

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660210

研究課題名(和文) インスリン受容体基質と相互作用するRNAの網羅的同定とその機能解析の試み

研究課題名(英文) Identification and elucidation of the roles of RNAs associated with insulin receptor substrate

研究代表者

高橋 伸一郎 (Takahashi, Shin-ichiro)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：00197146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン様成長因子(IGF)/インスリン(INS)のシグナル伝達に重要な受容体チロシンキナーゼ基質の一つ、インスリン受容体基質(IRS)-1が、RNA代謝に関与する多数のタンパク質と複合体を形成しており、同時に、この複合体にはRNAが含まれることを発見した。IRS-1と相互作用するRNAを同定し、その機能を検討した結果、IRS-1は、翻訳マシナリーの足場として機能する、リボソーム生合成のマシナリーの成熟を促進する、スプライシングや翻訳を制御しているなど、これまでに報告のない機構でIGF/INS活性を調節している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Insulin receptor substrates (IRSs) are known to play important roles in mediating various bioactivities of insulin-like growth factors (IGFs)/insulin. In this study, we revealed that IRS-1 is incorporated into the high-molecular mass complexes that contain RNA binding proteins as well as various RNAs. We identified RNAs in IRS-1 complexes by in vivo UV-crosslinking and immunoprecipitation (CLIP) method. Our results revealed that IRS-1 functions as scaffold proteins for formation of translation machinery, maturation of ribogenesis machinery, and regulation of splicing and translation. The unanticipated function of IRS-1 in RNA metabolism highlights the potential of RNA-associated IRS-1 complex to open a new line of investigation to dissect the novel mechanisms regulating IGFs/insulin-mediated biological events.

研究分野：畜産学・獣医学 応用動物科学

キーワード：代謝・内分泌制御 インスリン受容体基質 RNA 翻訳 リボソーム合成 スプライシング

1. 研究開始当初の背景

インスリン様成長因子 (IGF) /インスリン (INS) は、特定の遺伝子の転写、タンパク質の翻訳を誘導し、動物の成長や発達などを促し、物質代謝を制御することが知られている。一般に、これらのホルモンが細胞膜上の特異的受容体に結合すると、受容体キナーゼが活性化し、インスリン受容体基質 (IRS) などをチロシン酸化する。これが引き金となって下流シグナル経路が活性化し、広範な生理活性を発現すると考えられている。一方我々は、IRS が他の多くのタンパク質と相互作用し、巨大なシグナル分子複合体を形成していることを明らかにしてきた。IRS との共免疫沈降物中に含まれるタンパク質をプロテオミクス的手法で解析したところ、IRS の IGF/INS 依存性チロシン酸化を調節するようなタンパク質、IRS の細胞内局在を決定するタンパク質、IRS の寿命や品質管理に関わるタンパク質などが多数同定された。更に、これらによって IRS を介した IGF シグナルの修飾が引き起こされることを見出した [Biochem Biophys Res Commun 404: 763 (2011)]。驚いたことに、IRS 複合体を形成するタンパク質の中には、mRNA のスプライシング、翻訳、安定化に関与するタンパク質、例えば、スプライシング反応で中心的な役割を果たす Uridine-rich small nuclear ribonucleoprotein particle (U snRNP) の成熟に関わる PRMT5 や SMN、mRNA の翻訳制御に関わる G3BP や SKAR、mRNA 安定性制御に関わる PABPC1 などが含まれることを発見した [GH-IGF Res 22 S1: S4 (2011)]。そこで、IRS 複合体を RNase 処理したところ、この複合体が崩壊することが明らかになり、IRS は核にも存在するなどの他の結果も併せ、我々は、IRS 複合体には種々の RNA が含まれていると結論するに至った。

2. 研究の目的

そこで本研究では、(1) IRS 複合体が翻訳に果たす役割を検討する。更に、(2) IRS 複合体に含まれる RNA を同定し、(3) これらが IGF/INS の生理活性発現に果たす機能を明らかにする。得られた結果から「IGF/INS が、IRS を介した全く新しい分子機構で標的 RNA の代謝や機能を調節し、インスリン様活性を発現している」ことを証明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) IRS が翻訳制御に果たす役割の解析

