

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月22日現在

機関番号：17401  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23710226  
 研究課題名（和文）  
 栄養環境依存性ヒストン脱メチル化酵素による肥満エピゲノム形成機序の研究  
 研究課題名（英文）The role of nutrition-sensitive histone demethylase in the formation of obesity-associated epigenome  
 研究代表者  
 日野 信次郎（HINO SHINJIRO）  
 熊本大学・発生医学研究所・助教  
 研究者番号：00448523

## 研究成果の概要（和文）：

若齢期の生活習慣が後年の肥満リスクにどのように影響を及ぼすかは未解明である。本課題では、過栄養状態が長期的な代謝に及ぼす影響を遺伝子制御のレベルで明らかにした。遺伝子制御分子 LSD1 が栄養状況に応じて機能する仕組みを明らかにしたとともに、その阻害薬剤がミトコンドリア機能向上に役立つことを発見した。これらの知見は肥満のみならず、環境因子と疾患の関係を考える重要なヒントになると考えられる。

## 研究成果の概要（英文）：

To date, we do not know how dietary habit in childhood affects the development of obesity later in life. We identified that LSD1, a gene regulator, controls the cellular metabolism in response to the energy overload. Our findings provide important clues for understanding how environmental factors influence the disease risks.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：エピジェネティクス

科研費の分科・細目：ゲノム科学、ゲノム医科学

キーワード：エピジェネティクス、ヒストン脱メチル化、エネルギー代謝、肥満

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 国内外の研究動向について

生体内におけるエネルギー恒常性は、神経・内分泌などの中枢制御系や肝、筋及び脂肪等の末梢組織において、遺伝子発現のレベルで精密に維持されている。肥満に伴う遺伝子発現制御の異常はエネルギー恒常性の破綻を引き起こし、糖尿病や循環器疾患などのメタボリックシンドロームのリスクを増大させる。これら疾患において、特に末梢組織におけるミトコンドリア好気呼吸関連遺伝子の発現低下がエネルギーバランスの破綻

の原因となっているが、最近の研究で、これらの遺伝子が DNA メチル化依存的に不活性化されていることが示されている。胎生期や若齢期の栄養環境が後年のメタボリックリスクに反映されることと合わせて考えると、エピジェネティックな機序による長期的な遺伝子発現変化が代謝疾患の土台を形成している可能性が推察される。近年、癌をはじめとする様々な疾患において固有のエピジェネティクス制御異常が見出されており、疾患エピゲノムの概念が確立されつつあるが、正常な代謝エピゲノムが肥満エピゲノムへと転換されるプロセスはほとんど解明され

ていない。

## (2) 応募者のこれまでの研究成果を踏まえた着想

上記の状況を踏まえ、ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 に注目して研究を進めてきた。LSD1 は、細胞内エネルギー代謝の重要な仲介因子である flavin adenine dinucleotide (FAD) を補酵素として必要とすることから、細胞内エネルギー状況に応じた FAD 産生の変化と LSD1 機能が共役してエピゲノム制御に貢献していると仮定して研究を進めた。応募者はこれまでの研究において、LSD1 が脂肪組織において重要なエネルギー代謝調節因子としてはたらいっていることを明らかにした。LSD1 はヒストン H3 リジン 4 (H3K4) を脱メチル化することによって好気呼吸関連遺伝子の発現を抑制しており、siRNA や阻害剤を用いて LSD1 の機能を抑制すると細胞内脂肪の分解やミトコンドリア好気呼吸の活性化が認められた。興味深いことに、LSD1 によるエネルギー消費抑制作用は肥満マウス脂肪組織において顕著に認められたが、正常マウスでは観察されなかった。さらに LSD1 阻害剤 tranilcypromine を高脂肪食給与マウスに投与することにより、肥満発症を抑止できることを明らかにした。また、脂肪細胞の成熟や脂質負荷といった細胞内脂肪蓄積が亢進する条件下で細胞内 FAD 量が上昇することを明らかにした。以上の点から、FAD/LSD1 経路は栄養環境依存的な代謝エピゲノム形成や、その結果として誘導されるメタボリックリスクに関与しうる有力な分子機構を担っていると考察し、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

上記の仮説を踏まえて、下記の項目を解明する目的で、研究を計画した。

### (1) 代謝メモリー形成と肥満発症を繋ぐ LSD1 の機能

栄養環境が LSD1 機能にどのような影響を与えるかを、LSD1 遺伝子発現制御、LSD1 タンパク質複合体形成の観点から明らかにする。

### (2) FAD 依存的 LSD1 活性化とエネルギー

## 一代謝調節

細胞内 FAD 合成の変化が LSD1 依存的エネルギー代謝制御にどのような影響を及ぼすかを明らかにする。

### (3) LSD1 阻害剤による肥満エピゲノムの転換

一度構築された肥満エピゲノムが種々の LSD1 阻害剤により転換できるか検討し、LSD1 阻害剤の作用点解明や治療標的としての評価を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) 代謝メモリー形成と肥満発症を繋ぐ LSD1 の機能

LSD1 による肥満エピゲノム調節の過程で、環境要因、特に過栄養状態が LSD1 遺伝子の発現調節に寄与している可能性が考えられる。そこで、様々な、代謝ストレス下で LSD1 遺伝子発現がどのように変化するか検討した。また、LSD1 遺伝子プロモーターを用いたレポーター解析により、代謝状況依存的発現を担う DNA 配列を同定することを試みた。

LSD1 がエネルギー代謝遺伝子を制御している点はこれまでに明らかにしたが、LSD1 は DNA 結合能をもたないことから、標的遺伝子が規定される機構は不明である。また、栄養環境依存的 LSD1 機能は、FAD 利用性だけでなく、協働する転写因子や調節因子の離合によって決定されている可能性が考えられる。この点を明らかにする目的で、LSD1 共役因子の同定を試みた。栄養状況に応じてホルモンやサイトカイン等の代謝刺激により活性化・不活性化されるさまざまな転写因子について、LSD1 との相互作用を培養脂肪細胞を用いて検討した。それらの分子の LSD1 との相互作用や標的遺伝子発現制御について検討した。

### (2) FAD 依存的 LSD1 活性化とエネルギー代謝調節

LSD1 の分子機能が実際に細胞内 FAD 利用性に依存しているか検討した。細胞内 FAD は、特異的トランスポーターを介して取り込まれたリボフラビンが riboflavin kinase

(RFK) 及び FAD synthetase (FADS) に代謝されることにより合成される。これらの分子の発現を特異的 siRNA を用いて阻害した条件下で細胞内 FAD 量の変化や LSD1 標的遺伝子発現を解析した。また、FAD 合成阻害下で LSD1 の遺伝子発現調節機能が直接影響を受けるかを GAL4-LSD1 レポーター試験により検討した。この際、FAD 結合部位に変異をもつ LSD1 を併用することで、FAD/LSD1 相互作用の遺伝子発現制御における重要性を検証した。同様に、リボフラビン取り込み阻害剤 lumiflavin を用いた FAD 合成阻害実験も併せて行った。

### (3) LSD1 阻害剤による肥満エピゲノムの転換

先述のように、LSD1 阻害活性をもつ化合物 tranilcypromine (TC) がマウスにおいて抗肥満活性を有し、エネルギー消費遺伝子を活性化することを見出している。一方で、TC 投与により一度形成された肥満エピゲノムを転換し代謝改善を誘導できるかは不明であり、この点を明らかにすることが LSD1 機能の正確な理解や新規治療法開発に向けて重要である。また、TC は神経伝達物質の代謝に関わるモノアミンオキシダーゼに対しても阻害活性を有することから、特異性を高めた阻害剤を用いた検証も必要である。そこで、本研究では TC 及び新規の高特異性 LSD1 阻害化合物群を用いてエピゲノム転換とそれに伴う代謝改善効果を検討した。培養細胞を用いて各阻害剤がミトコンドリア好気呼吸に及ぼす影響を調べた。LSD1 標的遺伝子発現に及ぼす影響も合わせて検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 代謝メモリー形成と肥満発症を繋ぐ LSD1 の機能

LSD1 が肥満環境においてどのように機能するかを検討する目的で、肥満関連刺激を施した脂肪細胞における LSD1 の mRNA/タンパク質発現変化を検討した。LSD1 発現は高グルコース負荷時に低グルコース負荷時と比較して有意に上昇したが、炎症性サイトカ

イン処理では変化はなかった。一方、LSD1 の抑制標的であるエネルギー消費遺伝子群は、インスリン刺激下で発現が低下したが、LSD1 阻害下ではその効果は認められなかった。以前に見出した、肥満マウス由来の脂肪組織で LSD1 がエネルギー消費遺伝子の発現を抑制する点と合わせて考えると、LSD1 は過栄養負荷・取り込みに応答して発現上昇、活性化され、エネルギー消費を抑えることが示唆された。また、LSD1 遺伝子プロモーターの機能解析を行ったところ、転写開始点近傍に脂肪細胞における発現を規定する領域があることを見出した。さらに、LSD1 タンパク質と相互作用する転写因子をいくつか同定した。

