



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	The long noncoding RNA Neat1 regulates beige cell differentiation upon cold stimulation [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	戸谷, ひかる
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第15797号
Issue Date	2024-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92303
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Hikaru_Toya_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（臨床薬学） 氏 名 戸谷 ひかる

学 位 論 文 題 名

The long noncoding RNA Neat1 regulates beige cell differentiation upon cold stimulation
(長鎖ノンコーディング RNA Neat1 によるベージュ細胞分化制御機構に関する研究)

【研究背景と目的】

核内は RNA や DNA・タンパク質が均一に分布しているわけではなく、それぞれが特異的な相手と相互作用することで様々な構造体を形成することが知られている。これらの構造体は、周囲を囲む膜を持たないことから非膜オルガネラと呼ばれ、多価の弱い分子間相互作用により引き起こされる液-液相分離により形成される。当研究室では非膜オルガネラの 1 つであるパラスペckルに着目して研究を進めてきた。パラスペckルはタンパク質をコードしないノンコーディング RNA である Neat1 を必須の骨格として持ち、様々な RNA 結合タンパク質から形成される核内構造体である。パラスペckルの構成因子やその形成メカニズムについては、培養細胞を用いた実験により明らかとなりつつある。当研究室ではパラスペckルの生理機能を明らかとすることを目的とし、パラスペckルを欠損する Neat1 KO マウスを作製し、その表現型解析を進めてきた。これまでも Neat1 KO マウスは妊孕性が低下することを報告しているが、この表現型の浸透率は 50 %と低く遺伝的背景が同一である同一個体を用いても表現型を示す時と示さない時があることから、その分子メカニズムに迫ることが困難であった。そこで本研究では、Neat1 が再現性良く表現型を示す条件の探索を行なった。

これまでも培養細胞を用いた研究により、Neat1 がヒートショックやウイルス感染時に発現が増加することや、個体においても通常環境下では差が見られないもののストレス環境下において多動を示すといった報告があることから、Neat1 が環境依存的に機能を発揮するのではないかと仮説を立てた。そこで野生型マウスと Neat1 KO マウスを様々なストレス環境下におきその応答を比較することで、Neat1 が機能を発揮する環境の同定を試みた。

【結果・考察】

1. Neat1 KO マウスは寒冷刺激により誘導されるベージュ細胞分化が抑制されている

寒冷刺激下では、褐色脂肪組織の活性化や皮下白色脂肪組織内にベージュ細胞と呼ばれる新たな熱産生細胞が誘導され、体温の保持に寄与することが知られている。これらの応答を比較するために、RT-qPCR とウエスタンブロッティングによるマーカー遺伝子 Ucp1 の発現量比較や HE 染色による組織学的な解析を行なった。すると寒冷刺激により褐色脂肪組織では、Neat1 KO マウスでも野生型と同程度 Ucp1 の発現増加が見られ、組織学的にも脂肪滴が小さくなるような変化が見られた。一方、皮下白色脂肪組織では Neat1 KO マウスは野生型に比べ Ucp1 の発現増加が抑制されており、組織学的な解析からもベージュ細胞が少ない傾向が見られた。このことより Neat1 KO マウスでは寒冷刺激により褐色脂肪組織の活性化は正常に生じる一方で、ベージュ細胞の分化が抑制されていることが明らかとなり、Neat1 が必要となる環境の同定に成功した。

2. Neat1_1 特異的欠損マウスでは正常にベージュ細胞の分化が生じる

Neat1 には長さの異なる Neat1_1 と Neat1_2 の 2 つのアイソフォームが存在している。当研究室では過去に Neat1_2 のみ発現する dPAS マウスを作製している。ベージュ細胞分化において Neat1 のどちらのアイソフォームが必要であるか明らかとするために、dPAS を用いて野生型とベージュ細胞の分化効率を比較した。すると、dPAS マウスでは野生型と同程度マーカー遺伝子である Ucp1 の発現増加が見られ、組織学的な解析からもベージュ細胞の分化が認められた。このことか

