

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08193

研究課題名(和文) アセチルCoAを接点としたグルコース代謝とFOXO1アセチル化の制御機構の解明

研究課題名(英文) Relationship between glucose metabolism and FOXO1 acetylation through acetyl-CoA

研究代表者

大徳 浩照 (Daitoku, Hiroaki)

筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・講師

研究者番号：30361314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：血糖値の恒常性維持や寿命延長の鍵となる転写因子FOXO1は、インスリン-Aktシグナル経路を介したリン酸化に加えて、CBPによるアセチル化制御を受けることが知られていたが、アセチル化の引き金となる生理的条件は不明であった。本研究では、「過剰なグルコース代謝が細胞内のアセチルCoA量を上昇させることでFOXO1のアセチル化を亢進する」という仮説の検証を進め、高グルコース条件下で培養したヒト細胞株では、解糖系の代謝を介してFOXO1のアセチル化が亢進することを見出した。また線虫のFOXO1オルソログであるDAF-16のアセチル化も高グルコース条件下で亢進し、リン酸化非依存的に寿命を短縮した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、糖新生(空腹時に血糖値を維持する仕組み)の調節を担う転写因子FOXO1には、血中インスリン濃度に応じたリン酸化による抑制に加えて、血糖そのものの濃度に応じたアセチル化による抑制も受けことが明らかとなった。この第2のブレーキの発見は、2型糖尿病の主たる要因であるインスリン抵抗性においても、糖新生を抑える手段を提示するものであり、新たな創薬のターゲットになり得るものと期待される。

研究成果の概要(英文)：It has been known that transcription factor FOXO1, a key mediator of blood sugar levels and lifespan extension, is regulated by phosphorylation under the insulin-Akt signaling pathway. In addition, FOXO1 is known to be acetylated by a histone acetyltransferase CBP; however, the physiological condition that trigger acetylation remains unclear. In this study, I tested a hypothesis under which “an excess glucose metabolism increases the amounts of acetyl-CoA and thereby enhances acetylation of FOXO1” and uncovered that high glucose condition induces FOXO1 acetylation through the glycolytic pathway in human cell lines. Furthermore, I found that high glucose condition also induces acetylation of DAF-16, the nematode orthologue of FOXO1, and shortens the lifespan of *C. elegans* independent on phosphorylation pathway.

研究分野：分子生物学

キーワード：FOXO アセチル化 糖代謝 グルコース 線虫 寿命

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

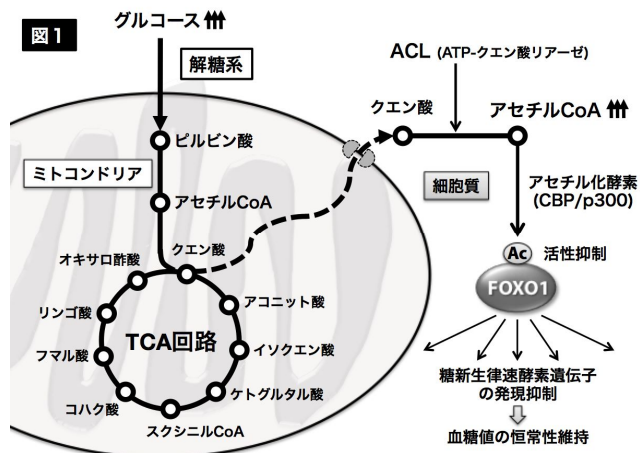
## 1. 研究開始当初の背景

フォークヘッド型転写因子 FOXO1 は絶食・飢餓ストレス時に活性化し、肝臓では糖新生律速酵素の遺伝子発現を誘導することで血糖値の恒常性を維持している。逆に食後の高血糖時には、血中インスリン濃度の上昇に伴い、シグナル下流に存在するリン酸化酵素 Akt によってリン酸化され、局在が核から細胞質へ移行することで転写活性が抑制される。このリン酸化による抑制に加え、2005 年には我々と海外の 2 つのグループが同時に、FOXO1 のアセチル化修飾による制御機構を報告した (PNAS 2005)。この中で我々は、転写コアクチベーターである CBP が FOXO1 をアセチル化することで DNA 結合活性を減弱させ、NAD 依存性脱アセチル化酵素である SIRT1 がこれをキャンセルすることを見出したが、他のグループはアセチル化のトリガーが酸化ストレスであると報告している。しかしながらその実験では、培養細胞を高濃度の過酸化水素で処理するなど生理的条件とは言い難く、実際に *in vivo* で酸化ストレスと FOXO1 アセチル化をつなぐ論文報告は無い。一方で FOXO1 のアセチル化自体の生物学的意義は証明されており、アセチル化されるリジンをアルギニンに置換したノックインマウスがインスリン抵抗性を呈することから、糖代謝において FOXO1 のアセチル化の重要性が示唆されていた。

