

論文の内容の要旨

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

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。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。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。これら間葉系細胞の分化誘導のプロセスにエピゲノム制御が関与することが近年多く報告されている。

脂肪細胞・骨芽細胞の分化制御において、PPAR γ と Wnt/ β -catenin signaling は重要な役割を果たす。PPAR γ は脂肪細胞分化のマスターレギュレーターで、脂肪細胞分化を正に制御し、骨芽細胞分化を負に制御する。一方、Wnt/ β -catenin signaling は脂肪細胞分化を負に制御し、骨芽細胞分化を正に制御している。

先行研究により、ヒストンメチル化酵素候補蛋白 SETD5(SET domain containing 5)は3T3-L1 前駆脂肪細胞の抗 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。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、PPAR γ によって負に制御されている可能性が考えられた。

SETD5 はヒストンメチル化を担う SET ドメインを有する。ヒストンメチル化酵素の系統樹において、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。また、SETD5、MLL5 と高い相同性のある SET ドメインを持つショウジョウバエのタンパク upSET は、HDAC complex をリクルートメントシクロマチン構造の変化を来すことが報告されている。

これらの背景から、SETD5 がエピゲノム変化を介して脂肪細胞・骨芽細胞分化の制御に関与することが考えられた。そこで、これらの分化における SETD5 の機能を解明し、その標的を探索することを目的として研究を行った。

SETD5 の発現制御における Wnt/ β -catenin signaling の関与を検討するために、抗 β -catenin 抗体を用いた ChIP on chip 解析を行った。未分化の 3T3-L1 細胞において Setd5 遺伝子上に β -catenin の結合を認めた。また、WNT3A を添加し Wnt/ β -catenin signaling によって脂肪細胞分化を抑制した 3T3-L1 細胞のマイクロアレイでは、Setd5 の遺伝子発現は 48 時間後に上昇に転じ、Setd5 が Wnt/ β -catenin signaling に正に制御されている可能性が示唆された。

実験を進めるにあたり、内在性 SETD5 認識抗体の作製を行った。抗原として、disorder 傾向が高く既知のドメイン構造を持たないユニークな配列として、SETD5 の 43-93 アミノ酸領域を選別した。ELISA およびイムノブロットでスクリーニングを行い、内在性 SETD5 を認識するモノクローナル抗体(IgG-F2104 抗体)が得られた。IgG-F2104 は、イムノブロットにおいて 100kDa 付近に非特異的なバンドを検出したが、内在性 SETD5 免疫沈降後のイムノブロットにおいてはこの非特異的なバンドは検出されなかった。

細胞系における SETD5 による分化制御を検討するために、脂肪細胞分化実験では 3T3-L1 細胞を、骨芽細胞分化実験では骨髄由来幹細胞である ST2 細胞を用いた。それぞれ、レトロウイルスを感染させた強制発現で gain of function を、RNA 干渉法を用いたノックダウンで loss of function を観察した。

まず、3T3-L1 細胞を用いて SETD5 の脂肪細胞分化への影響を検討した。レトロウイルスを感染させ SETD5 タンパクを強制発現した 3T3-L1 細胞を作製し、デキサメサゾン・IBMX・インスリンを用いて脂肪細胞分化を誘導、分化開始 8 日後に ORO 染色を行い、脂肪滴の蓄積を観察した。コントロール細胞では脂肪滴の蓄積が見られるのに対し、SETD5 強制発現細胞では脂肪滴の蓄積はなく、脂肪細胞分化が抑制されていた。Ppar γ 、Cebp α 、Fabp4、AdipoQ といった脂肪細胞分化関連遺伝子は、コントロール細胞で分化とともに上昇するのに対し、SETD5 強制発現細胞では上昇しなかった。また、脂肪細胞分化抑制効果に関与する SETD5 の機能部位の同定を目的として、9 種の欠失変異体、およびリン酸化修飾の報告があるアミノ酸を変異させた変異体 SETD5 が強制発現した 3T3-L1 細胞を作製し、脂肪細胞分化誘導を行って表現型を観察した。 Δ SET SETD5 強制発現細胞では全長の強制発現と同様の脂肪細胞分化抑制能を示したが、(Δ 437-1441)および(Δ 437-918)-SETD5 強制発現細胞では分化抑制解除が見られ、これらに共通する 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。さらに、siRNA を用いて Setd5 をノックダウンした細胞において、デキサメサゾンのみを用いて誘導を行い、同様に分化 8 日後に ORO 染色を行うと、コントロール細胞では脂肪滴蓄積が見られないのに対し、Setd5 ノックダウン細胞では脂肪滴蓄積が見られた。分化誘導開始時における遺伝子発現を見ると、ノックダウン細胞で Ppar γ は有意に増加していたが、Cebp α に差は見られなかった。これらより、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。以上の 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化実験の結果から、SETD5 は脂肪細胞分化を抑制する因子であることが解明された。

次に、ST2 細胞を用いて SETD5 の骨芽細胞分化への影響を検討した。レトロウイルスを

感染させ SETD5 タンパクを強制発現した ST2 細胞を作製、骨芽細胞分化を誘導し、4 日後にアルカリフォスファターゼ(ALP)染色を行った。分化誘導剤非存在下で、コントロール細胞は ALP 活性が見られなかったが、SETD5 強制発現細胞は活性を示した。アスコルビン酸と β -glycerophosphate を添加して分化後の石灰化が促進される条件で培養し、17 日後に von Kossa's 染色を行って石灰化状態を観察すると、SETD5 強制発現細胞において強い石灰化を認めた。分化誘導 4 日後の骨芽細胞分化関連遺伝子の発現を見ると、SETD5 強制発現細胞において、Runx2、Sp7、Col1a1、Alpl の遺伝子発現の上昇を認めた。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 細胞を作製し、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 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。次に、siRNA を用いて Setd5 をノックダウンした細胞において、アスコルビン酸、WNT3A、BMP-2 を用いて骨芽細胞分化を誘導し 4 日後に ALP 染色を行うと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。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。これらより、内在性 SETD5 は ST2 細胞において骨芽細胞分化を促進することが見出された。以上の ST2 細胞の骨芽細胞分化実験の結果から、SETD5 は骨芽細胞分化を促進する因子であることが解明された。

細胞系の実験結果より、Setd5 は脂肪細胞分化抑制因子であり、骨芽細胞分化促進因子であることがわかった。

次に、この作用機構を解明するために 3T3-L1 細胞の ChIP-sequencing と脂肪細胞分化過程におけるマイクロアレイを統合的に解析し、SETD5 の標的を網羅的に探索した。

SETD5 の遺伝子結合領域は未知であるため、tag を付与した強制発現 SETD5 の tag 抗体を用いた 2 種と、今回作成した内在性 SETD5 認識抗体 IgG-F2104 を用いた 1 種、計 3 種の ChIP を行って ChIP の精度を高める工夫をした。細胞は脂肪細胞分化誘導開始時の 3T3-L1 細胞を用いた。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、通常の 1%ホルムアルデヒドに加え 1.5mM EGS を用いた。強制発現 SETD5 の ChIP は、C 末端に V5 tag、もしくは N 末端に 3xFLAG tag を付与した SETD5 強制発現 3T3-L1 細胞で、抗 V5 抗体もしくは抗 FLAG 抗体を用いて ChIP を行った。陽性対照として、既に当研究室で結果が得られている JHDM1B および SETDB1 を用いた。脱架橋して得られた DNA について、それぞれ既知の結合領域・非結合領域における qPCR を行い、陽性対照において結合領域のみに濃縮が得られたことを確認し、次世代シーケンサーでの sequencing を行った。また、内在性 SETD5 の ChIP は IgG-F2104 抗体を用いた。ChIP 産物のイムノブロットおよび得られる DNA 量を指標に条件検討を行い、至適抗体/タンパク比、免疫沈降時間を決定し、得られた DNA の sequencing を行った。

マイクロアレイ解析は *Setd5* ノックダウン 3T3-L1 細胞を用いて行った。コントロール細胞においてノックダウンと比べ2倍より発現が増加している遺伝子(つまり *Setd5* ノックダウンで発現が低下する遺伝子) 880 個を抽出した。

抗 FLAG 抗体による ChIP-sequencing の peak 解析から得られた SETD5 結合領域の 3345 遺伝子とマイクロアレイ解析の結果得られた 880 遺伝子に共通する 230 遺伝子を標的候補として抽出した。さらに、この 230 遺伝子の中から、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) 全てで 5 以上の signal が見られる 29 遺伝子を抽出した。この 29 遺伝子について、脂肪細胞・骨芽細胞分化への関連性を検討し、*Sox4* に注目した。*Sox4* は近年、Wnt/ β -catenin signaling における TCF の転写を活性化するという報告や、 β -catenin/TCF4 複合体をタンパクレベルで安定化することで Wnt/ β -catenin signaling を活性化状態に保つといった報告がある。SETD5 が *Sox4* を介して Wnt/ β -catenin signaling の活性化維持を行い、脂肪細胞分化抑制・骨芽細胞分化促進を行っている可能性が考えられた。*Sox4* の遺伝子領域にプライマーを作製し、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、約 6 倍の濃縮が得られ、SETD5 が *Sox4* の遺伝子領域に結合することが確認された。また、*Sox4* の遺伝子発現は、*Setd5* ノックダウン 3T3-L1 細胞では脂肪細胞分化開始時にコントロールの 1/4 に低下しており、SETD5 強制発現 3T3-L1 細胞では分化開始 24 時間後にコントロールの約 5 倍に上昇した。SETD5 が *Sox4* 遺伝子領域に結合していること、*Sox4* の遺伝子発現が SETD5 依存的に上昇することから、*Sox4* は SETD5 の標的と考えられた。

細胞系において *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。*Setd5* グローバルノックアウト雌マウスでは、高脂肪食投与下で野生型マウスに比べて体重の増加を認めた。これには SETD5 の脂肪細胞分化抑制機構が関与していることが示唆された。

以上の実験結果より、SETD5 は脂肪細胞分化を抑制し骨芽細胞分化を促進していることがわかった。いずれの分化制御においても、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。また、3T3-L1 細胞において、SETD5 が *Sox4* を標的とすることを見出した。加えて、*Setd5* グローバルノックアウトマウスを樹立した。今後、SETD5 の分化制御機構の解明およびノックアウトマウスの表現型解析が重要な課題である。