

研究終了報告書

「冬眠様選択的スプライシング機構の応用法の開発」

研究期間： 2021 年 10 月～2024 年 3 月

研究者： 堀井 有希

1. 研究のねらい

冬眠動物は、冬眠中に環境温度付近の極度の低体温になり、また、数時間で体温を回復させることができる。体温変化に伴い、全身の細胞では劇的な変化が起こるものの、冬眠動物は生命活動を維持することができ、組織障害は観察されない。本研究は、冬眠中の劇的な変化に対して、種々の細胞に共通の障害耐性機能が存在している可能性に着目した。

Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) は RNA 結合タンパク質であり、様々な RNA の転写後調節に関与する。CIRP にはアポトーシスを抑制する効果など、細胞を生存に導く効果が報告されている。CIRP は低温時に特徴的な選択的スプライシングの変化が誘導されるため、冬眠時に何らかの機能を担っている可能性があると考えた。

これまで、自身の研究において、冬眠動物であるシリアンハムスターでは、冬眠時に CIRP 遺伝子の選択的スプライシングが変化し、CIRP mRNA の発現効率が上昇することを発見してきた。平常時に発現が見られる一方で冬眠時には発現が見られなくなるスプライシングバリエントは、CIRP と同一の RNA 結合ドメインを有するものの、活性化に重要な C 末端が異なる配列であった。このことは、平常時に発現するスプライシングバリエントは機能的な CIRP のドミナントネガティブである可能性を示す。つまり、平常時から CIRP mRNA はある程度発現しているものの、スプライシングバリエントによって、合成された CIRP の機能が抑制されている可能性がある。一方、冬眠時には、CIRP mRNA の発現へ集約するため、ドミナントネガティブによる抑制も解除される。このような発現機序により、CIRP が冬眠時に効率よく機能する可能性があると考えた。

さらに、非冬眠動物であるマウスにおいても、人為的に CIRP 遺伝子を冬眠様のスプライシングパターンへ誘導することに成功してきた。このことは、CIRP のスプライシングを介した冬眠時の機能は、非冬眠動物にも再現できる可能性を示していると考えられる。

本研究は、冬眠様の CIRP における RNA 結合タンパク質としての機能を明らかにし、冬眠様の CIRP 発現が病態に関連する可能性と、CIRP の発現調節による治療法が病態の改善へと寄与する可能性を見出すことを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、CIRP 遺伝子のスプライシング部位のゲノム編集により、スプライシングの発現パターンを変化させたゲノム編集マウスの作製に取り組んだ。冬眠様の発現パターンでは、CIRP の Intron 6 がスプライシングされる。まず、ゲノム上から Intron 6 を欠損させたマウス（冬眠型マウス; H 型）系統を確立することに成功した。また、Intron 6 内のスプライシングモチーフを変異させ、Intron 6 のスプライシング効率を変化させたマウス（バリエント型マウス; V1 型、V2 型）系統も確立した。

野生型であれば 28℃付近の低温条件によりスプライシングが冬眠様に変化する。一方、V1 型マウスは、野生型が平常時に発現するスプライシングバリエントのひとつを常に発現し、CIRP mRNA を発現しなかった。V2 型マウスは、CIRP mRNA 及びスプライシングバリエントをいずれも発現しなかった。H 型マウスは、冬眠時に集約するスプライシングである CIRP mRNA を常に発現した。すべての系統について、野生型のような選択的スプライシングの集約は見られなかった。これらのマウスは、冬眠様の選択的スプライシングで変化する機能を描出できる

可能性がある。特に、H 型マウスは、平常時から高い障害耐性を持つことが期待される。

そこで、これらのゲノム編集マウスを用いて、冬眠時に観察されるような障害耐性を調べた。冬眠動物は、虚血-再環流障害に強い、寒冷環境や絶食に適応する、低体温時に生命活動を維持するなどの特徴がある。そこで、ゲノム編集マウスに腎虚血再灌流手術を施し、障害度合いを野生型マウスと比較した。また、寒冷環境や絶食に対しての生理的な応答を比較した。しかしながら、これらの障害モデルにおいて、それぞれのゲノム編集マウス、野生型マウスの間に明らかな違いは認められなかった。一方、それぞれの系統のマウスを急性の低体温へと誘導したところ、系統により不整脈の発生頻度に違いがみられた。このことは、冬眠様のスプライシングが、急性の温度変化に対する心機能維持に重要な役割をもつことを示唆している。また、個体及び細胞において様々な条件に対するスプライシング動態を解析したところ、選択的スプライシングは 30 分以内のタイムスケールで急速に変化し、それに伴い CIRP mRNA の発現量が増加した。このことから、冬眠様の選択的スプライシング制御は、急性障害への耐性付与に役立つ可能性が示唆された。