### (2) FAD 依存性 LSD1 活性化とエネルギー代謝調節

代謝状況に応じた FAD 量の変動が LSD1 によるエネルギー代謝調節の上流刺激である可能性を推察し、検証した。3T3-L1 脂肪細胞を用いて FAD 合成酵素遺伝子を RNAi 法にてノックダウンし、遺伝子発現変化を網羅的に解析したところ、LSD1 による抑制標的であるエネルギー消費遺伝子群の発現が上昇していた。また、FAD 結合部位に変異を導入した変異型 LSD1 を用いてレポーター遺伝子試験を行ったところ、転写抑制機能の著明な低下が認められた。これらのことから、低 FAD 条件下では LSD1 酵素活性が低下し、標的遺伝子の脱抑制が生じていた可能性が示唆された。

また、GAL4-LSD1 融合タンパク質を用いたレポーター遺伝子試験において、LSD1 依存的転写抑制作用が、FAD 合成を阻害する化合物 lumiflavin 処理によって消失した (図 1)。また、lumiflavin 処理下において、LSD1 mRNA 発現は変化しなかったが、タンパク質量は減少した。これらの点から、LSD1 による遺伝子制御機能は細胞内 FAD 合成に強く依存しており、低 FAD 濃度下では LSD1 タンパク質の不安定化または翻訳抑制が惹起される可能性が示唆された。

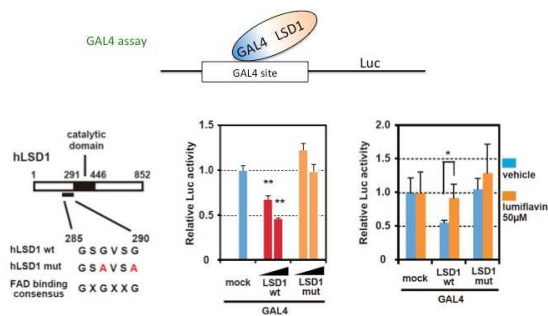


図 1. LSD1 による遺伝子制御と FAD 合成系の共役

### (3) 選択的 LSD1 阻害剤によるエネルギー代謝転換

これまでに LSD1 阻害活性を有する化合物 *tranylcypromine* が LSD1 標的エネルギー消費遺伝子群の発現を誘導すること、マウスにおいて抗肥満活性を有することを明らかにした。本課題では、より選択性の高い化合物を用いて LSD1 阻害とエネルギー代謝転換について検証した。この結果、いくつかの選択的阻害剤が強力にエネルギー消費遺伝子発現を誘導すること、ミトコンドリア呼吸を活性化することを明らかにした。また、マイクロアレイ解析により、本試験で用いた化合物が *tranylcypromine* と比較して際立って LSD1 に対する選択性が高いことがわかった。これらのことは、LSD1 活性阻害がミトコンドリア機能向上に有用である可能性を示唆している。

本課題ならびに代表者がこれまでに得た知見から、LSD1 は過栄養状況を感じて余剰エネルギーを脂肪細胞に蓄積させる、代謝プログラミング因子であることが示唆された (図 2)。この成果は、環境とエピジェネティクス機構の相互作用や、生活習慣関連疾患の分子機序を考える上で重要な知見であると考えられる。

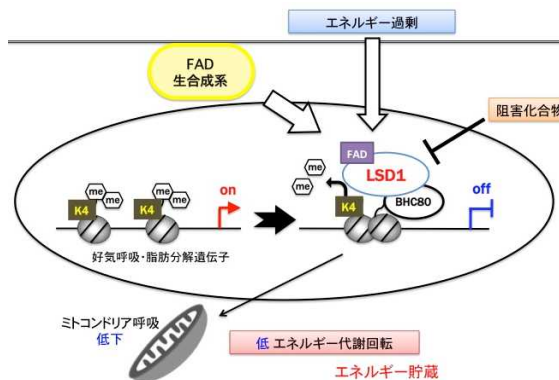


図 2. LSD1 によるエネルギー代謝調節機構

### 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 日野信次郎 「エネルギー代謝とエピジェネティクスのクロストーク 環境適応から代謝プログラミングへ」 シグマライフサイエンスニュース 2012 Winter: 15-18. 査読無

