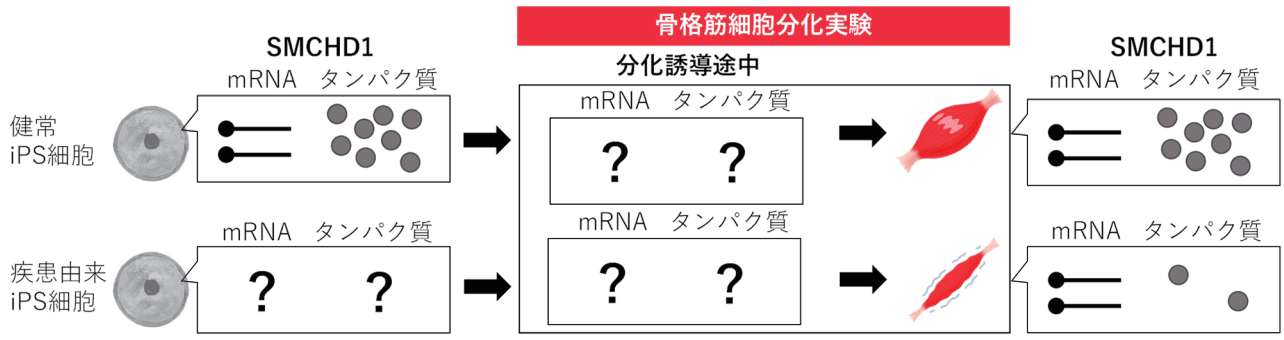
179　希少疾患原因遺伝子のタンパク量制御機構の解明	岩崎　未央

【目的】遺伝子の発現は、ゲノムから mRNA が転写され、転写された mRNA からタンパク質が翻訳される。一方で、その量的な関係（mRNA の量とタンパク質の量）は必ずしも相関しないことが知られている。これまでに、ヒト人工多能性幹細胞（iPSC）と分化した三胚葉の細胞群の比較を行い、mRNA 量とタンパク量が独立して制御される遺伝子群が特に多能性幹細胞特異的に存在することを明らかにした。これら遺伝子群の中に、特に希少疾患に関わる遺伝子群が濃縮されていた。そのうちの一つが 2 型顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（FSHD）の原因遺伝子として知られている SMCHD1 遺伝子である。FSHD は遺伝性の進行性筋ジストロフィーであり、骨格筋細胞を減少させる効果を持つ DUX4 遺伝子の異常発現が原因と考えられ、その異常発現の原因遺伝子として SMCHD1 が知られている。SMCHD1 はエピジェネティックなクロマチン制御因子であり、健常細胞では DUX4 の上流塩基配列を高度にメチル化する役割を担っているが、FSHD の疾患細胞では SMCHD1 遺伝子の量低下による DNA 低メチル化を伴うクロマチン構造の変化により、DUX4 遺伝子が発現してしまう。近年、FSHD 患者由来の疾患 iPS 細胞が樹立され、疾患 iPS 細胞から分化させた骨格筋細胞は特に酸化ストレスに弱くなることで DUX4 が増加し、骨格筋に悪影響を与えているということが示唆された。疾患 iPS 細胞での骨格筋分化後には SMCHD1 遺伝子自体の量も減少していたことから、SMCHD1 遺伝子の量的な制御は疾患発症に重要であるが、その量制御機構の詳細は明らかになっていない。本研究では、SMCHD1 遺伝子に着目し、多能性幹細胞特異的にタンパク量が制御されている機構および疾患発症における量制御機構の役割解明を目指す。

【方法】すでに樹立された FSHD 疾患 iPS 細胞と、疾患 iPS 細胞から遺伝子変異箇所を修復した Isogenic 細胞を用いて骨格筋を分化誘導し、iPS 細胞状態から分化誘導後 10 日まで 7 点で細胞を回収した。細胞は RNA 解析用とタンパク質解析用の二種類に分け、RNA 解析用試料は RNA-seq による遺伝子発現解析を行い、タンパク質解析用試料は WES（Simple Western 社製の自動ウェスタンブロッティング機器）および質量分析法によるプロテオーム解析を行った。

【結果】骨格筋分化誘導過程の細胞を用いて質量分析法によるプロテオーム解析を行ったところ、すべての細胞試料から約 1 万タンパク質が同定・定量された。SMCHD1 タンパク質も同定・定量されており、iPS 細胞の状態からすでに Isogenic 細胞と比較して疾患由来細胞では SMCHD1 タンパク量は約半量であることが分かった。骨格筋細胞の分化誘導途中で SMCHD1 と同様の挙動を示す遺伝子群をクラスター解析により抽出した結果、158 種類の遺伝子群が抽出された。量的変動が一致している遺伝子群は細胞内で相互作用していると考えられ、今後はこれらの細胞内機能の解明を目指す。

本研究で明らかにする、SMCHD1 遺伝子のタンパク量制御機構解明の概略図



179. 希少疾患原因遺伝子のタンパク量制御機構の解明

岩崎　未央

京都大学 iPS 細胞研究所 未来生命科学開拓部門

Key words：2 型顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（FSHD），ジストロフィー，プロテオミクス，SMCHD1

緒　言

2 型顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（FSHD）は遺伝性の進行性筋ジストロフィーである。骨格筋細胞を減少させる効果を持つ DUX4 遺伝子の異常発現が原因と考えられており、その異常発現の原因遺伝子として SMCHD1 が知られている。SMCHD1 はエピジェネティックなクロマチン制御因子であり、健常細胞では DUX4 の上流塩基配列を高度にメチル化する役割を担っているが、FSHD 疾患細胞では SMCHD1 遺伝子の量低下による DNA 低メチル化を伴うクロマチン構造の変化により、DUX4 遺伝子が発現してしまう。近年、FSHD 患者由来の疾患 iPS 細胞が樹立され［1］、疾患 iPS 細胞から分化させた骨格筋細胞は特に酸化ストレスに弱くなることで DUX4 が増加し、骨格筋に悪影響を与えているということが示唆された［2］。疾患 iPS 細胞の骨格筋分化後には SMCHD1 遺伝子自体の量も減少していたことから、SMCHD1 遺伝子の量的な制御は疾患発症に重要であるが、その量制御機構の詳細は明らかになっていない。

我々はこれまでに mRNA 量とタンパク量の網羅的な比較解析を行い、多能性幹細胞特異的に mRNA の量に依存せずにタンパク量が増加する遺伝子が数百個あることを示してきた。その遺伝子群には希少疾患特異的な遺伝子が濃縮されており、そのうちの一つが FSHD の原因遺伝子として知られている SMCHD1 遺伝子である。本研究では FSHD に着目し、疾患由来 iPS 細胞における SMCHD1 遺伝子のタンパク量制御が分化前後においてどの段階で制御されているのか、また、その制御機構の解明を目指す。

方法および結果

希少疾患患者由来の細胞のゲノム解析によって、疾患細胞特異的な変異を持つ遺伝子種類が明らかになってきた。しかし、原因遺伝子が判明しても、疾病を発症する機構は未知のままであり、大部分の希少疾患は治療法が存在しない。我々は、すべての細胞種類の元となる多能性幹細胞において、希少疾患に関連する遺伝子群が転写後制御を受けてタンパク質が多量に維持されているという事実を発見した［3］。その遺伝子が原因となる希少疾患の状態は様々であり、主に赤血球が産生されない希少疾患であるブラックファン貧血や、顔面・上腕などの筋委縮が起こる FSHD に関わる原因遺伝子が濃縮していた。細胞分化後における疾患状態は異なるが、多能性幹細胞に共通して希少疾患原因遺伝子が量的な転写後制御を受けるという結果から、これらのタンパク質発現量の制御と希少疾患発症機構との関連性を明らかにしたいと考えた。そこで、FSHD 疾患 iPS 細胞と、疾患 iPS 細胞から遺伝子変異箇所を修復した Isogenic 細胞を用いて、大規模なタンパク質の発現解析を行い、SMCHD1 と同様の遺伝子発現挙動を示す遺伝子群を抽出することで、FSHD の疾患発症に関わる機構解明を目指した。

1. 骨格筋細胞分化誘導実験による RNA とタンパク質の試料調製

すでに樹立された FSHD 疾患由来 iPS 細胞と、疾患 iPS 細胞から遺伝子変異箇所を修復した Isogenic 細胞を用いて骨格筋を分化誘導し［1，2］、iPS 細胞状態から分化誘導後 10 日まで 7 点で細胞を回収した。細胞は RNA 解析用とタンパク質解析用の二種類に分け、RNA 解析用試料は RNA-seq による遺伝子発現解析を行い、タンパ

