

遺伝子変異の効果を簡便にスクリーニングする *in vivo* システム

杉 江 淳

新潟大学脳研究所 脳病態解析分野

A Simple *in Vivo* System for Screening the Effects of Genetic Mutations

Atsushi SUGIE

Department of Neuroscience of Disease, Brain Research Institute, Niigata University

要 旨

次世代シーケンサーの普及により、希少疾患や未診断疾患を始めとして、様々な疾患の患者のゲノム配列を決定することが容易になってきた。その結果、病的意義が不明な希少な病因遺伝子変異候補が年々蓄積している。これら大量にある遺伝子変異の効果を、安価に簡便に検証できるようにしたいと筆者らは考えた。そのために、シンプルなモデル生物ショウジョウバエを用いて病的意義をスクリーニングするシステムを構築した。

キーワード：ショウジョウバエ, IRUD, J-RDMM, 未診断疾患, 軸索変性

はじめに

近年、次世代シーケンサーの普及や技術の発達により、安価で迅速にゲノム配列を決定することが容易になってきている。そのため、希少疾患や未診断疾患をはじめとして、様々な疾患の患者のゲノム配列を解析して、診断の確定をすることが現実できるようになった。このような診断確定方法は、倫理指針や法律の確立によって、今後さらに一般化する可能性がある。一方で、現在のゲノム解析技術、バイオインフォマティクス技術をもってしても病的意義が不明な遺伝子変異候補が年々蓄積している。

実際に、疾患に関与するヒトのバリエントが公開されているデータベース、CliniVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) に登録されるバリエント数は年々上昇し続けている。ここに登録されるバリエントには、Pathogenic, Likely pathogenic, Likely benign, Benign, Variant of Uncertain Significance (VUS) とカテゴライズされている。登録されるバリエントが増えるため、当然 VUS の数も増大している。VUS を解析することによ

って、Pathogenic か Benign かを明らかにする必要がある。にもかかわらず、高確率で病的意義がありそうだという変異でない限り、解析する時間とコストが見合わない。しかしながら、これを安価で簡便に検証できるような評価システムが現時点ではないというジレンマを抱えている。増え続ける VUS のバリエントに対し、その病的意義をシステムティックに評価できるようにしたいと筆者らは考えた。そのために、シンプルなモデル生物ショウジョウバエを用いて病的意義をスクリーニングするシステムを構築した。

本稿では、希少疾患・未診断疾患の確定診断に多大なる貢献をしている「IRUD とショウジョウバエの関係性」についてまず述べ、「ショウジョウバエのラフアイを用いた評価による病的意義の検証」、「神経軸索の変性をダイレクトに評価する実験モデルの開発」を紹介したい。

IRUD におけるシンプルなモデル生物の利用

ショウジョウバエの複眼は、700-800 の個眼からなり¹⁾、この構造異常が起こることを“ラフ

アイ”と呼ぶ。30年以上前に発見されたこの表現型²⁾は、ショウジョウバエを用いた疾患研究で多く利用されてきた³⁾。このラフアイ表現型を指標とした病的意義の検証は、やはり非常に効果的であることを IRUD の研究者と共同研究をする事になってから、筆者らは理解した。

IRUD は、Initiative on Rare and Undiagnosed Diseases (未診断疾患イニシアチブ) の略で、AMED の推進する研究として行われている⁴⁾。IRUD では、本学を含む全国の IRUD 拠点病院において、希少な未診断疾患患者の病状について専門的な検討を行う。そして、希少疾患や未診断疾患の患者のエクソームまたはゲノム解析によって DNA 配列の決定がなされ、特定された遺伝子変異から、従来困難であった確定診断に多大なる貢献をしている。具体的には、2021年3月末までに IRUD で診断が確定したのは 2247 家系にものぼる (<https://www.amed.go.jp/content/000052968.pdf>)。この結果は、解析済みのうち、43.7% が診断確定に至っており、高い診断率を誇っている。一方で、見いだされた遺伝子変異が疾患に関与しているのか不明な VUS も多数存在し、*in vitro* や、*in vivo* で変異の効果を検証する必要がある。

そのために、2017年に IRUD の成果をより進展させるために、IRUD Beyond が開始された。そのひとつに Beyond genotyping がある。そして、遺伝子変異の病的意義を検証し、確定診断率の向上に寄与する Japanese Rare Disease Models & Mechanism Network (J-RDMM) という組織は、この Beyond genotyping の一環に位置づけられている。J-RDMM は、希少疾患・未診断疾患で同定された遺伝子、または候補遺伝子について、シンプルなモデル生物、ハエや線虫、酵母、ゼブラフィッシュなどを利用することによって、その遺伝子変異の病的意義を検討する組織である。なお、より高度な病態解析のためにマウスモデルも利用されている。筆者らは、この J-RDMM の分担研究者として、ショウジョウバエを用いて、疾患に関与する可能性のある遺伝子変異の効果を検証している。

