2版

様 式 C－１９、F－１９－１、Z－１９ （共通）

科研費
KAKENHI

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ６ 月 ２４ 日現在

機関番号：１５４０１
研究種目：若手研究(A)
研究期間：2016～2018
課題番号：１６H０６２２６
研究課題名（和文）クロマチン修飾による褐色脂肪細胞分化制御機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of brown fat differentiation through chromatin modification

研究代表者
大野　晴也（Ohno, Haruya）

広島大学・医歯薬保健学研究科（医）・助教

研究者番号：６０７２５８９４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　15,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は褐色脂肪細胞とベージュ脂肪細胞の分化および機能を制御する新規エピゲノム因子を探索し解析することである．PRDM16/EHMT1転写共役複合体を形成する因子として新たにメチル基供与体合成酵素であるMATIIαを同定した．褐色脂肪組織特異的MATIIαノックアウトマウスを作成すると褐色脂肪組織の低形成を認めた．MATIIαを褐色脂肪細胞やベージュ脂肪細胞で欠失させると，白色脂肪細胞関連遺伝子のプロモーター領域のH3K9メチル化が低下しucp1などの熱産生関連遺伝子の低下を認め，MATIIαがクロマチン修飾を介して褐色脂肪細胞の分化制御を行っている機構が明らかとなった．

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究によりMATIIαがエピジェネティック調節機構を介して褐色脂肪細胞およびベージュ脂肪細胞の分化調節を行っているだけでなく、クレアチン生合成を介したUCP1非依存的な熱産性能をも制御しているという多面的な機能が明らかとなった．褐色脂肪細胞やベージュ脂肪細胞はエネルギーを熱として散逸させることができ，肥満症や糖尿病治療への応用が期待されている．今後MATIIαを含む転写複合体の機能解析を通じて褐色脂肪細胞やベージュ脂肪細胞の分化を促進させることや，UCP1に依存しない熱産生能を活性化させることができれば，糖尿病や肥満症治療の新たな選択肢を提示することができると期待される．

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to explore and analyze a new epigenetic factor that can modulate differentiation and function of brown adipocytes and beige adipocytes. We identified methionine adenosyltransferase II α(MATIIα), a synthetase of methyl donor S-adenosylmethionine, as a newly binding partner of a PRDM16/EHMT1 transcriptional complex. Genetic ablation of MATIIαcauses a loss of brown adipose tissue in vivo. Depletion of MATIIα in brown adipocytes or beige adipocytes induced demethylation of H3K9 at a promoter region of white adipocyte specific genes and caused reductions of thermogenic genes such as ucp1. These findings revealed a novel mechanism that MATIIα modulate differentiation of brown adipocytes through chromatin modification.

研究分野：糖尿病

キーワード：褐色脂肪細胞　ベージュ脂肪細胞

## １．研究開始当初の背景

褐色脂肪細胞はエネルギーを熱として散逸させる脂肪細胞である.活性化した褐色脂肪組織は抗肥満効果を持ち、またヒト成人における褐色脂肪細胞は、いわゆる古典的な褐色脂肪細胞とは異なり、寒冷やアドレナリン刺激などによって白色脂肪組織中に誘導されるベージュ脂肪細胞の特質をもつことが最近の研究により明らかとなっている．褐色脂肪細胞やベージュ脂肪細胞の量や活性を制御できれば、肥満症や糖尿病などへの治療応用が可能になるものと期待される.

褐色脂肪細胞の分化を担う重要な転写因子として PRDM16(PRD1-BF1-RIZ1 homologous domain containing 16)が同定されている．研究者らは PRDM16 複合体を形成する新規因子として、ヒストンメチル化酵素である EHMT1(Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1)を新たに同定し、この EHMT1 が褐色脂肪細胞の分化に必須であることを明らかにしている(Ohno H. et al Nature. 504,163-167: 2013)．EHMT1 を中心としたクロマチン修飾因子の変化に伴う褐色脂肪細胞の分化機構を解明することで、褐色脂肪細胞の分化制御を通じて肥満症などの代謝疾患への治療応用への端緒となることが期待される．PRDM16/EHMT1 複合体ががどのようにしてヒストンメチル化を行っているのか、またそのクロマチン修飾がどのような遺伝子発現制御を行い褐色脂肪細胞への運命決定を行っているのかについての詳細な機序は不明であった.

## ２．研究の目的

我々は PRDM16/ EHMT1 複合体と結合する新たなエピジェネティック因子として,メチル基供与体合成酵素である MATⅡα(Methionine adenosyltransferase)を同定した. MATⅡαはメチオニンを S-アデノシルメチオニン(SAM)に変換しメチル基を供与することでメチル化を触媒している. 本研究ではこの MATIIαが褐色脂肪細胞およびベージュ脂肪細胞の分化制御と機能調節に与える影響について検討することを目的とした．また褐色脂肪細胞の分化を制御する転写因子である NF1A のヒト組織における役割も検討した.

## ３．研究の方法

培養褐色脂肪細胞や鼠径部白色脂肪組織由来の培養白色脂肪細胞において siRNA を用いて MATIIαのノックダウンを行い，褐色脂肪細胞やベージュ脂肪細胞へと分化させた後に熱産生遺伝子の発現や H3K9 ヒストンメチル化能を検討した．また同細胞を用いて *Agt* や *Retn* といった白色脂肪細胞特異的遺伝子群のプロモーター領域における MATIIαの結合や H3K9 のメチル化をクロマチン免疫沈降法で検討した．C2C12 筋芽細胞に PRDM16 を導入し，さらに siRNA を用いて MATIIαをノックダウンして脂肪細胞への分化誘導能を検討した.

培養褐色脂肪細胞に FLAG-PRDM16 蛋白を導入し，FLAG 免疫沈降で PRDM16 転写複合体を精製し,褐色脂肪細胞の分化過程における PRDM16 複合体の H3K9 メチル化能を検討した. また同複合体の EHMT1 と MATIIαとの結合を免疫沈降法で検討した

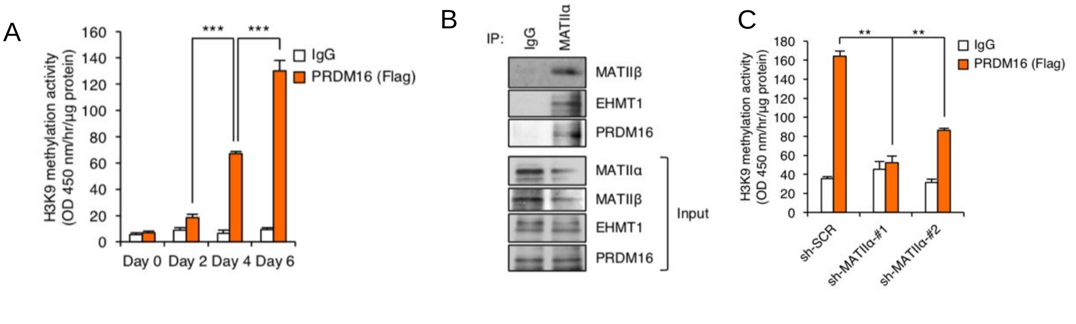
マウスモデルの作成にあたっては，MATIIα全身ノックアウトマウスは褐色脂肪組織が形成される前に胎生致死であるため，MATⅡαの flox マウス作製し，Myf5 プロモーター下に Cre を発現するマウスと交配することで褐色脂肪組織特異的に MATⅡαをノックアウトしたマウスを作成した.

ヒト褐色脂肪組織における検討には，褐色細胞腫もしくは非機能性腺腫患者由来の腎周囲脂肪組織における UCP1 などの熱産生関連遺伝子や転写因子 NF-1 の発現を定量 PCR 法で測定した.

