

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2013

課題番号：23791230

研究課題名（和文）ユビキチン-プロテアソーム系に注目した口唇口蓋裂へのゲノミクス的アプローチ

研究課題名（英文）Genomics Approach to orofacial clefts focusing the ubiquitin-proteasome system

研究代表者

三嶋 博之（MISHIMA HIROYUKI）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10513319

研究成果の概要（和文）：

近年、次世代シーケンサーの応用によって包括的かつ高精度の検出が可能になりつつあることを踏まえ、当初予定の方法に先行して、データ解析ワークフローの確立を行った。これにより、紫外線高感受性症候群原因遺伝子 *UVSSA* の発見、データベースアクセスライブラリ Ruby UCSC API の公開を達成した。期間中に口唇口蓋裂サンプルの解析を終えることができなかったが、今後構築したワークフローをもとに解析を継続する。

研究成果の概要（英文）：

Next generation sequencers (NGS) can analyze samples more comprehensively and more accurately than quantitative PCR. Thus, the author started to build data analysis workflow for NGS data. Using the workflow, the research team including the author succeeded to find the *UVSSA* gene causing UV sensitive syndrome A. The author also published database accessing library for Ruby, the Ruby UCSC API. The author plan to finish analysis of orofacial cleft samples using build workflows.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学／胎児・新生児医学

キーワード：次世代シーケンサー、バイオインフォマティクス、オープンソース

1. 研究開始当初の背景

非症候群性口唇口蓋裂の原因はいまだ不明である。一方、症候群性口唇口蓋裂では、複数の症候群の原因遺伝子として *TP63* と *IRF6* が知られている。最近の報告により（1）とマウス口蓋の癒合において、これらの遺伝子産物のユビキチン-プロテアソーム系（UPS）タンパク分解機構をとおした相互作用が必須であること、（2）ヒトにおいて、UPS 遺伝子のコピー数異常が UPS 機能異常を引き起こすことが明らかになった。本研究はこれらに加え、ヒト一般集団においても複数の UPS 関連遺伝子群がコピー数多型

をもつことに注目した。本研究の目的は、これらのコピー数多型による口唇口蓋裂発症機序への関与を、現在収集を継続しているゲノム DNA サンプル（申請時で約 210 家系／約 630 人）を用いて明らかにすることである。

2. 研究の目的

口唇口蓋裂は、ヒトにおける最も頻度の高い先天性形態異常のひとつである。口蓋裂併発を含む口唇裂の約 70%、また口蓋裂単独の約 50%が、他の先天性異常をもたない非症候群性口唇口蓋であるが、相関解析をはじめとす

るさまざまなアプローチにもかかわらず (Mishima et al., BMC Bioinformatics, 2008), いまだその原因は不明である。一方、一部の症候群性口唇口蓋裂では、その原因遺伝子が同定されている。これらは、非症候群性口唇口蓋裂の原因解明への手がかりとなり得る。TP63 遺伝子 (p63 タンパク) は外胚葉異形成・口唇口蓋裂・裂手裂足症 (EEC) 症候群および眼瞼癒着・外胚葉異形成・口唇口蓋裂 (AEC) 症候群の原因遺伝子である。また、IRF6 は、口唇口蓋裂を持つ症候群である van der Woude 症候群および膝窩翼状片症候群 (PPS) の原因遺伝子である。興味深いことに、IRF6 は、非症候群性口唇口蓋裂においても、複数の相関解析の結果から原因遺伝子候補のひとつにあげられている。最近の報告 (Moretti et al., 2010) により、マウス二次口蓋癒合時において、p63 による IRF6 の転写活性化と IRF6 による p63 分解促進が必須であること、およびこの p63 の分解はユビキチン-プロテアソーム系 (UPS) によってなされることが明らかになった。UPS は、生体内での選択的なタンパク分解を司るシステムであり、分解されるべきタンパクに結合するユビキチンと、ユビキチン化されたタンパクを分解する巨大なタンパク複合体プロテアソーム、およびそれらを制御する酵素群により構成される。UPS は、転写因子の分解、タンパクの品質管理、抗原提示、酸化ダメージを受けたタンパクの分解など、細胞の正常な機能の維持に広くかかわっている。その機能は発生、老化のプロセス、あるいは、悪性腫瘍・変性性神経疾患・自己炎症性疾患といった疾患と関連していることが知られている。

