

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16543

研究課題名（和文）2型リアノジン受容体の組織特異的スプライシングバリエーションの存在意義の解明

研究課題名（英文）Significance of tissue-specific splicing variants of the type 2 ryanodine receptor

研究代表者

牧野 舞 (Makino, Mai)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10736870

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：膵細胞においてインスリン生合成機構に関与する小胞体Ca²⁺チャネルである2型リアノジン受容体（RyR2）には、exon 75を含む「心筋型」とexon 75を欠く「膵細胞型」の組織特異的スプライシングバリエーションが存在する。その存在意義の解明を目指し、ヒト膵細胞由来1.1B4細胞に対しRYR2遺伝子のintron 75の特殊なスプライシング開始配列「gg」を「gt」に変異させRyR2を「心筋型」に改変した結果、インスリン生合成機能の低下がみられた。また、改変マウスの膵島ではグルコース応答性が低下した。以上より、インスリン生合成機能において「膵細胞型」RyR2が重要である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RyR2の選択的スプライシングは組織特異的であることから組織の機能との関連が予想された。今回の研究結果より、膵細胞においてRyR2のスプライス型（発現型）を「膵細胞型」から「心筋型」へ変化させるとインスリン生合成機能が障害されることが示され、インスリン生合成機能において「膵細胞型」RyR2が重要である可能性が示唆された。本研究の成果は、糖尿病の発症原因の一つである膵細胞の機能低下の詳細なメカニズムの解明においてRyR2の機能異常という新しい知見を提供できるものであり、糖尿病の新たな治療薬の開発研究にも貢献しうると考える。

研究成果の概要（英文）：The type 2 ryanodine receptor (RyR2), a Ca²⁺ channel in endoplasmic reticulum involved in insulin biosynthesis in pancreatic cells, has two tissue-specific splicing variants, “cardiac-type” containing exon 75 and “islet-type” lacking exon 75. To elucidate the significance of “islet-type” in pancreatic cells, the splice type of RyR2 was altered to “cardiac-type” by mutating the unique splice donor site of intron 75 in RYR2 gene “gg” to “gt” in human pancreatic cell-derived 1.1B4 cells, resulting in the decline in insulin biosynthesis. In addition, glucose responsiveness was decreased in “cardiac-type” islets of genome-modified mice. These results suggest that “islet-type” RyR2 is important for insulin biosynthesis in pancreatic cells.

研究分野：生化学・分子生物学・糖尿病学

キーワード：リアノジン受容体 カルシウムイオン スプライシングバリエーション インスリン生合成 ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) リアノジン受容体とインスリン分泌

リアノジン受容体 (RyR) は Ca^{2+} の刺激によって細胞内 Ca^{2+} プール (小胞体内腔) から細胞質への Ca^{2+} 放出 (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release; CICR) を行う Ca^{2+} チャネルであり, 細胞内 Ca^{2+} の動態に深く関わる。RyR には遺伝子の異なる骨格筋型 (RyR1), 心筋型 (RyR2), 脳型 (RyR3) の3種類のアイソフォームが存在する。RyR の遺伝子配列の点変異に由来するアミノ酸置換が心疾患や神経疾患の発症に関与することが報告されており, 悪性高熱症やセントラルコア病では RyR1 の点変異が, カテコラミン誘発性多形性心室頻拍や不整脈原性右室心筋症では RyR2 の点変異が発症要因の一つであるとされている。一方, 膵細胞において, グルコース刺激により細胞内情報伝達物質である cyclic ADP-ribose (cADPR) が産生され, これにより RyR2 が活性化し, Ca^{2+} が細胞質へ放出されインスリン分泌が促進される機構が存在することを当研究室で見出し, RyR2 は Ca^{2+} を介したインスリン分泌機能においても重要な役割を果たしていることが判明した。したがって, 心疾患だけでなく糖尿病の発症メカニズムの解明や効果的な治療法の確立・創薬研究において RyR の機能や機能異常のメカニズムを詳細に理解することが重要となる。

(2) リアノジン受容体の組織特異的選択的スプライシング

当研究室ではこれまでに, 心筋で特異的に発現していると考えられていた RyR2 が膵細胞でも発現していること, 心筋で発現している RyR2 と比較すると, 膵細胞型 RyR2 には exon 75 に該当する 12 アミノ酸残基が欠失していること, RyR2 遺伝子の intron 75 のスプライシング開始配列 (ドナー配列) が通常の「gt」ではなく「gg」であること,

RyR2 の exon 75 の有無は組織特異的であることを発見し (図 1, 2 を参照), また, これらがヒトに限らずラット・マウスでも同様の発現様式であることを見出した (Takasawa, *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397, 140-145, 2010)。RyR2 でなぜこのような「GT-AG 則」と異なったスプライシングが組織特異的に行われているのかを解明することは, RyR2 の組織別の機能とそれに関連する疾患の発症メカニズムをより深く理解するための重要な手がかりとなる。

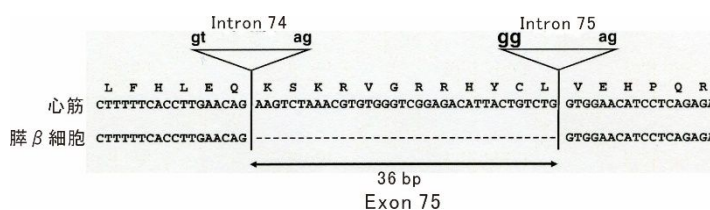


図 1. 心筋型 RyR2 と膵細胞型 RyR2 の塩基配列の一部の比較

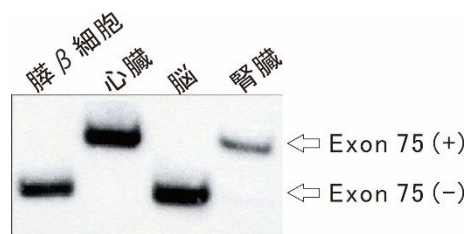


図 2. 組織別のスプライシングパターン

2. 研究の目的

Exon 75 の有無が RyR2 の機能にどのように関わるのか, それにより膵細胞のインスリン分泌機能や心筋細胞の機能にどのような影響が現れるのかを確認し, RyR2 の組織特異的なスプライシングバリエーションの存在意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ゲノム改変細胞のインスリン分泌量及びインスリン mRNA 発現量の測定

インスリン分泌能を保持したヒト膵細胞である 1.1B4 細胞, 及びこれに CRISPR/Cas9 システムにより RYR2 遺伝子の intron 75 のスプライスドナー配列を「gg」から「gt」へホモ改変させた細胞 (ホモ改変細胞と呼ぶ) のうち 2 クローン (#2, #26) から RNA を抽出し, cDNA 合成を行い, インスリン mRNA 量を real-time RT-PCR 法で測定した。また, 1.1B4 細胞及びホモ改変細胞 #2, #26 を 20 mM グルコースを含む RPMI 培地中で 37 °C・1 時間インキュベートし, 培地中のインスリン分泌量を ELISA で測定した。

(2) RyR2 遺伝子の導入後のインスリン mRNA 発現量の測定

ラット心筋型 Ryr2 または膵細胞型 Ryr2 の全長 cDNA を含む発現ベクターを親株 1.1B4 細胞及びホモ改変細胞 #2, #26 に導入し, 48 時間のインキュベーション後の細胞から RNA を抽出し cDNA 合成を行い, インスリン mRNA 量を real-time RT-PCR 法で測定した。

(3)インスリン遺伝子の転写活性の測定

ヒトインスリン遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したレポータープラスミドを作製し、親株 1.1B4 細胞及びホモ改変細胞#2, #26 へ導入した。24 時間のインキュベーション後、細胞を溶解し転写活性をルシフェラーゼ活性として測定した。

(4)マウス膵臓の組織像の確認

CRISPR/Cas9 システムにより *Ryr2* 遺伝子の intron 75 のプライドナー配列を「gt」へ変異させたゲノム改変マウスを作製し、ヘテロ改変マウス同士の交配によりホモ改変マウス(心筋型マウスと呼ぶ)を獲得した。8 週齢の野生型及び心筋型マウスから膵臓を摘出し、組織切片を作製した。

(5)マウス膵島のグルコース刺激によるインスリン分泌量の測定

9~12 週齢の野生型及び心筋型マウスから膵島を単離し、2.8 mM または 20 mM グルコースを含む Krebs-Ringer bicarbonate buffer 中で 37 °C・1 時間インキュベートし、上清中のインスリン分泌量を ELISA で測定した。

4. 研究成果

(1)インスリン mRNA 発現量及びインスリン分泌量を測定した結果、親株 1.1B4 細胞と比較して、ホモ改変細胞#2, #26 ではいずれも顕著に低下していた(図 3A, B)。

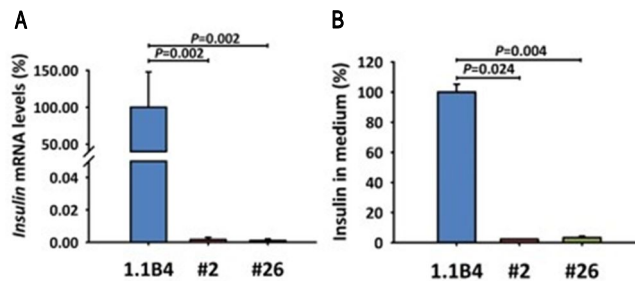
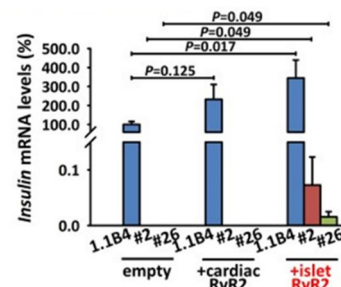


