

## 博士論文（要約）

良性成人型家族性ミオクローヌスてんかん(BAFME)に  
おける伸長リピート配列がもたらす病態機序の検討

三枝 亜希

良性成人型家族性ミオクローヌステんかん(Benign adult familial myoclonic epilepsy: BAFME)とは、皮質振戦と呼ばれる振戦様の微細なミオクローヌスと数年  
に一度の低頻度の全般性てんかんを主症状とする常染色体優性遺伝性疾患である。  
多くは若年成人以降に皮質振戦で発症し、加齢とともに皮質振戦は増悪する。  
*SAMD12*(chr 8)、*RAPGEF2*(chr 4)、*TNRC6A*(chr 16)、*MARCH6*(chr 5)、  
*STARD7*(chr 2)、*YEATS2*(chr 3)の intron の TTTTA/TTTCA repeat の異常伸長、  
が原因変異として報告されている。別々の遺伝子のイントロンに存在する同じリピ  
ートモチーフの伸長変異が同様の疾患を引き起こすことから、それぞれの遺伝子の  
機能というよりも、リピート伸長変異そのものが病態に強く関わると思われてい  
る。特に、健常者では TTTTA repeat の異常伸長を有するものもある一方で、  
TTTCA リピートの異常伸長を示すものは見いだされていないことから、TTTCA  
の異常伸長が病態に関与していると考えられている。また、興味深いことに、  
BAFME では複数の別の遺伝子に存在する同じ TTTCA repeat の異常伸長が同じ症  
状を来すことが特徴的であり、TTTCA repeat 自体が病態機序に関与しており、  
Repeat motif–phenotype correlation があると考えられている。しかし、TTTCA  
repeat の異常伸長がどのように病態に関与しているのかはまだわかっていない。

一般的なリピート配列の異常伸長の病態機序として、翻訳領域のリピート伸長に  
よって生じる疾患においては、リピートの異常伸長から産生されるポリペプチドが  
細胞内に蓄積することによる細胞毒性が考えられている。非翻訳領域のリピートの異

常伸長によって生じる疾患では、転写された RNA 分子の細胞内における異常凝集 (RNA foci)、RNA の二次構造が疾患特異的に RNA binding proteins (RBPs) を取り込み、正常な働きを阻害する RNA sequestration などの RNA gain of function の機序や、リピートの異常伸長により転写障害が起こり遺伝子の発現が抑制される loss of function の機序が考えられてきた。しかし 2011 年にリピートの異常伸長から ATG によらないタンパク質の翻訳 (Repeat-associated non-ATG ;RAN translation) が起こっていることが報告され、RAN translation により産生される様々な RAN protein がリピートの異常伸長を原因とする疾患において病態機序に関わっている可能性があることがわかってきた。しかし、RAN translation の先行研究は CAG repeat や CGG repeat、GGGGCC repeat といった GC rich なリピートでの報告であり、AT rich なリピート配列での RAN translation の報告は未だない。

本邦に多い *SAMD12* のリピート伸長変異による BAFME1 型においては、病理学的にはホモ接合性症例においてはプルキンエ細胞の減少の報告はあるものの、ヘテロ接合性症例においては明らかな病理学的変化は見いだされない。欧米で認められる BAFME3 型においてはプルキンエ細胞の減少が指摘されているものの、特異的な萎縮や凝集体の存在などは明らかでない。一方、BAFME1 型においては、先行研究では TTTCA repeat の transcript が RNA foci を形成していることが報告されている。RNA foci が確認されていることから筋強直性ジストロフィー 1 型で見られ

たような RNA 結合タンパクを介した病態機序の可能性も考えられるが、BAFME のような AT rich な配列のリピート伸長病においては RAN translation についてはほとんど調べられていない。

更なる病態機序解明のため、BAFME 患者における *SAMD12* の発現量の検討を行うとともに *SAMD12* におけるリピート伸長変異による RAN translation の有無を検討することとした。

