

熱産生への関与が推測される RNA 結合タンパク質 MCRIP2 の機能解析

金野寛史¹⁾, 長谷川豊¹⁾, 那谷耕司²⁾, 石垣 泰¹⁾

¹⁾ 岩手医科大学医学部, 内科学講座糖尿病・代謝・内分泌内科分野

²⁾ 岩手医科大学薬学部, 病態薬理学講座臨床医化学分野

(Received on January 17, 2023 & Accepted on February 9, 2023)

要旨

褐色/ベージュ脂肪細胞は, 熱産生機構を備えた脂肪細胞で, 寒冷時の体温維持やエネルギー消費, 代謝調節に関わり, 肥満やそれに伴う代謝疾患の治療ターゲットとして注目されている. MAPK regulated corepressor interacting protein 2 (MCRIP2) は, 褐色脂肪細胞で高発現している蛋白で, この遺伝子をノックアウトしたマウスでは耐寒能が低下することが知られている. しかしながら, 未だ不明な点が多いため, その機能を明らかにするため研究を行った. *In*

vitro において *Mcrip2* 遺伝子をノックダウンした褐色脂肪細胞では, 細胞への分化・成熟には明らかな影響が認められなかったが, 脂肪細胞の熱産生に関する脱共役蛋白質 1 uncoupling protein 1 (*Ucp1*) 遺伝子の発現が低下していた. さらに, ミトコンドリア活性が低く, ミトコンドリア関連遺伝子の発現が低下していた. 以上から, MCRIP2 は, 褐色脂肪細胞における熱産生機能に重要な役割を果たしており, ミトコンドリア機能を制御していることが示唆された.

Key words : *MCRIP2, brown adipocyte, brown adipose tissue, thermogenesis*

I. 緒 言

ヒトを含めた哺乳類には白色脂肪細胞, 褐色/ベージュ脂肪細胞の 2 種類の脂肪細胞が存在する. 白色脂肪細胞は, 中性脂肪をエネルギー源として蓄えて必要時にエネルギーを供給する役割を果たしている. これに対して, 褐色/ベージュ脂肪細胞は, 脂質や糖質などのエネルギー源を利用し熱に変換する, 非ふるえ熱産生という機構を備えた脂肪細胞である. 寒冷環境下における体温維持に関与するのみならず, 全身のエネルギー代謝や体脂肪量の調整にも関わるた

め, 肥満やそれに伴う代謝疾患の治療ターゲットとして注目されている¹⁾. 従来, ヒトの褐色/ベージュ脂肪細胞は新生児にのみ存在し, 成長に伴い機能しなくなると考えられていた. しかし, 現在では成人でもその存在が確認されており, 寒冷曝露により活性化することがわかっている. 夏季よりも冬季に活性化することが報告されており, 寒冷刺激が重要な誘導因子であることが分かる²⁻⁶⁾. この褐色/ベージュ脂肪細胞の熱産生プロセスは, ミトコンドリア内膜における uncoupling protein 1 (UCP1) の活性化により媒介されている⁷⁾. 褐色脂肪細胞の形成に関連する因子にペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (peroxisome proliferator-

Corresponding author: Yasushi Ishigaki
ishigaki@iwate-med.ac.jp

activated receptor; PPAR)があり, その中でも peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG)は脂肪細胞への分化の際に *UCPI* 発現を誘導し, 脂肪細胞の褐色脂肪細胞への分化を促す⁸⁾. その他にも褐色脂肪細胞の活性化に関わる因子はいくつか知られているが, まだ未知の部分が多い.

RNA 結合タンパク質 (RNA binding protein; RBP)は, 遺伝子発現からタンパク質翻訳まで RNA 代謝の機能を制御し, 無数の細胞プロセスを調整している. インタラクトームキャプチャーと呼ばれる解析方法により, これまで知られていなかった多数の RBP が特定された⁹⁾. 褐色脂肪細胞に関わる RBP の中に MAPK regulated corepressor interacting protein 2 (MCRIP2)があり, 熱産生機構への関与が示唆されているが, まだ十分に研究が進んでおらず不明な点が多い. この MCRIP2 の機能を解明し, 全身代謝へ及ぼす役割を明らかにする.