## ４．研究成果

<u>①MATIIαは PRDM16/EHMT1 とともに転写複合体を形成しヒストンメチル化能を制御する.</u>

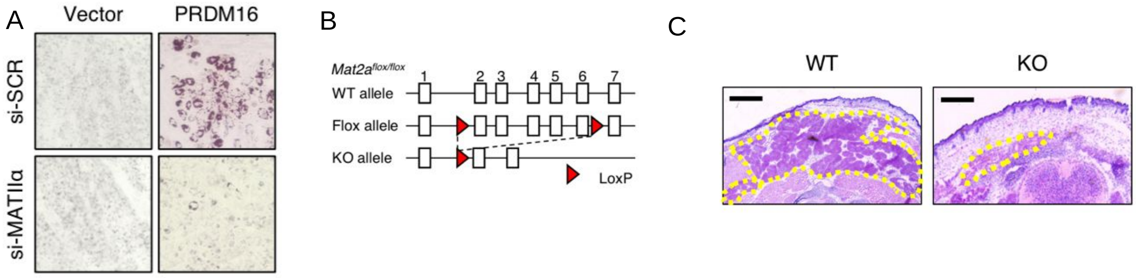
褐色脂肪細胞の分化段階における PRDM16 転写複合体のヒストンメチル化能を検討したところ PRDM16 転写複合体の H3K9 メチル化能は分化に伴い顕著に増加していた(図 1A)．また EHMT1 のヒストンメチル化能を欠失させた変異体の導入により，褐色脂肪細胞への分化誘導機能は失われた.そこで PRDM16/EHMT1 複合体におけるヒストンのメチル化活性が褐色脂肪細胞の分化制御に重要であると考え，クロマチン修飾因子と様々な複合体を形成しメチル化能を制御している MATIIαに注目しその機能解析を行うこととした．褐色脂肪細胞の核内において MATIIαは PRDM16/EHMT1 と複合体を形成していた(図 1B)．また MATIIαを欠失させることで PRDM16 転写複合体のヒストンメチル化活性は著明に抑制され(図 1C)，MATIIαの PRDM16/EHMT1 複合体におけるヒストンメチル化能の制御への関与が明らかとなった.



（図 1） A．褐色脂肪細胞において PRDM16 転写複合体の H3K9 メチル化能は分化に伴い顕著に増加した
B．褐色脂肪細胞の核内において MATIIαは PRDM16/EHMT1 と複合体を形成していることを免疫沈降で確認
C．MATIIαを欠失させることで PRDM16 転写複合体のヒストンメチル化活性は著明に抑制された

**②MATIIαの欠失により褐色脂肪細胞の分化が抑制される．**

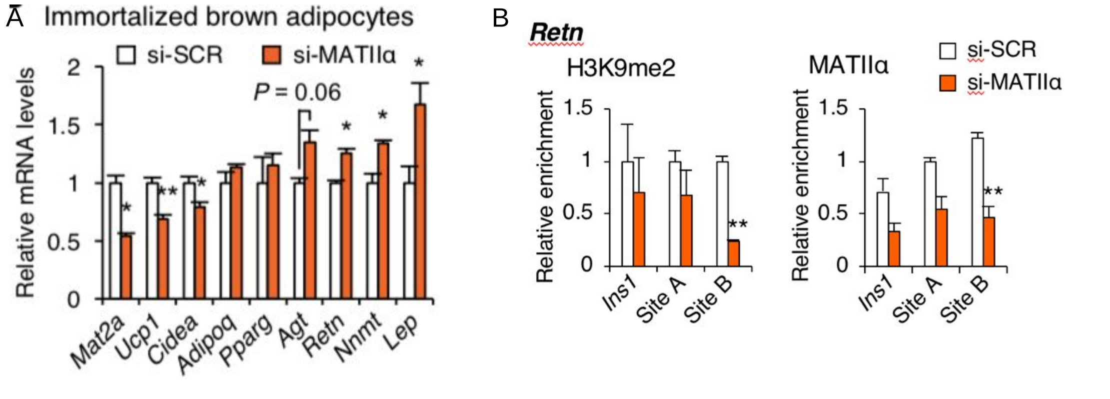
次に我々は褐色脂肪細胞分化における MATIIαの役割を検討した．骨格筋前駆細胞である C2C12 細胞に PRDM16 を導入すると褐色脂肪細胞へと分化誘導させることができる． この PRDM16 依存性の褐色脂肪細胞への分化誘導は MATIIαの欠失により失われた（図 2A）．
褐色脂肪組織特異的 MATIIαノックアウトマウス（図 2B）の E18.5 における肩甲骨間組織を採取し組織学的な検討を行ったところ，褐色脂肪組織は顕著に縮小しており（図 2C），MATIIαが in vivo モデルにおいても褐色脂肪細胞分化を制御していることが明らかとなった．




