HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	The long noncoding RNA Neat1 regulates beige cell differentiation upon cold stimulation
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15797
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92305
Type	doctoral thesis
File Information	Hikaru_Toya.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士学位論文

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）

戸谷ひかる

北海道大学大学院生命科学院

臨床薬学専攻

RNA 生物学研究室

令和 6 年 3 月

目次

略語一覧 4
1.序論 7
1.1 ノンコーディング RNA....7
1.2 非膜オルガネラ....9
1.3 パラスペックルと *Neat1* 11
1.4 パラスペックルの生理機能 12
1.5 寒冷刺激への応答(褐色脂肪組織とベージュ細胞) 13
1.6 ベージュの細胞分化時のノルアドレナリンによるシグナル伝達 14
1.7 ベージュの細胞の起源細胞と周辺細胞による影響....15
2.研究の背景と目的....16
3.結果 17
3.1 *Neat1* KO マウスでは正常に寒冷刺激により褐色脂肪組織の活性化が生じる.17
3.2 *Neat1* KO マウスでは寒冷刺激によるベージュ細胞の分化が抑制されている.20
3.3 *Neat1_1* ではなく *Neat1_2* がベージュ細胞分化に必要である 23
3.4 皮下白色脂肪組織では *Neat1* は脂肪細胞と脂肪細胞前駆細胞で発現している 28
3.5 皮下白色脂肪組織では寒冷刺激後 4 時間において *Neat1_2* の発現が一過的に増加する 30
3.6 *Neat1* KO マウスと野生型マウスにおいて、皮下白色脂肪組織での前駆細胞やマクロファージの数に差は見られない 34
3.7 *Neat1* KO マウスでは寒冷刺激時の皮下白色脂肪組織でのノルアドレナリン量が減少している 37
3.8 *Neat1* KO マウスでは寒冷刺激のシグナル伝達に関与する脳領域での活性化が生じる 39

3.9 皮下白色脂肪組織では寒冷刺激からの時間経過に伴って発現変動遺伝子が増加する 41

3.10 *Neat1* KO マウスではノルアドレナリン受容体 β3 のアゴニストの投与によって、ベージュ細胞の分化が正常に生じる 45

4.考察 47

4.1 *Neat1* KO マウスは寒冷刺激に対してベージュ細胞特異的な表現型を示す 47

4.2 *Neat1_1* ではなく *Neat1_2* がベージュ細胞分化に必要である 48

4.3 寒冷刺激による *Neat1_2* の発現増加 48

4.4 *Neat1* KO マウスでは皮下白色脂肪組織内のノルアドレナリン濃度の低下が生じる 50

4.5 *Neat1* KO マウスでは室温飼育時の皮下白色脂肪組織には差がなく、寒冷刺激への応答に差が見られる 50

4.6 *Neat1* によるベージュ細胞分化制御モデル 51

5.結語 52

6.実験機器 53

7.試薬調製 54

8.実験操作・方法 59

9.参考文献 68

10.謝辞 85

略語一覧

APA	alternative polyadenylation
Ap2	adipocyte Protein 2
arcRNA	architectural RNA
ATF2	activating transcription factor 2
ATP	adenosine triphosphate
BAT	brown adipocyte tissue
BSA	bovine serum albumin
CBB	coomassie brilliant blue
CFIm	cleavage factor Im
Cidea	cell death inducing DFFA like effector A
circRNA	circular RNA
Cox4	cytochrome C oxidase subunit 4
DFC	dense fibrillar component
Dio2	iodothyronine deiodinase 2
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
DNA	deoxyribonucleic acid
DW	deionized water
cAMP	cyclic AMP
cDNA	complementary DNA
dsDNA	double-stranded DNA
EDTA	ethylene diamine-*N', N', N', N'*-tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked Immuno sorbent assay
Elovl3	elongation of very long chain fatty acids-3
ESC	embryonic stem cells
EtOH	ethanol
FBS	fetal bovine serum
FC	fibrillar center
GC	granular component
HE	hematoxylin and eosin
HOTAIR	HOX transcript antisense RNA
hPSC	human pluripotent stem cell
HSATIII	human satellite III
IGAZs	interchromatin granule-associated zone
KO	knockout
lncRNA	long non-coding RNA

miRNA	microRNA
miscRNA	miscellaneous RNA
ncRNA	non-coding RNA
Neat1	マウス nuclear enriched abundant transcript 1
NEAT1	ヒト nuclear enriched abundant transcript 1
NETO	norepinephrine turnover
Nono	non POU domain containing octamer binding protein
NORAD	non-coding RNA activated by DNA damage
nSB	nuclear stress body
PAS	polyadenylation (poly-A) signal
PBS	phosphate-buffered saline
PFA	paraformaldehyde
Pgc1a	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
piRNA	PIWI-interacting RNA
PKA	protein kinase A
PolII	RNA polymerase II
PML	promyelocytic leukaemia
Prdm16	PR/SET domain 16
PRC	polycomb repressive complex
Pspc1	paraspeckle component 1
ProK	proteinase K
p38 MAPK	p38 mitogen-activated protein kinase
RADICL-seq	RNA and DNA interacting complexes ligated and sequenced
RT	room temperature
RT-qPCR	reverse transcription- quantitative polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
RNA-seq	RNA sequencing
rRNA	ribosome RNA
scaRNA	small cajal body-specific RNA
SINEB1	short interspersed elements B1
snoRNA	small nucleolar RNA
snRNA	small nuclear RNA
SSC	saline sodium citrate
SUMO	small ubiquitin-related modifier
TBS	tris buffered saline
Tbx1	T-box protein 1

TH	tyrosine hydroxylase
TNFα	tumor necrosis factor-α
Tris	tris (hydroxymethyl)aminomethane
Ucp1	uncoupling protein 1
UV	ultraviolet
WAT	white adipocyte tissue
WT	wild type
Xist	X-inactive specific transcript
4.5SH	4.5S RNAH

脚注

本研究では、ヒトの遺伝子およびタンパク質を全て大文字で示し、マウスは頭文字のみ大文字で表記している。また遺伝子名および RNA を示す場合にはイタリック体にて表記した。

例：ヒト：*NEAT1*、マウス：*Neat1*

1. 序論

1.1 ノンコーディング RNA

近年の大規模なトランスクリプトーム解析により、ヒトやマウスなどの高等真核生物ではタンパク質をコードする mRNA のみならず、タンパク質をコードしないノンコーディング RNA(ncRNA)が大量に転写されていることが明らかとなった。その種類はタンパク質をコードする mRNA の約半数程度であり、非常に多様なノンコーディング RNA が存在する(図 1 左)[1,2]。またノンコーディング RNA はさらにその長さに応じて 2 種類に分類される。200 塩基以下の RNA は短鎖ノンコーディング RNA と呼ばれる。これらには標的遺伝子と相補的な配列を有しその遺伝子の翻訳抑制を行う microRNA[3,4,5]や、生殖細胞特異的に発現しレトロトランスポゾンの発現を抑制することが報告されている piRNA などが含まれる[6,7,8]。また小型の齧歯類特異的に産生される短鎖ノンコーディング RNA の *4.5SH* は *SINEB1* と相補的な配列を持ち[9]、イントロン内に存在する *SINEB1* を認識することで、スプライシングを抑制し *SINEB1* のエクソン化を抑制する働きが報告されている[10]。一方 200 塩基以上の RNA は長鎖ノンコーディング RNA と呼ばれ、ノンコーディング RNA のおおよそ 7 割程度を占める(図 1 右)。長鎖ノンコーディング RNA の代表例としては、X 染色体の不活性化に寄与することで有名な *Xist*[11]や、本研究で着目する *Neat1* などが挙げられる。

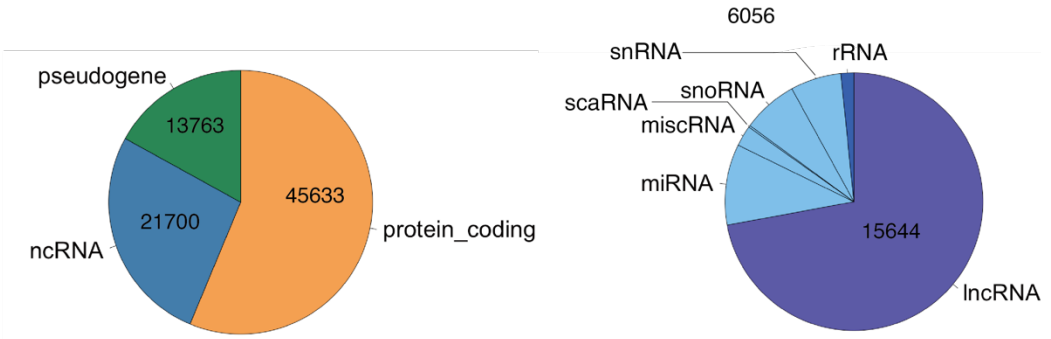


図 1 ：高等真核生物では多種多様なノンコーディング RNA が産生される。(GENCODE vM34 gtf でのアノテーションを使用し作製した。)
タンパク質をコードする mRNA のおおよそ半分にも及ぶ多様なノンコーディング RNA が存在する(左青色)。ノンコーディング RNA は長さに応じて、短鎖ノンコーディング RNA(右図水色)と長鎖ノンコーディング RNA(右図紫色)に分類される。

近年、逆遺伝学的手法により長鎖ノンコーディング RNA が様々な機能を有することが報告されている[12,13,14]。しかしその作用機序は長鎖ノンコーディング RNA が相互作用する因子に依存するため様々である。大きく 3 つに分け次に説明する。

1 つ目はスポンジモデルや隔離モデルと呼ばれ、長鎖ノンコーディング RNA が特定の相互作用因子をくわえ込むことでその動態を制御し機能を発揮するモデルである[14]。その代

表例の 1 つとして *NORAD* が知られる。*NORAD* は、p53 依存的に DNA 損傷時に発現が増加する長鎖ノンコーディング RNA として同定された。全長は 5.3kb であり、400 塩基のリピート配列からなる 5 つのドメインを持つ。*NORAD* の KO 細胞では染色体の安定性が低下することが報告されているが、このドメインを介して DNA 複製や DNA 修復に関与するとされる PUMILIO タンパク質と相互作用し、一部に集めておくとこで PUMILIO タンパク質を抑制的に制御していることが報告されている[15]。またノンコーディング RNA の 1 つであり末端を持たず環状構造を持つ、環状ノンコーディング RNA(circRNA)は、相補的な配列をもつ miRNA と相互作用しその活性を抑制していることも知られている(図 2A)[16,17]。 2 つ目の機能モデルはノンコーディング RNA による転写制御である。その代表例が X 染色体の不活性化を行う *Xist* である[11]。*Xist* は X 染色体から転写され、X 染色体上にヒストン H3 の 27 番目のリシンをトリメチル化する活性を持つ、ポリコーム複合体 2(PRC2)を呼び込むことで、X 染色体の不活化をシスに制御する[18,19]。また *HOTAIR* もまた PRC2 を特定の遺伝子領域に呼び込むことで、ヒストン修飾を介した転写調節を行うことが報告されている。*Xist* とは異なり *HOTAIR* の転写される領域から離れた遺伝子の発現をトランスに制御することがその特徴である(図 2B)[20,21]。 3 つ目は構造体の骨格として機能しているモデルである。ノンコーディング RNA の中には、複数のタンパク質や RNA と相互作用すること細胞内で構造体を形成するものがあり、architectural RNA(arcRNA)と呼ばれる[22,23]。本研究で着目している *Neat1* も arcRNA の 1 つであり、様々な RNA 結合タンパク質と結合しパラスペックルと呼ばれる核内構造体の足場として機能する(図 3C)。この他にも、*HSATIII* は、熱ストレスにより発現が誘導され、様々な RNA 結合タンパク質を係留することにより核内ストレス体(nSB)を形成する[24,25]。このような arcRNA には共通して難容性という特徴を持つことから、難容性 RNA を網羅的に同定することで新規の arcRNA を探索する研究も進められている[26,27]。

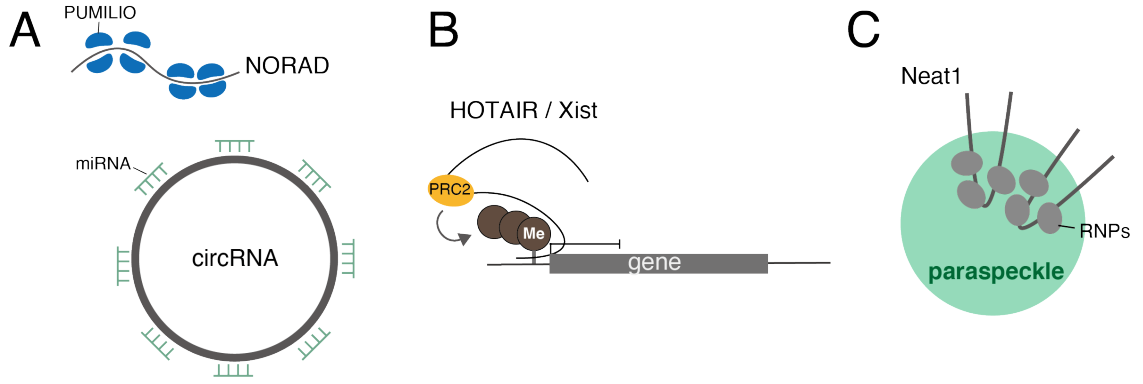


図 2：長鎖ノンコーディング RNA の作用モデル
(A) 標的タンパク質をくわえ込む、スポンジモデルの模式図。
(B) ノンコーディング RNA による標的遺伝子の発現制御のモデル図。
(C) 構造体の骨格として働くノンコーディング RNA の *Neat1* により形成されるパラスペックルの模式図。詳細は次の項で述べる。

1.2 非膜オルガネラ

細胞内には膜によって隔てられていない様々な構造体が多数存在することが知られている(図 3)。これらは非膜オルガネラとも呼ばれ、RNA-RNA、タンパク質-タンパク質、RNA-タンパク質間の弱い多価の分子間相互作用によって形成される [28,29]。非膜オルガネラは構造体ごとにそれぞれ特異的な因子と相互作用することで、様々な機能モデルが提唱されている。いくつか具体例を挙げ、その機能と形成メカニズムについて紹介する。

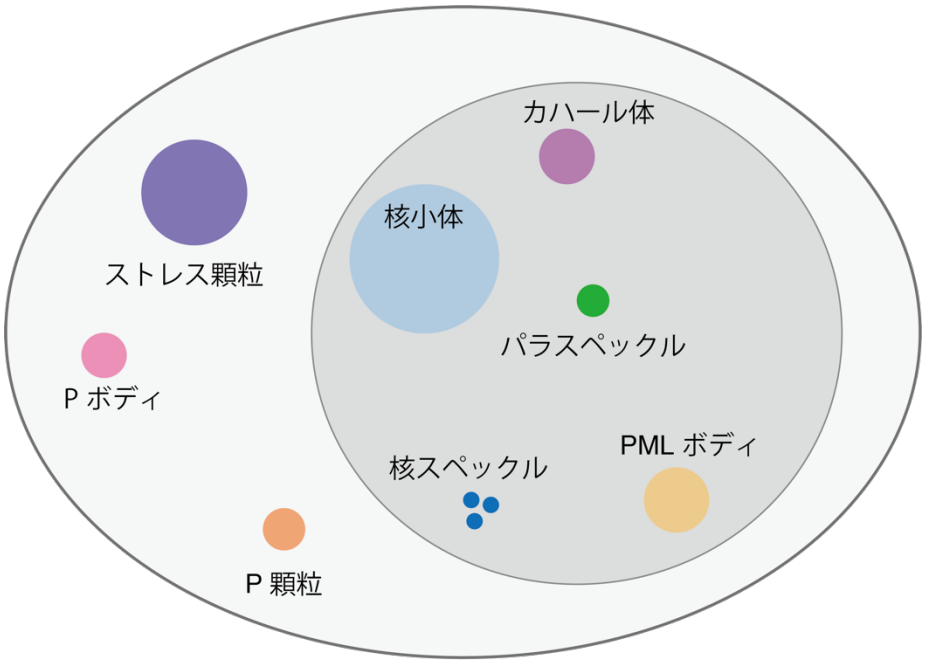


図 3：細胞内での様々な非膜オルガネラ(Hirose et.al, 2023 改編)
細胞質・核質にはそれぞれ特異的な構成因子を持つ、様々な非膜オルガネラが存在する。

古くからその存在が知られている核小体も非膜オルガネラの 1 つである [30]。核小体は、リボソーム RNA の転写・プロセシングやリボソーム合成の場として知られる。核小体の内部は、その中心部から FC、DFC、GC と呼ばれる 3 つの領域に分類することができる。FC には rDNA やポリメラーゼ I が局在し、この表面部において rRNA の転写が行われる。転写された rRNA は DFC でのプロセシングを経て、GC においてリボソームタンパク質と会合することにより、リボソームのアッセンブリーが行われる [31]。このようにそれぞれの画分に特異的なタンパク質や RNA を局在させることで、特異的な反応の場として機能することが報告されている。

PML ボディは、がん抑制因子として知られる PML タンパク質を主要な構成因子として形成され、直径は約 1 μm ほどの核内に形成される構造体である [32]。PML タンパク質内にある SUMO interacting motif (SIM)ドメインを介して、PML タンパク質自身が SUMO 化されることで安定な PML ボディを形成し [33]、SUMO 化に必要な因子を集めることでクライアントのタンパク質の SUMO 化が効率よく起こるような反応の場として機能することが報告されている [34]。また PML ボディはタンパク質のみならず特定のゲノム領域と相互作用することが知られており、転写活性の維持に重要であることが報告されている [35,36]。特に Y 染色体上においては DNA のメチル基の転移活性を持つ DNMT3A (DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A)を近づけない状態にすることで、メチル化の維持に寄与することなど [37]、複数の機能モデルが報告されている。

非膜オルガネラには恒常的に形成されているもののみならず、誘導性の非膜オルガネラも存在しており、その 1 つとしてストレス顆粒が知られている。ストレス顆粒は、UV 照射・酸化ストレス・ヒートショックなど様々な環境ストレスに応じて細胞質に誘導される非膜オルガネラである [38]。mRNA と 200 種類以上の RNA 結合タンパク質を含み、特異的な構成因子としては G3BP1 や TIA1 などが知られている [39]。ストレス負荷時に一過的に形成され、mRNA をストレス顆粒内に係留することで、タンパク質への翻訳を一時的に抑制すると考えられている。

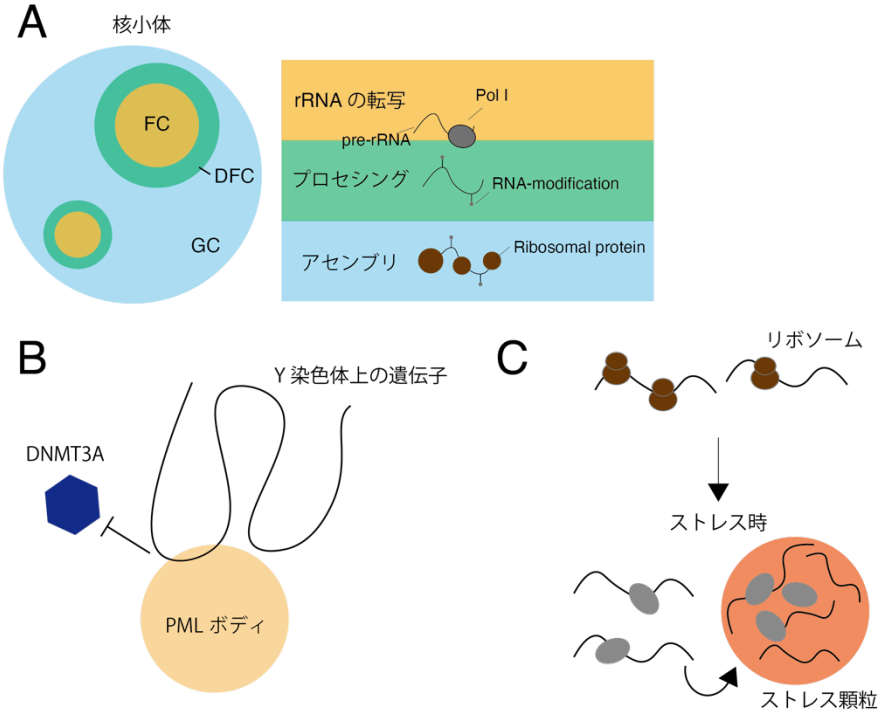


図 4：代表的な非膜オルガネラの作用モデル
(A)核小体はそれぞれの領域で異なる反応を行う。
(B)PML ボディによる転写制御モデル。
(C)ストレス時に誘導されるストレス顆粒。mRNA を係留することで翻訳を一時的に抑制する。

1.3 パラスペックルと *Neat1*

当研究室で着目しているパラスペックルは、核内に形成される非膜オルガネラの 1 つであり、タンパク質をコードしない長鎖ノンコーディング RNA である *Neat1* を骨格として形成される核内構造体として知られている [40,41,42]。パラスペックルは、電子顕微鏡を用いた観察により、電子密度が高い構造体として発見され、当初はクロマチン間顆粒関連領域 (interchromatin granule-associated zone : IGAZs) として報告されていた [43]。その後、新規の核小体タンパク質を探索する過程で同定された Pspc1 や Nono といった RNA 結合タンパク質が、核内で特徴的な局在を示すことが明らかとなった。この構造体は、核スペックルの近傍に位置することから、パラスペックルと名付けられ、IGAZs と同一の構造体であることが明らかとなった [44]。パラスペックルの構成因子のタンパク質には RNA 結合ドメインを持つものが多く含まれることや、RNase 処理により消失することから、RNA 依存的な構造体であることが予想されてきたが、具体的にどの RNA が骨格として機能しているかはしばらく不明であった。2009 年に複数の研究グループから、長鎖ノンコーディング RNA である *Neat1* がパラスペックルの骨格であることが報告された [46,47,48,49]。

Neat1 は共通した 5'配列をもつ 2 つのアイソフォームからなり、3kb ほどの *Neat1_1* と 20kb ほどの *Neat1_2* が存在する (図 5A)。このうち *Neat1_2* がパラスペックルの骨格として必須である。さらに電子顕微鏡を用いた解析から、*Neat1_2* の中央配列を構造の中心部に持ち、5'と 3'の末端配列を外縁部に持つような特徴的な配向を持つことが報告されている [50]。超解像顕微鏡を用いた観察からも同様の結果が得られており、core-shell 構造と呼ばれそれぞれの領域に特異的な結合タンパク質が存在している [51] (図 5B)。このような特徴的な配向を持つパラスペックルの形成メカニズムとしては、骨格である *Neat1_2* に様々な RNA 結合タンパク質が結合することで、重合体を形成し液-液相分離を引き起こすことで形成されるというモデルが提唱されている [52] (図 5C)。パラスペックルの構成因子については、ヒトの cDNA ライブラリーを用いた網羅的なスクリーニングにより 30 種類以上の RNA 結合タンパク質が含まれることや、パラスペックルの形成に必須であるものとそうでないものが存在することが報告されている [53]。また近年では、新たな手法を用いたパラスペックルおよび *Neat1* の相互作用因子の同定も進められている。lncRNA と相互作用する DNA 領域を解析する手法として開発された RADICL-seq では、*Neat1* が細胞タイプにより異なる DNA 領域と相互作用することが報告されている [54]。近位ビオチンラベル法を用いた新たな構成因子の探索も行われており、その構成因子の解明が進められている [55]。パラスペックルについては、このような形成メカニズムや構成因子は、培養細胞を用いた研究により徐々に明らかとなりつつある、一方で生理機能については不明な点が多く残されている。当研究室では、様々な *Neat1* 遺伝子改編マウスを用いパラスペックルの生理機能に着目した研究を進めてきた。

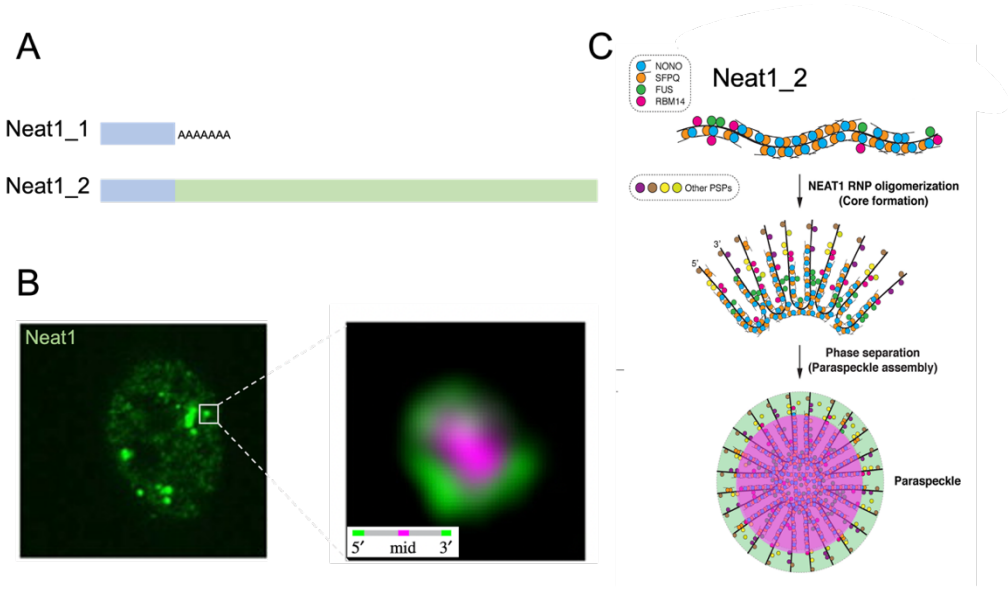


図 5. *Neat1* とパラスペックル
(A) *Neat1* の遺伝子の模式図。共通する 5′領域を青色で示す。
(B) 細胞内でのパラスペックル。緑色が *Neat1* を示す(左)。超解像顕微鏡にてより詳細に観察した写真。*Neat1* の両端を緑色、中央部分をマゼンダで表す(右)。
(C) パラスペックルの形成モデル。(Yamazaki et.al, 2018 より引用)

1.4 パラスペックルの生理機能

当研究室ではパラスペックルの生理機能に迫るために、*Neat1* の各組織における発現パターンの解析[56]を行なっており、*Neat1_1* は脳では非常に発現が低いものの、それ以外の多くの組織でユビキタスな発現がみられることや、*Neat1_2* は一部の細胞でのみ発現していることを明らかとしている。また *Neat1* の両方のアイソフォームを欠損する *Neat1* KO マウスを作製しその表現型解析を進めており、これまでにも黄体形成不全による妊娠率の低下を報告している[57]。しかしながらこの表現型の浸透率は 50%と低く、同一の *Neat1* KO 個体を用いても、不妊の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を明らかとする上で大きな障壁となっていた。培養細胞を用いた研究から、*Neat1* がウイルス感染時や[58]、ヒートショック[59]など様々なストレスに応答して発現が増加することが報告されている。また個体においても、ストレス環境下において多動を示すことが報告されており、*Neat1* がストレス応答時に機能を発揮する可能性が示唆されてきた[60]。

1.5 寒冷刺激への応答(褐色脂肪組織とベージュ細胞)

マウスには 2 種類の脂肪組織が存在する。1 つが肩甲骨の周囲に存在する褐色脂肪組織である。ミトコンドリアを豊富に含み室温時にも熱産生を行い、体温の保持に寄与するとされている [61,62]。2 つ目は白色脂肪組織で、脂肪を蓄えエネルギーの貯蔵庫として機能している。寒冷刺激時には、褐色脂肪組織が活性化することで熱産生能を増加させることに加えて、皮下の白色脂肪組織内に新たな熱産生細胞であるベージュ細胞が出現することが知られている [63,64]。ベージュ細胞は、褐色脂肪組織と同様にミトコンドリアを豊富に含んでおり熱産生を行い、寒冷環境下での体温保持に寄与するとされている [65] (図 6)。

その熱産生においては Ucp1 タンパク質が必須である。Ucp1 はミトコンドリアの内膜に存在し、通常時では ATP 産生に使用される H^+の濃度勾配を脱共役することにより、そのエネルギーにより熱産生を行う [66,67]。*Ucp1* KO マウスでは、褐色脂肪組織による熱産生能が低下し低温不耐性となることも報告されている [68]。

