

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860816

研究課題名(和文) 乳児期発症てんかん性脳症を引き起こすアミノアシルtRNA合成酵素変異の同定と解析

研究課題名(英文) Mutations in the glutamyl-tRNA synthetase gene cause early-onset epileptic encephalopathy

研究代表者

小寺 啓文 (KODERA, Hirofumi)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員

研究者番号：70637884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：全エクソーム解析を用いることにより、乳児期発症てんかん性脳症1家系(兄弟例)から、難治性のてんかん発作に加えて精神運動発達遅滞を呈する乳児期発症のてんかん性脳症の原因遺伝子QARSの同定に成功した。変異が病的であるかの評価のために、同定された変異をもとにした組換えタンパク質の神経細胞内発現解析を行った。このQARSの複合ヘテロ接合性変異によって引き起こされるてんかん性脳症の特徴として、髄鞘低形成および白質異常が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Using whole exome sequencing, we identified compound heterozygous mutations [c.169T>C (p.Tyr57His) and c.1485dup (p.Lys496*)] in QARS, which encodes glutamyl-tRNA synthetase, in two siblings with early-onset epileptic encephalopathy (EOEE). Recessive mutations in QARS, including the loss-of-function missense mutation p.Tyr57His, have been reported to cause intractable seizures with progressive microcephaly. The p.Lys496* mutation is novel and causes truncation of the QARS protein, leading to a deletion of part of the catalytic domain and the entire anticodon-binding domain. Transient expression of the p.Lys496* mutant in neuroblastoma 2A cells revealed diminished and aberrantly aggregated expression, indicating the loss-of-function nature of this mutant. Together with the previous report, our data suggest that abnormal aminoacylation is one of the underlying pathologies of EOEE.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：てんかん性脳症 全エクソーム解析 QARS アミノアシルtRNA合成酵素 アミノアシル化

1. 研究開始当初の背景

乳児期発症のてんかん性脳症は、難治性のてんかん発作に加えて精神運動発達遅滞を呈する疾患群である。これまでに、イオンチャネル遺伝子、シナプス小胞調節遺伝子、3量体G蛋白質遺伝子やヌクレオチド-糖トランスporter-遺伝子の異常等が見つかっているが、全体の3割程度を説明するに留まっており、新規責任遺伝子の同定とその病態解明が待たれている。

てんかん性脳症においては、責任遺伝子に生じた点変異とコピー数異常が重要な疾患原因であることが知られている。エキソンキャプチャー法と次世代シーケンズ技術を組み合わせた Exome 解析は、全エクソンの9割以上の領域において点変異を検出可能であるが、更に1エキソンあたりで読まれるリード数を解析することにより、遺伝子のコピー数異常も検出可能である。我々は、この Exome 解析を用いて、GNAO1 変異と SLC35A2 変異がてんかん性脳症を引き起こすことを、また WDR45 変異が神経変性症の一種である SENDA を引き起こすことを明らかにし、同定された変異体の機能異常を分子生物学的手法を用いて証明していた (Kodera et al., Hum Mutat, 2013; Nakamura et al., Am J Hum Genet, 2013; Saitsu et al., Nat Genet, 2013)。更に、Exome 解析データを用いたコピー数異常の検出においても豊富な経験を有していた (Kodera et al., Epilepsia, 2013)。また、変異が同定された場合には、まず健常者がその変異アレルを有する頻度を確認することが重要であるが、当研究室では既に575名を超える日本人健常者の全エクソームデータが蓄積されており、Exome 解析による網羅的遺伝子異常の検出が世界最高水準で遂行可能な体制が整っていた。

我々は、申請にあたって、100例を超える乳児期発症てんかん性脳症の Exome 解析を通じて、3家系において、常染色体劣性遺伝形式をとる3種のアミノアシル tRNA 合成酵素遺伝子変異の同定に成功していた (現在3遺伝子中2種は未発表データ)。過去の報告では、アミノアシル tRNA 合成酵素遺伝子変異で、てんかんを伴う白質脳症や末梢神経障害が報告されている。そのため、てんかん性脳症の病態の一つに、アミノアシル tRNA 合成異常が関与している可能性は極めて強く、てんかんの新しい発症機序が示唆されていた。

2. 研究の目的

過去の報告では、アミノアシル tRNA 合成酵素遺伝子変異で、てんかんを伴う白質脳症や末梢神経障害が報告されており、アミノアシル tRNA 合成異常とてんかん性脳症との関連が強く示唆されていた。そのため、本研究では (1) Exome 解析によるアミノアシル tRNA

合成酵素遺伝子変異症例の更なる集積と、(2) 変異体の発現解析および生化学的活性測定による機能異常の評価を行うことで、てんかん性脳症におけるアミノアシル tRNA 合成異常の全容を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

