

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 1日現在

機関番号：34204

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770187

研究課題名（和文） スプライシングアイソフォーム間の機能部位の差異推定法の開発

研究課題名（英文） Development of a estimation method for difference of functional sites among splicing isoforms

研究代表者

塩生 真史 (SHIONYU MASAFUMI)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・講師

研究者番号：30345847

研究成果の概要（和文）：選択的スプライシングにより生じるタンパク質（スプライシングアイソフォーム）の中で、機能が明らかになっている例は少ない。そこで、個々のスプライシングアイソフォームがそもそも機能を持つかどうかを推定する方法の開発を行った。開発した方法を用いて、タンパク質の立体構造形成に重要な疎水性コアの一部を欠失するスプライシングアイソフォームの評価を行ったところ、実際には約20%程度のスプライシングアイソフォームが機能を持つ可能性を初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Although many kinds of splicing isoforms are produced by alternative splicing, splicing isoforms whose functions are investigated are much fewer than all known sequence data of splicing isoforms. Therefore, I developed a pipeline that can estimate a functional significance of splicing isoforms. Using the pipeline, I estimated the functional significance of splicing isoforms that lost their parts important for forming hydrophobic core and seemed not to be stable. As a result, it is suggested that about 20% of such splicing isoform are functionally significant.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：バイオインフォマティクス・選択的スプライシング・機能予測・立体構造予測データベース・次世代シーケンサ・プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

選択的スプライシングは未成熟 mRNA においてスプライスパターンが変わることにより、1つの遺伝子から塩基配列の異なる成熟 mRNA（以下、スプライシングバリエントと示す）が作られる機構である。それぞれのスプライシングバリエントがコードするタンパク質（以下、mRNA と区別するためにスプライシングアイソフォームと示す）が異なる機能を有していれば、1つの遺伝子の機能を多様化することができる。そのため選択的スプライシングは、高等真核生物において遺

伝子機能を多様化させる重要な機構の一つと考えられている（Blencowe, 2006. Cell, 126, 37-47）。

近年、次世代シーケンサをはじめとする転写産物の発現解析技術が進歩するにつれて、選択的スプライシングはごく少数の遺伝子に起こる例外的な現象ではなく、高等真核生物の多くの遺伝子で起こる一般的な現象であることが明らかになってきた。特にヒトでは、複数のエクソンからなる遺伝子の90%以上において選択的スプライシングが起きていることが示されている（Wang et al., 2008.

Nature, 456, 470-476)。一方で、立体構造形成に重要な疎水性コアの一部が欠失してしまうために安定な立体構造が形成できず、生化学的な機能を持たないと推定されるスプライシングアイソフォームが数多く存在することが示されている (Yura et al., 2006. Gene, 380, 63-71)。このことは選択的スプライシングが遺伝子機能の多様化に寄与するという考え方と一見矛盾する。そこで、個々のスプライシングアイソフォームの機能的な有意性を推定し、有意なものについては機能部位の差異を推定する手法の開発に取り組んだ。

2. 研究の目的

発現情報や進化的な保存性、立体構造推定を組み合わせ、選択的スプライシングにより生じるタンパク質間の機能部位の違いを推定する方法を開発することを目的とする。そのために以下のことに取り組む。

- (1) 各スプライシングバリエントの発現情報解析、および、選択的スプライシングの生物種間の保存性解析にもとづいてスプライシングアイソフォームの生物学的な重要性を推定し、重要と推定される立体構造未知のものについては精密な立体構造予測を行うパイプラインを開発する。
- (2) 開発したパイプラインにより得られた結果に基づいてスプライシングアイソフォーム間の機能部位の差異を推定し、それをこれにまで開発してきた選択的スプライシングのデータベースである AS-ALPS から閲覧できるようにすることで、ヒトおよびマウスにおける遺伝子機能解析実験の指針となるデータを提供する。

3. 研究の方法

- (1) 次世代シーケンサにより得られた転写産物配列情報を用いた発現情報解析から、多くの発現、もしくは、発現調節が見られるスプライシングバリエントを特定する。
- (2) AS-ALPS を構築する際に開発した選択的スプライシング同定のパイプラインを用いて、ヒトとマウス以外の全ゲノムが決定されている高等真核生物の選択的スプライシングを同定し、その情報に基づいて複数の生物種において保存されている選択的スプライシングを求める。
- (3) スプライシングアイソフォームの機能的有意性を評価するパイプラインを開発し、有意性があると推定されるものについて立体構造を推定できるようにする。

