

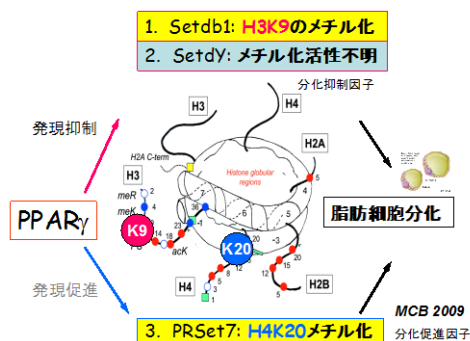
脂肪細胞分化を制御する Set ドメイン蛋白のメチル化酵素活性化能の解析

東京大学 先端科学技術研究センター 代謝医学分野
酒井 寿郎

1. 序論

エピゲノムとは、DNA塩基配列以外のDNAのメチル化とヒストン修飾で維持・伝達される遺伝情報である。これらの修飾の違いにより、同一のゲノムを有しながらも200種類の異なった細胞に分化する。核内受容体PPAR γ は脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであり、脂肪細胞のフェノタイプ獲得のための多くの遺伝子の発現を制御する。脂肪細胞の分化においてもエピゲノムは重要と考えられるが、PPAR γ のエピゲノム制御への関与は全く明らかではなかった。我々は、ChIP on Chip解析によるPPAR γ 標的遺伝子の網羅的解析から、PPAR γ がSetドメインを有する複数のヒストンリジンメチル化酵素遺伝子を標的とし、これらの遺伝子発現を直接制御することで脂肪細胞分

PPAR γ によるエピジェネティックな制御



H3K9のメチル化が脂肪細胞分化を抑制し、H4K20のメチル化が促進することを発見した。すなわち、PPAR γ は、従来知られている転写因子としてのジェネティックな制御とともに、クロマチン構造を改変し、エピジェネティックな制御を行っていることを発見した。

ウイルス強制発現による gain of functionから、SetdYは脂肪細胞分化のネガティブレギュレーターである知見を得ている (図2)。さらに重要なことに、 β カテンンのChIP on Chip解析の結果からSetdYは、Wnt/ β カテニンシグナルの直接の標的であり、Wnt刺激で正に制御されることを見いだした。Wntは間葉系幹細胞を骨分化へと誘導し、逆に脂肪細胞への分化を強力に抑制する分泌

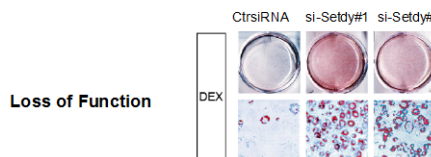
化におけるエピゲノムを制御するという新たなパラダイムを示した (図1)

(Mol Cell Biol, 2009)。PPAR γ 標的の他のSetドメイン蛋白もまた、PPAR γ の下流で調節されながら、時間空間的に必要なエピゲノム修飾を行っていると考えられるが、まだ明らかではない。SetdY遺伝子はPPAR γ 標的の1つとして明らかにされ (図1)、PPAR γ によって負に制御される (図2)。SetdYのRNA干渉によるloss of function、レトロ

