

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20390090
 研究課題名 (和文) プロテオミクスによる Wnt シグナルと核内受容体の脂肪細胞におけるシグナル統合解析
 研究課題名 (英文) Comprehensive analyses of signals of Wnt and nuclear receptors in adipogenesis through proteomics
 研究代表者 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

研究成果の概要 (和文)：脂肪細胞分化において、分化誘導のマスターレギュレータ PPAR γ が分化を完成させるメカニズムの一端として、ヒストン修飾酵素の発現を制御し、エピジェネティックな制御機構を担うことを解明した。また、Wnt が脂肪細胞分化を抑制する機構として、核内受容体 COUP-TFII の転写を促進し、これが PPAR γ の転写調節領域に結合し、ヒストン脱アセチル化複合体を介して PPAR γ 発現を抑制するメカニズムを解明した。

研究成果の概要 (英文)：We revealed that PPAR γ regulates several genes involved in histone lysine methyltransferase genes thereby regulates adipogenesis. We also revealed that the mechanism by which Wnt/ β -catenin inhibits adipogenesis. Wnt/ β -catenin stimulates COUP-TFII gene expressions, whose gene product inhibits PPAR γ 2 gene expression through the recruitment of HDAC to the transcription regulatory region of PPAR γ 2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
総計	10,700,000	3,210,000	13,910,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：(1)COUP-TFII (2)PPAR γ (3)エピゲノム (4) β カテニン (5)Wnt
 (6)脂肪細胞分化 (7)標的遺伝子のゲノムワイド解析

1. 研究開始当初の背景

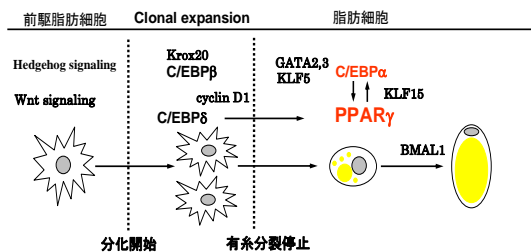
メタボリックシンドロームや動脈硬化など多因子の疾患の解明は 21 世紀の生物医学の大きな課題となっている。肥満を基盤としたメタボリックシンドロームでは、生理機能の破綻した脂肪細胞が原因で、糖尿病、動脈硬化などが発症するというメカニズムが注目されており、肥大化に伴う**脂肪細胞の機能破綻を理解**するために、脂肪細胞の分化と肥大

化に関わるシステムの**動作原理の解明**が求められている。最近、Wnt シグナル上の転写因子である TCF の遺伝子変異が糖尿病にリンクすることや、Wnt 蛋白の受容体 LRP6 が動脈硬化にリンクするなど**Wnt シグナルと生活習慣病との関連**が明らかにされつつある (図 1)。さらには、遺伝背景が同一でも細胞の分化に関与する遺伝子のエピゲノムの違いを起こす Wnt 関連物質 (sFRP) によって肥満傾向が

異なることが明らかにされており (PLoS Genetics, 2: e81, 2006)、遺伝子発現や遺伝子配列情報に加えクロマチン修飾等への理解も重要となっている。

脂肪細胞分化

脂肪細胞分化とは多数の転写因子が遺伝子発現を劇的に変動させる複雑な現象であると考えられる



Farmer S.R. Cell Metab 4: 263-273, 2006

図 1

2. 研究の目的

Wnt シグナルと核内受容体によって制御される代謝の解析に、脂肪細胞分化系で、プロテオーム解析・トランスクリプトーム解析を高時間分解能で行い、これにエピゲノム解析を加えるシグナルの統合解析を目的とした。

3. 研究の方法

Wnt 刺激に伴う PPAR γ の複合体解析、リン酸化解析のために、**プロテオミクス**を行う。プロテオミクスについては磁気ビーズを用いる。Wnt による PPAR γ の発現制御を解析するために、PPAR γ プロモーターのヒストンの K9 トリメチル、K27 トリメチル化修飾状態変化をクロマチン免疫沈降 PCR (ChIP PCR) によって解析する。また、時系列的に Wnt の下流に位置する核内受容体 COUP-TF が PPAR γ や C/EBP α 遺伝子プロモーターの結合する部位を同様に同定する。さらに、すでに作成した 3T3L1 前駆脂肪細胞での発現アレイとデータを統合する。