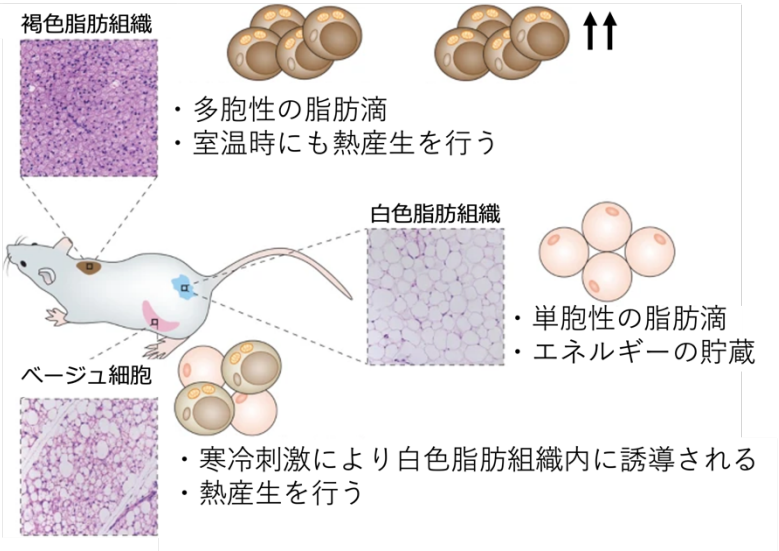


図 6. 褐色脂肪組織と皮下白色脂肪組織での寒冷刺激時の応答
褐色脂肪組織では寒冷刺激によりさらに熱産生能を増加させる。皮下白色脂肪組織では、ベージュ細胞と呼ばれる新たな熱産生能を持つ細胞が出現する。(Wang et al., 2016 改編)

1.6 ベージュの細胞分化時のノルアドレナリンによるシグナル伝達

寒冷刺激は体表の温度感受性 TRP チャネルにより感受され、視床下部へと情報が伝達される。その後交感神経節を経由し、褐色脂肪組織や皮下白色脂肪組織へ投射する交感神経が活性化し、神経終末からノルアドレナリンが放出されることで、褐色脂肪組織の活性化や皮下白色脂肪組織でのベージュ細胞分化が誘導されることが知られている[69,70,71](図 7 A)。またこの経路においてどの脳領域が重要であるかについては様々な研究がなされおり、これまでに褐色脂肪組織においては、視床下部背内側核(DMH)や視床下部背側野(DHA)などの脳領域が褐色脂肪組織における熱産生に寄与していることが示されてきた[72,73,74]。また褐色脂肪組織には影響を与えず、ベージュ細胞の分化のみに影響を与える領域として視床下部腹内側部(VMH)が報告されている[75]。

また組織で放出されたノルアドレナリンは、白色脂肪細胞で発現しているノルアドレナリン受容体に結合し細胞内へとシグナルを伝達することが報告されている。ノルアドレナリン受容体には、β1~3 のサブタイプが存在しており、皮下白色脂肪組織では他の受容体と比較して β3 の発現が非常に強いことが報告されており[76]ベージュ細胞分化には β3 受容体の寄与が大きいと考えられている。ノルアドレナリン β3 受容体は Gs タンパク共役型受容体であり、ノルアドレナリンとの結合後アデニル酸シクラーゼの活性化が生じ、ATP から cAMP の産生を増加させる。増加した cAMP により cAMP 依存性プロテインキナーゼである PKA が活性化し、下流の p38 MAPK やミトコンドリアの生合成や Ucp1 の転写調節に重要とされる ATF2、Pgc1a などの転写因子をリン酸化することで、より下流の転写調節が行われる[77,78](図 7B)。

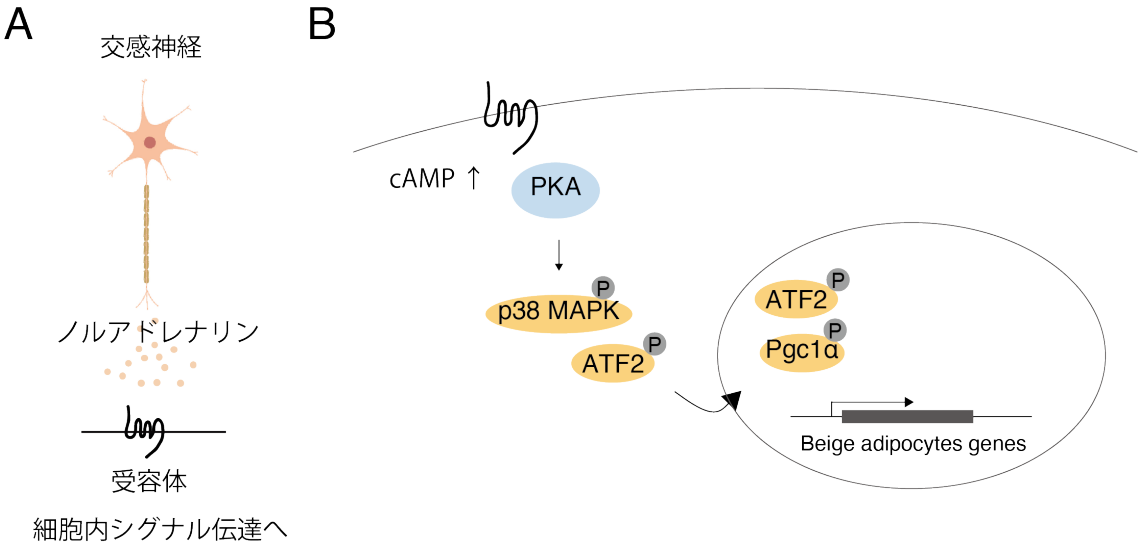


図 7. 寒冷刺激からベージュ細胞分化までのシグナル伝達
(A) 交感神経からのノルアドレナリンの放出がベージュ細胞分化の引き金として働く。
(B) PKA を介した転写因子のリン酸化による細胞内シグナル伝達の様子。

1.7 ベージュの細胞の起源細胞と周辺細胞による影響

皮下白色脂肪組織は、脂肪滴を持つ白色脂肪組織のみならず様々な細胞から構成されている。T 細胞や B 細胞やマクロファージ・樹状細胞などの免疫に関わる細胞や、脂肪細胞の前駆細胞、血管内皮細胞などが存在している。ベージュ細胞がどの細胞タイプから分化してくるかについては未だ議論が残るが、大きく分けると前駆細胞から分化するパターンと、白色脂肪細胞からベージュ細胞へ変化するパターンの分化が報告されている[79,80](図 8)。また、寒冷刺激により誘導されたベージュ細胞は、室温飼育時には白色脂肪細胞様に戻り、次の刺激時にこのような細胞からベージュ細胞が分化してくることも報告されている[81]。近年の single-cell RNA-seq を用いた解析から、白色脂肪細胞やベージュ細胞は不均一な細胞集団であることが報告されており[82]、このような複雑な分化の過程を反映しているものと考えられる。またベージュ細胞の前駆細胞についても、血管内皮細胞や平滑筋様細胞から分化するなど様々なグループから、そのマーカー遺伝子の報告があり議論の余地が残されている[79]。

また皮下白色脂肪組織に存在するマクロファージもベージュ細胞分化に影響することが報告されている。マクロファージは大きく分けて炎症性サイトカインを分泌する M1 マクロファージと、抗炎症反応や組織のリモデリングに関与するとされる M2 マクロファージに分けられる[83,84]。肥満マウスでは、マクロファージの M1 マクロファージの数が増加し M2 マクロファージが減少することが知られており[85,86,87]、このことによりベージュ細胞への分化が抑制されることが報告されている。また本来ベージュ細胞の分化が生じない精巣周囲の白色脂肪細胞では、寒冷刺激により M1 マクロファージの活性化が生じ、産生するサイトカインの TNFα の発現が増加することでベージュ化が抑制されており、M1 マクロファージの除去を行うと、Ucp1 の発現増加が生じるようになる[88]。これらのことから、M1 マクロファ―ジはベージュ細胞の分化に抑制的に機能すると考えられている。一方 M2 マクロファージに関しては、寒冷刺激により IL-4 や IL-13 などの Th2 サイトカインを介して活性化され、ベージュ細胞分化に促進的に働くことが報告されている[89,90,91,92]。

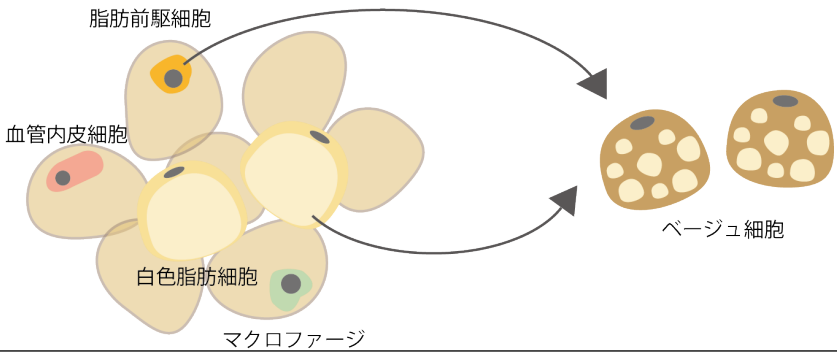


図 8. 白色脂肪組織には様々な細胞タイプが存在する
脂肪前駆細胞や白色脂肪組織からベージュ細胞が分化することが報告されている。

2. 研究の背景と目的

Neat1 の生理機能やさらにはその機能を発揮する分子メカニズムを明らかとするために *Neat1* KO マウスがより再現性良く表現型を示す環境の同定を試みた。序論で述べたように *Neat1* KO マウスの妊娠率の低下の表現型は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に加えて、培養細胞の研究より *Neat1* は様々なストレス応答時に発現が増加することを受けて、何らかのストレスや環境依存的に *Neat1* が必要となるのではないかと仮説を立てた。そこで本研究では、*Neat1* が機能を発揮する新たな環境を同定しその分子メカニズムに迫ることを目的とした。そこで野生型マウスおよび *Neat1* KO マウスをさまざまなストレス環境下で飼育し、それらのストレスが及ぼす影響を比較することとした。*Neat1* KO マウスでは体重が減少するという予備的なデータがあったために、代謝や摂食に関連するストレスを与え野生型での *Neat1* の発現量変化や、野生型と *Neat1* KO マウスでの各種ストレスへの応答を比較する中で、寒冷刺激に対する応答が *Neat1* KO マウスでは正常に起こらないことを見出した。

3. 結果

3.1 *Neat1* KO マウスでは正常に寒冷刺激により褐色脂肪組織の活性化が生じる

Neat1 が必要となる環境を同定するために、高脂肪食負荷や絶食・摂食時など様々なストレス環境に対する応答を野生型と *Neat1*　KO マウス間で比較を行なった。その過程において寒冷刺激時の応答に差が見られることを見出した。

寒冷刺激への応答を比較するために、野生型と *Neat1* KO マウスをそれぞれ、室温飼育と寒冷刺激(4ºC 1 週間)を行なったのちに、褐色脂肪組織をサンプリングし以降の解析を行った。褐色脂肪組織をサンプリング後 RNA およびタンパク質を抽出し、RT-qPCR およびウエスタンブロッティング法により、マーカー遺伝子である Ucp1 の発現量の比較を行なった。すると RT-qPCR の結果より、野生型の褐色脂肪組織では寒冷刺激により *Ucp1*mRNA の発現量は 2 倍程度に増加することが確認された。また *Neat1* KO では、室温飼育時の *Ucp1* mRNA は野生型と同程度発現しており、寒冷刺激により野生型と同程度発現が増加することが確認された (図 9A)。ウエンタンブロッティングからも同様の結果が得られており、*Neat1* KO マウスでの Ucp1 タンパク発現量は室温時および寒冷刺激時どちらにおいても野生型との間に差は見られなかった。(図 9B)。またパラフィンブロックを作製し、ヘマトキシリン&エオジン(HE)染色による組織学的な解析を行なったが、野生型と *Neat1* KO マウス間で大きな差は認められなかった。どちらにおいても、寒冷刺激により脂肪滴が小さくなりエオジンで染色される細胞質が密になるような組織学的な変化が見られた(図 9C 左)。また Ucp1 の抗体染色からもその発現パターンに大きな差は見られていない。野生型および *Neat1* KO マウスどちらにおいても、寒冷刺激により Ucp1 のシグナルが強くなる傾向が見られた(図 9C 右)。これらの結果より、寒冷刺激による褐色脂肪細胞の活性化は *Neat1* KO マウスでも正常に生じることが明らかとなった。また複数のマーカー遺伝子(褐色脂肪組織とベージュ細胞マーカー：*Cox4,Cidea,Prdm16, Pgc1α,Dio2, Elovl3*, 脂肪組織マーカー：*Ap2*, 褐色脂肪組織マーカー：*Eva1*,ベージュ細胞マーカー：*Cd137, Tbx1*)の発現量について、RT-qPCR により発現量の比較を行なった。室温飼育では、*Ap2・Cox4・Cidea* については *Neat1* KO マウスで野生型よりも発現が有意に増加していた。寒冷飼育 1 週間後では野生型マウスと *Neat1* KO マウスの間で有意な差は見られなかった(図 9D)。

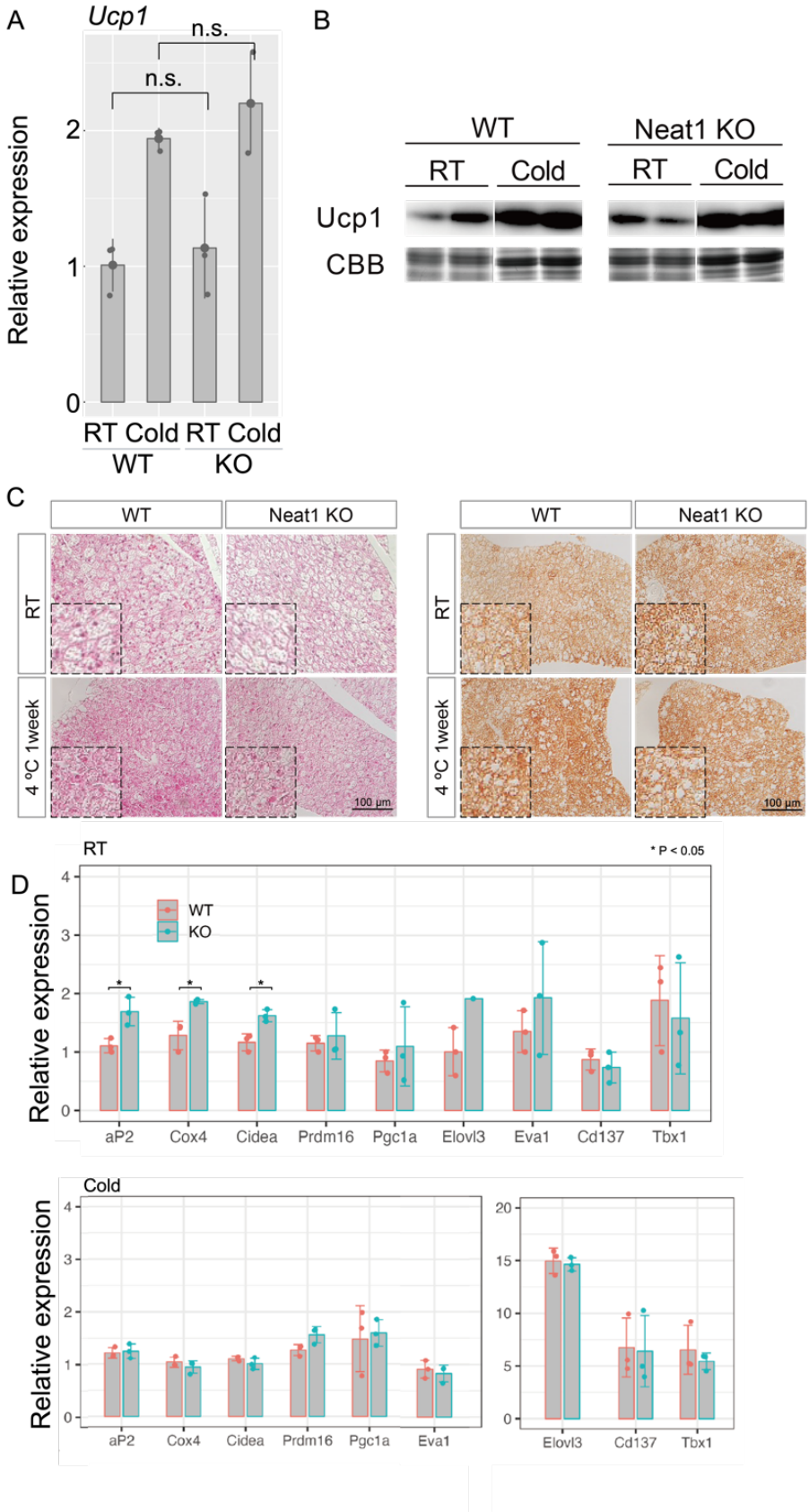

A
Ucp1
n.s.
n.s.
Relative expression
RT Cold RT Cold
WT KO
B
WT
Neat1 KO
RT Cold RT Cold
Ucp1
CBB
C
WT
Neat1 KO
RT
4 °C 1week
100 μm
D
RT
* P < 0.05
WT
KO
Relative expression
aP2 Cox4 Cidea Prdm16 Pgc1a Elovl3 Eva1 Cd137 Tbx1
Cold
aP2 Cox4 Cidea Prdm16 Pgc1a Eva1
Elovl3 Cd137 Tbx1

図 9. *Neat1* KO マウスでは寒冷刺激による褐色脂肪組織の活性化は正常に生じる
(A) RT- qPCR による室温時および寒冷刺激時の褐色脂肪組織における *Ucp1*mRNA の発現量比較。(mead ±S.D., n = 3, by unpaired student's T-test)
(B) ウエスタンブロットによる室温時および寒冷刺激時の褐色脂肪組織における Ucp1 タンパク質の発現量比較。
(C) HE 染色(左)と Ucp1 抗体染色(右)による組織学的解析。
(D) 室温飼育および寒冷飼育 1 週間後の褐色脂肪組織における RT-qPCR による他のベージュ細胞・褐色脂肪組織・白色脂肪組織のマーカー遺伝子の発現量比較。(mead ±S.D., n = 3, * p <0.05 by unpaired student's T-test)

3.2 *Neat1* KO マウスでは寒冷刺激によるベージュ細胞の分化が抑制されている

次に寒冷刺激で誘導されるベージュ細胞の分化に差が見られるかを明らかとするために、同様の解析を皮下白色脂肪組織においても行なった。すると野生型のマウスでは寒冷刺激により *Ucp1* の mRNA が大幅に増加する一方で、*Neat1* KO マウスでは増加が非常に抑制されることが明らかとなった(図 10A)。ウエスタンブロットからも同様の結果が得られており、野生型では寒冷刺激により Ucp1 タンパク質の発現増加によるバンドがはっきりと確認できた一方で、*Neat1* KO マウスでは野生型と比較して薄いバンドが見られ、タンパク質レベルでも Ucp1 の発現増加が抑制されていた(図 10B)。また組織学的な解析からも顕著な差が見られた。ベージュ細胞は皮下白色脂肪組織内のリンパ周辺に多く出現することが知られている。そこで解析に使用した場所による分化効率の影響を排除するために、リンパ周辺から切片を作製し比較を行なっている。野生型では寒冷刺激により細かい脂肪滴を持つベージュ細胞の出現が見られた一方で、*Neat1* KO マウスではそのような細胞は非常に少なかった。また Ucp1 の抗体染色の結果からも、野生型では寒冷刺激により Ucp1 陽性のベージュ細胞が多く見られた一方で、*Neat1* KO マウスでは少ないことが明らかとなった(図 10C)。また Ucp1 以外のマーカー遺伝子についても、RT- qPCR による発現定量解析を行なった。室温飼育ではどの遺伝子についても有意な差は見られなかった(図 10D 上)。一方、寒冷飼育後 1 週間では、ミトコンドリアマーカーの *Cox4* やミトコンドリアの生合成や Ucp1 の転写因子として知られる *Pgc1a*、ベージュ細胞に比べ褐色脂肪細胞でより発現していることが知られている *Eva1* が *Neat1* KO マウスにおいて有意に発現が減少していた。また Ucp1 の機能制御に関わるとされる *Cidea* や脂肪酸伸長酵素の *Elovl3* については、野生型マウスにおいて寒冷刺激により発現が非常に増加する一方で、*Neat1* KO マウスでは発現増加が抑制されていた(図 10D 下)。これらの結果から、*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が明らかとなった。

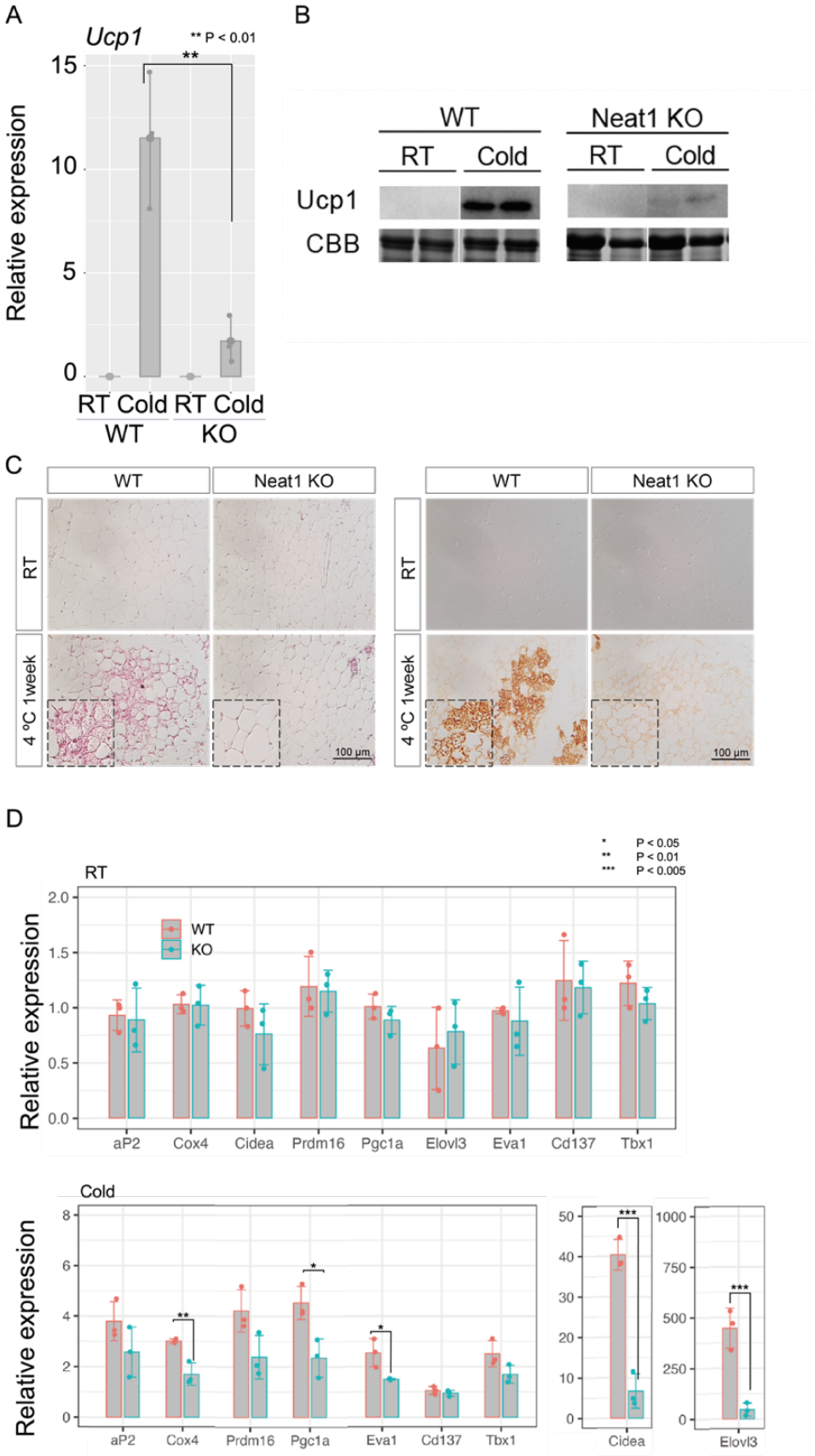

A
Ucp1
** P < 0.01
**
Relative expression
15
10
5
0
RT Cold RT Cold
WT KO
B
WT
Neat1 KO
RT Cold RT Cold
Ucp1
CBB
C
WT
Neat1 KO
RT
4 ºC 1week
100 µm
D
RT
* P < 0.05
** P < 0.01
*** P < 0.005
Relative expression
WT
KO
aP2 Cox4 Cidea Prdm16 Pgc1a Elovl3 Eva1 Cd137 Tbx1
Cold
aP2 Cox4 Prdm16 Pgc1a Eva1 Cd137 Tbx1
Cidea
Elovl3

図 10. *Neat1* KO マウスでは寒冷刺激によるベージュ細胞の分化が抑制されている
(A)RT- qPCR による室温時および寒冷刺激時の皮下白色脂肪組織における *Ucp1*mRNA の発現量比較。(mead ±S.D., n = 3, ** p <0.01 by unpaired student's T-test)
(B)ウエスタンブロットによる室温時および寒冷刺激時の皮下白色脂肪組織における Ucp1 タンパク質の発現量比較。
(C)HE 染色(左)と Ucp1 抗体染色(右)による組織学的解析。
(D) 室温飼育および寒冷飼育 1 週間後の皮下白色脂肪組織における RT- qPCR による他のベージュ細胞・褐色脂肪組織・白色脂肪組織のマーカー遺伝子の発現量比較。(mead ±S.D., n = 3, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.005 by unpaired student's T-test)

3.3 *Neat1_1* ではなく *Neat1_2* がベージュ細胞分化に必要である

Neat1 には長さの異なる 2 つのアイソフォームである *Neat1_1* と *Neat1_2* が存在する。ここまでの実験で用いた *Neat1* KO マウスは両方のアイソフォームを欠損しているために、ベージュ細胞分化にどちらのアイソフォームが寄与しているのかが不明であった。そこで当研究室で過去に作製した *Neat1_1* を特異的に欠損する dPAS マウスを用いることとした [93]。*Neat1* には 3kb 付近ほどに polyA 付加配列である PAS が存在している。この PAS により polyA 付加が起こることで短いアイソフォームである *Neat1_1* が産生され、PAS が読み飛ばされると、長いアイソフォームである *Neat1_2* が産生される。dPAS マウスでは PAS 周辺の 39bp を欠損させることで、*Neat1_1* を特異的に欠損させている(図 11A・B)。この dPAS マウスを用いることにより、ベージュ細胞の分化が正常に生じるならばベージュ細胞分化には *Neat1_2* が重要であり、分化が抑制されているならば *Neat1_1* が必要であると考えられる(図 11C)。

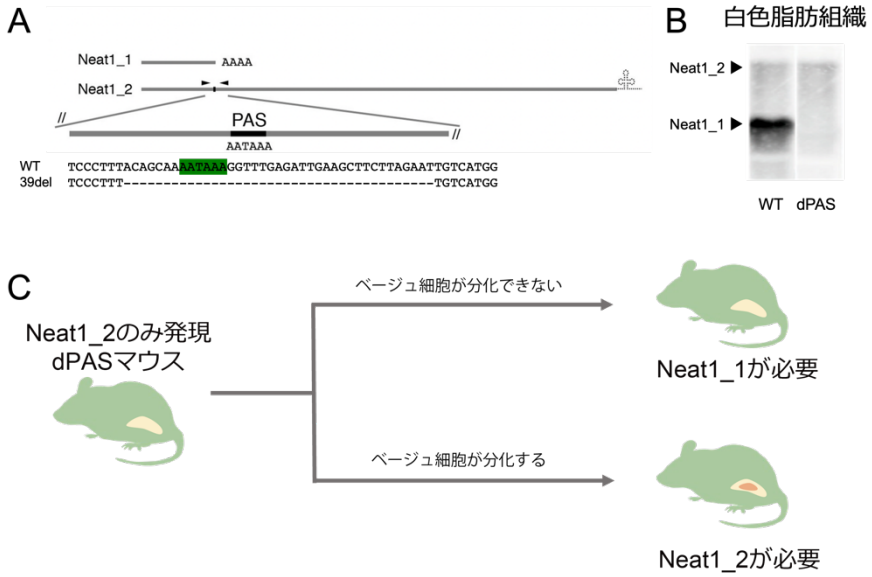
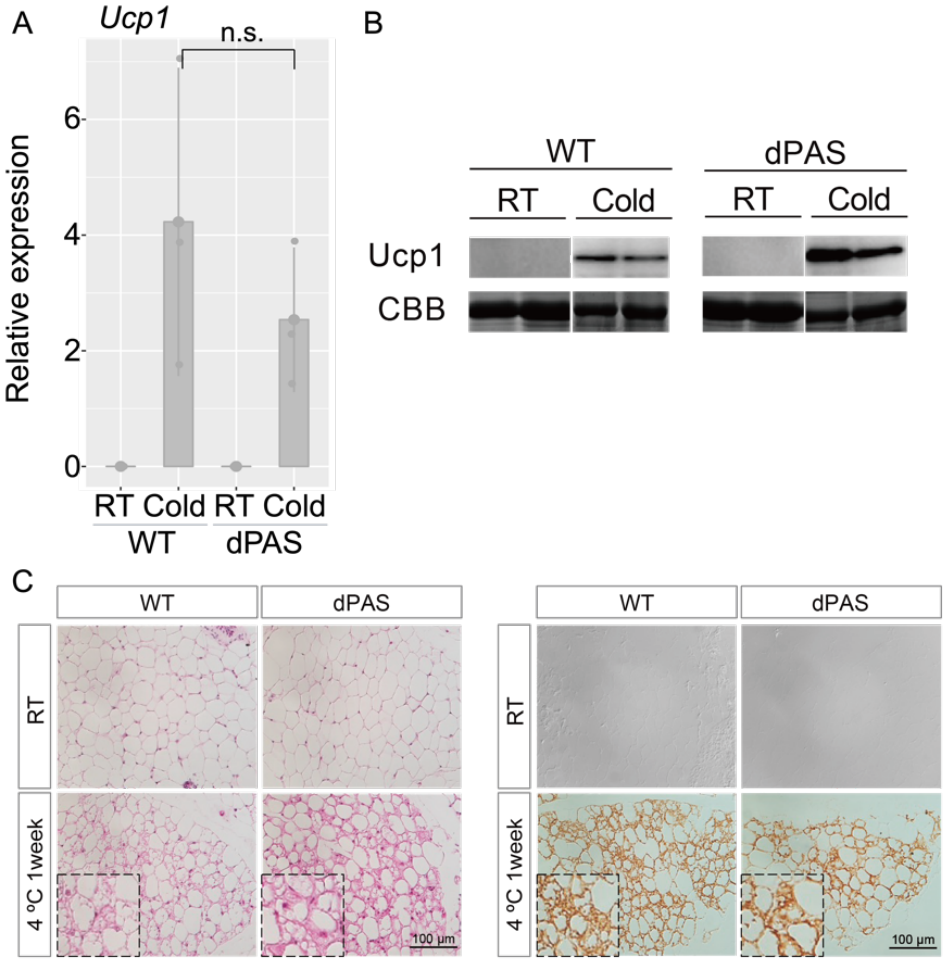


図 11. *Neat1_2* のみ発現する dPAS マウス
(A)dPAS マウスは PAS 配列周辺の 39 塩基を欠損する。
(B)WT と野生型マウスの白色脂肪組織での *Neat1* 検出プローブでのノザンブロッティングの結果。
(C)dPAS マウスを用いることでベージュ細胞分化に寄与するアイソフォームを明らかにすることができる。

そこで野生型マウスと dPAS マウスを使用して同様に皮下白色脂肪組織におけるベージュ細胞の分化効率の比較を行った。すると dPAS マウスでは寒冷刺激により、*Ucp1* の mRNA の発現が野生型と同程度増加していた(図 12A)。またウエスタンブロットからも同様の結果が得られており、dPAS マウスでは寒冷刺激により Ucp1 タンパク質の発現増加が正常に生じることが明らかとなった(図 12B)。また HE 染色による組織学的な解析からも、野生型と dPAS 間に大きな差は見られなかった。野生型マウスおよび dPAS マウスどちらにおいても、寒冷刺激により細かい脂肪滴を持つベージュ細胞の出現が確認でき、Ucp1 抗体染色からも Ucp1 陽性細胞が同程度誘導されていた(図 12C)。また他のマーカー遺伝子についても RT-qPCR により野生型マウスと dPAS マウスの比較を行なったが、室温飼育および寒冷飼育後 1 週間どちらの条件においても有意な差は見られなかった(図 12D)。このことから dPAS マウスでは寒冷刺激時のベージュ細胞分化が正常に生じることが示され、ベージュ細胞分化には *Neat1_1* ではなく *Neat1_2* および *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。



D

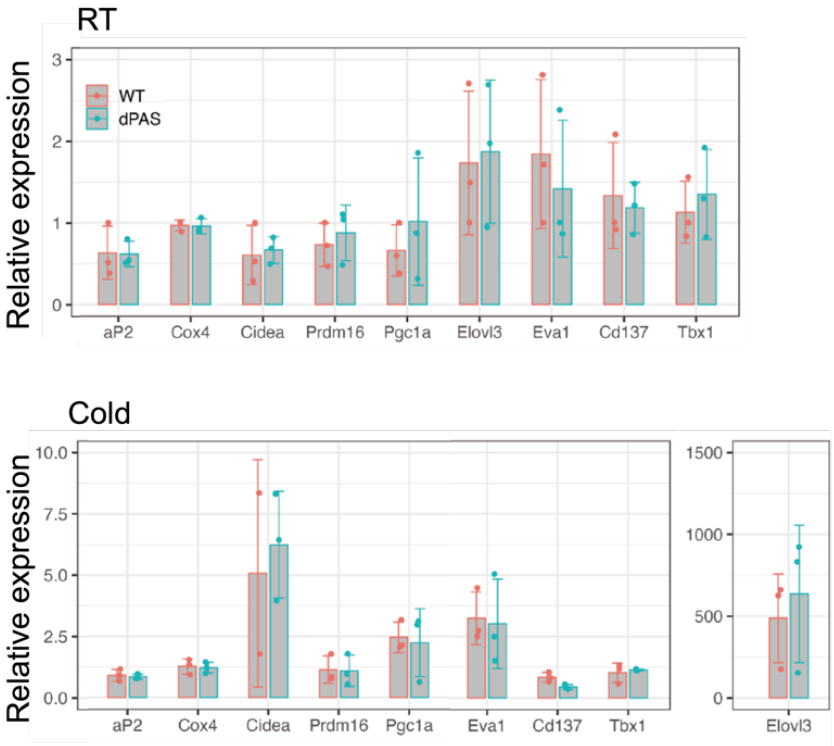
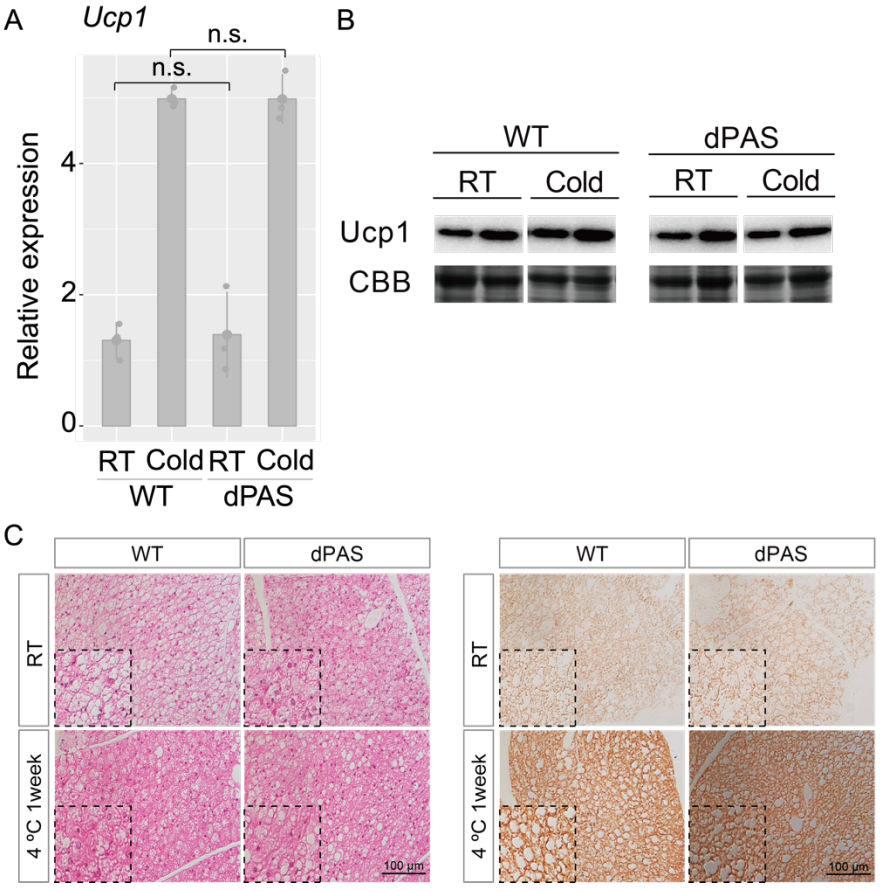


図 12. dPAS マウスでは寒冷刺激によるベージュ細胞の分化が正常に生じる
(A)RT- qPCR による室温時および寒冷刺激時の皮下白色脂肪組織における *Ucp1*mRNA の発現量比較。(mead ±S.D., n = 3, by unpaired student's T-test)
(B)ウエスタンブロットによる室温時および寒冷刺激時の皮下白色脂肪組織における Ucp1 タンパク質の発現量比較。
(C)HE 染色(左)と Ucp1 抗体染色(右)による組織学的解析。
(D) 室温飼育および寒冷飼育 1 週間後の皮下白色脂肪組織における RT- qPCR による他のベージュ細胞・褐色脂肪組織・白色脂肪組織のマーカー遺伝子の発現量比較。赤が WT・水色が dPAS マウスの結果を示す。
(mead ±S.D., n = 3, by unpaired student's T-test)

また dPAS マウスにおける寒冷刺激時の褐色脂肪組織の活性化についても同様の比較を行なった。室温時の *Ucp1* mRNA およびタンパク質発現量には差がなく、寒冷刺激によりどちらも同程度増加する傾向にあることが明らかとなった(図 13A・B)。また組織学的な解析からも大きな差は見られなかった。野生型および dPAS マウスどちらにおいても、寒冷刺激により脂肪滴が小さくなり細胞質が密になるような変化が見られた。また Ucp1 抗体染色からも寒冷刺激によりシグナルが強くなる様子が確認された(図 13C)。これらのデータより褐色脂肪組織の活性化においては、*Neat1* KO マウスと同様に dPAS マウスでも正常に生じていることが示された。



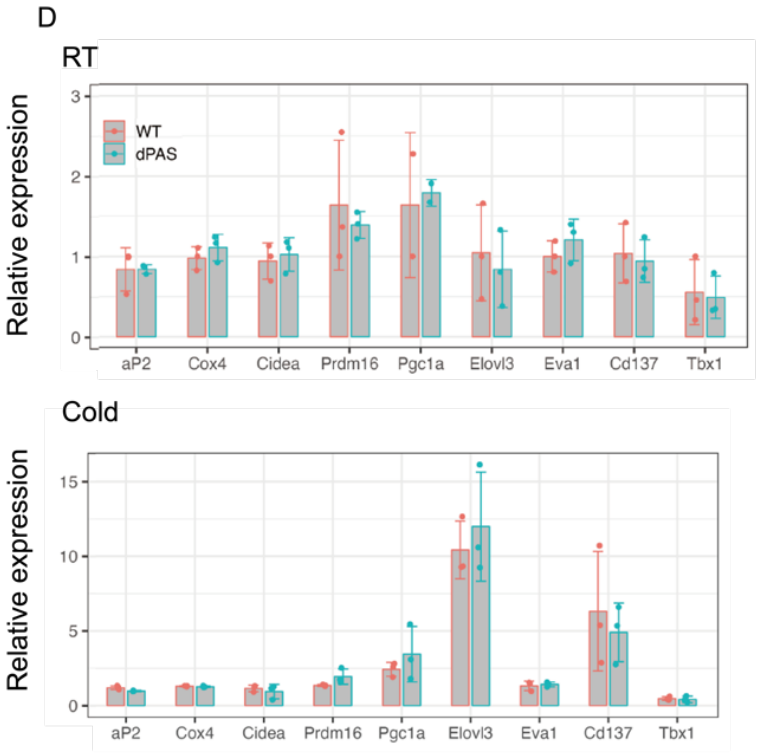


図 13. dPAS マウスでは寒冷刺激による褐色脂肪組織の活性化が正常に起こる
(A)RT- qPCR による室温時および寒冷刺激時の褐色脂肪組織における *Ucp1*mRNA の発現量比較。(mead ±S.D., n = 3, by unpaired student's T-test)
(B)ウエスタンブロットによる室温時および寒冷刺激時の褐色脂肪組織における Ucp1 タンパク質の発現量比較。
(C)HE 染色(左)と Ucp1 抗体染色(右)による組織学的解析。
(D) 室温飼育および寒冷飼育 1 週間後の褐色脂肪組織における RT- qPCR による他のベージュ細胞・褐色脂肪組織・白色脂肪組織のマーカー遺伝子の発現量比較。
赤が WT・水色が dPAS マウスの結果を示す。(mead ±S.D., n = 3, by unpaired student's T-test)

3.4 皮下白色脂肪組織では *Neat1* は脂肪細胞と脂肪細胞前駆細胞で発現している

皮下白色脂肪組織は白色脂肪細胞のみならず、脂肪細胞前駆細胞やマクロファージ・血管内皮細胞など様々な細胞タイプから構成される[94,95]。寒冷刺激により血管内皮細胞や白色脂肪組織や脂肪前駆細胞からベージュ細胞が分化することが報告されている[79,80]。そこでどのような細胞タイプで *Neat1* が発現しているのかを明らかとすることを目的として、公共のデータベースから single cell RNA-seq のデータをダウンロードし再解析を行なった。解析には Rajbhandari et al., *eLife*,2019 での single cell RNA-seq（GSE133486）[96]で用いられていた野生型の室温飼育時の皮下白色脂肪組織のデータを使用し、R にて single cell RNA-seq の解析用パッケージである seurat を用い解析を行なった。得られた細胞ごとのトランスクリプトームを元に umap による次元圧縮をおこなったのちに、クラスタリングを行なった。各クラスターへの細胞タイプのラベルは、それぞれの細胞タイプマーカーの発現パターンや、データセットに付与されていたラベルをもとにラベルを行なっている(図 14 左)。クラスタリング後、各細胞における *Neat1* の発現量をプロットした(図 14 右)。すると白色脂肪細胞や脂肪細胞前駆細胞において、*Neat1* が多く発現している傾向が見られた。

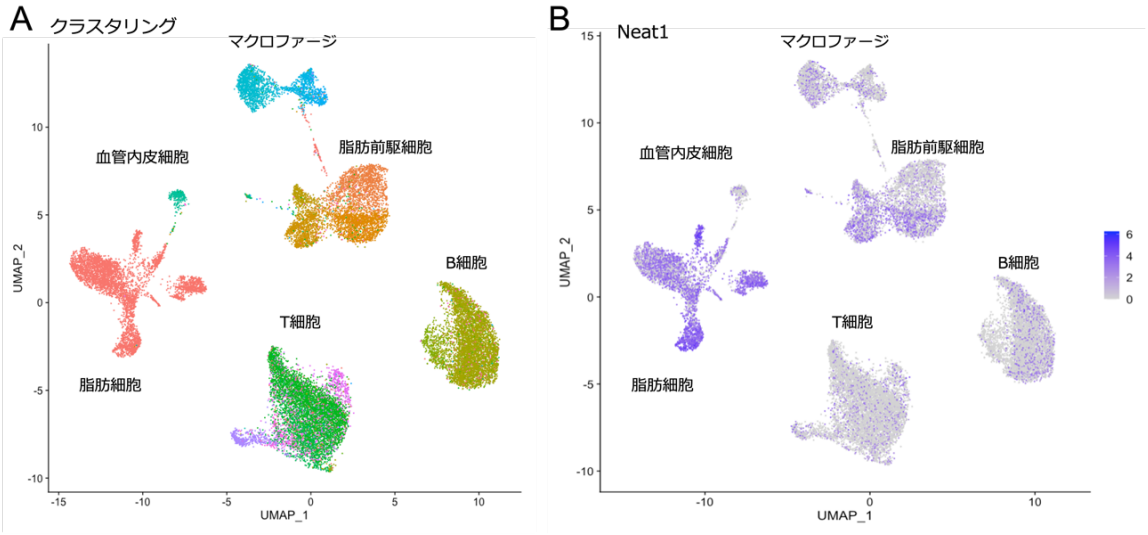


図 14. Single cell RNA-seq の再解析結果
(A)細胞ごとのトランスクリプトームを umap により次元圧縮を行い、クラスタリングを行なった結果。
(B)クラスタリング後、各細胞における *Neat1* の発現量をプロットしている。

実際に野生型のマウスでもこれらの細胞で発現しているか確かめるために、insitu Hybridization 法により検討を行なった。皮下の白色脂肪組織をサンプリング後、凍結切片を作製し染色を行なった。白色脂肪細胞マーカーとしては *Pparg* を、脂肪前駆細胞マーカーとしては *Pi16* を用い[95]、プローブ作製を行なった。脂肪組織は自家蛍光が非常に強く細胞質でのシグナルの検出が困難であることから、核質でのシグナルを解析対象とすることとし、核内でのみシグナルが観察可能なイントロンプローブを作製し染色を行なった(図 15A)。すると *Neat1* が発現している細胞において、それぞれの細胞マーカーの発現が確認された。このことから *Neat1* が脂肪細胞や脂肪細胞前駆細胞において発現していることが明らかとなった(図 15B)。

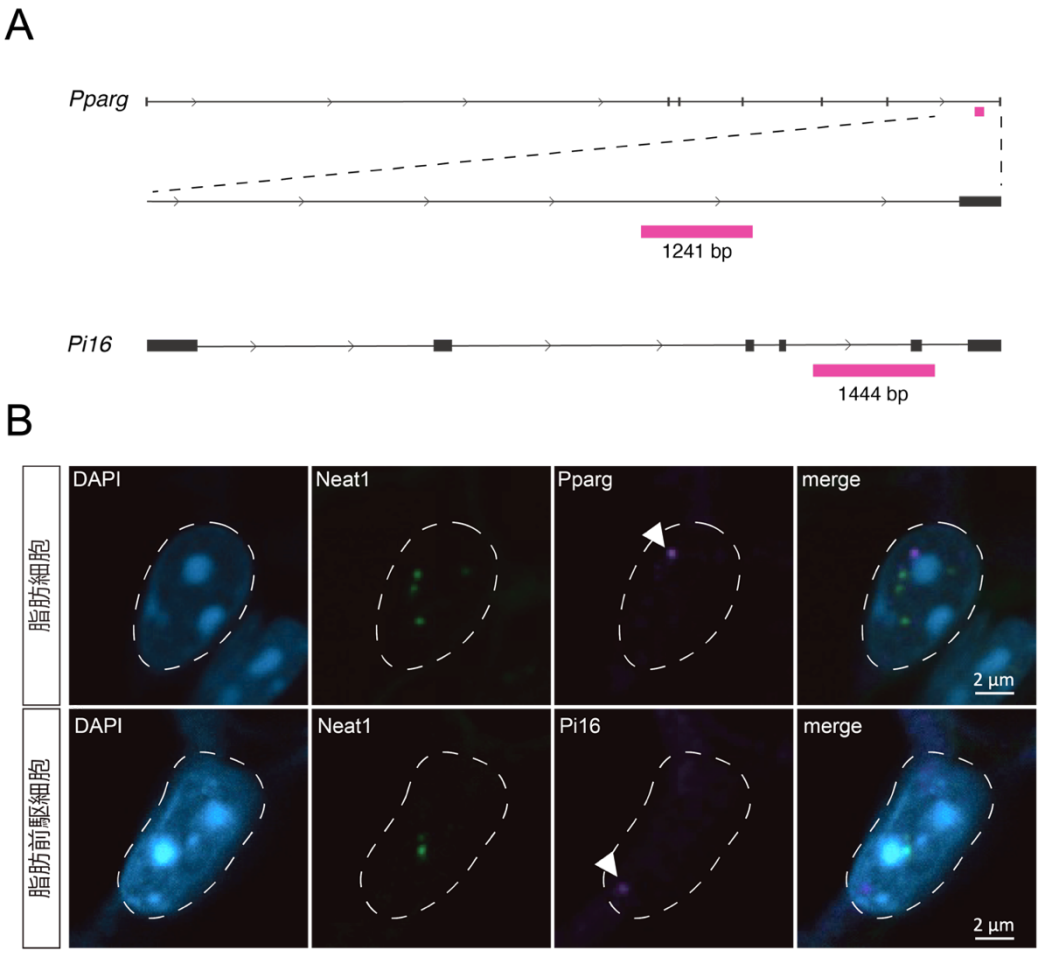


図 15. 皮下白色脂肪組織でのマーカー遺伝子と *Neat1* の in situ Hybridization 法による共染色
(A)*Pparg* と *Pi16* に対するイントロンプローブの設計位置の模式図。プローブの設計位置をマゼンダで示す。
(B)脂肪細胞マーカーである *Pparg* と(上段)、脂肪前駆細胞マーカーの *Pi16*(下段)と *Neat1* の共染色の結果。白矢頭は各マーカー遺伝子でのシグナルを示しており、核を白点枠で示す。

3.5 皮下白色脂肪組織では寒冷刺激後 4 時間において *Neat1_2* の発現が一過的に増加する

寒冷刺激によりベージュ細胞が分化するまでには、系統差や環境・個体差などにより違いがあるものの、今回の実験条件下(4－10 度)においては、4 時間でマーカー遺伝子である *Ucp1* の mRNA の発現増加が生じ、4 日から 1 週間ほどでプラトーに達することや、3－4 日程度で組織学的な変化も始まることを確認している。このような経時的な変化が見られる中でいつ *Neat1* がその機能を発揮するのだろうか。この点について明らかとするために、寒冷刺激後から複数のタイムポイントにおいての *Neat1* の発現パターンを検証することとした。そこで室温飼育時・寒冷飼育後 4 時間・２４時間・4 日後の皮下白色脂肪組織をサンプリング後、RNA 抽出を行い、ノザンブロッティングおよび RT-qPCR を行った。用いたプローブやプライマーの位置は模式図で示した(図 16A)。ノザンブロッティングの結果より、室温飼育時の皮下白色脂肪組織では *Neat1_1* が強く発現しており、*Neat1_2* の弱い発現が確認できた。これに比べて寒冷刺激 4 時間後では、*Neat1_1* の発現には大きな差が見られない一方で、*Neat1_2* の発現が増加している傾向が認められた。この発現増加は、一過性でありその後の寒冷刺激後 24 時間や 4 日目では *Neat1_2* の発現増加は見られなかった(図 16B)。RT-qPCR の結果からも、*Neat1_2* の室温時における発現量の個体差は大きいものの、寒冷刺激後 4 時間では有意に *Neat1_2* の発現増加が生じることが明らかとなった。その他のタイムポイントにおいては、有意差は見られなかった(図 16C)。また *Ucp1* の RT-qPCR の結果では、寒冷刺激後 4 時間で *Ucp1* の発現が増加している傾向が見られるものの有意な差は認められず、寒冷刺激後 4 日目では有意に発現が増加していることが示された。このことより、*Neat1* の一過的な発現増加は *Ucp1* が有意に発現増加するよりも早い初期の段階において生じることが明らかとなった。

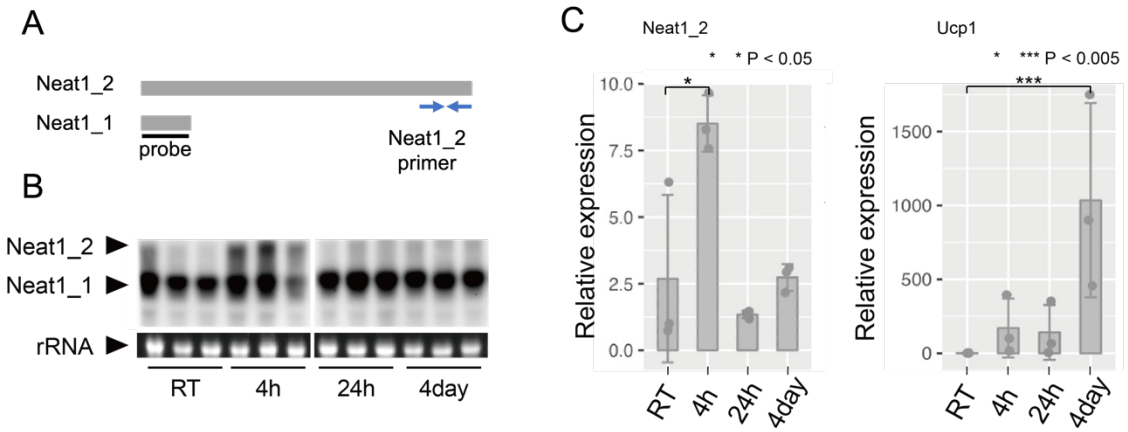


図 16. 皮下白色脂肪組織における寒冷刺激による *Neat1* の発現パターンの変化
(A) ノザンブロッティングに使用したプローブと RT-qPCR に使用したプライマーの設計位置の模式図。
(B) 各タイムポイントにおける皮下白色脂肪組織での *Neat1* に対するプローブでのノザンブロッティングの結果。ローディングコントロールとして各サンプルの rRNA のエチブロ染色画像を示す。
(C) (B)と同タイムポイントにおける *Neat1* と *Ucp1* プライマーでの RT-qPCR の結果。(mead ±S.D., n = 3, * p <0.05, ***p < 0.005 by permutation test)

次にこれらの傾向が細胞レベルでも見られるのかについて明らかとするために、insitu hybridization 法による染色で確認を行なった。室温飼育時と *Neat1_2* の発現増加が見られた寒冷刺激後 4 時間において皮下白色脂肪組織をサンプリング後、凍結切片を作製し染色を行なった。すると室温飼育時には、*Neat1* の両方のアイソフォームを検出する *Neat1_1/1_2* プローブにおいては核質に広がるシグナルが見られ、その一部が foci を形成していた。*Neat1_2* プローブではこの foci と共局在するシグナルが見られた。*Neat1_1* はパラスペックル以外にも局在することが知られていることから [97]、核質に広がっているシグナルは *Neat1_1* 由来のシグナルであると考えられる。そして *Neat1_1/1_2* プローブと *Neat1_2*プローブで共局在が見られた foci がパラスペックルであると考えられた(図 17A 上段)。寒冷刺激 4 時間後では、ノザンブロッティングや RT-qPCR の結果と一致して、*Neat1_2* プローブでの foci が大きくなっている傾向が見られた。また核質で広がっていたシグナルが減少し、*Neat1_2* の foci と共局在するシグナルが強く見られるようになった(図 17A 下段)。

次にシグナルの面積と 1 細胞あたりの数についても定量を行なった。*Neat1_1/1_2* プローブでは室温飼育時では面積が小さい foci が多く 1 細胞あたりの数も多い一方で、寒冷飼育後 4 時間では、面積が大きい foci がみられるようになり 1 細胞あたりの数が減少することが確認できた(図 17B)。*Neat1_2* プローブでは、寒冷刺激後 4 時間で foci の面積が大きくなる傾向があったものの、有意差は得られなかった。細胞あたりの数では室温飼育時と比較し、寒冷刺激後 4 時間では有意にその数が増加することが明らかとなった(図 17C)。これらの結果から、室温飼育時に比べて寒冷刺激後では *Neat1_2* の発現が増加していることが示された。