シンプルなモデル生物の一つであるショウジョウ

ウバエは、疾患に関与する相同遺伝子が多く保存されている⁵⁾⁻⁷⁾。また、小さく、シンプルながらも脳を持っており、記憶・学習、睡眠、サーカディアンリズムなど脳の重要な機能を発揮する。そして、個体のサイズが小さく、ライフサイクルが短く重複遺伝子が少ないため、迅速な遺伝学的解析ができる。さらに、安価で簡単に飼育でき、これまで蓄積されてきた豊富な遺伝学的ツールが存在する。これらのメリットから、病的意義が不明な遺伝子変異 VUS を評価するにあたり、時間・人・予算・スペースの制約に対してリスクとリターンが見合うシンプルなモデル生物である。

ショウジョウバエを用いた病的意義の検証例

研究の進め方としては、J-RDMM で担当した遺伝子に対し、野生型と変異型を発現させるための遺伝子組換え体を作製していく。まずはベクターを構築する。そして、このベクターを胚にインジェクションして遺伝子組換え体を作製する。そして遺伝子変異の効果を検証する、という手順となる。

遺伝子変異の効果を検証するために、ショウジョウバエの複眼を利用する。ショウジョウバエの複眼は、細胞の毒性に対して感受性が高く、形態異常をラフアイという表現型で簡便に可視化でき、古くから遺伝子機能解析のために用いられてきた⁸⁾。ラフアイ表現型を利用して、野生型と変異型のヒト遺伝子をショウジョウバエ複眼で発現させ、形態を比較する。これにより、疾患への関与が未知数な遺伝子変異について、病的な意義があるかどうかを簡便に示すことができる。以上の実験から、機能喪失、機能獲得型毒性といった変異の効果を明らかにし、IRUD の共同研究者へ報告する。

筆者らは、現在 25 遺伝子について並行して解析を行っている。その中の一つで、論文の成果になったものに、低分子量 G タンパク質をコードする遺伝子 ARF3 がある⁹⁾。この研究では、遺伝学的な評価によって、二つの新規遺伝子変異 (D67V と R99L) が見つけられた。臨床において、

それぞれの変異は、異なる神経発達障害を引き起こす所見であった。新たに見つかったこれら ARF3 遺伝子変異が、おそらく原因となると考えられるものの、遺伝子変異の病的意義が不明であった。筆者らは、IRUD 研究者の横浜市立大学の松本直通教授らとの共同研究により、ショウジョウバエを用いて遺伝子変異の毒性効果を検証した。その結果、恒常的活性型と知られている Q71L 変異と同様に、R99L 変異でもラフアイになる表現型が得られた。一方で、D67V は、非常に毒性が高いのか、致死であった。なお、ドミナントネガティブとして知られている T31N も致死という結果だった。*in vitro* の解析結果と合わせ、この研究で初めて D67V 変異はドミナントネガティブ、R99L 変異は機能獲得型毒性を示すことが明らかにされた。

現在筆者らは、ラフアイ表現型をより精密に定量しつつ、大規模にスクリーニングするプロジェクトを進めている。これにより、年々蓄積する VUS の中から病的意義を持つ候補を選抜し、マウスモデルで検証する見通しをつけ、診断の確定への貢献をしたい。そのために、システム顕微鏡に顕微鏡用デジタルカメラおよび電動ステージをつけたシステムを構築している。これを用いれば、大量なサンプルを自動的に撮影できる。さらに、フォーカスブラケット機能でピント位置を変えながら得られたデータを深度合成する工程も、システム顕微鏡に搭載されているソフトウェアにより自動的に行われる。深度合成されたハエ複眼は、Flynotyper¹⁰⁾ というソフトウェアにより自動的に形態異常度合いを定量できる。以上の一連の操作を半自動化することで、大量にある遺伝子変異の効果もスクリーニングできると期待している。

神経の軸索変性を自動で評価する定量システム開発

ラフアイは非常に簡便でパワフルな遺伝子変異効果検証方法である。例えば、ある遺伝子を発現させてラフアイになれば毒性を発揮していることが示せる。また、疾患遺伝子を発現させてラフアイになっている状況で、ある遺伝子も発現させる

とラフアイが抑制される場合は、その遺伝子が疾患遺伝子の毒性を和らげる可能性が示唆できる。そのため、モディファイアーを探索するための遺伝子スクリーニングに非常に向いている。モディファイアーとは、疾患原因タンパク質による病態を、促進または抑制する因子である。しかし、ラフアイ表現型は、神経そのものを見ているわけではない。ハエの個眼一つを見ると、光受容体の神経細胞だけでなく、コーンセルやピグメントセルといったいくつかの細胞種から構成されている。すなわち、ラフアイによって毒性が発揮されるというのは、個眼の数が減る、個眼の並びがおかしくなる、個眼の形成が異常になる、ということである。そのため、神経変性疾患の研究でもよく使われるこのラフアイは、実際は雑な観察方法であることは否めない。

ハエを用いた神経変性疾患の研究は多くあるが、ラフアイを始め、変性の評価方法は神経組織のボリュームや密度、個体の生存率や行動学的解析など間接的なものであり³⁾、神経変性そのものを評価する方法はほとんどなかった。そこで筆者らは、軸索の数を直接数える方法の開発に取り組んだ。そのために着目したのは、ショウジョウバエの視神経細胞である。ハエの視神経細胞はレチナに細胞体が存在し、直接脳の二次視覚中枢であるメダラという領域に投射する。視神経の軸索は、トポロジーを保ったままきれいに投射し、しかもそれぞれが分離しているため、数えることが比較的容易である。また、視神経を特異的に可視化できる抗体が存在するため、蛍光タンパク質などの遺伝学的ツールを使う必要もない。

これらの利点を生かして、軸索の数を数える方法を考案した¹¹⁾。まず、Imaris という画像解析ソフトを用い、軸索の末端のみを選択するような領域を手動で作製する。そして、マスクされた部分のみを切り出す。するとドット状の軸索末端が現れる。次に、サンプルごとのシグナルの強度やバックグラウンドのシグナルの違いなどを補正する。最後に、Imaris の spot detection 機能を使って、ドット状の軸索末端を数える。これにより、実際に 700-800 の軸索数を正確に数えることができ

た。以上の方法は、サンプルを準備して、共焦点顕微鏡で画像を撮影し、Imarisを用いて軸索末端を切り取り、ドット状の軸索末端を数えるという方法である。この方法は、正確に定量することができるが、軸索末端を切り取る部分が手動であることと、spot detectionを実行する際にあるパラメータをサンプルによって調整する必要がある。さらに、この工程で1サンプルに対し20分ほど時間がかかってしまうため、大量なサンプルに対して対応することができない。まとめると、すべての視神経軸索を数えることができるものの、時間がかかることと、定量するための熟練が必要になることに問題が生じる。

そこで筆者らは、機械学習を用いた自動定量方法、MeDUsAを開発した¹²⁾。この開発により、上記の問題点を解決し、全て自動化して定量することができるようになった。このMeDUsAを使い、実際にこれらヒトの代表的な神経変性疾患の原因因子が軸索の変性を引き起こすのかどうかを検証した。その結果、 α シヌクレイン、Tau、TDP43、Httどれも軸索の数が減少しており、疾患原因因子による神経の変性がショウジョウバエでも見られること、しかもそれが軸索の変性として直接的に評価することができた。

終わりに

本稿では、ラファイ表現型を利用して、簡便に遺伝子変異の効果を検証することができることを紹介した。また、神経変性を直接定量できるMeDUsAについて記した。今後、ラファイ表現型、MeDUsAを用いて、神経変性を評価する大規模な遺伝子スクリーニングが可能だと考えている。将来のビジョンとして、筆者らは診断の確定へ貢献するためのショウジョウバエの利用を一般的なものにしたいと考えている。そのために、臨床と基礎研究を結ぶ立ち位置で、変異の病的意義をスクリーニングしつつ、そこから興味深い表現型が観察されるなどのシーズが発見できれば、様々なモデル生物研究者へそれを提供したりして、未知なる病態機序の解明に貢献したい。

