

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 7 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350887

研究課題名(和文)規格外遺伝子とそのアウトレット制御に基づく新しい予防医学研究の展開

研究課題名(英文)Role of diet and lifestyles in regulating nonsense mRNA expression and its associated diseases

研究代表者

原田 永勝 (HARADA, Nagakatsu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師

研究者番号：40359914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、食生活やライフスタイル(運動)がmRNA品質管理機構(NMD機構)およびナンセンス型mRNA発現量に与える影響を解析した。高脂肪食のうち高カカオバター食の投与はマウス肝臓において、ナンセンス型mRNA発現量を増加させた。一方、運動負荷や食事制限/絶食はナンセンス型mRNA発現量に大きな影響を与えなかった。高カカオバター食によるナンセンス型mRNA発現量の増加は、細胞内ストレス応答因子eIF2のリン酸化、NMD因子UPF1や脂質合成酵素SCD1の発現以外の因子によるものであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Effect of diet and exercise training on nonsense-mediated mRNA decay (NMD) and nonsense mRNA expression was studied in mice. The results show that high cacao butter diet, but not other high fat diet or exercise training, increased nonsense mRNA expression levels in mouse liver. We revealed that the cacao butter-induced increase in nonsense mRNA levels was not dependent on phosphorylation levels of eIF2alpha and expression levels of NMD factor UPF1 and lipogenic protein SCD1.

研究分野：代謝栄養学, 分子生物学

キーワード：ライフスタイル ナンセンス型mRNA 規格外遺伝子 アウトレット 予防医学 ストレス 高脂肪食
運動負荷

1. 研究開始当初の背景

私たちの生命活動(生活)を支える分子基盤の主体は細胞における遺伝子発現である。毎日の食事やその他の日常生活活動(運動など)に基づく様々な環境変化は、常に私たちの細胞の遺伝子発現に大きな影響を与えている。遺伝子発現の恒常性の破綻は病気の形成に寄与すると考えられている。しかし、その破綻がどのように引き起こされるのか、とくに、日常生活が標的とする細胞内遺伝子発現統制機構の実体の多くは不明であった。遺伝子発現統制機構は個々の遺伝子発現を統制する細胞内上位システムであり、これを分子標的とすることで、日常生活の乱れを基盤とする生活習慣病を根本から予防あるいは治療する手段の開発が期待できる。

mRNA の品質管理機構は nonsense-mediated mRNA decay (NMD) 機構ともいわれ、細胞内の代表的な遺伝子発現統制機構の一つである。およそ 22,000 と推測されるヒト(およびその他哺乳類)の遺伝子から転写される pre-mRNA は、選択的スプライシングによるエキソンの使い分けにより 22,000×数倍の多様な種類の成熟 mRNA へと分岐する。このうち、最終エキソン上に翻訳停止コドン(UGA, UAG, あるいは UAA) が出現する mRNA は正規 mRNA としてタンパク質へと翻訳される。一方、最終エキソンより上流に異所性の翻訳停止コドン(ナンセンスコドン、もしくは premature termination codon; PTC とよばれる)が出現するナンセンス型 mRNA は mRNA 規格に合わない『規格外遺伝子』として NMD 機構に認識され分解・廃棄される(PTC とその下流のエキソン-エキソン接合部との距離あるいは 3'側非翻訳領域の長さが NMD の標的となるか否かを決定する)。なぜなら、規格外ナンセンス型 mRNA から翻訳される鎖長の短いタンパク質は dominant-negative 型や gain-of-function 型など規格外機能を有し細胞にとって有害となるからである。最近、ヒトでは 2,000 種以上もの規格外ナンセンス型 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。

NMD 機構では、mRNA 翻訳装置であるリボソームに加え、エキソン接合部タンパク質複合体(EJC)や数多くの NMD 因子(UPF1 など)が機能する。これまで、NMD 機構の機能レベルは高く、その精度が低下することはないと考えられてきた。最近、癌細胞において NMD 機構が阻害されること、さらにはこのことが細胞の癌化に重要であるとする知見が報告された。こうした研究結果は、NMD 機構の機能が常に安定したものでないこと、また、規格外ナンセンス型 mRNA から翻訳されるタンパク質の産生(アウトレット)亢進が細胞の機能異常を惹起する可能性を示唆

する。これについて、NMD 因子 Upf2 の欠損はマウスにおいて脂肪肝を誘導することも報告されており、NMD 機構の機能低下が上述の癌や脂肪肝など生活習慣病の形成に重要であるとする知見が集積してきた。しかし、どのような食習慣あるいは生活習慣が NMD 機構およびナンセンス型 mRNA 発現量に影響を与えるのかについて明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、食生活やライフスタイル(運動)が NMD 機構およびナンセンス型 mRNA 発現量に与える影響を解析することで、生活習慣病の新しい発症機構とその予防メカニズムを解明するための研究基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ナンセンス型 mRNA 発現量に対する食生活および運動の影響

6週齢の C57BL/6 マウスを購入し、通常飼料(対照)あるいは高脂肪食(高ラード食、高パーム油食、あるいは高カカオバター食;いずれも脂肪カロリー比 50%)で 6週間飼育した(実験 1)。また、通常飼料で飼育し、回転カゴにて自由運動を 6週間させたマウス群を運動負荷群として同時に飼育し、運動させない対照群と比較した(実験 2)。一方、食餌制限実験(実験 3)では、C57BL/6 マウス(6週齢)の摂食量を 43%(食餌制限群)あるいは 0%(絶食群)に制限した。制限期間は 2日間とし、自由摂食群を対照とした。それぞれの実験において、飼育期間終了後にマウスの体重を測定し採血した。マウスから組織(肝臓、骨格筋)を採取し RNA およびタンパク質を抽出した。選択的スプライシングによりナンセンス型 mRNA を産生するマーカー遺伝子(Nktr, Flot1 など)について、ナンセンス型 mRNA および総 mRNA の発現量を定量的リアルタイム PCR 法により解析した。ナンセンス型 mRNA 発現量/総 mRNA 発現量の比を算出し、NMD 機能の指標とした。

(2) ウエスタンブロット

抽出したタンパク質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にて分離した。SDS-PAGE 後のタンパク質は Immobilon-P メンブレン(Millipore, Bedford, MA)にトランスファーした。メンブレンは 5%スキムミルク入りの TBST(Tris-buffered saline, 0.05% Tween20)で 1時間ブロッキングした後、UPF1、Calnexin、GADD34、Phospho-eIF2 α 、eIF2 α 、GAPDH、SCD1、Phospho-AMPK、あるいは

AMPK に対する一次抗体を用いて 4 にてひと晩ハイブリダイズした。TBST で洗浄後、HRP conjugate 二次抗体を反応させ(室温 1 時間)、ECL prime Western Blotting Detection System (GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, England)を用いて検出した。

(3) レポーター遺伝子を用いた NMD 機能試験

Renilla ルシフェラーゼ遺伝子の下流にヒト β グロビンの pre-mRNA 配列を挿入した発現プラスミド (pRL(CP)-G1) および同遺伝子の下流にヒト β グロビンの mRNA 配列を挿入した発現プラスミド (pRL(CP)-G2) を実験に用いた。それぞれのプラスミドは内部標準となる pCMV β (β ガラクトシダーゼ発現プラスミド) とともに Lipofectamine2000 を用いて Hepal 細胞にトランスフェクションした。pRL(CP)-G1 から転写される mRNA はルシフェラーゼ遺伝子の翻訳終止コドンの下流に β グロビン pre-mRNA スプライシングによるエキソン結合部が出現するため NMD 機構の標的となる。そのため、pRL(CP)-G1 を発現する細胞のルシフェラーゼ活性は pRL(CP)-G2 (NMD の標的とならない対照) を発現する細胞のルシフェラーゼ活性に比べて低くなる。NMD 機構が阻害される条件では、pRL(CP)-G1 由来のルシフェラーゼ mRNA の分解が抑制されるため、細胞のルシフェラーゼ活性は増加する。この増加をもって NMD 機能低下の程度を判断できる。それぞれの条件におけるデータは pRL(CP)-G2 を発現する細胞のルシフェラーゼ活性に対する倍数 (割合) として求めた。

(4) eIF2 α 過剰発現実験

マウス eIF2 α (S51D 活性型) の cDNA を挿入した発現プラスミド (ベクターは pBApo-CMV-Pur) を作製した。Hepal 細胞に当該プラスミドあるいは空ベクターをトランスフェクションし、その後 Puromycin にてトランスフェクションされていない細胞を除いた。その後細胞から RNA を抽出し、NMD マーカー遺伝子 (上述) に対して定量的リアルタイム PCR を行った。

4. 研究成果

実験 1 において、高脂肪食投与群 (高ラード食、高パーム油食、あるいは高力カオバター食; いずれも脂肪カロリー比 50%) のマウス体重は、対照群に比べて増加傾向を示した。実験 2 において、運動負荷群 (6 週間) のマウス体重は対照群に比べて減少傾向を示した。実験 3 において、2 日間の食事制限ある

いは絶食は自由摂食 (対照) に比べて有意に体重を低下させた。

それぞれのマウス群の組織におけるナンセンス型 mRNA 発現量をマーカー遺伝子 (Nktr, Flot1) に対する定量的リアルタイム PCR 法によって調べた。実験 1 では、高力カオバター食投与群の肝臓において、Nktr および Flot1 遺伝子のナンセンス型 mRNA 発現量 (ナンセンス型 mRNA 発現量 / 総 mRNA 発現量比) が有意に増加した。高ラード食や高パーム油食ではナンセンス型 mRNA 発現量の有意な増加は認められなかった。一方、実験 2 では、運動負荷群の骨格筋において、ナンセンス型 mRNA 発現量の有意な変化はみられなかった。実験 3 では、食事制限や絶食はマウス肝臓におけるナンセンス型 mRNA 発現量に有意な変化をもたらさなかった。

細胞内ストレス応答因子 eIF2 α のリン酸化亢進は、NMD 機構を抑制することが報告されている。そこで、実験 1 および実験 3 のマウス肝臓における eIF2 α のリン酸化の程度をウエスタンブロットにより調べた。高脂肪食投与群では高パーム油食および高力カオバター食投与群で、対照群に比べて eIF2 α のリン酸化亢進が認められた。

一方、食事制限および絶食の処置はマウス肝臓における eIF2 α のリン酸化を増加させた。eIF2 α のシグナルに重要な小胞体ストレス応答について、小胞体タンパク質 calnexin や GADD34 タンパク質の発現量を解析したところ、高脂肪食投与 (実験 1) あるいは食事制限・絶食処置によって有意な変化は認められなかった。NMD 機構の重要因子である UPF1 のタンパク質発現量は、高脂肪食投与 (実験 1) および食事制限 / 絶食 (実験 3) の有意な影響を受けなかった。

細胞内エネルギーセンサーの一つである AMPK の活性 (リン酸化) の程度は高脂肪食投与では大きく影響されなかったが、脂肪合成系遺伝子であり細胞ストレスとも関わりが深い SCD1 の発現量は、高脂肪食投与で低下した。今回、*Renilla* ルシフェラーゼ遺伝子の発現に基づく外来性 NMD レポーター遺伝子 (“研究の方法” 参照) を用いて、SCD1 阻害剤 (A939572) の NMD 機構への影響を解析した。結果、SCD1 の阻害はルシフェラーゼ活性に有意な影響を及ぼさなかった。

上述したように、eIF2 α のリン酸化の亢進は高脂肪食投与 (抗パーム油食および高力カオバター食) および食事制限 / 絶食処置のいずれにおいても確認された。しかし、ナンセンス型 mRNA 発現量の増加は、高脂肪食のうち

とくに高カカオバター食投与によってのみみられた。eIF2 α のリン酸化亢進がナンセンス型 mRNA 発現量に及ぼす影響を解析するため、Hepa1 細胞に eIF2 α (S51D 活性型) 遺伝子をコードする発現プラスミドを導入した。細胞から RNA を抽出し、マーカー遺伝子のナンセンス型 mRNA 発現量を解析したところ、Nktr および Flot1 いずれの遺伝子のナンセンス型 mRNA 発現量も活性型 eIF2 α の過剰発現の影響を受けなかった。

以上の結果より、高脂肪食のうち高カカオバター食の投与はマウス肝臓において、ナンセンス型 mRNA 発現量を増加させることが明らかとなった。一方、運動負荷や食事制限/絶食はナンセンス型 mRNA 発現量に大きな影響を与えなかった。高脂肪食は細胞内ストレス応答因子 eIF2 α のリン酸化を高め、また脂質合成系酵素 SCD1 の発現量を低下させたが、これらはナンセンス型 mRNA 発現量の増加に直接関わっていないことを明らかにした。よって、カカオバターによるナンセンス型 mRNA 発現量の増加は、eIF2 α 、SCD1 や AMPK 以外の因子によるものであることが示唆された。

NMD 機構の機能低下は、普段細胞内に存在しないナンセンス型 mRNA 発現量の増加をもたらす。これら規格外の mRNA およびタンパク質の発現は細胞機能に大きな影響を与え、これが癌や脂肪肝など生活習慣病の形成に重要であるかもしれない。本研究は、生活習慣がナンセンス型 mRNA 発現量に及ぼす影響を解析したものであり、生活習慣病の新しい発症機構とその予防メカニズムを解明するためのさらなる研究展開へとその応用が期待できる。

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)

Ryo Otsuka, Nagakatsu Harada, Shouhei Aoki, Kanna Shirai, Kazuchika Nishitsuji, Ayane Nozaki, Adzumi Hatakeyama, Masayuki Shono, Noriko Mizusawa, Katsuhiko Yoshimoto, Yutaka Nakaya, Hiroshi Kitahata, Hiroshi Sakaue. C-terminal region of GADD34 regulates eIF2alpha dephosphorylation and cell proliferation in CHO-K1 cells. Cell Stress Chaperones, 21:29-40, 2016 査読有, DOI:10.1007/s12192-015-0633-9

[学会発表](計1件)

Nagakatsu Harada, Hitomi Taniwaki, Haruka Yonemoto, Takashi Oyamada, Yukie Nara, Haruka Omachi, Ayane Nozaki, Masaki Yoshida, Rie Tsutsumi, Hironori Yamamoto, Hiroshi Sakaue, Yutaka Nakaya. Nonsense-mediated mRNA decay regulates expression of a constitutively active form of sterol regulatory element-binding protein 1. The 8th Asia-Oceania Conference on Obesity, October 3, 2015, Nagoya Congress Center, Nagoya City, Aichi, Japan

6 . 研究組織

(1)研究代表者

原田 永勝 (HARADA, Nagakatsu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師

研究者番号：40359914