

審査の結果の要旨

氏名 三宅 加奈

本研究は、褐色脂肪細胞の分化において重要な役割を担うと考えられる転写因子 NFIA の異なる3つの作用、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脂肪細胞分化促進作用とは独立した褐色脂肪遺伝子の誘導作用を担うドメインを明らかにするため、レトロウイルスベクターを用いてマウス NFIA および NFIA の機能ドメイン欠失変異体をマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞に導入して分化誘導する系において、褐色脂肪関連遺伝子、白色脂肪と褐色脂肪に共通する脂肪細胞関連遺伝子、筋細胞関連遺伝子の mRNA 発現量、および脂肪細胞遺伝子周辺のエンハンサー領域候補でのクロマチンアクセシビリティを評価した。脂肪細胞のマスターレギュレーターであり、DNA 上で NFIA と共局在することが過去に報告されている PPAR γ を共発現させた系でも同様に評価した。また、マウス NFIA の転写制御ドメイン、およびその各欠失変異体を酵母由来の Gal4-DNA 結合ドメインと融合させ、HEK293T 細胞株に導入した系でルシフェラーゼアッセイを行い、NFIA の転写活性化能を評価した。

これらによって以下の結果を得ている。

1. マウス NFIA の DNA 結合ドメイン全体の欠失変異(Δ 1-199)、および転写制御ドメイン全体の欠失(Δ 201-509) の mRNA 発現量評価では、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。

2. 転写制御ドメインの C 末端側の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(Δ Pro#1; Δ 397-441aa, Δ Pro#2; Δ 442-492aa, Δ Pro#3; Δ 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、 Δ Pro#1, Δ Pro#3 は脂肪細胞分化誘導能が大幅に低下し、 Δ 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(Δ Pro#3; Δ 493-509aa)は、特に PPAR γ の発現誘導と脂肪細胞への分化促進作用、褐色脂肪遺伝子群の誘導作用はほぼ完全に消失していた。

3. 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、

Δ Pro#3 に相当する C 末端の 17 アミノ酸を欠失した Gal4-NFIA(Δ 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。

4. 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 γ 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。共発現させた PPAR γ の存在下では、NFIA の C 末端の 17 アミノ酸の欠失(Δ Pro#3; Δ 493-509aa)は、NFIA 全長を共発現させた場合と同様に、褐色脂肪細胞特異的遺伝子の発現を誘導した。

さらに、DNA 上では NFIA と PPAR γ 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同研究室の先行研究で明らかにされていた。NFIA だけが結合する領域で比較すると、NFIA Δ 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 Δ 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 γ だけが結合する領域においては NFIA Δ Pro#3 ではおおよそ消失した。これはこの変異体が PPAR γ 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 γ 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 γ 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 γ 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 γ 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 Δ Pro#3 を PPAR γ と共発現させた場合、NFIA 全長を PPAR γ と共発現させた場合と同様に、NFIA と PPAR γ 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。

5. C 末端の 17 アミノ酸の欠失(Δ Pro#3; Δ 493-509aa)は、特に PPAR γ 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 Δ 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 γ 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 γ 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。

以上、本研究により、NFIA の様々な機能において重要な領域が明らかになった。これら

の結果は、褐色脂肪細胞でのエネルギー消費を促進することによる肥満症の治療の開発において重要な知見と考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。