

# Pyrosequencingによる定量的塩基配列解析法とその精神疾患研究への応用

○文東美紀、岩本和也、宗像可枝、加藤忠史(理研・脳科学・精神疾患動態)

Quantitative sequence analysis by pyrosequencing and its applications to psychiatric research

OMiki Bundo, Kazuya Iwamoto, Kae Munakata, Tadafumi Kato

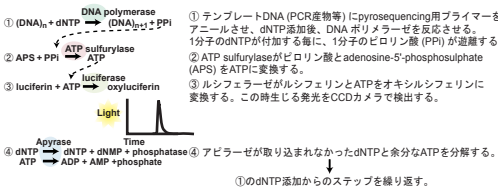
(Lab. for Molecular Dynamics of Mental Disorders, BSI, RIKEN)

## 要旨

現在までに、双極性障害や統合失調症など、精神疾患の発症機序について様々な観点から研究が進められているが、未だ主要な遺伝的原因是因は明らかにされていない。近年、ゲノム上の塩基配列以外の変異や変化が、精神疾患の病因や病態と密接に関与している可能性が指摘されている。例えば、精神疾患に関連があると考えられている候補遺伝子において、患者対照群間でRNA編集の程度や、プロモーター領域のDNAメチル化の違いなどエピジェネティクスの変化が見出されている。また双極性障害では、ミトコンドリアDNAの変異や多型、ヘテロプラスミーの程度などとの関連も指摘されている。こうした定量的な塩基配列の解析には、これまでサブローニング法や放射能同位体を用いたプライマー伸長法などが用いられてきたが、簡便性、定量性などの面で困難があった。

Pyrosequencingは、プライマー伸長を基盤とし、ルシフェラーゼ発光反応を厳密に制御することにより、定量的な塩基配列の解析を行うことができる技術である。この方法は従来主としてSNPタイピングのような定量的な目的のために利用されてきたが、定量性を活かした解析にむける威力を発揮すると期待される。我々はこの技術を用いて、1.セロトニン2C受容体における連続した5ヶ所のRNA編集部位の測定法の開発、2.ミトコンドリアDNAにおけるヘテロプラスミー測定法の開発、3.多数塩基における精神疾患候補遺伝子ODNAメチル化の測定、などを行っている。本年度では、これらの精神疾患研究におけるpyrosequencingを用いた定量系について報告するとともに、その有用性と問題点などについて議論したい。

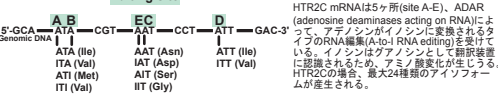
## 1. Pyrosequencingの原理



## 2. セロトニン2C受容体mRNA編集の定量的測定

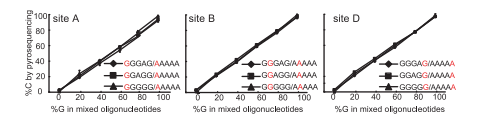
セロトニン2C受容体(HTR2C)のmRNAは、5ヶ所の部位でRNA編集を受けており、そのいずれにおいてもアミノ酸配列が変化して、機能の異なる多数のアイソフォームが作られる。HTR2Cは古くから精神疾患との関わりが指摘されており、患者死後脳やうつ病モデルマウスでRNA編集率の増加が報告されている。我々は1反応で、連続した編集部位 (site E,C) を含む5ヶ所までの部位の定量的測定系を確立した。

## A セロトニン2C受容体mRNAの編集部位



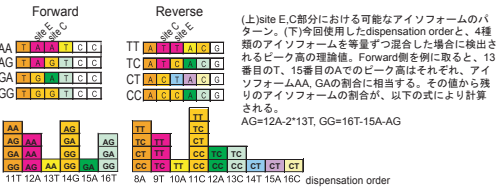
## B オリゴヌクレオチドを使用した編集部位の定量

2種類のオリゴヌクレオチドを様々な割合で混合し、それぞれの編集部位を定量した。連続していない編集部位であるsite A, B, Dは通常のプロトコルで正確に定量することができた。



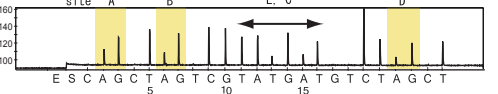
## C 連続した編集部位 (site E,C) を測定するための方法

Pyrosequencingはプライマー伸長法を応用した技術であるため、通常のdispensation order (dNTP添加順序) では連続多型の定量的測定は不可能である。dNTPのdispensation orderを工夫することにより、連続した編集部位であるsite E,Cの編集率を定量的に測定することができた。

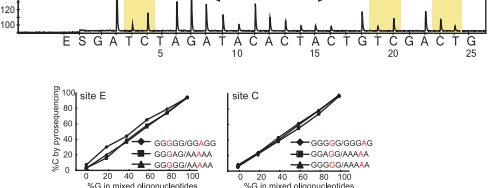


## D オリゴヌクレオチドをテンプレートに使用したpyrogram

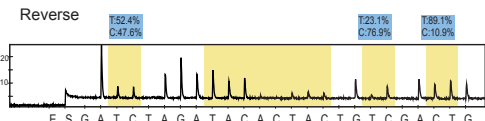
4種類のオリゴヌクレオチドを等量ずつ混合した時のpyrogram. 理論値に近いピーク高が検出された。



## B) 同様に様々な割合で混合した2種類のオリゴヌクレオチドをsite E, site C上でのdispensation orderで測定したところ、正確に定量できていた。

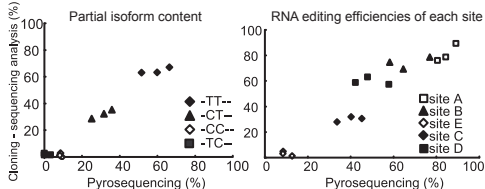


## E ラット脳mRNAからのRT-PCR産物を用いた場合のpyrogram



## F サブローニング法とpyrosequencingの比較

ラット脳(m=3)からのRT-PCR産物のサブローニング法とpyrosequencingでのデータを比較した。site E,Cにおける部分的なアイソフォームの割合と、各サイトの編集率を比較したところ、2つのデータは高い相関を示した。(R=0.984, R=0.952)



## G 使用したオリゴヌクレオチドとプライマー

Sequences	
1st RT-PCR primers	5'-TGGATTTCAGTACATGGTGCT-3'
orientation)	5'-GTCCCTCAGTCCAACTCACAG-3'
	Bio-5'-TGGATTTCAGTACATGGTGCT-3'
	5'-TTGATATTGCCAAACGATG-3'
Pyrosequencing in forward orientation*	
CCCCC	5'-ACAGGACACCGCACTGCTACATACCGGTCCAGCG-3'
CTCCC	5'-ACAGGACTAGCGCACTGCTACATACCGGTCCAGCG-3'
CTCCC	5'-ACAGGACTAGCGCACTGCTACATACCGGTCCAGCG-3'
CTCCC	5'-ACAGGACTAGCGCACTGCTACATACCGGTCCAGCG-3'
TTTTT	5'-ATAGGATACGATTTGCTACATACCGGTCCAGCG-3'
sequencing primer	5'-CGCTGGACCGGTTGCTACAGC-3'
reading sequence	5'-A/GTACGGTACATGCTCATGTTG-3'
dispensation order	CAGCTAGTCTGATGATGCTAGCT
Pyrosequencing in reverse orientation*	
GGGGG	5'-GTCCCTCAGTCTGTGGACTAGCGGGTCAATTC-3'
GGAGG	5'-GTCCCTCAGTCTGTGGACTAGCGGGTCAATTC-3'
GGGAG	5'-GTCCCTCAGTCTGTGGACTAGCGGGTCAATTC-3'
GGGAG	5'-GTCCCTCAGTCTGTGGACTAGCGGGTCAATTC-3'
AAAAA	5'-ATACGTAATCCTACTTATGAGCATAGCGGGTCAATTC-3'
sequencing primer	5'-GAATTGAACCGGCTATGCTC-3'
reading sequence	5'-AATTCAGGATGATCTAGTATGCTG-3'
dispensation order	GATCTAGTACATCACTGATGCTGACGTC

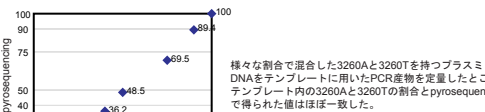
## 3. ミトコンドリアDNAヘテロプラスミーの定量的測定例

ミトコンドリアDNA (mtDNA)は約16kbの環状分子で、1細胞あたり数百-数千コピー存在する。変異が入ったmtDNAは、正常なmtDNAと様々な割合で共存し、ヘテロプラスミーと呼ばれる状態になる。ミトコンドリアは細胞内カルシウムの濃度調節を介して、神経可塑性、アポトーシスシグナルに重要な役割を持つ。精神疾患患者DNAにおいてもmtDNAに突変が蓄積されている例が報告されており、ヘテロプラスミーの割合を定量的に測定する方法を検討した。

