

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成29年度

受付番号 843

氏 名

八幡 隆一

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: New York (国名: アメリカ合衆国)
2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。
MED1 アイソフォームによるメディエーター複合体の生化学的性質と機能の変化
3. 派遣期間: 平成 29 年 8 月 1 日 ~ 令和 1 年 7 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名
The Rockefeller University / Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology
5. 所期の目的の遂行状況及び成果 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入のものも可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

申請者は哺乳類の Mediator 複合体サブユニット Med1 には、従来から知られている約 200kDa の Med1(Med1L)の他に、同遺伝子座から Alternative Splicing によって生成される短いアイソフォーム(Med1S)が存在することを見出した。本研究では、生体内における各アイソフォームの発現様式の解析、遺伝学的手法を用いたマウスにおける機能解析、そして生化学的手法によるアイソフォームによるメディエーター複合体の性質変化を解析することによって明らかにすることを目的として研究を開始した。また、並べて計画当初には予定していなかったものの ES 細胞および脂肪細胞における Med1 そのものの機能解析を行い、Med1 が必須な役割を果たす生命現象の一端を明らかにした。

1) Med1S/ Med1L の発現様式

申請者ははじめにマウス組織およびヒト由来のガン細胞において両アイソフォームの mRNA 発現量を確認した。その結果、発現量比に若干のばらつきはあるものの両アイソフォームはほとんどのサンプルに発現していることが確認された。次に、これら mRNA がタンパク質に翻訳されていることを確認することを試みた。研究開始当時には既存の抗 MED1 抗体が全て Med1L のみを認識するものであったことから、マウス ES 細胞において Epitope tag のノックインを行うことで検出を試みた。その結果、Med1S/Med1L がタンパクとしてほぼ等量検出されることが確認した。一方で、ヒト胎仔腎臓由来の細胞である HEK293 細胞で同実験を行なったところ、mRNA レベルでは両アイソフォームともに検出可能であるがタンパクレベルでは Med1L しか検出されなかった。これらのことから、生物種間あるいは細胞種間でこれらタンパクの量比が大きく変化していることが示唆された。

そこで、マウス ES 細胞において eGFP および kusabira Orange をアイソフォーム特異的な Exon にノックインすることで両アイソフォームの発現を可視化することが可能な系を確立した。現在はまだマウスの作成には至っていないが、ES 細胞を用いた分化誘導時に両アイソフォームの量比にどう変化があるかを現在解析している。また汎用性も考慮し Med1S/L に共通のタンパク質領域を免疫原として抗 MED1N ポリクローナル抗体の作製を試みたが、今のところこのポリクローナル抗体は力価が弱く、免疫染色に使用できるレベルのものは得られていない。

2) Med1S/ Med1L の機能的差異

Med1S/L の両アイソフォーム間の機能的差異を調べることが可能な実験系を構築するため、まずは Med1 欠損時に表現型が顕著に見える現象を検討した。まず、Med1S の発現が確認されたマウス ES 細胞に着目し、Med1 ヘテロ欠損マウス同士の交配により得られた胚盤胞から雄のマウス ES 細胞を複数株樹立し Med1 欠損 ES 細胞の表現型の解析を行った。その結果、多能性を強固に維持する 2i/LIF 培養条件下では、Med1 欠損 ES 細胞はゲノムワイドな遺伝子発現パターンも同腹由来の野生型 ES 細胞と比較してもほとんど変化を見せず、正常なコロニー増殖能を示した。さらに、LIF 非存在条件下での Spontaneous な分化能もコントロールと比較してあまり顕著な差がみられなかった。これらのデータから、ES 細胞は Med1S/Med1L の機能差を検討する実験系としては適さないと考えられた。

