

**第 6 回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 –**  
**研究成果報告書（追加助成） <概要>**

<b>所 属</b>	群馬大学 生体調節研究所 代謝シグナル解析分野
<b>氏 名</b>	河野 大輔
<b>研究テーマ</b>	FTO によるエネルギー恒常性制御機構の解明

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを 1 ページにまとめてください。（図表、写真などの貼付を含む）

FTO タンパクは、N6 メチルアデノシ(m6A)修飾の脱メチル化酵素として機能する。m6A 修飾は、RNA の安定性や選択的スプライシングのされやすさなどに影響する修飾である。Fto の全身性や中枢特異的な欠損マウスが体重減少を呈し、全身性の過剰発現マウスが、肥満の表現型を呈することから、おもに脳における Fto の発現が、体重の調節を担っていると考えられている。一方で、FTO が体重調節を担う脳の領域は、いまだ不明である。そこで本研究では、視床下部摂食代謝中枢に分布する FTO に焦点を当て、分布の詳細や体重や代謝の調節における役割を調べた。

Fto-lacZ マウスを使い検討したところ、Fto は、NPY/AgRP ニューロンの 85%に発現しており、視床下部摂食代謝中枢の中でも NPY/AgRP ニューロンに、特に豊富に発現していることが明らかになった。視床下部摂食代謝中枢を構成する各神経核やニューロン群特異的 Fto 欠損マウスを作成し、体重を測定することにより Fto が体重調節を担う視床下部領域を調べた。AgRP ニューロン特異的 FTO 欠損マウスのオスが体重減少を示すのに対し、視床下部摂食代謝中枢を構成する他の領域特異的な FTO 欠損マウスは体重の変化を示さなかった。したがって、視床下部摂食代謝中枢の中でも NPY/AgRP ニューロンの FTO が体重調節を担うことが明らかになった。

そこで、AgRP ニューロン特異的 FTO 欠損マウスの表現型の詳細を解析した。AgRP ニューロン特異的 Fto 欠損マウスは、5 週齢から有意な体重減少を呈した。摂食量や暗期はじめの摂食行動が低下したのに対し、酸素消費量には違いがなかったため、摂食行動の低下が体重減少の原因であると考えられる。また、呼吸商が低下しており、エネルギー消費における脂質利用の割合の増加が示唆された。また、血液中の遊離脂肪酸濃度が低下したことから、血液中の脂質の利用が増加していると考えられた。一般に、食事から摂取した栄養素のうち、糖が脂肪より優先して利用されることが知られているが、NPY/AgRP ニューロンの FTO は、このような糖の優先利用に必須の役割をしており、脂質を効率的に蓄積することを可能にさせていると考えられる。

これらのことから、NPY/AgRP ニューロンの機能の低下が推測される。そこで分子機序の検討のため、FTO により脱メチル化される m6A 修飾の網羅的解析 (m6A-seq) や、RNA 発現の網羅的解析 (RNA-seq) を行った。FTO は、エクソンやイントロン領域の m6A 修飾を主に脱メチル化しており、軸索伸長や膜輸送、選択的スプライシングに関わる遺伝子の m6A 修飾の脱メチル化を行っていることが明らかになった。また、FTO により脱メチル化される遺伝子のほとんどは RNA 発現の変化を示さなかった。RNA 発現が変化した遺伝子にも、軸索伸長や膜輸送、選択的スプライシングに関わる遺伝子が多く含まれていた。

そこで、AgRP ニューロン特異的 Fto 欠損マウスの軸索密度や顆粒密度を測定したところ、弓状核や投射先である室傍核において低下していることが確認できた。また、選択的スプライシングについては、FTO が脱メチル化する m6A 修飾領域にスプライシングバリエーションを持つ遺伝子が複数存在し、スプライシングバリエーション比が Fto 欠損マウスで変化していた遺伝子が存在していた。

これらのことから、AgRP ニューロンにある FTO が正常な体重の調節に必須な役割を担っていることが明らかになった。AgRP ニューロンにある FTO は、軸索伸長や軸索輸送、選択的スプライシングに関わる遺伝子を主な標的としており、m6A の脱メチル化を介して AgRP ニューロンの軸索伸長や輸送を促進することにより、摂食行動や効率的な栄養素の利用の促進に働いている可能性がある。

