

みにれびゅう

## 体細胞初期化過程における選択的スプライシングの変化とその分子機構

太田 翔<sup>1</sup>, 山本 拓也<sup>1,2</sup>

### 1. はじめに

特定の転写因子を強制的に発現させることにより分化後の体細胞が多能性を持つ細胞 (iPS 細胞) へと変換される体細胞初期化現象が, 2006 年マウスで<sup>1)</sup>, 2007 年にはヒトで<sup>2)</sup>報告された。それ以来, iPS 細胞の医療・創薬応用への期待もあり, 体細胞初期化の分子メカニズムにアプローチする研究が世界中で精力的に行われている。特に Oct4, Sox2 をはじめとする多能性関連遺伝子群を中心とした転写制御ネットワークや, 遺伝子発現調節に重要なエピジェネティック修飾制御に関する研究が多数報告されている。しかしながら, 体細胞初期化過程における選択的スプライシングの変化やその制御機構は不明な点が多い。本稿では我々の研究内容を中心に, 体細胞初期化過程における選択的スプライシング制御の重要性とその分子機構を紹介する。

### 2. 選択的スプライシング

ゲノム DNA にコードされている遺伝子は, 核内でメッセンジャー RNA (前駆体 mRNA) へと転写された後, さまざまな修飾を受け (転写後修飾), 成熟した mRNA となる。成熟した mRNA は細胞質へ移行し, mRNA の塩基配列をもとにタンパク質へと翻訳される。RNA スプライシングは, 転写後修飾の一つであり, 前駆体 mRNA からイントロン配列を取り除き, エキソン配列どうしをつなぎ合わせる機構のことである。RNA スプライシングの中でも

選択的スプライシングは, エキソン配列を選択的につなぎ合わせることにより, 単一の遺伝子から配列が一部異なる複数の mRNA (スプライシングバリエント) を生み出す。その結果, 同一遺伝子からアミノ酸配列が異なる複数のタンパク質を産生することができる。したがって選択的スプライシングは細胞内のタンパク質の多様性を生み出す原動力となっている<sup>3)</sup>。また, アミノ酸配列に影響を与えるだけでなく, 安定性や翻訳活性の異なる mRNA を生成することにより遺伝子発現制御にも関与している。

### 3. 生理的プロセスにおける選択的スプライシングの役割

これまでに, 多くの生理的プロセスにおいて選択的スプライシング制御が重要な役割を担っていることが知られている<sup>4)</sup>。多能性幹細胞の一つである胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いた研究からも, ES 細胞特異的に選択的スプライシングを受ける遺伝子や, 選択的スプライシングにより機能の異なるタンパク質が産生される多能性関連遺伝子が見つかった。特に, 転写因子 FOXP1 には, ES 細胞特異的なスプライシングバリエント (FOXP1-ES) と体細胞型のスプライシングバリエント (FOXP1) が存在し, それら二つのバリエントは DNA 結合配列が異なり, 別々の遺伝子群をターゲットとすることが示された<sup>5)</sup>。さらに, FOXP1-ES と FOXP1 は, 多能性維持や体細胞初期化過程で異なる働きをすることも明らかとなった<sup>5)</sup>。この報告により, 体細胞初期化過程においても選択的スプライシングが深く関与していることが示唆されていたが, 体細胞初期化過程における選択的スプライシング制御機構は不明なままであった。さらに, 選択的スプライシングが遺伝子発現と同様に体細胞初期化によってゲノムワイドにリセットされるか否かも明らかではなかった。そこで, 我々は, 体細胞初期化過程における選択的スプライシングの変化を網羅的に解析し, それらの制御機構を明らかにすることを目的とし研究を開始した。

<sup>1</sup>京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) (〒606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町 53)

<sup>2</sup>京都大学物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS) (〒606-8302 京都府京都市左京区吉田牛ノ宮町)

#### Alternative splicing regulation during somatic cell reprogramming

Sho Ohta<sup>1</sup> and Takuya Yamamoto<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), 53 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto, Kyoto 606-8507, Japan; <sup>2</sup>Institute for Integrated Cell-Material Sciences (WPI-iCeMS), Kyoto University, Yoshida-Ushinomiya-cho, Sakyo-ku, Kyoto, Kyoto 606-8302, Japan)

#### 4. 体細胞初期化によりスプライシングパターンが変化する遺伝子群の同定

まず、体細胞初期化によりスプライシングバリエーションの発現比（スプライシングパターン）が変化する遺伝子の網羅的な同定を試みた<sup>6)</sup>。マウス胚性線維芽細胞（MEF）と、MEFより誘導・樹立したiPS細胞を対象に、次世代シーケンサーを用いたRNAシーケンシングにより解析した。RNAシーケンシングによって得られたリードデータのうち、mRNAのエキソンとエキシソンの連結部位（エキシソ・ジャンクション）に相当するリードデータ（ジャンクションリード）を抽出し、それらのリード数の比を調べることで各遺伝子のスプライシングパターンを決定した（図1A）。本解析により、体細胞初期化前後でスプライシングパターンが変化する遺伝子を587個同定した。また、ES細胞においても同様の解析を行い、MEFとiPS細胞の結果と比較したところ、ES細胞におけるスプライシングパターンとiPS細胞におけるスプライシングパターンが類似していた。この結果は、体細胞初期化によりMEFにおけるスプライシングパターンがES細胞型のスプライシングパターンへとゲノムワイドに変換されていることを示している。

さらに詳細な解析を進めるために、デジタルPCRと定量的リアルタイム-PCR（qRT-PCR）の二つの手法を組み合わせ、遺伝子発現の絶対定量を試みた<sup>6)</sup>。デジタルPCRは、反応液を多数のチャンバーに分割し、PCRを行い、PCR産物が検出されたチャンバーの数をカウントすることによってPCR反応液中のターゲット分子の絶対数を定量する手法である。また、定量的RT-PCRによる相対発現値を、デジタルPCRによって得た単一のリファレンスサンプルにおける絶対定量値で補正することにより、高いスループットで遺伝子発現の絶対定量を行った（絶対定量法）。この絶対定量法により、スプライシングバリエーション間の遺伝子発現を直接比較することができ、スプライシングパターンを分子数の割合として正確に測定できるようになった（図1B）。まず絶対定量法を用いてRNAシーケンシングによる解析結果を検証した。これまでの報告から体細胞初期化に重要であると考えられるDNA結合タンパク質ならびにタンパク質リン酸化酵素をコードする遺伝子を検証の対象とした。その結果、RNAシーケンシングによる解析結果を高い割合で再現できた（38遺伝子中35遺伝子）。さらに、絶対定量法を用いた解析により、ES/iPS細胞におけるスプライシングパターンはさまざまな組織の中で精巣におけるスプライシングパターンに類似していること、体細胞初期化過程で生じるスプライシングパターンの変化はある特定の時期で一斉に起こるのではなく、遺伝子

ごとに異なったタイミングで起こることを明らかにした。

#### 5. 体細胞初期化過程におけるスプライシング制御因子の同定

続いて我々は、体細胞初期化過程での選択的スプライシングの制御因子の同定を試みた<sup>6)</sup>。一般に選択的スプライシングはRNA結合タンパク質が前駆体mRNAに結合することにより制御される。そこで、ES細胞ならびにiPS細胞で高発現するRNA結合タンパク質に着目して解析を行うことにした。まず、マイクロアレイ解析により、ES/iPS細胞で高い発現を示すRNA結合タンパク質をコードする遺伝子を92個抽出した。次に、これら92遺伝子それぞれを標的とするsiRNAを用いて、ES/iPS細胞におけるノックダウンスクリーニングを行った。それぞれのsiRNAによるスプライシングパターンへの影響はハイスループットなqRT-PCR法を用いて解析した。結果、9個のRNA結合タンパク質をコードする遺伝子（U2af1, Srsf3, Snrpal, Nsun2, Ddx46, Hnrmpal, Celf1, Nhp2, Larp4）の発現抑制により、一部のES/iPS細胞特異的なスプライシングパターンが変化する事がわかった。よって、これらRNA結合タンパク質は多能性幹細胞における選択的スプライシング制御因子であると考えられる。さらに、同定したこれら9個のスプライシング制御因子が、体細胞初期化に関与するかどうかを調べた。上記9個の因子をコードする遺伝子それぞれに対してshRNAベクターを作製し、初期化因子（Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc）とともにMEFに強制発現させ、これらの遺伝子の発現抑制がiPS細胞誘導効率に与える影響を解析した。その結果、U2af1およびSrsf3の遺伝子発現抑制によりiPS細胞誘導効率が減少することがわかった<sup>6)</sup>。この結果は、U2af1およびSrsf3が体細胞初期化過程において重要な役割を担っていることを示している。U2af1はU2AFヘテロ二量体のサブユニットであり、未成熟mRNAの3'スプライス部位に結合しスプライシングを促進する<sup>7)</sup>。また、U2af1の存在量が選択的スプライシングに影響を与えることが示されている<sup>8)</sup>。したがって、多能性幹細胞におけるスプライシングパターンはU2af1により維持されている可能性がある。Srsf3はSRタンパク質ファミリーに属し、選択的スプライシング制御因子として知られている。Srsf3ノックアウトマウスは胎胚期に胚性致死となる<sup>9)</sup>。さらに我々の研究結果から、ES細胞におけるSrsf3の遺伝子発現抑制により、多能性関連遺伝子であるNanogとOct4の遺伝子発現が減少することがわかった。これらのことからSrsf3が多能性の維持においても重要な機能を持つと考えられる。