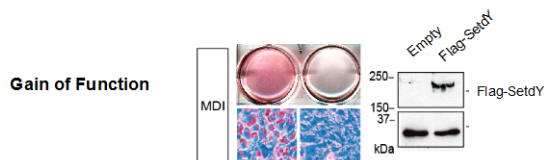
図1

図2

SetdYのRNA干渉によるノックダウンは脂肪細胞分化を促進。



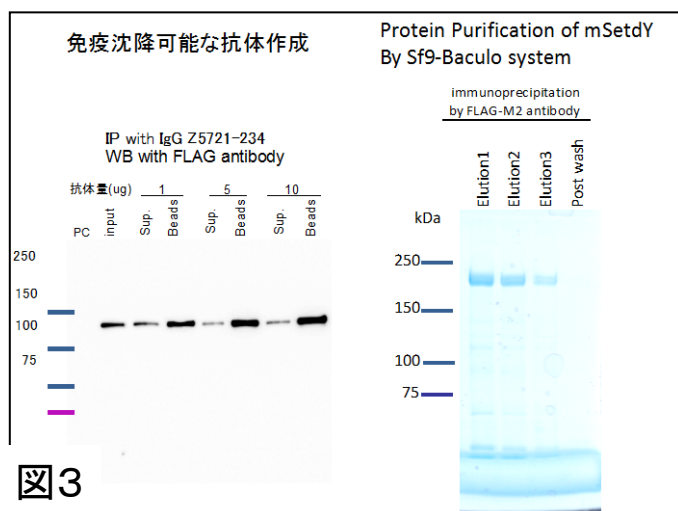
SetdYの過剰発現は脂肪細胞分化を抑制する



蛋白である。SetdYはWntとPPAR γ の直接の制御下にて各々正と負に制御されることから、2つのシグナルの下流で骨または脂肪細胞への分化に必要なエピゲノム変化を制御する “**molecular hub**” であると考えられた。しかし、SetdYが実際にヒストン修飾酵素活性を有するか否かは明らかにされていない。本研究ではまずSetdYのヒストン修飾の酵素活性を明らかにする。またSetdYに対するモノクローナル抗体を作製し、ChIP シーケンス(ChIP seq)によって、SetdYの標的遺伝子とそのヒストン修飾を解析する。さらにSetdYの蛋白複合体解析も行う予定である。

2. 方法

- ①. リコンビナント蛋白の精製：Flagタグをつけた全長またはSetドメインのみのSetdYのcDNAを作製し、大腸菌に発現させ、蛋白を精製する。
- ②. In vitroでの質量分析器を用いたヒストンリジンメチル化 (HKMT) アッセイ：ヒストンH3またはH4 tailのペプチドを10-20アミノ酸長で複数合成し、SetdYの全長またはSetドメインの精製蛋白とS-adenosyl-L-(methyl- 3 H)methionineと30℃で2日インキュベートし、MALDI-TOF MSでメチル化による分子量シフト (プラス14) 解析を行う。
- ③. In vitroでのRI標識S-adenosyl-L-(methyl- 3 H)methionineとリコンビナントSet蛋白を用いたHKMTアッセイ：in vitroにおけるヌクレオソームの再構成を行う。3T3-L1細胞からsalt dilution methodによってヒストンオクタマーを精製する。精製ヒストンとトリチウムラベルS-adenosyl-L-(methyl- 3 H)methionineとをHKMTバッファー中でインキュベートし、SDS-PAGEに電気泳動した後オートラジオグラフィで解析する。変化が見られた場合は精製したヒストンオクタマーのメチル化部位の同定をLC-MS/MSで試みる。
- ④. 以上で困難な場合には、蛋白の翻訳後修飾を受けている可能性を考え、Flag-SetdYの複合体をショ糖濃度勾配法によって精製し、精製蛋白で活性化が取れるかを試みる。もし、これで活性が取れた場合には、そのフラクションのSetdYの翻訳後修飾をLC-MS/MS解析を行う。O-GlcNAcであれば解析可能である。
- ⑤. リコンビナントタンパクの代わりにHeLa細胞など大量培養が比較的容易な細胞にFlag-SetdYを発現させ、上記のin vitroでのHKMT活性を解析する。
- ⑥. SetdYの複合体を明らかにする。Flag-SetdYの安定発現細胞をFlagのカラムで精製したのち、ショットガンプロテオミクス解析を行い、複合体の解析を行う。これにより、活性化に必要な蛋白複合体の同定を行う。



