

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 7日現在

機関番号：83903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790879

研究課題名（和文） 脂肪細胞特異的 mRNA制御機構の解明とインスリン感受性調節における役割

研究課題名（英文） Role of adipocyte-specific mRNA regulatory system in the control of insulin-mediated glucose metabolism

研究代表者

杉本 昌隆（SUGIMOTO MASATAKA）

国立長寿医療研究センター・老化細胞研究プロジェクトチーム・プロジェクトリーダー

研究者番号：50426491

研究成果の概要（和文）：生体のインスリン感受性調節において脂肪組織は重要な機能を持っている。研究代表者は以前に、Hzf と呼ばれる RNA 制御タンパク質が生体において脂肪組織に特異的に発現し、脂肪細胞の機能制御を介して生体のインスリン感受性を制御する因子であることを報告した。本研究では Hzf の機能するメカニズムについてさらに詳細な解析を行い、Hzf が細胞内で HuR と呼ばれる別の RNA 結合タンパク質と協調して脂肪細胞の機能に不可欠な遺伝子の発現を転写後調節を行うことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Adipocytes play essential roles in controlling the insulin sensitivity. We have previously shown that an RNA-binding protein Hzf is specifically expressed in adipose tissue and required for proper adipocyte functions thereby contributing to the regulation of insulin-mediated glucose metabolism. We here investigate the detailed molecular mechanism by which Hzf functions in adipocytes and show that Hzf associates with another RNA-binding protein HuR. These proteins cooperate in the regulation of gene expression through post-transcriptional mechanism, which is required for the adipocyte functions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝額

キーワード：RNA結合タンパク質・脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

我が国における2型糖尿病患者は生活習慣の変化に伴い現在急激に増加している。2型糖尿病は、先進国において死因の上位を占める脳・心血管系疾患のリスクを飛躍的に高め、また患者 QOL の低下や、長期間の治療を必要とするなどの経済的観点からも損失は計

り知れず、その対策は急務とされる。2型糖尿病は肥満等を原因とする脂肪組織の機能不全に起因することが多い。脂肪細胞は余剰のエネルギー貯蔵を行うとともに、アディポカインと総称される様々な生理活性物質を分泌して末梢組織におけるインスリン感受性を制御するなど、生体にとって極めて重要

な内分泌器官として機能している。肥満等により脂肪組織の機能が破綻するとアディポカインの分泌バランスが崩れ、インスリン抵抗性が惹起される。したがって脂肪細胞の形成(分化)や機能に必要な分子メカニズムを理解することができれば、将来より効率の良い薬学的肥満・2型糖尿病対策(予防・治療法)の開発へと繋がるのが期待される。

研究代表者らは以前に、癌抑制タンパク質 p53 の標的因子として Hzf と呼ばれる RNA 結合タンパク質を同定した。その後の解析により、正常な生体において Hzf は脂肪組織に特異的に発現していることを見出した。培養細胞においても、Hzf の発現は脂肪細胞の成熟とともに著しく誘導されることが明らかになった。Hzf の発現を阻害すると、脂肪細胞の成熟が正常に起こらない。さらに興味深いことに、Hzf ノックアウトマウスはアディポネクチン、レプチン分泌など脂肪細胞の機能に以上が見られ、野生型と比較して顕著なインスリン抵抗性を示した。研究代表者らはこの原因として、Hzf 非存在下では脂肪細胞の機能に必須な C/EBP タンパク質の発現が低下することを見出した。Hzf は C/EBP の mRNA に直接結合し、その発現を転写後調節することを明らかにしたが、その詳細なメカニズムについては殆ど不明であった。

2. 研究の目的

以前の研究結果から、Hzf が作用する転写後遺伝子発現制御機構が脂肪細胞の機能にきわめて重要な役割を持つことは明らかである。本研究では Hzf が作用するメカニズムについて詳細な解析を行い、転写後遺伝子発現制御系が脂肪細胞の機能にどのような役割を持つのかについて明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Hzf と相互作用する分子の同定

細胞内において Hzf がどのような分子と相互作用しているのか調べるために、Hzf 複合体を細胞内から精製し、質量分析により Hzf と相互作用するタンパク質を解析する。

(2) Hzf 相互作用分子の機能解析

上記から得られた Hzf と相互作用する分子について、脂肪細胞における Hzf の機能とどのようなかわりを持つかが調べる。培養細胞脂肪分化モデルとして汎用される 3T3-L1 細胞を使用し、複合体の動態およびその機能について調べる。

