

脂肪組織は、エネルギーの貯蔵庫の役割を担う器官であるとともに、アディポカインと呼ばれる様々な生理活性物質を分泌する内分泌器官である。脂肪組織は生体の恒常性維持に重要な役割を担っているが、飽食と車社会の現代では、脂肪組織が過剰な状態である肥満がメタボリックシンドロームの危険因子として深刻な問題となっている。肥満における脂肪組織の過剰状態は、脂肪細胞の肥大化と数の増加に起因することから、これらの機構を解明することは、メタボリックシンドロームの克服のために重要な課題である。

脂肪細胞の数の増加は、間葉系幹細胞から分化した前駆脂肪細胞が脂肪細胞へと分化することに依存する。脂肪細胞への分化は、核内受容体 peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ) に代表される転写因子による制御機構が知られている。抗糖尿病薬のチアゾリジン系薬剤は脂肪細胞における PPAR γ を主たる標的としており、脂肪細胞への分化における PPAR γ の役割を解明することは、メタボリックシンドロームの克服を目指した創薬研究での重要な課題である。さらに、細胞の分化という観点から、脂肪細胞への分化においてもエピジェネティクスによる制御が重要であると予想される。脂肪細胞への分化におけるエピジェネティクス機構を解明することは、新たな経路を標的とした創薬への展開が期待される。

若林賢一の研究は、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 標的遺伝子とエピジェネティクス機構の解明、という2点について解析したものである。(図1)

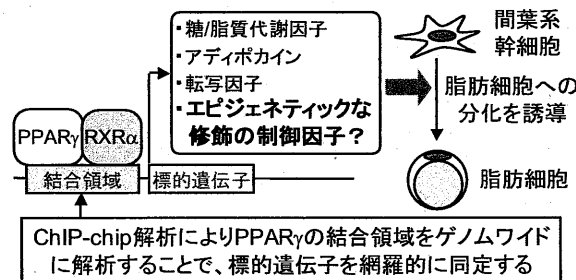


図1. 研究の概略図。(1) ChIP-chip 解析を用いた PPAR γ 標的遺伝子の同定、(2) エピジェネティックな修飾による脂肪細胞への分化の制御機構の解明。

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-xantine (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と分化する。これまでの既報では過剰発現系を用いた機能解析により、PPAR γ が核内受容体 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ことを示している。若林は、

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 の結合を検出し、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を示した。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。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た。転写開始点上流 5 Kb から下流 1 Kb、あるいは第 1 イントロンの間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。PPAR γ 標的遺伝子を機能別に分類したところ、約半数は代謝関連遺伝子であったが、加えて新たに 10 個の SET ドメインタンパク質 (ヒストンメチル化酵素) を同定した。

(2) 標的遺伝子の発現解析

さらに若林は、ChIP-chip 解析により同定した PPAR γ /RXR α 標的遺伝子について、3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化に伴う発現変化を Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) を用いて解析した。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、この中には、*Pparg* 自身も含まれていること、また、PPAR γ 標的遺伝子として同定した SET ドメインタンパク質をコードする 10 個の遺伝子の中で、8 個の発現が分化に伴い変動していることを明らかにした。

2. 脂肪細胞分化におけるヒストン修飾酵素の機能

PPAR γ の転写活性に依存して発現が変化する SET ドメインタンパク質を選び出す為に、siRNA による PPAR γ の発現抑制と PPAR γ アンタゴニストを添加した際の遺伝子の発現変化を調べた。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 ドメインタンパク質のうち、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ため、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 ドメイン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ることを示した。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。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観察された。よって、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た。

(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、SETD8 の発現を抑制した場合もコントロールと比較して変化はなく、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ることを示した。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た。

(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 が変化することを予想した。そこで、H4K20me1 に対する抗体を用いた ChIP を行い、定量的 PCR によりその変化を解析した。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。また、SETD8 の発現を抑制した際には、H4K20me1 が誘導されなかった。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り、遺伝子発現と H4K20me1 の関係は明らかにはなっていない。H4K20me1 は遺伝子の発現誘導に比べ後期に誘導されていたことなどから、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察している。

若林の研究では、まず、転写因子や代謝に関連する因子の発現を制御し、脂肪細胞への分化を促進するマスターレギュレーターであると理解されてきた PPAR γ の役割を、その標的遺伝子を網羅的に同定することで証明した。さらに、PPAR γ がヒストンメチル化酵素を介したエピジェネティックな変化をも制御し、脂肪細胞への分化を促進していることを明らかにした (図 2)。

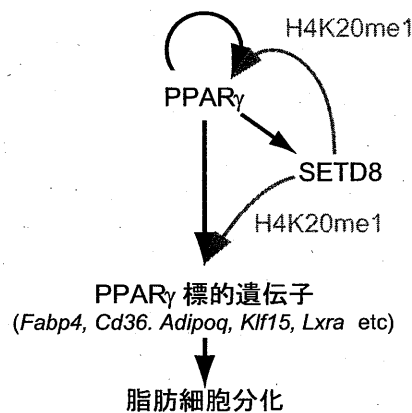


図 2. PPAR γ は転写による経路とエピジェネティックな経路を介して、3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化を促進している。黒色線は PPAR γ がプロモーターに結合し転写を活性化する経路 (転写による経路)、灰色線は SETD8 が H4K20 のモノメチル化を介して発現を調節する経路 (エピジェネティックな経路) を示している。

以上、若林賢一の研究業績は、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であり、博士 (薬学) の学位を授与するに値すると判断した。