

令和 6 年 4 月 26 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19249

研究課題名（和文）メチオニン代謝のリン酸化シグナルへの変換に着目したNASH発症機構の解明

研究課題名（英文）Understanding the pathogenic mechanism of NASH by focusing on the conversion of methionine metabolism to phosphorylation signals.

研究代表者

大浜 剛（Ohama, Takashi）

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：50579018

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：メチオニンはSAMに代謝されることでDNAやヒストンのメチル化を引き起こし、エピジェネティックな制御機構において中心的な役割を果たす。研究代表者はメチル化を受けるタンパク質はヒストンだけではないにも関わらず、その他のタンパク質のメチル化に関する情報が極めて少ないことに疑問を持ち、主要な脱リン酸化酵素であるPP2Aのメチル化が果たす役割に関する研究を進めた。本研究から、PP2Aのメチル化がNASH病態の発症に重要な役割を果たすことが明らかになり、PP2Aメチル化が細胞シグナルに与える影響や、PP2Aメチル化を制御する分子機構に関する報告を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、PP2Aのメチル化を例として、非ヒストンタンパク質のメチル化にも生理学的および病態生理学的に重要な役割があることを提示した。また、本研究には、NASHの病態進行に関する分子機構に新たな概念を提供した。NASH治療薬の市場規模は5兆円とも言われ、製薬企業各社が開発に力を注いでいるが結果を残せておらず、基礎研究レベルでの病態機構の解明が重要である。本研究が新たな研究分野を開拓することで、NASHを始めとしたアンメット・メディカル・ニーズに対する真に新しい治療戦略の創出に発展する可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Methionine is metabolized to S-adenosylmethionine (SAM), which induces methylation of DNA and histones, playing a central role in epigenetic regulatory mechanisms. The principal investigator questioned the scarcity of information regarding the methylation of proteins other than histones, prompting research into the role of methylation of the major phosphatase, PP2A. This study revealed the significant role of PP2A methylation in the pathogenesis of NASH and reported on the impact of PP2A methylation on cellular signaling and the molecular mechanisms controlling PP2A methylation.

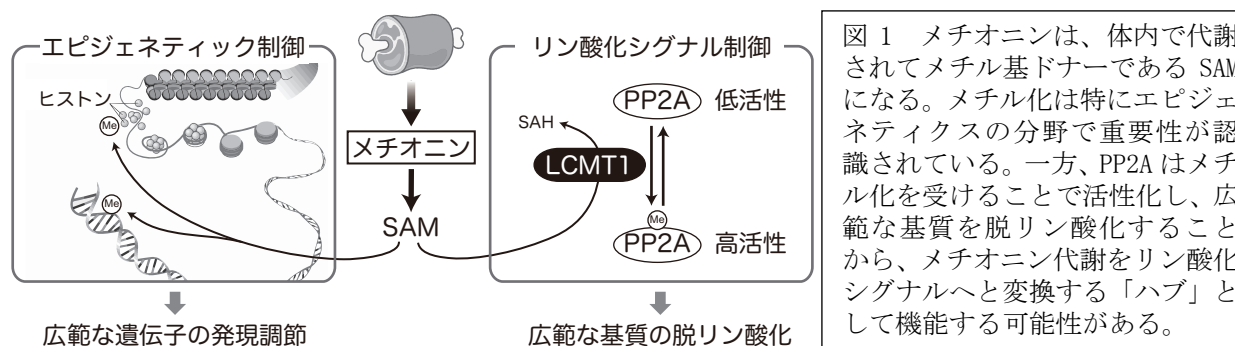
研究分野：獣医学

キーワード：PP2A タンパク質メチル化 NASH

1. 研究開始当初の背景

メチオニン代謝は食事や栄養条件の影響を受けやすく、メチオニン摂取量を制限することで、寿命の延長や (*Nat. Commun.*, 2015:8332-) がん治療の効果が高まること (*Nature* 2019:397-) などが報告されており、生理的・病態生理的に極めて重要な代謝経路である。メチオニンはS-アデノシルメチオニン (SAM) に代謝されることで、DNA やヒストンのメチル化を引き起こす (図1)。DNA やヒストンのメチル化は、エピジェネティックな制御機構において中心的な役割を果たすことから盛んに研究が行われてきた。

研究代表者は、メチル化を受けるタンパク質はヒストンだけではなくにも関わらず、その他のタンパク質のメチル化に関する情報が極めて少ないことに疑問を持ち、主要な脱リン酸化酵素である protein phosphatase 2A (PP2A) のメチル化が果たす役割に関する研究を進めてきた。その中で、①PP2A メチル化が過剰になると PP2A はユビキチン・プロテアソーム分解を受ける (PLoS ONE, 2015)、②PP2A メチル化は一部の PP2A 複合体の形成を促進する (FEBS OpenBio, 2018)、③PP2A メチル化が間葉系幹細胞の脂肪分化を抑制する (J. Biochem. 2020) ことなどを報告していた。これらの研究は、メチル化が PP2A の活性を変化させて生理学的にも重要な役割を果たすことを示唆し、PP2A がメチオニン代謝をリン酸化シグナルへ変換する「ハブ」として機能しているのではないかと、本研究の概念を着想するに至った。



非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) は、飲酒を原因としない脂肪肝 (NAFL) が進行した病態であり、現在推計で世界人口の 3-5% が罹患している。肝硬変や肝臓癌など不可逆的かつ致命的な病態へと進行するリスクが高いことから、治療法の確立が世界的な課題である。しかし現在根治的な治療法がないだけでなく、NAFL から NASH への進行を司る決定的因子も明らかになっていない。マウスではメチオニン減量・コリン欠乏・高脂肪餌で食餌的に NASH モデルを誘導できることから、メチオニン代謝の変化にともなう細胞内シグナルの変化が病態の発症に関与すると考えられる。申請者は、PP2A のメチル化制御が、食餌誘導性 NASH モデルマウスの病態に重要な役割を果たすという予備的知見を得ていた。

2. 研究の目的

本研究課題では、PP2A のメチル化が果たす役割を例として、非ヒストンタンパク質のメチル化にも重要な役割があることを提示し、エピジェネティクスにとどまらないタンパク質メチル化の重要性を提示し、新たな研究領域の創出に寄与することを目的として開始された。具体的には、以下の4つの課題について解析を行った。

- 課題1：食餌誘導性 NASH モデルマウスにおいて、PP2A のメチル化はどのような役割を果たすのか？
- 課題2：PP2A メチル化の異常は、細胞内シグナルにどのような変化をもたらすのか？
- 課題3：PP2A と PME-1 の結合・解離は、どのような分子機構で制御されているのか？
- 課題4：加齢と PP2A メチル化レベルには関係があるのか？

3. 研究の方法

- 課題1：Lcmt1 および Ppme1 の各種遺伝子改変マウスを作製し、NASH モデルの病態に対する影響を解析した。
- 課題2：PME-1 欠損細胞を用いて transcriptome 解析を行い、PP2A メチル化の異常が細胞内シグナルに与える影響を網羅的に解析した。
- 課題3：生細胞における PP2A と PME-1 のタンパク質間結合を発光的に解析する系を樹立し、化合物スクリーニングから PP2A と PME-1 の結合・解離を制御する分子機構を解析した。
- 課題4：カンクイザルの脳組織を用いて、加齢が PP2A メチル化に与える影響を解析した。

4. 研究成果

成果1：食餌誘導性 NASH モデルマウスの病態進行において、PP2A のメチル化が果たす役割とその分子機構を明らかにした。

我々は、研究開始以前の段階で *Lcmt1* floxed マウスを樹立し、ROSA26-CreERT2 マウスと交配することで、タモキシフェン誘導性全身性 *Lcmt1* KO マウスを作製していた。当該マウスを用いた解析から、全身性 *Lcmt1* KO マウスでは食餌誘導性 NASH モデルの病態が変化するという予備的知見を得ていた。本研究期間では、さらに *Ppme1* floxed マウスを作製し、*Lcmt1* floxed マウスとともに、肝実質細胞特異的 (*Alb-Cre*) KO マウスや肝星細胞特異的 (*GFAP-Cre*) KO マウスを作製し解析を行った。論文投稿前であるため詳細は割愛するが、当該 KO マウスおよび培養細胞を用いた解析から、PP2A メチル化の異常が NASH 病態の病態進行に関与すること、およびその分子機構を明らかにした。

成果2：PP2A メチル化レベルの上昇が細胞内シグナルに与える影響に包括的に明らかにした。

PP2A のメチル化の異常が細胞内シグナルに与える影響に関しては、包括的な理解はされていなかった。そこで、野生型および PME-1 KO マウスの胎児線維芽細胞を用いて transcriptome 解析を行った。各種エンリッチメント解析や生化学的解析の結果、PME-1 欠損による PP2A の過剰なメチル化は、NF κ B シグナルや STAT3 シグナルなどの炎症性シグナルの亢進、TGF- β シグナルの低下による間葉上皮転換、PI3K/Akt シグナルの抑制などを引き起こすことが明らかになった。

一連の研究成果は「Transcriptome analysis revealed that PME-1 suppresses inflammatory signaling, activates PI3K/Akt signaling, and promotes epithelial-mesenchymal transition」として、2024 年に *Biochemical and Biophysical Research Communications* に掲載された。

成果3：PP2A と PME-1 の結合を制御する分子機構を解明し、その生物学的意義を明らかにした。

PME-1 には PP2A 脱メチル化酵素としての側面と、PP2A と直接結合して活性を抑制する PP2A 阻害タンパク質としての側面が存在する。我々は以前、脱メチル化酵素としての機能と PP2A 阻害タンパク質としての機能は切り分けられることを報告した (Yabe R et al. *FEBS OpenBio* 2018)。本研究では、PME-1 と PP2A の結合・解離がどのように制御されているか、またその生物学的意義はなにかを明らかにするため、生細胞内のタンパク質間結合 (PPI) を発光的に解析できる NanoBiT システム (Promega 社) を用いた。すなわち、PME-1 と PP2A が結合するとルシフェラーゼが再構築されて細胞が発光する (図2)。

