

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26253054

研究課題名(和文) COQ2変異に基づく多系統萎縮症の病態機序解明とサロゲートマーカーの開発

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms and development of surrogate markers for multiple system atrophy caused by COQ2 mutations

研究代表者

辻 省次 (Tsuji, Shoji)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：70150612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,500,000円

研究成果の概要(和文)：多系統萎縮症発症の遺伝的要因として見出されたCOQ2遺伝子変異について、ミトコンドリアの酸化的リン酸化機能を、フラックスアナライザーを用いて定量的に解析する方法を開発した。COQ2遺伝子を欠損する酵母細胞に、変異ヒトCOQ2 cDNAを導入し、フラックスアナライザーにより、酸素消費を測定した。孤発性多系統萎縮症に関連するV393A変異、家族性多系統萎縮症で病原性変異として見出されているM128Vについて、これらの変異が有意にCOQ2の機能障害をもたらすことを確認し、本疾患のsurrogate markerとして活用できることを示した。

研究成果の概要(英文)：In our previous studies, we found that COQ2 mutations are associated with familial as well as sporadic multiple system atrophy (MSA). To quantitatively evaluate the altered functions of COQ2 coding for an enzyme in the biosynthesis of CoQ10, we measured oxygen consumption rates (OCR) of yeast harboring mutant human COQ2 cDNA employing a Flux Analyzer. We prepared mutant yeast with a deletion of yeast COQ2 gene. We then transformed the yeast with mutant human COQ2 cDNA, and measured the OCRs of these yeast strains. We demonstrated that OCRs of yeast harboring V393A, a susceptibility variant for sporadic MSA, or M128V, a causative mutation for familial MSA, are significantly decreased. The results suggest that OCR measurement may be utilized as a surrogate marker for MSA.

研究分野：神経内科学, 分子遺伝学

キーワード：多系統萎縮症 COQ2 フラックスアナライザー coenzyme Q10 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

多系統萎縮症 (multiple system atrophy, MSA) は自律神経症状に加えて、パーキンソニズム、小脳失調等を呈する神経変性疾患である。MSA は、オリゴデンドログリアに細胞質内封入体 (glial cytoplasmic inclusion, GCI) を認めることが本疾患に特異的な病理学的所見として知られている。MSA は、大部分孤発性であるが、一部に、多発家系が認められる。

日本人においては、約 12,000 人の患者がいると推定され、平均発症年齢は 57 歳程度と考えられている。臨床病型はパーキンソニズム主体の MSA-P と小脳失調主体の MSA-C に分けることができる。欧米では MSA-P が MSA-C より 2.1-2.6 倍程度多いと考えられているが、日本では MSA-C が 2.1-2.8 倍程度多いと考えられ、民族差が観察されることが特徴である。このことはその発症に遺伝的な背景が関連している可能性を示している。

MSA の特徴的な病理学的所見である GCI は、 $\alpha$ -シヌクレインが主成分であることが見出されている。 $\alpha$ -シヌクレインは、シナプス前末端に存在しており、シナプス小胞からの神経伝達物質の放出に関与していると考えられている。パーキンソン病とレビー小体病ではこの  $\alpha$ -シヌクレインがレビー小体として神経細胞の細胞質内に蓄積し、MSA では GCI としてオリゴデンドログリアの細胞質内に蓄積する。 $\alpha$ -シヌクレインの凝集や蓄積がどのようにして MSA の病態機序に関与するかについては、まだ十分に解明されていない。