らベージュ細胞の分化には、Neat1_1ではなく、Neat1_2もしくはNeat1_2を骨格として形成されるパラスペックルが必要であることが明らかとなった。個体では困難であった Neat1 のアイソフォームの切り分けを行うことに成功した。

3. 皮下白色脂肪組織の細胞タイプの構成は野生型と変わらない

Neat1 KO マウスで見られたベージュ細胞分化が抑制されている原因として、皮下白色脂肪組織内に存在するベージュ前駆細胞が Neat1 KO マウスでは、野生型と比較して減少しているのではないかと仮説を立てた。そこで前駆細胞の数をフローサイトメトリーにより野生型と Neat1 KO マウス間で比較を行なったが、有意な差は見られなかった。またマクロファージもサイトカインを介して、ベージュ細胞分化に関与していることが報告されている。これらの数についても同様に比較を行なったが、野生型と Neat1 KO マウス間で差は見られなかった。このことから皮下白色脂肪組織の細胞構成自体には差がないことが明らかとなった。

4. 寒冷刺激により Neat1_2 が一過的に発現増加する

寒冷刺激開始からベージュ細胞分化にはおよそ1週間程度の時間を要する。この中で、いつ Neat1 が必要となるのかを明らかにするために、寒冷刺激から4・24時間・4日後とタイムポイントを取り、ノザンブロットングとRT-qPCRにより Neat1 の発現量を定量した。すると、Neat1_1 の発現量は室温時と寒冷刺激後どのタイムポイントにおいても大きな変動はない一方で、Neat1_2 は寒冷刺激後4時間において一過的に発現が増加していた。また凍結切片を作製し、in situ Hybridization 法による染色から Neat1_2 が寒冷刺激後4時間において発現が増加しており、パラスペックルが大きくなることが確認できた。このことから寒冷刺激後4時間という初期の段階において、Neat1_2 が機能を発揮していることが示唆された。

5. 寒冷刺激後24時間の発現変動遺伝子がゲノムの特定領域に集中している

Neat1 KO マウスでの寒冷刺激に対する応答において、どのような異常が生じているのかを明らかにするため、RNA-seqにより室温飼育時・寒冷刺激後4時間・24時間で皮下白色脂肪組織での網羅的な発現変動解析を行った。すると室温飼育時には発現変動遺伝子が非常に少なく、その数は寒冷刺激からの時間経過とともに増加していた。このことから、通常状態の皮下白色脂肪組織に異常があるためにベージュ細胞の分化が抑制されているのではなく、寒冷刺激への応答が正常に行えないことが示唆された。また寒冷刺激後24時間での Neat1 KO マウスでの発現変動遺伝子をゲノム上にプロットしたところ、特定の領域に集中している傾向が見られた。またこれらの領域は、野生型で寒冷刺激による発現変動遺伝子が集中している領域と一部重複していることから、寒冷刺激により発現が大きく変わる領域での転写調節に Neat1 が関与している可能性が示唆された。

【総括】

Neat1 KO マウスでは寒冷刺激によるベージュ細胞の分化誘導が抑制されていることを見出し、Neat1 が再現性良く機能を発揮する環境の同定に成功した。また Neat1_2 のみ発現する dPAS マウスを用いた解析から、ベージュ細胞の分化には Neat1_1 ではなく Neat1_2 が必要であることが明らかとなり、個体において Neat1 のアイソフォームごとの機能を切り分けることができた。Neat1 が寒冷刺激時の特定の領域での転写調節に関与している可能性があり、新たなパラスペックルの作用モデルを提唱した。

ベージュ細胞は代謝を亢進させることから、糖尿病や肥満などの代謝性疾患に対する創薬ターゲットとして注目されている。将来的には Neat1 を介したベージュ細胞の分化制御機構が創薬につながることを期待される。