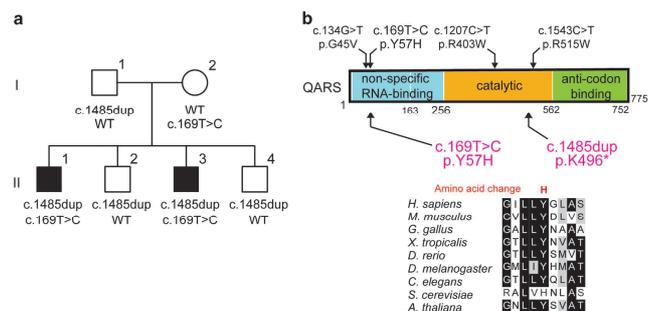
(1) Exome 解析による病的変異の網羅的スクリーニング
解析依頼が予想される年間約 80 症例に対して Exome 解析を施行し、網羅的にアミノアシル tRNA 合成酵素遺伝子異常を検出する。

(2) 動物細胞を用いた発現解析および生化学的活性測定

得られた病的変異について組換えタンパク質の発現・精製を行う。その後、神経細胞内発現解析および放射性同位体を用いたアミノアシル化活性測定を施行することによって、変異タンパク質と野生型との機能の違いから、変異タンパク質が疾患を引き起こす機序を明らかにする。

4. 研究成果

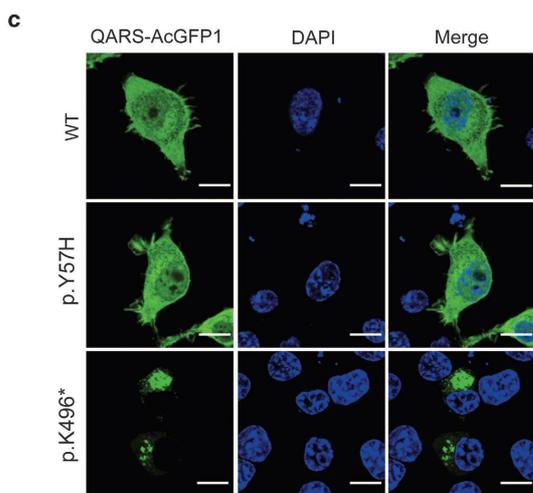
全エクソーム解析を用いることにより、乳児期発症てんかん性脳症1家系(兄弟例)から、アミノアシル tRNA 合成酵素遺伝子の一種である QARS の複合ヘテロ接合性変異 [c.169T>C (p.Y57H) および c.1485dup (p.K496*)] を同定した (図 a, b)。



乳児期発症のてんかん性脳症は、難治性のてんかん発作に加えて精神運動発達遅滞を呈する疾患群である。これまでに、イオンチャネル遺伝子、シナプス小胞調節遺伝子、3量体G蛋白質遺伝子や糖ヌクレオチドトランスporter-遺伝子の異常等が見つかっているが、全体の3割程度を説明するに留まっていた。本研究による QARS の同定は、アミノアシル tRNA 合成異常が関与する、てんかんの新しい発症機序の存在を示唆するものであった。

変異が病的であるか評価を行うため、同定された変異をもとにした組換えタンパク質を

作成し神経細胞内発現解析を行った。Neuro2A細胞内においてAcGFP1-tagを付加したQARS変異体を一過性に発現させたところ、p.K496*変異体では細胞内における分解が観察されたものの、p.Y57H変異体では野生型との間に局在の違いを認めなかった(図c)。



そのため、生化学的に酵素活性の違いを比較するため、放射性同位体を用いたアミノアシル化活性測定に取りかかった。しかしながら、アメリカのグループにより、QARS変異が進行性小頭症および難治性てんかんの原因であるとの報告がなされたため、それまでに得られた実験データを詳細な臨床所見と併せ、すぐにセカンドレポートとして報告した(Kodera et al., J Hum Genet 2014)。我々の報告した1家系とアメリカのグループが報告した2家系を併せて考えると、QARS変異によって、髄鞘低形成および白質異常が引き起こされると考えられた。

また、我々が同定した残りの2種のアミノアシル tRNA 合成酵素遺伝子変異についても同様に、変異が病的であるか評価を行うため、同定された変異をもとにした組換えタンパク質を作成し神経細胞内発現解析を行った。Neuro2A細胞内において変異体を一過性に発現させたところ、QARSのミスセンス変異と同様に、明らかな局在の異常は認めなかった。そのため、これらの変異体もQARSと同様に生化学的な活性に異常をきたしている可能性があると考えられた。放射性同位体¹⁴Cで標識したアミノ酸を用いたアミノアシル化活性測定を行うことを目標とし、同定された変異をもとにした動物細胞発現用ベクターの作成を続けている。

また、現在までに病的変異の網羅的スクリーニングを続けてきたが、新規のアミノアシル tRNA 合成酵素遺伝子変異の同定には至っていない。このことから、アミノアシル tRNA 合成酵素遺伝子変異が原因となる乳児期発症のてんかん性脳症は非常にレアな症例だと予想される。

本研究の症例解析により、アミノアシル tRNA

合成酵素遺伝子変異がもたらす疾患の病態解明に努める。

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9件)

- Kodera H, Ando N, Yuasa I, Wada Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saitoh S, Matsumoto N, Saitsu H. “Mutations in COG2 encoding a subunit of the conserved oligomeric golgi complex cause a congenital disorder of glycosylation.” *Clinical Genetics*(2015) (87) 455-460 doi: 10.1111/cge.12417. 査読有
- Hirofumi Kodera, et al, Hiroto mo Saitsu and Naomichi Matsumoto “ De novo GABRA1 mutations in Ohtahara and West syndromes ” *Epilepsia* (2015) (57)566-573 doi: 10.1111/epi.13344. 査読有
- Kodera H, Osaka H, Iai M, Aida N, Yamashita A, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. “Mutations in the glutaminyl-tRNA synthetase gene cause early-onset epileptic encephalopathy.” *J Hum Genet.* (2015) (60) 97-101 doi: 10.1038/jhg.2014.103. 査読有
- Ohba C, Shiina M, Tohyama J, Haginoya K, Lerman-Sagie T, Okamoto N, Blumkin L, Lev D, Mukaida S, Nozaki F, Uematsu M, Onuma A, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Tanaka F, Kato M, Ogata K, Saitsu H, Matsumoto N. “ GRIN1 mutations cause encephalopathy with infantile-onset epilepsy, and hyperkinetic and stereotyped

- movement disorders. ” *Epilepsia* (2015) 56 (6) 841-8 doi: 10.1111/epi.12987. 査読有
- Ohba C, Kato M, Takahashi N, Osaka H, Shiihara T, Tohyama J, Nabatame S, Azuma J, Fujii Y, Hara M, Tsurusawa R, Inoue T, Ogata R, Watanabe Y, Togashi N, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Tanaka F, Saitsu H, Matsumoto N. “ De novo KCNT1 mutations in early-onset epileptic encephalopathy. ” *Epilepsia* (2015)56(9) doi: 10.1111/epi.13072 e121-8. 査読有
- Kodera H, Osaka H, Iai M, Aida N, Yamashita A Tsurusaki Y , Nakashima M, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. “Mutations in the glutaminyl-tRNA synthetase gene cause early-onset epileptic encephalopathy” *Journal of Human Genetics*(2014) (60) 97-101 . doi: 10.1038/jhg.2014.103. 査読有
- Tsurusaki Y, Koshimizu E, Ohashi H, Phadke S, Kou I, Shiina M, Suzuki T, Okamoto N, Imamura S, Yamashita A, Watanabe S, Yoshiura K, Kodera H, Miyatake S, Nakashima M, Saitsu H, Ogata K, Ikegawa S, Miyake N, Matsumoto N, “De novo SOX11 mutations cause Coffin-Siris Syndrome” *Nature Communications*(2014)(5) doi: 10.1038/ncomms5011. 査読有
- Nakamura K, Osaka H, Murakami Y, Anzai R, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Kinoshita H, Matsumoto N, Saitsu H. “ PIGO mutations in intractable epilepsy and severe developmental delay with mild elevation of alkaline phosphatase levels” *Epilepsia*(2014)(55) e13-17 doi: 10.1111/epi.12508. 査読有
- Nakamura K, Kato M, Tohyama J, Shiohama T, Hayasaka K, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Matsumoto N, Saitsu H. “ AKT3 and PIK3R2 mutations in two patients in two patients with megalencephaly-related syndromes : MCAP and MPPH.” *Clinical Genetics*(2014)(85) 396-398 doi: 10.1111/cge.12188. 査読有
- 〔学会発表〕(計2件)
 小寺啓文、安藤直樹、湯浅勲、和田芳直、鶴崎美德、中島光子、三宅紀子、斎藤伸治、松本直通、才津浩智
 「先天性糖鎖合成異常症の新規原因遺伝子 COG2 の同定」
 第 59 回日本人類遺伝学会 タワーホール船堀 (東京都) 2014 年 11 月 19 日 ~ 22 日
Kodera H, Ando N, Yuasa I, Wada Y, Tsurusaki Y, Nakashima Y, Miyake N Saitoh S, Matsumoto N, Saitsu H.
 「 Mutations in COG ” encoding a subunit of the conserved oligomeric golgi complex cause a congenital disorder of glycosylation. 」
 The American Society of Human Genetics 64th Annual Meeting サンディエゴ (アメリカ) 2014 年 10 月 18 日 ~ 10 月 22 日
- 〔その他〕
 ホームページ等
<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~hygiene/>
- 6 . 研究組織
- (1)研究代表者
 小寺 啓文 (KODERA, Hirofumi)
 横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員
 研究者番号 : 70637884