

平成 30 年 4 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02896

研究課題名(和文)核内受容体の翻訳後修飾と相互作用因子の局在を介した新たな転写制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the transcriptional regulatory mechanism of nuclear receptors via posttranslational modification of the nuclear receptors and localization of the interacting factors

研究代表者

橘 敬祐 (Keisuke, Tachibana)

大阪大学・薬学研究科・特任講師(常勤)

研究者番号：30432446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：核内受容体PPARやLXRは栄養成分である不飽和脂肪酸やコレステロールなどをリガンドとし、脂質の蓄積、代謝などの役割を担っている。今回我々は、新規PPAR活性化化合物の開発に成功し、*in vivo*において血中トリグリセリド値の低下効果を発揮すること、また、LXRによって遺伝子レベルで発現制御を受ける脂質代謝制御分子LPIN1について、その蛋白質の分解制御機構を解明した。さらに、脂質代謝に関わるヒストンメチル化酵素SETDB1の局在制御機構並びに翻訳後修飾を介した活性制御機構を明らかにした。これら成果は、生活習慣病を予防・治療できる薬剤の開発に繋がる可能性があり、非常に意義深いものである。

研究成果の概要(英文)：Both PPAR and LXR are ligand-activated transcription factors that play pivotal roles in regulating lipid homeostasis. In the present study, we developed novel PPAR ligands that act *in vivo* to reduce plasma triglyceride levels. We also revealed that LPIN1, having dual functions in the regulation of lipid metabolism, is degraded by the E3 ubiquitin ligase BTRC. Furthermore, we investigated the subcellular localization and enzymatic activity regulation of the histone methyltransferase SETDB1. These findings will be useful for developing the drugs to treat metabolic diseases.

研究分野：分子代謝学

キーワード：核内受容体 翻訳後修飾 PPAR 活性化剤 蛋白質 分解 LPIN SETDB1

1. 研究開始当初の背景

肥満を基盤とする生活習慣病を予防・改善し、心疾患や脳血管疾患の発症を防ぐことは、健康長寿を実現する上で重要である。核内受容体 PPAR や LXR は、栄養成分である不飽和脂肪酸やコレステロールなどをリガンドとする転写因子であり、様々な因子と直接あるいは間接的に相互に影響を及ぼしあうことで、その機能を制御している。それら因子としては、脂肪細胞の分化に関わるヒストンメチル化酵素 SETDB1 や、核内においては脂肪酸の燃焼を促し、細胞質においては脂質の生合成を制御するユニークな脂質代謝制御因子 LPIN などが挙げられる。

これまでの研究成果から、これら因子の活性化には、細胞内の局在や翻訳後修飾が重要な役割を担うことが分かってきた。そこで本研究では、これら因子の活性制御機構を明らかにする共に、新たな活性化剤を開発することで、それら疾患の予防・治療方法の研究基盤を確立することとした。

2. 研究の目的

本研究では、核内受容体、ヒストンメチル化酵素、脂質代謝制御分子に関して、それぞれ異なるアプローチを用いてその活性制御機構を解明することとした。

(1)核内受容体 PPAR α は不飽和脂肪酸をリガンドとし、脂肪酸の代謝を促進する。そのため、PPAR α の活性を制御できる分子は、生活習慣病の予防・治療方法を確立する上で重要である。そこで、これまでに独自に構築してきた PPAR α 転写活性化剤スクリーニング系を用いて、種々の分子を評価することで、新たな活性化剤の開発を行うこととした。

(2)ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基(H3K9)のメチル化が亢進したマウスは、脂質代謝が低下し肥満を呈することが明らかとなっている。SETDB1 は H3K9 をメチル化する酵素であり、脂肪細胞の分化において PPAR γ と共に機能する。したがって、SETDB1 の活性制御メカニズムを明らかにすることが、脂質代謝を制御する上で重要であると考えられた。そこで、SETDB1 どのようにして核内でヒストンをメチル化するかを、細胞内局在及び翻訳後修飾に焦点を当て解析することとした。

(3)核内受容体 LXR は酸化コレステロールをリガンドとし、肝臓においてコレステロールの恒常性の維持に寄与している。我々はこれまでに LXR が、直接 LDL 受容体の発現を、また SREBP を介して LPIN の発現を制御していることを明らかにしてきた。LPIN は細胞質においては脂肪合成を、一方核内においては PPAR の転写活性を制御して脂肪酸代謝を促進すると考えられている。このように LPIN は、コレステロールの恒常性維持に関わる LXR と、脂質代謝を制御する PPAR のいずれの働きにも関わっている興味深い脂質代謝制御分子である。そこで、LPIN が細胞内においてどのように制御されているかを解

析することとした。

3. 研究の方法

(1)PPAR α の転写活性化化合物を得るために、構築したスクリーニング系を用いて、植物抽出液及び化合物ライブラリーの評価を実施する。得られたヒット化合物は、*in vitro* での PPAR サブタイプ特異性について評価する。さらに、*in vivo* での病態モデル動物を用いて、薬効の評価を行う。

(2)SETDB1 の細胞内局在を解析するために、SETDB1 に対する抗体を用いて免疫染色を行う。また、分画した細胞抽出液を用いて、ウェスタンブロット法によっても SETDB1 の局在を解析する。一方、SETDB1 の翻訳後修飾による活性制御メカニズムを明らかにするために、MS 解析により翻訳後修飾部位及びその種類を同定する。これら翻訳後修飾がヒストンメチル化酵素活性に及ぼす影響を解析するために、翻訳後修飾部位に変異を加えた時の活性を評価する。

(3)LPIN の細胞内での安定性がどのように制御されているかを明らかにするために、LPIN タンパク質のモチーフ検索を実施する。見出したモチーフと相互作用する因子があるかを、免疫沈降実験により明らかにする。さらに、当該モチーフ及び相互作用因子による、LPIN の細胞内での安定性を評価する。

4. 研究成果

(1)独自に構築したスクリーニング系を用いて、植物抽出液及び化合物ライブラリーのスクリーニングを実施し、PPAR α の転写活性を制御する成分を探索した。その結果、PPAR α の転写活性を上昇させる成分をいくつか得ることに成功した。興味深いことに、そのうちの一つは、既存の PPAR α リガンドとはまったく異なる構造を持つ化合物であった。実際にこの化合物が PPAR α を活性化することは、培養細胞を用いた標的遺伝子の発現量の変化を解析することで確認した。

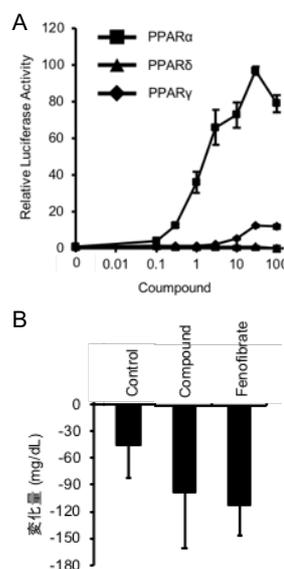


図 1 新規 PPAR α 活性化剤のサブタイプ特異性 (A) 及び *in vivo* 薬効評価

また、*in vitro* において PPAR ファミリーに対するサブタイプ特異性を評価した結果、本化合物は PPAR α を選択的に活性化することが明らかになった(図 1 A)。

次に、本化合物の *in vivo* での薬効を評価するために、フルクトースを負荷することで血中トリグリセリド値が上昇したラットを高脂血症モデルとして用い、反復経口投与した時の影響を評価した。その結果、血中トリグリセリド値の低下効果(図 1 B)、並びに、肝臓での標的遺伝子の発現上昇が確認できた。すなわち、見出した新規化合物は *in vivo* において PPAR α を活性化させることで薬効を発揮することが明らかとなった。

本化合物はこれまでの PPAR リガンドとは全く異なる構造であり、新たな生活習慣病の予防・治療薬になり得る可能性があり、意義深い結果である。

(2) SETDB1 の細胞内局在を解析するために、SETDB1 に対する抗体を用いて肝ガン由来細胞株における局在を解析した結果、SETDB1 は細胞質に多く存在した(図 2A)。細胞抽出液を細胞質、核、細胞内小器官に分画してウエスタンブロット解析を実施したところ、同様に SETDB1 は細胞質に多く存在した(図 2B)。さらなる解析を実施した結果、SETDB1 は核内から細胞質に排出されること、核内においてプロテアソームにより分解を受けること、その結果として SETDB1 が細胞質に多く存在することが示唆された。

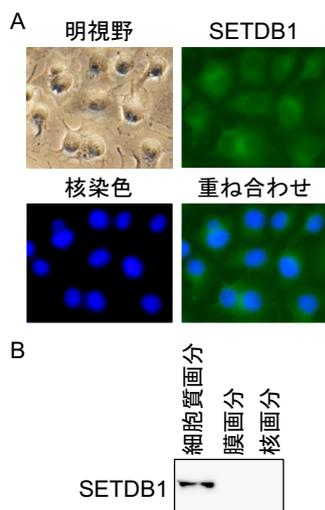


図 2 免疫染色(A)及びウエスタンブロット(B)による SETDB1 の細胞内局在解析

次に、SETDB1 の翻訳後修飾を受ける部位とその種類を解析することとした。MS 解析を行った結果、SETDB1 の C 末端側のアミノ酸残基が翻訳後修飾を受けること、その修飾がユビキチン化修飾であることが示された(図 3A)。さらに、ユビキチン化修飾を受けることで、SETDB1 の H3K9 に対するメチル化酵素活性が増強すると共に、標的遺伝子の発現を制御することが明らかになった(図 3B)。

今回明らかにした SETDB1 の局在制御やヒストンメチル化酵素活性の制御メカニズムは、脂肪細胞分化や脂質代謝等を調節する仕組みの一端を担っている可能性があり、興味深い成果で

あると考えられる。

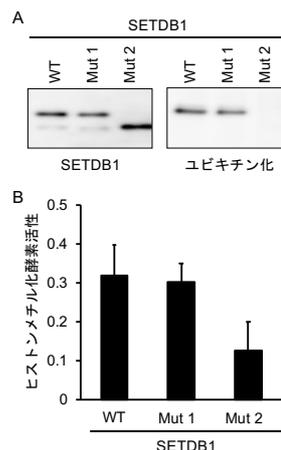


図 3 SETDB1 の翻訳後修飾解析(A)とヒストンメチル化酵素活性に及ぼす影響の解析(B)

(3) LPIN タンパク質の細胞内での分解制御機構を明らかにするために LPIN のアミノ酸配列を基にモチーフ検索を実施した結果、DSGXXS モチーフが見出された。このモチーフに変異を導入した結果、LPIN タンパク質の細胞内での安定性が増加した。そこで、この領域を用いて相互作用分子を探索した結果、E3 ユビキチンリガーゼである BTRC によって LPIN タンパク質の DSGXXS モチーフが認識されることが示された(図 4)。従って、細胞質中の LPIN タンパク質は、ユビキチン-プロテアソーム系を介して分解を受けることが示唆された。

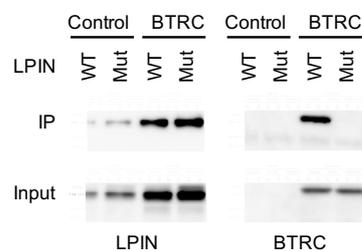


図 4 LPIN タンパク質と E3 ユビキチンリガーゼ BTRC との相互作用解析

今回明らかにした分解制御機構を応用することで、LPIN の脂肪酸燃焼と脂質合成の相反する機能を制御できる可能性があり、興味深い。

以上、本研究で得られた成果は生活習慣病を予防・治療できる薬剤の開発に繋がる可能性があり、非常に意義深いものと考えている。

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 4 件)

- ① Ishimoto K, Hayase A, Kumagai F, Kawai M, Okuno H, Hino N, Okada Y, Kawamura T, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Tachibana K, Doi T, Degradation of human Lipin-1 by BTRC E3 ubiquitin ligase.

Biochem Biophys Res Commun, 488, 1, 159-164 (2017), 査読有.

- ② Luo M, Yeruva S, Liu Y, Chodisetti G, Riederer B, Menon MB, **Tachibana K**, Doi T, Seidler U, IL-1 β -induced downregulation of the multifunctional PDZ adaptor PDZK1 is attenuated by ERK inhibition, RXR α or PPAR α stimulation in enterocytes. *Frontiers in Physiology*, 8, 61 (2017), 査読有.
- ③ Ishimoto K, Kawamata N, Uchihara Y, Okubo M, Fujimoto R, Gotoh E, Kakinouchi K, Mizohata E, Hino N, Okada Y, Mochizuki Y, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Inoue T, **Tachibana K**, Doi T, Ubiquitination of Lysine 867 of the Human SETDB1 Protein Upregulates Its Histone H3 Lysine 9 (H3K9) Methyltransferase Activity. *PLoS One*, 11, e0165766 (2016), 査読有.
- ④ **Tachibana K**, Gotoh E, Kawamata N, Ishimoto K, Uchihara Y, Iwanari H, Sugiyama A, Kawamura T, Mochizuki Y, Tanaka T, Sakai J, Hamakubo T, Kodama T, Doi T, Analysis of the subcellular localization of the human histone methyltransferase SETDB1. *Biochem Biophys Res Commun*, 465, 4, 725-731 (2015), 査読有.

