

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 25 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2015

課題番号：26713033

研究課題名(和文) 転写調節因子CITED2による摂食依存的な肝臓の糖脂質代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification of the mechanisms underlying transcriptional cofactor CITED2-mediated regulation of feeding state-dependent metabolic gene expression in the liver

研究代表者

酒井 真志人(Sakai, Mashito)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：40643490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：転写調節因子CITED2による摂食サイクル依存的な肝臓の代謝関連遺伝子の発現制御機構を解析し、ヒストンアセチル基転移酵素GCN5はCITED2依存性にPKAと相互作用すること、絶食時にPKAによってGCN5 Ser275がリン酸化されること、リン酸化GCN5によって絶食時の糖新生系酵素発現が誘導されることが明らかとなった。また、肥満糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスの肝臓ではGCN5リン酸化が亢進しているが、GCN5-CITED2-PKAモジュールの形成を阻害すると肝糖新生が抑制されることから、本モジュールは糖尿病における肝糖新生の亢進の治療ターゲットとなりうることを示された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanisms by which the transcriptional cofactor CITED2 regulates feeding state-dependent metabolic gene expression in the liver and found that (1) the histone acetyltransferase GCN5 interacts with PKA in a CITED2-dependent manner, (2) PKA phosphorylates GCN5 at Ser275 during fasting, and (3) phosphorylated GCN5 promotes gluconeogenic gene induction. Therefore, the GCN5-CITED2-PKA module functions as an essential regulator of gluconeogenesis. Hepatic GCN5 phosphorylation was significantly higher in obese insulin-resistant db/db mice; disruption of the GCN5-CITED2-PKA module by CITED2 depletion reduced gluconeogenic gene expression and hyperglycemia in these mice. Inhibiting GCN5-CITED2-PKA module formation may be the therapeutic target for accelerated hepatic gluconeogenesis in diabetes.

研究分野：代謝学

キーワード：糖尿病 遺伝子転写 転写共役因子 ヒストンアセチル基転移酵素

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝臓の様々な代謝酵素遺伝子の発現は摂食状態に応じて主にホルモンにより遺伝子転写レベルで制御され、糖脂質代謝の恒常性を維持している。一方、糖尿病では、摂食サイクル依存的な遺伝子発現調節システムが破綻し、肝臓の脂質合成系および糖新生系酵素遺伝子の発現の病的亢進が脂肪肝と高血糖の原因となる。遺伝子転写の活性化には、ヒストンアセチル基転移酵素(HAT)依存性のヒストンアセチル化によるクロマチン構造変化が中心的な役割を果たすが、ヒストン以外の基質のアセチル化も転写調節に重要である。例えば糖新生系酵素遺伝子の発現誘導に重要な転写コアクチベーターであるPGC-1の活性はアセチル化によって抑制される。このようにHATは遺伝子転写調節に重要な役割を果たすが、HATによるヒストンを含む複数の基質のアセチル化が、摂食サイクルに応じて合目的に調節されるメカニズム、またHAT機能調節メカニズムの破綻が疾患の発症にどのように関与するのかについては不明であった。

2. 研究の目的

我々は転写調節因子CITED2(CBP/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 2)がHATとして知られるGCN5と相互作用し、GCN5によるPGC-1のアセチル化を抑制して活性化し肝臓の糖新生を増加させることを報告した(Sakai et al. Nature Medicine 2012)。CITED2は複数のHATと相互作用してその作用を調節する。そこで、肝臓におけるCITED2による摂食サイクル依存性のHAT機能調節メカニズムと、その遺伝子発現調節に果たす役割を明らかにするために本研究をおこなった。

3. 研究の方法

CITED2が肝臓における摂食サイクル依存的な代謝関連遺伝子の発現調節に果たす役割とそのメカニズムを明らかにするために、以下の方法で研究をおこなった。

(1) マウスにおけるCITED2の機能獲得/欠損による代謝表現型の解析

CITED2およびCITED2 shRNAを発現するアデノウイルスを用いて、通常マウス、糖尿病モデルマウスの肝臓におけるCITED2の強発現/ノックダウンをおこない、代謝表現型を解析した。またCITED2と相互作用するHATであるGCN5をCITED2と共発現、もしくはノックダウンした際の効果についても検討した。

