

翻訳開始因子障害による神経発達症の病態解明

中島光子

浜松医科大学 医学部 医化学講座

【研究の背景】

小児神経発達症は一般集団において 3~5%の頻度で認められる非常に頻度の高い小児神経疾患の一つであり、男児に多い傾向があることが報告されている¹⁾。次世代シーケンサーの登場によってゲノム解析効率が飛躍的に向上したことで、非常に多くの神経発達症の遺伝的要因が解明され、その遺伝的背景が非常に多様であることが明らかになってきた。しかし、現状においても半数以上の神経発達症患者の疾患原因遺伝子は不明なままである。そのため、複雑な神経発達症の遺伝的背景を明らかにしその疾患病態の詳細を解明することは、将来的に本疾患の新規治療法開発に貢献できる可能性がある。

【目 的】

本研究では、小児神経発達症患者の新規原因遺伝子として同定された遺伝子 X のバリエントがタンパク質機能に及ぼす影響を明らかにし、ヒト疾患における疾患分子病態を明らかにすることを目的とする。遺伝子 X は真核生物翻訳開始因子 (eukaryotic translation initiation factor: eIF) を構成するタンパク質をコードしており、RNA との安定的な結合および開始コドン (AUG) の認識など mRNA の翻訳開始段階において重要な役割を持つことが知られている²⁾。本疾患の病態を明らかにするために、1 塩基多型がどのようなメカニズムで機能障害をきたすのかを分子レベルで評価し、その結果どのような生体機能異常をきたすのかを検証する必要があると考えた。

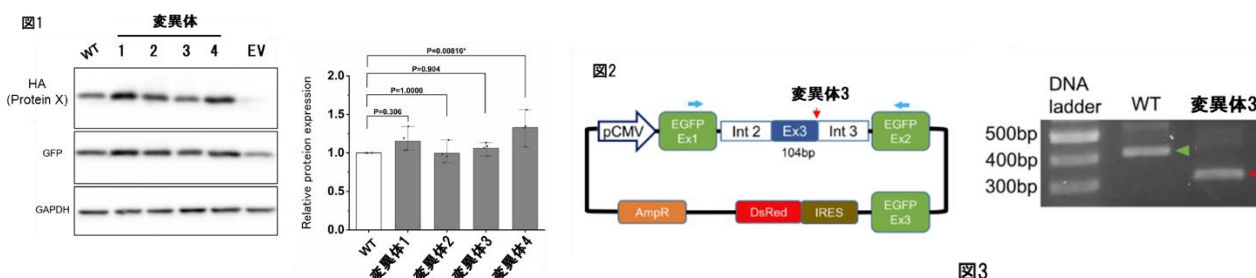
【方 法】

ゲノム解析により同定された遺伝子 X バリエントについて、1) エクソームを用いたゲノム解析、2) *in silico* 予測ツールを用いた構造予測、3) 培養細胞を用いたタンパク質機能評価、4) ショウジョウバエ視神経を用いた表現型の観察を行い、病的バリエントが分子的・組織的に及ぼす影響を検証した。

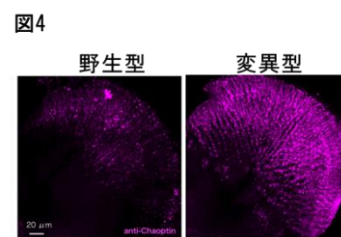
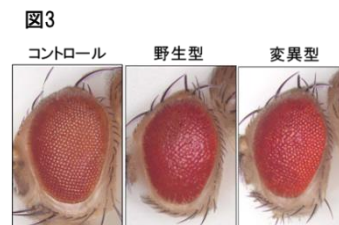
【結 果】

