

課題番号 : 26指106  
研究課題名 : 肝臓における代謝シグナルの解明と創薬標的の探索  
主任研究者名 : 酒井 真志人  
分担研究者名 :

キーワード : 糖尿病 脂肪肝 インスリン抵抗性 転写 エピジェネティクス  
研究成果 :

#### ① 肝臓における脂肪酸・中性脂肪合成経路の役割の解明

脂肪酸合成酵素 (fatty acid synthase: FAS) は、グルコースからパルミチン酸を合成するリポジェニック酵素であり、インスリンによって発現が誘導される。FAS は脂肪酸・中性脂肪合成経路の鍵となる酵素であり、肥満・2型糖尿病の肝臓ではその発現が亢進していることが知られている。しかし、脂肪肝を合併する2型糖尿病の病態におけるFASの発現亢進の病態生理学的意義は明らかにされていなかった。脂肪肝合併2型糖尿病の病態におけるFASの関与を検討するために *ob/ob* マウス (以下 *ob/ob*) を対照として肝臓特異的 FAS 欠損 *ob/ob* マウス (以下 KO) の代謝表現型解析を行った。KO では *ob/ob* に比べ、著明な脂肪肝の抑制とグルコース負荷試験における耐糖能の劇的な改善を認める一方、随時の高血糖を示した。肝臓のメタボローム・遺伝子発現・インスリンシグナルの解析から、*ob/ob* マウスにおける肝臓特異的な FAS の欠損により、① 絶食時には脂肪酸酸化の抑制による ATP 量の減少および G6Pase 発現の減少による糖新生の抑制、Glucokinase の増加によって肝糖取り込み量が増加し、② 摂食時には解糖系・脂肪酸合成経路での糖利用の低下により、グルコースは主にグリコーゲン合成経路に流入するが、グリコーゲン蓄積が飽和すると糖取り込みが低下し、随時高血糖を呈することが明らかとなった。本研究より、肥満・糖尿病における肝臓の FAS の発現亢進は、単なるインスリン抵抗性の増悪因子ではなく、脂肪酸合成・糖新生・脂肪酸酸化経路に多面的に作用し、絶食-摂食サイクルにおける血糖値の変動を軽減し、血糖の恒常性維持に寄与していることが示唆された。

#### ② 肝臓における摂食依存的な遺伝子発現調節メカニズムの解明

転写調節因子 CITED2 および CITED2 と相互作用する分子であるヒストンアセチル基転移酵素 GCN5、CITED2 のターゲット遺伝子である SetU が摂食依存的な遺伝子発現調節メカニズムに果たす役割を明らかにするために、モデル動物の作製、遺伝子発現解析、分子メカニズムの解析を並行して進めている。

ヒストンアセチル化酵素 GCN5 の肝臓の摂食依存的な遺伝子発現調節メカニズムにおける役割を明らかにするために、肝臓特異的 GCN5 欠損マウスを作製した。

SetU はリジンメチル化酵素ドメインである SET ドメインを有し、メチル化酵素だと考えられていたが、その酵素活性は不明であった。我々は、SetU および SET ドメインに変異を入れた不活性型変異体 SetU $\Delta$ SET を用いて *In Vitro* Methyltransferase assay をおこなうことで、SetU がメチル化酵素活性を持つことを明らかにした。そこで、次に SetU の代謝調節作用に必要な相互作用因子、基質の同定を試みた。これまでに SetU 結合蛋白の網羅的探索や共沈実験から SetU と相互作用する転写共役因子およびサーチュインファミリーの脱アセチル化酵素の1つである分子 X を同定した。さらには、SetU の標的遺伝子を明らかにするために、SetU をノックダウンした初代培養肝細胞および肝臓特異的 SetU 欠損マウスの肝臓で cDNA Microarray をおこない、発現変動遺伝子を網羅的に同定した。これらの結果に基づき、SetU の肝糖脂質代謝における役割を解析していく予定である。

Subject No. : 26S106

Title : Elucidating hepatic metabolic signaling to identify novel therapeutic targets for type 2 diabetes

Researchers : Mashito Sakai

Key word : Diabetes mellitus, NAFLD, Insulin resistance, Transcription, Epigenetics

Abstract :

#### 1. Understanding the role of fatty acid and triglyceride synthesis in the liver

Fatty acid synthase (FAS) catalyzes the first committed step in *de novo* lipogenesis to generate palmitate. Hepatic FAS expression is increased in obese diabetic subjects, however, the pathophysiological role of FAS in type 2 diabetes with fatty liver is yet to be elucidated. We examined the role of FAS in type 2 diabetes using liver-specific FAS knockout *ob/ob* mice (*ob/ob* LKO).

While hepatic FAS deletion improved fatty liver and glucose tolerance, it aggravated fed hyperglycemia. Therefore, we carried out metabolomic analysis to understand the mechanism by which hepatic FAS deletion leads to this phenotype. Our results suggest that during fasting, decreased ATP production (due to impaired fatty acid oxidation) and decreased G6Pase expression in the liver of *ob/ob* LKO suppress hepatic gluconeogenesis. Down-regulation of gluconeogenesis and up-regulation of Gck expression increases hepatic glucose uptake. During feeding, glucose mainly enters the glycogen synthetic pathway as the glucose flux in the glycolytic pathway is disturbed by hepatic FAS deletion. Hepatic glucose uptake is impaired after saturation of the glycogen synthetic pathway, resulting in fed hyperglycemia.

Increased expression of hepatic FAS in obese diabetic subjects may contribute in improving glucose homeostasis by regulating *de novo* lipogenesis, gluconeogenesis, fatty acid oxidation, and hepatic glucose uptake.

#### 2. Elucidating feeding-dependent transcriptional regulation in the liver

As planned, we generated genetically modified mice and analyzed gene expression as well as relevant molecular mechanisms to understand the role of transcriptional regulators CITED2, GCN5, and SetU in feeding-dependent transcriptional regulation in the liver.

We generated liver-specific GCN5 knockout mice to determine the role of histone acetyltransferase GCN5 in transcriptional regulation of metabolic genes in the liver.

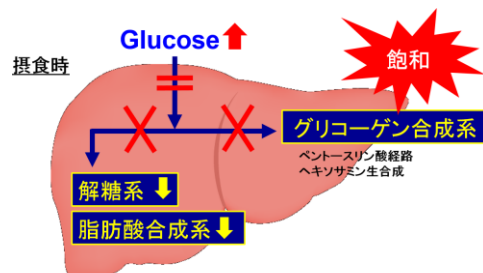
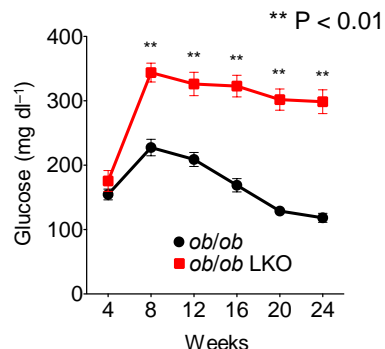
Although the enzymatic activity of SetU has not been determined, the presence of SET domain suggests its activity as lysine methyltransferase. We performed *in vitro* methyltransferase assay to confirm the methyltransferase activity using SetU WT and SetU  $\Delta$ SET, which harbors mutation in the SET domain. We also identified protein X, belonging to sirtuin family, as SetU-interacting protein using co-immunoprecipitation assay. cDNA microarray analysis with SetU-depleted hepatocytes and liver-specific SetU knockout mice comprehensively revealed target genes of SetU. Based on these findings, currently we are trying to elucidate the role of SetU in glucose and lipid metabolism in the liver.

Researchers には、分担研究者を記載する。

# 26指106 肝臓における代謝シグナルの解明と創薬標的の探索

## ① 肝臓における脂肪酸・中性脂肪合成経路の役割の解明

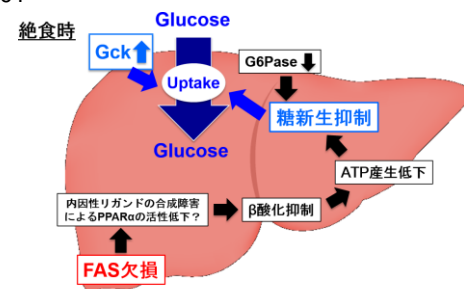
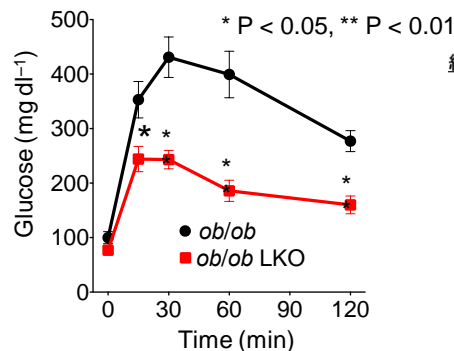
### ob/ob LKOマウスの随時高血糖とそのメカニズム



ob/obマウスの遺伝的背景を導入した肝臓特異的FAS欠損マウス(ob/ob LKO)は、脂肪肝は軽減するものの、著明な随時高血糖を示す(左図)。

ob/ob LKOではFASの欠損により解糖系・脂肪酸合成系による糖利用が低下しているため、摂食時にグルコースは主にグリコーゲン合成経路に流入するが、グリコーゲン蓄積が飽和すると糖取り込みが低下し、随時高血糖を呈する(右図)。

### ob/ob LKOマウスの耐糖能の改善とそのメカニズム



ob/ob LKOは絶食時にグルコース負荷後の血糖上昇が著明に抑制されており、耐糖能が大きく改善している(左図)。

絶食時には脂肪酸酸化の抑制によるATP量の減少及びG6Paseの発現の減少による糖新生の抑制、Glucokinaseの増加によって肝糖取り込み量が増加する(右図)。

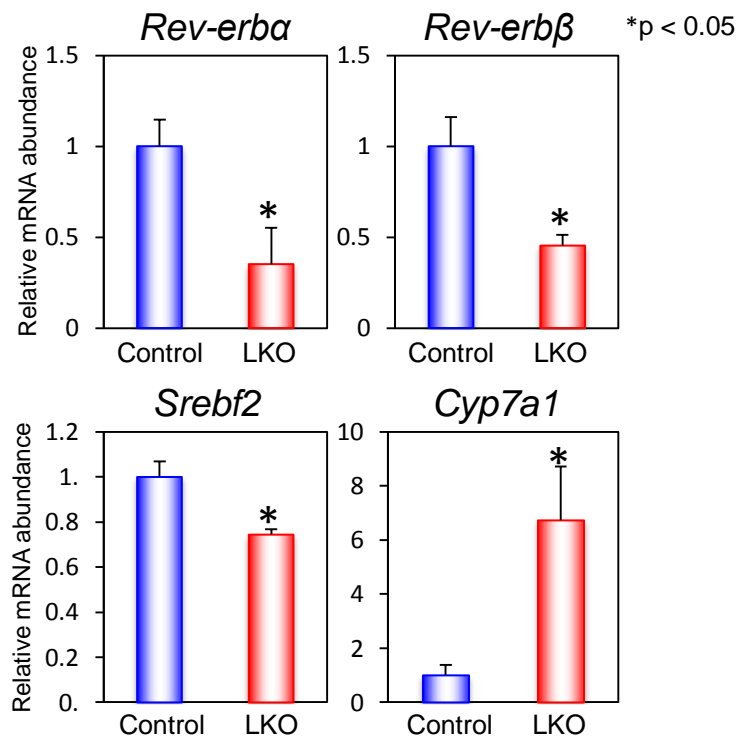
糖尿病・肥満における肝臓の脂肪酸・中性脂肪合成経路の病態生理学的意義を明らかにするために、肥満糖尿病モデルマウスであるob/obマウスの遺伝的背景を導入した肝臓特異的FAS欠損マウス(ob/ob LKO)を作製し解析をおこなった。ob/ob LKOは随時高血糖を呈する一方で、絶食時には著明な耐糖能の改善を示した。インスリン感受性はコントロールと同等であったことから、これらの代謝表現型が肝内代謝産物の変化に起因することを想定して肝組織メタボローム解析をおこない、その結果をもとにして上記のメカニズムを明らかにした。

これまでの結果から肥満・糖尿病における肝臓のFASの発現亢進は、単なるインスリン抵抗性の増悪因子ではなく、脂肪酸合成・糖新生・脂肪酸酸経路に多面的に作用し、絶食-摂食サイクルにおける血糖値の変動を軽減し、血糖の恒常性維持に寄与していることが示唆された。

