

本件の取り扱いについては、下記の解禁時間以降でお願い申し上げます。

日本時間 2021年12月21日(火) 午後6時

令和3年12月13日

各報道機関 御中

国立大学法人山梨大学

trrap 遺伝子破壊ゼブラフィッシュがヒト遺伝子疾患の病態に似た表現型を示すことを発見

山梨大学大学院総合研究部発生生物学の川原敦雄教授の研究グループは、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 法で作製した *trrap* 遺伝子破壊ゼブラフィッシュがヒト *TRRAP* 遺伝子疾患で報告されている小頭症や頭蓋顔面形成不全などの病態に似た表現型を示すことを明らかにしました。なお、この発表は、慶応大学医学部の小崎健次郎教授の研究グループとの共同研究の成果です。

我々の体が形作られる過程では様々な遺伝子が機能していますが、ゲノムの中の一つの遺伝子に導入された変異が頭のサイズや顔貌などに大きな影響を与えることがあります。ヒト *TRRAP* 遺伝子は、核内のヒストン・タンパク質に働くアセチルトランスフェラーゼ複合体の構成分子として同定されましたが、形態形成における機能は十分には理解されていませんでした。最近、ヒト *TRRAP* 遺伝子に様々なミスセンス変異が見つかってきており、それらのゲノム変異と小頭症、頭蓋顔面形成不全、発育不全や精神遅滞など多様な病態との関連性が注目されています。*trrap* 遺伝子のゲノム変異が疾患の原因であるかを確定する目的で、私達は *trrap* 遺伝子破壊ゼブラフィッシュを作製しヒト疾患と似た病態を示すかを調べました。*trrap* 変異体は頭や目が小さく下顎と歯の形態異常を示しており、ヒト疾患の病態の一部と良く似ていることが分かりました。*trrap* 変異体では顎で誘導される遺伝子および歯で機能する遺伝子の発現が減少していました。これらの結果は、*trrap* 遺伝子が頭部や顔面の形態形成を調節する重要な遺伝子の一つであることを示唆しています。

この研究結果は、*trrap* 遺伝子破壊ゼブラフィッシュがヒト *TRRAP* 遺伝子疾患の病態解析に活用できる可能性を示しています。さらに、*trrap* 変異体の病態を抑制する化合物を探索することでヒト疾患に対する治療薬の候補を同定できる可能性があります。

なお、この研究発表は、2021年12月21日(火)午後6時(日本時間)に、*Scientific Reports*(電子版, Springer Nature Group)の Online Publication として掲載されます。

論文タイトル : Involvement of the zebrafish *trrap* gene in craniofacial development

(*trrap* 遺伝子はゼブラフィッシュの頭蓋顔面の発生過程で機能する)

<https://www.nature.com/articles/s41598-021-03123-z>

1. 内容

論文タイトル: Involvement of the zebrafish *trrap* gene in craniofacial development
(*trrap* 遺伝子はゼブラフィッシュの頭蓋顔面の発生過程で機能する)

我々の体の形作りは様々な遺伝子で制御されていますが、例えばゲノムの中の一つの遺伝子に導入された変異が頭部のサイズや顔貌などに大きな影響を与えることがあります。最近、ヒト *TRRAP* (transformation/transcription domain-associated protein) 遺伝子の特定の領域に様々なミスセンス変異が見つかってきており、それらのゲノム変異と小頭症、頭蓋顔面形成不全、発育不全や精神遅滞など多様な病態との関連性が注目されています。*TRRAP* 遺伝子は、遺伝情報が収納されているクロマチンのヒストン・タンパク質に働くアセチルトランスフェラーゼ複合体の構成分子として同定されましたが、個体発生や形態形成における *TRRAP* 遺伝子の機能はこれまで十分には理解されていませんでした。私達は *trrap* 遺伝子のゲノム変異がヒト疾患の病態と関連するかを調べる目的で、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 法を用いヒト *TRRAP* 遺伝子に変異が集積する領域に対応するゼブラフィッシュのゲノム領域に変異を導入した *trrap* 遺伝子破壊ゼブラフィッシュを作製して表現型解析を行いました。*trrap* 遺伝子破壊ゼブラフィッシュは頭や目が小さくなり、さらに、下顎と歯の形態に異常を示しました。このように *trrap* 変異体の表現型はヒト *TRRAP* 遺伝子疾患の病態の一部と良く似た表現型を示しており、私達は、*trrap* 遺伝子破壊ゼブラフィッシュがヒト *TRRAP* 遺伝子疾患に対する疾患モデルになりうると考えています。

