

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04130

研究課題名（和文）スプライシング調節によるエネルギー代謝の最適化を介した寿命制御

研究課題名（英文）Regulatory mechanisms of lifespan by altered energy metabolism via splicing control

研究代表者

樋上 賀一（Higami, Yoshikazu）

東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・教授

研究者番号：90253640

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：カロリー制限（CR）による代謝改善・抗老化・寿命延伸効果は、脂肪組織でのミトコンドリアの量の増加と質の改善が重要であること、またCRによるミトコンドリアの質の改善に関連するミトコンドリアシグナルペプチダーゼの1つであるmitochondria intermediate peptidaseのスプライシングがCRにより変化することを示した。そこで、脂肪組織におけるCRによるスプライシングの変化を、RNAseqデータを用いて網羅的に解析した。その結果、CRによりスプライシング調節に変化が生じている4つの遺伝子を抽出し、組織を解析した結果、2つの遺伝子でスプライシングが変化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

近年、老化の分子メカニズムの解明が進み、科学的に根拠に基づいた老化を制御する予防法や治療法の開発が進められるようになってきた。その中で、老化細胞除去薬やカロリー制限模倣薬がその候補となると考えられている。本研究の推進は、老化制御の分子基盤の解明のみならず、カロリー制限模倣薬の開発に繋がると期待でき、超高齢化社会を迎えている本邦のみならず、近い将来、高齢化が進むであろう世界中の国々の公共の福祉に資すると期待できる。

研究成果の概要（英文）：The metabolic improvement, anti-aging and longevity effects of caloric restriction (CR) depend on quantity and quality of mitochondria in the white adipose tissue (WAT). CR changes splicing regulation in one of mitochondrial signal peptidases, mitochondria intermediate peptidase, which is involved in the improvement of mitochondrial quality by CR. Therefore, we comprehensively analyzed changes in CR-induced splicing in WAT using RNAseq data. As a result, we extracted 4 genes whose splicing regulation was changed by CR, analyzed these gene expressions in WAT, and finally identify 2 genes.

研究分野：実験病理学

キーワード：老化 寿命 カロリー制限 脂肪組織 ミトコンドリア 脂質代謝 スプライシング制御

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

前駆型 mRNA はスプライシングにより成熟化し、タンパク質に翻訳される。その過程では、Serine/Arginine-Rich Splicing Factor 1 (SRSF1) など種々のスプライシング調節因子を介して、複数種類のタンパク質が生成される。リポジストロフィー（脂肪異栄養症）は、遺伝子異常などにより発症する比較的稀な疾患であるが、寿命や生命予後に関わるため、病態解明と治療法の確立が急がれている。皮下脂肪優位なりポジストロフィーを示す疾患として、核膜裏打ちタンパク質であるラミン（LMNA）遺伝子の変異により発症する早老症 Hutchinson-Gilford プロジェリア症候群（HGPS）があり、白色脂肪組織（WAT）でのミトコンドリア活性が過度に亢進している。申請者らは、ミトコンドリアタンパク質の成熟化に必要な mitochondria intermediate peptidase（MIPEP）を脂肪特異的に欠損させたマウスを世界で初めて作成し、その表現型を解析し、HGPS 様の皮下脂肪選択的なりポジストロフィーを呈することを見出した。しかし、WAT でのミトコンドリア活性は HGPS の表現型とは異なり低下した。また、MIPEP はラミンと同様、スプライシング因子である SRSF1 により、スプライシング調節を受けること、SRSF1 は代謝改善・抗老化・寿命延伸効果のあるカロリー制限により発現が増加することから、寿命延伸効果への関与が示唆される。以上より、『SRSF1 が MIPEP やラミンを含む標的因子のスプライシング調節を介して、摂餌量に対するエネルギー代謝を最適化して、寿命を制御する』と仮説するに至った。

2. 研究の目的

本申請では、以下の点を明らかにする。

- (1) 代謝組織における SRSF1 の役割を明らかにする。
- (2) 脂肪特異的 MIPEP 欠損マウスおよび HGPS モデルマウスの病態を解明する。
- (3) スプライシング制御による新規代謝・寿命制御機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 代謝組織における SRSF1 の役割の解明

C57BL/6 マウスを自由摂食 (AL; ad libitum) 群と 9 ヶ月間摂餌量を 70%に制限した CR 群に分け、数種類のスプライシング関連 RNA 結合タンパク質の WAT における遺伝子発現を Real-time RT-PCR により解析した。

SRSF1 のスプライシング活性を評価するため、SRSF1 による制御が報告されている数種の遺伝子のスプライシング変化を上記の CR マウスの WAT において解析した。

CR により特に WAT で SRSF1 の遺伝子発現およびタンパク質発現が変化したことから、脂肪組織及び脂肪細胞に特徴的な SRSF1 の制御及び機能の存在が示唆される。そこで脂肪細胞の分化成熟に着目し、マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 の分化に伴う SRSF1 の発現変化を遺伝子およびタンパク質レベルで解析した。

脂肪細胞における SRSF1 の機能をさらに詳細に解析するために、レトロウイルスベ

クターを用いて Srsf1 OE 及び KD 3T3-L1 細胞株を作製した。上記の細胞株を 8 日から 10 日間分化誘導し、細胞株を解析した。

(2) 脂肪特異的 MIPEP 欠損マウスの解析

Mipepflox/flox マウスと Adiponectin-Cre マウスとの交配により、脂肪特異的 Mipep KO マウスを作製した。

雌の Mipepflox/flox マウス (wild-type; WT) と Mipep KO マウスを 19~20 週齢でコンピュータ断層 (CT 撮影)、代謝測定、グルコース負荷試験 (GTT)、インスリン負荷試験 (ITT)、自発運動量測定を行った後、21~30 週齢 (14~21 週間 HFD) で安楽死させ、血漿、生殖器周囲 WAT (gWAT)、皮下 WAT (sWAT)、褐色脂肪組織 (BAT) など、各組織を採取し、種々の解析を実施した。

(3) CR によりスプライシングが変化する代謝関連遺伝子の同定。

3 ヶ月齢から 6 ヶ月間 CR を行ったマウスの皮下脂肪組織と 9 ヶ月齢まで自由摂餌させた雄マウスの皮下脂肪組織を用いて RNAseq を行い、CR によるスプライシングの変化を明らかにした。

研究成果

(1) 代謝組織における SRSF1 の役割の解明

その結果、Srsf1 発現が顕著に増加していた。また、WAT 以外の器官ではこのような Srsf1 の顕著な変化は確認されなかった。一方で、WAT における SRSF1 のタンパク質発現量を Western blotting により解析したところ、遺伝子レベルとは異なり CR により減少傾向を示した。

ribosomal protein S6 kinase B1 (Rps6kb1) のバリエーション体 Rps6kb1-002 の total Rps6kb1 に対する発現割合と translocase of inner mitochondrial membrane 9 (Timm9) のバリエーション体 Timm9 2 の total Timm9 に対する発現割合がともに CR により減少した。

SRSF1 の遺伝子およびタンパク質発現量は脂肪細胞の分化に伴い減少した。

OE 細胞株では脂肪滴の蓄積量が減少した一方で、KD 細胞株では増加傾向を示した。KD 細胞株において、Rps6kb1-002 は発現量及び total Rps6kb1 に対する割合が共に減少し、Timm9 2 では total Timm9 に対する割合のみ減少した。

(2) 脂肪特異的 MIPEP 欠損マウスの病態解明

脂肪特異的な MIPEP 欠損により WAT や BAT に MIPEP 基質タンパク質の増加もしくは減少が観察され、ミトコンドリアマトリクスタンパク質のプロテオスタシス異常が観察された。

脂肪細胞の分化に関連する遺伝子発現が減少し、WAT において脂肪萎縮症、BAT において白色脂肪組織化が観察された。

電子顕微鏡による解析により、WAT において白色脂肪細胞のミトコンドリアのクリ

ステの消失が観察されたが、BAT において褐色脂肪細胞のミトコンドリアのクリステの減少が観察された。

酸素消費量や二酸化炭素排出量には大きな変化はなかったが、GTT、ITT は軽度悪化し、脂肪肝が観察された。また、脾臓重量の増加とともに、全身の炎症が亢進した。

白色、褐色脂肪組織では、ミトコンドリア生合成関連遺伝子群の発現低下、ミトカイン発現の増加を伴うミトコンドリア UPR の亢進が見られた。

(3) CR によりスプライシングが変化する代謝関連遺伝子の同定

Fastq ファイルの RNAseq データを bai ファイルに変換して FeatureCounts ソフトウェアにより 57011 遺伝子のカウントデータを得た。また、Fastq ファイルの RNAseq データを bam ファイルに変換して rMATS により CR による 400 のスプライシング変化を抽出した。CR によるスプライシング変化は特定の pathway に関連していなかった。そこで、転写因子に着目した。57011 遺伝子のうち 3370 個が転写関連因子と分類されており、そのうち 65 個に CR によるスプライシングの変化が認められた。そのうち代謝経路に関連する遺伝子が 32 遺伝子、さらに脂質代謝に関連する遺伝子が 4 遺伝子であり、この 4 遺伝子に関して、rmats2sashimiplo t によりスプライシング変化の詳細を示した。

sashimiplo t によるエクソンスキッピングの詳細なデータをもとに、この 4 遺伝子のスプライシング変化を PCR で確認したところ、Ncoa2(Nuclear Receptor Coactivator 2) と Mlxip1/Chrebp-1 (MLX Interacting Protein 1 / Carbohydrate-responsive element-binding protein) が、CR によりスプライシングが変化した。

Ncoa2 は 23 の exon により構成される遺伝子で、CR により exon13 欠損の比率が減少し、高脂肪食摂取餌肥満症マウスの WAT では exon13 欠損の比率が増加していた。一方、Mlxip1 は 17 の exon により構成される遺伝子で、CR により exon6 欠損に比率が増加していた。

WAT において、CR により Ppar の発現や Srebp-1c の発現顕著に増加することが示されており、両因子は共に CR による WAT の質の向上に寄与していると考えられている。

Ncoa2 は Ppar の発現を正に制御する因子との報告がある。また、Mlxip1(Chrebp1) は Srebp-1c と類似した機能を有する転写因子であり、両因子がスプライシング制御を受けるとことは非常に興味深い。さらにこのスプライシング変化の詳細な解明が進めば、CR 模倣薬の開発、CR 模倣薬を開発するためのバイオマーカーに繋がると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kobayashi Masaki, Nezu Yuichiro, Itoh Mayu, Uchida Rio, Arikawa Tomoya, Otsubo Minami, Nozaki Yuka, Tagawa Ryoma, Fujishima Yuya, Maeda Norikazu, Shimomura Iichiro, Higami Yoshikazu	4. 巻 164
2. 論文標題 Individual evaluation of aging- and caloric restriction-related changes to distinct multimeric complexes of circulating adiponectin by immunoblotting	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Gerontology	6. 最初と最後の頁 111821 ~ 111821
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exger.2022.111821	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tagawa Ryoma, Kobayashi Masaki, Sakurai Misako, Yoshida Maho, Kaneko Hiroki, Mizunoe Yuhei, Nozaki Yuka, Okita Naoyuki, Sudo Yuka, Higami Yoshikazu	4. 巻 23
2. 論文標題 Long-Term Dietary Taurine Lowers Plasma Levels of Cholesterol and Bile Acids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1793 ~ 1793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23031793	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizunoe Yuhei, Kobayashi Masaki, Saito Hiroki, Goto Akifumi, Migitaka Ryota, Miura Kumi, Okita Naoyuki, Sudo Yuka, Tagawa Ryoma, Yoshida Miki, Umemori Ai, Nakagawa Yoshimi, Shimano Hitoshi, Higami Yoshikazu	4. 巻 154
2. 論文標題 Prolonged caloric restriction ameliorates age-related atrophy in slow and fast muscle fibers of rat soleus muscle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Gerontology	6. 最初と最後の頁 111519 ~ 111519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exger.2021.111519	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Masaki, Deguchi Yusuke, Nozaki Yuka, Higami Yoshikazu	4. 巻 22
2. 論文標題 Contribution of PGC-1 to Obesity- and Caloric Restriction-Related Physiological Changes in White Adipose Tissue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6025 ~ 6025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22116025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Masaki, Nezu Yuichiro, Tagawa Ryoma, Higami Yoshikazu	4. 巻 22
2. 論文標題 Mitochondrial Unfolded Protein Responses in White Adipose Tissue: Lipoatrophy, Whole-Body Metabolism and Lifespan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2854 ~ 2854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22062854	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi M, Nezu Y, Tagawa R, Higami Y.	4. 巻 22
2. 論文標題 Mitochondrial Unfolded Protein Responses in White Adipose Tissue: Lipoatrophy, Whole-Body Metabolism and Lifespan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 2854
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22062854	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi M, Uta S, Otsubo M, Deguchi Y, Tagawa R, Mizunoe Y, Nakagawa Y, Shimano H, Higami Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Srebp-1c/Fgf21/Pgc-1 Axis Regulated by Leptin Signaling in Adipocytes-Possible Mechanism of Caloric Restriction-Associated Metabolic Remodeling of White Adipose Tissue.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12072054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ミトカイン混合物を調製するための間葉系幹細胞及び脂肪細胞、並びに治療又は予防用医薬	発明者 樋上賀一、小林正樹、成田 匠、瀧加菜里、平尾勇人	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願 2021-023574	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	三浦 ゆり (Miura Yuri) (00216574)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長 (82674)	
研究分担者	小林 正樹 (Kobayashi Masaki) (30795612)	東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・講師 (32660)	
研究分担者	沖田 直之 (Okita Naoyuki) (60453841)	山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・講師 (25503)	
研究分担者	中川 嘉 (Nakagawa Yoshimi) (80361351)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授 (13201)	
研究分担者	近藤 洋介 (Kondo Yousuke) (30778204)	東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・助教 (32660)	

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