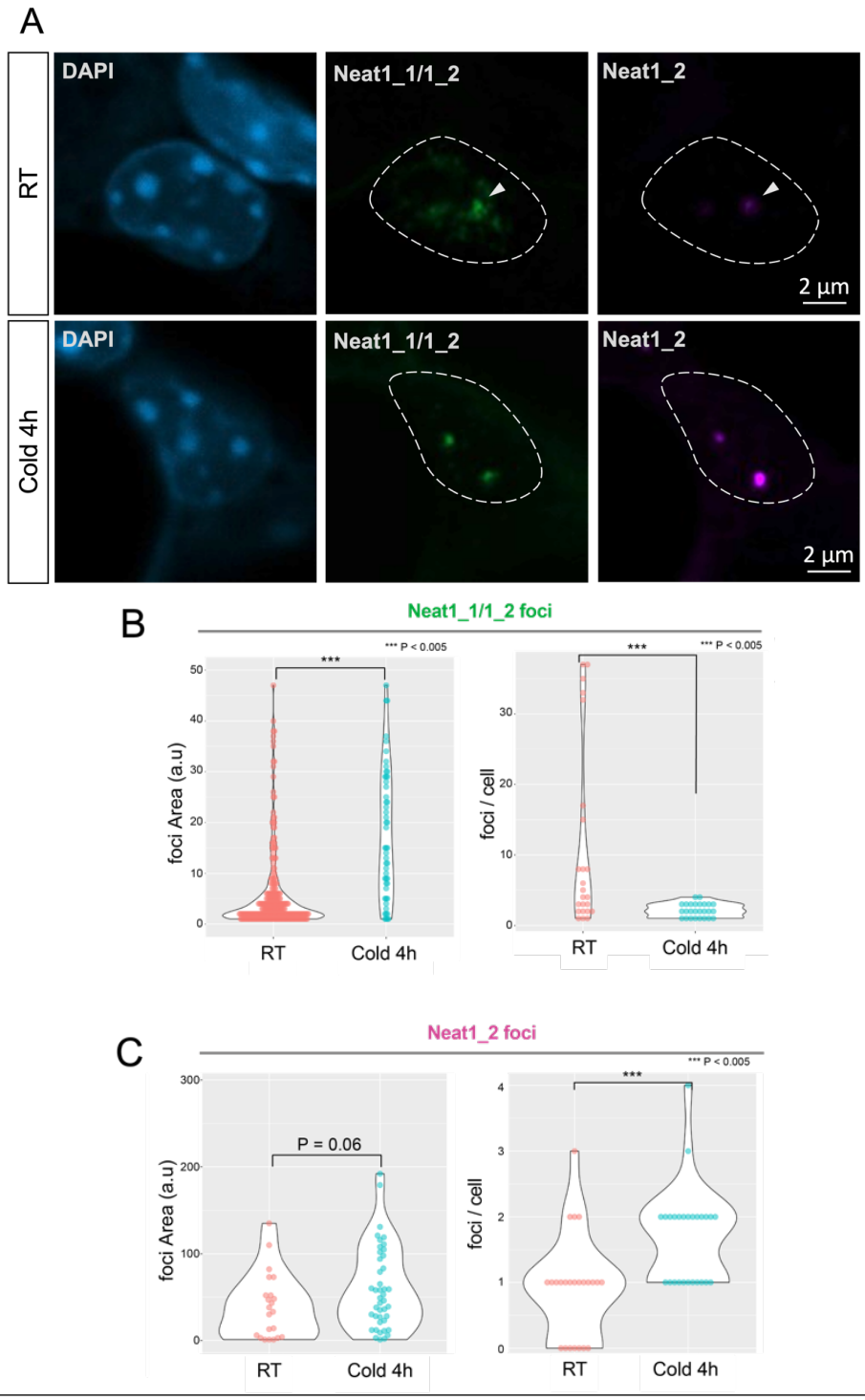


図 17. 室温時および寒冷刺激後 4 時間での皮下白色脂肪組織における *Neat1* の染色像とその定量
(A)室温飼育時と寒冷飼育後 4 時間での皮下白色脂肪組織での *Neat1* の局在変化。
(B) 室温飼育時と寒冷飼育後 4 時間での *Neat1_1/1_2* プローブでの foci の大きさと数の定量。
(C) 室温飼育時と寒冷飼育後 4 時間での *Neat1_2* プローブでの foci の大きさと数の定量。(mead ±S.D., ***p < 0.005 by permutation test)

また皮下白色脂肪組織と同様に褐色脂肪組織でも *Neat1* の発現パターンに変化が見られるのか検討を行なった。すると一部の個体において室温時や寒冷刺激後 4 時間で *Neat1_2* の発現が増加していたが(図 18A)、RT-qPCR で定量を行なった結果、寒冷刺激による *Neat1* 発現量に有意な変動は見られなかった(図 18B)。褐色脂肪組織では、寒冷刺激による活性化についても野生型と *Neat1* KO マウス間で差は見られておらず、*Neat1* は褐色脂肪細胞の活性化には寄与していないことが示された。

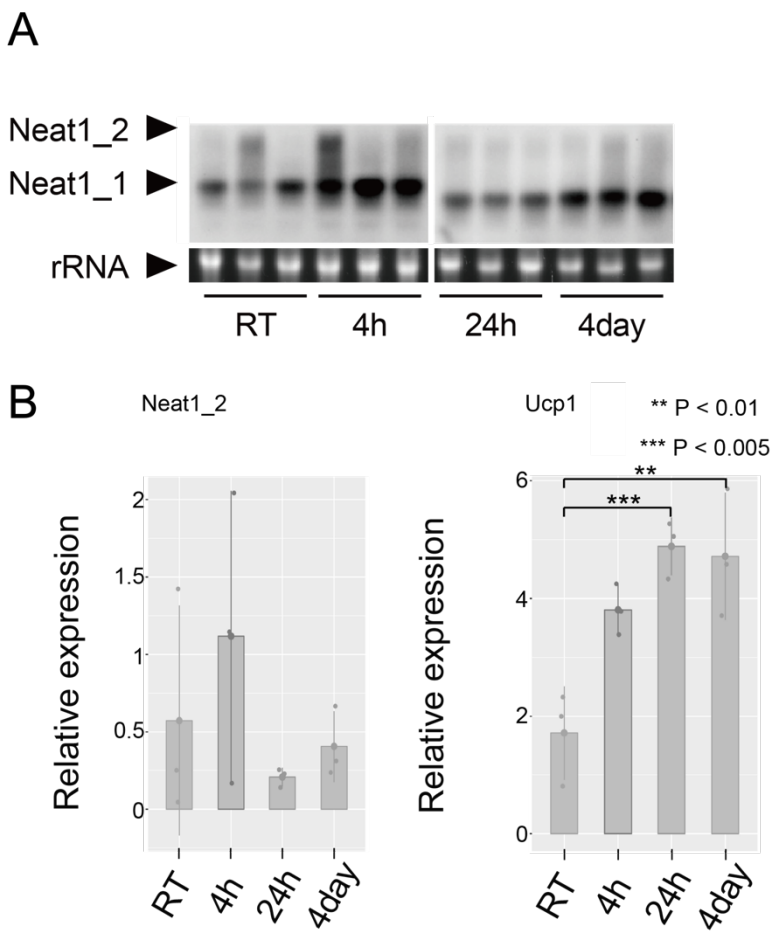


図 18. 褐色脂肪組織における寒冷刺激による *Neat1* の発現パターンの変化
(A)各タイムポイントにおける褐色脂肪組織での *Neat1* に対するプローブでのノザンブロッティングの結果とコントロールとして各サンプルの rRNA のエチブロ染色画像。
(B)と同タイムポイントにおける *Neat1* と *Ucp1* プライマーでの RT-qPCR の結果。
(mead ±S.D., n = 3, * p <0.05, ***p < 0.005 by Fisher's exact test)

3.6 *Neat1* KO マウスと野生型マウスにおいて、皮下白色脂肪組織での前駆細胞やマクロファージの数に差は見られない

Neat1 が脂肪前駆細胞で発現していることに加えて、脂肪前駆細胞からベージュ細胞へ分化すると報告もあることから [98,99]、*Neat1* KO マウスで寒冷刺激によるベージュ細胞の分化が抑制されている理由として、脂肪前駆細胞の数が減少しているのではないかと仮説を立てた。そこでこの仮説を検証するために、皮下白色脂肪組織における脂肪前駆細胞の数についてフローサイトメトリーを用いて定量を行なった。脂肪前駆細胞のマーカーには様々な報告がされているが、本研究では過去の報告をもとに [99,100]、CD31-,CD34+, Sca1+,PDGFRα の細胞を前駆細胞とした(図 19A)。またサンプリングは室温飼育時と *Neat1* の発現増加が生じる寒冷刺激後 4 時間の 2 点で行なった。ゲーティングは図 19B に示した形で行った。すると、室温飼育時および寒冷刺激 4 時間後どちらにおいても、PDGFRα 陽性前駆細胞の細胞数は野生型マウスと *Neat1* KO マウスの間で有意な差は見られなかった(図 19C 右)。また血管内皮細胞から分泌される成長因子によってベージュ細胞の分化が促進されるという報告もあることから [101,102,103]、CD31 陽性の血管内皮細胞についても同様に比較を行なったが、少なくても数においては野生型マウスと *Neat1* KO マウスの間で有意な差は見られなかった (図 19C 左)。

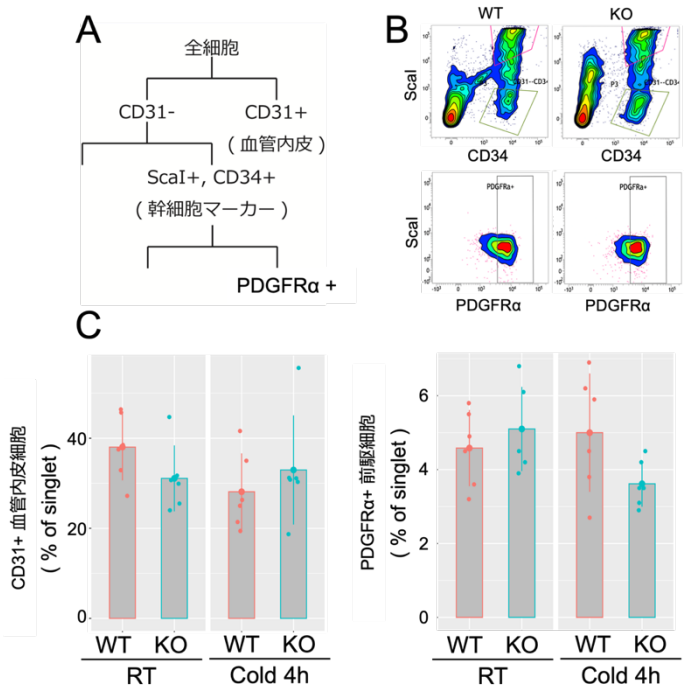
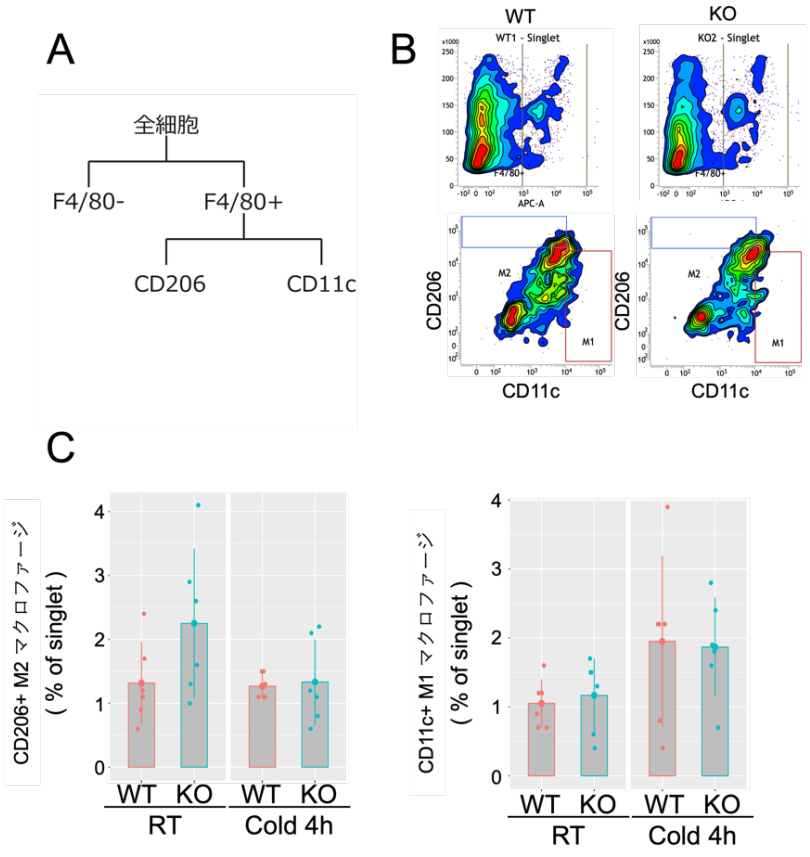


図 19. 皮下白色脂肪組織における PDGFRα陽性ベージュ細胞前駆細胞数
(A)フローサイトメトリーで用いた細胞マーカーの模式図。CD31-かつ ScaI+,Cd31+かつ PDGFRα+の細胞をベージュ細胞前駆細胞とした。
(B)野生型マウスと *Neat1* KO マウスでの細胞のゲーティングの様子。
(C)皮下白色脂肪組織での、siglet に対する CD31+血管内皮細胞(左)と FDGDRα+ベージュ細胞前駆細胞(右)の割合を示す。

またベージュ細胞の分化にはマクロファージが関与していることが知られている。マクロファージは、炎症性サイトカインを分泌する M1 マクロファージと、抗炎症反応や組織のリモデリングに関与するとされる M2 マクロファージに分類される[83,84]。これらのマクロファージはそれぞれが放出するサイトカインを介して、M1 マクロファージはベージュ細胞の分化に抑制的に、M2 マクロファージは、促進的に働くことが報告されている[89,90,91,92]。そこで、フローサイトメトリーを用いて、M1 と M2 のマクロファージの数の測定を行った。室温飼育時と寒冷飼育後 4 時間の野生型マウスと *Neat1* KO マウスから皮下白色脂肪組織をサンプリングし、間質血管画分を単離しフローサイトメトリーを行った。その後に過去の報告を参考に F4/80+かつ CD206+の細胞を M2 マクロファージ、F4/80+かつ CD11c+の細胞を M1 マクロファージとした(図 20A)。細胞のゲーティングは図 20B のように行った。すると、ベージュ細胞の分化に促進的に働く M2 マクロファージの数と、抑制的に働く M1 マクロファージについては、室温時および寒冷刺激後どちらにおいても有意な差は見られなかった(図 20C)。またフローサイトメトリーにより明らかとなった前駆細胞と M1・M2 マクロファージの占める割合を以下に示した(図 20D)。これらの結果から、皮下白色脂肪組織における前駆細胞やマクロファージの組成については大きな差がないことが明らかとなり、*Neat1* KO マウスで見られるベージュ細胞の分化抑制は、細胞構成の違いによるものではないことが示唆された。



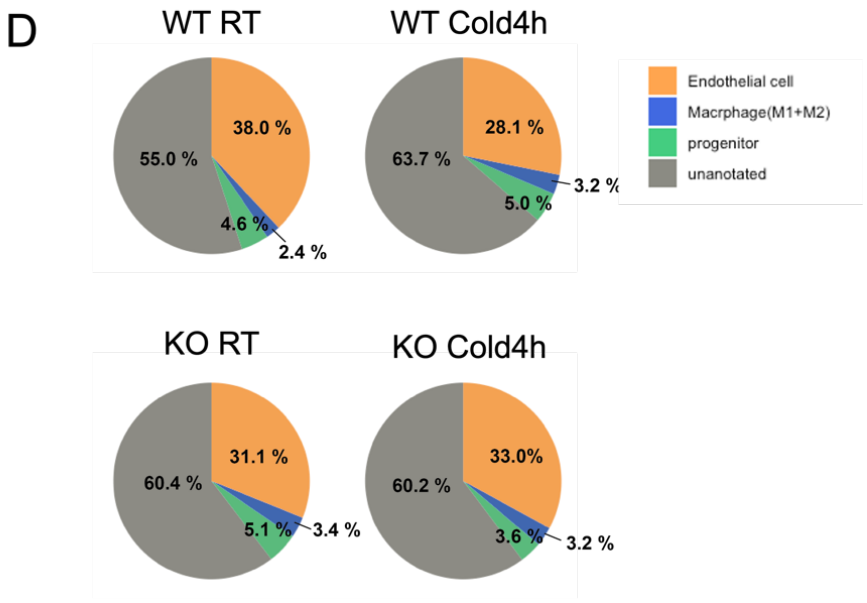


図 20. 皮下白色脂肪組織におけるマクロファージ細胞数
(A)フローサイトメトリーで用いたマクロファージマーカーの模式図。F4/80+かつ CD206+の細胞を M2 マクロファージ、F4/80+かつ CD11c+の細胞を M1 マクロファージ とした。
(B)野生型マウスと *Neat1* KO マウスでの細胞のゲーティングの様子。
(C)皮下白色脂肪組織での、siglet に対する F4/80+,CD206+ M2 マクロファージ (左)と F4/80+かつ CD11c+ M2 マクロファージ(右)の割合
(D)皮下白色脂肪組織における前駆細胞と M1・M2 マクロファージの占める割合を示す。

3.7 *Neat1* KO マウスでは寒冷刺激時の皮下白色脂肪組織でのノルアドレナリン量が減少している

寒冷刺激の受容からベージュ細胞の分化の経路としては、寒冷刺激を感受後、視床下部および交感神経節を介して、褐色脂肪組織や皮下白色脂肪組織に投射する交感神経が活性化し、ノルアドレナリンが放出されることで褐色脂肪組織の活性化やベージュ細胞の分化が生じることが知られている [69,70,71] (図 21A)。そこでまずは褐色脂肪組織および皮下白色脂肪組織内のノルアドレナリン量に違いがあるか検討を行なった。室温飼育時と寒冷刺激後 4 時間において、野生型マウスと *Neat1* KO マウスからそれぞれ褐色脂肪組織と皮下白色脂肪組織をサンプリングし、その細胞抽出液を用い ELISA 法によりノルアドレナリン量の測定を行なった。褐色脂肪組織では、室温および寒冷刺激 4 時間ともに、*Neat1* KO マウスで若干ノルアドレナリン量が低下している傾向が見られたものの、有意な差は得られなかった (図 21B 左)。また皮下白色脂肪組織では、室温時には僅かにノルアドレナリン量が減少している傾向が見られ、寒冷刺激後 4 時間では有意にノルアドレナリン量の減少が認められた(図 21B 右)。*Neat1* KO マウスでベージュ細胞の分化誘導が抑制されている原因の 1 つである可能性が示唆された。しかしながら、*Neat1* KO マウスではノルアドレナリンが存在していないわけではなく、野生型の半分程度の減少であることから他の要因も関与していることが予想された。

次に、*Neat1* KO マウスでノルアドレナリン量が有意に減少していた皮下白色脂肪組織において、交感神経の投射量について差があるかどうかを交感神経マーカーであるチロシンヒドロキシラーゼ(TH)の発現量をウエスタンブロットにより比較を行なった。すると室温飼育時及び寒冷刺激後 4 時間どちらにおいても、TH の発現量には差が見られず(図 21C)交感神経の投射量には差がないと考えられた。

また後述する RNA-seq による網羅的発現変動解析の結果を用い、ノルアドレナリン受容体の発現量の比較を行なった。ノルアドレナリン受容体には、β1~3 のサブタイプが存在しており、皮下白色脂肪組織では他の受容体と比較してβ3 の発現が非常に強いことが報告されている [76]。このことからベージュ細胞分化にはβ3 受容体の寄与が大きいと考えられている。過去の報告と一致して、RNA-seq のリードカウントからもβ1 とβ2 に比べてβ3 の mRNA レベルでの発現が非常に多いことが確認できた。またノルアドレナリン受容体β1 については、野生型と *Neat1* KO マウス間で有意な差はなく、寒冷刺激による発現変動も見られなかった。ノルアドレナリン受容体β2 は *Neat1* KO マウスで寒冷刺激時に室温飼育と比較して、有意に発現が増加していた。またノルアドレナリン受容体β3 では、野生型マウスと *Neat1* KO マウス間では差が見られなかったものの、野生型において室温飼育時に比べ寒冷刺激により発現量が有意に減少していることが明らかとなった(図 21D)。

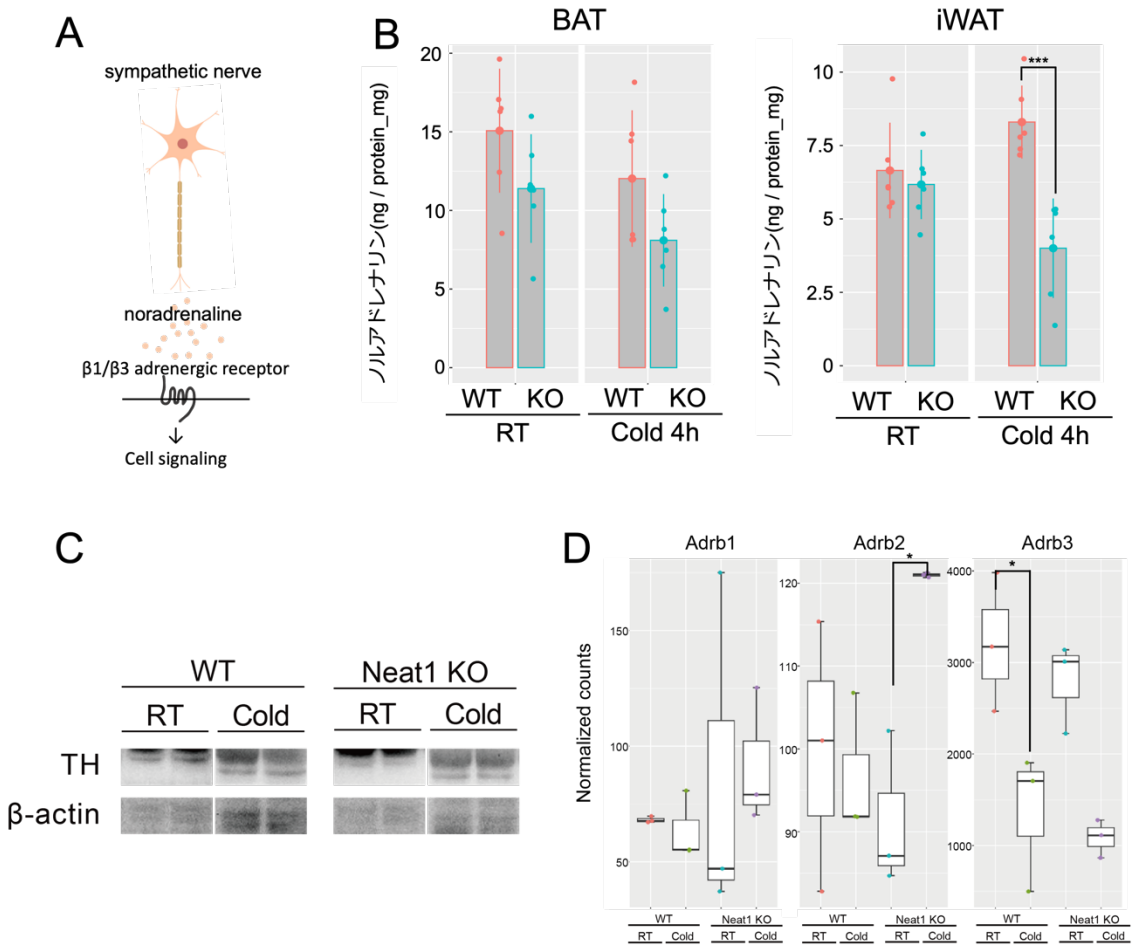


図 21. 寒冷刺激時のノルアドレナリン量の定量
(A)寒冷刺激によるシグナル伝達の模式図を示す。
(B)ELISA 法による褐色脂肪組織と皮下白色脂肪組織におけるノルアドレナリン量の定量結果。(mead ±S.D., n = 3, *** p <0.005 by unpaired student's T-test)
(C)ウエスタンブロットによる野生型マウスと *Neat1* KO マウスにおける交感神経マーカーTH の発現量比較。(下のバンドが TH を示している。)
(D)アドレナリンレセプター(1/2/3)の RNA-seq により得られたリードの比較。(mead ±S.D., n = 3, * p <0.05 by unpaired student's T-test)

3.8 Neat1 KO マウスでは寒冷刺激のシグナル伝達に関与する脳領域での活性化が生じる

寒冷刺激による交感神経の活性化において、どの脳領域が重要であるかについては多くの研究がなされてきた。褐色脂肪組織に関しては、視床下部背内側核(DMH)や視床下部背側野(DHA)などの脳領域が [72,73,74]、皮下白色脂肪組織でのベージュ細胞分化にのみ影響を与える脳領域としては、視床下部腹内側部(VMH)が報告されている [75]。そこでこれらの脳領域について、野生型マウスと *Neat1* KO マウスで神経の活性化に差が見られるかどうか検討を行なった。まず条件検討のため、寒冷刺激によりこれらの脳領域で(図 22A)、神経活性化のマーカーである c-fos の発現増加が見られるかどうか染色により確認を行った。野生型マウスから室温飼育・寒冷飼育 1 時間・3 時間のタイムポイントにおいて脳をサンプリングし、脳全体に着目するために厚切り切片を作製し *c-fos* のプローブを用い in situ Hybridization 法による検出を行なった。すると VMH 領域周辺において、寒冷刺激の時間と共に *c-fos* のシグナルが増加する傾向が見られた(図 22B)。次にこれらの領域での *c-fos* の発現を野生型マウスと *Neat1* KO マウスで比較を行なった。野生型マウスでは、予備検討時と同様に、寒冷刺激により *c-fos* の発現が見られるようになった。*Neat1* KO マウスにおいても室温飼育時と比較して、*c-fos* のシグナルが増える傾向にあるものの野生型マウスと比較すると若干シグナルが弱く、少ない傾向が見られた(図 22C)。このことから、程度に差はあるものの *Neat1* KO マウスでも VMH と思われる領域において神経細胞の活性化が生じていることが示された。より詳細な解析を行うために、脳をサンプリング後凍結し薄切切片を作製し、c-fos 抗体での蛍光染色を行なった。野生型マウスと *Neat1* KO マウスから作製した脳切片を形態的におおよそ同一と見られる部位について比較を行なった。厚切り切片での染色時とおおよそ同じ領域において、c-fos のシグナルが確認された。またシグナルの強さに関しては、厚切り切片による AP 染色時に見られていた時とは異なりむしろ *Neat1* KO マウスでより c-fos の発現が強いように見られた(図 22D)。これらの結果より、*Neat1* KO マウスで見られていた c-fos のシグナルの減弱については、個体差の範囲ではないかと考えている。皮下白色脂肪組織で見られたノルアドレナリン量の低下は、寒冷刺激による刺激が脳まで伝達されていないからではなく、ノルアドレナリンの代謝効率などそれ以降の経路に異常があると予想している。

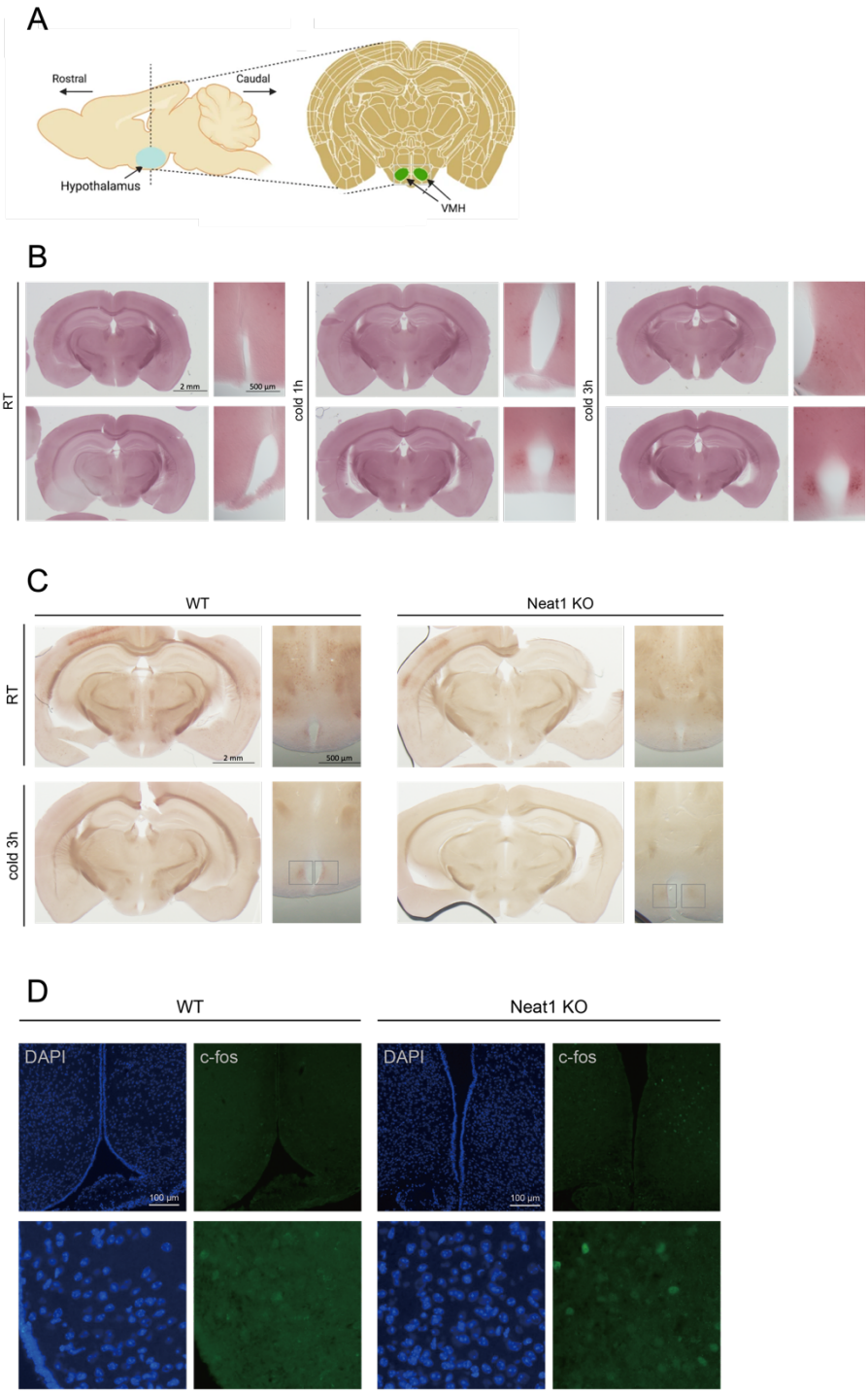


図 22. 寒冷刺激により特定の脳領域において c-fos のシグナルが増加する
(A)寒冷刺激で活性化が生じると報告のある脳領域(Tu et al., 2022 の Fig1 を引用)。
(B)寒冷刺激の時間経過とともに、特定の脳領域で c-fos のシグナルが増加する。
(C)野生型と Neat1 KO マウスの室温飼育及び寒冷刺激 3h での厚切り切片における c-fos 染色。シグナルが集中している領域は灰色の枠で囲っている。
(D)薄切切片を用いた野生型と Neat1 KO マウスでの、脳での c-fos 染色。

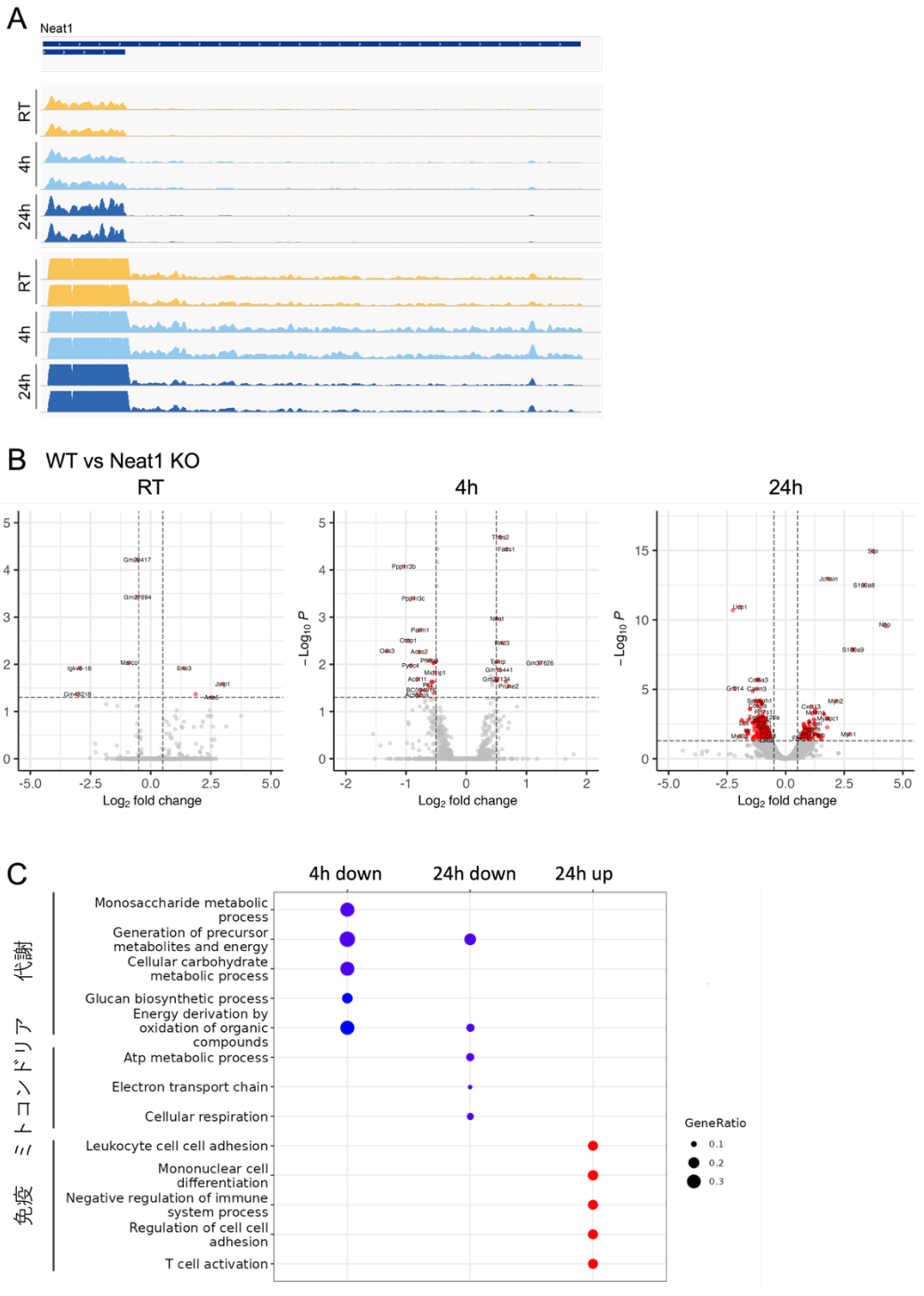
3.9 皮下白色脂肪組織では寒冷刺激からの時間経過に伴って発現変動遺伝子が増加する

Neat1 KO マウスでは寒冷刺激後のベージュ細胞分化が抑制されていることが明らかとなった。この分子メカニズムをより詳細に明らかとするために RNA-seq による網羅的な発現変動解析を行なった。*Neat1_2* の発現増加が寒冷刺激後 4 時間と初期のタイミングで生じることから、室温時と寒冷刺激後 4 時間・24 時間のタイムポイントで皮下白色脂肪組織をサンプリングし、RNA 抽出を行なった。ライブラリーの作製は共同研究先である国立研究開発法人 理化学研究所 岩崎 RNA システム生化学研究室に依頼し、シーケンスはマクロジェンに外部委託した。得られたシーケンスデータを用いて以降の解析を行なった。ノザンブロッティングや RT-qPCR で見られた寒冷刺激後 4 時間における *Neat1_2* の一過的な発現増加が RNA-seq においても確認された(図 23A)。次に、各タイムポイントにおいて野生型と *Neat1* KO マウス間でどのような遺伝子が変動しているか DEseq2 による発現変動解析を行なった。各タイムポイントごとに得られた結果を Volcano プロットで示し、Log_2 fold change が-0.5 以下または 0.5 以上かつ、Pvalue が 0.05 以下のものについて有意に変動しているものとして定義し、プロット上で赤色で示した。すると室温飼育時では、発現変動遺伝子が非常に少なく、寒冷刺激からの時間経過とともに発現変動遺伝子が増加することが明らかとなった(図 23B)。このことから、室温飼育時の皮下白色脂肪組織に何らかの異常が生じているためにベージュ細胞への分化が抑制されているわけではなく、寒冷刺激に対する応答が正常に行えていないことが示唆された。また *Neat1* KO マウスにおいてどのような遺伝子群が発現変動していたかを明らかとするために、gene ontology 解析を行なった。室温飼育時で *Neat1* KO マウスで発現変動していた遺伝子群や寒冷飼育後 4 時間で *Neat1* KO マウスで発現が増加していた遺伝子群については、その数が少なかったために、有意な GOterm が得られなかった。一方で多数の発現変動遺伝子が得られた寒冷刺激後 4 時間では代謝産物の生合成に関わる遺伝子群が、寒冷刺激後２４時間後では ATP 産生や呼吸鎖複合体などミトコンドリアで生じる反応に関わる遺伝子群の発現が *Neat1* KO マウスで発現が減少していた。また寒冷刺激後２４時間では免疫系の細胞の分化や活性化に関わる遺伝子群の発現が *Neat1* KO マウスで増加していた(図 23C)。代謝産物の生合成やミトコンドリアに関わる遺伝子群が寒冷刺激により発現が増加するという報告があることからも、寒冷刺激により本来発現が増加する遺伝子群の発現調節が *Neat1* KO マウスでは正常に行えていないことが示唆された。

発現変動遺伝子が多数得られた寒冷刺激後２４時間において、発現変動遺伝子が染色体上のどこに位置しているのかプロットを行なった。すると特定のゲノム領域において *Neat1* KO マウスで発現が低下した遺伝子が集中している傾向があることを見出した(図 23D 左)。また野生型において室温時と比較した際に寒冷刺激後２４時間で発現が変動している遺伝子を同様に染色体上にプロットを行った。すると、*Neat1* KO マウスでの発現変動遺伝子が集中していた領域(緑枠)において、野生型マウスの寒冷刺激２４時間後にお

ける発現変動遺伝子が多く存在している傾向があることが明らかとなった(図 23D 右)。これらの結果から、*Neat1* KO マウスでは寒冷刺激により転写が大きく変動する領域においての転写調節が正常に行えなくなっている可能性が示唆された。

そこでこれらのゲノム領域の転写調節をパラスペックルが直接的に行っていると仮説を立て、室温時と *Neat1* の発現増加が生じる寒冷刺激後 4 時間において、これらのゲノム領域とパラスペックルの距離を比較することとした。In situ Hybridization 法により *Neat1* およびパラスペックルの染色後、DNA—FISH により各クラスター領域を染色し、それぞれのシグナル間の距離を計測し比較を行なった。室温時ではパラスペックルはコントロールの 6 番染色体上の 4.5SH が存在する領域と比べて、*Neat1* やその近傍に存在する *Cox8a* を含む 19 番染色体上のゲノム領域と有意に近くにいることが示された。培養細胞を用いた研究からパラスペックルは転写開始点付近で形成されることが報告されており、これらの知見とも一致する結果が得られた [40]。一方でその他のクラスターが存在するゲノム領域はコントロールと有意な差は見られなかった(図 23E 左)。寒冷刺激後 4 時間では、コントロールの *4.5SH* とパラスペックルの距離は変化が見られない一方で、変動遺伝子が集中していたクラスターの一部が、コントロールと比較して有意に距離が短くなることが示された(図 23E 右)。これらの結果から、パラスペックルは直接的にこれらの領域と相互作用はしていないことが示され、間接的に転写の活性化に寄与している可能性が示唆された。


A
Neat1
RT
4h
24h
RT
4h
24h
B
WT vs Neat1 KO
RT
4h
24h
−Log10 P
Log2 fold change
C
4h down
24h down
24h up
Monosaccharide metabolic process
Generation of precursor metabolites and energy
Cellular carbohydrate metabolic process
Glucan biosynthetic process
Energy derivation by oxidation of organic compounds
Atp metabolic process
Electron transport chain
Cellular respiration
Leukocyte cell cell adhesion
Mononuclear cell differentiation
Negative regulation of immune system process
Regulation of cell cell adhesion
T cell activation
代謝
ミトコンドリア
免疫
GeneRatio
0.1
0.2
0.3

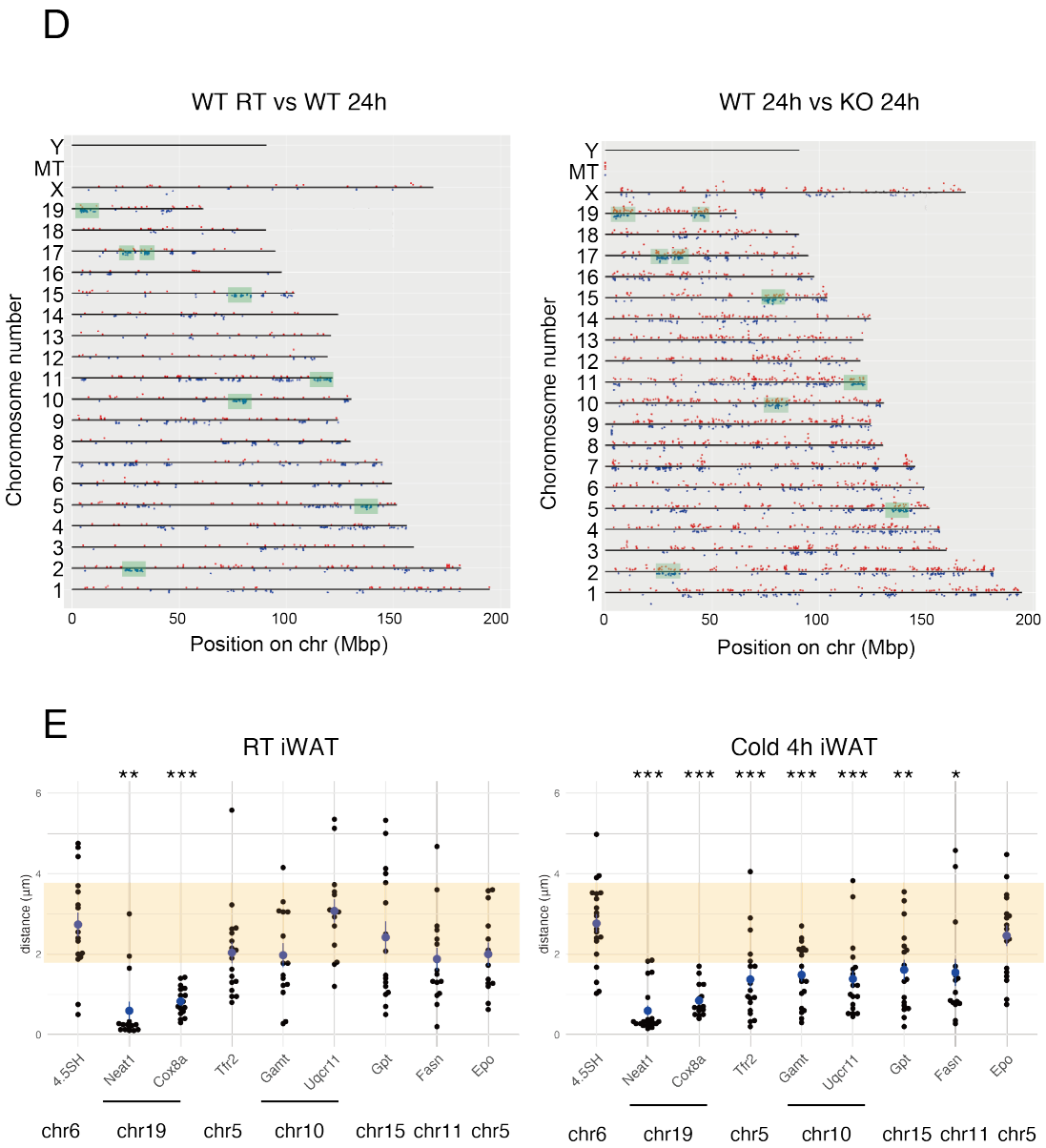


図 23. 皮下白色脂肪組織における野生型と *Neat1* KO マウスでの発現変動解析

(A) 各タイムポイントにおける *Neat1* の発現量を IGV 上で示す。最上段に Neat1 の遺伝子の模式図を示す。

(B) 各タイムポイントにおける発現変動遺伝子を volcano plot。有意に変動していた遺伝子を赤色で示す。

(C) 各タイムポイントにおける Gene ontology 解析で同定された GOtrem。

(D) 寒冷飼育２４時間における野生型と比べた際の *Neat1* KO での発現変動遺伝子の染色体上の位置(左)。発現が低下している遺伝子が集中している領域を緑色の枠で示す。寒冷飼育後２４時間における野生型での発現変動遺伝子の位置を右図に示す。

(E)各クラスターとパラスペックルの距離。コントロールの *4.5SH* との距離を比較した。(mead ±SEM.: *p< 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.005 by Dunnett's multiple comparison test)

3.10 *Neat1* KO マウスではノルアドレナリン受容体β3 のアゴニストの投与によって、ベージュ細胞の分化が正常に生じる

ベージュ細胞の分化は寒冷刺激のみならず、薬剤の投与により誘導することが可能である。寒冷刺激により生じるノルアドレナリンの放出を模倣するために、ノルアドレナリン受容体β3 のアゴニストである CL 316,243[104]を腹腔内投与することで、ベージュ細胞が誘導される[105,106,107]。そこで野生型マウスと *Neat1* KO マウスに CL 316,243 を 0.1 mg / kg の濃度で 1 週間腹腔内投与を行なったのちにベージュ細胞の分化効率の比較を行なった。褐色脂肪組織では、マーカー遺伝子である Ucp1 の発現量は mRNA およびタンパク質どちらにおいても CL 投与による発現増加は見られなかった(図 24A・B 左)。また組織学的な解析からも寒冷刺激時に見られたような脂肪滴が小さくなり細胞が密になるような組織学的な変化は見られなかった(図 24C 左)。一方皮下白色脂肪組織では、CL 投与により野生型マウスのみならず *Neat1* KO マウスでも Ucp1 の発現増加が生じることが明らかとなった(図 19A・B 右)。しかしながら、個体差も大きく野生型では有意差は得られなかった。

寒冷刺激に比べ、CL 投与による褐色脂肪組織の活性化が見られなかったことや、皮下白色脂肪組織でのベージュ細胞分化が弱い傾向が全体的に見られた。ベージュ細胞や褐色脂肪組織の研究では、よりベージュ細胞の分化が誘導されやすい系統である A/J マウスがよく使用されているが本研究では B6N マウスを用いており、反応性が低かった要因の 1 つであると考えられた。もともと Ucp1 がある程度発現している褐色脂肪細胞では弱い誘導ではその差が見えにくくなってしまったことが考えられる。一方で皮下白色脂肪細胞では、定常状態では Ucp1 はほとんど発現しておらず、わずかな発現増加でも検出することができたのではないかと考えている。

HE 染色による組織学的な解析からも、野生型マウスおよび *Neat1* KO で CL 投与により脂肪滴が細かくなり、網目状の組織像をもつベージュ細胞が出現していることが確認された(図 24C 右)。これらの結果より、*Neat1* KO マウスでは寒冷刺激によるベージュ細胞の分化は抑制されている一方で、ノルアドレナリン受容体β3 のアゴニストである CL 投与によるベージュ細胞分化は生じることが明らかとなった。寒冷刺激と CL 投与によって誘導されたベージュ細胞では、遺伝子の発現レベルにおいて違いがあることが報告されている[108,109]。また寒冷刺激と CL 投与により分化するベージュ細胞はそれぞれ起源となる細胞タイプが異なることが報告されている[110]。またその割合については、寒冷刺激によるベージュ細胞分化では、前駆細胞から分化するものと白色脂肪細胞から変化するものがおおよそ半々だが、CL 投与により分化したベージュ細胞は白色脂肪細胞から変化したものが 7 割近くを占めることも報告されている[79]。これらのことから、*Neat1* KO マウスでは白色脂肪細胞からのベージュ細胞分化は正常に生じる一方で、前駆細胞からの分化が抑制されている可能性が示唆された。

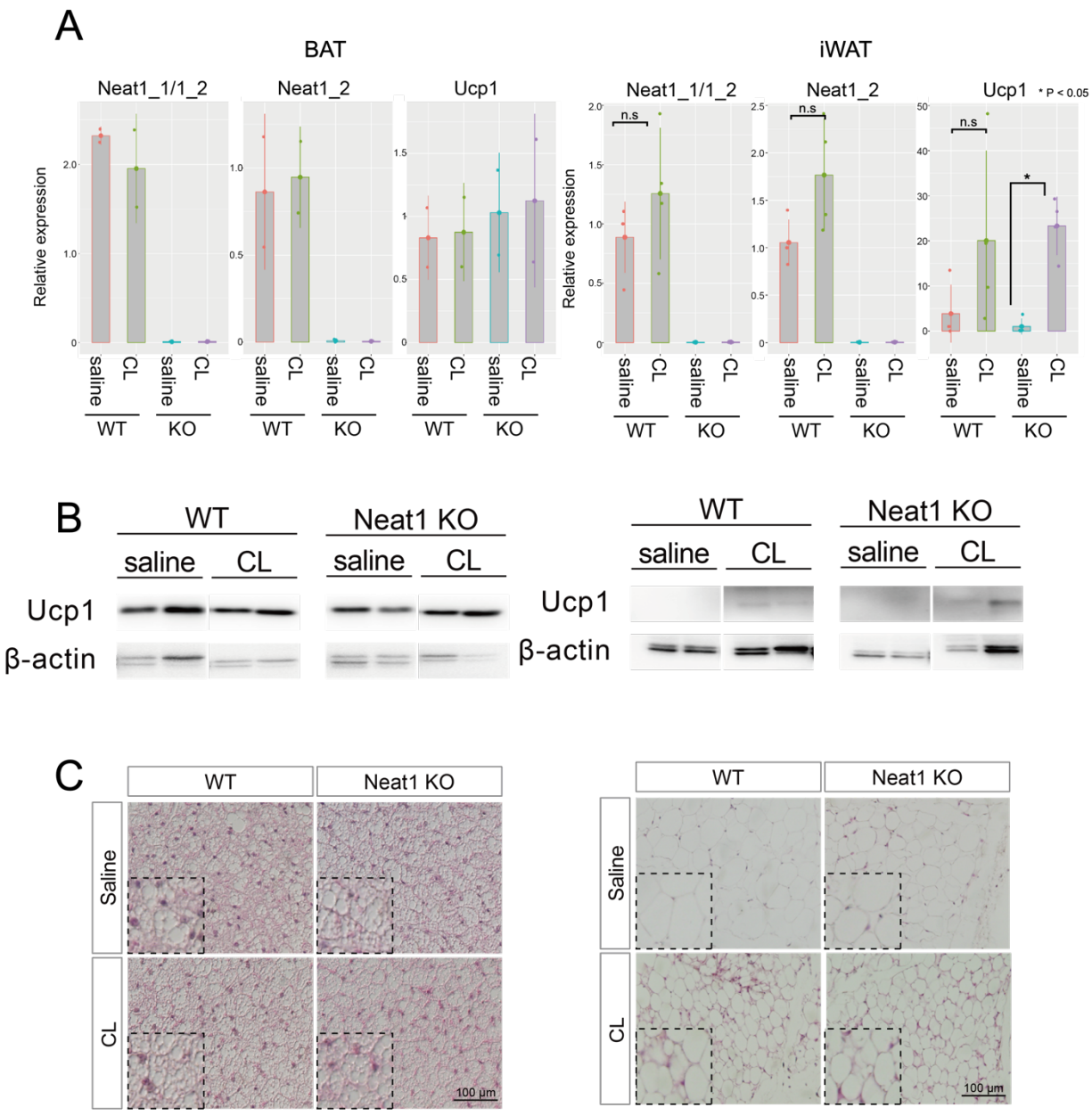


図 24. CL 投与時の褐色脂肪組織の活性化と皮下白色脂肪組織でのベージュ細胞分化
(A)褐色脂肪組織(左)と皮下白色脂肪組織(右)での生理食塩水と CL を 1 週間投与時の Neat1 および Ucp1 の RT-qPCR による mRNA 発現量比較。(mead ±S.D., n = 3, * p <0.05 by unpaired student's T-test)
(B) 褐色脂肪組織(左)と皮下白色脂肪組織(右)での生理食塩水と CL を 1 週間投与時の Ucp1 抗体によるウエスタンブロッティング。
(C) 褐色脂肪組織(左)と皮下白色脂肪組織(右)での生理食塩水と CL を 1 週間投与時の HE 染色。

4. 考察

4.1 *Neat1* KO マウスは寒冷刺激に対してベージュ細胞特異的な表現型を示す

Neat1 KO マウスでは、寒冷刺激に対して褐色脂肪組織の活性化は正常に生じる一方で、皮下白色脂肪組織ではベージュ細胞の分化誘導が抑制されていた(図 9・10)。褐色脂肪組織の活性化とベージュ細胞の分化誘導では、多くの共通した転写因子やヒストン修飾酵素・miRNA などを介した制御について報告されている [111,112](表 1)。いくつかの報告で、ベージュ細胞の分化特異的に機能する因子が報告されている。Notch1 は転写抑制因子である Hes1 を介して、Pgc1a や Prdm16 といったベージュ化に重要な遺伝子の転写制御を行っており、脂肪細胞特異的な Notch1 の欠損はベージュ細胞分化が促進される一方で、褐色脂肪細胞には影響を与えない [113]。また骨格筋や筋肉で発現している転写因子の myocardin の co-activator として知られる MRTFA の欠損マウスでも TGF-β/BMP pathway を介して、ベージュ細胞分化が促進される [114,115]。他にも脱アセチル化酵素である SirT1 は、脂肪細胞で発現している転写因子の Pparg を脱アセチル化することで Prdm16 と Pparg が複合体を形成することが報告されており、SirT1 KO マウスでは寒冷時のベージュ細胞分化が抑制されている [116]。 他にもインスリンや Fgf21 などの細胞外分泌因子を介したベージュ細胞特異的な制御の報告もある。*Neat1* がこれらの経路に関与している可能性もあると考えている。

制御因子	分類	相互作用因子	褐色脂肪組織への影響	ベージュ細胞への影響
Blnc1	Long non-coding RNA (lncRNA)	EBF2	Yes (promoting in culture cells)	Yes (promoting in culture cells)
C/EBPβ	Transcriptional factor	PRDM16	Yes (promoting)	Yes (promoting)
CREB, ATF2	Transcription factor	CBP	Yes (promoting UCP1 expression)	Yes (promoting UCP1 expression)
EBF2	Transcription factor	PRDM16	Yes (promoting)	Yes (promoting)
EHMT1	H3K9 methyltransferase	PRDM16	Yes (reduced BAT in knockout mice)	Yes (promoting)
FOXC2	Transcription factor	PKA	Yes (promoting)	Yes (promoting)
IRF4	Transcription factor	PGC1α	Yes (promoting)	Yes (promoting)
JMJD3	H3K9 demethylase	RREB1	Yes (promoting BAT gene expression)	Yes (promoting beige gene expression)
LXR	Nuclear receptor	RIP140	Yes (inhibiting UCP1 gene expression)	Yes (inhibiting beige gene expression)
miR-133	microRNA	PRDM16	Yes (inhibiting)	Yes (inhibiting)
miR-155	microRNA	C/EBPβ	Yes (inhibiting)	Yes (inhibiting)
miR-27	microRNA	PRDM16, PPARα, PPARγ, CREB, PGC1β	Yes (inhibiting in culture cells)	Yes (inhibiting in culture cells)
miR-30	microRNA	RIP140	Yes (promoting)	Yes (promoting)
miR-34a	microRNA	FGFR1, SIRT1	Yes (inhibiting)	Yes (inhibiting)
miR-455	microRNA	RUNX1T1, Necdin, HIF1AN	Yes (promoting)	Yes (promoting)
p107	Pocket protein family	PRDM16, PGC1α	Yes (inhibiting)	Yes (inhibiting)
p53	Tumour suppressor	PGC1α	Yes (reduced BAT gene expression in knockout mice) or no change	Yes (inhibiting)
PGC1a	Transcriptional co-activator	PPARγ, PRDM16 and others	Yes (promoting)	Yes (promoting)
PPARγ	Nuclear receptor	PRDM16, PGC1α and others	Yes (promoting)	Yes (promoting)
PRDM16	Transcriptional co-activator/repressor	PPARγ, C/EBPβ, EHMT1 and others	Yes (promoting)	Yes (promoting)
Rb	Pocket protein family	PPARγ	Yes (increased BAT in knockout mice)	Yes (inhibiting)
SMAD3	Transcription factor (downstream of TGFβ)	PRDM16, PGC1α	Yes (inhibiting)	Yes (inhibiting)
TLE3	Transcriptional repressor	PRDM16	Yes (inhibiting)	Yes (inhibiting)
TWIST1	Transcription factor	PGC1α	Yes (inhibiting brown thermogenesis gene)	Yes (inhibiting)
ZFP516	Transcription factor	PRDM16	Yes (promoting)	Yes (promoting)
HES1	Transcription factor (downstream of Notch)	PRDM16, PGC1α	No	Yes (inhibiting)
miR-196a	microRNA	HOXC8, C/EBPβ	No	Yes (promoting)
MRTFA	Transcription factor	SRF, BMP7	No	Yes (inhibiting)
RIP140	Transcriptional repressor	PGC1α, LXR	No	Yes (inhibiting beige gene expression)
SIRT1	Deacetylase	PPARγ	No	Yes (promoting)
miR-378	microRNA	PDE1B	Yes (promoting)	No

