

## 学内グラント 報告書

平成26年度 学内グラント終了時報告書

ヒト新規インプリント遺伝子の同定、  
および遺伝性疾患とのミッシングリンクの検討

研究代表者 神田 将和 (ゲノム医学研究センター)

## 緒言

本研究ではアレル特異的発現を呈する遺伝子候補を同定し、さらに難病のミトコンドリア呼吸鎖異常症との関連を調べ、遺伝性疾患の解明に寄与する基盤を確立していくことを最終的な目標として考えだされた。このために(1)アレル特異的な発現パターンを呈する遺伝子の解析環境の構築と実際の同定を行い(2)ミトコンドリア関連遺伝子とインプリント遺伝子の関わりを明らかにしていくことを進めた部分において報告する。一般にインプリント遺伝子の異常による疾患はプラダーウィリー症候群など特徴的なものだけが知られており、既存の遺伝性疾患との関わりは明らかでない。アレル特異的発現 (Allele-Specific Expression; ASE) の遺伝子についても同様である。インプリント遺伝子のみならず、遺伝子発現を制御するメカニズムの異常が疾患原因変異と密接に関わっているケースが存在することは想像に難くないが、これを明らかにすることを阻んでいる問題は、少なくとも以下のものが存在する: (I) ヒトとマウスの種間でインプリント遺伝子の違いが存在する (そのためヒトの研究が必要) (II) しかしヒト試料による実験では、マウスのように自由な系統交配ができないため、エクソン上の多型マーカーが乏しいという物理的な制約が存在する (III) シークエンス解析における高率の擬陽性の存在。今後、ヒトでも大規模な解析による進展が見込める部分はあるが、疾患との関わりをどう探していくかについてはそれぞれで体制を整える必要があるのは明らかであり、本研究についても最終的な目標として設定した。

## 材料と方法

本研究では、まずヒトで普遍的にインプリントを受けている遺伝子の新規同定を行い、さらに新規インプリント遺伝子と難病の1つであるミトコンドリア呼吸鎖異常症との関わりを調べていく、というフェイズに分けて計画していた。

## サンプルの準備と候補遺伝子の同定

ヒト皮膚由来線維芽細胞の20株分のDNA/RNAの両

シーケンスデータを取得した。これを用いてDNAではヘテロ塩基多型を示すが、RNAでは片アレル発現を呈する遺伝子を候補として同定することとした。また多型マーカーが少ない点については、サンプル数を20まで拡大することで、これまで現在知られている84のヒトインプリント遺伝子のうち、71遺伝子で、最低5サンプルが解析に有効なヘテロな多型マーカーを持っていることに基いて、この問題に対応した。

## 結果

今回用意できたシーケンスデータから転写産物のバリエーションを読み取り、特定のアレルが発現制御を受けている遺伝子の候補を集めた (図1)。候補遺伝子群 (2797バリエーションサイト, 930遺伝子) の一部を目視でシーケンスデータのキュレーションをしたところ、多くはASE (Allele-Specific Expression) と考えられる。発現アレルに偏りがあるデータであった。この中からERAP2遺伝子 (図1の6段目) で見られたアレル特異的発現を図2に示す。この遺伝子のメカニズムは明らかになっていないがアレル特異的発現を示すことが報告されている (Bjornsson et al. 2008)。また別の候補遺伝子について独立したDNA解析から一部のエクソンを欠失している例が見つかった (図3)。単体データではヘテロな欠失のみのため、特に劣性遺伝形式の疾患に関わるとは考えられなかったが、今回の解析でASEであることがシーケンスデータから確認できた。

## 考察

本研究は基礎的な遺伝子発現制御をテーマにしつつ、最終的に疾患との関連を見出すことを目標に据えている。この観点からは imprinting のみならず、ASE (Allele Specific Expression) を示す遺伝子、またはRME (Random Mono-allelic Expression) を示す遺伝子も対象に含めても良いと考えている。

この領域での進展については、これまでの見聞から予測していたが幾つかは当たり、幾つかは外れた。結果としては予想に反し、大規模なプロジェクト (GTEx, Geuvadas)



図 1. アレル特異的発現を示すと考えられる候補遺伝子と含まれていた既知のインプリント遺伝子(一部). 今回の解析データで見つかった, DNAとRNAで異なるパターンを示すバリエーションの数, および遺伝子名のリスト.

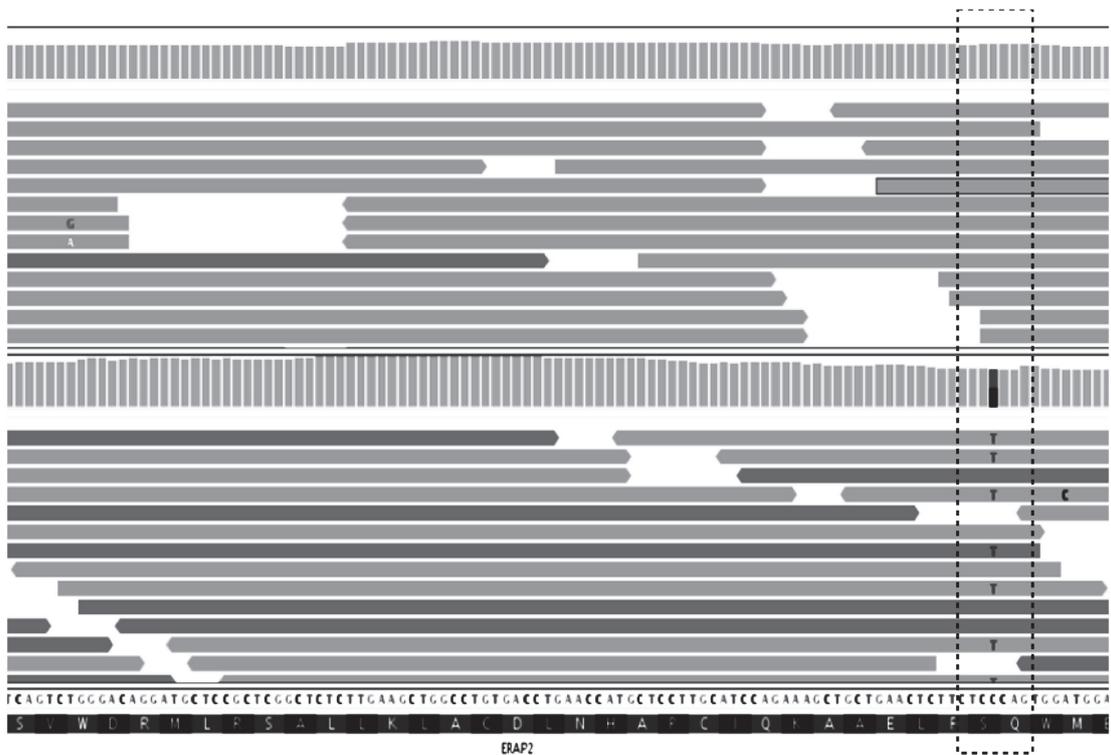


図 2. ERAP2 遺伝子で見られたアレル特異的発現. 上段: RNA シークエンス, 下段: DNA シークエンスを並べて可視化するとTアレル側の転写産物が見られないことが分かる.

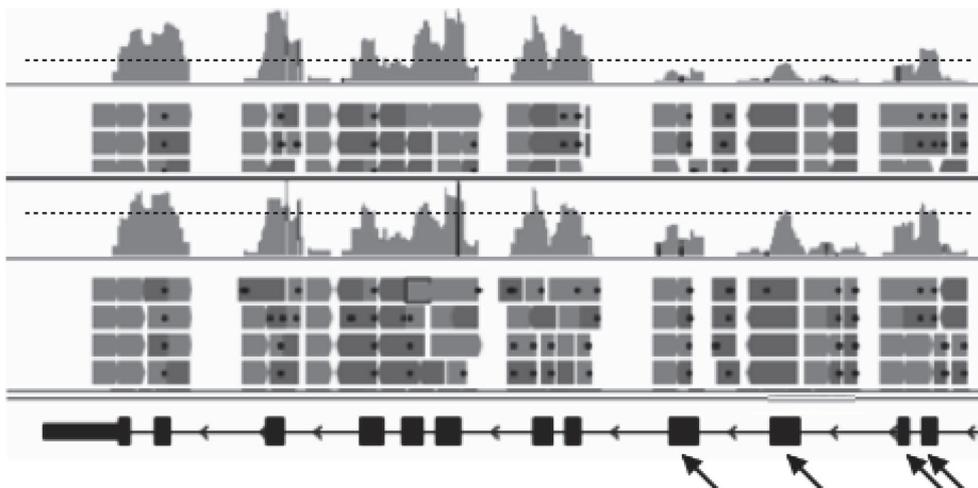


図 3. DNAシーケンスデータ解析によるエクソン欠失の検出. 上段: 遺伝子のエクソン欠失がある検体, 下段: コントロール. 欠失エクソンのある領域では物理的にDNA量が半分になるため, 高速シーケンサーで読まれる回数が少なくなり, カバレッジ (読まれた回数) に反映されていることがわかる.

の解析により大きな変化はもたらされなかった. 当然そこから新しい知見も複数報告されているが, 初めて大規模解析のデータが整備されたことが重要視されている状況である. また解析法 (特に false positive の除去) については様々な段階での問題が残されたままになっている. 実際に最も基本的なはずのシーケンスデータのマッピング, そこからのバリエーションコールについても開発が続いている状況があまり変わっていない.

今回見つけた候補遺伝子群は1) (known/novel) imprinting 2) ASE 3) false positive のいずれかと考えられる. 3を除き, 候補遺伝子たちは少なくとも特定の細胞において, 片側アレルに偏って発現していると考えられる. 一方で独立したゲノムデータの解析により, 今回含まれたある候補遺伝子でエクソンを片側欠損している検体を同定した. このケースでは片側アレルは欠損による一部エクソンの消失, 反対側のアレルは発現が消失したことで疾患の可能性が考えられるため, 引き続き調べていく.

今後の研究の進め方として, 前述した大規模プロジェクトによる発現データを取り込んだ上で, よりシステムティックにゲノムデータの解析と結びつけていく必要がある. しかし現在のシーケンス技術 (エクソーム) では一部エクソンの欠失は同定することが容易ではない. そのためコストを無視すれば候補遺伝子群の領域のみをゲノムシーケンスするなど, 何らかの改善が必要な部分がある.

#### 研究成果リスト (論文, 学会発表, 特許出願等)

\*本研究における研究成果の学会や出版物への発表はまだなされていない.

#### 謝 辞

本研究を行うにあたり, 同部門 平田智子助手・岡崎康司教授に多大な協力を頂きました. 深く感謝いたします.