

審査の結果の要旨

氏名 高橋 宙大

本研究では、白色脂肪組織のベージュ化において熱産生遺伝子の発現誘導に重要な役割を担っていると考えられるヒストン脱メチル化酵素 JMJD1A の 265 番目のセリン残基リン酸化の脱リン酸化酵素の網羅的な同定を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 3T3-L1 白色脂肪前駆細胞より調整した全細胞溶解液から精製した JMJD1A 関連たんぱく質のプロテオーム解析を実施した。結果、ミオシン軽鎖ホスファターゼの調節サブユニットである MYPT1 と触媒サブユニットである PP1 $\beta$  を同定した。
2.  $\beta$  アドレナリン受容体作動薬である Isoproterenol で刺激した 3T3-L1 白色脂肪前駆細胞より調整した核抽出液から精製した JMJD1A 関連たんぱく質のプロテオームデータ (Abe et al., 2015 (Nat Commun 6, 7052 (2015))) の解析を行った。結果、MYPT1 の同定ペプチド数が Isoproterenol 刺激により増加し、MYPT1 が  $\beta$  アドレナリン受容体シグナル依存的に JMJD1A と相互作用し得る事が示された。

また、核内受容体 PPAR $\gamma$  のアゴニストであるロシグリタゾンによりベージュ化を誘導する系を用いて、MYPT1、PP1 $\beta$  のベージュ化における機能解析を試みた結果、下記の結果を得ている。

1. 野生型マウス由来皮下白色脂肪初代培養細胞において、siRNA により MYPT1 をノックダウンの上、ベージュ化を誘導した。その後、ベージュ脂肪細胞の quantitative polymerase chain reaction (qPCR) 法による熱産生遺伝子発現量の定量、Flux analyzer を用いたミトコンドリア活性の測定、及び RNA sequencing 法による遺伝子発現プロファイルの解析を実施した。結果、MYPT1 のノックダウンにより、熱産生遺伝子群の発現量、及び熱産生の指標である uncoupled respiration が増加したことから、MYPT1 がベージュ化を抑制的に制御する事が示された。
2. MYPT1<sup>flax/flax</sup> マウス由来皮下白色脂肪初代培養細胞において、Cre recombinase アデノウイルスを感染させ、MYPT1 遺伝子の deletion を行った。その後、ベージュ化を誘導し、ベージュ脂肪細胞において qPCR 法により熱産生遺伝子の発現量の定量解析を行った。結果、MYPT1 遺伝子の deletion によっても、熱産生遺伝子の発現誘導が認められた。
3. 1 と同じ条件で PP1 $\beta$  を siRNA によりノックダウンし、qPCR 法により熱産生遺伝子の発現量を定量した。結果、PP1 $\beta$  のノックダウンにより、熱産生遺伝子の発現量が増加した。従って、PP1 $\beta$  もベージュ化において熱産生遺伝子の発現を抑制的に制御している

事が示された。

更に、MYPT1によるベージュ化における熱産生遺伝子の発現制御機構の解明を試みた結果、下記の結果を得ている。

1. siRNAによりMYPT1をノックダウンした不死化白色脂肪前駆細胞より調整した全細胞溶解液からJMJD1Aたんぱく質を精製した。続いて、Immunoblot法により、リン酸化Jmjd1a抗体を用いてJMJD1Aの265番目のセリン残基のリン酸化レベルを評価した。結果、MYPT1のノックダウンにより、JMJD1Aのリン酸化レベルが増加したことから、MYPT1がJMJD1Aの265番目のセリン残基の脱リン酸化を担い得る事が示された。
2. 野生型及び265番目のセリン残基がphospho-defectiveなアラニン残基に置換されたリン酸化されないJMJD1Aノックインマウス由来の皮下白色脂肪初代培養細胞において、siRNAによりMYPT1をノックダウンした。続いてベージュ化を誘導し、ベージュ脂肪細胞においてqPCR法により熱産生遺伝子の発現量の定量解析を行った。結果、野生型及びノックインマウス由来のベージュ脂肪細胞で共に、MYPT1のノックダウンにより、熱産生遺伝子の発現誘導が認められた。一方同時に、野生型に比べ、ノックインマウス由来のベージュ脂肪細胞では、熱産生遺伝子の発現誘導の減弱が認められた。このことから、JMJD1AのみならずJMJD1A以外のたんぱく質もMYPT1によるベージュ化制御に働く事が示された。
3. siRNAによりMYPT1をノックダウンした不死化白色脂肪前駆細胞より調整した全細胞溶解液からリン酸化ペプチドを濃縮・精製し、リン酸化プロテオミクス解析に供した。結果、MYPT1のノックダウンにより、リン酸化レベルが増加する潜在的なMYPT1の脱リン酸化ターゲット部位が網羅的に同定された。更に、同定されたターゲット部位のリン酸化を担うキナーゼの一つであるミオシン軽鎖キナーゼMYLKをsiRNAにより不死化白色脂肪前駆細胞において、MYPT1と共にダブルノックダウンした。そして、ベージュ化を誘導後、ベージュ脂肪細胞においてqPCR法により熱産生遺伝子の発現量の定量解析を行った。結果、MYPT1をシングルノックダウンした場合に比べ、MYLKとMYPT1のダブルノックダウン時には、熱産生遺伝子の発現誘導の減弱が認められた。従って、MYLKがMYPT1による熱産生遺伝子の発現制御において、MYPT1に拮抗されるキナーゼの一つである事が示唆された。

以上、本論文は皮下白色脂肪細胞において、プロテオーム解析より同定されたJMJD1Aの脱リン酸化酵素の候補の機能解析から、新しい脂肪細胞のベージュ化の抑制因子として脱リン酸化酵素複合体MYPT1-PP1 $\beta$ の存在を明らかにした。薬理的刺激によるベージュ脂肪細胞の活性化によりエネルギー消費を増大させる事が肥満症の新たな治療戦略として注目を集め、世界中でベージュ化の制御を担う化合物の同定が展開されている中、新しいベージュ化の制御因子を同定した事は医学的に非常に意義深い研究であると考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。