

論文の内容の要旨

論文題目 脂肪細胞分化における PPAR γ 標的遺伝子の網羅的同定とヒストン修飾の解析

氏名 若林 賢一

【序】

これまで遺伝子の発現制御は、転写因子による DNA 配列の読み取りと結合に基づく機構が詳細に解明されてきた。近年ではこのような機構に加えて、DNA のメチル化やヒストンの修飾などに代表されるエピジェネティックな制御機構の重要性が明らかになってきた。DNA の一次配列によらないエピジェネティックな転写制御は発生や分化だけでなく、その異常が癌などの疾患にも関与しており、創薬における新たな標的経路としても期待がもたれる。これまでの研究から、核内受容体 Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) は間葉系幹細胞を起源とする前駆脂肪細胞から、脂肪細胞への分化を誘導するマスターレギュレーターとして働くことが知られている。脂肪細胞への分化における PPAR γ の標的遺伝子としては脂肪酸やグルコースの代謝関連因子、種々のアディポカインや転写因子をコードする遺伝子が同定されている。しかし、脂肪細胞への分化や PPAR γ アゴニスト添加による遺伝子の発現プロファイリングを考慮すると、多くの PPAR γ 標的遺伝子が未同定なままと考えられる。PPAR γ は脂肪細胞への分化のマスターレギュレーターであることから、未同定の PPAR γ 標的遺伝子の中には、

エピジェネティックな変化を制御する因子の存在が予想される。そこで本研究では、PPAR γ はエピジェネティックな変化も制御し、脂肪細胞への分化を誘導しているとの仮説を立て、マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化系を用いて、1)クロマチン免疫沈降法 (ChIP) とゲノムタイリングアレイ (chip) を組み合わ

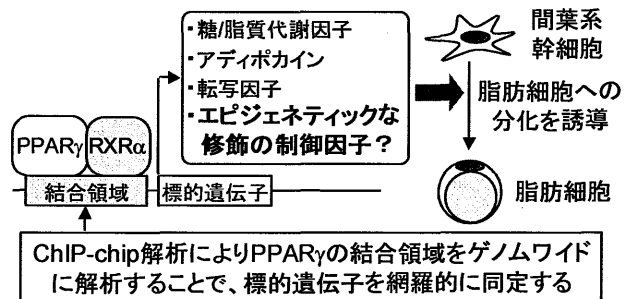


図 1. 研究の概略図 (ChIP-chip 解析を用いた PPAR γ 標的遺伝子同定とエピジェネティックな修飾による脂肪細胞分化の制御)

せた ChIP-chip 解析による PPAR γ 標的遺伝子の網羅的同定、2) PPAR γ 標的遺伝子として同定したヒストンメチル化酵素による脂肪細胞への分化の制御、の 2 点について解析した(図 1)。

【方法と結果】

1. ChIP-chip 解析と遺伝子発現解析による標的遺伝子の網羅的同定

(1) ChIP-chip 解析による標的遺伝子の同定

3T3-L1 細胞はデキサメタゾン(DEX)/3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX) /インスリン(Ins)を併用した分化誘導により、PPAR γ の発現上昇を伴って脂肪細胞へ分化する。これまでの過剰発現系を用いた機能解析から、PPAR γ は核内受容体 RXR α と二量体(PPAR γ /RXR α)を形成して標的遺伝子の転写を制御すると考えられている。そこで、PPAR γ または RXR α を特異的に認識する抗体を用いた ChIP を行い、回収した DNA 断片を Mouse Promoter 1.0 Array (Affymetrix) により検出した。本系においても既知の PPAR γ 標的遺伝子である *Fabp4*, *Cd36*, *Adipoq* などのプロモーター領域に PPAR γ と RXR α の結合が検出された。分化誘導後 8 日目では、PPAR γ と RXR α の多くは共通の DNA 上に結合していることが分かった。共通な結合領域の中で、シグナルの強い上位 500 箇所の配列について *in silico* で解析を行ったところ、PPAR 応答配列である DR1 (5'-AGGTCA-N-AGGTCA-3') 配列が抽出された(図 2)。これらのことから、PPAR γ と RXR α は生理的条件においても二量体を形成し、DR1 配列に結合していると考えられる。転写開始点上流 5 Kb から下流 1 Kb、あるいは第 1 イントロンの中に結合がある遺伝子を標的遺伝子と定義したところ、1764 個の遺伝子が PPAR γ 標的遺伝子として同定された(図 3)。PPAR γ 標的遺伝子を機能別に分類したところ、その大部分は代謝関連遺伝子であったが、加えて新たに 10 個の SET タンパク質(ヒストンメチル化酵素)が同定された。

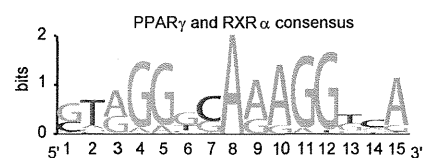


図 2. PPAR γ と RXR α に共通の結合領域での DR1 配列の抽出

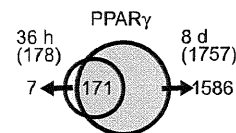


図 3. 分化誘導後 36 時間と 8 日での PPAR γ の標的遺伝子数

(2) 標的遺伝子の発現解析

ChIP-chip 解析により同定した標的遺伝子について、Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) を用いて分化に伴う発現変化を解析した。分化誘導後 8 日目における PPAR γ /RXR α 標的遺伝子の 39% は分化前に比較して発現が 2 倍以上に上昇していた。この中には、*Pparg* 自身も含まれていることが分かった。また、PPAR γ 標的遺伝子として同定した 10 個の SET タンパク質うち、8 個が発現していることが分かった。

2. 脂肪細胞分化におけるヒストン修飾酵素の機能

PPAR γ の活性依存的に発現が変化する遺伝子を選び出す為に、siRNA による PPAR γ の発現抑制と PPAR γ アンタゴニスト(T0070907)を添加した際の遺伝子の発現変化を調べた。その結果、PPAR γ 標的遺伝子として同定され 3T3-L1 で発現していた 8 個の SET タンパク質のうち、SETD8、SETDB1、SETD5 の 3 つが PPAR γ の活性依存的に発現パターンが変化していた。このうち、SETD8 (ヒストン H4K20 のモノメチル化酵素)と SETDB1 (H3K9 のトリメチル化酵素)について脂肪細胞への分化に与える影響を検討した。

(1) siRNA を用いた SET タンパク質の発現抑制による脂肪滴蓄積への影響

SET タンパク質の発現抑制による脂肪細胞への分化の変化を、オイルレッド O を用いた脂肪滴の染色により観察した。分化に伴い発現が上昇する SETD8 については、siRNA を用いた発現抑制により脂肪滴の蓄積が阻害された(図 4)。一方、SETDB1 は DEX/IBMX/Ins による分化誘導に伴い発現が減少する。そこで siRNA により SETDB1 の発現を抑制したところ、DEX 単独による弱い分化誘導条件においても脂肪滴の蓄積が促進した(図 5)。同様の結果は、マウス胎仔由来間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 細胞の脂肪細胞への分化系においても確認できた。これらのことから、脂肪細胞への分化には SET タンパク質によるヒストンのメチル化状態の変化が関与すると考えられた。

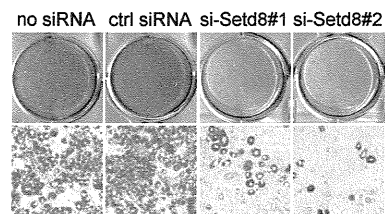


図 4. si-Setd8 による脂肪滴蓄積の阻害 (上段: 全体写真, 下段: 拡大写真)

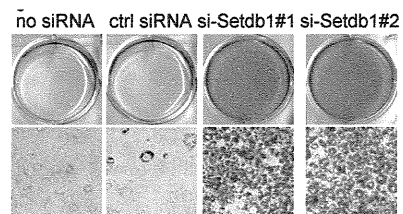


図 5. si-Setdb1 による脂肪滴蓄積の促進 (上段: 全体写真, 下段: 拡大写真)

