

論文要旨

Brain-specific transcript variants of 5' and 3' ends of mouse *VPS13A* and *VPS13C*

マウス *VPS13A* と *VPS13C* 遺伝子の 5' および 3' 末端には脳特異的な転写バリエーションが存在する

水野 恵三子

【序論および目的】

有棘赤血球舞踏病 (ChAc) は、ハンチントン病様の神経精神症状と有棘赤血球症を呈する稀な遺伝性神経変性疾患であり、我々は病因遺伝子として *VPS13A* を同定した。ヒト ChAc 症例は数少なく、臨床研究には限界があるためモデル動物を要すと考え、我々はヒトと同じ遺伝し変異を持つ ChAc モデルマウスを作成した。このマウスは ChAc 類似の症状を呈し、線条体特異的な神経変性を持つことが明らかになった。また、モデルマウス作成のためにマウス *VPS13A* を同定する過程において、マウス EST 検索にてマウス *VPS13A* 類似配列の遺伝子を検出し、これがヒト *VPS13C* のホモログであることを同定した。これらの過程で 5' および 3' 末端にさまざまな転写バリエーションが存在することが観察されていた。今回我々は、ChAc 病態すなわち脳特異的な変性にはこれらバリエーションの同定が必要と考え、マウス *VPS13A* と *VPS13C* の脳および末梢組織における転写バリエーションの同定を行った。

【材料および方法】

7 週齢の C57BL/6J 野生型雌マウスを用い、脳の各領域 (海馬、線条体、大脳皮質、脳幹、中脳、小脳) と末梢組織から total RNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて逆転写反応 (RT) を行った。マウス *VPS13A* 遺伝子配列類似のマウス EST 配列に基づいてプライマーを設計し、マウス全脳由来の cDNA を用いて 5' および 3'-RACE 法により全塩基配列を決定し、その配列がマウス *VPS13C* であることを確認した。

各組織由来の total RNA を用い 3' および 5' RACE-PCR を行い、PCR 産物のクローニング、シーケンシングを行い、3' および 5' 末端の転写バリエーションを確認した。5' および 3' 末端以外の遺伝子領域については、RT-PCR 法により転写バリエーションの有無を確認した。

【結果】

マウス *VPS13A* の 5'-RACE PCR の結果

PCR 産物のアガロースゲル電気泳動によって約 150-500 塩基にわたる 5 種類のバンドが観察され、約 500 bp のバンドは主に脳部位に認められ、また、シーケンシングの結果、これらの 5 種類の転写バリエーションは、それぞれ転写開始点が異なっていた。

マウス *VPS13A* の 3'-RACE PCR の結果

PCR 産物のアガロースゲル電気泳動によって 6 種類のバンドが観察され、脳に特異的及び末梢組織に特異的なバンドを認めた。シーケンシングの結果、転写バリエーションはそれぞれポリ A 付加部位が異なり、スプライシングバリエーションも存在した。

マウス *VPS13C* の同定と 5' および 3'-RACE PCR の結果

マウス *VPS13A* 類似配列を有するマウス EST 配列をもとに 5' および 3'-RACE 法を用いてマウス *VPS13C* の全配列を同定した。

5'-RACE PCR 産物の電気泳動の結果、9 種類の転写バリエーションを同定した。約 800 bp のバンドは脳

に特異的であり、シーケンシングの結果、それらのバリエントは転写開始点が異なり、またスプライシングバリエントも認められた。

3'-RACE PCR 産物の電気泳動の結果、4種類の転写バリエントが検出されたが、これらには組織特異性はみられなかった。

【結論及び考察】

マウス *VPS13A* の5'末端領域に6つの転写開始点が確認された。各転写開始点の上流に転写因子結合配列をデータベース検索によって確認した。また、各転写バリエントを比較すると非翻訳領域の長さの違いだけでなく、翻訳開始点の使い分けもみられた。主に脳の各領域にみられた転写バリエントはエクソン1から転写が開始され翻訳されていると考えられる。転写バリエントによっては翻訳開始点がエクソン5やエクソン9に存在する可能性があり、この場合、それぞれ107、221アミノ酸残基分短いタンパク質が産生され、*VPS13A* がコードするタンパク質 chorein の coiled-coil 構造が欠失することが予想された。

