

博士論文

論文題目 ヒストンメチル化酵素候補蛋白 SETD5 の機能解明に

関する研究

氏名 山崎 あゆむ

目 次

略語一覧.....	3
要 旨	5
第1章 序 文.....	6
1-1. 生活習慣病とエピゲノム	6
1-2. エピゲノムにおけるヒストン修飾の意義	7
1-3. 間葉系細胞分化におけるエピゲノム	10
1-4. 脂肪細胞分化の制御	10
1-5. 骨芽細胞分化の制御	11
1-6. Wnt signaling について.....	12
1-7. クロマチン免疫沈降(ChIP) on chip/ChIP-sequencing、マイクロアレイを用いた統合解析.....	16
1-8. SETD5 は PPAR γ の標的遺伝子候補である	17
第2章 目 的.....	22
第3章 方 法.....	23
3-1. 細胞培養	23
3-2. マウス SETD5 発現プラスミドの作製	25
3-3. レトロウイルスを用いた SETD5 発現 3T3-L1 細胞・ST2 細胞の作製	30
3-4. 3T3-L1 細胞および ST2 細胞への siRNA の導入	31
3-5. Oil Red O 染色	31
3-6. アルカリフォスファターゼ染色	32
3-7. von Kossa's 染色.....	33
3-8. 細胞免疫染色	33
3-9. 3T3-L1 細胞および ST2 細胞の cDNA を用いた定量的 reverse transcription polymerase chain reaction(qRT-PCR).....	34
3-10. 3T3-L1 細胞由来 cDNA を用いたマイクロアレイ解析.....	37
3-11. 抗原用 mouse SETD5(aa43-93) 発現バキュロウイルスの精製	37
3-12. イムノブロット	39
3-13. 免疫沈降	42
3-14. ChIP	43
3-15. ChIP-qPCR	47
3-16. ChIP on chip	49
3-17. ChIP-sequencing.....	49
3-18. Setd5 グローバルノックアウトマウスの作製と表現型解析	50

第4章	結 果	56
4-1.	強制発現した SETD5 は核内に存在する	56
4-2.	Setd5 は Wnt/ β -catenin signaling に制御されることが示唆される	58
4-3.	抗 SETD5 抗体の作製	60
4-3-1.	抗原領域の決定	60
4-3-2.	抗 SETD5 抗体の評価	62
4-4.	脂肪細胞分化における SETD5 の機能	65
4-4-1.	3T3-L1 細胞における SETD5 強制発現の脂肪細胞分化への影響	65
4-4-2.	脂肪細胞分化抑制に関与する SETD5 アミノ酸部位の同定	69
4-4-3.	3T3-L1 細胞における Setd5 ノックダウンの脂肪細胞分化への影響	73
4-5.	骨芽細胞分化における SETD5 の機能	75
4-5-1.	ST2 細胞における SETD5 強制発現の骨芽細胞分化への影響	75
4-5-2.	ST2 細胞における Setd5 ノックダウンの骨芽細胞分化への影響	79
4-6.	ChIP-sequencing とマイクロアレイを用いた SETD5 の標的遺伝子の探索	82
4-6-1.	SETD5 の ChIP	82
4-6-2.	マイクロアレイと ChIP-sequencing による統合的解析	87
4-6-3.	SETD5 依存的に Sox4 の遺伝子発現は上昇する	93
4-6-4.	SETD5 の脂肪細胞分化抑制効果に Wnt/ β -catenin signaling が関与する可能性はある	95
4-7.	Setd5 グローバルノックアウトマウスの樹立	97
4-7-1.	Setd5 グローバルノックアウトマウスの作製	97
4-7-2.	Setd5 グローバルノックアウトマウスの体重変化	102
第5章	考 察	105
5-1.	脂肪細胞・骨芽細胞分化における SETD5 の機能	105
5-2.	SETD5 による脂肪細胞・骨芽細胞分化制御機構について	106
5-3.	SETD5 は Sox4 の遺伝子発現をどのように制御しているか	109
5-4.	生体内での SETD5 の機能について	112
第6章	結 論	114
	参考文献	115
	謝 辞	120

略語一覧

ALP, alkaline phosphatase

Alpl, alkaline phosphatase liver/bone/kidney

APC, adenomatosis polyposis coil

Bglap, bone gamma carboxyglutamate protein (=Osteocalcin)

BMP, bone morphogenetic protein

Cbfb, core binding factor beta

Cdk2, cyclin-dependent kinase 2

Cdkn1, cyclin-dependent kinase inhibitor 1

C/EBP, CCAAT/enhancer binding protein

ChIP, chromatin immunoprecipitation

CK1a, casein kinase 1a

Col1a1, collagen type I α 1

DAPI, 4', 6-diamidino-2-phenylindole

DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium

dNTPs, deoxyribonucleotide triphosphate

DTT, dithiothreitol

EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid

EGS, ethylene glycol bis [succinimidylsuccinate]

EGTA, ethylene glycol tetraacetic acid

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay

ES cell, embryonic stem cell

FBS, fetal bovine serum

FGF, fibroblast growth factors

FZL, frizzled

GLP, G9a-like protein

GSK3, glycogen synthase kinase 3

Hoxa9, homeobox A9

IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine

IGF, insulin-like growth factors

JHDM1B, JmjC domain-containing family of histone demethylase 1B

Klf5, Kruppel-like factor 5

LEF, lymphoid enhancer binding factor

LRP, LDL-receptor-related proteins

Mest, mesoderm specific transcript

MLL5, myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 5

Nnat, neuronatin
Nr2f2, nuclear receptor subfamily 2 group F member2
ORO, Oil Red O
PBS, phosphate buffered saline
PCP, planar cell polarity
PCR, polymerase chain reaction
PKA, protein kinase A
PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride
PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor γ
PPRE, PPAR response element
PP2A, protein phosphatase 2A
qRT-PCR, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RPMI, RPMI medium
Runx2, runt related transcription factor 2
SETDB1, SET domain bifurcated 1
SETD5, SET domain containing 5
Sox4, sex determining region Y-related HMG-box 4
Spp1, secreted phosphoprotein 1
Sp7, transcription factor 7 (=Osterix)
SSIIRT, SuperScript II Reverse Transcriptase
Suv39h1, suppressor of variegation 3-9 homolog 1
TCF, transcription factor
Wnt, wingless-related MMTV integration site

要 旨

SETD5 は 3T3-L1 細胞の抗 PPAR γ 抗体を用いた ChIP on chip 解析で標的遺伝子として見出された。抗 β -catenin 抗体を用いた ChIP on chip 解析において、 β -catenin により制御を受けることが示唆された。PPAR γ および β -catenin(Wnt/ β -signaling) は脂肪細胞・骨芽細胞分化を制御することが知られており、SETD5 がこれらの分化制御に関わることが示唆された。そこで、脂肪細胞・骨芽細胞分化における SETD5 の機能を解明することを目的として本研究を行った。

SETD5 は 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化を抑制し、ST2 細胞の骨芽細胞分化を促進した。強制発現 SETD5 は、自身の SET ドメイン非依存的に分化制御を行った。

3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化過程におけるマイクロアレイと、SETD5 の ChIP-sequencing の統合的解析からその標的の一つとして Sox4 を見出した。また、新たに Setd5 グローバルノックアウトマウスを樹立した。Setd5 グローバルノックアウト雌マウスにおいては、高脂肪食投与下で野生型に比べて体重増加が大きかった。今後、さらなる解析が必要である。

第1章 序 文

1-1. 生活習慣病とエピゲノム

食生活が欧米化された近代日本において、メタボリックシンドロームから引き起こされる2型糖尿病、脂質代謝異常、高血圧症といった生活習慣病は深刻な社会問題となっている。また、加齢や生活習慣に伴って発症する骨粗鬆症も生活習慣病の一部とみなされるようになった[1]。高齢者のみならず、動脈硬化性疾患の発症や骨粗鬆症に伴う骨折など著しい運動機能の制限が生じれば、廃用症候群に陥り、さらなる疾病を惹起するという負の連鎖が形成される。このような悪循環を改善するため、メタボリックシンドローム・生活習慣病は発症を未然に防ぐことが重要な課題である。

メタボリックシンドロームの発症には脂肪細胞およびそこから分泌される各種サイトカインが強く関わっており、脂肪細胞分化制御機構を解明することはメタボリックシンドロームの予防につながる[2]。また、脂肪細胞と同じ間葉系細胞に属する骨芽細胞の分化は、脂肪細胞分化と種々の分化制御因子の点で双極をなしており、さらに対骨粗鬆症の観点からも興味深い[3,4]。脂肪細胞や骨芽細胞といった間葉系細胞の分化誘導のプロセスにはDNA塩基配列による遺伝情報のみならず、DNAのメチル化やヒストンの翻訳後修飾、RNAによる転写制御といったエピゲノム制御が関与することが報告されている[5,6]。生活習慣病など

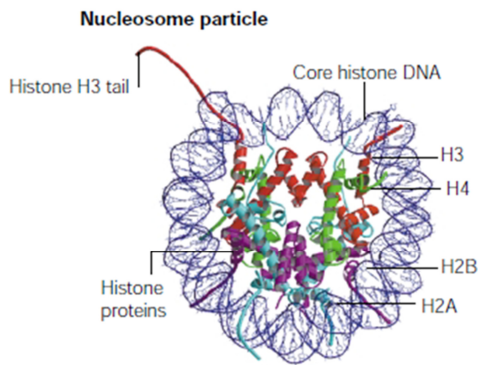
外的環境によってエピゲノムは変化することから、間葉系細胞分化におけるエピゲノム制御メカニズムの解明は急務と言える。

1-2. エピゲノムにおけるヒストン修飾の意義

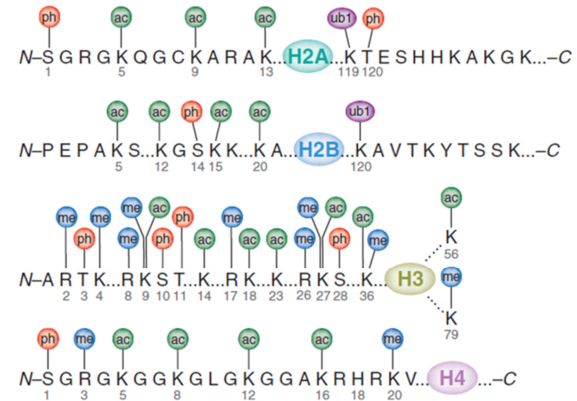
エピゲノム変化はクロマチン構造を変化させ、遺伝子の発現制御において重要な役割を担っている。クロマチン構造の最小単位はヌクレオソームで、2つのヒストン H2A-H2B 二量体と1つの H3-H4 四量体で構成されるコアヒストン八量体の周りを146bpのDNAが1.75回転で左巻きに巻いている(図1A) [7]。ヒストンのC末端はヒストンフォールドドメインと呼ばれる三次構造をとり、ヌクレオソームの構造形成に関与する。N末端を構成する20~30のアミノ酸は立体構造に乏しく、ヒストンテールと呼ばれ、リン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化、SUMO化などの修飾のターゲットとなる(図1B) [8,9]。これらのヒストンテールの修飾は、ヌクレオソーム間を緩めたり閉じたりして相互作用を調節したり、大々的にクロマチンの形態を変化させるような SWI/SNF complex などのクロマチン再構築因子をリクルートメントすることが知られている[10]。具体的には、ヒストン3(H3)の4番目のリジン(K4)のメチル化、H3K9/27のアセチル化などは転写促進に、H3K9/27、H4K20のメチル化、各リジンの脱アセチル化などは転写抑制に働くことが知られている(図1C) [11]。また、これ

らの修飾は可逆的であるため、修飾の組み合わせは、時間的・空間的に多岐にわたる。ヒストンのメチル化修飾に着目すると、一般的に、転写が活性化されている遺伝子のプロモーターおよび転写開始点の領域には H3K4 トリメチルが分布しており、不活化の指標である H3K27 トリメチルや H3K9 トリメチルは存在しない。しかしながら、転写が不活化されている遺伝子のプロモーター領域に関しては、H3K27 トリメチルが広く存在するが H3K4 トリメチルも同時に認められ、活性化と不活化という相反する指標が存在する二価的(bivalent)な状態にある。これは特に、分化段階の細胞において時間的な転写制御を行う上で重要な役割を果たしていると考えられており、その制御においては種々のヒストンメチル化・脱メチル化酵素が関与している。

A



B



C

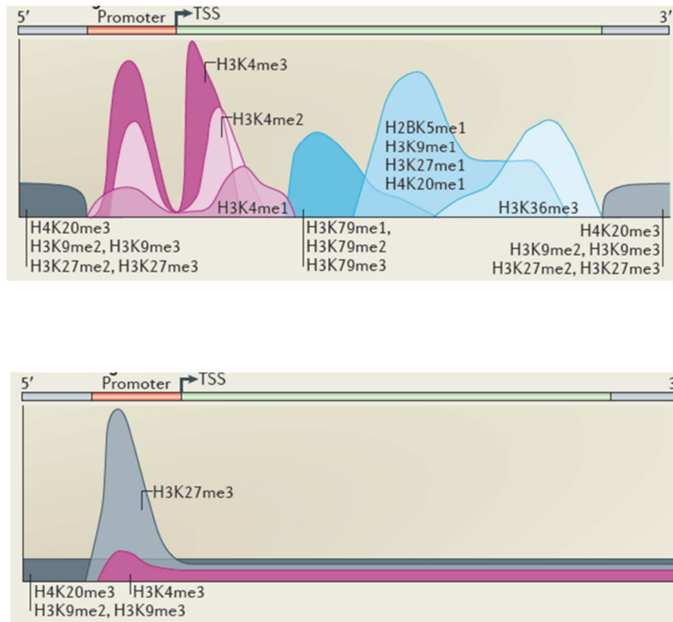


図1 ヒストン修飾によるエピゲノム制御

- (A) ヌクレオソームの構造 (文献7より引用)
- (B) ヒストンテールの各種修飾。ph: リン酸化、ac: アセチル化、ub1: ユビキチン化、me: メチル化 (文献9より引用)
- (C) 上: 転写が活性化された遺伝子領域におけるヒストン修飾の分布。
 下: 転写が不活性化された遺伝子領域におけるヒストン修飾の分布。
 TSS:転写開始点 (文献11より引用)

1-3. 間葉系細胞分化におけるエピゲノム

間葉系細胞分化における遺伝子発現制御には、エピゲノムの一つであるヒストンメチル化の状態変化が重要な役割を担っている。脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)や各 CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP)遺伝子の発現に際し、近傍ヒストンのメチル化が変化することが知られている[12]。一方、マウス骨髄由来幹細胞である ST2 細胞において、PPAR response element (PPRE) 領域の H3K9 のメチル化の変化が骨芽細胞分化を促進することが報告されている[13]。

1-4. 脂肪細胞分化の制御

脂肪組織は、摂取したエネルギーの貯蔵先としてだけでなく代謝調節ホルモンの産生臓器として生体内のエネルギー調節における重要な器官である[14]。その構成要素である脂肪細胞は、中胚葉由来幹細胞より分化した繊維芽細胞株の前駆脂肪細胞が、増殖停止後に終末分化・成熟したものである[15]。脂肪細胞の分化過程については、分化モデルとしてマウス繊維芽細胞由来株 3T3-L1 細胞を用いた研究が多くなされている[16,17]。3T3-L1 細胞に、デキサメサゾン、3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)、インスリンを添加し分化を誘導すると、C/EBP β 、C/EBP δ 等の早期脂肪細胞分化誘導転写因子の遺伝子発現を経て、マス

ターレギュレーターである PPAR γ と C/EBP α の発現が誘導される。その結果、脂肪蓄積関連遺伝子の発現が誘導され、脂肪滴が蓄積した終末分化を認める [18-20]。

1-5. 骨芽細胞分化の制御

骨組織は、骨構成細胞と細胞外基質から構成される。細胞外基質は基質タンパク質にハイドロキシアパタイト結晶が沈着して石灰化し硬度の高い組織となっている。この石灰化には、骨芽細胞が発現する alkaline phosphatase (ALP)による石灰化抑制因子ピロリン酸の分解が重要である [21]。また、骨組織は成長が終わった後も、常に古い組織が破骨細胞により吸収され、骨芽細胞により新しい骨が形成される骨リモデリングを行っている [22]。

骨芽細胞は、間葉系幹細胞から分化する。分化には、bone morphogenetic protein (BMP)や、fibroblast growth factors (FGF)、insulin-like growth factors (IGF)、副甲状腺ホルモン、Wnt signalingなどが直接的に作用していることが知られている [23]。しかしながら、血球系幹細胞から分化する破骨細胞分化と比較すると、時系列の詳細な分化制御機構に関しては不明な点が多く残っている。その為、骨リモデリング異常が主因である骨粗鬆症の治療薬として、破骨細胞に関連する薬剤は広く使用され効果を発揮しているが、骨芽細胞に作用する薬剤はいまだ実用

化されていない。骨芽細胞分化においては、前述の液性因子による分化誘導によって重要な転写因子である runt related transcription factor 2 (Runx2) が誘導されると、下流にある Osterix(Sp7;*Mus musculus*)が誘導される。これは、Runx2 ノックアウトマウスには Osterix の発現が認められないことから、このように考えられてきた。Runx2 はそれ自身での DNA 結合能が非常に弱いため、core binding factor beta (Cbfb)とヘテロダイマーを形成して結合能を獲得し、Collagen type I α 1 (Col1a1)をはじめとする Osoteopontin(Spp1; *Mus musculus*)、Osteocalcin(Bglap)、alkaline phosphatase liver/bone/kidney (Alp; *Mus musculus*) などの骨芽細胞マーカーとなる遺伝子群の発現を誘導する。

1-6. Wnt signaling について

Wnt signaling は、動物の初期発生や形態形成に深く関与するシグナルとして研究が行われてきた。また、成体でも重要な役割を担うが、このシグナルの異常は多くの疾病を引き起こすことが報告されている[24]。Wnt signaling は Wnt family タンパク、膜貫通型受容体である frizzled (FZL)、LDL-receptor-related proteins 5/6 (LRP5/6)の組み合わせに依存する。現在知られている経路として、大きく分けて2つの経路がある。canonical Wnt signaling と呼ばれる β -catenin を介した経路と、それ以外の noncanonical Wnt signaling である[25]。

canonical Wnt signaling は Wnt/ β -catenin signaling と呼ばれ、細胞内の β -catenin の分解を抑制し、 β -catenin が核へ移行することで transcription factor /lymphoid enhancer binding factor(TCF/LEF)ファミリーとともに各標的遺伝子の転写を直接制御する経路である (図 2)。通常 β -catenin は、Axin、adenomatosis polyposis coil (APC)、protein phosphatase 2A (PP2A)、glycogen synthase kinase 3 (GSK3)、casein kinase 1a (CK1a)の複合体によってリン酸化され、ユビキチン化の標的となり分解されている。しかし、WNT タンパクが FZL および LRP5/6 に結合すると β -catenin のリン酸化が抑制されるため、細胞内 β -catenin の濃度が上昇し、核内へ移行する。核に入った β -catenin は TCF と複合体を形成して標的遺伝子のプロモーターに結合して目的遺伝子の転写を活性化する。

Wnt/ β -catenin signaling における LRP5 は骨代謝患者の原因遺伝子として報告されている[26]。また、LRP5 ノックアウトマウスにおいて血中コレステロール値の上昇、グルコース依存的なインスリン分泌の異常が観察されている[27]。脂肪細胞分化における機能については、核内の β -catenin によって活性化された TCF が脂肪細胞分化の抑制に作用するという報告がある[28]。また、3T3-L1 細胞において Ppar γ の転写を抑制し脂肪細胞分化を抑制するという報告もある[29]。さらに、PPAR γ ばかりでなく C/EBP α が同時に抑制されることで骨芽細胞分化が促進する[30,31]。これらの報告から、Wnt/ β -catenin signaling が脂肪細胞・骨芽細胞

分化において重要な役割を果たしていることがわかる。

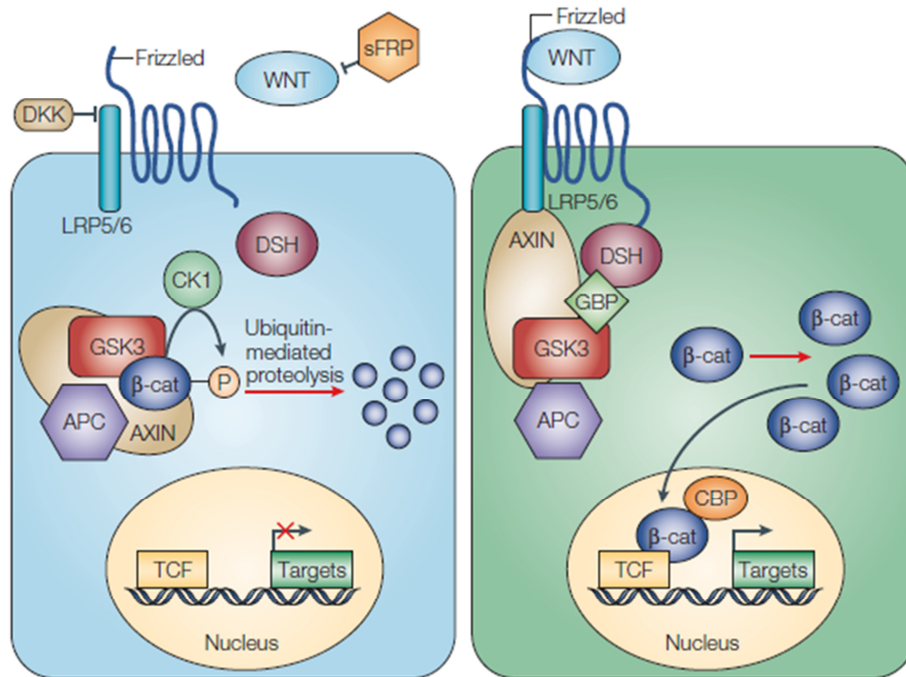


図2 Wnt/β-catenin signaling の模式図

左: Wnt signal が「OFF」の状態。

右: WNT タンパクが受容体に結合し Wnt signal が「ON」になった状態。β-catenin の細胞内濃度が上昇、核へ移行し標的遺伝子の転写を促進する。

(文献 25 より引用)

1-7. クロマチン免疫沈降(ChIP) on chip/ChIP-sequencing、マイクロアレイを用いた統合解析

クロマチン免疫沈降法(chromatin immunoprecipitation、ChIP)は、in vivo でヌクレオソームを維持したまま DNA-タンパクの相互作用を検出できる手法である。ChIP では、まずホルムアルデヒド等の架橋剤で細胞内の DNA-タンパクを固定する。このサンプルに対して免疫沈降を行い、細胞内に存在するクロマチン上の DNA-タンパク相互作用を検出する。架橋反応はクロマチン構造を維持したまま行われるため、クロマチン構造を反映した DNA-タンパク間の結合を分析することが可能になる。方法としては、固定された細胞中のクロマチン DNA を超音波破碎によって断片化し、タンパクと共に選択的に沈降する。沈降したサンプルを加熱することにより、DNA-タンパク間の架橋を分解し、DNA 断片を解析することでタンパクと結合していた DNA 領域を特定する。この方法の開発により、転写因子やヒストン修飾因子など DNA との結合があるタンパクにおける機能の解明が飛躍的に進歩した。

ChIP on chip とは、ChIP によって得られた DNA 断片を数千から数万のプローブを持つ高密度マイクロアレイ(chip)によって固定する手法である。これにより、未知の領域についても網羅的に解析が行えるようになった[32]。

ChIP-sequencing とは、ChIP によって得られた DNA 断片を次世代シーケン

サーを用いて解析することにより、全ゲノム上での結合を網羅的に解析できる手法である。ChIP on chip では見つけることができなかった micro RNA や non-coding RNA といったゲノム DNA 以外の制御に関する解析や、そのタンパクが結合する特異的な塩基配列、各遺伝子のコード領域との位置関係等、エピゲノム全般に関する二次構造を含めた解析まで行うことが可能になった[33]。

これら、ChIP on chip もしくは ChIP-sequencing とマイクロアレイのデータを統合的に解析することにより、未知の標的の探索が可能となった。

1-8. SETD5 は PPAR γ の標的遺伝子候補である

先行研究により、ヒストンメチル化酵素候補蛋白 SET domain containing 5 (SETD5) は 3T3-L1 細胞の抗 PPAR γ 抗体を用いた ChIP on Chip 解析で PPAR γ の標的候補遺伝子として見出された (図 3 A)。

3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化におけるマイクロアレイ解析において、Setd5 の遺伝子発現は分化の進行とともに低下しており、脂肪細胞分化への関与が示唆された (図 3 B) [5]。

SETD5 はヒストンメチル化を担う SET ドメインを有する 1441 アミノ酸からなるタンパクで、H3K9 のモノメチル化を行うとの報告があるが、分子メカニズムについての報告は皆無である[34]。ヒストンメチル化酵素の系統樹において、

H3K4 トリメチル化酵素である myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 5 (MLL5)と同じ分枝に位置し、両者の SET ドメインは高い相同性を示す(図 4 A、B) [35,36]。また、プロテオミクスを用いた解析でいくつかのリン酸化修飾が報告されており、591 番目のセリンは protein kinase A (PKA)によってリン酸化される[37,38]。

Setd5 遺伝子は、ヒト遺伝子上で第 3 染色体に位置し、第 3 染色体短腕の一部欠失による 3p 部分欠失症候群(3p25.3)の複数の患者における遺伝子欠失部位の重複領域に含まれている(図 5) [39]。この症候群においては、知的障害、低筋緊張、特徴的顔貌などの表現型が見られる。