II. 研究材料及び方法

1. 細胞株

マウス褐色脂肪前駆細胞は Kajimura Lab (ボストン, マサチューセッツ, アメリカ)で樹立されたものを, 梶村真吾先生より供与いただいた. 37°C, 5% CO₂ の加湿環境で 10% ウシ胎児血清 (サーモフィッシャー, ウォルサム, マサチューセッツ, アメリカ), ペニシリン 100 unit/ml (ライフテクノロジー, カールスバッド, カリフォルニア, アメリカ), アムホテリシン B 100 unit/ml (富士フィルム, 東京), 1% GlutaMAX (サーモフィッシャー)を含むダルベッコ改変イーグル培地 (シグマアルドリッチ, セントルイス, ミズーリ, アメリカ)を使用して培養し, 1日置きに培地を交換した. 成熟褐色脂肪細胞への分化は, 細胞がコンフルエントになった後に分化誘導培地 (10% ウシ胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル培地, 10 nM T3, 50 µg/ml インスリン, 1 µM デキサメ

タゾン, 0.125 mM インドメタシン)で 48 時間培養することで行った. 2日目以降は1日置きに維持培地 (10% ウシ胎児血清含有ダルベッコ改変イーグル培地, 10 nM T3, 50 µg/ml インスリン)を交換し, 分化誘導培地交換から 8 日目まで培養した.

2. Quantitative real time PCR (qRT-PCR)

のための細胞, 組織からの mRNA 抽出 細胞では分化誘導から 8 日目に培地を吸引後, 培養皿に TRIzol Reagent (サーモフィッシャー)を加え, ピペッティングを行いチューブに回収した. 組織では摘出後に液体窒素で凍結し, ホモジナイズしてから TRIzol を加え, 全 RNA を抽出した. mRNA 濃度はナノドロップライト (サーモフィッシャー)で測定した. iScript Reverse Transcription Supermix (バイオラッド, ハーキュリーズ, カリフォルニア, アメリカ)を使用して 500 ng の mRNA から cDNA を作製した. qRT-PCR は SsoFast EvaGreen Supermix (バイオラッド)を使用し Light Cycler 96 (日本ジェネティクス, 東京)で測定した. 遺伝子発現は *36b4* 遺伝子, あるいは *Tbp* 遺伝子で正規化した. 使用したプライマーの配列は, 5' から 3' 方向に, フォワード, リバーズの順で, *Mcrip2* が TTCTGGGCCAAGACTTGTATTC, AAATCGGACGTTCTCCTCGTG, *Tbp* が AGAACATCCAGACTAGCAGCA, GGGAACCTCACATCACAGCTC, *36b4* が AGATTCGGGATATGCTGTTGGC, TCGGGTCCTAGACCAGTGTTTC である.

3. 実験動物

全てのマウス実験は熊谷重安商店 (宮城) から購入した C57BL/6J の雄マウスを使用した. 飼育は 24°C, 12 時間毎の明暗サイクルの環境で行われた. 実験は, 岩手医科大学の動物実験委員会により, 承認番号 30-030, 「MCRIP2 が肥満と糖・脂質代謝に及ぼす役割の解明」として承認を得た.