(2) 肝臓および初代培養肝細胞でCITED2によって発現調節される遺伝子の同定

CITED2を強発現あるいはノックダウンしたマウスの肝臓からRNAを抽出しcDNA Microarray、定量的PCRで遺伝子発現解析をおこなった。また、CITED2を強発現ある

いはノックダウンしたマウスの初代培養肝細胞を、グルカゴンのセカンドメッセンジャーであるcAMPもしくは、高グルコース(25mM)およびインスリンで刺激した後RNAを抽出し、cDNA Microarray、定量的PCRにより遺伝子発現解析をおこなった。GCN5を共発現、ノックダウンした際の、遺伝子発現に対する効果も検討した。

(3) CITED2によるHAT機能調節メカニズムの解明

CITED2の転写部位へのHATのリクルートメントに対する効果

CITED2がCBP、GCN5といったHATのゲノム上へのリクルートメントに与える効果を、CITED2を強発現もしくはノックダウンした初代培養肝細胞を用いたChIP(クロマチン免疫沈降)解析で検討した。

CITED2によるGCN5活性調節作用の解析

これまでの検討からCITED2はGCN5の活性や基質指向性を調節する可能性があると考えられたため、CITED2を強発現あるいはノックダウン/ノックアウトした肝細胞からGCN5を免疫沈降し、*in vitro*でアセチル化活性を測定することでCITED2によるGCN5活性の調節作用を解析した。

CITED2とGCN5に対する摂食サイクル依存性の調節機構

CITED2のGCN5に対する作用の摂食サイクル依存的な調節機構を解明するために、CITED2とGCN5へのインスリン・グルカゴンの効果を検討した。

(4) CITED2のエピゲノム修飾への効果

CITED2がその標的遺伝子のプロモーターにおけるエピゲノム修飾およびプロモーターへの転写因子の誘導に与える効果を、CITED2を強発現もしくはノックダウンした初代培養肝細胞を用いたChIP解析によって検討した。

4. 研究成果

転写調節因子CITED2と相互作用するHATであるGCN5の肝糖新生における機能、CITED2によるGCN5機能の調節メカニズムを検討し、CITED2が絶食時にPKA(protein kinase A)依存性のGCN5のリン酸化を促進することで、糖新生系酵素遺伝子の発現を誘導することが明らかとなった。

(1) GCN5の肝糖代謝における機能

GCN5は、GNATファミリーに属するHATであり、ヒストンアセチル化を介した遺伝子転写の活性化に関与するが、肝糖新生へのその関与は未だ不明であった。そこで、肝糖新生調節におけるGCN5のHATとしての役割を明らかにするために、*in vitro*, *in vivo*

における機能欠損/獲得実験などにより検討した。

マウスの肝臓における GCN5 のノックダウンによって絶食時の糖新生系酵素の発現が低下し、空腹時血糖値ならびに肝糖新生能の指標であるピルビン酸負荷時の血糖値の上昇が低下した。また肥満糖尿病モデルマウスである db/db マウスの肝臓では GCN5 の発現が著明に亢進していたが、GCN5 のノックダウンによって糖新生系酵素の発現が抑制された。培養肝細胞において cAMP 処理、PGC-1 強発現、CITED2 強発現はいずれも糖新生系酵素遺伝子の発現ならびに糖産生を誘導するが、これらは GCN5 のノックダウンにより抑制された。また肝細胞の網羅的な遺伝子発現解析から、GCN5 のノックダウンによって減少する遺伝子の多くが、PGC-1 あるいは CITED2 のノックダウンによって減少する絶食応答遺伝子であった。これらの結果から GCN5 は肝細胞において糖新生系遺伝子を含めた絶食応答遺伝子の発現誘導に必須であることが明らかとなった。