**第 6 回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 –**  
**研究成果報告書（追加助成） <詳細>**

<b>所 属</b>	群馬大学 生体調節研究所 代謝シグナル解析分野
<b>氏 名</b>	河野 大輔

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

**<背景・目的>**

FTO (Fat mass and obesity-associated protein) は、イントロンに、肥満と非常に関連度の高い複数の一塩基多型 (SNP) を含むことで有名な肥満関連遺伝子である (Science. 2007, 316(5826):889-94)。ただし、これらの SNP を含む領域は、エンハンサーとして近傍の肥満関連遺伝子の発現促進に働いており、SNP は、エンハンサーとしての働きを変化させることにより周囲の肥満関連遺伝子の発現に影響を与え、肥満のなりやすさに影響を与えていると考えられている (Nature. 2014 507(7492):371-5)。したがって、Fto 遺伝子の SNP による体重増加には、FTO タンパクは直接的には関わっていない。一方で、SNP とは独立して、FTO タンパクも体重調節に非常に重要な役割を果たしていることが知られている。SNP の領域の遺伝子配列は変えずに全身性に FTO を欠損させたマウスでは体重や成長の低下が見られるのに対し (Nature. 2009 458(7240):894-8)、FTO の過剰発現マウスは、導入した Fto cDNA のコピー数が多いほど肥満になることが報告されている (Nat Genet. 2010 42(12):1086-92)。したがって、FTO が増えると肥満、減ると体が小さくなると思われる。また、興味深いことに、神経特異的な Fto 欠損マウスが、全身性の欠損マウスに類似して、体重減少を呈することも報告されている (PLoS One. 2010 5(11):e14005)。したがって、脳における FTO が体重の調節に重要な役割を果たしていると考えられる。一方で、脳のどこの領域で FTO が体重調節を担っているかは、いまだ不明である。FTO タンパクは、RNA のアデニンのメチル化修飾である N6-メチルアデノシン (m6A) 修飾の脱メチル化酵素として機能することが知られている。m6A 修飾は、RNA の安定性や選択的スプライシングなどに影響することが知られている。そこで我々は体重調節に重要な脳領域である視床下部摂食代謝中枢の FTO に注目し、体重調節における FTO の役割と、その m6A 修飾を介した分子機構を明らかにすることを目的とした。

**<研究方法・結果>**

まず、視床下部における FTO の分布を調べた。Fto の in situ ハイブリダイゼーションを行ったところ、FTO は、弓状核、室傍核、腹内側核に豊富に発現していた。そこで、弓状核の特定のニューロンとの共局在を調べた。Fto 遺伝子の発現にともない LacZ を発現する Fto-lacZ マウスと Npy-hrGFP マウスまたは POMC-GFP マウスと掛け合わせたマウスを作成し、脳切片を X-gal 染色したところ、FTO は、NPY/AgRP ニューロンの 85%、POMC ニューロンの 63% に共局在していた。これらのことから FTO は、視床下部摂食代謝中枢ニューロンに広く発現していることが明らかになった。

次に、視床下部摂食代謝中枢における FTO タンパクの役割を明らかにするために、摂食代謝中枢を構成する各神経核・神経群特異的に Fto 欠損マウスを作成した。AgRP ニューロン特異的 Fto 欠損マウスは、5 週齢から有意な体重減少を呈したのに対し、POMC ニューロン特異的 Fto 欠損マウスや室傍核特異的 Fto 欠損マウス、腹内側核特異的 Fto 欠損マウスは体重の変化は示さなかった。したがって、FTO による体重調節作用の少なくとも一部は、AgRP ニューロンにある FTO により担われていることが明らかになった。そこで AgRP ニューロン特異的 Fto 欠損マウスの詳細を解析した。AgRP ニューロン特異的 Fto 欠損マウスは、体脂肪率や脂肪組織重量が低下していたのに対し、体長は変化していなかった。したがって、脂肪量の減少によ

る痩せが起こっていることが明らかになった。AgRP ニューロン特異的 Fto 欠損マウスは、摂食量が減少していた。詳細に摂食行動を調べると、暗期のはじめの摂食行動が低下していた。一方で、酸素消費量には違いがなかったため、摂食量の減少により体重減少が引き起こされたと考えられる。また、呼吸商が低下しており、血液中の遊離脂肪酸濃度も有意に低下していた。エネルギー源として脂肪利用の割合が増えており、食事から得た脂肪がより多く使われているため、血液中の遊離脂肪酸が低下したと考えている。

このような摂食行動や代謝の表現型は、NPY/AgRP ニューロンの機能低下が原因であると推測される。そこで分子機序を明らかにするため、AgRP ニューロン特異的 Fto 欠損マウスの弓状核組織から抽出した RNA を用いて、抗 m6A 抗体を用いた免疫沈降とそれ続く次世代シーケンサー解析(m6A-seq)および RNA 発現解析(RNA-seq)を行った。その結果、AgRP ニューロンにおいて、FTO は特に、エクソンやイントロン領域にある m6A 修飾を脱メチル化することが明らかになった。一般に、これらの領域の m6A 修飾は、選択的スプライシングのされやすさに影響することが知られているが、それと一致して、FTO により脱メチル化される遺伝子としては、スプライシングバリエーションを持つ遺伝子が多く含まれていた。また、機能としては、神経成長や膜輸送、選択的スプライシングの調節に関わる遺伝子多く含まれていた。RNA-seq の結果についても重ねて解析すると、m6A-Seq で FTO の標的であると見いだされた遺伝子の 1 割程度しか、遺伝子発現の変化を起こさなかった。このことは、一般に、m6A 修飾は、RNA 量ではなく、タンパク量に影響していることと一致するものであった。また、遺伝子発現が変化した遺伝子には、軸索誘導シグナリングや選択的スプライシング、生体膜に関わる遺伝子が多く含まれていた。これらのことから、AgRP ニューロンにおける FTO による m6A の脱メチル化は、軸索伸長や膜輸送、選択的スプライシングに関わる遺伝子の m6A 修飾と発現レベルを、直接的または間接的に制御していることが明らかになった。

そこで、実際に、軸索伸長や膜輸送、選択的スプライシングが Fto 欠損マウスで変化しているか調べた。抗 NPY 抗体を視床下部を免疫染色すると、主に、軸索にある NPY が染色されることが報告されている。そこで抗 NPY 抗体を用いて免疫染色したところ、AgRP ニューロン特異的 Fto 欠損マウスの弓状核や室傍核において、軸索 NPY 密度が低下していることが見出された。したがって、軸索密度または軸索輸送が低下していることが示唆された。また、NPY や AgRP などの神経伝達物質の輸送を担う有芯小胞を染色したところ、AgRP ニューロン特異的 Fto 欠損マウスの弓状核や室傍核で低下していることが明らかになった。また、また、NPY-hrGFP マウスと掛け合わせた AgRP ニューロン特異的 Fto 欠損マウスにおいて、hrGFP により示される神経線維密度が弓状核や室傍核で低下していた。これらのことから、AgRP ニューロン特異的 Fto 欠損マウスでは、弓状核や室傍核において、NPY などの分泌顆粒が低下しており、分泌が低下している可能性があることが示唆された。また、選択的スプライシングの変化については、FTO の標的となる m6A 領域において、PCR で調べたところ、複数の遺伝子でスプライシングバリエーションになっていることが明らかになった。さらに、デジタル PCR を用いて、スプライシングバリエーションの割合の変化を調べたところ、Fto 欠損マウスにおいて、スプライシングバリエーション比が変化している遺伝子が存在していた。

#### <考察>

本研究により、AgRP ニューロンにある FTO が正常な体重の調節に必須な役割を担っていることが明らかになった。AgRP ニューロンにある FTO は、軸索伸長や軸索輸送、選択的スプライシングに関わる遺伝子を主な標的としており、m6A の脱メチル化を介して AgRP ニューロンの軸索伸長や輸送を促進することにより、摂

目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

食行動や効率的な栄養素の利用の促進に働いている可能性がある。

**<今後の課題>**

FTO による m6A 修飾の脱メチル化により、RNA が実際にはどのように変化しているのか具体的に明らかにしたい。いくつかの遺伝子については、ついでに、スプライシングバリエーションの割合が変化していることを見出し、この変化が機能にどのように影響するか明らかにしたい。また、過剰発現で肥満になることが報告されていることから、AgRP ニューロン特異的な FTO の過剰発現でも表現型が現れる可能性があり、現在、実験準備中である。

第 6 回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 –

研究成果報告書（追加助成） <発表実績/予定一覧>

所 属	河野 大輔
氏 名	FTO によるエネルギー恒常性制御機構の解明

**1. 論文発表実績**

- ・ 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。
- ・ 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。
- ・ 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。
- ・ 国内外雑誌を問わない。
- ・ 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。
- ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。

① <論文 PDF 添付あり>

1	
2	
3	
4	

② <論文 PDF 添付なし>

1	
2	
3	

<b>2. 学会発表実績</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。</li> <li>・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。</li> <li>・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。</li> <li>・ 国内外を問わない。</li> <li>・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul>		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2019年11月	第40回日本肥満学会、河野 大輔、川端 麗香、西山 正彦、佐々木 努、北村 忠弘、視床下部の FTO による体重調節機構
2	2018年10月	第39回日本肥満学会、河野 大輔、川端 麗香、西山 正彦、佐々木 努、北村 忠弘、視床下部の FTO による m6A 修飾を介した体重調節機構
3	2018年8月	日本 DOHaD 学会、河野 大輔、川端 麗香、西山 正彦、北村 忠弘、視床下部における FTO と m6A 修飾の役割
4	2018年5月	エピジェネティクス研究会、河野 大輔、川端 麗香、西山 正彦、北村 忠弘、FTO による m6A 修飾の制御と体重調節
<b>3. 投稿、発表予定（投稿中の論文も含める）</b>		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2019年1月	日本糖尿病・肥満動物学会
2	論文投稿準備中	
3		
4		