4. 研究成果

脂肪細胞のマスターレギュレーターである PPAR γ や Wnt の下流にある β カテニンの**標的遺伝子のゲノムワイド解析** (ChIP on Chip 解析) を行った。その結果、Setdb1、Setd8、を含む複数の Set ドメイン蛋白遺伝子を同定した(図 2)。PPAR γ によってヒストン H3 の 9 番目のリジン(H3K9)のメチル化修飾をする Setdb1 は転写レベルで負に、ヒストン H4 の 20 番目のリジン(H4K20)のモノメチル化酵素 Setd8 は正に制御される標的遺伝子であることを見いだした(図 2)。さらに、H3K9 トリメチル修飾は脂肪細胞分化抑制に、そして

H4K20 モノメチル化は分化促進に働くことを見いだした(図 3)。以上より、PPAR γ はこれらヒストン修飾酵素遺伝子の発現を抑制し、さらにこれを介して脂肪細胞の分化をエピゲノム修飾から制御する経路があることを発見した(図 4) (*Mol Cell Biol*, 2009)。そこで、H3K9 の脱メチル化と肥満・生活習慣病との関連を解析するため、H3K9 の**脱メチル化に異常があるマウス** (JHDM2A $^{-/-}$) を作成したところ、驚くべきことに、**肥満・インスリン抵抗性を呈する生活習慣病のモデルマウス** となる新たな知見を得た (*Genes to Cells*, 2009)。同様の知見は米国からも報告された (Tateishi K et al *Nature*, 458, 757-761, 2009)。また、Wnt の核内エフェクター蛋白である β カテニンの ChIP on Chip からは、Wnt が核内受容体 COUP-TFII 遺伝子を標的とし活性化すること、そして、これが PPAR γ 遺伝子の調節領域に結合し、さらにプロテオミクス解析から、ここにクロマチン修飾蛋白複合体をリクルートして PPAR γ 遺伝子をエピジェネティックにサイレンシングする一連の機構を解明した。

ChIP-Chip 解析の結果、脂肪細胞のマスターレギュレーター PPAR γ は 3 種類のヒストンメチル化酵素遺伝子の制御領域に結合していた。

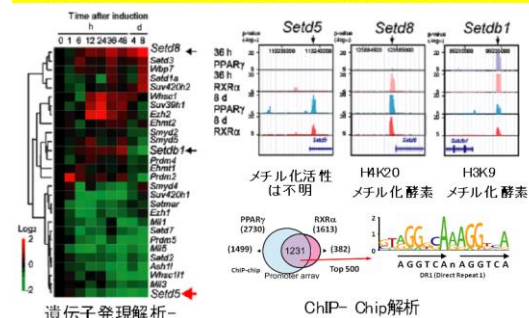


図 2

•Setdb1 (H3K9メチル化酵素) をノックダウンすると脂肪細胞になりやすくなり
•Setd8 (H4K20メチル化酵素) をノックダウンすると脂肪細胞になりにくくなる