（図 2） A．C2C12 細胞において PRDM16 依存性の褐色脂肪細胞への分化誘導能は MATIIαの欠失により失われた
B．MATIIαの flox マウス作製
C．褐色脂肪細胞特異的に MATIIαをノックアウトマウス E18.5 では褐色脂肪組織の縮小を認めた

**③MATIIαは褐色脂肪細胞の形質をエピジェネティックな機構により維持している．**

さらに我々は MATIIαによる褐色脂肪細胞の分化制御メカニズムを検討することとした．褐色脂肪細胞において MATIIαを欠失させると *Ucp1* や *Cidea* などの熱産生遺伝子群の低下とともに *Agt* や *Retn* といった白色脂肪細胞特異的遺伝子群の上昇を認めた（図 3A）．またそれら遺伝子群の発現制御領域において MATIIαの欠失により H3K9me2 および MATIIαの enrichment が低下しており，褐色脂肪細胞の形質維持には MATIIαによるヒストンメチル化を介したエピジェネティックな遺伝子発現調節機構が必要であることがわかった（図 3B）．

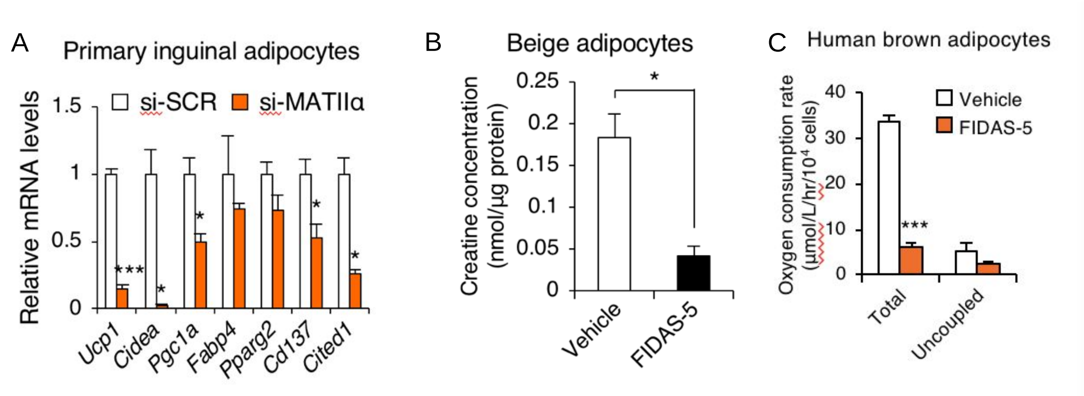



（図 3） A．褐色脂肪細胞において MATIIαを欠失させると熱産生遺伝子群の低下とともに白色脂肪関連遺伝子の上昇を認めた
B．遺伝子群の発現制御領域において ChIP-qPCR で評価した H3K9me2 および MATIIαの recruitment が低下していた

**④MATIIαはベージュ脂肪細胞の分化および UCP1 非依存性の熱産性能を制御している．**

最後に我々はベージュ脂肪細胞における MATIIαの役割について検討した．鼠径部由来の初代培養白色脂肪細胞において Rosiglitazone を用いてベージュ脂肪細胞へと分化させる際に MATIIαの欠失させると，*Ucp1* などの熱産生遺伝子や *Cited1* といったベージュ特異的遺伝子群の低下を認めた（図 4A）．
近年，UCP1 非依存的な熱産生能に，細胞質のクレアチン代謝が大きく関与していること示され

ている(Kazak et. al. *Cell.* 2015). また興味深いことに MATIIαは細胞質においてグアニジノ酢酸からクレアチンを合成する際に必要である. そこで MATIIα のクレアチンを介した熱産性能への影響を検討した. MATIIα 阻害薬である FIDAS-5 をベージュ脂肪細胞に添加すると,細胞内クレアチンの減少とともに, UCP1 非依存性の酸素消費量の低下が認められた(図 4B). またベージュ脂肪細胞により近い性質を持つヒトの培養褐色脂肪細胞においても FIDAS-5 の添加に伴い酸素消費量の低下を認め, ベージュ脂肪細胞とヒト褐色脂肪細胞におけるクレアチン生合成を介した MATIIα の UCP1 非依存性熱産性能への働きが明らかとなった(図 4C).




