

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09887

研究課題名(和文) ヒト褐色脂肪の新規代謝調節機構の解明～光非依存的なOpsin3の役割～

研究課題名(英文) Metabolic regulation of human brown adipose tissues by Opsin3 in light-independent manner

研究代表者

佐藤 真理 (Sato, Mari)

北海道大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：40546488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：光非依存的なOpsin3受容体がヒト褐色脂肪に与える影響を調べるために、Opsin3受容体ノックアウト褐色脂肪細胞を樹立して機能解析実験を行った。その結果、ミトコンドリアでの熱産生に深く関わるucp1の発現、およびGlut1を介した糖取り込みによるエネルギー代謝・産生に光を介さずにOpsin3が関与していることが示唆された。これらの機能調節にどのようなシグナル経路が関与しているかを調べるため、RNA-sequenceデータを用いたシグナル解析を行ったところ、種々の代謝関連シグナル経路や褐色脂肪の機能発揮への関連シグナル経路が含まれていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は光受容体であるOpsin3をターゲットとした従来にない全く新しい褐色脂肪の活性化法の提案を目指すものである。Opsin3と褐色脂肪に関する報告はまだ少なく、さらにOpsin3の光刺激に依存しない褐色脂肪の新規活性化刺激の研究は代謝研究の新たな領域を切り開くものである。ヒトOpsin3について光依存性のみならず光非依存性の役割をも明らかにし、Opsin3のbi-functionalな役割を褐色脂肪の代謝メカニズムとともに示すことは、肥満や糖尿病といった代謝疾患における新たな予防・治療法の確立に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To analyze the role of light-independent Opsin3 functions in human brown adipose tissues, Opsin3 knock-out human brown adipocytes were established. Opsin3 regulated mitochondrial uncoupling protein-1 (UCP1) expression and Glut1-mediated glucose intake in light-independent manner. RNA-sequencing analysis identified that Opsin3 regulated various metabolic signaling to induce brown adipocytes function in energy expenditure.

研究分野：代謝学

キーワード：Opsin3 褐色脂肪

## 1. 研究開始当初の背景

G protein coupled receptor (GPCR) のひとつである Opn3 は 1999 年にマウスの脳で発見された脊椎動物型の新規 Opsin である (Blachshaw S et al., J Neurosci, 1999)。その後、マウス全組織における GPCR の網羅的解析により、Opn3 は脳組織よりも脂肪組織に高発現することが示され脂肪クラスターに分類された (Regard JB et al., Cell, 2008)。続いて 2013 年には、光感受性のない組織に発現する Opn3 が光を感知して GPCR シグナルを喚起することが報告された (Koyanagi M et al., Proc Natl Acad Sci, 2013)。ところが、脂肪組織に発現する Opn3 の機能的役割に関する報告はこれまでになく、申請者が世界に先駆けて Opn3-KO マウスを用いた代謝における表現系解析を行った。その結果、Opn3-KO マウスは易肥満傾向を呈し、それは褐色脂肪の機能低下によるものであった。褐色脂肪は血中の糖や脂肪を取り込み、褐色脂肪のミトコンドリアに特異的に発現する脱共益タンパク質 Ucp1 によってそれを熱に変換する (Kajimura S et al., Cell Metab, 2015)。つまり褐色脂肪が活発に機能していれば、糖や脂肪が白色脂肪に大量に蓄積されることなく、褐色脂肪で熱産生エネルギーとして使われるため、代謝が上がり太りにくい体質になる (Nedergaard J et al., Cell Metab, 2010)。このことから、褐色脂肪をターゲットとした代謝研究が世界中で行われており、中でも多くの研究者が褐色脂肪の機能を増強する新規刺激因子の発見に強い興味を持っている。Opn3-KO マウスが褐色脂肪機能不全による肥満傾向を示すことから、申請者は Opn3 を介した光刺激によって褐色脂肪を活性化することができると考え研究を行い、これを明らかにした。この研究成果については現在論文投稿中である。次に重要なことは、臨床応用を見据えて、マウスでの知見がヒトでも同様に確認できるかを明らかにすることである。このため、CRISPR/Cas9 システムを用いて Opn3-KO ヒト褐色脂肪細胞を作成し、光刺激実験および RNA-seq による遺伝子変動解析を行った。この結果、ヒト褐色脂肪細胞では Opn3 を介した代謝制御が存在するものの、光刺激による効果はほぼなく、光に依存しない経路がメインの制御機構であることが分かった。これは当初の予想に反するものであったが、Opn3 の光非依存性シグナルの存在については以前から示唆されており (Leung NY et al., Annu Rev Cell Dev Biol, 2017)、申請者の研究結果からも、マウスの褐色脂肪における Opn3 による代謝制御機構の一部は光非依存的に制御されていたことから、この結果は受け入れが妥当である。また、Opsin は進化の過程で生物の行動や生存環境に適した様々な変化を遂げており (Terakita A., Genome Biol, 2005Ref)、夜行性であるマウスと昼行性であるヒトでの役割が変化している可能性は高い。実際に、マウスの褐色脂肪は光暴露されやすい背部肩甲骨付近の皮膚直下にあるが、ヒトでは頸部深部や腋窩など光暴露されにくい部分に位置することからも、光応答の必要性がマウスとヒトでは異なることが示唆される。Opn3 の光非依存的な役割は哺乳類ではほとんど報告がなく、その詳細なメカニズムについては未知である。この研究課題の核心をなす学術的な問いは「ヒト褐色脂肪における Opn3 は光を介さないどのような機構で全身のエネルギー代謝を制御しているのか？」である。この未知の制御機構を明らかにすることで Opn3 を刺激しうる全く新しいトリガーが発見される可能性があり、褐色脂肪を活性化させる新規因子の発見において非常に重要である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト褐色脂肪において光非依存的に Opn3 が誘導しうる全身のエネルギー代謝制御システムを明らかにすることである。これは Opn3 をターゲットとした従来にない全く新しい褐色脂肪の活性化法の提案を目指すものである。Opn3 と褐色脂肪に関する報告は申請者の知る限りまだ報告がなく、この新規因子による褐色脂肪の新規活性化刺激の研究は代謝領域において独自性と創造性に富む。

