

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19790217
 研究課題名(和文) 網膜芽細胞腫タンパク質 RB とヒストン脱メチル化酵素複合体による細胞系譜制御機構
 研究課題名(英文) The cooperative regulation of cell differentiation by retinoblastoma protein RB and histone demethylase complex
 研究代表者
 日野 信次郎 (HINO SHINJIRO)
 熊本大学・発生医学研究センター・COE リサーチアソシエイト
 研究者番号： 00448523

研究成果の概要： 網膜芽細胞腫タンパク質 RB が間葉系細胞を特定の細胞系譜に誘導する分子機構について検討した。特に研究代表者らが RB 結合性タンパク質として見出したヒストン脱メチル化酵素補助因子 (CoDM) と RB の協調的作用について解析を行った。In vitro の脂肪前駆細胞の分化誘導系を用いて RB/CoDM が成熟脂肪細胞形成に必要であることを明らかにした。CoDM はヒストン脱メチル化酵素 HDM の酵素活性に必須な因子であるが、本課題では、RB、CoDM 及び HDM がヒストン脱メチル化を介してエネルギー消費遺伝子の発現を抑制していることを発見した。これらの知見は、RB が細胞内エネルギー代謝を転写レベルで制御することにより細胞系譜制御に寄与している可能性を示唆している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	450,000	3,550,000

研究分野： 分子生物学

科研費の分科・細目： 基礎医学・医化学一般

キーワード： エピジェネティクス、細胞分化

1. 研究開始当初の背景

網膜芽細胞腫タンパク質 (RB) は、細胞周期制御に重要な転写調節因子であり、G1/S 期進行を負に制御している。一方で、RB 欠損マウスの解析などから RB は多岐に亘る細胞系譜の分化・成熟にも必須の分子であることが報告されている。これらのことから、RB は未分化な細胞が分裂を停止し分化成熟の方向に進む過程を統合的に制御していると考えら

れる。RB による細胞周期調節の分子機構は詳細に解析されているのに対し、細胞分化制御に関しては共役因子や標的遺伝子を含め不明な点が多い。特に、RB は間葉系幹細胞を祖とする脂肪細胞、筋芽細胞及び骨芽細胞の分化に必須であることが報告されており、各系譜において RB は共役因子を使い分けながら特異的な機能を発揮している可能性が考えられる。

研究代表者は、RB に結合するタンパク質としてヒストン脱メチル化酵素 (HDM) の補助因子 CoDM を酵母-2 ハイブリッド法により同定した。HDM/CoDM 複合体は近年同定された転写抑制性の複合体であるが、その生理的役割はほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえて、本研究では RB による多彩な細胞分化制御の中で、RB が HDM/CoDM とどのように相互作用をもち、特定の機能を発揮するかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ノックアウトマウス等の解析から、RB は正常な脂肪細胞分化に必須であることが報告されている。脂肪細胞分化は *in vitro* において効率よく再現できることから、RB/HDM 複合体の機能解析を行う上でこの分化系は有用であると考えられた。本研究では、マウス由来脂肪前駆細胞株 3T3-L1 を用いた分化誘導系における RB/HDM の挙動及び意義を検討した。

(2) HDM は主として転写抑制分子として機能することから、本研究では RB/HDM 複合体の標的遺伝子群の同定を行った。さらに、その作用の分子機序を細胞生物学的及び分子生物学的手法を用いて検討した。

(3) HDM/CoDM の生理的役割をマウス組織における発現分布や飼育環境による発現変化を解析することにより検討した。

4. 研究成果

(1) 脂肪細胞分化における RB/HDM 複合体の役割

HDM/CoDM の脂肪細胞分化における発現変化

3T3-L1 細胞に定法に従い分化誘導刺激を与えた後、経時的に細胞を回収し、RNA 及びタンパク質レベルでの HDM 及び CoDM の発現を解析した。同時に脂肪細胞分化能を持たない線維芽細胞 NIH3T3 についても発現解析を行った。その結果、RNA 及びタンパク質いずれにおいても HDM は細胞種や分化度に依存せず高発現を示したのに対し、CoDM は NIH3T3 と比較して 3T3-L1 において高発現を示し、mRNA レベルでは脂肪細胞分化の進行と共に発現量が上昇する傾向を示した。また、多能性間葉系細胞様の特性をもつ C3H10T1/2 細胞を用いて同様に発現解析を行ったところ、未

分化な状態では CoDM は低発現を示したが、脂肪分化と共に劇的にその発現量が上昇した。

これらのことから、HDM/CoDM 複合体は脂肪細胞系譜において何らかの機能を有していると考えられた。

RB、HDM 及び CoDM 遺伝子のノックダウン

RB、HDM 及び CoDM が脂肪細胞形成に寄与しているかを検討する目的で、3T3-L1 細胞にこれら遺伝子に対する特異的 siRNA を導入した後分化誘導を施した。その結果、いずれの遺伝子をノックダウンした場合でも細胞内脂肪蓄積が顕著に抑制された(図1)。このことから、RB、HDM 及び CoDM は正常な脂肪細胞形成に必須である可能性が示唆された。

