

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15360

研究課題名（和文）長鎖シーケンス法によるスプライシングバリエーション関連多型の解析と疾患研究への応用

研究課題名（英文）Analysis of splicing variant-related polymorphisms by long-read sequencing and its application to disease research

研究代表者

嶋多 美穂子（Shimada, Mihoko）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・研究所・ゲノム医科学プロジェクト 上級研究員

研究者番号：50792727

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、同一サンプル由来の3つの異なる脳領域から抽出したRNAを用いてロングリード遺伝子発現解析を行った。従来のショートリードを用いた解析では、転写産物の全長を一度に解析することができず、そのアイソフォームは推定にならざるを得なかった。今回ロングリード法を用いて正確にアイソフォームを同定することにより、3つの脳部位のうち2か所以上で発現しているアイソフォームに絞っても、その半数以上がこれまでに登録のない新規のアイソフォームであることがわかった。その情報を用いて様々な解析を行い、特に脳の部位間で異なるアイソフォームを発現する遺伝子には細胞突起の形成に関わるものが多いことなどを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果から、ロングリード法を用いて遺伝子発現解析を実施した場合、従来のショートリード法では同定できていなかった多数のアイソフォームが検出可能であることが示され、今後の遺伝子発現解析におけるロングリード法の有用性を示すことができた。また脳は部位によってその細胞組成が大きく異なるが、それに応じて部位間で発現している主要なアイソフォームに違いがある遺伝子や、発現パターンが異なってくるメカニズムについての知見を得ることができた。このようなデータは今後の脳に関わる疾患研究のコントロールデータとなり得るため、意義がある結果と考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed long-read RNA-sequencing using RNA extracted from three different brain regions derived from the same sample. With conventional short-read analysis, it was not possible to analyze the full length of the transcripts at once, and the isoforms had to be estimated. By accurately identifying isoforms using the long-read method, we found that more than half of the isoforms expressed in at least two of the three brain regions were novel isoforms. Using this information, we conducted various analyses and found that genes expressing different isoforms between brain regions were often involved in the formation of cell projections.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：小脳 視床下部 側頭葉皮質 アイソフォーム ロングリード法 RNA-seq

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経疾患や精神神経疾患では、さまざまな脳領域が影響を受けるが、遺伝子発現パターンの違いがこのメカニズムを説明できる可能性が示唆されていた。しかしながら、ヒトの脳の異なる領域における遺伝子発現を正確に調べた研究は限られており、従来のショートリードシーケンスを用いた遺伝子発現解析技術は、mRNA の全長を解析することができず、そのデータに基づくスプライシングバリエーションは推定にたどるを得ないという問題があった。本研究では、このような課題を克服するため、同一サンプル由来の小脳、視床下部、側頭皮質の3つの異なる脳領域から抽出した RNA を用いてロングリード遺伝子発現解析を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ロングリード法による遺伝子発現解析技術を用いて、脳の3つの部位(小脳、側頭葉皮質、視床下部)の遺伝子発現を調べることである。正確なアイソフォームの情報に基づき、各々の部位で発現しているアイソフォームのプロファイルを明らかにすると共に、部位間の違いや、部位間で異なるアイソフォームが発現するメカニズムについて検討することを目的とする。

