

博士論文（要約）

多系統萎縮症の疾患関連遺伝子 *COQ2* における変異の  
機能解析と新たな疾患関連遺伝子の探索

安田 勉

多系統萎縮症(MSA)は自律神経症状に加えてパーキンソニズム、小脳失調や錐体路徴候等々を認める神経変性疾患である。大多数の MSA は孤発性である。日本人の有病率は 10 万人あたりおよそ 19.9 人程度と思われる。日本における平均発症年齢は 55.4~60 歳程度と考えられている。発症から ADL がベッド上になるまで平均で 6 年、平均生存期間は 6-9.8 年程度とされており、予後の良い疾患ではないと言える。

MSA は一般的に孤発性の疾患と考えられているが、MSA 多発家系 6 家系中 2 家系に *COQ2* の 2 アレル変異が認められ、また孤発性 MSA 患者で *COQ2* 変異キャリアの頻度が有意に高いことから *COQ2* は MSA の疾患関連遺伝子と同定された。MSA 症例において最も多く認める変異は V393A である。V393A 以外は頻度が非常に低いため個別には疾患関連の検討が困難であり、*COQ2* の機能解析が必要となる。今まで human *COQ2* (*hCOQ2*) cDNA 変異体で形質転換した *coq2* 欠損酵母の非発酵培地における成長率比較が行われた。これは *COQ2* 変異による機能障害から呼吸効率が落ち、延いては成長率が低下するという考えに基づいていた。

これにより一部の変異は機能障害性であることが確認された。しかし、日本人孤発性 MSA 患者で最も多く認めた V393A に関しては V393A *hCOQ2* cDNA で形質転換された酵母の成長率はコントロールと比較して低下しておらず、機能障害性と位置づけることができなかった。以上のことから一部の変異に関しては酵母の成長率比較による機能解析では十分に差が検出できていないと考えられた。そこで酵母を用いた高感度の機能解析が有用と思われた。

また、MSA 患者において *COQ2* 変異を認める症例が MSA 患者の一部であることを考えるとすべての MSA 患者の疾患原因を *COQ2* 変異だけで説明するのは困難である。そこで、両親が従兄弟婚の孤発性 MSA 患者に着目した。常染色体劣性遺伝(AR)を想定して連鎖解析とエクソーム解析に基づく遺伝学的検討を行った。

## 第一章 酵母を用いた *COQ2* 変異の機能解析

*COQ2* の翻訳産物である parahydroxybenzoate-polyprenyl transferase は CoQ10 の生合成に不可欠であり、CoQ10 は好気呼吸の際、ミトコンドリア内の電子伝達系における complex I と complex II から complex III への電子の運搬を担っている。*COQ2* の変異によって好気呼吸の低下が考えられ、それによる酸素消費速度(oxygen consumption rate: OCR)の低下が予想された。このことに着目して *hCOQ2* cDNA で形質転換した *coq2* 欠損酵母を用いた OCR の比較による機能解析を行った。この際、培地に非発酵培地を使用することにより酵母は発酵による ATP 産生ができず、好気呼吸による ATP 産生に依存することになる。また、ヒトの野生型 *COQ2* cDNA で *coq2* 欠損酵母を形質転換すると酵母の *COQ2* が代替されることは Forsgren により報告されている。

Human Placenta Total RNA の RT-PCR により *hCOQ2* cDNA(wt)を作成、pTA2 plasmid にサブクローニングした。この *hCOQ2* cDNA(wt)は全長 1266bp で最初の ATG codon を含んでいる。MSA 症例で認められた様々な *COQ2* 変異に関して、部位特異的変異導入を利用して対応する *hCOQ2* cDNA(mutant)を作成した。次に *hCOQ2* cDNA(wt/mutant)を酵母が利用できる

ベクター pAUR123 にサブクローニングし、これを pAUR123-*hCOQ2*(wt/mutant)とした。pAUR123-*hCOQ2*(wt/mutant)で酵母 (BY4741 $\Delta$ coq2) を形質転換した。

様々な *COQ2* 変異が導入された pAUR123-*hCOQ2* で形質転換された酵母の OCR を観察する目的で XFe24 Extracellular Flux Analyzer を用いて OCR を測定した。酵母  $1.0 \times 10^5$  cell を YPGA 培地 600  $\mu$ l ごと XF24 Cell Culture Microplate の well に植菌した。この YPGA 培地は発酵のできない培地であり、ATP 産生は好気呼吸に依存する。Flux Analyzer の温度を 30°C、混合時間 1 min、待機時間 1 min、測定時間を 2 min に設定し、計測した。

