

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07426

研究課題名（和文）DUX4による非コードDNAの転写活性化の病理的意義の研究

研究課題名（英文）Pathological significance of transcriptional activation of non-coding DNA by DUX4

研究代表者

三橋 弘明（Mitsubishi, Hiroaki）

東海大学・工学部・准教授

研究者番号：20466220

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD)は常染色体優性遺伝の筋疾患で、健常者の骨格筋には発現していない転写因子DUX4-f1の発現が原因と考えられている。本研究ではDUX4-f1が転写を活性化する非コードDNAに着目し、ロングリードシーケンサーを用いてその完全長を明らかにした。また、その非コードDNAの中で翻訳の可能性があるものを見出したため、ORFをクローニングし、ヒト由来培養細胞株での過剰発現をおこなった。その結果、非コードDNA由来のORF配列からタンパク質が翻訳されることが確認された。これらのタンパク質の発現とFSHDの病態との関連について、今後さらなる研究が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの原因遺伝子DUX4-f1の発現は様々な細胞障害を引き起こし、最終的に細胞死を起こすが、DUX4-f1の下流で細胞障害の原因となる特定のタンパク質はまだ同定されていない。本研究ではDUX4-f1の下流の非コードDNAを網羅的に探索し、その完全長を同定した。このデータをデータベースに公開することにより、今後、FSHDの病態解明に向けた研究を加速することに寄与できると考えている。また、本研究では非コードDNAと考えられてきた領域からの翻訳の可能性を示唆することができたため、非コードDNAの意義を再考するような学術的な意義を持つものと考えている。

研究成果の概要（英文）：Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) is an autosomal dominant inherited muscle disease and is thought to be caused by the expression of the transcription factor DUX4-f1, which is not expressed in skeletal muscle of healthy individuals. In this study, we focused on the noncoding DNAs activated by DUX4-f1, and revealed the full length sequences of the noncoding DNAs using a long-read sequencer. Among them, we found several non-coding DNAs that may have been translated. Thus, we cloned ORFs of those noncoding DNAs, and overexpressed them in human-derived cultured cell lines. As the results, we confirmed that the proteins were translated from the non-coding DNA-derived ORFs. Further studies are needed to elucidate the relationship between the expression of these proteins and the pathogenesis of FSHD.

研究分野：神経内科学

キーワード：DUX4 FSHD 非コードDNA 筋ジストロフィー

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー (FSHD) は常染色体優性遺伝の筋疾患で、筋細胞の壊死と炎症所見を特徴とする。FSHD 患者の筋肉では、健常者には発現していない転写因子 DUX4-f1 が発現しており、この DUX4-f1 の異所的な発現が FSHD の原因と考えられている。これまでの研究成果から、DUX4-f1 が転写活性に依存して細胞死を引き起こすことが明らかになっており、DUX4-f1 が発現誘導する転写産物の中に、細胞死を引き起こす原因があると考えられるが、その機序は依然としてわかっていない。

最近、DUX4-f1 が発生に関わる遺伝子群に加え、サテライト DNA や内在性レトロウイルス (ERV) などの非コード DNA と考えられていた反復配列からの転写を促進することが報告された。さらに、サテライト DNA の 1 つである HSATII の発現抑制によって DUX4-f1 依存性の細胞死が軽減されることが示された。そのため、反復配列からの転写産物は FSHD 病態を引き起こす要因の一つであり、FSHD の病態解明のためには、その網羅的な同定が必要だと考えた。しかし、ゲノム上に多数のコピーが存在する反復配列は従来のシーケンサーでは解読が困難だという問題があった。そこで我々は反復配列の解読を得意とするナノポアロングリードシーケンサーを用い、DUX4-f1 発現細胞の転写産物を網羅的に解析し、ERV、LINE、Alu や反復配列と遺伝子の融合転写産物など様々な非コード DNA 由来の転写産物の発現を明らかにした。

### 2. 研究の目的

本研究は、DUX4-f1 によって発現誘導される非コード DNA 由来の配列の全長配列を決定し、それらの転写産物と FSHD の病態との関連について検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) DUX4-f1 誘導性反復配列由来転写産物の完全長 cDNA シークエンシング

DUX4-f1 の発現コンストラクトをヒト横紋筋肉腫細胞株 RD 細胞へトランスフェクションし、RNA を抽出した。SMARTer 法を用いて完全長 cDNA を合成し、PacBio 社ロングリードシーケンサー Sequel II を用いた Iso-seq 解析をおこなった。ロングリードシーケンシングのデータをヒトゲノムのリファレンス配列にマッピングし、染色体上の座位やスプライシングパターンなどを調べた。代表的な 4 つの反復配列について、RT-PCR を用いて発現の確認をおこなった。

#### (2) dsRNA 介在性細胞死の検証

DUX4-f1 と、転写活性を持たないスプライシングバリエント DUX4-s を HeLa 細胞、HEK 細胞にトランスフェクションし、dsRNA が産生されるかを抗 dsRNA 抗体を用いた免疫染色で調べた。また、dsRNA に対する細胞応答系の 1 つである PKR について、ウェスタンブロットで PKR の活性化を調べた。

#### (3) DUX4-f1 誘導性反復配列由来転写産物のリボソームプロファイリング

DUX4-f1 と DUX4-s、対照として EGFP の発現コンストラクトをヒト横紋筋肉腫細胞株 RD 細胞へトランスフェクションし、ライセートよりリボソームを精製して、結合している RNA の配列をショートリード型次世代シーケンサーで解読する Ribo-seq をおこなった。得られた配列を Iso-seq データにマッピングし、DUX4-f1 誘導性反復配列由来転写産物の中でリボソームの結合が見られる配列を同定した。リボソームの結合が見られた配列のうち、およそ 100 アミノ酸ほどの ORF 内にマッピングされているものについて、ORF をクローニングし、FLAG タグを融合させて HEK 細胞でのタンパク質発現を調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) DUX4-f1 誘導性反復配列由来転写産物の完全長 cDNA シークエンシング

Iso-seq 解析の結果、DUX4-f1 誘導性非コード DNA 転写産物の 5' 末端までの解読に成功した。同定した配列のヒトゲノム上の座位を UCSC ゲノムブラウザで確認し、RNA スプライシングを受けていることや複数のスプライシングバリエントがあることを見出した。同定した配列についてパイオインフォマティクス解析をおこない、多くの転写産物に既知のドメインが含まれていることを見出した。代表的な 4 つの転写産物について、RT-PCR 解析をおこなった結果、DUX4-f1 によって発現が誘導されることが確認された。

#### (2) dsRNA 介在性細胞死の検証

完全長 cDNA シークエンシングで同定された SAR サテライト DNA からは+鎖-鎖両方からの転写が検出されたため、二本鎖 RNA (dsRNA) の産生が予想された。そこで DUX4-f1 と対照としての DUX4-s を発現させた HeLa 細胞、HEK 細胞を用いて、抗 dsRNA 抗体による免疫染色をおこなった。その結果、dsRNA の foci を持つ核が検出されたが、DUX4-f1 陽性核のうちのおよそ 1%程度と頻度は

非常に低かった。また、dsRNA に応答してリン酸化を受けて活性化する PKR の発現量とリン酸化型の量をウェスタンブロットによって解析したところ、ポジコンである polyI:C 存在下では PKR のリン酸化は強く誘導されていたが、DUX4-f1 トランスフェクションによっては非常に弱いリン酸化 PKR のバンドしか確認できなかった。DUX4-f1 の発現量に依存して dsRNA およびリン酸化 PKR の量が増える傾向が見られたが、それでもごく微量であった。DUX4-f1 による dsRNA の産生とそれに対する細胞応答経路の解析には、DUX4-f1 安定発現系の構築など、DUX4-f1 発現細胞を濃縮して調べる必要があると考えられ、今後の課題となった。

### (3) DUX4-f1 誘導性反復配列由来転写産物のリボソームプロファイリング

非コード DNA からの転写産物が翻訳されている可能性を探るため、DUX4-f1, DUX4-s, EGFP 発現細胞の RNA を用いて Ribo-seq をおこなった。マッピングの結果から、様々な非コード DNA 領域からの転写産物にリボソームが結合している可能性が示唆された。特にピークが強く、およそ 100 アミノ酸ほどの ORF があるものについて ORF をクローニングして HEK 細胞で発現した結果、3 つの転写産物について少なくとも過剰発現系ではタンパク質として安定に発現することが確認された。今後、これらのタンパク質の発現が細胞にどのような影響を与えるか、FSHD 病態にどのように関連するのか、さらなる検討が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 三橋弘明	4. 巻 76
2. 論文標題 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの治療法開発に向けたDUX4遺伝子の機能解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 医療	6. 最初と最後の頁 50-54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三橋弘明
2. 発表標題 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーの病態解明と治療法開発研究
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第66回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 三橋弘明	4. 発行年 2023年
2. 出版社 メディカルドゥ	5. 総ページ数 11
3. 書名 遺伝子医学 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー	

〔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
研究分担者	三橋 里美  (Mitsuhashi Satomi)  (40466222)	聖マリアンナ医科大学・医学部・教授    (32713)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	中川 草  (Nakagawa So)  (70510014)	東海大学・医学部・准教授    (32644)	

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