

令和 6 年 5 月 11 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19488

研究課題名（和文）ミスセンス変異体の安定性に注目したハイスループット機能評価系の開発

研究課題名（英文）Development of a high-throughput functional evaluation system focusing on the stability of missense variants

研究代表者

才津 浩智（Saitu, Hirotomo）

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：40402838

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、タンパク質の安定性に影響を与えるミスセンスバリエーションの評価を、GFP融合タンパク質の発現によってハイスループットスクリーニングする解析系を確立した。GFP融合ランダム変異体を104クローン作成し、うち24個の蛍光評価とシーケンスをおこなったところ、病的予測スコアが高値の7バリエーションを有するクローンでも蛍光強度が保たれていた。in silicoの病的予測スコアはあくまで参考で、機能評価が重要であることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子解析において、1アミノ酸の置換に過ぎないミスセンスバリエーションは病的意義不明のバリエーションと分類されることが多く、その機能評価が重要な課題となっている。本研究で確立した蛍光強度に基づいたタンパク質安定性のハイスループットスクリーニングは、遺伝子産物でも適用可能であり、かつ特別な機器を必要としない。この挑戦的研究によりProof of Conceptとなる研究成果を得ることで、希少疾患の原因遺伝子においてミスセンス変異タンパク質の安定性データベースが多くの研究者によって構築され、分子構造の理解とバリエーションの解釈に大いに貢献することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established a high-throughput screening analysis system to assess missense variants impacting protein stability by expressing a GFP fusion protein. Upon creating 104 clones of GFP fusion random mutants and conducting fluorescence evaluation and sequencing on 24 of them, we observed that fluorescence intensity remained consistent even in clones harboring 7 variants with high pathological prediction scores. This underscores the notion that in silico pathological prediction scores serve merely as reference points, emphasizing the crucial role of functional evaluation.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：ハイスループットスクリーニング 次世代シーケンス ミスセンス変異体

1. 研究開始当初の背景

多くの遺伝性疾患で次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析が行われている。同定されたバリエーションの病的意義の解釈においては、米国臨床遺伝・ゲノム学会が作成したガイドラインが用いられるが、わずか 1 アミノ酸の置換に過ぎないミスセンスバリエーションは病的意義不明のバリエーションと分類されることが多く、その機能評価が重要な課題となっている。現状ではタンパク質の保存性に注目した *in silico* 解析が主流であるが、あくまで **Supporting evidence** である。変異タンパク質の安定性低下は機能低下の重要な指標の一つであり、網羅的な変異タンパク質安定性解析の開発が重要な課題となっていた。

2. 研究の目的

本研究では以下の 3 つの研究項目により、この課題を克服しうる網羅的変異タンパク質安定性解析の **Proof of Concept** となる研究成果の取得を目指す。

- (1) GFP融合ランダム変異体のハイスループット表現型スクリーニング: 変異体の細胞発現と蛍光強度を指標としたタンパク質安定性評価
- (2) 次世代シーケンスによる変異体の配列決定: ロングリードシーケンスの利点を生かした、多数の変異体のコーディング領域全長の配列決定
- (3) 既知バリエーションデータとの相関の検証: 実験系の有用性を、ClinVarやgnomADといった既知バリエーションデータとの相関に基づいて検証

3. 研究の方法

- (1) GFP 融合ランダム変異体のハイスループット表現型スクリーニング: 当初の計画では、発現ベクターライブラリとして多クローンの混合状態でプラスミド DNA を抽出し、細胞にトランスフェクション後にフローサイトメーターで蛍光強度でグループ分けを行う予定していた。しかし、野生型の GFP-STXBP1 を発現する発現ベクターと顕著な不安定性を有する GFP-STXBP1-Y84D 変異体を発現するベクターを用いて、フローサイトメーターで分取可能か条件検討を行ったところ、2 つのプラスミドを同時にトランスフェクションした場合、同一細胞に同時にトランスフェクションされるため、GFP が陰性である細胞 (Y84D 群) が認められないという結果が得られた。この結果から、トランスフェクションは各クローン別々に行う必要があると考えられた。スループットを上げるために、各クローンのミニプレップは 96 サンプル処理が可能なキットを用いて行い、各クローンの GFP-STXBP1 の発現量を評価後に、抽出した DNA を混合して配列決定を行うこととした。
- (2) 次世代シーケンスによる変異体の配列決定: STXBP1 の cDNA の全長 (1800bp) のシーケンスが可能な MinION (オックスフォードナノポア) で PCR 産物をシーケンスした
- (3) 既知バリエーションデータとの相関の検証: 同定したバリエーションに関して、多型と考えられるバリエーション (ClinVar で **benign/likely benign**、gnomAD・54KJPN のアレル頻度データベースに登録のあるバリエーション) と、病的と考えられるバリエーション (ClinVar で **pathogenic/likely pathogenic**、Human Gene Mutation Database で病的と判断されるバリエーション) が無いか確認し、本研究で得られた蛍光強度のデータと比較した。