# 26指106 肝臓における代謝シグナルの解明と創薬標的の探索

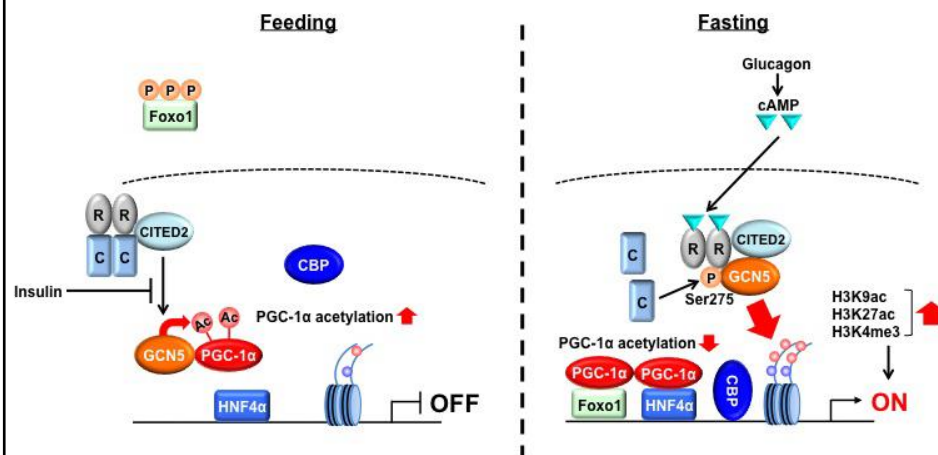
## ② 肝臓における摂食依存的な遺伝子発現調節メカニズムの解明

### 肝臓特異的SetU欠損マウス(SetU)の肝臓における遺伝子発現変化 (qRT-PCR)



概日リズム、脂肪酸/コレステロール代謝に関与する遺伝子の発現の変化がみられた。

### GCN5機能の摂食サイクル依存的な調節機構



GCN5はCITED2依存性に相互作用するPKAによってリン酸化され、PGC-1αからHistone H3に基質が換わることでPGC-1αコアクチベーター活性の増加とヒストンアセチル化が起こり、糖新生系酵素の発現を強く誘導する。摂食時にはインスリンによるCITED2とGCN5の相互作用の抑制と、cAMP量の減少によって、GCN5のリン酸化は減少し、糖新生が抑制される。

肝臓特異的GCN5欠損マウスを作製中であり、摂食時の遺伝子発現調節におけるGCN5の作用、糖尿病モデルマウスの肝臓におけるGCN5欠損の効果を解析予定である。

転写調節因子CITED2、及びCITED2と相互作用するヒストンアセチル基転移酵素であるGCN5、CITED2の標的遺伝子であるSetUによる摂食依存的な遺伝子発現調節メカニズムの解析から、糖尿病をはじめとする生活習慣病の新規創薬ターゲットを同定する。平成26年度では、肝臓特異的GCN5欠損マウスの作製、肝臓特異的SetU欠損マウスの肝臓における網羅的な遺伝子発現解析、CITED2/PKA依存的なGCN5のHAT機能制御に対するインスリンの効果について検討をおこなった。今後、メチル化酵素SetUによる代謝調節の分子メカニズム、摂食依存的な遺伝子発現調節に対するCITED2/GCN5の作用の解析を進める。

