

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06012

研究課題名(和文) インスリン受容体の選択的スプライシング調節を介した新規シグナル伝達制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a novel mechanism for regulation of signal transduction through Insulin receptor alternative splicing

研究代表者

片岡 直行 (Kataoka, Naoyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：60346062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン受容体(IR)は、選択的スプライシングを受け、IR-AとIR-Bが産生される。我々は、ラットIR遺伝子の一部を用いたレポーターを作製し、ラットH4IIE細胞導入したところ、内在性IR遺伝子と同じスプライシングパターンを示すことを確認した。そしてイントロン11内に、スプライシング制御因子Rbfox2の結合部位を見出し、Rbfox2と既知のSRSF3によってエクソン11の包含が起きていることを明らかにした。さらに、H4IIE細胞を様々な条件で培養し、細胞外のアミノ酸が、インスリン受容体の選択的スプライシングを変化させることを見出し、アミノ酸が代謝制御シグナルとして働くことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インスリン受容体のアイソフォームの一つIR-AはIGF-IIにも結合し、がんの増殖を助ける役割があると考えられる。インスリン様活性は、その制御が崩れた場合、インスリン抵抗性や糖尿病、がんや低成長といった疾患となる。実際にアミノ酸バランスを変化させて餌を給餌したラット成体肝では、IR-A型が増えるのが観察されている。IR-B型を産生するための機構が明らかになったことで、アミノ酸飢餓によりIR-A型に変化する機構の糸口がつかめた。今後その機構を解明し、IR-A型に変化した肝臓でIR-B型へと戻す方法を探索することで、インスリン様活性の異常に起因するがんや糖尿病、脂肪肝の治療に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Insulin receptor (IR) pre-mRNA undergoes alternative splicing to produce two isoforms, IR-A and B. We prepared a splicing reporter that contains a portion of rat IR gene. We confirmed our reporter recapitulate endogenous IR splicing pattern in rat H4IIE cells, and deletion analyses identified a binding site for splicing regulator Rbfox. We further demonstrate that SRSF3 and Rbfox2 are required for IR-B type splicing in H4IIE cells. Finally, we found that amino acid depletion causes IR splicing change, indicating that amino acid has a novel role as a metabolic regulatory signal.

研究分野：RNA生物学

キーワード：インスリン受容体 選択的スプライシング Rbfox2 SRSF3 ISE ESE シグナル伝達

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、動物の成長や発達などを促し、物質代謝を制御するなどの生理活性を有する動物の健康な一生に必須なホルモンである。インスリンを受容するインスリン受容体(IR)には、選択的スプライシングによって生じる二つのバリエーション IR-A と IR-B が存在する。この選択的スプライシングパターンは、ヒト、ラット、マウスで保存されている。また、IR-A/IR-B 比は組織によって異なっており、脳を含む神経系では、エクソン 11 を排除した IR-A がほとんどとなっているのに対し、ヒト成人肝臓ではエクソン 11 を包含する IR-B がほとんどとなっている。さらに、ヒト胎児では IR-A と IR-B の両方が発現していることから、IR の選択的スプライシングは種を超えて保存され、発生段階や組織特異的な制御を受けていると考えられる。また、IR-A は、インスリンのみならず、IGF-II にも結合することが報告されており、がん化した細胞で IR-A の発現量が増加していることと併せ、IR-A の発現と細胞増殖・がん化、2 型糖尿病との関連が示唆されている。しかしながら、IR の組織特異的な選択的スプライシング機構については、未だ明らかになっていない部分が多い。

2. 研究の目的

本研究課題では、IR の組織特異的な選択的スプライシング機構を、我々が用いてきたスプライシングレポーターを用いて解析し、特に肝臓における IR-B 特異的なスプライシング機構の解明を目指した。また、IR の選択的スプライシングが、細胞の培養条件によって変化することを見出し、どのような細胞培養条件下において IR の選択的スプライシングが変化するかを調べ、細胞外シグナルと転写後調節の一つである選択的スプライシングがどのように連携しているのかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ラット IR 遺伝子のうち、選択的スプライシングを受けるエクソン 11 とその両端のイントロン領域(上流および下流それぞれ 500 塩基長程度)を用いたスプライシングレポーターを作製した。そしてそのレポーターをラット肝癌由来細胞 H4IIE に導入し、スプライシングパターンを解析した。また、そのレポーターのエクソン内やイントロン内に様々な欠失を導入し、どの領域が IR-B 型のスプライシングに必要なかを解析した。さらに H4IIE 細胞を様々な培養条件下で培養し、IR-B 型のスプライシングが IR-A 型へと変化する条件を探索した。