表 1．褐色脂肪組織とベージュ細胞の分化に関与する因子(Inagaki T et al.,2016 の Table1 を改変)
どちらにも共通するものを白、ベージュ細胞のみに関与するものをオレンジ、褐色脂肪組織のみに関与するものを緑で示す。

4.2 *Neat1_1* ではなく *Neat1_2* がベージュ細胞分化に必要である

Neat1_2 のみ発現する dPAS マウスにおいては野生型と同程度ベージュ細胞の分化誘導が生じることが明らかとなった(図 12)。dPAS マウスでは、野生型マウスと比較して *Neat1_2* の発現が増加しパラスペックルも増加することが報告されている。先行研究より白色脂肪組織においても dPAS マウスでは、野生型と比較して *Neat1_2* の発現が増加していることが確認されている。しかしながら、dPAS マウスでは寒冷飼育 1 週間において、野生型と同程度のベージュ細胞の分化が見られている。また寒冷飼育後 4 時間という初期の段階において、Ucp1 の発現量を RT-qPCR にて比較したところ野生型と同程度の発現増加が確認されている(data not shown)。これらの結果より、dPAS マウスでは野生型と比較してベージュ細胞分化が亢進するわけではないことが示唆された。このことよりベージュ細胞の分化にはパラスペックルの形成のみならず、他の因子が必要であることが予想された。

4.3 寒冷刺激による *Neat1_2* の発現増加

また寒冷刺激により *Neat1_1* の発現量に変化は見られない一方で、*Neat1_2* 特異的な発現増加が見られた(図 16)。RNA-seq のリードからも、*Neat1_1* のピークには大きな変化は見られない一方、*Neat1_2* の全長にわたって発現量が増加していることが明らかとなった(図 23A)。*Neat1_1* と *Neat1_2* は共通の 5'領域を持ち共通のプロモーターにより発現が制御されている。*Neat1_1* の発現量を維持したまま、*Neat1_2* の増加が生じていることから、この増加はプロモーターが活性化し両アイソフォームの発現量が増加していることに加えて、アイソフォームの切り替えが生じていることが示唆された。転写因子の ATF2 は、寒冷刺激によりリン酸化を受け活性化しミトコンドリアに関わる因子や、Ucp1 の発現を増加させることが知られている [117]。この ATF2 の結合部位がヒトの *NEAT1* のプロモーター領域に存在し *NEAT1* の発現を増加させることおよび、ミトコンドリアと *NEAT1* がともに制御されていることが報告されている [118]。この ATF 2 による転写制御がマウスで見られた寒冷刺激時の *Neat1* の発現増加に関与している可能性が考えられた。しかしながら、*Neat1* は構造的な特徴については保存されているものの配列は保存性が高くないため、マウスでの *Neat1* のプロモーター領域と ATF2 との結合および発現制御についての検討の余地は残されている。

また *Neat1* のアイソフォームの切り替えに関与する因子として、3'末端の切断と polyA 付加を行う CFIm(cleavage factor I mammalian)の構成因子である cpsf6 が polyA を持つアイソフォームである Neat1_1 の産生に促進的に働くことや、RNA 結合タンパク質である hnRNPK が抑制的に寄与することが報告されている [53]。そこで室温飼育時と寒冷刺激後のこれらの核内局在を染色にて比較を行なったが、大きな違いは見られなかった(data not shown)。

細胞分化と Neat1 の発現制御に関して、ヒト多能性幹細胞(hPSC)を用い薬剤をにより様々な細胞タイプに分化させた時、分化に伴って *Neat1_2* が増加するとの報告がある [119]。

この増加は dsDNA と結合する薬剤により抑制されることから、分化により 3 次構造が変化した DNA と *Neat1_2* が triple-helix 構造をとることで安定化することにより、*Neat1_2* の増加が生じるとされている。本研究でも、*Neat1* が特定のゲノム領域の転写を調節している可能性が示唆されており、これらのゲノム領域と相互作用し *Neat1_2* が安定化することにより増加している可能性が考えられた。

また胚性幹細胞(ESC)が分化する際にも *Neat1_2* の発現が増加し、*Neat1_2* を欠損する細胞では未分化な細胞が増加し分化が抑制される傾向があることが知られている[120]。細胞の分化時には、未分化な状態とは異なる polyA site が使用される alternative-polyadenylation(APA)が生じることが知られており[121]、この論文では *Neat1_2* もこの APA により制御されるとされている。脂肪細胞の分化時にも APA が生じることも知られていることから[122,123]、室温飼育条件下では近位の polyA site が使用され *Neat1_1* が主に発現しているが、寒冷刺激により誘導される APA により *Neat1_2* が産生される可能性がある。常に *Neat1_1* を発現していることにより、寒冷刺激に速やかに適応できるのではないだろうか。

また両方のアイソファームを検出する *Neat1_1/Neat1_2* プローブでの染色では、室温時には核質に広がるシグナルが確認できた一方で、寒冷刺激ではそれらのシグナルが減少する局在の変化が見られている(図 17)。プロテアソーム阻害剤である MG132 を培養細胞に添加すると、*Neat1_1* および *Neat1_2* の発現増加が生じパラスペックルが大きくなることが報告されている。この時に、通常時では核質に広がる *Neat1_1* が MG132 処理後ではパラスペックル内に取り込まれる様子が確認されている[124]。このことから、パラスペックルが肥大化することにより、*Neat1_1* は積極的にパラスペックル内に取り込まれることが考えられた。皮下白色脂肪組織で見られた寒冷刺激による局在変化は、アイソフォームスイッチにより増加した *Neat1_2* が大きなパラスペックルを形成し、このパラスペックル内に *Neat1_1* が取り込まれるようになった結果を反映しているものと考えられた。

では何がアイソフォームスイッチを引き起こす要因となるのだろうか？そこで *Neat1* が寒冷刺激を感知する温度センサーとして機能する可能性を考え、寒冷飼育後のマウスの皮下白色脂肪組織周辺の温度の計測を行なった。しかしながら寒冷刺激時でも皮下白色脂肪組織周辺の温度は、36 度程度であり顕著な温度の低下は認められなかった。また培養細胞ではヒートショックにより *Neat1* の発現が増加し、パラスペックルが増加することが報告されている[125]。寒冷刺激による温度変化によりパラスペックルが誘導されるか、培養細胞を用いての検討も行なった。薬剤を用いることでベージュ細胞可能な C3H10T$^{1}/_{2}$ 細胞を用いて、寒冷条件(32 度)で培養後 in situ hybridization 法により *Neat1* の発現を定量した。寒冷条件で培養した細胞で、わずかにパラスペックルが大きくなる傾向が見られたものの、組織ほどの顕著な増加は見られていない(data not shown)。使用した細胞タイプや寒冷培養の条件による影響も否定はできないが、*Neat1* そのものが温度のセンサーとして機能しているわけではなく、寒冷刺激を感受したことによる上流からの刺激が、*Neat1* のアイソフォームスイッチには必要であることが示唆された。

4.4 *Neat1* KO マウスでは皮下白色脂肪組織内のノルアドレナリン濃度の低下が生じる

Neat1 KO マウスでは、寒冷刺激により特定の脳領域での神経の活性化は生じ、皮下白色脂肪組織に投射している交感神経の量に差は見られない一方で、寒冷刺激時の皮下白色脂肪組織においてノルアドレナリン量が減少していた(図 21・22)。しかしながら、*Neat1* は脳での発現が低く、特に *Neat1_2* はほとんど発現しておらず、神経細胞ではなく主にはグリア細胞にて発現している [60,126]。これに加えて脳から皮下白色脂肪組織へ交感神経が投射する際に経由する交感神経節での発現も in situ hybridization 法による染色で確認したところ、神経細胞での *Neat1_2* の発現は見られなかった。今回のベージュ細胞分化が抑制される表現型において、*Neat1_2* のみ発現する dPAS マウスを用いた実験により、*Neat1_2* が必要であることが明らかとなっている。これらの結果と合わせて、ノルアドレナリン量の減少は、*Neat1_2* の発現が見られない脳や交感神経など上流での異常ではなく、皮下白色脂肪組織内において異常が生じた結果ではないかと考えられる。組織内のノルアドレナリン量は、交感神経終末からの放出と組織における turnover rate(NETO)によっても制御されていることから [127,128]、*Neat1* KO マウスでは NETO に何らかの異常が生じている可能性がある。またノルアドレナリン受容体β3のアゴニストである CL 投与では野生型と同程度ベージュ細胞の分化が生じること(図 24)を加味すると、*Neat1* KO マウスで見られたノルアドレナリン量の低下が、*Neat1* KO マウスでベージュ細胞の分化が抑制されている要因の 1 つである可能性が示唆される。

4.5 *Neat1* KO マウスでは室温飼育時の皮下白色脂肪組織には差がなく、寒冷刺激への応答に差が見られる

フローサイトメトリーの結果から、皮下白色脂肪組織においてベージュ細胞の前駆細胞とマクロファージの数については差がなく、細胞構成自体には大きな違いがないことが示された(図 19・20)。また RNA-seq の結果からも、室温飼育時に同定された発現変動遺伝子は非常に少なかった。これらの結果からも通常飼育条件下での皮下白色脂肪組織には野生型と *Neat1* KO マウス間で大きな違いがないことが予想された。ベージュ細胞は、ベージュ前駆細胞・脂肪細胞どちらからも分化することが知られており [110,111]、寒冷刺激時にはベージュ前駆細胞からの分化の割合が大きく、CL 投与では脂肪細胞からの分化の割合が大きくなる。*Neat1*KO マウスでは CL 投与時には野生型と同程度ベージュ細胞分化が生じること(図 24)を考えると、脂肪細胞からの分化は正常に生じる一方で、ベージュ細胞前駆細胞からの分化に異常が生じていることが予想された。実際にどちらの細胞での *Neat1* の発現がベージュ細胞分化に重要であるか検討するためには、ベージュ前駆細胞もしくは脂肪細胞特異的な *Neat1* KO マウスを作製し分化効率を比較する必要が残されている。しかしながらベージュ前駆細胞においては、様々なグループからマーカー遺伝子の報告があり、特異的な発現遺伝子およびそのプロモーターについては議論が残されていることから、ベージュ前駆細胞特異的な *Neat1* KO マウスの作製が困難な現状である。そこでまずは、報告のある脂肪細胞特異的なプロモーターと Cre-loxP システムを用いた、脂肪細胞特異的

な *Neat1* KO マウスの作製が課題であると考えている。もしくは、RNA-seq で見られた発現変動遺伝子がどの細胞タイプで生じているのかを single-cell RNA-seq を用いた 1 細胞レベルでの発現変動解析を用いることで明らかにすることができれば、*Neat1* が影響を与えている細胞タイプの絞り込みが可能であると考えている。

4.6 *Neat1* によるベージュ細胞分化制御モデル

RNA-seq の結果から、*Neat1* KO マウスでは特定のゲノム領域での遺伝子発現が低下している傾向が見られた。これらの領域は、野生型マウスで寒冷刺激により発現が変動する遺伝子が集中している領域とも重複しており、*Neat1* が寒冷刺激により発現が変動する遺伝子領域での転写制御に関与している可能性が示唆された。また dPAS マウスを用いた実験より、*Neat1_1* ではなくパラスペックルの必須の構成因子である *Neat1_2* がベージュ細胞の分化には必要であること、*Neat1_2* が寒冷刺激により発現が増加することが確認されている。また DNA—FISH の結果から、発現変動遺伝子が集中していたゲノム領域が寒冷刺激によりパラスペックルとより近い位置に局在することが示された。これまでにも *Neat1* は、転写が活性化している遺伝子の転写開始サイトに多く結合していることが報告されている [129]。また液–液相分離による転写制御機構として、transcriptional Hub と呼ばれるモデルが提唱されている [130,131]。転写因子には構造を持たない IDR 領域を持つものが多く、この IDR を介して液–液相分離を誘導するとされている。これらの IDR を介した液–液相分離に、pol II や転写制御因子である Mediator 複合体が取り込まれ、転写を制御しているというモデルである。これに加え、パラスペックルの構成タンパク質の Pspc1 や Fus・Ewsr1 は、pol II と相互作用し液–液相分離を誘導し、転写制御に関与するとの報告もある [132,133,134]。これらの実験結果と過去の知見から、パラスペックルは、転写が活性化しているゲノム領域の近傍に存在することで、転写活性化因子のリクルートなどを介して transcriptional Hub の形成やその活性の維持に寄与しているのではないかと考察している。今回は一部のゲノム領域に絞った解析を行なったが、HI-C シーケンスなどを用い、*Neat1* と相互作用するゲノム領域を網羅的に解析すること必要がある。また DNA 領域のみならず、近接依存性標識法によりパラスペックルと相互作用するタンパク質や RNA を同定することで分子メカニズムに迫ることができると考えている。

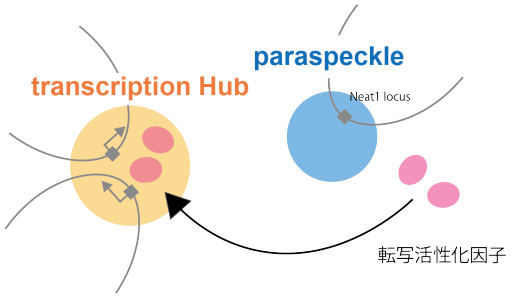


図 25. パラスペックルの機能モデル
パラスペックルが transcription Hub の転写活性の維持に間接的に寄与するモデル。

5. 結語

本研究で明らかとした点を以下にまとめる。

・ベージュ細胞分化という *Neat1* の新たな生理機能を明らかとした。

・*Neat1_1* ではなく *Neat1_2* がベージュ細胞分化に必要であることを示し、個体においてアイソフォームの機能的な切り分けを行なった。

・寒冷刺激により *Neat1_2* は一過的に発現が増加することを明らかとし、特定のゲノム領域の転写活性の維持に関与している可能性が示唆された。

本研究では、皮下白色脂肪組織におけるベージュ細胞分化においてパラスペックルが特定のゲノム領域の転写調節を行なっているという新たなモデルを提唱した。同様の機構により、他の組織や他の刺激の応答時に転写調節が行われている可能性が考えられ、今後の研究に期待される。
またベージュ細胞は基礎代謝を亢進することから、肥満や糖尿病等の代謝性疾患の新たな創薬ターゲットとして着目されている。分子メカニズムなど未だ明らかとなっていない点も多く残されているが、本研究が代謝性疾患の新たな治療法開発につながることを期待される。

6. 実験機器

微量高速冷却遠心機 ：MX-301(TOMY, Tokyo, JAPAN)
高圧蒸気滅菌器：BS-325, BS-245 (TOMY, Tokyo, JAPAN)
ソニケーター : UR-20P(TOMY, Tokyo, JAPAN)
ホモジェナイザー： TissueRuptor 9002755(Quiagen)
シリンジポンプエコノミー：SPE－1(アズワン)
ロータリーミクロトーム : HM325(MICROM)
吸光度測定：Q5000(TOMY, Tokyo, JAPAN)f
フローサイトメーター：BD FACSVerse™(BD Biosciences)
蛍光・吸光プレートリーダー： Sunrise™ Remote(テカンジャパン)
共焦点顕微鏡：LSM900(ZEISS)
落射蛍光顕微鏡 : BX51 (Olympus)
カラーCCD カメラ: DP70 (Olympus)
レンズ : UPlanSApo 60×/NA=1.2 water (OLYMPUS)
恒温水槽：NTT-2100(東京理化器械)
トランスブロッター：トランスブロット Turbo システム(BIO-RAD, #M10536)
撮影機器：ChemiDoc™ Touch Gel Imaging System (BIO-RAD, #1708370)

7. 試薬調製

10×PBS

NaCl 80 g、Na_2HPO_4 (anh)11.5 g、KCl 2 g、KH_2PO_4 2g を DW に溶解し 1 L としたのちに、オートクレーブした。10×とし DDW で 10 倍希釈しオートクレーブ滅菌したものを 1×PBS として用いた。

20×TBS

Tris(hydroxymethyl)aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$) 121 g、NaCl 175.4 g、conc HCl 70 ml を加え、pH 7.0 に pH 調整後 DW で 1 L にメスアップし、オートクレーブした。これを DDW で 20 倍希釈しオートクレーブ滅菌したものを 1×PBS として用いた。

20xSSC

くえん酸三ナトリウム二水和物 88.2 g と NaCl 175.3 g を DW で溶解し 1 L とし、オートクレーブを行った。使用前に各濃度で希釈し、オートクレーブ滅菌後に使用した。

0.5 M EDTA(pH 8.0)

EDTA・2Na 93 g に DW 250 mL 程度加え NaOH 10 g を加え溶解させた。DW で 500 mL までメスアップし 10N NaOH により pH を調整後、オートクレーブ滅菌を行った。

2M Tris-HCl(pH 8.0)

Tris(hydroxymethyl)aminomethane 121.1 g を DW 600 mL に溶解し conc HCl 42 mL 程度加えて pH 8.0 に調整した。DW で 500 mL までメスアップしオートクレーブ滅菌を行った。

5M NaCl

NaCl 146.1 g を DW で 500 mL に溶解しオートクレーブ滅菌を行った。

Tris-HCl, EDTA buffer(TE)

2M Tris-HCl 5 ml、0.5 M EDTA を 2ml を 1 L にメスアップしオートクレーブ滅菌した。

1M $Na_2S_2O_5$

$Na_2S_2O_5$ 1.9 g を DDW に溶解し 10 mL とした。

10% tween 20

DW 180 mL をオートクレーブ滅菌、tween20 を 20 g 加え 200 ml とした。

10% triton X-100

DW 180 mL をオートクレーブ滅菌、Triton X-100 を 20 g 加え 200 ml とした。

10 % Sodium Dodecyl Sulfate(SDS)

SDS 50 g を DDW に溶解し 500 mL とし、4 ºC で保存した。

３種混合麻酔

ドミトール(日本全薬工業)を 1.8 mL、ミタゾラム(サンド)を 2 mL、ベトルファール(Meiji Seika ファルマ)を 2.5 mL に生理食塩水を 18.6 mL 加え 25 mL とした。

10×HCMF

NaCl 80 g、KCl 4 g、$Na_2HPO_4(12H_2O)$ 1.2 g、HEPES 24 g、NaOH 1.92 g、 glucose 10 g、phenol red 10 mg、を加え 1 L に溶解し、オートクレーブ滅菌を行なった。これを DW で 10 倍希釈したものを 1×HCMF オートクレーブ滅菌し用いた。

4% PFA

DW 80 mL に 1N NaOH を 1 ml とパラホルムアルデヒドを 4 g 加え、溶解するまで混合した。10×HCMF を 10 mL 加え 1 N HCl にて色調を見ながら pH を調整後、DW で 100 mL にメスアップした。

0.1M リン酸緩衝バッファー(pH7.3)

A 液：0.1M リン酸水素二ナトリウム 7.1 g/500 mL

B 液：0.1M リン酸二水素ナトリウム 7.8 g/500 mL

A 液と B 液を 77：23 の割合で混合しオートクレーブ滅菌を行った。

30% スクロース溶液

スクロース 30 g を 0.1M リン酸緩衝バッファー(pH7.3)で溶解し 100 mL とし、オートクレーブ滅菌を行い、4 度で保存した。

[In situ Hybridization 試薬]

proK buffer(proK 3 µg / ml, 100 mM Tris, 10 mM EDTA)

2M Tris-HCl(pH 8.0) 10 mL、0.5 M EDTA 4 mL を DDW で 200 mL にメスアップし、使用直前し proK を最終濃度が 3 µg / ml になるように加えた。

Acetylation buffer

DDW 195 mL にトリエタノールアミン 3 ml , 濃塩酸 0.5 ml を加えよく混合した。使用直前に、無水酢酸 0.5 mL を加えて使用した。

Prehybridization buffer

ホルムアミド 25mL、50×Denhrdt's solution 1mL、20×SSC 5 mL、0.5 M EDTA 1mL、10 mg / mL yeast tRNA 500 µl、10 % tween-20 50 µl を DDW で 50 mL にメスアップし－20 度で保存した。

hybridization buffer

ホルムアミド 25mL、50×Denhrdt's solution 1mL、20×SSC 5 mL、0.5 M EDTA 1mL、10 mg / mL yeast tRNA 500 µl、20 % Dextransulfate 12.5 mL、10 % tween-20 50 µl を DDW で 50 mL にメスアップし－20 度で保存した。

wash buffer

ホルムアミド 250 mL、20x SSC 50 mL、10 % tween-20 500 µl を DW で 500 mL にメスアップした。

RNase A buffer

5M NaCl 40 mL、2M Tris-HCl pH8 2 mL、0.5 M EDTA 800 µl、10 % tween-20 400 µl を DW で 400 mL にメスアップしオートクレーブした。

10x マレイン酸バッファー(10 x MAB)

マレイン酸 116 g、NaCl 87.7 g を DW で溶解し 1 L とし、オートクレーブを行った。

1 x blocking regent

blocking regent(Roche, #11096176001) 10 g と 10 x MAB 10 mL を DDW で 100 mL とした。インキュベーターで 60 度に加温しながら 1 時間振盪し完全に溶解したことを確認し、オートクレーブをし−20 度で保存した。使用時に溶解し TBST で 10 倍希釈した。

[**Northern blotting** 試薬]

Northern hybridization buffer

DIG-easy Hyb(sigma, #11603558001)を室温にて溶解後、終濃度がとなるように 100 µg / ml salmon sperm DNA(thermo fisher#156320110) を加えた。

Detection buffer(0.1M Tris-HCl pH 9.5 , 0.1M NaCl)

1M Tris-HCl pH 9.5 10 mL、5M NaCl 2 mL を DDW にて 100 mL にメスアップ後オートクレーブした。

Northern hybridization buffer

DIG-easy Hyb(sigma, #11603558001)を室温にて溶解後、終濃度がとなるように 100 µg / ml salmon sperm DNA(thermo fisher#156320110) を加えた。

2xSDS sampling buffer(4 %SDS, pH6.8 120mM Tris-HCl,20 % Glycerol, 5% メルカプトエタノール)

10 % SDS 20 mL、500mM Tris-HCl pH6.8 12mL、glycerol 10mL を加え、DDW で 50 mL にメスアップした。使用直前に、メルカプトエタノールを 10 倍希釈(終濃度 5%)となるように加えた。

ELISA sampling buffer(0.01N HCl, 1mM EDTA, 1mM $Na_2S_2O_5$ in DW)

1N HCl 100 µl、0.5M EDTA 20 µl、1M $Na_2S_2O_5$ 40 µl 加え DW で 10 mL にメスアップした。

collagenase solution

マウス 1 匹当たり、collagenase(Wako #034-22363)20 mg、BSA(fatty acid free, Sigma #A6003) 0.1 g を DMEM/High glucose 10ml に溶解し、37 度に温めてから使用した。

10xACK 溶血 buffer(155 mM NH_4Cl 10 mM $KHCO_3$, 0.1 mM EDTA)

NH_4Cl 8 g、$KHCO_3$ 1 g、500 mM EDTA・2Na 200 µl を DDW で 100 mL にメスアップし、濾過滅菌した。使用前に DDW で 10 倍希釈し使用した。

フローサイトメトリー wash buffer

FBS 1 mL を PBS 50 mL と混合した。

[**DNA-FISH** 試薬]

40% デキストラン溶液

デキストラン硫酸 ナトリウム塩(Sigma, #D8906)を 4 g を DDW で溶解し 10 ml にメスアップし、4 度で保存した。

2×ハイブリダイゼーションバッファ-

20×SSC 200 µl、40% デキストラン溶液 500 µl、20 mg/ml BSA (NEB, # B9000S)100 µl、10% triton-X 2 µl、DW 200 µl で 1ml とした。よく混合後、－20 度で保存した。

8. 実験操作・方法

マウス

Neat1 KO および dPAS マウスは過去に当研究室で作製したものを使用した [13,*]。室温飼育は、室温 23±1 ºC、湿度 50±5 %の SPF 環境下において 12 時間の明暗サイクルにて、また自由給餌・給水の条件下で飼育を行った。動物実験については北海道大学動物委員会の規定に従い行なった。

寒冷刺激は室温 4−10 ºC の低温環境下において、12 時間の明暗サイクルにて、また自由給餌・給水の条件下で飼育を行った。

CL 投与

CL316,243 は共同研究先の北海道大学獣医学部生化学研究室岡松優子先生からご供与いただいた。CL を生理食塩水で 10 µg /ml に希釈後、20g のマウスなら 200 µl 腹腔内投与した(体重当たり 0.1 mg / kg での投与)。コントロールは、体重当たり等量の生理食塩水を腹腔内投与した。1 日 1 回の投与を 1 週間継続後、サンプリングを行なった。

パラフィン切片の作製

マウスを頚椎脱臼後、褐色・白色脂肪組織をサンプリングし 70 %EtOH において、4ºC で 24 時間以上、脱脂および固定を行なった。その後、室温において 1 時間ずつ 95 %・100 % EtOH 液および Absolute EtOH により脱水を行った。その後、30 分おきに 3 回クロロホルムで振盪後、パラフィンに置換し 55 度で一晩浸透させた。翌日新しいパラフィンに置換し、包埋後室温に放置し、パラフィンブロックを作製した。作製したパラフィンブロックはミクロトームにて 8 µm で薄切し、ノンコートのスライドガラス上に回収し 37 度の加温台上で伸展を行なった。十分に伸展したことを確認したのち、水分を除去し 37 度の加温台上で一晩乾燥させた。

HE 染色

作製したパラフィン切片は、キシレンと 100%EtOH でそれぞれ 5 分で 2 回ずつ置換し、脱パラフィンを行なった。その後、ヘマトキシリン(Sigma #HHS16)で 10 分染色後流水で脱色を行い、エオジン溶液で 1 分(Sigma #HT110116)染色をおこなった。染色後は 75, 90, 100, absEtOH,キシレンで脱水を行ったのちに、非水性マウント剤のエンテランニュー(Sigma #107961)によりマウントした。

Ucp1 抗体染色

HE 染色時と同様に脱パラフィンを行い PBS に置換後、0.1 % proK in PBS で室温で 5 分間賦活化処理を行なった。PBS で洗浄をおこなったのちに、10 % H_2O_2 in 5% serum TBS で

室温 30 分処理し、内在性ペルオキシターゼの不活性化をおこなった。TBS-T で洗浄後、１次抗体として Ucp1 抗体(Sigma # U6382)を TBS-T で 400 倍希釈し、室温で 1 時間反応させた。TBST で複数回洗浄後、２次抗体として、anti-Rb HRP(Cytiva #NA9340)を TBS-T で 400 倍希釈し室温で 1 時間反応させた。TBS で複数回洗浄後、ImmPACT®DAB Substrate Kit(Vector#SK-4105)で 5－10 分程度発色を行なった。発色後、DW で洗浄を行い、75, 90, 100, absEtOH,キシレンで脱水後、エンテランニューでマウントを行なった。

RNA 抽出

頚椎脱臼後のマウスから、褐色脂肪組織と皮下白色脂肪組織をサンプリングした。サンプリングを行なった組織は、1 ml の TRIzol®Reagent(Invitrogen, #15596026)にてホモジェナイズし、1.5 ml チューブに回収した。Neat1 を含む難溶性 RNA は、通常のプロコトルでは回収率がとても低いことが報告されている。そこでサンプルをヒートブロック上で 55 度で 10 分間加熱処理を行なった。また脂肪組織に含まれる脂肪分が RNA 抽出の効率を低下させるため、4 度、800 g で 20 分間遠心を行い、中間層を回収し脂肪の除去を行なった。その後、クロロホルムを 200 µl 加え激しく 30 秒混和後、ローテーターにて 5 分間混和し、4 度、17,200 g で 5 分間遠心を行った。水層を 400 µl 回収後、グリコーゲン(5 mg/ ml)を 2 µl 加え、よく混ぜたのちに、イソプロパノールを 400 µl 加えた。溶液が均一になるまで混合後、室温にて 10 分静置した。4 度、17,200 g で 20 分間遠心を行い、ペレットに沈澱させた。上清を除去後、70 % EtOH を加えペレットの洗浄を行なった。上清を除去後、50 度のヒートブロック上で 3 分静置し、ペレットを乾燥させたのちに、1/10 TE に溶解し、吸光度測定により濃度を算出した。

逆転写反応

RNA 500 µg をテンプレートとし、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, #FSQ-301)を使用し逆転写反応を行なった。各サンプルごと 8 連チューブに分注し、サーマルサイクラーにて 65 度 5 分で変性を行なった。4×DN Master Mix を加え、37 度で 5 分間 DNA の除去を行なった。5×RT Master Mix II を添加し、トータル 10 µl の系で逆転写反応(37 度 15 分、50 度 5 分、98 度 5 分)を行い、cDNA を作製した。DW を 40 µl ずつ加え、5 倍希釈したものを RT-qPCR のテンプレートとして用いた。

RT-qPCR

上記の方法で作製した cDNA をテンプレートとし、THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix(TOYOBO, # QPX-201)にて、RT-qPCR を行った。反応は添付文書に従い 10µl の系で行い、用いたプライマーは表 2 まとめた。PCR は以下の条件で行った(95ºC 1 分、95 ºC 15 秒 : 60 ºC 1 分を 40 サイクル, 95 ºC 10 秒, 65 ºC から 95 ºC の間で 熱解離曲線を作製した)。

凍結切片作製

マウスに 3 種混合麻酔(Medetomidine: Midazolam: Butorphanol = 0.75, 4, 5 mg/kg)を腹腔内投与したのちに、麻酔下で 1×HCMF を 2ml 灌流し脱血処理後、4%PFA を灌流し固定を行なった。皮下白色脂肪組織・褐色脂肪組織をサンプルング後、5mm 各程度に細切した。その後、4% PFA で 4 度で一晩固定を行なった。翌日に 1×PBS で洗浄後、30%スクロース液で 4 度で一晩置換した。その後 OCT(Sakura,Japan)に包埋し、ドライアイスで氷冷したエタノール内で凍結させ、−80 度で保存した。−30 度のミクロトームで 25 µm で薄切し、PLL コートカバーガラス(MATSUNAMI #S7441)に貼り付け回収し-80 度で保存した。

RNA プローブ作製

クローニング PCR のテンプレートとして用いる cDNA は皮下白色脂肪組織の RNA を 0.5 µg に対して oligo(dT) プライマーと random プライマーを用いて Revertra Ace(TRT-101, TOYOBO)により逆転写反応を行なった。遺伝子の配列は UCSC ゲノムブラウザ(https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway)から取得した。この配列を使用して、クローニング用のプライマ-primerBlast(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)を用いて設計した。用いたプライマーの配列情報は表 2 にまとめた。クローニング PCR は PrimeSTAR Max DNA Polimerase(R045A, Takara)を用いて行い、反応後 rTaq DNA Polymerase(TOYOBO, #TAP-201)により A 付加を行なった。PCR 産物は Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(A9282, Promega)にて精製を行い、pGEM-T Easy Vector by using pGEM-T Easy Vector Systems(A1360, Promega)を用い、両側にプロモーター配列を持つ pGEM-T Easy Vector へクローニングした。これらのベクターに対して、それぞれのインサートの向きに応じて、SP6(10810274001, Roche) もしくは T7(10881775001, Roche) polymerase を使用して、DIG(11277073910, Roche) or FITC(11685619910, Roche) ラベル NTPs を加え、in vitro transcription を行った。転写されたプローブは、engineered molecular precisionCentriPure MINI Spin Columns Desalt Z-50(MS-0101-Z100.0-001, BIOTECH)を用いて精製し、等量のホルムアミドを加え−20 度で保存した。

Insitu Hybridization 法

凍結切片は室温に戻した後、4% PFA で一晩固定をした。その後は過去の報告に従って行った(Nakagawa et al., 2011,JCB)。固定後の切片は、0.2 N HCl で 20 分処理したのちに水浴で 37 度に温めた proK buffer で 7 分間 proK 処理を行なった。0.2 % glycine in PBS で反応を止めたのちに 4% PFA で再固定し、acetylation buffer(で 15 分間アセチル化処理を行なった。その後プレハイブリダイゼーション液で 55 度で 2 時間プレハイブリダイゼーションし、DIG もしくは FITC で標識したプローブをハイブリダイゼーション液 400-800 倍し、スライドガラス上にかけ 55 度で一晩ハイブリダイゼーションを行った。翌日、55 度の wash 液で 30 分×2 回の洗浄後、37 度の RNasebuffer に浸漬し非特異的に結合したプローブの除去を行なったのちに、55 度の 2×SSC、0.2×SSC で 30 分ずつ洗浄を行なった。TBST で置換後、1 x

blocking regent(Roche #11096176001)をスライドにかけ、10 分間ブロッキングを行い、anti-DIG()もしくは anti-FITC()抗体を 400 倍希釈溶液にて室温で 1 時間反応させた。TBST で 5 分間の洗浄を 3 回繰り返したのちに、蛍光標識された二次抗体の 400 倍希釈溶液にて室温で 1 時間反応させた。TBST で 5 分間の洗浄を 3 回繰り返したのちに、PVA でマウントを行なった。染色画像は、落射蛍光顕微鏡(Olympus, #BX51) に付属した CCD カメラ(Olympus,#DP74)もしくは、共焦点顕微鏡(ZEISS,#LSM900)により撮影を行なった。

ノザンブロッティング

1 レーンあたり RNA は 2.5-5 ug を、ホルムアミドゲル(1% アガロース, 1xMOPS, 3% ホルマリン) にアプライし、で 1xMOPS(Nacalai, #23442-81)にて泳動を行った。ゲルは DW、0.05N NaOH in DW、DW、20×SSC の順に 20 分ずつ振盪した。RNA はナイロンメンブレンに一晩かけトランスファーを行った。トランスファー後のメンブレンは UV でクロスリンクを行った(1200x 100 μJ/cm^2)。その後、Northern hybridization buffer にメンブレン浸し、68 度で 30 分プレハイブリダイゼーションを行った。その後、上記の Northern hybridization buffer と同じ組成の液に、プローブを 10,000 倍希釈で加え 80 度で 10 分加熱し、プローブの変性を行った。変性後のプローブ液で置換し、浸透ながら 68 度で o/n ハイブリダイゼーションを行った。翌日、68 度の水浴上で 2×SSC, 0.1 % SDS と 0.2×SSC, 0.1 % SDS それぞれ 20 分× 2 回ずつメンブレンを洗浄した。TBST で置換後、1 x blocking regent(Roche #11096176001)で 30 分浸透し、ブロッキング後、αDIG-AP 抗体を 1 x blocking regent で 10,000 倍希釈し、メンブレンに加え、室温で 1 時間反応させた。TBST で 15 分×2 回洗浄後、Detection buffer で平衡化を行なったのちに、CDP-star(sigma # 11685627001)を Detection buffer で 100 倍希釈しメンブレンにかけ、ChemiDoc™ Touch Gel Imaging System (BIO-RAD, #1708370)にて検出を行なった。

ウエスタンブロッティング

褐色脂肪組織の重量の 10 倍量の PBS または、白色脂肪組織の重量と等量の PBS を加え、ホモジェナイズし、エッペンチューブに回収した。4 度、800 g で 20 分遠心後、中間層を回収しサンプルとした。これに等量の 2x SDS Sampling buffer を加え、混合後 3 分ボイルし、ソニケーションを行い、ウエスタンサンプルとした。このサンプルを 10% アクリルアミドゲルにアプライし、泳動を行なった。その後、トランスブロット Turbo 転写システムを用い(BIORAD #1704150J1)、PVDF メンブレンに転写した。TBST でメンブレンを洗浄後、4%スキムミルクで 10 分ブロッキングを行った。その後、各抗体(表 3)を 4%スキムミルクで 1000 倍希釈し、メンブレンにかけ室温で 1 時間振盪した。TBST による洗浄を 5 分×3 回、15 分行ったのちに、二次抗体を 1000 倍希釈で加え、室温で 1 時間振盪した。TBST による洗浄を 15 分×3 回行った。ECL prime(Cytiva #RPN2232)をメンブレンにかけたのちに ChemiDoc によるバンドの検出を行なった。

ELISA 法によるノルアドレナリン濃度測定

褐色脂肪組織の重量の 10 倍量もしくは、白色脂肪組織の重量の 5 倍量のサンプリングバッファーでホモジェナイズし、エッペンチューブに回収した。4 度で 800g で 20 分間遠心後、中間層を回収して ELISA サンプルとした。褐色脂肪組織は 50 倍希釈、白色脂肪組織は 10 倍希釈したものを使用した。Norepinephrine ELISA kit(immusmol, #BA-E-5200R)にてプロトコルに従い行なった。吸光マイクロプレートリーダーにて 450nm 吸光度を測定した。検量線の curve fitting には非線形回帰(4-parameter)を使用し、検量線を作成しサンプルごとの濃度を算出した。またサンプルの補正にはタンパク質濃度を用いた。タンパク質濃度の測定には、BCA 法を用いた(Apro Science,#KY-2030)。

フローサイトメトリー

白色脂肪組織をサンプリング後、リンパ球系の細胞が含まれないようにリンパ節を取り除いた。その後 37 度に加温した collagenase solution を 27G 針で白色脂肪組織に 5 回程度灌流を行った。 加温台上で温めながら細切し、15ml チューブへ回収した。37 度で揺らしながらインキュベートし、15 分ごとにピペッティングを行った。細胞が分散したことを確認したのち、200 μm メッシュでフィルターし 1500 rpm で 2 分間遠心した。上清を除去しペレットを懸濁後、ACK 溶血バッファーを 400 μl 加え軽くボルテックス溶血処理を行った。洗浄バッファーを 10ml 加え、1500 rpm で 2 分間遠心した。上清を除去後、300 μl の洗浄バッファーを加え、ペレットの懸濁後、100 μl ずつエッペンに分注を行った。その後、50 倍希釈したマクロファージマーカー(F4/80-APC(BioLegend), Cd11c-FITC(BD Biosciences, San Jose, CA), Cd206-perCP/Cy5.5(BioLegend))・前駆細胞マーカー(Cd140α-APC(BioLegend), ScaI-perCP/Cy5.5(BioLegend), Cd34-PE(BioLegend), Cd31-PE/Cy(BioLegend, San Diego, CA))の抗体のミックス液を 100 μl ずつ加え混合後、遮光下にて氷上で 30 分反応させた。洗浄バッファーを 500 μl 加え、4 度で 3000 rpm で 5 分遠心した。上清を取りのぞき、洗浄バッファーを 500 μl 加え再度同条件で遠心した。洗浄バッファーを 500 μl 加えペレットを懸濁後、40 μm のナイロンメッシュでフィルター後、FACS チューブへ回収した。フローサイトメータにより計測を行った。

RNA-seq

総 RNA から rRNA の除去は mouse/rat riboPOOL RNA-Seq siTOOLs(Biotech, # DP-P024-000055)を用いて行い、ライブラリーの作製は、TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Gold(Illumina)にて行った。これらの操作は共同研究先である国立研究開発法人 理化学研究所 岩崎 RNA システム生化学研究室に依頼し行ってもらった。調整されたライブラリーは HiSeqX_Ten にてシーケンスを行った。シーケンスについてはマクロジェンに外部委託した。得られたシーケンスファイルは Fastqc によりクオリティーの確認を行ったあと、

HISAT2 (Kim et al. 2019)を用いて、マウスのゲノム(Mus_musculus.GRCm38.84.gtf)にマッピングを行なった。マッピングされたリードは featureCounts(Liao et al. 2014)によりカウントを行い、DESeq2(Love et.al, 2014, Genome Biol.)により発現変動遺伝子の解析を行なった。得られたカウントデータをもとに、idep96 (Ge et.al, 2018, BMC Bioinformatics)と RNAseqChef (Etoh et.al, 2023, JBC)を用いて、Gene ontology 解析などの詳細な解析を行なった。

Single-cell RNA-seq 解析

解析には NCBI データベースの GEO に登録されている GSE133486(Rajbhandari P et.al, 2019)のサンプルアノテーションデータ(barcode)と遺伝子アノテーションデータ(feature)、遺伝子発現のマトリクスデータ(expression.matrix)を用いた。その後の解析は、R にてシングル RNA-seq 解析用パッケージ Seurat を用いて行なった。1 細胞あたりの発現している遺伝子数に応じて(200<,<2500)細胞をフィルター後、LogNormalize を用い標準化した。UMAP を用い、次元下げを行なったのちにクラスタリングを行なった。細胞タイプのラベルは、meta データに付与されていたラベルを参考に付与した。その後、Feature plot により各細胞での Neat1 の発現量をプロットした。

パラスペックル定量

LSM900 で撮影した画像をもとに ImageJ を用いて定量を行なった。8 bit に変更後、スレッシュホールドを決め、二値化を行なった。この画像に対して BioVoxxel Toolbox の Speckle Inspector を用い、核ごとのシグナルの数を算出した。またこの時に抽出された核の位置情報を ROI に設定し、Analyze Particles にて核ごとにシグナルの面積の算出を行なった。得られた解析結果は R にてまとめ解析を行なった。

RNA-DNAFISH

ターゲット領域に対する BAC DNA は RIKEN バイオリソース研究センター（BRC）から購入した。使用した BACDNA は表 3 にまとめた。

DNA プローブは、BAC DNA、Nick Translation Enzymes、および dNTP を混合後、15°C で 60 分間 Nick Translation 反応を行い、蛍光ラベルを行った。その後、QIAquick PCR Purification Kit（Qiagen、#28104）を使用して精製し、ソニケーション処理を行い、プローブとして使用した。

RNA FISH は上記の Insitu Hybridization 法に記載したプロトコルにて行った。続く DNA FISH によって RNA-FISH のシグナルが減弱してしまうため、TSA キット（Kiko Tech、#NEL741001KT）を用いシグナルの増感を行なった。プローブの洗浄後、TSA ブロッキング剤（Kiko Tech、FP1020）を用い室温で 30 分間ブロッキングを行なった。その後、500 倍希釈した HRP 標識の DIG または FITC 抗体を添加し、室温で 1 時間反応させた。 5 分間の洗浄を 3 回繰り返したのちに、TSA 増幅を室温で 10 分間行った。反応を停止するために、

５分間の洗浄を３回繰り返したのちに 4%の PFA で固定を 5 分間行った。
その後続けて DNA FISH を行った。作製した DNA プローブは、Cot1 DNA（それぞれ 50 ng/サンプル）とともにエタノール沈殿法後、軽く風乾を行い、50°C の 100%ホルムアミドに溶解した。このプローブ溶液に 2×ハイブリダイゼーションバッファ-を加え、95°C で 5 分間変性し、使用まで 37°C で加温した。
固定後の切片は、70%および 100%エタノール中で脱水され、70%ホルムアミド/2× SSC 中で 75°C で 5 分間変性を行った。その後急速に氷上で冷却し、氷冷した 70%エタノールおよび 100%エタノール中で脱水しよく風乾させた。変性後のプローブをスライドガラス上の切片にアプライし、37°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。翌日、スライドガラスは室温にて 2× SSC 0.01%triton で 3 回洗浄後、45°C で 2× SSC 0.01%triton で 2 回、0.2× SSC 0.01%triton で 1 回洗浄し、DAPI（1μg/ml）を含む PVA でマウントを行なった。

パラスペックルと DNAfoci の距離計測

LSM900 で撮影した z-stack 画像をもとに ImageJ を用いて定量を行なった。imageJ の image to stack を用いて stack 画像のとした。その後、imageJ のプラグインである DIAna にそれぞれのチャネルの画像を読み込ませ、セグメント化を行い、それぞれの輝点の中心間の距離を測定した。

表 2. 使用したプライマーの配列(5′→3′)

qPCR primer

Gene	FW	RV
TFIIb	TGGAGATTTGTCCACCATGA	GAATTGCCAAACTCATCAAAACT
Neat1_1/1_2	TTGGGACAGTGGACGTGTG	TCAAGTGCCAGCAGACAGCA
Neat1_2	GCTCTGGGACCTTCGTGACTCT	CTGCCTTGGCTTGGAAATGTAA
Ucp1	GGCCTCTACGACTCAGTCCA	TAAGCCGGCTGAGATCTTGT
Cox4	TGAGCCTGATTGGCAAGAGA	CGAAGCTCTCGTTAAACTGG
Cidea	CTTATCAGCAAGACTCTGGATG	GAAGGTGACTCTGGCTATTC
Prdm16	GACATTCCAATCCCACCAGA	CACCTCTGTATCCGTCAGCA
Pgc1a	GTGTGGAACTCTCTGGAACT	GCGTACAACTCAGATTGCTC
Elovl3	TCCGCGTTCTCATGTAGGTCT	GGACCTGATGCAACCCTATGA
aP2	AAGACAGCTCCTCCTCGAAGGTT	TGACCAAATCCCCATTTACGC
Eva1	CCACTTCTCCTGAGTTTACAGC	GCATTTTAACCGAACATCTGTCC
Tbx1	GGCAGGCAGACGAATGTTC	TTGTCATCTACGGGCACAAAG
cd137	CGTGCAGAACTCCTGTGATAAC	GTCCACCTATGCTGGAGAAGG

cloning primer

Gene	FW	RV
ppar	CTTGCTGCCCCAAGTGATTTC	TCTGCTTCTGCTTCCTGAACG
pi16	GCTAGGCAGTCCTCTAAGCG	GAGGCGCGTTTAGCGTTTC

表 3. 使用した抗体

antibody	supplier	catNum
mouse monoclonal anti DIG	Abcam	#ab420
rabbit polyclonal anti FITC	Abcam	#ab19491
anti-rabbit Ucp1	sigma	U6382
anti-rabbit β-actin	GeneTex	GTX109639
anti-mouse TH	CHEMICON	MAB5280
anti-rabbit c-fos	CALBIOCHEM	PC38
anti-mouse Cy3	MerckMillipore	#AP124C
anti-rabbit 488	Invitrogen	A11008
anti-mouse F4/80-APC	BioLegend	#123115
anti-mouse Cd11c-FITC	BD Biosciences	AB_396683
anti-mouse Cd206-perCP/Cy5.5	BioLegend	#141715
Cd140α-APC	BioLegend	#135907
ScaI- perCP/Cy5.5	BioLegend	#301327
Cd34-PE	BioLegend	#128610
Cd31-PE/Cy7	BioLegend	#102523

表 4. 使用した BAC DNA

locus	clone number
chr5_Tfr2	B6Ng01-205L6
chr5_Epo	B6Ng01-143D1
chr6_4.5SH_1	B6Ng01-245H3
chr6_4.5SH_2	B6Ng01-197C04
chr10_Gampt	B6Ng01-137K4
chr10_Uqcr11	B6Ng01-301G5
chr11_Fasn	B6Ng01-283P22
chr15_Gpt	B6Ng01-319F22
chr19_Neat1	B6Ng01-78H11
chr19_cox8a	B6Ng01-340H16

9. 参考文献

1) Ruth L Seal rseal, Ling-Ling Chen , Sam Griffiths-Jones , Todd M Lowe , Michael B Mathews , Dawn O'Reilly , Andrew J Pierce , Peter F Stadler , Igor Ulitsky , Sandra L Wolin & Elspeth A Bruford., et al.

A guide to naming human non-coding RNA genes, The EMBO Journal, **39**, 288–304 (2020)

2) Uszczynska-Ratajczak, B., Lagarde, J., Frankish, A. et al., et al.

Towards a complete map of the human long non-coding RNA transcriptome., Nat Rev Genet, **19**, 535–548 (2018)

3) Rosalind C. Lee, Rhonda L. Feinbaum, Victor Ambrosi., et al.

The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14., Cell, **75**, 843-854 (1993)

4) Nelson C. Lau., et al.

An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in Caenorhabditis elegans., Science, **294**, 858-862 (2001)

5) Shang, R., Lee, S., Senavirathne, G. et al., et al.

microRNAs in action: biogenesis, function and regulation., Nat Rev Genet, **24**, 816–833 (2023)

6) Alexei A. Aravin, Mariana Lagos-Quintana, Abdullah Yalcin, Mihaela Zavolan, Debora Marks, Ben Snyder, Terry Gaasterland, Jutta Meyer, Thomas Tuschl., et al.

The Small RNA Profile during Drosophila melanogaster Development., Developmental Cell, **5**, 337-350 (2003)

7) Kuniaki Saito, Kazumichi M. Nishida, Tomoko Mori, Yoshinori Kawamura, Keita Miyoshi, Tomoko Nagami, Haruhiko Siomi, and Mikiko C. Siomi., et al.

Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the Drosophila genome., Genes & Dev., **20**, 2214-2222 (2006)

8) Siomi, M., Sato, K., Pezic, D., et al.

PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence., Nat Rev Mol Cell Biol, **12**, 246–258 (2011)

9) Schoeniger, L.O. & Jelinek, W.R., et al.
4.5S RNA isencoded by hundreds of tandemly linked genes, has a shorthalf-life, and is hydrogen bonded in vivo to poly(A)-termi-nated RNAs in the cytoplasm of cultured mouse cells., Mol.Cell. Biol, **6**, 1508–1519 (1986)

10) Rei Yoshimoto, Yuta Nakayama, Ikuko Nomura, Ikuko Yamamoto, Yumeka Nakagawa, Shigeyuki Tanaka, Misuzu Kurihara, Yu Suzuki, Takehiko Kobayashi, Hiroko Kozuka-Hata, Masaaki Oyama, Mari Mito, Shintaro Iwasaki, Tomohiro Yamazaki, Tetsuro Hirose, Kimi Araki, Shinichi Nakagawa., et al.
4.5SH RNA counteracts deleterious exonization of SINE B1 in mice., Molecular Cell., **83**, 4479-4493 (2023)

11) Brown C, Ballabio A, Rupert JL, Lafreniere RG, Grompe M, Tonlorenzi R., et al.
A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome., Nature., **349**, 38-44 (1991)

12) Mattick, J.S., Amaral, P.P., Carninci, P., et al.
Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations., Nat Rev Mol Cell Biol, **24**, 430–447 (2023)

13) Statello, L., Guo, CJ., Chen, LL., et al.
Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions., Nat Rev Mol Cell Biol, **22**, 96–118 (2021)

14) Florian Kopp, Joshua T. Mendell., et al.
Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs., Cell, **172**, 393-407 (2018)

15) Lee S, Kopp F, Chang TC, Sataluri A, Chen B, Sivakumar S, Yu H, Xie Y, Mendell JT.., et al.
Noncoding RNA NORAD Regulates Genomic Stability by Sequestering PUMILIO Proteins., Cell, **164**, 69-80 (2016)

16) Ling-Ling Chen & Li Yang., et al.
Regulation of circRNA biogenesis., RNA Biology **12**, 381-388 (2015)

17) Panda, A. C., et al.
Circular RNAs Act as miRNA Sponges., Adv Exp Med Biol. **1087**, 67-79 (2018)

18) Kathrin Plath et al.,
Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in X Inactivation., Science, **300**, 131-135(2003)

19) Jing Zhao et al.,
Polycomb Proteins Targeted by a Short Repeat RNA to the Mouse X Chromosome., Science, **322**, 750-756(2008)

20) John L. Rinn, Michael Kertesz, Jordon K. Wang, Sharon L. Squazzo, Xiao Xu, Samantha A. Brugmann, L. Henry Goodnough, Jill A. Helms, Peggy J. Farnham, Eran Segal, Howard Y. Chang., et al.
Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs., Cell, **129**, 1311-1323 (2007)

21) Gupta, R., Shah, N., Wang, K., et al.
Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis., Nature, **464**, 1071–1076 (2010)

22) Takeshi Chujo, Tomohiro Yamazaki, Tetsuro Hirose., et al.
Architectural RNAs (arcRNAs): A class of long noncoding RNAs that function as the scaffold of nuclear bodies., BBA, **1859**, 139-146 (2016)

23) Tomohiro Yamazaki, Shinichi Nakagawa and Tetsuro Hirose., et al.
Architectural RNAs for Membraneless Nuclear Body Formation., Cold Spring Harb Symp Quant Biol, **84**, 227-237 (2019)

24) Kensuke Ninomiya et alView article pageKensuke Ninomiya, Shungo Adachi, Tohru Natsume, Junichi Iwakiri, Goro Terai, Kiyoshi Asai and Tetsuro Hirose., et al.
LncRNA-dependent nuclear stress bodies promote intron retention through SR protein phosphorylation., EMBO J, **39**, e102729 (2020)

25) Kensuke Ninomiya, Junichi Iwakiri, Mahmoud Khamis Aly, Yuriko Sakaguchi, Shungo Adachi, Tohru Natsume, Goro Terai, Kiyoshi Asai, Tsutomu Suzuki, Tetsuro Hirose., et al.
m6A modification of HSATIII lncRNAs regulates temperature-dependent splicing., EMBO J, **40**, e107976 (2021)

26) Takeshi Chujo, Tomohiro Yamazaki, Tetsuya Kawaguchi, Satoshi Kurosaka, Toru Takumi, Shinichi Nakagawa and Tetsuro Hirose., et al.
Unusual semi-extractability as a hallmark of nuclear body-associated architectural noncoding RNAs., EMBO J, **36**, 1447-1462 (2017)

27) Chao Zeng, Takeshi Chujo, Tetsuro Hirose, Michiaki Hamada., et al.
Landscape of semi-extractable RNAs across five human cell lines., Nucleic Acids Research, **51**, 7820–7831 (2023)

28) Tetsuro Hirose, Kensuke Ninomiya, Shinichi Nakagawa & Tomohiro Yamazaki., et al.
A guide to membraneless organelles and their various roles in gene regulation. , Nat Rev Mol Cell Biol, **24**, 288–304 (2023)

29) Salman F. Banani, Hyun O. Lee, Anthony A. Hyman & Michael K. Rosen., et al.
Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry, **18**, 285–298 (2017)

30) Montgomery, T.S.H., Jr., et al.
Comparative cytological studies, with especial regard to the morphology of the nucleolus., J. Morphol., **15**, 265-582 (1898)

31) Lafontaine DLJ, Riback JA, Bascetin R, Brangwynne CP., et al.
The nucleolus as a multiphase liquid condensate., Nat Rev Mol Cell Biol., **22**, 165-182 (2021)

32) Valérie Lallemand-Breitenbach, Hugues de Thé., et al.
PML nuclear bodies: from architecture to function, Current Opinion in Cell Biology, **52**, 154-161 (2018)

33) Shen TH, Lin HK, Scaglioni PP, Yung TM, Pandolfi PP., et al.
The mechanisms of PML-nuclear body formation., Mol Cell, **24**, 331-339 (2006)

34) Sahin U, Ferhi O, Jeanne M, Benhenda S, Berthier C, Jollivet F, Niwa-Kawakita M, Faklaris O, Setterblad N, de Thé H, Lallemand-Breitenbach V., et al.
Oxidative stress-induced assembly of PML nuclear bodies controls sumoylation of partner proteins., J Cell Biol., **204**, 931-945 (2014)

35) Wang J, Shiels C, Sasieni P, Wu PJ, Islam SA, Freemont PS, Sheer D.., et al.
Promyelocytic leukemia nuclear bodies associate with transcriptionally active genomic regions., J Cell Biol., **164**, 515-26 (2004)

36) Shiels C, Islam SA, Vatcheva R, Sasieni P, Sternberg MJ, Freemont PS, Sheer D., et al.
PML bodies associate specifically with the MHC gene cluster in interphase nuclei., J Cell Sci., **114**, 3705-3716 (2001)

37) Kurihara M, Kato K, Sanbo C, Shigenobu S, Ohkawa Y, Fuchigami T, Miyanari Y., et al.
Genomic Profiling by ALaP-Seq Reveals Transcriptional Regulation by PML Bodies through DNMT3A Exclusion., Mol Cell, **78**, 493-505.e8. (2020)

38) Protter DSW, Parker R., et al.
Principles and Properties of Stress Granules., Trends Cell Biol., **26**, 668-679 (2016)

39) Sebastian Markmiller, Sahar Soltanieh, Kari L. Server, Raymond Mak, Wenhao Jin, Mark Y. Fang, En-Ching Luo, Florian Krach, Dejun Yang, Anindya Sen, Amit Fulzele, Jacob M. Wozniak, David J. Gonzalez, Mark W. Kankel, Fen-Biao Gao, Eric J. Bennett, Eric Lécuyer, Gene W. Yeo., et al.
Context-Dependent and Disease-Specific Diversity in Protein Interactions within Stress Granules, Cell, **172**, 590-604 (2018)

40) Christine M Clemson, John N Hutchinson, Sergio A Sara, Alexander W Ensminger, Archa H Fox, Andrew Chess, Jeanne B Lawrence., et al.
An Architectural Role for a Nuclear Noncoding RNA: NEAT1 RNA Is Essential for the Structure of Paraspeckles, Mol Cell, **33**, 717-726 (2009)

41) Yasnory T. F. Sasaki, Takashi Ideue, Miho Sano, Toutai Mituyama, and Tetsuro Hirose., et al.
MENε/β noncoding RNAs are essential for structural integrity of nuclear paraspeckles PNAS, **106**, 2525-2530 (2009)

42) Hongjae Sunwoo, Marcel E. Dinger, Jeremy E. Wilusz, Paulo P. Amaral, John S. Mattick, and David L. Spector., et al.
MEN e/b nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles, Genome res, **19**, 347-359 (2009)

43) Visa N, Puvion-Dutilleul F, Bachellerie JP, Puvion E., Gérard Pierron., et al.
Intranuclear distribution of U1 and U2 snRNAs visualized by high resolution in situ hybridization: revelation of a novel compartment containing U1 but not U2 snRNA in HeLa cells., Eur J Cell Biol, **60**, 308-321 (1993)

44) Archa H. Fox, Yun Wah Lam, Anthony K.L. Leung, Carol E. Lyon, Jens Andersen, Matthias Mann, Angus I. Lamond., et al.
Paraspeckles: A Novel Nuclear Domain., Current Biology, **12**, 13-25 (2002)

45) Fox AH, Bond CS, Lamond AI., et al.
P54nrb forms a heterodimer with PSP1 that localizes to paraspeckles in an RNA-dependent manner., Mol Biol Cell., **16**, 5304-5315 (2005)

46) Clemson CM, Hutchinson JN, Sara SA, Ensminger AW, Fox AH, Chess A., et al.
An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles., Molecular cell., **33**, 717-26 (2009)

47) Sasaki YT, Ideue T, Sano M, Mituyama T, Hirose T., et al.
MENepsilon/beta noncoding RNAs are essential for structural integrity of nuclear paraspeckles., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America., **106**, 2525-30 (2009)

48) Chen LL, Carmichael GG., et al.
Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA., Molecular cell., **35**, 467-78 (2009)

49) Sunwoo H, Dinger ME, Wilusz JE, Amaral PP, Mattick JS, Spector DL., et al.
MEN epsilon/beta nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles., Genome Res., **19**, 347-59 (2009)

50) Sylvie Souquere, Guillaume Beauclair, Francis Harper, Archa Fox, Gérard Pierron., et al.
Highly ordered spatial organization of the structural long noncoding NEAT1 RNAs within paraspeckle nuclear bodies, Mol Biol Cell, **22**, 4020-4027 (2010)

51) Jason A. West,Mari Mito,Satoshi Kurosaka,Toru Takumi,Chiharu Tanegashima,Takeshi Chujo,Kaori Yanaka,Robert E. Kingston,Tetsuro Hirose,Charles Bond,Archa Fox,and Shinichi Nakagawa., et al.
Structural, super-resolution microscopy analysis of paraspeckle nuclear body organization, J Cell Biol, **214**, 817–830 (2016)

52) Tomohiro Yamazaki, Sylvie Souquere, Takeshi Chujo, Simon Kobelke, Yee Seng Chong, Archa H Fox, Charles S Bond, Shinichi Nakagawa, Gerard Pierron, Tetsuro Hirose., et al.
Functional Domains of NEAT1 Architectural lncRNA Induce Paraspeckle Assembly through Phase Separation, Mol Cell, **70**, 1038-1053.e7 (2018)

53) Takao Naganuma, Shinichi Nakagawa, Akie Tanigawa, Yasnory F Sasaki, Naoki Goshima, Tetsuro Hirose., et al.
Alternative 3′-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles, EMBO, **31**, 4020-4034 (2012)

54) Bonetti, A., Agostini, F., Suzuki, A.M., et al.
RADICL-seq identifies general and cell type–specific principles of genome-wide RNA-chromatin interactions., Nat Commun, **11**, 1018 (2020)

55) Yap K, Chung TH, Makeyev EV., et al.
Hybridization-proximity labeling reveals spatially ordered interactions of nuclear RNA compartments., Mol Cell., **82**, 463-478 (2022)

56) Nakagawa S, Naganuma T, Shioi G, Hirose T., et al.
araspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice., J Cell Biol., **193**, 31-9 (2011)

57) Shinichi Nakagawa, Masayuki Shimada, Kaori Yanaka, Mari Mito, Takashi Arai, Eiki Takahashi, Youko Fujita, Toshihiko Fujimori, Laura Standaert, Jean-Christophe Marine, Tetsuro Hirose., et al.
The lncRNA Neat1 is required for corpus luteum formation and the establishment of pregnancy in a subpopulation of mice, Development, **141**, 4618–4627 (2014)

58) Katsutoshi Imamura, Naoto Imamachi, Gen Akizuki, Michiko Kumakura, Atsushi Kawaguchi, Kyosuke Nagata, Akihisa Kato, Yasushi Kawaguchi, Hiroki Sato, Misako Yoneda, Chieko Kai, Tetsushi Yada, Yutaka Suzuki, Toshimichi Yamada, Takeaki Ozawa, Kiyomi Kaneki, Tsuyoshi Inoue, Mika Kobayashi, Tatsuhiko Kodama, Youichiro Wada, Kazuhisa Sekimizu, Nobuyoshi Akimitsu., et al.
Long noncoding RNA NEAT1-dependent SFPQ relocation from promoter region to paraspeckle mediates IL8 expression upon immune stimuli., Mol Biol Cell, **53**, 393-406 (2014)

59) S. Mohammad Lellahi, Ingrid Arctander Rosenlund, Annica Hedberg, Liv Torill Kiær, Ingvild Mikkola, Erik Knutsen, Maria Perander., et al.
The long noncoding RNA NEAT1 and nuclear paraspeckles are up-regulated by the transcription factor HSF1 in the heat shock response., JBC, **293**, 18965-18976 (2018)

60) Michail S. Kukharsky, Natalia N. Ninkina, Haiyan An, Vsevolod Telezhkin, Wenbin Wei, Camille Rabesahala de Meritens, Johnathan Cooper-Knock, Shinichi Nakagawa, Tetsuro Hirose, Vladimir L. Buchman & Tatyana A. Shelkovnikova., et al.
Long non-coding RNA Neat1 regulates adaptive behavioural response to stress in mice, Translational Psychiatry, **volume 10, Article number: 171**, (2020)

61) Cannon, Barbara, and Jan Nedergaard., et al.
Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance, physrev, **84,** 277-359, (2004)

62) P. Young, J.R.S. Arch and Margaret Ashwell., et al.
Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse, FEBS LETTERS, **167,** 10-14, (1983)

63) Andrea Frontini 1, Saverio Cinti., et al.
Distribution and Development of Brown Adipocytes in the Murine and Human Adipose Organ, Cell Metabolism, **11,** 253-256, (2010)

64) B Cousin, S Cinti, M Morroni, S Raimbault, D Ricquier, L Pénicaud, L Casteilla., et al.
Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization, J Cell Sci, **103,** 931-42, (1992)

65) Yuko Okamatsu-Ogura ,Keigo Fukano,Ayumi Tsubota,Akihiro Uozumi,Akira Terao,Kazuhiro Kimura,Masayuki Saito., et al.
Thermogenic Ability of Uncoupling Protein 1 in Beige Adipocytes in Mice, PLoS ONE, **12,** e84229, (2013)

66) Martin Klingenberg, Shu-Gui Huang., et al.
Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue, BBA, **1415,** 271-296, (1999)

67) Jan Nedergaard, Valeria Golozoubova, Anita Matthias, Abolfazl Asadi, Anders Jacobsson, Barbara Cannon., et al.
UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency, BBA, **1504,** 82-106, (2001)

68) Sven Enerbäck, Anders Jacobsson, Elizabeth M. Simpson, Carmen Guerra, Hitoshi Yamashita, Mary-Ellen Harper & Leslie P. Kozak, et al.
Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese, Nature, **387,** 90–94, (1997)

69) Heike Münzberg,Elizabeth Floyd, andJi Suk Chang., et al.
Sympathetic Innervation of White Adipose Tissue: to Beige or Not to Beige?, Physiology, **36,** 246–255, (2021)

70) Tj Bartness, Vitaly Ryu., et al.
Neural control of white, beige and brown adipocytes., Obesity, **5,** 35-39, (2015)

71) Fubiao Shi, Sheila Collins., et al.
Second messenger signaling mechanisms of the brown adipocyte thermogenic program: An integrative perspective., Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation., 1-9, (2017)

72) Maria V. Zaretskaia, Dmitry V. Zaretsky, Anantha Shekhar, Joseph A. DiMicco., et al.
Chemical stimulation of the dorsomedial hypothalamus evokes non-shivering thermogenesis in anesthetized rats., Brain Research., **928,** 113–125, (2002)

73) W.-H. CAO,a W. FANb AND S. F. MORRISON., et al.
MEDULLARY PATHWAYS MEDIATING SPECIFIC SYMPATHETIC RESPONSES TO ACTIVATION OF DORSOMEDIAL HYPOTHALAMUS., Neuroscience., **126,** 229–240, (2004)

74) Ellen Paula Santos da Conceição1, Shaun F. Morrison, Georgina Cano, Pierfrancesco Chiavetta & DomenicoTupone., et al.
Median preoptic area neurons are required for the cooling and febrile activations of brown adipose tissue thermogenesis in rat., Scientifc Reports., **10:18072**, (2020)

75) Baile Wang, Ang Li, Xiaomu Li, Philip WL Ho, Donghai Wu, Xiaoqi Wang, Zhuohao Liu,Kelvin KL Wu, Sonata SY Yau, Aimin Xu, Kenneth KY Cheng., et al.
Activation of hypothalamic RIP-Cre neuronspromotes beiging of WAT via sympathetic nervoussystem., EMBO Reports., **19:e44977**, (2018)

76) Sheila Collins., et al.
β-Adrenergic Receptors and Adipose Tissue Metabolism : Evolution of an Old Story., EMBO Reports., **84**, 1–16 (2022)

77) Inagaki, T., Sakai, J. & Kajimura, S., et al.
Transcriptional and epigenetic control of brown and beige adipose cell fate and function., Nat Rev Mol Cell Biol, **17,** 480–495 (2016)

78) Harms, M., Seale, P., et al.
Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential., Nat Med, **19,** 1252–1263 (2013)

79) Mengle Shao, Qiong A. Wang, Anying Song, Lavanya Vishvanath, Napoleon C. Busbuso, Philipp E. Scherer, Rana K. Gupta., et al.
Cellular Origins of Beige Fat Cells Revisited., Diabetes, **68,** 1874–1885 (2019)

80) Berry, D., Jiang, Y. & Graff, J., et al.
Mouse strains to study cold-inducible beige progenitors and beige adipocyte formation and function., Nat Commun, **7,** 10184 (2016)

81) Hyun Cheol Roh, Linus T.Y. Tsai, Mengle Shao, Danielle Tenen, Yachen Shen, Manju Kumari, Anna Lyubetskaya, Christopher Jacobs, Brian Dawes, Rana K. Gupta, Evan D. Rosen., et al.
Warming Induces Significant Reprogramming of Beige, but Not Brown, Adipocyte Cellular Identity., Cell Metabolism, **27,** 1121-1137 (2018)

82) Qi Y, Hui XH., et al.
The Single-Cell Revelation of Thermogenic Adipose Tissue., Mol Cells., **45,** 673-684 (2022)

83) Siamon Gordon & Philip R. Taylor., et al.
Monocyte and macrophage heterogeneity., Nature Reviews Immunology., **5,** 953–964 (2005)

84) Alberto Mantovani, Antonio Sica, Silvano Sozzani, Paola Allavena,Annunciata Vecchi and Massimo Locati., et al.
The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization., TRENDS in Immunology., **25,** 677-686 (2004)

85) Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR., et al.
Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization., J Clin Invest., **117,** 175–184 (2007)

86) Wellen KE, Hotamisligil GS., et al.
Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue., J Clin Invest., **112,** 1785–1788 (2003)

87) Sakamoto T, Nitta T, Maruno K, Yeh YS, Kuwata H, Tomita K, Goto T, Takahashi N, Kawada T., et al.
Macrophage infiltration into obese adipose tissues suppresses the induction of UCP1 level in mice., Am J Physiol Endocrinol Metab., **310,** 676–687 (2016)

88) Ken Machida, Yuko Okamatsu-Ogura, Woongchul Shin, Shinya Matsuoka, Ayumi Tsubota & Kazuhiro Kimura., et al.
Role of macrophages in depot-dependent browning of white adipose tissue, The Journal of Physiological Sciences., **68,** 601–608 (2018)

89) Yifu Qiu, Khoa D. Nguyen,Justin I. Odegaard,Xiaojin Cui,Xiaoyu Tian,Richard M. Locksley,Richard D. Palmiter,Ajay Chawla., et al.
Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat., Cell, **157,** 1292–1308 (2014)

90) Rajesh R. Rao, Jonathan Z. Long, James P. White, Katrin J. Svensson, Jesse Lou, Isha Lokurkar, Mark P. Jedrychowski, Jorge L. Ruas, Christiane D. Wrann , James C. Lo, Donny M. Camera, Jenn Lachey, Steven Gygi, Jasbir Seehra, John A. Hawley, Bruce M. Spiegelman., et al.
Meteorin-like Is a Hormone that Regulates Immune-Adipose Interactions to Increase Beige Fat Thermogenesis., Cell, **157,** 1279-1291(2014)

91) Min-Woo Lee,Justin I. Odegaard,Lata Mukundan,Yifu Qiu,Ari B. Molofsky,Jesse C. Nussbaum,Karen Yun,Richard M.,Locksley,and Ajay Chawla., et al.
Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis., Cell, **160,** 74–87 (2015)

92) Nguen KD, Qit Y, Cui X, Goh YP, Mwangi J, David T, Mukundan L, Brombacher F, Locksley RM, Chawla A., et al.
Alternatively activated macrophage produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis., Nature, **480,** 104–108 (2011)

93) Momo Isobe, Hikaru Toya, Mari Mito, Tomoki Chiba, Hiroshi Asahara, Tetsuro Hirose, Shinichi Nakagawa, et al.
Forced isoform switching of Neat1_1 to Neat1_2 leads to the loss of Neat1_1 and the hyperformation of paraspeckles but does not affect the development and growth of mice, RNA, **26,** 251-264, (2020)

94) Tongtong Wang, Anand Kumar Sharma & Christian Wolfrum, et al.
Novel insights into adipose tissue heterogeneity, Endocr Metab Disord, **23,** 5–12, (2022)

95) Babukrishna Maniyadath,Qianbin Zhang,Rana K. Gupta,Susanne Mandrup, et al.
Adipose tissue at single-cell resolution, Cell Metabolism, **35,** 386–413, (2023)

96) Prashant Rajbhandari, Douglas Arneson, Sydney K Hart,In Sook Ahn, Graciel Diamante,Luis C Santos, Nima Zaghari, An-Chieh Feng, Brandon J Thomas, Laurent Vergnes, Stephen D Lee, Abha K Rajbhandari, Karen Reue, Stephen T Smale,Xia Yang,Peter Tontonoz, et al.
Single cell analysis reveals immune cell–adipocyte crosstalk regulating the transcription of thermogenic adipocytes, eLife, **e49501**, (2019)

97) RUOHAN LI,ALAN R. HARVEY,STUART I. HODGETTS, and ARCHA H. FOX, et al.
Functional dissection of NEAT1 using genome editing reveals substantial localisation of the NEAT1_1 isoform outside paraspeckles, RNA, **23**, 872–881 (2018)

98) Qiong A Wang, Caroline Tao, Rana K Gupta & Philipp E Scherer, et al.
Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration, Nature Medicine, **19**, 1338–1344 (2013)

99) Yun-Hee Lee, Anelia P. Petkova, Emilio P. Mottillo, James G. Granneman et al.
In Vivo Identification of Bipotential Adipocyte Progenitors Recruited by β3-Adrenoceptor Activation and High-Fat Feeding, Cell Metabolism, **15**, 480-491 (2012)

100) Woongchul Shin, Yuko Okamatsu-Ogura, Ken Machida, Ayumi Tsubota, Junko Nio-Kobayashi, Kazuhiro Kimura et al.
Impaired adrenergic agonist-dependent beige adipocyte induction in aged mice, Obesity, **25**, 417-423 (2017)

101) Takahiro Seki, Kayoko Hosaka, Sharon Lim, Carina Fischer, Jennifer Honek, Yunlong Yang, Patrik Andersson, Masaki Nakamura, Erik Näslund, Seppo Ylä-Herttuala, Meili Sun, Hideki Iwamoto, Xuri Li, Yizhi Liu, Nilesh J. Samani & Yihai Cao et al.
Endothelial PDGF-CC regulates angiogenesis-dependent thermogenesis in beige fat, Nature Communications, **7**, 12152 (2016)

102) Chenguang Wang,Yalan Wu,Yangxian Li,Yang Zhang,Yee Lok Fung,Ka Kui Tong,Chi Wai Lau,Li Xiang,Kin Ming Kwan,Li-Ru You,Yu Huang,and Xiao Yu Tian et al.
Smad4-mediated angiogenesis facilitates the beiging of white adipose tissue in mice, iScience, **26**, 106272 (2017)

103) Kai Sun, Ingrid Wernstedt Asterholm, Christine M. Kusminski, Ana Carolina Bueno, Zhao V. Wang, Jeffrey W. Pollard, Rolf A. Brekken, and Philipp E. Scherer et al.
Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction, PNAS, **109**, 5874-5879 (2012)

104) Jonathan D. Bloom, Minu D. Dutia, Bernard D. Johnson, Allan Wissner, Michael G. Burns, Elwood E. Largis, Jo Alene Dolan, and Thomas H. Claus., et al.
Disodium (R,R)-5-[2-[[2-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethyl]amino]propyl]-1,3-benzodioxole-2,2-dicarboxylate (CL 316,243). A potent .beta.-adrenergic agonist virtually specific for .beta.3 receptors. A promising antidiabetic and antiobesity agent., Journal of Medicinal Chemistry., **16**, 3081-3084, (1992)

105) J. Himms-Hagen, J. Cui, E. Danforth, Jr, D. J. Taatjes, S. S. Lang, B. L. Waters, and T. H. Claus., et al.
Effect of CL-316,243, a thermogenic beta 3-agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats., Physiology-Regulatory., **266**, R1371-R1382, (1994)

106) Itsuro Nagase,Toshihide Yoshida., et al.
Expression of Uncoupling Protein in Skeletal Muscle and White Fat of Obese Mice
Treated with Thermogenic b3-Adrenergic Agonist., J. Clin. Invest., **97**, 2898–2904, (1996)

107) Umekawa, T.,T. Yoshida, N. Sakane, M. Saito, K. Kuma-moto, and M. Kondo., et al.
Anti-obesity and anti-diabetic effects of CL316,243, a specificb3-adrenoceptor agonist., J.Endocrinol., **136**, 429–437, (1997)

108) Li Y, Ping X, Zhang Y, Li G, Zhang T, Chen G, Ma X, Wang D and Xu L .,et al.
Comparative Transcriptome Profiling of Cold Exposure and β3-AR Agonist CL316,243-Induced Browning of White Fat., Front. Physiol., **12**, 667698, (2021)

109) Seoyeon Lee, Abigail M. Benvie, Hui Gyu Park, Roman Spektor, Blaine Harlan, J. Thomas Brenna, Daniel C. Berry & Paul D. Soloway.,et al.
Remodeling of gene regulatory networks underlying thermogenic stimuli-induced adipose beiging., COMMUNICATIONS BIOLOGY., **5:584**, (2022)

110) Yuwei Jiang, Daniel C Berry,and Jonathan M Graff,et al.
Distinct cellular and molecular mechanisms for β3 adrenergic receptor-induced beige adipocyte formation., eLife., **6**, e30329,(2017)

111) Takeshi Inagaki, Juro Sakai,and Shingo Kajimura.,et al.
Transcriptional and epigenetic control of brown and beige adipose cell fate and function., Nat Rev Mol Cell Biol., **17**, 480–495, (2016)

112) Wang C, Wang X and Hu W.,et al.
Molecular and cellular regulation of thermogenic fat., Front. Endocrinol., **14:1215772.** (2023)

113) Pengpeng Bi, Tizhong Shan, Weiyi Liu, Feng Yue, Xin Yang, Xin-Rong Liang, Jinghua Wang, Jie Li, Nadia Carlesso, Xiaoqi Liu, and Shihuan Kuang., et al.
Notch signaling regulates adipose browning and energy metabolism, Nat Med, **20**, 911–918 (2014)

114) Meghan E McDonald, Chendi Li, Hejiao Bian, Barbara D Smith, Matthew D Layne, and Stephen R Farmer., et al.
Myocardin-related transcription factor A regulates conversion of progenitors to beige adipocytes, Cell., **160**, 105–118 (2015)

115) Ruya Liu ,Xuekai Xiong , Deokhwa Nam , Vijay Yechoor , Ke Ma, et al.
SRF-MRTF signaling suppresses brown adipocyte development by modulating TGF-β/BMP pathway, Molecular and Cellular Endocrinology, **515: 110920**, (2020)

116) Li Qiang, Liheng Wang,Ning Kon, Wenhui Zhao, Sangkyu Lee, Yiying Zhang, Michael Rosenbaum, Yingming Zhao, Wei Gu, Stephen R. Farmer, and Domenico Accili., et al.
Brown Remodeling of White Adipose Tissue by SirT1-Dependent Deacetylation of Pparγ, Cell., **150**, 620–632 (2012)

117) Y Cao, W. et al.,
p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene., Mol. Cell. Biol., **24**, 3057–3067 (2004)

118) Yang Wang, Shi-Bin Hu, Meng-Ran Wang, Run-Wen Yao, Di Wu, Li Yangand Ling-Ling Chen, et al.
Genome-wide screening of NEAT1 regulators reveals cross-regulation between paraspeckles and mitochondria, Nature Cell Biology., **20**, 1145–1158 (2018)

119) Miha Modic, Markus Grosch,Gregor Rot,Silvia Schirge, Tjasa Lepko, Tomohiro Yamazaki, Flora C.Y. Lee, Ejona Rusha,Dmitry Shaposhnikov, Michael Palo, Juliane Merl-Pham, Davide Cacchiarelli, Boris Rogelj, Stefanie M. Hauck, Christian von Mering, Alexander Meissner, Heiko Lickert, Tetsuro Hirose, Jernej Ule, and Micha Drukker., et al.
Cross-Regulation between TDP-43 and Paraspeckles Promotes Pluripotency-Differentiation Transition, Molecular Cell., **74**, 1–15 (2019)

120) Grosch, M., Ittermann, S., Rusha, E., et al.
Nucleus size and DNA accessibility are linked to the regulation of paraspeckle formation in cellular differentiation., BMC Biol., **18**, (2020)

121) Mitschka, S., Mayr, C. et al.
Context-specific regulation and function of mRNA alternative polyadenylation. Nat Rev Mol Cell Biol, **23**, 779–796,(2022)

122) Rong Xiao, Chengping Li, Chao Wang, Yang Cao, Lichun Zhang, Yan Guo, Youzhi Xin, Haiyan Zhang and Guoli Zhou. et al.
Adipogenesis associated Mth938 domain containing(AAMDC) protein expression is regulated by alternativepolyadenylation and microRNAs., FEBS Letters **,593**, 1724–1734, (2019)

123) Xiangge Meng, Chengping Li, Yu Hei, Xiang Zhou, Guoli Zhou et al.
Comparative alternative polyadenylation profiles in differentiated
adipocytes of subcutaneous and intramuscular fat tissue in cattle., Gene**, 894**, 147949, (2024)

124) Hirose T, Virnicchi G, Tanigawa A, Naganuma T, Li R, Kimura H, Yokoi T, Nakagawa S, Bénard M, Fox AH, Pierron G. et al.
NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies., Mol Biol Cell.**, 25**, 169-83, (2014)

125) S. Mohammad Lellahi, Ingrid Arctander Rosenlund, Annica Hedberg, Liv Torill Kiær, Ingvild Mikkola, Erik Knutsen, Maria Perander et al.
The long noncoding RNA NEAT1 and nuclear paraspeckles are up-regulated by the transcription factor HSF1 in the heat shock response., Journal of Biological Chemistry**, 293**, 18965-18976, (2018)

126) Shinichi Nakagawa, Takao Naganuma, Go Shioi, and Tetsuro Hirose et al.
Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice, J. Cell Biol.**,** **193**, 31–39, (2011)

127) Maria A.R. Garofalo, Isis C. Kettelhut, Jos6 E.S. Roselino, Renato H. Migliorini et al.
Effect of acute cold exposure on norpinephrine turnover rates in rat
white adipose tissue, Journal of the Autonomic Nervous System**, 60**, 206-208, (1996)

128) Yasufumi Teramura, Akira Terao, Yuko Okada, Junichi Tomida, Yuko Okamatsu-Ogura and Kazuhiro Kimura et al.
Organ-specific changes in norepinephrine
turnover against various stress conditions in thermoneutral mice Journal of Veterinary Research**, 62**, 117-127 (2014)

129) Jason A. West, Christopher P. Davis, Hongjae Sunwoo, Matthew D. Simon, Ruslan I. Sadreyev, Peggy I. Wang, Michael Y. Tolstorukov, and Robert E. Kingston, et al.
The long noncoding RNAs NEAT1 and MALAT1 bind active chromatin sites, Mol Cell., **55**, 791–802 (2014)

130) Koji Kawasaki, Takashi Fukaya, et al.
Functional coordination between transcription factor clustering and gene activity, Mol Cell., **83**, 1605–1622 (2023)

131) Vallari Shukla, Anna Cetnarowska, Mette Hyldahl, and Susanne Mandrup, et al.
Interplay between regulatory elements and chromatin topology in cellular lineage determination, Trends in Genetics, **38**, 1048-1061 (2022)

132) Kathleen A. Burke, Abigail M. Janke, Christy L. Rhine, Nicolas L. Fawzi, et al.
Residue-by-Residue View of In Vitro FUS Granules that Bind the C-Terminal Domain of RNA Polymerase II, Molecular Cell, **60**, 231-241 (2015)

133) Ilmin Kwon, Masato Kato, Siheng Xiang, Leeju Wu, Pano Theodoropoulos, Hamid Mirzaei, Tina Han, Shanhai Xie, Jeffry L. Corden, Steven L. McKnight, et al.
Phosphorylation-Regulated Binding of RNA Polymerase II to Fibrous Polymers of Low-Complexity Domains, Cell, **155**, 1049-1060 (2013)

134) Shao, W., Bi, X., Pan, Y. et al.
Phase separation of RNA-binding protein promotes polymerase binding and transcription., Nat Chem Biol, **18**, 70–80 (2022)

10. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導・ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院薬学研究院 RNA 生物学研究室　中川真一 教授に深く感謝申し上げます。

また研究のみならず様々な場面において、ご助言・ご協力いただきました北海道大学大学院薬学研究院 RNA 生物学研究室 米田宏　講師、横井佐織　助教ならびに、栗原美寿々助教に深くお礼申し上げます。

本論文の副査としてご指導賜りました北海道大学大学院薬学研究院生化学研究室
木原　章雄 教授 ならびに佐々貴之 准教授に深く感謝申し上げます。

また共同研究として、RNA-seq のサンプル調整を行っていただいた、国立研究開発法人理化学研究所 岩崎 RNA システム生化学研究室 岩崎信太郎　先生ならびに水戸　麻理さん、寒冷刺激実験や体温測定にご協力いただいた山口良文先生、フローサイトメトリーや CL 投与実験など様々な実験においてご助言いただいた　北海道大学 大学院獣医学研究院 基礎獣医科学講座 生化学教室 岡松優子　准教授、鈴木美羅さんに深く感謝申し上げます。

また日々の研究室生活で支えてくれた北海道大学大学院薬学研究院 RNA 生物学研究室の全ての方に心から感謝申し上げます。

最後にこれまで温かく見守ってくれた家族に感謝いたします。

本研究は日本学術振興会による研究奨励金による支援のもと実施されました。