今回、BAFME 患者 10 症例(ホモ接合性変異 2 症例、ヘテロ接合性変異 2 症例)、健常 TTTTA repeat 伸長異常保有者 10 症例、正常コントロール 10 症例のリンパ芽球様細胞から RNA を抽出し、qRT-PCR で *SAMD12* の発現量を比較した。今回の検討では正常コントロールと比較して *SAMD12* の transcript の発現量に有意差は認められなかった。先行研究においても BAFME 患者の剖検脳での *SAMD12* の発現量の変化は見られておらず、今回も同様であった。また、先行研究で用いた BAFME 患者 6 症例(ホモ接合性変異 1 症例、ヘテロ接合性変異 5 症例)の脳、BAFME 患者 6 症例(ホモ接合性変異 2 症例、ヘテロ接合性変異 4 症例)のリンパ芽球様細胞の RNA-seq のデータを再解析し、*SAMD12* 全体の発現量の検討を行った。脳では BAFME 患者において *SAMD12* の exon 1-4、intron 4 の TTTTA/TTTCA repeat 上流の発現量の増加を認めた。リンパ芽球様細胞では exon 1-4 の発現量が多い傾向はあったが有意差は認めなかった。リンパ芽球様細胞では intron 4 の TTTTA/TTTCA repeat 上流についてはコントロールに比して発現量の増

加は認められず、transcriptional abortion が脳でのみ起こっていることを反映している結果と考えられた。

この結果からは、BAFME ではハプロ不全 (loss of function)の関与は大きくないと考えられ、gain of function の機序に着目し、特に BAFME1 型における RAN translation の関与について検討を行うこととした。

まず RAN protein が発現した際に EGFP の蛍光により確認できる様にするため、pEGFP-N1 ベクターを用いてコンストラクトを作成した。RAN translation の翻訳開始機序は未だ分かっていない点も多く、様々な場所から翻訳が開始されると考えられている。また、同一のリピート配列から読み枠の違いで複数の翻訳開始機序があることが想定されている。今回は pEGFP-N1 ベクターの CMV promoter と multiple cloning site (MCS)の間に全てのフレームで2つのストップコドン

(6xstops) を配置し、MCS の下流の EGFPに関しては、EGFP直上のスタートコドン を消去すると同時に、3つの frame で EGFP が発現する様に塩基の挿入を行い、6xstops-pEGFP\_0,-1,-2 を作成した。

実験系の検証には先行研究において RAN translation の報告のある Huntington disease の原因遺伝子変異である *HTT* の exon1 の CAG repeat を MCS に挿入し、6xstops-pEGFP\_0,-1,-2\_HTT(CAG105)を作成してそれぞれの plasmid を HEK293 細胞に transfection し、蛍光顕微鏡で確認後 total protein を抽出し、抗 GFP 抗体を用いて western blot analysis で検証した。本来のスタートコドン ATG の下流の

polyQ については発現が確認され、スタートコドン を消去すると polyQ の発現が認められなかった。しかし、polyA, polyS フレームについては、6xstops の下流に ATG コドンは存在しないものの、EGFP の発現が確認され、RAN translation が生じていることを確認した。

次に、BAFME の原因遺伝子変異である *SAMD12* の TTTTA/TTTCA repeat を 6xstops-pEGFP\_0,-1,-2 の MCS に挿入し、6xstops-pEGFP\_0, -1, -2\_SAMD12 (TTTTA65/TTTCA70) を作成した。この plasmid を用いて BAFME における RAN protein の発現の有無を検討した。これらの plasmid を HEK293 細胞に transfection し、蛍光顕微鏡で確認後 total protein を抽出し、抗 GFP 抗体を用いて western blot analysis で検証したが、TTTTA/TTTCA repeat の異常伸長から RAN protein を示すようなシグナルは認められなかった。

今回は BAFME1 型における、TTTTA/TTTCA repeat 伸長異常の病態機序への関与について検討した。定量 RT-PCR 並びに RNA-seq の解析からは、BAFME1 型患者において *SAMD12* の発現は大きくは減じていないと考えられた。一方で、*in vitro* の検討で、RAN translation が生じているとする証拠は得られなかった。これまで、AT rich なリピート伸長による疾患において RAN translation を検討した報告はなく、AT rich な repeat では GC rich なリピートのように高次構造を取りにくい ため、RAN translation が起こりにくい可能性を考えた。さらに長いリピート長を用いた検討や、他細胞種での RAN translation の検討、生体内での RAN protein

の直接評価については今後の課題であるが、今回の結果からは、**BAFME1** においては **RAN translation** よりも **RNA 毒性**の病態機序の関与をより示唆するものと考えられ、**BAFME** の病態機序における有益な知見であると考えられた。