(2) 詳細

研究項目 1: 冬眠様の選択的スプライシング制御による他の RNA への影響の解析

本研究項目では、野生型マウスの個体及び細胞を用いて、温度等の刺激に対して選択的スプライシングの動態を明らかとし、CIRP の下流においてどのような RNA が変化される可能性があるのかを RNA シーケンスにより抽出した。

まず、人為的に細胞を 28℃ 付近の温度域へ誘導すると、冬眠様の選択的スプライシングパターンを示し、それに伴い CIRP mRNA の発現量が増加することを明らかとした。一方、15℃ へ誘導した場合には、スプライシングパターンおよび CIRP mRNA の発現量は変化しなかった。また、CIRP mRNA が増加した 28℃ の条件であっても、CIRP mRNA 以外の転写物を含む転写物の総量には変化がなかった。このことから、CIRP mRNA の発現量の増加は、CIRP の転写制御に先立ち行われたと考えられる(図 1)。また、低温から 37℃ へ復温させた場合には、スプライシングバリエーションの発現が速やかに平常時のレベルへと回復した。したがって、CIRP の選択的スプライシングによる調節は、可逆的であり、細胞の状況にしたがって速やかに下流の RNA の発現を調節する役割を担う可能性がある。

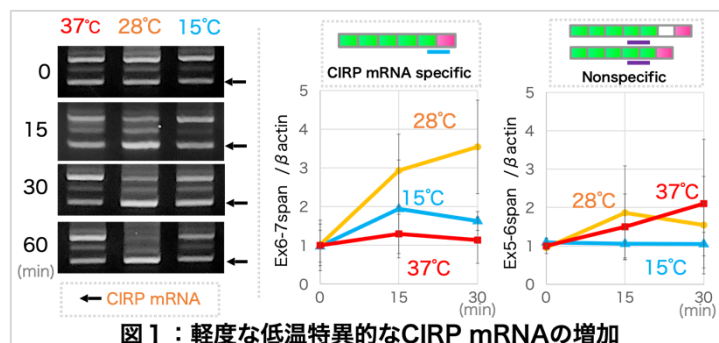


図 1：軽度な低温特異的な CIRP mRNA の増加

細胞の状況にしたがって速やかに下流の RNA の発現を調節する役割を担う可能性がある。

研究項目 2 におけるゲノム編集マウスの確立に伴い、ゲノム編集マウスおよび野生型マウスにおける RNA-Seq 解析を行い、冬眠時の表現系と関連する可能性のある RNA 候補を明らかとした。

研究項目 2: 病態と CIRP 遺伝子の選択的スプライシング制御機構の関連の解明

野生型のマウスは、平常時には CIRP mRNA を含む複数のスプライシングバリエーションが発現する。また、28℃ 付近の低温時には、Exon 6-7 間のスプライシングが行われ、CIRP mRNA の発現に集約するという冬眠様発現を呈する。そこで、CIRP 遺伝子のスプライシング部位の配

列を編集し、スプライシングの発現パターンを変化させたゲノム編集マウスの作製に取り組んだ。まず、ゲノム上から Intron 6 を欠損させたマウス(冬眠型マウス; H 型)系統を確立することに成功した。また、Intron 6 内のスプライシングモチーフを変異させたマウス(バリエント型マウス; V1 型、V2 型)系統も確立した。

次に、mRNA 発現パターンを解析したところ、H 型マウスは、平常時から、冬眠時に観察されるような CIRP mRNA への集約する発現パターンを示した。また、V1 型マウスは、野生型が平常時に発現するスプライシングバリエントのひとつを常に発現し、CIRP mRNA を発現しなかった。V2 型マウスは、CIRP mRNA 及びスプライシン V2 型マウスは、CIRP mRNA 及びスプライシングバリエントをいずれも発現しなかった。次に、野生型マウスのように 28℃付近の温度域でスプライシングの変化が起こるのかを調べた。その結果、ゲノム編集マウスのいずれの系統においても、低温による発現パターンの変化は認められなかった(図3)。仮説の通りに CIRP の冬眠様の選択的スプライシングが冬眠様の障害耐性に関与するとすれば、H 型マウスは平常時から障害耐性を有する可能性がある。一方、V 型マウスの障害耐性は低い可能性がある。