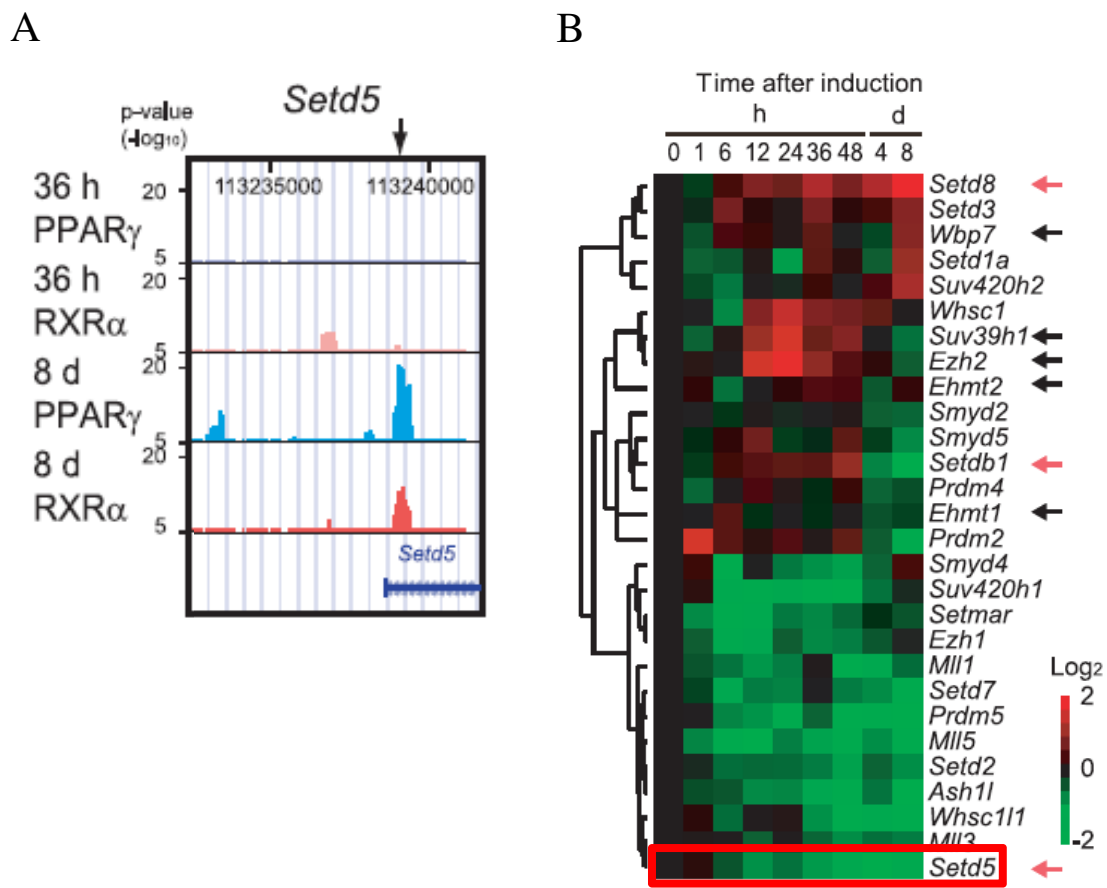


図3 Setd5 は PPAR γ の標的候補遺伝子である

(A) 3T3-L1 細胞を用いた抗 PPAR γ 抗体および抗 RXR α 抗体による ChIP on chip。分化開始 36 時間後 (36h) と分化開始 8 日後 (8d) において実施。分化早期である 36h では両者の結合は見られないが、分化終末である 8d では *Setd5* 転写開始点付近にシグナルを認める。

(文献 5 より引用、一部改変)

(B) 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化過程におけるマイクロアレイデータ解析。分化の進行と共に *Setd5* の遺伝子発現は低下する。

(文献 5 より引用、一部改変)

A

SETD5	230	QNA---LEQHLHSNKEFVGKPAILDITINKTELACNNTVIGSQMQL	QLGRVTRVQKHKIL	286
MLL5	297	QREAQRLAQRLLGSGNDS-----KDMNKSELSTNNSLFRPPVE-----SHIQKMKIL		343
SETD5	287	RAARDLALDTLIIIEYRGKVMRLRQQFEVNGHFFKKPYPFVLFYSKFNGVEMCVDARTFGND		346
MLL5	344	++A+DL D LIIIEYRGK MLR+QFE NG+FFK+PYPFVLFYSKF+G+EMCVDARTFGN+		403
SETD5	347	ARFIRRSCTPNAEVRHMIADGMIHLICIYAVSAITKDAEVTIAFDYEYSNC	NYKVDACCHK	406
MLL5	404	ARFIRRSCTPNAEVRHEIEEGTIHLYIYSIQSIPKGTETITIAFDYGNCKYKVDACLK		463

SET domain of SETD5
 SET domain of MLL5

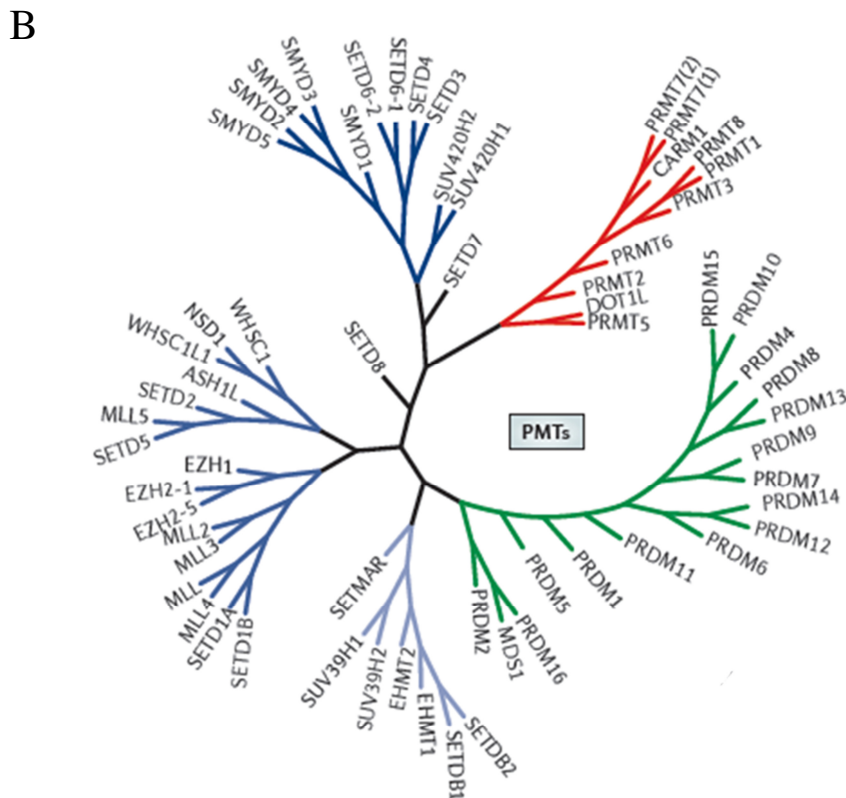


図4 SETD5はMLL5と高い相同性を示す

(A) SETD5とMLL5のSETドメインのアミノ酸配列。

赤網掛：SETD5のSETドメインのアミノ酸配列。

青網掛：MLL5のSETドメインのアミノ酸配列。

両者は高い相同性を示す。

(B) ヒストンメチル化酵素の系統樹。SETD5はMLL5と同じ分枝に位置する。

(文献35より引用)

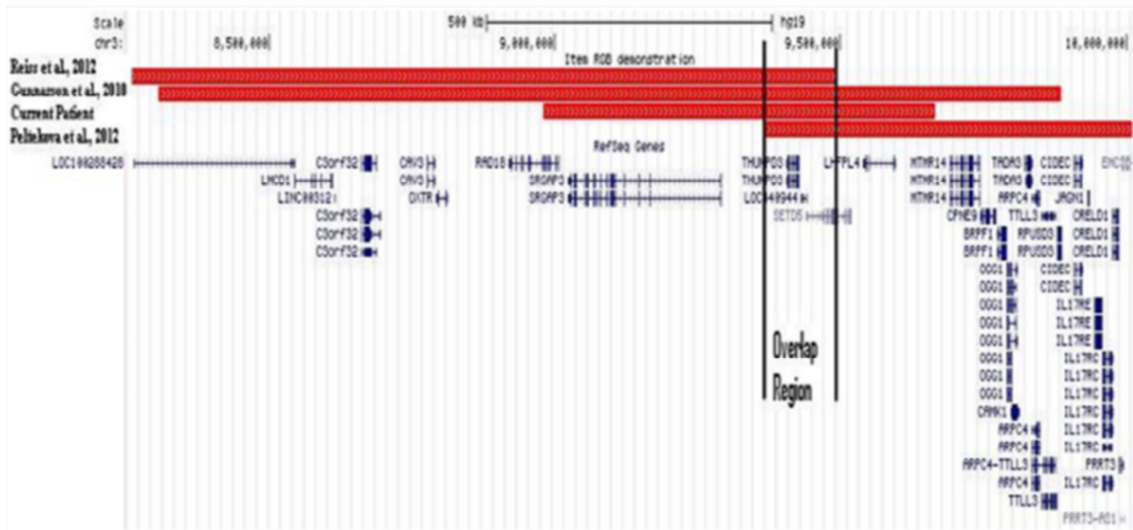


図5 3p 部分欠失症候群の複数の患者における遺伝子欠失部位
 3p 部分欠失症候群の患者における遺伝子欠失部位が赤太線で示されている。
 Setd5 遺伝子の一部が Overlap Region (重複領域)に位置している。
 (文献 39 より引用)

第2章 目的

前述のように、SETD5 は脂肪細胞・骨芽細胞分化への関与が示唆され、作用機構としてエピゲノム変化を介する可能性が考えられた。しかし、それらに関する報告はいまだない。

そこで、脂肪細胞・骨芽細胞分化における SETD5 の機能を解明し、その標的を見出すことを目的とし、本研究に着手した。

第3章 方法

3-1. 細胞培養

マウス線維芽細胞由来株 3T3-L1 細胞は、American Type Culture Collection から購入した。細胞は 10%ウシ胎児血清(FBS、GIBCO)、100units/ml ペニシリンおよび 100 μ g/ml ストレプトマイシン(nacalai)を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM、Invitrogen) を基本培地とし、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下で培養した。培地交換は 2-3 日おきに行った。脂肪細胞分化誘導は以下のように行った。細胞を 6-well plate (3224; FARCON) に 2×10^5 cells/well で播種し、2 日後に 100%コンフルエントになったことを確認し培地を交換した。その 2 日後に分化誘導培地 (0.5mM IBMX (15879; SIGMA) 、0.25 μ M デキサメサゾン (D4902;SIGMA) 、1 μ g/ml インスリン (I0516;SIGMA) を含む基本培地(DMI)、もしくは 0.25 μ M デキサメサゾンのみを含む基本培地(DEX)) に置換し、脂肪細胞分化誘導を開始した。分化誘導 2 日後に培地を除去し、1 μ g/ml インスリンを含む基本培地を加えた。その後は基本培地で 2 日おきに培地交換を行った。WNT3A(R&D systems) 添加による脂肪細胞分化抑制実験においては、分化誘導開始培地に WNT3A 20ng/ml を加え、以後、培地交換時に同様に添加した。

マウス骨髄由来間葉系幹細胞である ST2 細胞は、American Type Culture Collection から購入した。細胞は 10%FBS、100units/ml ペニシリンおよび 100 μ g/ml

ストレプトマイシンを含む RPMI Medium 1640 (RPMI, invitrogen) を基本培地とし、37°C、5%CO₂ 下で培養した。培地交換は 2-3 日おきに行った。骨芽細胞分化誘導は、以下のように行った。細胞を 6-well plate に 2×10⁵cells/well で播種、2 日後に 100%コンフルエントになったことを確認し、分化誘導培地（100µg/ml の L(+)-アスコルビン酸(nacalai)、100µg/ml の L(+)-アスコルビン酸と 100µg/ml のβ-Glycerophosphate disodium salt hydrate(G9422; SIGMA)、20ng/ml WNT3A、2ng/ml BMP-2(R&D systems)のいずれかを添加した基本培地）と置換し、骨芽細胞分化誘導を開始した。その後は、それぞれの分化誘導培地で 2 日おきに培地交換を行った。

レトロウイルスのパッケージング細胞である PlatE 細胞は、東京大学医科学研究所 北村俊雄教授より供与頂いた。細胞は、1µg/ml の Puromycin (P8833; SIGMA)、5µg/ml の Blasticidin S (R210-01; invitrogen)、10%FBS、100units/ml のペニシリンおよび 100µg/ml のストレプトマイシンを含む DMEM を用いて 37°C、5%CO₂ 下で培養した。培地交換は 2 日おきに行った。

バキュロウイルスのパッケージング細胞である Sf-9 昆虫細胞は、東京大学先端科学技術研究センター計算生物医学 浜窪隆雄教授より供与頂いた。細胞は、10%FBS、100units/ml のペニシリンおよび 100µg/ml のストレプトマイシンを含む Grace's Insect Medium Supplemented (GIBCO)を用いて、27°C、5%CO₂ 下で培養

した。dish 上での培養においては 2 日おきに培地交換を行い、スピナーフラスコ内での培養においては 3 日おきに培地交換を行った。

HEK293 細胞は、American Type Culture Collection から購入した。細胞は 10%FBS、100units/ml ペニシリンおよび 100 μ g/ml ストレプトマイシを含む DMEM を基本培地とし、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下で培養した。培地交換は 2-3 日おきに行った。

3-2. マウス SETD5 発現プラスミドの作製

サイトメガロウイルスプロモーターおよびパッケージングシグナルを有するレトロウイルス作製用ベクターである pMXs-IRES-Puro (Cell Biolabs) に、N 末端に 3 \times FLAG tag もしくは C 末端に V5 tag を付与した Setd5 フラグメントを挿入したタンパク発現ベクターを作製した。

まず、N 末端に 3 \times FLAG tag を付与した Setd5 フラグメント構築のために以下の操作を行った。3T3-L1 細胞から抽出した total RNA を SuperScript II Reverse Transcriptase (SSIIRT, Invitrogen)を用いて逆転写し、合成した complementary DNA (cDNA)を鋳型として polymerase chain reaction (PCR) 法で Setd5 フラグメントを増幅した。forward プライマーとして 5'-ATAAGAATGCGGCCGCGGGAGGAGGAAGCATTGCAATCCCTCTG -3' を、reverse プライマーとして 5'-CTAGGAAAGTCCTGTCTGAGTCT -3' (5'末端リン

酸化あり) を用いて、PCR 反応は、KOD-plus-(TOYOBO)で実施した。total RNA 200ng から合成された cDNA に、添付 10×buffer 5μl、10pmol の dNTPs、125pmol の MgSO₄、各 10pmol のプライマーを加え、滅菌蒸留水で 50μl とし、94°C、5 分間加熱した後、熱変性(94°C、30 秒間)、アニーリング(60°C、30 秒間)および進展反応(68°C、5 分間)を 30 サイクル実施し、最後に 68°Cで 7 分間加熱した。得られた PCR 産物を NotI (タカラバイオ) で処理した。N 末端側に 3×FLAG tag を付与するために、MT-CAG-3×FLAG-IRES-BSD (理化学研究所基幹研究所眞貝洋一先生より供与) を EcoRI で消化し Klenow を用いて末端平滑化処理した後、NotI で消化を行い、NotI/平滑末端で前述の Setd5 フラグメントを挿入し、MT-CAG-3×FLAG-IRES BSD-mSetd5(full length)を作製した。これを鋳型として、forward プライマー5'- AGATCTATGGACTACAAAGACCATGAC -3'、reverse プライマー5'- GTCGACCTAGGAAAGTCCTGTCTGAGT -3'を用いて、前述と同じ PCR 反応を行い、N 末端に 3×FLAG tag が付与された Setd5 フラグメントを増幅した。

次に、これを BglII (タカラバイオ)、SalI (タカラバイオ) で消化した後、pMXs-IRES-Puro の BamHI/XhoI サイトに挿入し、pMXs-IRES-Puro-3×FLAG-mSetd5(full length)を構築した。

C 末端に V5 tag を付与した SETD5 発現ベクター作製の為に、

MT-CAG-3×FLAG-IRES BSD-mSetd5(full length)を鋳型として forward プライマー 5'- TTTTAGATCTGCCACCATGAGCATTGCAATCCCT -3'、 reverse プライマー 5'- AAAAGCGGCCGCCTAAGTAGAATCTAAACCTAATAAAGGATTAGGAATAGGT TTACCGGAAAGTCCTGTCTGAGT -3'を用いて前述と同じ PCR 法で C 末端に V5 tag を付与した Setd5 フラグメントを増幅した。これを、 BglII と NotI で消化した後、 pMXs-IRES-Puro の BamHI/NotI サイトに挿入し、 pMXs-IRES-Puro-mSetd5(full length)-V5 を構築した。

欠失変異体 Δ SET、(Δ 437-1441)、(Δ 919-1441)、(Δ 437-918)、(Δ 437-531)、(Δ 532-603)、(Δ 604-793) 、 (Δ 794-918) -SETD5 発現ベクターの作成は pMXs-IRES-Puro-mSetd5(full length)-V5 を鋳型として KOD-plus- Mutagenesis Kit (TOYOBO) を用いて行った。各欠失体における forward primer および reverse primer は表 1 に記載する。5 μ l の添付バッファー、1 μ l の KOD-plus-、10nmol の dNTPs、各 15pmol のプライマーに滅菌蒸留水を加え 50 μ l とした。これを 94 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱した後、熱変性(98 $^{\circ}$ C、10 秒間)、アニーリング(55 $^{\circ}$ C、1 分間)および進展反応(68 $^{\circ}$ C、11 分間)を 20 サイクル実施し、最後に 68 $^{\circ}$ C で 7 分間加熱した。PCR 産物に 10units の DpnI (タカラバイオ) を加え、37 $^{\circ}$ C 下で 1 時間静置し、template のプラスミドの消化処理を行った。この反応液 2 μ l に対し、T4 Polynucleotide Kinase 1 μ l と Ligation high 5 μ l、滅菌蒸留水 7 μ l を加え、16 $^{\circ}$ C 下で 1

時間静置してライゲーションした。DH5 α を用いて各プラスミドを増幅し、目的のプラスミドを得た。

変異体 S591A-SETD5 発現ベクターの作成は、pMXs-IRES-Puro-mSetd5(full length)-V5 を鋳型として、表 1 のプライマーを用いて PCR 反応を行った。94°C で 5 分間加熱した後、熱変性(98°C、10 秒間)、アニーリング(55°C、1 分間)および進展反応(68°C、11 分間)を 15 サイクル実施し、最後に 68°C で 7 分間加熱した。PCR 産物に 10units の DpnI を加え、37°C 下で 1 時間静置し、template のプラスミドの消化処理を行った後、DH5 α を用いて増幅し、目的のプラスミドを得た。

表 1 SETD5 欠失変異体発現ベクター作製に用いたプライマー配列

plasmids	Sequences	
	Forward	Reverse
pMXs-IRES-Puro-mSetd5 ΔSET-V5	5'- AATTACAAAGTGGACTGT -3'	5'- TAACTGCATTTGGGAACC -3'
pMXs-IRES-Puro-mSetd5(Δaa437-1441)-V5	5'- GGTAACCTATTCCTAAT -3'	5'- TGCTCCAATGGTGGGAAA -3'
pMXs-IRES-Puro-mSetd5(Δaa919-1441)-V5	5'- GGTAACCTATTCCTAAT -3'	5'- TGTCAAATCTAGGTCTTT -3'
pMXs-IRES-Puro-mSetd5(Δaa437-918)-V5	5'- AAAGTGGGATTCCAGAC -3'	5'- TGCTCCAATGGTGGGAAA -3'
pMXs-IRES-Puro-mSetd5(Δaa437-531)-V5	5'- CGGGATCAGCCTGTAGAA -3'	5'- TGCTCCAATGGTGGGAAA -3'
pMXs-IRES-Puro-mSetd5(Δaa532-603)-V5	5'- AAACCACCTCCAGCTAAG -3'	5'- CCGTTTCTTTCTCTTCTC -3'
pMXs-IRES-Puro-mSetd5(Δaa604-793)-V5	5'- ACTCAGACTTCATCTGTG -3'	5'- AGGGATTGGCTTTTCTGC -3'
pMXs-IRES-Puro-mSetd5(Δaa794-918)-V5	5'- AAAGTGGGATTCCAGAC -3'	5'- CATCCCTTCTTCCAAGGC -3'
pMXs-IRES-Puro-mSetd5(S591A)-V5	5'- GTGAATACTCGGAGGTC CGCTCATGCTGGGGATGTAGCT -3'	5'- AGCTACATCCCCAGCA TGAGCGGACCTCCGAGTATTCAC -3'

3-3. レトロウイルスを用いた SETD5 発現 3T3-L1 細胞・ST2 細胞の作製

レトロウイルスのパッケージング細胞である PlatE 細胞に pMXs-IRES-Puro-3xFLAG-mSetd5 もしくは pMXs-IRES-Puro-mSetd5-V5 および各欠失変異体発現ベクターをトランスフェクションし、レトロウイルスを作成した。トランスフェクションは、60mm dish に、あらかじめ調整し 20 分間室温静置しておいた 9 μ l の Gene Juice (Novagen)、200 μ l の Opti-MEM (31985;gibco) ならびに 3 μ g の各遺伝子を導入した pMXs-IRES-Puro ベクターを加えた後、PlatE 細胞を 1.5×10^6 cells/4ml で播種して行った。播種 72 時間後にウイルスを含む培養上清を回収し、遠心 (1000g、5 分間、4 $^{\circ}$ C) 後、その上清をウイルス液とした。ウイルス液は platE 細胞の混入を防ぐため、一度 -80 $^{\circ}$ C で凍結した。

3T3-L1 細胞もしくは ST2 細胞を 100mm dish に 8×10^4 cells/10ml medium で播種した翌日に 10 μ g/ml の Hexadimethrine bromide (H9268; SIGMA) を添加した 2ml のウイルス液と 8ml の基本培地を加えた感染培地に培地を交換し、レトロウイルスを感染させた。翌日に基本培地に交換し、感染開始 4 日後に 0.05% Trypsin-EDTA (nacalai)を用いて細胞を回収し、150mm dish 2 枚に播種した。感染開始 6 日後に 10 μ g/ml の Puromycin を含む基本培地に交換した。感染開始 7 日後も Puromycin を含む培地に交換し、コントロールとして培養している非感染細胞が Puromycin により完全に死滅するのを確認し、感染開始 8 日後より基本培地に

戻し、安定発現株として実験に用いた。

3-4. 3T3-L1 細胞および ST2 細胞への siRNA の導入

3T3-L1 細胞および ST2 細胞への siRNA の導入は以下のように実施した。あらかじめ 1well あたり 5 μ l の Lipofectamine RNAiMAX(13778; invitrogen)、500 μ l の Opti-MEM、10pmol の siRNA を懸濁した混合液を 20 分間室温に静置した後、6-well plate に分注した。80%コンフルエントまで培養した 3T3-L1 細胞もしくは ST2 細胞を 0.05% Trypsin-EDTA を用いて回収し、 2×10^5 cells/well を加え、計 2ml/well となるように基本培地を加えた後、5%CO₂、37°C 下にて培養を開始した。3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化誘導の際には、播種 2 日後に基本培地に交換し、播種 4 日後に分化誘導培地に交換するとともに播種時と同じ組成の siRNA トランスフェクション液を作製し、各 well に添加した。以後、通常の脂肪細胞分化誘導を行った。ST2 細胞の骨芽細胞分化誘導の際には、播種 2 日後に分化誘導培地に交換するとともに、播種時と同じ組成の siRNA トランスフェクション液を作製し、各 well に添加し、以後、通常の骨芽細胞分化を行った。

3-5. Oil Red O 染色

3T3-L1 細胞の Oil Red O (ORO) 染色は、分化誘導開始から 8 日後に実施した。

細胞を播種した各 well を 2ml の phosphate buffered saline (PBS、GIBCO)で 2 回洗
浄後、1ml の 10% (v/v) ホルマリン(WAKO)を加え、室温で 10 分間固定処理した。
その後、2ml の PBS で 2 回洗浄し、1ml の 60% (v/v) 2-プロパノール(WAKO)を加
え 1 分間室温で静置した。60% (v/v) 2-プロパノールを吸引後、1ml の ORO 染色
液 (1.8mg/ml Oil Red O (nacalai)、60% (v/v) 2-プロパノール)を加え、室温で 20
分間静置した。ORO 染色液を除去後、2ml の 60% (v/v) 2-プロパノールで洗浄、
2ml の PBS で 2 回洗浄した後、2ml の PBS を加え観察に用いた。

3-6. アルカリフォスファターゼ染色

ST2 細胞のアルカリフォスファターゼ(ALP)染色は、分化誘導開始から 4 日後
に実施した。細胞を播種した各 well を 2ml の PBS で 2 回洗浄後、1ml の細胞固
定液(152mM クエン酸バッファー pH5.4、45% (v/v) アセトン、10% (v/v) メタ
ノール)を加え、室温で 5 分間固定処理した。滅菌蒸留水 2ml を加え、細胞固定
液と共に吸引後、滅菌蒸留水 2ml で洗浄した。FAST BCIP/NBT (B5655;SIGMA) 1
錠を 10ml の滅菌蒸留水に溶解した ALP 染色液 1ml を加え、37°C 下で 20 分間静
置した。染色液を除去後、2ml の滅菌蒸留水で 2 回洗浄し、2ml の滅菌蒸留水を
加え観察に用いた。

3-7. von Kossa's 染色

von Kossa's 染色は石灰化を染色する方法として骨芽細胞分化状態の評価において用いられる[40]。

ST2 細胞の von Kossa's 染色は、分化誘導開始から 17 日後に実施した。細胞を播種した各 well を 2ml の PBS で 2 回洗浄後、10% (v/v) ホルマリンを加え、室温で 30 分間固定処理した。その後、2ml の滅菌蒸留水で 2 回洗浄し、滅菌蒸留水に溶解した 5% (w/v) 硝酸銀 (31038-72;nacalai) を 1ml 加え、室温、紫外線灯下に 1 時間静置した。2ml の滅菌蒸留水で 2 回洗浄した後、滅菌蒸留水に溶解した 5% (w/v) sodium thiosulfate (nacalai) を 2ml 加え洗浄した。さらに、2ml の滅菌蒸留水で 2 回洗浄した後、2ml の滅菌蒸留水を加え観察に用いた。

3-8. 細胞免疫染色

レトロウイルス感染により SETD5 タンパクを強制発現した 3T3-L1 細胞において、免疫染色を行った。細胞をチャンバースライド(177399;Thermo)に 5×10^4 cells/chamber となるように播種し、500 μ l の基本培地、5%CO₂、37°C 下で一晩培養した。培地を除去した後、400 μ l の 4% (w/v) パラホルムアルデヒド/PBS を加えて室温で 10 分間静置し固定処理した。500 μ l の PBS で 2 回洗浄した後、200 μ l の 0.1% (v/v) NP-40 (SIGMA) / PBS を加え室温で 10 分間静置し透過処理した。

500 μ l の PBS で 2 回洗浄した後、200 μ l の 10% (v/v) goat serum (S-1000;Vector Laboratories) / PBS を加えて、室温で 30 分間静置しブロッキングした。PBS で 5 μ g/ml に希釈した Monoclonal Anti-FLAG antibody (F3165;SIGMA)もしくは 11.8 μ g/ml に希釈した Anti-V5 Antibody (R96025; invitrogen)を 200 μ l 加え、4 $^{\circ}$ C 下で一晩静置した。500 μ l の PBS で 2 回洗浄した後、500 倍希釈した蛍光標識二次抗体 Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG (Jackson Immuno Research)を 200 μ l 加え、室温暗所に 30 分間静置した。500 μ l の PBS で 3 回洗浄した後、チャンバーを除去し、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories)で封入し、Leica DMI 6000B (Leica Microsystems)を用いて観察した。

