

新潟大学脳研究所
「脳神経病理資源活用の疾患病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

ロングリードシーケンスを用いた 脳部位特異的に発現するアイソフォームの探索

研究代表者 嶋多 美穂子^{1), 2)}
研究分担者 柿田 明美³⁾, 宮川 卓²⁾

- 1) 国立研究開発法人 国立国際医療研究センター 研究所 ゲノム医科学プロジェクト (戸山)
- 2) 公益財団法人東京都医学総合研究所 精神医学行動分野 睡眠プロジェクト
- 3) 新潟大学脳研究所病理学分野

研究要旨

本研究では、同一サンプル由来の小脳、視床下部、側頭葉皮質の3つの異なる脳領域から抽出したRNAを用いてロングリード遺伝子発現解析を行った。その結果、3つの脳部位のうち2か所以上で発現しているアイソフォームに絞っても、その半数以上が新規のアイソフォームであった。特に各々の部位において、発現している主要なアイソフォームが異なる遺伝子に着目して解析を行ったところ、このような傾向が最も強い遺伝子はGAS7であった。同様に脳の部位間で異なる主要なアイソフォームを発現する遺伝子について検討したところ、細胞の突起の形成に関わるものが多いことが示唆された。同じ遺伝子から脳の部位によって異なるアイソフォームが発現するメカニズムに迫るため、DNAのメチル化に着目した解析を行い、特に転写開始点が異なるアイソフォーム同士において、その発現メカニズムにDNAのメチル化が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

神経疾患や精神神経疾患では、さまざまな脳領域が影響を受けるが、遺伝子発現パターンの違いがこのメカニズムを説明できる可能性が示唆されていた。しかしながら、ヒトの脳の異なる領域における遺伝子発現を正確に調べた研究は限られており、従来のショートリードシーケンスを用いた遺伝子発現解析技術は、mRNAの全長を解析することができず、そのデータに基づくスプライシングバリエーションは推定にならざるを得ないという問題があった。本研究では、このような課題を克服するため、同一サンプル由来の小脳、視床下部、側頭皮質の3つの異なる脳領域から抽出したRNAを用いてロングリード遺伝子発現解析を行った。

本研究の目的は、ロングリード法による遺伝子

発現解析技術を用いて、脳の3つの部位（小脳、側頭葉皮質、視床下部）の遺伝子発現を調べることである。正確なアイソフォームの情報に基づき、各々の部位で発現しているアイソフォームのプロファイルを明らかにすると共に、部位間の違いや、部位間で異なるアイソフォームが発現するメカニズムについて検討することを目的とする。

B. 研究方法

脳研究所からご提供いただいた、脳に影響を与える疾患で亡くなっていない4例の日本人男性の死後脳から、小脳、側頭葉皮質、視床下部を切り出し、そこからRNAを抽出した。RNAは逆転写を行いcDNA化して、Pacific Biosciencesのプラットフォームによるロングリード法にて遺伝子発現解析を実施した。得られたデータは適切にQC

を行い、アーティファクトと推定されるアイソフォームを除外する、最低2サンプル以上で発現しているアイソフォームに限定するといった厳しいフィルタリングを行った。また同じサンプルから抽出したDNAを用いてIllumina社のEPICアレイを用いて網羅的なDNAメチル化データを取得した。上記データを用いて、「C. 研究結果」に示す各々の解析を実施した。

なお、本研究はヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則に則り実施され、東京都医学総合研究所並びに新潟大学の倫理委員会の承諾を得ている。また全ての被験者からは書面でのインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

(1) ロングリード法によって得られた遺伝子・アイソフォームの発現状況

全サンプルあわせて66,860個のアイソフォームが同定され、それらは14,382の既知の遺伝子と52の新規の遺伝子に由来するものであった(図1)。3つの脳部位のうち2か所以上で発現しているアイソフォームに絞っても、その半数以上がこれまでに登録のない新規のアイソフォームであった。また我々のデータでは、発現しているアイソフォームの数は特に小脳で脳に属する他の2つの部位に比べて少なかった(小脳 vs 視床下部 $P = 8.04E-3$, 小脳 vs 側頭葉皮質 $P = 2.74E-4$, 視床下部 vs 側頭葉皮質 $P = 0.33$)。

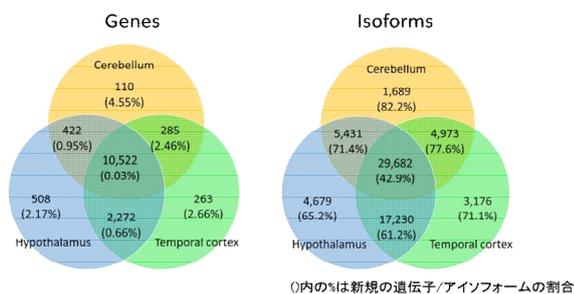


図1. 遺伝子・アイソフォームの検出状況

(2) 脳部位間の遺伝子・アイソフォームの発現状況の比較

各々の部位で発現量が異なる遺伝子について検討したところ、小脳、側頭葉皮質で他の部位と比較して発現量が多い遺伝子には、脳神経系の発達などに関わるものが多いのに対し、視床下部では免疫関連遺伝子が検出された。さらに同じ遺伝