4. マウスの寒冷刺激

上記のマウスを12週齢0日の9時から、最小限の床敷を残して4℃のインキュベーター内で3日間飼育した。3日経過したところで褐色脂肪組織、単径部白色脂肪組織、精巣上体白色脂肪組織、肝臓を摘出し、凍結保存した後にmRNAを抽出した。

5. *Mcrip2* のノックダウン

褐色脂肪細胞における *Mcrip2* のノックダウンは、Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (サーモフィッシャー) を使用した。siRNA は、10 μ M のストックをプロトコルに従い調整し、3種を併用した。配列は5' から3' 方向に、フォワード、リバースの順で、1つ目はGCCAACAUUUGGACUUUUGCACCTG, CAGGUGCAAAGUCCAAAUGUUGGCAC, 2つ目はGACUUGUAUUCAAUCGAGUAAA CGG, CCGUUUACUCGAUUGAAUACAAGU CUU, 3つ目はGUUUCUGGCUAAAAUCACC AACUGT, ACAGUUGGUGAUUUUAGCCAG AAACUGである。コントロールとして、Negative Control DsiRNA (Integrated DNA Technologies, コーラルビル, アイオワ, アメリカ) を用いた。褐色脂肪細胞がコンフルエントになり、分化誘導を行ってから4日目にトランスフェクションを行い、6日目に培養液を交換し、8日目に細胞を回収した。

6. 細胞の低温培養

分化誘導から6日目の褐色脂肪細胞を使用した。6日目から8日目の9時から12時、14時から17時、19時から22時は32℃で培養し、それ以外は37℃で培養した。培地交換は偶数日の12時から14時の間に行った。8日目の22時に上述の方法でmRNAを抽出した。

7. ミトコンドリア染色

分化誘導から8日経過した褐色脂肪細胞に対し、MitoTracker Red CMXRos (サーモフィッシャー) を使用した。培地に100 nM となるよう同薬を加え37℃で30分間培養した後に、4%

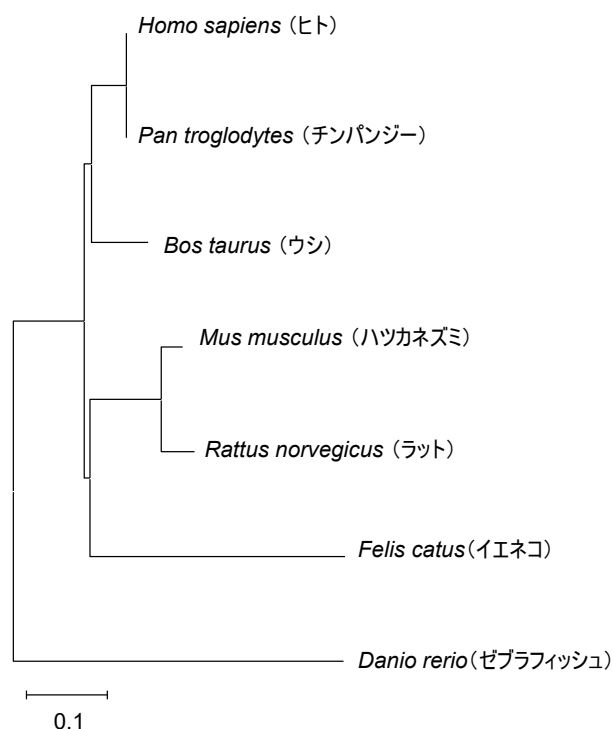


図1. MCRIP2の系統樹解析

パラホルムアルデヒドを使用して固定した。4', 6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) 0.5 μ g/dl で染色後にカバーガラスで被覆し、HS オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000 (キーエンス, 大阪) で観察, 撮影した。

8. 画素値の計測

蛍光顕微鏡で撮影した画像を、コントロールと *Mcrip2* をノックダウンしたものそれぞれ4枚ずつ、画像処理ソフトウェア (ImageJ, <https://imagej.net/Fiji>) で解析した。

9. 統計解析

2群間の比較は、等分散を仮定したt検定で分析し、 $p < 0.05$ を有意とした。統計解析はエクセル統計 (BellCurve, 東京) を使用して行った。

III. 結 果

mRNA インタラクトームキャプチャーにより検出され、未だ機能が明らかになっていないRBPの中から、褐色脂肪細胞で発現の高いMCRIP2を研究対象とした。ヒトMCRIP2遺