3-9. 3T3-L1 細胞および ST2 細胞の cDNA を用いた定量的 reverse transcription polymerase chain reaction(qRT-PCR)

3T3-L1 細胞および ST2 細胞の total RNA を ISOGEN (WAKO)を用いて抽出し、2 μ g の total RNA より、SSIIRT を用いて逆転写して cDNA を合成した。1well あたり 10ng の total RNA から合成した cDNA をテンプレートとして使用し、200nM の目的遺伝子特異的 forward プライマー、reverse プライマー、PCR buffer、50 μ M の dNTPs (promega)、SYBR Green (Applied Biosystems)、ROX reference dye

(SIGMA)、Taq polymerase を用いて調整したサンプルについて、ABI7900 を用いて実施した。qRT-PCR の内部標準として、Cyclophilin を用いた。表 2 に qRT-PCR 用プライマーの配列を記す。PCR 反応は全て triplicate 以上で行い、測定した遺伝子発現量を平均化した上で、サンプル中の内部標準発現量で補正し、データは平均±標準誤差で表示した。有意差の検定については、EXSUS 7.6NP を用いて F 検定を実施した後、Student's t-test 法にて実施した。P<0.05 である場合を有意な差とした。

表 2 qRT-PCR に用いたプライマー配列

Gene	Sequences	
	Forward	Reverse
Cyclophilin	5'- GGAGATGGCACAGGAGGAA -3'	5'- GCCCGTAGTGCTTCAGCTT -3'
Setd5	5'- CGTCGCCCCGTAGAGGAACGC -3'	5'- CCCCTGCTCAITCCCCTGCACT -3'
Cebp α	5'- AGATGAGGGAGTCAGGCCGT -3'	5'- CGGAAAGTCTCTCGGTCTCAA -3'
Ppar γ	5'- CAAGAATACCAAAGTGCGATCAA -3'	5'- GAGCTGGGTCTTTTCAGAATAAT -3'
Runx2	5'- GCCGGGAATGATGAGAACTA -3'	5'- ATGCGCCCTAAATCACTGAG -3'
Sp7	5'- TCTCTGCTTGAGGAAGAAGTC -3'	5'- TCTTTGTGCCTCCTTTCCCC -3'
Coll1a1	5'- ACGTCCTGGTGAAGTTGGTC -3'	5'- CAGGGAAGCCTCTTTCTCCT -3'
Alpl	5'- ACACCTTGACTGTGGTTACTGCTGA -3'	5'- CCTTGTAGCCAGGCCCGTTA -3'
Sox4	5'- GGTTCCAGTCTTGCACGC -3'	5'- TGCAACAGACCGGCATGAAT -3'

3-10. 3T3-L1 細胞由来 cDNA を用いたマイクロアレイ解析

3T3-L1 細胞由来の total RNA を、ISOGEN を用いて添付プロトコールに基づいて抽出した。2 μ g の total RNA より First strand cDNA synthesis kit (Invitrogen) を用いて逆転写し cDNA を合成した。これを用いてマイクロアレイ(Mouse Genome 430 2.0 Array; Affymetrix)を実施した。

3-11. 抗原用 mouse SETD5(aa43-93) 発現バキュロウイルスの精製

pFastBac HTB(Invitrogen)は、N 末端 His-tag 融合タンパクを昆虫由来の Sf-9 細胞に発現させるバキュロウイルスを作製するための bacmid 作業用ベクターである。pFastBac HTB-Setd5(aa43-93)は、SETD5(aa43-93)の N 末端に His tag を付与したタンパクに対する発現プラスミドとして以下のように作製した。はじめに、3T3-L1 細胞から抽出した total RNA を SSIIRT を用いて逆転写し、合成した cDNA を鋳型として SETD5(aa43-93)をコードする遺伝子断片を PCR 法で増幅した。PCR 反応は、cDNA、プライマー10pmol、5 μ l の添付 10 \times buffer、10pmol の dNTPs、125pmol の MgSO₄ を加え、KOD-plus-で実施した。滅菌蒸留水で 50 μ l とし、94 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱した後、熱変性(94 $^{\circ}$ C、30 秒間)、アニーリング(60 $^{\circ}$ C、30 秒間)および進展反応(68 $^{\circ}$ C、30 秒間)を 30 サイクル実施し、最後に 68 $^{\circ}$ C で 7 分間加熱した。増幅した遺伝子断片を BamHI および EcoRI で消化し、pFastBac HTB の

EcoRI/BamHI サイトに挿入した。DH5 α にトランスフォーメーションし、プラスミドを増幅した。

pFastBac HTB-mSetd5(aa43-93) を Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen) に従って DH10Bac にトランスフォーメーションし、組み換わった bacmid を QIAfilter Plasmid Midi Kits (Qiagen) を用いて回収した。

Bacmid を Bac-to-Bac Baculovirus Expression System に従って Sf-9 細胞に感染させ、72 時間後の培養上清を P1 バキュロウイルスとして回収した。次に 75 μ l の P1 バキュロウイルス液を 1.2×10^7 cells/100mm dish の Sf-9 細胞に感染させ、72 時間後に回収した培養上清を P2 バキュロウイルス液とした。P2 バキュロウイルス液 25ml を 5×10^8 cells/225ml medium の Sf-9 細胞に感染させ 72 時間の培養を行った後、培養液から以下のようにバキュロウイルスを精製した。培養液を 50ml ずつ 50ml チューブに回収し遠心(8000g、10 分間、4 $^{\circ}$ C)した後、上清をウイルス液として回収した。ウイルス液を超遠心(24000rpm、30 分間、4 $^{\circ}$ C)し、上清を除去し、沈殿を 10ml/チューブの PBS に懸濁し 4 $^{\circ}$ C 下で 4 時間攪拌した。ウイルスを 1 本の 50ml チューブに集め、再度、遠心(800g、10 分間、4 $^{\circ}$ C)後、上清を回収して、超遠心(24000rpm、30 分間、4 $^{\circ}$ C)し、沈殿をウイルスとして回収、350 μ l の 1mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA、nacalai)を含む PBS を加え、4 $^{\circ}$ C 下に 4 時間静置した後、懸濁して 1.5ml チューブに回収した。これを抗原として、

特殊免疫研究所においてモノクローナル抗体作製を行った。抗原の精製バキュロウイルスを、gp64 を過剰発現させたトランスジェニックマウスに免疫し、免疫したマウスの脾臓細胞を単離し、常法によりマウス P3U1 細胞との細胞融合を行い、ハイブリドーマ細胞を樹立した後、その培養上清を Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)を用いてスクリーニングした。ELISA 陽性であったクローンを用いて HEK293 細胞および 3T3-L1 細胞を用いてイムノブロッティングを行ってさらにクローンを選別した。各モノクローナル抗体はハイブリドーマ細胞の培養上清より硫酸沈殿法により調整した。

3-12. イムノロット

強制発現 SETD5 タンパクのイムノロットによる確認は以下のように行った。レトロウイルスを感染させタンパクを強制発現した 3T3-L1 細胞もしくは ST2 細胞が 150mm dish に 80%コンフルエントの状態ですべての培地を除去し、PBS 10ml で 2 回洗浄した後、PBS 2ml を加え、セルスクレーパーを用いて細胞を剥離した。15ml チューブにこれを回収し、遠心(1000g、5 分間、4°C)後、上清を除き、沈殿を 250µl/dish の 2×SDS sample buffer (60mM Tris-HCl pH6.8、6%SDS、10% (v/v) Glycerol、20mM EDTA)に懸濁し、1.5ml チューブに移した。95°Cで 5 分間処理した後、ハンディソニケーターを用いて超音波破碎し、泳動サンプルとした。ド

デシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)については、Laemmli の方法に従って実施した[41]。6%または 12%ポリアクリルアミドゲル(定電圧 150V、60-90 分間)を用いて電気泳動を行った後、ニトロセルロースメンブレン (Bio-Rad)に転写し、5% (w/v) スキムミルク(nacalai)となるよう調整した 0.05% (v/v) Tween20 (SIGMA)を含む PBS(PBS-T)で室温で 1 時間ブロッキングした。一次抗体として PBS-T で希釈し 1.18 μ g/ml とした Anti-V5 Antibody (R96025; Invitrogen)を加えて 4 $^{\circ}$ C 下で一晩反応させた後、メンブレンを PBS-T で 3 回洗浄した。その後、二次抗体として PBS-T で 0.1 μ g/ml に希釈した Anti-Mouse IgG-peroxidase (WAKO) を室温で 30 分間反応させ、メンブレンを PBS-T で 3 回洗浄した後、SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (#34076; Thermo)を用いて発光させ、ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare)でシグナルを検出した。

SETD5 内在性タンパクの検出には細胞核抽出液を用いてイムノブロットを行った。細胞核抽出液の調整は以下のように行った。3T3-L1 細胞もしくは ST2 細胞もしくは HEK293 細胞の培地を除去後、PBS で 2 回洗浄し、1ml/100mm dish、2ml/150mm dish の PBS を加えてセルスクレーパーで細胞を剥離し、15ml チューブに回収した。遠心(1000g、5 分間、4 $^{\circ}$ C)後、上清を除去し 1mM DTT、1mM PMSF、1% (v/v) プロテアーゼインヒビターカクテル(nacalai)を添加した 100 μ l/100mm

dish、150 μ l/150mm dish の Buffer A (10mM HEPES-NaOH pH7.6、1.5mM MgCl₂、10mM KCl、1mM EDTA、1mM EGTA)に懸濁したあと、氷上に 20 分間静置した。その後、シリンジを用いて 22G 針を 30 回通し遠心(1000g、7 分間、4°C)した。上清を除いた後、1mM DTT、1mM PMSF、1% (v/v)プロテアーゼインヒビターカクテルを添加した 20 μ l/100mm dish、40 μ l/150mm dish の Buffer C(20mM HEPES-NaOH pH7.6、2.5% (v/v) Glycerol、420mM NaCl、1.5mM MgCl₂、1mM EDTA、1mM EGTA)に懸濁し、4°Cで 30 分間攪拌した。遠心(15000rpm、15 分間、4°C)した後、上清を核抽出液として回収し、Protein Assay を用いて Bradford 法でタンパク濃度を測定し、サンプル間の濃度を調整した。これに、サンプルの 1/4 量の 5 \times SDS sample buffer(150mM Tris-HCl pH6.8、15%SDS、25%Glycerol、50mM EDTA)を添加し、95°Cで 5 分間処理し、前述のポリアクリルアミドゲル電気泳動、メンブレンへの転写、5% (w/v) スキムミルクを含む PBS-T によるブロッキングを行った。一次抗体として PBS-T で 5 倍希釈した培養上清、もしくは 10 μ g/ml の IgG-F2104、もしくは 0.55 μ g/ml の抗 FLAG-M2-HRP conjugate 抗体(A8592; SIGMA)を 4°C下で一晩反応させ、メンブレンを PBS-T で 3 回洗浄した。抗 FLAG-M2-HRP conjugate 抗体以外は、二次抗体反応以降、前述と同じ方法で行った。

3-13. 免疫沈降

3T3-L1 細胞の IgG-F2104 抗体での免疫沈降は以下のように行った。

150mm dish に播種した 3T3-L1 細胞を 80%コンフルエントの状態 で用いた。培地を除去し 10ml の PBS で洗浄した後、2ml/dish の PBS を加えて、氷上でセルスクレーパーを用いて細胞を剥離し回収した。遠心(1000g、5 分間、4°C)後、上清を除去し、ペレットに 1mM DTT、1mM PMSF、1%プロテアーゼインヒビターカクテルを添加した RIPA buffer (50mM HEPES-NaOH pH7.4、150mM NaCl、1.5mM MgCl₂、1% (v/v) NP-40)を加えて懸濁した後、氷上でハンディソニケーターを用いて超音波破碎した。遠心(3500rpm、10 分間、4°C)後、上清を回収し、whole cell lysate とした。1.5ml チューブに 800μl ずつ分注し、マウス IgG(WAKO)、IgG-F2104 を 10μg ずつ添加した後、4°C 下で 1 時間攪拌した。RIPA buffer に置換した protein G sepharose (GE Healthcare)を 50μl ずつ加え、さらに 4°C 下で一晩攪拌した。遠心(500g、1 分間、4°C)後、上清を分離し、protein G sepharose を 1ml の RIPA buffer で 2 回洗浄した。再度、遠心(500g、1 分間、4°C)し、protein G sepharose のみとし、2×SDS sample buffer を 50μl 加え、95°C で 5 分間処理し、泳動サンプルとした。また、分離した上清 200μl はアセトン沈殿を行い、20μl の 5×SDS sample buffer に懸濁した。input として whole cell lysate 10μl に 2.5μl の 5×SDS sample buffer を加え、95°C 下で 5 分間処理して泳動サンプルとした。6%ポリアクリルアミド

ゲルに電気泳動後、ニトロセルロースメンブレンに転写し、5% (w/v) スキムミルクを含む PBS-T を用いて室温で 1 時間ブロッキングした。一次抗体として PBS-T で希釈した 10 μ g/ml の IgG-F2104 を 4 $^{\circ}$ C 下で一晩反応させ、メンブレンを PBS-T で 3 回洗浄した。二次抗体として PBS-T で 0.1 μ g/ml に希釈した Anti-Mouse IgG-peroxidase を室温で 30 分間反応させ、メンブレンを PBS-T で 3 回洗浄した後、SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate を用いて発光させ、ImageQuant LAS 4000 mini でシグナルを検出した。

3-14. ChIP

ChIP に用いるサンプルの調整は以下のように行った。

3T3-L1 細胞を 150mm dish に 2.7×10^6 cells/dish で播種し 20ml の基本培地とともに培養した。2 日後に 100%コンフルエントになったことを確認し培地を交換し、さらに 2 日後に分化誘導 0 日目の細胞として回収した。培地を除去した後、PBS に溶解した 1.5mM EGS 10ml を加え、室温に 30 分間静置した後、最終濃度 1% のホルムアルデヒド(WAKO)を添加、混和し、室温で 10 分間静置してゲノム DNA とタンパクの架橋を行った。最終濃度 200mM の Glycine を添加、混和し架橋反応を停止し反応液を除去した後、10ml の PBS で 2 回洗浄した。4ml の PBS を加え、細胞をセルスクレーパーで剥離し 50ml チューブに回収し、遠心(3000rpm、

3 分間、4°C)後、上清を除去し細胞ペレットとした。このペレットに 10 倍の容積の Hypotonic buffer (10mM HEPES-KOH pH7.5、1.5mM MgCl₂、10mM KCl、1mM EDTA、1mM EGTA、1mM PMSF、1%(v/v)プロテアーゼインヒビターカクテル)を加え懸濁した後、シリンジを用いて 22G 針を 10 回通した。15ml チューブに、5ml ずつ分注し遠心(1000g、7 分間、4°C)した後、上清を除いた。沈殿に 4 倍の容積の SDS lysis buffer (50mM Tris-HCl pH 8.0、10mM EDTA、1% (w/v) SDS、1mM PMSF、1% (v/v)プロテアーゼインヒビターカクテル)を加え懸濁し核ペレットにした後、SONIFIER 250 advanced (BRANSON)を用いて、氷冷で 15 秒間超音波破碎、15 秒間静置の工程を 6 回行い、ゲノム DNA を断片化し核破碎液とした。核破碎液を 1.5ml チューブに分注し、遠心(15000rpm、10 分間、4°C)し上清を回収して、DC protein assay (Bio-Rad)を用いて Lowry 法によりタンパク濃度を測定した。

調整後のサンプルを用いて、抗 β -catenin 抗体を用いた ChIP は以下のように行った。500 μ g のサンプルとその 9 倍の容積の 1mM PMSF と 1% (v/v) プロテアーゼインヒビターカクテルを加えた ChIP dilution buffer を混和し、Anti- β -catenin Antibody (IgG-H102sc-7199) 2 μ g を加え 4°C 下で 1 時間攪拌した。さらに、ChIP dilution buffer で洗浄した protein G sepharose (GE healthcare) 50 μ l を加え、さらに 4°C で一晩攪拌した。遠心によりビーズを沈降させ上清を除去した後、ビーズを

1ml の Low salt IC wash buffer (20mM Tris-HCl pH 8.0、2mM EDTA、1% (v/v) TritonX-100、0.1% (w/v) SDS、150mM NaCl)、High salt IC wash buffer (20mM Tris-HCl pH 8.0、2mM EDTA、1% (v/v) TritonX-100、0.1% (w/v) SDS、500mM NaCl)、LiCl IC wash buffer (10mM Tris-HCl pH 8.0、1mM EDTA、250mM LiCl、1% (v/v) NP-40、1% (w/v) sodium deoxycholate) 、TE0.1 (10mM Tris-HCl pH 8.0、0.1mM EDTA)でそれぞれ 2 回ずつ洗浄した。ビーズに 1% (w/v) SDS+100mM NaHCO₃ 200μl、Pronase (Roche) 2μl を加え、42°C下で 2 時間静置し、その後 65°C下で一晩静置して抗体-タンパク-DNA の結合を解除した。遠心(3000rpm、10 秒間、4°C)後、上清を回収し、QIAquick PCR purification kit (QIAGEN)を用いて DNA を抽出した。また、サンプル 100μg に同様の Pronase 処理、DNA 抽出を行い、input DNA とした。

抗 V5 抗体を用いた ChIP は以下のように行った。まず、0.02% (v/v) Tween20 を含む PBS (PBS-0.02% Tween20) 1ml で Dynabeads (Invitrogen) 50μl を洗浄した。磁気スタンドに静置し上清を除いた後、PBS-0.02% Tween20 100μl と Anti-V5 Antibody 2μg を加え、室温で 1 時間攪拌した。磁気スタンドに静置し上清を除いた後、1ml の ChIP dilution buffer (16.7mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.2mM EDTA, 1.1% (v/v) TritonX-100, 0.01% (w/v) SDS, 167mM NaCl)で洗浄した。磁気スタンドに静置し上清を除いた後、500μg のサンプルとその 9 倍の容積の ChIP dilution buffer (1mM

PMSF、1% (v/v) プロテアーゼインヒビターカクテル添加)を混和し、4°C下で一晩攪拌した。磁気スタンドに静置し、上清を除去した後、ビーズを 1ml の Low salt IC wash buffer、High salt IC wash buffer、LiCl IC wash buffer、TE0.1 でそれぞれ 2 回ずつ洗浄した。ビーズに 1% (w/v) SDS 100 μ l+100mM NaHCO₃ 200 μ l、Pronease 2 μ l を加え、42°C下で 2 時間静置し、その後 65°C下で一晩静置して抗体-タンパク-DNA の結合を解除した。遠心(3000rpm、10 秒間、4°C)後、上清を回収し、QIAquick PCR purification kit を用いて DNA を抽出した。また、サンプル 100 μ g に同様の Pronease 処理、DNA 抽出を行い、input DNA とした。

抗 FLAG 抗体を用いた ChIP は以下のように行った。1mg のサンプルに 9 倍の容積の ChIP dilution buffer (1mM PMSF、1% (v/v) プロテアーゼインヒビターカクテル添加)を加え、これに ChIP dilution buffer で 2 回洗浄した 100 μ l の Anti-FLAG M2 Magnetic Beads (M8823; SIGMA)を添加し、4°C下で 2 時間攪拌した。以後の操作は、抗 V5 抗体の時と同様に行った。

IgG-F2104 抗体を用いた ChIP は以下のように行った。PBS-0.02% Tween20 1ml で Dynabeads 500 μ l を洗浄した。磁気スタンドに静置し上清を除いた後、PBS-0.02% Tween20 1ml と IgG-F2104 75 μ g を加え、室温で 1 時間攪拌した。磁気スタンドに静置し上清を除いた後、1ml の ChIP dilution buffer で洗浄した。磁気スタンドに静置し上清を除いた後、500 μ g のサンプルとその 9 倍の容積の ChIP

dilution buffer (1mM PMSF、1% (v/v) プロテアーゼインヒビターカクテル添加)を混和し、4℃下で2時間もしくは一晩攪拌した。以後の操作は、抗 V5 抗体の時と同様に行った。

抽出した DNA は、Qubit2.0 フルオロメーター (invitrogen)を用いて濃度を測定し、アコースティックソルビライザー(Covaris)を用いて約 200bp のサイズに断片化し、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)で断片化サイズの確認を行った。

3-15. ChIP-qPCR

3T3-L1 細胞の ChIP において得られた DNA をテンプレートとして使用し、200nM の目的遺伝子領域特異的 forward プライマー、reverse プライマー、PCR buffer、50 μ M の dNTPs、SYBR Green、ROX reference dye、Taq polymerase を用いて調整したサンプルについて、ABI7900 で実施した。input DNA を標準直線用のサンプルとして用いた。結果は、この直線を用いて算出した数値(%input)を ChIP-DNA の input DNA に対する量比で除し、fold enrichment とした。この計算方法では、理論上、コントロール IgG 抗体での ChIP においてどの領域で qPCR を行っても fold enrichment は 1 となる。表 3 に ChIP-qPCR に用いたプライマーの配列を記す。PCR 反応は全て triplicate 以上で行った。

表 3 ChIP-qPCR に用いたプライマー配列

Gene	Amplified regions	Sequences	
		Forward	Reverse
<i>Cyclophilin</i>	chr9:65,912,074-65,912,228	5'- CTCACCCCAACTAGTCTAATCC -3'	5'- GTGACACACAGTACTAACTCC -3'
<i>Hoxa9</i>	chr6:52,173,020-42,173,107	5'- TTTATCAACCTCACCTCAGCC -3'	TTGATICTTTIACGTTGTGCG
<i>Cdkn1</i>	chr6:134,871,015-134,871,104	5'- TTCCGCCTGCAGAAATCTCT -3'	5'- CTCGCTTCTCCATATCCCG -3'
<i>Cdk2</i>	chr10: 128,141,861-128,141,797	5'- GGAGAACTTCCAAAAGGTGGA -3'	5'- GGATCTTCTTAAGCGCCACA -3'
<i>Pparg1</i>	chr6:115,372,141-115,372,240	5'- CTGGGAGATTCTCCTGTTGACC -3'	5'- CCTTGCAGCAACATCAGGAA -3'
<i>Mest</i>	chr6:30,687,733-30,687,815	5'- AGGGTCTAGGGACCAGTGCGTG -3'	5'- AATGCCCGGGCAAGGATGA -3'
<i>Nnat</i>	chr2:157,385,915-157,386,023	5'- TTTCCGAACCATGGCCGCAGT -3'	5'- CCACCCAAAGCCCGGTACA -3'
<i>Sox4</i>	chr13:29,044,477-29,044,549	5'- GTTGCCCGACTTCACCTTCTT -3'	5'- GCTGCGCCTCAAGCACAT -3'

3-16. ChIP on chip

抽出した DNA はインビトロトランスクリプション(IVT)により転写し RNA にして、この RNA から T7 Megascript Kit (Ambion)を用いて 2 本鎖 cDNA を合成した。合成した cDNA を DNase I を用いて断片化し、oligonucleotide tiling array (Affymetrix) にハイブリダイズした[42,43]。input DNA もサンプルと同様に処理した。濃縮値(ChIP DNA/input DNA)は model-based analysis of tiling-array (MAT) アルゴリズムを用いて解析した[44]。

3-17. ChIP-sequencing

次世代シーケンサーに用いるサンプルを作成するために、断片化した DNA の末端にアダプターを付加した。ChIP-seq DNA Sample Prekit (Illumina)を用いて、DNA の末端平滑化を行った後、3'末端に PolyA を付加し、5'末端および 3'末端にアダプターを付加した。抗 V5 抗体および IgG-F2104 で ChIP を行ったサンプルはアガロースゲルに電気泳動し目的の 250-350bp 付近のゲルを切り出し、精製した。抗 FLAG 抗体で ChIP を行ったサンプルは Agencourt AMPure XP (A63880; BECKMAN COULTER)を用いて精製した。精製した断片化 DNA を PCR 法により増幅した。

DNA サンプルを Solexa Genome Analyzer II (Illumina)を用いて sequencing した

後、Pipeline software v1.4 (Illumina)を用いて 36bp のシングルエンドをマウスゲノム、NCBI Build #37 (UCSC mm9)でマッピングした。Window size は 1000bp、Cut off=2 でピークを算出し、抗 V5 抗体では 35,409,678、抗 FLAG 抗体では 41,392,992、IgG-F2104 では 42,580,827 のリード数を得て解析を行った。

3-18. Setd5 グローバルノックアウトマウスの作製と表現型解析

Setd5 の翻訳開始点は第 2 エクソンにあり、第 2 エクソンを欠失するとフレームシフトを起こすことで SETD5 タンパクの翻訳が行われないことから、この第 2 エクソンの上下流に loxP 配列を持つサイトを挿入し、Cre-loxP システムにより第 2 エクソンを欠失させる方法をとった。ターゲティングベクター作製のマウス Setd5 遺伝子は、BAC クローン RP24-140011 (Children's Hospital Oakland Research Institute)を用いた。第 2 エクソンの約 100bp 上流に site A としてネオマイシン耐性遺伝子とそれを挟む形で loxP サイトを 2 か所挿入した。約 900bp 下流に site B として FRT-ネオマイシン耐性遺伝子-FRT-loxP の順での塩基配列を挿入した。これらはいずれも、BAC クローンより PCR 法を用いてそれぞれのサイト挿入部位の前後の塩基配列を増幅し、制限酵素を用いて site A、site B の配列をもつベクター(PL452、pPE7neoW-F2LR)に挿入し、制限酵素処理して目的配列のみを切り出して作製した。RP24-140011 を、電気穿孔法を用いて BAC クロー

ン専用大腸菌株である EL350 に遺伝子導入し、BAC クローンがもつ loxP サイトを p24loxZeo と電気穿孔法にて相同組換えすることでゼオシン耐性遺伝子に置換した後、site A を電気穿孔法を用いて導入し、相同組換えが起こった大腸菌株を選別した。Cre-loxP システムを用いて 10%アラビノースを反応させネオマイシン耐性遺伝子と 2 か所ある loxP サイトのうち 1 か所を欠失させた。さらに、site B を、電気穿孔法を用いて導入し、相同組換えが起こった大腸菌株を選別した。site A の上流約 6kbp、および site B の下流約 3kbp のアームとなる配列を RP24-140011 より PCR 法を用いて増幅し、レトリービングベクターである pl253 に挿入した。レトリービングベクターを site A および site B が挿入された BAC クローンを持つ EL350 に電気穿孔法を用いて導入し、相同組換え株を選別し、ターゲティングベクターを得た。ターゲティングベクターの配列はシーケンシングにより確認した。

