

## 本邦における終板アセチルコリンエステラーゼ欠損症の分子病態

研究分担者：大野欽司<sup>1)</sup>

共同研究者：中田智彦<sup>1)</sup>、伊藤美佳子<sup>1)</sup>、東慶輝<sup>1)</sup>、大塚健司<sup>1)</sup>  
小牧宏文<sup>2)</sup>、奥村彰久<sup>3)</sup>、白石一浩<sup>4)</sup>

- 1) 名古屋大学大学院医学系研究科・神経遺伝情報学
- 2) 国立精神・神経医療研究センター病院・小児神経科
- 3) 順天堂大学医学部小児科
- 4) 国立病院機構宇多野病院小児神経科

### 研究要旨

本邦の終板アセチルコリンエステラーゼ欠損症(endplate AChE deficiency, EAD)の3例において、AChEを終板基底膜に係留をするcollagen Q (ColQ)をコードするCOLQ遺伝子変異に5種類の変異を同定し、機能解析にて2変異(p.R227X, p.V322D)は非対称性AChE分子を作ることができず、3変異(p.C444Y, p.D447H, p.R452C)はColQのMuSKへの結合を阻害することを明らかにした。

### A：研究目的

終板アセチルコリンエステラーゼ欠損症(endplate AChE deficiency, EAD)は、AChEを終板基底膜に係留をするcollagen QをコードするCOLQ遺伝子の変異によって起きる。本研究の目的は、本邦EAD3症例の分子遺伝学的基盤を明らかにすることである。

### B：研究方法

(i) 患者血液より単離をしたDNAを用いてSanger法によりCOLQ遺伝子のすべてのエクソンならびに両側イントロン領域の塩基配列決定を行った。(ii) COS細胞にヒトACHE遺伝子とヒトCOLQ遺伝子を発現させシヨ糖濃度勾配超遠心によりAChE分子を分画した。(iii) Colqノックアウトマウス筋切片に精製非

対称型AChEをオーバーレイし、AChEの神経筋接合部への係留を調べた。(iv) プレートに精製MuSKを吸着させ精製非対称型AChEをオーバーレイし、AChE活性を測定した。(v) Colqノックアウトマウスの前脛骨筋に正常COLQならびに変異COLQを*in vivo* electroporationにて導入し、神経筋接合部におけるAChEの発現を調べた。(vi) AAV8-COLQ-p.Asp447HisをColqノックアウトマウス尾静脈より導入し神経筋接合部におけるAChEの発現を調べた。

(倫理面への配慮)

本研究は名古屋大学医学系研究科、国立精神・神経医療研究センター、順天堂大学医学部、国立病院機構宇多野病院の生命倫理委員

会の承認を得た後、患者のインフォームドコンセントを得た上で、関係倫理指針に則り行った。

### C : 研究結果

3名のEAD患者において5種類のCOLQ遺伝子変異を同定した。5種類の変異のうちcollagen domainのtruncation mutations (p.Arg227X)とmissense mutation (p.Val322Asp)は、シヨ糖濃度勾配超遠心によるAChE分子分画解析にて正常の非対称性AChE分子を作ることができないことが判明した。p.Cys444Tyr, p.Asp447His, p.Arg452Cysの3種類のCOLQミスセンス変異はいずれもColQ C末端ドメインに存在する。Colqノックアウトマウス筋切片への精製変異非対称型AChEをオーバーレイする*in vitro* overlay解析にて、3種類のいずれのミスセンス変異も神経筋接合部に係留できなかった。プレートに精製MuSKを吸着させ精製変異非対称型AChEをオーバーレイする*in vitro* plate-binding assayでも3種類のいずれのミスセンス変異もMuSKに結合をできなかった。Colqノックアウトマウスの前脛骨筋に正常COLQを*in vivo* electroporationにて導入したところ、AChEの神経筋接合部における発現を認めた。一方、変異COLQの*in vivo* electroporationではAChEの神経筋接合部における発現を認めなかった。同様に、正常AAV8-COLQのColqノックアウトマウス尾静脈注射にて、すべての神経筋接合部にAChEの発現を認め、運動機能の顕著な改善を認めた。一方、AAV8-COLQ-p.Asp447HisのColqノックアウトマウス尾静脈注射では神経筋接合部におけるAChEの発現を認めず、マウス運動機能改善も認めなかった。