② Hino S.\*, Sakamoto A., Nagaoka K., Anan K., Wang Y., Mimasu S., Umehara T., Yokoyama S., Kosai K. and Nakao M.\* (\*corresponding authors) FAD-dependent lysine demethylase LSD1 regulates cellular energy expenditure. Nature Commun. 3: Article No.758, 2012. 査読有

③ Watanabe T., Ishihara K., Hirose A., Watanabe S., Hino S., Ojima H., Kanai Y., Sasaki Y. and Nakao M. Higher-order chromatin regulation and differential gene expression in human TNF/LT locus in hepatocellular carcinoma cells. Mol. Cell. Biol. 32: 1529-1541, 2012. 査読有

④ 富田さおり、笹井信広、日野信次郎、中尾光善「エピゲノム修飾を標的としたがん治療ポテンシャル」日本臨床「分子標的薬 -がんから他疾患までの治療をめざして-」70 (8): 91-97, 2012. 査読無

⑤ 坂元顕久、長岡克弥、阿南浩太郎、中尾光善、日野信次郎「癌代謝とエピジェネティクス」実験医学 29:2231-2235, 2011. 査読無

〔学会発表〕(計8件)

①日野信次朗「代謝メモリーの基盤となるエピジェネティクス制御機構」発生過程におけるエネルギー代謝を考える会・第2回研究会議 2013年2月21日 愛知県岡崎市 基礎生物学研究所

②Hino S., Sakamoto A., Nagaoka K., Anan K., Takase R. and Nakao M. Epigenetic Regulation of Cellular Energy Flow by FAD-dependent LSD1. 第85回日本生化学会大会(シンポジウム: Networks of transcription and metabolism: physiology, diseases, and structural basis) 2012年12月15日 福岡県福岡市 福岡国際会議場

③日野信次朗、坂元顕久、長岡克弥、阿南浩太郎、高瀬隆太、中尾光善「細胞のエネルギー戦略とエピジェネティクス」第35回日本分子生物学会年会(ワークショップ: 生命現象をエネルギー代謝から理解する) 2012年12月12日 福岡県福岡市 福岡国際会議場

④日野信次朗 「FAD 依存性ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 によるエネルギー代謝調節」第6回日本エピジェネティクス研究会年会(平成24年度奨励賞受賞講演) 2012年5月15日 東京都千代田区 学術総合センター

⑤Nakao M., Hino S. (演者) and Ishihara K. Epigenetic cell regulation and deregulation by chromatin factors. 第34回日本分子生物学会年会(シンポジウム: Static and dynamic states of the epigenome-maintenance, establishment, and reprogramming) 2011年12月15日 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜

⑥日野信次朗「FAD 依存性脱メチル化酵素によるエネルギー代謝制御」第12回 Wako つくばフォーラム「転写と代謝のクロストーク」 2011年11月29日 茨城県つくば市 筑波和光ホール

⑦日野信次朗、坂元顕久、長岡克弥、阿南浩太郎、中尾光善「脂肪細胞のエネルギー戦略に関わるエピジェネティクス機構」第32回日本肥満学会(シンポジウム: 脂肪細胞生物

学の最前線) 2011年9月23日 兵庫県淡路市 淡路夢舞台

⑧日野信次朗、坂元顕久、長岡克弥、中尾光善「肥満におけるエネルギー代謝のエピジェネティック制御機構」第84回日本内分泌学会学術総会(ミニシンポジウム: 内分泌学におけるエピジェネティクス) 2011年4月21日 兵庫県神戸市 神戸国際会議場

〔図書〕(計3件)

①長岡克弥、日野信次朗、中尾光善「栄養・エネルギー代謝にかかわるエピジェネティクス制御」Annual Review 2013 糖尿病・代謝・内分泌 178-184 中外医学社 2013.

②日野信次朗、中尾光善「エピジェネティック制御」イラストで徹底理解するシグナル伝達キーワード事典 327-334 羊土社 2012.

③中尾光善、日野信次朗「エピジェネティクス機構による代謝制御と病態」栄養とエピジェネティクス 63-73 建帛社 2012.

〔その他〕

ホームページ等

熊本大学プレスリリース

[http://www.kumamoto-u.ac.jp/daigakujouhou/kouhou/pressrelease/2011\\_file/release120328.pdf](http://www.kumamoto-u.ac.jp/daigakujouhou/kouhou/pressrelease/2011_file/release120328.pdf)

日経バイオテク オンライン版掲載

<https://bio.nikkeibp.co.jp/article/news/20120328/160244/>

熊本日日新聞掲載

<http://qq.kumanichi.com/medical/2012/03/post-1933.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日野 信次朗 (HINO SHINJIRO)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号: 00448523