

論文の内容の要旨

論文題目 : Histone Demethylase JMJD1A Regulates Metabolism in Adipose Tissue

(ヒストン脱メチル化酵素 JMJD1A による代謝制御機構の解明)

氏名 藤原 庸右

【序】

DNA の塩基配列の変化を伴わず、遺伝子の働きを変える仕組みをエピジェネティクスと呼び、DNA やヒストンに対するメチル化やアセチル化などの翻訳後修飾 (エピゲノム) による遺伝子の転写制御の研究が盛んに行われている。その中でヒストン 3 の 9 番目リジン残基ジメチル (H3K9me2) は、転写抑制のヒストン修飾であり、ヘテロクロマチンの形成と関係する。H3K9me2 の脱メチル化酵素の一つである Jumonji-C domain-containing 1a (JMJD1A) は、遺伝子発現を正に制御する。

恒温動物は急速な寒冷刺激に暴露されると、震え熱産生と非震え熱産生を行い自身の体温を保つ。この非震え熱産生において、大きな役割を果たすのが褐色脂肪組織 (BAT) である。さらに BAT において、JMJD1A は、 β -アドレナリン/PKA シグナルを介して、265 番目のセリン (JMJD1A-Ser265) のリン酸化修飾を受ける。リン酸化された JMJD1A は、ハブタンパクとして機能し、熱産生関連遺伝子の急速な転写を促進する。このリン酸化を介した熱産生機構は、JMJD1A が本来持つ脱メチル活性に非依存的であった (Abe Y, et al., *Nat Commun*, 2015)。

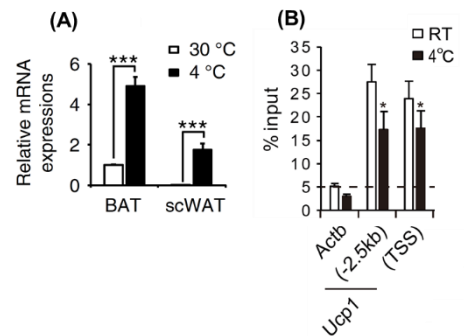
また近年、慢性的な寒冷暴露により、皮下白色脂肪組織 (scWAT) において、ミトコンドリアを豊富に含み、非震え熱産生を司る UCPI (Uncoupling protein 1) を多く発現した褐色脂肪細胞様のベージュ脂肪細胞が新たに作られ (ベージュ化)、寒冷に適応する事が報告されている (Wu J, et al., *Cell*, 2012)。このベージュ化は、脂肪燃焼とエネルギー消費を促進することから、肥満やインスリン抵抗性といった治療標的になりうると考えられている (Kajimura S, et al., *Cell Metab* 2017)。

しかし、ベージュ化を制御する詳細なメカニズムは、未だ不明な点が多い。寒冷刺激前から熱産生関連遺伝子を発現する BAT とは異なり、ベージュ脂肪細胞は、前駆白色脂肪細胞から新たに作られることから、寒冷刺激前は、熱産生関連遺伝子の転写領域はヘテロクロマチンを形成し、転写が抑制されていると推測される。そこで私は本研究において、H3K9 脱メチル化酵素である JMJD1A を介したベージュ化制御機構の解明を目指した。

【方法と結果】

1. ベージュ化過程において、H3K9 ジメチルが脱メチル化される。

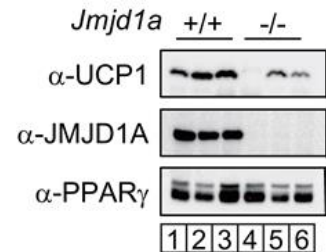
まず、ベージュ化に H3K9me2 が関わっているかを調べるため、野生型マウスを寒冷 (4°C) 下で1週間飼育した。その後、BAT, scWAT を採取し、RT-qPCR 法で熱産生関連遺伝子である *Ucp1* の発現量を測定した。長期的な寒冷暴露により、scWAT に *Ucp1* が発現し、ベージュ化した事を確認した (図 1-A)。さらに、抗 H3K9me2 抗体を用いた ChIP-qPCR 法により、*Ucp1* 転写領域の H3K9me2 レベルを評価した。その結果、scWAT では長期的な寒冷暴露により、H3K9me2 レベルが下がり、その転写が亢進している事を見出した (図 1-B)。この事から、ベージュ化過程において、H3K9me2 が脱メチル化される事が示された。



【図 1】 (A) RT-qPCR による *Ucp1* 遺伝子発現量の測定。 (B) 抗 H3K9me2 抗体を用いた ChIP-qPCR 解析による scWAT 中の H3K9me2 のレベルの評価

