

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月29日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究（B）

研究期間：H22年度～H23年度

課題番号：22780256

研究課題名（和文） マイクロRNA解析によるブタの脂肪合成・代謝機構の解明

研究課題名（英文）

Effect of microRNA-33b on adipogenesis regulated with SREBF1 in porcine adipocytes

研究代表者

独立行政法人農業生物資源研究所・家畜ゲノム研究ユニット・任期付研究員

谷口 雅章（TANIGUCHI MASAOKI）

研究者番号：60531431

研究成果の概要（和文）：

脂質合成の鍵転写因子 SREBP-1 のブタ完全長遺伝子塩基配列を決定した。ブタ SREBP-1 遺伝子内に、マイクロ RNA-33b (miR-33b) が存在する。ブタ脂肪細胞において、miR-33b と SREBP-1 遺伝子は同時に発現することを明らかにした。また、miR-33b が SREBP 活性化に関わる SCAP (SREBP cleavage-activating protein) タンパク質発現量を減少させ、脂肪合成系遺伝子発現、ならびに、脂肪合成量の減少に関わることを示した。本研究により、ブタ脂肪細胞において新たな脂質合成経路が存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Sterol regulatory element binding proteins (SREBP) are transcription regulator for cholesterol and fatty acid homeostasis. MicroRNA-33b (miR-33b) is conserved in an intron of SREBP-1 genes of most mammalians. A computational prediction suggested that target for miR-33b includes SREBP-cleavage activating protein (SCAP). Therefore we sought to investigate the effect of miR-33b on lipogenic pathway regulated with SCAP/SREBP-1 feedback in porcine subcutaneous pre-adipocytes (PSPA) cell line. Transfection of miR-33b decreased SCAP expression at both mRNA and protein levels by 4 d post transfection. Additionally, expression of lipogenic genes and triglyceride contents were degraded in miR-33b transfected PSPA. On the other hands, miR-33b transfection obviously decreased gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 (PPAR γ 2). Our results suggested that miR-33b is associated in part with attenuation of SCAP/SREBP-1 pathway, but also affected PPAR γ pathway which might consequently cause downregulation of lipogenesis in porcine adipocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2012年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：畜産、遺伝子、脂質、マイクロ RNA

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA は、約 22 塩基の小分子 RNA で、相補的な配列を持つ標的遺伝子に結合することで転写後調節を抑制する効果を持つことが知られており、ヒト疾患、個体発生、細胞分化等との関連について研究が進展してきた。家畜動物種においては、ゲノムプロジェクトの一環として、さまざまな組織や器官におけるマイクロ RNA 発現プロファイルが決定されているが、特定のマイクロ RNA 機能についての詳細な検討は、いまだ進展していないのが現状である。本研究で対象とした miR-33b は、脂質合成における重要な転写因子 SREBP-1 遺伝子のイントロン内に存在する。近年、ヒト miR-33b は、肝臓におけるコレステロール代謝に関わる遺伝子発現調節に対して影響を及ぼすことが報告された。しかしながら、miR-33b、および、SREBP-1 の脂肪細胞における脂肪酸合成経路に対する効果については知見が得られていない。さらに、マウス Srebp-1 遺伝子には miR-33b が存在しない。

ブタは有用な肉用家畜としてだけでなく、近年、医療モデル動物としても注目されており、エネルギー代謝にかかわる分子経路について知見を得ることにより、糖尿病や肥満等の疾患研究にも貢献する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではまず、これまで未決定であったブタ SREBP-1 遺伝子の完全長塩基配列を決定した。次に、ブタ肝臓、筋肉、および、皮下脂肪組織における miR-33b、および、SREBP-1 遺伝子の発現量を測定した。マイクロ RNA の標的遺伝子予測により SREBP-1 の活性化に寄与する SREBP-cleavage activating protein (SCAP) が miR-33b の標的となる可能性がある。SCAP、および、SREBP は脂質合成のフィードバック調節を制御しており、miR-33b はその制御機構に影響しうるため、ブタ皮下脂肪由来脂肪前駆細胞 (Porcine Subcutaneous Pre-Adipocyte : PSPA) を用いて、脂肪細胞における脂質合成に miR-33b 導入が SCAP/SREBP-1 系の脂肪合成経路の遺伝子発現調節への影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) ブタゲノム BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ライブラリーをスクリーニングすることにより、ブタ SREBP-1 遺伝子を含むクローンを単離し、キャピラリーシーケンサーを用いて、完全長塩基配列を決定した。

