

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月18日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790823

研究課題名（和文） 劣性型脊髄小脳変性症の遺伝子単離研究

研究課題名（英文） Isolation of causative genes for recessive spinocerebellar ataxia

研究代表者

土井 宏 (DOI HIROSHI)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：10326035

研究成果の概要（和文）：常染色体劣性遺伝性小脳失調症（ARCA）は常染色体劣性遺伝性を示し、臨床的に運動失調症状を示す不均一な疾患の総称である。今回日本人 ARCA の3家系を経験について、ホモ接合性マッピング・連鎖解析と次世代シーケンサーを使用したエクソーム解析を併用し、その疾患責任遺伝子の同定を試みた。その結果、1家系において Synaptotagmin XIV 遺伝子（*SYT14*）のホモ接合性変異が ARCA の新規疾患責任遺伝子であることを同定した。本研究に用いた方法により小規模な家系においても疾患責任遺伝子同定が可能なことを示した。

研究成果の概要（英文）：Autosomal recessive cerebellar ataxias (ARCA) are heterogeneous disorders clinically associated with cerebellar ataxias. In this study, we performed the whole exome sequencing analysis combined with homozygosity mapping and linkage analysis, to identify causative mutations from three Japanese families of ARCA. As a result, a homozygous missense mutation in *SYT14*, encoding synaptotagmin XIV, was identified in one of the families. We showed that the above methods could successfully identify a causative mutation from small family.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：神経内科学

科研費の分科・細目：若手研究（B）

キーワード：脊髄小脳変性症、エクソーム、常染色体劣性遺伝

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症 Spinocerebellar Ataxia (SCA) は、およそ 60%は孤発性、30-40%は優性遺伝性、数%が劣性遺伝性である。優性

型においては連鎖解析およびポジショナルクローニングといった遺伝学的解析が極めて有効で当時、少なくとも遺伝学的に異なる28種類のSCA（SCA30まで分類）が明らかに

なりとそのうち 16 の責任遺伝子が単離され (Carlson KM et al., Curr Opin Genet Dev 19, 247-253, 2009)、本邦においても約 9 割の患者で既知の原因遺伝子に変異を持つことが明らかにされていた (Nozaki H et al., Mov Disord 22, 857-862, 2007)。一方、常染色体劣性遺伝性小脳失調症 (ARCA) では 20 種類以上の責任遺伝子が同定されており、欧米諸国においては Friedrich 失調症の頻度が最も高いが約半数の患者で原因遺伝子が不明との疫学調査があった。本邦においては Friedrich 失調症の報告例はなく、欧米諸国とは原因遺伝子の構成は異なるが欧米同様、原因遺伝子の判明していない ARCA 患者が数多く存在すると推定されていた。しかし ARCA は頻度が少なく、小家系しか得られないことが多かったため、これまでの方法では解析が困難であった。今回 SCA の劣性遺伝性家系 3 例を経験した。近年発達した高密度 SNP アレイを用いたホモ接合性マッピングにより遺伝子局在部位を明らかにし、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を併用することにより、責任遺伝子単離が可能ではないかとの仮定に基づき研究を開始した。

## 2. 研究の目的

今回血族婚を伴う日本人家系に見られた高齢発症の ARCA3 家系を経験したのでその疾患責任遺伝子の同定することを目的として研究を開始した。以下、原因遺伝子が同定可能であった精神発達遅滞を伴う高齢発症の ARCA 兄弟例についての研究方法、結果について述べる。

## 3. 研究の方法

### 症例

信州大学医学部附属病院で臨床的に SCA と診断された 2 症例を有する日本人 1 家系を対象にした (図 1)。合計で 2 名の SCA 症例 (IV-3、

IV-4) と 3 名の非罹患者 (III-1、IV-1、IV-2) より末梢血白血球からゲノム DNA を抽出し解析に用いた。本研究は横浜市立大学および信州大学の倫理委員会の承認を得て行った。

