

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14840

研究課題名(和文) インスリン受容体RNAの選択的スプライシングの生理的意義と制御機構の解明の試み

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms of alternative splicing of insulin receptor RNA and its physiological significance

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(農学部)・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)：インスリン受容体(IR)には選択的スプライシングによって生じる2つのアイソフォーム(IR-A/B)が存在している。本研究の成果から、IRの選択的スプライシングは組織特異的に置かれた環境に応答して調節され、この制御にインスリン様シグナルの仲介分子IRS-1やスプライシング関連因子PRMT5、更にRBFoxを含む複数のスプライシング因子が関与することが明らかとなった。また、IR-AとIR-Bを介したインスリン様シグナルに差異が認められた。

研究成果の概要(英文)：Alternative splicing of insulin receptor (IR) of exon 11 encoding a part of the  $\alpha$ -subunit results in the expression of two isoforms: IR-A (skipping exon 11) and IR-B (including exon 11). Our results demonstrated that alternative splicing of insulin receptor RNA is regulated in tissue-specific manners in response to environment changes through insulin receptor substrate-1, splicing regulatory factor PRMT5, and various splicing factors including RBFox. We also found the differences of insulin-like signaling between IR-A and IR-B.

研究分野：分子内分泌学

キーワード：代謝・内分泌制御 インスリン受容体 スプライシング インスリン様シグナル

### 1. 研究開始当初の背景

インスリン受容体 (IR) RNA は選択的スプライシング (AS) を受け、バリエント IR-A と IR-B が産生する。IR-B は、主にインスリンに結合して代謝制御活性を仲介するのに対して、IR-A は、インスリン (INS) のみならず、インスリン様成長因子 (IGF) -II にも親和性が高く、細胞増殖を誘導する。IR-A は、増殖活性が高い細胞やがん化した細胞で発現量が増加していることから、細胞の増殖誘導やがん化への寄与が示唆されている。

しかし、IR RNA の AS 制御の分子機構は全く明らかにされておらず、INS の代謝制御活性や IGF-II の増殖誘導活性の調節機構を解明するためには、IR のそれぞれのバリエントの生理的意義と AS の分子機構の解明は急務である。

これまで研究代表者らは、動物の正常な発生・発達や成長などに必須なホルモンである INS や IGF の生理活性の修飾機構を検討してきた。その過程で、インスリン様シグナルの仲介タンパク質である IRS-1 が多くのタンパク質や RNA と結合して巨大なシグナル分子複合体を形成しており、IRS-1 と結合するタンパク質群には、スプライシング関連タンパク質が多数含まれていることを発見した。続いて、ヒト乳がん由来細胞 MCF-7 細胞の IRS-1 を発現抑制したところ、IR-A/B mRNA 量比が増加し、他の結果も併せ、研究代表者らは、「IRS-1 はスプライシング関連タンパク質と結合することにより IR の AS を制御し、IR-B 量の維持によりインスリン活性を維持、あるいは IR-A 量の増加により IR-A を介した IGF 活性の発現を誘導する」という、これまでにない斬新な作業仮説を構築するに至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、(1)種々の細胞の IR のバリエント IR-A あるいは IR-B の発現状態を調べる、(2)IR RNA の AS を制御するスプライシング関連タンパク質を特定、これらが IR RNA の AS を制御する分子機構の基礎を明らかにする、(3)IR のバリエント IR-A あるいは IR-B を介した細胞内インスリン様シグナル、インスリン様活性を明らかにすることを目的としている。

### 3. 研究の方法

(1)IR のバリエント IR-A と IR-B の発現量を調べる系の確立

IR の二つのバリエントは、エクソン 11 の排除 (IR-A) または包含 (IR-B) によって産生される。そこで IR のエクソン 10 とエクソン 12 の間を増幅するプライマーを設計し、これを用いて PCR の後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、異なる長さの 2 種類の増幅産物が確認される系を確立した。この RT-PCR に加えて、解析の定量性をあげるために IR-A と IR-B をそれぞれ特異的に増幅させ

るプライマーを設計し、リアルタイム PCR による解析も行った。更に、IR RNA の選択的スプライシングに関わる RNA 上の制御配列を特定するために、IR 遺伝子の一部を用いたスプライシングレポータープラスミドも作製した。

(2)IR RNA の AS 制御を変化させるスプライシング関連タンパク質の特定

①IR RNA の AS 制御を引き起こす細胞外因子・培養条件の決定

ヒト乳癌由来細胞 MCF7 細胞 (IRS-A/B の両方の mRNA の発現が観察されている) や IR-B が主に発現しているラット肝臓由来細胞 H4IIE について、種々の条件下で培養し、real-time PCR 法などにより IR-A/B mRNA 量比を測定した。

②IRS-1 と結合し IR RNA の AS 制御に関わるスプライシング関連タンパク質の検討

研究代表者らはこれまでに、IRS-1 と結合するスプライシング関連タンパク質として、PRMT5、SMN などの単離に成功している。そこで、MCF-7 細胞について、siRNA 法などを用いてこれらのタンパク質を発現抑制後、IR-A/B バリエント量に変化を与える細胞外因子で処理または細胞培養条件で培養後、これらの細胞の IR-A/B バリエント mRNA 量比を測定、これを変化させる IRS-1 結合タンパク質を検討した。

③IR RNA の AS 制御に関わる他のスプライシング関連タンパク質の検討

選択的スプライシングは、それを受けるエクソンとその付近のイントロンに存在する RNA の制御配列に、特定のスプライシング制御因子が相互作用することで引き起こされる。IR RNA の選択的スプライシングに関わる RNA 上の制御配列を特定するために、IR 遺伝子の一部を用いたスプライシングレポータープラスミドを作製した。スプライシングの解析には、ラット肝臓と同様に IR-B が主に発現している H4IIE を用いた。

(3)IR のバリエントを介した細胞内インスリン様シグナル、インスリン様活性の検討

①培養細胞系を用いた解析

脂肪細胞、肝細胞、筋肉細胞、神経細胞、乳がん細胞などインスリン/IGF の標的細胞について、無血清状態で培養あるいはインスリンあるいは IGF-I/II で刺激し、インスリン様シグナル経路の活性化を immunoblotting によるインスリン様シグナル分子のリン酸化量の測定などを行った。

②*in vivo*系を用いた解析

CRISPR-Cas9 法を用いて、IR-A/B のどちらかのバリエントのみを特異的に発現するノックアウト細胞、ノックアウトマウスの作製を行った。

### 4. 研究成果

(1)種々の条件下における組織・細胞の IR-A/B mRNA の発現動態の解析

今回、マウス繊維芽細胞 3T3-L1 細胞の cDNA

を用いて PCR を行ったところ、マウス IR にも 2 つのアイソフォームが存在することが明らかとなった。マウス各組織における IR-A/B 発現パターンを解析した結果、肝臓や脂肪組織などのインスリンの代謝制御活性が観察される組織では IR-B の発現が高く、脳や増殖が盛んな胎児期の組織では IR-A が高発現であった。

本研究により、様々ながん細胞で IR-A の発現比が増加しており、ヒト、マウス、ラットの脳で IR-A が、肝臓で IR-B が主に発現しているなど各組織で IR のアイソフォームの発現が異なる、また、アミノ酸欠乏培地で培養あるいはインスリンで処理した肝臓由来細胞では、AS が変化し、IR-A が増加することが明らかとなった。これらの結果は、IR の選択的スプライシングは組織特異的に制御され、その制御を介して代謝調節あるいは増殖促進など IR 機能のスイッチングが引き起こされる可能性を示している。