ク質解析用試料は WES（Simple Western 社製の自動ウェスタンブロッティング機器）および質量分析法によるプロテオーム解析を行った（図 1）。

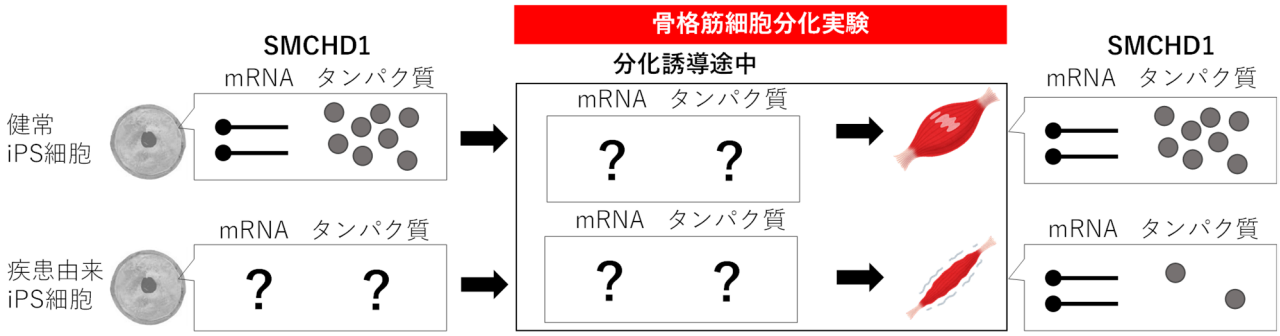


図 1. 本研究で行った SMCHD1 遺伝子のタンパク量制御機構解明に向けた実験系の概略図
疾患由来の iPS 細胞と、健常に修復した Isogenic な iPS 細胞を用いて mRNA 量とタンパク量を比較し、骨格筋への分化誘導途中の転写後制御機構を解明する。

2. 骨格筋細胞のプロテオーム解析

細胞からタンパク質を Phase Transfer Surfactant（PTS）法［4］を用いて抽出し、トリプシンによるタンパク質の酵素消化を行った。タンパク質消化後の試料を 200 ng 用いて、timsTOFpro2（Bruker 社製）を用いた Data independent acquisition（DIA）解析法によってデータを取得し、DIA-NN［5］によるタンパク質の同定・定量を行った。その結果、FSHD 疾患由来 iPS 細胞と Isogenic 細胞を用いた骨格筋分化過程の段階において、各細胞試料から約 1 万タンパク質が同定・定量された（図 2）。

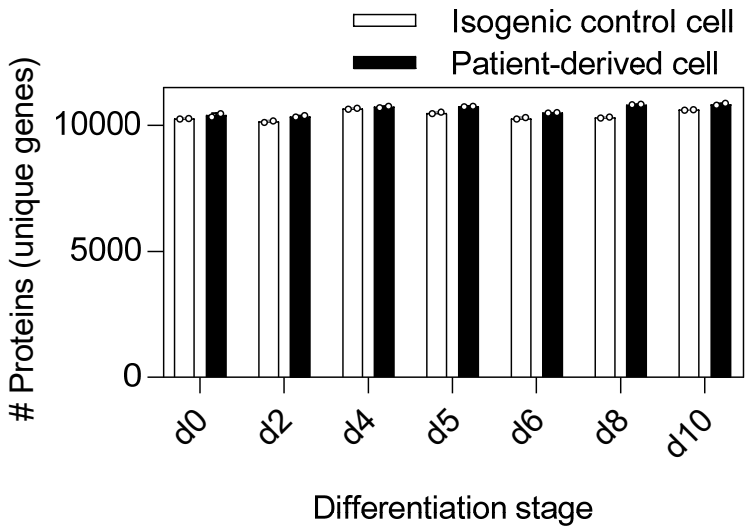


図 2. プロテオーム解析によって骨格筋分化過程の細胞で同定されたタンパク質数
プロテオーム解析によって、骨格筋分化誘導途中の約 1 万種類のタンパク質の定量結果を取得した。

3. SMCHD1 タンパク質と量的に共変動する遺伝子群の抽出

骨格筋誘導過程の各分化段階におけるプロテオーム解析結果から SMCHD1 と同じ定量的変動を示す遺伝子群を、R script による DEGreport:degPatterns モジュールを用いて解析した。その結果、Group9 に SMCHD1 が含まれ、同様の挙動を示す遺伝子群が 158 種類あることがわかった（図 3）。濃縮された遺伝子群の機能を調べるために Gene Ontology 解析を行ったところ、微小管でのタンパク質輸送に関わる遺伝子が濃縮されていた。これらのタンパク量と RNA 量との乖離は解析途中である。

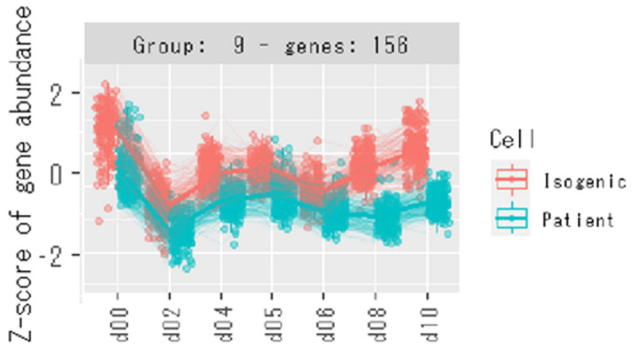


図 3. プロテオーム解析で SMCHD1 と共変動していた遺伝子群の分布
R script による DEGreport:degPatterns モジュールによる解析結果のうち、
SMCHD1 を含む遺伝子群の変動を示す。

考　察

DUX4 の発現量増加がエピゲノム制御によるものであるため、これまでの FSHD 研究ではクロマチン構造の変化やエピゲノム情報についての研究が多くなされてきた［6, 7］。そして、疾患由来細胞では骨格筋細胞分化後に SMCHD1 遺伝子のタンパク質発現量が低下するという現象は知られていたが、その発現量制御機構についての理解は進んでいなかった。本研究で、SMCHD1 遺伝子のタンパク質発現量自体が分化前後で制御を受けており、定量的に共発現するタンパク質が 158 種類あることがわかった。158 種類の遺伝子には微小管のタンパク質輸送に関わる遺伝子が濃縮されており、今後は SMCHD1 と細胞内タンパク質輸送との関連を解析していきたいと考えている。

本研究は、希少疾患に関連する遺伝子のタンパク質発現量を制御する機構の一端を明らかにし、翻訳制御という生命現象の根幹の機構の理解を深め、これまでの mRNA のみの発現量解析では見いだせなかったような新しい現象の発見を目指した研究の前哨戦である。この量的な制御が化合物などで制御可能となれば、新しい希少疾患治療法の開発にも応用できる。今後は、今回同定された遺伝子群の詳細な分子機構の解明を目指す。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学 iPS 細胞研究所櫻井研究室の櫻井英俊准教授、本田充研究員、および何君潔大学院生である。特に、何君潔大学院生には、骨格筋細胞の分化誘導など実験面において多大な貢献をしていただいた。さらに、本研究を助成して頂いた上原記念生命科学財団に心より感謝いたします。

文　献

1) Sasaki-Honda M, Kagita A, Jonouchi T, Araki T, Hotta A, Sakurai H. Generation of a transgene-free iPSC line and genetically modified line from a facioscapulohumeral muscular dystrophy type 2 (FSHD2) patient with SMCHD1 p.Lys607Ter mutation. Stem Cell Res. 2020 Jun 24;47:101884. Epub ahead of print. PMID: 32711388. DOI: 10.1016/j.scr.2020.101884.

2) Sasaki-Honda M, Jonouchi T, Arai M, Hotta A, Mitsuhashi S, Nishino I, Matsuda R, Sakurai H. A patient-derived iPSC model revealed oxidative stress increases facioscapulohumeral muscular dystrophy-causative DUX4. Hum Mol Genet. 2018 Dec 1;27(23):4024-4035. PMID: 30107443, DOI: 10.1093/hmg/ddy293.

3) Iwasaki M, Kawahara Y, Okubo C, Yamakawa T, Nakamura M, Tabata T, Nishi Y, Narita M, Ohta A, Saito H, Yamamoto T, Nakagawa M, Yamanaka S, Takahashi K. Multi-omics approach reveals posttranscriptionally regulated genes are essential for human pluripotent stem cells. iScience. 2022 Apr 25;25(5):104289. PMID: 35573189, DOI: 10.1016/j.isci.2022.104289.

4) Masuda T, Saito N, Tomita M, Ishihama Y. Unbiased quantitation of Escherichia coli membrane proteome using phase transfer surfactants. Mol Cell Proteomics. 2009 Dec;8(12):2770-7. Epub 2009 Sep 18. PMID: 19767571, DOI: 10.1074/mcp.M900240-MCP200.

5) Demichev V, Messner CB, Vernardis SI, Lilley KS, Ralser M. DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput. Nat Methods. 2020 Jan;17(1):41-44. Epub 2019 Nov 25. PMID: 31768060, DOI: 10.1038/s41592-019-0638-x.

6) Balog J, Thijssen PE, Shadle S, Straasheijm KR, van der Vliet PJ, Krom YD, van den Boogaard ML, de Jong A, F Lemmers RJ, Tawil R, Tapscott SJ, van der Maarel SM. Increased DUX4 expression during muscle differentiation correlates with decreased SMCHD1 protein levels at D4Z4. Epigenetics. 2015;10(12):1133-42. Erratum in: Epigenetics. 2016;11(2):175. PMID: 26575099, DOI: 10.1080/15592294.2015.1113798.

7) Chen K, Birkinshaw RW, Gurzau AD, Wanigasuriya I, Wang R, Iminitoff M, Sandow JJ, Young SN, Hennessy PJ, Willson TA, Heckmann DA, Webb AI, Blewitt ME, Czabotar PE, Murphy JM. Crystal structure of the hinge domain of Smchd1 reveals its dimerization mode and nucleic acid-binding residues. Sci Signal. 2020 Jun 16;13(636):eaaz5599. PMID: 32546545, DOI: 10.1126/scisignal.aaz5599.