

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780249

研究課題名（和文）インスリン受容体基質と相互作用している ARF1 mRNA の生理的意義の解明

研究課題名（英文）Physiological roles of ARF1 mRNA interacting with insulin receptor substrates

## 研究代表者

福嶋 俊明（FUKUSHIMA TOSHIAKI）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70543552

## 研究成果の概要（和文）：

我々は、インスリンやインスリン様成長因子（IGF）の細胞内シグナルを仲介するインスリン受容体基質（IRS）が RNA と複合体を形成していることを見出し、この複合体形成の意義を解析した。その結果、IRS は、①small nucleolar RNA（snoRNA）の生合成を促進して、リボソームの成熟・活性化を進める、②mRNA の配列内リボソーム進入部位（IRES）を介した翻訳を調節する、という多面的な意義を有している可能性を示した。

## 研究成果の概要（英文）：

We have previously found that insulin receptor substrates (IRSs), mediators of insulin/insulin-like growth factors (IGFs) signals, are associated with RNA. In this study, we investigated roles of the complexes. Results suggest that IRSs play multiple roles; 1) they promote small nucleolar RNA (snoRNA) biogenesis, leading to enhanced ribosomal maturation/activation, and 2) they regulate internal ribosome entry site (IRES)-mediated translation.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学獣医学・応用動物科学

キーワード：代謝・内分泌制御

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、これまでに、インスリンやインスリン様成長因子（IGF）の細胞内シグナルを仲介するインスリン受容体基質（IRS）に着目して研究を行い、一部の IRS 結合タンパク質が IGF 活性を強める役割を

果たすことを明らかにしてきたが、この研究の過程で、IRS が細胞内シグナル伝達タンパク質をコードする mRNA 群 [例えば ADP-ribosylation Factor 1 (ARF1) mRNA, RACK1 mRNA] と直接結合しているという予想外の事実を発見した。更にこの発見に至る

きっかけとして、申請者らは IRS が mRNA の翻訳や安定性の制御に関わるタンパク質群（例えば SKAR, PABPC1）と結合していることも見出している。これらの意味とはいったい何だろうか。申請者らは、IGF に応答して IRS に結合している“シグナルタンパク質をコードする mRNA（例えば ARF1 mRNA）”が迅速に翻訳され、IRS 近傍で産生されたこれらタンパク質が IGF シグナルを仲介・修飾する分子として機能してしていると考えると発見した事実をよく説明でき、このようなしくみが存在することを示せば全く新しい機序のインスリン/IGF シグナル伝達を提案することができると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々が最近同定した IRS 結合性 mRNA の中から、細胞内シグナル伝達に関わる ARF1 や RACK1 をコードする mRNA、また、研究の過程で新たに IRS 結合性 mRNA であることが明らかとなった Bcl-2 をコードする mRNA に着目し、IRS がこれらの mRNA と複合体を形成していることの生理的意義を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

初年度は、まず、IRS-1 を免疫沈降し、そこに ARF1 mRNA や RACK1 mRNA が含まれることを RT-PCR 法で確認した。興味深いことに、RACK1 mRNA について、成熟型 mRNA は IRS と相互作用せず、第 2 イントロンを含む pre-mRNA が相互作用していることを見出した。RACK1 遺伝子の第 2 イントロンには U96A small nucleolar RNA (snoRNA) をコードする配列が含まれている。そこで、IRS-1 が U96A と *in vitro* で直接相互作用することをゲルシフトアッセイで確認し、更に、IRS-1 の免疫沈降物から RNA を抽出し U96A をノザンプロットで検出することにより、細胞内でも相互作用していることを確認した。一方、IRS-1 を過剰発現すると U96A が増加し、IRS-1 ノックアウトマウス由来の胚性線維芽細胞では U96A が減少していることを見出した。IRS と mRNA スプライシング関連因子が相互作用しているという我々の最近の知見を併せ、IRS は RACK1 pre-mRNA のスプライシングを促進し、U96A の産生を誘導する可能性が考えられた。U96A を含む snoRNA はリボソームの成熟・活性化に関与すると考えられていることから、この成果を端緒に、インスリン/IGF に応答したタンパク質合成制御の全く新しい機構を解明できると期待された。

2010 年度の研究では、まず、IRS-RNA 複合体の中に翻訳開始因子 eIF4E, eIF4G などが含まれていることがわかり、IRS が翻訳中のリボソームと相互作用していると結論した。

また、IRS 結合タンパク質として新たに G3BP1 を同定し、G3BP1 が分子内に mRNA 認識モチーフを有し、IRS と mRNA の相互作用を仲介するアダプタータンパク質であることを明らかにした。G3BP1 は、mRNA の途中に存在してリボソームの導入を可能とする配列 (IRES) を認識する。そこで、Bcl-2 mRNA に存在する IRES に着目して解析を進めた結果、IRS-1 の発現抑制によってこの IRES を介した翻訳が抑制され、Bcl-2 タンパク質が減少した。更に、IRES を含むことが知られている c-myc, IGF-I receptor, cyclin D1, XIAP の mRNA も IRS-1 と相互作用していることがわかった。以上から、「IRS は G3BP1 を介して一部の mRNA の IRES に相互作用し、これらの翻訳を調節する新機能を有している」と結論した。

## 4. 研究成果

本研究の成果から、IRS-RNA 複合体は、タンパク質合成において、①small nucleolar RNA (snoRNA) の生合成を促進してリボソームの成熟・活性化を進める、②IRES を介した mRNA の翻訳を調節する、という多面的な生理的意義を有している可能性を世界で初めて示すことができた。

当初、IRS に結合する ARF1 mRNA の生理的意義を明らかにする目的で研究を開始したが、研究の過程で、ARF1 mRNA に限らず種々の mRNA の翻訳に IRS が重要な役割を果たすこと、しかも、その作用点として snoRNA の生合成や、IRES を介した mRNA の翻訳のステップに関与する可能性を示すことができた。IRS がこのような作用点を介してタンパク質合成を制御するという発見は当初予想していなかったことであり、その学術的な新規性は極めて高い。

今後は、IRS が snoRNA の生合成、および、IRES を介した mRNA の翻訳を促進する詳細な分子機構を解明する必要がある。前者に関しては、「前駆体 RNA のスプライシング→切り出されたイントロンへの関連タンパク質の会合→イントロンの processing による成熟 snoRNA の合成」という一連の過程における IRS の作用点を特定し、これを端緒として研究を進めたい。後者に関しては、「IRS との相互作用によって G3BP1 の RNA ヘリカーゼ活性が強まる結果、IRES へのリボソームの導入が促進される」という仮説を証明し、その詳細な分子機構を明らかとしたい。次のステップとして、解明した分子機構を特異的に阻害する手法を構築し、IRS を介した新規タンパク質合成制御の生理的意義を細胞系・動物系で明らかにする研究として発展させたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. 山中大介、福嶋俊明 (3 番目) 他 8 名, Phosphatidylinositol 3-Kinase Binding Protein, PI3KAP/XB130 is Required for cAMP-induced Amplification of IGF Mitogenic Activity in FRTL-5 Thyroid Cells. *Endocrinology*, 査読有り, 2012, 印刷中, doi.org/doi: 10.1210/me.2011-1349
2. 鞆嶋有紀 福嶋俊明 (3 番目) 他 7 名, Novel missense mutation in the IGF-I receptor L2 domain results in intrauterine and postnatal growth retardation. *Clinical Endocrinology*, 査読有り, 2012, 印刷中, doi.org/10.1111/j.1365-2265.2012.04357.x
3. 櫛山暁史 福嶋俊明 (10 番目) 他 14 名, Xanthine Oxidoreductase Is Involved in Macrophage Foam Cell Formation and Atherosclerosis Development. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 査読有り, 32, 2012, pp291-8, doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.234559
4. 岩下未咲 福嶋俊明 (7 番目) 他 14 名, Valsartan, independently of AT1 receptor or PPAR  $\gamma$ , suppresses LPS-induced macrophage activation and improves insulin resistance in co-cultured adipocytes. *American Journal of Physiology -Endocrinology and Metabolism*, 査読有り 302, 2012, E286-96, doi.org/10.1152/ajpendo.00324.2011
5. 福嶋俊明 他 10 名, HSP90 interacting with IRS-2 is involved in cAMP-dependent potentiation of IGF-I signals in FRTL-5 cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 査読有り, 344, 2011, pp81-89, doi.org/10.1016/j.mce.2011.06.029
6. 中津祐介、福嶋俊明 (8 番目) 他 21 名、Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1 associates with IRS-1 and enhances insulin actions and adipogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 査読有り, 286, 2011, pp20812-22, doi: 10.1074/jbc.M110.206904
7. 大野晴也、福嶋俊明 (10 番目) 他 15 名、4F2hc stabilizes GLUT1 protein and increases glucose transport activity. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 査読有り, 300, 2011, pp1047-54, doi: 10.1152/ajpcell.00416.2010
8. 福嶋俊明 他 17 名, Insulin receptor substrates form high-molecular-mass complexes that modulate their availability to insulin/insulin-like growth factor-I receptor tyrosine kinases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有り, 404(3), 2011, pp767-73, doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.045
9. 中津祐介、福嶋俊明 (16 番目) 他 18 名, Pin1 associates with and induces translocation of CRTC2 to the cytosol, thereby suppressing cAMP-responsive element transcriptional activity. *The Journal of biological chemistry*, 査読有り, 285, 2010, pp33018-27, doi: 10.1074/jbc.M110.137836
10. 柴田倫宏、福嶋俊明 (5 番目) 他 12 名, Paraquat-induced oxidative stress represses phosphatidylinositol 3-kinase activities leading to impaired glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry*, 査読有り, 285, 2010, pp20915-25, doi: 10.1074/jbc.M110.126482

[学会発表] (計 8 件)

1. 中津祐介 福嶋俊明 他, Roles of peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1 in non-alcoholic steatohepatitis. 日本生化学会, 2011 年 9 月 24 日, 京都
2. 福嶋俊明 他, Nedd4 potentiates insulin signals through ubiquitination of IRS-2 in hepatocytes. 日本生化学会, 2011 年 9 月 23 日, 京都
3. 福嶋俊明 他, Ubiquitination of insulin receptor substrate by Nedd4 potentiates insulin/IGF signals. 日本生化学会中国四国支部会, 2011 年 5 月 14 日, 広島
4. 鏑延淳一 福嶋俊明 他, PGAM5, a serine/threonine phosphatase associating with IRS, is required for the enhancement of insulin response. 日本内分泌学会, 2011

年4月22日, 神戸

5. 福嶋俊明 他, Ubiquitin ligase Nedd4 recruits insulin receptor substrate (IRS)-2 to membrane fractions, enhancing IRS-2-mediated signals followed by mitogenic bioactivity of insulin-like growth factors (IGFs). Gordon Research Conference: Insulin like growth factors in physiology and disease. 2011年3月1日, Ventura, CA, USA

6. 福嶋俊明 他, Ubiquitin ligase Nedd4 recruits insulin receptor substrate (IRS)-2 to membrane fractions, enhancing IRS-2-mediated signals and mitogenic bioactivity of insulin-like growth factor (IGF). 日本生化学会, 2010年12月10日, 神戸

7. 尾添敦史、福嶋俊明 他, Insulin receptor substrates (IRSs) interact with snoRNA. 日本生化学会, 2010年12月9日, 神戸

8. 尾添敦史、福嶋俊明 他, Insulin receptor substrates (IRSs) form a complex with RNAs, affecting RNA metabolism and translation, International Congress of the GRS and the IGF Society, 2010年10月6日, New York, USA

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/ikagaku/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福嶋 俊明 (FUKUSHIMA TOSHIAKI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70543552

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし