



CITED2 links hormonal signaling to PGC-1 α acetylation in regulation of gluconeogenesis

酒井, 真志人

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2012-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5606

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005606>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

CITED2 links hormonal signaling to PGC-1 α acetylation in regulation of gluconeogenesis

転写共役因子 CITED2 はホルモン応答性に PGC-1 α のアセチル化
を調節し肝糖新生を制御する

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
糖尿病・内分泌内科学
(指導教員：清野・進教授)

酒井 真志人

インスリン抵抗性に伴う肝臓からの糖産生の病的亢進は2型糖尿病における空腹時高血糖の主因であり、その分子機構の解明は新規糖尿病治療薬開発の標的分子を提供し得る重要な課題である。転写共役因子 CITED2 は、肝臓における代謝調節に重要な HNF4 α ・PPAR α / γ ・CBP などの転写調節因子と相互作用することは報告されているものの、代謝制御における役割は不明であった。今回我々は CITED2 の肝糖代謝調節における役割を検討した。

CITED2 蛋白発現は絶食時のマウス肝臓および肥満糖尿病モデルマウスである db/db マウス、高脂肪食負荷マウスの肝臓で増加していた。また、in vitro における検討から CITED2 蛋白はグルカゴン-cAMP-プロテインキナーゼA(PKA)シグナルによって増加することが明らかとなった。そのため肝糖新生における CITED2 の機能を検討した。

マウス初代培養肝細胞において CITED2 shRNA 発現アデノウイルスによって CITED2 をノックダウンすると、グルカゴンならびにそのセカンドメッセンジャーである cAMP による糖産生系酵素遺伝子 G6pc, Pck1 の発現誘導が障害され、糖産生は減少した。逆に、CITED2 の強発現により、糖産生系酵素遺伝子の発現ならびに糖産生が著明に増強した。CBP および HNF-4 α への結合に必要な部位である CR2 ドメインを欠損する CITED2(Δ CR2)の強発現によっても野生型 CITED2 強発現と同等の効果が認められることから、CITED2 による cAMP 依存性の糖新生系酵素発現の調節には CBP、HNF4 α との結合は必要ではないことが明らかとなった。

次に CITED2 の in vivo における機能を検討した。マウスの肝臓において、CITED2 の強発現により糖産生系酵素の発現亢進と空腹時血糖値の上昇を、機能欠損により糖産生系酵素の発現低下を認めた。また、db/db マウスの肝臓における CITED2 のノックダウンでは、高血糖の改善を認めた。

以上の in vitro, in vivo の結果から、転写共役因子 CITED2 が肝糖新生系酵素の発現調節を介して血糖を制御していると考えられたので、そのメカニズムを検討した。

転写コアクチベーターPGC-1 α は絶食時にグルカゴン・cAMP 経路によって発現が誘導され、糖新生系酵素の発現誘導を介した肝糖産生に重要な役割を果たす分子である。そこで CITED2 による cAMP 依存性の糖新生系酵素発現誘導に対する PGC-1 α ノックダウンの効果を検討したところ、PGC-1 α ノックダウンにより

CITED2 の効果が消失することが明らかとなった。次に PGC-1 α 依存性の糖産生系酵素発現誘導への CITED2 の関与についても検討した。PGC-1 α による糖産生系酵素の発現誘導は CITED2 ノックダウンにより著明に減弱した。逆に強発現により、PGC-1 α 依存性の糖新生系酵素の発現は著明に増強した。さらには G6pc promoter assay をおこない、CITED2 および CITED2(Δ CR2)が PGC-1 α 依存性の G6pc promoter 活性の増加をさらに増強することを確認した。これらの結果より CITED2 が PGC-1 α の活性を増強することが示唆された。

次に CITED2 による PGC-1 α 活性増強作用の分子機構を検討した。PGC-1 α の活性はアセチル化、リン酸化、メチル化、SUMO 化などの様々な翻訳後修飾によって調節されているが、CITED2 は PGC-1 α のアセチル化を抑制することが明らかとなった。PGC-1 α 活性が GCN5 によるアセチル化によって抑制され、SIRT1 による脱アセチル化によって増強することが既に報告されていた (Rodgers JT et. Al. Nature 434 2005, Lerin, C. et al. Cell Metab. 3 2006)。そこで CITED2 による PGC-1 α アセチル化調節メカニズムについて検討した。

まず CITED2 と PGC-1 α 、SIRT1、GCN5 の相互作用について、共沈実験によって検討した。CITED2 は PGC-1 α 、SIRT1 とは共沈しないことが明らかとなった。さらに CITED2 は PGC-1 α と SIRT1 の結合や細胞内 NAD⁺/NADH 比、および SIRT1 のターゲットである FOXO1 のアセチル化に影響を与えなかったため、CITED2 は SIRT1 依存性の PGC-1 α 脱アセチル化には関与しないと考えられた。一方、CITED2 は GCN5 と共沈し、相互作用することが示された。そこで、GCN5 依存性の PGC-1 α アセチル化に対する CITED2 の効果を HEK293 細胞で検討した。既報のように GCN5 は PGC-1 α に結合し、そのアセチル化を増加させたが、CITED2 は PGC-1 α の結合する GCN5 の量と PGC-1 α のアセチル化を用量依存性に減少させた。一方、GCN5 活性に対する CITED2 の効果を histone H3 を基質とした HAT assay で検討したところ、CITED2 強発現は GCN5 活性を減少させないことが明らかとなった。これらの結果から CITED2 は GCN5 に結合し、PGC-1 α と GCN5 の結合を阻害することで PGC-1 α のアセチル化を抑制すると考えられた。

CITED2 と GCN5 の相互作用に必要な部位を同定するために、それぞれの欠損変異体を HEK293 細胞に発現させ、共沈実験をおこなった。その結果 CITED2 の CR1、SRJ ドメインが GCN5 との相互作用に必要なことが明らかとなった。実際、SRJ ドメインを欠損する CITED2(Δ SRJ)は GCN5 依存性の PGC-1 α アセチル化を抑制せず、cAMP 依存性の糖新生系酵素発現を増加させなかった。

次に CITED2 と GCN5 の相互作用にインスリンが与える影響を検討した。インスリンは GCN5 と共沈する CITED2 の量を減少させ、この効果は PI3K 阻害剤および Akt 阻害剤で解除されたが mTOR 阻害剤である Rapamycin では解除されなかった。またインスリンは CITED2 による PGC-1 α アセチル化の抑制を完全に回復させることが示された。これらの結果から PI3K-Akt シグナルは CITED2 と GCN5 の相互作用を減少させ、PGC-1 α のアセチル化を回復させることが明らかとなった。このインスリンの効果はマウス肝臓においても観察された。

以上の結果から絶食時には CITED2 および PGC-1 α の発現はグルカゴン-cAMP-PKA シグナルによって増加し、CITED2 は GCN5 に結合して PGC-1 α のアセチル化は抑制されるため、活性化された PGC-1 α が増加し糖新生系酵素遺伝子の発現が強誘導される。一方摂食時にはインスリンによって CITED2 と GCN5 の相互作用が抑制され PGC-1 α のアセチル化が増加して PGC-1 α 活性が減弱し、糖新生系酵素発現が抑制されると考えられる。すなわち CITED2 はインスリン・グルカゴンシグナルを PGC-1 α のアセチル化・活性へと変換することで糖新生を制御する分子である。

また肥満糖尿病モデルマウスの肝臓では CITED2 発現が著明に増加しており、CITED2 ノックダウンによって高血糖が改善することから、CITED2 が糖尿病の病態形成に関与している可能性がある。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2261 号	氏 名	酒井 真志人
論文題目 Title of Dissertation	<p>CITED2 links hormonal signaling to PGC-1α acetylation in regulation of gluconeogenesis</p> <p>転写共役因子 CITED2 はホルモン応答性に PGC-1α のアセチル化を調節し肝糖新生を制御する</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 平 岡 健 一 Chief Examiner</p> <p>副 査 片 岡 徹 Vice-examiner</p> <p>副 査 的 崎 尚 Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

インスリン抵抗性に伴う肝臓からの糖産生の病的亢進は2型糖尿病における空腹時高血糖の主因であり、その分子機構の解明は新規糖尿病治療薬開発の標的分子を提供し得る重要な課題である。転写共役因子 CITED2 は、肝臓における代謝調節に重要な HNF4 α ・PPAR α ・CBP などの転写調節分子と相互作用することは報告されているものの、代謝制御における役割は不明であった。申請者は CITED2 の肝糖代謝調節における役割を検討した。

<方法・結果>

CITED2 蛋白発現は絶食時のマウス肝臓および肥満糖尿病モデルマウスである db/db マウス、高脂肪食負荷マウスの肝臓で増加していた。また、in vitro における検討から CITED2 蛋白はグルカゴン-cAMP-プロテインキナーゼ A(PKA) シグナルによって増加することが明らかとなった。そのため肝糖新生における CITED2 の機能を検討した。

マウス初代培養肝細胞において CITED2 shRNA 発現アデノウイルスによって CITED2 をノックダウンすると、グルカゴンならびにそのセカンドメッセンジャーである cAMP による糖産生系酵素遺伝子 G6pc, Pck1 の発現誘導が障害され、糖産生は減少した。逆に、CITED2 の強発現により、糖産生系酵素遺伝子の発現ならびに糖産生が著明に増強した。CBP および HNF-4 α への結合に必要な部位である CR2 ドメインを欠損する CITED2 (Δ CR2) の強発現によっても野生型 CITED2 強発現と同等の効果が認められることから、CITED2 による cAMP 依存性の糖新生系酵素発現の調節には CBP, HNF4 α との結合は必要ではないことが明らかとなった。

次に CITED2 の in vivo における機能を検討した。マウスの肝臓において、CITED2 の強発現により糖産生系酵素の発現亢進と空腹時血糖値の上昇を、機能欠損により糖産生系酵素の発現低下を認めた。また、db/db マウスの肝臓における CITED2 のノックダウンでは、高血糖の改善を認めた。

以上の結果から、転写共役因子 CITED2 が肝糖新生系酵素の発現調節を介して血糖を制御していると考えられたので、そのメカニズムを検討した。

転写コアクチベーター PGC-1 α は糖新生系酵素の発現誘導を介した肝糖産生に重要な役割を果たす分子である。そこで CITED2 による cAMP 依存性の糖新生系酵素発現誘導に対する PGC-1 α ノックダウンの効果を検討したところ、PGC-1 α ノックダウンにより CITED2 の効果が消失することが明らかとなった。次に PGC-1 α 依存性の糖産生系酵素発現誘導への CITED2 の関与について検討した。PGC-1 α による糖産生系酵素の発現誘導は CITED2 ノックダウンにより著明に減弱した。逆に強発現により、PGC-1 α 依存性の糖新生系酵素の発現は著明に増強した。CITED2 による PGC-1 α 活性増強作用の分子機構を検討したところ、CITED2 は PGC-1 α のアセチル化を抑制することが明らかとなった。次に、CITED2 による PGC-1 α アセチル化調節メカニズムについて検討した。CITED2 は GCN5 と共沈し、相互作用することが示された。そこで、GCN5 依存性の PGC-1 α アセチル化に対する CITED2 の効果を HEK293 細胞で検討した。既報のように GCN5 は PGC-1 α に結合し、そのアセチル化を増加させたが、CITED2 は PGC-1 α の結合する GCN5 の量と PGC-1 α のアセチル化を用量依存性に減少させた。これらの結果から CITED2 は GCN5 に結合し、PGC-1 α と GCN5 の結合を阻害することで PGC-1 α のアセチル化を抑制すると考えられた。CITED2 と GCN5 の相互作用に必要な部位を同定するために、それぞれの欠損変異体を HEK293 細胞に発現させ、共沈実験をおこなった。その結果 CITED2 の CR1, SRJ ドメインが GCN5 との相互作用に必要であることが明らかとなった。

次に CITED2 と GCN5 の相互作用にインスリンが与える影響を検討した。インスリンは GCN5 と共沈する CITED2 の量を減少させ、この効果は PI3K 阻害剤および Akt 阻害剤で解除されたが mTOR 阻害剤である Rapamycin では解除されなかった。またインスリンは CITED2 による PGC-1 α アセチル化の抑制を完全に回復させることが示された。これらの結果から PI3K-Akt シグナルは CITED2 と GCN5 の相互作用を減少させ、PGC-1 α のアセチル化を回復させた。

本研究は、CITED2 がインスリン・グルカゴンシグナルを PGC-1 α のアセチル化・活性へと変換することで糖新生を制御する分子であることを明らかにし、CITED2 が糖尿病の病態形成に関与している可能性を示した価値ある研究である。したがって、申請者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。