OCR の測定の精度を確認するために pAUR123-*hCOQ2*(wt)で形質転換された酵母を様々な個数( $0.5 \times 10^5$  から  $4.0 \times 10^5$ )で測定した。次に、pAUR123-*hCOQ2*(mutant)で形質転換された酵母の OCR を pAUR123-*hCOQ2*(wt)で形質転換された酵母の OCR の平均と比較した。平均値の比較には one-way ANOVA と Tukey の方法を用いた。  $P < 0.05$  を有意差有りとした。 $0.5 \times 10^5$  から  $4.0 \times 10^5$  cell/well において酵母の数と OCR は良く相関した ( $R^2=0.9998$ )。pAUR123-*hCOQ2*(mutant)で形質転換された酵母の OCR は pAUR123-*hCOQ2*(wt)に比べてすべて有意に低下していた。

OCR 測定の結果は V393A の変異が機能障害性であることを示し、成長率比較では検出できなかった wild-type と V393A における差を検出することが可能だった。本実験により様々な *COQ2* 変異が機能障害性であることを示すことができた。また、本実験により Flux Analyzer による *COQ2* の新たな機能解析系を確立した。

## 第二章 多系統萎縮症の新たな疾患関連遺伝子の探索

新たな関連遺伝子を探索する目的で当科が関わっている MSA 大規模リソースにて収集した両親に従兄弟婚を認める MSA 孤発症例 20 例に着目した。これらの症例は両親が従兄弟婚であるためホモ接合性変異が集積しやすく、いずれの症例も累代発症が無いことから常染色体劣性 (AR) 遺伝形式を疑った。両親に従兄弟婚を認める MSA 症例に関して、AR 遺伝形式を想定して連鎖解析とエクソーム解析を行い、症例間で共通するようなホモ接合性の変異を持つ遺伝子に注目することで新たな疾患関連遺伝子の探索を行った。

連鎖解析は Genome-Wide Human SNP Array 6.0 を用いて MSA 発症者 20 人、非発症者 12 人の SNP typing を行った。パラメトリック多点 LOD スコアと HLOD スコアは AR モデルを想定(疾患アレル頻度  $10^{-3}$ 、浸透率 1.0)して SNP HiTLink と Allegro 2.0 を用いて計算した。1.0 を越える HLOD 領域を 7 箇所認め、もっとも高い HLOD は 1.8 で 19 番染色体上に認めた。この領域は 6 つの家系で LOD スコア陽性となった。同部位は範囲にしておよそ 20 Mbp であり、367 遺伝子を含んでいる。一方で累積パラメトリック多点 LOD スコアが陽性となる領域は認めず、遺伝的異質性が示唆された。

エクソーム解析のシーケンシングは Hiseq 2500 で行った。得られた配列は BWA を用いて GRCh37/hg19 にマッピングし、SAMtools を用いて変異を抽出した。新しい MSA 関連遺伝子を探索する上で両親が従兄弟婚の AR 遺伝形式を想定して以下の全ての条件に合う変異を抽出

した。①アミノ酸変化をもたらす変異、あるいはスプライスサイトに存在する変異であり、②HGVD、ExAC、ExAC East Asian、当科コントロール(1148 症例)のすべてにおいてアレル頻度が 1%未満であり、③SAMtools の base call quality value が 30 より大きい、④ホモ接合性である。これらの条件を満たす変異を持つ遺伝子が複数症例で認められた場合に特に注目した。

両親に従兄弟婚を認める日本人 MSA 20 症例において前述の変異を抽出する条件①～④の条件を満たす変異を合計 247 個認めた。そのうち 6 遺伝子は 2 症例に共通していた。直接塩基配列決定法でそれぞれの変異の有無を確認したところ 3 遺伝子、5 変異が最終的に残った。

このうち、当科日本人コントロール 721 症例にて AR 遺伝形式に合致する変異を認めなかったのは A 遺伝子一つであり、A 遺伝子を候補遺伝子と考えた。今回の解析で日本人孤発性 MSA 591 症例において A 遺伝子に二つ以上の変異を持つ症例を認めなかったが、今後解析規模が大きくなった際には期待が持てるかもしれない。

どの *COQ2* 変異が機能障害性であるかを見極める上で、感度の高い機能解析法が必要であった。本研究で確立した酵母を用いた OCR 比較による *COQ2* 変異の機能解析は酵母の成長率比較では検出できなかった差を検出することが可能であり、機能障害性の判定としてより望ましいと思われる。MSA 多発家系は極めてまれであり、多発家系の解析のみでは新たな関連遺伝子が同定できなかった。新しい手法として大規模リソースから従兄弟婚家系を抽出して網羅的に遺伝学的解析を行った。この手法により新たに A 遺伝子を MSA に関連する候補遺伝子と同定した。これを手掛かりにさらに症例を蓄積し、検討を進めたい。