

## 審査の結果の要旨

氏名 藤原 庸右

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とが知られている。特に、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。BAT において、JMJD1A は、 $\beta$ -アドレナリン/PKA シグナルを介して、265 番目のセリンのリン酸化修飾を受ける。リン酸化された JMJD1A は、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적である。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 UCP1 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。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。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た。

このような状況において、藤原は博士課程において、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。

まず、ベージュ化に H3K9me2 が関わっているかを調べるため、常法に従い、野生型マウスを寒冷 (4°C) 下で 1 週間飼育した後、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。その結果、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。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。この事から、

藤原は、ベージュ化過程において、H3K9me2 が脱メチル化される事を示した。

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、ベージュ化が減弱していた。この事から、藤原は、JMJD1A がベージュ化において必要である事を示した。

さらに  $\beta$ -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。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。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減弱していた。これらの結果から、藤原は JMJD1A KI マウスではベージュ化が減弱し、JMJD1A Ser265 のリン酸化はベージュ化に寄与していることを明らかにした。

以上の検討により、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った。そこで藤原は、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。その結果、藤原は、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 $\cdot$  や PGC1 $\cdot$ 、PRDM16 と相互作用する事を見出した。

藤原はここまでの解析から、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を明らかにした。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かった。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 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。この結果から、藤原は、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を示した。

以上の成果は、白色脂肪細胞のベージュ化の分子機構を詳細に明らかにした重要な発見であり、将来肥満防止の新たな戦略の重要な知見を与えるものである。よって本論文は博士（薬学）の学位請求論文として合格と認められる。