

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 17 年度博士課程 進学
氏名 馬場 敦史
指導教員氏名 加藤 茂明

論文題目 胆汁酸受容体を介した絶食シグナル伝達を担う新規転写制御複合体の解析

第一章 序論

高等真核生物における遺伝子発現制御は、DNA 結合性の転写制御因子と、ヒストン修飾酵素複合体や ATP 依存性クロマチンリモデリング因子複合体等の転写共役因子複合体群との協調的な作用によるクロマチン構造変換を介して行われる。

このようなクロマチン制御機構の中で、ヒストン N 末端配列の可逆的な翻訳後修飾は転写活性化状態・抑制状態の形成・維持において重要である。このような翻訳後修飾として、アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化が知られており、中でも、H3 リジン残基 4 番目 (H3K4) のメチル化は遺伝子発現を活性化、H3K9 や H3K27 のメチル化は遺伝子発現を抑制する。これまでヒストンメチル化は不可逆的な修飾であると考えられてきたが、近年、JmjC domain がヒストン脱メチル化酵素活性を有する事が報告された。これらヒストン修飾を担う酵素群は一般に単一分子ではなく複合体として機能する事が知られている。複合体構成因子の違いがヒストン修飾の標的遺伝子特異性、基質特異性、組織特異性を規定していると考えられている。しかし、これら複合体群を介したヒストン修飾のシグナル依存的制御機構及び生物現象における意義に関しては不明な点が多く残されている。

遺伝子発現制御は代謝調節や飢餓応答といった生物現象において重要な役割を果たしている。代謝調節に関わる転写制御因子として胆汁酸受容体 (FXR ; Farnesoid X Receptor) が知られている。FXR は胆汁酸等をリガンドとする核内受容体型転写制御因子であり、リガンド依存的に認識配列に結合、転写共役因子複合体をリクルートする事で、標的遺伝子群の発現を誘導する。胆汁酸はコレステロールの主要な排出形態であり、胆汁酸・コレステロール代謝恒常性は FXR により厳密に制御されている。すなわち、FXR は肝細胞内胆汁酸濃度が上昇すると、抑制型の転写因子 SHP (Small Heterodimer Partner) の発現を誘導する事で、コレステロールからの胆汁酸合成の律速酵素 CYP7A1 の発現を抑制する。

FXR の転写活性化能は胆汁酸濃度のみならず、栄養状態によっても制御される事がマウス個

体において示されている。すなわち、FXR は絶食時に活性化し、肝臓において SHP の遺伝子発現を誘導する。しかしながら、絶食シグナル依存的な FXR の機能を仲介する転写共役因子複合体はこれまでに知られていない。

そこで、本研究では、生化学的な手法を用いて FXR 新規転写共役因子複合体の精製、同定を行い、FXR による絶食シグナル依存的なクロマチン転写制御機構の解明を試みた。

第二章 FXR 新規転写共役因子複合体の精製

代謝調節系において中心的な役割を果たす組織である肝臓細胞における FXR 相互作用因子複合体の同定を試みた。その為の材料として肝臓癌由来細胞株 HepG2 を用いる事とし、その細胞核抽出法を確立した。FXR 相互作用因子複合体を精製する為の bait として、GST 融合 FXR (DE 領域)再構築タンパク質を用いた。HepG2 細胞核抽出液を GST-FXR (DE)とコンタクトする事で FXR と相互作用する複合体群を得た。更に、これら複合体群をグリセロール密度勾配遠心法を用いて、分子量により分離した。その結果、GST-FXR (DE)が分子量約 500 kDa の複合体を形成している事が判明した。MALDI-TOF/MS による解析の結果、この複合体の中から、新規因子 PHF2 (plant homeodomain finger protein 2)、及び ARID5B α/β (AT rich interactive domain containing protein 5B α/β)を同定した。PHF2 は、ヒストン脱メチル化活性を有する可能性のある JmjC domain、タンパク質間相互作用 domain でありメチル化ヒストン認識が報告されている PHD finger を有するが、その機能は不明である。また、ARID5B α/β は、DNA 結合性の AT rich interactive domain (ARID)を有する機能未知因子である。両者は肝臓を含む広範な組織において発現が確認された。