4. 研究成果

(1) 肝臓由来細胞での IR-B 型の選択的スプライシングに必要な RNA 領域の同定
最初に、ヒトやラット、マウスの各組織由来の RNA を用いた RT-PCR 解析を行い、組織間での IR の選択的スプライシングパターンの違いを解析した。その結果、ヒト、ラット、マウスの全てで、肝臓においてはエクソン 11 を含んだ IR-B 型がほとんどであるのに対して、脳においては、エクソン 11 を排除した IR-A 型がほとんどであることが明らかになった。この結果は、IR の選択的スプライシングは組織特異的に制御されており、その制御は種間で保存されていることが強く示唆された。そこで肝臓での IR-B 型の選択的スプライシング機構を解明する目的で、ラット IR 遺伝子のエクソン 11 とその両端のイントロン領域(上流および下流それぞれ 500 塩基長程度)を用いたレポーターを作製し、ラット肝癌由来細胞 H4IIE に導入した。H4IIE 細胞の内在性 IR のスプライシングは、IR-B 型がほとんどとなっており、ラット成体肝臓でのパターンとほぼ同じである。導入したレポーター由来の mRNA 前駆体は、ほとんどが IR-B 型の選択的スプライシングパターンを受けたため、作製したレポーターは、H4IIE 細胞の内在性 IR のスプライシングパターンを反映していると考え、その後の研究に用いることとした。エクソン 11 の両側のイントロン領域に様々な欠失を導入して、そのスプライシングパターンを解析したところ、エクソン 11 の下流 95 塩基から 178 塩基の領域を血質させると、IR のスプライシングが IR-B 型優位から IR-A 型優位へと変化することがわかった。以上の結果から、IR mRNA 前駆体のエクソン 11 の下流 95 塩基から 178 塩基の領域が、エクソン 11 の包含に必要なことが明らかになった。そこでこの領域の配列をヒト、ラット、マウス間で比較したところ、エクソン 11 の下流 110 塩基のとこ

るに UGCAUG という配列が保存されていることを見出した。この配列は、スプライシング調節因子 Rbfox タンパク質の結合配列であった。この配列に変異を導入したレポーターを作製し、H4IIE 細胞に導入したところ、IR-B 型のスプライシングが IR-A 型へと大きく変化した。このことは、IR-B 型スプライシングには、エクソン 11 の下流のイントロン 11 内に存在する UGCAUG 配列が必要であり、そこに結合する Rbfox タンパク質が制御因子であることが考えられた。

これに加えて、ラット IR 遺伝子のエクソン 10 から 12 までの全長領域を持たせたスプライシングレポーターを作製することができ、H4IIE 細胞に導入したところ、内在性 IR と同様のスプライシングパターンを示すことを確認した。

(2) 肝臓由来細胞での IR-B 型の選択的スプライシングに必要なトランス制御因子の同定
前項の実験により、Rbfox タンパク質の IR-B 型スプライシングへの関与が強く示唆されたため、過剰発現による選択的スプライシングへの影響を調べた。Rbfox タンパク質には、神経等で発現し、組織特異性を有する Rbfox1 タンパク質と、ほぼ全ての組織に発現している Rbfox2 タンパク質が存在する。これらのタンパク質を H4IIE 細胞で過剰発現し、前述のレポーターのスプライシングパターンを解析したところ、IR-B 型の選択的スプライシングがより促進された。また、UGCAUG 配列に変異を導入したレポーターでは、過剰発現による IR-B 型の促進は見られなかった。次に、H4IIE 細胞での Rbfox1,2 タンパク質の発現を、特異的な抗体を用いたウェスタンブロッティング法により調べたところ、H4IIE 細胞では Rbfox2 タンパク質の発現のみがみられた。そこで Rbfox2 タンパク質を、siRNA を用いて特異的にノックダウンし、内在性 IR の選択的スプライシングパターンを解析したところ、IR-B 型が優位であった内在性 IR のパターンが、IR-A 型優位へと変化するようになった。以上のことから、H4IIE 細胞においては、Rbfox2 タンパク質が、IR mRNA 前駆体のイントロン 11 に存在する UGCAUG 配列に結合してエクソン 11 の包含を促進し、IR-B 型 mRNA の発現を促進することがわかった。

しかし、Rbfox2 結合部位に変異を導入したレポーターにおいても、完全には IR-A 型には変化しないこと、Rbfox2 タンパク質をほぼ完全にノックダウンしても内在性 IR のスプライシングが完全には IR-A 型へと変化しないことを考えると、他にもトランス制御因子が存在することが考えられた。そこで、先行研究において、マウス肝臓において IR-B 型を促進することが知られていた SRSF3 について解析を行った。SRSF3 はスプライシング制御因子 SR タンパク質ファミリーに属するタンパク質で、IR のエクソン 11 内の C/U-rich 配列に結合することがわかっていて、そこで、前述のスプライシングレポーターにおいて、エクソン 11 内の SRSF3 結合部位に変異を導入したものを作製した。先行研究から予想された通り、このレポーターは IR-A 型が多くなるパターンを示した。次に、前述した Rbfox2 結合部位に変異を導入したレポーターにさらに SRSF3 結合部位に変異を導入した二重変異レポーターを作製し、H4IIE 細胞に導入した。その結果、ほぼ IR-A 型のみが検出された。以上の結果から、H4IIE 細胞においては、SRSF3 と Rbfox2 が IR-B 型の選択的スプライシングには必要で、それぞれがエクソン 11 内の Exonic splicing enhancer とイントロン 11 内の Intronic splicing enhancer に結合してエクソン 11 の包含を促進することが明らかになった。

以上(1),(2)の結果をまとめ、Elsevier 出版の Biochimie 誌に投稿し、受理され、出版された。

(3) IR の選択的スプライシングを変化させる細胞培養条件の検討

H4IIE 細胞を様々な細胞培養条件で培養し、内在性 IR の選択的スプライシングパターンを解析したところ、細胞外のアミノ酸飢餓が、IR の選択的スプライシングを IR-B 型優位から IR-A 型優位へと変化させることを見出した。さらに、その変化は、アミノ酸を後から添加することで打ち消され、IR の選択的スプライシングが元のパターンに戻ることを見出した。このことは、アミノ酸が従来知られていたような栄養素としての働きを持つだけでなく、細胞外からの代謝制御シグナルとして働き、転写後調節機構の一つである選択的スプライシングを調節することを見出した。これは我々のグループがこれまでに推進してきた、RNA スプライシングと他の細胞内諸過程との連携の研究における新たな発見であり、細胞での遺伝子発現調節における新機構の発見でもある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Masaki So, Kabuto Takafumi, Suzuki Kenji, Kataoka Naoyuki (*Corresponding author)	4. 巻 25
2. 論文標題 Multiple nuclear localization sequences in SRSF4 protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 327-333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12756	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masaki So, Ikeda Shun, Hata Asuka, Shiozawa Yusuke, Kon Ayana, Ogawa Seishi, Suzuki Kenji, Hakuno Fumihiko, Takahashi Shin-Ichiro, Kataoka Naoyuki* (*Corresponding author)	4. 巻 10
2. 論文標題 Myelodysplastic Syndrome-Associated SRSF2 Mutations Cause Splicing Changes by Altering Binding Motif Sequences	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fgene.2019.00338	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 -
1. 著者名 Kawamura Hidenobu, Nojima Takayuki, Oshiro-Ideue Takako, Kataoka Naoyuki* and Hagiwara Masatoshi* (2020) (*Corresponding authors)	4. 巻 7
2. 論文標題 RNA binding activity of HSV-2 ICP27 protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RNA & DISEASE	6. 最初と最後の頁 e1165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14800/rd.1165	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 -
1. 著者名 Nakura Takahito, Ozoe Atsufumi, Narita Yuka, Matsuo Masafumi, Hakuno Fumihiko, Kataoka Naoyuki* and Takahashi Shin-Ichiro.* (2021) (*Corresponding authors)	4. 巻 187
2. 論文標題 Rbfox2 mediates exon 11 inclusion in insulin receptor pre-mRNA splicing in hepatoma cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimie	6. 最初と最後の頁 25-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biochi.2021.05.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama Koh* and Kataoka Naoyuki* (*Corresponding authors)	4. 巻 20
2. 論文標題 Regulation of gene expression under hypoxic conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20133278	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6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 片岡 直行、伊藤 美佳子、増田 章男、大野 欽司、江口 加代子、伯野 史彦、高橋 伸一郎、中山 恒
2. 発表標題 Mechanism for hypoxia-response through alternative splicing regulation
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡 直行、伊藤 美佳子、増田 章男、大野 欽司、江口 加代子、伯野 史彦、高橋 伸一郎、中山 恒
2. 発表標題 低酸素条件下における選択的スプライシング機構の解明
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoyuki Kataoka
2. 発表標題 Rbfox2 protein mediates exon 11 inclusion in insulin receptor alternative splicing in hepatoma cells
3. 学会等名 Gordon Research Conference IGF and Insulin System in Physiology and Disease (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡直行、正木聡、池田俊、秦明日香、都築千鶴、雲財知、伯野史彦、高橋伸一郎
2. 発表標題 骨髄異形成症候群原因遺伝子SRSF2の変異によるスプライシング異常の解析
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片岡直行、正木聡
2. 発表標題 Uncovering a mechanism for MDS onset caused by mis-splicing
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片岡 直行、伊藤 美佳子、増田 章男、大野 欽司、江口 加代子、伯野 史彦、高橋 伸一郎、中山 恒
2. 発表標題 低酸素刺激特異的な選択的スプライシング機構の解明
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Naoyuki Kataoka	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 286
3. 書名 Applied RNA Bioscience (Editors: Seiji Masuda, Shingo Izawa)	

〔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
研究協力者	高橋 伸一郎 (Takahashi Shin-Ichiro)	東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授 (12601)	
研究協力者	伯野 史彦 (Hakuno Fumihiko)	東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授 (12601)	

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