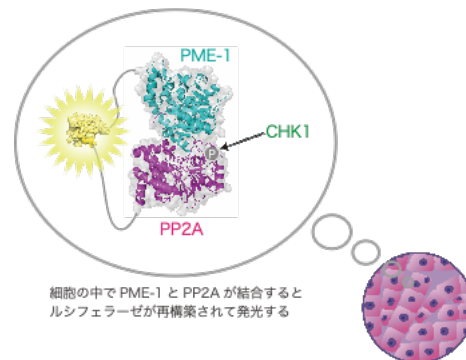


図2 NanoBiT システムを用いた PP2A と PME-1 のタンパク質間結合の解析

化合物スクリーニングを行い、発光強度に影響を与える化合物を網羅的に解析したところ、CHK1 阻害剤 SB218078 がヒットした。詳細な解析から、CHK1 は PP2A の Thr219 を含む複数のアミノ酸をリン酸化することで、PP2A と PME-1 の結合を促進することが明らかになった。一方、*in vitro* phosphatase アッセイから、PP2A は CHK1 を直接脱リン酸化すること、PME-1 がこれを阻害することが明らかになった。CHK1 阻害剤はがん細胞のコロニー形成能を抑制するが、PME-1 発現を抑制すると、細胞の CHK1 阻害剤に対する感受性が増強された。また、UV 刺激による CHK1 リン酸化レベルの増加も、PME-1 発現抑制により遅延することが明らかになった。以上の結果から、CHK1 は PP2A をリン酸化して PME-1 による PP2A 活性阻害を誘導すること、これは静止レベルでの CHK1 活性の維持や UV 刺激時の迅速な応答に寄与していることが明らかになった。

一連の研究成果は「The luciferase-based *in vivo* protein-protein interaction assay revealed that CHK1 promotes PP2A and PME-1 interaction」として、2024 年に *Journal of Biological Chemistry* に掲載された。

成果4：カニクイザルの脳では、加齢に伴い PP2A メチル化レベルが低下していくことを明らかにした。

我々は、PP2A がメチル化を受けると PP2A-B55 複合体が形成されることを報告してきた (Yabe R et al. *FEBS OpenBio* 2018)。PP2A-B55 複合体の減少は、アルツハイマー病 (AD) の一因である tau の過剰なリン酸化を引き起こすため、PP2A メチル化レベルの低下は AD の

発症・悪性化の一因になると考えられている。カニクイザルは霊長類であり、加齢による tau のリン酸化レベルの上昇が観察されるなど、脳の老化研究において有用なモデルである。我々は、2歳から43歳までのカニクイザルを用いて、加齢によって脳の PP2A メチル化レベルが低下することを報告した。このことは、老化にともなう脳の PP2A メチル化レベルの低下が、AD 発症の一因になっている可能性を示唆する。

一連の研究成果は「Age-related alterations in protein phosphatase 2A methylation levels in brains of cynomolgus monkeys: a pilot study」として、2023年に Journal of Biochemistry に掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ando Sana, Sakurai Masashi, Shibutani Shusaku, Kimura Nobuyuki, Shimosawa Nobuhiro, Yasutomi Yasuhiro, Yabe Ryotaro, Ohama Takashi, Sato Koichi	4. 巻 173
2. 論文標題 Age-related alterations in protein phosphatase 2A methylation levels in brains of cynomolgus monkeys: a pilot study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 435 ~ 445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 KITAMURA Nao, OHAMA Takashi, SATO Koichi	4. 巻 85
2. 論文標題 Protein phosphatase 6 promotes transforming growth factor- signaling in mouse embryonic fibroblasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1319 ~ 1323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.23-0380	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 -
1. 著者名 Ikeda Shunta, Sato Koichi, Ohama Takashi	4. 巻 692
2. 論文標題 Transcriptome analysis revealed that PME-1 suppresses inflammatory signaling, activates PI3K/Akt signaling, and promotes epithelial-mesenchymal transition	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149148 ~ 149148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.149148	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 -
1. 著者名 Ando Sana, Tanaka Keiko, Matsumoto Maharu, Oyama Yuki, Tomabechi Yuri, Yamagata Atsushi, Shirouzu Mikako, Nakagawa Reiko, Okimoto Noriaki, Taiji Makoto, Sato Koichi, Ohama Takashi	4. 巻 Apr 6
2. 論文標題 The luciferase-based in vivo protein-protein interaction assay revealed that CHK1 promotes PP2A and PME-1 interaction.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 107277 ~ 107277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2024.107277	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takashi Ohama
2. 発表標題 The role of PME-1 as a PP2A methyl-esterase and a PP2A inhibitory protein
3. 学会等名 FASEB The Protein Phosphatase Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sana Ando
2. 発表標題 CHK1 promotes PP2A and PME-1 association through the phosphorylation of PP2Ac
3. 学会等名 The 5th Japan-Taiwan Bilateral Conference on Protein Phosphatase (国際学会)
4. 発表年 2024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
---------	---------