

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670134

研究課題名(和文)mRNAスプライシング活性調節による脂肪細胞分化制御に関する研究

研究課題名(英文)Study on regulation of adipocyte differentiation through the control of mRNA splicing activity

研究代表者

甲斐田 大輔(Kaida, Daisuke)

富山大学・先端ライフサイエンス拠点・准教授

研究者番号：60415122

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):マウス3T3-L1細胞において、低分子化合物を用いてスプライソソームの構成因子の機能阻害を行ったところ、濃度依存的な脂肪細胞分化の抑制が観察された。また、その抑制効果は、分化誘導段階においてスプライソソームの機能阻害を行うことによって顕著に観察された。また、各snRNAを個別に阻害した際にある特定のイントロンのみが抵抗性を示すことが明らかとなった。このような反応性の違いが、細胞分化に何らかの影響を与えていると考えられる。

研究成果の概要(英文):We treated mouse 3T3-L1 cells with a splicing inhibitor that binds and inhibits U2 snRNP, and found that adipogenesis was inhibited in a dose dependent manner. The significant inhibition of adipogenesis was observed if the cells were treated with the splicing inhibitor when the cells were cultured in differentiation medium. We also found that some introns showed resistance against splicing inhibition in an intron- and snRNA-dependent manner. These dependency might affect differentiation efficiency.

研究分野：分子生物学

キーワード：スプライシング snRNP

## 1. 研究開始当初の背景

真核細胞においては、転写されたばかりの mRNA は未成熟の状態であり、スプライシングによるイントロンの除去などの転写後修飾を受け成熟型となる。スプライシング反応を担うのはスプライソソームと呼ばれる高分子複合体であり、U1, U2, U4, U5, U6 snRNP という5つの構成因子が会合することによりスプライソソームが形成される。これら snRNP の細胞内存在量は各組織においてそれぞれ異なることが知られており、また、その量の変動は遺伝子発現パターンの変化を引き起こす。この遺伝子発現パターンの変化は、活性化ニューロンやがん細胞の性質に影響を与え、さらには脊髄性筋萎縮症などの疾患を引き起こすことが知られている (Zhang et al., Cell 2008; Kaida et al., Nature 2010; Berg et al., Cell 2012)。

これら snRNP の存在量が変化することにより、細胞分化にどのような影響があるかを確かめるため、マウス 3T3-L1 細胞が脂肪細胞へと分化する際の snRNP の量を測定したところ、幾つかの snRNP の存在量に変動が観察された。このことから、これら変動の観察された snRNP は脂肪細胞分化に大きな役割を果たしていると推測される。

各 snRNP は、snRNA と pre-mRNA 間の RNA-RNA 結合により pre-mRNA と結合している。したがって、その RNA-RNA 結合を阻害するようなアンチセンスオリゴで細胞を処理することにより snRNP の機能を個別に阻害できると考えられる。また、もし snRNP が阻害できたならば、スプライシング活性が低下するものと考えられる。先行研究において、そのようなアンチセンスオリゴを用いることにより、スプライシングが阻害されることを確かめている。

## 2. 研究の目的

先行研究から、脂肪細胞分化時に snRNP の存在量に変動が観察され、幾つかのものは上昇していた。このことから、これらの存在量が上昇した snRNP は脂肪細胞に必須な snRNP だと考えられる。そこで、これら脂肪細胞分化時に上昇する snRNP の機能を、脂肪細胞分

化時にアンチセンスオリゴを用いて阻害し、その際に細胞内で起こる変化を詳細に解析することにより、脂肪分化のメカニズムの統合的な理解と、肥満症の改善を目的とした研究を行う。

