

論文の内容の要旨

論文題目 3T3-L1 細胞を用いた脂肪細胞分化における Jhdm1b の影響

氏名 岩崎 聡

概要

脂肪細胞分化において、ヒストン修飾によるクロマチン構造の変化は重要な役割を担う。特に、脂肪細胞分化誘導時に惹起される clonal expansion はその鍵となるステップであり、これに際してヒストンのメチル化、脱メチル化反応の関与が強く示唆されるが、その詳細は不明である。本研究は、ヒストン脱メチル化酵素 JmJc-domain-containing histone demethylase 1b (Jhdm1b) に着目し、脂肪細胞分化、特に clonal expansion に対する影響を検討した。

マウス線維芽細胞由来株 3T3-L1 細胞を用いた脂肪細胞分化誘導時において、Jhdm1b の遺伝子発現が clonal expansion の惹起と同時期に一過的に増加することを見出した。マウス Jhdm1b については、複数のスプライスバリエントが報告されており、ヒストン脱メチル化触媒活性を有する Jumonji C (JmJc) ドメインを持つタイプ 1 と持たないタイプ 2 が存在する。そこで、脂肪細胞分化誘導時の両スプライスバリエントの遺伝子発現を比較したところ、タイプ 2 の発現が優位であった。続いて、肥満モデルである ob/ob マウスおよび高脂肪食負荷マウスの白色脂肪組織における遺伝子発現を検討したところ、Jhdm1b タイプ 1, 2 ともに遺伝子発現の亢進が認められた。これらより、Jhdm1b は脂肪細胞の分化に関与することを想定した。

そこで、マウス Jhdm1b タイプ 1, 2 を強制発現した 3T3-L1 細胞を作製し、以後の検討を実施した。Jhdm1b タイプ 1 を強制発現した 3T3-L1 細胞では、脂肪滴の蓄積が顕著に抑制された。この際、脂肪細胞分化誘導後 2 日以降の peroxisome proliferator-activated receptor γ や CCAAT/enhancer binding protein α といった転写因子や各細胞周期関連タンパク質の遺伝子発現に乱れが生じた。興味深いことに、Jhdm1b の強制発現により、対数増殖に対する影響は認められず、clonal expansion 時の細胞増殖のみが抑制された。さらに、脂肪細胞分化時の細胞周期への影響を検討したところ、脂肪細胞分化誘導後 2 日時点での S 期移行が特異的に障害されることが明らかとなった。以上より、3T3-L1 細胞における脂肪細胞分化において、Jhdm1b は clonal expansion 時の細胞周期移行および脂肪細胞分化関連遺伝子の発現を介

した脂肪滴の蓄積を抑制することを見出した。

続いて、Jhdm1b による脂肪細胞分化の抑制に関与する機能ドメインの同定を目的として、各ドメイン欠失体を用いた検討を実施した。JmjCドメインを含まないJhdm1bタイプ2を強制発現した3T3-L1細胞では、Jhdm1bタイプ1発現時と同様に、脂肪滴の蓄積および clonal expansion が抑制された。その一方、F-boxドメインを欠失したJhdm1bを強制発現した3T3-L1細胞ではこの抑制が認められないことから、Jhdm1bによる脂肪細胞分化抑制において、JmjCドメインでなく、両スプライズバリエーションに存在するF-boxドメインが重要であることを明らかとなった(図1)。

F-boxドメインはタンパク質間相互作用部位であることから、Jhdm1bのF-boxドメインを介して複合体を形成するタンパク質の同定を試みた。プロテオミクス解析結果により得られた複数の候補分子について、RNA干渉法を用いた検討を実施した。その結果より、S-phase kinase-associated protein 1a (Skp1a)に着目した。免疫沈降法をもちいた検討により、Jhdm1bとSkp1aとの複合体形成にF-boxドメインが重要であることが明らかとなった。Skp1aに対するRNA干渉により、Jhdm1b発現3T3-L1細胞における脂肪細胞分化誘導時の脂肪滴蓄積および clonal expansion 時におけるS期移行の抑制は一部解除された(図2)。

