

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22651

研究課題名（和文）冬眠様選択的スプライシング調節による低温ショックタンパク質の機能の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the function of cold shock protein by the regulation of alternative splicing

研究代表者

堀井 有希 (Horii, Yuuki)

岐阜大学・糖鎖生命コア研究所・助教

研究者番号：20888531

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ハムスター等の冬眠する哺乳動物は、冬眠中に極度の低体温に陥るにも関わらず低体温による障害が起こらない。これまでの研究により、冬眠動物であるシリアンハムスターにおいて、Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) の選択的スプライシングは冬眠時に特徴的な変化を示すことを明らかにしてきた。本研究では、非冬眠動物におけるCIRPの選択的スプライシングの発現動態を明らかとし、冬眠動物の障害耐性を非冬眠動物へ応用できる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、冬眠動物で見られるCold-inducible RNA-binding protein遺伝子の特徴的な発現調節が非冬眠動物においても再現できたことは、冬眠動物が保有している特性を非冬眠動物でも再現できる可能性を示唆している。選択的スプライシングの段階での調節が備わっていることは、転写調節よりも効率的な調節が可能であるため、医療応用可能な新しい発見へつながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Hibernating mammals such as hamsters do not suffer from hypothermia despite being extremely hypothermic during hibernation. Previous studies have shown that alternative splicing of Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) exhibits characteristic changes during hibernation in the hibernating Syrian hamster. In this study, we clarified the expression kinetics of alternative splicing of CIRP in non-hibernating animals, and showed the possibility of applying the disorder tolerance of hibernating animals to non-hibernating animals.

研究分野：獣医生理学

キーワード：冬眠 低温ショックタンパク質 選択的スプライシング 低体温 休眠 CIRP

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む多くの哺乳動物は、体温が著しく低下すると生命活動を維持することができない。一方、リスやシリアンハムスターをはじめとする冬眠する哺乳動物は、冬のような低温環境下で、体温を環境温度付近にまで低下させ、数日間を過ごす。冬眠をしない動物では低温により組織障害が生じるが、冬眠動物では組織障害が起こらない。冬眠動物のように、冬眠しない動物でも低温による組織障害を防ぐことができれば、人工的な低体温状態を維持することが可能となり、移植臓器の長期保存、脳梗塞や心筋梗塞などへの低体温療法、寿命延長等に利用できる。そこで、本研究は、冬眠動物のもつ低体温耐性メカニズムを明らかとし、ヒト等の哺乳動物に適用することを目指している。

これまで、ハムスターの冬眠時には低温ショックタンパク質のひとつである Cold-inducible RNA-binding protein(CIRP)遺伝子にスプライシングレベルの変化が起こっていることを明らかとしてきた^{1,2)}。CIRPは、低温下にて発現が上昇し、他のRNAに結合することで、障害に対して細胞を保護する機能が報告されている分子である³⁾。そこで、冬眠動物は冬眠時に低温下でCIRPの発現及び機能を変化させることで低体温耐性を獲得している可能性があるとする。と予想した。

2. 研究の目的

本研究は、CIRPのスプライシングパターンが冬眠様となるのがCIRPの機能や組織障害へどのように影響するのかを調べ、低温時の組織障害を緩和するのかどうか明らかにすることを目的とした。また、CIRPの関連する細胞保護機能を誘導することで、非冬眠動物においても組織障害の起こらない低体温誘導法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

非冬眠動物であるマウス、ラット等を用いて、生理的及び人為的に体温を変化させた場合におけるCIRP遺伝子およびタンパク質発現動態を解析した。また、非冬眠動物を人為的に極度の低体温へと誘導すると、組織障害を呈する。そこで、CIRP遺伝子を人為的に冬眠様発現へと変化させ、人為的な低体温による組織障害が緩和されるかどうかを、生化学的解析、心電図解析、組織学的解析等により調べ、CIRP遺伝子の冬眠様選択的スプライシング発現が低体温耐性へと寄与する可能性を明らかとした。

4. 研究成果

(1) 非冬眠動物におけるCIRP遺伝子の冬眠様選択的スプライシング発現

冬眠動物であるシリアンハムスターにおいて、平常時にはCIRP遺伝子は、機能的なCIRPタンパク質をコードするCIRP mRNAを含む複数のスプライシングバリエントを発現する。一方、冬眠時には、スプライシングバリエントの発現が消失し、CIRP mRNAの発現へと集約する¹⁾(図1)。

