

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07266

研究課題名（和文）長鎖非コードRNAによる代謝調節と細胞機能制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of metabolism and cell function by long noncoding RNA

研究代表者

長沼 孝雄（Naganuma, Takao）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・上級研究員

研究者番号：40466462

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）：報告者が発見したlncRNA-FR1が、アルギントランスポーターCATX遺伝子の転写活性化に寄与することを機能喪失・獲得実験より明らかにした。また、lncRNA-FR1が、細胞内へのアルギニンの取り込みを増加させ、糖産生を調節することが示唆された。さらに、lncRNA-FR1は細胞内へのアルギニンの取り込みを制御することでmTORC1の活性を調節し、細胞増殖に関与することが示唆された。lncRNA-FR1によるCATX遺伝子の転写活性化の作用機序としては、lncRNA-FR1がCATX遺伝子プロモーター領域のヒストンアセチル化を促進させることであ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

肝臓の新たな代謝調節因子としてlncRNAが注目されているが、lncRNAによる代謝調節とそれに応答した細胞機能の制御については不明な点が多い。これまでにlncRNAがアミノ酸トランスポーターの活性を制御し、細胞内のアミノ酸量をコントロールしているという報告例はまだ無く、またlncRNAがmTORC1の活性を調節して細胞機能を制御する例も不明である。従って、本研究の成果は、学術的にも意義の高いものといえる。さらに、mTORC1活性の異常は代謝性疾患の病因になり得ることから、本研究結果からlncRNAを標的とするmTORC1活性を制御する薬剤の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We showed that lncRNA-FR1 contributes to the transcriptional activation of the arginine transporter CATX gene from loss-of-function and gain-of-function experiments. Next, we examined how lncRNA-FR1 affects the regulation of metabolism and cellular function, and found that lncRNA-FR1 increased the uptake of arginine into the cell and regulated glucose production. We also found that lncRNA-FR1 modulates the activity of mTORC1 by regulating the uptake of arginine into the cell and is involved in cell proliferation function. Moreover, we investigated the molecular mechanisms underlying the transcriptional activation of the CATX gene by lncRNA-FR1 and found that lncRNA-FR1 enhances histone acetylation in the CATX gene promoter region and contributes to the activation of transcription.

研究分野：RNA生物学

キーワード：長鎖非コードRNA 転写制御 代謝調節 細胞機能

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝臓では、全身の恒常性維持のために栄養のシグナルによって代謝が高度に調節されており、このシグナルへの応答には遺伝子発現制御が大きな役割を担っている。過剰な栄養摂取は、肥満のような代謝性疾患の病因となり得る。一方で、適度な栄養摂取の制限は寿命延長に繋がる。このようなことから、栄養シグナルによる代謝調節の分子機構の解明は健康長寿の鍵を握っている。

長鎖非コード RNA (lncRNA) とは、200 塩基以上の長さをもつタンパク質をコードしない転写産物群の総称である。lncRNA の多くは組織や細胞系列特異的な発現パターンを示すことが知られている。一部の研究から lncRNA が遺伝子発現を制御することで、多様な生命現象において機能することが明らかになりつつあるが、その他多くの lncRNA については機能不明のままである。報告者はこれまでに細胞内の構造体構築に必須な lncRNA の研究を行い、その構造構築の分子機構を明らかにした (Naganuma et al., EMBO J. 2012)。また、lncRNA による細胞内構造体の生理機能についても明らかにした (Hirose, Naganuma et al., Mol. Bio. Cell 2014)。近年、肝臓においても多くの lncRNA の存在が明らかになり、肝臓における新たな代謝調節因子として注目されている。しかし、大部分の lncRNA については機能解析に至っていない。極一部の肝臓の lncRNA の研究から代謝に関与することは示唆されているが、lncRNA による代謝調節やそれに応答した細胞機能の制御については不明な点が多く残されている。

