

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26882008

研究課題名(和文) エネルギー代謝における転写因子複合体形成と遺伝子発現制御

研究課題名(英文) Transcription factor complex formation and gene expression control in energy metabolism

研究代表者

韓 松伊 (HAN, SONGIEE)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：80729541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：CREBHは肝臓、小腸にのみ発現する転写因子である。CREBHはPPAR、PGC-1 と結合し、FGF21の発現を上昇させた。また、CREBHはSREBPとも結合し、SREBPの転写活性を抑制する。この結果CREBHは脂肪酸・コレステロール合成を抑制した。CREBHはPPAR およびSREBPなどのように転写因子間クロストークからエネルギー代謝の恒常性を制御し生活習慣病を改善する新たな因子であることを明らかにした。また、CRISPR/Cas9システムを用いCREBH組織特異的なKOマウスを作成し、CREBHの欠損が非アルコール性脂肪肝の発症に関わることを見出した。

研究成果の概要(英文)：CREBH is a transcription factor, which is expressed in liver and intestine. CREBH regulates whole-body lipid metabolism. CREBH can bind to PPAR and its co-activator PGC-1, leading to activation of FGF21 expression. CREBH also binds to SREBP, a master regulator for fatty acid and cholesterol synthesis. This association suppressed the transcriptional activity of SREBP. We identify that the cross-talk among CREB3L3 and transcription factors maintains energy homeostasis and improves metabolic syndrome. We developed liver-specific CREBH KO mice using one-step CRISPR/Cas9 system. We find the deficiency of CREBH in liver leads to non-alcoholic fatty liver disease.

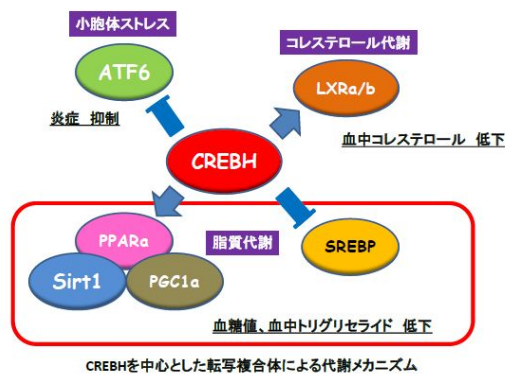
研究分野：分子生物学

キーワード：CREBH

1. 研究開始当初の背景

近年、世界中で生活習慣病患者の急激な増加が社会問題となっている。そのため、生活習慣病の発症のメカニズムの解明とそこから導き出される新たな治療法の確立が必要である。生活習慣病の発症には遺伝子の発現レベルでの調節が大きく寄与している。生活習慣病の発症進展は長期的な代謝の異常が原因となる。その代謝の異常に転写因子による代謝系遺伝子発現の破綻が大きく関与することが明らかとなっている。

我々は新たに肝臓にのみ発現し、絶食時に機能する転写因子 CREBH に着目している。CREBH が血糖値、インスリン値の低下とともに血中脂質の低下が引き起こすことを見出した(Nakagawa 2014 *Endocrinology*)。その効果が生活習慣病改善因子 FGF21 の発現上昇と PPAR α の活性上昇にあることを明らかにしている。PPAR α は脂質異常症治療薬フィブラート(Feno)、Wy の標的遺伝子である。これら薬剤を CREBH KO マウスに投与すると、血中脂質の低下が抑制される。その際、PPAR α の発現低下は軽微であるにも関わらず、PPAR α の標的遺伝子(Cpt1a, FGF21)の発現は明らかな低下を示した。CREBH は PPAR α の転写活性化能を何らかの方法で制御することが推測された。そのメカニズムとして転写因子間のクロストークによる制御に着目し研究を行ってきた。また、さらに CREBH が様々な生活習慣病に寄与するデータを得てきている。



これら CREBH の効果には他の転写因子の機能への影響が見られている。CREBH は PPAR α の活性化に必須であり、転写レベルで PPAR α と CREBH がオートループ活性化機構を作る。CREBH は他の転写因子と相互に作用し、生体の恒常性を維持し、さらには様々な転写因子との転写因子複合体形成が生活習慣病に関わるエネルギー代謝調節遺伝子の発現を制御すると想定している。

本研究では様々な生活習慣病モデルマウスの中での CREBH 転写因複合体形成、活性化とそれに伴う遺伝子発現制御について解析を行う。

2. 研究の目的

転写因子は細胞内のエネルギー状態(生活習慣病)を感知し活性化される。また、逆に活性化された転写因子によってエネルギー状態は変化し、その結果、代謝産物に変化する。本課題では CREBH を中心とした転写因子間クロストークとともに代謝産物の変化をもたらす転写環境の変化を明らかにする。それら解析から新たな治療標的の同定とそれに基づく治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

