Smek2* 過発現誘導

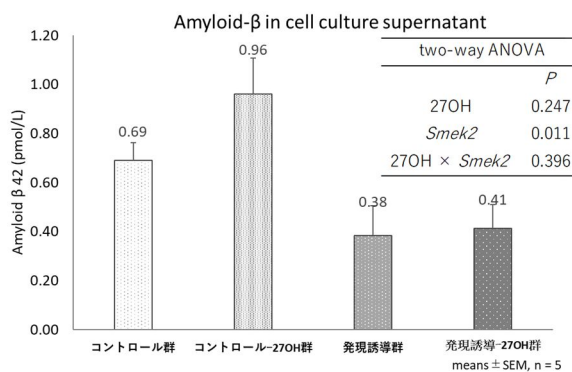


図 6. ヒト神経芽細胞における *Smek2* 過発現誘導時の培養上清中アミロイド β 量

4.4 ゲノム編集ラットの作製

ゲノム編集ラットの作製作業を行ったが、産児を得るに至らなかった。

5. 結語

本研究の目的は新規代謝調節遺伝子として同定された *Smek2* 遺伝子の機能の全容を解明することにある。そのために CRISPER/Cas9 システムを用いたノックアウトラットの作製と、*in vitro* における過発現系の作製に取り組んだ。*Smek2* ノックアウトラットの作製については技術的な問題から作製に至らなかった。過発現系用のベクターの構築に成功し、ラット肝臓細胞およびヒト神経芽細胞腫細胞における過発現実験を行った。その結果、*Smek2* が肝臓糖代謝におけるターゲット *Pfkf1* の遺伝子発現を制御する経路を特定した。また、*in vitro* 試験においても *Smek2* は脳内のアミノ酸代謝、特に分枝アミノ酸の代謝の制御を介して、脳内アミロイド β を減少方向に制御している可能性があることを見出した。

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 1件）

1. 著者名 Tanaka Yasutake, Kawano Michio, Nakashima Sawako, Yamaguchi Chisato, Asahina Makoto, Sakamoto Mai, Shirouchi Bungo, Tashiro Kousuke, Imaizumi Katsumi, Sato Masao	4. 巻 13
2. 論文標題 Mutation in Smek2 regulating hepatic glucose metabolism causes hypersarcosinemia and hyperhomocysteinemia in rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3053
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-26115-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yasutake Tanaka, Michio Kawano, Makoto Asahina, Katsumi Imaizumi, Masao Sato
2. 発表標題 Smek2 is a multi-function regulator of three major nutritions
3. 学会等名 22nd IUNS-ICN INTERNATIONAL CONGRESS OF NUTRITION（国際学会）
4. 発表年 2022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
---------	---------