

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：82729

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07873

研究課題名(和文)塩基変異の引き起こすエクソンスキップを分子機構の解明と治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism and development of therapeutic method of exon skip caused by mutation

研究代表者

成戸 卓也 (NARUTO, TAKUYA)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター(臨床研究所)・臨床研究所・主任研究員

研究者番号：60438124

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)：RNAスプライシングのシス制御配列の変異やトランス制御因子の変化によりRNAスプライシングの異常が疾患の原因となっている。患者自身の白血球よりRNA-Seqを行い、実際の患者におけるスプライシング変異に関わるスプライシングパターンと発現量をStringTieを用いて検証した。スプライシング予測ソフトより予測される変異が生じていないかをミニジェンアッセイで検証した。これらの結果からエクソン途中の欠失は連続しているイントロンの配列を用いてRNAに転写されており、元から存在するスプライシング箇所を強力に保持しており、イントロン内の予測されるスプライシング箇所は使用されていなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソン欠失の報告が数少ない遺伝子におけるスプライシング変異の詳細な解析を行い、mRNAのパターンと発現の解析をした。数多くのスプライシング予測ソフトが公開されているが、本研究の結果を組み入れることによりDNA変異から生じるRNAの予測向上の一助となることが期待される。また、迅速な結果解釈による病気の早期診断や治療の向上が期待される。

研究成果の概要(英文)：Abnormal RNA splicing is the cause of the disease due to mutations in the cis-regulatory sequence of RNA splicing and changes in trans-regulatory factors. RNA-Seq was performed from the patient's blood verified splicing patterns and expression levels related to splicing mutations in actual patients using StringTie. A minigene assay was used to verify whether mutations predicted by splicing prediction software had occurred. These results showed that the exon-terminal deletion was transcribed into RNA using contiguous intron sequences, strongly preserving the original splicing sites and not using the predicted splicing sites in introns.

研究分野：分子生物学

キーワード：スプライシング変異

1. 研究開始当初の背景

人遺伝性疾患における点突然変異のうち、約 15%がスプライス変異によると推察されている。我々は、遺伝子内の新規イントロン挿入変異により引き起こされるエクソンスキップが疾患に関わることを発見した。挿入変異の塩基を変化させることによりエクソンスキップをキャンセルさせることに成功したが、そのメカニズムは既存のスプライシング予測プログラム等では解決不能であった。この挿入変異はエクソンスキップがオンオフと強力に作用し、そのメカニズムを解明することは治療法の発見に繋がることが期待できる。本研究では、イントロンにおける標的分子とその機序を特定し、スプライシング異常症の新たな治療法の開発基盤を提案する。

2. 研究の目的

ヒトゲノムプロジェクトの進行に伴い分子レベルでの病態解明を目指した網羅的解析が精力的に推進され、膨大なオミックス情報が蓄積されてきている。また、2002 年からは Single Nucleotide Polymorphism (SNP) をマーカーにした網羅的ゲノム関連解析 (GWAS)が進められたことで多大な成果が得られ、2007 年には次世代型高速シーケンサー (NGS)が登場したことで、人遺伝性疾患における点突然変異のうち、約 15%がスプライス変異によると推察されている。スプライシングに関わる部位のコンセンサ配列は高等生物ではかなり緩いものであるため、スプライス部位の正確な認識のためには mRNA 前駆体上の他の配列要素「シスエレメント」が深く関与することになる。シスエレメントは、一般的に短く多様化した塩基配列で、さまざまな「制御因子」が結合して機能している。ESE に結合してエクソンの包含を促進する制御因子として SR タンパク質群がよく解析されている。また、ESS や ISS に結合してスプライシングを抑制する主な制御因子は hnRNP 群である。近年、パイオインフォマティクス解析によりシスエレメントの候補配列は多数報告されている。スプライシング予測ツールとしては SpliceSiteFinder-like, MaxEntScan, NNSPLICE, GeneSplicer, HumanSplicing Finder が公開されている。しかし、保存されている配列の抽出にとどまり予測されたシスエレメントが実際に選択性の制御に関わっているか否かの解析にはシミュレーションでは未解決で、未だに何らかの実験的な解析手段が不可欠である。

3. 研究の方法

症例は 3 歳男児で口唇口蓋裂術の既往があり発達遅滞、特異的顔貌所見、finger pad より歌舞伎症候群を疑った。KMT2D 遺伝子および、KDM6A 遺伝子のエクソンを NGS にて解析した。両親と児で gDNA の定量を qPCR 法で行い、欠失領域の確認を行った。エクソン 39 とエクソン 51 の領域にプライマーを設定し、ロング PCR での切断点の解析を行った。

KMT2D 遺伝子変異をスプライシング解析用ミニジーンに組み込み、培養細胞 (Hela 細胞、293T) へ導入する。その後、細胞より RNA を抽出し RT-PCR 法によりスプライシングパターンを解析する。導入したインサートは KMT2D のエクソン 39 から 51 の領域内で (1)患者由来の変異アレル (2)患者父親の正常遺伝子を解析用ミニジーンに組み込み、培養細胞へ導入しスプライシングパターンを解析し両者を比較検討した。

シーケンズリードは BWA でヒト参照ゲノム (hg38) にマッピングし、StringTie を用いて、FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments) 値を算出した。

4. 研究成果

遺伝学的検査で歌舞伎症候群遺伝子検査を行った結果、KMT2D 遺伝子のエクソン 40 からイントロン 49 までの 6,853 bp 欠失を検出した。両親と児で gDNA の定量を qPCR 法で行い、エクソン 40 の後半、46、49 で児のみに欠失を認めた。ロング PCR での切断点の解析により、6 塩基を共有した MMEJ (Microhomology-mediated End Joining) による欠失と推測された。(図 1)