私は本研究計画の申請当初、新学術領域「転写代謝システム」の連携研究者として、代謝と転写の接点、特にメチオニン代謝で生じる S-アデノシルメチオニンとこれをメチル基供与体とするメチル化修飾に関する研究に従事しており、その過程で、FOXO1 のアセチル化修飾も代謝と何らかの接点があるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究で私は、アセチル化修飾の補酵素であるアセチル CoA が、糖代謝の中間代謝物であることに着目し、「高血糖時に細胞内へ過剰のグルコースが流入することで、解糖系を経てアセチル CoA 量が増加し、これが FOXO1 のアセチル化のトリガーになるのでは」という仮説を立てた。この仮説の妥当性を考える上で重要な点は、グルコース代謝が過剰になると TCA 回路においてクエン酸が蓄積し、選択的にミトコンドリア膜外へ輸送されること、また細胞質のクエン酸が ACL (クエン酸-ATP リアーゼ) という酵素によって、再びアセチル CoA へと変換されることである。この代謝経路は細胞質での脂肪酸合成に必須であるが、一方で ACL を介して再変換されたアセチル CoA が、核内でヒストンのアセチル化に寄与することから、高グルコース下では FOXO1 のアセチル化が亢進する可能性がある (図 1)。また FOXO1 遺伝子は種を超えて広く保存されており、線虫 (*C. elegans*) の FOXO1 オルソログである DAF-16 は、その活性が寿命と正に相関することやグルコース培地では寿命が短縮することが知られている。以上の背景を踏まえ、本研究では、FOXO1/DAF-16 アセチル化が亢進する生理的条件として、グルコース濃度に着目し、高血糖時における糖新生の抑制や、高グルコース環境下における線虫の寿命短縮の背景に、糖代謝を介した FOXO1/DAF-16 のアセチル化が存在するのかについて検証する。



### 3. 研究の方法

#### (1) 培養細胞を用いた高グルコース条件下での FOXO1 アセチル化の分子メカニズムの解明

ヒト培養細胞株に FLAG タグ付きの FOXO1 を過剰発現させ、特異抗体を用いた WB によって、FOXO1 のアセチル化レベルをモニタリングする。高グルコース条件は市販の DMEM (High glucose) 培地で培養し、解糖系の阻害剤である 2-デオキシグルコース (2-DG) 処理や抗酸化剤 N-アセチル-L-システイン (NAC) 処理、ACL の siRNA ノックダウンなどの影響を調べる。また高グルコース培養下での細胞内のアセチル CoA やクエン酸の量は、LC-MS/MS 法によって定量する。

#### (2) 線虫を用いた過剰グルコース摂取と老化促進メカニズムの解明

通常、線虫はグルコースを含まない NGM 寒天培地上に大腸菌を塗布し、これを餌として飼育する。本実験では先行報告に準じて、2%グルコースを含む NGM 寒天培地を用いることで、グルコース過剰摂取による線虫 DAF-16 のアセチル化レベルの変化を調べる。また線虫において過剰なグルコース摂取は寿命を短縮することが報告されているが、このとき DAF-16 活性が抑制されているのか、さらにそれが ACL を介したクエン酸からアセチル CoA の変換に起因するかについて検証する。

### 4. 研究成果

#### (1) 培養細胞を用いた高グルコース条件下での FOXO1 アセチル化の分子メカニズムの解明

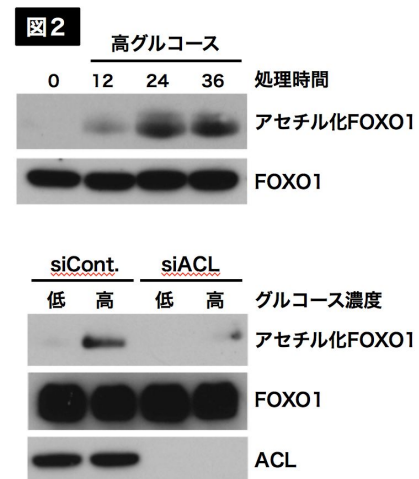
ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 およびヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293T を高グルコース培地で 24 時間培養したところ、内在性 FOXO1 のアセチル化の亢進が認められた (図 2)。

上述した FOXO1 のアセチル化の亢進は、2-DG 処理で阻害されたことから、この現象には解糖系による代謝が関与することが示された。

高グルコース培地での培養条件下では、活性酸素が産生することが知られている。FOXO1 のアセチル化亢進と酸化ストレスの関連性を検証するため、抗酸化作用を持つ NAC 処理を行った。高グルコース培地下での FOXO1 のアセチル化亢進は、NAC 処理で阻害されなかったことから、この現象に酸化ストレスは無関係であることが示された。

