

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 28日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700906

研究課題名（和文） 過食で増加する規格外遺伝子の同定と生活習慣病における役割解明

研究課題名（英文） Role of non-standard genes in hyperphagia-induced metabolic disease

研究代表者

原田 永勝（HARADA NAGAKATSU）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：40359914

研究成果の概要（和文）：本研究では、過食による肥満・生活習慣病マウスにおける規格外遺伝子（異所性翻訳停止コドンを有するナンセンス型 mRNA）の発現量の変化とその意義について検討した。結果、過食性肥満の一部の組織（腎臓や褐色脂肪組織）においてナンセンス型 mRNA の発現が増加していることを明らかにした。ナンセンス型 mRNA とそれに由来するタンパク質の役割を検討した結果、それらが生活習慣病の病態形成に影響する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The results of this study show that the expression levels of non-standard genes (nonsense mRNAs) were increased in several tissues (including kidney and brown adipose tissue) of hyperphagia-induced obese mice. Functional analysis of proteins derived from the nonsense mRNAs suggested the possibility that the non-standard genes play roles in the development of obesity and metabolic disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：規格外遺伝子、ナンセンス型 mRNA、ナンセンスコドン依存的 mRNA 分解機構、食生活、選択的スプライシング、生活習慣病、ストレス応答、NMD

1. 研究開始当初の背景

私たち生物の健康と病気は食習慣によって形成される。過食や欧米型食生活は肥満や糖尿病を誘導し、低タンパク質食および低脂肪食は時に脳出血の危険性を増大させる。生体恒常性機能を破綻に追い込む主体の一つが遺伝子発現の変化である。およそ 22,000 と推測されるヒト遺伝子の多くは食習慣の乱れに反応しその発現量を変化させる。遺伝子発現システムを統括する食習慣応答因子あるいは応答機構の多くは明らかとされていない。これら実体の解明は、健康と病気を制御する新しい分子標的の発見につながるものと期待される。

私たちの細胞で発現する遺伝子の中には規格外遺伝子が存在する。DNA から転写された pre-mRNA からスプライシングによりイントロンが取り除かれエキソンのみが連なった成熟 mRNA ができる。成熟 mRNA のうち、最終エキソン上に翻訳停止コドン (UGA, UAG, あるいは UAA) を持つものは規格に合った正規 mRNA として正規タンパク質へと翻訳される。一方、例えば遺伝子変異によって最終エキソンより上流に翻訳停止コドン（この場合ナンセンスコドンと呼ばれる）が出現するナンセンス mRNA は、規格外遺伝子として細胞に認識される。ナンセンス mRNA からは、対照となる正規 mRNA からできるタンパク質に対して①機能を持たないタンパク質、②機能を保

持するタンパク質、③機能が異なるタンパク質ができる。細胞はナンセンスコドン依存的 mRNA 分解機構 (nonsense-mediated mRNA decay; 通称 NMD 機構) によってこれらナンセンス mRNA をただちに分解し規格外タンパク質の産生を抑制する。特筆すべきは、“②機能を保持するタンパク質”をコードするナンセンス mRNA も規格外として無差別的に分解されてしまうことである (Ullrich 病や嚢胞性線維症など遺伝性ナンセンス変異疾患の原因として知られている)。遺伝子変異を持たなくても、ヒト遺伝子の 30~60% は選択的スプライシングを受け、そのうちおよそ 35% はナンセンス mRNA を産生すると考えられてきた。最近コンピューター解析によって、ヒトでは 2,000 種以上もの規格外ナンセンス mRNA が NMD 機構の標的として常に産生と分解を繰り返していると推定された。

2008 年に申請者は、体内脂質合成を著しく増加させるヒト規格外遺伝子 SREBP1delta を発見し報告した (Harada N et al. Biochem Biophys Res Commun, 2008)。SREBP1 delta の他にも数多くの規格外遺伝子が生体恒常性を大きく乱す力を有していると考えられている。しかし、遺伝子変異に由来しない規格外遺伝子が普段ありふれた私たちの生活の中でどのように制御され、また私たちに最も身近な疾患である生活習慣病においてどのような役割を担うのかは全くの未解明であった。

2. 研究の目的

本研究では、過食を基盤とする生活習慣病 (ここでは遺伝性肥満) で規格外遺伝子がどのように制御されているのかを調べるとともに、規格外遺伝子の生活習慣病における役割について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 規格外遺伝子の発現に対する過食性肥満の影響解明 (各組織一斉解析)

6 週齢の対照マウス (?/+) および過食モデルである ob/ob マウスを 4 週間飼育した。飼育終了時にマウスを解剖した。マウスから各組織 (肝臓、脂肪組織、筋肉、腎臓、肺、心臓および脾臓) を採取しそれぞれから RNA を抽出した。申請者が選別した規格外遺伝子 (Nktr, Tmem183A, Intersectin1 および Flot1 遺伝子) の mRNA 発現量の変化を定量的リアルタイム PCR 法により解析した。それぞれの遺伝子発現解析において、規格外遺伝子 (ナンセンス型 mRNA ; 図中 nonsense) の発現量は、それぞれの一般型 mRNA 発現量 (図中 major) に対する相対値として任意の単位で表した。

(2) ナンセンス変異依存的 mRNA 分解機構 (NMD 機構) に対する過食性肥満の影響解明 組織における NMD 機構の変化を解析した。NMD 因子 (SMG1, Upf1) について、mRNA 発現量 (定量的リアルタイム PCR 法) あるいはタンパク質発現量 (ウエスタンブロット法) を解析した。NMD 機構の阻害に重要と報告されている細胞内ストレス応答因子 eIF2alpha のリン酸化測定 (ウエスタンブロット法) も行った。

(3) NMD 機構阻害時の規格外遺伝子機能の解析

申請者が発見したヒト規格外遺伝子 SREBP1 delta について、NMD 機構阻害時の発現量の変化および脂質代謝に与える影響を解析した。NMD 機構の阻害は NMD 因子 Upf1 に対する RNA 干渉法で行い、申請者が同定した脂質合成酵素 GPAT1 遺伝子発現プロモーターの転写活性を脂質合成能の指標とした。SREBP1delta 遺伝子について、マウス組織における発現を RT-PCR 法にて解析した。その他の規格外遺伝子として、Nktr, Tmem183A についてタンパク質構造の解析を行った。

4. 研究成果

図1に実験に使用した肥満マウス (ob/obマウス) および対照マウス (?/+) の摂食量、体重、血糖値および血中インスリン値を示した。肥満マウスは摂食量増加に伴い過体重および高血糖・高インスリン血症を呈した (図1)。両マウスについて、各組織の規格外遺伝子 (Nktr, Tmem183A, および Intersectin1 遺伝子のナンセンス型 mRNA) の発現量を比較解析した結果、肥満マウスの腎臓および褐色脂肪組織において Tmem183A および Nktr のナンセンス型 mRNA 発現量が増加した (図2)。肥満の肝臓においては Tmem183A および Nktr 遺伝子のナンセンス型 mRNA 発現量は増加しなかったが、Intersectin1 遺伝子のナンセンス型 mRNA 発現量が増加した (図3)。肝臓においては他のマーカー遺伝子として Flot1 の発現も試みたが、肥満の肝臓では Flot1 遺伝子のナンセンス型 mRNA 発現量は増加しなかった。このことから、肥満マウスの肝臓における Intersectin1 遺伝子のナンセンス型 mRNA 発現量の増加は NMD 機構に依存しない他の影響 (たとえば選択的スプライシングの効率の変化など) による可能性が示唆された。その他の組織 (脾臓など) においてナンセンス型 mRNA の特徴的な増加は認められなかった。

各組織において、NMD 機構に関わる因子につ



図1 対照(lean; ?/+)および肥満 (obese; ob/ob) マウスの摂食量 (A), 解剖時体重 (B), 血糖値 (C), および血漿インスリン値 (D)

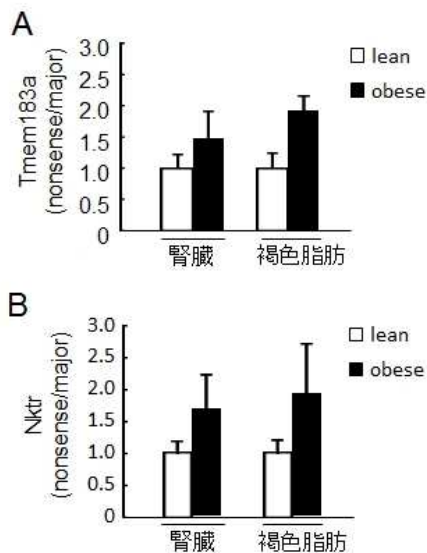


図2 対照(lean)および肥満マウス(obese)の腎臓および褐色脂肪組織における Tmem183A (A) および Nktr (B) 遺伝子のナンセンス型 mRNA 発現量

いて調べたところ、Upf1 タンパク質発現量、SMG1 mRNA 発現量は対照マウスと肥満マウスの間で有意な差を認めなかった。NMD 機構に対する阻害効果が報告されているストレス応答因子 eIF2 α のリン酸化は、ナンセンス型 mRNA 発現量が基本的には増加しなかった肥満マウスの肝臓においても高く (図4)、eIF2 α のリン酸化の亢進単独ではナンセンス型 mRNA 発現量増加に至らないものと推測された。

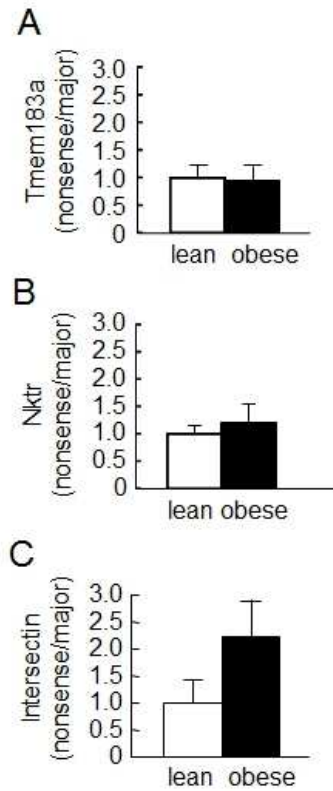


図3 対照(lean)および肥満マウス(obese)の肝臓における Tmem183A (A), Nktr (B), および Intersectin (C) 遺伝子のナンセンス型 mRNA 発現量

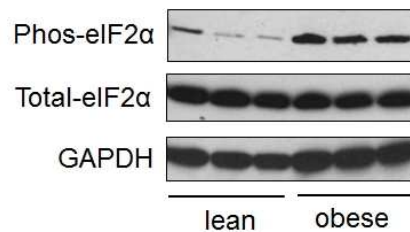


図4 対照(lean)および肥満マウス(obese)の肝臓におけるリン酸化(phos-)eIF2 α , 総(total-)eIF2 α , および GAPDH (内部コントロール) タンパク質発現量 (ウエスタンブロット)

今回、Tmem183A および Nktr 遺伝子のタンパク質を解析した。Nktr のナンセンス型 mRNA は、正規タンパク質の 7% のアミノ酸鎖長しかコードしなかったが、それでも 101 アミノ酸をコードしており、リン酸化や ATP/GTP 結合モチーフを一部保持するものであった。Tmem183A のナンセンス型 mRNA 由来タンパク質は、正規タンパク質の 63% のアミノ酸鎖を保持し且つ膜貫通領域を欠く新しい変異タンパク質であることが明らかとなった(表 1)。

表1 産生されるタンパク質のアミノ酸鎖長

	Nktr	Tmem183A
正規mRNA由来	1453	375
ナンセンス型mRNA由来	101	235

一方、ヒト組織から発見した規格外遺伝子 SREBP1delta について、NMD 機構阻害時の発現量の変化および脂質代謝に与える影響を解析した。培養細胞に NMD 因子 Upf1 特異的 shRNA 発現プラスミドを投与し NMD 機構を阻害したところ、SREBP1delta mRNA 発現量の有意な増加が認められた(図 5)。SREBP1delta から産生されるタンパク質は、分子内に活性制御領域を持たないため構成的活性型となる(Harada N et al. Biochem Biophys Res Commun, 2008)。申請者が同定した脂質合成酵素 GPAT1 プロモーターの活性を指標に脂質代謝に対する NMD 機構の影響を検討したところ、NMD 機構の阻害は SREBP1delta の発現増加を介して脂質合成を高めることが明らかとなった。一方、マウスにおける SREBP1delta の発現を RT-PCR 法にて解析したところ、マウス組織で SREBP1delta 遺伝子の発現は認められなかった。このことから、NMD 機構による SREBP1delta 遺伝子発現制御はヒト特異的なものである可能性が示唆された。

これまで、食生活がナンセンス型 mRNA 発現に与える影響はほとんど明らかとなっていなかった。そうした中、本研究では、過食性肥満の一部の組織において規格外遺伝子(ナンセンス型 mRNA)発現が増加し、生活習慣病の病態形成に影響する可能性を示唆した。本研究で得られた成果は、ナンセンス型 mRNA あるいはその制御機構(NMD 機構)を分子標的とした新しい生活習慣病予防法あるいは治療法の開発へつながるものと期待される。

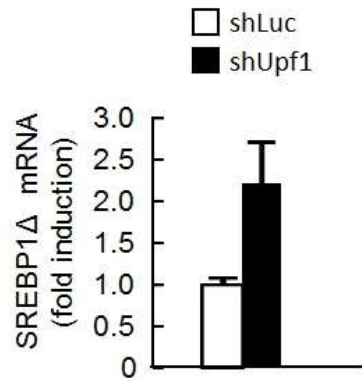


図5 HEK293細胞におけるSREBP1Δ発現量。細胞にルシフェラーゼ(shLuc;コントロール)あるいはUpf1(shUpf1)に対するshRNA発現プラスミドを遺伝子導入した。定量的リアルタイムPCR法にてSREBP1ΔmRNA発現量を解析した。

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 2 件)

① Harada N, Fujimoto E, Okuyama M, Sakaue H, Nakaya Y. Identification and functional characterization of human glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 gene promoters. Biochem Biophys Res Commun 423: 128-133, 2012 査読有, DOI:10.1016/j.bbrc.2012.05.094

② Nakagawa T, Harada N, Miyamoto A, Kawanishi Y, Yoshida M, Shono M, Mawatari K, Takahashi A, Sakaue H, Nakaya Y, Membrane topology of murine glycerol-3-phosphate acyltransferase 2. Biochem Biophys Res Commun 418: 506-511, 2012 査読有, DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.01.055

[学会発表] (計 1 件)

① 中川 忠彦, 原田 永勝, 吉田 将紀, 宮本 愛子, 川西 由希子, 阪上 浩, 中屋 豊 脂質合成律速酵素 GPAT2 の膜トポロジー解析 第 32 回日本肥満学会, 平成 23 年 9 月, 兵庫

6. 研究組織

(1)研究代表者

原田 永勝 (HARADA NAGAKATSU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号:40359914