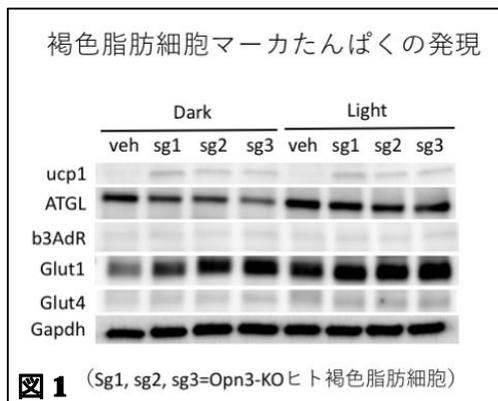
## 3. 研究の方法

Opn3-KO ヒト褐色脂肪細胞を用いた代謝機能解析実験を行う。CRISPR/Cas9 システムによって作製した Opn3-KO ヒト褐色脂肪細胞と野生型ヒト褐色脂肪細胞を用いて、褐色脂肪の機能的マーカーを測定し、ミトコンドリア活性、脂質分解、糖取り込みにおいて機能解析実験を行う。ミトコンドリア活性に関してはミトコンドリア数の変化、cytochrome C の活性を測定する。脂質合成に関しては関連酵素である FAS, ACC, scd1 の発現を測定する。脂質分解に関しては関連酵素である HSL, ATGL の発現を測定し、併せて脂質分解能測定実験を行う。糖代謝に関しては糖取り込み試験を行う。加えて、光照射実験を行い Opn3 を介して光非依存的に調節される分子機構を同定する。さらに、ヒト褐色脂肪において光非依存的に Opn3 で制御される新規シグナル経路の同定を目指し、RNA-seq の結果をもとに David を用いた pathway 解析を行う。これらで同定されたシグナル経路が Opn3 で喚起される GPCR シグナルとどのように協調しているかを調べる。

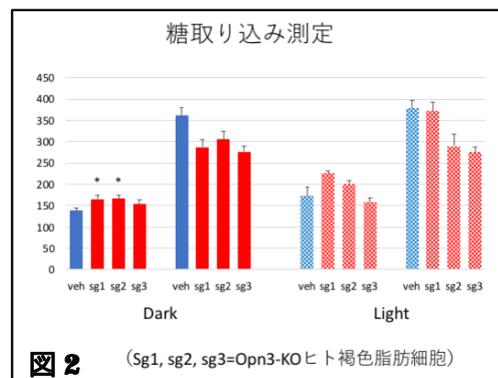
## 4. 研究成果

In vivo 実験：図 1 参照

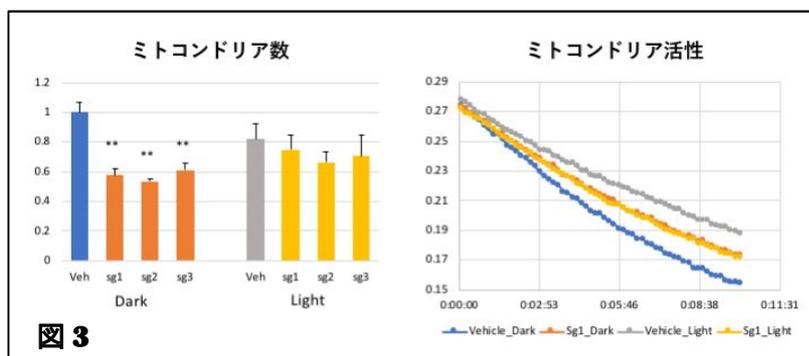
CRISPR/Cas9 システムによって Opn3-KO ヒト褐色脂肪細胞を 3 種類の guide RNA を用いて作成した (sg1-, sg2-, sg3-Opn3-KO cell)。この 3 種類の Opn3-KO ヒト褐色脂肪細胞を用いて褐色脂肪の機能マーカーである ucp1, ATGL, b3AdR, Glut1, Glut4 の発現を調べた。加えて光照射を行い、Opn3 欠損によるこれら因子の発現変動がどのように変化するかを調べた。その結果、ucp1 は Opn3 欠損により発現が上昇したが光照射では発現に変化はなかった。つまり、Opn3 は光非依存的に ucp1 の発現を正に調節していることが分かった。一方、Glut1 は Opn3 欠損により発現が上昇するが、Opn3 の有無に関わらず光照射にて増強された。つまり、Glut1 は Opn3 を介して光依存・非依存的な双方の経路にて正に調節されることが分かった (図 1)。



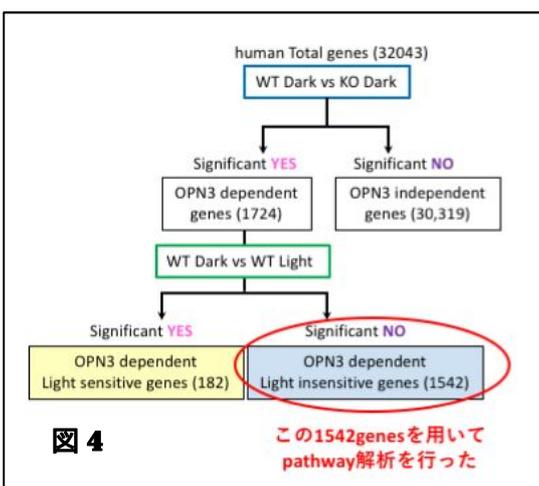
次に機能解析実験として糖取り込み測定を行った。糖取り込みは Opn3 欠損により増強するが、Opn3 の有無に関わらず光照射にて増強される。これは Glut1 の発現変化の傾向と同様であった。つまり、Glut1 を介した糖取り込みに関しては Opn3 を介して光依存・非依存的な双方の経路にて正に調節されることが分かった (図 2)。また、ミトコンドリア数の測定およびミトコンドリアの活性測定を行ったところ、ミトコンドリア数およびミトコンドリア活性は Opn3-KO ヒト褐色脂肪細胞で減少していた。これらは光照射により著しく低下するが Opn3 欠損によりある程度低下が抑制されており、ミトコンドリア数とミトコンドリア活性は Opn3 を介した光刺激により主に負に調節されていることが分かった (図 3)。



ここまでの結果から、ヒト褐色脂肪細胞において、ミトコンドリアでの熱産生に深く関わる ucp1 の発現、および Glut1 を介した糖取り込みによるエネルギー代謝・産生に光を介さずに Opn3 が関与していることが示唆された。次に、これらの機能調節にどのようなシグナル経路が関与しているかを調べるために RNA-sequence データを用いたシグナル解析を行った。野生型と Opn3-KO ヒト褐色脂肪細胞に光照射を与えたサンプルを用いた RNA-seq 解析から抽出した Opn3 を介する光非依存性に発現が変動する 1542 遺伝子を用いて解析ツール David を用いた pathway 解析を行った (図 4)。



その結果、基準の Enrichment score を満たすシグナル経路が 49 同定された。この中には、Fatty acid metabolism, Lipolysis, Glycolysis, Insulin signaling などの代謝関連シグナル経路、AMPK signaling pathway, PPAR signaling pathway, HIF-1 signaling pathway などの褐色脂肪の機能発揮への関連シグナル経路が含まれていた (図 5)。Opn3 は GPCR であり、GPCR シグナルを介して光非依存的に褐色脂肪の代謝を制御している可能性が高い。今後は褐色脂肪細胞における GPCR シグナルに関わる Gq シグナル関連因子の変化を調べ、Opn3 で喚起される GPCR シグナルがどのような代謝経路と協調しているかを調べる。