上述したように、MSA は、大部分孤発性であるが、われわれは、まれに、多発家系が観察されることを見出してきた (Hara *et al. Arch Neurol*, 2007)。MSA 多発家系の存在は、その発症に、遺伝的な要因が関与し知るところを強く支持しており、分子遺伝学的な解析により、MSA 発症に関わる遺伝的な要因を解明することにより、MSA の発症機構を解明できる可能性が考えられる。これまでに、6 家系の MSA 多発家系を集積し、6 家系について、連鎖解析を実施し、候補領域を見出すと共に、全ゲノム配列解析を実施し、候補領域内に存在する病原性遺伝子の探索を進めた。その結果、*COQ2* 遺伝子に、ホモ接合性、あるいは、複合ヘテロ接合性の変異を有する家系として 2 家系を見出し、これらの家系では *COQ2* 遺伝子が病因遺伝子として発症に関与していると考えられることを報告してきた (Mitsui *et al. New Engl J Med*, 2013)。

次に、孤発性 MSA 患者において *COQ2* 変異が MSA 発症に関連しているかどうかについて *COQ2* 遺伝子の関連解析を行った。その結果、日本人孤発性 MSA 患者で最も高頻度に認められた V393A 変異のアレル頻度は、日本人患者群で 4.8%、日本人コントロール群では 1.6%と、MSA 患者群で有意に多いこと

を見出した (odds ratio = 3.05, 95% CI: 1.65-5.85,  $P = 1.5 \times 10^{-4}$ ) (Mitsui *et al. New Engl J Med*, 2013)。その後、台湾、中国で、V393A が MSA に有意に関連することが示され、メタ解析で、V393A が MSA の発症に関連することが改めて確認された (Zhao *et al. Neurol Sci*, 2015)。一方、欧米では、V393A は一般集団を含めて観察されず、人種差があることも見出されている。

V393A 以外は頻度が非常に低いため、個別の変異の頻度比較で、統計学的有意性を示すことが困難であった。そのため、MSA の発症に、*COQ2* の機能障害性変異が関連するという仮説のもと、それぞれの変異について、機能障害性であるかどうかを評価し、機能障害性変異をまとめて、MSA 群と control 群との間で統計学的検定を行い、関連解析を実施することとした。*COQ2* 変異が、機能障害性であるかどうかを評価するために、まず、酵母を用いた機能解析を行った。酵母の *COQ2* 遺伝子をノックアウトした変異株を準備し、ここに、野生型、あるいは、変異型のヒト *COQ2* cDNA (h*COQ2*) をトランスフォーメーションにより導入し、欠損酵母の非発酵培地における成長速度の比較を行った。この方法は、*COQ2* 変異が機能障害変異であった場合には、ミトコンドリアの酸化的リン酸化が障害され、成長速度が低下するという考えに基づくものである。この機能解析により機能障害性と評価された変異 (P99H, S107T, R119H, I147T, P157S, S163F, T317A, S347C, R387Q) に限定してヘテロ接合性の *COQ2* 変異の頻度を、孤発性 MSA 患者群とコントロール群で比較したところ、患者群で 0.53%、コントロール群で 0.05%と、有意差を認め (odds ratio = 11.97, 95% CI:

1.60-531.5,  $P = 0.004$ ) (Mitsui *et al. New Engl J Med*, 2013)、*COQ2* の機能障害性変異が MSA の発症に関わっていると考えられた。

上述のように、日本人 MSA 患者で最も高頻度に観察される *COQ2* 変異は、V392A 変異であるが、上記の酵母を用いた成長速度の測定では、V393A 変異に関しては、野生型 *COQ2* を導入した場合と同様の成育速度を示し、機能低下が示されなかった。そのため、患者から樹立した、lymphoblastoid cell line を用いて、parahydroxybenzoate-polyprenyl transferase の活性を直接測定した。その結果、V393A 変異については、parahydroxy-benzoate-polyprenyl transferase 活性が軽度であるが、有意に低下していることが証明された (Mitsui *et al. New Engl J Med*, 2013)。

*COQ2* の翻訳産物である parahydroxybenzoate-polyprenyl transferase は coenzyme Q10 (CoQ10) の生合成に必要であり、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電子の運搬や活性酸素種の解毒に関わっているとされている。このことから、MSA の発症に、ミトコンド