## A mtDNAの模式図と今回使用したプライマー

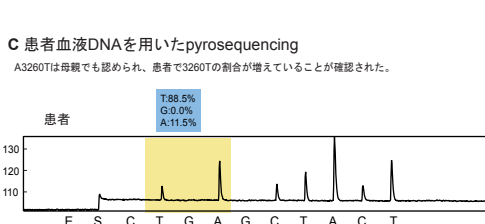


## B プラスミドDNAからのPCR産物によるpyrosequencing

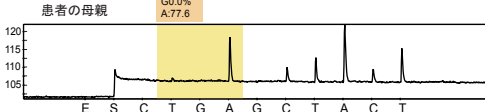


## C 患者血液DNAを用いたpyrosequencing

A3260Tは母親でも認められ、患者で3260Tの割合が増えていることが確認された。



## 患者の母親

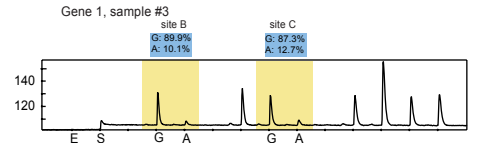


## 4. 多数サンプルを用いたDNAメチル化状態の定量的測定例

精神疾患の発症には、塩基配列上の変異だけでなく、エピジェネティックな変異が関与している可能性が示唆されている。これまで結合失調症-陽性症児群-一致由来ゲノムDNAや患者死後脳で、遺伝子発現制御を担っているプロモーター領域のDNAメチル化状態の変異が見出されている。今回、双生児不一致例で差異の認められた2つの遺伝子について、多数の患者・健康者サンプルを用いてプロモーター領域のDNAメチル化状態を定量的に測定した。

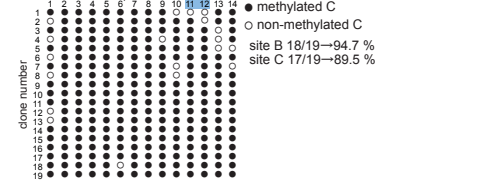
## A 遺伝子1におけるpyrogram例

ヒトリンパ芽球由来のDNAを用いて、遺伝子1において3ヶ所(site A-C)、遺伝子2において4ヶ所(site A-D)のCpG部位を含む領域でbisulfite変換後のDNAを用いたPCRを行い、メチル化状態を測定した。ここに示したのは、遺伝子1のsiteBのpyrogramである。



## B サブローニング法によるメチル化解析例

Aで使用した同じDNAサンプルを用いたメチル化解析例。

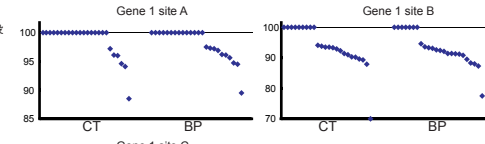


## C pyrosequencingとサブローニング法の比較

ヒトリンパ芽球由来のDNAを3サンプル用いて、pyrosequencingとサブローニング法を用いてメチル化状態の測定を行い、データを比較したところ、誤差は0-17.9%であり、高い相関を示した。

	Gene 1				Gene 2				
	site A	site B	site C	site D	site C	site C	site D	site D	
pyro cloning	92.2	90.5	92.6	100	89.7	95.7	0	0	0
sample #1	92.2	90.5	92.6	100	89.7	95.7	0	0	0
sample #2	93.7	86.4	92.2	100	87.8	100	17.9	0	0
sample #3	92.3	83.3	89.9	94.7	87.3	89.5	0	11.8	5.9

## D 健康者(n=24)と双極性患者(n=24)のリンパ芽球DNAを用いたメチル化状態の比較



## 5. まとめ

今回、mRNAの編集率、ミトコンドリアDNAの変異率、ゲノムDNAのメチル化状態という3種類の異なる塩基定量を行った。そのいずれにおいても、pyrosequencingで定量が可能であることが示された。PyrosequencingはPCR後の処理が短時間で済み、測定に要する時間が30 min/96 well plate程度であるため、多量のサンプルを測定する場合、非常に有用である。これまで塩基定量に使われてきたサブローニング法は操作が煩雑で時間がかかるという欠点もあつた。PyrosequencingされるPCR産物にバイアスがかかる可能性があるという欠点もあつた。Pyrosequencingは、より正確な定量が可能であると考えられる。

Pyrosequencingで信頼性の高い定量を行うには、PCR産物量が数百ng必要であるため、PCR条件を決定する段階が律速段階になると思われた。またpyrosequencingで測定できる範囲は、通常プライマーから10bp前後であるため、広範囲の領域を測定することが必要な場合には、サブローニング法の方が適すると考えられ、目的による使い分けが必要であると思われた。

1. これまで、連続した部位の定量にはサブローニング法以外の方法は存在しなかった。セロトニン2C受容体mRNAの連続した2ヶ所を含む、5ヶ所の編集部位の定量を行えるハイスループットな系を確立した。

2. ミトコンドリアDNAはPCRが比較的容易であり、多くの産物が得られるため、ヘテロプラスミーの定量にpyrosequencingには適していると思われる。ただ相同性のある核ゲノムDNA領域をPCRで増やしてしまつた場合、pyrosequencingではそれを区別することは出来なため、PCR条件の条件検討には注意が必要である。

3. DNAメチル化を定量するためにはbisulfite PCRが必要になるが、一般的に多量な産物を得られにくいため、条件設定にやや時間がかかる。