(2) SETD8 依存的な遺伝子発現の変化

SETD8 の発現抑制による脂肪細胞への分化阻害のメカニズムを明らかにするために、Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて遺伝子の発現変化を解析した。3T3-L1 細胞において PPAR γ の発現を誘導する分化促進因子の C/EBP β や C/EBP δ 、KLF5、あるいは分化抑制因子である COUP-TFII の発現は、コントロールと比較して変化は見られなかった。一方、PPAR γ や同じく分化促進因子の C/EBP α の発現は顕著に抑制され、PPAR γ 標的遺伝子の FABP4 や CD36 などの発現も抑制されていた(図 6)。これより SETD8 は PPAR γ やその標的遺伝子の発現を誘導して脂肪細胞への分化を制御していると考えられる。

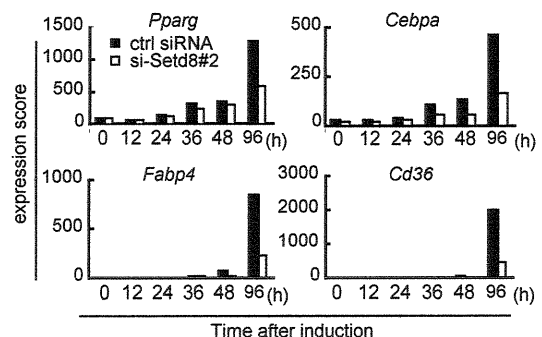


図 6. si-Setd8 による PPAR γ 、C/EBP α 、PPAR γ 標的遺伝子の発現抑制

(3) 脂肪細胞への分化におけるモノメチル化 H4K20(H4K20me1) の変化

SETD8 は H4K20 のモノメチル化酵素であることから、分化前後で Pparg や標的遺伝子の領域で H4K20me1 が変化すると考えた。そこで、H4K20me1 に対する抗体を用いた ChIP を行った。定量的 PCR によりその変化を解析し、分化誘導後 8 日目では Pparg や標的遺伝子の領域で H4K20me1 が誘導されることを確認した(図 7)。また、SETD8 の発現を抑制した際には、H4K20me1 が誘導されなかった。これまでに、H4K20me1 は遺伝子の転写抑制と促進に働くという両方の報告がある。また、H4K20me1 は遺伝子の発現誘導に比べ後期に誘導されていた。SETD8 は H4K20me1 を誘導することでクロマチンの構造を固定し、脂肪細胞への分化を維持しているのではないかと考えられる。

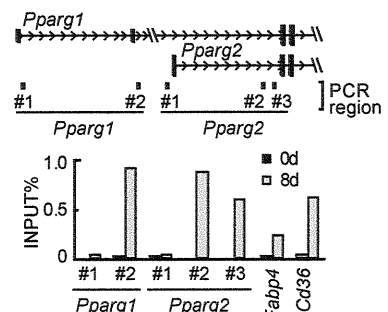


図 7. 分化による H4K20me1 の誘導

【まとめ】

本研究では、ChIP-chip 解析を用いて 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化系における PPAR γ と RXR α の標的遺伝子を網羅的に同定した。PPAR γ と RXR α に共通の結合領域には DR1 配列が濃縮されていたことから、内因性の PPAR γ と RXR α が二量体を形成し DNA に結合していることが示唆された。さらに、PPAR γ の標的遺伝子として同定された SET タンパク質が、H4K20me1 の修飾を介して、脂肪細胞への分化を制御していることを明らかにした。従来 PPAR γ は、代謝関連遺伝子の転写因子として理解されていたが、本研究によりエピジェネティックな変化をも制御し、脂肪細胞分化を促進していることが明らかとなった(図 8)。本研究の成果は、脂肪細胞分化の基礎生物学のみならず、エピジェネティックな経路を標的とした創薬を推進する上で新たな指針を与えるものとする。

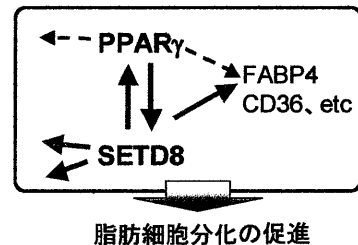


図 8. 本研究で提示した PPAR γ によるヒストン修飾を介した脂肪細胞への分化促進のモデル(黒実線:新規 PPAR γ 標的遺伝子、灰実線:H4K20me1 の誘導、破線:既知 PPAR γ 標的遺伝子)