マウス *VPS13A* の3'末端ではヒトで報告されているトランスクリプトA、B、Cに相同する配列が同定され、このうちトランスクリプトBに相同する転写バリエントが脳に特異的であった。

マウス *VPS13C* の5'末端ではエクソン1-9全てで構成される配列が脳における主要なバンドとして観察され、脳の部位間における発現量の違いはみられなかった。末梢組織では組織間で転写開始点の違いがあり、エクソン1以外から転写開始されるものは翻訳開始点がエクソン11に存在することになり、これにより産生されるタンパク質は294アミノ酸残基分短いことが予想された。

マウス *VPS13C* の産物はマウス *VPS13A* 産物 chorein と相同性が最も高く、脳特異的な転写バリエントは何らかの神経変性疾患に関与しているのかもしれない。

マウス *VPS13A* の脳特異的な転写バリエントは、今後のChAcモデルマウスの病態に関わる可能性が高く、脳病理研究に有益であると考えられる。

(BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS Volume 353, Issue 4, Pages 902-907, 2007年 掲載予定)

論文審査の要旨

報告番号	総研第	7号	学位申請者	水野 恵三子
審査委員	主査	出雲 周二	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	乾 明夫	副査	宮田 篤郎
	副査	丸山 征郎	副査	橋口 照人

Brain-specific transcript variants of 5' and 3' ends of mouse *VPS13A* and *VPS13C*

マウス *VPS13A* と *VPS13C* 遺伝子の 5' および 3' 末端には
脳特異的な転写バリエントが存在する

(BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS Volume 353, Issue 4, Pages
902-907, 2007 年 掲載)

有棘赤血球舞踏病 (ChAc) は、ハンチントン病様の神経精神症状と有棘赤血球症を呈する遺伝性神経変性疾患であり、*VPS13A* が原因遺伝子である。先行研究として作製された ChAc モデルマウスは ChAc 類似の症状を呈し、線条体特異的な神経変性を持つことが明らかになっている。また、モデルマウス作成のためにマウス *VPS13A* を同定する過程において、5'、3'末端にさまざまな転写バリエントが存在することが観察されていた。そこで学位申請者らは、野生型マウス *VPS13A* の組織ごとの mRNA 発現について解析を行った。さらに、マウス EST 検索にてマウス *VPS13A* 類似配列の遺伝子が検出されたためこの全配列を同定し、これがヒト *VPS13C* のホモログであることを同定した。さらにマウス *VPS13C* の野生型マウス組織における発現様式についても解析を行った。その結果、以下の知見が明らかにされた。

野生型マウスにおける *VPS13A* の組織ごとの発現様式

5'-RACE PCRの結果より、電気泳動にて脳の各領域にエクソン1から転写が開始される配列が主要なバンドとして観察された。また、転写バリエントを比較すると非翻訳領域の長さの違いだけでなく、翻訳開始点の使い分けもみられた。バリエントによっては翻訳開始点がエクソン5やエクソン9に存在する可能性があり、この場合、各107、221アミノ酸残基短いタンパク質が産生されており、*VPS13A*がコードするタンパク質choreinのcoiled-coil構造が欠失していることが示唆される。3'-RACE PCRではヒトで報告されているトランスクリプトA、B、Dに相同する配列が同定され、このうちトランスクリプトBに相同するバリエントが脳に特異的であった。なお、脳の各領域では特異性がみられなかった。マウス *VPS13A* 遺伝子は5'末端においてはバリエントI、3'末端においてはバリエントIIが脳において特異的に発現しているものと考えられた。

マウス *VPS13C* の同定

マウス *VPS13A* 類似のマウス EST 配列をもとに全長にわたりプライマーを設計してシーケンシングを行い、5'側端と3'側端については5'および3'-RACE法を用いてマウス *VPS13C* の全配列を同定した。

野生型マウスにおける *VPS13C* の組織ごとの発現様式

5'-RACE PCRではエクソン6、7を含む配列が主要なバンドとして観察され、脳の各領域における発現量に違いはみられなかった。末梢組織では組織ごとに転写開始点の違いがあり、エクソン1以外から転写開始されるものは翻訳開始点がエクソン11に存在することが示唆されており、これにより産生されるタンパク質は294アミノ酸短いことになる。

