

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06452

研究課題名(和文)現代人類集団におけるグルタミン反復多型多様化の意義

研究課題名(英文)Implication of diversified polyglutamine repeat polymorphisms in human evolution

研究代表者

嶋田 誠 (Shimada, Makoto)

藤田医科大学・総合医科学研究所・講師

研究者番号：00528044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：polyQ多様化仮説に従い、polyQ長の多様性によりヒトの個性が形成されるとすると、その生物学的基盤は何か。本研究ではそれを、「polyQが、そのタンパク質や核酸との結合能を利用して、発達期の神経細胞内で複合体を形成する足場として多く使われること」と考え、その実証のために、polyQ病責任反復をもつタンパク質やpolyQに結合する代表的なタンパク質間の相互作用(PPI)情報に着目して解析した。その結果、それぞれの分子は神経細胞内の発達調節に関係する複合体の形成および、シグナルを伝達に参与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「進化」と書くと日本では特定の価値観に向かって進歩することと結びつけて考えがちであるが、生物進化にはそのような特定の社会的価値観との結びつきはない。本研究では特に、現代人類は、個性を多様化する方向に進化したことで、その特徴である、高度な分業社会形成ができるようになった結果、地球上に広がることができた、という仮説が元になっている。個性の多様化の原動力になった分子が、どのような生物学的なしくみで、胎児期の脳内神経細胞を多様に発達させるのかを、本研究はポリグルタミンに着目することで示すものである。

研究成果の概要(英文)：Given polyQ length variation brings human individuality according to the polyQ-diversified hypothesis, what is the biological basis? I speculated that polyQs functioned as scaffoldings of protein complexes by using binding ability of polyQ molecules. Thus, I analyzed protein-protein interaction information of proteins containing polyQs responsible for polyQ diseases and representatives of polyQ-binding proteins. As a result, each of these proteins was suggested to involve formation of protein complexes and signal transduction in regulation of brain development.

研究分野：ゲノム進化学

キーワード：タンパク質間相互作用 データベース 複合体形成 人類進化 ポリグルタミン 天然変性hubタンパク質

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。

1. 研究開始当初の背景

究極的目標は、研究代表者が前に提唱した仮説である、polyQ長多様化仮説(Shimada et al. 2016)の検証である。ところが研究開始当初、仮説証明のための、実験的検証の現場となるパスウェイや分子が特定されていない状態であった。

polyQ長多様化仮説とは、単一アミノ酸反復を網羅的にヒトゲノム中で比較した際に、グルタミン反復が反復長多型を伴うことが最も多く、また反復長多型のあるpolyQ座位を内に含む遺伝子は、神経発達調節にかかわり、この特徴は多型のないpolyQ座位では見られないという、結果を説明するところから構築された。反復長多型のあるpolyQ座位のうち、9座位では反復長が急速に異常過伸長を起し、神経変性疾患(トリプレットリピート病; polyQ病)に至ることが知られている。polyQ病は長いallele(アレル)を受け継いだ場合に発症頻度が高く、また早く発症する傾向が知られている。にもかかわらず、これらの座位ではとりわけ長い傾向が示された。

類人猿との間でpolyQ病反復多型を比較した研究によると、ヒトでは平均的に反復長が長い傾向があるが、特筆すべき特徴はその分散が著しく大きいことであった(Andrés et al. 2004)。長いpolyQ反復はpolyQ病を引き起こす危険があるにもかかわらず、長い反復を含むように多様化したのはなぜか? 現在も、ヒトでこれらの反復長が著しく多様である理由はわかっていない。健康人の反復長多型範囲内で長短間の比較データが殆ど無い状態であった。

2. 研究の目的

健康人の間で見られるpolyQ反復多型が脳神経系の表現型へ及ぼす影響とそのメカニズムを明らかにする。そして、実験的検証が可能な系を具体化することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) polyQ結合能に着目した複合体形成・生物学的機能のPPI情報探索:

polyQ長の多型性がいかに個人の個性を生み出しているかを知る手がかりを見つけるため、polyQに結合するタンパク質(binder)とpolyQ病責任タンパク質(carrier)との結合関係を情報学的に抽出することで、どのような複合体を形成し、どのような生物学的機能・パスウェイを担っているか、そして観察される細胞は何かを明らかにし、polyQ長の違いがもたらす効果を確認する実験系構築の手がかりとする。

(2) 核・細胞質両局在性天然変性ハブ蛋白質に着目した、PPI情報探索:

ヒトの多型polyQの関わる相互作用のうち、神経発生のシグナル伝達経路として機能しているものを明らかにすることで、実証実験系構築の手がかりとするため、polyQの天然変性の性質を利用することで、複合体を形成し、細胞質と核との間を行き来していると考えられるタンパク質を、相互作用(PPI)データベースより抽出した。

(3) ハンチンチンのpolyQ長が神経突起長へ影響を及ぼす分子機序モデルの構築:

ハンチンチン(HTT)のPPIおよび神経突起伸長調整にいたるパスウェイの両知識空間の重なりより、HTTにおいて神経突起伸長の調節に関与することが知られている経路を抽出した。

4. 研究成果

(1) polyQ結合能に着目した複合体形成・生物学的機能のPPI情報探索:

polyQに結合する代表的な二つのタンパク質(binder)として、PQBP1およびTERA/VCP/P97のPPIをデータベースHIPPIE(Schaefer et al. 2012; Alanis-Lobato, Andrade-Navarro, and Schaefer 2016)で検索したところ、それぞれPQBP1は55タンパク質、TERA/VCP/P97は620タンパク質へのタンパク質間相互作用(PPI)が抽出できた。これらをinteractorと以下称する。これらのなかで、polyQ病責任タンパク質(carrier)は、PQBP1のinteractor中にHTT、AR、ATXN1の3carrierが、TERA/VCP/P97のinteractor中にHTT、AR、ATXN1、ATXN3、ATXN7の5carrierが存在した(表1)。

同様に各々のcarrierに相互作用するinteractorを調べ、両者に共通するco-interactorを抽出した(表1)。

		polyQ disease causing <i>Carrier</i>					
		HTT	AR	ATXN1	ATXN3	ATXN7	
		PQBP1	MED31 VDAC3	BCOR ESR1 PPP1CA WDR77	APBB1	<i>n.a.</i>	<i>n.a.</i>
Binding Protein <i>Binder</i>	VCP/TERA	AKT1 AMFR AP2A2 ATG5 BZW2 CASP7 CCT6A CCT8 CHMP4B CLASP1 CRMP1 CUL2 CUL5 GGA2 GOLPH3L GRB2 GTF3C3 HIP1R HLA-B HSP90AB1 HSPA8 HSPD1 HUWE1 ITPR1 MAP1LC3A MAPK3 MTOR NFKB1 NUB1 NUP1L1/NUP58 OPTN PIK3R2 PIK3R3 PKM2 PPP2CA PSMC5 PSMD4 SLC25A3 SPTAN1 STIP1 SUMO1 SYMPK SYVN1 TKT TP53 TRAF6 TUBA1A TUBB UBQLN1 WAC YWHAB YWHAG	ACTB AKT1 APPL1 BRCA1 CALR CASP7 CAV1 CDC25A CDC37 CUL2 DAP3 ESR1 EZH2 GRB2 HIF1A HOTAIR HSP90AA1 HSPA1A HSPA1B JUN MAPK1 MDM2 MDN1 NCOA1 NFKB1 PHB PIK3R2 PIK3R3 PPP2CA PTGES3 RAF1 RNF2 SH2D2A SMARCC1 SRC STUB1 SUMO1 SUMO2 SUZ12 TP53 TSG101 USP10 YWHAH YWHAG	ACACA AKT1 ANKHD1 ANKHD1-EIF4EBP3 COIL CRY2 GGA2 HOTAIR HSPA1A, HSPA1B HSPA4 HSPA8 ITGB4 LOC401442 RBF31 RNF1 RNF31 STAM2 STUB1 SUMO1 SUMO2 U2AF2 WNK1 YWHAE YWHAZ	AMFR ANXA7 C1orf124 CANX CDKN1A CSNK2B HDAC6 HLA-A HSP90AA1 HSPA4 NFKBIA PARK2/PRKN PSMC5 PSMD4 RAD23A RPL6 RPS6A1 SLC3A2 SMURF1 STUB1 SUMO1 SYVN1 TELO2 TP53 TRAF6 TUBA1A TUBB UBB UBC_HUMAN UBE2L7P/UBE2L1 UBE2S UBE4B UBQLN1 USP13	ACTN1 ACTN4 FN1 NUP62 PSMC1 PSMC5 RAD23A RNF31 SUMO1 SUMO2 TAF6L	
Other Clue		Aggressive behavior observed in mice knocked-in expanded poly-Q (Sawada et al. 2007). [Huntington's disease (HD)]	Anxiety-like behavior observed in adult female and her offsprings by maternal testosterone exposure in amygdala in mice (Hu et al. 2015). [Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA)]	[Spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1)]	Significant diversity in repeat length in human (Andrés et al. 2004). [Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3, Machado-Joseph)]	[Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7)]	

また、それらの相互作用を脳内で存在するものに絞った (図 1)。

明らかになったbinder-carrier両方に相互作用するタンパク質の特徴を DAVID (Huang, Sherman, and Lempicki 2009a, 2009b) の gene enrichment解析により明らかにした (表 2)。

PQBP1 はスプライシング因子に結合することが知られていることから類推されるように、脳発生における転写調節に関する特徴が示され、VCPでは発症機序に関係の深い特徴である、ユビキチン・プロテアーゼ系による小胞体での品質管理が示された。

HTT - PQBP1および両者共通interactorで示された特徴は、ARやATXN1のそれと比べ独自性が強かった。つまり、共通する特徴は核内局在のみであるので共通の進化機構ではないであろうと考えられる。このことは、Yeast2Hybridによる失調症関連PPI研究

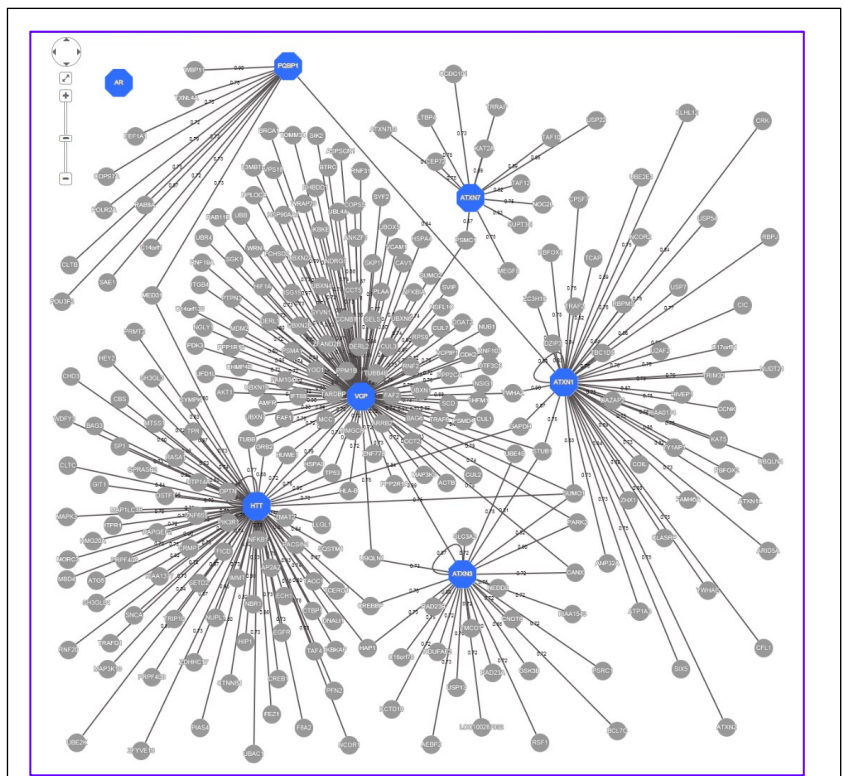


図 1、ヒト脳内での polyQ 含有タンパク質の PPI ネットワーク

表 2、三者(binder, carrier, co-interactor)の特徴抽出結果

	Feature		
		Specific	Common
Binding Protein	PQBP1	Regulation of transcription	Nucleoplasm(CC) Cytosplasm(CC) Protein binding(MF)
<i>Binder</i>	VCP/TERA	Ubiquitin-proteasome for ER stress	