### D : 考察

ColQ C末端ドメインが筋終板細胞膜のMuSKに結合をすることが2004年に報告された(Cartaud et al. *J. Cell Biol.*, 165: 505-515, 2004)が、本研究まで追試は行われていなかった。本研究によりColQ-MuSK結合を検証するとともに、ColQ C末端ドメインの遺伝子変異の分子機構を初めて明らかにすることができた。

### E : 結論

本邦3例のEADにおいて5種類のCOLQ変異を同定した。変異ColQ分子の解析にて、ColQ C-terminal domainはMuSKと結合し、変異がColQとMuSKとの結合能を阻害することを明らかにした。

### F : 健康危険情報

特記事項なし。

### G : 研究発表

(発表雑誌名、巻号、頁、発行年なども記入)

#### 1 : 論文発表

##### (Original Article)

1. Masuda A, Andersen HS, Doktor TK, Okamoto T, Ito M, Andresen BS, Ohno K. CUGBP1 and MBNL1 preferentially bind to 3' UTRs and facilitate mRNA decay. *Sci Rep* 2012, 2: 209.
2. Yoshinaga H, Sakoda S, Good J M, Takahashi M P, Kubota T, Arikawa-Hirasawa E, Nakata T, Ohno K, Kitamura T, Kobayashi K, Ohtsuka Y. A novel mutation in SCN4A causes severe myotonia and school-age-onset paralytic episodes. *J Neurol Sci* 2012, 315:15-19.
3. Matsuura T, Minami N, Arahata H, Ohno K, Abe K, Hayashi YK, Nishino I. Myotonic dystrophy type 2 is rare in the Japanese population. *J Hum Genet* 2012, 57:219-220.
4. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K. Protein-anchoring strategy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction. *Mol Ther* 2012, 20: 1384-1392.
5. Kurosaki T, Ueda S, Ishida T, Abe K, Ohno K, Matsuura T. The unstable CCTG repeat responsible for myotonic dystrophy type 2