3'-RACE PCRにおいても4つのバリエントがみられたが、組織間の発現様式に差異はみられなかった。

本結果より、野生型マウスにおけるマウス *VPS13A* と *VPS13C* の発現様式において組織間で違いがみられており、ともに脳に特異的なバリエントがみられた。

本研究は、初めてマウス *VPS13C* の全配列を確認し、組織ごとの発現様式を報告した。マウス *VPS13A* と *VPS13C* の脳特異的な転写バリエントは、ChAc モデルマウスの病態解明、さらには今後の治療法の開発に役立つと考えられる。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 7 号	学位申請者	水野 恵三子
審査委員	主査	出雲 周二	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	乾 明夫	副査 宮田 篤郎
	副査	丸山 征郎	副査 橋口 照人

主査および副査の5名は、平成19年2月19日、学位申請者水野恵三子君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) *VPS13C* はヒトでも同定されているのか、病態の関わりは論文に出ているのか。

(回答) ヒトでも *VPS13A* のファミリー遺伝子のひとつとして *VPS13C* が報告されている。スプライシングバリエントの報告がある。*VPS13A* が有棘赤血球舞踏病 (ChAc)、*VPS13B* が中枢神経に関わる劣性遺伝病である Cohen 症候群の原因遺伝子であることがわかっている。

質問2) ChAc では *VPS13C* の発現変化の報告はないのか。

(回答) 我々の ChAc モデルマウス線条体のマイクロアレイ解析では変化なかった。

質問3) ChAc の疾患変異は欠失変異のほかに一塩基変異で疾患をおこすような報告はあるのか。

(回答) 疾患変異は、一塩基変異としてはアミノ酸置換するミスセンス変異の疾患変異はわずかであるが、ストップコドン呈するナンセンス変異やスプライシング異常を呈するスプライスサイトでの一塩基変異がほとんどである。

質問4) 非常に大きい遺伝子なので解析は困難であったと思われる。今回は5'と3'末端のバリエントは検索しているが、いわゆる全長としてバリエントのフォームはどのようなタイプのものが一番多いということになるのか。すなわち、それぞれ多かった末端の配列からプライマーを設計して脳で発現しているかの実験は行ったのか。具体的に脳で多かった5'末端の variant I と3'末端の variant I や II に実際にプライマーを組んで発現を PCR で確認しましたか。

(回答) 遺伝子が約10kbpと巨大であるため全長におよぶPCRはうまくいかなかった。バリエント特異的なプライマーを組んでのRT-PCRは行ったが組織特異的な違いはみられず、これは定量性のないPCRであるためと考えている。

質問5) 他の脳のタンパクでこのようにバリエントが多くあるという報告はあるか。脳にこれほど多様なバリエントが出ている。脳だけは発生の段階で間仕切りなしに層状の構造をとることになるため、その中で生じたバリエントなのではと考える。脳の発生の段階で追いかけたか。

(回答) 他のタンパク質の例については不明である。発生段階ごとに調べてはいない。

質問6) VPSAP のドメインはどのような機能をもつか。赤血球に小胞体は存在しないが、異常は赤血球にもみられる。Vacuole のオートファジーやアポトーシスとの関連はわかっていないのか。腎臓はどちらの尿細管で発現が多いか。近位尿細管であれば物質輸送に関わる。

(回答) 小胞体輸送に関連していると考えられている。マイクロアレイの解析では小胞体ストレス系に関連するアポトーシスのパスウェイが活性化されていることが明らかとなっている。免疫組織染色では腎臓は近位尿細管で発現が優位であった。

質問7) ノックアウトマウスでは表現型の出現は遅いが7週齢の比較的若いマウスを使った根拠はあるのか。

(回答) 正常個体での発現様式を調査することが目的であったため。

質問8) マウス *VPS13C* とヒト *VPS13C* の相同性はどの程度と予測されるか。

(回答) エクソン数は一致。構造も近似している。アミノ酸の相同性が86.61%である。

質問9) *VPS13A* に含まれるコンサバティブモチーフフリージョンは、バリエントの中においても保存されているのか。

最終試験の結果の要旨

(回答) VPSAP はバリエーションによっても保存されていた。質問 1 0) coiled-coil region の欠失はタンパク質の機能変化をきたすと思われるが、別のタンパク質で coiled-coil structure が欠失した場合の機能変化の例はあるのだろうか。

