

## [課程-2]

### 審査の結果の要旨

氏名 山崎 あゆむ

本研究は、生活習慣病の発症に関与する脂肪細胞・骨芽細胞分化の分化制御について、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化系と ST2 細胞の骨芽細胞分化系を用いて、ヒストンメチル化酵素候補蛋白 SETD5 の機能解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. SETD5 強制発現 3T3-L1 細胞における細胞免疫染色により、SETD5 が核内に局在することが示された。
2. 抗 $\beta$ -catenin 抗体を用いた ChIP on chip では Setd5 の遺伝子領域に $\beta$ -catenin の結合を認めた。3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化を WNT3A を添加して抑制した系におけるマイクロアレイ解析では、WNT3A 添加 48 時間後に Setd5 の遺伝子発現が上昇した。これらより Setd5 が Wnt/ $\beta$ -catenin signaling に制御されている可能性が考えられた。
3. 新たに内在性 SETD5 を認識する抗体を作製した。
4. 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化の系において、SETD5 強制発現細胞を用いて脂肪細胞分化誘導を行うと、分化が抑制されていた。各種欠失変異体を強制発現した細胞の脂肪細胞分化誘導においては、SET ドメイン欠失 SETD5 強制発現細胞において全長と同様の分化抑制が見られたが、437-1441 アミノ酸、437-918 アミノ酸欠失 SETD5 強制発現細胞においては、部分的な分化抑制解除が見られた。RNA 干渉法を用いた Setd5 ノックダウン細胞の脂肪細胞分化誘導では、通常では分化が見られないデキサメサゾンのみでの誘導において分化が見られ、内在性 SETD5 が脂肪細胞分化を抑制していることが示された。これらより、SETD5 は脂肪細胞分化を抑制する因子で、自身の SET ドメイン非依存的に分化抑制を行うことが見出され、437-918 アミノ酸が分化制御機能に関与する部位である可能性が示唆された。
5. ST2 細胞の骨芽細胞分化の系において、SETD5 強制発現細胞を用いて骨芽細胞分化誘導を行うと、分化が促進されていた。SET ドメイン欠失 SETD5 強制発現細胞においては、コントロール細胞より分化が促進していることが示された。RNA 干渉法を用いた Setd5 ノックダウン細胞の骨芽細胞分化誘導では、アスコルビン酸、WNT3A、BMP-2 といった分化誘導剤を添加している条件下においても分化が見られず、内在性 SETD5 が骨芽細胞分化を促進していることが示された。これらより、SETD5 は骨芽細胞分化を促進する因子で、自身の SET ドメイン非依存的に分化促進を行うことが見出された。
6. 3T3-L1 細胞における SETD5 の ChIP-sequencing と Setd5 ノックダウン 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化におけるマイクロアレイの統合的解析より、SETD5 の標的候補として Sox4 が見出された。ChIP-qPCR において、Sox4 の遺伝子領域に SETD5 が結合していることが示され、

SETD5 依存的に Sox4 の遺伝子発現が上昇することが定量的 PCR より明らかであるため、Sox4 は SETD5 の標的遺伝子であると考えられた。

7. Setd5 グローバルノックアウトマウスを樹立し、高脂肪食投与下での体重変化の検討において、Setd5 ノックアウト雌マウスが野生型と比べ体重増加が大きいことが示された。

以上、本論文は SETD5 が脂肪細胞分化を抑制し、骨芽細胞分化を促進することを明らかにし、SETD5 の標的として Sox4 を見出した。さらに Setd5 グローバルノックアウトマウスを樹立している。本研究は間葉系細胞の分化制御を行う新たな分子を示し、その機能解明に近づくための重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。