糖新生系酵素遺伝子プロモーターにおけるヒストンのアセチル化における GCN5 の関与を ChIP 解析により検討した。cAMP 刺激によって GCN5 はプロモーター上に誘導され、そのターゲットであるヒストン H3K9 のアセチル化も cAMP 刺激によって増強した。ヒストン H3K9 のアセチル化は転写の活性化に重要なヒストン修飾であるが、GCN5 の KD によってこれらの遺伝子プロモーターにおける cAMP 依存性のヒストン H3K9 アセチル化が抑制されたことから、GCN5 の HAT 活性の重要性が示唆された。実際 GCN5 の強発現は、肝臓における cAMP/CITED2 依存性の糖新生系酵素遺伝子の発現をさらに大きく増加させたが、この効果はアセチル化酵素活性を欠損する変異体である GCN5 AT にはみられなかったことから、GCN5 のアセチル化酵素活性は糖新生系酵素の発現誘導に必須であることが明らかとなった。

(2) CITED2 による GCN5 機能調節メカニズム

GCN5 のアセチル化酵素活性が重要であることが明らかとなったため、GCN5 の酵素活性調節メカニズムを、抗 GCN5 抗体免疫沈降産物中のアセチル化活性をヒストン H3 および PGC-1 を基質とする *in vitro* HAT assay によって検討した。GCN5 によるヒストン H3 アセチル化活性は CITED2 強発現によって増加し、この効果は cAMP 刺激によってさらに増強した。一方、GCN5 の PGC-1 に対するアセチル化は CITED2 によって抑制された。この結果から絶食時のような cAMP/CITED2 の存在下では、GCN5 の HAT 活性の増加と PGC-1 のコアクチベーター活性の増加が協調的に糖新生系酵素の発現を誘導することが示唆された。

GCN5 が cAMP 刺激によって活性化することから、PKA によってリン酸化される可能

性を考え、cAMP 刺激時の PKA モチーフのリン酸化を検討した。GCN5 は cAMP 刺激時に、その PKA モチーフがリン酸化されること、そのリン酸化は CITED2 の強発現によって増強し、CITED2 のノックダウンによって減弱することが明らかとなった。さらに GCN5 と PKA の相互作用を共沈実験によって検討した。GCN5 は PKA の catalytic subunit である PKAC と、CITED2 依存性に相互作用した。

cAMP/CITED2 依存性の GCN5 の HAT 活性の増加は、PKA をノックダウンすると消失したことから、PKA によるリン酸化が GCN5 の活性調節に重要と考えられたため、PKA による GCN5 のリン酸化部位を検討し、Ser275 を同定した。

GCN5 の恒常的リン酸化変異体である GCN5 S275D は HAT 活性が増強し、PGC-1 アセチル化活性は減少していた。次に GCN5 Ser275 リン酸化の糖新生系酵素の発現誘導に対する効果を検討した。GCN5 の恒常的非リン酸化変異体である GCN5 S275A は野生型 GCN5 との比較で、cAMP 刺激時の糖新生系酵素の発現誘導の増強作用が減弱しており、逆に GCN5 S275D は増強していることから、GCN5 Ser275 リン酸化は糖新生系酵素の発現誘導を促進すると考えられた。

以上の結果から、GCN5 は CITED2 依存性に PKA と相互作用し、GCN5-CITED2-PKA モジュールを形成していること、絶食時にはグルカゴンのセカンドメッセンジャーである cAMP によって、CITED2 依存性に GCN5 と相互作用している PKA が活性化し、GCN5 がリン酸化されること、リン酸化した GCN5 の PGC-1 アセチル化活性は減少、ヒストンアセチル化活性は増加し、アセチル化の抑制による PGC-1 コアクチベーター活性の増加とヒストンアセチル化の増加が協調的に絶食時の糖新生系酵素遺伝子発現を強く誘導することが明らかとなった。

さらに GCN5-CITED2-PKA モジュールの生理学的・病態生理学的役割について解析した。マウスの肝臓で絶食時に GCN5 のリン酸化は増強した。また、肥満糖尿病モデルマウスである高脂肪食負荷マウス、db/db マウスの肝臓では GCN5 Ser275 のリン酸化が亢進していた。db/db マウスの肝臓で CITED2 をノックダウンすることによって GCN5-CITED2-PKA モジュールの形成を阻害すると、GCN5 のリン酸化は強く抑制され、db/db マウスの肝臓における糖新生系酵素遺伝子の発現増加と高血糖が大きく改善した。以上の結果から GCN5-CITED2-PKA モジュールは糖尿病における肝糖新生の亢進の治療ターゲットとなりうることが示された。

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)

〔学会発表〕(計15件)

松本 道宏、酒井 真志人
「GCN5-CITED2-PKA モジュールを介した肝糖新生制御メカニズム」第38回日本分子生物学会(2015年12月3日神戸)

Mashito Sakai, Masato Kasuga, Michihiro Matsumoto「The histone acetyltransferase GCN5 regulates hepatic gluconeogenesis through CITED2-dependent substrate switch」The 8th Asia-Oceania Conference on Obesity(2015年10月3日名古屋)

酒井 真志人「CITED2-GCN5 複合体による肝糖新生制御機構の解明」第33回内分泌代謝サマーセミナー(2015年7月10日柳川)

松本 道宏、酒井 真志人、八木 孝「肝臓における糖代謝調節の分子機構」第58回日本糖尿病学会年次学術集会(2015年5月23日下関)

酒井 真志人、辻村-早川 知子、山地 大介、八木 孝、満島 勝、矢野 宏行、春日 雅人、松本 道宏「CITED2-GCN5 複合体による肝糖新生調節機構の解明」第58回日本糖尿病学会年次学術集会(2015年5月21日下関)

酒井 真志人、辻村-早川 知子、山地 大介、八木 孝、満島 勝、矢野 宏行、春日 雅人、松本 道宏「CITED2-GCN5 複合体による肝糖新生調節機構の解明」第88回日本内分泌学会学術総会(2015年4月24日東京)

酒井 真志人、辻村-早川 知子、山地 大介、八木 孝、満島 勝、矢野 宏行、春日 雅人、松本 道宏「CITED2-GCN5 複合体による肝糖新生制御機構の解明」第52回日本臨床分子医学会学術集会(2015年4月10日)

酒井 真志人、辻村-早川 知子、山地 大介、八木 孝、満島 勝、矢野 宏行、春日 雅人、松本 道宏「CITED2-GCN5 複合体による肝糖新生調節機構の解明」第29回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会(2015年2月13日)

酒井 真志人、辻村-早川 知子、山地 大介、八木 孝、満島 勝、矢野 宏行、春日 雅人、松本 道宏「CITED2-GCN5 複合体による肝糖新生制御機構の解明」冬の若手ワークショップ2015(2015年2月5日)

酒井 真志人、辻村 知子、山地 大介、八木 孝、満島 勝、矢野 宏行、春日 雅人、松本 道宏「CITED2-GCN5 複合体による肝糖新生調節機構の解明」第26回分子糖尿病学シンポジウム(2014年12月6日)

酒井 真志人、辻村-早川 知子、山地 大介、八木 孝、矢野 宏行、満島 勝、春日 雅人、松本 道宏「ヒストンアセ

チル化酵素 GCN5 による肝臓の糖新生調節機構の解明」第29回日本糖尿病合併症学会(2014年10月4日東京)

Mashito Sakai, Masato Kasuga, Michihiro Matsumoto「Histone acetyltransferase GCN5 regulates hepatic gluconeogenesis through CITED2-dependent substrate switch」9th Metabolic syndrome, Type2 Diabetes and Atherosclerosis Congress (MSDA)(2014年9月13日京都)

酒井 真志人、辻村 知子、山地 大介、八木 孝、春日 雅人、松本 道宏「ヒストンアセチル化酵素 GCN5 による肝臓の糖新生調節機構の解明」第57回日本糖尿病学会年次学術集会(2014年5月24日大阪)

酒井 真志人、春日 雅人、松本 道宏「CITED2-GCN5 複合体による肝糖新生調節機構の解明」第87回日本内分泌学会学術総会(2014年4月25日福岡)

酒井 真志人、辻村 知子、山地 大介、八木 孝、春日 雅人、松本 道宏第51回日本臨床分子医学会学術集会(2014年4月11日)

〔図書〕(計2件)

松本 道宏、酒井 真志人、八木 孝、中外医学社、Annual review. 糖尿病・代謝・内分泌、2016、21-29

松本 道宏、酒井 真志人、メディカルレビュー社、The Lipid[インスリン・グルカゴンと飢餓応答]、2015、14-21

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 真志人 (SAKAI, Mashito)

国立国際医療研究センター研究所・糖尿病研究センター・分子代謝制御研究部・室長

研究者番号：40643490