

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 06 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2012

課題番号：21687013

研究課題名（和文）ヒストン脱メチル化酵素 Jmjd1a による糖脂質代謝調節

研究課題名（英文）Histone demethylase Jmjd1a as a regulator of glycolipid metabolism

研究代表者

稲垣 毅 (INAGAKI TAKESHI)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授

研究者番号：10507825

研究成果の概要（和文）：Jmjd1a は、転写の発現抑制に関与するエピジェネティックな標識であるヒストン H3 の 9 番目のリジンのメチル化修飾を外す酵素である。我々は、Jmjd1a のノックアウト (KO) マウスが肥満や糖脂質代謝異常をきたすことを発見して報告した。さらに、遺伝子発現解析を行うとともに、独自に作製したクローン化 Jmjd1a 抗体を用いてクロマチン免疫沈降とショットガンプロテオミクスを行った。その結果、KO マウスや新規に樹立した褐色脂肪細胞における Jmjd1a の代謝関連標的遺伝子を明らかにし、さらにレトロトランスポゾンコードする領域が Jmjd1a によって制御されていることを明らかにした。プロテオミクス解析では、RNA プロセッシングに関わるタンパク群やヒストン脱アセチル化に関与する Sin3a との複合体形成を認めただけ、Jmjd1a の翻訳後修飾を明らかにした。本研究結果は、ヒストンのメチル化変化が代謝制御に関わるという世界で最初期の報告に結実しており、さらに詳細な分子機構の解明に結びつくことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Jmjd1a (also known as Jhdm2a and KDM3a) catalyzes removal of H3K9 mono- and dimethylation. We established JMJD1a deficient mice (*JMJD1A*^{-/-}) and discovered that the mice develop adult onset obesity, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, and insulin insensitivity, that are hallmarks of metabolic syndrome. To investigate the molecular mechanism of Jmjd1a working machinery, we sought to elucidate Jmjd1a target genes and working complex using techniques of chromatin immunoprecipitation and mass spectrometry. We raised monoclonal antibodies against mouse and human Jmjd1a protein prepared by baculovirus expression system. ChIP sequence using Jmjd1a antibody as well as methylated histone antibodies showed a specific binding region which codes a retrotransposon. Whole cell extracted protein from HeLa cells was immunoprecipitated using the established Jmjd1a antibodies and the precipitated protein complex was analyzed using shotgun mass spectrometry. Interestingly, a series of splicing factors and sin3a complex forming proteins appeared in the list of shotgun proteomics. It is also elucidated that there is a functional phosphorylated site in Jmjd1a. Our result indicates that Jmjd1a regulates gene transcription through changing the chromatin formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2010年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2012年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
総計	20,400,000	6,120,000	26,520,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・分子生物学

キーワード：エピゲノム・ヒストン脱メチル化酵素・Jmjd1a・糖脂質代謝調節

1. 研究開始当初の背景

ヒストンのメチル化は遺伝子の転写制御に働くエピゲノム変化である。このメチル化は細胞内で化学的に安定した状態と考えられていたため、2004年にLysine-specific demethylase 1 (*Lsd1*)が発見されるまで (Shi Y. et al. *Cell* 2004) ヒストンの脱メチル化酵素の存在自体が不明であった。その後、2006年にJmjcドメインを持つ一群が、ヒストン脱メチル化酵素であることが報告されたことから、ヒストン脱メチル化酵素の探索競争が起こり、結果として同定が進んだ。その中でも、*Jmjd1a*は最初に報告されたJmjcドメインを持つヒストン脱メチル化酵素のひとつで、Histone 3 Lysine 9 (H3K9)の脱メチル化を担う (Yamane K. et al. *Cell* 2006)。加えて、*Jmjd1a*ノックアウト (KO) マウスが精子形成不全を来すことが報告された (Okada Y et al. *Nature* 2007)。しかしながら、ヒストンのメチル化変化が生体の糖脂質代謝制御に関わるかどうかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、Histone3 Lysin9 (H3K9)の脱メチル化酵素である *Jmjd1a*(*Jhdm2a*)のノックアウトマウスを用いて、エピジェネティクスによる遺伝子発現調節 (特にヒストンメチル化変化) が、糖脂質代謝異常及び肥満に及ぼす影響とその分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) *Jmjd1a* KO マウスの基礎データの取得するため、マウスを繁殖させて成長曲線と摂餌量を調べ、詳細な体重増加と

摂餌量を検討した。また、組織学的な検討を行った。具体的には、肝臓、白色脂肪、褐色脂肪、骨格筋等の臓器についてH&E染色を行い光学顕微鏡で確認した。

- (2) *Jmjd1a* KO マウスの糖、脂質の利用状況と蓄積状態を明らかにするため、血清や肝臓における糖脂質濃度のプロファイリングを行った。血清中のグルコース、コレステロール、遊離脂肪酸値測定のほか、インスリン負荷試験、グルコース負荷試験を行うことで血糖調節能力を検討した。また、肝臓内に蓄積した中性脂肪、コレステロール、グリコーゲン量を測定した。
- (3) マウス生体全体の生理学的状況を検討するために、代謝ケージを用いて酸素消費量と二酸化炭素排出量を調べ、代謝状態の活性化の有無を検討した。また、呼吸商を計算することで利用されているエネルギー源のバランスを特定した。加えて、体温を調査してエネルギー消費の詳細を検討した。
- (4) 標的遺伝子を絞り込むために、肝臓、骨格筋、白色脂肪、褐色脂肪のマイクロアレイを行い、Quantitative RT-PCR法を追加して行った。マウスを用いたマイクロアレイ実験の場合、false positive データが出やすいという欠点がある為、*in vitro*系を並行して用いてマイクロアレイを行った。具体的には、3T3L1 脂肪細胞のほかに、新規にsv40を導入して不死化したマウス褐色脂肪細胞株 (K-BAT) について、*Jmjd1a* siRNA をトランスフェクションして *Jmjd1a* 遺伝子をノックダウンしたのちに分化させ、この細胞から得られるRNAを用いてマイクロアレイを行った。

- (5) 基礎データにおいて、肝臓、骨格筋、白色脂肪、褐色脂肪でサーカディアンリズム関連遺伝子の発現変化を認めたことに関連して、4時間ごとの詳細な遺伝子発現検討のほか、マウスの行動解析、マウス繊維芽細胞 (MEF) を用いた時計遺伝子発現解析をおこなった。
- (6) *Jmjd1a* KO マウスにおける肥満の原因候補遺伝子として *ApoC1* の遺伝子発現変化が認められたため、初代培養白色脂肪細胞を調製し、ラジオリラベルしたオレイン酸を用いて脂肪細胞における脂肪の吸収と分解放出を検討した。
- (7) *Jmjd1a* が標的遺伝子制御領域での直接的な発現調節に関連していることを検討するために、H3K9 モノ、ジ、トリ、メチル化抗体のほか、独自にヒト及びマウス *Jmjd1a* に対する抗体作製をおこない、作製された抗体を用いて ChIP シークエンスを行った。さらに RNA シークエンスを用いて遺伝子発現レベルを検討した。
- (8) *Jmjd1a* の作用複合体や翻訳後修飾を解明するため、(7) で作製した *Jmjd1a* 特異的抗体を用いて免疫沈降を行い、質量分析を用いてプロテオミクス解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 成長曲線と摂餌量を検討した。その結果、*Jmjd1a* KO マウスは、野生型マウスと比較して生後6週すぎから体重増加を認め、体重が 40%程度多くなること became 明らかになった (図1)。この変化は高脂肪食での飼育においてより顕著になった。一方、摂餌量は両群において変化を認めな

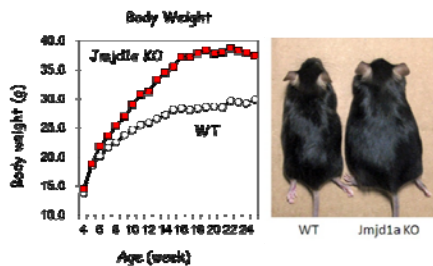


図1 *Jmjd1a*KOマウスは肥満を呈する

かった。組織学的には、マウスの白色脂肪量は野生型より多く、さらに 16 週齢までの若年マウスを用いて病理学的解析を行った結果、脂肪細胞のサイズが大型化していることが明らかになった。一方、肝臓、骨格筋、褐色脂肪においては、特別な病理学的変化を認めなかった。