ヒト *TRRAP* 遺伝子疾患において、Trrap 分子の N 末端から 1,031-1,159 アミノ酸の領域に多様なミスセンス変異が見つかってきており、これらの遺伝子変異が *TRRAP* 遺伝子疾患で認められる小頭症、頭蓋顔面形成不全、発育不全および精神遅滞などの多様な病態と関連すると考えられます (ヒト *TRRAP* 遺伝子に生じたゲノム変異が病態の原因であるかを他の生物種で検証することが重要です)。まず、*trrap* 遺伝子の初期発生における発現部位を antisense *trrap* mRNA プローブで調べた結果、私達はゼブラフィッシュの *trrap* 遺伝子の mRNA の発現が初期発生過程で頭部に誘導されることを見出しました (図 1)。そこで、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 法を用いてゼブラフィッシュの Trrap 分子の N 末端から 1000 アミノ酸前後に相当する領域に変異を導入した *trrap* 変異体を作製し、初期発生過程における表現型解析を行いました。野生型と比較しますと頭部と目のサイズが小さくなっており、ヒト小頭症と似た表現型を示しました (図 2)。また、5 日齢の軟骨染色により *trrap* 変異体の下顎の形態に異常が認められました。さらに、10 日齢の硬骨染色により *trrap* 変異体における歯の形成不全が観察されました。

Trrap 分子は、ヒストン・アセチルトランスフェラーゼ複合体の構成分子であり、形態形成を司る様々な遺伝子の発現を調節している可能性が示唆されています。そこで、*trrap* 変異体における顎・咽頭や歯の形成に重要な遺伝子の発現動態を調べました。その結果、顎・咽頭に発現している転写因子である *dlx3* の発現領域が狭くなり、また、歯に発現している *dlx2b* 遺伝子の発現が減弱していることが明らかになりました (図 3)。これらの結果は、*trrap* 遺伝子が顎・咽頭および歯に誘導される遺伝子の発現を調節することで頭蓋・顔面の形態形成を制御していると考えられました。

まとめますと、*trrap* 遺伝子破壊ゼブラフィッシュの表現型解析から、頭部に発現誘導される *trrap* 遺伝子が頭蓋・顔面の形態形成に重要な役割を担うことが明らかとなりました。

2. 今後の研究について

私達は、*trrap* 遺伝子破壊ゼブラフィッシュの機能解析から、*trrap* 遺伝子が頭蓋・顔面の形態形成に重要な遺伝子であることを明らかにしました。ヒト *TRRAP* 遺伝子疾患では、N 末端から 1,031-1,159 アミノ酸の領域に様々なミスセンス変異が集積しており、この領域が何らかの機能ドメインとして働くことが考えられます。今後は、この領域にどのような分子が相互作用することで頭蓋顔面の形態形成を制御しているかを解明することが重要だと考えています。また、*Trrap* 分子はヒストンに対するアセチルトランスフェラーゼ複合体の構成分子ですので、この酵素活性を介しどのような遺伝子の発現を調節しているのかを明らかにする必要があります。さらに、個体発生過程で *trrap* 遺伝子が頭蓋顔面形成以外でどのような形態形成に関与しているかも興味深い研究課題だと考えています。

3. 今回の研究の応用に関して

今回の研究結果は、*trrap* 遺伝子破壊ゼブラフィッシュの機能解析がヒト *TRRAP* 遺伝子疾患の病態の解明に貢献できる可能性が期待されます。小頭症や頭蓋顔面形成不全といった表現型以外にヒト *TRRAP* 遺伝子疾患で認められています発育不全や精神遅滞などの表現型を *trrap* 遺伝子破壊ゼブラフィッシュが示すかを調べるのが重要です。ゼブラフィッシュ胚は体長が2mm程と非常に小さいので、飼育水に様々な低分子化合物を添加することにより *trrap* 遺伝子破壊ゼブラフィッシュが示す小頭症や頭蓋顔面形成不全を改善する治療薬候補がないかを探索することに応用が可能だと考えられます。

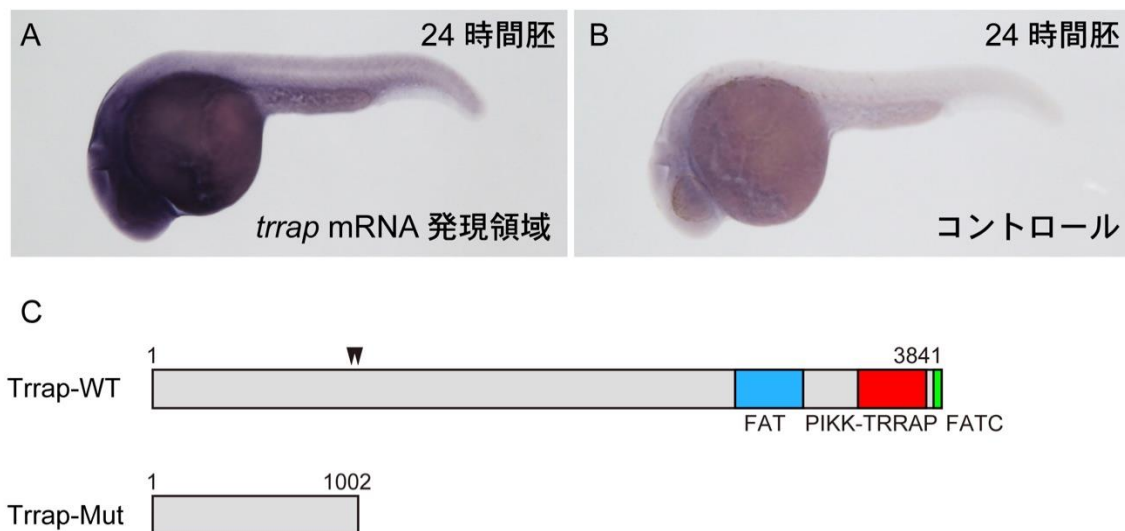


図 1 *trrap* 遺伝子は初期発生過程で頭部に発現誘導される

(A, B) ゼブラフィッシュの受精後 24 時間胚では *trrap* mRNA の発現が頭部に観察された (濃い紫色)。 (C) ゼブラフィッシュの *Trrap* 分子は 3,841 アミノ酸からなり、C 末端付近に FAT, PIKK-TRRAP および FATC ドメインがあるが、各ドメインの機能は不明な点が多い。ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 法で *trrap* 遺伝子にゲノム変異を導入し (矢頭: 標的ゲノム部位)、N 末端の 1002 アミノ酸で停止する *Trrap* 変異型タンパク質を生成する *trrap* 遺伝子破壊ゼブラフィッシュを作製した。

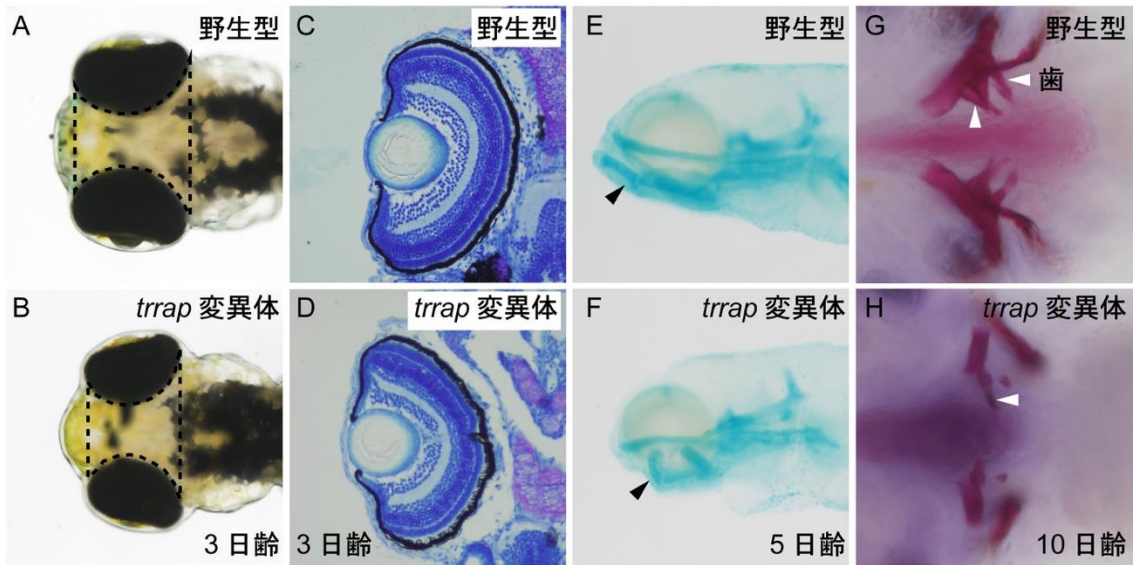


図 2 *trrap* 変異体の頭部と目のサイズおよび下顎と歯の形態形成における異常

(A, B) 3 日齢の頭部の面積を計測し、*trrap* 変異体が野生型と比較して頭部のサイズが小さいことが分かった。(C, D) 3 日齢の目の切断面。野生型と比較して *trrap* 変異体の目のサイズが小さかった（ただし網膜の層構造には顕著な異常は認められていない）。(E, F) 5 日齢の頭部の軟骨染色。*trrap* 変異体は下顎が小さく形態異常を示した（矢頭：下顎）。(G, H) 10 日齢の頭部の硬骨染色。*trrap* 変異体は歯の形成不全を示した（白矢頭：歯）。

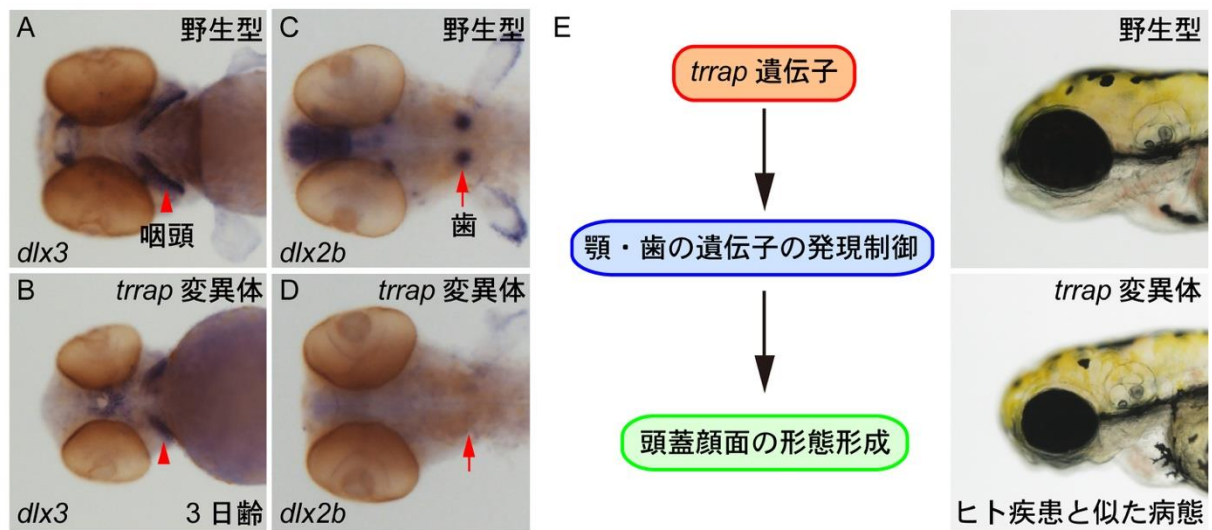


図 3 *trrap* 変異体における顎・咽頭および歯の遺伝子発現

(A, B) 3 日齢の顎・咽頭における *dlx3* 遺伝子の発現領域が *trrap* 変異体で狭くなっていた（赤矢頭）。(C, D) 3 日齢の歯における *dlx2b* 遺伝子の発現が *trrap* 変異体で減弱していた（赤矢印）。(E) *trrap* 変異体では、顎・咽頭の遺伝子の発現領域が狭くなり、歯の遺伝子の発現が減弱しており、それらの遺伝子発現の変動が顔面の形態の異常と関連していると考えられた。*trrap* 遺伝子破壊ゼブラフィッシュは、ヒト *TRRAP* 遺伝疾患に対する良い疾患モデルになりうると考えられる。

[用語説明]

CRISPR/Cas9 法 : ゲノム編集技術の一つで標的ゲノム部位に DNA 二重鎖切断を誘導できる。その後引き起こるゲノム修復の過程において高頻度で挿入・欠失変異が導入されることで効率よく標的遺伝子が破壊される。

ミスセンス変異 : アミノ酸は三つ組の塩基配列 (コドン) の並びで規定されるが、そのコドンの中に起こった置換によって異なるアミノ酸に変換される変異をミスセンス変異という。

***trrap* (transformation/transcription domain-associated protein) 遺伝子** : ヒストン・アセチルトランスフェラーゼ複合体の構成分子の一つで、様々な遺伝子の発現の調節に関与すると考えられている。

[論文に関する情報]

Involvement of the zebrafish *trrap* gene in craniofacial development

Taichi Suzuki, Yo Hirai, Tomoko Uehara, Rie Ohga, Kenjiro Kosaki, Atsuo Kawahara

Scientific Report, 2021

<https://www.nature.com/articles/s41598-021-03123-z>

[特許] 本研究で作製した *trrap* 遺伝子破壊ゼブラフィッシュに関して特許を申請しています (特願 2021-145821)。

[本研究の特色]

鈴木太智 山梨大学医学部医学科 2 年生

平井陽 山梨大学医学部医学科 6 年生

※学部の学生がこの研究の中で重要な役割を担ったことも本研究の特色です。

<研究についての問い合わせ先>

山梨大学大学院総合研究部発生活生物学

教授 川原 敦雄 (かわはら あつお)

TEL : 055-273-9375

e-mail : akawahara@yamanashi.ac.jp

<広報についての問い合わせ先>

山梨大学総務部総務課広報企画室

TEL : 055-220-8005, 8006 FAX : 055-220-8799

E-mail: koho@yamanashi.ac.jp