

平成30年 5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13042

研究課題名(和文) エネルギーセンサーによるクロマチンダイナミクス制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of chromatin dynamics by an energy sensor histone demethylase

研究代表者

酒井 寿郎 (SAKAI, Juro)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：80323020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：AMPキナーゼ(AMPK)は、細胞内のエネルギーセンサーとして代謝、細胞増殖、リプログラミングに重要な役割を担う。インシリコ解析からヒストン脱メチル化酵素JMJD1AはAMPKのモチーフを複数有していることから、AMPKによるJMJD1Aリン酸化の可能性を解析した。インビトロアッセイではJMJD1Aタンパク質はAMP依存的にリン酸化されることがフォスタグゲルやAMPK基質抗体などによって明らかとされた。さらにリン酸化プロテオミクス解析から十数個のセリン・スレオニン残基のAMPKによるリン酸化部位を同定した。内在性JMJD1AのAMPKによるリン酸化アミノ酸残基特定ははまだ途上にある。

研究成果の概要(英文)：AMP Activated Protein Kinase (AMPK) is a serine / threonine phosphorylating enzyme and plays an extremely important role in metabolism, cell proliferation and reprogramming as an intracellular energy sensor. Since histone demethylase JMJD1A has multiple motifs of AMPK from "ScanSite", we analyzed whether AMPK phosphorylated JMJD1A and was functioning. The JMJD1A recombinant protein was found to be phosphorylated AMP dependent in vitro by Phos-tag gel separation and immunoblotting (IB) with JMJD1A antibody and IB analysis using AMPK substrate antibody. Furthermore, phospho-proteomic analysis demonstrated that there are more than ten serine and/or threonine residues phosphorylated by AMPK. Identification of phosphorylated amino acid residues of endogenous JMJD1A by AMPK is still on the way.

研究分野：代謝医学・分子生理学

キーワード：ヒストン脱メチル化酵素 栄養 AMPキナーゼ 飢餓時のエピゲノム変化

1. 研究開始当初の背景

AMP 活性化プロテインキナーゼ

(AMPK) は、セリン・スレオニンリン酸化酵素の一種で、細胞内のエネルギーセンサーとして代謝、細胞増殖、リプログラミングに極めて重要な役割を担う。AMPK は、低グルコース、低酸素、虚血、熱ショックのような細胞内 ATP 供給が枯渇した状況において、AMP の増加に反応して活性化される。運動によって活性化された AMPK は骨格筋や肝臓の脂肪を 燃焼させインスリン感受性の亢進、糖尿病治療薬のメトホルミンは AMPK の活性化を介してインスリン抵抗性を改善させるなど、AMPK は代謝の中心的役割を担う。その機序として、申請者がこれまで明らかにしてきたコレステロール代謝に関与する転写因子 SREBP (Cell 1996, Mol Cell 1997, 1998) のような多くの脂質代謝関連分子が、AMPK によってリン酸化され、脂肪燃焼を促進させる。一方で 近年、申請者は、エピゲノム修飾酵素が脂質代謝を担う重要な鍵因子であることを報告してきたが (Nature Commun 6:7052, 2015)、ヒストンのメチル化や脱メチル化酵素が AMPK の基質となりエピゲノムを制御するという報告はまだない。

2. 研究の目的

AMP キナーゼ (AMPK) は、細胞内の ATP の減少を増加に転じさせるように代謝のスイッチを切り換えるセンサーとして機能し、酵素、転写因子をリン酸化し活性を制御する。申請者は、エピゲノム因子としては初めて、ヒストン脱メチル化酵素 JMJD1A が AMPK によってリン酸化されるという興味深い知見を得た。本研究では、細胞内エネルギー状態が AMPK による JMJD1A のリン酸化を介してどのように動的なクロマチンを変化させ転写制御に関与するかを解明する。

3. 研究の方法

AMPK によって JMJD1A のどのアミノ酸がリン酸化されるのかその評価系を構築し、リン酸化部位を同定する。絞り込まれたリン酸化部位については、アラニン変異体を作製する。① 質量分析によるリン酸化部位のマッピング ① Sf9 昆虫細胞から大量精製したリコンビナント JMJD1A タンパク質を in vitro で AMPK によってリン酸化させ、質量分析で解析することで、JMJD1A のリン酸化部位をマッピングする。② AMPK は ATP 枯渇状態すなわち低グルコース状態などで活性化される。HeLa 細胞を用いて AMPK による JMJD1A のリン酸化部位の検討を行う。低グルコース状態を誘導するため、ATP まで代謝されないグルコース類似体である 2-デオキシ-D-グルコース (2-DG) を培養細胞に添加する。内在性の JMJD1A を免疫沈降し、質量分析でマッピングする。③ ScanSite のモチーフサーチソフトを用いて、