免疫沈降及び GST pull-down assay により、FXR、PHF2、ARID5B が直接結合により複合体を形成する事が明らかとなった。更に、luciferase assay 及び RT-PCR の結果、PHF2 はリガンド非依的に FXR の転写活性化能を促進した。

以上の結果より、PHF2/ARID5B が FXR の転写活性化能を促進する新規転写共役活性化因子複合体である事が判明した。

第三章 PHF2/ARID5B 複合体の機能解析

(第一節) PHF2/ARID5B 複合体は glucagon 依存的ヒストン脱メチル化酵素である

PHF2 の転写共役活性化因子としての分子機構解明を試みた。PHF2 が JmjC domain を有している事から、ヒストン脱メチル化活性を検討した。その結果、in vitro 系、及び in vivo 系において PHF2 がヒストン H3K9-Me2 の脱メチル化酵素活性を有している事を見出した。更に、JmjC domain を欠いた変異体 PHF2 を用いた解析から、PHF2 による FXR 活性化はヒストン脱メチル化活性を介している事が示された。

PHF2 がリガンド非依的に FXR 転写活性化能を促進した事から、PHF2 が胆汁酸以外のシグナルを受けて FXR を活性化する可能性が考えられた。そこで、絶食時に放出されるホルモンである glucagon の影響について検討した。luciferase assay の結果、glucagon により FXR 転

写活性化能は促進され、この作用は RNAi 法を用いた PHF2 又は ARID5B の knock down により消失した。また、細胞内で glucagon 依存的に PHF2/ARID5B/FXR 複合体が形成される事、PHF2/ARID5B のヒストン脱メチル化活性が glucagon により増強される事が示された。更に、ChIP assay において、この複合体が glucagon 依存的に FXR 標的遺伝子である SHP 及び PEPCK (Phosphoenolpyruvate Carboxykinase) promoter にリクルートされ、それに伴いヒストン H3K9-Me2 が消失する事が見い出された。以上の結果より、PHF2/ARID5B が glucagon 依存的に複合体を形成し、ヒストン脱メチル化を介して FXR 転写活性化能を促進する事が示された。

(第二節) PHF2/ARID5B 複合体の glucagon シグナル受容分子機構の解析

PHF2/ARID5B 複合体が glucagon に応答する分子機構の解明を試みた。glucagon の下流シグナルとして cAMP/PKA シグナルが知られている。実際に、glucagon による FXR 転写活性の促進作用は PKA 阻害剤により消失した。そこで、PKA に着目して検討したところ、PHF2 の C 末端領域の 4 箇所の Ser 残基が PKA によりリン酸化される事を見出した。この PKA リン酸化部位点変異体を用いた解析から、glucagon/PKA による PHF2 のリン酸化が、PHF2/ARID5B 複合体の promoter 結合及び FXR 転写活性促進能に必須である事が示された。

更に、PHF2 の脱メチル化酵素活性が PHF2/ARID5B 複合体の SHP promoter 結合に必須である事が明らかとなった。ARID5B の DNA 結合ドメインである ARID ドメイン内の保存された K336 周辺配列がヒストン H3K9 に類似していた為、PHF2 が ARID5B を脱メチル化する可能性について ARID5B K336 点変異体及び抗メチル化リジン抗体を用いて検討した。その結果、ARID5B K336 が細胞内においてメチル化されており、PHF2 及び glucagon 依存的に脱メチル化される事を見出した。更に、ARID5B K336 の脱メチル化が PHF2/ARID5B 複合体の SHP promoter 結合を誘導する事が示唆された。

以上の結果より、以下のモデルが提唱された。glucagon/PKA によりリン酸化された PHF2 は ARID5B と会合してその K336 を脱メチル化し、PHF2/ARID5B/FXR の標的遺伝子 promoter 結合を誘導する。PHF2/ARID5B はヒストン H3K9-Me2 の脱メチル化を介して、FXR 標的遺伝子の発現を誘導すると考えられる。