(2) IR RNA の AS 制御を変化させるスプライシング関連タンパク質の検討

研究代表者は、INS/IGF の生理活性の修飾機構を解明する過程で、INS/IGF-I 受容体チロシンキナーゼの基質の一つである、インスリン受容体基質 (IRS) が、スプライシング必須因子 UsnRNP の成熟に関与するアルギニンメチル基転移酵素 PRMT5 と複合体を形成することを見出した。今回、ヒト乳癌細胞 MCF-7 を用いて、IRS や PRMT5 が IR RNA の AS に果たす役割を検討した。まず、異なる条件で培養した MCF-7 細胞の IR の mRNA 量を解析した。その結果、IR-A、IR-B どちらの mRNA も検出され、血清飢餓下では IR-B の割合が増加した。次に、PRMT5 と IRS-1/2 (IRS の二つのアイソフォーム) との相互作用を調べたところ、PRMT5 は IRS-1 のみと相互作用が観察された。続いて、IRS あるいは PRMT5 を発現抑制 (KD) した細胞で IR-A/B mRNA 比を解析した。その結果、IR-A の割合は、IRS-2 KD 細胞では変化しなかったが、IRS-1 KD 細胞では上昇、逆に PRMT5 KD 細胞で顕著に低下した。これらの結果より、PRMT5 による UsnRNP の成熟は IR-A の生成に重要であるが、IRS-1 との相互作用がこれを抑制している可能性が考えられた。このように、IRS-1 や PRMT5 が IR RNA の AS を制御している因子であることが初めて明らかとなった。

このように IR RNA の選択的にスプライシングには、PRMT5 が関与することが明らかとなったが、研究代表者がこれまで明らかにしている IRS と相互作用するスプライシング因子については関与が認められなかった。

更に、IR の選択的スプライシングの分子機構を明らかにする目的で、種々の培養細胞における IR-A/B の発現パターンを調べた。その結果、ラット肝癌由来細胞 H4IIE ではラット肝臓と同様に IR-B が主に発現していることが明らかとなった。そこでラット IR 遺伝子のエクソン 11 とその周辺領域を用いてス

プライシングレポーターを作製し H4IIE に導入したところ、内在性 IR と同様のパターンの発現が観察された。エクソン 11 の下流には、スプライシング制御因子 RFX1/2 の結合配列が種間で保存されて存在していたため、この配列に変異を導入したレポーターで発現パターンを調べた結果、エクソン 11 の排除が促進され、この配列がエクソン 11 の包含に機能することが明らかになった。他の結果も併せ、IR の組織特異的スプライシングには、RFX を含む複数のスプライシング因子が関与すると結論した。

(3) IR のバリエーションを介した細胞内シグナルおよびインスリン様活性の検討

IR-A/B の機能の差異を調べるために、ヒト IR-A または IR-B を恒常的に発現する NIH3T3 細胞株を樹立した。インスリンあるいは IGF-II 刺激を行った IR-A 恒常発現細胞では、IGF-II に応答した MAP kinase 経路 (細胞増殖誘導に重要な IR/IGF-IR シグナル伝達の下流経路) の活性化が起こり、血清存在下での培養で増殖速度が速いことがわかった。これらの結果は、IR-B が主に代謝制御活性を、IR-A が増殖誘導活性も仲介するという仮説を良く支持している。

また、IR-A のみを発現するマウスの樹立に成功し、現在、IR-B のみを発現するマウスを作製中である。

## 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 1 件)

- (1) 高橋伸一郎、福嶋俊明、安藤康年、伯野史彦 2016 インスリン受容体基質を含む巨大分子複合体を介した新しいインスリン様活性調節機構 バイオサイエンスとインダストリー 74: 21-25 (査読なし)

[学会発表] (計 16 件)

- (1) 高橋伸一郎 進化から学ぶインスリン様成長因子/インスリンシステムの生理的意義 日本農芸化学会 2018 年大会 シンポジウム「食の代謝・進化から迫る生命の戦略」4SY03-4 日本農芸化学会 2018 年度大会 2018 年 3 月 18 日 (名古屋)
- (2) 名倉敬仁、尾添敦文、成田佑果、西宏起、千田和広、伯野史彦、片岡直行、高橋伸一郎 インスリン受容体 RNA の組織特異的な選択的スプライシング機構の解析 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 2017 年 12 月 6 日~9 日 (神戸)
- (3) Shin-Ichiro Takahashi Insulin Receptor Substrate-Associated Proteins: The keys to regulation of insulin-like actions. Invited lecture hosted by Dr. Briony Forbes. 9th October 2017 (Flinders University, Adelaide,

- Australia)
- (4) 名倉敬仁、尾添敦文、成田佑果、太田一実、千田和広、伯野史彦、片岡直行、高橋伸一郎 インスリン受容体 RNA の組織特異的な選択的スプライシング機構の解析 第 19 回日本 RNA 学会年会 RNA2017 2017 年 7 月 19 日-21 日 (富山国際会議場)
  - (5) 高橋伸一郎 インスリン様活性の調節機構と動物の一生に果たす役割 第 90 回日本内分泌学会学術総会 教育講演 「IGF-1 の調節と老化における IGF-I の役割」 2017 年 4 月 20 日 (みやこめっせ、京都)
  - (6) Takahito Nakura, Atsufumi Ozoe, Yuka Narita, Kazuhiro Chida, Fumihiko Hakuno, Naoyuki Kataoka, Shin-Ichiro Takahashi Analysis of tissue-specific alternative splicing of insulin receptor pre-mRNA. Gordon Research Conference on IGF & insulin physiology & Diseases 12th-17th March, 2017 (Ventura Beach Marriott, Ventura, CA, USA)
  - (7) Naoyuki Kataoka, Fumihiko Hakuno, Shin-Ichiro Takahashi Regulation of Insulin-like activities through alternative splicing of Insulin Receptor pre-mRNA. International Seminar of Core-to-Core Project “Insulin-like Signaling and Nutrient Signaling: universal signaling for extension of healthy lifespan and improvement of quality for humans and animals” 24th-26th January, 2017 (Nakashima Hall at Food Sciences Building, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo)
  - (8) 高橋伸一郎 RNA を含むインスリン受容体基質複合体の新機能 シンポジウム：異分野との融合による RNA 生物学の新展開 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日 (横浜)
  - (9) 高橋伸一郎 ソマトメジンと私 第 41 回東京成長ホルモン成長因子セミナー 2016 年 11 月 25 日 (東京)
  - (10) Yuuri Nakaoki, Atsufumi Ozoe, Meri Yonezawa-Sone, Toshiaki Fukushima, Kazuhiro Chida, Fumihiko Hakuno, Naoyuki Kataoka, and Shin-Ichiro Takahashi Insulin receptor substrates (IRSs), interacting with Ras-GAP SH3-domain-binding protein 1 (G3BP1), regulate cap-independent translation. RNA2016 28th June-3rd July, 2016 (Kyoto)
  - (11) Takahito Nakura, Atsufumi Ozoe, Yuka Narita, Toshiaki Fukushima, Akihiro Ito, Minoru Yoshida, Kazuhiro Chida, Tomoichiro Asano, Fumihiko Hakuno, Naoyuki Kataoka, Shin-Ichiro Takahashi

- Insulin receptor substrate (IRS)-1 interacts with protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5), regulating alternative pre-mRNA splicing of insulin receptor RNA. RNA2016 28th June-3rd July, 2016 (Kyoto)
- (12) 中沖優里、尾添淳文、曾根芽里、山中大介、福嶋俊明、片岡直行、浅野知一郎、千田和広、伯野史彦、高橋伸一郎 インスリン受容体基質が cap 非依存的翻訳促進に果たす新規機能 日本農芸化学会 2016 年度大会 2016 年 3 月 27 日~30 日 (札幌コンベンションセンター、札幌市産業振興センター、札幌)
  - (13) 高橋伸一郎、伯野史彦、安藤康年 巨大なシグナル分子複合体 IRSome がインスリン活性の調節に果たす新しい役割 ワークショップ・BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会/第 88 回日本生化学大会合同大会) 2015 年 12 月 2 日 (神戸)
  - (14) Shin-Ichiro Takahashi “Regulation of alternative splicing of insulin receptor RNA by insulin receptor substrate” International Seminar: Current boundaries of the expanding landscape of insulin-like activities and beyond 25th September 2015 (Cajal Institute, Madrid, Spain)
  - (15) 高橋伸一郎 GH/IGF-I & longevity 教育講演：IGF-I 研究の最前線 Pfizer Endocrinology Forum 2015 / GH/IGF-I & Longevity 2015 年 9 月 13 日 (虎ノ門ヒルズフォーラム)
  - (16) 高橋伸一郎 インスリン様活性から見たクワシオルコル. 第 15 回新生児栄養フォーラム 2015 年 5 月 31 日 (飯田橋、東京)

[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:

<http://endo.ar.a.u-tokyo.ac.jp/>

## 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)  
東京大学大学院農学生命科学研究科・  
特任准教授

研究者番号：60346062  
藤井 渉 (FUJII WATARU)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・  
助教

研究者番号：40708161  
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

(4) 研究協力者

なし