[学会発表](計 8件)

- ① **Keisuke TACHIBANA**, Tomohiro YUZURIHA, Ryotaro TABATA, Syohei FUKUDA, Kazuto NUNOMURA, Tadayuki KOBAYASHI, Kenji ISHIMOTO, Hiroyuki MIYACHI, Takefumi DOI, Development of novel non-fibrate PPAR α activator for metabolic diseases, 4th International Symposium of Medicinal Sciences, 2018.
- ② **橘敬祐**, 田畑遼太郎, 福田昭平, 布村一人, 土井健史, 非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 克服を目指した新規核内受容体 PPAR α 活性化剤の創製, 先導的学際研究機構 創薬サイエンス部門シンポジウム「我が国が切り拓く難病治療の未来」, 2018.
- ③ **橘敬祐**, 田畑遼太郎, 杠智博, 福田昭平, 前川貴志, 石本憲司, 布村一人, 小林直之, 宮地弘幸, 土井健史, 核内受容体 PPAR α 発現細胞株を用いたリガンドスクリーニング系の構築と新規活性化剤の探索, 第 21 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 2017.
- ④ 田畑遼太郎, **橘敬祐**, 杠智博, 前川貴志, 福田昭平, 石本憲司, 小林直之, 田中十志也, 児玉龍彦, 宮地弘幸, 土井健史, 脂質異常症治療薬の開発を目指した新規 PPAR α 活性化化合物の薬効と毒性の評価, 日本薬学会 第 137 年会, 2017.

- ⑤ **橘敬祐**, 杠智博, 田畑遼太郎, 前川貴志, 福田昭平, 石本憲司, 小林直之, 宮地弘幸, 土井健史, 心血管イベントの残余リスクの軽減を目指した新規核内受容体 PPAR α 作用薬の開発, 第 1 回 黒潮カンファレンス, 2016.
- ⑥ 田畑遼太郎, **橘敬祐**, 杠智博, 前川貴志, 福田昭平, 石本憲司, 小林直之, 田中十志也, 児玉龍彦, 宮地弘幸, 土井健史, 核内受容体 PPAR α を標的とした新規脂質異常症治療薬の開発, 第 15 回 次世代を担う若手ファーマ・バイオフィオーラム 2016, 2016.
- ⑦ 杠智博, **橘敬祐**, 前川貴志, 田畑遼太郎, 石本憲司, 小林直之, 田中十志也, 児玉龍彦, 宮地弘幸, 土井健史, 脂質異常症治療薬を目指した核内受容体 PPAR α の新規活性化化合物の開発, 第 65 回 日本薬学会近畿支部総会・大会, 2015.
- ⑧ 奥野紘子, 石本憲司, 熊谷文子, 早瀬絢香, 樋野展正, **橘敬祐**, 川村猛, 田中十志也, 児玉龍彦, 土井健史, 脂質代謝制御因子 Lipin1 と分解メカニズムの解明, 第 16 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム, 2015.

[産業財産権]

○出願状況(計 1件)

名称:ピラゾロピリジン誘導体およびその使用

発明者:土井健史、**橘敬祐**、小林直之、杠智博、石本憲司、宮地弘幸

権利者:国立大学法人 大阪大学、国立大学法人 岡山大学

種類:特許

番号:特願 2015-223167/PCT/JP2016/83471

出願年月日:2015年11月13日/2016年11月11日

国内外の別:国内/国外

[その他]

ホームページ等

<https://seimeijohokaiseki.wixsite.com/tanpaku>

6. 研究組織

(1)研究代表者

橘 敬祐 (TACHIBANA, Keisuke)

大阪大学・薬学研究科・特任講師(常勤)

研究者番号:30432446

(2)研究分担者

土井 健史 (DOI, Takefumi)

大阪大学・薬学研究科・教授

研究者番号:00211409

石本 憲司 (ISHIMOTO, Kenji)

大阪大学・薬学研究科・助教

研究者番号:00572984