Embryonic stem (ES)細胞への遺伝子導入のために、ターゲティングベクターを NotI で消化処理し直線化した。直線化したターゲティングベクターを ES 細胞に電気穿孔法により導入し、継代時に細胞を完全にシングルセルとし、相同組換えを起こした ES 細胞をネオマイシンおよびチミジンキナーゼで薬剤選別した後、ゲノム DNA を抽出し、forward プライマー 5'-CTAATCCCTTCTCTTTCCAC-3'、reverse プライマー 5'-GCAATCCATCTTGTTCAATG-3'を用いて PCR 法を行い、

スクリーニングした。スクリーニングした細胞株については、サザンブロッティングにより同定した。サザンブロッティングは、5'側、3'側、ネオマイシン耐性遺伝子上の3か所にプローブを設計し、それぞれについて行った。それぞれ、ApaLI/ClaI、KpnI、KpnIによりゲノムDNAの消化処理を行い、アガロースゲルに電気泳動した後、ニトロセルロースメンブレンに室温で一晩かけて転写し、PerfectHyb (TAKARA) を用いて68°C下で攪拌しながらプレハイブリダイゼーションした。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (Perkin Elmer)で標識したプローブを 1.5×10^6 cpm/mlの濃度でPerfectHybに希釈し、68°C下で2時間攪拌した。2×SSC(150mM NaCl, 15mM クエン酸ナトリウム)+0.1% (w/v) SDSで5分間を2回、1×SSC+0.1% (w/v) SDSで15分間を2回、0.1×SSC+0.1% (w/v) SDSで15分間を2回洗浄した後、X線フィルム(富士フィルム)、増感紙(富士フィルム)とともにフィルムカセットに入れ、-80°C下で一晩静置した後、現像してシグナルを検出し、すべてのプローブで陽性である5つのクローンを得た。そのうち2つのES細胞株をC57BL/6N (Charles River)の胎生3.5日胚に注入し、キメラマウスを作製した。成育したキメラマウスの尾から抽出したゲノムDNAに目的配列があることを第2エクソン下流の共通配列のforwardプライマー 5'- GAAAGGAAGTGGAAGCCCC -3'、site B内のforwardプライマー 5'- ACGCGTCGACGCGAAAGAGACCCAAGGGGC -3'、site Bより下流にある配列のreverseプライマー 5'-

CGAGCTCTACTGATACATCATTGTGTTA -3' を用いた PCR 法で確認した。マウス尾からのゲノム DNA の抽出には、REDExtract-N-Amp Tissue PCR kit (SIGMA) を用い添付のプロトコールに従って行った。PCR は 1 反応当たり約 100ng のゲノム DNA をテンプレートとして使用し、10pmol の forward プライマーと reverse プライマー、6.25nmol の dNTPs、Taq polymerase、滅菌蒸留水で 25 μ l とし、95 $^{\circ}$ C、30 秒間加熱した後、熱変性(95 $^{\circ}$ C、30 秒間)、アニーリング(60 $^{\circ}$ C、30 秒間)および進展反応(72 $^{\circ}$ C、1 分間)を 35 サイクル実施し、最後に 72 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱した。得られた PCR 産物を 1.5% アガロースゲルに電気泳動し、目的のバンドが得られたか確認した。キメラマウスと C57BL/6N を交配し、得られた産仔においても同様の PCR 法を行い、野生型アリルと Setd5 第 2 エクソン上下流にターゲティングベクターが相同組換えされたアリルを持つ flox/+マウスを確認した。このマウスを、生殖細胞特異的に Cre 遺伝子を発現しているトランスジェニックマウス(Vasa-Cre、理化学研究所基幹研究所眞貝洋一先生より供与)[45]と交配させ、得られた産仔において、第 2 エクソン上下流に設計した forward プライマー 5'-CACTTGTGTAGCGCCAAGTG -3' と reverse プライマー 5'-CGAGCTCTACTGATACATCATTGTGTTA -3' で PCR 法を行い、Setd5 $^{+/-}$ のゲノムを持つマウスを確認した。Setd5 $^{+/-}$ マウス同士を交配させることで、Setd5 グローバルノックアウトマウスを得た。

実験に用いたマウスは、12 時間明暗サイクル、気温 23°Cの条件下で飼育し、餌（CE2；日本クレア）と水は自由に摂取できる状態とした。高脂肪食負荷を行う場合は、特別配合飼料（オリエンタル酵母）（タンパク質：炭水化物：脂肪＝15:27:58（カロリー比）（表3）を与えた。体重測定は、週1回木曜日の14時に
行い、摂餌量は餌箱を含めた重量を測定し前回重量からの差として求めた。

表 4 高脂肪食負荷に用いた特別配合飼料の組成

原料名	配合比率 (%)
カゼイン	22
ラード	35.5
デキストリン	7
マルトース	30.05
AIN93Gミネラル	3.5
AIN93ビタミン	1
メチオニン	0.7
重酒石酸コリン	0.25

第4章 結果

4-1. 強制発現した SETD5 は核内に存在する

SETD5 の細胞内局在を明らかにするために、細胞免疫染色を行った。C 末端側に V5 tag を付与した SETD5 を強制発現した 3T3-L1 細胞において、抗 V5 抗体を用いた免疫染色を行うと、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で染色される核と一致したシグナルを認め、強制発現した SETD5 は核に局在することが明らかになった。強拡大で観察すると、DAPI で強く染色されるヘテロクロマチン領域において抗 V5 抗体のシグナルが減弱していることから、強制発現した SETD5 はユークロマチン領域に多く存在することが示唆された (図6)。

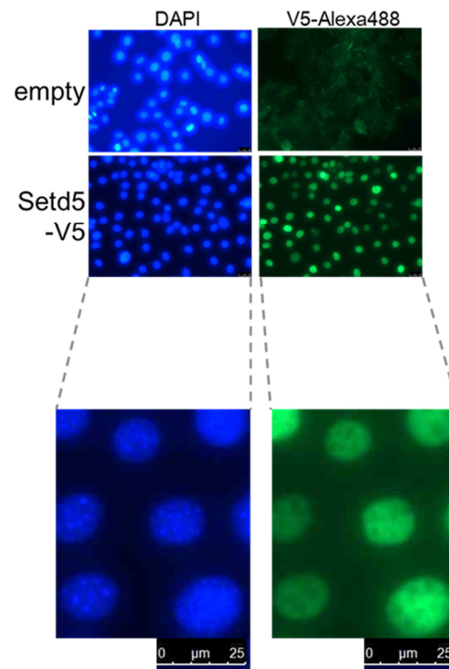


図6 強制発現した SETD5 は核に局在する

C 末端側に V5 tag を付与した SETD5 強制発現 3T3-L1 細胞での細胞免疫染色。左：青色は DAPI 染色、右：緑色は一次抗体として抗 V5 抗体を、二次抗体としてマウス IgG-Alexa-488 conjugate 抗体を用いた。DAPI 染色で濃く染まるヘテロクロマチン領域は、抗 V5 抗体による免疫染色では周囲に比べてシグナルが減弱している。

4-2. Setd5 は Wnt/ β -catenin signaling に制御されることが示唆される

脂肪細胞・骨芽細胞分化の両方に関与する Wnt/ β -catenin signaling に注目し、3T3-L1 細胞において抗 β -catenin 抗体を用いた ChIP on chip を行った。その結果、Setd5 の転写開始点近傍に β -catenin の結合を認めた (図 7 A)。また、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化過程におけるマイクロアレイでは、分化の進行とともに Setd5 の遺伝子発現は低下していたが、WNT3A 添加により Wnt/ β -catenin signaling を活性化し脂肪細胞分化を抑制すると、添加から 48 時間後に上昇した (図 7 B)。これらの結果から、Setd5 が Wnt/ β -catenin signaling に制御されることが示唆された。

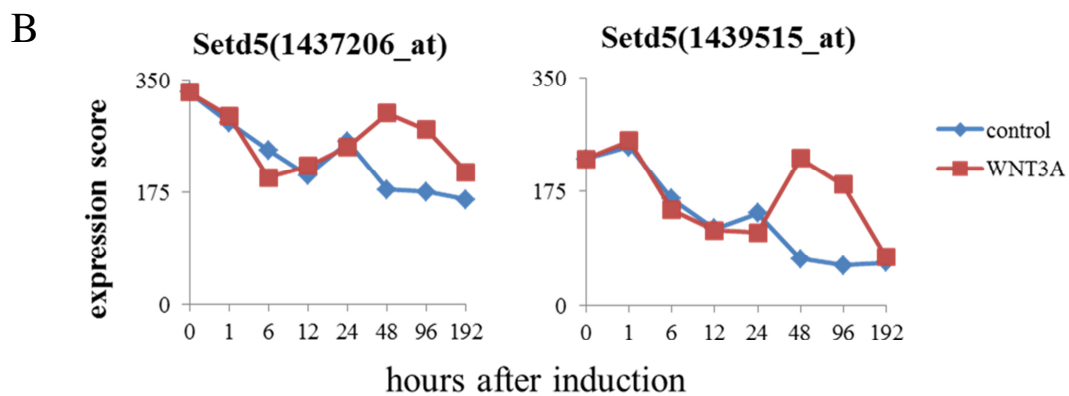
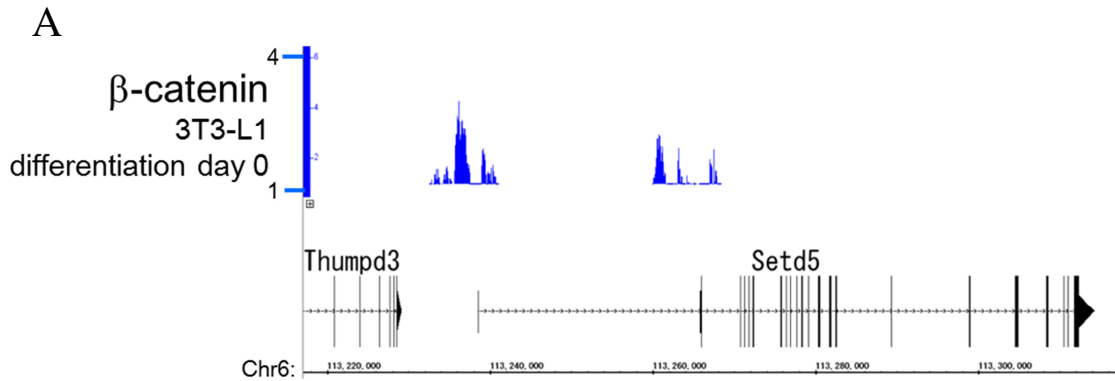


図 7 Setd5 は Wnt/ β -catenin signaling に制御されると考えられる

(A) 抗 β -catenin 抗体を用いた ChIP on chip。Integrated Genome Browser 7.0.4 を用いて表示した。縦軸は p-value ($-\log_{10}$)を示す。Setd5 の遺伝子領域にシグナルを認める。

(B) 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化過程におけるマイクロアレイ解析の結果。分化誘導開始時に 20ng/ml の WNT3A を添加、以後、2 日おきの培地交換時に同量を添加した。Setd5 は 2 つのプローブで、赤線で示す WNT3A 添加時において、48 時間後に発現上昇を認めた。

4-3. 抗 SETD5 抗体の作製

4-3-1. 抗原領域の決定

内在性マウス SETD5 を認識する抗 SETD5 抗体を作製するために、抗原とする SETD5 のアミノ酸領域を選定した。抗体の特異性をあげるために、①既知のドメイン構造を持たないユニークな配列であること、②disorder 領域であることを条件とした。disorder 領域とは一定の構造をとらないゆらぎの多い領域で、タンパクや DNA、RNA 等との相互作用に関与することや翻訳後修飾を受けることが知られている[46]。この領域を抗原として特異性の高い抗体が作成されている報告がある[47]。GlobPlot (<http://globplot.embl.de/>) を用いて SETD5 の disorder 領域を予測し、43-93 番のアミノ酸配列を抗原とした (図 8)。

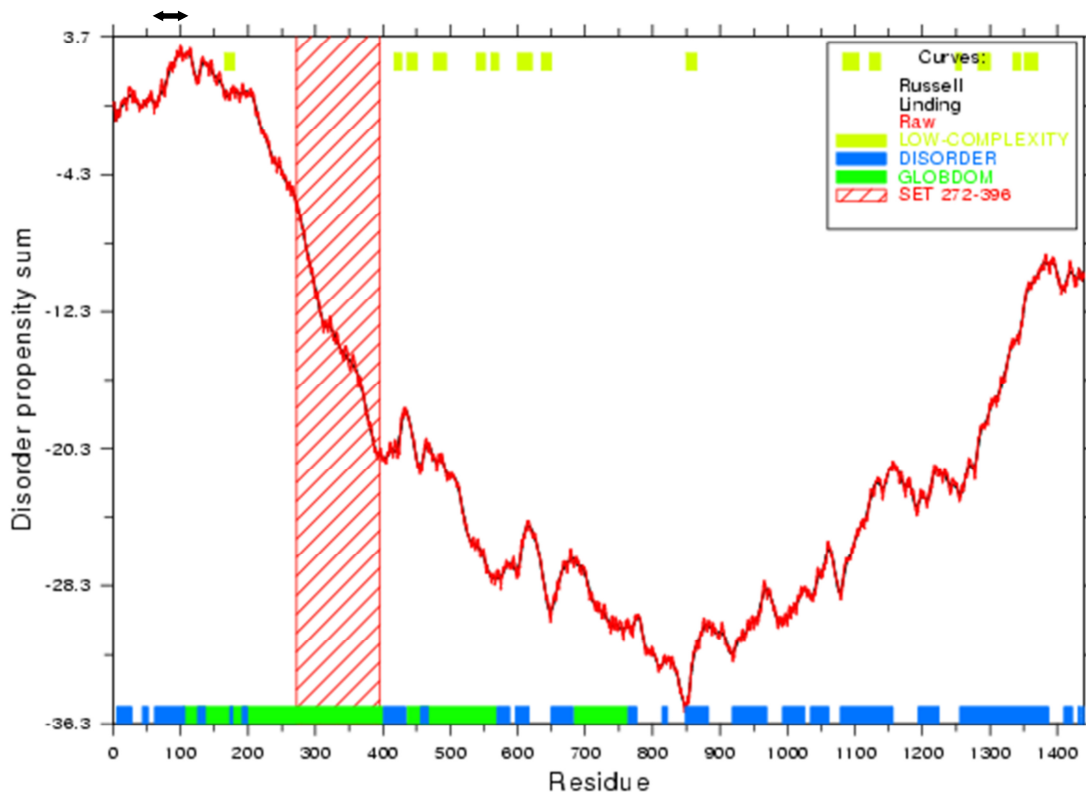


図 8 SETD5 の disorder 領域の予測

GlobPlot(<http://globplot.embl.de/>)を用いて予測した。縦軸は disorder 傾向であり、高値であるほどゆらぎが大きい。SET ドメイン(赤斜線)領域より N 末端側が比較的 disorder が高かったため、43-93 番のアミノ酸 (黒両矢印) を抗原領域として決定した。

4-3-2. 抗 SETD5 抗体の評価

バキュロウイルスを抗原として免疫したマウスから単離した脾臓細胞と P3U1 細胞とのハイブリドーマ細胞の培養上清から ELISA を用いて 10 個のクローンを選別した。これら 10 個のクローンの培養上清を用いて、SETD5 強制発現 HEK293 細胞の核抽出液のイムノブロットを行い、強制発現 SETD5 タンパクを認識する 4 つのクローン IgG-F2104、F2107、F2125、F2161 を同定した (図 9 A)。これらの培養上清から硫酸沈殿法によりモノクローナル抗体を精製し、精製した抗体を用いて 3T3-L1 細胞の核抽出液のイムノブロットを行い、内在性 SETD5 タンパクを認識するモノクローナル抗体 IgG-F2104 を見出した (図 9 B)。次に siRNA を用いて Setd5 をノックダウンした 3T3-L1 細胞の核抽出液を用いたイムノブロットを行った (図 9 C)。control siRNA をトランスフェクションした 3T3-L1 細胞で認められる内在性 SETD5 のシグナルは Setd5 ノックダウン細胞において減弱していたが、100kDa 付近に非特異的なシグナルを認めた。さらに、3T3-L1 細胞を用いて内在性 SETD5 の免疫沈降について検討を行った (図 9 D)。免疫沈降によって得られたサンプルを IgG-F2104 抗体を用いてイムノブロットし、IgG-F2104 抗体による内在性 SETD5 の免疫沈降が可能であることを見出した。核抽出液のイムノブロットで見られた非特異的なシグナルは、免疫沈降後のイムノブロットでは認められなかった。

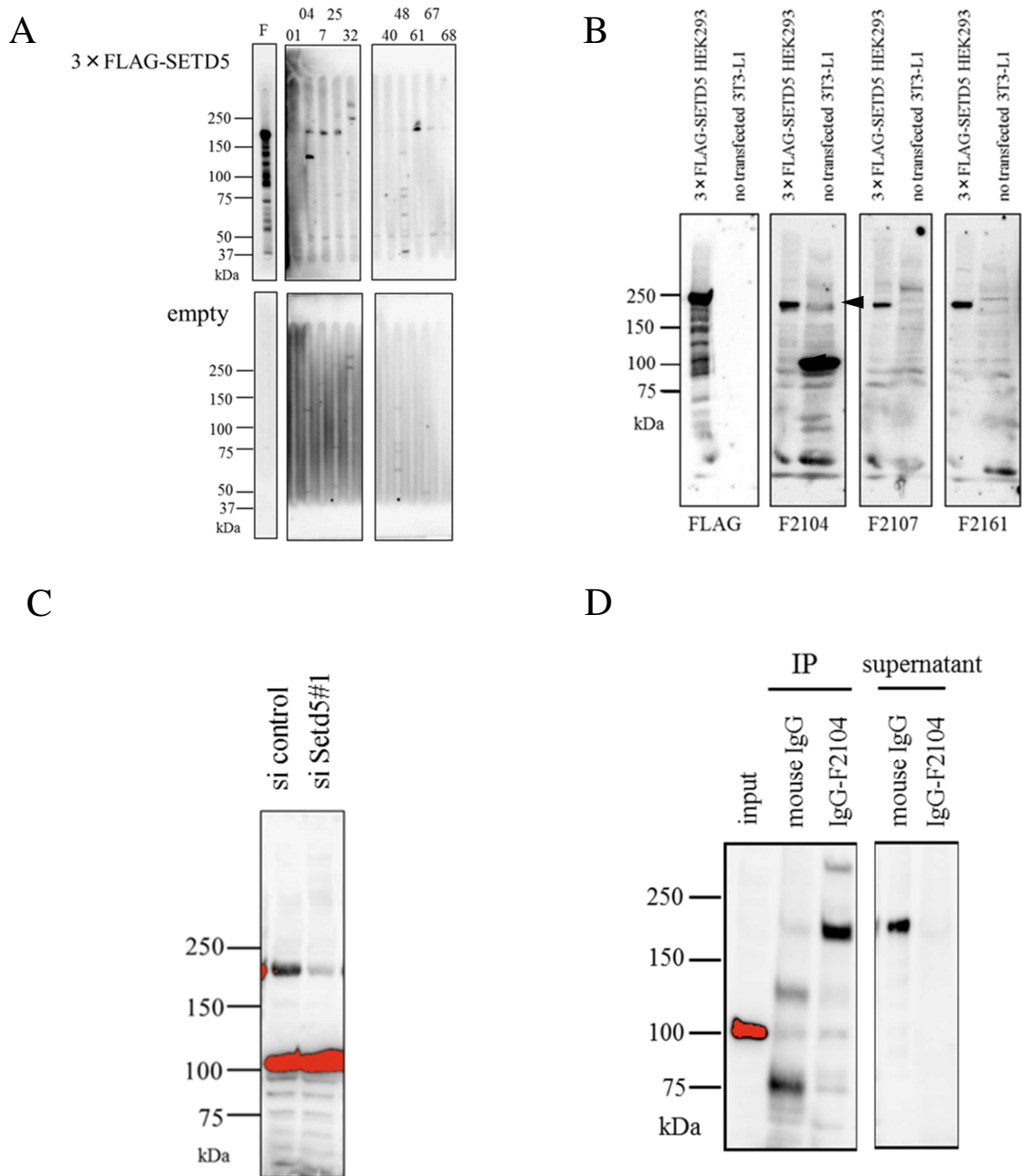


図9 抗 SETD5 抗体の評価

(A) 3×FLAG-SETD5 強制発現 HEK293 細胞 (上段) とコントロール細胞 (empty、下段) の核抽出液を用いてイムノブロットを行った。各 lane は 10ug 相当の核抽出液を使用している。「F」は抗 FLAG 抗体、数字は各培養上清のクローンナンバー(F21 シリーズ)を示す。0.55μg/ml の抗 FLAG 抗体、5 倍希釈の培養上清を用いた。4 つのクローン(F2104,F2107,F2125,F2161)で抗 FLAG 抗体と同じ分子量のバンドが検出され、強制発現 SETD5 タンパクを認識する抗体を含む培養上清と考えられた。

- (B) 3×FLAG-SETD5 強制発現 HEK293 細胞(20µg/lane)と 3T3-L1 細胞(70µg/lane)の核抽出液を用いてイムノブロットを行った。用いた抗体をブロット像下に示す。0.55µg/ml の抗 FLAG 抗体、10µg/ml の各モノクローナル抗体を用いた。IgG-F2104 のイムノブロットのみで、SETD5 強制発現 HEK293 細胞核抽出液と同じ分子量のバンドが 3T3-L1 細胞核抽出液においても観察され (黒矢頭)、内在性 SETD5 を検出していると考えられた。
- (C) siSetd5 #1 とコントロール siRNA をトランスフェクションした 3T3-L1 細胞を用いて IgG-F2104 抗体によるイムノブロットを行った。75µg/lane の 3T3-L1 細胞の核抽出液、10µg/ml の IgG-F2104 抗体を用いた。Setd5 ノックダウン細胞でシグナル強度が減弱している。100kDa 付近に両者に共通する非特異的シグナルを認める。
- (D) IgG-F2104 抗体による免疫沈降。3T3-L1 細胞の whole cell lysate を用いて免疫沈降を行い、イムノブロットで内在性 SETD5 が免疫沈降されていることを確認した。IP pellet は総量の 1/2 量、supernatant は総量の 1/5 量を電気泳動し、10µg/ml の IgG-F2104 抗体でイムノブロットを行った。(C)で認めた非特異的なシグナルは免疫沈降後のイムノブロットでは認めなかった。

4-4. 脂肪細胞分化における SETD5 の機能

4-4-1. 3T3-L1 細胞における SETD5 強制発現の脂肪細胞分化への影響

SETD5 による脂肪細胞分化に対する影響を検討するために、レトロウイルスを用いて、C 末端側に V5 tag を付与した SETD5 が恒常的に発現する 3T3-L1 細胞を作製した。また、強制発現タンパクの比較対象として N 末端側に FLAG tag を付与した SETDB1 が発現する 3T3-L1 細胞を用いた。

まず、これらの細胞における導入タンパクの発現を確認するため、抗 V5 抗体および抗 FLAG 抗体を用いてイムノブロットを実施した。この結果、SETD5 強制発現細胞に、抗 V5 抗体で認識されるバンドを認め、SETDB1 強制発現細胞では、抗 FLAG 抗体で認識されるバンドを認めた (図 10A)。

これらの細胞を用いて、成熟脂肪細胞への分化能を検討した。コントロールベクターを導入した empty (コントロール) 細胞では、デキサメサゾン、IBMX、インスリン(DMI) による脂肪細胞分化誘導により、脂肪滴の蓄積が確認された (図 10B)。一方、SETD5 強制発現細胞では、同条件下で脂肪滴の蓄積が顕著に抑制された。SETDB1 強制発現細胞ではコントロール細胞と同等の脂肪滴の蓄積が見られ、分化抑制作用がタンパク強制発現に伴う二次的変化でないことが示された。

SETD5 の発現により脂肪細胞分化誘導時の脂肪滴蓄積が抑制されたことか

ら、脂肪細胞分化に関連する各遺伝子に対する影響が推察された。そこで、コントロール細胞および SETD5 強制発現細胞に脂肪細胞分化を誘導し、その 0、12、24、36、48、192 時間後の遺伝子発現について、マイクロアレイを用いて検討した (図 10C)。まず、脂肪細胞分化に関与する各転写因子のうち、早期に誘導される Cebp β 、Cebp δ や分化早期に一過的な上昇を示す Kruppel-like factor 5 (Klf5) の発現変動について検討したところ、両細胞間で差を認めなかった。分化誘導後に低下する nuclear receptor subfamily 2 group F member2 (Nr2f2) については、SETD5 の発現により分化誘導 36 時間以降の発現低下が遅延していた。さらに、分化誘導 48 時間以降に遺伝子発現が誘導される転写因子 Cebp α 、Ppar γ 、Srebf1 や各脂肪細胞分化マーカー Cd36、Fabp4、Adipoq については、SETD5 強制発現により遺伝子発現誘導が抑制された。