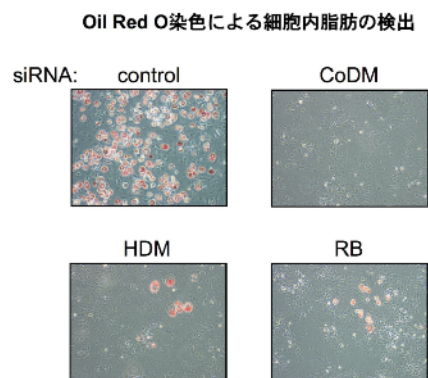


図1 RB、HDM及びCoDMノックダウンが細胞内脂肪蓄積に及ぼす影響

(2) RB/CoDM 複合体の標的遺伝子の網羅的検索

RB/HDM/CoDM 複合体は遺伝子発現を負に制御すると想定されることから、脂肪細胞系譜においてこれら分子の標的遺伝子をマイクロアレイ法を用いて網羅的に検索した。RB、HDM または CoDM ノックダウン細胞それぞれに対し、分化誘導を施し、24 時間後に RNA を回収・解析することによりこれら因子の一次標的遺伝子の同定を試みた。解析を行ったところ、当初予想していた細胞分化制御遺伝子は抑制標的になっておらず、代わりにエネルギー消費に関連する重要遺伝子が標的遺伝子として多数同定された。このことから、RB、HDM 及び CoDM ノックダウンによる脂肪蓄積の抑制は、エネルギー消費・貯蔵のバランスが前者に傾いたことに起因すると推察された。

(3) RB/CoDM 複合体による標的遺伝子発現調節の分子機構

上記(2)において同定された標的遺伝子がRB/HDMによって直接制御されているかをレポーター遺伝子試験及びクロマチン免疫沈降法により検討した。まず、RB/HDM標的の一つであるrtg-1遺伝子のプロモーター領域の下流にルシフェラーゼレポーター遺伝子を連結しRB/CoDM/HDMのいずれかをノックダウンした細胞に導入したところ、いずれの細胞でもコントロールと比較してレポーター発現は有意に上昇した(図2)。

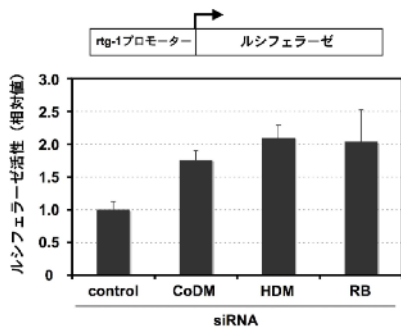


図2 RB/HDM/CoDMによるrtg-1遺伝子プロモーター活性の制御

また、クロマチン免疫沈降法により細胞内におけるHDM及びCoDMの標的遺伝子への結合を検討したところ、解析した全ての遺伝子において両分子のプロモーター領域への結合が確認された(図3)。

これらの結果より、RB/HDMは同定された標的遺伝子の発現を直接的に抑制していることが示唆された。

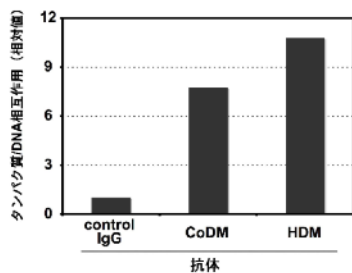


図3 HDM/CoDMのrtg-1遺伝子プロモーターとの相互作用

さらに、観察された発現制御にヒストン脱メチル化が関与しているかを検討した。クロマチン免疫沈降法により標的遺伝子におけるヒストンメチル化を解析したところ、RB/CoDM及びHDMいずれをノックダウンした場合にもヒストンメチル化が更新していることがわかった。このことから、RB/HDMによる転写抑制はヒストン脱メチル化を介している可能性が示唆された。

(4) ミトコンドリア内エネルギー代謝にお

けるRB/HDMの役割

先述のrtg-1をはじめとして、RB/HDMの抑制標的遺伝子の多くはミトコンドリア内エネルギー代謝を担うものや活性化に寄与するものであった。このことから、RB/HDMがミトコンドリアにおけるエネルギー産生を抑制する可能性を想定し、試験を行った。RB、HDM又はCoDMノックダウン3T3-L1細胞を蛍光色素JC-1で染色し、その蛍光強度を測定した。JC-1はミトコンドリア内膜に結合する低分子化合物で、緑色の蛍光発色を示すが、膜電位依存的に凝集体を形成し赤色を呈する。つまり、緑色蛍光を測定することでミトコンドリア量を、赤色を測定することでエネルギー産生活性を定量することができる。いずれのノックダウン細胞においても緑色蛍光に変化は認められなかったが、赤色の蛍光強度はコントロールと比較して高値を示した(図4)。このことから、RB/HDMはエネルギー消費遺伝子抑制を介してミトコンドリア内エネルギー代謝を抑制していることが示唆された。

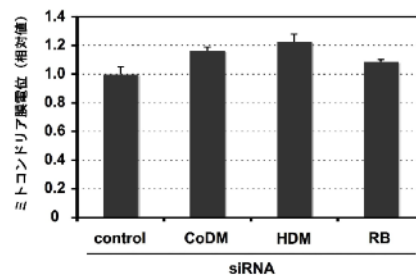


図4 RB/HDM/CoDMノックダウン細胞におけるミトコンドリアエネルギー代謝の活性化

(5) HDM/CoDMのマウス組織における発現

HDM/CoDMの生理的役割を検討する目的で、これら遺伝子のマウス組織における分布を解析した。両遺伝子とも脳及び脂肪組織において高発現を示した。CoDMはエネルギー消費型の褐色脂肪組織と比較してエネルギー貯蔵型の白色脂肪組織において有意に高発現を示したことから、生体内においてもエネルギー消費抑制に貢献している可能性が示唆された。

さらに、過剰なエネルギー貯蔵亢進病態である肥満におけるHDM/CoDMの役割を検討する目的で、高脂肪食誘導性肥満及び野生型マウスにおける両遺伝子の発現を調べた。いずれの遺伝子も同週齢の通常食給与マウスと比較して肥満マウスにおいて顕著な高発現を認めたことから、これら遺伝子の肥満病態との関連性が示唆された(図5)。

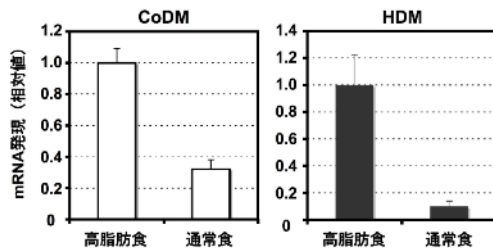


図5 肥満マウスにおけるHDM及びCoDM遺伝子発現

(6) 研究成果のインパクト、今後の展望

本研究により、RBによる細胞系譜制御機構の一端が明らかになった。RBは多岐に亘る細胞系譜の分化を制御しているが、その一部は細胞内エネルギー代謝機構の転換を介している可能性が考えられた。マウス組織においてCoDMが白色脂肪組織において高発現しているのに対し骨格筋においては発現が低い。このことはCoDMがRBの細胞系譜特異的作用を規定している可能性を示唆している。RBが種々のエピジェネティクス因子と相互作用することで各系譜における代謝表現型を構築している可能性がある。

また、エピジェネティクス因子がエネルギー恒常性や肥満発症に関与することが明らかになった。近年、メタボリックシンドローム研究において、胎生期及び幼児期のエネルギー摂取状況が成人後のメタボリックリスクを決定する「代謝メモリー」の概念が提唱されている。この機構にはエピジェネティックな機構が重要な役割を果たすことが想定されているが、具体的な機序は全く不明である。本研究の成果は、代謝メモリー形成の分子基盤を構築する上で重要な知見を提供していると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Lifeng Liu, Ko Ishihara, Takaya Ichimura, Naoyuki Fujita, Shinjiro Hino, Saori Tomita, Sugiko Watanabe, Noriko Saitoh, Takaaki Ito and Mitsuyoshi Nakao. MCAF1/AM is involved in Sp1-mediated maintenance of cancer-associated telomerase activity. Journal of Biological Chemistry,

284(8): 5165-5174, 2009 査読有り

Tsuyoshi Mishiro, Ko Ishihara, Shinjiro Hino, Shuichi Tsutsumi, Hiroyuki Aburatani, Katsuhiko Shirahige, Yoshikazu Kinoshita and Mitsuyoshi Nakao. Architectural roles of multiple chromatin insulators at the human apolipoprotein gene cluster, 2009 published online 査読有り

日野信次郎、渡邊すぎ子、中尾光善 「DNAメチル化を介したエピジェネティック制御機構」 実験医学 25(10):1518-1523, 2007 査読なし

[学会発表](計1件)

Shinjiro Hino and Mitsuyoshi Nakao. Co-operative role of retinoblastoma protein and histone demethylase in the regulation of adipogenesis, Global COE International Symposium, January 16 2008, Kumamoto

[図書](計1件)

日野信次郎、中尾光善 南山堂 「転写制御とエピジェネティクス」2008, p91-98

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日野 信次郎 (HINO SHINJIRO)
熊本大学・発生医学研究センター・COE リサーチアソシエイト
研究者番号：00448523

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者