リアの機能不全が関わる可能性が示される。上述のように、軽度機能障害性変異については、lymphoblastoid cell line を用いた parahydroxybenzoate-polypprenyl transferase 活性の測定が有用であるが、患者から lymphoblastoid cell line を樹立する必要があり、酵素活性の測定に困難を伴う場合が少なくない。

## 2. 研究の目的

これまでの研究で、*COQ2* 遺伝子の機能性変異が、MSA 発症の背景あり、ホモ接合性、あるいは、複合ヘテロ接合性変異を有すると、多発性家系の発症につながることで、ヘテロ接合性の機能障害性変異では、孤発性 MSA の発症リスクを高めることを明らかにした。以上のことから、*COQ2* 変異に見出される変異について、機能障害、すなわち、CoQ10 合成機能の障害をもたらすかどうかの評価をすることが、MSA 発症のリスクの評価に重要である。

*COQ2* 変異の機能解析については、これまでの研究で、*COQ2* 遺伝子を欠損する酵母株を用いて、そこに、変異を有するヒト *COQ2* cDNA を導入して、酵母の成育速度を評価する方法、あるいは、患者から樹立した、lymphoblastoid cell line を用いて、parahydroxybenzoate-polypprenyl transferase の活性を直接測定する方法を用いていた。これまでの研究結果から、酵母の成育速度を評価する実験系では、軽度の機能障害をもたらす変異の場合、酵母の成育速度が野生型 human *COQ2* cDNA を導入した場合と差はなく、評価が困難であることが確認され、軽度機能障害をもたらす *COQ2* 変異の評価には必ずしも適していないことが明らかになっている。また、lymphoblastoid cell line を用いて、parahydroxybenzoate-polypprenyl transferase の活性を直接測定する方法は、測定感度は良いものの、患者から lymphoblastoid cell line を樹立する必要があり、通常診療において、酵素活性の測定に困難を伴う場合が少なくない。

以上のことから、簡便で、*COQ2* 変異の機能を評価できる新たな測定方法の開発を検討することとした。

*COQ2* は、CoQ10 合成系の酵素の一つをコードしており、*COQ2* 変異により、細胞内での CoQ10 の低下をもたらすと考えられる。CoQ10 は、ミトコンドリアにおける、complex I、あるいは、complex II から、complex III への電子伝達において、電子のキャリアとして作用しており、CoQ10 の合成低下は、ミトコンドリアの酸化リン酸化の低下をもたらすと想定される。すなわち、ミトコンドリアによる好氣的代謝における酸素消費速度を測定することにより、変異 *COQ2* の機能を正確に評価できるのではないかと考えた。この考えに基づき、酵母の発現系を用いて、Flux Analyzer を用いて、酸

素消費速度を測定することにより、*COQ2* 変異の機能障害を定量的に測定する方法の開発を検討した。

## 3. 研究の方法

機器として酸素消費速度 (oxygen consumption rate, OCR) を観察できる XFe24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA) を用いた。

本解析では MSA 患者において報告のある *COQ2* 変異 M128V, S146N, L162F, V393A を用いた。M128V は酵母の成長率比較にて機能障害性と評価されている変異である。S146N の機能解析はこれまでに行われていないが、ホモ接合性に認められた場合、難治性てんかん、白質脳症、腎不全など重篤な症状を呈する primary CoQ10 deficiency を発症することが知られている。L162F は MSA 一例で報告されているが、機能解析は行われていない。V393A は酵母の成長速度の検討では機能障害性と位置づけられなかったが、lymphoblastoid cell line における *COQ2* 活性の測定からは機能障害性と考えられている。

酵母は発酵性培地であれば発酵のみで生存が可能であり、*COQ2* 欠損でも生存が可能であるためモデル生物として選択した。変異を導入する酵母として既報の *COQ2* 遺伝子を欠損した BY4741 *coq2* 株を使用した。*COQ2* 遺伝子を欠損する BY4741 *coq2* は好気呼吸ができず、非発酵性培地では増殖することも ATP を産生することもできない。h*COQ2* cDNA の野生種あるいは変異種をプラスミドに導入して BY4741 *coq2* の形質転換を行い、非発酵性培地を用いて OCR を計測した。