本研究において、clonal expansionに同調して遺伝子発現が変動し、肥満により白色脂肪組織での遺伝子発現が増加する分子として、Jhdm1bを同定した。Jhdm1bの強制発現により、3T3-L1細胞における脂肪細胞分化時の clonal expansion および脂肪滴の蓄積が抑制されることを見出した。また、この抑制作用において JmjCドメインではなく、F-boxドメインが重要であることを明らかにした。さらにそのメカニズムとして、F-boxドメインを介したSkp1aとの相互作用により、clonal expansion時のS期移行が抑制されることを明らかにした。以上より、Jhdm1bは脂肪細胞分化誘導時の clonal expansion に対する抑制因子であることを明らかにした。

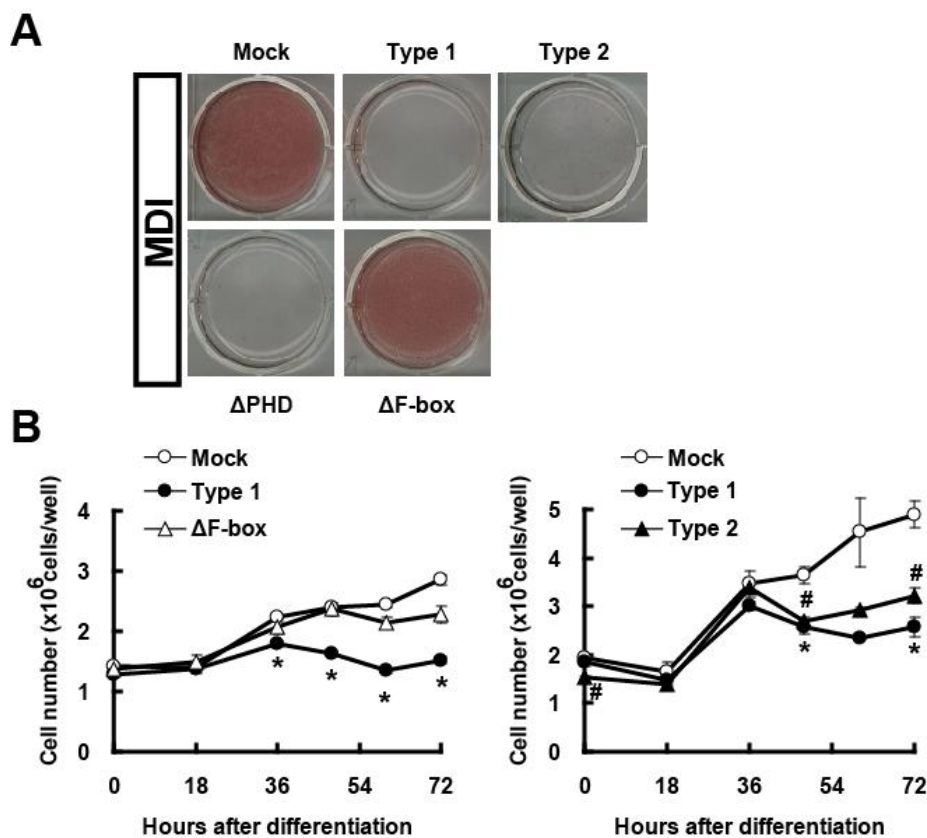


図 1. Jhdm1b 各スプライスバリエントおよび機能ドメイン欠損体を強制発現した 3T3-L1 細胞における脂肪滴蓄積および clonal expansion 時の細胞増殖に対する検討. 各データは平均±標準誤差で表示した. * $p < 0.01$; タイプ 1 v.s. Mock, # $p < 0.01$; タイプ 2 v.s. Mock (n=3)

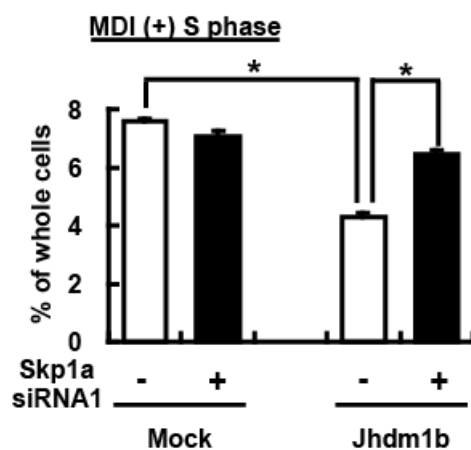


図 2. Skp1a に対する RNA 干渉により, Jhdm1b 強制発現による clonal expansion 時の S 期移行抑制は一部解除される. 各データは平均±標準誤差で表示した. * $P < 0.01$ (n=3)

以上.