

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670275

研究課題名(和文)ミトコンドリア病遺伝子診断キットの開発を目的とした網羅的病因遺伝子検索法の開発

研究課題名(英文)The utility of targeted exome sequencing for mitochondrial disorders

研究代表者

松島 雄一 (Matsushima, Yuichi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20571342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア病の病因遺伝子はミトコンドリアDNAコードと核DNAコードの遺伝子に大別され、核DNAの病因遺伝子は100を超えその数は今も増え続けている。これら既報の核DNAの病因遺伝子及び遺伝子機能等から予測される候補遺伝子の計776遺伝子を選抜しカスタムシーケンスキャプチャキットを構築した。これを用いてミトコンドリア病患者ゲノムに対し変異解析を行い、複数の患者で未報及び既報の病因遺伝子変異を見出した。このうちミトコンドリアの酸化酵素ECHS1 (short chain enoyl coenzyme A hydratase)の遺伝子に変異を持つ患者について詳細な解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial disease can be due to pathogenic mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) or nuclear DNA coding for mitochondrial components. Over 100 nuclear genes have been identified that cause mitochondrial disease. We selected 776 nuclear-encoded mitochondrial genes that include known genes causing mitochondrial disease and candidate genes expected to be involved in critical mitochondrial functions and we constructed custom exome capture kit against 776 genes. To identify the responsible mutations in nuclear DNA, targeted exome sequencing was performed against genomic DNAs from the patients who have no pathogenic mutations in mtDNA. We identified mutations considered to be possibly disease-causing based in reported responsible genes and candidate responsible genes. Among these patients, we performed detailed analysis of a boy with short chain enoyl coenzyme A hydratase (ECHS1) deficiency.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリア病 ミトコンドリア 遺伝子診断 ミトコンドリアDNA 酸化

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア病は主に遺伝子の変異により引き起こされるエネルギー代謝障害である。ミトコンドリア病の病因遺伝子はミトコンドリア DNA (mtDNA) コードと核 DNA コードの遺伝子に大別され、患者の 40%程度は mtDNA の変異が病因であると推定されている。

mtDNA はわずか 16kbp の環状 DNA であるため、全周シーケンスによる遺伝子検査が比較的容易であり、既に幾つかの医療機関等で行われている。現在までに mtDNA の点変異だけで 500 個所を超える報告があり、その変異情報は MITOMAP と呼ばれる mtDNA ゲノムデータベースで公開されミトコンドリア病遺伝子診断の指標等に用いられている。

ミトコンドリアで働くタンパク質は 1000 種類以上あるとされ、ほとんどは核ゲノムにコードされている。この内、ミトコンドリア病の病因として報告されている遺伝子数は 100 を超えており現在なお増え続けている。しかし、これら核ゲノムにコードされている病因遺伝子の遺伝子検査は技術的・コスト的に困難である。またミトコンドリア病の特徴として同一遺伝子の変異であっても変異部位の違い等により比較的軽度な症状から重度な症状まで多種多様であることから、臨床情報から病因遺伝子を推定することも困難である。

次世代シーケンサーの登場によりヒトゲノムの解析は飛躍的に進み、多くの遺伝病で新たな病因遺伝子が明らかになるなど画期的な成果を生み出している。現在行われている遺伝病の病因遺伝子の探索には主に全ゲノム解析やエキソーム解析が用いられている。これらの方法は病因遺伝子を特定する確率は高いものの、一人あたりの解析費用が高額であることや解析作業に 1 週間以上必要であるなど現状においては多数の患者検体を処理するには不向きである。

また多くの遺伝病と異なり、ミトコンドリア病は病因となりうる遺伝子の数が非常に多いのが特徴であり、mtDNA の全周シーケンスで病因遺伝子が検出できなかった場合には病因遺伝子を特定する簡便で有効な方法が存在しない

2. 研究の目的

本研究は既報のミトコンドリア病の病因遺伝子及び遺伝子機能等から推測されるミトコンドリア病の病因候補遺伝子を次世代シーケンサーによる遺伝子解析の対象として限定することで必要な費用や時間を削減し、病因

遺伝子の効率的な同定を行うことを目的とする。具体的な目標を以下に示す。

(1) 既報の核ゲノムコードの病因遺伝子に加え遺伝子機能等から予測される新たな病因候補遺伝子を選抜し、これに対応したミトコンドリア病シーケンスキャプチャキットを構築する。

