

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2013

課題番号：24689044

研究課題名(和文) RNAとDNAデータの複合解析で明らかにする遺伝性疾患の新規発症メカニズム

研究課題名(英文) Integrated analysis of Exome-seq and RNA-seq for genetic diseases

研究代表者

神田 将和 (KOHDA, Masakazu)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：20415417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,300,000円、(間接経費) 6,090,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではエクソーム解析で原因解明のできない症例に対して、RNA・DNAデータを統合して解析するための基盤研究と、実際の検体での検討を行った。まず最初にRNA-Seq単体に加えて、エクソームキャプチャーを加えたRNA-Seqを開発し、どちらがより本申請の達成に有利かを検討した。次にアレルト異的発現を示す遺伝子を網羅的に検索した。290の候補の中には、23のインプリント遺伝子が含まれていた。その他にアレルト異的発現が知られているMRPL43やERAP2遺伝子なども検出された。さらに候補遺伝子が疾患の発症に寄与しているかを検討するために、有害な変異候補を持つ臨床検体のスクリーニングまでを行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed RNA and DNA integrated analysis for unresolved genetic disease patients. At first, we constructed and tested cDNA-based exome capture libraries for better variant calling on RNA sequence data. Then, we identified 290 candidate genes for allele-specific gene expression. There were 23 known imprinted genes. In addition, like MRPL43 or ERAP2, several known allele-specific expressed genes were also detected. Finally, to examine the possibility of contributing to the development of the disease, we conducted to screen heterozygous harmful variants of these candidate genes in clinical samples.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：遺伝医学 バイオインフォマティクス 高速シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーによりヒト遺伝子の全エクソン配列解析 (エクソーム解析) が可能になり、メンデル遺伝を示す遺伝性疾患は全て解明できると言われた。しかし 2011 年アメリカ人類遺伝学会では、種々の遺伝性疾患でエクソーム解析をしても、症例の一部では原因変異らしきものが見つからず、DNA レベルでのエクソーム解析という手法だけでは解明できない問題が活発に議論された。

申請者も実際の解析経験から、この問題に気づいていた。申請者が行った典型的な遺伝性疾患の 1 つであるミトコンドリア呼吸鎖異常症 (MRCD) の DNA エクソーム解析で、実際に全体の 50% が原因不明に分類された。同じく I 型複合体異常を示す MRCD で、既知遺伝子とミトコンドリア関連遺伝子を解析したグループの報告でも 49% が原因不明のままであった (Calvo et al., Nature genetics, 2010)。

このような問題に、本研究計画で申請者は新しく提案する RNA と DNA の統合解析により、遺伝性疾患の原因解明を行う。RNA レベルでの変異解析を突き詰めることで、遺伝性疾患の新しい発生機序の発見するための基盤研究を行う。

2. 研究の目的

申請者は次世代シーケンサーによる DNA エクソーム解析を行い、遺伝性疾患における新規原因遺伝子の研究を進めてきた。その中で単純に DNA を調べるだけでは原因が不明なままの症例が多く存在することに気付いた。本申請はこのような症例由来の RNA を、今回提案する RNA エクソーム法で解析する。これにより RNA レベルで起きている配列変異・発現異常が遺伝子疾患の発症機序にどう関わっているかを明らかにする。そして DNA と RNA の知見を複合することで、遺伝子疾患の発症機序に新たな知見を生み出し、今後の遺伝性疾患の解明を加速させることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーによる RNA のバリエーション解析系の開発

通常の RNA シークエンスではなく、DNA エクソーム解析で利用しているエクソームキャプチャー法の応用を検討した。

(2) RNA と DNA レベルの統合解析

特定のアレルだけが発現している遺伝子の同定 (Imprinting/Allelic expression)、スプライシングを変化させる塩基置換の検索、RNA-editing のような RNA レベルで初めて起きる塩基置換の検索を行った。

(3) RNA と DNA レベルのデータを統合した解析による新規原因遺伝子の探索

実際に発現している RNA の配列およびエクソン構造を解析し、DNA と RNA のエクソーム

解析データと複合した解析で、新規の原因遺伝子を明らかにできるか検討した。

4. 研究成果

(1) RNA シーケンスでのバリエーション解析

各遺伝子の発現量には差異があるため、発現量の低い遺伝子について RNA シーケンスでバリエーション検出を行うのは困難を伴う場合がある。本研究では遺伝子発現量の少ない遺伝子からも効率よくバリエーション検出を行えるようエクソーム抽出法により一旦 RNA (cDNA) をキャプチャーすることで低発現遺伝子に対する試みを検討した。これにより実際にバリエーション検出が安定する傾向が見られた。しかしながら当時の技術制約で多型に富む UTR 領域のバリエーション検出に劣ること及びコストを考慮し、最終的に directional RNA-Seq 法を採用した。