### h*COQ2* cDNA(wt) の調製と変異 h*COQ2* cDNA の作成

h*COQ2* cDNA(wt) は、Human Placenta Total RNA (Clontech, Shiga, Japan) を用いて reverse transcript (RT)-PCR により取得した。RT-PCR 産物を pTA2 プラスミド (Toyobo, Osaka, Japan) にサブクローニングし、これを pTA2-h*COQ2*(wt) とした。この h*COQ2* cDNA(wt) は全長 1266bp で最初の ATG codon を含んでいる (NM015697.7)。

変異 h*COQ2* cDNA (M128V, S146N, L162F, V393A) は KOD-Plus- Mutagenesis Kit (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて部位特異的変異導入により作成した。

### pAUR123-h*COQ2* の作成

pTA2-h*COQ2*(wt, mutant) を酵母の複製起点と蛋白質発現用プロモーターを搭載している pAUR123 (Takara Bio Shiga, Japan) の SmaI と XhoI 制限酵素切断末端にサブクローニングした。この pAUR123 は大腸菌の複製起点 ori と *S. cerevisiae* の複製起点 ARS の両方をもっているため、どちらの生物でも複製が可能

である。また、ARSに加えてCENを持っているために一酵母あたり安定して一個のプラスミドが維持される。*S. cerevisiae*の蛋白質発現用プロモーターとして*ADH1*遺伝子のプロモーターが含まれている。大腸菌の選択マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子、*S. cerevisiae*の選択マーカーとしてオーレオバシジンA耐性遺伝子をもっている。

#### 酵母の形質転換

pAUR123-h*COQ2*(wt/mutant)でBY4741 *coq2*を形質転換した。形質転換にはQuick & Easy Yeast Transformation Mix (Takara Bio, Shiga, Japan)を使用した。

酵母が目的のプラスミド、pAUR123-h*COQ2*(wt/mutant)で形質転換されていることを確認するために酵母からプラスミドを抽出、直接塩基配列決定法で*COQ2*の全塩基配列を確認した。

#### Basal oxygen consumption rate (OCR)の測定

*COQ2*変異(M128V, S146N, L162F, V393A)が導入されたpAUR123-h*COQ2*で形質転換された酵母のOCRを観察する目的でXFe24 Flux Analyzerを用いてOCRを測定した。

測定する酵母はYPGA培地(グリセロール3%, ペプトン2%, 酵母エキス1%, 寒天2%, オーレオバシジンA 1 µg/mL)で30にて早期対数期まで増殖させた。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。酵母はグルコースからグリセロール等に炭素源を切り替える際に代謝に必要な酵素を合成する時間(diauxic lag)がかかってしまう。炭素源を切り替えたばかりの数時間は好気呼吸の本領を発揮できない可能性があるため、増殖から計測まで一貫して培地にYPGAを使用した。

増殖した酵母から $1.0 \times 10^5$ 個の酵母細胞を新しいYPGA培地600 µlに移し換え、XF24 Cell Culture Microplate (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA)のwellに培地ごと植菌した。Microplateのwellは酵母を粘着させるために前もってpoly-L lysineでコーティングした。Microplateのwellにpoly-L lysineを50 µL (50 µg/mL) (Wako, Osaka, Japan)入れ、30分静置、poly-L lysineを除去してから室温で30分乾燥させた。植菌された酵母をwellに粘着させるために50 ×gで1分の遠心を行った。Seahorse Sensor Cartridge (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA)は前もってCalibrant (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA) 1 mL/wellを注入、30°Cで24時間静置し、水和した。

Flux Analyzerの温度を30、混合時間1 min、待機時間1 min、測定時間を2 minに設定した。それぞれの酵母を4 wellずつ測定した。Sensor Cartridgeのセンサースポットに塗布されている蛍光物質が酸素に接触すると蛍光を発する仕組みになっており、これにより間接的にOCRを測定している。532nmの

