

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390311

研究課題名(和文) Duchenne 型筋ジストロフィーに合併する

精神発達遅滞に関する新規遺伝子群

研究課題名(英文) Genes responsible for mental retardation complicating to Duchenne muscular dystrophy

研究代表者

松尾 雅文(MATSUO MASAFUMI)

神戸学院大学・総合リハビリテーション学部・教授

研究者番号：10157266

研究成果の概要(和文): Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)では精神発達遅滞(MR)が約3割もの多くの患者に合併する。しかし、ジストロフィン遺伝子の異常とMRの発生とを直接的につなげることは困難である。今回、DMDのジストロフィン遺伝子の解析をもとにMRにつながる遺伝子について研究を行った。その結果、新たなジストロフィン遺伝子のスプライシングバリエーションの同定に成功するなどの成果を挙げた。また新たなジストロフィン遺伝子産物をクローニングし詳細を解析している。

研究成果の概要(英文): DMD is characterized by high incidence of complication of mental retardation, although it is a progressive muscle wasting disease. Here, we have identified a new variant of R-dystrophin. In addition, a new transcript from the dystrophin gene was cloned.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：内科系・臨床医学・小児科学

キーワード：ジストロフィン 精神発達遅滞

1. 研究開始当初の背景

Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)では精神発達遅滞(MR)が約3割もの多くの患者に合併する。このMRの発症に関与する遺伝子の同定は高次脳機能解明の手懸りとして、世界中で大きく注目されている。DMDに合併するMRはジストロフィン遺伝子の3側に異常を持つ側に好発すると考えられてきた。DMDの遺伝子解析を進めたところ、それ以外の遺伝子の異常でもMRを合併することを明らかにしてきた。しかしながら、DMDに合併するMRの詳細な発生機序は不明である。

最近、私たちは、MRを合併したDMD患者の遺伝子診断をする中で、ジストロフィン遺伝子の異常に加えて、X染色体上の未知の遺伝子の断片が挿入された複合遺伝子異常例を少なからずの例で見

出した。これはDMDに合併するMRの発生に関与する遺伝子の解明手掛かりである。そこで、遺伝子診断結果を出発点として、DMDのMR合併に関与する遺伝子群について明らかにした。

2. 研究の目的

本研究は、DMDに合併するMRの責任遺伝子としてすでに手掛かりが得られた断片、あるいは、その他のMRと関連すると考えられる遺伝子を対象として、これら一群の新規遺伝子のクローニングを行い、分子生物学的・分子遺伝学的手法を駆使してMRの責任遺伝子との関連を明らかにするものである。

3. 研究の方法

すでに手懸りを得ている新規A遺伝子に関する研究と他の候補遺伝子の研究を同時に実施した。

方法

1) 新規A遺伝子cDNA全塩基配列の解明

手掛かりを得ている新規A遺伝子のcDNAの全塩基配列を明らかにするために、ここでは試薬として入手できるヒトRNAを材料としてcDNAを合成し、5'あるいは3' Rapid Ends Cloning法(5' RACEあるいは3' RACE)などの手法を駆使した。そして、明らかにしたcDNA配列をもとにヒトゲノム配列上に各エクソンを同定し、この新規A遺伝子の構造全体を明らかにした。さらに、転写活性の高い臓器を明らかにするために、ヒト各臓器RNAを対象にして、RT-PCR法により転写産物の定量解析を実施した。

2) スプライシングバリエント解析

MRの発症に関与すると考えられるジストロフィンのアイソフォームを対象にして未だ知られていないスプライシングバリエントの存在について検討した。そのために、脳機能と関連する各アイソフォームの塩基配列を基にさらに逆転写PCR増幅を行い、増幅産物に未知のものがあるか解析した。得られた産物の塩基配列を明らかにし、新しいバリエントの発現をヒト各組織をRT-PCR解析して同定した。

3) ジストロフィン遺伝子への挿入配列に関する研究

ジストロフィン遺伝子に新たにレトロトランスポゾンとして挿入された配列を明らかにしてきた。その配列の起源と役割について検討した。その起源と考えられる配列が11番染色体にあることから、その挿入配列の全体像をゲノムシーケンスで明らかにした。さらに患者家系においても同様な配列を有するか検討した。さらに、挿入配列の機能を探るため、ヒト組織mRNAを対象としてRT-PCR法による発現量解析を実施した。

4) 新規ジストロフィン転写産物

多くのDMD患者のmRNA解析あるいは免疫染色解析を続けていくと、巨大なジストロフィン遺伝子の中央部内から転写されるmRNAの存在が示唆される。そこで、この新規転写産物のクローニングと特徴化をおこなった。全長クローニングをはかるため現在明らかにしている断片の配列を起点として、5' RACEあるいは3' RACE法を駆使してcDNAの5'あるいは3' 端領域をクローニングし、その全塩基配列を明らかにした。さらにヒト組織でそれが発現組織解析した。塩基配列からそこにコードされると予想されるタンパクのアミノ酸配列を明らかにした。そしてその配列をも

とに抗体を作成し、ヒト組織での発現解析を実施している。

4. 研究成果

1) A 遺伝子に関する研究

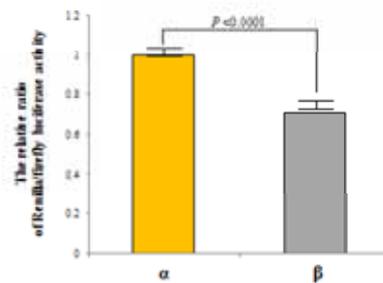
ある1人のMRを合併したDMD患者で見出した新規融合遺伝子の形成に関与した遺伝子のクローニングを行った。融合遺伝子の一方はジストロフィン遺伝子で、もう一方は未知の遺伝子であった。この未知の遺伝子のクローニングをはかった。RT-PCR法により、その全長の配列を明らかにした。しかしながら、その塩基配列は有意なタンパクをコードしていなかった。ついで、この遺伝子の病態的意義の解析を発現解析することで行った。この未知の遺伝子転写産物は脳に多く発現していることが判明した。MR発生に関与することが示唆されたが、その病態的意義の解明は将来の課題として残された。

2) 新規スプライシングバリエントの同定

神経に発現するジストロフィンの多様性について検討を加えていったところ、網膜ジストロフィンのRT-PCR産物で新しいスプライシングバリエントを同定することに成功した。このバリエントは従来知られていた網膜に発現するR-dystrophinの5' UTR部にある潜在スプライス部位が活性化されて新たなスプライシング様式を持って産生されるものであった。このスプライシングバリエントは網膜に特異的に多く発現していた。

また、このバリエントの機能は5' UTRにあってジストロフィンの翻訳を制御しており、このバリエントの方が翻訳活性を低下させることがミニ遺伝子を用いたルシフェラーゼ解析により判明した。(図)

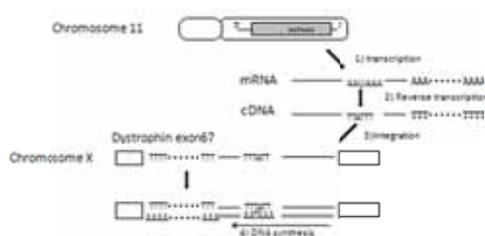
新規バリエント(β)による翻訳低下



3) ジストロフィン遺伝子への挿入レトロトランスポゾン

あるDMD患者では、ジストロフィン遺伝子のエクソン内に全く新しい挿入配列が見出された。この挿入配列はその起源が11番染色体にあった(図)。この挿入配列の起源についてアメリカの研究者と共同研究を行い、患者での挿入配列は11番染色体にあるレトロトランスポゾンL1で、しかもその転写が活発に行われていることを明らかにした。そして、挿入配列はレトロポゾンの3側の一部の配列であることを世界で初めて明らかにした。さらに、この挿入配列の発現様式をヒト組織で解析すると能に高く発現していた。このことから、この挿入配列と精神発達遅滞の関連を強く示唆した。

新しいレトロトランスポゾンの移転機構



4) 新規ジストロフィンアイソフォーム

巨大なジストロフィン遺伝子からの未知の転写産物がないかを探索し、ジストロフィン遺伝子の中央部で5'RACEと3'RACEで新たな転写産物のクローニングすることに成功した。この新しいcDNAはジストロフィン遺伝子の中央部の複数のエクソンと共通で、5'端と3'端はそれぞれのエクソンに隣接したイントロン配列を取り込んだものであった。

その遺伝子の配列から予想されるタンパクのアミノ酸配列を明らかにした。さらに、その機能についてバイオインフォーマティクス的手法を駆使した解析を試みたが有用な結果は得られなかった。一方、塩基配列から予想されるアミノ酸配列からタンパクに対する抗体を作成した。そして、現在その抗体を用いた免疫染色を実施することにより、ヒトでの発現臓器と発現様式を解析中である。さらに、この転写産物の発現をmRNAから解析すると脳に発現が見られており、今後の解析によりそのNRとの関連の意義が明らかにされるものと期待される。今後この新しい分子種がDMDのMR発症機序の解明に大きく貢献するものと期待される。

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2件)

Solyom S, Ewing AD, Hancks DC, Takeshima Y, Awano H, Matsuo M, Kazazian HH Jr. 2012 Pathogenic orphan transduction created by a non-reference LINE-1 retrotransposon. **Hum. Mutat**33:369-371.

Kubokawa, I., Takeshima Y., Ota, M., Enomoto, M., Okizuka, Y., Mori, T., Nishimura, N., Awano H., Yagi M., Matsuo M. 2010. Molecular characterization of the 5'-UTR of retinal dystrophin reveals a cryptic intron that regulates translational activity. **Mol Vis** 16:2590-2597.

[学会発表](計3件)

Pediatric Academic Societies 2010 Annual Meeting 2010.5.1 ~ 4 Vancouver
Genotype-phenotype correlation of the dystrophinopathy cases with small mutations in the dystrophin gene.
Awano H, Takeshima Y, Yagi M, Yamauchi Y, Malueka RG, Dwianingsih EK, Matsuo M.

The American Society of Human Genetics 60th Annual Meeting 2010.11.2 ~ 6 Washington, DC
Chemical treatment of muscular dystrophy that enhances skipping of the mutated exon in the dystrophin gene.
Nishida A, Kataoka N, Takeshima Y, Yagi M, Awano H, Ota M, Itoh K, Hagiwara M, Matsuo M.
Evolutionary acquired alternative splicing in the 5'-UTR of retinal dystrophin transcript is a default pathway with weaker translational activity than nonspliced retina specific form.
Kubokawa I, Yagi M, Awano H, Ota M, Nishida A, Dwianingsih EK, Malueka RG, Takeshima Y, Matsuo M.

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kobegakuin.ac.jp/general-information/soran/08_rehabilitation/matsuo.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 雅文(MATSUO MASAFUMI)

神戸学院大学・総合リハビリテーション学部・教授

研究者番号：10157266

(2) 研究分担者

竹島 泰弘(YASUHIRO TAKESHIMA)

神戸大学・大学院医学研究科・特命教授

研究者番号：40281141

八木 麻里子(MARIKO YAGI)

神戸大学・大学院医学研究科・特命教授

研究者番号：60362787

栗野 宏之(HIROYUKI AWANO)

神戸大学・大学院医学研究科・特命助教

研究者番号：30437470