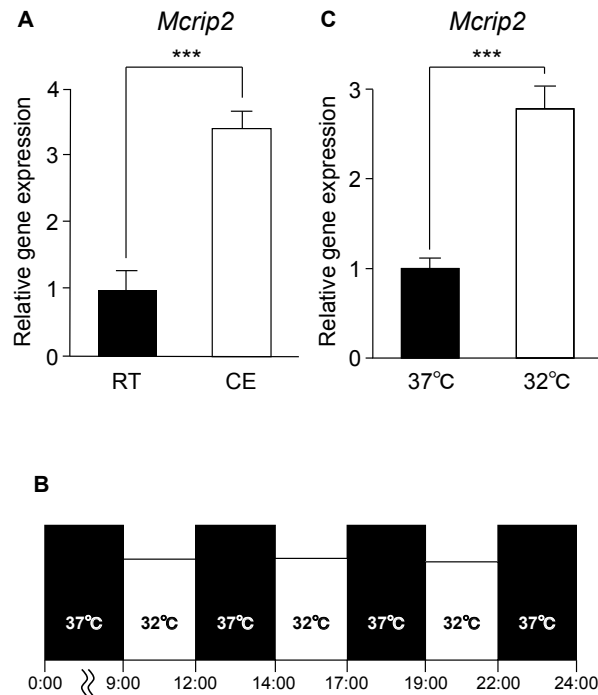


図2. 寒冷刺激が褐色脂肪細胞の *Mcrip2* 遺伝子発現に与える影響

- A. 寒冷刺激を行ったマウス (cold exposure; CE) の BAT における *Mcrip2* 遺伝子の発現を, 室温のみで飼育したマウス (room temperature; RT) を基準として示した. 12 週齢の雄マウスをそれぞれ 6 匹ずつ使用し, 12 週齢となった時点から 3 日間, 4°C で飼育後に臓器を摘出した. RT; room temperature, CE; cold exposure, ***; $p < 0.001$.
- B. 低温培養のスケジュール. 褐色脂肪細胞を分化誘導後 6 日目から 8 日目まで, 間欠的に 32°C の環境で培養した. 9 時から 12 時, 14 時から 17 時, 19 時から 22 時は 32°C で培養し, それ以外の時間は 37°C で培養した.
- C. 低温培養を行った褐色脂肪細胞における *Mcrip2* 遺伝子の発現. 分化誘導から 8 日目に mRNA を抽出した.

伝子は 16 番染色体上に存在し, 160 のアミノ酸をコードする 5 つのエクソンを含む. 別名 *FAM195A* としても知られており, 褐色脂肪組織の他, 心臓や腎臓で発現が高い. 系統樹解析を行った所, ヒト *MCRIP2* 遺伝子はチンパンジーと極めて高い類似性があり, マウス, ラットとも高い類似性を示し, 哺乳類で広く保存されていることが判明した (図 1).

MCRIP2 遺伝子は, 熱産生機能を有する褐色脂肪細胞で発現が高く, *Mcrip2* をノックアウトしたマウスでは耐寒能が低下する¹⁰⁾. そのため熱産生に関わると考えられ, 寒冷刺激によりその発現が亢進するのかを検討した. 寒冷刺激を与えたマウスの臓器を摘出し, qRT-

PCR で *Mcrip2* の発現を比較した. 寒冷刺激を与えたマウスでは室温で飼育したマウスよりも有意にその発現が亢進していた (図 2-A). *in vitro* でも同様の変化が見られるか調べるため, 褐色脂肪細胞を間欠的に 32°C の低温環境に暴露させた (図 2B). 37°C で培養したものと qRT-PCR で比較し, 低温暴露群で *Mcrip2* の発現は亢進していた (図 2C).

次に, 褐色脂肪細胞における *MCRIP2* の機能と役割を解析するため, small interfering RNA (siRNA) 法により褐色脂肪細胞で *Mcrip2* 遺伝子をターゲットとした特異的ノックダウンを行った. *Mcrip2* 遺伝子のノックダウンによりコントロールと比較して, *Mcrip2*

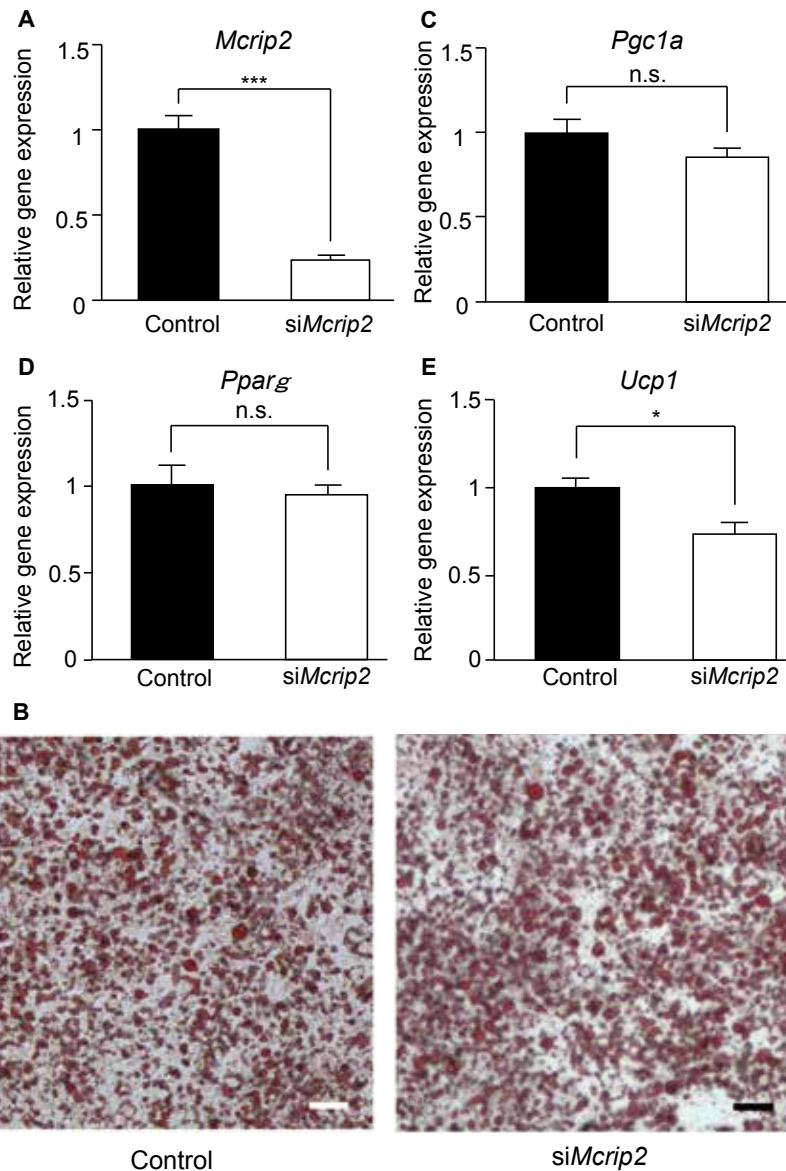


図3. *Mcrip2* 遺伝子のノックダウンが成熟褐色脂肪細胞の形態とミトコンドリア機能に及ぼす役割の解明.
 A: *Mcrip2* の発現をコントロールを基準に示した. ***, $p < 0.001$.
 B: *Mcrip2* をノックダウンした成熟褐色脂肪細胞をオイルレッドOで染色し, 蛍光顕微鏡の400倍で撮影した. スケールバーは $100\mu\text{m}$ を表す.
 C: *Pgc1a* の発現をコントロールを基準に示した. n.s.; not significant.
 D: *Pparg* の発現をコントロールを基準に示した.
 E: *Ucp1* の発現をコントロールを基準に示した. *, $p < 0.05$.

遺伝子の発現を特異的に約70%抑制していることが確認できた(図3A). ノックダウンした褐色脂肪細胞をオイルレッドO染色で観察したところ, 細胞の形態に明らかな差はなかった(図3B). また, 脂肪細胞分化の主要な規定

因子である peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (*Pgc1a*) 遺伝子, peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*Pparg*) 遺伝子の発現にも有意な差は見られなかった(図3C,D). しかしながら, ノッ

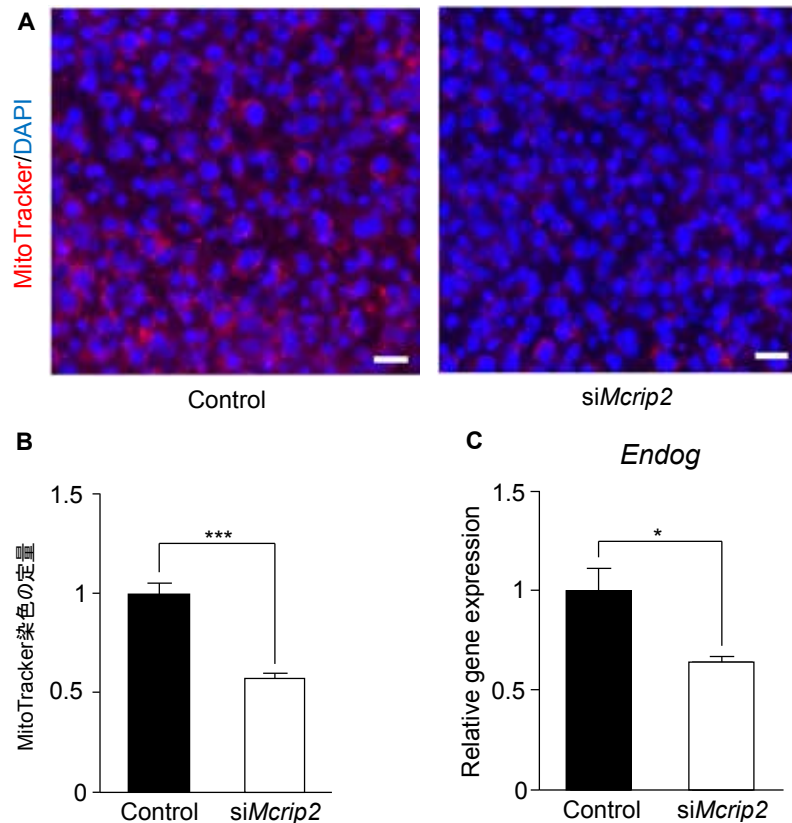


図4. *Mcrip2* のノックダウンが褐色脂肪細胞のミトコンドリア機能に与える影響。

A: 蛍光顕微鏡で撮影した. 赤が MitoTracker, 青が DAPI を示す. スケールバーは $20\mu\text{m}$ を表す.

B: 赤の画素値を計測し, コントロールを基準に示した. ***, $p < 0.001$.

C: *Endog* の発現をコントロールを基準に示した. *, $p < 0.05$.

クダウンにより *Ucp1* 遺伝子の発現は有意に低下していた (図 3E). このことから, *Mcrip2* 遺伝子は褐色脂肪細胞の分化に必須ではないが, UCP1 を介した脂肪細胞の熱産生を規定していることが示唆された.