(Lim et al. 2006) でpolyQ含有遺伝子間の共通性の高さが示されたことと対照的である。健常時のタンパク質複合体に着目すると、それぞれ別の機能を担っていることが見えてくるが、polyQ病発症後に観察される複合体には共通性があるということを示しているのかもしれない。

(2) 核・細胞質両局在性天然変性 hub 蛋白質に着目した、PPI 情報探索：

ヒトゲノム情報よりpolyQを含有することが確認できた全 198 タンパク質 (Shimada, MK. et al. 2016) を、おもに次の 2 点で区別した。すなわちpolyQ反復長の多型の有無と、多型polyQの特異的特徴である「神経発達調節」に関するアノテーションがつけられているかどうかである。そして、それぞれにおいて、核・細胞質両局在性天然変性 (ID) hubとして挙げられた 210 タンパク質 (Ota et al. 2016) との重なる件数を統計的に評価した。

その結果、polyQを含有するタンパク質には核・細胞質両局在性ID-Hubタンパク質が 9 つあり、有意に多く含まれていた (Fisher test $p < 0.05\%$)。このことはpolyQ領域が結合能を持ったID領域であることで、核・細胞質両局在性ID-Hubタンパク質として期待されている構造的優位性を有し、複合体形成に、頻繁に利用されている可能性を示した。

これらpolyQ配列を有する 9 タンパク質において、細胞質と核との間を行き交う、タンパク質との間で 8 個の相互作用が見つかった。それらはNotchシグナル、ユビキチン化、ヒストンアセチル化といったシグナル経路に関与していることを発見した (表 3)。

表 3、polyQ を含有する核・細胞質両局在性 ID-Hub タンパク質

反復多型	GO	タンパク質	相互作用	分子機能	反応経路
多型なし	n/a	Histone acetyltransferase p300	209	転写調節	核酸代謝の調節
		CREB-binding protein	198	転写調節	核酸代謝の調節
		Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7 (USP7)	40	タンパク分解酵素	タンパク代謝
		Ran-binding protein 9	28	細胞骨格タンパク結合	細胞増殖・維持
		Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	19	mRNA結合	核酸代謝の調節
多型あり	多型polyQ特異的GOを有する	Ataxin-1	159	RNA結合	核酸代謝の調節
		Androgen receptor	150	リガンド依存性の核受容体	細胞内シグナル伝達
		Huntingtin	59	DNA結合	核酸代謝の調節
		Nuclear receptor coactivator 3	47	転写調節	細胞内シグナル伝達
	無し				

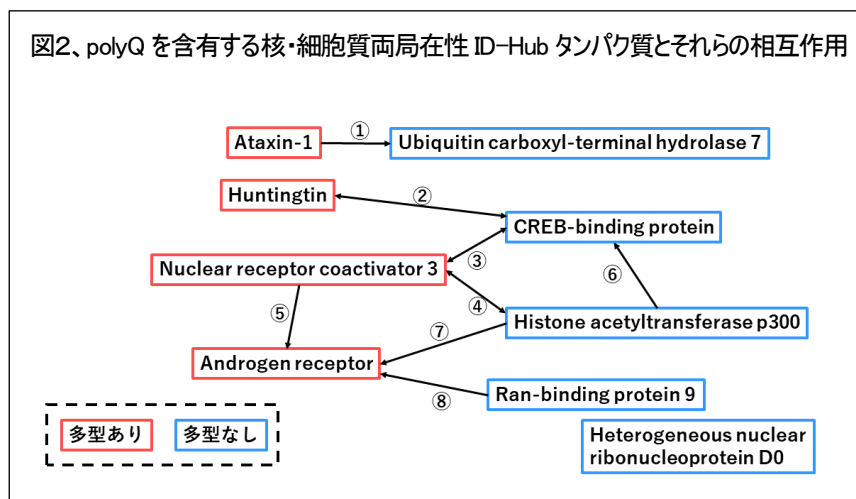
このようなpolyQを含有する核・細胞質両局在性ID-Hubタンパク質にはpolyQ領域に反復多型の有る蛋白質と無い蛋白質とが相互作用により協調して機能している例を複数発見した (図 2)。その内訳は、反復多型のある蛋白質間、および無い蛋白質間ではそれぞれ 1 つずつの相互作用が存在したのに対して、反復多型のある (多型) 4 蛋白質と無い (単型) 5 蛋白質の間では 6 つの相互作用が見つかった。

(3) ハンチンチンの polyQ 長が神経突起長へ影響を及ぼす分子機序モデルの構築：

Mehta et al. (2018) は、iPS細胞から皮質のニューロンへ分化 (130 日) 後の神経突起長において、polyQ 長が「健常」範囲内 3 群 (18 回、21 回、33 回) および「異常過伸長」3 群 (77 回、109 回、180 回) の計 6 群

の間で、負の相関関係が見られたことを報告した。これをもとに、文献情報から、神経細胞発達過程でHTTのpolyQ長が神経突起長を調節するシグナルの関係性を整理した (図 3)。

図2、polyQ を含有する核・細胞質両局在性 ID-Hub タンパク質とそれらの相互作用



5. 結語

polyQ長多様化仮説 (Shimada et al. 2016) の中で証拠不十分とされていた部分、すなわちpolyQ長の違いが神経発達の違いに如何につながるのか、について、既知の情報整備を基本とした、本研究プロジェクトの一連の解析で、検証可能なシグナル経路が複数存在することを示すことができた。

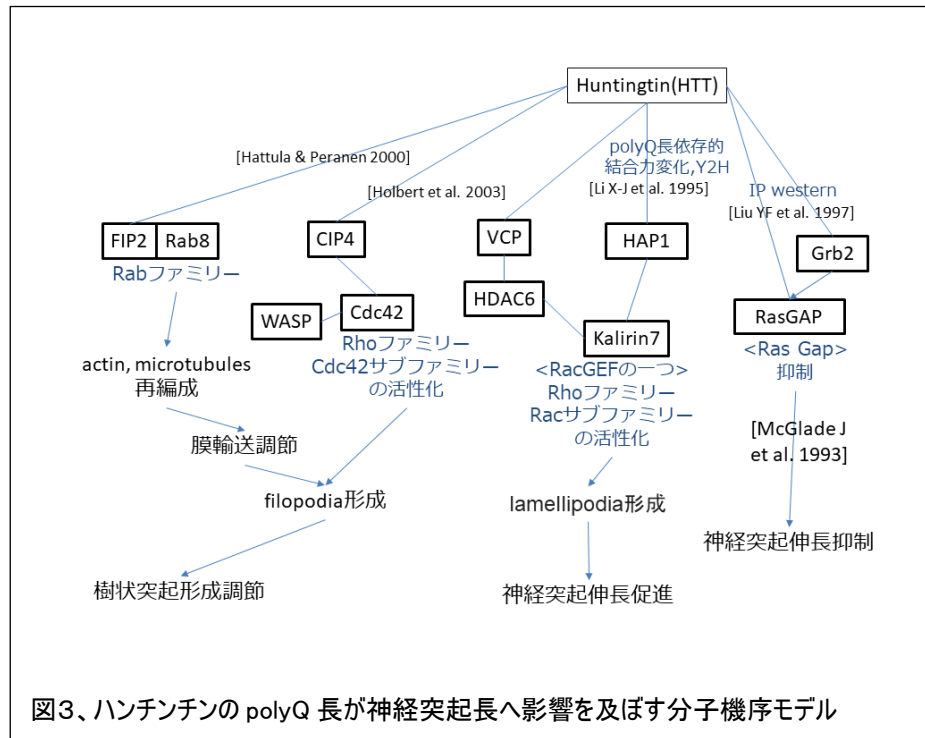


図3、ハンチンチンの polyQ 長が神経突起長へ影響を及ぼす分子機序モデル

<引用文献>

- Alanis-Lobato, Gregorio, Miguel A. Andrade-Navarro, and Martin H. Schaefer. 2016. 'HIPPIE v2.0: enhancing meaningfulness and reliability of protein-protein interaction networks', *Nucleic Acids Research*, 45: D408-D14.
- Andrés, Aida M, Marta Soldevila, Oscar Lao, Víctor Volpini, Naruya Saitou, Howard T Jacobs, Ikuo Hayasaka, Francesc Calafell, and Jaume Bertranpetit. 2004. 'Comparative genetics of functional trinucleotide tandem repeats in humans and apes', *Journal of Molecular Evolution*, 59: 329-39.
- Huang, Da Wei, Brad T. Sherman, and Richard A. Lempicki. 2009a. 'Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists', *Nucleic Acids Research*, 37: 1-13.
- . 2009b. 'Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources', *Nat. Protocols*, 4: 44-57.
- Lim, Janghoo, Tong Hao, Chad Shaw, Akash J. Patel, Gábor Szabó, Jean-François Rual, C. Joseph Fisk, Ning Li, Alex Smolyar, David E. Hill, Albert-László Barabás, Marc Vidal, and Huda Y. Zoghbi. 2006. 'A Protein-Protein Interaction Network for Human Inherited Ataxias and Disorders of Purkinje Cell Degeneration', *Cell*, 125: 801-14.
- Mehta, Shagun R., Colton M. Tom, Yizhou Wang, Catherine Bresee, David Rushton, Pranav P. Mathkar, Jie Tang, and Virginia B. Mattis. 2018. 'Human Huntington's Disease iPSC-Derived Cortical Neurons Display Altered Transcriptomics, Morphology, and Maturation', *Cell Reports*, 25: 1081-96.e6.
- Ota, Motonori, Hideki Gonja, Ryotaro Koike, and Satoshi Fukuchi. 2016. 'Multiple-Localization and Hub Proteins', *PLoS ONE*, 11: e0156455.
- Schaefer, Martin H., Jean-Fred Fontaine, Arunachalam Vinayagam, Pablo Porras, Erich E. Wanker, and Miguel A. Andrade-Navarro. 2012. 'HIPPIE: Integrating Protein Interaction Networks with Experiment Based Quality Scores', *PLoS ONE*, 7: e31826.
- Shimada, Makoto K., Ryoko Sanbonmatsu, Yumi Yamaguchi-Kabata, Chisato Yamasaki, Yoshiyuki Suzuki, Ranajit Chakraborty, Takashi Gojobori, and Tadashi Imanishi. 2016. 'Selection pressure on human STR loci and its relevance in repeat expansion disease', *Molecular Genetics and Genomics*, 291: 1851-69.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimada Makoto K., Nishida Tsunetoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Focusing on human haplotype diversity in numerous individual genomes demonstrates an evolutionary feature of each locus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2020.03.28.012914	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Shimada, Makoto
2. 発表標題 Human haplotype genealogy and population history using massive individual genome data. Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution
3. 学会等名 SMBE 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 嶋田 誠
2. 発表標題 ヒトゲノム多様性の起源：S*解析における課題
3. 学会等名 日本遺伝学会 第91回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimada, Makoto
2. 発表標題 Poly-Q repeat polymorphism indicates evolution toward diversified individuality.
3. 学会等名 International Symposium; Toward understanding “Individuality”（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimada, Makoto
2. 発表標題 Distinction between ancient introgression and incomplete lineage sorting in modern human genomes
3. 学会等名 Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 嶋田 誠
2. 発表標題 ヒト個人ゲノム時代のハプロタイプ動態解析法の検討
3. 学会等名 日本遺伝学会 第90回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shimada, Makoto
2. 発表標題 Project for evolutionary mechanism on diversification of polyglutamine repeats in human
3. 学会等名 第22回 日本進化学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://www.fujita-hu.ac.jp/~mshimada/sub/ShimadaMK/ShimadaSub/ResContents.html>
脳内選択的スライシングの人類進化における意義の解明
<http://www.fujita-hu.ac.jp/~mshimada/sub/ShimadaMK/ShimadaSub/ResContents.html>

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
連携研究者	眞部 孝幸 (Manabe Takayuki) (90382283)	中京学院大学・看護学部・教授 (33706)	
連携研究者	亀山 俊樹 (Kameyama Toshiki) (60298544)	藤田医科大学・医学部・講師 (33916)	
連携研究者	前田 明 (Mayeda Akila) (50212204)	藤田医科大学・総合医科学研究所・教授 (33916)	

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