まず、IRS が翻訳マシナリーを形成している種々の因子と相互作用しているかを検討した。その後、IRS 複合体を RNase で処理し、これらの因子が IRS 複合体から解離するかを調べ、この結果より、IRS と当該因子が直接相互作用しているか、あるいは RNA を介して相互作用をしているかを明らかにした。更に、標的細胞内のタンパク質合成を増加させる

因子、例えば IGF-I で細胞を刺激後、IRS と翻訳因子の相互作用を解析して、IRS 複合体が翻訳促進に果たす役割を検討した。

(2) IRS 複合体に含まれる RNA の同定

In vivo UV-crosslinking and immunoprecipitation (CLIP) 法を用いて、IRS-1 と直接相互作用する RNA の網羅的同定を試みた。

(3) IRS が snoRNA 生成に果たす役割の解析

CLIP 法により、snoRNA の一つ、U96A と相互作用することが示唆されたため、標的細胞内での IRS-1 と U96A の相互作用を確認した。その後、IRS-1 と細胞内で相互作用する部位を検討し、snoRNA の産生制御に果たす IRS-1 の役割を調べた。

4. 研究成果

(1) IRS と翻訳マシナリーの相互作用

これまでの研究で PABPC1 が IRS-1 と相互作用するタンパク質として同定されていることから、IRS-1 複合体には mRNA が構成因子として含まれ、これを介して翻訳開始因子も存在している可能性が考えられた。そこでまず、mRNA の cap 構造に結合する eIF4E や eIF4G、pioneer round of translation における mRNA の品質管理等に重要な役割を果たしている exon junction complex に含まれる eIF4A などが、IRS-1 複体内に存在するかを検討した。ヒト乳癌細胞 MCF-7 より抗 IRS-1 抗体で内在性の IRS-1 を免疫沈降し、沈降物を上記の分子に特異的な抗体を用いた immunoblotting に供した結果、IRS-1 複合体には PABPC1 に加えて、eIF4E や eIF4G、eIF4A3 も存在することが明らかとなった。続いて、IRS-1 を免疫沈降後、沈降物に RNase 処理を行ったところ、これらのタンパク質が IRS-1 複合体から解離した。この結果より、IRS-1 は RNA を介してこれらの因子と間接的に相互作用していることがわかった。また、MCF-7 細胞を IGF-I で刺激し、同様に共免疫沈降法で相互作用を検討した結果、IRS と翻訳開始因子との相互作用が増加していた。更に増殖期の MCF-7 細胞の細胞質抽出液をスクロース密度勾配遠心分画に供すると IRS-1 が polysome 画分に分画された。他の結果を併せ、IRS-1 は、増殖刺激の有無に関わらず mRNA-protein complex (mRNP) と相互作用しているが、増殖刺激に応答して起こる翻訳活性化状態では翻訳マシナリーの足場として機能し、翻訳促進に新しい機構で関与しているものと結論した。

(2) IRS と相互作用する RNA の網羅的解析

IRS-1 は既知の RNA 結合ドメインは有していないが、RNA と直接結合する可能性も考えられた。そこで、in vivo UV-crosslinking and immunoprecipitation (CLIP) 法により IRS-1 と直接相互作用する RNA の同定を試みた。CLIP 法により同定された RNA には、mRNA の他、non-coding RNA や rRNA も含まれていた。

(3) IRS と snoRNA の相互作用

今回、同定された non-coding RNA の中で核小体小分子 RNA (snoRNA) の一つ、U96A snoRNA (U96A) は、Receptor for Activated C Kinase 1 (RACK1) 遺伝子の intron 2 内にコードされているが、RACK1 のスプライシングと共役して産生された後、部位特異的転写された 5.8S rRNA にメチル化修飾を引き起こす酵素をガイドする。まず IRS と U96A の相互作用をゲルシフト法や免疫沈降法により検討したところ、IRS が U96A と直接相互作用することが明らかとなった。更に、免疫沈降法により U96A は RACK1 の intron 2 のみがスプライシングされずに残った pre-mRNA や切り出された intron 2 とも相互作用することを見出した。これらの結果は、U96A が RACK1 のイントロンから切り出され、核小体で機能するまでの過程に、IRS-1 が何らかの機能を果たしている可能性を示していた。IRS は既に核内に移行することが報告されているが、核内での IRS の局在や意義についてはほとんど不明である。そこで核内での IRS-1 の局在を解析するため、IRS-1 に SV40 の核内移行シグナル (NLS) を付加した変異体 (IRS-1-NLS) を作成し、これを種々の核内オルガネラマーカータンパク質と GFP の融合タンパク質と HeLa 細胞に共発現し、共焦点顕微鏡により局在部位を検討した。その結果、snoRNA 生合成の場でもある Cajal body に IRS-1-NLS が局在することがわかり、IRS-1 が snoRNA 産生に何らかの役割を果たしていることが示唆された。更に、IRS-1 ノックアウトマウスの胎児から調製した線維芽細胞 (MEF) で U96A 量を解析したところ、野生型 MEF と比較して、その量が有意に減少していることも明らかとなった。これらの一連の結果は、IRS が、rRNA の転写後メチル化修飾および成熟に必要な snoRNA の産生を正に制御し、リボソーム生合成のマシナリーの成熟を促進する結果、全タンパク質合成活性が上昇するという新規機構の存在を示している。

(4) ストレス反応やスプライシング制御にかかわるタンパク質 IRS との相互作用

今回の研究により、IRS-1 は、スプライシング制御に関わるタンパク質 PRMT5、mRNA の翻訳制御に関わる G3BP とも相互作用することが明らかとなった。そこで、IRS-1 をノックダウンあるいはそれぞれのタンパク質をノックダウンしたところ、標的となる RNA のスプライシングや翻訳が変動することがわかった。これらの結果は、IRS-1 がスプライシング制御に関わるタンパク質や mRNA の翻訳制御に関わるタンパク質と相互作用して、標的 RNA のプロセッシングや翻訳に影響している可能性を示している。

(4) まとめ

本研究の成果より我々は、INS/IGF シグナルのアダプター分子としての機能が注目されてきた IRS が RNA および RNA 代謝関連タンパク質と相互作用することで、これまでに報告のない新しい機構により種々のタンパク

質の翻訳が制御されていると結論した。今後、今回同定した IRS-associating RNA の機能を総合的に解析することで、インスリン様活性の発現調節における IRS-1-RNA 複合体の新しい生理的意義を解明できるものと期待している。

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 5 件)

- ①Hakuno F, Fukushima T, Yoneyama Y, Kame H, Ozoe A, Yoshihara H, Yamanaka D, Shibano T, Sone-Yonezawa M, Yu B-C, Chida K, Takahashi S-I. 2015 The novel functions of high-molecular-mass complexes containing insulin receptor substrates in mediation and modulation of insulin-like activities: Emerging concept of diverse function by IRS-associated proteins. *Frontiers in Endocrinology*. Volume 6 Article 73. .doi: 10.3389/fendo.2015.00073 査読あり
- ②Ozoe A, Sone M, Fukushima T, Kataoka N, Chida K, Asano T, Hakuno F, Takahashi S-I. 2014 Insulin receptor substrate-1 associates with small nucleolar RNA which contributes to ribosome biogenesis. *Frontiers in Endocrinology* 5: Article 24, 1-12. doi: 10.3389/fendo.2014.00024. 査読有り
- ③高橋伸一郎、金子元、竹中麻子、東祐輔、尾添淳文、伯野史彦 2013 酸化ストレスとインスリン様活性の相互作用が健康寿命延伸に果たす役割 *医学のあゆみ* 247 (9): 934-941. 第五土曜特集「活性酸素: 基礎から病態解明・制御まで」 査読なし
- ④高橋伸一郎、伯野史彦、亀井宏泰、Leonard Girnita、Ignacio Torres-Aleman、東祐輔、福嶋俊明、柴野卓志、尾添淳文、山中大介 解説:インスリン様活性と高齢化社会で克服すべき疾病 *化学と生物* 51: 389-399. https://katosei.jsbba.or.jp/back_issue.php?bn_vol=51&bn_no=6 査読あり
- ⑤Ozoe A, Sone M, Fukushima T, Kataoka N, Arai T, Chida K, Asano T, Hakuno F, Takahashi S-I. 2013 Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) Forms a Ribonucleoprotein Complex Associated with Polysomes. *FEBS Lett*. 587(15):2319-24. doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.066. 査読あり

[学会発表] (計 9 件)

- ①Atsufumi Ozoe, Yuka Narita, Toshiaki Fukushima, Naoyuki Kataoka, Akihiro Ito, Minoru Yoshida, Kazuhiro Chida,

