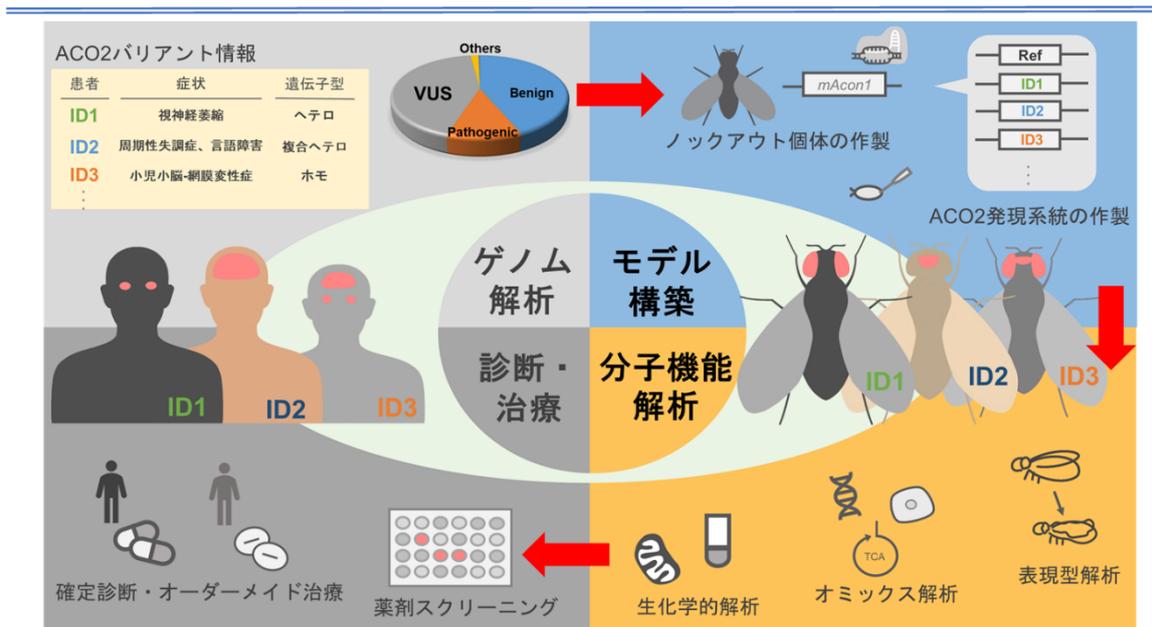


モデル生物を用いた疾患関連遺伝子 AC02 の VUS 解析

東京都立大学大学院 理学研究科 生命科学専攻 細胞遺伝学研究室
武尾 里美

本研究の概要

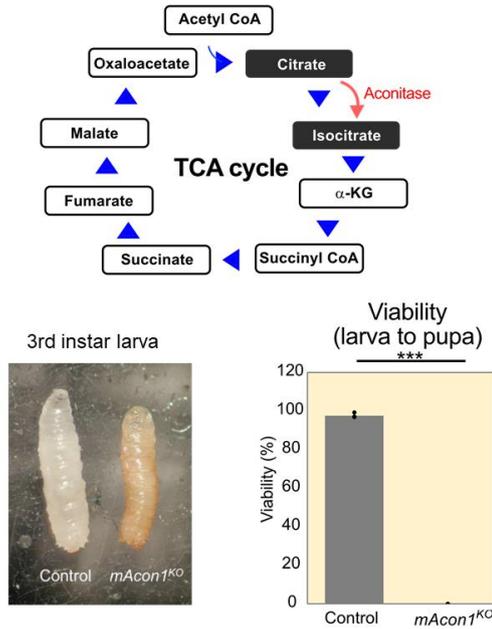


近年のシーケンス技術の向上により、個人のDNA配列を調べ、病気の診断や治療をおこなう「ゲノム医療」という新しい分野が躍進している。遺伝子機能予測、生化学的な研究データ、アレル頻度などに基いて、バリエントが病原性をもつ (Pathogenic variant: PV) か、良性 (Benign variant: BV) であるかを評価するためのACMGガイドラインも定められている。しかし、遺伝性希少疾患の多くは研究にかかるコストや時間の問題もあり科学的知見が乏しい。そのため、患者ゲノムで見つかったバリエントの多くが、蛋白質機能への影響や疾患との関連性が分からないVUS (Variant of unknown significance, VUS) と定義されてしまう。よって治療も対症療法に頼らざるを得ないのが現状である。したがって、VUSを評価するための最適な実験系を用い、分子機能の変化と疾患の症状を体系的に理解できるような研究戦略が必要である。

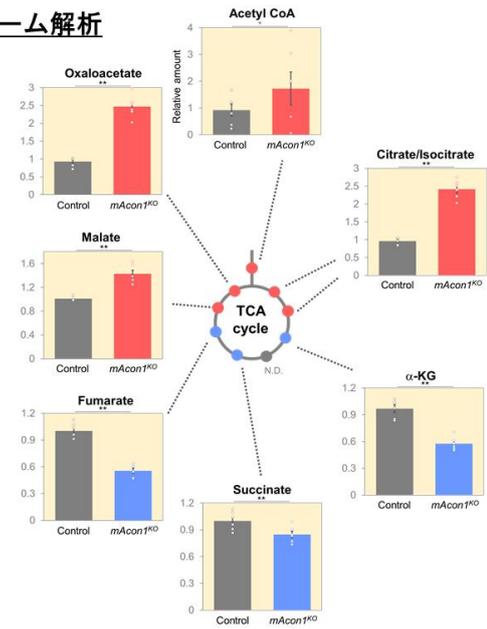
本研究は、モデル生物であるショウジョウバエ (以後ハエ) を用いて、多数のバリエントを評価するための実験系を確立するとともに、分子機能の変化と疾患の関連性を明らかにすることを目的とした。代謝酵素であるミトコンドリアアコニターゼ (ACO2) 遺伝子に注目し、複数の疾患バリエントについて遺伝学的、生化学的解析をおこなったので、ここに報告する。

代謝は個体の生存と活動を維持する上で必要不可欠である。特に、トリカルボン酸 (TCA) 回路は糖質、脂質、アミノ酸が合流する代謝の中心となり、ミトコンドリア内でATPやNADHなどのエネルギーを効率的に産生する重要な役割を果たす。TCA回路は生物間で高い保存性を持ち、モデル生物であるショウジョウバエもヒトと同様の代謝経路を有している。ACO2はTCA回路を構成する酵素の一つであり、クエン酸からイソクエン酸への触媒をおこなう。ハエmAcon1は、ヒトACO2と高い同一性 (71.7%) および類似性 (82.7%) を示す。また、脳症、視神経萎縮、発達遅延などの症状を示すヒト患者のACO2遺伝子内には、多数のバリエントがみついている。Clinvarデータベースには現在760種類のバリエントが登録されているが、そのうち43%がVUSに分類され、各バリエントと疾患の関連性、病原性については未解明な部分が多い。したがって、本研究では、ACO2の分子機能理解を深めることを目的とし、1. mAcon1の生体内における機能の解析、2. ヒト疾患バリエントを解析するためのモデル構築をおこなった。

mAcon1欠損は致死性、代謝異常をもたらす



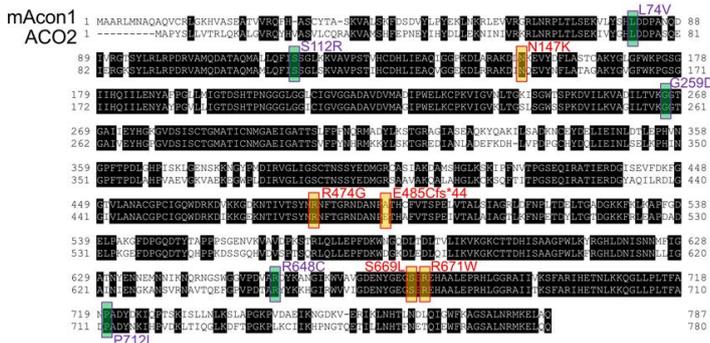
メタボローム解析



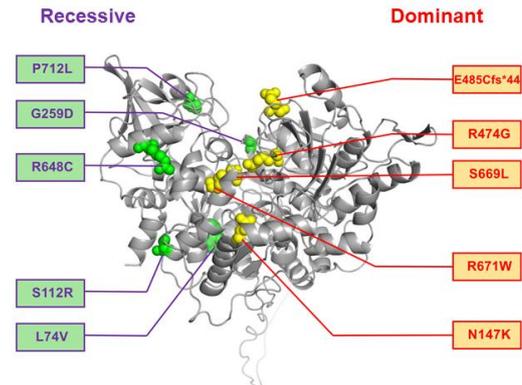
まず、CRISPR-Cas9システムを用いてmAcon1タンパク質コード領域を完全に欠損する*mAcon1^{KO}*系統を作製した。*mAcon1^{KO}*ホモ接合体では、幼虫での体重減少、発生速度の遅延がみとめられ、蛹の段階で致死となった。次に、*mAcon1*変異が個体の代謝状態にどのような影響するのかを検証するため、高速液体クロマトグラフィー・質量分析装置 (LC-MS) を用いてメタボローム解析を行った。致死性を示す直前の幼虫ステージでは、mAcon1の基質であるクエン酸、中間体であるCis-アコニット酸は*mAcon1^{KO}*で有意に増加していた。一方で、mAcon1下流の中間産物の量は減少していた。TCA回路の上流の代謝経路である解糖系についても調べたところ、野生型と比べて有意に増減する代謝物がみつかった。さらに、酸化ストレスの指標であるMethionine sulfoxideやGSSH/GSH比の上昇が*mAcon1^{KO}*で確認された。ストレスがかかっている状態の細胞では、細胞の機能不全や細胞死が促進されることから、*mAcon1^{KO}*が示した致死性には酸化ストレスが関与していると考えられる。そこで、*mAcon1*の欠損が細胞の正常な機能にどう影響するかを調べるため、細胞死を検出するアクリジンオレンジ染色を行った。その結果、*mAcon1^{KO}*幼虫の脳葉において野生型と比較して有意な細胞死がおこることが確認された。以上の結果から、*mAcon1^{KO}*では様々な代謝異常が起きており、発生速度の遅延や細胞死、蛹ステージでの致死性につながる事が推測された。

ACO2バリエントとその機能評価

アミノ酸配列比較



解析に用いたACO2バリエント



同定されているAC02バリエントは、顕性（ヘテロ）、潜性（ホモ、複合ヘテロ）の両方の遺伝様式タイプがある。顕性バリエントを持つ患者の多くが視神経萎縮を呈し、潜性バリエントは症状が重度な小児小脳-網膜変性症患者で多く同定されている。一般的に、AC02の顕性バリエントはamorphで視神経萎縮はハプロ不全によっておこり、潜性バリエントはhypomorph変異と考えられている。しかしながら、患者によって症状も多様であるため各バリエントと疾患の関連性については不明な点が多い。

本研究では、GAL4/UASシステムによりハエの生体内で遺伝子を強制発現させ、AC02バリエントの機能評価をするためのハエモデルを作製した。まず、ハエとヒトの野生型コンストラクトについてUASシステムを作製し、*mAcon1^{fl}*で観察された致死性が遺伝子の強制発現により回復できるかどうかを調べた（遺伝子回復実験）。ヒトAC02の強制発現は、mAcon1と同じレベルで*mAcon1^{fl}*の致死性を回復できたことから、ヒトの分子がハエで機能することが明らかとなった。次に、潜性バリエント5種類、顕性バリエント5種類の計10種類のUASシステムを作製した。分類の指標に用いるため、Pathogenicと定義されているバリエントについては、患者数が多く、フレームシフト変異をはじめその機能変化が理解されているものを選択した。10種類のバリエントのうち、5種類はVUS（R648C、R474G、S669L）もしくはCIP

（Conflicting interpretations of pathogenicity; L74V、P712L）を選択した。遺伝子回復実験の結果、潜性バリエントのうち、S112RとR648Cは部分的な回復を示したことからhypomorph変異であることが考えられたが、G259Dでは回復しなかった。顕性バリエントであるN147K、R474G、E485Cfs*44、R671Wでは回復がみられなかったことから、顕性バリエントはamorphであるという理解とつじつまが合う。L74V、S669L、P712Lについては現在解析中である。

次に、バリエントの酵素活性を評価する実験系を構築した。バリエントを強制発現する個体からミトコンドリアを単離し、ウエスタンブロットとアコニターゼ活性測定をおこなった。内在性のアコニターゼ活性との差異から、酵素活性の有無、ドミナント効果を評価した。現在までの実験から、顕性バリエントは酵素活性がないことを示唆する結果が得られており、遺伝学的解析の結果とも一致する。一方で、潜性バリエントには野生型と同程度の活性を持つものがあつた。この結果から、潜性バリエントは酵素活性以外の機能に影響すると考えている。今後は、鉄イオン濃度制御など多機能酵素としてのアコニターゼの機能に注目した研究に発展させていきたい。