UCP1 は, 褐色脂肪細胞のミトコンドリア内膜上に高発現し, 酸化リン酸化反応を脱共役させて, 熱を産生する役割を担っている¹⁾. そのことから, ミトコンドリア機能を規定していると考えられ, ミトコンドリア膜電位依存プローブである MitoTracker により染色を行った. MitoTracker 染色では, 膜電位の低下に伴い輝度が低下する. *Mcrip2* 遺伝子をノックダウンした褐色脂肪細胞では輝度が低いことから, ミトコンドリア機能が低下していることが示された (図 4A, B). さらに, ミトコンドリア

ア関連遺伝子である Endonuclease G (*Endog*) 遺伝子の発現が低下していた (図 4C). 以上から, MCRIP2 は, 褐色脂肪細胞における UCP1 を介した熱産生を規定し, ミトコンドリア機能を制御していることが明らかとなった.

IV. 考 察

肥満人口の増加は, 世界的な問題である. 肥満は, 2 型糖尿病や高血圧症を始めとした様々な代謝疾患の原因となり, 個人の生活の質を低下させ, また医療全体として医療費を増大させる要因となる¹¹⁾. 肥満の改善には, 食事療法, 運動療法, 行動療法などが推奨されている. 実際には, 減量目標を達成できない場合も多く, 効果的な治療法の開発が模索されている. 褐色脂肪細胞は, ミトコンドリアに富み, 熱産生の

際にグルコースや脂肪酸が消費されるため、インスリン抵抗性の改善や血糖変動を緩和する役割を果たしている¹²⁾。ヒトにおける褐色脂肪細胞の量は、BMI、内臓脂肪の量と逆相関することが報告されている^{2,4)}。また、マウスで褐色脂肪組織 (brown adipose tissue; BAT) を切除するとインスリン抵抗性が上昇し肥満が助長され、逆に BAT を移植すると体重が減少しインスリン抵抗性と糖代謝が改善する¹³⁾。このように、褐色脂肪細胞は肥満に大きく関わり、それを活性化させる因子の発見は肥満の病態解明、治療に繋がる¹⁴⁾。

全身で *Mcrip2* 遺伝子をノックアウトしたマウスは、耐寒能が低下し、寒冷曝露により低体温症を発症しやすくなることが報告されている¹⁰⁾。今回 *in vivo* で寒冷刺激を与えたマウスの BAT と、*in vitro* で低温培養した褐色脂肪細胞で *Mcrip2* の発現が亢進していたことから、MCRIP2 が熱産生のプロセスに関与することが示唆された。*in vitro* において *Mcrip2* をノックダウンした褐色脂肪細胞では、分化や形態に異常は見られなかったが、*Ucp1* 遺伝子の発現が低下していた。MCRIP2 は熱産生において重要な役割を果たす UCP1 を規定している。

MitoTracker 染色では、*Mcrip2* ノックダウン群で輝度が低下しており、ミトコンドリア機能の低下を示した。またミトコンドリアに局在

し、ミトコンドリア DNA の複製を調整するとされる *Endog* 遺伝子の発現が低下していた^{15,16)}。褐色脂肪細胞の熱産生という特徴的な機能は、褐色脂肪細胞のミトコンドリア内膜に特異的な UCP1 に依存している。ミトコンドリア機能の低下は、熱産生能の低下だけでなく、グルコース、脂肪酸の消費を低下させ、代謝を悪化させる。MCRIP2 は、ミトコンドリアが正常に機能するために必要な因子であり、ミトコンドリアの調整を介して UCP1 の発現に関わると推測した。褐色脂肪細胞における熱産生機能に関与している MCRIP2 は、糖・脂質代謝を規定し、肥満を制御する重要な蛋白である可能性がある。今回の研究では、MCRIP2 機能を低下させることによる影響を解析したが、今後、機能を亢進させることでどのような影響があるのかを解析する必要がある。MCRIP2 機能を亢進させることで、熱産生能の活性化など、代謝改善効果が得られれば、肥満治療の重要なターゲットとなりうる。また、MCRIP2 の作用経路を明らかにできれば、肥満の病態解明に繋がると考えられる。

稿を終えるにあたり本研究に関わった研究協力者の方々に感謝いたします。

利益相反：著者らには開示すべき利益相反はない。

References

- 1) **Kajimura S and Saito M:** A new era in brown adipose tissue biology: molecular control of brown fat development and energy homeostasis. *Annu Rev Physiol* **76**, 225-249, 2014.
- 2) **Cypess AM, Lehman S, Williams G, et al.:** Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* **360**, 1509-1517, 2009.
- 3) **Lichtenbelt WD, Vanhommelrig JW, Smulders NM, et al.:** Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* **360**, 1500-1508, 2009.
- 4) **Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, et al.:** High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* **58**, 1526-1531, 2009.
- 5) **Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, et al.:** Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* **360**, 1518-1525, 2009.

- 6) **Worku MG, Seretew WS, Angaw DA, et al.:** Prevalence and associated factor of brown adipose tissue: systematic review and meta-analysis. *Biomed Res Int*, <https://doi.org/10.1155/2020/9106976>, 2020.
- 7) **Sidossis L and Kajimura S:** Brown and beige fat in humans: thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis. *J Clin Investig* **125**, 478-486, 2015.
- 8) **Chang JS and Ha K:** A truncated PPAR gamma 2 localizes to mitochondria and regulates mitochondrial respiration in brown adipocytes. *PLoS ONE* **13**, e0195007, 2018.
- 9) **Castello A, Fischer B, Eichelbaum K, et al.:** Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell* **149**, 1393-1406, 2012.
- 10) **Cannavino J, Shao M, An YA, et al.:** Regulation of cold-induced thermogenesis by the RNA binding protein FAM195A. *Proc Natl Acad Sci* **118**, e2104650118, 2021.
- 11) **Engin A:** The definition and prevalence of obesity and metabolic syndrome. *Adv Exp Med Biol* **960**, 1-17, 2017.
- 12) **Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, et al.:** Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med* **17**, 200-205, 2011.
- 13) **Stanford KI, Middlebeek RJ, Townsend KL, et al.:** Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest* **123**, 215-223, 2013.
- 14) **Raiko J, Holstila M, Virtanen KA, et al.:** Brown adipose tissue triglyceride content is associated with decreased insulin sensitivity, independently of age and obesity. *Diabetes Obes Metab* **17**, 516-519, 2015.
- 15) **Li LY, Luo X and Wang X:** Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95-99, 2001.
- 16) **Sharma P and Sampath H:** Mitochondrial DNA integrity: role in health and disease. *Cells* **8**, 100, 2019.

Functional analysis of the RNA binding protein MCRIP2

Hirofumi KINNO¹⁾, Yutaka HASEGAWA¹⁾,
Koji NATA²⁾ and Yasushi ISHIGAKI¹⁾

¹⁾Division of Diabetes, Metabolism and Endocrinology,
Department of Internal Medicine, School of Medicine,
Iwate Medical University, Yahaba, Japan

²⁾Division of Medical Biochemistry, Department of Pathophysiology and
Pharmacology, School of Pharmacy,
Iwate Medical University, Yahaba, Japan

(Received on January 17, 2023 & Accepted on February 9, 2023)

Abstract

Brown adipocytes have a thermogenic function and are involved in maintaining body temperature when cold, regulating energy consumption and metabolism. These functions are attracting attention as therapeutic targets for obesity and associated metabolic diseases. Deficiency of MAPK regulated corepressor interacting protein 2 (MCRIP2), a highly expressed gene in brown adipocytes, attenuated cold tolerance in mice. Cellular knockdown of *Mcrip2*

in brown adipocytes had no apparent effect on the differentiation of progenitor cells to mature cells. On the other hand, expressions of mitochondria-related genes and mitochondrial glycolysis were both significantly reduced. Taken together, these observations suggest that MCRIP2 plays an important role in maintaining normal mitochondrial function.