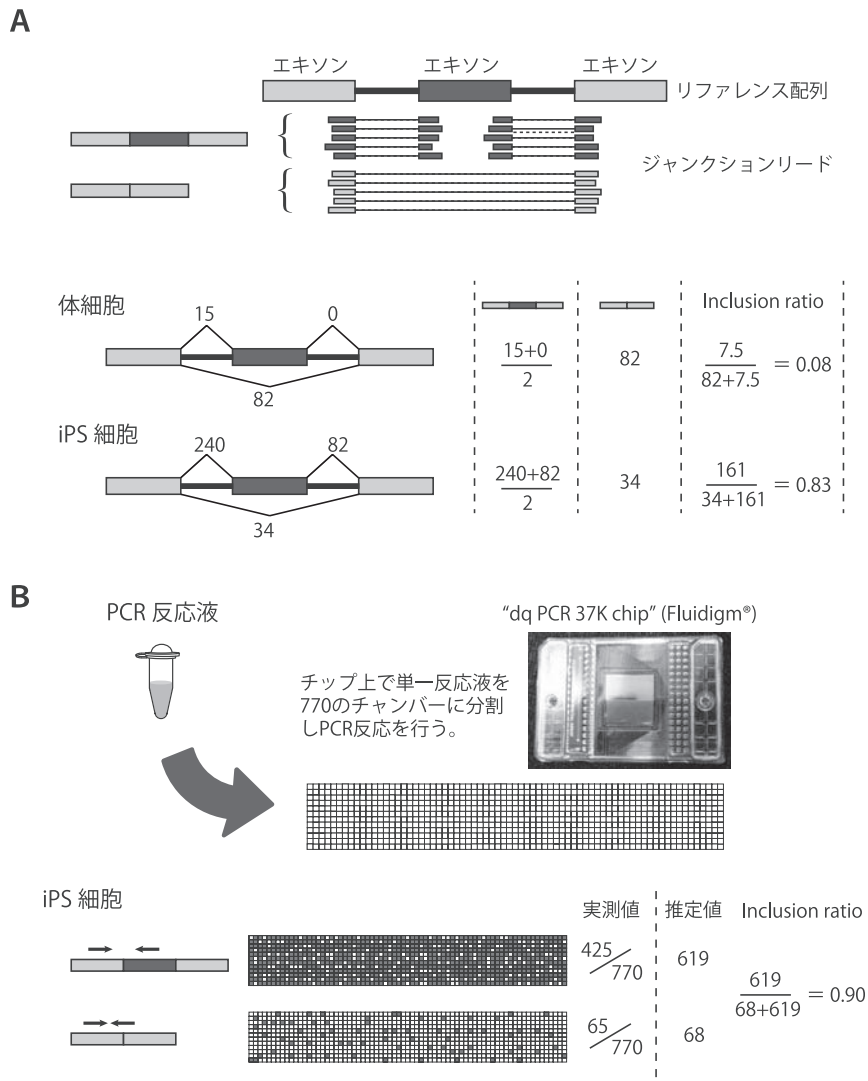
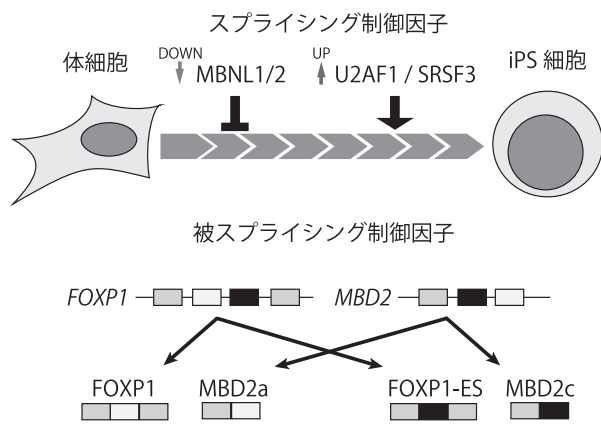


図1 RNAシーケンシングならびにデジタルPCRを用いた選択的スプライシング解析 (A) RNAシーケンシングを用いた選択的スプライシングの解析。エキソン-エキソン連結部位に相当するリード(ジャンクションリード)に着目し解析を行った(上図)。下図には解析の一例を示す。図中の数値はジャンクションリードの数を示す。ジャンクションリードの数に基づいてスプライシングバリエーションの比をInclusion ratioとして定義した。(B) Fluidigm dq PCR 37K chipを用いたデジタルPCRの概説(上図)ならびにデジタルPCRを用いた選択的スプライシング解析の一例(下図)。PCR産物が検出されたチャンバーを灰色で示した。実測値からポアソン分布を用いて補正した推定値に基づきInclusion ratioを計算した。

## 6. 体細胞初期化過程における選択的スプライシング制御の重要性

以上のように我々は、体細胞初期化によりゲノムワイドな選択的スプライシングの初期化が起こることを明らかにし、体細胞初期化過程における選択的スプライシング制御の重要性を示した<sup>9)</sup>。我々の報告と時期を同じくして、別の研究グループからも体細胞初期化における選択的スプラ

イシングの制御メカニズムに関する研究がいくつか報告されている。Hansらの報告によると、RNA結合タンパク質MBNL1およびMBNL2が体細胞初期化における選択的スプライシングを制御していることが示唆された<sup>10)</sup>。我々は体細胞初期化に伴って遺伝子発現が上昇するRNA結合タンパク質の中からU2AF1とSRSF3をスプライシング制御因子として同定したが、本報告では多能性幹細胞特異的に低い遺伝子発現を示す因子としてMBNL1/2を同定した。MBNL1/2は多能性幹細胞特異的な選択的スプライシング



**図2** 体細胞初期化過程における選択的スプライシング制御  
体細胞初期化に関与するスプライシング制御因子ならびに被スプライシング制御因子。体細胞初期化過程においてMBNL1/2 (初期化を負に制御するRNA結合タンパク質)の発現は減少し、U2AF1およびSRSF3 (初期化を正に制御するRNA結合タンパク質)の発現は上昇する。

の実に半数もの制御に関わっており、MBNL1/2の遺伝子発現抑制により体細胞初期化効率が上昇する。MBNL1/2の被制御因子の中には前述のFOXP1が含まれており、FOXP1をはじめとする多能性幹細胞特異的な選択的スプライシング制御を阻害することにより体細胞初期化を負に制御していると考えられる。またLuらは、メチル化DNA結合タンパク質であるMBD2の選択的スプライシング制御が体細胞初期化ならびに多能性の維持に関わっていることを示した<sup>11)</sup>。MBD2のスプライシングアイソフォームMBD2aはES細胞を分化に向かわせる一方で、別のスプライシングアイソフォームMBD2cは体細胞初期化を促進する。さらにMBD2遺伝子のスプライシング制御因子としてSRSF2を同定し、多能性関連遺伝子Oct4を含む3因子により構成される、選択的スプライシング制御を介したポジティブフィードバックループの存在も示唆している。これらの報告は、選択的スプライシング制御と遺伝子発現制御ネットワークとの密接な関連を示しており、体細胞初期化機構の全容解明にはこれらの統合的な理解が必要である(図2)。

## 7. おわりに

以上のように、体細胞初期化における選択的スプライシング制御の重要性は徐々に理解され始めている。今後の研究により、さらに多くのスプライシング制御因子ならびに被スプライシング因子が体細胞初期化メカニズムにおける重要な役者として同定されることが期待される。体細胞初期化に限らず、生理的プロセスにおける選択的スプライ

ングの変化のほとんどはスプライシングアイソフォームの発現を完全に切り替えるものではなく、スプライシングアイソフォームの発現比を変化させるにとどまる。選択的スプライシングの変化はタンパク質間相互作用や遺伝子発現レベルの微調整により細胞内分子ネットワークを形成・再構成しているかもしれない<sup>12,13)</sup>。特にスプライシングを制御するRNA結合タンパク質をコードする遺伝子群は、その多くが自身もスプライシングによる制御を受けることが知られている。実際、我々の解析でも体細胞初期化前後でスプライシングパターンが変化する遺伝子にはRNA結合タンパク質が有意に濃縮していた。このことは、転写因子ネットワークと同様に、RNA結合タンパク質から構成される複雑なRNAスプライシングネットワークの存在を示唆する。今後の研究を通じて体細胞初期化過程におけるRNAスプライシングネットワークの全容が解明されることを期待したい。

- 1) Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006) *Cell*, 126, 663-676.
- 2) Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007) *Cell*, 131, 861-872.
- 3) Nilsen, T.W. & Graveley, B.R. (2010) *Nature*, 463, 457-463.
- 4) Kalsotra, A. & Cooper, T.A. (2011) *Nat. Rev. Genet.*, 12, 715-729.
- 5) Gabut, M., Samavarchi-Tehrani, P., Wang, X., Slobodeniuc, V., O'Hanlon, D., Sung, H.K., Alvarez, M., Talukder, S., Pan, Q., Mazzoni, E.O., Nedelec, S., Wichterle, H., Woltjen, K., Hughes, T.R., Zandstra, P.W., Nagy, A., Wrana, J.L., & Blencowe, B.J. (2011) *Cell*, 147, 132-146.
- 6) Ohta, S., Nishida, E., Yamanaka, S., & Yamamoto, T. (2013) *Cell Rep.*, 5, 357-366.
- 7) Wu, S., Romfo, C.M., Nilsen, T.W., & Green, M.R. (1999) *Nature*, 402, 832-835.
- 8) Pacheco, T.R., Coelho, M.B., Desterro, J.M., Mollet, I., & Carmo-Fonseca, M. (2006) *Mol. Cell. Biol.*, 26, 8183-8190.
- 9) Jumaa, H., Wei, G., & Nielsen, P.J. (1999) *Curr. Biol.*, 9, 899-902.
- 10) Han, H., Irimia, M., Ross, P.J., Sung, H.K., Alipanahi, B., David, L., Golipour, A., Gabut, M., Michael, I.P., Nachman, E. N., Wang, E., Trcka, D., Thompson, T., O'Hanlon, D., Slobodeniuc, V., Barbosa-Morais, N.L., Burge, C.B., Moffat, J., Frey, B.J., Nagy, A., Ellis, J., Wrana, J.L., & Blencowe, B.J. (2013) *Nature*, 498, 241-245.
- 11) Lu, Y., Loh, Y.H., Li, H., Cesana, M., Ficarro, S.B., Parikh, J. R., Salomonis, N., Toh, C.X., Andreadis, S.T., Luckey, C.J., Collins, J.J., Daley, G.Q., & Marto, J.A. (2014) *Cell Stem Cell*, 15, 92-101.
- 12) Buljan, M., Chalancon, G., Eustermann, S., Wagner, G.P., Fuxreiter, M., Bateman, A., & Babu, M.M. (2012) *Mol. Cell*, 46, 871-883.
- 13) Ellis, J.D., Barrios-Rodiles, M., Colak, R., Irimia, M., Kim, T., Calarco, J.A., Wang, X., Pan, Q., O'Hanlon, D., Kim, P.M., Wrana, J.L., & Blencowe, B.J. (2012) *Mol. Cell*, 46, 884-892.

---

**著者寸描****●太田 翔** (おおた しょう)

京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) 博士研究員, 博士 (生命科学).

■**略歴** 1987 年に生る. 2009 年京都大学理学部卒業. 14 年同大学院生命科学研究科統合生命科学専攻後期博士課程修了. 14 年より現職.

■**研究テーマと抱負** 体細胞初期化過程における選択的スライミング制御機構.

■**趣味** 読書.

**山本拓也** (やまもと たくや)

京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA), 物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS) 特定拠点助教, 博士 (生命科学).

■**略歴** 1977 年大阪府に生る. 2001 年京都大学理学部卒業. 06 年同大学院生命科学研究科統合生命科学専攻後期博士課程修了. 06~09 年同大学院生命科学研究科博士研究員. 09 年京都大学物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS) iPS 細胞研究センター特定拠点助教. 10 年より現職.

■**研究テーマと抱負** 網羅的解析, バイオインフォマティクス, 生化学・分子生物学を駆使し, 統合的に iPS 細胞誘導過程の分子基盤の解明を目指している. 細胞が性質を変化させるための根本原理を明らかにしたい.

■**ウェブサイト** <http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/yamamoto/>

■**趣味** 読書・スポーツ観戦.