### ホモ接合性マッピングおよび連鎖解析

Affymetrix 社の Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (6.0 アレイ) を用いて全ゲノム SNP タイピングを施行 (東京大学神経内科との共同研究) し、そのデータをもとに HomozygosityMapper (Seelow, D. et al., Nucleic Acids Res 37, W593-599, 2009.) を用いてホモ接合性マッピングを施行、罹患者に共通するホモ接合領域を同定した。さらに 6.0 アレイデータから Linkdatagen (Bahlo, M. et al., Bioinformatics 25, 1961-1962, 2009. The Walter and Eliza Hall Institute, Australia) で情報性の高い SNP を抽出し、抽出した SNP 情報をもとに Allegro version 2 ソフトウェアを使用して多点連鎖解析を行って、常染色体劣性遺伝形式および X 染色体劣性遺伝形式を想定し LOD スコアを算出した。次世代シーケンサーによるエクソーム解析

IV-3 および IV-4 のゲノム DNA 3  $\mu$ g に対し Agilent Technologies 社 SureSelect Human All Exon Kit v.1 を用いたエクソームキャプチャーを行い、Illumina 社次世代シーケンサー-GAIIx を用いて解析した。得られた配列は Mapping and Assembly with Qualities (MAQ) と NextGENe software v2.00 (SoftGenetics 社) を用いて解析した。同定した変異については、ダイレクトシーケンス法で変異の存在を確認した。日本人正常コントロールの解析においては変異を含む領域について High resolution melt 法で変異の有無をスクリーニングし、変異を持つことが疑われた検体については、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。

SYT14 の発現解析には TaqMan™ 定量 PCR 法

を行い、テンプレートとしては成人組織別、胎児組織別、マウス組織別 cDNA（以上 Clontech 社）、マウス脳部位別 cDNA（日本ジェネティクス株式会社）を使用した。発現量は Rotor-Gene Q Series Software (QIAGEN 社)を用いて  $2^{-\Delta \Delta C_t}$  法で相対的に定量化した。培養細胞免疫染色、マウス凍結切片およびヒトパラフィン切片の組織免疫染色は標準的な方法で免疫染色を行った。蛍光染色した切片は共焦点顕微鏡で観察した。ヒトパラフィン切片では Vectastain ABC kit (Vector Laboratories) を使用し抗体を検出した。

#### 4. 研究成果

ホモ接合性マッピングでは 3 領域、11.35Mb が候補領域として同定された (表 1)。非罹患者を含めた連鎖解析においても同領域は候補領域として矛盾しないことを確認した。エクソーム解析データについては表 2 のように同定されたすべての変異 (Total variants) から SNP データベース登録のあるものを除外し、その中からアミノ酸変化を伴うホモ接合性変異を選び出したところ 2 種類に候補が絞られ、サンガー法によるシーケンスでも IV-3、IV-4 においてホモ接合、III-1、IV-1、IV-2 においてヘテロ接合性変異として認められたのは synaptotagmin XIV 遺伝子 (*SYT14*) の変異 c.1451G>A (p.Gly484Asp) のみであった。よって *SYT14* が唯一の疾患責任遺伝子の候補として同定された。

表 1

Chr	Chromosomal position (rsID)	Size (Mb)
1	207226930 (rs2761781) - 213992561 (rs1857229)	6.77
4	181929079 (rs918401) - 185188999 (rs7690914)	3.26
22	45676443 (rs3905396) - 47003473 (rs2013591)	1.33

表 2

	IV-3		IV-4	
	MAQ	NexGENe	MAQ	NexGENe
Total variants	102,033	66,469	200,735	69,239
SNP登録 (dbSNP130) なし	21,096	28,753	42,128	29,927
ホモ接合性変異	3,332	11,890	7,892	11,787
タンパク質翻訳領域*	314	364	367	412
アミノ酸変化を伴う	85	222	123	262
候補領域内	2	2	2	2
サンガー法による Segregation の確認	1	1	1	1

本家系で認めた *SYT14* 変異は、SYT14 の機能ドメインである C2B ドメイン上に存在し、ハエからヒトまで進化的に高度に保存されたアミノ酸の変化であり、また異なる変異効果予測ソフト (polyphen、polyphen2、SIFT、Align GVGD) で一貫して病的変異であると予測された。同変異は正常日本人 576 クロモソームの解析では認められなかった。X 染色体劣性遺伝形式を想定した候補領域内には病的な変異が検出されなかった (データ省略)。以上から *SYT14* 変異は本家系にみられた ARCA の原因として矛盾しないと考えた。

