

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790334

研究課題名(和文) 肥満に関わるヒストンメチルトランスフェラーゼの解析

研究課題名(英文) The functional analysis of histone methyltransferase in obesity

研究代表者

藤井 智明 (Fujii, Tomoaki)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：10511420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストン修飾酵素が肥満発症に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。本研究では、ヒストンメチルトランスフェラーゼをコードするSmyd (SET and MYND domain-containing protein) ファミリー遺伝子のSmyd2とSmyd3二重欠損マウスを作製し、表現型解析を行ったところ、本マウスは、体重増加や異常な脂肪蓄積などの肥満症の表現型を示した。これらの結果は、Smyd2とSmyd3が脂肪細胞分化や脂肪蓄積に重要な役割を果たしていることを示している。

研究成果の概要(英文)：Accumulating findings show that histone methyltransferases are implicated in obesity. To investigate the role of Smyd family genes encode histone methyltransferase, we generated and analyzed Smyd2/3 double knockout mice. The mice exhibited obesity related phenotypes, an increase in body weight and abnormal accumulation of fat. These results suggest that Smyd2 and Smyd3 play a significant role in fat accumulation and adipocyte differentiation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：エピジェネティクス ヒストンメチルトランスフェラーゼ 肥満

1. 研究開始当初の背景

ヒストン修飾は、クロマチン構造の変化を伴う遺伝子発現に直接関わる重要な現象である。ヒストンのメチル化は主にリジン残基に見られ、ヒストン H3 では K4、K9、K27、K36、K79 がメチル化され、ヒストン H4 では K20 がメチル化される。これらのメチル化の内、H3K4、K36、K79 は転写活性化に関与し、H3K9、K27、H4K20 は転写抑制に関与することが知られている。

SMYD ファミリーは SET ドメインを持ち、ヒストンメチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子群である。本遺伝子群は生物種間でよく保存されており、ヒトでは SMYD1 から SMYD5 の 5 つの遺伝子から構成される。SMYD3 は今まで報告されていないヒストン H4K5 をメチル化修飾する (Van Aller et al, Epigenetics, 2012)。さらに、最近、SMYD3 は、非コード RNA のひとつであるイントロニック SMYD3 RNA として機能している。つまり、機能性 RNA としての性質ももつことが明らかにされた (Guil S et al, Nat Struct Mol Biol. 2012)。SMYD5 は特異的にヒストン H4K20me2 をメチル化修飾する (Stender JD et al, Mol Cell, 2012)。ヒストン H4K20 me2 をメチル化修飾する酵素は他に知られているが、SMYD5 のように特異的にヒストン H4K20me2 をメチル化する酵素は今まで報告されていない。このように SMYD ファミリーはユニークな性質を持つ遺伝子群である。

SMYD ファミリーは腫瘍形成や形態形成など様々な生命現象に関与していることが明らかにされつつある。我々は、SMYD3 が大腸癌肝臓癌、乳癌で発現が亢進していること、そしてその発現が癌細胞の生存や増殖に重要であることを示した (Hamamoto et al, Nat Cell Biol, 2004)。また、ゼブラフィッシュを用いて Smyd3 のノックダウンを行い、Smyd3 がゼブラフィッシュの骨格筋および心臓形成に関与していることを明らかにした

(Fujii et al, PLoS One, 2011)。しかしながら、SMYD ファミリー遺伝子の生理学的な機能は未解明な部分が多い。

我々は、*Smyd2* や *Smyd3* の遺伝子改変マウスを用いてこれらの遺伝子の機能を解析している。その結果、*Smyd3* 変異マウスのホモ接合体は (hypomorphic マウス: *Smyd3^{h/h}*) は現在までのところ顕著な異常は示していない。また、*Smyd2* 変異マウス (*Smyd2^{h/h}*) についても、同様に異常な表現型を認めていない。SMYD2 は SMYD3 とその構造と生化学的特徴が似ているため、互いに機能的に重複している可能性があると考え、*Smyd2^{h/h}* マウスと *Smyd3^{h/h}* マウスを交配し、*Smyd2* と *Smyd3* の二重変異マウス (*Smyd2^{h/h};Smyd3^{h/h}*) を作製した。その結果、予備的な結果ではあるが、*Smyd2^{h/h};Smyd3^{h/h}* マウスは、体重増加や脂肪蓄積などの肥満症の表現型を示した。

近年、ヒストン修飾酵素が肥満発症に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。例えば、ヒストン H3K9 の脱メチル化酵素である *Jhdm2a* ノックアウトマウスはメタボリック症候群様の表現型を示す。また、ヒストン H3K4、H3K9 および H4K20 のメチル化酵素である MLL3、SETDB1 および SETD8 が、脂肪細胞の分化に深く関わっていることが報告されている (Okamura et al, Organogenesis, 2010)。

そこで、本研究計画では、肥満に関わる新たなヒストンメチル化酵素である SMYD2 と SMYD3 の生体内での役割を明らかにする。

2. 研究の目的

- (1) *Smyd2* と *Smyd3* の発現パターンの解明。
- (2) *Smyd2* と *Smyd3* の二重欠損マウス (*Smyd2^{-/-};Smyd3^{-/-}* マウス) 系統の確立。
- (3) *Smyd2^{-/-};Smyd3^{-/-}* マウスを用いた、肥満に関わる形質を中心とした表現型解析。

3. 研究の方法

(1) *Smyd2* と *Smyd3* の発現パターンの解明 .

Smyd2 と *Smyd3* の発現時期や発現部位を調べるために、発生各時期のマウス胚および組織から、RNA を抽出し、RT-PCR を行った . また、*Smyd2* と *Smyd3* の変異マウスは遺伝子領域に LacZ と LoxP を導入したマウスである . これら変異マウスのヘテロ接合体の胎仔および組織切片を用いて LacZ 染色を行い、*Smyd2* および *Smyd3* の発現部位を調べた .

(2) *Smyd2* と *Smyd3* の二重欠損マウス (*Smyd2*^{-/-}; *Smyd3*^{-/-}マウス) 系統の確立 .

我々が用いている *Smyd2*^{h/h} および *Smyd3*^{h/h} マウスは、Cre リコンビナーゼによって目的遺伝子を欠損させることが可能であるとともに、フリッパーゼによって LacZ 遺伝子を欠損させることが可能である . これらのマウスに Cre リコンビナーゼを全身で発現するマウスとフリッパーゼを全身で発現するマウスを順に交配して、目的の遺伝子を欠損させたマウスを確立する .

(3) *Smyd2*^{-/-}; *Smyd3*^{-/-}マウスを用いた、肥満に関わる形質を中心とした表現型解析 .

Smyd2^{-/-}; *Smyd3*^{-/-}マウスの肥満発症のメカニズムを解明するために、*Smyd2*^{-/-}; *Smyd3*^{-/-}マウスと野生型マウスの体重を測定した . また、各脂肪組織の脂肪重量の測定、組織学的な解析を行った .

4 . 研究成果

(1) *Smyd2* と *Smyd3* の発現パターンの解明 .

まず、E8.5 ~ E17.5 マウス胚および組織から、RNA を抽出し、RT-PCR を行った . その結果、*Smyd2* および *Smyd3* は調べたすべてのマウス胚で発現が確認できた . 各組織においても、これらの遺伝子は、調べたすべての組織で発現が確認できた . また、*Smyd2*^{h/+}と *Smyd3*^{h/+}の E10.5 のマウス胚を用いて、LacZ 染色を行ったところ、*Smyd2* は心臓で強く発現していた . *Smyd3* に関しては、全身で発現が見られた . また、腹膜脂肪組織、腸間膜脂

肪組織、性腺脂肪組織などの白色脂肪組織および褐色脂肪組織から、RNA を抽出し RT-PCR を行ったところ、*Smyd2* と *Smyd3* はともにこれらの組織で発現が確認できた .

(2) *Smyd2* と *Smyd3* の二重欠損マウス (*Smyd2*^{-/-}; *Smyd3*^{-/-}マウス) 系統の確立 .

Smyd2^{h/+}および *Smyd3*^{h/+}マウスに、全身で Cre リコンビナーゼおよびフリッパーゼを発現するマウスをそれぞれ交配し、*Smyd2*^{+/-}および *Smyd3*^{+/-}マウスを作製し、その後、これらのマウスを交配することによって、*Smyd2*^{-/-}; *Smyd3*^{-/-}マウス系統を確立した .

(3) *Smyd2*^{-/-}; *Smyd3*^{-/-}マウスを用いた、肥満に関わる形質を中心とした表現型解析 .

我々は、*Smyd2*^{-/-}; *Smyd3*^{-/-}マウスを確立し、表現型解析を行った . *Smyd2*^{-/-}; *Smyd3*^{-/-}マウスは野生型と比較して、体重が有意に増加した . 異常な白色脂肪蓄積 (白色脂肪重量の増加) と白色脂肪細胞の肥大がみられた . 異常な褐色脂肪蓄積 (褐色脂肪重量の増加) と褐色脂肪細胞の肥大がみられた . 肝臓に著明な脂肪蓄積が見られた . これらの結果は、*Smyd2* と *Smyd3* が脂肪細胞分化や脂肪蓄積に重要な役割を果たしていることを示している .