2. JMJD1A はベージュ化に必要である。

次に、H3K9me2 の脱メチル化を担う JMJD1A がベージュ化に必要であるかを検証するため、JMJD1A KO マウスを寒冷 (4°C) 下で1週間飼育した。その後、scWAT を採取し、UCP1 に対するイムノブロット法、免疫染色法により、ベージュ化を評価した。野生型マウスに比べ、JMJD1A KO マウスでは、scWAT の UCP1 の発現誘導が低下し、ベージュ化が减弱していた (図 2)。この事から、JMJD1A がベージュ化において、必要である事が示された。

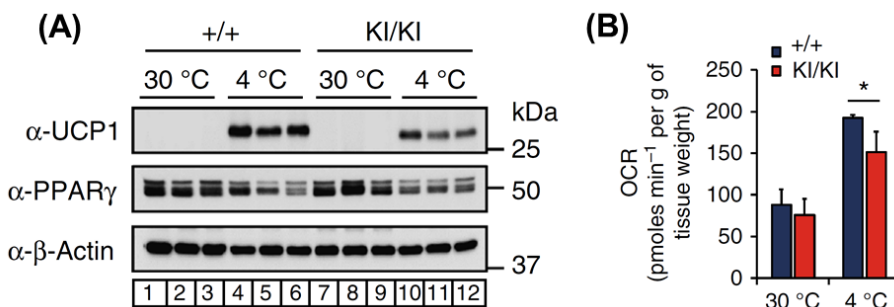


【図 2】 イムノブロット法による scWAT 中の UCP1 発現量の評価

3. JMJD1A Ser265 のリン酸化はベージュ化に寄与する。

さらに β -アドレナリン/PKA シグナルを介した JMJD1A Ser265 のリン酸化がベージュ化に必要であるかを検討した。当研究室で作製した JMJD1A S265A 点変異マウス (JMJD1A KI マウス) を寒冷 (4°C) 下で1週間飼育した。その後、scWAT を採取し、RT-qPCR, UCP1 に対するイムノブロット法、免疫染色法により、ベージュ化を評価した。野生型マウスに比べ、JMJD1A KI マウスは寒冷下で UCP1 の発現量が低下していた (図 3-A)。さらに、寒冷で飼育したマウスから scWAT を採取し、Flux analyzer によりミトコンドリア活性の指標となる Oxygen consumption rate (OCR) を測定した。寒冷下で飼育した JMJD1A KI マウスの scWAT の OCR は野生型マウスに比較して减弱していた (図 3-B)。これらの結果から、JMJD1A KI マウスではベージュ化が减弱し、JMJD1A Ser265 のリン酸化はベージュ化に

寄与していることが示された。

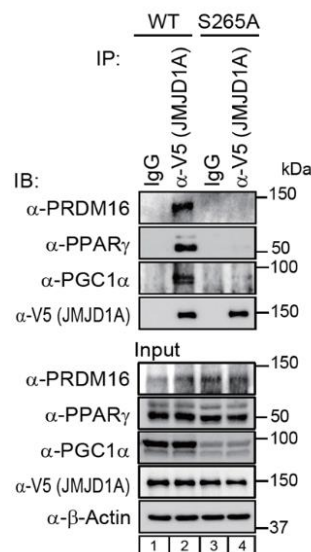


【図 3】 (A) イムノブロット法による scWAT 中の UCP1 発現量の評価 (B) Flux analyzer を用いた scWAT の OCR の評価

4. ベージュ化過程で JMJD1A はリン酸化依存的なタンパク質複合体を形成する。

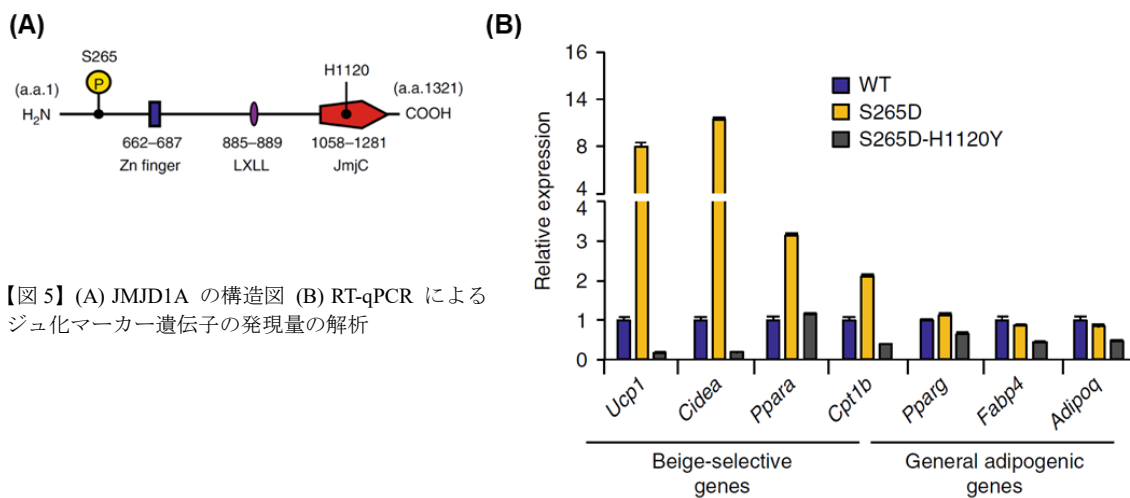
これまでの検討により、JMJD1A ならびにそのリン酸化がベージュ化に必要である事が明らかとなった。しかし、リン酸化 JMJD1A がどのようなメカニズムでベージュ化を制御するかは不明である。そこで私はリン酸化 JMJD1A 特異的に相互作用する複合体の探索を行った。野生型 JMJD1A もしくは JMJD1A S265A mutant を過剰発現した不死化白色脂肪前駆細胞を用いて、ベージュ化誘導を行い、共免疫沈降法により解析した。JMJD1A はリン酸化依存的にベージュ化関連転写因子といわれる PPAR γ や PGC1 α 、PRDM16 と相互作用する事を見出した (図 4)。

