

## 博士論文（要約）

転写因子 NFIA の褐色脂肪分化と筋細胞分化の  
制御作用ドメインの解析

三宅 加奈

## 論文の内容の要旨

論文題目 転写因子 NFIA の褐色脂肪分化と筋細胞分化の制御作用ドメインの解析

氏名 三宅 加奈

【背景】褐色脂肪細胞は、白色脂肪細胞と比較して豊富なミトコンドリア、多房性の脂肪滴を持ち、機能的には寒冷時などに脂質や糖質を取り込み、熱産生を行うことで体温維持に寄与しており、肥満症治療の標的臓器として注目されている。

我々は、転写因子 Nuclear Factor I/A (NFIA) が褐色脂肪細胞に特異的な転写制御に重要であることを見出した。NFIA には、マウス筋細胞由来の C2C12 細胞に導入すると、3つの機能を示す：①筋細胞への分化抑制作用 ②脂肪細胞への分化促進作用 ③脂肪細胞の中でも特に、褐色脂肪細胞に分化誘導させる作用である。C2C12 細胞に NFIA を導入し、脂肪細胞分化プロトコルで培養すると、細胞の形態的観察上、脂肪滴が蓄積され、脂肪細胞様の形態をとる。mRNA 発現解析では、筋細胞遺伝子の転写は抑制されるのに対し、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPAR $\gamma$  遺伝子やその標的遺伝子である脂肪のマーカー遺伝子群の発現が促進され、さらに熱産生に重要な UCP-1 に代表される褐色脂肪細胞に特異的な遺伝子群の誘導が認められる。機能的にも酸素消費量の増大を認め、褐色脂肪細胞の形質を獲得する。

NFIA が PPAR $\gamma$  の発現を介した脂肪細胞分化促進作用と別に、褐色脂肪細胞遺伝子の転写促進作用を有することは、NFIA と PPAR $\gamma$  を共発現実験で示される：PPAR $\gamma$  は単独導入で C2C12 細胞を脂肪細胞に分化させるが、NFIA と PPAR $\gamma$  を共発現させると、脂肪滴の蓄積や脂肪分化のマーカー遺伝子群の発現には大きな差はないものの、褐色脂肪細胞特異的な遺伝子の発現量が著明に増加する。さらに、ChIP 解析の結果から、NFIA と PPAR $\gamma$  は褐色脂肪遺伝子の近傍のエンハンサー上で、互いに近接して結合しており、NFIA が PPAR $\gamma$  の結合やクロマチンアクセシビリティを増大させることにより、褐色脂肪遺伝子の転写を促進していることが明らかにされている ( Y. Hiraike, et al. Nat. Cell Biol., vol. 19, no. 9, pp. 1081-1092, 2017. )。

【目的と方法】NFIA は、N 末端側に DNA 結合ドメインを、C 末端側には転写調節ドメインが存在することが知られている。本研究では、上述の NFIA の3つの転写調節作用において、どのドメインがその作用を担っている領域を明らかにするために、NFIA の各機能ドメイン及びその一部分を欠失する複数の変異体の発現プラスミドを作成し、レトロウイルスを介して C2C12 細胞に導入し、脂肪細胞分化および筋細胞分化を誘導し、全長 NFIA の導入細胞と比較した。

脂肪細胞や筋細胞への分化能は、形態学的評価、および定量的 RT-qPCR 法による、分化に特異的なマーカー遺伝子の発現量で評価した。また、NFIA と PPAR $\gamma$  が協調して褐色脂肪細胞関連遺伝子の発現を誘導する作用については、PPAR $\gamma$  とこれらの NFIA の変異体を C2C12 細胞に共発現

させ、脂肪細胞分化を誘導し同様に評価した。また、褐色脂肪細胞特異的遺伝子、褐色・白色脂肪細胞に共通のマーカー遺伝子の近傍に存在するエンハンサー領域の候補である領域について、NFIA や PPAR $\gamma$  の結合領域のクロマチンアクセシビリティの増大の有無を FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) 法で評価した。

なお、本研究に用いている各種欠失変異は、蛋白の発現量自体は同程度であることはウェスタンブロットティングで確認した。

**【結果】** NFIA の DNA 結合ドメイン全体の欠失変異 ( $\Delta$ 1-199)、および転写制御ドメイン全体の欠失 ( $\Delta$ 201-509) ではいずれも、筋細胞の分化抑制、脂肪細胞への分化、褐色脂肪遺伝子の誘導作用のすべてが消失した。このことから、3つの作用の全てにおいて NFIA は DNA に結合する転写因子として作用していることが示唆された。

転写制御ドメインの C 末端側にはプロリンリッチドメイン領域 (397-509aa (amino acids)) を欠損した変異体においては、脂肪細胞への分化、褐色脂肪遺伝子の誘導作用が消失し、筋細胞への分化は部分的に消失した。続けて、プロリンリッチドメインを 3 領域に分けて欠失させた変異体について検討した ( $\Delta$ Pro#1;  $\Delta$ 397-441aa,  $\Delta$ Pro#2;  $\Delta$ 442-492aa,  $\Delta$ Pro#3;  $\Delta$ 493-509aa)。これらの変異体では、筋細胞分化抑制能は、この 3 種類の変異体でいずれも保たれていたのに対して、 $\Delta$ Pro#1,  $\Delta$ Pro#3 は脂肪細胞分化誘導能が大幅に低下し、 $\Delta$ Pro#2 では脂肪細胞分化がむしろ促進された。これらの変異の中で C 末端の 17 アミノ酸の欠失 ( $\Delta$ Pro#3;  $\Delta$ 493-509aa) は、特に PPAR $\gamma$  の発現誘導と脂肪細胞への分化促進作用、主な褐色脂肪遺伝子の Ucp1 の誘導作用はほぼ完全に消失していた。

次に、転写活性化能の評価のために、酵母由来の Gal4-DBD ドメインと NFIA の転写制御ドメイン (199-509) の融合タンパクを作成してルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、 $\Delta$ Pro#3 に相当する C 末端の 17 アミノ酸を欠失した Gal4-NFIA ( $\Delta$ 493-509) はコントロールベクターと比較し著しく転写活性化能が低下していた。

C2C12 細胞で NFIA は脂肪細胞のマスターレギュレーターである PPAR $\gamma$  と共発現させると、脂肪細胞分化とは独立した褐色脂肪特異的遺伝子の発現の促進作用を有している。興味深いことに、共発現させた PPAR $\gamma$  の存在下では、NFIA の C 末端の 17 アミノ酸の欠失 ( $\Delta$ Pro#3;  $\Delta$ 493-509aa) は、NFIA 全長を共発現させた場合と同様に、代表的な褐色脂肪細胞特異的遺伝子 Ucp1 の発現を誘導した。

さらに、DNA 上では NFIA と PPAR $\gamma$  が褐色脂肪特異的遺伝子のエンハンサー上で共局在すると、エンハンサーのクロマチンアクセシビリティを増大させ、褐色脂肪特異的な遺伝子の発現を制御することが当研究室の平池らの先行研究で明らかにされている。NFIA だけが結合する領域で比較すると、NFIA  $\Delta$ Pro#3 は NFIA と比較して、クロマチンアクセシビリティが比較的保たれていたことから、NFIA  $\Delta$ Pro#3 はエンハンサー領域でヌクレオソームの構造を変化させる機能を、多くの領域では保持している可能性が示唆された。それとは対照的に、PPAR $\gamma$  だけが結合する領域においては NFIA  $\Delta$ Pro#3 ではおおよそ消失した。これはこの変異体が PPAR $\gamma$  の発現誘導作

用がほぼ消失しており、NFIA により誘導される PPAR $\gamma$  を介したクロマチンアクセシビリティの増加が起こらなかったと推測された。一方、NFIA と PPAR $\gamma$  が共局在することが示唆される領域において、多くの領域で NFIA、PPAR $\gamma$  いずれの単独発現でもクロマチンアクセシビリティを増大させたが、NFIA と PPAR $\gamma$  を共発現させた場合には相乗的に作用が増強することが示唆された。その上で、NFIA  $\Delta$ Pro#3 を PPAR $\gamma$  と共発現させた場合、NFIA 全長を PPAR $\gamma$  と共発現させた場合と同様に、NFIA と PPAR $\gamma$  の相乗的なクロマチンアクセシビリティ増大が保たれていた。

#### 【考察】

本研究では、NFIA の (1)– (3) の機能について、重要な領域を検討した。

- (1) PPAR $\gamma$  発現誘導を介した脂肪分化促進作用
- (2) (1) とは独立した褐色脂肪遺伝子の誘導作用
- (3) 筋細胞への分化を誘導する遺伝子に対する抑制作用

まず、NFIA の脂肪細胞への分化作用には DNA 結合ドメインおよびプロリンリッチドメインが必須であった。筋細胞の分化抑制、脂肪細胞への分化、褐色脂肪遺伝子の誘導作用のすべてが消失した。このことから、3つの作用の全てに NFIA の DNA への結合が重要であり、DNA に結合する転写因子として作用していることが示唆された。プロリンリッチドメインを 3 領域に分けて欠失させた変異体の検討では、筋細胞分化抑制能は、この 3 種類の変異体でいずれも保たれていたのに対して、 $\Delta$ Pro#1、 $\Delta$ Pro#3 は脂肪細胞分化誘導能が大幅に低下し、 $\Delta$ Pro#2 では脂肪細胞分化がむしろ促進された。このことから Pro#2; 442–492aa 領域には脂肪細胞分化を抑制する作用がある可能性が示唆された。C 末端の 17 アミノ酸の欠失 ( $\Delta$ Pro#3;  $\Delta$ 493–509aa) は、特に PPAR $\gamma$  の発現誘導と脂肪細胞への分化促進作用、褐色脂肪遺伝子 Ucp1 の誘導作用はほぼ完全に消失していた。NFIA  $\Delta$ Pro#3 は、ルシフェラーゼアッセイにおいて転写活性化能も著しく低下しており、NFIA の転写因子としての活性及び、PPAR $\gamma$  を含む標的遺伝子の発現誘導作用は C 末端の 17 残基が重要な役割を担うことが示唆された。一方、NFIA 結合領域のクロマチンアクセシビリティ増大作用や PPAR $\gamma$  共発現下での褐色脂肪遺伝子誘導作用、筋細胞分化の抑制作用は保たれており、Pro#3 以外の部位がそのメカニズムを担っている可能性が高いと考えられた。そのメカニズムとしては、クロマチンアクセシビリティを増大させる作用を担うクロマチンリモデリング複合体やコファクターのリクルートを担う領域が異なる可能性が想定されるが、今後、そのような機構を同定するために、本研究で検討した変異体が有用なツールになることが期待された。