(2) mtDNA にミトコンドリア病の変異を持たないことから核ゲノムの変異が病因と疑われるミトコンドリア病患者細胞を用いてミトコンドリア病シーケンスキャプチャキットと次世代シーケンサーによる変異解析を行う。

(3) 検出された変異の病因性の確認のため、患者細胞を用いたレスキュー実験を行い病因遺伝子の確定を行う。また、必要に応じて詳細な解析を行いミトコンドリア病に対する新たな知見を得る。

(4) 得られた情報はミトコンドリア病遺伝子診断に役立てる。

3. 研究の方法

(1) 解析対象とする核ゲノム変異が病因と推測されるミトコンドリア病患者の選抜

本研究はミトコンドリア病患者から採取した筋肉・皮膚由来細胞を用いて行う。これら患者由来細胞に対して mtDNA の全周シーケンスを行い、mtDNA に病的変異を持たない患者由来細胞、すなわち核ゲノムの変異がミトコンドリア病の病因である可能性が高い患者由来細胞を用いて網羅的病因遺伝子検索を行った(図1)。



図1 核ゲノムの変異が病因であるミトコンドリア病患者細胞のスクリーニング

(2) ミトコンドリア病の網羅的病因遺伝子検索

ミトコンドリア病の病因遺伝子と病因候補遺伝子の合計 776 遺伝子を対象としたシーケンスキャプチャキットの作製を行う。解析対象とした 777 遺伝子の選抜は以下に示すように行った。

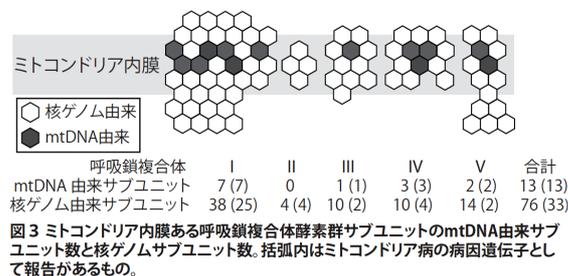
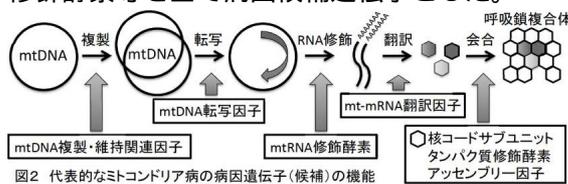
既報のミトコンドリア病の病因遺伝子

論文などにより報告されたミトコンドリア病の病因遺伝子を解析対象に加えた。

既報の病因遺伝子と類似する機能を持つと推測される遺伝子

核ゲノムにコードされているミトコンドリア病の病因遺伝子は機能面から以下のように大別される。「mtDNA 複製・維持関連因

子」「mtDNA 転写関連因子」「ミトコンドリアの RNA 修飾酵素」「ミトコンドリア翻訳因子」「呼吸鎖酵素サブユニット」「呼吸鎖酵素のアッセムリー因子」「タンパク質分解・修飾酵素」「その他」(図2)。これらのうち呼吸鎖酵素を構成するサブユニットは 76 遺伝子中 30 遺伝子以上がすでに病因として報告されていたが(図3)、残りの遺伝子についても変異により呼吸鎖酵素の活性低下が起きると予測されることから病因候補遺伝子に加えた。またミトコンドリアリボソームのサブユニットも病因遺伝子として報告が複数あることから、残りのサブユニットも病因候補遺伝子に加えた。以下同様に mtDNA 複製・維持関連遺伝子やミトコンドリア RNA 修飾酵素等を全て病因候補遺伝子とした。



酵母のミトコンドリア関連遺伝子と類似する機能を持つと推測される遺伝子

酵母もミトコンドリアをもつ生物であり、これまで酵母のミトコンドリア関連遺伝子との相同性等から多くのヒトのミトコンドリア関連遺伝子が同定されてきた。酵母のミトコンドリア関連因子と相同性を持ち、ミトコンドリア移行予測ソフトウェア(MITOPROT)解析によりミトコンドリア局在の可能性が高いヒトの相同遺伝子を病因候補遺伝子に加えた。

(3) レスキュー実験による病因遺伝子の確定

網羅的病因遺伝子検索により検出された変異が病因であるかを確認するため、患者由来細胞を用いて表現型の確認を行う。表現型が確認された後にレスキュー実験を行う。具体的には患者由来細胞を不死化した後に野生型遺伝子を導入し表現型の回復を試みることで、病因遺伝子の確定を行った。