- originates from an AluSx element insertion into an early primate genome. *PLOS ONE* 2012, 7: e38379.
6. Yamashita Y\*, Matsuura T\*, Shinmi J, Amakusa Y, Masuda A, Ito M, Kinoshita M, Furuya H, Abe K, Ibi T, Sahashi K, Ohno K. Four parameters increase the sensitivity and specificity of the exon array analysis and disclose twenty-five novel aberrantly spliced exons in myotonic dystrophy. *J Hum Genet* 2012, 57: 368-374.  
\*Equal contribution.
  7. Ishigaki S, Masuda A, Fujioka Y, Iguchi Y, Katsuno M, Shibata A, Urano F, Sobue G, Ohno K. Position-dependent FUS-RNA interactions regulate alternative splicing events and transcriptions. *Sci Rep* 2012, 2: 529.
  8. Nakata T, Ito M, Azuma Y, Otsuka K, Noguchi Y, Komaki H, Okumura A, Shiraiishi K, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Ohno K. Mutations in the C-terminal domain of ColQ in endplate acetylcholinesterase deficiency compromise ColQ-MuSK interaction. *Hum Mutat* 2013, 34: 997-1004.
  9. Selcen D, Shen XM, Milone M, Brengman J, Ohno K, Deymeer F, Finkel R, Rowin J, Engel AG. Gfpt1-myasthenia: Clinical, structural, and electrophysiologic heterogeneity. *Neurology* 2013, 81: 370-378.
  10. Rahman MA, Masuda A, Ohe K, Ito M, Hutchinson DO, Mayeda A, Engel AG, Ohno K. HnRNP L and hnRNP LL antagonistically modulate PTB-mediated splicing suppression of CHRNA1 pre-mRNA. *Sci Rep* 2013, 3: 2931.
  11. Matsuura T, Nakayama T, Nakamura H, Ohya Y, Kimura T, Imahuku I, Ohno K, Nishino I, Abe K. Clinical and genetic analysis of the first known Asian family with myotonic dystrophy type 2. *J Hum Genet*, in press.
  12. Ohkawara B, Cabrera Serrano M, Nakata T, Milone M, Asai N, Ito K, Ito M, Masuda A, Ito Y, Engel AG, Ohno K. LRP4 third  $\beta$ -propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner. *Hum Mol Genet*, in press.
  13. Kokunai Y\*, Nakata T\*, Furuta M\*, Sakata S, Kimura H, Aiba T, Yoshinaga M, Osaki Y, Nakamori M, Itoh H, Sato T, Kubota T, Kadota K, Shindo K, Mochizuki H, Shimizu W, Horie M, Okamura Y, Ohno K, Takahashi MP. A mutation of Kir3.4 is responsible for Andersen-Tawil syndrome by dominant negative effect on Kir2.1. *Neurology*, in press. \*Equal contribution.
- (Reviews and Book Chapters)**
1. Engel AG, Shen X-M, Ohno K, and Sine SM. Chapter 8: Congenital myasthenic syndromes. *Myasthenia gravis and myasthenic disorders* 2nd ed. Ed. by Engel AG. Contemporary Neurology Series. Series Ed. by Gilman S. Oxford University Press, New York, 2012, pp173-230.
  2. Ohno K, Ito M, and Engel AG. Congenital Myasthenic Syndromes - Molecular Bases of Congenital Defects of Proteins at the Neuromuscular Junction - Neuromuscular Disorders. InTech, Rijeka, 2012, pp175-200. (査読有)
  3. Ohno K, Ito M, Kawakami Y, Krejci E, Engel AG. Specific binding of collagen Q to the neuromuscular junction is exploited to cure congenital myasthenia and to explore bases of myasthenia gravis. *Chem Biol Interact*, 2013, 203: pp 335-340. (査読有)
  4. Ohe K, Masuda A, Ohno K. Chapter 2: Intronic and exonic nucleotide variations that affect RNA splicing in humans. *Genomics I - Humans, Animals and Plants*. ISBN: 978-1-477554-91-3. iConcept Press, Hong Kong, 2013. (査読有)
  5. Ohno K, Ito M, Kawakami Y. Collagen Q is a key player for developing rational therapy for congenital myasthenia and for dissecting the mechanisms of anti-MuSK myasthenia gravis. *J Mol Neurosci*, Springer, New York, 2013, DOI 10.1007/s12031-013-0170-x, 3 pages (査読有)
  6. Ohno K, Ohkawara B, Ito M, Engel AG. *Molecular Genetics of Congenital Myasthenic Syndromes*. eLS. John Wiley & Sons, Inc., Manuscript ID: A24314.R1, in press. (査読有)
- 2 : 学会発表**
- (Poster Presentation)**
1. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K

- Protein-anchoring therapy for delivering acetylcholinesterase to the neuromuscular junction  
The 11th International Meeting on Cholinesterases (Poster), Kazan, Russia  
Jun 4-9, 2012
2. Kinoshita M, Kokunai Y, Kubota T, Takahashi M, Sasaki R, Ohno K, Hirose K  
EMG findings at non-myotonia and myotonia states in patients with Na channelopathies  
The 11th Annual Scientific Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center (Poster), Kyoto, Japan  
Jun 7-8, 2012
  3. Kinoshita M, Morita S, Ohno K, Hirose K  
In myotonic dystrophy type 1 Peroxiredoxin-2 of RBC membrane protein was reduced, compared with a normal subject  
The 11th Annual Scientific Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center (Poster), Kyoto, Japan  
Jun 7-8, 2012
  4. Masuda A, Andersen HS, Doktor TK, Okamoto T, Ito I, Andresen BS, Ohno K  
Global analysis of RNA-binding sites of CUGBP1 and MBNL1 reveal their preferential binding to 3' UTRs to regulate mRNA stability  
The 11th Annual Scientific Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center (Poster), Kyoto, Japan  
Jun 7-8, 2012
  5. Ohkawara B, Fuse Y, Nakashima H, Ohno K  
Functional characterization of GFPT1 during myogenesis and NMJ formation  
The 11th Annual Scientific Meeting of the Asian and Oceanian Myology Center (Poster), Kyoto, Japan  
Jun 7-8, 2012
  6. Rahman MA, Ohe K, Masuda A, Ito M, Hutchinson DO, Engel AG, Ohno K  
Mutation in congenital myasthenic syndrome reveals opposite splicing regulatory effects of hnRNPs L and LL  
35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Poster), Nagoya, Japan  
Sep 18-21, 2012
  7. Nasrin F, Rahman MA, Ohe K, Masuda A, Ohno K  
Alternative RNA splicing regulating the molecular architecture of NMJ  
5th NAGOYA Global Retreat (Poster), Nagoya, Japan  
Feb 2, 2013
  8. Selcen D, Shen X-M, Milone M, Brengman J, Ohno K, McQuillen M, Deymeer F, Finkel R, Rowin J, Engel AG  
Investigation of 11 patients with GFPT1-myasthenia reveals clinical, structural, and electrophysiologic heterogeneity  
65th American Academy of Neurology (Platform), San Diego, California, USA  
Mar 16-23, 2013
  9. Ohkawara B, Cabrera M, Nakata T, Milone M, Ito Y, Engel AG, Ohno K  
Mutations in the third  $\beta$ -propeller domain of LRP4 in congenital myasthenia compromise agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner  
36th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Poster), Kyoto, Japan  
Jun 22, 2013
  10. Nakashima H, Ohkawara B, Imagama S, Ito Z, Ishiguro N, Ohno K  
R-spondin2 is crucial for neuromuscular junction formation  
3rd Annual Meeting, Society for Neuroscience (Poster), San Diego, California, USA  
Nov 13, 2013
  11. Ohkawara B, Cabrera M, Nakata T, Shen X, Ito Y, Engel AG, Ohno K  
Mutations in LRP4 in congenital myasthenia reveal position-specific regulations of agrin and Wnt signaling of LPR4  
43rd Annual Meeting, Society for Neuroscience (Poster), San Diego, California, USA  
Nov 13, 2013
- (Invited Presentation)**
1. Ohno K  
RNA diseases caused by defects in cis-acting elements and trans-acting factors  
"Danish-Japanese joint seminar on aberrant RNA splicing in neuromuscular disease",  
Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark (SDU), Odense, Denmark  
Mar 7, 2013
  2. Ohno K  
Specific binding of collagen Q to the neuromuscular junction is exploited to cure

congenital myasthenia and to explore bases of myasthenia gravis

11th International Meeting on Cholinesterases, Kazan, Russia  
Jun 4-9, 2012

3. Ohno K  
Congenital defects of neuromuscular signal transduction  
3rd Berlin Summer School for Myology, Berlin, Germany  
Jun 18-22, 2012
4. Ohno K  
Molecular bases and therapeutic intervention of neuromuscular transmission defects  
Ninth French-Japanese Workshop on Muscular Dystrophies, Tokyo, Japan  
Sep 7, 2012
5. Ohno K, Ito M, Kawakami Y, Ohtsuka K, Krejci E.  
Collagen Q is a key player for developing rational therapy for congenital myasthenia and for causing anti-MuSK myasthenia gravis  
XIV International Symposium on Cholinergic Mechanisms, Hangzhou, China  
May 5-9, 2013

## **H : 知的所有権の取得状況（予定を含む）**

### **1 : 特許取得**

なし。

### **2 : 実用新案登録**

なし。

### **3 : その他**

特記事項なし。