

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08610

研究課題名(和文) モデルマウスによるUCP1発現細胞の非侵襲的イメージング解析

研究課題名(英文) Non-invasive imaging of UCP1 expression in live mice

研究代表者

福田 綾 (Fukuda, Aya)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：50436276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：UCP1はエネルギー消費能を有し、肥満解消への有用性が期待されている。本研究では生体におけるUCP1の発現変動と肥満への影響を検討するため、近赤外蛍光タンパク質を用いてUCP1を非侵襲的かつ簡便に検出できるイメージングマウスを作製した。解析の結果、マウスの褐色脂肪組織のみならず、アドレナリン刺激によって白色脂肪組織内に誘導されたベージュ脂肪細胞をも蛍光観察できることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当研究で作製したUCP1イメージングマウスを用いると、従来のように動物から脂肪組織を取り出してUCP1の発現を解析する必要がなく簡便なうえ、さまざまな実験過程で起こりうる影響を排除できる。また、同一個体で継続的にUCP1の発現変動を解析できるため、個体差を考慮せずに長期的に解析できる。さらに、本マウスの脂肪組織から採取した脂肪幹細胞を用いてin vitroでUCP1の発現を誘導する薬剤をスクリーニングし、肥満治療薬の開発につながることも将来的に可能である。以上の点から、本研究で作製したUCP1イメージングマウスは、世界的な肥満問題の解決につながる有意義なモデル動物である。

研究成果の概要(英文)：Uncoupling protein 1 (UCP1) is a mitochondrial protein that is expressed in both brown and beige adipocytes. UCP1 plays an important role in thermogenesis by uncoupling mitochondrial electron transport chain from ATP synthesis. Previous studies have shown that the Ucp1-deficient mice become sensitive to obesity while overexpression of UCP1 in adipose tissues prevents obesity, suggesting a role of UCP1 in the whole-body metabolism. To monitor the expression of UCP1 in a living animal non-invasively, we generated the Ucp1-iRFP720 knock-in mice, in which a near-infrared fluorescent protein iRFP720-coding gene is inserted into the Ucp1 gene locus. Using the mice, we observed strong fluorescence in the brown adipose tissues, and also detected the induction of beige adipocytes in the inguinal white adipose tissues of mice administered with a beta3 adrenoceptor agonist CL316243.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：UCP1 褐色脂肪細胞 ベージュ脂肪細胞 イメージング

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、世界中の多くの国で肥満者が増加し、大きな社会問題となっている。肥満は糖尿病やがんなど様々な疾患を引き起こすため対策が急がれているが、現在のところ、有効な治療方法はない。

肥満を解消する有用な候補分子の一つとして UCP1 (uncoupling protein 1) が注目されている。UCP1 は褐色脂肪組織で発現が高く、ミトコンドリア内膜での酸化リン酸化を脱共役させてエネルギーを熱として放散させる。褐色脂肪組織はヒト成人にも存在することから、UCP1 は我々の体内エネルギーバランスの調節に深く関わっていると考えられる。これまでの研究で、褐色脂肪組織の活性が肥満者では低く、痩身者では高い傾向があることが示され、体型と褐色脂肪組織の活性に相関があると報告されている。また UCP1 を人為的に欠損させたマウスは肥満を呈し、食餌誘導性熱産生が低下することも示されている。さらに、代謝を活性化するアドレナリン刺激を継続的に与えた動物では、褐色脂肪組織のみならず白色脂肪組織においても UCP1 の発現が顕著に増加し、それに伴う体重減少も認められている。これら一連の研究結果は UCP1 の抗肥満効果を示唆するものであり、UCP1 を体内で継続的に誘導することができれば肥満解消への効果が期待できる。しかし、従来の解析方法では、UCP1 の発現を調べるために毎回動物を安楽死させて脂肪組織を取り出す必要があり、操作が煩雑なうえ、UCP1 の継続的な発現量の変化と肥満に及ぼす影響を解析することができない。

2. 研究の目的

本研究では、UCP1 の発現を近赤外蛍光タンパク質 (iRFP) によって非侵襲的かつ簡便に検出できるイメージングマウスを作製し、UCP1 発現量変動と肥満への影響について検討する。本 UCP1 生体検出マウスは将来的に肥満治療薬のスクリーニングにも応用でき、非常に有用である。

3. 研究の方法

1. 遺伝子ノックインベクターの構築

UCP1 遺伝子座に iRFP 遺伝子をノックインするためのベクターを構築した。ノックインには、従来の遺伝子改変技術に比べてゲノム編集効率が高く短期間で遺伝子改変マウスを作製できる CRISPR/Cas9 システムを用いた。UCP1 遺伝子の翻訳開始部位周辺にガイド RNA (gRNA) を複数設計し、gRNA と Cas9 を介した DNA 切断および相同組み換えの効率を既報の方法に従って比較した(文献 1)。このアッセイシステムでは、プラスミド上の EGFP 遺伝子内部に gRNA の標的配列を含む Ucp1 配列が挿入されており、gRNA/Cas9 による標的配列の認識と切断、および相同組換えによる EGFP 遺伝子の復元が起きると EGFP タンパク質が発現する。このため、EGFP の蛍光を検出することで、gRNA と Cas9 による標的配列の認識および切断効率を評価できる。さらに、組換えのドナーベクターとして、Ucp1 遺伝子の翻訳開始部位に蛍光タンパク質遺伝子を挿入したものを構築した。

2. UCP1 イメージングマウスの作製

マウス受精卵に Cas9/gRNA 発現ベクターおよび蛍光タンパク質 iRFP 遺伝子を含むドナーベクターを導入し、Ucp1 遺伝子座へ iRFP 遺伝子をノックインした。iRFP は従来の近赤外蛍光タンパク質と同じく発色団に Billiverdin (BV) を要するが、BV とのアフィニティが強く細胞内 BV だけで十分なため、他の近赤外蛍光タンパク質のように外から BV を添加する必要がない。そのため、EGFP 等と同様にマウスでのイメージングを簡便に行うことができ、すでに iRFP を用いたマウスでのイメージングデータも報告されている。得られた F0 マウスの尾よりゲノム DNA を抽出し、目的の Ucp1 遺伝子座に iRFP 遺伝子がノックインされているか、また、Cas9 遺伝子等を含むベクター DNA がゲノムの目的領域以外にランダムに挿入されていないかを PCR により解析した。さらに、ノックインした iRFP 遺伝子が次世代へ受け継がれるかを、F0 マウスと野生型マウスを交配させて検証した。

3. UCP1 イメージングマウスにおける蛍光シグナルの検出

ジェノタイプングによって選別した目的のノックインマウスを IVIS (In Vivo Imaging System) によって観察し、UCP1 を発現する組織において蛍光シグナルを観察した。さらに、褐色脂肪細胞様の機能を有することで近年注目されているベージュ脂肪細胞の誘導を検出できるか調べるため、既知の誘導シグナルであるアドレナリン $\beta 3$ 受容体アゴニスト CL316423 をマウスに投与し、蛍光シグナルを IVIS により観察した。

4. 研究成果

1. 遺伝子ノックインベクターの構築

マウス *Ucp1* 遺伝子の翻訳開始部位周辺に複数の gRNA を設計し、それぞれをコードする二本鎖 DNA を Cas9/gRNA 発現ベクター (pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9) の BbsI サイトに挿入した。HEK293 を用いた既報のアッセイ方法により、各 gRNA の作用効率を比較し、最も効率が良い gRNA をマウス作製用に選択した。また、ノックイン用ドナーベクターとして pBluescriptIIKS(-) に *Ucp1* 遺伝子の翻訳開始部位上流 (約 740 bp)、人工イントロン、KOZAK 配列、*iRFP720* 遺伝子、BGHpA および *Ucp1* 遺伝子の翻訳開始部位下流 (約 1,140 bp) を挿入したものを構築した。Cas9/gRNA 発現ベクターおよびドナーベクターの挿入断片について DNA 配列が正しいことを確認し、Midiprep Kit を用いて純度の高いプラスミド DNA を調製した。