4. 研究成果

核ゲノムの異常が病因である可能性が高い (mtDNAに遺伝子変異を持たない)ミトコン

ドリア病患者ゲノムに対し、上述のカスタムシーケンスキャプチャキットと次世代シーケンサーを用いてミトコンドリア病病因(候補)遺伝子に限定した変異解析を行った。

患者細胞 4 例の変異解析の結果、既知のミトコンドリア病の病因遺伝子変異やこれまでミトコンドリア病の病因遺伝子として報告のない遺伝子に変異を見出した。さらに、これらの遺伝子変異を持つ患者細胞についてさらなる解析を行った。これらのうち、ECHS1遺伝子にヘテロ劣性変異を持つ Leigh 症候群患者一例の詳細について以下に示した。

ECHS1 (short chain enoyl coenzyme A hydratase) はミトコンドリアのβ酸化における4段階反応の2段階目を触媒する酵素である。患者は筋緊張低下、代謝性アシドーシス及び精神運動発達退行を示しさらに呼吸鎖複合体 I、III、IVの複数の活性低下が認められた(図4)。患者がmtDNAに病的変異を持たなかったことから、核DNAコードの原因遺伝子を検索した。ミトコンドリア関連の776遺伝子をキャプチャし、次世代シーケンサーを用いたターゲットリシーケンスを行ったところ、ECHS1にc.2T>G; p.M1R とc.5C>T; p.A2Vの変異をコンパウンドヘテロ接合で同定した(図5)。患者の骨格筋、培養細胞を用いたイムノブロットにおいてはECHS1タンパク質の発現がほとんど認められず、ECHS1活性はコントロールの約10%に低下していることが判った(図6)。

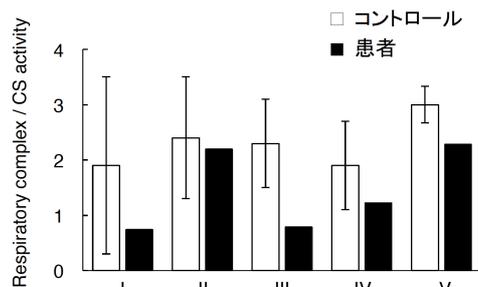


図4 ECHS1遺伝子ヘテロ接合変異を持つ患者のミトコンドリア呼吸鎖複合体の活性

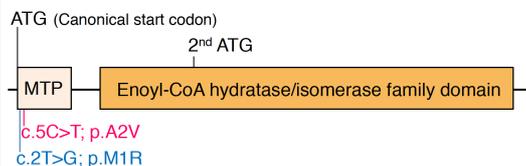


図5 ECHS1遺伝子のヘテロ接合変異

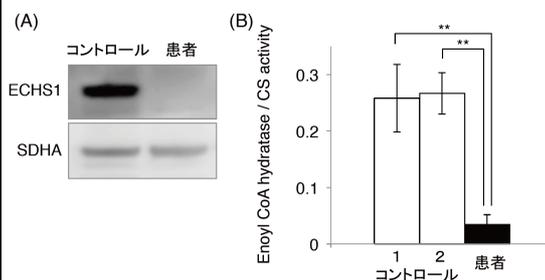


図6 (A) ECHS1タンパク質のイムノブロット解析 (B) ECHS1活性

野生型ECHS1と患者と同じ変異をそれぞれ持つECHS1をHeLa細胞に発現させたところ、野生型ECHS1の発現は確認されたが、変異型ECHS1の発現はほとんど検出されなかった。不死化した患者細胞に野生型のECHS1を発現させると、ECHS1の活性が回復し、また呼吸鎖の活性低下もほぼ回復した(図7)。よってこれらの変異がこの患者のミトコンドリア病の原因であることが明らかになった。

