

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15804

研究課題名(和文) RNA結合蛋白質Mex3Bによる脂肪細胞分化制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the regulation of adipocyte differentiation by RNA binding protein, Mex-3B

研究代表者

鴨志田 祐己 (Kamoshida, Yuki)

東京大学・定量生命科学研究所・特任研究員

研究者番号：50835759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、RNA結合タンパク質Mex-3Bの欠損マウスがやせ型を呈すること、ならびに寿命が延長することを見出している。その原因を解明する過程で、Mex-3B欠損細胞は脂肪細胞への分化が抑制されていることを見出した。そこで、Mex-3Bによる脂肪細胞分化の制御機構を明らかにするため、Mex-3B蛋白質結合RNAの網羅的同定ならびに解析を行った。その結果、Mex-3Bタンパク質はPPAR とC/EBP の2つのmRNAと結合すること、ならびにPPAR はmRNAレベルで、C/EBP は蛋白質レベルで発現を制御してい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

高齢化社会が進行している現代日本において、健康寿命の延長法の解明は急務である。これまでに我々はMex-3Bの欠損マウスがやせ型ならびに健康寿命の延長という表現型を呈していることを見出しており、その分子機構を明らかにすることは、健康寿命の延長法の解明につながる。また、脂肪細胞におけるMex-3Bの機能を明らかにすることで、寿命制御においてMex-3Bが果たす役割を明らかにすることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We previously found that RNA binding protein Mex-3B deficient mice are resistant to obesity and long-lived. During the process of this study, we discovered that Mex-3B deficient cells are less capable of differentiation into adipocytes. Therefore, in order to elucidate the mechanism of regulation of adipocyte differentiation by Mex-3B, we identified mRNAs that bind Mex-3B protein exhaustively and analyzed them. In the result, we found that Mex-3B protein binds with PPAR and C/EBP mRNA. Moreover, Mex-3B protein regulate PPAR expression in mRNA levels, whereas regulate C/EBP expression in protein levels.

研究分野：応用細胞生物学

キーワード：脂肪細胞分化 RNA結合タンパク質 PPAR C/EBP

1. 研究開始当初の背景

老化を遅延させ、寿命を延長させる方法として、摂取カロリーの制限法が有効であることが広い生物種において報告されている。一方で、肥満は脳血管疾患や心筋梗塞など多様な疾患のリスクを引き起こすことが広く知られており、「肥満は万病のもと」とも言われている。

我々は、独自で作製したRNA結合タンパク質Mex-3Bの欠損マウスが野生型と比較して寿命が有意に延長していることを見出した。さらにこのMex-3Bの欠損マウスはやせ型を呈し、脂肪組織重量が顕著な減少が確認された(図1)。加えて、このマウスは加齢や遺伝変異による過食、高脂肪食負荷など、多様な原因で惹起される肥満に対して抵抗性を有し、インスリン感受性が亢進していることが示された。これら結果より、Mex-3B欠損マウスはカロリー制限状態を模倣して寿命延長効果を示している可能性が考えられた。また、Mex-3BのmRNA発現はヒト、マウスともに糖・脂質代謝を担う主要臓器(肝臓、心臓、筋肉、脂肪組織)の中では、脂肪組織に最も高く発現していた。以上の結果より、Mex-3Bは脂肪組織において代謝調節を担い、その機能を介して寿命の制御を行っているという仮説を立て、さらなる解析を行った。

これまでにMex-3Bが代謝制御や細胞の分化に対して影響を与えるという報告はない。そこで、*in vitro*の培養細胞の実験系に還元し、Mex-3Bが脂肪細胞分化制御に与える影響を検討した。その結果、Mex-3Bの欠損細胞では、脂肪細胞分化が抑制されることを見出した。

