

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17952

研究課題名(和文) 脱リン酸化酵素によるベージュ化調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of beige adipocyte-differentiation by protein phosphatase.

研究代表者

伊藤 亮 (Ito, Ryo)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80733815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ベージュ脂肪細胞は活発に糖や脂肪を燃焼し、生活習慣病の新規治療標的として注目されている。ヒストン脱メチル化酵素JMJD1Aが アドレナリンシグナル下流でリン酸化され、抑制ヒストンメチル化修飾を消去し、クロマチンを活性化することが知られている。本研究では、プロテオミクス解析を行い、リン酸化JMJD1A脱リン酸化酵素複合体(phospho JMJD1A protein phosphatase complex, p-JMJD1A-PPC)を同定し、p-JMJD1A-PPCがJMJD1A S265のリン酸化を調節し、ベージュ脂肪細胞における熱産生遺伝子の発現制御に寄与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヒストン脱メチル化酵素JMJD1Aのリン酸化調節に着目し、脱リン酸化酵素を同定し、その脱リン酸化酵素を阻害することでJMJD1Aのリン酸化を亢進させ、ベージュ脂肪細胞分化を促進できることを明らかにした。すなわち、脱リン酸化酵素のコントロールを介してヒストン脱メチル化酵素による遺伝子発現を調節できることを示しており、この点に学術的意義がある。また、これらの成果は肥満や高脂血症といった生活習慣病に対する治療薬開発に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Beige adipocytes are attracting attention as a novel therapeutic target for lifestyle-related diseases because beige adipocyte burn sugar and fat actively. It has been shown that the histone demethylase JMJD1A is phosphorylated downstream of the α -adrenergic signal, removing the inhibitory histone methylation and activating chromatin. It was unclear how this phosphorylation level of JMJD1A was regulated. In this study, we comprehensively searched for JMJD1A interacting factors and identified a phospho JMJD1A protein phosphatase complex (p-JMJD1A-PPC). p-JMJD1A-PPC dephosphorylate phosphorylated JMJD1A and contributed to the regulation of the expression of thermogenic genes in beige adipocytes.

研究分野：遺伝子発現制御、分子代謝生理学

キーワード：熱産生

1. 研究開始当初の背景

近年、長期間の寒冷刺激により白色脂肪組織内に熱産生を行うベージュ脂肪細胞が誘導されることが解明されてきている。ベージュ脂肪細胞は活発に糖や脂肪を燃焼し、過栄養によって生じる糖脂質代謝異常を改善する効果があるため、生活習慣病の新規治療標的として注目されている。ベージュ脂肪細胞の分化には寒冷刺激にともなう白色脂肪組織での持続的な アドレナリン受容体 (AR) 刺激により、白色脂肪組織ではクロマチンレベルで抑制されている Ucp1 などの熱産生遺伝子の活性化が必要である。最近、ヒストン脱メチル化酵素 JMJD1A が ARシグナル下流でリン酸化され、抑制ヒストンメチル化修飾を消去して、クロマチンを活性化することが明らかにされた (図 1)。この JMJD1A のリン酸化レベルがどのようにして維持されるのか、リン酸化レベルを調節する脱リン酸化酵素の存在や、これが脂肪細胞のベージュ化を制御するか否かなどは不明である。本研究では、脱リン酸化酵素複合体を明らかにし、白色脂肪のベージュ化におけるエピゲノム調節の解明を目指す。

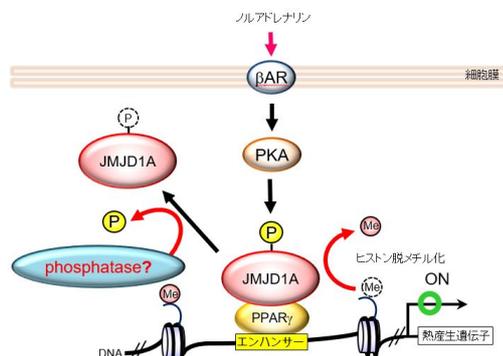


図1 リン酸化シグナル伝達とヒストン脱メチル化による熱産生遺伝子発現

2. 研究の目的

本研究では、リン酸化 JMJD1A の脱リン酸化酵素複合体を明らかにし、脱リン酸化を阻害することにより最終的にヒストン脱メチル化変化を誘導できるのか、また白色脂肪のベージュ化が誘導できるかを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

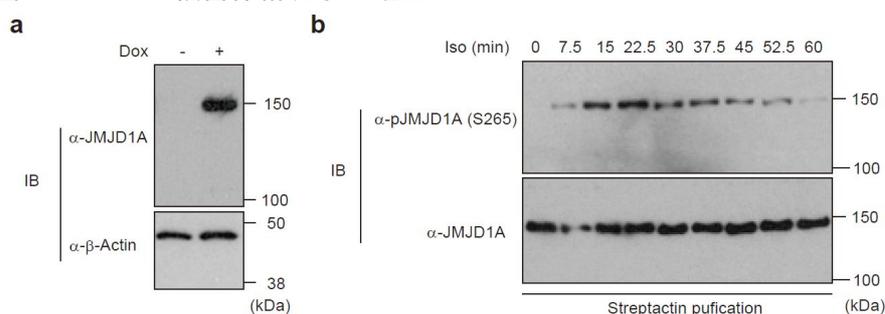
(1) JMJD1A の脱リン酸化酵素複合体の同定を行うため、マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 細胞を元に薬剤誘導性 SF (Strep-FLAG) タグ融合 JMJD1A 発現細胞株を作製した。(2) 作製した SF-JMJD1A 発現細胞を用い、JMJD1A 複合体のアフィニティー精製を行った。精製物はトリプシンを用いてペプチド断片に消化し、質量分析器を用いて JMJD1A 複合体の構成タンパク質の同定を行った。(3) 同定したリン酸化 JMJD1A 脱リン酸化複合体 (phospho JMJD1A protein phosphatase complex, p-JMJD1A-PPC)の活性を抑制し、JMJD1A のリン酸化が亢進しうるか否かを検証した。(4) RNA 干渉法を用いて p-JMJD1A-PPC 阻害条件下におけるベージュ脂肪細胞遺伝子のプロモーターやエンハンサーの H3K9me2 レベルを ChIP 法により解析した。(5) p-JMJD1A-PPC の活性を阻害し、Ucp1 をはじめとしたベージュ脂肪細胞遺伝子発現への影響を評価した。

4. 研究成果

(1) JMJD1A の複合体精製の確立

SF-JMJD1A 発現レンチウイルスを 3T3-L1 細胞に感染させた。レンチウイルスベクターには蛍光タンパク質 Venus が搭載されており、感染細胞をフローサイトメーターにより選択した。得られた細胞をドキシサイクリン(Dox)で処理し、SF-JMJD1A が発現することを確認した (図 2a)。JMJD1A はアドレナリン受容体シグナルを介した Protein kinase A (PKA) 活性化により 265 番目のセリンがリン酸化されることが知られている。SF-JMJD1A をドキシサイクリン処理で誘導し、アドレナリン受容体非選択的アゴニストであるアイソプロテレノール (Iso) を加えると処理後 15、22.5 分をピークに JMJD1A S265 のリン酸化が蓄積し、その後減衰していく様子が観察できた (図 2b)。この結果はアイソプロテレノール刺激により SF-JMJD1A がリン酸化し、脱リン酸化が起こっていることを示しており、すなわち、今回樹立した SF-JMJD1A 精製系が脱リン酸化酵素複合体の同定に応用可能なことを示唆するものであった。

図 2 JMJD1A 複合体精製の確立



(2) p-JMJD1A-PPC の同定

(1) で作製した細胞株を用い、SF-JMJD1A をアフィニティー精製した (図 3a)。この精製物を質量分析に供し、JMJD1A の脱リン酸化酵素の探索を行った。ベイトである SF-JMJD1A とともに脱リン酸化酵素複合体を同定し、p-JMJD1A-PPC1、p-JMJD1A-PPC2、及び p-JMJD1A-PPC3 と名付けた (図 3b)。この内、p-JMJD1A-PPC1 は触媒サブユニット、p-JMJD1A-PPC2 は調節サブユニット、p-JMJD1A-PPC3 は構成サブユニットであった。これらの結果から、JMJD1A は p-JMJD1A-PPC 複合体によって脱リン酸化が調節されている可能性が示唆された。

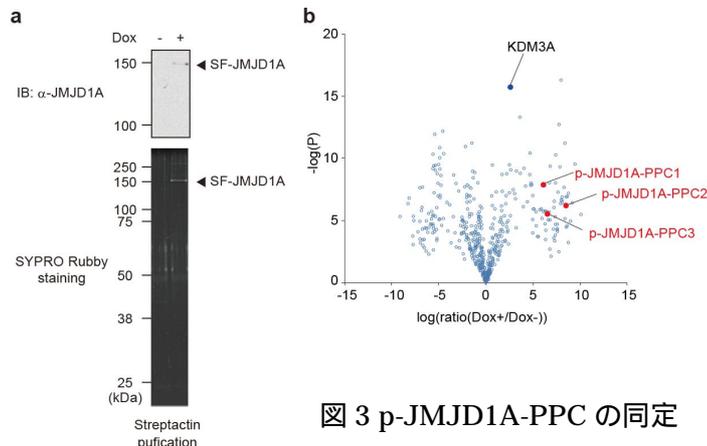


図 3 p-JMJD1A-PPC の同定

(3) p-JMJD1A-PPC 機能阻害による JMJD1A のリン酸化

次に p-JMJD1A-PPC の JMJD1A 脱リン酸化への関与を検証するため、p-JMJD1A-PPC の機能阻害を試みた。カリクリン A (Calyculin A, CA) は p-JMJD1A-PPC を含む複数の脱リン酸化酵素の阻害剤であり、この阻害剤を 10 nM で 30 分間処理すると SF-JMJD1A S265 のリン酸化が蓄積していることが示された (図 4a)。また、触媒サブユニット p-JMJD1A-PPC1 の発現を RNA 干渉法で抑制し、脱リン酸化酵素複合体の機能を阻害すると、内在性 JMJD1A S265 のリン酸化が亢進することが明らかとなった (図 4b)。これらの結果は、p-JMJD1A-PPC によって JMJD1A S265 のリン酸化が調節されていることを示している。

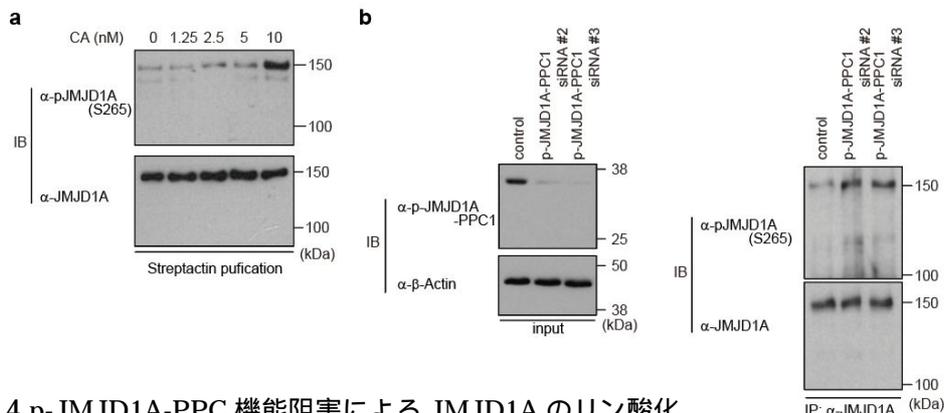
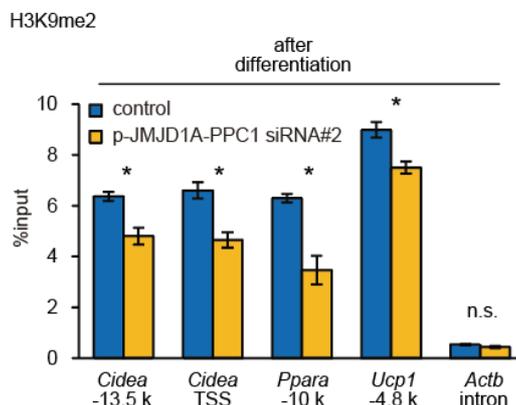


図 4 p-JMJD1A-PPC 機能阻害による JMJD1A のリン酸化

(4) JMJD1A リン酸化によるヒストン脱メチル化亢進

リン酸化 JMJD1A によるベージュ脂肪細胞マーカー遺伝子の転写活性化はヒストン H3 の 9 番目リジン (H3K9) の脱メチル化を介して行われる。p-JMJD1A-PPC 阻害条件下での H3K9 ジメチル抗体を用いた ChIP 法を行い、各ベージュ遺伝子のプロモーターやエンハンサー上の H3K9me2 レベルを評価した。その結果、p-JMJD1A-PPC 阻害条件下では *Cidea* 遺伝子のエンハンサー領域 (-13.5k) と転写開始点付近 (TSS)、*Ppara* 遺伝子のエンハンサー領域 (-10k)、及び *Ucp1* 遺伝子のエンハンサー領域 (-4.8k) における H3K9me2 レベルが低下していることが明らかとなった (図 5)。

図 5 p-JMJD1A-PPC 機能阻害によるヒストン脱メチル化亢進

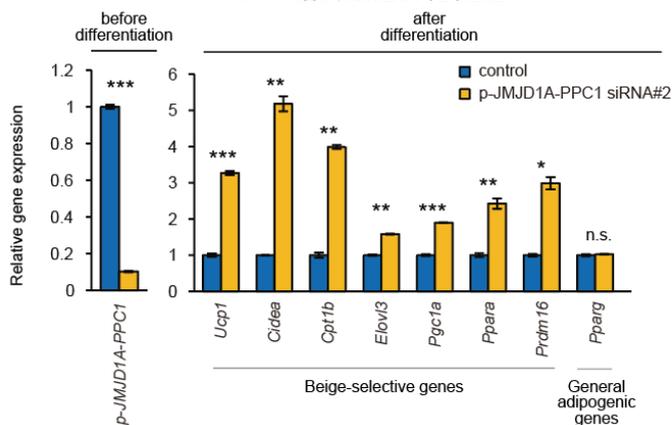


(5) JMJD1A S265 リン酸化亢進によるベージュ脂肪細胞分化促進

JMJD1A はリン酸化することで前駆脂肪細胞のベージュ脂肪細胞分化を促進することが報告されている。本研究では、p-JMJD1A-PPC の機能を抑制し、JMJD1A S265 のリン酸化を亢進した条件下で実際にベージュ脂肪細胞分化を促進するか否かを検証した。触媒サブユニット

p-JMJD1A-PPC1 に対する siRNA を導入した前駆脂肪細胞では p-JMJD1A-PPC1 遺伝子の発現低下が見られた。これらの細胞にベージュ脂肪細胞へと分化誘導を行い、誘導 8 日目の遺伝子発現変化を解析したところ、脂肪細胞マーカー遺伝子である Pparg に発現変化が見られなかったのに対し、ベージュ脂肪細胞マーカー遺伝子 Ucp1、Cidea、Cpt1b、Elovl3、Pgc1a、Ppara、Prdm16 は p-JMJD1A-PPC の機能を阻害すると発現上昇することが見いだされた (図 6)。

図 6 JMJD1A S265 リン酸化亢進によるベージュ脂肪細胞分化促進



(6) 本研究で得られた結果より、JMJD1A は脱リン酸化酵素複合体である p-JMJD1A-PPC によって脱リン酸化調節を受けることが明らかとなった (図 3)。さらに p-JMJD1A-PPC を阻害することで JMJD1A のリン酸化レベルを上昇させ (図 4)、ベージュ脂肪細胞遺伝子のプロモーターやエンハンサーの H3K9 脱メチル化を亢進することでベージュ脂肪細胞分化を促進することが示された (図 5, 6)。これらの結果は、ベージュ脂肪細胞分化において JMJD1A がリン酸化だけでなく脱リン酸化によっても機能調節を受けることを示している。さらに、JMJD1A の脱リン酸化を阻害し、JMJD1A S265 のリン酸化を亢進することでベージュ脂肪細胞分化を促進させることができることも示唆されており、将来的な生活習慣病の治療標的として期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ito Ryo, Shima Hiroki, Masuda Koji, Sato Ikuko, Shimada Hiroki, Yokoyama Atsushi, Shirahige Katsuhiko, Igarashi Kazuhiko, Sugawara Akira	4. 巻 68
2. 論文標題 Comparative proteomic analysis to identify the novel target gene of angiotensin II in adrenocortical H295R cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 441 ~ 450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endorcj.EJ20-0144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ito Ryo, Morita Masanobu, Nakano Taichi, Sato Ikuko, Yokoyama Atsushi, Sugawara Akira	4. 巻 534
2. 論文標題 The establishment of a novel high-throughput screening system using RNA-guided genome editing to identify chemicals that suppress aldosterone synthase expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 672 ~ 679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kagawa Yoshiteru, Umaru Banlanjo Abdulaziz, Shima Hiroki, Ito Ryo, et al.	4. 巻 57
2. 論文標題 FABP7 Regulates Acetyl-CoA Metabolism Through the Interaction with ACLY in the Nucleus of Astrocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 4891 ~ 4910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-020-02057-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saijoh Satoshi, Nakamura-Shima Mao, Shibuya-Takahashi Rie, Ito Ryo, et al.	4. 巻 537
2. 論文標題 Discovery of a chemical compound that suppresses expression of BEX2, a dormant cancer stem cell-related protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 132 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------