

審査の結果の要旨

氏名 Rozqie Royhan ロズキ ロイハン

本論文は、「Phospho-JMJD1A-dependent SWI/SNF Complex Regulates Energy Expenditure in Brown Adipocytes」(ヒストン修飾酵素 JMJD1A と SWI/SNF 複合体による熱産生遺伝子の発現機構に関する研究)と題し、褐色脂肪細胞でのヒストン脱メチル化酵素 JMJD1A の生理的役割について述べている。褐色脂肪細胞において JMJD1A は寒冷刺激(交感神経刺激)に応答して、脂肪酸酸化に関わる *Ppara* や熱産生に関わる *Ucp1* の遺伝子プロモーター領域に結合し、これら遺伝子の転写を促進することが報告されている。すなわち、JMJD1A は生体内でのエネルギー消費において重要な役割を担っていると考えられているが、JMJD1A による代謝関連遺伝子の制御メカニズムの詳細は未だ明らかとなっていない。本論文では、交感神経刺激を与えた褐色脂肪細胞での遺伝子発現変化と抗 JMJD1A 抗体を用いた ChIP-seq データを統合し、JMJD1A の標的遺伝子を網羅的に解析した。さらに、それらの遺伝子群の中で熱産生経路の上流に位置する $\beta 1$ アドレナリン受容体遺伝子 (*Adrb1*) に着目し、その遺伝子の転写制御機構の解明を行った。

第一章では、褐色脂肪細胞における β アドレナリン受容体 (β -AR) アゴニスト Isoproterenol (ISO) 刺激後のトランスクリプトーム解析と JMJD1A の ChIP-seq 解析を統合したバイオインフォマティクス解析から、JMJD1A が標的とする代謝関連遺伝子 *Adrb1* ($\beta 1$ アドレナリン受容体)、*Ucp1* (ミトコンドリア脱共役タンパク質) などを見出した。さらに、JMJD1A は転写因子結合部位 PPAR、EBF、AP2 などに局在することも見出した。

第二章では、JMJD1A が交感神経刺激下で cAMP-PKA シグナルによって Ser265 にリン酸化修飾を受けるという先行研究(当研究室)から、内源性 JMJD1A を shRNA によってノックダウンした褐色脂肪細胞に、ヒト JMJD1A の野生型 WT あるいは変異型 S265A を安定的に発現させた細胞を樹立し、代謝関連遺伝子 *Adrb1* および *Ucp1* の発現変動を解析した。その結果、WT 細胞では ISO 刺激によって、これら遺伝子の発現上昇が認められるのに対し、S265A 細胞では認められなかった。これより、交感神経刺激による代謝関連遺伝子 *Adrb1* および *Ucp1* の発現誘導には JMJD1A-Ser265 のリン酸化が必須であることを示した。

第三章では、リン酸化 JMJD1A による *Adrb1* および *Ucp1* 遺伝子の転写

制御が、JMJD1A によるヒストン脱メチル化を介した現象であるか否かを明らかにするために、*in vitro* でリン酸化 JMJD1A の H3K9 脱メチル化酵素活性を測定した。その結果、JMJD1A のリン酸化はヒストン脱メチル化酵素活性に必須でないことが示された。このことは、ISO 刺激後の褐色脂肪細胞において、*Adrb1* および *Ucp1* 遺伝子領域の H3K9me2 レベルに変化がないことと合致している。

第四章では、リン酸化 JMJD1A の脱メチル化酵素活性非依存的な遺伝子転写制御機構を明らかにするために、JMJD1A のリン酸化依存的に結合するタンパク質群の同定を試みた。その結果、JMJD1A がリン酸化依存的にクロマチンリモデリング因子 SWI/SNF および転写因子 PPAR γ と結合することを見出した。さらに、JMJD1A のリン酸化部位の変異体 S265A では、SWI/SNF との結合が抑制され、また SWI/SNF をノックダウンすると JMJD1A と PPAR γ との結合が抑制されることから、リン酸化 JMJD1A は SWI/SNF を介して、PPAR γ と結合することが示唆された。

第五章では、褐色脂肪細胞における *Adrb1* 遺伝子領域のヒストン修飾および JMJD1A、PPAR γ 、SWI/SNF サブユニットの局在を ChIP-seq 解析によって明らかにした。*Adrb1* 遺伝子本体から -44 kb (E1) および -22 kb (E2) 上流には、H3K27ac レベルが高く、この 2 領域は *Adrb1* 遺伝子のエンハンサーであることが想定された。これらの領域には、PPAR γ が局在しており、ISO 刺激によって JMJD1A および SWI/SNF サブユニットの局在が促進されることを見出した。

題六・七章 では、リン酸化された JMJD1A による *Adrb1* 遺伝子の転写制御機構の詳細を解明するために、ISO 刺激後の *Adrb1* 遺伝子のクロマチン高次構造変化とプロモーター活性との関連に着目した。その結果、ISO 刺激によって、*Adrb1* 遺伝子の E1 領域、E2 領域およびプロモーターが近接し、*Adrb1* 遺伝子の転写が ON になるという新規の転写制御機構を証明した。

加えて、フラックスアナライザーを用いた、細胞内酸素消費の測定によって、JMJD1A のリン酸化は、褐色脂肪細胞におけるエネルギー消費を促進することを明らかにした。

以上、本論文は、交感神経刺激によってリン酸化された JMJD1A が、SWI/SNF および PPAR γ と複合体を形成し、これが *Adrb1* 遺伝子のエンハンサーにリクルートされることで、クロマチン高次構造変化を介した *Adrb1* 遺伝子の転写が促進されることを明らかにした。本研究内容は、肥満・生活習慣病に関連したエネルギー消費機構の解明に貢献する成果と考えられる。

よって本論文は博士（学術）の学位請求論文として合格と認める。