な蛋白複合体の同定を行う。

- ⑦. モノクローナル抗体作製。現在免疫中のSetdY抗体を精製し、内在性蛋白の同定、ChIP seq解析に供する。

3. 研究成果

1. バキュロウイルスを用い、SetdYのN末端のモノクローナル抗体作成に成功した(図3)。この抗

体は免疫沈降可能であり、今後プロテオミクスやチップシーケンシングに供する。

2. Sf9昆虫細胞にウイルスを感染させ、SetdY蛋白の精製を行った。
3. ヒストンリジンメチル化アッセイでは、Sf9昆虫細胞で発現させた蛋白では、未だに活性は認められていない。ヌクレオソームの再構成を行い、EZH2をポジティブコントロールとして行った。バキュロウイルスを用い、免疫沈降可能なモノクローナル抗体の作成に成功した。これを用い、今後チップシーケンシングや複合体解析を行う予定としている。
4. 骨髄由来幹細胞を用いた実験では、SetdYを強制発現することで骨化が強力に誘導された(図4左)。

SetdY過剰発現細胞は骨分化を強力に誘導した。

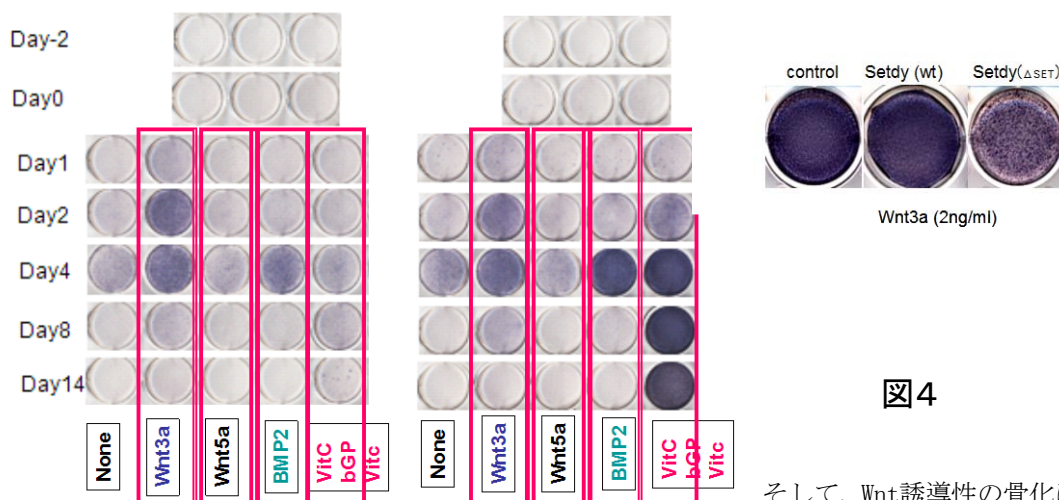


図4

そして、Wnt誘導性の骨化は

Setドメインを欠損させたSetdYを発現させることで抑制されることから(図4右)、SetdYの機能ドメインはSetドメインにあること、そしてWnt誘導性の骨化のシグナル経路にあることが示唆された。

4. まとめ

SetdYは脂肪細胞分化を抑制する一方、骨髄由来幹細胞を骨化に誘導する鍵となる蛋白であることが解明された。メチル化能については未だ明かではない。今後、SetdYのモノクローナル抗体を用いたチップシーケンシングにより、標的となる遺伝子を同定していくとともに、プロテオーム解析からwntシグナルとの関連について解析を進めていく予定である。

5. 参考文献

1. Wakabayashi K, Okamura M, Tsutsumi S, Tanaka T, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H, Sakai J: (2009) 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.
2. Okamura M, Kudo H, Wakabayashi KI, Sakai J.* et al. (16名中16番目) (2009) 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.
3. Inagaki T, Tachibana M, Magoori K, Sakai J.* et al. (10名中10番目) (2009) Obesity and Metabolic Syndrome in Histone Demethylase JHDM2a Deficient Mice. *Genes to Cells*, 14, 991-1001.