- 1) 当研究室で同定された 1 症例および GeneMatcher³⁾ を通じて集積した 3 症例、計 4 症例において遺伝子 X の *de novo* バリエントが同定された。3 バリエントはアミノ酸置換を伴うミスセンスバリエントであり、1 バリエントとはアミノ酸置換とともに mRNA スプライシングの異常をきたすことが予想されるバリエントであった。
- 2) 変異体がタンパク質構造に与える影響を明らかにするために、3 つのミスセンスバリエントに対し GROMACS を用いた *in silico* 解析を実施した。PCA および FEL 解析では、2 変異体に対して複数のクラスターベイソンが得られた。一方、1 変異体は野生型に類似した単一の小さなクラスターを獲得した。また、2 変異ではタンパク質の構造破壊が予想されたのに対し、1 変異と良性コントロールモデルでは構造変化は見られなかった。
- 3) 野生型および変異型遺伝子 X バリエントを有するプラスミドベクターを作成し、哺乳類培養細胞株へ一過性発現させ、タンパク質の安定性を評価した。Western blot 解析において、野生型および変異体を発現する細胞のタンパク質発現

レベルが低下しておらず、野生型および変異体タンパク質の安定性に有意差がないことを示唆していた(下記図 1)。また、スプライシング異常が予想されるバリエント 3 に関しては、minigene 法を用いて RNA スプライシングの変化を検証した。その結果、変異型では 1 エクソンの skipping を生じ早期終止コドンが生成されることが示唆された。(下記図 2)



- 4) 野生型あるいは変異型タンパク質を発現する遺伝子改変ショウジョウバエを作成し、コントロール、野生型、変異型の複眼の形態変化を観察した。その結果、遺伝子導入を行っていない個体に比べて野生型を導入した個体では配列の乱れと複眼の異形構造が認められたのに対し、変異型を導入した個体ではこれらの異常が認められなかった(右図 3)。また、深層学習と軸索を計測するツールを組み合わせた Python ベースのコンピュータプログラム MeDUsA (Method for the quantification of Degeneration Using fly Axons⁴) を用いて、野生型および変異型ショウジョウバエの変性軸索の数を定量し、視神経への影響を評価した。野生型を導入した個体においては、視神経細胞の数が減少する強い神経毒性が認められたのに対し、変異型を導入した個体においては有意な視神経細胞数の減少が認められなかった(右図 4)。



【考 察】

以上の結果から、今回同定されたすべてのバリエントが機能喪失型バリエントである可能性が示唆されている。今回同定された症例はすべて男児であり、遺伝子 X は X 染色体上に存在する遺伝子であることから、変異型を有する男児においては正常な機能を持つタンパク質 X が欠損しており、RNA 翻訳機構の異常が正常な神経発生を障害している可能性が示唆された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

現在までに遺伝子 X とヒト先天性疾患との関連についての報告はなく、本研究の成果が得られればヒト神経発達症との関連を示す世界初の報告となる可能性が高い。また、RNA 翻訳機構の異常による神経発達症の疾患病態の詳細は未だ明らかになっておらず、本研究によって発症機構の解明につながれば、類似の疾患群の病態解明にも大きく貢献できるものと考えている。

【参考・引用文献】

1. Bölte S, Neufeld J, Marschik PB, Williams ZJ, Gallagher L, Lai MC. Sex and gender in neurodevelopmental conditions. *Nat Rev Neurol*. 2023 Mar;19(3):136–159.
2. Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Feb;11(2):113–27.
3. Sobreira N, Schiettecatte F, Valle D, Hamosh A. GeneMatcher: A Matching Tool for Connecting Investigators with an Interest in the Same Gene. *Hum Mutat*. Oct;36(10):928–30.

4. Nitta Y, Kawai H, Maki R, Osaka J, Hakeda-Suzuki S, Nagai Y, Doubková K, Uehara T, Watanabe K, Kosaki K, Suzuki T, Tavosanis G, Sugie A. Direct evaluation of neuroaxonal degeneration with the causative genes of neurodegenerative diseases in *Drosophila* using the automated axon quantification system, *MeDUsA Hum Mol Genet.* 2023 Apr 20;32(9):1524-1538.