TaqMan 定量 PCR 法では、*SYT14* の mRNA 発現はヒト組織では成人、胎児とも脳で強いことを確認し、マウスの脳においても *Syt14* の mRNA が発現しており、その発現は小脳に強いことを確認できた (図 2)。

COS1 細胞を用いた強制発現系 (図 3) では野生型 SYT14 は主として核近傍で小胞体 (ER) マーカー PDI (protein disulfide isomerase : 赤) と共染し細胞膜近傍顆粒状構造は PDI とは共染しないが、p.Gly484Asp 変異型 SYT14 は (下段、緑) の大部分は PDI とは共染することから、変異型では ER からの輸送が障害されており、ER に蓄積していることが示唆された。抗 SYT14 抗体 (今回の研究のために作成) を用いた免疫染色をマウス小脳凍結切片 (図 4 上段、抗 SYT14 抗体は緑色にラベル)、ヒトパラフィン切片 (図 4 下段、左は事前に SYT14 の抗原ペプチドと反応させた抗体を使用したもの) に対して行ったところ、SYT14 がマウスおよびヒトにおいて

プルキンエ細胞に発現していることが確認できた。この結果からも *SYT14* 変異が小脳障害の原因となりうることが傍証され、ARCA の疾患責任遺伝子であることが強く示唆された。

図 1

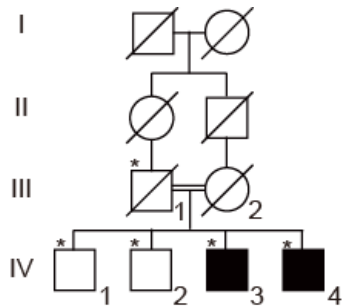


図 2

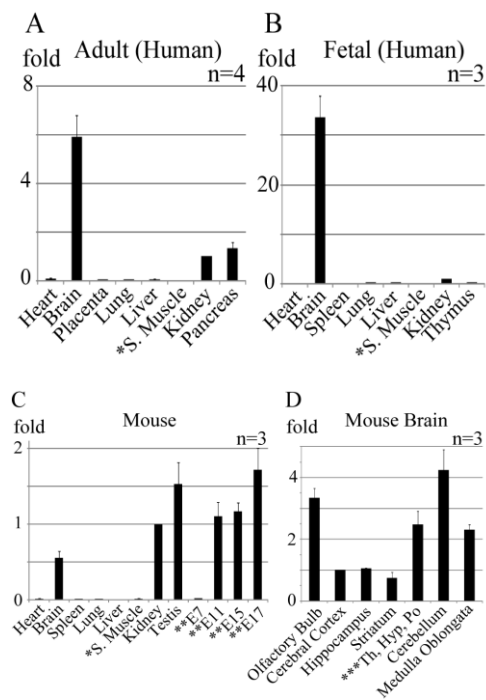


図 3

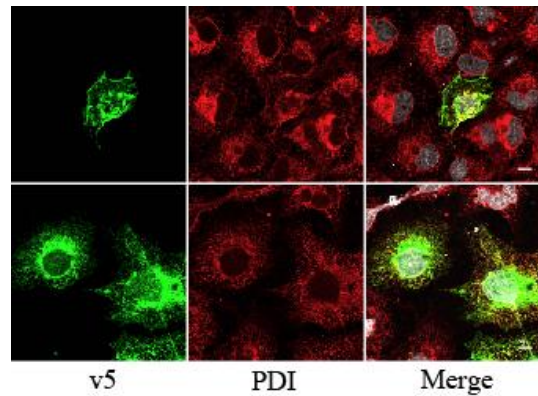
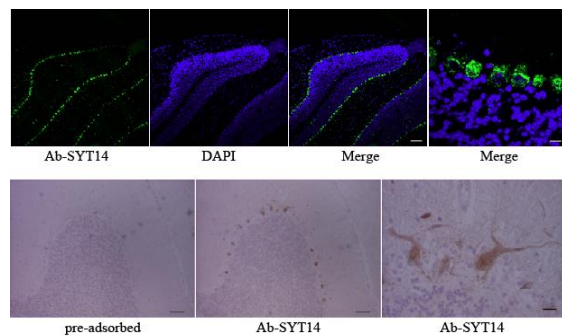