(2) 5 か月齢のブタ肝臓、筋肉、皮下脂肪 (内

層および外層) から全 RNA (小分子 RNA を含む) を抽出し、リアルタイム PCR 法により SREBP-1、および、miR-33b 遺伝子発現量を測定した。

(3) ブタ PSPA 細胞株を用いて、miR-33b を導入した実験区に対し、特定の生理活性を示さない miRNA を導入した対照区の間で、SCAP、SREBP-1、および、脂質合成系遺伝子発現、さらに、脂質合成量を比較した。

4. 研究成果

(1) 本研究により、約 20kb のブタ SREBP-1 遺伝子塩基配列が第 12 染色体上に存在し、19 個のエクソンと 18 個のイントロンで構成されることを明らかにした。さらに、第 16 イントロンに存在する miR-33b は、ヒト等の他の動物種の miR-33b と完全に一致することを明らかにした (図 1)。

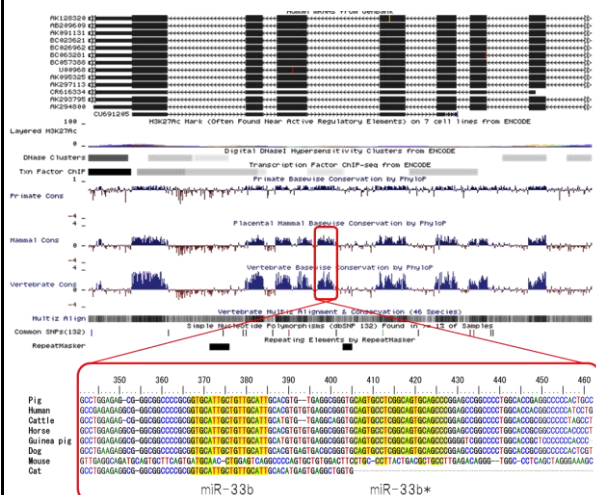


図1 SREBP-1遺伝子の動物種間比較
SREBP-1遺伝子イントロン領域のうち赤線で囲った領域は相同性が高く、その中にmiR-33b配列が含まれる。

(2) ブタ SREBP-1 遺伝子と miR-33b 発現量は、肝臓、および、筋肉組織で低く、それらの間で有意な差異は認められなかったが、いずれの遺伝子も肝臓での発現量に比べて、皮下脂肪組織 (内層 : Sc fat (in) と外層 : Sc fat (out) の両方) での発現量が有意に 3 倍程度高いことを示した (図 2)。さらに、皮下脂肪組織における miR-33b と SREBP-1 遺伝子発現が同期することが明らかとなった。そこで、miR-33b がブタの脂肪細胞における脂質合成に何らかの効果を持つと考えた。

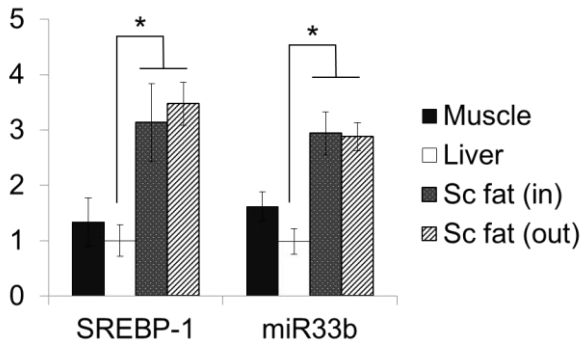


図2 ブタSREBP-1とmiR-33b遺伝子発現の組織分布

(3) ブタ PSPA 細胞株に miR-33b を導入することにより、脂質合成量が有意に減少した(図3 赤く染色された部分が脂肪)。

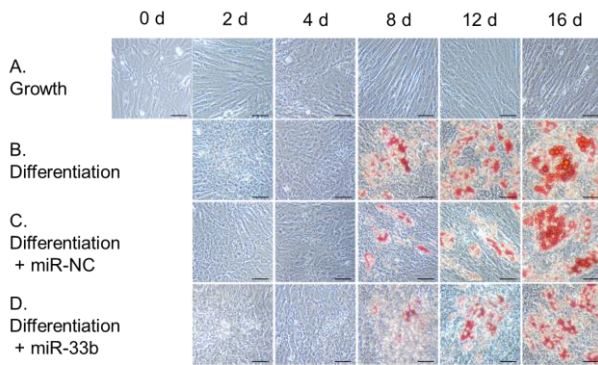


図3 PSPA脂肪合成の経時的変化におけるmiR-33bの効果

miR-33b の標的候補である SCAP 発現量(遺伝子、および、タンパク質の両方)は、対照区と比べて有意に減少した。さらに、SREBP-1 発現量も影響を受け、脂質合成遺伝子である FASN (Fatty acid synthase)、および、SCD1 (Stearoyl-CoA desaturase 1) 発現量が減少した(図4)。このため、miR-33b は標的候補遺伝子である SCAP 発現に影響を及ぼし、その結果、SREBP-1 活性が減少したため、転写制御を受ける脂質合成系遺伝子発現が抑制され、脂質合成量が減少したことが示唆された。