## 3. 研究の方法

snRNP 量の変化が脂肪細胞分化に与える影響を明らかにするために以下の実験を行なう。

(1) 各 snRNP の機能阻害を行ない、脂肪細胞分化の効率を測定する。

(2) 各 snRNP の機能阻害時の遺伝子発現の変化を観察し、脂肪細胞分化に影響を与える原因遺伝子の探索を行なう。

これらの実験から、snRNP 量の変化が脂肪細胞分化に与える影響やその生理的意義を明らかにし、これらの知見をもとにして脂肪細胞分化を制御することを目指す。

## 4. 研究成果

(1) snRNP 機能阻害時の脂肪細胞への分化効率

まずは、U2 snRNP の脂肪細胞分化への影響を観察するために、U2 snRNP に結合しその機能を阻害する低分子化合物であるスプライソスタチン A (SSA) で 3T3-L1 処理し、その際の細胞増殖率を測定した。3T3-L1 細胞播種後 1 日目 (Day -2) に通常の DMEM 培地に培地交換を行い、さらにその 2 日後に分化培地へと培地交換した (Day 0)。また、分化培地への交換と同時に細胞を SSA 処理し、その 1、2、3 日後の細胞数も測定した (Day 1, 2, 3)。Day -2 の細胞数を 1 とし、各点での相対的な細胞数の計算を行った。

すると、SSA の濃度依存的に細胞増殖が抑えられることが明らかとなった (図 1)。また、0.5 ng/ml の濃度まではそれほど顕著な差は観察されなかったものの、1 ng/ml 以上の SSA で処理することにより、細胞増殖が強く抑制された。このことから、1 ng/ml 以上の SSA で処理することにより、脂肪細胞分化にとって必須な clonal expansion が抑制されていると考えられる。

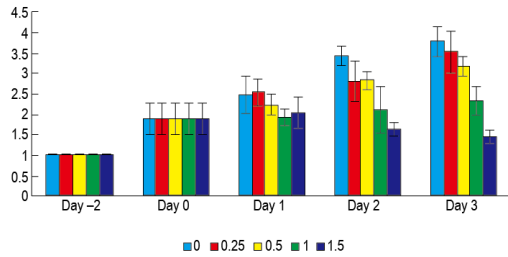


図1 3T3-L1 細胞が脂肪細胞へと分化する過程における SSA が細胞周期進行に与える影響の解析

また、脂肪細胞への分化効率を定量的に観察するために、3T3-L1 細胞を脂肪細胞へと分化させる各過程で細胞を異なる濃度の SSA 処理し、その際の細胞内トリグリセリド量を測定した。分化誘導培地へと培地交換した際に SSA を加え、その後、維持培地へと培地交換した際には SSA を含まない培地で培養したサンプル(分化のみ)と、分化誘導培地には SSA を加えず、維持培地でのみ SSA 処理したもの(維持のみ)と、分化培地、維持培地のいずれにも SSA を添加したもの(分化+維持)の比較を行ったところ、高濃度の SSA(1.5 ng/ml)で処理した際はいずれの条件においても細胞内トリグリセリド量が低下していたが、中程度の濃度の SSA (1 ng/ml) で処理した際は、分化誘導段階に SSA が含まれているサンプルでより強い効果が観察された。このことから、分化誘導時の clonal expansion が分化にとって必須であり、その後の維持培地での培養は比較的スプライシングの異常に耐性を示すということが明らかとなった。

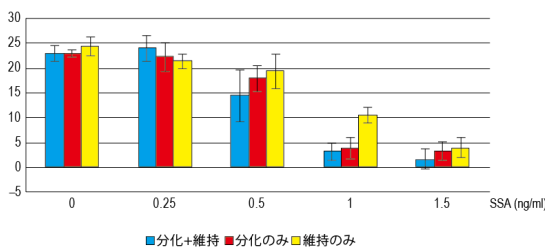


図2 3T3-L1 細胞が脂肪細胞へと分化する過程における SSA が細胞内トリグリセリド量に与える影響の解析

(2) 各 snRNP の機能阻害時の遺伝子発現の

変化の観察を介した、脂肪細胞分化に影響を与える原因遺伝子の探索

次に、各 snRNP を個別に阻害した際のスプライシング阻害の影響をいくつかのイントロンにおいて観察した。そうしたところ、遺伝子 A のイントロン 1 のみが U6 snRNA の阻害に抵抗性を示した。興味深いことに、遺伝子 A のイントロン 2 や他の遺伝子のイントロンは U6 snRNA の阻害に抵抗性を示さなかったことから、イントロン 1 特異的な効果であることが確認された。また、他の snRNA の阻害には抵抗性を示さなかったことから、U6 snRNA 特異的な現象であることが示された。

