

歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症 たんぱく質(DRPLA)の生理的機能に
基づく治療法開発研究

業務担当責任者：後藤 順 東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科学
研究協力者：波多野敬子¹⁾、伊達英俊¹⁾、三井純¹⁾、石浦浩之¹⁾、吉村淳²⁾、
土井晃一郎²⁾、森下真一²⁾、辻省次¹⁾
1) 東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経内科学
2) 東京大学大学院新領域創成科学研究科

研究要旨

歯状核赤核・淡蒼球ルイ体萎縮症蛋白質(DRPLA)の転写 co-regulator としての標的遺伝子の検討を行った。テトラサイクリン(Tet)誘導 全長 DRPLA 発現細胞系(正常 polyQ₁₉、及び異常伸長 polyQ₈₈)を用い、Tet-ON 24 時間後の RNA にて、次世代シーケンサーによる RNAseq により網羅的な遺伝子発現解析を行った。DRPLA(Q19)発現に並行し、解析可能遺伝子の 99.7%が、ON で OFF に比し 0.5 倍~2.0 倍の範囲で発現変動した。有意に発現変動した遺伝子は 99 個であった。

A . 研究目的

DRPLA 原因遺伝子産物 DRPLA は共役蛋白質と共に転写調節機能を有することが示唆されているが、転写調節の標的遺伝子や共役蛋白質は同定されていない。

テトラサイクリン(Tet)誘導全長 DRPLA 発現細胞系(正常 polyQ₁₉、及び異常伸長 polyQ₈₈)を用い、次世代シーケンサーによる RNAseq により網羅的な遺伝子発現解析を行い、転写調節標的遺伝子を探索することを目的とした。

B . 研究方法

1) 細胞 ; Tet-On/Off system 制御下で GFP-full length DRPLA(Q19 or Q88) 融合遺伝子を定常発現する HEK293 細胞株(以下 Q19、Q88)を用いた。

- 2) 発現実験 ; 6 well plate で約 3.0×10^6 cell/well、培地 3 ml/well とし、Tet 添加濃度は $1 \mu\text{g/ml}$ とした。
- 3) RNA 抽出 ; 細胞からの total RNA 抽出(Qiagen, RNeasy Plus Mini kit)の後、BioAnalyzer (Agilent Technologies) にて RNA Integrity Number >9 を確認した。
- 4) RNAseq の対象とするタイムウィンドウの検討 ; Q19, Q88 の定量 PCR(Tet-ON 0, 12, 24, 48, 72 時間後)、Q19 の Western Blot (Tet-ON 24, 48, 72 時間後)を行った。
() 定量 PCR ; total RNA から cDNA を調製の後、Target を DRPLA、Endogenous Control を ACTB とし、比較定量法 (n=5) により行った。

() Western Blot ; total protein に対し、抗 GFP 抗体、抗 β -actin 抗体 (Control) を用いた。

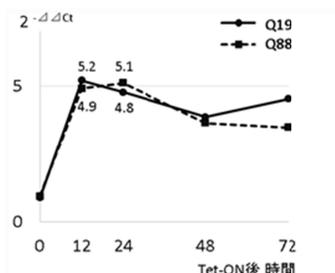
- 5) RNAseq ; total RNA 1 μ g から ribosomal RNA depletion を行った後、random primer により逆転写を行い cDNA library を調製した (Illumina, TruSeq Stranded Total RNA with Ribo Zero Gold Kit)。Q19, Q88 の、各々 Tet-ON, OFF の 2 条件 (以下 ON, OFF) について、biological triplicate とした 2 回ずつ行った。HiSeq2500 を用いて paired-end read (101 bp \times 2) の sequence を行った。Q19 (ON) vs Q19 (OFF) (Q19 の存在下での発現変動遺伝子のプロファイリング)、Q88 (ON) vs Q19 (ON) (Q19 で得られた遺伝子発現プロファイリングが Q88 の存在下で受ける影響) の比較を計画した。解析は、マッピングは TopHat-2.0.8b、Bowtie2-2.1.0、発現解析は Cufflinks-2.1.1 を用いた。

(倫理面への配慮)

HEK293 細胞株を用いた実験で、特に問題はない。

C. 研究結果・考察

1. 定量 PCR ; DRPLA mRNA 転写量は、Tet-ON 12 時間後、24 時間後で Q19, Q88 共に上昇が得られた。



2. Western Blot ; Tet-ON 24 時間後の GFP-DRPLA 融合蛋白質 (150kDa ~

250kDa の 2 本のバンド) の発現を確認した。



3. RNAseq ; Q19 (ON) vs Q19 (OFF)

平均 mapped read 数/sample は antisense 3.5×10^7 、sense 3.7×10^7 であった。

遺伝子発現量の再現性は 3 組の実験間の FPKM 値について、Pearson の積率相関係数は 0.99 ~ 1.00 であった。

Q19 では、Tet-ON/OFF にて、DRPLA 発現は 2.2 倍で有意に増加し ($p = 0.007$)、ACTB 発現に有意な変動はなかった ($p = 0.989$)。尚、 p 値は FDR 補正值、有意水準は $p < 0.01$ 。

解析可能遺伝子数は 13,891、うち有意な発現変動遺伝子数は、99 (0.7%) であった (ON で down-regulation が 57%、up-regulation が 43%)。Fold Change は解析可能遺伝子の 99.7% が 0.5 倍 ~ 2.0 倍であった。発現変動遺伝子に対し、厳格な filtering 条件¹⁾ (平均発現量が発現変動遺伝子の上位 8 割の遺伝子のうち、Fold Change 0.5 未満または 2 より大) では、再現性の確認が必要であるが、4 遺伝子 (up-regulation 1 遺伝子、down-regulation 3 遺伝子) が残った。

D. 結論

正常 polyQ 長 DRPLA 発現系を用いて Tet-ON による DRPLA_p の発現誘導を Western blot にて確認した。RNAseq 解

析で、OFF 時に対し ON 時の発現変動は、解析可能遺伝子の 99.7%が 0.5 ~ 2.0 倍の範囲で、有意に発現変動した遺伝子は 99 であった。

今後は全実験サンプルの解析結果を踏まえて、DRPLAp (正常 polyQ₁₉、及び異常伸長 polyQ₈₈) の転写 co-regulator としての標的の同定を進めたいと考えている。

[参考文献]

- 1) SEQC/MAQC-III Consortium. A comprehensive assessment of RNA-seq accuracy, reproducibility and information content by the Sequencing Quality Control Consortium. Nature Biotechnology 2014;32: 903-914.

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表 (2014/4/1~2015/3/31 発表)

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

なし