このような状況において、最近報告者は肝細胞において栄養シグナルで発現誘導される数種類の lncRNA を発見した (未発表)。また、その中の 1 つである lncRNA-FR1 を肝細胞で機能抑制すると、lncRNA-FR1 の近隣のアルギニントランスポーター CATX 遺伝子の発現が抑制されることを明らかにした (未発表)。報告者による先行研究の結果から、栄養シグナルに依存して発現誘導される lncRNA-FR1 は CATX 遺伝子の発現を抑制し、細胞内の代謝物を変化させることで代謝調節に関与するのではないかと考えられた。また lncRNA-FR1 は、代謝調節を介して細胞機能を制御しているのではないかと推察された。したがって、これら問題点を解決することで、栄養シグナルに依存した lncRNA による代謝調節と細胞機能制御の分子機構を解明することが出来ると考え、本研究計画の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、報告者が発見した lncRNA-FR1 が、どのように栄養シグナルに依存して代謝調節ならびに細胞機能を制御しているのかを明らかにすることで、栄養シグナル依存性 lncRNA による代謝調節と細胞機能制御の分子基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) lncRNA-FR1 が CATX 遺伝子の転写活性化に寄与することを明らかにするために、CRISPRa法 (Gilbert et al., Cell 2014) と呼ばれる CRISPR RNA とヌクレアーゼ不活性 Cas9 (dCas9) -転写活性化ドメイン融合体による内因性遺伝子強制発現系を利用した機能獲得実験を試みた。lncRNA-FR1 を標的とする CRISPR RNA と dCas9-転写活性化ドメイン融合体についてそれぞれのアデノウイルスベクターを使って共発現させることで内因性の lncRNA-FR1 を強発現させた肝細胞から RNA を調製し、定量 RT-PCR (qRT-PCR) によって lncRNA-FR1 ならびに CATX 遺伝子の発現について解析を行った。

(2) lncRNA-FR1 の代謝調節や細胞機能における役割を明らかにするために、lncRNA-FR1 を機能抑制した肝細胞の代謝や細胞機能の変化について調査を行った。lncRNA-FR1 の機能抑制には、CRISPRi法 (Gilbert et al., Cell 2014) と呼ばれる CRISPR RNA と dCas9-転写抑制ドメイン融合体による遺伝子サイレンシング系を利用した。lncRNA-FR1 を標的とする CRISPR RNA と dCas9-転写抑制ドメイン融合体についてそれぞれのアデノウイルスベクターを使って共発現させることで lncRNA-FR1 の機能抑制を行った。代謝の変化としては、アルギニンが糖原性アミノ酸として糖産生の基質として利用されることに注目し、アルギニンに依存した糖産生を測定した。また、細胞機能の変化としては、アルギニンが mTORC1 活性化アミノ酸の 1 つであることから、アルギニンに依存した mTORC1 の活性化についてその標的タンパク質のリン酸化の変化をウェスタンブロットで検出し、また経時的に細胞数をカウントすることで細胞増殖を測定した。

(3) lncRNA-FR1によるCATX遺伝子プロモーター領域に対するエピゲノム修飾への寄与を明らかにするために、CRISPRi法によりlncRNA-FR1を機能抑制した肝細胞におけるCATX遺伝子プロモーター領域のエピゲノム修飾についてクロマチン免疫沈降 (ChIP) -qPCRにより検討を行った。エピゲノム修飾としては、転写活性化に関わるヒストンアセチル化について調査を行った。

(4) lncRNA-FR1による代謝調節と細胞機能における役割の全容を明らかにするために、肝細胞においてlncRNA-FR1によって発現制御される遺伝子をDNAマイクロアレイ解析により網羅的に探索した。CRISPRi法によりlncRNA-FR1を機能抑制した肝細胞からRNAを調製し、DNAマイクロアレイ解析を行った。その結果を基にlncRNA-FR1の機能抑制により50%以下に発現が減少する遺伝子群を選別したあと、それらについてパスウェイ解析を実施した。

4. 研究成果

(1) lncRNA-FR1によるCATX遺伝子転写活性化への寄与の解明

報告者はこれまでにCRISPRi法によるlncRNA-FR1の機能抑制によりCATX遺伝子の発現が抑制されることを明らかにした (図1A)。この結果はlncRNA-FR1がCATX遺伝子の転写の活性化に関与することを示唆している。lncRNA-FR1によるCATX遺伝子の転写制御への役割を明確にするために、lncRNA-FR1の強発現による機能獲得実験を行い、その時のCATX遺伝子の発現について解析した。CRISPRa法を利用して肝細胞において内因性のlncRNA-FR1を強発現させたところ、CATX遺伝子の発現促進が確認された (図1B)。これら機能喪失・獲得実験の結果から、lncRNA-FR1はCATX遺伝子の転写活性化に寄与することが明らかになった。

(2) lncRNA-FR1による代謝調節における役割の解明

lncRNA-FR1が、代謝調節においてどのような役割を持つのかについて検討した。細胞内に取り込まれたアルギニンは、糖原性アミノ酸として糖新生の基質として利用されることに注目した。そこで、CRISPRi法によりlncRNA-FR1を機能抑制させた肝細胞におけるアルギニンを基質とした糖産生の変化について検討したところ、コントロール細胞に比べてlncRNA-FR1機能抑制細胞ではアルギニンを基質とした糖産生が減少していた (図2)。この結果から、lncRNA-FR1は、遺伝子転写を介してCATXのトランスポーター活性を増強し、細胞内へのアルギニンの取り込みを促すことで、糖新生の基質の供給を増加させ糖産生を促進していることが示唆された。

(3) lncRNA-FR1による細胞機能の解明

lncRNA-FR1による細胞機能について検討した。アルギニンが栄養感知因子であるmTORC1を活性化するアミノ酸の一つであることに注目し、lncRNA-FR1がアルギニンの取り込みを介してmTORC1の活性を調節し、細胞機能を制御するのではないかと考えた。そこで、CRISPRi法によりlncRNA-FR1を機能抑制させた肝細胞におけるmTORC1の活性の変化をその標的であるS6タンパク質のリン酸化を指標と

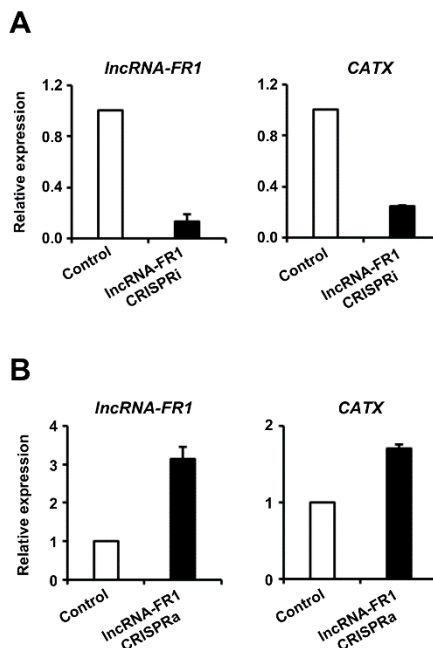


図1 lncRNA-FR1は、CATX遺伝子の転写活性化に寄与する

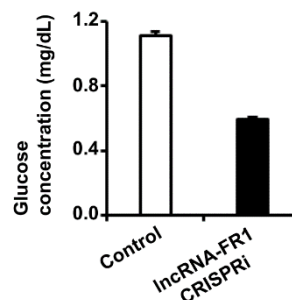


図2 lncRNA-FR1は、アルギニン依存性の糖産生を調節する

して調査したところ、コントロール肝細胞に比べて lncRNA-FR1 機能抑制細胞では、mTORC1 の活性化を反映している S6 タンパク質のリン酸化が減弱していた (図3A)。さらに、mTORC1 が細胞増殖に重要な役割を担っていることから、lncRNA-FR1 を機能抑制させた肝細胞の細胞増殖を調べたところ、コントロール肝細胞に比べて lncRNA-FR1 機能抑制肝細胞では細胞増殖が抑制されていた (図3B)。これらの結果から、lncRNA-FR1 は細胞内へのアルギニンの取り込みを制御することで mTORC1 の活性を調節し、細胞増殖機能に関与することが示唆された。

(4) lncRNA-FR1 による CATX 遺伝子転写活性化の分子機構の解明

lncRNA-FR1 による CATX 遺伝子の転写活性化に寄与する分子メカニズムを明らかにすることにした。遺伝子転写の活性化は、遺伝子のプロモーターやエンハンサー領域の転写抑制性ヒストン修飾から転写活性化ヒストン修飾への変換といったエピゲノムの変化を伴うことが知られている。多くの lncRNA が、エピゲノムの変化を制御することが示されてきていることから、lncRNA-FR1 もまたエピゲノムを制御することで CATX 遺伝子の転写活性化に関与するのではないかと考えた。そこで、CRISPRi 法により lncRNA-FR1 を機能抑制させた肝細胞における CATX 遺伝子プロモーター領域の転写活性化マークであるヒストンアセチル化修飾について ChIP-qPCR 解析を行ったところ、コントロール肝細胞に比べて lncRNA-FR1 機能抑制肝細胞では CATX 遺伝子プロモーター領域のヒストンアセチル化の減少が観察された (data not shown)。この結果から、lncRNA-FR1 は CATX 遺伝子プロモーター領域のヒストンアセチル化を促進させることで、転写の活性化に寄与していることが示された。おそらく lncRNA-FR1 は CATX 遺伝子プロモーター領域にヒストンアセチル化酵素 (HAT) のリクルートメントを促すことでヒストンアセチル化の促進に関与していると推察され、現在 CATX 遺伝子プロモーター領域への HAT のリクルートメントに対する lncRNA-FR1 の効果を ChIP-qPCR 解析により検討しているところである。

(5) lncRNA-FR1 によって発現制御される遺伝子の探索

lncRNA-FR1 による代謝調節と細胞機能における役割の全容を明らかにするために、肝細胞において lncRNA-FR1 によって発現制御される遺伝子を DNA マイクロアレイ解析により網羅的に探索した。DNA マイクロアレイ解析の結果を基に lncRNA-FR1 機能抑制肝細胞で発現が 50% 以下に減少する遺伝子群リストを選別し、パスウェイ解析を実施したところ、lncRNA-FR1 機能抑制肝細胞では“Metabolic pathways”というパスウェイに分類される遺伝子が多く変動しており、その中には複数のアミノ酸代謝酵素が含まれていた (data not shown)。この結果から、lncRNA-FR1 が CATX 遺伝子に加えて、アミノ酸代謝酵素遺伝子の転写に関与していることが示唆された。現在、lncRNA-FR1 によるアミノ酸代謝酵素遺伝子の転写制御ならびに代謝調節や細胞機能における役割について検討しているところである。

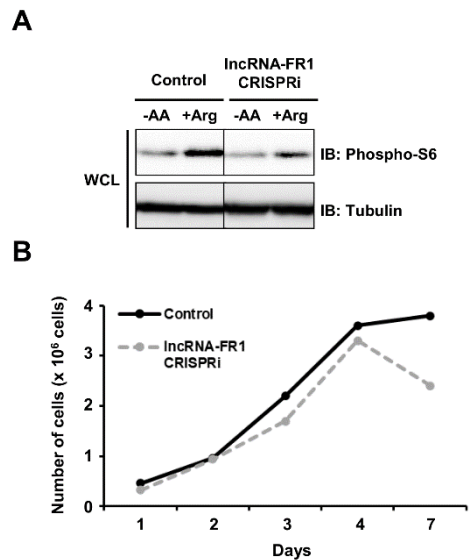


図3 lncRNA-FR1 は、mTORC1 の活性を調節し、細胞増殖を制御する

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yano H, Sakai M, Matsukawa T, Yagi T, Naganuma T, Mitsushima M, Iida S, Inaba Y, Inoue H, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y, Asahara SI, Kido Y, Minami S, Kasuga M, Matsumoto M	4. 巻 8
2. 論文標題 PHD3 regulates glucose metabolism by suppressing stress-induced signalling and optimising gluconeogenesis and insulin signalling in hepatocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14290-14305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-32575-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長沼 孝雄, 松川 隼也, 酒井 真志人, 満島 勝, 矢野 宏行, 春日 雅人, 松本 道宏
2. 発表標題 絶食誘導性長鎖ノンコーディングRNAの代謝調節における役割の解明
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長沼 孝雄, 高橋 経太, 酒井 真志人, 満島 勝, 矢野 宏行, 松川 隼也, 春日 雅人, 松本 道宏
2. 発表標題 絶食応答性長鎖ノンコーディングRNAの代謝調節における役割の解明
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長沼 孝雄, 高橋 経太, 酒井 真志人, 満島 勝, 矢野 宏行, 松川 隼也, 春日 雅人, 松本 道宏
2. 発表標題 絶食応答性長鎖ノンコーディングRNAの代謝調節における役割の解明
3. 学会等名 第32回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長沼孝雄, 松川隼也, 酒井真志人, 満島勝, 矢野宏行, 八木孝, 春日雅人, 松本道宏
2. 発表標題 絶食誘導性長鎖ノンコーディングRNAの代謝調節における機能的役割の解明
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長沼孝雄, 松川隼也, 酒井真志人, 満島勝, 矢野宏行, 春日雅人, 松本道宏
2. 発表標題 絶食誘導性 lncRNA の代謝調節における機能的役割の解明
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長沼孝雄, 松川隼也, 酒井真志人, 満島勝, 矢野宏行, 春日雅人, 松本道宏
2. 発表標題 絶食誘導性長鎖ノンコーディングRNAの代謝調節における機能の解明
3. 学会等名 2019年度生理学研究所研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長沼孝雄, 松川隼也, 酒井真志人, 満島勝, 矢野宏行, 春日雅人, 松本道宏
2. 発表標題 絶食誘導性 lncRNA の代謝調節における機能の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長沼孝雄, 松川隼也, 酒井真志人, 満島勝, 矢野宏行, 春日雅人, 松本道宏
2. 発表標題 グルカゴン誘導性長鎖ノンコーディングRNAの代謝調節における機能の解明
3. 学会等名 第31回分子糖尿病学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長沼孝雄, 松川隼也, 酒井真志人, 満島勝, 矢野宏行, 春日雅人, 松本道宏
2. 発表標題 グルカゴン誘導性長鎖ノンコーディングRNAの代謝調節機能の解明
3. 学会等名 第34回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----