平成 30 年度 共同研究報告書

研究区分	一般共同研究	
研究課題	免疫応答に関わるアルギニン摂取を制御するノンコーディング RNA の作用機序の解明	
新規・継続の別	新規・継続	
研究代表者	所属	国立国際医療研究センター研究所
	職名・氏名	上級研究員・長沼 孝雄
研究分担者 (適宜行を追加して下さい)	所属	国立国際医療研究センター研究所
	職名・氏名	部長・松本 道宏
	所属	
	職名・氏名	
受け入れ教員	職名・氏名	教授・廣瀬 哲郎
概要 (100～150 字程度)	<p>本研究は、申請者が発見した長鎖ノンコーディング RNA である CAIRT が、標的遺伝子 CAT2 の転写を活性化する分子機構を明らかにすることを目的として実施した。本研究から、CAIRT が転写因子 HNF4α と相互作用することで CAT2 遺伝子の転写を活性化していることが明らかになった。</p>	
研究目的 (300 字程度)	<p>申請者は、これまでの研究からアミノ酸の一つであるアルギニンの細胞外から細胞内への取込みを促進し、細胞内アルギニン量を制御している長鎖ノンコーディング RNA として CAIRT (Cationic Amino acids Intake Regulated Transcript) を発見した。CAIRT は、ゲノム上近隣に位置するアルギニントランスポーター CAT2 遺伝子の転写を活性化することで、そのトランスポーター活性を上昇させ、アルギニンの細胞外から細胞内への取込みを促進し、細胞内アルギニン量を制御している。本研究では、CAIRT による CAT2 遺伝子の転写活性化の分子機構を明らかにすることを目的としている。</p>	
研究内容・成果 (1000 字程度)	<p>申請者はこれまでに CRISPRi/a 法を用いた CAIRT の機能喪失・獲得実験から、CAIRT がゲノム上近隣に位置する CAT2 遺伝子の転写を活性化することで、そのトランスポーター活性を上昇させ、アルギニンの細胞外から細胞内への取込みを促進し、細胞内アルギニン量を制御していることを明らかにしてきている。しかし、CAIRT がどのような作用機序で CAT2 遺伝子の転写活性化に寄与するかについては不明である。CAT2 によるアルギニン取込みの上昇と免疫応答の活性化が密接に関連していることや、多くのがん細胞が細胞外からのアルギニン取込みに依存して増殖・成長していることから、CAIRT による CAT2 遺伝子の転写活性化を介したアルギニン取込みに関わる分子機構を理解することは重要であるといえる。そこで、本研究では CAIRT による CAT2 遺伝子の転写活性化の分子機構を明らかにすることにした。</p> <p>CAIRT が、どのように作用することで CAT2 遺伝子の転写を活性化するのかを明らかにするために、CAIRT と協調して機能するタンパク質因子の探索を試みることにした。CAIRT は、肝</p>	

	<p>細胞において cAMP のシグナルに応答して発現誘導され、CAT2 遺伝子を活性化することから、CAIRT は肝細胞において cAMP 応答性転写因子と相互作用するのではないかと考えた。公共のデータベースに登録されている数種類の cAMP 応答性転写因子の ChIP-seq データを利用し、CAT2 遺伝子のプロモーター領域に結合するものを in silico で解析したところ、HNF4α がそこに結合することを見出した。そこで、HNF4α と CAIRT の間に相互作用があるのではないかと考え、検証を行った。肝細胞から HNF4α を免疫沈降したところ、CAIRT との共沈が確認された。また、in vitro で合成したビオチン化 CAIRT をベイトとして肝細胞核抽出液からプルダウンを行ったところ、HNF4α の共沈が確認された。これらの結果から、CAIRT は HNF4α と相互作用することで CAT2 遺伝子の転写を活性化に寄与することが示唆された。現在、CAIRT と HNF4α による CAT2 遺伝子転写の活性化について詳細な分子機構を明らかにするために、CAIRT ノックダウンによる CAT2 遺伝子プロモーター領域への HNF4α の結合の変化を ChIP 法により調査しているところである。また、in vitro RNA プルダウン法や ChIRP 法を用いて CAIRT と相互作用し、HNF4α と共に転写活性化複合体形成に関わるタンパク質因子の同定を試みているところである。</p>
<p>成果</p>	<p>【学会報告】</p> <p>参加者名、講演タイトル、学会名、開催場所、開催日時入力のこと 長沼 孝雄, 高橋 経太, 酒井 真志人, 満島 勝, 矢野 宏行, 松川 隼也, 春日 雅人, 松本 道宏, 「絶食応答性長鎖ノンコーディング RNA の代謝調節における役割の解明」, 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会, 東京国際フォーラム, 2018 年 5 月 24-26 日</p> <p>長沼 孝雄, 松川 隼也, 酒井 真志人, 満島 勝, 矢野 宏行, 春日 雅人, 松本 道宏 「絶食誘導性長鎖ノンコーディング RNA の代謝調節における役割の解明」, 第 41 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 2018 年 11 月 28-30 日</p> <p>【論文発表】</p> <p>著者、論文名、掲載誌名、号・年・ページ等、IF 入力のこと Yano H, Sakai M, Matsukawa T, Yagi T, Naganuma T, Mitsushima M, Iida S, Inaba Y, Inoue H, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y, Asahara SI, Kido Y, Minami S, Kasuga M, Matsumoto M, 「PHD3 regulates glucose metabolism by suppressing stress-induced signalling and optimising gluconeogenesis and insulin signalling in hepatocytes」, Sci Rep., 2018 Sep 24;8(1):14290, IF: 4.122</p> <p>【新聞報道】</p> <p>特になし</p>