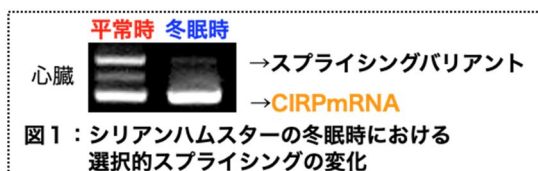


図1：シリアンハムスターの冬眠時における選択的スプライシングの変化

また、ハムスターにおける冬眠時の選択的スプライシング調節を変化させる要因は、冬眠導入期の軽度な低体温であることを明らかとしてきた³⁾。

そこで、まず冬眠しない動物であるマウスやラットにおいて、麻酔薬を用い、外部から体温を15度の極度の低体温へと誘導する方法を開発した⁴⁾。次に、様々な体温における、CIRP遺伝子の選択的スプライシングの発現動態を解析した。その結果、非冬眠動物であるマウスに加え、ラットにおいても、冬眠動物と同様に、平常時には機能的なCIRPタンパク質をコードするCIRP mRNAを含む複数のスプライシングバリエントを発現していることを確認した。また、人為的に低体温へと誘導した場合、28度付近の軽度な低体温において、CIRP遺伝子の選択的スプライシングは冬眠時のようにCIRP mRNAへと発現を集約させた。一方、15度付近の極度の低体温ではCIRP遺伝子の選択的スプライシングはCIRP mRNAへ集約しないことを明らかとした(図2)。

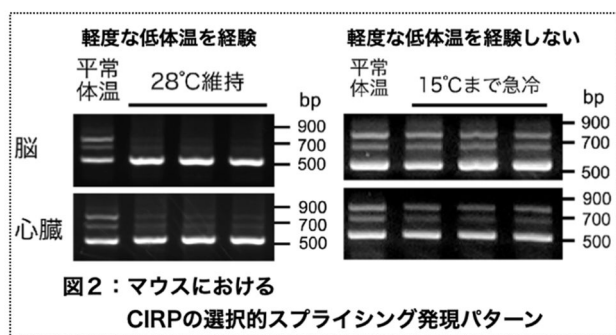


図2：マウスにおけるCIRPの選択的スプライシング発現パターン

(2) 冬眠様選択的スプライシング調節によるCIRP遺伝子転写物の定量

非冬眠動物であるマウス及びラットであっても、冬眠動物と同様に30度付近の軽度な低体温において特異的にCIRP遺伝子の選択的スプライシングが変化することを明らかとなったため、冬眠時様の選択的スプライシングのパターンの変化に伴う転写物の定量をおこなった。ハムス

ター、マウス及びラットにおいて、常時低温に晒されている臓器である精巣を除いて組織特異性は見られなかったため、以下の実験には白血球を用いた。

まず、採血後の白血球を37度、28度、15度でインキュベートした。電気泳動により、28度によってのみ選択的スプライシングが冬眠様に集約したことを確認した後、リアルタイム RT-PCRにより転写物の定量をおこなった。

Taq-man プローブを用いて CIRP mRNA を特異的に検出したところ、28度の環境下では30分ほどで優位に CIRP mRNA の発現が増加した。一方、CIRP mRNA を含む複数のスプライシングバリエーションを検出するプローブを用いて検出をおこなうと、各温度において1時間以内では発現量に変化は見られなかった(図3)。したがって、28度における冬眠様の選択的スプライシング発現への変化は、転写量に関わらず CIRP mRNA 量を効率よく増加させるために役立っていると考えられた。

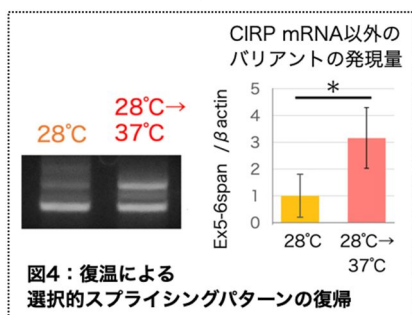
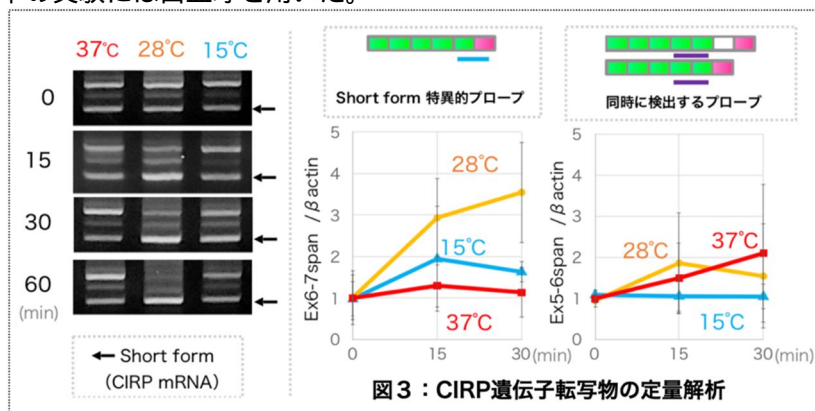
また、温度の低下だけでなく、温度の上昇に伴いバリエーションの発現パターンが変化することを捉えた(図4)。本結果は、CIRP の選択的スプライシングは、CIRP の発現が誘導される低温誘導時のみでなく、平常温度への復温によっても発現が可逆的に制御されていることを示唆している。

本研究により、スプライシングによる機能的な CIRP 発現メカニズムは、転写活性に頼らずとも、速やかに低温環境へ適応できる利点があることが明らかとなった。この機構により冬眠動物は体温低下中に効率的に CIRP の発現を増加させ、冬眠中の低温耐性を発揮している可能性があることが示唆された。また、冬眠からの回復時における体温上昇時においても、スプライシングバリエーションの発現により CIRP の機能が調節されている可能性があると考えている。

CIRP は、原核生物、植物、両生類など広くホモログの報告されているタンパク質であり、ヒトやマウスでは精巣のような低温にさらされる部位で発現が認められる⁶⁾。このことから、生物種や組織特異的な低温環境への順応に関与していると考えられる。CIRP の機能を制御する方法を明らかとすることにより将来的に CIRP のスプライシングをターゲットにした細胞障害保護薬という新しいタイプの創薬に発展する可能性を秘めており、医学・生物学分野への甚大な波及効果が期待できる。

引用文献

- (1) Sano Y, Shiina T, Naitou K, Nakamori H, Shimizu Y. (2015). Hibernation-specific alternative splicing of the mRNA encoding cold-inducible RNA-binding protein in the hearts of hamsters. *Biochem Biophys Res Commun.*, **462**(4), 322-325.
- (2) Horii Y, Shiina T, Shimizu Y. (2018). The mechanism enabling hibernation in mammals. *Adv Exp Med Biol.*, **1081**, 45-60.
- (3) Zhang HT, Xue JH, Zhang ZW, Kong HB, Liu AJ, Li SC, Xu DG. (2015). Cold-inducible RNA-binding protein inhibits neuron apoptosis through the suppression of mitochondrial apoptosis. *Brain Res.*, **1622**, 474-483.
- (4) Shimaoka H, Shiina T, Suzuki H, Horii Y, Horii K, Shimizu Y. (2021). Successful induction of deep hypothermia by isoflurane anesthesia and cooling in a non-hibernator, the rat. *J Physiol Sci.*, **71**(1),10.
- (5) Horii Y, Shimaoka H, Horii K, Shiina T, Shimizu Y. (2019). Mild hypothermia causes a shift in the alternative splicing of cold-inducible RNA-binding protein transcripts in Syrian hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, **317**(2), R240-R247.
- (6) Nishiyama H, Danno S, Kaneko Y, Itoh K, Yokoi H, Fukumoto M, Okuno H, Millán JL, Matsuda T,



Yoshida O, Fujita J.(1998). Decreased expression of cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) in male germ cells at elevated temperature. *Am J Pathol.* **152**(1), 289-296.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimaoka Hiroki, Shiina Takahiko, Suzuki Hayato, Horii Yuuki, Horii Kazuhiro, Shimizu Yasutake	4. 巻 71
2. 論文標題 Successful induction of deep hypothermia by isoflurane anesthesia and cooling in a non-hibernator, the rat	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12576-021-00794-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀井有希
2. 発表標題 冬眠動物を含む哺乳動物の低体温時におけるCold-inducible RNA-binding protein mRNAの選択的スプライシング
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀井有希
2. 発表標題 冬眠時におけるCold-inducible RNA-binding proteinの選択的スプライシングによる発現調節
3. 学会等名 日本生理学会環境生理学グループディナー 久野寧記念賞オンライン受賞講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀井有希、白石茂菜実、椎名貴彦、志水泰武
2. 発表標題 冬眠様選択的スプライシングの変化におけるCold-inducible RNA-binding protein転写物の定量的解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀井有希、白石茂菜実、椎名貴彦、志水泰武
2. 発表標題 Quantitative analysis of the transcripts of Cold-inducible RNA-binding protein gene in hibernation-like alternative splicing
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------