図 3. 親株 1.1B4 細胞及びホモ改変細胞#2, #26 のインスリン mRNA 発現量(A)及びインスリン分泌量(B)

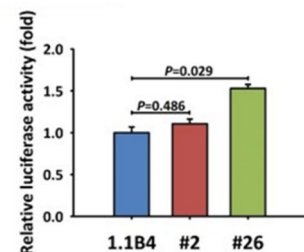
(2)心筋型 RyR2 または膵細胞型 RyR2 発現ベクターを親株 1.1B4 細胞及びホモ改変細胞#2, #26 へ導入し組換え体 RyR2 を発現させたところ、膵細胞型 RyR2 を導入した細胞においてのみインスリン mRNA 発現量の増加がみられた(図 4)。

図 4. 親株 1.1B4 細胞及びホモ改変細胞#2, #26 における心筋型または膵細胞型 RyR2 cDNA 導入後のインスリン mRNA 発現量



(3)インスリン遺伝子のプロモーター領域を用いたレポーターアッセイの結果、インスリン遺伝子のプロモーター活性はホモ改変細胞#2, #26 で低下していないことが示された(図 5)。

図 5. 親株 1.1B4 細胞及びホモ改変細胞#2, #26 におけるインスリン遺伝子のプロモーター活性



(4)野生型及び心筋型マウスから採取した膵臓の組織像を比較した結果、野生型に比べて心筋型マウスの膵臓では膵島のわずかな個数減少が認められた。

(5)一方、野生型及び心筋型マウスの膵島に対するグルコース刺激処理の結果、野生型膵島では高(20 mM)グルコース存在下でインスリン分泌量が 6.98 倍増加したが、心筋型膵島では増加は認められなかった。さらに、低(2.8 mM)グルコースにおけるインスリン分泌量は心筋型膵島の方が野生型より 9.67 倍高かった。

以上の結果より、膵細胞におけるインスリン生合成機能には exon 75 欠失型である「膵細胞型」RyR2 が必要であることが示され、RyR2 を介した Ca^{2+} シグナルはインスリン生合成機能の

特に転写後段階に影響を与える可能性が示唆された。これまで、RyR2 がインスリン生合成機構に関わることは当研究室での先行研究のみならず国内外で研究され知見が蓄積されてきていたが、本研究により RyR2 の組織特異的スプライシングバリエントがその機能発現に關与する可能性を新たに示すことができた。今後は、膵細胞に加え、RyR2 のスプライス型の変化が「心筋型」を発現する心筋や「膵細胞型」を発現する脳神経細胞の機能においてどのような影響を及ぼすのかについても検証し、RyR2 の組織特異的スプライシングバリエントの *in vivo* での意義の解明へと研究を進めたいと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshinori Takeda, Asako Itaya-Hironaka, Akiyo Yamauchi, Mai Makino, Sumiyo Sakuramoto-Tsuchida, Hiroyo Ota, Ryuji Kawaguchi, Shin Takasawa	4. 巻 22
2. 論文標題 Intermittent hypoxia upregulates the Renin and Cd38 mRNAs in renin-producing cells via the downregulation of miR-203	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms221810127	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 Juria Akasaka, Katsuhiko Naruse, Toshiyuki Sado, Tomoko Uchiyama, Mai Makino, Akiyo Yamauchi, Hiroyo Ota, Sumiyo Sakuramoto-Tsuchida, Asako Itaya-Hironaka, Shin Takasawa, Hiroshi Kobayashi	4. 巻 20
2. 論文標題 Involvement of receptor for advanced glycation endproducts in hypertensive disorders of pregnancy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5462
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20215462	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15件（うち招待講演 0件/うち国際学会 10件）

1. 発表者名 Mai Makino, Asako Itaya-Hironaka, Akiyo Yamauchi, Sumiyo Sakuramoto-Tsuchida, Shin Takasawa
2. 発表標題 Tissue-specific alternative splicing of type 2 ryanodine receptor gene affects insulin biosynthesis in pancreatic cells
3. 学会等名 56th EASD Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shin Takasawa, Ryogo Shobatake, Asako Itaya-Hironaka, Mai Makino, Sumiyo Sakuramoto-Tsuchida, Tomoko Uchiyama, Hiroyo Ota, Akiyo Yamauchi
2. 発表標題 Up-regulation of IL-8, osteonectin, and myonectine mRNAs by intermittent hypoxia via OCT1- and NRF2-mediated mechanisms in skeletal muscle cells
3. 学会等名 56th EASD Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shin Takasawa, Ryogo Shobarake, Asako Itaya-Hironaka, Mai Makino, Sumiyo Sakuramoto-Tsuchida, Tomoko Uchiyama, Hiroyo Ota, Akiyo Yamauchi
2. 発表標題 Intermittent hypoxia increased the expressions of interleukin (IL)-8, osteonectin, and myonectine via OCT1 and NRF2 binding to the promoters in muscle cells
3. 学会等名 80th American Diabetes Association Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 正島 良悟, 山内 晶世, 牧野 舞, 内山 智子, 土田 澄代, 京谷 陽司, 太田 浩世, 広中 安佐子, 高橋 信行, 高沢 伸
2. 発表標題 間歇的低酸素は哺乳類骨格筋細胞において糖尿病関連ミオカインのmRNAを増加させる
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 牧野 舞, 広中 安佐子, 山内 晶世, 土田 澄代, 内山 智子, 正島 良悟, 高沢 伸
2. 発表標題 膵 細胞での2型リアノジン受容体の組織特異的スプライシングバリエントの役割
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mai Makino, Asako Itaya-Hironaka, Akiyo Yamauchi, Sumiyo Sakuramoto-Tsuchida, Tomoko Uchiyama, Ryogo Shobatake, Shin Takasawa
2. 発表標題 The involvement of exon 75 of ryanodine receptor on insulin biosynthesis in pancreatic cells
3. 学会等名 International Diabetes Federation Congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Shin Takasawa, Chikatsugu Tsuchida, Sumiyo Sakuramoto-Tsuchida, Tomoko Uchiyama, Mai Makino, Akiyo Yamauchi, Asako Itaya-Hironaka
2 . 発表標題 Expression of human REG IV gene in inflammatory bowel diseases and its possible mechanism
3 . 学会等名 12th International Congress on Autoimmunity (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Mai Makino, Asako Itaya-Hironaka, Akiyo Yamauchi, Sumiyo Sakuramoto-Tsuchida, Yoshinori Takeda, Tomoko Uchiyama, Shin Takasawa
2 . 発表標題 Alteration of alternative splicing of Ryr2 modulates insulin biosynthesis in pancreatic β -cells
3 . 学会等名 81st American Diabetes Association Scientific Sessions (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Shin Takasawa, Asako Itaya-Hironaka, Akiyo Yamauchi, Mai Makino, Sumiyo Sakuramoto-Tsuchida, Tomoko Uchiyama, Yoshinori Takeda, Yoji Kyotani, Hiroyo Ota
2 . 発表標題 Up-regulation of regenerating gene IV and hepatocyte growth factor in cardiomyocytes by intermittent hypoxia and its microRNA-mediated mechanism
3 . 学会等名 81st American Diabetes Association Scientific Sessions (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Yoshinori Takeda, Asako Itaya-Hironaka, Akiyo Yamauchi, Mai Makino, Sumiyo Sakuramoto-Tsuchida, Hiroyo Ota, Ryuji Kawaguchi, Shin Takasawa
2 . 発表標題 Intermittent hypoxia up-regulates Renin and Cd38 mRNAs in renin-producing cells via miR-203
3 . 学会等名 ERS International Congress 2021 (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1. 発表者名 Juria Akasaka, Katsuhiko Naruse, Yoshinori Takeda, Mayuko Ichikawa, Hiroshi Kobayashi, Tomoko Uchiyama, Mai Makino, Akiyo Yamauchi, Asako Itaya-Hironaka, Shin Takasawa
2. 発表標題 Involvement of RAGE pathway in visceral adipose tissue in preeclampsia
3. 学会等名 The 22nd World Congress of International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shin Takasawa, Ryogo Shobatake, Yoshinori Takeda, Tomoko Uchiyama, Akiyo Yamauchi, Mai Makino, Keito Asai, Hiroyo Ota
2. 発表標題 Intermittent hypoxia increased the expression of DBH and PNMT in neuronal cells via microRNA-mediated mechanism
3. 学会等名 82nd American Diabetes Association Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 牧野 舞, 広中 安佐子, 山内 晶世, 竹田 善紀, 土田 澄代, 高沢 伸
2. 発表標題 膵 細胞において2型リアノジン受容体の選択的スプライシングはインスリン生合成機構に影響を及ぼす
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高沢 伸, 山内 晶世, 牧野 舞, 竹田 善紀, 土田 澄代, 太田 浩世, 広中 安佐子
2. 発表標題 間歇的低酸素は哺乳類心筋細胞においてReg IVとHGF mRNAを増加させる
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高沢 伸, 正島 良悟, 竹田 善紀, 内山 智子, 山内 晶世, 牧野 舞, 土田 澄代, 朝井 啓斗, 太田 浩世, 広中 安佐子
2. 発表標題 間歇的低酸素は神経細胞においてカテコールアミン合成酵素mRNAを増加させる
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
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
---------	---------