図 4



本研究では、SNP タイピングを用いたホモ接合性マッピング・連鎖解析とエクソーム解析を併用することにより小規模な家系から疾患候補遺伝子を絞り込むことが可能であることを示した。*SYT14* は分泌小胞の膜タンパクであると考えられるため、今回の発見により分泌小胞、膜輸送系の障害が神経変性疾患を発症する新しい機序となりうることを示され、脊髄小脳変性症さらには精神運動発達遅滞の発症機構の理解がさらに進むと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 17 件)

- ① Tsurusaki Y, Kosho T, Hatasaki K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N, Exome sequencing in a family with an X-linked lethal malformation syndrome: clinical consequences of hemizygous truncating *OFD1* mutations in male patients, *Clin Genet*, 査読有, 2012, in press, DOI: 10.1111/j.1399-0004.2012.01885.x
- ② Tsurusaki Y, Okamoto N, Ohashi H, Kosho T, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kaname T, Naritomi K, Kawame H, Wakui K, Fukushima Y, Homma T, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Mizuno S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Shiina M, Ogata K,

- Ohta T, Niikawa N, Miyatake S, Okada I, Mizuguchi T, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N, Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome, *Nat Genet*, 査読有, 2012, 44 巻, 376-378, DOI: 10.1038/ng.2219
- ③ Miyatake S, Miyake N, Touho H, Nishimura-Tadaki A, Kondo Y, Okada I, Tsurusaki Y, Doi H, Sakai H, Saitsu H, Shimojima K, Yamamoto T, Higurashi M, Kawahara N, Kawachi H, Nagasaka K, Okamoto N, Mori T, Koyano S, Kuroiwa Y, Taguri M, Morita S, Matsubara Y, Kure S, Matsumoto N, Homozygous c.14576G>A variant of *RNF213* predicts early-onset and severe form of moyamoya disease, *Neurology*, 査読有, 2012, 78 巻, 803-810, DOI: 10.1212/WNL.0b013e318249f71f
- ④ Yoneda Y, Saitsu H, Touyama M, Makita Y, Miyamoto A, Hamada K, Kurotaki N, Tomita H, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Ogata K, Naritomi K, Matsumoto N, Missense mutations in the DNA-binding/dimerization domain of NFIX cause Sotos-like features, *J Hum Genet*, 査読有, 2012, 57 巻, 207-211, DOI: 10.1038/jhg.2012.7
- ⑤ Kondo Y, Saitsu H, Miyamoto T, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Ryoo NK, Kim JH, Yu YS, Matsumoto N, A family of oculofaciocardiodental syndrome (OFCD) with a novel *BCOR* mutation and genomic rearrangements involving NHS, *J Hum Genet*, 査読有, 2012, 57 巻, 197-201, DOI: 10.1038/jhg.2012.4
- ⑥ Saitsu H, Kato M, Shimono M, Senju A, Tanabe S, Kimura T, Nishiyama K, Yoneda Y, Kondo Y, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N, Association of genomic deletions in the *STXBP1* gene with Ohtahara syndrome, *Clin Genet*, 査読有, 2012, 81 巻, 399-402, DOI: 10.1111/j.1399-0004.2011.01733.x
- ⑦ Sakai H, Suzuki S, Mizuguchi T, Imoto K, Yamashita Y, Doi H, Kikuchi M, Tsurusaki Y, Saitsu H, Miyake N, Masuda M, Matsumoto N, Rapid detection of gene mutations responsible for non-syndromic aortic aneurysm and dissection using two different methods: resequencing microarray technology and next-generation sequencing, *Hum Genet*, 査読有, 2012, 131 巻, 591-599, DOI: 10.1007/s00439-011-1105-7
- ⑧ Yoneda Y, Haginoya K, Arai H, Yamaoka S, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Yokochi K, Osaka H, Kato M, Matsumoto N, Saitsu H, De novo and inherited mutations in *COL4A2*, encoding the type IV collagen  $\alpha 2$  chain cause porencephaly, *Am J Hum Genet*, 査読有, 2012, 90 巻, 86-90, DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.11.016
- ⑨ Saitsu H, Osaka H, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N, A girl with early-onset epileptic encephalopathy associated with microdeletion involving *CDKL5*, *Brain Dev*, 査読有, 2012, 34 巻, 364-367, DOI: 10.1016/j.braindev.2011.07.004
- ⑩ Doi H, Yoshida K, Yasuda T, Fukuda M, Fukuda Y, Morita H, Ikeda S, Kato R, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Sakai H, Miyatake S, Shiina M, Nukina N, Koyano S, Tsuji S, Kuroiwa Y, Matsumoto N, Exome sequencing reveals a homozygous *SYT14* mutation in adult-onset, autosomal-recessive spinocerebellar ataxia with psychomotor retardation, *Am J Hum Genet*, 査読有, 89 巻, 2011, 320-327, DOI:10.1016/j.ajhg.2011.07.012
- ⑪ Saitsu H, Osaka H, Sugiyama S, Kurosawa K, Mizuguchi T, Nishiyama K, Nishimura A, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Harada N, Kato M, Matsumoto N, Early infantile epileptic encephalopathy associated with the disrupted gene encoding Slit-Robo Rho GTPase activating protein 2 (*SRGAP2*), *Am J Med Genet A*, 査読有, 2011, in press, DOI: 10.1002/ajmg.a.34363
- ⑫ Saitsu H, Osaka H, Sasaki M, Takanashi J, Hamada K, Yamashita A, Shibayama H, Shiina M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Miyake N, Doi H, Ogata K, Inoue K, Matsumoto N, Mutations in *POLR3A* and *POLR3B* Encoding RNA Polymerase III Subunits Cause an Autosomal-Recessive Hypomyelinating Leukoencephalopathy, *Am J Hum Genet*, 査読有, 2011, 89 巻, 644-651, DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.10.003
- ⑬ Miyake N, Yamashita S, Kurosawa K, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Matsumoto N, A novel homozygous mutation of *DARS2* may cause a severe LBSL variant, *Clin Genet*, 査読有, 2011, 80 巻, 293-296, DOI:

- 10.1111/j.1399-0004.2011.01644.x
- ⑭ Tsurusaki Y, Okamoto N, Suzuki Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N, Exome sequencing of two patients in a family with atypical X-linked leukodystrophy, Clin Genet, 査読有, 2011, 80 巻, 161-166, DOI: 10.1111/j.1399-0004.2011.01721.x
- ⑮ Tadaki H, Saitsu H, Kanegane H, Miyake N, Imagawa T, Kikuchi M, Hara R, Kaneko U, Kishi T, Miyamae T, Nishimura A, Doi H, Tsurusaki Y, Sakai H, Yokota S, Matsumoto N, Exonic deletion of *CASPI0* in a patient presenting with systemic juvenile idiopathic arthritis, but not with autoimmune lymphoproliferative syndrome type IIa, Int J Immunogenet, 査読有, 2011, 38 巻, 287-293, DOI: 10.1111/j.1744-313X.2011.01005.x
- ⑯ Tadaki H, Saitsu H, Nishimura-Tadaki A, Imagawa T, Kikuchi M, Hara R, Kaneko U, Kishi T, Miyamae T, Miyake N, Doi H, Tsurusaki Y, Sakai H, Yokota S, Matsumoto N, De novo 19q13.42 duplications involving *NLRP* gene cluster in a patient with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis, J Hum Genet, 査読有, 2011, 56 巻, 343-347, DOI: 10.1038/jhg.2011.16
- ⑰ Tsurusaki Y, Osaka H, Hamanoue H, Shimbo H, Tsuji M, Doi H, Saitsu H, Matsumoto N, Miyake N, Rapid detection of a mutation causing X-linked leucoencephalopathy by exome sequencing, J Med Genet, 査読有, 2011, 48 巻, 606-609, DOI: 10.1136/jmg.2010.083535

[学会発表] (計2件)

- ① 土井宏、Exome sequencing reveals a novel homozygous mutation in adult-onset autosomal recessive spinocerebellar ataxia with psychomotor retardation、American Society of Human Genetics Annual Meeting 2011、2011/10/14、Montreal、Canada
- ② 土井宏、次世代シーケンサーを用いた常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症責任遺伝子の単離研究、日本神経学会学術大会、2011/5/19、名古屋国際会議場 (愛知県)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

- ①名称: 常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症

の検出方法

発明者: 土井 宏、松本直通

権利者: 横浜市立大学

種類: 特願

番号: 特願 2011-136277

出願年月日: 2011/6/20

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

土井 宏 (DOI HIROSHI)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号: 10326035

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし