

歯状核赤核・淡蒼球レイ体萎縮症タンパク質（DRPLA protein）の転写調節標的遺伝子の探索

著者	波多野 敬子
学位授与年月日	2016-03-24
URL	http://doi.org/10.15083/00073716

博士論文（要約）

論文題目 歯状核赤核・淡蒼球レイ体萎縮症タンパク質
(DRPLA protein) の転写調節標的遺伝子の探索

氏 名 波多野敬子

博士論文の要約

論文題目 歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症タンパク質 (DRPLA protein) の
転写調節標的遺伝子の探索

氏名 波多野敬子

歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症 (dentatorubral-pallidoluysian atrophy, DRPLA) は、常染色体優性遺伝性の脊髄小脳変性症である。発症年齢により主な症状が異なり、若年発症型 (20 歳未満) では進行性ミオクロウスムス、成人発症型 (40 歳以上) は小脳性運動失調と不随意運動が主体である。若年成人型 (20 歳以上 40 歳未満) は遅発成人発症型と若年成人型の中間型を示す。病因は 12p13.31 における *DRPLA* 遺伝子の CAG リピート数の異常伸長 (≥ 49 回) である。CAG リピートは DRPLA タンパク質 (DRPLAp) のポリグルタミン鎖をコードすることから、DRPLA はポリグルタミン病に分類される。発症年齢とリピート数とは負の相関を呈する特徴がある。世代を経る毎に発症年齢が若年化する表現促進現象が知られるが、これはリピート長の不安定性によるものと考えられている。

DRPLA の病態機序については、ヒト剖検脳、トランスジェニックマウス、培養細胞を用いた系において、mutant DRPLAp による核における機能障害が示唆されてきた。DRPLAp の核における機能については、転写 co-regulator としての機能が示されてきたが、転写調節標的遺伝子の全容については明らかではなかった。また、培養細胞を用いた先行研究は truncated DRPLAp を用いた研究が多いが full length DRPLAp と truncated DRPLAp とで機能が異なることが知られており、DRPLA の生理的な機能の解明にあたり、full length DRPLAp を用いた病態機序研究が必要であった。

今回の研究においては DRPLAp の転写の co-regulator としての標的遺伝子を解明することを目的に、full length *DRPLA* 遺伝子を定常発現する培養細胞を用いた RNA-seq 解析により、標的遺伝子を網羅的に探索することとした。

ライン間で均一な環境を作ることを目的に、それぞれ 19 個、88 個のポリグルタミン鎖を有する GFP-full length DRPLA (Q19 or Q88) 遺伝子を Flp-In™ T-REx™ 293 細胞株の同一の FRT (Flp recombination target) 部位に挿入した細胞株を構築した。この細胞株では、GFP-DRPLA 融合遺伝子は Tet-On system 制御下で定常発現させることができる。qRT-PCR と Western blot により GFP-DRPLA 融合遺伝子の発現が Tet-On 24 時間後にピークとなっていたことから、Tet-On 24 時間後の total RNA を用いて RNA-seq を行った。Q19 または Q88 の、各々 Dox (+) or Dox (-) の計 4 条件について、同時並行に 3 つの well を用いて培養し、12 サンプルを 1 set とした。独立に合計 4 set の発現実験を行い、計 48 サンプルから total RNA を抽出した。Total RNA の質は RNA integrity number が 9 以上と良好であること、total

RNA から ribosomal RNA が除去されたことを、Bioanalyzer により確認した。シーケンスライブラリは TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold を用いて作成し、HiSeq 2500 でペアエンドシーケンスを行った。Q88 の set 2 の Dox (+) の 3 サンプルは read 数のばらつきが大きかったため、Q88 の set 2 は解析から除外し、Q19 は 4 set、Q88 は 3 set 分の解析を行った。シーケンスデータとして平均 60 (範囲 : 33-93) $\times 10^6$ /sample の read が得られ、TopHat 2 を用いて平均 30 (範囲 : 11-53) $\times 10^6$ /sample の read が参照配列 hg19 に alignment された。遺伝子発現量と発現変動遺伝子 (differentially expressed genes; DEGs) 抽出は、Cufflinks 2 と edgeR の 2 種類のソフトウェアを並列に用いて行った。各 set の各条件における RNA-seq から得られた発現量の再現性については、3 サンプル同士の遺伝子発現量の Spearman's correlation coefficient は $p \geq 0.98$ であった。DEGs は同じ set の Dox (+) or Dox (-) の 3 サンプルずつの alignment データの比較において、有意水準 $q < 0.05$ を満たして発現変動した遺伝子とした。可能な限り再現性のある DEGs を得るため、Cufflinks 2 と edgeR のそれぞれにおいて Q19 は 4 set、Q88 は 3 set で共通して有意に発現変動する遺伝子を 1st step-DEGs と定義した。1st step-DEGs を対象に Gene Ontology 解析を、DAVID Bioinformatics Resources を用いて行った。Cufflinks 2、edgeR を用いて得られた 1st step-DEGs について、両ソフトウェアで共通して有意に変動する遺伝子を、2nd step-DEGs と定義した。最後に、2nd step-DEGs の validation のため、qRT-PCR を行った。発現変動の方向性が同一であることを以て validate されたとした。

