

論文審査の結果の要旨

馬場 敦史

申請者氏名

生物は、絶食・摂食等の栄養状態変化に応答し、代謝を調節する。このような絶食・摂食応答の一端は遺伝子発現レベルで制御されるが、クロマチン構造調節レベルでの分子基盤に関しては不明な点が多い。胆汁酸代謝調節を担う転写制御因子である胆汁酸受容体 FXR のリガンドは胆汁酸であり、絶食時においてその機能が活性化される事が知られている。しかし、絶食による FXR 機能亢進を仲介する転写共役因子複合体は未だ同定されていない。本研究では、FXR 新規転写共役因子複合体を生化学的手法により精製、同定し、FXR による絶食シグナル依存的なクロマチン構造調節を介した転写制御機構の解明を試みている。

第一章の序論に続き、第二章では、肝臓由来細胞株(HepG2)から FXR 新規相互作用因子複合体の同定を試みている。HepG2 細胞株の細胞核抽出液より、GST-FXR 及びグリセロール密度勾配遠心法を用いた精製を行い、機能未知因子 PHF2 及び ARID5B から成る FXR 新規複合体を同定した。PHF2 はヒストン脱メチル化酵素活性を有する可能性のある JmjC ドメイン、また ARID5B は DNA 結合性の ARID ドメインを有する。両者は肝臓を含めた広範な組織において発現している事が示された。また、PHF2、ARID5B、FXR はリガンド非依存的に直接結合を介して複合体を形成し、更に、PHF2 はリガンド非依存的に FXR 転写活性化能を促進する事が見出された。

第三章では、PHF2/ARID5B 複合体の機能解析を行っている。まず、PHF2 のヒストン脱メチル化活性を、in vitro 及び in vivo での assay 系を構築し検討している。その結果、PHF2 がヒストン H3K9me2 脱メチル化活性を有している事を明らかにした。更に、PHF2 による FXR 転写活性の促進は、ヒストン脱メチル化活性を介している事を示している。

次に、PHF2/ARID5B を制御する上流シグナルについて検討している。その結果、glucagon により FXR 転写活性が促進される事が見出され、PHF2 又は ARID5B の knock down によりこの効果が消失する事が示された。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 依存的である事が示されている。更に、PHF2/ARID5B は glucagon 依存的に FXR 標的遺伝子プロモーター上にリクルートされ、それに伴ってヒストン H3K9me2 が消失する事が見出された。

次に、PHF2/ARID5Bによる glucagon シグナル受容機構に関して検討している。その結果、glucagon による FXR 活性化は PKA シグナルを介している事が示された。また、PHF2 が PKA によりリン酸化される事、このリン酸化が PHF2/ARID5B の promoter 結合及び FXR 転写活性の促進に必須である事が明らかとなった。

更に、PHF2 の脱メチル化活性が複合体の promoter 結合に必須であった事から、PHF2 が ARID5B を脱メチル化する可能性について検討している。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が示された。更に、ARID5B K336 の脱メチル化が PHF2/ARID5B の promoter 結合を誘導する事が明らかとなった。以上の結果より、glucagon/PKA により PHF2 がリン酸化されると ARID5B と複合体を形成し、そのリジン残基を脱メチル化する事で複合体によるプロモーター結合が誘導される事が示された。

第四章においては、PHF2 の生体内における機能について検討している。絶食下のマウス肝臓では FXR 標的遺伝子 SHP 及び PEPCK の発現が誘導される事が示された。更に、これら遺伝子プロモーター上に PHF2 がリクルートされる事が明らかとなった。

最後に、PHF2 遺伝子欠損マウスの作出を試みている。組織特異的な遺伝子欠損が可能な 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ている。BAC を用いた大腸菌内での相同組み換え法により targeting vector を作製し、最終段階の前段階まで完了している。

本論文では、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。更に、絶食応答という生理現象の分子基盤の一端を、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確化している。従って、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。