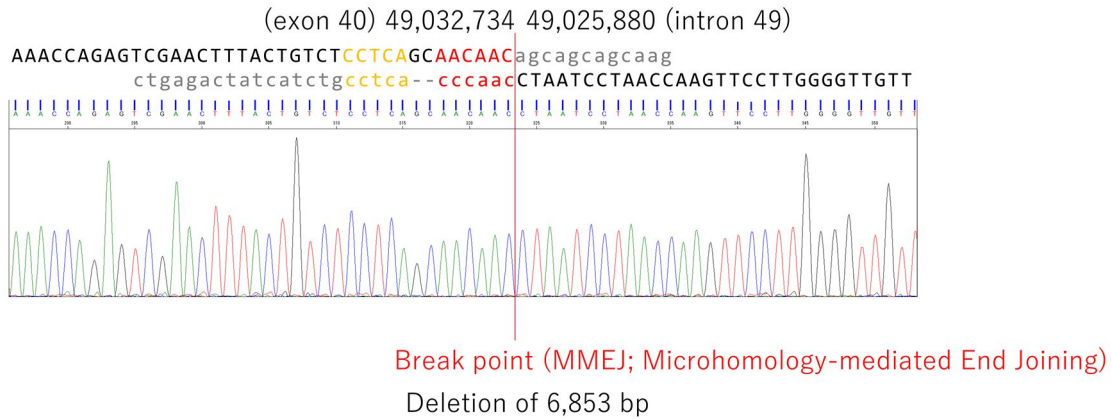


図 1: ロング PCR での切断点の解析

ミニジーン解析では (1)患者由来の変異アレルを組み込んだものでは 2,667 bp の産物が得られた。シーケンスで解析したところ Exon39: 233 bp、Exon40: 1,231 bp、イントロン 49: 935 bp、Exon50: 137 bp、Exon51: 131 bp の産物であった。(2)患者父親の正常遺伝子では正常なパターンの 5,545 bp が得られた。Berkeley Drosophila Genome Project^{*}によるスプライスサイト予測では、子の欠失変異による新たなアクセプターサイトやドナーサイトが生じていなかった。このためエクソン 40 はスプライシングされず、エクソン 50 までの連続した領域が mRNA となることと推測された。このツールではエクソン 47 のアクセプターサイトが予測されないことが判明し、現状の予測ツールの限界を示した。

全血を用いた RNA-seq を施行した。この欠失によりエクソン 40 の途中からイントロン 49 を含むエクソン 50 までの DNA 配列を使用した mRNA が生じていることが StringTie の解析により判明した。FPKM 解析では変異の RNA が野生型の 2 倍の発現を呈しており、発現量が増強されるのか、RNA の半減期が長いのかを判定することはできなかった。(図 2)

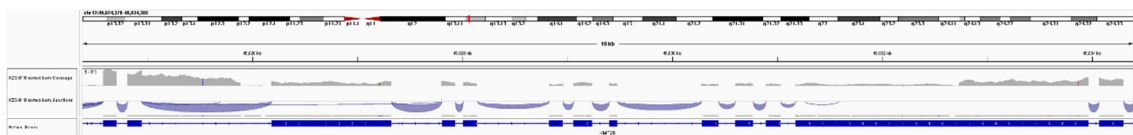


図 2: RNA-seq による変異転写産物の確認

RT-PCR で変異の RNA を確認し、転写されるタンパクは異常終止コドン (p.Gln3991Profs*30) を生じることが予測され、歌舞伎症候群と診断した。

KMT2D の病原性変異は 1000 を超える数が HGMD に登録されているが、複数エクソンの欠失はエクソン 40 以降から遺伝子外への欠失が報告されているのみである。またエクソン内の重複は 1 例のみである。KMT2D 遺伝子においてはまれな構造的変異である遺伝子内欠失によるスプライシング変異により歌舞伎症候群に関与することを同定した。

^{*}Berkeley Drosophila Genome Project: https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murakami H, Tsurusaki Y, Enomoto K, Kuroda Y, Yokoi T, Furuya N, Yoshihashi H, Minatogawa M, Abe-Hatano C, Ohashi I, Nishimura N, Kumaki T, Enomoto Y, Naruto T, Iwasaki F, Harada N, Ishikawa A, Kawame H, Sameshima K, Yamaguchi Y, Kobayashi M, Tominaga M, Kuroki Y, Kurosawa K. et al.	4. 巻 182
2. 論文標題 Update of the genotype and phenotype of KMT2D and KDM6A by genetic screening of 100 patients with clinically suspected Kabuki syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part A	6. 最初と最後の頁 2333 ~ 2344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg.a.61793	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 -

1. 著者名 Tozawa Yusuke, Abdrabou Shima Said Mohamed Ali, Nogawa-Chida Natsuko, Nishiuchi Ritsuo, Ishida Toshiaki, Suzuki Yuichi, Sano Hideki, Kobayashi Ryoji, Kishimoto Kenji, Ohara Osamu, Imai Kohsuke, Naruto Takuya, Kobayashi Kunihiro, Ariga Tadashi, Yamada Masafumi	4. 巻 208
2. 論文標題 A deep intronic mutation of c.1166-285 T > G in SLC46A1 is shared by four unrelated Japanese patients with hereditary folate malabsorption (HFM)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 108256 ~ 108256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clim.2019.108256	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 -

〔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
---------	---------