

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21125

研究課題名(和文) 脂肪分化におけるRNAスプライシングが制御する遺伝子発現調節機構の解明

研究課題名(英文) Is adipose differentiation-related alternative splicing the essential event for differentiation?

研究代表者

正木 聡 (Masaki, So)

立命館大学・薬学部・助教

研究者番号：70711977

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)：本研究では、脂肪分化の過程で惹起される選択的スプライシングに着目した。スプライシングの変動が脂肪分化を成立させる必須の現象であることを示し、RNAスプライシングを中心とした分化誘導機構の解明を目指した。オープンアクセスのRNA-seqデータを利用し、分化に伴ってスプライシングパターンが変動すると予測される遺伝子を絞り込んだ。続いて、発現パターンのクラスター分類、各クラスターに含まれる遺伝子の機能分類などを行い、分化に関連すると予測される遺伝子を抽出した。これら遺伝子のisoform発現をRT-PCRで検証し、脂肪分化に伴いスプライシングアイソフォームの発現割合が変動する遺伝子を幾つか得た。

研究成果の概要(英文)：This study is designed to verify the essential roles of alternative splicing (AS) in the process of adipose differentiation and to establish the concept that RNA splicing is one of the adipose differentiation-modulators. First, we extracted the genes that seemed their splicing patterns are fluctuating in the process of adipose differentiation, using open access RNA-seq data. Then, we performed a cluster analysis of gene expression patterns, and classified the gene included in each clusters into its physiological functions. We inspected these "candidates" by RT-PCR, and obtained several genes that vary their splicing pattern during adipose differentiation.

研究分野：分子生物学

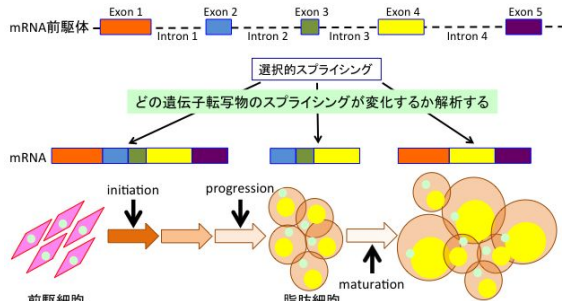
キーワード：脂肪分化 スプライシング 大規模解析

### 1. 研究開始当初の背景

脂肪分化誘導の分子機構は、PPAR や C/EBP などの Master regulator と呼ばれる分子の発現機構、それらの標的遺伝子の機能解析、分化前後の遺伝子発現パターン解析など、様々な観点から精力的に研究されてきた。近年では、次世代シーケンスを用いた大規模解析や、メタボローム解析などの網羅的解析による新たな切り口・方法論からアプローチする制御メカニズムの解明が注目されている。このような解析方法の広がりから、RNA プロセッシングと分化誘導の関連について、まだ多くの研究の余地を残しており、その中でも RNA スプライシングを中心とした分化誘導機構の解明は、新たな科学的知見をもたらすと期待されている。

### 2. 研究の目的

背景でも述べたように、脂肪分化を誘導するキー分子の同定や機能解析を中心とした解析はこれまでに盛んに行われてきた。本研究では、脂肪分化・成熟の過程で惹起される選択的スプライシングに着目した。スプライシングの変動が脂肪分化を成立させる必須の現象であることを示し、その解析結果をもとに、分化誘導に伴うスプライシング変化を制御する化合物や RNA 結合タンパク質を見出すことも目的とした(図1)。



(図1: 研究目的の概略図)

### 3. 研究の方法

脂肪細胞への分化・成熟過程における選択的スプライシングの経時変化を捉えるため、分化誘導過程のスプライシングパターン変動の網羅的解析を行った。本研究では、マウス由来の脂肪前駆細胞である 3T3-L1 を用いて、分化誘導前(0 時間)、分化誘導後 24 時間と 48 時間の 3 つのタイムポイントでの遺伝子発現変化を RNA-seq を用いて解析した。

#### (1) RNA-seq による遺伝子発現解析

RNA-seq データは、TopHat (v2.1.1)を用いてアライメントした。Reference 配列には *Mus musculus* genome Build 37.2 を用いた。リードのアライメント結果と遺伝子アノテーション情報を元に、Cufflinks (v.2.2.1)を用いて各遺伝子の遺伝子発現量を推定した。また、発現データの可視化には CummeRbund (v.2.22.0)を用い、時間経過に従って、有意に

発現差異を示し、かつ、それら遺伝子のアイソフォームの発現バランスの変化が示唆された遺伝子を抽出した。

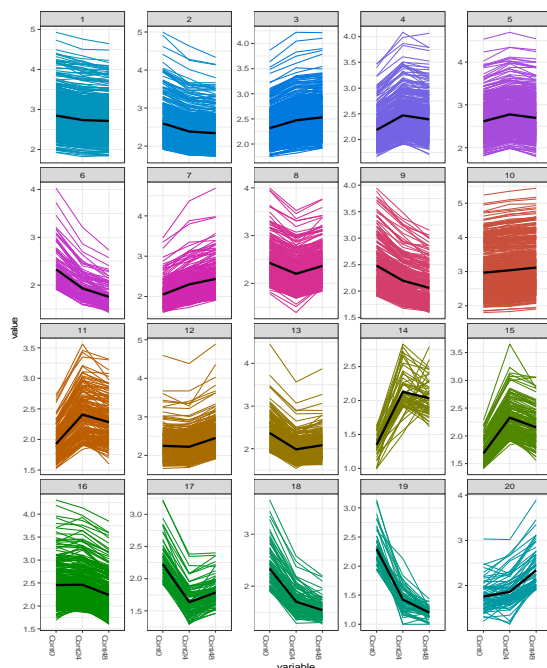
#### (2) RT-PCR による遺伝子の発現検出

上記(1)の RNA-seq 解析結果を元に、これら遺伝子のアイソフォーム発現を RT-PCR で検証した。本研究では、脂肪細胞への分化誘導実験で汎用されている 3T3-L1 細胞を用いた。また、脂肪への分化は、基本培地に insulin、dexamethasone、IBMX (3-Isobutyl 1-methylxanthine) の 3 剤を添加した initiation step(48 時間)、さらに insulin のみを添加した progression step(48 時間)を経て maturation step(通常培地で培養)に至らせ、分化を誘導する方法を採用した。

### 4. 研究成果

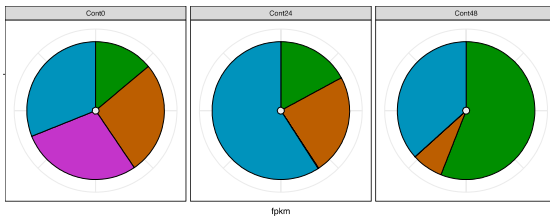
#### (1) 時系列 RNA-seq 解析

RNA-seq 解析により、5200 個の遺伝子に発現差異が示唆された。この遺伝子群を 20 の発現変動パターンに分類した(図2)。その結果、時系列に従い、発現低下を示すクラスター群(クラスター 1, 2, 6, 9, 13, 17, 18, 19)が検出され、それらクラスターには 1862 遺伝子が含まれていた。また発現増加を示すクラスター(クラスター 3, 7, 10, 11, 14, 15, 20)には 1641 遺伝子が含まれていた。これらそれぞれのクラスターに含まれる遺伝子群がどのような機能に関連するのか、DAVID (v.6.7)を用いて機能解析を行った。発現低下を示したクラスター群に含まれる遺伝子は Lysosome, actin binding, protein localization などに関連する遺伝子が多かった。一方で、発現増加を示すクラスター群に含まれる遺伝子は ribonucleoprotein complex, M phase of mitotic cell cycle, RNA processing に関連するものが多かった。



(図2 :  $p < 0.05$  を満たす発現変動遺伝子のクラスタリング)

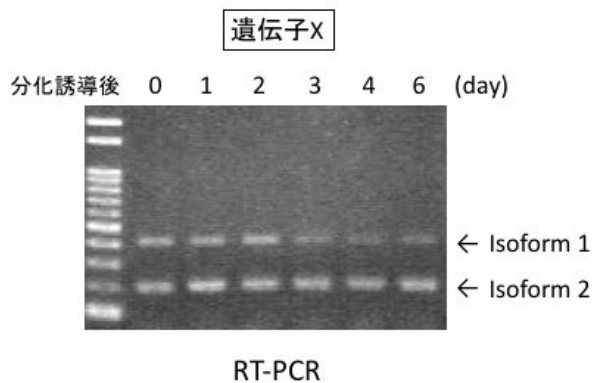
次に、これらのクラスタに含まれる各遺伝子について、RNA-seq 解析結果を用いてアイソフォームレベルでの有意な発現変動を示す遺伝子を抽出したところ、3183 のアイソフォームが1つ以上のタイムポイントで有意な発現差を示すことが示唆された。これら、遺伝子レベル、アイソフォームレベルでの発現変動結果を統合し、脂肪分化の初期でスプライシングパターンが変動する可能性がある遺伝子を絞り込んだ(図3)。



(図3 : 時系列における発現変動を示す遺伝子 X のスプライシングアイソフォームの発現変動図。各色ごと、一つのアイソフォームを示している。)

#### (2) RT-PCR による検証

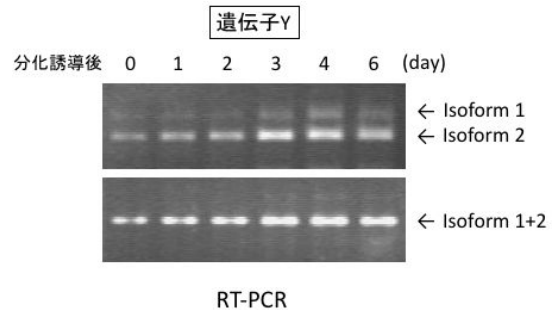
上述したように、脂肪分化のプロセスでスプライシングアイソフォームの発現割合が変動する遺伝子を抽出できたので、それら各遺伝子のアイソフォーム発現を RT-PCR 法によって検証した。図4に示す結果はその一例である。



(図4 : 遺伝子 X のスプライシングアイソフォームの発現量比)

当初の計画では、分化誘導の過程において転写レベルで発現が変化する RNA プロセッシングに関連する遺伝子群を抽出し、その発現変動とスプライシングアイソフォームの変動が協調するような分子機構の解明を目指していた。しかしながら、スプライシングアイ

ソフォームの変動とマッチングして発現が大きく変動する RNA プロセッシング関連遺伝子は見出すことはできなかった。一方、遺伝子 X とは異なる様式でスプライシングアイソフォームの割合が変動する遺伝子 Y を見出した(図5)。



(図5 : 遺伝子 Y のスプライシングアイソフォームの発現量比とアイソフォームを区別しない発現量)

アイソフォームを区別しないプライマーで PCR 反応させた産物が「Isoform 1+2」のバンドに相当するが、これは分化誘導に伴って転写が活性化し、遺伝子 Y の mRNA レベルが増加していることを示す。このように転写を介しながらある一方のスプライシングアイソフォームの発現量を増加させる遺伝子も存在することが判明した。

今後は、遺伝子 X や Y を含め、分化誘導に伴ってスプライシングアイソフォームが変動する遺伝子に対して、それらの変動を制御する分子の同定を行っていきたい。研究計画では、このスプライシングを変動させるタンパク質や化合物の同定まで解析する予定であったが、上述したように、大規模解析から判明した遺伝子変動が予想とは異なる結果であり、現在は、遺伝子 X や Y のスプライシングの変動を検出するツール作りの過程である。研究期間で得られた結果・知見をもとに、さらに解析を進め、研究目的である「分化誘導時のスプライシングアイソフォーム変動を制御することで、分化の成立に影響を及ぼすことができるか」を検証していきたい。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

(1)大出寧香、倉はるか、鈴木健二、正木聡 スプライシングレポーターを用いた PKM スプライシングスイッチの生理的意義の解明 衛生薬学・環境トキシコロジー フォーラム 2017 年

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

正木 聡 (MASAKI, So)

立命館大学・薬学部・助教

研究者番号 : 70711977