(3) モデルマウスの作製

モデルマウスを作製し、これら分子の相互作用が生体においてどのような昨日を持つのか、特に重要な脂肪機能のひとつであるインスリン感受性調節に焦点を当てて解析を行う。

4. 研究成果

(1) Hzf と相互作用する分子の同定

Hzf 複合体を細胞内から精製するために、精製用に Flag タグおよび His タグをそれぞれ N 末端および C 末端に付加した Hzf タンパク質を発現させるためのレトロウィルスを作製した。このウィルスを NIH-3T3 細胞に感染させ、感染した細胞のライゼートを Flag 抗体で免疫沈降し、その後 Flag ペプチドを用いて Hzf 複合体を溶出し、溶出物をニッケルカラムを用いて 2 度目の精製を行い、イミダゾールで溶出した。得られた Hzf タンパク質複合体を濃縮し、SDS-PAGE で分離し、銀染色を行い、Hzf 特異的に共沈してきたタンパク質のバンドを切り出し、トリプシン処理後質量分析を行った。その結果、Hzf は細胞内で様々な RNA 結合タンパク質と相互作用することがわかり、中でも HuR と呼ばれる RNA 結合タンパク質は Hzf と強い相互作用を示した(図1)。

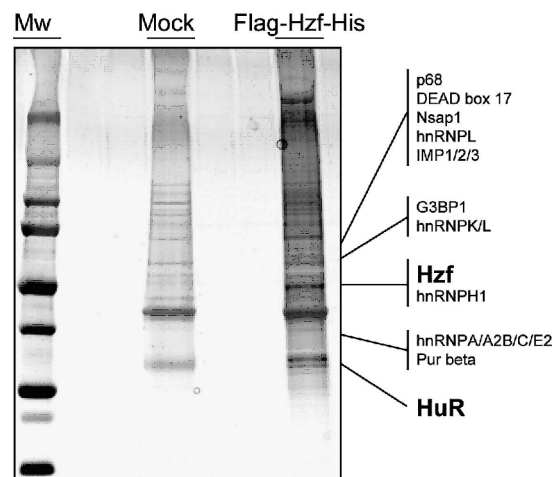


図1. Hzf タンパク質複合体の精製。NIH-3T3 細胞に Flag-Hzf-His を発現させ、Flag 抗体およびニッケルカラムを用いて Hzf タンパク質複合体をタンデムアフィニティー精製した。複合体中に含まれるタンパク質を質量分析により解析した。

(2) Hzf 相互作用分子の機能解析

脂肪細胞においてこれら分子複合体がどのような機能を持つのか調べるために、3T3-L1 細胞を用いて分化刺激後の複合体の動態を調べた。細胞をインスリン、Dexamethasone isobutylmethylxanthine 含有培地で 0 ~ 8 日間培養し、脂肪分化を誘導し、ライゼートを調製後、内在性 HuR を免疫沈降し、Hzf-HuR 複合体の検出を行った。実験の結果、分化刺激後 2 日目に Hzf-HuR 複合体量は増加し、その後は減少して刺激前と同

じレベルまで低下することが示された（図2）

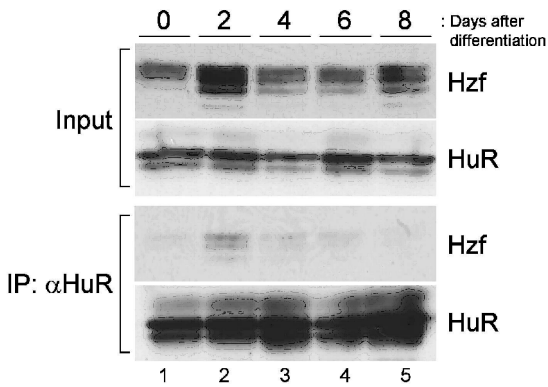


図2．脂肪分化刺激後の Hzf-HuR複合体の動態。

3T3-L1細胞を脂肪分化刺激後経時的にライゼートを調整し、免疫沈降後医務のプロットによりタンパク質の検出を行った。

次にこれらタンパク質の相互作用が脂肪細胞の成熟にどのような影響を与えているのか調べるために、3T3-L1細胞に Hzf, HuR ノックダウン sh-RNA 発現レトロウイルスを感染させ、脂肪分化させ、Oil Red O 染色を行った（図3）。Hzf 単独ノックダウンすると以前に報告したように脂肪分化が阻害され、HuR 単独ノックダウンでは殆ど影響は見られなかった。興味深いことに両者をノックダウンした細胞では、脂肪分化が著しく阻害された。このことから、Hzf-HuR 複合体は脂肪細胞の成熟に重要な役割を持つことが示唆された。