【図 4】 共免疫沈降法によるリン酸化 JMJD1A と結合するタンパク質の同定。



5. JMJD1A のリン酸化と脱メチル活性の両方がベージュ化に必要である。

ベージュ化過程で熱産生関連遺伝子の H3K9me2 が脱メチル化されている事、JMJD1A がリン酸化依存的にタンパク質複合体を形成し、ベージュ化を制御している事が明らかとなった。しかし JMJD1A の H3K9me2 脱メチル化活性がベージュ化に関与しているかは明らかではない。そこで、リン酸化を恒常的に模倣した JMJD1A S265D mutant、リン酸化を模倣しているが、脱メチル化活性を持つ JmjC ドメインの H1120 (図 5-A) に点変異を導入した JMJD1A S265D-H1120Y mutant を過剰発現した不死化白色脂肪細胞株を作成して解析を行った。それぞれの細胞をベージュ化誘導した後、ベージュ化マーカー遺伝子の発現量を RT-qPCR により解析した。また、ミトコンドリア活性を Flux analyzer を用いて解析した。その結果、S265D mutant では野生型に比較して、*Ucp1* や *Cidea* といったベージュ化マーカー遺伝子の発現量が上昇する一方、S265D-H1120Y mutant では野生型よりもその発現量は低下していた (図 5-b)。この結果から、リン酸化だけではなく、JMJD1A の本来持つ H3K9me2 の脱メチル活性もベージュ化に必要であることが示唆された。

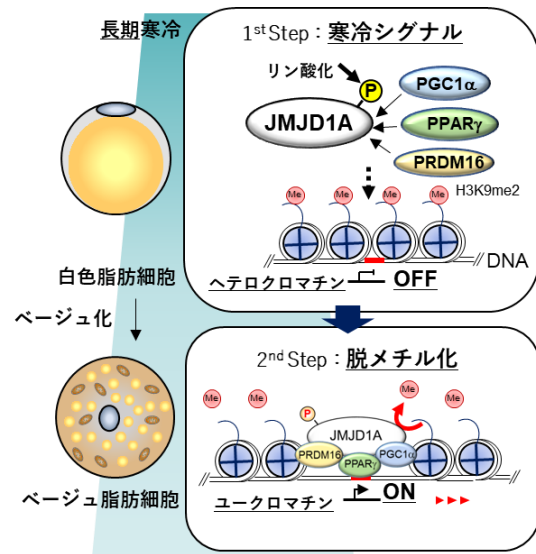


【図 5】 (A) JMJD1A の構造図 (B) RT-qPCR によるベージュ化マーカー遺伝子の発現量の解析

【まとめと考察】

ベージュ脂肪細胞は、脂肪を燃焼する事で、エネルギー消費を増やし、太りにくい体質の獲得に関与することが報告されているが (Schulz, et al., *Nature* 2013)、ベージュ化分子機構の詳細は解明されておらず、今日までベージュ化誘導によるエネルギー消費を増大させる肥満症治療薬の開発は実現していない。

本研究において私は、JMJD1A が Ser265 のリン酸化とそれに続くタンパク質複合体形成 (1st Step)、そして、H3K9me2 の脱メチル化によるエピゲノム変化 (2nd Step) によりベージュ化を制御している事を解明した (図 6)。つまり、これまで不明であったエピゲノムを介した詳細なベージュ化の制御機構の1つを明らかにしたといえる。これらの研究成果により、JMJD1A のリン酸化というわずか一つの翻訳後修飾を標的とする事で、遺伝子領域特異的なエピゲノム書き換えを介した肥満症治療薬の創薬が期待できる。



【図 6】 JMJD1A を介したベージュ化制御機構モデル