(回答) そのような報告はみつけない。

質問 1 1) Vacuolar protein coating は小胞体輸送系に関わるということであるが、いわゆる ER リテンション、すなわち小胞体からゴルジ体への輸送に関わっているのか、それとも ER におけるタンパク質の修飾に関わっているのだろうか。

(回答) いずれであるか明らかでない。

質問 1 2) 抗コレイン抗体によるウェスタンブロットで分子量の異なるバンドが観察されることを提示されていたが、このデータと今回の結果はある程度関連しているのか。

(回答) 筋肉などではむしろ逆の結果が出ているが、その他の臓器についてはある程度関連している。

質問 1 3) ウェスタンブロットでは精巣での発現が脳の 1 0 倍程であったが、今回の結果と合わせてどのように考えるか。

(回答) 精巣においては脳よりコレインの安定性が高い可能性が考えられる。また、mRNA 発現レベルでは 5'末端での精巣の発現は弱かったが 3'末端では比較的強く発現がみられている。

質問 1 4) *VPS13B* の Cohen syndrome では同様のバリエーションの存在の研究は文献的になされているのか。

(回答) トランスクリプトバリエーションの解析はされているが、組織ごとの系統立てた解析ではない。

質問 1 5) 論文 P907 first paragraph 最後の文は、何を強調したいのか。

(回答) マウスの脳に特異的なバリエーションに相同するヒトの transcript variant B での疾患報告はなく、ヒトの transcript variant A で疾患変異がみられているという矛盾した内容を自ら指摘している。

質問 1 6) ウェスタンブロットの結果、これらのメッセージは読まれているものと考えられる。ウェスタンブロットでタンパク質の大きさが微妙に揃っておらず、ここからバリエーションの検索を行っているが、メッセージとして発現しているもの、あるいは functional な RNA というかたちで機能しているという可能性もあると思われる。そのへんについてはどのように想像しているか。

(回答) 今回提示したバリエーションの意義については不明な点も多く、今後の検討課題となると考えている。

質問 1 7) *VPS13A* のほうで線条体特異的なバリエーションがなくて、類似遺伝子を探して *VPS13C* でバリエーションを調べたらバリエーション VII が線条体と中脳に特異的であったがこれについての解析はすすんでいるのか。タンパク質として検索をすすめているのか。モデルマウスで発現がアップレギュレートされているのかといった調査はすすんでいるのか。

(回答) 他の部位でみられたバリエーションが代償性に働いているのではないかという仮説から検証を始めているが、バリエーション VII についての調査には至っていない。

質問 1 8) ヒトの脳で ER に異常があるとか ER ストレスに関連しているといったデータはないのか。

(回答) マイクロアレイ解析の結果、ChAc モデルマウス線条体で ER ストレス関連アポトーシスパスウェイが活性化されている。

質問 1 9) 転写開始部位が複数あり、いくつかについては転写因子結合モチーフについて検索しリストをあげて報告してあるが、実際のところ神経特異的、それ以外での組織特異的な転写因子というものはあるのか。それと *VPS13A* と C について、転写因子に相同性はあったのか。

(回答) 多数の転写因子結合モチーフがオンラインソフトであげられたが、組織ごとや遺伝子間で相同のモチーフなどの傾向はあきらかでなかった。

質問 2 0) マウス *VPS13C* の 5'末端の組織ごとの濃さが違うが Fig. 4 の 3'末端 PCR の濃さは一律、発現レベルが変わらないと考えてよいのか。

(回答) そのように結論づけた。

質問 2 1) nested PCR でやっているが定量性についてはどのように考えるか。バンドの濃さは発現の強さを反映していると思うか。

(回答) 定量性については反映できていないと思う。今後リアルタイム PCR などで定量していく必要はあると考えている。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。