第四章 PHF2 高次機能解析の試み

次に、PHF2 の生体内における機能を検討した。マウスを絶食後、肝臓における遺伝子発現を RT-PCR により調べたところ、FXR 標的遺伝子 SHP 及び PEPCK の発現が絶食によりリガンド投与と同様に上昇する事が確認された。また、マウス肝臓を用いた in vivo ChIP assay の結果、これら遺伝子 promoter に PHF2 が絶食依存的にリクルートされる事が示された。以上の結果から、絶食時における胆汁酸代謝制御に PHF2 が関与している事が示唆された。

最後に、PHF2 の生体内における機能を解析する為、PHF2 遺伝子欠損マウスの作出を試みた。全身性の遺伝子欠損マウスが胎生致死となる可能性がある為、組織特異的な遺伝子欠損マウスの作出が可能な Cre-loxP システムを用いたコンディショナル遺伝子欠損マウスの作出を目指した。

機能 domain である JmjC domain を含む exon6-exon9 の両端に loxP 配列を挿入した targeting vector を作製する事とした。BAC を用いた大腸菌内での相同組み換え法により、3' 側の loxP 配列の挿入及び retrieving に成功した。現在、最終段階の 5' 側の loxP 配列の挿入を行っている。今後、相同組み換え体を取得して遺伝子欠損マウスを作出し、機能解析する予定である。

第五章 総合討論

本研究において、FXR と相互作用する核内複合体精製系を確立し、肝臓由来細胞から FXR 転写共役活性化因子複合体として、新規ヒストン脱メチル化酵素 PHF2/ARID5B 複合体を生化学的に同定した。これまでに単一分子としてのみ報告されていたヒストン脱メチル化酵素が複合体として機能する事を証明した。更に、ヒストン脱メチル化酵素活性がシグナル依存的な複合体構成因子間の機能制御を介し発揮される事を明らかにした。

本研究において、絶食応答という生理現象の分子機構を、転写共役因子複合体によるエピジェネティック制御という視点から明らかにした。近年、絶食・摂食等の栄養応答機構が遺伝子発現制御レベルで解析されているが、このような栄養応答を仲介するクロマチン制御因子複合体に関しては不明な点が多い。本研究では、絶食応答時の胆汁酸代謝制御における FXR 活性化シグナルとして glucagon シグナルを見出した。更に、glucagon シグナル依存的な FXR 転写共役活性化因子として PHF2/ARID5B 複合体を同定し、この複合体が glucagon シグナルと胆汁酸シグナルのクロストークを仲介する事を明らかにした。

更に、本研究では PHF2/ARID5B が glucagon 依存的ヒストン脱メチル化酵素である事を見出した。近年、ヒストン脱メチル化が、核内受容体の転写活性のリガンド依存性を規定する事が報告され、その重要性が明らかになりつつある。しかしながら、ヒストン脱メチル化酵素のシグナル依存的な制御に関してはこれまで不明であった。PHF2/ARID5B の複合体形成及び標的遺伝子におけるヒストン H3K9-Me2 脱メチル化酵素活性は glucagon 依存的である事を示した。本研究は、シグナル依存性ヒストン脱メチル化酵素を初めて報告するものである。

また、本研究では、PHF2/ARID5B 複合体のシグナル受容機構として、PHF2 が複合体構成因子 ARID5B を脱メチル化するという、複体内での脱メチル化反応による活性調節が glucagon シグナルセンサーとなっている事を見出した。本研究は、JmjC domain を有する脱メチル化酵素のヒストン以外の基質を初めて報告するものである。ヒストン脱メチル化酵素群の中には、JmjC domain と ARID domain の両者を同一分子内に有するタンパク質が多く存在する。考え合わせると、PHF2/ARID5B 複合体は、これら domain を別々のタンパク質内に有する事により、複合体形成を介したシグナル応答性を獲得したと考えられる。

以上、本研究では、シグナル依存的なヒストン脱メチル化酵素複合体を同定し、絶食シグナル応答という生物現象の分子基盤の一端を転写制御複合体レベルで明らかにした。

1) Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A.,

Nohara, K., Chiba, T., Fujii-Kuriyama, Y., and Kato, S. *Nature*, **446**, 562-566 (2007)