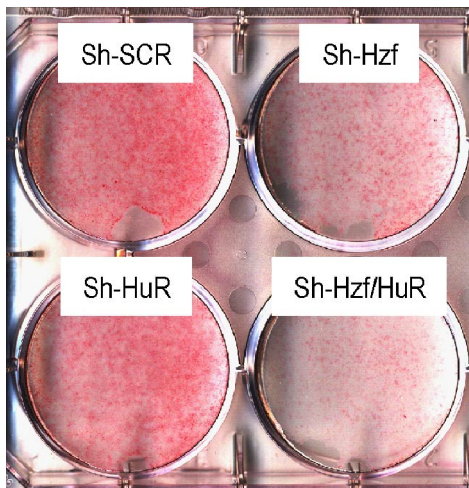


図3．Hzf-HuRタンパク質は脂肪分化に不可欠である。

3T3-L1細胞に sh-Hzf/HuR 発現レトロウイルスを感染させ、6日間脂肪分化させた後に Oil Red O 染色を行った。

研究代表者らは以前に、Hzf が脂肪細胞の分化過程において C/EBP タンパク質の発現に必要であることを報告した。Hzf-HuR 複合体が脂肪細胞の分化・成熟に必要な遺伝子群の発現に対してどのような影響を持つのかを調べるために図3の実験で用いた細胞におけるこれらタンパク質の発現を調べた。以前の報告と同様に、Hzf 非存在下では C/EBP

タンパク質の発現は低いレベルに抑えられていた。HuR ノックダウン細胞においては他のグループから報告されたように、C/EBP の発現が低かった。しかしながら、C/EBP は C/EBP と機能的に相補性を持つために C/EBP の低下だけでは脂肪分化に大きな影響が出なかったと考えられる。Hzf/HuR ダブルノックダウン細胞においては、分化刺激後の C/EBP タンパク質の発現は殆ど観察されなかった。したがって Hzf と HuR タンパク質は協調して C/EBP タンパク質の発現を制御していることが示唆された。

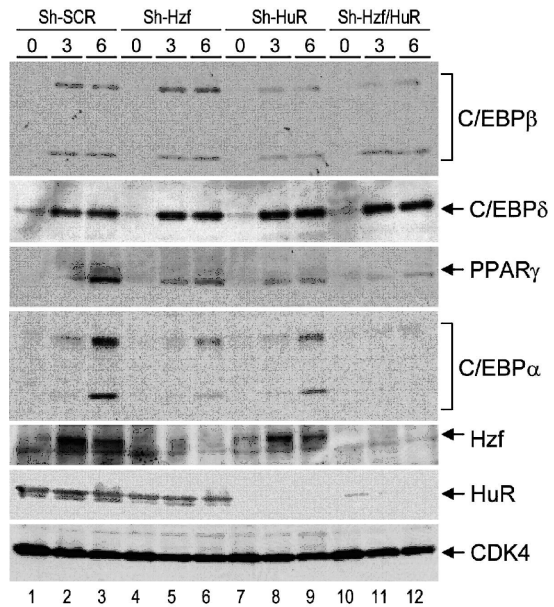


図4．Hzf-HuR 複合体は脂肪分化における C/EBP のタンパク質に不可欠である。

Hzf, HuR をノックダウンした 3T3-L1 細胞に分化刺激後、経時的にサンプルを採取し、図中に示されたタンパク質の発現をイムノプロットにより評価した。

次にこれらのサンプルで C/EBP mRNA 量を測定したところ、全てのサンプルで C/EBP mRNA は同様に検出された（図5）。このことから、Hzf/HuR 非存在下においても、分化刺激により C/EBP mRNA の転写は正常に起こるが、転写後の発現調節機構が正常に機能しないために C/EBP タンパク質の合成が効率良く行われなかったことが示唆された。