図 3

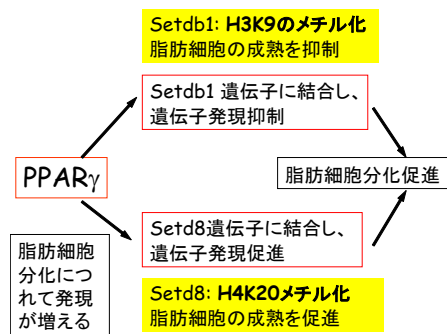


図 4

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 9 件) 全て査読有

1. Kuwahara A, Hirabayashi Y, Knoepfler PS, Taketo MM, Sakai J, Kodama T, Gotoh Y: Wnt signaling and its downstream target N-myc regulate basal progenitors in the developing neocortex. *Development*, 137, 1035-1044. (2010)
2. Okamura M, Inagaki T, Tanaka T and Sakai J: Role of histone methylation and demethylation in adipogenesis and obesity. (Review) *Organogenesis*, 6(1), 24-32. (2010)
3. Ishimoto K, Tachibana K, Hanano I, Yamasaki D, Nakamura H, Kawai M, Urano Y, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Doi T: Sterol regulatory element-binding protein 2 and nuclear factor Y controls human farnesyl diphosphate synthase expression and affects cell proliferation in hepatoblastoma cells. *Biochem J*. Epub ahead of print. (2010)
4. Inagaki T, Tachibana M, Magoori K, Kudo H, Tanaka T, Okamura M, Naito M, Kodama T, Shinkai Y, Sakai J: Obesity and Metabolic Syndrome in Histone Demethylase JHDM2a Deficient Mice. *Genes to Cells*, 14, 991-1001. (2009)
5. Wakabayashi K, Okamura M, Tsutsumi S, Tanaka T, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H, Sakai J: PPAR γ /RXR α Heterodimer Targets Genes of Histone Modification Enzymes Setd8 and Regulates Adipogenesis through a Feed-back Mechanism. *Mol Cell Biol*, 29, 3544-3555. (2009)
6. Okamura M, Kudo H, Wakabayashi KI, Tanaka T, Nonaka A, Uchida A, Tsutsumi S, Sakakibara I, Naito M, Osborne TF, Hamakubo T, Ito S, Aburatani H, Yanagisawa M, Kodama T, Sakai J: COUP-TFII acts downstream of Wnt/ β -catenin signal to silence PPAR γ gene expression and repress adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 10,

5819-5824. (2009)

7. Kamisuki S, Mao Q, Abu-Elheiga L, Gu Z, Kugimiya A, Kwon Y, Shinohara T, Kawazoe Y, Sato S-i, Asakura K, Choo H-YP, Sakai J, Wakil SJ, Uesugi M: A small molecule that blocks fat synthesis by inhibiting the activation of SREBP. *Chemistry & Biology*, 16, 882-892. (2009)
8. Ishimoto K, Nakamura H, Tachibana K, Yamasaki D, Ota A, Hirano K-i, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Doi T: Sterol-Mediated Regulation of Human Lipin 1 Gene Expression in Hepatoblastoma Cells. *J Biol Chem*, 284, 22195-22205. (2009)
9. Sakakibara I, Fujino T, Ishii M, Tanaka T, Shimosawa T, Miura S, Zhang W, Tokutake Y, Yamamoto J, Awano M, Iwasaki S, Motoike T, Okamura M, Inagaki T, Kita K, Ezaki O, Naito M, Kuwaki T, Chohnan S, Yamamoto TT, Hammer RE, Kodama T, Yanagisawa M, Sakai J: Fasting-induced hypothermia and reduced energy production in mice lacking acetyl-CoA synthetase 2. *Cell Metabolism*, 9, 191-202. (2009)

[学会発表] (計 5 件)

1. Sakai J, Aburatani H, Kodama T, Wakabayashi K, Tanaka T, Okamura M, Tsutsumi S, Hamakubo T: PPAR γ /RXR α Heterodimer Targets Gene of Histone Modification Enzyme PR-Set7/Setd8 and Regulates Adipogenesis through a Positive Feedback Loop. 第 32 回日本分子生物学会, 第 82 回日本生化学会, 横浜, 2009 年 12 月 9 日
2. 酒井寿郎: ヒストンリジンメチル化の脂肪細胞分化および肥満形成における役割, 第 30 回日本肥満学会, 浜松, 2009 年 10 月 9 日
3. 酒井寿郎: 次世代シーケンサーを用いた脂肪細胞におけるエピゲノム研究, 第 11 回日本骨粗鬆症学会, 名古屋, 2009 年 10 月 15 日
4. Tanaka T, Wakabayashi K, Okamura M, Tsutsumi S, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H and Sakai J: The peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor alpha heterodimer targets the histone modification enzyme PR-Set7/Setd8 gene and regulates adipogenesis through a positive feedback loop. EMBO Conference on Nuclear Receptors, Croatia, 2009.9.28.
5. 酒井寿郎: COUP-TFII acts downstream of Wnt/ β -catenin signal to silence PPAR γ gene expression and repress adipogenesis, 第 31

回日本分子生物学会，第 81 回日本生化学会，神戸，2008 年 12 月 9 日

[その他]

1. 酒井寿郎：特集記事「脂肪細胞の分化や肥満に関与するエピゲノムのしくみを解明！」，Nature Japan，2009 年 11 月 13 日付
2. 酒井寿郎 他：「遺伝子の働き制御するエピゲノム」，朝日新聞，2009 年 9 月 29 日付

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

田中 十志也 (TANAKA TOSHIYA)
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：20396930

川村 猛 (KAWAMURA TAKESHI)
東京大学・先端科学技術研究センター・
特任助教
研究者番号：70306825

(3) 連携研究者

該当なし