子から転写されるアイソフォームの種類数が部位間で異なる遺伝子についても検討したところ、小脳と側頭葉皮質では脳神経系に関わる遺伝子が、視床下部では脳神経系に加えて免疫系の遺伝子が多くのアイソフォームを発現していることが明らかになった。

(3) 脳部位間で異なる主要なアイソフォームを発現する遺伝子の検討

各々の脳部位において、遺伝子全体の発現量は変わらなくとも、発現している主要なアイソフォームが異なる遺伝子に着目して解析を行った。その結果、このような傾向が最も強い遺伝子は *GAS7* (Growth Arrest Specific 7) であり、3つの部位でそれぞれ異なる主要なアイソフォームを発現しており、特に視床下部、側頭葉皮質では長いアイソフォームを、小脳では短いアイソフォームを発現していた。*GAS7* が脳皮質では長いアイソフォームを、小脳では短いアイソフォームを発現することは、すでにマウスの脳のウェスタンブロッティングを用いた研究などでも明らかとなっており(1)、今回の結果はヒトでも同じ現象が見られることを示している。*GAS7* は神経突起伸長に重要な機能を持つことが報告されている(2,3)。*GAS7* 以外にも同様に脳部位間で異なる主要なアイソフォームを発現する遺伝子について検討したところ、パスウェイ解析から細胞の突起の形成に関わるものが多いことが示唆された。

(4) 脳部位間で異なるアイソフォームが発現する機構とDNAメチル化

最後に私たちは、上述のように同じ遺伝子から脳部位によって異なるアイソフォームが発現するメカニズムに迫るため、DNAのメチル化に着目した解析を行った。ロングリード解析を行ったサンプルで網羅的なDNAメチル化率のデータも取得し、発現データとあわせて解析することで、部位間でDNAのメチル化率が異なるメチル化部位が、異なるアイソフォームを発現する遺伝子周辺に特に多いことを明らかにした。また特に転写開始点異なるアイソフォーム同士の転写開始点下流1kbにメチル化率が異なる部位が多いことがわかり、異なるアイソフォームの発現メカニズムにDNAのメチル化が関与している可能性が示唆され

た。

D. 考察

本研究では脳の3つの部位から抽出したRNAを用いて遺伝子発現について検討しており、発現プロファイルの部位特異性が観察されているが、シングルセル解析ではないため、今回観察された部位特異性の大部分は、脳の部位によってその細胞組成が異なることに由来するものであると考えられる。今後シングルセル解析とロングリード遺伝子発現解析を組み合わせることにより、より詳細な脳における遺伝子発現に関する知見が得られることが期待される。

E. 結論

ロングリード遺伝子発現解析を行い、ほとんどの転写産物に対して、その全長を一度に解析することにより、多くの新規のアイソフォームが検出された。それらの正確なアイソフォームの情報をを用いて検討した結果、脳の異なる部位で異なるメジャーなアイソフォームを発現する遺伝子には、細胞の突起の形成に関わる遺伝子が多いことなどが明らかになった。また特に転写開始点が異なるアイソフォームが発現するメカニズムに、転写開始点から下流1kbのDNAメチル化が関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表（上記課題名に関するもの）

1. 論文発表

1. Mihoko Shimada*, Yosuke Omae, Akiyoshi Kakita, Ramil Gabdulkaev, Yuki Hitomi, Taku Miyagawa, Makoto Honda, Akihiro Fujimoto, and Katsushi Tokunaga. Identification of region-specific gene isoforms in the human brain using long-read transcriptome sequencing. *Science Advances* 10(4): eadj5279 2024

2. 学会発表

1. 日本人類遺伝学会 2023. 10. 14 東京
Mihoko Shimada, Yosuke Omae, Akiyoshi Kakita, Ramil Gabdulkaev, Taku Miyagawa, Makoto Honda, Akihiro

Fujimoto, and Katsushi Tokunaga. Region-specific gene isoforms in the human brain using long-read sequencing and their correlation with DNA methylation.

2. 日本人類遺伝学会 2023. 10. 12 東京（招待講演）
嶋多美穂子. ロングリードRNAシーケンス Iso-Seq を用いたヒトの脳の部位間でのトランスクリプトームの比較

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

※ なお、本研究は脳研究所からご提供いただいた非常に質の良いサンプルにより実施が可能になった。関係する方々に心より御礼申し上げます。

【参考文献】

- (1) E. M. Lazakovitch, B. R. She, C. L. Lien, W. M. Woo, Y. T. Ju, S. Lin-Chao, The Gas7 gene encodes two protein isoforms differentially expressed within the brain. *Genomics* 61, 298-306 (1999).
- (2) B. R. She, G. G. Liou, S. Lin-Chao, Association of the growth-arrest-specific protein Gas7 with F-actin induces reorganization of microfilaments and promotes membrane outgrowth. *Exp Cell Res* 273, 34-44 (2002).
- (3) J. J. You, S. Lin-Chao, Gas7 functions with N-WASP to regulate the neurite outgrowth of hippocampal neurons. *J Biol Chem* 285, 11652-11666 (2010).