- (2) *Jmjd1a* KO マウスは野生型マウスと比較して、血中の中性脂肪値、コレステロール値、グルコース値、インスリン値が有

意に高値であった。さらに、グルコース負荷試験、インスリン負荷試験の結果、

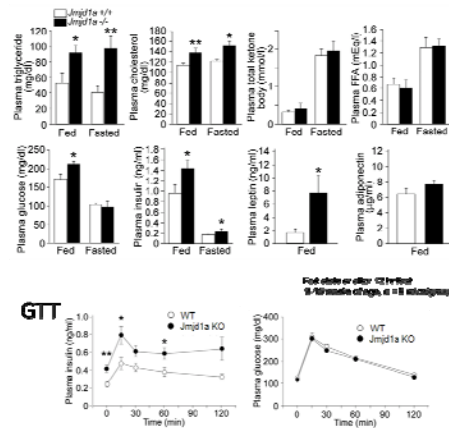


図2 *Jmjd1a*KOマウスの高脂血症、耐糖能異常 (Inagaki et. al. Genes to Cells 2009 より抜粋)

- (3) 代謝ケージを用いた生理学的検索を行ったところ、酸素消費量においては野生型と *Jmjd1a* KO マウスの違いを認めなかったが、*Jmjd1a* KO マウスは野生型に比べて呼吸商が高値であった (図3)。このことは、

Jmjd1a KO マウスのエネルギー源が脂肪から糖にシフトしていることを示しており、脂肪が特異的に蓄積している表現形を説明しうるものであった。また、*Jmjd1a* KO マウスは絶食依存性に体温の低下を示した。

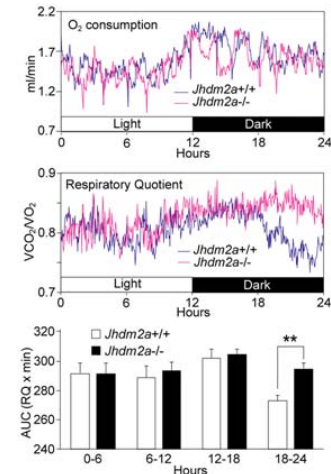


図3 *Jmjd1a*KOマウスは呼吸商が高値を示す (Inagaki et. al. Genes to Cells 2009 より抜粋)

- (4) 肝臓、骨格筋、白色脂肪、褐色脂肪においてマイクロアレイを行った。マイクロアレイの結果をもとに、*Jmjd1a* KO マウスの白色脂肪と siRNA を用いて *Jmjd1a* をノックダウン (KD) した 3T3L1 脂肪細胞の両方で、*Adams9*、*ApoC1*、*Glut4* の発現が低下していることを見出した。さらに、KD した K-BAT 褐色脂肪細胞細胞を用いて、*ADRB* 刺激の有無における網羅的遺伝子解析を行ったところ、*ADRB* の発現

変化のほか、解糖系と脂肪酸酸化の異化酵素と電子伝達系の遺伝子群の発現が低下し、中性脂肪合成の同化酵素遺伝子群の発現が上昇しているという結果が得られた。

- (5) *Jmjd1a* が中枢の時計に作用してリズムを制御している可能性を検討した。*Jmjd1a*KO マウスの行動解析を行うため、野生型マウスと *Jmjd1a*KO マウス（開始時6週齢、オス）をエリアセンサーを配したケージに個別飼育し、12時間明期（200ルクス以下）-12時間暗期の条件で2週間同調させたのち、恒暗条件に移行し、赤外線センサーによる行動解析を行った。フリーラン周期を算出し、恒暗条件開始3日後より14日間のデータについて、活動周期移行の傾き (Tau) を計算した結果、野生型マウスと *Jmjd1a*KO マウスにおいて、恒暗条件にした時の活動時間のシフト変化に有意な差を認めなかった。また、上記の方法でリズムを同調させたマウスを用いて4時間ごとの代謝関連臓器における遺伝子発現を検討したところ、野生型と *Jmjd1a* KO マウスのあいだに変化を認めなかった。さらに *Jmjd1a*KO マウス及び野生型マウスの E13.5 胎児から MEF を作製し、この MEF を 100nM Dexamethasone で 15 分間処理することで、概日リズムの時間振幅を誘導した。0、6、12、18、24、30、36 時間後における時計関連遺伝子の発現をリ

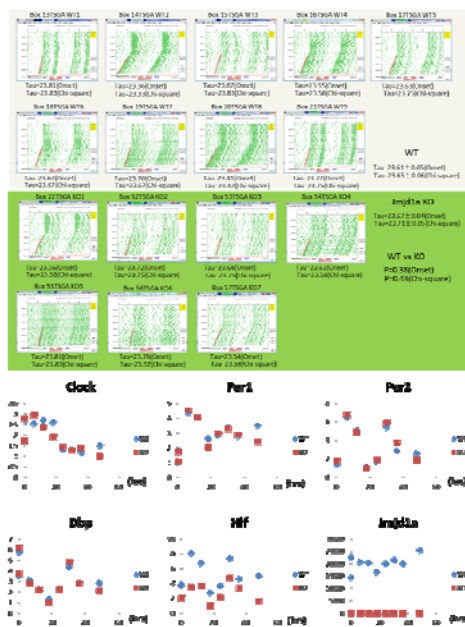


図4 *Jmjd1a*KOの発現による顕著な生体リズムの変化は認めなかった

アルタイム定量PCR法を用いて検討した結果、Clock, Perなどの時計遺伝子の発現レベル変化のリズムは、2群間で有意

な変化を認めなかった。代替制御系として働く PAR bZip 転写因子である Hlf 遺伝子の発現に関しては、*Jmjd1a*KO において観測したすべての時間で低下していた (図4)。

- (6) 野生型と *Jmjd1a*KO マウス由来の初代培養白色脂肪細胞を用いて脂肪細胞における脂肪の吸収と分解放出を検討した結果、*Jmjd1a*KO 細胞においては脂肪吸収が野生型と比較して約2倍であったのに対し、放出は二群間でほぼ同等であった (図5)。

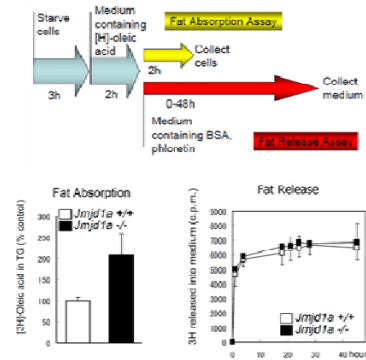


図5 *Jmjd1a*KO初代培養白色脂肪細胞では脂肪の取り込みが増大していた

- (7) *Jmjd1a* の特異的な抗体を作製した。昆虫細胞系を用いて発現させた全長マウス *Jmjd1a* タンパク質 (全長 *mJmjd1a*) を His tag をもちいて精製した上でマウスに免疫する方法と、50 アミノ酸の部分長 *mJmjd1a* (*mJmjd1a* AA843-893) を抗原として提示するバキュロウィルスを作製し、マウスに免疫するという2種の方法を採用することとし、並行して抗体作製を行った。その結果、内在性の *mJmjd1a* タンパク質を認識することができ、さらにホルムアルデヒド固定後の細胞について免疫沈降をおこなえる *mJmjd1a* 抗体を3種類作製することができた (図6A)。この *Jmjd1a* 抗体と H3K9 モノ、ジ、トリ、メチル化抗体をもちいた ChIP シークエンス法を行い、*mJmjd1a* がヒストン H3K9 のメチル化制御を介して遺伝子発現に関与する標的部位を検討した結果、KO MEF 特異的に H3K9me1, H3K9me2, H3K9me3, H3K4me3 の濃縮が認められる特徴的な領域を Chromosome 6 の EZH2 と 4.5sRNA コーディング領域の近傍に発見した (図6B) (Region 1 と命名)。Region 1 に発現する転写産物の有無を定量的 RT-PCR と RNA シークエンスをもちいて検討した結果、*Jmjd1a* KO MEF 特異的に転写産物があることが示された (図6C)。Region 1 の転写産物は、WT マウスおよび *Jmjd1a* KO マウスから抽出した白色脂肪組織および褐色脂肪組織におい

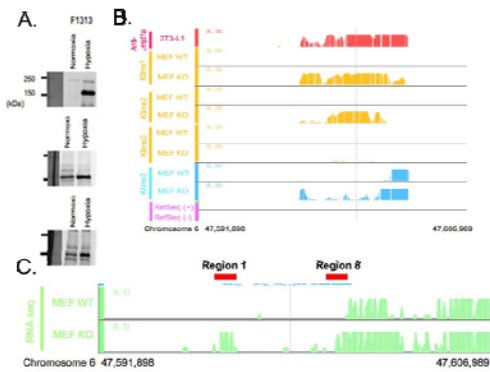


図6 作製したJmjd1a抗体(A)とそれを用いたChIPシーケンス(B)とRNAシーケンスの結果(C)