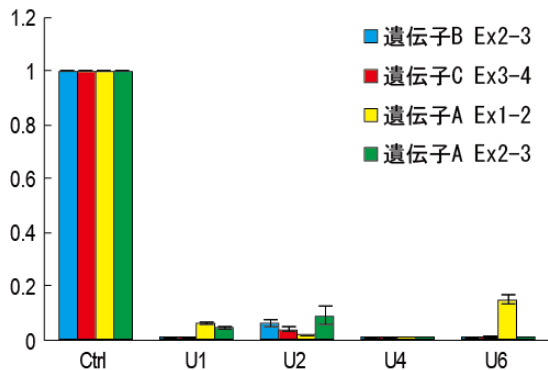


図3 各 snRNA 阻害時における遺伝子 A-C のスプライシングレベル

また、qRT-PCR のみならず、RT-PCR においても U6snRNA 阻害に対する抵抗性の確認を行ったところ、イントロン 2 は U6 snRNA の阻害によりスプライシングを受けた mRNA の量が低下し、イントロンの残った pre-mRNA の蓄積が観察されたが、イントロン 1 に関しては、スプライシングを受けた mRNA のみが観察され、pre-mRNA は観察されなかった。興味深いことに、U6 snRNA の阻害によりスプライシングを受けた mRNA のレベルが上昇していることから、U6 snRNA の阻害、もしくはスプライシングの阻害により遺伝子 A の転写が促進されると考えられる。この転写活性化を引き起こすメカニズムの解明については、今後解析を行っていく予定である。さらに、遺伝子 A のエクソン 1 から 3 までが含まれるプラスミドを構築し、このプラスミド由来の pre-mRNA もまた U6 snRNA の阻害に対して内

在性の遺伝子と同様の反応を示したため、今後は、このプラスミドを用い、U6 snRNA 阻害に対する抵抗性に関わる配列を同定する予定である。

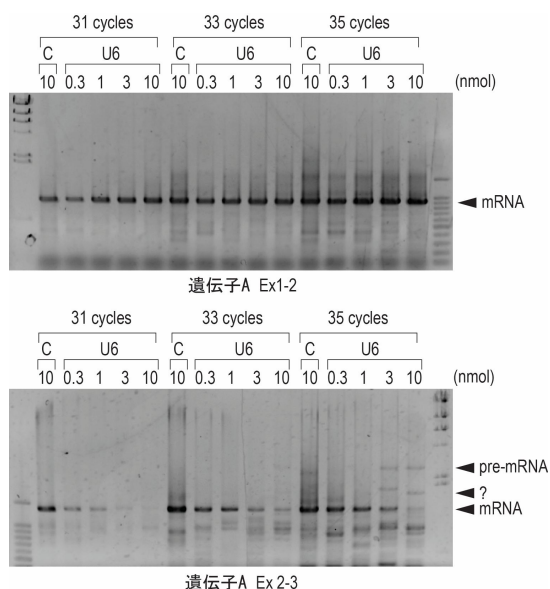


図4 U6 snRNA 阻害細胞中の遺伝子 A のスプライシングレベル

これらの結果から、各 snRNA はそれぞれのイントロンに対して、異なる影響を持っていることが予測される。今後はゲノムワイドな解析を通し、脂肪細胞分化に必須なスプライシングイベントの同定と、その制御機構について研究を行っていく予定である。

## 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)

The reciprocal regulation between splicing and 3'-end processing

Daisuke Kaida

Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, advanced online publication (2016)

DOI: 10.1002/wrna.1348

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

この研究に関する論文を投稿準備中である。

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

甲斐田 大輔 (KAIDA, Daisuke)

富山大学・先端ライフサイエンス拠点・准教授

研究者番号：60415122