これらの結果より、SETD5 の恒常的な発現増加は脂肪細胞分化を抑制することがわかった。

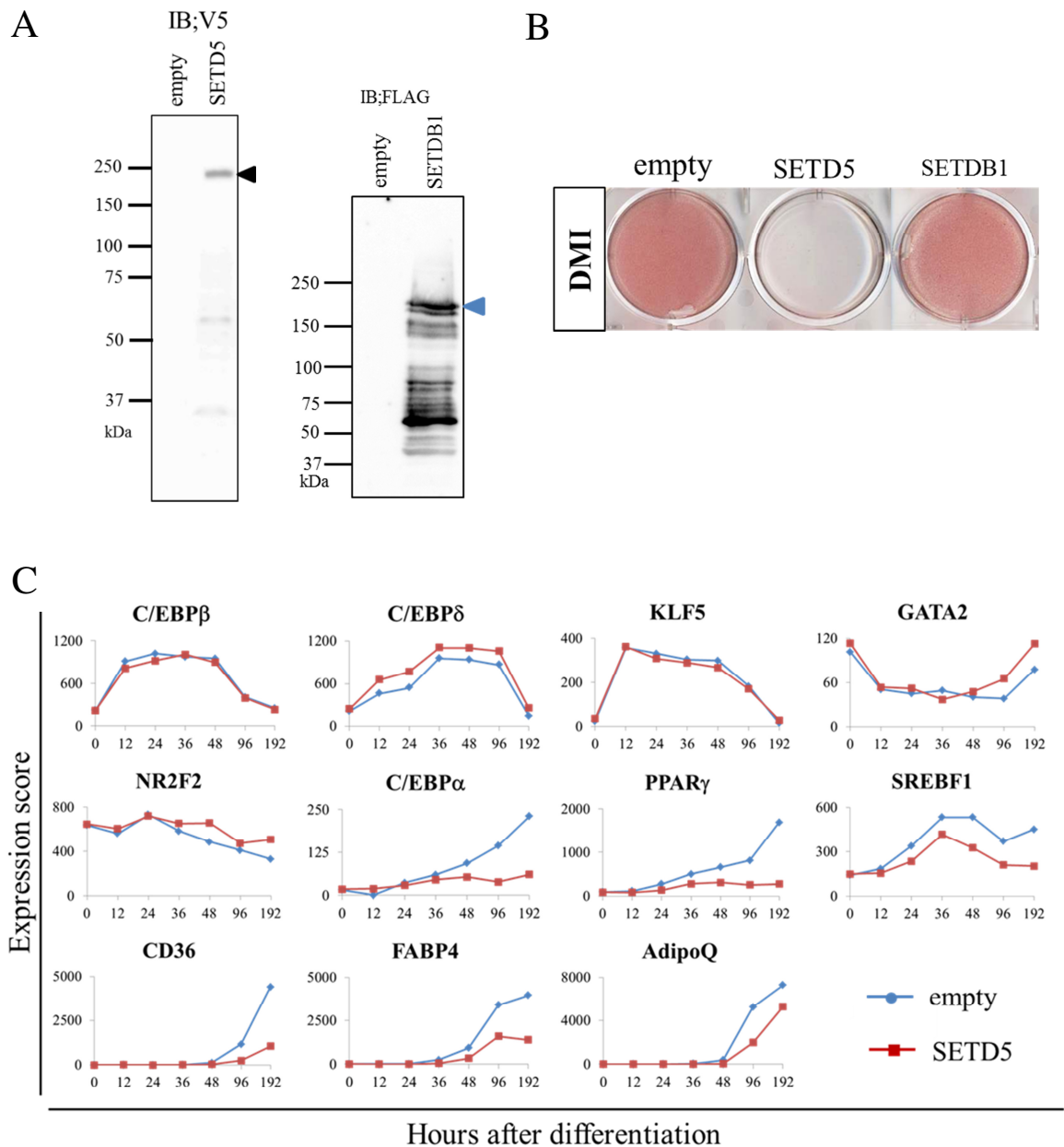


図 10 SETD5 強制発現は 3T3-L1 細胞において脂肪細胞分化を抑制する

(A) 左：抗 V5 抗体を用いた SETD5-V5 タンパク発現の確認。C 末端側に V5 tag を付与した SETD5 の発現ベクター (SETD5) またはコントロールベクター (empty) を導入した 3T3-L1 細胞で、1.18 μ g/ml の抗 V5 抗体を用いてイムノブロットを行った。黒矢頭で目的のバンドを示す。

右：抗 FLAG 抗体を用いた 3 \times FLAG-SETDB1 タンパク発現の確認。N 末端に FLAG tag を付与した SETDB1 の発現ベクター (SETDB1) またはコントロールベクター (empty) を導入した 3T3-L1 細胞で、0.55 μ g/ml の抗 FLAG 抗体を用いてイムノブロットを行った。青矢頭で目的のバンドを示す。

- (B) デキサメサゾン、IBMX、インスリン (DMI) による脂肪細胞分化誘導後の脂肪滴蓄積の評価。分化誘導 8 日後に ORO 染色を行った。empty および SETDB1 強制発現 3T3-L1 細胞では脂肪滴の蓄積が見られるのに対し、SETD5 強制発現 3T3-L1 細胞では、脂肪滴の蓄積が見られない。
- (C) empty および SETD5 強制発現 3T3-L1 細胞について、DMI による脂肪細胞分化誘導開始時を 0 時間とし、以後 12、24、36、48、192 時間後に ISOGEN を加え、total RNA を抽出し、調整した cDNA をマイクロアレイに供した。empty (コントロール) 細胞を青線、SETD5 強制発現細胞を赤線で示す。

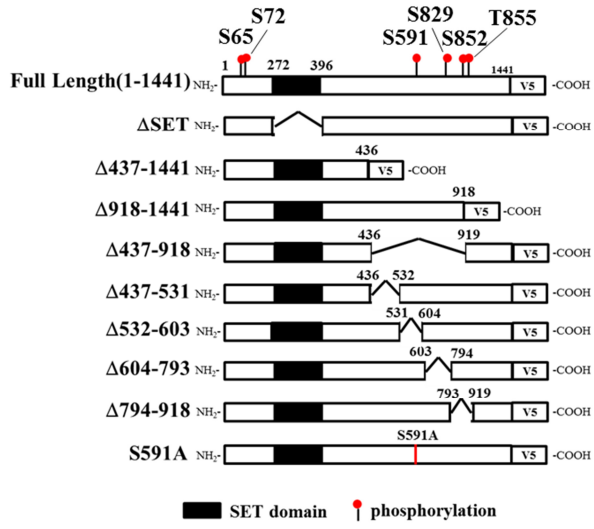
4-4-2. 脂肪細胞分化抑制に関与する SETD5 アミノ酸部位の同定

3T3-L1 細胞における SETD5 の脂肪細胞分化抑制効果に関与する機能部位の同定を目的として、各種欠失変異体 (Δ SET、 Δ 437-1441、 Δ 919-1441、 Δ 437-918、 Δ 437-531、 Δ 532-603、 Δ 604-793、 Δ 794-918) SETD5 を発現する 3T3-L1 細胞を作製した。また、protein kinase A (PKA) によるリン酸化修飾の報告がある 591 番目のセリンをアラニンにした変異体 (S591A) SETD5 を発現する 3T3-L1 細胞も同様に作製した (図 1 1 A) [37]。各細胞でのタンパク発現を抗 V5 抗体で免疫ブロットし確認した後、脂肪細胞分化を誘導して脂肪滴の蓄積を観察した (図 1 1 B, C)。 Δ SET、(Δ 919-1441)、(Δ 437-531)、(Δ 532-603)、(Δ 604-793)、(Δ 794-918)、S591A-SETD5 を強制発現した 3T3-L1 細胞では、全長タンパク発現時と同様に脂肪滴の蓄積を認めなかった。一方、(Δ 437-1441)、(Δ 437-918)-SETD5 を強制発現した細胞では、コントロール細胞より軽度であるが、脂肪滴の蓄積を認めた。これらの結果より、SETD5 の 437-918 アミノ酸が脂肪細胞分化抑制において重要であることが示唆された。

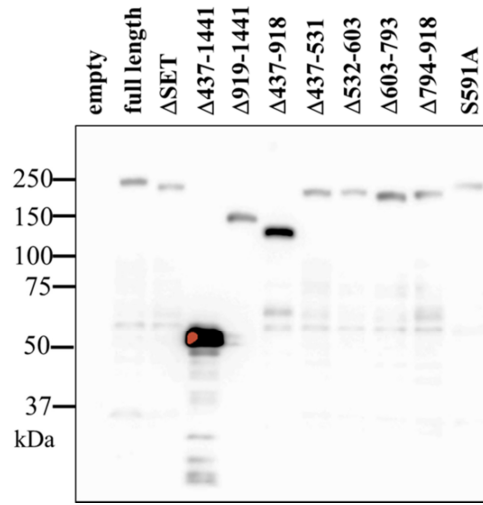
細胞内局在の異常が部分欠失変異体における分化抑制能に影響している可能性を考えた。そこで、 Δ SET、(Δ 437-1441)、(Δ 437-918)、(Δ 437-531)-SETD5 を強制発現した細胞について抗 V5 抗体を用いて免疫染色を行うと、いずれの欠失変異体においても全長タンパク発現と同様に DAPI 染色と一致する核にシグナル

を認めた (図 1 1 D)。この結果より、(Δ 437-1441)、(Δ 437-918)-SETD5 で脂肪細胞分化抑制効果が失われた理由として、タンパクの局在異常ではなく機能喪失が考えられた。

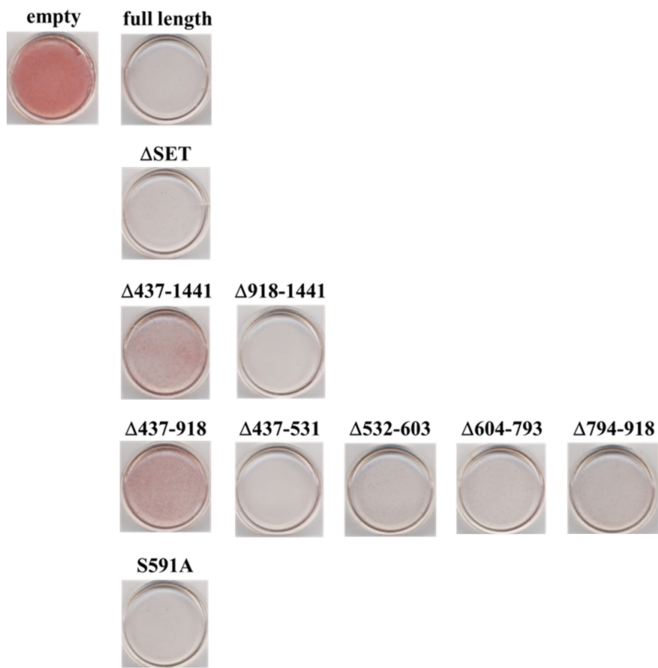
A



B



C



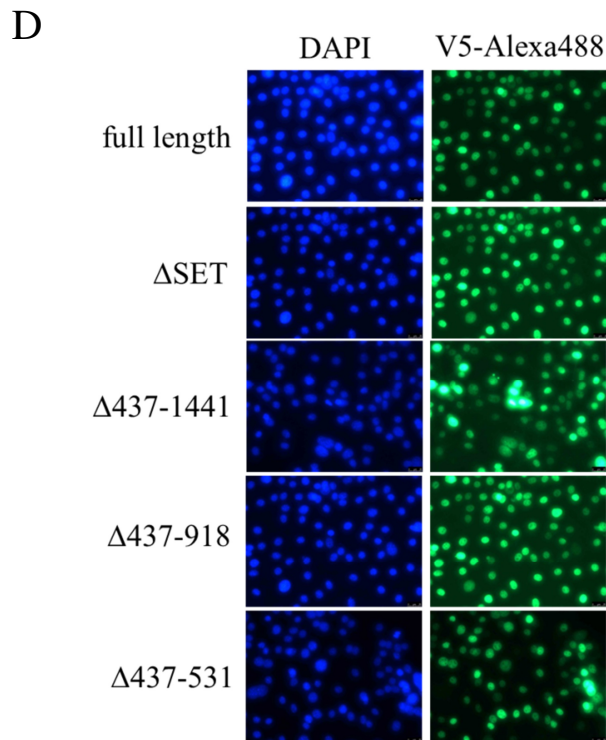


図 1 1 (Δ437-1441)、(Δ437-918)-SETD5 強制発現 3T3-L1 細胞は、脂肪細胞分化能を示す

- (A) 強制発現した SETD5 全長および各欠失変異体タンパクの構造の模式図。いずれも C 末端に V5 tag を付与したコンストラクトとして作製した。黒色は SET ドメイン、赤丸は既報のリン酸化修飾部位を示す。
- (B) 各欠失変異体 SETD5 の発現検討。1.18 μ g/ml の抗 V5 抗体を用いた免疫ブロットを実施した。
- (C) DMI で脂肪細胞分化を誘導した各欠失変異体 SETD5 強制発現 3T3-L1 細胞の ORO 染色(分化誘導 8 日後)。(Δ437-1441)、(Δ437-918)-SETD5 強制発現 3T3-L1 細胞では、脂肪滴の蓄積を認める。
- (D) 欠失変異体 SETD5 強制発現細胞とコントロール細胞において、抗 V5 抗体を用いて免疫染色を行った。いずれの細胞においても、DAPI(左：青色)と一致する核に抗 V5 抗体のシグナル(右：緑色)を認める。

4-4-3. 3T3-L1 細胞における Setd5 ノックダウンの脂肪細胞分化への影響

次に、siRNA 配列を用いて Setd5 の発現を抑制した際の影響を検討した。ノックダウン効率を調べるために、siRNA を導入した 48 時間後の 3T3-L1 細胞の RNA を抽出し、qRT-PCR で Setd5 の発現レベルを定量したところ、2 種類の siRNA 配列においてコントロール siRNA 配列と比較し、40-60%に低下していた (図 1 2 A)。siRNA によるノックダウン効率が十分であると判断し、siRNA を導入した細胞において、デキサメサゾンのみでの脂肪細胞分化誘導を行った。3T3-L1 細胞は、デキサメサゾンのみで分化誘導を行っても脂肪細胞分化せず脂肪滴の蓄積が見られないが、Setd5 ノックダウン細胞においては、脂肪滴の蓄積が見られた (図 1 2 B)。この表現型は 2 種類の siRNA 配列で観察された。分化誘導開始時の Cebp α と Ppar γ についての発現レベルを定量すると、Setd5 ノックダウン細胞では、コントロール細胞に比べて Ppar γ の発現が有意に増加しているのに対し、Cebp α の発現に差は見られなかった (図 1 2 C)。

以上より、内在性 SETD5 は 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化を抑制する機能を有しており、分化開始時の Ppar γ の遺伝子発現を直接的もしくは間接的に抑制していると考えられた。

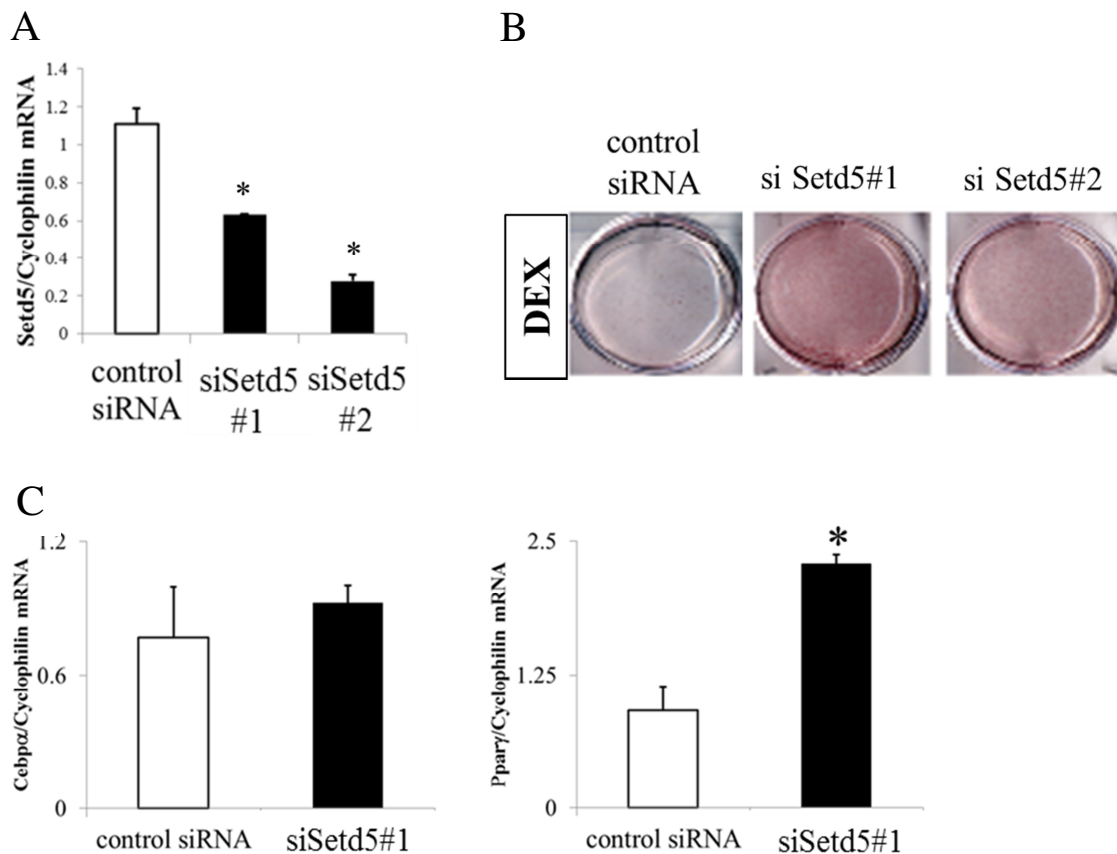


図 1 2 Setd5 ノックダウンは 3T3-L1 細胞において脂肪細胞分化を促進する

- (A) siRNA を用いた Setd5 ノックダウン効率の検討。3T3-L1 細胞播種時にそれぞれの siRNA を導入し、48 時間後に RNA を回収、qRT-PCR を行った(* $p < 0.01$)。値はいずれも internal control である Cyclophilin で補正後。
- (B) デキサメサゾン(DEX)のみで脂肪細胞分化を誘導した際の分化開始 8 日後の ORO 染色。Setd5 ノックダウン細胞ではコントロール細胞と比べて脂肪滴蓄積が見られた。
- (C) 分化開始時に回収した RNA を用いて qRT-PCR により Cebp α および Ppar γ の遺伝子発現レベルを検討した。値は Cyclophilin で補正後。Ppar γ の発現は、コントロールと比べ、Setd5 ノックダウン細胞で上昇した(* $p < 0.01$)。

4-5. 骨芽細胞分化における SETD5 の機能

4-5-1. ST2 細胞における SETD5 強制発現の骨芽細胞分化への影響

SETD5 による骨芽細胞分化に対する影響を検討するために、レトロウイルスを用いて、C末端側に V5 tag を付与した SETD5 タンパクが恒常的に発現する ST2 細胞を作製した。この細胞における導入タンパクの発現を、抗 V5 抗体を用いたイムノブロットにより確認した (図 1 3 A)。

この細胞を用いて、骨芽細胞への分化能を検討した。細胞が 100%コンフルエントになった時点を分化開始点とし、4 日間の培養後、アルカリフォスファターゼ(ALP)染色を用いて ALP 活性を観察した。分化誘導剤非存在下では、コントロールベクターを導入した empty ST2 (コントロール) 細胞では ALP 活性がないのに対し、SETD5 強制発現細胞は活性を示した (図 1 3 B)。また、分化開始時にアスコルビン酸と β -glycerophosphate を添加し骨芽細胞分化時の石灰化が促進される条件で培養し、分化誘導 17 日後に von Kossa's 染色を行って石灰化状態を観察したところ、SETD5 強制発現細胞において強い石灰化を認めた (図 1 3 C)。

SETD5 の発現により ALP 活性の上昇および石灰化が観察されたことから、骨芽細胞分化に関連する各遺伝子に対する影響が推察された。そこで、分化誘導 4 日後の骨芽細胞分化に関連する各遺伝子の発現について qRT-PCR を用いて評価した。SETD5 強制発現細胞において、骨芽細胞分化で早期に変化が見られる転

写因子 Runx2、Sp7、骨芽細胞分化マーカーCol1a1、Alpl の遺伝子発現の上昇を認めた (図 1 3 D)。これらの結果より、SETD5 の恒常的な発現増加は骨芽細胞分化を促進することがわかった。

さらに、SETD5 の骨芽細胞分化促進効果への SET ドメインの関与を調べるために、 Δ SET-SETD5 を強制発現する ST2 細胞を作成し、骨芽細胞分化誘導を行った。アスコルビン酸により分化を誘導し、分化開始 4 日後に ALP 染色を行うと、 Δ SET-SETD5 強制発現細胞では、コントロール細胞に比べて ALP 活性の上昇を認めた。このことから、強制発現 SETD5 は自身の SET ドメイン非依存的に骨芽細胞分化促進を行うことが示唆され、3T3-L1 細胞における脂肪細胞分化抑制機構との共通点が見出された (図 1 3 E)。

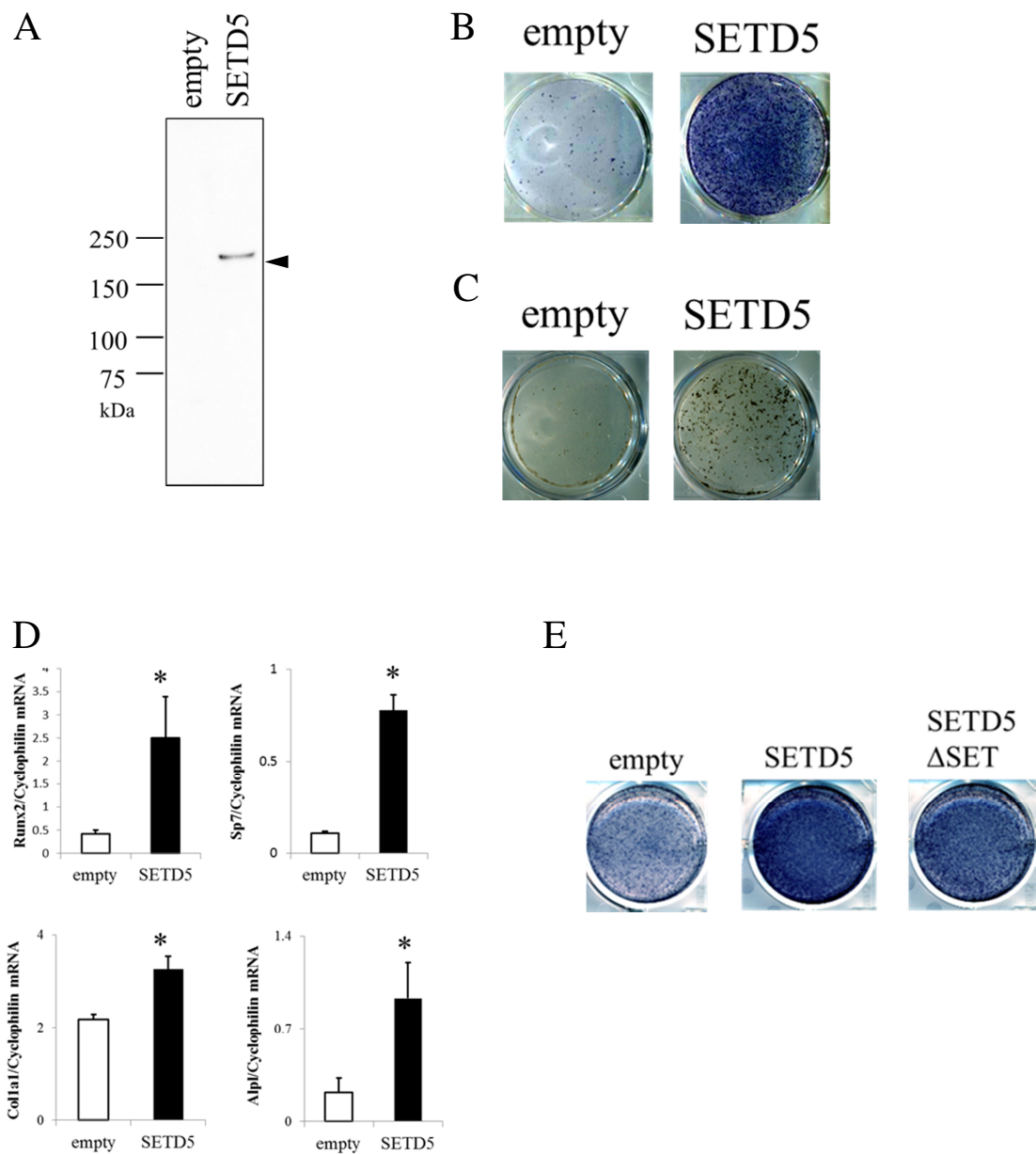


図 1 3 SETD5 強制発現は ST2 細胞において骨芽細胞分化を促進する

- (A) 抗 V5 抗体を用いた SETD5-V5 タンパク発現の確認。C 末端側に V5 tag を付与した SETD5 の発現ベクター(SETD5)またはコントロールベクター(empty)を導入した ST2 細胞で、1.18 μ g/ml の抗 V5 抗体を用いてイムノブロットを行った。矢頭で目的のバンドを表示。
- (B) 骨芽細胞分化誘導後の ALP 染色。分化誘導剤非添加で分化誘導 4 日後に行った。ALP 活性が青色に染色されている。
- (C) 骨芽細胞分化誘導後の von Kossa's 染色。アスコルビン酸と β -glycerophosphate による分化誘導 17 日後に実施した。石灰化部位が褐色に染色されている。

- (D) SETD5 強制発現細胞とコントロール細胞において、分化開始 4 日後に RNA を回収し qRT-PCR で骨芽細胞分化関連遺伝子の発現レベルを検討した。値はいずれも internal control である Cyclophilin で補正後。(*p<0.01)
- (E) SETD5 強制発現および Δ SET-SETD5 強制発現細胞における骨芽細胞分化誘導における ALP 染色。アスコルビン酸による分化誘導 4 日後。

4-5-2. ST2 細胞における Setd5 ノックダウンの骨芽細胞分化への影響

次に、siRNA 配列を用いて Setd5 の発現を抑制した際の影響を検討した。

siRNA を導入した 48 時間後のノックダウン効率を検討したところ、2 種類の siRNA で Setd5 の発現は 40-50% に低下した (図 1 4 A)。アスコルビン酸で骨芽細胞分化を誘導し 4 日後に ALP 染色を行うと control siRNA を導入した ST2 (コントロール) 細胞においては、ALP 活性が見られるのに対し、Setd5 ノックダウン細胞においては活性が見られなかった (図 1 4 B)。さらに、Setd5 ノックダウン細胞では、強力な骨芽細胞分化誘導剤である WNT3A および BMP-2 により分化を誘導しても、ALP 活性は見られなかった。骨芽細胞分化関連遺伝子の遺伝子発現を qRT-PCR で定量すると、Setd5 ノックダウン細胞では、コントロール細胞に比べて Sp7、Alpl の遺伝子発現が有意に低下していた (図 1 4 C)。

