

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：16K08592

研究課題名(和文)脂質代謝が駆動する転写活性化とダイレクトリプログラミングの解析

研究課題名(英文) Analysis of the cooperation between transcription activity and lipid metabolism in direct reprogramming

研究代表者

堀澤 健一 (HORISAWA, Kenichi)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：70424207

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)：体細胞を強制的に他の細胞に分化誘導するダイレクトリプログラミング技術は、再生医療において有望な技術である。その分化誘導は、特定の転写因子群を導入することで実現できるが、メカニズムは大部分が不明である。申請者らはプロテオーム解析を行うことで、肝細胞様細胞を誘導する転写因子の一つ Foxa が、核内において脂肪酸のベータ酸化酵素群と物理的に共役する可能性を見出した。検出された酵素のうち、複数の代表的な代謝酵素について詳細に検討したところ、それら酵素が通常存在するミトコンドリアから離れて、核内で Foxa と複合体を形成することを明らかにした。これにより脂肪酸代謝が転写機構と共役する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダイレクトリプログラミングは、iPS細胞のように未分化状態を経ることがないため、誘導した細胞を患者に移植しても癌化の危険性が低く、また比較的短時間で細胞が誘導可能であるという利点がある。そのため再生医療にとって有効な技術であると目されているが、リプログラミングの機構には不明な部分が多く、誘導効率が高くないという問題がある。本研究成果はそのメカニズムの一旦を明らかにするものであり、安全かつ安定的、そして高効率なリプログラミング技術の確立に貢献するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：The strategy of direct cell-fate conversion from one cell type into another cell type, termed “direct reprogramming”, is expected to be a complementary or alternative technology for future cell-based regenerative therapies using pluripotent stem cells. Although transduction of defined sets of transcription factors converts the cell-fate easily and efficiently, most of the parts of the molecular mechanism are still unclear. We performed proteomic analysis to discover interacting partners of a transcription factor, Foxa, which has been used in the direct reprogramming of induced hepatocyte-like (iHep) cells, and found that a considerable number of beta-oxidation enzymes physically associated with the Foxa. As a result of detailed study, we identified that some of the beta-oxidation enzymes co-localized and formed a complex with the Foxa in the nucleus of iHep cells. This result suggests novel cooperation between transcriptional regulation and lipid metabolism.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：ダイレクトリプログラミング 転写因子 代謝 脂肪酸 ベータ酸化 肝細胞 転写 クロマチン

1. 研究開始当初の背景

細胞の初期化技術である iPS 細胞をはじめ、神経細胞や心筋細胞、肝細胞などの特有の機能を持つ細胞への強制的な分化転換を行う体細胞リプログラミング技術が開発され、再生医療への応用研究が加速している。体細胞リプログラミング技術は、少数の転写因子を異所的に発現させることで、通常は細胞が超えられない「分化の壁」を強制的に乗り越えさせる。それら転写因子の多くは、分化・発生過程で中心的な役割を果たすマスター因子であり、元細胞のエピゲノム状態に関わらず、強制的にクロマチン構造や転写状態を変化させる力がある。しかし、具体的にどのような分子機構が転写・クロマチン変化を駆動しているのか、ほとんど明らかにされておらず、安全かつ安定的な医療応用に向け、リプログラミング機構の分子メカニズムの理解は急務であった。申請者所属の研究室では、体細胞に2種の転写因子(Hnf4 および Foxa1~3 のいずれか)を導入することで、肝細胞様(iHep)細胞を誘導することに成功していた(Sekiya & Suzuki, Nature, 2011)。その導入因子の一つである Foxa は、閉じたクロマチンを開くパイオニア因子であることが既に知られていた。そこで申請者は Foxa の分子機構を解析することで、iHep 細胞リプログラミングの仕組みの一端を理解することができると考え、免疫沈降・質量分析(IP-MS)解析による Foxa の相互作用因子の探索を行った。その結果、p300 などの既知転写コアクチベーターに加え、予想外に脂肪酸の酸化関連酵素群が多数検出された。近年、転写研究の領域では、DNA やヒストンの化学修飾を介した、転写と代謝のクロストークが注目され始めており、Foxa による転写とリプログラミングの制御に、脂質の代謝が関わっている可能性が浮かび上がった。

2. 研究の目的

本研究は、IP-MS 解析の結果 Foxa の相互作用因子として同定されてきた、脂肪酸の酸化関連酵素群が、Foxa による転写促進機構と、物理的・機能的にどのように関連しているのかを、分子レベルで解明することを目的として行った。そのため、

- (1) 酸化酵素複合体が核移行し、クロマチン上で Foxa と相互作用する
- (2) ミトコンドリア自体が核膜(および何らかの仲介因子)を介して、核内の転写マシーナリーと共役する

という2つの仮説をベースとして、生化学的・細胞生物学的な解析を行った(図1)。これにより、分化・器官発生のマスター因子として機能する転写因子が、どのような機構により強制的な体細胞リプログラミングを実現しているか解明することを、研究の最終的な目標とした。以上のことを明らかにすることで、安定かつ安全な、臨床応用可能なリプログラミング技術確立する有用な情報が得られると期待できる。

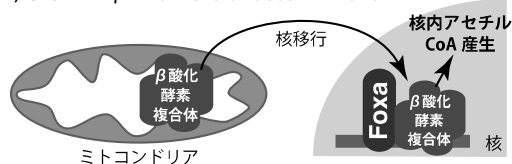
3. 研究の方法

本研究では、上述した2つの仮説を念頭に検証実験を行なった。第1の仮説である、酸化酵素複合体の核移行、および第2の仮説である、ミトコンドリア自体が核膜を介して、核内の転写マシーナリーと共役する機構のそれぞれの可能性について、生化学的・細胞生物学的な検証を行った。まず、先行実験における IP-MS 解析により Foxa と物理的に相互作用することが示唆されていた代表的な酸化関連酵素群に関して、iHep 細胞内での局在、および強制発現した Foxa との共局在を、蛍光免疫染色法および共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察によって検証した。次に、酸化酵素群と Foxa タンパク質の物理的な相互作用を、iHep 細胞をサンプルとして生化学的な手法により解析した。既往の研究で行った IP-MS 解析では、Foxa に付加した FLAG-tag で免疫沈降し、共沈降したタンパク質を質量分析することで、候補タンパク質を同定した。そこで、より確証的な情報を得るために、検出された代表的な候補タンパク質群の抗体を使用して IP-Western 解析を行った。さらに、核-細胞質の分画実験を行うことで、候補タンパク質がミトコンドリアから独立して核内に存在することの確認を行った。さらに、酸化酵素-Foxa 複合体が、仮説の通り、脂肪酸からアセチル CoA を産生し得る機能的な代謝複合体であるのかを、*in vitro* の機能解析により検証した。具体的には、Foxa を免疫沈降して得た非変性のタンパク質複合体を用いて、試験管内で脂肪酸の代謝を測定した。基質としてパルミチン酸、ミリスチン酸、ラウリン酸といった様々な炭素鎖長を持つ脂肪酸を用いて、アセチル化のドナー分子であるアセチル CoA が試験管内で生成するかを検討した。

4. 研究成果

IP-MS 解析によって検出された、Acsm3、Mcad、Acaa2、Hadha などの代表的な酸化酵素について、蛍光免疫染色を行い、その iHep 細胞内における局在を共焦点レーザー顕微鏡に

A) 仮説1: β酸化酵素複合体の核移行



B) 仮説2: 核に近接したミトコンドリアとの共役

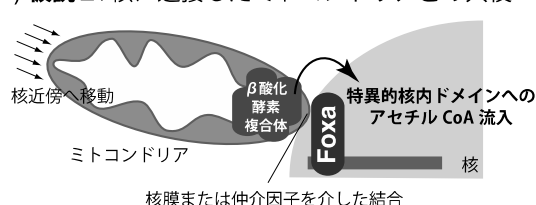


図1 酸化酵素複合体が核内の Foxa と共役する分子機構の仮説

よって詳細に観察した。その結果、これまで報告があった通り、それら酵素の大部分はミトコンドリアに集積していた一方、核内においてもスペックル状のシグナルが得られたことから、発現した酵素のうち一部分が核内移行していることが示された(図2)。この局在は、生化学的な分画後の Western blotting による検証によっても同様の結果が得られ、核画分からはミトコンドリアマーカーのシグナルが得られなかったことから、ミトコンドリアとは独立した形で、酸化酵素複合体が核内移行するという、第1の仮説を裏付ける結果となった。また、酸化酵素のスペックル状のシグナルの多くは、DAPI のシグナルが弱い、オープクロマチン領域と思われる部分に多く見られたことから、転写の亢進に関与するという仮説にも合致した結果となった。今後は、より微細なレベルでの共局在を証明するために、Proximity ligation assay 等の手法を用いた解析が必要であると考えている。

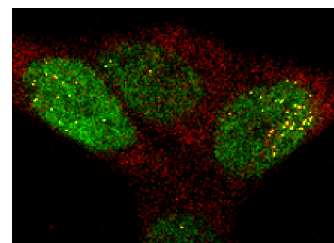


図2 Foxa2(緑)と代表的な酸化酵素 Acsm3(赤)の iHep 細胞における核内共局在(黄)

酸化酵素と Foxa の核内における物理的な共役が明らかになったため、次に転写因子周辺に集積した酸化酵素群の分子的機能を解析する実験を行った。現在まで、Foxa の免疫沈降物を用いた *in vitro* 脂質代謝アッセイを試みているが、これまでのところ転写機能と脂質代謝の直接的な関連性を説明できるデータは得られていない。そのため、今後は安定同位体を導入した脂肪酸と質量分析計を用いた解析など、他の手法を導入する必要があると考えられる。

これまでの常識では、酸化関連酵素はミトコンドリアのみに局在し、酸化反応はミトコンドリア内で限局的に起こると考えられてきた(ペルオキシソームにも酸化機構は存在するが、超長鎖脂肪酸代謝や分岐脂肪酸の短縮化といった反応に特化し、脂肪酸の完全分解には関与しない)。しかし近年、酸化酵素群と同じ様にミトコンドリアに局在するはずのピルビン酸代謝酵素複合体(PDH)が HSP70 の働きにより核移行し、核内でアセチル CoA の生産を行いヒストンアセチル化に寄与するという報告がなされた他(Sutendra *et al. Cell*, 2014)、本研究課題の実施期間内においても、神経細胞のクロマチン上で ACSS2 が酢酸からアセチル CoA を産生することがヒストンアセチル化と転写制御に寄与するという報告がなされ(Mews *et al. Nature*, 2017)、代謝の常識が大きく覆されている。我々の研究結果は、酸化反応が核内においても動作し、その反応には酸化酵素群の核移行が中心的な役割を果たしている可能性を強く示唆するものである。一連の酸化反応経路の中でアセチル CoA 産生反応を直接的に触媒する2酵素(Hadha および Hadhb)は、脂肪酸酸化酵素複合体(TFP)という複合体を形成し、PDH と同様に基質チャネリングによる効率的な代謝反応を行う。超高度分子クラウディング状態のため分子の自由拡散が制限される核内環境ではPDHの様にTFPも有効な分子機構として働くことは想像に難しくなく、他の酸化酵素を含めた超複合体が核内に存在する可能性が強く示唆される。

本研究を進めていく中で申請者らは、Foxa を含むリプログラミング転写因子セットが、体細胞の運命転換だけではなく、がん細胞の正常細胞への復帰を促す効果があることを示し、論文として報告した(Takashima *et al., Cancer sci.*, 2018)。この結果は、Foxa などのリプログラミング因子が、分化だけでなく癌化や正常細胞の機能維持にも大きく関わっていることを示しており、核内において共役する酸化酵素群がより広範な役割を担っている可能性を示唆している。今後は、未だ確認できていない核内における酸化活性を測定すると共に、それが転写亢進、ひいては細胞の強制的なリプログラミングに繋がる道筋を明らかにしていきたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

- 1) Yasuo Takashima\*, Kenichi Horisawa\*, Miyako Udonon\*, Yasuyuki Ohkawa, Atsushi Suzuki. Prolonged inhibition of hepatocellular carcinoma cell proliferation by combinatorial expression of defined transcription factors. *Cancer Science*, **109**, 2018, 3543-3553.  
査読：有 (\* equal contribution)  
DOI: 10.1111/cas.13798
- 2) Maiko Terada, Kenichi Horisawa, Shizuka Miura, Yasuo Takashima, Yasuyuki Ohkawa, Sayaka Sekiya, Kanae Matsuda-Ito, Atsushi Suzuki. Kupffer cells induce Notch-mediated hepatocyte conversion in a common mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Scientific Reports*, **6**, 2016, 34691.  
査読：有  
DOI: 10.1038/srep34691
- 3) Nakayama, M., Komiya, S., Fujiwara, K., Horisawa, K., Doi, N. *In vitro* selection of bispecific diabody fragments using covalent bicistronic DNA display. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **478**, 2016, 606-611.

査読：有  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.07.113

〔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：  
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

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：鈴木 淳史  
ローマ字氏名：SUZUKI, Atsushi  
所属研究機関名：九州大学  
部局名：生体防御医学研究所 器官発生再生学分野  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：30415195

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：中山 貴博  
ローマ字氏名：NAKAYAMA, Takahiro

科研費による研究は、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。