研究項目3: 治療的 CIRP 遺伝子制御による新規治療法の開発

CIRP ゲノム編集マウスの障害耐性を検証した。また、野生型マウスにおいて CIRP の選択的スプライシングを変化させる条件を経た場合、冬眠型マウスと類似した障害耐性を得られるかを検証した。

冬眠動物は、虚血-再灌流障害に強い、寒冷環境や絶食に適応する、低体温時に生命活動を維持するなどの特徴がある。そこで、ゲノム編集マウスに腎虚血再灌流手術を施し、障害度合いを野生型マウスと比較した。しかしながら、腎障害モデルにおいて、それぞれのゲノム編集マウス、野生型マウスの間に明らかな違いは認められなかった。したがって、CIRP のスプライシング変化は腎臓虚血再灌流障害からの保護作用に関与しない可能性が高い。

次に、冬眠動物が餌の不足に適応し、体温を自発的に低下させる行動である日内休眠に着目した。日内休眠はエネルギー温存のために役立つ。本研究においても野生型マウスでは 24 時間以内の絶食により日内休眠が観察され、餌不足へと対応した。しかしながら、H 型および V 型において、絶食による日内休眠の発動や低体温の維持時間、回復について違いは認められなかった。したがって、CIRP の選択的スプライシングは日内休眠のメカニズムにおいても重要な役割は担っていない可能性がある。

続いて、マウスに麻酔薬を用いて急性の低体温へと誘導すると不整脈が引き起こされることに着目した。この条件を強制低体温障害モデルとして、ゲノム編集マウスにおいて違いが観察されるかを調べた。CIRP ゲノム編集マウスにおいて急性低体温へと誘導すると、系統により不整脈の発生頻度に違いがみられた。このことは、冬眠様のスプライシングが、急性の温度変化に対する心機能維持に重要な役割をもつことを示唆している。

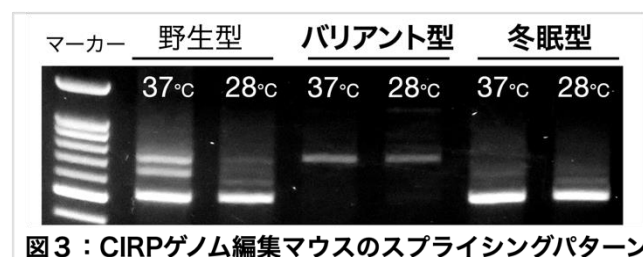


図3: CIRPゲノム編集マウスのスプライシングパターン

3. 今後の展開

現在、心機能保護メカニズムに

ついて精査するため、in vivo および ex vivo 実験系に取り組んでいる。本研究では、RNA の網羅的解析により、CIRP のターゲットとなる候補分子を絞りこんだ。今後、これらの遺伝子について着目し、CIRP の選択的スプライシングとその機能にどのような RNA が関与しているかを明らかとすることを目指している。

4. 自己評価

本研究では、機能解析に有用な複数のゲノム編集マウスを系統化することができた。さまざまな障害モデルの作出を行い、心不全に関与する可能性を示唆する結果を得られた。

本研究の開始当初は、共同研究の経験がほとんどなかったが、ACT-X をきっかけに、現在、共同研究や研究相談のできる関係を築くことができた。勉強会や領域会議にて知り合った若手研究者とのつながりは、研究のアイデアとともに、研究者としての人生設計など、公私ともに気付きをいただける重要な関係となった。このネットワークを今後も発展させていきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 0 件

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主な学会発表

- ・堀井有希, 高橋愛佳, 椎名貴彦, 志水泰武: Cold-inducible RNA-binding protein の冬眠様転写後調節による mRNA 発現動態. 第 31 回日本病態生理学会大会, 2022. 岐阜
- ・堀井有希, 倉田真奈美, 椎名貴彦, 志水泰武: 冬眠動物シリアンハムスターにおける冬眠時の心臓 Akt リン酸化. 第 32 回日本病態生理学会大会, 2023. 東京

著作物

- ・堀井有希, 椎名貴彦, 志水泰武: 実験室における哺乳動物の冬眠・休眠誘導. (総説) 低温科学 81: 131-139, 2023. <https://doi.org/10.14943/lowtemsci.81.131>
- ・堀井有希: 夢の人工冬眠を目指して. 生物工学会誌 101: 314, 2022. https://doi.org/10.34565/seibutsukogaku.101.6_314
- ・堀井有希, 椎名貴彦, 志水泰武: シリアンハムスターにおける低温ショックタンパク質の冬眠特異的遺伝子発現メカニズム. In: 温度ストレスによる生体応答ダイナミクス. 永島計監修. NTS, pp. 167-175, 2022 (ISBN 978-4-86043-830-2)