4. 研究成果

(1) GFP 融合ランダム変異体のハイスループット表現型スクリーニング

104 個のランダム変異体クローンを単離し、それぞれプラスミド DNA を抽出して HEK293T 細胞にトランスフェクションして蛍光強度を確認したところ、GFP 融合ランダム変異体と IRES で発現する内部標準の DsRed の蛍光強度によって 4 群に分けられた (Type 1 両方発現、Type 2 GFP 減弱、DsRed 発現、Type 3 GFP 発現、DsRed 減弱、Type 4 GFP 発現、DsRed 消失、図 1)。

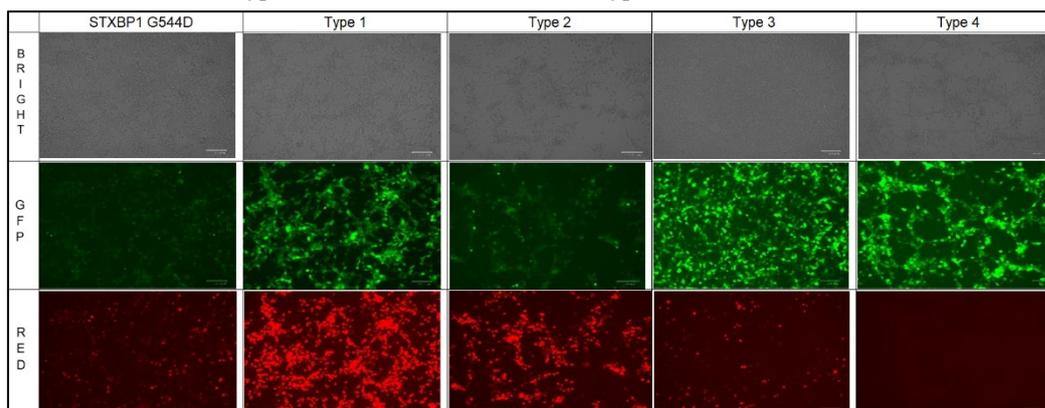


図 1. *STXBP1* ランダム変異体の GFP 蛍光と内部標準の DsRed の蛍光。G544D 変異体は、アミノ酸置換によってタンパク質の安定性が著しく減少することが分かっており (Saitsu et al., *Nat. Genet.* 2008)、本解析でも GFP 蛍光は著しく減少していた。Type 2 では G544D 変異体と同様に、GFP の蛍光が著しく減少しており、タンパク質の安定性に多大な影響を与えるバリエーションと考えられる。一方、Type 1, 3, 4 では GFP 蛍光は保たれており、タンパク質の安定性への影響はすくないと考えられる。

DsRed の減弱および消失は、クローニングに伴い IRES-DsRed に組換えが起こっている可能性が示唆された。しかし、GFP の発現は評価できるため Type 1 (9 クローン) と Type 4 (2 クローン)、および Type 2 (13 クローン) についてロングリードシーケンスを行った。

(2) 次世代シーケンスによる変異体の配列決定:

STXBP1 の cDNA 全長を増幅する PCR 産物に対して、ナノポアシーケンスで配列を決定した (図 2)。IRES-DsRed に組換えが起こっていると予想された Type 4 に関しては、組換えが起こっており、薬剤耐性遺伝子や SV40 プロモーター、F1 オリジンの配列が読まれていた。

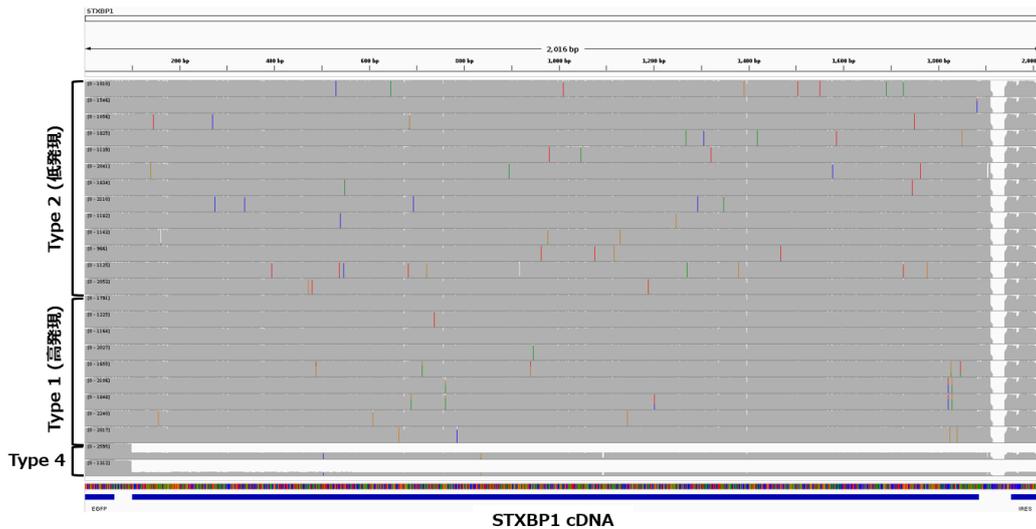


図 2. *STXBP1* ランダム変異体の次世代シーケンスによる配列決定。バリエーションは色がついた縦棒線で表される。

Type 2 は平均変異数が 4.2 で、Type 1 の平均変異数 2 に比べて変異が多い傾向が見られた。Type 1 の 3 クローンは変異がヘテロ接合性にコールされているものもあり、2 クローンの混合である可能性が示唆された (水色ハイライト)。Type 2 ではナンセンス変異やフレームシフト変異も 3 クローンで認められ、蛍光評価と一致する知見が得られた。患者で同定されたバリエーションのデータベースである ClinVar や集団のアレル頻度のデータベースである gnomAD のデータを統合的に解析することで、各クローンでの病的ミスセンス変異が同定されたクローンは 4 クローンあり、合計で 7 クローンにおいて病的変異が同定された (下表の赤字)。興味深いことに終止コドンの変異が 1 クローンあり、*STXBP1* の終止コドンの変異も病的である可能性が示唆

クローン	タイプ	バリエーション数	バリエーション (ナンセンス、フレームシフトは右に記載)	ナンセンス、フレームシフトバリエーション	ClinVar VUS:病的意義不明; LB:おそれる病的意義はない	gnomAD version4 アレル頻度
1	2	8	V144A,L183M,T304S,Q431R S469C,D484V,Y531N,G543R	0	VUS(S469C)	-
2	2	1	X595Q(stop loss)	0	-	-
3	2	4	H16Y,I57I,K196E,R551C	0	VUS(H16Y), LB(I57I), Pathogenic(R551C)	0.00000684105(I57I)
4	2	5	I390N,Y402Y,I440N,T496S,K584R	0	LB(Y402Y)	0.00000205221(Y402Y)
5	2	3	K294M,M316I,I408F	0	LB(M316I)	0.00000120033(M316I)
6	2	4	I14V,Y266N,K493T,E555V	0	VUS(I478A)	0.00000205265(I14V)
7	2	2	A150A,E549V	0	-	-
8	2	5	E59A,S80P,N198N,N398N,N416K	0	VUS(S80P)	-
9	2	2	L147S,I383S	0	-	-
10	2	3	H293R,Y344D	K21Rfs*16	-	-
11	2	4	W288C,D326V,K339K,R457C	0	VUS(D326V),LB(K339K)	0.00000159046(D326V) 0.00000283156(R457C)
12	2	10	Y99F,S146S,S149S,Y195F K208E,V391I,I427S,G543W,N560D	E273Gfs*4	VUS(V391I)	0.00000205223(V391I)
13	2	3	K125E,I127I	K364X	-	-
14	1	0	0	0	-	-
15	1	1	K213I	0	-	-
16	1	0	0	0	-	-
17	1	1	E283K	0	Pathogenic(E283K)	-
18	1	4	L130R,I205V,L281R,K583M	0	-	-
19	1	1	E221G	0	-	0.00000159045(E221G)
20	1	2	D197G,E221G	0	-	0.00000159045(E221G)
21	1	3	I19M,E170G,H349R	0	-	-
22	1	4	A188A,Q229P,P575P,T581A	0	-	-
23	4	1	I135T	0	-	-
24	4	1	K333del	0	-	-

された。

(3) 既知バリエーションデータとの相関の検証: Type 1 には、PolyPhen2 や Alphasense, REVEL スコアといった病的予測スコアが高値の 7 変異が含まれており、*in silico* の病的予測スコアはあくまで参考で、機能評価が重要であることが改めて確認された。ClinVar で pathogenic と登録がある R551C バリエーションは GFP が減弱している Type 2 であり、実験データと一致していた。しかし、一方で、Pathogenic で ClinVar に登録のある E283K は GFP 蛍光が保たれている Type I であった。E283K バリエーションが報告されている論文を確認すると (Carvill et al., Neurology 2014)、それまで報告されていた最重症の太田原症候群でなく (乳児期発症)、11 歳で退行を示した Dravet 症候群症例であった。明らかに表現型が違っており、タンパク質の安定性もある程度保たれている可能性が考えられた。これらを区別するためには蛍光強度の正確な計測が必要である。計画では、内部標準の DsRed で補正して GFP を定量する予定であったが、組換え等があり、DsRed の蛍光強度が安定しなかった。IRES でなく 2A ペプチドを用いたバイシストロニック発現を行うか、別にプロモーターをつけて DsRed を発現させる必要性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中島 光子 (Nakashima Mitsuko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関