続いて、Mex-3Bが脂肪細胞分化を制御する分子機構の解明を試みた。これまでに我々は、Mex-3B蛋白質は標的mRNAの3' UTRに結合してmiRNAの作用を抑制することによってその発現を促進し、アポトーシス誘導や炎症応答などに重要な役割を果たすことを見出している [Yamazumi *et al*, *Cell Rep* (2016), Oda *et al*, *Oncogene* (2018)]。これらの知見を踏まえると、Mex-3Bはその結合mRNAの発現制御を介して脂肪細胞分化の制御を担っていることが考えられた。そこで、脂肪細胞におけるMex-3B蛋白質の結合RNAの網羅的同定を目指してCLIP-Seq(Cross-linking immunoprecipitation sequencing)を行った。その結果、数多くのMex-3B結合候補mRNAの同定に成功した。しかしながら、Mex3Bがこれらの結合候補mRNAの中で何れの因子の制御を介して脂肪細胞分化の調節を担っているのかは未知であった。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究をさらに進展させ、得られた脂肪細胞におけるMex-3Bの標的RNAの同定・解析を行うことで、Mex-3Bによる脂肪細胞分化制御機構を明らかにすることを目的とする。さらに、培養細胞レベルの脂肪細胞分化の変動と、動物個体レベルの肥満との関わり、そして老化制御とのクロストークの一端を明らかにすることも期待される。これらの研究を通じて、最終的にはこれまでに全く報告のない「RNA結合蛋白質による寿命の制御機構」を解明し、新たな寿命の制御機構を提唱することを目指している。

3. 研究の方法

(1) 脂肪細胞分化過程におけるMex-3B自身の発現変動の上流解析

脂肪細胞分化過程におけるMex-3Bの制御機構の解明を試みる。具体的には、各脂肪細胞分化誘導試薬の有無の条件下で、Mex-3B発現量の変化を確認する。その後、刺激によるMex-3Bの転写活性の変化をLuciferase assayやChIP assayを用いて解析する。

(2) Mex-3B蛋白質結合RNAの同定

得られたMex-3B蛋白質結合mRNA候補の中で、既に脂肪細胞分化を制御することが知られている因子について、解析を行う。具体的には、以下の解析を行う。

Mex-3B蛋白質とMex-3B結合候補mRNAが実際に結合することを検証する。

ウイルスやプラスミドを用いてMex-3Bを強制発現した細胞、もしくはsiRNAを用いてMex-3Bの発現抑制を引き起こした細胞、およびMex-3Bの欠損マウス由来のMEFなどを用いて、Mex-3B量の増減に伴って結合候補の発現量に生じる変化をmRNAレベルおよび蛋白質レベルで検討する。

Mex-3BによるMex-3B結合mRNA候補の発現制御が脂肪細胞分化の制御に重要であることを示すため、Mex-3Bを欠損した細胞に対してウイルスを用いて候補mRNAを発現させ、脂肪細胞分化の変化をOil red O染色やReal time RT-PCRによるPPARシグナルの発現変動の確認を通じて検証する。

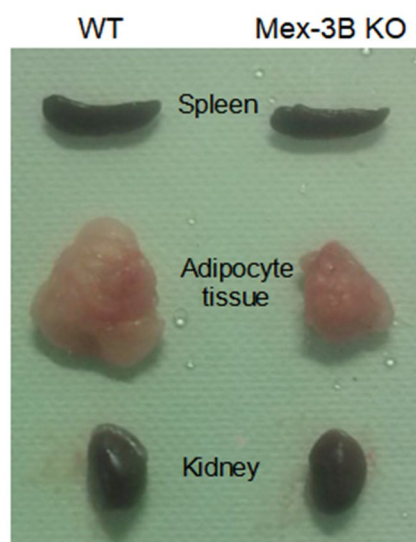


図1. Mex-3B欠損マウスでは、脂肪組織量が顕著に減少している

(3)マウス個体の脂肪組織での Mex-3B 欠損に伴う Mex-3B 結合 mRNA 候補ならびに PPAR シグナルの発現変動の確認

*in vivo*のマウス個体の脂肪組織において、Mex-3B の欠損に伴う Mex-3B 蛋白質結合候補、ならびに PPAR シグナルの発現変動を確認する。具体的には、野生型、Mex-3B 欠損マウスの皮下・内臓脂肪組織から RNA を抽出し、Real time RT-PCR に供することで、各因子の発現変動を確認する。

4. 研究成果

(1)Mex-3B は脂肪細胞分化過程において、Glucocorticoid Receptor:GR 依存的に発現抑制を受ける

脂肪細胞分化過程において Mex-3B の発現抑制に関わる上流因子を同定するため、4 種類の分化誘導試薬の有無条件下で 3T3-L1 細胞に対して分化誘導処理を行い、Mex-3B の発現変動を検討した。その結果、核内受容体 GR の agonist である Dexamethasone (Dex) 存在時のみ、Mex-3B の発現抑制が認められた。続いて、GR による Mex-3B の発現変動が転写レベルで行われているか否かを検討するため、Mex-3B のプロモーター領域を用いて Luciferase assay を行った。しかし、Dex 処理による Mex-3B プロモーター活性の低下は認められなかった。また Mex-3B のプロモーター領域の塩基配列を確認したところ、GR が結合するとされている特定の塩基配列の存在は認められなかった。しかしながら、DNA polymerase II を用いた ChIP assay の結果、Dex 処理によって、DNA polymerase II が Mex-3B の転写開始点付近にリクルートされてくることが確認された。一方で、Dex 処理による Mex-3B mRNA の安定性の変化は生じなかった。以上の結果より、脂肪細胞分化過程において、Mex-3B は核内受容体 GR による転写レベルでの発現制御を受けることが示唆された。

(2)Mex-3B 蛋白質は PPAR、C/EBP mRNA と結合し、PPAR は mRNA レベル、C/EBP は蛋白質レベルで発現を制御する。

続いて、先行研究において行われた CLIP-seq によって同定された Mex-3B 蛋白質結合 mRNA の中で、脂肪細胞分化制御に関与する因子の同定を試みた。まずは、候補因子の中で、脂肪細胞分化の制御を担うことが既に報告されている C/EBP に着目した。実際に、C/EBP mRNA と Mex-3B 蛋白質が結合しているかを検討するため、RIP-assay を行った。その結果、両因子の結合が確認された。それに加えて、脂肪細胞分化の代表的な制御因子についても Mex-3B 蛋白質との RIP-assay を行った結果、PPAR mRNA も Mex-3B 蛋白質との結合因子であることが確認された。

まずは、Mex-3B による PPAR 発現制御の解析を行った。Mex-3B を強制発現させた 3T3-L1 細胞に対して脂肪細胞分化誘導を行ったところ、脂肪細胞分化の抑制ならびに PPAR の mRNA、蛋白質の発現減少が確認された。続いて、この現象に、Mex-3B の RNA 結合能が関与しているのかを確認するため、RNA 結合領域である KH domain を欠損した Mex-3B を同様に強制発現させ、脂肪細胞分化誘導を行った。その結果、KH domain を失った Mex-3B では、脂肪細胞分化の抑制ならびに PPAR への発現抑制効果は認められなかった。次に、この Mex-3B の RNA 結合能依存的な PPAR mRNA 発現抑制機構が PPAR の 3' UTR 領域を介しているかを検討するため、Mex-3B を強制発現させた 3T3-L1 細胞に対して、PPAR の coding Sequence のみ、もしくは coding sequence に 3' UTR を付加した PPAR を強制発現し、脂肪細胞分化を誘導した。その結果、Mex-3B の強制発現は、coding sequence だけを発現させた PPAR により誘導される脂肪細胞分化は抑制できない一方で、coding sequence に 3' UTR を付加した PPAR により誘導される脂肪細胞分化は抑制することが出来ることを見出した。さらに、この抑制効果は、KH domain を欠損させた Mex-3B の強制発現では認められなかった。以上の結果より、Mex-3B は、PPAR mRNA の 3' UTR 領域に結合し、PPAR mRNA の発現を抑制することにより、脂肪細胞分化を抑制する可能性があると考えられた。続いて、内因性の Mex-3B が PPAR mRNA の発現制御に関わっているのかを検討した。HA-tag を付加した HA-PPAR および、HA-PPAR に 3' UTR を付加したコンストラクトをそれぞれ強制発現し、siRNA を用いて Mex-3B のノックダウンを行った際に生じる HA-PPAR 蛋白質量の変化を検証した。その結果、Mex-3B のノックダウンは HA-PPAR の発現に影響を与えない一方で、3' UTR を付加した HA-PPAR の発現を増加させることが明らかになった。以上の結果より、内因性の Mex-3B も 3' UTR 依存的に PPAR mRNA の発現を抑制していることが明らかになった。