これらより、内在性 SETD5 は ST2 細胞の骨芽細胞分化を促進する機能を有することが見出された。

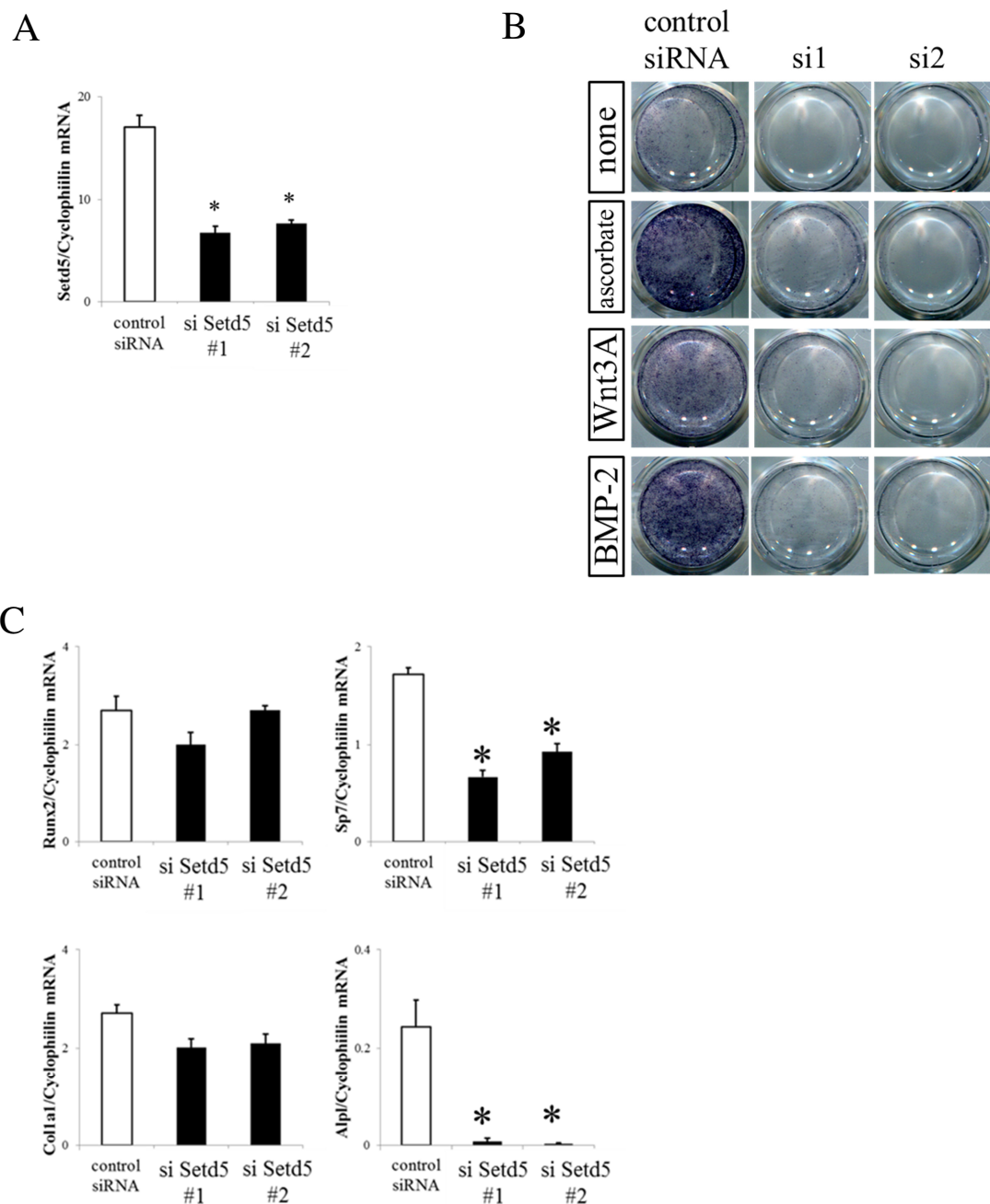


図 1 4 SETD5 ノックダウンは ST2 細胞において骨芽細胞分化を抑制する

(A) siRNA を用いた Setd5 ノックダウン効率の検討。ST2 細胞播種時にそれぞれの siRNA を導入し、48 時間後に RNA を回収、qRT-PCR を行った。

値はいずれも internal control である Cyclophilin で補正後(*p<0.01)。

(B) 分化誘導試薬なし(none)、100 μ g/ml のアスコルビン酸(ascorbate)、20ng/ml の WNT3A(Wnt3A)、2ng/ml の BMP-2(BMP-2)を用いて骨芽細胞分化誘導した際の分化開始 4 日後の ALP 染色。Setd5 ノックダウン細胞ではいずれにおいても ALP 活性は見られなかった。

(C) 分化誘導 4 日後に回収した RNA を用いて qRT-PCR により骨芽細胞分化関連遺伝子の発現レベルを検討した。値はいずれも Cyclophilin で補正後。Sp7、Alpl は Setd5 ノックダウン細胞で有意に低下していた(* $p < 0.01$)。

4-6. ChIP-sequencing とマイクロアレイを用いた SETD5 の標的遺伝子の探索

脂肪細胞・骨芽細胞の分化における SETD5 の作用機構を解明するために、SETD5 の標的を網羅的に探索した。

4-6-1. SETD5 の ChIP

まず、ChIP を行い、次世代シーケンサーを用いた ChIP-sequencing の解析によって、3T3-L1 細胞において SETD5 が結合する遺伝子領域を見出した。

最初に、抗 V5 抗体、抗 FLAG 抗体を用いた ChIP の検討を行った。SETD5 が結合する遺伝子領域に関しては報告がなく標的となる遺伝子も未知であるため、ChIP 条件については、当研究室において既に ChIP-sequencing の結果が得られている V5 tag を付与した JmjC-domain-containing histone demethylase 1b(JHDM1B)に対する抗 V5 抗体、および 3×FLAG tag を付与した SET domain bifurcated 1(SETDB1)に対する抗 FLAG 抗体での ChIP を陽性対照として用いた。タンパク-DNA の架橋は、DNA 結合ドメインを持たない SETD5 が複合体を介して DNA に結合している可能性を考慮して、1%ホルムアルデヒドに加え、1.5mM EGS を用いた。

抗 V5 抗体を用いた ChIP は、C 末端側に V5 tag を付与した SETD5 もしくは JHDM1B タンパクが強制発現している 3T3-L1 細胞と、陰性対照としてレトロ

ウイルスの感染がない 3T3-L1 細胞の核破砕液をサンプルとし、抗 V5 抗体を用いて行った。免疫沈降後、脱架橋した後に得られた DNA において、既知の JHDM1B の結合遺伝子である cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (Cdkn1)、cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2)の領域を認識するプライマーを用いて qPCR を行うと、JHDM1B 強制発現細胞における抗 V5 抗体の ChIP では mouse IgG 抗体と比較して、10-16 倍の濃縮が得られた (図 1 5 A)。結合領域ではない Cyclophilin、homeobox A9 (Hoxa9)の領域については濃縮を認めなかった。抗 V5 抗体による ChIP が機能していると考え、同時に行った SETD5 強制発現細胞における ChIP DNA を次世代シーケンサーでのシーケンシングに用いた。

また、抗 FLAG 抗体を用いた ChIP は、N 末端に 3×FLAG tag を付与した SETD5 もしくは SETDB1 強制発現 3T3-L1 細胞とレトロウイルスの感染がない 3T3-L1 細胞を用いて、核破砕液をサンプルとして抗 FLAG 抗体を用いて行った。免疫沈降後、脱架橋した後に得られた DNA において、既知の SETDB1 の結合遺伝子である Pparg1、mesoderm specific transcript (Mest、neuronatin (Nnat)の領域を認識するプライマーを用いた qPCR を行うと、SETDB1 強制発現細胞における抗 FLAG 抗体の ChIP では mouse IgG 抗体と比較して、約 6-14 倍の濃縮が得られた(図 1 5 B)。非結合領域である Cyclophilin の領域については濃縮を認めなかった。抗 FLAG 抗体による ChIP が機能していると考え、同時に行った SETD5

強制発現細胞における ChIP DNA を次世代シーケンサーでのシーケンシングに用いた。

さらに、内在性タンパクを認識する抗 SETD5 抗体 IgG-F2104 を用いた ChIP を行った。3T3-L1 細胞の核破砕液をサンプルとして抗 mouse IgG 抗体、IgG-F2104 で ChIP し、ChIP 産物をイムノブロットで評価し、至適抗体量を検討した。核破砕液 500 μ g のタンパク量に対し 25、50、100 μ g の IgG-F2104 で ChIP を行い、IgG-F2104 を用いてイムノブロットすると、抗体量 50 μ g までは免疫沈降される SETD5 のシグナルが抗体量依存的に増加したが、50 μ g と 100 μ g では量依存性が見られなかった。この結果から、IgG-F2104 は 75 μ g を用いることにした。次に、脱架橋した際に得られる DNA の回収率(DNA%input)を検討した。免疫沈降時間を 2 時間と一晩で条件検討したところ、2 時間での DNA%input は mouse IgG が 0.009、IgG-F2104 が 0.038 であるのに対し、一晩での DNA%input は mouse IgG が 0.119、IgG-F2104 が 0.397 と約 10 倍の値を示した (図 1 5 C)。この時の ChIP 産物を IgG-F2104 でイムノブロットすると、バンドのシグナルには差が見られなかった (図 1 5 D)。これらより、一晩の免疫沈降で得られた 10 倍量の DNA には非特異的なものが多く含まれると考え、2 時間の免疫沈降で得られた DNA に対し ChIP-sequencing を行った。

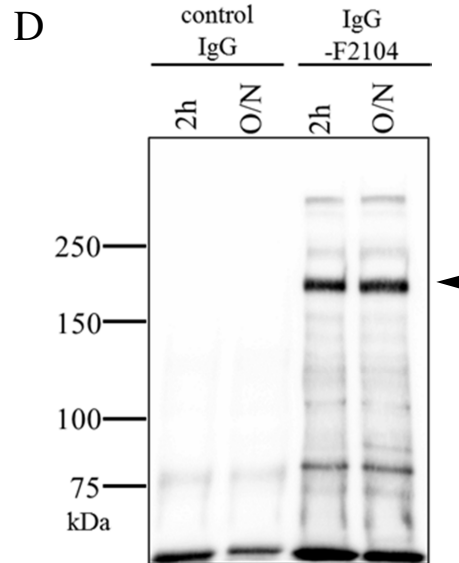
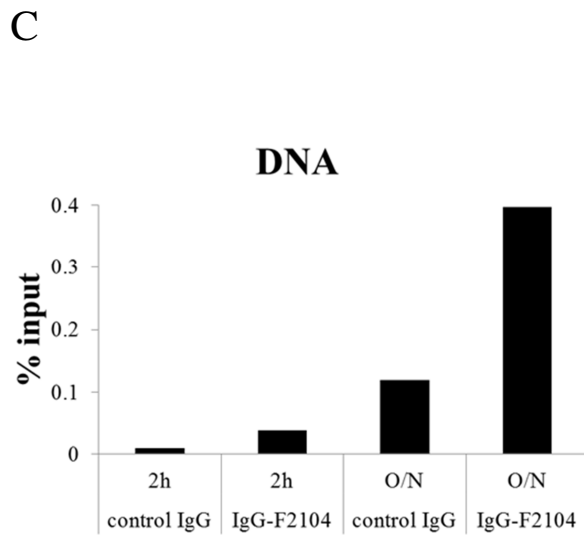
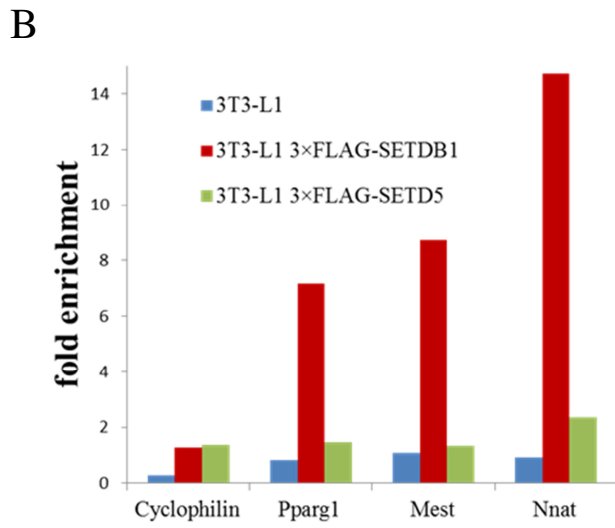
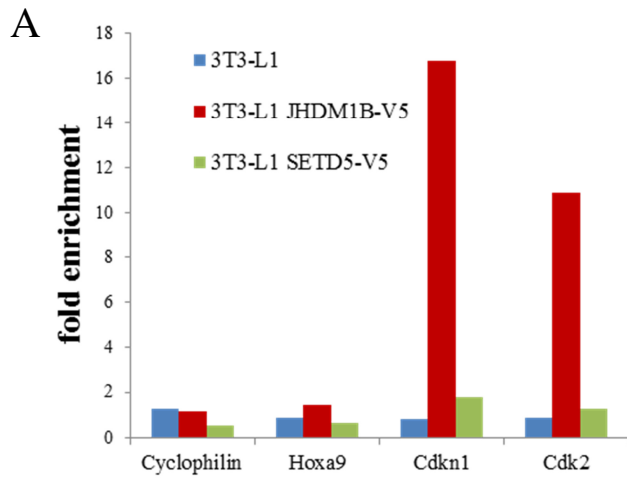


図 1 5 SETD5 の ChIP の条件検討

- (A) JHDM1B および SETD5 強制発現 3T3-L1 細胞での抗 V5 抗体を用いた ChIP 産物から得られた DNA(ChIP-DNA)についてそれぞれの遺伝子領域で qPCR を行った。input DNA を標準直線用のサンプルとして用い、この直線を用いて算出した数値(%input)を ChIP-DNA の input DNA に対する量比で除し、fold enrichment とした。JHDM1B 強制発現細胞の ChIP において、既知の JHDM1B 結合領域(Cdkn1、Cdk2)で濃縮が得られたが、非結合領域(Hoxa9、Cyclophilin)では、非強制発現細胞(3T3-L1)とほぼ同等であった。
- (B) SETDB1 および SETD5 強制発現 3T3-L1 細胞での抗 FLAG 抗体を用いた ChIP-DNA についてそれぞれの遺伝子領域で qPCR を行い、fold enrichment を示した。SETDB1 強制発現細胞の ChIP において、既知の SETDB1 結合領域(Pparg1、Mest、Nnat)で濃縮が得られた。
- (C) 3T3-L1 細胞でコントロール IgG と IgG-F2104 を用いて 2 時間もしくは一晩 ChIP を行った際に免疫沈降される DNA 量の比較。縦軸は、input DNA に対する ChIP-DNA の量比(%input)を示した。一晩の ChIP (O/N IgG-F2104)では 2 時間(2H IgG-F2104)に比べて約 10 倍量の ChIP DNA が沈降された。
- (D) 3T3-L1 細胞で IgG と IgG-F2104 を用いて 2 時間もしくは一晩 ChIP を行った際に免疫沈降されるタンパク量を検討したイムノブロット。ChIP 産物の 1/2 量を電気泳動し、一次抗体は 10 μ g/ml の IgG-F2104 を用いた。2 時間(2H)および一晩(O/N)の ChIP で得られる SETD5 タンパクはほぼ同量であった (矢頭)。

4-6-2. マイクロアレイと ChIP-sequencing による統合的解析

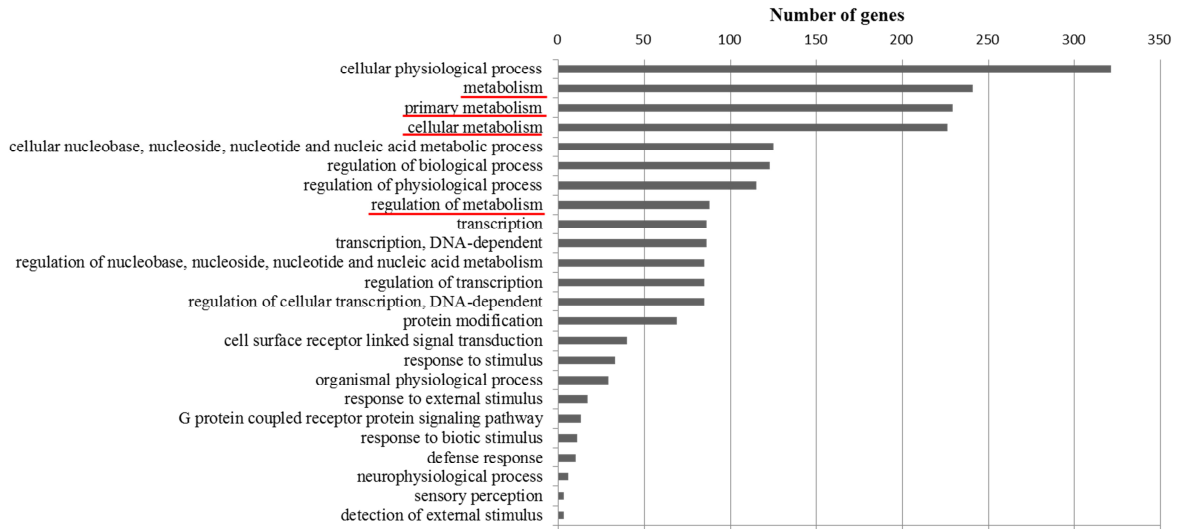
Setd5 ノックダウン 3T3-L1 細胞とコントロール細胞においてデキサメサゾンのみで脂肪細胞分化誘導を行い、その 0、12、24、36、192 時間後の遺伝子発現についてマイクロアレイを用いて検討した。0 時間後(分化開始時)に、コントロール細胞で Setd5 ノックダウン 3T3-L1 細胞と比べ 2 倍より発現が高い遺伝子 (Setd5 ノックダウン細胞で発現が低下する遺伝子) として 880 個の遺伝子を抽出した。この 880 遺伝子を Gene Ontology で解析すると、p value<0.0001 で該当するカテゴリーには metabolism、primary metabolism、cellular metabolism、regulation of metabolism があり、最低でも 85 遺伝子が含まれていた(図 1 6 A)。この解析結果から、Setd5 は脂肪細胞分化に関与する代謝関連遺伝子を制御している可能性が考えられた。

次に、抗 FLAG 抗体による ChIP-sequencing の結果を、input であるクロマチン免疫沈降前の核破砕液から得られる DNA の ChIP-sequencing の結果で除し、MACS を用いて p-value が e^{-5} 以下の peak を抽出すると、4285 領域 (3345 遺伝子近傍) が抽出された[48]。これらの peak について距離解析を行うと、SETD5 の結合領域は、遺伝子の転写開始点をピークとして 100bp 上流から 400bp 下流に見られた (図 1 6 B)。結合領域の分布は、50%以上が遺伝子内であり、多くのヒストン修飾タンパクや転写因子と似た分布を示した (図 1 6 C) [49、50]。

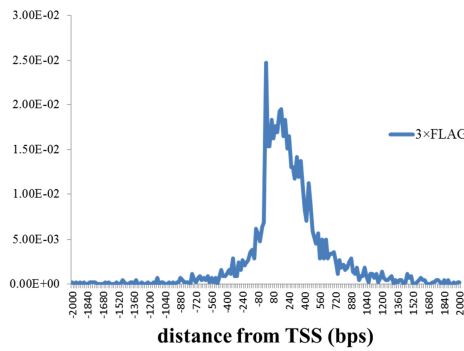
マイクロアレイ解析の結果得られた 880 遺伝子と抗 FLAG 抗体による ChIP-sequencing 解析から得られた SETD5 結合領域の 3345 遺伝子に共通する 230 遺伝子を標的候補として抽出した (図 1 6 D)。さらに、この 230 遺伝子より、Integrated Genome Browser 7.0.4 上で 3 つの ChIP-sequencing (抗 V5 抗体・抗 FLAG 抗体・IgG-F2104 抗体) 全てにおいて 5 以上の signal が見られる 29 遺伝子を抽出し、この中に Sox4 を見出した (図 1 6 E、表 5)。

Sox4 の遺伝子領域にプライマーを作製し、N 末端に 3×FLAG tag を付与した SETD5 強制発現 3T3-L1 細胞の抗 FLAG 抗体によって得られた ChIP-DNA をサンプルとして qPCR を行うと、非結合領域に比べ、約 6 倍の濃縮が得られた (図 1 6 F)。これにより、SETD5 は Sox4 の遺伝子領域に結合することが確認された。

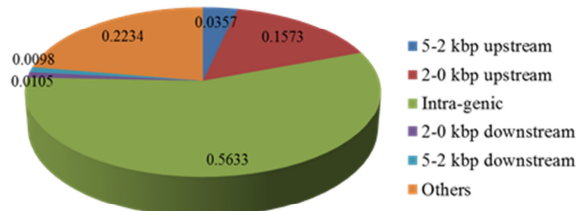
A



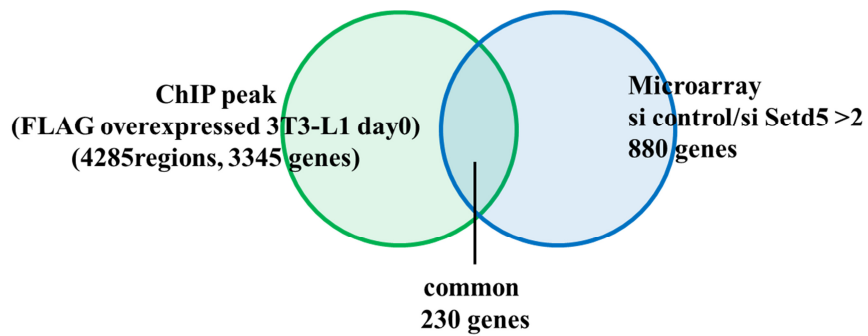
B



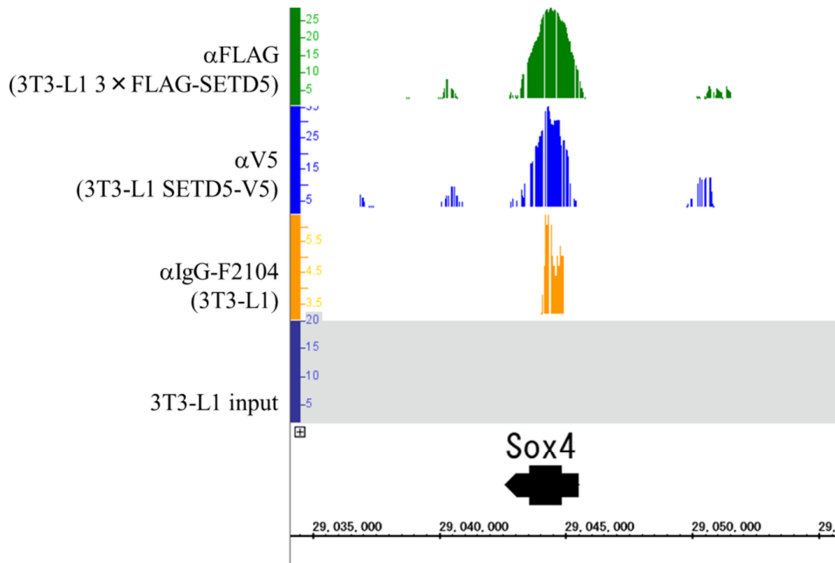
C



D



E



F

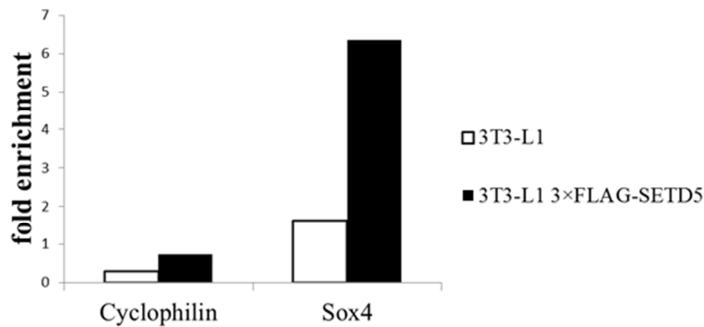


図 1 6 マイクロアレイと ChIP-sequencing の統合的解析により SETD5 の標的候補遺伝子として Sox4 を見出した

- (A) コントロール細胞で Setd5 ノックダウン 3T3-L1 細胞と比べ、発現が 2 倍より高い 880 遺伝子の Gene Ontology 解析結果。p<0.0001 で該当するカテゴリーとその遺伝子数をグラフ化した。代謝関連を赤下線で示す。
- (B) SETD5 結合領域の距離解析。N 末端側に 3×FLAG tag を付与した SETD5 強制発現 3T3-L1 細胞の分化開始時における抗 FLAG 抗体を用いた ChIP-sequencing のデータより解析した。転写開始点近傍に多く結合している。
- (C) SETD5 結合領域のゲノム上での分布を解析した。56%が遺伝子上(intra-genic)の領域に結合している。

- (D) 抗 FLAG 抗体による SETD5 強制発現細胞における ChIP-sequencing のピーク 3345 遺伝子近傍と、マイクロアレイ解析で Setd5 ノックダウン細胞よりコントロール細胞で発現が 2 倍より高い 880 遺伝子の共通遺伝子 230 個を抽出した。
- (D) Integrate Genome Browser 7.0.4 において SETD5 の peak は Sox4 遺伝子上に見られる。window size 1000bp で BAR 変換を行い可視化した。
- (E) SETD5 強制発現 3T3-L1 細胞における抗 FLAG 抗体を用いた ChIP-DNA で Sox4 遺伝子領域のプライマーを用いて qPCR を行うと、非結合領域である Cyclophilin 遺伝子領域と比べて約 6 倍の濃縮が得られた。

表 5 3つの ChIP-sequencing で共通した peak が見られる 29 遺伝子

Genes of common peak on 3 kinds of ChIP-sequencing		
1810011O10Rik	Fam115a	Sox4
Hook3	Fam13a	Adamts12
Stox2	Atp5o	Myo10
Nr3c2	Slc5a3	Gtpbp1
Ednra	Ccny	Crebbp
Zfhx3	Malat1	Ccdc74a
Wwox	Prume2	Usp34
Ptgfrn	Cnnm2	Rptor
Cdk14	Nup214	Timm9
Cyth3	8430427H17Rik	

4-6-3. SETD5 依存的に Sox4 の遺伝子発現は上昇する

3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化過程における Sox4 遺伝子の発現変化をマイクロアレイ解析で追うと、Sox4 は脂肪細胞分化開始 12 時間後には開始時の約 1/2 の発現となり、その後、低い発現状態を維持していた。しかしながら、Setd5 をノックダウンした 3T3-L1 細胞においては、Sox4 の発現は分化開始時よりコントロール細胞の約 1/2 に低下していた (図 1 7 A)。

qPCR を用いて分化開始時の Sox4 遺伝子の mRNA 発現レベルを定量したところ、Setd5 ノックダウン 3T3-L1 細胞においてコントロールの約 1/4 に発現が低下していた (図 1 7 B)。さらに、SETD5 強制発現 3T3-L1 細胞とコントロール細胞における Sox4 遺伝子の発現レベルは、分化誘導開始時には差を認めないが、DMI で分化を誘導した 24 時間後には SETD5 強制発現細胞でコントロール細胞の約 5 倍に上昇した(図 1 7 C)。これらから、SETD5 は Sox4 の遺伝子発現を正に制御していることが示唆された。

以上より、SETD5 は Sox4 の遺伝子領域に結合しており (前項)、Sox4 の遺伝子発現は SETD5 依存的に上昇することから、Sox4 は SETD5 の標的であると考えられた。