(2) アレル特異的発現を示す遺伝子の探索

DNA と RNA の配列を比較することで、アレル特異的発現を示す遺伝子 (ASE) の体系的な分離を行った。

結果として 930 の ASE 候補を得た。この数字は線維芽細胞を元にシーケンスを行ったものである。930 のうち、複数サイト (複数サンプル) でサポートするデータが得られたのは 290 であった。

この 290 には、染色体を受け継いだ親の性別により片アレル発現を示すことが知られているインプリント遺伝子が 23 含まれていた (表 1)。また MRPL43, ERAP2 などスプライシングによりアレル特異的発現を持つ遺伝子が含まれていることも同時に確認できた (図 1)。

また上述したアレル特異的発現とは異なる、RNA レベルでの塩基置換も検索を行った (図 2)。

今回得られた候補の中で、既存の報告がないものについてはより検証を進めており、利用可能なリソースがあるものについては発現アレルの親由来まで確認することを行っている。

(3) アレル特異的発現を示す遺伝子と疾患との関わり

当初の予想より多くの ASE 候補を得たため、これら候補とミトコンドリア呼吸鎖異常症との関わりについて検討も行った。

今回同定した ASE 候補には、これまで ASE の可能性が報じられていた ARMC10 などミトコンドリア関連遺伝子が少なくとも 10 含まれていることが分かった。

次にこれら候補遺伝子上に、ヘテロな有害変異と考えられるバリエーションを持つ患者を探索した。その結果、幾つかの遺伝子では DNA エクソーム解析で原因不明に終わったケースにおいて、候補と考えられるバリエーションを

見出すことができた。

インプリント遺伝子名	サイト数	インプリント遺伝子名	サイト数
PRIM2	192	DGCR8	3
ZDBF2	83	SIM2	2
H19	52	PEG3	2
PEG10	41	MEST	2
KCNQ1OT1	21	GABRA5	2
NAP1L5	16	CPA4	2
PLAGL1	10	ZNF738	1
ZNF597	9	ZNF215	1
NDN	9	SPON2	1
MEG3	9	SLC38A4	1
SNRPN:SNURF	8	RBP5	1
RTL1	8	PPP1R9A	1
INPP5F	6	PPAP2C:PPAP2C	1
PRIM2:PRIM2	4	PEG3:ZIM2	1
IGF2	4	MEG8	1
NAAB0	3	FOXF1	1
FAM50B	3	CCDC85A	1

表 1. 検出されたインプリント遺伝子エクソン上に多型を持つ検体を抽出し、DNA/RNA 間で多型パターンが異なるサイトを確認した

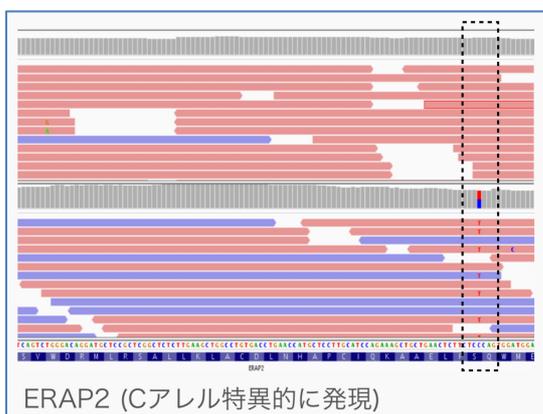


図 1. ERAP2 遺伝子のアレル特異的発現
上段: RNA, 下段: DNA シークエンスデータ
インプリント遺伝子とは異なり、親由来の性別に依存しないアレル特異的発現を示す遺伝子も同定していることを示した

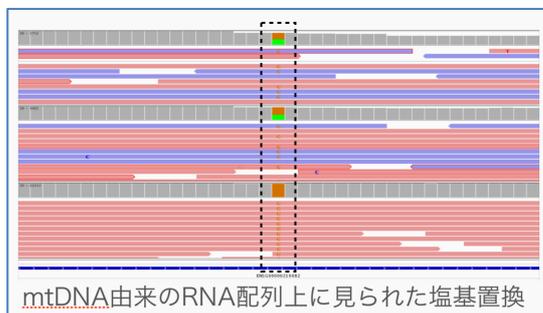


図 2. RNA-DNA differences と考えられるミトコンドリア配列での塩基置換
上段・中段: 同一サンプル由来の RNA、下段: DNA シークエンスデータ

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 3 件)

1. 神田将和 他、A comprehensive genomic analysis for mitochondrial respiratory chain disorder.、日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日、兵庫県神戸市
2. 神田将和 他、ミトコンドリア呼吸鎖異常症の包括的ゲノム解析、日本人類遺伝学会、2013 年 11 月 21 日、宮城県仙台市
3. 神田将和 他、A comprehensive disease mutation search in mitochondrial respiratory chain disorders.、アメリカ人類遺伝学会、2013 年 10 月 25 日、米国ボストン

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
神田 将和 (KOHD A Masakazu)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号：20415417

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：