このほかの成果として、新学術領域の助成を受け、脂肪組織と同じ中胚葉由来である血液系に注目して、*Smyd2*^{-/-}、*Smyd3*^{-/-}および *Smyd2*^{-/-}; *Smyd3*^{-/-}マウスの血液細胞の構成をフローサイトメトリー法を用いて検討を行っている .

(4) まとめ

肥満は、糖尿病、高血圧、動脈硬化、脂質異常症などの生活習慣病の成因に深く関与している . したがって、肥満発症のメカニズムを明らかにすることは、種々の生活習慣病の予防法及び治療法の開発のために非常に重要である . 肥満は複数の遺伝子が関与し、環境の影響を強く受ける多因子性疾患である . ヒストンのメチル化などのエピジェネテ

イックな変化が、生活習慣病発症に関わっていることがすでに報告されている。本研究は、肥満に関わる新たなメチルトランスフェラーゼである *Smyd2* と *Smyd3* の生体内における役割を明らかにすることを目的とした。

まず、*Smyd2* と *Smyd3* のそれぞれの発現パターンを調べた結果、全身で発現がみられ、腹膜脂肪組織、腸間膜脂肪組織、性腺脂肪組織などの白色脂肪組織や褐色脂肪組織などにも、発現が確認できた。

Smyd2 と *Smyd3* の単独の遺伝子変異マウスでは著しい表現型を呈さないことから、*Smyd2*^{-/-};*Smyd3*^{-/-}マウス系統を確立し、表現型解析を行ったところ、本マウスは、体重増加や異常な脂肪蓄積などの肥満症の表現型を示した。これらの結果は、ヒストンメチル化酵素である SMYD2 と SMYD3 が生体内で脂肪細胞分化や脂肪蓄積に重要な役割を果たしていることを示している。

今後、これらヒストンメチルトランスフェラーゼが制御する遺伝子群を明らかにすることで、新たな脂肪蓄積制御機構を解明していく。本研究を通して得られる結果は、肥満発症の新規のメカニズムの解明につながり、その成果は様々な疾患の原因となる肥満症の予防法や治療法の開発に寄与できるものと期待できる。

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2件)

Takahashi, N., Yamaguchi, K., Ikenoue, T., Fujii, T., Furukawa, Y. Identification of Two Wnt-Responsive Elements in the Intron of RING Finger Protein 43 (RNF43) Gene. PLoS ONE 9(1), e8658, 2014

Yamaguchi, K., Yamaguchi, R., Takahashi, N., Ikenoue, T., Fujii, T.,

Shinozaki, M., Tsurita, G., Hata, K., Niida, A., Imoto, S., Miyano, S., Nakamura, Y., Furukawa, Y. Overexpression of Cohesion Establishment Factor DSCC1 through E2F in Colorectal Cancer. PLoS ONE 9(1):e85750 9(1),e85750, 2014

[学会発表](計4件)

水越幸輔, 岡澤裕, 小見山博光, 藤井智明, 伊藤恭彦, 五藤倫敏, 垣生園子, 樋野興夫, 坂本一博, 折茂彰, 患者大腸癌組織片の移植モデルにおける顕著な肝臓および肺への転移形成 第72回日本癌学会学術総会2013年10月5日 パシフィコ横浜

池上恒雄, 今井光穂, 藤井智明, 山口貴世志, 松原大祐, 伊地知秀明, 立石敬介, 小池和彦, 古川洋一, オートファジー不全は恒常性活性化型 Kras 変異に起因するマウス膵腫瘍の発生を促進する. 第72回日本癌学会学術総会2013年10月3日 パシフィコ横浜

藤井智明, 堀本義哉, Ahmet Acar, 伊藤恭彦, 斎藤光江, 樋野興夫, 折茂彰 乳癌における癌間質内 Jagged1-Notch3 シグナル. 第72回日本癌学会学術総会2013年10月3日 パシフィコ横浜

今井光穂, 池上恒雄, 藤井智明, 磯村好洋, 小池和彦, 古川洋一, オートファジー不全はマウスの膵腫瘍の発生を促進する 2012年12月13日 さっぽろ芸文館

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井智明 (Fujii, Tomoaki)

順天堂大学大学院医学研究科 特任研究員

研究者番号: 10511420