ても、Jmjd1a KO 特異的に高発現していることが示された。さらに、mJmjd1a KD 3T3-L1 脂肪細胞において検討したところ、コントロール細胞と比較において、Region 1 の発現が高いことが示された。RACE 法を用いて転写産物の全長を取得した結果、Region 1 の転写産物の長さは550bp で、同領域にコーディング遺伝子の報告がない long non-coding RNA (lncRNA)であった。UCSC ゲノムブラウザーをもちいて解析したところ、この部位はRMER12B というLTR型のレトロトランスポゾンと重なっている事がわかった。近年、H3K9 メチル化制御を行っているG9a が、ES 細胞におけるレトロトランスポゾンの発現抑制に関わっていることが報告されていることを踏まえ、今回の結果は、Jmjd1a がレトロトランスポゾンの発現制御に関与する可能性を示唆していると考えられた。

- (8) Jmjd1a 抗体を用いて免疫沈降を行ったのちに質量分析を用いてショットガンプロテオミクスを行った。HeLa 細胞から得られる抽出タンパク質について免疫沈降を行い、質量分析にかけることでJmjd1a の翻訳後修飾と作用複合体を解析した。その結果、Jmjd1a 上にリン酸化部位があることが明らかになった。さらにJmjd1a のN端部分(a. a. 1-600)を認識する抗体を用いた場合とC端部分(a. a. 489-1321)を認識する抗体を用いた場合とでは、共沈してくるタンパク質が異なることが明らかになった。N端部分認識抗体によって得られるタンパク質は、ASAP 複合体やsnRNP といったRNAプロセッシングに関わるタンパク群であり(図7A)、C端部分認識抗体によって沈降してくるタンパク質はSin3a 複合体やE3 リガーゼといったタンパク質群であった(図7B)。これらのことは、Jmjd1a がC端部分で結合するタンパク質との複合体を介してRNAプロセッシングに関与する可能性を示唆していた。一方、Jmjd1a

がN端部分で結合すると考えられるSin3a は、NCoR やSMRT を介した転写調節、HDAC を介したヒストン脱アセチル化、Tet1 を介したDNA 脱メチル化との関連が知られている。このことから、Jmjd1a がヒストンメチル化以外の制御を介して遺伝子発現を制御している可能性が示された。このJmjd1a の共沈タンパク質にはHDAC1 が含まれたことから、Jmjd1a がヒストン脱アセチル化を制御して遺伝子発現制御に関与することが示唆された。また、Jmjd1a にE3 リガーゼが結合していることから、Jmjd1a の細胞内の安定性に、ポリユビキチン化が関与している可能性が考えられた。

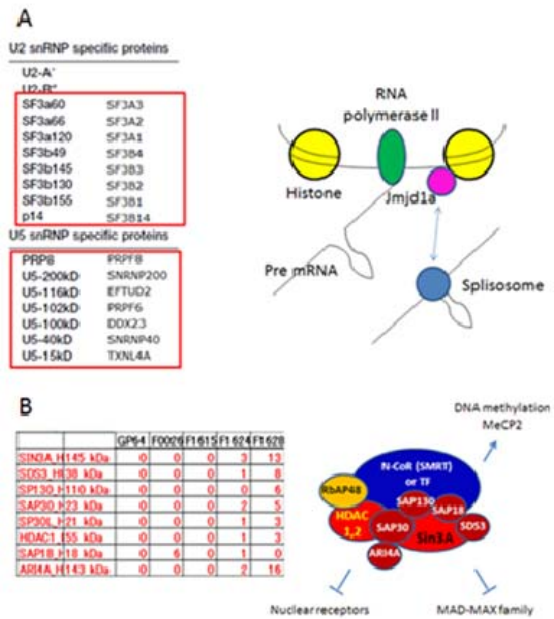


図7 ショットガンプロテオミクスをもちいたJMJD1A複合体形成タンパク質解析の結果

- (9) 以上のまとめとして、本研究の結果、Jmjd1a KO が肥満、高脂血症、耐糖能異常を示すということを示すことができた。この成果を論文にまとめて*Genes to Cells*誌上に行った報告は、ヒストンメチル化制御因子が代謝異常の発症に関与することを示す世界で最初期の報告となった(同様の結果は米国のグループからもなされた。Tateishi et al. *Nature* 2009)。さらに、Jmjd1a の生理学的解析、遺伝子発現解析、ChIP シークエンス、プロテオミクス法の手法を駆使して研究を進めたことで、いくつかの詳細な分子機構に迫ることができた。現在、これらの手法を用いたJmjd1a の翻訳後修飾解析や遺伝子発現解析、タンパク質構造解析を継続して行っている。また、新規Jmjd1a フロックスマウスを作製し、現在脂肪細胞特異的ヘテロマウス

が得られていることから、本研究をもとに、さらに新しいエピゲノム分子機構を明らかにできるものと考えている。

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)

- ① Mimura I, Nangaku M, Kanki Y, Tsutsumi S, Inoue T, Kohro T, Yamamoto S, Fujita T, Shimamura T, Suehiro JI, Taguchi A, Kobayashi M, Tanimura K, Inagaki T, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Aburatani H, Kodama T, Wada Y. (2012). Dynamic change of the chromatin conformation in response to hypoxia enhances the expression of GLUT3 (SLC2A3) by cooperative interaction of HIF1 and KDM3A. *Mol. Cell. Biol.* 32, 3018-3032、査読有、doi: 10.1128/MCB.06643-11
- ② Okamura M., Inagaki T., Tanaka T., Sakai J. (2010). Role of histone methylation and demethylation in adipogenesis and obesity. *Organogenesis* 6(1):24-32、査読有、<http://dx.doi.org/10.4161/org.6.1.11121>
- ③ Inagaki T., Tachibana M., Magoori K., Kudo H., Tanaka T., Okamura M., Naito M., Kodama T., Shinkai Y., Sakai J. (2009). Obesity and Metabolic Syndrome in Histone Demethylase JHDM2a Deficient Mice. *Genes to Cells*. 14(8):991-1001、査読有、doi: 10.1111/j.1365-2443.2009.01326.x.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 稲垣 毅 : 「核内受容体による FGF 制御とエピゲノムを介した糖脂質代謝調節」, 京都成人血管病シンポジウム, 2012.12.5、京都
- ② 稲垣 毅、立花 誠、眞貝洋一、酒井寿郎 : 「ヒストン脱メチル化酵素 Jmjd1a による代謝調節」, 第 84 回日本内分泌学会学術総会 (シンポジウム), 2011.4.23、神戸
- ③ 稲垣 毅 : 「Transcriptional and Epigenetic Regulations of Metabolism」, 熊本大学発生医学研究所グローバル COE リエゾンラボ研究会, 2011.3.9、熊本
- ④ 稲垣 毅、立花 誠、眞貝洋一、酒井寿郎 : 「ヒストン脱メチル化酵素 Jmjd1a による糖脂質代謝調節」, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010), 2010.12.10、

神戸

- ⑤ 稲垣 毅 : 「Glycolipid Metabolism Regulation by Fibroblast Growth Factors」, 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会 (シンポジウム), 2010.5.28、岡山
- ⑥ 稲垣 毅 「ヒストン脱メチル化酵素による代謝調節」東京, Keystone symposia, adipose tissue biology, 2010.01.25、Keystone, Colorado, USA
- ⑦ 稲垣 毅 「Obesity and Metabolic Syndrome in Histone Demethylase JHDM2a Deficient Mice」, 第 6 回インスリン抵抗性とメタボリックシンドローム研究会, 2009.08.01、東京
- ⑧ 稲垣 毅 「ヒストン脱メチル化酵素による代謝調節」東京, Brainstorming Medical Conference, 2009.04.18、東京

[その他]

ホームページ等

<http://www.lsbm.org/staff/inagaki.html>

<http://www.mm.rcast.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲垣 毅 (INAGAKI TAKESHI)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授

研究者番号 : 10507825

(2) 研究協力者

酒井寿郎 (SAKAI JURO)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号 : 80323020

眞貝洋一 (SHINKAI YOICHI)

理化学研究所・主任研究員

研究者番号 : 20211972

立花誠 (TACHIBANA MAKOTO)

京都大学・ウイルス研究所・准教授

研究者番号 : 80303915

油谷浩幸 (ABURATANI HIROYUKI)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号 : 10202657

児玉龍彦 (KODAMA TATSUHIKO)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号 : 90170266

川村猛 (KAWAMURA TAKESHI)

東京大学・先端科学技術研究センター・助教

研究者番号 : 70306835

岡村均 (OKAMURA HITOSHI)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号 : 60158813

土居雅夫 (DOI MASAO)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号 : 20432578