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：26指106

研究課題名：肝臓における代謝シグナルの解明と創薬標的の探索

主任研究者名：酒井 真志人

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
該当なし				

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
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	酒井 真志人, 辻村-早川 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	東京	2014年4月
肝臓の脂肪酸合成酵素は肥満・糖尿病の病態において肝脂肪蓄積の促進と高血糖の抑制に寄与する	八木 孝, 酒井 真志人, 辻村-早川 知子, 山地 大介, 内田 亨, 楯谷 三四郎, 春日 雅人, 南 史朗, 松本 道宏	第51回 日本臨床分子医学会学術集会	東京	2014年4月
CITED2-GCN5複合体による肝糖新生調節機構の解明	酒井 真志人, 春日 雅人, 松本 道宏	第87回 日本内分泌学会学術総会	福岡	2014年4月
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	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57回日本糖尿病学会年次学術集会	大阪	2014年5月
脂肪酸合成酵素FASの脂肪肝・インスリン抵抗性における機能の解析	八木 孝, 酒井 真志人, 辻村-早川 知子, 山地 大介, 内田 亨, 楯谷 三四郎, 春日 雅人, 南 史朗, 松本 道宏	第57回日本糖尿病学会年次学術集会	大阪	2014年5月
CITED2-GCN5複合体による肝糖新生調節機構	松本 道宏, 酒井 真志人, 春日 雅人,	第14回日本蛋白質科学会年会	横浜	2014年6月
過栄養による脂肪肝・糖尿病における肝臓のde novo lipogenesis亢進の病態生理学的意義の検討	八木 孝, 酒井 真志人, 辻村-早川 知子, 山地 大介, 春日 雅人, 南 史朗, 松本 道宏	第1回 肝臓と糖尿病・代謝研究会	東京	2014年7月
肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の欠損はob/obマウスの脂肪肝と耐糖能を改善するが随時高血糖を惹起する	八木 孝, 酒井 真志人, 内田 亨, 辻村-早川 知子, 山地 大介, 矢野 宏行, 満島 勝, 長嶋 洋治, 南 史朗, 春日 雅人, 松本 道宏	第19回アディポサイエンス・シンポジウム	大阪	2014年8月
Histone acetyltransferase GCN5 regulates hepatic gluconeogenesis through CITED2-dependent substrate switch	Mashito Sakai, Masato Kasuga, Michihiro Matsumoto	9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress (MSDA)	京都	2014年9月
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	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	第29回日本糖尿病合併症学会	東京	2014年10月
肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の欠損はob/obマウスの脂肪肝と耐糖能を改善するが随時高血糖を惹起する	八木 孝, 酒井 真志人, 内田 亨, 辻村-早川 知子, 山地 大介, 矢野 宏行, 満島 勝, 長嶋 洋治, 南 史朗, 春日 雅人, 松本 道宏	第29回日本糖尿病合併症学会	東京	2014年10月
肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の欠損はob/obマウスの脂肪肝と耐糖能を改善するが随時高血糖を惹起する	八木 孝, 酒井 真志人, 内田 亨, 辻村-早川 知子, 山地 大介, 矢野 宏行, 満島 勝, 長嶋 洋治, 南 史朗, 春日 雅人, 松本 道宏	第35回日本肥満学会	宮崎	2014年10月
ヒストンアセチル化酵素GCN5はCITED2依存的に基質指向性を変化させ肝臓の糖新生を制御する	松本 道宏, 酒井 真志人	第37回日本分子生物学会	横浜	2014年11月

研究発表及び特許取得報告について

CITED2-GCN5 複合体による肝糖新生調節機構の解明	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	第26回分子糖尿病学シンポジウム	高知	2014年12月
肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の欠損はob/obマウスの脂肪肝と耐糖能を改善するが随時高血糖を惹起する	八木 孝, 酒井 真志人, 内田 亨, 辻村 (早川) 知子, 山地 大介, 矢野 宏行, 満島 勝, 長嶋 洋治, 南 史朗, 春日 雅人, 松本 道宏	第18回日本病態栄養学年次学術集会	京都	2015年1月
CITED2-GCN5複合体による肝糖新生制御機構の解明	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	冬の若手ワークショップ2015	伊香保	2015年2月
CITED2-GCN5複合体による肝糖新生調節機構の解明	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	第29回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会	京都	2015年2月
肝臓特異的な脂肪酸合成酵素の欠損はob/obマウスの脂肪肝と耐糖能を改善するが随時高血糖を惹起する	八木 孝, 酒井 真志人, 辻村-早川 知子, 山地 大介, 矢野 宏行, 満島 勝, 内田 亨, 長嶋 洋治, 南 史朗, 春日 雅人, 松本 道宏	第29回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会	京都	2015年2月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
インスリン・グルカゴンと飢餓応答	松本 道宏, 酒井 真志人	The Lipid Vol.26 NO.1, 14-21, 2015		2015年1月10日

特許取得状況について ※出願申請中のものは( )記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日 (申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。