

大石 由美子

東京大学大学院医学系研究科

循環器内科・システム疾患生命科学による先端医療技術開発

## 研究テーマ

### 転写因子の翻訳後修飾による代謝ストレス応答機構の解明

#### 1. はじめに

全身のホメオスタシスは複数の代謝臓器間の連携によって維持されている。我々のこれまでの研究成果から、転写因子 Krüppel-like factor 5 (KLF5)が複数の組織において生体にもたらされるストレス情報を集約し、関連する遺伝子発現調節を通して刺激に応答するという重要な役割を担うことが明らかとなった。たとえば、心血管系では外的ストレスに応答し動脈硬化病変の形成にいたる組織リモデリングの際に重要である。一方、骨格筋では、KLF5 が可逆的な翻訳後修飾のひとつである SUMO 化を受けることによって PPAR $\delta$ を介した骨格筋での脂肪酸燃焼の on-off スイッチとして機能することが明らかとなった。これまでに PPAR $\delta$ リガンドをマウスに投与すると脂肪酸燃焼が亢進することが報告され、この作用に KLF5 が必要であることが示唆されるが、PPAR $\delta$ リガンドにより、KLF5 を中心とした転写複合体がどのような遺伝子上に構成されるのか、その詳細は明確ではない。

そこで、今回我々は、骨格筋において PPAR $\delta$ リガンド GW901516 によって SUMO 化 KLF5 から脱 SUMO 化へと変化するとこのこれまでの研究成果を踏まえ、PPAR $\delta$ リガンド GW901516 作用前後で KLF5 が in vivo で相互作用している遺伝子がどのように変化するか、特にエネルギー代謝関連遺伝子の発現にどのように影響するかをゲノムワイドの ChIP-seq 法により解析した。

#### 2. 方法

C2C12 細胞を myobube に完全に分化させたのち、GW501516 1 $\mu$ M を添加、4 時間後に細胞を回収した。添加前のサンプルも同様に回収し、KLF5 に対するモノクローナル抗体を用いた ChIP-sequence (ChIP-454)解析によって解析した。

また、C2C12 myotube に KLF5 特異的な siRNA を導入し、KLF5 の発現を約 1/2 に減少させた細胞群とコントロール siRNA を導入した細胞群、KLF5 ヘテロノックアウトマウスとコントロール野生型マウスから採取した soleus muscle よりそれぞれ RNA を精製し、計 18 サンプル(9 比較)について GeneChip 発現解析(Mouse Genome 430 2.0 Array)を行った。

#### 3. 結果 研究成果

##### 1. KLF5 が相互作用する遺伝子群は PPAR $\delta$ リガンド投与前後で大きく変化する

ChIP-sequence 法の結果、リガンド刺激前のサンプルから 26967 遺伝子、刺激後のサンプルから 26299 遺伝子、計 39504 遺伝子がシーケンスにより同定された。リガンド結合前に KLF5 が結合している遺伝子のうち、リガンド投与後に結合が 50%以上増加するのは 3 遺伝子であったが、残念ながらすべて未知の遺伝子であった。結合が 50%以上減弱するのは 1 遺伝子 (neuregulin 3 (Nrg3): 上皮やグリア、骨格筋細胞の増殖や分化に重要な役割を示すタンパクで、膜貫通型の EGF-like ドメインには ErbB4 が結合する、PNAS 94, 9652, 1999)、リガンド投与後も結合が変化しない遺伝子は 3 遺伝

子であった。PPAR $\delta$ リガンド投与前のサンプルで結合が同定された他の多くの遺伝子は投与後に結合が減弱し、逆に PPAR $\delta$ リガンド投与後のサンプルで結合が同定されたほとんどの遺伝子は投与後に結合が誘導されていた。これは、PPAR $\delta$ リガンドの投与により、KLF5 が相互作用する遺伝子群がかなり大きく変化している可能性を示唆する。ただし、今回の ChIP-sequence 法で結合が同定された遺伝子数（リード数）が 40000 遺伝子弱と少なく、また単回での結果にとどまるため、今後解析手法をさらに向上させより確かな結果を導く必要があると考えている。

## 2. KLF5 が相互作用する遺伝子の半数以上が実際に発現している

結合が確認された遺伝子のうち、どのくらいの遺伝子が実際に培養骨格筋由来細胞C2C12myotubeやマウス骨格筋に発現しているかを検討するため、次に我々はChIP-seqで得られた結果とGenechip発現解析により得られた結果とを総合して検証することとした。PPAR $\delta$ リガンド投与前のサンプルにおいて、ChIP-seqでKLF5の結合4回以上同定され得た遺伝子のうち、C2C12細胞で発現がある遺伝子は71遺伝子であったのに対し、発現がみられない遺伝子は52遺伝子であった。骨格筋サンプルでは同様に発現を認めるのが71遺伝子に対し発現が見られないのは59遺伝子であった。PPAR $\delta$ リガンド投与後のサンプルにおいては、KLF5の結合が同定された遺伝子のうちC2C12細胞で発現がある遺伝子は76遺伝子であったのに対し、発現がみられない遺伝子は37遺伝子、骨格筋サンプルでは同様に発現が見られたのが85遺伝子に対し発現が見られないのは50遺伝子であった。

## 3. KLF5 は骨格筋において複数の代謝に関連した遺伝子と相互作用する

今回の検討で KLF5 が相互作用することが見出された遺伝子のうち、いくつかに着目した。

a. Angptl3 : Angiopoietin-like 3 (Angptl3) は、血管新生に関与する Angiopoietin に相同性を有す遺伝子として見出され、肝臓に多く発現する。血中脂質（特に中性脂肪）レベルが低下しているマウス（KK/Snk マウス）のポジショナルクローニングの結果、血清脂質低下の原因遺伝子は Angptl3 であることが同定された。Angptl3 は N 末端側に coiled-coil 領域を含みこれによって lipoprotein lipase (LPL) 活性を低下させる。また、インスリンやレプチンは Angptl3 の産生を抑制するほか、LXR リガンドは Angptl3 の産生を増加させる。今回の我々のデータでは、骨格筋細胞ならびにマウス骨格筋において発現を認め、PPAR $\delta$  ligand 刺激後に KLF5 がこの遺伝子上に誘導され発現はやや低下する傾向にあった。PPAR $\delta$ リガンドの作用の結果、細胞内の脂質利用が亢進する際に KLF5 が Angptl3 の発現制御にも関連している可能性があると考えられる。

### b. Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (Ror1)

ROR1 はチロシンキナーゼ内蔵型の受容体で、細胞外に WNT 結合ドメインをもち、発生段階で多くの細胞に発現する。WNT5A がリガンドであると近年報告され、ROR1 の発現レベルとリンパ腫などの発癌との相関が明らかとなっている。一方、ROR1 の loss-of function mutation を原因として高度の肥満の表現型を呈する家系が報告されているほか、ROR1 は ApoA1 や ApoCIII の発現調節を介して脂質代謝にも関与する。ROR1 は骨格筋では p300 や PGC-1 と協調して caveolin-3 や carnitine palmitoyltransferase-1(CPT-1)の発現を正に調節する。ROR1 は骨格筋では脂肪酸利用を亢進し脂肪酸燃焼を上昇させる方向に作用する因子であると考えられることができる。今回の我々の解析から、PPAR $\delta$  ligand によって KLF5 が ROR1 遺伝子上に誘導されることが示された。KLF5 と ROR1 は骨格筋において協調して脂肪酸代謝を制御してい

る可能性が示唆された。

#### c. Peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 beta (Ppargc1b)

PGC-1bはPGC-1aと相同性のあるコファクターで、ERR(estrogen related receptor)のリガンドとして機能する。骨格筋特異的 PGC-1b 過剰発現マウスは骨格筋での脂肪酸β酸化が亢進しやせの表現型を示すように、PGC-1bはPGC-1aとならび骨格筋でのミオシンアイソフォームのスイッチングや脂肪酸代謝を直接制御することが報告されている。ROR1の発現制御にPGC-1が関与するとの報告があるが、KLF5はROR1だけでなくPGC-1bとも協調して骨格筋での脂肪酸代謝を制御しているのでないかと考えられる。

#### 4. 考察

今回我々は、骨格筋由来マウス C2C12 筋管細胞において PPARδ リガンド刺激前後で KLF5 の相互作用している遺伝子群がどのように変化しているかを ChIP-454 解析によりシーケンスすることにより同定、評価した。また、同定され得た遺伝子群が C2C12 筋管細胞やマウス骨格筋組織に実際に発現しているかを同様にして得たマイクロアレイデータと紐付けすることによりさらに検討した。ChIP-454 解析によりあまり多くのリード数を検出できなかったことは今回の解析の最大の問題点である。ChIP サンプル回収の手法をさらに最適化することにより、今後より信頼性の高い解析に繋げなくてはならない。また、今回 ChIP-seq で KLF5 の結合が複数同定され得た遺伝子についてその内容を詳細に検討した。非常に限られたサンプルのみの解析であったにもかかわらず、特に PPARs リガンドの刺激後に KLF5 は脂質代謝に関連した遺伝子との相互作用を強め、これらの遺伝子上で転写複合体を形成している可能性を示唆する結果を得た。いくつかの核内受容体など、相対的発現レベルがそれほど多くはないと考えられる遺伝子群との相互作用が明確に示されたのは特に興味深い。KLF5 が SUMO 化の標的であることをこれまでに示したが、SUMO 化をはじめとした翻訳後修飾が遺伝子の発現や機能の調節に関連している可能性が高いことが最近報告されている。今後、エネルギー代謝関連遺伝子群のプロモーターにおける SUMO 化解析、ならびに SUMO 化に必要な酵素のひとつである PIAS1 の ChIP-seq によるゲノムワイドの解析を行うことによって、転写因子翻訳後修飾の代謝疾患及び心血管疾患発症における役割をさらに明確にしてゆきたい。

#### 謝辞

この度は、平成 20 年度研究助成金を頂戴いたしまして、誠にありがたく存じます。病態代謝研究会の関係者の皆様、また審査にあられました理事・評議員の先生方に心より厚く御礼申し上げます。

#### 5. 発表論文、参考文献

1. Oishi, Y., Manabe, I., Tobe, K., Ohsugi, M., Kubota, T., Fujiu, K., Maemura, K., Kubota, N., Kadowaki, T., Nagai, R. SUMOylation of Kruppel-like transcription factor 5 acts as a molecular switch in transcriptional programs of lipid metabolism involving PPAR-delta Nat Med 14: 656-66, 2008