2. UCP1 イメージングマウスの作製

本研究では、マイクロインジェクション法によって F0 マウスを作製した。ノックインマウスの作製は筑波大学生命科学動物資源センターにて行われた。本研究で構築した Cas9/gRNA 発現ベクターおよびドナーベクターを注入した受精卵を仮親マウスに移植し、82 匹の F0 マウス (雄 38 匹、雌 44 匹) を得た。ゲノム PCR 解析により、*iRFP720* 遺伝子が *Ucp1* 遺伝子座へ特異的に挿入されているかどうかを複数の異なる位置に設計したプライマーセットを用いて調べた。また、ノックインマウス作製に使用した 2 つのベクターの非特異的なゲノムへの挿入についても、Cas9 やアンピシリン耐性遺伝子に対するプライマーセットを使用して解析した。ゲノム PCR の結果、82 匹中 17 匹において、*Ucp1* 遺伝子座への *iRFP720* 遺伝子の特異的な挿入が検出された。しかし、そのうちドナーベクターあるいは Cas9/gRNA 発現ベクターの非特異的な挿入がないマウスは 12 匹であり、そのうち 1 匹は *iRFP720* が両アリルに挿入されたホモ接合型 *iRFP720*^{+/+} マウスであった。さらに、ノックインされた *iRFP720* 遺伝子が次世代に遺伝するか調べるため、F0 マウスを野生型 C57BL/6J マウスと交配させた。その結果、41 匹の F1 マウスが得られ、ゲノム PCR 解析により 19 匹において *iRFP720* 遺伝子の *Ucp1* 遺伝子座へのノックインが確認された。これらのマウスにおいては、ドナーベクターや Cas9 発現ベクターの非特異的な挿入がないことも確認した。本研究で作製したマウスは、C57BL/6J-Ucp1^{em1(iRFP720)U_{tr}} と名付けた。

3. UCP1 イメージングマウスにおける蛍光シグナルの検出

ヘテロ接合型 *iRFP720*^{+/-} マウスを用い、褐色脂肪組織が存在する肩甲骨間領域の蛍光シグナルを観察した。比較対象として、*iRFP720* 遺伝子が挿入されていない野生型マウスを用いた。通常のマウスのエサには強い蛍光を発する物質が含まれているため、蛍光イメージングに適した低蛍光エサ iVid#2 に切り替えて 1 週間程度飼育し、IVIS を用いて蛍光イメージングを行った。IVIS による観察の結果、ヘテロ接合型 *iRFP720*^{+/-} マウスの肩甲骨間領域に強い蛍光を検出した (図 1A)。ホモ接合型 *iRFP720*^{+/+} マウスにおいてはより強い蛍光が検出された。次にマウス肩甲骨間領域で検出した蛍光シグナルが褐色脂肪組織に由来するものかどうかを確認するため、マウスを解剖して各臓器を取り出し、蛍光を観察した。その結果、褐色脂肪組織から強い蛍光が観察され (図 1B)、さらに UCP1 が発現していることが知られる副腎からも蛍光シグナルが観察された。ウェスタンブロットにより褐色脂肪組織における UCP1 タンパク質の発現量を調べた結果、ヘテロ接合型 *iRFP720*^{+/-} マウスでは UCP1 発現量が減少し、両アリルに *iRFP* 遺伝子がノックインされたホモ接合型 *iRFP720*^{+/+} マウスでは UCP1 の発現が完全に消失していた (図 1C)。

さらに、近年、褐色脂肪組織と同様にエネルギー消費能を有することで注目されているベージュ脂肪細胞の誘導を蛍光によってモニターできるかどうかを調べた。ベージュ脂肪細胞の誘導には、既知の誘導剤であるアドレナリン β 3 受容体アゴニスト CL316,243 を用いた。IVIS による蛍光観察の結果、CL316,243 を 1 週間投与したマウスにおいて鼠蹊部に強い蛍光が観察され (図 2A)、ベージュ脂肪細