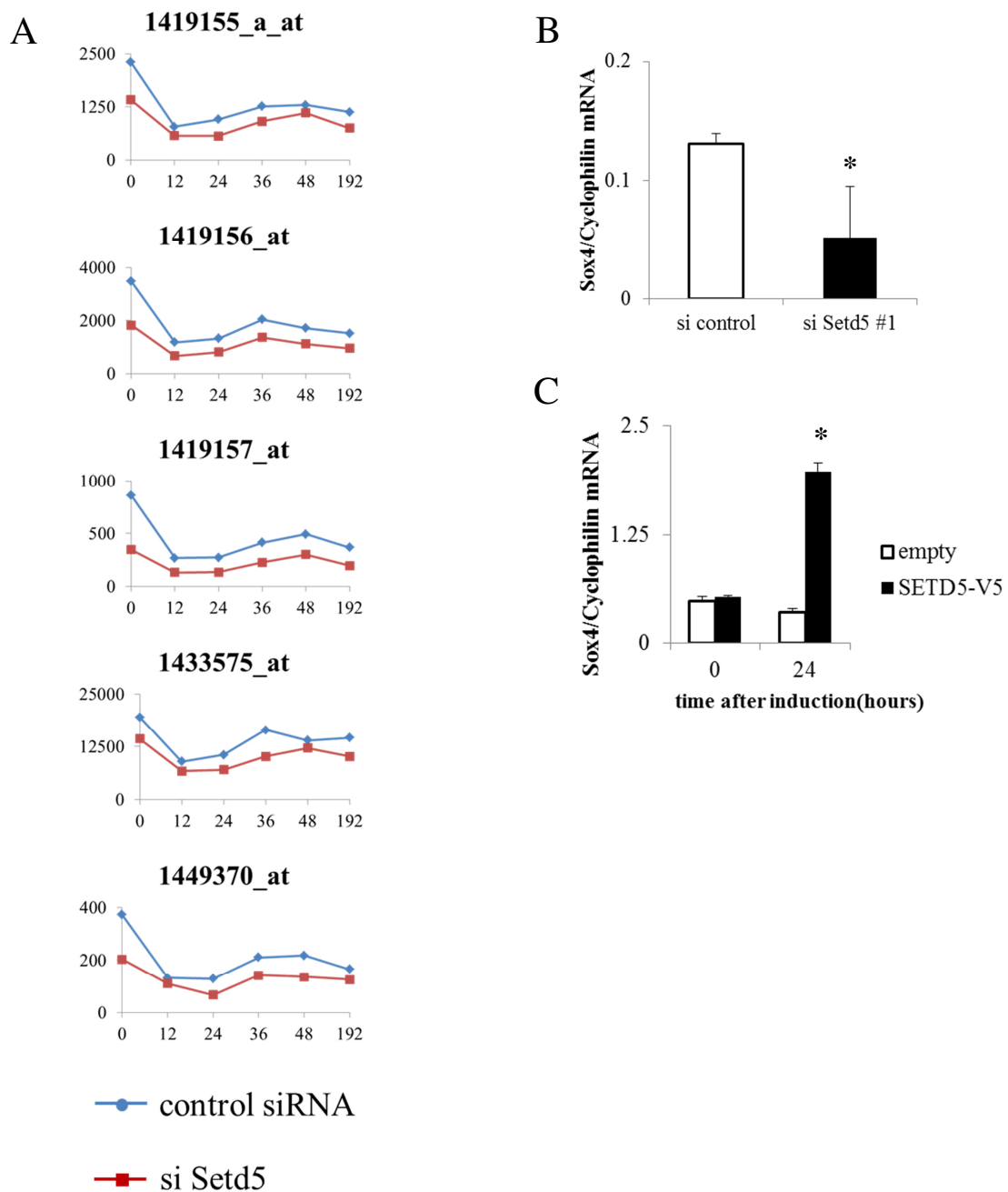


図 1 7 Sox4 の遺伝子発現は SETD5 依存的に上昇する

- (A) Setd5 ノックダウン 3T3-L1 細胞のマイクロアレイにおける Sox4 遺伝子の発現変化。5つのプローブ全てで、Sox4 の発現は Setd5 ノックダウン細胞において分化誘導開始時から低下している。
- (B) Setd5 ノックダウン 3T3-L1 細胞の qPCR での Sox4 発現量の検討。分化開始時に回収した RNA を用いて qRT-PCR を行った(* $p < 0.01$)。
- (C) SETD5 強制発現 3T3-L1 細胞における分化開始時および 24 時間後の Sox4 発現量の検討(* $p < 0.01$)。

4-6-4. SETD5 の脂肪細胞分化抑制効果に Wnt/ β -catenin signaling が関与する可能性がある

SOX4 は Wnt/ β -catenin signaling において、TCF の転写を活性化し β -catenin/TCF 複合体を安定化させることで、Wnt/ β -catenin signaling を活性状態に維持するという報告がある[51、52]。そこで、Sox4 を標的とする SETD5 が Wnt/ β -catenin signaling に関連しているかを検討するために、SETD5 強制発現 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化において、 β -catenin のノックダウンを行った。

3T3-L1 細胞において、 β -catenin(Ctnnb1)をノックダウンし、DEX による脂肪細胞分化を行うと、コントロール細胞では脂肪滴の蓄積が見られないのに対し、 β -catenin(Ctnnb1)ノックダウン細胞においては、脂肪滴の蓄積が観察された (図 18 A、B)。SETD5 を強制発現した 3T3-L1 細胞においては、DMI による脂肪細胞分化誘導を行っても脂肪滴の蓄積が見られないが (前述)、この細胞で Setd5 をノックダウンすると脂肪滴の蓄積が観察され抑制効果の解除が見られた。 β -catenin(Ctnnb1)をノックダウンすると、Setd5 ノックダウン細胞と同程度の脂肪滴蓄積が認められた。すなわち、SETD5 による脂肪細胞分化抑制効果に、 β -catenin が関与する可能性が示唆された。

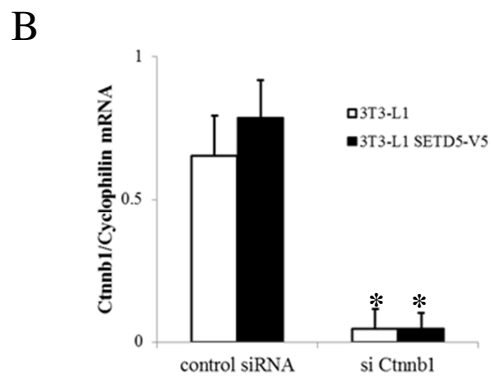
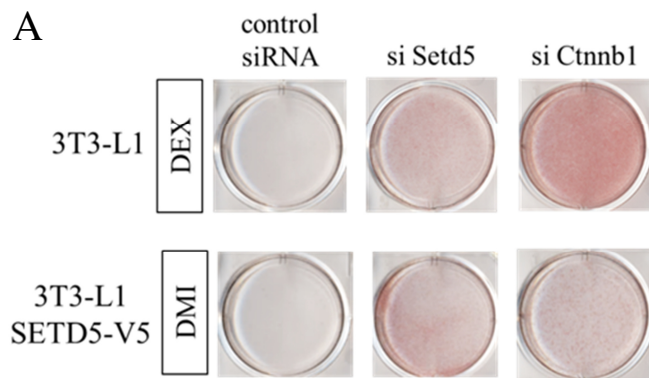


図 1 8 SETD5 の脂肪細胞分化抑制効果はβ-catenin ノックダウンにおいて部分的に解除される

- (A) 3T3-L1 細胞および SETD5 強制発現 3T3-L1 細胞におけるβ-catenin ノックダウン下での脂肪細胞分化誘導。分化開始 8 日後に ORO 染色を行った。
- (B) 3T3-L1 細胞および SETD5 強制発現 3T3-L1 細胞におけるβ-catenin(Ctnnb1)ノックダウン効率の検討。分化開始時に RNA を回収し qRT-PCR を行った (*p<0.01)。

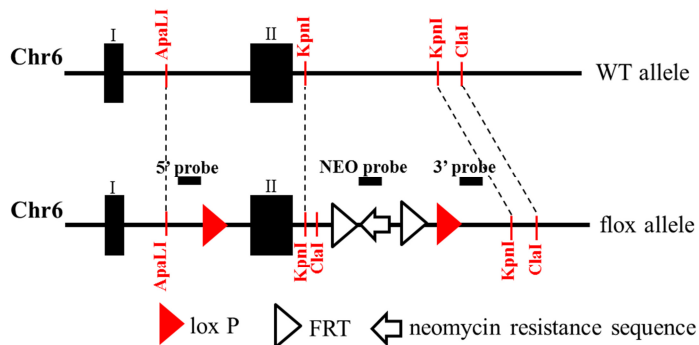
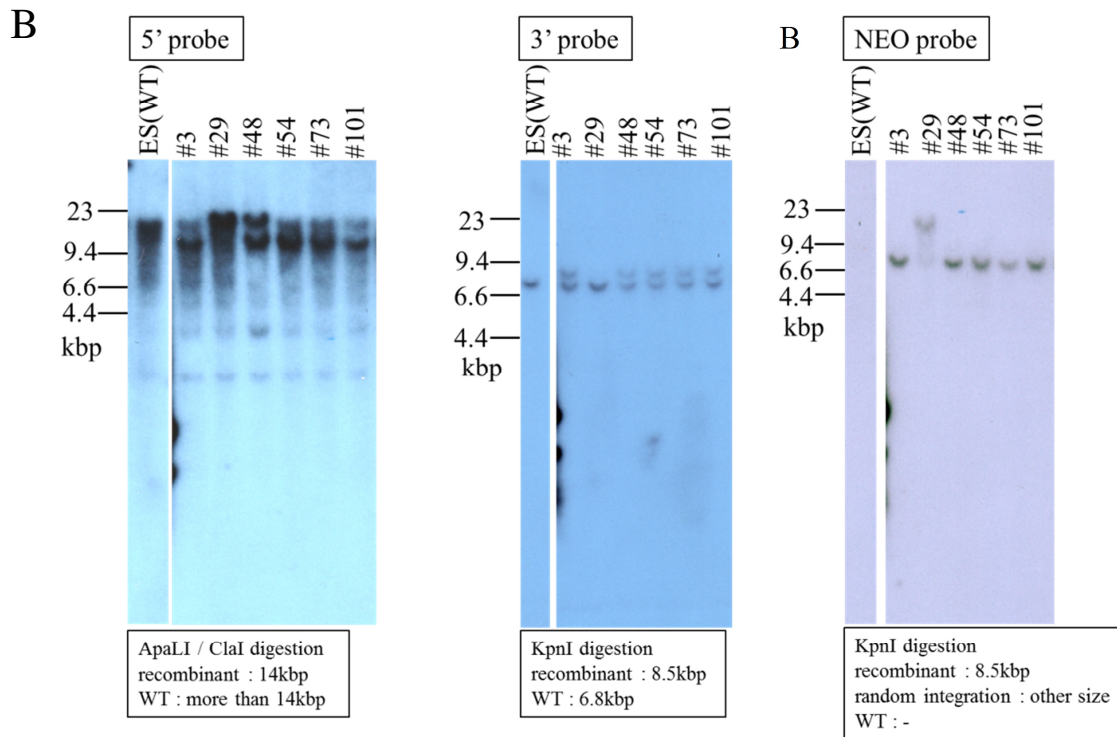
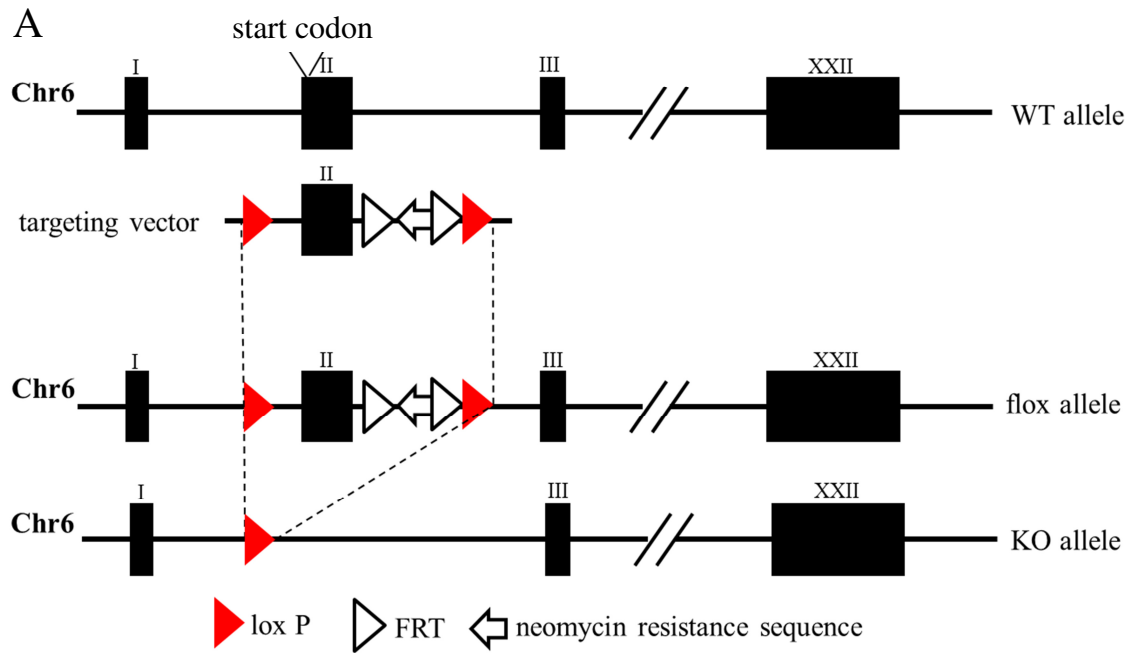
4-7. Setd5 グローバルノックアウトマウスの樹立

4-7-1. Setd5 グローバルノックアウトマウスの作製

脂肪細胞・骨芽細胞分化における Setd5 ノックダウンで表現型の変化が見られたことから、Setd5 欠失におけるさらなる解析を進めるために SETD5 グローバルノックアウトマウスを樹立した。

ES(Embryonic Stem)細胞において相同組換えを行い、SETD5 の第 2 エクソンの上下流に loxP サイトが挿入されたアリルをもつクローンを作製した(図 1 9 A)。ES 細胞からゲノム DNA を抽出し、図 1 9 B に示した 3 つのプロンプを用いて、ゲノミックサザンブロットィングを行った(図 1 9 B)。Setd5 の第 2 エクソン上下流に loxP サイトが挿入されたアリル (floxed アリル) をもつ ES 細胞の 5 つのクローンが得られた。この 5 つのクローンのうち 2 つ(#73、#101)のクローンについて ES 細胞をマウス胚に注入し、キメラマウスを作製した。キメラマウスと C57BL/6N マウスを交配し、産仔のマウス尾からゲノム DNA を抽出し、PCR 法を用いて floxed アリルを持つ個体が得られ、キメラマウスの生殖細胞ゲノム上にも floxed アリルが存在することが確認できた(図 1 9 C)。#73 のクローンの floxed/+ マウスを生殖細胞で cre タンパクが発現している Vasa-Cre マウスと交配し、cre-loxP システムにより loxP サイトで挟まれた第 2 エクソンが欠損したアリルを持つヘテロマウスを得た(図 1 9 D)。ヘテロマウス同士の交配から、SETD5

欠損マウスを得た。マウス尾のゲノム DNA を用いた PCR 法により、遺伝型を確認した (図 1 9 E)。ヘテロマウス同士の体外受精において得られた産仔の遺伝型を解析すると、ノックアウトマウスは全体の 26% であり、メンデルの法則によって予測される 25% に近い仔数であった (図 1 9 F)。このことより、Setd5 ノックアウトが胎生期において致死的とはならないことがわかった。



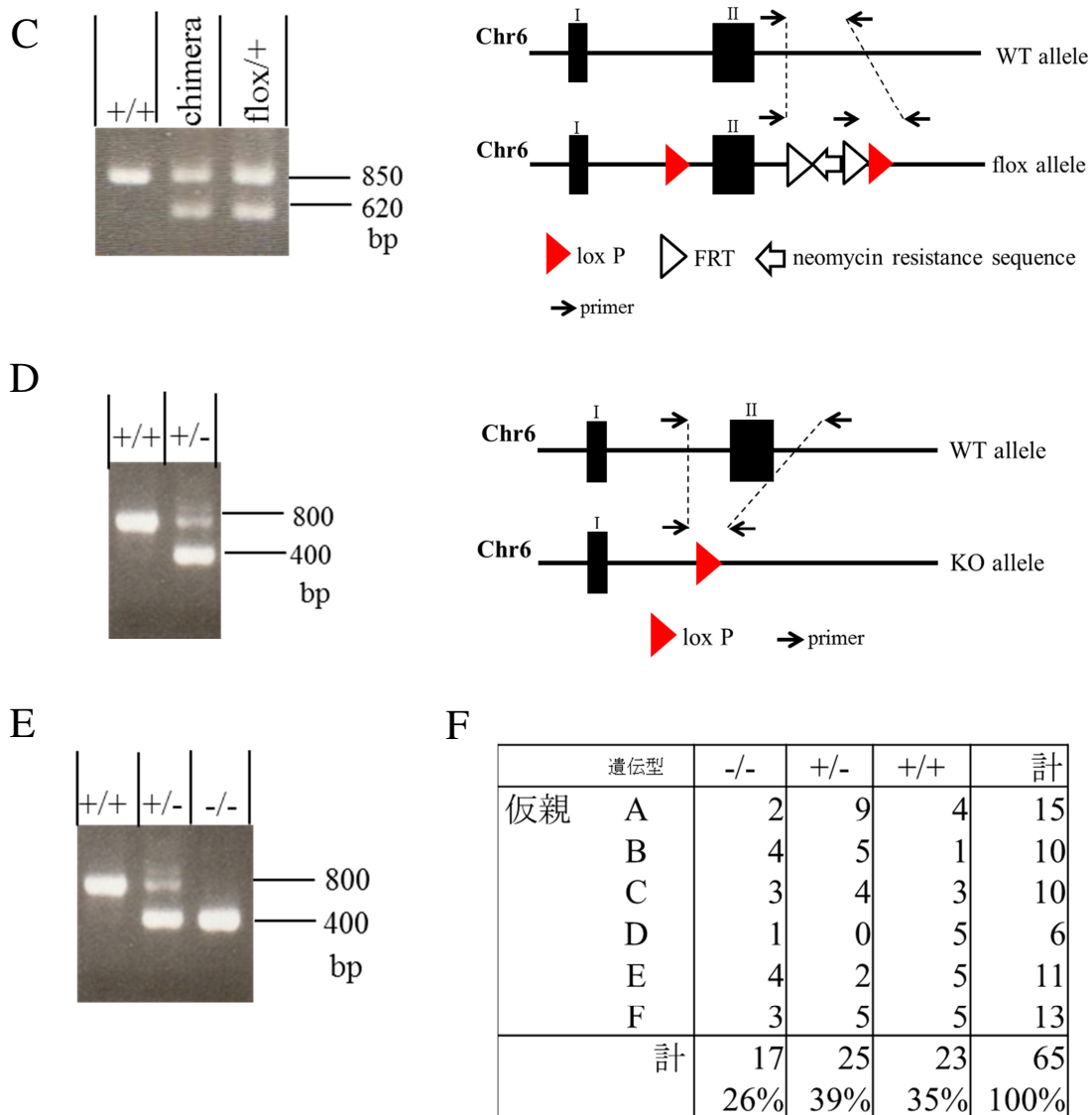


図 1 9 SETD5 グローバルノックアウトマウス作製

- (A) ノックアウトコンストラクトの模式図。Setd5 遺伝子はマウス第 6 染色体に位置し、第 2 エクソンに翻訳開始点を持つ。第 2 エクソン上下流に loxP サイトを挿入した。
- (B) ゲノミックサザンブロットによる ES 細胞のスクリーニング。3 種のプローブ(5'probe、3'probe、NEO probe)を用いて陽性クローン 5 つ(#3、#48、#54、#73、#101)を選別した。各制限酵素サイトおよびプローブの位置を下の模式図に示す。
- (C) #73 クローンのマウスゲノム尾から抽出したゲノム DNA を用いて PCR 法で flox アリルの存在を確認した。プライマーの位置を右模式図に矢印で示した。PCR 後、1.5%アガロースゲルに電気泳動を行った。野生型アリルでは 850bp のバンドが検出されるのに対し、flox アリルでは 620bp のバンドが検出され

る。野生型マウス(+/+)では 850bp のみ、キメラマウス(chimera)では 850bp と 620bp、キメラマウスと野生型マウスの産仔(flox/+)の一部からは 850bp、620bp とキメラマウスと同様のバンドが得られた。

- (D) ゲノム DNA を用いた PCR 法によるゲノム表現型の解析。プライマーの位置を右模式図に示す。1.5%アガロースゲルに電気泳動した。野生型アリルでは 800bp、ノックアウトアリルでは 400bp のバンドが検出される。Vasa-cre マウスと flox/+マウスの産仔の一部に、800 および 400bp 両方のバンドを持つヘテロマウス(+/-)を見出した。
- (E) ヘテロマウス同士を交配させた産仔のゲノム DNA を用いたゲノム表現型の解析。1.5%アガロースゲルに電気泳動した。プライマーの位置は、(D)右模式図と同様。400bp のバンドのみを有するノックアウトマウスを得た。
- (F) ヘテロマウス同士の体外受精における産仔の遺伝型の解析。ノックアウト (-/-)は全体の 26%でほぼメンデルの法則で予測される割合に近い。

4-7-2. Setd5 グローバルノックアウトマウスの体重変化

細胞系における実験では SETD5 が脂肪細胞分化を抑制しており、この表現型が生体内ではどのように現れるかを検討するために、体重および摂餌量の変化を測定した。

通常の餌を与えている場合、SETD5 グローバルノックアウトおよび野生型雄マウスにおいて体重増加に差を認めなかった (図 20A)。高脂肪食投与を行うと、雄マウスにおいては野生型・ノックアウトで体重増加量に差を認めなかったが、雌マウスにおいてはノックアウトマウスで 7 週齢頃より体重増加量が野生型に比べ、増加していた (図 20B、C、D)。高脂肪食摂餌量は雌雄ともに、野生型とノックアウトで差を認めなかった。

これらより、高脂肪食投与下では、Setd5 グローバルノックアウト雌マウスは、食餌摂取量は同じであっても体重増加や肥満を呈しやすいことが明らかとなった。脂肪細胞分化を抑制する SETD5 の機能が Setd5 ノックアウトマウスの肥満の表現型に関与することが示唆された。

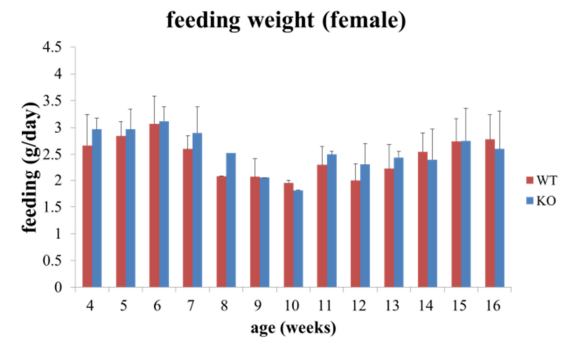
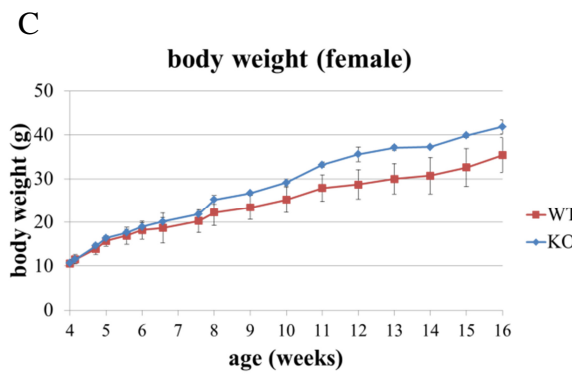
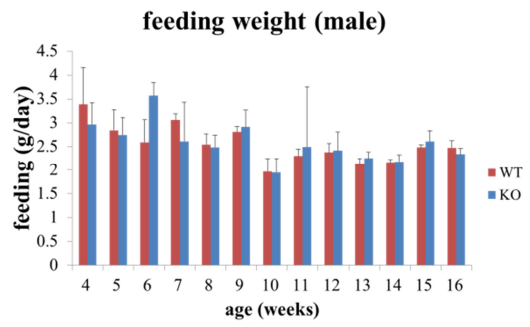
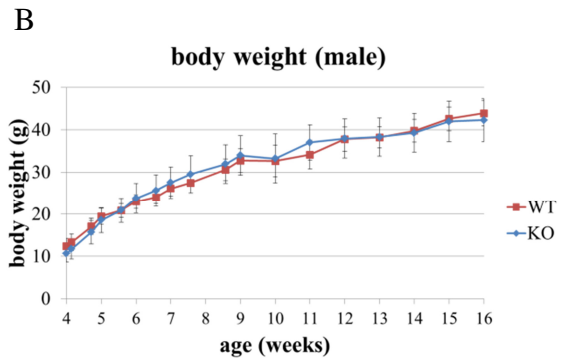
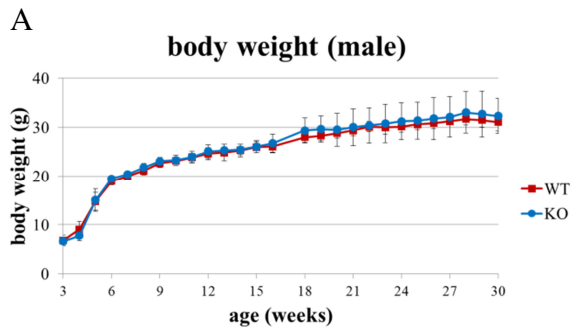


図 2 0 Setd5 グローバルノックアウト雌マウスは肥満を呈しやすい

- (A) 通常食投与下の雄マウスの体重変化。3 週齢より体重測定を開始し、以後 1 回/週の頻度で体重測定を行った。4 週齢に離乳し通常食摂取を開始した。野生型マウス(赤線、N=4)、ノックアウトマウス(青線、N=5)で体重変化に差はみられない。
- (B) 左: 高脂肪食投与下の雄マウスの体重変化。4 週齢に離乳し、体重測定および高脂肪食投与を開始した。野生型マウス(赤線、N=6)、ノックアウトマウス(青線、N=6)で体重変化に差は見られない。
右: 同マウスにおける高脂肪食摂餌量の変化。1 日あたりの摂取量(g)で表示した。野生型とノックアウトで摂餌量に差は見られない。
- (C) 左: 高脂肪食投与下の雌マウスの体重変化。4 週齢に離乳し、体重測定と高脂肪食投与を開始した。ノックアウトマウス(青線、N=7)では野生型マウス(赤線、N=8)に比較し、7 週齢頃より体重増加量が多くなっている。
右: 同マウスにおける高脂肪食摂餌量の変化。野生型とノックアウトで摂餌量に差は見られない。
- (D) Setd5 グローバルノックアウト雌マウス (右) と野生型雌マウス (左)。高脂肪食投与下、20 週齢。

第5章 考 察

5-1. 脂肪細胞・骨芽細胞分化における SETD5 の機能

SETD5 は 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化を抑制し、ST2 細胞の骨芽細胞分化を促進していた。ΔSET-SETD5 強制発現細胞においては、脂肪細胞分化・骨芽細胞分化いずれにおいても全長の強制発現細胞と同じ表現型が観察された。2つの異なった分化制御において共通して SET ドメイン構造を必要としないことは興味深い。しかしながら、強制発現という非生理的な条件下であること、後述するよう SETD5 によるヒストンメチル化に関しては未だ不明な点が多いことなどから、内在性 SETD5 による分化制御において SET ドメインが機能している可能性は否定できない。

3T3-L1 細胞における各アミノ酸欠失体 SETD5 強制発現細胞での脂肪細胞分化の結果からは、437-918 アミノ酸の重要性が示唆された。これらの部位には、既報のプロテオミクスによるリン酸化解析でリン酸化が予測されるセリンもしくはスレオニンが存在しており（前述）、翻訳後修飾によって SETD5 が分化制御を獲得することも考えられるが、必須リン酸化部位の同定はできなかった。また、(Δ437-918)-SETD5 および(Δ437-1441)-SETD5 は他の欠失体と比較して欠失アミノ酸数が多いことから、SETD5 がタンパクとして高次構造を形成できなくなり、機能を喪失した可能性も考えられる。これらの欠失変異体 SETD5 は全長

同様に核に局在することが免疫細胞染色から明らかであり、未熟な構造による局在異常によるものではないことがわかった。

5-2. SETD5 による脂肪細胞・骨芽細胞分化制御機構について

ChIP において、今回新たに SETD5 の結合領域を見出したことで、さらに特異度の高い ChIP-sequencing を行うことが可能になった。また、Setd5 グローバルノックアウトマウスの組織を用いた ChIP を行い、野生型との差分を解析することで、内在性 SETD5 の結合領域をより明確にすることができる。SETD5 による分化制御機構を解明するにあたり、これらを用いてさらなる標的を探索することが重要な課題である。

今回、SETD5 の標的として見出した SOX4 は SOX ファミリーに属する。SOX ファミリーは発生段階における細胞の運命づけに関与しており転写因子として働くことが知られている。SOX5、SOX6、SOX9 は軟骨細胞分化制御に関与するという報告がある[53]。代謝疾患との関連では、当研究室から、SOX6 が β -catenin や HDAC と結合し、cyclin D1 のプロモーター領域の H3 および H4 の脱アセチル化を行うことでプロモーター活性を低下させ、膵 β 細胞からのグルコース応答性のインスリン分泌を低下させることを報告している[54]。

SOX4 については、Sox4 ヘテロ欠損マウスで骨形成が損なわれており、マウ

ス頭蓋冠から得られる前骨芽細胞において骨芽細胞分化が著しく抑制されているという報告がある[55]。また、Sox4 は転写因子としての機能とは別に、タンパク安定化の機能を持つ。大腸癌や子宮内膜癌において、SOX4 は β -catenin および TCF4 の分解を抑制しタンパクとして安定化させることにより Wnt/ β -catenin signaling を促進し腫瘍細胞増殖に関与すると報告されている[51,56,57]。

3T3-L1 細胞のマイクロアレイ解析では、SETD5 強制発現細胞において Wnt/ β -catenin signaling に直接関わる遺伝子の発現に変化は見られなかったが、その下流にある脂肪細胞分化制御に関与する遺伝子（前述）は低下していた。また、SETD5 強制発現 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化において β -catenin をノックダウンすると、SETD5 の分化抑制効果が部分的に解除された。これらの結果より、SETD5 の作用機構の一つとして、SETD5 強制発現により誘導された SOX4 が β -catenin、TCF4 をタンパクレベルで安定化させ Wnt/ β -catenin signaling を促進することにより脂肪細胞分化を抑制する可能性が挙げられる。この作用機構が存在すると仮定すると、Setd5 ノックダウン 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化開始時にコントロール細胞と比べて Ppar γ の発現上昇を認めたことに関して、SETD5 が Sox4、Wnt/ β -catenin signaling を介して PPAR γ の発現を抑制し、脂肪細胞分化を抑制したと考えることもできる。

骨芽細胞分化において、Wnt signaling と BMP signaling は協調して働いている

という報告がある[58]。SETD5 強制発現 ST2 細胞では、分化誘導剤非存在下でも分化が進行していた。また、Setd5 をノックダウンした ST2 細胞では、WNT3A や BMP-2 の添加によっても分化が抑制されていた。これらの結果は、ST2 細胞においても SETD5 が Wnt/ β -catenin signaling に促進的に作用していることを支持するものである。さらに、SETD5 が Wnt/ β -catenin signaling と BMP signaling の協調作用そのものに関与している可能性も考えられた。

以上をまとめると、SETD5 による分化制御機構の一つの可能性として、SETD5 により発現が上昇した SOX4 が、 β -catenin および TCF4 をタンパクレベルで安定化させ Wnt/ β -catenin signaling を活性化した状態に保つことで、脂肪細胞分化抑制・骨芽細胞分化促進につながることを推測された。

5-3. SETD5 は Sox4 の遺伝子発現をどのように制御しているか

SOX4 が SETD5 の標的の一つであることが見出されたが、その遺伝子制御がいかに行われているかは現時点で明らかでないため、考えられ得る可能性について考察する。

まず、SET ドメインを介したヒストンメチル化による遺伝子発現制御である。SETD5 は H3K9 のモノメチル化酵素として報告されている（前述）が、精製タンパクと H3 ペプチドを用いた *in vitro* での実験であり、他の部位のヒストンメチル化能を持つ可能性は否定できない。SETD5 の SET ドメインは H3K4 ジメチル・トリメチル化酵素である MLL5 と相同性が高い。さらに、当研究室における 3T3-L1 細胞および ST2 細胞での抗 H3K4me3 抗体を用いた ChIP-sequencing では、Sox4 遺伝子の SETD5 結合領域と一致してピークが見られる（図 2 1）。SETD5 と相同性の高い SET ドメインを有する酵母の SET1 は、単独ではヒストンメチル化能を持たないが、complex proteins associated with Set1 (COMPASS)と呼ばれるタンパク複合体を形成することで H3K4 のトリメチル化能を獲得するという報告もある[59]。これらから考えられるのは、SETD5 が H3K4 のトリメチル化を行うことで Sox4 遺伝子の転写活性を促進しているという可能性である。したがって、SETD5 のヒストンメチル化活性の解明が急務であると言える。

次に、SET ドメインを欠失させた Δ SET SETD5 の強制発現は全長と同様に脂

肪・骨芽細胞分化を変化させたことから、SETD5 が SET ドメインを介さずスキ
ャフォールドタンパクとして Sox4 の遺伝子発現を制御する可能性が考えられる。
一つ目は、SETD5 が他のヒストンメチル化酵素をリクルートメントしタンパク
複合体を形成することでクロマチン制御を行う可能性である。例えば、H3K9 の
メチル化においては、suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Suv39h1)、G9a、
G9a-like protein (GLP)、SETDB1 の 3 つの酵素が複合体を形成し協調的にヒスト
ンメチル化制御を行うと報告されている[60]。二つ目は、他のヒストン修飾タン
パクをリクルートメントする可能性である。ショウジョウバエで存在する upSET
は、SETD5 と相同性の高い SET ドメインを有するタンパクである。upSET は
Rpd3/Sin3-containing complex により、HDAC をリクルートメントし、ヒストンの
脱アセチル化を行うことによってクロマチンへのタンパクの接近性を高めると
いう報告がある[61]。三つ目として、直接、転写因子もしくは転写因子を含むタ
ンパク複合体をリクルートメントする可能性が挙げられる。

以上のことより、SETD5 が相互作用し協調的に機能する分子を解明すること
は重要な課題であり、そのためには本研究において作製した内在性 SETD5 認識
抗体を用いたプロテオミクスが有用であると考えられる。

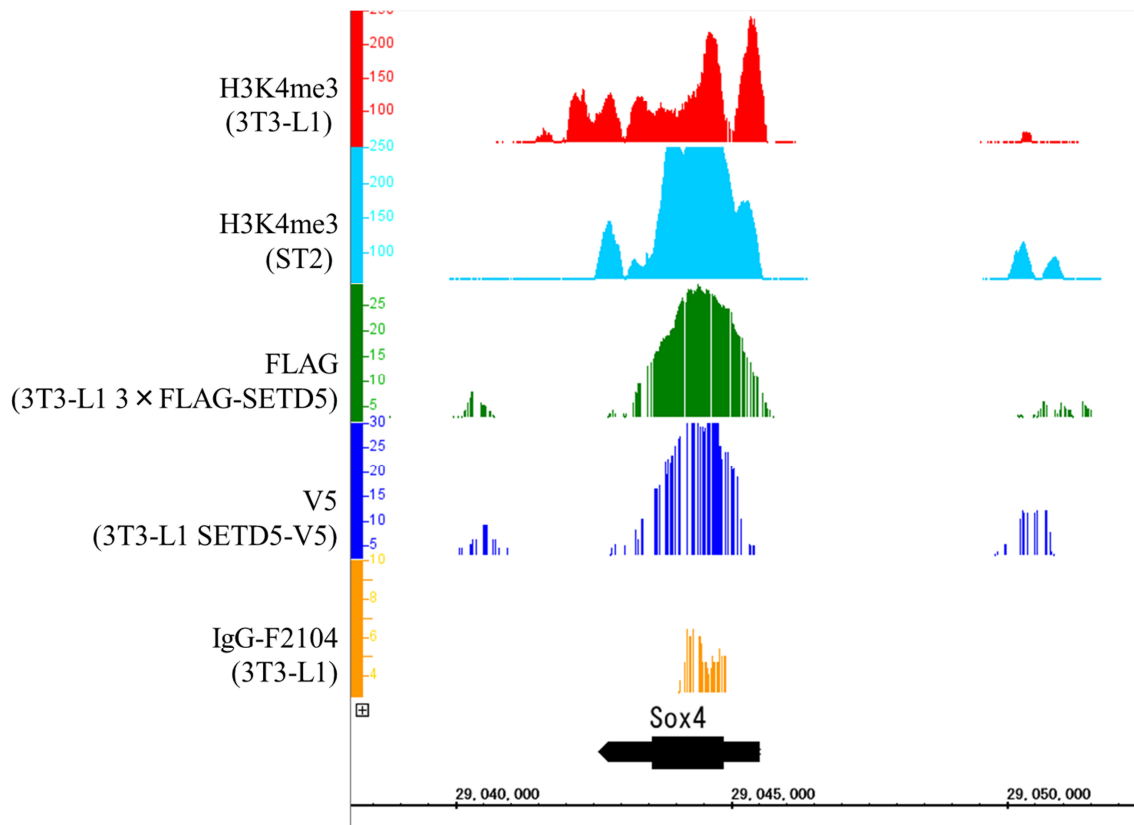


図 2 2 SETD5 が結合する Sox4 遺伝子領域には H3K4 トリメチルが認められる 3T3-L1 細胞（最上段赤）および ST2 細胞（2 段目水色）での抗 H3K4me3 抗体を用いた ChIP-seq。SETD5 の結合領域と一致してシグナルが見られる。

5-4. 生体内での SETD5 の機能について

ST2 細胞の骨芽細胞分化において WNT3A による分化誘導を行っても *Setd5* ノックダウンによって分化が抑制されたため、ノックアウトでは Wnt/ β -catenin signaling が重要な役割を果たしている発生段階における骨形成不全が生じる可能性が考えられた。また、SETD5 の標的遺伝子の一つである Sox4 のグローバルノックアウトマウスは耐性致死である。しかしながら、SETD5 ノックアウトマウスは耐性致死ではなく、通常飼育下で骨形成不全を示唆するような明らかな表現型は見られない。SOX4、Wnt/ β -catenin signaling は生命維持において必須であることから、SETD5 以外による制御を受けていることも考えられる。SETD5 と相同性の高い MLL5 は H3K4 のトリメチル化タンパクで、その SET ドメインの糖鎖修飾は H3K4 のモノ・ジメチル化に必須であると報告されている[36,62]。MLL5 のグローバルノックアウトマウスはわずかな血球系細胞の異常と雄の不妊を呈するが胎生致死ではないことから、発生過程において SETD5 による代償機構の可能性が示唆されている[63,64]。Setd5 グローバルノックアウトマウスにおいてもこれとは逆に MLL5 による代償補填機構が関与している可能性が考えられる。

Setd5 グローバルノックアウトマウスにおいて、雌マウスでは高脂肪食投与下で野生型に比べて肥満を呈しやすいことを見出した。3T3-L1 細胞という白色脂

肪細胞系において、SETD5 は脂肪細胞分化を抑制することから、ノックアウトでは脂肪細胞分化抑制機構が損なわれ、特に皮下脂肪が相対的に多い雌マウスにおいて白色脂肪が増大し、肥満を呈しやすい表現型を示したと考えられる。今後、組織学的な解析や肥満に伴う代謝の変化に関して検討が必要である。また、雌特異的な表現型であることは、女性ホルモンとの関連も示唆している。卵巣摘除により女性ホルモンを枯渇させた状態においてこのような表現型が同様に観察されるかということは非常に興味深い。また、骨芽細胞分化促進能を持つ Setd5 がノックアウトされた状態で、卵巣摘除によって誘発される骨粗鬆症がもたらす影響も検討すべき課題の一つである。

第6章 結論

ヒストンメチル化酵素候補蛋白 SETD5 は脂肪細胞分化を抑制し、骨芽細胞分化を促進する機能を有する。SETD5 は強制発現系において、自身の SET ドメイン非依存的にこれらの分化制御を行う。

今回、新規に SETD5 の ChIP-sequencing を行い、マイクロアレイと統合的に解析することによって、SETD5 が結合する遺伝子として Sox4 を見出した。Sox4 の遺伝子発現は SETD5 依存的に上昇した。これらのことから、Sox4 は SETD5 の標的と考えられた。

また、Setd5 グローバルノックアウトマウスを樹立した。Setd5 グローバルノックアウト雌マウスは高脂肪食投与下において肥満を呈しやすく、SETD5 による脂肪細胞分化への関与は生体内においても重要と考えられた。

今後、SETD5 の脂肪細胞・骨芽細胞分化制御が SOX4 を介するものであるか、SETD5 が Sox4 の発現をどのように制御しているかに関する検討が必要である。また、Setd5 グローバルノックアウトマウスのさらなる解析も重要な課題である。

参考文献

1. Leslie, M., *et al.* Osteoporosis: Implications for risk reduction in the college setting. *Journal of American College Health* **48**, 67-71 (1999)
2. Nakagami, H., *et al.* The mechanism of white and brown adipocyte differentiation. *Diabetes & Metabolism Journal* **37**, 85-90 (2013)
3. Abdallah, B.M., *et al.* New factors controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis. *Bone* **50**, 540-545 (2012)
4. Gijsen, H. SV., *et al.* The interrelationship between bone and fat: from cellular see-saw to endocrine reciprocity. *Cellular and Molecular Life Sciences* **70**, 2331-2349 (2013)
5. Wakabayashi, K., *et al.* The peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor alpha heterodimer targets the histone modification enzyme PR-Set7/Setd8 gene and regulates adipogenesis through a positive feedback loop. *Molecular Cell Biology* **29**, 3544-3555 (2009)
6. Hirst, M., *et al.* Epigenetics and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **41**, 136-146 (2009)
7. Marmorstein, R., Protein modules that manipulate histone tails for chromatin regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**, 422-432 (2001)
8. Fischle, W., *et al.* Histone and chromatin cross-talk. *Current Opinion in Cell Biology* **15**, 172-183 (2003)
9. Bhaumik S.R. *et al.*, Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nature Structural and Molecular Biology* **14**, 1008-1016 (2007)
10. Ho, L., *et al.* Chromatin remodeling during development. *Nature* **463**, 474-484 (2010)
11. Kooistra, S.M., Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**, 297-311 (2012)
12. Lizcano, F., *et al.* Regulation of adipogenesis by nuclear receptor PPAR γ is modulated by the histone demethylase JMJD2C. *Genetics and Molecular Biology* **34**, 19-24 (2011)
13. Lawson, K.A., *et al.* ESET histone methyltransferase regulates osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells during postnatal bone development. *FEBS Letters* doi: 10.1016 (2013)
14. Rosen, E.D., *et al.* Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* **444**, 847-853 (2006)
15. Filipak, M., *et al.* Integrated control of proliferation and differentiation of

- mesenchymal stem cells. *Environmental Health Perspectives* **80**, 117-125 (1989)
16. Green, H., *et al.* An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* **3**, 127-133 (1974)
 17. Ross, S.E., *et al.* Microarray analyses during adipogenesis: understanding the effects of Wnt signaling on adipogenesis and the roles of liver X receptor alpha in adipocyte metabolism. *Molecular Cell Biology* **22**, 5989-5999 (2002)
 18. Student, A.K., *et al.* Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiation 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Biological Chemistry* **255**, 4745-4750 (1980)
 19. MacDougald, O.A., *et al.* Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annual Review of Biochemistry* **64**, 345-373 (1995)
 20. Morrison, R.F., *et al.* Role of PPAR γ in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18 (INK4c) and p21 (Waf1/Cip1), during adipogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 17088-17097 (1999)
 21. Murshed, M., *et al.* Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes & Development* **19**, 1093-1104 (2005)
 22. Harada, S., *et al.* Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* **423**, 349-355 (2003)
 23. Long, F., Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Molecular cell biology* **13**, 27-38 (2012)
 24. Behrens, J., Everything you would like to know about Wnt signaling. *Science Signaling* **6**, 17-18 (2013)
 25. Moon, R.T., *et al.* Wnt and β -catenin signaling; diseases and therapies. *Nature Reviews Genetics* **5**, 689-699 (2004)
 26. Gong, Y., *et al.* LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* **107**, 513-523 (2001)
 27. Fujino, T., *et al.* Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion. *Proceedings of the National Academy of Science* **100**, 229-234 (2002)
 28. Ross, S.E., *et al.* Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* **289**, 950-953 (2000)
 29. Kawai, M., *et al.* Wnt/Lrp/ β -catenin signaling suppresses adipogenesis by inhibiting mutual activation of PPAR γ and C/EBP α . *Biochemical and Biophysical Research Communications* **363**, 276-282 (2007)]
 30. Kang, S., *et al.* Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein and peroxisome

- proliferator-activated receptor gamma. *The Journal of Biological chemistry* **19**, 14515-14524 (2007)
31. Cawthorn, W.P., *et al.* Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a β -catenin-dependent mechanism. *Bone* **50**, 477-489 (2011)
 32. Hanlon, S.E., *et al.* Progress and challenges in profiling the dynamics of chromatin and transcription factor binding with DNA microarrays. *Current Opinion in Genetics & Development* **14**, 697-705 (2004)
 33. Park, P. J., ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nature Reviews Genetics* **10**, 669-680 (2009)
 34. Pinheiro, I., *et al.* Prdm3 and Prdm16 are H3K9me1 methyltransferases required for mammalian heterochromatin integrity. *Cell* **150**, 948-960 (2012)
 35. Arrowsmith, C.H., *et al.* Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* **11**, 385-400
 36. Fujiki, R., *et al.* GlcNAcylation of a histone methyltransferase in retinoic-acid-induced granulopoiesis. *Nature* **459**, 455-461 (2009)
 37. Engholm-Keller, K., *et al.* Multidimensional strategy for sensitive phosphoproteomics incorporating protein prefractionation combines with SIMAC, HILIC, and TiO₂ chromatography applied to proximal EGF signaling. *Journal of proteome research* **10**, 5383-5397 (2011)
 38. Weber, C., *et al.* Dual phosphoproteomics and chemical proteomics analysis of erlotinib and gefitinib interference in acute myeloid leukemia cells. *Journal of proteomics* **75**, 1343-1356 (2012)
 39. Kellogg, G., *et al.* Deletion of 3q25.3 in a patient with intellectual disability and dysmorphic features with further definition of a critical region. *American Journal of Medical Genetics* **161**, 1405-1408 (2013)
 40. Gomide, V.S., *et al.* In vitro and in vivo osteogenic potential of bioactive glass-PVA hybrid scaffolds colonized by mesenchymal stem cells. *Biomedical Materials* **7**, (2012)
 41. Laemmli, U.K., *et al.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970)
 42. Hayashi, H., *et al.* High-resolution mapping of DNA methylation in human genome using oligonucleotide tiling array. *Human Genetics* **120**, 701-711 (2007)
 43. Katou, Y., *et al.* Genomic approach for the understanding of dynamic aspect of chromosome behavior *Methods Enzymology* **409**, 389-410 (2006)
 44. Johnson, WE., *et al.* Model-based analysis of tiling-arrays for ChIP-chip.

- Proceedings of the National Academy of Science* **103**, 12457-12462 (2006)
45. Gallardo, T., *et al.* Generation of a germ cell-specific mouse transgenic Cre line, Vasa-Cre *Genesis* **45**, 413-417 (2007)
 46. Yuan, P., *et al.* Eset partners with Oct4 to restrict extraembryonic trophoblast lineage potential in embryonic stem cells. *Genes Development* **23**, 2507-2520 (2009)
 47. Dunker, A. K., *et al.* Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry* **41**, 6573-6582 (2003)
 48. Feng, J., *et al.* Identifying ChIP-seq enrichment using MACS. *Nature Protocols* **7**, 1728-1740 (2012)
 49. Koudritsky, M., *et al.* Positional distribution of human transcription factor binding sites. *Nucleic Acids Research* **36**, 6795-6805 (2008)
 50. Bailey, T.M., *et al.* Inferring direct DNA binding from ChIP-seq *Nucleic Acids Research* **40**, e128 (2012)
 51. Lee, AE-K., *et al.* Sox4 stimulates β -catenin activity through induction of CK2. *Oncology Reports* **25**, 559-565 (2011)
 52. Sinner, D., *et al.* Sox17 and Sox4 differentially regulates β -catenin/T-cell factor activity and proliferation of colon carcinoma cells. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 7802-7815 (2011)
 53. Bowles, J., *et al.* Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Developmental Biology* **227**, 239-255 (2000)
 54. Iguchi, H., *et al.* SOX6 suppresses cyclin D1 promoter activity by interacting with β -catenin and histone deacetylase 1, and its down-regulation induces pancreatic β -cell proliferation. *Journal of biological chemistry* **282**, 19052-19061 (2007)
 55. Nissen-Meyer, L.S.H., *et al.* Osteopenia, decreased bone formation and impaired osteoblast development in Sox4 heterozygous mice. *Journal of Cell Science* **120**, 2785-2795 (2007)
 56. Saegusa, M., *et al.* Sox4 functions as a positive regulator of b-catenin signaling through upregulation of TCF4 during morular differentiation of endometrial carcinomas. *Laboratory Investigation* **92**, 511-521 (2012)
 57. Sinner, D., *et al.* Sox17 and Sox4 differentially regulate b-catenin/T-cell factor activity and proliferation of colon carcinoma cells. *Molecular and cellular biology* **27**, 7802-7815 (2007)
 58. Salazar, V.S., *et al.* Embryonic ablation of osteoblast Smad4 interrupts matrix synthesis in response to canonical Wnt signaling and causes an osteogenesis-imperfecta-like phenotype. *Journal of Cell Science* **126**, 4974-4984

(2013)

59. Miller, T., *et al.* COMPASS: A complex of proteins associated with a trithorax-related SET domain protein. *Proceedings of the National Academy of Science* **98**, 12902-12907 (2001)
60. Fritsch, L., *et al.* A subset of the histone H3 lysine 9 methyltransferases Suv39h1, G9a, GLP and SETDB1 participate in a multimeric complex. *Molecular Cell* **37**, 46-56 (2010)
61. Rincon-Arano, H., *et al.* UpSET recruits HDAC complexes and restricts chromatin accessibility and acetylation at promoter regions. *Cell* **151**, 1214-1228 (2012)
62. Madan, V., *et al.* Impaired function of primitive hematopoietic cells in mice lacking the mixed-lineage leukemia homolog MLL5. *Blood* **113**, 1444-1454 (2009)
63. Heuser, M., *et al.*, Loss of MLL5 results in pleiotropic hematopoietic defects, reduced neutrophil immune function, and extreme sensitivity to DNA demethylation. *Blood* **113**, 1432-1443 (2009)
64. Zhang, Y., *et al.*, MLL5 contributes to hematopoietic stem cell fitness and homeostasis. *Blood* **113**, 1455-1463 (2009)

謝 辞

本テーマのご指導を賜った先端科学技術研究センター代謝医学分野 酒井寿郎教授に深謝いたします。本研究を進める環境を整えて下さった佐賀大学医学部附属病院循環器内科 野出孝一教授に深くお礼申し上げます。また、本研究を支えて下さった代謝生理化学 栗原裕基教授に感謝致します。

論文作成にあたりまして、篤くご指導を頂きました疾患生命工学センター分子病態医科学部門 宮崎徹教授、分子細胞生物学研究所ゲノム情報解析研究分野 白髭克彦教授、老年病科 秋下雅弘教授、リポドミクス社会連携講座 北芳博准教授、脂肪細胞機能制御学 脇裕典准教授に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、研究全般にわたり様々なご指導および終始ありがたいご指摘を頂きました先端科学技術研究センター代謝医学分野 稲垣毅准教授、松村欣宏助教、システム生物医学 児玉龍彦教授、田中十志也准教授、抗体作製およびマウス飼育におきましてご協力いただきました計量生物医学 浜窪隆雄教授、血管生物学 南敬教授に深く感謝いたします。

骨関連において篤いご指導を賜った東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科細胞生理学分野 竹田秀教授、福田亨助教にお礼申し上げます。

ノックアウトマウス作製におきましてご尽力いただいた熊本大学生命資源研究・支援センター技術開発分野 竹田直樹助教に深謝いたします。

ChIP-sequencing およびマイクロアレイにおける解析におきましてご尽力頂いた先端科学技術研究センター・ゲノムサイエンス分野 油谷浩幸教授、仲木竜先生、山本尚吾先生に深くお礼申し上げます。

細胞を供与頂いた東京大学医科学研究所 北村俊雄教授、プラスミド・*vasa-cre* マウスを供与頂いた理化学研究所基幹研究所 眞貝洋一先生、マウス体外授精でご協力いただいた京都大学ウイルス研究所感染症モデル研究センター 宮地均先生に深くお礼申し上げます。

本研究における実験を終始支えて下さった先端科学技術研究センター・代謝医学分野 栗原玲子様、内田あおい様、川崎裕子様、大木翔太郎様、藤橋ひとみ様、有益なご討論を頂いた酒井研究室の皆様、特に馬郡健太様、鶴谷悠也様、塩野陽様、阿部陽平様、Royhan Rozqie 様に感謝致します。

最後に、大学院生活を支えてくれた母山崎久子に感謝します。