(図 4)　A. MATIIαの欠失させると, Ucp1 などの熱産生遺伝子や Cited1 といったベージュ特異的遺伝子群の低下を認めた
B. MATIIα 阻害薬である FIDAS-5 をベージュ脂肪細胞に添加すると, 細胞内クレアチンが減少した
C. ヒトの培養褐色脂肪細胞においても FIDAS-5 の添加に伴い酸素消費量の低下を認めた

**⑤ヒト褐色脂肪組織において NF1A 遺伝子は高発現する**
腎周囲から採取した脂肪組織において, 褐色細胞腫の患者では高カテコラミン血症により褐色脂肪様細胞が誘導されるが, 非機能腺腫の患者由来の脂肪組織と比べ褐色細胞腫の患者由来の脂肪細胞では NF1A の発現が高く, また NF1A の発現は *UCP1* などの熱産生関連遺伝子との発現と正の相関を示していた.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計　2　件)
①Nakatsu Y, Matsunaga Y, Yamamotoya T, Ueda K, Inoue MK, Mizuno Y, Nakanishi M, Sano T, Yamawaki Y, Kushiyama A, Sakoda H, Fujishiro M, Ryo A, Ono H, Minamino T, Takahashi S, Ohno H, Yoneda M, Takahashi K, Ishihara H, Katagiri H, Nishimura F, Kanematsu T, Yamada T, Asano T, Prolyl Isomerase Pin1 Suppresses Thermogenic Programs in Adipocytes by Promoting Degradation of Transcriptional Co-activator PRDM16. *Cell Reports.* 26(12):3221-3230, 2019　査読あり
②Hiraike Y, Waki H, Yu J, Nakamura M, Miyake K, Nagano G, Nakaki R, Suzuki K, Kobayashi H, Yamamoto S, Sun W, Aoyama T, Hirota Y, Ohno H, Oki K, Yoneda M, White AP, Tseng YH, Cypess AM, Larsen TJ, Jespersen NZ, Scheele C, Tsutsumi S, Aburatani H, Yamauchi T, Kadowaki T: NFIA co-localizes with PPARγ and transcriptionally controls the brown fat gene program. *Nat Cell Biol.* 19(9): 1081-1092, 2017　査読あり

〔学会発表〕(計　6　件)
①江草玄太郎, 大野晴也, 森田好美, 長野学, 沖健司, 米田真康. ベージュ脂肪細胞の機能維持機構の解明. 日本糖尿病学会中国四国地方会第 56 回総会. 2018 年
②江草玄太郎, 大野晴也, 森田好美, 長野学, 沖健司, 米田真康. ベージュ脂肪細胞の形質維持における PPARα アゴニストの役割. 第 39 回日本肥満学会. 2018 年
③長野学, 大野晴也, 森田好美, 沖健司, 梶村真吾, 米田真康. メチル基供与体合成酵素 MATII は褐色脂肪の分化と熱産生を制御する.　第 90 回日本内分泌学会学術総会. 2017 年
④長野学, 大野晴也, 森田好美, 梶村真吾, 米田真康. 褐色脂肪の分化・機能を制御するエピ

ジェネティクス．2017 年度生命科学系学会合同年次大会．2017 年
⑤長野学，大野晴也，江草玄太郎，森田好美，梶村真吾，米田真康．褐色脂肪の分化・機能を制御するエピジェネティクス．2017 年度生命科学系学会合同年次大会．2017 年
⑥大野晴也，長野学，森田好美，沖健司，米田真康．褐色脂肪細胞分化と熱産生能の制御に関わるエピジェネティック調節機構(シンポジウム)．第 39 回日本分子生物学会年会．2016 年

〔図書〕（計　1　件）
①大野晴也　他，羊土社，実験医学増刊 Vol.35 No.2，2017，77-84

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0　件）
なし

○取得状況（計　0　件）
なし

〔その他〕
なし

６．研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
研究分担者氏名：長野学

ローマ字氏名：Nagano Gaku

研究分担者氏名：森田好美

ローマ字氏名：Morita Yoshimi

研究分担者氏名：江草玄太郎

ローマ字氏名：Egusa Gentaro

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。