続いて、Mex-3B による C/EBP 発現制御機構の解明を試みた。野生型ならびに Mex-3B 欠損マウス由来の MEF に対して脂肪細胞分化を誘導したところ、C/EBP の mRNA 量に大きな変化は認められない一方で、C/EBP 蛋白質量の減少が確認され、脂肪細胞分化も抑制されていた。また、脂肪細胞分化を誘導した Mex-3B 欠損マウス由来の MEF に対して、C/EBP 抗体を用いた ChIP assay を行った結果、Mex-3B の欠損により、C/EBP 蛋白質の標的遺伝子プロモーターへのリクルートが減少していることが見出された。そこで、この Mex-3B 欠損による脂肪細胞分化の抑制効果が C/EBP 発現抑制を介しているかを検討するため、Mex-3B を欠損させた MEF に C/EBP 蛋白質を強制発現させ、脂肪細胞分化誘導を行った。その結果、C/EBP の強制発現は、Mex-3B 欠損による脂肪細胞分化の抑制をレスキューすることが確認された。一方で、3' UTR を付加した

C/EBP を強制発現しても、Mex-3B 欠損による脂肪細胞分化の抑制をレスキューすることが出来なかった。以上の結果より、Mex-3B の欠損は、3' UTR 依存的に C/EBP 蛋白質の減少を引き起こすこと、およびこの C/EBP 蛋白質の減少により、脂肪細胞分化が抑制されると考えられた。

(3) Mex-3B 欠損マウスの脂肪組織では、PPAR シグナルの抑制が認められる。

最後に、Mex-3B 欠損マウスの脂肪組織における PPAR シグナルの発現変動を検討した。インスリン感受性の変化が認められた Mex-3B 欠損雄マウスの皮下・内臓脂肪組織における PPAR シグナルの発現量を確認したところ、PPAR およびその下流因子の発現抑制が確認された。これらの結果より、*in vivo* のマウスの脂肪組織においても PPAR シグナルは Mex-3B により制御されていることが示唆された。

以上の結果より、Mex-3B は

- (1) 脂肪細胞分化過程において、GR 依存的に発現抑制を受けること
- (2) KH domain 依存的に PPAR の 3' UTR に作用し、PPAR mRNA の発現を抑制すること
- (3) C/EBP の 3' UTR に作用し、C/EBP 蛋白質の増加を促すこと

が明らかになった。Mex-3B を欠損させた細胞や Mex-3B 欠損マウスの脂肪組織では、(3) の作用が表現型として現れているため、PPAR シグナルの発現減弱がみられると考えられる。一方で、Mex-3B の強制発現では、より直接的に PPAR の発現抑制を引き起こしているため、脂肪細胞分化が抑制されていると考えられる。これらのことは、C/EBP が PPAR の上流に位置していることと矛盾しない。