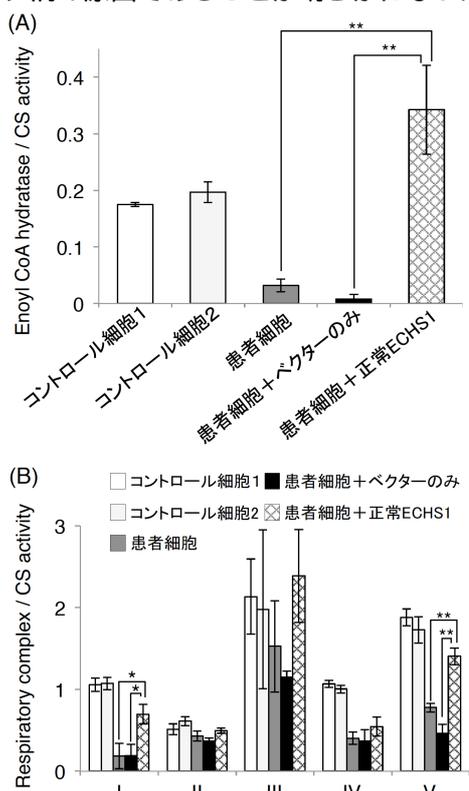


図7 (A)レスキュー実験によるECHS1活性の回復(B)レスキュー実験による呼吸鎖複合体活性の回復

脂肪酸代謝異常を検出する血中アシルカルニチン分析においては患者に大きな異常は認められなかったが尿中有機酸分析においてグリオキシル酸等の蓄積が観察された。グリオキシル酸は呼吸鎖やピルビン酸脱水素酵素複合体の活性を阻害することが知られており、その影響により呼吸鎖の活性低下が起こっている可能性が考えられる。

これまでに ECHS1 以外の β 酸化酵素の欠損症による Leigh 症候群の報告はほとんどなく、ECHS1 欠損が未解明のメカニズムで呼吸鎖欠損を引き起こし Leigh 症候群を呈した可能性が考えられる。

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 1 件)

Sakai C, Yamaguchi S, Sasaki M, Miyamoto Y, Matsushima Y, Goto Y: ECHS1 mutations cause

combined respiratory chain deficiency resulting in Leigh syndrome. Hum Mutant, 36, 232-239, 2015

DOI: 10.1002/humu.22730

〔学会発表〕(計 7 件)

(1) Matsushima Y, Hatakeyama H, Takeshita R, Kitamura T, Kobayashi K, Yoshinaga H, Goto Y: Leigh-like syndrome associated with calcification of the bilateral basal ganglia caused by compound heterozygous mutations in mitochondrial poly(A) polymerase, International Symposium on Mitochondria, Tokyo, 2013

(2) Matsushima Y, Hatakeyama H, Takeshita R, Kitamura T, Kobayashi K, Yoshinaga H, Goto Y: Leigh-like syndrome associated with calcification of the bilateral basal ganglia caused by compound heterozygous mutations in mitochondrial poly(A) polymerase, 第 36 回日本分子生物学会, 12.03, 神戸, 2013

(3) Matsushima Y, Hatakeyama H, Takeshita E, Kitamura T, Kobayashi K, Yoshinaga H, Goto Y, Leigh-like syndrome associated with calcification of the bilateral basal ganglia caused by compound heterozygous mutations in mitochondrial poly(A) polymerase: Euromit 2014 - 9th international Meeting on Mitochondrial Pathology, Tampere (Finland), 6.17 2014,

(4) 松島雄一, 坂井千香, 康東天, 後藤 雄一: ミトコンドリア病の病因遺伝子の探索及び病因遺伝子の機能解析, 第 61 回日本臨床検査医学会学術集会, 福岡市, 11.24. 2014

(5) 松島雄一, 廣藤雄太, Laurie S Kaguni, 康東天: ショウジョウバエ培養細胞におけるミトコンドリアマトリクスプロテアーゼの機能解析, 第 14 回日本ミトコンドリア学会年会, 福岡市, 12.4. 2014

(6) 廣藤雄太, 松島雄一, 康東天: ショウジョウバエ培養細胞におけるミトコンドリア RNA 結合タンパク質の役割, 第 14 回日本ミトコンドリア学会年会, 福岡市, 12.4. 2014

(7) 坂井千香, 松島雄一, 山口清次, 佐々木 征行, 宮本雄策, 後藤雄一: ECHS1 の変異は呼吸鎖の活性低下を伴う Leigh 症候群を引き起こす, 第 14 回日本ミトコンドリア学会年会, 福岡市, 12.4. 2014

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松島雄一 (MATSUSHIMA, Yuichi)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号：20571342

(3) 連携研究者

後藤雄一 (GOTO, Yu-ichi)
国立精神・神経医療研究センター
神経研究所疾病研究第二部・部長
研究者番号：20225668