UPS での重要なステップのひとつが、分解標的タンパクのユビキチン化である。この機能を司るユビキチンリガーゼをコードする遺伝子 UBE3A は、Angelman 症候群の原因遺伝子として知られ、Angelman 症候群の一部症例では口唇口蓋裂を併発することが報告されている (Roesby et al., 1996; Tsai et al., 2004)。さらに、UBE3A のコピー数異常 (遺伝子の重複) が、mRNA およびタンパクレベルでの発現亢進を引き起こし、結果として UPS による p53 の過剰分解をもたらすことが報告されている (Baron et al., 2006) さらに興味深いことに、一般集団サンプルに対するゲノム多型データベース (DGV) 上に現在登録されているコピー数多型のうち、UPS 遺伝子のエクソンを含むものを検索したところ (表 1), 60 個の UPS 遺伝子のうち 3 割弱がコピー数多型を持つことがわかった。一般集団において、ゲノム上のほとんどの遺伝子は父由来/母由来 (2 倍体) の 2 コピー存在する。コピー数多型とは、一部の遺伝子において、2 コピー以上 (重

複) あるいはそれ以下 (欠失) のコピー数の集団内多様性を持つことである。これらは、UBE3A 同様に、UPS の機能に影響を与えている可能性がある。

申請者は、以上の背景より、UPS 遺伝子のコピー数多型が、UPS による制御機構の攪乱を引き起こし、口唇口蓋裂発症につながるとの仮説を立て、本研究計画の着想に至った。

研究期間に何をどこまで明らかにしようとするのか

UPS 遺伝子群のコピー数多型 それぞれの UPS 遺伝子に対して校正プラスミドを構築し、正確なコピー数測定系を確立する。その上で口唇口蓋裂患者群と一般集団群との間でコピー数分布に差異を示す UPS 遺伝子の存在を明らかにする。検出されたコピー数は遺伝性か、それとも de novo か? 申請者が収集継続しているサンプルでは患者とその両親の 3 サンプルをセットにしている。非症候群性口唇口蓋裂群に関しては、家系内個発例が多い特徴を考えると、非遺伝性 (de novo) コピー数変異が生じている可能性がある。コピー数多型は UPS 遺伝子発現に影響するのか? 一部のサンプルについては、不死化 B 細胞を得ている。細胞抽出液を用いて、mRNA およびタンパク発現量にコピー数が影響しているかどうかを明らかにする。コピー数多型は UPS 機能に影響するのか? 同様に不死化 B 細胞でのユビキチン化タンパク/酸化タンパクの蓄積、プロテアソームのタンパク分解活性を測定し、UPS 遺伝子コピー数多型が UPS 機能への影響するのかを確認する。

本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義

非症候群性口唇口蓋裂の原因は、広範な努力にもかかわらずいまだ不明である。また、ヒト UPS 遺伝子群のコピー数が UPS 機能へ及ぼす影響は UBE3A に関する報告以外ほとんどわかっていない。本研究は、これらの状況をふまえ、複数の UPS 遺伝子にコピー数多型が存在することに注目し、本研究の着想に至った。本研究は口唇口蓋裂/UPS/コピー数多型を総合した点に特色・独創性を持つ。本研究の結果は、口唇口蓋裂の予防法開発にむけたブレイクスルーという意義のみならず、多因子遺伝疾患 (口唇口蓋裂の他に自閉症・統合失調症などといった精神疾患、あるいは生活習慣病などが含まれる) のテーラメード予防医学の確立にインパクトを与えることが期待できる。

3. 研究の方法

当初予定されていた方法は以下のとおりである：(1) 詳細な解析を行う UPS 遺伝子候補の絞り込みを目的に、申請者所属教室の持つマイクロアレイデータのコピー数解析を行う。(2) 正確なコピー数測定系の確立を目的に、校正プラスミドを構築する。(3) 患者サンプルを用いたコピー数測定を行う。(4) コピー数伝達様式の推定を目的に、患者両親サンプルのコピー数測定を行う。(5) コピー数変異の細胞内での影響の確認を目的に患者由来不死化 B 細胞を用いて対象遺伝子の mRNA 量、およびタンパク量の定量、さらに、(6) ユビキチン化タンパク/酸化タンパクの蓄積、およびプロテアソームのタンパク分解活性測定を行う。

しかしながら、急速な次世代シーケンサー技術 (NGS) の発達に伴い、NGS によるユビキチン-プロテアソーム系関連遺伝子のスクリーニングを行い、その結果に対して上記の詳細な解析を進めるべきであると考えた。このためには、まず NGS から出力される大規模なデータを解析するワークフローを構築することが必須であり、まずこの課題に取り組んだ。

4. 研究成果

まず、NGS データのうち、実際のエクソーム解析のワークフローの構築を行った。エクソーム解析ワークフローについて、恵まれていた点は、ゲノムマッピングソフトウェアや、ゲノムを対象としたデータベースの整備などコアになる技術の開発が急速に進んでいた点である。一方、その発達は急激であり、高頻度に更新されるため、プロジェクト途中に繰り返しワークフローの再構築が必要になる問題点があった。これに対し、代表研究者が構築した Pwrake/Rake をベースにしたワークフロー管理 (Mishima et al., BMC Res Notes, 2011) が効果を発揮した。これにより最終的に紫外線高感受性症候群原因遺伝子 *UVSSA* の発見という成果につながった。