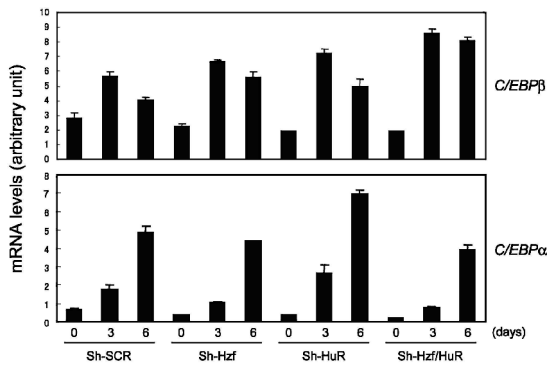


図5. C/EBP の転写は Hzf, HuR 非存在下でも正常に起こる。

Hzf, HuR をノックダウンした 3T3-L1 細胞を、分化刺激後経時的に RNA を回収し、示された mRNA をリアルタイム PCR 法により定量した。

Hzf, HuR はともに RNA 結合タンパク質であることから、両者のタンパク質の相互作用は共通した RNA リガンドを介して見られることが考えられる。この可能性について検証するために、レトロウイルスを用いて NIH-3T3 細胞に Hzf および HuR にそれぞれ Flag タグおよび HA タグを付加したタンパク質を発現させ、ライゼートを RNase 処理した後に免疫沈降を行った。RNase 未処理では両タンパク質の相互作用は容易に検出できたが、RNase 処理後は両タンパク質の相互作用は全く検出することができなかった (図 6)。したがって細胞内においてこれらタンパク質の相互作用は直接的ではなく、共通の RNA リガンドを介して行われることが示唆された。

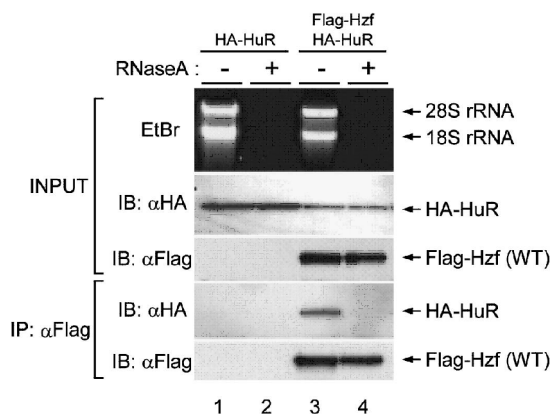


図6. Hzf と HuR は RNA 依存的に相互作用する。

Flag-Hzf および HA-HuR を発現した NIH-3T3 細胞からライゼートを調製し、RNase 処理してから Flag 抗体を用いて免疫沈降した。

Hzf は脂肪細胞において C/EBP mRNA に結合する。この結合は mRNA の翻訳に重要であることが以前の報告により示されている。そこで、Hzf-HuR 複合体中に C/EBP mRNA が含まれるかについて検討を行った。3T3-L1 細胞に Flag-Hzf および HA-HuR を発現させ、Flag 抗体を用いて免疫沈降を行い、Hzf 複合体を溶出後 HA 抗体を用いて再び免疫沈降を行った。免疫沈降サンプルから RNA を回収し、C/EBP 遺伝子群の mRNA を定量した。C/EBP mRNA は Hzf-HuR 複合体中に検出されなかったが、C/EBP および C/EBP は顕著に複合体中に濃縮されていることがわかった (図 7)。このことから、Hzf-HuR 複合体は C/EBP だけでなく C/EBP mRNA 上においても形成されることが示唆された。以前の報告では Hzf は C/EBP mRNA には結合は見られなかったが、この理由として以前の実験系では非特異的吸着を減らすために極度に厳しい条件下 (尿素含有バッファー) で免疫沈降を行ったのに対し、今回の実験では連続して免疫沈降を行うため、マイルドな条件でライゼートを調製をしたためだと考えられる。HuR は他のグループの報告で C/EBP mRNA に結合することが示されている。今回の我々の実験では Hzf と HuR が同時に C/EBP mRNA に結合することが示されたが、C/EBP タンパク質の発現は Hzf のステータスにより差ほど変化が見られないことから (図 4)、Hzf-HuR 複合体の機能的ターゲットではないと考えられる。これに対し、C/EBP の発現には Hzf と HuR が協調して作用することから、この RNA の翻訳に Hzf-HuR 複合体が重要な役割を持つことが考えられる。

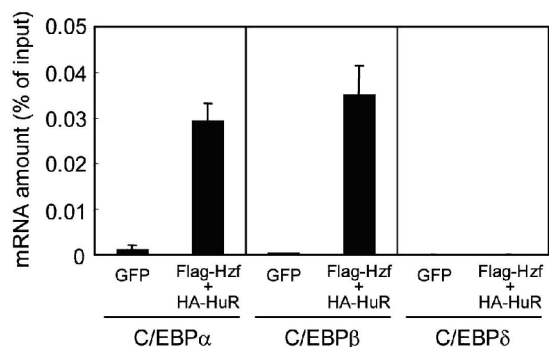
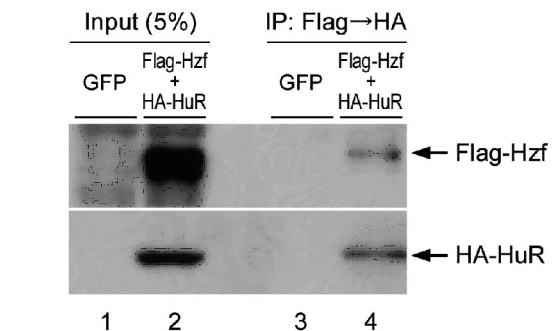


図7. Hzf-HuR複合体は C/EBP mRNA上に形成される。

3T3-L1細胞に Flag-Hzfおよび HA-HuRを発現させ、ライゼートを調製し、Flag抗体および HA抗体を用いて sequential免疫沈降を行った。免疫沈降産物から RNAを回収し、リアルタイム PCR法により上に記された mRNAを定量した。

さらに、Hzf-HuRタンパク質複合体が生体の脂肪組織機能にどのように関与するのかについて明らかにするために、モデルマウスの作製を行った。Hzfノックアウトマウスは viableであるが、HuRノックアウトマウスは胎性致死の表現型を示すため、HuRコンディショナルノックアウトマウスと Hzfノックアウトマウス、および脂肪特異的 CRE 発現 (ap2-CRE) マウスを交配した。これまでに複数回の交配を行ったが、Hzfノックアウトマウスの多くは性成熟を迎える前に敗血症で死んでしまうため、現在までのところ解析に十分な数の個体を得られていない。

これまでの実験から、脂肪細胞内において Hzfと HuRタンパク質は C/EBP mRNAを共通した RNAリガンドとして認識し、複合体を形成することが示された。この複合体形成が C/EBP タンパク質の合成に関与している可能性は極めて強い。今後は、ルシフェラーゼレポーターなど mRNA発現・翻訳の単純化モデルを用いて、これらタンパク質による複合体形成がどのようにして C/EBP の発現を制御するのかについて検討する必要がある。

モデルマウスに関しては、以前の報告から Hzfノックアウトマウスは形態的に脂肪組織に異常が認められないにもかかわらず著しいインスリン抵抗性を示すことが明らかになっている。脂肪特異的 Hzf/HuRダブルノックアウトマウスにおいて、これら表現型にどのような変化が見られるのかについては興味深い点であり、更に今後も交配を継続して目的個体数を増やし、解析を行う必要がある。

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1件)

Nakamura, H., Kawagishi, H., Watanabe, A., Sugimoto, K., Maruyama, M., and Sugimoto, M. Cooperative role of RNA-binding proteins, Hzf and HuR in p53 activation. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1997-2009, 2011., 査読有.

[学会発表](計4件)

Kawagishi, H., Nakamura, H., Tsugawa, T. and Sugimoto, M. HuR maintains replicative lifespan by repressing ARF tumor suppressor. 第34回大会 日本分子生物学会年会 横浜, 2011年12月14日

Kawagishi, H. and Sugimoto, M. RNA-binding protein HuR suppresses cellular lifespan by repressing the translation of ARF mRNA. Mechanism and Model of Cancer, SALK symposia, 2011年8月17日

Nakamura, H., Kawagishi, H., Watanabe, A., Maruyama, M., Sugimoto, M. Post-transcriptional regulation of the p53 tumor suppressor. Molecular Genetics of Aging, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, 2010年8月18日

Sugimoto, M. Post-transcriptional regulation of the p53 pathway. 日本基礎老化学会第33回大会 シンポジウム 愛知県, 2010年6月17日

Sugimoto, M. Post-transcriptional regulation of the p53 pathway. 日本基礎老化学会第33回大会 シンポジウム 愛知県, 2010年6月17日

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉本 昌隆 (SUGIMOTO MASATAKA)

国立長寿医療研究センター・老化細胞研究プロジェクトチーム・プロジェクトリーダー

研究者番号: 50426491