

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22790848

研究課題名（和文） 新規絶食応答転写共役因子複合体 PHF2/ARID5B の生理機能解明

研究課題名（英文） Analysis of the physiological roles of PHF2/ARID5B, a novel fasting-responsive transcription complex

研究代表者

奥野 陽亮（YOSUKE OKUNO）

東京大学・分子細胞生物学研究所・特任研究員

研究者番号：10534513

研究成果の概要（和文）：PHF2 の個体内における生理機能を明らかにする為、全身性 PHF2 欠損マウスを作出した。本マウスは脂肪萎縮を示し、脂肪滴の縮小、脂肪細胞数の減少が見られた。薬剤誘導性 PHF2 欠損マウス由来の初代培養脂肪細胞を用いた実験から、PHF2 は脂肪細胞分化を促進することを見出した。また、PHF2 は脂肪細胞分化を促進する転写因子である C/EBP $\alpha$  と共役して、転写活性化する事により、脂肪細胞分化を促進している事が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the role of PHF2 in vivo, we have generated systemic PHF2 knockout mice. These mice had less adipose tissue compared to their littermates. Adipose tissue in these mice had decreased size and number of adipocytes. With in vitro study using primary cells from tamoxifen-inducible PHF2 KO, we have clarified that PHF2 promotes differentiation of adipocytes. This seemed to be through coactivation of C/EBP $\alpha$ .

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1600000	480000	2080000
2011 年度	1400000	420000	1820000
年度			
年度			
年度			
総計	3000000	900000	3900000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：転写

## 1. 研究開始当初の背景

近年、転写の調節はクロマチン制御によって行われる事が急速に解明されている。また、クロマチンの制御は、クロマチンを構成するヒストンの修飾による事が分かっている。ヒストン修飾には、リン酸化、ユビキチン化、アセチル化、メチル化などがあり、ヒストンの種類及びアミノ酸により、その効果は変化する。その中でも、ヒストンメチル化は、転写制御に関与する最も重要な修飾であり、H3K4のメチル化は遺伝子発現を正に調節し、H3K9のメチル化は遺伝子発現を負に調節する。ヒストンのメチル化は、可逆的反応であり、ヒストンメチル化酵素とヒストン脱メチル化酵素によって触媒される。

PHF2/ARID5Bは核内受容体に結合し、活性化する転写共役因子である。PHF2はJmJc familyに属し、H3K9me2を脱メチル化する脱メチル化酵素であるが、その活性はprotein kinase A (PKA)によるリン酸化による調節される。PHF2は肝細胞の核抽出物から同定され、肝細胞における機能がin vitroで調べられていたものの、その個体内における機能は明らかではなかった。様々なヒストンメチル化酵素、ヒストン脱メチル化酵素は、脂肪細胞など、細胞の分化決定に関与している事が知られており、PHF2も何らかの細胞分化に関与している事が予想された。

## 2. 研究の目的

PHF2の個体内における機能を明らかにする事を目的とした。

## 3. 研究の方法

PHF2のfloxマウスを作出すべく、ターゲティングベクターを構築した。本ベクターをES細胞に導入し、サザンブロッティングによるスクリーニングを用い、相同組み換え体を取得した。相同組み換え体を、BDF1の8細胞期胚とアグリゲーションする事により、キメラマウスを取得し、キメラマウスを野生型マウスと交配させる事により、ヘテロマウスを取得した。本ヘテロマウスをCMV-Creトランスジェニックマウスと交配させることにより、全身性PHF2欠損マウスを作出した。また、Actb-Flpeトランスジェニックマウスとj交配させる事により、floxマウスを作出した。本floxマウスをCre-ERT2マウスと交配させることにより、タモキシフェン誘導性PHF2欠損マウスを作出した。

## 4. 研究成果

(1) 全身性PHF2欠損マウスは、DNA、RNA、蛋白レベルでPHF2の完全な欠損を確認出来た。また、Cre-ERT2マウスと交配させたところ、4-OHT依存的にPHF2遺伝子が欠損し、発現が減少することを確認した。

(2) 全身性PHF2欠損マウスの致死率を調べた。出生直前の胎児の生存数は正常であった為、胎生致死は示さないと考えられたが、皮膚の色が少し紫に変化しており、軽いチアノーゼがあると考えられた。また、二週令における生存数を調べたところ、約1/3の個体しか生存していない事が明らか

となった。出生後の状態を詳細に調べたところ、生後 3 日までに、2/3 程度の個体が死亡する事が明らかとなった。また、死亡しなかった個体も出生後 2 週までに著しい体重減少を認めた。この体重減少は成長後も持続した。

(3) 5 週令において、全身性 PHF2 欠損マウスの臓器重量を調べたところ、白色脂肪組織重量の減少が見られた。これは、精巣周囲脂肪、皮下脂肪、内臓脂肪全てで同様であった。精巣周囲脂肪組織の切片を作成し、HE 染色を行い、脂肪滴の面積を測定したところ、ノックアウトマウスの脂肪組織においては、脂肪組織の大きさが小さくなっている事が明らかとなった。また、脂肪組織を osmium tetroxide で固定後 8M urea で処理する事により単離し、脂肪組織中に含まれている脂肪細胞数を数えた所、組織中に含まれている脂肪細胞数も減少していた。また、マイクロアレイを用いて遺伝子発現を調べたところ、脂肪細胞分化に関与する遺伝子の発現が低下している事が明らかとなった。

(4) 薬剤誘導性 PHF2 欠損マウスの脂肪組織から stromal vascular cell (SVC) を単離し、4-OHT 処理により PHF2 を欠損させ、脂肪細胞への分化誘導を行った所、脂肪細胞への分化が抑制された。これは Oil Red O 染色及び、脂肪細胞マーカー遺伝子の発現変化によって評価した。また、PHF2 に対する shRNA を用いて 3T3-L1 前駆脂肪細胞の PHF2 をノックダウンしたところ、SVC と同様に脂肪細胞への分化が抑制された。

(5) 脂肪細胞分化に重要な役割を果たす CEBPA と PHF2 の関連を調べた。HEK293 細胞

に対して FLAG-CEBPA を過剰発現させ、免疫沈降を行った所、PHF2 共免疫沈降した為、CEBPA と PHF2 が結合する事が明らかとなった。また、3T3-L1 脂肪細胞に対する ChIP assay により、CEBPA 結合領域に PHF2 がリクルートされている事が明らかとなった。また、PHF2 をノックダウンした脂肪細胞においては、CEBPA 結合領域の H3K9me2 が増加している事が明らかとなった。以上の事から、PHF2 は CEBPA の転写共役因子として脂肪細胞の分化を正に調節する事が明らかとなった。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

①奥野陽亮、大竹史明、今井祐記、加藤茂明

Physiological role of a histone demethylase PHF2 in the regulation of energy metabolism

日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜  
平成 23 年 12 月 14 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

奥野 陽亮 (YOSUKE OKUNO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・特任  
研究員

研究者番号：10534513

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：