Q19 Dox (+) vs Dox (-) の解析における 1st step-DEGs は、Cufflinks 2 において up-regulate が 11 遺伝子、down-regulate が 9 遺伝子、edgeR において up-regulate が 12 遺伝子、down-regulate が 10 遺伝子であった。2nd step-DEGs は、up-regulate が 9 遺伝子、down-regulate が 7 遺伝子であった。1st step-DEGs についての Gene Ontology 解析では、up-regulate された遺伝子は、骨格の発生、転写調節、RNA 代謝に関する GO term が特徴として抽出された。Down-regulate された 1st step-DEGs は特定の特徴を呈さなかった。2nd step-DEGs のうち 11 遺伝子に対して qRT-PCR による validation を行ったところ全 11 遺伝子が validate された。

Q88 Dox (+) vs Dox (-) の解析における 1st step-DEGs は、Cufflinks 2 における up-regulate が 17 遺伝子、down-regulate が 24 遺伝子、edgeR における up-regulate が 60 遺伝子、down-regulate が 61 遺伝子であった。2nd step-DEGs は、up-regulate が 17 遺伝子、down-regulate が 22 遺伝子であった。1st step-DEGs についての Gene Ontology 解析では、up-regulate された遺伝子は、主に四肢・骨格の発生に関する GO term が特徴として抽出された。Down-regulate された 1st step-DEGs は特定の特徴を呈さなかった。2nd step-DEGs のうち 13 遺伝子に対して qRT-PCR による validation を行ったところ 10 遺伝子が validate された。

今回の RNA-seq の解析において、2 つのソフトウェアで Q19 は 4 set、Q88 は 3 set において有意に変動していた 2nd step-DEGs に対する qRT-PCR による validation においては、行っ

た 24 遺伝子のうち 21 遺伝子が **validate** され、DEGs の抽出方法の確実性が示唆された。

DRPLAp (Q19) の強制発現により発現変動した 11 遺伝子のうち、4 遺伝子が **up-regulate**、7 遺伝子が **down-regulate** されていた。これらの知見は、DRPLAp の生理的機能の解明の手がかりとなるものと考えられた。

DRPLAp (Q88) により **down-regulate** された 7 遺伝子のうちには **loss-of-function** であることが示唆されているヒトのてんかんの病因遺伝子が含まれており、DRPLA の病態を考える上で興味深い知見と思われた。

Q88 Dox (+) vs Q19 Dox (+) の比較についても、set 1, 3, 4 において共通して発現変動する遺伝子 (1st step-DEGs) を抽出した後、Cufflinks 2 と edgeR で共通して発現変動する遺伝子を検討したところ、再現性を持って有意に変動する遺伝子は認めないという結果となった。

Q88 Dox (+) と Q19 Dox (+) の比較において、*DRPLA* 遺伝子の発現量の差も観察されており、結果については慎重な解釈が必要と思われた。

今後の課題は、DRPLAp が、今回見出した 21 遺伝子の転写制御に直接的に影響を及ぼしていることを示すことである。DRPLAp と共役する転写因子に対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降 - 大量並列シーケンシング (**chromatin-immunoprecipitation followed by massively parallel sequencing (ChIP-seq)**) による検討を行い、共役因子がクロマチンに結合する部位と、今回見いだされた遺伝子との関係を検討することが必要である。また、21 遺伝子の *in vivo* における変動を調べるため、今後神経系における検証が必要である。これらの遺伝子が病態に関わっていることが判明すれば、治療介入のシーズになる可能性もあり、注目すべきであると考えられる。