- (4) 上記により得られた結果を簡便に閲覧できるように AS-ALPS のインターフェースを改良し、ユーザーが機能部位に差異があるかどうかの推定を容易に行えるようにする。

4. 研究成果

- (1) 公共データベース GEO に公開されているヒトの RNA-seq のデータを、AS-ALPS に登録されているヒトゲノム、および、転写産物の塩基配列に対してマッピングを行い、組織間で有意な発現量の差異がみられるスプライシングバリエントや、どの組織でも多くの発現が見られるスプライシングバリエントを特定した。
- (2) これまでに AS-ALPS データベースで扱っていたヒトとマウスに加えて、ショウジョウバエ、線虫、シロイヌナズナ、イネの全ゲノムデータおよび転写産物データに対して AS-ALPS 構築に用いたパイプラインを適用し、これらの生物種の選択的スプライシング情報の収集を行った。その結果、ヒト以外の生物種においても、疎水性コアの一部が欠失する選択的スプライシングが、ランダムに選択的スプライシングが起これるとして期待される値よりも有意に多いことを初めて明らかとした (図 1)。

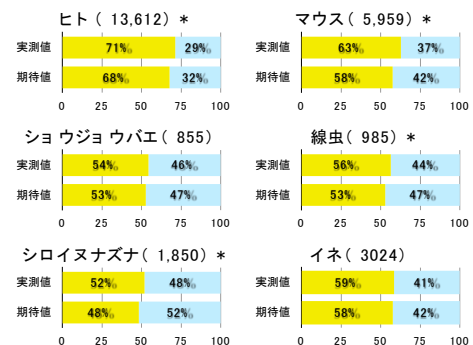


図 1 疎水性コアの一部を欠失させる選択的スプライシングの割合。黄色が疎水性コアを欠失する選択的スプライシングを示す。括弧内は選択的スプライシングにより変化する部位の数を示し、右肩の*は期待値と有意な差があることを示す。

また、得られた結果を用いて、生物種間で位置が保存された選択的スプライシングが起きているスプライシングアイソフォームを特定した。

- (3) スプライシングアイソフォームの機能的有意性を見積もるためのパイプラインを開発した。開発したパイプラインでは、(1)の mRNA レベルでの発現情報と、

(2)の選択的スプライシングにより影響を受ける部位の位置の6種類のモデル生物種間での保存情報に加えて、質量分析法によるプロテオミクス解析のデータベースである PeptideAtlas によるタンパク質レベルでの発現情報を用いるようにした。開発したパイプラインを用いて、すでに機能解析が行われているスプライシングアイソフォームについて評価を行ったところ、約 80%において機能的有意性があると判断され、開発したパイプラインの有効性が見いだされた。

次に、タンパク質の立体構造形成に重要な疎水性コアを失っているために、立体構造の観点からは機能的有意性が低いと考えられるスプライシングアイソフォームの評価を行った。その結果、ヒトにおいて、約 20%の疎水性コア欠失型スプライシングアイソフォームが実際には機能的有意性があると考えられることを明らかにした (図2)。

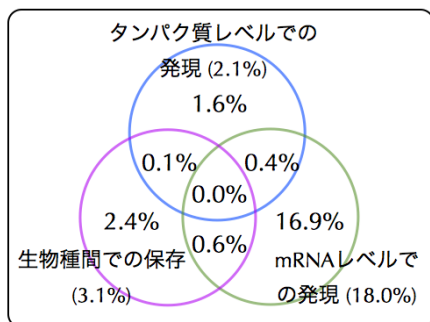


図2 開発したパイプラインにより機能的有意性があると判断された疎水性コア欠失型スプライシングアイソフォームの割合。

これらの機能的有意性があると推定されるものについてその特徴を調べたところ、マルチドメインタンパク質である割合が有意に多かった。いずれかのドメインの立体構造を不安定化する場合が多く、ドメイン構成の変化によってスプライシングアイソフォーム間での機能的差異が生じることが示唆された。これまで、スプライシングアイソフォームの機能の有意性について、立体構造の保持や機能部位の保持にもとづいて評価する研究はなされている (Leoni et al., 2011. *Genome Biol.*, 12:R9) が、これらが保持されていない場合でも機能的有意性があることを示した点は新規のことである。今後は、機能的有意性が見られたスプライシングアイソフォームについて、実験的な検証も行うことを予定している。

- (4) RNA-seq のデータをゲノム上にマッピングした結果、および、PeptideAtlas

のデータをスプライシングアイソフォームにマッピングした結果を AS-ALPS から閲覧できるようにデータベースのユーザーインターフェースを構築した。これにより、AS-ALPS に登録されているスプライシングバリエントが、どの組織で多く発現しているのかについてや、タンパク質として発現しているのかについて、ユーザーが容易に調べられるようになった。さらに、日本語化した AS-ALPS データベースも公開することにより、日本国内において広く選択的スプライシングの解析結果を閲覧し易くした。