CREBH を中心としエネルギー代謝に関わる転写制御を転写因子のクロストーク、転写制御による代謝産物の違いに焦点を当て解析を行う。

生体材料(マウス)を用い解析を行い、より生理的な機能の解析を行う。

1)メタボローム解析、トランスクリプトーム解析などからエネルギー環境変化と転写因子の機能を網羅的解析し、転写因子機能に関わる生体リガンドを同定する。

正常マウスおよび肝臓特異的、小腸特異的 CREBH 過剰発現マウス、CREBH KO マウスの肝臓、小腸で網羅的なメタボローム解析および遺伝子発現を行った。

CREBH に結合する因子の探索のため、アデノウイルス HA-CREBH を作成し、マウスへ感染させた。肝臓タンパクから HA 抗体をもちいた免疫沈降法にて HA-CREBH タンパクとその結合分子を単離した。そのサンプルを MASS 解析し、結合したタンパクを同定した。

2)転写因子の標的遺伝子探索には生体を使った ChIP-Seq を使い網羅的に解析する。

上記、アデノウイルス HA-CREBH を感染した肝臓を用い、ChIP 解析を行った。まず、既知の CREBH が結合するプロモーター領域との結合の確認を行った。

3) CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子改変マウスを作製法の確立。ゲノム編集により簡単に遺伝子改変マウスを作成する。CREBH の intron 内 2 箇所を切断する guide RNA 配列を選択し、その効果を in vitro で評価した。2 箇所に挿入する LoxP site を含む CREBH ゲノム DNA 断片を構築した。受精卵に 1 度に 2 つの gDNA と Cas9 を含む発現ベクターと 2 つの挿入用 DNA 断片を injection した。生まれたマウスを PCR により Genotyping し目的配列の挿入を確認した。得られた LoxP を 2 つ持つマウス(flox マウス)と肝臓特異的 Cre Tg マウスおよび小腸特異的 Cre Tg マウスを交配し、肝臓特異的および小腸特異的 CREBH KO(LKO、IKO)マウスを作成した。

4)作成された遺伝子改変マウスの評価。flox マウスをコントロールとし、LKO マウスの表現型を血中パラメーター、肝臓の遺伝子発現を検討した。

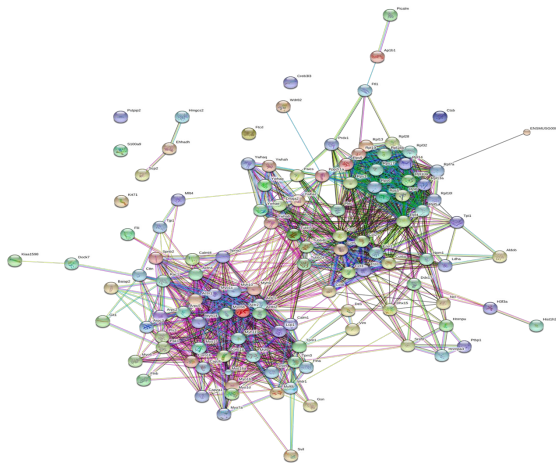
4. 研究成果

CREBH 遺伝子改変マウスにおけるメタボローム解析、プロテオーム解析

正常マウス、肝臓特異的 CREBH Tg マウス、脂肪組織特異的 CREBH Tg マウス、CREBH KO マウスの肝臓を用い、メタボローム解析、遺伝子発現解析(メタボローム解析)を行った。現在、得られた結果を継続して解析している。

CREBH 結合因子の探索

組み換えアデノウイルス HA-tag CREBH を作成し、正常マウスに投与した。肝臓で HA-CREBH が過剰発現された肝臓を摘出し、HA 抗体を用い、HA-CREBH とそこに結合するタンパク質を免疫沈降法にて単離し、MS でタンパクを同定した(下図)。



CREBH に結合する分子として翻訳、代謝に関わる分子を確認した。それぞれの結合の意味については今後、解析をしていく。

CREBH は PPAR α および PPAR α の共役因子である PGC-1 α と分子間で結合し、標的遺伝子である FGF21 の発現を誘導する。

動脈硬化病態では脂肪酸・コレステロール合成系遺伝子の発現を制御する SREBP が活性化するが、CREBH の過剰発現ではその効果が減弱する。その際に CREBH と SREBP が結合することにより SREBP の転写活性機能が低下するデータを得ている。

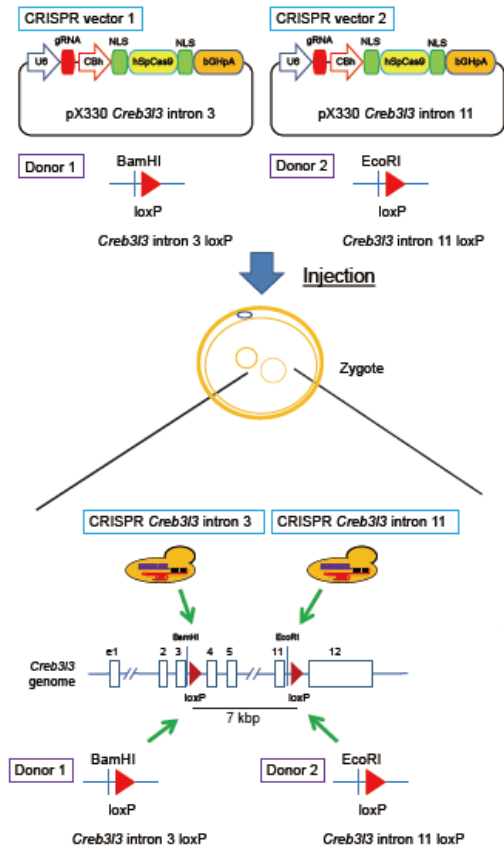
CREBH が結合する遺伝子プロモーターの網羅的解析

上記、HA-CREBH アデノウイルスを感染させたマウス肝臓から HA 抗体を用い、HA-CREBH と結合するプロモーター領域の複合体を単離した。そのサンプルからプロモーター DNA のみをさらに単離し、既知の CREBH と結合するプロモーター領域を PCR にて検出した。結合を観察できたので、今後は ChIP-seq で網羅的な解析を行う予定である。

CRISPR/Cas9 による遺伝子改変マウスの作成

CRISPR/Cas9 を使って遺伝子改変マウスを作成する技術が近年使われ始めた。我々は組織特異的な CREBH ノックアウトマウスを作成するため、CRISPR/Cas9 システムを用い、下図の手順で CREBH flox マウスを作成

した。



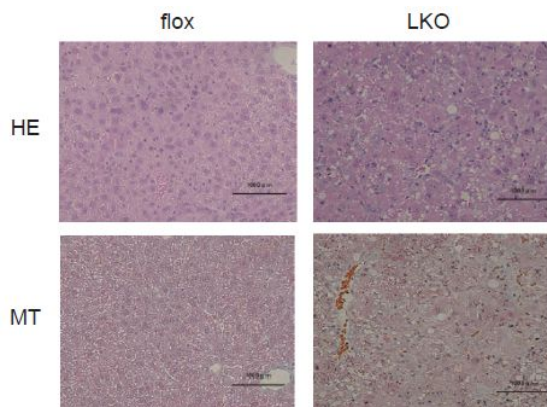
1 度に 2 つの loxP site をゲノムに挿入した例は過去に 1 報報告があるが、実際に、組織特異的 KO マウスを作成例はなかった。我々は受精卵に CRISPR/Cas9 に必要なベクターおよび DNA 断片を挿入し、20 匹のマウスを得た。このうち、1 匹が loxP site を 2 個持つマウスであった。このマウスに組織特異的 Cre Tg マウスと交配し、組織特異的な CREBH KO マウスを作成した(Nakagawa *Scientific Reports* in press)。

Injected embryos	Transferred embryos (%)	Pups delivered (%)	Indel (%)
277	239 (86)	20 (7)	1 (0.4)

CREBH 肝臓特異的 KO マウスは脂肪肝を発症する

作成した肝臓特異的 CREBH KO(LKO)マウスは全身で CREBH を欠損した(CREBH KO)マウスとは異なる血中脂質の変化を起こした。CREBH KO では血中トリグリセライドの上昇、コレステロールの低下を示したのに対し、LKO マウスではトリグリセライド、コレステロールの両方で上昇を示した。LKO ではコレステロール合成系遺伝子の発現を統括する転写因子 SREBP-2 の発現を始め、その下流遺伝子の発現も上昇しておりこれはコレステロール上昇の原因として考えられた。

血中脂質の上昇が非アルコール性脂肪肝と関連があると想定し、メチオニン・コリン欠損食により生じる脂肪肝を発症するモデ



ルでの CREBH の機能を検証した。LKO マウスでは正常マウスと比較し、早期に肝障害を生じる結果を得た。炎症系の遺伝子発現の上昇が原因にあり、血中の肝障害マーカーALT、AST が早期に急激に上昇した。肝臓の病理所見も炎症、繊維化の所見を観察した (Nakagawa *Scientific Reports* in press)。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Nakagawa Y, Oikawa F, Mizuno S, Ohno H, Yagishita Y, Satoh A, Osaki Y, Takei K, Kikuchi T, S.I. Han, Matsuzaka T, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Yahagi N, Suzuki H, Sone H, Takahashi S, Yamada N, Shimano H.

Hyperlipidemia and hepatitis in liver-specific CREB3L3 knockout mice generated using a one-step CRISPR/Cas9 system.

Sci Rep. 2016, in press. 査読有

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.u-tsubuaba-endocrinology.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

韓 松伊 (HAN SONGIEE)
筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：

80729541