Mex-3B は上記のように、(2) では脂肪細胞分化の抑制、(3) では脂肪細胞分化の誘導、という脂肪細胞分化の制御において 2 面性を有することが示唆された。この事実と、(1) の Mex-3B が脂肪細胞分化過程において、発現抑制を受けること、を踏まえると、分化段階における Mex-3B の機能の使い分けがある可能性があると考えられる。即ち、未分化状態では、脂肪細胞分化に向かわないように、PPAR mRNA の発現を抑制し、分化初期では C/EBP 蛋白質の発現誘導を担う。そして、分化後期では Mex-3B 自身の発現が減少するために、PPAR mRNA の発現抑制能が低下し、PPAR シグナルの活性化が起こると考えられる(表)。今後、この Mex-3B が持つ 2 面性をいかなる機構で使い分けを行っているのか明らかにする必要がある。また、PPAR や C/EBP は脂肪細胞分化以外にも幅広い生理機能を持つため、それらの機能が Mex-3B 欠損マウスのやせ形、寿命延長という表現型に関わっている可能性も考えられる。また、PPAR や C/EBP 以外の Mex-3B 標的因子が脂肪細胞分化制御を担っている可能性も考えられ、今後さらなる研究を進めることが必要である。

脂肪細胞分化過程において、発現抑制を受けること、を踏まえると、分化段階における Mex-3B の機能の使い分けがある可能性があると考えられる。即ち、未分化状態では、脂肪細胞分化に向かわないように、PPAR mRNA の発現を抑制し、分化初期では C/EBP 蛋白質の発現誘導を担う。そして、分化後期では Mex-3B 自身の発現が減少するために、PPAR mRNA の発現抑制能が低下し、PPAR シグナルの活性化が起こると考えられる(表)。

| | Non-differentiated state | Early stage of Adipocyte differentiation | Late stage of Adipocyte differentiation |
|-----------------------------------|--|--|---|
| Expression level of Mex3B | High | Gradually decrease by GR(Guocorticoid Receptor) signal | Low |
| Function of Mex3B | Repress the expression of PPAR γ mRNA | Promote the translation of C/EBP β protein | × |
| Expression level of C/EBP β | Low | High | Moderate |
| Expression level of PPAR γ | Low | Gradually increase | High |

表:脂肪細胞分化のステージ毎における Mex3B、C/EBP β 、PPAR γ の発現量の変動とその際に示唆される Mex3B の機能の一覧図

今後、この Mex-3B が持つ 2 面性をいかなる機構で使い分けを行っているのか明らかにする必要がある。また、PPAR や C/EBP は脂肪細胞分化以外にも幅広い生理機能を持つため、それらの機能が Mex-3B 欠損マウスのやせ形、寿命延長という表現型に関わっている可能性も考えられる。また、PPAR や C/EBP 以外の Mex-3B 標的因子が脂肪細胞分化制御を担っている可能性も考えられ、今後さらなる研究を進めることが必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Yamazumi Yusuke, Sasaki Oh, Suyama-Fuchino Saki, Kohu Kazuyoshi, Kamoshida Yuki, Harada Hiroaki, Fujio Keishi, Oda Takeaki, Akiyama Tetsu | 4. 巻 519 |
| 2. 論文標題 The RNA-binding protein Mex-3B plays critical roles in the development of steroid-resistant neutrophilic airway inflammation | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 220 ~ 226 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.08.158 | 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 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Taniue Kenzui, Hayashi Tomoatsu, Kamoshida Yuki, Kurimoto Akiko, Takeda Yasuko, Negishi Lumi, Iwasaki Kei, Kawamura Yoshifumi, Goshima Naoki, Akiyama Tetsu | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 UHRF1-KAT7-mediated regulation of TUSC3 expression via histone methylation/acetylation is critical for the proliferation of colon cancer cells | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Oncogene | 6. 最初と最後の頁 1018 ~ 1030 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-019-1032-y | 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0件

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|