- Tomoichiro Asano, Fumihiko Hakuno, Shin-Ichiro Takahashi. Insulin receptor substrate (IRS)-1 interacts with protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5), regulating alternative pre-mRNA splicing of insulin receptor RNA. Gordon Research Conference: IGF & Insulin System in Physiology & Disease, March 8-13, 2015. Ventura, CA, USA. Poster Presentation. (IGF Society Award)
- ② Shin-Ichiro Takahashi. Keynote Lecture: Insulin receptor substrates (IRSs) form high-molecular-mass complexes with various proteins that control RNA splicing and translation. Oral presentation. 5th Nagasaki University-Pusan University Joint Seminar of Aging Research. 6th February, 2015. Nagasaki, Japan (Invited Lecture)
- ③ Atsufumi Ozoe, Yuka Narita, Toshiaki Fukushima, Naoyuki Kataoka, Akihiro Ito, Minoru Yoshida, Kazuhiro Chida, Tomoichiro Asano, Fumihiko Hakuno, Shin-Ichiro Takahashi. Insulin receptor substrate (IRS)-1 interacts with protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5), emerging as a novel regulator of alternative pre-mRNA splicing. Oral presentation. 7th International Congress of the GRS and IGF Society. 15-18th October 2014. Singapore
- ④ Fumihiko Hakuno and Shin-Ichiro Takahashi. Phospho-tyrosine independent roles of insulin receptor substrates. International Seminar “Evolution of Insulin-like Peptides and Their Function: Development, Growth, Metabolism and Ageing” sponsored by Core-to-Core Project by JSPS “New Insights into the Molecular Basis of Prevention of Diseases in the Aging Society Caused by Modulation of Insulin-Like Activities” Oral Presentation. 11th October 2014. Tokyo, Japan.
- ⑤ 高橋伸一郎 IGF-1を知る～アクロメガリー治療への扉～ IGF-1活性とその調節 第10回アクロメガリーフォーラム 2014年10月4日 京都 (招待講演)
- ⑥ 成田佑果、尾添淳文、福嶋俊明、片岡直行、伊藤 昭博、吉田稔、浅野知一郎、千田和広、伯野史彦、高橋伸一郎 インスリン受容体 RNA の選択的スプライシングの新しい制御機構 口頭発表 第87回日本内分泌学会学術総会 2014年4月24日～26日 福岡
- ⑦ Shin-Ichiro Takahashi. Regulation of intracellular localization of insulin receptor substrate (IRS) proteins and insulin-like activities. Obesity, Diabetes and Cancer: the roles of insulin and insulin-like growth factors. 4th October 2013. Taormina, Italy. (Invited lecture)
- ⑧ Atsufumi Ozoe, Shin-Ichiro Takahashi. Novel mechanisms for the expression of insulin/IGF bioactivities by IRS-1-RNA complex. INTERNATIONAL OPEN WORKSHOP “Emerging Paradigms of Insulin-Like Activities in Physiology & Disease: From Pathophysiology to Targeted Therapy” Oral presentation. 12-16th August 2013. Stockholm, Sweden.
- ⑨ Shin-Ichiro Takahashi. Kynote lecture: IRSome: novel complexes to mediate/modulate insulin-like activities. INTERNATIONAL OPEN WORKSHOP “Emerging Paradigms of Insulin-Like Activities in Physiology & Disease: From Pathophysiology to Targeted Therapy” 12-16th August 2013 Stockholm, Sweden. (Invited lecture)
- [図書] (計0件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)
- [その他]
- ホームページ等
 生体の生命維持に必要な細胞内シグナルのクロストークを科学する
<http://endo.ar.a.u-tokyo.ac.jp/index0.html>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
高橋 伸一郎 (Takahashi, Shin-Ichiro)
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
 研究者番号：00197146
- (2) 研究分担者
 なし
- (3) 連携研究者
伯野 史彦 (Hakuno, Fumihiko)
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
 研究者番号：30282700
- 片岡 直行 (Kataoka, Naoyuki)
 京都大学・大学院医学研究科・特定准教授
 研究者番号：60346062

伊藤 昭博 (Ito, Akihiro)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝
学研究室・専任研究員
研究者番号：40391859

金子 元 (Kaneko, Gen)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助
教
研究者番号：30466809

(4)研究協力者

尾添 淳文 (Ozoe, Atsufumi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・博
士課程学生および特任研究員