波長で励起、650nmの波長で検出をしている。予備実験としてBasal OCRの測定の精度を確認するためにpAUR123-h*COQ2*(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。それぞれの個数の酵母を4 wellずつ測定した。

次の予備実験としてbasal OCRが好気呼吸による酸素消費速度を反映していることを確認するため、*COQ2*を搭載していないpAUR123-h*COQ2*(null)で形質転換したBY4741 *coq2*のbasal OCRを測定した。比較としてpAUR123-h*COQ2*(wt)で形質転換したBY4741 *coq2*を同一条件でbasal OCR測定した。pAUR123-h*COQ2*(null)で形質転換されたBY4741 *coq2*はYPGA培地では増殖しないので、この予備実験ではYPDA培地で早期対数期まで増殖、その後diauxic lagを乗り越えるのに必要な時間をYPGA培地で30にてincubateした。 $1.0 \times 10^5$  cell/wellでbasal OCRを測定した。それぞれの酵母を4 wellずつ測定した。Diauxic lag時間の測定にはpAUR123-h*COQ2*(wt)で形質転換されたBY4741  $\Delta$ *coq2*を使用し、微量なグルコース0.08%、微量なグリセロール0.08%、ペプトン2%、酵母エキス1%、オーレオバシジンA 1 µg/mLによる培地40 mLを使用、30でOD600により成長を記録した。OD600の計測にはODSensor-S (TAITEC, Saitama, Japan)を使用し、OD600 0.1から測定を開始、10分おきに計測した。OD600は4つのフラスコの平均とした。

pAUR123-h*COQ2*(mutant)で形質転換された酵母のbasal OCRをpAUR123-h*COQ2*(wt)で形質転換された酵母のbasal OCRの平均と比較した。酵母の数は $1.0 \times 10^5$  cells/well使用、4 wellずつ測定した。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。

#### 4. 研究成果

まず、予備的検討として、酵母の細胞数を $0.5 \times 10^5$ から $4.0 \times 10^5$  cells/wellの範囲で、OCRを測定した。その結果、酵母の数とbasal OCRは良く相関することが確認された( $R^2=0.999$ )。

wild-type, M128V, S146N, L162F, V393Aで形質転換された酵母 $1.0 \times 10^5$  cells/wellのbasal OCRはそれぞれ $137.1 \pm 21.8$ ,  $85.2 \pm 13.9$ ,  $62.3 \pm 13.0$ ,  $99.0 \pm 24.2$ ,  $87.5 \pm 18.0$  pmol/minであった(平均値 ± SD)。Basal OCRの平均値はM128V, S146N, L162F, V393Aにおいてwild-typeと比較して有意に低下していた。特にS146Nがもっとも低下していた。

Basal 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、成長速度の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。酵母の成長率比較に対して酵母のbasal OCR比較はCoQ10が作用している経路をより直接評価しているため検出力が高い可能性を考え

られる。S146N をホモ接合性に認めると難治性てんかん、白質脳症、腎不全などを呈する primary CoQ10 deficiency を発症することが知られている。一方で V393A をホモ接合性に認めた MSA 患者は primary CoQ10 deficiency と比較すると臨床像は軽症である。有意差は認めなかったが、本実験で S146N の basal OCR が V393A よりさらに低下していたことは臨床像と相関している可能性がある。S146N は L162F より有意に OCR が低下していたが、L162F の臨床像が不詳なため、その意義に関しては今後さらなる検討が必要である。

本実験により M128V, S146N, L162F, V393A が機能障害性であることを示すことができた。本実験により Flux Analyzer による COQ2 の新たな機能解析系を確立することができた。この結果は、lymphoblastoid cell line の酵素測定をしなくても、患者で見出された COQ2 変異を酵母を用いた発現系で OCR を測定することにより、その機能障害性を正確に評価できることを示しており、患者で見出された変異の評価に有用であると考えられる。