また、RNA-seq などの解析により新規のスプライシングバリエントが見つかった場合に、それらがどのような機能的差異を持つかを推定する情報を提供するツールである AS-EAST を公開した (図3)。AS-EAST では、スプライシングバリエントにコードされるスプライシングアイソフォームの立体構造を推定できるようにした。

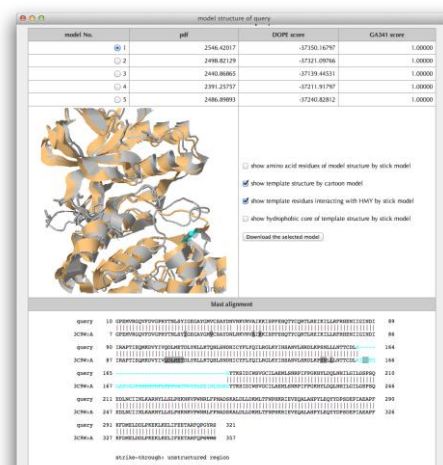


図3 公開した AS-EAST におけるスプライシングアイソフォームの立体構造推定結果の表示。

AS-ALPS、および、AS-EAST のユニークな訪問者数は図4のようになっており、徐々に増加してきている。また、英国や米国、ブラジルなどの国外からのアクセスも多い。今後も AS-ALPS と AS-EAST のデータ更新や機能改良を継続し、より有用性のある選択的スプライシングのデータベースおよび解析ツールにして行く。

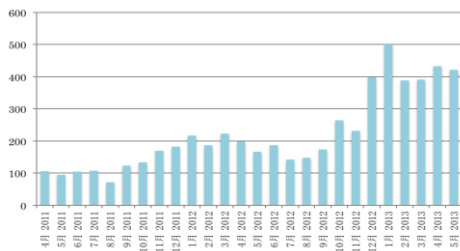


図4 AS-ALPS の訪問者数の推移。
2011年12月からはAS-EASTへの訪問者数も含む。

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2件)

- ① Masafumi Shionyu, Ken-ichi Takahashi, Mitiko Go
AS-EAST: a functional annotation tool for putative proteins encoded by alternatively spliced transcripts. *Bioinformatics*, 2012, 28:2076-2077
査読有り
doi: 10.1093/bioinformatics/bts320
- ② Satoru Hirako, Masafumi Shionyu
DINE: A novel score function for modeling multidomain protein structures with domain linker and interface restraints. *IPSJ Transaction on Bioinformatics*, 2012, 5:18-26
査読有り
doi:10.2197/ipsjtbio.5.18

[学会発表] (計6件)

- ① Shiori Ikeda, Ken-ichi Takahashi, Masafumi Shionyu
Conservation and expression analyses of splicing isoforms lacking part of the hydrophobic core.
第35回日本分子生物学会年会、2012年12月14日、福岡
- ② Masafumi Shionyu, Ken-ichi Takahashi, Mitiko Go
Development of a functional and structural annotation tool of novel protein isoforms produced by alternative splicing.
日本生物物理学会第50回年会、2012年9月23日、愛知
- ③ 池田志織, 高橋健一, 塩生真史
保存された選択的スプライシングがタンパク質疎水性コアに与える影響の解

析

第12回日本蛋白質科学会年会、2012年6月22日、愛知

- ④ Shiori Ikeda, Ken-ichi Takahashi, Masafumi Shionyu
Comprehensive analysis of the effects of alternative splicing on protein structures
第34回日本分子生物学会年会、2011年12月14日、神奈川
- ⑤ Masafumi Shionyu, Ken-ichi Takahashi, Mitiko Go
AS-EAST: a web tool for functional annotation of protein isoforms produced by alternative splicing
第34回日本分子生物学会年会、2011年12月14日、神奈川
- ⑥ 池田志織, 高橋健一, 塩生真史
タンパク質立体構造の疎水性コアに対する選択的スプライシングの影響
第11回日本蛋白質科学会年会、2011年6月8日、大阪

[その他]

ホームページ等

AS-ALPS データベース

<http://as-alps.nagahama-i-bio.ac.jp/>

AS-EAST オンラインツール

<http://as-alps.nagahama-i-bio.ac.jp/ASEAST>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩生 真史 (SHIONYU MASAFUMI)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・講師

研究者番号：30345847

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：