3. 研究の方法

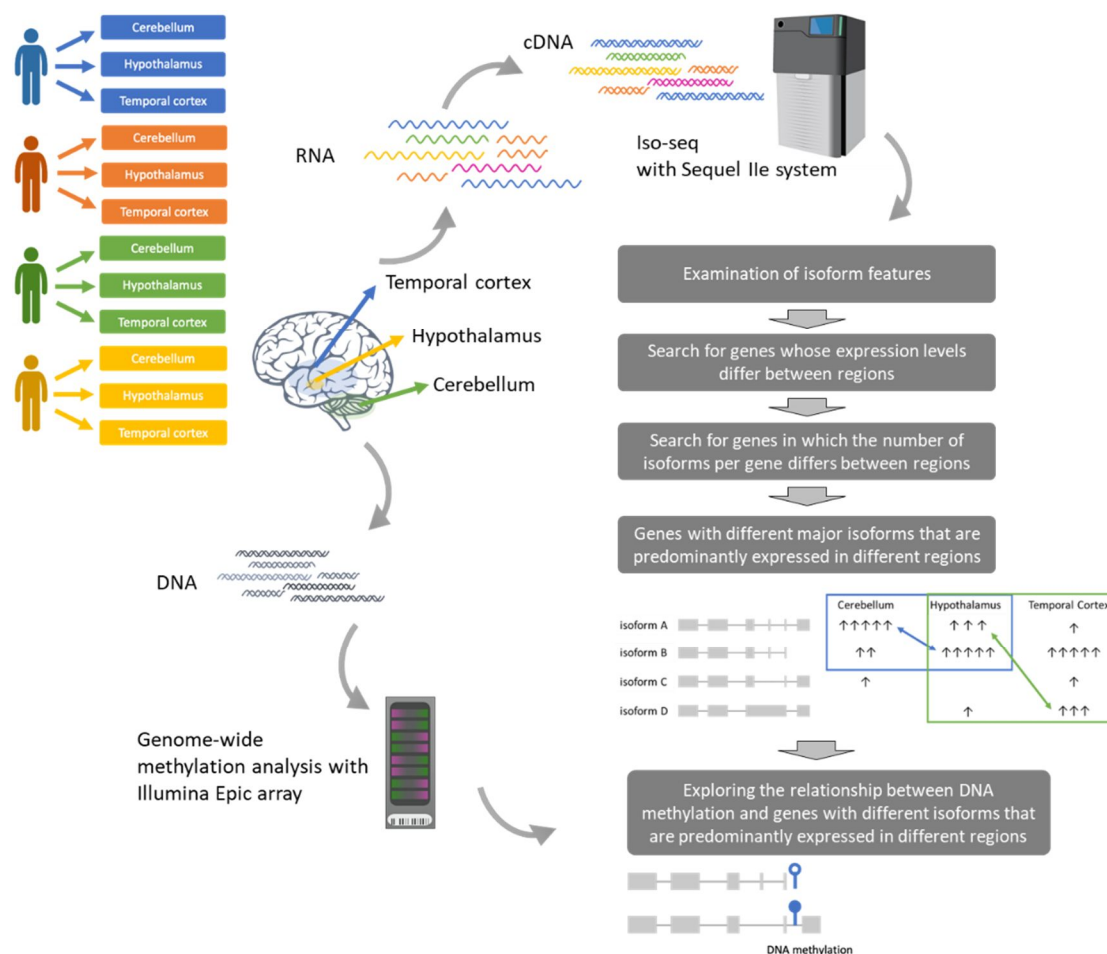


図 1. 研究の概要

脳に影響を与える疾患で亡くなっていない4例の日本人男性の死後脳から、小脳、側頭葉皮質、視床下部を切り出し、そこから RNA を抽出した。RNA は逆転写を行い cDNA 化して、Pacific Biosciences のプラットフォームによるロングリード法にて遺伝子発現解析を実施した。得られたデータは適切に QC を行い、アーティファクトと推定されるアイソフォームを除外する、最低2サンプル以上で発現しているアイソフォームに限定するといった厳しいフィルタリングを行った。また同じサンプルから抽出した DNA を用いて Illumina 社の EPIC アレイを用いて網羅的な DNA メチル化データを取得した。上記データを用いて、「4. 研究成果」に示す各々の解析を実施した。

4. 研究成果

(1) ロングリード法によって得られた遺伝子・アイソフォームの発現状況

全サンプルあわせて66,860個のアイソフォームが同定され、それらは14,382の既知の遺伝子と52の新規の遺伝子に由来するものであった(図2)。3つの脳部位のうち2か所以上で発現しているアイソフォームに絞っても、その半数以上がこれまでに登録のない新規のアイソフォームであった。また我々のデータでは、発現しているアイソフォームの数は特に小脳で脳に属する他の2つの部位に比べて少なかった(小脳 vs 視床下部 $P = 8.04E-3$, 小脳 vs 側頭葉皮質 $P = 2.74E-4$, 視床下部 vs 側頭葉皮質 $P = 0.33$)。

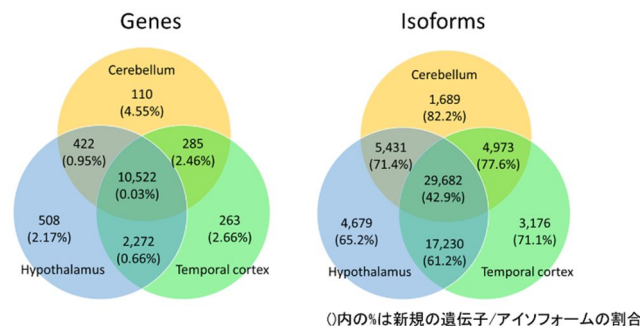


図2. 遺伝子・アイソフォームの検出状況

(2) 脳部位間の遺伝子・アイソフォームの発現状況の比較

各々の部位で発現量が異なる遺伝子について検討したところ、小脳、側頭葉皮質で他の部位と比較して発現量が多い遺伝子には、脳神経系の発達などに関わるものが多いのに対し、視床下部では免疫関連遺伝子が検出された。さらに同じ遺伝子から転写されるアイソフォームの種類数が部位間で異なる遺伝子についても検討したところ、小脳と側頭葉皮質では脳神経系に関わる遺伝子が、視床下部では脳神経系に加えて免疫系の遺伝子が多くのアイソフォームを発現していることが明らかになった。

