

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21211

研究課題名（和文）ヒストン脱メチル化酵素のリン酸化制御タンパク質同定による脂肪細胞褐色化機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of beiging through identification of phosphatase of histone demethylase JMJD1A

研究代表者

高橋 宙大（Takahashi, Hiroki）

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00909822

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、寒冷刺激を感知しベージュ化を誘導するヒストン脱メチル化酵素JMJD1Aのリン酸化を除去するMYPT1-PP1 脱リン酸化酵素複合体を特定した。この脱リン酸化酵素の活性を阻害するリン酸化部位も特定し、リン酸化によるMYPT1機能抑制がエピゲノム書き換えを介しベージュ化を促進させることを示した。脂肪組織特異的MYPT1欠損マウスではベージュ化が誘導され、食事性肥満や糖代謝異常の改善が認められた。またMYPT1-PP1 はYAP/TAZ転写共役因子を介した転写活性化を抑制することを見出し、寒冷刺激によるエピゲノム変化と転写共役因子を介した協調的な熱産生遺伝子活性化機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、肥満や肥満が成因基盤とする生活習慣病の治療・予防法への応用が期待される。本研究は、先行研究で同定した寒冷刺激を感知しベージュ化を誘導するエピゲノム酵素のリン酸化に着目し、このリン酸化レベルを制御することでエピゲノム書き換えを誘導し、「脂肪燃焼体質」を細胞に記憶させることができるか検証する挑戦的な試みであった。エピゲノム酵素の機能を亢進させ、エピゲノム変化を特定の遺伝子座で制御するという新規エピゲノム創薬の可能性を提示するもので、今後生命科学および多因子性疾患の予防と治療に大きな可能性が広がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Beige adipocytes are thermogenic adipocytes induced in white fat by chronic cold exposure and are attracting attention as a novel strategy for the treatment and prevention of obesity.

In this study, we identified MYPT1-PP1 as a phosphatase of JMJD1A, a histone demethylase crucial for beiging, and found that their activity is inhibited via PKA-dependent phosphorylation, increasing phosphorylated JMJD1A and beige adipogenesis. Mechanistically, MYPT1-PP1 depletion results in JMJD1A-mediated H3K9 demethylation and activation of Ucp1 gene. In addition, MYPT1-PP1 suppresses beiging by dephosphorylating myosin light chain which regulates actomyosin tension-mediated activation of YAP/TAZ. Pre-adipocyte specific Mypt1 deficient mice exhibit enhanced beiging, improved diet-induced obesity, and glucose metabolism. Thus, we have uncovered regulatory cross-talk involved in beige adipogenesis that coordinates epigenetic regulation with direct activation of transcriptional co-activators.

研究分野：代謝学

キーワード：エピゲノム ベージュ脂肪細胞 脱リン酸化酵素

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国では、生活習慣病が、死因別死亡割合の約5割、国民医療費の約3割を占めるに至っており、高齢化が進むにあたり、治療法の確立は喫緊の課題である。齧歯類の脂肪組織は、脂肪の貯蔵を担う白色脂肪組織と、脂肪を燃焼し、熱を産生する褐色脂肪組織に大別される。近年、慢性寒冷環境下において、ベージュ脂肪細胞と呼ばれる熱産生脂肪細胞が皮下白色脂肪組織(scWAT)中に誘導される事が明らかとなった。ベージュ脂肪細胞は成人ヒトにも存在し、熱産生にエネルギーを消費する事から、肥満を成因基盤とする生活習慣病の新規治療標的として注目される。ヒストン脱メチル化酵素 JMJD1A は、その欠損マウスが肥満の表現型を示し、エネルギー代謝において重要な役割を担う事が知られる (Inagaki et al., 2009)。申請者は近年、JMJD1A が、慢性寒冷下、プロテインキナーゼ A により Ser265 でリン酸化される事で寒冷を感知 (1st step) し、熱産生遺伝子座にリクルートされる。更に、JMJD1A が熱産生遺伝子座の転写抑制マークのヒストン H3 の 9 番目リジンのジメチル化 (H3K9me2) を取り除く (2nd step) という二段階機構を介しベージュ化を誘導する事を見出した (Abe et al., 2018)。この結果から、JMJD1A の脱リン酸化酵素の阻害が、JMJD1A のリン酸化 (1st step) を増加させる事で、エピゲノム変化 (2nd step) を誘導し、延いてはベージュ化を誘導する可能性が示唆された。しかし、現在までに JMJD1A の脱リン酸化酵素は、同定されていない。