Pathway	Item	Count	%	P-value	Proportion
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Biosynthesis of antibiotics</a>	56	3.8	4.6E-14	1.3E-11
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Metabolic pathways</a>	167	11.3	2.2E-10	3.1E-8
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Citrate cycle (TCA cycle)</a>	15	1.0	5.2E-8	4.8E-6
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Carbon metabolism</a>	29	2.0	2.7E-7	1.9E-5
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Pyruvate metabolism</a>	16	1.1	5.8E-7	3.2E-5
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Steroid biosynthesis</a>	11	0.7	2.0E-6	9.4E-5
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Fatty acid metabolism</a>	16	1.1	8.1E-6	3.2E-4
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Valine, leucine and isoleucine degradation</a>	15	1.0	3.0E-5	1.0E-3
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)</a>	30	2.0	3.7E-5	1.2E-3
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Fatty acid elongation</a>	10	0.7	1.6E-4	4.5E-3
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Regulation of lipolysis in adipocytes</a>	15	1.0	2.4E-4	6.1E-3
KEGG_PATHWAY	<a href="#">AMPK signaling pathway</a>	24	1.6	3.5E-4	8.2E-3
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Oxidative phosphorylation</a>	24	1.6	1.1E-3	2.3E-2
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Glycolysis / Gluconeogenesis</a>	15	1.0	1.7E-3	3.3E-2
KEGG_PATHWAY	<a href="#">PPAR signaling pathway</a>	15	1.0	1.7E-3	3.3E-2
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Propanoate metabolism</a>	9	0.6	2.1E-3	3.9E-2
KEGG_PATHWAY	<a href="#">TNF signaling pathway</a>	20	1.4	2.1E-3	3.6E-2
KEGG_PATHWAY	<a href="#">2-Oxocarboxylic acid metabolism</a>	7	0.5	2.3E-3	3.8E-2
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Biosynthesis of unsaturated fatty acids</a>	8	0.5	2.7E-3	4.1E-2
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Fatty acid degradation</a>	11	0.7	2.7E-3	4.0E-2
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Alzheimer's disease</a>	26	1.8	5.7E-3	7.7E-2
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Parkinson's disease</a>	23	1.6	5.7E-3	7.3E-2
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Tryptophan metabolism</a>	10	0.7	6.6E-3	8.1E-2
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Butanoate metabolism</a>	8	0.5	7.1E-3	8.4E-2
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Biosynthesis of amino acids</a>	14	0.9	8.8E-3	9.9E-2
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Huntington's disease</a>	28	1.9	8.9E-3	9.5E-2
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Phenylalanine metabolism</a>	6	0.4	1.3E-2	1.3E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Adipocytokine signaling pathway</a>	13	0.9	1.7E-2	1.7E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Fatty acid biosynthesis</a>	5	0.3	2.2E-2	2.0E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Glyoxylate and dicarboxylate metabolism</a>	7	0.5	2.6E-2	2.3E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Glycerolipid metabolism</a>	11	0.7	2.7E-2	2.3E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Glutathione metabolism</a>	10	0.7	3.1E-2	2.5E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Focal adhesion</a>	27	1.8	3.6E-2	2.7E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Terpenoid backbone biosynthesis</a>	6	0.4	3.8E-2	2.8E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">NF-kappa B signaling pathway</a>	14	0.9	3.8E-2	2.8E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">beta-Alanine metabolism</a>	7	0.5	4.9E-2	3.3E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Central carbon metabolism in cancer</a>	11	0.7	5.0E-2	3.3E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Axon guidance</a>	18	1.2	5.0E-2	3.2E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Peroxisome</a>	13	0.9	5.6E-2	3.5E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Pertussis</a>	12	0.8	6.0E-2	3.6E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Cocaine addiction</a>	9	0.6	6.1E-2	3.5E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Small cell lung cancer</a>	13	0.9	6.5E-2	3.7E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)</a>	9	0.6	6.7E-2	3.7E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">HIF-1 signaling pathway</a>	14	0.9	7.4E-2	4.0E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Complement and coagulation cascades</a>	11	0.7	7.6E-2	4.0E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Tyrosine metabolism</a>	7	0.5	8.0E-2	4.1E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Protein digestion and absorption</a>	13	0.9	8.1E-2	4.0E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Insulin resistance</a>	15	1.0	8.7E-2	4.2E-1
KEGG_PATHWAY	<a href="#">Insulin signaling pathway</a>	18	1.2	9.3E-2	4.4E-1

图 5

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 Mari Sato	4. 巻 8
2. 論文標題 Significance and Application of Light Therapy Based on Photoreceptors to the Regulation of Fat Metabolism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Oral Health Reports	6. 最初と最後の頁 84-89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mari Sato
2. 発表標題 Light sensitivity of brown adipose tissue via photoreceptor Opsin3
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mari Sato
2. 発表標題 Light sensitivity and metabolic regulation of brown adipose tissue via Opsin3
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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			
米国	Joslin Diabetes Center			