文 献

- 1) Ready DF, Hanson TE, Benzer S. Development of the *Drosophila* retina, a neurocrystalline lattice. *Dev Biol.* 1976; 53(2): 217-240. doi: 10.1016/0012-1606(76)90225-6
- 2) Tomlinson A, Kimmel BE, Rubin GM. rough, a *Drosophila* homeobox gene required in photoreceptors R2 and R5 for inductive interactions in the developing eye. *Cell.* 1988; 55(5): 771-784. doi: 10.1016/0092-8674(88)90133-X
- 3) McGurk L, Berson A, Bonini NM. *Drosophila* as an *In Vivo* Model for Human Neurodegenerative Disease. *Genetics.* 2015; 201(2): 377-402. doi: 10.1534/genetics.115.179457
- 4) Adachi T, Kawamura K, Furusawa Y, Nishizaki Y, Imanishi N, Umehara S, Izumi K, Suematsu M. Japan's initiative on rare and undiagnosed diseases (IRUD): towards an end to the diagnostic odyssey. *Eur J Hum Genet.* 2017; 25(9): 1025-1028. doi: 10.1038/ejhg.2017.106
- 5) Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, Gabor Miklos GL, Nelson CR, Hariharan IK, Fortini ME, Li PW, Apweiler R, Fleischmann W, Cherry JM, Henikoff S, Skupski MP, Misra S, Ashburner M, Birney E, Boguski MS, Brody T, Brokstein P, Celniker SE, Chervitz SA, Coates D, Cravchik A, Gabrielian A, Galle RF, Gelbart WM, George RA, Goldstein LSB, Gong F, Guan P, Harris NL, Hay BA, Hoskins RA, Li J, Li Z, Hynes RO, Jones SJM, Kuehl PM, Lemaitre B, Littleton JT, Morrison DK, Mungall C, O'Farrell PH, Pickeral OK, Shue C, Vossall LB, Zhang J, Zhao Q, Zheng XH, Zhong F, Zhong W, Gibbs R, Venter JC, Adams MD, Lewis S. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science (80-).* 2000; 287(5461): 2204-2215. doi: 10.1126/science.287.5461.2204
- 6) Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 2001; 11(6): 1114-1125. doi: 10.1101/gr.169101

- 7) Yamamoto S, Jaiswal M, Charng WL, Gambin T, Karaca E, Mirzaa G, Wiszniewski W, Sandoval H, Haelterman NA, Xiong B, Zhang K, Bayat V, David G, Li T, Chen K, Gala U, Harel T, Pehlivan D, Penney S, Vissers LELM, de Ligt J, Jhangiani SN, Xie Y, Tsang SH, Parman Y, Sivaci M, Battaloglu E, Muzny D, Wan YW, Liu Z, Lin-Moore AT, Clark RD, Curry CJ, Link N, Schulze KL, Boerwinkle E, Dobyns WB, Allikmets R, Gibbs RA, Chen R, Lupski JR, Wangler MF, Bellen HJ. A drosophila genetic resource of mutants to study mechanisms underlying human genetic diseases. *Cell*. 2014; 159(1): 200-214. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.002
- 8) Thomas BJ, Wassarman DA. A fly's eye view of biology. *Trends Genet*. 1999; 15(5): 184-190. doi: 10.1016/S0168-9525(99)01720-5
- 9) Sakamoto M, Sasaki K, Sugie A, Nitta Y, Kimura T, Gürsoy S, Cinleti T, Iai M, Sengoku T, Ogata K, Suzuki A, Okamoto N, Iwama K, Tsuchida N, Uchiyama Y, Koshimizu E, Fujita A, Hamanaka K, Miyatake S, Mizuguchi T, Taguri M, Ito S, Takahashi H, Miyake N, Matsumoto N. *De novo ARF3* variants cause neurodevelopmental disorder with brain abnormality. *Hum Mol Genet*. August 2021. doi: 10.1093/hmg/ddab224
- 10) Iyer J, Wang Q, Le T, Pizzo L, Grönke S, Ambegaokar SS, Imai Y, Srivastava A, Troisi BL, Mardon G, Artero R, Jackson GR, Isaacs AM, Partridge L, Lu B, Kumar JP, Girirajan S. Quantitative Assessment of Eye Phenotypes for Functional Genetic Studies Using *Drosophila melanogaster*. *G3 Genes/Genomes/Genetics*. 2016; 6(5): 1427-1437. doi: 10.1534/g3.116.027060
- 11) Richard M, Doubková K, Nitta Y, Kawai H, Sugie A, Tavosanis G. A quantitative model of sporadic axonal degeneration in the *Drosophila* visual system. *bioRxiv*. 2021.
- 12) Nitta Y, Kawai H, Osaka J, Hakeda-Suzuki S, Nagai Y, Doubková K, Suzuki T, Tavosanis G, Sugie A. MeDUsA: A novel system for automated axon quantification to evaluate neuroaxonal degeneration. *bioRxiv*. 2021.
-