ACL のノックダウンによって、高グルコース培地における FOXO1 のアセチル化の亢進が抑制されたことから、クエン酸からアセチル CoA への変換が関与することが示された (図 2)。

高グルコース培養条件下で、実際に細胞内のアセチル CoA 量が増加していることを確認した。



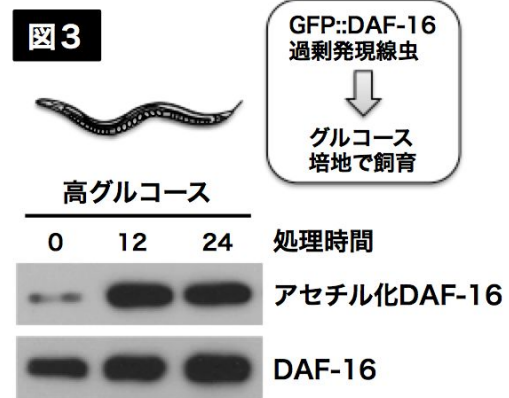
#### (2) 線虫を用いた過剰グルコース摂取と老化促進メカニズムの解明

DAF-16::GFP を過剰発現する Tg 線虫をグルコース添加培地で飼育し、アセチル化リジン抗体で免疫沈降した後に DAF-16 抗体で WB したところ、DAF-16 のアセチル化の亢進が認められた (図 3)。

グルコース添加培地で飼育した線虫では寿命の有意な短縮が認められ、その効果はAktシグナル経路が大きく減弱した*daf-2*変異体でも同様にみられたことから、リン酸化ではなくアセチル化による影響が示唆された。

上述したグルコースによる寿命の短縮は、ヒトACLの線虫オルソログである*acly-1*および*acly-2*の単独ノックダウンでも認められた。いずれかの代償作用による影響が予想されたが、線虫ではダブルノックダウンの効率が低いため、十分な検証は行えなかった。

DAF-16結合配列のモデルレポーターをゲノムに組み込んだTg線虫を樹立し、ルシフェラーゼアッセイによる内在性DAF-16の活性評価系を確立した。この系を用いることで、高グルコース培養条件下において、DAF-16の転写活性が抑制されることが明らかになった。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hada K, Hirota K, Inanobe A, Kako K, Miyata M, Araoi S, Matsumoto M, Ohta R, Arisawa M, Daitoku H, Hanada T, and Fukamizu A.	4. 巻 294
2. 論文標題 Tricarboxylic acid cycle activity suppresses acetylation of mitochondrial proteins during early embryonic development in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 3091-3099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.004726	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Araoi S, Daitoku H, Yokoyama A, Kako K, Hirota K and Fukamizu A.	4. 巻 163
2. 論文標題 The GATA transcription factor ELT-2 modulates both the expression and methyltransferase activity of PRMT-1 in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 433-440
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvy012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sha L, Daitoku H, Araoi S, Kaneko Y, Takahashi Y, Kako K, and Fukamizu A.	4. 巻 37
2. 論文標題 Asymmetric Arginine Dimethylation Modulates Mitochondrial Energy Metabolism and Homeostasis in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00504-00516
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MCB.00504-16	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirota K, Shigekawa C, Araoi S, Sha L, Inagawa T, Kanou A, Kako K, Daitoku H, and Fukamizu A.	4. 巻 161
2. 論文標題 Simultaneous ablation of prmt-1 and prmt-5 abolishes asymmetric and symmetric arginine dimethylations in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 521-527
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvw101	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮田 真衣、大徳 浩照、角 直亮、横山 航、廣田 恵子、深水 昭吉
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> における開始メチオニンtRNA m1A58修飾が寿命に及ぼす影響
3. 学会等名 2018年度 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大徳 浩照、廣田 恵子、宮田 真衣、角 直亮、深水 昭吉
2. 発表標題 RNAメチル化修飾による寿命制御メカニズム
3. 学会等名 第72回 日本栄養・食糧学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島 実咲、大徳 浩照、狩野 明彦、廣田 恵子、深水 昭吉
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> のリボソームに対するヒスチジンメチル基転移酵素hpm-1の役割
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大徳 浩照、宮田 真衣、角 直亮、横山 航、廣田 恵子、深水 昭吉
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> における開始メチオニンtRNA m1A58修飾を介した寿命制御機構の解析
3. 学会等名 第91回 日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新生翔、大徳浩照、金子悠太、深水昭吉
2. 発表標題 線虫C. elegansにおける転写因子DAF-16の活性化に働く熱センサーの同定
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 宮田真衣、大徳浩照、深水昭吉	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 4
3. 書名 実験医学 特集 RNAが修飾される	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----