

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07740

研究課題名(和文) ロングリードシーケンサーを用いた筋強直性ジストロフィー2型伸長リピート構造の解明

研究課題名(英文) Long-read sequencing across the DM2 repeat expansion reveals unique insight of repeat expansion structure

研究代表者

松浦 徹 (Matsuura, Tohru)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90402560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではナノポア・ロングリードシーケンサーを用いて、従来解析が困難であった筋強直性ジストロフィー2型(DM2)のCCTGリピート伸長変異の解析を行い、下記の治験を得た。1) 日本人DM2は独自の単一ハプロタイプを共有し、欧米人DM2が共有するハプロタイプと異なっていた。2) 日本人DM2は異なるサイズのリピートを保有し、著明な体細胞モザイクを呈していた。3) 日本人CCTG伸長リピート変異は、複数のCAGAリピート挿入配列を包含しており、近年欧米DM2で報告された所見と類似していた。4) CCTG正常リピートアレルと伸長リピートアレル間にCpGメチル化程度の相違を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノポア・ロングリードシーケンサーを用いて、従来解析困難であった非翻訳領域リピート伸長の一つであるDM2 CCTGリピート伸長変異を解析した。ナノポア・ロングリードシーケンシングは、単一実験でリピート長・リピート内部配列・ハプロタイプ解析・CpGメチル化の同時解析が可能である。本研究は、同手法が伸長リピート変異解析に極めて有用なツールであることを実証した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to characterize the origin and features of expanded CCTG repeats in Japanese DM2 patients. Over the last 15 years, we have identified 7 DM2 patients from 5 unrelated families in Japan. We used Nanopore long-read sequencing (LRS) to investigate the following measures: 1) the phase of SNPs flanking the repeat, 2) repeat length of the expanded repeat, 3) sequence of the repeat tract, and 4) adjacent DNA modifications. LRS revealed that Japanese DM2 patients share a common haplotype, which differs from European DM2 patients. Simultaneous detection of the CNBP repeat region revealed that each read has different number of repeats, suggesting somatic mosaicism of the expanded repeat allele. The sequence within the repeat showed interruptions of the CAGA repeat. We also detected the CpG modifications in the native DNA molecules, which were not substantially altered in normal and expanded alleles.

研究分野：神経遺伝学、神経内科学

キーワード：筋強直性ジストロフィー2型(DM2)、非翻訳領域リピート病、次世代シーケンサー、ハプロタイプ解析、伸長リピート内シーケンス、DNAメチル化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

筋強直性ジストロフィー2型 (DM2) は欧米白人に多い優性遺伝性疾患である。その原因遺伝子変異は数千に及ぶ非翻訳領域 CCTG リピート不安定伸長であるが、リピート長のみでその多彩な表現型を説明できず、そのリピート不安定性・病態メカニズムも明らかではない。申請者はこれまで、アジア人初の DM2 患者を本邦に見出し、比較ゲノム解析により CCTG リピートの由来がレトロトランスポゾンであることを明らかにしてきた。しかしながら、本邦 DM2 の創始者が欧米のそれと同一であるのか、更にそのリピート内部構造は明らかになっていない。DM2 CCTG リピート伸長変異が、なぜ最大 (~11000 リピート) かつ、不安定なのか?そして、多彩な臨床像を示すのか?それらを明らかにするためには、周辺部位を含めた CCTG 伸長リピート構造の解明が必要であり、挿入配列の有無を含めたリピート内・周辺シーケンスを明らかにする必要がある。しかしながら、伸長リピート内シーケンスの解明は、そのクローニングや PCR 増幅が困難で、現実的には不可能であった。そこで、技術的に進展の著しい次世代シーケンサーの中で、~50 kb まで解析可能な 1 分子リアルタイム・ロングリードシーケンサーを用いる解析を考えた。

### 2. 研究の目的

非翻訳領域リピート伸長は翻訳領域リピート伸長に比べ、遥かに大きく、極めて不安定である。リピート長と表現型の相関も極めて弱く、その病態メカニズムも十分解明されていない。その大きな原因の一つは、リピート長が大きくクローニングできず、その内部構造が未解明であることにある。本研究では、PCR やクローニングせずに、ターゲット領域の長い・ネイティブな塩基配列情報を得ることができるロングリードシーケンサーを用いて、DM2 CCTG リピート内部構造を解明する。これらにより、その不安定性・病態メカニズムについて新しい知見が明らかになると考えた。

### 3. 研究の方法

筋強直性ジストロフィー1型を否定された筋ジストロフィー患者群の中から、血縁関係のない日本人 DM2 7 症例を遺伝子診断で同定した。その後、患者から十分量の高純度・高分子 DNA を精製抽出した。ナノポア・ロングリードシーケンサーを用いて、1) CCTG 伸長リピート変異のハプロタイプ解析 2) CCTG 伸長リピート長サイジング 3) CCTG 伸長リピート内シーケンス解析 4) CCTG リピート周辺領域の CpG メチル化解析、を施行した。1)においては、欧米人 DM2 の DNA サンプルを用いて比較検討した。

### 4. 研究成果

我々は、本研究で下記の研究成果を得た。

- 1) 日本人 DM2 は独自の単一ハプロタイプを共有し、欧米人 DM2 が共有するハプロタイプと異なっていた。
- 2) 日本人 DM2 は異なるサイズのリピートを保有し、著明な体細胞モザイクを呈していた。
- 3) 日本人 CCTG 伸長リピート変異は、複数の CAGA リピート挿入配列を包含しており、近年欧米 DM2 で報告された所見と類似していた。
- 4) CCTG 正常リピートアレルと伸長リピートアレル間に CpG メチル化程度の相違を認めなかった。

上記の結果から、本邦 DM2 と欧米 DM 遺伝子変異の起源は異なるが、それらの共通した臨床像は CCTG リピート伸長そのものの病原性に起因すると考えられた。ナノポア・ロングリードシーケ

ンサーは、単一実験で上記 1) ~ 4) の解析を可能とし、伸長リピート変異の解析に極めて有用なツールであることを実証した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakoe K, Shioda, N, Matsuura T	4. 巻 1868
2. 論文標題 A newly identified NES sequence present in spastin regulates its subcellular localization and microtubule severing activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Cell Res	6. 最初と最後の頁 118862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamcr.2020.118862.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Asamitsu S, Yabuki Y, Ikenoshita S, Kawakubo K, Kawasaki M, Usuki S, Nakayama Y, Adachi K, Kugoh H, Ishii K, Matsuura T, Nanba E, Sugiyama H, Fukunaga K, Shioda N	4. 巻 7
2. 論文標題 CGG repeat RNA G-quadruplexes interact with FMRpolyG to cause neuronal dysfunction in fragile X-related tremor/ataxia syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Adv	6. 最初と最後の頁 eabd9440
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abd9440	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------