#### 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 4 件)

1. Mitsui J, Koguchi K, Momose T, Takahashi M, Matsukawa T, Yasuda T, Tokushige SI, Ishiura H, Goto J, Nakazaki S, Kondo T, Ito H, Yamamoto Y, Tsuji S. Three-Year Follow-Up of High-Dose Ubiquinol Supplementation in a Case of Familial Multiple System Atrophy with Compound Heterozygous COQ2 Mutations. *Cerebellum*. 査読有 16, 2017, 664-672. DOI: 10.1007/s12311-017-0846-9.
2. Mitsui J, Tsuji S. Plasma Coenzyme Q10 Levels and Multiple System Atrophy-Reply. *JAMA Neurol*. 査読有 73, 2016, 1499-1500. DOI: 10.1001/jamaneurol.2016.4133.
3. Mitsui J, Matsukawa T, Yasuda T, Ishiura H, Tsuji S. Plasma Coenzyme Q10 Levels in Patients With Multiple System Atrophy. *JAMA Neurol*. 査読有 73, 2016, 977-80. DOI: 10.1001/jamaneurol.2016.1325.
4. Mitsui J, Matsukawa T, Sasaki H, Yabe I, Matsushima M, Dürr A, Brice A, Takashima H, Kikuchi A, Aoki M, Ishiura H, Yasuda T, Date H, Ahsan B, Iwata A, Goto J, Ichikawa Y, Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y, Hara K, Kakita A, Yamada M, Takahashi H, Onodera O, Nishizawa M, Watanabe H, Ito M, Sobue G, Ishikawa K, Mizusawa H, Kanai K, Hattori T, Kuwabara S, Arai K, Koyano S, Kuroiwa Y, Hasegawa K, Yuasa

T, Yasui K, Nakashima K, Ito H, Izumi Y, Kaji R, Kato T, Kusunoki S, Osaki Y, Horiuchi M, Kondo T, Murayama S, Hattori N, Yamamoto M, Murata M, Satake W, Toda T, Filla A, Klockgether T, Wüllner U, Nicholson G, Gilman S, Tanner CM, Kukull WA, Stern MB, Lee VM, Trojanowski JQ, Masliah E, Low PA, Sandroni P, Ozelius LJ, Foroud T, Tsuji S. Variants associated with Gaucher disease in multiple system atrophy. *Ann Clin Transl Neurol*. 査読有 2, 2015, 417-26. DOI: 10.1002/acn3.185.

[学会発表](計 3 件)

1. Yasuda T, Matsukawa T, Ishiura H, Mitsui J, Tsuji S. Linkage analysis on the 20 consanguineous singleton families with multiple system atrophy. American Society of Human Genetics 2016 Annual Meeting. Oct 21<sup>st</sup>, 2016, Vancouver, Canada.
2. Yasuda T, Matsukawa T, Mitsui J, Tsuji S. Functional Analysis of Variants Associated with MSA on OCR of Transformed Yeasts. 第 57 回日本神経学会学術集会。2016 年 5 月 9 日、神戸コンベンションセンター(神戸国際会議場・神戸国際展示場)兵庫県・神戸市)
3. Yasuda T, Matsukawa T, Mitsui J, Tsuji S. Functional Analysis of COQ2 V393A Variant Associated with Multiple System Atrophy Based on Measurement of Oxygen Consumption Rate of Transformed Yeasts Carrying human COQ2 cDNAs. The International Congress of Human Genetics 2016 (Apr 3<sup>rd</sup>, 2016) 国立京都国際会館(京都府・京都市)

[図書](計 0 件)

(該当なし)

[産業財産権]

出願状況(該当なし)

取得状況(該当なし)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

辻 省次 (TSUJI, Shoji)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：70150612

(2)研究分担者

(3)連携研究者

後藤 順 (GOTO, Jun)  
東京大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：10211252  
(平成 26 年度まで連携研究者)

三井 純 (MITSUI, Jun)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：70579862

(4)研究協力者