胞が誘導されていることが示唆された。この蛍光は、溶媒 PBS のみを投与していたマウスからは検出されなかった。CL316,243 を投与したマウスの鼠蹊部白色脂肪組織を取り出して蛍光観察した結果、非常に強い蛍光シグナルが観察でき(図 2B)、組織切片の HE 染色の結果からもベージュ脂肪細胞の誘導を示唆する結果を得た。さらに、定量 PCR 解析によるベージュ脂肪細胞マーカー遺伝子の誘導、およびウェスタンブロットによる UCP1 タンパク質の発現も確認した(図 2C)。これらの結果より、本研究で作製した UCP1 イメージングマウスは、褐色脂肪組織のみならず、ベージュ脂肪細胞の誘導をも蛍光シグナルによってモニターできることが明らかになった。

図1

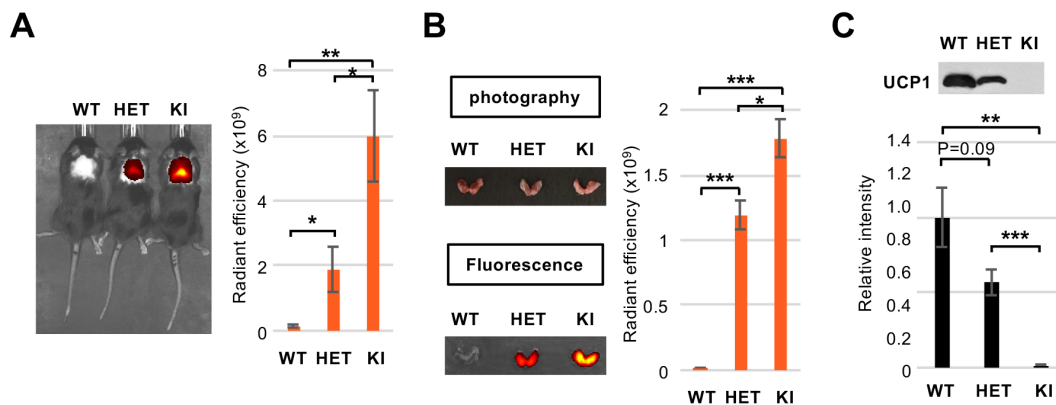


図1 (A) マウス肩甲骨間の蛍光シグナル
(B) 褐色脂肪組織の蛍光シグナル
(C) 褐色脂肪組織におけるUCP1タンパク質の発現

図2

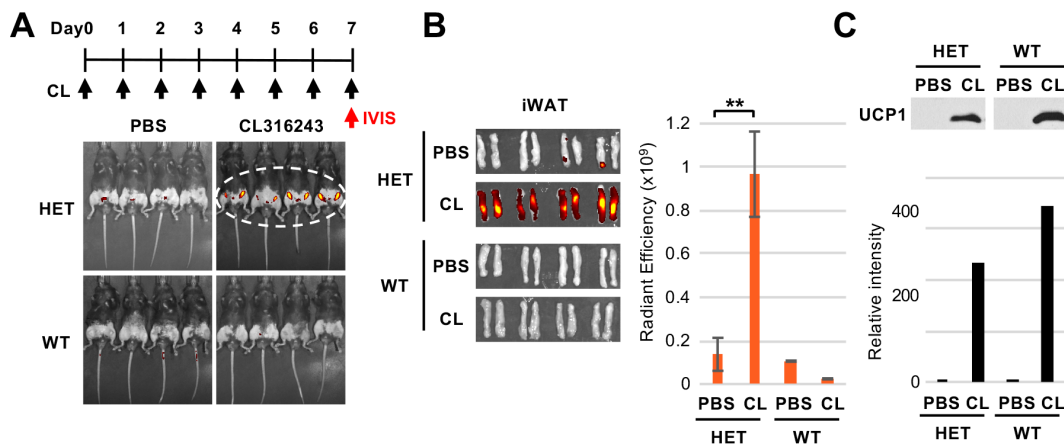


図2 (A) マウス鼠蹊部の蛍光シグナル
(B) 鼠蹊部白色脂肪組織の蛍光シグナル
(C) 鼠蹊部白色脂肪組織におけるUCP1タンパク質の発現

文献

1. Mashiko D. et al, Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. Scientific Reports 3, 3355 (2013)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

(1) Nishimura K, Ishiwata H, Sakuragi Y, Hayashi Y, Fukuda A, Hisatake K

Live cell imaging of subcellular structures for quantitative evaluation of pluripotent stem cells. Scientific reports, 9(1):1777.(2019)

査読有

- (2) Tran THY*, Fukuda A* (* equal contribution), Aizawa S, Bui PL, Hayashi Y, Nishimura K, Hisatake K
Live cell imaging of X chromosome reactivation during somatic cell reprogramming.
Biochemistry and biophysics reports, 15:86-92(2018) 査読有
- (3) Nishimura K, Aizawa S, Nugroho FL, Shiomitsu E, Tran YT, Bui PL, Borisova E, Sakuragi Y, Takada H, Kurisaki A, Hayashi Y, Fukuda A, Nakanishi M, Hisatake K
A Role for KLF4 in Promoting the Metabolic Shift via TCL1 during Induced Pluripotent Stem Cell Generation. Stem Cell Reports 8(3):787-801(2017) 査読有
- (4) Hayashi Y, Hsiao EC, Sami S, Lancero M, Schlieve CR, Nguyen T, Yano K, Nagahashi A, Ikeya M, Matsumoto Y, Nishimura K, Fukuda A, Hisatake K, Tomoda K, Asaka I, Toguchida J, Conklin BR, and Yamanaka S
BMP-SMAD-ID Promotes Reprogramming to Pluripotency by Inhibiting p16/INK4A-Dependent Senescence.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113(46):13057-13062(2016) 査読有

〔学会発表〕（計 7 件）

- (1) 関口裕也、福田綾、西村健、久武幸司「軟骨分化におけるSOX9変異体の機能解析」第41回日本分子生物学会年会、2018年11月（横浜）
- (2) 平井理愛、武井祐樹、下平雄貴、加納英明、島田林太郎、西村健、福田綾、久武幸司「褐色脂肪細胞における不飽和脂肪酸の機能解析」第41回日本分子生物学会年会、2018年11月（横浜）
- (3) Sekiguchi Y, Fukuda A, Nishimura K, Hisatake K. 「Functional analysis of SOX9 variants in chondrocyte differentiation」Tsukuba Global Science Week 2018, Tsukuba, September, 2018
- (4) Hirai R, Takei Y, Shimodaira Y, Kano H, Shimada R, Nishimura K, Fukuda A, Hisatake K. 「Functional analysis of unsaturated fatty acids in brown adipocytes」Tsukuba Global Science Week 2018, Tsukuba, September, 2018
- (5) Le PHA, Kato T, Nguyen TL, Fukuda A, Nishimura K, Hisatake K. 「Analysis on transcriptional regulation in the early phase of somatic cell reprogramming」Tsukuba Global Science Week 2018, Tsukuba, September, 2018
- (6) 本多志帆、福田綾、水野聖哉、杉山文博、岡松優子、斉藤昌之、林洋平、西村健、久武幸司「UCP1発現脂肪細胞の非侵襲イメージング法の作製」第40回日本分子生物学会年会、2017年12月（神戸）
- (7) Honda S., Fukuda A., Mizuno S., Sugiyama F., Hayashi Y., Nishimura K., Hisatake K.
「Production of a non-invasive monitoring system of Uncoupling protein 1-expressing adipocytes」Tsukuba Global Science Week 2017、2017年9月（つくば）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：遺伝子改変非ヒト動物及びその使用
発明者：本多志帆、福田綾、久武幸司
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2017-223802

出願年：2017 年
国内外の別：国内

○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

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/biochem/gene/research3.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：西村健

ローマ字氏名：NISHIMURA, Ken

所属研究機関名：筑波大学

部局名：医学医療系

職名：准教授

研究者番号（8桁）：80500610

(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。