

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651221

研究課題名(和文)疾患感受性領域の検出に特化した核内染色体空間配置決定法の開発

研究課題名(英文)chromosome conformation capture variant technique for disease risk genomic loci

研究代表者

長谷川 舞衣(Hasegawa, Mai)

新潟大学・脳研究所・研究員

研究者番号：50596153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムワイド関連解析(GWAS)で見いだされる疾患感受性の一塩基多型(SNP)のうち、非コード領域に位置するものについては、疾患への関与機序が不明なものが多い。本研究では、これらのSNP周辺の配列が、ゲノム配列上離れて位置する遺伝子の調節配列である可能性に着目し、ポストGWAS解析に特化した核内ゲノムDNAの高次構造解析法の開発を行った。ゲノムワイドな高次構造解析法であるtethered conformation capture(TCC)とビオチン化RNAプローブを用いた疾患感受性SNP周辺配列のプルダウンを併用することで、空間的に近接する部位の効率的な検出が可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Recent case-control genome-wide association studies (GWAS) have identified numerous single nucleotide polymorphisms (SNPs) which act as genetic risk factor, but most of SNPs which located on non-coding region are still unknown for their function. Since such SNP is predicted to act as a distal enhancer of responsible gene, we have developed a chromosome conformation capture method suitable for post-GWAS analysis. We demonstrated that tethered conformation capture (a comprehensive chromatin conformation capture method) and following pulldown using biotinylated RNA probe which is targeted to risk SNP region can detect spatially proximate genomic loci efficiently.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：核内高次構造 クロマチン構造 発現制御 ポストGWAS

1. 研究開始当初の背景

遺伝的要因が強く示唆される多因子疾患の研究では、新規の疾患関連遺伝子の探索を目標とし、2000年代より一塩基多型(SNP)を用いたゲノムワイド関連解析(GWAS)が精力的に行われている。その結果、それぞれの疾患について数十～数百の疾患感受性の染色体領域が報告された。しかし、ほとんどの疾患感受性領域は遺伝子間やイントロンに位置していたこと、疾患への効果が小さかったことから、GWASの結果が直接に病態の理解に結びついた例はごく一部に留まっている。これを受け、GWAS後の研究は「GWASで報告された感受性領域の機能解析」と「GWASでは検出できない稀な変異の探索」という二方向に進んでいる。このうち前者では、特定の mRNA の発現量の変化と SNP 型が相関する領域をゲノムワイドに検出することが可能な、expression Quantitative Trait Loci (eQTL) 解析が有用である。eQTL 解析では、発現量の変化していた遺伝子から数百 kb 以上離れた場所や他の染色体に SNP がみられる場合がしばしばあり、核内での高次構造を反映していると考えられるため、これを他の手法で検証することが必要である。しかし、研究開始当時に利用可能だった染色体高次構造の解析法はいずれも、GWASで得られる数十 kb の感受性領域と近接する部位をゲノムワイドに探索する用途には不向きであった。

2. 研究の目的

そこで我々は、疾患感受性領域の機能を明らかにするため、ポスト GWAS 解析に特化した染色体高次構造の検出法の開発を目的とした。その最初の例として、アルツハイマー病でのリスク遺伝子として知られているアポリタンパク質 E (APOE) 遺伝子を含む約 75 kb の染色体領域について、核内での染色体高次構造の検出と細胞の種類による違いの特定を試みた。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた検出系の構築

染色体の高次構造解析法のひとつである chromosome conformation capture (3C) によって、核内で空間的に近接している領域の組み合わせをキメラ DNA として調製したのち、そこから APOE 付近に位置する疾患感受性領域を含む DNA 断片のみを濃縮することを試みた。神経芽細胞腫に由来する株化細胞 SK-N-SH をホルマリンで架橋し、制限酵素消化、DNA 末端どうしのライゲーション、脱架橋処理によって 3C サンプルを調製した。このサンプルを超音波で断片化し、APOE 周辺領域に対するビオチン化 RNA プローブ (Agilent SureSelect カスタムキット) を用いて APOE 周辺領域を含む DNA 断片を回収し、次世代シーケンサ (Illumina GAIIx また

は MiSeq) で配列を決定した。アラインメントパイプラインによって染色体上の位置を決定し、統計学的手法により APOE 周辺領域と近接していた領域の位置と頻度を求めた。

(2) 異なる細胞株間の差異の検討

前述の手法を用いて星状細胞腫由来の株化細胞 U-251MG のサンプル調製と配列解析を実施し、SK-N-SH との違いを評価した。また、エクソンアレイチップ (Affymetrix GeneChip Human Exon 1.0 ST Array) を用いた発現量解析を実施して、APOE 周辺領域の染色体高次構造と発現量との関連を検討した。

4. 研究成果

(1) 培養細胞を用いた検出系の構築

はじめに、ビオチン化 RNA プローブによってキメラ DNA の濃縮が可能であるかを、3C サンプルを用いて検討した。APOE 周辺領域に対して設計した RNA プローブとハイブリダイズした DNA 断片を回収し、次世代シーケンサによって両端の配列を決定し、参照配列 (hg19) にマッピングした。しかし、RNA プローブでの処理の有無によらず、マッピングされた DNA 断片の濃縮のほとんどがキメラを形成していなかったことから、RNA プローブによる濃縮処理を実施するより以前の工程で、3C サンプル内のキメラ DNA の存在比を増加させることが必要であることが判明した。キメラ DNA 断片の割合を増加させるため、3C から派生した手法のひとつである tethered conformation capture (TCC) (Kalhor R et al. (2012) *Nat. Biotechnol.*, **30**(1):90-98) (図 1) によってサンプルを調製した。

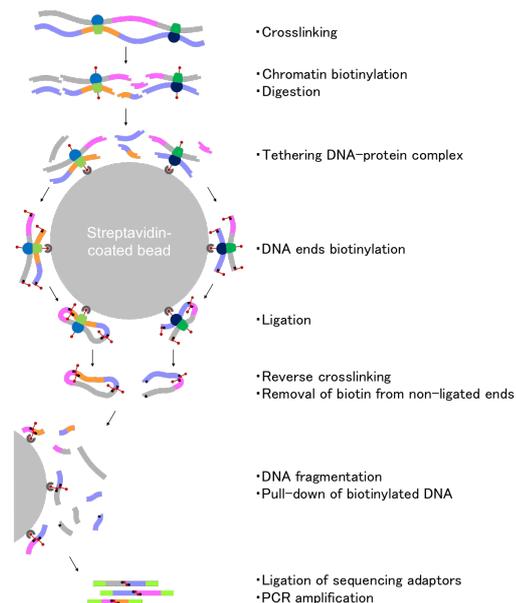


図 1 TCC 法によるサンプル調製手順の概略

タンパク質-DNA 複合体のプルダウンと、キメラ DNA 断片のプルダウンを行うことで、核内で空間的に近接していたゲノム領域どうしのキメラ DNA の収率が改善される。

SK-N-SH から TCC サンプルを調製し、RNA プローブによるプルダウン、次世代シーケンサによる配列決定とマッピングを実施し、プルダウンを実施する前のサンプルと比較した。その結果、プルダウン前の TCC サンプルでは APOE 周辺領域を含むキメラ DNA の数は 100 万断片あたり 5~8 断片だったが、プルダウンにより 71~94 断片となり、約 10 倍の増加がみられた(表 1)。なお、Agilent SureSelect を使用した場合の濃縮効率は通常 100 倍程度とされているが、今回標的とした APOE 周辺領域は GC 含量が高く、SureSelect を用いた場合の濃縮効率が低くなる傾向があることが知られており、また、平均的な GC 含量の領域を用いて実施した予備実験においてもキメラ DNA 断片に限定した場合の濃縮効率の増加は 20~30 倍程度だったことから、今回の手法でこれ以上の濃縮効率の向上を目指すことは本研究課題の趣旨から外れるものであると判断した。

表 1 RNA プローブによるプルダウンの効果
Total: 次世代シーケンサによって配列を決定した断片の総数; APOE locus: 2 領域のキメラを形成し、かつ少なくとも一方が RNA プローブによってプルダウンした領域 (APOE 周辺領域) の配列を含んでいた断片の数

ID	Pulldown (-)		Pulldown (+)	
	Total	APOE locus	Total	APOE locus
1	108,120,354	564	64,679,701	6,093
2	86,214,118	656	51,769,792	4,201
3	55,849,092	490	80,350,106	5,713

次に、APOE 周辺領域と近接頻度の大きいゲノム領域の検出を試みた。Splinter からのウィンドウサーチ (Splinter E *et al.* (2011) *Genes Dev.*, **25**:1371-1383) を検出方法として採用し、FDR < 0.01 となるゲノム領域を「核内で APOE 周辺領域と近接していた領域」と判定した。同一の方法で調製した 3 サンプルでそれぞれ近接領域の検出を行ったときに、少なくとも 2 サンプルで共通して検出された再現性のある領域は、APOE 周辺領域が位置する 19 番染色体に 3 カ所、5 番染色体に 1 カ所みられた。このうち、19 番染色体の 1 カ所 (chr19:35,607,577-36,620,630) には、アルツハイマー病の関連解析で疾患の有無と遺伝子内 SNP との相関が Li らによって報告された遺伝子のひとつ GAPDHS (Li Y *et al.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**(44): 15688-15693) が含まれていた。今回の結果は、培養細胞で得られたものではあるが、同一の疾患に対する疾患感受性領域どうしが核内でタンパク質を介して近接することを示しており、これらの感受性領域が協調することでたとえば 4 番染色体の慢性閉塞性肺疾患

(COPD) のリスク SNP (Zhou X *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, **21**(6):1325-35) や 11 番染色体の乳がんのリスク SNP (French J *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, **92**(4):489-503) のように、ゲノム配列上は数十 kb 以上離れて位置する遺伝子の発現量に影響をおよぼす、遠位の調節エレメントとして機能する可能性が考えられる。

(2) 異なる細胞株間の差異の検討

まず、それぞれの細胞株における遺伝子の発現量を、エクソンアレイを用いて比較した。SK-N-SH と U-251MG それぞれの発現量を比較したときに、SK-N-SH で 2 倍以上多かったものは 1297 遺伝子、U-251MG で 2 倍以上だったものは 1112 遺伝子だった。また、発現量に 2 倍以上の開きが見られた遺伝子群の中で発現量比の大きい側から順番をつけたときに、SK-N-SH > U-251MG 群については CHGA: 22 位; NEFM: 87 位; SNAP25: 117 位、SK-N-SH < U-251MG 群では GFAP: 19 位; S100B: 88 位 と、神経細胞やグリア細胞のマーカーとして知られる遺伝子が、それぞれの群の上位に登場することが確認できたことから、発現量解析は適切に実施できたと判断した。なお、今回の発現量解析では、APOE 周辺領域に位置する 4 遺伝子 (PVRL2, TOMM40, APOE, APOC1) のいずれも、SK-N-SH と U-251MG の間の差は 2 倍未満であった。

次に、U-251MG を用いて、SK-N-SH のときと同様に、TCC サンプルから RNA プローブを用いて APOE 周辺領域をプルダウンし、次世代シーケンサによる配列決定とその後の解析を実施した。U-251MG において検出された APOE 周辺領域と近接するゲノム領域は、SK-N-SH で検出された領域とは異なる 19 番染色体の 1 カ所のみであり、現在までにアルツハイマー病との相関が報告されている SNP も存在しなかったが、この領域 (chr19:5,859,385-6,569,807) には、RFX2 という、アミロイド前駆体 (APP) のプロモータ領域に位置する SNP 型が特定の塩基である場合にのみ APP の転写を活性化する可能性が示唆されている (Lahiri DK *et al.* (2005) *Neurobiol. Aging*, **26**:1329-1341) 転写因子の遺伝子座が位置していた。APP の発現量の増加はアルツハイマー病のリスクを増大させることから、疾患のリスク領域である APOE 周辺領域は、アストロサイトにおいて RFX2 の転写調節領域として機能し、間接的に原因遺伝子 APP の代謝に関与する可能性が考えられる。また、SK-N-SH と U-152MG とで、APOE 周辺領域が近接するゲノム領域が異なるにもかかわらず、いずれの場合にもアルツハイマー病との関連が報告されている遺伝子が含まれていたことから、APOE 周辺領域は神経細胞とアストロサイトの両方で疾患へ関与してい

るが、その機序がそれぞれの細胞で異なっていることが期待される。今後、APOE 周辺領域が RFX2 の転写調節に關与しうるかどうかをレポーターアッセイで、ヒト脳組織のアストロサイトにおいても近接がみられるかを 3C や蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) によって、それぞれ検証することが必要である。

以上より、「これまでの GWAS によって明らかになった疾患感受性 SNP のデータを活用して効率的に疾患関連遺伝子を探索するための手段を提供する」という課題に対し、TCC 法とピオチン化 RNA プローブによるプルダウン (SureSelect) の併用という手法が利用可能であることを示すことができた。なお、本研究の成果に関しては、現在投稿準備中である。

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)

[学会発表](計 3 件)

長谷川舞衣, 原範和, 菊地正隆, 宮下哲典, 中谷明弘, 池内健, 桑野良三; 細胞特異的なゲノム高次構造解析法の検討; 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 5 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

中谷明弘, 宮下哲典, 菊地正隆, 長谷川舞衣, 原範和, 西田奈央, 徳永勝土, 井原康夫, 池内健, 桑野良三; AD/GD CNVdb: アルツハイマー病のコピー数変異データベース; 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

長谷川舞衣, 原範和, 菊地正隆, 中谷明弘, 宮下哲典, 池内健, 桑野良三; 細胞特異的な転写制御にかかわるゲノム高次構造の解析法の検討; 第 43 回新潟神経学夏期セミナー, 2013 年 7 月 26 日, 新潟大学脳研究所 統合脳機能研究センター セミナーホール (新潟県新潟市)

[その他]

ホームページ等

研究室

<http://www.bri.niigata-u.ac.jp/ idenshi/>

所属機関 (新潟大学脳研究所)

<http://www.bri.niigata-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 舞衣 (HASEGAWA MAI)

新潟大学・脳研究所・研究員

研究者番号: 50596153

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

桑野 良三 (KUWANO RYOZO)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号: 20111734

中谷 明弘 (NAKAYA AKIHIRO)

新潟大学・超域学院・准教授

研究者番号: 60301149

宮下 哲典 (MIYASHITA AKINORI)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号: 60323995