リン酸化部位にあたりをつける。2. in vitro キナーゼアッセイ系の確立 1) 免疫沈降: HeLa 細胞に V5 tag の付いたヒト JMJD1A の野生型あるいはセリン・スレオニンのアラニン変異体を一過性に強制発現させ、抗 V5 抗体を用いて免疫沈降する。2) In vitro AMPK assay および イムノブロット: 10 cm dish 1 枚分の HeLa 細胞の免疫沈降産物を AMPK で反応させ、サンプルを SDS-PAGE ゲルで電気泳動し、抗 Phospho-(Ser/Thr)-AMPK-substrate 抗体を用いてイムノブロットを行う。その結果、JMJD1A タンパク質の野生型でリン酸化が検出された。また、変異体を作製し同様の実験を行う。

4. 研究成果

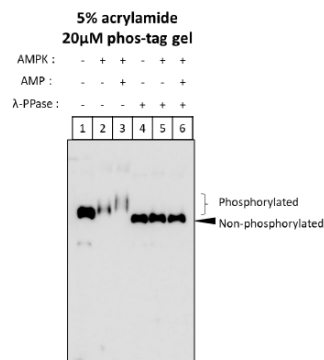
JMJD1A is a putative target of AMPK



スキャンサイトから JMJD1A は AMPK のモチーフを複数有していることが判明した (図)

① 細胞と飢餓刺激の検討。細胞の種類を検討したところ HeLa 細胞では AMPK の活性がうまく取れないという既報もあり、前駆脂肪細胞を使う系に変更した。ポジティブコントロールとなるアシル-CoA カルボキシラーゼなどのリン酸化はグルコース除去培地などでリン酸化が確認され、グルコース除去の刺激は入っていることが認められた。

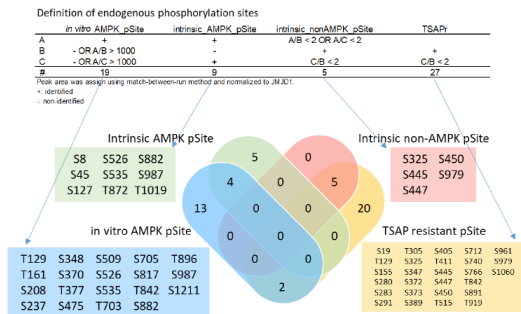
② リン酸化検出系の検討。in vitro での AMP キナーゼアッセイ。昆虫細胞 Sf9 から精製した JMJD1A リコンビナントタ



ンパク質を用い、in vitro AMP キナーゼアッセイを行った。

フォスタグゲルを用いた解析から、in vitro ではリンコンビナント AMPK はリンコンビナントのJMJD1Aをリン酸化することが見出された。このリン酸化はアッセイに供した AMP に依存しており、in vitro において JMJD1A は AMPK の基質であることが認められた (図)。

質量分析によるリン酸化アミノ酸残基の同定。このたんぱく質をリン酸化プロテオミクス解析に供したところ、多数のリン酸化サイトを同定することができた (図)。



リン酸化プロテオミクス解析

③ 細胞内 JMJD1A タンパク質の AMPK によるリン酸化の検討

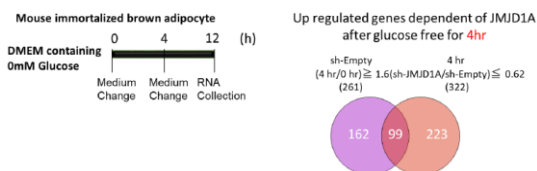
ポジティブコントロールとなるアシル-CoA カルボキシラーゼ (ACC) などのリン酸化はグルコース除去培地や 2DG 処理などで確認され、グルコース除去の刺激は 3T3-L1 細胞、kBAT (褐色脂肪細胞) では入っていることが認められた。そして AMPK 阻害薬 C コンパウンドでこれが阻害される。

上記処理した細胞から JMJD1A を免疫沈降し、サンプルをプロテオミクス解析、フォスタグゲル解析、抗 AMPK サブトレイト抗体による検出を試みた。

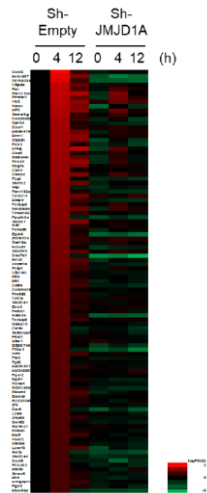
質量分析による解析。

内在性のタンパク質を免疫沈降した検討からは、質量分析による同定カバー率が 20 数パーセント弱と少なく、読めている範囲ではグルコース飢餓により特異的にリン酸化されるアミノ酸残基の特定には至らなかった。抗 AMPK サブトレイト抗体による検出では、抗体の感受性の問題もあり、グルコース飢餓による特異的なシグナルの検出には至っていない。

グルコース飢餓による JMJD1A 依存的な遺伝子誘導の解析



JMJD1A 特異的 shRNA (RNA 干渉) レトロウイルス感染により kBAT 中の JMJD1A をノックダウンした細胞とコントロールのレトロウイルスを感染した細胞を分化誘導させ、グルコース飢餓ののち、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。



JMJD1A は解糖系の遺伝子を絶食で制御していることが解明された。

今後は強制発現系をもちい、JMJD1A の AMPK によるリン酸化部位を同定し、点変異を入れるなどし、この影響について遺伝子発現などから検証する。

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 5 件)

- (1) Abe Y, Fujiwara Y, Takahashi H, Matsumura Y, Sawada T, Jiang S, Nakaki R, Uchida A, Nagao N, Naito M, Kajimura S, Kimura H, Osborne TF, Aburatani H, Kodama T, Inagaki T, Sakai J. Histone demethylase JMJD1A coordinates acute and chronic adaptation to cold stress via thermogenic phospho-switch. *Nat Commun.*, 査読有, 9, 2018, 1566, DOI:10.1038/s41467-018-03868-8
- (2) Nakatsuka T, Tateishi K, Kudo Y, Yamamoto K, Nakagawa H, Fujiwara H, Takahashi R, Miyabayashi K, Asaoka Y, Tanaka Y, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Kato M, Sakai J, Tachibana M, Aburatani H, Shinkai Y, Koike K. Impact of histone demethylase KDM3A-dependent AP-1 transactivity on hepatotumorigenesis induced by PI3K activation. *Oncogene*, 査読有, 36(45), 2017, 6262-6271, DOI:10.1038/onc.2017.222.
- (3) 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*, 査読有, 488(1), 2017, 159-164, DOI:10.1016/j.bbrc.2017.04.159

- (4) Yeyati PL, Schiller R, Mali G, Kasioulis I, Kawamura A, Adams IR, Playfoot C, Gilbert N, van Heyningen V, Wills J, von Kriegsheim A, Finch A, Sakai J, Schofield CJ, Jackson IJ, Mill P. KDM3A coordinates actin dynamics with intraflagellar transport to regulate cilia stability. *J Cell Biol*, 査読有, 216, 2017, 999-1013, DOI:10.1083/jcb.201607032
- (5) Inagaki T, Sakai J, Kajimura S. Transcriptional and epigenetic control of brown and beige adipose cell fate and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 査読有, 17, 2016, 480-495, DOI:10.1038/nrm.2016.62

〔学会発表〕(計8件)

- (1) 酒井寿郎: ヒストン脱メチル化酵素による脂肪細胞の熱産生機構と糖代謝制御機構. 第52回糖尿病学の進歩, 2018年
- (2) 酒井寿郎, 阿部陽平, 藤原庸右, 高橋宙大, 児玉龍彦, 油谷浩幸, 松村欣宏, 稲垣毅: 寒冷刺激による翻訳後修飾とエピゲノム変化による脂肪細胞のベージュ化機構. 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 2017年
- (3) 松村欣宏, Eko Fuji Ariyanto, 曾我朋義, 酒井寿郎: 脂肪細胞を特徴づける代謝によるエピゲノム制御. 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 2017年
- (4) 松村欣宏, 仲木竜, 稲垣毅, 油谷浩幸, 酒井寿郎: エピゲノムを介した白色脂肪細胞分化の制御機構. 第35回内分泌学代謝学サマーセミナー, 2017年
- (5) 酒井寿郎: ヒストン脱メチル化酵素のリン酸化と脱メチル化による白色脂肪細胞の褐色化機構. 第11回エピジェネティクス研究会年会, 2017年
- (6) Eko F. Ariyanto, 松村欣宏, 曾我朋義, 稲垣毅, 酒井寿郎: 脂肪細胞における代謝産物とエピゲノムによるエネルギー代謝調節. 日本がん分子標的治療学会 第12回トランスレーショナルリサーチワークショップ, 2017年
- (7) 松村欣宏, 鹿野優佳, 吉田文乃, 川村猛, 稲垣毅, 酒井寿郎: ヒストンメチル化酵素 SETDB1 のユビキチン化は細胞内局在を制御する. 第89回日本生化学会, 2016年
- (8) 酒井寿郎: 絶食でのケトン体産生のメカニズム. 第16回日本抗加齢医学会総会シンポジウム, 2016年

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.mm.rcast.u-tokyo.ac.jp/publications/pubs.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
酒井 寿郎 (SAKAI, Juro)
東京大学・先端科学技術研究センター・教授
研究者番号: 80323020

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
川村 猛 (KAWAMURA, Takeshi)
東京大学・アイソトープ総合センター・准教授
研究者番号: 70306835

木村 宏 (KIMURA, Hiroshi)
東京工業大学・生命理工学研究科・教授
研究者番号: 30241392

油谷 浩幸 (ABURATANI, Hiroyuki)
東京大学・先端科学技術研究センター・教授
研究者番号: 10202657

稲垣 毅 (INAGAKI Takeshi)
東京大学・先端科学技術研究センター・教授 (2016年9月まで)
群馬大学・生体調節研究所・教授 (2016年10月より)
研究者番号: 10507825

松村 欣宏 (MATSUMURA, Yoshihiro)
東京大学・先端科学技術研究センター・助教 (2017年3月まで)、准教授 (2017年4月より)
研究者番号: 20375257

阿部 陽平 (ABE, Yohei)
東京大学・先端科学技術研究センター・学振特別研究員 (2018年1月まで)
研究者番号: 80771063

(4) 研究協力者
なし