

令和元年6月10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K15026

研究課題名(和文)代謝における転写後制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)The analysis of post-transcriptional regulation for metabolism

研究代表者

伊藤 義晃(Yoshiaki, Ito)

東京医科歯科大学・統合研究機構・助教

研究者番号：50511044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：代謝に重要なRNA結合タンパク質のスクリーニングを行った結果、FGF21およびPGC-1レポーターを上昇させるZF-1を同定した。ZF-1ノックアウトマウスを作製し高脂肪食による肥満モデルを行った結果、ノックアウトマウスの体重増加が減少し、ZF-1が代謝に関与している可能性が示された。またルシフェラーゼ遺伝子の3'-UTRに約5000の全長cDNAを挿入したレポーターライブラリーを用いて転写後制御因子の標的遺伝子をスクリーニングするシステムを開発し、ZF-1の標的遺伝子解析を行い、ZF-1が炎症性サイトカインの発現を促進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、代謝に関わる可能性のある遺伝子としてZF-1を同定した。ZF-1は機能不明なRNA結合タンパク質であり、ノックアウトマウスでは高脂肪食モデルによる体重増加が少ないことから代謝に関わる重要な遺伝子であることが考えられる。またZF-1は代謝に重要なFGF21やPGC-1、炎症性サイトカインを制御している可能性が示唆された。ZF-1による転写後制御機構は、これまで分かっていない代謝制御メカニズムの1つである可能性があり、肥満やメタボリックシンドロームに関わる新たな分子機構の解明に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：High throughput screening using RNA-binding protein (RBP) gene library including 1,200 RBP genes and reporter vectors in which the luciferase gene included 3'UTRs of FGF21 and PGC-1 in its 3'UTR was performed, and identified ZF-1 as a positive regulator of both FGF21 and PGC-1 reporters. ZF-1 knockout mice gained less weight than wild-type mice on high-fat diet model. In addition, we developed reporter library system, which is a target screening system for post-transcriptional regulators using reporter library in which included about 5,000 full-length cDNA in the 3'UTR. This system identified that ZF-1 promotes the inflammatory cytokines.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA結合タンパク質 転写後制御 代謝

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の食生活の欧米化や運動不足に伴い、我が国では生活習慣病の原因となり得る肥満の罹患率が増加の一途をたどっている。肥満は、エネルギー代謝のバランス異常により組織内での脂質が過剰蓄積することにより生じる。近年、寒冷刺激などにより白色脂肪組織中にエネルギー消費を促す褐色脂肪様細胞（ベージュ細胞）が誘導されることが明らかとなり、肥満治療への応用に期待が高まっている。このベージュ細胞化に関わる因子はいくつか同定されているが、その中で脂肪組織・骨格筋・マクロファージ・肝臓などの各臓器・細胞間において、生理活性物質を介したクロストークが代謝機構に重要であることが明らかとなってきた。FGF21 は、筋・脂肪・肝細胞などで発現する分泌タンパク質で、筋細胞や脂肪細胞から寒冷刺激や運動により分泌され、グルコース取り込みの促進、白色脂肪細胞の褐色脂肪化（ベージュ細胞化）、エネルギー消費の亢進、脂肪量低下の促進などの効果を持つ重要なサイトカインであることが示唆されているが、我々は、この FGF21 を AU-rich element (ARE) を介して制御する RNA 結合タンパク質 (RBP) を、遺伝子ライブラリーを用いたスクリーニングにより明らかにした。さらに、白色脂肪細胞の褐色脂肪化を促すマイオカインである Irisin や、褐色脂肪化に関わる UCP-1 遺伝子などの発現誘導に関わる代謝に重要な転写コファクターである PGC-1 α は、脂肪細胞において FGF21 刺激により mRNA 量の変化は見られないが、タンパク質量の増大が見られることが報告されている (Fisher et al. Gene Dev 2012)。これらの結果は、代謝制御に重要な FGF21 や PGC-1 α が積極的に転写後調節を受けている可能性を示唆している。しかしながら、これら遺伝子の転写後制御メカニズムについては良く分かっていない。

2. 研究の目的

我々は、1,126 個の、転写後制御の中心的エフェクターである RBP の発現ベクターライブラリー (RBP ライブラリー) を構築し、本 RBP ライブラリーと、ルシフェラーゼ遺伝子の UTR を、興味ある遺伝子の UTR に置換したレポーターベクターを用いた High through-put transfection screening (HTS) を開発した (図 1)。本研究では、①RBP ライブラリーを用いた HTS 法による、FGF21 および PGC-1 α の転写後制御因子の同定、②スクリーニングにより同定した RBP の CRISPR/Cas9 システムを用いたノックアウトマウスの作製・解析および、③細胞・分子レベルでの機能解析を行い、代謝制御に重要な新規 RBP を同定し、個体・分子レベルで代謝における機能を明らかにすることを目的とする。

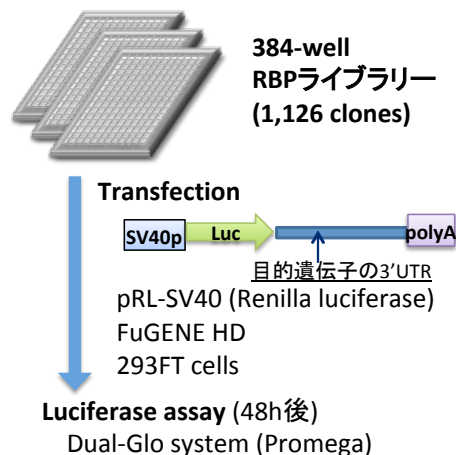


図1 High-throughput transfection screening (HTS) system

3. 研究の方法

代謝に関与する転写後制御因子を同定するために、1万遺伝子以上の発現ベクターライブラリーから、Gene Ontology における機能が RNA binding となっているもの、RNA 結合タンパク質 (RBP) に多く見られるモチーフであるジンクフィンガーを有している遺伝子を 1,126 個ピックアップした RBP ライブラリーを構築した。転写後制御を受けていることが予想される、代謝機構に重要な遺伝子である PGC-1 α および FGF21 の 3' UTR 領域をホタルルシフェラーゼ遺伝子の 3' UTR に挿入したレポーターベクターを作製し、このレポーターベクターと、内部コントロール用のウミシイタケルシフェラーゼベクター、RBP ライブラリーを 384-well plate 上で 293FT 細胞にコトランスフェクションし、48 時間後に Dual-Glo luciferase assay system (Promega) を用いてそのレポーター活性を計測した。PGC-1 α 又は FGF21 の 3' UTR を挿入したレポーターの活性を上昇あるいは低下させる RBP を抽出し、96-well plate スケールでの二次スクリーニングによって確認した。上記スクリーニングで同定された RBP について、CRISPR/Cas9 システムを用いたノックアウトマウスの作製・解析を行った。

また、RBP の機能を明らかにする上で重要な標的遺伝子について、FGF21 や PGC1 α 以外にも調査する。標的遺伝子の同定方法として、RNA-seq などのトランスクリプトーム解析、CLIP (UV cross-linking and immunoprecipitation) や RIP (RNA immunoprecipitation) などの RBP と標的 RNA の結合解析、RBP の結合配列からの予測を、単独あるいは複合的に用いて行うことが主流である。しかしながら、トランスクリプトーム解析では翻訳制御 RBP の場合、標的 mRNA の発現の変化がなくタンパク質レベルでのみ発現が変化する場合、同定が困難である、RBP と RNA の結合解析では必ずしも機能的な標的となっていない RNA も検出されてしまう場合がある、結合配列からの予測では未知の RBP では使用できないなどの問題点がある。我々は、ルシフェラーゼ遺伝子の 3' UTR に全長の cDNA を挿入したレポーターライブラリーを構築し、興味ある転写後制御因子の発現ベクターと細胞に導入してルシフェラーゼアッセイベースのスクリーニン

グを行う新しい転写後制御因子の標的遺伝子スクリーニング方法の開発を試みた。本手法は、ルシフェラーゼ活性を測定することで評価するため、タンパク質レベルの変化が観察でき、活性変化を伴う標的を同定することが可能で、また結合配列の分からないものでも評価可能であるという利点がある。

4. 研究成果

FGF21 および PGC-1 α の 3' UTR をルシフェラーゼ遺伝子の 3' UTR に挿入したレポーターを作製し、約 1200 個の RNA 結合タンパク質 (RBP) 遺伝子やジンクフィンガータンパク質などを含んだ、RBP ライブラリーを用いて、ハイスループットスクリーニングを行い、FGF21 および PGC-1 α の発現を変化させる遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、FGF21 および PGC-1 α 両方のレポーター活性を上昇させる遺伝子として、zinc finger 型の RNA 結合タンパク質である ZF-1 を同定した。また ARE に変異を導入した FGF21 レポーターベクターを用いたルシフェラーゼアッセイより、ZF-1 は ARE を介して FGF21 を制御していることが示された。本遺伝子について、CRISPR を用いて本遺伝子のノックアウトマウスを作製した。ZF-1 ノックアウトマウスは、問題なく発生し、出生後の体重についても変化はなかった。しかし、ZF-1 ノックアウトマウスを用いて高脂肪食モデルを行った結果、ZF-1 ノックアウトマウスの体重増加は、野生型と比べて減少することが分かった (図 2)。以上の結果から、ZF-1 が代謝に関与している可能性が示された。

また転写後制御因子の標的遺伝子を同定する新しいシステムの開発に成功した。ルシフェラーゼ遺伝子の 3' UTR に、約 5000 の全長 cDNA を挿入したレポーターライブラリーを作製し、興味ある RBP や microRNA (miRNA) などとともに細胞へ導入することで、レポーター活性からそのターゲット遺伝子をスクリーニングするシステムである (図 3)。これを用いてがん抑制 miRNA としてよく知られ、標的遺伝子が多く同定されている miR-34a を含む miRNA の標的遺伝子の同定に成功した (図 4; Ito et al, PNAS 2017;

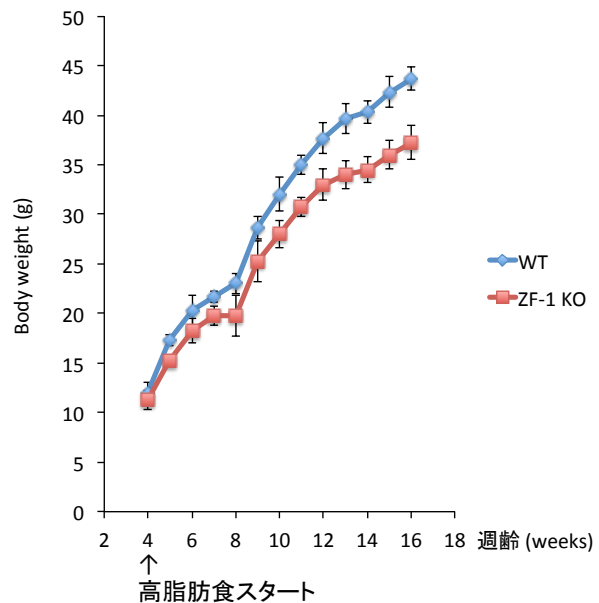


図2 高脂肪食モデルによるZF-1ノックアウトマウスの体重変化

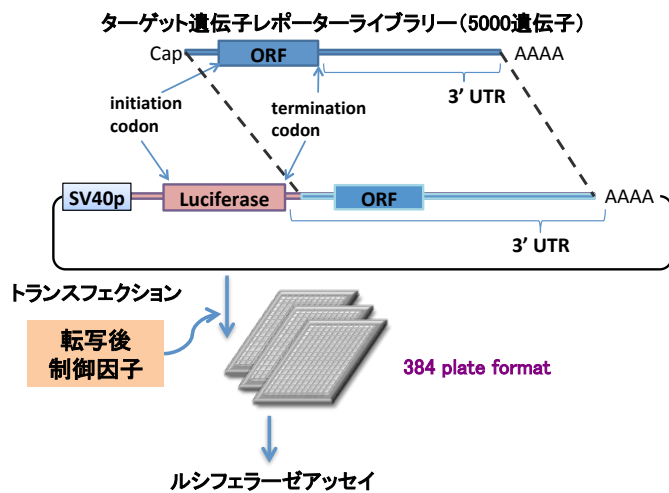


図3 レポーターライブラリーによる転写後制御因子の標的遺伝子スクリーニングシステム

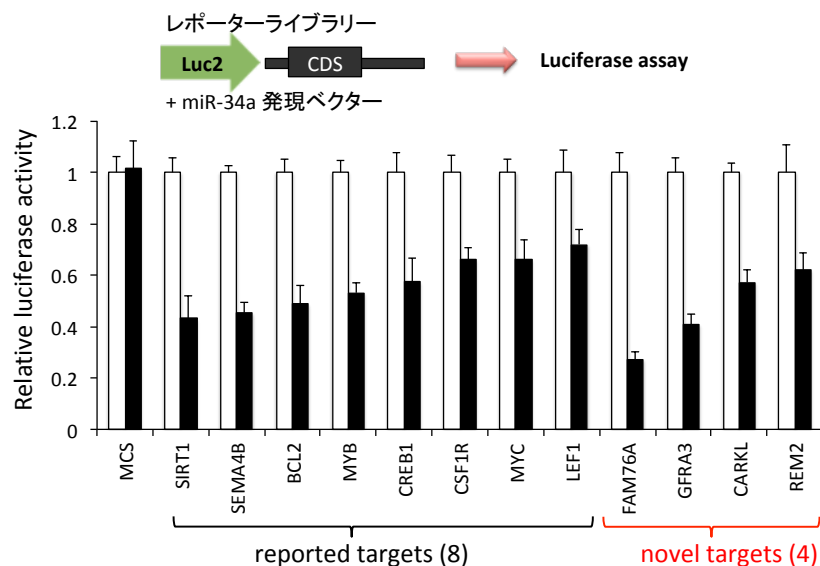


図4 レポーターライブラリーによるmiR-34aの標的遺伝子スクリーニング

Mitsumura and Ito et al, Blood Adv 2018)。また RBP への応用が可能であることを、よく知られている RBP である TTP を用いた解析により明らかにした。本システムを用いて ZF-1 の標的遺伝子の解析を行った。その結果、ZF-1 が TNF α などの炎症性サイトカインの発現を促進している可能性を明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. T. Mitsumura*, Y. Ito*, T. Chiba*, T. Matsushima, R. Kurimoto, Y. Tanaka, T. Kato, K. Uchida, T. Ito, K. Yamamoto, Y. Eishi, M. Kitagawa, Y. Miyazaki, N. Inase, H. Asahara. Ablation of miR-146b in mice causes hematopoietic malignancy. *Blood Adv.* 2(23): pp3483-3491. 2018. ***co-first author.**
2. Y. Ito, A. Inoue, T. Seers, Y. Hato, A. Igarashi, T. Toyama, KD. Taganov, MP. Boldin, H. Asahara. Identification of targets of tumor suppressor microRNA-34a using a reporter library system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114(15): pp3927-3932, 2017.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 伊藤義晃, 松崎時生, 綾部文明, 茂久田翔, 山下聡, 浅原弘嗣. 軟骨の恒常性を制御する microRNA の機能解析. ベーシックリサーチカンファレンス, 2018.
2. 伊藤義晃, 松崎時生, 綾部文明, 茂久田翔, 山下聡, 浅原弘嗣. 軟骨恒常性維持に関わる microRNA-455 の機能解析. 日本軟骨代謝学会, 2018.
3. Y. Ito, A. Inoue, T. Seers, Y. Hato, A. Igarashi, T. Toyama, H. Asahara. Identification of microRNA-34a using a reporter library system. Molecular Biology Society of Japan, 2016.
4. 伊藤義晃, 松島隆英, 五島直樹, 浅原弘嗣. RNA 結合タンパク質遺伝子ライブラリーを用いた転写後制御因子スクリーニングシステムの開発. 日本分子生物学会, 2015.

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。