

180 RNAプロファイリングによる認知症の発症機序解明	永田 健一
------------------------------	-------

【目的】 アルツハイマー病は高齢期発症の認知症の過半数を占める神経変性疾患であり、患者数の増加が深刻な問題となっている。疾患発症機序に関する理解は未だ限定的であり、根本原因を取り除くような治療薬は存在しない。ごく一部の遺伝性の患者では、原因遺伝子上の遺伝子変異が発症の引き金になる。また、孤発性患者においても、Genome-wide association study (GWAS) や次世代シーケンサーを用いて疾患発症の遺伝的素因について網羅的に探索することが可能になっており、これまでに孤発性アルツハイマー病の発症に関わる数十のリスク因子が同定されている。ただし、多くのリスク因子で機能的側面の知見は十分に集まっておらず、なぜアルツハイマー病発症のリスクとなるのかは不明瞭なままである。本研究ではアルツハイマー病の発症機序について新たな知見を得ることを目的とし、リスク因子である RNA 結合タンパク CELF1 についてゲノム編集技術や革新的なシーケンサーを駆使して機能解析を行った。

【方法】 まず、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を用いて *CELF1* ノックアウト細胞を樹立した。次に、未編集のコントロール細胞、ノックアウト細胞のそれぞれから RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて RNA-seq を行った。網羅的探索の結果や過去の知見を踏まえて *CELF1* の標的候補を絞り、さらに第三世代シーケンサーを用いて各転写産物の全長を定量的に評価した。

【結果】 *CELF1* の翻訳開始地点の周辺を狙って、CRISPR/Cas9 の発現プラスミドを細胞に導入した。ゲノム編集の効率を確認し、編集効率が高く、タンパク質の読み枠がずれる標的配列のみを以降の解析に使用した。プラスミド導入後、96 well プレートに 1 細胞ずつ入るように播き直し、細胞の増殖を待って DNA の編集結果をシーケンサーで評価した。また、*CELF1* 抗体を使った western blotting で *CELF1* タンパクが出ていないことを確認した。RNA-seq による解析で転写産物のスプライシングの異常を網羅的に探索し、HeLa 細胞および HEK 細胞のどちらの細胞株でも変化している遺伝子を *CELF1* の標的候補とした。標的候補のリストの中で、*KLC1* 遺伝子についてはアルツハイマー病との関連が指摘されていたため、さらに第三世代シーケンサーを用いた全長の定量的解析を行った。*CELF1* ノックアウト細胞では *KLC1* 転写産物が質的・量的に変化していることが明らかとなった。

アルツハイマー病のリスク因子 CELF1 の機能解析