(3) 脳部位間で異なる主要なアイソフォームを発現する遺伝子の検討

各々の脳部位において、遺伝子全体の発現量は変わらなくとも、発現している主要なアイソフォームが異なる遺伝子に着目して解析を行った。その結果、このような傾向が最も強い遺伝子はGAS7 (Growth Arrest Specific 7)であり、3つの部位でそれぞれ異なる主要なアイソフォームを発現しており、

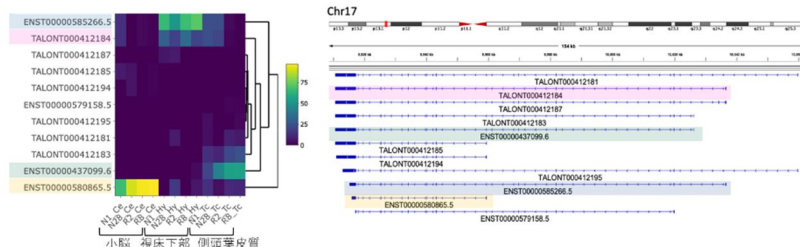


図3. GAS7のアイソフォーム

特に視床下部、側頭葉皮質では長いアイソフォームを、小脳では短いアイソフォームを発現していた(図3)。GAS7が大脳皮質では長いアイソフォームを、小脳では短いアイソフォームを発現することは、すでにマウスの脳のウェスタンブロットティングを用いた研究などでも明らかとなっており(1)、今回の結果はヒトでも同じ現象が見られることを示している。GAS7は神経突起伸長に重要な機能を持つことが報告されている(2,3)。GAS7以外にも同様に脳部位間で異なる主要なアイソフォームを発現する遺伝子について検討したところ、パスウェイ解析から細胞の突起の形成に関わるものが多いことが示唆された。

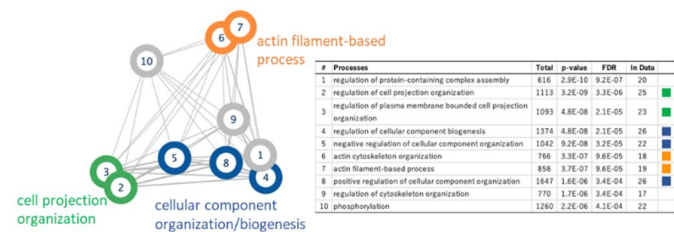


図4. パスウェイ解析の一例(小脳 vs 視床下部)

(4) 脳部位間で異なるアイソフォームが発現する機構とDNAメチル化

最後に私たちは、上述のように同じ遺伝子から脳部位によって異なるアイソフォームが発現するメカニズムに迫るため、DNAのメチル化に着目した解析を行った。ロングリード解析を行ったサンプルで網羅的なDNAメチル化率のデータも取得し、発現データとあわせて解析することで、部位間でDNAのメチル化率が異なるメチル化部位が、異なるアイソフォームを発現する遺伝子周辺に特に多いことを明らかにした。また特に転写開始点異なるアイソフォーム同士の間で転写開始点付近にメチル化率が異なる部位が多いことがわかり、異なるアイソフォームの発現メカニズムにDNAのメチル化が関与している可能性が示唆された。

【参考文献】

- (1) E. M. Lazakovitch, B. R. She, C. L. Lien, W. M. Woo, Y. T. Ju, S. Lin-Chao, The Gas7 gene encodes two protein isoforms differentially expressed within the brain. *Genomics* 61, 298-306 (1999).
- (2) B. R. She, G. G. Liou, S. Lin-Chao, Association of the growth-arrest-specific protein Gas7 with F-actin induces reorganization of microfilaments and promotes membrane outgrowth. *Exp Cell Res* 273, 34-44 (2002).
- (3) J. J. You, S. Lin-Chao, Gas7 functions with N-WASP to regulate the neurite outgrowth of hippocampal neurons. *J Biol Chem* 285, 11652-11666 (2010).

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 1件）

1. 著者名 Mihoko Shimada, Yosuke Omae, Akiyoshi Kakita, Ramil Gabdulkaev, Yuki Hitomi, Taku Miyagawa, Makoto Honda, Akihiro Fujimoto, and Katsushi Tokunaga	4. 巻 10(4)
2. 論文標題 Identification of region-specific gene isoforms in the human brain using long-read transcriptome sequencing	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.adj5279	査読の有無 有
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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mihoko Shimada, Yosuke Omae, Akiyoshi Kakita, Ramil Gabdulkaev, Yuki Hitomi, Taku Miyagawa, Makoto Honda, Akihiro Fujimoto, and Katsushi Tokunaga
2. 発表標題 Region-specific gene isoforms in the human brain using long-read sequencing and their correlation with DNA methylation
3. 学会等名 日本人類遺伝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 嶋多美穂子
2. 発表標題 ロングリードRNAシーケンスIso-Seqを用いたヒトの脳の部位間でのトランスクリプトームの比較
3. 学会等名 日本人類遺伝学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------