しかしながら、過剰量の miR-33b が導入されたにもかかわらず、SCAP、および、SREBP-1 発現量の減少は小さく、miR-33b の SCAP/SREBP-1 系の脂質合成経路に対する効果は、限定的だったのではないかと推察される。そこで、SREBP-1 とともに脂質合成系遺伝子発現の調節に重要な役割を持つことで知られる PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated protein gamma) 遺伝子発現についても miR-33b の効果を検討した。その結果、脂肪組織で優位に発現するアイソフォームである PPAR $\gamma 2$ 遺伝子発現量は、miR-33b 導入により、有意に減少することを明らかとした(図4)。脂質合成系遺伝子のう

ち、SCD1 は SREBP-1 だけでなく、PPAR γ にも転写制御を受けることが知られている。このことを反映するように SCD1 遺伝子発現量が減少した可能性がある(図4)。このように、miR-33b は、当初予想した SCAP/SREBP-1 系の

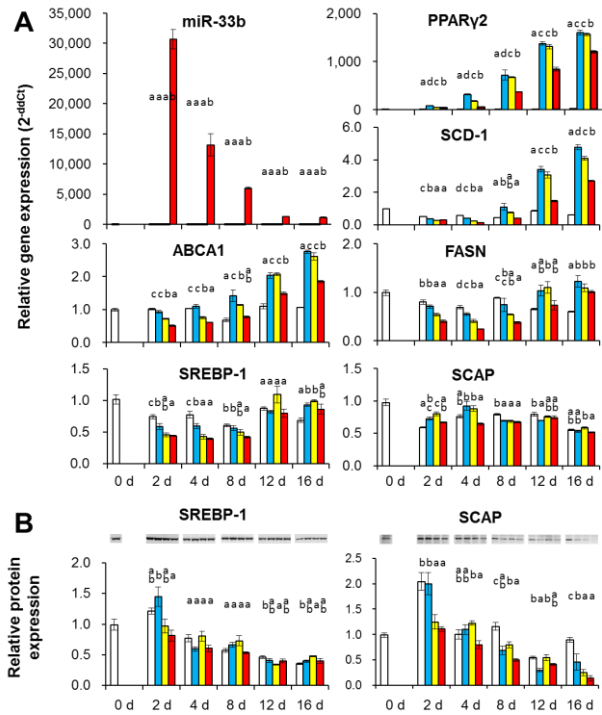


図4 PSPAへのmiR-33b導入による遺伝子およびタンパク質発現量の変動

脂肪合成経路の抑制に加え、PPAR γ による脂肪合成経路にも影響を及ぼすことにより、ブタ脂肪細胞における脂質合成量の減少に関与したことが示唆された。

今後、ブタ脂肪細胞の miR-33b 発現量と成長過程における脂肪細胞分化、および、脂質合成量との関係、あるいは、ブタ品種間に見られる脂肪組織の発達の差異との関係などを明らかにすることにより、肉豚生産において効率的な飼養技術の開発に向けた研究の推進を予定している。また、miR-33b がどのようにして PPAR γ 系の脂質合成経路に影響を及ぼしたか、ブタ脂肪細胞における miR-33b の標的遺伝子をクローニング等、分子生物学的手法により、脂肪合成経路に対する効果の詳細について検討する。

本研究が進展し、ブタの脂肪細胞における新たな脂質合成経路が解明されることにより、医療モデル動物としてもブタの有用性が高まり、エネルギー代謝に関連する疾患のメカニズム解明にも寄与しうる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

M. Taniguchi, I. Nakajima, T. Awata, S. Mikawa. Effect of miR-33b on porcine adipocytes differentiation and development. Plant & Animal Genome XIX conference. 2011.1.17, San Diego, CA, USA

谷口雅章, 中島郁世, 栗田崇, 美川智. ブタ皮下脂肪細胞の分化成熟過程におけるマイクロRNAの効果, 第34回日本分子生物学会年会, 2011.12.16, 横浜市

〔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:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

独立行政法人農業生物資源研究所・農業生物先端ゲノム研究センター・家畜ゲノム研究ユニット・任期付研究員
谷口 雅章 (TANIGUCHI MASA AKI)

研究者番号: 60531431

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: