

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16207

研究課題名（和文）インスリン抵抗性発症過程におけるミトコンドリア酸化的リン酸化の時系列オミクス解析

研究課題名（英文）Time series multi-omics analysis of mitochondria OXPHOS in the onset of insulin resistance

研究代表者

湯通堂 紀子（Yutsudo, Noriko）

九州大学・生体防御医学研究所・特任助教

研究者番号：00631649

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）：本研究は、マウスの肝臓で肥満から前糖尿病に至る過程における、ミトコンドリア酸化的リン酸化経路の、ヒストン修飾（ChIP-seqデータ）、遺伝子発現（RNA-seqデータ）、タンパク質発現（プロテオミクスデータ）の3階層における変動を時系列で解析し、その制御メカニズムを解明することを目的として行った。

解析の過程で、当初解析対象としていたミトコンドリア酸化的リン酸化経路だけではなく、関連するミトコンドリア代謝経路全体に変動が見られたため、これらに対象を広げて解析を行った。各階層及び多階層にまたがる時系列変動が同定され、これらの変動が、肥満から前糖尿病段階に至る際に重要な経路であると推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肥満により生じるミトコンドリア代謝経路の変化は、2型糖尿病の主な原因のひとつであるインスリン抵抗性に関与していることが知られているが、その詳細なメカニズムは未だ解明されていない。本研究では、肥満から前糖尿病段階に至る過程における、ミトコンドリア代謝経路の、時系列・3階層（ヒストン修飾・遺伝子発現・タンパク質発現）の変動分子・ネットワークを解析した。この研究成果から、肥満により誘発されるミトコンドリア代謝経路の変動の、最上流の制御因子から下流分子への伝達経路や、インスリン抵抗性発症に重要な分子・ネットワークを同定し、肥満や2型糖尿病の創薬ターゲットとなる分子機構の解明につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Mitochondrial OXPHOS dysfunction was reported to be a cause of insulin resistance. To elucidate the role of mitochondrial metabolic pathways in insulin resistance, we performed time series multi-omics analysis. We examined alteration of mitochondrial metabolic pathways through time series epigenome, transcriptome, and proteome analysis of the obese mouse liver. Sequential fluctuations of molecules and networks were identified in multi-layers of mitochondrial metabolic pathways, suggesting that these alterations may be involved in insulin resistance and can be therapeutic targets for obesity and diabetes.

研究分野：システム生物学、分子生物学

キーワード：ミトコンドリア代謝経路 マルチオミクス 時系列データ解析 エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

日本人の糖尿病の9割を占める2型糖尿病は、インスリン抵抗性とインスリン分泌低下が主な原因で発症すると考えられている。インスリン分泌低下の主な原因は遺伝因子であるが、インスリン抵抗性には肥満などの環境因子が深く関与していることが分かっている。肥満によりインスリン抵抗性が引き起こされるメカニズムとして、ミトコンドリアの酸化的リン酸化(OXPHOS)との関連が報告されており、その制御機構を調べるための研究が行われてきたが、未だ詳細は明らかにされていない。また、肥満はエピジェネティック制御を変化させるが、同時に起こる遺伝子発現・タンパク質発現の変化や、ミトコンドリア OXPHOS 経路やインスリン抵抗性との関係の詳細は明らかにされていない。

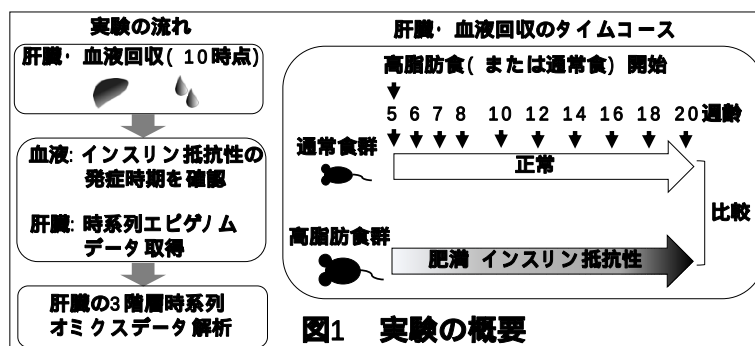
2. 研究の目的

本研究は、肥満から前糖尿病状態に至るまでの過程における、ミトコンドリア OXPHOS 経路関連分子の時系列・3階層(ヒストン修飾・遺伝子発現・タンパク質発現)の変動を解析し、OXPHOS 経路とインスリン抵抗性の関係・制御機構を明らかにすることを目的に行う。本研究で、肥満により引き起こされる変化の、上流から下流への伝達様式を解明することで、肥満や糖尿病の治療・予防標的を明らかにしたい。

3. 研究の方法

[1] 肥満～前糖尿病モデルマウス肝臓の時系列エピゲノムデータ取得

オスの C57BL/6J マウスを用いて、高脂肪食を給餌し前糖尿病性肥満を誘発させる高脂肪食群と、通常食を給餌する通常食コントロール群に分け、5～20週齢の10時点で肝臓を回収し、液体窒素で急速凍結する(図1)。同時に尾静脈採血を行い、インスリン抵抗性の発症時期を特定する。また、血糖値、血中インスリン濃度を測定し、平均

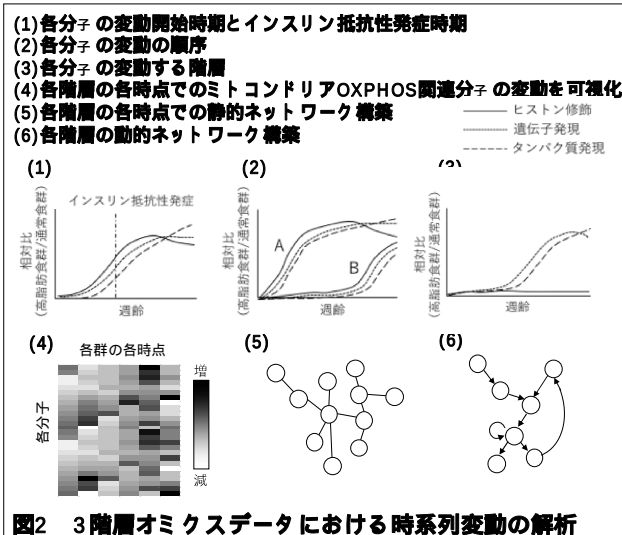


的な挙動を示すサンプルを選択する際に利用する。選択した肝臓から凍結肝臓粉末を作製し、5本のチューブに分配する。分配した試料のうち1本をChIP-seqによるエピゲノム解析に行います。残りの試料は申請者が他プロジェクトで他対象の解析を目的とした、トランスクリプトームデータ及びプロテオームデータの取得に用いる。

[2] 3階層におけるミトコンドリア OXPHOS 経路の分子・ネットワークの解析

上記の方法で取得した3階層のオミクスデータを、本研究と他プロジェクトで共用し、それぞれ異なる対象の解析を行う。本研究では、下記の通りにミトコンドリア OXPHOS 経路の分子・ネットワークの時系列の変動を解析する(図2)。解析対象のミトコンドリア OXPHOS 関連分子は、KEGG の酸化的リン酸化(map00190)に記載されている135遺伝子とその産物とする。

(1)各階層での OXPHOS 分子の変動をグラフにして可視化し、血糖値及び血中インスリン濃度から特定したインスリン抵抗性発症時期と各分子の変動開始時期を比較する。インスリン抵抗性発症時期よりも前の変動は、インスリン抵抗性の原因として、インスリン抵抗性発症後の変動は、インスリン抵抗性の結果として生じると考えられる。
(2)時系列で各 OXPHOS 分子の変動の順序を明らかにすることで、上流～下流の分子への伝達経路を明らかにする。
(3)各分子がヒストン修飾、遺伝子発現、タンパク質発現のどの階層で制御を受けているかを明らかにする。



(4)各階層の各時点での OXPHOS 分子の変化をヒートマップで可視化することで、OXPHOS システム全体の時系列の変動の様子を明らかにする。
 (5)Ingenuity pathwayanalysis (IPA) ・DAVID 等のソフトウェアを用いて、各階層の各時点で変動した分子の静的ネットワークを作成する。
 (6)時系列データから、動的ベイジアンネットワークを用いて、フィードバック制御、セルフープ等の循環型制御を含む動的ネットワークの作成を試みる。
 以上の方法で、肥満により誘発されるミトコンドリア OXPHOS の変化とインスリン抵抗性の関係、及び最上流の制御因子から下流分子への伝達経路を明らかにすることで、肥満や 2 型糖尿病の創薬ターゲットとなる分子と経路を同定できることが期待される。

4. 研究成果

[1] 肥満～前糖尿病モデルマウス肝臓の時系列エピゲノムデータ取得

当初の研究計画通り、肥満～前糖尿病モデルマウス肝臓のサンプルと 4 種のヒストン修飾抗体を用いて、Input DNA (コントロール) サンプルと共に ChIP-seq を行い、時系列エピゲノムデータを取得した。データのオリティチェックを行い、解析に十分なクオリティのデータが得られていることを確認した。各ヒストン修飾データにおける時系列での変動を検出するためには全データで同じ領域のピークを検出し定量値として算出する必要があったため、4 種の定量値算出方法を比較検討し、最も適切と思われる方法で算出した。Narrow peak の 2 種のヒストン修飾データについては、時系列の変動が検出できたものの、Broad peak の 2 種のヒストン修飾データについては、時系列での変動が十分に検出されなかったため、以下の解析には Narrow peak の 2 種のヒストン修飾データのみを用いることとした。

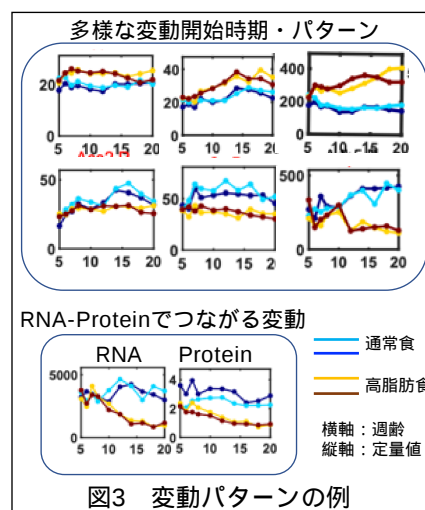
[2] 3 階層におけるミトコンドリア OXPHOS 経路の分子・ネットワークの解析

[1] で取得したデータを含む、肥満から前糖尿病状態までの時系列の 3 階層オミクス (エピゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム) データの定量値を用いて、変動分子・ネットワークの解析を行った。解析の過程において、ミトコンドリア OXPHOS 経路だけではなく、関連するミトコンドリア代謝経路の分子においても変動が見られたので、解析対象をミトコンドリア代謝経路 (解糖系・クエン酸回路・電子伝達系) に属する分子に広げた。解析対象分子は、KEGG の解糖系・糖新生系 (map00010)、クエン酸回路 (map00020)、酸化リン酸化 (map00190) に記載の分子とした。各階層データの定量値を算出し、データクリーニングを行った後に、時系列の変動をグラフ化し、図 2 の方法に従い、変動分子・ネットワークの解析を行った。インスリン抵抗性発症時期は、肝臓組織サンプルと同時に回収した血液のインスリン濃度・血糖値・体重から 10-12 週齢と推測され、類似条件の既報と一致した。同定された変動の開始時期は様々であったが、インスリン抵抗性発症時期付近で変動開始する分子が多く見られた。一方で、10-12 週齢以前もしくは以降に変動開始する分子も存在し、それらはインスリン抵抗性の原因もしくは結果となる変動である可能性が示唆された。

変動の傾向については、通常食に比べて高脂肪食で減少傾向の変動が、増加傾向の変動よりも多く見られた。変動した分子は、トランスクリプトームデータで最も多く、エピゲノムデータ・プロテオームデータではやや少なかったが、一方で図 3 に示すような、2～3 階層で同傾向の変動 (階層をつなぐ変動) が見られる分子も同定された。つながる階層ごとに変動分子を分類することで、各分子がエピジェネティック制御、転写制御、翻訳制御のどの制御を受けているか推測した。また、変動パターンやつながる階層ごとに変動分子を分類後、ネットワークを作成し、各ネットワークの特徴を精査中である。

エピゲノムデータの追加の解析として、変動が確認されたピークの配列に対して JASPAR を用いたモチーフ解析を行い、ヒストン修飾に変動が検出された遺伝子を制御する転写因子を推測した。推測された転写因子候補には、インスリン制御に関与することが知られている転写因子が含まれ、これらを上流因子としてインスリン抵抗性が制御されている可能性が示唆された。

本研究期間中に、(6)の動的ネットワークの構築までは至らなかったが、引き続き解析を行い達成する見込みである。また、本研究の成果を踏まえた次の展開として、代謝物やタンパク質リン酸化での変動を調べるために、メタボロームデータ・ホスホプロテオームデータを取得し、現在解析中である。これらのデータを統合して、5 階層の変動を解析することで、肥満により生じるミトコンドリア代謝経路の変動とインスリン抵抗性の制御メカニズムに関して更なる理解が得られると期待される。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------