また、ワークフローの試行錯誤による改良をすすめるためには、データベースへのアクセスを容易にする必要があり、特にヒトゲノムのアノテーションを広範囲に収録している UCSC Genome Database を対象にしたライブラリ Ruby UCSC API を開発し、オープンソースソフトウェアとして公開した。

口唇口蓋裂サンプルについて、エクソーム解析に用いることを前提に、研究倫理審査委員会の承認および文書によるインフォームドコンセントを得た上での収集を継続している。しかしながら、本研究期間中には解析を終えることができなかった。これまで構築に成功したデータ解析のためのワークフローを活用して、今後、これらのサンプルの解

析をすすめる予定である。

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)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Abe S, Miura K, Kinoshita A, Mishima H, Miura S, Yamasaki K, Hasegawa Y, Higashijima A, Jo O, Sasaki K, Yoshida A, Yoshiura K, Masuzaki H: Copy number variation of the antimicrobial-gene, defensin beta 4, is associated with susceptibility to cervical cancer. *J Hum Genet* 2013.
2. Higashijima A, Miura K, Mishima H, Kinoshita A, Jo O, Abe S, Hasegawa Y, Miura S, Yamasaki K, Yoshida A, Yoshiura K, Masuzaki H: Characterization of placenta-specific microRNAs in fetal growth restriction pregnancy. *Prenatal Diagnosis* 2013, 33:214-222.
3. Sasaki K, Mishima H, Miura K, Yoshiura K: Uniparental disomy analysis in trios using genome-wide SNP array and whole-genome sequencing data imply segmental uniparental isodisomy in general populations. *Gene* 2012, 512:267-274.
4. Mishima H, Aerts J, Katayama T, Bonnal RJ, Yoshiura K: The Ruby UCSC API: accessing the UCSC genome database using Ruby. *BMC Bioinformatics* 2012, 13:240.
5. Nakazawa Y, Sasaki K, Mitsutake N, Matsuse M, Shimada M, Nardo T, Takahashi Y, Ohyama K, Ito K, Mishima H, Nomura M, Kinoshita A, Ono S, Takenaka K, Masuyama R, Kudo T, Slor H, Utani A, Tateishi S, Yamashita S, Stefanini M, Lehmann AR, Yoshiura K, Ogi T: Mutations in *UVSSA* cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase IIo processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair. *Nature Genetics* 2012, 44:586-592.

[学会発表] (計 7 件)

1. 【国内口演】三嶋博之, 吉浦孝一郎:(3W2III-6) ヒトゲノム変異解析ワークフローにおける公共データベース活用.

第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月13日, 福岡市福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

2. 【国内ポスター】三嶋博之, 吉浦孝一郎:(3P-0053)ヒトゲノム変異解析ワークフローにおける公共データベース活用. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月13日, 福岡市福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
3. 【国内招待講演】三嶋博之:(教育講演6)次世代シーケンサーを用いた Disease Gene Hunting. 第24回日本小児口腔外科学会総会・学術大会, 2012年11月24日, 名古屋市愛知学院大学
4. 【海外口演】Hiroyuki Mishima, Raoul J. P. Bonnal, Naohisa Goto, Francesco Strozzi, Toshiaki Katayama, Pjotr Prins: Biogem, Ruby UCSC API, and Bioruby. The 13th Annual Bioinformatics Open Source Conference, 2012年7月13-14日, Long Beach Convention Center, Long Beach, CA, USA.
5. 【海外ポスター】(5) Hiroyuki Mishima, Raoul J. P. Bonnal, Naohisa Goto, Francesco Strozzi, Toshiaki Katayama, Pjotr Prins: Biogem, Ruby UCSC API, and Bioruby. The 13th Annual Bioinformatics Open Source Conference, 2012年7月13-14日, Long Beach Convention Center, Long Beach, CA, USA.
6. 【海外ポスター】(06) Hiroyuki Mishima, Jan Aerts, Toshiaki Katayama, Raoul J. P. Bonnal, Koh-ichiro Yoshiura: The Ruby UCSC API: accessing the UCSC Genome Database using Ruby. 20th Annual International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, 2012年7月15-17日, Long Beach Convention Center, Long Beach, CA, USA.
7. 【国内ポスター】三嶋博之:(R52) 5500 SOLiD を使ったヒトエクソーム解析データ処理の実際. NGS 現場の会第二回研究会, 2012年5月23-25日, 大阪市ホテル阪急エキスポパーク

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<https://github.com/misshie/bioruby-ucsc-api>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三嶋 博之 (MISHIMA HIROYUKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 10513319

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし