

課題番号 : 29指1034
研究課題名 : 糖尿病創薬シーズ探索に資する長鎖非コードRNAの機能解明
主任研究者名 : 長沼 孝雄
分担研究者名 : 該当なし

キーワード : 長鎖非コード RNA、転写制御、代謝調節、肝臓、ホルモン・栄養シグナル
研究成果 :

本研究は、糖尿病に対する新たな創薬シーズ探索に資するために、肝臓におけるホルモン・栄養応答性長鎖非コード RNA (lncRNA) の代謝調節への機能的役割を解明することを目的としている。本年度は、申請者が発見した lncRNA の 1 つである Lnc-FR1 の代謝調節に関わる機能的役割について検討を行ったので報告する。

①肝細胞における Lnc-FR1 の遺伝子転写促進機能の同定

Lnc-FR1 は、マウス初代培養肝細胞におけるグルカゴン-cAMP 応答性と GCN5-CITED2 モジュール依存性、マウス肝臓における絶食応答性を指標に取得したホルモン・栄養応答性 lncRNA の 1 つであり、核内局在を示すことから遺伝子転写の制御に機能することが示唆された。Lnc-FR1 が遺伝子転写の制御に機能することを明らかにするために、肝細胞において機能喪失実験ならびに機能獲得実験を行った。CRISPRi により Lnc-FR1 をノックダウンしたところ、ゲノム上近傍に存在するアルギニントランスポーターCatX 遺伝子の発現抑制が確認された。また、CRISPRa を用いて Lnc-FR1 を強発現させたところ、CatX 遺伝子の発現促進が確認された。これらの結果から、Lnc-FR1 が CatX 遺伝子の転写促進に寄与していることが明らかになった。

次に、Lnc-FR1 による遺伝子転写制御の全貌を明らかにするために、Lnc-FR1 ノックアウトマウスから初代培養肝細胞を単離し、DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。それから、Lnc-FR1 ノックアウトで発現が 50%以下に減少する遺伝子群を抽出し、*in silico* によるパスウェイ解析を行ったところ、Lnc-FR1 ノックアウトでは“metabolic pathway”というパスウェイに分類される遺伝子が多く変動し、その中には糖新生やアミノ酸異化などの酵素遺伝子が含まれていた。定量的 PCR 法で検証したところ、Lnc-FR1 ノックアウト肝細胞では G6pc、Pck1 といった糖新生系酵素遺伝子の発現ならびに Hal、Sds といったアミノ酸異化酵素遺伝子の発現が共に減少していた。これらの結果から、Lnc-FR1 は CatX の遺伝子転写の促進だけでなく糖新生やアミノ酸異化といった絶食応答を担う酵素群の遺伝子転写促進にも関わるということが明らかになった。

②肝細胞における Lnc-FR1 による代謝調節に関わる機能的役割の同定

肝細胞における Lnc-FR1 による代謝調節に関する機能的役割について検討した。Lnc-FR1 による CatX 遺伝子の転写促進が、CatX のアルギニントランスポーター活性を変化させ、細胞内へのアルギニンの取り込みを促進していることを明らかにするため、アルギニン依存的に活性化することが知られている mTORC1 シグナルをリードアウトとすることで CatX による細胞内へのアルギニンの取り込みを検出した。アミノ酸飢状態にした肝細胞へのアルギニンの添加により、mTORC1 の活性化を反映して S6K、S6、4E-BP1 タンパク質のリン酸化が認められたが、CRISPRi による Lnc-FR1 ノックダウン肝細胞ではコントロール細胞に比べて S6K、S6、4E-BP1 タンパク質のリン酸化の減弱が見られた。この結果は、Lnc-FR1 ノックダウンによる CatX 遺伝子の発現抑制を介して細胞内へのアルギニンの取り込みが減少していることを示しており、このことから Lnc-FR1 は CatX 遺伝子の転写を促進し、その発現を増加させることでアルギニントランスポーター活性を強め、細胞内へのアルギニンの取り込みを促進していることが明らかになった。

Subject No. : 29 指 1034

Title : Functional analysis of long noncoding RNAs that contribute to exploring new drug seeds for diabetes

Researchers : Takao Naganuma

Key word : Long noncoding RNA, transcriptional regulation, metabolic regulation, liver, hormone / nutrient signals

Abstract :

This research aims to elucidate the functional roles of hormone and nutrient responsive long noncoding RNAs (lncRNAs) involved in metabolism regulation in the liver to contribute to exploring new drug seeds for diabetes. Herein, we report about the functional roles involved in the metabolic regulation of Lnc-FR1 which is one of the lncRNAs discovered by us.

①Functional roles involved in gene transcriptional regulation by Lnc-FR1 in hepatocytes

Lnc-FR1 is one of hormone and nutrient responsive lncRNAs obtained by using glucagon-cAMP responsiveness and dependency on GCN5-CITED2 module in mouse primary hepatocytes and fasting responsiveness in mouse liver as indicators. It is suggested that Lnc-FR1 functions to regulate gene transcription as it localized to the nucleus. To clarify that Lnc-FR1 is involved in the regulation of gene transcription, we performed the loss-of-function and gain-of-function experiments in hepatocytes. CRISPR-mediated knockdown of Lnc-FR1 reduced the arginine transporter CatX transcript levels, which CatX is one of the genes surrounding the Lnc-FR1 locus in the mouse genome. In addition, CRISPR-mediated activation of Lnc-FR1 increased the CatX transcript levels. These results revealed that Lnc-FR1 promoted the CatX gene transcription.

Next, to clarify the whole picture of gene transcriptional regulation by Lnc-FR1, we performed the isolation of primary hepatocytes from Lnc-FR1 knockout mice and the comprehensive gene expression analysis with DNA microarray. Then, we extracted a group of genes whose expression decreased to less than 50 % by Lnc-FR1 knockout and performed the pathway analysis *in silico*. As a result, we found that Lnc-FR1 knockout fluctuated highly the genes classified as "metabolic pathway" in Lnc-FR1 containing enzyme genes such as gluconeogenesis and amino acids catabolism. The validation by quantitative PCR method of DNA microarray data indicated that Lnc-FR1 knockout decreased the expression of gluconeogenic enzyme genes such as G6pc, Pck1 and expression of amino acids catabolic enzyme genes such as Hal, Sds in hepatocytes. This result revealed that Lnc-FR1 is also involved in promoting gene transcription of enzymes responsible for fasting responses such as gluconeogenesis and amino acids catabolism.

②Functional roles involved in metabolic regulation by Lnc-FR1 in hepatocytes

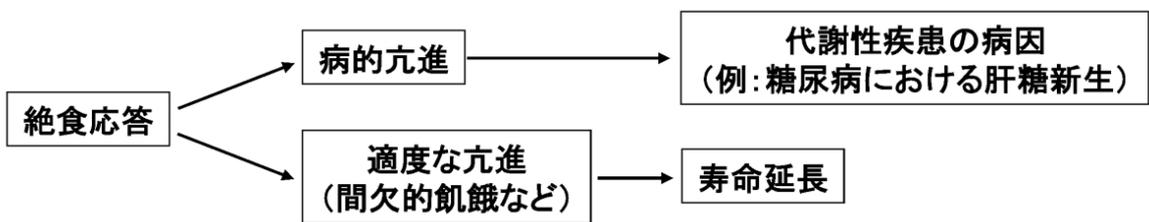
We investigated the functional role of regulating metabolism by Lnc-FR1 in hepatocytes. To clarify whether Lnc-FR1-mediated the promotion of CatX gene transcription alters the arginine transporter activity of CatX and promotes the arginine uptake into cells, we utilized the mTORC1 signals as readout, which is known that arginine activates the mTORC1 signals. In hepatocyte under the amino acids starved condition, CRISPR-mediated knockdown of Lnc-FR1 attenuated the phosphorylation of S6K, S6, 4E-BP1 protein which reflects the arginine dependent activation of mTORC1 signals compared with control cells. This result suggested that Lnc-FR1-mediated the promotion of CatX gene transcription alters the arginine transporter activity of CatX and promotes the arginine uptake into cells.

糖尿病創薬シーズ探索に資する長鎖非コードRNAの機能解明

平成29年度 研究報告要旨

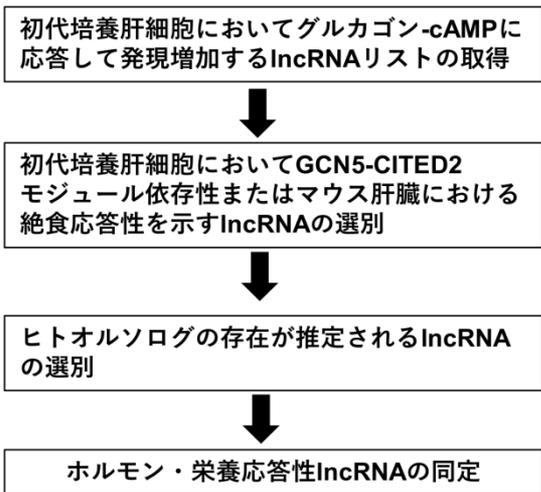
本研究は、糖尿病に対する新たな創薬シーズ探索に資するために、肝臓におけるホルモン・栄養応答性長鎖非コードRNA (lncRNA) の代謝調節への機能的役割を解明することを目的としている。本年度は、申請者が発見したlncRNAの1つであるLnc-FR1の代謝調節に関わる機能的役割について検討を行い、以下のことを明らかにした。

- ①Lnc-FR1がCatX遺伝子の転写を促進することを明らかにした。
- ②Lnc-FR1はCatXの遺伝子転写の促進だけでなく糖新生やアミノ異化といった絶食応答を担う酵素群の遺伝子転写促進にも関わることが明らかになった。
- ③Lnc-FR1はCatX遺伝子の転写を促進し、その発現を増加させることでアルギニントランスポーター活性を強め、細胞内へのアルギニンの取り込みを促進していることが明らかになった。

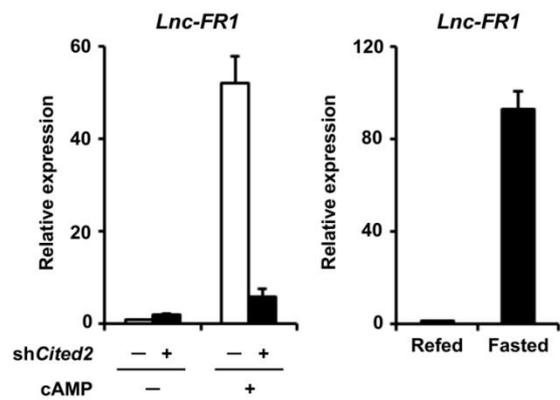


絶食応答の分子機構の解明は代謝疾患ならびに寿命を制御する鍵となる
→新規糖尿病開発のための重要課題である

肝臓におけるホルモン・栄養応答性lncRNAの同定の流れ

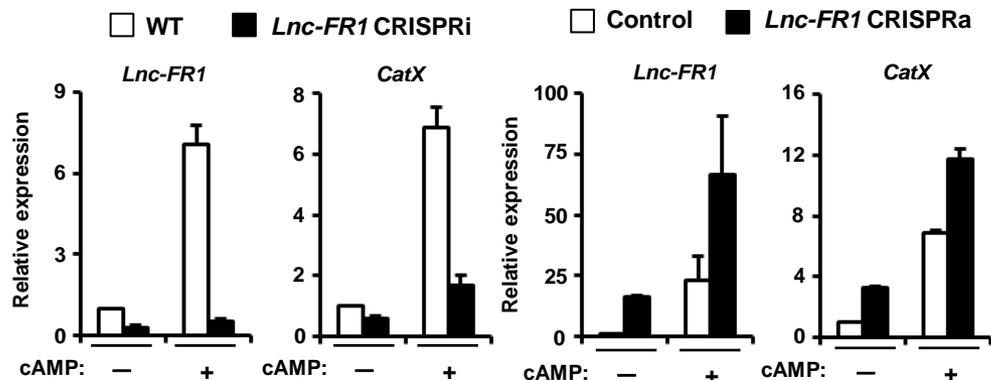
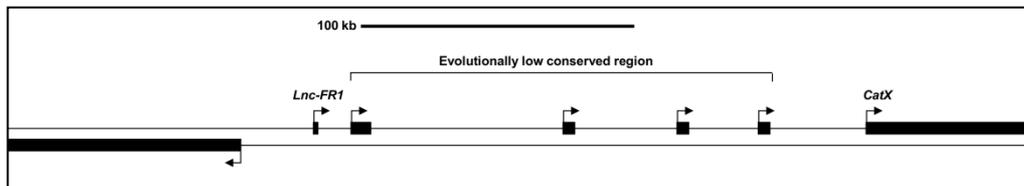


肝臓におけるホルモン・栄養応答性lncRNAの例

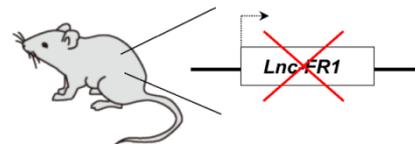


ホルモン・栄養シグナルに応答しGCN5-CITED2モジュールによって発現が制御されるlncRNAは、絶食応答に関与するのでは？
→糖尿病に対する新たな創薬シーズになるのではないかと？

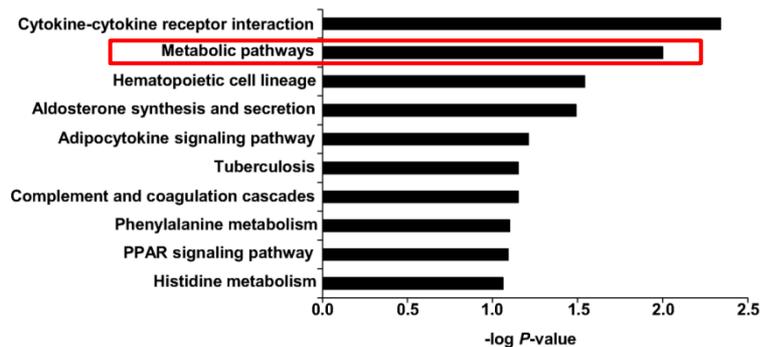
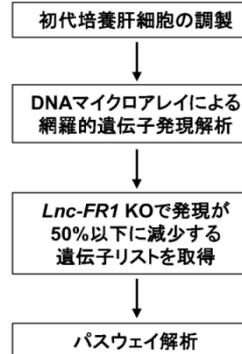
Lnc-FR1は、CatX遺伝子の転写を促進する



Lnc-FR1は、絶食応答を担う酵素群の遺伝子転写促進に関わる



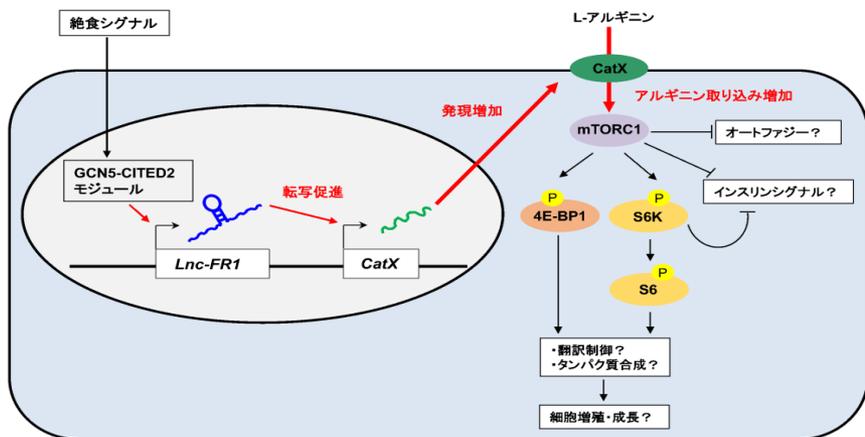
Lnc-FR1ノックアウトマウス
(Lnc-FR1 KO)



Lnc-FR1ノックアウトにより発現変動する
代謝関連遺伝子の例

糖新生	<i>G6pc</i>	2.0 down
	<i>Pck1</i>	2.3 down
アミノ酸異化	<i>Hal</i>	3.0 down
	<i>Sds</i>	2.0 down

Lnc-FR1によるCatX遺伝子の転写促進は、細胞内へのアルギニン摂取を促進する



研究発表及び特許取得報告について

課題番号：29指1034

研究課題名：糖尿病創薬シーズ探索に資する長鎖非コードRNAの機能解明

主任研究者名：長沼孝雄

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
該当なし				

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
絶食応答性長鎖ノンコーディングRNAの代謝調節における役割の解明	長沼孝雄	第32回日本糖尿病・肥満動物学会 年次学術集会	名古屋	2018年2月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。