本研究を行っている期間中に、ES 細胞をモデルとして Med1 の Intrinsically disordered region を介して Mediator 複合体を含めた転写共役因子群が相分離を呈し、更に DNA 結合性の転写因子は転写活性化ドメインを介してこの転写共役因子群にアクセスしているというモデルが Young らから提唱された。しかしながら、申請者のこの ES 細胞の実験から、そもそも Med1 自体が ES 細胞における転写プログラムそして細胞の形質維持には必須ではないことが明らかであり、更には Med1 欠損マウスが胎生中期まで比較的正常に発生が進むことを考えると、Med1 自身に転写における普遍的な機能があるとは考えにくい。これらのことから、細胞における転写共役因子群の集積がどのように形成されるのか、そしてその生物学的意義は何かを再検証するきっかけとなるデータであると考えている。

次に、MED1 は脂肪細胞の分化・機能において必須な役割を果たす核内受容体 PPAR γ にとって必須な転写共役因子であることが当研究室から報告されていたことから脂肪細胞の分化誘導に使用される培養細胞株である 3T3L1 に着目した。CRISPR/Cas9 法を用いて MED1 を KO し、そこに各種アイソフォームを異所的に発現させることで両アイソフォームの脂肪細胞誘導における機能を解析した。その結果、(i) 確かに MED1 は 3T3L1 の脂肪分化に必須であること、(ii) Med1S は脂肪細胞の分化誘導能の再獲得には不十分であること、そして (iii) MED1L を発現させた場合のみ脂肪細胞の分化が誘導されることが観測された。分化誘導時の時系列的な遺伝子発現解析から、Med1S のみの発現では脂肪細胞の形成に必須な PPAR γ が誘導されないことがわかった。このことから、3T3L1 においては実際に Med1S/L には機能的差異が存在し、PPAR γ の上流においては Med1L が必須であることが明らかとなった。今後さらに、両アイソフォームの生理機能を知るために各アイソフォーム一つしか発現することができないマウスを作成しているところである。

また、上記の ES 細胞のように細胞の機能を発揮するうえで Med1 自身がそもそも必須ではないケースが存在することから、まずは Med1 の生理的機能を個体で明らかにすることが重要であると結論づけた。そこで、3T3L1 細胞の結果をもとにまずは脂肪細胞の形成および機能における MED1 の必要性を検討することを計画した(以下 (3))。

3) Med1 の生理的機能解析

当研究室を含めた複数のグループの先行研究から、主に生化学的手法を用いて Med1 が核内受容体の転写活性に必須のサブユニットであることが提唱されており、実際に核内受容体 PPAR γ を強制発現した胎児線維芽細胞の脂肪分化にも Med1 は必須であることが報告されている。一方、この実験系における脂肪分化能の獲得には、核内受容体との直接の結合能を持たない短い変異体の Med1 で十分であるという知見がその後に報告され、核内受容体とその機能を果たす際に Med1 がどのように作用しているのかを細胞および個体レベルで見直す必要があると考えられた。

申請者は、コンディショナルノックアウトマウス (cKO マウス) を用いて Med1 がそもそも脂肪細胞の分化・成熟に必須かどうかを検討し、その表現型を PPAR γ 欠損マウスの表現型と比較することで PPAR γ の活性に必須の因子であるかを検証することを計画した。Myf5^{Cre} (褐色脂肪細胞および筋肉特異的) および Adipo^{Cre} (全脂肪前駆細胞特異的) を用いて褐色および白色脂肪細胞の分化・機能そして性質維持に必須であるかを検討した。同ストラテジーによる、脂肪細胞の分化に必須な PPAR γ の cKO マウスは、白色および褐色脂肪組織をほぼ欠損することが報告されている。これまでの先行研究が提唱するように Med1 が PPAR γ の転写活性に必須であるならば、PPAR γ cKO マウスと同様の脂肪組織の欠損するであろうという予測のもと研究を開始した。

(a) Myf5^{Cre} Med1-cKO マウス

褐色脂肪細胞の分化および組織形成における Med1 の機能を調べる目的で、褐色脂肪細胞の発生学的 Origin となる Dermomyotome で Cre リコンビナーゼを発現する Myf5^{Cre} マウスを用いて Med1 コンディショナル欠損 (cKO) マウスを作製した。このマウスは、周産期においてはコントロール群と比較して若干小さいものの、組織学的にはほぼ正常な褐色脂肪組織を有しており、PPAR γ の発現も確認された。このことから、Med1 自体は褐色脂肪組織の形成そのものには必須ではないことがわかった。一方で、胎生 17.5 日齢マウスの褐色脂肪組織を外科的に単離し、網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ熱産生機能を担う遺伝子である Ucp1 や Dio2、そして Cox8b などの代表的な遺伝子群の発現がコントロール群と比較して顕著に低いことが明らかとなった。また、実際に新生仔を母親マウスから単離して数分後に体温を測定すると、cKO マウスは同腹の対照群と比較して顕著に 1-2℃ほど低い体温であった。このことから、Myf5^{Cre} Med1-cKO マウスは褐色脂肪細胞組織の分化・形成はおこるものの、機能遺伝子の発現に異常があること

がわかった。

一方、このマウスは出生後一週間を過ぎると顕著な発育異常を伴い、離乳期を過ぎると致死になることがわかった。この発育異常が見られる時期において、肩甲骨領域の褐色脂肪組織は周産期同様にきちんと組織が確認される一方で、その周りを取り囲む一部の白色脂肪組織が顕著に縮退していることが観察された。肩甲骨領域の白色脂肪細胞は約半分を Myf5 陽性細胞を起源としていることが報告されており、Myf5^{Cre} マウスを用いた Med1 を欠損する実験においてはそれらの白色脂肪細胞が顕著に影響を受けていることが示唆された。

Myf5^{Cre} Med1-cK0 マウスの死因は現在解析中であるが、褐色脂肪細胞を欠損するマウスが比較的正常に発育することなどを考慮すると、褐色脂肪細胞の機能異常が原因であるとは考えにくい。Myf5 陽性細胞は、骨格筋、一部の表皮細胞、そして脳のごくわずかな領域に寄与することがわかっており、一番の候補として骨格筋が考えられる。生後 10 日齢の骨格筋の遺伝子発現を解析したところ、Myf5^{Cre} Med1-cK0 マウスは胎児型の Myosin heavy chain(MyHC)の発現が高いままであり、成体型の MyHC の発現に移行しないという表現型が見られた。これらのことから骨格筋の成熟においても MED1 が重要な機能を持つことが示唆された。

(b) Adipo^{Cre} Med1-cK0 マウス

白色脂肪細胞特異的な Cre モデルが存在しないことから、白色・褐色含めすべての脂肪細胞で Cre を発現する Adipo^{Cre} マウスを用いて、白色脂肪細胞への成熟過程において Med1 を欠損するモデルを作製し解析した。この変異体マウスは、離乳期までは正常な脂肪組織をもつものの、離乳期を過ぎると、白色脂肪細胞組織である Visceral adipose tissue および Subcutaneous adipose tissue が著しく縮退・欠損する lipodystrophy が確認された。この白色脂肪組織の欠損に伴い、異所的に脂肪滴が沈着した脂肪肝の形成、膵島の肥大化、さらに全身性のインスリン抵抗性を示し、糖尿病様の病態を示すことがわかった。以上より、Med1 は生体において白色脂肪細胞の成熟化および機能維持に必須な機能を担うことが確認された。

4) Med1/Mediator の生化学的解析

Med1 ノックアウトマウスの機能解析をする際に、表現型が Med1 欠損そのものに起因するのか、もしくは Med1 を欠損することによりおこる Mediator 複合体の質的な変化に起因するのか（複合体から離脱する因子や、新たにそこを補填する因子があるのか）を検討することが必要であった。そこで申請者はアフィニティー精製により Mediator 複合体を回収する目的で CRISPR/Cas9 法を用いて MED10 にタグをノックインした HEK293 細胞を樹立した。この細胞株において MED1 を再び CRISPR/Cas9 法を用いてノックアウトし、各細胞株から様々な手法を用いて完全な Mediator 複合体と、MED1-KO/Mediator 複合体の精製を試みた。この過程で、界面活性剤などの処理に対して MED1-KO/Mediator 複合体は不安定であり Med1 に近接する MED4, MED7, MED9 が剥がれやすい一方で、界面活性剤を使用せずイオン交換カラムを用いて高塩濃度で溶出される画分からアフィニティー精製を用いた手法においては MED1-KO/Mediator 複合体は MED1 のみを欠失し他のサブユニットは離脱しないことが確認された。またこの複合体に結合する因子を、質量分析を行い網羅的に解析したところ、MED1 欠損 Mediator は RNA Polymerase II 複合体と結合しやすいことがわかった。（ただし、この Pol II との結合能が向上している様子は細胞の抽出液から免疫沈降した際は観察されず、普段はこのような結合はおきないものの、両者しか存在しない条件下においては結合しやすいということが示唆された）。以上より、Med1-KO/Mediator 複合体は完全な Mediator 複合体と比較して不安定ではあるが生理的条件下では他のサブユニットの離脱を伴わないことが明らかになった。引き続き、MED1S の生理的機能が明らかにしたのち、その表現型の原因を担う遺伝子座の転写活性化機構を MED1-KO/Mediator、Intact Mediator、MED1L-Mediator、そして MED1S-Mediator を並べて生化学的に解析する予定である。

まとめと今後の予定

本研究において、マウスの細胞において実際に Med1S と Med1L がタンパクとして発現していることが確認され、両アイソフォーム間で機能的に差異があることが示唆された。今後、生体組織において、これらの量比がいかに制御されているかを解析することが課題である。Mediator は増殖期の細胞において、Pol II の約 1/10 程度の量で存在する転写共役因子（5000 コピー/培養細胞）であり、現在は組織レベルで定量性のある検出方法の検討をしている。また、各アイソフォームの機能に関しては、単一のアイソフォームしか発現しないマウスのコンストラクトの検討を終え、マウスの作製に着手している。これらのマウスの表現型解析からこのアイソフォームの使い分けとその意義に迫りたいと考えている。

MED1 の生理的機能を解析する目的で解析を進めたマウス脂肪細胞においては、(a)MED1 は褐色脂肪細胞の形成には必須ではないが、正常な機能に必須であること、そして(b)離乳後の白色脂肪組織の機能および維持に必須であり、Adipo^{Cre} Med1-cK0 は白色脂肪組織をほぼ欠損するという非常に興味深い表現型が得られた。現段階では、白色脂肪細胞のオリジンで作動する特異的な Cre 発現モデルがないため、白色脂肪細胞の形成に Med1 が必須かどうかは結論づけることができないが、今後いくつかのアプローチを用いて検証予定である。

一方で、PPAR γ -cKO マウスにおいて周産期以降全ての脂肪組織が形成されないという強烈な表現型と照らし合わせると、Med1-cKO マウスのそれはPPAR γ のものよりもかなりマイルドである。この表現型の違いが、脂肪細胞の形成・機能に必須なPPAR γ の機能減弱によるものなのか、PPAR γ と協調して働くPPAR γ 以外の因子の機能異常であるのかを現在は検討している。現在、Med1 依存的にMediator に結合する核内因子のスクリーニングを終えたところであり、PPAR γ の機能を制御する候補因子を得ている。また、Med1-cKO マウス由来の脂肪組織サンプルにおけるMediator 複合体およびRNA PolymeraseII の局在をCUT and RUN法を用いて網羅的に解析しているところである。これによって、Med1によって直接制御される表現型に重要な遺伝子座の同定を行い、研究室独自の試験管内転写再構成系を用いて、脂肪組織において重要な遺伝子座の転写制御機構を明らかにしたいと考えている。