2. 研究の目的

本研究では、JMJD1A の脱リン酸化酵素を同定し、これを阻害する事によるリン酸化亢進 (1st step) が、ヒストン脱メチル化を亢進させ (2nd step)、ベージュ化を誘導するかを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) プロテオーム解析による JMJD1A 脱リン酸化酵素候補の同定—JMJD1A を過剰発現させた 3T3-L1 前駆脂肪細胞のライゼートを用い、JMJD1A を免疫沈降に供し、共免疫沈降複合体の質量分析解析を行う事で、リン酸化 JMJD1A の脱リン酸化酵素の候補タンパク質を同定する。

(2) 脱リン酸化酵素候補に対する機能解析 JMJD1A の脱リン酸化酵素タンパクの検証—(1) で同定した候補タンパク質を RNA 干渉 (RNAi) 法によって白色前駆脂肪細胞において ノックダウンし以下を検証する。

① JMJD1A リン酸化が亢進するか否か、リン酸化 JMJD1A (P-JMJD1A) に対する抗リン酸化抗体 (anti-pS265-JMJD1A IgG) を用いたイムノブロット法で評価する。

② 熱産生遺伝子 (*Ucp1*, *Uncoupling protein 1*) 座の転写抑制ヒストン修飾 (H3K9me2) が減少するか否か、クロマチン免疫沈降 (H3K9me2-ChIP) により評価する。

③ ベージュ化遺伝子が誘導されるか、熱産生遺伝子発現解析 (qPCR) 等により評価する。

(3) P-JMJD1A 脱リン酸化酵素欠損マウスの解析—MYPT1 を細胞種特異的に欠損させ、個体レベルでのベージュ化への影響を解析する。

(4) 脱リン酸化酵素 MYPT1 標的タンパク質の網羅的解析—MYPT1 ノックダウン細胞と対照細胞を用いリン酸化プロテオミクス解析を行う。チタニアビーズを用いた解析から、*Ucp1* 遺伝子転写制御への関与が示唆されているアクトミオシン-YAP/TAZ 経路中に存在するタンパク質等が同定され、この知見を更に固める。

(5) JMJD1A を介したエピゲノムパスウェイと YAP/TAZ を介した転写パスウェイのクロストークを明らかにするため、酵素非活性 JMJD1A 点異体発現細胞を用いた解析を行う。

(6) 寒冷/ β アドレナリン刺激に伴う MYPT1-PP1 β の活性制御機構を解析するため、 β アドレナリン受容体刺激下における MYPT1 の翻訳後修飾解析、脱リン酸化活性の評価を行う。

4. 研究成果

(1) 質量分析解析より、JMJD1A の脱リン酸化酵素タンパク質の候補として脱リン酸化酵素の触媒サブユニット PP1 β (Protein phosphatase 1 catalytic subunit beta) と調節サブユニット MYPT1 (Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A) からなる脱リン酸化酵素複合体を同定した。

(2) リン酸化 JMJD1A 脱リン酸化酵素候補遺伝子 (*Ppp1cb* 並びに *Mypt1*) をノックダウンすると、JMJD1A のリン酸化レベルが増加し、熱産生遺伝子座の H3K9me2 レベルが減少し、且つ熱産生遺伝子が顕著に誘導される事を見出した。このことから、JMJD1A の脱リン酸化酵素の阻害が、JMJD1A のリン酸化 (1st step) を増加させる事で、エピゲノム変化 (2nd step) を誘導し、延いてはベージュ化を誘導することを証明した。

(3) 作製した *Mypt1-flox* マウスとベージュ脂肪細胞の前駆細胞特異的 Cre ドライバー (*Pdgfra-Cre*) マウスを交配することで脂肪組織特異的な MYPT1 欠損マウスの作製に成功した。この遺伝子改変マウスでは、鼠径部白色脂肪組織におけるベージュ化誘導が亢進しており、また高脂肪食負荷誘導性の肥満や糖代謝異常が改善していることを見出した。

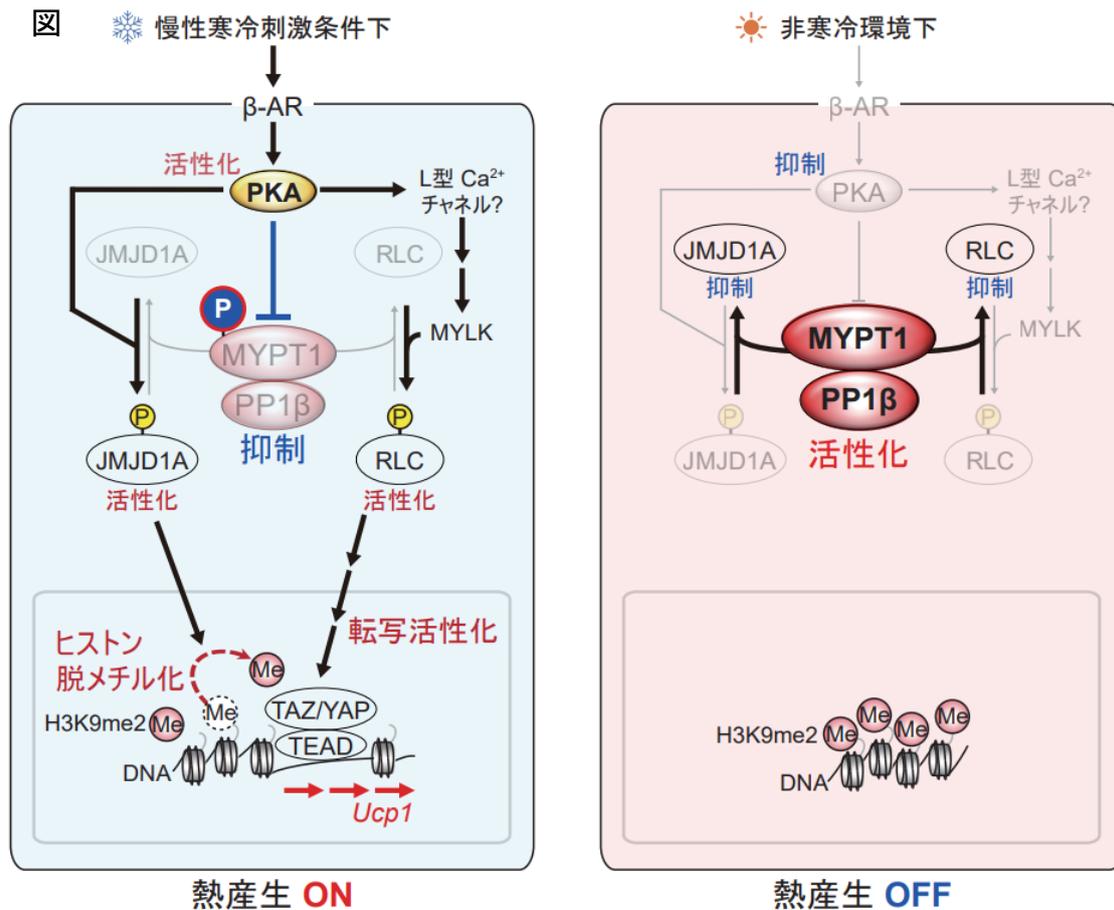
(4) チタニアビーズを用いた解析から、ミオシン調節軽鎖の T18/S19 のリン酸化を MYPT1-PP1 β の脱リン酸化標的部位として同定し、このリン酸化部位を非リン酸化アミノ酸に変異させると熱産生遺伝子の誘導が起きにくいを見出した。またミオシン調節軽鎖のリン酸化により制御されることが知られるアクチンミオシンの張力や、その下流で核内活性化される機械感受性 YAP/TAZ 転写共役因子の阻害によっても熱産生遺伝子の誘導が起きにくいを見出した。以上から MYPT1-PP1 β 脱リン酸化酵素は、JMJD1A を介したエピゲノム経路に加え、YAP/TAZ 転写共役因子を介した転写経路も制御することでベージュ化を抑制していることが明らかとなった。

(5) 酵素非活性 JMJD1A 点異体発現細胞では、MYPT1 のノックダウンによる熱産生遺伝子の発現誘導が起きないことが明らかとなった。以上の結果から、MYPT1 阻害による熱産生遺伝子発現誘導には、JMJD1A による転写抑制性ヒストン修飾の除去が先行して必要であることを見出し、その後オープンになったクロマチンに YAP/TAZ 転写コアクチベーターがリクルートされ、熱産生遺伝子の転写が活性化されるという仕組みが示唆された。

(6) 寒冷刺激を模した非選択的 β アゴニスト処理した細胞におけるリン酸化プロテオミクス解析から、 β -アドレナリン受容体の刺激により MYPT1 がスレオニンの 694 番目でリン酸化を受けることを見出した。更にリン酸化イムノブロット解析から、このリン酸化部位を非リン酸化アミノ酸に変異させると、 β アゴニスト刺激による JMJD1A のリン酸化の誘導が起きにくいこと、ベージュ化誘導が減弱することを見出した。以上からこの MYPT1 のリン酸化が、MYPT1-PP1 β の活性を負に制御することを見出し、寒冷環境下、 β -アドレナリン受容体の活性化に伴い、MYPT1-PP1 β は不活化されることで、JMJD1A の寒冷誘発性のリン酸化が増加し、ベージュ化が誘導されるという仕組みが明らかとなった。

以上、本研究では JMJD1A の負の制御因子として、脱リン酸化酵素である MYPT1-PP1 β 脱リン酸化酵素複合体を同定し、これの阻害が、JMJD1A リン酸化の安定化を介して、エピゲノム書き換えが誘導、即ち JMJD1A が活性化されることでベージュ化が誘導され、肥満や糖代謝異常が改善することを見出した。更に寒冷/ β アドレナリン受容体シグナルにより、MYPT1-PP1 β はリン酸化を介して不活化されることで寒冷センサーとして機能し、これに伴いリン酸化 JMJD1A を介したエピゲノムの書き換えが誘導され、続いて YAP/TAZ 転写コアクチベーターの核内活性が促進されることで、ベージュ化が誘導されるという仕組みが明らかにし、寒冷刺激によるエピゲ

ノム変化と転写共役因子を介した協奏的な熱産生遺伝子活性化機構を解明した(下図)(Takahashi et al., 2022)。本研究成果は、肥満や生活習慣病に対する新規治療・予防法への応用が期待される。



引用文献

- Abe, Y., Fujiwara, Y., Takahashi, H., Matsumura, Y., Sawada, T., Jiang, S., Nakaki, R., Uchida, A., Nagao, N., Naito, M., et al. (2018). Histone demethylase JMJD1A coordinates acute and chronic adaptation to cold stress via thermogenic phospho-switch. *Nat Commun* 9, 1566. 10.1038/s41467-018-03868-8 [doi] 10.1038/s41467-018-03868-8 [pii].
- Inagaki, T., Tachibana, M., Magoori, K., Kudo, H., Tanaka, T., Okamura, M., Naito, M., Kodama, T., Shinkai, Y., and Sakai, J. (2009). Obesity and metabolic syndrome in histone demethylase JHDM2a-deficient mice. *Genes Cells* 14, 991-1001. GTC1326 [pii] 10.1111/j.1365-2443.2009.01326.x [doi].
- Takahashi, H., Yang, G., Yoneshiro, T., Abe, Y., Ito, R., Yang, C., Nakazono, J., Okamoto-Katsuyama, M., Uchida, A., Arai, M., et al. (2022). MYPT1-PP1β phosphatase negatively regulates both chromatin landscape and co-activator recruitment for beige adipogenesis. *Nat Commun* 13, 5715. 10.1038/s41467-022-33363-0.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋 宙大
2. 発表標題 MYPT1-PP1 脱リン酸化酵素複合体による細胞記憶の書き換えを介したベージュ化制御機構の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 宙大
2. 発表標題 Thermogenic gene regulation via MYPT1-PP1 phosphatase complex during beige adipocyte differentiation
3. 学会等名 第99回 日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 宙大
2. 発表標題 MYPT1-PP1 脱リン酸化酵素複合体によるベージュ化制御機構の解明
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 宙大
2. 発表標題 MYPT1-PP1 脱リン酸化酵素複合体によるベージュ化制御機構の解明
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------