

■受領No.1298

プロテオーム解析技術の希少遺伝性疾患の原因解明への応用

代表研究者

岡 泰由

名古屋大学 環境医学研究所 発生遺伝分野 特任助教



1. 研究目的

昨今の大規模ゲノム解析研究から、健常人のゲノムにも数多くの機能変化を生じうる遺伝子変異が多数存在することが明らかとなってきた。全エキソーム解析を行ったとしても、疾患原因遺伝子変異の絞り込みが困難なため、確定診断に至るのは約30%程度といわれており、疾患原因因子の同定のための新たな探索技術の開発が喫緊の課題である。

DNA損傷応答機構の破綻によって、ヒトでは様々な病態を示す希少遺伝性疾患を発症することが知られている。しかしながら、これらの疾患の中には、いまだに遺伝的な疾患発症原因が不明なものも多く残されている。未知の疾患原因因子を同定することで、これら遺伝性疾患の病態解明へと繋がり、更には、これら希少疾患に対する治療薬/緩和剤の開発に繋がることを期待される。

本研究の目的は、次世代シーケンサーを用いて得られたゲノム情報と精密質量分析装置を用いて得られた蛋白質発現プロファイルとを統合することで、ゲノム解析のみでは候補遺伝子を絞り込むことができなかった、DNA損傷応答機構の破綻によって生じた、希少遺伝性疾患の発症原因因子を特定するための新規方法を開発することである。

2. 研究概要

2.1 プロテオーム解析技術を用いた DNA 損傷応答機構の破綻によって発症した疾患の原因因子新規検出法の確立

DNA損傷応答機構に関連する蛋白質群は細胞内コピー数が少ないものが多く、定量性ならびに再現性に優れた質量分析法が必要である。そのため、健常人と患者間における相対比較に優れた標識定量法を利用する。標識定量法として、安定同位体アミノ酸標識法 (Stable Isotope Labeling using Amino Acids in Cell Culture: SILAC) を用いた。検出法の確立のため、既知の遺伝子変異を持った細胞 (47番目の alanine が valine に置換した *MRE11* 遺伝子変異が原因となり発症した毛細血管拡張性運動失調症様患者由来の不死化Bリンパ球細胞) を用いた。患者由来の細胞は Heavy アミノ酸含有培地 (13C6 L-Lysine と 13C6/15N4 L-Arginine) を用いて培養し、健常人由来の細胞は Light アミノ酸含有培地 (12C6 L-Lysine と 12C6/14N4 L-Arginine) で6代以上培養することで標識を行った。標識された健常人と患者由来の細胞から蛋白質を回収し、定量した後に、同量を混合した。蛋白質を分画するために SDS-PAGE ゲル電気泳動を行い、還元・アルキル化処理を行った後に、トリプシンを用いてゲル内消化した。ペプチド精製後に、質量分析測定を実施した。ナノ流量液体クロマトグラフィーと高感度質量分析計を組み合わせたプロテオーム解析によって、約8000

個の蛋白質を同定することが可能となり、疾患発症因子 (MRE11)の発現量低下ならびに、MRE11の相互作用蛋白質であるRAD50とNBS1蛋白質の発現量低下を検出することに成功した (図1)。

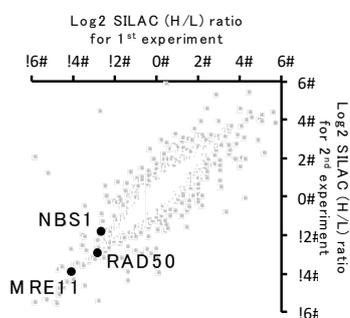


図1. プロテオーム解析を用いた患者細胞での蛋白質複合体発現量の検出

健康人由来の細胞をLightアミノ酸含有培地 (L)、患者由来の細胞をHeavyアミノ酸含有培地 (H)で培養した。それぞれの細胞から蛋白質を抽出し、SDS-PAGE後にゲル内消化・ペプチド精製を行い、精密質量分析装置を用いて解析した。

2.2 プロテオーム解析技術を用いたDNA損傷応答機構の破綻によって発症した疾患の原因因子新規検出法の応用

胎児期からの低身長、小頭症、大脳基底核と脳室周囲の石灰化を主徴とした症例の解析を実施した。両親がいとこ婚で、3人の子どもが全員死産であったことから、劣性遺伝性疾患であることが予想され (TORCH症候群は陰性)、当初はDNA損傷応答機構の破綻によって発症することが知られているゼッケル症候群疑いと診断されていた。患者とその両親のトリオ全エクソーム解析を行ったが、既知の病的変異ならびにDNA損傷応答機構に関連する遺伝子変異は見つからず、候補因子を絞り込むことはできなかった。そこで、患者由来の細胞をSILAC標識し、プロテオーム解析を実施した結果、DNA:RNAハイブリッド中のRNAの分解に

関与するRNASEH2複合体の構成因子全て (RNASEH2A,B,C)の発現量低下が認められた。また、RNASEH2複合体のmRNAレベルを測定した結果、複合体を構成する3種の遺伝子のうち、*RNASEH2B* 遺伝子の発現低下が確認された。全エクソーム解析ではRNASEH2B遺伝子コード領域に変異は検出されなかったことから、非典型的のイントロン上の変異によるスプライシング異常が生じている可能性が考えられた。そこで、RNAシーケンシングならびに全ゲノム解析を実施した結果、*RNASEH2B*遺伝子のイントロン5とエクソン6の境界からおよそ1.3 kb上流に極めて頻度の低いホモ接合型変異を同定した。*RNASEH2B*遺伝子のエクソン5とエクソン6にプライマーを設計し、cDNAを鋳型にPCRを行った結果、患者特異的に、予想されたDNA断片長とは異なるPCR産物が得られた。これらのDNA配列を解析した結果、患者細胞では、異所性のスプライス供与部位が挿入されていることが明らかとなった。

RNASEH2A、*RNASEH2B*、*RNASEH2C*はアイカルディ・ゴーティエ症候群の発症関連遺伝子としてすでに報告されている。これまでの研究結果から、*RNASEH2B*変異により発症したアイカルディ・ゴーティエ症候群の症例 (104例)では、すべてアミノ酸置換を含む複合変異であることが明らかとなっている (Crow et al., 2015)。本症例は新規の遺伝子発現異常により転写産物が激減したため、既知の*RNASEH2B* 変異によって発症した症例には見られない重篤な症状を示していると考えられる。

3. 発表

- (1) 岡泰由、中沢由華、荻朋男、マルチオミクス解析を用いた希少遺伝性疾患原因因子の新規同定法の開発、第15回日本プロテオーム学会2017年大会 (ポスター、大阪、2017年)
- (2) 岡泰由、中沢由華、荻朋男、Identification of pathogenic mutations in patients with rare

diseases using multi-omics analysis、第40回日本
分子生物学会年会 (ポスター、神戸、2017年)

- (3) Yasuyoshi Oka, Tomoo Ogi. Identification of
pathogenic mutations in patients with rare
diseases using multiomics approaches.
Conference on Mass Spectrometry and
Proteomics 2018 (Oral, Osaka, 2018)